



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180101

数字出版日期: 2019-03-28; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20190328.1512.002.html>

一种新型抗菌肽 Hydramacin-1 在毕赤酵母中的 重组表达、纯化及其抗菌活性

孟德梅, 石林玥, 李文娟, 孙雪晴, 郭雅君, 贾雪霞, 樊振川

(省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 大健康生物技术国际科技合作基地, 天津市大健康生物技术国际联合研究中心, 天津 300457)

摘要: Hydramacin-1 是来源于大乳头水螅(*Hydra*)的上皮防御组织的具有广谱抗菌特性的新型抗菌肽。本研究构建了外泌型重组酵母表达载体 pPICZ α A-Hydramacin-1, 再将线性化的重组表达载体 pPICZ α A-Hydramacin-1 电转入毕赤酵母宿主菌(*Pichia pastoris*)GS115 中, 成功构建了重组毕赤酵母表达菌株。在培养温度为 28 °C、甲醇体积分数为 1.5%、诱导表达时长为 120 h 时, 蛋白表达量达到最高, 重组抗菌肽 Hydramacin-1 的表达量可达 83 mg/L。经阳离子交换柱纯化, 每升发酵液可得到约 9 mg 纯度为 90%的重组抗菌肽 Hydramacin-1。经最小抑菌浓度的测定, 制备的重组抗菌肽具有广谱抗菌特性, 相比于革兰氏阳性菌, 革兰氏阴性菌对此抗菌肽更为敏感。本实验将 Hydramacin-1 抗菌肽首次成功地在毕赤酵母中高效表达, 为以后该抗菌肽的理论研究和应用奠定了基础。

关键词: 抗菌肽; Hydramacin-1; 毕赤酵母; 抗菌活性

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2019)04-0022-08

Expression and Purification of A Novel Antimicrobial Peptide Hydramacin-1 in *Pichia pastoris* and Characterization of its Antibacterial Activity

MENG Demei, SHI Linyue, LI Wenjuan, SUN Xueqing, GUO Yajun, JIA Xuexia, FAN Zhenchuan
(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education of China, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, China International Science and Technology Cooperation Base for Health Biotechnology, International Collaborative Research Center for Health Biotechnology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Hydramacin-1 is a novel antimicrobial peptide isolated from basal metazoan *Hydra*. It is active against a broad-spectrum of bacteria of both Gram-negative and Gram-positive. In this study, after the recombinant yeast expression vector pPICZ α A-Hydramacin-1 was constructed, we transformed *Pichia pastoris* GS115 cells with a linearized pPICZ α A-Hydramacin-1 through electroporation, and thus the recombinant *P. pastoris*-expression strains expressing a secreted Hydramacin-1 was successfully constructed. The optimal culture conditions for recombinant Hydramacin-1 expression were 1.5% methanol induction, 120 h incubation at 28 °C and 83 mg/L recombinant Hydramacin-1. After purification with cation exchange column, nearly 9 mg recombinant Hydramacin-1 with 90% purity was obtained from 1 L of cell culture medium. Minimal inhibition concentration assay test showed that the purified recombinant Hydramacin-1 demonstrated a broad antibacterial spectrum and was more active against gram-negative bacteria than gram-positive bacteria. This is the first report on the highly efficient expression of a biologically active Hydramacin-1 peptide in *P. pastoris*, which has laid a foundation for both research and application of antimicrobial peptide in future.

收稿日期: 2018-04-03; 修回日期: 2018-08-28

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(17JQNJC14400, 18JZDZJC34100); 天津市企业科技特派员资助项目(18JCTPJC54000)

作者简介: 孟德梅(1987—), 女, 山东人, 讲师; 通信作者: 樊振川, 教授, fanzhen@tust.edu.cn

Key words: antimicrobial peptide; Hydramacin-1; *Pichia pastoris*; antibacterial activity

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是一种来源于动物、植物及真菌等先天免疫组织的有抑菌活性的小分子短肽^[1], 它可有效御防病原体入侵, 大部分抗菌肽具有广谱抗菌活性和抑制细菌、真菌、寄生虫和病毒生长的功能, 有些抗菌肽对肿瘤具有选择性杀伤作用^[2-4]. 抗菌肽与传统抗生素相比, 其作用机理独特, 不易产生耐药性, 因此成为了有望替代抗生素的理想药物^[5]. 目前, 基因工程法是生产抗菌肽的主要方法之一^[6], 其中利用毕赤酵母表达体系生产抗菌肽是一种重要方式. 该表达体系相比于原核表达体系具有诸多优点^[7-9], 如可以将蛋白分泌到胞外, 在蛋白质的加工、折叠、翻译后修饰等方面具有诸多优势, 从而能较好地保持目的蛋白的生物活性. 现在已有诸多来源的抗菌肽在毕赤酵母表达体系中成功表达, 如人源抗菌肽 human cathelicidin^[10]、鸡源抗菌肽 Fowllicidin-3^[11]和植物源抗菌肽 PaDef^[12]等.

