

· 全健康 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230010



主持人: 韩谦、刘萌萌

抗菌肽 Cathelicidin-1 真核表达 及发酵液抑菌活性鉴定

李飞航, 武浩恒, 李宏, 李娟娟, 马香, 唐燕琼, 刘柱

(海南大学 生命科学学院, 海口 570228)

摘要: 为了获得体外表达的高活性抗菌肽, 通过分子克隆技术构建了抗菌肽 Cathelicidin-1 重组载体, 在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中表达, 并鉴定包含该抗菌肽的发酵液的抑菌活性。通过 DNA 全合成技术合成编码抗菌肽 Cathelicidin-1 的全长基因, 采用 PCR 技术扩增靶基因并与真核表达载体 pGAPZαA 连接, 获得重组质粒 pGAPZαA-Cathelicidin-1; 将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5α 中扩增, 提取质粒并经单酶切处理后转化毕赤酵母 GS115; 使用 YPD 培养基培养酵母, 72 h 后收集发酵液, 通过 Tricine-SDS-PAGE 检测抗菌肽表达, 并通过抑菌圈与抑菌曲线测定鉴定发酵液的抑菌活性。结果表明, 抗菌肽 Cathelicidin-1 以分泌肽形式表达于发酵液中, 并且该发酵液能够显著抑制大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的生长, 而对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 则无明显抑菌效果。

关键词: 抗菌肽; 真核表达; 发酵液; 抑菌效果

中图分类号: Q78; TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2023)05-0474-07

李飞航, 武浩恒, 李宏, 等. 抗菌肽 Cathelicidin-1 真核表达及发酵液抑菌活性鉴定 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(5): 474-480. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230010

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 也称抗微生物肽和宿主防御肽, 是一类具有抗菌活性的小分子量多肽, 一般由 20 ~ 50 个氨基酸组成, 具有净正电荷, 广泛存在于各类植物、动物、真菌、细菌以及人体中^[1-3]。依据来源的不同, 可将抗菌肽划分为动物抗菌肽、微生物抗菌肽及人造抗菌肽等^[4]。抗菌肽参与多种生物学功能, 比如免疫调节、血管生成、伤口愈合、抗炎活性和抗肿瘤活性。随着对抗菌肽研究的不断深入, 人们发现与传统抗生素相比, 抗菌肽会作用于病原菌细胞膜, 通过物理方式使病原菌死亡, 因而不易使病原菌产生耐药性, 其作为抗生素的替代药物具有巨大发展潜力^[5-6]。相关研究表明, 抗菌肽在临床试验中已取得成功, 但受限于其来源, 难以投入实际应用^[7]。Cathelicidin-1 是 2006 年从鸡 (*Gallus*

domesticus) 中分离鉴定出来的一种抗菌肽, 由 26 个氨基酸组成, 一级结构为 NH₂-RVKR VWPLVIRTVIAGYNLYRAIKKK-COOH, 其具有广谱抑菌活性, 能有效抑制单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等细菌的生长^[8-9]。目前, 对于该抗菌肽, 获取途径仍局限于天然提取和化学合成, 成本高昂, 而通过基因工程技术构建工程菌株可以高效、低廉、大量生产抗菌肽。因此, 笔者拟通过分子克隆技术构建抗菌肽 Cathelicidin-1 重组载体, 在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中表达, 并鉴定包含该抗菌肽的发酵液的抑菌活性, 旨在获得体外表达的高活性抗菌肽, 为纯化抗菌肽 Cathelicidin-1、研究其作用机制及实际应用奠定基础。

收稿日期: 2023-02-09

修回日期: 2023-03-20

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2021XDNY181)

第一作者: 李飞航 (1998-), 男, 海南大学生命科学学院 2020 级研究生. E-mail: 2294684896@qq.com

通信作者: 唐燕琼 (1968-), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 遗传学及生物防控. E-mail: 990804@hainu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究使用的菌株与质粒见表 1。

