

重组抗菌肽基因克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达及鉴定*

彭 梅 孙茂盛**

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所 昆明 650118)

摘要 根据毕赤酵母对遗传密码的偏爱性,在不改动氨基酸序列的前提下,用化学法合成抗菌肽麻蝇素 A 的基因片段,合成片段拼接后,与 α 因子重组,重组基因再构建到表达载体 pPIC9K 上,得到受乙醇氧化酶 I 基因(AOX1)的启动子与转录终止区控制的酵母表达质粒,经限制性酶切鉴定及核苷酸序列分析,阳性重组子转化 *pastoris* GS115 宿主菌,经表型筛选,阳性克隆用甲醇诱导表达.表达产物经 PAGE 凝胶电泳分析、纯化及抗菌活性检测,结果表明,重组抗菌肽基因在酵母中获得高效表达,表达产物经 α 因子信号肽分泌到胞外,具有较强的抗菌活性。

关键词 基因克隆 抗菌肽 *Pichia pastoris* 表达

中图分类号 Q786

抗菌肽(antimicrobial peptides)最初是从昆虫免疫后的血淋巴细胞中发现的一类碱性多肽类物质。最早的抗菌肽是 1980 年瑞典科学家 Boman 等^[1,2]从惜古(hyalophoracecropia)蛹中发现的。到目前为止,在昆虫中已发现了大量的抗菌肽。这些抗菌肽抗菌谱广且效率高,其作用机制独特,不易产生抗性。在抗生素的抗药性日趋严重的情况下,抗菌肽极有可能成为新的抗生药物的来源^[3]。

当前的研究多集中于其它昆虫的抗菌肽,而来源于麻蝇的抗菌肽则很少,特别国内几乎没有研究麻蝇素 A 的相关报道。与其它昆虫抗菌肽进行比较,来自麻蝇的一些抗菌肽具有更强的抗菌作用和多重生物作用,如抗真菌、抗肿瘤等等。人类真菌病害在目前仍是一个难以解决的问题,真正对真菌有强大杀伤力的药物很少。麻蝇素除了具有广谱高效的抗细菌活性外,同时还对从麻蝇中分离出的一种抗真菌肽 AFP(antifungal protein, AFP)有很强的增效作用。日本东京大学的名取俊二教授(1986)首先发现从麻蝇幼虫分离到的两种抗菌蛋白,能促进小鼠巨嗜细胞及异型核细胞对癌细胞的攻击作用,又能使细胞产生干扰素

并使肿瘤坏死因子活化,因而有较强的抗肿瘤作用。

建立有效的基因工程方法来获取抗菌肽是目前主要的研究方向。由于抗菌肽对细菌具有很强的杀伤作用,不宜在原核系统中直接表达,一般采用融合表达或在酵母中表达。毕赤酵母表达系统是目前最为成功的外源蛋白表达系统之一,国外已有小肽在毕赤酵母中成功分泌表达的报道^[4],本课题成功地克隆了重组抗菌肽麻蝇素 A 基因,并构建了高效分泌表达麻蝇素 A 的重组毕赤酵母工程菌,初步建立从发酵液上清中分离纯化麻蝇素 A 抗菌肽的工艺流程,并通过体外实验对重组抗菌肽抑制细菌活性进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli DH5 α , 抗菌肽敏感菌株 *E. coli* C3000, 毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 (his^- , Mut^+), 表达质粒 pPIC9K 均由本实验室保存。抗菌肽敏感菌株 *E. coli* ESD 由昆明医学院第一附属医院细菌室惠赠。

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 *Xho*I、*Bam*H I、*Eco*RI 及 T4 DNA Ligase 等为 TaKaRa 公司产品;Tryptone、Yeast Extract 为

收稿日期:2008-03-04 修回日期:2008-05-10

* 云南省自然科学基金资助项目(2004C0029Q)

**通讯作者,电子信箱:maoshengsun@public.km.yn.cn

Oxoid 公司产品; SDS、Tris、Acrylamide、Bisacrylamide 等为 Sigma 公司产品; 其余常用试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 引物合成 根据毕赤酵母翻译的偏爱密码子^[5]和麻蝇素 A 抗菌肽氨基酸序列、pPIC9K 的多克隆位点, 设计合成 6 条引物, 两条单链之间都有互补配对碱基, 用于拼接麻蝇素 A 抗菌基因, b1、b8 用于给抗菌肽麻蝇素 A 基因加酶切位点。序列如下:

b1: 5'GTCTCGAGAAAAGAGGTTGGTTGAAGAAGATTGG

b8: 5'GTGAATTCTTATCTAGCAGTAGCAGCAACGTTAG

用于扩增 α 引导肽基因的引物序列如下:

