

太平洋牡蛎防御素在毕赤酵母中的重组表达及其抑菌活性

崔旭, 陶妍, 王强厚, 张亚莉, 颜倩倩

上海海洋大学 食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

崔旭, 陶妍, 王强厚, 等. 太平洋牡蛎防御素在毕赤酵母中的重组表达及其抑菌活性. 生物工程学报, 2019, 35(1): 91–101.
Cui X, Tao Y, Wang QH, et al. Recombinant expression of *Crassostrea gigas* defensin in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 91–101.

摘 要: 防御素是一类富含精氨酸和半胱氨酸的内源性阳离子抗菌肽, 是软体动物抵御各种病原微生物侵袭的重要免疫因子。太平洋牡蛎防御素 (*Crassostrea gigas* defensin, CgD) 近羧基端的 43 个氨基酸残基构成了其成熟肽区域, 决定了 CgD 的生物学活性。首先通过逆转录 PCR 和设计特异性引物从太平洋牡蛎外套膜中分离并扩增到 3'端添加和不添加 6×His 标签的两种目的基因 *CgDH⁺* 和 *CgDH⁻*; 与 pPICZαA 连接后构建的重组表达载体 (pPICZαA-*CgDH⁺* 和 pPICZαA-*CgDH⁻*) 电转至毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33 中, 使用 1.0% 甲醇诱导表达目的蛋白 *CgDH⁺* 和 *CgDH⁻*, 最适培养条件为 29 °C、250 r/min、72 h; 通过固定金属离子亲和层析 (IMAC) 获得分子量为 5.78 kDa 的纯化的重组蛋白 *CgDH⁺*, 根据其蛋白质浓度推算表达量为 2.32 mg/L。经 MALDI-TOF-TOF 质谱分析证明纯化产物即为预期的目的蛋白。抑菌试验结果显示分别含重组蛋白 *CgDH⁺* 和重组蛋白 *CgDH⁻* 的培养液上清对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 都具有抑菌活性, 表明重组蛋白中 6×His 标签的存在与否并不影响其生物学活性。

关键词: 太平洋牡蛎, 防御素, 毕赤酵母, 重组表达, 抑菌活性

Recombinant expression of *Crassostrea gigas* defensin in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity

Xu Cui, Yan Tao, Qianghou Wang, Yali Zhang, and Qianqian Yan

Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Defensins are endogenous cationic antimicrobial peptides rich in arginine and cysteine residues. They are important immune factors resisting pathogenic bacteria infection for mollusks. The 43 amino acid residues near the carboxyl

Received: March 30, 2018; **Accepted:** May 16, 2018

Supported by: Ability Promotion Project of Engineering Center in Science & Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 16DZ2280300).

Corresponding author: Yan Tao. Tel: +86-21-61900384; E-mail: ytao@shou.edu.cn

上海市科委工程中心能力提升项目 (No. 16DZ2280300) 资助。

terminal for *Crassostrea gigas* defensin (CgD) form its mature peptide region, responsible for the biological activity of CgD. First, two target genes, CgDH⁺ (with 6×His-tag at 3' end) and CgDH⁻ (without 6×His-tag at 3' end) were separated and amplified by RT-PCR with specific primers from *Crassostrea gigas* mantle. These two target genes were ligated to the expression vector pPICZαA to construct recombinant expression vectors, pPICZαA-CgDH⁺ and pPICZαA-CgDH⁻, which were transformed into competent *Pichia pastoris* X-33 cells by electroporation respectively. The recombinant target proteins, CgDH⁺ and CgDH⁻, were induced for 72 h with 1% methanol at 29 °C and 250 r/min. The recombinant CgDH⁺ (5.78 kDa) was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), and identified by MALDI-TOF-TOF analysis, demonstrating that it was the expected target protein. Based on the concentration of the purified product, the estimated yield of recombinant CgDH⁺ was 2.32 mg/L. Antimicrobial assay showed that the culture medium supernatant containing recombinant CgDH⁺ and recombinant CgDH⁻, respectively, had activities against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, indicating that the existence of 6×His tag in the recombinant proteins do not affect their biological activities.

Keywords: *Crassostrea gigas*, defensin, *Pichia pastoris*, recombinant expression, antibacterial activity

防御素是生物机体在长期进化过程中保留下来的自身防御机制中的重要组成成分,是机体抵御外来病原微生物入侵的重要屏障,在机体的先天性免疫中发挥重要的作用^[1-4]。1960年美国洛克菲勒研究所 Cohn 等^[5]首次从兔的多形核白细胞中提取出此类具有杀菌活性的阳离子蛋白,其具有抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的作用,并能抑制蛋白水解酶的作用,他们将其命名为“Phagocytin”(吞噬素);六年以后,北卡罗莱纳大学医学院的 Zeya 等^[6-7]经过一系列研究证实了“吞噬素”实际上是存在于胞质颗粒内的富含精氨酸和半胱氨酸的碱性阳离子多肽,并称之为“Lysosomal cationic proteins”(溶酶体阳离子蛋白),且此类多肽显示了对大肠杆菌的抑制作用。20 世纪 80 年代中期,加州大学洛杉矶分校医学院的 Ganz 等^[8]首次以“Defensin”(防御素)命名此类多肽;之后人体内存在的 3 种 α-防御素(HNP-1、HNP-2、HNP-3)被证实对病原微生物、流感病毒、巨细胞病毒和水泡型口炎病毒等具有杀灭或抑制作用^[9-10];并且,研究显示,经 HNP 免疫的小鼠血清中免疫球蛋白的量明显增加^[11]。21 世纪初,美国洛克菲勒大学华人科学家张林琦在 *Science* 发表论文,称其用蛋白芯片法分离并识别出人体内 T-细胞分泌的具有抑制艾滋病病毒复制作用的

