

• 生物技术与方法 •

抗菌肽 VIP 在毕赤酵母中的高效表达及鉴定

乔想金^{1,2}, 李文新¹, 白丽娟¹, 胡巍¹, 南怀燕¹

1 兰州兰石能源装备工程研究院 生物制造工程技术中心, 甘肃 兰州 730300

2 中国科学院西北生态环境研究院, 甘肃 兰州 730000

乔想金, 李文新, 白丽娟, 等. 抗菌肽 VIP 在毕赤酵母中的高效表达及鉴定. 生物工程学报, 2018, 34(6): 1002-1011.

Qiao XJ, Li WX, Bai LJ, et al. Expression and identification of an antimicrobial peptide VIP in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2018, 34(6): 1002-1011.

摘要: 基于人抗菌肽 VIP (Vasoactive intestinal peptide) 基因序列, 按照毕赤酵母密码子偏好性设计引物; 用 SOE-PCR 法扩增目的基因; 然后将目的基因克隆至毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZαA 上, 构建 VIP 分泌表达菌株 GS115-pPICZαA-vip。用甲醇诱导 96 h 收集上清, 用质谱进行鉴定, 结果显示分泌表达产物与人抗菌肽 VIP 理论值 (3 326.82 Da) 完全一致, 表明人抗菌肽 VIP 成功得到分泌表达。琼脂糖凝胶扩散法实验结果显示, 重组 VIP 对大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 都有很强的抗菌活性, MIC (Minimal inhibitory concentration) 分别为 8 mmol/L 和 16 mmol/L。进一步细胞毒性和溶血性实验结果显示, 重组 VIP 对正常细胞 NCM460 和 IPEC-J2 没有毒性, 其对 SD 大鼠红细胞不具有溶血活性。通过透射电镜观察了 VIP 的抗菌机制, 结果显示 VIP 主要通过破坏细胞膜的方式抑杀细菌。本研究为人抗菌肽 VIP 的开发应用和大量生产奠定了基础。

关键词: 抗菌肽, 基因克隆, 毕赤酵母, 分泌表达, 抗菌活性

Expression and identification of an antimicrobial peptide VIP in *Pichia pastoris*

Xiangjin Qiao^{1,2}, Wenxin Li¹, Lijuan Bai¹, Wei Hu¹, and Huaiyan Nan¹

1 Lanzhou Lanshi Energy Equipment Engineering Institute CO., LTD, Lanzhou 730300, Gansu, China

2 Northwest Institute of Eco-environment and Resource, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: With the sequence of the vasoactive intestinal peptide (VIP) from humans and according to the codon bias of *Pichia pastoris*, we designed PCR primers of VIP and obtained the sequence of VIP by SOE-PCR. Then VIP gene was cloned into *Pichia pastoris* secretory expression vector and the cell secretory system GS115-pPICZαA-vip was constructed. The recombinant strain was induced by methanol for 96 hours, and we collected the supernatant and identified the VIP by mass

Received: December 21, 2017; **Accepted:** March 14, 2018

Supported by: The Scientific and Technological Innovation Projects of The Institute of Lanshi Group (No. G17-22)

Corresponding author: Xiangjin Qiao. Tel/Fax: +86-931-2907138; E-mail: qiaoxj2009@163.com

兰石集团研究院技术创新项目 (No. G17-22) 资助。

网络出版时间: 2018-04-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20180417.1551.002.html>

spectrometry. The molecular weight of VIP was consistent with theoretical molecular weight. The final result showed that the target peptide VIP was successfully expressed. The experimental investigations of agarose gel diffusion revealed that the recombinant expression modified VIP had relatively strong antibacterial activity to *E. coli* ATCC25922 and *S. aureus* ATCC25923. The minimal inhibitory concentration (MIC) of VIP to *E. coli* ATCC25922 and *S. aureus* ATCC25923 was 8 mmol/L and 16 mmol/L. Further cytotoxicity and hemolytic experiments indicated that recombinant VIP was non-toxic to normal cells NCM460 and IPEC-J2, had little hemolysis activity to SD rat erythrocytes. Meanwhile, by transmission electron microscopy, we found that VIP mainly inhibited bacteria by disrupting the cell membrane. These experiments established a useful system for further studies, application and mass production of antimicrobial peptide VIP.

Keywords: antimicrobial peptide, gene cloning, *Pichia pastoris*, secretory expression, antibacterial activity

抗菌肽是一类具有天然抗菌活性的小肽,最初是从昆虫血淋巴细胞中发现的^[1]。自瑞典科学家 Boman 等从天蚕蛹中发现第一个抗菌肽后,科学家相继从细菌、真菌、高等植物、高等动物中发现并分离得到了具有类似天然抗菌活性的小肽类^[2]。到目前为止发现的抗菌肽有 1 000 多种^[2-3]。过去的几十年中,人们发现大量使用传统抗生素容易诱导耐药性菌株的产生,从而导致治疗同种感染时抗生素的使用量越来越多^[4-6],陷入一种恶性循环模式。因此,开发不具有诱导耐药性菌株产生的新型抗生素极为迫切。

