

## 抗菌肽天蚕素 B 基因及其串联体在毕赤酵母中的表达

王秀青<sup>1</sup>, 张素芳<sup>2</sup>, 曹瑞兵<sup>1</sup>, 周斌<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>1\*</sup>

(1. 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, 江苏 南京 210095;  
2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 通过重叠区扩增基因拼接法 (SOE) 合成抗菌肽天蚕素 B 基因, 并在其 N 端引入 Kex2 酶切位点。亚克隆天蚕素 B 并将 3 个亚克隆串联在一起, 每个单体前都加上 Kex2 酶切位点, 将天蚕素 B 以及串联体克隆至表达载体 pPICZαA 上, 用 Sac I 酶切使之线性化, 采用电击法转化毕赤酵母 SMD1168, 转化子用小瓶发酵。经 Tricine-SDS-PAGE 检测, 在 α 信号因子的引导下, 表达产物可以分泌到培养基中, 且具有明显抑菌活性。

**关键词:** 天蚕素 B; 抗菌肽; 毕赤酵母; 表达; 抑菌活性; 重叠区扩增基因拼接法 (SOE)

中图分类号: Q784 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 03-0120-04

## Antibacterial peptide Cecropin B and its tandem gene expressed in *Pichia pastoris*

WANG Xiu-qing<sup>1</sup>, ZHANG Su-fang<sup>2</sup>, CAO Rui-bing<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Cecropin B gene was achieved through the gene splicing by overlap extension (SOE). Especially a Kex2 signal cleavage site was fused in N end of the antibacterial peptide gene. Cecropin B gene was subcloned and ligated tandem. The modified Cecropin B and its tandem genes cloned into the pPICZαA vector to construct the recombinant expression vectors. The recombinant expression vectors were linearized by Sac I and transformed into *Pichia pastoris* SMD1168 strain by electroporation. The positive clones were screened and those clones were fermented in flask. Tricine-SDS-PAGE showed that the Cecropin B protein could be secreted into the culture leading by α-factor from pPICZαA. Antibacterial activities and heat-stability were also found.

**Key words:** Cecropin B; antibacterial peptide; *Pichia pastoris*; expression; antibacterial activity; splicing by overlap extension (SOE)

抗菌肽 (antibacterial peptide, ABP) 是生物体内经诱导产生的一类具有生物活性的小分子多肽。天蚕素 (cecropins) 是其中的一种, 由 37 ~ 39 个氨基酸组成, 相对分子质量约 4 000, 具有广谱的抗菌能力和抗病毒活性。天蚕素 B (Cecropin B) 是最早从天蚕体内分离得到的一种热稳定的可溶性多肽<sup>[1]</sup>, 在已分离的众多抗菌肽中抗性较强<sup>[2]</sup>。它不仅对一些革兰氏阳性菌及阴性菌有很高的抗菌活力, 且对真菌、原虫、某些病毒和一些肿瘤细胞也有明显的杀伤作用, 且该抗菌肽对真核细胞几乎没有破坏作用<sup>[3]</sup>。由于抗菌肽对细菌具有很强的杀伤作用, 且相对分子质量较小, 所以不宜在原核系统中直接表达。我们利用毕赤酵母偏爱密码子设计合成天蚕素 B 成熟肽段, 使其在毕赤酵母系统中得到高效表达。近年来国内外先后报道了有关抗菌肽基因以及与其他相关基因融合的克隆和表达, 但未见有关将抗菌肽基因串联表达的报道。本试验的目的是通过基因串联, 进一步探讨单体和串联体表达之间的差异以及相关性和相关性, 以期找到一种具有更高活性的抗菌蛋白, 为以后进行大规模生产奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 金黄色葡萄球菌 CowanI、大肠杆菌 K88、枯草芽孢杆菌、毕赤氏巴斯德酵母

收稿日期: 2006-03-28

基金项目: 江苏省科技攻关项目 (BE2006364); 教育部高等学校博士点基金 (20050307023)

