

杂合抗菌肽 CecA-Mag 的人工合成及其在 *Pichia pastoris* 中的分泌表达

王秀青 苏春霞 周 斌 曹瑞兵 陈溥言*

(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)

摘 要 根据抗菌肽天蚕素 A (cecropinA, CA) N 端第 1~7 个氨基酸残基, 马盖宁 (magainin, M) N 端第 2~12 个氨基酸残基, 以毕赤酵母偏爱的密码子设计合成了杂合肽 CA(1~7)-M(2~12) 基因, 同载体 pPICZ α -A 连接后转化 *Pichia pastoris* 受体菌 SMD1168, 在醇氧化酶 (AOX) 启动子调控下, 分子量约 1.9kDa 的 CecA-Mag 杂合抗菌肽获得表达。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。初步抑菌活性测定, 显示该杂合肽对金黄色葡萄球菌、耐氨苄青霉素的大肠杆菌及枯草芽孢杆菌有良好的抑杀活性。酸稳定实验显示 pH 为 3.2 时仍具有相当高的活性。热稳定性实验显示该杂合肽 100℃ 加热 5min 后仍具有抑菌活性。这些特点使得重组抗菌肽 CecA-mag 在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-Mag; *Pichia pastoris*; 分泌表达; 抑菌活性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0075-04

抗菌肽是昆虫体内一类起重要免疫作用的多肽^[1,2]。天蚕素 A 是较早从惜古比天蚕中分离的抗菌肽, 具有广谱的杀菌能力, 耐高温且对真核细胞无毒副作用^[3-5]。其 N 端碱性很强, 形成双亲 α 螺旋结构, N 端序列对于其活性具有重要作用。由于抗菌肽 A 由 37 个氨基酸残基组成, 在体内应用时能引起免疫反应等问题, 所以它不是发展为药物的理想候选者。一些其他种类的抗菌肽如蛙皮素、防卫素和蜂毒素等, 它们不是结构过于复杂, 就是抗菌能力不足, 或者对真核细胞有毒性。Magainin 是从非洲瓜蟾中发现的含有 21~27 个氨基酸的一大类碱性无半胱氨酸的抗菌肽。具有广谱抗性、亲水脂特性, 有较低的溶血活性, 不同于裂解肽 Melittin 和 Bombinin, 后者具有高效的细胞溶血作用。微摩尔浓度的 Magainin 能杀死革兰氏阳性细菌、阴性细菌、真菌和原生动物, 甚至真核的肿瘤细胞。但其不伤害体细胞或红细胞^[6-8]。Magainin 家族肽由于氨基酸数目少, 具抗菌活性, 当人类感染细菌、真菌或原虫后, 可能具备治疗疾病的潜力, 目前运用基因工程的方法合成 Magainin 已进入临床 3 期试验阶段。因此, 探寻一些长度显著缩短但仍具广谱抗菌活性且对人体无害的多肽就成了人们努力的目标。在抗生素广泛使用且导致越来越多抗性病菌泛滥的今天, 构建一种活性高的抗菌肽不失为一种新的抗菌药物的研究发展对象。

为了能够避免在体内应用时引起免疫反应和增强其杀菌活性, 选用了 CecropinA 的 N 端作为杂合肽

的 N 端 Magainin 杂合, 杂合后可减小 Magainin 的溶血活性。鉴于以上考虑, 本工作构建 CecropinA、Magainin [CA(1~7)-MA(2~12)] 的杂合肽基因, 并克隆到 *Pichia pastoris* 的表达载体 pPICZ α -A 中, 在 *Pichia pastoris* 中进行了表达, 同时对表达产物进行了初步的活性测定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 转化用 *Escherichia coli* DH5 α 、毕赤氏巴斯德酵母 *Pichia pastoris*、受体菌 SMD1168 (His/Mut⁺), 由南京农业大学传染病组保存; 表达载体 pPICZ α -A 购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂: 高保真的 pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTP、限制性内切工具酶购于 TaKaRa 公司; Tricine 购于上海生工生物工程公司; SDS-PAGE 超低分子量 Marker (C6210) 购于 Sigma 公司; Zeocin 购于 Invitrogen 公司; 其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 杂合抗菌肽 CecA-Mag 基因的合成

