

# 抗菌肽 ABP3 基因的克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达\*

沈俊卿 屈贤铭\*\*

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

田 昱

(上海医科大学分子遗传研究室 上海 200032)

**摘 要** 用化学合成法合成以植物偏爱密码子编码的新抗菌肽 ABP3 基因片段, 合成片段拼接后, 与 pUC19 重组, 经限制酶片段分析与核苷酸序列分析, 获得抗菌肽 ABP3 基因。ABP3 基因与表达载体 pPIC9 重组, 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 宿主菌, 经表型筛选, 阳性克隆用甲醇诱导表达, 重组 ABP3 以分泌型表达, 具抗菌活性, 且符合 ABP3 的抗菌特性。

**关键词** 抗菌肽 ABP3, 酵母表达

**分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0489-93

抗菌肽(Antibacterial peptide, ABP)最早在昆虫体内发现, 是昆虫免疫应答的产物。昆虫被病菌感染或受到伤害后, 能快速合成大量抗菌肽, 迅速杀灭入侵病菌, 可阻止病菌的继续侵染。迄今已从动物界不同组织中分离和鉴定出 100 多种具有抗菌作用的肽类物质<sup>[1,2]</sup>。尽管它们氨基酸组成不尽相同, 但都能形成与脂质双分子层结合的两性  $\alpha$  螺旋结构, 这与其杀菌机制有关。抗菌肽根据其结构可分为 5 类, Cecropins 是其中的一类, 由 33~39 个氨基酸组成, 分子量约为 4kD, 其 N 端碱性很强, 形成两性  $\alpha$  螺旋结构, C 端为疏水区, 末端酰胺化, 中间则由脯氨酸或甘氨酸形成的铰链区连接。Cecropins 具有广谱的抗菌能力, 在农业和医学上具有广阔的应用前景。我室以天然抗菌肽中活性最强的 CecropinB 为蓝本, 设计并合成了一些新的抗菌肽, 以期提高对某些菌株的杀菌活性。其中 ABP3 与 Cecropin B 的同源性为 83%, 其螺旋度明显提高<sup>[3]</sup>, 活性测定结果表明, ABP3 在保持了 Cecropin B 本身的抗菌能力外, 对软腐菌的杀伤作用明显提高<sup>[4]</sup>。

抗菌肽因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, 我们采用 *Pichia pastoris* 系统成功地表达了 ABP3。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** 大肠杆菌 JM109、K12D31, 软腐菌 10M, 质粒 pUC19 为本室提供。*Pichia pastoris* 表达系统为 Invitrogen 产品。

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 101-01-02-03)。

\*\* 联系人。

收稿日期:1998-05-11, 修回日期:1999-05-26。

**1.1.2 试剂与仪器:** PCR 试剂盒购自 Sangon 生物工程公司, 核酸工具酶购自 Promega 公司, YNB 购自 Difco 公司, Dig 随机引物标记与检测试剂盒购自 BM 公司。其它试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 寡聚核苷酸:** 由 Sangon 生物工程公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 ABP3 基因片段的拼接、克隆和鉴定:** 参照文献[5]进行。

**1.2.2 ABP3 基因在 *Pichia pastoris* 中的表达:** 参照文献[6]进行。

**1.2.3 抗菌活性的测定:** 琼脂糖扩散法和液相法均参照文献[4]进行。

**1.2.4 Southern blot 分析:** 参照文献[5]进行。

## 2 结 果

### 2.1 ABP3 基因的合成与克隆

根据 ABP3 氨基酸序列, 在其 N 端加上起始密码子 ATG, 并在其后加上 Ala 的密码子 GCC, 以促进其在植物中的表达。终止密码子前加上 Gly 密码子 GTT, 以利于表达产物的酰胺化, 整个基因选用植物偏爱的密码子<sup>[7]</sup>, 全长 144bp。在基因的两端分别设有酶切位点以便与载体相连。基因拼接鉴定后, 与 pUC19 重组并转化 JM109 大肠杆菌, 经限制酶片段分析, 重组质粒具有特征性酶切位点, 经 DNA 序列分析, 获得 ABP3 基因。

