

重组抗菌肽 Cecropin P1 在毕赤酵母 X-33 中的表达以及纯化后的生物活性分析

唐丽云¹, 郭春和², 郑红玉¹, 项林盛¹, 刘德辉³, 黄毓茂¹, 焦茂兴⁴

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510006;

3 广州沃德生物技术有限公司, 广东 广州 510623; 4 宜春学院, 江西 宜春 336000)

摘要:为了在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统中表达猪源 Cecropin P1 并分析其生物活性, 根据 Cecropin P1 的氨基酸序列和毕赤酵母的密码子偏好性设计引物, 通过 SOEing 法合成全基因片段载入到 PpicZαA 质粒中, 酶切线性化重组质粒 PpicZαA-cecropin P1 后电穿孔导入毕赤酵母 X-33 中进行整合, 经 Zection 筛选和 PCR 检测获得高拷贝的转化子. 发酵表达后将表达产物经加热预处理和 Sephadex G-25 层析及冻干浓缩后, Tricine-SDS-PAGE 显示明亮单一一条带. 采用琼脂扩散法对纯化后的抗菌肽的热稳定性、酸碱稳定性、耐胰酶和胃蛋白酶稳定性进行了生物活性分析, 结果表明 Cecropin P1 具有较强的热稳定性、酸稳定性及胃蛋白酶稳定性, 但是在碱性环境下和胰酶作用下抑菌活性明显下降.

关键词: 抗菌肽; 表达; 纯化; 生物活性

中图分类号: S188

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2013)04-0569-05

Expressions of Recombinant Antimicrobial Peptide Cecropin P1 in *Pichia pastoris* X-33 and Biological Activity Analysis After Purification

TANG Liyun¹, GUO Chunhe², ZHENG Hongyu¹, XIANG Linsheng¹, LIU Dehui³,
HUANG Yumao¹, JIAO Maoxing⁴

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

3 Guangzhou Ward Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510623, China; 4 College of Yichun, Yichun 336000, China)

Abstract: To express the porcine antibacterial peptide Cecropin P1 in *Pichia pastoris* and analyze the biological activity of the expressed product, Cecropin P1 gene was designed and synthesized to include the partiality codons of *P. pastoris* based on the gene sequences encoding swine antibacterial Cecropin P1. The linearized recombinant was shocked into *P. pastoris* X-33 by electroporation, and the high copy transformants were screened with Zection and PCR. After being pured, Tricine-SDS-PAGE showed a single bright band. Agar diffusion method was used to analyze the biological activity of the purified antimicrobial peptides under the thermal, different pH, trypsin and pepsin. The results indicated that the cecropin P1 had a strong thermal stability, acid stability and pepsin stability. However, in alkaline environment and pancreatin, the antibacterial activity of cecropin P1 decreased significantly.

Key words: antimicrobial peptide; expression; purification; biological activity

收稿日期: 2013-01-10 网络出版时间: 2013-09-09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130909.1859.001.html>

作者简介: 唐丽云 (1986—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 焦茂兴 (1967—), 男, 副教授, E-mail: jiaomaoxin@163.com

基金项目: 宜春市科技创新“六个一”工程项目; 广东省现代农业生猪产业技术体系 (F10021); 江西省教育厅科技项目 (2002 年)

根据抗菌肽前体的基因结构和氨基酸序列特征,猪源抗菌肽被分为4类:防御素(Defensins)超家族、Cathelieidins 家族、Cecropins 家族和 NK-lysin. 这些抗菌肽在猪体内构成了一道重要的防御体系. Cecropin P1 是 1989 年 Lee 等^[1]首次从猪小肠中分离出的 Cecropin 类抗菌肽,后经研究证实它实际是来源于猪肠道内的蛔虫^[2-3],其含有 31 个氨基酸残基、相对分子质量为 3 337.87、不含半胱氨酸、不形成分子内二硫键、有强碱性的 N-端和强疏水性的 C-端,二维核磁共振分析表明 Cecropin P1 空间结构主要为一条纵贯全长的连续的 α -螺旋,不存在铰链结构.

