

猪 β 防御素 1 基因在毕赤酵母中的分泌表达

Expression of Porcine β -defensin 1 Gene in *Pichia pastoris*

姜丽华, 卢海蓉, 黄德新, 易俊波, 李凌云, 林 枫*

JIANG Li-Hua, LU Hai-Rong, HUANG De-Xin, YI Jun-Bo, LI Ling-Yun and LIN Feng*

深圳国家生化工程技术开发中心, 深圳 518057

National Engineering Center for Biotechnology, Shenzhen 518057, China

摘 要 PBD-1 是猪防御系统起重要作用的抗菌小肽, 为实现其在毕赤酵母中的表达, 根据已发表的猪 β 防御素 1 (PBD-1) 氨基酸序列和酵母偏好密码子, 用 PCR 方法获得 PBD-1 基因, 克隆到分泌型表达载体 pPIC9K 信号序列 α 因子之后, 构建重组表达质粒 pPIC9K-PBD-1, 用 *Sal* I 将其线性化后转化毕赤酵母 SMD1168, 采用 PCR 法筛选 *Mut*⁺ 表型, 在 AOX1 启动子调控下, 分子量约 4.5 kD 的 PBD-1 抗菌肽得到表达。抗菌特性研究表明, 该表达产物对金黄色葡萄球菌有较好的抑菌活性。首次在毕赤酵母表达系统中实现了 PBD-1 的分泌表达。

关键词 PBD-1, 毕赤酵母, pPIC9K, 分泌表达, 抑菌活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-1036-04

Abstract PBD-1 is an antibacterial peptide that plays an important role in defence system of porcine. To produce PBD-1 with bioactivity in *Pichia pastoris*, according to published amino acid sequence of porcine β -defensin 1 (PBD-1) and the partiality codon of yeast, the PBD-1 gene was synthesized by PCR and cloned into pPIC9K to construct the recombinant expression vector pPIC9K-PBD-1, the obtained recombinant plasmid was linearized by *Sal* I, and then transformed into SMD1168 by electroporation. Under the control of the promoter AOX1, an approximately 4.5 kD PBD-1 peptide was expressed. Antibacterial activity assay shows that the PBD-1 has the antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. This is the first secreted expression of porcine β -defensin 1 gene in *Pichia pastoris*.

Key words porcine β -defensin 1, *Pichia pastoris*, pPIC9K, secreted expression, antibacterial activity

抗菌肽是近年来发现的广泛存在于生物体内的一种具有强抗菌作用的多肽, 由于其独特的抗菌机制^[1,2], 病原微生物不易对其产生耐药性, 因此, 抗菌肽成为最具开发前景的抗生素替代品。防御素 (defensin) 是抗菌肽中较为重要的一种, 主要来源于上皮组织, 是正常机体抵抗外界病原微生物入侵的第一道防线。猪的 β -防御素 1 (porcine β -defensin 1, PBD-1) 广泛分布于消化道、呼吸道、肝肾等多种组织细胞内, 在猪防御系统中有重要作用^[3-5]。它可作为食品保鲜剂和饲料添加剂, 因此, 通过克隆表达

PBD-1 基因获得抗菌肽将能带来极大的社会效益。

PBD-1 在大肠杆菌表达系统^[6]和昆虫杆状病毒表达系统^[7]中的表达已有报道, 虽然大肠杆菌生长快, 培养基廉价, 但所表达的外源蛋白难以进行正确的翻译后修饰加工, 且融合表达的后处理麻烦。而昆虫杆状病毒表达的外源蛋白虽能得到良好的翻译后修饰加工, 但其成本较高, 不适宜大规模生产。而毕赤酵母 (*Pichia*) 表达系统以其无可比拟的优越性成为近年来发展迅速、应用广泛的真核表达系统。

本研究将 PBD-1 基因插入毕赤酵母表达载体,期望在毕赤酵母系统中获得有抗菌活性的猪抗菌肽,为进一步探索利用基因工程手段进行大规模生产抗菌肽奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :*E. coli* TOP10 ,金黄色葡萄球菌标准株 , *Pichia pastoris* SMD1168 , pPIC9K 均由本实验室保存。

