

抗菌肽 CM4 基因克隆及其在毕赤酵母中的表达鉴定

张 杰 吴 希 岳园园 陈玉清 张双全*

(南京师范大学生命科学院 江苏省分子医学生物技术重点实验室 南京 210097)

摘 要:为了在毕赤酵母中获得抗菌肽 CM4 表达,将抗菌肽 CM4 基因克隆入表达质粒 pPIC9, Sac I 线性化的重组表达质粒 pPIC9-CM4 电击转化 *P. pastoris* GS115(*his⁻*) 采用 MM、MD 板和 PCR 法筛选 Mut⁺ 表型,甲醇诱导表达,抗菌活性检测、Tricine-SDS-PAGE 及酸性活性电泳均表明抗菌肽 CM4 在毕赤酵母中成功地分泌表达,重组抗菌肽 CM4 对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*) 都有很强的抑菌活性。

关键词: 抗菌肽 CM4 毕赤酵母 表达 pPIC9 真菌

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)05-0720-04

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]从惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*) 蛹中发现的。此后人们相继从细菌、真菌、两栖类、高等植物、哺乳动物乃至人类中发现并分离获得具有类似性质的活性多肽,现已发现抗菌肽、蛋白有 800 种以上。在过去的几十年中,人们发现许多传统的抗生素能够诱导耐药菌株的产生,随着耐药菌株对抗生素的抗性急剧增加,急需开发一种新的抗菌药物,抗菌肽的抗菌模式不同于抗生素,不易诱导产生耐药菌株,容易被降解,不易在微生物体内富集,抗菌肽抗菌谱广,包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌及一些病毒等,因此被认为能够成为替代抗生素的首选药物,而且当前已有一些抗菌肽开发成抗生素进入临床实验^[3-5]。

抗菌肽 CM4 是由张双全等^[6]从中国家蚕中发现的,具有两亲性 α -螺旋结构区域,属于 Cecropin 家族,含 35 个氨基酸残基,分子量约为 3.8kD,有很强的杀菌能力,对细菌、真菌、病原菌及病毒都有作用^[7-9]。抗菌肽天然产量非常低,合成肽价格相当昂贵,这成为开发成药的一个瓶颈,通过基因工程技术生产抗菌肽具有广阔的应用前景。

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。本实验室曾采用 PET-28a 载体以融合蛋白的形式表达 CM4,结果不是十分理想,我们尝试采用巴

斯德毕赤酵母表达系统(*Pichia pastoris*)进行分泌表达,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^[10],因此,我们合成抗菌肽 CM4 基因,并将其在 *P. pastoris* 中进行异源表达,以期获得高表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 抗菌肽敏感菌株 *E. coli* K₁₂D₃₁, 毕赤酵母 *P. pastoris* GS115(*his⁻ mut⁺*), 表达质粒 pPIC9 均由本实验室保存。

1.1.2 试剂:限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I、*Sac* I 及 T4 DNA Ligase 等为 TaKaRa Biotech 公司产品; Tryptone、Yeast Extract 为 Oxoid 公司产品; SDS、Tris、Acrylamide、Bisacrylamide 等为 Sigma 公司产品; Zerocin 为 Invitrogen 公司产品,其余常用试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 抗菌肽 CM4 基因的拼接、克隆及重组表达质粒的构建

1.2.1 引物合成:根据毕赤酵母基因翻译的偏爱密码子^[11]和抗菌肽 CM4 氨基酸序列、pPIC9 的多克隆位点,设计合成 ABP-F、ABP-R、ABPP-F、ABPP-R 4 条引物,ABP-F、ABP-R 各含 59bp,两条单链之间有 13bp 互补配对,用于拼接抗菌肽 CM4 基因,ABPP-F、ABPP-R 用于给抗菌肽 CM4 基因加酶切位点。序列

基金项目:国家自然科学基金(30271093)

* 通讯作者。Tel: 86-25-83598216; E-mail: zhangshuangquan@263.net

作者简介:张 杰(1981-)男,江苏南通人,硕士,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: jiezhang8088@yahoo.com

收稿日期:2005-01-06,修回日期:2005-05-03

如下: ABP-F 5'-AGATGGAAGATTTTCAAGAAGATCGA GAAGGTCGGTCAAAACATCAGAGACGGTATCGT-3'; ABP-R 5'-AATAGTAGCAGCTTGACCGACGACAGCGAC AGCTGGACCAGCCTTGACGATACCGTCTC-3'; ABPP-F: 5'-CCGGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAGATGGA AGATTTTC-3'; ABPP-R: 5'-GCCGCGCCGCTTAAATA GTAGCAGC-3'.