因子,即为 α-防御素,为艾滋病的治疗提供了新的方向^[12]。综上所述,防御素具有较广谱的抑菌作用、抗炎和免疫调节功能,是开发天然免疫蛋白和天然抑菌剂的良好候选者。

迄今为止,国内外在防御素的研究方面取得了较大进展,已从多种生物(人、鸡、马和玉米等)机体中分离获得防御素基因^[13-16],其在基因工程研究领域中的应用正在不断扩大。水产生物的栖息环境复杂,近年来出现的严重水域污染使它们比其他生物更易遭受病原微生物的侵袭^[17]。换言之,水产生物的机体必须拥有比其他生物更强的免疫系统才能适应这种复杂的生存环境,尤其是贝类等软体动物在缺乏具有“记忆效应”的特异性免疫机制的情况下,仍然能抵御各种病原微生物的侵袭,而防御素则是其先天性免疫系统中的重要免疫因子^[18]。Zhao 等^[19]从海湾扇贝 *Argopecten irradians* 中提取大防御素 AiBD 基因,构建了重组表达载体,通过在毕赤酵母中的表达获得重组 AiBD,抑菌试验显示该重组蛋白对多种革兰氏阳性和阴性菌具有抑制作用;之后,他们又将从菲律宾蛤仔 *Venerupis philippinarum* 中克隆到的大防御素 VpBD 基因通过大肠杆菌表达系统获得重组 VpBD,其对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和恶臭假单胞菌 *Pseudomonas*

putida 具有抑菌活性^[20]。据 Guenguen 等^[21]报道, 他们从太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 外套膜中也发现了一种新型防御素基因, 将其命名为 *Cg-def*, 通过原核表达系统获得的重组 *Cg-def* 对革兰氏阳性菌具有较好的抑菌活性, 但对革兰氏阴性菌无明显作用。众所周知, 原核表达系统存在一定的缺陷, 比如不能对表达产物进行翻译后加工修饰, 以致表达的目的蛋白会形成不溶性的包涵体, 需要经过复杂的复性才能恢复构象和活性。而与原核表达系统相比, 巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 作为真核表达的宿主, 其有助于表达产物空间构象的形成, 进而获得具有生物学活性的重组蛋白, 并可实现目的蛋白的细胞外分泌表达以方便表达产物的后续处理, 是目前公认的外源蛋白表达的良好宿主^[22]。最近, 我们报道了基于毕赤酵母表达系统获得的斑马鱼 *Danio rerio* 重组 β -防御素 (zfDB3), 它对大肠杆菌 *Escherchia coli*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 等显示了良好的抑菌活性^[23]。本研究以上述太平洋牡蛎防御素基因作为重组表达的目标, 拟通过毕赤酵母表达系统获得具有生物学活性的重组蛋白, 以期开发能够替代或部分替代抗生素的天然抗菌剂提供良好的候选者和技术途径。

为了实现上述目标, 首先通过 RT-PCR 从太平洋牡蛎外套膜中分离编码防御素的 cDNA 片段; 通过设计添加和不添加 6×His 标签的两种目的基因, 以 pPICZαA 为表达载体, 构建重组表达载体; 在毕赤酵母 X-33 中使用甲醇诱导表达重组蛋白, 并通过固化金属离子亲和层析 (IMAC) 和 MALDI-TOF/TOF 质谱分析对表达产物进行纯化和结构鉴定, 最终检测太平洋牡蛎重组防御素的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、菌株和载体

鲜活的太平洋牡蛎购自上海市芦潮港海鲜市场; 毕赤酵母 X-33 和表达载体 pPICZαA 购自 Invitrogen 公司 (美国); 克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司 (日本); 大肠杆菌 DH5α 购自天根生物科技有限公司 (北京); 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌由本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和设备

RNAiso plus、限制性内切酶 (*Sac* I、*Xho* I 和 *Xba* I)、T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; 3'-RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司; DNA 分子量 marker、DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒和酵母基因组 DNA 提取试剂盒均购自天根生物科技有限公司; 超低蛋白质分子量 marker 购自中科瑞泰生物科技有限公司 (北京); Western blotting 试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司 (北京); PCR 仪、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪、电转仪和 IMAC 柱均来自 BIO-RAD 公司 (美国)。引物合成、DNA 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成; MALDI-TOF-TOF 质谱分析由上海中科新生命生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

鲜活太平洋牡蛎运至实验室后, 取其外套膜, 采用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA; 通过 3'-RACE 法合成第一链 cDNA: 总 RNA 2 μL、通用引物 (5 μmol/L) 1 μL、5×PrimeScript 缓冲液 2 μL、dNTPs (10 mmol/L) 1 μL、RNase 抑制剂 (40 U/μL) 0.25 μL、PrimeScript RTase (200 U/μL) 0.25 μL, 用 RNase Free dH₂O 调至 10 μL; 42 °C 反应 60 min, 然后 70 °C 保温 15 min, 获得第一链 cDNA 保存于 -20 °C。

