

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.09.021

新型牛乳铁蛋白衍生肽 LFcInB-W 的抗感染作用

闫永平, 肖桂然, 吴磊, 李广莹

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: 抗菌肽有望替代抗生素成为一种安全、绿色、高效的理想抗菌剂, 牛乳铁蛋白肽 (bovine lactoferricin, LFcInB) 是由牛乳铁蛋白经消化酶水解产生的一类具有广谱抑菌活性的短肽。文章以牛乳铁蛋白肽为基础, 根据抗菌肽结构与功能的关系, 对 LFcInB 的结构进行优化设计得到衍生肽 LFcInB-W。将设计得到的 LFcInB-W 基因片段与 pPIC9K 质粒构建重组表达载体, 转化毕赤酵母细胞 GS115 诱导表达。对发酵上清液进行分离纯化和活性测试, 结果证明该衍生肽对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有更强的抑菌活性; 利用病原体 *Erwinia carotovora carotovora* 15 (Ecc15) 感染模式生物果蝇肠道, 进一步探究 LFcInB-W 对感染模型的保护作用, 结果显示 LFcInB-W 可有效缓解病原体感染对果蝇造成的损伤, 在体内表现出比 LFcInB 更好的抗感染作用, 为进一步研究该肽的生物活性及生产应用提供参考。

关键词: 牛乳铁蛋白肽 (LFcInB); 结构设计; 果蝇; 抗感染作用

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2023)09-1292-05

Anti-infection effect of a novel lactoferrin derived peptide LFcInB-W

YAN Yongping, XIAO Guiran, WU Lei, LI Guangying

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Antibacterial peptides are expected to replace antibiotics and become a safe, green and efficient ideal antibacterial agent. Bovine lactoferricin (LFcInB) is a kind of short peptide with broad spectrum antibacterial activity produced via hydrolysis of lactoferrin by digestive enzymes. Based on LFcInB, the derivative peptide LFcInB-W was obtained by optimizing the structure of LFcInB according to the relationship between structure and function of antibacterial peptide. The recombinant expression vector was constructed by combining LFcInB-W gene fragment with pPIC9K plasmid, and transformed into *Pichia pastoris* GS115 cells to induce expression. The fermentation supernatants were separated, purified and tested for antibacterial activity, and the results showed that the peptide had stronger antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The model organism *Drosophila* gut was infected by the pathogen *Erwinia carotovora carotovora* 15 (Ecc15) to investigate the protective effect of LFcInB-W on the infection model, and the results indicated that LFcInB-W could effectively alleviate the damage caused by pathogen infection in *Drosophila* and showed better anti-infection effect than LFcInB, providing reference for the further study of the biological activity and production and application of LFcInB-W.

Key words: bovine lactoferricin (LFcInB); structure design; *Drosophila*; anti-infection effect

抗生素耐药问题产生的临床和公共卫生负担已成为困扰全世界的大问题^[1]。基于目前的医疗情况和抗菌药物的研究进展, 文献[2]对未来30 a

全球抗生素耐药情况作出了预测: 至2050年, 抗生素耐药每年将会导致世界上1 000万人死亡, 明显高于癌症的致死人数, 寻找有效的抗生素替

收稿日期: 2022-04-14; 修回日期: 2022-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31671284); 安徽省科协青年科技人才托举计划资助项目(RCTJ202001)

作者简介: 闫永平(1997—), 男, 内蒙古乌兰察布人, 合肥工业大学硕士生;

肖桂然(1988—), 女, 山东邹城人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: xiaoguiran.101@163.com.

