

人源抗菌肽 LL-37 在毕赤酵母中的 高效表达及其活性检测

申艳敏^{1,2} 魏建超¹ 尚书文^{1,2} 牛明福¹ 周玉珍^{1,2} 周 斌¹ 曹瑞兵¹ 陈溥言¹ 侯继波^{2*}

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

(2. 江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心 南京 210014)

摘 要: 根据 GenBank CAA86115 中的 LL-37 氨基酸序列, 选择毕赤酵母偏好密码子, 采用 SOE 方法合成了人源抗菌肽 LL-37 基因。所合成的 LL-37 基因全长为 141 bp, 并在其 N 端引入 kex2 裂解位点, 以保证表达抗菌肽具有天然 N 端。基因克隆入 pPICZ α -A 质粒, 构建分泌型重组酵母表达载体 pPICZ α -A-LL-37。pPICZ α -A-LL-37 经 *Sac* 酶切线性化后电转化导入毕赤酵母菌株 X-33。PCR 鉴定为阳性的酵母转化子经甲醇诱导分泌 LL-37 于发酵上清液, 其表达量为 206 mg/L。表达产物 LL-37 耐热性强, 在 100℃ 条件下 40 min 内抗菌活性不变, 煮沸 3 h 以上仍具有活性。琼脂糖孔穴扩散法检测显示 LL-37 对多种革兰氏阴性菌和阳性菌均具有很好的抑制活性, 其对金黄色葡萄球菌 *Cowan I* (*Staphylococcus aureus*)、致病性大肠杆菌 K99 (*Enteropathogenic E. coli*) 和鸡白痢沙门氏菌 (*Salmonella pullorum*) 的最小抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 分别为 1.56 μ g/mL、3.12 μ g/mL 和 1.56 μ g/mL。

关键词: 抗菌肽 LL-37, 基因设计, 分泌表达, 活性检测

High Expression of the Human Antibacterial Peptide LL-37 in *Pichia pastoris* and the Detection of Its Activity

SHEN Yan-Min^{1,2} WEI Jian-Chao¹ SHANG Shu-Wen^{1,2} NIU Ming-Fu¹ ZHOU Yu-Zhen^{1,2}
ZHOU-Bin¹ CAO Rui-Bing¹ CHEN Pu-Yan¹ HOU Ji-Bo^{2*}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture in
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(2. National Veterinary Biological Medicine Engineering Research Center, Nanjing 210014)

Abstract: Based on the gene sequences encoding human antibacterial peptide LL-37 as registered in GenBank (serial number in GenBank is CAA86115), using the preferential codon of *P. pastoris*, the antibacterial peptide LL-37 gene 141 bp in length was designed and synthesized. Especially a Kex2 signal cleavage site was fused in 5' end of the antibacterial peptide gene. The modified antibacterial peptide gene was cloned into the pPICZ α -A vector to construct the recombinant expression vector pPICZ α -A-LL-37. The *Sac* linearized plasmid pPICZ α -A-LL-37 was transformed into *P. pastoris* X-33 by electroporation. The trans-

formants were identified by PCR using R2 and 5' AOX1 specific primers. The concentration of the secreted LL-37 was 206 mg/L. The new peptide, which has a weight of 4.5 kD, could remain its inhibition activity after being treated for more than 3 hours in boiled water. Agrose diffusion assay showed that LL-37 had broad-spectrum antibacterial abilities not only to Gram-negative bacteria but also to Gram-positive bacteria, the MIC to *Staphylococcus aureus* (Cowan I), *E. coli* K99 and *Salmonella pullorum* were 1.56 µg/mL, 3.12 µg/mL and 1.56 µg/mL, respectively.

