

复合抗菌肽 PL 在毕赤酵母中的分泌表达及其活性研究 Secreted Expression of the Combinant Antimicrobial Peptide PL in *Pichia pastoris* and Its Antibacterial Activity *in vitro*

牛明福¹ 李翔² 曹瑞兵¹ 周斌¹ 陈德胜¹ 陈溥言^{1*}

NIU Ming-Fu¹ LI Xiang² CAO Rui-Bing¹ ZHOU Bin¹ CHEN De-Sheng¹ and CHEN Pu-Yan^{1*}

1 南京农业大学 动物医学院农业部动物疫病诊断和免疫重点实验室 南京 210095

2 河南新乡医学院基础医学院 新乡 453003

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

2 Department of Basic Medical College of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China

摘 要 为了获得抗菌活性较强的抗菌肽,将几种抗菌肽串联起来在毕赤酵母中表达,并比较其与单独抗菌肽的抑菌活性。以 GenBank 中的 Protegrin-1(PG-1)、Scorpion Defensin(SD)、Metalnikowin-2A 和 Sheep Myeloid Antibacterial Peptide(SMAP-29)(序列号分别为 AAB27599, AAAB27538, P80409 和 P49928)成熟肽段作为模板序列,根据巴斯德毕赤氏酵母(*P. pastoris*)偏好密码子,设计并人工合成复合抗菌肽 *pl* 基因,同时用 SOE 法获得 Scorpion Defensin 的基因,分别克隆到 pPICZαA 载体中,转化 *P. pastoris* 受体菌 X-33,在醇氧化酶(AOX)启动子调控下,复合抗菌肽 PL 及 SD 均获得表达。体外抑菌试验检测复合抗菌肽 PL 与单独的蝎子防御素 SD 的热稳定性、酸稳定性、最低抑菌浓度等,结果显示复合抗菌肽 PL 及 SD 具有很强的热酸稳定性,而针对不同的细菌,复合抗菌肽则表现出了强于单独的 SD 的活性,特别是对大肠杆菌。上述结果说明了该复合抗菌肽具有很好的开发前景。

关键词 复合抗菌肽 PL, 蝎子防御素 SD, 分泌表达, 热酸稳定性, 抑菌活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0418-05

Abstract In order to obtain a high activity antibacterial peptide, an expression vector pPICZαA-*pl* is constructed with a tandem of four antimicrobial peptides in the same direction, which includes Protegrin-1(PG-1), Scorpion Defensin(SD), Metalnikowin-2A and Sheep Myeloid Antibacterial Peptide(SMAP-29)(serial number in GenBank are AAB27599, AAAB27538, P80409 and P49928 respectively). At the same time the expression vector pPICZαA-*sd* which express Scorpion Defensin was constructed. The expression vectors of pPICZαA-*pl* and pPICZαA-*sd* were linearized and transformed into the yeast host strain X-33 respectively. Under the control of the promoter AOX1(alcohol oxidase1), the peptides PL and SD were secreted expressed. Their heat-stable property, acid-stable property and MIC were detected *in vitro*. The results suggest the peptides PL and SD have good heat-stable and acid-stable properties, and the combinant PL peptide shows higher antibacterial activity against several Gram-positive bacteria(G^+) and Gram-negative bacteria(G^-) than the peptide SD, especially against *Escherichia coli*. The antibacterial activity of combinant antimicrobial peptide PL shows its far exploiting perspective.

Key words recombinant antimicrobial peptide PL, scorpion defensin(SD), secretion expression, heat and stable stability; antibacterial activity

Received: October 27, 2006; Accepted: December 12, 2006.

This work was supported by the grants from the Jiangsu Province Tackle Key Problems in Science and Technology Funds(No. BE2006364) and Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China(No. 20050307023).

