

鸡 NK-lysin 在毕赤酵母中的高效表达及活性鉴定

陈思璇, 师美玉, 涂涛, 黄火清, 罗会颖, 姚斌, 王苑*, 张红莲*

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 畜禽营养与饲养全国重点实验室, 北京

陈思璇, 师美玉, 涂涛, 黄火清, 罗会颖, 姚斌, 王苑, 张红莲. 鸡 NK-lysin 在毕赤酵母中的高效表达及活性鉴定[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3324-3336.

CHEN Sixuan, SHI Meiyu, TU Tao, HUANG Huoqing, LUO Huiying, YAO Bin, WANG Yuan, ZHANG Honglian. High-level expression and activity identification of chicken NK-lysin in *Pichia pastoris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(7): 3324-3336.

摘要: 【目的】高效表达并纯化 9 kDa 和 15 kDa 鸡 NK-lysin 重组蛋白(cNK19 和 cNK15), 评估其体外抗菌活性及免疫调节活性。【方法】将 *cNK19* 和 *cNK15* 目的基因分别克隆至 pPIC9K 载体中, 构建重组表达质粒进行异源表达。经 SDS-PAGE 分析及 Western blotting 特异性验证, 确认重组蛋白正确表达后, 通过镍亲和层析法获得高纯度的 cNK19 和 cNK15 重组蛋白。以鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 为靶标菌株, 采用平板活菌计数法(CFU 法)评估重组蛋白的体外抗菌活性; 通过 RT-qPCR 技术检测 mRNA 表达水平, 分析重组蛋白处理 HD11 鸡巨噬细胞系后相关细胞因子的转录水平变化。在 15 L 发酵罐放大培养体系中, 通过优化高密度发酵工艺实现重组蛋白的高效表达。【结果】成功构建毕赤酵母重组表达质粒 pPIC9K-*cNK19* 和 pPIC9K-*cNK15*。SDS-PAGE 及 Western blotting 验证结果显示, 培养上清中可检测到重组 cNK19 和 cNK15 蛋白的特异性条带, 证实目标蛋白已实现正确分泌表达。抑菌活性检测结果表明, 重组 cNK19 蛋白对鼠伤寒沙门氏菌及大肠埃希氏菌 O157:H7 均具有显著抗菌活性, 而重组 cNK15 蛋白对上述 2 株病原菌无明显抑制作用。RT-qPCR 结果显示, 重组 cNK15 蛋白显著上调 HD11 细胞中 CCL4、CCL20 等细胞因子的基因转录水平, 重组 cNK19 蛋白则无此免疫调节作用。此外, 在 15 L 发酵罐放大培养体系中, cNK19 和 cNK15 的异源表达量分别可达 0.64 g/L 和 0.53 g/L。【结论】本研究在毕赤酵母系统中实现了 cNK19 和 cNK15 蛋白的高效重组表达。其中, cNK19 蛋白对鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 具有抗菌活性, cNK15 蛋白能够通过上调鸡巨噬细胞 HD11 中细胞因子的 mRNA 表达水平发挥免疫调节功能。上述结果为 cNK19 和 cNK15 蛋白作为抗菌或免疫调节产品的开发提供了实验依据, 具有良好的应用前景。

关键词: 鸡 NK-lysin 基因; 重组蛋白; 毕赤酵母; 抗菌活性; 免疫调节活性

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1300701); 国家自然科学基金(32372915); 现代农业产业技术体系项目(CARS-41)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1300701), the National Natural Science Foundation of China (32372915), and the China Agriculture Research System (CARS-41).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Yuan, wangyuan08@caas.cn; ZHANG Honglian, zhanghonglian@caas.cn

Received: 2025-10-31; Accepted: 2026-02-13; Published online: 2026-03-10

High-level expression and activity identification of chicken NK-lysin in *Pichia pastoris*

CHEN Sixuan, SHI Meiyu, TU Tao, HUANG Huoqing, LUO Huiying, YAO Bin, WANG Yuan*, ZHANG Honglian*

State Key Laboratory of Animal Nutrition and Feeding, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

Abstract: [Objective] To achieve high-level expression and purification of the recombinant 9 kDa and 15 kDa chicken NK-lysin proteins (designated as cNKL9 and cNKL15) and evaluate their *in vitro* antibacterial and immunomodulatory activities. [Methods] The target genes—*cNKL9* and *cNKL15*—were individually cloned into the pPIC9K vector to construct recombinant expression plasmids for heterologous expression in *Pichia pastoris*. After confirming the correct expression of the recombinant proteins *via* SDS-PAGE and Western blotting, we used nickel affinity chromatography to obtain highly purified recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins. The *in vitro* antibacterial activities of recombinant proteins against *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 were assessed by colony forming unit (CFU) assays. We measured the mRNA levels by RT-qPCR and analyzed the transcriptional changes of relevant cytokines after applying the recombinant proteins to the chicken macrophage cell line HD11. High-level expression of the recombinant proteins was achieved in a 15 L fermenter for scale-up culture *via* optimization of the high-density fermentation process. [Results] The *P. pastoris* expression plasmids pPIC9K-*cNKL9* and pPIC9K-*cNKL15* were successfully constructed. SDS-PAGE and Western blotting results revealed specific bands of recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins in the culture supernatant, confirming the successful secretory expression of the target proteins. Antibacterial activity assay demonstrated that the recombinant cNKL9 protein exhibited significant inhibitory activities against both *S. typhimurium* and *E. coli* O157:H7, whereas the recombinant cNKL15 protein showed no obvious inhibitory effects on either pathogenic strain. RT-qPCR analysis showed that the recombinant cNKL15 protein significantly upregulated the transcription levels of cytokines such as CCL4 and CCL20 in HD11 cells, while the recombinant cNKL9 protein did not exhibit immunomodulatory activity. Furthermore, in the 15 L fermenter, the heterologous expression yields of cNKL9 and cNKL15 reached 0.64 g/L and 0.53 g/L, respectively. [Conclusion] For the first time, we achieved high-level expression of recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins in the *P. pastoris* system. Specifically, cNKL9 exhibited inhibitory activities against *S. typhimurium* and *E. coli* O157:H7, while cNKL15 exerted immunomodulatory effects by upregulating the mRNA levels of cytokines in the chicken macrophage cell line HD11. These findings provide experimental evidence for the development of cNKL9 and cNKL15 as antibacterial or immunomodulatory agents, indicating their considerable application potential.

