

邓赣奇,陈柏东,黄增颖,等. 重组菌丝霉素在毕赤酵母中的分泌表达及活性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(18):86-91.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.015

# 重组菌丝霉素在毕赤酵母中的分泌表达及活性研究

邓赣奇,陈柏东,黄增颖,宫 莉,张辉华,刘 燊

(佛山科学技术学院生命科学与工程学院,广东佛山 528000)

**摘要:**为获得一种能分泌菌丝霉素的毕赤酵母菌并探讨菌丝霉素的活性,将优化的目的蛋白碱基序列与标签 MBP 基因序列融合,通过双酶切将重组基因序列插入到毕赤酵母 pGAPZaA 表达载体上并进行连接反应。取 10  $\mu$ L 连接产物转化至感受态细胞,挑取含 Zeocin(25 mg/L)平板筛选出的单菌落进行 PCR 鉴定,将阳性克隆送往测序公司测序。对鉴定正确的含有重组质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  进行活化培养并提取其质粒,得到的重组质粒进一步线性化和纯化,并电转入 GS115 感受态细胞中筛选出阳性克隆,诱导分泌蛋白,对其进行 Western blot 检测、纯化、活性分析和质谱鉴定,得到的重组蛋白为 55 Ku 左右,浓度为 700 mg/L,纯度达到 80% 以上。质谱鉴定结果表明,蛋白序列的覆盖率达到 98%,纯化后的蛋白也对金黄色葡萄球菌具有抑制作用,成功构建出一株能够分泌菌丝霉素的毕赤酵母菌,这为菌丝霉素的工业化生产和研发新型绿色的饲料添加剂奠定了基础。

**关键词:**菌丝霉素;毕赤酵母;重组蛋白;饲料添加剂

**中图分类号:**S182;S816.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)18-0086-06

抗生素自被发现以来,为人类社会做出了极大贡献,它不仅拯救了无数人的生命,更使畜牧生产得到了极大的提高。但随着抗生素的大量使用和滥用,抗生素在畜禽体内大量残留,威胁着食品安全并影响生态环境,这使得细菌产生耐药性而出现“超级细菌”。在欧洲的一些国家如瑞典,在 1986 年禁止向饲料中添加抗生素<sup>[1]</sup>,而为响应国家绿色发展的理念,我国农业农村部兽医局局长冯忠武在 2018 年的中国饲料发展论坛上表示,药物饲料添加剂将在 2020 年全部退出<sup>[2]</sup>，“减抗”“替抗”因此成为了非常热的研究方向,目前研究人员新研制出许多“减抗”“替抗”的产品,如微生态制剂、酶制剂、酸化剂、中草药制剂、抗菌肽等。抗菌肽作为绿色、高效、低毒、广谱的饲料添加剂,是现在比较热门的研究对象之一。

抗菌肽是生物体在抵抗病原菌时产生的一种防御性小肽,是组成免疫系统的重要组成部分,它

对真菌、病毒、肿瘤等均有抑制作用,抗菌谱广、分子量小、不易产生耐药性、热稳定性和水溶性好,是目前替代抗生素较为理想的抗菌剂之一<sup>[3]</sup>。菌丝霉素是 Mygind 等从腐生子囊菌的分泌蛋白中分离得到,它是首次发现的真菌防御素,对人体不会产生危害<sup>[4]</sup>。Schneider 等研究表明,菌丝霉素的作用机制主要是通过阻断细胞壁的合成而起到杀菌的作用<sup>[5]</sup>。有研究表明,菌丝霉素对革兰氏阳性菌有较强的抑制能力,没有溶血性作用,可以用来治疗感染革兰氏阳性菌的疾病,可替代部分的抗生素类药物<sup>[6-7]</sup>。传统获得菌丝霉素的方法是从天然微生物中分离提取,但这种方法分离纯化工序复杂、成本高、产量低,限制了其广泛的应用。

