

文章编号: 1674-5566(2017)01-0023-08

DOI:10.12024/jsou.20160401759

## 斑点叉尾鲷 LEAP2 成熟肽在毕赤酵母中的表达及其抑菌活性

孙立人<sup>1,2</sup>, 陶妍<sup>1,2</sup>, 高北<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** LEAP2 (Liver expressed antimicrobial peptide-2) 抗菌肽是一类主要在动物肝脏中表达的小分子肽, 它们在动物的免疫系统中发挥了重要作用。斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) LEAP2 的一级结构由信号肽和原前体肽组成; 原前体肽由 66 个氨基酸残基组成, 近羧基端的 41 个残基组成了其成熟肽区域 (mLEAP2), 该区域决定了 LEAP2 的生物学活性。本文以斑点叉尾鲷 mLEAP2 为研究对象, 通过建立毕赤酵母表达系统, 实现了 mLEAP2 在毕赤酵母中的重组 DNA 表达, 优化的表达条件为: 29 °C、pH 6、250 r/min、0.5% 甲醇、120 h。Tricine-SDS-PAGE 分析表明: 表达产物经固化金属离子亲和层析 (IMAC) 纯化后, 获得了高纯度的目的蛋白。经 Folin-酚法测定, 纯化产物的浓度为 0.22 mg/mL, 推算至表达量为 2.2 mg/L。进一步通过 MALDI-TOF/TOF 质谱分析对纯化产物的结构进行鉴定, 结果证明: 获得的纯化产物为预期的重组体 mLEAP2 (rmLEAP2)。此外, 抑菌实验结果显示 rmLEAP2 具有明显的抑制枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的活性。

**关键词:** 斑点叉尾鲷; LEAP2 成熟肽; 毕赤酵母; 重组 DNA 表达

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

抗菌肽是动物先天免疫系统的重要组成部分, 其分子量一般为 1.5 ~ 10 ku, 它们对细菌、真菌、有包膜的病毒乃至癌细胞等均有抑制作用, 故又被称为动物的“第二防御体系”<sup>[1-2]</sup>, 也因此被认为是替代抗生素的良好候选者。LEAP2 (Liver expressed antimicrobial peptide-2) 抗菌肽是一类主要在动物肝脏中表达的小分子肽, 最初是从人血液超滤产物中得到<sup>[3]</sup>, 被发现能抵抗革兰氏阳性的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*) 和革兰氏阴性的灰色奈瑟菌 (*Neisseria cinerea*) 等细菌。鱼类中的 LEAP2 基因首次发现于虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[4]</sup>, 目前, 多种鱼类的 LEAP2 基因已经被相继分离和克隆, 包括斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[5]</sup>、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[6]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[7]</sup>、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[8]</sup> 和鲢鱼 (*Müichthys müuy*)<sup>[9]</sup> 等。但迄今为止, 关于

LEAP2 基因外源表达方面的研究报道较少, 已有的报道大多数也是基于大肠杆菌原核表达系统的重组 DNA 表达, 例如斑点叉尾鲷<sup>[10-11]</sup>、大黄鱼<sup>[7]</sup> 和人类<sup>[2]</sup> LEAP2 基因在大肠杆菌中的表达; 至于 LEAP2 基因真核表达方面的研究报道则更少, 仅王红亮<sup>[12]</sup> 报道了小鼠 LEAP2 基因在毕赤酵母中的表达, 而鱼类来源 LEAP2 基因的真核重组 DNA 表达还未见报道。

本研究室在过去的几年中以斑点叉尾鲷 LEAP2 抗菌肽为研究对象, 开展了重组 DNA 表达方面的研究, 旨在开发用于替代抗生素的绿色饲料添加剂。就 LEAP2 的结构而言, 除去信号肽之后的原前体肽由 66 个氨基酸残基组成, 近羧基端的 41 个残基为成熟肽区域, 该区域决定了 LEAP2 的生物学活性<sup>[5]</sup>; 4 个高度保守的半胱氨酸残基位于成熟肽区域, 它们在空间上可形成 2 对二硫键, 对 LEAP2 的稳定和活性起了重要作用。鉴于此, 在先前的研究中, 本实验室以 LEAP2 成熟肽“mLEAP2”为研究对象, 开展了基