抗菌肽 Hydramacin-1 来源于大乳头水螅的上皮防御组织, 氨基酸序列与已发现的抗菌肽氨基酸序列具有极低的相似性, 是一种新型抗菌肽^[13]. 该抗菌肽含有 60 个氨基酸残基, 净电荷为 +6, 结构中具有一个二硫键桥. 二硫键桥将该肽中的一个 α -螺旋和 β -折叠连接在一起, 形成一个结扣式的结构, 有利于维持该结构的稳定. 疏水性氨基酸的比例为 33%, 分布在两侧, 由于带正电荷的残基被夹在两个疏水区域的中间, 疏水区域的基团与细胞膜上的疏水基团相互作用插到磷脂双分子层中, 从而使得细胞聚集在一起, 因此它的抑菌机制被描述为聚集效应模型. Jung 等^[13]鉴定了由大肠杆菌表达系统表达的重组抗菌肽 Hydramacin-1 的抗菌活性, 结果显示 Hydramacin-1 具有广谱抗菌特性, 对革兰氏阴性菌具有较好的抑制效果, 但对革兰氏阳性菌的抑制效果并不理想, 其中对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度高于 100 $\mu\text{g/mL}$. 因此, 本文将抗菌肽 Hydramacin-1 在毕赤酵母系统中表达, 获得重组抗菌肽 Hydramacin-1, 并检测其表达产量和抗菌活性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 和质粒 pPICZ α A 购于 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia*

coli) O157 ATCC35150、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) ATCC10305、单增李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) ATCC21633 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923 均购于美国菌种保藏中心; 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) LZZ-133 由中国农业大学申琳教授惠赠.

1.1.2 主要试剂

博来霉素 (Zeocin), Invitrogen 公司; 庆大霉素 (Gen)、超低分子量蛋白质 marker 和 BCA Protein Assay Kit, 北京索莱宝科技有限公司; 限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I 和 *Taq* DNA 聚合酶, Fermentas 公司; 限制性核酸内切酶 *Sac* I、dNTPs、1 kbp DNA Ladder、100 bp DNA Ladder 和 DNA marker *Trans* 2 K, 全式金生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 Hydramacin-1 重组表达载体的构建

依据毕赤酵母密码子的偏好性^[14]优化抗菌肽 Hydramacin-1 的 DNA 序列, 在 Hydramacin-1 DNA 序列的 5'端添加酶切位点 *EcoR* I, 起始密码子 ATG, 3'端添加终止密码子 TAA, 酶切位点 *Kpn* I, 最终顺序为: *EcoR* I -ATG-Hydramacin-1 目的基因-TAA-*Kpn* I. 将以上设计好的目的基因送往苏州金唯智生物科技有限公司进行全基因合成, 并通过 *EcoR* I 和 *Kpn* I 两个酶切位点将合成的目的基因克隆至载体 pPICZ α A 上, 最终得到含有重组表达质粒 pPICZ α A-Hydramacin-1 的穿刺菌.

挑取含有重组表达质粒 pPICZ α A-Hydramacin-1 的穿刺菌接种于含有 Zeocin (终质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养过夜. 使用北京索莱宝生物科技有限公司的质粒小提试剂盒提取质粒. 提取的质粒用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 对其进行双酶切验证, 并送往北京奥科生物公司测序验证.

1.2.2 重组抗菌肽 Hydramacin-1 的诱导表达与鉴定

使用限制性核酸内切酶 *Sac* I 对重组表达质粒 pPICZ α A-Hydramacin-1 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行单酶切 2 h, 使其线性化. 经 DNA 产物回收试剂盒收集的线性化质粒与毕赤酵母 GS115 感受态细胞混匀, 置于预冷的 2 mm 电转杯中, 以电压 1 500 V、电容 25 μF 、电阻 200 Ω 的条件进行电击, 最后将电转化产物涂布于含有 Zeocin (终质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$) 的 YPD 平板

上, 30 °C 培养 3 ~ 4 d, 观察转化子的生长.

利用菌落 PCR 验证的方法^[15]进行阳性转化子的筛选. 挑取不同酵母转化子于 0.2% SDS 溶液中, 混匀, 沸水浴 10 min, 使菌体细胞膜破裂释放出基因组 DNA, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为实验组的 PCR 模板; 用未转入质粒的毕赤酵母 GS115 单克隆作阴性对照, 同样上述处理; 用重组质粒 pPICZ α A-Hydramacin-1 作阳性对照. 利用软件 (Primer premier 5.0) 设计的特异性引物 P1 (5'-GAAGCTGTCATCGGTTACTCA-3') 和 P2 (5'-TCCGCACAAACGAAGGTC-3') 进行 PCR 验证. PCR 反应结束后, 取 5 μ L PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 检测抗菌肽基因是否成功插入到毕赤酵母基因组中.