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

教育部高校博士点基金(No. 20050307023)和江苏省科技攻关项目(No. BE2006364)资助。 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

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,具有广谱抗菌活性,是生物先天性免疫的重要组成部分。1972年,瑞典科学家 Boman G 等^[1]首次从天蚕蛹中发现抗菌肽 Cecropins。

近年来由于抗生素的滥用,耐药菌株愈来愈多,据报道,美国每年要花 20 亿~40 亿美元对付耐药细菌。据美国新闻周刊报道,早在 1992 年全美就有 13300 名患者死于抗生素耐药性细菌感染。现在,已经出现了能对抗所有抗生素的耐药菌^[2]。

抗菌肽由于其独特的抗菌机制被认为是能够成为替代抗生素的首选药物。而且抗菌肽发挥防御作用的基础在于微生物的细胞膜结构的特点,这些特点是动植物所不具备的,所以抗菌肽仅对微生物有抑杀作用,而对动植物细胞不起作用。这方面的研究使人们对抗菌肽的认识更深入,也促使人们创造新的抗感染疗法,抗菌肽作为广谱抗菌药物所具有的应用开发前景十分可观,已有一些科研机构试图研制合成肽作为治疗药物用于人类疾病治疗^[3]。Mare Cudic 等^[4]设计并合成了 pyrrolicoricin 及 pyrrolicoricin 的二聚体类似物,结果显示它们可以杀死抗四环素或氨基糖苷的大肠杆菌、沙门氏菌等。Andrea Giacometti 等^[5]用 cecropin A 和 melittin 人工合成的 CA(1-7)M(2-9)杂合肽对甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌有较好的抗菌活性。已有一些科研机构、生物科技公司联合大的制药厂,在动物或人体上对不同的抗菌肽进行了前期临床研究和临床应用评价^[6]。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。

本研究利用巴斯德毕赤酵母的表达特点,将几种富含不同阳离子氨基酸的抗菌肽通过酵母本身的蛋白酶 *kex2* 识别位点序列串联起来,希望它们不同的杀菌机制能联合起来,发挥更强的杀菌活性。

1 材料和方法

1.1 质粒、受体菌、指示菌株

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)受体菌 X-33,表达载体 pPICZαA 购于 Invitrogen 公司,试验菌株猪大肠杆菌 k88(C83903)、金黄色葡萄球菌 Cowan I(*Staphylococcus aureus*)、鸡伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhic*)、鸡致病性大肠杆菌 O1(*Enteropathogenic E. coli*)、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)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等试验菌株为本实验室保存。

1.2 主要试剂

ExTaq 酶、限制性内切酶、连接酶等购自 TaKaRa 公司,SDS-PAGE 低分子量 Marker 购自创瑞生物公司,Tricine、Tris 购自 Sigma 公司,Zeocin 购自 Invitrogen 公司,其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 基因的设计及合成

根据 GenBank 中几种抗菌肽的成熟肽段氨基酸序列,选用酵母偏爱密码子^[7]设计 *pl* 复合抗菌肽基因,在其 N 端及各肽段之间均加上 A 信号肽 *Kex2* 裂解位点,以保证各种抗菌肽具有天然 N 端,设计好的 *pl* 基因核苷酸序列由上海赛百盛公司合成,两端分别引入 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点。同时设计三条引物通过 SOE(Splicing by Overlap Extension)法获得 Scorpion Defensin 成熟肽段基因(*sd*),引物序列如下:
p1: 5' ctcgagaaaagagggttccgtgtccattgaatcaaggtgcttcatagacattgtaga3';
p2: 5' gaaaccagcacaataaccacctcttctctaataagatctacaatgtctatgacaagcacc3';
p3: 5' gggtattgtctgggtttctcaagcaactgtactgttatagaatcaataaagatct3',两端也分别引入了 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点。

1.4 酵母表达载体的构建

获得的 *pl* 和 *sd* 基因经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后与同样双酶切的酵母表达载体 pPICZαA 连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,构建 pPICZαA-*pl*、pPICZαA-*sd* 表达质粒,构建好的重组质粒送 Invitrogen 公司测序以验证序列及阅读框的正确性。

1.5 重组酵母表达载体的构建及筛选

将测序正确的重组质粒用 *Sac* I 线性化后电击转化酵母菌 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,电击后的酵母菌铺 YPDS 平板(含 100 μg/mL 的 Zeocin),用 PCR 法筛选阳性转化子。

1.6 复合抗菌肽 PL 和 SD 的诱导表达

将筛选到的阳性酵母菌接种于 100 mL BMGY 培养基,30℃ 250 r/min 培养至 OD_{600} 达到 2~6,离心收集菌体重悬于 500 mL BMMY 培养基,进行诱导表达 28℃ 250 r/min 培养 96 h,期间每 24 h 补加终浓度为 0.5%(V/V)的甲醇。96 h 后,12000 r/min 离心 5 min 收集培养液上清,进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳、蛋白浓度测定及抑菌活性测定。