Keywords: chicken *NK-lysin* gene; recombinant proteins; *Pichia pastoris*; antibacterial activity; immunomodulatory activity

随着畜禽养殖规模的持续扩大,动物源性病原微生物的传播风险与抗生素耐药性问题日趋严峻。在全球范围内,细菌性禽类疾病每年造成巨大的经济损失,其中由沙门氏菌、大肠埃希氏菌等革兰氏阴性菌引发的感染尤为常见^[1]。传统抗生素治疗不仅面临严格的监管限制,且随着耐药菌株的不断进化,其抗菌效果已显著下降^[2]。这促使研究者更加关注天然免疫系统,尤其是具有广谱抗菌活性且不易诱导耐药性的天然免疫蛋白^[3-4]。NK-lysin 属于鞘脂激活蛋白 saposin 样蛋白(saposin-like protein, SAPLIP)家族成员,是由自然杀伤细胞(natural killer cells, NK 细胞)和细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)分泌的关键天然免疫蛋白,成熟蛋白与穿孔素、颗粒酶一同存在于细胞毒性颗粒中^[5-7]。NK-lysin 最先从猪小肠组织中分离获得^[8],随后,研究人员在鸡脾细胞、胸腺细胞和肠上皮淋巴细胞中鉴定出 NK-lysin 的鸡同源物^[9]。

鸡 NK-lysin 基因定位于 22 号染色体远端,其表达产物主要以 2 种形式存在,即 15 kDa 前体蛋白(cNK15)和 9 kDa 成熟蛋白(cNK9)^[10]。二者结构与颗粒溶素(granulysin, GNLY)及其他物种的 NK-lysin 同源物高度相似,包含 6 个半胱氨酸形成的 3 对二硫键及 5 个 α -螺旋结构^[5,9,11-13]。目前,针对 cNK9 蛋白和 cNK15 蛋白的外源重组表达及功能鉴定的研究鲜有报道。在 cNK15 蛋白的外源表达方面,现有研究主要通过 COS7 细胞转染实现,所得重组 cNK15 蛋白未表现出明显的抗菌活性,但具有抗艾美尔球虫活性,且可通过诱导细胞因子表达对巨噬细胞发挥免疫调节作用^[14-15]。关于 cNK9 蛋白的重组表达尚未见相关报道,但有研究通过化学合成获得全长 cNK9 蛋白,证实其具备较强的抗菌活性^[16]。此外,为探究不同 α -螺旋区域的生物活性,部分研究基于蛋白结构合成了一系列短肽,发现其中某些短肽具有显著的抗菌活性、抗球虫活性或免疫调节

活性^[12,16-17]。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种操作简便、生产成本低的高效真核表达系统^[18]。其核心优势在于具有可严格调控外源蛋白表达的乙醇氧化酶(alcohol oxidase 1, AOX1)基因启动子^[19];同时,作为真核生物,毕赤酵母具备完善的翻译后修饰能力,能在内质网中高效完成糖基化、二硫键形成等关键修饰,确保重组蛋白的天然构象与生物学活性^[20]。此外,通过 α -factor 等信号肽引导,目标蛋白可分泌至培养基,并经内源 KEX2 蛋白酶切割信号肽,实现完整蛋白的分泌表达,从而大幅简化纯化步骤^[21]。该表达系统还采用甘油/甲醇两阶段培养策略,以廉价碳源支持工程菌株的高密度发酵,便于实现工业化放大生产^[22]。为高效表达 cNK9 和 cNK15 蛋白并系统比较二者的功能活性,本研究利用毕赤酵母表达系统完成了 2 种蛋白的重组表达与纯化,并对其抑菌活性及免疫调节活性进行了鉴定,同时通过发酵罐高密度培养实现了 2 种 cNK 蛋白的高效制备,为其后续生产开发与应用奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

毕赤酵母 GS115 菌株、载体 pPIC9K, Invitrogen 公司;大肠埃希氏菌 TOP10 感受态细胞, Biomed 公司;鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) CVCC541、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) O157:H7 CVCC1491, 本实验室保存菌株;HD11 鸡巨噬细胞,浙江大学占秀安教授惠赠。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物(yeast extract) 5.0, 蛋白胨(tryptone) 10.0, 氯化钠(NaCl) 10.0; 固体培养基含琼脂粉(agar) 20.0 g/L, 121 °C 灭菌 21 min。

YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白

胨 20.0, 葡萄糖(D-glucose) 20.0。固体培养基含琼脂粉 20.0, 121 °C 灭菌 21 min。

MD 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 琼脂糖 20.0, 121 °C 灭菌 21 min, 使用时加入无氨基酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acids) 13.4, 生物素(D-biotin) 4.0×10^{-4} 。

BMGY 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 丙三醇(glycerol) 10.0, 121 °C 灭菌 21 min, 使用时加入无氨基酵母氮源 13.4, 生物素 4.0×10^{-4} 。

BMMY 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 121 °C 灭菌 21 min, 使用时加入无氨基酵母氮源 13.4, 生物素 4.0×10^{-4} , 甲醇(methanol)的体积分数为 1%, 每 24 h 补加体积分数为 1% 的甲醇。

HD11 鸡巨噬细胞完全培养基: DMEM 培养基含体积分数为 10% 的胎牛血清(fetal bovine serum)和体积分数为 1% 的青霉素/链霉素(penicillin-streptomycin)。

1.3 重组质粒的构建和转化

在 GenBank 中获得 *cNKL15* 基因的氨基酸序列(序列号: NM_001044680.2), 根据毕赤酵母的密码子偏好性(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)对 *cNKL15* 基因序列进行密码子优化, 优

化后的基因序列见表 1, 通过基因合成获得 *cNKL15* 基因。对 *cNKL15* 蛋白序列及结构进行分析, 得到成熟蛋白 *cNKL9* 对应的序列(*cNKL15* N 端去除 43 个氨基酸, C 端去除 2 个氨基酸)。为便于后续目的蛋白的检测和纯化, 在 *cNKL9* 和 *cNKL15* 羧基端添加 6×His 标签。利用表 2 中 2 对特异性引物, 以 *cNKL15* 基因为模板使用 DNA 聚合酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行 PCR 扩增, 获得 *cNKL9* 和 *cNKL15* 基因片段。利用同源重组酶(北京全式金生物技术有限公司)将目的基因与 pPIC9K 载体进行同源重组, 并转化至大肠埃希氏菌 TOP10 感受态细胞, 转化产物涂布于含氨苄青霉素($100 \mu\text{g/mL}$)的 LB 固体培养基进行抗性筛选。挑取单菌落进行扩大培养, 使用质粒小提中量试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)提取重组质粒, 并送北京睿博兴科生物技术有限公司测序鉴定, 对测序正确的质粒, 进一步以载体上的 5'*AOX* 和 3'*AOX* 引物进行 PCR 扩增, 验证目的基因是否准确插入 pPIC9K 载体的 *AOX1* 位点。通过化学预处理法制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 使用 *Bgl* II 酶[宝日医生物技术(北京)有限公司]将鉴定正确的重组质粒进行线性化处理, 再通过电转化法转化毕赤酵母 GS115 感

