

研究报告

泥鳅抗菌肽在毕赤酵母 SMD1168 中的高效表达及活性检测

马萍^{1,2} 薛林贵^{1,2*} 尚海^{1,2} 何小燕^{1,2} 谢长庚³ 王霞^{1,2}
范桃桃^{1,2} 陈熙明² 姜金融^{1,2} 李婷²

(1. 兰州交通大学化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 中国科学院西北生态环境资源研究院沙漠与沙漠化重点实验室 甘肃 兰州 730000)

(3. 兰州大学细胞活动与逆境适应教育部重点实验室 甘肃 兰州 730000)

摘要:【背景】泥鳅抗菌肽 Misgurin 是泥鳅非特异性免疫防御系统的重要组成部分, 具有广谱和较强的抗菌能力, 所以获得大量抗菌肽是很有必要的。【目的】为了实现高效表达泥鳅抗菌肽 Misgurin。【方法】将泥鳅抗菌肽的目的基因与 pPIC9K 表达载体连接, 构建重组表达质粒 pPIC9K-misgurin, *Sal*I 酶切线性化, 再通过电击法将其整合到毕赤酵母 SMD1168 染色体上。在 MD 固体培养基挑选阳性克隆子到 MD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 摇瓶培养 96 h, 转接到 BMMY 液体培养基进行诱导表达, 每隔 24 h 加入 5% 的甲醇。通过比较抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈直径的大小, 筛选出活性较高的菌株 pPIC9K-misgurin-22。将该菌株在 100 L 的发酵罐中诱导表达, 48 h 后进行活性检测。【结果】经 Tricine-SDS-PAGE 蛋白胶检测和质谱分析鉴定, pPIC9K-misgurin-22 菌株诱导表达的活性物质为抗菌肽 Misgurin。发酵罐发酵 48 h 相对于摇瓶发酵 48 h, 抗大肠杆菌的生物效价提高了 1.47 倍, 抗金黄色葡萄球菌的生物效价提高了 1.43 倍; 抗菌肽 Misgurin 对鲍曼不动杆菌、沙门氏菌有较弱的抗菌活性, 对致病菌产气荚膜梭菌和益生菌如枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、乳酸菌没有抗菌活性, 无明显溶血活性; 当温度达到 90 °C 时发酵液的抗菌活性明显减弱, 调发酵液的 pH 值在 1.0–12.0 之间都有抗菌活性; 加入胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 后抗菌活性减弱。【结论】获得了一株在毕赤酵母中表达量较高、有工业化生产潜力的产抗菌肽 Misgurin 的菌株。

关键词: 泥鳅抗菌肽, 毕赤酵母, 发酵, 抑菌活性, 溶血活性, 耐酸碱

Foundation items: Science and Technology Support Program of Gansu Province (1504FKCA015); National Natural Science Foundation of China (31260135, 31400437)

*Corresponding author: Tel: 86-931-4938702; E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

Received: July 20, 2017; **Accepted:** December 08, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 20, 2017

基金项目: 甘肃省科技支撑计划(1504FKCA015); 国家自然科学基金(31260135, 31400437)

*通信作者: Tel: 86-931-4938702; E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

收稿日期: 2017-07-20; **接受日期:** 2017-12-08; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-20

High-level expression in *Pichia pastoris* SMD1168 of misgurin and its antimicrobial activity

MA Ping^{1,2} XUE Lin-Gui^{1,2*} SHANG Hai^{1,2} HE Xiao-Yan^{1,2} XIE Chang-Geng³
WANG Xia^{1,2} FAN Tao-Tao^{1,2} CHEN Xi-Ming² JIANG Jin-Rong^{1,2} LI Ting²

(1. School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. Key Laboratory of Desert and Desertification, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China)

(3. Ministry of Education Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: [Background] Misgurin is an important component of nonspecific immune defense system in *Misgurnus anguillicaudatus*. It has broad spectrum and strong antimicrobial ability. Therefore, it is necessary to obtain large quantities of antimicrobial peptides. [Objective] To achieve high-efficient expression of misgurin. [Methods] Misgurin gene was cloned into expression vector pPIC9K in order to construct recombinant expression plasmid pPIC9K-misgurin. Using *Sal* I restriction endonuclease digest linearization scheme, the recombinant expression vector was integrated into the chromosome of *Pichia pastoris* SMD1168 by electric shock method. The positive single colonies was screened through minimal dextrose (MD) solid medium, which was inoculated MD liquid medium at 30 °C, 200 r/min shake flask for 96 h before transfer to BMMY liquid medium to induce expression, adding 5% methanol every 24 h. By comparing the diameter of bacteriostasis circle of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, strain pPIC9K-misgurin-22 with the better antimicrobial activity was screened out and inoculated to a 100 L of fermentor induction for 48 h and then detected of activity. [Results] This active substance of pPIC9K-misgurin-22 strain was identified as misgurin by Tricine-SDS-PAGE protein gel detection and mass spectrometry analysis. In comparison with shaking flask fermentation, the bioavailability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fermentor fermentation increased by 1.47 fold, 1.43 fold, respectively; misgurin has weak antimicrobial activity to *Acinetobacter baumannii* and *Salmonella*. It has no antimicrobial activity to *Clostridium perfringens* and probiotics (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus*), and has no obvious hemolytic activity; When the temperature reaches 90 °C, the antimicrobial activity of fermentation broth is obviously weakened, the pH value of fermentation broth at 1.0–12.0, everyone has antimicrobial activity; The antimicrobial activity is weakened after adding trypsin, pepsin and protease K. [Conclusion] A strain producing misgurin is obtained, which has high expression and industrialized production potential in *Pichia pastoris*.

