

人溶菌酶在毕赤酵母中的表达及体外抑菌活性研究

李学优, 曹丁*, 肖宏艳, 黄秀敏, 甘祥武 (广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要 对重组人溶菌酶真核表达载体的构建筛选、表达与活性鉴定, 经过双酶切和测序鉴定表明, 重组载体正确。电转化毕赤酵母 GWDL 菌株, 通过 G418 抗性平板筛选得到高表达高效价菌株, 经诱导表达, 检测蛋白含量, 体外抑菌检测, 表达产物 15 ku 和预期结果一致, 筛选得到效价为 1 907 U/mL, 编号为 SMD1168-pPIC9k-HLZ 的高效价菌株; 采用重组人溶菌酶制剂, 检测样品 GWDL 对 5 种菌的最小抑菌浓度 (MIC), 藤黄微球菌的最小抑菌浓度较好, 表明重组人溶菌酶在毕赤酵母中成功表达, 活性较为稳定。

关键词 毕赤酵母; 菌株筛选; 高效表达; 抑菌活性

中图分类号 S 188 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)04-0100-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.04.029

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Expression of Human Lysozyme in *Pichia Pastoris* and Its Antibacterial Activity *in vitro*

LI Xue-you, CAO Ding, XIAO Hong-yan et al (Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663)

Abstract The screening, expression and activity identification of constructed recombinant human lysozyme eukartic expression vectors were studied. The recombinant vectors were shown to be correct through double enzyme digestion and sequencing identification. To electro-transform the *pichia pastoris* GWDL strain, through G418 resistance flat screening to obtain high expression of high-efficiency strains, the expression product (15 ku) was consistent with the expected results after induced expression, detection of protein content and *in vitro* antiseptic detection, we obtained No. SMD1168-pPIC9k-HLZ high titer strain with a titer of 1 907 U/mL; To detect the sample GWDL minimum bacterial concentration (MIC) for five bacteria by using Recombinant human lysozyme preparation, the minimum concentration of micrococcus luteus was better, indicating that recombinant human lysozyme in *pichia pastoris* successfully expressed, the activity was more stable.

Key words *Pichia pastoris*; Strain screening; Efficient expression; Antibacterial activity

溶菌酶是小分子碱性蛋白, 因其能有效地降解微生物的细胞壁, 溶解作用较好, 不易产生耐药性, 无副作用等优点, 被广泛应用于医药制剂、食品防腐等多个行业。溶菌酶可从胎盘中少量提取得到, 因提取量较少, 有着巨大的应用前景^[1-3]。

毕赤酵母是一种真核表达菌株, 此系统具有稳定性、高效表达、分泌性等特点, 可通过甲醇诱导, 提高溶氧量, 使得菌株效价更高^[4-5]。该研究以毕赤酵母为表达系统, 重组质粒, 经电击转化 SMD1168, 菌株经 G418 抗性筛选, 对筛选菌株进行诱导表达, 加大溶氧量提高表达量, 检测活性, 得到毕赤酵母的高效表达, 以期为后期扩大培养打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 大肠杆菌 DH5 α 、pPIC9K 质粒、藤黄微球菌、毕赤酵母 SMD1168 由广东省微生物种质资源库保存。

PFU Mix、DNA 胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒、引物、核酸染色剂、琼脂糖购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶、G418、DNA Marker、Protein Marker 购自 TaKaRa 公司; 酵母抽提物、胰蛋白酶购自英国 Oxoid 公司; cDNA 合成试剂盒购自 Toyobo 公司; 重组人溶菌酶标准品购自 Sigma 公司; 琼脂粉购自广州环凯生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备 生化培养箱, DHZ-DA 大容量全温振荡器, 752N 型紫外可见分光光度计, PCR 仪, 恒温金属浴, 水平/垂直电泳仪, 蓝光切胶仪, 显微镜, 电子天平, pH 计等。

1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 上发表的人溶菌酶基

因成熟肽序列及表达载体 pPIC9k 多克隆位点, 用 DNA star 5.0 设计合成引物 C1、引物 C2, 其中引物 C1 含有 *Xho* I 酶切位点 (下划线部分), 引物 C2 含有 *Not* I 酶切位点 (下划线部分), 插入序列带有蛋白酶裂解位点, 表达的溶菌酶有天然的 N 端。引物 C1: CCCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAAG-GTCTTTG; 引物 C2: CTGCGGCCGCTTACTCCACAACCTT-GAACATA。

