



牛乳铁蛋白 N-叶在毕赤氏酵母中的高效表达及抑菌性

赵慧婷, 李利宏, 张荣珍*, 徐岩

江南大学生物工程学院教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

赵慧婷, 李利宏, 张荣珍, 徐岩. 牛乳铁蛋白 N-叶在毕赤氏酵母中的高效表达及抑菌性. 微生物学报, 2022, 62(4): 1425–1437.

Zhao Huiting, Li Lihong, Zhang Rongzhen, Xu Yan. High expression of bovine lactoferrin N-lobe in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1425–1437.

摘要:【目的】本研究将牛乳铁蛋白的 N-叶(BLF-N)克隆至毕赤氏酵母菌基因组中, 通过密码子优化和发酵条件优化, 实现 BLF-N 的异源高效表达, 研究重组 BLF-N 的抑菌功能。【方法】本文以 *BLF* 基因为模板, 按照毕赤氏酵母的密码子偏好性进行密码子优化, 构建重组表达载体 pPIC9K-UBLF-N, 电击转化到 *Pichia pastoris* GS115 中, 获得重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N。通过高拷贝策略和发酵条件优化, 结合 SDS-PAGE 分析 BLF-N 蛋白表达情况, 研究重组的 BLF-N 蛋白对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的抑菌活性。【结果】SDS-PAGE 结果表明, BLF-N 在 *P. pastoris* GS115 中实现了可溶性高效表达, 分子量为 37 kDa 左右, 与其理论分子量一致。通过高拷贝筛选, 获得了在 3 mg/mL 遗传霉素 G418 抗性平板上生长的转化子; 通过发酵条件优化, 获得最优蛋白表达条件为: 0.2% (V/V) 甲醇添加量、30 °C、pH 5.0, 在此条件下, 重组 BLF-N 的表达量为 50.5 mg/L。抑菌实验结果表明, 重组 BLF-N 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有较强的抑菌活性, 且重组 BLF-N 较商业 BLF 抑菌活性更高。【结论】通过蛋白表达和发酵条件优化策略, 本研究成功实现了 BLF-N 在毕赤氏酵母中的高效表达, 且重组 BLF-N 的抑菌活性较 BLF 显著提升。该研究为牛乳铁蛋白的高效绿色制备及产业化生产奠定了研究基础, 同时为后续研究 BLF 和 BLF-N 的结构-功能关系差异提供了理论指导。

关键词: 牛乳铁蛋白 N-叶; 毕赤氏酵母; 可溶性表达; 抑菌功能

基金项目: 国家自然科学基金(31970045); 国家轻工技术与工程双一流学科项目(LITE2018-12); 高校学科人才引进计划(111-2-06); 江苏省高等学校拔尖学科项目

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970045), by the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-12), by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06) and by the Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions

*Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 19 July 2021; Revised: 13 September 2021; Published online: 29 September 2021

High expression of bovine lactoferrin N-lobe in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity

ZHAO Huiting, LI Lihong, ZHANG Rongzhen*, XU Yan

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] We cloned the bovine lactoferrin N-lobe (BLF-N) into the genome of *Pichia pastoris* and enabled the heterologous expression of BLF-N through the optimization of its gene codon and fermentation conditions. Furthermore, we studied the antibacterial activity of the recombinant protein. [Methods] With *BLF* gene as template, *BLF-N* gene was optimized according to the codon bias of *P. pastoris*. On this basis, the recombinant expression vector pPIC9K-UBLF-N was constructed and transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation to yield the recombinant *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N. Through high-copy screening and optimization of fermentation conditions, BLF-N expression was improved and then evaluated by SDS-PAGE. The inhibition of the recombinant BLF-N on Gram-positive and Gram-negative bacteria was explored. [Results] SDS-PAGE results showed the efficient soluble expression of BLF-N with molecular weight of about 37 kDa (consistent with the theoretical molecular weight) in *P. pastoris* GS115. A transformant resistant to 3 mg/mL genomycin G418 was obtained through high-copy screening. The highest recombinant BLF-N yield (50.5 mg/L) was achieved under the following optimized fermentation conditions: 0.2% (V/V) methanol, 30 °C, and pH 5.0. Recombinant BLF-N demonstrated strong inhibition on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and higher antibacterial activity than commercial BLF. [Conclusion] Through high-copy screening and optimization of fermentation conditions, we achieved the efficient expression of BLF-N in *P. pastoris* and the recombinant BLF-N presented significantly higher antibacterial activity than the commercial BLF. This study lays a foundation for the efficient and green preparation and industrial production of BLF-N and provides theoretical guidance for research on the difference in structure-function relationship between BLF and BLF-N.

Keywords: bovine lactoferrin N-lobe; *Pichia pastoris*; soluble expression; antibacterial function

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)(EC 1.16.3.1), 是转铁蛋白家族中一种天然的、具有多种生理功能的铁结合糖蛋白, 是哺乳动物非特异性免疫和获得性免疫反应重要的介导分子^[1]。乳铁蛋白主要由乳腺上皮细胞表达和分泌, 在乳汁中含量较高, 同时存在于一些分泌物中, 如泪液、唾液、汗液等^[2], 另外还有少量存在于粘膜表面和多形核白细胞的一些颗粒中。乳铁蛋白具有多种生物功能, 可以促进人体对铁的吸收^[3], 同时具有广谱的抗菌、抗病毒能力, 还可以抗真

菌、消炎, 在抗肿瘤方面也有显著的治疗潜力^[4-6]。因此乳铁蛋白在食品、饲料添加剂、化妆品和医药行业中均有广阔的应用前景^[7-8]。

根据来源不同, 乳铁蛋白可分为人乳铁蛋白(HLF)、牛乳铁蛋白(BLF)、羊乳铁蛋白(OLF)和猪乳铁蛋白(PLF)等。人乳中的乳铁蛋白含量最为丰富, 其中人初乳的乳铁蛋白含量高于 5 g/L, 成熟母乳的乳铁蛋白含量为 2-3 g/L^[9]。牛乳是最为丰富的奶源, 但是牛初乳的乳铁蛋白含量约为 0.8 g/L^[10], 成熟牛乳的含量仅有 0.03-0.49 g/L^[11]。

