

中国明对虾血蓝蛋白 C 末端片段在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性

邱楚雯^{1,2}, 刘梅¹, 王宝杰¹, 蒋克勇¹, 孙姝娟¹, 孟晓林^{1,2}, 骆作勇^{1,2}, 王雷¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为研究中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血蓝蛋白 C 末端(FcHC-C)的抗菌功能, 将血蓝蛋白基因 *FcHC* 的 2 个 C 末端基因片段连接到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 构建酵母表达载体 pPIC9K/FcHC-C。该载体经 *Sal I* 酶切后, 采用 PEG 法转化毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)。转化子经过 PCR 鉴定后, 阳性克隆通过含有 G418 的 YPD 平板筛选, 获得高拷贝重组子。重组毕赤酵母利用甲醇诱导表达目的基因。经 Tricine-SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果表明, 利用酵母工程菌成功表达了血蓝蛋白 C 末端片段(rFcHC-C1 和 rFcHC-C2)。抑菌活性鉴定实验结果显示, 重组蛋白 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 作为阴离子抗菌肽具有抗真菌和抗细菌的活性。

关键词: 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*); 血蓝蛋白; 抗菌肽; 毕赤酵母(*Pichia pastoris*); 重组表达

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)06-0001-07

根据联合国粮农组织(FAO)数据统计结果显示, 自 20 世纪 80 年代初以来全球对虾养殖产量不断增加^[1], 越来越多的消费者把虾作为重要的蛋白质来源。目前虾捕捞产量未见明显增长, 消费者日益增长的需求量主要是通过水产养殖来满足的。然而高密度养殖虾导致了许多问题, 其中最为严重的是病毒、细菌和真菌病原体的感染性疾病。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国主要的虾类养殖品种之一。中国明对虾养殖过程中疾病的爆发严重影响养殖产业的发展。因此, 迫切需要找到有效的方法来防止和抑制虾类养殖过程中疾病的发生^[2]。

血蓝蛋白是节肢动物和软体动物血淋巴中的呼吸蛋白, 由 3 个结构域构成, 分别是 hemocyanin_N 结构域, hemocyanin_M 结构域和 hemocyanin_C 结构域^[3]。第 1 个和第 3 结构域分别为蛋白的 N 端和 C 端, 第 2 个结构域为血蓝蛋白的活性部位。近年来, 研究表明血蓝蛋白不仅参与氧的运输, 而且还参与能量储存, 维持渗透压, 蜕皮调控, 伤口愈合以及黑色素的合成。值得注意的是 Destoumieux 等^[4-5]研究发现南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)的血蓝蛋白及其降解片段参与非特异性免疫活动。因此, 血蓝蛋白被认为有抗菌活性。

抗菌肽(Antimicrobial peptide, AMPs)是生物体内产生的小肽类物质, 在先天性免疫反应中发挥重要作用, 其抗菌谱广, 对细菌、真菌、病毒等均有抑

制作用。抗菌肽直接破坏膜的稳定性并产生穿孔或裂解, 引起内容物泄露, 导致细胞死亡^[6]。自从 Steiner 等^[7]首先在巨型蚕蛾中发现了天蚕素 cecropin 抗菌肽之后, 越来越多的抗菌肽被发现或预测出来。根据氨基酸组成、分子大小和结构的不同, 将抗菌肽分为几种类型, 其中包括 α -螺旋、 β -折叠结构的抗菌肽等^[8]。常见的抗菌肽多为阳离子抗菌肽(Cationic AMPs (CAMPs))。而 Lai 等^[9]根据蟾蜍的基因序列克隆并合成了抗菌肽 Maximin H, 发现它是具有与阳离子抗菌肽类似功能的阴离子抗菌肽(Anionic AMPs (AAMPs))。

目前, 在脊椎动物、无脊椎动物和植物体内均发现有阴离子抗菌肽。阴离子抗菌肽是动植物体内先天性免疫系统的重要组成部分^[10]。阴离子抗菌肽的净电荷从 -1 到 -7, 由 5~70 个残基构成^[11]。Destoumieux 等^[4]研究表明血蓝蛋白的 C-端片段具有阴离子抗菌肽活性。基于血蓝蛋白 C 端片段的抑菌活性, 本研究利用真核表达系统重组表达中国明对虾血蓝蛋白 C 端基因片段。与传统的分离与纯化抗