表 1 实验材料及来源

实验材料	相关属性	来源	
菌株 Strains	<i>E. coli</i> DH5 α	野生型, 用于质粒克隆	实验室保存
	<i>P. pastoris</i> GS115	野生型, 用于表达外源蛋白	实验室保存
	<i>E. coli</i> K88	野生型, 用作指示菌	实验室保存
	<i>S. aureus</i> ATCC25923	野生型, 用作指示菌	实验室保存
质粒 Plasmids	pGAPZ α A	毕赤酵母蛋白胞 外表达载体	实验室保存
	pGAPZ α A- Cathelicidin-1	用于表达蛋白	本实验构建

1.2 实验试剂 从美国 NEB 公司选购限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶; 2 \times Phanta Max Master Mix, DL5000 DNA Marker、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒购自中国 Vazyme 公司; 双色预染蛋白 Marker、酵母基因组提取试剂盒和蛋白上样缓冲液购于中国生工公司; 其他所用试剂为国产分析级。

1.3 Cathelicidin-1 的合成、扩增及纯化 抗菌肽 Cathelicidin-1 的全长核苷酸序列由中国生工公司合成, 以该核苷酸序列为模板, 通过引物对 Cathelicidin-1-F/Cathelicidin-1-R 扩增 Cathelicidin-1 目的基因 (Cathelicidin-1-F: 5'-CCGGAATTCGG-AGTAAAGCGAGTTTGGCC-3'; Cathelicidin-1-R: 5'-TGCTCTAGAGCACCTTGAAAGTACAAG-TTTTCCTTC-3')。PCR 总反应体系为 12 μ L, 体系包括: 0.5 μ L 上游引物, 0.5 μ L 下游引物, 1 μ L 模板, 6 μ L 2 \times PCR mix, 4 μ L ddH₂O。PCR 产物经由电泳进行检测, 依照试剂盒操作, 回收目的条带。

1.4 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 重组载体构建 首先用限制性核酸内切酶 *Xba* I 与 *Eco*R I 消化 pGAPZ α A 质粒与目的基因片段, 酶切总体积共 100 μ L, 组分如下: 1 μ L 内切酶 *Xba* I, 1 μ L 内切酶 *Eco*R I, 10 μ L Cutsmart 缓冲液, 500 ng 目的基因和 500 ng 空载质粒, 60 μ L ddH₂O。依照试剂盒说明书, 回收酶切产物, 使用酶标仪测定浓度, 并通过 T4 DNA 连接酶 20 $^{\circ}$ C 连接 1 h。通过热

激法转化 *E. coli* DH5 α 细胞, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后涂布到含 25 mg \cdot L⁻¹ 博莱霉素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温过夜培养, 随机选取单菌落至 LB 培养基中, 恒温过夜培养 12 h, 过夜培养物提取质粒, 用目的基因扩增引物对 Cathelicidin-1-F/Cathelicidin-1-R 进行 PCR, 将待测样品送至海南楠山生物技术有限公司测序。

1.5 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 重组载体扩增、单酶切及真核转化 选取测序正确的阳性转化子到含有 25 mg \cdot L⁻¹ 博莱霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡过夜。用质粒萃取试剂盒纯化回收 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 重组载体, 并用内切酶 *Bam*H I 酶切消化, 处理体系为 50 μ L, 包括: 内切酶 *Bam*H I 1 μ L, Cutsmart 缓冲液 5 μ L, 质粒 600 ng, ddH₂O 30 μ L。依照试剂盒操作步骤回收单酶切产物, 电转至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中。酵母细胞在 30 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后涂布到含 50 mg \cdot L⁻¹ 博莱霉素的 YPDS 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h, 随机选取单克隆菌落转移到 YPD 培养基中 30 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养, 经蜗牛酶处理 1 h 后, 提取酵母基因组, 用验证性引物 pGAP-F/3'AOX1 进行 PCR 以验证阳性克隆子 (pGAP-F:5'-GTCCCTAT-TTCAATCAATTGAA-3'; 3'AOX1:5'-GCAAATG-GCATTCTGACATCC-3'), 将待测阳性克隆子送至海南楠山生物技术有限公司测序。

