

大黄鱼与美国红鱼抗菌肽 *Piscidin* 串联基因的构建、 酵母表达及抗菌活性鉴定

乔莹¹, 王军², 马笑晚¹, 潘滢³, 柯巧珍³, 郑炜强³, 苏永全^{2*}

(1. 自然资源部第四海洋研究所, 广西 北海 536000; 2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102; 3. 大黄鱼育种企业国家重点实验室, 福建 宁德 352103)

摘要: 采用 *Piscidin* 基因串联表达的方案, 通过 *Eco31I* 快切酶定向连接方法合成 *Pseudosciaena crocea-Sciaenops ocellatus-piscidin* (PSP) 串联基因。以毕赤酵母穿梭表达载体 pPICZαA 为表达载体, 构建重组表达载体 pPICZαA-PSP, 转化入毕赤酵母 SMD1168 中, 应用实时定量方法进行多拷贝克隆筛选, 对 PSP 重组蛋白进行诱导表达并纯化, 并对其抑菌活性进行初步鉴定, 为 *piscidin* 抗菌肽的生产应用奠定基础。

关键词: 抗菌肽; *piscidin*; 串联基因; 真核表达; 抗菌活性

中图分类号: Q781

文献标志码: A

Piscidin 家族抗菌肽作为最常见的阳离子抗菌肽, 对细菌、真菌、病毒、等有着广泛的抑制作用, 是生物体天然免疫的重要组成部分^[1-2]。本课题组前期研究表明大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) *piscidin* 抗菌肽 (PC-*piscidin*) 对多种细菌和真菌都具有杀灭活性, 且对鱼类常见寄生虫刺激隐核虫具有较强的杀灭作用^[3], 而美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*) *piscidin* 抗菌肽 (SO-*piscidin*) 对细菌杀灭活性较弱, 但对刺激隐核虫具有较好的杀灭作用 (未发表)。

从天然资源中提取抗菌肽成本高、得率低, 而化学合成抗菌肽则价格昂贵, 难以应用。目前多使用基因工程制备抗菌肽, 但由于 *Piscidin* 家族抗菌肽约为 20~26 个氨基酸组成的小肽, 分子量较小, 容易降解, 导致表达产量低, 成为其生产应用的主要瓶颈。本研究构建了两种 *piscidin* 抗菌肽串联基因表达载体, 在毕赤酵母 SMD1168 菌株中表达串联抗菌肽, 并对其抑菌活性进行了初步鉴定, 以期为 *piscidin* 抗菌肽的串联表达和应用提供实践依据。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2018-12-26 **录用日期:** 2019-05-13

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金 (2017L3019); 大黄鱼技术平台建设项目 (XDHT2018143A); 国家海水鱼产业技术体系 (CARS-47); 自然资源部第四海洋研究所博士启动基金 (201803)

***通信作者:** yqsu@xmu.edu.cn

1.1 材料

大黄鱼 piscidin 成熟肽基因 (PC-piscidin, GenBank: KC357672.1), 美国红鱼 piscidin 成熟肽基因 (SO-piscidin, GenBank: JQ710935.1) 由本实验室扩增获得, 并分别构建 PC-piscidin-pmd19-T, SO -piscidin-pmd19-T 克隆载体。

真核表达载体 pPICZ α A 及 SMD1168 酵母细胞株由本实验室保存; 克隆菌株 *E.coli* Trans5 α 购自全式金生物有限公司; 限制性内切酶 *Xho*I、*Xba*I、*Eco*31I、*Sac*I 购自 Fermentas 公司; 琼脂糖凝胶电泳 DNA 回收试剂购自 Axygen 公司; T4 连接酶及博莱霉素 zeocin 购自 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司; 遗传霉素(或抗生素)G418 购自索莱宝公司; SYBR $\text{\textcircled{R}}$ Premix Ex Taq TM 聚合酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 串联基因设计及表达载体构建

P. crocea-*S. ocellatus*-piscidin (PSP) 串联基因设计如图 1 所示, 由 2 个 PC-piscidin 基因串联、2 个 SO-piscidin 基因串联、3 个连接肽基因 (linker gene, 序列为 5'-GGTTCTCCAGGTTCCGGT-3') 组成, 串联肽 N-端加入 His 标签, 便于采用亲和层系纯化目的蛋白; 5'-端根据 pPICZ α A 载体说明书添加 Kex2 蛋白酶切位点, 以便于重组目的蛋白的分泌表达。两端 *Xho*I、*Xba*I 酶切位点用于连接 pPICZ α A 表达载体, *Eco*31I 酶切位点用于引入 linker gene, 并实现各个串联基因间的无缝连接^[4]。

