



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106554401 A

(43)申请公布日 2017. 04. 05

(21)申请号 201611053684.7

A61P 31/04(2006.01)

(22)申请日 2016.11.25

C12R 1/84(2006.01)

(71)申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号东北农业大学动物营养研究所

(72)发明人 单安山 曹艳萍 王良 孙雯宇 王天宇

(74)专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务有限责任公司 23101

代理人 吴振刚

(51)Int. Cl.

C07K 14/47(2006.01)

C12N 15/81(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

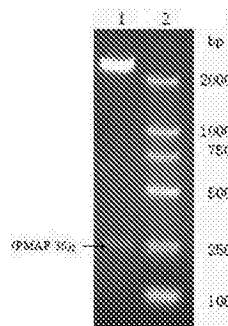
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽及其制备方法和应用,其序列如序列表SEQ ID No.1所示,本发明根据PMAP-36成熟区的氨基酸序列,设计出其反向平行的二聚体(PMAP-36)₂,利用基因工程方法人工合成(PMAP-36)₂的基因片段,在毕赤酵母中成功表达了重组抗菌肽,并进行体内外抗菌活性验证。(PMAP-36)₂表达产物能够抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长,并均无溶血活性,此方法为基因工程方法规模化生产抗菌肽奠定了理论与实践基础,对建立肽类基因工程菌和抗菌肽研究的共性技术具有重要意义。



1. 一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽 (PMAP-36)₂, 其特征在于, 序列如序列表SEQ ID No.1所示。

2. 根据权利要求1所述的一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽 (PMAP-36)₂的制备方法, 其特征在于, 步骤如下:

(1) 根据PMAP-36成熟区的氨基酸序列, 将第35位半胱氨酸替换为丝氨酸, 设计出其反向平行的二聚体 (PMAP-36)₂, 并根据毕赤酵母密码子偏爱性设计抗菌肽 (PMAP-36)₂的编码基因;

(2) 将步骤(1)所述序列克隆到真核表达载体pPICZαA中, 构建真核重组表达载体pPICZαA-(PMAP-36)₂;

(3) 将重组表达载体进行线性化并将其转化到毕赤酵母GS115中进行表达, 表达产物进行Tricine-SDS-PAGE定性和考马斯亮蓝定量分析。

3. 根据权利要求1所述一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽 (PMAP-36)₂, 在制备治疗革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌感染性疾病药物中的应用。

一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 抗生素的残留及耐药性的产生成为困扰人类的难题,随着抗生素在饲料生产以及动物养殖中的不断应用,许多问题接踵而至,如抗生素添加剂的长期使用导致耐药性病原菌的产生,同时在畜产品中产生严重的药物残留,从而对畜禽疾病的进一步防治和人类的健康都产生了不利影响等等。因此,世界各国严格限制抗生素添加剂在饲料生产和动物养殖中的应用。这样就迫切需要一种安全的饲料添加剂替代抗生素添加到饲料中,预防动物疾病,促进动物生长,降低饲养成本。抗菌肽在生物体内广泛存在,是先天免疫的重要组成部分,具有广泛的抗菌活性。抗菌肽由于带有净正电荷,从而通过物理作用与细菌胞膜产生物理作用;再通过疏水性残基与磷脂中的疏水组分相互作用而抑制或者杀死细菌。而对于细菌等微生物很难改变其自身磷脂双分子层的胞膜结构,使得抗微生物肽产生耐药性的几率大大降低。因此,抗菌肽的研究已成为基因工程和药物开发等领域的研究热点,具有极广阔的市场应用前景。Defensins和Cathelicidins是组成抗菌肽的两大家族,PAMP-36是一种富含精氨酸的猪源骨髓cathelicidin,成熟肽含有36个氨基酸残基,其中第35位为半胱氨酸。有研究表明,PAMP-36能通过半胱氨酸形成分子间二硫键,进而形成二聚体(PMAP-36)₂。本研究利用基因工程方法在毕赤酵母中成功表达了具有广谱抗菌活性的重组抗菌肽(PMAP-36)₂,为基因工程方法规模化生产抗菌肽奠定了理论与实践基础。

