

LfcinB与EGFP融合蛋白在毕赤酵母中的胞内表达与分离纯化

刘威¹, 王玉莲¹, 王林², 吴昊东¹, 田会敏¹, 成德¹, 王亮^{1*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212000) (2. 济南亿民动物药业有限公司, 山东济南 250000)

摘要: 该研究将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因片段与抗菌肽牛乳铁蛋白肽(LfcinB-His)基因片段的N末端连接, 构建以EGFP为报告基因的胞内表达载体, 融合表达重组蛋白EGFP-LfcinB-His, 并对其活性检测。将重组表达质粒电转入毕赤酵母GS115中, 筛选阳性转化子, 甲醇诱导其发酵表达, 488 nm的激发光下检测到较强的荧光。当酵母细胞培养达到最高密度后, 收集菌体细胞, 破壁, 用酵母细胞蛋白裂解液进行裂解。裂解液经过超滤浓缩、Ni-NTA亲和层析、甲酸裂解等纯化步骤后, Tricine-SDS-PAGE检测到相对分子质量为4.1 ku的目标蛋白(LfcinB-His)条带。通过液质联用测定与分析, 最终获得了纯度为90.32%的LfcinB-His超滤浓缩液, 对测试的6株致病菌均有不同程度的抑制作用, 抑菌浓度范围在16~64 μg/mL。综上, 该研究为毕赤酵母表达小分子多肽提供了较好的方法学参考, 也为进一步研究LfcinB的生物活性及高密度发酵奠定了基础。

关键词: 牛乳铁蛋白肽; 绿色荧光蛋白; 毕赤酵母; 融合表达; 蛋白纯化

文章编号: 1673-9078(2024)12-67-74

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1223

Intracellular Expression, Isolation and Purification of LfcinB and EGFP Fusion Protein in *Pichia pastoris*

LIU Wei¹, WANG Yulian¹, WANG Lin², WU Haodong¹, TIAN Huimin¹, CHENG De¹, WANG Liang^{1*}

(1.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

(2.Jinan Yimin Animal Pharmaceutical Co. Ltd., Jinan 250000, China)

Abstract: In this study, the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene fragment was ligated with the N-terminus of the antimicrobial peptide bovine lactoferrin peptide (LfcinB-His) gene fragment to construct an intracellular expression vector with EGFP as the reporter gene. The recombinant protein EGFP-LfcinB-His was fused and expressed, and its activity was determined. The recombinant expression plasmid was electroporated into *Pichia pastoris* GS115, and the positive transformants were screened. The fermentation expression was induced by methanol, and strong fluorescence was detected under the excitation light of 488 nm. When the yeast cell culture reached the highest density, the cells were collected, the

引文格式:

刘威,王玉莲,王林,等. LfcinB与EGFP融合蛋白在毕赤酵母中的胞内表达与分离纯化[J].现代食品科技,2024,40(12):67-74.

LIU Wei, WANG Yulian, WANG Lin, et al. Intracellular expression, isolation and purification of LfcinB and EGFP fusion protein in *Pichia pastoris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 67-74.

收稿日期: 2023-10-13

基金项目: 四川省科技计划项目-科研院所科技成果转化项目(2022JDZH0036); 四川省科研院所科技成果转化基金项目(22YSZH0016); 江苏大学高水平大学-师资建设-科研启动基金(4111360007); 江苏大学高级专业人才科研启动基金(12JDG069)

作者简介: 刘威(1997-), 男, 硕士, 研究方向: 基因工程菌发酵, E-mail: 17826260965@163.com

通讯作者: 王亮(1966-), 男, 研究员, 研究方向: 基因工程菌发酵、食品微生物菌种筛选及代谢机制, E-mail: wangliang_2004wl@163.com

cell walls were broken, and the cells were lysed with a yeast cell protein lysate. The target protein (LfcinB-His) band with a relative molecular mass of 4.1 ku was detected by Tricine-SDS-PAGE, after the lysate was purified by steps such as ultrafiltration concentration, Ni-NTA affinity chromatography and formic acid lysis. Finally, a LfcinB-His ultrafiltration concentrate with a purity of 90.32% was obtained through the determination and analysis by liquid chromatography-mass spectrometry, which had different degrees of inhibition on the six strains of pathogenic bacteria tested, and the inhibitory concentration range was 16~64 $\mu\text{g/mL}$. In summary, this study provides a good methodological reference for the expression of small molecular peptides in *Pichia pastoris*, and also lays a foundation for further research on the biological activity and high-density fermentation of LfcinB.

