

研究报告

密码子优化后的柞蚕溶菌酶在酵母中的表达及活性测定

刘真英 李文利*

(大连理工大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

摘要:【目的】提高柞蚕溶菌酶在毕赤酵母中的表达量,对柞蚕溶菌酶活性进行测定。【方法】根据毕赤酵母密码子偏爱性对柞蚕溶菌酶基因进行优化,并在目的基因 3'端加上 6 个组氨酸标签,优化后的基因克隆至表达 pPIC9K 载体中,并通过电转化的方法导入毕赤酵母 GS115 中。利用不同浓度梯度的 G418 进行高拷贝转化子的筛选,经甲醇诱导实现分泌表达。通过硫酸铵盐析、镍柱亲和层析等工艺分离纯化柞蚕溶菌酶,利用琼脂扩散方法测定柞蚕溶菌酶对溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、苍白杆菌及过氧化醋杆菌的抑菌作用,利用比浊法测定酶活大小。【结果】密码子优化后的柞蚕溶菌酶在诱导温度 25 °C、甲醇量 0.75% 和 pH 7.0 条件下实现了最高表达,表达量达到了 2.4 g/L,并且纯化后的柞蚕溶菌酶酶活达到 23 970 U/mg。

【结论】密码子优化后的柞蚕溶菌酶在毕赤酵母中实现了高效表达,纯化后的柞蚕溶菌酶对溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、苍白杆菌及过氧化醋杆菌均有抑菌作用。

关键词: 密码子优化, 柞蚕溶菌酶, 毕赤酵母, 抑菌作用

Expression and activity determination of codon optimized *Antheraea pernyi* lysozyme in *Pichia pastoris*

LIU Zhen-Ying LI Wen-Li *

(School of Life Science and Biotechnology, Dalian University and Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] In order to improve the expression of *Antheraea pernyi* lysozyme in *Pichia pastoris* and determinate the lysozyme activity. [Methods] According to the *Pichia pastoris* codon preference, we optimized the codons of *Antheraea pernyi* lysozyme gene and added six histidine residues at the 3' terminal of the gene. The optimized gene cloned into pPIC9K vector. Then we transferred it into *Pichia pastoris* GS115 through the electroporation method. High copy transformants were screened by using different concentration gradient of G418 and realized the secretory expression by methanol induction. We separated and purified *Antheraea pernyi* lysozyme by ammonium sulfate precipitation and Ni-chelating affinity chromatography. Then we determined the *Antheraea pernyi* lysozyme activity by turbidimetric method and detected antibacterial activity against *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Ochrobactrum tritici*, *Escherichia coli* and *Acetobacter beijerinck* by the agar diffusion method. [Results] The expression conditions were

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31201879)

*Corresponding author: E-mail: biolwl@dlut.edu.cn

Received: March 14, 2015; **Accepted:** May 19, 2015; **Published online** (www.cnki.net): June 02, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31201879)

*通讯作者: E-mail: biolwl@dlut.edu.cn

收稿日期: 2015-03-14; **接受日期:** 2015-05-19; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-06-02

optimized, and the highest expression level of *Antheraea pernyi* lysozyme occurred when the recombinant strain was induced with 0.75% methanol under pH 7.0 at 25 °C for 96 h. The expression quantity reached 2.4 g/L and the specific activity of *Antheraea pernyi* lysozyme towards *Micrococcus lysodeikticus* was 23 970 U/mg. **[Conclusion]** Codon optimized *Antheraea pernyi* lysozyme was successfully produced as a single major secreted protein in *Pichia pastoris* GS115. *Antheraea pernyi* lysozyme exhibited antibacterial activity against *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Ochrobactrum tritici*, *Escherichia coli* and *Acetobacter beijerinck*.

Keywords: Codon optimization, *Antheraea pernyi* lysozyme, *Pichia pastoris*, Antibacterial activity

近年来, 抗生素虽然在治疗传染病及危害生命健康的细菌感染中占有非常重要的地位, 但是由于抗生素的滥用, 却产生了细菌抗药性的问题, 甚至出现了能对抗生素完全抵抗的超级细菌。根据中国医院管理研究机构报告, 我国已经成为全球细菌耐药最为严重的国家之一^[1]。随着人们对天然、无害产品的重视, 溶菌酶的市场需求快速提高, 现行的产量远不能满足市场的需要^[2]。越来越多的人将目光放在利用生物工程技术表达其他来源的溶菌酶上, 以期能够获得更高的酶表达量和更好的酶活性。

溶菌酶(Lysozyme), 又称胞壁质酶或 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶, 主要通过破坏细菌细胞壁肽聚糖中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4 糖苷键, 使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽, 导致细胞壁破裂内容物逸出而使细菌溶解^[3-6]。因此, 溶菌酶在大多数生物体生物防御方面具有重要作用。此外, 在无脊椎动物中, 溶菌酶可以作为重要的消化酶分解细菌, 产生的 C 元素和 N 元素还可以供无脊椎动物生长。溶菌酶还可与带有负电荷的病毒蛋白直接结合, 与 DNA、RNA、脱辅基蛋白形成复盐, 使病毒失活^[7]。溶菌酶还有许多其他功能, 包括生殖、生长刺激、抗病毒、免疫调节、抗炎和抗肿瘤。因此, 溶菌酶被广泛地应用于饲料、食品、临床医学、生物学等领域^[8]。毕赤酵母表达系统是一种重要的异源表达系统, 已有 1 000 多种外源蛋白在该表达系统中成功表达, 重组蛋白广泛应用于工业、制药和基础性研究^[9]。该表达系统不仅克服了大肠杆菌表达系统不能表达结构复杂的蛋白质、分泌型表达产量低等缺陷, 而

