

仇妍虹, 李鹏, 李斐, 等. 重组家蝇抗菌肽 Des-HF 在酵母中的表达及对金黄色葡萄球菌的抗菌活性 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 105 - 109

重组家蝇抗菌肽 Des-HF 在酵母中的表达及 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性

仇妍虹^{1,2}, 李鹏¹, 李斐³, 郑其升¹, 曹瑞兵¹, 周斌¹, 陈德胜¹, 陈溥言^{1*}

(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. 北京市兽医卫生监督所, 北京 100044; 3. 青岛农业大学生命科学学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 参考家蝇防御素抗菌肽基因序列 (AY260152) 设计 4 条引物, 用降落 PCR 方法获得家蝇防御素抗菌肽成熟肽基因。将基因克隆入酵母表达载体 pPICZα-A, 构建分泌型重组酵母表达载体 pPIC-Des-HF, 转化 *Pichia pastoris* 受体菌 SMD1168, 在醇氧化酶 (AOX) 启动子调控下, 相对分子质量约 5 000 的重组抗菌肽 Des-HF 获得表达。抗菌试验结果表明, 该表达产物对金黄色葡萄球菌有较好的抑菌活性。以小鼠为试验模型研究重组抗菌肽对金黄色葡萄球菌的体内抗菌活性, 试验结果表明, 240 μg 重组 Des-HF 可分别保护小鼠免受 10 倍最小致死浓度的金黄色葡萄球菌 (ATCC26003) 和 Cowan I 的攻击。

关键词: 家蝇防御素抗菌肽; Des-HF; 酵母; 分泌表达; 金黄色葡萄球菌; 抗菌活性

中图分类号: S852.4⁺4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2009) 01-0105-05

Secretive expression of recombinant antibacterial peptide Des-HF in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*

QIU Yan-hong^{1,2}, LI Peng¹, LI Fei³, ZHENG Qi-sheng¹, CAO Rui-bing¹,
ZHOU Bin¹, CHEN De-sheng¹, CHEN Pu-yan^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Diseases Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Beijing Institute of Veterinary Supervision, Beijing 100044, China;
3. College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: With four pairs of specific primers designed according to the relevant sequence published on GenBank, the housefly antibacterial peptide defense gene was amplified with touch-down PCR method. After sequencing, the target gene was directly cloned into multiple cloning site of the *Pastoris* expression plasmid pPICZα-A to get the recombinant plasmid pPIC-Des-HF. The 5 000 relative molecular weight recombinant antibacterial peptide Des-HF was secretively expressed in the *Pichia pastoris* host cell SMD1168, when induced with methanol. The recombinant Des-HF showed perfect bacteriostasis activity against Gram-positive bacteria. Mice as animal model were used to test bacteriostasis activity and the result indicated that 240 μg recombinant Des-HF could completely protect the mice from ten folds minimum lethal dose concentration of *Staphylococcus aureus* (ATCC26003) and Cowan I.

Key words: housefly antibacterial peptide defense; Des-HF; *Pichia pastoris*; secretive expression; *Staphylococcus aureus*; antibacterial activity

抗生素的滥用不仅导致了药物残留等公共卫生隐患, 更导致耐药菌株的出现。鉴于此, “无毒、无残留、无耐药性” 是新一代抗菌制剂的发展趋势和要求。抗菌肽因具有不易诱导产生耐药菌株, 容易被降解, 不易在微生物体内富集, 抗菌谱广, 因此被认为是能够替代抗生素的首选药物, 当前已有一些抗菌肽进入临床试验^[1-3]。

防御素是近年来发现的一组新型抗菌活性肽。它是一类富含精氨酸的阳离子低分子短肽, 广泛存在

于动物、植物和昆虫体内^[4-5]。家蝇防御素抗菌肽 (housefly antibacterial peptide defense) 是一类碱性多肽, 分子中有 α -螺旋结构, 含有半胱氨酸并形成分子内二硫桥, 主要作用于革兰氏阳性菌^[6]。本文采用毕赤酵母表达系统表达家蝇防御素抗菌肽 Des-HF, 并对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 进行了抑菌试验。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌株与试剂