Cecropin P1 的抗菌活性与昆虫天蚕素相当, Merrifield 等^[4]发现它对 G^+ 菌(如巨大芽胞杆菌和化脓链球菌)和 G^- 菌(如大肠埃希菌、沙门菌)都很敏感,尤其是对 G^- 菌^[5-6]. 正是由于 Cecropin P1 重要的抗菌活性,构建高表达量的基因工程菌,从而为探索新的抗菌药提供理论基础具有重要意义. 近年来,人们利用毕赤酵母表达体系已经成功地表达了抗菌肽 Cecropin P1^[7-8],然而对其生物活性的分析基本是在未纯化的基础上进行,很难排除其他因素对抗菌肽活性的影响. 因此本试验在已有研究基础上构建了 PpicZ α A-cecropin P1 重组质粒,并在毕赤酵母 X-33 中进行了高效表达,利用综合纯化方法对抗菌肽 Cecropin P1 进行纯化,再对其生物活性进行分析.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *Pichia pastoris* 受体菌 X-33、表达载体 PpicZ α A 为 Invitrogen 公司产品、大肠埃希菌 *Escherichia coli* (DH5 α) ATCC25922、金黄色葡萄球菌 *Streptococcus suis* ATCC29213 由华南农业大学传染病实验室保存.

1.1.2 主要试剂与材料 EX Taq DNA 聚合酶 T4 DNA Ligase 限制性内切酶 *Xho*I、*Xba*I、*Avr*II 以及预染蛋白质低分子 Marker 为 TaKaRa 公司产品;胶回收试剂盒为 Promega 公司产品;Zeocin 为 Invitrogen 公司产品;Tricine 为北京鼎国生物技术公司产品.

1.2 方法

1.2.1 Cecropin P1 全基因的扩增及重组表达载体的构建 根据已发表的 Cecropin P1 氨基酸序列,在其两端添加表达载体的同源序列,利用重叠区基因扩增拼接法(SOEing 法)^[9]和 Touchdown(TD) PCR 技术合成抗菌肽基因. PCR 产物经回收试剂盒回收后进行 *Xho*I 和 *Xba*I 双酶切,与相同双酶切处理的

酵母表达载体 PpicZ α A 连接,转化大肠埃希菌,构建重组表达质粒 PpicZ α A-Cecropin P1,其具体操作见文献[10],重组质粒经缺失酶切位点鉴定和 PCR 鉴定,阳性质粒送广州英韦创津生物科技有限公司测序.

1.2.2 重组载体转化 *P. pastoris* X-33 转化子的筛选鉴定:将感受态 *P. pastoris* X-33(70 μ L)与 *Avr*II线性化的 PpicZ α A-cecropin P1(20 μ g)混合,305 V、200 Ω 电击 15 ms. 将转化后的酵母细胞铺于新鲜制备的 Yeast peptone dextrose sepharose(简称 YPDS)平板(含 100 μ g/mL Zeocin)上,将平板倒置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中培养至单菌落出现(需要 2~4 d). 采用煮-冻-煮法制备 PCR 模板^[11],分析 *P. pastoris* 转化子.

用位于载体 PpicZ α A 多克隆位点之前和位于 Cecropin P1 基因区的 2 条引物进行 PCR 鉴定,所扩增的片段长度为 391 bp. 引物基因序列为:P1:5'-GTCCCTATTTCATCAAT-3'; P2: 5'-GACCACCTTGAATAGCAAT-3'.

阳性转化子再经不同质量浓度 Zeocin 的 YPD 平板挑选高拷贝克隆,用于表达目的蛋白.

1.2.3 重组 *P. pastoris* 诱导表达 用灭菌牙签挑取具有 Zeocin 抗性的单菌落,于 5 mL 的 YPD 液体培养基中进行一级培养,30 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡过夜,至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 2~6 时取 1 mL 培养液,重悬于 30 mL 的 YPD 中,继续振荡培养,每隔 12 h 取出 1 mL 培养液,3 000 r/min 离心 5 min,收集培养液上清液用体积分数为 100% 的三氯乙酸沉淀上清液,冰浴 0.5 h 以上,10 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,溶解于 100 μ L PBS 溶液中,以 Tricine-SDS-PAGE 分析表达产物,另取 50 μ L 表达上清液做抑菌试验初步鉴定活性.

1.2.4 表达产物的 Tricine- SDS- PAGE 鉴定 参照文献[12]的方法进行.