挑取不同阳性转化子于 5 mL BMGY 培养基中, 28 °C、220 r/min 培养 18 ~ 24 h 后, 按 20% 的比例转接于 25 mL BMGY 培养基中培养; 待 A_{600} 达 8.0 ~ 10.0 时, 收集菌体, 离心弃上清液, 用甲醇体积分数为 1.0% 的 25 mL BMMY 培养基重悬菌体, 进行诱导表达; 每隔 24 h 补加甲醇, 96 h 后, 离心收集上清液进行 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳^[16], 检测目的蛋白是否表达.

1.2.3 表达条件的优化

将扩大培养后的重组酵母转化子离心收集, 重悬于甲醇体积分数分别为 0.5%、1%、1.5%、2% 的 BMMY 培养基中培养, 每隔 24 h 取样, 并补加甲醇至各自的终浓度, 144 h 后终止培养, 最后通过 BCA Protein Assay Kit 测定发酵上清液中的总蛋白含量, 同时进行 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳和银染实验检测目的蛋白, 并结合 ImageJ 1.8.0 软件对电泳结果进行灰度分析, 比较不同发酵时间、不同甲醇体积分数对目的蛋白表达量的影响.

1.2.4 重组抗菌肽 Hydramacin-1 的纯化

通过离子交换层析的方法, 使用 1 mL HiTrap SP 柱 (GE Healthcare, USA) 纯化抗菌肽 Hydramacin-1. 首先, 将发酵上清液在 4 °C、8 000 g 的条件下离心 10 min, 去除菌体, 并用 0.22 μ m 的水系滤器过滤发酵上清液; 然后用 3 个柱体积的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 对发酵上清液透析置换. HiTrap SP 柱先用 5 倍柱体积的含有 1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 洗涤, 再用 5 倍柱体积的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 平衡. 用注射器将样品以 1 mL/min 的速度注入柱中, 用 5 倍柱体积的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 漂洗; 最后用 5 倍

柱体积的含有 150 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 洗脱目的蛋白, 通过 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳和银染实验, 结合 ImageJ 1.8.0 软件进行灰度分析, 检测纯化后的抗菌肽纯度. 将纯化后的抗菌肽真空冷冻干燥, 保存.

1.2.5 重组抗菌肽 Hydramacin-1 的抑菌活力测定

通过测定抗菌肽质量浓度分别为 30、60、80、100 μ g/mL 时对各指示菌的抑制率, 进而评价其抗菌活性的高低. 挑取指示菌于 1 mL LB 培养基中, 培养至对数生长期, 再用 LB 培养基稀释菌体至 1×10^5 mL⁻¹ 左右, 待用. 用无菌的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 将抗菌肽溶解至所需浓度, 将 20 μ L 的各浓度抗菌肽加入 96 孔板中, 再向每个孔中加入 100 μ L 稀释完毕的菌液, 每个样品 3 个平行, 37 °C 过夜振荡培养 16 h, 通过酶标仪在 600 nm 下测定样品的吸光度. 实验组 A_{600} 值记为 A , 20 μ L 无菌的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 和 100 μ L 的新鲜 LB 培养基混合液吸光度为 A_1 , 20 μ L 无菌的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 与 100 μ L 的受试菌混合液吸光度为 A_0 , 按照式 (1) 计算抑制率.

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_1} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

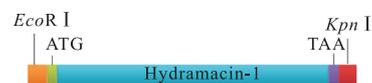
2.1 Hydramacin-1 重组表达载体的构建

抗菌肽 Hydramacin-1 的 DNA 序列全长为 180 bp, 具有 60 个氨基酸, 根据毕赤酵母密码子的偏好性 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) 对其基因序列进行优化设计 (图 1).

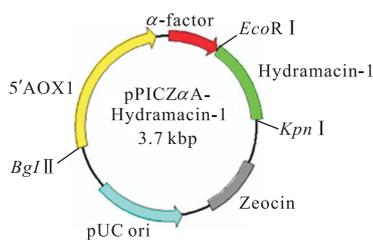
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gln	Ile	Val	Asp	Cys	Trp	Glu	Thr	Trp	Ser	Arg	Cys	Thr	Lys	Trp
CAAATTGTT GATTGT TGGGAAACTTGG TCTAGATGT ACTAAGTGG														
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ser	Gln	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Trp	Lys	Ser	Cys	Asn	Asp	Arg
TCTCAAGGTGGTACT GGTACT TTGTGGAAGTCTTGTAAACGATAGA														
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Cys	Lys	Glu	Leu	Gly	Arg	Lys	Arg	Gly	Gln	Cys	Glu	Glu	Lys	Pro
TGTAAGGAATTGGGTAGAAAGAGAGGTC AATGTGAAGAAAAGCCA														
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Ser	Arg	Cys	Pro	Leu	Ser	Lys	Lys	Ala	Trp	Thr	Cys	Ile	Cys	Tys
TCTAGATGCCATTGTCTAAGAAGGCTTGGACTTGTATTGTTC														