作者简介: 王秀青, 博士研究生。\* 通讯作者: 陈溥言, 教授, 主要从事分子病毒学与分子免疫学研究, E-mail: aid@njau.edu.cn。

(*Pichia pastoris*) 受体菌 SMD1168 (His/Mut<sup>+</sup>)、表达载体 pPICZ $\alpha$ -A 均购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂 高保真 DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA ligase、dNTP、限制性内切工具酶购于 TaKaRa 公司, Tricine 购于上海生物工程公司, SDS-PAGE 超低分子质量标准品 (C6210) 购于 Sigma 公司, Zeocin 购于 Invitrogen 公司, SDS-PAGE 低分子质量标准品购于生兴生物公司, D-葡萄糖、D-山梨醇、peptone-Y、酵母提取物、酵母氮源基础培养基 (yeast nitrogen base, YNB)、生物素等购于美国 BBI 公司, 其他试剂均为分析纯。本试验所有引物均由 Invitrogen 上海分公司合成。

## 1.2 天蚕素 B 基因的合成

根据 GenBank 中天蚕素 B 成熟肽段的氨基酸序列, 选用酵母偏爱密码子, 利用 DNASTar、Primer premier 软件设计天蚕素 B 基因, 在其 N 端加上  $\alpha$  信号肽 Kex2 裂解位点, 以保证所分泌表达的天蚕素 B 具有天然 N 端。设计 3 条引物片段 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>, 2 条引物之间有 20 个碱基配对, 扩增改造后的天蚕素 B 基因。基因序列如下: F<sub>1</sub>: 5'-cctctcgagaaaagaagtggaaggtcttcaagaagatcgaaagatgggtcgtaac-3'; F<sub>2</sub>: 5'-gatagctggaccagccttgacgataccgtacggatgttacgccatcttttc-3'; F<sub>3</sub>: 5'-gctggtcagctatcgctgtcctaggtgaaagtaaggctctacaatgatctagatagact-3'。

基因合成采用重叠区扩增基因拼接法 (SOE)<sup>[4]</sup>, 天蚕素 B 基因 5' 和 3' 端分别引入 *Xho* I、*Xba* I 内切酶位点; 另设计合成 1 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天蚕素 B 基因区, 扩增长度 496 bp。P<sub>1</sub>: 5'-gtctccacattgtatgcttc-3'; P<sub>2</sub>: 5'-ctgtgcaggaactgat-3'。

应用 SOE 法, 以 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub> 片段互为模板互为引物进行 PCR 扩增。为了保证 SOE 合成的特异性, 采用降落 (touchdown, TD) PCR 技术。TD-PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): 10  $\times$  PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 3  $\mu$ L, dNTP (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L, F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub> (40 pmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 2  $\mu$ L, *ExTaq*<sup>TM</sup> 0.5  $\mu$ L, 灭菌超纯水 38.5  $\mu$ L。混匀, 瞬间离心, 进行 TD-PCR。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 进入 TD-PCR 循环: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火温度从 65  $^{\circ}$ C 降至 50  $^{\circ}$ C, 每个循环 1 min, 每一个循环降低 0.5  $^{\circ}$ C, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环后温度降至 50  $^{\circ}$ C, 再在最适退火温度 52  $^{\circ}$ C 进行 15 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。取 TD-PCR 产物 10  $\mu$ L, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察并拍照。