牛乳铁蛋白是一种单链多肽糖蛋白, 分子质量约 80 kDa。成熟蛋白由 689 个氨基酸组成, 空间结构包括 2 个叶状结构, 即 N-叶和 C-叶, 其中 N-叶为 1–333 氨基酸残基, 具有杀菌和与肝素结合的功能; C-叶为 345–689 氨基酸残基, 主要执行肝细胞结合和内化功能; 残基 334–344 组成一个 α -螺旋, 连接 N-叶和 C-叶^[12]。

目前商品化牛乳铁蛋白主要从牛乳中提取, 效率低且成本较高, 因此通过构建基因工程安全菌来生产乳铁蛋白, 逐渐成为食品行业中的一个研究热点。但是由于乳铁蛋白来源于大型哺乳动物, 它的异源表达遇到了很大的困难。自 1990 年, Powell 和 Ogden^[13]、Rey 等^[14]分别发表了人乳铁蛋白的部分基因和 cDNA 序列后, 研究者相继在哺乳动物、昆虫、植物、细菌等系统中表达乳铁蛋白基因, 但是蛋白表达水平均很低。近年来, 随着转基因技术的迅猛发展, 乳铁蛋白异源表达的宿主越来越多元化, 表达量也有了一定的提升。

García-Montoya 等^[15]在大肠杆菌中表达了具有抗菌活性的牛乳铁蛋白; Kim 等^[16]在 *Rhodococcus erythropolis* 中表达、纯化并表征了牛乳铁蛋白 C-叶的抑菌特性; Jin 等^[17]在枯草芽孢杆菌中获得了具有抗菌活性的牛乳铁蛋白 N-叶。用原核宿主细胞表达牛乳铁蛋白, 一方面, 有些宿主本身会产生毒素, 如大肠杆菌

产生肠毒素, 不符合食品安全规范; 另一方面, 乳铁蛋白是糖基化蛋白, 而原核宿主细胞无法完成蛋白后续的加工和修饰。真核系统的毕赤氏酵母作为表达宿主, 具有翻译后折叠修饰、加工、糖基化等功能, 利于乳铁蛋白的功能性表达, 因而引起了学者的广泛研究。Jiang 等^[18]在毕赤氏酵母中成功地获得了重组人乳铁蛋白; Li 等^[19]从西藏羊乳腺组织中获得了乳铁蛋白基因, 并在毕赤氏酵母中成功表达; Iglesias-Figueroa 等^[20]在毕赤氏酵母 KM71-H 中高效表达了牛乳铁蛋白, 蛋白产量高达 3.5 g/L, 而且对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌都有较高的抑制活性。

本研究以 pPIC9K 为表达载体, 以毕赤氏酵母 GS115 为宿主菌, 对牛乳铁蛋白的 N-叶进行功能表达。通过密码子优化、高拷贝筛选和发酵条件优化等策略提高目的蛋白的表达量, 研究重组蛋白的抑菌活性, 为牛乳铁蛋白 N-叶的异源表达和产业化生产提供理论指导, 同时为后续基于结构-功能关系研究乳铁蛋白及其 N-叶的功能差异奠定较坚实的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用到的菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Descriptions	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	Host for cloning gene	This lab
<i>P. pastoris</i> GS115	Host for gene expression	This lab
<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9K-BLF-N	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-BLF-N	This study
<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9K-UBLF-N	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-UBLF-N	This study
Plasmids		
pPIC9K	Plasmid for gene expression	This lab
pPIC9K-BLFN	pPIC9K containing BLF-N	This study
pPIC9K-UBLF-N	pPIC9K containing UBLF-N	This study

本研究所用的引物如表 2 所示。

1.1.2 主要的试剂和仪器

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、限制性核酸内切酶、DL 2000 DNA Marker、Premixed Protein Marker (Low)均购自 TaKaRa 生物有限公司；单片段同源重组试剂盒、质粒提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；无氨基酵母氮源(YNB)培养基、遗传霉素(G418)购自北京索莱宝科技有限公司；5 mm 玻璃珠购自 Sigma-Aldrich 公司；其余试剂均为国产分析纯。电转化仪购自 Eppendorf 公司；PCR 仪、GelDoc 凝胶成像仪、电泳仪均购自 Bio-Rad 公司；AKTA purifier 蛋白纯化仪和镍离子亲和层析柱购自美国 GE 公司。

1.1.3 主要培养基

生长培养基 LB：酵母提取物 0.5%，蛋白胨 1.0%，NaCl 1.0%；YPD：酵母提取物 1.0%，蛋白胨 2.0%，葡萄糖 2.0%；选择培养基 MD (固体)：葡萄糖 20.0 g/L，琼脂 20.0 g/L，YNB 13.4 g/L，生物素 0.4 mg/L；发酵培养基 BMGY：酵母提取物 1.0%，蛋白胨 2.0%，YNB 1.34%，生物素 4.0×10^{-5} %，甘油 1.0% (V/V)，100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0；BMMY：酵母提取物 1.0%，蛋白胨 2.0%，YNB 1.34%，生物素 4.0×10^{-5} %，甲醇 0.5% (V/V)，100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0。

1.2 目的基因的扩增

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中

调取牛乳铁蛋白的基因序列(NCBI 数据库基因登录号为 JX294418.1)，委托天霖生物科技有限公司合成。选取 N 叶部分(编码第 1–333 位氨基酸)进行 PCR 扩增，获得目的基因 *BLF-N*。扩增条件为：98 °C 预变性 30 s；98 °C 变性 10 s，55 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 25 s，30 个循环；72 °C 延伸 10 min。PCR 结束之后，进行核酸凝胶电泳验证。

1.3 重组表达载体的构建

PCR 获得的 *BLF-N* 基因进行纯化，表达载体 pPIC9K 进行 *SnaB* I 和 *Not* I 双酶切之后纯化。利用单片段同源重组酶，将目的基因与酶切后的线性载体在 37 °C 连接 30 min。连接后的重组质粒 pPIC9K-BLF-N 转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞，经 PCR 验证后送天霖生物科技有限公司测序验证，获得重组表达载体 pPIC9K-BLF-N。根据 *P. pastoris* 密码子使用频率表对 *BLF-N* 基因进行密码子优化，委托天霖生物科技有限公司合成密码子优化基因 *UBLF-N*，按上述方法构建重组表达载体 pPIC9K-UBLF-N。

1.4 重组载体电转毕赤氏酵母

pPIC9K-BLF-N 和 pPIC9K-UBLF-N 分别用限制性核酸内切酶 *Sac* I 进行线性化后，电转 *P. pastoris* GS115 感受态细胞，毕赤氏酵母感受态的制备方法参照 Invitrogen 公司的《毕赤酵母表达操作手册》。电转后的细胞置于 30 °C 温育 1–2 h，涂布 MD 平板，30 °C 培养 3 d，至长出较大的菌落。

