论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0310-04

人α-防御素5在毕赤酵母中分泌表达的研究

王艾平,粟永萍,申明强,王 崧,程天民,王军平 (第三军医大学预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探索人α-防御素5成熟肽(mHD_5)在酵母中高效分泌表达的可行性。**方法** PCR扩增获得酵母菌偏好的mHD_5密码子序列,应用基因重组方法构建表达质粒,电击转化酵母菌株GS115,应用G418浓度梯度、表型和PCR技术筛选高拷贝转化株。经摇瓶发酵和甲醇诱导,Tricine-SDS-PAGE分析重组mHD_5($rmHD_5$)表达量,并采用Western blot鉴定。选用琼脂扩散法检测$rmHD_5$的抑菌活性。**结果** 构建了pPIC9K-mHD_5酵母表达质粒。筛选得到3株His^+/Mut^+表型,且耐受8 mg/ml G418的多拷贝转化酵母菌株,成功获得表达量约120 mg/L的发酵上清。$rmHD_5$对大肠杆菌(EC25922)和金黄色葡萄球菌(SA25923)2种标准菌株均具有明显的抑菌活性。**结论** 防御素基因可以在毕赤酵母中实现分泌型离表达,此策略可能是抗菌肽工业化开发的有效途径之一。

关键词: 防御素;酵母表达;生物活性

中图法分类号: Q516;Q786;Q949.326.1 **文献标识码:** A

Secretion expression of human alpha-defensin 5 in *Pichia pastoris*

WANG Ai-ping, SU Yong-ping, SHEN Ming-qiang, WANG Song, CHENG Tian-min, WANG Jun-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of high-level secretion expression of bioactive mature human alpha-defensin 5 (mHD_5) in *Pichia pastoris*. **Methods** DNA fragment containing mHD_5 coding sequence with biased codons of *Pichia pastoris* was amplified by PCR, then inserted into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K. After the recombinant plasmid was transformed into the yeast host strain GS115 by electroporation, the transformants with multi-copy inserts were selected by PCR identification and G418 phenotype screen. After optimization of the flask-shaking culture fermentation, the expression of recombinant mHD_5($rmHD_5$) induced by methanol was analyzed by Tricine-SDS-PAGE and Western blot. The bioactivity of $rmHD_5$ was examined by antibacterial assay. **Results** The plasmid pPIC9K-mHD_5 was correctly constructed. Three transferred GS115 strains containing multi-copy mHD_5 gene were singled out, which could grow in the media with 8 mg/ml G418 and showed His^+/Mut^+ phenotype. The yield of $rmHD_5$ was about 120 mg/L in the clarified broth of fermentation media. The $rmHD_5$ displayed obvious antibacterial activity against both EC25922 and SA25923. **Conclusion** The strategy of secretion expression of defensin gene in *Pichia pastoris* may be an effective way to produce bioactive antimicrobial peptide on a large scale.

Key words: defensin; yeast expression; bioactivity

人α-防御素5成熟肽(mature human alpha-defensin-5, mHD_5)是相对分子质量为3.58×10^3的阳离子短肽,含保守的6个半胱氨酸残基,构成3个分子内二硫键,形成稳定的肽链折叠,并进而形成具有3条β-折叠片组成的两歧性分子[1]。研究表明,mHD_5除在潘氏细胞(小肠)中大量分泌表达外,在生殖道上皮细胞、鼻黏膜和部分正常支气管黏膜等细胞中也存在固有表达,还可因炎症、感染和细胞恶性转变等因素的刺激而表达、分泌上调[2]。由此可见,mHD_5在消化道、生

基金项目: 国家自然科学基金(30771892);重庆市院士基金(2007AB5022);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G076)
Supported by the National Natrural Science Foundation of China (30771892), the Grants from Academician Fundation of Chongqing (2007AB5022) and the "Eleventh Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China (06G076)

作者简介: 王艾平,男,四川省泸县人,博士研究生,讲师,主要从事分子进化和基因工程方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68771723, E-mail: aiping@cta.cq.cn