代品迫在眉睫。牛乳铁蛋白肽(bovine lactoferrin, LFcInB) (WQWRM KKLGA PSITC VRRAF)具备抗菌、抗病毒、抗氧化、抗癌等生物活性,有望替代抗生素成为一种安全、绿色、高效的理想抗菌剂,在医疗、食品、饲料和保鲜等领域展现出广泛的应用前景,而成为研究和关注的热点^[3-6]。抗菌肽商品化开发中的两大难点是来源不足和稳定性低。牛体内牛乳铁蛋白肽的含量很少,天然分离 LFcInB 产量低、工艺复杂、费用较高;人工合成 LFcInB 及其衍生物成本更高,不适合工业化生产,无法广泛普及应用,成为 LFcInB 广泛应用的制约因素^[7]。因此,利用转基因技术将 LFcInB 转入其他生物,利用生物工程发酵技术实现低成本、产品质量稳定的生产,是解决生产生活中 LFcInB 来源不足最具潜力的途径。研究抗菌肽结构功能关系,通过对抗菌肽两亲性参数、净电荷数、疏水性参数等理化参数的改变获得具有更高生物活性的衍生肽是解决稳定性低的最佳方案,成为近年来的研究热点^[8]。文献^[9]为确定对抗菌活性重要的特定氨基酸,对牛乳铁蛋白肽进行了丙氨酸扫描,发现 2 个 Trp 残基(trp6 和 trp8)被丙氨酸替换后会导致其抗菌活性降低;文献^[10]将牛乳铁蛋白衍生肽中的 Trp 含量增加 5 个残基后得到的多肽则显示出显著的抗菌活性增加,表明其对抗菌活性是绝对必要的;文献^[11]设计并表达了牛乳铁蛋白肽衍生肽 LFcInB-W4, 10,且经检测发现其对金黄色葡萄球菌具有良好的抑菌活性。

本研究以牛乳铁蛋白肽 LFcInB 为母肽,以提高其高电荷、强疏水性为目标,依据对称结构设计理念,引入色氨酸(Trp)替换,设计出新型衍生肽 LFcInB-W 经过生物信息学工具比较分析, LFcInB 的第 1 位、第 3 位和第 7 位氨基酸被色氨酸(Trp)替换后能够保持与原肽相似的空间结构,其净电荷数与原肽相同,疏水残基比例提高到 60%,且通过抗菌肽数据库预测其抗菌活性更高。利用毕赤酵母 GS115 成功表达出衍生肽 LFcInB-W,使用琼脂板扩散法检测到衍生肽对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性比母肽 LFcInB 高 2 倍,并利用革兰氏阴性菌 *Erwinia carotovora carotovora* 15(Ecc15)刺激果蝇肠道,探究 LFcInB-W 在果蝇天然免疫中起作用,结果表明, LFcInB-W 在体内可以有效缓解病原体感染对果蝇造成的损伤,具有比 LFcInB 更好的抗感染疗效。研究结果表明,第 1 位、第 3 位和第 7 位氨基酸经色氨酸 Trp

替换后的牛乳铁蛋白肽衍生肽具有很好的抗感染疗效,实验为进一步探究牛乳铁蛋白衍生肽生物活性的改进奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与菌株

表达载体 pPIC9K(Invitrogen 公司),毕赤酵母 GS115、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠杆菌 ATCC25922、枯草芽孢杆菌 ATCC6051、ECC15(本实验室保藏),DH5 α (生工生物工程(上海)股份有限公司)。

1.1.2 衍生肽氨基酸序列与基因序列

氨基酸序列:WKWRR WWWRM KKLGA PSITC VRRAF。

基因序列:TGGAAATGGAGAAGATGGT GGTGGAGATGAAAAAATTGGGTGCTCCA AGTATTACTTGTGTTAGAAGAGCTTTT。

引物序列:

F:5'-AATTCTGGAAATGGAGAAGATGGTGTGGAGATGAAAAAATTGGGTGCTCCA AGTATTACTTGTGTTAGAAGAGCTTTTT AAGC-3'。

R:5'-GGCCGCTTAAAAAGCTCTTCTAACA CAAGTAACTTGGAGCACCAATTTTTTTCAT CTCCACCACCATCTTCTCCATTTCCAG-3'。

1.1.3 酶与试剂

EcoR I、*Not* I、T4 DNA 连接酶购于 New England Biolabs 公司, LB 肉汤培养基、LB 琼脂培养基、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、DNA 胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、DNA 分子量标准 Marker M (250~10 000 bp)、DNA 分子量标准 Marker M (100~2 000 bp)均购于生工生物工程(上海)股份有限公司, GoldView I 型核酸染料购于上海索莱宝生物科技有限公司,琼脂糖、琼脂粉均购于 Biofroxx 公司, 2 \times PCR Master Mix 购于北京博迈德基因技术有限公司。