根据 GenBank 中 CecropinA 成熟肽段 (1~7) 以及 Magainin (2~12) 的氨基酸序列 (GenBank 上的序列号分别为 X06672 和 J03193), 选用酵母偏爱密码子设计 CecA-Mag 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-Mag 杂合抗菌肽具有天然 N 端。设计两个引物片段 F1 和 F2, 扩增改造后的 CecA-Mag 杂合抗菌肽基因。

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

作者简介: 王秀青 (1979-), 女, 内蒙古凉城县人, 博士生, 研究方向为分子病毒学与分子免疫学。E-mail: xiuqingwang1979@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-06-05; 接受日期: 2006-07-10; 修回日期: 2006-10-12

F1: 5'-CCTCTCGAGAAAAGACAAGGCGAAGCTTGTCA
GTAAGCTAGGTCCAGGTAAG-3'; F2: 5'-CTATCTAGA
GAACTTGGTGCACCTGTGTACGAACCTTTACTGATCCGAT
CTTCTT-3'。两个引物的 3'端有 21 个碱基的互补
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,
SOE)^[9]。CecA-Mag 杂合肽基因 5'和 3'端分别引入
Xho I、*Xba* I 内切酶位点,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-Mag 基因区,引物扩增长度为 406bp。P1: 5'-
GTCTCCACATTGTATGCTTC-3'; P2: 5'-CTGTGCAGG
AACTTGAT-3', F1、F2、P1 和 P2 均由 Invitrogen 上海
分公司合成。

应用 SOE 法,以 F1 和 F2 片段互为模板互为引
物进行 PCR 扩增,合成 CecA-Mag 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)^[10] PCR 技术对 PCR 进行优化。TD-
PCR 反应体系(50 μ L):10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ free)
5 μ L, MgCl₂(25mmol/L) 3 μ L, dNTP(10mmol/L) 1 μ L;
F1、F2 40pmol/L 各 2 μ L, TaKaRa Ex TaqTM 0.5 μ L, 灭
菌超纯水 38.5 μ L。混匀并瞬间离心,进行 TD-PCR。
PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 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 52 $^{\circ}$ C 的条件下进行 15
个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 6min。取 TD-PCR 产物 10 μ L,
1.5% 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

PCR 产物和 pPICZ α -A 均用 *Xho* I、*Xba* I 双酶
切,T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化 *E. coli*
DH5 α 重组表达质粒进行 PCR、缺失酶切位点鉴定,
其具体操作见参考文献 [11]。PCR 以及酶切鉴定为
阳性的质粒送 Invitrogen 上海分公司测序。构建正
确的重组表达质粒命名为 pPICZ α -CA。

1.4 SMD1168 (His/Mut⁺) 及 Mut⁺ 转化子的筛选 和鉴定

感受态 *Pichia pastoris* SMD1168 (His/Mut⁺)
(80 μ L)与 *Sac* I 线性化 pPICZ α -CA(5 μ g)相混合,转
移至预冷的 0.2cm 电转杯(Bio-Rad)中,置冰上
5min,1.5kV、25 μ F、200 Ω 电击,立即加入 1mL 预冷的
1mol/L 山梨醇,取 200 μ L 涂布于 YPDS 平板上,30 $^{\circ}$ C
培养至单菌落出现。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 P1、P2 为引
物,反应体系同上,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C
45s,48 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 45s,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 6min。以能
扩增出 406bp 的克隆定为阳性转化子。

1.5 重组 *P. pastoris* 菌在摇瓶中的诱导表达

将筛选到的阳性酵母菌接种到 5mL BMGY 中,
30 $^{\circ}$ C、230r/min 振荡培养约 22h 至 OD₆₀₀ 达到 3~6;
室温 3000r/min 离心 2min,收集菌体重悬于 25mL
BMMY 培养基,进行诱导表达。28 $^{\circ}$ C、250r/min 培养
60h,期间每 24h 补加终浓度为 1%(V/V)的甲醇。
72h 后,5000r/min 离心 10min。收集培养液上清,进
行抑菌活性测定。