Key words: bovine lactoferricin; green fluorescent protein; *Pichia pastoris*; fusion expression; protein purification

牛乳铁蛋白肽 (LfcinB) 最初是由日本学者 Bellamy 等^[1,2]发现的, 由牛乳铁蛋白经过胃中蛋白酶充分水解消化后, 在 N 端释放得到的含 25 个氨基酸残基的阳离子短肽。LfcinB 除没有铁离子结合位点外, 具备牛乳铁蛋白大部分的生物活性, 例如广谱的抗菌性^[1,3,4]、抗病毒活性^[5], 兼具有抗肿瘤^[6]、免疫调节及缓解炎症^[7,8]等生物学功能, 它的抗菌活性是牛乳铁蛋白的 400 多倍^[1], 且具有更高的热稳定性^[9-11]。LfcinB 因其抗菌活性高、抗菌机制的多重性和高度生物安全性, 已引起人们的广泛关注。绿色荧光蛋白 (GFP), 由 238 个氨基酸组成, 分子量 26.9 ku, 在蓝色光线激发下, 会发出绿色荧光。增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 是在野生型 GFP 氨基酸序列上, 将位于第 64 位的苯丙氨酸点突变为亮氨酸而得来的, 发射出的荧光强度比 GFP 强 6 倍以上, 灵敏度更高^[12]。EGFP 灵敏度高, 不需要添加任何外来底物就能在荧光显微镜下观察研究活体细胞, 在生物学领域得到了广泛应用^[13]。

近年来, 对 LfcinB 的研究多集中在其抑菌活性中心作用机制上, 探讨其与抑菌功能相关的氨基酸替代, 平衡 LfcinB 的正电荷数与疏水性, 以期获得更高抑菌活性的衍生肽, 例如用 Arg 和 Trp 替代 Ala 和 Gly 等非必需氨基酸^[14-17]。迄今为止, 研究虽然取得了很好的进展, 一些 LfcinB 衍生肽展现了较高抗菌活性, 但较为关键的还是如何利用基因工程技术解决 LfcinB 生产问题, 特别是小分子 LfcinB 的纯化, 仍是当前迫切需要解决的问题。

本研究将 EGFP 基因片段与 LfcinB-His 基因片段的 N 末端连接, 构建了胞内表达载体 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His, EGFP 与 LfcinB-His 之间设有甲酸裂解位点。pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His 经大肠杆菌扩增, 基因序列鉴定, 线性化后电转至毕赤酵母 GS115 中。重组酵母用甲醇诱导发酵, 利

用激光共聚焦显微镜直接观察融合蛋白在重组酵母内表达情况。通过对表达获得的融合蛋白进行超滤浓缩、亲和层析、甲酸裂解等纯化步骤, 得到了纯度较高的融合蛋白 LfcinB-His, 为进一步研究 LfcinB 的生物功能及发酵生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒及菌株

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC26003)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC29213)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* TOP10)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* MC1061)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC25922)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* C600)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* CMCC44103)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris* GS115)、pEGFP-N3, 均由本实验室保存; pPIC9K-LfcinB-His 由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂

Taq PCR Mix 预混液 (2 \times)、TureColor 双色预染 Marker、Ni-NTA 纯化树脂预装柱、酵母细胞蛋白裂解液, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 甲醇 AR、甲酸 88% AR、咪唑, 国药集团化学试剂; *EcoR* I、*BamH* I、T4 DNA Ligase、*Sac* I, Invitrogen-赛默飞世尔中国; Amicon® Ultra-15 超滤离心管 (3K、10K、50K), Millipore 默克密理博。

1.2 仪器与设备

T100 PCR 仪、Mini-Sub® Cell GT 小型水平电泳仪、Mini Protean Tetra 垂直电泳仪、Gene Pulser Xcell 电转化仪, Bio-Rad 生命医学; G: BOX F3

凝胶成像系统, SYNGENE (香港); Thermo Shaker MB-202 恒温金属浴, 杭州博日科技; 5910R 多功能冷冻离心机, Eppendorf (上海) 国际贸易; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技; Leica SP5 II 共聚焦激光扫描显微镜, 德国徕卡仪器; Card-F98 荧光分光光度计, 上海棱光仪器; VIS-7220N 可见光分光光度计, 北分瑞利 (北京) 分析仪器; RE-2000B 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器。

1.3 试验方法

1.3.1 EGFP基因片段的获得

将 pEGFP-N3 质粒通过热激法转化至感受态的大肠杆菌 TOP10 中, 并涂布在 50 μg/mL 卡那霉素溶液的 LB 琼脂培养基上, 37 °C 静置过夜培养, 待菌落长出。挑取单菌落 pEGFP-N3-TOP10 接种至 50 μg/mL 卡那霉素溶液的 LB 液体培养基中, 于 210 r/min、37 °C 培养 6~8 h, 大量扩增后, 提取质粒。以 pEGFP-N3 质粒为模板, 设计引物时在 EGFP 的 3' 端引入甲酸裂解位点 (Asp-Pro) 和 *EcoRI* 酶切位点, EGFP 的 5' 端以 *BamHI* 酶切位点为 PCR 的起始位点。引物为: pEGFP-F: 5'-CGCGGATCCATCGCCACCA-3'; pEGFP-R: 5'-CGGGAATTCTGGGTCCTTGACAGCTCGTCCA

TGC-3'。PCR 反应程序为: 98 °C, 3 min (预变性); 98 °C, 1 min (变性); 66 °C, 30 s (退火); 72 °C, 20 s (延伸), 35 个循环反应后再延伸 10 min。随后, 对 PCR 产物中的 EGFP 片段进行电泳检测并切胶回收。