且弥补了昆虫类细胞、哺乳类细胞表达系统产业化生产成本低、操作复杂、表达水平低等不足。同时, 又避免了酿酒酵母表达系统表达质粒易丢失、过度糖基化、分泌效率差等缺点。外源蛋白表达量不仅受基因内在特性的影响, 而且培养条件对表达量的影响更为显著, 如温度、甲醇浓度、诱导时间、pH 值等。除此之外, 由于毕赤酵母对密码子的偏爱性, 目的基因的密码子序列对产物的表达量也有很大影响^[10-12]。

柞蚕溶菌酶(*Antheraea pernyi* lysozyme, ApLZ)与蛋清溶菌酶同属于 C 型溶菌酶, 其成熟肽含 120 个氨基酸, 预测分子量为 13 987.8 Da, 含 4 个二硫键, 活性中心由 Glu32 和 Asp50 构成^[13]。本研究根据毕赤酵母密码子偏爱性对柞蚕溶菌酶基因进行优化, 利用生物工程技术构建了柞蚕溶菌酶的毕赤酵母表达系统, 分析了柞蚕溶菌酶抑菌活性, 为工业化大批生产溶菌酶奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、苍白杆菌及过氧化醋杆菌、毕赤酵母菌株 GS115、pPIC9K 质粒均由本实验室保存; 限制性内切酶 *Sna*B I、*Not* I、*Sal* I 购自大连 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、G418 抗生素均购自上海生工生物工程有限公司; YPD、BMGY、BMMY 和 MD 培养基均按 Invitrogen 公司的毕赤酵母菌实验操作手册配制。

1.2 实验方法

1.2.1 柞蚕溶菌酶密码子优化: 参照 GenBank 中柞

蚕溶菌酶基因序列(GenBank 登录号: DQ353869), 根据毕赤酵母偏爱的密码子, 在不改变氨基酸序列的前提下, 利用密码子优化软件对柞蚕溶菌酶基因进行密码子优化, 并在序列的 5'端加上 *SnaB* I 酶切位点, 3'端先加上 6 个组氨酸标签后再加上 *Not* I 酶切位点。将优化构建好的基因序列送上海生工公司合成, 合成的基因连接到 PUC57-T 上。

1.2.2 毕赤酵母表达载体的构建: 用 *SnaB* I /*Not* I 分别双酶切 PUC57T-ApLZ 质粒、pPIC9K 质粒。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段, 与双酶切后的 pPIC9K 载体连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经双酶切鉴定获得 pPIC9K-ApLZ 表达载体。

1.2.3 毕赤酵母的电转化: pPIC9K-ApLZ 表达载体用 *Sal* I 单酶切线性化后, 采用电击转化法转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中。电击转化结束后于 30 °C 静置孵育 5–7 h, 涂布到缺少组氨酸的 MD 固体培养基上, 30 °C 培养 2–3 d, 直到长出转化子。

1.2.4 高拷贝阳性转化子的筛选及 PCR 鉴定: 挑取在 MD 培养基上生长的转化子依次点种在含不同浓度 G418 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L) 的 YPD 培养基上, 30 °C 培养 3–4 d。选取在含 5.0 g/L G418 的 YPD 培养基上长出来的菌落做 PCR 鉴定。以煮沸-煮法^[14]提取筛选得到的高拷贝阳性转化子基因组, 引物使用 pPIC9K 载体通用引物, 5'AOX-F: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'; 3'AOX-R: 5'-GGCAAATGGCATTCTGACAT-3'。PCR 反应体系(20 μ L): 引物 AOX-F 和 AOX-R (10 μ mol/L)各 1.0 μ L, 模板(30 mg/L) 1.0 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, LA *Taq* (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 \times LA *Taq* buffer 2.0 μ L, ddH₂O 12.8 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.5 摇瓶培养柞蚕溶菌酶的表达: 挑取经 PCR 鉴定正确的单菌落接种于 25 mL BMGY 培养基中^[11], 28–30 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} =3–5。4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体悬浮于 50 mL BMMY

培养基中^[11], 28–30 °C、180 r/min 继续振荡培养。每隔 24 h 取 1 mL 培养物 10 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 上清用于产物的活性分析, 同时每隔 24 h 补加甲醇至终浓度为 5 mL/L。

1.2.6 柞蚕溶菌酶的分离纯化: 将 ApLZ 发酵上清液先经 40%硫酸铵沉淀去除部分杂蛋白, 再经 80%硫酸铵沉淀后, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)透析过夜除盐, 然后用镍柱亲和层析, 洗脱液为含 500 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液(pH 7.5), 最后将洗脱液真空冷冻干燥。

1.2.7 柞蚕溶菌酶 N-糖基化鉴定: 采用 Endo-H 酶解法^[15]鉴定优化后的柞蚕溶菌酶 N-糖基化。取 20 μ g 柞蚕溶菌酶于 1 \times 糖蛋白变性缓冲液中 100 °C 煮沸 10 min 使其变性, 加入 1/10 体积的 10 \times G5 缓冲液, 最后加入 1–5 μ L Endo-H, 37 °C 温育 1 h。15% SDS-PAGE 凝胶电泳检验酶解后的柞蚕溶菌酶。