1.4 人外周血淋巴细胞总 RNA 的提取及 cDNA 模板的克隆 收集无菌血样, 取 5 mL (适量肝素抗凝)。将采得的抗凝血在无菌状态下缓慢加入 2 倍 Ficoll 淋巴细胞分离液, 2 000 r/min 离心 10 min, 取云雾状的单核细胞层; 用 Trizol 法按照试剂盒说明提取人外周血淋巴细胞总 RNA, 即得到人淋巴细胞总 RNA; 并以总 RNA 为模板, 用 cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 合成反应。

1.5 人溶菌酶基因序列的 PCR 扩增 以反转录的 cDNA 为模板, 取引物 C1、C2 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, PFU Mix 25 μ L, 补充双蒸水至 50 μ L, PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应结束后将反应产物分别于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收, 回收产物即为人溶菌酶成熟肽基因片段。

1.6 人溶菌酶真核表达载体的构建与鉴定 将人溶菌酶基因片段和 pPIC9k 质粒分别用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切反应后, 回收酶切产物并进行连接反应, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 构建表达载体 pPIC9k-HLZ。将转化菌落经菌落 PCR 鉴定, 提取阳性克隆质粒送上海生工进行序列测定。

1.7 重组质粒对毕赤酵母 SMD1168 的转化及筛选 将构

基金项目 广州市科技计划项目 (201806010022)。

作者简介 李学优 (1995—), 女, 广东梅州人, 从事生物农业工程研究。

* 通信作者, 工程师, 硕士, 从事生物农业工程研究。

收稿日期 2019-09-02

建的重组质粒 pPIC9k-HLZ, 根据《毕赤酵母表达手册》用 *Sac* I 进行单酶切, 线性化质粒电击转化 SMD1168, 转化后的酵母细胞在无组氨酸培养基中培养至长出单菌落。挑选转化平板上长出来的菌落, 用裂解液进行 PCR 模板制备, 利用通用引物 α -Factor 和 3' AOX 进行 PCR 扩增, 将筛选到的阳性转化子经浓度逐渐增高的 G418 抗生素筛选高拷贝克隆, 用于表达目的蛋白。取证实整合有人溶菌酶目的基因的菌落, 为提高目的基因拷贝数, 提取质粒进行二次转化, 最后将转化菌液涂布于含 1 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 做高抗筛选, 依次增加 G418 抗性平板浓度, 筛选高拷贝克隆菌株, 筛选菌株标记为 SMD1168-pPIC9k-HLZ。

1.8 人溶菌酶的诱导表达及检测 将菌株 SMD1168-pPIC9k-HLZ 每组抗生素浓度分别选择 3 株接种到 BMGY 培养基中, 培养 24 h 后按照 10% 接种量转接 BMMY 表达培养基中用甲醇进行诱导表达, 于培养的 24、48、72 h 取表达上清进行 SDS-PAGE 蛋白电泳和抑菌活性检测。

1.9 重组酵母表达人溶菌酶抑菌活性测定

1.9.1 重组人溶菌酶抑菌效价测定。 将培养好的藤黄微球菌菌液调整至合适的菌浓, 加适量入熔化后的固体检测培养基中, 吸取混合均匀的含菌检测培养基 20 mL, 使其在 90 mm 培养皿底内均匀摊布, 放置在超净工作台上待其凝固。然后用灭菌的打孔器 (孔径 4.2 mm) 在每个培养皿均匀地打孔, 每孔加入 20 μ L 重组毕赤酵母表达上清, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 40~48 h。

标准曲线制作: 将稀释好的 2 万、1.5 万、1 万、5 000、2 500、1 000 标准品点样于同一个平板上。分别以标准品溶菌圈直径的平方为横坐标, 活性单位的常用对数值为纵坐标, 制作标准曲线。取待测样品稀释, 使其活性单位在标准曲线的活性浓度范围内, 将样品的抑菌圈直径数值代入标准曲线, 计算样品抑菌效价 (U/mL)。

