

类橡胶蛋白 AbAMP1 的重组表达及其抑菌活性研究

邓名荣¹ 龙良鲲¹ 朱红惠^{1*} 曲新勇²

(1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(2. 澳大利亚环宇生物反应器有限公司 澳大利亚)

摘要: 将类橡胶蛋白 AbAMP1 基因克隆至 pPIC9, 获得重组载体 pPIC9-Ab, 线性化后转化 *Pichia pastoris* SMD1163, 筛选获得阳性转化子。取表型为 Mut⁺ 的转化子 AS16 进行诱导表达, 上清经 Tricine-SDS-PAGE 分析, 在约 4.7 kD 处有一条较强主带, 与 AbAMP1 的预期大小相符, 表明获得高效表达。上清经酸性非变性电泳后, 用凝胶琼脂糖弥散法测定其抑菌活性, 在含 *Bacillus thuringiensis* 琼脂糖平板 AbAMP1 对应处有一明显抑菌带, 说明重组表达的 AbAMP1 具有天然活性。上清液抑菌活性试验显示, AbAMP1 对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 以及 *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* 等 G⁺ 细菌均有显著的抑制作用, 而对其它供试丝状真菌、酵母菌以及 G⁻ 细菌无明显抑制作用。

关键词: 类橡胶蛋白, AbAMP1, 重组表达, 抑菌活性

Recombinant Expression and Antimicrobial Assay of Hevein-like Peptide AbAMP1

DENG Ming-Rong¹ LONG Liang-Kun¹ ZHU Hong-Hui^{1*} QU Xin-Yong²

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

(2. Huan Yu Bioreactor Co. Ltd, Australia)

Abstract: The gene of hevein-like peptide AbAMP1 was cloned into the vector pPIC9 successfully. After linearized with restriction enzymes, the recombinant plasmid pPIC9-Ab was transformed into *Pichia pastoris* SMD1163 by electrotransformation. The transformants were screened on MD plate medium, and then identified using PCR method. The transformant AS16 with Mut⁺ phenotype was used for inducing expression and other assays. A protein band of about 4.7 kD was detected on the gel by a tricine-SDS-PAGE analysis of induced culture supernatant, which indicates the protein content of the supernatant of culture after 72 h induction are almost the target peptide AbAMP1. A conspicuous inhibition band formed on a double-layered *B. thuringiensis*-containing plate where AbAMP1 gel band located after acid-native PAGE. This suggested

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2003C50204); 广州市科技计划项目(No. 2004Z3 - I0021)

* 通讯作者: Tel: 020-37656629; 信箱: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-04-30; 接受日期: 2007-07-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

the recombinant expressed AbAMP1 retains its natural antimicrobial activity. The supernatant of induced AS16 culture showed remarkable inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, but no observable inhibition against other filamentous fungi, yeasts or Gram negative bacteria.

Keywords: Hevein-like peptide, AbAMP1, Recombinant expression, Antimicrobial assay

自 1888 年 Stillmark 首次在蓖麻(*Ricinus communis*) 中发现蓖麻毒素以来, 几百种植物凝集素已在各种植物中发现。根据目前的定义, 存在至少一个能与特定糖可逆结合的非催化结构域的植物蛋白, 均可称为植物凝集素^[1]。这是一类十分异源的植物蛋白, 其在植物体内的生理学功能至今仍未明确。但其与植物防御相关的证据越来越多, 许多植物凝集素被发现具有抗真菌、细菌、病毒、昆虫等生物活性^[2]。如异株荨麻(*Urtica dioica*)凝集素(UDA)^[3]、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)的橡胶蛋白(Hevein)^[4]等对植物病原真菌具有广谱的抑制作用, 而从尾穗苋(*Amaranthus caudatus*)种子中分离到的 AcAMP1、AcAMP2 不仅能抑制真菌, 而且对革兰氏阳性细菌也有显著的抑制作用^[5]。目前已有多种凝集素基因在抗病(抗虫)育种中应用, 但寻找新的高抑菌(杀虫)活性的凝集素仍是一个热点之一。

AbAMP1 是从澳洲野生植物种子中分离获得的一种新的具有抑菌活性的类 Hevein 植物凝集素(未发表)。该多肽含 43 个氨基酸, 由 8 个半胱氨酸构成 4 个二硫键形成环状的二级结构, 分子量约 4.73 kD。制备大量的 AbAMP1, 是进一步研究和应用的前提。利用微生物表达外源基因, 制备大量目标蛋白是目前常用的方法。毕赤酵母表达系统是近年来应用较多的表达系统之一, 本文报道了利用该系统表达 AbAMP1 的结果及其抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