1.1.4 仪器与设备

微量高速离心机(Thermo Scientific)、超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司)、电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、全波长酶标仪(Thermo Scientific)、凝胶成像分析系统(美国伯乐 BIO-RAD 公司)、Western Blot 电泳槽(上海天能科技有限公司)、电热恒温培养箱

(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、恒温培养振荡器(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 衍生肽的设计改造

利用抗菌肽数据库(antimicrobial peptide database, APD)(<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>)和 ProtParam tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)蛋白分析工具,对比分析 LFcInB 和 LFcInB-W 的理化参数;用建模工具 SWISS-MODEL(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)对其空间结构进行模拟,并利用 APD 和 CAMP(<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>)^[12]预测衍生肽的抗菌活性。

1.2.2 目的基因的获取

以 SnapGene 提供的毕赤酵母密码子优化表为参考,设计 LFcInB-W 氨基酸序列对应的碱基序列。将设计好的衍生肽基因序列交由生物公司以引物的形式合成。

1.2.3 重组质粒表达载体的构建

将用于表达载体构建的质粒 pPIC9K 通过热激转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性转化子大量培养以扩增质粒,使用 Qiagen Plasmid Midi Kit 试剂盒提取质粒后用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对质粒进行双酶切。使用 T4 DNA 连接酶对双酶切获得的线性化 pPIC9K 与退火形成的目的基因进行连接,构建重组表达载体 pPIC9K-LFcInB-W。

1.2.4 抑菌性检测

利用毕赤酵母 GS115 分泌性表达衍生肽,并使用琼脂扩散法检测上清液的抑菌活性,指示菌为金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、大肠杆菌(ATCC25922)和枯草芽孢杆菌(ATCC6051)。

1.2.5 果蝇寿命实验

挑选 20 只已经饥饿脱水 2 h 的成虫果蝇,置于加有 ECC15 菌液($A_{600}=200$)的饲养管或只加 5% 蔗糖的饲养管,于 29 °C 果蝇培养箱中培养。每 24 h 将果蝇转移至正常食物的饲养管中,剔除死亡果蝇并计数,至各组果蝇全部死亡,每组 10 管。

1.2.6 果蝇肠道形态学变化观察

收集常规培养基中羽化 2~3 d 的雌蝇,经过 24 h 染菌处理后,在解剖盘中分离出 12~15 条完整果蝇肠道,于荧光显微镜明场下拍摄肠道形态,并统计分析肠道的长度和单侧表面积,重复 3 次独立实验。

1.2.7 数据统计与分析

利用 Image J 软件统计肠道长度及表面积,SPSS 19.0 软件处理实验数据,实验结果均为(平均值 \pm 标准差),组间统计差异使用 One way ANOVA 检验,显著性水平:NS 表示无显著性差异,* 表示 $P < 0.05$,** 表示 $P < 0.01$,*** 表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 LFcInB-W 基因的设计与合成

利用生物信息学工具对比分析 LFcInB 和 LFcInB-W 的理化参数结果见表 1 所列。由表 1 可知,衍生肽 LFcInB-W 相较于原肽疏水残基比由 48% 提升至 60%,其净电荷数未发生改变,均为 +8。利用同源建模工具 SWISS-MODEL 模拟的牛乳铁蛋白肽 LFcInB 和衍生肽 LFcInB-W 的空间结构如图 1 所示。图 1 中:灰色为 α 螺旋;黄色为 β 折叠;蓝色为转角。