1.6 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳分析 挑经测序的酵母阳性转化子单菌落至含 50 mg \cdot L⁻¹ 博莱霉素的 5 mL YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养 48 h。将酵母培养物按初始浓度 10⁶ CFU \cdot mL⁻¹ 转接到 200 mL YPD 培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 发酵培养 72 h, 然后 5 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 经滤膜过滤并收集发酵液。取 20 μ L 发酵液与 20 μ L 2 \times 蛋白上样缓冲液混匀, 以转入空载质粒的酵母发酵液为对照, 使用试剂盒配置 18% Tricine-SDS-PAGE 凝胶, 随后进行电泳分析, 使用考马斯亮蓝处理 1 h, 经脱色液处理 3 h 后观察结果。

1.7 重组酵母发酵液抑菌活性鉴定 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 使用牛津杯法与抑菌曲线法分别测定发酵液抑菌活性。对于牛津杯法, 先将转接培养的 2 种指示菌恒温培育 12 h, 取 5 \times 10⁶ CFU 的初始菌量涂板, 待平板晾干后, 将牛津杯竖直放置其上, 往其中加入 100 μ L 发酵液,

37 °C 放置 12 h 后, 观察有无抑菌圈, 使用游标卡尺记录其直径。对于抑菌活性测定, 先使用 96 孔板接种 10^7 CFU 初始指示菌量, 培养总体积 200 μ L, 然后加入不同体积的发酵液, 使其体积分数分别达到 25%、50%、75% 和 100%, 以转入空载质粒重组菌株等体积分数的发酵液体为阴性对照, 设置 3 个生物学重复, 37 °C 恒温培养 24 h, 在培养期间, 每 3 h 测定 1 次 OD_{600} 吸光值, 绘制抑菌曲线。

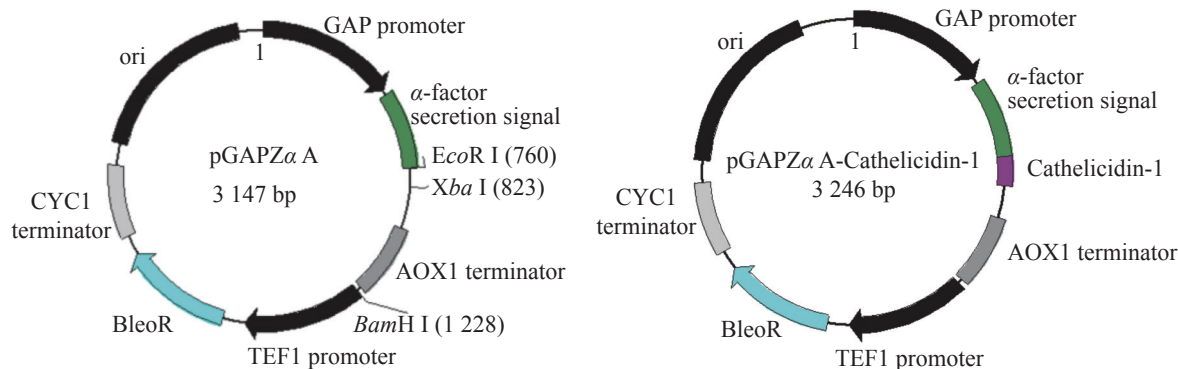


图 1 pGAPZ α A 空载体与携带外源片段的 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 重组载体图谱

通过 PCR 扩增 Cathelicidin-1 全长序列 (123 bp), 并在其 5' 及 3' 端分别引入相应的酶切位点。通过电泳分析 PCR 产物, 由图可知在大约 120 bp 处存在 1 条明亮单一的条带, 即为目的条带, 表明获得符合预期的 PCR 产物 (图 2)。