1.6 Tricine-SDS-PAGE

具体操作步骤参照文献 [13] 进行。

1.7 重组杂合肽的初步抗菌活性测定

采用标准琼脂孔穴扩散法,以金黄色葡萄球菌
(Cowan I)、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌为实验菌株,将
供试菌悬浮液(OD₆₀₀ = 0.2~0.3)200 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,用
灭过菌的打孔器(直径 5mm)打孔,孔中滴加 20 μ L 待
测的表达上清,37 $^{\circ}$ C 培养过夜(8~12h),以同体积的
pPICZ α -A 空载体转化酵母的上清做为阴性对照,
Amp 为阳性对照,第 2 天测量抑菌直径。

1.8 酸性处理

参照文献 [13] 的方法,配制 pH2.5~8.5 的缓冲
液,取 20 μ L 表达上清,分别加入 20 μ L 不同 pH 值的
缓冲液,以不加抗菌肽的不同 pH 值缓冲液为对照,
进行抑菌试验,方法同 1.7。

1.9 温度处理

对表达的上清液在 60、80、100 $^{\circ}$ C 各处理 5min,
12000r/min 离心 10min 去除沉淀,取上清进行抑菌试
验,方法同 1.7。

1.10 重组杂合肽抗菌谱的完善

供试验的主要菌株均由天津瑞普生物制药公司
提供,分别为标准株:大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡
萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus*
subtilis)、短小杆菌(*Curtobacterium*)、八叠球菌
(*Sporosarcina*)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella*
pullorum)等,临床上分别从山东、吉林、天津、南京分
离到的耐氨苄青霉素的大肠杆菌共 15 株,实验方法
同 1.7。

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

所设计的杂合肽氨基酸残基完全一致,测序结果显示,改造后的杂合肽 CecA-Mag 基因,已正确插入表达载体的 Kex2 蛋白酶裂解位点之后,测序工作由 Invitrogen 上海分公司完成。最终合成的杂合肽的氨基酸序列为 KWKLFKIKFLHSAKKFN(不包括在构建载体时加入的酶切位点的序列)。

2.2 杂合肽 cecA-mag 的 Tricine-SDS-PAGE

杂合肽 CecA-mag 在 Tricine-SDS-PAGE 体系中得到了较好的分离效果,在大约 1.9kDa 处出现了特异条带,而对照空载体 SMD1168/pPICZ α -A 没有出现任何条带,说明杂合肽在 SMD1168 中得以表达(图 1)。

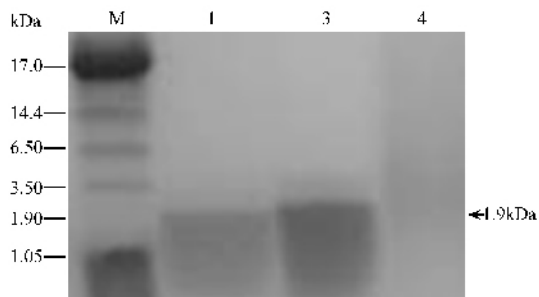


图 1 抗菌肽 CecA-mag 的 Tricine-SDS-PAGE

Fig.1 The tricine-SDS-PAGE of the antibacterial peptide CecA-mag. M. Ultra-low molecular weight markers for proteins; 1, 2. The culture supernatant of SMD1168/pPICZ α -CA; 3. The supernatant of SMD1168/pPICZ α -A.

2.3 重组杂合肽 CecA-Mag 初步抗菌活性测定

试验结果显示,杂合肽 CecA-Mag 对 *E. coli* DH5 α 、金黄色葡萄球菌以及枯草芽孢杆菌等菌株均有良好的抑杀作用,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达 23.4mm,对耐氨苄青霉素的大肠杆菌有良好的抑菌活性(图 2-A、B)。

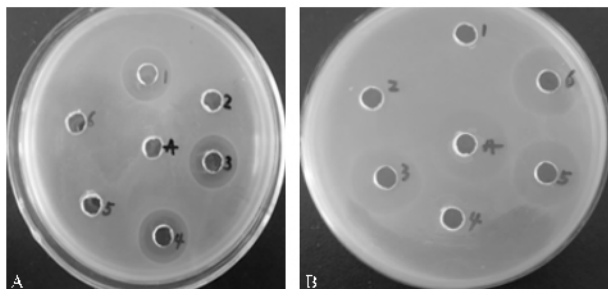


图 2 重组抗菌肽对耐药的大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的抑菌活性

Fig.2 Detection of the antibacterial activity of cecA-mag against *E. coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B). A: Amp control (25 μ g/mL); A: 1, 3. Supernate of antibacterial peptides cecA-mag; 2, 5, 6. The control of supernate of *Pichia pastoris* SMD1168/pPICZ α -A. B: 1, 2. A. The control of supernate of *Pichia pastoris* SMD1168/pPICZ α -A; 3, 5, 6. Supernate of antibacterial peptides cecA-mag.