发明内容

[0003] 基于以上不足之处,本发明提供一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽及其制备方法和应用,本发明利用毕赤酵母表达系统,表达具有广谱抗菌活性的重组抗菌肽(PMAP-36)₂,并研究其替代抗生素的可能性。

[0004] 本发明的目的通过如下技术实现:一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽(PMAP-36)₂,序列如序列表SEQ ID No.1所示。

[0005] 本发明还具有如下技术特征:

[0006] 1、如上所述的一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽(PMAP-36)₂的制备方法如下:

[0007] (1) 根据PMAP-36成熟区的氨基酸序列,将第35位半胱氨酸替换为丝氨酸,设计出其反向平行的二聚体(PMAP-36)₂,并根据毕赤酵母密码子偏爱性设计抗菌肽(PMAP-36)₂的编码基因;

[0008] (2) 将(1)所述序列克隆到真核表达载体pPICZαA中,构建真核重组表达载体pPICZαA-(PMAP-36)₂;

[0009] (3) 将重组表达载体进行线性化并将其转化到毕赤酵母GS115中进行表达,表达产物进行Tricine-SDS-PAGE定性和考马斯亮蓝定量分析。

[0010] 2、如上所述一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽(PMAP-36)₂在制备治疗革兰氏阳性

菌或革兰氏阴性菌感染性疾病药物中的应用。

[0011] 本发明利用基因工程方法在毕赤酵母中成功表达了具有广谱抗菌活性的重组抗菌肽 (PMAP-36)₂, 并对其活性进行了研究。抗菌肽 (PMAP-36)₂ 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑菌效果, 但无溶血活性; 对免疫器官无影响, 不影响其发育。本发明为基因工程方法规模化生产抗菌肽奠定了理论与实践基础, 并且证明本抗菌肽具有替代抗生素的潜力。

附图说明

[0012] 图1是 (PMAP-36)₂ 重组表达载体构建的原理图。

[0013] 图2是 (PMAP-36)₂ 目的基因片段图,

[0014] 其中, 1为目的片段 (PMAP-36)₂ 的基因, 2为DNA分子量标准。

[0015] 图3为筛选ZeocinTM抗性的重组酵母图。

[0016] 图4为 (PMAP-36)₂ 酵母阳性转化子PCR验证情况图,

[0017] 其中, 1为DL 1000Marker, 2为pPICZαA空质粒的PCR产物, 3~8为重组酵母GS115/pPICZαA- (PMAP-36)₂ 的PCR产物。

[0018] 图5是重组蛋白Tricine-SDS-PAGE检测结果图,

[0019] 其中, 1-2为空载体对照, 3为超低分子量蛋白Marker, 4-8为 (PMAP-36)₂ 的表达产物。

具体实施方式

[0020] 实施例1抗菌肽基因的设计及合成

[0021] 根据PMAP-36成熟区的氨基酸序列和毕赤酵母的密码子偏爱性, 设计 (PMAP-36)₂, 并以丝氨酸代替二聚体 (PMAP-36)₂ 的半胱氨酸以避免二硫键的形成。分别在目的基因5'端和3'端加上XhoI和NotI酶切位点, 在目的片段5'端与XhoI酶切位点之间加上Kex2蛋白酶切位点, 在目的片段的3'端与NotI之间加上终止密码子TAA, 基因序列由表1所示, 基因结构如图1所示。基因合成由上海生工生物工程有限公司完成。

[0022] 表1 (PMAP-36)₂ 的基因序列

[0023]

