

文章编号:1008-1542(2019)05-0454-07

微生物源抗菌肽表达系统研究进展及改造策略

徐珂¹, 张丽萍², 张园园¹, 刘俊果¹

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北省科学院生物研究所, 河北石家庄 050081)

摘要:针对抗菌肽的生物活性、重组表达系统以及分子改造设计进行了回顾总结,提出了抗菌肽研究及技术开发领域目前存在的问题,包括抗菌活性较弱、生物合成效率不高、选择性差等。同时提出分子改造是提高抗菌活性和选择性的有效策略,而优化重组表达系统是提高生物合成效率的关键途径。认为针对抗菌肽的研究和开发,一方面会深化人类对于抗菌肽的结构与抗菌性、选择性、毒性关系的认识,深化对重组表达系统关键步骤及调控机理的认识,具有显著的科学意义;另一方面,由于抗菌肽独特的抗菌机制,不易产生耐药性,对抗菌肽的研发将会大大推动其在药品、食品、化妆品、饲料等领域的应用。

关键词:蛋白质工程;抗菌肽;生物活性;表达系统;重组表达;分子改造

中图分类号:Q816 文献标志码:A doi:10.7535/hbkd.2019yx05011

Advances in microbial antimicrobial peptides expression system and transformation strategy

XU Ke¹, ZHANG Liping², ZHANG Yuanyuan¹, LIU Junguo¹

(1. School of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081, China)

Abstract: In this paper, a review on antimicrobial peptides, including the bioactivity, recombinant expression system and molecular transformation strategy, is provided. The main problems in the fields of antimicrobial peptides are put out, including low antibacterial activity, small productivity, and weak selectivity. It is considered that molecular structure modification is a valid strategy to enhance its antibacterial activity and selectivity. Optimization of recombinant expression system would be the key way to improve productivity. On one hand, the research and development on antibacterial peptides will strengthen the knowledge on the relationship between structure and function, including selectivity, antibacterial activity and toxicity, and the regulation strategies on gene expression system, both of which show significant scientific importance. On the other hand,

收稿日期:2019-01-06;修回日期:2019-09-03;责任编辑:王海云

基金项目:河北省科技计划项目(17222906D);河北省科学院重点项目(18310)

第一作者简介:徐珂(1992—),男,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事发酵工程与微生物应用方面的研究。

通信作者:刘俊果副教授。E-mail:1308676013@qq.com

徐珂,张丽萍,张园园,等.微生物源抗菌肽表达系统研究进展及改造策略[J].河北科技大学学报,2019,40(5):454-460.

XU Ke, ZHANG Liping, ZHANG Yuanyuan, et al. Advances in microbial antimicrobial peptides expression system and transformation strategy[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(5): 454-460.

antimicrobial peptides seldom shows drug resistance because of its antibacterial mechanism, and the research and development on antibacterial peptides will promote greatly its application in the fields of food, pharmaceuticals, cosmetics, and feed industry, etc.

Keywords: protein engineering; antimicrobial peptides; biological activity; expression system; recombinant expression; molecular transformation

抗生素依赖于单一酶参与的代谢调控途径,容易使细菌产生耐药性,长期服用会引起机体产生严重的抗药性^[1]。抗菌肽(antimicrobial peptides, AMP)作为生物合成的先天免疫成分,凭借其种类多样、安全无害而被认为是传统抗生素的替代品^[2],具有热稳定性、耐受性、pH 值稳定性、消化酶稳定性等生物学特性。抗菌肽是一类携带正电荷、具有广谱抗菌能力且不易产生抗药性的小分子多肽类物质^[3],大部分抗菌肽分子质量小,由 12~50 个氨基酸残基组成,具有两亲性特征^[4],部分抗菌肽具有靶向性。抗菌肽在自然界中分布广泛,原核和脊椎动物体内都有发现^[5],同时在线数据库(<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)共记录有 2 971 种抗菌肽,主要来源于动植物、细菌、真菌、古细菌和原生生物,按其结构特性进行分类,主要有 α -螺旋类、 β -折叠类、片层结构类和环状结构类抗菌肽^[6]。

目前,获得抗菌肽的方法主要有直接提取法、化学合成法以及基因工程法。从生物体内直接分离、纯化得到的抗菌肽浓度低,操作程序复杂,成本高,工艺流程中的强酸、强碱和有机溶剂会产生较大的污染。而化学合成法不仅成本高、耗时长,合成目标肽的结构和生物活性也得不到保证。基因工程法已经成为获取抗菌肽的主要途径之一,除少数采用动植物表达系统外,其余大部分均采用细菌和酵母表达系统。研究能够高效表达、并且对宿主无抑制作用的微生物表达系统及其改造成为近年来抗菌肽领域的重点。本文对不同微生物来源的抗菌肽及其生物活性、靶向性、重组表达系统、分子改造设计的研究进行综述,以为今后抗菌肽的研究提供理论基础。