收稿日期: 2016-04-28      修回日期: 2016-05-12

基金项目: 上海市教育委员会产学研项目 (15CX30); 农业部都市农业 (南方) 重点实验室开放基金项目 (UA201307)

作者简介: 孙立人 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产生物化学与分子生物学。E-mail: 442333777@qq.com

通信作者: 陶妍, E-mail: ytao@shou.edu.cn

于大肠杆菌表达系统的重组 DNA 表达,但由于原核表达系统存在表达量低、无翻译后折叠修饰功能、易在细胞内形成包涵体等众所周知的缺点,并未获得具有良好生物学活性的重组蛋白<sup>[10-11]</sup>。据此,本文在前期原核表达研究的基础上,以既有的原核重组表达载体“pET-32a-*mLEAP2*”为模板,通过 PCR 扩增含相关酶切位点的 LEAP2 成熟肽基因;以 pPIC9K 为表达载体、毕赤酵母 GS115 为工程菌,构建真核表达系统,以期实现斑点叉尾鲷 LEAP2 成熟肽在毕赤酵母中的重组 DNA 表达,并对其结构和生物学活性进行鉴定。本研究结果将为进一步探明 LEAP2 的生物学功能和作为绿色饲料添加剂应用于水产养殖奠定重要的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 质粒和菌种

用作模板的“pET-32a-*mLEAP2*”为本实验室保存。用于质粒复制和 DNA 克隆的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自北京天根生物科技有限公司;克隆质粒 pMD19-T simple 购自日本 TaKaRa 公司;表达载体 pPIC9K 及毕赤酵母 GS115 购自美国 Invitrogen 公司。

#### 1.1.2 主要试剂和设备

DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒、DNA 分子量标准和

蛋白质分子量标准购自北京天根生物科技有限公司;超滤设备 Vivaflow 200 购自德国 Sartorius 公司;蛋白质纯化仪 Profinia、IMAC 柱为美国 Bio-rad 公司产品。超滤离心管购自美国 Millipore 公司。无氨基酵母氮源 (YNB) 培养基购自英国 Oxoid 公司;其他试剂均为国产分析纯。引物的合成及 DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成。MALDI-TOF-TOF 分析委托上海中科新生命生物科技有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 斑点叉尾鲷 LEAP-2 成熟肽基因酶切位点的添加

设计 3 个分别含 *EcoR* I、*Not* I 酶切位点和 6  $\times$  his 标签的引物(表 1)。第一次 PCR 以既有的斑点叉尾鲷 LEAP-2 成熟肽基因“*mLEAP2*”的原核表达载体“pET-32a-*mLEAP2*”为模板,以 LF 和 LR1 为引物,反应体系和条件如下:“pET-32a-*mLEAP2*”2.5  $\mu$ L、正反引物各 4.0  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)、dNTP(10 mmol/L)8.0  $\mu$ L、PCR 缓冲液 10  $\mu$ L、*Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa, Otsu, Japan)1  $\mu$ L,用无菌水调至 100  $\mu$ L;94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min、94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、54.6  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,最终 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以该 PCR 产物为模板,以 LF 和 LR2 为引物,进行第二次 PCR,反应体系和条件同上,除了退火温度改为 60  $^{\circ}$ C。将第二次 PCR 扩增的目的片段“*mLEAP2*”连接至 pMD19-T 质粒后用于 DNA 测序。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	长度/bp Size
LF	CG <u>GAATTC</u> ATGCACCCCTTTGGAG	25
LR1	TTACTGGTGGTGGTGGTGGGAAATTATAGGTTGGCT	39
LR2	<u>GCGCCGCTT</u> ACTGGTGGTGGTGGTGGTGG	30
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21

注:下划线为限制性酶切位点

Note: Underlines are restriction sites

#### 1.2.2 “pPIC9K-*mLEAP2*”重组表达载体的构建及转化毕赤酵母 GS115 细胞

采用 *EcoR* I 和 *Not* I 对重组质粒“pMD19-T-*mLEAP2*”进行双酶切,将获得的片段“*mLEAP2*”与经同样酶处理过的表达载体 pPIC9K 连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞

后,通过菌落 PCR、双酶切和 DNA 测序对重组表达载体“pPIC9K-*mLEAP2*”进行鉴定。“pPIC9K-*mLEAP2*”经 *Sac* I 酶切割后电转入毕赤酵母 GS115 细胞,取适量涂于 His<sup>-</sup> 的 MD 平板上,30  $^{\circ}$ C 培养至单克隆产生。

### 1.2.3 高拷贝酵母转化子的筛选及鉴定

将 MD 平板上的单菌落依次接种于 G418 浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0 g/L 的 YPD 平板,30 °C 培养 2~5 d 后筛选高拷贝酵母转化子;将筛选到的转化子在 MM 平板上培养以筛选 Mut<sup>+</sup> 或 Mut<sup>-</sup> 表型;对筛选到的甲醇利用快速型高拷贝酵母转化子提取基因组 DNA,以此为模板,采用 pPIC9K 上的通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1(表 1),进行 PCR 鉴定。

### 1.2.4 斑点叉尾鲷 LEAP2 成熟肽在毕赤酵母 GS115 中的表达及其纯化

挑取筛选到的酵母转化子,接种于 BMG 液体培养基中,29 °C、250 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 4,10 000 × g 离心后用 1 800 mL BMM 液体培养基重悬细胞至 OD<sub>600</sub> 约为 1.0,加入 0.5% 甲醇诱导表达 120 h,每隔 24 h 取培养液以备分析;收集培养液离心(10 000 × g,30 min),上清经超滤浓缩后,采用 Profinia 蛋白质纯化仪对其进行纯化,纯化产物用于 Tricine-SDS-PAGE 分析(Tricine 浓度 0.1 mol/L,浓缩胶、夹层胶和分离胶的浓度分别为 4%、10% 和 16.5%)。

### 1.2.5 表达产物的 Western-blot 和 MALDI-TOF/TOF 分析

经 Tricine-SDS-PAGE 分析后的凝胶用于 Western blot 分析,阴性对照为含 pPIC9K 空载体的酵母表达上清。100 V 恒压 1 h,将蛋白转至 PVDF 膜上,依次用抗 his 标签鼠单克隆抗体和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 孵育,最后采用 HRP-DAB 显色试剂盒显色。目的条带经割胶后由上海中科新生命生物科技有限公司作 MALDI-TOF/TOF 质谱分析。

### 1.2.6 重组体 mLEAP2 的抑菌活性测定

将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)37 °C、150 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.0,取 1 μL 与 100 μL 含 mLEAP2 的培养液上清混匀,37 °C 培养 2 h;取 30 μL 培养液涂布于营养琼脂平板,观察细菌生长情况。空白对照为 100 μL 含 pPIC9K 空载体的酵母培养液。

## 2 结果与分析

### 2.1 “mLEAP2”基因序列验证及其构建的重组表达载体“pPIC9K-mLEAP2”

图 1a 为通过两次 PCR 扩增得到的目的片段

“mLEAP2”经 DNA 测序验证后的 cDNA 序列及推断的氨基酸序列,证明目的片段的 5'端已添加 EcoR I 酶切位点,3'端已添加 Not I 酶切位点和 6 × his 标签;除去 2 个酶切位点和 6 × his 标签,其余 123 bp 编码了由 41 个氨基酸残基组成的斑点叉尾鲷 LEAP2 成熟肽。图 1b 为经过菌落 PCR、双酶切鉴定和 DNA 测序确认后成功构建的重组表达载体“pPIC9K-mLEAP2”。

### 2.2 在毕赤酵母 GS115 中表达重组体 mLEAP2 及其 Western blot 鉴定

图 2a 是表达不同时间段培养液上清的 Tricine-SDS-PAGE 分析结果,可以发现表达 120 h 时在近 7.8 ku 处有最深条带,证明此时表达量达到最高,但空白对照(含 pPIC9K 空载体的酵母转化子)未见此条带。随后,利用目的蛋白羧基端携带的 6 × his 标签可与 his 单克隆抗体结合的原理,对表达 120 h 的培养液上清进行 Western blot 分析,结果发现在近 10 ku 处有明显的杂交条带(图 2b),由此初步证明获得了预期的重组体 mLEAP2(rmLEAP2)。