表 2 本研究中所需的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'→3')	Application
BLF-N-F	AGAGAGGCTGAAGCTTACGTAATGGCCCCCTCGTAAGAACGT	Amplify the target gene
BLF-N-R	AAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAATGGTGGTGATGATGGTGC	
UBLF-N-F	AGAGAGGCTGAAGCTTACGTAATGGCTCCTAGAAAGAATGTGAGAT	Amplify the target gene
UBLF-N-R	AAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAATGGTGGTGATGATGGTGC	
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Identification of positive clones
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	

1.5 重组酵母菌阳性转化子的鉴定

从 MD 平板上筛选得到的 His⁺ 转化子中挑取 10 个单克隆, 接入 YPD 培养基中过夜培养, 采取“煮-冻-煮”的方法提取基因组, 以 AOX1 为引物进行 PCR, 鉴定 pPIC9K-BLF-N、pPIC9K-UBLF-N 是否整合入酵母的基因组中。

1.6 诱导表达及鉴定

挑取经鉴定为阳性的转化子, 接种至 BMGY 培养基中, 在 30 °C、250 r/min 的条件下, 培养 18 h 至 OD₆₀₀ 为 4-5。室温 4 000×g 离心 10 min, 弃上清, 用 BMMY 培养基重悬细胞至 OD₆₀₀ 为 1。之后在 28 °C、250 r/min 的条件下进行诱导表达, 每 24 h 补加终浓度为 0.5% (V/V) 的甲醇, 总诱导时间为 96 h。收集培养好的细胞, 通过 SDS-PAGE 检测细胞破碎上清和沉淀中蛋白的表达情况。

1.7 细胞破碎

取 1 mL 菌液离心, 弃上清, 加入 100 μL 裂解液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mmol/L EDTA-2Na, 5% (V/V) 甘油, pH 7.4) 进行悬浮。悬浮细胞之后加入等量的酸洗玻璃珠(0.5 mm), 涡旋 30 s, 冰上孵育 30 s, 重复 8 次。将破碎后的细胞液于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 将上清转移至离心管中, 取细胞破碎上清和细胞碎片进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 蛋白纯化

收集菌体, 进行细胞破碎, 破碎液于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 水系滤膜。利用镍离子亲和层析柱对 BLF-N 进行纯化, 纯化得到的样品进行 SDS-PAGE, 使用 Gelpro Analyzer 软件分析纯化蛋白的纯度。

1.9 高拷贝的筛选

吸取 1-2 mL 灭菌水于电转后的 MD 平板上, 用灭菌刮子重悬 His⁺ 转化子, 将细胞悬液集中转移至离心管中, 涡旋(5-10 s), 测定其浓

度(1 OD₆₀₀ 约 5×10⁷ 细胞/mL)。在含有遗传霉素为 0、0.25、0.5、1.0、1.5、1.75、2.0、3.0、4.0 mg/mL 的 YPD 平板上分别涂 10⁵ 细胞, 30 °C 孵育平板。

1.10 发酵条件的优化

对高拷贝菌株进行发酵条件的优化, 包括甲醇添加量、诱导温度和 pH 值。甲醇添加量的优化: 每 24 h 添加甲醇至终浓度为 0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、1.5% (V/V), 发酵 96 h 之后, 取细胞破碎上清进行 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况, 纯化之后计算蛋白表达量。在最适甲醇添加量的条件下, 进行诱导温度的优化, 设置温度为 20、24、28、30 °C, 发酵 96 h 之后, 分析不同诱导温度对蛋白表达的影响。在最适甲醇添加量和诱导温度的条件下, 对 pH 进行优化, 设置磷酸钾缓冲液的 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0, 发酵 96 h 之后, 分析蛋白表达情况。

1.11 抑菌活性分析

利用琼脂扩散法检测获得的重组牛乳铁蛋白 N-叶(BLF-N)的抑菌效果。从 *E. coli* JM109、*Staphylococcus aureus* CGMCC1.282 平板上分别挑取单克隆至 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 生长 12 h 后, 分别吸取 1 mL 菌液加入到 200 mL 降温至 50-60 °C 的固体 LB 培养基中, 混匀。在培养皿中先倒入下层培养基, 待冷却后, 将灭菌的牛津杯(8 mm×6 mm×10 mm)立于培养基上, 再倒入上层固体培养基, 将牛津杯固定于培养基中。在不同的牛津杯中加入 100 μL ddH₂O (阴性对照), 100 μL 0.1 mg/mL 的氨苄青霉素 (阳性对照) 和 100 μL 1 mg/mL 纯化之后的 BLF-N, 37 °C 培养 16 h 后观察是否产生抑菌圈。

参考 Bai 等^[21]的抑菌实验方法, 对商业牛乳铁蛋白(BLF)和获得的重组牛乳铁蛋白 N-叶(BLF-N)进行抑菌效果的比较。从 *E. coli* JM109、*S. aureus* CGMCC1.282 平板上分别挑

取单克隆至 LB 液体培养基中，培养至对数生长期，以接种量 1% 接种至新的 LB 培养基中。不含任何抑菌物质的培养基为阴性对照，其他培养基分别含有 1 mg/mL BLF、1 mg/mL BLF-N 和 0.1 mg/mL 氨苄青霉素(阳性对照)。混合物在 37 °C 培养 8 h，每隔 1 h 测定 OD_{600} 评估菌的生长情况，以此来测定牛乳铁蛋白的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 BLF-N 密码子优化

根据毕赤氏酵母密码子的偏好性(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)^[22]以及序列的 GC 含量分布，将原始编码密码子 GCC 替换成 GCT，CGT→AGA，AAC→AAT，GTT→GTA，TGC→TGT，ACA→ACC，ATC→ATT，AGT→TCC，CAG→CAA，GAG→GAA，AAA→AAG，GGC→GGT，TTT→TTC，CTT→TTG，CAC→CAT，CCT→CCA。BLF-N 密码子优化前后的序列比对结果如图 1 所示。

2.2 重组毕赤氏酵母体系的构建

按照 1.2.2 中方法进行重组表达载体 pPIC9K-BLF-N 的构建，以质粒为模板，PCR 扩增目的基因进行验证，1 000 bp 处出现一条清晰条带，与目的片段理论分子大小一致(包含 6×His，1 023 bp)，将验证为阳性的重组质粒送天霖生物科技有限公司测序验证。优化后的 UBLF-N 基因由天霖生物科技有限公司合成后，按照相同的方法进行构建，重组质粒命名为 pPIC9K-UBLF-N。

