

杂合抗菌肽 Scy-Hep3 在毕赤酵母中的 分泌表达及其抗菌活性

彭会^{1,2}, 王克坚^{1,2}

(1. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102; 2. 海洋生物制备技术国家地方联合工程实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 为获得体外稳定表达的高抗菌活性新型抗菌肽, 通过重叠延伸 PCR 技术获得了拟穴青蟹抗菌肽 Scygonadin (简记为 Scy) 和斜带石斑鱼抗菌肽 Hepcidin 3 (简记为 Hep3) 的杂合抗菌肽基因 *scygonadin-hepcidin3* (简记为 *scy-hep3*), 将 *scy-hep3* 与毕赤酵母 *Pichia pastoris* 的 pPIC9K 质粒连接, 构建了分泌型表达载体 pPIC9K-*scy-hep3*, 用电转化法将其转化至毕赤酵母 GS115 菌中, 经甲醇诱导表达和亲和纯化后获得杂合抗菌肽 Scy-Hep3, 并进行抗菌活性分析。结果表明: 本研究中成功构建了重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-*scy-hep3*, 用体积分数为 0.5% 的甲醇诱导表达 24 h, 分泌表达上清液中获得稳定表达的相对分子量约 24 000 的表达产物, 与预期杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的大小相符; 抗菌活性结果表明, 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 具有广谱抗菌活性, 对被测的 3 种革兰氏阳性菌 (溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*) 和 4 种革兰氏阴性菌 (施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和弗氏志贺氏菌 *Shigella flexneri*) 具有较强的抗菌活性 (最小抑菌浓度 MIC < 12 μmol/L); 相比于单一的抗菌肽 Scy 和 Hep3, 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的抗菌活性显著增强。本研究结果将为杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的生产和开发应用提供数据资料。

关键词: 杂合抗菌肽; 毕赤酵母; 重组表达; 抗菌活性

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A

多重耐药性超级细菌频繁出现, 威胁着人类健康和公共卫生安全, 开发新型抗菌药物刻不容缓。抗菌肽是一类从生物体中分离的小分子多肽, 广泛存在于生物界的各个门类, 其进化上相对保守, 在抵抗病原微生物感染方面发挥着至关重要的作用。随着对抗菌肽的深入研究发现, 绝大多数抗菌肽具有多重生物学功能, 不但具有抗细菌作用, 还具有抗病毒、抗真菌、抗肿瘤、免疫调节和促进创伤修复等生物学功能^[1-4]。研究、开发与应用抗菌肽, 对解决细菌耐药性和饲料中滥用抗生素造成的药物残留及环境污染等问题具有重要的科学意义和实际应用价值。

抗菌肽 Scygonadin (简记为 Scy) 是厦门大学海洋生物制备技术国家地方联合工程实验室 2006 年首次报道的从雄性拟穴青蟹 *Scylla paramamosain*

精浆中分离鉴定的一个新型抗菌肽, 在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统中可以获得高表达, 其表达产物对溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 具有较强的抗菌活性 (最小抑菌浓度 MIC < 25 μmol/L), 并对对虾白斑病毒 (WSSV) 具有一定的抑杀作用^[5]。Hepcidin 3 (简记为 Hep3) 是 2013 年在斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 中新发现的 Hepcidin 抗菌肽, 不同于常见的含有 8 个半胱氨酸残基形成的四对二硫键的 Hepcidin, 其主要特点是含有 4 个半胱氨酸残基形成的两对二硫键, 其原核表达产物能选择性地抑制革兰氏阳性和阴性菌, 杀菌动力学曲线显示, 12 μmol/L 的重组蛋白 Hep3

收稿日期: 2018-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41676158); 福建省科技重大专项 (2017NZ0004); 中央高校基本科研业务费专项 (20720180117)

作者简介: 彭会 (1980—), 女, 博士, 工程师。E-mail: penghui@xmu.edu.cn

通信作者: 王克坚 (1964—), 男, 博士, 教授。E-mail: wkjian@xmu.edu.cn

能够在 60 min 内杀灭全部金黄色葡萄球菌, 30 min 内杀灭全部施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri*, 显示出较大的应用价值^[6]。