### 2.3 rmLEAP2 的纯化及其 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定

收集表达 120 h 的培养液上清,通过 IMAC 亲和层析对目的蛋白进行分离纯化,纯化产物经 Tricine-SDS-PAGE 分析后在近 7.8 ku 处有单一条带(图 3),与图 2a 中的条带分子量位置相同,经 Folin-酚法测定,其浓度为 0.22 mg/mL,推算至表达量约为 2.2 mg/L。目的条带经割胶后用于 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定(图 4),结果显示,一级质谱的 m/z 799.0 至 m/z 4 013.0 范围内,共检测到 21 个峰,其中 m/z 为 2 054.9502 和 2 183.042 的两个峰的氨基酸序列分别为 GHCSFSQPIISHHHHHH 和 KGHCSFSQPIISHHH HHH,分别与 rmLEAP2 自羧基端起的 17 个氨基酸残基和 18 个氨基酸残基的理论序列相符,由此证明纯化到的目的蛋白为预期的 rmLEAP2。

### 2.4 rmLEAP2 的抑菌活性

将枯草芽孢杆菌与含 rmLEAP2 的培养液上清按 1:100(V/V)混合后 37 °C 培养 2 h 涂平板,经 37 °C、8~10 h 培养后,发现平板上生长的菌落数明显减少(图 5a);而将空白对照(含 pPIC9K 空载体的酵母转化子)的培养液上清经同样处理后涂平板培养,可以发现菌落长成一片(图 5b),



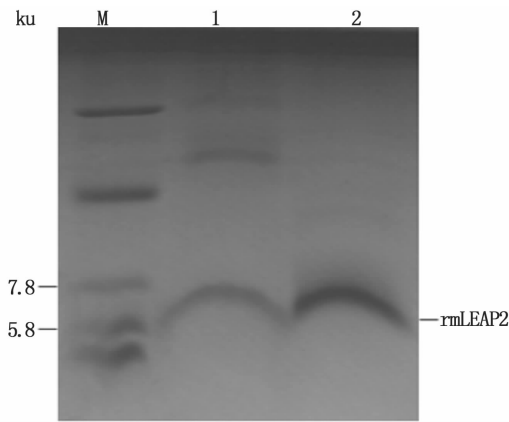


图3 纯化后的 rmLEAP2 的 Tricine-SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE analysis for the purified rmLEAP2

M. 蛋白质分子量标准; 1. 培养液上清; 2. 纯化产物  
M. protein marker; 1. supernatant from fermentation broth; 2. purified product

### 3 讨论

毕赤酵母除了具有可高密度培养、生长速度

快、易于分泌表达外源蛋白、重组子稳定等优点,还可以对重组蛋白进行翻译后折叠修饰,因此被认为是良好的表达外源蛋白的宿主<sup>[14]</sup>。本研究通过建立毕赤酵母表达系统,首次实现了斑点叉尾鲷 LEAP2 成熟肽在毕赤酵母中的重组 DNA 表达,一系列的鉴定实验证明了表达的产物为预期的 rmLEAP2。但由于是在摇瓶中表达,pH 不够稳定及溶氧量等各方面的表达条件有限,以致表达量不太高;此外,由于本次用于表达的目的基因是来自斑点叉尾鲷肝脏的天然 cDNA,未根据毕赤酵母的偏爱性对密码子进行过优化,这可能也是影响表达量的一个重要原因。张宇婷等<sup>[15]</sup>通过对 N-酰基高丝氨酸内酯酶基因(*aiiaB546* 基因)进行密码子优化,使其酶活从原来的 33.1 U/mL 上升至 36.2 U/mL;陈惠等<sup>[16]</sup>通过对植酸酶基因进行密码子优化,使其酶活从原来的 23 667 U/mL 上升至 47 600 U/mL。进一步的研究将聚焦于对 *mLEAP2* 基因的密码子优化以及发酵培养条件的筛选和优化。