毕赤氏巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*) 受体菌 SMD1168、表达载体 pPICZ α -A 购于 Invitrogen 公司。指示菌株金黄色葡萄球菌 ATCC26003 和 Cowan I 均为本实验室保存。

低分子量蛋白质标准品购于生兴生物工程有限公司; SDS-PAGE 低分子量标准品 (C6210)、Tricine 和 TrisBase 购于 Sigma 公司; Zeocin 购于 Invitrogen 公司; PEG 6000、山梨醇、Peptone-Y、酵母提取物、酵母氮源基础培养基 (YNB)、生物素等购于 BBI 公司; T₄ DNA 连接酶、*rTaq* 酶、dNTP、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。其他试剂均为分析纯。普通级昆明种雄性小鼠, 体重 18~22 g, 购于南京医科大学实验动物中心。

1.2 抗菌肽基因设计

根据 Des-HF 的氨基酸序列, 选用毕赤酵母偏好密码子设计了 4 条引物: F₁、F₂、F₃ 和 F₄。其中 F₁ 引物 5'端加入 *Xho* I 酶切位点和 α 信号肽 *Kex2* 裂解位点, 以保证所分泌表达的抗菌肽具有天然 N 端。F₄ 引物 5'端加入 *Xba* I 酶切位点。F₁ 和 F₂ 改造后的 *Des-HF* 基因 2 个片段的 3'端有 19 bp 的互补序列, F₃ 和 F₄ 改造后的 *Des-HF* 基因 2 个片段的 3'端有 18 bp 的互补序列, F₃ 改造后的 *Des-HF* 成熟肽基因 5'端和 F₂ 改造后的 *Des-HF* 基因 3'端有 21 bp 的互补序列, 符合基因重叠延伸拼接法 (gene splicing by overlap extension, SOE) 的要求, 全部引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 *Des-HF* 基因的扩增

Des-HF 基因的合成采用 SOE 法^[7]。为保证 SOE 合成的特异性, 采用了降落 (touch-down, TD) PCR 技术并进行优化。TD-PCR 反应体系: 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ free) 5.0 μ L, 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 3.0 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 1.0 μ L, 20 pmol \cdot L⁻¹ F₁、F₂、F₃、F₄ 各 2.0 μ L, *rTaq* 酶 0.5 μ L, 灭菌超纯水 32.5 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 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, 每个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环后温度降至 50 $^{\circ}$ C, 再在最适退火温度 53 $^{\circ}$ C 条件下进行 15 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 TD-PCR 产物 10 μ L, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察并拍照。

1.4 重组酵母表达载体的构建

用 SOE 合成好的基因经 *Xho* I、*Xba* I 双酶切, 定向插入酵母表达载体 pPICZ α -A 中, 构建重组质粒 pPIC-Des-HF, 经缺失酶切位点鉴定^[7]阳性的质粒送上海博亚公司测序。将测序正确的重组质粒转化酵母菌 SMD1168, 再进行重组酵母的电击转化、筛选。

1.5 酵母重组子的诱导表达

将筛选到的阳性酵母菌接种于 100 mL BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C 250 r \cdot min⁻¹ 培养至 D_{600} 达到 5~6 时离心收集菌体, 重悬于 500 mL BMMY 培养基 (以进行诱导表达), 28 $^{\circ}$ C 250 r \cdot min⁻¹ 振荡培养 72 h, 期间每 24 h 补加终浓度为 1% (体积分数) 的甲醇。10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min 收集培养上清液, 进行 Tricine-SDS-PAGE 分析及 Bradford 蛋白质总含量测定。

1.6 重组抗菌肽 Des-HF 的抗菌活性测定

采用标准琼脂孔穴扩散法^[8], 以金黄色葡萄球菌 ATCC26003 为试验菌株。

1.7 试验用菌对小鼠的最小致死剂量的测定

将计数好的试验用菌 (1×10^8 CFU \cdot mL⁻¹) 分别进行 1:1、1:10 和 1:100 稀释。21 只小鼠随机分为 7 组, 1~3 组和 4~6 组分别腹腔注射金黄色葡萄球菌 ATCC26003 和 Cowan I, 根据小鼠体重每 20 g 接种 0.5 mL。第 7 组为对照组, 接同剂量的生理盐水。接种后观察 48 h, 每天纪录小鼠死亡数, 以 48 h 内死亡小鼠的最小接菌剂量为该试验用菌的最小致死剂量 (MLD)。无菌剖杀死鼠进行细菌检查。

