

# 以莱茵衣藻为载体表达外源抗菌肽的研究

赵艳苹<sup>1,2</sup>, 李小燕<sup>1</sup>, 彭婷婷<sup>1</sup>, 黄开耀<sup>1</sup>, 王高鸿<sup>1,2</sup>

(1.中国科学院水生生物研究所藻类生物学重点实验室,武汉 430072;  
2.中国科学院大学,北京 100049)

**摘要:**将黑水虻抗菌肽基因 *sarcotoxin3* 转入到莱茵衣藻细胞中,以期实现抗菌肽活性片段的大规模表达生产,为将来完成抗菌肽的临床测试及水产应用奠定实验基础。以质粒 pHK85 为骨架,插入荧光素酶基因和黑水虻抗菌肽 *sarcotoxin3* 基因,用 DNA 连接酶将质粒连接,构成抗菌肽质粒。抗菌肽质粒经克隆、提取、酶切线性化、衣藻玻璃珠转化、荧光素酶活性筛选和抑菌实验,结果表明:经过测序进一步确认质粒成功构建,碱基序列与所设计质粒序列一致,质粒浓度 472.8 ng/ $\mu$ L、纯度( $A_{260}/A_{280}$ )1.93,7 d 后每个巴龙霉素平板长有单克隆约 200 个,大多数单克隆荧光素酶活力值可高达  $10^6$ ,少数单克隆荧光值甚至可达  $10^8$ ;藻株在 26 kDa 附近出现了特异信号,含有抗菌肽的蛋白对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  有一定的抑制作用。莱茵衣藻可以作为抗菌肽外源表达的一种载体,为抗菌肽的大量生产提供了一种可能。

**关键词:**抗菌肽;莱茵衣藻;基因表达;载体

**中图分类号:**Q782,Q786      **文献标志码:**A      **文章编号:**1674-3075(2021)03-0106-08

抗菌肽是一类广泛存在于自然界生物中的小分子多肽,一般由 10~50 个氨基酸组成。抗菌肽通过破坏细菌细胞膜的结构完整性,使细胞内外屏障丧失,从而杀死细菌(林文静,2014);作为生物体先天性免疫系统的一部分,还可以诱导生物体的免疫系统而发挥功能(刘书东等,2011);另外,抗菌肽还参与免疫调节,帮助伤口愈合,诱导细胞凋亡,抑制某些物质如促肾上腺皮质激素、蛋白激酶 C 等的生物活性(卫银丹,2013)。目前已发现来源于不同生物体的抗菌肽有 2 700 多种(Oren & Shai,1996;丁雪,2018)。与传统抗生素相比,抗菌肽具有抗菌谱更广、活性更强、稳定性好、杀菌机制比较特殊及病原菌很难对其产生抗药性等优点,大大增加了其替代传统抗生素的可能性(王改玲等,2017;宫霞等,2005)。

抗菌肽在动植物细胞内表达含量很低,且动植物细胞生长周期长,分化慢,很难通过动植物来进行大量表达抗菌肽。如黑水虻(*Hermetia illucens* L)体内含有大量强抗菌作用的抗菌肽,以防止自身受

病原体的侵袭,其中 *sarcotoxin3* 就是从黑水虻中分离的一种活性很强的抗菌肽(Elhag et al,2017),具有广阔的应用前景,但目前尚无很好的方法进行大规模生产。因此,寻找高效表达且能大规模生产的抗菌肽载体就成为抗菌肽广泛应用的关键。衣藻(*Chlamydomonas*)具备完整的遗传转化系统,利用衣藻表达外源蛋白已经成为研究热点。黄亚萍(2019)在利用衣藻表达人表皮生长因子和 C 反应蛋白时成功构建了一个双元表达载体,使得衣藻表达系统有了显著进步;刘芮均等(2018)研究了衣藻外源表达蛋白含量与衣藻基因组之间的关系,为提高衣藻表达蛋白含量提供了理论基础。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是一种真核绿藻,目前,其基因组已全部测序完成,并建立了分子遗传学研究技术与遗传分析系统和细胞核、线粒体、叶绿体 3 套遗传转化系统(Grossman,2000)。莱茵衣藻外源基因表达系统结合了细菌和高等植物的双重优势,具有生长快、生活周期短、成本低等特点;另外,与其他藻类不同,衣藻既能在光照下生长也能在黑暗条件下生长,并且能够将外界提供的碳源与光合成的碳源分开,是一种作为转基因生物反应器的良好材料。