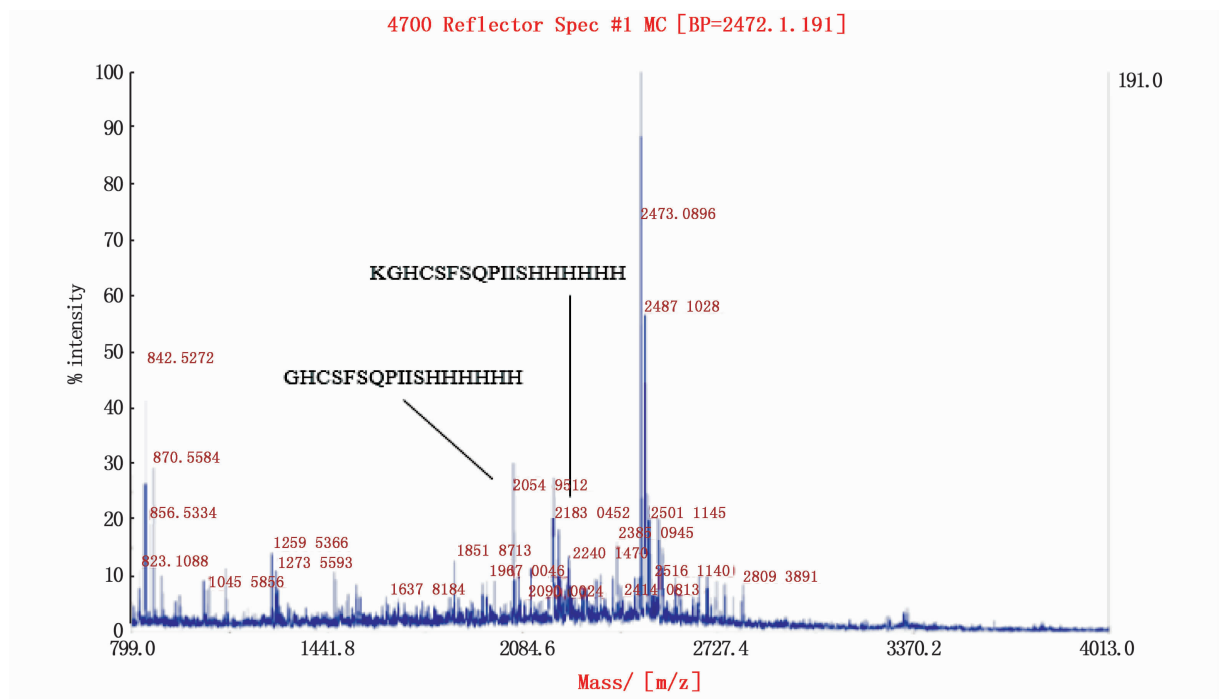


图4 rmLEAP2 的 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定  
Fig. 4 MALDI-TOF/TOF analysis for rmLEAP2

