

海洋生物技术

基于 SOE-PCR 的两种鱼类 hepcidin 基因串联及其在毕赤酵母中的表达

李文婧¹, 陶妍¹, 赵冬梅¹, 徐冰冰²

1 上海海洋大学食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

2 江苏八陆生物科技有限公司, 江苏 南通 226400

李文婧, 陶妍, 赵冬梅, 等. 基于 SOE-PCR 的两种鱼类 hepcidin 基因串联及其在毕赤酵母中的表达. 生物工程学报, 2015, 31(5): 682-691.

Li WJ, Tao Y, Zhao DM, et al. Connection of hepcidin genes from two fish species and their expression in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 682-691.

摘要: Hpcidin 抗菌肽是由生物肝脏细胞表达的一类具有抗菌作用和铁代谢调节功能的碱性小分子肽, 它们在机体免疫系统中发挥了重要作用, 被认为是抗生素的理想替代品。通过重组 DNA 表达技术制备抗菌肽无疑是一条良好的途径。为扩大 hepcidin 的抗菌谱和提高其表达量, 通过 SOE-PCR 将斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* hepcidin 成熟肽的 cDNA“mCH”与尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* hepcidin 成熟肽的 cDNA“mTH”进行串联, 并在两端分别添加 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点, 以 pPIC9K 为真核表达载体, 成功构建了“pPIC9K-mCH-mTH”重组表达载体; 电转化进毕赤酵母 GS115 中, 经不同浓度 G418 和选择性培养基筛选以及对酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定, 得到高拷贝酵母转化子; 在 30 °C、以 1% 的甲醇诱导表达不同时间后, 经 Tricine-SDS-PAGE 分析, 表明发酵培养 72 h 时目的蛋白的表达量最高, 达 77 mg/L。发酵上清经 SP-Sepharose 阳离子交换层析纯化后获得高纯度的目的蛋白。抑菌实验显示含目的蛋白的发酵上清和经纯化后的重组目的蛋白对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌都有良好的抑菌效果。本研究结果为 hepcidin 抗菌肽的产业化生产奠定了良好的基础。

关键词: 抗菌肽, Hpcidin 成熟肽, 毕赤酵母, SOE-PCR

Received: September 10, 2014; **Accepted:** November 15, 2014

Supported by: the Industry-University-Research Cooperation of Shanghai Municipal Education Commission (No. 15CX30), Foundation of Key Laboratory of Urban Agriculture (South), Ministry of Agriculture, P. R. China (No. UA201307).

Corresponding author: Yan Tao. Tel: +86-21-61900384; E-mail: ytiao@shou.edu.cn

上海市教育委员会产学研合作项目 (No. 15CX30), 农业部都市农业 (南方) 重点实验室开放课题 (No. UA201307) 资助。

Connection of hepcidin genes from two fish species and their expression in *Pichia pastoris*

Wenjing Li¹, Yan Tao¹, Dongmei Zhao¹, and Bingbing Xu²

¹ Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

² Jiangsu Balu Biotechnology Co., LTD., Nantong 226400, Jiangsu, China

Abstract: Hepcidin are small cationic peptides with antibacterial activity expressed mainly in the liver of living organisms, and they play important roles in the host's immune response against microbial invasion and regulation of iron metabolism. Thus, they are considered to be good substitutes for traditional antibiotics. It is a good choice that the antimicrobial peptides are prepared by recombinant DNA expression. In the present study, two hepcidin mature peptide cDNAs from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (*mCH*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) (*mTH*) were connected by SOE-PCR in order to obtain more recombinant hepcidin with broad antimicrobial spectrum, and *EcoR* I and *Not* I sites were added to 5'- and 3'- ends of the fragment, respectively. The recombinant eukaryotic expression vector "pPIC9K-*mCH-mTH*" was successfully constructed, and transformed into *Pichia pastoris* GS115. The transformants containing multicopy gene insertion were selected by using different concentrations of G418 and other specific mediums, and identified by PCR for yeast genomic DNA. Expression was induced by adding 1% methanol at 30 °C for different times. Tricine-SDS-PAGE analysis demonstrated that the most appropriate expression time was 72 h, at which a high expression yield (77 mg/L) for the target protein was exhibited. The highly purified target protein was obtained from the fermentation supernatant by SP-Sepharose cation exchange chromatography. Bacteriostatic activity assay demonstrated that the fermentation supernatant containing the target protein and purified recombinant target protein had bacteriostatic activities against gram-positive and gram-negative bacterium. The present result provides the important initial value for industrial production of hepcidin antimicrobial peptide.