1.3.2 重组表达载体 pPIC9K 胞内-EGFP-LfcinB-His 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 对表达载体 pPIC9K-LfcinB-His 进行酶切, 去除信号肽 α-MF。酶切去除信号肽 α-MF 后, 用质量分数为 1.0% 的凝胶电泳验证并切胶回收大片段。按照图 1 所示, 将 PCR 扩增获得的 EGFP 片段进行测序鉴定, 与切胶回收的 pPIC9K-LfcinB-His 的大片段用 T4 DNA Ligase 酶连, 构建胞内重组表达载体 pPIC9K 胞内-EGFP-LfcinB-His。将其转化至大肠杆菌 MC1061 中, 并涂布在 100 μg/mL Amp 的 LB 琼脂培养基上, 于 37 °C 培养箱中静置培养 12~16 h。随机挑取 4 株转化子菌落, 以 5'AOX1:5'-CGACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' 为上游引物, 3'AOX1:5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 为下游引物进行菌落 PCR 扩增。菌落 PCR 反应程序为: 95 °C, 3 min (预变性); 95 °C, 1 min (变性); 55 °C, 30 s (退火); 72 °C, 45 s (延伸), 30 个循环反应后再延伸 10 min。随后, 对 PCR 产物进行电泳检测。

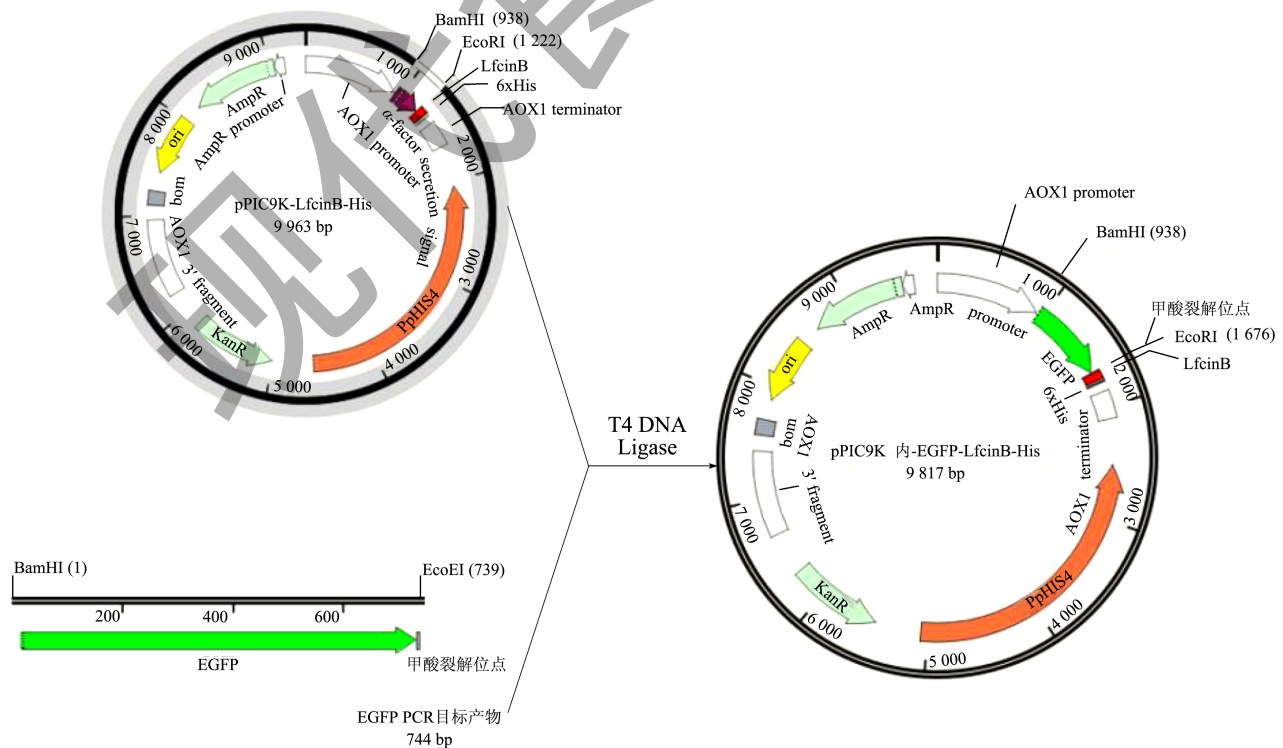


图 1 构建表达载体 pPIC9K 胞内-EGFP-LfcinB-His

Fig.1 The construction of recombinant intracellular expression vector

1.3.3 pPIC9K胞内-EGFP-LfcinB-His-GS115的构建及鉴定

取 80 μL 感受态的毕赤酵母 GS115 细胞与 10 μL 经 *Sac* I 酶切线性化的重组表达载体 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His 混匀, 冰浴 5 min 后, 迅速转入到电转杯中。将电转杯置入到电转化仪槽中, 1 500 V、25 μF 、200 Ω 电击转化, 电击时间为 3.6 ms。电转结束后, 立刻向电转杯中加入 1 mL 冰上预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液, 将电转杯内的菌液全部转入 1.5 mL EP 管内。将得到的电转菌液涂布于 MD 培养基上, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置培养 72 h, 观察单菌落生长情况。毕赤酵母 GS115 体内没有天然质粒, 线性化的重组表达载体电转入毕赤酵母 GS115 后与宿主染色体发生同源重组时存在两种情况: 一种是通过单交换整合入酵母染色体中, 此时 *AOX1* 基因没有被破坏, 得到的转化子可以在甲醇培养基中快速生长, 表型为 Mut^+ ; 另一种是通过重组替换了酵母染色体上的 *AOX1* 基因, 导致 *AOX1* 基因缺失, 得到的转化子在甲醇培养基中缓慢生长, 表型为 Mut^s 。挑取 MD 平板上的菌落, 以 5' *AOX1* 和 3' *AOX1* 为引物对菌落进行 PCR 鉴定。

1.3.4 重组毕赤酵母 pPIC9K 胞内-EGFP-LfcinB-His-GS115 的荧光检测

挑取重组酵母 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His-GS115 单菌落接种至 50 mL BMGY 液体培养基中, 于 210 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 左右至 $\text{OD}_{600}=2\sim 6$ 。离心收集全部菌体, 用适量 BMMY 培养基重悬菌体至 $\text{OD}_{600}=1$ 左右, 于 210 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上振荡培养, 每隔 24 h 补给一次体积分数为 0.5% 的甲醇, 并记录发酵过程中重组酵母的生长曲线。取 1.5 mL 发酵液, 10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 获得的菌体细胞, 用等体积的磷酸盐缓冲液洗涤两次后, 用 1 mL 缓冲液重悬, 取 20 μL 滴加到载玻片上。利用激光共聚焦显微镜, 在 488 nm 波长的激发光下观察重组酵母细胞的荧光情况和具体形态。