Keywords: Misgurin, *Pichia pastoris*, Fermentation, Antimicrobial activity, Hemolytic activity, Tolerance acid and alkali

泥鳅是分布于亚洲沿岸的底层经济鱼类, 营养价值较高, 曾与人参相媲美。目前, 泥鳅自身抵抗外源致病菌产生的天然免疫活性物质成为国内外的研究热点, 这种活性物质被称为抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)。抗菌肽是存在于宿主防御系统的小分子阳离子多肽, 广泛分布于寄主生物, 包括植物、动物和人类中, 一般由 30–100 个氨基酸组成^[1-2]。大部分抗菌肽共有的特征: (1) 具有广谱的

抗菌活性如抗细菌、真菌和病毒; (2) 多数具有两亲性的二级结构, 分子量小及抗菌活性较高; (3) 耐高温、杀菌过程中不易产生耐药性; (4) 对人体及环境副作用小等优点^[3-4]。Park 等^[5]和裴颖等^[6]采用物理方法将新鲜的泥鳅搅拌均质化后获得天然抗菌肽; 龚杰万^[7]利用化学合成法合成了 Misgurin 基因和接头, 在体外将基因多拷贝同向串联并与 pPIC9K 连接, 电击转入到毕赤酵母 GS115 中, 异

源表达获得抗菌肽。上述方法均能获得泥鳅抗菌肽,但产量较低,技术难度及成本过高。目前,基因工程合成法是世界公认且使用最普遍的方法。泥鳅抗菌肽 Misgurin 是由泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)产生的强碱性小分子抗菌肽, cDNA 序列全长 63 bp, 编码 21 个氨基酸残基, 分子量为 2 501.9 Da, 等电点为 11.84, 含极性带正电荷的 4 个赖氨酸和 5 个精氨酸残基, 还有 1 个亲水性甘氨酸用于提高对革兰氏阴性菌的杀菌能力。该抗菌肽氨基酸序列为 RQRVEELSKFSKKGAAARRRK, 不含半胱氨酸, 可折叠成亲水性或疏水性 α -螺旋结构。有研究表明, 小分子抗菌肽的抗菌活性较高, 更具有研究价值^[8]。抗菌肽杀菌属于电荷效应, 生物功能包括: 直接杀菌、免疫调节、免疫激活和免疫抑制的作用^[9]。

中试工艺是连接研发和生产的重要平台, 是科技成果向生产力转化的重要环节^[10]。发酵工艺的特点在于成本最低化和目的蛋白表达量的最大化。本实验主要利用毕赤酵母表达系统的优点: 表达产物分泌至胞外、杂蛋白少、易于纯化、快速表达、可高密度培养、遗传稳定性高等^[11-12], 还有毕赤酵母细胞特有的甲醇代谢所必需的 AOX I 基因, 先用含葡萄糖的 YDFM 培养基大量发酵已筛选的阳性菌株, 再用 BSM 培养基高密度发酵, 此时 AOX I 启动子被抑制, 待葡萄糖耗尽后转接到不含葡萄糖的 BMMY 培养基加甲醇, AOX I 启动子开启, 甲醇作为唯一碳源诱导毕赤酵母异源表达抗菌肽。相关研究表明抗菌肽在高盐浓度时抑菌效果会大大降低^[13], 发酵过程中 BSM 和 YDFM 培养基都含大量的盐, 如硫酸钾、硫酸镁、硫酸钙、硫酸铵、氯化钠、氯化钾等, 有可能对抗菌肽活性产生屏蔽效应, 检测不到活性, 可通过倍比稀释降低盐离子浓度发挥最大抗菌效果。本研究包括基因合成、重组表达载体的构建、泥鳅抗菌肽的表达与活性检测、发酵罐诱导发酵、抗菌肽抗菌谱的确定、溶血活性检测、耐高温、耐酸碱和耐消化酶实验及抗菌肽纯化等内容, 较系统地研究了泥鳅抗菌肽, 为其他抗菌肽在毕赤酵母表达及发酵罐发酵方面提供

参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

毕赤酵母宿主菌 SMD1168 和 pPIC9K 载体购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、产气荚膜杆菌、枯草芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、粪肠球菌和乳酸菌由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和 Fungal DNA Kit 购自 Omega Bio-Tek 公司; Sal I 酶购自 NEB 公司; 脱纤维绵羊血、血液琼脂基础、胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 购自北京索莱宝科技有限公司; Nutrient broth 培养基购自北京兰伯瑞生物技术有限公司; Thermo 26628 预染蛋白小分子量 Marker 购自上海力敏实业有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; PCR 仪, 吉泰生物有限责任公司; 凝胶成像仪, 吉泰生物有限责任公司; 恒温培养箱、恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 小型垂直蛋白电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因合成及表达载体的构建

根据已知泥鳅抗菌肽 Misgurin 的氨基酸序列, 以毕赤酵母密码子偏好性为原则, 设计并基因合成泥鳅抗菌肽。在序列两端添加 Xho I 和 Not I 限制性内切酶位点, Xho I 和序列前端之间添加 Kex 2 蛋白酶切位点, 序列末端和 Not I 之间添加终止密码子。由杭州研真生物科技有限公司进行基因合成。

1.2.2 重组表达载体的转化及表达

用 Xho I 和 Not I 双酶切获得目的基因, 将目的基因与 pPIC9K 表达载体用 T4 DNA 连接酶连接, CaCl₂ 法转入到大肠杆菌 DH5 α 中, 37 °C 培养挑选 7 个单菌落进行测序鉴定。将鉴定正确的含重组表达质粒的大肠杆菌用液体 LB 培养基 30 °C、

200 r/min 培养 24 h, 质粒提取试剂盒提取质粒。*Sal* I 酶切线性化: 60 μ L 的重组质粒中加入 6 μ L 的 NE buffer, 4 μ L *Sal* I 酶, 放入 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h, 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒回收。挑毕赤酵母宿主菌 SMD1168 单菌落到 YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h, 待 OD_{600} 为 2–6 时显微镜镜检, 无杂菌后 6 000 r/min 离心 2 min, 弃上清后分别用等体积的无菌水和占总体积 1/2 的 10% 的甘油重悬, 6 000 r/min 离心 2 min 后弃上清, 加入 1 mol/L 的山梨醇制备成感受态。线性化的质粒电击导入到毕赤酵母感受态中, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱孵育 3 h。每 200 μ L 涂 MD 固体的培养皿。MD 培养基属于组氨酸缺陷型培养基, 所有的表达质粒都有 *His4* 基因, 当毕赤酵母染色体上整合重组质粒载体基因时, 毕赤酵母才能正常生长, 利用这种方法筛出重组菌株。培养 4 d 左右长出单菌落后, 每个平板挑 5 个乳白色、表面湿润、有光泽、圆形、边缘整齐、不透明的单菌落, 共 25 个, 分别用 1–25 进行编号。MD 液体 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养基培养 96 h 后转接到 BMMY 中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 开始诱导, 每 24 h 加一次甲醇, 甲醇终浓度为 0.5%, 分别在 24、48、72、96、120 h 取样, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液–80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.3 泥鳅抗菌肽的表达与活性检测