9K1: 5'ATTCTGAAGGATCCAAACGATG 3'

9K2: 5'CTCTCTTTTCTCGAGAGATAC 3'

1.3.2 抗菌肽基因的拼接、克隆 合成的基因片段在 37℃ 磷酸化、退火后回收, 回收片段 2 μ l 用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜。连接产物作为模板, 用 b1、b8 片段作为引物, 反应体系 (50 μ l): 10 \times Bufer 5 μ l, Mg (25mmol/L) 3 μ l, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ l, 引物 (10pmol/ μ l) 各 1 μ l, Taq 酶 (5U/ μ l) 1 μ l, ddH₂O 35 μ l。PCR 反应条件: 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 进行 25 个循环; 72℃ 7min; 得到麻蝇素 A 抗菌肽基因, 并引入 *Xho*I 和 *Eco*RI 两个酶切位点。

以质粒 pPIC9K 作为模板扩增 α 引导肽的基因, 反应体系 (50 μ l): 10 \times Bufer 5 μ l, Mg (25mmol/L) 3 μ l, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ l, 9K1、9K2 引物 (10pmol/ μ l) 各 1 μ l, Taq 酶 (5U/ μ l) 1 μ l, ddH₂O 35 μ l。抗菌肽基因 PCR 产物和 α 引导肽的基因 PCR 扩增产物均用 *Xho*I 酶切, 酶切产物用凝胶回收、T4 DNA Ligase 连接, 完成目的基因与 α 因子的重组构建。

1.3.3 重组表达质粒的构建及鉴定 麻蝇素 A 抗菌肽基因与 α 引导肽的基因的连接产物作为模板, 再用 9K1 和 b8 引物进行 PCR 扩增。反应体系 (50 μ l): 10 \times Bufer 5 μ l, Mg (25mmol/L) 3 μ l, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ l, 引物 (10pmol/ μ l) 各 1 μ l, Taq 酶 (5U/ μ l) 1 μ l, ddH₂O 35 μ l。重组基因的扩增产物和 pPIC9K 质粒分别用 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切, 酶切产物用凝胶回收、T4 DNA Ligase 连接; 连接产物转化 *E. coli* DH5 α ; 重组表达质粒进行 PCR、酶切鉴定和序列测定, 测序引物为随机引物 (生工合成), 构建正确的重组表达质粒命名为

pPIC9-A。

1.3.4 pPIC9-A 转化 *P. pastoris* GS115 及 Mut 转化子的筛选和鉴定 感受态 *P. pastoris* GS115 (*his*⁻, *Mut*⁺) (80 μ l) 与 Sac I 线性化 pPIC9-A (5 μ g) 相混合, 转移至预冷的 0.2 cm 电转杯 (Bio-Rad) 中, 置冰上 5min, 1.5kV、25 μ F、200 Ω 电击 5 毫秒, 立即加入 1ml 预冷的 1mol/L 山梨醇, 取 200 μ l 涂布于 MD 板上, 30℃ 培养至单菌落出现。然后用 G418 筛选多拷贝转化子: 从平板上挑 100 个转化子, 点到含 G418 (0.25mg/ml) 的 YPD 板上, 30℃ 培养 48 ~ 72 小时, 再将生长良好的单菌落依次接种含 G418 2mg/ml 和 4mg/ml 的 YPD 板上, 30℃ 培养 48 ~ 72 小时。详细步骤参照 *Pichia* Expression Kit^[6]。

1.3.5 重组 *P. pastoris* 菌在摇瓶中的诱导表达 挑取在含 G418 4mg/ml 的 YPD 板上生长良好的重组 *P. pastoris* 单菌落, 接种到含 100ml YP-甘油培养基的 500ml 三角瓶中, 30℃、230r/min 振荡培养约 24 ~ 48h 至菌液 OD 达到 10 ~ 12, 2000r/min, 4℃ 离心 10min, 弃上清, 将沉淀重悬于 200ml YT 培养液中, 30℃、250r/min 振荡培养, 每隔 24 小时取样并加入 100% 甲醇至终浓度为 0.5% 进行甲醇诱导表达, 诱导 96 小时后, 5000r/min, 4℃ 离心 10min, 表达上清、浓缩样品、及对照进行 15% SDS-PAGE 电泳检测, 方法参照文献^[7,8]。表达产物命名为 YT-A。