大多数抗菌肽都带有正电荷,具有正电性和两性分子的特征^[7-8]。其杀菌机制主要是通过直接破坏生物膜或与细胞内大分子相互作用而抑杀细菌,从而不会诱导产生耐药菌株^[2,8]。抗菌肽具有广谱的抗菌活性,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有一定的抗性,被认为是最具有开发新型抗生素药物的肽类物质^[9-10]。目前,国外有一些抗菌肽药物已经应用于临床^[11-13]。抗菌肽 VIP 是有机体内广泛分布的具有抗菌活性的小肽,对细菌和真菌都有很好的抗菌活性^[14]。VIP 的天然产量很低,化学合成成本相当昂贵,这是其开发利用过程中的关键瓶颈^[15]。因此,通过基因工程方法高效生产 VIP 具有很好的前景。

抗菌肽 VIP 对细菌有很强的抑杀作用,因此不能在原核表达系统中直接表达。本实验室曾将人抗菌肽 VIP 与用硫氧还蛋白串联,用 pET32a

在大肠杆菌中融合表达,但是由于需要切除融合标签和破碎菌体,成本还是相对较高,不太理想。毕赤酵母具有可以直接分泌表达蛋白和折叠修饰的优势,是目前分泌表达外源蛋白最理想的表达系统之一^[16]。VIP 对真核生物几乎没有毒性^[14],因此,我们尝试采用毕赤酵母表达系统直接分泌表达 VIP,从而省略切割标签和破碎菌体的繁琐步骤,以期 VIP 高效表达,降低生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

毕赤酵母 GS115、表达质粒 pPICZαA、NCM460 和 IPEC-J2 由西北工业大学生命学院生物化学实验室惠赠;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α、*E. coli* ATCC25922、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC25923 均由本实验室保存。

1.1.2 试剂耗材

限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;PCR 试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、小量质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自天庚生物科技有限公司;博来霉素、DNA Marker、蛋白 Marker 购自 BBI 生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 VIP 目的基因的克隆

VIP 氨基酸序列为:HSDAVFTDNYTRLRKQ MAVKKYLNSILN。根据毕赤酵母密码子偏好性,

优化获得 VIP 核苷酸序列: CACAGCGACGCCGT ATTCACAGATAACTACACCAGACTAAGAAAA CAAATGGCCGTAAAAAAGTACCTAAACAGCA TCCTAAAC, 在序列两端添加 *Xho* I 和 *Xba* I 限制性内切酶酶切位点和保护碱基, 限制性内切酶 *Xho* I 和基因序列之间添加 *Kex2* 酶切位点, 基因序列末端添加终止密码子 TAA, 引物序列设计见表 1。

其中, 所述引物序列 P1 和引物序列 P2 中的方框分别表示 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点, 使用套叠 PCR (Splice overlap extension PCR, SOE-PCR) 扩增 *vip* 基因, 反应条件如下: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 1 min, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 产物和克隆载体质粒 PUC19 同时用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布氨苄抗性 LB 固体平板, 挑取 5 个单克隆, 用小量质粒提取试剂盒抽提质粒, 送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.2 表达载体的构建

将 SOE-PCR 扩增的目的基因与 pPICZ α A 质粒用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 同时进行双酶切, 用 DNA 胶回收试剂盒对基因和质粒片段进行回收, 用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜。将连

接混合液转化 DH5 α 感受态细胞, 37 °C 摇床孵育 60 min, 取 100 μ L 转化菌液涂布固体 LB 培养基 (含 20 μ g/mL 博来霉素), 37 °C 培养 18 h。挑取单克隆, 双酶切和基因测序鉴定正确后进行下一步实验。

1.2.3 重组质粒的转化与鉴定

制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 具体过程如下: 从超低温冰箱取出 GS115 菌种, 接种于 YPD 固体平板上, 30 °C 培养 30 h; 挑取单克隆接种于 10 mL YPD 液体培养基, 30 °C 培养过夜; 取 500 μ L 过夜培养的菌液接种于 50 mL YPD 液体培养基, 30 °C 培养至 OD_{600} 为 0.8–1.2 时离心, 收集菌体; 用冰水浴预冷的超纯水洗涤 3 次; 用山梨醇缓冲液洗涤一次, 用 1 mL 山梨醇缓冲液重悬, 每 100 μ L 分装到 1.5 mL 离心管中, 以备电转。

取 50 μ L 重组质粒 pPICZ α A-*vip*, 用限制性内切酶 *Sac* I 进行线性化, 用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定并回收, 胶回收的最后一步用超纯水进行洗脱, 以保证较低的离子强度以便电转。取 10 μ L 线性化回收的质粒片段, 加入到 GS115 感受态细胞中, 迅速吹打均匀后置冰上 10 min; 将感受态细胞和质粒混合液迅速转入 2 mm 预冷的电转杯中, 2 500 V 电击; 电击完成后迅速加入 800 μ L YPD 培养基, 冰上静置 10 min, 放入 30 °C 培养箱静置培养 3 h; 取 300 μ L 菌液涂布于博来霉素抗性的 YPD 固体平板上, 培养 2 d; 挑取单克隆接种于含有 200 μ g/mL 博来霉素的 YPD 液体培养基上; 用酵母基因组提取试剂盒提取重组酵母基因组 DNA, 以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物, 用 PCR 检测目的基因在 GS115 中的整合情况, 将验证正确的重组菌命名为 GS115-PIC-*vip*。