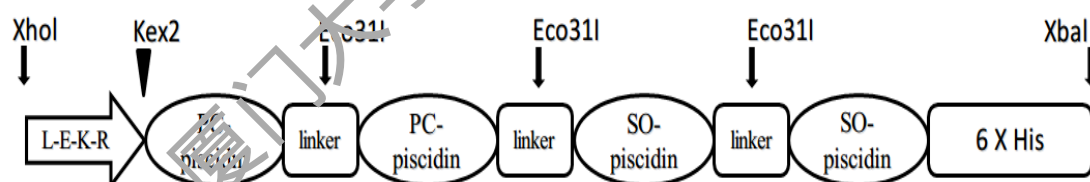


图 1 PSP 串联基因设计结构

Fig. 1 Construction of PSP tandem piscidin gene

参照 PSP 串联肽基因设计, 根据毕赤酵母密码子偏好性, 分别设计合成 PC1、PC2、PC3、PC4、SO5、SO6、SO7、SO8 共 8 条引物 (表 1), 分别使用 PC-piscidin-pmd19-T 与 SO-piscidin-pmd19-T 质粒为模板进行 PCR 扩增。扩增产物胶回收后进行 TA 克隆, 送测序公司测序验证。分别使用 *Xho*I、*Xba*I 及 *Eco*31I 对测序正确质粒进行酶切, 切胶回收目的条带。分别加入适量浓度的回收片段, 与适量浓度 *Xho*I/*Xba*I 酶切处理后的 pPICZ α A 载体混匀, 加入 T4 连接酶, 16 $^{\circ}$ C 水浴连接过夜, 转化 *E.coli* Trans5 α ^[5], 涂布 zeocin 抗性的 LB 平板。PCR 方法与双酶切方法筛选阳性克隆后, 送测序公司测序验证序列, 获得含有目的片段的

重组质粒 pPICZ α A-PSP。

表 1 实验使用引物

Tab.1 Primers used in the experiment

引物名称	引物序列 (5'→3')
PC1	CTCGAGAAAAGAATTTGGGGTTTAATTG
PC2	GGTCTCCTGGAGAACCGTGACCTCGTATC
PC3	GGTCTCCTCCAGGTTCCGGTATTTGGGGTTTAA
PC4	GGTCTCCAGAACCGTGACCTCGTATCAG
SO5	GGTCTCGTTCTCCAGGTTCCGGTATTTGGGGGCTTA
SO6	GGTCTCGCCTGGAGAACCGCCATTAACCAG
SO7	GGTCTCGCAGGTTCCGGTATTTGGGGGCTTA
SO8	TCTAGATCAATGATGATGATGATGGTGGCC
GAP-F	CACAATGGCTATCACTGTCG
GAP-R	GACACACTACAGCCCGCATT
RT-GAP-1	GGTATTAACGGTTTCGGACGTATTG
RT-GAP-2	GATGTTGACAGGGTCTCTCTCTTTCG
RT-PSP-1	CTCGAGAAAAGAATTTGGGGTTTAA
RT-PSP-2	TGATGATGATGATGGTGGCCATTA
5'-AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'-AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC

1.2.2 阳性重组酵母菌株构建及鉴定

大量培养提取验证的 pPICZ α A-PSP 质粒，使用 *SacI* 限制性内切酶线性化约 10 μ g 重组表达质粒，重沉淀回收后，利用 P10-rad 电转化仪将其转化入 SMD1168 酵母感受态细胞中（电容 25 μ F、电压 2000 V、电阻 200 Ω ）。取适量电转化后的酵母细胞，涂布于基础葡萄糖培养基（Minimal Dextrose MD）平板上，30 $^{\circ}$ C 孵育 2~3 d 至白色克隆子产生。阴性对照为 pPICZ α A 空载体转化 SMD1168。

将所有的克隆子用无菌水冲洗混匀，稀释，均匀涂布于含有不同浓度 G418（0.5，1.0，2.0，3.0，4.0 mg/mL）的 YPD 平板上，30 $^{\circ}$ C 孵育 2~3 d 筛选多拷贝重组子。挑取新生长的重组子于 YPD 培养基中培养，提取酵母基因组 DNA，使用 5'-AOX、3'-AOX、PC1、SO8 引物交替组合进行 PCR 筛选阳性克隆。

1.2.3 实时荧光定量（qRT-PCR）方法鉴定多拷贝重组子

1) 标准质粒及检测样品构建

以 SMD1168 酵母基因组为模板，GAP-1 和 GAP-2 为引物（表 1），扩增毕赤酵母看家基因 GAP（Glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase），连接克隆载体，构建 pmd-19-T-GAP（T-GAP）标准质粒，测序验证。