1.2.2 PCR 扩增: ABP-F、ABP-R 互为模板、引物, 反应体系(50 μ L): 10 \times Buffer 5 μ L, Mg²⁺ (25mmol/L) 3 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L, ABP-F、ABP-R (10pmol/L) 各 1 μ L, Taq 酶 (5U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 35 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 进行 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min; 得抗菌肽 CM4 基因, ABPP-F、ABPP-R 两引物加酶切位点, 反应体系(50 μ L): 10 \times Buffer 5 μ L, Mg²⁺ (25mmol/L) 3 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L, CM4 (30ng/ μ L) 1 μ L; ABPP-F、ABPP-R (10pmol/L) 各 1 μ L, Taq 酶 (5U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 34 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 进行 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min。

1.2.3 重组表达质粒的构建: PCR 产物和 pPIC9 均用 Xho I、Not I 双酶切, 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 Invitrogen 操作手册上提供的 5' AOX1 引物, 构建正确的重组表达质粒命名为 pPIC9-CM4。

1.3 pPIC9-CM4 转化 *P. pastoris* GS115 (his⁻ mut⁺) 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-CM4 (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 $^{\circ}$ C 培养至单菌落出现。从平板上挑转化子, 点到 MM 和 MD 板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2d, 通过比较转化子在 MM 和 MD 板上的生长速度来筛选 Mut⁺ 转化子。详细步骤参照 *Pichia* Expression Kit。

采用 PCR 方法分析 *P. pastoris* 转化子, 用煮-冻-煮法制备 PCR 模板^[12], 以 5' AOX1、3' AOX1 为引物, 反应体系同上, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.4 重组 *P. pastoris* 菌在摇瓶中的诱导表达

挑取重组 *P. pastoris*, 接种到 BMGY 中, 30 $^{\circ}$ C、230r/min 振荡培养约 20h 至 OD₆₀₀ 达到 2~6; 室温 3000r/min 离心 5min, 用 BMMY (含 1% Casamino

acids) 重悬至 OD₆₀₀ 约为 1.0, 30 $^{\circ}$ C、250r/min 振荡培养, 进行甲醇诱导表达, 每隔 24h 取样, 同时补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%, 重组抗菌肽 CM4 的表达通过抑菌圈法抗菌活性实验检测, 参照 Dar^[13] 的方法, 每孔加 100 μ L 表达上清。

1.5 Tricine-SDS-PAGE 及酸性 SDS-PAGE

取 5 μ L 表达上清进行 Tricine-SDS-PAGE, 凝胶采用硝酸银染色, 参照 Hermann^[14] 的方法, 样品浓缩进行酸性聚丙烯酰胺活性电泳, 参照文献 [13]。

1.6 重组 CM4 抗真菌活性检测

马铃薯斜面培养基 (PDA 培养真菌) (5d, 28 $^{\circ}$ C), 用无菌水冲洗斜面, 获得孢子悬浮液 (10⁴/mL), 取 150 μ L 涂布于 PDA, 并打一排直径 5mm 孔, 每孔加 20 μ L 40 μ mol/L 重组抗菌肽 CM4, 28 $^{\circ}$ C 培养 3d, 观察抑菌活性。

2 结果和分析

2.1 抗菌肽 CM4 基因的拼接、克隆及重组表达质粒的构建

为了高效表达抗菌肽 CM4, 我们选择毕赤酵母基因翻译的偏爱密码子设计合成 ABP-F、ABP-R 两条互补配对引物, PCR 扩增得到抗菌肽 CM4 双链基因, 条带大小为 105bp, 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 100bp 左右, 双酶切鉴定也可看出在 100bp 与 200bp 之间有一条带 (图略), DNA 自动测序仪测序, 序列如下: CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAGATGGAAGATTT TCAAGAAGATCGAGAAGGTCGGTCAAAACATCAGAG ACGGTATCGTCAAGGCTGGTCCAGCTGTCGCTGTCGT CCGTCAAGCTGCTACTATTTAA。结果表明, 重组表达质粒的构建完全正确。

2.2 筛选、鉴定 Mut⁺ 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-CM4 转化 *P. pastoris* GS115 (his⁻ mut⁺) 通过 MM 和 MD 板鉴定表型, 大约 80% 的为 Mut⁺, PCR 扩增结果显示, 阳性重组子出现 AOX1 (2.2kb) 和 597bp (pPIC9 上、下游引物之间序列长度与插入的目的片段长度之和) 两条扩增带, 与预期结果相符。