1.3.5 重组毕赤酵母的破壁

取细胞密度最高时的重组酵母菌液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min 后收集细胞沉淀菌体。按照每 20 mg 湿重菌体加酵母细胞蛋白裂解液中的溶液 A 1 mL、溶液 B 10 μL 和溶液 C 1 μL 。这些溶液能使酵母细胞快速破裂而释放蛋白质, 且含有强烈的蛋白酶抑制剂从而保证外源重组蛋白的完整性。将裂解液涡悬振荡 30 s, 让菌体充分悬浮。在脱色

摇床上轻轻振荡 30 min 后, 将细胞裂解液转移至冷冻离心机中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。

1.3.6 融合蛋白 EGFP-LfcinB-His 的纯化

先向干燥的超滤管加入 MilliQ 水, 水量过膜, 冰箱内预冷几分钟, 将水倒出。向 Amicon® Ultra-15 50K 超滤离心管中加入 12 mL 的重组酵母细胞裂解液。将超滤离心管放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的离心机中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 30 min。离心结束后, 将收集管内的滤出液完全转移至 Amicon® Ultra-15 10K 超滤离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min, 收集浓缩产物。取 12 mL 超滤浓缩产物, 复水溶于 1 mL 无菌水, 用 0.45 μm 的滤膜对溶液过滤。将过滤后的超滤浓缩产物加入到预装柱中, 将预装柱的两段密封, 在垂直混合仪上夹紧, 室温下以中高转速 65 r/min 上下垂直混合 1 h, 让目的蛋白上的 His 标签同预装柱中的填料充分接触, 以达到挂柱的效果。先用 Ni-Native-10 buffer (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 值 8.0) 进行流穿和洗杂, 然后用 Ni-Native-250 buffer (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 值 8.0) 进行洗脱, 控制流速约为 1 mL/min, 对洗脱液冷冻干燥后的冻干粉复水溶液进行 SDS-PAGE 检测。将冷冻干燥后的融合蛋白溶解在体积分数 70% 的甲酸溶液中, 充氮气后, 室温暗处静置 24 h, 将裂解液置于旋转蒸发器中 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~3 h 至甲酸完全挥发^[18], 得到的固形物用 PBS 溶解。

1.3.7 LfcinB-His 的浓缩、纯化及鉴定

对甲酸裂解后的产物先用 Ni-NTA 亲和层析纯化, 洗脱液再用 Amicon® Ultra-15 3K 超滤离心管进行超滤浓缩同时可以达到脱盐的目的。超滤浓缩后的固形物用少量 PBS 溶解, 后进行 Tricine-SDS-PAGE 检测。检测有清晰的目的条带后, 使用液质联用质谱仪对浓缩液中蛋白的含量和纯度进行分析。

1.3.8 LfcinB-His 的抑菌活性检测

采用微量肉汤稀释法^[19]对 LfcinB-His 的最小抑菌质量浓度 (MIC) 进行测定, 将含有 LfcinB-His 的超滤浓缩液进行稀释, 使 LfcinB-His 质量浓度为 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 过滤除菌后倍比稀释, 使 LfcinB-His 的终质量浓度分别为 256、128、64、32、16、8、4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将活化好的病原菌用 LB 培养基稀释至 10^6 CFU/mL, 96 孔培养板每孔加入 50 μL , 然后分别加入 50 μL 含有不同质量浓度 LfcinB-His 的稀释