1.7 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE

由于抗菌肽分子量一般都只有几个 kD,理论上分子量低于 15 kD 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,我们使用了

分离小肽的 Tris-Tricine 电泳系统,使重组多肽得到了较好的分辨率及带型,取诱导表达的上清液 50 μ L 与等量的上样缓冲液混合,沸水浴煮 10min 后取 20 μ L 上样,同时取 10 μ L 0.1 μ g/ μ L 的分子量为 97.2 ~ 14.4kD (南京创瑞有限公司)及 3 μ L 1 μ g/ μ L 的分子量为 66 ~ 4.1kD (Bio Basic Inc) 的蛋白质标准样品作为对照。

1.8 复合抗菌肽 PL 和 SD 的蛋白浓度测定及初步抗菌活性测定

用 DNA/RNA 微量定量仪和考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 相对照确定蛋白浓度。抑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*)、猪大肠杆菌 k88 (C83903)、枯草芽孢杆菌和鸡白痢沙门氏菌为实验菌株,将四种细菌悬浮液 ($OD_{600} = 1.0 \sim 1.2$) 15 μ L 与 LB 固体培养基 25mL 混匀后铺平板,待其凝固后用灭菌的打孔器打孔,孔中分别各滴加 2 μ g 的 PL (约 40 μ L) 和 SD (约 40 μ L) 表达上清,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,第 2 天测量抑菌圈直径。

1.9 复合抗菌肽 PL 和 SD 的最低抑制浓度 (MIC) 测定

用液体生长抑制法测定两种抗菌肽对金黄色葡萄球菌 (*Cowan I*)、猪大肠杆菌 k88 (C83903)、枯草芽孢杆菌和沙门氏菌等细菌的最低抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)。将能完全抑制菌体生长的最低蛋白浓度确定为 MIC。将活化培养的菌液用 LB 培养基稀释至 10^6 CFU/mL,分别取 50 μ L 加到 96 孔培养板上,然后分别加入稀释的 PL (分别为 2.376 μ g, 1.188 μ g, 0.594 μ g, 0.297 μ g, 0.149 μ g, 0.075 μ g) 和 SD (分别为 2.28 μ g, 1.14 μ g, 0.57 μ g, 0.285 μ g, 0.19 μ g, 0.095 μ g) 的溶液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16h。

1.10 复合抗菌肽 PL 和 SD 对几种菌生长的抑制测定

仍以金黄色葡萄球菌 (*Cowan I*)、猪大肠杆菌 k88 (C83903)、枯草芽孢杆菌和鸡白痢沙门氏菌为实验菌株,将活化培养的细菌菌液按 10^6 CFU/mL 接种于 LB 培养基,分别将 1/10 MIC 的 PL 和 SD 抗菌肽加入试管,同时用空载体 pPICZ α 转化的 X-33 诱导的表达上清作为对照,37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养,期间每 1h 取出 200 μ L 测定 OD_{600} 值,绘制细菌生长曲线。

1.11 复合抗菌肽 PL 和 SD 的热稳定性比较

将抗菌肽在沸水浴中放置不同的时间,检测其对金黄色葡萄球菌 (*Cowan I*) 的抑菌活性变化,同时以无菌水和未煮沸的抗菌肽作对照。实验方法同 1.7 节所述,在孔中加入分别煮沸 5 min、10min、15min、20min、30min、1h 的 2 μ g PL 复合抗菌肽和 SD,

进行抑菌实验。

1.12 复合抗菌肽 PL 和 SD 在不同 pH 值缓冲液中的稳定性

配制 pH2 ~ 12 的 PBS 缓冲液,取 2 μ g PL 复合抗菌肽和 SD,分别加入等量的不同 pH 值缓冲液,以不加抗菌肽的不同 pH 值缓冲液为对照,以金黄色葡萄球菌 (*Cowan I*) 为受试菌,做抑菌实验,方法同 1.7 节,第二天测量抑菌圈大小,绘制变化曲线。