1.8 小鼠体内重组抗菌肽最小保护浓度的测定

将50只小鼠随机均分为10组, 1~4组为Des-HF加ATCC26003试验组, 6~9组为Des-HF加Cowan I试验组, 第5组和第10组分别为ATCC26003和Cowan I接菌对照组。先将1~4、6~9组分别腹腔注射240、180、120和60 ng的重组抗菌肽, 再参照1.7节实验结果, 腹腔注射两种试验菌10倍MLD, 观察48 h, 记录各组小鼠的存活情况, 确定重组抗菌肽对小鼠的最小保护浓度。

1.9 重组抗菌肽对小鼠感染金黄色葡萄球菌的预防与治疗对比试验

菌液 (1×10^7 CFU · mL⁻¹) 准备同上。将64只小鼠随机均分成8组, 1~3组和4~6组分别是ATCC26003和Cowan I试验组, 分别为两种试验用菌相应的接菌对照组、注射预防组和注射治疗组; 第7组为只注射Des-HF抗菌肽的对照组; 第8组为氨苄青霉素治疗对照组。各组接菌剂量均为每20 g体重0.5 mL。预防组以240 μg (据1.8节得出的数据) 重组抗菌肽Des-HF的剂量在注射菌液前2 h腹腔注射, 治疗组则在注射菌液后2 h用药, 隔12 h后再同样剂量重复给药1次, 观察48 h, 记录小鼠的存活情况。48 h不死亡的试验组小鼠扑杀后无菌采取其腹腔液, 查看病原菌的分离情况。

2 结果与分析

2.1 序列测定结果

根据核苷酸序列推导出的氨基酸序列结果, 经SOE合成的Des-HF抗菌肽基因全长120 bp, 已正确插入表达载体的Kex2蛋白酶裂解位点之后。

2.2 表达产物的Tricine-SDS-PAGE分析

对筛选到的阳性酵母菌诱导表达, 表达上清液进行Tricine-SDS-PAGE电泳(图1), 电泳结果显示重组Des-HF抗菌肽的相对分子质量约为5 000。用DNA/RNA微量定量仪测定得出Des-HF蛋白含量为200 μg · mL⁻¹。

2.3 重组抗菌肽Des-HF活性测定结果

测定结果显示(图2), 抗菌肽Des-HF对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌有较好的活性, 抑菌圈直径最小为1.55 cm, 最大为2.47 cm。5 μL Amp (2.5 μg · mL⁻¹) 对照抑菌圈的直径为5.61 cm。

2.4 试验用菌最小致死剂量的测定结果

各试验组接种不同剂量的金黄色葡萄球菌ATCC26003和Cowan I后, 死亡情况见表1。接种原浓度(约 1×10^8 CFU · mL⁻¹) 1:10倍稀释ATCC26003和Cowan I试验组, 所有小鼠均在48 h内死亡, 1:100倍稀释组(约 1×10^6 CFU · mL⁻¹) 的小鼠则有部分存活。因此, 将1:10倍稀释的细菌剂量(1×10^7 CFU · mL⁻¹) 试验用金黄色葡萄球菌ATCC26003和Cowan I定为两者对小鼠的最小致死剂量。

2.5 小鼠体内重组抗菌肽最小保护剂量的测定

重组抗菌肽Des-HF以240、180、120和60 μg的剂量腹腔注射小鼠, 1 h后按10倍MLD的剂量分别接种金黄色葡萄球菌ATCC26003和Cowan I, 观察48 h内小鼠的存活情况。结果发现, 每只小鼠采用240 μg注射剂量时可完全保护ATCC26003和Cowan I对小鼠的攻击, 采用180 μg小鼠注射剂量时可明显降低小鼠的死亡数; 低于此剂量时, 对小鼠仅有部分保护, 不能减少小鼠细菌感染的死亡数。2个对照组的小鼠全部死亡(表2)。因此240 μg剂

