

杂合抗菌肽 CecA-mil 的改造及在毕赤酵母中的分泌表达

张素芳¹ 曹瑞兵¹ 贾 赟^{1,2} 周 斌¹ 陈溥言^{1*}

(¹南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

(²辽宁出入境检验检疫局 大连 116001)

摘 要 参照毕赤氏巴斯德酵母(*Pichia pastoris*)偏好密码子,改造并化学合成杂合抗菌肽 CecA-mil 基因,改造后的 CecA-mil 基因克隆到 pPICZ α -A 载体中,构建分泌型重组酵母表达载体 pPICZ α -A-CM,转化 *Pichia pastoris* 受体菌 X-33。在醇氧化酶(AOX)启动子调控下,分子量约 1.9 kD 的 CecA-mil 杂合抗菌肽获得表达,经表达条件优化,重组酵母菌的摇瓶发酵产率可达到 245 μ g/mL。抗菌特性研究表明,该表达产物具有广谱抗菌活性,对多数 G⁻ 菌及 G⁺ 菌均有较好的抑菌活性,特别是对氨基青霉素抗性菌和卡那霉素抗性菌抑杀效果更好;具有热稳定性和酸稳定性。这些特点使得重组抗菌肽 CecA-mil 在食品防腐、疾病防治和动物饲料添加剂等方面显露出很好的应用前景。

关键词 杂合抗菌肽 CecA-mil, *Pichia pastoris*, 分泌表达, 抑菌活性, 抗菌谱

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0218-05

抗菌肽(Antibacterial peptides, ABP)是生物体产生的一种阳离子小肽,具有广谱抗菌活性,是生物先天性免疫的重要组成成分。迄今为止,已在许多生物包括昆虫、鸟类、动物、植物及原核生物中发现 1000 多种抗菌活性肽。其作为广谱抗菌药物所具有的应用开发前景十分可观。随着对抗菌肽结构、功能与杀菌机理研究的深入,人们开始尝试设计杀菌活力更强、抗菌谱更广的新型抗菌肽。Jaynes 等^[1]以抗菌肽 B 为蓝本设计并化学合成的 Shiva-1 和 Fink 等^[2]固机法化学合成的杂合抗菌肽 AD(A₁₋₁₁D₁₂₋₃₇)其杀菌活性远远高于原天然抗菌肽,抗菌谱也有所增加。我们根据 Cecropin A 和 Milittin 的氨基酸序列,选用毕赤酵母偏好密码子^[3],设计并合成了新型杂合抗菌肽 CecA-mil 基因。这是由 Cecropin A 成熟肽 N 端 1~7 位氨基酸和 Milittin 成熟肽 N 端 5~12 位氨基酸杂合而成的 15 肽,它不仅保持 Cecropin A 的广谱抗菌活性,也获得了蜂毒素的抗菌活性并且无蜂毒素的细胞毒性^[4]。由于抗菌肽本身对原核宿主菌的杀伤作用,其不适合在原核系统中直接表达,一般选用融合表达或进行真核表达,而原核融合表达将使下游工作繁琐化。本文用 *Pichia pastoris* 成功表达了杂合抗菌肽 CecA-mil。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、受体菌、指示菌株:毕赤氏巴斯德酵母

Pichia pastoris 受体菌 X-33(*His⁻Mut⁺*) 表达载体 pPICZ α -A 购于 Invitrogen 公司。指示菌鸡致病性大肠杆菌(O₁)、金黄色葡萄球菌(Cowan I)、鸡伤寒沙门氏菌(*Salmonella gallinarum*)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)、致化脓性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、牛无乳/停乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*)由河南农业大学王川庆教授惠赠,大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 为本实验室保存。其中,鸡致病性大肠杆菌(O₁)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)对氨基青霉素和卡那霉素呈强耐药性。

1.1.2 主要试剂:高保真的 pyrobest DNA 聚合酶等工具酶购于 TaKaRa 公司;SDS-PAGE 低分子量 Marker 购于生星生物公司;聚乙二醇 6000、截流分子量 1000 的透析袋 SP132640 购于上海 Sangon 公司;SDS-PAGE 超低分子量 Marker(C6210)、Tricine 和 Tris 购于 Sigma 公司;Zeocin 购于 Invitrogen 公司;其它试剂均为进口或国产之分析纯。

