

· 论 著 ·

## 东海贻贝抗菌肽 Myticin A 基因的克隆表达及其生物学活性

仲 燕,刘军华,张建鹏,冯伟华\*,焦炳华\*

(第二军医大学基础医学部生物化学和分子生物学教研室,上海 200433)

**[摘要]** 目的:在毕赤酵母表达系统中表达贻贝抗菌肽 Myticin A 并检测其生物学活性。方法:提取贻贝总 mRNA,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增得到 DNA 片段。PCR 产物与 pMD18-T 连接,得到阳性重组载体 pMD18-Myticin A。Myticin A 基因插入载体 pPIC9K 中,得到的重组载体 pPIC9K-Myticin A 转化至宿主菌中。得到高抗性阳性菌株并进行诱导表达。发酵上清进行 Tricine-SDS-PAGE 分析并用 CM-sepharose 柱和 Sephadex G-25 柱纯化,Western 印迹法鉴定并检测生物学活性。结果:获得重组载体 pPIC9K-Myticin A。高抗性多拷贝阳性表达菌株 GS115/pPIC9K-Myticin A 经甲醇诱导后,Tricine-SDS-PAGE 证实其相对分子质量为 4 500,表达量为 14% 以上,纯化后纯度达到 90% 以上。Western 印迹法证实所表达样品为 Myticin A。表达样品对巨大芽胞杆菌的生长有抑制作用,对小鼠成纤维细胞(L929)、胰腺癌细胞(SW1990)、结肠腺癌细胞(LoVo)的生长均有明显抑制作用。结论:应用毕赤酵母表达系统能较好地表达抗菌肽 Myticin A,生物学活性研究证实其具有抗革兰阳性菌作用,明显抑制肿瘤细胞生长。

**[关键词]** 抗菌肽;Myticin A;贻贝;重组质粒;毕赤酵母;基因表达

**[中图分类号]** R 978.69 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0065-04

### Cloning, expression and biological characterization of Myticin A, an antimicrobial peptide from mussel (*Mytilus*)

ZHONG Yan, LIU Jun-hua, ZHANG Jian-peng, FENG Wei-hua\*, JIAO Bing-hua\* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To express Myticin A in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and to test the bioactivity of the recombinant peptide *in vitro*. **Methods:** Total RNA was isolated from adult mussel body fluid and mRNA was used to construct a cDNA library. Reverse transcription PCR was used to obtain Myticin A gene fragment. A recombinant plasmid of pMD18-Myticin A was constructed. The Myticin A gene was inserted into the vector pPIC9K and the product was transformed into strain GS115. The transformants were selected and the recombinant peptide was expressed. The expressed sample was analyzed by Tricine-SDS-PAGE and purified by CM-sepharose and Sephadex G25 column chromatography. The biological activities were also assessed. **Results:** The pPIC9K-Myticin A was obtained and the stable recombinant *Pichia pastoris* strains were selected. Myticin A was successfully expressed as identified by Tricine-SDS-PAGE. The recombinant Myticin A was firstly purified by CM-sepharose column chromatography and the active fraction was collected and further purified by Sephadex G25 with the maximal purity reaching 90%. Purified sample was analyzed by Tricine-SDS-PAGE. Myticin A showed a strong inhibitory effect against the growth of gram-positive bacteria, specially to the *Bacillus megaterium*. It also inhibited the growth of tumor cell lines including SW1990, L929 and LoVo. **Conclusion:** An antimicrobial peptide, Myticin A, has been cloned from the body fluid of mussel and expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant Myticin A exhibits a strong inhibitory effects on the growth of gram-positive bacteria, especially on *Bacillus megaterium*.