本试验中, 通过重叠延伸 PCR 技术构建了抗菌肽 Scy 和 Hep3 的真核融合表达载体 pPIC9K-*scy-hep3*, 在毕赤酵母 GS115 菌株中诱导表达获得杂合抗菌肽 Scy-Hep3, 并阐明其抗菌活性和抗菌谱, 旨在为杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的生产和开发应用提供数据资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体与菌株 毕赤酵母表达用载体 pPIC9K 和菌株 GS115 均购自 Invitrogen 公司。抗菌试验用菌株: 金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌、谷氨酸棒杆菌、施氏假单胞菌、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、弗氏志贺氏菌 *Shigella flexneri*、荧光假单胞菌和嗜水气单胞菌购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

1.1.2 主要试剂 质粒小量中量提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自广州东盛科技有限公司; DNA 聚合酶购自全式金公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I 和 DNA 连接 Kit 购自 TaKaRa 公司; 酵母粉和胰蛋白酶购自 OXOID 公司; 丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; HisTrap™ FF crude 5 mL 购自 GE 公司; 预染蛋白 Marker 购自 Thermo Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因片段 根据分泌型表达载体 pPIC9K 上的 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点, 以及拟穴青蟹抗菌肽 *scy* 基因的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: AY864802) 和斜带石斑鱼 *hep3* 基因的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: HQ008222), 运用重叠延伸 PCR 原理设计杂合肽 *scy-hep3* 的上、下游引物, 两个基因中间连接肽 (Linker) 的氨基酸序列为 GPGSG, 其对应的碱基序列为 5' GGTGGCCAG-GTTCCGGT 3' (见表 1 引物 F2 方框内碱基序列), 该段碱基序列的反向互补序列为 5' ACCGGAACCT-GGGCCACC 3' (见表 1 引物 R1 方框内碱基序列)。将连接肽的碱基序列设计成重叠互补序列, 重叠区互为模板便于 PCR 扩增出全长目的基因片段。同

时为检测目的基因的表达, 在引物 R2 中终止密码子前引入组氨酸标签 (6×His 标签), 大小为 18 bp。使用重叠延伸 PCR 方法, 以上述拟穴青蟹抗菌肽 *scy* 的 cDNA 序列和 *hep3* 的 cDNA 序列为模板, 分别以 F1 和 R1、F2 和 R2 为上、下游引物, PCR 扩增获得 *scy* 和 *hep3* 基因片段。然后以获得的 *scy* 基因片段和 *hep3* 基因片段为模板, 以 F1 和 R2 为上、下游引物, PCR 扩增获得 *scy-hep3* 目的基因片段。

表 1 *scy-hep3* 目的基因扩增的上、下游引物

Tab. 1 Primers used for the pPIC9K-*scy-hep3* plasmid construction

引物 primer	序列 sequence(5'-3')
F1	GGGGAATTCGGCCAGGCACTCAACAA
R1	<u>ACCGGAACCTGGCCACC</u> GTAAGAAGCAA-TCCAGTCCT-CGACCTC
F2	<u>GGTGGCCAGGTTCCGGT</u> TTACCCGTCACT-GGAGTAGA-AGAGCTG
R2	CATGCGGCCGCTTAATGCTGATGCTGATGATG-TTGGAACTCACAGCGGACTCCGCAG

注: 其中下划线为限制性内切酶位点, 方框内为重叠互补序列, 斜体部分为 6×His 组氨酸标签

Note: The sequences of restriction enzyme sites are shown underlined and the overlap complementary sequences of F2 and R1 are shown the box. Italics indicate sequences coding the hexa-histidine tag

1.2.2 pPIC9K-*scy-hep3* 表达载体的构建 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 *scy-hep3* 目的基因片段, *scy-hep3* 基因片段和载体 pPIC9K 用 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶于 37 °C 下酶切 5~6 h, 回收酶切后的基因片段和载体, 并用 DNA 连接 Kit 在 16 °C 下连接, 连接后的产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中, 将转化后的菌液涂布于含 100 μg/mL Amp 抗生素的固体 LB 培养板上, 37 °C 下培养过夜。任意挑取若干单克隆用 F1 和 R2 引物进行 PCR 扩增鉴定, 并将阳性克隆送交英潍捷基贸易有限公司进行基因测序。

1.2.3 pPIC9K-*scy-hep3* 载体的转化 将测序正确的重组质粒 pPIC9K-*scy-hep3* 用 *Sal* I 内切酶进行线性化, 用 DNA 凝胶回收线性化的质粒, 取 10 μL 回收产物与 80 μL GS115 感受态细胞混合均匀, 用电转化的方法将目的基因整合至酵母基因组中, 将转化液涂布于 MD 选择培养平板上, 28 °C 下培养 2 d, 将长出的阳性单克隆分别转移至 YPD 平板上, 以备后续高效表达菌株的筛选。