## 1.3 天蚕素 B 的亚克隆以及串联体的生成

对所合成的天蚕素 B 基因进行测序, 确认基因序列完全正确后再设计 6 条引物用来扩增天蚕素 B 基因, 分别在引物的 5' 和 3' 端引入 *Xho* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Xba* I 4 个酶切位点。为了保证串联后的串联体有天然的 N 端, 在 5' 端酶切位点之后添加了 Kex2。6 条引物序列如下: P<sub>3</sub>: 5'-accctc-gagaaaagaaaagtggaag-3'; P<sub>4</sub>: 5'-actggatcctgttagagccttag-3'; P<sub>5</sub>: 5'-ttaggatccaaaagaaaagtggaag-3'; P<sub>6</sub>: 5'-tgg-gaattctgttagagccttag-3'; P<sub>7</sub>: 5'-tgggaattcaaaagaaaagtggaag-3'; P<sub>8</sub>: 5'-ccgtctagatcattgttagagcct-3'。

## 1.4 重组表达载体的构建

天蚕素 B 的 PCR 产物和 pPICZ $\alpha$ -A 均用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切, 串联体用不同的限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Xba* I 分别进行酶切之后用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 其具体操作见文献 [5]。重组表达质粒进行 PCR、*Xho* I/*Xba* I 双酶切及缺失酶切位点鉴定, 其具体操作见参考文献 [6]。PCR 产物以及酶切鉴定为阳性的质粒送 Invitrogen 上海分公司测序。将构建正确的重组表达质粒分别命名为 pPICZ $\alpha$ A-CB, pPICZ $\alpha$ A-3XCB。

## 1.5 重组载体转化毕赤酵母 SMD1168 (His/Mut<sup>+</sup>) 及 Mut<sup>+</sup> 转化子的筛选和鉴定

将感受态毕赤酵母 SMD1168 (His/Mut<sup>+</sup>) (80  $\mu$ L) 与 *Sac* I 线性化 pPICZ $\alpha$ A-CB、pPICZ $\alpha$ A-3XCB (5  $\mu$ g) 相混合, 转移至预冷的直径 0.2 cm 的电转杯 (Bio-Rad 的产品) 中; 置冰上 5 min, 1.5 kV、25  $\mu$ F、200  $\Omega$  电击 5 ms, 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 山梨醇; 取 200  $\mu$ 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 说明书。

采用 PCR 方法分析毕赤酵母转化子, 用煮—冻—煮法制备 PCR 模板<sup>[7]</sup>, 以 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物, 反应体系同上。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 48  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 6 min。其中 pPICZ $\alpha$ A-CB 以能扩出 496 bp 的克隆定为阳性转化子。pPICZ $\alpha$ A-3XCB 以酵母的 3' 和 5' AOX 引物为引物, PCR 体系同上。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。以能扩出 1.2 kb 的克隆定为阳性转化子。

### 1.6 重组毕赤酵母在摇瓶中的诱导表达

将筛选到的阳性酵母菌接种到 5 mL BMGY 培养基中, 30 °C 230 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养约 22 h 至  $D_{600}$  达到 3~6; 室温 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 收集菌体重悬于 25 mL BMMY 培养基中, 进行诱导表达。28 °C 250 r · min<sup>-1</sup> 培养 60 h, 期间每 24 h 补加终含量为 1% (体积分数) 的甲醇。72 h 后, 5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 收集上清液, 进行抑菌活性测定。

### 1.7 Tricine-SDS-PAGE 鉴定

具体操作步骤参照文献 [8] 进行。

### 1.8 重组天蚕素 B 及其串联体的抗菌活性测定

采用标准琼脂孔穴扩散法<sup>[9]</sup>, 以金黄色葡萄球菌 Cowan I、大肠杆菌 K88、枯草芽孢杆菌 (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分离鉴定) 为试验菌株, 将供试菌悬浮液 ( $D_{600} = 0.2 \sim 0.3$ ) 200  $\mu$ L 与 55 °C 的 LB 固体培养基 25 mL 混匀后铺平板; 待其凝固后用灭过菌的打孔器 (直径 5 mm) 打孔, 孔中滴加 20  $\mu$ L 待测的表达上清液, 37 °C 培养 8~12 h。以同体积的 pPICZ $\alpha$ A 空载体转化酵母的上清液为阴性对照, Amp 为阳性对照。第 2 天测量抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列验证

