

研究报告



# 天蚕素 AD 在毕赤酵母中的多拷贝整合表达及表达条件优化

牛军波<sup>1,2</sup> 薛林贵<sup>\*1</sup> 吴娟丽<sup>1</sup> 陈熙明<sup>2</sup> 李娟<sup>2,3</sup> 王霞<sup>1</sup> 刘阳<sup>2,4</sup>

Emaneghemi Brown<sup>1</sup>

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 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室  
甘肃 兰州 730000

3 中国科学院大学 北京 100049

4 西北师范大学 甘肃 兰州 730070

**摘要:**【背景】天蚕素抗菌肽是目前研究最清楚、效果最显著的抗菌肽，实现工业化生产为其在农业、养殖业中的应用奠定了基础。【目的】获得一株高效生产天蚕素 AD 的基因工程菌株。【方法】构建重组载体 pGAPZαA-CAD 通过电击转化至 *Pichia pastoris* X33 中，表达天蚕素 AD 基因并获得 X33/GCAD 菌株；构建重组载体 pUCGAP-CAD 导入至 X33/GCAD 菌株中。pGAPZαA-CAD 是以博来霉素为抗性筛选标签被整合到 *P. pastoris* X33 的 GAPDH 启动子区域，pUCGAP-CAD 是以遗传霉素为抗性筛选标签被整合到 *P. pastoris* X33 的非翻译 rDNA 区域，最终获得一株高效表达天蚕素 AD 的酵母菌株 X33/GUCAD。【结果】通过质谱分析鉴定 X33/GUCAD 表达的抑菌物质为天蚕素 AD，通过发酵条件的优化，表明 X33/GUCAD 菌株在以甘油为碳源和以蛋白胨、酵母提取物为有机氮源的情况下具有较强表达天蚕素 AD 的能力。【结论】较高的拷贝数更有利于提高天蚕素 AD 的产量，此工程菌株在后期发酵过程中稳定性较好，适于工业化生产。

**关键词:** 天蚕素 AD，基因工程菌，生物效价

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31860163); Foundation Project of Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering of Gansu Province (EEMRE201603)

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

**Received:** 19-06-2019; **Accepted:** 29-11-2019; **Published online:** 06-01-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(31860163); 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室开放基金课题 (EEMRE201603)

**\*通信作者:** Tel: 0931-4938702; E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

**收稿日期:** 2019-06-19; **接受日期:** 2019-11-29; **网络首发日期:** 2020-01-06

## Multicopy integrative expression and optimization of cecropin AD expression in *Pichia pastoris*

NIU Jun-Bo<sup>1,2</sup> XUE Lin-Gui<sup>\*1</sup> WU Juan-Li<sup>1</sup> CHEN Xi-Ming<sup>2</sup> LI Juan<sup>2,3</sup>  
WANG Xia<sup>1</sup> LIU Yang<sup>2,4</sup> Emaneghem Brown<sup>1</sup>

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

2 Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China

**Abstract:** [Background] Cecropin is extensively studied and which is an effective antimicrobial peptide. It will lay the foundation for the practical application of cecropin in aquaculture and agriculture to realize the commercial production of cecropin. [Objective] To obtain a genetically engineered strain for efficient production of cecropin AD. [Methods] The recombinant vector pGAPZ $\alpha$ A-CAD was firstly constructed and then transformed to *P. pastoris* X33 strain by electric shock. Cecropin AD gene was successfully expressed and X33/GCAD strain was obtained. Secondly, the recombinant vector pUCGAP-CAD was constructed and transformed into X33/GCAD strain. The pGAPZ $\alpha$ A-CAD plasmid was integrated into the GAPDH promoter region of *P. pastoris* X33 with Zeocin as resistance screening label, while pUCGAP-CAD plasmid was integrated into the non-translated rDNA region of *P. pastoris* X33 with Geneticin as resistance screening label. Finally, a recombinant X33/GUCAD strain with an efficiently expressed cecropin AD gene was obtained. [Results] The antimicrobial compound of X33/GUCAD was cecropin AD which was identified by mass spectrometry. Afterward optimizing its fermentation conditions, we found that the X33/GUCAD strain having higher potential to express cecropin AD by consuming glycerol as a sole carbon source while peptone and yeast extract for organic nitrogen source. [Conclusion] The higher copy number is more beneficial to increase the yield of cecropin AD, and the engineering strain is more stable in the later fermentation process and suitable for industrial production.

**Keywords:** Cecropin AD, Genetically engineered bacteria, Biological value

随着生活水平的提高和健康意识的增强,人们在选择畜禽产品时不仅要求营养丰富,而且要求安全、卫生、健康,其中最重要的是无药物残留。饲料中使用抗生素曾对动物防病以及生长起到积极作用,但随着抗生素的长期使用与滥用,已对养殖业、饲料工业带来严重威胁,抗生素的滥用导致其残留于动物性食品中并经过食物链最终进入人体内,对人体的健康造成严重危害,同时畜禽排泄物中残留的抗生素造成了土壤和水体的污染。因此,开发一种可替代抗生素、增强畜禽抵抗力和免疫力、具有促生长、无抗药性、无毒副作用及无残留的生物饲料添加剂成为保障我国食品安全的迫切任务<sup>[1-3]</sup>。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是大多

数生物体先天性免疫系统的重要组成部分,是生物体经过诱导产生的一类具有抗菌活性的小肽类物质<sup>[4]</sup>,可在生物体中有效杀灭病原菌以及抵御外来细菌和病毒的入侵。20世纪80年代, Boman等<sup>[5]</sup>从惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)蛹中分离获得一种抗菌物质,将其命名为天蚕素,是目前研究最清楚、效果最显著的抗菌肽,该抗菌肽中富含疏水性氨基酸及带正电荷的氨基酸,在其加工成熟后形成 $\alpha$ 螺旋结构,该结构的一侧为疏水区域,一侧为带正电荷的区域。该结构可与细菌的细胞膜结合,并在细胞膜表面形成孔道结构,最终导致细菌胞内内容物外泄从而杀灭细菌<sup>[6-7]</sup>。由于抗菌肽是通过物理性打孔杀灭细菌的,因此应用抗菌肽杀菌不会出现耐药菌问题<sup>[8-12]</sup>。另外,由于抗菌肽是一类小

