

DCD-1L 在毕赤酵母中的克隆和表达

赖玉平 彭沂非 郁正艳 黄 静 吴自荣*

(华东师范大学生物化学与分子生物学实验室 上海 200062)

摘要 由于细菌对抗生素耐药性的产生,迫切需要寻求一种新的抗菌剂来代替它。DCD 是最近从人汗腺中发现的具有广谱抗菌活性的抗菌肽。与抗生素不同,它不会在生物体内富集,也不会诱导产生耐药菌株。为了能快速并低成本地获得该肽, DCD-1L 基因,第一次被克隆到毕赤酵母载体 pPIC9 中,并在毕赤酵母 GS115 中进行表达。实验结果显示毕赤酵母 GS115 系统所表达的 DCD-1L 在 pH 5.5~7.4 范围内具有抗大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的活性。这个结果说明在毕赤酵母中表达的 DCD-1L 能够抗部分革兰氏阴性和阳性细菌。

关键词 抗菌肽 DCD-1L Dermcidin 毕赤酵母

人们发现许多传统的抗生素,特别是青霉素,能够诱导耐药菌株的产生^[1]。为了解决抗生素耐药性的问题,研制新的抗生素或抗菌肽就显得特别重要^[2,3]。抗菌肽具有良好的抗菌选择性和独特的抗菌模式,而且不会诱导产生耐药菌株,容易被降解,不易在微生物体内富集。因此被认为能够成为替代抗生素的首选药物。

Dermcidin(DCD)是德国科学家 Schittek 等^[4]首先在人汗腺中发现的能特异表达的基因。它编码 110 个氨基酸的蛋白质前体,在分泌到汗液之前被蛋白酶降解成 47 个氨基酸(63~109 残基)的小肽。这个小肽被命名为 DCD-1,它具有广谱的抗菌活性。而 DCD-1L 是 DCD-1 的衍生物,在 DCD-1 的 3' 端加了一个亮氨酸,同样具有广谱的抗菌活性。DCD-1L 能够有效地抗革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌,如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌,而金黄色葡萄球菌是皮肤感染,特别是遗传性过敏皮炎的主要感染源。DCD-1L 还有抗真菌的功能,如白色念珠菌。但还没有报道 DCD-1L 对毕赤酵母有抗菌活性。

到目前为止,DCD-1L 的抗菌机理仍然不清楚。它和其它已知的抗菌肽没有同源性,因此它的抗菌方式可能与其它已知的抗菌肽不同。

至今,仍未有将 DCD-1L 克隆到微生物中的报

道。目前 DCD-1L 只能通过化学合成或从人汗液中分离^[4]。化学合成法成本很高,而从人汗液分离 DCD-1L 的过程又非常复杂。为了研究 DCD-1L 的作用机理并将其发展为具有抗菌活性的新型基因药物,我们将 DCD-1L 基因克隆到毕赤酵母载体 pPIC9(原理见图 1),使它在毕赤酵母中稳定表达。从而,通过基因工程的方法在微生物中大量表达 DCD-1L 成为获得该肽的一种新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

克隆宿主菌 *E. coli* DH5α 由本实验室保存。表达载体 pPIC9 和表达宿主菌 *Pichia pastoris* GS115 由季文明博士馈赠。*E. coli* CMCC(B) 44102 和 *S. aureus* CMCC(B) 2600 购自上海药检所。MD、MM 和 BMMY 培养基(Invitrogen *Pichia* Expression Kit)用于 DCD-1L 的表达。

限制性内切酶 *Xho*I、*Eco*RI、*Stu*I 购自上海晶美生物工程有限公司;Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术发展中心;T4 连接酶购自大连宝生生物工程公司;DNA Gel Extraction Kit 购自杭州维特洁生物技术有限公司。DCD-1L 基因片段和引物由上海博亚生物技术有限公司合成。其它所用试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 DCD-1L 基因的获得

