

家蝇幼虫防御素基因 *Mdd I* 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性鉴定

傅小蒙¹, 万玲¹, 唐艳¹, 孔令聪¹, 裴志花¹, 刘树明¹, 马红霞^{1,2*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林农业大学, 长春 130118)

[收稿日期] 2015-07-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0022-05 [中图分类号] S852.743

[摘要] 根据家蝇幼虫防御素基因 (*Mdd I*) 序列, 设计合成含有 *Kpn I* 和 *Xba I* 酶切位点的特异性引物, PCR 扩增出 *Mdd I* 基因全长序列。克隆并测定序列后, 构建真核表达质粒 pGAPZαA - *Mdd I*, 将其在毕赤酵母 (*P. pastoris*) GS115 中分泌表达, 并对表达产物进行抑菌活性分析。结果表明, *Mdd I* 基因在 *P. pastoris* 中成功表达, 分子量约为 10.3 kDa, 抑菌结果显示 *Mdd I* 基因的真核表达产物对猪源链球菌有抑制作用。该试验成功构建了表达 *Mdd I* 基因的 *P. pastoris* 菌株, 为进一步研究 *Mdd I* 真核表达产物的生物学活性和免疫学活性奠定了基础。

[关键词] 家蝇; 防御素; *P. pastoris*; 真核表达; 抗菌活性

Expression of *Musca domestica* Larvae Defensin Gene *Mdd I* in *P. pastoris* and Identification of Its Antibacterial Activity

FU Xiao-meng¹, WAN Ling¹, TANG Yan¹, KONG Ling-cong¹, PEI Zhi-hua¹,

LIU Shu-ming¹, MA Hong-xia^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Animal Production & Product Quality and Security of the Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: A pair of primers with restriction sites *Kpn I* and *Xba I* were designed and synthesized according to the gene sequence of *Musca domestica* larvae defensin gene *Mdd I*, then facilitated to amplify the full-length sequence of *Mdd I* by polymerase chain reaction (PCR). After cloning and sequencing, the eukaryotic expression plasmid pGAPZαA - *Mdd I* was constructed and then expressed in *P. pastoris* GS115, subsequently the antimicrobial activity of recombinant protein was analyzed. The result showed that the expressed protein of *Mdd I* was about 10.3 kDa, which possessed antibacterial activity against swine *Streptococcus*. Conclusively, the recombinant *P. pastoris* with gene *Mdd I* was successfully constructed, which was a basis for further researchers in biological and immunologic activities of eukaryotic expression product of *Mdd I*.

Key words: *Musca domestica*; defensin; *P. pastoris*; eukaryotic expression; antimicrobial activity

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31140026); 吉林省世行贷款农产品质量安全项目(2011-Y05)

作者简介: 傅小蒙, 硕士研究生, 从事动物药理与毒理学的研究。

通讯作者: 马红霞. E-mail: hongxia0731001@163.com

家蝇是地球上分布极其广泛的一种昆虫, 长期生活在杂菌横生的环境中, 研究报道其独特的抗病能力可能源于其体内所含有的多种抗菌活性物质, 而防御素就是其中之一^[1-2]。家蝇防御素可抑制多种病原微生物的生长, 尤其对耐药的革兰氏阳性菌有很强的杀伤作用^[3], 在抗生素耐药性日趋严重的情况下, 利用基因工程的方法大量制备抗菌肽产品具有广阔的研究前景。由于防御素对细菌有很强的杀伤作用^[4]而不易在细菌中高效表达, 且其在原核系统中的表达具有不能正确折叠, 缺少翻译后的修饰等^[5]缺点, 而 *P. pastoris* 表达系统具有比较完备的基因表达调控机制和对真核基因表达产物的加工修饰能力, 是一个较为理想的抗菌肽基因表达系统^[6]。家蝇幼虫防御素基因 *Mdd I* 是家蝇防御素 Defensin - 2 家族中的一员, 与 GenBank 中登录号为 AY260152 的家蝇防御素基因同源性最高, 达到 76%。本研究构建了表达 *Mdd I* 基因的重组酵母菌株, 对 *Mdd I* 基因进行了真核表达及表达产物活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与表达载体 大肠杆菌 DH5 α 菌株、*P. pastoris* GS115 菌株、pGAPZ α A 载体、猪源链球菌耐药株、鸡源大肠杆菌耐药株与鸡伤寒沙门氏菌耐药株, 均由吉林农业大学兽医药理实验室保存。