表1 优化后的*cNKL9*和*cNKL15*基因序列

Table 1 The sequences of the optimized *cNKL9* and *cNKL15* genes

Gene names	Sequences (5'→3')
<i>cNKL9</i>	ATCAAGTGCAGATTTTGTGTTTCTTTGGTTAAGAAAGTCCAGAAAA TTGTTGGTGACGATCCAGACGAAGACGCTATCAACAACGCATTGAA CAAGGTTTGTTCCTGTTAGAAAGACAAAGATCTATTTGTAAGCAA CTTCTGAAGAAGTTGAGACAACAGTTGTCCGATGCCTTGCAGAACA ATGACGATCCTAGAGATGTTTGTACTACATTGGGTCTGTGC
<i>cNKL15</i>	TTCTCTGGCTTGACCCCTGAGCATTCTGCTCTGGCTAGAGCTCATCCT TGTGACGGCGAGCAATTTTGTGCAACTTGGCACCAGAAGACCCAC AAGGAGATCAATTACTTCAGAGAGAAGAAGTTGGTTTGATCTGTGAG TCTTGTAGAAAAATTATCCAAAAGTTGGAAGATATGGTTGGCCCTCAA CCTAATGAGGATACCGTTACTCAGGCCGCTTCTAGAGTTTGTGATAAG ATGAAGATTCTGAGAGGTGTTTGTAAAAAGATAATGAGAACCTTCTTG AGAAGAATCTCCAAGGACATCTTGACTGGTAAAAAGCCACAAGCTAT CTGTGTTGACATCAAGATCTGCAAGGAAAAGACCGGTTTGATT

表2 载体构建所用引物

Table 2 Primers used for vector construction

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>cNKL9</i> -F	GAAAAAAGAGAGGCTGAAGCTATCAAGTGCAGATTTTGTGTTTC
<i>cNKL9</i> -R	CTTAATGGTGATGATGATGATGGCACAGACCCAATGTAGTAC
<i>cNKL15</i> -F	GAAAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAACCACCTAGAGATGATCAC
<i>cNKL15</i> -R	CTTAATGGTGATGATGATGATGACCTTTCACAGACCCAATGTAGTAC
5' <i>AOX</i>	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3' <i>AOX</i>	GCAAATGGCATTCTGACATCC

受态细胞。转化产物涂布于组氨酸缺陷型 MD 固体培养基上进行筛选。

1.4 重组蛋白在毕赤酵母系统中的外源表达及纯化

1.4.1 重组蛋白在毕赤酵母系统中的外源表达

在 MD 平板上随机选取约 10 个转化子单菌落，将其接种于含 3 mL BMGY 培养基的塑料无菌试管中，30 °C、200 r/min 条件下富集培养 48 h。将菌液 4 500 r/min 离心 5 min，弃上清，用 1 mL BMMY 培养基重悬菌体，在同一培养条件下诱导蛋白表达。48 h 后，通过 SDS-PAGE 和使用抗 6×His 标签鼠单克隆抗体(北京全式金生物技术有限公司)进行 Western blotting，检测培养上清液中目标蛋白 cNKL9 和 cNKL15 的表达水平。选取表达量较高的 2 个菌株进行保种，菌液与 40% 甘油以 1:1 的比例混合保存于 EP 管中，置于-80 °C冰箱保存。

1.4.2 重组蛋白的纯化

选择表达量最高的 cNKL9 菌株和 cNKL15 菌株进行摇瓶发酵，在 30 °C、200 r/min 条件下分别使用 800 mL BMGY 培养基进行富集培养 48 h，以及 400 mL BMMY 培养基进行甲醇诱导表达 48 h。将发酵液于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，经 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜过滤后，通过镍亲和层析柱对蛋白进行纯化。层析柱预先使用含 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)、0.5 mol/L 氯化钠和 10 mmol/L 咪唑的平衡

液进行平衡，在上清液全部过柱后，使用与平衡液相同浓度的缓冲液洗涤层析柱。目标蛋白分别使用含 0.2 mol/L 咪唑和 0.3 mol/L 咪唑的缓冲液洗脱。洗脱后的蛋白装入透析袋中，依次使用含 0.50、0.35、0.15 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液(100 mmol/L Na₂HPO₄、10% 甘油)进行梯度透析以降低蛋白液的盐浓度，最后经 0.22 μm 滤器过滤灭菌后分装，置于-80 °C冰箱保存，用于后续实验。

1.5 重组蛋白的活性鉴定

1.5.1 抑菌活性检测

使用鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 检测重组蛋白 cNKL9 和 cNKL15 的抑菌活性。将鼠伤寒沙门氏菌或大肠埃希氏菌 O157:H7 保存菌株接种于 LB 无抗液体培养基中，置于 37 °C 恒温培养箱中 200 r/min 培养 12 h；第 2 天以 1% 接种量转接于 50 mL LB 无抗液体培养基中，37 °C、200 r/min 培养约 2 h 至 OD₆₀₀ 值达 0.5。将培养好的菌液用磷酸盐缓冲液(20 mmol/L Na₂HPO₄, pH 7.4)稀释 3 000 倍，使菌液浓度约为 3×10⁵ CFU/mL；cNKL9 和 cNKL15 蛋白用磷酸盐缓冲液分别稀释至 0.2、1、5 μmol/L。随后将 25 μL 菌液分别与 25 μL 不同浓度的蛋白混合，同时设置 25 μL 菌液与 25 μL 磷酸盐缓冲液为阴性对照组，25 μL 菌液与 25 μL 50 mg/mL 卡那霉素为阳性对照组(每次试验均设 3 个平行组)。将所有组别置于 37 °C 恒温培养箱中静置作用 3 h 后，用预冷的磷酸盐缓冲液将反应物稀释 100 倍，取 100 μL 涂布于 LB

无抗固体培养基上, 置于恒温培养箱中培养。菌落于固体培养基上生长约 14 h 可见明显清晰单菌落后, 对每个培养板上的单菌落进行计数统计。统计分析结果以均值 $\pm$ 标准差表示, 所有实验均重复 3 次以上。

1.5.2 免疫调节活性检测

使用 HD11 鸡巨噬细胞检测重组蛋白 cNKL9 和 cNKL15 的免疫调节活性。将 10 cm 培养皿中状态良好的细胞以 1:3 的比例接种于 12 孔细胞培养板中, 置于 37 °C 恒温培养箱 (5% CO₂) 中培养 16 h 后, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞, 加入用完全培养基稀释的 100、1 000、4 000 nmol/L 浓度的 cNKL9 和 cNKL15 蛋白, 同时设置仅含完全培养基的对照组为阴性对照。在 37 °C 恒温培养箱 (5% CO₂) 中作用细胞 6 h 后收集细胞样品, 分别使用 RNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、cDNA 合成试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)、荧光定量 PCR 试剂(北京全式金生物技术有限公司)进行 RNA 提取、反转录及 RT-qPCR, 检测 HD11 细胞中细胞因子 CCL4、CCL20、IL-1 β 、IL-8 的 mRNA 表达水平(RT-qPCR 所用引物见表 3)。统计分析结果以均值 $\pm$ 标准差表示, 所有实验均重复 3 次以上。

1.6 重组蛋白的 15 L 发酵罐放大培养工艺

选取表达良好的菌株接种于 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 将菌液转接至 600 mL YPD 培养基中继续培养 12 h。当 OD₆₀₀ 值达到 5.0–6.0 时将细胞培养物接种至含 7.5 L 基础盐培养基并添加 PTM1 溶液的 15 L 发酵罐中。初始条件设定为: 振荡速度 600 r/min, 温度 30 °C, 通过添加 28% 氨水维持 pH 5.0, 溶解氧控制在 20%–40%。当甘油耗尽导致溶解氧(dissolved oxygen, DO)快速上升时开始添加含 50% 甘油和 PTM1 溶液的补料培养基。以 18 mL/(L·h) 的甘油补料速率持续 6 h, 直至培养