以插入 *PSP* 串联基因的 SMD1168 毕赤酵母基因组 DNA 作为 qRT-PCR 的检测样品。

2) 标准曲线建立

根据质粒的质量分数和阿伏伽德罗常数 (6.02205×10^{23}), 计算出每微升 T-GAP 质粒溶液中所含质粒的拷贝数。将质粒溶液稀释成拷贝数分别为 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 $10^9/\mu\text{L}$ 的质粒 DNA 溶液, 分别以 $1 \mu\text{L}$ 各稀释梯度的质粒溶液作为模板, 以 RT-GAP-1、RT-GAP-2 和 RT-PSP-1、RT-PSP-2 引物 (表 1), 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ (TAKARA) 说明书进行 qRT-PCR。每个样品重复 3 次进行检测, 以 Ct 值作为横坐标, 起始模板中质粒拷贝数的对数作为纵坐标, 建立标准曲线。

3) *PSP* 基因拷贝数检测

以插入 *PSP* 串联基因的 SMD1168 毕赤酵母基因组 DNA 各 $1 \mu\text{L}$ 作为模板, 以 RT-GAP-1、RT-GAP-2 和 RT-PSP-1、RT-PSP-2 引物, 进行 qRT-PCR 检测。将获得的 Ct 值代入标准曲线方程内, 求出 DNA 样品中 *GAP* 基因和 *PSP* 基因的起始模板拷贝数。由于 *GAP* 基因以单拷贝形式存在于毕赤酵母基因组中^[6], 故为 *PSP* 基因在毕赤酵母基因组中的拷贝数即为 *PSP* 基因起始模板拷贝数与 *GAP* 基因起始模板拷贝数的比值。

1.2.4 *PSP* 串联肽的表达和检测

将筛选到的多拷贝阳性克隆接种于 5 mL 缓冲甘油复合培养基 (buffered glycerol-complex medium/ BMGY) (pH 6.0) 中, $29 \text{ }^\circ\text{C}$, 260 r/min 振荡培养约 18 h , 至 A_{600} 达 $2.0 \sim 6.0$, 室温 $1500 \sim 2000 \text{ g}$ 离心收集细胞。使用等体积 (5 mL) 缓冲甲醇复合培养基 (buffered methanol-complex medium/ BMMY) (pH 6.0) 重悬细胞, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 230 r/min 振荡培养, 诱导表达; 每 24 h 补充一次甲醇至终体积分数 0.5% , 同时补充 BMMY 使发酵液总体积保持不变。在培养 0 和 72 h 时间点各取 3 mL 发酵液, 离心取上清用于蛋白表达量的分析。TCA (三氯乙酸) 法浓缩蛋白, 加入适量 $1 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液重悬, tricine-SDS-PAGE 电泳^[7]分析蛋白的表达情况, 并使用 Western blot 检测重组蛋白的表达。

1.2.5 抑菌活性检测

通过最小抑菌浓度 (minimum inhibition concentration, MIC) 的测定检测抑菌活性。带有组氨酸标签的表达产物, 通过镍柱纯化回收后, 定量分装冻存待用。抑菌活性实验选择革兰氏阳性菌: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*); 革兰氏阴性菌: 大肠杆菌、嗜水假单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、铜绿假单胞菌

(*Pseudomonas aeruginosa*); 酵母: 白假丝酵母 (*Candida albicans*)、毕赤酵母 GS115 (*Pichia pastoris* GS115); 真菌: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 为待测菌。

将少量已活化的菌液划线于 MHA 平板上, 倒置培养 12 h。从平板上挑取 1 个单菌落划线于 MHA 斜面培养基上, 28 °C 培养 12 h 后, 用 NaPB (10 mmol/L) 洗脱斜面培养物, 并用酶标仪测定洗脱液的吸光度值。加一定量的洗脱液于 NaPB 或工作培养基中, 使最终细菌悬浮液的吸光度值为 0.0018。