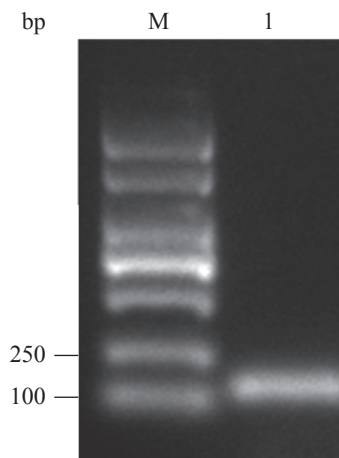


图 2 Cathelicidin-1 编码基因 PCR 扩增产物
M: DL5000 DNA Marker; 1: 目的基因 PCR 产物。

纯化 PCR 产物, 与 pGAPZ α A 载体用相同的内切酶 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切处理, 回收酶切产物。接着, 将酶切产物连接, 构建融合表达载体 pGAPZ α A-Cathelicidin-1, 通过热激导入 *E. coli* DH5 α 细胞中, 均匀涂布到有 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 博莱霉素

2 结果与分析

2.1 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 表达载体构建 为了获得分泌至 *P. pastoris* 胞外的抗菌肽, 以便于后续检测, 选用 pGAPZ α A 为载体, 将外源片段插入其中 α -因子分泌信号肽编码序列下游。从图 1 可知, 重组载体在其表达的蛋白 N-端添加酿酒酵母 α -因子分泌信号肽, 使得表达的抗菌肽可以分泌到发酵液中。pGAPZ α A 的 GAP 启动子为组成型启动子, 无需诱导物即可表达重组蛋白。

的抗性平板上。最后, 随机挑取抗性平板的单菌落, 通过菌液 PCR 验证是否为阳性。电泳结果表明, 可以获得 120 bp 左右的目的条带, PCR 产物条带单一且浓度丰富 (图 3, 泳道 3~9)。随后提取质粒, 送至海南楠山生物技术有限公司, 测序对比表明已构建成功重组载体。

2.2 Cathelicidin-1 的真核表达及 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳分析 pGAPZ α A 载体能够整合到酵母染色体上, 具有较高遗传稳定性。为了防止环状载体与染色体整合时发生随机断裂, 在将重组载体 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 转化酵母之前首先对其进行单酶切, 以固定断裂位点。由图 4 可知, 通过内切酶 *Bam*H I 对重组载体进行单酶切后, 酶切后的线性质粒 (图 4, 泳道 2~4) 泳动速度要低于未酶切的环状质粒 (图 4, 泳道 1), 证明酶切成功, 随后纯化单酶切产物。

将重组载体单酶切产物电转化至 *P. pastoris* GS115 感受态细胞中, 均匀涂布在有 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 博莱霉素抗性平板上, 挑选阳性克隆, 转接到 5 ml YPD 培养基中, 培养 24 h, 经蜗牛酶处理后, 提取基因组, 通过 PCR 扩增后, 电泳验证。由图可知, 能够获得与阳性对照大小一致的目的产物, PCR 产物条带单一且浓度丰富 (图 5, 泳道 3)。

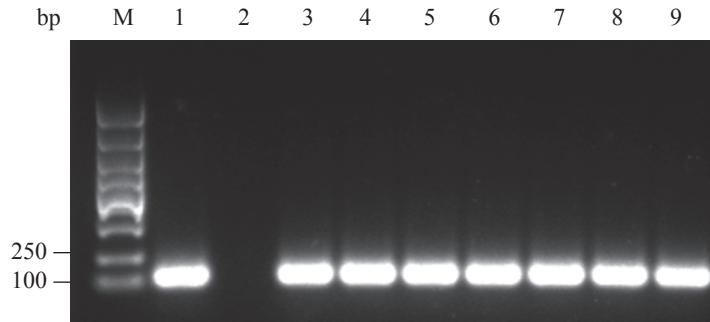


图 3 菌液 PCR 鉴定重组载体转化 *E. coli* DH5 α 阳性克隆

M: DL5000 DNA Marker, B. 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~9: 阳性克隆。