1.2.2 添加和不添加 6×His 标签的目的基因的 cDNA 克隆

以第一链 cDNA 为模板, 参考多种软体动物防御素基因设计正向引物 CgD-F 和反向引物 CgD-R (表 1), 通过 PCR 扩增编码太平洋牡蛎防御素的 cDNA 片段, 反应体系和条件如下: 10×*Taq* 缓冲液 2 μL、dNTPs (10 mmol/L) 1.6 μL、正向和反向引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL、第一链 cDNA 0.2 μL、*Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.2 μL, 无菌水调至 20 μL; 94 °C 3 min、94 °C 40 s、53.5 °C 30 s、72 °C 1 min、72 °C 10 min, 反应进行 30 个循环; 该片段经连接至 pMD19-T simple 载体后转入大肠杆菌 DH5α, 37 °C 过夜培养后选择阳性克隆由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 DNA 测序。以此 cDNA 片段为模板、采用 CgD-F1 和 CgD-R1 以及 CgD-F1 和 CgD-R2 两对引物 (表 1), 通过两次 PCR 扩增 5'端含 *Xho* I 酶切位点和 Kex 2 信号肽识别位点, 3'端含 6×His 标签、终止密码子和 *Xba* I 酶切位点的目的基因 *CgDH*⁺; 另一方面, 以 CgD-F1 和 CgD-R3 为引物 (表 1), 通过 PCR 扩增 5'端含 *Xho* I 酶切位点和 Kex 2 信号肽识别位点、3'端含终止密码子和 *Xba* I 酶切位点的目的基因 *CgDH*。扩增该两种目的基因的所有 PCR 反应体系和条件基本同上, 除了退火温度有所改变 (扩增 *CgDH*⁺ 的两次 PCR 的退火温度分别为 56.8 °C 和 56.5 °C; 扩增 *CgDH* 的退火温度为 54.2 °C)。扩增到的两种目的基因同上处理后由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 DNA 测序, 通过 ExPASy 软件(<http://web.expasy.org/compute.pi/>)预测它们编码的蛋白质的分子量和等电点。

1.2.3 重组表达载体的构建及电转至毕赤酵母 X-33

采用 *Xho* I 和 *Xba* I 分别对 pMD19-T-*CgDH*⁺ 和 pMD19-T-*CgDH* 进行双酶切, 获得目的基因 *CgDH*⁺ 和 *CgDH* 后, 在 T4 DNA 连接酶作用下,

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
CgD-F	ACATGGCTTTTCTGGATT	20
CgD-R	TTACTTCTTCCATTACAATCGGT	24
CgD-F1	<u>CTCGAG</u> AAAAGAGGATTGGCTGT	24
CgD-R1	GTGGTGGTGGTGGTGGT GCTTCTTCCATT	30
CgD-R2	<u>TCTAGACT</u> ATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTT	33
CgD-R3	<u>TCTAGACT</u> ATTACTTCTTTCCATTACAAT	29
3'AOX1	GCAAAATGGCATTCTGACATCC	21
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21

Underlines represent restriction sites, italics represent the sequence encoding Kex 2 protease recognition site, boldfaces represent 6×His.

将其与经同样限制性酶处理过的 pPICZαA 按 1 : 1 (V/V) 连接 (16 °C, 1 h) 以构建重组表达载体 pPICZαA-*CgDH*⁺ 和 pPICZαA-*CgDH*; 两者被转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 对其进行鉴定并测序。经确证的 pPICZαA-*CgDH*⁺ 和 pPICZαA-*CgDH* 用限制性内切酶 *Sac* I 处理后, 分别与毕赤酵母 X-33 感受态细胞以 1 : 8 (V/V) 混合, 转入预冷的 0.2 cm 电转杯中冰浴 5 min, 2 000 V、25 μF 和 200 Ω 条件下电击 5 ms; 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇。另外, 将 pPICZαA (空载体) 电转至毕赤酵母 X-33, 以此作为阴性对照。

1.2.4 高拷贝酵母转化子的筛选

将上述电转后的溶液置于 30 °C 恒温箱中保温 2 h, 离心后将菌体涂于含 100 μg/mL 博来霉素的 YPD 平板 (酵母粉 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L) 上, 于 29 °C 孵育至单克隆产生; 选择长势良好的菌落分别接种至含高浓度博来霉素 (1 000 μg/mL) 的 YPD 及 MM (YNB 13.4 g/L、生物素 0.4 mg/L、甲醇 5 mL/L、琼脂 15 g/L) 和 MD (YNB 13.4 g/L、生物素 0.4 mg/L、

葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L)平板上, 29 °C 培养 8 h。对筛选获得的甲醇利用快速型高拷贝酵母转化子提取基因组 DNA, 并以此为模板, 采用 pPICZαA 上的通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1 (表 1) 进行 PCR 鉴定。