1.1.2 工具酶和生化试剂 :ExTaq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 公司产品 ;Tryptone、Yeast Extract 为 Oxoid 公司产品 ;G418 为 Invitrogen 公司产品 ;YNB 为 Amresco 公司产品 ; Biotin 为 Biobasic 公司产品 ;其余常用试剂为国产或进口分析纯。培养基参照 Invitrogen 公司 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 说明书配制。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 根据酵母偏好密码子^[8,9]和 PBD-1 基因成熟肽氨基酸序列^[3],设计合成 PBD-F、PBD-R、EPBD-F、EPBD-R 共 4 条引物 ,PBD-F、PBD-R 之间有 18 bp 互补配对 ,用于拼接 PBD-1 基因 ,EPBD-F、EPBD-R 用于在 PBD-1 基因两端加入 *EcoR* I 酶切位点。序列如下 :

PBD-F :5'-AAGAACATCGGTAAGTCTGTTTCTGTTTGA
GGAACAAGGGTGTGTTGTATGCCAGGAAAGTGTGCTC
CA-3'

PBD-R :5'-TTACTTTCTTTTGCAACACTTAAGTTGTGGC
ATTCCACAAGTACCAATTTGTTTCATCTTTGGAGCA
CACTTTCCTGG-3' ;

EPBD-F 5'-GCCGAATTCAAGAACATTGGTAACT-3'
EPBD-R :5'-GGCGAATTCTTACTTTCTTTTGCAACAC-3'
(划线部分为 *EcoR* I 酶切位点)

1.2.2 PCR 扩增 PBD-F、PBD-R 互为模板、引物 ,进行 PCR 扩增。反应条件 :94℃ 预热 5min ,然后 ,94℃ 1min ,55℃ 30s ,72℃ 30s ,25 个循环 ;最后 ,72℃ 继续延伸 10min ,获得 PBD-1 基因 ,以此为模板 ,EPBD-F、EPBD-R 为引物 ,将酶切位点加在 PBD-1 基因的两端 ,反应条件同上。

1.2.3 重组表达质粒的构建及鉴定 :PCR 产物和 pPIC9K 分别经 *EcoR* I 酶切、连接 ,转入大肠杆菌 TOP10 ,获得的重组质粒用 5' AOX1 和 EPBD-R 做定向 PCR 鉴定和序列测定 ,筛选出阳性克隆。

1.2.4 酵母的电击转化及 Mut⁺ 转化子的筛选 :将

Sal I 线性化的 pPIC9K-PBD-1 转入 SMD1168 感受态细胞(1.5kV、25 μ F 电击 5ms) ,立即加入 1mL 预冷的 1mol/L 山梨醇混匀 ,涂布于含 2mg/mL G418 的 MD 平板上 ,30℃ 培养至单菌落出现。采用 PCR 方法分析 PBD-1 基因是否整合到酵母基因组 DNA 及转化子表型 提取重组酵母基因组 DNA 作为模板 ,以 5' AOX1、3' AOX1 为引物进行 PCR 鉴定 ,实验方法参见 Invitrogen 公司 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 说明书。

1.2.5 重组 *P. pastoris* 的诱导表达 :挑取重组 *P. pastoris* 及实验对照(pPIC9K/SMD1168) ,接种到 25mL BMGY 中培养至 OD₆₀₀ 达到 4.0 ~ 6.0 ,室温 1500g 离心 5min ,用 100mL BMMY(pH6.0)重悬至 OD₆₀₀ 约为 1.0 ,甲醇诱导培养 7d ,每隔 24 h 取样及补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%。样品离心取上清 , - 20℃ 冻存储用。将诱导 1 ~ 7d 的表达上清约 300 μ L 用 TCA(三氯乙酸)浓缩 10 倍 ,加上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 重组 PBD-1 抗菌活性检测 :重组 PBD-1 抗菌活性实验通过抑菌圈法检测。在斜面培养基培养金黄色葡萄球菌。用无菌水冲洗斜面 ,获得悬浮液 ,取 150 μ L 加入灭菌 LB(约 50℃) ,混匀倒平板 ,待凝固后打直径 2mm 孔 ,每孔加 50 μ L 表达上清 ,37℃ 培养过夜 ,观察抑菌活性。