肽类物质, 该类物质对蛋白酶较为敏感, 所以长期使用该物质不会在环境及动物中出现残留<sup>[13-14]</sup>。因此, 抗菌肽是一类在农业养殖过程中替代抗生素的首选物质。

现今常用生产抗菌肽的方法有 3 种: (1) 从动物中直接提取: 例如蝇蛆抗菌肽的生产工艺是将蝇蛆磨碎、匀浆, 利用超滤方法除去杂质, 最终获得存在于蝇蛆中的抗菌肽复合物。该方法生产工艺较为简单, 但是生产过程中需要饲养大量的动物作为提取原料, 成本相对较高, 且抗菌肽在动物体内含量较低, 因此抗菌肽生产效率较低。(2) 人工化学合成: 利用人工化学合成也可获得抗菌肽, 但也存在很多缺陷, 例如成本昂贵、副产物较多以及会造成污染等一些问题<sup>[15]</sup>。(3) 利用工程菌株重组表达: 现已报道的多是利用 *Pichia pastoris* 作为宿主菌株, 对该菌株进行遗传工程改造, 使 *P. pastoris* 在生长过程中可表达并分泌抗菌肽。例如本实验室已成功利用 *P. pastoris* SMD1168 重组表达蜜蜂中的抗菌肽 Apidaecin, 结果表明重组产生的 Apidaecin 与天然 Apidaecin 具有相同的抗菌效果<sup>[16]</sup>。尹娜在 *P. pastoris* GS115 中成功表达天蚕素 D 基因, 且结果发现抗菌肽天蚕素 D 有广谱抗菌活性<sup>[17]</sup>。王珍等在 *P. pastoris* SMD1168 菌株中成功表达了抗菌肽天蚕素 AD, 且结果发现其具有生物活性<sup>[18]</sup>。Guo 等成功在 *P. pastoris* SMD1168 中表达了天蚕素 D, 且结果发现其对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌均有抑菌活性<sup>[19]</sup>。Meng 等首次在 *P. pastoris* GS115 中成功表达了来源于墨西哥鳄梨果实中的一种新型抗菌肽 PaDef<sup>[20]</sup>。Wan 等成功在 *P. pastoris* X33 中表达了菌丝霉素, 其抗菌性表明可以作为抗猪链球菌及金黄色葡萄球菌的潜在替代抗生素<sup>[21]</sup>。Chen 等在 *P. pastoris* GS115 中分别用诱导型载体 pPICZαA 和组成型载体 pGAPZαA 成功表达了菌丝霉素, 结果表明 pGAPZαA 更适合在 GS115 中表达<sup>[22]</sup>。

动物养殖过程中对抗菌物质需求量较大, 所以

如何降低抗菌肽的制备成本成为决定抗菌肽是否可应用于动物养殖的重要因素。本研究通过构建带有两种不同抗生素筛选标签的组成型表达天蚕素 AD 的载体 pGAPZαA-CAD 和 pUCGAP-CAD, 并将这两种载体分别整合至 *P. pastoris* X33 中, 提高了组成型表达天蚕素 AD 的拷贝数, 促使毕赤酵母发酵过程中天蚕素 AD 的产量提高, 再通过对该菌发酵条件的优化, 最终获得高效、低成本生产天蚕素 AD 的发酵工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

质粒 pGAPZαA, Invitrogen 公司; 毕赤酵母 X33、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、沙门氏菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌 BL21、铜绿假单胞菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、李斯特菌及枯草芽孢杆菌均为本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, Omega 公司; 限制性内切酶、DNA 聚合酶等工具酶, NEB 公司; 2×Phanta Max Master Mix 和重组酶 Exnase Multis, 南京诺唯赞生物科技有限公司。

实时荧光定量 PCR 仪, 安捷伦科技有限公司; PCR 仪、凝胶成像仪, 吉泰生物有限责任公司; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 小型蛋白垂直蛋白电泳仪, Bio-Rad 公司。

#### 1.1.3 培养基

YPD、BMGY 培养基按照 Invitrogen 公司多克隆毕赤酵母表达手册配制; YDFM 培养基: 原 YDFM 培养基中除去 NaCl 和 KCl, 添加胰蛋白胍 20.0 g/L、酵母提取物 10.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L。

### 1.2 重组菌株的表达

#### 1.2.1 重组表达载体 pGAPZαA-CAD 的构建及重组菌株 X33/GCAD 的表达

将目的基因天蚕素 AD 和毕赤酵母组成型表达载体 pGAPZαA 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双

酶切, 酶切产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并使用胶回收试剂盒进行回收, 回收后的天蚕素 AD 片段与 pGAPZαA 载体用 T4 连接酶连接过夜, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 中, 利用菌落 PCR 测序验证其正确性, 将测序正确的质粒命名为 pGAPZαA-CAD, 使用限制性内切酶 *Avr* II 将重组质粒 pGAPZαA-CAD 进行线性化, 并且使用琼脂糖凝胶电泳进行回收, 将线性化后的质粒电击转化至 *P. pastoris* X33 感受态中, 在含有 100 μg/mL Zeocin 的 YPD 培养基上筛选转化成功的阳性克隆, 将其命名为 X33/GCAD。

### 1.2.2 重组表达载体 pUCGAP-CAD 的构建及重组菌株 X33/GUCAD 的表达

以 pGAPZαA-CAD 为模板, 利用引物 pGAP P1 与 pGAP P2 (表 1) 将不含 Zeocin 抗性基因区段的载体的其他序列全部扩增出来。以 pPIC9K 为模板利用 Kan P1 与 Kan P2 (表 1) 将其中 Kana 基因扩增出来。利用重组酶对上面获得的两个片段进行重组, 形成 pGAPKaA-CAD。以毕赤酵母基因组为模板, 利用 rDNA P1 与 rDNA P2 (表 1) 对酵母中的 18S rDNA 进行扩增, 将其扩增产物进行回收并利用 *Bam*H I 与 *Bgl* II 进行酶切, 并连接至 *Bgl* II 酶切好的 pGAPKaA-CAD 中, 最终形成 pUCGAP-CAD 载体。引物序列列于表 1。PCR 反应体系(25 μL): 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 50 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 引物设计