1.2.8 柞蚕溶菌酶酶活测定: (1) 利用琼脂扩散法^[16]鉴定柞蚕溶菌酶的生物活性。利用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.2)将溶壁微球菌液稀释到 OD_{600} 为 0.8, 用孔径 5 mm 打孔器在分别含有溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和大肠杆菌的琼脂平板上均匀打孔, 把 40 μ L 待测柞蚕溶菌酶液滴在孔内, 同时以标准品溶菌酶作阳性对照, 倒置于 30 °C 恒温箱中培养 12 h, 观察抑菌圈情况。(2) 利用比浊法^[17]测定柞蚕溶菌酶酶活大小。取溶壁微球菌悬浊液 1 mL, 置于比色皿中测定 A_{450} 值, 然后于 25 °C、pH 6.2 条件下迅速加入柞蚕溶菌酶液 0.2 mL 并混匀, 从加入酶液起计时, 每隔 30 s 测定 A_{450} 值。酶活力单位定义: 在 25 °C、pH 6.2 条件下, A_{450} 每分钟下降 0.001 为 1 个酶活力单位, 即 1 U。由此得到柞蚕溶菌酶酶活力计算公式为: 每毫克的酶活力单位=[A_{450} (0 s)– A_{450} (60 s)] \times 1 000/样品毫克数, 其中样品质量浓度采用 BCA 法测定。

1.2.9 2.5 L 发酵罐培养柞蚕溶菌酶表达条件的优化: 利用 2.5 L 发酵罐进行发酵, 培养基采用 BMGY/BMMY 进行发酵^[11], 利用氨水和磷酸调节 pH。在菌体生长阶段, 温度设为 28 °C, pH 7.0,

转速为 300 r/min, 通气量为 0.5 V/(V·min), 当溶氧不再下降时表明菌体密度已经达到最大值, 停止补加甘油, 饥饿 1 h 后, 进入甲醇诱导表达阶段, 分别对诱导温度(20.0、25.0、30.0 °C)、甲醇浓度(0.50%、0.75%、1.00%、1.25%)、培养基 pH 值(pH 5.0、6.0、7.0、8.0)进行优化, 分别测定其酶活力, 从而确定最优发酵条件。

1.2.10 柞蚕溶菌酶酶学性质的研究: (1) 最适酶活反应温度。取纯化后的柞蚕溶菌酶溶解在 pH 6.2 的磷酸盐缓冲液中, 采用比浊法测定 4、16、25、37、45、55、65、75 °C 下酶活性。(2) 最适酶活反应 pH。在最适温度下, 分别测定 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 磷酸盐缓冲液下酶活性。

2 结果与分析

2.1 柞蚕溶菌酶基因密码子的优化

在保持氨基酸序列不变的前提下, 共替换了天然柞蚕溶菌酶基因序列的 77 个位点, 通过人工合成的方法获得优化后的柞蚕溶菌酶基因序列(图 1, 划线部分为突变的碱基序列)。

2.2 毕赤酵母表达载体 pPIC9K-ApLZ 的构建

pPIC9K-ApLZ 质粒经 *Sna*B I /*Not* I 双酶切

Native	AAATGGTTTACCAAATGTGGGCTAGTGCACGAGCTGAGGAGACAA
Optimized	AAATGGTTTACTAAGTGTGGTTTGGTTTCAATGAATTGAGAAGACAA
Amino acid	K W F T K C G L V H E L R R Q
Native	GGCTTCGACGAGAGCCTAATCGGGACTGGGTCTGTCTCGTTGAG
Optimized	GGTTTTGATGAATCT TTGATGAGAGATTGGGTTTGTGGTT GAA
Amino acid	G F D E S L M R D W V C L V E
Native	AACGAAAGCAGCCGTTATACTAATAAAATCGGTAAAGTGAATAAG
Optimized	AACGAATCTTCTAGATACACTAACAGATTGGTAAGTTAACAAG
Amino acid	N E S S R Y T N K I G K V N K
Native	AATGGCTCAGGAGACTACGGCTCTTCCAGATCAATGACAAATAT
Optimized	AACGGTTCTAGAGATTACGGTTTGTTCAAATTAACGATAAGTAC
Amino acid	N G S R D Y G L F Q I N D K Y
Native	TGGTGTAGTAAGACCTCCACCCCGGAAGGATTGCAATGTGACT
Optimized	TGGTGTCTAAGACTTCTACTCCAGGT AAGGATTGTAACGTT ACT
Amino acid	W C S K T S T P G K D C N V T
Native	TGTAATCAGCTCTTGACTGACGATATTACAGTCGCGCGACCTGC
Optimized	TGTAACCAATTGTTGACTGATGATATTACTGTTGCTGCT ACT TGT
Amino acid	C N Q L L T D D I T V A A T C
Native	CGCAAAAAGATTACAAACGCCATAAGTTTAACGCTTGGTACGGA
Optimized	GCTAAGAAGATTTACAAGAGACATAAGTTTAACGCTTGGTACGGT
Amino acid	A K K I Y K R H K F N A W Y G
Native	TGGTTAAACCACTGCCAACTCTCTTC CAGACATTAGCGACTGT
Optimized	TGGTTGAACATTGTCAA CATTCTTTGCCAGATATTCT GATTGT
Amino acid	W L N H C Q H S L P D I S D C

图 1 柞蚕溶菌酶天然基因序列与优化后基因序列比较

Figure 1 Comparison of native and optimized ApLZ gene sequence

鉴定, 结果(图 2)显示, 有 395 bp 左右的条带出现, 表明 ApLZ 基因已成功连接到了 pPIC9K 载体上。

2.3 重组毕赤酵母 pPIC9K-ApLZ 高拷贝阳性转化子的筛选及 PCR 鉴定

随机挑取 MD 平板上生长出来的 100 多个菌落(图 3A), 经过含不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选后, 获得 16 株高拷贝阳性转化子(图 3B)。用 pPIC9K 载体的通用引物进行 PCR 扩增(图 4), 结果显示, 阳性转化子出现 2 条带, 一条约 2.2 kb 的片段为毕赤酵母菌株上 AOX1 基因, 一条约 870 bp 的片段是目的基因 377 bp 和 Flanking AOX1 (492 bp)之和。