1.2.5 重组抗菌肽的蛋白质量浓度测定及抑菌活性测定 DNA/RNA 微量定量仪测定蛋白质量浓度. 抑菌活性测定采用标准琼脂孔穴扩散法:将处于对数生长期的大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 悬浮液($D_{600\text{ nm}} \approx 0.5$)各 10 μ L,与 55 $^{\circ}$ C 的 LB 固体培养基 30 mL 混匀后铺平板,待其凝固后,用灭菌的打孔器(直径 3 mm)打孔,分别滴加 150 μ L 煮过 0.5 h 和未处理的 Cecropin P1 样品,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,以同体积的 PpicZ α A 空载体转化酵母表达蛋白为阴性对照,氨苄青霉素(Amp⁺)为阳性对照,第 2 天测量抑菌圈直径.

1.2.6 Cecropin P1 的纯化、冻干浓缩、活性检测及

Tricine-SDS-PAGE 鉴定 根据 Cecropin P1 生物活性分析结果,将抗菌肽表达上清液在沸水中煮 0.5 h 后离心,取离心后上清液进行 Sephadex G-25 层析纯化,纯化产物冻干浓缩后,再溶解进行琼脂扩散法和 Tricine-SDS-PAGE 鉴定.

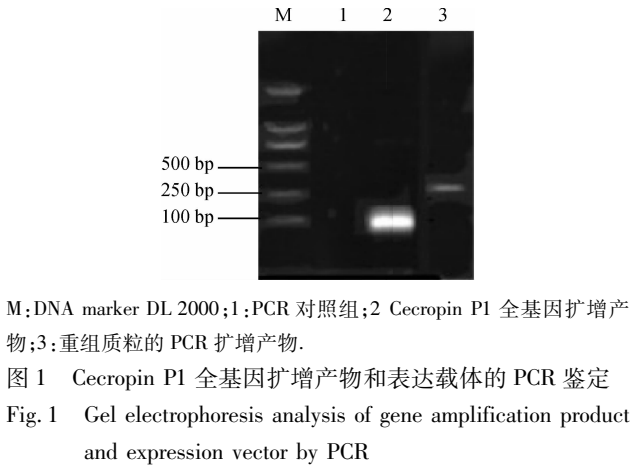
1.2.7 温度、酸碱、胰酶和胃蛋白酶处理 将纯化后的抗菌肽 Cecropin P1 分别沸水浴 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,琼脂扩散法进行抑菌试验,以 PpicZαA 空载体转化酵母的表达上清液和未煮沸的抗菌肽 Cecropin P1 作为对照,第 2 天测量抑菌圈直径;用盐酸和氢氧化钠将抗菌肽 Cecropin P1 表达上清液的 pH 分别调为 3 和 9,于室温分别放置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,琼脂扩散法进行抑菌试验,以 PpicZαA 空载体转化酵母的表达上清液和未煮沸的抗菌肽 Cecropin P1 作为对照,第 2 天测量抑菌圈直径;用盐酸和氢氧化钠将纯化并用 ddH₂O 溶解的抗菌肽 Cecropin P1 的 pH 调为 7.5,加胰酶于 37 ℃ 水浴锅中分别放置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 后调回溶解时的 pH(5.0),琼脂扩散法进行抑菌试验,以 PpicZαA 空载体转化酵母的表达上清液和未煮沸的抗菌肽 Cecropin P1 作为对照,第 2 天测量抑菌圈直径;用盐酸和氢氧化钠将抗菌肽 Cecropin P1 表达上清液的 pH 调为 2,加胃蛋白酶于 37 ℃ 水浴锅中分别放置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 后调回溶解时的 pH(5.0),琼脂扩散法进行抑菌试验,以 PpicZαA 空载体转化酵母的表达上清液和未煮沸的抗菌肽 Cecropin P1 作为对照,第 2 天测量抑菌圈直径.

1.2.8 单纯酸和碱对大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 生长的抑制 使用乳酸和氢氧化钠配成 pH = 2 ~ 10 的溶液,琼脂扩散法进行抑菌试验,观察对大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 抑菌圈的直径大小.