近年来,得益于基因工程的大力发展,通过构建高效的蛋白表达系统即可获得更多的菌丝霉素。根据万津的研究,将 Ple 多聚体基因克隆到毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZaA,转化后得到 1 株基因工程菌 PPle,通过摇瓶诱导,毕赤酵母基因工程菌 PPle 分泌水平达 143 mg/L<sup>[8]</sup>。李洪金等探讨重组 NZ2114 毕赤酵母工程菌的高效发酵工艺,并从培养基配方、接种条件、甲醇诱导、流加方式、菌体湿重等几个方面入手,结果发现,使用 BSM 培养基,接种量为 15%,甲醇诱导 48 h,湿重达到  $3 \times 10^5$  mg/L 时,菌丝霉素的表达量是最高的且活性达到最佳状态,此时的成本也控制在可接受范围内<sup>[9]</sup>。李延的

收稿日期:2019-11-03

基金项目:佛山市生物活性肽工程技术研究中心项目(编号:2017GA00022);广东省教育厅高校科研项目(编号:2017GCZX006)。

作者简介:邓赣奇(1995—),男,江西赣州人,硕士研究生,从事动物营养研究。E-mail:dengganqi@foxmail.com。

通信作者:刘 燊,博士,副教授,主要从事动物生物技术与动物营养研究。E-mail:shencn@aliyun.com。

重组菌丝霉素发酵培养基优化试验表明,甘油基础盐培养基为最适发酵培养基,在发酵 114 h 时,上清液的总蛋白浓度可达 3 941 mg/L<sup>[10]</sup>。

本试验通过重组菌丝霉素基因序列,将其克隆到毕赤酵母表达载体 pGAPZaA 中,构建出一种胞内表达菌丝霉素的毕赤酵母菌,再通过适当的发酵条件,分离纯化获得菌丝霉素,为其工业化生产以及重组菌丝霉素作为饲料添加剂的开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌种与质粒

毕赤酵母 GS115 菌用于重组载体的表达;pMAL-c5x 质粒(10 ng/μL)用于扩增编码融合标签 MBP 的基因序列;DH5α 感受态细胞;pGAPZaA 载体。

### 1.2 试验试剂

试验主要试剂有 UltraPure™ DNase/RNase - Free Distilled Water (10977015, Invitrogen)、2 × Hotstart Taq PCR ProMix、2 × PfuMax HiFi PCR ProMix,均购自广州英赞生物科技有限公司;凝胶纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,均购自天根生化科技有限公司;10 × FD buffer、10 × T<sub>4</sub> ligase buffer、10 × Cutsmart Buffer、Buffer A[50 mmol/L 三甲醇氨基甲烷(pH 值 8.0)、50 mmol/L 氯化钠、5% 甘油]、洗脱缓冲液 Buffer B[50 mmol/L 三甲醇氨基甲烷(pH 值 8.0)、50 mmol/L 氯化钠、500 mmol/L 咪唑、5% 甘油];Low Salt LB (不含抗生素)培养液;抗生素 Zeocin;T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性内切酶(*Avr* II、*Eco*R I 和 *Xba* I)、DNA marker、蛋白质 marker,均购自大连 TaKaRa 公司;YPDS 培养基(10.0 g/L 酵母提取物、20.0 g/L 蛋白胨、20.0 g/L 葡萄糖、1.0 mol/L 山梨醇);LDST 溶液[100 mmol/L LiAc, 10 mmol/L dithiothreitol, 0.6 mol/L sorbitol, 10 mmol/L Tris - HCl (pH 值 7.5),现用现配不能保存];考马斯亮蓝 G-250;其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 仪器设备

主要的试验仪器有质谱仪(Thermo Scientific Q Exactive)、液相色谱(Thermo Dionex Ultimate 3000 RSLCnano)、PCR 仪 T100、电转化仪、核酸电泳仪,均购自美国 Bio-Rad 公司;超微量紫外分光光度计 K5500,购自北京凯奥公司;高速冷冻离心机,购自

湖南湘仪仪器有限公司;台式高速离心机、微量移液枪,均购自 Eppendorf;超净工作台,购自苏净安泰公司;Alpha 凝胶成像系统,Alpha Innotech;电泳系统,购自上海天能科技有限公司;蛋白纯化系统,GE Healthcare AKTA pure,购自美国 GE 公司;恒流泵,购自南京大学普阳分析仪器厂;隔水式恒温培养箱,购自上海新苗医疗器械制造有限公司;超纯水仪,购自密理博(Millipore)公司;台式全温摇床,购自太仓市华美生化仪器厂。