1.2.5 目的蛋白在毕赤酵母 X-33 中的表达及表达条件的优化

将上述经 PCR 鉴定获得的两株酵母转化子(含 pPICZαA-CgDH⁺ 和 pPICZαA-CgDH⁻)分别接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 29 °C、250 r/min 培养 24 h 后, 取 500 μL 转接至 50 mL MGY 培养基 (酵母粉 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、YNB 13.4 g/L、生物素 0.4 mg/L、甘油 10 mL/L、磷酸钾缓冲液 100 mmol/L, pH 6.0) 中, 相同条件下培养 24 h; 全部转入 MM 培养基 (配方同 MGY 培养基, 除了 10 mL/L 的甲醇取代甘油) 中, 29 °C、250 r/min 培养 72 h, 每隔 24 h 补加甲醇至 1.0%。培养液经超滤浓缩后, 通过 Tricine-SDS-PAGE 对其进行分析, 电泳条件: 0.1 mol/L N-三(羟甲基) 甲基甘氨酸, 浓缩胶、夹层胶和分离胶的浓度分别为 4%、10% 和 16.5%。同时, 将 MM 培养基中的甲醇浓度设为 0%、0.5%、1%、1.5% 和 2%, 选取含 pPICZαA-CgDH⁻ 的酵母转化子同上条件进行培养, 以确定最适甲醇浓度; 在此基础上, 进一步对同一酵母转化子进行不同时间段的培养, 以确定最佳表达时间。

1.2.6 表达产物的纯化及 Western blotting 分析和结构鉴定

将上述筛选到的含 pPICZαA-CgDH⁺ 的酵母转化子扩大培养至 1 L, 在最适条件下进行培养; 培养液经离心后收集上清, 经赛多利斯切向回流超滤器浓缩后, 通过 Profina 蛋白质纯化仪进行固定金属离子亲和层析 (IMAC); 纯化产物经 Tricine-SDS-PAGE 分析后, 切下目的条带由上海中科新生命生物科技有限公司进行 MALDI-TOF-TOF 质谱分析。采用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。此外, 将电泳后的凝胶电转至 PVDF 膜上 (100 V, 1 h), 采用

Western blotting 试剂盒进行分析, 具体操作如下: 加封闭液反应 1 h 后洗膜, 加入鼠单克隆抗体 (一抗) 室温孵育 2 h; 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (二抗) 室温孵育 1 h; 洗膜后用 HRP-DAB 显色试剂盒进行显色。

1.2.7 重组蛋白的抑菌活性测定

以金黄色葡萄球菌和铜绿假单孢菌为试验菌, 将两者分别接种于 5 mL Luria-Bertani (LB) 液体培养基中, 于 37 °C、150 r/min 条件下培养至对数生长期; 菌液经 10 倍稀释后取 1 μL 分别与 100 μL 的含重组蛋白 CgDH⁺ 和含重组蛋白 CgDH⁻ 的培养液上清 (蛋白质总浓度分别为 2.4 mg/mL 和 2.69 mg/mL) 混合, 37 °C 保温 2 h, 取 30 μL 涂于 LB 平板, 再 37 °C 培养 24 h, 观察细菌生长情况。另外, 以含 pPICZαA (空载体) 的酵母转化子的培养液上清作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 目的基因 CgDH⁺ 和 CgDH⁻ 的 PCR 扩增及其序列分析

以太平洋牡蛎外套膜的第一链 cDNA 为模板, 使用引物 CgD-F 和 CgD-R, 扩增到 146 bp 的编码防御素的 cDNA 片段。以此 cDNA 片段为模板, 一方面通过使用两对引物 CgD-F1 和 CgD-R1 以及 CgD-F1 和 CgD-R2, 扩增得到含 6×His 标签的 171 bp 的目的基因 CgDH⁺; 另一方面, 通过使用 CgD-F1 和 CgD-R3 引物, 扩增得到不含 6×His 标签的目的基因 CgDH⁻。DNA 测序结果显示相关酶切位点和 6×His 标签被正确添加 (图 1); CgDH⁺ 和 CgDH⁻ 分别编码了由 49 个和 43 个氨基酸残基组成的多肽, 内含 8 个高度保守的半胱氨酸残基, 它们在空间上可以形成 4 对二硫键, 以稳定蛋白质结构并赋予其生物学活性。经 ExPASy 软件预测, 两种目的蛋白 CgDH⁺ 和 CgDH⁻ 的理论分子量分别为 5.78 kDa 和 4.95 kDa, 等电点分别为 7.77 和 7.70。

5'- CTC GAG AAA AGA GGATTT GGCTGT CCA GAT GAC GAGTAC GAGTGT AAT AGACAC
 L E K R G F G P D D E Y E N R H
 TGC AGGTCC ATC GGT TGT AGAGCG GGGTAC TGT GACTTC TGG ACG GTG AGGCAG
R S I G R A G Y D F W T V R Q
 AGATGT ACA TGT ACC GAT TGT AAT GGAAAGAAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA
 R T T D N G K K H H H H H H *
 TAG TCT AGA-3'
 * S R

图1 目的基因 $CgDH^+$ 和 $CgDH^-$ 的核苷酸及推断的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of target genes, $CgDH^+$ and $CgDH^-$. Underlines represent restriction sites; italics represent Kex 2 protease recognition site; shaded letters represent conserved cysteine residues; box represents 6×His; asterisks represent stop codons.