1.1.2 主要试剂与酶 限制性内切酶 *Kpn*I、*Xba*I、*Bln*I, T4 DNA 连接酶, 低分子量标准蛋白 Marker(14.3 ~ 97.2 kDa), DNA Marker (DL2000, λ -Hind III) 均购自宝生物工程有限公司; 博来霉素 (Zeocin) 购置 Invitrogen 公司; 考马斯亮蓝 G-250、溴酚蓝、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、四甲基乙二胺 (TEMED)、Tris、甘氨酸与十二烷基磺酸钠, 均购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *Mdd I* 的克隆 根据 *Mdd I* 基因序列^[7], 应用 Primer5.0 软件设计两条特异性引物, 序列为 P1: ATTAGGTACC GCCACC ATGAAATTC, 其中第一条与第二条下划线序列分别为 *Kpn*I 限制性内切

酶酶切位点与 Kozak 序列^[8]; P2: GGCCTTA-ATTCTAGATCAGTTACG, 下划线部分为 *Xba*I 限制性内切酶酶切位点。设计的引物送上海生工生物工程技术服务有限公司合成。利用两条特异性引物, PCR 扩增出 *Mdd I* 基因目的片段后与 pMD-18T 克隆载体进行连接, 对克隆质粒进行双酶切验证分析, 并将阳性克隆质粒送往上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.2.2 重组毕赤酵母表达质粒 pGAPZ α A - *Mdd I* 的构建 将 T-A 克隆成功的质粒与 pGAPZ α A 载体经 *Kpn*I 和 *Xba*I 双酶切后, 回收并连接, 构建 pGAPZ α A - *Mdd I* 真核表达质粒, 并对其进行双酶切验证和测序分析。

1.2.3 酵母的电击转化及重组酵母菌株的筛选

P. pastoris GS115 感受态细胞的制备参照 Invitrogen 公司提供的毕赤酵母表达手册进行^[9]。通过电击转化的方法将经过 *Bln*I 单酶切线性化的重组表达质粒转化入 GS115 感受态细胞 (电转参数 1500 V、25 μ F、200 Ω)。转化后将酵母细胞涂布于含 100 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 ~ 3 d, 挑取转化子, 用特异性引物对转化子进行 PCR 鉴定。再经不同浓度梯度博来霉素的 YPDS 平板筛选高拷贝重组转化子。

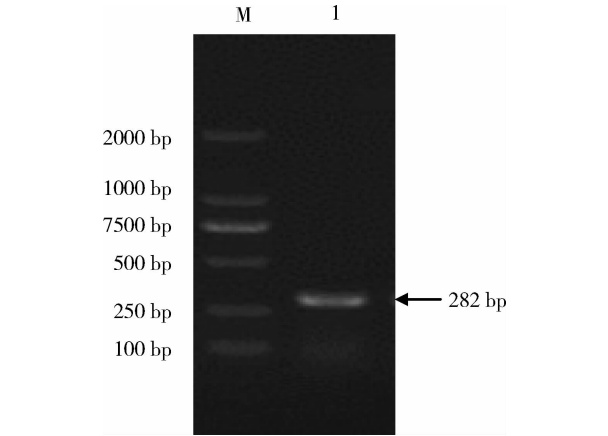
1.2.4 *Mdd I* 基因在毕赤酵母中的表达

pGAPZ α A 为组成型表达载体, 非诱导表达参照 Invitrogen 公司推荐的非诱导表达程序进行^[10], 挑取高拷贝重组表达酵母菌株于 5 mL 的 YPD (含 100 μ g/mL Zeocin) 液体培养基中进行培养, OD_{600nm} 达到 2 ~ 6 时取 1 mL 培养液, 重悬于 50 mL 的 YPD 液体培养基中, 每隔 24 h 取 1 mL 培养液, 收集上清进行 Tris-SDS-PAGE 分析。