2 结果

2.1 Cecropin P1 基因的合成及表达载体的构建及鉴定

以合成的 2 条引物互为模板进行 TD-PCR 扩增,扩增产物经 0.01 kg/L 琼脂糖凝胶电泳,可观察到大小约 100 bp 的单一一条带(图 1),与设计相符.回收 Cecropin P1 基因片段并定向插入酵母表达载体 PpicZαA 中,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 鉴定,扩增产物经 0.01 kg/L 琼脂糖凝胶电泳,可观察到大小约为 291 bp 的单一一条带(图 1),送检测序结果,Cecropin P1 基因为 102 bp(与所设计基因片段大小相符),并已成功插入表达载体.



2.2 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE、蛋白质质量浓度测定及抑菌活性的初步鉴定

Tricine-SDS-PAGE 显示有 1 条相对分子质量约 3 300 的条带;根据 BSA 蛋白定量法测得表达上清液的蛋白总质量浓度为 179 mg/L;运用琼脂扩散法鉴定,原表达上清液和经过煮沸 0.5 h 的 Cecropin P1 对大肠埃希菌 ATCC25922 都有抑菌活性,抑菌圈直径分别为 13 和 12 mm(图 2).

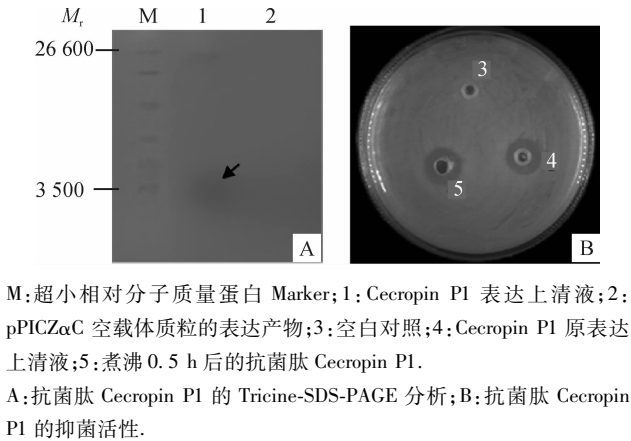


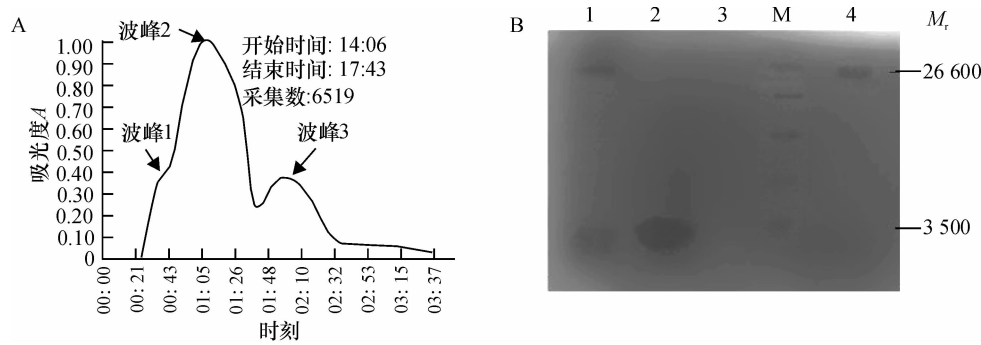
图 2 抗菌肽 Cecropin P1 的表达与鉴定

2.3 抗菌肽 Cecropin P1 的纯化及纯度鉴定

表达产物经 Sephadex G-25 层析纯化后收集不同的波峰进行冻干浓缩,琼脂扩散法检测发现只有波峰 2 有抑菌活性,并且在经过常温放置 1 个月后再进行琼脂糖扩散试验,发现波峰 2 依然保持同样的活性;将 3 个波峰进行 Tricine-SDS-PAGE 分析发现也只有波峰 2 处于相对分子质量 3 300 左右的位置,并与未纯化的抗菌肽 Cecropin P1 表达上清液更加明亮(图 3).

2.4 高温、酸碱度、胃蛋白酶以及胰酶对 Cecropin P1 的抑菌活性的影响

抗菌肽 Cecropin P1 沸水浴 1 h 后抑菌圈有微弱变化(变小),2.5 h 后仍具有活性(表 1).由此可见,



1:未纯化前的抗菌肽 Cecropin P1;2:波峰2;3:空白对照;M:超小相对分子质量蛋白 Marker;4:波峰1.