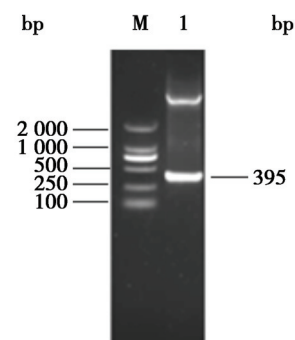


图 2 重组质粒 pPIC9K-ApLZ 双酶切鉴定

Figure 2 Double restriction sites analysis of pPIC9K-ApLZ

注: M: 标准分子量 DNA; 1: 经 *Sna*B I /*Not* I 双酶切后的 pPIC9K-ApLZ 质粒。

Note: M: DL2000 marker; 1: Digest with *Sna*B I /*Not* I .

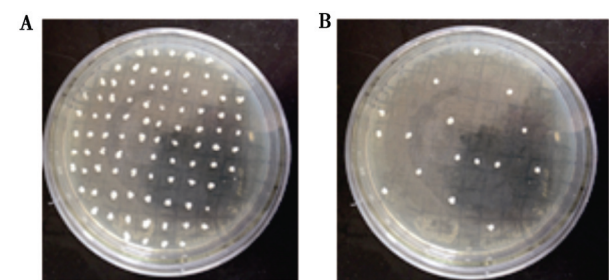


图 3 高拷贝阳性转化子的筛选

Figure 3 Screening of high-copy positive transformants

注: A: 转化子在不含 G418 的 YPD 平板上生长情况; B: 转化子在含 5.0 g/L G418 的 YPD 平板上生长情况。

Note: A: Growth in the YPD without G418; B: Growth in the YPD with 5.0 g/L G418.

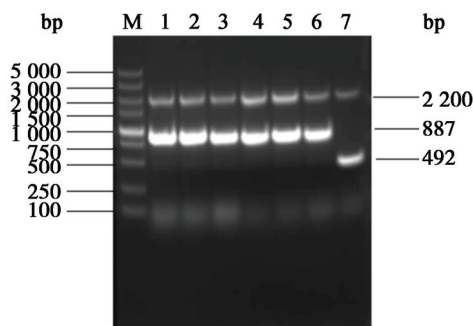


图4 转化子的PCR扩增结果

Figure 4 PCR amplification results of transformants

注: M: 标准分子量 DNA; 1-6: 阳性转化子; 7: 阴性转化子.

Note: M: DL5000 marker; 1-6: Positive transformants; 7: Negative transformants.

2.4 柞蚕溶菌酶蛋白电泳分析

诱导表达 120 h 后 8 000 r/min 离心 10 min 收集发酵上清液, 进行 15% SDS-PAGE 电泳鉴定。图 5 可以看出 pPIC9K-ApLZ 在 20.0 kD 左右有一条明显的条带, 为目的条带, 比预测的大 6.0 kD 左右, 预测可能发生 N-糖基化。

2.5 柞蚕溶菌酶分离纯化

将透析后的溶液经过镍柱亲和层析纯化后, 分别收集穿透峰、洗脱峰, 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 6 所示, 在洗脱液中柞蚕溶菌酶被洗脱出来, 流出液中不存在柞蚕溶菌酶。说明柞蚕溶菌酶可以通过镍柱亲和层析的方法纯化。

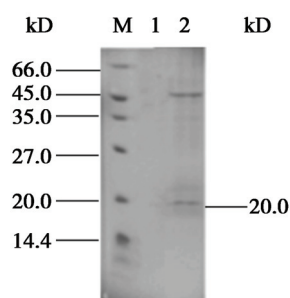


图5 柞蚕溶菌酶的诱导表达

Figure 5 The SDS-PAGE analysis of ApLZ expressed in *Pichia pastoris*

注: M: 标准分子量蛋白; 1: 空载发酵上清液; 2: 柞蚕溶菌酶发酵上清液.

Note: M: Protein marker; 1: Negative control supernatant; 2: ApLZ supernatant.

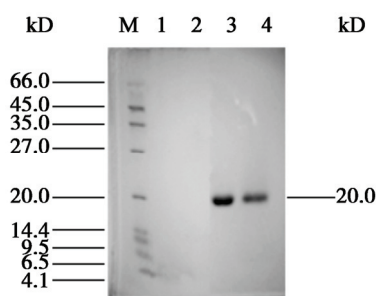


图6 柞蚕溶菌酶的纯化

Figure 6 The 15% SDS-PAGE of the purified ApLZ

注: M: 标准分子量蛋白; 1: 空载发酵上清液; 2: 穿透峰; 3-4: 洗脱峰.

Note: M: Protein marker; 1: Negative control supernatant; 2: Penetration peak; 3-4: Elution peak.

2.6 柞蚕溶菌酶 N-糖基化鉴定

Endo-H 酶解法分析柞蚕溶菌酶糖基化, 15% SDS-PAGE 电泳鉴定。从图 7 可以看出, 在发酵表达过程中柞蚕溶菌酶确实发生了 N-糖基化。N-糖基化时通过糖链还原端的 N-乙酰氨基葡萄糖和肽链中某些 Asn 侧链酰胺基上的氮原子相连, 能接有糖链的 Asn 必须处于 Asn-X-Ser/Thr 基序中, 其中 X 为除 Pro 的任意氨基酸残基^[13]。所以, 预测柞蚕溶菌酶可能会发生糖基化的位点为: N³¹-E³²-S³³、N⁴⁶-G⁴⁷-S⁴⁸、N⁷³-V⁷⁴-T⁷⁵。

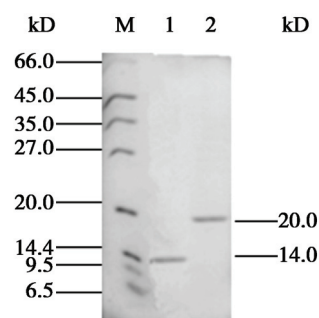


图7 ApLZ 经 Endo-H 酶解后的凝胶电泳

Figure 7 The SDS-PAGE of ApLZ after enzymatic hydrolysis of Endo-H

注: M: 标准分子量蛋白; 1: 经 Endo-H 酶解后的柞蚕溶菌酶; 2: 未经 Endo-H 酶解的柞蚕溶菌酶.