Table 1 Primers in this study

Name of primers	Sequences (5'→3')
pGAP P1	GGTTTAGTTCCTCACCTTGTCG
pGAP P2	CACGTCCGACGGCGGCCACGG
Kan P1	CAAGGTGAGGAATAAACCATGAGCCATATTC AACGG
Kan P2	TGGGCCGCGCTCGGACGTGTTAGAAAACTC ATCGAGC
rDNA P1	TTAGATCTATGATGATGTCTTTACAGCC
rDNA P2	TTAGATCTCTAATAATCACTGTCACTCTCG

以 X33/GCAD 为宿主菌株制备电击感受态细胞。将构建好的 pUCGAP-CAD 电击转化至感受态细胞中, 在含有 100 μg/mL Zeocin 以及 200 μg/mL Geneticin 的 YPD 固体培养基上筛选重组阳性克隆。将获得的阳性克隆分别在不含有抗生素的 YPD 液体培养基中于 30 °C、200 r/min 培养, 72 h 后取上清通过抑菌圈法测定抗菌肽的抑菌效果, 最终获得了一株多拷贝整合表达天蚕素的重组工程毕赤酵母, 将其命名为 X33/GUCAD。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 法确定重组菌株中的基因拷贝数

由于 GAPDH 在酵母基因组中是单拷贝, 因此选用 GAPDH 作为内参基因。以毕赤酵母基因组为模板, 使用引物 GP1 和 GP2 (表 2) 将其 GAPDH 基因扩增出来, 反应体系与反应条件同 1.2.2, 将其扩增产物与载体 pUC57 连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 中, 将测序正确的质粒命名为 pUC57-gap。将质粒 pGAPZαA-CAD 和 pUC57-gap 分别用 *Avr* II 和 *Nco* I 线性化后作为标准品, 通过公式(1)计算内参基因和目的基因的绝对拷贝数。待测样本拷贝数(copies/μL)=

$$\frac{OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数} \times 6.022 \times 10^{14}}{650 \times \text{质粒碱基数}} \quad (1)$$

将原液梯度稀释为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$  拷贝数/μL 做标准品。将实时荧光定量 PCR 得到的  $C_t$  值与相对应的拷贝数对数构建标准曲线, 算出标准曲线方程。

TaqMan 探针荧光激团为 HEX, 淬灭激团为 BHQ-1, 天蚕素 AD 上、下游引物及中间探针分别为 cadF、cadR 和 Probe-cad (表 2), GAPDH 上、下游引物及中间探针分别为 gapF、gapR 和 Probe-gap (表 2)。PCR 反应体系(20 μL): Premix Taq Hot Start Version Mix 10 μL, 上、下游引物( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)各 0.5 μL, 荧光探针( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) 0.5 μL, 模板(线性化质粒或酵母基因组 DNA) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.5 μL。每组实验重复 3 次。PCR 反应条件: 50 °C 5 min, 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。将不同单克隆转化子基因组作为样品模板进行实

表 2 引物和探针

Table 2 Primers and probes

Name of primers and probes	Sequences (5'→3')
GP1	ATGGCTATCACTGTCGGTATTAACGG
GP2	TTAAGCCTTAGCAACGTGTTGCAAC
cadF	AATTGAGAAAAGTTGGGCAACGTGTC
cadR	TGTAGCCTGAGCCACAGTCGCAAC
Probe-cad	HEX-ACGCAGTCATCTCCGCCGGTCCT-BHQ-1
gapF	CGGTGTTTTACCACTTTGGA
gapR	CAACGAACATTGGAGCATCCT
Probe-gap	HEX-CCAAAAGCACATCGACGCCGGT-BHQ-1

时荧光定量 PCR 反应, 将得到的  $C_t$  值根据标准曲线方程计算出目的基因的绝对拷贝数, 再根据公式(2)计算出目的基因拷贝数。

$$\text{基因拷贝数}_{\text{目的基因}} = \frac{\text{目的基因绝对拷贝数}}{\text{内参基因绝对拷贝数}} \quad (2)$$

#### 1.4 天蚕素 AD 的 Tricine-SDS-PAGE 小分子蛋白电泳及质谱鉴定

首先将发酵液 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 除去酵母菌体, 保存至  $-80^\circ\text{C}$  备用。电泳需在冰浴下进行, 浓缩胶用 30 V 电压, 分离胶用 90 V 电压<sup>[23]</sup>。

利用 8 倍体积的丙酮对发酵上清液中的杂蛋白进行沉淀过夜, 7 000 r/min 离心 5 min 除去沉淀杂蛋白。利用旋转蒸发器将丙酮蒸干, 回收丙酮, 再利用冷冻干燥机将剩余的水分冻干。称取 1 g 冻干粉溶解于 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  中, 利用 LC-MS 方法对其进行分离与鉴定。

#### 1.5 发酵条件优化

##### 1.5.1 不同发酵培养基的选择

将工程菌株 X33/GUCAD-3 接种于 YPD 培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜, 再以 1%接种量分别接种于 50 mL YPD、BMGY 和 YDFM 中,  $30^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养, 每 12 h 取一次样取至 120 h, 取上清发酵液测定其抑菌效果。

##### 1.5.2 发酵培养基中不同碳源的选择

将工程菌株 X33/GUCAD-3 接种于 YPD 培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜, 再以 1%接种量接种于以麦芽糖、甘油和葡萄糖分别作为唯一碳源的

YDFM 培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养, 每 12 h 取一次样取至 120 h, 取上清发酵液测定其抑菌效果。

##### 1.5.3 发酵培养中氮源添加量优化

将工程菌株 X33/GUCAD-3 接种于 YPD 培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜, 再以 1%接种量接种于 YDFM 培养基中, 分别以蛋白胨与酵母提取物 2:1 的质量比添加有机氮源(不补料; 24 h 补料 5 g/L; 24 h 和 48 h 分别补料 5 g/L; 24 h、48 h 和 72 h 分别补料 5 g/L),  $30^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养, 每 12 h 取一次样取至 120 h, 取上清发酵液测定其抑菌效果。