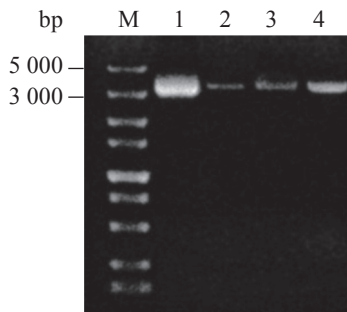


图 4 重组载体 pGAPZ α A-Cathelicidin-1(泳道 1)及重组载体 pGAPZ α A-Cathelicidin-1 酶切产物(泳道 2~4)电泳结果

M:DL5000 DNA Marker; 1: 酶切前的质粒; 2~4: 酶切后的质粒。

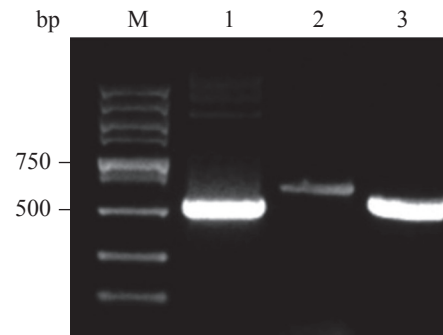


图 5 基因组 PCR 鉴定重组载体转化 *P. pastoris* GS115 阳性克隆

M: DL5000 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 假阳性克隆; 3: 阳性克隆。

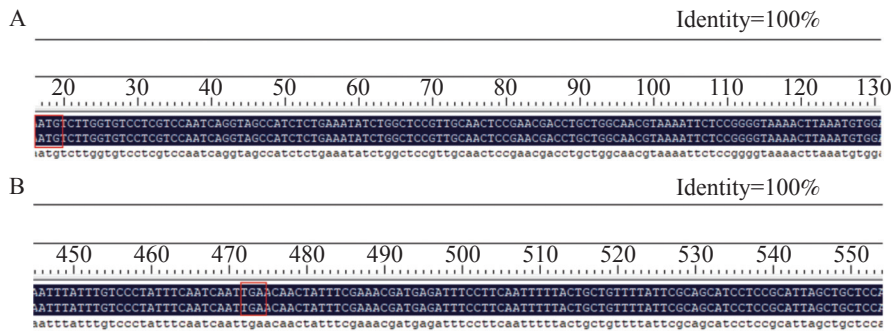


图 6 Cathelicidin-1 编码基因开放阅读框起始密码子端测序结果(A)和终止密码子端测序结果(B) 红框分别显示了起始密码子(A)和终止密码子(B)。

回收 PCR 产物, 送至海南楠山生物技术有限公司分析, 结果表明, 重组载体已整合到酵母基因组中, 且开放阅读框未出现突变, 一致性达 100%(图 6-A 和图 6-B)。最后, 将重组酵母转接到 YPD 培养基中发酵 72 h, 离心收集发酵液, 进行 Tricine-SDS-PAGE 分析, 结果表明, 与转化空载体的菌株相比, 表达抗菌肽的重组菌株发酵液在 10 kDa 处出现显著目的条带, 与预期大小一致, 表明抗菌肽以胞外分泌形式表达(图 7)。

2.3 发酵液抑菌活性测定 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别为革兰氏阴性与阳性指示菌, 分别采用牛津杯法和抑菌曲线测定法鉴定本研究重