1.2 杂合抗菌肽 CecA-mil 基因的克隆

根据 GenBank 中 Cecropin A 成熟肽段(1~7)、Milittin 成熟肽段(5~12)的氨基酸序列(GenBank 序列号分别为 X06672 和 AJ314920),选用酵母偏爱密码子设计 CecA-mil 杂合肽基因,在其 N 端加上 α 信号肽 Kex2 裂解位点,以保证所分泌表达的 CecA-mil 杂合抗菌肽具有天然 N 端。设计两个引物片段 F1

* 通讯作者。Tel 86-25-84396028, Fax 86-25-84396335, E-mail: zsd@njau.edu.cn

作者简介 张素芳(1978-),女,河南安阳人,博士研究生,研究方向为分子病毒学与分子免疫学。E-mail: zsf780331@tom.com

收稿日期: 2004-09-30, 修回日期: 2004-12-27

和 F2 扩增改造后的 CecA-mil 杂合抗菌肽基因。

F1 : 5'-CGCGAATTCCTCGAGAAAAGAAAGTGGAGTGTTC AAGAAGGCTCTTGAAGGTC-3' ; F2 : 5'-GCCAAGCTTTCTAGATTAGTTACCGGTGCTCAAGACCTTC-AAGACCTTCTGAACAA-3'。

两个引物的 3' 端有 21 个 bp 的互补序列,符合 SOEing 的要求,基因合成采用了重叠区扩增基因拼接法 (Gene splicing by overlap extension, gene SOEing),为便于基因工程操作,CecA-mil 杂合肽基因 5' 和 3' 端分别引入 *Xho* I、*Xba* I 位点。另设计合成一对引物,用于重组载体及重组酵母菌的鉴定,其中,上游引物位于毕赤酵母 5' AOX 基因区,下游引物位于插入片段 CecA-mil 基因区。引物扩增长度为 384bp。P1 : 5'-TACTTTCATAATTGCGACTG-3' ; P2 : 5'-CCCTTCTGAACAACCTTCC-3'。引物 F1、F2、P1 和 P2 均由上海博亚公司合成。

应用 SOE 法,以 F1、F2 片段互为模板互为引物进行 PCR 扩增,合成 CecA-mil 杂合肽基因。为了保证 SOE 合成的特异性,我们采用了降落 (Touchdown, TD) PCR 技术进行优化。TD-PCR 反应体系 (50 μ L) : 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ free) 5.0 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 3.0 μ L, dNTP (10mmol/L) 1.0 μ L, F1、F2 100 pmol/L 各 1.0 μ L, TaKaRa Ex TaqTM 0.5 μ L, 灭菌超纯水 38.5 μ L。混匀,瞬间离心,进行 TD-PCR。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,进入 TD-PCR 循环: 94 $^{\circ}$ C 30s,退火温度从 65 $^{\circ}$ C 降至 50 $^{\circ}$ C,每循环 1min,每一个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 1min,共 30 个循环后温度降至 50 $^{\circ}$ C,再在最适退火温度 55 $^{\circ}$ C 的条件下进行 15 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。取 TD-PCR 产物 10 μ L 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下观察并记录拍照。

1.3 重组酵母表达载体的构建和 CecA-mil 的诱导表达

经 SOE 合成好的基因经 *Xho* I、*Xba* I 双酶切,定向插入酵母表达载体 pPICZ α -A 中,构建 CecA-mil 重组质粒,缺失酶切位点鉴定阳性的质粒命名为 pPICZ α -A-CM,送上海博亚公司测序。SOE 及缺失酶切位点鉴定的具体操作见参考文献 [5]。将测序正确的重组质粒转化酵母菌 X-33,重组酵母的电击转化、筛选按 Invitrogen 公司酵母表达操作手册进行,略有改进。

将筛选到的阳性酵母菌接种于 100mL BMGY 培养基 30 $^{\circ}$ C 250r/min 培养至 A₆₀₀ 达到 3~6,离心收集菌体重悬于 500mL BMMY 培养基,进行诱导表达。28 $^{\circ}$ C, 250r/min 培养 72 h,期间每 24 h 补加终浓度为