液, 37 °C 孵育 12 h 后观察细菌的生长情况。

2 结果与讨论

2.1 EGFP基因片段的获得

以 pEGFP-F、pEGFP-R 为引物, PCR 扩增产物电泳检测结果如图 2 所示, 获得了分子量为 744 bp 的 EGFP 片段。切胶回收 EGFP 片段的质量浓度为 95.22 ng/μL, 后使用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 对其进行酶切, 酶切出了粘性末端, 可用于构建胞内表达载体。

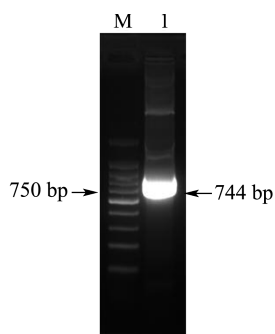


图 2 PCR 获得 EGFP 片段

Fig.2 EGFP fragment obtained by PCR

注: M 为 DNA Marker, 1 为 EGFP 获得时的 PCR 产物。

2.2 pPIC9K胞内-EGFP-LfcinB-His的鉴定

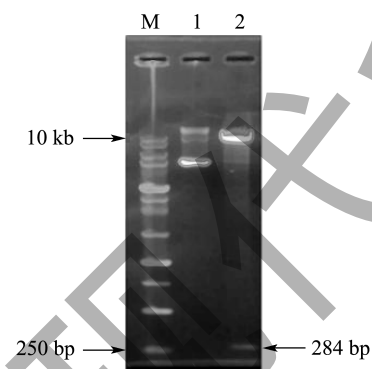


图 3 pPIC9K-LfcinB-His 的双酶切

Fig.3 The double enzyme digestion product of pPIC9K-LfcinB-His

注: M 为 DNA Marker, 1 为 pPIC9K-LfcinB-His, 2 为双酶切的 pPIC9K-LfcinB-His。

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 对 pPIC9K-LfcinB-His 进行酶切, 酶切产物电泳检测结果如图 3 所示, 其中小片段 284 bp 符合 α -MF 信号肽的分子量, 证明信号肽的基因片段被切下, 后切胶回收了大片段。随机挑取 4 株 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His-MC1061 转化子菌落, 进行 PCR 扩增验

证。表达载体转化子因切去了 α -MF 信号肽序列, PCR 所得产物的片段应约为 1 000 bp (图 4 泳道 1~4)。将对应的转化子菌株大量扩增后提取质粒, 送测序, 测序结果无误。说明 EGFP 片段已准确插入到 pPIC9K-LfcinB-His 中, pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His 构建成功。

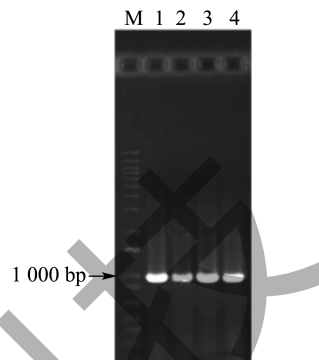


图 4 重组表达载体 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of recombinant expression vectors

注: M 为 DNA marker, 1~4 为扩增菌落 PCR 产物。

2.3 转化子 pPIC9K胞内-EGFP-LfcinB-His-GS115的筛选

用限制性内切酶 *Sac* I 对重组胞内表达载体 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His 酶切线性化, 将线性化的重组载体 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His 电转至感受态的毕赤酵母 GS115, 涂布在 MD 培养基上, 在 30 °C 培养 72 h 左右, 获得了大量阳性转化子菌落。对阳性转化子菌落进行 PCR 鉴定, 结果如图 5 所示, 泳道 2~13 既含有目的基因条带, 也含有 AOX1 基因条带, 其甲醇利用型均为 Mut⁺。

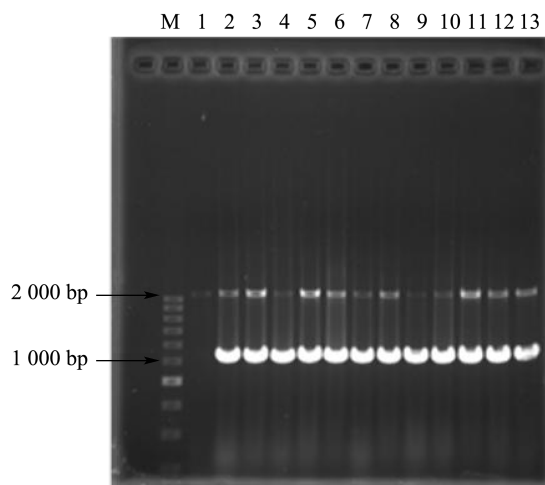


图 5 转化子 PCR 鉴定

Fig.5 Transformants PCR identification

注: M 为 DNA Marker, 1 为 GS115, 2~13 为阳性转化子。

2.4 重组毕赤酵母pPIC9K胞内-EGFP-LfcinB-His-GS155的荧光检测

在MD培养基上挑取一株表型为Mut⁺的阳性转化子菌株,用甲醇进行发酵诱导表达,生长曲线如图6所示,细胞在12~48 h迅速增长,48 h后生长速度变缓,发酵84 h左右细胞密度达到最大。收集菌体细胞,激光共聚焦显微镜下观察细胞内外源融合蛋白的表达情况。如图7所示,在激光共聚焦显微镜下可见明显绿色荧光,此时EGFP得到大量表达。