1.2.4 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的真核表达及高效表达菌株的筛选 挑取如上若干个单克隆, 分别接

种于 10 mL BMGY (pH 6.0) 培养基中, 30 °C 下以 230 r/min 振荡培养约 20 h 至对数生长期, 以 2000 g 离心收集菌体, 并将其重悬于 10 mL BMMY 表达培养基中, 继续培养 24 h 后离心收集上清液, 用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况^[5]。

1.2.5 抗菌肽 Scy-Hep3 的大量表达与纯化 将重组毕赤酵母表达菌株 GS115/pPIC9K-*scy-hep3* 表达 24 h 后, 离心获得发酵上清液, 在磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L 磷酸缓冲液+50 mmol/L NaCl, pH 8.5) 中透析, 以 12000 g 离心, 上清液用 0.45 μm 滤膜进行过滤, 待上柱纯化。用 5 个柱体积去离子水清洗 HisTrap 纯化柱 (HisTrap™ FF Crude 5 mL), 流速为 2 mL/min; 5 个柱体积的平衡缓冲液 (20 mmol/L 磷酸缓冲液+50 mmol/L NaCl+10 mmol/L 咪唑, pH 8.5) 平衡柱子, 流速为 2 mL/min; 将过滤后的发酵上清液上样, 流速为 2 mL/min; 用 3~5 个柱体积的平衡缓冲液过柱洗去未结合的杂蛋白; 用流速 1 mL/min 的洗脱缓冲液 (20 mmol/L 磷酸缓冲液+150 mmol/L NaCl+250 mmol/L 咪唑, pH 8.5) 过柱, 洗脱目的蛋白, 收集洗脱液并进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.6 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的最小抑菌浓度的测定 最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 的测定在 96 孔细胞培养板上进行^[7-8]。将-80 °C 下保种的金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌、谷氨酸棒杆菌、施氏假单胞菌、蜡样芽孢杆菌、弗氏志贺氏菌、荧光假单胞菌和嗜水气单胞菌划线于营养肉汤平板上, 在 28 °C 或 37 °C 下倒置培养过夜; 从各平板上挑取菌落接种于 MH 培养基斜面上, 继续培养 12~18 h; 用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (DPBS, pH 7.2) 将细菌从斜面上冲下, 用酶标仪测定各个细菌在 600 nm 波长下的吸光值 (OD_{600 nm}), 调整菌悬液浓度至 OD_{600 nm} 为 0.003 备用。在 96 孔细胞培养板上, 每种被测细菌都设置阳性对照组和待测蛋白试验组, 每组设置 3 个平行。其中阳性对照组为 50 μL 磷酸钠盐缓冲液和 50 μL 含 MH 培养液的菌悬液, 待测蛋白试验组为 50 μL 待测蛋白样品和 50 μL 含 MH 培养液的菌悬液。将细胞培养板置于 28 °C 培养箱中培养 1 d, 观察待测 MIC 结果。以上试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 目的基因片段 *scy-hep3* 的获得

以笔者所在实验室前期已获得的拟穴青蟹抗菌

肽 *scy* 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: AY864802) 和斜带石斑鱼 *hep3* 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: HQ008222) 为模板, 分别以 F1 和 R1、F2 和 R2 为上、下游引物 (表 1), 用 20 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析, PCR 扩增获得 *scy* 成熟肽基因相关片段约 330 bp (图 1-A, 第 2 泳道) 和 *hep3* 基因相关片段约 240 bp (图 1-A, 第 3 泳道)。最后以上述 PCR 扩增获得的 *scy* 成熟肽基因片段和 *hep3* 基因片段为模版, 以 F1 和 R2 为上、下游引物, 扩增获得 560 bp 的杂合肽 *scy-hep3* 目的基因片段 (图 1-A, 第 1 泳道), 与预期目的条带大小相符。