本研究通过将黑水虻抗菌肽基因 *sarcotoxin3* 转入到衣藻细胞中,通过基因和蛋白层面检测及体外抑菌试验等过程,进行逐步筛选,得到高效表达抗菌肽的藻株,并对其扩大培养,以期实现抗菌肽活性

收稿日期:2020-03-30      修回日期:2021-04-22  
基金 项目:国家水体污染控制与治理重大科技专项(2017ZX07203001);国家载人航天工程空间站任务空间应用项目(YYWT-0801-EXP-09)。

作者简介:赵艳苹,女,1995 年 5 月生,硕士研究生,主要从事高效抗菌肽外源表达平台的构建及水污染控制方面的研究。E-mail:2864499719@qq.com

通信作者:王高鸿。E-mail:space@ihb.ac.cn

片段的大规模表达生产,建立抗菌肽体外表达的关键技术平台,为将来完成抗菌肽的临床测试及水产应用奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

莱茵衣藻 CW15 株由本实验室保存,培养基为 TAP 培养基,培养条件为 25℃,光强 200 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。黑水虻抗菌肽 *sarcotoxin3* 基因序列由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室张吉斌教授提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 构建抗菌肽质粒 以实验室原有的质粒 pHK85 为骨架,用限制性内切酶 *Nde* I、*Eco*RV、*Eco*R I 在对应的位点将 pHK85 质粒切开,加入强启动子 HSP70-RBCS2,切除 GFP 片段,插入荧光素酶(*Gaussia luciferase*)基因和黑水虻抗菌肽 *sarcotoxin3* 基因,最后用 DNA 连接酶将质粒连接,构成抗菌肽质粒,如图 1。

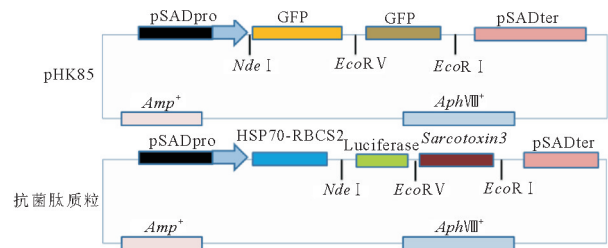


图 1 质粒构建

Fig.1 Plasmid construction

1.2.2 质粒的克隆、提取、酶切线性化 将构建好的质粒转入大肠杆菌中,用 LB 培养基无菌接种后置于摇床中 37℃、120 r/min 扩大培养约 16 h。

将上述培养物离心收集细胞,根据天根质粒小提试剂盒 DP103-03 的说明书提取质粒并测浓度。依据 Thermo 公司的 *Kpn* I 限制酶说明书将提取的质粒进行线性化并测定线性化后质粒的浓度。

配置 1%的琼脂糖凝胶,对线性质粒进行电泳,依据诺唯赞产物纯化试剂盒 DC301-01 的说明书对 8 000 bp 处的条带进行切胶回收,并对回收的线性质粒测定浓度。

1.2.3 高活性衣藻细胞的培养 无菌接种衣藻,于 25℃、150 μmol/(m<sup>2</sup>·s)光照、转速 80 r/min 下培养 5~6 d 时进入对数生长期,取此时期的藻液离心,去上清后用无菌 TAP 培养基重悬细胞至密度为 10<sup>8</sup> 个/mL。

1.2.4 衣藻玻璃珠转化 取灭菌的直径为 0.3 mm 的玻璃珠及 1.5 mL 离心管于无菌操作台。依次向离心管中加入适量玻璃珠、300 μL 藻液、700 ng~1 μg 线性质粒,将涡旋仪速度调至最大,离心管在涡旋仪上涡旋 15 s,停 5 s,再涡旋 15 s(高翔,2016)。吸取涡旋后的藻液到装有 10 mL 培养基的 50 mL 三角瓶中,置于摇床弱光修复 18 h 后离心收集藻细胞,涂布在含有 10 μg/mL 巴龙霉素的 TAP 平板上,将平板放置在培养架上弱光培养(王亚丽,2015)。约 1 周后平板上长出单克隆,用无菌吸头挑取单克隆到另一个 TAP 平板上,并进行编号。