1.2.5 表达产物抑菌活性检测 大量收集酵母表达上清, 并用 3 kDa 的超滤管进行浓缩脱盐, 取浓缩后的上清进行抑菌活性检测。以本实验室在临床分离的几种耐药菌株 (猪源链球菌耐药株、鸡源大肠杆菌耐药株与鸡伤寒沙门氏菌耐药株,) 为试验菌, 采用管碟法测定表达上清对这些耐药菌株的敏感性。

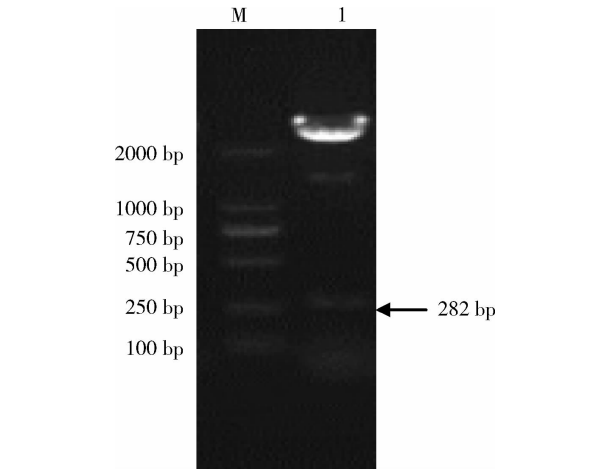
2 结果与分析

2.1 *Mdd* I 基因 PCR 扩增结果 *Mdd* I 基因 PCR 扩增产物经过 1% 琼脂糖电泳检测显示,获得约为 282 bp 的目的片段,与预期大小相符(图 1)。



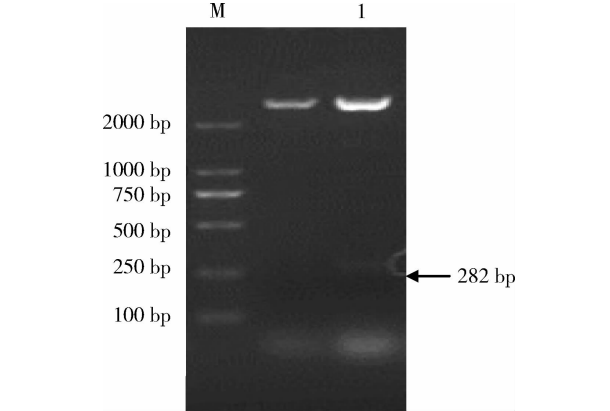
M:DNA 分子量标准 DL2000; 1:PCR 扩增的 *Mdd* I 基因
图 1 *Mdd* I PCR 扩增结果

2.2 *Mdd* I 基因 T - A 克隆结果 pMD - 18T - *Mdd* I 克隆质粒的双酶切鉴定结果显示,在 282 bp 处有一条清晰条带,与目的片段预期大小一致(图 2)。



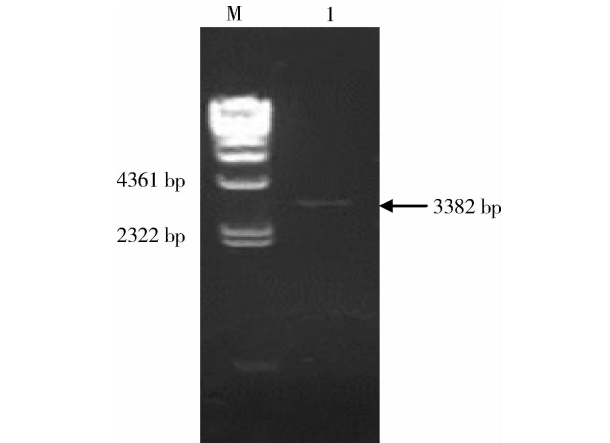
M:DNA 分子量标准 DL2000; 1:pMD - 18T - *Mdd* I 双酶切
图 2 pMD - 18T - *Mdd* I 双酶切鉴定结果