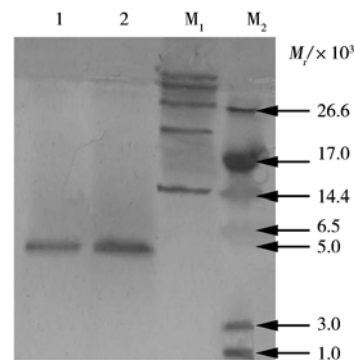


图1 抗菌肽Des-HF的Tricine-SDS-PAGE分析

Fig. 1 The Tricine-SDS-PAGE of the antibacterial peptide Des-HF

M₁: 低相对分子质量蛋白质标准; M₂: 超低相对分子质量蛋白质标准; 1~2: SMD1168/pPIC-Des-HF表达上清液

M₁: Low relative molecular weight markers for proteins; M₂: Ultra-low relative molecular weight markers for proteins; 1-2: The culture supernatant of SMD1168/pPIC-Des-HF

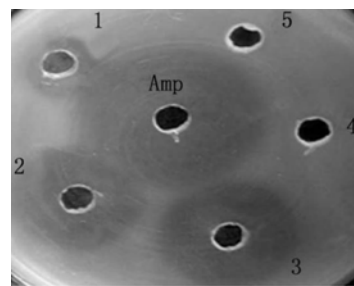


图2 重组抗菌肽的活性测定

Fig. 2 Detection of the antibacterial activity of antibacterial peptides Des-HF against *Staphylococcus aureus*

Amp: Amp对照(2.5 μg · mL⁻¹); 1~4: 抗菌肽Des-HF不同阳性克隆表达上清液; 5: pPICα-A空载体转化SMD1168酵母表达蛋白的阴性对照

Amp: Amp control (2.5 μg · mL⁻¹); 1-4: Supernatant of antibacterial peptides Des-HF; 5: The control of supernatant of *Pichia pastoris* SMD1168/pPICα-A

量的 Des-HF 为体内保护试验的注射剂量的参考值。

表1 细菌对小鼠最小致死剂量测定 ($n=3$)

Table 1 Detection of MLD of the bacteria for mice

处理 Treatment	受菌攻击后死亡数/只 Number of death after infection								
	0 ~ 24 h			24 ~ 48 h			合计 Total		
	1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100
ATCC26003	3	1	0	0	2	1	3	3	1
Cowan I	3	3	1	0	0	1	3	3	2
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: 1:1、1:10、1:100 为细菌的稀释倍数。1:1, 1:10, 1:100 is multiple of attenuan ATCC26003 and Cowan I.

表2 抗菌肽保护剂量测定 ($n=5$)

Table 2 Detection of the recombinant antibacterial peptides protecting concentration

注射剂量/ μg Injected dosage	受菌攻击后死亡数/只 Number of death after infection					
	ATCC260003			Cowan I		
	0 ~ 24 h	24 ~ 48 h	合计 Total	0 ~ 24 h	24 ~ 48 h	合计 Total
240	0	0	0	0	0	0
180	0	2	2	2	0	2
120	2	3	5	2	3	5
60	2	3	5	3	2	5
0	5	0	5	5	0	5

2.6 重组抗菌肽对小鼠细菌感染的预防和治疗效果

接种 ATCC26003 并注射 Des-HF 的预防组, 8 只小鼠全部存活, 接种 ATCC26003 并注射 Des-HF 的治疗组, 8 只小鼠中有 7 只存活。接种 Cowan I 并注射 Des-HF 的预防组, 8 只小鼠中有 7 只存活, 接种 Cowan I 并注射 Des-HF 的治疗组, 8 只小鼠中有 5 只存活。20 只存活小鼠中随机选取 10 只小鼠, 于治疗试验结束后抽取腹腔液涂布于普通 LB 平板上培养, 没有观察到细菌生长。

青霉素治疗对照组中, 8 只小鼠存活 6 只, 但 2 只小鼠的死亡是由于青霉素过敏所致, 只注射 Des-HF 的对照组的 8 只小鼠均存活。细菌接种对照组的 8 只小鼠全部死亡。分析认为适当剂量的 Des-HF 不会引起小鼠的过敏反应。