0.5% (V/V) 的甲醇。72h 后,10000r/min 离心 20min 收集培养液上清,进行抑菌活性测定。

1.4 重组杂合肽 CecA-mil 的初步抗菌活性测定

采用标准琼脂孔穴扩散法,以 *E. coli* DH5 α 为实验菌株,将 *E. coli* DH5 α 悬浮液 (A₆₀₀ = 0.5~0.6) 15 μ L 与 55 $^{\circ}$ C 的 LB 固体培养基 25mL 混匀后铺平板,待其凝固后 4 $^{\circ}$ C 保存,用灭过菌的打孔器 (直径 5mm) 打孔,孔中滴加 20 μ L 浓缩 10 倍的待测表达上清 (如无特殊说明,文章中所用样品均是浓缩 10 倍的上清,下略),37 $^{\circ}$ C 培养过夜 (8~12h),以同体积的 pPICZ α -A 空载体转化酵母的 10 倍浓缩上清做为阴性对照,Amp 为阳性对照,第 2 天测量抑菌直径。

1.5 重组 CecA-mil 的表达优化

为提高重组酵母的表达效率,对 CecA-mil 重组酵母菌株的摇瓶发酵条件进行了优化,包括其诱导起始时种菌的 OD 值、诱导时间、诱导温度、培养基的 pH 值控制、甲醇浓度及营养成分的追加等多种参数。

1.6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

重组杂合肽 CecA-mil 的分子量约为 1.9kD,理论上,分子量低于 15kD 的多肽在常规 Tris-甘氨酸电泳系统中难以得到理想的电泳分辨率。因此,我们使用 Tricine (三羟甲基氨基甘氨酸) 代替甘氨酸作为终止离子,并增加电泳缓冲液的摩尔浓度,使重组 CecA-mil 多肽得到了较好的分辨率及带型。电泳结果进行薄层扫描分析。

1.7 重组杂合肽 CecA-mil 的抑菌效价测定

分别取 40 μ L *E. coli* DH5 α (A₆₀₀ = 0.5~0.6),加入 260 μ L LB 培养基于 1.5mL EP 管中。向各管中依次加入 10 μ L、20 μ L、30 μ L、40 μ L、50 μ L、60 μ L 和 70 μ L 杂合抗菌肽 CecA-mil,37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。取过夜培养物 100 μ L 测 OD₆₀₀。

1.8 重组杂合肽 CecA-mil 的热稳定性和酸碱稳定性检测

将杂合抗菌肽 CecA-mil 分别煮沸 10min、1h、2h、3h、4h,再按实验方法 1.4 所述进行抑菌试验,检测其对 *E. coli* DH5 α 抗性的变化,同时以 pPICZ α -A 空载体转化酵母的表达上清和未煮沸的抗菌肽 CecA-mil 作对照。

按照文献 [6] 配制 pH2~12 的缓冲液。取 20 μ L 表达上清,分别加入 20 μ L 不同 pH 值缓冲液,以不加抗菌肽的不同 pH 值缓冲液为对照,做抑菌实验,方法同 1.4。

1.9 重组杂合肽 CecA-mil 的广谱抗菌活性检测

按实验方法 1.4 所述检测抗菌肽对不同细菌的抑菌活性。实验指示菌有 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21、鸡致病性大肠杆菌(*O*₁)、金黄色葡萄球菌(*Cowan I*)、鸡伤寒沙门氏菌(*Salmonella gallinarum*)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)、致化脓性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、牛无乳/停乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*)。

2 结果

2.1 序列验证

根据测序核苷酸序列推导出的氨基酸序列,与 Cecropin A N 端 1-7 氨基酸残基和 Milittin N 端 5-12 氨基酸残基完全一致,测序结果显示,改造后的 CecA-mil 杂合肽基因全长 45bp,已正确插入表达载体的 Kex2 蛋白酶裂解位点之后,使用了酵母偏好密码子(*Ues bias codon*)。

2.2 重组杂合肽 CecA-mil 初步抗菌活性测定结果

试验结果显示,CecA-mil 杂合肽对 *E. coli* DH5 α 具有良好的杀菌活性。20 μ L 浓缩 10 倍的表达上清对 *E. coli* DH5 α 的抑菌直径可达到 14.5mm,与 10 μ L Amp (25 μ g/mL) 抑菌圈相当,而小于 10 μ L Amp (50 μ g/mL) 相应的抑菌直径(17.5mm)(图 1)。

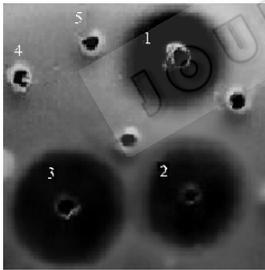


图 1 重组抗菌肽的抑菌活性测定

Fig.1 Detection of the antibacterial activity of recombinant antibacterial peptides

1. Recombinant hybrid peptide CecA-mil; 2. AMP control (25 μ g/mL);
3. AMP control (50 μ g/mL) 4. Negative contrast of PBS(0.1mol/L); 5. The negative control of supernatant of *Pichia pastoris* X-33/pPICZ α -A.