2.3 重组表达质粒 pGAPZαA - *Mdd* I 双酶切鉴定结果 pGAPZαA - *Mdd* I 经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后,在 282 bp 处切出目的条带,证明真核表达质粒构建成功(图 3)。



M:DNA 分子量标准 DL2000;
1: pGAPZαA - *Mdd* I 质粒双酶切
图 3 pGAPZαA - *Mdd* I 双酶切鉴定结果

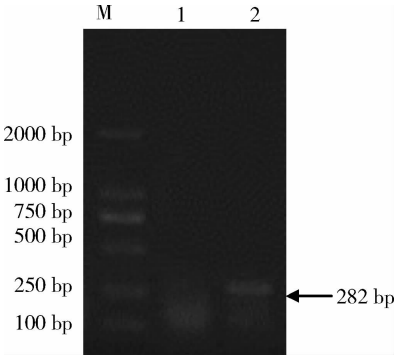
2.4 重组阳性表达质粒单酶切鉴定结果 pGAPZαA - *Mdd* I 经过 *Bln* I 单酶切线性化后,在 3382 bp 处出现目的条带(图 4)。



M:DNA 分子量标准 λ - *Hind* III;
1:pGAPZαA - *Mdd* I 单酶切
图 4 pGAPZαA - *Mdd* I 质粒单酶切鉴定结果

2.5 重组阳性酵母表达菌株 GS115/ pGAPZαA - *Mdd* I PCR 鉴定结果 挑取在 YPDS 平板上生长的菌落于 YPD 液体培养基中,利用特异性引物对过夜培养的菌液进行 PCR 验证,阳性酵母表达菌株在 282 bp 处出现目的条带,证明重组表达质粒已成功转入 *P. pastoris* GS115 中(图 5)。

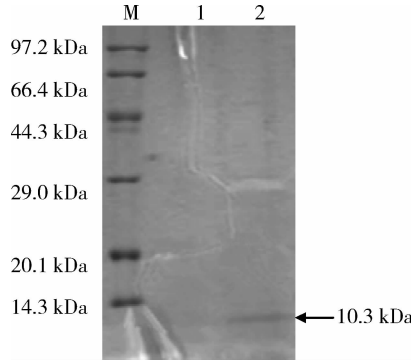
2.6 GS115/ pGAPZαA - *Mdd* I 重组酵母表达产物 Tris - SDS - PAGE 检测 收集酵母表达上清进行



M:DNA 分子量标准 DL2000;1:GS115 阴性对照;
2:GS115/ pGAPZαA - *Mdd I*

图 5 重组酵母表达菌株 PCR 鉴定结果

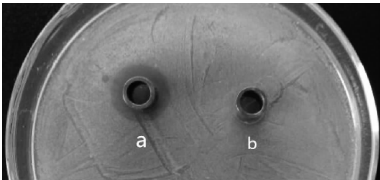
Tris - SDS - PAGE 分析,结果显示,在 14.3 kDa 之下有一明显重组表达条带(图 6)。



M: Protein Marker;1:GS115/ pGAPZαA 空载体对照;
2:GS115/ pGAPZαA - *Mdd I* 酵母表达上清

图 6 重组酵母表达产物 Tris - SDS - PAGE 检测结果

2.7 *Mdd I* 重组酵母表达产物抑菌活性检测 抑菌活性检测结果显示 *Mdd I* 重组酵母表达产物对猪源链球菌耐药株具有显著的抑制作用,而对鸡源大肠杆菌耐药株、鸡伤寒沙门氏菌耐药株无明显抑制作用(图 7)。



a:GS115/ pGAPZαA - *Mdd I* 酵母表达上清;b:阴性对照

图 7 *Mdd I* 重组酵母表达产物对猪源链球菌耐药株的活性

3 讨论与小结

与传统抗生素相比,防御素作为一种新型的抗菌肽,其独特的作用方式使细菌不易产生耐药性^[11]。本试验在研究 *Mdd I* 基因的抑菌活性时,发现其对革兰阴性菌无明显抑制作用,而对革兰阳性菌的抑制效果十分显著,这与先前报道的家蝇防御素对革兰阳性菌敏感度较高这一结论相符。防御素发挥抗菌作用主要有细胞膜渗透机制、与细胞内生物大分子作用以及诱导调节机体免疫反应三种方式^[12-13],*Mdd I* 基因致革兰阳性菌死亡属于上述哪种机制还有待于进一步论证。