2.2 真核重组表达载体的构建与鉴定

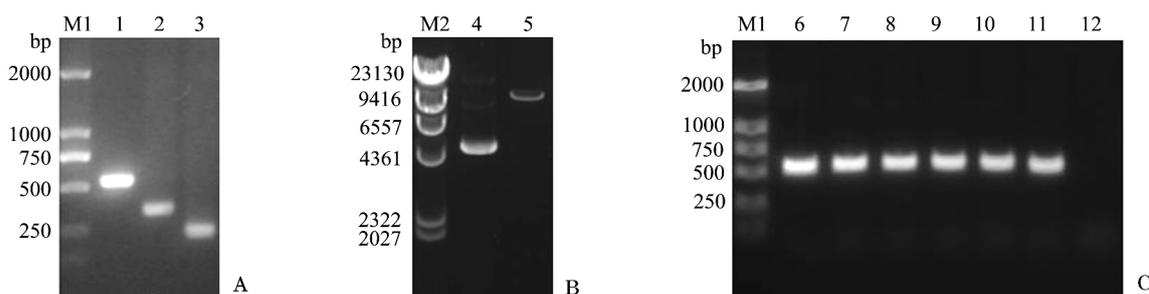
经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后的表达载体 pPIC9K 为单一的约 9400 bp 大小的清晰条带, 与载体实际大小相符 (图 1-B)。经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切的杂合抗菌肽 *scy-hep3* 目的基因片段和 pPIC9K 连接转化至大肠杆菌 DH5α 后, 取若干阳性克隆摇菌培养, 并进行 PCR 鉴定, 得到的阳性克隆片段长度 560 bp (图 1-C), 与预期大小相符。选择阳性克隆送至英潍捷基贸易有限公司测序, 测序结果表明, 目的基因 *scy-hep3* 已成功构建至表达载体 pPIC9K 上。

如图 2-A 所示, 分泌型重组表达载体 pPIC9K-*scy-hep3* 的特点是其 N 端采用 AOX1 启动子, 用信号肽 α-factor 引导目的蛋白 Scy-Hep3 分泌到胞外表达, 在抗菌肽 *scy* 基因和 *hep3* 基因间加入连接肽序列, 并在 C 端带有 6×His 标签, 便于亲和层析纯化目的蛋白。推导的氨基酸序列组成见图 2-B。

2.3 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 在毕赤酵母中的表达及高效表达菌株的筛选

将测序正确的重组表达载体 pPIC9K-*scy-hep3* 用 *Sal* I 限制性内切酶线性化, 将其电转入酵母菌 GS115 后, 在选择性平板 MD 上培养。之后随机挑取若干个重组酵母转化子 GS115/pPIC9K-*scy-hep3*, 用体积分数为 0.5% 的甲醇诱导表达 24 h, 筛选高效表达菌株。

如图 3 所示, SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 相对于诱导前的上清 (第 1 泳道), 若干克隆 (2~7 泳道) 诱导表达 24 h 后的发酵上清液中出现相对分子质量大小约 24 000 的条带, 与预期的 Scy-Hep3 大小相符 (毕赤酵母表达的拟穴青蟹抗菌肽 Scygonadin 表观相对分子质量大小约 11 000^[5], 原核表达的斜带石斑鱼抗菌肽 Hecpudin 3 相对分子质



注: M1 为 DL2000 DNA Marker; M2 为 λ Hind III DNA Marker; 1 为 PCR 扩增获得实际大小 560 bp 的杂合抗菌肽 *scy-hep3* 目的基因片段; 2 为 333 bp 的 *scy* 成熟肽基因片段; 3 为 245 bp 的 *hep3* 基因片段; 4 为酶切前 pPIC9K 质粒; 5 为 9276 bp 的经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后的 pPIC9K; 6~11 分别为重组表达载体 pPIC9K-*scy-hep3* 的阳性克隆; 12 为阴性对照

Note: M1, DL2000 DNA Marker; M2, λ Hind III DNA Marker; 1, PCR amplification of *scy-hep3* gene 560 bp fragment; 2, *scy* mature gene with 333 bp; 3, *hep3* gene with 245 bp; 4, pPIC9K; 5, pPIC9K digested with *EcoR* I and *Not* I for 9276 bp; 6-11, positive clone of recombinant expression vector pPIC9K-*scy-hep3*; 12, negative control

图 1 重组表达载体 pPIC9K-*scy-hep3* 的构建与 PCR 鉴定

Fig. 1 Construction and PCR identification of recombinant expression vector plasmid pPIC9K-*scy-hep3*