1.2.4 重组质粒的诱导表达、纯化及质谱鉴定

将基因工程菌 GS115-PIC-*vip* 接种于 50 mL YPD 培养基, 30 °C 摇床培养过夜。取上述过夜培养菌液, 按照 1 : 100 的比例接种于 1 L 新鲜 YPD 培养基中, 待 OD_{600} 值达到 0.8–1.2 时, 6 000 r/min

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P1	TCTCTCGAGAAGAGAGAG GCTGAAGCTCACAGCGAC GCCGTATTCACAGATAAC	54
P2	GCCTCTAGATTAGTTAGGA TGCTGTTTAGGTACTTTTT ACGGCCATTTGTTTTCTTA	53
P3	AGCGACGCCGTATTCACAG ATAACTACACCAGACTAAG AAAACAAATGGCCGTAAA AA	55

Note: *Xho* I and *Xba* I restriction sites in frame.

离心,将菌体重悬于 50 mL 新鲜 YPM 培养基进行诱导,每 24 h 补加甲醇 5 mL,连续诱导 120 h。

重组 VIP 的纯化:用 5 倍柱体积的去离子水冲洗阳离子交换柱(层析柱介质为 CM Sepharose Fast flow,柱尺寸 1.6 cm×20 cm),流速 2 mL/min;用 4 倍柱体积 0.1 mol/L NaOH 处理阳离子交换柱,流速 2 mL/min;用去离子水冲洗至中性;用 4 倍柱体积 0.1 mol/L HCl 处理阳离子交换柱,流速 2 mL/min;去离子水冲洗至中性;用 4 倍柱体积的 A 液(20 mmol/L 磷酸盐缓冲液,pH 6.5)进行平衡,流速 2 mL/min;将发酵上清液稀释 5 倍,用 0.45 μm 的滤膜进行过滤,超声脱气 10 min 后上样,流速 1 mL/min;用磷酸缓冲液洗脱杂蛋白,直至 280 nm 处没有紫外吸收峰;用 A 液和 B 液(1 mol/L NaCl)进行线性梯度洗脱,收集 280 nm 处的紫外吸收峰。将纯化的 VIP 用透析袋进行脱盐处理,通过冷冻干燥仪进行浓缩,用 Bradford 法测定浓缩液重组 VIP 的浓度,取样进行质谱鉴定,其余的浓缩液在-20 °C 保存,以便后续重组 VIP 溶液的稀释配制。

质谱测定的是核质比 m/z ,因此测定的物质分子量计算公式如下:

$$M(\text{分子量}) = \text{离子峰峰值} \times \text{电荷数} - \text{质子数}。$$

1.2.5 重组 VIP 的抑菌活性检测

用琼脂孔扩散实验对重组表达的人抗菌肽 VIP 从定性方面检测抗菌活性。将 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC5923 培养至对数期(OD_{600} 为 0.4-0.6),用平板稀释法稀释至 10^8 CFUs/mL,将其按照 1%的比例接到 LB 固体培养基中,混匀后倒平板。等平板凝固后用打孔器进行打孔,每孔加入 70 μL 液体,37 °C 静置培养过夜,观察抑菌圈情况。

1.2.6 重组 VIP 的最小抑菌浓度(MIC)检测

从-80 °C 取出冻存的 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923,划线接种于肉汤培养基

(MH)中培养过夜;挑单克隆接种于 MH 液体培养基,培养过夜;将过夜培养的菌按照 1:100 的比例转接到 MH 培养基,待 OD_{600} 达到 0.4-0.6 时,取适量菌液,通过平板稀释法,用 MH 培养基稀释至 1×10^5 - 5×10^5 CFUs/mL;取 96 孔板,每孔加入 100 μL 菌液,再加入 100 μL 用 MH 培养基稀释好的重组 VIP 溶液,使 VIP 终浓度为 2-64 μmol/L (阴性对照孔加入 200 μL MH 培养基;阳性对照加入 100 μL 菌液+100 μL MH 培养基);37 °C 静置培养过夜后用酶标仪测 OD_{600} 值,分析纯化后的 VIP 对 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923 的 MIC。

1.2.7 重组 VIP 摇瓶发酵条件优化

将过夜培养的工程菌 GS115-PIC-vip 按照 1:100 的比例转接,培养 OD_{600} 至 0.4-0.6 时,设置诱导时间长度、诱导温度、甲醇诱导浓度梯度,通过检测 VIP 分泌的量确定实验室摇瓶最佳发酵条件。

1.2.8 VIP 细胞毒性检测

将人肠上皮细胞 (NCM460) 和猪肠上皮细胞(IPEC-J2)进行活化,培养至对数期;细胞浓度稀释至 1×10^5 个/mL,将稀释好的细胞液转接至 96 孔板,每孔加入 90 μL,5% CO_2 、37 °C 静置培养 4 h;待细胞贴壁后,加入 10 μL 稀释好的 VIP 溶液(用 0.22 μm 的滤器过滤除菌),使 VIP 终浓度为 16 μmol/L;空白对照:90 μL DMEM+10 μL PBS,正常对照:90 μL 细胞悬液+10 μL PBS。培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,继续培养 4 h;吸取上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 15 min 使结晶紫充分溶解;490 nm 下测吸光值。细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{正常}} - OD_{\text{空白}})} \times 100\%。$$