### 2.2 pQSEI-ABP3、pQSEII-ABP3 质粒的构建

ABP3 基因通过 *EcoRI* 位点与酵母表达载体 pPIC-9 重组, 目的基因前具  $\alpha$ -Factor 的信号肽顺序, 转录上受 AOX1 基因的启动与终止, 以氨苄青霉素抗性基因与组氨酸脱氢酶基因(HIS4)为筛选标志。重组质粒转化 JM109 大肠杆菌, 经限制酶片段分析, 获得 ABP3 酵母表达质粒 pQSEI-ABP3。该表达质粒的 ABP3 产物经切割后, 因表达载体 pPIC-9 上的 *EcoRI* 克隆位点而在 ABP3 的 N 端多了 Glu、Phe 两个氨基酸。为消除这两个氨基酸对 ABP3 可能的影响, 又设计了两个引物: 5' 端 5' ATCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCTAAGTGGGAAGG, 3' 端 5' ATGCGGCCGCGGATCCTCATTATCAAGAG, 经 PCR 扩增, 产物经鉴定后, 以信号肽前的 *XhoI* 位点与表达载体 pPIC-9 重组, 获得 ABP3 酵母表达质粒 pQSEII-ABP3。

### 2.3 pQSEI-ABP3 和 pQSEII-ABP3 的转化、阳性克隆的筛选和表达

质粒以 AOX1 基因顺序, 用 LiCl 方法与 GS115 酵母宿主菌进行同源重组, 以组氨酸脱氢酶基因为筛选标志, 经 MD(葡萄糖最低限度培养基)和 MM(甲醇最低限度培养基)平板筛选与基因型相符的生长表型。分别挑取 4 株 pQSEI-ABP3 和 3 株 pQSEII-ABP3 阳性克隆接种于 BMG(甘油最低限度缓冲培养基)培养液中, 培养至菌体光密度达 3 左右 (600 nm) 时, 离心去除 BMG 培养液, 加 1/10 原培养体积的 BMM(甲醇最低限度缓冲培养基)培养液, 1% (含 PMSF) 甲醇诱导培养 7d, 每天取样, 进行抗菌活性测定。

### 2.4 重组 ABP3 抗菌活性的测定

用改良 Lowry 法测定培养液上清总蛋白含量, 并稀释至蛋白浓度约为 30 $\mu$ g/mL 进行活性测定。用琼脂糖扩散法检测(每孔加样量为 16 $\mu$ L), 以大肠杆菌 K12D31 为测试菌, pQSEI-ABP3 和 pQSEII-ABP3 表达菌诱导培养液在前 4d 均没有出现抑菌圈, 第 5 天, 有一

株 pQSEII-ABP3 克隆出现抑菌圈,第 7 天,又有 3 株 pQSEI-ABP3 克隆出现了抑制圈,随着诱导时间的延长,活性越来越明显,而 7d 中对照均未见抑菌圈(图 1a)。测定重组 ABP3 对软腐菌 10M 的抑制作用(图 1b)发现,重组 ABP3 对软腐菌的杀伤作用比大肠杆菌的作用强。培液加热煮沸 10 min 后,活性有所提高。

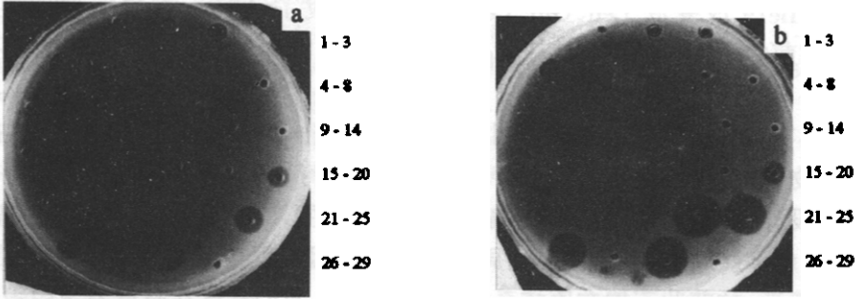


图 1 重组 ABP3 对 *E. coli* K12D31(a)及 *E. carotovora* 10M(b)的抑菌作用

Fig. 1 Effect of recombinant ABP3 on *E. coli* K12D31(a) and *E. carotovora* 10M(b)