### 1.4 试验方法

1.4.1 重组基因的合成 试验于 2019 年 4—10 月在佛山科学技术学院生命科学与工程学院 B7-117 动物营养实验室进行。根据目标蛋白质的氨基酸序列,对密码子优化并确定碱基序列,将目的蛋白基因进行编码并拼接重组,按反应体系 2 × PfuMax HiFi PCR ProMix 10 μL、Gene1-4 引物(10 μmol/L)各 0.4 μL、8.4 μL ddH<sub>2</sub>O 进行 PCR 反应;进一步将目的蛋白基因扩增,反应体系为 2 × PfuMax HiFi PCR ProMix 25 μL、T-RP 和 T-FP(10 μmol/L)引物各 1 μL、1 μL 目的蛋白基因 PCR 产物、ddH<sub>2</sub>O 22 μL,共 50 μL,进行 PCR 反应;对 MBP 的基因序列进行编码融合并扩增,反应体系为 2 × PfuMax HiFi PCR ProMix 25 μL、M-RP 和 M-FP(10 μmol/L)引物各 1 μL、pMAL-c5x 质粒(10 ng/μL)1 μL、ddH<sub>2</sub>O 22 μL,共 50 μL,进行 PCR 反应,由此完成 MBP 基因序列的扩增和重组基因的合成。

1.4.2 pGAPZaA-MBP 表达载体的构建 按设定的体系与反应条件扩增含有标签 MBP 的基因序列,并将扩增的 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖电泳分析,后进行纯化。利用搭桥 PCR 的方法合成 MBP 标签的目的蛋白基因序列,扩增的 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖电泳分析,回收 PCR 产物。通过 *Eco*R I 和 *Xba* I 分别双酶切含有 MBP 的重组基因和 pGAPZaA 载体,回收目的片段,将含 MBP 的 DNA 片段与 pGAPZaA 载体连接,转入至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,在孵化培养后,将离心得到的菌液均匀涂布于含 Zeocin(25 mg/L)的固体 Low Salt LB 培养基上,于 37 ℃ 条件下培养 12~16 h。在长出来的菌落中,挑取 10 个单菌落进行 PCR 鉴定,筛选出阳性克隆,至此 MBP 基因克隆到质粒 pGAPZaA 中,构建好 pGAPZaA-MBP 表达载体。

1.4.3 重组质粒的提取与线性化 从 -80 ℃ 冰箱中取出已鉴定正确的菌液,冰上自融后,以 1:100

的比例将菌液接种于含 Zeocin (25 mg/L) 的 Low Salt LB 培养液中,在 37 ℃、200 r/min 的摇床中培养 16 h,培养时间到后,用质粒提取试剂盒提取质粒,并用微量分光光度计对其浓度进行测定,测得浓度为 203 mg/L,而  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  为 1.901,提取所得质粒在 -20 ℃ 条件下保存备用。根据质粒 pGAPZa A 中可选择的线性化位点以及插入基因的碱基序列,选取限制性内切酶 *Avr II* 进行重组质粒的线性化处理,将线性化溶液混匀后置于恒温水浴槽中,37 ℃ 酶切 2 h,取 2  $\mu\text{L}$  酶切后的产物用 1.5% (体积比) 的琼脂糖凝胶检测重组质粒是否线性化完全。剩余线性化产物用三氯甲烷回收,用微量分光光度计测定回收线性化产物的浓度,测得浓度为 203 mg/L,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  为 1.874, -20 ℃ 保存备用。

**1.4.4 毕赤酵母 GS115 的电转化与鉴定** 将毕赤酵母 GS115 菌液用无菌接种环划线接种至 YPD 固体培养基上,在 30 ℃ 恒温培养箱中培养至有单菌落,挑取单菌落制备成感受态。将 5~10  $\mu\text{L}$  纯化后的线性化质粒加入到新鲜制备的 GS115 感受态细胞中,轻轻旋转离心管,使质粒和感受态细胞完全混匀后,将其全部转移至冰预冷处理的 0.2 cm 无菌电转杯中,再冰浴 5 min 后准备电击,电转化仪条件设置电压为 1 500 V,电阻为 200  $\Omega$ ,电容为 2.5 mF,时间为 5 ms。电击结束后,立即向电转杯中加入 1 mL 冰预冷的 1 mol/L 山梨醇,用移液枪轻轻吹打混匀后,全部转移至无菌的 1.5 mL 离心管中并将其置于 30 ℃ 恒温培养箱中静置孵育 1~2 h。分别吸取 10、25、50、100、200  $\mu\text{L}$  菌液涂布在含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 的 YPDS 固体培养基上,30 ℃ 恒温倒置平板 2~3 d,至长出单菌落,取单菌落进行 PCR 鉴定。