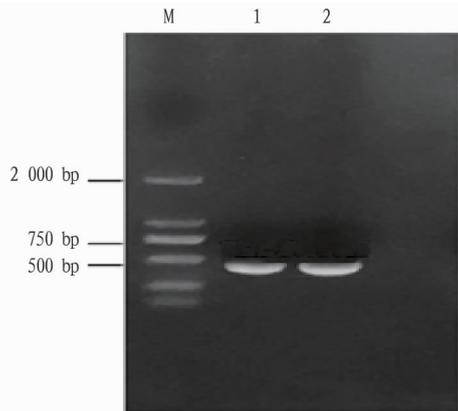
1.9.2 重组人溶菌酶制剂对体外常见致病菌的最小抑菌浓度测定。 调整每管致病菌菌液浓度约为 1×10^6 CFU/mL, 使用常量稀释法, 将重组人溶菌酶制剂稀释成浓度分别为 50.200、25.100、12.550、6.275、3.138、1.569、0.784、0.392、0.196、0.098 mg/mL, 检测重组人溶菌酶制剂对藤黄微球菌、大肠标准菌株、大肠杆菌 K12D31、巨大芽孢杆菌、沙门氏菌 5 种菌株抗菌药物最低抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 人溶菌酶基因序列的 PCR 扩增 由图 1 可知, 反转录后克隆人溶菌酶成熟肽基因序列, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现有一条清晰的条带, PCR 扩增后的溶菌酶成熟肽基因序列, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现有一条清晰的条带, 与 DNA Marker 相比, 大小位于 500 bp 左右, 带酶切位点的人溶菌酶基因序列为 429 bp, 条带大小相符。

2.2 人溶菌酶真核表达载体的构建与鉴定 从图 2 可看出, 选取人溶菌酶基因和 pPIC9k 连接产物转化子, 经菌落 PCR 扩增, 有明显条带, 与 DNA Marker 比对, 位于 500 bp 附近。由于鉴定 PCR 中采用的是 α -Factor 和 3' AOX 引物, 因此扩

增出来的片段是 583 bp, 与 PCR 检测的结果基本相符。将鉴定为阳性克隆的重组子委托上海生工进行序列测定, 测序结果显示, 此基因序列与 GenBank 上提供的相关基因序列的同源性为 100%。将此步构建的重组质粒含重组人溶菌酶基因命名为 pPIC9k-HLZ。

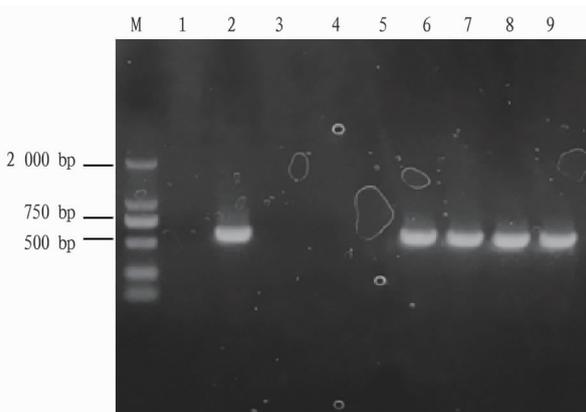


注: M. DL2000 DNA Marker; 1~2. 人溶菌酶基因片段

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1~2. Human lysozyme gene fragments

图 1 人溶菌酶基因 PCR 产物电泳结果

Fig.1 Electrophoretic results of PCR products of human lysozyme gene



注: M. DL2000 DNA Marker; 2, 6~9. 人溶菌酶基因阳性转化子的菌落 PCR 扩增产物

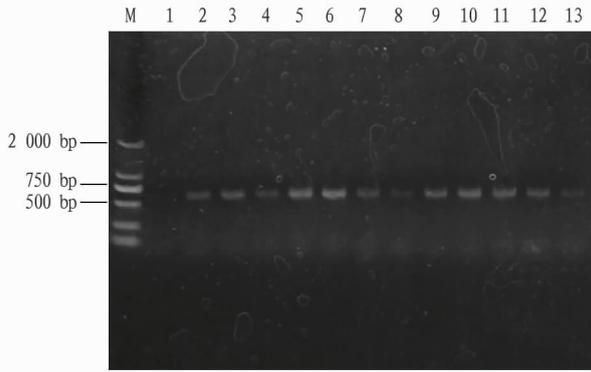
Note: M. DL2000 DNA Marker; 2, 6~9. PCR amplification of the colonies of human lysozyme gene-positive converter

图 2 人溶菌酶基因阳性转化子的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of human lysozyme gene-positive converter

