DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00739

石斑鱼 β-防御素的酵母表达及其产物抗菌活性分析

金俊琰 周 莉 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 防御素是一类阳离子抗菌肽。研究从石斑鱼垂体 SMART cDNA 文库中扩增出 129 bp 石斑鱼 β-防御素成熟肽序列, 将其克隆到毕赤酵母表达载体 pPCIZαA 中, 构建了石斑鱼 β-防御素的真核表达载体, 电击转化毕赤酵母 GS115。Western Blot 分析表明石斑鱼 β-防御素在酵母菌中获得了表达。体外抗菌实验表明纯化的重组蛋白具有抑制大肠杆菌以及嗜水气单胞菌的作用, 但是对革兰氏阳性菌, 如金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌的生长没有抑制作用。实验结果表明酵母表达的石斑鱼 β-防御素能够特异地抑制革兰氏阴性菌的生长。

关键词: 石斑鱼 β-防御素; 酵母表达; 抗菌活性

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)05-0739-06

近年来, 随着高密度、高产量养殖技术的应用, 改变了苗种原来生活的生态环境、营养条件、生活习性, 使网箱养殖的石斑鱼疾病日益严重[1−4]。当前防治鱼病的主要方法是使用抗生素及化学合成药物。但药物的大量使用, 会导致耐药菌株的产生以及水产品中的药物残留, 直接或间接给人类健康造成危害。因此, 研究和开发安全、绿色的新型药物具有重要意义。

防御素是机体防御外界病原菌入侵的第一道防线[5], 具有广谱的抗菌活性[6], 能抵抗革兰氏阳性/阴性菌、酵母菌、真菌、原生生物和病毒 [7]。根据分子内二硫键的连接方式可以将防御素分为三类: α-防御素、β-防御素以及 θ-防御素[8]。由于具有广谱抗菌活性和不容易产生耐药性的特点, 这些天然抗生物质具有代替化学合成抗生素药物的巨大潜力和应用前景。目前关于鱼类防御素的研究还不是很多, 仅在斑马鱼、虹鳟、青鳉以及牙鲆中有报道[9−12]。在前期的研究中, 我们从 4 龄雌性石斑鱼的垂体 SMART cDNA 文库中筛选到了石斑鱼的 β-防御素。

目前防御素蛋白的表达和纯化存在一定的难度[13]。一般说来, 利用原核系统表达无法进行翻译后折叠, 而体外的化学合成通常成本较高[14]。毕赤酵母是一个优良的表达系统[15], 具有以下三个优点: 1、简单的技术, 良好的实验系统; 2、表达丰度高; 3、翻译后修饰[16]。迄今为止, 研究人员利用酵母表达了很多抗菌蛋白, 如人的 SLPI[17], 人的 hepcidin[18] 等, 但是利用酵母系统表达鱼类防御素目前还没有报道。

在本研究中, 我们构建了石斑鱼 β-防御素的酵母真核表达载体, 并将表达产物进行抗菌实验。结果表明, 纯化后的重组蛋白具有抗革兰氏阴性菌的活性。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

大肠杆菌(*E. coli*)DH5α 为本实验室保存; 表达菌株毕赤酵母 GS115 和表达载体 pPCIZαA 购自 Invitrogen 公司。

1.2 目的基因 cDNA 序列扩增

根据石斑鱼 β-防御素基因的成熟肽 cDNA 序列,

收稿日期: 2010-07-22; 修订日期: 2011-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(U0631007); 973 项目(2010CB126301); 淡水生态与生物技术国家重点实验室创新项目(085B181F01)资助

作者简介: 金俊琰(1983—), 女, 安徽铜陵人; 博士; 主要从事鱼类发育遗传学研究。E-mail: jinjunyan@ihb.ac.cn

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

设计一对引物 P1/P2(P1: CTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCAGATCCAGAAATGCAG; P2: TCTAGACTCGAGCTAAGACCGCACAGCACA), 以石斑鱼垂体 SMART cDNA 文库为模板扩增。PCR 反应条件为: 94℃预变性 4min, 94℃变性 30s, 60℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 35 个循环, 72℃延伸 10min。1%琼脂糖凝胶进行电泳, 胶回收试剂盒(Omega)回收目的条带。