**1.4.5 重组菌丝霉素在毕赤酵母中的表达与纯化**

取阳性单克隆过夜培养液 0.1 mL 接种到 50 mL (250 mL 摇瓶) 的 YPD 培养基中,于 30 ℃、250 r/min 条件下摇瓶表达。在 0 ℃ 的条件下,边搅拌边将硫酸粉末慢慢敲入发酵液上清,4 ℃ 冰箱静置 4 h,12 000 r/min 离心 30 min,弃上清。按 1 L 发酵液上清加入 20 mL 组氨酸标签-亲和层析柱结合缓冲液的比例加入缓冲液,并涡旋直至所有蛋白复溶,复溶后所得溶液用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤头过滤,所得溶液转移到新的无菌瓶中。将得到的溶液使用 1 mL 组氨酸标签-亲和层析柱和 GE Healthcare AKTA pure 纯化系统再进行亲和层析,经过洗泵、平衡柱子、上样、洗脱、收集等一系列操作步骤后即可

完成重组蛋白的亲和层析纯化。层析纯化到的目的蛋白再通过 SDS-PAGE 电泳检测其纯度。

**1.4.6 重组菌丝霉素在毕赤酵母中的表达检测和浓度的测定** 在 30 ℃、250 r/min 条件下分别培养 0、6、12、24、48、72、96 h,用 15 mL 离心管取 6 mL 培养液,于 8 000 r/min 离心 5 min,上清转至另一个 15 mL 离心管,不同表达时间的培养液上清经超滤浓缩、硫酸铵沉淀并复溶后进行 Western blot 检测。考马斯亮蓝与芳香族氨基酸在酸性介质中结合后,溶液变成蓝色,溶液的最大吸收峰从 465 nm 转成 595 nm,因为颜色的变化程度与蛋白浓度呈正比,所以再检测 595 nm 处溶液中蛋白质浓度的吸光度,即可进一步得其浓度,所得重组菌丝霉素蛋白的浓度为 700 mg/L,用 50 mmol/L 三甲胺基甲烷 (pH 值 8.0)、50 mmol/L 氯化钠和 5% 甘油的缓冲液将其储存。

**1.4.7 重组菌丝霉素蛋白的质谱鉴定** 将纯化所得重组菌丝霉素蛋白液加入 0.05 mol/L TCEP 溶液,60 ℃ 反应 1 h,还原完后,加入 55 mmol/L MMTS 溶液,并在室温下避光 45 min;然后将菌丝霉素蛋白液加入 10 Ku 超滤管中,12 000 g 下离心 20 min,后加入 100  $\mu\text{L}$  UA (8 mol/L urea, pH 值 8.5) 溶液,12 000 g 离心 20 min,并离心 2 次,将 100  $\mu\text{L}$  0.25 mol/L TEAB 加入到超滤管中,12 000 g 离心 20 min,重复 3 次;继续加入 50  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L TEAB 溶液和 2% 胰酶 (胰酶与蛋白质量比为 1:50),在 37 ℃ 下孵育 12 h。次日补加 1% 胰酶 (胰酶与蛋白质量比为 1:100),并在 37 ℃ 孵育 4 h,离心收集滤液,低温真空抽干。

所得样品用 0.1% 甲酸、2% 乙腈混合液进行溶解,在 13 200 r/min,4 ℃ 条件下离心 20 min,取上清,进行质谱鉴定;做完质谱后,还需将质谱原始文件经过 MM File Conversion 软件处理转换,然后将所得到的数据与数据库进行比对分析。

