

# 人 $\alpha$ 防御素5在酿酒酵母中的分泌表达及其活性分析

宋南, 邵婕, 刘子昊, 徐子龙, 许琪瑶, 张学文, 陈金军\*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 中国湖南 长沙 410128)

**摘要:** 人 $\alpha$ -防御素5 (human  $\alpha$ -defensin 5, HD5) 是人防御素 $\alpha$ 家族中发现的抑菌活性最高的多肽。为了探究HD5在酿酒酵母中分泌表达的可行性, 首先利用PCR扩增获得酵母菌偏好的HD5核酸序列, 构建酿酒酵母表达载体pVT102U/ $\alpha$ -HD5, 并将该重组质粒转入酿酒酵母S78中, 通过营养缺陷筛选获得阳性转化菌株。然后, 对重组菌进行发酵培养, 取上清液纯化后通过tricine-SDS-PAGE和质谱检测表达产物。最后, 利用琼脂扩散法检测表达的HD5的抑菌活性以及其对温度的耐受性, 同时通过二倍稀释法检测表达的HD5对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及沙门氏杆菌的最小完全抑制浓度。结果显示: 表达的HD5对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及沙门氏杆菌均具有明显的抑菌活性。发酵上清冻干粉对金黄色葡萄球菌完全抑制的最小浓度为10 mg/mL, 对大肠杆菌和沙门氏杆菌完全抑制的最小浓度为40 mg/mL; 且在不同温度处理下, 表达的HD5对3种细菌仍具有一定的抑菌作用。上述结果表明具有高抑菌活性的HD5防御素在该重组系统中成功表达。

**关键词:** 防御素; 酿酒酵母; 抗菌活性; 载体构建; 表达纯化

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)06-0471-06

## Activity Analysis and Secretory Expression of Human Alpha-defensin 5 in *Saccharomyces cerevisiae*

SONG Nan, SHAO Jie, LIU Zi-hao, XU Zi-long, XU Qi-yao, ZHANG Xue-wen, CHEN Jin-jun\*

(College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China)

**Abstract:** The feasibility of secretion expression of human  $\alpha$ -defensin 5 (HD5), which exhibits the highest antimicrobial activity in human  $\alpha$ -defensin family, in *Saccharomyces cerevisiae* was explored. The DNA fragment containing HD5 coding sequence with biased codons of *S. cerevisiae* was amplified by PCR, and inserted into the shuttle plasmid pVT102U/ $\alpha$  of *S. cerevisiae*. The recombinant vector named pVT102U/ $\alpha$ -HD5 was transformed into *S. cerevisiae* S78. The positive recombinant clones were screened out under nutrient deficiency. After fermentation, the recombinant protein could be detected in the culture supernatant by tricine-SDS-PAGE, and the protein was further subjected to mass spectroscopy to identify the relative molecular mass. The antimicrobial activities of the supernatant against the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella pullorum* were investigated. The minimal concentrations of the lyophilized powder of fermentation supernatant were 10 mg/mL to *S. aureus* and 40 mg/mL to both *E. coli* and *S. pullorum* for complete inhibition. Furthermore, the antibacterial activity of supernatant did not attenuate after treatment with various temperatures up to 140 °C for 10 min. The results showed that the recombinant HD5 could be produced with high antibacterial activity.

收稿日期: 2017-03-16; 修回日期: 2017-09-16

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(16A098); 湖南省科技厅重点项目(2017NK2311); 国家自然科学基金资助项目(31672457, 31772865); 湖南农业大学大学生创新项目(XCX17071)

作者简介: 宋南(1990-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生; \*通讯作者: 陈金军(1975-), 女, 湖南长沙人, 博士, 湖南农业大学副教授, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究, E-mail: chhncjj@126.com。

**Key words:** defensin; *Saccharomyces cerevisiae*; antibacterial activity; vector construction; expression and purification

(*Life Science Research*, 2017, 21(6): 471~476)

抗生素的大规模滥用,导致越来越多的微生物对传统抗生素产生了抗药性,进而给人类健康带来了极大的威胁与挑战。目前,人们正迫切地寻找能够代替传统抗生素的药物,以逆转现今抗耐药性微生物感染的严峻局面<sup>[1,2]</sup>。抗菌肽是一类广泛存在于自然界生物体中的小肽类物质,是机体先天性免疫系统的重要组成部分,能有效杀死细菌、真菌、寄生虫和包膜病毒,且其抗菌机理与抗生素的抗菌机理不相同,不易产生耐药性的突变。相较于传统抗生素,抗菌肽具有重要的应用前景<sup>[3]</sup>。抗菌肽种类繁多,迄今为止,已有 2 798 种不同来源的抗菌肽被报道(the Antimicrobial Peptide Databases, [http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic\\_function.php](http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_function.php), 2017)。