2.3 摇瓶诱导表达

Mut⁺、Mut^s 两种表型分别进行甲醇诱导表达, Mut⁺ 表达量略高 (数据未显示); Mut⁺ 重组菌进行大量诱导表达, 表达上清有很强的抑菌活性 (图 1):

Clare^[15]曾报道酸水解酪素能有效抑制目的表达蛋白被酵母自身所分泌的蛋白酶降解,为了提高抗菌肽 CM4 的表达量,防止其被酵母自身所分泌的蛋白酶降解,添加 1% 酸水解酪素于 BMMY 中,与未加酸水解酪素相比,能有效增加重组抗菌肽 CM4 表达量(数据未显示);同时对诱导时间进行优化,重组抗菌肽 CM4 表达量在甲醇诱导 36h 后达到最高值;诱导时间、菌湿重及抗菌活性之间关系见图 2。

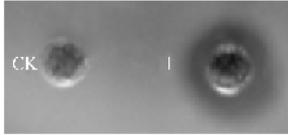


图 1 抑菌活性实验

Fig. 1 Antibacterial assay

CK. Control with no insert; 1. Positive recombinants induced 36h.

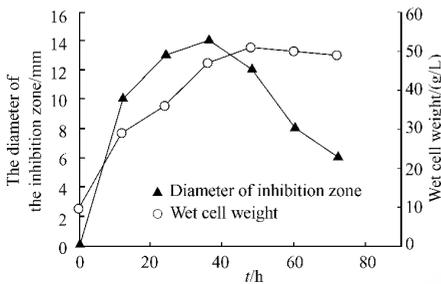


图 2 诱导时间、菌湿重及抗菌活性之间关系

Fig. 2 The relationship between the diameter of the inhibition zone and wet cell weight

2.4 Tricine-SDS-PAGE 及酸性聚丙烯酰胺活性电泳

抗菌肽 CM4 分子量只有 3.8kD,在常规 SDS-PAGE 系统中难以得到理想的分辨率,我们使用 Tricine-SDS-PAGE (16% Separating gel, 10% Spacer gel 4% Stacking gel),使得重组抗菌肽 CM4 得到较好的分离,Tricine-SDS-PAGE 结果显示:甲醇诱导表

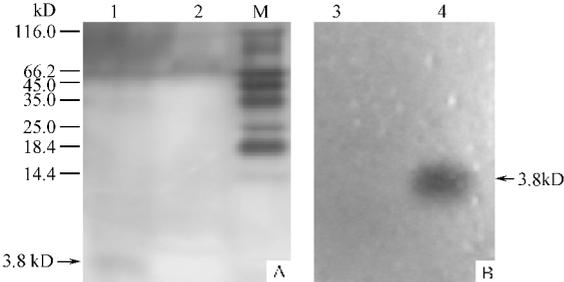


图 3 Tricine-SDS-PAGE (A) 和酸性聚丙烯酰胺活性电泳 (B) 图谱

Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE (A) and acid polyacrylamide gel electrophoresis (B)

M. Molecular mass marker; 1. Supernatant of positive recombinant induced; 2 and 3. Control with no insert; 4. Recombinant ABP-CM4.

达上清在 3.8kD 处出现一条带(图 3-A),与天然家蚕抗菌肽 CM4 分子量大小一致;酸性测活电泳结果,进一步说明重组抗菌肽 CM4 在毕赤酵母中成功地分泌表达(图 3-B)。

2.5 重组 CM4 抗真菌活性

如图 4 所示,加了重组抗菌肽 CM4 的孔有很明显的抑菌圈,这说明重组抗菌肽 CM4 对黑曲霉(*A. niger*)、绿色木霉(*T. viride*)都有很强的抑菌活性。

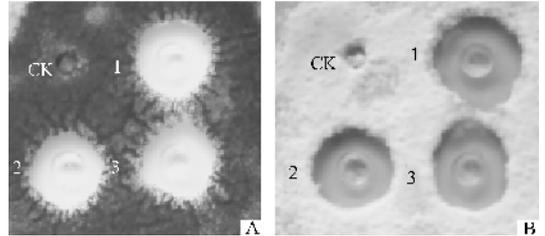


图 4 重组 CM4 对黑曲霉 (A) 绿色木霉 (B) 的作用

Fig. 4 (A) Assay of the recombinant ABP-CM4 on *A. niger*; (B) Assay of the recombinant ABP-CM4 on *T. viride*

CK: Control with no insert; 1~3. Recombinant ABP-CM4.