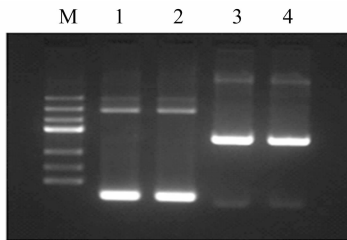
**1.4.8 重组菌丝霉素蛋白体外抑菌活性的测定** 将保存在 -20 ℃ 的大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌菌液划线活化,直至长出单菌落为止,挑取单菌落于 LB 液体培养基中,孵化培养 12 h,用 3 个锥形瓶分别配制 100 mL LB 固体培养基,在灭完菌冷却至 45 ℃ 时,分别吸取 100  $\mu\text{L}$  菌液加入到培养基中并轻轻摇均匀倒板,待板干燥后摆放好牛津杯,将提纯得到的重组菌丝霉素蛋白 (700 mg/L) 稀释 10 倍、100 倍,吸取 200  $\mu\text{L}$  分别加入牛津杯中,

空白对照则加无菌水, 并做 3 个重复, 然后放入 37 ℃ 培养箱中培养 12 h, 用电子游标卡尺测量抑菌圈的大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组基因的验证

在完成标签 MBP 基因序列的 PCR 扩增编码融合, 合成重组有 MBP 标签的目的蛋白基因序列后, 分别取 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖电泳分析, 结果(图 1、图 2)表明, 扩增大小与理论预测相符合。

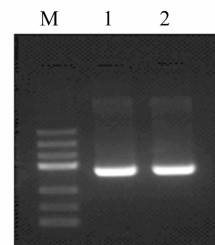


M—蛋白 Marker; 1、2—目的基因 PCE 扩增产物;  
3、4—MBP 标签 PCR 扩增产物

图1 标签 MBP 基因序列的电泳分析结果

### 2.2 pGAPZaA - MBP 表达载体的验证

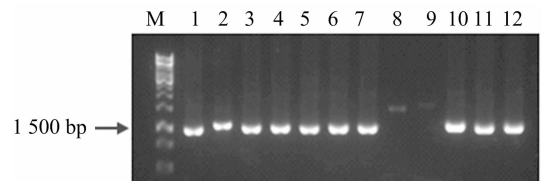
挑取 12 个“1.4.5”节中平板上的单菌落, 分别溶到 500 μL 含 25 μg/mL Zeocin 的 Low Salt LB 培养液中, 37 ℃、180 rpm/min 振荡培养 4 h, 每管取 0.5 μL 菌液作模板进行 PCR, 后取 5 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析, 用载体上游和下游引



M—蛋白 Marker; 1、2—拼接 PCR 扩增产物

图2 验证有重组 MBP 标签目的蛋白基因的电泳分析结果

物扩增的条带理论大小为 1 300 bp 左右, 结果表明, 实际扩增条带为 1 500 bp, 符合合理的范围内, 而除第 8、9 号外其他均为阳性克隆菌(图 3), 为进一步鉴定, 挑取 10、11 号菌进行测序, 测得部分结果如图 4 所示, 其中小写部分为 N 端融合标签 MBP 蛋白的部分基因序列, 标记下划线部分为目的蛋白的基因序列即菌丝霉素的基因序列, 标记方框部分为 C 端融合标签的基因序列, 测序结果表明 MBP 基因克隆正确, 成功构建了重组表达载体 pGAPZaA - MBP。