A:抗菌肽 Cecropin P1 的层析图谱;B:层析后抗菌肽 Cecropin P1 的 Tricine-SDS-PAGE 分析.

图 3 抗菌肽 Cecropin P1 的纯化

Fig. 3 The purification of peptide Cecropin P1

表 1 高温、酸碱度、胃蛋白酶及胰酶对 Cecropin P1 抑菌活性的影响

Tab. 1 The antibacterial activity of Cecropin P1 treated with high temperature and in acidity, alkalinity, pepsin and trypsin

处理	t/h	抑菌圈直径/mm	
		大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌
高温	0	19	17
	0.5	19	17
	1.0	17	15
	1.5	16	13
	2.0	15	12
	2.5	12	10
pH = 3	0	19	17
	0.5	19	17
	1.0	18	16
	1.5	17	15
	2.0	16	15
	2.5	14	14
pH = 9	0	19	16
	0.5	15	14
	1.0	14	13
	1.5	14	12
	2.0	12	11
	2.5	12	11
胃蛋白酶	0	19	17
	0.5	19	17
	1.0	18	16
	0.5	18	16
	2.0	17	15
	2.5	15	14
胰蛋白酶	0	19	16
	0.5	16	15
	1.0	15	14
	1.5	15	14
	2.0	13	13
	2.5	12	11

Cecropin P1 的热稳定性很好,高温 2 h 仍不能完全破坏抗菌肽 Cecropin P1 的结构和抑菌活性.

抗菌肽 Cecropin P1 经酸处理 2.5 h 后抑菌圈仅有微弱变化(变小),但在碱性环境中处理后活性明显下降(表 1).由此可见,Cecropin P1 具有强耐酸性,但耐碱性差.

抗菌肽 Cecropin P1 胃蛋白酶处理后抑菌圈变化微弱,2.5 h 后依然具有活性(表 1).但是经胰酶处理后 0.5 h 活性变化明显,不过 2.5 h 后仍有活性(表 1).由此可见,Cecropin P1 能抗胰酶和胃蛋白酶.

2.5 单纯酸碱度的抑菌圈试验结果

由表 2 可见,在 pH = 5 ~ 8 的纯酸碱下,对大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 的生长是没有影响的,前面所述试验中使用的 pH 都是在该范围内进行,因此抑菌圈大小不受酸碱度的影响;从 pH = 4 及 pH = 9 开始出现抑菌圈,且随着酸碱度增高,抑菌圈越大.

表 2 不同 pH 下 2 种细菌的抑菌圈直径
Tab. 2 The antibacterial diameter of different pH in two bacteria

pH	抑菌圈直径/mm	
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌
2	25	16
3	12	13
4	8	7
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	9	8
10	16	15

3 讨论

抗菌肽在成为抗生素替代物及成为抗病毒的特效药等方面都具有广阔的前景,虽然基因工程的方

法生产抗菌肽较天然提取和人工合成具有明显的优势,但是现有的表达系统存在表达量低的问题,而且我国蛋白纯化技术起步较晚,纯化技术还相对落后,如何获得高表达量抗菌肽及如何纯化是摆在我们面前的问题。

本研究选用巴斯德毕赤酵母表达系统表达 Cecropin P1,主要是因为巴斯德毕赤酵母自身不受抗菌肽的毒害,并且具有翻译修饰过程,且自身分泌的蛋白少,有利于纯化。这诸多优势使得巴斯德毕赤酵母被广泛用于重组蛋白表达,但是不同的外源蛋白在该系统中的表达量高低不等,高的如明胶,可达 1 418 mg/L^[13],低的只有 1~5 mg/L^[14]。造成表达量高低差异的根本原因是影响外源基因在毕赤酵母中表达的因素很多,主要受外源基因本身特性及发酵环境的影响。经过多次摸索后发现,电穿孔参数设为电压 305 V、电容 25 μ F、电阻 200 Ω 、电击时间 15 ms,电转的效率最高,因为低电压可以降低电转所导致的感受态酵母死亡率,从而提高转化效率;再通过 ZeocinTM 抗性梯度筛选和 PCR 复筛获得高拷贝的转化子;在培养发酵过程中,探索发现培养 96 h,抗菌肽表达量最高,于此时段收集;另外选择了发酵表达法,获得了比诱导表达法(另文发表)更高的表达量 179 mg/L。