通信作者: 程天民,电话:(023)68752009
王军平,电话:(023)68752883, E-mail: wangjunp@yahoo.com

收稿日期: 2007-09-05;**修回日期:** 2007-10-16

殖道等黏膜内源性感染预防和免疫保护调节中发挥着重要作用。

研究表明,化学合成、从黏膜组织提取或哺乳动物细胞表达的 mHD_5 不仅具有高效而广谱的抑菌和参与免疫保护调节作用的活性[3],而且具有阻止 HIV、HSV 等病毒黏附进入细胞和抑制病毒颗粒复制的抗病毒作用[4]。在细菌耐药已经成为全球性医学难题的今天,mHD_5 展现了其作为新型抗病原微生物药物的前景。但 mHD_5 通过化学合成和哺乳动物表达制备生产的成本相对较高,并且其在原核细胞中具有不能直接表达或表达量极低,融合表达时又极易形成包涵体,且裂解出融合分子的效率低等缺点。鉴于酵母系统具有高表达、高稳定、高分泌的优点,本实验设计并构建 mHD_5 的分泌型表达载体,拟筛选出高拷贝转化酵母 GS115 克隆株,诱导、获得重组 mHD_5($rmHD_5$)分泌性高表达,通过琼脂孔穴扩散法证实其体外抗菌活性,为开发 mHD_5 奠定基础。

1　材料与方法

1.1　质粒、菌株与主要试剂

pPIC9K 质粒和毕赤酵母菌株 GS115(His^-/Mut^+)购自 Invitrogen 公司,*Sna*B Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ内切酶购自 NEB 公司,HDEFA5 抗体购自 Alpha Diagnostic 公司,寡聚 DNA 单链购于上海生物工程公司,Pyrobest DNA Polymerase、T_4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司,$DH_{5\alpha}$、EC25922 和 SA25923 菌株由本所保存。

1.2　寡聚 DNA 单链的设计

应用软件 Leto 设计出酵母菌使用偏好的 mHD_5 密码子序列,合成 2 条寡聚 DNA 单链 P_1 和 P_2。P_1:5′-GCTACTTGTTACTGTAGAACTGGTAGATGTGCTACTAGAGAATCTTTGTCC-3′,P_2:5′-TTATCTACAACACAATCTGTACAATCTACCAGAAATTTCACAAACACCGGACAAAGATTCTCT-3′。P_1 3′端的 15 个碱基与 P_2 3′端的 15 个碱基互补(下划线标记)。

1.3　mHD_5 密码子优化序列的克隆

以 mHD_5 密码子优化序列为模板设计引物 P_3 和 P_4,P_3 的 5′端引入 *Sna*B Ⅰ酶切位点,P_4 的 5′端引入 *Not* Ⅰ酶切位点(酶切位点和保护碱基分别以下划线和斜体标记)。P_3:5′-*CATATG*-TACGTAGCTACTTGTTACTG-3′,P_4:5′-*AAGGAAAAAA*GCGGC-CGCTTATCTACAACAC-3′。首先将 P_1 和 P_2 在 94 ℃ 30 s→45 ℃ 30 s→72 ℃ 5 min 条件下进行 DNA 双链合成,然后取 1 μl 产物作模板,以 P_3 和 P_4 为引物进行 PCR 扩增,反应条件:94 ℃ 30 s→58 ℃ 1 min→72 ℃ 12 s,共 32 个循环,然后 72 ℃延伸 5 min 后终止反应。

1.4　pPIC9K-mHD_5 表达载体的构建

将 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收,用 *Sna*B Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切(37 ℃,8 h)后再凝胶电泳回收目的片段。将 pPIC9K 质粒用 *Sna*B Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切(37 ℃,4 h)后凝胶回收大片段。将目的片段 mHD_5 和 pPIC9K 载体按 4∶1 比例,在 T_4 DNA 连接酶的作用下连接反应(16 ℃,16 h),然后电击转化至 *E. coli* $DH_{5\alpha}$ 菌株,Amp 抗性筛选阳性重组子,阳性菌落扩增后提取质粒,经 *Bam*H Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切初步鉴定,并委托上海生物工程公司测序。