2.3 重组杂合肽 CecA-mil 的表达优化参数和表达产物的 Tricine-SDS-PAGE

通过对重组酵母菌发酵条件的优化,得到一组发酵参数: BMMY 发酵培养基 pH 6.0,表达后期 BMMY 培养基 pH 控制在 3.0,26 $^{\circ}$ C 培养 72 h,其间每 24h 添加 0.5% (V/V) 的甲醇和 3% (V/V) 营养液。这样,CecA-mil 摇瓶发酵的表达量提高到 245 μ g/mL,是条件优化前的 1.96 倍。

在改良的 Tris-Tricine 电泳系统中,重组表达的

CecA-mil 杂合肽大小为 1.9kD,得到较理想的电泳分辨率和带型(图 2),重组菌株优化表达后其表达量较高,经薄层扫描分析,表达量可达到 245 μ g/mL,而优化前为 125 μ g/mL(图略)。

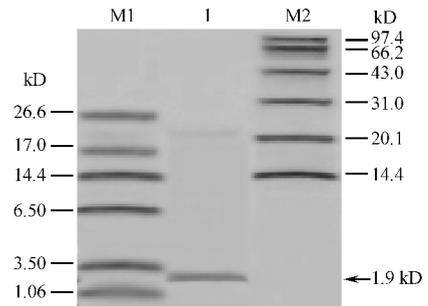


图 2 重组 CecA-mil 的 Tricine-SDS-PAGE

Fig.2 Tricine-SDS-PAGE analysis of the culture supernatant of X-33/pPICZ α -A-CM

M1. Ultra-low molecular weight markers for proteins; 1. The culture supernatant of X-33/pPICZ α -A-CM; M2. Low molecular weight markers for proteins

2.4 重组杂合肽 CecA-mil 的抑菌效价

在表达上清加入量大于 40 μ L ($\geq 9.8\mu$ g) 后,OD 值从开始的 $OD_{650} = 0.075$ 下降到 $OD_{650} \leq 0.025$,也即加入 9.8 μ g 重组 CecA-mil 就可以抑制 260 μ L LB 培养基中含有 40 μ L 的 *E. coli* DH5 α ($OD_{650} = 0.75$) 的生长。随着抗菌肽量的增多, OD_{650} 值越来越小,表明抗菌活性与抗菌肽的量有一定关系(图 3)。

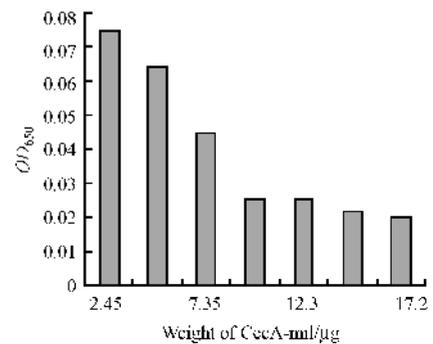


图 3 重组杂合肽的抑菌效价测定

Fig.3 The testing antibacterial efficiency of CecA-mil

2.5 重组杂合肽 CecA-mil 的热稳定性和酸稳定性

结果显示,重组杂合肽 CecA-mil 煮沸 10min 后抑菌圈反而有所增大,可能是煮沸时去掉了上清中的某些抑制成分所致。煮沸 1h 的 CecA-mil 抑菌圈与未煮沸的抗菌肽的抑菌圈大小无明显区别,煮沸 2h 和 3h 之后,其抑菌直径略有减小,煮沸 4h 后抑菌圈减半。表明抗菌肽具有很强的热稳定性。