根据毕赤酵母基因翻译的偏爱密码子和 DCD-1L 氨基酸序列合成两条单链 DNA(DCD-1L1 和

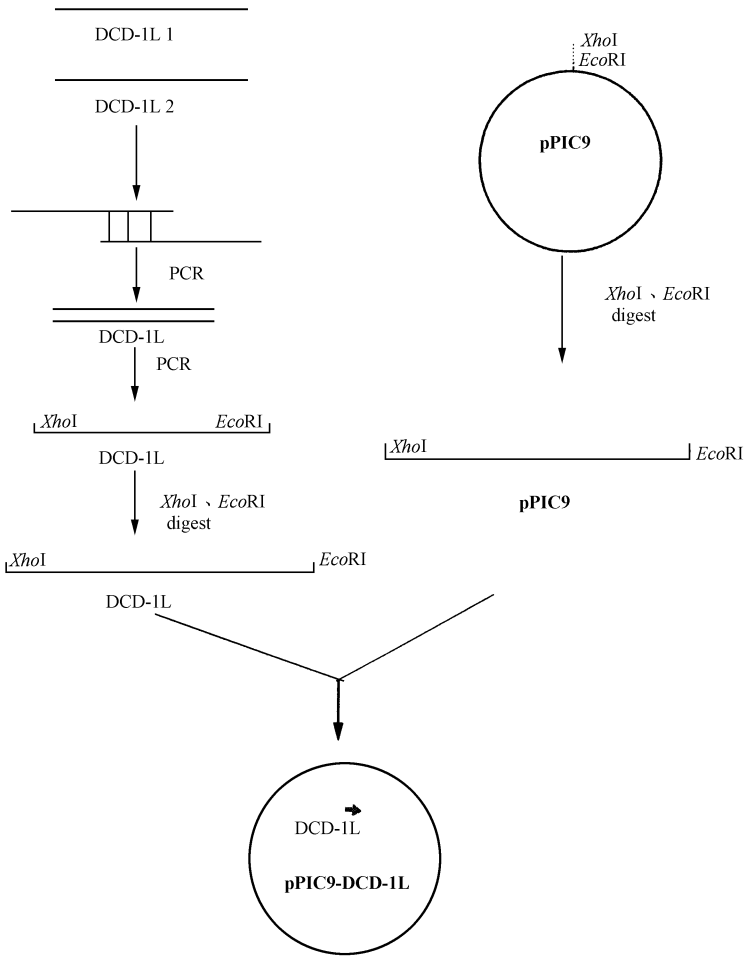


Fig. 1 Construction of pPIC9-DCD-1L

DCD-1L2), 并且两条单链之间有26bp互补。两条单链 DNA 的基因序列如下:

DCD-1L1(85bp):
5' TCITCTTTGTTGGAGAAGGGTTTGGACGGTGCT-AAGAAGGCTGTTGGTGGTTTGGGTAAGTTGGGTAAG-GACGCTGTTGAGGACT 3'
DCD-1L2(85bp):
5' CAAAACAGAGTCCAAAACGTCCTTAACGTCGTG-AACAGCACCCTTACCAACAGACTCCAAGTCCTCAAG-AGCGTCCITACCCAAC 3'

两条单链等摩尔混合, 在 Taq DNA 聚合酶作用下, 94℃ 3 min, 45℃ 2 min, 72℃ 10 min, 互为模板形成双链。然后以获得的双链 DNA 为模板, 加入引物 P5 和 P3 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系中包含: 2μl 模板 (双链 DCD-1L 基因), 1.5μl 10× Taq buffer, 3μl Taq DNA 聚合酶, 4μl dNTP, 引物 P5 和 P3 各 2μl, 3.5μl 无菌水。P5 (5' GCCTGCTCGACAAAAGA-

TCITCTTTGTTGG 3') 在 5' 端引入了 a- factor 的 KEX2 位点和 XhoI 限制性酶切位点。P3 (5' CCGGAATTCTGACCAGGTCC 3') 在 3' 端引入 EcoRI 限制性酶切位点。PCR 扩增条件为: 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 80s, 循环 28 次后在 72℃ 维持 5min。反应产物用 DNA Gel Extraction Kit 回收。

1.3 克隆/表达载体的构建

用 XhoI、EcoRI 酶切载体 pPIC9。DCD-1L 基因的 PCR 产物也用 XhoI、EcoRI 酶切。DCD-1L 基因和 pPIC9 连接反应体系如下: 4μl DCD-1L, 2μl pPIC9, 1μl T4 连接酶, 2μl 10× T4 ligase buffer, 加无菌水至 20μl。16℃连接过夜。连接产物转化感受态 E. coli DH5α 细胞, 涂布于 37℃预热的含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板, 37℃培养过夜。随机挑选 10 个转化子接种于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中。少量抽提质粒 DNA 用于 PCR 鉴定、酶切鉴定和基因测序分析。

经测序确认后的阳性克隆,我们用碱裂解法抽提质粒DNA并用 *Stu*I 线性化。线性化的质粒DNA电转化感受态细胞 *Pichia pastoris* GS115,涂布于MD平板。30℃培养至菌落出现。