1.3 表达载体的构建

回收的片段按以前的报道[19, 20]连接至 pMD18-T 载体中, 筛选阳性克隆, 并测序验证。提取质粒后用 *Xho* I /*Xba* I 双酶切, 电泳后回收的片段连接到同样进行双酶切的空 pPCIZαA 中。将连接后的质粒转化至 DH5α 中, 筛选阳性克隆, 提取质粒。

1.4 目的基因在毕赤酵母中的表达

将重组质粒经 *Sac*I 线性化后电转化毕赤酵母 GS115, 将电转后的菌液涂布于 YPDS(1% 酵母粉、2% 胰蛋白胨、2% 葡萄糖、1 mol/L 山梨醇、100 μg/mL Zeocin)的平板上, 30℃培养。挑取克隆接种于 YPDS 培养基中, 30℃培养后用酵母基因组提取试剂盒(Omega)提取酵母基因组 DNA。用 5′AOX1/3′AOX1 进行扩增鉴定目的片段的整合情况。将得到的成功整合到酵母基因组上的克隆接种于 BMGY(1% 酵母粉、2% 胰蛋白胨、1.34% YNB、1% 甘油、4 mg/L 生物素、0.1 mol/L 磷酸钾 pH 6.0)培养基中, 30℃ 250 r/min 培养至 A_{600} 为 2—6, 1500 r/min 5min 收集菌体, 用 1/5 体积的 BMMY(1%酵母粉、2% 胰蛋白胨、1.34% YNP、0.5% 甲醇、4 mg/L 生物素、0.1 mol/L 磷酸钾 pH 6.0)培养基重悬。30℃ 250 r/min 摇床继续培养。每 24h 向培养基中添加甲醇至终浓度为 0.5%。每 12h 取样, 离心收集上清液, 置于−80℃, 用于 Western Blot 分析。

1.5 **Western Blot** 分析蛋白表达及纯化

将不同时期收集的上清液进行 Western Blot 分析[16−18]。配置 16%的 Tricine-SDS-PAGE, 按时间顺序上样。电泳结束后, 用半干转膜仪(Bio-rad)进行转膜。用石斑鱼 β-防御素的多克隆抗体作为一抗孵育 1h 后(一抗为大肠杆菌表达的石斑鱼 β-防御素重组蛋白免疫大白兔所得), 用 TBS 洗 3 次, 加入适量二抗孵育液(1∶2500 稀释 AP-标记羊抗兔、1% 奶粉溶于 TBS 中)室温孵育 1h 后, TBS 洗 3 次后, 采用 NBT/BCIP 显色系统进行显色。

选取表达量最大的时间点进行大量表达后, 收集上清。4℃用 1.5 kD 的超滤膜(Millipore)进行超滤, 截留下来的浓缩液为含有石斑鱼 β-防御素蛋白的溶液, 再将蛋白换液至 Tris-HCl(pH 8.0)中。收集蛋白后用 BCA kit (Perice) 测定蛋白浓度, 用于后续抗菌实验。

1.6 抗菌活性分析

利用纯化后的石斑鱼 β-防御素进行体外抗菌活性分析。挑取革兰氏阴性菌大肠杆菌(*E. coli*)和嗜水气单胞杆菌(*A. hydrophila*)以及革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和藤黄微球菌(*M. luteus*)。单克隆 37℃(*E. coli* 和 *S. aureus*)或 28℃(*A. hydrophila* 和 *M. luteus*)培养至 A_{600} 为 0.4 时, 首先 100 倍稀释培养液, 然后吸取 50 μL 培养液加入至 96 孔培养板, 用透析液稀释蛋白浓度分别为 25 μg/mL 到 5 μg/mL, 每种浓度按 3 个重复加入 50 μL 溶液至培养孔中, 同时用透析液作为阴性对照。将培养板置室温 25℃孵育 4h 后, 将培养板置 37℃培养 12h, 测定每个培养孔的 A_{600} 值。

2 结果

2.1 石斑鱼 **β**-防御素基因克隆及酵母表达载体的构建

我们设计了一对扩增石斑鱼 β-防御素的引物, 从石斑鱼 SMART cDNA 垂体文库中扩增石斑鱼 β-防御素成熟肽全长。如图 1 所示, 我们得到了单一的条带, 大小为 129 bp。然后连到 PMD18-T 载体中,