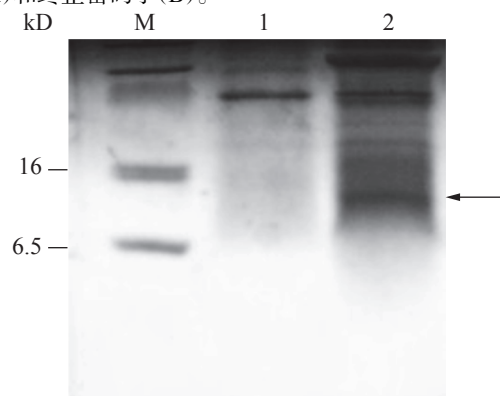


图 7 Tricine-SDS-PAGE 分析 Cathelicidin-1 的胞外分泌表达

M: 6.5~130kDa 蛋白 Marker; 1: 表达空载体的重组酵母发酵液; 2: 表达抗菌肽 Cathelicidin-1 的重组酵母发酵液。

组菌株的发酵液抑菌活性。牛津杯法结果表明,表达抗菌肽 Cathelicidin-1 的重组酵母发酵液对于大肠杆菌有明显的抑菌效果,产生抑菌圈直径达 15 mm(图 8-A),而对于金黄色葡萄球菌则观察不到明显的抑菌圈(图 8-B),几乎没有抑菌效果。

经 SPSS 23 对 24 h 时的 OD 值进行统计分析,结果表明添加 50%、75%、100% 抗菌肽 Cathelicidin-1 发酵液与其他组存在显著差异 ($P < 0.05$),与表达空白载体的重组酵母发酵液相比,随着表达 Cathelicidin-1 的酵母发酵液所占体

积分数的提高,大肠杆菌的生长速度逐渐减缓,表明发酵液对于大肠杆菌呈现浓度依赖性的抑菌活性,在发酵液达到 100% 的情况下,大肠杆菌无法生长,被完全抑制(图 9-A)。与此不同,对于金黄色葡萄球菌,各个组别在 24 h 时的 OD 值都无显著差异,说明表达 Cathelicidin-1 的酵母发酵液对于金黄色葡萄球菌的生长并未产生显著抑制效果,甚至 100% 体积分数的发酵液也并未对金黄色葡萄球菌的生长造成任何显著影响(图 9-B)。

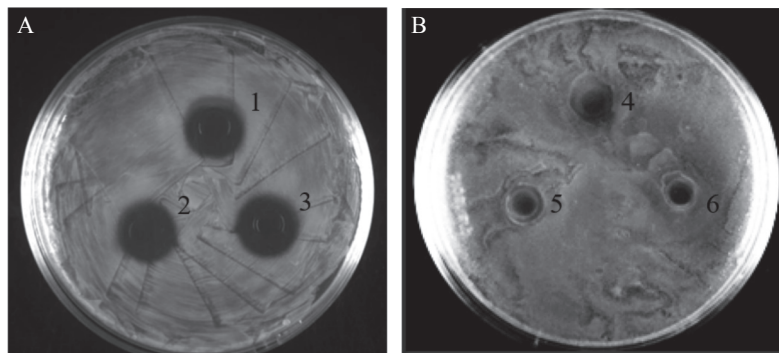


图 8 牛津杯法检测表达 Cathelicidin-1 的重组酵母发酵液对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌的抑菌圈(B)1~3:生物学重复;4~6:生物学重复。