50% 的 Nutrient broth 培养基配方: Nutrient broth 培养基 6.5 g, 琼脂 20.0 g, 加 1 L 蒸馏水, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。待培养基温度降至 40 $^{\circ}$ C 左右, 每 30 mL 50% 的 Nutrient broth 培养基分别加入 30 μ L OD_{600} 为 1.0 的新鲜大肠杆菌和金黄色葡萄球菌混合倒平板, 待凝固后用酒精灯灼烧过的打孔器打孔, 每孔加入 65 μ L 上清液, 将 125 个上清液样品(摇瓶发酵液经 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清用 0.22 μ m 过滤器过滤后获得的上清液)全部加完, 初次检测抗菌活性。经多次筛选后获得一株抗菌活性较好、表达量较稳定的 pPIC9K-misgurin-22 号菌株。用 Fungal DNA Kit 提取 22 号菌株的 DNA, 设计引物 (5'-AGAACTTAATCTGGTTTGATCATGC-3') 和

(5'-TTACTTTCTCCTACGGGCAGCGGC-3'), 交由华大基因合成。PCR 反应体系: ddH₂O 10.5 μ L, Green Taq Mix 12.5 μ L, DNA 1 μ L, 引物混合物 1 μ L (上、下游引物浓度都为 100 μ mol/L, 上、下游引物各取 5 μ L 加入 90 μ L ddH₂O 配成引物混合物, 其浓度为 10 μ mol/L)。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min, 30 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 泥鳅抗菌肽摇瓶发酵

将筛选到的 pPIC9K-misgurin-22 号菌株挑单菌落于 15 mL 液体 MD 培养基中培养, 通过检测 24、48、72、96 h 的 OD_{600} 值发现, 24 h 其 OD_{600} 值增长最快, 48 h 时 OD_{600} 值不变, 72 h 开始 OD_{600} 值缓慢降低。挑该菌株的单菌落于 MD 中, 96 h 后葡萄糖耗尽时转接到 BMMY 中, 诱导 0–120 h, 每 24 h 分别取样后加 5% 的甲醇。将获得的样品除检测抑菌活性外, 还需在冰水浴中进行 Tricine-SDS-PAGE 小分子蛋白胶鉴定。

溶液的配制: (1) 3 C 丙烯酰胺储存液: 丙烯酰胺 49.5 g, 甲叉双丙烯酰胺 3 g, 加蒸馏水定容至 100 mL; (2) 6 C 丙烯酰胺储存液: 丙烯酰胺 49.5 g, 甲叉双丙烯酰胺 6 g, 加蒸馏水定容至 100 mL; (3) 上样缓冲液: 12% SDS, 6% β -巯基乙醇, 30% 甘油, 0.05% 考马斯亮蓝 G-250, 150 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0); (4) 凝胶缓冲液(3 \times): Tris 181.71 g, SDS 1.50 g, 溶于 400 mL 蒸馏水, 用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 为 8.45, 蒸馏水定容至 500 mL; (5) 正极缓冲液: 121.14 g Tris 溶于 400 mL 水, 用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 为 8.9, 蒸馏水定容至 500 mL; (6) 负极缓冲液: 60.55 g Tris, 89.58 g Tricine, 5 g SDS, 加蒸馏水定容至 500 mL。

凝胶的配制: (1) 4% 的浓缩胶: 3 C 0.2 mL, 凝胶缓冲液(3 \times) 0.6 mL, 水 1.6 mL, 过硫酸铵(10%) 30 μ L, TEMED 3 μ L; (2) 10% 的分离胶: 6 C 1.2 mL, 的凝胶缓冲液(3 \times) 2 mL, 50% 的甘油 1 mL, 水 1.8 mL, 过硫酸铵(10%) 60 μ L, TEMED 6 μ L。电泳时, 浓缩胶用 30 V 电压, 到分离胶时电压调到 90 V。

生物效价^[14]的计算方法：生物效价 $U=2X \times 1\,000 \times \text{稀释倍数}$ ， $X=(Y-4)/2.1$ ， Y 是抗菌肽抑菌圈平均直径(mm)，4 指孔的直径(mm)，2.1 是抗菌肽浓度与抑菌圈直径的比值常数，稀释倍数为 1.583×10^4 。

1.2.5 泥鳅抗菌肽 100 L 发酵罐发酵

用 100 L 的发酵罐诱导，先用 YDFM 培养基培养，菌液浓度较高时用 BSM 高密度培养基发酵，再用 BMMY 培养基加甲醇诱导。发酵过程的重要参数如表 1 所示。

培养过程中，葡萄糖(500 g/L)完全耗尽后开始流加甲醇，刚进料酵母需要适应甲醇，进料速度不能太快。代谢甲醇的过程中会产生热量，因此这个阶段的温度控制很重要，一般通过水箱来调节温度。泥鳅抗菌肽是带正电荷的酸性物质，发酵过程中可通过监测 pH 的变化间接判断抗菌肽的产量变化。发酵罐发酵 48 h，pH 为 7.43 的发酵液 12 000 r/min 离心 2 min，取上清用 0.22 μm 的过滤器过滤除菌，50%的 Nutrient broth 固体培养基分别加入大肠杆菌和金黄色葡萄球菌混合倒入培养皿中，凝固后打孔加入 65 μL 的无菌上清。抗菌肽发挥抗菌效果主要在于电荷效应，有研究表明抗菌肽 pH 为 6.0 时抑菌活性损失最大^[15]。本实验在筛选高效菌株时，将 125 个含抗菌肽的上清液调 pH 为 5.1–5.4 之间，发现通过摇瓶发酵获得的发酵液在这

个 pH 范围内活性没有明显变化，而且不影响大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长，因此将发酵液 pH 调至 5.1–5.4 后用于下面实验。在 120 mL 50%的 Nutrient broth 液体培养基中，加入 120 μL 已培养的 OD_{600} 为 0.6 的新鲜大肠杆菌菌液做液体抑菌试验，每 5 mL 分装到 24 个 50 mL 的离心管，每 3 个离心管为一组，8 组中分别加入 0–1 600 μL 的发酵液，通过 OD_{600} 值的变化间接反应抗菌活性强弱。