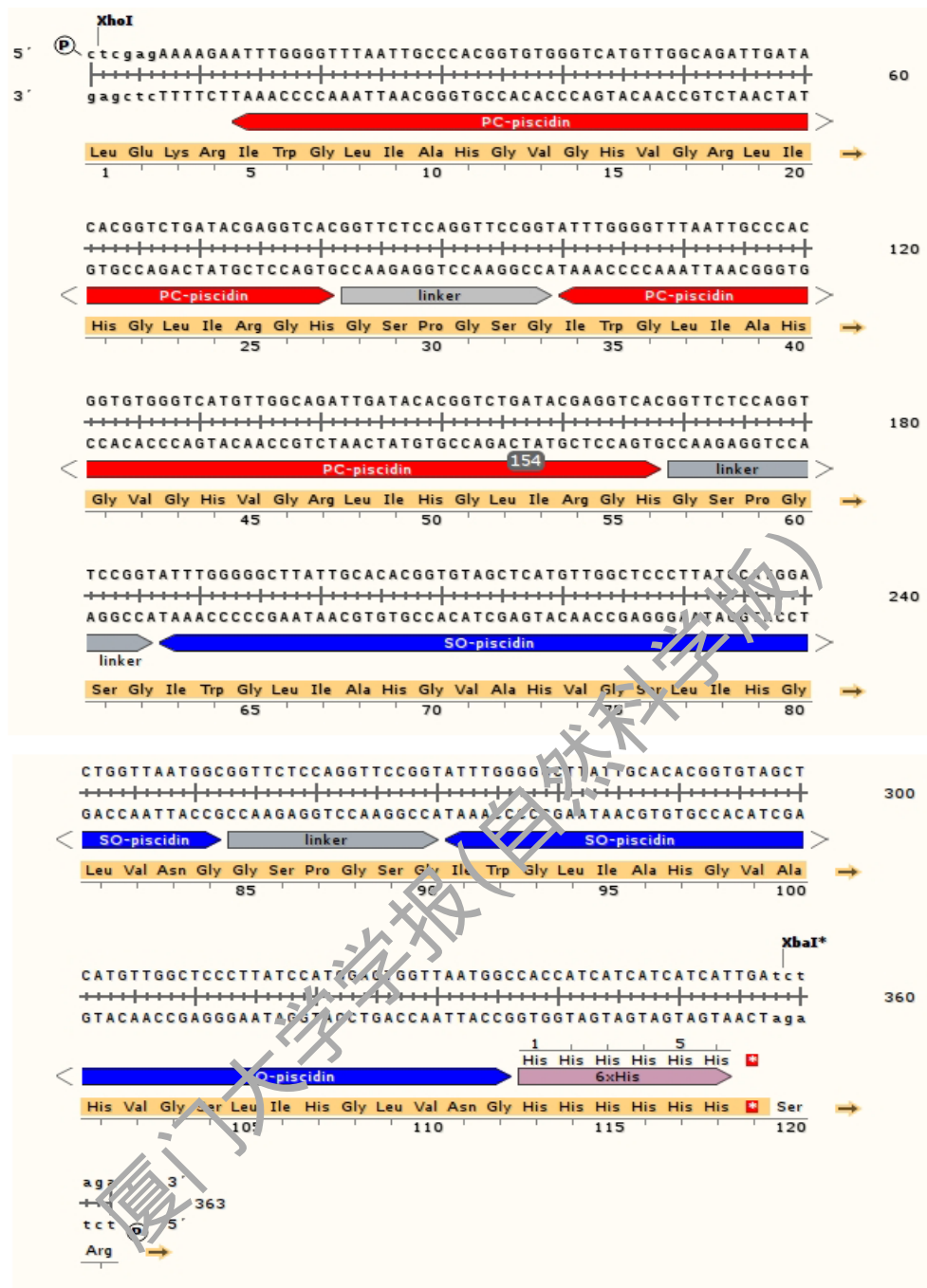
设计实验组、空白对照组和阴性对照组进行实验, 每个待测 PSP 抗菌肽浓度设 2 个平行。各组分配如下: 1) 实验组为 50 μ L 抗菌肽工作液+ 50 μ L 细菌悬浮液; 2) 空白对照为 50 μ L 无菌水 + 50 μ L 细菌悬浮液; 3) 阴性对照为 50 μ L 工作培养基 + 50 μ L 最低浓度的抗菌肽工作液。

28 °C 培养 24 h 后肉眼观察实验结果。当空白对照组细菌明显生长、阴性对照组培养物澄清时, 有细菌生长的最高抗菌肽浓度 (a) 至细菌未生长 (即培养物澄清) 的最低抗菌肽浓度 (b) 为 MIC (a~b), 3 次重复操作确定其最小抑菌浓度 MIC。

2 结果与分析

2.1 表达载体构建

重组表达载体经测序验证正确, 目的片段为 358 bp, 与片段设计大小相符, 基因序列及各个组分如图 2 所示。红色片段为 PC-piscidin 重复序列, 蓝色片段为 SO-piscidin 重复序列, 灰色为连接肽重复序列。基因 C 端连接 6 \times His 标签, 便于重组蛋白的亲纯化。