1.4 DCD-1L 基因的筛选和表达

用无菌牙签随机挑取100个转化子点于MM平板,筛选 His⁺ Mut⁺ 阳性克隆。随机挑取10个 His⁺ Mut⁺ 阳性克隆,接种于1ml MD培养基中,28~30℃培养至 OD₆₀₀=2~6。3000g 离心5min,收集菌体。分别用10ml MM和BMY培养基重悬菌体,每隔24h加无水甲醇至终浓度为0.5%进行诱导表达。分别在不同的时间取样,离心,将上清和菌体分别保存于-20℃。

收集的菌体用于菌体PCR进行克隆鉴定。菌体重悬于20μl 无菌水,0℃放置15min,37℃15min,95℃10min。吸取5μl进行PCR。PCR反应条件如下:94℃预变性4min,94℃1min,58℃30s,72℃40s。28个循环后在72℃维持5min。

1.5 DCD-1L 抗菌活性的测试

将 *E. coli* CMCC(B) 44102 和 *S. aureus* CMCC(B) 2600 培养至 OD₆₀₀=0.2~0.3。分别吸出43μl *E. coli* 和1ml *S. aureus* 与10ml溶化的1%琼脂培养基混匀,铺至2% LB平板,室温放置至琼脂凝固。吸取pH4.0~7.4的DCD-1L上清液滴加到无菌的2mm滤纸片上,然后将滤纸片分别平铺于加了指示菌 *E. coli* 和 *S. aureus* 的LB平板,37℃培养过夜。

2 结果

2.1 DCD-1L 基因合成

我们通过合成 DCD-1L 基因的两条单链 DCD-1L1 和 DCD-1L2, 在实验室经两轮 PCR 扩增得到 DCD-1L 双链基因(原理见图1)。毕赤酵母载体 pPIC9 利用本身的 α -factor 信号肽能够分泌表达外源基因,在分泌过程中 α -factor 识别信号肽上的 KEX2 酶切位点并进行切割,外源蛋白被分泌到培养基中。我们利用毕赤酵母载体 pPIC9 上 α -factor 信号肽基因内的 *Xho*I 位点和该载体多克隆位点上的 *Eco*RI 位点将 DCD-1L 克隆到载体 pPIC9 上。在 PCR 扩增过程中,我们利用引物在 5' 端引入 α -factor 的 KEX2 位点和 *Xho*I 位点,在 3' 端加上 TAG 终止密码子和 *Eco*RI 酶切位点,得到的基因全长

165bp(图2)。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后,用干净的刀片割下所要胶带,用 DNA Gel Extraction Kit 回收 DCD-1L 基因片段。

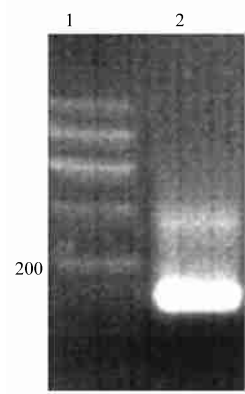


Fig. 2 DCD-1L PCR product

Lane 1: 100bp ladder DNA molecular weight marker: 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 100bp; Lane 2: DCD-1L PCR product, about 165bp

2.2 克隆/表达载体的构建、鉴定和表达

因 DCD-1L 基因片段小(165bp),少量的质粒DNA经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切后很难在电泳图谱上分辨出 DCD-1L 片段。而重组质粒 pPIC9-DCD-1L 经 S&E Clone Manager 软件分析有三个 *Bgl* II 酶切位点,其中一个位于 DCD-1L 基因 5' 端。我们通过 *Bgl* II 酶切来鉴定阳性克隆。pPIC9-DCD-1L 经 *Bgl*

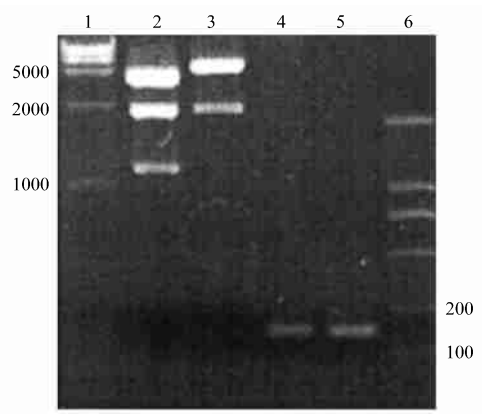


Fig. 3 Identification of the cloning/ expression vector by enzyme digestion and PCR