人体防御素是先天性免疫系统的重要组成部分,不仅具有良好的抗菌作用,在免疫细胞的分裂和成熟、上皮组织分化、伤口愈合以及肿瘤抑制方面也具有重要作用。人体防御素是一类大小只有 4~5 kD 的阳离子小肽,基于氨基酸序列的同源性以及二硫键的连接方式,主要可将其分为  $\alpha$ 、 $\beta$  两种亚型。现阶段已有 6 种人类  $\alpha$  防御素(human  $\alpha$ -defensins, HDs)被发现,其中包括髓源性 HNP1~4 (human neutrophil peptides 1~4)和肠源性 HD5、HD6<sup>[4]</sup>。研究发现,HD5 不仅可以高效杀灭各种细菌、真菌以及病原虫,也可抵御一些病毒的侵害,对包膜病毒 HIV<sup>[5]</sup>和无包膜的人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)<sup>[6]</sup>均具有一定的抑杀作用。此外,HD5 在刺激小肠分泌、抑制自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)活性、促进炎性细胞趋化等机体功能中也扮演重要角色<sup>[7]</sup>。考虑到现阶段获取 HD5 遇到的产量低、成本高的瓶颈,王艾平等先后通过基因工程的方法在原核细胞<sup>[8]</sup>以及毕赤酵母细胞<sup>[9]</sup>中成功表达 HD5,且在活性检测中发现表达的 HD5 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有极强的抑制作用。然而,原核细胞表达的 HD5,因包涵体问题而不易纯化;HD5 在毕赤酵母细胞中的表达,需要在甲醇诱导剂的作用下方可实现,且甲醇对人体有害,为后期 HD5 在生产中的应用带来困扰。基于以上分析,本文探究了 HD5 在酿酒酵母中的表达情况,并系统地研究了表达产物

对大肠杆菌、沙门氏杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用以及其对温度的耐受性。本研究中探讨的 HD5 在酿酒酵母中表达,是胞外分泌表达且无需诱导剂,易于纯化,在工业应用上更具优势。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌和酿酒酵母表达菌株 S78 均为本实验室保存。真核酵母表达载体 pVT102U/ $\alpha$  为本实验室保存。

### 1.2 工具和生化试剂

T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司(立陶宛);限制性内切酶 *Xba* I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司(日本);Trans2K plus DNA 相对质量标准购自北京全式金生物技术有限公司;Tricine-SDS-PAGE 试剂盒和质粒小提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒和普通 DNA 产物纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;氨苄青霉素和卡那霉素购自长沙市佳和生物科技有限责任公司;阳离子交换柱和反相高效液相色谱购自 Waters 公司(美国)。

LB 培养基:酵母提取物 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,溶于 1 L 蒸馏水,pH 7.0,121 °C 灭菌;YPD 培养基:酵母提取物 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,溶于 1 L 蒸馏水,pH 7.0,115 °C 灭菌;YSD 培养基:Yeast Nitrogen Base 6.7 g,葡萄糖 20 g,亮氨酸 200 mg,腺嘌呤 100 mg,肌醇 200 mg,pH 7.0,115 °C 灭菌。

### 1.3 基因的获取及表达载体的构建

在 NCBI 上找到 HD5 的氨基酸序列,参照酿酒酵母菌的密码子偏好,设计其可编码的 DNA 序列,并在序列的 5' 端和 3' 端引入酶切位点与相应的保护碱基。设计的引物见表 1。所用引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

HD5 基因克隆主要分两个 PCR 阶段。第一阶段 PCR 利用引物 HD5-F1 和 HD5-R1 相互搭桥合成 HD5 基因的中间部分。反应条件:94 °C 30 s、68 °C 30 s、68 °C 30 s,循环 25 次,68 °C 终末延伸 5 min 的条件下进行 DNA 双链合成。第二轮 PCR 以第一阶段 PCR 产物作为模板,以 HD5-F2 和