Keywords: Antibacterial peptide LL-37, Genetic modification, Secretion expression, Detection activity

抗菌肽(Antibacterial peptide)是生物体内经诱导产生的一类具有生物学活性的小分子多肽,存在于多种生物体中,是宿主免疫防御系统的一个重要组成部分^[1],具有广谱抗菌、无耐药性及毒副作用等优点。随着研究的不断深入,越来越显示出了其在医学、兽医学等相关领域的独特应用价值。

LL-37 是迄今为止发现的唯一一种存在于人体的 Cathelicidin 类抗菌肽,是由其前体肽 Human cathelicidin antimicrobial peptide 18(hCAP-18)经丝氨酸蛋白酶 3 和其他蛋白水解酶酶解后释放出的有活性的 C 端片段。体外实验证实 LL-37 具有广谱抗菌作用,抗菌活性依赖其螺旋构象的形成,通过“地毯样”机制杀灭细菌。LL-37 除了直接杀菌作用外,还具有抗肿瘤、结合与中和内毒素、趋化及促进血管生成等作用。An 等^[2]构建了 LL-37 和 M-CSFRJ6-1 (Macrophage colony-stimulating factor receptor from the J6-1 leukemic cell line)融合基因,发现其表达产物能够保护小鼠免受肿瘤细胞 Sp2/0-CSFRJ6-1 的攻击。冯新富等^[3]在 LL-37 抗菌肽治疗实验性内毒素血症的研究中显示,LL-37 可使内毒素血症小鼠成活率显著提高,且存在明显的量效关系。近几年来,LL-37 得到了越来越多的关注,被认为有望成为新一代抗生素的理想模板。

抗菌肽从天然资源中提取成本高、得率低、工序繁琐;化学合成则价格相当昂贵,也难以应用于临床,利用基因工程技术生产抗菌肽具有重要意义。由于抗菌肽本身对原核宿主菌的杀伤作用,不适合在原核系统中直接表达,一般选用融合表达或

真核表达。在此,本研究选用 *Pichia pastoris* 系统来表达人源抗菌肽 LL-37,目的在于利用毕赤酵母表达系统的特点和 SOE(Gene splicing by overlap extension, gene SOEing)人工合成目的基因的方法来获得高表达量的抗菌肽 LL-37,并研究其体外抗菌活性,为今后其在临床上的应用提供理论基础。

1 材料和方法

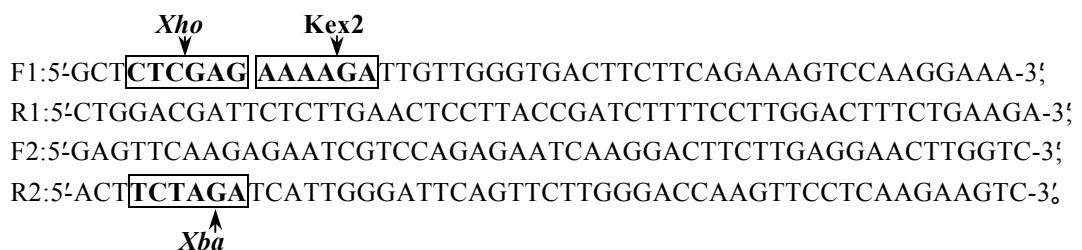
1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:金黄色葡萄球菌 Cowan (ATCC12598),致病性大肠杆菌K99(ATCC39302)和鸡白痢沙门氏菌(ATCC10398),大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α,巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)受体菌 X-33(His⁻/Mut⁺)和表达载体 pPICZα-A均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂:*Xho*、*Xba*、*EcoR*、*Sac*及 T4 DNA Ligase 等为 TaKaRa Biotech 公司产品;Tryptone、Yeast Extract 为 Oxoid 公司产品;Tricine、SDS-PAGE 低分子量 Marker 购自南京生兴生物公司;Zeocin 购自 Invitrogen 公司;其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 抗菌肽基因设计和合成

根据 LL-37 的氨基酸序列,选用毕赤酵母偏好密码子^[4],利用 DNA Star、primer premier 5.0 软件设计了 4 个基因片段:F1、R1、F2 和 R2。F1 和 R1 的 3 端、R1 和 F2 的 5 端、F2 和 R2 的 3 端分别有 21 个 bp 的互补序列,符合 gene SOEing (gene splicing by overlap extension)的要求。序列如下:



4 条引物中, F1 含 49 bp, R1 含 53 bp, F2 和 R2 各含 51 bp, 由 Invitrogen 上海分公司合成。

1.3 PCR 扩增

4 条引物两两互为模板、引物, 反应体系 (50 μ L): 10 \times PCR Buffer 5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, F1、R1、F2 和 R2 (10 pmol/L) 各 1 μ L, Taq^{TM} 0.5 μ L, ddH₂O 36.5 μ L。混匀, 瞬间离心。为了保证 SOE 合成的特异性, 我们采用了降落(touchdown, TD) PCR 技术进行优化。94 预变性 4 min, 进入 TD-PCR 循环: 94 30 s, 退火温度从 65 降至 50, 每循环 1 min, 每 1 个循环降低 0.5, 72 45 s, 共 30 个循环后温度降至 50, 再在最适退火温度 52 的条件下进行 15 个循环。最后 72 延伸 7 min, 取 TD-PCR 产物 2.0 μ L, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下观察并记录拍照。

1.4 重组酵母表达载体的构建

PCR 产物和 pPICZ α -A 均用 *Xho*、*Xba* 双酶切, T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 重组表达质粒进行 PCR、缺失酶切位点鉴定, 其具体操作见参考文献[5]。缺失酶切位点鉴定阳性的质粒送 Invitrogen 上海分公司测序。构建正确的重组表达质粒命名为 pPICZ α -A-LL-37。

1.5 X-33(His⁻/Mut⁺)及 Mut⁺转化子的筛选和鉴定

感受态 *Pichia pastoris* X-33 (His⁻/Mut⁺) (80 μ L) 与 *Sac* I 线性化 pPICZ α -A-LL-37 (5 μ g) 相混合, 转移至预冷的 0.2 cm 电转杯(Bio-Rad)中, 置冰上 5 min, 1.5 kV、25 μ F、200 Ω 电击, 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇, 取 200 μ L 涂布于 YPDS 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养至单菌落出现。详细步骤参照 *Pichia* Expression Kit。采用 PCR 方法分析 *P. pastoris* 转化子, 用煮-冻-煮法制备 PCR 模板^[6], 以 P1、R2 为引物, 其中 P1 为鉴定阳性转化子的毕赤酵母两条通用引物之一, 其序列为 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', 反应体系同上, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 48 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 6 min。以能扩增出 467 bp 的克隆定为阳性转化子。

1.6 重组 *P. pastoris* 菌在摇瓶中的诱导表达

将筛选到的阳性酵母菌接种到 5 mL BMGY 中, 30 $^{\circ}$ C、230 r/min 振荡培养约 22 h 至 OD_{600} 达到 5~6; 室温 3000 r/min 离心 2 min, 收集菌体重悬于 25 mL

BMMY 培养基, 进行诱导表达。28 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 84 h, 期间每 24 h 补加终浓度为 1%(V/V)的甲醇。96 h 后, 5000 r/min 离心 10 min, 收集培养液上清。

1.7 重组表达抗菌肽的 Tricine-SDS-PAGE

重组 LL-37 抗菌肽的分子量为 4.5 kD。理论上, 分子量低于 15 kD 的多肽在常规 Tris-甘氨酸电泳系统中难以得到理想的电泳分辨率。在此, 我们使用 Tricine(三羟甲基氨基甘氨酸)代替甘氨酸作为终止离子, 提高了交联度和凝胶浓度, 并加入了适量的尿素^[7], 使重组 LL-37 抗菌肽得到了较好的分辨率及带型。

1.8 重组蛋白的分离纯化

将大量诱导表达的抗菌肽 LL-37 用 MINIPORE(截留分子量 3000 D)进行 5 倍浓缩, 再用截留分子量 1000 D 的透析袋(SPI32640)在 PH7.0 的 PBS 中透析过夜, 之后过 Sephadex-G25 层析柱, 0.2 mol/L NaAc (pH 6.0)以流速 10.0 mL/cm²/h 洗脱, 分部收集洗脱液进行电泳分析, 最后合并含目的蛋白的洗脱液, 进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳和抑菌活性测定。