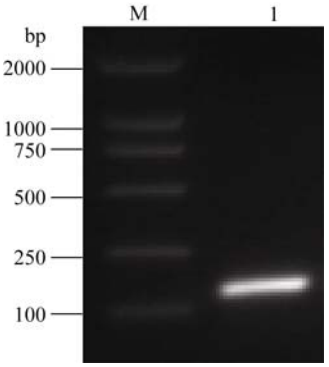


图 1 石斑鱼 β-防御素表达片段扩增

Fig. 1 Amplification of grouper β-defensin

M. DL2000 marker; 1. 石斑鱼垂体 SMART cDNA

M. DL2000 marker, 1. Grouper pituitary SMART cDNA

测序结果表明我们扩增到的序列是正确的。用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后, 连进酵母表达载体 pPICZαA。

2.2　石斑鱼 β-防御素基因阳性克隆 PCR 鉴定

将构建好的表达质粒转化到 GS115 酵母菌中, 挑取 11 个克隆。提取酵母基因组后, PCR 检测发现目的片段都成功插入到了酵母基因组中(图 2)。同时, 转化空质粒的酵母的基因组中没有阳性片段的存在。

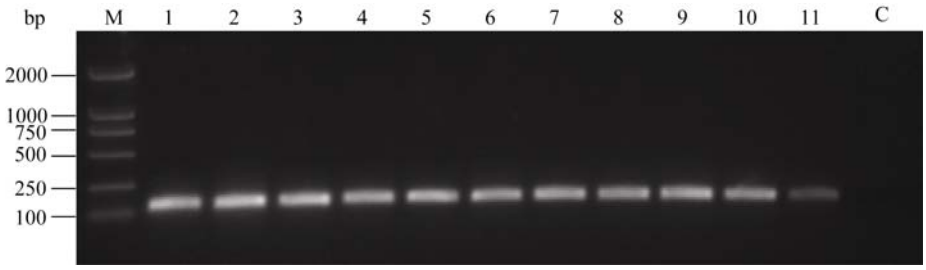


图 2　PCR 验证阳性克隆

Fig. 2　PCR amplification of recombinant clones

M. DL2000 marker; 1—11. 阳性克隆; C. 阴性对照

M. DL2000 marker, 1—11. Positive clones, C. Negative control

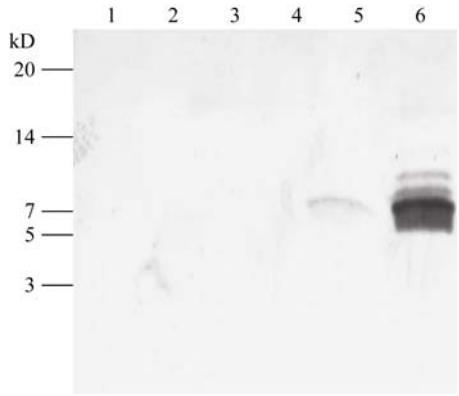


图 3　Western blot 分析石斑鱼 β-防御素在酵母菌株中的表达情况

Fig. 3　The expression of grouper β-defensin in yeast analyzed by Western Blot

1. 未转质粒的酵母菌; 2. 转化空质粒的酵母菌; 3—6. 阳性菌株分别诱导 0h、24h、48h 和 72h

1. Negative control without plasmid, 2. Negative control with empty plasmid; 3—6. Positive yeast induced by methanol with 0h, 24h, 48h and 72h

2.3　石斑鱼 β-防御素的诱导表达分析

选取 1 个阳性克隆进行诱导表达, 分别于 0h、24h、48h 和 72h 取样。我们利用石斑鱼 β-防御素的多克隆抗体检测酵母表达情况。Western Blot 分析表明, 诱导 24h 时没有蛋白的合成, 48h 有微弱的表达, 72h 表达量最高。而在未转质粒和转空质粒的酵母菌中没有蛋白表达(图 3)。