表1 PCR所用引物  
Table 1 Sequences of primers used in PCR

Primer	Sequence
HD5-F1	5'-TAAGAGATGTTATTGTAGAACTGCTAGATGCTACTAGAGAATCATTGTCTGGTGTCT-3'
HD5-R1	5'-TTATCTACAACACAATCTATACAATCTACCCTAATTCACAGACACCAGACAATGATT-3'
HD5-F2	5'-CGTCTAGATAAGAGATGTTA-3'
HD5-R2	5'-CCGAAGCTTTATCTACAACA-3'

注: HD5-F2 序列中的下划线表示 *Xba* I 酶切位点; HD5-R2 序列中的下划线表示 *Hind* III 酶切位点。

Notes: The underline in HD5-F2 represents the recognition site of *Xba* I and the underline in HD5-R2 represents the recognition site of *Hind* III.

HD5-R2 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 30 s、52 °C 40 s、72 °C 40 s, 共 35 个循环, 然后 72 °C 延伸 7 min, 切胶回收 PCR 产物。

将 pVT102U/ $\alpha$  和上述回收的 PCR 产物分别进行 *Xba* I、*Hind* III 限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳检测, 并切胶回收。酶切处理后的 pVT102U/ $\alpha$  和目的片段 HD5, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 连接过夜。将连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 于 37 °C 恒温培养箱培养 8~16 h 后, PCR 筛选阳性转化子。用浓度为 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。阳性重组质粒命名为 pVT102U/ $\alpha$ -HD5。

#### 1.4 酿酒酵母的转化及表达

将重组质粒 pVT102U/ $\alpha$ -HD5 转入酿酒酵母 S78 感受态细胞后, 涂布于 YSD 营养缺陷型筛选固体培养基上, 于 30 °C 恒温箱培养 3~4 d。挑取直径约为 3~5 mm 大小的菌落于 20 mL 的 YSD 液体培养中, 200 r/min、30 °C 摇瓶过夜; 按 1 : 50 (V/V) 的比例, 继代种子液, 200 r/min、30 °C 摇瓶过夜; 按 1 : 50 (V/V) 的比例, 将种子液转入 YPD 液体培养基中, 于 200 r/min、30 °C 恒温箱中继续发酵培养 96 h。4 °C、5 000 r/min 离心收集发酵上清, 取 100 mL 上清原液进行冷冻干燥, 制备干预液。pVT102U/ $\alpha$ -HD5 转化的酵母菌培养上清通过冷冻干燥后再稀释, 获得原液和 20 倍浓缩液, 用于活性检测。以空白质粒转化的酵母菌发酵液作为对照。

#### 1.5 产物分离纯化与鉴定分析

分离纯化: 将发酵液上清过滤后上样阳离子交换柱进行分离。上样完成后, 先过 0.1 mol/L pH 4.2 的 NaAC 缓冲液, 洗去杂蛋白; 然后依次用含 0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L NaCl-NaAC 的平衡液进行洗脱。分梯度取样, 冷冻干燥至 2 mL 左右进行蛋白质 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳, 通过反相高效液相色谱分离纯

化的蛋白质。

检测与鉴定: 参照 Tricine-SDS-PAGE 电泳套装试剂盒的说明书检测离子交换洗脱液冻干样; 用质谱鉴定准确的相对分子质量。

#### 1.6 表达产量分析

根据改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒的使用说明书配制 BSA 蛋白标准液及工作液。1) 分别取不同浓度的 BSA 蛋白标准液 100  $\mu$ L 与 Bradford 工作液 1.0 mL 充分混匀后, 室温(25~30 °C) 放置 10 min, 在分光光度计上测定各管  $A_{595}$  值, 并设置 2 组重复; 2) 以各管 BSA 蛋白标准液的  $A_{595}$  的平均值为纵坐标, 对应的蛋白质浓度为横坐标, 在 SigmaPlot 软件中绘制标准曲线; 3) 按照上述 1) 的操作方法测定表达产物的 20 倍浓缩液的  $A_{595}$  值, 并在标准曲线上计算出待测样品的蛋白质浓度, 将空白质粒转化的酵母菌发酵液作为对照。