#### 1.6 固体抑菌试验及抗菌谱的测定

采用琼脂扩散法, 利用 LB 液体培养基将金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、沙门氏菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌 BL21、铜绿假单胞菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、李斯特菌及枯草芽孢杆菌培养至  $OD_{600}$  大约为 1.0 时, 分别取 25  $\mu\text{L}$  加入到  $50^\circ\text{C}$  左右的 50% NB 固体培养基中, 倒平板待其凝固后用打孔器打孔。用 YPD 液体培养基将米曲霉、黄曲霉培养至  $OD_{600}$  大约为 1.0 时, 分别取 25  $\mu\text{L}$  加入到  $50^\circ\text{C}$  左右的 YPD 固体培养基中, 倒平板待其凝固后用打孔器打孔。在孔中分别加入 50  $\mu\text{L}$  发酵上清液,  $37^\circ\text{C}$  培养 4~6 h, 观察抑菌圈大小。

##### 1.7 抗菌肽生物效价的计算方法<sup>[24]</sup>

抗菌肽生物效价的计算公式为:  $U=2X \times 1\,000 \times$  稀释倍数, 式中,  $U$  指抗菌肽生物效价,  $X=(Y-4)/2.1$ ,  $Y$  是抑菌圈直径(mm), 4 是打孔器直径(mm), 2.1 是抗菌肽浓度与抑菌圈直径的比值常数。

## 2 结果与分析

### 2.1 多拷贝整合表达天蚕素 AD 毕赤酵母工程菌的构建

如图 1 质粒图谱所示, 将天蚕素 AD 基因插入至毕赤酵母组成型表达载体 pGAPZ $\alpha$ A, 得到质粒 pGAPZ $\alpha$ A-CAD, 将其线性化后电击转化至 *P. pastoris* X33 感受态细胞中, 得到重组菌株 X33/GCAD。利用 pGAPZ $\alpha$ A-CAD 质粒为模板,

特异性扩增天蚕素 AD 基因, 理论应得到 128 bp 的基因片段, 图 2 表明已获得与理论值相符的片段, 表明 pGAPZ $\alpha$ A-CAD 质粒构建成功。构建 pUCGAP-CAD 载体, 以 X33/GCAD 为宿主菌株, 将构建好的 pUCGAP-CAD 电击转化至感受态细胞中, 筛选阳性克隆 X33/GUCAD。利用

pUCGAP-CAD 质粒为模板, 特异性扩增天蚕素 AD 基因, 图 3 表明已获得与理论值相符的片段, 说明 pUCGAP-CAD 质粒构建成功。分别用 X33/GCAD 和 X33/GUCAD 发酵上清液做固体抑菌试验, 如图 4 所示, 多拷贝整合菌株 X33/GUCAD 的抑菌效果明显强于 X33/GCAD 菌株。

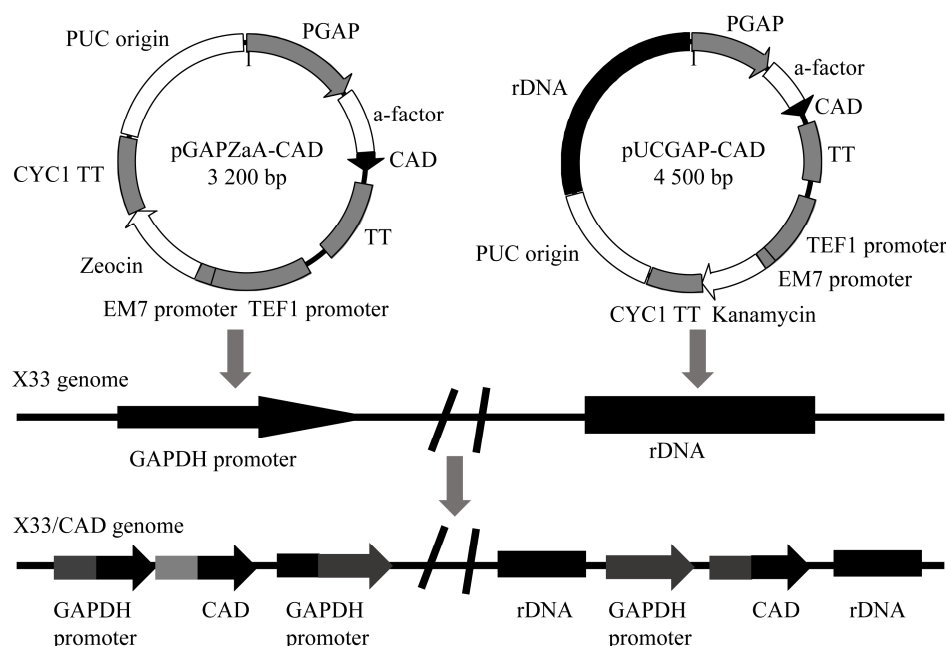


图 1 pGAPZ $\alpha$ A-CAD 和 pUCGAP-CAD 质粒图谱

Figure 1 Plasmids map of pGAPZ $\alpha$ A-CAD and pUCGAP-CAD

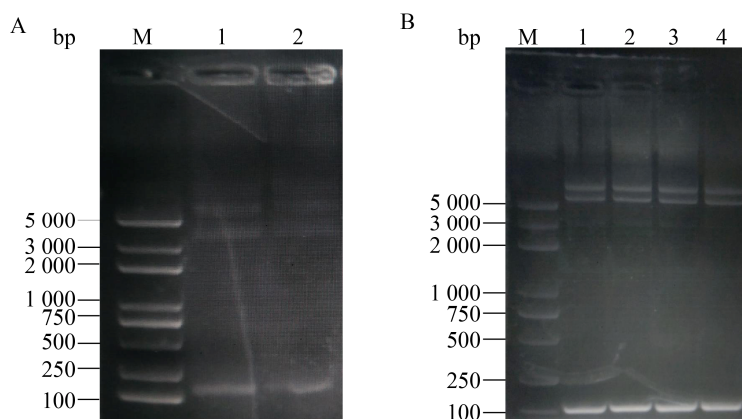


图 2 重组质粒 pGAPZ $\alpha$ A-CAD (A)和 pUCGAP-CAD (B)中天蚕素 AD 基因的 PCR 扩增鉴定

Figure 2 PCR amplification and identification of cecropin AD in recombinant plasmids pGAPZ $\alpha$ A-CAD (A) and pUCGAP-CAD (B)

注: M: 5 000 bp DNA Marker; A: 1-2: 重组质粒 pGAPZ $\alpha$ A-CAD 中的天蚕素 AD 基因; B: 1-4: 重组质粒 pUCGAP-CAD 中的天蚕素 AD 基因。

Note: M: 5 000 bp DNA Marker; A: 1-2: Cecropin AD gene in recombinant plasmid pGAPZ $\alpha$ A-CAD; B: 1-4: Cecropin AD gene in recombinant plasmid pUCGAP-CAD.