将构建成功的表达载体 pPIC9K-BLF-N、pPIC9K-UBLF-N 分别电转化入 *P. pastoris* GS115，30 °C 培养 3 d，至长出较大的菌落后，从 MD 平板上，挑取 10 个单克隆。30 °C 培养 16 h 后，提取基因组，以此为模板，以 AOX1 为引物进行 PCR 扩增，以未转化入毕赤氏酵母的质粒为对照，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证，结果如图 2 和图 3 所示。图 2 中泳道 1-5、8 在 1 500 bp 处出现条带，与目的基因 1 504 bp 大

```

ATC GCC CCT CGT AAG AAC GTT CGC TGG TGC ACA ATC AGT CAG CCT GAG TGG TTT AAG TGC CGT CGI TGG CAG TGG CGC ATG AAA AAA ATT G GGC GCC CCA TCT ATT
GCT AGA AAT GTG AGA TGT ACC AIT TCC CAA GAA TGT AGA AGA CAA AGA AAG GGT GCT TCC
ACG TGC GTC CGC CGC GCC TTT GCT CTT GAG TGC ATC CGT GCG ATC GCT GAA AAG AAG GCA GAT GCA GTA ACC TTA GAT GGG GGC ATG GTT TTC GAA GCT GGG
ACT TGT GTT AGA AGAGCT TTC TTG GAATGTATTAGAGCT AIT GCAGAGAAAAA GCT GCT GTT ACT TTG GGT GGT TTT GAG GGT
CGT GAC CCT TAT AAG TTG CGT CCG GTAGCA GCA GAG ATT TAT GGT ACA AAG GAG TCG CCG CAG ACA CAT TAC TAC GCG GTT GCT GTG GTC AAA AAA GGA AGC
AGA GAT CCA TTA AGACCA GTGGCT GCT GAAATA GAACT AAAGAATCT CCACAACT CAC TAT GCT GTT GTA AAG GGT TCC
AAC TTT CAACTT GAC CAA CTT CAG GGA CGC AAA TCT TGC CAC ACT GGG TTA GGG CGT TCC GCA GGC TGG ATC ATC CCA ATG GGG ATT TTA CGC CCT TAT CTG AGC
AAT TTG CAG TTG CAAGGT AGAAAG TCC TGT GGA CTG GGT AGATCT GCT GGT ATT ATT GGA ATC TTG AGACCATAC TTG TCC
TGG ACG CAG TCT TTA GAA CCG CTG CAAGCC GCT GTG GCA AAA TTT TTT TCG GCC TCT TGC GTA CCT TGT AIT GAT CGT CAA GCT TAT CCG AAC TTG TGT CAATTA
ACT GAATCATTG CCT GGT GTC GCT TTC TCC GCT TGT GTT AGACAG GCC CCT AAT CTG TGC TTG
TGT AAA GGC GAG GGA GAG AAC CAG TGT GCA TGT AGT TCT CGC GAA CCG TAC TTT GGG TAT AGCGGAGCA TTC AAG TGC CTG CAAGAC GGG CGC GGC GAT GTA
AAG GGT GAA GGT GAA CAA GCT TCA AGA CCA TTC GGT TCC GCC TTT TGT TTA GGT GCT GGT GTT
GCC TTC GTG AAG GAA ACA CTG GTT TTT GAG AAT CTG CCG GAG AAA GCT GAT CGT GAT CAG TAT GAA CTT TTG TGT TTA AAC AAC TCG CGT GCA CCT GTT GAC GCA
GCT GTT ACT GAAAAC TTG CCT GAAAAG AGA CAA GAG TTACTT CTT AAT TCT AGG GCT CCA GAT GCT
TTT AAA GAA TGT CAC TTG GCA CAA GTA CCC AGT CAT GCC GTC GTA GCA CGT AGC GTA GAT GGT AAG GAAGAC CTT ATC TGG AAA CTG CTG TCG AAG GCC CAG
AAG GAG CAT CTT GCT GTT CCA TCT GCT GTT GTT GCT AGA TCT GGAAAA GAT TTG TTG TTG TCT AAAGCACAA
GAG AAG TTT GGAAAA AAT AAG AGT CGT TCT TTT CAG CTT TTC GGT TCA CCG CCT GGACAG CGC GAC TTG CTG TTT AAA GAT TCT GCC CTT GGATTC CTT CGC ATT
GAA AAG TCT AGG TCA CAATTG TCT CCA GGT CAA AGA TTG AAG AGC GCT TTG TTT TTG CGT ATC
CCG TCAAAA GTA GAT TCT GCT CTT TAC TTG GGA AGT CGC TAC CTT ACA ACA CTG AAG AAC CTT CGC GAG TAA
CCA AAG GTT TCC TTA GGT TCT AGA ACT ACC TTG TTG AGA

```

图 1 BLF-N 密码子优化前后的序列比对

Figure 1 Sequence alignment of BLF-N before and after codon optimization.

小一致, 同时出现约 2 200 bp 的条带, 与甲醇脱氢酶 AOX1 基因的条带大小一致, 表明这几个克隆为 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N 阳性转化子, 且为甲醇利用型 Mut⁺。图 3 中泳道 2-6、9 为 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 阳性转化子, 甲醇利用型为 Mut⁺。

2.3 BLF-N 和 UBLF-N 在 *P. pastoris* GS115 的表达与纯化

挑取经 PCR 鉴定为阳性克隆(图 2)的 6 个重组酵母转化子单克隆, 分别接入不同的 BMGY 培养基中生长至 OD₆₀₀ 值为 4-5, 收集菌体转入 BMMY 培养基进行诱导表达, 诱导



图 2 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N 转化子 PCR 鉴定

Figure 2 PCR identification of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N transformants. M: DL 2000 DNA marker; lane 1-10: *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N transformants genome PCR; lane 11: plasmid pPIC9K-BLF-N as template PCR.



图 3 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 转化子 PCR 鉴定

Figure 3 PCR identification of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N transformants. M: DL 2000 DNA marker; lane 1-10: *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N transformants genome PCR; lane 11: plasmid pPIC9K-UBLF-N as template PCR.