2 结果和分析

2.1 抗菌肽 PBD-1 基因的拼接、克隆及重组表达质粒的构建

经 PCR 扩增得到 PBD-1 基因应为 141 bp ,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示 ,与预期大小相符(如图 1A) ;重组表达质粒用 5' AOX1 和 EPBD-R 进行定向 PCR 鉴定 ,扩增带约 510 bp(5' AOX1 引物到 *EcoR* I 位点前的 273 bp 加 141 bp)的菌株可以确定 PBD-1 基因以正确方向连接到载体 pPIC9K 上 ,琼脂糖凝胶电泳结果如图 1B。测序结果表明 ,PBD-1 基因序列完全正确 ,并以正确的方向插入 pPIC9K *EcoR* I 位点 ,重组表达质粒的构建完全正确 ,将其命名为 pPIC9K-PBD-1。

2.2 筛选、鉴定 Mut⁺ 转化子

通过 PCR 扩增鉴定重组酵母生长表型 ,大约 80% 的为 Mut⁺ ;PCR 扩增结果显示 ,阳性重组子出现约 2.2 kb 的野生型 AOX1 基因片段扩增带及 627 bp 长度的产物(AOX1 上、下游引物之间序列 492bp 与插入的目的基因片段 35bp 之和)扩增带(如图

2),与预期结果相符。

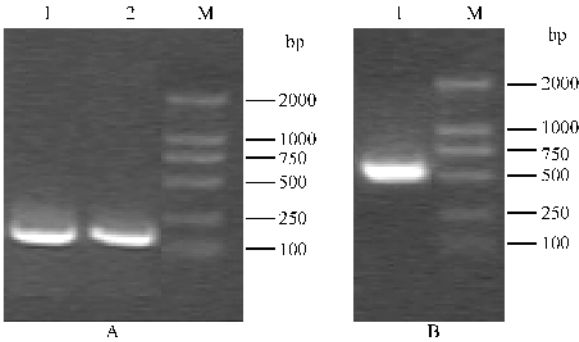


图1 *PBD-1* 基因的 PCR 扩增产物 (A) 及重组质粒的 PCR 鉴定 (B)

Fig. 1 PCR products of *PBD-1* gene (A) and identification of recombinant plasmid with PCR technique (B)
M :DL2000 marker ;1 ,2(A) :PCR products of *PBD-1* ;1(B) :PCR identification of recombinant plasmid.

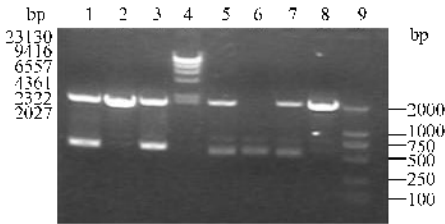


图2 酵母重组子的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant *Pichia* by PCR
1, 3, 5, 7 : successful transformed *Mut*⁺ phenotype ; 2 : abortive transformation of *Pichia* ; 6 : successful transformed *Mut*⁻ phenotype ; 8 : the PCR product from SMD1168 ; 4 : DNA marker λ /Hind III ; 9 : DNA marker DL2000.

2.3 SDS-PAGE

对上述筛选的阳性重组酵母进行诱导培养,获得的上清液进行 SDS-PAGE ,结果显示 ,在相对分子量(*M_r*)约 4.5 kD 处有特异蛋白带(图 3),与预期分子量大小相符,而对照酵母未出现相应蛋白带。从下图可以看出,重组酵母诱导 3 d 抗菌肽分泌表达量最高。

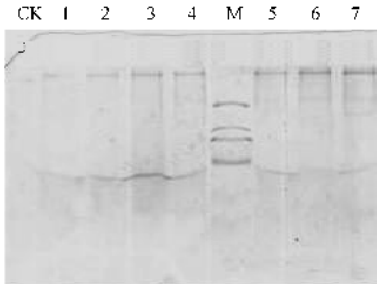


图3 *PBD-1* 重组酵母的表达上清 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of culture supernatant of recombinant yeast

CK :pPIC9K-SMD1168 induced for 96h (negative control); 1 ~ 7 : pPIC9K-PBD-SMD1168 induced for 1 ~ 7 days ; M :low molecular protein marke(26.625 ,16.950 ,14.437 ,6.512 ,3.496 ,1.423 kD).

2.4 摇瓶诱导表达和表达产物的生物活性

Mut⁺ 重组菌进行大量诱导表达 ,表达上清有很强的抑菌活性 ,图 4 为表达上清对金黄色葡萄球菌的抑菌实验。

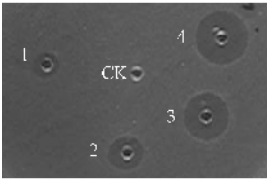


图4 重组酵母表达上清抑菌活性实验

Fig. 4 Antibacterial activity of recominate *Pichia* supernatant

CK :culture supernatant of pPIC9K-SMD1168 ;1 ~ 4 :expressed *PBD-1* after induced of 24h ,48h ,72h and 96h.