1.9 重组抗菌肽的蛋白浓度测定及抑菌活性测定

用 DNA/RNA 微量定量仪测定蛋白浓度。抑菌活性测定采用标准琼脂孔穴扩散法: 将处于对数生长期的金黄色葡萄球菌(*Cowan*)、致病性大肠杆菌 K99 和鸡白痢沙门氏菌悬浮液(OD_{600} 0.5)各 15 μ L, 与 55 $^{\circ}$ C 的 LB 固体培养基 25 mL 混匀后铺平板, 等其凝固后, 用灭菌的打孔器(直径 5 mm)打孔, 滴加 40 μ L 待测 LL-37 样品, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 以同体积的 pPICZ α -A 空载体转化酵母表达蛋白为阴性对照, Amp 为阳性对照, 第 2 天测量抑菌圈直径。

1.10 抗菌肽 LL-37 对几种菌的最低抑菌浓度(MIC)测定

用液体生长抑制法测定抗菌肽对金黄色葡萄球菌(*Cowan*)、致病性大肠杆菌 K99 和鸡白痢沙门氏菌的 MIC, 将能完全抑制菌体生长的最低蛋白浓度确定为 MIC。将活化培养的菌液用 LB 培养基稀释至 10⁶ CFU/mL, 分别取 50 μ L 加到 96 孔培养板上, 然后分别加入稀释的 LL-37(浓度分别为 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL, 6.25 μ g/mL, 3.12 μ g/mL, 1.56 μ g/mL, 0.78 μ g/mL, 0.39 μ g/mL, 0.20 μ g/mL)的溶液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后用自动酶

标仪测定 OD_{600} 确定结果。

1.11 重组抗菌肽的热稳定性

将抗菌肽 LL-37 沸水浴 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、40 min、50 min、1 h、2 h、3 h, 再按方法 1.9 所述进行抑菌试验, 检测其对金黄色葡萄球菌抗性的变化, 同时以 pPICZ α -A 空载体转化酵母的表达上清和未煮沸的 LL-37 抗菌肽作对照。

2 结果

2.1 基因设计

设计的 LL-37 基因的碱基序列如图 1 所示。所合成的 LL-37 基因全长 141 bp, 包括 37 个氨基酸的编码序列、终止密码子、酰胺化碱基和保护性碱基。基因 N 端设有 *Xho* 识别序列, C 端设有 *Xba* 识别序列。并在基因的 N 端引入毕赤酵母 Kex2 蛋白酶裂解位点。

	<i>Xho</i> I	Kex2	L	L	G	D	F	F	R	K	S	K	E		
5' GCT	CTCGAG	AAAAGA	TTG	TTG	GGT	GAC	TTC	TTC	AGA	AAG	TCC	AAG	GAA		
K	I	G	K	E	F	K	R	I	V	Q	R	I	K	D	F
AAG	ATC	GGT	AAG	GAG	TTT	AAG	AGA	ATC	GTC	CAG	AGA	ATC	AAG	GAC	TTC
L	R	N	L	V	P	R	T	E	S						
TTG	AGG	AAC	TTG	GTC	CCA	AGA	ACT	GAA	TCC	CAA	TGA	TCTAGA	AGT	3'	

图1 设计合成的抗菌肽LL-37基因的核苷酸序列

Fig. 1 The DNA sequence of the designed and synthetic LL-37 gene

2.2 基因合成及克隆鉴定

4 条引物进行 TD-PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 可观察到 141 bp 的单一一条带(图 2)。

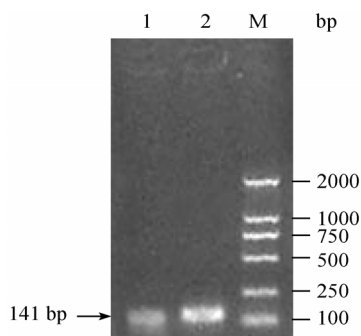


图2 LL-37基因的TD-PCR扩增

Fig. 2 The amplification of LL-37 gene by TD-PCR.