Lanel: DNA ladder marker: 15000bp, 10000bp, 7500bp, 5000bp, 2500bp, 1000bp; Lane2: the cloning/ expression vector digested by *Bgl* II; Lane3: Vector pPIC9 digested by *Bgl* II; Lane4: the cloning/ expression vector PCR; Lane5: DCD-1L PCR; Lane6: DNA ladder marker: 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 100bp

II 酶切后得到大小分别为 1200bp、2403bp、4549bp 的三条带,而对照载体 pPIC9 经 *Bgl* II 酶切只有两条带,大小分别为 2403bp、5620bp(图 3)。同时,经过 DNA 测序分析,证明 DCD-1L 的基因序列是正确的并且位于 pPIC9 α -factor 信号肽的阅读框内(图 4)。

重组质粒 pPIC9 DCD-1L,用 *Stu*I 线性化后,His⁺ Mut⁺ 基因是完整的。线性化重组质粒电转毕赤酵母 GS115,转化子能够在 MM 平板上生长。经菌落 PCR 证明 DCD-1L 基因被整合到毕赤酵母 GS115 的染色体上,并可通过甲醇诱导表达。

*Xho*I

CTCGAGAAAAGATCTTCTTTGTTGGAGAAGGGTTTGGACGGTGCTAAGA

Lue Glu Lys Arg

AGGCTGTTGGTGGTTTGGGTAAGTTGGGTAAGGACGCTGTTGAGGACTT

GGAGTCTGTTGGTAAGGGTGCTGTTTCACGACGTTAAGGACGTTTTTGGAC

TCTGTTTTGTAGCTTAAG

End EcoRI

Fig.4 The sequencing result of DCD-1L gene in cloning/ expression vector

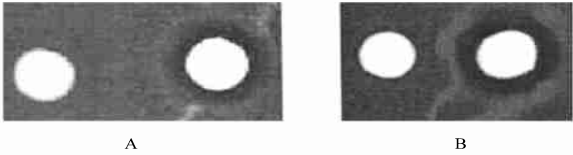


Fig. 5 Activities of DCD-1L anti *E. coli* and *S. aureus*
A: DCD-1L anti *E. coli*: left: pPIC9 in *Pichia pastoris* anti *E. coli*, right: pPIC9 DCD-1L in *Pichia pastoris* anti *E. coli*;
B: DCD-1L anti *S. aureus*: left: pPIC9 in *Pichia pastoris* anti *S. aureus*, right: pPIC9 DCD-1L in *Pichia pastoris* anti *S. aureus*

3 讨 论

Schittek 和他的同事们在筛选人皮肤细胞扣除互补 DNA 文库时,分离出一个编码新型抗菌肽的多肽基因,即 *Dermcidin*^[4]。他们分析了该基因序列发现该肽与其他已知的抗菌肽没有同源性。这个蛋白在汗腺中特异地表达,经蛋白酶酶切成一个 47 肽后分泌到汗液中。经他们实验证明,用化学合成和从人汗腺分离得到的 DCD-1 和 DCD-1L 在较广的 pH 范围和高盐浓度下具有抗细菌和真菌的活性。这个结果表明人汗腺中至少包含一种抗菌肽在调节皮肤菌群和天生的自身免疫应答方面

2.3 DCD-1L 抗菌活性

抗菌实验结果表明,DCD-1L 用 MM 和 BMMY 培养基发酵的上清液在 pH4.0~5.4 之间没有抗菌活性,在 pH5.5~7.4 具有抗 *E. coli* 和 *S. aureus* 的活性,并且在 pH6.0 时抗菌活性最高(图 5)。

虽然在毕赤酵母中表达的 DCD-1L 抗 *E. coli* 和 *S. aureus* 的活性不是很高,但它在一个比较广的 pH 范围内能保持抗菌活性。目前,我们正通过优化毕赤酵母的发酵条件来提高它的表达量,从而通过 DCD-1L 纯化来提高它的抗菌活性。

起一定的作用^[5]。这个抗菌肽就是 *Dermcidin* (DCD)。

与大多数抗菌肽如 defensin 富含精氨酸和赖氨酸而带正电荷不同,DCD 带 5 个负电荷^[4]。阳离子抗菌肽 defensin 的作用模式是结合到微生物细胞膜上,通过在膜上“打孔”使细胞膜内外渗透压不平衡而杀死微生物。DCD 的作用方式与其他抗菌肽不同,它能否杀死具有耐药性的微生物我们正在研究。