质粒 pPIC9(中山大学陆勇军博士惠赠)、PTG/AbAMP1(含 AbAMP1 基因), 受体菌 *Pichia pastoris* SMD1163(*his4*, *pep4*, *prb1*)、*Escherichia coli* Top10。抑菌谱测定菌株: *Aspergillus niger* ATCC16404、*Botrytis cinerea* AS3.3789、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race4、*Paecilomyces varioti* AS3.4253、*Candida albicans* ATCC10231、*Bacillus thuringiensis* AS1.16、*B. subtilis* ATCC6633、*Staphy-*

lococcus aureus subsp. *aureus* ATCC6538、*E. coli* ATCC8739、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027、*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* DSM4224、*Xanthomona campestris* XC05。所有质粒和菌株除特别说明外, 均由广东省微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.2 主要试剂

各种工具酶和 PCR 试剂, 购于宝生物工程(大连)有限公司; 酵母氮源(YNB), 购于 Sigma 公司; 多肽 Marker 购于 BioRad 公司; 琼脂糖(Spanish); SDS、丙稀酰胺, 甲叉双丙稀酰胺等, 均为国产分析纯, 购于广州威佳科技有限公司。

1.3 培养基

Yeast Extract Peptone Dextrose Medium(YPD), Minimal Dextrose Medium(MD), Minimal Methanol Medium(MM), Buffered Glycerol-complex Medium(BMGY), Buffered Methanol-complex Medium(BMMY)等均按 Invitrogen 公司毕赤酵母表达操作手册配方配制*。底层培养基: 0.022%(W/V)营养肉汤(广东环凯微生物科技有限公司), 1%琼脂糖, 顶层培养基: 2×营养肉汤, 1%琼脂糖。

1.4 重组酵母菌的构建

根据 AbAMP1 的序列设计引物, 引物 P1 的 5'端引入 *Xho*I 及 *Kex*2 位点; 引物 P2 的 5'端引入 *Eco*R I 位点, 引物序列为: P1: 5'-CCGCTCGAGA-AAAGAGATCCTACATGTTCA-3'; P2: 5'-CGGAA-TTCCTATTAACCAGGCCAACATTGA-3'。以质粒 PTG/AbAMP1 为模板, 扩增目的基因, PCR 产物用 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切, 纯化后与同样经双酶切的载体 pPIC9 相连接, 连接产物采用氯化钙法转化 *E. coli* Top10, 涂布于含氨苄青霉素平板上筛选。阳性转化子扩繁后抽提质粒, 经 *Eco*R I 和 *Bgl* II 双酶切验证后, 送上海英骏生物技术有限公司进一步测序验证。

抽提重组质粒 pPIC-Ab, 用 *Bgl* II 和 *Sal* I 分别单酶切(两种酶切方式得到 Mut^S/Mut⁺表型的比例不同), 线性化的质粒电转毕赤酵母 SMD1163 (Eppen-

* A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* (Version M) at <http://www.invitrogen.com>.

dorf 电转仪, 电转条件: 1600 V, 5 mS), 同时以 pPIC9 空载体作为对照。取 200 μ L 转化液涂布于 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 筛选转化子。提取转化子总 DNA, 以 P1/P2 为引物, PCR 法验证, 详细步骤参见文献[6]。

1.5 AbAMP1 的表达及产物分析

转化子在 MD 及 MM 平板上表型鉴定后, 经 BMGY 扩大培养, 在 BMMY 中用甲醇诱导表达。表达上清用 Tricine-SDS-PAGE 进行分析^[7], 对表达上清总蛋白用 Bradford 法直接进行定量^[8]。

1.6 AbAMP1 的抑菌活性

AbAMP1 为弱阳离子多肽, 表达上清进行酸性非变性聚丙烯酰胺电泳(Acid native PAGE)^[8], 电泳条件: 反转电极, 100 V 恒压 15 min, 进入分离胶后 160 V 恒压, 至指示剂移动到胶板底部停止。电泳完毕后, 凝胶垂直切成两半, 一半用考马斯亮蓝染色, 另一半采用电泳凝胶琼脂糖弥散法测定抑菌活性^[9], 所用菌为 *B. huringiensis* AS1.16。