M—蛋白 Marker; 1~12—待测菌落

图3 菌落 PCR 的鉴定

```
atgaaaatcgaagaaggtaaactggaatctggattaacggcgataaaggctataacggctcgcgtgaagtcgtaagaaattcgagaagat
accggaattaaagtcaccgttgagcatccggataaactggaagagaaattccacaggttgccggaactggcgatggccctgacattatctct
gggcacacgaccgcttgggtgctacgtcaatctggcctgttggtgctgaatcaccggacaaagcggttcaggacaagctgtatccgttta
cctgggatgccgtactgtacaacggcaagctgattgctaccgcatcgctgttgaagcggtatcgctgattataacaagatctgctgccgaac
ccgcaaaaaacctgggaagagatccggcgctggataaagaactgaaagcgaaaggttaagagcgcgctgatgttcaacctgcaagaacc
gtacttcacctggcgctgattgctgctgacgggggttatgcttcaagtatgaaaacggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataa
cgctggcgcgaaagcggtctgaccttctggttgacctgattaaaaacaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgagaagctgc
ctttaataaaggcgaaacagcgatgacctcaacggccgctgggcatggtccaacatcgacaccagcaaaagtgaattatggtgtaacggttac
tgccgaccttaagggtcaacctcaaaccgttcgttggcgtgctgagcgaggtattaacgccgccagtcggaacaaagagctggcaaaa
gagttctcgtgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcgggttaataaagacaaaccgtgggtgccgtagcgctgaagctctacgag
gaagagttggtgaaagatccgcgtattgccgacctatggaaaacgcccagaaggtgaaatcatgccgaacatccgcagatgtccgcttt
ctggtatgccgtgctactgcggtgatcaacgccgccagcggtcgtcagactgtcgtgatgaagccctgaaagacgcgcgagactaattcgagct
cgAacaacaacaataacaataacaacaacctcgggatcgagggaaggGGTTTTGGTTGTAACGGTCCTTGA
ACGAAGATGATTTGAGATGTCATAACCATTGTAAATCCATTAAGGGTTACAAGGGTGGTA
TACTGTGCTAAAGGTGGTTTTGTTTGTAAAGTGCTAC[TTTCTAGAACAAAACTCATCTC]
AGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCAT
```

图4 菌落的测序结果

2.3 重组菌丝霉素蛋白的纯化及在毕赤酵母中的表达检测

纯化后的重组菌丝霉素蛋白进行 SDS - PAGE 电泳,由图 5 可见,蛋白纯化后纯度在 80% 以上。将不同时间的培养液上清经超滤浓缩、硫酸铵沉淀并复溶后进行 Western blot 检测,由图 6 可知,带组氨酸标签的目的蛋白获得了可溶性表达,并且在 48 h 培养后目的蛋白的表达量趋于饱和,因此表达培养时间为 48 h 较好。

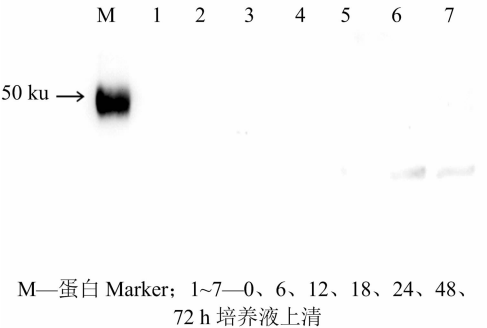
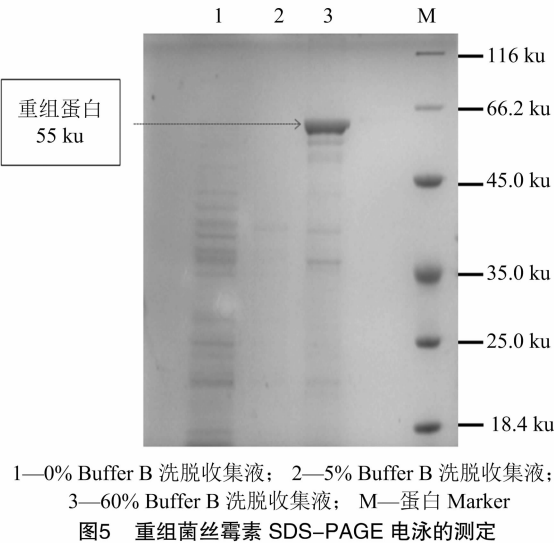


图6 重组菌丝霉素 Western blot 法鉴定

2.4 重组菌丝霉素蛋白的质谱鉴定

根据质谱的鉴定分析可得重组菌丝霉素蛋白完整的氨基酸序列,如图 7 所示,其中标记方框部分表示未匹配上的序列,其余部分均为匹配上的序列,将鉴定分析出的序列用 MASCOT (V2.1, Matrix Science, London U. K) 搜库软件进行比对可得蛋白序列的覆盖率达 98%,则可得该蛋白即为重组菌丝霉素蛋白。