1.3.6 重组蛋白的纯化、浓缩及鉴定 诱导 96 小时后, 表达产物 5000r/min, 4℃ 离心 10min, 收集上清约 150ml; 用三个柱体积的 A 液平衡 CM-sepharose 层析柱 (规格为 26mmX160mm), 将收集的上清以 2ml/min 的流速直接上样, 收集穿透峰; 用 B 液 BB 线性梯度洗脱, 流速 2ml/min, 梯度 90min, 收集洗脱峰。纯化产物经 15% SDS-PAGE 电泳检测分析后, 用透析液 2L 在 4℃ 透析 2 次, 每次透析 8h。将透析后的目的蛋白用 PEG20000 在 4℃ 浓缩。再经 15% SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.3.7 活性测定 将大肠杆菌菌株 *E. coli* C3000 和 ESD 在 37℃ 培养至 OD 0.6-0.8, 3000r/min, 4℃ 离心 10min。弃上清, 用 PBS (PH7.4) 洗涤两次, PBS 重悬菌体至 OD₆₅₀ 为 0.3, 将 500 μ l 菌体与 10ml LBE (LB 中含 50x E 溶液 2%, 20% 葡萄糖 1%, 琼脂 1%) 培养基在 50℃ 左右混合均匀, 倒平板, 待其冷凝后在培养皿内等距离打直径 3mm 的小孔, 每孔滴加不同稀释梯度的样品 20 μ l, 37℃ 培养过夜, 测量抑菌圈的大小。

2 结 果

2.1 抗菌肽基因的拼接、克隆及重组表达质粒的构建

设计合成了麻蝇素 A 抗菌肽基因的互补配对引物,合成的基因片段经 PCR 扩增后得到麻蝇素 A 抗菌肽双链基因,条带大小为 120bp;其 N 端加上起始密码子 ATG、并在基因的两端分别设有酶切位点以便与 α 因子和载体相连;用质粒 pPIC9K 作为模板扩增得到的 α 引导肽的基因,条带大小为 275bp,并在基因的两端分别设有酶切位点以便与抗菌肽基因和载体相连;抗菌肽基因和 α 引导肽基因的 PCR 扩增产物通过 *Xho* I 酶切位点连接后得到 395bp 大小的片段,重组基因的扩增产物通过 *Bam*HI/*Eco*RI 两个酶切位点构建到酵母表达质粒 pPIC9K 上,重组表达质粒进行 PCR、酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,以重组表达质粒为模板扩增得到的条带明显比以 pPIC9 模板扩增得到的条带多出 120bp 左右,*Bam*HI/*Eco*RI 双酶切鉴定也可得到相同的结果(图 1);DNA 自动测序仪进行序列测定表明,pPIC9-A 重组表达质粒的构建完全正确。

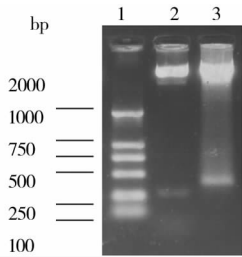


图 1 重组质粒 pPIC9-A 的酶切鉴定
Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmids pPIC9-A

1: DNA Molecular weight markers DL2000; 2: pPIC9K digested with *Eco*RI/*Bam*HI; 3: pPIC9-A digested with *Eco*RI/*Bam*HI

2.2 转化 *P. pastoris* GS115、筛选稳定的多拷贝转化子

为了获得更高的转化效率和高拷贝,采用电击转化法将 *Sac* I 线性化重组表达质粒 pPIC9 — A 转化 *P. pastoris* GS115 (*his*⁻, *Mut*⁺) 感受态细胞,通过 G418 0.25mg/ml、2mg/ml 和 4mg/ml 的浓度加压筛选,最终从含 G418, 4mg/ml 的 YPD 板上筛选出稳定的多拷贝转化子用于诱导表达实验。

2.3 重组子的摇瓶诱导表达

挑取在含 G418 4mg/ml 的 YPD 板上生长良好的重组 *P. pastoris* 单菌落,接种到含 100ml YP-甘油培养基

的 500ml 三角瓶中,经甲醇诱导表达,15% SDS-PAGE 电泳检测结果表明,诱导 96h 后,pPIC9-B 重组子转化的酵母菌在分子量 4kDa 附近出现一条明显的表达条带,其分子量大小与预期的目的蛋白一致。表达产物命名为 YT-A。