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-02-26

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA100311)

作者简介: 邱楚雯(1988-), 女, 福建建瓯人, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害防治, E-mail: nanqiuchuwen.05@163.com; 刘梅, 通信作者, 电话: 0532-82898722 E-mail: liumei@qdio.ac.cn; 王雷, 通信作者, 电话: 0532-82898722, E-mail: wanglei@qdio.ac.cn

菌肽相比,真核表达系统具有许多优点,如产量高,易于纯化,培养基成分简单,成本较低^[12]。作为真核生物,毕赤酵母具有高等真核表达系统的许多优点,如蛋白加工、折叠、翻译后修饰等。不仅如此,毕赤酵母(*Pichia pastoris*)具有与酿酒酵母相似的分子及遗传操作优点,且它的外源蛋白表达水平是后者的10倍以至100倍,这使得毕赤酵母成为非常有用的蛋白表达系统。实际上,已有利用毕赤酵母表达系统重组表达抗菌肽的报道^[13-16]。本研究构建了中国明对虾血蓝蛋白-C端的部分片段(FcHC-C1和FcHC-C2)的毕赤酵母表达体系,并初步研究这两种重组多肽片段的抗菌活性。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物	序列	PCR 目的
CPF23E	5'-TACGTAGAATTTCGGTAACGAACAGGGTCTG-3'	<i>FcHC-C1</i> 基因克隆
CPR23B	5'-ATCTGGGGATCCACGATCCAGGGGGTAGCC-3'	<i>FcHC-C1</i> 基因克隆
CPF13E	5'-TACGTAGAATTCTTTGAAGTCCTTCCCAAC-3'	<i>FcHC-C2</i> 基因克隆
CPR13B	5'-TTCTATGGATCCATGGTGATGGATATGTTTC-3'	<i>FcHC-C2</i> 基因克隆
AOXF	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'	转化子鉴定
AOXR	5'-AAATGGCATTCTGACATCCTC-3'	转化子鉴定

1.1.2 工具酶及主要试剂

Taq DNA Polymerase 购自 TIANGEN 公司, T4 DNA Ligase 购自 MBI 公司, *EcoR* I、*Sal* I、*Bam* H I 工具酶购自大连宝生物公司, Tris、EDTA、核酸 marker、蛋白 marker、Agarose、Tryptone、Yeast Extract、Biotin、YNB、山梨醇、dNTP、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒等购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体的构建

本实验室已从中国明对虾肝胰腺中克隆出血蓝蛋白基因 *FcHC* 的全长 cDNA 序列(GenBank 登陆号: FJ594414), 根据中国明对虾血蓝蛋白 cDNA 序列设计特异性引物, 克隆两个 *FcHC-C* 端片段, 分别命名为 *FcHC-C1* 和 *FcHC-C2*。引物 CPF23E/CPR23B 和 CPF13E/CPR13B 分别用来扩增 *FcHC-C1* 和 *FcHC-C2*。正向引物含有 *EcoR* I 限制性酶切位点, 反向引物包含 *Bam* H I 限制性酶切位点。PCR 条件如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 36 个循环; 72 °C 继续延伸 10 min。用限制

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒、引物

毕赤酵母表达菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 Top10 来自于本实验室。改造的 pPIC9K 酵母表达载体由中国科技大学周丛照教授馈赠。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 引物序列见表 1。2 个基因片段(*FcHC-C1* 和 *FcHC-C2*) 在中国明对虾血蓝蛋白基因 *FcHC*(GenBank 登录号: FJ594414)的相对位置分别为 1741~1947 和 1936~2055, 基因序列可参见 NCBI 数据库。

性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam* H I 分别对纯化后的 PCR 片段和含有组氨酸(His)标签的质粒 pPIC9K 进行双酶切, 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收酶切片段, 采用 T4 DNA 连接酶连接酶切产物。连接产物分别转化 *Escherichia coli* Top10 感受态细胞, 通过筛选获得重组酵母表达载体 pPIC9K-*FcHC-C1* 和 pPIC9K-*FcHC-C2*。用上游 α -Factor 引物(TACTATTGCCAG CATTG CTGC)为测序引物, 对重组载体进行测序鉴定。

