

# 一种新融合抗菌肽 Hex-Mag 基因的克隆、表达及其抗菌活性的研究

李桂平<sup>1,2</sup>, 陈仪本<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

(<sup>2</sup>广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

**摘 要** 通过在 Magainin1-1X(GIGKFLHSAKKF)的 N 端添加碱性氨基酸片段 Hexapeptide(RRWQWR)以增强其对细胞膜的吸附能力来提高 Magainin1-12 的抗菌活性。利用 Hexapeptide 和 Magainin1-12 的基因序列,结合酵母偏爱密码子设计出新的融合基因 Hex-Mag,通过重叠区扩增基因拼接法(Gene splicing by overlap extension, gene SOEing)利用 PCR 扩增出基因片段,再将融合基因进行酶切并纯化后导入穿梭质粒 pPIC9 中,构建受乙醇氧化酶 1 基因(AOX1)的启动子与转录终止区控制的酵母表达质粒,转化 GS115 毕赤酵母宿主菌,经表型筛选,阳性克隆用甲醇诱导表达。表达出的融合肽 Hex-Mag 分子量约 2.3kDa,其耐热性强,在 100℃条件下,其活性可维持 3h 以上。琼脂糖孔穴扩散法检测显示 Hex-Mag 对多种革兰氏阴性菌和阳性菌具有抑制活性,与 Magainin1-12 相比,其活性有明显增强,N 端正电荷增加的预期效应得到初步体现。

**关键词:** Hexapeptide(RRWQWR); Magainin1-12; 重叠区扩增基因拼接法; 融合肽 Hex-Mag

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0115-06

抗菌肽是生物体内经人工或自然诱导而产生的一种防御性多肽,自 Boman 从西哥罗佩蛾<sup>[1]</sup>中分离出具广谱抗菌活性的抗菌肽 Cecropin 后,在抗生素大量使用所引起的抗药性日益严重的形势下,全球掀起了一场研究抗菌肽的热潮,迄今已有近千种天然抗菌肽被分离出来([www.bbcm.univ.triest.it](http://www.bbcm.univ.triest.it)),但是天然抗菌肽的分离纯化过程烦琐且费用较高,另外多数抗菌肽的活性较弱难以达到应用的水平,有些抗菌肽还具有副作用。分子生物学的飞速发展对上述问题提供了有效的解决方法,利用重组 DNA 技术不仅可以改造天然抗菌肽得到新的抗菌肽种类,减弱或消除副作用,同时还可以通过转化、发酵得到大量的表达产物以实现工业化生产。基因工程在抗菌肽改造与应用研究方面的应用,国内外已积累了很多成功的经验:早在 1988 年,徐飞等<sup>[2]</sup>就设计、合成了抗菌肽 D 基因。随后李丹青等<sup>[3]</sup>将抗菌肽 D 基因导入根癌农杆菌并转化于番茄取得成功。1999 年 Dostoumieux 等<sup>[4]</sup>将 Pen-2 与 Pen-3 (penaeidins 的两种形式)的 cDNA 克隆于酵母穿梭载体 pTCA812 中进行了酿酒酵母表达,并利用 Edman 降解法等对重组的 Pen-2 与 Pen-3a 进行了鉴定,结果显示酵母表达适于功能性 penaeidins 的大规模生产,而且它们