Keywords: antimicrobial peptide, hepcidin mature peptide, *Pichia pastoris*, splicing by overlapping extension PCR

抗菌肽 (Antimicrobial peptide, AMP) 是生物防御外来病菌时, 在体内迅速合成的具有免疫抗菌活性的肽类物质^[1]。抗菌肽具有结构和活性稳定、不易产生耐药性、对环境污染小等优点, 进而受到越来越广泛的关注。Hepcidin 又称 LEAP-1 (Liver-expressed antimicrobial peptide 1), 是一种主要由肝细胞产生和分泌的碱性小分子抗菌肽, 具有广谱抗菌活性^[2]; Nicolas 等^[3]以老鼠为研究对象, 证明 hepcidin 对于调节机体铁离子代谢平衡发挥着重要的作用, 任何生理状态对体内 hepcidin 水平的改变都将导致机

体铁水平的变化。Hepcidin 由 Kruusea 等^[4]首次从人血清中分离得到, 之后 Park 等^[5]从人尿液中也分离得到, 随后在两栖动物和鱼类中亦发现了类似于 hepcidin 的同源基因^[6-8]。Hepcidin 在各物种间具有较高的结构保守性, 尤其在成熟肽区域含有 6 或 8 个半胱氨酸残基, 以致在空间上可形成 3 或 4 对二硫键, 与其结构稳定和生物活性有关^[9]。鱼类 hepcidin 最早由 Shike 等^[10]从杂交斑纹鲈鱼 *Morone chrysops* × *M. saxatilis* 的鳃中分离到。目前, 已在黑鲷 *Acanthopagrus schlegelii*、斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*、尼罗罗

非鱼 *Oreochromis niloticus*、大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 等多种鱼类中分离克隆到 *hepcidin* 基因^[11-14]。虽然已有一些关于昆虫和两栖动物来源抗菌肽的原核或真核表达方面的研究报道^[15-16]，但迄今为止，对于鱼类抗菌肽的重组 DNA 表达研究还鲜有报道。

在过去的两年中，本研究室已分别对斑点叉尾鲴和尼罗罗非鱼的 *hepcidin* 成熟肽实现了在大肠杆菌中的成功表达，且表达的重组蛋白具有良好的抑制革兰氏阳性和阴性细菌的活性^[17-18]，但由于原核表达系统存在众所周知的局限性和不足，因而不适合实际生产中大规模的制备。据此，本研究拟通过建立酵母表达系统，实现对上述两种鱼类 *hepcidin* 成熟肽的重组 DNA 表达。此外，为了扩大目的蛋白的抗菌谱和提高表达量，通过重叠延伸 PCR (Splicing by overlapping extension PCR, SOE-PCR)^[19]对两种鱼类 *hepcidin* 成熟肽的 cDNA 进行了串联，并在它们之间添加信号肽酶切位点，便于分泌表达时两者的分离。本研究为鱼类抗菌肽的基因工程制备奠定了重要的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒和菌种

用于质粒复制和 cDNA 克隆的大肠杆菌 DH5 α 购自北京天根生物科技公司；克隆质粒 pMD19-T simple 购自日本 TaKaRa 公司；真核表达载体 pPIC9K 及毕赤酵母 GS115 购自美国 Invitrogen 公司。用于抑菌活性鉴定的金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、单增李斯特

菌 *Listeria monocytogenes*、沙门氏菌 *Salmonella enterica* 均为本实验室保藏菌种。

1.1.2 试 剂

Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒、DNA 分子量 marker 和蛋白质分子量 marker 购自北京天根生物科技公司；离子交换层析柱 SP-Sepharose 购自美国 GE Healthcare 公司；酵母粉 (Yeast extract)、胰蛋白胨 (Tryptone) 购自 OXOID 公司；其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 基于 SOE-PCR 的斑点叉尾鲴和尼罗罗非鱼 *hepcidin* 成熟肽的 cDNA 串联

编码斑点叉尾鲴 *hepcidin* 成熟肽的 cDNA “*mCH*”和编码尼罗罗非鱼 *hepcidin* 成熟肽的 cDNA “*mTH*”分别通过 RT-PCR 克隆而来^[17-18]。SOE-PCR 的策略如图 1 所示，设计的各引物序列见表 1。以 “*mCH*”为模板的 PCR 反应体系和条件如下：2.5 μ L *mCH*、各 4.0 μ L 10 μ mol/L 的正向引物 P1 和反向引物 P2、50 μ L PrimeSTAR[®]HS (Premix) (TaKaRa, Otsu, Japan)，用无菌水将反应液调至 100 μ L；94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s；60 $^{\circ}$ C 退火 30 s；72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min；30 个循环，最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 “*mTH*”为模板的 PCR 反应体系和条件同上，除了引物为 P3 和 P4、退火温度改为 62 $^{\circ}$ C。扩增 “*mCH-mTH*”串联片段的 PCR 反应体系和条件如下：0.5 μ L *mCH*、0.5 μ L *mTH*、各 0.8 μ L 10 μ mol/L 的正向引物 P1 和反向引物 P4、10 μ L PrimeSTAR[®]HS (Premix)，用无菌水将反应液调至 20 μ L；94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s；58 $^{\circ}$ C 退火 30 s；72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min；10 个循环；最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以该 PCR 产