1 抗菌肽的生物活性及靶向性

抗菌肽的抗菌机制主要是其自身结构与细菌细胞膜上的离子产生静电作用,通过相互吸引与细菌细胞膜结合,抗菌肽转化为二级结构,平行或垂直于细胞膜,再通过毯式模型(Carpet model)、桶板模型(Barrel-stave model)或环形孔洞模型(Torodial pore model)穿透细胞膜(见图 1),形成的这种离子通道使膜内的大量内容物外流,从而发挥抑菌作用。除此之外,抗菌肽还具有抵抗真菌和病毒的活性,对肿瘤细胞、原生物和寄生虫均有杀伤破坏能力,同时具有抗内毒素、促进伤口愈合等免疫调节活性。

尽管抗菌肽优点众多,但自身的一些特性仍然限制了其应用的范围。抗菌肽具有一定的溶血性,在高浓度的环境中,阳离子抗菌肽会与带有负电荷的细菌细胞膜产生接触。在动物细胞环境中,抗菌肽能够损伤哺乳动物细胞,造成细胞自溶。高浓度的抗菌肽对宿主细胞会产生抑制作用^[7],靶性抗菌肽的能够克服对普通菌群包含宿主细胞的抑制或杀伤作用,对目标细菌的治疗更具高效性。革兰氏阴性菌的脂多糖(LPS)是细菌外壁层中特有的一种化学物质,是细菌内毒素的主要成分,是一类重要的信号分子。FRECER 等^[8]设计并合成了针对 LPS 的抗菌肽,属于环状阳离子多肽,对 LPS 和 LA 均有辨识能力;多肽含有相同的两亲性序列,能够与 LPS 或 LA 结合,在 Cys1—Cys19 之间形成二硫键以及 β -发夹结构;LPS-targeted 及其拟肽对革兰氏阴性菌有很好的选择性作用。CHOU 等^[9]设计的抗菌肽 GW-Q4, GW-Q6 和 GW-H1 抑菌活性明显高于天然抗菌肽 magainin 2a 与 pleurocadin,人工设计合成的抗菌肽所具有的螺旋结构能够特异识别 *Vibrio* spp,为海洋病原菌提供了一类新的靶向药物。

2 微生物源抗菌肽的重组表达系统

2.1 原核重组表达系统

原核表达系统是最早采用的表达系统。原核生物具有诸多优点,能够高效地将克隆载体转化细菌进行

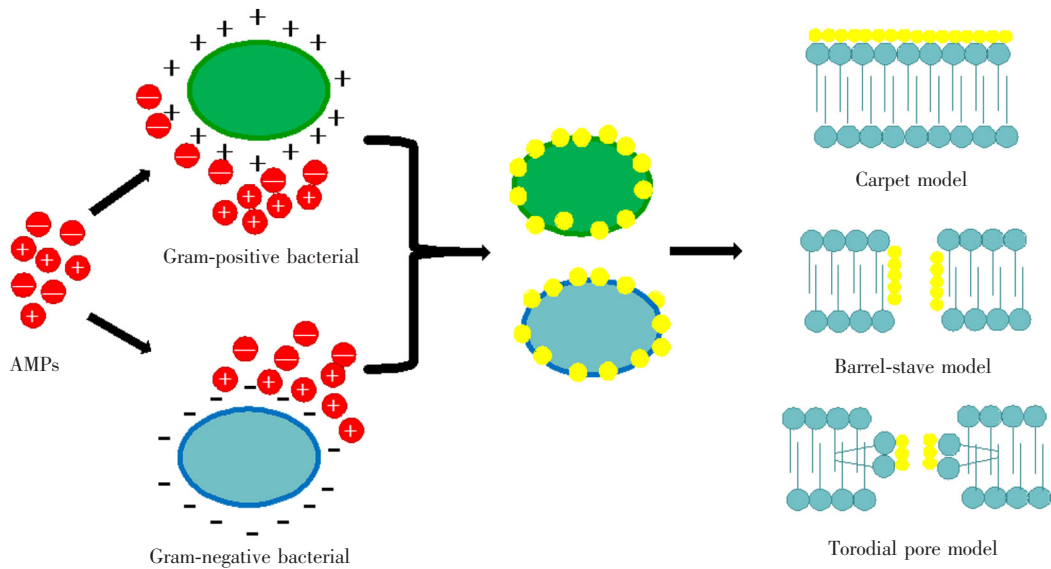


图1 抗菌肽的抗菌机制

Fig.1 Antibacterial mechanism of antimicrobial peptides

诱导表达,进而纯化获得目的蛋白。宿主菌主要有大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),常用的表达载体有 pET, pTrc, pLex, pGEX, pQE 等。