■ 带负电氨基酸残基 ■ 带正电氨基酸残基
 ■ α -螺旋结构 ■ β -折叠结构

(a) Hydramacin-1 的基因序列及氨基酸序列

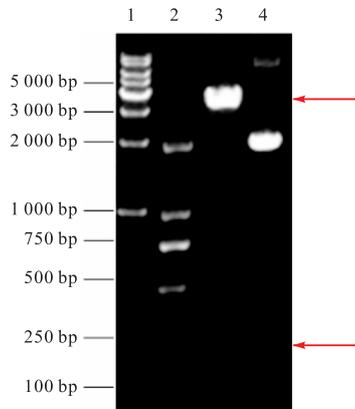


(b) 目的基因的构建

(c) 重组表达质粒 pPICZ α A-Hydramacin-1 的构建图 1 pPICZ α A-Hydramacin-1 重组表达载体的构建Fig. 1 Construction of *P. pastoris* expression plasmid pPICZ α A-Hydramacin-1

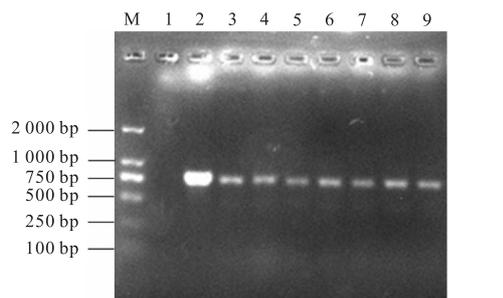
优化后的 DNA 序列如图 1(a) 所示; 在优化后的 DNA 序列前加上 *EcoR* I 酶切位点和 ATG 起始密码子, 序列后加上 TAA 终止密码子和 *Kpn* I 酶切位点, 序列长度为 198 bp, 如图 1(b) 所示; 再将其连接至毕赤酵母外泌型表达载体 pPICZ α A 中, 如图 1(c) 所示。

用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 对获得的重组质粒进行双酶切, 得到两条大小分别约为 200 bp 和 3 500 bp 的条带, 与理论上设计的载体长度一致 (图 2)。此后将质粒送往北京奥科公司测序, 测序结果同样证明重组表达质粒 pPICZ α A-Hydramacin-1 构建成功。

1. 1 kbp marker; 2. Trans 2kbp marker; 3. *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切 pPICZ α A-Hydramacin-1 质粒; 4. pPICZ α A-Hydramacin-1 质粒图 2 pPICZ α A-Hydramacin-1 的双酶切验证Fig. 2 Restriction identification of pPICZ α A-Hydramacin-1

2.2 高表达量转化子的获得

采用菌落 PCR 的方法进行阳性转化子的验证, 结果如图 3 所示。泳道 1 为阴性对照, 无条带出现, 证明实验的可靠性; 泳道 2 为阳性对照, 重组质粒作模板, 扩增出 750 bp 的单一目的条带; 泳道 3—9 为验证的 7 个不同酵母转化子, 其所出现的条带与阳性对照条带相一致, 说明 Hydramacin-1 基因已整合到毕赤酵母基因组中, 它们均为阳性转化子。

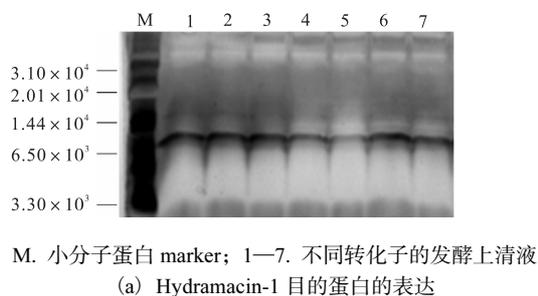
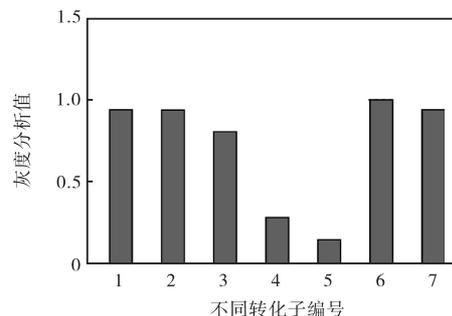


M. Trans 2 kbp marker; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3—9. 不同转化子

图 3 菌落 PCR 筛选阳性转化子

Fig. 3 Positive transformant screening by colony-PCR

由于不同转化子中插入的目的基因片段数目不相同, 导致拷贝数不同; 拷贝数越高, 表达量越高, 因此进一步筛选获得的阳性转化子。取等体积的不同阳性转化子的发酵上清液进行 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 并对不同转化子的目的蛋白条带进行灰度分析比较, 结果如图 4 所示。7 个阳性转化子表达的目的蛋白大小均在 7.0×10^3 左右, 证明其得到了准确表达; 通过对目的条带进行灰度分析比较, 最终选取了蛋白表达量最高的 6 号转化子进行后续实验研究。