2.2 重组表达载体和高拷贝酵母转化子的鉴定

使用载体上的通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1 对 pPICZαA- $CgDH^+$ 和 pPICZαA- $CgDH^-$ 进行大肠杆菌菌落 PCR 鉴定, 获得 4 个含 pPICZαA- $CgDH^+$ 的阳性菌落和 3 个含 pPICZαA- $CgDH^-$ 的阳性菌落; 各选 1 株菌用于 DNA 测序, 结果显示两个目的基因分别与表达载体 pPICZαA 正确连接, 未发现任何核苷酸突变。将纯化的 pPICZαA- $CgDH^+$ 和 pPICZαA- $CgDH^-$ 分别电转入毕赤酵母 X-33 后, 经含高浓度博来霉素的 MM 和 MD 平板筛选, 各取 3 株长势良好的菌株提取其基因组 DNA 为模板, 使用 5'AOX1 和 3'AOX1 进行 PCR 鉴定, 结果证明 pPICZαA- $CgDH^+$ 和 pPICZαA- $CgDH^-$ 已成功嵌合进毕赤酵母 X-33 基因组。

2.3 在毕赤酵母 X-33 中表达目的蛋白及其表达条件的优化

从上述两种酵母转化子中各选 1 株用于目的蛋白的表达, 经 Tricine-SDS-PAGE 分析表明 (图 2A), 含 pPICZαA- $CgDH^-$ 和 pPICZαA- $CgDH^+$ 的两种酵母转化子的培养液上清均在近 7.8 kDa 处有明显蛋白质条带, 前者位置略低于后者 (两者理论上相差 0.83 kDa), 而含空载体的酵母转化子的培养液上清则无此条带。鉴于后者培养液上清中的目的蛋白含 6×His 标签, 在对其扩大至 1 L 培养后, 通过 IMAC 法获得纯化产物, 电泳结果显示该纯化产物为分子量近 7.8 kDa 的单一一条带, 证明其纯度较高, 该条带用于 Western blotting 和 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。经 BCA 法测得纯化的重组蛋白浓度为 0.58 mg/mL, 推算至表达量为 2.32 mg/L。

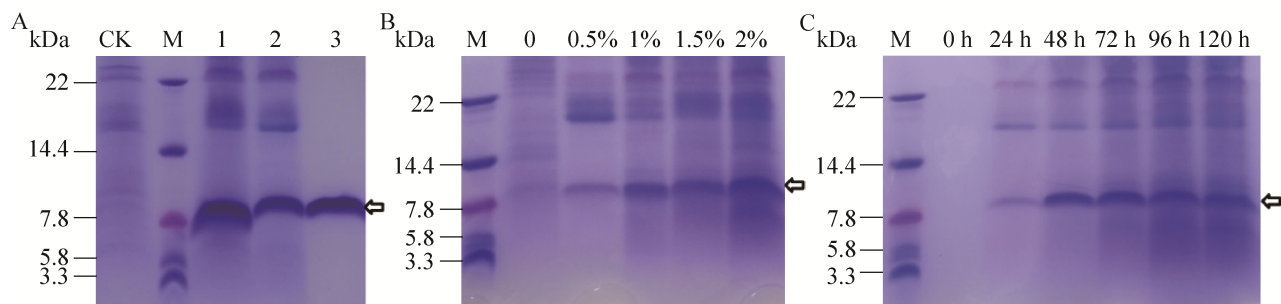


图2 纯化的 $CgDH^+$ (A) 以及不同甲醇浓度 (B) 和不同表达时间 (C) 下的培养液上清的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE analysis for the purified $CgDH^+$ (A) and culture medium supernatants from yeast transformants induced with different concentrations of methanol (B) and expressed for different time (C). M: protein marker; CK: yeast transformant harboring pPICZαA; 1: yeast transformant harboring "pPICZαA- $CgDH^-$ "; 2: yeast transformant harboring "pPICZαA- $CgDH^+$ "; 3: purified $CgDH^+$.

在上述实验的基础上, 考察不同甲醇浓度对含 pPICZαA-CgDH⁺的酵母转化子表达量的影响, 结果如图 2B 所示。1.0%甲醇浓度下的表达产物中杂蛋白较少, 并且目的蛋白的条带最清晰, 故在分时段表达时采用 1.0%的甲醇浓度。同样以该酵母转化子为例, 考察不同培养时间对表达量的影响, 由图 2C 可见, 培养 24–120 h 时都有目的蛋白表达, 在 48 h 时表达量已较高, 之后随着培养时间的延长, 表达量并无明显增加。据此, 一方面考虑到杂蛋白的影响和降低成本, 另一方面据文献报道^[21], 防御素对真菌有一定的抑制作用, 随着防御素含量的增加, 酵母细胞的生长可能会受到影响, 并且目的蛋白可能会被蛋白酶降解。因此, 选择最佳的诱导培养时间为 48–72 h。

2.4 重组蛋白 CgDH⁺的 Western blotting 分析及 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定

含重组蛋白 CgDH⁺的培养液上清和纯化产物经 Western blotting 分析后显示 (图 3A、3B), 在 10 kDa 附近都存在单一明显条带, 此位置的分子量明显高于理论分子量 5.78 kDa, 究其原因可能

是因为超低分子量蛋白质 marker 与显色染料共价偶联, 在电泳时影响了其迁移速度, 以致显示目的蛋白的分子量比理论分子量高。纯化产物的 MALDI-TOF-TOF 质谱分析显示 (图 4), 在 m/z 799.0–4 013.0 之间捕捉到 7 个肽段, 其覆盖的残基数约占重组蛋白 CgDH⁺氨基酸序列总长的