M: DNA分子量标准; 1, 2: LL-37的PCR扩增产物

M: DNA marker DL2000; 1, 2: PCR products of LL-37 gene

2.3 序列测定结果

经 Invitrogen 测序, 所合成基因序列与设计序列完全一致。

2.4 重组抗菌肽的 Tricine-SDS-PAGE 结果

抗菌肽 LL-37 在 Tricine-SDS-PAGE 体系中得到了较好的分离效果, 在 4.5 kD 处出现了特异条带, 而空载体 X-33/pPICZ α -A 阴性对照没有出现任何条带, 说明抗菌肽 LL-37 在 X-33 中得以表达(图 3)。

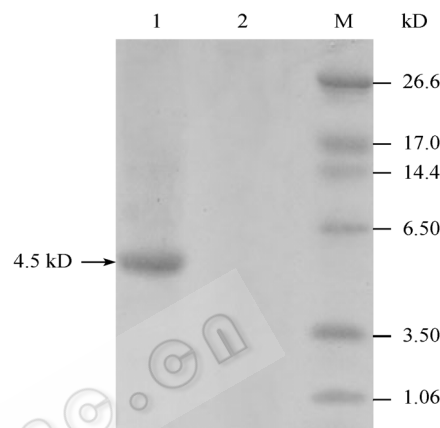


图3 抗菌肽LL-37的Tricine-SDS-PAGE

Fig. 3 The Tricine-SDS-PAGE of the antibacterial peptide LL-37

M: 蛋白质低分子量标准; 1: 抗菌肽LL-37蛋白; 2: X-33/pPICZ α -A 阴性对照

M: Low molecular weight protein marker; 1: Supernatant of X-33/pPICZ α -A-LL-37; 2: The control of Supernatant of X-33/pPICZ α -A

2.5 重组蛋白的纯化结果

纯化后, Tricine-SDS-PAGE 结果显示, 重组蛋白 LL-37 在 4.5 kD 处得到了理想的电泳分辨率和带型(图 4)。

2.6 重组抗菌肽的蛋白浓度测定及抑菌活性测定结果

DNA/RNA 微量定量仪测得 LL-37 的蛋白浓度为 206 mg/L。抑菌活性测定结果显示, LL-37 对革兰氏阳性、阴性菌均有很好的杀伤效果, 对金黄色葡萄球菌(*Cowan*)、致病性大肠杆菌 K99 和鸡白痢沙门氏菌的抑菌圈直径分别为 3.2 cm、2.5 cm 和 2.8 cm, 如图 5 所示。

2.7 抗菌肽 LL-37 对几种菌的最低抑菌浓度(MIC)测定结果

用菌体液体生长抑制法测得重组蛋白 LL-37 对

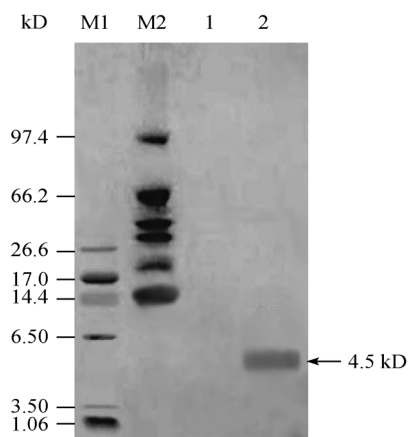


图4 纯化后的重组抗菌肽Tricine-SDS-PAGE分析

Fig. 4 The Tricine-SDS-PAGE assay of the purified recombinant antimicrobial peptide

M1,M2: 蛋白质低分子量标准; 1: X-33/pPICZα-A阴性对照; 2: 纯化后的LL-37

M1,M2: Low molecular weight protein marker; 1: The control of Supernatant of X-33/pPICZ α-A; 2: The purified Supernatant of X-33/pPICZ α-A-LL-37

金黄色葡萄球菌(*Cowan*)、致病性大肠杆菌 K99 和鸡白痢沙门氏菌的 MIC 值分别为 1.56 μg/mL、3.12 μg/mL 和 1.56 μg/mL。