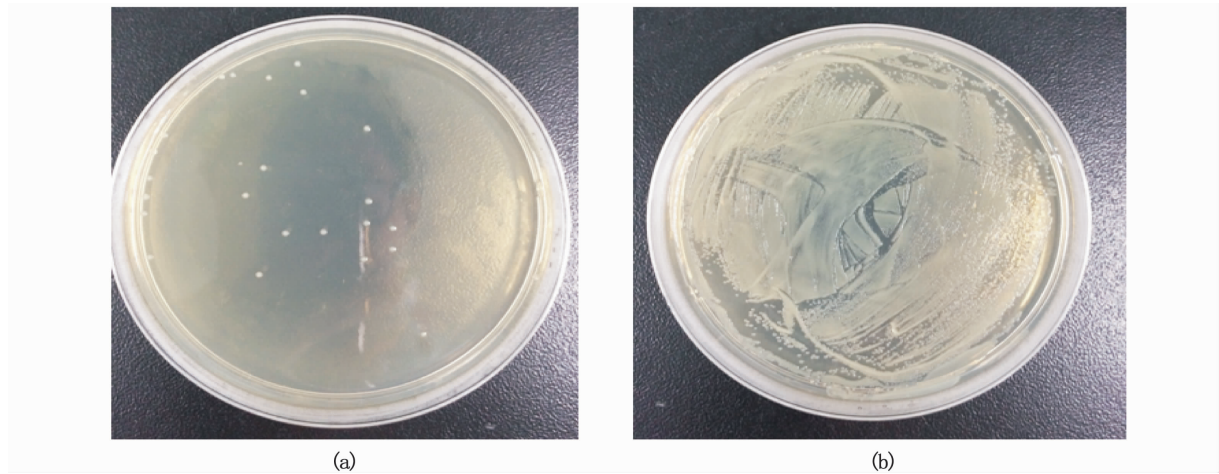


图5 含 rmLEAP2 的培养液上清的抑菌活性

Fig. 5 Bacteriostatic activity for the supernatant from fermentation broth containing rmLEAP2

由于扩大制备或实际生产应用中不可能将纯化产物作为最终产品使用,而是对发酵液上清进行浓缩或干燥处理后将其作为实际应用的产品,因此发酵液上清是否具有生物学活性是至关重要的。本研究中我们将含 rmLEAP2 的培养液上清超滤浓缩 10 倍之后用于抑菌活性的测定,初步证明其具有抑制枯草芽孢杆菌的活性,但由于培养液的量以及表达量有限,未对其他细菌作进一步的抑菌效果测定。另一方面,本研究构建的重组表达载体“pPIC9K-*mLEAP2*”的信号肽基因区域按 5'-3'方向依次含有 1 个 Kex2 和 2 个 Ste13 信号肽酶切位点基因,使得重组子在分泌表达时,理论上可能发生 3 种切割结果,而在 Kex2 位点处被切开的概率最高,以致 2 个 Ste13 位点所对应的氨基酸残基(EAEA)被留在目的蛋白的 N 端;此外,由于 *EcoR* I 酶切位点(对应 YV 残基)位于 2 个 Ste13 位点的 3'端,最终导致 rmLEAP2 的 N 末端会携带 6 个额外的氨基酸残基。上述情况是否会影响 rmLEAP2 的抑菌活性尚未知,因此,进一步的研究将聚焦于更换表达载体以期获得具天然 N 末端的 rmLEAP2。

#### 4 结论

本研究成功构建了斑点叉尾鲷 LEAP2 成熟肽的真核重组表达载体“pPIC9K-*mLEAP2*”,并在毕赤酵母 GS115 中实现分泌表达;表达产物通过 IMAC 亲和层析法获得较高纯度的 rmLEAP2,经 Western blot 分析和 MALDI-TOF-TOF 鉴定,证明该 rmLEAP2 为预期的目的蛋白。抑菌实验证明

含 rmLEAP2 的培养液上清具有抑制枯草芽孢杆菌的活性。本研究结果为鱼类 LEAP2 抗菌肽的基因工程制备奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 路妍,刘宝业,井金学,等. 抗菌肽 Rs-AFP2 的原核表达及抑菌活性[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 11(1): 84-88.  
LIU Y, LIU B Y, JING J X. Expression of Rs-AFP2 in *Escherichia coli* and its antifungal assay[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 11(1): 84-88.
- [2] 刘晓萌,周琳,陈龙. 肝脏表达的抗菌肽-2[J]. 生命的化学, 2008, 28(6): 723-726.  
LIU X M, ZHOU L, CHEN L. Liver-expressed antimicrobial peptide-2[J]. Chemistry of Life, 2008, 28(6): 723-726.
- [3] KRAUSE A, SILLARD R, KLEEMEIER B, et al. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver[J]. Protein Science, 2003, 12(1): 143-152.
- [4] ZHANG Y A, ZHOU J, CHANG C I, et al. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, 101(3/4): 259-269.
- [5] BAO B L, PEATMAN E, XU P, et al. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated[J]. Molecular Immunology, 2006, 43(4): 367-377.
- [6] 陈晓武,施志仪,李倩,等. 牙鲆肝脏抗菌肽-2 基因序列和表达分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(s1): 12-17.  
CHEN X Y, SHI Z Y, LI Q, et al. Sequence and expression analysis of LEAP-2 gene from *Paralichthys*