1.5　重组 pPIC9K-mHD_5 质粒转化毕赤酵母株 GS115 及高拷贝转化株的筛选

Sac Ⅰ线性化 pPIC9K-mHD_5 质粒后,经 Bio-Rad 电转仪转化 GS115。电击条件:电压 2 000 V,电容 25 μF,电阻 200 Ω。在含有 100 μg/ml G418 的固体 YPD 培养基上筛选转化克隆。再使用 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/ml G418 浓度梯度筛选出高拷贝转化菌株。对首轮筛选出的克隆应用同样方法进行再次电击转化,筛选出对高浓度 G418 抗性的 His^+/Mut^+ 克隆作为甲醇诱导表达的试验菌株。

1.6　重组转化酵母 GS115 克隆株的 PCR 鉴定

挑选转化酵母单菌落于 5 ml YPD 培养基中,30 ℃、250 r/min 振荡培养 17 h,1 200 × *g* 离心 10 min,收集菌体,抽提酵母基因组 DNA,以其作为模板,以 P_3 和 P_4 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物送上海生物工程公司测序。

1.7　重组酵母株在摇瓶中的诱导表达

挑取筛选获得的多拷贝转化酵母株菌落接种到 BMGY 中,30 ℃、250 r/min 振荡培养 18 h 至 $D(600)$ 值为 2 ~ 6,室温下 4 000 × *g* 离心 5 min,将菌体用 BMMY(含 1% Casaminoacids)重悬至 $D(600)$ 值约为 1。28 ℃、250 r/min 振荡培养,进行甲醇诱导表达,每隔 12 h 取样,同时补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%。所有取样经 10 000 × *g* 离心 5 min,将上清移置入新的灭菌离心管中,于液氮中保存。

1.8　Tricine-SDS-PAGE 分析

分离胶和积层胶浓度分别为 15% 和 5%,12 V/cm 恒压电泳 80 min。然后用考马斯亮蓝染色 1 h 后脱色,分析目的条带及其含量。

1.9　Western blot 鉴定

将高表达的诱导上清液浓缩后进行 15% Tricine-SDS-PAGE 电泳,应用半干电转印仪转移蛋白至直径为 0.22 μm 的 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加一抗(羊抗 HD_5,1∶500)4 ℃杂交过夜,二抗(HRP 标记的兔抗羊 IgG)室温孵育 2 h,用化学发光法增强显色。

1.10　$rmHD_5$ 生物活性的初步检测

采用琼脂孔穴扩散法[5],将处于对数生长期的大肠埃希菌(EC25922)和金黄色葡萄球菌(SA25923)悬浮液 15 μl,与 55 ℃ 的 LB 固体培养基 20 ml 混匀后铺平板,凝固后,用灭菌打孔器打孔,滴加 50 μl 待测表达上清样品,37 ℃培养过夜,以同体积的 pPIC9K 空载体转化酵母表达上清作阴性对照。