的抗菌活性与其天然分子没有什么差别。赖玉平等<sup>[5]</sup>将从人汗腺中发现的抗菌肽 DCD-1L 基因克隆到毕赤酵母载体 pPIC9 中,并在毕赤酵母 GS115 中进行了表达。结果表明 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。Kyung-Soo Hahn 实验室<sup>[6-8]</sup>将 CecropinA1-8 与 Magainin1-12 融合在一起,得到了活性较好的融合肽,且发现了对其活性起关键作用的区域——Gly-Ile-Gly,位于 Magainin 氨基端的这一特殊区域在新的融合肽中起到了铰链的作用,便于整个肽链在 N 端的吸附和 C 端疏水作用过程中的构象变化。这一发现促进了抗菌肽结构功能学的研究,有利于抗菌肽的定向改造。目前抗菌肽作用的主要原理是通过带正电荷的 N 端与细胞质膜磷脂分子上的负电荷发生静电吸引,便于抗菌肽吸附在细胞膜表面,再通过疏水的 C 端破坏细胞膜,细胞内物质外漏导致细胞死亡<sup>[9,10]</sup>。在这一过程中 N 端所带的正电荷和位于两端连接处的铰链结构对细胞的破坏起着关键的作用,正电荷决定抗菌肽与细胞膜结合强度,铰链结构决定 C 端作用的自由度和有效度。本文通过在具有铰链结构“Gly-Ile-Gly”的 Magainin1-12 的 N 端连接上强碱性的六肽 RRWQWR

基金项目:广东省科技攻关项目(2003C104022)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87688142 E-mail: cheniyiben168@yahoo.com.cn

作者简介:李桂平(1980-)男,安徽当涂人,硕士研究生,主要从事抗菌新材料研究。E-mail: gplee1999@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-03-27 接受日期:2006-06-05 修回日期:2006-08-05

以增强其活性。利用 SOEing 法合成出了融合抗菌肽基因 Hex-Mag (GenBank Accession No. DQ440931) 并在毕赤酵母 (*Pichia pastoris* GS115) 中实现了稳定表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**质粒 pPIC9、毕赤酵母 (*Pichia pastoris* GS115) 由中山大学陆勇军教授惠赠;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、沙门伤寒菌 (*Salmonella typhi*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 均为广东省菌种保藏与应用重点实验室保存。

**1.1.2 主要试剂:**Taq 酶、dNTPs、限制性内切酶 (*Eco*R I、*Xho* I、*Bgl* II) 均购自北京赛百盛公司;T4 DNA 连接酶购自华美公司;PCR 产物纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒均购自深圳依诺金公司;甲叉双丙稀酰胺 (Fluka)、尿素、Tris、PMSF、丙稀酰胺、考马斯亮蓝 G-250 (MBCHEM)、蛋白质低分子量标准 (上海 Sangon) 均购自广州威佳公司。

**1.1.3 仪器:**恒温振荡培养箱 (FMC-1000, Japan)、隔水式恒温培养箱 (GHP-9160, China)、梯度 PCR 仪 (PTC-200, USA)、台式高速冷冻离心机 (Sigma3K30, Germany)、高效冷冻离心机 (Beckman Avanti J301, USA)、电泳仪 (EPS301, Sweden)、凝胶成像分析系统 (UV I, Britain)、核酸/蛋白分析仪 (DU640, USA)、冷冻真空干燥机 (LYPH-LOK 12L, USA)、超纯水器 (Millipore, USA)。

### 1.2 融合抗菌肽基因的构建与克隆

根据毕赤酵母基因翻译的偏爱密码子、抗菌肽 Hexapeptide (RRWQWR) 及 Magainin1 至 12 的氨基酸序列,设计得到待克隆的融合基因序列如下: AGAAGATGGCAATGGAGAGCTATTGGTAAATTTTTGC ATTCTGCTAAAAAATTT,在融合基因的两端分别加上  $\alpha$  信号肽裂解位点 Kex2 (AAA AGA) 以及终止子 (TAA) 的序列,结合质粒 pPIC9 的多克隆位点,在上述序列的两端分别添加酶切位点 *Xho* I (CCACTCGAG)、*Eco*R I (GAATTCGGT),根据以上所得的最终序列设计下列两条引物:Primer1 (HM1):5'-CCACTCGAGAAAAGAAGATGGCAATGGAGAGGTTTGGTAAATTTTTGCA-3';Primer2 (HM2):5'-ACCGAATTCTTAAATTTTTTAGCAGAATGCAAAAATTTACCA