2 结果

2.1 阳性转化子的筛选与鉴定

提取酵母基因组,用 5' AOX 和 3' AOX 通用引物 PCR 鉴定阳性转化子,鉴定结果如图 1, X-33/pPICZ α -sd 可以扩增出约 660bp 条带, X-33/pPICZ α -pl 可以扩增出约 1000bp 条带,而空载体对照 X-33/pPICZ α 仅扩增出 598bp 的条带。

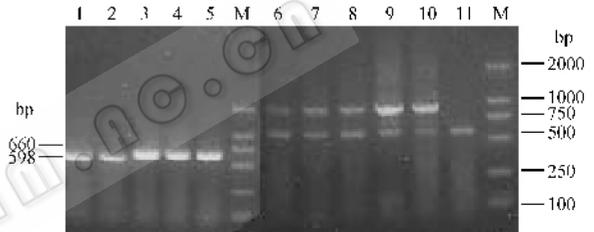


图 1 X-33/pPICZ α -sd 和 X-33/pPICZ α -pl 的转化子 PCR 鉴定

Fig. 1 The PCR identification of X-33/pPICZ α -sd and X-33/pPICZ α -pl

1, 2, 11: X-33/pPICZ α ; 3 ~ 5: X-33/pPICZ α -sd; 6 ~ 10: X-33/pPICZ α -pl; M: DNA molecular marker (DL2000).

2.2 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 结果

将筛选到的阳性重组菌株及空的 pPICZ α 菌株诱导表达,表达上清进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳 (图 2),由于 PL 复合抗菌肽表达后被酵母本身的 Kex2 酶

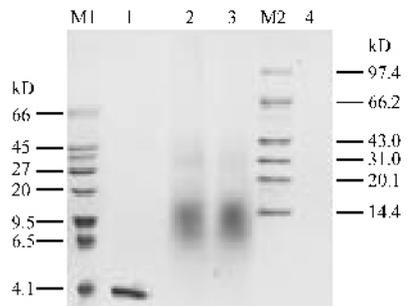


图 2 PL 复合抗菌肽 PL 及防御素 SD 的 Tricine-SDS-PAGE 结果

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE of PL and SD

M1: protein molecular marker (4.1 ~ 66.2kD); M2: protein molecular

marker (97.4 ~ 14.4kD); 1: SD; 2, 3: PL; 4: control of blank vector.

切为单个肽段 所以电泳结果为一个梯带,而不是单一的一条带,而蝎子防御素 SD 则为一条单一的一条带。

2.3 复合抗菌肽 PL 和 SD 的蛋白浓度及初步抑菌活性测定结果

用 DNA/RNA 微量定量仪测定 PL 和 SD 的蛋白浓度分别为 $95.04\mu\text{g/mL}$ 和 $91\mu\text{g/mL}$ 。如图 3 所示,等量($2\mu\text{g}$)的 PL 和 SD 对四种菌的抑菌圈分别为 15mm、10mm、13mm、14mm 和 12mm、6mm、6mm、12mm。

2.4 复合抗菌肽 PL 和 SD 对几种菌的最低抑制浓度(MIC 测定)

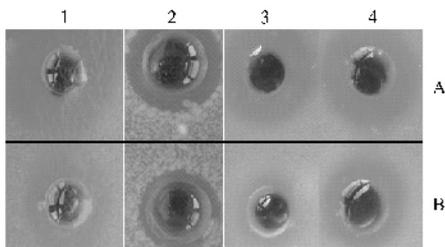
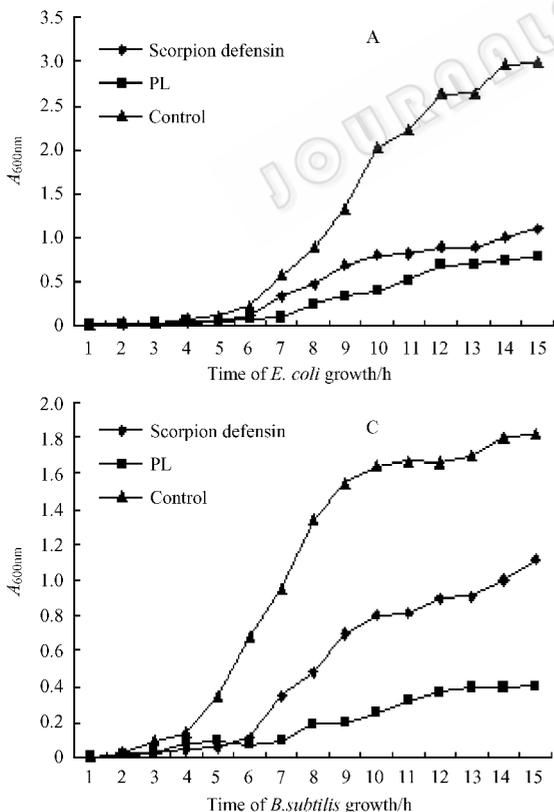