2.4　石斑鱼 β-防御素的体外抑菌活性

将纯化后的石斑鱼 β-防御素重组蛋白进行体外抗菌实验(图 4), 石斑鱼 β-防御素具有明显的抗大肠杆菌的作用。与对照相比, 加入的蛋白浓度越大, 抑菌效果越明显。蛋白浓度为 25 μg/mL 时, *E. coli* 的 A_{600} 仅为 0.17, *A. hydrophila* 的 A_{600} 为 0.19, 最大程度上抑制了大肠杆菌以及嗜水气单胞菌的生长。相同浓度的蛋白对金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌的抑制效果不明显, A_{600} 分别为 0.53 和 0.54。以上结果表明我们成功构建了石斑鱼 β-防御素的真核表达系统, 并且纯化获得的蛋白具有生物活性, 能特异抑制革兰氏阴性菌的生长。

3　讨论

蛋白功能的发挥需要高级结构, 但是大肠杆菌表达出来的蛋白缺乏翻译后折叠, 不利于后续的功能分析。作为一个真核生物, 酵母能够进行翻译后修饰, 形成正确的分子内二硫键[14]。在本研究中, 我们利用毕赤酵母成功表达了石斑鱼 β-防御素蛋白, 并且纯化获得的蛋白具有生物活性, 能特异抑制革兰氏阴性菌的生长。但是表达的蛋白浓度很低。可能是由以下原因造成的: 1、石斑鱼 β-防御素本身具有抗菌作用, 可能抑制了酵母菌的生长; 2、酵母菌具有其特有的偏好密码子, 可能石斑鱼 β-防御素的序列中含有其表达的稀有密码子, 使得蛋白的表达受到了一定的限制。在后续的研究中将继续摸索能大量表达石斑鱼 β-防御素蛋白的真核表达体系。

防御素具有广谱的抗菌活性, 通常对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都具有抑制作用[21], 比如 mBD-1[22]、HBD-3[23]、Apl AvBD2[24]、HNP-1[25]和 GNCPs[26]等。体外抗菌实验结果表明石斑鱼 β-防御素具有明显的抑制革兰氏阴性菌生长的作用, 而对