1~5. Cecropin B: Concentration is 0, 0.5  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , respectively

6~29. Induced cultures of rABP3

6. pPIC9 in the 5th day; 7~10. pQSEI-ABP3 in the 5th day; 11~13. pQSEII-ABP3 in the 5th day;

14. pPIC9 in the 6th day; 15~18. pQSEI-ABP3 in the 6th day; 19~21. pQSEII-ABP3 in the 6th day;

22. pPIC9 in the 7th day; 23~260. pQSEI-ABP3 in the 7th day; 27~29. pQSEII-ABP3 in the 7th day

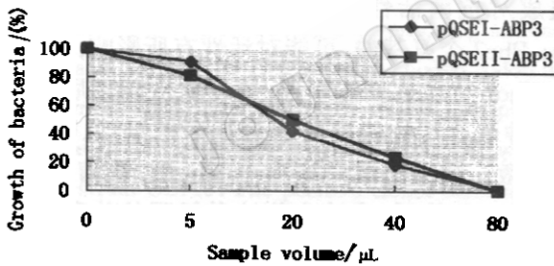


图 2 重组 ABP3 的抑菌活性

Fig. 2 Antibacterial activity of recombinant ABP3 to *E. coli* K12D31.

酵母转化子中抽提染色体 DNA, 分别用 *EcoRI*/*Bam*HI 和 *XhoI*/*Bam*HI 酶解, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 用毛细管法将 DNA 转移至尼龙膜上。以 ABP3 基因片段为模板, 用随机引物法标记 Dig 探针。经杂交后, 在 NBT/BCIP 色原系统中显色。挑取的 4 株阳性克隆显示出特异的杂交条带, 而对照酵母染色体未见(图 3), 结果表明 ABP3 基因

分别从 pQSEI-ABP3 和 pQSEII-ABP3 酵母转化子中选取一株活性最强的克隆培养上清用于液相测定法, 结果表明: 约 20 $\mu\text{L}$  培养上清液对 2 mL 菌液即可达到 50% 的抗菌能力, 而 pPIC9 载体对照的诱导上清液对细菌生长没有影响(图 2)。

### 2.5 酵母转化子 ABP3 基因的 Southern blot 分析

从 pQSEI-ABP3 和 pQSEII-ABP3

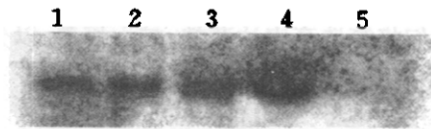


图 3 酵母转化子中 ABP3 基因的 Southern blot 分析

Fig. 3 Southern blot analysis of ABP3 gene

in *Pichia* transfectants.

1~3. pQSEI-ABP3; 4. pQSEII-ABP3;

5. Negative control.

已在阳性克隆的染色体 DNA 整合。表达产物所显示的抗菌活性确为 ABP3 的作用。

### 3 讨 论

我室以天然抗菌肽中活性最强的 Cecropin B 为蓝本,将其 N 端两性  $\alpha$  螺旋上的 Ile15、Asn17、Ile19 改变成 Leu、Glu、Leu,设计并合成了 ABP3,其螺旋度明显提高<sup>[3]</sup>。ABP3 对软腐菌的杀伤作用明显高于 Cecropin B,对其它测试菌的作用等同或略低于 Cecropin B<sup>[4]</sup>。

ABP3 具有较强的软腐菌杀伤作用,可将其基因导入受体植物细胞,培育出抗软腐病的转基因植物(此工作由合作单位中国农科院正在进行),为提高 ABP3 在植物中的表达,在其基因的设计上,我们选用了植物偏爱密码子,并在 ATG 后加上 Ala 的密码子 GCC。此外,人工合成多肽成本高,应用受到局限,因此,基因工程产品的研究意义则更为重要。鉴于其杀菌活性,抗菌肽不能在原核系统中直接表达,我们尝试在酵母系统中表达抗菌肽基因。