3 讨论

抗菌肽最早是在昆虫体内发现的,抗菌肽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,热稳定,水溶性好,无免疫原性,抗菌谱广等特点,并可以抑杀某些真菌、病毒及原虫,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,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 CM4 是从中国家蚕中提取的一种小分子多肽,只有 35 个氨基酸残基,抗菌谱广。

抗菌肽可望成为新一代的抗菌、抗病毒、抗癌药物,但天然抗菌肽的来源少,成本高,无法满足临床试用和基础研究的需要,而人工合成成本高,所以采用重组表达的方法可大量获得抗菌肽,以满足其抗菌作用机理研究及开发成一类新型抗菌药物。

近年来,以酵母菌为基因工程受体菌的研究日益受到人们的重视。尤其是甲醇营养酵母表达系统,该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(Acohol 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可达 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^[16-18]。

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 CM4 基因,并克隆到酵母分泌表达载体 pPIC9 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 CM4, BMMY 中添加 1% 酸水解酪素可有效防止目的蛋白的降解,表达上清煮沸 30min 后抗菌活性不变,在纯化过程中可先煮沸表达上清以去除大部分大分子杂质,便于后面重组抗菌肽 CM4 的纯化;另外,重组抗菌肽 CM4 同样具有很强的抗真菌活性,对黑曲霉 (*A. niger*)、绿色木霉 (*T. viride*) 等病原菌都有很强的杀伤作用。

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 CM4,为其大量生产开发成新型抗生素奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13 : 61 - 92.
- [2] Boman H G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 2003, 254 (3) : 197 - 215.
- [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] Diamond G. Nature's antibiotics: the potential of antimicrobial peptides as new drugs. *Biologist* (London), 2001, 48 (5) : 209 - 212.
- [5] Bals R. Antimicrobial peptides and peptide antibiotics. *Med Klin* (Munich), 2000, 95 (9) : 496 - 502.
- [6] 屠益增, 屈贤铭, 张双全. 蚕茧抗菌肽 CM2Ph1 等分离、纯化及其性质的研究. *中国科学*, B 辑, 1989, 32 (9) : 1072 - 1081.

- [7] 徐进暑, 张双全. 抗菌肽 CM4 组分对寄生曲霉抗性机制的研究. *自然科学进展*, 2001, 11 (12) : 1263 - 1267.
- [8] 张双全, 贾红武, 戴祝英. 抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的超微结构研究. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24 (2) : 159 - 163.
- [9] 王芳, 张双全, 戴祝英. 抗菌肽 CM4 组分对 K562 癌细胞染色质 DNA 断裂作用的 SCGE 研究. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25 (1) : 64 - 67.
- [10] Nozomi K, Tomoyas A, Hiroshi S, et al. Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm *Pseudaletia separate* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002, 25 : 416 - 425.
- [11] 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.
- [12] 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. *天津医药*, 2003, 31 (5) : 270 - 272.
- [13] Dan H, Ake E, Hans B. Insect Immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *Eur J Biochem*, 1982, 127 : 207 - 217.
- [14] Hermann S, Gebhard V J. Tricine-sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166 : 368 - 379.
- [15] Clare J J, Romanos M A, Rayment F B, et al. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991, 105 : 205 - 212.
- [16] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24 (1) : 45 - 66.
- [17] Koti S, Robert G B, Keith E K. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 1990 (1) : 55 - 62.
- [18] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, 16 (1) : 23 - 52.

Cloning, expression and characterization of antibacterial peptide CM4 in *Pichia pastoris*

ZHANG Jie WU Xi YUE Yuan-yuan CHEN Yu-qing ZHANG Shuang-quan*

(Jiangsu Province Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: To explore a new approach of expression of ABP-CM4 in methylotrophic yeast *P. pastoris*. The gene of ABP-CM4 was cloned into the vector pPIC9. The *Sac* I-linearized plasmid pPIC9-CM4 was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation. By means of MM and MD plates and PCR, the recombinant *P. pastoris* strains (his⁻ mut⁺) were obtained. Antibacterial assay, Tricine-SDS-PAGE and Polyarylamide Gel Electrophoresis demonstrated that ABP-CM4 was extracellularly expressed in *P. pastoris* with the induction of methanol. The recombinant ABP-CM4 has the antifungal activity on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*.

Key words: Antibacterial peptide CM4, *P. pastoris*, Expression, pPIC9, Fungus

Foundation item: National Natural Sciences Foundation of China (30271093)

* Corresponding author. Tel: 86-25-83598216, E-mail: zhangshuangquan@263.net

Received date: 01-06-2005