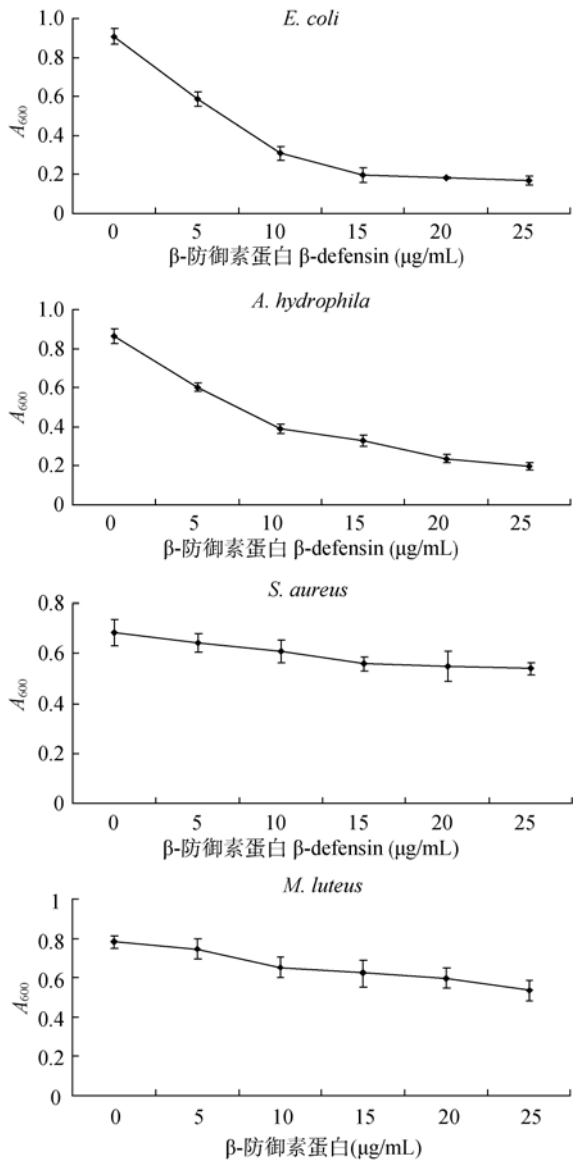


图 4 酵母表达蛋白的体外抗菌实验

Fig. 4 Antimicrobial activity of recombinant grouper β-defensin

革兰氏阳性菌作用不明显，与石斑鱼β-防御素原核表达产物体外抗菌实验结果一致[27]。这种特异性的抗菌活性同青鳉的防御素[8]、人的防御素-1[28]和人防御素-2[29]是一致的。不同的生物所处的生态位是不同的，所以它们特异表达的防御素与周围的病原微生物相关[30]，不同物种所含的防御素为更好的保护宿主在不断地进化，因此其抗菌特性有所不同。其中 *A. hydrophila* 是鱼类重要的致病菌[31]，β-防御素对于嗜水气单胞菌的抑制作用将能够应用于鱼类养殖中。

总之，本研究利用酵母系统表达石斑鱼 β-防御素为更深层次地了解其其他功能以及蛋白性质打下基础，同时也使得酵母菌株表达防御素作为鱼类的饵料添加剂成为可能。

参考文献:

[1] Lee K K, Liu P C, Chuang W H. Pathogenesis of gastroenteritis caused by Vibrio carchariae in cultured marine fish [J]. *Marine Biotechnologyl* (*NY*), 2002, **4**: 267—277

[2] Lu D Q, Bei J X, Feng L N, *et al*. Interleukin-1β gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction [J]. *Molecular Immunology*, 2008, **45**: 857—867

[3] Yin Z X, He W, Chen W J, *et al*. Cloning, expression and antimicrobial activity of an antimicrobial peptide, epinecidin-1, from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**: 204—211

[4] Chi S C, Lin S C, Su H M, *et al*. Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae [J]. *Virus Research*, 1999, **63**: 107—114

[5] Selsted M E, Ouellette A J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response [J]. *Nature Immunology*, 2005, **6**: 551—557

[6] Zou J, Mercier C, Koussounadis A, *et al*. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish [J]. *Molecular Immunology*, 2007, **44**: 638—647

[7] Falco A, Chico V, Marroqui L, *et al*. Expression and antiviral activity of a β-defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences [J]. *Molecular Immunology*, 2008, **45**: 757—765

[8] Zhao J G, Zhou L, Jin J Y, *et al*. Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF-κB and Sp1 of a medaka β-defensin [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, **33**: 624—637

[9] Nam B H, Moon J Y, Kim Y O, *et al*. Multiple β-defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **28**: 267—274

[10] Guo C, Diao H, Lian Y, *et al*. Recombinant expression and characterization of an epididymis-specific antimicrobial peptide BIN1b/SPAG11E [J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, **139**: 33—37

[11] Diao H, Guo C, Lin D, *et al*. Intein-mediated expression is an effective approach in the study of beta-defensins [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **357**: 840—846

[12] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, *et al*. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1997, **190**: 55—62

[13] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS*

Microbiology Reviews, 2000, **24**: 45—66

[14] Li Z, Moy A, Sohal K, *et al*. Expression and characterization of recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) protein from *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, **67**: 175—181

[15] Koliaraki V, Marinou M, Samiotaki M, *et al*. Iron regulatory and bactericidal properties of human recombinant hepcidin expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Biochimie*, 2008, **90**: 726—735

[16] Huang W, Zhou L, Li Z, *et al*. Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (Cyp19a1a) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, **307**: 224—236

[17] Peng J X, Xie J L, Zhou L, *et al*. Evolutionary conservation of *Dazl* genomic organization and its continuous and dynamic distribution throughout germline development in gynogenetic gibel carp [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B*, 2009, **312**: 855—871

[18] Wu N, Yue H M, Chen B, *et al*. Histone H2A has a novel variant in fish oocytes [J]. *Biology of Reproduction*, 2009, **81**: 275—283

[19] Li C Y, Wang Y, Zhou L, *et al*. Cloning of red-spotted grouper TSHb promoter and its localization expression in primitive gonad and pituitary of zebrafish embryos [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 822—827 [李辰昱，汪洋，周莉，等. 赤点石斑鱼促甲状腺激素TSHb 启动子的克隆及其在斑马鱼胚胎原始性腺和垂体中定位表达. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 822—827]