表 1 理化参数分析

理化特性	LFcInB	LFcInB-W
疏水残基比/%	48	60
净电荷数	+8	+8
相对分子质量	3 125.80	3 306.01
理论等电点	11.84	12.18
脂肪族指数	50.8	50.8
GRAVY	-0.576	-0.756

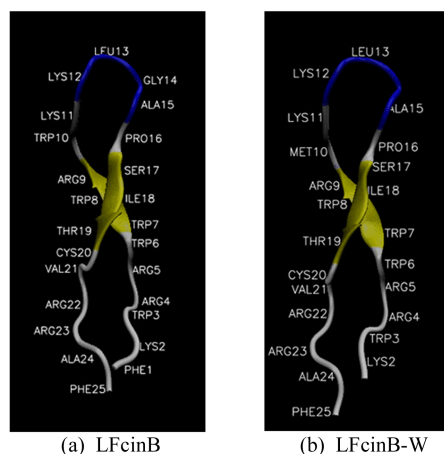


图 1 LFcInB 和 LFcInB-W 空间结构对比

由图 1 可知,衍生肽 LFcInB-W 与原肽结构相似,因此预测衍生肽 LFcInB-W 具备与原肽类似的生物学功能。

抗菌活性预测结果见表 2 所列,由表 2 可知,衍生肽的各项预测数据都高于原肽,表明衍生肽 LFcInB-W 的设计在理论上是合理的。

表 2 抗菌活性预测结果

多肽	SVM	RF	DA	ANN	CAMPY
LFcInB	0.842	0.994 5	0.963	AMP	AMP
LFcInB-W	0.986	0.995 5	0.967	AMP	AMP

根据毕赤酵母密码子偏好性,优化人工设计的衍生肽的基因序列,用化学合成法合成 LFcInB-W 基因片段克隆到巴斯德毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中,获得的重组质粒 pPIC9K-LFcInB-W 通过限制性内切酶酶切线性化,电击法转化毕赤酵母 GS115 宿主菌,筛选得到高拷贝转化子,如图 2 所示。

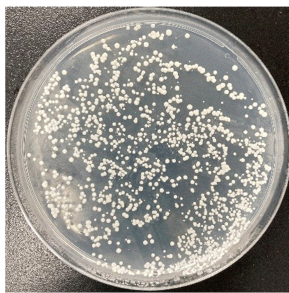


图 2 酵母阳性转化子

2.2 抑菌性检测

阳性克隆经甲醇诱导表达 LFcInB-W,诱导表达 3 d,取上清 1 mL 利用琼脂扩散法检测衍生肽的抑菌活性,结果如 3 所示。图 3 中:1~2 为 LFcInB 的抑菌圈;3~4 为 LFcInB-W 的抑菌圈;5 为阳性对照 50 mg/mL 氨苄青霉素。

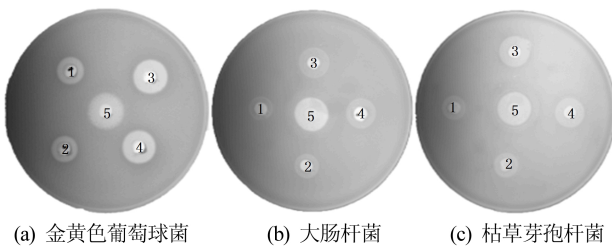


图 3 抑菌活性检测

LFcInB 和 LFcInB-W 对不同菌种抑菌圈直径的影响如图 4 所示。由图 4 可知,LFcInB-W 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径约为 LFcInB 的 1.52 倍,说明衍生肽表现出比原肽更高的抑菌活性,此外 LFcInB-W 对大肠杆菌及枯草芽孢杆菌表现出优于 LFcInB 的抗菌活性,说明成功表达出具有更高抑菌活性的衍生肽 LFcInB-W,且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有良好抗菌活性。