**[KEY WORDS]** antimicrobial peptide; Myticin A; mussel; recombinant plasmid; *Pichia pastoris*; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 65-68]

抗菌肽一般是指相对分子质量在 10 000 以下,具有某种抗菌活性的多肽类物质。它们具有水溶性好、热稳定性强、免疫原性低、抗菌谱广的特点<sup>[1]</sup>。目前,在植物、昆虫及脊椎动物中均已发现抗菌肽的存在。贻贝(mussel)属海洋双壳软体动物。贻贝抗菌肽多为一类小分子的阳离子肽,以富含半胱氨酸为特征,是近年来新发现的抗菌肽家族。Mitta 等<sup>[2,3]</sup>从 2 种贻贝(*Mytilus edulis*, *Mytilus gallo-*

*provincialis*)中分离到多种抗菌肽,根据它们的一级结构和半胱氨酸数量的不同分为 4 组:Defensins、Mytilins、Myticins 和 Mytimycins。研究表明,Mytilins 主要对革兰阳性菌有抗菌活性,包括对

**[作者简介]** 仲 燕(1970-),女(汉族),硕士生。  
E-mail:zhongy701125@163.com

\* Corresponding author. Tel: 021-25070306-8002

一些海洋无脊椎动物的病原体,对革兰阴性菌和真菌的作用较弱<sup>[3]</sup>。本研究应用基因工程技术对我国东海厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)抗菌肽基因进行克隆,并选用真核表达系统中的毕赤酵母表达系统对其进行表达,观察其抑菌和抑制肿瘤细胞的生物学活性。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 新鲜成熟厚壳贻贝,长7~8 cm,由浙江省嵊泗县嵊山镇贻贝养殖场提供。

1.2 试剂 限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Nco* I 和 RT-PCR 试剂盒、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、DL2000 DNA marker 为 TaKaRa 公司产品。*X*-gal、IPTG、氨苄青霉素为 Promega 公司产品。

1.3 总 mRNA 提取 取新鲜厚壳贻贝 6 只,用无菌注射器抽取贻贝体液每只约 0.5 ml,常规方法提取总 mRNA,以  $D_{260}/D_{280}$  鉴定 RNA 纯度,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 mRNA 的完整性。

1.4 cDNA 的合成 cDNA 第 1 条链的合成以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物。PCR 引物的设计:依据文献报道<sup>[3]</sup> Myticin A 基因序列设计引物,在 5' 端引物中引入限制性内切酶 *Nco* I 切点,在 3' 端引物中引入限制性内切酶 *Xho* I 切点:上游引物 P1: 5'-GGC CAT GGC ATT CGC ACG CTT GTA CA-3', 下游引物 P2: 5'-CCC TCG AGG AAT TCT TAC CTG CTG CA-3'。预期扩增目的片段为 120 bp,引物由上海华诺生物工程公司合成。用 PCR 试剂盒扩增逆转录产物,产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 pMD-Myticin A 质粒构建与扩增 将胶回收的 PCR 产物与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接,构建 pMD-Myticin A 质粒,转化大肠杆菌 B21(本教研室保存)。进行 PCR 筛选及双酶切鉴定,筛选出重组子后进行序列分析(上海华诺生物工程公司)。

1.6 表达质粒 pPIC9K-Myticin A 的构建和电转化 PCR 将质粒 pMD-Myticin A 的酶切位点转换为 *Xho* I 和 *Eco*R I。构建好 Myticin A 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行双酶切,与毕赤酵母表达载体 pPIC9 (Invitrogen) 连接。将 pPIC9-Myticin A 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,定向插入酵母表达载体 pPIC9K (Invitrogen) 中,获得重组表达质粒 pPIC9K-Myticin A,应用双酶切及 DNA 测序验证。pPIC9K-Myticin A 大量扩增,分别以 *Sal* I 和 *Bgl* II 线性化。利用 Bio-Rad GenePulser 将线性化的重组表达质粒电穿孔转化(1.3 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ )入嗜甲醇毕赤酵母 GS115(本教研室保存)感受态细胞

中。以空载体 pPIC9K 为阴性对照。

1.7 重组嗜甲醇毕赤酵母菌株的诱导表达、鉴定和纯化 将转化子悬浮于 YEPD 培养液中培养。用 YPD/G418 培养基(2 mg/ml) 重复筛选 1 次,得到阳性克隆。抽提酵母染色体,用 PCR 筛选验证 Myticin A 基因与酵母染色体整合情况。获得的阳性重组子在 YEPD 培养基中 30℃ 培养 48 h,每天加入 1.5% 甲醇诱导(以 *Bgl* II 线性化后得到的菌株隔日加入 0.5% 甲醇诱导),以 Tricine-SDS-PAGE 分析表达产物。上清液透析除盐,经 CM-Sepharose 纤维素柱(直径 1.55 cm,长 20 cm)层析(25~50 mmol/L 醋酸铵洗脱)、SephadexG-25 柱层析多次纯化、Tricine-SDS-PAGE 分析及抑菌、抑肿瘤细胞实验后,确定活性峰,进行 Western 印迹鉴定。