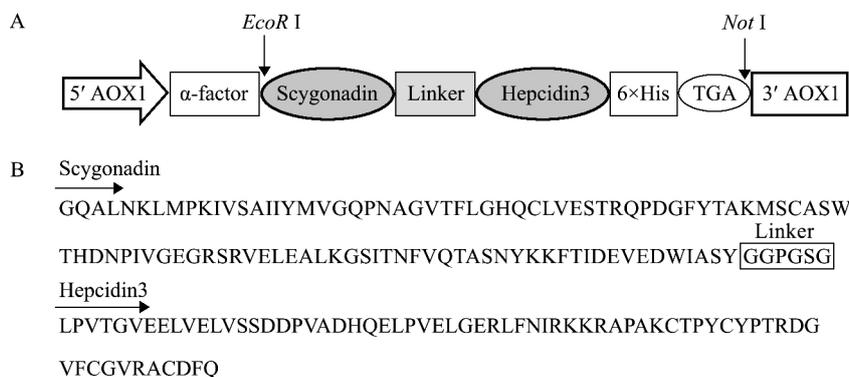
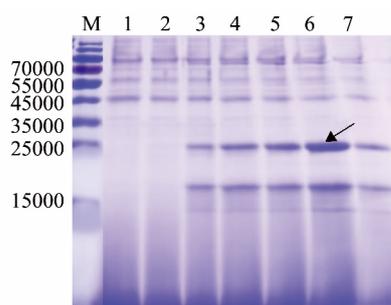


图 2 pPIC9K-*scy-hep3* 分泌型重组表达载体的构建示意图及推导的氨基酸序列组成

Fig. 2 Schematic representation of the secretion expression vector pPIC9K-*scy-hep3* and deduced amino acid sequence of hybrid antimicrobial peptide Scy-Hep3



注: M 为蛋白 Marker; 1 为重组酵母转化子 GS115/pPIC9K-*scy-hep3* 诱导前的发酵上清液; 2~7 泳道为随机挑选的 6 个阳性克隆诱导表达 24 h 后的发酵上清液

Note: M, protein maker; 1, supernatant of positive strain GS115/pPIC9K-*scy-hep3* culture before induction; 2-7, supernatant of six strains of GS115/pPIC9K-*scy-hep3* culture in 24 h induction

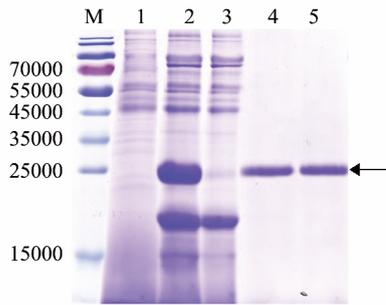
图 3 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 在毕赤酵母中的分泌表达及高效表达菌株筛选

Fig. 3 Hybrid antimicrobial peptide Scy-Hep3 secreted expression in yeast *Pichia pastoris* and screening of highly expressed strains

量约 12 000^[6], 为目的蛋白条带。如图 3 箭头所指, 6 号泳道的目的蛋白表达量最高, 因此, 收获该株毕赤酵母高效表达菌株。

2.4 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的表达和纯化

将筛选获得的重组毕赤酵母高效表达菌株 GS115/pPIC9K-*scy-hep3*, 用终浓度为 0.5% 的甲醇诱导表达 24 h 后, 收集分泌到胞外的上清液进行亲和纯化, 用低浓度咪唑 (10 mmol/L) 的平衡缓冲液可洗脱掉杂蛋白 (图 4, 第 3 泳道), 用高浓度咪唑 (250 mmol/L) 的洗脱缓冲液可洗脱整合的目的蛋白 (图 4, 第 4、第 5 泳道)。SDS-PAGE 电泳结果表明 (图 4), 相对分子质量约 24 000 的重组目的蛋白 Scy-Hep3 可特异性地与镍离子金属螯合层析柱结合, 并在高浓度咪唑竞争洗涤后被洗脱。



注: M 为蛋白 Marker; 1 为重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-*scy-hep3* 诱导前的发酵上清液; 2 为重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-*scy-hep3* 诱导表达 24 h 后的发酵上清液; 3 为流出组分; 4、5 为洗脱组分

Note: M, protein Marker; 1, supernatant of GS115/pPIC9K-*scy-hep3* culture before induction; 2, supernatant of GS115/pPIC9K-*scy-hep3* culture in 24 h induction; 3, flow through fractions with 10 mmol/L imidazole; 4 and 5, elution fractions with 250 mmol/L imidazole