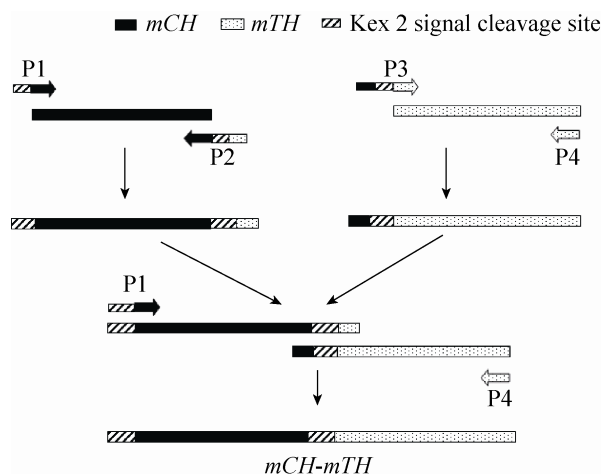


图 1 SOE-PCR 策略图

Fig. 1 Strategic map of SOE-PCR.

物为模板,设计一对分别含 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点的正向引物 Fc 和反向引物 Rc,用以扩增含黏性末端的“*mCH-mTH*”串联片段,PCR 反应体系如下:2.5 μ L *mCH-mTH*、各 4.0 μ L 10 μ mol/L 的正向引物 Fc 和反向引物 Rc、1.0 μ L *Ex Taq* plus DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) (TaKaRa, Otsu, Japan)、10 μ L *Ex Taq* plus 缓冲液、8.0 μ L dNTPs,用无菌水将反应液调至 100 μ L;反应条件同上述“*mCH-mTH*”串联片段的扩增,除了循环次数改为 30。扩增的片段经 DNA 纯化试剂盒纯化后,与 pMD19-T simple 载体连接,转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,由上海生工生物工程

技术有限公司进行 DNA 测序。

1.2.2 pPIC9K-*mCH-mTH* 重组表达载体的构建及其转化毕赤酵母 GS115

采用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对重组质粒“pMD19-T-*mCH-mTH*”进行酶切,经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段“*mCH-mTH*”后,将其与用同样酶处理过的表达载体 pPIC9K 按 15:1 连接 (图 2),在 T4 DNA 连接酶作用下,16 $^{\circ}$ C 保温 20 h,转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,通过菌落 PCR、双酶切和 DNA 测序对重组表达载体“pPIC9K-*mCH-mTH*”进行筛选。

“pPIC9K-*mCH-mTH*”经 *Sac* I 酶切线性化后电转入毕赤酵母 GS115,方法如下:将 5–10 μ L 线性重组质粒加入 80 μ L 酵母感受态细胞中,一并转入预冷的电转杯中,冰上放置 5 min 后进行电转,条件如下:1.5 kV、25 μ F、200 Ω 、5 ms;加入 600 μ L 预冷的 1 mol/L 山梨醇,30 $^{\circ}$ C 静置 1–2 h,取适量涂于 His $^{-}$ 的 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养至产生单克隆。理论上长出来的克隆都是发生同源重组的 His $^{+}$ 克隆。

1.2.3 酵母重组转化子的筛选及鉴定

将 MD 平板上的单菌落依次接种于 G418 浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0 g/L 的 YPD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2–5 d 后筛选高拷贝酵母转化子;将筛选到

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P1	AAAAGACAGAGTCACTCTCT	21
P2	GATGCCTCTTTTGAACCTGCAGCAGAA	27
P3	AGGTTCAAAAAGAGGCATCAAGTGTCGC	27
P4	TCAGAACCTGCAGCAAACCTCC	21
Fc	GAATTCAAAAGACAGAGTCACTCTCTCTG	30
Rc	GCGGCCGCTTAGAACCTGCAGCAAACCTCC	29

Underlines represent complementary regions, shaded areas represent sequences encoding Kex 2 protease recognition sites.