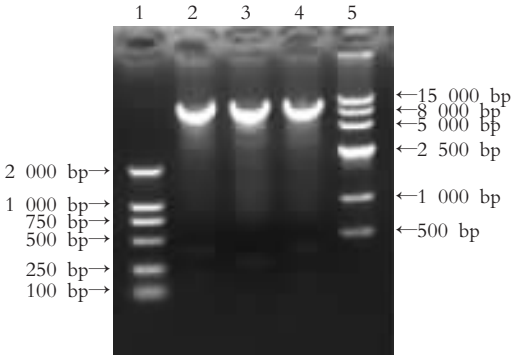
2　结果

2.1　mHD_5 序列的克隆

用设计的 2 条寡脱氧核苷酸单链经 PCR 扩增,2% 琼脂糖凝胶电泳见约 130 bp 处有 1 条清晰带,与预计大小相符。

2.2 重组质粒 pPIC9K-mHD$_5$酶切鉴定

提取的可疑质粒用 *Bam*HⅠ/*Not*Ⅰ双酶切,在 1% 琼脂糖凝胶电泳中见到约 9×10^3 bp 和 300 bp 2 条条带,阳性重组子的小片段明显比空质粒小片段大约 100 bp,与理论计算值 81 bp 相符(图 1)。测序结果表明重组质粒序列与设计完全一致,mHD$_5$阅读框正确插入表达载体。

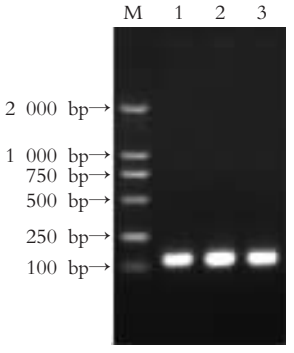


1、5: DNA 标准; 2、4:分别为 2 个重组克隆经 *Sna*BⅠ/*Not*Ⅰ酶切; 3:空质粒经 *Sna*BⅠ/*Not*Ⅰ酶切

图 1 pPIC9K-mHD$_5$ 重组质粒酶切鉴定

2.3 重组转化酵母的 PCR 鉴定

抽提筛选获得的 3 株具有 His^+/Mut^+ 表型,并且能在含 8 mg/ml G418 MM 平板上生长的多拷贝转化酵母克隆和 1 株未经转化的酵母克隆的基因组 DNA,分别以其为模板,以 P_3 和 P_4 为引物进行 PCR 扩增。电泳结果显示 3 个转化克隆均扩增出约 130 bp 的目的片段,与理论值相符(图 2)。PCR 产物测序结果与设计序列完全一致,表明 mHD$_5$基因已经整合到酵母 GS115 基因组中。



M: DNA 标准(DL 2000); 1~3: 3 个转化克隆

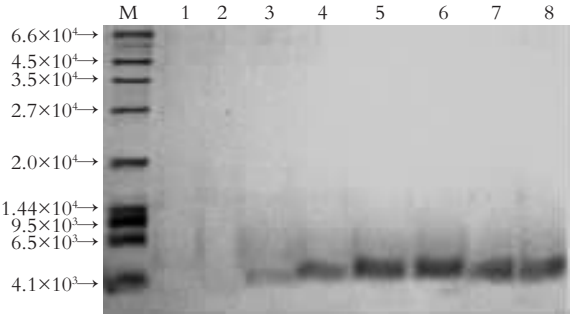
图 2 重组载体转化酵母克隆基因组 DNA 的 PCR 鉴定

2.4 Tricine-SDS-PAGE 电泳结果

经甲醇诱导 24~90 h 的表达上清样品在相对分子质量为 4.1×10^3 的标准带处出现明显的蛋白条带,与设计的 rmHD$_5$理论分子量一致(图 3)。表明,在 Tris-Tricine 电泳系统中,rmHD$_5$得到了理想的分辨率和带型。甲醇诱导 48 h 时,rmHD$_5$的表达量最高,用蛋白定量试剂盒测定 rmHD$_5$ 的表达量约为 120 mg/L。

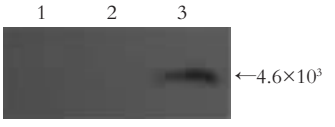
2.5 Western blot 检测 rmHD$_5$的表达

分别将 pPIC9K-mHD$_5$/GS115、pPIC9K/GS115 和 GS115 的诱导表达上清浓缩后进行 15% Tricine-SDS-PAGE 电泳,转膜后以抗 mHD$_5$的单克隆抗体为一抗,二抗孵育后用化学发光液处理膜,再用胶片曝光显色。结果表明只有 pPIC9K-mHD$_5$/GS115 重组克隆的对应孔显示出特异的蛋白复合物(图 4)。