图 3 PL 复合抗菌肽和 SD 的抑菌活性测定

Fig.3 Detection of the antibacterial activity of PL and SD

1: *S. aureus* (Cowan 1); 2: *B. subtilis*; 3: porcine *E. coli* k88; 4: *Salmonella gallinarum*; A: PL; B: SD.

用菌体液体生长抑制法测得两种抗菌肽对几



2.5 复合抗菌肽 PL 和 SD 对四种菌生长的抑制测定结果

从细菌生长曲线(图 4)可以看出,两种抗菌肽在浓度低于 MIC 时仍能部分抑制细菌的生长。

2.6 复合抗菌肽 PL 和 SD 的热稳定性检测

热稳定性试验显示,两种抗菌肽在煮沸 5 ~ 10min 时抑菌圈大小与未煮时均没有差别,但 20min

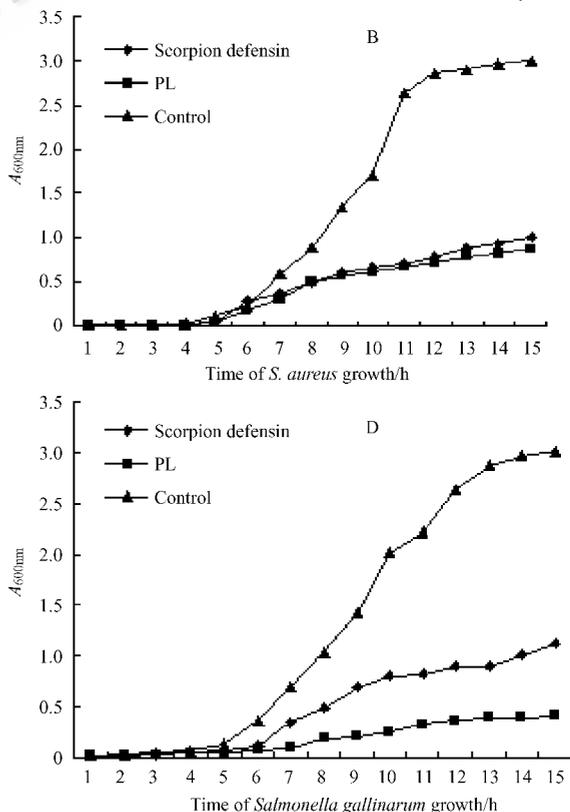


图 4 复合抗菌肽 PL 及 SD 对四种菌的抑制生长曲线^a

Fig.4 *In vitro* bactericidal activity of PL and SD against *E. coli* K88; *S. aureus*, *B. subtilis* and *Salmonella gallinarum*

Control: blank vector expression supermanent; ^a a mean value of three triplicates.

以后它们的抑菌圈都逐渐变小,1h时基本上看不到抑菌圈,说明两者在热稳定性上差别不大,都至少能耐受10min的高温。

2.7 复合抗菌肽 PL 和 SD 在不同 pH 值缓冲液中抑菌活性的变化结果

两种抗菌肽在不同 pH 值时的抑菌活性如图 5 所示,在 pH 值低至 1 时两者仍具有抑菌活性,而在 pH 值上升至 8 以后抑菌活性急剧下降,直至丧失活性,说明该抗菌肽具有较强的酸稳定性,但不能耐受碱。