Peptide	DNA sequences	Length
(PMAP-36) ₂	CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGGTAGATT	251 bp
	CAGAAGATTGAGAAAGAAGACTAGAAAGAGAT	
	TGAAGAAGATCGGTAAGGTCTTGAAGTGGATCC	
	CACCAATCGTCGGTTCCATCCCATTGGGTCCG	
	GTGGTTCCGGTTTGCCAATCTCCGGTGTTCATCCC	
	ACCAATCTGGAAGTTGGTCAAGGGTATCAAGAA	
	GTTGAGAAAGAGAACTAAGAAGAGATTGAGAA	
	GATTCAGAGGTTAAGCGGCCGC	

[0024] 实施例2抗菌肽基因的表达

[0025] 将目的基因 (PMAP-36)₂和表达载体pPICZαA分别进行XhoI和NotI双酶切,酶切结果如图2所示。胶回收酶切产物,用T4连接酶连接目的片段和载体,并转化入DH5α感受态中。提取质粒pPICZαA-(PMAP-36)₂,并用SacI进行线性化,回收线性化产物,电转入毕赤酵母GS115中。同时,将pPICZαA空载体也转化入GS115中。经Zeocin™抗性筛选和PCR鉴定,表明目的基因成功转化到毕赤酵母GS115中。Zeocin™抗性筛选结果如图3所示。PCR鉴定结果如图4所示。筛选的阳性克隆接种到BMGY和BMMY培养基中进行真核表达,将GS115/pPICZαA-(PMAP-36)₂阳性重组酵母以及GS115/pPICZαA上清液进行TCA浓缩,Tricine-SDS-PAGE电泳结果显示目的基因成功表达,结果如图5所示。采用考马斯亮蓝法对表达产物的浓度进行测定,浓度为106mg/L。抗菌肽有抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌活性,结果如表2所示,但无溶血活性。

[0026] 表2 (PMAP-36)₂的最小抑菌浓度

[0027]	Peptide	MIC (μg/mL) ^a	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
	(PMAP-36) ₂	12.5	25
[0028]	对照	>50	>50

[0029] 实施例3动物体内实验

[0030] 选取120只体重相近的7日龄健康AA肉仔鸡,随机分成4组,每组6个重复,每个重复5只鸡。抗菌肽组(I组)和空载体组(II组)分别将重组GS115-(PMAP-36)₂和GS115-pPICZαA表达产物(10mg/只·d)加入饮水中;抗生素组(III组)将预防剂量(10mg/只·d)的乳酸环丙沙星混入饮水中;IV组为空白对照。饲养至21日龄时取样测定。所有试验用鸡均正常进行饲养管理。1-7日龄期间每天在饮用水中添加多维。7日龄滴鼻接种新城疫弱毒苗与传染性支气管炎联苗。

[0031] 采样方法:屠宰前12h编号,禁食,自由饮水。至21日龄每个重复挑选两只接近平均体重的鸡称重,然后采用颈部放血法屠宰,用10mL EP管收集血液,3000g离心10min,收集血清,-30℃保存。分别摘取脾脏和法氏囊并称鲜重,计算胸腺指数、脾脏指数、法氏囊指数。将盲肠从鸡体内取出,开口端用棉线系紧,防止内容物流出,然后迅速放入无菌袋中密封,待全部样品收集完毕,进行实验室操作。在无菌条件下取出盲肠内容物,每重复取盲肠内容物0.5g,加入缓冲蛋白胍水(20%甘油)4.5mL,制成10倍稀释溶液,震荡均匀后将其分装入1.5mL EP管中,标号,-80℃保存。

[0032] 1、血清IgG和IgM浓度

[0033] 用试剂盒测定血清IgG和IgM浓度,结果如表3所示。(PMAP-36)₂提高血清IgM浓度,但对IgG无显著影响。

[0034] 表3表达产物对肉仔鸡血清IgG和IgM的影响

[0035]

项目	I 组	II 组	抗生素组	对照组
IgG (g/L)	2.96±0.22	2.78±0.15	2.83±0.14	2.59±0.17
IgM (g/L)	3.83±0.17 ^a	3.29±0.16 ^{bc}	3.5±0.16 ^{ab}	3.06±0.12 ^c