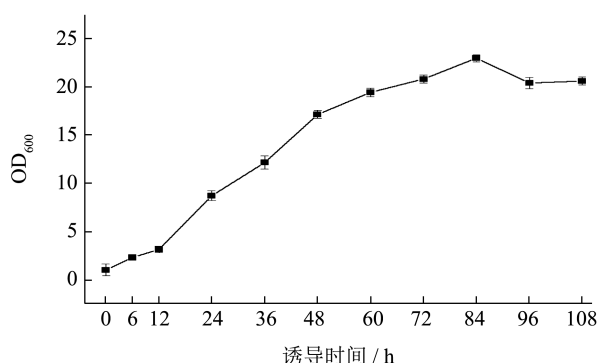


图6 重组毕赤酵母诱导过程中的生长曲线

Fig.6 The growth curve of recombinant *Pichia pastoris* during induction process

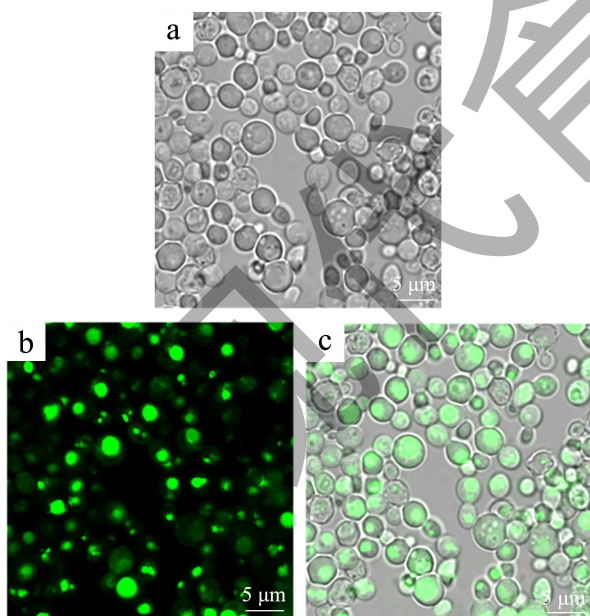


图7 重组毕赤酵母在激光共聚焦显微镜下的荧光检测(4000×)

Fig.7 The fluorescence detection of recombinant *Pichia pastoris* under laser confocal microscope

注: a 为 Bright, b 为 Fluorescence, c 为 Channel superposition.

2.5 LfcinB与EGFP融合蛋白的SDS-PAGE检测

重组酵母细胞的裂解液经过超滤浓缩后,用

Ni-NTA亲和层析纯化,将EGFP-LfcinB-His融合蛋白洗脱液进行冷冻干燥,冻干粉的复水溶液经SDS-PAGE检测,结果如图8所示。其中泳道1为Ni-NTA柱纯化融合蛋白时的流穿液,隐约可见少量融合蛋白流失;泳道2为洗杂液,重复洗涤后,洗出的杂蛋白量比较少;泳道3为浓缩10倍后的洗脱液,目标融合蛋白的条带清晰,可用于后续的甲酸裂解;泳道4和5为纯化之前胞内重组酵母细胞蛋白裂解液。

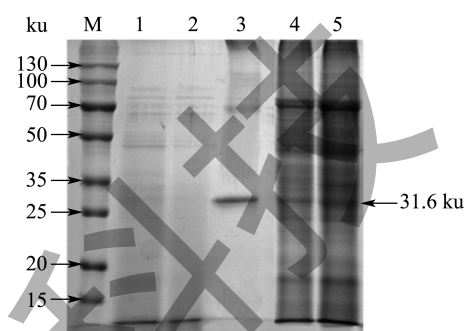


图8 SDS-PAGE 检测纯化的融合蛋白

Fig.8 The SDS-PAGE detection of purified fusion protein

注: M 为蛋白 Marker, 1 为流穿液, 2 为洗杂液, 3 为浓缩后的洗脱液, 4、5 为 pPIC9K 胞内-EGFP-LfcinB-His-GS115。

2.6 LfcinB-His的鉴定

2.6.1 Tricine-SDS-PAGE检测LfcinB-His

甲酸裂解融合蛋白EGFP-LfcinB-His,裂解液经Ni-NTA亲和层析纯化和分子筛脱盐浓缩,浓缩液Tricine-SDS-PAGE检测结果如图9所示。泳道1~4均为浓缩液,显示浓缩液含有纯度较高的融合蛋白LfcinB-His。经测定,蛋白质量浓度为2.82 g/L。