#### 1.7 重组 HD5 蛋白的生物活性检测

琼脂扩散法: 将 3 mL 的大肠杆菌 ( $OD_{600\text{ nm}}=1.5\sim2.0$ )、金黄色葡萄球菌 ( $OD_{600\text{ nm}}=1.5\sim2.0$ ) 和沙门氏杆菌 ( $OD_{600\text{ nm}}=1.5\sim2.0$ ) 菌液加至 100 mL 已融化的 LB 培养基中, 制成含菌平板, 打孔并注入 100  $\mu$ L 的待测原液以及浓缩液, 37 °C 培养 8~16 h, 观察细菌生长情况以及抑菌圈的大小。将表达产物的浓缩液分别置于温度为 60 °C、80 °C、100 °C 的水浴锅以及 120 °C、140 °C 的烘箱中处理 10 min, 利用琼脂扩散法检测处理后的样品对 3 种菌的抑制效果。

#### 1.8 重组 HD5 蛋白的最小抑菌浓度测定

菌体浓度测定: 将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌培养至对数生长期 ( $OD_{600\text{ nm}}=0.4\sim0.6$ ), 用 LB 培养基调其  $OD_{600\text{ nm}}$  为 0.1, 随后将菌液按 10 倍梯度稀释法调至  $1\times 10^3$  cfu/mL, 涂布于固体 LB 培养基, 37 °C 培养 8~16 h 后, 统计菌落个数。

抑菌实验: 取 50  $\mu$ L 不同浓度(40 mg/mL、20 mg/mL、10 mg/mL、5.0 mg/mL、2.5 mg/mL、0 mg/mL) 的表达产物与 50  $\mu$ L 浓度为  $1\times 10^3$  cfu/mL 的菌液

混合,混匀后涂布到LB固体培养基上,37℃培养8~16h,观察细菌生长情况,统计菌落个数。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组表达载体构建的结果

通过搭桥PCR扩增得到编码目的多肽的核酸序列。将第二轮PCR的产物进行核酸凝胶电泳检测,结果如图1A所示,1~3泳道显示的电泳条带大小约为100bp,与预期的目的片段大小基本一致。切胶回收后,将目的片段和表达载体经*Xba*I和*Hind*III酶切,连接转化后从转化平板上挑取单菌落,进行菌落PCR检测。检测结果如图1B所示,第1泳道是阳性对照,即用目的片段做模板得到的PCR产物,第2、3泳道均为重组质粒阳性克隆菌落PCR产物,第2、3泳道的电泳条带大小与第1泳道的条带大小基本一致。PCR扩增所获得的编码HD5防御素的基因片段核苷酸序列为:CGTCTAGATAAGAGATGTTATTGTAGAAC-TGGTAGATGTGCTACTAGAGAATCATTGTCTGG-TGTCTGTGAAATTAGTGGTAGATTGTATAGATT-GTGTTGTAGATAAAGCTTCGG,测序结果与预期序列完全一致,包含*Xba*I和*Hind*III酶切位点,以及蛋白酶Kex2识别位点。

### 2.2 重组HD5蛋白的纯化分析结果

通过阳离子交换,收集洗脱峰,将这些洗脱峰的冻干样品通过

### 2.3 产物表达量分析结果

根据改良型Bradford法绘制蛋白质标准曲线(图4),随后将发酵所得的表达产物适量溶解后制成浓缩液,测定其595nm下的吸光值。根据标准曲线计算产物的表达量,其中空白对照的总表达量平均值为69.62 mg/L,样品组S78-pVT102U/ $\alpha$ -HD5的总表达量平均值为233.45 mg/L,从而得到防御素HD5的20倍浓缩液的表达量为163.83 mg/L。

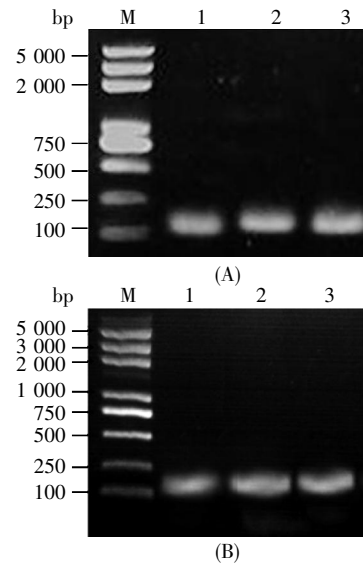


图1 重组表达载体构建的相关结果图

(A)基因克隆后目的片段电泳检测图。M: DNA标准,1~3: PCR扩增产物; (B)菌落PCR筛选重组质粒的电泳检测图。M: DNA标准; 1: 阳性对照(目的片段); 2, 3: 重组质粒阳性克隆菌落PCR产物。

### Fig.1 The result of construction of recombinant expression vector

(A) PCR amplification of target fragment. M: Trans2K plus DNA marker; 1~3: PCR amplification product; (B) PCR amplification of target fragment in single colonies. M: Trans2K plus DNA marker; 1: Positive control; 2, 3: PCR from single positive colonies.