3 讨论

抗菌肽是一类小分子多肽, 由于其在组织中含量低, 分离获得大量的天然产物很困难, 而人工合成多肽的成本高, 因而限制了其应用, 故采用人工合成的方法来获得目的基因, 再通过基因工程方法进行微生物发酵生产抗菌肽则更具有实际意义。由于抗菌肽对原核生物具有明显的抑制作用, 且原核表达系统对外源蛋白无翻译后加工修饰, 不能在原核系统表达有活性的抗菌肽, 因此采用真核表达系统表达抗菌肽是理想的选择。巴斯德毕赤酵母表达系统是近年发展起来的一种新型真核表达系统, 它具有工艺成熟、易于工业化、成本低廉、无内毒素, 又可进行蛋白翻译后修饰、加工和折叠等优点^[9], 从而愈来愈受到人们青睐。我们实验室采用该表达系统已成功表达了多种抗菌肽^[7,10-11]。

抗菌肽在体外具有良好的抗菌活性及其他生物活性, 但体外环境远不能和复杂的体内环境相比, 如抗菌肽在体内的分布、代谢, 体内 pH 值对抗菌肽的影响, 宿主蛋白酶对抗菌肽的降解作用如何等等都还未知, 因此体外具有一定抗菌活性并不能直接说明问题。由于目前国内的研究多停留在抗菌肽的分离、纯化、理化特性、体外的生物活性及抗菌活性等方面, 有关抗菌肽的应用研究甚少^[12-14], 更缺乏在动物体内试验数据, 无法证明其体内稳定性、有效性和安全性, 从而严重影响了其从研究向应用的快速转化。本试验不仅研究了重组抗菌肽 Des-HF 对金黄色葡萄球菌的体外抗菌活性, 还以小鼠为试验模型, 研究重组抗菌肽 Des-HF 对小鼠感染金黄色葡萄球菌的治疗和预防效果。试验结果表明, 240 μg 剂量的重组抗菌肽 Des-HF 可完全保护小鼠免受 10 倍 MLD 的金黄色葡萄球菌 ATCC26003 和 Cowan I 的攻击, 而且预防用药的保护率高于治疗组但略低于青霉素用药组, 且 Des-HF 抗菌肽不存在过敏现象。这为临床应用提供了参考依据, 也为其被开发成新型抗菌药物奠定了基础。

参考文献:

[1] Hancock R E, Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics [J]. Curr Drug Targets

- Infect Disord, 2002, 2(1): 79-83
- [2] Diamond G. Natures antibiotics; the potential of antimicrobial peptides as new drugs [J]. *Biologist*, 2001, 48(5): 209-212
- [3] Bals R. Antimicrobial peptides and peptide antibiotics [J]. *Med Klin(Munich)*, 2000, 95(9): 496-502
- [4] Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection [J]. *Respir Res*, 2000, 1(3): 141-150
- [5] Ortega M R, Ganz T, Milner S M. Human beta defensin is absent in burn blister fluid [J]. *Burns*, 2000, 26(8): 724-726
- [6] 刘先凯, 赵彤言. 昆虫抗菌肽研究进展 [J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2001, 8(2): 115-120
- [7] 张素芳, 贾云, 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]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(7): 93-97
- [8] 管志远, 王艾琳, 李坚. 医学微生物学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 84-85
- [9] 王勇, 刘哲伟. 毕赤酵母表达外源基因研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2001, 32(1): 62-66
- [10] 王秀青, 张素芳, 曹瑞兵, 等. 抗菌肽天蚕素 B 基因及其串联体在毕赤酵母中的表达 [J]. *南京农业大学学报*, 2007, 30(3): 120-123
- [11] 牛明福, 李翔, 曹瑞兵, 等. 复合抗菌肽 PL 在毕赤酵母中的分泌表达及其活性研究 [J]. *生物工程学报*, 2007, 23(7): 418-422
- [12] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity [J]. *Ann Rev Immunol*, 1995, 13: 61-92
- [13] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 308-311
- [14] 屈军梅, 陈平洁, 李文平, 等. 莫家蝇抗菌肽提取及对鸡大肠杆菌病药效试验 [J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(3): 56-58

责任编辑: 周广礼