96 h, 每 24 h 取样进行 SDS-PAGE 分析。6 个转化子的表达量差异较大, SDS-PAGE 结果表明只有 1 个转化子看到有明显的表达条带(图 4A), 其他转化子未发现明显的表达条带, 可能原

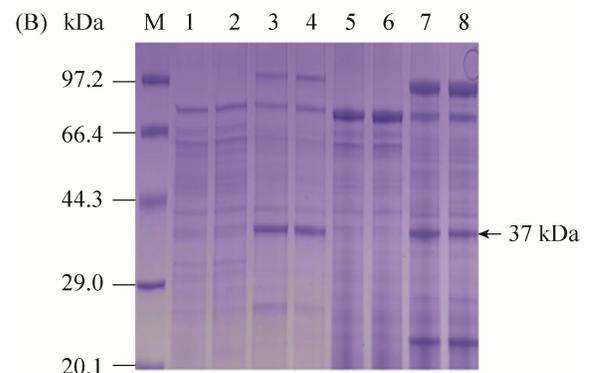
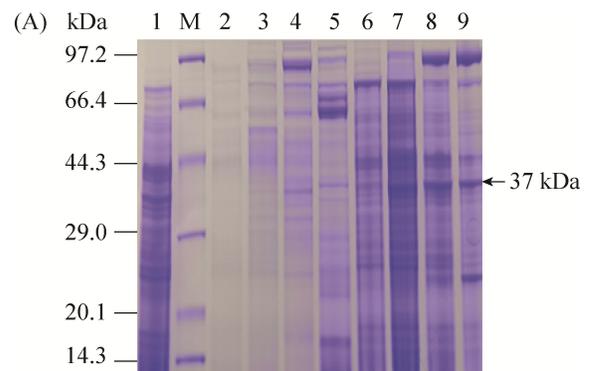


图 4 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N 在毕赤氏酵母中的表达结果

Figure 4 Expression of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N in *P. pastoris*. A: M: molecular weight marker; lane 1: the whole-cells of *P. pastoris* GS115/pPIC9K; lane 2-5: the fermentation supernatant of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N at 24, 48, 72 and 96 h; lane 6-9: the whole-cells of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N at 24, 48, 72 and 96 h. B: M: molecular weight marker; lane 1 and 2: the cell-free extracts of *P. pastoris* GS115/pPIC9K; lane 3 and 4: the cell-free extracts of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N; lane 5 and 6: the sediments of *P. pastoris* GS115/pPIC9K; lane 7 and 8: the sediments of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N.

因是不同的转化子含有的基因拷贝数不相同^[23]。图 4A 结果表明, 随着发酵时间增加至 48 h 后, 细胞中有明显的表达条带, 大小为 37 kDa, 与牛乳铁蛋白 N-叶的理论分子量大小一致, 但对照 *P. pastoris* GS115/pPIC9K 细胞在 37 kDa 附近也有条带。取细胞破碎上清和沉淀再次进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4B 所示, *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N 发酵 96 h 的细胞破碎之后, 上清在 37 kDa 处有明显的目的条带, 而 *P. pastoris* GS115/pPIC9K 细胞破碎上清在 37 kDa 处条带不明显, 说明 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N 在细胞中实现了可溶性表达, 蛋白表达量约为 10.3 mg/L。

根据毕赤氏酵母密码子的偏好性, 对 *BLF-N* 基因进行了优化。重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 的表达结果如图 5A 所示, 发酵 48 h 时, 目的蛋白(37 kDa)开始表达, 随着发酵时间的延长, 在 72、96 h 时蛋白条带逐渐变粗, 说明蛋白逐渐积累。在细胞破碎上

清中也观察到 37 kDa 处有明显的表达条带(图 5B), 与目的条带大小一致, 说明 BLF-N 在 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 中也实现了可溶性表达。与密码子优化前的重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-BLF-N 相比较, BLF-N 在密码子优化后的重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 中的表达条带更粗, 说明密码子优化能够提高蛋白表达量^[22]。BLF-N 在 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 中表达量约为 25.2 mg/L。

采用 Ni²⁺柱亲和层析的方法, 对 N 端带有 6×His 标签的目的蛋白进行纯化。纯化结果表明, 在 300 mmol/L 咪唑浓度下, 目标蛋白被洗脱。SDS-PAGE 分析结果如图 6 所示, 在 37 kDa 处有纯度较高的目的条带, 分析得出 BLF-N 的纯度为 91.3%。

2.4 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 的高拷贝筛选

将电转后 MD 平板上长出的 His⁺转化子转

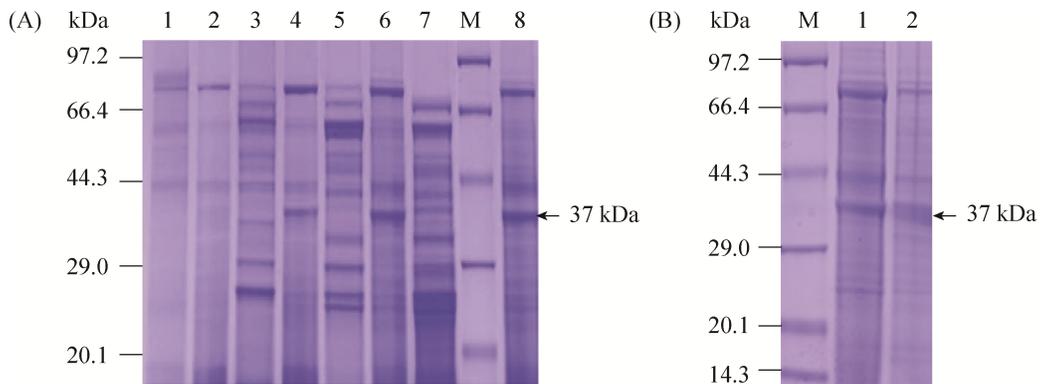


图 5 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 在毕赤氏酵母中的表达结果

Figure 5 Expression of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N in *P. pastoris*. A: fermentation supernatant and whole cell results at different induction times. M: molecular weight marker; lane 1, 3, 5 and 7: the fermentation supernatant of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N at 24, 48, 72 and 96 h; lane 2, 4, 6 and 8: the whole-cells of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N at 24, 48, 72 and 96 h. B: lane M: molecular weight marker; lane 1 and 2: the cell-free extracts and sediments of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N at 96 h.