2.3 重组质粒对毕赤酵母 SMD1168 的转化及筛选 用载体的通用引物 α -Factor 和 3' AOX 进行 PCR 分析, 得到约 583 bp 的片段, 阴性对照无扩增片段, 表明人溶菌酶基因表达单元已成功重组到酵母染色体上, 获得了人溶菌酶重组菌株, 表型均为 His+Mut+ (图 3)。获得的这些菌株可以作为甲醇诱导表达的菌株。

2.4 表达蛋白的电泳检测 分别取重组酵母 24、48、72 h 的摇瓶诱导表达上清做电泳鉴定, 同时以空酵母菌 SMD1168 的诱导上清和空载体 pPIC9k 转化酵母菌的诱导上清作为对照, 进行 15% SDS-PAGE 分析。

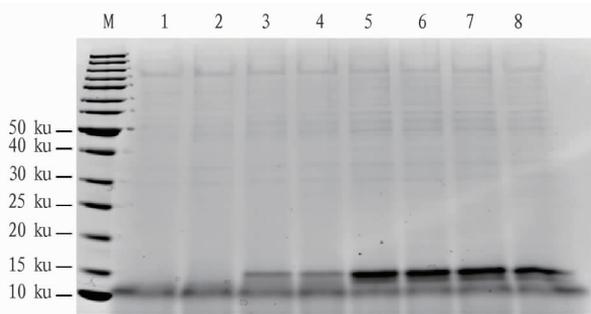


注: M. DL2000 DNA Marker; 1. SMD1168 酵母的 PCR 扩增结果; 2~13. pPIC9k-HLZ 转化毕赤酵母的菌落 PCR 扩增结果
Note: M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR amplification results of SMD1168 yeast; 2-13. pPIC9k-HLZ transforms PCR amplification results of bacillus in Beechy yeast

图3 阳性重组酵母的鉴定

Fig.3 Identification of positive recombinant yeast

将筛选到的高拷贝阳性毕赤酵母重组子 SMD1168-pPIC9k-HLZ 进行摇瓶诱导表达试验, 分别取不同时间表达上清进行 15% SDS-PAGE 电泳。从图 4 可以看出, 在 15 ku 左右出现特异蛋白条带, 与预期分子量 16 ku 大小基本相符, 而阴性对照未重组的 SMD1168 和空质粒转化对照 SMD1168-pPIC9k 未出现相应条带。光密度扫描结果显示, 重组人溶菌酶基因重组酵母摇瓶蛋白表达量在 48 h 达到最高, 72 h 保持稳定, 可选择 48 h 为结束培养时间。



注: M. 蛋白 Marker; 1. SMD1168 诱导 48 h 表达上清; 2. SMD1168-pPIC9k 诱导 48 h 表达上清; 3~4. SMD1168-pPIC9k-HLZ 诱导 24 h 表达上清; 5~6. SMD1168-pPIC9k-HLZ 诱导 48 h 表达上清; 7~8. SMD1168-pPIC9k-HLZ 诱导 72 h 表达上清

Note: M. Protein Marker; 1. SMD1168 induced 48 h expression supernatant; 2. SMD1168-pPIC9k induced 48 h expression supernatant; 3-4. SMD1168-pPIC9k-HLZ induced 24 h expression supernatant; 5-6. SMD1168-pPIC9k-HLZ induced 48 h expression supernatant; 7-8. SMD1168-pPIC9k-HLZ induced 72 h expression supernatant

图4 酵母不同时间诱导上清 SDS-PAGE 结果

Fig.4 SDS-PAGE results of supernatant induced by yeast at different time

2.5 抑菌活性检测 从图 5 可看出, 溶菌酶的抑菌活性与菌株的抗生素抗性在一定范围内呈正相关, 拷贝数的增加并不能持续提高溶菌酶的表达, 可能跟宿主菌细胞的物质代谢有