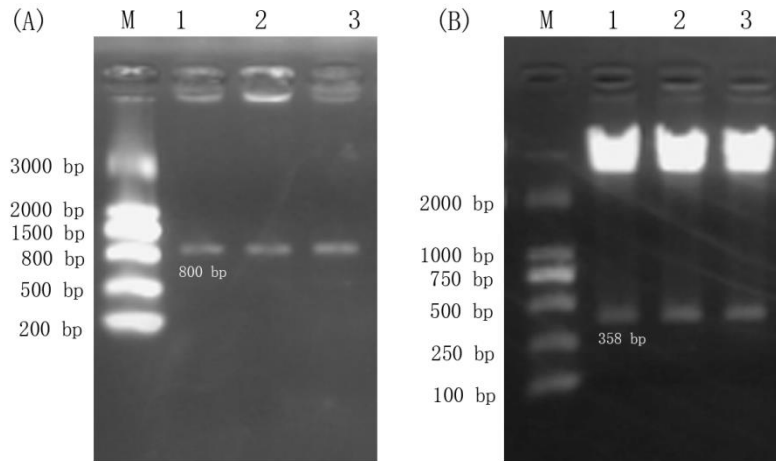


图中红色标记为 PC-piscidin 片段，蓝色标记为 SO-piscidin 片段，灰色标记为 linker 片段，棕色标记为 6×His 片段。

图 2 PSP 串联基因序列及结构

Fig.2 Sequence and illustration of the *PSP* tandem gene

使用 5'-AOX 和 3'-AOX 通用引物 PCR 检测重组质粒获得约 800 bp 目的条带(图 3(A))，并使用 *Xho*I, *Xba*I 双酶切处理 pPICZαA-PSP 质粒，如图 3(B)所示，酶切形成 358 bp 与 3500 bp 两条带，证实插入表达载体片段与设计合成基因一致。



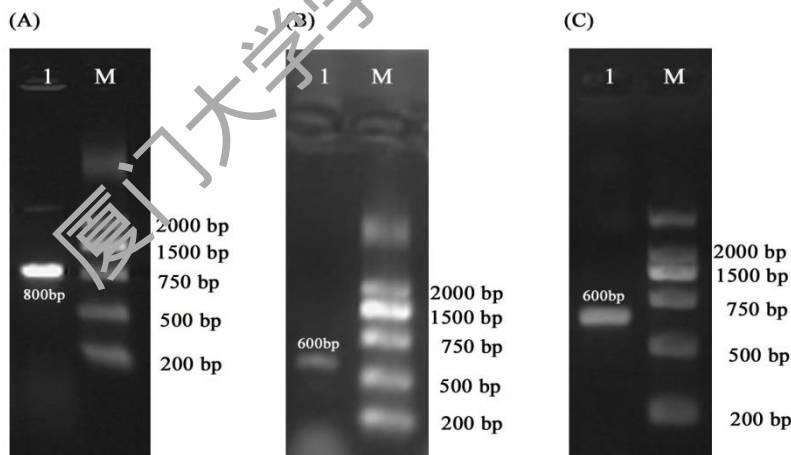
(A) Products of PCR from pPICZ α A-PSP, 图中条带显示 800 bp; (B) pPICZ α A-PSP digested by *Xho*I and *Xba*I. 图中条带显示约 358 bp。M. DNA 分子质量标准。

图 3 pPICZ α A-PSP 重组质粒 PCR 与双酶切验证

Fig.3 PCR and double enzymes confirmation of pPICZ α A-PSP plasmid

2.2 重组酵母菌株构建及鉴定

*Sac*I 限制性内切酶线性化后的 pPICZ α A-PSP 及 pPICZ α A 质粒, 经电转化 SMD1168 毕赤酵母感受态, 获得菌落扩大培养后, 提取基因组 DNA。使用 5'-AOX, 3'-AOX, PC1, SO8 引物交替组合进行 PCR 筛选阳性克隆。各对组合交替验证证明目的片段已整合进酵母基因组中 (图 4)。



(A) 5'-AOX, 3'-AOX 引物扩增条带约为 800 bp; (B) 5'-AOX, SO8 引物扩增条带约为 600 bp; (C) PC1, 3'-AOX 引物扩增条带约为 600 bp。

图 4 阳性克隆筛选

Fig.4 Positive clone screening result

2.3 多拷贝重组菌株的筛选

GAP 和 *PSP* 基因的标准曲线见图 5。 *GAP* 基因标准曲线的回归方程为: $y = -0.25368x +$

10.71949 ($R = 0.99813$), *PSP* 基因标准曲线的回归方程为: $y = -0.25696x + 11.93806$ ($R = 0.99683$)。将实验所得各阳性菌株的 C_t 值分别代入标准曲线回归方程中, 求出所检测 DNA 模板样品中 *PSP* 基因拷贝数与 *GAP* 基因拷贝数, 两者之比即为 *PSP* 基因在酵母基因组中的拷贝数, 见表 2。结果显示第 12 号菌株在基因组中存在 5 个拷贝的 *PSP* 基因, 采用此菌株进行后续蛋白表达。