分离纯化抗菌肽一般分 3 步:预处理、粗分级分离和细分级分离。根据所分离的抗菌肽特性分离方法又有所差别,根据本试验结果抗菌肽 Cecropin P1 具有如下特性:(1)耐热性,即沸水浴处理 30 min 仍保持抗菌活性;(2)相对分子质量低($\geq 3\ 300$, $< 50\ 000$);(3)具有较强的抗菌活性(对大肠埃希菌具有较强的抗菌活性);(4)水溶性好。综合抗菌肽 Cecropin P1 的特性以及由于表达上清液含有未知蛋白质、盐类和其他小分子,预处理可以除去部分大蛋白,而选用 Sephadex G-25 可以将盐类和分子大小不同的蛋白质分开,因此本试验选择通过预处理——Sephadex G-25 凝胶层析两步法对其纯化,Tricine-SDS-PAGE 鉴定,最终获得了组分较纯的抗菌肽 Cecropin P1。

国内已有很多研究对抗菌肽 Cecropin P1 进行了表达和生物活性分析^[7-8],但重点倾向于提高其表达量,并且对其生物活性分析基本是在未纯化的基础上进行,很难排除其他因素对抗菌肽活性造成的影响;另外,酵母表达系统表达的抗菌肽溶于培养上清液,该上清液呈强酸性(pH 可达 3),直接采用上清液来进行抗菌肽的生物活性分析,很难排除是否为强酸性导致,本研究对抗菌肽 Cecropin P1 表达产物纯化后,溶解所得的溶液 pH $\approx$ 5,该 pH 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生长无影响。对纯化后的抗菌肽 Cecropin P1 进行耐热、耐酸碱和耐酶的活性分析,结果表明 Cecropin P1 具有较强的热稳定性,酸稳

定性及胃蛋白酶稳定性,但是在碱性环境下和胰酶作用下抑菌活性明显下降。得到的数据更加可靠,丰富了抗菌肽 Cecropin P1 开发成为抗生素替代物的理论基础,同时为重组表达的抗菌肽 Cecropin P1 后续的抗病毒活性分析以及其他探索提供了基础。

参考文献:

- [1] LEE J Y, BOMAN A, SUN Chuanxin, et al. Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(23): 9159-9162.
- [2] ANDERSSON M, BOMAN A, BOMAN H G. Ascaris nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: Isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides[J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60(3): 599-606.
- [3] PILLAI A, UENO S, ZHANG Hong, et al. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: A bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*[J]. Biochem J, 2005, 390(Pt1): 207-214.
- [4] MERRIFIELD R B, MERRIFIELD E L, JUVVADI P, et al. Design and synthesis of antimicrobial peptides[J]. Ciba Found Symp, 1994, 186: 5-20.
- [5] AGERBERTH B, LEE J Y, BERGMAN T, et al. Amino acid sequence of PR-39: Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides[J]. Eur J Biochem, 1991, 202(3): 849-854.
- [6] LEE I H, CHO Y, LEHRER R. Effect of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins[J]. Infect Immun, 1997, 65(7): 2898-2903.
- [7] 周玉珍. 猪小肠抗菌肽 cecropin P1 在毕赤酵母中的分泌表达及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [8] 李巍, 仲飞, 李秀锦, 等. 重组猪蛔虫抗菌肽 cecropin P1 在毕赤酵母中的表达及抑菌活性[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(8): 1133-1137.
- [9] HO S N, HUNT H D, HORTON R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬燕, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1987.
- [11] 剧海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较[J]. 天津医药, 2003, 31(5): 270-272.
- [12] 曹佐武. 有效分离 1kDa 小肽的 Tricine-SDS-PAGE 方法[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 74-76.
- [13] GRINNA L S, TSCHOPP J F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*[J]. Yeast, 1989, 5(2): 107-1151.
- [14] 龚杰万, 刘飞鹏. 抗菌肽基因 *misgurin* 同向串联表达载体构建新策略[J]. 生物技术, 2002(1): 1-2.