2.4 重组蛋白的纯化、浓缩及鉴定

诱导 96h 后,表达产物经 CM-sepharose 离子交换柱纯化后,纯化蛋白经透析液透析、PEG20000 浓缩,再通过 15% SDS-PAGE 电泳鉴定,电泳分析结果表明,大部分表达的重组外源蛋白存在于唯一的洗脱峰中,结果见图 2。

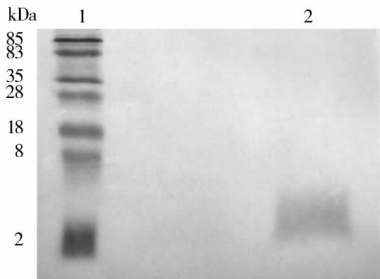


图 2 CM-sepharose 离子交换柱纯化洗脱峰的 SDS-PAGE 检测

Fig.2 SDS-PAGE of eluate of CM-sepharose chromatography
1: Protein molecular weight standard; 2: Protein eluate from CM-sepharose chromatography

2.5 发酵产物活性测定

将大肠杆菌菌株 *E. coli* C3000 和 ESD 在 37℃ 培养后收集菌体,PBS 重悬菌体至 OD₆₅₀ 为 0.3,菌体与 LBE 混合均匀,倒平板,打孔,每孔滴加不同稀释梯度的样品,37℃ 培养 48h 后出现明显的抑菌圈,结果见图 4,测量抑菌圈的大小。抑菌圈的大小与抗菌肽的浓度相关。

3 讨 论

抗菌肽最早是在昆虫体内发现的,是昆虫免疫后血淋巴中的一类抗菌多肽.它具有相对分子量小、水溶性好、无免疫原性、抗菌谱广等特点.现在,它被认为是从细菌到高等哺乳动物普遍存在的一类防御性多肽.称之为“第二防御体系”;抗菌肽的杀菌机理,国内外众多学者都进行细致的研究,提出了各种各样的观点.国内李文楚等研究表明,抗菌肽作用于细菌的细胞膜,特别是杆状细菌的两端,抗菌肽造成细菌的细胞

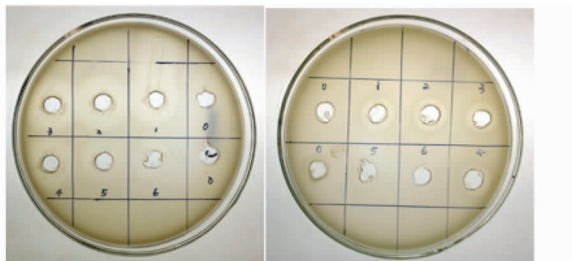


图3 重组 YT-B 对大肠杆菌 *E. coli* C3000 和 *E. coli* SD 的抑菌作用

Fig.3 Effect of recombinant YT-B on *E. coli* C3000 and *E. coli* SD0-6; YT-A Concentration is 0 μ g, 16 μ g, 8 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 1 μ g, 0.5 μ g respectively

膜形成空洞,从而引起细胞内容物的外泄,导致细菌死亡^[9]。

麻蝇有其独特的免疫防御机制,比一般昆虫能更有效地抵御病原菌的感染。因此,对麻蝇体液抗菌肽进行研究具有广泛的理论和应用价值。国外已有学者对麻蝇的抗菌物质进行了初步研究,证明其体内存在着高活性的抗菌物质。麻蝇素还可以抑杀某些真菌,并对多种癌细胞及动物实体瘤有明显的杀伤作用而不破坏正常细胞。抗菌肽麻蝇素 A 是从麻蝇中提取的一种小分子多肽,为 40 个氨基酸残基,抗菌谱广。抗菌肽在生物组织中含量少,分离获得大量天然产物困难很大,人工合成则成本高。随着基因工程技术的迅速发展,利用微生物发酵体系生产重组蛋白质,已成为目前研究的热点之一。其突出的优点是工艺简单、高效、生产成本低廉。但是由于抗菌肽分子小,容易被蛋白酶降解,同时由于其表达产物对宿主菌有害,不能在原核系统中直接表达具有天然生物活性的抗菌肽,因此,利用酵母表达系统表达抗菌肽是一条有效途径。酵母系统已成为极为成功的外源蛋白表达系统之一,具有许多优点:(1)利用受甲醇诱导的醇氧化酶(alcohol oxidase I AOXI)启动子。可严格控制外源基因的表达,无论胞内、胞外均可实现外源基因的高表达;(2)毕赤酵母生长快速,培养条件简单,适合高密度培养,发酵后每升培养液中细胞湿重达 450g,有利于提高目的蛋白产量;(3)毕赤酵母作为一种真核细胞生物。可进行翻译后的蛋白加工,以使外源蛋白得到正确的折叠和修饰^[10~12]。