1.2.6 泥鳅抗菌肽抗菌谱的确定

配制 50%的 Nutrient broth 培养基， 1×10^5 Pa 灭菌 20 min，温度降至 40 °C 左右，取 6 个无菌的 50 mL 离心管，每个管中加入 30 mL 上述培养基，分别加入 30 μL OD_{600} 为 1.0 的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、沙门氏菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌液上下颠倒混匀，倒固体平板，待凝固后用酒精灯灼烧过的打孔器打孔，每孔加入 65 μL 上清液(发酵液经 12 000 r/min 离心 2 min，取上清用 0.22 μm 过滤器过滤后获得的上清液)，检测抗菌活性。产气荚膜梭菌和乳酸菌分别在液体的肉汤培养基和 YPD 培养基并加液体石蜡厌氧培养后测抗菌活性。液体抑菌实验时用 33 个 50 mL 灭菌处理的离心管，每管加入 5 mL 已配制好的培养基，加入相对应的菌液，每管含产气荚膜梭菌的培养基平均 OD_{600} 为 0.424，含乳酸菌的培养基的每个离心管平均 OD_{600} 为 0.133。33 个离心管中除 3 个对照外其余每 10 个

表 1 监控整个发酵过程中的重要参数

Table 1 Monitor the important parameters during the whole fermentation process

发酵参数 Fermentation parameters	发酵过程 Fermentation process		原因 Reason
	培养过程 Culture process	诱导过程 Induction process	
Temperature	28 °C	28 °C	当温度超过 32 °C，不利于毕赤酵母生长，也会使有害蛋白表达
Dissolved oxygen	>20%	>20%	确保毕赤酵母正常生长
pH	6.0	6.8	确保毕赤酵母生长和诱导分泌泥鳅抗菌肽
Stirring speed	500 r/min	500 r/min	最大限度地提高发酵罐中氧气的浓度
Ventilatory volume	1.5 m ³ /min	1.5 m ³ /min	提供充足的氧气
Amount of defoamer added	0.5‰	0.5‰	抑制或消除泡沫，加入量过高会导致分泌变性蛋白
Culture medium	YDFM	BSM, BMMY	不同的培养基先让毕赤酵母大量生长后再开始诱导
PTM trace salt	4.25 mL/L	12 mL/L	提供微量元素

为 1 组, 分别加入 10–100 μL 的发酵液培养 5 h 后测 OD_{600} 值。

1.2.7 泥鳅抗菌肽溶血活性检测

4.5 g 的血液琼脂基础培养基加 100 mL 蒸馏水 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 待培养基温度降至 55 $^{\circ}\text{C}$ 时加 7 mL 脱纤维绵羊血摇匀, 每 30 mL 的血液培养基倒入 90 mm 的培养皿中, 凝固后打孔, 孔内加入 65 μL 的发酵液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 4–6 h。

1.2.8 泥鳅抗菌肽耐高温、酸碱和消化酶实验

耐高温实验: 将处理好的发酵液在 60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 分别处理 1、2、3 h 后检测对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性的变化。耐酸碱实验: 耐酸碱实验过程中先将发酵液 pH 值分别调到 1.0–12.0, 不同 pH 值的发酵液分别室温处理 1、2、3、4、5 h, 总共 60 个样品, 然后将这些样品的 pH 值回调至 5.1–5.4, 测定抗菌肽活性变化。耐消化酶实验: 用 1、2.5、5、10 U 的胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 对发酵液 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴分别处理 0.5、1、2、3 h, 检测抗菌活性的变化。

1.2.9 泥鳅抗菌肽的纯化

将发酵液 12 000 r/min 离心 2 min 去除酵母, 上清与丙酮的体积比为 1:9, 室温沉淀 30 min, 12 000 r/min 再次离心 2 min 去除部分亲脂蛋白, 取上清用旋转蒸发器蒸发, 将丙酮回收利用, 获得浓

度较高的蛋白溶液, 将纯化后的样品送到中国科学院化学物理研究所进行质谱分析。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的结构图谱及 PCR 扩增泥鳅抗菌肽基因表达片段

泥鳅抗菌肽基因与 pPIC9K 载体成功连接, 构建重组质粒经基因测序结果显示, 基因序列 100% 正确且无碱基突变。图 1A 为重组质粒结构图谱, 箭头表示 PCR 扩增片段。Sal I 酶切线性化重组质粒, 用电击法导入到毕赤酵母中, 筛选出高效表达的 pPIC9K-misgurin-22 号菌株, 提取 DNA, 设计特异性引物, PCR 扩增含泥鳅抗菌肽目的基因, 理论应获得 2 524 bp 的基因片段, 从图 1B 中可以看出, 已经获得了与理论值相等的片段, 证明获得的 pPIC9K-misgurin-22 号菌株表达的泥鳅抗菌肽的目的基因整合到毕赤酵母染色体上。

2.2 摇瓶诱导效果

挑选的 25 株菌加甲醇共诱导 120 h, 每 24 h 取样检测抑菌活性, 其中有 10 株菌有抑菌活性, 同时抗大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 其中活性较强的只有 pPIC9K-misgurin-22 号菌株, 最终确定 pPIC9K-misgurin-22 号为实验获得的高产菌株。摇瓶诱导结果如表 2 所示: 在 48 h 活性达到最高,

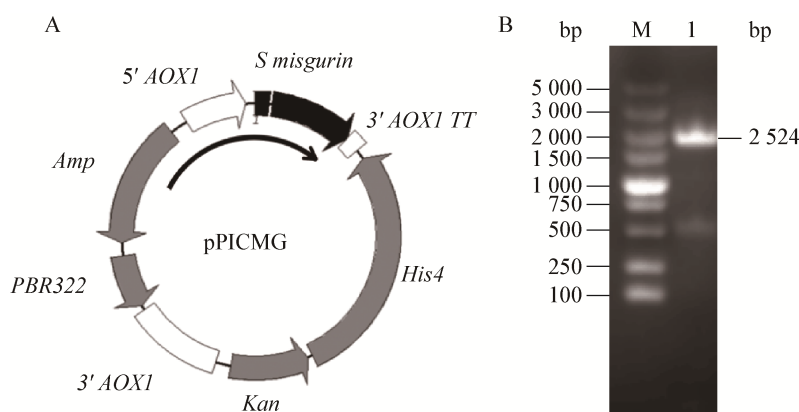


图 1 重组质粒结构图谱(A)及 PCR 扩增泥鳅抗菌肽基因(B)

Figure 1 Structure map of recombinant plasmid (A) and misgurin gene after PCR amplification (B)

注: M: 5000 bp DNA marker; 1: PCR 产物。

Note: M: 5000 bp DNA marker; 1: PCR product.