3 讨论

由于长期滥用抗菌药物 ,细菌耐药性问题已经成为困扰医学界的一大难题。克服细菌耐药性问题是当务之急 ,抗菌肽作为生物机体内天然免疫系统的重要组成部分 ,具有抗菌、抗病毒、抗真菌、抗肿瘤等多种生物学活性 ,具有作为新型抗生素的潜在应用前景。但从天然资源中提取抗菌肽和多肽合成成本较高 ,因而阻碍了其广泛应用 ,采用基因工程方法生产抗菌肽是解决问题的一条经济有效的途径。

目前已建立的原核和真核表达系统 ,其代表分别为大肠杆菌表达系统和酵母表达系统。大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早 ,应用广泛的经典表达系统 ,与其他表达系统比较 ,此系统具有遗传背景清楚、繁殖快、成本低、抗污染能力强以及适用范围广等优点 ,但同时该表达系统也有明显的缺陷 ,如表达产物缺少翻译后修饰 ,易折叠错误导致表达产物没有活性 ,而且大肠杆菌本身含有内毒素等 ,另外 ,由于抗菌肽对大肠杆菌有很强的杀伤力 ,因而不宜在大肠杆菌中直接表达 ,而采用融合蛋白方式 ,表达后需对产物进行裂解纯化等后处理。导致成本上升。酵母表达系统是近年来迅速发展起来的一种具有诸多优点的表达系统。它具有大肠杆菌表达系统生长繁殖迅速、营养要求简单 ,可工业化、大规模、高密度发酵培养等优点 ,同时又具有真核细胞翻译后修饰加工功能 ,而且酵母毒性比细菌小 ,安全可靠。还有抗菌肽表达产物对酵母无毒性 ,可以直接表达出有活性的抗菌肽 ,而且酵母菌可以将表达的外源蛋白通过一定的途径分泌到胞外 ,加之酵母在生长过程中自身分泌的成分少 ,从而使后续纯化步骤简单 ,有利于蛋白的分离纯化。

本实验的重要意义在于这是首次报道的用 *P. pastoris* 表达系统对 PBD-1 这种抗菌短肽进行异源表达。本项研究弥补了抗菌肽天然提取成本高等缺陷,获得了具有生物学活性的抗菌肽基因工程真核表达株,为用基因工程方法生产无毒副作用、无有害残留、不易使细菌产生耐药性的具有多种生物活性抗菌肽奠定了基础。但在本实验中,得到的表达水平不够理想,还需要进一步地优化 *Pichia* 酵母表达要素,实现外源基因在 *Pichia* 酵母中的最佳表达。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wu JM(吴金梅),Chen LY(陈丽颖),Wang YL(王艳玲). Application and advance in antimicrobial peptides. *Progress in Veterinary Medicine*(动物医学进展) 2005 **26**(9):27-30
- [2] Wu X(吴希),Zhang SQ(张双全). Molecular mechanisms of antibacterial peptides against bacterium. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展) 2005 **32**(12):1109-1113
- [3] Zhang G,Wu H,Shi J. Molecular cloning and tissue expression of pBD-1, a porcine β -defensin. *FEBS Lett*,1998 **424**:37-40
- [4] Zhang G,Hiraiwa H,Yasue H *et al.* Cloning and characterization of the gene for a new epithelial β -defensin: genomic structure, chromosomal localization and evidence for its constitutive expression. *J Biol Chem*,1999, **274**:24031-24037
- [5] Zhang GL,Ross CR,Blecha F. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res* 2000, **31**:277-296
- [6] Luo X(罗刚),Wei H(魏泓). Recombination and fusion expression of porcine defensin gene PBD-1 in *E. coli*. *Hereditas*(遗传), 2003 **25**(2):146-150
- [7] Shi JS,Zhang GL,Wu H *et al.* Porcine epithelial β -defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infection and Immunity*,1999, **67**:3121-3127
- [8] Zhao X(赵翔),Huo KK(霍克克),Li YY(李育阳). Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报),2000, **16**(3):308-311
- [9] Jeffrey L Bennetzen,Benjamin D Hall. Codon selection in yeast. *J Biol Chem*,1982 **257**:3026-3031