测序结果显示, 改造后的天蚕素 B 基因全长 123 bp, 已正确插入表达载体的 Kex2 蛋白酶裂解位点, 对比核苷酸序列推导出的氨基酸序列, 与天蚕素 B 氨基酸残基完全一致。对合成的串联体测序显示, 3 个串联单体已经首尾相连接设计正确合成。

### 2.2 重组天蚕素 B 以及串联体的电泳检测

在改良的 Tris-Tricine 电泳系统中, 重组表达的天蚕素 B 得到了比较理想的电泳分辨率和带型 (图 1)。

### 2.3 重组抗菌肽初步抗菌活性测定结果

试验结果显示 (图 2), 重组天蚕素 B 对 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、金黄色葡萄球菌以及枯草芽孢杆菌均有良好的抑菌作用。其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到 346 mm, 与 5  $\mu$ L Amp (25  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>) 的抑菌圈直径相当, 重组天蚕素 B 对耐 Amp 的大肠杆菌的抑菌圈直径达到 287 mm。

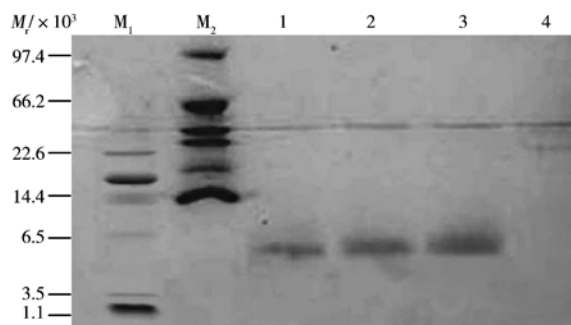


图 1 重组天蚕素 B 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 Tricine-SDS-PAGE of the Cecropin B

$M_1$ ,  $M_2$ . 分子质量蛋白标准品 Molecular weight markers for proteins; 1, 2. pPICZ $\alpha$ A-CB 表达的上清液 Supernatant of pPICZ $\alpha$ A-CB; 3. pPICZ $\alpha$ A-3XCB 表达的上清液 Supernatant of pPICZ $\alpha$ A-3XCB; 4. 载体对照 CK

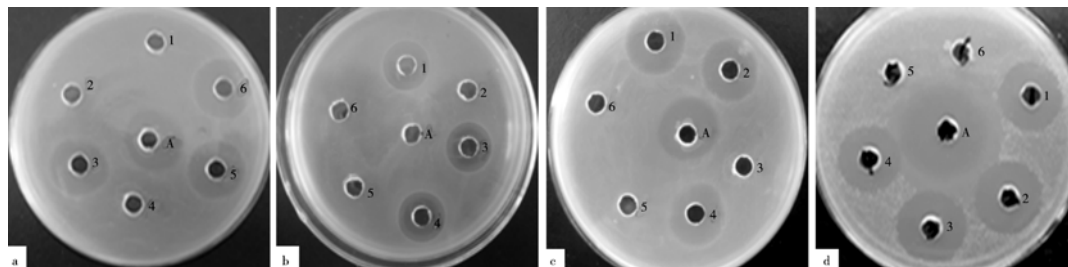


图 2 重组天蚕素 B 抗菌肽的抑菌活性

Fig. 2 Antibacterial activity of Cecropin B

a. 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性 Cecropin B against *Staphylococcus aureus*: 1, 2, 4. 载体对照 CK; 3, 5. Cecropin B; 6. 天蚕素 B 串联体 Poly-cecropin B; A. Amp (25  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>)。b. 对大肠杆菌 K88 的抑菌活性 Cecropin B against *E. coli* (K88): 1. Cecropin B; 2, 5, 6. 载体对照 CK; 3, 4. 天蚕素 B 串联体 Poly-cecropin B; A. Amp (25  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>)。c. 对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的抑菌活性 Cecropin B against *E. coli* DH5 $\alpha$ : 1, 2. Cecropin B; 3, 5, 6. 载体对照 CK; 4. 天蚕素 B 串联体 Poly-cecropin B; A. Amp (25  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>)。d. 对枯草芽孢杆菌的抑菌活性 Cecropin B against *Bacillus subtilis*: 1, 3. Cecropin B; 2, 4, 6. 载体对照 CK; 5. 天蚕素 B 串联体 Poly-cecropin B; A. Amp (25  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>)。