M. 小分子蛋白 marker; 1—7. 不同转化子的发酵上清液
(a) Hydramacin-1 目的蛋白的表达

(b) 不同转化子的目的蛋白条带的灰度分析比较

图 4 重组抗菌肽 Hydramacin-1 在毕赤酵母中的诱导表达
Fig. 4 Expressing recombinant Hydramacin-1 in *P. pastoris*

2.3 发酵时间和甲醇体积分数对蛋白表达的影响

2.3.1 诱导表达条件对总蛋白表达量的影响

由于实验中所用载体为外泌型表达载体, 蛋白主

要富集在发酵上清液之中,并且 GS115 菌株分泌的自身蛋白量很低^[17],所以通过 BCA 法测定上清液中总蛋白的表达量情况,也可在一定程度上反映目的蛋白的表达量情况. 诱导表达条件对总蛋白表达量的影响如图 5 所示. 由图 5 可知:转化空白质粒的毕赤酵母在不同体积分数甲醇的诱导下,总蛋白表达水平

在 72 h 后趋于稳定,最高表达量小于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;而在 4 个不同体积分数甲醇的诱导下,转化重组表达载体的阳性转化子的总蛋白表达水平均呈上升趋势,并在 144 h 时达到最高,在甲醇体积分数为 1.5% 时,阳性转化子分泌的总蛋白量已达 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,是转化空质粒毕赤酵母蛋白表达量的 2 倍.

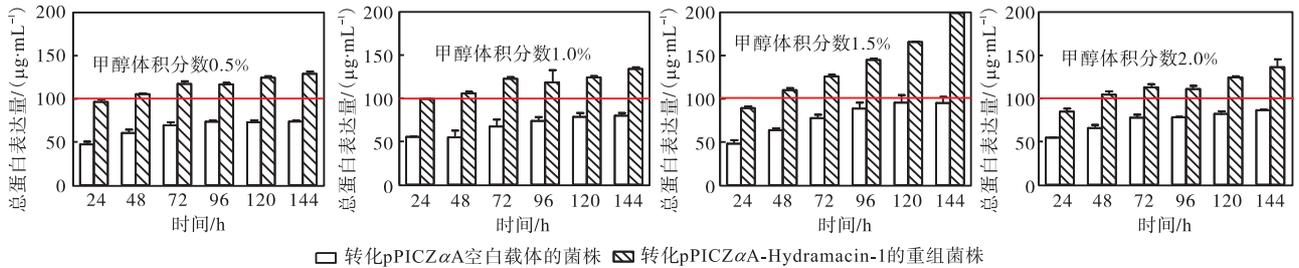


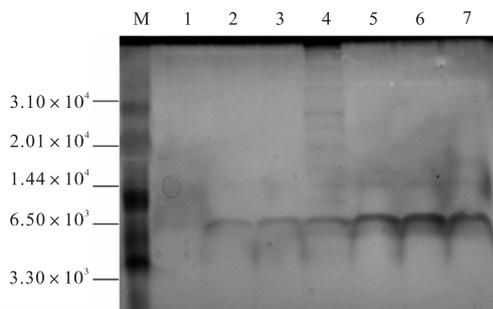
图 5 诱导表达条件对总蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of expression conditions on total protein expression

2.3.2 诱导表达条件对目的蛋白表达量的影响

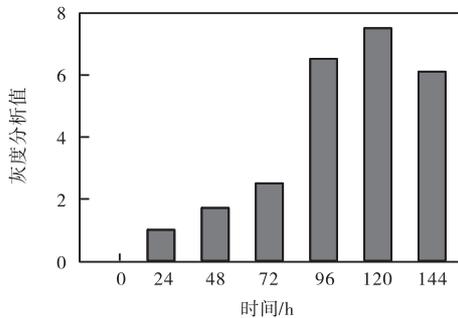
通过 Tricine SDS-PAGE 凝胶电泳结合灰度分析,在甲醇体积分数为 1.5% 时,目的蛋白表达量随诱导时间的延长而增加,在诱导时长为 120 h 时,灰度分析值最大,目的蛋白表达量达到最高(图 6).

为 1.5% 时,目的蛋白表达量达到最高(图 7).



M. 小分子蛋白 marker; 1. 0 h; 2. 24 h; 3. 48 h; 4. 72 h; 5. 96 h; 6. 120 h; 7. 144 h

(a) 发酵上清液的蛋白电泳分析

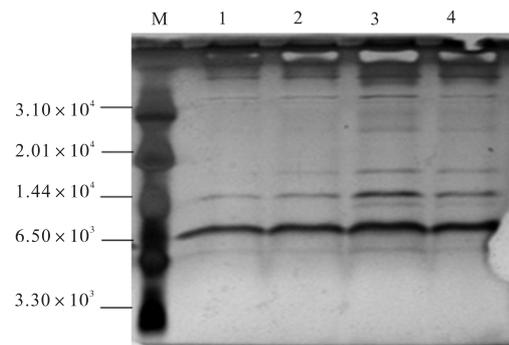


(b) 目的蛋白条带的相对灰度分析

图 6 诱导表达时间对目的蛋白表达量的影响

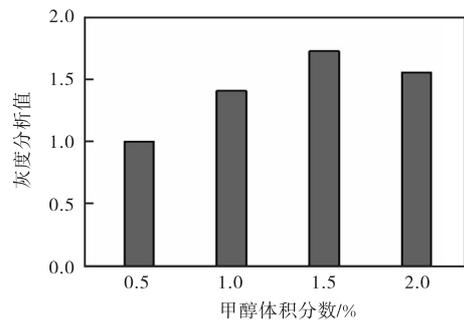
Fig. 6 Expression of recombinant Hydrumacin-1 at different induction time