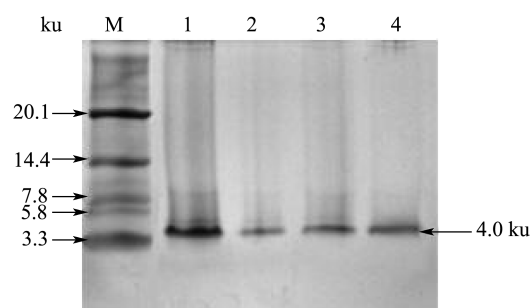


图9 Tricine-SDS-PAGE 检测纯化后的 LfcinB-His

Fig.9 The Tricine-SDS-PAGE detection of purified LfcinB-His

注: M 为蛋白 Marker, 1~4 为纯化的 LfcinB-His 浓缩液。

2.6.2 液质联用测定LfcinB-His的纯度

液质联用分析的结果如图10a和10b所示。

2.76 min 处出现一个最大的吸收峰, 峰面积占总体峰面积的 90.32%, 对该峰进行质谱分析。质谱分析的结果为 3 988.08 u, 受质谱分辨率和自己推算分子量误差的影响, 测定的值同理论值之间存在偏移但是较为接近。基本可以说明主要的大吸收峰为 LfcinB-His, 纯度为 90.32% 左右。张恩鹏等^[20] 将牛乳铁蛋白肽衍生肽 (LfcinB-W4) 基因片段在毕赤酵母 GS115 中甲醇诱导表达, 发酵上清液对金黄色葡萄球菌具有很强的抑制作用, 但并没有纯化出高纯度的 LfcinB-W4。本研究将 LfcinB-His 与 EGFP 进行胞内融合表达成功解决了 LfcinB 分子量小, 表达量偏低难以纯化的问题, 获得了纯度为 90.32% 的 LfcinB-His 浓缩液。

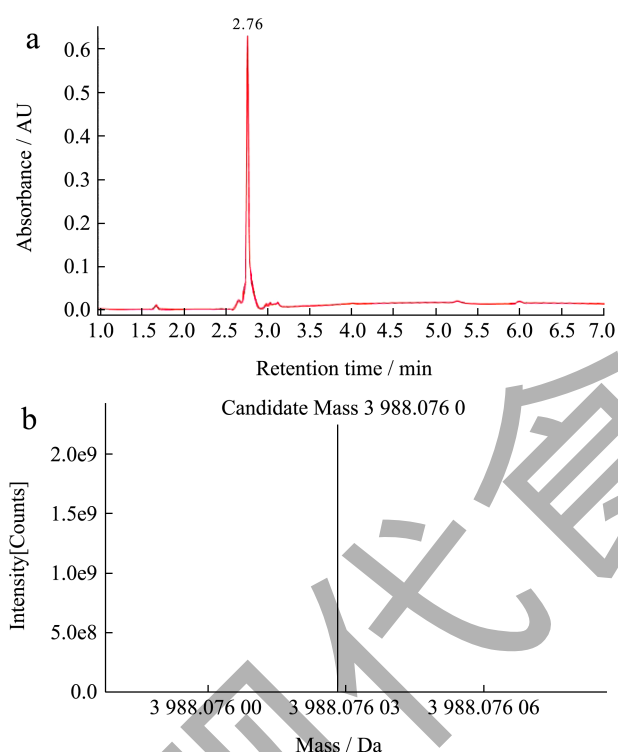


图 10 LfcinB-His 纯度的测定与分析

Fig.10 The determination and analysis of purity of LfcinB-His

注: (a) 为液相色谱分析 LfcinB-His 纯度, (b) 为质谱分析 LfcinB-His 的分子量。

2.7 LfcinB-His 的抑菌活性检测

分别以金黄色葡萄球菌 ATCC25923、金黄色葡萄球菌 CMCC26003、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠杆菌 ATCC25922、大肠杆菌 C600、大肠杆菌 CMCC44103 为指示菌, 利用微量肉汤法测定 LfcinB-His 的 MIC, 结果如表 1 所示, 对几种病原菌均有明显的抑制, 抑菌质量浓度在 16~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其中, 对大肠杆菌 ATCC25922 和大肠杆菌 C600

的抑制效果最好。苏梦茹等^[21] 以大肠杆菌 ATCC25922 为指示菌, 对头孢噻唑钠、硫酸链霉素、强力霉素、土霉素、氨苄西林、氟苯尼考、替米考星、硫酸新霉素、青霉素的 MIC 进行了测定, 测得对应的 MIC 值分别为 2、4、4、16、8、16、64、32、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由此可见, 以大肠杆菌 ATCC25922 为指示菌, LfcinB-His 的抗菌能力与土霉素、氟苯尼考相当, 高于替米考星、硫酸新霉素、青霉素。

表 1 牛乳铁蛋白肽最小抑菌质量浓度

Table 1 Minimal inhibitory concentrations of bovine lactoferrin peptide

菌株	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
金黄色葡萄球菌 ATCC25923	32
金黄色葡萄球菌 CMCC26003	64
金黄色葡萄球菌 ATCC29213	64
大肠杆菌 ATCC25922	16
大肠杆菌 C600	16
大肠杆菌 CMCC44103	64