表 2 摇瓶发酵液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制(抑菌圈直径, cm)
Table 2 Inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by shake flask fermentation (diameter of bacteriostasis circle, cm)

菌株 Strains	Time (h)				
	24	48	72	96	120
<i>Escherichia coli</i>	1.483±0.076	1.683±0.577	1.617±0.577	1.567±0.076	1.350±0.050
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.417±0.014	1.500±0.071	1.475±0.035	1.383±0.012	1.217±0.029

抗大肠杆菌的抑菌圈平均直径为 1.683 cm, 生物效价为 10.62×10^8 U/g, 抗金黄色葡萄球菌的抑菌圈平均直径为 1.5 cm, 生物效价为 5.804×10^8 U/g, 96 h 活性开始降低, 120 h 时活性更弱。随着诱导时间的延长, 可能受到溶氧量不足、甲醇供给不及时、营养物质缺乏等因素的限制, 抗菌肽活性逐渐降低。

将 22 号菌株诱导不同时间段的发酵液 Tricine-SDS-PAGE 小分子量蛋白胶鉴定, 其结果如图 2 所示: 泥鳅抗菌肽的理论分子量为 2 501.9 Da, 与实验获得的蛋白分子量相等, 证明此活性蛋白是泥鳅抗菌肽; 在 24、48、72、96、120 h 时间段条带的亮度与抑菌圈的大小基本符合。

2.3 发酵液的抑菌活性

泥鳅抗菌肽菌株 pPIC9K-misgurin-22 在 100 L 的发酵罐中发酵 48 h, 用 50% 的 Nutrient broth 固体培养基与新鲜的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌混合倒平板做抑菌实验, 结果如图 3 所示, 当泥鳅抗菌肽作用于大肠杆菌时, 抑菌圈直径为 1.8 cm, 生物效价为 15.66×10^8 U/g; 作用于金黄色葡萄球菌时, 抑菌圈直径为 1.6 cm, 生物效价为 8.31×10^8 U/g。发酵罐培养 48 h 相对于摇瓶诱导 48 h, 抗大肠杆菌的生物效价提高了 1.47 倍, 抗金黄色葡萄球菌的生

物效价提高了 1.43 倍。发酵罐满足了毕赤酵母表达泥鳅抗菌肽的必要条件, 通过监测仪实时补充能源物质, 氧气充足, AOX I 启动子正常开启, 提高了抗菌肽的表达量。发酵液的原 pH 值为 7.03, 经丙酮沉淀, 旋转蒸发仪处理后 pH 值下降到 4.23, 说明泥鳅抗菌肽是带正电荷的酸性物质。将发酵液稀释 2、4、8、16 倍后作用于大肠杆菌, 稀释 2 倍和 4 倍的抑菌圈直径分别为 1.3 cm 和 0.8 cm, 稀释 2 倍后作用于金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为 0.85 cm, 其余稀释倍数均没有抑菌活性。发酵液稀释过程中降低了盐离子浓度的同时也大幅度降低了抑菌活性。

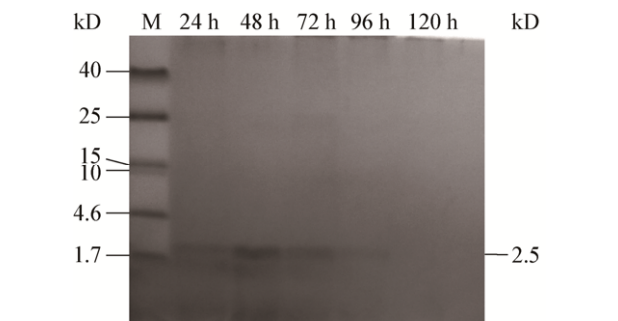


图 2 Tricine-SDS-PAGE 小分子量蛋白胶鉴定
Figure 2 Tricine-SDS-PAGE identification of small molecular weight protein gel

注: M: 预染蛋白小分子量 Marker.
Note: M: Small molecular weight of predyed protein marker.



图 3 抗大肠杆菌和抗金黄色葡萄球菌的抑菌圈
Figure 3 Inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteriostasis circle

注: 1、2、3 分别代表发酵液原液、2 倍稀释、4 倍稀释后抗大肠杆菌的抑菌圈图; 4、5、6 分别代表发酵液原液、2 倍稀释、4 倍稀释后抗金黄色葡萄球菌的抑菌圈图。

Note: 1, 2 and 3 respectively represent the fermentation broth, 2 times dilution, and 4 times dilution inhibition of *Escherichia coli* bacteriostasis circle; 4, 5 and 6 respectively represent the fermentation broth, 2 times dilution, and 4 times dilution inhibition of *Staphylococcus aureus* bacteriostasis circle.

从图 4 中可明显看出当 50% 的 Nutrient broth 培养基中只含大肠杆菌即对照组, 培养 5 h 和 10 h 后 OD_{600} 平均值分别为 0.066 和 0.819。培养 5 h 时当发酵液加入量为 200 μL 后 OD_{600} 平均值为 0.033, 是对照组 OD_{600} 值的一半。培养 10 h 时发酵液加入量为 100 μL OD_{600} 平均值为 0.433, 是对照组 OD_{600} 值的一半。培养 10 h, 含大肠杆菌的培养基中随着加入发酵液的量增加抑制效果更明显, 说明泥鳅抗菌肽对大肠杆菌的抑菌能力非常好。

2.4 抗菌谱

发酵罐发酵获得的上清液与鲍曼不动杆菌、沙门氏菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌做固体抑菌实验, 结果显示, 对鲍曼不动杆菌和沙门氏菌有微弱抗性, 抑菌圈直径均为 0.7 cm, 对粪肠球菌和枯草芽孢杆菌无抗菌活性。对产气荚膜梭菌和乳酸菌做液体抑菌实验, 通过检测 OD_{600} 反映抑菌效果, 结果如表 3 所示。从表 3 中可以明显看出发酵液对产气荚膜梭菌和乳酸菌没有抑制效应, 随着发酵液量的增加, 乳酸菌和产气荚膜梭菌有增长趋势。