1.8 生物学活性检测 通过观察表达产物对细菌的抑制作用来测定其抑菌活性。选用的菌株为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*, 以上菌株购自中国普通微生物菌种保藏中心)、肠球菌(*Enterococcus viridans*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等革兰阳性菌,革兰阴性菌大肠杆菌(*E. coli* D31)等。用扩散法测定表达产物对细菌生长的抑制程度<sup>[4]</sup>。用体外细胞毒活性筛选法中的结晶紫染色法测定纯化的表达产物对胰腺癌细胞(SW1990, ATCC)、小鼠成纤维细胞(L929, ATCC)和结肠癌细胞(LoVo, 中国科学院上海细胞所)的抑制作用<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

2.1 mRNA 的鉴定 经鉴定 mRNA 完整,  $D_{260}/D_{280}$  测定 mRNA 纯度为 1.8。

2.2 PCR 扩增产物电泳及序列分析 电泳分析获得表观约为 136 bp 的特异扩增条带。重组子 pMD-Myticin A 序列分析结果表明,克隆获得的基因长度为 120 bp,共 40 个氨基酸残基,与 GenBank 登录的 Myticin A 结构域编码序列完全一致。

2.3 重组表达质粒 pPIC9-Myticin A 和 pPIC9K-Myticin A 的鉴定 由图 1 可见, *Xho* I/*Eco*R I 切下 1 条清晰的 136 bp 的小片段和 1 条大片段,这条大片段与表达载体 pPIC9 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切后产生的大片段长度一样,说明 Myticin A 已成功插入表达载体 pPIC9 中。由图 2 可见,质粒 pPIC9K 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后,得到 284 bp 小片段,而重组质粒 pPIC9K-Myticin A 和 pPIC9-Myticin A 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后均得到 1 条长 398 bp 的条带,说明 Myticin A 已插入表达载体 pPIC9K 中。

重组质粒 pPIC9K-Myticin A 由上海生工生物工程有限公司进行 DNA 序列测定, 证实 Myticin A 基因已成功插入表达载体 pPIC9K 中。

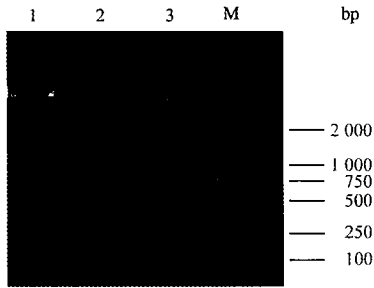


图 1 重组表达质粒 pPIC9-Myticin A 的酶切鉴定

Fig 1 Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid pPIC9-Myticin A

M: DL2000 DNA marker; 1: Plasmid pPIC9; 2: Plasmid pPIC9 DNAs digested with *Xho* I and *EcoR* I; 3: Recombinant plasmid pPIC9-Myticin A DNAs digested with *Xho* I and *EcoR* I

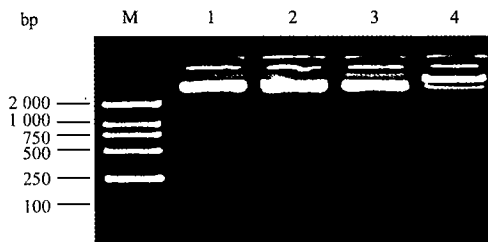


图 2 重组表达质粒 pPIC9K-Myticin A 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid pPIC9K-Myticin A

M: DL2000 DNA marker; 1: Recombinant plasmid pPIC9-Myticin A digested with *BamH* I and *EcoR* I; 2: Recombinant plasmid pPIC9K-Myticin A digested with *BamH* I and *EcoR* I; 3: Plasmid pPIC9K digested with *BamH* I and *EcoR* I; 4: Plasmid pPIC9K