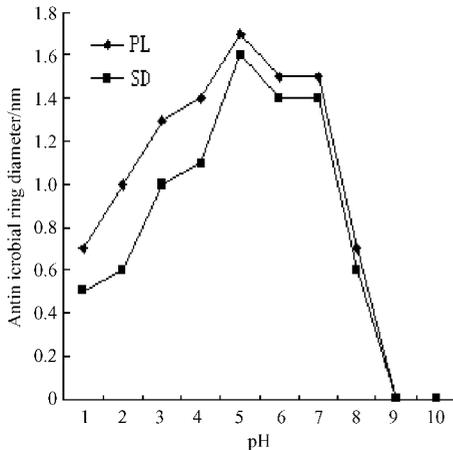


图 5 复合抗菌肽 PL 和 SD 在不同 pH 值缓冲液中抑菌活性变化曲线

Fig.5 Plot of the bacteriostasis of PL and SD in different pH buffer

3 讨论

早期的抗菌肽多数是从组织材料中纯化得到的,现在采用基因工程技术构建高表达系统来生产抗菌肽是目前较多的选择。Rao 等^[8]曾用大肠杆菌表达铜绿假单胞菌抗菌素;Yang 等^[9]则表达了人抗菌肽 hCAP218/LL237,但这些都原核系统中成功表达出的抗菌肽都是以融合蛋白形式得到的,它们都需要去除融合伴侣后,才能表现应有的抗菌活性。Lepage 等^[1]报导昆虫防御素 A 在啤酒酵母内的表达产物与天然产物在一级结构以及分子间的二硫键形成无差别。本试验室以前的研究也证明了在酵母系统抗菌肽可以单独表达,而且可以保持原有活性,本研究也利用酵母表达系统成功表达了复合抗菌肽及单独的防御素 SD,获得了较好的结果。

Kex2 是酵母自身编码的一种前体加工酶,该蛋白是一个 Ca^{2+} 依赖性的丝氨酸蛋白酶,属于枯草杆菌蛋白酶家族,负责大多数酵母蛋白的分泌与成熟^[11,12]。本研究根据酵母自身能表达 kex2 这一特点,将几种抗菌肽成熟肽段串联起来,并且每两两之

间插入 kex2 酶识别位点(Gly-Lys-Arg * Glu-Ala),这样表达的蛋白就自动被酵母本身表达的 kex2 酶所识别并加工,分泌到酵母上清中。结果表明,该复合抗菌肽获得了表达,与单独的抗菌肽相比,其抗菌活性显著增强,特别是对大肠杆菌,证明了本试验的思路是可行有效的,有望进一步研究开发利用。

根据天然纯化产物在体外抗菌作用的最好试验结果,防御素对最敏感菌种的有效抑菌浓度应在 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上^[13]。其他情况下,天然防御素的杀菌浓度在 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上。本研究得到的复合抗菌肽对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的体外最低抑菌浓度为 $2.97\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $4.4\mu\text{g}/\text{mL}$,均低于 $10\mu\text{g}/\text{mL}$,下一步将进一步研究其在动物体内的抑菌活性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Boman HG, Nissson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defense system in *Drasophila*. *Nature*, 1972, **237**(5): 232-235.
- [2] Wong AH, Wenzel RP, Edmond MB. Epidemiology of bacteriuria caused by vancomycin-resistant enterococci retrospective study. *Am J Infect Control*, 2000, **28**: 277.
- [3] Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, 1995, **13**(3): 61-92.
- [4] Mare Cudic, Barry A Condie, Daniel J Weiner, et al. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides*, 2002, **23**(12): 2071-2083.
- [5] Andrea Giacometti, Oscar Cirioni, Wojciech Kamysz, et al. In vitro activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2004, **49**(3): 197-200.
- [6] Andress R, Koczulla R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs*, 2003, **63**(4): 389-406.
- [7] Zhao X (赵翔), Huo KK (霍克克), Li YY (李育阳). Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(3): 308-311.
- [8] Rao XC, Li S, Hu JC, et al. A novel carrier molecule for high level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, **36**(1): 11-18.
- [9] Yang YH, Zheng GG, Li G, et al. Expression of bioactive recombinant GSSL239, a variant of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, **37**(1): 229-235.
- [10] Lepage P, Bitsch F, Roecklin D, et al. Determination of disulfide bridges in natural and recombinant insect defensin A. *Eur J Biochem*, 1991, **196**(3): 735-742.
- [11] Fuller RS, Brake A, Thorne J. Intracellular target in gland structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, 1989, **246**(4949): 482-486.
- [12] Bathurst IC, Brennan SO, Carrell RW, et al. Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science*, 1987, **235**(4786): 348-350.
- [13] Evans EW, Beach FG, Moore KM, et al. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP2. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, **39**(4): 895-903.