### 3 讨论

为模拟天然天蚕素 B 的结构, 解决翻译后不能进行酰胺化的修饰问题, 笔者在设计天蚕素 B 时, 在其终止密码子 TAG 之前设计了 1 个谷氨酰胺的密码子 CAA, 这样翻译出的多肽其末端就带有  $\beta$  位的酰胺基团, 其与天然抗菌肽中  $\alpha$  位酰胺基团对抗菌活性作用的差异, 有待进一步研究。但从表达产物的抑菌活性可以得出, 由基因直接编码出 C 末端带有酰胺基团的天蚕素 B 抗菌肽具有抗菌活性。

在小分子多肽的基因工程表达中经常遇到的问题是表达产物容易降解, 检测和纯化都会有一定困难, 所以常采用融合蛋白的策略进行表达, 但因为目的多肽在融合蛋白中所占比例较小, 即使融合蛋白表达量很高, 目的蛋白的量也并不高<sup>[10-13]</sup>。本研究尝试用一个基因多拷贝同向串连融合表达的策略, 以期获得较高表达量的目的蛋白。常见的多拷贝构建通常采用非对称性识别序列的内切酶, 过程复杂, 对使用的载体有限制, 操作成本也比较高, 故使用比较少。本试验在设计时利用了 Kex2 裂解位点能够在蛋白质分泌过程中产生作用, 使每个单体都能得到表达, 同时也能完全去掉在构建重组载体过程中加入的限制性内切酶所表达的氨基酸, 使抗菌肽的氨基酸序列受到最小的影响, 有利于蛋白质二级结构的形成。但是, 从抑菌直径来看, 串联体并不比单体的抑菌直径大很多。因此, 仅从表达量方面分析不足以说明 3 个单体都得到了表达, 这可能与毕赤酵母的表达条件有关, 也可能与 Kex2 酶切位点的酶切效果有关。

#### 参考文献:

- [1] 赵东红, 戴祝英, 周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 14-17
- [2] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation and structure of Cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae* [J]. Eur J Biochem, 1982, 127(1): 207-217
- [3] 胡云龙, 胡泰山, 林世康, 等. Cecropin B 抗菌肽基因的定向诱变与表达 [J]. 药物生物技术, 1999, 6(4): 193-197
- [4] Horton R M, Hunt H D, Ho S N, et al. Engineering hybrid gene without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. Gene, 1989, 15, 77(1): 61-68
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬燕, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1987
- [6] 张素芳, 贾赞, 蔡梅红, 等. Magainin 和 CecA-mil 抗菌肽基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达 [J]. 生物工程杂志, 2004, 24(7): 93-97
- [7] 刷海, 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 [J]. 天津医药, 2003, 31(5): 270-272
- [8] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368-379
- [9] 管远志, 王艾林, 李坚. 医学微生物学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 108-121
- [10] Higuchi R, Krummel B, Saiki R K. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interaction [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(15): 7351-7367
- [11] Davis G T, Bedzyk W D, Voss E W, et al. Single chain antibody encoding genes: one step construction and expression in eukaryotic cells [J]. Biotechnology, 1991, 88(9): 3792-3796
- [12] Kain K C, Orlandi P A, Lanar D E. Universal promoter for gene expression without cloning: expression PCR [J]. Biotechniques, 1991, 10(3): 366-374
- [13] Cruciani R A, Barker J L, Zasloff M, et al. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(9): 3792-3796

责任编辑: 周广礼