P. pastoris 表达系统具有许多原核表达系统无法比拟的优点,例如分子遗传操作技术简单,具有多种翻译后加工修饰能力等^[14]。本研究选用 *P. pastoris*GS115 菌株和 pGAPZαA 载体表达 *Mdd I* 基因主要有两点原因:一为 *P. pastoris*GS115 是组氨酸缺陷型酵母菌株,而表达载体上携带的组氨酸基因,可补偿宿主的组氨酸缺陷,因此可以在不含组氨酸的培养基上筛选转化子,二为 pGAPZαA 是组成型分泌表达载体,具有 PGAP 启动子(三磷酸甘油醛脱氢酶启动子),在它控制下的外源基因表达率比甲醇诱导下的以 PAOX1 为启动子的产量更高,并且 PGAP 为组成型启动子不需甲醇诱导,发酵工艺简单且生产过程安全,是一个很有潜力的启动子。

本研究为了提高防御素基因在 *P. pastoris* 表达系统中的表达量,设计合成引物时,在起始密码子前加入了 Kozak 序列,有研究证明在起始密码子前后加入 Kozak 序列(GCCACC),基因开始转录翻译的效率最高^[8]。本研究 Tris - SDS - PAGE 分析结果显示,表达的目的蛋白相对分子量略微偏大,参考 Invitrogen 公司酵母表达手册分析得出原因,可能是由于蛋白在翻译加工时,C - 末端 2.5 kDa 的标签未能成功切割所致。本试验结果为进一步研究 *Mdd I* 基因真核表达产物的生物学活性和免疫学活性奠定了基础。

参考文献:

[1] Pei Z H, Sun X N, Tang Y, et al. Cloning, expression, and

- purification of a new antimicrobial peptide gene from *Musca domestica* larva[J]. *Gene*, 2014, 549(1): 41–45.
- [2] Ebenhan T, Gheysens O, Kruger H G, *et al.* Antimicrobial peptides; their role as infection – selective tracers for molecular imaging[J]. *BioMed research international*, 2014, 867381.
- [3] 焦莉萍. 家蝇幼虫抗菌肽 DEFENSIN 基因的克隆, 表达, 纯化及抑菌, 抑肿瘤活性研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2013.
- [4] Wang J X, Zhao X F, Liang Y L, *et al.* Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (*Musca domestica*) [J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2006, 63(24): 3072–3082.
- [5] LI Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review [J]. *Protein expression and purification*, 2011, 80(2): 260–267.
- [6] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5301–5317.
- [7] 万 玲, 傅小蒙, 唐 艳, 等. 家蝇幼虫防御素基因 *Mdd I* 的克隆与原核表达[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(12): 1280–1284.
- [8] 王 照. 毕赤酵母表达犬长效干扰素融合蛋白的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [9] 王海霞, 缪 刘, 祁克宗, 等. 鸡 β 防御素 2 成熟肽基因在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性分析[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(7): 719–724.
- [10] 郭春和, 焦茂兴, 何 俊, 等. 抗菌肽 Cecropin D 基因在毕赤酵母中的表达与抗菌活性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(11): 858–861.
- [11] Silva O N, Mulder K C L, Barbosa A E A D, *et al.* Exploring the pharmacological potential of promiscuous host – defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications [J]. *Front Microbiol*, 2011, 2:232.
- [12] Nguyen L T, Haney E F, Vogel H J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action [J]. *Trends in biotechnology*, 2011, 29(9): 464–472.
- [13] Parachin N S, Mulder K C, Viana A A B, *et al.* Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides[J]. *Peptides*, 2012, (38): 446–456.
- [14] Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells[J]. *Biotechnology advances*, 2012, 30(5): 1108–1118.

(编 辑:侯向辉)