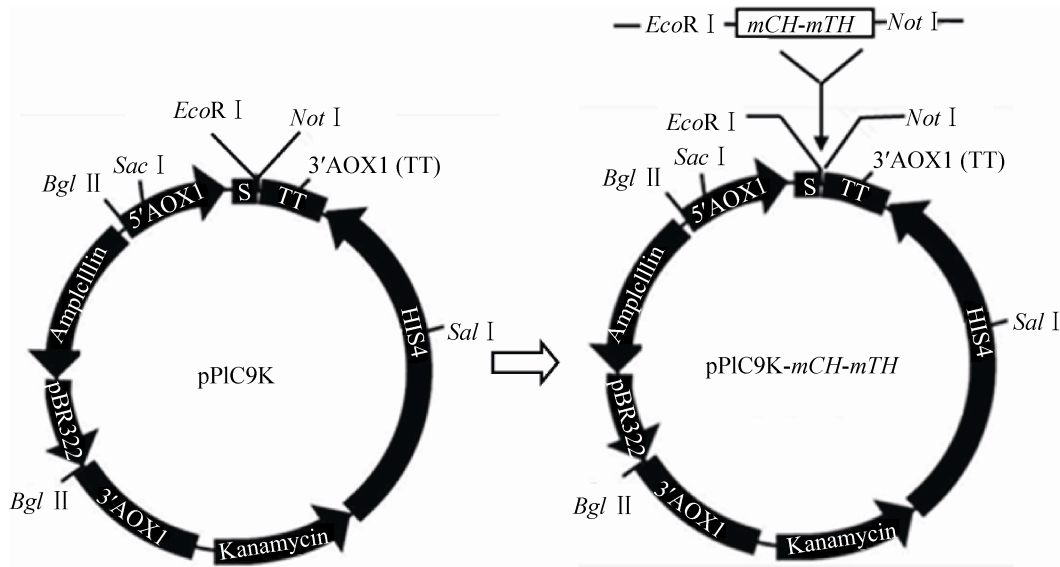


图 2 重组表达载体“pPIC9K-mCH-mTH”的构建

Fig. 2 Construction of “pPIC9K-mCH-mTH” recombinant expression vector.

的转化子在 MD 平板上培养以鉴定其 Mut⁺或 Mut⁻表型；提取 His⁺Mut⁺高拷贝酵母转化子的基因组 DNA，以此为模板，采用 pPIC9K 上的通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1，进行 PCR 扩增。

1.2.4 mCH-mTH 在毕赤酵母 GS115 中的表达及其纯化

挑取筛选到的酵母转化子，接种于 BMGY 液体培养基中，30 °C、250–300 r/min 培养至 $OD_{600}=2-6$ ，离心后用 BMMY 液体培养基重悬细胞至 OD_{600} 约为 1.0，进行甲醇诱导表达，每隔 24 h 取上清以备分析，并添加甲醇至终浓度为 1%；取诱导表达 72 h 的发酵上清通过 SP-Sepharose 阳离子交换层析进行纯化，用 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 预平衡，0.0–1.0 mol/L NaCl 进行梯度洗脱。纯化后的 mCH-mTH 通过 PBS (140 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L Na₂HPO₄、2 mmol/L KH₂PO₄，pH 7.4) 透析后，真空冷冻干燥成粉末，-80 °C 保存备用。通过

Tricine-SDS-PAGE 对纯化的蛋白进行鉴定，Tricine 浓度为 0.1 mol/L，浓缩胶、夹层胶和分离胶的浓度分别为 4%、10%和 16.5%。

1.2.5 发酵上清及纯化的重组体 mCH-mTH 的抑菌活性测定

发酵液通过离心后获得的上清再经浓缩 10 倍后的蛋白质浓度约为 13.5 mg/mL，将其用于活性测定。将金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌培养至对数生长期，各取 50 μL 菌液与 20 mL 营养琼脂混合，倒平板；用灭菌打孔器在平板上打 6 mm 的孔，各孔加入 80 μL 浓缩上清，空质粒经诱导表达的浓缩上清和磷酸钾缓冲液作为对照。

另一方面，用预冷的 PBS 溶解纯化的重组体 mCH-mTH 粉末，采用 Folin 酚法测其浓度为 1.4 mg/mL。选择金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、枯草芽胞杆菌、单增李斯特菌、沙门氏菌为待测菌，分别接种于 LB 液体培养基

中, 培养至 OD_{600} 为 0.2 (5×10^7 CFU/mL), 1:10 稀释至 5×10^6 CFU/mL, 分别吸取 50 μ L 至 96 孔培养板, 每孔加入 60 μ L mCH-mTH, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 阴性对照组各菌液中加入 60 μ L PBS; 测定各处理组和对照组在 OD_{600} 的吸光值, 计算存活细胞率^[20]。