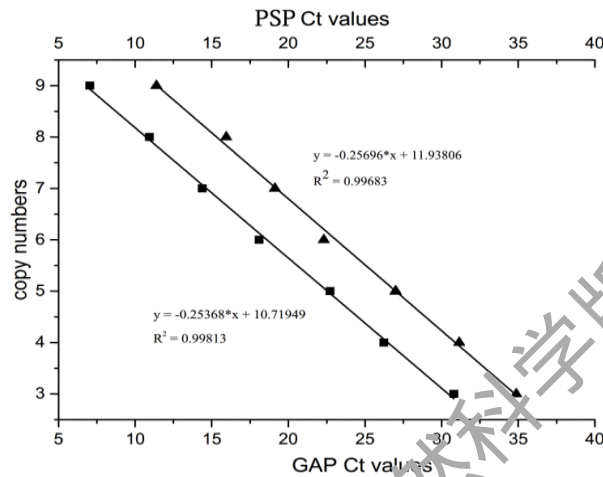


图 5 *PSP* 与 *GAP* 基因的标准曲线
Fig.5 Standard curves of *GAP* and *PSP* genes

表 2 qRT-PCR 检测 *PSP* 基因的拷贝数
Tab.2 Copy numbers of *PSP* gene detected by qRT-PCR

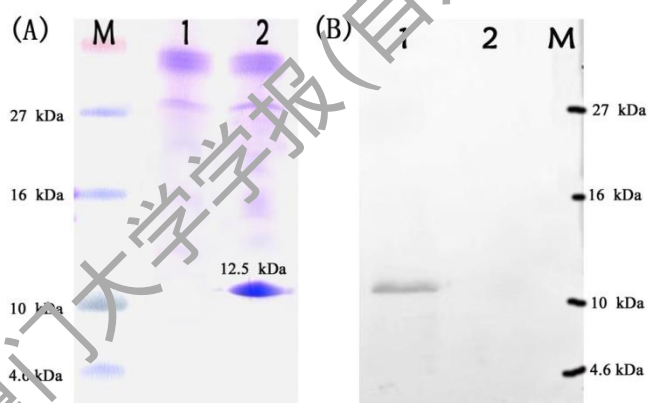
菌株 编号	C_t 值		基因拷贝数		<i>PSP</i> 基因在酵母基因组中的拷贝数 (<i>PSP</i> 基因拷贝数/ <i>GAP</i> 基因拷贝数)
	<i>PSP</i> 基因	<i>GAP</i> 基因	<i>PSP</i> 基因	<i>GAP</i> 基因	
1	15.23±0.45	15.44±0.07	8.02±0.12	6.80±0.02	1.18±0.02
2	14.09±0.39	34.67±0.78	8.32±0.10	1.92±0.20	4.35±0.46
3	-	-	-	-	-
4	17.82±0.10	18.23±0.28	7.36±0.03	6.09±0.07	1.21±0.02
5	14.85±0.05	15.62±0.22	8.12±0.01	6.76±0.06	1.20±0.01
6	14.15±0.02	19.81±4.33	8.30±0.01	5.69±1.10	1.50±0.32
7	14.58±0.07	15.51±0.03	8.19±0.02	6.78±0.01	1.21±0.00
8	15.07±0.36	17.09±0.88	8.06±0.09	6.38±0.22	1.26±0.03
9	16.09±0.02	16.33±0.04	7.80±0.01	6.58±0.01	1.19±0.00
10	15.11±0.22	15.58±0.16	8.06±0.06	6.77±0.04	1.19±0.01
11	-	-	-	-	-
12	13.37±0.09	35.45±0.92	8.50±0.02	1.72±0.23	5.00±0.74
13	-	-	-	-	-
14	13.97±0.04	29.69±4.09	8.35±0.01	3.19±1.04	2.79±0.80
15	13.95±0.03	34.85±1.43	8.35±0.01	1.88±0.36	4.57±0.99

16	14.86±0.40	17.73±0.34	8.12±0.10	6.22±0.09	1.31±0.02
17	15.65±0.10	16.02±0.12	7.92±0.03	6.65±0.03	1.19±0.01
18	14.73±0.08	15.38±0.09	8.15±0.02	6.82±0.02	1.20±0.00
19	15.31±0.08	16.49±0.10	8.00±0.02	6.53±0.02	1.22±0.00
20	13.45±0.13	34.38±0.51	8.48±0.03	2.00±0.13	4.26±0.29
21	12.57±0.13	13.78±0.12	8.71±0.03	7.22±0.03	1.21±0.01
22	14.13±0.05	16.73±0.45	8.31±0.01	6.48±0.11	1.28±0.02
23	15.50±0.03	16.24±0.08	7.95±0.01	6.60±0.02	1.21±0.00
24	15.64±0.13	14.75±0.32	7.92±0.03	6.98±0.08	1.14±0.02