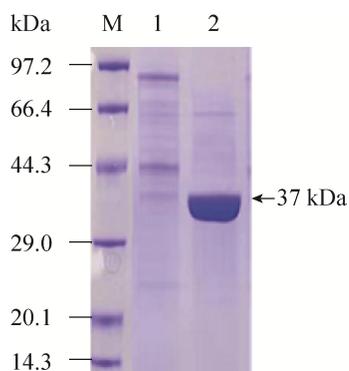


图 6 从 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 6 SDS-PAGE analysis of the purified *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N. Lane M: molecular weight marker; lane 1: flow-through solution; lane 2: the washed elution by 300 mmol/L imidazole.

涂至 YPD-G418 平板, 生长 2-7 d, 结果如图 7 所示。图中 YPD-G418 平板的 G418 浓度从左至右依次为 0、0.25、0.5、1.0、1.5、1.75、2.0、3.0 mg/mL, 大于 G418 浓度 3.0 mg/mL 的转化子未能筛选到。将抗 3.0 mg/mL G418 的 3 个转化子, 分别在 28 °C、250 r/min、0.5% (V/V) 甲醇添加量、pH 6.0 的条件下进行发酵表达, 发酵 96 h 后, 将细胞破碎, 取细胞破碎上清和破碎沉淀, 进行 SDS-PAGE。结果如图 8 所示, No.1、No.2、No.3 转化子细胞破碎上清在 37 kDa 处都有目的条带, No.2 转化子条带更粗, 表达量约为 30.5 mg/L, 选取该菌株进行后续的发酵条件的优化。

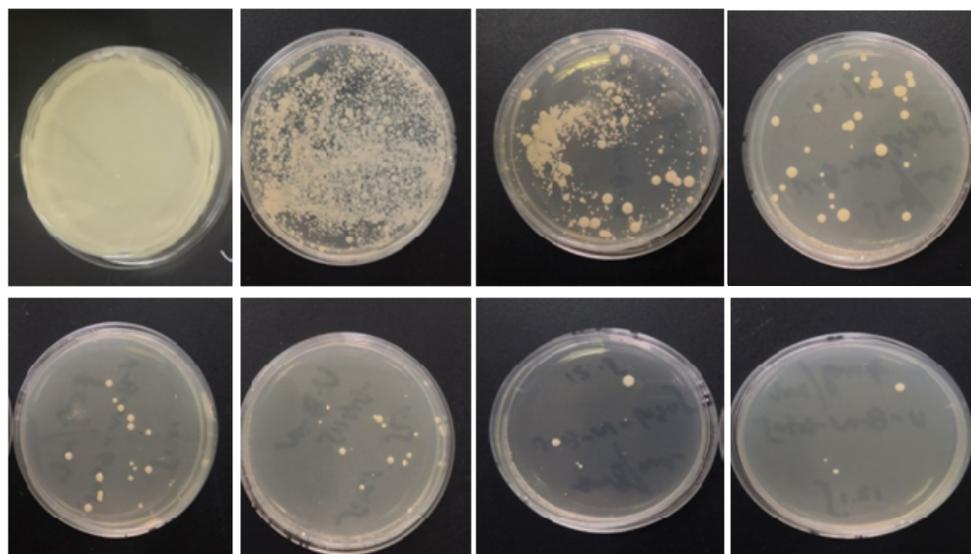


图 7 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 高拷贝筛选

Figure 7 Screening of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N with high copy.

2.5 发酵条件优化提高目的蛋白表达

实验对 No.2 转化子进行了甲醇添加量、诱导温度和 pH 的优化。将重组 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 在不同诱导条件下培养, 比较发酵 96 h 的酵母细胞中目的蛋白的表达情况。当诱导温度增加到 32 °C 时, 蛋白表达为包涵体形式, 所以实验中温度设置梯度最高为 30 °C。发

酵条件优化实验结果如图 9 所示, 在甲醇每日添加量为 0.2% (V/V)、诱导温度为 30 °C、pH 为 5.0 时, 目的蛋白的表达量约为 50.5 mg/L。Jin 等^[17]报道了乳铁蛋白 N-叶在枯草芽孢杆菌中的表达量为 16.5 mg/L; Wang 等^[24]报道了乳铁蛋白 N-叶在大肠杆菌中的表达量为 20 mg/L。与这些宿主相比, 乳铁蛋白 N-叶在毕赤氏酵母中的表达更高。

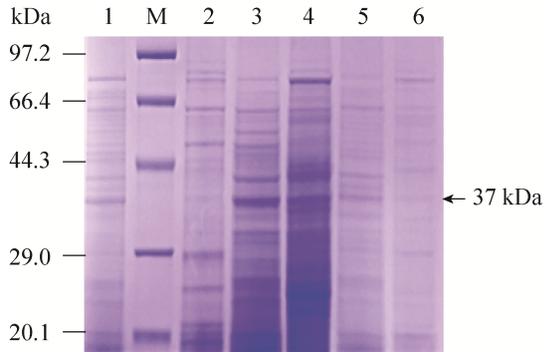


图 8 3.0 mg/mL G418 筛选获得的高拷贝转化子表达结果

Figure 8 Expression results of high-copy transformants screened with 3 mg/mL G418. M: molecular weight marker; lane 1 and 2: the supernatants and sediments of No.1 clone; lane 3 and 4: the supernatants and sediments of No.2 clone; lane 5 and 6: the supernatants and sediments of No.3 clone.

2.6 抑菌活性

抑菌实验选取革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌大肠杆菌作为指示菌，检测抑菌效果。琼脂扩散法检测抑菌活性的结果如图 10 所示，以 ddH₂O 为阴性对照、氨苄青霉素为阳性对照，重组 BLF-N 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径均大于阴性对照，说明其能抑制这 2 种菌的生长，且对大肠杆菌的抑制效果强于对金黄色葡萄球菌的抑制效果。参考 Bai 等^[21]的抑菌方法，研究重组 BLF-N 和商业 BLF 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长抑制效果。结果如图 11 所示，重组 BLF-N 和商业 BLF 对这 2 种菌均有抑制效果，但是对大肠杆菌的抑制效果更佳，且重组 BLF-N 的抑菌效果较商业 BLF 更好。