1.2.5 荧光素酶活性筛选 使用 Promega 公司的 Renilla Luciferase Assay System 试剂盒(TM055)对衣藻进行荧光素酶活力测定。具体方法按试剂盒说明书。

1.2.6 Western blot 筛选 选取荧光素酶活力最强的 50 株单克隆进行 Western blot 筛选。培养待选单克隆藻株至对数期,离心收集藻细胞,提取衣藻蛋白。使用碧云天公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 P0009 对蛋白浓度进行测定。所有样品用 1×PBS 将浓度定量到 50 μg/μL,然后加入 5×上样缓冲液沸水浴 5 min 对蛋白进行变性,存放在-80℃冰箱待用,上述所有过程均需在 4℃条件下操作。配置 12%的 SDS-PAGE 凝胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,先 80 V 电泳 30 min,后 120 V 电泳 2 h。然后进行蛋白的转印,条件为 250V 恒压转印 60 min,取出 PVDF 膜用丽春红染液染色观察是否成功转印并用记号笔标清孔道,最后用 1×TBST 溶液润洗膜 3 次,每次 5 min。将膜放入杂交袋,加入适量 5%脱脂牛奶封闭液封闭 1 h,1×TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。一抗选用 Thermo 公司的 PA1-181 荧光素酶的商业化抗体,内参抗体选用 Sigma 公司的货号为 T6199 的  $\alpha$ -tubulin 抗体,根据说明书将抗体稀释,将膜放入杂交袋,加入 5 mL 一抗抗体稀释液反应 1 h,1×TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。二抗选用 Sigma 公司的鼠二抗及兔二抗,操作同一抗。用 Millipore 公司的 ECL 发光液对结果进行显影(焦思恺,2017;李镇芳,2017;刘立闯,2008)。

1.2.7 抑菌实验 无菌接种野生型藻种及成功转入抗菌肽的藻种于 10 L 血清瓶内,通气培养至对数期,收集藻细胞提取蛋白。将蛋白依次用 Millipore 公司的 50 kDa 和 3 kDa 超滤管对蛋白进行浓缩纯化,并测定蛋白的最终浓度(马卫明,2004)。

无菌接种大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,置于摇床过夜培养

后用 LB 培养基稀释至 OD<sub>600</sub> 为 0.2 用于后续实验。

采用测吸光度的方法测定抗菌肽对细菌生长的影响。取无菌 1.5 mL 离心管及 96 孔板若干,在无菌操作台内按每孔 50 μL 蛋白、10 μL 菌液、140 μL 培养基的体系,其中阴性对照只加菌液和培养基,阳性对照添加野生型衣藻蛋白、菌液和培养基,实验组添加转抗菌肽衣藻蛋白、菌液及培养基,每组 5 个平行。先将所有成分在 1.5 mL 离心管内混匀,然后依次加到 96 孔板中,测定初始 OD<sub>600</sub>,然后将 96 孔板盖紧放置在 37℃ 培养箱中,24 h 后测定 OD<sub>600</sub>。

1.2.8 统计分析 采用 SPSS 8.01 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 载体构建

经过酶切和连接,在原始质粒的基础上成功加入了 HSP70 强启动子、Gaussia luciferase 基因以及目的抗菌肽 *sarcotoxin3* 基因,经过测序进一步确认质粒成功构建,碱基序列与所设计质粒序列一致,序列如下:

TGACCGCCTATGAAGGGGCGGAGGAAGCTCTGGAAAGGGTCGCCGAT  
TGGGGCGCGCGGCCGTCCCAGAA GCGCCCATACGGCCCGGCTGGCGGCAA  
CCCATCCCGGTATAAAAGCCGCGACCCCGAACGGTGACCCTCCACTTCAGC  
GACAAACGAGCACTTATACATACGCGACTATTCTGCCGCTATACATAACCAC  
TCAGCTAGCTTAAGATCCCCGGGCGCGCCAGAAGGAGCGCAGCCAAACCA  
GGATGATGTTTGATGGGGTATTTGAGCACTTGCAACCCTTTATCCGGAAGCC  
CCCTGGCCCCACAAAGGCTAGGCGCCAATGCAAGCAGTTCGCATGCAGCCC  
CTGGAGCGGTGCCCTCCTGATAAACCGGCCAGGGGGCCTATGTTCTTTACT  
TTTTTACAAGA GATATC ATGGGATGGTTGAAGAGAAAGATTGGAATGATGA  
TGAAGAACTCCAACCTTCAACAGTACTGAAGAACGAGAAAGCTGCGAAGAA  
GAATTACAAAAGGAAATACGTTCTTGGTTCTCTGGTGCTAACGTTGCTGCT  
ACTGCTAGAATGGTCAACGGCGTGAAAGGTGCTGTTGCGCCCTGATCTGCATC  
GCCGTGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAAACGAGGACTTCAACATCGT  
GGCCGTGGCCAGCAACTTCGCCACCACCGACCTGGACGCCGACCGCGGCA  
AGCTGCCCGGCAAGGAAGCTGCCCC T GGAGGTGCTGAAGGAGATGGAGGC  
CAACGCCCGCAAGGCCGGCTGCACCCGCGGCTGCCTGATCTGC CT GAGCC  
ACATCAAGTGCACCCCCAAGATGAAGAAGTTCATCCCCGGCCGCTGCCAC  
ACCTACGAGGGCGACAAGGAGAGCGCCCAGGGCGGCATCGGCGAGGCCA  
TCGTGGACATCCCCGAGATCCCCGGCTTCAAGGACCTGGAGCCCATGGAG  
CAGTTCATCGCCAGGTGGACCTGTGCGTGGACTGCACCACCGGCTGCCT  
GAAGGGCCTGGCCAACGTGCAGTGCAGCGACCTGCTGAAGAAGTGGCTG  
CCCCAGCGCTGCGCCACCTTCGCCAGCAAGATCCAGGGCCAGGTGGACAA  
GATCAAGGGCGCCGGCGGCGACGATACGTAAGA AATTCT TGGCAGCAGCTGG

ACCGCCTGTACCATGGAGAAGAGCTTTACTTGCCGGGATGGCCGATTTCGC  
TGATTGATACGGGATCGGAGCTCGGAGGCTTTCGCGCTAGGGGCTAGGCGA  
AGGGCAGTGGTGACCAGGGTCGGTGTGGGGTCGGCCCACGGTCAATTAGC  
CACAGGAGGATCAGGGGAGGTAGGCACGTCGACTTGTTTTGCGACCCCGC  
AGTTTTTGGCGGACGTGCTGTTGTAGATGTTAGCGTGTGCGTGAGCCAGTGG  
CCAACGTGCCACCACCCATTGAGAGACACACTTACTGGCATATCTGGCCAT  
GCATACTGCATGTATGCAGTCATGTGAGAGTTTGCCGTGCCCTGGCCGCGC  
GCCCTCGGGGGGCGCCAAT

2.2 质粒的克隆、提取、酶切线性化结果

质粒克隆提取纯化后经超微量分光光度计测量浓度和纯度结果如表 1,其中线性质粒的电泳图如图 2。

表 1 各质粒浓度及纯度

Tab.1 Concentration and purity of each plasmid

| 质粒名称                                | 质粒浓度/<br>ng · μL <sup>-1</sup> | 质粒纯度<br>(A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ) |
|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>sarcotoxin3</i> +luciferase      | 1428.5                         | 2.12                                          |
| <i>sarcotoxin3</i> +luciferase 线性质粒 | 472.8                          | 1.93                                          |

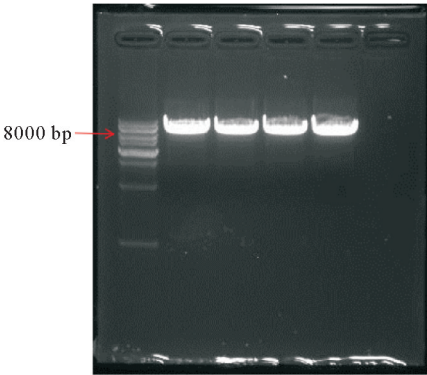


图 2 线性质粒电泳

Fig.2 Linear plasmid electrophoresis

2.3 转化结果

由于载体中含有抗巴龙霉素的基因,只有转入载体的衣藻细胞能在巴龙霉素平板上存活,而未转入的衣藻细胞则不能在巴龙霉素平板上生长。大概 7 d 后,平板上长出了单克隆,每个平板有单克隆约 200 个,如图 3。