关。选取抗 3.0 mg/mL 的重组毕赤酵母分泌表达菌株 SMD1168-pPIC9k-HLZ 进行后续的优化试验。

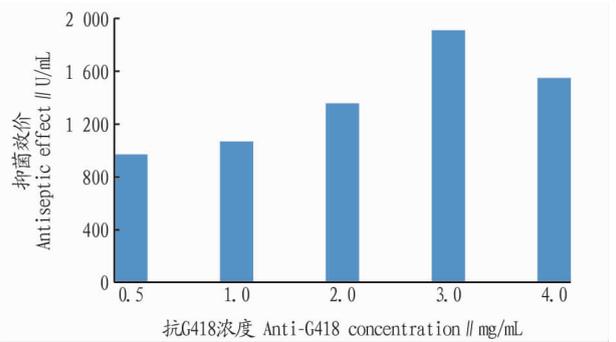


图5 不同筛选菌株的抑菌效价

Fig.5 The antiseptic effect of different filtered strains

2.6 重组人溶菌酶制剂对体外常见致病菌的最小抑菌浓度测定 取抑菌效价为 12 000 U/g 左右的重组人溶菌酶制剂, 测定其对不同致病菌株的 MIC。从表 1 可看出, 其对革兰氏阳性菌有较好的抑菌作用, 对革兰氏阴性菌抑菌作用较差, 对藤黄微球菌的最低抑菌浓度最小, 抑菌效果最好, 对沙门氏菌无抑菌作用, 此抑菌数据对重组人溶菌酶制剂后期在饲料添加剂领域的应用具有指导作用。

表1 重组人溶菌酶制剂对 5 种致病菌的 MIC 检测结果

Table 1 MIC test results of recombinant human lysozyme preparations for five pathogenic bacteria

序号 No.	受试菌 Tested bacteria	MIC 浓度 MIC concentration // mg/mL
1	藤黄微球菌	0.196
2	大肠标准菌株	25.100
3	大肠杆菌 K ₁₂ D ₃₁	12.550
4	巨大芽孢杆菌	1.569
5	沙门氏菌	50.200

3 结论与讨论

该研究成功构建载体, 整合重组人溶菌酶, 通过转化筛选, 经诱导表达, 检测蛋白含量, 进行体外抑菌检测, 表达产物 15 ku, 和预期结果一致, 筛选得到效价为 1 907 U/mL, 编号为 SMD1168-pPIC9k-HLZ 的高效价菌株; 重组人溶菌酶制剂, 通过检测样品毕赤酵母 GWDL 对 5 种菌的最小抑菌浓度 (MIC), 对藤黄微球菌的最低抑菌浓度最小, 抑菌效果最好, 对阳性菌有较好的抑菌作用。

毕赤酵母分泌表达人溶菌酶基因的研究较多, 其成分简单, 便于制成溶菌酶基因工程产品, 而关于胞外表达的研究较少, 关于溶菌酶的研究很多^[6-7]。目前, 国内外人溶菌酶主要是基因工程表达, 表达产物大多都是包涵体的形式, 为保证蛋白分离纯化和重组蛋白的活性, 毕赤酵母表达系统产物都分泌于培养上清中, 自身所分泌的蛋白较少, 比较有利于蛋白分离纯化^[8]。但市面上由于致病菌的耐药性问题日益加剧, 抗生素的滥用, 导致安全性问题越来越严重。人溶菌酶是人体自身产生的碱性肽类抗菌物质, 其解决了抗生素

(下转第 105 页)

研究开发利用提供基础支持;其次,大力引导以中草药、山野菜、木本粮油为代表的野生植物种质资源的开发利用,定期向社会发布可供利用的野生植物种质资源目录,引导公众绿色、健康、环保的消费理念,立足林业,解决与人们生活密切相关的“药罐子”“菜篮子”“粮袋子”“油瓶子”问题^[14,16];第三,引领社会公众了解森林、亲近自然,全面认知各类野生种质资源及其产品与人们生产生活之间的密切关系,宣传绿色可持续发展的理念。建立中国林草资源博物馆,通过全方位形象生动的展示,提高全社会对种质资源及生态保护在美丽中国建设中重要地位的认识,争取社会各界对林业建设的支持,同时吸引更多的社会力量参与到林业事业发展中来。

3.3 眼光更远一些 “不谋大势者,不足以谋一时”。种质资源保护是一项基础性、长期性的工作,必须要立足当前、着眼长远。一是始终将人才作为第一资源,创新作为第一动力,依托林业院校、国内外科研院所,建设林木种质资源研究创新团队,重点培养青年科技人才,分层次培养实用性人才和领军型人才,形成稳定、专业化的林木种质资源人才队伍。支持大专院校、科研院所进行林木种质资源保存、利用和选育联合攻关。二是加强合作交流,利用好国家林木种质资源共享服务平台,加强与国内外科研院所的合作。三是开展林木种质资源动态监测,建立林木种质资源动态监测体系,研究建立原地保存、异地保存与设施保存等不同方式的监测与预警制度体系及技术体系,建立林木种质资源监测站(网)点,为我国建立林木种质资源监测预警体系和应急响应机制提供科学决策^[10,17]。