2.4 酸性环境对抗菌活性的影响

该杂合肽在 pH 为 4 时活性最高, pH 为 3.5 ~ 7.5 时抑菌直径较原来无明显的变化, pH 8.5 时随着 pH 值增高抑菌直径逐渐减小,说明此杂合肽在酸性环境较稳定,高 pH 对其抗菌性有抑制作用(图 3-A)。

2.5 温度对杂合肽抑菌活性的影响

对表达的上清液 60、80、100 $^{\circ}$ C 各处理 5min, 12000r/min 离心 10min 去除沉淀,取上清,再按实验方法 1.7 所述进行抑菌试验,同时以 pPICZ α -A 空载体转化酵母的表达上清和未处理过的杂合肽 CecA-Mag 做对照。进行抑菌试验,结果如图所示,60 $^{\circ}$ C 以下温度处理 5min 对抗菌活性没有影响,而随着温度的升高,活性有明显的降低(图 3-B)。酸碱稳定性和热稳定性实验均是 3 次实验结果的平均值。

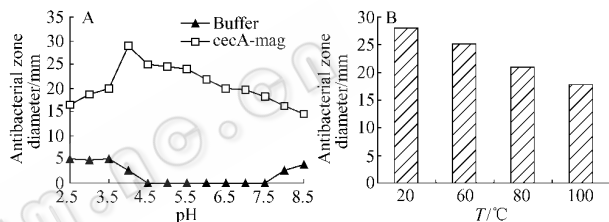


图 3 重组杂合肽 CecA-mag 的酸碱稳定性(A)和热稳定性(B)

Fig.3 The antibacterial activity of CecA-mag affected by different pH (A) and different temperature (B).

2.6 重组杂合肽的抗菌谱

重组杂合肽采用标准琼脂孔穴扩散法测定其活性,结果显示杂合肽对多种 G^{+} 、 G^{-} 均具有良好的抑菌作用,尤其对临床上分离到的多株对氨苄青霉素有抗性的大肠杆菌有很好的活性。

表 1 杂合抗菌肽 Cec-Mag 的抗菌谱

Table 1 The antibacterial spectrum of hybrid antimicrobial peptide Cec-Mag

Indicator strains	Antibacterial activity
<i>E. coli</i>	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++++
<i>Bacillus subtilis</i>	++++
<i>Salmonella pullorum</i>	+++
<i>E. coli</i> DH5 α	++++
<i>E. coli</i> BL21	++++
<i>Sporosarcina</i>	++++
<i>Curtobacterium</i>	++++
<i>E. coli</i> (ampicillin resistant come from Shandong)	++++
<i>E. coli</i> (ampicillin resistant come from Jilin)	++++
<i>E. coli</i> (ampicillin resistant come from Tianjin)	++++
<i>E. coli</i> (ampicillin resistant come from Hebei)	++++

3 讨论

在原核系统中直接表达,又由于分子量较小,一般采用融合表达或在酵母中表达。作为真核表达系统,毕赤酵母表达外源基因具有许多其他蛋白表达系统所不具备的优点,概括如下(1)酵母是真核生物,毒性比细菌小。(2)酵母繁殖速度快,营养要求低,培养基廉价,便于工业化生产。(3)高稳定性,该系统的载体能和核基因组进行整合,所以构建的菌株稳定,一般不会出现外源基因随生长繁殖而丢失的现象。(4)作为真核表达系统,可对表达的蛋白进行翻译后的加工和修饰,使表达的蛋白质获得正确的折叠和N-末端加工,从而使表达出的蛋白具有生物活性。(5)在毕赤酵母中表达的蛋白既可存在于胞内,又可分泌至胞外。毕赤酵母自身分泌的蛋白(背景蛋白)非常少,十分有利于纯化,介于我们所表达的杂合抗菌肽的特殊性,所以选择了毕赤酵母表达系统,此外本研究所选择的毕赤酵母受体菌SMD1168是蛋白酶缺陷型,可降低蛋白酶对外源蛋白的降解作用,可以延长所分泌的蛋白质的保存时间。