M:蛋白质分子量; 1:未诱导上清;2~8:分别为诱导 12、24、36、48、60、72 h 和 90 h 的上清

图 3 pPIC9K-mHD$_5$ 转化酵母甲醇诱导上清的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

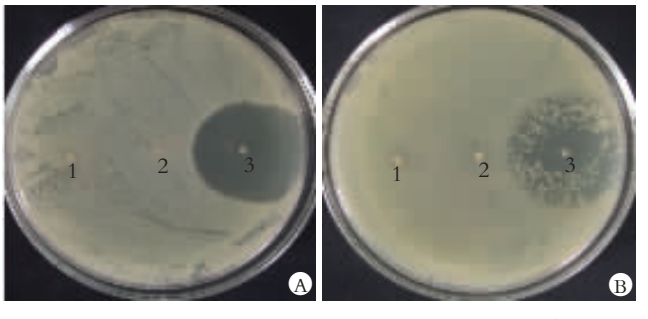


1:GS115 表达上清;2:pPIC9K/GS115 表达上清;3:pPIC9K-mHD$_5$/GS115 表达上清

图 4 rmHD$_5$ Western blot 鉴定

2.6 rmHD$_5$ 生物活性检测

采用琼脂扩散法测定 rmHD$_5$对大肠埃希菌(EC25922)和金黄色葡萄球菌(SA25923) 2 种标准菌株的抗菌活性。结果显示含 rmHD$_5$转化酵母的表达上清对此 2 种细菌的生长均具有明显的抑制作用,对前者的杀菌作用更强;而对照上清却未见有抑制细菌生长的现象(图 5)。



A:抗 EC25922;B:抗 SA25923 1: pPIC9K/GS115 发酵上清对照; 2: GS115 发酵上清阴性对照;3: pPIC9K-mHD$_5$/GS115 发酵上清

图 5 rmHD$_5$ 的抗菌活性测定

3 讨论

由于防御素具有抑/杀细菌的生物活性使其不能在原核细胞中直接表达。尽管防御素与合适的承载分子融合后在大肠杆菌中获得了高表达,但靶蛋白在大多数情况以包涵体形式出现,使得不得不经过程序复杂而又效率低下的复性过程,加之目的肽从融合分子

中裂解出来需要价格昂贵的酶,且裂解效率也常常很低,因此欲利用原核表达系统获得大量具有生物活性的防御素存在相当大的困难[6]。近年来,以巴斯德毕赤酵母(P. pastoris)为宿主的外源基因表达系统发展迅速,并已成功表达了一系列具有重要生物活性功能的多肽[7,8]。因此,本研究选用了 P. pastoris GS115 作为防御素的表达宿主。

本研究选用生物活性最强的 mHD_5 剪切体序列,并利用软件替换了其天然序列中含有的 14 个酵母稀有密码子,获得了酵母偏好的密码子序列,并成功构建 pPIC9K-mHD_5 重组载体。为目的肽的成功高表达奠定了基础。pPIC9K 载体中含有较强分泌功能信号肽 α-factor,使得表达的目的肽大部分分泌到培养基中成为可能。

由于在甲基营养型酵母中质粒不能生存,载体必须和酵母基因组中的同源区发生重组,才能实现外源蛋白的稳定表达。实验中选用 *Sac* Ⅰ 切割载体 pPIC9K-mHD_5,使之线型化后只产生游离的 AOX_1 5′端,与宿主染色体的同源区发生单交换。这种单交换的优点在于重组载体整合到 GS115 基因组中后,并未删除宿主染色体中的 AOX_1 结构基因,同时将目的基因和 His4 基因带入宿主染色体,并且为含目的基因的重组载体多次同源重组入宿主基因组成为可能。基于此,利用阳性重组转化 GS115 克隆应具有的 His^+/Mut^+ 表型和对 G418 抗性浓度不同的特点,研究中创新性地采用了“再次转化”策略,确保了重组表达载体至少 2 次通过单交换整合到宿主基因组中,现通过 G418 的筛选,获得了多拷贝克隆。理论上保证了可获得目的肽高表达的成功。虽然获得的多拷贝整合的菌株也不一定能带来高水平目的蛋白的表达[9],实验中获得了高表达肽的结果反向表明筛选所得克隆的正确性。