2.5 抗菌肽溶血活性检测

抗菌肽的溶血活性直接反应了其在生物体内应用的生物安全性^[16]。抗菌肽发生溶血的机制主要是: 改变红细胞膜的渗透性, 促使红细胞破裂, 血红蛋白从细胞内逸出出现溶血的现象。图 5 中的 A 孔中加入的是把发酵液原液经 12 000 r/min 离心 2 min, 0.22 μm 过滤器过滤后的液体, 溶血活性较弱。图 5 中的 B 孔中加入的是发酵液原液经 12 000 r/min 离心 2 min, 0.22 μm 过滤器过滤, 再通过丙酮纯化和旋转蒸发器蒸发收集的液体, 出现较透亮的溶血圈, 其原因在于蒸发的过程中除了蒸发丙酮, 还有水, 有浓缩的过程, 因此出现较透亮的溶血圈。

2.6 耐高温、酸碱及消化酶的测定

2.6.1 泥鳅抗菌肽经不同温度处理的影响

泥鳅抗菌肽经 60–90 $^{\circ}\text{C}$ 分别处理 1–3 h 后作用于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 结果显示, 随着温度的升高和处理时间的增长抗菌肽的活性呈现减弱趋势, 说明抗菌肽对温度比较敏感, 耐高温性较

弱。90 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3 h 后, 抑菌圈降到 1 cm 以下, 结果如图 6 所示。

2.6.2 泥鳅抗菌肽经不同 pH 处理的影响

泥鳅抗菌肽的 pH 值分别调到 1.0–12.0, 每个样品分别处理 1–5 h 后, 将 60 个样品的 pH 值回调到 5.1–5.4, 再与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用, 抑菌圈结果如图 7、8 所示, 泥鳅抗菌肽在强酸强碱处理下抗菌活性没有减弱, 在酸性和碱性增强的过程中抑菌活性有逐渐增强的趋势, 说明泥鳅抗菌肽对酸碱的耐受性较强。

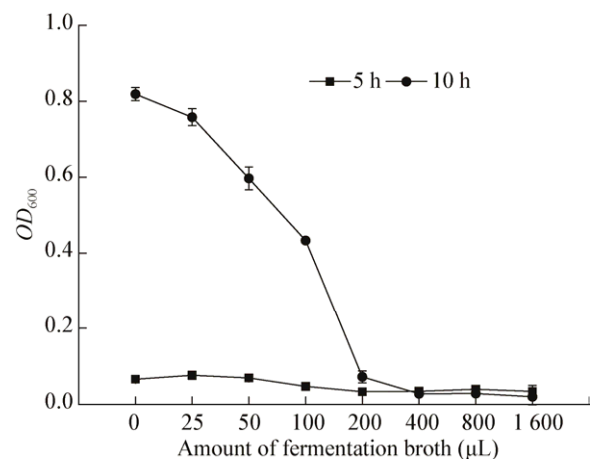


图 4 加入不同量的发酵液对大肠杆菌的影响

Figure 4 Effect of adding different amounts of fermented liquid on *Escherichia coli*

表 3 发酵液对乳酸菌和产气荚膜梭菌的液体抑菌效果
Table 3 Liquid inhibitory effect of fermented liquid on Lactic acid bacteria and *Clostridium perfringens*

发酵液的加入量 Amount of fermentation broth (μL)	含不同菌的培养基 Different bacteria in culture medium	
	Lactic acid bacteria	<i>Clostridium perfringens</i>
0	0.244 \pm 0.030	0.299 \pm 0.016
10	0.466 \pm 0.018	0.430 \pm 0.042
20	1.187 \pm 0.192	0.454 \pm 0.072
30	1.367 \pm 0.065	0.596 \pm 0.039
40	1.593 \pm 0.127	0.785 \pm 0.063
50	1.811 \pm 0.060	0.929 \pm 0.037
60	1.829 \pm 0.018	1.137 \pm 0.016
70	1.580 \pm 0.034	1.421 \pm 0.052
80	1.673 \pm 0.029	1.292 \pm 0.056
90	1.885 \pm 0.075	1.436 \pm 0.044
100	1.903 \pm 0.038	1.503 \pm 0.047



图5 泥鳅抗菌肽溶血实验

Figure 5 Hemolysis test of misgurin

注: A 孔内加入的是发酵液原液, B 孔内加入的是丙酮纯化后的发酵液。

Note: The A hole is added to the fermentation liquid, and the B hole is added to the purified fermentation broth of acetone.

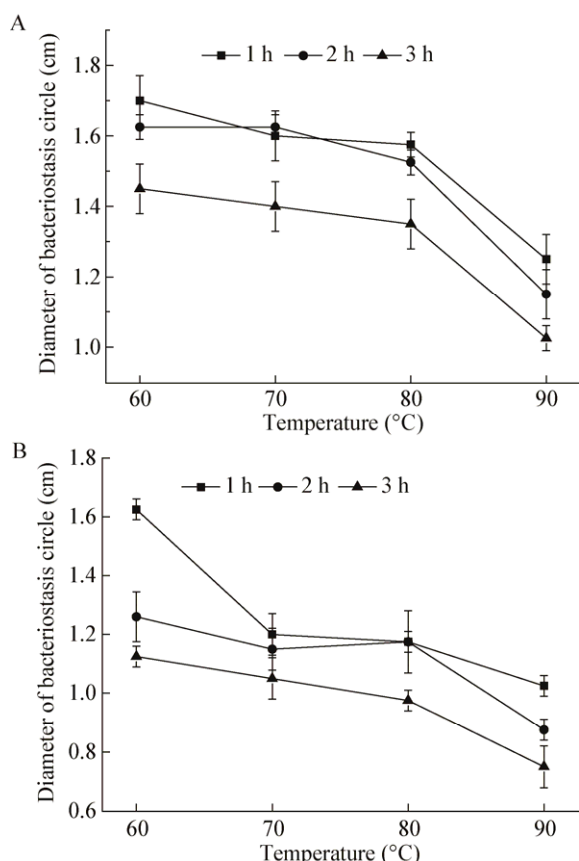


图6 不同温度处理后的发酵液分别作用于大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)

Figure 6 The fermented liquid treated for different temperatures and acted on *Escherichia coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B)