从上面实验结果可以看出,选用毕赤酵母偏爱的密码子合成抗菌肽麻蝇素 A 基因,使之与酵母 α -factor

启动子-前导肽系统进行重组,将重组基因克隆到酵母分泌表达载体 pPIC9K 上,经 0.5% 甲醇诱导,重组毕赤酵母菌可大量分泌表达具有生物活性的抗菌肽麻蝇素 A;初步建立从发酵液上清中分离纯化麻蝇素 A 抗菌肽的工艺流程,由于该抗菌肽分子量小,碱性强,极易降解,而且未见有分离纯化方面的报道。所以我们克服了重重困难,经过多方摸索,才成功地获得了检测分子量仅 4kDa 的麻蝇素 A 抗菌肽的方法,以及利用其具有极强的抗酸性的特点,选用酸性的纯化条件进行纯化,可降低内源性蛋白酶对麻蝇素 A 的降解;通过体外实验对重组抗菌肽抑制细菌活性进行研究,用琼脂糖扩散法测定抑菌活性,证明所表达的多肽产物具有抗菌活性,而且其致死浓度在 μ mol/L 级。

总之,本文采用 *Pichia pastoris* 系统成功地分泌表达了具有生物活性的抗菌肽麻蝇素 A,为其大量生产重组抗菌肽开发成新型抗生药物奠定了一定的基础。随着重组抗菌肽在微生物中表达研究的开展,其在医学中的应用将展示更广阔的前景。

参考文献

- [1] Hultmark D, Andersson K, Boman H G, et al. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. EMBO J, 1983,2(4): 571~576
- [2] Lee J Y, Edlund T, Boman H G, et al. Insect immunity. Isolation of cDNA clones corresponding to attacins and immune protein P4 from *Hyalophora cecropia*. EMBO J, 1983,2(4): 577~581
- [3] Hancock R E, Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. Curr Drug Targets Infect Disord, 2002,2(1): 79~83
- [4] Nozomi K, Tomoyas A, Hiroshi S, et al. Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from array worm *Pseudaletia separate* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 2002, 25: 416~425
- [5] 赵翔,霍克克,李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. 生物工程学报, 2000, 16(3): 308~311
Zhao X, Huo K K, Li Y Y. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(3): 308~311
- [6] Invitrogen. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*
- [7] Dan H, Ake E, Han S B. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components

from cecropiapupae. Eur J Biochem ,1982,127:207 ~217

[8] Herman N S, Gebhard V J. THeine -sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis for the sepasion of proteins in therange from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry, 1987, 166:368 ~ 379

[9] 李文楚,张家明,温流发,等. 柞蚕抗菌肽对热带作物病原菌的杀菌作用. 热带作物学报,1994,15(1):97 ~ 102

Li W C, Zhang J M, Wen L F. Chinese Journal of Tropical Crops, 1994,15(1):97 ~ 102

[10] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000,24(1):45 ~ 66

[11] Koti S,Robert G B,Keith E K. Strategies for optimal synthesis andsecretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris*. Gene,1997,1990(1):55 ~ 62

[12] Cregg J M , Cereghino J L, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastori*. Mol Biotechnol,2000,16(1):23 ~ 52

Cloning and Expression of Antibacterial Peptide Gene in *Pichia pastoris* and Identifying of Activity

PENG Mei SUN Mao-sheng

(Institute of Medical Biology ,Chinese Academy of Medicine Science ,Peking Union Medical College ,Kunming 650118,China)

Abstract A 120bp DNA fragment encoding antibacterial peptide of sarcophaga peregrina A was designed based on the amino acid sequence of antibacterial peptide and the biased codon usage of pastoris. Eight oligonucleotides were chemically synthesized, linked and then recombinant with α -factor gene, recombinanted gene was cloned into yeast expression vector pPIC9K. After restriction enzyme analysis and DNA sequencing, the recombinanted gene of antibacterial peptide was transfected the *Pichia pastoris* GSII5 strain. The positive clones screened by the phenotype were induced by methanol, the expression product was tested by SDS-PAGE and inhibit zone using *E. coli* SD and *E. coli* C3000 as tested strain. The results showed that antibacterial peptide gene was expressed in *Pichia pastoris* successfully. The expression product was secreted outside with the lead of α -factor signal and had strong antibacterial activity.

Key words Gene cloning Antibacterial peptide *Pichia pastoris* Expression