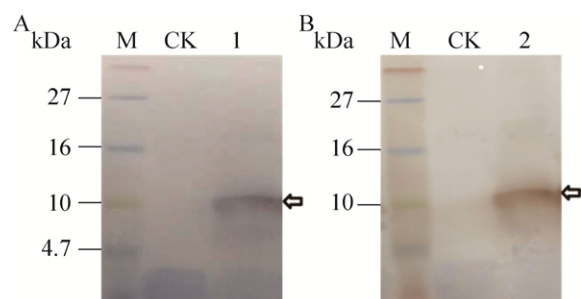


图 3 含 pPICZαA-CgDH⁺的酵母转化子的培养液上清 (A) 和纯化 CgDH⁺(B) 的 Western blotting 分析
Fig. 3 Western blotting analysis for the culture medium supernatant from yeast transformant harboring pPICZαA-CgDH⁺(A) and purified CgDH⁺ (B). M: protein marker; CK: yeast transformant harboring pPICZαA; 1: yeast transformant harboring “pPICZαA-CgDH⁺”; 2: purified CgDH⁺.

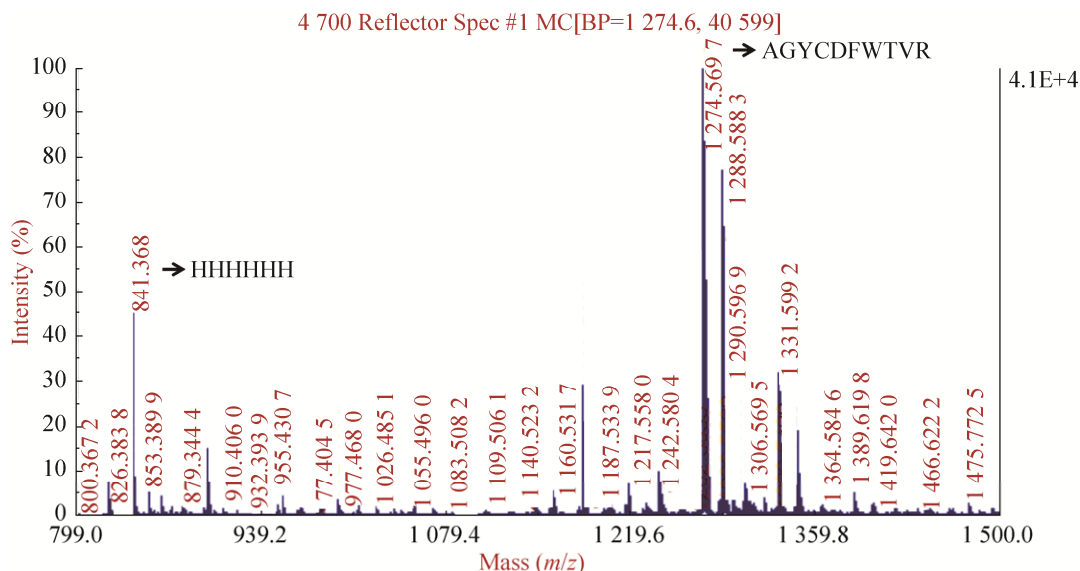


图 4 纯化的 CgDH⁺的 MALDI-TOF-TOF 质谱分析

Fig. 4 MALDI-TOF-TOF analysis for the purified CgDH⁺.

83.67%；其中 m/z 为 841.371 3 和 1 217.540 9 的两个峰分别代表自 N 端起 44–49 残基 (HHHHHH) 和 22–31 残基 (AGYCDFWTVR) 的肽段，该两段序列分别与相应位置的理论序列相符，由此证明，纯化产物即为预期的重组蛋白 CgDH⁺。

2.5 重组蛋白 CgDH⁺和重组蛋白 CgDH⁻的抑菌活性

由图 5 所示，与阴性对照（两种试验菌与含空载体的酵母转化子的培养液上清作用）相比，革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性的铜绿假单胞菌经与含重组蛋白 CgDH⁺和重组蛋白 CgDH⁻的培养液上清作用，平板上的菌落数明显减少，表明这两种培养液上清显示的抑菌活性分别来源于重组蛋白 CgDH⁺和重组蛋白 CgDH⁻。另一方面，该结果也初步证明重组蛋白中 6×His 标签的存在与否并不影响其生物学活性。

3 讨论

软体动物进化地位较低，而它们在生物界中发展和进化的历史却比脊椎动物长得多；它们虽

然缺乏特异性的免疫系统，但从物种生存以及繁衍的角度看，其机体的防御体系并不逊色于脊椎动物，而防御素则是它们机体细胞中关键的免疫因子^[18,24]。由此可以推测，较脊椎动物而言，来自软体动物的防御素具有更为天然的优势成为天然抗菌剂开发的良好候选者。本研究聚焦于太平

洋牡蛎防御素的重组表达，经优化表达条件，建立了毕赤酵母表达系统；通过该系统获得了含 6×His 和不含 6×His 的两种重组太平洋牡蛎防御素。根据 ExPASy 软件预测，这两种重组蛋白的理论分子量分别为 5.78 kDa 和 4.95 kDa，但 Tricine-SDS-PAGE 分析显示目的条带的分子量偏高（图 2），其原因可能是因为目的蛋白的分子量过小且带正电荷，SDS 不能完全屏蔽蛋白质分子间的电荷差异和结构差异，导致其电泳时的位置偏高^[25]。基于 MALDI-TOF-TOF 质谱分析的结构鉴定进一步证明了上述目的条带为预期的目的蛋白。另一方面，通过本研究建立的毕赤酵母表达系统，获得了表达量仅为 2.32 mg/L 的重组蛋白 CgDH⁺，这种低表达量的现象可能与本研究使用