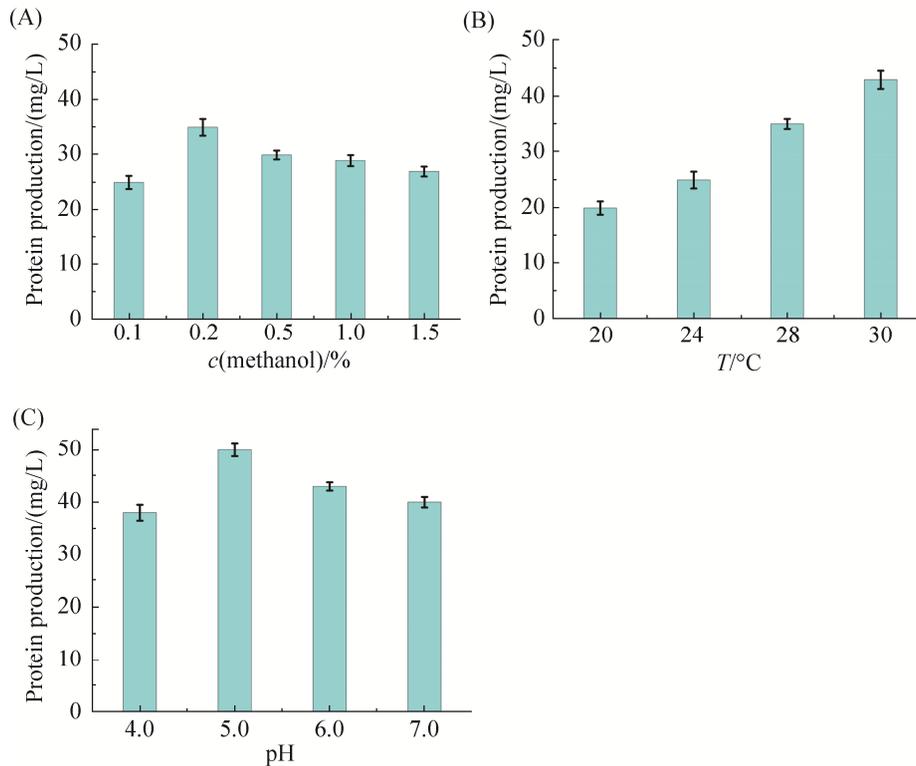


图 9 甲醇添加量(A)、诱导温度(B)及 pH(C)对 BLF-N 表达量的影响

Figure 9 Effects of methanol addition (A), induction temperature (B) and pH (C) on BLF-N expression. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

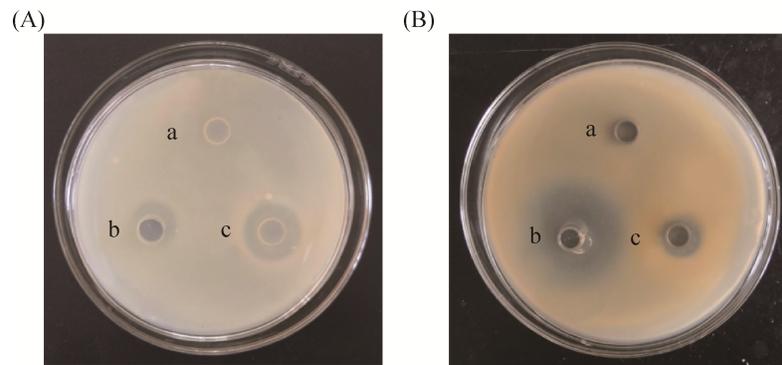


图 10 重组 BLF-N 对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的抑制作用

Figure 10 Inhibitory effect of recombinant BLF-N on *E. coli* and *S. aureus*. A: *E. coli* JM109; B: *S. aureus* CGMCC1.282. a: ddH₂O; b: 0.1 mg/mL Amp; c: 1 mg/mL BLF-N.

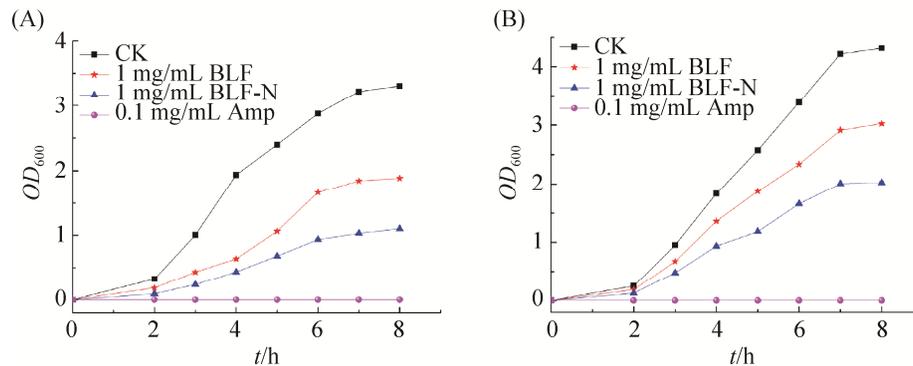


图 11 重组 BLF-N 和商业 BLF 对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的抑菌效果

Figure 11 Antibacterial effects of recombinant BLF-N and commercial BLF on *E. coli* JM109 (A) and *S. aureus* CGMCC1.282 (B).

3 讨论与结论

乳铁蛋白是天然免疫系统的重要组成部分，作为一种天然免疫分子，是机体抵御外界病毒侵入的一道屏障，具有多种生物功能。由于在临床中作为治疗剂的重要用途，被命名为“营养蛋白”，广泛应用于婴幼儿食品、乳品、保健食品、日化用品、宠物食品中。工业上生产乳铁蛋白，目前主要通过从牛奶中直接提取，但是提取比例很低，受限奶源供应，而且工艺严苛，使得供需十分紧张。通过构建基因工程安全菌来生产乳铁蛋白，已成为国内外的一个研究热点。

毕赤氏酵母被美国 FDA 认定为 GRAS (generally recognized as safe) 微生物，从而为毕赤氏酵母在食品和医疗卫生行业的应用奠定了良好的基础。毕赤氏酵母表达系统是重组蛋白质制备的重要方法之一，具有表达量高、稳定性高、较为完备的后加工处理能力等优点。不同物种的基因在密码子的使用上存在着明显的不同，密码子的偏好性对重组蛋白质的异源表达具有重要影响^[25]。同时毕赤氏酵母表达系统中，外源蛋白的表达量通常与插入的外源基因拷贝数成正相关，提高外源基因拷贝数，是一个快速获取高产菌株的有效方法。适宜的诱导条件是高效表达重组蛋白质的必要条件^[26]，