多细胞生物的表皮是对环境的主要屏障并且提供了抗微生物入侵的第一道防线。在人皮肤中,已经发现了两种抗菌肽: Cathelicidins^[6,7] 和 β -defensins,但是 defensin 家族的抗菌肽只在低盐浓度下才有活性,而在高盐浓度下没有活性^[8,9]。然而,DCD 在高盐浓度和较广的 pH 范围内都有抗革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌的活性。所以 DCD 在人汗液中可能起到调节人皮肤菌群的作用,并且它在病菌感染后的前几个小时有帮助抑制的作用。

最近的研究表明抗菌肽可作为设计新型抗菌药物的天然模板。DCD 对研究许多人的皮肤病非常有用,包括各种皮肤疾病,如痤疮、牛皮癣和遗传性过敏性皮炎。它提供了新型的诊断手段和预测

因子,同时也为治疗皮肤疾病提供了新的见解^[10]。最近还发现在乳腺癌细胞中表达的 DCD 能够促进细胞生长、提高细胞存活率和降低细胞的血清依赖性。因此 DCD 可能在部分乳腺癌中通过促进细胞生长和提高细胞存活率对肿瘤发生起作用^[11]。另外,一种 DCD 的单克隆抗体已经被制备并可用于快速、方便地检测汗液和其它组织中的 DCD^[12]。DCD-1L 来自人,它可能对人红细胞没有溶血活性,这对 DCD-1L 成为新型抗菌药物非常有利。另外,人体基因编码的抗菌肽为人体正常物质,它有如下优点:(1)对人体没有毒性,容易通过药物研究临床前毒性实验;(2)不易引起人体过敏反应;(3)作为同种物质,在人体内排除更慢,应有更长的半衰期和生物利用度^[13]。目前,我们将 DCD-1L 基因克隆到 pPIC9 中并在毕赤酵母 GS115 中表达,并确定了它具有抗部分革兰氏阴性和阳性细菌的活性。我们将通过优化发酵条件来大量获得 DCD-1L,然后大批量纯化 DCD-1L,来分析它的作用模式及其与其它疾病的相互关系。

参考文献

- [1] Davies, J. Bacteria on the rampage. *Nature*, 1996, 383(6597): 219~220
- [2] Hancock R E W, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 82~88
- [3] Hancock R E W. Host defense (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs*, 1999, 57: 469~473

- [4] Schittek B, Hipfel R, Sauer B, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2001, 2(12): 1133~1137
- [5] Melanie B. Self defence is a sweaty business. *Nature Reviews Immunology*, 2001, 1: 174
- [6] Gallo R L, Siebert I, Kim C W, et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23): 11035~11039
- [7] Murakami M, Ohtake T, Dorschner R A, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol*, 2002, 119(5): 1090~1095
- [8] Goldman M J, Anderson G M, Stolzenberg E D, et al. Human β -defensin 1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 1997, 88: 553~560
- [9] Gallo R L, Huttner K M. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*, 1998, 111: 739~743
- [10] Flad T, Bogumil R, Tolson J, et al. Detection of dermcidin derived peptides in sweat by Proteinchip^R Technology. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 270(1): 53~62
- [11] Porter D, Weremowicz S, Chin K, et al. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(19): 10931~10936
- [12] Sagawa K, Kimura A, Saito Y, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat specific protein and its application for sweat identification. *Int J Legal Med*, 2003, 117(2): 90~95
- [13] 胡福泉. 肽抗生素研究进展及其应用前景. *微生物学杂志*, 2003, 23(2): 59~60

Cloning and Expression of DCD-1L in *Pichia pastoris*

LAI Yir ping PENG Yir fei YU Zheng yan HUANG Jing WU Zi-rong

(Department of Biochemistry and Molecular Biology East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Due to bacterial resistance of conventional antibiotics, it is urgent to find a new class of antibiotics that cannot induce bacteria against antibiotics and accumulate in microorganisms *in vivo*. *Dermcidin* is a broad-spectrum antimicrobial peptide identified most recently and the gene for *Dermcidin* has been found to expressed specifically in human sweat glands. In this study, the gene of DCD-1L, a derivant of *Dermcidin*, was first cloned into plasmid pPIC9 and expressed in *Pichia pastiros* GS115. The supernatant extracted from the expressing system had the activities against *E. coli* and *S. aureus*. The result indicates that DCD-1L expressed in *Pichia pastoris* may have the activity against some of Gram negative and positive bacteria.

Key words Antimicrobial peptide DCD-1L *Dermcidin* *Pichia pastiris*