2.4 转化嗜甲醇酵母菌株 GS115 及重组子筛选鉴定和表达产物纯化 将筛选到的重组子进行 PCR 进一步筛选, 以得到高抗性的重组子。经天能凝胶成像系统扫描, 结果表达量占总蛋白的 14% 以上, 发酵培养表达量可达到 12.6 mg/L。纯化产物经 Tricine-SDS-PAGE 分析(图 3)和 Western 印迹分析, 在相对分子质量为 4 500 处有一条带。纯化产物的纯度达到 90% 以上。

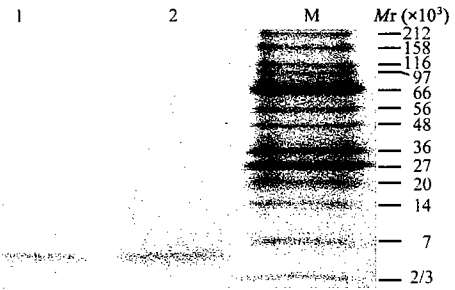


图 3 纯化的重组 Myticin A 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig 3 Tricine-SDS-PAGE of purified recombinant Myticin A

M: Protein marker; 1, 2: Purified Myticin A

2.5 生物学活性检测 经初步观察, 表达产物对革兰阳性菌巨大芽胞杆菌有抗菌活性, 其抑菌圈 14~16 mm。表达产物对胰腺癌细胞(SW1990)的抑制作用较对小鼠成纤维细胞(L929)和结肠腺癌细胞(LoVo)的抑制作用明显(图 4), 肿瘤细胞在数量和形态上均发生改变, 细胞数量减少并发生明显皱缩(图 5)。

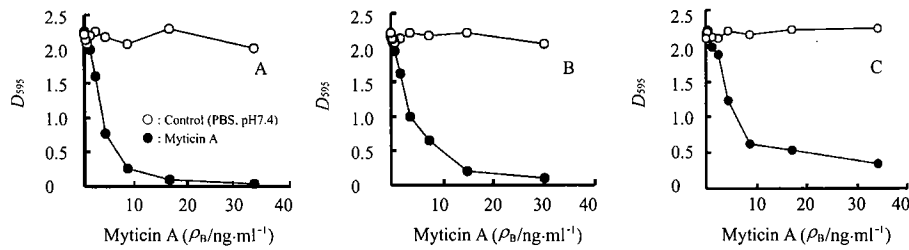


图 4 Myticin A 对胰腺癌细胞 SW1990(A)、小鼠纤维细胞 L929(B)和结肠癌细胞 LoVo(C)的抑制作用

Fig 4 Inhibition effects of Myticin A on SW1990 cell(A), L929 cell (B) and LoVo cell(C)

### 3 讨论

抗菌肽不仅具有抑菌作用而且还具有抗病毒和抑制肿瘤细胞的作用<sup>[6,7]</sup>, 由于其对正常细胞无破坏作用和无耐药性, 有望成为新一代的抗肿瘤、抗菌候选药物。由于抗菌肽在天然产物中含量少, 而化

学合成价格昂贵, 因此利用基因工程技术对抗菌肽进行表达成为大量生产抗菌肽的有效途径。

我国东海厚壳贻贝养殖量大, 无污染, 不仅营养丰富, 且是补肾良药, 本研究首次对其成分抗菌肽 Myticin A 进行克隆表达及生物学活性研究。毕赤酵母表达系统是近年来兴起的一个真核高效表达系

统,具备独特的优点:菌体自身分泌蛋白较少,外源目的基因通过整合型质粒进入酵母染色体组,结构比较稳定,特别是可对表达的外源蛋白进行翻译后修饰和加工,如二硫键的形成、糖基化等,在表达外源基因方面应用越来越广泛<sup>[8,9]</sup>。