1.2.2 pPIC9K/*FcHC-C* 转化 *P. pastoris* GS115 及高拷贝转化子筛选

用 *Sal* I 酶切重组质粒 pPIC9K-*FcHC-C*, 根据 Invitrogen 公司毕赤酵母表达手册, 采用 PEG 法将重组子转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 并将转化后的毕赤酵母 GS115 感受态细胞涂布于 MD 生长培养基上, 30 °C 培养约 2 d, 直至克隆出现。吸取 2 mL 无菌水收集 MD 平板上的转化子。一定浓度的转化子涂布于含有不同浓度 G418(0.5, 1.0, 1.5, 和 2.0 g/L)的 YPD(1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖, 2%琼脂)平板上, 30 °C 孵育 2~5 d。挑取单菌落至 YPD 液体培养基, 30 °C 培养 24 h 后提取 DNA, 用 AOX-F/AOX-R 引物(表 1)进行 PCR 鉴定, 使用

pPIC9K 空质粒转化的毕赤酵母菌做阴性对照。

1.2.3 重组毕赤酵母 GS115 诱导表达 FcHC-C

将筛选出的阳性克隆接种于 50 mL BMGY 培养基中(1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 1.34%YNB, 1%甘油和 0.4 g/L 的生物素和 1%磷酸钾缓冲液)^[15], 28℃, 转速 230 rpm 条件下培养约 20 h, 直到培养物达到 A_{600} 为 2~5。培养物通过 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。菌体用 50 mL BMMY 培养基(1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 1.34% YNB, 0.5%甲醇和 0.4 mg/mL 的生物素和 1%磷酸钾缓冲液)重新悬浮于 500 mL 三角瓶中 28℃培养, 转速为 230 rpm。每 24 h 添加甲醇溶液(100%)至最终质量分数为 0.5%。

1.2.4 重组蛋白 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 的纯化及鉴定

将培养 96 h 后的菌液, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 上样于用 20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑(pH7.4)预平衡后的 His-GraviTrap 柱子, 用 20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L 氯化钠, 500 mmol/L 咪唑(pH7.4)洗脱。纯化的重组蛋白 FcHC-C1 和 FcHC-C2 透析脱盐处理, 最终冻干备用。按 Western blotting 常规方法制胶, 将纯化后样品经 Tricine-SDS-PAGE 电泳^[17]后, 30 V 恒压 15 min 转移到硝酸纤维素膜上, 室温下封闭 1 h 后加入一抗(兔抗 His 抗体 1: 50000 比例), 4℃放置 12 h 以上。弃一抗, 用 TBST 洗膜 4 次。加入二抗(羊抗兔抗体 1: 2000 比例), 平稳摇动, 室温下 1 h。弃二抗, TBST 洗膜 4 次。加入显色液后避光显影至出现条带后终止反应^[18]。

1.2.5 重组蛋白 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 的抗菌活性检测

对纯化后的重组蛋白 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 进行抑菌活性鉴定。指示菌包括革兰氏阳性细菌如藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*), 革兰氏阴性细菌如鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 以及铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 真菌如尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、终极霉菌(*Pythium ultimum*)、灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、柑桔绿霉病菌(*Pestalotia diospyri*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*) 以及核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*), 共 10 种菌。最小抑菌浓度(MIC)测定方法如下^[19-21]: 将纯化后的重组蛋白用 0.01%的乙酸和 0.2%的牛血清白蛋白稀释成适当倍数之后, 取 10 μ L 样品加入 96 孔板中, 同时加入 100 μ L LB 培养基培养的细菌($2 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ 个/mL)或者加入 80 μ L PDB 培养基培养的真菌孢子(10^4 个/mL)。30℃振荡培养 24 h 后, 在 600 nm 下用

酶标仪测定吸光值。

2 结果

2.1 pPIC9K-FcHC-C 载体构建

以本实验室保存的血蓝蛋白(*FcHC*)cDNA 为模板, PCR 扩增血蓝蛋白基因的 2 个 C 末端基因片段 *FcHC-C1* 和 *FcHC-C2*, 琼脂糖凝胶电泳检测可见在 100~250 bp 有两个不同大小的条带。*FcHC-C1* 片段大小与预计的 207 bp 相符。*FcHC-C2* 片段大小则与预计的 120 bp 相符(图 1)。胶回收的 PCR 产物酶切后连接到载体 pPIC9K。测序结果表明插入的外源基因与 *FcHC-C1* 和 *FcHC-C2* 序列相符, 重组 pPIC9K-FcHC-C1 与 pPIC9K-FcHC-C2 载体构建成功。