1.2.9 VIP 溶血活性检测

取 5 mL SD 大鼠静脉腹腔血,在含有玻璃珠

的三角瓶中轻摇 10 min; 将三角瓶中的血液用 0.9% NaCl 稀释 10 倍, 1 000 r/min 离心收集血细胞; 收集的血细胞用 0.9% NaCl 重悬, 1 000 r/min 离心, 弃上清; 重复上述步骤, 直到上清不显红色; 将所得的红细胞用 0.9% NaCl 配制成 2% 的红细胞悬液; 取 10 个 10 mL 无菌离心管, 每管加入 2.5 mL 红细胞悬液。加入 0.9% NaCl 和纯化的 VIP 溶液。使重组 VIP 终浓度为 5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$; 阴性对照: 2.5 mL 红细胞悬液和 2.5 mL 0.9% NaCl; 阳性对照: 2.5 mL 红细胞悬液和 2.5 mL ddH₂O; 37 °C 静置 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清在 545 nm 下测吸光值。红细胞溶血率计算公式:

$$\text{红细胞溶血率(\%)} = (\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{阴性}}) / (\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{阴性}}) \times 100\%。$$

1.2.10 VIP 抗菌机制检测

将培养至对数期的 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923 稀释 1 000 倍, 加入终浓度为 MIC 浓度的重组 VIP。37 °C 孵育 2 h, 3 000 r/min 离心, 用 5% 的戊二醛溶液重悬, 放入 4 °C 冰箱固定过夜。做包埋后切片, 在 JEM-1230 型透射电镜下观察细菌形态变化。

2 结果

2.1 目的基因的获取

通过 SOE-PCR 法, 以 3 条引物合成 *vip* 基因序列。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果如图 1 所示, PCR 产物片段大小与理论值 (122 bp) 相一致, 挑取的阳性克隆测序正确。

2.2 表达载体的构建

通过双酶切对重组质粒 PIC-*vip* 进行鉴定, 结果如图 2 所示。结果表明, 双酶切得到的 DNA 片段大小与理论值一致。进一步测序表明, 目的基因已成功构建到质粒 pPICZaA 上。

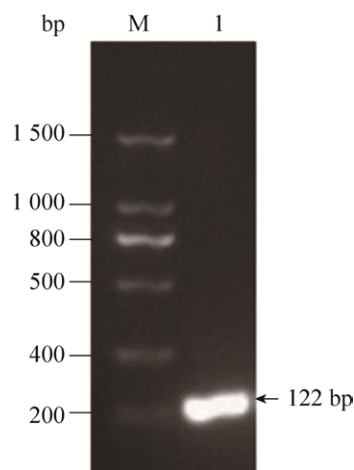


图 1 目的基因 *vip* 的扩增

Fig. 1 Amplification of the target gene *vip*. M: DNA marker; 1: target gene.

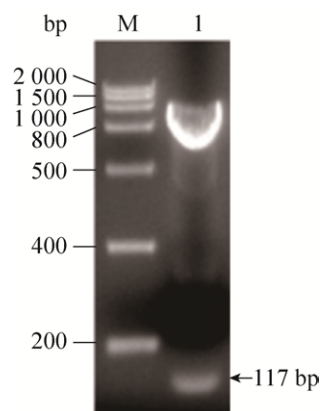


图 2 双酶切鉴定重组质粒 PIC-*vip*

Fig. 2 Recombinant plasmids PIC-*vip* were identified by double enzyme digestion. M: DNA marker; 1: target gene.

2.3 重组质粒的转化与鉴定

将重组质粒 PIC-VIP 通过电转化将其整合到毕赤酵母 GS115 中。提取毕赤酵母基因组 DNA, 以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物, 进行 PCR 扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测质粒整合情况, 结果如图 3 所示。PCR 扩增条带大小与理论值 (613 bp) 一致, 这表明重组质粒 PIC-*vip* 已成功整合到毕赤酵母 GS115 中。

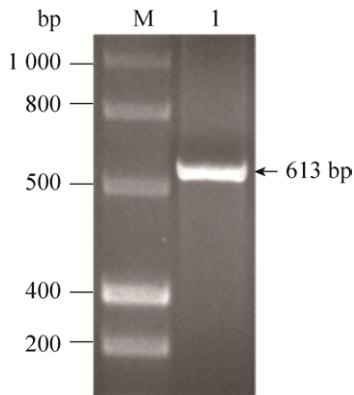


图 3 全基因组扩增鉴定质粒整合

Fig. 3 Plasmid integration was identified by whole-genome PCR amplification. M: DNA marker; 1: target gene.