Note: M: Protein marker; 1: ApLZ after enzymatic hydrolysis of Endo-H; 2: ApLZ without enzymatic hydrolysis of Endo-H.

2.7 柞蚕溶菌酶酶活的测定

纯化后的柞蚕溶菌酶浓度经 BCA 法测定, 浓度为 2.4 g/L, BCA 标准曲线如图 8 所示, 标准方程为 $y=0.895\ 32x+0.136\ 76$, $R^2=0.993\ 7$ 。通过比浊法测定纯化后的柞蚕溶菌酶酶活, 最高能达到 23 970 U/mg。通过琼脂扩散方法, 发现柞蚕溶菌酶对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、溶壁微球菌、苍白杆菌、大肠杆菌、过氧化醋杆菌均有抑菌活性(图 9), 尤其对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、溶壁微球菌的抑菌性高。

2.8 2.5 L 发酵罐发酵柞蚕溶菌酶条件优化

从图 10 可以看出, 柞蚕溶菌酶在 2.5 L 发酵罐内最佳诱导条件为: 诱导时间 96 h、诱导温度 25 °C、培养基 pH 7.0、甲醇浓度 0.75%。

2.9 柞蚕溶菌酶酶学性质的测定

从图 11A 可以看出, 柞蚕溶菌酶的最适作用温度为 37 °C, 在 25–45 °C 范围内, 相对酶活保持在

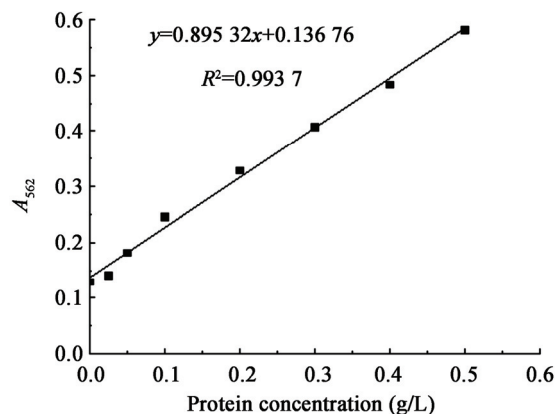


图 8 BCA 法测定蛋白浓度标准曲线

Figure 8 Standard curve of protein concentration by BCA

75%以上, 高于 55 °C 时, 其酶活性急剧下降, 85 °C 时相对酶活几乎为 0。从图 11B 可以看出, 柞蚕溶菌酶的最适作用 pH 为 5.0, 在偏酸性条件下相对酶活保持较高, 当 pH 达到 9.0 时相对酶活仅为 27%, 表明柞蚕溶菌酶在酸性条件酶活较高。

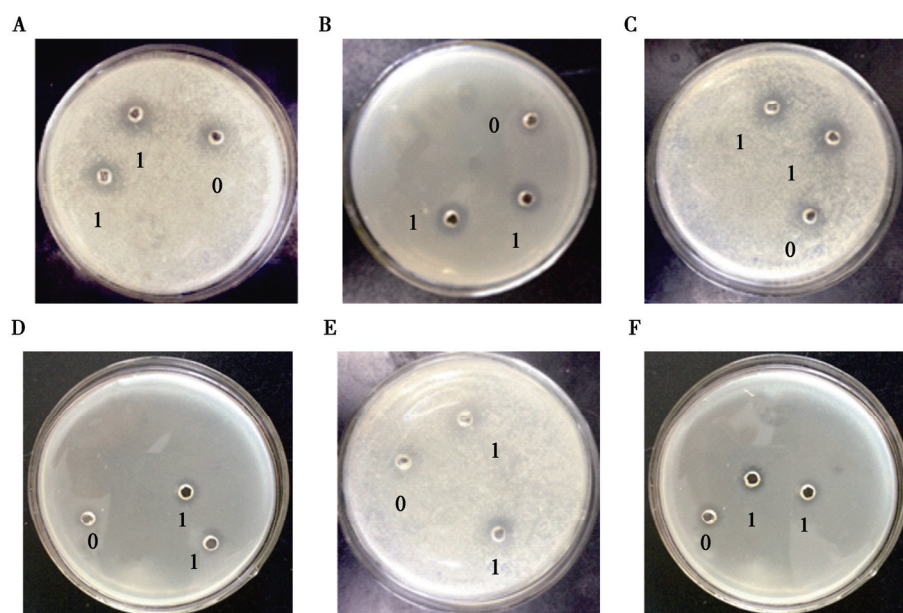


图 9 柞蚕溶菌酶的抑菌作用

Figure 9 The antimicrobial activity of ApLZ

注: A: 金黄色葡萄球菌; B: 枯草芽孢杆菌; C: 溶壁微球菌; D: 苍白杆菌; E: 大肠杆菌; F: 过氧化醋杆菌. 0: 标准溶菌酶; 1: 柞蚕溶菌酶。

Note: A: *Staphylococcus aureus*; B: *Bacillus subtilis*; C: *Micrococcus lysodeikticus*; D: *Ochrobactrum tritici*; E: *Escherichia coli*; F: *Acetobacter beijerinckii*. 0: Standard lysozyme; 1: *Anthraea pernyi* lysozyme.