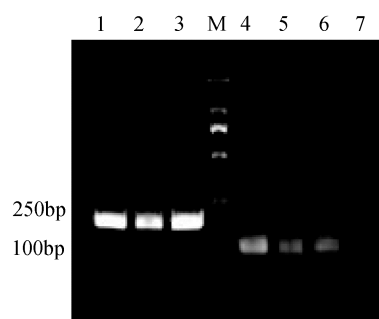


图 1 *FcHC-C* 基因片段的 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of *FcHC-C*

M. DNA 标记; 1-3. *FcHC-C1*; 5-7. *FcHC-C2*
M. DNA marker; 1-3. *FcHC-C1*; 5-7. *FcHC-C2*

2.2 PCR 鉴定转化子

pPIC9K/*FcHC-C1*、pPIC9K/*FcHC-C2* 和 pPIC9K 分别通过 *Sal* I 酶切线性化之后采用 PEG 法转化 GS115 感受态细胞, 挑取单菌落至 YPD 液体培养基, 30℃培养 24 h 后提取 DNA, 用 AOX-F/AOX-R 引物进行 PCR 鉴定。琼脂糖凝胶电泳显示阳性转化子扩增出两个条带(图 2)。重组菌 GS115/pPIC9K-*FcHC-C1* 扩增出约 700 bp(pPIC9K 上下游引物之间序列长度与插入目的基因长度之和)和 2.2 kb(AOX1)条带; 重组菌 GS115/pPIC9K-*FcHC-C1* 扩增出约 610 bp 和 2.2 kb(AOX1)条带。表明重组载体 pPIC9K/*FcHC-C* 已经成功整合到酵母基因组 DNA 上。

2.3 FcHC-C1 和 FcHC-C2 在毕赤酵母中的表达

挑取 G418 质量浓度为 2 g/L 的 YPD 平板上的单菌落, 甲醇诱导表达 96 h 后, 发酵液经过离心取上清液通过 His-GraviTrap 柱纯化后的样品通过蛋白凝

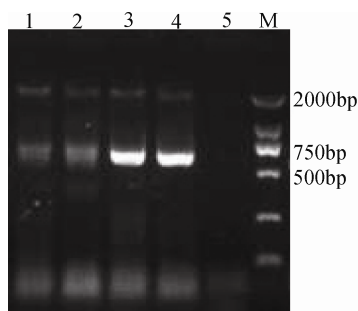


图2 PCR 鉴定重组载体整合入酵母基因组

Fig.2 PCR Analysis of *Pichia* Integrants

M: DNA 标记; 1~4. AOXF/AOXR 鉴定转化子; 1~2. pPIC9K/FcHC-C1; 3~4. pPIC9K/FcHC-C2; 5. 阴性对照
M. DNA marker; 1~4. AOXF/AOXR Identification of transformant 1~2. pPIC9K/FcHC-C1; 3~4. pPIC9K/FcHC-C2; 5. negative control

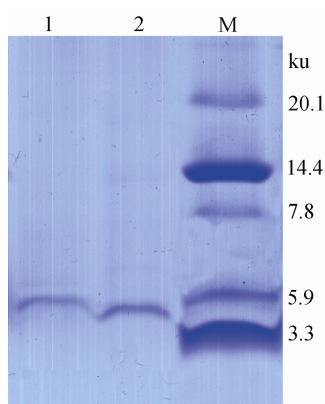


图3 纯化的 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE analysis of the expressed *FcHC-C1* and *FcHC-C2*

M. 蛋白标记; 1. rFcHC-C1; 2. rFcHC-C2
M. Protein Marker; 1. rFcHC-C1; 2. rFcHC-C2

胶电泳 Tricine-SDS-PAGE, 可见在大约 7 ku 和 5 ku 附近出现条带(图 3)。条带大小与预计大小有些偏差是由于 SDS-PAGE 蛋白电泳过程中, 蛋白的迁移受许多因素的影响, 蛋白电泳显示的蛋白大小是蛋白的表现大小并非实际大小, 蛋白大小的偏差的具体原因有待进一步验证^[22]。凝胶电泳 Tricine-SDS-PAGE 结果表明外源基因在毕赤酵母系统中已表达, Western Blot 分析结果也发现目的条带表明血蓝蛋白 C 端的两个片段(FcHC-C1 和 FcHC-C2)成功表达。