ATACCTCTCC-3',引物由北京赛百盛公司合成, Magainin1-12 (GIGKFLHSAKKF) 的引物设计方法同上,文中省略的对照组 Magainin1-12 的实验步骤参照 Hex-Mag。

**梯度 PCR:**每管 20 $\mu$ L 反应体系,共计 6 管,将 60~75 $^{\circ}$ C 分 6 个梯度,10 $\times$  PCR buffer 2 $\mu$ L (20mmol/L Mg $^{2+}$ ),dNTP (10mmol/L) 0.4 $\mu$ L, Taq 酶 (5U/ $\mu$ L) 0.2 $\mu$ L,引物 HM1、引物 HM2 (10 $\mu$ mol/L) 各 1 $\mu$ L, ddH $_2$ O 15.4 $\mu$ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,60~75 $^{\circ}$ C 30s,75 $^{\circ}$ C 1min,45 个循环,75 $^{\circ}$ C 10min。

**PCR 合成基因:**采用重叠区扩增基因拼接法 (Gene splicing by overlap extension, geneSOEing)<sup>[11]</sup> 合成,100 $\mu$ L 反应体系 (各成分浓度同上):10 $\times$  PCR buffer 10 $\mu$ L, dNTP 2 $\mu$ L, Taq 酶 1 $\mu$ L, PrimerHM1 5 $\mu$ L, PrimerHM2 5 $\mu$ L, ddH $_2$ O 77 $\mu$ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s,70 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,45 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

### 1.3 重组酵母表达载体的构建

分别利用 *Eco*R I、*Xho* I 酶切融合基因 Hex-Mag 和质粒 pPIC9 酶切产物经琼脂糖电泳后切胶回收 (参照深圳依诺金公司胶回收试剂盒操作说明),17 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转入感受态细胞 DH5 $\alpha$  中培养备用。重组质粒命名为 pPIC9-HM (简称 P-HM),PCR 检测并送至上海博亚公司测序鉴定。将鉴定正确的重组表达质粒 pPIC9-HM 按照 eppendorf 仪器使用手册电击转入毕赤酵母,电转液 28 $^{\circ}$ C 摇床培养约 2h 后涂于 MD 选择性培养基 (1.34% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % 生物素,2% 葡萄糖,琼脂粉 2%) 上,30 $^{\circ}$ C 继续培养,观察 Mut $^+$  和 Mut $^*$ 。

参照剧海等<sup>[12]</sup>的方法利用煮-冻-煮方法制作重组酵母 PCR 模板,以  $\alpha$ -Factor 和 AOX1 为引物利用 PCR 方法检测重组酵母。

### 1.4 融合肽 Hex-Mag 在毕赤酵母中的诱导表达及活性测定

将筛选到的重组酵母菌 (简称 G-PH) 株转接入 40mL BMGY 培养液 (100mmol/L 磷酸钾缓冲液,1.34% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % 生物素,1% 甘油,酵母提取物 1%,蛋白胨 2%) 中,28 $^{\circ}$ C、280r/min 培养 17h,OD $_{600}$  达 2~6,收集 BMGY 培养菌液 (4000r/min,4 $^{\circ}$ C,5min),用 10mL BMMY (100mmol/L 磷酸钾缓冲液,1.34% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % 生物素,0.5% 甲醇,酵母提取物 1%,蛋白胨 2%) 培养液重悬,每 24h 取 1mL 表达上清备用,补加 1mL 5% 甲醇并补加培养液至 10mL 继续培养,用琼脂糖孔穴扩散法<sup>[13]</sup>测定,在含有适

量细菌(*S. aureus*)的琼脂培养基上打孔(孔径为4mm),每孔加20 $\mu$ L样品(样品为浓缩10倍的表达上清,下同),37 $^{\circ}$ C培养过夜10~15h,观察并测量抑菌圈。