[20] Liu S, Gui J F. Molecular characterization and functional analysis of gibel carp *dmart2b* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(3): 379—383 [刘沙，桂建芳. 银鲫 *dmart2b* 基因的分子特征及功能分析. 水生生物学报, 2011, **35**(3): 379—383]

[21] Semple C A, Gautier P, Taylor K, *et al*. The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of β-defensins [J]. *Molecular Diversity*, 2006, **10**: 575—584

[22] Bals R, Goldman M J, Wilson J M. Mouse β-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract [J]. *Infection and Immunity*, 1998, **66**: 1225—1232

[23] Garcia J R, Jaumann F, Schulz S, *et al*. Identification of a novel, multifunctional β-defensin (human β-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction [J]. *Cell Tissue Research*, 2001, **306**: 257—264

[24] Soman S S, Arathy D S, Sreekumar E. Discovery of *Anas platyrhynchos* avian β-defensin 2 (Apl_AvBD2) with antibacterial and chemotactic functions [J]. *Molecular Immunology*, 2009, **46**: 2029—2038

[25] Varkey J, Nagaraj R. Antibacterial activity of human neutrophil defensin HNP-1 analogs without cysteines [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**: 4561—4566

[26] Yomogida S, Nagaoka I, Yamashita T. Comparative studies on the extracellular release and biological activity of guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and defensins [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 1997, **116**: 99—107

[27] Jin J Y, Zhou L, Wang Y, *et al*. Antibacterial and antiviral roles of a fish β-defensin expressed both in pituitary and testis [J]. *Plos one*, 2010, 5(12): e12883

[28] Goldman M J, Anderson G M, Stolzenberg E D, *et al*. Human β-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis [J]. *Cell*, 1997, **88**: 553—560

[29] Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al*. A peptide antibiotic from human skin [J]. *Nature*, 1997, **387**: 861

[30] Patil A, Hughes A L, Zhang G L. Rapid evolution and diversification of mammalian α-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes [J]. *Physiological Genomics*, 2004, **20**: 1—11

[31] Li A H, Yang W M, Hu J, *et al*. Optimization by orthogonal array design and humoral immunity of the bivalent vaccine against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, **37**: 813—820

THE YEAST EXPRESSION OF GROUPER β-DEFENSIN AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE RECOMBINANT PROTEIN

JIN Jun-Yan, ZHOU Li and GUI Jian-Fang

(*State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology*, *Institute of Hydrobiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Defensin, a small cationic peptide, is an antimicrobial peptide, exhibit broad-spectrum antibacterial activity. They spread widely in plants, invertebrate and vertebrate animals, which can rapidly kill bacteria, fungi and viruses etc. Bacteria and viruses limited the production of grouper (*Epinephelus coioides*). In this study, we cloned grouper β-defensin open reading frame, to express in the *Pichia pastoris*, and detect the bioactive of recombinant protein against bacteria. First, grouper β-defensin cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pituitary cDNA library of a protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper. The 129 bp DNA fragment encoding mature grouper β-defensin peptide was subcloned into vector PMD18-T, then inserted into the yeast expression vector pPCIZαA and transfected into *Pichia pastoris* GS115 expression host by electroporation. The genome of *Pichia pastoris* clone was extracted as template for screened the positive clone by using PCR. After grouper β-defensin was secreted by GS 115 by small-scale culture, the recombinant grouper β-defensin was induced by methanol for large scale. The supernatant was collected in 24h, 48h and 72h post induction for the recombinant protein detection. Subsequently, the grouper β-defensin peptide was detected in the supernatant of transfected yeast by Western Blot analysis. The purified recombinant grouper β-defensin crude extract from transfected *P. pastoris* showed antimicrobial activities against *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila*. However, recombinant protein did not inhibit the growth of Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. Bioactivity analysis indicated that the antibacterial activity of the recombinant grouper β-defensin expressed in *P. pastoris* specific to Gram-negative bacteria. Grouper β-defensin have antibacterial activity-specific to Gram-negative bacteria, this specificity is in correspondence with the environment of grouper.

Key words: Grouper β-defensin; Yeast expression; Antibacterial activity