2.4 VIP 的诱导表达及质谱鉴定

转接重组菌 GS115-PIC-*vip*, 进行诱导。用阳离子交换树脂对分泌的 VIP 进行纯化, 通过质谱进行鉴定, 结果如图 4 所示。质谱中 M+6H、M+5H、M+4H 等均为同一个物质, 只是所带电荷数不同。质谱测定的是核质比 m/z , 因此所检测物质的分子量为: $555.46 \times 6 - 6 = 3\ 326.76$ 或 $666.36 \times 5 - 5 = 3\ 326.80$ 或 $832.71 \times 4 - 4 = 3\ 326.84$ 或 $1\ 109.93 \times 3 - 3 =$

$3\ 326.79$, 根据计算结果, 在误差允许的范围内, 分泌表达的人抗菌肽 VIP 分子量与理论值 ($3\ 326.82$) 一致, 这表明重组菌 GS115-PIC-*vip* 能够成功分泌表达 VIP。

2.5 重组 VIP 抗菌活性检测

通过抑菌圈法可以从定性角度观察重组 VIP 是否具有抗菌活性。结果如图 5 所示, 对照组 YPM 培养基、空质粒诱导培养上清液和纤维素酶缓冲液均没有抗菌活性, 重组菌 GS115-PIC-*vip* 诱导后上清液有明显的抑菌圈出现, 纯化后的 VIP 具有更强的抗菌活性。实验表明, 分泌的 VIP 从定性角度具有良好的抗菌活性。下一步将通过最小抑菌浓度 MIC 从定量角度验证分泌的 VIP 抗菌活性。

2.6 重组 VIP 的最小抑菌浓度检测

通过测定重组 VIP 最小抑菌浓度 MIC, 从定量角度分析 VIP 的抗菌能力。检测结果显示, 纯化后的 VIP 对 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923 的 MIC 分别为 $8\ \mu\text{mol/L}$ 和 $16\ \mu\text{mol/L}$, 从定量角度说明重组 VIP 对 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923 具有很好的抗菌活性。

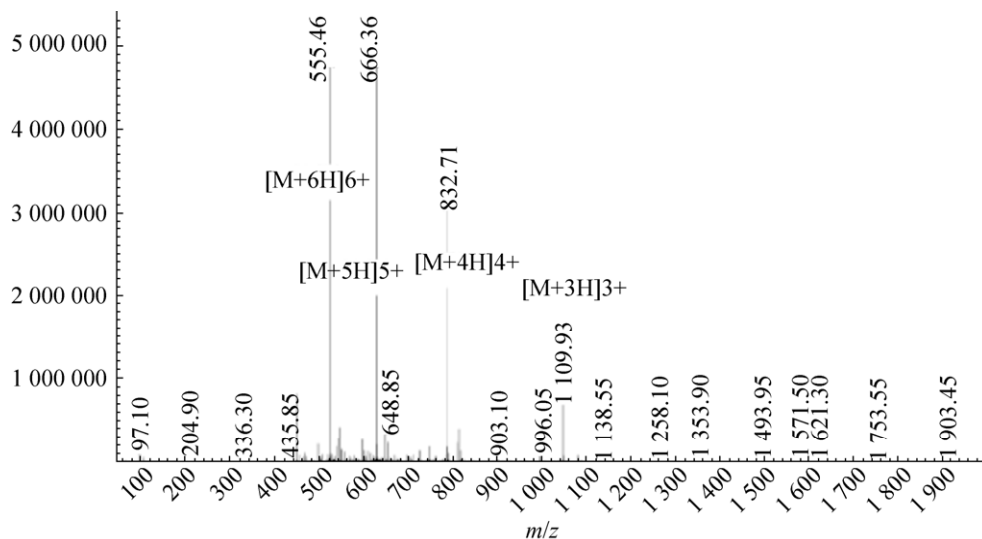


图 4 重组 VIP 质谱鉴定结果

Fig. 4 Identification of VIP by mass spectrometry.

2.7 重组 VIP 摇瓶发酵条件优化

通过测定诱导后 VIP 的含量确定摇瓶最佳发酵条件,结果如图 6 所示。结果显示,在 24–96 h 范围内,随着诱导时间的延长,VIP 表达量呈上升趋势;96 h 后,随着诱导时间的延长,VIP 表达量呈缓慢下降趋势;在 24–28 °C 范围内,VIP 表达量随着温度的升高呈上升趋势,当温度超过 28 °C 时,随着温度的上升,VIP 表达量呈下降趋势;甲醇诱导浓度在 0.1%–0.7% 范围时,随着甲醇浓度的升高,VIP 表达量呈上升趋势,当甲醇浓度超过 0.7% 时,随着甲醇诱导浓度的上升,VIP 表达量呈下降趋势。结果表明重组菌 GS115-PIC-*vip* 在 28 °C、0.7% 甲醇浓度条件下诱导 96 h 时 VIP 表达量最高,为 13.37 mg/mL。

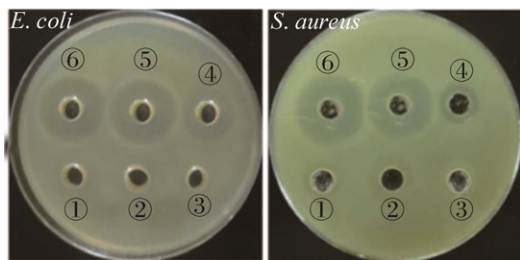


图 5 重组 VIP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌活性
Fig. 5 Antibacterial activity of recombinant VIP against *E. coli* and *S. aureus*. ①: YPM medium; ②: induced supernatant of empty plasmid; ③: cellulase buffer; ④: induced supernatant of recombinant GS115-PIC-*vip*; ⑤: induced supernatant of recombinant GS115-PIC-*vip*; ⑥: purified VIP.