### 1.5 融合肽 Hex-Mag 抗菌谱的测定

如1.4所示方法检测融合肽 Hex-Mag 对各种指示菌的抑菌活性,指示菌有:大肠杆菌(*E. coli*)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (*E. coli* DH5 $\alpha$ )、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)、沙门伤寒菌(*S. typhi*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)。

### 1.6 AU-PAGE 凝胶琼脂糖弥散法分析表达上清液

参照文献[14]所提供的方法将制作好的电泳胶沿中线切开,左右两侧分别上样,左侧为重组酵母 G-PH 浓缩发酵液、阴性对照(空质粒酵母)浓缩发酵液及分子量蛋白质标准,电泳后染色;右侧依次为重组酵母 G-PH 浓缩发酵液、阴性对照浓缩发酵液,电泳后先用10mmol/L PBS(pH7.4)缓冲液漂洗两次,每次20min,然后覆盖在含菌培养基上,37 $^{\circ}$ C孵育3h后取出电泳凝胶,在底层琼脂上倾倒一层LB培养基,37 $^{\circ}$ C培养10~15h,观察结果。

### 1.7 融合肽 Hex-Mag 耐热性测定

**1.7.1 活性与温度关系:**取出100 $\mu$ L样品6管,分别于50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C热处理15min后离心(12000r/min,4 $^{\circ}$ C,1min),取上清液作抗菌实验。

**1.7.2 活性与煮沸时间关系:**取出100 $\mu$ L样品6管,分别于100 $^{\circ}$ C热处理5min、10min、30min、60min、100min、150min、200min后离心(12000r/min,4 $^{\circ}$ C,1min),取上清作抗菌实验。

### 1.8 表达条件优化

**1.8.1 表达量与时间:**分别取12h、24h、36h、48h、60h、72h时的BMMY发酵液离心,取上清冻干浓缩10倍后,利用琼脂糖孔穴扩散法作抗菌实验,37 $^{\circ}$ C培养10~15h,测定抑菌圈直径。

**1.8.2 表达量与pH:**分别利用磷酸和氢氧化钾调节10mL BMMY培养液的pH至4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8,接入经BMYG培养至 $OD_{600} = 5.5$ 的酵母转化子G-PH6,28 $^{\circ}$ C培养48h后测定抗菌活性。

**1.8.3 表达量与甲醇浓度:**分别在10mL BMMY培养液中加入终浓度为0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%的甲醇,接入经BMYG培养至 $OD_{600} = 5.5$ 的酵母转化子G-PH6,28 $^{\circ}$ C培养48h后测定抗菌活性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增结果

为了得到高效表达的融合基因,选择毕赤酵母偏爱密码子设计出融合基因 Hex-Mag 的两条引物。由于两条引物的 $T_m$ 值都较高(70 $^{\circ}$ C左右),因此选择较高的退火温度来扩增,为了得到合适的退火温度,先做一个60~75 $^{\circ}$ C的梯度PCR,结果显示退火温度在60~70 $^{\circ}$ C之间时,产物量基本没有变化,选择70 $^{\circ}$ C作为最佳退火温度,既得到较高浓度的产物又没有单引物二聚体。扩增产物(大小为81bp)经2%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。

### 2.2 重组质粒构建及鉴定

将纯化的PCR产物及质粒pPIC9分别经EcoRI和XhoI双酶切,回收并连接后转入感受态细胞DH5 $\alpha$ 中,以所得的转化质粒为模板,分别以 $\alpha$ -Factor和HM2、HM1和AOX1为引物作PCR验证重组质粒的正确性,空质粒为模板作阴性对照,以转化质粒为模板的PCR产物分别在约120bp和200bp处有清晰的条带,推算结果( $\alpha$ -Factor位点与AOX1位点相距195bp)显示载体中加入了约70bp的外源片段,大小约相当于目的片段,而空质粒则没有相应条带,进一步测序结果显示目的片段成功克隆到载体中。