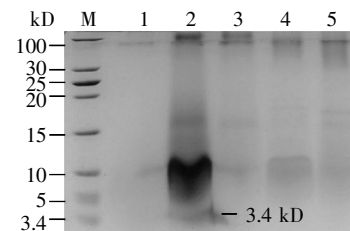


图2 发酵产物阳离子交换洗脱液

M: 蛋白质标准; 1: 0.1 mol/L洗脱液; 2: 0.2 mol/L洗脱液; 3: 0.3 mol/L洗脱液; 4: 0.5 mol/L洗脱液; 5: 1.0 mol/L洗脱液。

### Fig.2 The tricine-SDS-PAGE analysis of expressed HD5 from the eluent of cation-exchange column

M: Protein marker; 1: From 0.1 mol/L eluent; 2: From 0.2 mol/L eluent; 3: From 0.3 mol/L eluent; 4: From 0.5 mol/L eluent; 5: From 1.0 mol/L eluent.

### 2.4 生物活性检测

取发酵的上清进行抑菌实验,结果如图5所示。从A~C图中3、4号的抑菌圈大小可以发现,目的蛋白对3种测试菌均具有很强的抑制作用,但对金黄色葡萄球菌的杀菌作用更强。

### 2.5 抗菌活性对温度的耐受性

为了进一步研究重组表达的目的蛋白对温度的耐受性,我们对经过不同温度处理的发酵上清

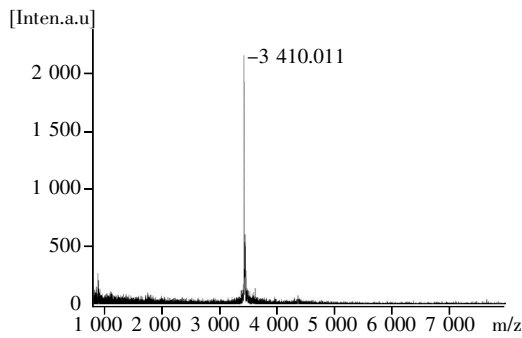


图 3 HD5 纯化产物质谱分析图谱

Fig.3 MALDI-TOF-MS analysis of HD5

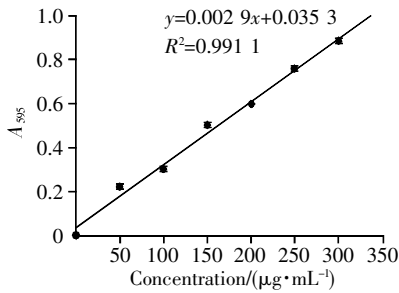


图 4 BSA 蛋白标准曲线

Fig.4 The standard curve of BSA

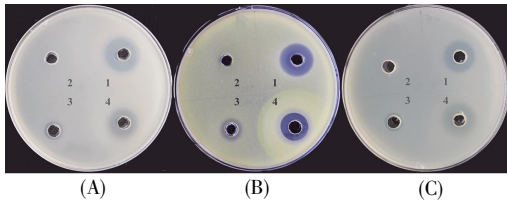


图 5 重组 HD5 蛋白的抑菌检测图

(A) 重组 HD5 蛋白对大肠杆菌的抑菌图; (B) 重组 HD5 蛋白对金黄色葡萄球菌的抑菌图; (C) 重组 HD5 蛋白对沙门氏杆菌的抑菌图。1: 阳性对照, 其中(A)和(C)的阳性对照为 0.2 mg/mL 氨苄青霉素, (B)的阳性对照为 0.5 mg/mL 卡那霉素; 2: 空载体表达上清; 3: 表达上清液; 4: 20 倍浓缩液。

Fig.5 The antibacterial effects of recombinant HD5

(A) The antibacterial effects of recombinant HD5 on *E. coli*; (B) The antibacterial effects of recombinant HD5 on *S. aureus*; (C) The antibacterial effects of recombinant HD5 on *S. pullorum*. 1: Positive control, 0.2 mg/mL ampicillin for *E. coli* (A) and *S. pullorum* (C), and 0.5 mg/mL kanamycin for *S. aureus* (B); 2: Expression supernatant of pVT102U/ $\alpha$ ; 3: Expression supernatant of pVT102U/ $\alpha$ -HD5; 4: Concentrated solution (20 $\times$ ) of expressed product.