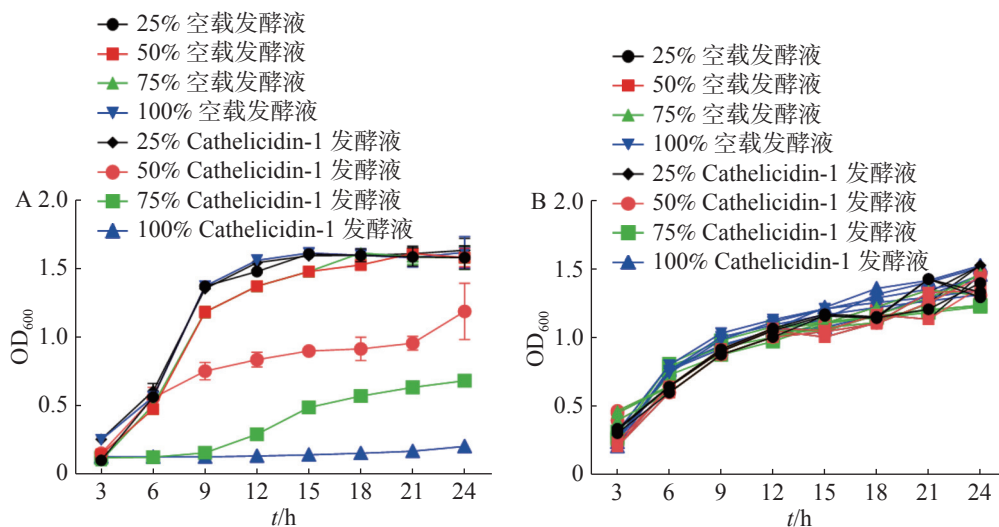


图 9 表达 Cathelicidin-1 的酵母发酵液对于大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的抑菌曲线

3 讨论

抗菌肽是近年来受到普遍关注,有望替代抗生素的一类抗菌剂,与大多数主要通过阻断有限的细胞内靶点发挥作用的常规抗生素不同,它们的杀菌活性通常来自于破坏细菌膜完整性的能力^[10]。目前,已有多个模型对抗菌肽的抗菌机制进行解析,其中多数模型提出抗菌肽主要靶向破坏

细胞膜^[11]。膜靶向模型解释抗菌肽对细菌细胞的选择性依赖于带负电荷的细菌细胞和两性离子真核细胞之间的表面电荷差异^[12]。阳离子抗菌肽被吸引到阴离子细菌细胞表面并与之结合,从而破坏生物膜完整性,最终导致细胞死亡^[13-14]。由于抗菌肽是对细菌细胞膜造成物理破坏从而抑菌,细菌不能针对这种作用方式产生耐药性,因此,抗

菌肽被认为是前景巨大的抗菌候选药物,有可能解决迅速增长的抗微生物药物耐药性危机^[15]。

有研究表明,抗菌肽 Cathelicidin-1 具有良好抗菌活性,对多种细菌病原菌都具有较好的抑菌效果^[8]。然而,目前获取 Cathelicidin-1 的方式仍局限于天然提取和化学合成,成本高昂,相比之下,通过基因工程表达 Cathelicidin-1 抗菌肽无疑是降低生产成本、提高产量的有效途径。