### 2.3 重组酵母鉴定和表达

为了获得较高的转化效率和拷贝数,采用电击转化法将经过BglII线性化的重组表达质粒pPIC9-HM转化感受态细胞*Pichia pastoris* GS115,通过MD板鉴定表型,约70%的菌株为Mut $^+$ 。转化酵母G-PH通过PCR方法检测,文献[12]显示煮沸冷冻法在快速提取酵母DNA中效果较好,本文利用该方法所得到的转化酵母总DNA作为模板扩增得到了清晰的目的条带,以 $\alpha$ -Factor和AOX1为引物的PCR结果显示含融合基因 Hex-Mag 的重组质粒片段成功的转入了毕赤酵母中。融合肽 Hex-Mag 与对照组 Magainin1-12 的表达水平相当,约260mg/L Hex-Mag 为253mg/L, Magainin1-12 为268mg/L。

### 2.4 抑菌活性及抗菌谱

融合肽 Hex-Mag 对多种细菌表现出较好的抑菌活性,且活性明显比Magainin1-12强(图1和表1),Hex-Mag 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有明显的抑菌活性,其中对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的活性最为明显,其10倍浓缩表达上清的抑菌圈直径可达10mm以上。

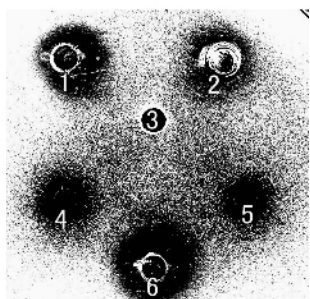


图1 Hex-Mag 及 Magainin1-12 对金黄色葡萄球菌( *S. aureus* )的抑菌效果

Fig.1 The results of antibacterial experiment of Hex-Mag and Mag1-12 to *S. aureus* . 1 and 2. The supernatant of Hex-Mag ; 3. Negative control ; 4 and 5. The supernatant of Magainin1-12 ; 6. AMP control( 10 $\mu$ g/mL ).

表1 Hex-Mag 及 Magainin1-12 对几种细菌的抑制效果

Table 1 Antibacterial activities of Hex-Mag and Magainin1-12 to several kinds of bacteria

Indicator strains	Width of inhibition zone/mm	
	Hex-Mag	Magainin1-12
<i>E. coli</i>	11	7
<i>E. coli</i> DH5	12	9
<i>S. aureus</i>	13	10
<i>S. epidermidis</i>	11	6
<i>S. pneumoniae</i>	6	7
<i>S. typhi</i>	10	7
<i>P. aeruginosa</i>	9	0

2.5 AU-PAGE 凝胶琼脂糖弥散法分析

由于 Hex-Mag 的分子量较小( 2300Da ),所以分辨率不太理想,在 2300Da 附近出现了一个比较明显

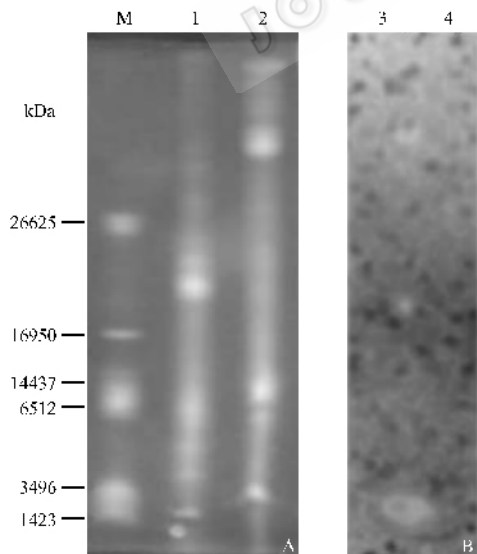


图2 融合肽 Hex-Mag 电泳分析及其电泳凝胶琼脂糖弥散法抗菌活性检测

Fig.2 AU-PAGE of Hex-Mag. A :The results of AU-PAGE ; B :The results of antibacterial experiments by over lay technique. M. Marker ; 1. The supernatant of Hex-Mag ; 2. The supernatant of negative control ; 3. The antibacterial results of supernatant of Hex-Mag ; 4. The antibacterial results of supernatant of negative control.