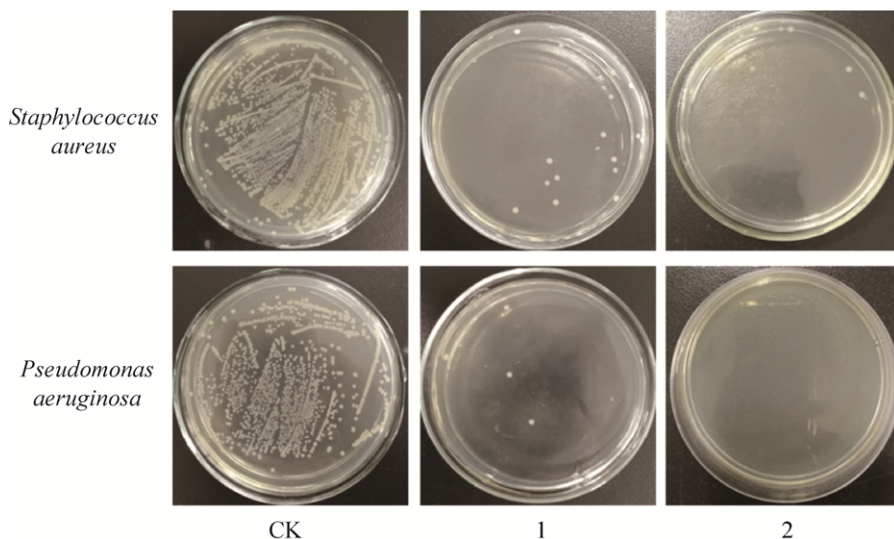


图 5 含重组目的蛋白的培养液上清的抑菌活性

Fig. 5 Antibacterial activity of the culture medium supernatants containing recombinant target proteins. CK: yeast transformants harboring pPICZαA; 1: yeast transformants harboring “pPICZαA-CgDH⁺”; 2: yeast transformants harboring “pPICZαA-CgDH⁻”.

的编码太平洋牡蛎防御素的天然 cDNA 有关; 根据 Graphical Codon Usage Analyser (<http://www.gcua.schoedl.de/>) 预测, 该 cDNA 中存在 17 个低频密码子, 它们可能影响了目的蛋白在毕赤酵母中的高效表达。Yang 等^[26]对黑曲霉 *Aspergillus niger lip2* 基因的密码子进行优化后在毕赤酵母细胞中表达重组蛋白, 发现其表达量和生物学活性分别提高了 11.6 和 5.3 倍; 王方芹等^[27]根据酿酒酵母的密码子偏爱性优化了黑曲霉的 α -L-鼠李糖苷酶基因 *rha*, 发现重组 *rha* 的表达量提高了 2.9 倍, 并且其酶活力也提高了 2.7 倍。此外, 我们最近报道的在毕赤酵母 X-33 中表达的斑马鱼重组 β -防御素 (zfDB3) 与本研究获得的两种重组目的蛋白相比, 显示了更好的抑菌活性^[23], 而 zfDB3 的编码基因中有 28 个密码子是被优化过的。据此, 后续研究将根据毕赤酵母的密码子偏爱性进一步对目的基因进行密码子优化, 以期提高表达量。

众所周知, 对重组蛋白添加 6 \times His 标签将有利于其纯化及其结构鉴定, 但是否会影响重组蛋白的生物学活性依据各种蛋白质的结构和性质是不同的^[28-30]。本研究设计了 C 端含 6 \times His 和不含 6 \times His 的重组蛋白 CgDH⁺ 和 CgDH⁻, 抑菌试验显示两者对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌都具有抑菌活性 (图 5), 与马君燕等^[30]的研究结果一致。在过去的两年中, 我们曾开展了斑点叉尾鲷 C 型溶菌酶在毕赤酵母 X-33 中的表达研究, 获得了含 6 \times His 和不含 6 \times His 的 3 种重组溶菌酶, 发现不含 6 \times His 和 C 端含 6 \times His 的重组溶菌酶均具有抑制枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的活性, 而 N 端含 6 \times His 的重组溶菌酶则无抑菌活性^[31]。产生上述现象的原因被推测为可能是 N 端的 6 \times His 在一定程度上改变了蛋白质的一级结构, 进而影响了溶菌酶活性中心的形成; 而 C 端存在的 6 \times His 并不影响重组溶菌酶和重组蛋白 CgDH⁺ 的空间

结构。

考虑到对目的蛋白进行大规模发酵时不可能对其进行纯化处理, 故本研究分别考察了含重组蛋白 CgDH⁺ 和重组蛋白 CgDH⁻ 的培养液上清的抑菌活性, 证明两者均显示了抑制革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性的铜绿假单胞菌的活性, 该结果为今后进一步通过发酵罐发酵制备产品及确定产品的形式提供了重要的依据。

4 结论

本研究从太平洋牡蛎外套膜中分离获得防御素基因, 确定其在毕赤酵母 X-33 中的最适表达条件为: 29 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min、1.0% 甲醇、培养 72 h; 表达的两种目的蛋白 (CgDH⁺ 和 CgDH⁻) 均显示了对于金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌活性。根据纯化的重组蛋白 CgDH⁺ 的蛋白质浓度推算表达量为 2.32 mg/L。本研究结果为软体动物防御素的基因工程制备奠定了重要的研究基础。