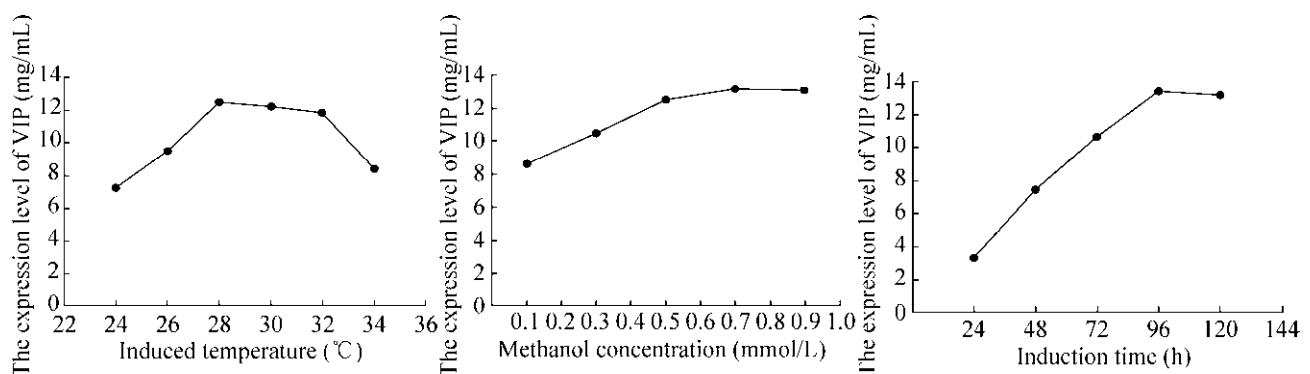


图 6 发酵参数优化

Fig. 6 Optimization of fermentation parameters.

2.8 重组 VIP 细胞毒性检测

通过检测 VIP 对人肠上皮细胞 (NCM460) 和猪肠上皮细胞 (IPEC-J2) 存活率的影响测定 VIP 对正常机体细胞的毒性 (图 7)。结果表明重组 VIP 对正常 NCM460 和 IPEC-J2 细胞存活率没有影响。

2.9 重组 VIP 溶血活性检测

取 SD 大鼠静脉腹腔血,检测重组 VIP 对其的溶血活性。结果如图 8 所示,5–40 μmol/L VIP 处理后的 SD 大鼠红细胞都没有发生溶血作用,表明 VIP 不具有溶血性。

2.10 重组 VIP 抗菌机制研究

用 MIC 浓度 VIP 处理后的 *E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923 形态如图 9 所示。结果显示,对照组 *E. coli* ATCC25922 形态结构完整,呈杆状,细胞质分布均匀;而与对照组相对应的用 MIC 浓度 VIP 处理之后的实验组 *E. coli* ATCC25922 细胞膜和细胞壁遭到严重破坏,细胞质固缩、内容物外泄甚至空泡化。正常对照组 *S. aureus* ATCC25923 呈球形,表面光滑,细胞质分布均匀;而用 MIC 浓度 VIP 处理之后的 *S. aureus* ATCC25923 几乎看不到完整的细胞,细胞壁和细胞膜严重变形甚至破裂,内容物外泄,细胞质固缩。说明在 MIC 浓度的 VIP 处理下,*E. coli* ATCC25922 和 *S. aureus* ATCC25923 细胞结构破坏极其显著。

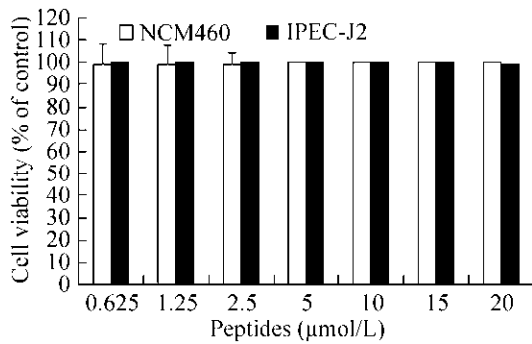


图7 VIP对NCM460和IPEC-J2存活率的影响
Fig. 7 Effect of VIP on the survival rate of NCM460 and IPEC-J2.

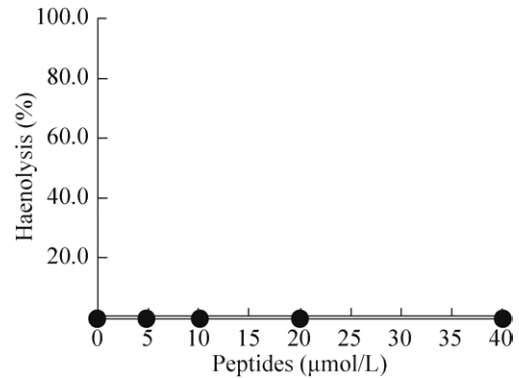


图8 VIP对SD大鼠红细胞溶血活性分析
Fig. 8 Analysis of erythrocyte hemolytic activity of VIP on SD rats.