在诱导表达时间为 120 h 的条件下,目的蛋白表达量随甲醇体积分数的提高而增加,在甲醇体积分数



M. 小分子蛋白 marker; 1. 0.5% 的甲醇; 2. 1.0% 的甲醇; 3. 1.5% 的甲醇; 4. 2.0% 的甲醇

(a) 发酵上清液的蛋白电泳分析



(b) 目的蛋白条带的相对灰度分析

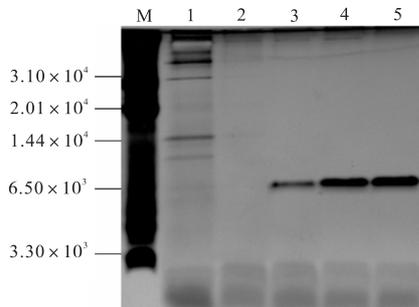
图 7 甲醇体积分数对目的蛋白表达量的影响

Fig. 7 Expression of recombinant Hydrumacin-1 induced with different methanol concentrations

因此,甲醇体积分数为 1.5%,发酵时间为 120 h 为发酵最优条件,总蛋白表达量可达 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 由灰度分析得知,目的蛋白表达量占总蛋白量的 50% 以上,由此可计算出目的蛋白的产量可达 83 mg/L .

2.4 重组抗菌肽 Hydramacin-1 的纯化

通过 HiTrap SP 柱对发酵上清液进行纯化,得到了纯度较高的目的蛋白,如图 8 所示。



M. 小分子蛋白 marker; 1. 流穿液; 2. 漂洗液; 3—5. 洗脱液

图 8 阳离子交换柱纯化重组抗菌肽 Hydramacin-1

Fig. 8 Cation exchange column purified recombinant Hydramacin-1

泳道 1 为流穿液,杂蛋白流出,目的蛋白仅有微

小损失;泳道 2 为漂洗液,未见目的蛋白被洗下来,可见漂洗液的离子强度与 pH 条件选择正确;泳道 3—5 为洗脱液对目的蛋白进行洗脱的结果,得到单一目的条带,经灰度分析,蛋白纯度达 90% 以上。

2.5 重组抗菌肽 Hydramacin-1 的抑菌活力测定

使用纯化后的目的蛋白进行抑菌活力测定,结果如图 9 所示。由图 9 可知:重组抗菌肽 Hydramacin-1 具有广谱抗菌特性,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组抗菌肽 Hydramacin-1 可将大肠杆菌 O157 ATCC35150 全部抑制,抑制率达 100%;100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组抗菌肽 Hydramacin-1 对大肠埃希氏菌 ATCC10305 的抑制率为 100%,而对革兰氏阳性菌单增李斯特氏菌 ATCC 21633、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和枯草芽胞杆菌 LZZ-133 的抑制率仅分别为 38%、72% 和 64%。由此可见,相比于革兰氏阳性菌,重组抗菌肽 Hydramacin-1 对革兰氏阴性菌具有更好的抑制作用。