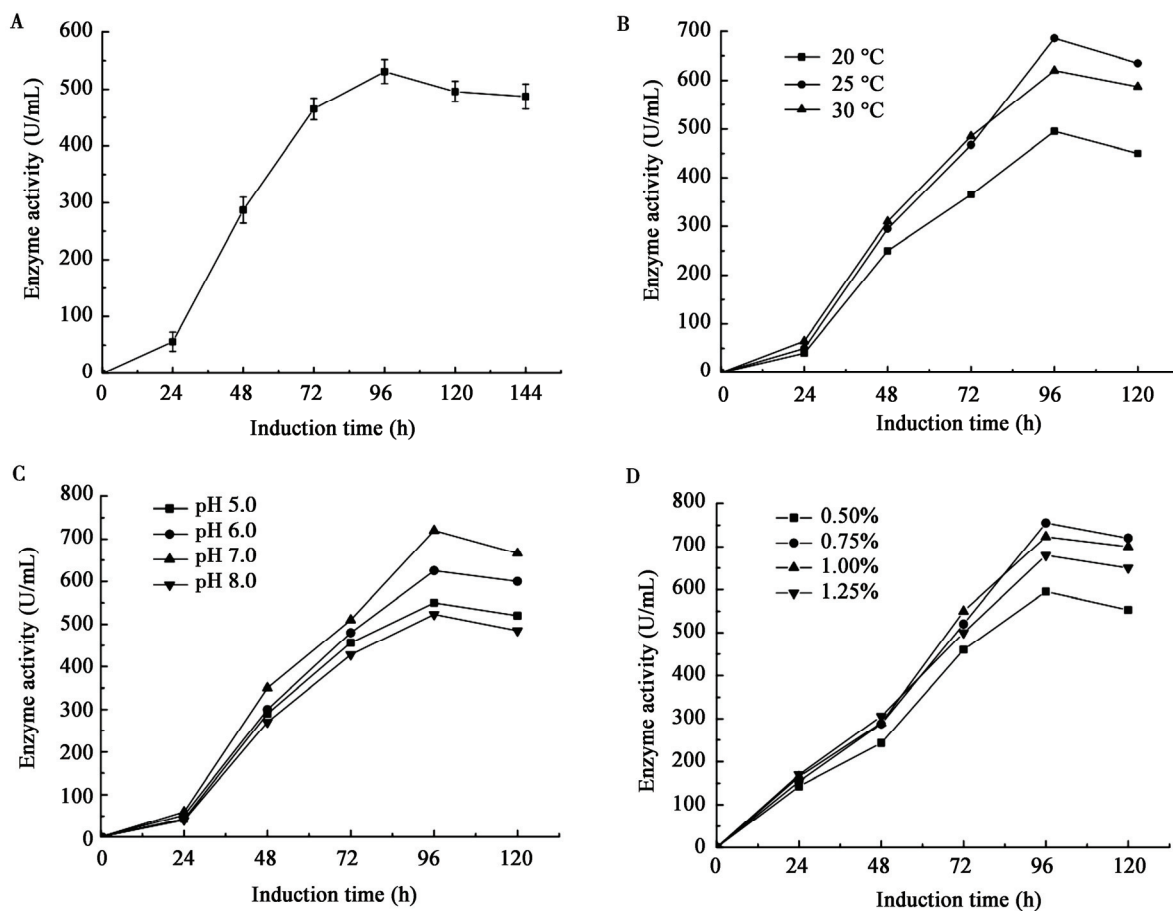


图 10 诱导时间(A)、诱导温度(B)、培养基 pH (C)、甲醇浓度(D)对柞蚕溶菌酶表达量的影响
Figure 10 Effect of induction time (A), induction temperature (B), pH of medium (C), and methanol concentration (D) on the expression level of ApLZ

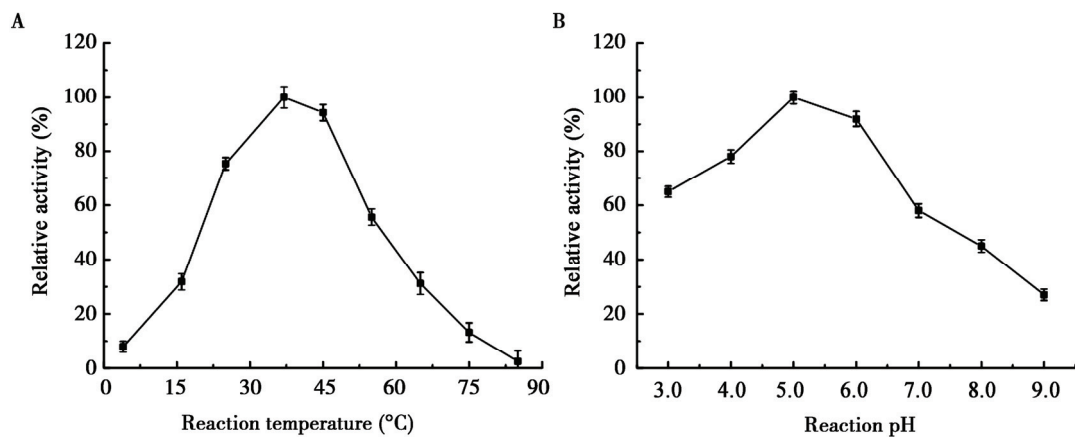


图 11 柞蚕溶菌酶温度(A)、pH 作用曲线(B)
Figure 11 The curve of ApLZ for reaction temperature (A) and pH (B)