(上接第 102 页)

滥用引起的耐药性和药物残留问题^[9-10]。将溶菌酶添加到饲料中,会大大减低畜禽的发病率,可提高动物的生产性能。试验重组人溶菌酶,提高菌株活性,在后期大量生产得到高效能产物,减少生产成本。

参考文献

- [1] 陈晶晶.巴斯德毕赤酵母发酵生产重组人溶菌酶研究[D].北京:北京化工大学,2006.
- [2] 丁健.基于人工智能和代谢调控的典型好氧发酵过程在线控制和故障诊断[D].无锡:江南大学,2014.
- [3] 夏清风,侯英敏,曹芳,等.人溶菌酶基因在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性检测[J].大连工业大学学报,2011,30(5):346-349.

参考文献

- [1] LI D Z, PRITCHARD H W. The science and economics of ex situ plant conservation[J]. Trends in plant science, 2009, 14(11): 614-621.
- [2] JACKSON P W, KENNEDY K. The Global Strategy for Plant Conservation: A challenge and opportunity for the international community[J]. Trends in plant science, 2009, 14(11): 578-580.
- [3] LARKIN D J, JACOBI S K, HIPPI A L, et al. Keeping all the PIECES: Phylogenetically Informed Ex Situ Conservation of Endangered Species [J]. PLoS One, 2016, 11(6): 1-17.
- [4] 郭起荣.中国森林植物种质资源保育[D].北京:中国林业科学研究院,2006.
- [5] 戴薛,张家来.林木种质资源保存技术探讨[J].湖北林业科技,2018,47(3):20-24,33.
- [6] 任海.植物园与植物回归[J].生物多样性,2017,25(9):945-950.
- [7] 林富荣,顾万春.植物种质资源设施保存研究进展[J].世界林业研究,2004,17(4):19-23.
- [8] 李德铤,杨湘云,PRITCHARD H W.种质资源保存的战略问题和面临的挑战[J].植物分类与资源学报,2011,33(1):11-18.
- [9] 富玫瑰.关于林木种质资源设施保存库建设的思考[J].林业资源管理,2018(2):35-37,57.
- [10] 王玉玲,解孝满,韩彪,等.林木种质资源设施保护中的问题与思考[J].山东林业科技,2013,43(3):107-109.
- [11] 黎裕,王天宇.美国植物种质资源保护与研究利用[J].作物杂志,2018(86):1-9.
- [12] 张金梅,闫文君,李雪,等.桃花粉低温和超低温保存方法比较研究[J].植物遗传资源学报,2017,18(4):670-675.
- [13] 李德铤.中国西南野生生物种质资源库种子名录 2018[M].北京:科学出版社,2018:1-14.
- [14] 刘加文.大力发展中国草种业[J].草地学报,2016,24(3):483-484.
- [15] 高秋,马金星.DNA 条形码技术及其在草种质资源保护中的应用前景[J].种子,2015,34(8):53-56.
- [16] 陈志宏,李新一,洪军.我国草种质资源的保护现状、存在问题及建议[J].草业科学,2018,35(1):186-191.
- [17] 卢新雄.植物种质资源库的设计与建设要求[J].植物学通报,2006,23(1):119-125.
- [4] 贾向志,袁汉英,马文煜,等.人溶菌酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J].第四军医大学学报,2001,22(22):2068-2072.
- [5] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1): 45-66.
- [6] 胡乔,赵凌侠,唐克轩.在毕赤酵母中表达人溶菌酶蛋白的研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2008,26(3):233-236,241.
- [7] 齐小雨,陈熙,张伟.人溶菌酶重组酵母工程菌的构建和活性干粉的制备[J].江苏农业学报,2016,32(5):1122-1127.
- [8] 申艳敏,魏建超,尚书文,等.人源抗菌肽 LL-37 在毕赤酵母中的高效表达及其活性检测[J].微生物学通报,2008,35(4):539-544.
- [9] 温赛,刘怀然,续丹丹.溶菌酶及其分子改造研究进展[J].中国生物工程杂志,2015,35(8):116-125.
- [10] 夏宇.溶菌酶替代抗生素的研究进展[J].现代畜牧兽医,2016(5):51-54.