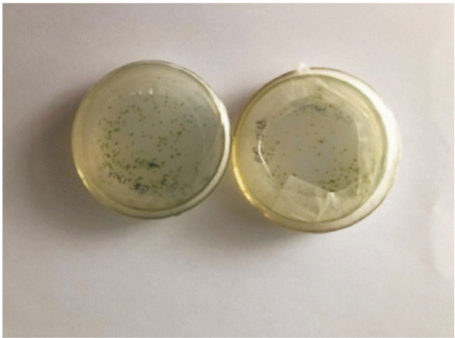


图 3 巴龙霉素抗性筛选结果

Fig.3 Screening results of resistance to balanomycin

2.4 荧光素酶活性筛选结果

挑取巴龙霉素平板上长出的 700 个单克隆进行荧光素酶活力的测定,结果如图 4。大多数单克隆荧光素酶活力值可高达 10<sup>6</sup>,少数单克隆荧光值甚至可达 10<sup>8</sup>。

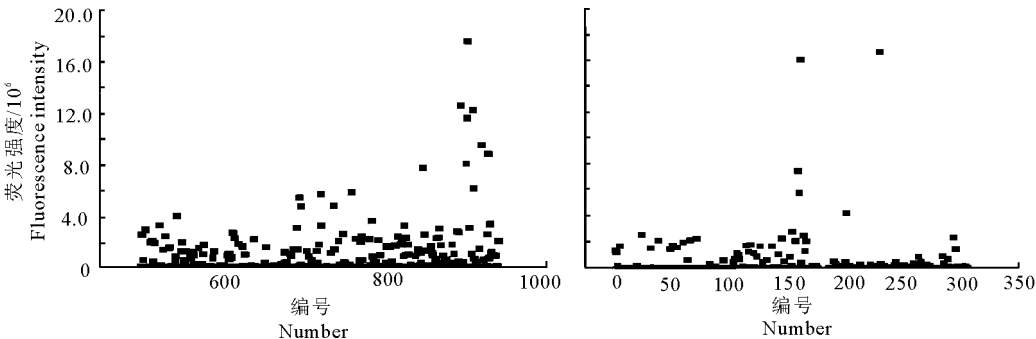


图 4 700 个转化子荧光素酶活力

Fig.4 Luciferase activity of 700 transformants

2.5 Western blot 筛选结果

选取荧光素酶活力值达到  $10^7$  以上的 6 个单克隆进行 Western blot 筛选验证,在载体中,荧光素酶基因和抗菌肽基因结合在一起,共同受一个启动子的调控。只要表达了荧光素酶的转化子理论上也会表达抗菌肽,因此可通过判断单克隆藻株是否表达荧光素酶从而将表达抗菌肽的单克隆藻株筛选出来。

Western blot 结果如图 5。荧光素酶蛋白大小为 20.33 kDa,抗菌肽大小为 5.47 kDa,2 个蛋白一起约是 25.8 kDa;内参基因 *tublin* 蛋白大小约为 50 kDa。经过和荧光素酶一抗和相应的二抗反应后,在内参 *tublin* 均有信号且信号强度近乎一致的情况下,编号为 3-231 的藻株在 26 kDa 附近出现了特异信号,而野生型 CW15 株及其他株均未有信号,表明 3-231 株成功表达了抗菌肽蛋白。

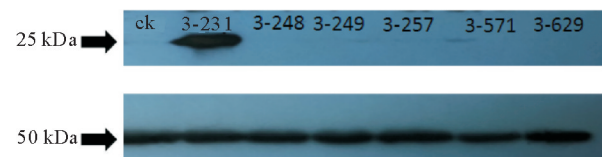


图 5 荧光素酶信号及 *tublin* 信号

Fig.5 Luciferase signal and *tublin* signal

2.6 抑菌试验结果

蛋白经过 50 kDa 和 3 kDa 的超滤管处理,能将 26 kDa 左右的蛋白浓缩,从而将目的蛋白抗菌肽的浓度提高。蛋白加入到对应的菌液中后,通过测定菌细胞的生长曲线,判断蛋白对菌细胞生长产生的影响。实验结果表明,加入含有抗菌肽的蛋白(浓度为 0.02 mg/mL)对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  有一定的抑制作用,如图 6。用 SPSS 8.01 对数据进行单因素方差分析,3 个不同处理组对大肠杆菌的生长影响具有显著性差异( $P<0.05$ )。