2.1.1 大肠杆菌表达系统

大肠杆菌表达系统是目前最成熟的抗菌肽表达系统^[10]。该系统在表达过程中具有一定的难度,大肠杆菌作为原核生物表达时容易形成包涵体,影响后期的分离和纯化,需要进行复性处理,系统也缺乏翻译后的加工修饰系统。宿主细胞表达的抗菌肽产物会反馈抑制宿主细胞的增殖,从而影响到系统的表达量。大肠杆菌表达多为阳离子肽,本身具有大量的正电荷,对蛋白酶较敏感易造成酶解,而降低表达量,因此抗菌肽通常以融合蛋白的方式进行表达,且具有生物活性^[11]。

分子伴侣作为纯化标签可以减少包涵体的形成,同时促进目标蛋白的可溶性表达。这些标签蛋白有谷胱甘肽转移酶(GST)^[12]、麦芽糖结合蛋白(MBP)^[13]、绿色荧光蛋白(GFP)^[14]、小泛素相关修饰物(SUMO)^[15]和硫氧化还原蛋白(Trx)^[16]。GST 标签相对分子质量为 26 kD^[17],可促进融合蛋白的可溶性表达,若目标蛋白为非水溶性蛋白,需先变性溶解后才能用 GST 亲和柱纯化。MBP 标签相对分子质量为 40 kD^[16],使用时先用交联淀粉亲和层纯化,再用专一性蛋白酶切割融合蛋白。GFP 标签相对分子质量为 2.6 kD,当 GFP 表达温度高于 30 °C 时,就能形成大量包涵体,因此可用来生产包涵体或融合蛋白表达的小分子蛋白标签^[18]。SUMO 标签相对分子质量为 12 kD,由于其分子质量小,因而有利于保留抗菌肽的天然活性,增加目标蛋白在融合蛋白中的比例,是一种新型的标签蛋白。除了上述标签蛋白被报道使用之外, NUSA (55 kD)、ubiquitin(UB, 8 kD)等标签蛋白也被用于大肠杆菌系统的表达中。研究中发现一部分分子伴侣可以促进包涵体的形成,这些蛋白标签主要包括 PurF 片段(16.3 kD)、PaP3.30(17.6 kD)和 TAF12 组蛋白折叠结构域(8.4 kD)等。形成的包涵体能够保护融合表达的抗菌肽,防止被降解而且可以进行快速纯化。

分子质量小的抗菌肽增加了分离、纯化和检测的难度,串联表达不仅适用于真核表达系统,还可弥补原核表达系统对目标蛋白回收率低的不足,获得的重组蛋白通过切割仍具有抑菌活性。如按密码子使用频率对抗菌肽 Spinosan-C 进行优化,设计合成 8 拷贝的串联 8 × Spinosan-C 基因,转化到大肠杆菌表达载体 pET-28a 中进行克隆,再在 Rosetta 中进行原核表达,获得重组蛋白,切割获得的单体仍能抑制枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的生长^[19]。

2.1.2 枯草芽孢杆菌表达系统

枯草芽孢杆菌是一种表达稳定、生产成本低、无污染、在工业酶和饲用酶工业发酵中应用广泛、具有良好前景的基因工程受体菌。目前 *B. Subtilis*168 基因组已经完成测序,相关基因组被发表,这为枯草芽孢杆菌

菌株改造和工程菌的构建提供了极大的帮助。与大肠杆菌表达系统相比,该系统具有较强的蛋白分泌能力,可直接分泌到细胞体外,有利于收集、分离和纯化目标蛋白,大大降低了成本。如抗菌肽 Fowlicidin-3 在枯草芽孢杆菌中高效表达,抑菌实验表明 6 种临床分离菌株的 MIC 值为 11~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[20]。但枯草芽孢杆菌在培养过程中会分泌降解活性很强的蛋白酶,从而降低表达产物的稳定性,获得的重组蛋白量小于大肠杆菌表达系统,适用的载体数量也少于大肠杆菌表达系统。目前,该系统主要用来防护和治疗植物病害,对人类和动物疾病的应用较少。