2 结果与分析

2.1 通过 SOE-PCR 串联的 mCH-mTH cDNA 片段

通过 SOE-PCR, 扩增到 156 bp 的含 Kex 2 蛋白酶识别位点编码序列的“mCH-mTH”串联片段 (图 3A); 进一步以该片段为模板, 通过设计添加 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性酶切位点的引物, 扩增到 170 bp 的目的片段 (图 3B), 经 DNA 测序确证, 该两个限制性酶切位点和另两个 Kex 2 蛋白酶识别位点“Lys-Arg”的编码序列均被成功添加 (图 4)。除去所有酶切位点序列, 该片段编码了由 25 个氨基酸残基组成的斑点叉尾鲷 hepcidin 成熟肽“mCH”和由 22 个氨基酸残基组

成的尼罗罗非鱼 hepcidin 成熟肽“mTH”, 两者均含有 8 个保守的半胱氨酸残基。“mCH”与“mTH”之间添加的 Kex 2 蛋白酶酶切位点有利于分泌表达时两者的分离。

2.2 对于酵母重组表达系统的鉴定

以重组表达载体“pPIC9K-mCH-mTH”为模板, 以 5'*AOX1* 和 *Rc* 为引物, 通过菌落 PCR, 发现在约 277 bp 处有清晰谱带 (图 5A), 与理论相符; 进一步采用 *EcoR* I 和 *Not* I 对该载体进行双酶切处理, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 发现存在大、小分子量的两条谱带, 其中一条约 170 bp 的小分子量谱带属于目的片段 (图 5B); 最终通过 DNA 测序, 证明目的片段“mCH-mTH”已正确连接至 pPIC9K 表达载体, 并且核苷酸序列未发生任何碱基突变。

线性化的“pPIC9K-mCH-mTH”电转入毕赤酵母 GS115 后, 经含不同浓度 G418 的 YPD 培养基筛选, 发现在含 4.0 g/L G418 的 YPD 平板上有 13 株长势良好的酵母转化子, 将这些转化

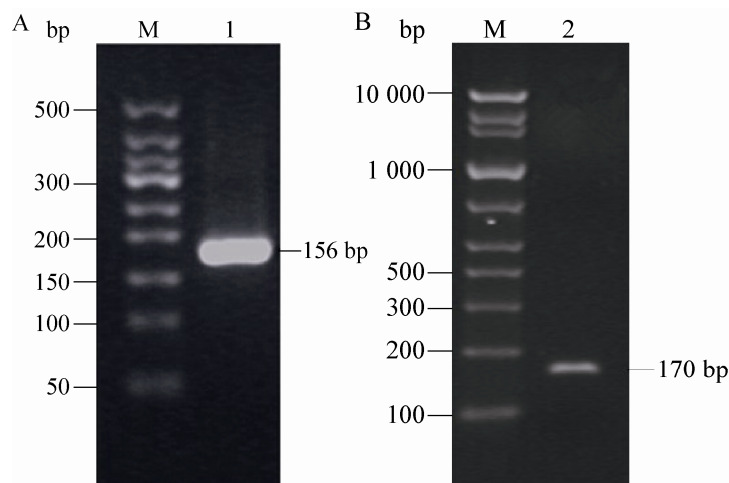


图 3 基于 SOE-PCR 扩增的串联片段“mCH-mTH”(A) 和对其添加酶切位点的 PCR 扩增 (B)

Fig. 3 SOE-PCR amplification of “mCH-mTH” fragment (A) and PCR amplification for adding restriction sites to it (B). M: DNA ladder; 1: amplified product for SOE-PCR; 2: amplified product for adding restriction sites.

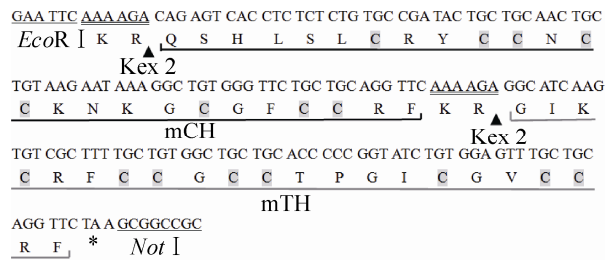


图4 用于连接至 pPIC9K 的片段的核苷酸及推断的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the fragment used as connecting with pPIC9K. Underlines are *EcoR* I and *Not* I sites; double underlines are Kex 2 recognition sites; shaded letters are conserved cysteine residues; triangle is Kex 2 cutting site.