结果显示,pH2~7 时,抑菌直径较原来无明显变化,pH8~12 时随着 pH 值增高,抑菌直径逐渐减

小。说明此抗菌肽对酸具有稳定性,而高 pH 对其抗菌活性有抑制作用(图 4)。

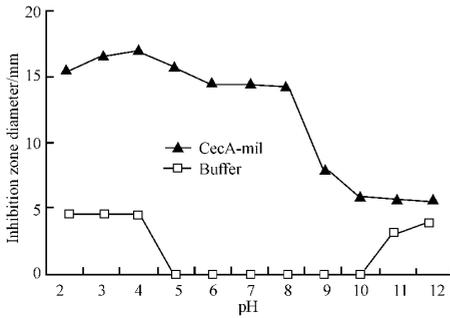


图 4 重组杂合肽 CecA-mil 的酸碱稳定性

Fig.4 The antibacterial activity of CecA-mil affected by different pH

2.6 重组杂合肽 CecA-mil 的广谱抗菌活性

结果显示,杂合抗菌肽对 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21、鸡致病性大肠杆菌(O₁)、金黄色葡萄球菌(Cowan I)、鸡伤寒沙门氏菌(*Salmonella gallinarum*)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)、致化脓性金黄色葡萄球菌和牛无乳/停乳链球菌有不同程度的抑杀作用(表 1)。其中,对肠道菌(大肠杆菌、沙门氏菌)的抑杀作用最强。

令我们感兴趣的是,对于氨苄青霉素抗性和卡那霉素抗性的鸡致病性大肠杆菌(O₁)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*),杂合抗菌肽具有明显的抑杀作用。

表 1 杂合抗菌肽 CecA-mil 的抗菌谱

Table 1 The antibacterial spectrum of hybrid antimicrobial peptide CecA-mil

Indicator strains	Antibacterial activity
<i>E. coli</i> DH5 α	++++
<i>E. coli</i> BL21	+++
Pathogenic <i>E. coli</i> (O ₁) from chicken	++++
<i>Salmonella gallinarum</i>	++++
<i>Salmonella pullorum</i>	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I)	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	++

The antibacterial activity is expressed by the diameter of inhibition zone. +++ . 5~10mm; ++++ . 10~15 mm; +++++ . 15~20mm.

3 讨论

抗生素的滥用不仅导致了严重的病原菌耐药性问题,而且也造成了药物残留等公共卫生隐患。针对于此,研制和应用无毒无公害的新型抗菌剂,代替抗生素在饲料添加剂及畜禽疾病防治中的应用,已

成为当前兽医工作者的一项重要内容。近期的研究发现,抗菌肽不但广谱抗菌,能抑杀耐药性菌株,而且它的杀菌机制使病原菌不易产生耐药性突变,从而成为最具开发前景的抗生素替代品。

抗菌肽的来源有 3 种:天然资源提取、人工固相合成及基因工程表达。从天然资源中提取的抗菌肽成本高、得率低、工序繁琐,人工固相合成肽又价格相当昂贵,都难以应用于实际临床。由于抗菌肽基因一般都较小,故采用人工合成的方法来获得目的基因,再通过基因工程方法进行微生物发酵生产抗菌肽则更具有实际意义。

关于抗菌肽的表达研究,目前存在一个问题:不论是在微生物中表达,还是在植物、昆虫中表达,表达量都偏低,这成了抗菌肽走向产业化的限制瓶颈因素。抗菌肽若要走向产业化,必须建立其高效表达体系和快速纯化系统。

Boman 等^[7] 1989 年利用固相合成技术研究 CecA-mil 杂合肽在抗菌及抗疟疾方面的应用,并证实一个由 Cecropin A N 端 1~13 个氨基酸残基和 Melittin N 端 1~13 个氨基酸残基杂合而成的 26 肽 CA(1~13)M(1~13)具有百倍于 Cecropin A 的杀葡萄球菌活性,10 倍于 Cecropin B 或 Magainin 2 的抗疟活性,但无 Melittin 的溶红细胞活性。1992 年又发现 CA(1~7)M(2~9)、CA(1~7)M(4~11)和 CA(1~7)M(5~12)等 3 种缩短的 CecA-mil 杂合肽具有和 26 肽相似的抗菌活性^[4]。本文对 CA(1~7)M(5~12)杂合肽进行了表达及抗菌活性研究。