图 4 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的表达和纯化

Fig. 4 Expression and purification of hybrid antimicrobial peptide Scy-Hep3

2.5 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的抗菌活性

将纯化后的杂合抗菌肽 Scy-Hep3 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后, 倍比稀释蛋白浓度至 1.5、3.0、6.0、12.0、24.0、48.0 μmol/L 共 6 个浓度, 与等体积的菌悬液混合培养 1~2 d 后观察 MIC 结果。如表 2 所示, 表达的杂合抗菌肽 Scy-Hep3 具有广谱抗菌活性, 能够较好地抑制多数被测的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长, 其中对 3 种革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌、谷氨酸棒杆菌、溶壁微球菌和 2 种革兰氏阴性菌如施氏假单胞菌、荧光假单胞菌的最小抑菌浓度均小于 1.5 μmol/L, 对 2 种革兰氏阴性菌如嗜水气单胞菌和弗氏志贺氏菌最小抑菌浓度为 6~12 μmol/L, 不抗蜡样芽孢杆菌 (MIC>48 μmol/L)。抗菌试验结果表明, 毕赤酵母表达的杂合抗菌肽 Scy-Hep3 具有广谱高效抗菌活性, 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的抗菌活性显著高于单一的抗菌肽 Scy 和 Hep3 的抗菌活性。

表 2 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的抗菌活性

Tab. 2 Antimicrobial activities of Scy-Hep3

菌株 microorganism	中国微生物菌种保藏 编号 CGMCC No.	Scy-Hep3	Scy ^[5]	Hep3 ^[6]
		MIC/(μmol·L ⁻¹)	MIC/(μmol·L ⁻¹)	MIC/(μmol·L ⁻¹)
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.363	<1.5	6.25~12.50	1.5~3.0
革兰氏 溶壁微球菌 <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	1.634	<1.5	6.25~12.50	24~48
阳性菌 谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.1886	<1.5	12.5~25.0	48~96
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	1.447	>48	>50	>96
施氏假单胞菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.1803	<1.5	NT	<1.5
革兰氏 荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.0032	<1.5	12.5~25.0	24~48
阴性菌 嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	1.2017	6~12	12.5~25.0	>96
弗氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	1.1868	6~12	25~50	>96

注: NT 表示未检测

Note: NT means undetected

3 讨论

抗菌肽的研发与应用, 不仅具有重要的医学开发前景, 还是实现海水动物健康养殖、减少抗生素污染的重要保障。近年来, 随着对抗菌肽结构功能及杀菌机理的深入研究, 人们开始尝试设计抗菌活性更强、抗菌谱更广且稳定性高的杂合抗菌肽。杂合抗菌肽可以提高单一抗菌肽的抗菌活性, 同时降低溶血特性, 因而有望发展成新型的抗菌药物^[9-10]。通过构建杂合肽的工程菌株发酵生产抗菌肽可降低其生产成本^[11]。牛明福等^[12]为了获得抗菌活性较强的抗菌肽, 将几种抗菌肽串联起来在毕

赤酵母中表达, 获得的复合抗菌肽 PL 表现出了强于单独的蝎子防御素 SD 的抗菌活性。

3.1 杂合抗菌肽 Scy-Hep3 的设计

本研究团队前期对海洋鱼类 Hecpeidin 抗菌肽和青蟹 Scygonadin 抗菌肽等进行了系列研究^[13], 其中 Scy 是从拟穴青蟹精浆中分离鉴定的一个新型阴离子抗菌肽, 可能在青蟹的生殖免疫中起着重要作用。斜带石斑鱼 Hep3 属于鱼类 Hecpeidin 家族的抗菌肽, Hecpeidin 是鱼类普遍存在的重要免疫防御因子^[13]。前期研究发现, 青蟹抗菌肽 Scy 和斜带石斑鱼抗菌肽 Hep3 的表达产物对细菌的抗菌活性

与抗菌谱显著不同^[5-6],例如,Hep3对金黄色葡萄球菌的抗菌活性显著高于Scy,约为Scy抗菌活性的4倍;而Scy对水产致病嗜水气单胞菌具有较强的抗菌活性,Hep3不抗嗜水气单胞菌。鉴于青蟹抗菌肽Scy和石斑鱼抗菌肽Hep3不同的抗菌谱,为获得抗菌活性更强或抗菌谱更广的抗海洋鱼类和蟹类病原菌的融合多肽产品,本研究中将青蟹抗菌肽Scy和石斑鱼抗菌肽Hep3在毕赤酵母中进行融合表达和抗菌活性分析。