*Pichia pastoris* 表达系统为 80~90 年代发展起来的极具潜力的酵母表达系统,已成功地表了数十种外源蛋白<sup>[8]</sup>。ABP3 的一级结构中不具备 *Pichia pastoris* 信号肽切割识别位点,可将 ABP3 基因与分泌型表达载体 pPIC9 重组,以  $\alpha$ -Factor 为信号肽,作分泌表达,以利于下游纯化。

经甲醇诱导,琼脂糖扩散法测定抑菌活性,证明培液具有抗菌活性。16 $\mu$ L 培液即可出现明显的抑菌圈。经蛋白定量,培液中蛋白总量约为 30 $\mu$ g/mL。Cecropins N 端极为保守,且碱性极强,一般认为 N 端氨基酸组成对抗菌活性尤为重要。我们在操作时,用 *Eco*RI 位点装入 pPIC9 载体,便会引入 Glu、Phe2 个氨基酸,可能对活性有所影响,因而我们又以  $\alpha$ -Factor 信号肽前的非多克隆位点 *Xho*I 与表达载体相连,信号肽被切割后,可得到精确的 ABP3 表达产物。经活性测定,两种表达产物的抑菌能力基本相似,说明 Glu、Phe 的存在对 ABP3 N 端的螺旋结构影响甚微。诱导培液经煮沸 10min 后,抗菌活性有所提高,可能是加热去除了影响抗菌肽活性的一些物质,表达产物这种极强的热稳定性,符合抗菌肽的生物学特性。在活性测定中,表达产物对软腐菌的抑菌能力大大高于对大肠杆菌的作用,符合 ABP3 的抑菌特性。抗菌肽 ABP3 因分子量小,碱性强,在水溶液中呈无规则卷曲,极易降解,添加蛋白酶抑制剂 PMSF(100 $\mu$ g/mL)有助于稳定表达产物。抗菌肽具有极强的抗酸性,在酸性环境中表达 ABP3(pH 小于 3),可降低内源性蛋白酶对 ABP3 的降解。

我们将筛选高表达菌株,扩大培养,以分离纯化重组 ABP3,对其理化、生物学特性进行进一步的研究。

**致 谢** 感谢贾士荣教授和唐益雄博士的帮助和合作。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] H. G. Bomen. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, 13: 61~92.
- [ 2 ] Z. Oren, H. Jiang, Y. Shai. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(23): 14643~14649.
- [ 3 ] 王三山, 徐 梅, 甘人宝等. 马铃薯抗菌肽基因工程, 北京: 中国农业科技出版社, 1996, pp. 32~38.
- [ 4 ] 陆莹瑾, 王 禾, 屈贤铭. 马铃薯抗菌肽基因工程, 北京: 中国农业科技出版社, 1996, pp. 50~59.
- [ 5 ] J. 萨姆布鲁克等著, 金冬雁译, 分子克隆试验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 6 ] Invitrogen. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*.
- [ 7 ] E. E. Murray, J. Lotzer, M. Eberle. *Nucleic. Acids. Res.*, 1989, 17: 477~498.
- [ 8 ] 刘 峰, 霍克克, 李育阳. 生物工程学报, 1996, 2(1): 1~5.

### Cloning and Expression of Antibacterial Peptide ABP3 Gene in *Pichia pastoris*\*

Shen Junqing Qu Xianming

<sup>1</sup>(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Science, Shanghai 200233)

Tian Yu

<sup>2</sup>(Department of Molecular Genetics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

**Abstract** A 144bp DNA fragment encoding antibacterial peptide ABP3 was designed based on the amino acid sequence of ABP3 and the biased codon usage of plant. Eight oligonucleotides were chemically synthesized, linked and then cloned into pUC19 vector. After restriction enzyme analysis and DNA sequencing, the ABP3 gene was ligated with yeast expression vector pPIC9 and transfected a special strain GS115. The positive clones screened by the phenotype were induced by methanol and were able to express rABP3 which exhibited the antibacterial activity.

**Key words** Antibacteria peptide ABP3, expression in *Pichia pastoris*

\* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development(No. 101-01-02-03).