[0036] 2、盲肠内容物菌群数量

[0037] 用平板计数法计算盲肠内容物菌群数量,结果如表4所示。(PMAP-36)₂能减少肉仔鸡盲肠内容物中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的数量,增加双歧杆菌的数量,但是对乳酸杆菌数量无显著影响。

[0038] 表4表达产物对肉仔鸡盲肠内容物中菌群数量的影响 (log₁₀CFU/g)

[0039]

项目	I 组	II 组	抗生素组	对照组
大肠杆菌	7.49±0.16 ^b	7.94±0.30 ^{ab}	7.62±0.10 ^{ab}	8.03±0.15 ^a
金黄色葡萄球菌	5.87±0.70	5.89±0.07	5.88±0.23	5.90±0.07
乳酸杆菌	6.95±0.37 ^a	6.98±0.16 ^a	6.08±0.20 ^b	7.01±0.05 ^a
双歧杆菌	8.39±0.30 ^a	8.04±0.19 ^b	7.88±0.14 ^b	8.00±0.14 ^b

[0040] 3、免疫器官指数测定

[0041] 免疫器官指数的测定,计算公式如下:

[0042] 胸腺指数 (g/kg) = 胸腺重 (g) / 体重 (kg)

[0043] 脾脏指数 (g/kg) = 脾脏重 (g) / 体重 (kg)

[0044] 法氏囊指数 (g/kg) = 法氏囊重 (g) / 体重 (kg)

[0045] 结果如表5所示,试验组、抗生素组和对照组之间AA肉仔鸡免疫器官指数均无显著差异,抗生素组的脾脏指数比其它各组有增高的趋势。说明本试验中的抗菌肽表达产物对免疫器官没有影响,不影响免疫器官的正常发育。

[0046] 表5重组肽 (PMAP-36)₂对AA肉仔鸡免疫器官指数的影响

[0047]

项目	I 组	II 组	抗生素组	对照组
脾脏指数	1.41±0.12	1.36±0.18	1.80±0.17	1.37±0.13
胸腺指数	3.99±0.26	3.54±0.24	3.91±0.25	3.53±0.20
法氏囊指数	1.88±0.17	1.70±0.16	1.74±0.14	1.69±0.15

[0048] 实验结果显示,表达产物 (PMAP-36)₂能一定程度上增强肉仔鸡的免疫力,改善盲肠内容物的菌群分布,因此具有替代抗生素的潜力。

<110> 东北农业大学

<120> 一种在毕赤酵母中表达的抗菌肽及其制备方法和应用

<160> 1

<210> 1

<211> 251

<212> DNA

<213> (PMAP-36) 2

<400> 1

```
CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTGGTAGA TTCAGAAGAT TGAGAAAGAA GACTAGAAAG 60
AGATTGAAGA AGATCGGTAA GGTCTTGAAG TGGATCCCAC CAATCGTCGG TTCCATCCCA 120
TTGGGTTCGG GTGGTTCCGG TTTGCCAATC TCCGGTGTCA TCCCACCAAT CTGGAAGTTG 180
GTCAAGGGTA TCAAGAAGTT GAGAAAGAGA ACTAAGAAGA GATTGAGAAG ATTCAGAGGT 240
TAAGCGGCCG C 251
```