3.2 连接肽的设计

合适的连接肽应有足够的长度和较高的柔韧性,不会影响融合蛋白中各个蛋白的结构和生物学活性。设计连接肽时一般主要考虑氨基酸组成、连接肽长度、构象、柔韧性等因素,连接肽中常用的氨基酸包括甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)等,其中Gly作为相对分子质量最小且亲水性强的氨基酸使用最为广泛,富含Gly使得连接肽柔软易弯折^[14-15]。蔡晓娜^[16]通过体外重组表达了含不同连接肽的重组TRAIL-Fc融合蛋白,筛选获得了通过连接肽(GGGGGGGG或THTSPSP)连接的重组融合蛋白结构更稳定。赵昆等^[17]使用连接肽(SPGS)将牛抗菌肽Bca7和Bca5融合表达,获得的杂合抗菌肽比单一抗菌肽具有更高的抗菌活性。合适的连接肽能够稳定融合蛋白结构,具有较好的生物学活性,但目前关于连接肽的研究还不够深入,没有统一的标准,还需要更多的试验设计和验证。本研究中使用连接肽(GGPGSG)将拟穴青蟹抗菌肽Scy和携带石斑鱼抗菌肽Hep3构建融合抗菌多肽,主要利用Gly残基无侧链基团的柔软效应和Pro残基的转角效应,认为该柔性短肽有利于各自抗菌肽保持其稳定的空间结构和相对独立的抗菌活性。通过连接肽(GGPGSG)连接的重组杂合抗菌肽Scy-Hep3的抗菌活性显著高于单一的抗菌肽Scy和Hep3。但该连接肽设计的合理性和最优性还需要通过表达不含连接肽或表达含不同连接肽的重组融合蛋白Scy-Hep3,并比较其抗菌活性才能得到进一步验证。

3.3 杂合抗菌肽Scy-Hep3的抗菌活性分析

杂合抗菌肽Scy-Hep3的抗菌活性显著增强可能是由于杂合抗菌肽拓展了单一抗菌肽的抗菌谱,还可能是由于毕赤酵母系统表达的目的蛋白有利于转录翻译后的蛋白折叠加工成正确结构的目的蛋

白,从而有利于其抗菌活性的体现。杂合抗菌肽Scy-Hep3中的单一抗菌肽Hep3属于抗菌肽Hepcidin家族,Hepcidin是一种富含半胱氨酸的两性分子,可以通过二硫键形成稳定的 β 折叠结构和Loop结构,这种结构与Hepcidin的抗菌活性密切相关^[18]。一般通过毕赤酵母真核表达系统表达的具有这类特殊结构的蛋白的抗菌活性要比用大肠杆菌表达系统获得的表达产物抗菌活性强。如薛剑峰^[19]用大肠杆菌表达系统和毕赤酵母表达系统表达了来源于中国明对虾的对虾素Chp5,毕赤酵母分泌表达的Chp5的抗菌效果与天然抗菌肽相近,而原核表达的Chp5抑菌活性不高,认为是由于大肠杆菌表达系统不具有真核系统对翻译后的蛋白进行修饰加工的作用,Chp5无法形成正确的二硫键结构。本研究中通过毕赤酵母表达系统获得了具有高抗菌活性的杂合抗菌肽Scy-Hep3,将为杂合抗菌肽的开发应用提供数据资料。

参考文献:

- [1] Jenssen H, Hamill P, Hancock R E. Peptide antimicrobial agents [J]. *Clin Microbiol Rev* 2006, 19(3): 491-511.
- [2] Hoskin D W, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides [J]. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1778(2): 357-375.
- [3] Alalwani S M, Sierigk J, Herr C, et al. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils [J]. *Eur J Immunol* 2010, 40(4): 1118-1126.
- [4] Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide [J]. *Nature* 2007, 449(7162): 564-569.
- [5] Peng Hui, Liu Hhaipeng, Chen Bei, et al. Optimized production of scygonadin in *Pichia pastoris* and analysis of its antimicrobial and antiviral activities [J]. *Protein Express Purif* 2012, 82(1): 37-44.
- [6] Qu Haidong, Chen Bei, Peng Hui, et al. Molecular cloning, recombinant expression, and antimicrobial activity of EC-hepcidin3, a new four-cysteine hepcidin isoform from *Epinephelus coioides* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013, 77(1): 103-110.
- [7] Bulet P, Dimarcq J L, Hetru C, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution [J]. *J Biol Chem* 1993, 268(20): 14893-14897.
- [8] López-García B, Ubhayasekera W, Gallo R, et al. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 356(1): 107-113.
- [9] 武如娟, 张日俊. 杂合抗菌肽设计及生物学活性的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志* 2013, 33(9): 94-100.
- [10] 巫春旭, 卢雪梅, 金小宝, 等. 天蚕素类抗菌肽分子设计研究进展 [J]. *中国生物工程杂志* 2016, 36(2): 96-100.
- [11] 杨平, 袁奕豪, 杨晓莉, 等. 抗菌肽高效表达及生产优化研究进

- 展[J].生物技术通报,2016,32(3):24-30.
- [12] 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(3):418-422.
- [13] 王克坚.海洋鱼类和青蟹抗菌肽 hepcidin 和 scygonadin 的研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2011,50(2):418-424.
- [14] Xue Fan,Gu Zhong,Feng Jin'an.LINKER: a web server to generate peptide sequences with extended conformation[J].Nucleic Acids Res,2004,32(S2):W562-W565.
- [15] 于健,Setrerrahmane S,徐寒梅.连接肽在融合蛋白设计中的选择及应用[J].药物生物技术,2016,23(3):260-263.
- [16] 蔡晓娜.不同连接肽的 TRAIL-Fc 融合蛋白在 *E.coli* 中的重组表达及其活性研究[D].重庆:重庆理工大学,2014.
- [17] 赵昆,刘思国,王春来,等.牛抗菌肽 Bac7-Bac5 融合基因在大肠杆菌中的过表达、纯化及抑菌活性[J].中国生物工程杂志,2007,27(3):65-70.
- [18] Hunter H N,Fulton D B,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].J Biol Chem,2002,277(40):37597-37603.
- [19] 薛剑峰.对虾素 CHP3 和 CHP5 的原核与真核重组表达及性质研究[D].济南:山东大学,2005.

Secretion expression ,purification and antimicrobial activity of hybrid antimicrobial peptide Scy-Hep3 in yeast *Pichia pastoris*

PENG Hui^{1,2}, WANG Ke-jian^{1,2}

(1. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. State-Province Joint Engineering Laboratory of Marine Bio-products and Technology, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: A hybrid antimicrobial peptide sequence of *scygonadin-hepcidin3*(*scy-hep3*) was obtained by overlap extension PCR using cDNA sequences of Scygonadin(Scy) and Hecpudin 3(Hep3) as the templates, and cloned into yeast *Pichia pastoris* by the secreted expression vector of pPIC9K. The constructed plasmid of pPIC9K-*scy-hep3* was transformed into the yeast GS115 cells by electroporation, and the hybrid antimicrobial peptide Scy-Hep3 was obtained and its antibacterial activity was analyzed after methanol induction and affinity purification in order to obtain stable expression of a new antibacterial peptide with high antibacterial activity. The results showed that the recombinant plasmid pPIC9K-*scy-hep3* was constructed successfully, and the clone of GS115/pPIC9K-*scy-hep3* was induced by 0.5% methanol for 24 h, a stable expressed product with molecular weight of about 24 000 being obtained, consistent with the calculated molecular weight of Scy-Hep3. Antibacterial assays demonstrated that the recombinant product of Scy-Hep3 had broad spectra of antimicrobial properties, especially antibacterial activity against three Gram-positive bacteria *Micrococcus lysodeikticus*, *Corynebacterium glutamicum* and *Staphylococcus aureus*, and four Gram-negative bacteria *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Shigella flexneri* [minimal inhibitory concentration(MIC) <12 $\mu\text{mol/L}$]. There was higher antibacterial activity in the hybrid antibacterial peptide Scy-Hep3 than that in the single peptide of Scy and Hep3. The findings are first report on the hybrid antimicrobial peptide Scy-Hep3, and beneficial to production and application of Scy-Hep3 in future.

Key words: hybrid antimicrobial peptide; *Pichia pastoris*; recombinant expression; antimicrobial activity