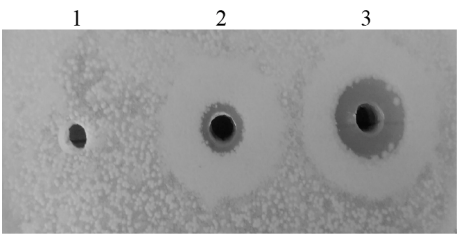


图 3 抑菌效果图

**Figure 3 The bioassay of bacteriostasis**

注: 孔 1 为阴性对照, 孔 2 为 X33/GCAD 菌株发酵上清液, 孔 3 为 X33/GUCAD 发酵上清液.

Note: The hole 1 was a negative control, the hole 2 was X33/GCAD fermentation supernatant, and the hole 3 was X33/GUCAD fermentation supernatant.

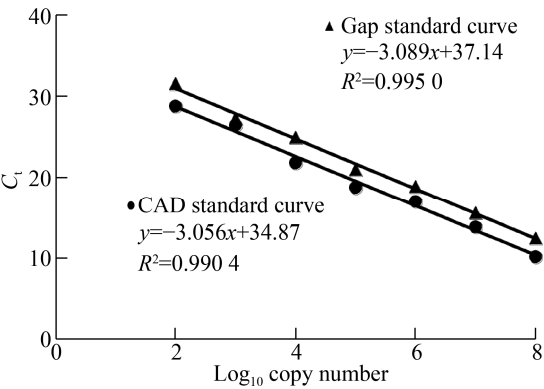


图 4 Gap 和 CAD 的标准曲线

**Figure 4 Standard curves of gap and CAD**

**2.2 不同转化子中天蚕素 AD 基因拷贝数的确定**

根据实时荧光定量 PCR 得到  $C_t$  值与相对于拷贝数对数的关系得到标准曲线如图 4 所示, 以不同单克隆转化子的基因组作为模板, 进行实时荧光定量 PCR 将获得的  $C_t$  通过标准曲线方程计算出不同转化子的基因拷贝数, 如表 3 所示, X33/GUCAD-3 菌株拷贝数最高, 因此选取此菌株作为后续实验菌株。

**2.3 天蚕素 AD 的 Tricine-SDS-PAGE 小分子蛋白胶及质谱图分析**

将目的菌株不同时间段的发酵液使用 Tricine-SDS-PAGE 小分子蛋白胶进行鉴定, 天蚕素 AD 抗菌肽的理论分子量( $M_w$ )为 3 950.73 Da, 图 5 表明实际蛋白分子量与理论蛋白分子量基本符合, 证明此蛋白是天蚕素 AD 抗菌肽。

表 3 不同转化子的 CAD 基因拷贝数

**Table 3 CAD gene copy number of different clones**

Clones	Gap $C_t$	CAD $C_t$	CAD copy number
X33/GCAD-1	22.24±0.05	32.64±0.07	0
X33/GCAD-2	20.98±0.04	19.23±0.07	0.77±0.01
X33/GCAD-3	20.53±0.01	17.26±0.02	2.12±0.01
X33/GCAD-4	19.24±0.05	16.25±0.04	1.99±0.13
X33/GUCAD-1	20.12±0.01	16.25±0.04	3.82±0.10
X33/GUCAD-2	19.89±0.07	15.23±0.01	6.94±0.28
X33/GUCAD-3	20.34±0.05	14.78±0.09	13.65±0.41

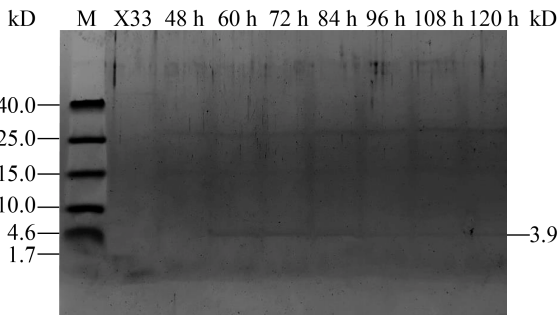


图 5 Tricine-SDS-PAGE 小分子蛋白胶

**Figure 5 Tricine-SDS-PAGE identification of small molecular weight protein**

注: M: 小分子蛋白 Marker; X33: 阴性对照.

Note: M: Small molecular weight of protein marker; X33: Negative control.

经丙酮沉淀纯化后的抗菌肽活性增强, 将冻干粉溶解后测质谱<sup>[23]</sup>, 图 6 表明质谱鉴定出的物质为天蚕素 AD。图 6 横坐标表示质荷比, 纵坐标代表丰度, 4 个峰分别代表了不同电荷的天蚕素 AD 抗菌肽。由图 6 可知, 当  $m/z=659.35$  时,  $M_w=659.35 \times 6 - 6 = 3\ 950.10$ ; 当  $m/z=791.05$  时,  $M_w=791.05 \times 5 - 5 = 3\ 950.25$ ; 当  $m/z=988.60$  时,  $M_w=988.60 \times 4 - 4 = 3\ 950.4$ ; 当  $m/z=1\ 317.65$  时,  $M_w=1\ 317.65 \times 3 - 3 = 3\ 949.95$ 。天蚕素 AD 抗菌肽的理论分子量为 3 950.73 Da, 由此看出实际分子量与理论分子量基本相符。

**2.4 不同培养基、碳源以及氮源含量对天蚕素 AD 表达的影响**

用 3 种培养基 YPD、YDFM 和 BMGY 进行选择, 培养 72 h 后发现使用 YDFM 培养基时菌株 X33/GUCAD-3 生长得最好, 在 600 nm 下菌体密

度平均值为 27.8, 抗菌肽生物效价为  $5.22 \times 10^8$  U/L, 约为使用 YPD 培养基时生物效价的 1.08 倍, 约为使用 BMGY 培养基时生物效价的 1.3 倍, 如图 7 所示。