注：表格中“-”表示无效数据。

2.4 PSP 串联肽的诱导表达及鉴定

挑取筛选到的阳性酵母菌株进行诱导表达，同时将空载体(pPICZαA)转化菌作为阴性对照。菌体诱导 72 h 后，将发酵液离心去除菌体，上清使用 TCA 法浓缩蛋白，进行 tricine-SDS-PAGE 检测(图 6(A))，在 12.5 kDa 处检测到目的条带，与设计理论值一致。Western blot 使用 His-tag 抗体显色，重组蛋白有明显显色条带，证明重组 PSP 串联肽有正确表达释放(图 6(B))。



(A) M.低分子质量蛋白标准，1.未诱导浓缩上清，2.诱导后浓缩上清；(B) M.低分子质量蛋白标准；1.诱导后浓缩上清；2.未诱导浓缩上清。

图 6 PSP 串联肽表达产物 Tricine-SDS-PAGE 分析和 Western blot 检测

Fig. 6 Tricine-SDS-PAGE and Western blot analysis of the culture supernatant of PSP- tandom peptide

2.5 表达产物抗菌活性检测

PSP 串联肽 MIC 测定结果显示，其对于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 均有较好的抑菌效果，其 MIC 为 1.5~3 μM (见表 3)。相较于大黄鱼 PC-piscidin，PSP 串联肽 MIC 值略微下降，证明其抑菌活性略微低于 PC-piscidin，但其抑菌活性普遍高于美国红鱼 SO-piscidin 抗菌肽，仅

对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*/*Pseudomonas aeruginosa*)、假丝酵母菌 (*Candida albicans*) 及黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 抑菌活性较弱。

表 3 大黄鱼 PC-piscidin, 美国红鱼 SO-piscidin 及 PSP 串联抗菌肽抑菌活性比较
Tab.3 Comparison of MIC of PC-piscidin, SO-piscidin and PSP.

菌株	PC-piscidin MIC (μmol/L)	SO-piscidin MIC (μmol/L)	PSP MIC (μmol/L)
革兰氏阳性菌			
<i>Bacillus subtilis</i>	0.75~1.5	>96	1.5~3
<i>Staphylococcus aureus</i>	6~12	>96	1.5~3
革兰氏阴性菌			
<i>Escherichia coli</i>	3~6	>96	3~6
<i>Vibrio alginolyticus</i>	6~12	>96	12~24
<i>Vibrio harveyi</i>	6~12	>96	6~12
<i>Vibrio prahaemolyticus</i>	12~24	>96	12~24
<i>Edwardsiella tarda</i>	<0.375	>96	1.5~3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	>96	>96	>96
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.5~3	>96	>96
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>96	>96	>96
酵母菌			
<i>Pichia pastoris</i> GS115	3~6	>96	12~24
<i>Candida albicans</i>	24~48	>96	>96
丝状真菌			
<i>Aspergillus niger</i>	48~96	>96	>96

3 讨论

抗菌肽的生物提取难度较大,且对技术和成本要求较高,对其规模化生产应用造成限制,而化学合成抗菌肽成本同样较高,故现在对抗菌肽的研究应用多采用微生物表达的方法来进行,通过融合表达的策略,克服抗菌肽分子量普遍偏小,表达产物不稳定易降解,不便于检测与纯化,且对表达宿主具有毒性,往往无法获得大量表达的难题^[9-10]。本文采取了两种 piscidin 抗菌肽串联表达的方法,利用连接肽(linker: GSPGSG)将抗菌肽串联起来,构建了 PSP 串联肽。柔性的甘氨酸和脯氨酸转角,可以减少蛋白间的相互折叠和空间位阻,从而最大限度的保护串联肽的生物学活性^[11]。

酵母表达系统在表达抗菌肽方面具有多方面优势,不仅费用低廉,操作方便,而且能对表达的蛋白进行正确加工、折叠及适度糖基化,已有多种抗菌肽已实现了酵母表达^[12-13]。故本研究中选择毕赤酵母表达系统,成功对 PSP 串联肽进行了表达,并通过最小抑菌浓度 MIC

法对 PSP 串联肽的生物学活性进行了初步验证, 证明其具有一定的抑菌活性。

虽然有研究表明, 特异的增加外源基因整合拷贝数对于在毕赤酵母中的表达情况并无明显效果^[14], 但由于多拷贝子更易于获得高效的表达效果^[15-16], 所以在表达前对于多拷贝子克隆子的筛选是有必要的。本文通过 qRT-PCR 中的双标准曲线法^[17], 以毕赤酵母看家基因 GAP 作为内参, 分别绘制看家基因和目的基因的标准曲线, 通过 GAP 基因的拷贝数表征毕赤酵母基因组的拷贝数, 计算比值得到 PSP 串联肽基因整合在毕赤酵母基因组中的拷贝数^[18]。