子分别点到 MM 和 MD 平板上, 进一步鉴定其生长表型, 结果显示均为正常型 Mut⁺; 选择 1 个高拷贝转化子提取其基因组 DNA 为模板, 采用 pPIC9K 上的通用引物进行 PCR 扩增出一条约 644 bp 的清晰谱带 (图 6), 与理论值相符,

证明目的基因已成功整合进酵母染色体中。

2.3 在毕赤酵母 GS115 中表达的重重组体 mCH-mTH 及其纯化

上述经鉴定的高拷贝转化子在 BMMY 液体培养基中, 通过 1% 甲醇诱导表达 120 h。每 24 h 取样用于 Tricine-SDS-PAGE 分析, 由图 7 可见, 诱导表达 24 h 时在理论分子量附近有很淡的谱带, 48 h 时已有明显的谱带, 至 72 h 时表达量达到最高, 但因蛋白质分子量标准偏高, 不能够显示确切的分子量。随后收集表达 72 h 的发酵上清, 通过 SP-Sepharose 阳离子交换层析、采用 0.0–1.0 mol/L 的 NaCl 浓度梯度洗脱, 对目的蛋白进行分离纯化, 结果显示, 经 1.0 mol/L NaCl 洗脱的收集液在 1.7–4.6 kDa 之间有较宽的单一谱带 (图 8), 表明被分离的目的蛋白纯度较高, 经 Folin-酚法测定, 其浓度为 3.2 mg/mL, 根据纯化的 mCH-mTH 的量计算出表达量约为 77 mg/L。

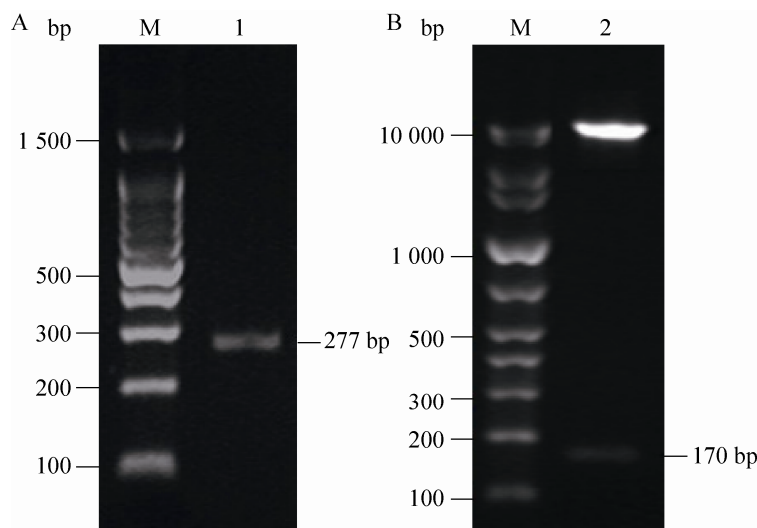


图5 重组表达载体“pPIC9K-mCH-mTH”的菌落 PCR (A) 和双酶切鉴定 (B)

Fig. 5 Identification of the recombinant expression vector “pPIC9K-mCH-mTH” by colony PCR (A) and restriction enzyme digestion (B). M: DNA ladder; 1: colony PCR product; 2: products digested by restriction enzymes.

2.4 重组体 mCH-mTH 的抑菌活性

首先, 通过琼脂糖弥散法检测了浓度为 13.5 mg/mL 的浓缩上清的抑菌活性, 由图 9 可见, 对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌都显示了较明显的抑菌圈。进一步通过微量肉汤稀释法对浓度为 1.4 mg/mL 的纯化的重组体 mCH-mTH 进行抑菌活性测定, 结果显示, 对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、枯草芽胞杆菌、单增李斯特菌、沙门氏菌均有很好的抑制效果, 菌株存活率均低于 15%, 而且对沙门氏菌的抑菌效果最好, 其菌株存活率仅为 8.4% (图 10)。

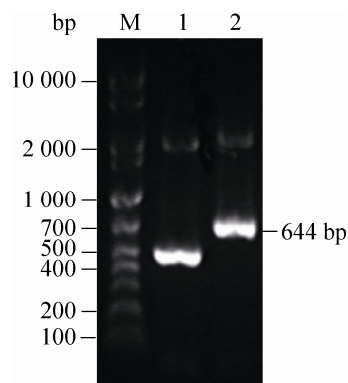


图 6 酵母转化子基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of genomic DNAs from *Pichia pastoris* transformants. M: DNA ladder; 1: transformant containing empty vector; 2: transformant containing recombinant expression vector.

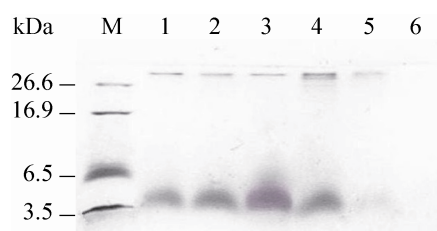


图 7 诱导表达不同时间的目的蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 7 Tricine-SDS-PAGE analysis for target proteins with different induction times. M: protein marker; 1-6: induction times are 120, 96, 72, 48, 24 and 0 h, respectively.