AbAMP1 抑菌谱的测定, 真菌采用抑制菌丝生长速率法: 取表达上清液 2 mL 于无菌培养皿内, 与 18 mL 冷却至 45 $^{\circ}$ C 的 PDA 培养基迅速混匀, 凝固后将直径为 5 mm 的供试菌菌饼反接于培养皿中央, 置 25 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 以无菌水处理作为对照, 重复 3 次。菌丝生长抑制率% = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) \times 100 / (对照菌落直径 - 5)。对香蕉枯萎病菌的孢子、酵母和细菌采用琼脂糖扩散法: 冷却至 45 $^{\circ}$ C 的培养基, 加入终浓度 10^5 cfu/mL 的孢子或菌体, 混匀, 每皿 20 mL, 制成含菌平板。打孔器打孔(ϕ 5mm), 孔内加待测上清, 30 μ L/孔, 25 $^{\circ}$ C 培养 1d ~ 3d, 观察抑菌圈的形成。

2 结果与分析

2.1 重组酵母菌的构建

AbAMP1 基因与载体 pPIC9 连接后转化 *E.coli* Top10, 抽提转化子质粒 pPIC-Ab, 用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切, 产生 3 个片段, 分别约 4400 bp、2400 bp、1339 bp, 而对照 pPIC9 载体分别产生约 4400 bp、2400 bp、1210 bp 的 3 个片段(图 1), 表明 AbAMP1 基因已成功插入表达载体。测序结果显示其碱基序列及编码框完全正确(数据未列)。

重组质粒 pPIC-Ab 经 *Bgl* II 和 *Sal* I 分别单酶切, 电转化法导入 SMD1163, 随机挑取 8 个转化子, 抽提总 DNA, PCR 结果显示转化子均能扩增出约 161bp 大小的片段, 而受体菌 SMD1163 对照及空载体 pPIC9 转化子对照均无扩增条带(图 2), 证明

AbAMP1 基因已整合至 SMD1163 基因组中。

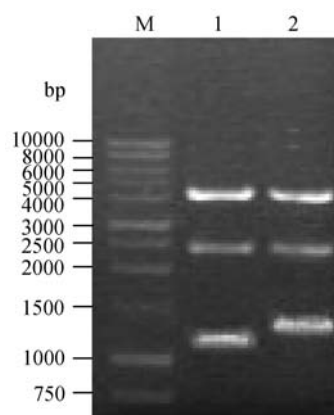


图 1 重组质粒 pPIC-Ab 酶切验证

Fig. 1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pPIC-Ab
M: 分子量标准; 1: 对照 pPIC9 酶切(*EcoR* I / *Bgl* II); 2: 重组质粒 pPIC-Ab 酶切(*EcoR* I and *Bgl* II)

M: DNA marker; 1: pPIC9 digested with *EcoR* I and *Bgl* II; 2: pPIC-Ab digested with *EcoR* I and *Bgl* II



图 2 重组酵母转化子 PCR 验证

Fig. 2 PCR result of yeast transformant

1-8: pPIC-Ab 转化子; 9: pPIC9 转化子; 10: 受体菌 SMD1163;
M: 分子量标准

1-8: transformants with pPIC-Ab; 9: transformant with pPIC9;
10: untransformed SMD1163; M: DNA marker

2.2 AbAMP1 的表达及产物分析

选择表型为 Mut⁺ 的转化子 AS16 用甲醇诱导表达, 取 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 表达上清进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。转化子 AS16 表达上清在约 4.7 kD 处存在蛋白条带, 与 AbAMP1 的预期大小相符, 而 pPIC9 对照转化子诱导 120 h 的上清没有可见条带, 初步表明 AbAMP1 已获得表达, 转化子 AS16 诱导 24 h 后, AbAMP1 已有少量表达, 在 72 h 已有较高的表达量, 至 120 h 保持稳定的表达量(图 3)。

对表达条件进行了初步的优化, 试验表明, 转化子 AS16 在 pH6.0, 28 $^{\circ}$ C 条件下, 一级扩繁 OD 值达到 4 时, 用浓度为 0.8% 的甲醇, 诱导表达 72 h 后, 可获得较高表达量。

Tricine-SDS-PAGE 分析发现, 其表达 72 h 后的上清中, 几乎全为目标蛋白 AbAMP1, 因此, 用 Bradford 法直接对表达上清进行定量, 以 BSA 作为