理论上 $rmHD_5$ 的 N 端比天然序列多酪氨酸和缬氨酸,使其相对分子质量由原来的 3.58×10^3 增加到 3.85×10^3,pI 仍约为 8.5。由于 $rmHD_5$ 从宿主胞内分泌至胞外过程中需经历 Kex2 和 Ste13 两种信号肽酶的 3 次切割,其可能存在酶切不充分的现象[8],使得 $rmHD_5$ 的 N 端比天然序列还多出 2 个或 4 个氨基酸(谷氨酸与丙氨酸对)。诱导上清的抗菌活性结果显示 $rmHD_5$ 对 G^- 菌和 G^+ 菌均具有抑/杀作用,对 G^- 菌的抑制作用比对 G^+ 菌强,与人工合成肽的抗菌活性[3]一致。其可能机制是 $rmHD_5$ 带有大量正电荷与带负电荷的 G^- 菌细胞膜相互作用从而破坏了细胞膜的正常结构与功能;相对 G^- 菌而言,G^+ 菌因细胞壁较厚,磷壁酸较多,带负电荷较少,因而不易受到靠正电荷作用的防御素的影响[10]。活性实验也表明 $rmHD_5$ 也由宿主胞内分泌到培养基中,且可能具有正常的空间结构;同时也表明 $rmHD_5$ 的 N 端比天然序列多出的氨基酸对其活性影响不大。

尽管开发多肽纯化的工艺具有一定难度,但我们在确认 $rmHD_5$ 已表达和具有活性的基础上,正进行着通过离子交换和反相层析的工艺纯化 $rmHD_5$,已获得了纯度大于 90% 的重组目的肽。如果研制出具有较长半衰期的纳米材料包裹 $rmHD_5$ 分子的制剂,将其用于呼吸道、泌尿生殖道等局部感染的预防和治疗可能会获得理想效果。

本实验结果提示通过构建表达载体和筛选高拷贝的转化酵母克隆株,经甲醇诱导表达可在培养基上清中获得具有生物活性的防御素,可能是防御素工业化开发的有效途径。

参考文献:

[1] Seebah S, Suresh A, Zhuo S, *et al*. Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35 (Database issue): D265 – D268.

[2] Bevins C L, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract[J]. Gut, 1999, 45(6): 911 – 915.

[3] Ericksen B, Wu Z, Lu W, *et al*. Antibacterial activity and specificity of the six human alpha-defensins[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 269 – 275.

[4] Hazrati E, Galen B, Lu W, *et al*. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection[J]. J Immunol, 2006, 177(12): 8658 – 8666.

[5] Zhang H, Yuan Q P, Zhu Y P, *et al*. Expression and preparation of recombinant hepcidin in *Escherichia coli*[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(2): 409 – 416.

[6] Rao X C, Li S, Hu J C, *et al*. A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*[J]. Protein Expr Purif, 2004, 36(1): 11 – 18.

[7] 王　蒙, 杨　媛, 杨峥嵘, 等. 人 TALL-1 基因在毕赤酵母中的分泌表达与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 494 – 497.

[8] Cabral K M, Almeida M S, Valente A P, *et al*. Production of the active antifungal Pisum sativum defensin 1 (Psd1) in Pichia pastoris: overcoming the inefficiency of the STE13 protease[J]. Protein Expr Purif, 2003, 31(1): 115 – 122.

[9] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, *et al*. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. Biochemistry, 1989, 28(9): 4117 – 4125.

[10] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance[J]. Pharmacology, 2003, 55(1): 27 – 55.

(编辑　栾　嘉)