为了探讨以甘油、葡萄糖和麦芽糖作为唯一碳源时对菌株 X33/GUCAD-3 产天蚕素 AD 的影响, 分别以含有 20 g/L 甘油、葡萄糖和麦芽糖为唯一碳源的 YDFM 培养基对 X33/GUCAD 进行发酵培养。如图 8 所示, 结果表明以甘油为唯一碳源时, 培养重组工程酵母产生的抗菌肽的产量大于以葡萄糖或麦芽糖为唯一碳源培养重组工程酵母产生的抗菌肽。以发酵 72 h 为例, 使用甘油作为唯一

碳源时抗菌肽效价约为  $6.03 \times 10^8$  U/L, 是葡萄糖作为唯一碳源时生物效价的 1.34 倍, 是麦芽糖作为唯一碳源时生物效价的 2.2 倍。

由于抗菌肽在合成后会被酵母分泌到细胞外, 而酵母正常生长过程中会产生一定量的胞外蛋白酶用于消化培养基中的有机氮源。因此, 如何防止抗菌肽被酵母产生的蛋白酶降解是优化发酵条件的关键点。以 YDFM 培养基为发酵培养基, 以甘油为碳源, 以蛋白胨与酵母提取物质量比为 2:1 的比例向培养基中添加不同量的有机氮源。由于过程中不断补料, 其发酵过程中抗菌肽产量最高的时间也发生了变化, 如图 9 所示发酵 96 h 后

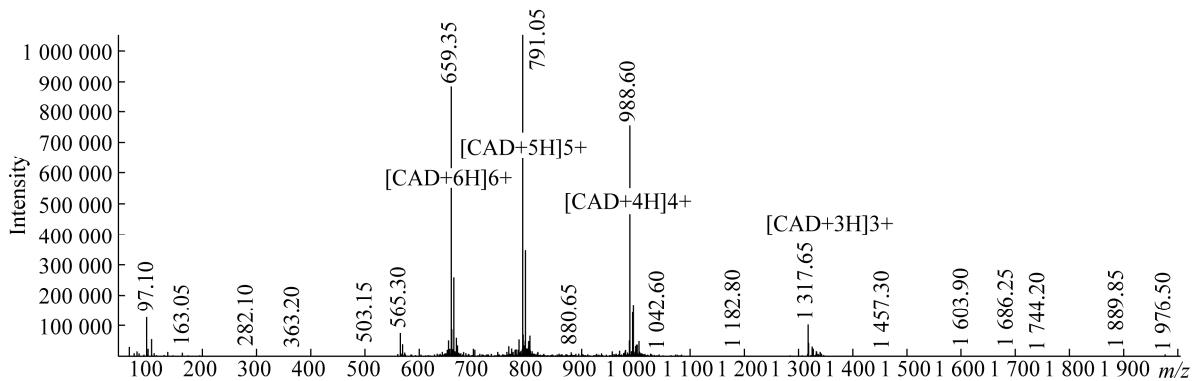


图 6 天蚕素 AD 质谱图

Figure 6 The mass spectrum of cecropin AD

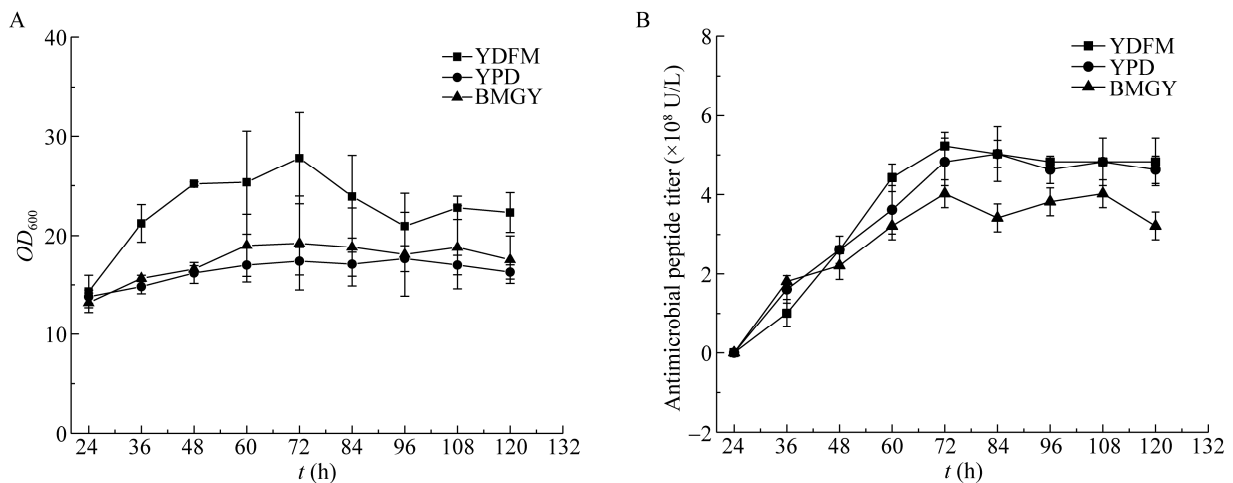


图 7 不同培养基对 X33/GUCAD-3 菌株生长(A)和抗菌肽效价(B)的影响

Figure 7 Effects of different medias on the growth (A) and the titer of antimicrobial peptides (B) of X33/GUCAD-3 strain

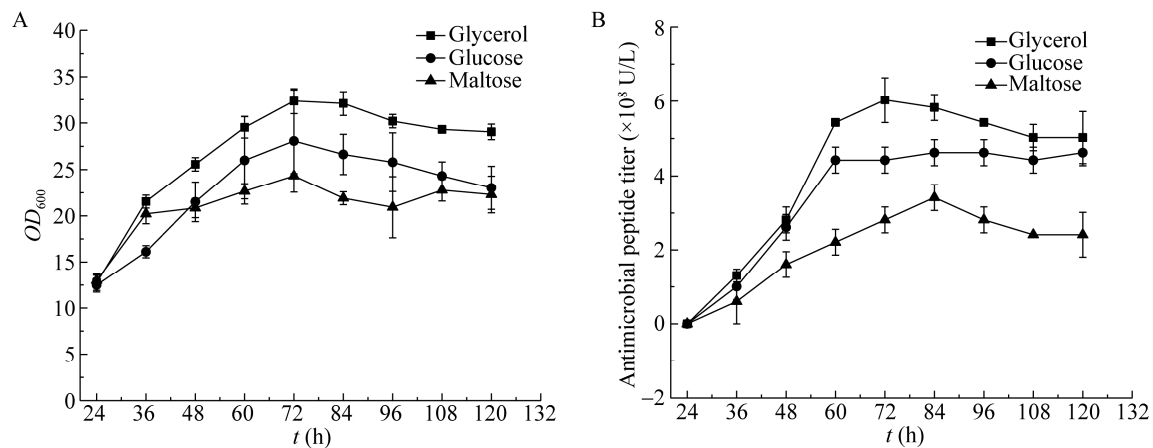


图 8 不同碳源对 X33/GUCAD-3 菌株生长(A)和抗菌肽效价(B)的影响

Figure 8 Effects of different carbon source on the growth (A) and the titer of antimicrobial peptides (B) of X33/GUCAD-3 strain