但有些弥散的带( 图 2 ),电泳凝胶琼脂糖弥散法检测结果显示与该条带对应的培养基上出现抑菌斑,而对照没有,可初步确定该条带为目的条带,即融合肽 Hex-Mag 获得表达。

2.6 融合抗菌肽 Hex-Mag 的耐热性

实验结果见图 3,不同温度热处理后抗菌实验显示其活性无明显差异,表明融合肽 Hex-Mag 的抗菌活性在 100 $^{\circ}$ C 的温度内其活性比较稳定。用 100 $^{\circ}$ C 煮沸处理不同时间,100min 后活性开始降低但降幅不大,进一步证明融合抗菌肽 Hex-Mag 具有较强的耐热性。

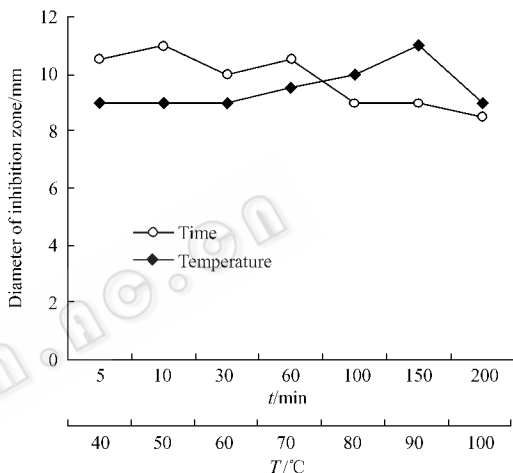


图3 耐热性测定

Fig.3 Detection of the heat tolerance.

2.7 表达量与时间、pH 值、甲醇浓度的关系

2.7.1 表达量与时间的关系:在保持各培养条件相同的情况下,融合肽的表达量(通过抑菌圈直径间接反映)与时间的关系曲线走势与重组酵母的生长曲

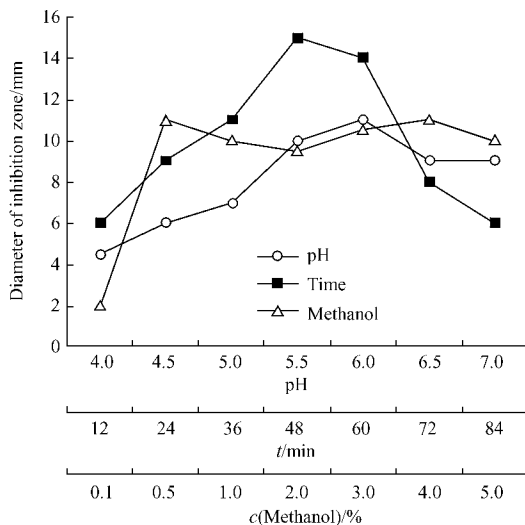


图4 反应条件优化结果

线相似,约 50h 后表达量达到最大,随后开始降低(图 4)。

2.7.2 表达量与 pH 值的关系 约在 pH 值为 6 时活性最强,其原因可能是在酸性和碱性条件下其表达均受到抑制(图 4)。

2.7.3 表达量与甲醇浓度的关系:在甲醇浓度达到 0.5% 时其表达量基本达到最大,数据显示甲醇浓度在 0.5% 与 5% 时产物活性变化不大,因此 0.5% 的甲醇浓度可以视作最适的诱导浓度(图 4)。