2.6.3 耐消化酶实验

泥鳅抗菌肽经胃蛋白酶在1 U时处理0.5、1、2、3 h后作用于大肠杆菌,其抑菌圈直径分别为0.95、0.95、0.90、0.85 cm,作用于金黄色葡萄球菌其抑菌圈直径分别为1.05、1.05、1.00、1.00 cm。胃蛋白酶2.5 U时处理0.5 h作用于大肠杆菌其抑菌圈直径为0.8 cm,其余均没有抑菌活性。胃蛋白酶

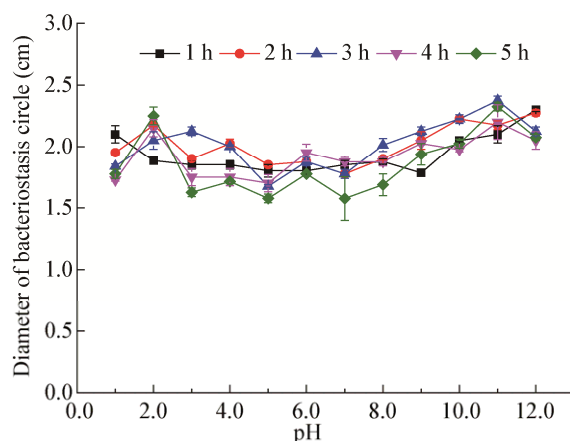


图7 不同pH处理后的发酵液对大肠杆菌的抑菌活性

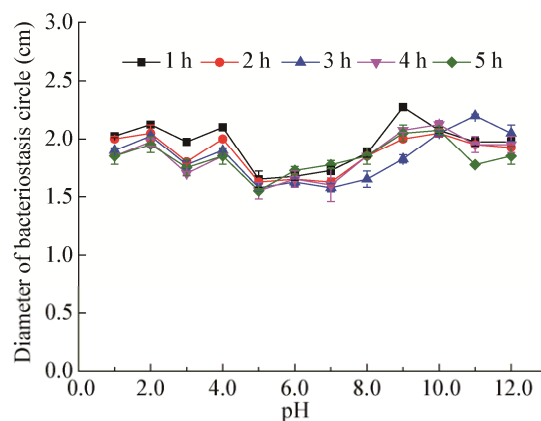
Figure 7 Antimicrobial activity of the fermentation against *Escherichia coli* after treated for different pH

图8 不同pH处理后的发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Figure 8 Antimicrobial activity of the fermentation against *Staphylococcus aureus* after treated for different pH

2.5 U时处理0.5、1、2、3 h后作用于金黄色葡萄球菌其抑菌圈直径分别为0.90、0.85、0.80、0.75 cm,胃蛋白酶5 U和10 U处理泥鳅抗菌肽均没有抑菌活性。胰蛋白酶和蛋白酶K分别处理后作用于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,抗菌活性明显减弱。

综上所述,泥鳅抗菌肽对消化酶的耐受性很弱,消化酶促进了它的分解,使得抗菌活性很微弱。

2.7 泥鳅抗菌肽的纯化及质谱图分析

丙酮纯化获得的抗菌肽活性虽然有增强趋势,但纯度并不高,尚可用于质谱分析。质谱图的横坐标代表质荷比,纵坐标代表丰度。泥鳅抗菌肽的理论分子量2501.9 Da,从图9可知:当 $M=417.95$,

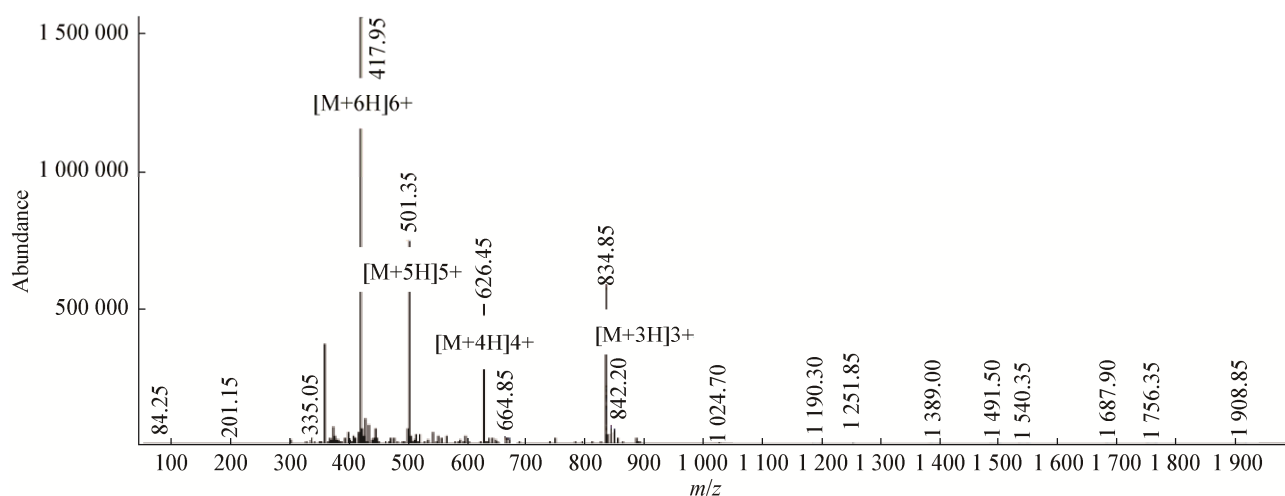


图9 蛋白质质谱图

Figure 9 Protein mass spectrum

417.95 \times 6+6=2 513.7; 当 $M=501.35$, 501.35 \times 5+5=2 511.75; 当 $M=626.45$, 626.45 \times 4+4=2 509.8; 当 $M=834.85$, 834.85 \times 3+3=2 507.55。这4个峰分别代表了带不同电荷的泥鳅抗菌肽。实际分子量与理论分子量基本相符,表明此肽为泥鳅抗菌肽且不存在翻译后修饰。