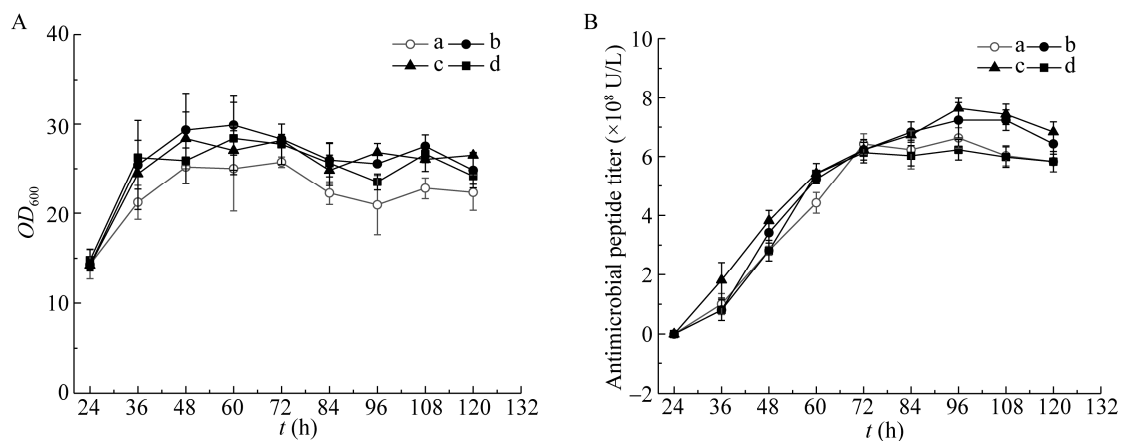


图 9 不同氮源补料量对 X33/GUCAD-3 菌株生长(A)和抗菌肽效价(B)的影响

Figure 9 Effects of different nitrogen source feeding amount on the growth (A) and the titer of antimicrobial peptides (B) of X33/GUCAD-3 strain

注: A: 不同氮源补料量对 X33/GUCAD-3 菌株菌体密度的影响; B: 不同氮源补料量对抗菌肽效价的影响. a: 发酵过程中不补充有机氮源; b: 发酵过程中 24 h 时, 补充 5 g/L 有机氮源; c: 发酵过程中在 24 h 和 48 h 时, 分别补充 5 g/L 有机氮源; d: 发酵过程中在 24、48 和 72 h 时, 分别补充 5 g/L 有机氮源.

Note: A: Effects of different nitrogen source feeding amount on the bacterial density of X33/GUCAD-3 strain. B: Effects of different nitrogen source feeding on the titer of antimicrobial peptides. a: No nitrogen source is supplemented in the fermentation process; b: The organic nitrogen source supplemented with 5 g/L at fermentation for 24 h; c: The organic nitrogen source supplemented with 5 g/L at fermentation for 24 h and 48 h; d: The organic nitrogen source supplemented with 5 g/L at fermentation for 24 h, 48 h and 72 h.

检测抗菌活性, 发现在 24 h 和 48 h 分别补料 5 g/L 有机氮源时抗菌肽生物效价最高。

## 2.5 抗菌谱的测定

如表 4 所示, 天蚕素 AD 对藤黄微球菌、米曲霉和黄曲霉没有抑菌活性, 但对金黄色葡萄

萄球菌、沙门氏菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌 BL21、铜绿假单胞菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、李斯特菌及枯草芽孢杆菌均有抑菌活性, 尤其对铜绿假单胞菌和李斯特菌抑菌效果最好。

表 4 天蚕素 AD 的抗菌谱

Table 4 Antibacterial spectrum of cecropin AD

菌株 Strains	抑菌直径 Inhibition zone diameter (cm)
革兰氏阳性菌 Gram positive bacteria	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.245±0.086
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	1.328±0.104
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	1.726±0.057
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	1.358±0.028
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	1.346±0.076
藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	0
革兰氏阴性菌 Gram negative bacteria	
大肠杆菌 BL21 <i>Escherichia coli</i> BL21	1.723±0.152
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	1.738±0.16
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	1.531±0.189
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.848±0.125
真菌 Fungi	
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	0
黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	0

### 3 讨论与结论

迄今为止已有 600 多种蛋白质在毕赤酵母系统中成功表达<sup>[25]</sup>, Chen 等<sup>[26]</sup>已经成功在枯草芽孢杆菌中表达了天蚕素 AD 抗菌肽且具有较好的生物活性。黄亚东等<sup>[27]</sup>成功在毕赤酵母 GS115 中表达了天蚕素 AD 且表达产物具有抑菌活性, 但发酵过程中需使用甲醇诱导。然而本实验使用组成型启动子 GAP, 发酵过程中不需使用甲醇诱导, 无需转换碳源, 且表达产物具有明显抑菌活性, 为抗菌肽在农业中的应用奠定了基础。毕赤酵母 X33 是一种工业常用于生产各种重组蛋白的工程酵母, 利用该酵母有效地表达抗菌肽可以降低成

本, 为抗菌肽在农业、养殖业方面的应用提供了可能性, 然而如何降低抗菌肽的生产成本成为研究热点。本研究获得一株多拷贝表达天蚕素 AD 的菌株 X33/GUCAD-3, 通过提高表达质粒在酵母中的整合拷贝数有效地提升了天蚕素 AD 的产量, 表明提高表达质粒在酵母中整合的拷贝数可以提高天蚕素 AD 在酵母中的转录量, 最终使天蚕素 AD 的表达量得以提升。然后对该菌株进行了发酵条件的优化, 首先通过选择发现菌株 X33/GUCAD-3 在 YDFM 培养基中生长得更好, 天蚕素 AD 产量最高; 其次通过对碳源的优化发现以甘油为唯一碳源时, 天蚕素 AD 产量较其他两种碳源更高; 另外通过酵母发酵培养基优化过程发现培养基中的有机氮源含量与酵母产生的天蚕素 AD 的产量有很大关系, 当氮源补料总量为 15 g/L 时, 天蚕素 AD 产量最高。