本研究通过串联表达方案, 利用 Eco31I 快切酶定向连接方法合成 PSP 串联基因, 使用毕赤酵母表达系统对 PSP 串联肽进行表达, 并对其抑菌活性进行初步鉴定。结果表明小分子抗菌肽的串联表达方案是可行的, 串联肽由于增大了分子量, 可顺利在毕赤酵母表达系统中进行表达, 且表达产物对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、爱德华氏菌等多种细菌、酵母、真菌等均有抑制生长的活性。在后续的研究中, 需要通过大规模发酵以及优化诱导表达条件以提高表达效率, 优化纯化方式, 或使用标签蛋白融合表达的方式, 提高产量, 并解决抗菌肽本身对于宿主细胞的毒性问题, 为抗菌肽的后续产业化应用提供经验和理论基础。

参考文献:

- [1] BUONOCORE F, RANDELLI E, CASANI D, et al. A piscidin-like antimicrobial peptide from the icefish *Chionodraco hamatus* (Perciformes: Channichthyidae): Molecular characterization, localization and bactericidal activity[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(5): 1183-1191.
- [2] SHRESTHA A, CHITSIF E L, FU R, et al. Structure- function relationship studies of piscidin 1 bound to model tumor cell membranes[J]. Biophysical Journal, 2013, 104(2, Sup1): 238a-239a.
- [3] NIU S F, LI Y, XU X, et al. Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaenella crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(2): 513-524.
- [4] TOMAS CERMAK E L D, MICHELLE CHRISTIAN, LI WANG, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(12):e82..
- [5] DEININGER P. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 182-183.
- [6] WATERHAM H R, DIGAN M E, KOUTZ P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. Gene, 1997, 186(1): 37-44.
- [7] SCHAGGER H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nat Protocols, 2006, 1(1): 16-22.
- [8] WANG L, LAI C E, WU Q, et al. Production and characterization of a novel antimicrobial peptide HKABF by *Pichia pastoris*[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(10): 1124-1131.
- [9] WEI Q, KIM Y S, SEO J H, et al. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide

- by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5038-5043.
- [10] HWANG S-W, LEE J-H, PARK H-B, et al. A Simple method for the purification of an antimicrobial peptide in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Molecular Biotechnology*, 2001, 18(3): 193-198.
- [11] BOCALANDRO Y M, MARIN M H, VALLEJO R A V, et al. Antigenic mixture of synthetic peptides for the immunodiagnosis of HTLV I/II infection[J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2004, 25(3): 205-214.
- [12] CAO Y, YU R Q, LIU Y, et al. Design, Recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides[J]. *Current Microbiology*, 2010, 61(3): 169-175.
- [13] NIU M, LI X, WEI J, et al. The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its in vitro activity[J]. *Protein Expr Purif*, 2008, 57(1): 95-100.
- [14] LOEWEN M C, LIU X, DAVIES P L, et al. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(4): 480-486.
- [15] MCGREW J T. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris* : use of a rapid method to detect high-level expressing transformants[J]. *Gene*, 1997, 187(2): 193-200.
- [16] M.R. E, C.M. B. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7(5): 525-530.
- [17] JOHNSON M R, WANG K, SMITH J B, et al. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 278(2): 175-184.
- [18] KAI L, HONG-LEI G, LI G, et al. Development of a real-time PCR for determination of foreign gene copy number in genome of *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2011,

Construction, yeast expression and antibacterial function of tandem Piscidin gene from *Pseudosciaena crocea* and *Sciaenops ocellatus*

QIAO Ying¹, WANG Jun², MA Xiaowan¹, PAN Ying³, KE Qiaozhen³,
ZHENG Weiqiang³, SU Yongquan^{2*}

(1. Fourth Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Beihai 536000, China; 2. College of Ocean-Earth sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 3. State key laboratory of large yellow croaker breeding, Ningde 352103, China)

Abstract: The *Pseudosciaena crocea*-*Sciaenops ocellatus*-tandem piscidin (PSP-tandem gene) was constructed using the directional ligation method. The recombinant expression vector pPICZαA-PSP was constructed and after transforming to the *pichia pastoris* SMD1168, the multi-copy transformants were screened using Real-time Fluorescent Quantitative PCR. The

recombinant PSP-tandom peptide was successfully expressed and its antibacterial activity was preliminary identified.

Keywords: antimicrobial peptide; piscidin; tandom gene; eukaryotic expression; antimicrobial activity

厦门大学学报(自然科学版)