3 讨论

在酵母中表达较高的基因往往是采用酵母本身所偏爱的密码子, 在所有 61 个密码子中有 25 个是酵母所偏爱的。通过优化基因的密码子序列, 可以适应 tRNA 的同工受体及宿主的反义密码子摇摆位置处被修饰的核苷酸的丰度, 同时也有利于翻译的二级结构的形成^[18]。王艳君^[19]对几丁质酶 Chi58 基因中 5 个精氨酸密码子 CGC 突变为毕赤酵母使用频率较高的 AGA 后, Chi58 的表达量提高了近 3 倍。Xu 等^[20]将脂肪酶基因 lipJ08 的 17 个丝氨酸密码子优化, 表达后脂肪酶的水解活性为 4.7 U/mL, 而未优化的基因表达后检测不到脂肪酶的水解活性, 从而表明, 经过密码子优化后表达效果更好。

柞蚕是我国特有的一种经济昆虫, 诱导后体内会产生多种抗性成分, 溶菌酶就是其中之一^[21]。宋佳等^[22]通过检测分析柞蚕蛹血淋巴中溶菌酶基因的表达变化及柞蚕蛹血淋巴的抑菌活性, 从分子水平和生理水平上证实了细菌、真菌、微孢子虫及无菌水等都可以诱导柞蚕蛹溶菌酶基因产生差异性表达, 抗菌活性从小到大依次为无菌水处理组、蛹虫草菌处理组、柞蚕微孢子虫处理组、大肠杆菌处理组。张波等^[21]对柞蚕溶菌酶基因进行克隆并分析了序列, 王丹等^[23]将柞蚕溶菌酶基因转化到巴斯德毕赤酵母中进行了表达, 结果发现柞蚕溶菌酶对人类口腔内的变形链球菌这一致病菌具有良好的杀灭作用。但对柞蚕溶菌酶的酶活大小及对其他细菌的抑菌作用没有做进一步的研究。本研究根据毕赤酵母密码子偏爱性, 成功将密码子优化后的柞蚕溶菌酶基因导入毕赤酵母 GS115 菌株内, 并对影响表达量的因素进行了优化, 在诱导时间 96 h、诱导温度 25 °C、甲醇浓度 0.75% 和培养基 pH 7.0 条件下实现了最高表达, 表达量最终达到 2.4 g/L。经过活性测定发现对溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苍白杆菌、大肠杆菌、过氧化醋杆菌均有抑菌活性, 尤其对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、溶壁微球菌的抑菌性较高。纯化后的柞蚕溶菌

酶酶活达到 23 970 U/mg, 为工业化大批生产柞蚕溶菌酶奠定了基础。此外, 天然抗菌肽不仅具有广谱的抗菌活性, 而且对某些病毒、真菌和原虫也具有抑杀作用, 是抗菌素的有效替代者^[24]。为了研制出具有更高抑菌活性的蛋白, 卢雪梅^[25]选取家蝇来源的抗菌肽天蚕素和人溶菌酶, 采用重叠延伸 PCR 技术构建融合基因, 通过大肠杆菌表达系统中进行表达, 发现融合蛋白抗菌谱更广, 活性也有所提高。欧阳萍等^[26]也利用大肠杆菌 BL21 系统对人溶菌酶-抗菌肽 Tachyplesins 融合蛋白进行诱导表达, 结果发现融合蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌具有一定的抑制作用。下一步实验准备将柞蚕溶菌酶与抗菌肽 GK10 基因融合, 利用毕赤酵母表达系统进行表达, 以期研制出具有更高抑菌活性的抗菌融合蛋白。

参考文献

- [1] Guo C, Zhang JP, Hua XW, et al. Discussion on the necessity of "Special Rectification Activities of Clinical Application of Antibacterials in China" through prescription analysis[J]. China Pharmacy, 2012, 23(2): 97-101 (in Chinese)
郭澄, 张剑萍, 华雪蔚, 等. 从处方分析探讨“全国抗菌药物临床应用专项整治活动”的必要性[J]. 中国药房, 2012, 23(2): 97-101
- [2] Cao T, Liu TJ, Wang YJ. Research and application of microbial lysozyme[J]. China Condiment, 2011, 36(3): 23-26 (in Chinese)
曹涛, 刘同军, 王艳君. 微生物溶菌酶的研究及应用[J]. 中国调味品, 2011, 36(3): 23-26
- [3] Wang TT, Xu YP, Liu WJ, et al. Expression of *Apostichopus japonicus* lysozyme in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 77(1): 20-25
- [4] Masuda T, Ueno Y, Kitabatake N. High yield secretion of the sweet-tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression & Purification, 2005, 39(1): 35-42
- [5] Gu YF, Cong LN, Luo N. Cloning and expression of lysozyme from *Stichopus japonicus* in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2010, 29(5): 317-320 (in Chinese)
古跃峰, 丛丽娜, 骆宁. 海参溶菌酶基因克隆及在毕赤酵母中的表达与纯化[J]. 大连工业大学学报, 2010, 29(5): 317-320
- [6] Zhou XY, Yu Y, Tao JJ, et al. Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(4): 420-425
- [7] Rong XH, Ling PX. Advances in the study of lysozyme[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 1999, 20(6): 319-320 (in Chinese)
荣晓花, 凌沛学. 溶菌酶的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(6): 319-320
- [8] Chen Y, Jiang MF, Ye YH, et al. Advances in the study of lysozyme[J]. Journal of Biology, 2009, 26(2): 64-66 (in Chinese)
陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂

- 志, 2009, 26(2): 64-66
- [9] Staley CA, Huang A, Nattestad M, et al. Analysis of the 5' untranslated region (5'UTR) of the oxidase 1 (*AOX1*) gene in recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Gene, 2012, 496(2): 118-127
- [10] Luo Y. Expression of novel cellulase gene from *Ampullaria crosseana* in *P. pastoris*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Technology, 2006 (in Chinese)
罗颖. 新型福寿螺纤维素酶在甲醇毕赤酵母中的表达[D]. 南京: 南京工业大学硕士学位论文, 2006
- [11] Sun FM. High-level expression and purification of codon optimized proteinase K in *Pichia pastoris*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2014 (in Chinese)
孙凤敏. 密码子优化的蛋白酶 K 在毕赤酵母中的表达及分离纯化[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2014
- [12] Yang M, Wen Z, Lin LY, et al. Advances of expression system of *Pichia pastoris* protein[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(4): 46-51 (in Chinese)
杨梅, 温真, 林丽玉, 等. 毕赤酵母蛋白表达系统研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(4): 46-51
- [13] Wang D. Expression of a lysozyme from *Antheraea pernyi* in *Pastoris* and the effects of recombinant AP-lysozyme on *Streptococcus mutans*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Medical University, 2006 (in Chinese)
王丹. 柞蚕溶菌酶基因在酵母中的表达及重组柞蚕溶菌酶对变形链球菌的作用[D]. 大连: 大连医科大学硕士学位论文, 2006
- [14] Ju H, Liang DC, Guo G, et al. Comparison of four methods to prepare *Pichia* genomic DNA for PCR[J]. Tianjin Medicine Journal, 2003, 31(5): 270-272 (in Chinese)
剧海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较[J]. 天津医药, 2003, 31(5): 270-272
- [15] Zhi YY, Chang SH, Gong X, et al. Expression of endo-beta-N-acetylglucosaminidase H in *Pichia pastoris* and its application to N-glycosylation analysis[J]. Military Medicine Science, 2014, 38(3): 193-197 (in Chinese)
支艳艳, 唱韶红, 巩新, 等. Endo-H 在毕赤酵母中的表达、纯化及其在 N-糖基化分析中的应用[J]. 军事医学, 2014, 38(3): 193-197
- [16] Chen JJ. Study on production of recombinant human lysozyme via fermentation in *Pichia pastoris*[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2006 (in Chinese)
陈晶晶. 巴斯德毕赤酵母发酵生产重组人溶菌酶的研究[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2006
- [17] Feng HY, Xu QM, Sun GZ. Study on bioassay methods of detecting lysozyme activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(4): 60-64 (in Chinese)
冯惠勇, 徐亲民, 孙国志. 溶菌酶的生物测定方法研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(4): 60-64
- [18] Nie DS, Liang SP, Li M. Optimized strategies to hyperexpress heterologous protein in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Jishou University (Natural Science Edition), 2001, 22(3): 40-44 (in Chinese)
聂东宋, 梁宋平, 李敏. 外源蛋白在巴氏毕赤酵母中高效表达的策略[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2001, 22(3): 40-44
- [19] Wang YJ. Cloning and codon optimization of Chi58 from *Chaetomium cupreum* and high-level expression in *Pichia pastoris*[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2009 (in Chinese)
王艳君. 角毛壳菌 Chi58 基因克隆与密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2009
- [20] Xu L, Jiang XQ, Yang JK, et al. Cloning of a novel lipase gene, *lipJ08*, from *Candida rugosa* and expression in *Pichia pastoris* by codon optimization[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(2): 269-276
- [21] Zhang B, Wang LM, Ye B, et al. Cloning and sequence analysis of lysozyme gene from the Chinese Oak silkworm, *Antheraea pernyi*[J]. Canye Kexue, 2009, 35(3): 539-546 (in Chinese)
张波, 王林美, 叶博, 等. 柞蚕溶菌酶基因的克隆和序列分析[J]. 蚕业科学, 2009, 35(3): 539-546
- [22] Song J, Jiang YR, Wang Y, et al. Expression analysis of *Antheraea pernyi* lysozyme gene induced by different microbes[J]. Science of Sericulture, 2013, 39(4): 695-701 (in Chinese)
宋佳, 姜义仁, 王勇, 等. 不同微生物诱导柞蚕溶菌酶基因的表达分析[J]. 蚕业科学, 2013, 39(4): 695-701
- [23] Wang D, Ma WD, Yu HJ, et al. Expression of a lysozyme from *Antheraea pernyi* in *Pastoris* and the effects of recombinant AP-lysozyme on *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Practical Stomatology, 2007, 23(5): 674-677 (in Chinese)
王丹, 马卫东, 于惠娟, 等. 柞蚕溶菌酶基因在酵母中的表达及对变形链球菌的作用[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(5): 674-677
- [24] Yu G, Zhao HL, Feng X, et al. Expression of recombinant human lysozyme-tachyplesin I (hLYZ-TP I) in *Pichia pastoris* and analysis of antibacterial activity[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(4): 319-322
- [25] Lu XM. Cloning, expression and antimicrobial activities of *Musca domestica* cecropin fused with human lysozyme[D]. Guangdong: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2010 (in Chinese)
卢雪梅. 家蝇天蚕素与人溶菌酶融合基因(Mdc-hly)构建、表达及其抗菌活性的实验研究[D]. 广东: 广东药学院硕士学位论文, 2010
- [26] Ouyang P, Gao Y, Lei LC, et al. Prokaryotic expression and antimicrobial activity of human lysozyme-Tachyplesins fusion protein[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2010, 23(8): 829-833 (in Chinese)
欧阳萍, 高宇, 雷连成, 等. 人溶菌酶-抗菌肽 Tachyplesins 融合蛋白的原核表达及其抗菌活性[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(8): 829-833