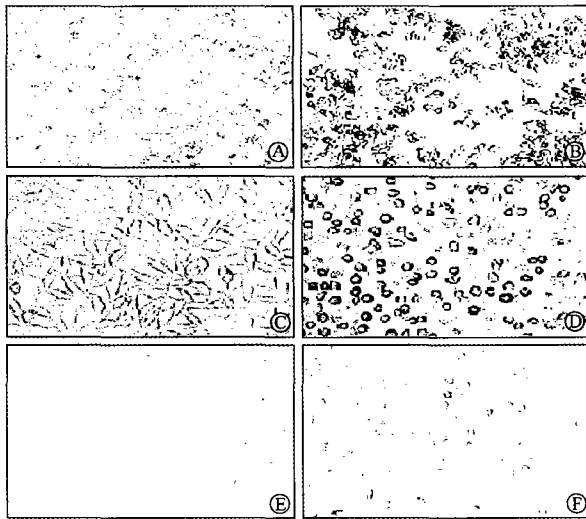


图5 Myticin A对SW1990细胞、L929细胞和LoVo细胞抑制作用的光镜观察结果

Fig 5 Photograph of Myticin A inhibiting SW1990 cell, L929 cell and LoVo cell (×250)

A: SW1990 cell; B: Inhibited SW1990 cell (3.25 µg/ml Myticin A); C: L929 cell; D: Inhibited L929 cell (7.13 µg/ml Myticin A); E: LoVo cell; F: Inhibited LoVo cell (7.18 µg/ml Myticin A)

实现外源基因在毕赤酵母菌株中的高效表达,需要考虑很多因素,如表达载体的类型、宿主菌的表型和培养条件、外源基因的性质、基因剂量、分泌信号、产物稳定性以及发酵参数等<sup>[10]</sup>。考虑到贻贝抗菌肽 Myticin A 的自身特点,如二硫键较多、对宿主菌有一定的毒性等特点,我们采用毕赤酵母菌株为宿主,以酵母表达质粒 pPIC9K 为介导,将 Myticin A 基因整合于 GS115 酵母菌株染色体,构建了稳定表达的 Myticin A 的基因工程菌株 GS115-Myticin A,发酵培养表达量可达到 12.6 mg/L,纯度可达 90%以上。

采用电激法转化并使用 G418 筛选高拷贝整合转化子,效果较理想,在将重组表达载体线性化时,分别用 *Bgl* II 和 *Sal* I 进行酶切,经电转化后分别发酵培养,在表达量上未见显著差异。本实验发现,甲醇诱导表达的浓度以 1.5% 为好,获得的表达蛋

白的浓度比 0.5% 甲醇诱导得到的蛋白浓度高 2~3 倍。

在生物学活性方面,本研究发现,纯化产物对革兰阳性菌的抑制作用较对革兰阴性菌明显,这与 Charlet 等<sup>[11]</sup>的报道一致。与天然产物的贻贝抗菌肽相比较<sup>[3]</sup>,我们得到的抗菌肽的抗菌活性较弱,这可能与表达产物的翻译后加工过程中与天然产物存在差异有关。目前对抗菌肽的抑制肿瘤活性的报道较多,但对贻贝抗菌肽的抑制肿瘤活性尚未见报道。本研究将继续观察纯化产物对其他肿瘤的作用。

[参考文献]

[1] Rao AG. Antimicrobial peptides[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995, 8(1): 6-13.  
 [2] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity[J]. *FEBS Lett*, 2000, 486(3): 185-190.  
 [3] Mitta G, Hubert F, Noel T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 265(1): 71-78.  
 [4] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1413.  
 [5] 王军志, 高凯, 饶春明. 重组人肿瘤坏死因子(rhTNF-α)国家标准品的研制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(4): 295-298.  
 [6] Jacob L, Zasloff M. Potential the rapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin[J]. *Ciba Fund Symp*, 1994, 186: 197-223.  
 [7] Radermacher SW, Schoop VM, Schluesener HJ. Aleukocytic antimicrobial peptide, is cytotoxic to neuronal and glial cells [J]. *J Neurosci Res*, 1993, 36(6): 657-662.  
 [8] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methlotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 45-66.  
 [9] Hollenberg CP, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methlotrophic yeast[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8(5): 554-560.  
 [10] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methyotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1997, 190(1): 55-62.  
 [11] Charlet M, Chernysh S, Philippe H, et al. Innate immunity isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis* [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(36): 21808-21813.

[收稿日期] 2004-05-06

[修回日期] 2004-07-09

[本文编辑] 尹 茶