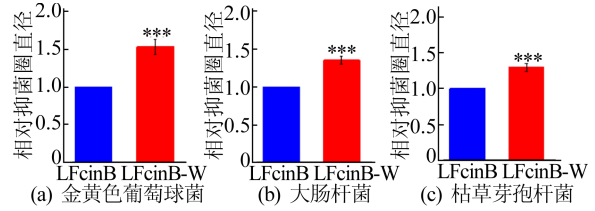


图 4 相对抑菌圈直径

2.3 LFcInB-W 对果蝇寿命的影响

为检测 LFcInB-W 在果蝇体内的活性,利用致病菌 ECC15 口腔感染野生型果蝇 W¹¹¹⁸ 构建果蝇结肠炎模型。不同食物组对果蝇寿命的影响如图 5 所示,图 5 中 NF 表示正常食物组。由图 5 可知,感染后的果蝇在 14 d 时全部死亡,存活率为 50% 时感染组的中期寿命为 10 d,而添加 LFcInB-W 后被延长至 21 d,添加 LFcInB 后被延长至 15 d,表明食物中添加 LFcInB-W 可以缓解肠道感染引起的果蝇寿命降低的现象,且 LFcInB-W 比 LFcInB 活性更高。

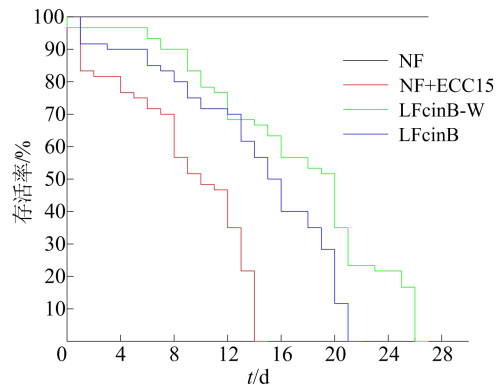


图 5 不同食物组对果蝇寿命的影响

2.4 衍生肽对果蝇肠道损伤的影响

野生型果蝇 W¹¹¹⁸ 感染病原体 ECC15 后,其肠道会缩短^[12]。因此利用 ECC15 感染野生型果蝇 W¹¹¹⁸ 分析不同食物组果蝇的肠道形态变化,如图 6a 所示,果蝇在感染后,肠道长度明显缩短,未感染的果蝇肠道形态完整,长度正常,而 LFcInB-W 组的果蝇在感染后明显挽救了肠道缩短的表型。对果蝇肠道长度及单侧表面积统计分析结果如图 6b、图 6c 所示。由图 6b、图 6c 可知,LFcInB-W 组比感染组肠道平均长度增加了 27.87% ($P < 0.001$),肠道平均单侧表面积增加了 31.66% ($P < 0.001$),表明 LFcInB-W 可以提高果蝇肠道的免疫力,减轻由病原体感染引起的肠道损伤,维持肠道正常形态及缓解由感染引起的肠道缩短的现象,且具有比 LFcInB 更好的抗感染作用。