REFERENCES

- [1] Teng L, Gao B, Zhang SC. The first chordate big defensin: identification, expression and bioactivity. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(4): 572–577.
- [2] Yang D, Biragyn A, Hoover DM, et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(1): 181–215.
- [3] Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, 2005, 6(6): 551–557.
- [4] Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(1): 32–38.
- [5] Cohn ZA, Hirsch JG. The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 1960, 112(6): 983–1004.
- [6] Zeya HI, Spitznagel JK. Cationic proteins of

- polymorphonuclear leukocyte lysosomes I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bacteriol*, 1966, 91(2): 750–754.
- [7] Zeya HI, Spitznagel JK. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. *J Bacteriol*, 1966, 91(2): 755–762.
- [8] Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 1985, 76(4): 1427–1435.
- [9] Lehrer RI, Selsted ME. Cationic oligopeptides having microbicidal activity: US, 4705777. 1985-06-28.
- [10] Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins. *Clin Immunol Newslett*, 1987, 8(9): 134–137.
- [11] Brogden KA, Heidari M, Sacco RE, et al. Defensin-induced adaptive immunity in mice and its potential in preventing periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, 2010, 18(2): 95–99.
- [12] Zhang LQ, Yu WJ, He T, et al. Contribution of human α -defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science*, 2002, 298(5595): 995–1000.
- [13] Song N, Shao J, Liu ZH, et al. Activity analysis and secretory expression of human alpha-defensin 5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Life Sci Res*, 2017, 21(6): 471–476 (in Chinese).
宋南, 邵婕, 刘子昊, 等. 人 α 防御素 5 在酿酒酵母中的分泌表达及其活性分析. *生命科学研究*, 2017, 21(6): 471–476.
- [14] Wang N, Li G, Zou HQ, et al. High expression of porcine β -defense in *Bacillus subtilis*. *Southwest China J Agr Sci*, 2017, 30(8): 1910–1913 (in Chinese).
王娜, 李钢, 邹辉琴, 等. 猪 β -防御素 cDNA 在枯草芽孢杆菌中的高效表达. *西南农业学报*, 2017, 30(8): 1910–1913.
- [15] Kant P, Liu WZ, Pauls KP. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides*, 2009, 30(9): 1593–1599.
- [16] Bruhn O, Regenhard P, Michalek M, et al. A novel horse α -defensin: gene transcription, recombinant expression and characterization of the structure and function. *Biochem J*, 2009, 128(1/3): 267–276.
- [17] Fang L, Li J. Discussion on China's water ecological security and governance. *Environ Prot*, 2018, 46(Z1): 30–34 (in Chinese).
方兰, 李军. 论我国水生态安全及治理. *环境保护*, 2018, 46(Z1): 30–34.
- [18] Bachère E, Rosa RD, Schmitt P, et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 46(1): 50–64.
- [19] Zhao JM, Song LS, Li CH, et al. Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Mol Immunol*, 2007, 44(4): 360–368.
- [20] Zhao JM, Li CH, Chen AQ, et al. Molecular characterization of a novel big defensin from clam *Venerupis philippinarum*. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13480.
- [21] Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 313–323.
- [22] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119–138.
- [23] Tao Y, Song CF, Li W. Expression of the Zebrafish β -defensin 3 mature peptide in *Pichia pastoris* and its purification and antibacterial activity. *Appl Biochem Microbiol*, 2017, 53(6): 661–668.
- [24] Schmitt P, Gueguen Y, Desmarais E, et al. Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 23.
- [25] Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 1987, 166(2): 368–379.
- [26] Yang JK, Liu LY. Codon optimization through a

- two-step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger lip2* gene in *Pichia pastoris*. J Mol Catal B: Enzym, 2010, 63(3/4): 164–169.
- [27] Wang FQ, Zhang F, He S, et al. Cell surface display and enzymatic property of codon-optimized α -L-rhamnosidase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci Sericult, 2017, 43(4): 638–647 (in Chinese).
王方芹, 张凡, 何姝, 等. 密码子优化 α -L-鼠李糖苷酶基因在酿酒酵母细胞的表面展示表达及产物的酶学性质. 蚕业科学, 2017, 43(4): 638–647.
- [28] Wu L, Su SB, Liu FM, et al. Removal of the tag from his-tagged ILYd4, a human CD59 inhibitor, significantly improves its physical properties and its activity. Curr Pharm Des, 2012, 18(27): 4187–4196.
- [29] Yeon YJ, Park HJ, Park HY, et al. Effect of his-tag location on the catalytic activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. Biotechnol Bioproc Eng, 2014, 19(5): 798–802.
- [30] Ma JY, Tan HD, Wang WX, et al. The effects of His 6-tag position in *Kluyveromyces cicerisporus* exo-inulinase on its activity. Life Sci Res, 2016, 20(3): 218–223 (in Chinese).
马君燕, 谭海东, 王文霞, 等. 组氨酸标签位置对重组鹰嘴豆孢克鲁维酵母外切菊粉酶活性的影响. 生命科学研究, 2016, 20(3): 218–223.
- [31] Feng YD. Expression of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) C-type lysozyme in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
冯亚东. 斑点叉尾鮰(*Ictalurus Punctatus*)C型溶菌酶在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.

(本文责编 陈宏宇)