标准品,测得总蛋白含量约为 133.1 mg/L。

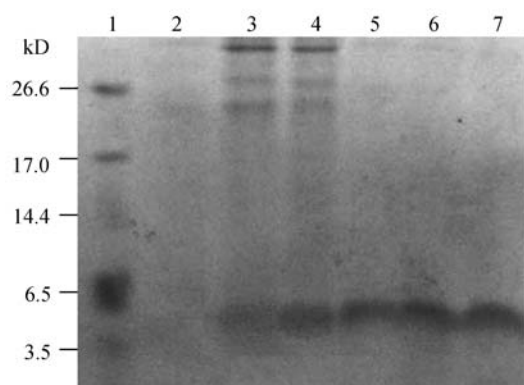


图3 转化子 AS16 表达上清 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE analysis of expressed supernatant of transformant AS16

1: 小分子多肽标准品; 2: 空载体 pPIC9 对照上清; 3-7: 含有 AbAMP1 基因的转化子 AS16 分别诱导表达 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 的上清

1: Peptide marker; 2: Supernatant of negative control transformant induced with methanol for 5d; 3-7: Supernatant of transformant AS16 induced with methanol for 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d

2.3 AbAMP1 的抑菌活性

AbAMP1 为弱阳离子多肽(理论等电点 8.52), 在电场中可借助自身电荷迁移, 酸性非变性电泳后仍可保持原有活性。酸性非变性电泳染色后凝胶中存在单一条带, 并在平板相应位置出现抑菌带, 表明在毕赤酵母中表达的 AbAMP1 具有活性(图 4)。

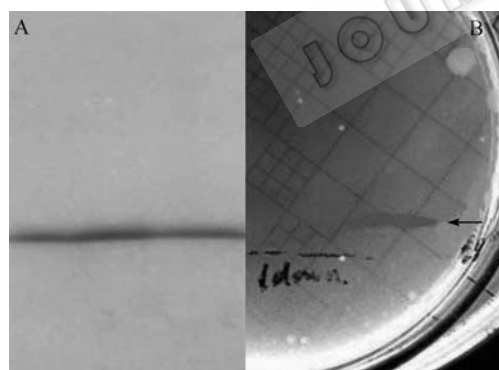


图4 AbAMP1 酸性非变性电泳及抑菌活性验证

Fig. 4 Acid-native PAGE analysis of AbAMP1 and antimicrobial activity of AbAMP1 gel band

A: AbAMP1 酸性非变性电泳染色条带; B: AbAMP1 对 *B. thuringiensis* 的抑菌条带

A: AbAMP1 band stained with Coomassie Brilliant Blue R-250; B: AbAMP1 gel band showed inhibition activity to *B. thuringiensis* on plate

表达上清所含蛋白主要是 AbAMP1, 因此直接用上清进行抑菌谱的测定。菌丝生长速率法试验表明, AbAMP1 对香蕉枯萎病菌具有较强的抑制作用, 抑制率达 82.3%, 而对黑曲霉、拟青霉等丝状真菌均

没有明显的抑制作用。琼脂糖扩散法试验显示, AbAMP1 对苏云金杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、香蕉枯萎病菌的孢子均有明显的抑制作用, 但对大肠杆菌、铜绿假单胞、酵母没有抑制作用(图 5)。AbAMP1 的抑菌活性表现为对革兰氏阳性细菌具有一定的广谱性, 而对丝状真菌中的香蕉枯萎病菌又有特异性。

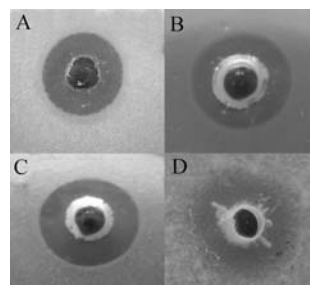


图5 AbAMP1 的抑菌作用

Fig. 5 Antimicrobial assay of supernatant containing AbAMP1

A: 苏云金杆菌; B: 金黄色葡萄球菌; C: 枯草芽孢杆菌; D: 香蕉枯萎病菌

A: *Bacillus thuringiensis* AS1.16; B: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC6538; C: *B. subtilis* ATCC6633; D: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race4