表3 RT-qPCR所用引物

Table 3 Primers used for RT-qPCR

Primer names	Primer sequences (5'→3')
CCL4-F	GCTGCCCTTCAGCTTTG
CCL4-R	TCAGTTCAGTTCCATCTTGTTTCATGTA
CCL20-F	GGCTTGAGCACCAAGAGTTTG
CCL20-R	CCCTTAATGACCTTCCGAGGC
IL-1 β -F ^[23]	TGGGCATCAAGGGCTACA
IL-1 β -R ^[23]	TCGGGTTGGTTGGTGATG
IL-8-F ^[23]	GGCTTGCTAGGGGAAATGA
IL-8-R ^[23]	AGCTGACTCTGACTAGGAAACTGT
TNF- α -F	TCAGGACAGCCTATGCCAAC
TNF- α -R	CTTGGTTGCTTTGTGCCTGG
GAPDH-F ^[23]	GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT
GAPDH-R ^[23]	ACCTCTGTCATCTCTCCACA

物湿重达到约 200 g/L。随后停止甘油补料, 改用甲醇诱导蛋白质表达。同时通过循环冷却水将温度调节至 25 °C 或 30 °C, 将 pH 值调整至 5.0 或 6.0, 并通过调节转速将溶解氧控制在 20%–40%^[24]。

2 结果与分析

2.1 cNKL9 和 cNKL15 重组质粒的构建及鉴定

为在毕赤酵母表达系统重组表达 cNKL9 和 cNKL15 蛋白, 本研究构建了重组表达质粒 pPIC9K-cNKL9 和 pPIC9K-cNKL15, 其质粒图谱见图 1A。首先以 cNKL15 基因(包含 cNKL9 基因序列)为模板, 通过相应的 PCR 引物分别扩增得到目的基因片段, 其大小分别为 268 bp 和 403 bp, 与预期一致(图 1B)。随后将目的基因片段与 pPIC9K 载体进行同源重组转化, 对重组质粒进行测序验证及 PCR 扩增鉴定。结果显示, 重组质粒测序结果正确, PCR 扩增片段大小与预期相符, 表明重组质粒构建成功(图 1C)。

2.2 cNKL9 和 cNKL15 重组蛋白的表达及纯化

将构建的 cNKL9 和 cNKL15 重组质粒分别

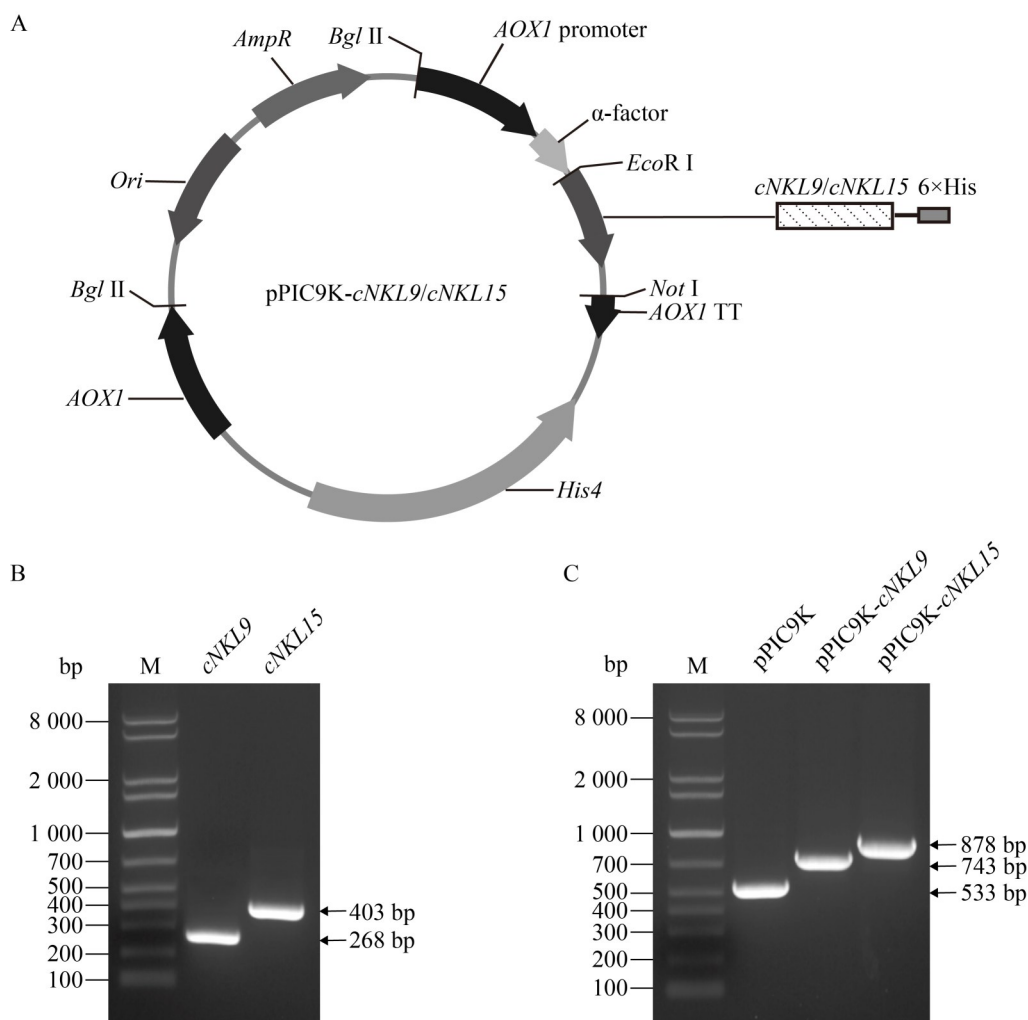


图1 pPIC9K-*cNKL9/cNKL15*表达质粒的构建

Figure 1 Construction of the pPIC9K-*cNKL9* and pPIC9K-*cNKL15* expression plasmids. A: Schematic diagram of pPIC9K-*cNKL9* and pPIC9K-*cNKL15* expression plasmids construction; B: Agarose gel electrophoresis analysis of PCR-amplified fragments of *cNKL9* and *cNKL15* genes; C: Agarose gel electrophoresis analysis for validation of recombinant plasmids pPIC9K-*cNKL9/cNKL15* construction. The recombinant plasmids were verified by PCR amplification with the 5'*AOX* and 3'*AOX* primers derived from the pPIC9K vector. Lane M: DNA marker.