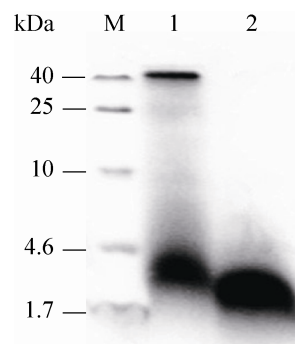


图 8 纯化的重组体 mCH-mTH 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 8 Tricine-SDS-PAGE analysis for the purified recombinant mCH-mTH. M: protein marker; 1: fermentation supernatant; 2: purified recombinant mCH-mTH.

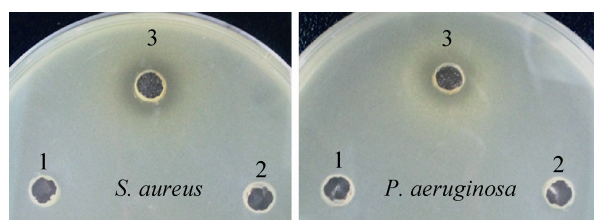


图 9 琼脂糖弥散法检测发酵上清的抑菌活性

Fig. 9 Detection of bacteriostatic activity for the fermentation supernatant by agarose diffusion assay. 1: induction expression supernatant for the empty vector; 2: potassium phosphate buffer; 3: fermentation supernatant containing mCH-mTH.

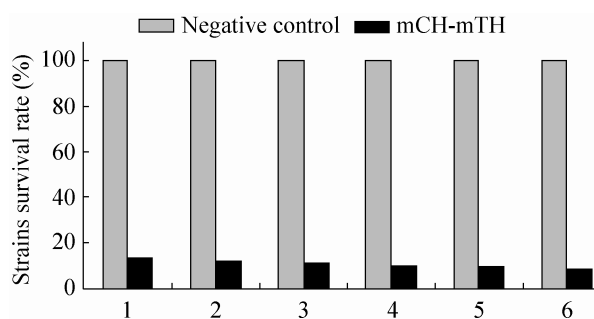


图 10 纯化的重组体 mCH-mTH 的抑菌活性测定

Fig. 10 Detection of bacteriostatic activity for the purified recombinant mCH-mTH. 1: *S. aureus*; 2: *P. aeruginosa*; 4: *B. subtilis*; 3: *E. coli*; 5: *L. monocytogenes*; 6: *S. enterica*.

3 讨论

抗菌肽在生物体内含量甚微,且分子量小,对其进行分离纯化困难。迄今为止,已有一些通过化学方法合成抗菌肽的研究报道^[21-22],但费用高、活性低。就鱼类 hepcidin 而言,Huang 等报道了化学合成的尼罗罗非鱼 hepcidin TH2-2 无抑菌活性^[13],究其原因可能与化学合成的抗菌肽分子难以形成正确的空间构象有关,以致影响了它们的生物学活性。据此,本研究通过 SOE-PCR 对编码两种鱼类 hepcidin 成熟肽的 cDNA 进行串联,以期提高重组体抗菌肽的表达量和扩大抗菌谱,事实上,与之前未经串联、通过大肠杆菌表达系统获得的单个重组体 mCH 和 mTH 的表达量 (47 mg/L) 和抗菌谱 (抗 2 个革兰氏阳性菌和 2 个革兰氏阴性菌) 相比,本研究中获得的重组体 mCH-mTH 显示了更高的表达量 (77 mg/L) 和更广的抗菌谱 (抗 3 个革兰氏阳性菌和 3 个革兰氏阴性菌)。采用的毕赤酵母表达系统有助于目的蛋白翻译后的正确折叠,导致其具有良好的生物学活性^[23-24];此外,分泌到胞外的目的蛋白便于分离纯化。在目的蛋白的 N 端以及在“mCH”与“mTH”之间添加 Kex 2 蛋白酶识别位点,以期使目的蛋白在分泌到胞外的过程中能将信号肽切除以及将两者分开,确保“mCH”和“mTH”的正确折叠。

发酵上清经阳离子交换层析纯化后,经 Tricine-SDS-PAGE 分析在 1.7–4.6 kDa 之间仅显示一条较深的宽谱带,但理论上应存在 3.2 kDa (mCH) 和 2.3 kDa (mTH) 的两个谱带,究其原因可能与两者的等电点很接近有关,采用 SP-Sepharose 阳离子交换层析无法将其分开,且它们的分子量很接近,Tricine-SDS-PAGE 也难以分辨两个谱带。