### 3 讨论

Hexapeptide 是一类六肽,文中用来特指序列为 RRWQWR 的一种,此段序列是牛乳铁传递蛋白 Lactoferrin 中的一段,具有广谱抗菌活性<sup>[15]</sup>,不仅对细菌、真菌有活性,对病毒和癌细胞也有较好的活性。抗菌肽杀菌的第一步即是通过其 N 端氨基酸所带的正电荷与细胞膜上磷脂所带负电荷作用从而吸附到细胞膜上进一步作用,Hexapeptide (RRWQWR) 是一个强碱性的肽段,肽链中有 3 个精氨酸,2 个色氨酸,都带正电荷,将其连接在 Magainin1-12 的 N 端在于增强后者对细胞膜的吸附作用,从而提高其抗菌活性。Magainin 是从非洲爪蟾的皮肤中分离得到的<sup>[16]</sup>,它不仅作用于革兰氏阳性菌和阴性菌,还能作用于原生动植物,目前它已被美国马盖宁制药公司设计改造成对病毒和肿瘤细胞均有较好杀伤作用的新肽 MAI278 并已运用于临床。Magainin 由于其良好的活性、独特的结构以及较为成熟的研究背景而成为抗菌肽分子改造领域的常用对象,文中以 Magainin 为例从增加 N 端正电荷入手来改造抗菌肽,以期得到活性增强的新肽。目前抗菌肽的毒副作用,如免疫原性尚不清楚,考虑到未来的应用,文中只选择了 Magainin 的 N 端 12 个氨基酸作为研究对象,以减弱其可能的免疫原性。

由于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)兼具原核表达系统的高表达量和真核表达系统可进行蛋白翻译后修饰、加工及折叠的优点,文中的表达宿主选择了毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)。基因工程在改造抗菌肽及推广应用方面取得了巨大的成就,但目前抗菌肽尚不能替代抗生素普及应用,这其中主要问题之一是:不论在微生物中表达,还是在植物、昆虫中表达,表达量都偏低,这严重制约了抗菌肽的产业化发展。抗菌肽的产业化发展,必须降低其使用成本,今后抗菌肽药物的来源将主要通过微生物发酵来获得,因此需要建立高效的表达体系和廉价、快

速的纯化系统。影响外源基因表达水平的因素很多,密码子的选择是影响表达量的重要因素之一,为了提高抗菌肽在毕赤酵母中的表达效率,文中对 Magainin1-12 和 Hexa-peptide 基因进行了密码子优化,采用酵母偏爱密码子进行了基因合成。另外天然 N 端对抗菌肽的生物活性起着决定性作用,为了保证所表达的抗菌肽具有天然 N 端,在抗菌肽基因的 N 端加上  $\alpha$  信号肽 Kex 裂解酶识别序列。文中采用 SOE 技术,即重叠区扩增基因拼接法<sup>[17,18]</sup>对抗菌肽基因进行密码子优化及合成。重叠区的最适长度目前尚无定论,一般以所合成引物长度的三分之一为宜。引物总长度,以其  $T_m$  值来计算,应控制在 50bp 左右为宜。重叠区一般至少有 15~20bp,引物总长度为 50bp 左右。实验中,除了常规优化方法外,还引入了降落 PCR 技术,在最佳条件下获得了 Hex-Mag 抗菌肽基因。

通过上述改造步骤,最终构建并获得了融合抗菌肽 Hex-Mag 的酵母高效分泌表达菌株。抗菌活性测定结果显示,改造后的 Magainin1-12 即 Hex-Mag 的抗菌活性明显强于对照组 Magainin1-12。另外文中还对重组酵母的发酵条件进行了初步优化,结果显示在 pH 为 6 的 BMMY 培养液中 0.5% 甲醇诱导约 50h 后获得的表达产物活性最强,即表达量最大。