3 结论

本研究将 EGFP 基因片段与 LfcinB-His 基因片段 N 末端连接, 构建了胞内重组表达载体 pPIC9K 胞内 -EGFP-LfcinB-His。电转入毕赤酵母 GS115 中, 筛选获得的转化子经甲醇诱导发酵, 荧光显示融合蛋白 EGFP-LfcinB-His 在重组毕赤酵母 GS115 内大量表达。酵母细胞经过破壁、分离纯化、超滤浓缩后, SDS-PAGE 检测到在 31.6 ku 附近有清晰的目标融合蛋白条带存在。融合蛋白经甲酸裂解后, 获得了纯度为 90.32% 的目的蛋白 LfcinB-His。超滤浓缩得到的 LfcinB-His 溶液稀释后, 进行 MIC 范围的测定, 发现其对测试的 6 株致病菌的抑菌质量浓度在 16~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。小分子肽 LfcinB 与大分子报告蛋白 EGFP 胞内融合表达, 既可以通过荧光观察直观判断融合蛋白的表达情况, 又便于获得较高浓度的目的蛋白, 还可以增加外源蛋白的分子量以便于电泳检测, 为进一步研究 LfcinB 的生物活性及高密度发酵奠定了基础。

参考文献

- [1] BELLAMY W, TAKASE M, WAKABAYASHI H, et al. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin [J]. Applied Bacteriology, 1992, 73(6): 472-479.

- [2] WAKABAYASHI H, TAKASE M, TOMITA M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(16): 1277-1287.
- [3] ALMEIDA J S D, MARRE A T D, TEIXEIRA F L, et al. Lactoferrin and lactoferricin B reduce adhesion and biofilm formation in the intestinal symbionts *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* [J]. *Anaerobe*, 2020, 64: 102232.
- [4] PEI J, XIONG L, CHU M, et al. Effect of intramolecular disulfide bond of bovine lactoferricin on its molecular structure and antibacterial activity against *Trueperella pyogenes* separated from cow milk with mastitis [J]. *Bmc Veterinary Research*, 2020, 16(1): 401.
- [5] BOAS L, CAMPOS M L, BERLANDA R, et al. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(18): 3525-3542.
- [6] BARRAGAN-CARDENAS A, URREA-PELAYO M, NINO-RAMIREZ V A, et al. Selective cytotoxic effect against the MDA-MB-468 breast cancer cell line of the antibacterial palindromic peptide derived from bovine lactoferricin [J]. *Rsc Advances*, 2020, 10(30): 17593-17601.
- [7] QI J, LI W S, LU K J, et al. PH and thermal dual-sensitive nanoparticle-mediated synergistic anti-tumor effect of immunotherapy and microwave thermotherapy [J]. *Nano Letters*, 2019, 19(8): 4949-4959.
- [8] SONG L Y, XIE W C, LIU Z H, et al. Oral delivery of a *Lactococcus lactis* strain secreting bovine lactoferricin-lactoferrampin alleviates the development of acute colitis in mice [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(15): 6169-6186.
- [9] LIU H Y, BOGGS I, WEEKS M, et al. Kinetic modelling of the heat stability of bovine lactoferrin in raw whole milk [J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 280: 109977.
- [10] SHESTAKOV A, JENSSEN H, NORDSTR M I, et al. Lactoferricin but not lactoferrin inhibit herpes simplex virus type 2 infection in mice [J]. *Antiviral Research*, 2012, 93(3): 340-345.
- [11] AHMADINIA K, YAN D, ELLMAN M, et al. The anti-catabolic role of bovine lactoferricin in cartilage [J]. *Biomolecular Concepts*, 2013, 4(5): 495-500.
- [12] 张丽琼. 抗菌肽DCD-1L与增强型绿色荧光蛋白在大肠杆菌Transetta中的融合表达[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2012.
- [13] 侯清华, 宋淑亮, 梁浩, 等. 增强型绿色荧光蛋白的色谱分离和纯化[J]. *色谱*, 2013, 31(2): 151-154.
- [14] STROM M B, HAUG B E, REKDAL O, et al. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002, 80(1): 65-74.
- [15] WANG L, WANG Y L, LV Z L, et al. Design of bovine lactoferricin-derived peptide and its expression and activity in *Pichia pastoris* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 534: 822-829.
- [16] HAN F F, GAO Y H, LUAN C, et al. Comparing bacterial membrane interactions and antimicrobial activity of porcine lactoferricin-derived peptides [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(6): 3471-3487.
- [17] SILVA T, MAGALHAES B, MAIA S, et al. Killing of *Mycobacterium avium* by lactoferricin peptides: improved activity of arginine- and D-amino-acid-containing molecules [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(6): 3461-3467.
- [18] PARK T J, KIM J S, CHOI S S, et al. Cloning, expression, isotope labeling, purification, and characterization of bovine antimicrobial peptide, lactophorin in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 65(1): 23-29.
- [19] 王臣, 张巫凡, 牛明福, 等. 天蚕素类抗菌肽CLP的设计及其活性测定[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(8): 600-604.
- [20] 张恩鹏, 吕自力, 戴甜, 等. 牛乳铁蛋白肽衍生肽结构设计及其在毕赤酵母中表达后的活性分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 163-169.
- [21] 苏梦茹, 马培培, 李鑫鑫, 等. 9种抗菌药物对大肠埃希菌最小抑菌浓度的测定[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(3): 52-56.