浓缩液进行抑菌实验, 结果如图 6 所示。比较各

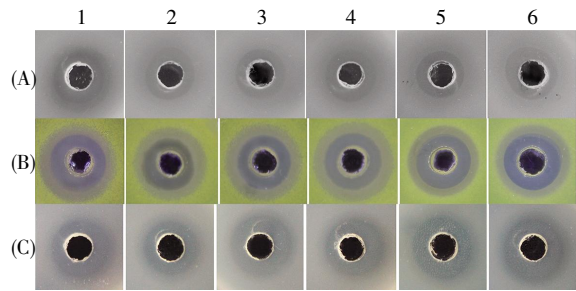


图 6 不同温度对重组 HD5 蛋白活性的影响

(A) 浓缩液对大肠杆菌的抑菌图; (B) 浓缩液对金黄色葡萄球菌的抑菌图; (C) 浓缩液对沙门氏杆菌的抑菌图。1: 未经热处理的发酵上清 20 倍浓缩液; 2~6 依次为 60  $^{\circ}$ C、80  $^{\circ}$ C、100  $^{\circ}$ C、120  $^{\circ}$ C、140  $^{\circ}$ C 热处理的浓缩液。

Fig.6 Effect of temperature on the antibacterial activity of recombinant HD5

(A) The antibacterial effects of the concentrated solution on *E. coli*; (B) The antibacterial effects of the concentrated solution on *S. aureus*; (C) The antibacterial effects of the concentrated solution on *S. pullorum*. 1: Without heat treatment; 2~6: Heat treatment at 60  $^{\circ}$ C, 80  $^{\circ}$ C, 100  $^{\circ}$ C, 120  $^{\circ}$ C and 140  $^{\circ}$ C, respectively.

组图片中 2~6 号样品的抑菌效果发现, 各组图片中的抑菌圈直径基本没有变化, 即使经过 120  $^{\circ}$ C 和 140  $^{\circ}$ C 的高温处理后仍然具有活性, 说明表达的目的蛋白 HD5 对温度具有较强的耐受性。

### 2.6 最小抑菌浓度的测定

用不同浓度的表达产物对 3 种细菌进行处理, 均匀涂布于 LB 培养基上培养, 随后记录每种处理的单菌落个数, 结果如表 2 所示。目标蛋白完全抑制金黄色葡萄球菌的最小浓度为 10 mg/mL, 完全抑制大肠杆菌和沙门氏杆菌的最小浓度为 40 mg/mL。

### 3 讨论

目前关于利用酿酒酵母细胞表达 HD5 的报道较少, 本实验首次将 HD5 基因在酿酒酵母细胞中成功表达, 且在活性检测实验中发现 HD5 表达产物不仅对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌具有明显的抑制作用, 对沙门氏杆菌同样具有抑制效果。研究发现, 天然抗菌肽不仅抗菌谱广且在温度方面

表 2 三种细菌被不同浓度的重组 HD5 蛋白处理后生长出的菌落数

Table 2 The colony counts of three kinds of bacteria treated with different concentrations of HD5

	0 mg/L	40 mg/mL	20 mg/mL	10 mg/mL	5.0 mg/mL	2.5 mg/mL
<i>S. aureus</i>	41 $\pm$ 7	0	0	0	19 $\pm$ 5	30 $\pm$ 6
<i>E. coli</i>	30 $\pm$ 7	0	10 $\pm$ 4	27 $\pm$ 6	-	-
<i>S. pullorum</i>	34 $\pm$ 6	0	13 $\pm$ 5	28 $\pm$ 6	-	-

注: “-”表示 HD5 对大肠杆菌和沙门氏杆菌没有抑制作用。

Note: “-” represents that HD5 has no inhibitory effect.