转化至毕赤酵母宿主菌株 GS115, 经甲醇诱导表达后, 收集培养上清液并进行 SDS-PAGE 检测。结果显示, 转化 *cNKL9* 重组质粒的菌株培养上清液中可检测到约 9 kDa 的蛋白条带, 转化 *cNKL15* 重组质粒的菌株培养上清液中可检测到约 15 kDa 的蛋白条带(图 2A)。cNKL9 和 cNKL15 蛋白条带的分子量均略高于理论值, 推

测为目标蛋白发生了糖基化修饰所致^[22]。此外, 在 cNKL15 蛋白对应 15 kDa 条带下方还检测到一条条带, 推测为 cNKL15 蛋白部分降解所致(图 2A)。采用抗 His 标签抗体对培养上清进行 Western blotting 验证, 结果显示, 在与 cNKL9 和 cNKL15 目的蛋白分子量对应的位置均检测到特异性 His 标签条带(图 2B), 进一步证实

cNKL9 和 cNKL15 蛋白在毕赤酵母中实现了重组表达。

随后分别对表达 cNKL9 和 cNKL15 重组蛋白的培养上清进行镍离子亲和层析纯化。SDS-PAGE 检测结果显示, 纯化后的 cNKL9 重组蛋白在约 9 kDa 处呈现单一条带, 纯化后的 cNKL15 重组蛋白在约 15 kDa 处呈现一条主带,

主带下方虽仍可见一条降解条带, 但强度较弱, 蛋白纯度满足后续功能实验要求(图 2C)。

2.3 cNKL9 和 cNKL15 重组蛋白的生物活性鉴定

采用平板活菌计数法检测 2 种重组蛋白的抑菌活性, 选取鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 这 2 种常见的高耐药性革兰氏阴性

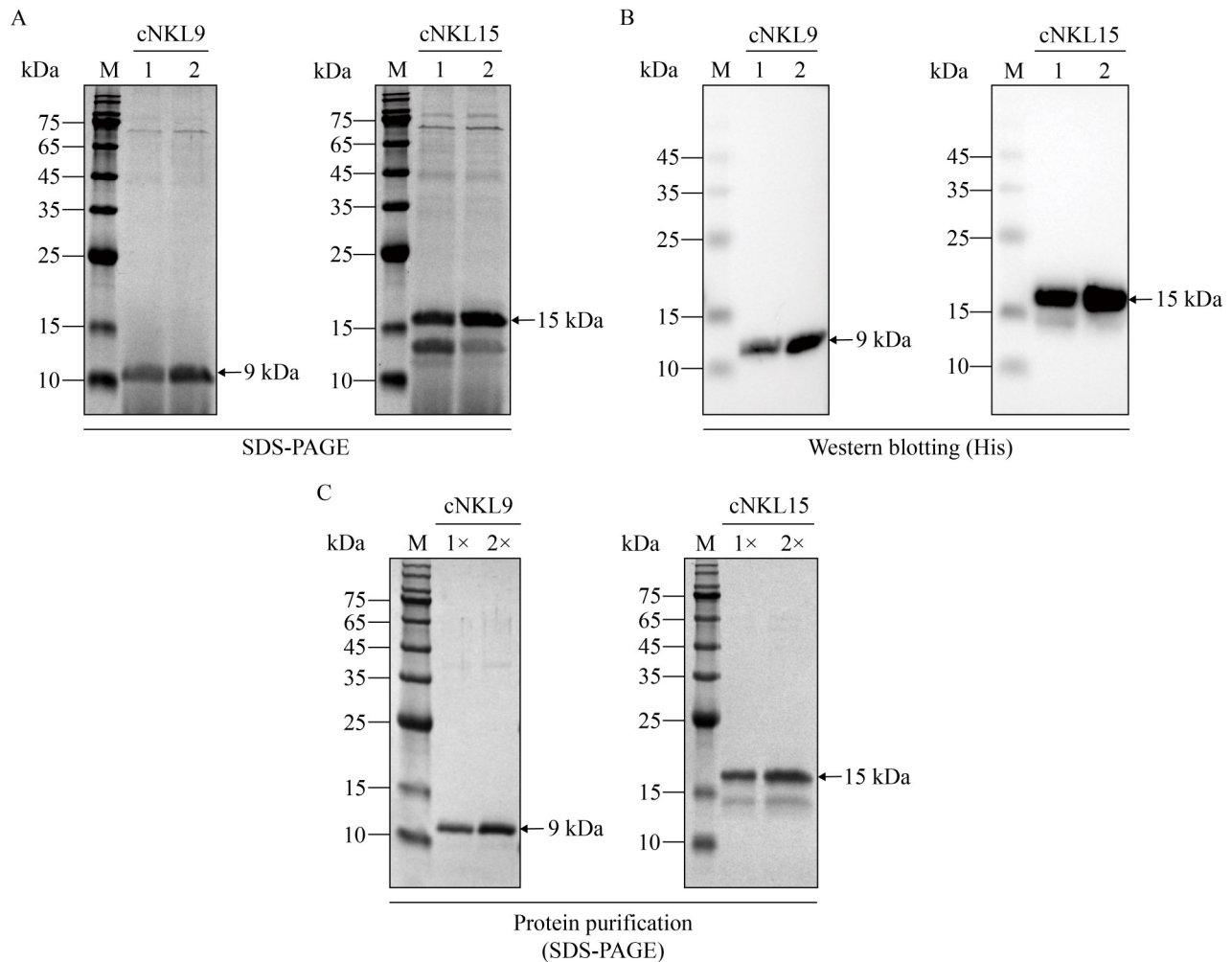


图2 重组蛋白cNKL9和cNKL15在毕赤酵母中的表达及纯化

Figure 2 Expression and purification of recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins in *Pichia pastoris*. A: SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins in the culture supernatants from two positive clones; B: Western blotting verification of recombinant proteins in the culture supernatant of two positive clones using an anti-His antibody; C: SDS-PAGE detection of purified recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins. Lanes 1–2: The culture supernatant of two transformants; Lane 1×: One volume of protein sample; Lane 2×: Two volumes of protein sample.

病原菌作为检测对象。结果显示, 重组 cNK19 蛋白在浓度低于 1 $\mu\text{mol/L}$ 时即呈剂量依赖性抑制菌落生长, 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 下均能完全抑制 2 种病原菌的生长(图 3A)。重组 cNK15 蛋白即使在 5 $\mu\text{mol/L}$ 的高浓度下, 也未表现出明显的抑菌活性(图 3A)。

为检测重组蛋白的免疫调节活性, 采用 RT-qPCR 技术检测不同浓度 cNK19 和 cNK15 重组蛋白刺激鸡源巨噬细胞 HD11 后多种细胞因子 mRNA 表达水平的变化。结果显示, cNK15 重组蛋白呈剂量依赖性显著上调细胞因子 CCL4、CCL20、IL-8 及 IL-1 β 的 mRNA 表达水平。在 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理下, 上述细胞因子的 mRNA 表达量较未处理对照组分别上升约 80、330、540、570 倍, 表明 cNK15 具有较强的免疫调节能力(图 3B)。cNK19 重组蛋白未能上调上述细胞因子的转录水平, 未表现出对 HD11 细胞的免疫调节活性(图 3B)。上述结果表明, 重组蛋白 cNK19 和 cNK15 表现出明显不同的生物活性。