从以上的试验结果看出,本研究所合成的杂合肽对一些常规耐药的致病菌株均有明显的抑制和杀灭作用,抗生素耐受问题已经严重威胁到人类的健康。解除耐药菌对人类日益严重的威胁已经是一个相当迫切的问题,然而在解决广谱耐药细菌这一问题上,常规抗生素的局限性越来越明显,而抗菌肽则是一类很有前途的有望替代传统抗生素或作为其候选药物的生物分子。其次在酸碱稳定性方面,该杂合肽在酸性环境中具有最佳的活性,能够耐受胃肠道的酸性环境,使其在消化道内不至于降解或者降低活性,为成为饲料添加剂以及生物制药奠定一定的基础。此外本研究中研制的杂合肽在100℃加热5min后依然保持一定的活性,可以耐受温度的变

化,有利于进行药物的研制和开发。由于现用的众多抗生素中,几乎没有一个不产生耐药性的,此外在畜牧业饲料添加剂的选择中,该杂合肽显示了无与伦比的优越性。

参 考 文 献

- [1] Hultmark D, Steiner H, Rasmusson T, et al. Insect immunity purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 1980, **100**(1): 7-16.
- [2] Boman HG, Hultmark D. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol*, 1987, **41**: 103-126.
- [3] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, **29**(4): 246-268.
- [4] Boman HG, Hultmark D. Cell free immunity in insects. *Ann Rev Microbiol*, 1987, **41**: 103-126.
- [5] 唐白辉,屈贤铭.昆虫体液免疫中抗菌肽的研究.生物化学与生物物理进展,1986, **11**(3): 8-12.
- [6] Zasloff M. Magainins: a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(15): 5449-5453.
- [7] Zasloff M, Martin B, Chen HC. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(3): 910-913.
- [8] Jacob L, Zasloff M. Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp*, 1994, **186**: 197-223.
- [9] Horton R, Hunt H, HoS Pullen JK. Engineering hybrid gene without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, **77**(1): 61-68.
- [10] 王天云,张贵星,薛乐勋,等.一种简便高效的改良降落PCR.中国生物工程杂志,2003, **23**(11): 80-82.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南.第二版.金冬燕,黎孟枫译.北京:科学出版社,1987.
- [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] 武汉大学主编.分析化学.北京:高等教育出版社,1995, 73-81.
- [14] 王远程,左晓峰,孙东旭,等.家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质.微生物学报,1997, **37**(2): 148-153.

Synthesis of hybrid antimicrobial peptide CecA-mag gene and its secretion expression in *Pichia pastoris*

WANG Xiu-qing, SU Chun-xia, ZHOU Bin, CAO Rui-bing, CHEN Pu-yan*

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

Abstract: According to the partiality codon of *Pichia pastoris*, hybrid antimicrobial peptide CecA-mag gene was synthesized and cloned into pPICZα-A to construct the recombinant expression vector pPICZα-A-CA. The *Sac*I-linearized plasmid pPICZα-A-CA was transformed into *P. pastoris* SMD1168 by electroporation. Under the control of the promoter AOX₁ (alcohol oxidase), an approximately 1.9kDa cecA-mag protein was expressed. Antibacterial assays demonstrated that cecA-mag had broad spectrum of antimicrobial property against Gram-positive as well as Gram-negative bacteria especially showed potent antibacterial activity against ampicillin resistant bacteria, such as pathogenic *E. coli*. In addition, the hybrid antibacterial peptide showed an extreme heat stable and acid stable characteristic. These results suggest that the *P. pastoris* expression system can be used to produce large quantities of fully functional cecA-mag for both research and industrial purpose. Based on these characteristics, the recombinant antibacterial peptide cecA-mag displays application foreground in the field of prevention of disease, and can be used as additives of animal feedstuff and so on.

Keywords: Hybrid antimicrobial peptide CecA-mag; *Pichia pastoris*; Secretion expression; Antibacterial activity

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

Received 5 June 2006/Accepted 10 July 2006/Revised 12 October 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>