具有一定的耐受性<sup>[10]</sup>。为了深入了解文中表达产物对温度的耐受性,本实验将表达产物的 20 倍浓缩样在 5 个不同温度中处理 10 min,发现 HD5 表达产物在不同温度处理后对 3 种测试菌仍具有较强的抑制效果,在经过 60 °C、80 °C、100 °C、120 °C 和 140 °C 高温处理后,表达产物仍具有活性且抑菌作用没有太大变化。HD5 的稳定性与其多肽的结构有关,该多肽包含 6 个半胱氨酸,组成 3 对链内二硫键,按 1-6、2-4 和 3-5 连接,从而使多肽结构稳定<sup>[11]</sup>。本文采用的宿主菌酿酒酵母,在无需诱导的条件下,组成型地将重组蛋白分泌到上清液中,并形成二硫键。利用该方法表达的 HD5 蛋白,不仅具有良好的抑菌活性且对温度具有一定的耐受性,推测其表达产物形成了与天然分子一致的空间构象,从而具备了稳定的抗菌生物活性。本文中的重组表达工艺简单,无需添加诱导试剂(如毕赤酵母诱导剂甲醇,大肠杆菌诱导剂 IPTG 等),且表达产物 HD5 蛋白能耐受高温环境,其生物活性比较稳定,为今后 HD5 抗菌肽在食品安全、无抗养殖以及医学方面的应用奠定了基础。

#### 参考文献(References):

- [1] 申婧. 人  $\beta$  防御素 4 基因的表达与鉴定[D]. 广州: 中山大学 (Shen Jing. The Expression and Identification of Human  $\beta$ -defensin-4[D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University), 2014.
- [2] 李冠楠, 夏雪娟, 隆耀航, 等. 抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 动物营养学报(Li Guan-nan, Xia Xue-juan, Long Yao-hang, et al. Research progresses and applications of antimicrobial peptides[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition), 2014, 26(1): 17-25.
- [3] 苗建银, 柯畅, 郭浩贤, 等. 抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J]. 现代食品科技(Miao Jian-yin, Ke Chang, Guo Hao-xian, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antimicrobial peptides[J]. Modern Food Science and Technology), 2014, 30(1): 233-240.
- [4] 滕丽娟, 欧阳文献. 人  $\alpha$ -防御素-5 研究进展[J]. 国际儿科学杂志(Teng Li-juan, Ouyang Wen-xian. Progress in human  $\alpha$ -defensin-5[J]. International Journal of Pediatrics), 2016, 43(11): 854-855.
- [5] Furci L, Tolazzi M, Sironi F, et al. Inhibition of HIV-1 infection by human  $\alpha$ -defensin-5, a natural antimicrobial peptide expressed in the genital and intestinal mucosae[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45208.
- [6] Wiens M E, Smith J G.  $\alpha$ -Defensin HD5 inhibits human papillomavirus 16 infection via capsid stabilization and redirection to the lysosome[J]. mBio, 2017, 8(1): e02304-16.
- [7] 汪芳, 吴晖, 李健兴, 等. 人  $\alpha$ -防御素 5 前体蛋白在毕赤酵母中分泌表达的研究[J]. 现代食品科技(Wang Fang, Wu Hui, Li Jian-xing, et al. Secreted expression of human  $\alpha$ -defensin-5 preproprotein in *Pichia pastoris* [J]. Modern Food Science and Technology), 2010, 26(11): 1181-1184.
- [8] 王艾平, 粟永萍, 程天民, 等. 人  $\alpha$  防御素 5 在大肠杆菌中的可溶性表达与纯化研究[J]. 生物工程学报(Wang Ai-ping, Su Yong-ping, Cheng Tian-min, et al. Soluble expression and purification of human  $\alpha$ -defensin-5 in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2008, 24(2): 291-296.
- [9] 王艾平, 粟永萍, 申明强, 等. 人  $\alpha$ -防御素 5 在毕赤酵母中分泌表达的研究[J]. 第三军医大学学报(Wang Ai-ping, Su Yong-ping, Shen Ming-qiang, et al. Secretion expression of human  $\alpha$ -defensin 5 in *Pichia pastoris*[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae), 2008, 30(4): 311-313.
- [10] 罗刚, 魏泓. 哺乳动物抗菌肽研究进展[J]. 四川动物(Luo Gang, Wei Hong. Advances in mammalian antimicrobial peptides[J]. Sichuan Journal of Zoology), 2002, 21(4): 255-258.
- [11] Szyk A, Wu Z, Tucker K, et al. Crystal structures of human  $\alpha$ -defensins HNP4, HD5, and HD6[J]. Protein Science, 2006, 15(12): 2749-2760.