2.8 重组抗菌肽的热稳定性结果

结果显示, 抗菌肽 LL-37 沸水浴 40 min 后抑菌圈观察不到明显的变化, 1 h 后抑菌圈开始有微弱变小, 3h 后仍具有活性。由此可见, LL-37 的热稳定性很好, 高温 3 h 不能破坏抗菌肽 LL-37 的结构和抑菌活性。

3 讨论

抗生素的耐药性、副作用、残留等问题已经是世界性的重大难题, 寻找高效、广谱、无残留、无耐药性、低副作用的抗生素代用品, 是近些年来人们一直努力的目标。本文所选用的人源抗菌肽 LL-37 是从人体中提取的一种小分子多肽, 只有 37

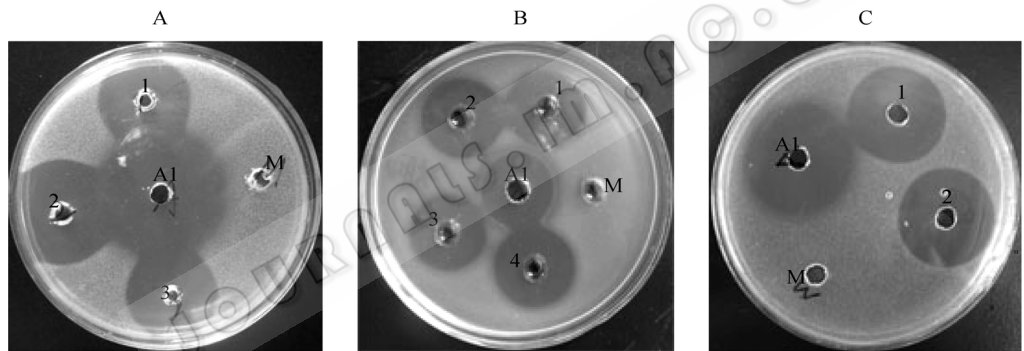


图5 重组抗菌肽对金黄色葡萄球菌(A)、致病性大肠杆菌(B)和鸡白痢沙门氏菌(C)的抑菌活性

Fig. 5 Detection of the antibacterial activity of LL-37 against *Staphylococcus aureus* (A), *E. coli* K99 (B) and *Salmonella pullorum* (C).

A1: Amp 对照(25 μg/mL); M: X-33/pPICZα-A 阴性对照; (A)1、2、3: 抗菌肽 LL-37 蛋白; (B)1、2、3、4: 抗菌肽 LL-37 蛋白; (C)1、2: 抗菌肽 LL-37 蛋白

A1: AMP control(25 μg/mL); M: the control of Supernatant of X-33/pPICZ α-A; (A) 1、2、3, (B)1、2、3、4, (C)1、2 : Supernatant of antibacterial peptides LL-37

个氨基酸残基, 抗菌谱广; 它作为人体内唯一的双亲性α-螺旋结构的多肽抗生素, 是开发新型抗生素的理想模板和分子骨架。

目前, 国内外学者主要通过融合表达的方式来获得抗菌肽 LL-37。Ja-Young Moon 等^[8]和 Yifeng Li 等^[9]分别采用大肠杆菌融合表达系统成功表达了抗菌肽 LL-37, 但表达产物都以融合蛋白形式得到, 它们均需要去除融合伴侣后才能表现应有的抗菌活性。毕赤酵母表达系统不仅表达产物都分泌于上清

液中, 而且毕赤酵母自身分泌的蛋白非常少, 十分有利于纯化。与原核生物相类似, 真核生物在密码子的选择上也具有偏爱性, 某些稀有密码子, 尤其是稀有密码子密集区往往成为制约翻译速率的因素, 进而导致重组蛋白表达量低甚至不表达。因此, 在本实验中, 我们对抗菌肽 LL-37 基因的密码子序列进行了优化, SOE 方法合成 LL-37 基因, 将其克隆到酵母分泌表达载体 pPICZα-A 上后, 经 1%甲醇诱导, 重组毕赤酵母菌大量分泌表达了具有生物活性的抗