所以为了提高 BLF-N 在毕赤氏酵母中的表达量,对基因进行密码子优化、高拷贝筛选以及发酵条件的优化是极其重要的。

本研究以牛乳铁蛋白中发挥杀菌功能的 N-叶为目的基因,研究了 BLF-N 在密码子优化前后的表达情况,结果表明密码子优化前后目的蛋白都实现了异源表达。经过 SDS-PAGE 分析,密码子优化前后 BLF-N 在 37 kDa 处都出现了目的条带,与牛乳铁蛋白 N-叶的理论分子量一致,密码子优化之后的目的蛋白表达量明显增加。表达产物经过镍柱亲和层析纯化,在 300 mmol/L 咪唑浓度下,获得了纯度高于 91% 的 BLF-N,分子量约为 37 kDa。对重组菌株 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-UBLF-N 进行了高拷贝筛选,在 G418 浓度为 3.0 mg/mL 的条件下,筛选获得 1 株高拷贝菌株 No.2。对该菌株进行发酵条件优化,结果表明在甲醇添加量为 0.2% (V/V)、诱导温度 30 °C、pH 为 5.0 的条件下,诱导 96 h, BLF-N 表达量最高,产量约为 50.5 mg/L。相比其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达^[17,24], BLF-N 在毕赤氏酵母中的蛋白表达量更高,这可能是因为甲醇代谢启动子 AOX1 是已知效果最强的启动子之一^[26]。抑菌实验表明,获得的重组 BLF-N 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有抑菌活性,而且比商业 BLF 抑菌性有显著提升。

根据密码子偏好性策略, BLF-N 基因经优化后在一定程度上提高了表达量,但 mRNA 的高级结构、活化能分布、消除潜在转录终止位点等也是密码子优化应该考虑的重要因素^[25]。在后续的研究中,我们将综合考虑这些因素对 BLF-N 表达的协同影响,进一步优化 BLF-N 基因序列,以期得到更高纯度、更高产量的 BLF-N。

综上所述,本研究实现了牛乳铁蛋白 N-叶在毕赤氏酵母中的高效表达,为牛乳铁蛋白 N-叶

的异源表达和产业化生产提供了理论指导,同时为后续研究乳铁蛋白及其 N-叶的功能显著差异,从结构与功能关系研究方面奠定了较坚实的前期研究基础。

参考文献

- [1] Lambert LA, Perri H, Meehan TJ. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(1): 11–25.
- [2] Jacobsen LC, Sørensen OE, Cowland JB, Borregaard N, Theilgaard-Mönch K. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, 83(5): 1155–1164.
- [3] Paesano R, Berlutti F, Pietropaoli M, Pantanella F, Pacifici E, Goolsbee W, Valenti P. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency Anemia in pregnant women. *BioMetals*, 2010, 23(3): 411–417.
- [4] Wang B, Timilsena YP, Blanch E, Adhikari B. Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(4): 580–596.
- [5] Cutone A, Rosa L, Ianiro G, Lepanto MS, Bonaccorsi di Patti MC, Valenti P, Musci G. Lactoferrin's anti-cancer properties: safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 456.
- [6] Al-Sheikh H. Effect of lactoferrin and iron on the growth of human pathogenic *Candida* species. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2009, 12(1): 91–94.
- [7] Elzoghby AO, Abdelmoneem MA, Hassanin IA, Abd Elwakil MM, Elnaggar MA, Mokhtar S, Fang JY, Elkhodairy KA. Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials*, 2020, 263: 120355.
- [8] De Figueiredo Furtado G, Ménard O, Yu XX, Ossemond J, Henry G, Jardin J, Briard-Bion V, Deglaire A, Hubinger MD, Dupont D. *In vitro* dynamic digestion of model infant formulae containing lactoferrin and medium chain triacylglycerols. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106787.

- [9] Montagne P, Cuillière ML, Molé C, Béné MC, Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Bioactive Components of Human Milk*, 2001, 501: 241–247.
- [10] Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(9): 4108–4116.
- [11] Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Wang JZ. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(3): 970–976.
- [12] Moore SA, Anderson BF, Groom CR, Haridas M, Baker EN. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 274(2): 222–236.
- [13] Powell MJ, Ogden JE. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(13): 4013.
- [14] Rey MW, Woloshuk SL, deBoer HA, Pieper FR. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(17): 5288.
- [15] García-Montoya I, Salazar-Martínez J, Arévalo-Gallegos S, Sinagawa-García S, Rascón-Cruz Q. Expression and characterization of recombinant bovine lactoferrin in *E. coli*. *BioMetals*, 2013, 26(1): 113–122.
- [16] Kim WS, Shimazaki KI, Tamura T. Expression of bovine lactoferrin C-lobe in *Rhodococcus erythropolis* and its purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(11): 2641–2645.
- [17] Jin L, Li LH, Zhou LX, Zhang RZ, Xu Y, Li JM. Improving expression of bovine lactoferrin N-lobe by promoter optimization and Codon engineering in *Bacillus subtilis* and its antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(35): 9749–9756.
- [18] Jiang TM, Chen LJ, Jia SQ, Chen LS, Ma Y. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Dairy Science & Technology*, 2008, 88(2): 173–181.
- [19] Li JB, Zhu WZ, Luo MR, Ren HH, Tang L, Liao HH, Wang Y. Molecular cloning, expression and purification of lactoferrin from Tibetan sheep mammary gland using a yeast expression system. *Protein Expression and Purification*, 2015, 109: 35–39.
- [20] Iglesias-Figueroa B, Valdiviezo-Godina N, Siqueiros-Cendón T, Sinagawa-García S, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. High-level expression of recombinant bovine lactoferrin in *Pichia pastoris* with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6): E902.
- [21] Bai XJ, Teng D, Tian ZG, Zhu YP, Yang YL, Wang JH. Contribution of bovine lactoferrin inter-lobe region to iron binding stability and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. *BioMetals*, 2010, 23(3): 431–439.
- [22] Karaođlan M, Erden-Karaođlan F. Effect of codon optimization and promoter choice on recombinant endo-polygalacturonase production in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 139: 109589.
- [23] Unver Y, Sensoy Gun B, Acar M, Yildiz S. Heterologous expression of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in the yeast *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(7): 723–730.
- [24] Wang JR, Tian ZG, Teng D, Yang YL, Hu JC, Wang JH. Cloning, expression and characterization of Kunming mice lactoferrin and its N-lobe. *BioMetals*, 2010, 23(3): 523–530.
- [25] Yang ZL, Zhang ZS. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 182–195.
- [26] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5301–5317.

(本文责编 张晓丽)