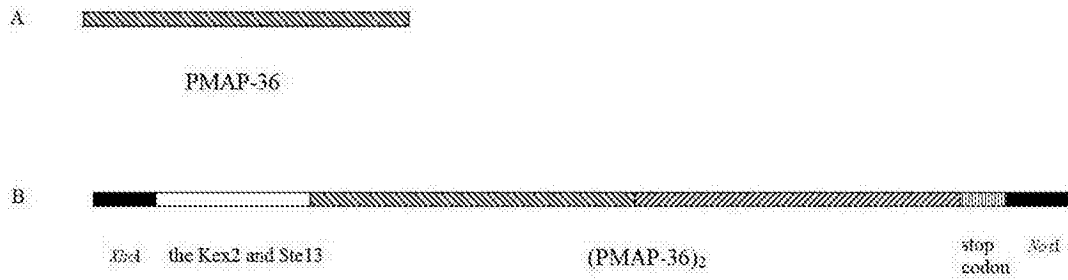


图1

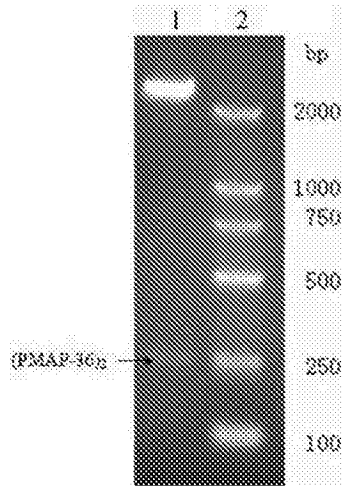


图2

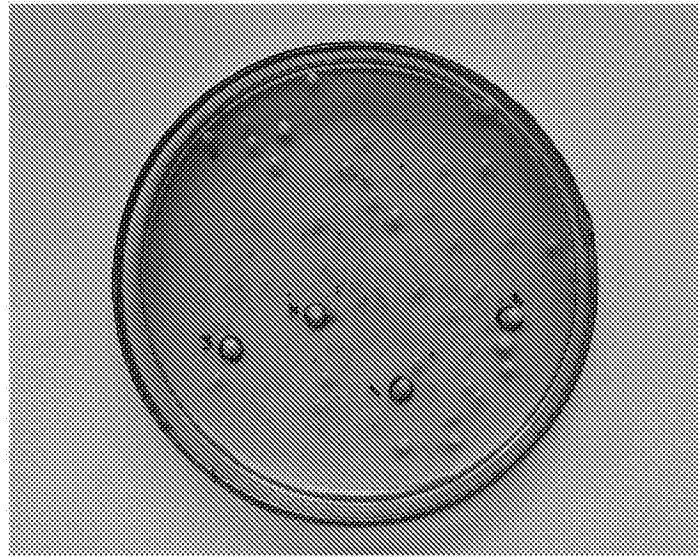


图3

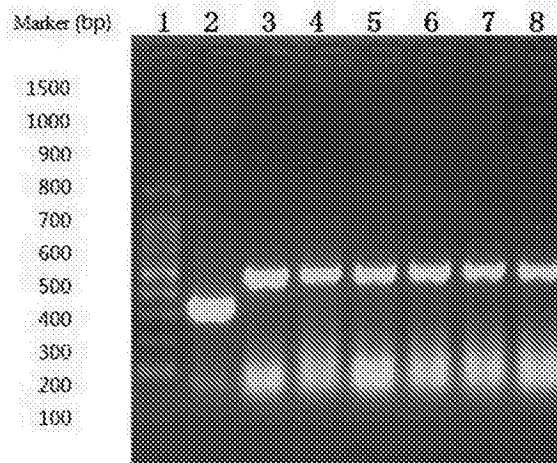


图4

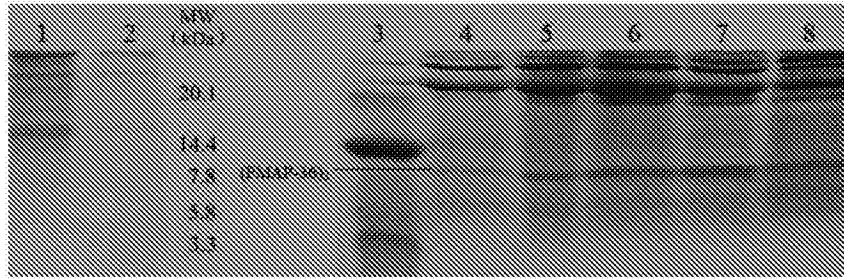


图5