2.4 cNK19 和 cNK15 重组蛋白的高密度发酵工艺优化与表达分析

为获得更高表达水平的 cNK19 和 cNK15 重组蛋白, 本研究采用 15 L 发酵罐对毕赤酵母重组表达菌株进行高密度发酵培养。经对发酵条件的系统优化, 最终确定甲醇诱导阶段的最佳参数为: 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.0。在最佳发酵条件下, 毕赤酵母重组菌株可持续增殖, 表达 cNK19 重组蛋白的菌株湿重在 72 h 后达到 287 g/L, 表达 cNK15 重组蛋白的菌株湿重在 72 h 后达到 256 g/L (图 4A)。与此同时, 2 株重组菌株发酵上清液中的粗蛋白含量自甲醇诱导后开始逐步积累, 其中 cNK19 重组菌株上清液中的粗蛋白含量从 24 h 的 0.43 g/L 增至 48 h 的 0.64 g/L, 72 h 后降至 0.25 g/L; cNK15 重组菌株的粗蛋白含量从 24 h 的 0.40 g/L 增至 48 h 的 0.53 g/L, 72 h 后降至 0.26 g/L (图 4B)。SDS-

PAGE 检测显示, 发酵上清液中的 cNK19 和 cNK15 重组蛋白在甲醇诱导后 0–48 h 内持续积累, 而在 48–72 h 期间, 目的蛋白出现明显降解, 与粗蛋白含量变化趋势一致(图 4C)。上述结果表明, 在高密度发酵条件下, cNK19 和 cNK15 重组蛋白在甲醇诱导约 48 h 时表达量达到最高水平。

3 讨论与结论

鸡源 NK-lysin 与颗粒溶素均属于 SAPLIP 蛋白家族成员, 二者氨基酸序列相似性较高(64%), 三维结构非常类似, 均具有由 3 个 loop 环连接成 5 个 α -螺旋束的特征结构^[5,9,25]。目前关于颗粒溶素的功能研究较为深入, 其 9 kDa 蛋白和 15 kDa 蛋白的功能差异也已明确。颗粒溶素 15 kDa 蛋白在抗原刺激 2–5 d 内可快速诱导表达, 且随着 9 kDa 蛋白的逐步生成, 15 kDa 蛋白的表达水平逐渐下降并趋于稳定^[26]。稳定表达的 15 kDa 蛋白主要定位于胞浆或分泌至胞外, 而成熟型 9 kDa 蛋白是 15 kDa 蛋白经酶切加工形成的产物, 与穿孔素及颗粒酶共同存在于细胞毒性颗粒中, 在接受信号刺激后通过胞吐作用释放至靶细胞内, 不仅具有广谱抗细菌、真菌及寄生虫活性, 还可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[27–29]。长期以来, 关于颗粒溶素的研究均集中于 9 kDa 蛋白, 而对 15 kDa 蛋白的关注较少, 此前普遍认为该蛋白仅作为 9 kDa 蛋白的前体发挥作用。直至 2008 年, 多项研究相继证实, 15 kDa 蛋白同样具有重要的免疫调节功能^[30–33]。尽管鸡源 NK-lysin 与颗粒溶素的三维结构高度相似, 但针对鸡源 NK-lysin 的相关研究却十分有限。因此, 对鸡源 NK-lysin 的 9 kDa 和 15 kDa 蛋白进行外源重组表达, 并深入探究二者的功能差异, 具有重要的研究价值。

目前对于鸡 NK-lysin 蛋白的异源重组表达主要集中于利用 COS7 细胞系统表达 cNK15 蛋白, 尚未见 cNK19 重组表达的相关报道^[14–15]。然而, 在 COS7 细胞中重组表达 cNK15 蛋白存

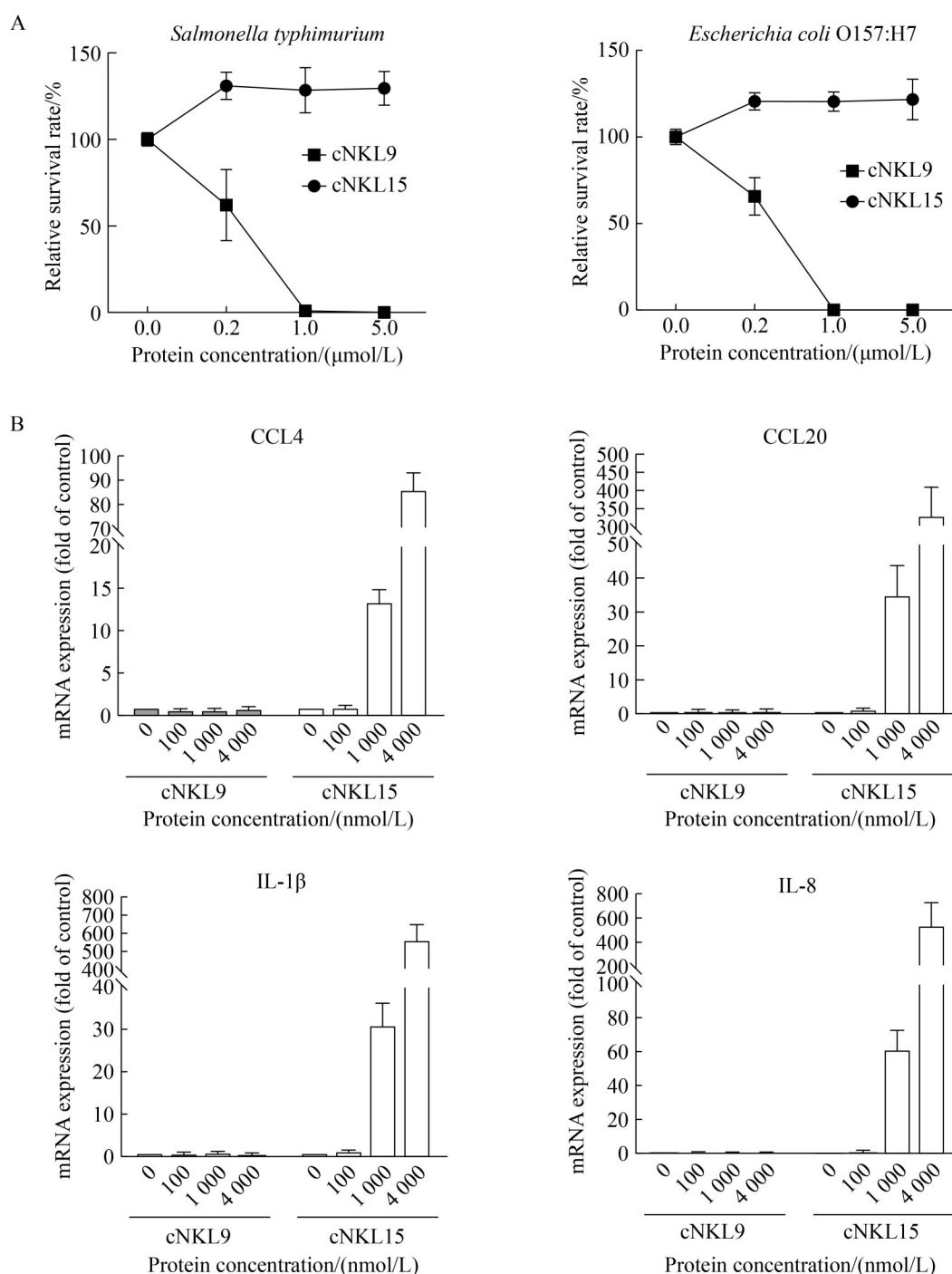


图3 cNKL9和cNKL15重组蛋白的抗菌活性及免疫调节活性

Figure 3 Antibacterial and immunomodulatory activities of recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins. A: Relative survival rates of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 treated with recombinant cNKL9 and cNKL15 proteins at different concentrations, compared with untreated control; B: mRNA expression levels of cytokines in HD11 cells treated with different concentrations of cNKL9 and cNKL15 proteins, detected by RT-qPCR. All data present the mean±SD from three independent experiments.