2.4 表达产物抗菌活性检测

采用多种细菌和真菌对毕赤酵母重组表达产物 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 进行抗菌活性检测, 所采用的指示菌包括 6 种真菌、1 种革兰氏阳性细菌和 3 种革兰氏阴性细菌。结果表明 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 具有一个相对宽的抗菌谱(表 2)。rFcHC-C1 对黄瓜炭疽病菌、尖孢镰刀菌最小抑菌浓度 MIC 分别为 1.1~2.1 $\mu\text{mol/L}$ 、10.6~21.2 $\mu\text{mol/L}$ 。rFcHC-C2 对灰霉病菌和黄瓜炭疽病菌的最小抑菌浓度 MIC 为 1.3~2.6 $\mu\text{mol/L}$, 而对尖孢镰刀菌的最小抑菌浓度 MIC 为 13.0~26.0 $\mu\text{mol/L}$ 。rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 对其他指示真菌抑菌活性较弱 ($\text{MIC}_{\text{rFcHC-C1}} > 21.2 \mu\text{mol/L}$ 和 $\text{MIC}_{\text{rFcHC-C2}} > 26.0 \mu\text{mol/L}$)。rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 可以抑制革兰氏阳性细菌-藤黄微球菌生长。然而, 这两种重组蛋白对 3 种革兰氏阴性菌抑菌效果比革兰氏阳性菌和部分真菌弱。

表 2 重组抗菌肽 FcHC-C1 和 FcHC-C2 最小抑菌浓度(MIC)

Tab.2 Minimal growth inhibition concentrations (MIC) of rFcHC-C1 and rFcHC-C2

指示菌	最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{mol/L}$)	
	rFcHC-1	rFcHC-2
真菌		
尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	10.6~21.2	13~26
终极霉菌(<i>Pythium ultimum</i>)	>21.2	>26
灰霉病菌 (<i>Botrytis cinerea</i>)	>21.2	1.3~2.6
柑桔绿霉病菌(<i>Pestalotia diospyri</i>)	>21.2	>26
黄瓜炭疽病菌(<i>Colletotrichum orbiculare</i>)	1.1~2.1	1.3~2.6
核盘菌(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	>21.2	>26
革兰氏阳性菌		
藤黄微球菌(<i>Micrococcus luteus</i>)	5.3~13.0	1.3~2.6
革兰氏阴性菌		
嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	10.6~21.2	13.0~26.00
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	>21.2	13.0~26.0
鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>)	>21.2	13.0~26.0

3 讨论

目前, 甲壳类动物, 如南美白对虾^[23]、斑节对虾^[24]血蓝蛋白的基因已被克隆并测序。本课题组已经克隆到中国明对虾血蓝蛋白 cDNA 全长, 并命名为 *FcHC*(GenBank 登录号: FJ594414)。Destoumieux 等研究表明血蓝蛋白不仅负责氧气输送, 而且血蓝蛋白及其降解片段参与各种先天免疫活动, 其中血蓝蛋白的 C-端参与抗菌肽的形成和释放。Destoumieux 等从南美蓝对虾(*P. stylirostris*)血清中纯化抗菌肽 PsHCt1 和 PsHCt2; 在凡纳滨对虾(*P. vannamei*)血清中发现抗菌肽 PvHCt, 这 3 种血蓝蛋白抗菌肽具有很强的抗真菌活性^[4]。将 2 个血蓝蛋白 C 末端片段(FcHC-C1 和 FcHC-C2)与 Destoumieux 等分离纯化出的抗菌肽(PsHCt1、PsHCt2 和 PvHCt)序列比对结果显示本研究中 FcHC-C1 氨基酸序列(FcHC-C1--LVVAVTDGEADA AVEGLHDNTDFIHYGSHGK YPDNRPHGYPLD)与 PsHCt1 和 PsHCt2 有 67.7%和 69.7%的相似性; FcHC-C2 的氨基酸序列(FcHC-C2--FEVLPNFKHIQVKVFNHGHEIH HHH)与 PvHCt 有 91.3%的相似性。因此推断中国明对虾血蓝蛋白 C-端可能具有潜在的抗菌活性, 其具体功能尚待阐明。甲壳类抗菌肽主要有 3 种类型, 分别是对虾素(Penaeidins)、甲壳素(Crustins)和抗脂多糖因子(Anti-lipopolysaccharide factor)^[25-27]。其中大部分抗菌肽为阳离子抗菌肽, 而阴离子抗菌肽的研究较少。FcHC-C1 和 FcHC-C2 序列编码蛋白的等电点估计为 5.08 和 6.77。阴离子抗菌肽的净电荷从-1 到-7, 由 5~70 个残基构成^[11], 因而推断 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 为阴离子抗菌肽。这为甲壳类动物阴离子抗菌肽的研究提供参考。