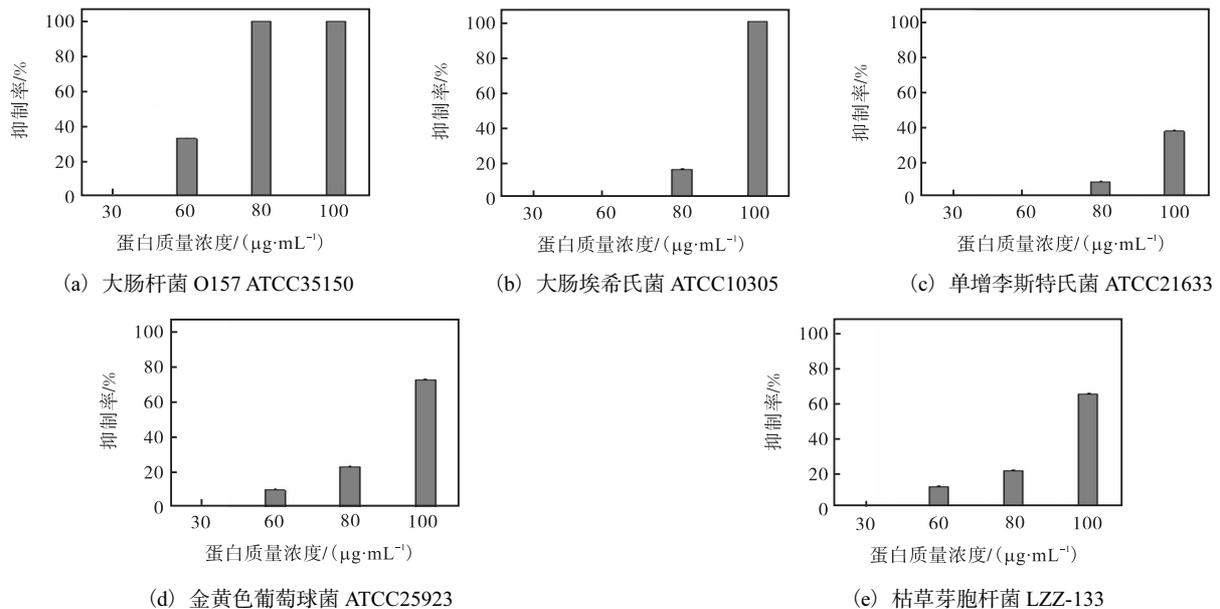


图 9 不同蛋白质质量浓度下的重组抗菌肽 Hydramacin-1 对指示菌的抑制率

Fig. 9 Inhibition rate of the purified recombinant Hydramacin-1 with different concentration against the tested bacterial strains

3 讨论

抗菌肽来源广泛,稳定性好,并且不易产生耐药性,可应用于医药、食品、饲料等不同领域,因此抗菌肽成为了当前研究的热点。例如,由于 Nisin^[18]可以很好地抑制单增李斯特菌和梭状肉毒杆菌的生长,进而有效保证食品安全,延长货架期,很多国家如美国、中国等均允许其应用到食品防腐保鲜上,尤其是应用于易被单增李斯特菌污染的乳制品上。本研究

中的抗菌肽 Hydramacin-1 若直接从生物体 *Hydra magnipapillata* 中分离制备,存在着成本高、效率低、分离难度大等诸多问题。为解决这个问题,本实验选用毕赤酵母表达系统,制备了可高效表达重组抗菌肽 Hydramacin-1 的基因工程菌株。通过多次实验以及对总蛋白表达量和目的蛋白表达量进行分析,120 h 为最佳诱导表达时间。超过 120 h,目的蛋白表达量降低,分析原因可能为发酵时间过长,目的蛋白发生降解,杂蛋白增多所致。此外,诱导所使用的甲醇体积分数也不宜过高,这是因为甲醇体积分数过高会对

细胞造成毒害作用. 本实验显示重组抗菌肽 Hydracin-1 在毕赤酵母中的最优表达条件是: 培养温度为 28 ℃, 甲醇体积分数为 1.5%, 发酵时间为 120 h. 在此条件下, 目的蛋白表达量可达 83 mg/L. 许多其他类型的抗菌肽, 如 Mytichitin-A^[19]、Scygonadin^[20]和 VpDef^[21]也已在毕赤酵母中成功表达, 并且在最佳培养条件下, 这些重组肽的产量分别可达到 45.5、70、60 mg/L. 以上结果均可表明, 毕赤酵母表达系统有利于重组抗菌肽 Hydracin-1 的高效表达. 后续可通过发酵及进一步优化发酵条件的方式提高其产量.

重组抗菌肽 Hydracin-1 的高抗菌活力非常重要. 本文测定了不同浓度下的重组抗菌肽 Hydracin-1 对 5 株受试菌的抑制率, 可知其具有广谱抗菌活性, 对革兰氏阴性菌的抑菌效果明显优于革兰氏阳性菌, 大肠杆菌 O157 对其最为敏感. 这一特点与大肠杆菌体系所表达的 Hydracin-1^[22]的抗菌特点相一致. 本研究中的重组抗菌肽 Hydracin-1 相比于 Defensing-TK^[23](对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 3 μg/mL) 和 rMP1106^[24](对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.06 μg/mL) 等抗菌肽的抗菌活性, 还需进一步提高. 目前主要是通过分子设计与结构改造的方法来提高肽的生物活性^[25-26], 例如氨基酸的替换, 将一个或多个氨基酸经定点突变技术替换为精氨酸、赖氨酸等带正电的氨基酸, 增加抗菌肽的带正电性, 进而提高抗菌肽的生物活性. 目前本实验室也正在对抗菌肽进行定向改造, 以期获得活性更高的抗菌肽.

综上所述, 本研究首次成功制备了具有高效表达能力和较好生物活性的重组抗菌肽 Hydracin-1 的毕赤酵母表达菌株, 为后续抗菌肽 Hydracin-1 更深入的科学研究和应用奠定了基础.