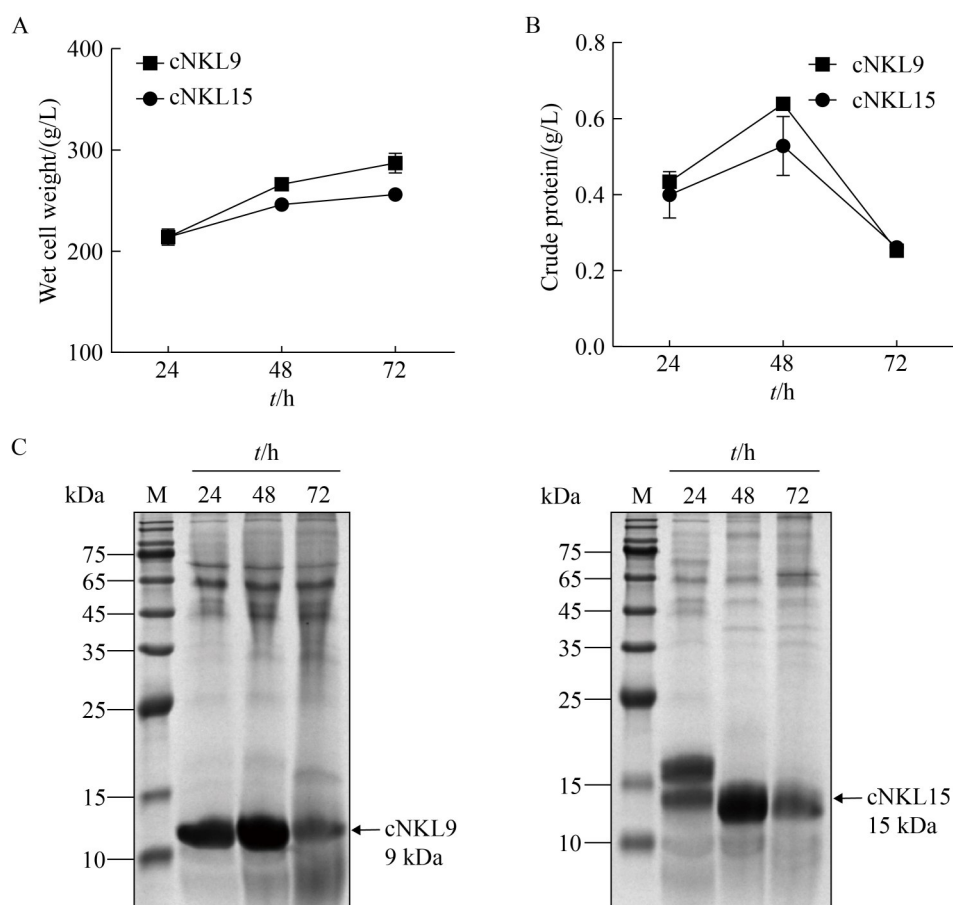


图4 毕赤酵母重组cNKL9和cNKL15蛋白菌株的高密度发酵工艺优化与表达分析

Figure 4 Optimization of high-density fermentation process and expression analysis of recombinant *Pichia pastoris* strains for cNKL9 and cNKL15 proteins. A: Changes in wet cell weight of recombinant strains during methanol induction; B: Changes in crude protein content in the high-density fermentation supernatants of recombinant strains at different induction times; C: SDS-PAGE analysis of target protein expression levels in the fermentation supernatants of recombinant strains at different induction times.

在表达量低的问题，仅能通过 Western blotting 检测到微量表达条带^[15]。本研究首次实现了 cNKL9 的异源重组表达，同时利用毕赤酵母系统成功分泌表达了 cNKL9 和 cNKL15 蛋白，并通过优化发酵条件实现了 2 种蛋白的高效表达，表达量分别达到约 0.64 g/L 和 0.53 g/L。此外，由于重组蛋白成功分泌至发酵上清，后续纯化步骤十分便捷，该表达体系的建立为 cNKL9 和 cNKL15 重组蛋白的后续应用研究奠定了良好基础。同时，在 15 L 发酵罐中进行放大发酵时发

现，cNKL9 和 cNKL15 重组蛋白在发酵 72 h 时表达量均出现下降，尤其是 cNKL15 蛋白在发酵 48 h 时即出现降解现象。其原因可能是发酵上清中积累的蛋白酶对目的蛋白产生了降解作用，后续仍需进一步优化发酵工艺条件，或采用蛋白酶缺陷型宿主菌株进行发酵。

本研究通过对 *cNKL9* 和 *cNKL15* 的基因序列进行毕赤酵母偏好性密码子优化，成功实现了 cNKL9 和 cNKL15 蛋白在毕赤酵母中的重组分泌表达。获得的重组 cNKL9 蛋白对鼠伤寒沙

门氏菌等革兰氏阴性菌具有显著抗菌活性, 但未能上调 HD11 细胞中 CCL20 等细胞因子的转录表达水平; 重组 cNK15 蛋白则恰好相反, 对革兰氏阴性菌未表现出明显抗菌活性, 但可显著上调 HD11 细胞中 CCL20 等细胞因子的转录表达水平, 展现出与哺乳动物细胞表达体系产物一致的功能活性^[14-15]。上述结果表明, cNK19 和 cNK15 蛋白在机体免疫系统中可能承担不同的功能。此外, cNK19 和 cNK15 蛋白均可通过高密度发酵实现高水平表达, 在优化条件下表达量分别达到约 0.64 g/L 和 0.53 g/L。因此, 在未来研究中可进一步挖掘 cNK19 和 cNK15 蛋白的潜在功能, 二者有望开发为新型抗生素替代产品或免疫调节产品, 应用于畜禽养殖领域, 对提高动物抗病能力、改善畜禽生长性能、推动绿色健康养殖发展具有重要的应用前景。