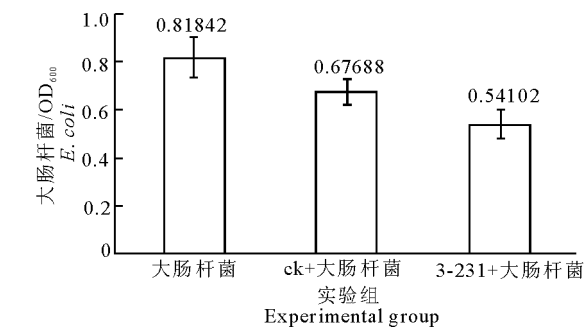


图 6 蛋白对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  生长的影响

Fig.6 Effect of different proteins on the growth of *E. coli* DH5 $\alpha$

3 讨论

目前常用于表达外源蛋白的反应器有酵母、大肠杆菌等(李荣荣等,2011;刘忠渊等,2003;孟兆丽等,2018;孙妍,2009;王改玲等,2017),这些微生物因转化效率低、无法表达结构复杂的蛋白等原因而在应用中受到限制(汪以真,2014)。莱茵衣藻作为一种真核单细胞生物,具有叶绿体和线粒体 2 种细胞器,广泛存在于各种水体中,目前已经建立了分子遗传学研究技术与遗传分析系统和细胞核、线粒体、叶绿体 3 套遗传转化系统,其外源基因表达系统将细菌和高等植物的双重优势集于一体,素有“绿色酵母”之称,是一种用作转基因生物反应器的良好材料。

在构建质粒的过程中,通常会选用一些抗性筛选基因以达到筛选的目的,如以 BLE 基因为基础构建的含有对争光霉素家族有抗性的基因,它是一种以细菌耐药性基因为基础的标记基因(Stevens et al,1996),巴龙霉素(Sizova et al,2001)和潮霉素 B(Berthold et al,2002)抗性基因现在也普遍用于各种筛选中。随后,一些合成报告基因如绿色荧光蛋白基因和荧光素酶基因也用于转化子的筛选(Fuhrmann et al,1999),荧光素酶基因可以灵敏地反应启动子活性。RBCS2 启动子是源于莱茵衣藻的一种强启动子,其带有转录增强元件,可大大提高基因的表达效率。HSP70 是一个编码热休克蛋白的基因,可被热激和光照所诱导,热激后可明显提高外源蛋白的表达水平,与 RBCS2 串联后仍能保持此特性(胡章立等,2005)。

本实验构建的载体在使用 pSAD 启动子和终止子的情况下,加入 HSP70 和 RBCS2 串联的强启动子,确保目标蛋白能在衣藻中稳定表达;另外,报告基因使用荧光素酶和巴龙霉素基因,荧光素酶基因是一种常见的报告基因,最先由 Shao(2008)等将其应用到莱茵衣藻的转化系统中,因其遇到相应的底物后可发出荧光而测定方法简单,且目前已经开发了测定荧光素酶活力的试剂盒,测定过程更加方便快捷,因此受到了许多科研人员的青睐。另外现在也研发了针对荧光素酶的商业化抗体,为荧光素酶的体外表达提供了强有力的验证工具。为此,本研究选择在抗菌肽基因前加入 1 个荧光素酶基因,与已在衣藻转化筛选中广泛应用的巴龙霉素基因结合起来,大大方便了转化株的筛选且节约了成本,为衣

藻表达系统的建立奠定了基础(Sizova et al,2001)。

将外源基因导入莱茵衣藻的方法有很多,如微粒轰击法、玻璃珠研磨法、电穿孔法、基因枪法和农杆菌感染法等。本研究选用细胞壁缺陷型的莱茵衣藻 CW15,没有细胞壁的阻碍,外源基因能更容易地进入细胞,大大提高了转化效率(Kindle,1990)。

虽然有关衣藻外源表达蛋白的方法有很多,但是使用较多的只有基因枪法和电穿孔法,这2种方法都需要特定的仪器,且效率不高。刘佳等(2019)通过电穿孔法在莱茵衣藻中表达绿色荧光蛋白,不论是野生型衣藻还是细胞壁缺陷型衣藻,获得的单克隆数均较少,仅有几十个,基因枪法更多应用于衣藻叶绿体转化,效率也欠佳,而玻璃珠研磨法能获得数百个单克隆。