- olivaceus [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27 (S1): 12-17.
- [7] 蔡灿, 薛良义, 孙爱飞. 大黄鱼肝表达抗菌肽 2 基因的克隆和原核表达[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(4): 55-59, 73.
- CAI C, XUE L Y, SUN A F. Cloning and prokaryotic expression of liver-expressed antimicrobial peptide-2 gene from *Larimichthys crocea* [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29 (4): 55-59, 73.
- [8] LIU F, LI J L, YUE G H, et al. Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 133 (2/3/4): 133-143.
- [9] LIU T X, GAO Y H, WANG R X, et al. Characterization, evolution and functional analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in Miiuy croaker [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41 (2): 191-199.
- [10] 张虹, 陶妍. 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 肝脏表达的抗菌肽-2 (LEAP-2) 在 *E. coli* 中的融合表达 [J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2010, 28(1): 70-75.
- ZHANG H, TAO Y. Fusion expression of a liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2010, 28(1): 70-75.
- [11] 高北, 陶妍. 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) LEAP2 成熟肽在大肠杆菌中的融合表达 [J]. *生物技术通报*, 2014, (2): 130-135.
- GAO B, TAO Y. Fusion expression of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) LEAP2 mature peptide in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, (2): 130-135.
- [12] 王红亮. 小鼠 LEAP-2 成熟肽基因在毕赤酵母中的分泌表达 [J]. *新乡学院学报(自然科学版)*, 2011, 28(4): 333-335.
- WANG H L. Secretory expression of mature mouse liver-expressed antimicrobial peptide-2 in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Xinxiang University (Natural Science Edition)*, 2011, 28(4): 333-335.
- [13] SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2): 368-379.
- [14] 姚晶, 吴正钧, 任婧. 巴氏毕赤酵母表达系统的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(3): 35-38.
- YAO J, WU Z J, REN J. Advances in *Pichia pastoris* expression system [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(3): 35-38.
- [15] 张宇婷, 曹雅男, 解绶启, 等. 密码子优化提高 aiiab546 毕赤酵母表达活性 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(1): 164-167.
- ZHANG Y T, CAO Y N, XIE S Q, et al. The n-acyl-homoserinellactonase-xylanase gene aiiab546 reached a higher expression level by codon optimization in *Pichia pastoris* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(1): 164-167.
- [16] 陈惠, 赵海霞, 王红宁, 等. 植酸酶基因中稀有密码子的改造提高其在毕赤酵母中的表达量 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(2): 170-174.
- CHEN H, ZHAO H X, WANG H N, et al. Increasing expression level of phytase gene (phyA) in *Pichia pastoris* by changing rare codons [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(2): 170-174.

## Expression of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) LEAP2 mature peptide in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity

SUN Liren<sup>1,2</sup>, TAO Yan<sup>1,2</sup>, GAO Bei<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** LEAP2 (Liver expressed antimicrobial peptide-2) antibacterial peptide is a kind of small molecular peptide expressed mainly in the liver of animals, and they play important roles in the immune systems of animals. The primary structure of LEAP2 from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is composed of signal peptide and prepeptide which is composed of 66 amino acid residues. The 41 residues near carboxyl terminal of the prepeptide form mature peptide region (mLEAP2), which is responsible for biological activity of the LEAP2 antibacterial peptide. The present study focused on the mLEAP2 for channel catfish. Recombinant DNA expression of the mLEAP2 in *Pichia pastoris* was realized by constructing *P. pastoris* expression system. The optimized expression conditions were as follows: 29 °C, pH 6, 250 r/min, 0.5% methanol and 120 h. Tricine-SDS-PAGE analysis indicated that the expressed product was highly purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The concentration of the purified product was 0.22 mg/mL, thus the expression yield of recombinant protein was calculated to be about 2.2 mg/L. Structure of the purified product was further identified by MALDI-TOF/TOF analysis, and the result demonstrated that the purified product was the recombinant mLEAP2 (rmLEAP2) expected. In addition, antibacterial assay showed that the fermentation supernatant containing the rmLEAP2 had bacteriostatic activity against *Bacillus subtilis*.

**Key words:** channel catfish; LEAP2 mature peptide; *Pichia pastoris*; recombinant DNA expression