抑菌实验显示纯化后的目的蛋白对多种革兰氏阳性和阴性菌显示良好的抑菌效果,证明通过本酵母表达系统表达的目的蛋白具有良好的生物学活性。此外,考虑到生产上大规模制备时难以对表达产物进行纯化处理,而是直接对发酵上清进行处理,因此,对发酵上清的抑菌活性进行了检测,结果显示对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均有良好的抑制作用,该结果为 hepcidin 抗菌肽的产业化生产奠定了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 2004, 198: 169–184.
- [2] Chanu KV, Kumar A, Kumar S. Structure–activity relationship of buffalo antibacterial hepcidin analogs. *Indian J Biochem Biophys*, 2011, 48(5): 325–330.
- [3] Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, et al. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cell Mol Dis*, 2002, 29(3): 327–335.
- [4] Krause A, Neitz S, Magerth J. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*, 2000, 480(2): 147–150.
- [5] Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 7806–7810.
- [6] Tian WJ, Liu JY, Jiang JP. Construction of eukaryotic expression vector of antimicrobial peptide Odorgrin A from *Odorgrana grahmi* and its transformation into *Pichia pastoris*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, 16(2): 222–227 (in Chinese). 田汶佳, 刘炯宇, 江建平. 无指盘臭蛙皮肤抗菌肽 Odorgrin A 真核表达载体的构建与转化. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(2): 222–227.
- [7] Dang XW, Li MY, Chang J, et al. Research progress on hepcidin. *J Anhui Agri Sci*, 2010, 38(7): 3351–3353 (in Chinese). 党晓伟, 李梦云, 常娟, 等. Hepcidin 的研究进展.

- 安徽农业科学, 2010, 38(7): 3351–3353.
- [8] Douglas SE, Gallant JW, Liebscher RS. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(6/7): 589–601.
- [9] Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, et al. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*, 2002, 277(40): 37597–37603.
- [10] Shike H, Lauth X, Westerman ME, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem*, 2002, 269(8): 2232–2237.
- [11] Yang M, Wang KJ, Chen JH, et al. Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B.). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 1060–1071.
- [12] Bao BL, Peatman E, Li P, et al. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(11): 939–950.
- [13] Huang PH, Chen JY, Kuo CM. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: Analysis of their expressions and biological functions. *Mol Immunol*, 2007, 44(8): 1922–1934.
- [14] Wang KJ, Cai JJ, Cai L, et al. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides*, 2009, 30(4): 638–646.
- [15] Chen YH, Chen QH, Chen K, et al. Optimization of coding sequences and expression of antimicrobial peptide magainin II in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 615–624 (in Chinese).
陈玉海, 陈庆煌, 陈科, 等. 抗菌肽 magainin II 的密码子优化及在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 615–624.
- [16] Ravi C, Jeyashree A, Devi KR. Antimicrobial peptides from insects: an overview. *Resin Biotech*, 2011, 2(5): 1–7.
- [17] Tao Y, Zhao DM, Wen Y. Expression, purification and antibacterial activity of the channel catfish hepcidin mature peptide. *Protein Express Purif*, 2014, 94: 73–78.
- [18] Wen Y, Tao Y. Hepcidin from Tilapia, *Oreochromis niloticus*: its fusion expression in *Escherichia coli* and antimicrobial activity. *J Shanghai Jiaotong Univ: Agri Sci Ed*, 2012, 30(4): 68–75 (in Chinese).
文雅, 陶妍. 尼罗罗非鱼 Hepcidin 抗菌肽在大肠杆菌中的融合表达及其抗菌活性. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2012, 30(4): 68–75.
- [19] Ho S, Horton R, Hunt H. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77(1): 51–59.
- [20] Cui LW, Yuan QP, Li WJ. Purification and characterization of recombinant human hepcidin expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bull*, 2009, 8: 115–117 (in Chinese).
崔力文, 袁其朋, 李文进. 毕赤酵母工程菌人 hepcidin 的纯化及部分铁代谢活性研究. *生物技术通报*, 2009, 8: 115–117.
- [21] Zanin LM, Alvares DS, Juliano MA, et al. Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy. *Eur Biophys J*, 2013, 42(11): 819–831.
- [22] Sivertsen A, Isaksson J, Leiros HK, et al. Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin. *Bmc Struct Biol*, 2014, 14(1): 1–14.
- [23] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 1993, 11(8): 905–910.
- [24] Li Z, Moy A, Sohal K, et al. Expression and characterization of recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) protein from *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif*, 2009, 67(2): 175–181.

(本文责编 陈宏宇)