毕赤酵母菌株 GS115 的分泌表达系统, 是通过信号肽 α -factor, 使外源蛋白实现胞外表达^[28], 分泌表达的外源蛋白通过 Kex2 和 Ste13 酶切 α -factor, 从而形成成熟肽, 有利于外源蛋白的纯化利用。同时外源基因是整合到毕赤酵母基因组中, 有利于表达系统的保存^[29]。由此表明, 本研究通过毕赤酵母真核表达系统用于表达血蓝蛋白 C 端抗菌 FcHC-C1 和 FcHC-C2 具有可行性。

毕赤酵母重组表达的抗菌肽 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 抗菌活性检测结果与 Destoumieux 等纯化出的抗菌肽 PsHCt1, PsHCt2 和 PvHCt 活性类似^[4]。PsHCt1, PsHCt2 和 PvHCt 的等电点为 5.65~6.54, 为阴离子抗菌肽, 主要表现为抗真菌活性; rFcHC-C1

和 rFcHC-C2 预测等电点为 5.08 和 6.77, 也是阴离子抗菌肽。rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 对真菌抑菌活性分析表明, 两者对黄瓜炭疽病菌作用效果最好, 其次是尖孢镰刀菌和灰霉病菌。然而 rFcHC-C1 和 rFcHC-C2 也表现出抗细菌的活性, 它们对革兰氏阳性细菌抑菌效果优于革兰氏阴性细菌。此外根据最小抑菌浓度大小, rFcHC-C2 抑菌活性整体强于 rFcHC-C1, 推测原因可能是由于 rFcHC-C2 的等电点更接近于 7.0, 表现出了阳离子抗菌肽的广谱抗菌性。在毕赤酵母菌株 GS115 甲醇诱导表达过程中, 酵母细胞生长缓慢, 上清液有一定黏性, 空白对照无此现象, 表明这两种重组表达蛋白对表达宿主有一定的抑制活性。

总之, 本研究通过毕赤酵母表达系统重组表达中国明对虾血蓝蛋白 C 端基因, 并研究表明此 2 种阴离子抗菌肽抗菌活性较好; 可用于有植物和水生动物疾病控制。然而, 中国明对虾血蓝蛋白 C 末端片段在对虾免疫防御机制中的功能有待进一步研究。中国明对虾血蓝蛋白 C 末端片段如何参与免疫反应, 并在免疫系统中扮演的角色尚存在疑问。深入研究中国明对虾血蓝蛋白 C 末端抗菌肽在抗病反应中的作用方式, 如何生产更多的抗菌肽 FcHC-C 对疾病的预防有深远的影响。

参考文献:

- [1] Flegel T W, Lightner D V, Lo C F, et al. Shrimp disease control: past, present and future[J]. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Philippines, 2008: 355-378.
- [2] Lightner D V, Redman R M. Shrimp diseases and current diagnostic methods[J]. Aquaculture, 1998, 164: 201-220.
- [3] Stoeva S, Idakieva K, Georgieva D N, et al. *Penaeus monodon* (tiger shrimp) hemocyanin: subunit composition and thermostability[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2001, 56: 416-422.
- [4] Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, et al. Crustacean Immunity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 47070-47077.
- [5] Zhang X B, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*[J]. Antiviral Research, 2004, 61: 93-99.
- [6] Smith V J, Desbois A P, Dyrynda E A. Conventional