### REFERENCES

- [1] Silva NC, Sarmiento B, Pintado M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(1): 5-10
- [2] Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease[J]. Clinical Immunology, 2010, 135(1): 1-11
- [3] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054
- [4] Zhao DH, Dai ZY, Zhou KY. The research advances in function, mechanism and molecular biology of insect antibacterial peptides[J]. Progress in Biotechnology, 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[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 14-18
- [5] Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*[J]. Nature, 1972, 237(5352): 232-235
- [6] Jin LL, Geng YJ, Wang QY. Overview of the membrane-associated methods of antibacterial mechanism of antimicrobial peptides[J]. Journal of Liaoning University (Natural Science Edition), 2014, 41(4): 356-361 (in Chinese)  
金莉莉, 耿玉俊, 王秋雨. 抗菌肽抑菌机制的质膜相关研究方法[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2014, 41(4): 356-361

- [7] Jiang X, Ma G, Xu ZC, et al. Secreted expression and activity detection of two hybrid antimicrobial peptides in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2007, 44(3): 673-678 (in Chinese)  
姜新, 马根, 许正超, 等. 两种杂合抗菌肽在毕赤酵母中的表达及活性测定[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2007, 44(3): 673-678
- [8] Ding YC, Zhang SC. Antimicrobial peptides from marine invertebrates and fish[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2013, 32(6): 87-96 (in Chinese)  
丁云超, 张士瑾. 海洋动物抗菌肽研究进展[J]. 中国海洋药物, 2013, 32(6): 87-96
- [9] Yang LL, Wang B, Zhu HH, et al. Bacteriostatic effect of antibacterial peptide from *Cipangopaludina cathayensis* and the determination of physical and chemical properties and tumor-suppressor activity[J]. Food Research and Development, 2013, 34(20): 5-8 (in Chinese)  
杨丽丽, 王斌, 朱化化, 等. 中华圆田螺抗菌肽理化性质及抑癌活性测定[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20): 5-8
- [10] Yin J. Primary studies on antibacterial activity of recombinant antibacterial peptide MgJ[J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2013, 30(11): 7-9 (in Chinese)  
尹佳. 杂合抗菌肽 MgJ 抗菌活性的初步研究[J]. 吉林化工学院学报, 2013, 30(11): 7-9
- [11] Miao JY, Ke C, Guo HX, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antibacterial peptides[J]. Modern Food Science & Technology, 2014, 30(1): 233-240 (in Chinese)  
苗建银, 柯畅, 郭浩贤, 等. 抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 233-240
- [12] Li GN, Xia XJ, Long YH, et al. Research progresses and applications of antimicrobial peptides[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(1): 17-25 (in Chinese)  
李冠楠, 夏雪娟, 隆耀航, 等. 抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(1): 17-25
- [13] Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences[J]. Trends in Microbiology, 2000, 8(9): 402-410
- [14] Yu SL, Wang YY, Xu ZY, et al. Research advance in application of antimicrobial peptide in aquaculture feed[J]. China Feed, 2014(8): 31-34 (in Chinese)  
于世亮, 王裕玉, 徐中玉, 等. 抗菌肽在水产动物饲料中的应用研究进展[J]. 中国饲料, 2014(8): 31-34
- [15] Merrifield RB, Vizioli LD, Boman HG. Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A(1-33)[J]. Biochemistry, 1982, 21(20): 5020-5031
- [16] Chen XM, Li J, Sun HL, et al. High-level heterologous production and functional secretion by recombinant *Pichia pastoris* of the shortest proline-rich antibacterial honeybee peptide Apidaecin[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 14543
- [17] Yin N. Expression, purification and characterization *in vitro* of antibacterial peptide Cecropin D[D]. Beijing: Master's Thesis of Union Medical College of China, 2008 (in Chinese)  
尹娜. 抗菌肽 Cecropin D 的表达、纯化及其体外活性鉴定[D]. 北京: 中国协和医科大学硕士学位论文, 2008
- [18] Wang Z, Jiang JY, Zhu FM, et al. Constitutive expression of antibacterial peptide Cecropin AD gene in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2010, 46(5): 51-54 (in Chinese)  
王珍, 姜建阳, 祝发明, 等. 抗菌肽 Cecropin AD 在毕赤酵母中的组成型表达的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(5): 51-54
- [19] Guo CH, Huang YM, Zheng HY, et al. Secretion and activity of antimicrobial peptide cecropin D expressed in *Pichia pastoris*[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2012, 4(6): 1063-1068
- [20] Meng DM, Zhao JF, Ling X, et al. Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 130: 90-99
- [21] Wan J, Li Y, Chen DW, et al. Expression of a tandemly arrayed plectasin gene from *Pseudoplectania nigrella* in *Pichia pastoris* and its antimicrobial activity[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 26(3): 461-468
- [22] Chen X, Hu YH, Chen WD, et al. Comparison of inducible versus constitutive expression of plectasin on yields and antimicrobial activities in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 118: 70-76
- [23] Ma P, Xue LG, Shang H, et al. High-level expression in *Pichia pastoris* SMD1168 of misgurin and its antimicrobial activity[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 970-980 (in Chinese)  
马萍, 薛林贵, 尚海, 等. 泥鳅抗菌肽在毕赤酵母 SMD1168 中的高效表达及活性检测[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 970-980
- [24] 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
- [25] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270
- [26] Chen X, Zhu FM, Cao YH, et al. Novel expression vector for secretion of cecropin AD in *Bacillus subtilis* with enhanced antimicrobial activity[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(9): 3683-3689
- [27] Huang YD, Zheng Q, Li XK, et al. Modification of cecropin AD gene and its expression in *pichiapastoris*[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2002, 30(2): 13-16 (in Chinese)  
黄亚东, 郑青, 李校堃, 等. 抗菌肽 AD 基因的改造及在毕赤酵母中的表达[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2002, 30(2): 13-16