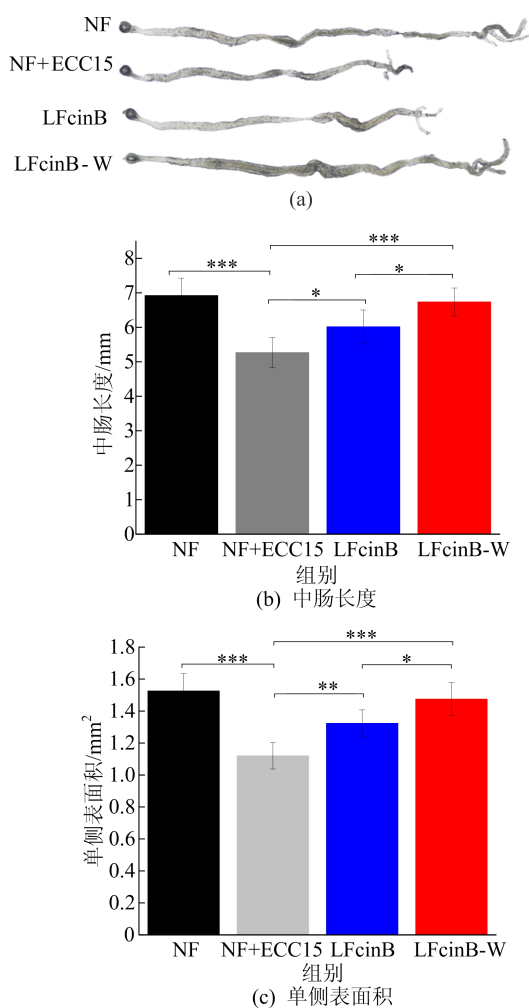


图 6 果蝇肠道形态、长度及表面积统计

3 讨 论

抗菌肽极有可能成为新一代绿色环保抗菌新药物,成为国内外动物和人类医学、营养学、饲料(食品)学和免疫学等领域研究和开发的热点。利用转基因技术将 LFcinB 及其衍生肽转入其他生物表达,是解决 LFcinB 来源不足极具潜力的途径。许多研究揭示了 LFcinB 活性中心和重要残基与其抗菌活性之间的重要关系。

本文利用生物信息学工具,以 LFcinB 为模板改造设计出对其原有的氨基酸进行突变的衍生肽 LFcinB-W,旨在获得更高活性的抗菌肽。利用酵母表达系统中分泌性表达了衍生肽,初步检测后发现,其对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有很强的抗菌活性,且其抗菌活性明显强于原肽,文献[12]报道果蝇、野生型果蝇 W^{1118} 感染病原体 ECC15 后,对肠道造成损伤,并出现肠道缩短现象,本文通过喂食果蝇衍生肽,有效缓解了感

染所引起的损伤,证明 LFcinB-W 在体内仍具有良好的抗感染作用,为衍生肽的改造设计及生产利用提供一定的参考。

[参 考 文 献]

- [1] JERNIGAN J, HATFIELD K, WOLFORD H, et al. Multi-drug-resistant bacterial infections in U. S. hospitalized patients, 2012-2017[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(14): 1309-1319.
- [2] BASSETTI M, POULAKOU G, RUPPE E, et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach[J]. Intensive Care Medicine, 2017, 43(10): 1464-1475.
- [3] PINEDA-CASTAÑEDA H, HUERTAS-ORTIZ K, LEAL-CASTRO A L, et al. Designing chimeric peptides: a powerful tool for enhancing antibacterial activity [J]. Chem Biodivers, 2021, 18(2): 413-417.
- [4] MOURITZEN M, VPETKOVIC M, QVIST K, et al. Improved diabetic wound healing by LFcinB is associated with relevant changes in the skin immune response and microbiota[J]. Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, 2021, 20: 726-739.
- [5] BO LY, LI T J, ZHAO X H. Effect of Cu/Mn-fortification on in vitro activities of the peptic hydrolysate of bovine lactoferrin against human gastric cancer BGC-823 cells [J]. Molecules, 2019, 24(7): 1195-1198.
- [6] AHMADINIA K, YAN D, ELLMAN M, et al. The anti-catabolic role of bovine lactoferrin in cartilage[J]. Biomol Concepts, 2013, 4(5): 495-500.
- [7] CHOUH T, KUO T Y, CHIANG J C, et al. Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against *Vibrio* spp[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(2): 130-138.
- [8] WANG G S, LI X, WANG Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D1087-D1093.
- [9] BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUCHI K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1992, 1121(1/2): 130.
- [10] STRØM M B, HAUG B E, REKDAL Ø, et al. Important structural features of 15-residue lactoferrin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2002, 80(1): 65-74.
- [11] 郭爱珍, 吕自力, 钟浩, 等. 牛乳铁蛋白肽及其衍生肽生物活性与研究进展[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(5): 23-27.
- [12] IATSENKO I, OQUETE J, LEMAITRE B. Microbiota-Derived lactate activates production of reactive oxygen species by the intestinal NADPH oxidase Nox and shortens drosophila lifespan[J]. Immunity, 2018, 49(5): 929-942.

(责任编辑 闫杏丽)