3 结论与讨论

本实验获得的蛋白经基因水平、Tricine-SDS-PAGE 小分子量蛋白胶及蛋白质质谱图鉴定为泥鳅抗菌肽,它具有较强抗菌活性。在摇瓶发酵筛选较稳定、抑菌活性较强的泥鳅抗菌肽菌株过程中,挑选了一株不需调 pH 活性就能达到较高的菌株 pPIC9K-misgurin-22。本实验获得的泥鳅抗菌肽与裴颖等^[6]用物理法从新鲜的泥鳅直接提取的相比总量大,因为发酵工艺可大量获得目的蛋白。与文豪^[17]获得的泥鳅抗菌肽相比,对高温的耐受性相对弱一些,其原因可能在于筛选高效菌株的方法,他是将重组菌株经浓度逐步增加的 ZeocinTM 抗性 YPD 平板筛选高拷贝菌株,而本实验是通过多次活性检测筛选的。龚杰万^[7]获得的重组质粒经线性化电转入到毕赤酵母 GS115 中,用 G418-MD 筛选高拷贝转化子,甲醇诱导,只简述了有目的蛋白表达,并没有说明不同时间段抗菌活性高低。本次实

验摇瓶发酵的程中,MD 液体培养基仅有葡萄糖、YNB 和生物素,在有限的营养成分中,毕赤酵母在培养基中 OD_{600} 值呈现先增高后逐渐降低的趋势,即在 24 h OD_{600} 值以最快的速度达到最大,48 h OD_{600} 值不变,72 h 开始缓慢降低,预计 96 h 葡萄糖耗尽转接到 BMMY 培养基中,甲醇作为唯一碳源诱导 AOX I 启动子开启,毕赤酵母分泌外源蛋白。此培养基含有的 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 这两种盐浓度较低,对泥鳅抗菌肽的正常分泌和抗菌活性较小。而在发酵罐发酵过程中需要大量的营养成分,促使毕赤酵母在最短的时间内达到最高的浓度,加入的盐成分较多对抗菌肽的活性有影响,甚至产生屏蔽效应。本实验中,在不影响致病菌或益生菌正常生长的前提下将抗菌效果最大化,选择将发酵液 pH 值调为 5.1–5.4 之间。100 L 的发酵罐中诱导 48 h 活性,作用于大肠杆菌的生物效价为 15.66×10^8 U/g,作用于金黄色葡萄球菌的生物效价为 8.31×10^8 U/g。为降低发酵成本只诱导了 48 h,很有可能到 72 h 时活性会更高。目前,发酵罐诱导可实时监测罐内情况,已成功解决了通氧量和甲醇供给这两个关键性问题。还有待解决的问题如下:(1) 如何降低发酵液的降解率;(2) 如何将抗菌肽的纯化量达到最高;(3) 是否部分分泌的抗菌肽因吸附在细胞膜表面而

影响表达量等。

泥鳅抗菌肽作为抗菌效果较好的新型免疫活性物质,如果在动物实验方面取得较好成绩,那它将在环境、食品、医药及水产养殖等领域发挥巨大作用。

REFERENCES

- [1] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(9): 710-720
- [2] Fulmer PA, Lundin JG, Wynne JH. Development of antimicrobial peptides (AMPs) for use in self-decontaminating coatings[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010, 2(4): 1266-1270
- [3] Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences[J]. *Trends in Microbiology*, 2000, 8(9): 402-410
- [4] Yang R, Chen SL. Recent advances in antimicrobial peptide from aquatic animals[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2005(2): 1-5,13 (in Chinese)
杨绒, 陈松林. 水产动物抗菌肽的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2005(2): 1-5,13
- [5] Park CB, Lee JH, Park IY, et al. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *FEBS Letters*, 1997, 411(2/3): 173-178
- [6] Pei Y, Chen XP. Research on preparation and antibacterial effect of loach cecropin[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2009(24): 296-297 (in Chinese)
裴颖, 陈晓平. 泥鳅抗菌肽的制备及其抑菌效果的研究[J]. *现代农业科技*, 2009(24): 296-297
- [7] Gong JW. Construction of two expression vectors of gene mae and misgurnin and their expression in *Pichia pastoris*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Jinan University, 2002 (in Chinese)
龚杰万. mae 和 misgurnin 两种基因表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达[D]. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 2002
- [8] Li W, Tailhades J, O'Brien-Simpson NM, et al. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(10): 2287-2294
- [9] Hou XS, Hu ZL, Chen GP, et al. Antimicrobial peptides: antibacterial mechanism and therapeutic use[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(1): 97-105 (in Chinese)
侯晓姝, 胡宗利, 陈国平, 等. 抗菌肽的抗菌机制及其临床应用[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 97-105
- [10] Chen XP, Fang DD. Optimization of pilot-scale fermentation conditions for the production of spinigerin α as an antibacterial peptide[J]. *Food Science*, 2014, 35(7): 138-142 (in Chinese)
陈晓平, 房丹丹. Spinigerin α 抗菌肽中试化发酵条件的研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(7): 138-142
- [11] Byrne B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 32: 9-17
- [12] Wang SK, Hao JQ, Wang ZW, et al. Studies on fermentation conditions for r-GOD production by *Pichia pastoris* GS115[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(9): 136-141 (in Chinese)
王帅坤, 郝杰清, 王振伟, 等. 毕赤酵母表达重组葡萄糖氧化酶的发酵条件[J]. *生物技术通报*, 2013(9): 136-141
- [13] Chu HL, Yu HY, Yip BS, et al. Boosting salt resistance of short antimicrobial peptides[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(8): 4050-4052
- [14] Zhang QH, Wang Q, Shang TT, et al. Studies on antibacterial activity and hemolysis of novel hemoglobin antimicrobial peptide[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(9): 54-57 (in Chinese)
张庆华, 王青, 尚田田, 等. 新型血红蛋白抗菌肽抑菌活性及溶血性研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(9): 54-57
- [15] Dong XY. Extraction and inhibitory properties of microbial antimicrobial peptide[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei University of Science and Technology, 2011 (in Chinese)
董新颖. 微生物抗菌肽的制备及其抑菌性质研究[D]. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2011
- [16] Qin P, Zhao PJ, Liang SW, et al. Optimization of the fermentation medium of cecropins production[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(8): 1046-1048 (in Chinese)
秦鹏, 赵培静, 梁淑娃, 等. 天蚕素抗菌肽发酵培养基优化[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(8): 1046-1048
- [17] Wen H. The synthesis and expression in *P. pastoris* of antibacterial peptides LL-37 and Misgurnin gene[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese)
文豪. 抗菌肽 LL-37 和 Misgurnin 基因合成及其在毕赤酵母中的表达[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2009