2.5 重组菌丝霉素蛋白体外抑菌活性的研究

将重组菌丝霉素蛋白(700 mg/L)稀释 10、100 倍后,测得其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌抑制效果的数据,用软件 SPSS 21 进行数据分

1 MKIEEGKLV I WINGDKGYNG LAEVGKKFEK DTGIKVTVEH PDKLEEKFPQ  
51 VAATGDGPD I IFWAHDRFGG YAQSGLLAEI TPDKAFQDKL YPFTWDAVRY  
101 NGKLIAYPIA VEALSIIYNK DLLPNPPTWE EIPALDKELK AKGKSALMFN  
151 LQEPYFTWPL IAADGGYAFK YENGKYDIKD VGVNDAGAKA GLTFLVDLIK  
201 NKHMNADTDY SIAEAAFNKG ETAMTINGPW AWSNIDTSKV NYGVTVLPTF  
251 KGQPKPFVGV LSAGINAASP NKELAKEFLE NYLLTDEGLE AVNKDKPLGA  
301 VALKSYYEEL VKDPRIAATM ENAQKGEIMP NIPQMSAFWY AVRTAVINAA  
351 SGRQTVDEAL KDAQTNSSSN NNNNNNNNL GEGRGFGCNG PWNE<sup>DD</sup>LRCH  
401 NHCKSIKGYK GGYCAKGGFV CKCYFLEQKL ISEEDLNSAV DHH<sup>HHHH</sup>

图7 重组菌丝霉素完整的氨基酸序列

析,结果(表 1)表明,重组菌丝霉素对革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌有抑制效果,且重组菌丝霉素的浓度越高抑制效果就越好,而重组菌丝霉素对革兰氏阴性菌如大肠杆菌、沙门氏菌的抑制效果非常的微弱,这与 Mygind 等的研究结果<sup>[4,8]</sup> 相同。

3 讨论

防御素是机体第一道防线的组成成分,属于  $\beta$  折叠型抗菌肽,广泛存在于各种生物中,对真菌、细

表 1 重组菌丝霉素体外抑菌活性

菌种类型	抑菌圈直径(mm)		
	稀释 10 倍	稀释 100 倍	无菌水
金黄色葡萄球菌	13.76 ± 0.23a	11.30 ± 0.23b	7.27 ± 0.40c
大肠杆菌	8.37 ± 0.04a	7.87 ± 0.07b	7.27 ± 0.40c
沙门氏菌	8.53 ± 0.07a	7.92 ± 0.07b	7.27 ± 0.40c

注:同行肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

菌、病毒、肿瘤等均具有一定的抑制作用<sup>[11-12]</sup>。目前,制备防御素的途径主要有天然提取、化学合成、

基因工程表达,因前 2 种获取方法提取工艺复杂、成本高等,基因工程表达则成为获取大量外源蛋白的主要方法<sup>[13]</sup>。毕赤酵母因为具有较为完善的基因表达调控机制、蛋白质加工修饰能力且不会产生内毒素,所以广泛用于产外源蛋白的表达系统<sup>[14-15]</sup>。

本试验提供一种获取多量重组菌丝霉素及其表达载体构建的方法,即根据目标蛋白质的氨基酸序列,对密码子优化并确定碱基序列,将含有 MBP 的基因序列与 pGAPZaA 表达载体相连接,并将重新组成的载体转入到毕赤酵母细胞中,表达出所需要的菌丝霉素,对其进行纯化得到浓度为 700 mg/L,并对金黄色葡萄球菌有一定的抑制效果。根据 Zhang 等研究,菌丝霉素类似物 NZ2114 对金黄色葡萄球菌具有较高的专一性,抗菌效果可达到与青霉素与万古霉素相当甚至更优<sup>[16]</sup>,则表明重组菌丝霉素都具有对金黄色葡萄球菌较强抑制效果的趋同性。