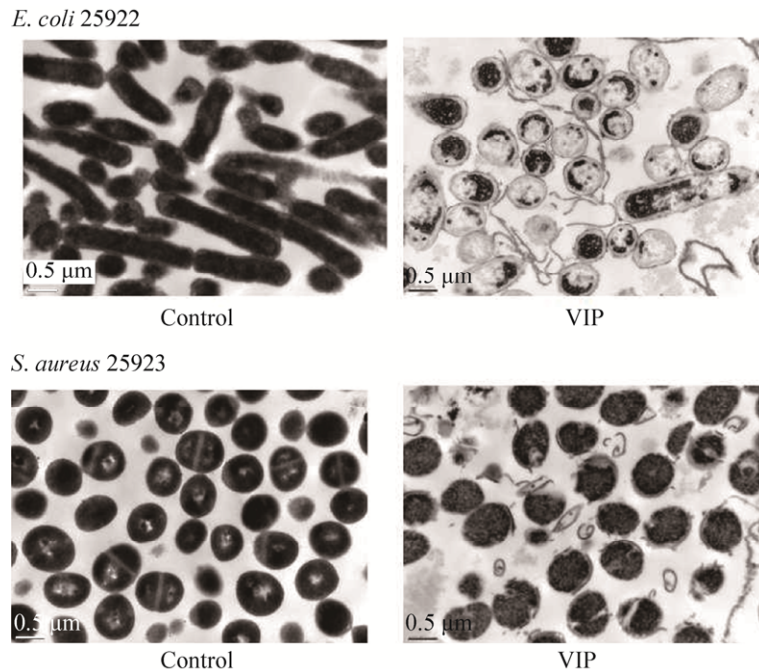


图9 VIP对*E. coli* ATCC25922和*S. aureus* ATCC25923的抗菌机制(1×MIC, 2 h, 30 000×)
Fig. 9 Antimicrobial mechanism of VIP on *E. coli* ATCC25922 and *S. aureus* ATCC25923 (1×MIC, 2 h, 30 000×).

3 讨论

抗菌肽起初是从昆虫血淋巴细胞中分离得到的一类具有抗菌活性的多肽,具有分子量小、热稳定性好、不具有免疫原性、抗菌谱广等特点^[17-18]。Bals等^[13]研究发现大多抗菌肽对细菌和

真菌都有很好的杀伤活性,而对正常动物细胞没有杀伤作用^[19-20]。本研究结果也再次证明了人抗菌肽VIP对正常细胞NCM460和IPEC-J2不具有细胞毒性。抗菌肽的溶血性则直接反映了其在生物体内的安全性,对于抗菌肽是否能运用于临床

起到决定性的作用^[7]。本研究结果显示 5–40 $\mu\text{mol/L}$ 的 VIP 对 SD 大鼠静脉腹腔血红细胞均未发生溶血现象,表明 VIP 对 SD 大鼠红细胞没有溶血活性。本研究电镜观察到人抗菌肽 VIP 主要通过破坏细菌细胞膜进行破坏而抑杀细菌。徐博成等也发现,抗菌肽杀菌机制主要是通过直接破坏生物膜或与细胞内大分子相互作用而抑杀细菌,从而不会诱导产生耐药菌株^[8]。抗菌肽是新型抗生素开发的首选^[2-3],由于抗菌肽天然产量非常低,化学合成成本昂贵,无法满足临床需求^[21]。因此,利用基因工程方法获得高产、高效、低成本的抗菌肽极为迫切。毕赤酵母被美国 FDA 认定为 GRAS (Generally recognized as safe) 微生物,从而为毕赤酵母在食品和医疗卫生行业的应用奠定了良好基础^[22]。毕赤酵母具有翻译后修饰、分泌表达外源蛋白、表达量高等诸多优点,广泛用于外源蛋白的表达^[23]。

本研究根据毕赤酵母密码子的偏好性优化人抗菌肽 VIP 基因序列,并通过毕赤酵母菌表达系统对人抗菌肽 VIP 进行表达与分离纯化,成功构建了表达载体 pPICZaA-vip。通过电转化将重组质粒 pPICZaA-vip 整合到毕赤酵母 GS115 基因组上。经 0.5% 的甲醇诱导后,人抗菌肽 VIP 得以表达。28 $^{\circ}\text{C}$ 、0.7% 甲醇诱导 96 h 产量达到最大值 13.37 mg/mL。通过发酵液的纯化,纯化产物的鉴定,质谱鉴定结果均显示分泌表达的产物与人抗菌肽 VIP 大小完全一致,表明人抗菌肽 VIP 成功分泌表达。分泌表达人抗菌肽 VIP 的抗菌活性实验表明,对大肠杆菌 *E. coli* ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC25923 均有明显的抑制作用。本实验只选择了具有代表性的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行抗菌活性实验,对于人抗菌肽 VIP 的抗菌谱还要进行更深入的研究。