菌肽 LL-37。进一步纯化后,我们成功地获得了成分较为单一的重组蛋白。抑菌试验和最低抑菌浓度试验结果显示:重组蛋白对金黄色葡萄球菌(*Cowan*)、致病性大肠杆菌 K99 和鸡白痢沙门氏菌为代表的革兰氏阳性菌和阴性菌均有很强的抑制作用。热稳定性试验结果显示 LL-37 具有很强的耐高温特性。本文在研究抗菌肽 LL-37 体外抗菌活性的基础上,下一步将研究其在动物体内的生物学活性。

总之,本文采用 *Pichia pastoris* 系统成功地高效分泌表达了具有生物活性的人源抗菌肽 LL-37,这不仅对于我们下一步将要进行的抗菌肽 LL-37 在动物体内生物学活性的研究具有重要意义,同时也为其大量生产开发成新型抗生药物奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] 徐灵龙,王云峰,石星明,等. 抗菌肽及其功能研究. 中国生物工程杂志, 2007, 27(1): 115-118.
- [2] An LL, Yang YH, Ma XT, *et al.* LL-37 enhances adaptive antitumor immune response in a murine model when genetically fused with M-CSFR (J_{6-1}) DNA vaccine. *Leuk Res*, 2005, 29(5): 535-543.
- [3] 冯新富,黄玉兰,张忠民,等. LL-37 抗菌肽重组及其治疗实验性内毒素血症的研究. 山东医药, 2005, 45(29): 1-3.
- [4] Zhao X, Huo KK, Li YX. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese J of Biotechnology*, 2000, 16(3): 308-311.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南. 第二版. 金冬燕, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1987.
- [6] 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. 天津医药, 2003, 31(5): 270-272.
- [7] 左爱军,梁东春,郭刚,等. 多肽的电泳分离. 天津医药, 2004, 32(10): 604-606.
- [8] Ja-Young Moon, Katherine A. Henzler-Wildman, *et al.* Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758: 1351-1358.
- [9] Yifeng Li, Xia Li, Guangshun Wang. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expression and Purification*, 2006, 47: 498-505.

科技信息

双歧杆菌的多功能

曾有研究发现广西巴马县长寿老人肠道内双歧杆菌(*Bifidobacterium* sp.)数量高于一般人,说明双歧杆菌对人体健康具有奇妙的功效。日本研究人员发现每天摄入大量双歧杆菌有助于预防流感,并对 27 名 65 岁以上老人进行了研究,最初 6 周让每位老人每天服用含 1000 亿个双歧杆菌的粉末(注:相当于 1 L 酸奶的双歧杆菌含量),其间给他们接种了流感疫苗。从第 7 周开始,研究人员将 27 人分成两组,其中一组继续按照前 6 周的剂量服用双歧杆菌,另一组则服用安慰剂。最后,服用安慰剂的研究对象中有 5 人患上流感,而继续服用双歧杆菌的一组则无一人发病。血液检查结果显示,自始至终服用双歧杆菌的人体内白细胞数量多于另一组。结果表明双歧杆菌能提高老人的免疫力,即使疫苗作用减弱,也能降低他们受流感病毒侵扰的机率。其实,双歧杆菌的功能还在于有效生产促进因子—低聚糖如低聚异麦芽糖,在人的肠道系统中发挥其重要作用,如整肠作用、清除人体内垃圾、分解致癌物质、降低血液中的胆固醇水平,预防高血压;还可以合成维生素和氨基酸,防止便秘、下痢;控制许多病原菌和腐败菌的生长,增强机体免疫功能;为开发保健功能食品提供了丰富的原料源,尤其对于生产低聚异麦芽糖的关键酶— α -葡萄糖苷酶具有十分重要的作用。因此,深入研究双歧杆菌七级低聚糖(双歧因子)与转化的关键酶及机制对开发其产品,实现其产业化、商品化均有重要价值。

(柯为供稿)