- and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8: 1213-1262.
- [7] Steiner H, Hultmark D, Engström Å, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity[J]. *Nature*, 1981, 292: 246-248.
- [8] Lai Y P, and Gallo R L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense[J]. *Trends in Immunology*, 2009, 30: 131-141.
- [9] Lai R, Liu H, Hui Lee W, et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 295: 796-799.
- [10] Harris F, Dennison S R, Phoenix D A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms[J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2009, 10: 585-606.
- [11] Diego-García E, Batista C V F, García-Gómez B I, et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function[J]. *Toxicon*, 2005, 45: 273-283.
- [12] Li L, Wang J X, Zhao X F, et al. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 39: 144-151.
- [13] Jin F, Xu X, Wang L, et al. Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in *Pichia pastoris*: purification and characterization[J]. *Protein Expression Purification*, 2006, 50 (2): 147-156.
- [14] Li L, Wang J X, Zhao X F, et al. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression Purification*, 2005, 39 (2): 144-151.
- [15] Yu X, Li Z, Xia X, et al. Expression and purification of anicrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression Purification*, 2007, 55 (2): 257-261.
- [16] Bhanot V, Balamurugan V, Bhanuprakash V, et al. Expression of P32 protein of goatpox virus in *Pichia pastoris* and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 162 (1-2): 251-257.
- [17] Schägger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166: 368-379.
- [18] 陈小芳, 陈显凌, 邹起练. 纤维连接蛋白 C 端肝素结合域多肽在毕赤酵母中的表达、纯化及鉴定[J]. *生物工程学报*, 2012, 28 (10): 1265-1273.
- [19] Bulet P, Dimarcq J, Hetru C, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (20): 14893-14897.
- [20] Hetru C, Bulet P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1997, 78: 35-50.
- [21] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263 (32): 16709-16713.
- [22] Ferguson, K. Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides[J]. *Metabolism*, 1964, 13(10): p. 985-1002.
- [23] Sellos D, Lemoine S, Van Wormhoudt A. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects[J]. *FEBS Letters*, 1997, 407: 153-158.
- [24] Sritunyaluksana K, Cerenius L, Söderhäll K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23: 179-186.
- [25] Destoumieux D, Munoz M, Bulet P, et al. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda) [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 57: 1260-1271.
- [26] Smith V J, Fernandes J M O, Kemp G D, et al. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32: 758-772.
- [27] Cerenius L, Jiravanichpaisal P, Liu H P, et al. Crustacean immunity[J]. *Invertebrate Immunity* 2010, 708: 239-259.
- [28] Brake A J, Merryweather J P, Coit D G, et al.

Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81 (15): 4642-4646.

[29] Cereghino G P L, Cregg J M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10 (5): 422-427.

Recombinant expression and antimicrobial activity analysis of hemocyanin C-terminal fragments from *Fenneropenaeus chinensis* in *Pichia pastoris*

QIU Chu-wen^{1, 2}, LIU Mei¹, WANG Bao-jie¹, JIANG Ke-yong¹, SUN Shu-juan¹, MENG Xiao-lin^{1, 2}, LUO Zuo-yong^{1, 2}, WANG Lei¹

(1 . Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Dec., 10, 2012

Key word: *Fenneropenaeus chinensis*; hemocyanin; antimicrobial peptides (AMPs); *Pichia pastoris*; recombinant expression

Abstract: Two C-terminal coding sequences of *Fenneropenaeus chinensis* hemocyanin *FCHc* were cloned into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K to produce the pPIC9K/FcHC-C yeast expression vectors. The constructed vectors pPIC9K/FcHC-C1 and pPIC9K/FcHC-C2 were linearized by *Sal* I enzyme, and transformed into *Pichia pastoris* GS115 using PEG-mediated transformation method. PCR identified transformants were screened by G418 selected YPD plates. The *P. pastoris* transformants of pPIC9K/FcHC-C expressed the two hemocyanin C-terminal gene fragments by methanol induction. The results of Tricine-SDS-PAGE and Western blotting showed that the recombinant FcHC-C1 and FcHC-C2 peptides (rFcHC-C1 and rFcHC-C2) were expressed successfully. An antimicrobial assay showed that rFcHC-C1 and rFcHC-C2 have antifungal and antibacterial activities as anionic AMPs.

(本文编辑: 梁德海)