近年来,许多报道通过毕赤酵母表达蛋白系统表达蛋白,并且酵母表达系统也在逐年优化,本研究采用的 pGAPZ α A 表达载体中的 GAP 类启动子为组成型的启动子,不同于诱导型启动子,无需添加有毒的诱导物即可高效诱导表达外源蛋白,且该载体中含有的 α 分泌信号肽编码序列可以与外源蛋白融合表达,引导外源蛋白一同分泌到胞外,并且 α 分泌信号肽在分泌过程中会发生自剪切,从而不对外源蛋白的最终结构产生影响。本研究采用上述经过优化的毕赤酵母表达系统,旨在获得高效表达且具有显著抗菌活性的抗菌肽 Cathelicidin-1。测序对比结果证明, Cathelicidin-1 基因已正确整合到毕赤酵母基因组中,而且, Tricine-SDS-PAGE 分析表明, Cathelicidin-1 抗菌肽以分泌方式表达于酵母发酵液中。进一步通过抑菌圈和抑菌曲线测定实验可知,含有外泌 Cathelicidin-1 抗菌肽的酵母发酵液对以浓度依赖的方式对大肠杆菌产生良好抑菌效果,只需少量即可显著抑制大肠杆菌的生长,在 100% 添加时完全抑制其生长。本研究构建的 Cathelicidin-1 抗菌肽酵母表达系统,以及获得的外源分泌表达 Cathelicidin-1 抗菌肽,为后续进一步研究 Cathelicidin-1 抗菌肽的抑菌机制及应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] HILCHIE A L, WUERTH K, HANCOCK R E. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(12): 761 – 768.
- [2] 刘敬, 李薇, 孙国文. 人源抗菌肽 LL-37 对柯萨奇 B3 病毒诱导的病毒性心肌炎小鼠病毒复制及炎症反应的影响 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2022, 28(4): 349 – 354.
- [3] 齐志涛, 徐杨, 邹钧, 等. 水产动物抗菌肽研究进展 [J]. *水产学报*, 2020, 44(9): 1572 – 1583.
- [4] LAI S, ZHANG Q, JIN L. Natural and Man-Made Cyclic Peptide-Based Antibiotics [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 12(1): 1 – 11.
- [5] 孙明杰, 盛永杰, 郝木强, 等. 天蚕素抗菌肽在饲料应用中的安全性研究 [J]. *中国饲料*, 2022(3): 43 – 46.
- [6] 彭会, 王克坚. 海洋鱼类和甲壳类抗菌肽的研究进展与应用前景 [J]. *渔业研究*, 2016, 38(3): 254 – 262.
- [7] BORMANN N, KOLISZAK A, KASPER S, et al. A short artificial antimicrobial peptide shows potential to prevent or treat bone infections [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1506.
- [8] XIAO Y, CAI Y, BOMMINENI Y R, et al. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(5): 2858 – 2867.
- [9] XIAO Y, DAI H, BOMMINENI Y R, et al. Structure-activity relationships of fowlicidin-1, a cathelicidin antimicrobial peptide in chicken [J]. *The FEBS Journal*, 2006, 273(12): 2581 – 2593.
- [10] RAJASEKARAN G, KUMAR S D, YANG S, et al. The design of a cell-selective fowlicidin-1-derived peptide with both antimicrobial and anti-inflammatory activities [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 182: 111623.
- [11] HANCOCK R, ALFORD M A, HANEY E F. Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(12): 786 – 797.
- [12] JOO H S, FU C I, OTTO M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1695): .1 – 11.
- [13] MOOKHERJEE N, ANDERSON M A, HAAGSMAN H P, et al. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(5): 311 – 332.
- [14] NGUYEN L T, HANEY E F, VOGEL H J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(9): 464 – 472.
- [15] ROOPE L, SMITH R D, POUWELS K B, et al. The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute [J]. *Science*, 2019, 364(6435): 4679.

Eukaryotic expression of Cathelicidin-1 and validation of its antimicrobial activity in the fermentation broth

LI Feihang, WU Haoheng, LI Hong, LI Juanjuan, MA Xiang, TANG Yanqiong, LIU Zhu
(School of Life Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In order to obtain exogenously expressed antimicrobial peptide, cathelicidin-1 expression recombinant vector was constructed using molecular cloning technique, and the secreted cathelicidin-1 was expressed in *Pichia pastoris*. The antimicrobial activity of the fermentation broth containing Cathelicidin-1 was evaluated. The full-length gene encoding cathelicidin-1 was synthesized by total DNA synthesis and amplified by PCR. The full-length gene was linked to the eukaryotic expression vector pGAPZ α A, and the recombinant plasmid pGAPZ α A-Cathelicidin-1 was transformed into *Escherichia coli* DH5 α for multiplication. The multiple plasmids were extracted, single digested, and transformed into the yeast *Pichia pastoris* GS115. The transformed yeast was cultured in the YPD culture medium, and the fermentation broth was collected after 72 hrs of culture and used to express the antimicrobial peptide Cathelicidin-1 in a secreted form by using Tricine-SDS-PAGE. The antimicrobial activities of the fermentation broth were evaluated by using inhibition zone of the antimicrobial peptide and the microbial growth curve. Measurements of inhibition zone and growth curve showed that the fermentation broth from the yeast expressing Cathelicidin-1 exhibited significant inhibitory activity against *E. coli*, but did not show any bacteriostatic effect on *Staphylococcus aureus*.

Keywords: antimicrobial peptides; eukaryotic expression; fermentation broth; bacteriostatic activity

(责任编辑:潘学峰)