抗菌肽被认为是最具有发展前景的绿色饲料添加剂之一,与传统抗生素相比,它具有无耐药性和对人体无毒副作用,是抗生素理想的替代品之一<sup>[17]</sup>。近年来,一些抗菌肽产品已投入到市场上销售,表明抗菌肽应用到饲料添加剂中正日渐变得广泛,根据 Ma 等的研究,饲料中添加重组防御素可以显著增加肉鸡的平均日增质量、降低料肉比,与空白对照组相比,血清免疫球蛋白 M 与免疫球蛋白 G 等含量都显著增高,其脂肪酶与胰蛋白酶的活性也会增高<sup>[18]</sup>。根据李延等研究表明,在基础日粮的基础上添加 0.2% 重组菌丝霉素可以显著提高断奶仔猪的平均日采食和平均日增质量,其回肠中食糜双歧杆菌的数量也显著增加<sup>[19]</sup>;此外,菌丝霉素也具有治疗奶牛金葡菌乳腺炎的潜力<sup>[20]</sup>。

根据这些研究结果可知,重组菌丝霉素作为饲料添加剂,对肉鸡、仔猪等都具有较好的促生长效果,甚至可作为药制剂来治疗某些疾病。该研究为产多量的菌丝霉素提供了更加廉价的途径,同时也为绿色新型饲料添加剂的利用和开发奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Castanon J R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds[J]. Poultry Science, 2007, 86(11): 2466 – 2471.
- [2] 许剑琴. 中兽医药——减抗替抗主力军[J]. 北方牧业, 2018(20): 15 – 16.
- [3] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2004, 75(1): 39 – 48.
- [4] Mygind P H, Fischer R L, Schnorr K M, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus[J]. Nature, 2005, 437(761): 975 – 980.
- [5] Schneider T, Kruse T, Wimmer R, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II[J]. Science, 2010, 328(5982): 1168 – 1172.
- [6] Yang Y L, Da T, Jun Z, et al. Characterization of recombinant plectasin; solubility, antimicrobial activity and factors that affect its activity[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(5): 1050 – 1055.
- [7] Jun Z, Yang Y L, Da T, et al. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphylococcus* and *Streptococcus* [J]. Protein Expression and Purification, 2011, 78(2): 189 – 196.
- [8] 万 津. 菌丝霉素在毕赤酵母中的分泌表达及其对大鼠肠道健康和免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [9] 李洪金, 陈天任, 孙丹丹, 等. 菌丝霉素 NZ2114 毕赤酵母工程菌高效发酵工艺的研究[J]. 广东饲料, 2016, 25(1): 26 – 29.
- [10] 李 延. 重组菌丝霉素抗菌肽的发酵培养基优化及其在断奶仔猪上的应用效果研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [11] Droin N, Jean – Baptiste H, Ducoroy P, et al. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules [J]. Journal of Proteomics, 2009, 72(6): 918 – 927.
- [12] Terras F R, Eggermont K, Kovaleva V, et al. Small cysteine – rich antifungal proteins from radish: their role in host defense[J]. Plant Cell, 1995, 7(5): 573 – 588.
- [13] 叶 滔, 杨静美, 闫 凯, 等. 菌丝霉素 NZ2114 基因在毕赤酵母中表达及中试发酵研究[J]. 饲料工业, 2015, 36(16): 54 – 59.
- [14] Parachin N S, Mulder K C, Viana A A B, et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides[J]. Peptides, 2012, 38(2): 446 – 456.
- [15] 聂金梅, 李阳源, 刘金山, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因改造及其在毕赤酵母中的表达[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 17 – 21.
- [16] Zhang Y, Teng D, Mao R Y, et al. High expression of a plectasin – derived peptide NZ2114 in *Pichia pastoris* and its pharmacodynamics, postantibiotic and synergy against *Staphylococcus aureus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(2): 681 – 694.
- [17] 万 津, 陈代文, 余 冰, 等. 重组菌丝霉素高密度发酵制备及其功效研究[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(12): 1625 – 1631.
- [18] Ma J L, Zhao L H, Sun D D, et al. Effects of dietary supplementation of recombinant plectasin on growth performance, intestinal health and innate immunity response in broilers [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(1): 214 – 223.
- [19] 李 延, 万 津, 晨 光, 等. 重组菌丝霉素发酵培养基筛选及重组菌丝霉素在断奶仔猪上的应用[J]. 动物营养学报, 2016, 28(1): 208 – 216.
- [20] 李连彬. 菌丝霉素源抗菌肽对金黄色葡萄球菌乳腺炎的防治及其耐药产生机制的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.