作者贡献声明

陈思璇: 实验操作, 数据收集和处理, 论文撰写和修改; 师美玉, 实验操作; 涂涛: 实验技术指导; 黄火清: 实验技术指导; 罗会颖: 研究构思和设计; 姚斌: 研究构思和设计; 王苑: 论文写作指导与修改; 张红莲: 实验设计, 论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Mak PHW, Rehman MA, Kiarie EG, Topp E, Diarra MS. Production systems and important antimicrobial resistant-pathogenic bacteria in poultry: a review[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2022, 13: 148.
- [2] Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, Polachek AJ, Ganshorn H, Sharma N, Kellner JD, Ghali WA. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Planetary Health, 2017, 1(8): e316-e327.
- [3] Nagib M, Sayed AM, Korany AH, Abdelkader K, Shari FH, MacKay WG, Rateb ME. Human defensins: structure, function, and potential as therapeutic antimicrobial agents with highlights against SARS CoV-2[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2025, 17(3): 1563-1583.
- [4] Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 194.
- [5] Linde CMA, Grundström S, Nordling E, Refai E, Brennan PJ, Andersson M. Conserved structure and function in the granulysin and NK-lysin peptide family[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(10): 6332-6339.
- [6] Wang GL, Wang MC, Liu YL, Zhang Q, Li CF, Liu PT, Li EZ, Nie P, Xie HX. Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 11-21.
- [7] Dassanayake RP, Wherry TLT, Falkenberg SM, Reinhardt TA, Casas E, Stabel JR. Bovine NK-lysin-derived peptides have bactericidal effects against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*[J]. Veterinary Research, 2021, 52: 11.
- [8] Bruhn O, Grötzinger J, Cascorbi I, Jung S. Antimicrobial peptides and proteins of the horse-insights into a well-armed organism[J]. Veterinary Research, 2011, 42(1): 98.
- [9] Hong YH, Lillehoj HS, Dalloul RA, Min W, Miska KB, Tuo WB, Lee SH, Han JY, Lillehoj EP. Molecular cloning and characterization of chicken NK-lysin[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 110(3/4): 339-347.
- [10] Lee MO, Yang EC, Morisson M, Vignal A, Huang YZ, Cheng HH, Muir WM, Lamont SJ, Lillehoj HS, Lee SH, Womack JE. Mapping and genotypic analysis of the NK-lysin gene in chicken[J]. Genetics Selection Evolution, 2014, 46: 43.
- [11] Lee MO, Kim EH, Jang HJ, Park MN, Woo HJ, Han JY, Womack JE. Effects of a single nucleotide polymorphism in the chicken NK-lysin gene on antimicrobial activity and cytotoxicity of cancer cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(30): 12087-12092.
- [12] Kim WH, Lillehoj HS, Min W. Evaluation of the immunomodulatory activity of the chicken NK-lysin-derived peptide cNK-2[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45099.
- [13] Soler-Agosta R, Guerrero-Ochoa P, Marco-Brualla J, Ibáñez-Pérez R, Marzo I, Martínez-Lostao L, Anel A. Conjugation of the 9-kDa isoform of granulysin with liposomes potentiates its cytotoxicity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8705.
- [14] Hong YH, Lillehoj HS, Siragusa GR, Bannerman DD, Lillehoj EP. Antimicrobial activity of chicken NK-lysin against *Eimeria sporozoites*[J]. Avian Diseases, 2008, 52(2): 302-305.
- [15] Kim WH, Min W, Park KI, Lillehoj HS, Fernandez-Colorado CP, Flores RA, Cammayo PLT, Nguyen BT. Expression of chicken NK-lysin and its role in chicken

- coccidiosis induced by *Eimeria necatrix*[J]. The Korean Journal of Parasitology, 2021, 59(5): 439-445.
- [16] Lee MO, Jang HJ, Han JY, Womack JE. Chicken NK-lysin is an alpha-helical cationic peptide that exerts its antibacterial activity through damage of bacterial cell membranes[J]. Poultry Science, 2014, 93(4): 864-870.
- [17] Lee SH, Lillehoj HS, Tuo WB, Murphy CA, Hong YH, Lillehoj EP. Parasitocidal activity of a novel synthetic peptide from the core α -helical region of NK-lysin[J]. Veterinary Parasitology, 2013, 197(1/2): 113-121.
- [18] Pan YJ, Yang J, Wu JP, Yang LR, Fang H. Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1059777.
- [19] Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, Johnson SN, Hyka P, Lin-Cereghino GP, Lin-Cereghino J, Kovar K, Cregg JM, Glieder A. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(12): e76.
- [20] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5301-5317.
- [21] Huang YD, Long YY, Li SH, Lin T, Wu JW, Zhang YF, Lin Y. Investigation on the processing and improving the cleavage efficiency of furin cleavage sites in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17: 172.
- [22] Guo YG, Luan G, Shen GD, Wu LD, Jia H, Zhong YJ, Li R, Li GW, Shen Y, Sun J, Hu SY, Xiao WH. Production and characterization of recombinant 9 and 15 kDa granulysin by fed-batch fermentation in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17): 7669-7677.
- [23] Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 114(3/4): 209-223.
- [24] Lu ZQ, Liu N, Huang HQ, Wang Y, Tu T, Qin X, Wang XL, Zhang J, Su XY, Tian J, Bai YG, Luo HY, Yao B, Zhang HL. Recombinant expression of IGF-1 and LR3 IGF-1 fused with xylanase in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(14): 4543-4551.
- [25] Bruhn H. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins[J]. Biochemical Journal, 2005, 389(2): 249-257.
- [26] Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U. Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes[J]. BMC Immunology, 2007, 8: 9.
- [27] Clayberger C, Finn MW, Wang TH, Saini R, Wilson C, Barr VA, Sabatino M, Castiello L, Stroncek D, Krensky AM. 15 kDa granulysin causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity[J]. The Journal of Immunology, 2012, 188(12): 6119-6126.
- [28] Krensky AM, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin[J]. Tissue Antigens, 2009, 73(3): 193-198.
- [29] Dotiwala F, Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes[J]. Current Opinion in Immunology, 2019, 60: 19-29.
- [30] Chung WH, Hung SI, Yang JY, Su SC, Huang SP, Wei CY, Chin SW, Chiou CC, Chu SC, Ho HC, Yang CH, Lu CF, Wu JY, Liao YD, Chen YT. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis[J]. Nature Medicine, 2008, 14(12): 1343-1350.
- [31] Sparrow E, Bodman-Smith MD. Granulysin: the attractive side of a natural born killer[J]. Immunology Letters, 2020, 217: 126-132.
- [32] Tewary P, Yang D, de la Rosa G, Li YN, Finn MW, Krensky AM, Clayberger C, Oppenheim JJ. Granulysin activates antigen-presenting cells through TLR4 and acts as an immune alarmin[J]. Blood, 2010, 116(18): 3465-3474.
- [33] Sparrow EL, Fowler DW, Fenn J, Caron J, Copier J, Dalgleish AG, Bodman-Smith MD. The cytotoxic molecule granulysin is capable of inducing either chemotaxis or fugetaxis in dendritic cells depending on maturation: a role for $V\delta 2^+ \gamma \delta$ T cells in the modulation of immune response to tumour[J]. Immunology, 2020, 161(3): 245-258.