为了提高 CecA-mil 杂合抗菌肽在毕赤酵母中的表达效率,简化其生产工艺。我们选择了毕赤酵母分泌表达体系。通过密码子偏好性改造,天然 N 端设计等改造措施,构建并获得了抗菌肽 CecA-mil 在酵母中的高效分泌表达菌株。所表达的 CecA-mil 杂合抗菌肽是个 15 肽,理论分子量大小为 1.9 kD,含有 5 个强碱性氨基,不含半胱氨酸、不具二硫键,等电点为 10.6, pH7.0 时荷正电 4.9。抗菌肽是一小分子肽,具有热稳定性,可以耐受 100℃ 的高温达 4h^[8]。本实验中,重组 CecA-mil 杂合肽至少可耐受 3h 的煮沸而不影响其活性,具有较强的热稳定性。

耐药菌株所致疾病的治疗,一直是兽医工作者头疼的问题。本实验中,重组 CecA-mil 杂合肽对携带氨苄青霉素抗性和卡那霉素抗性的鸡致病性大肠杆菌(O₁)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)具有很好的抑杀效果,这为耐药菌株所致畜禽疾病的治疗提供了一个新思路。

重组 CecA-mil 杂合肽具有广谱抗菌活性,对多数革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌均有不同程度的抑菌活性,特别是同时又具有热稳定性和酸稳定性、无残留、不会诱导耐药性产生的特点,使其在食品防腐、疾病防治和动物饲料添加剂等方面显示很好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Jaynes J M , Catherine A , Burton C A , *et al.* *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on plasmodium falciparum and trypanosome cruzi. *Faseb J* , 1988 , **2** :2878 - 2883.
- [2] Fink J , Merrifield R B , Bomman A , *et al.* The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity. *J Biol Chem* , 1989 , **264** (11) :6 260 - 6267.
- [3] 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.

- [4] David A , Ubach J , Boman A , *et al.* Shortened cecropin A - melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett* , 1992 , **296** (2) :190 - 194.
- [5] 张素芳 , 贾 赟 , 蔡梅红 , 等. Magainin 和 CecA-mil 抗菌肽基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达. 生物工程杂志 , 2004 , **24** (7) 93 - 97.
- [6] 武汉大学主编. 分析化学. 北京 : 高等教育出版社 , 1995 , 73 - 81.
- [7] Boman H G , Wade D , Boman I A , *et al.* Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittinhybrids. *FEBS Lett* , 1989 , **259** (1) :103 - 106.
- [8] 洪华珠 , Ann Marri Fallon. 粉纹夜蛾离体细胞抗菌肽的诱导和抗菌活性测定. 华中师范大学学报(自然科学版) , 1999 , **33** (4) 564 - 569.

Modification of hybrid antimicrobial peptide CecA-mil gene and its over-secretion expression in *Pichia pastoris*

ZHANG Su-fang¹ CAO Rui-bing¹ JIA Yun^{1 2} ZHOU Bin¹ CHEN Pu-yan^{1*}

(¹ Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(² Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Dalian 116001 , China)

Abstract : According to the partiality codon of *Pichia pastoris* , hybrid antimicrobial peptide CecA-mil gene was reconstructed , synthesized and cloned into pPICZ α -A to construct the recombinant expression vector pPICZ α -A-CM. The pPICZ α -A-CM was transformed into yeast host strain X-33. Under the control of the promoter AOX1 (alcohol oxidase 1) , a approximately 1.9 kD cecA-mil protein was expressed with the high level of 245 μ g/mL after optimized the requirements for the flask-shaking culture fermentation of the *Pichia pastoris* rX-33/pPICZ α -A -CM. The hybrid antibacterial peptide had a broad spectrum antibacterial activity on both gram-positive and gram-negative bacteria , especially showed potent antibacterial activity against ampicillin-resistant and kanamycin-resistant bacteria , such as *Staphylococcus aureus* (cowan I) and pathogenic *E. coli* (O1) from chicken. In addition , the hybrid antibacterial peptide showed an extreme heat-stable and acid-stable characteristic. Based on these characteristics , the recombinant antibacterial peptide CecA-mil display application foreground in the field of antisepsis of food , prevention of disease , additives of animal feedstuff and so on.

Key words : Hybrid antimicrobial peptide CecA-mil , *Pichia pastoris* , Secretion expression , Antibacterial activity , Antibacterial spectrum

* Corresponding author. Tel 86-25-84396028 ; Fax 86-25-84396335 ; E-mail : aid@njau.edu.cn