本研究,通过玻璃珠转化,在1周的时间内经过巴龙霉素筛选便得到了较多数量的单克隆,表明玻璃珠转化可以很好地应用于衣藻外源表达中,同时使用荧光素酶基因作为报告基因,经试剂盒测定其活力,能够快速高效地将目标单克隆筛选出来。

Western blot 技术是蛋白筛选的最常用技术,蛋白与对应的抗体结合后发生反应,遇到显影剂后能将反应结果呈现出来,而单纯的抗体遇到显影剂则不会有任何信号,因而 Western blot 技术可以很好地将蛋白筛选出来,且准确性较高。

抗菌肽最主要的生物活性便是抑制细菌的生长,其主要作用机制是通过在细菌细胞膜上形成跨膜的离子通道,破坏细胞膜的完整性,细胞内的内容物流出,从而将细胞杀死,因此,抗菌肽的抗菌谱很广(林文静,2014)。通过抑菌试验可以很直观地呈现出抗菌肽的生物活性。本研究通过抑菌实验发现,在加入 0.02 mg/mL 表达了黑水虻抗菌肽 *sarcotoxin3* 的蛋白后,对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  便有较好的抑制作用,而对照组中细菌生长没有受到影响,可能是由于大肠杆菌 DH5 $\alpha$  是一种感受态细胞,对外界环境的刺激作用比较敏感,因而在如此低浓度蛋白情况下,依然能够对其生长产生明显的影响。

总之,本研究利用衣藻为表达宿主,高效表达了外源抗菌肽蛋白,并且获得很好的抗菌活性,而且遗传转化方法简单方便、筛选方法高效便捷,这些都为莱茵衣藻表达抗菌肽提供了有力支撑,从而有望替代传统抗生素,也为抗菌肽在水产渔业养殖中疾病控制方面的应用奠定了基础。

## 参考文献

- 丁雪,2018.鱼鳞抗菌肽制备及抗菌包装应用研究[D].杭州:浙江工商大学:1-3.
- 宫霞,乐国伟,李云飞,2005.家蝇幼虫抗菌肽的抗菌谱及其与抗生素的协同作用研究[J].微生物学报,45(4):516-520.
- 高翔,2016.miRNA 在衣藻应对三种胁迫环境过程中的作用研究[D].武汉:中国科学院水生生物研究所:53-55.
- 胡章立,王潮岗,吴锦霞,2005.增强型绿色荧光蛋白在莱茵衣藻中的高效表达[J].深圳特区科技,(00):217-222.
- 黄亚萍,2019.莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)细胞核转化体系的构建及两种外源蛋白的表达研究[D].自贡:四川轻化工大学:10.
- 焦思恺,2017.棉花幼苗叶片中谷胱甘肽转移酶响应盐胁迫的分析[D].郑州:郑州大学:25-27.
- 刘佳,何炫程,项晨,等,2019.一种高效的莱茵衣藻电转化方法[J].北京农学院学报,34(2):5-9.
- 刘立闯,胡志和,刘彤,等,2008.螺旋藻蛋白提取方法比较研究[J].食品科学,29(11):228-233.
- 刘芮均,丁涛,彭丝伦,等,2018.莱茵衣藻外源基因整合特征分析[J].四川大学学报,55(3):655-660.
- 李荣荣,和祯泉,吕英军,等,2011.鸡源抗菌肽 Fowlicidin-3 表达条件的优化及生物学特性和体内疗效研究[J].南京农业大学学报,34(2):113-118.
- 刘书东,王娟娟,陈根元,等,2011.普通 PCR 与 TD-PCR 扩增叶尔羌高原鳃抗菌肽 Hecpidin 基因的比较[J].塔里木大学学报,23(4):40-45.
- 林文静,2014.斑马鱼 hepcidin-2 抑菌活性的研究[D].青岛:中国海洋大学:1-3.
- 李镇芳,2017.串联抗菌肽 Bacteriocin LS2 在莱茵衣藻中的表达、纯化及活性研究[D].天津:天津科技大学:59.
- 刘忠渊,张富春,蔡伦,等,2003.酵母菌中表达的新疆家蚕抗菌肽(Cecropin-XJ)的特性研究[J].微生物学报,43(5):635-641.
- 马卫明,2004.猪小肠抗菌肽分离鉴定及其生物活性研究[D].北京:中国农业大学:46-48.
- 孟兆丽,丛丽娜,曾国洪,等,2018.枯草芽孢杆菌 HS-A38 高产抗菌肽突变株的筛选及其抑菌机理的研究[J].工业微生物,48(2):23-28.
- 孙妍,2009.抗菌肽 CAP18 的规模化表达及其表达产物的活性检测[D].哈尔滨:东北农业大学:3-6.
- 王改玲,王明成,李传凤,等,2017.草鱼 *NK-lysin* 基因的克隆,原核表达与活性分析[J].水产学报,41(10):1500-1511.
- 卫银丹,2013.组蛋白 H2A 衍生抗菌肽的重组表达及活性分析[D].太原:山西大学:6.