3 讨论

本研究通过构建重组表达载体 pPIC-Ab, 在毕赤酵母 SMD1163 中成功获得了 AbAMP1 的分泌表达。两种线性化方式, *Bgl* II 酶切转化获得的转化子以甲醇利用缓慢型(*Mut*^S)为主, *Sal* I 酶切转化获得的转化子甲醇利用正常型为主(*Mut*⁺)。试验表明, *Mut*⁺ 转化子的表达效率优于 *Mut*^S 转化子。在试验过程中, 我们首先采用 GS115 作为受体菌, 但表达不稳定, 改用蛋白酶缺陷型的 SMD1163 后, AbAMP1 获得了较为稳定的表达, 表明 AbAMP1 可能对某些蛋白酶较敏感。经初步的表达条件优化, 其总蛋白含量可达 133.1 mg/L, 但作为一种抗菌产品开发, 仍需进一步提高表达量。

表达上清经酸性非变性电泳后, 只有带正电荷的蛋白质能进入凝胶中, 且仍保留其原来的活性。凝胶琼脂糖扩散法表明, 重组获得的 AbAMP1 具有抑菌活性。由于上清总蛋白中, 其它蛋白质很少, 直接用表达上清研究 AbAMP1 的抑菌活性, 其数据是可信的。

AbAMP1 是一种橡胶蛋白类凝集素, 与 hevein、UDA、AcAMP2 的同源率分别为 40.9%、34.9%、28.1%。这类凝集素均具有抗真菌活性, 其确切的机制仍未揭示, 但有证据显示与其几丁质结合活性有着

密切的联系^[1]。Hevein 和 UDA 抗真菌的活性较弱, 它们不影响真菌的新陈代谢, 而是通过破坏细胞壁中几丁质的合成和累积从而抑制了真菌的生长发育^[10]。AcAMP2 不仅有着较强的抗真菌活性, 而且对革兰氏阳性细菌也有显著的抑制作用^[5]。这种对细菌的抑制作用可能仍与其结合活性有关, 有研究表明^[11], 几种豆科种子凝集素对胞壁酸、N-乙酰胞壁酸、胞壁酰二肽均有较强的结合作用。这类凝集素对革兰氏阴性细菌普遍没有抑制作用, 这可能是由于革兰氏阴性细菌细胞壁外层还有一层脂质外膜, 干扰了凝集素与细胞壁的结合。本研究中的 AbAMP1 与 AcAMP2 有相似之处, 对真菌、革兰氏阳性细菌均有抑制作用, 但不同的是 AcAMP2 对真菌的抑制是广谱的, 而 AbAMP1 仅对香蕉枯萎病菌有特异的抑制作用, 其抑菌机理仍有待研究。AbAMP1 对香蕉枯萎病菌的特异抑制作用, 使得 AbAMP1 在香蕉枯萎病防治中有着广阔的应用前景; 对革兰氏阳性细菌的广谱抑制作用, 也使 AbAMP1 成为一个有潜在应用价值的肽类抗生素。

本研究在毕赤酵母中重组表达获得了具有抑菌活性的类橡胶蛋白 AbAMP1, 为以后开展糖结合特性、结构与活性的关系、抑菌机理及活性影响因素等方面的研究奠定了基础; 但作为应用, 其表达量仍需进一步提高。

参 考 文 献

- [1] Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Crit Rev Plant Sci*, 1998, **17**(6): 575–692.
- [2] Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiol*, 1995, **109**(2): 347–352.
- [3] Broekaert WF, Van Parijs J, Leyns F, *et al.* A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. *Science*, 1989, **245**(4922): 1100–1102.
- [4] Van Parijs J, Broekaert WF, Goldstein IJ, *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 1991, **183**(2): 258–262.
- [5] Broekaert WF, Marien W, Terras FRG, *et al.* Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 1992, **31**(17): 4308–4314.
- [6] 龙良鲲, 邓名荣, 曲新勇, 等. 植物防御素 PD5 基因在毕赤酵母中的分泌表达. 微生物学通报, 2006, **33**(5): 65–69.
- [7] 张晓楠, 曹云新, 程司堃, 等. 用于测定小分子多肽的两种电泳方法的比较. 生物工程进展, 2001, **21**(3): 74–75.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册, 北京: 科学出版社, 2002, pp. 42–46, pp. 111–120.
- [9] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, *et al.* Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods*, 1991, **137**(2): 167–173.
- [10] Ayoub A, Causse H, Van Damme EJM, *et al.* Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem Syst Ecol*, 1994, **22**(2): 153–159.
- [11] Van Parijs J, Joosen HM, Peumans WJ, *et al.* Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeana* Burgeff. *Arch Microbiol*, 1992, **158**(1): 19–25.

稿件规范化与标准化

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*HI、*Eco*RI、*Msp*I、*Sau*3AI 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。