参考文献:

- [1] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. Nature, 2002, 415(6870): 389-395.
- [2] 李冠楠, 夏雪娟, 隆耀航, 等. 抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(1): 17-25.
- [3] Lee D G, Park J H, Shin S Y, et al. Design of novel analogue peptides with potent fungicidal but low hemolytic activity based on the cecropin A melittin hybrid structure[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 43(3): 489-498.
- [4] Chu H L, Yip B S, Chen K H, et al. Novel antimicrobial peptides with high anticancer activity and selectivity[J]. PLoS One, 2015, 10: e0126390.
- [5] Deslouches B, Steckbeck J D, Craigo J K, et al. Engineered cationic antimicrobial peptides to overcome multidrug resistance by ESKAPE pathogens[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2015, 59(2): 1329-1333.
- [6] 付登峰, 胡建和, 刘兴友. 抗菌肽基因工程表达技术研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 124-126.
- [7] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Molecular Biotechnology, 2000, 16(1): 23-52.
- [8] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报(自科版)医学卷, 2008, 3: 77-82.
- [9] 郭雨刚. 毕赤酵母表达系统及其应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2012.
- [10] 申艳敏, 魏建超, 尚书文, 等. 人源抗菌肽 LL37 在毕赤酵母中的高效表达及其活性检测[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 539-544.
- [11] 李荣荣, 和祯泉, 鲍恩东, 等. 鸡源抗菌肽 Folicidin-3 在毕赤酵母中的分泌表达及其生物学活性鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4529-4535.
- [12] Meng D M, Zhao J F, Ling X, et al. Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression & Purification, 2017, 130: 90-99.
- [13] Jung S, Dingley A J, Augustin R, et al. Hydracin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(3): 1896-1905.
- [14] 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.
- [15] Pardesi B, Tompkins G R. Colony polymerase chain reaction of heme-accumulating bacteria[J]. Anaerobe, 2015, 32: 49-50.
- [16] Schagger H. Tricine-SDS-page[J]. Nature Protocols, 2006, 1: 16-22.
- [17] 田小梅, 任建洪, 房聪. 不同碳源下毕赤酵母 GS115 蛋白组学分析[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 21-29.
- [18] Ferreira M, Lund B. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and longlife cottage cheese[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(6): 433-438.
- [19] Meng D M, Dai H X, Gao X F, et al. Expression, purification and initial characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide Mytichitin-A in *Pichia pas-*

- toris*[J]. *Protein Expression & Purification*, 2016, 127: 35–43.
- [20] Peng H, Liu H P, Chen B, et al. Optimized production of scygonadin in *Pichia pastoris* and analysis of its antimicrobial and antiviral activities[J]. *Protein Expression & Purification*, 2012, 82(1): 37–44.
- [21] Meng D M, Lv Y J, Zhao J F, et al. Efficient production of a recombinant *Venerupis philippinarum* defensin (VpDef) in *Pichia pastoris* and characterization of its antibacterial activity and stability[J]. *Protein Expression & Purification*, 2018, 147: 78–84.
- [22] Jung S, Sönnichsen F D, Hung C W, et al. Macin family of antimicrobial proteins combines antimicrobial and nerve repair activities[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 14246–14258.
- [23] Shen W, Chen Y, Yao H, et al. A novel defensin-like antimicrobial peptide from the skin secretions of the tree frog, *Theloderma kwangsiensis*[J]. *Gene*, 2016, 576(1): 136–140.
- [24] Cao X, Zhang Y, Mao R, et al. Design and recombination expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 and its properties against *Staphylococcus aureus*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(6): 2649–2662.
- [25] Fjell C D, Hiss J A, Hancock R E, et al. Designing antimicrobial peptides: Form follows function[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 11(1): 37–51.
- [26] Ahn H S, Cho W M, Kang S K, et al. Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of α -helical domain of Tenecin 1, an insect defending protein, and structure-activity relationship study[J]. *Peptides*, 2006, 27(4): 640–648.

责任编辑: 郎婧

(上接第 21 页)

- [7] 杨柳青, 何南, 张玉彬. 手性药物的生物转化[J]. *中国新药杂志*, 2000, 9(12): 817–820.
- [8] Jia L G, Dong J Z, Wang R J, et al. Identification and characterization of the steroid 15 α -hydroxylase gene from *Penicillium raistrickii*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(1): 6409–6418.
- [9] 贾龙刚, 姜海琪, 郭凯, 等. 雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的克隆及生物信息学分析[J]. *天津科技大学学报*, 2016, 31(1): 27–30.
- [10] Irrgang S, Schlosser D, Schmauder H P. The steroid 15 α -hydroxylase of *Penicillium raistrickii* I 477 is inducible[J]. *Biotechnology Letter*, 1992, 14(1): 33–38.
- [11] 林本凤, 职亚飞, 刘晓光, 等. 黑曲霉 ATCC1015 催化 16 α , 17 α -环氧黄体酮 11 α -羟基化及相关 P450 基因诱导表达[J]. *天津科技大学学报*, 2017, 32(6): 8–14.
- [12] Sripalakit P, Wichai U, Saraphanchotiwitthaya A. Bio-transformation of various natural sterols to androsthenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2006, 41(1/2): 49–54.

责任编辑: 郎婧