- 王亚丽, 2015. 小球藻 *Chlorella vulgaris* 转化系统的建立, 淀粉形成突变体的筛选及初步分析[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所: 15 – 16.
- 汪以真, 2014. 动物源抗菌肽的研究现状和展望[J]. 动物营养学报, 26(10): 2934 – 2941.
- Berthold P, Schmitt R, Mages W, 2002. An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Protist*, 153(4): 401 – 412.
- Elhag O, Zhou D, Song Q, et al, 2017. Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L) [J]. *PloS One*, 12(1): e0169582.
- Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P, 1999. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Journal*, 19(3): 353 – 361.
- Grossman A R, 2000. *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2): 132 – 137.
- Kindle K L, 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(3): 1228 – 1232.
- Oren Z, Shai Y, 1996. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 237(1): 303 – 310.
- Shao N, Bock R, 2008. A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Current Genetics*, 53(6): 381 – 388.
- Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P, 2001. A *Streptomyces rimosus* aph VIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Gene*, 277(1/2): 221 – 229.
- Stevens D R, Purton S, Rochaix J D, 1996. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas* [J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 251(1): 23 – 30.

(责任编辑 张俊友)

Expression of Exogenous Antimicrobial Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*

ZHAO Yan-ping<sup>1,2</sup>, LI Xiao-yan<sup>1</sup>, PENG Ting-ting<sup>1</sup>, HUANG Kai-yao<sup>1</sup>, WANG Gao-hong<sup>1,2</sup>

(1.Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072,P.R.China;  
2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049,P.R.China)

**Abstract:** Antimicrobial peptides are small peptides found widely distributed in nature. As part of the innate immune system, they provide the first line of defense against pathogens. While antimicrobial peptides have excellent potential as an antibiotic, scaling up production has limited application. *Chlamydomonas reinhardtii*, known as the “green yeast”, is a single-celled eukaryotic green algae and a good bioreactor that integrates multiple advantages. In this study, we transferred the antibacterial peptide gene *sarcotoxin3* from *Hermetia illucens* into *C. reinhardtii* cells to realize large-scale expression and production of active antibacterial peptide fragments. The objective was to lay an experimental foundation for completion of clinical testing and future aquatic production of antibacterial peptides. Using plasmid pHK85 as the lattice, the genes for luciferase gene and *Hermetia illucens* peptide *sarcotoxin3* were inserted into the plasmid, and DNA ligase was used to ligate the plasmid to form the antimicrobial peptide. The *C. reinhardtii* plasmid was cloned on glass beads and the antimicrobial peptide produced was then extracted and linearized using a restriction enzyme. Finally, luciferase activity was screened and the antibacterial activity was tested. Sequencing was used to further confirm that the plasmid was successfully constructed and the base sequence was consistent with that of the designed plasmid sequence. The plasmid concentration was 472.8 ng/ $\mu$ L and the purity ( $A_{260}/A_{280}$ ) was 1.93. After 7 days, each paromomycin plate had about 200 single clones. The fluorescence of the monoclonal luciferase was as high as  $10^6$  and, in a few cases, reached  $10^8$ . The algae strain showed a specific signal near 26 kDa, and the protein containing antibacterial peptides had an inhibitory effect on *E. coli* DH5 $\alpha$ . Our results show that *C. reinhardtii* can be used as a carrier for the exogenous expression of antimicrobial peptides, providing a possible means for mass producing antimicrobial peptides.

**Key words:** antimicrobial peptide; *Chlamydomonas reinhardtii*; gene expression; carrier