本研究采用毕赤酵母表达系统成功分泌表达了具有生物活性的人抗菌肽 VIP,并对摇瓶发酵

条件进行了优化,为 VIP 进行大量生产和开发成为新型肽类抗生素药物奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13(1): 61–92.
- [2] Nibbering PH, Hiemstra P, Drijfhout JW. Antimicrobial peptide: US, 9562085. 2017-02-07.
- [3] Wang GS. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceutics*, 2014, 7(5): 545–594.
- [4] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389–395.
- [5] Li Q, Ma HX, Zhang HR, et al. Research process in artificial antimicrobial peptides. *Pharmaceut Biotechnol*, 2017, 24(4): 364–368 (in Chinese). 李倩, 马慧霞, 张皓然, 等. 人工抗菌肽的研究进展. *药物生物技术*, 2017, 24(4): 364–368.
- [6] Wang Q, Xu YZ, Liu BG, et al. Research advance in characteristics and genetic engineering of antibacterial peptides. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017, 17(9): 5–8 (in Chinese). 王青, 徐彦召, 刘保国, 等. 抗菌肽的特点及其基因工程研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, 17(9): 5–8.
- [7] Deslouches B, Di YP. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 46635–46651.
- [8] Xu BC, Chou SL, Shan AS. Antibacterial peptide classification, mechanism of action and application in animal production. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017(11): 72–76 (in Chinese). 徐博成, 丑淑丽, 单安山. 抗菌肽的分类、作用机理和在动物生产中的应用. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(11): 72–76.
- [9] Tian CP, Mao AH, Yuan HX, et al. Effects of the antibacterial peptide in prevention and treatment of cancer. *Gansu Med J*, 2017, 36(6): 431–432 (in Chinese). 田彩平, 毛爱红, 袁红霞, 等. 抗菌肽在肿瘤防治中的作用. *甘肃医药*, 2017, 36(6): 431–432.
- [10] Zhao DH, Dai ZY, Zhou KY. The research advances in function, mechanism and molecular biology of

- insect antibacterial peptides. *Progr Biotechnol*, 1999, 19(5): 14–18 (in Chinese).
- 赵东红, 戴祝英, 周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展. *生物工程进展*, 1999, 19(5): 14–18.
- [11] Hancock EW, Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2002, 2(1): 79–83.
- [12] Diamond G. Natures antibiotics: the potential of antimicrobial peptides as new drugs. *Biologist (London)*, 2001, 48(5): 209–212.
- [13] Bals R. Antimikrobielle peptide und peptidantibiotika. *Med Klin*, 2000, 95(9): 496–502.
- [14] Xu CL, Wang YM, Sun R, et al. Modulatory effects of vasoactive intestinal peptide on intestinal mucosal immunity and microbial community of weaned piglets challenged by an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88). *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e104183.
- [15] Xu CL, Shang XY, Niu WN, et al. Study on solid synthesis and antimicrobial activity *in vitro* of vasoactive intestinal peptide. *Chem Bioeng*, 2012, 29(5): 12–15 (in Chinese).
- 徐春兰, 尚晓娅, 牛卫宁, 等. 血管活性肠肽的固相合成及其体外抗菌活性研究. *化学生物工程*, 2012, 29(5): 12–15.
- [16] Zhang J, Wu X, Yue YY, et al. Cloning, expression and characterization of antibacterial peptide CM4 in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(5): 720–723 (in Chinese).
- 张杰, 吴希, 岳园园, 等. 抗菌肽 CM4 基因克隆及其在毕赤酵母中的表达鉴定. *微生物学报*, 2005, 45(5): 720–723.
- [17] Robinson K, Deng Z, Hou YQ, et al. Regulation of the intestinal barrier function by host defense peptides. *Front Vet Sci*, 2015, 2: 57.
- [18] Gong X, Shi YH, Le GW. Study on the interaction mechanism of antibacterial peptide MDL-1 in *Musca domestica* L and *E. coli* DNA by fluorescence spectra. *Spectrosc Spect Anal*, 2005, 25(3): 420–423 (in Chinese).
- 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 荧光光谱分析法蝇幼虫抗菌肽与大肠杆菌染色体 DNA 作用机理. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(3): 420–423.
- [19] Tam JP, Wang S, Wong KH, et al. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2015, 8(4): 711–757.
- [20] Bommineni YR, Dai HE, Gong YX, et al. Fowlicidin-3 is an α -helical cationic host defense peptide with potent antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing activities. *FEBS J*, 2007, 274(2): 418–428.
- [21] Hong J, Hu JY, Wang FM, et al. Molecular mechanisms of tachyplesin I role on genomic DNA and RNA of *Escherichia coli*. *J Agric Sci Technol*, 2013, 15(1): 71–75 (in Chinese).
- 洪军, 胡建业, 王福梅, 等. 鲎源抗菌肽对大肠杆菌基因组 DNA 和 RNA 作用的分子机制. *中国农业科技导报*, 2013, 15(1): 71–75.
- [22] Ansari AM, Majidzadeh AK, Darvishi B, et al. Extremely low frequency magnetic field enhances glucose oxidase expression in *Pichia pastoris* GS115. *Enzyme Microb Technol*, 2017, 98: 67–75.
- [23] Ma XJ, Liu L, Li QQ, et al. High-level expression of a bacterial laccase, CueO from *Escherichia coli* K12 in *Pichia pastoris* GS115 and its application on the decolorization of synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol*, 2017, 103: 34–41.

(本文责编 郝丽芳)