### 参 考 文 献

- [1] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 1980, **106**: 7-16.
- [2] 徐飞,施文,王启松,等. 柞蚕抗菌肽 D 基因的合成. 科学通报, 1988, **21**: 1656-1659.
- [3] 李丹青,徐飞,黄自然,等. 人工合成柞蚕抗菌肽 D 基因转入根癌农杆菌. 蚕业科学, 1990, **16**(2): 110-112.
- [4] Dostoumieux D, Bulet P, Strub JM. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem*, 1999, **266**(2): 335-346.
- [5] 赖玉平,彭沂非,郁正艳,等. DCD. 1L 在毕赤酵母中的克隆和表达. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(2): 61-65.
- [6] Song Yub Shin, Joo Hyun Kang, So Yun Jang, et al. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, **1643**(2): 209-218.
- [7] Shin SY, Lee MK, Kim KL, et al. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J*

- [ 8 ] Shin SY, Kang JH, Lee MK, *et al.* Cecropin A-magainin 2 hybrid peptides having potent antimicrobial activity with low hemolytic effect. *Biochem Mol Biol Int*, 1998 **44**( 6 ):1119 – 1126.
- [ 9 ] Wieprecht T, Apostolov O, Beveridge TJ, *et al.* Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa :Thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry*, 2000, **39** :442 – 452.
- [ 10 ] Shai Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides . *Trends Biochem Sci*, 1995, **20** :460 – 464.
- [ 11 ] Kim HS, Smithies O. Recombinant fragment assay for gene targeting based on the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1988 **16** :8887 – 8903.
- [ 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 ] 李秀兰, 戴祝英, 张双全. 抗菌肽琼脂糖孔穴扩散法与比浊法测活比较及其相关性. *南京师范大学学报( 自然科学版 )*, 1998 **21**( 2 ) 81 – 83.
- [ 14 ] Lehrer RI, Roseman M, Haarwig SSL, *et al.* Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial peptides. *J Immuno Meth*, 1991, **137** ( 2 ):167 – 172.
- [ 15 ] Vogle HJ, Schibli JD, Jing W, *et al.* Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan and arginine containing peptides. *Biochem Cell Biol*, 2002, **80** :49 – 63.
- [ 16 ] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin : isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** :5449 – 5453.
- [ 17 ] Ho S, Horton R, Hunt H. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, **77** :51 – 59.
- [ 18 ] Horton R, Hunt H, Ho S. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes : gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, **77** :61 – 68.

## Cloning, expression and characterization of a new hybrid AMP gene of Hex-Mag

LI Gui-ping<sup>1, 2</sup>, CHEN Yi-ben<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301, China)

(<sup>2</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**Abstract** :To enhance the antibacterial ability of Magainin1-12, its N side was joined with an alkaline peptide named Hexapeptide( RRWQWR ), which would make Magainin1-12 cling to the membrane of bacterial cells even tighter. According to the partiality codon of *Pichia pastoris*, a new hybrid antibacterial peptide Hex-Mag was designed based on the sequence of Hexapeptide and Magainin( 1-12 ). Synthesized through gene splicing by overlap extension, the hybrid gene was cloned into pPIC9 to construct the expression vector pPIC9-HM. After restriction enzyme analysis and purification, the pPIC9-HM was transformed into *Pichia pastoris* GS115. And the positive clones screened by the phenotype were induced by methanol. After optimized the requirements for the flask-shaking culture fermentation, the hybrid antibacterial peptide was expressed on high level. The new peptide, which has a weight of 2.3kDa, could remain its inhibition activity after treating for more than 3 hours in boiled water. Detected by agrose diffusion assay, Hex-Mag showed its broad-spectrum antibacterial abilities not only to Gram-negative bacteria but also to Gram-positive bacteria. The function of additive positive charges were testified by the antibacterial experiments, and the results showed the activity of Hex-Mag was stronger than that of Magainin1-12 obviously.

**Keywords** : Hexapeptide( RRWQWR ); Magainin1-12 ; SOEing ; Fusion peptide Hex-Mag