2.1.3 蓝藻表达系统

蓝藻的遗传背景简单,对生长环境要求低,人工培育时对培养基的污染小,适合规模化生产,是一种具有微生物和植物优点的基因工程的受体。应用的表达宿主主要有鱼腥藻、集胞藻、聚球藻和点形念珠藻。其中 hSM-CSF 造血刺激因子是最早在蓝藻系统中成功表达的外源蛋白。与大肠杆菌表达系统相比,蓝藻表达系统不含内毒素,不容易产出包涵体,便于纯化。蓝藻的优势明显,可能成为比大肠杆菌与酵母等宿主更理想的表达系统^[21]。

2.2 真核重组表达系统

真核表达系统主要有毕赤酵母表达系统与酿酒酵母表达系统两大成熟系统,以及目前处于热门的莱茵衣藻表达系统。酵母作为真核表达系统的主要宿主菌,包括毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)等,表达载体有 pPIC9K, pPIC3.5, pGAPZa, pPICZa 等。酵母表达系统得益于酵母单细胞真菌的特性,具有繁殖速度快、基因组小的特点,表达产物能够糖基化、分泌表达,并且表达量高,可弥补原核系统不能进行蛋白折叠和翻译后修饰的不足,使获得的目标蛋白更容易纯化,操作简单,生产成本低,适用于大批量发酵工艺,是一种具有商业价值的真核表达系统。

2.2.1 毕赤酵母表达系统

外源性 DNA 通过同源重组可直接整合到毕赤酵母基因组以获得稳定遗传的菌株^[22],不仅拥有高效表达的启动子,还能将表达的目标蛋白分泌到胞外,便于后续的分选纯化^[23],并且具有产量高和遗传稳定的特点,至今有 500 多种外源蛋白在该系统中获得高效表达。如利用毕赤酵母密码子的偏爱性,人工合成多聚阳离子抗菌肽与多聚阴离子抗菌肽的 DNA 序列,并将其克隆到 pPIC9 表达载体上,将表达质粒 pPIC9-PCAP 在 GS115 中,利用 0.5% (体积分数)的甲醇进行诱导表达多聚阳离子抗菌肽(poly-cationic antibacterial peptide, PCAP)^[24]。但甲醇易爆、有一定毒性,在用甲醇做诱导剂时存在危险性。与原核表达系统相比,毕赤酵母自身含有过氧化物酶,不会随着表达目标蛋白的增加而对自身产生毒害作用。如 HD5 α 对原核宿主菌有毒害作用,而在毕赤酵母中可高效表达^[25]。与酿酒酵母表达系统相比,毕赤酵母表达的外源蛋白不易过度糖基化,抗原性相对较弱,更适合临床应用。

2.2.2 酿酒酵母表达系统

酿酒酵母表达系统已有 30 多年的研究历史,不仅具有真核重组表达系统的优点,还是一种安全、无污染、能使用强启动子获得高表达量的真核表达系统。真核表达质粒 M-pYES2- α -LfcinB 在酿酒酵母宿主菌 INVSc1 中的高效表达,为葡萄糖抑制效应提供了实验基础。但酿酒酵母在发酵过程中产生乙醇,会影响菌群数量,使目标蛋白产量下降^[26],且表达质粒不稳定、外源蛋白易于过度糖基化、分子质量大的外源蛋白表达效率低、信号肽加工不完全等,这些都限制了其规模化生产。

2.2.3 莱茵衣藻表达系统

莱茵衣藻作为一种单细胞、带有鞭毛的真核生物,其生长周期短、生长迅速,并且培养条件简单、光合效率高,有着“光合酵母”之称。其生物学特性是可以短时间内获得大量遗传稳定的转基因后代,并为遗传学分析提供便利条件。目前多采用表达基因串联得到重组质粒,进行异源表达,且表达量占据细胞蛋白总量的 0.31%。与酿酒酵母和毕赤酵母相比,莱茵衣藻表达稳定,如 MytichA 在 pBluescript II SK+ 上进行三片段串联后构建的载体在细胞内高效稳定表达,这一结果为抗菌肽的获取以及具有抗菌活性的饵料藻的生产和

应用提供了新途径^[27]。

3 抗菌肽的分子改造设计

3.1 替换氨基酸残基

替换氨基酸残基是一种高效、简单的分子改造设计方法,在保证原有天然抗菌肽结果的基础上,对某些位置的氨基酸进行替换,从而改变其理化性质和空间结构,可获得活性较高的新型抗菌肽衍生物^[28]。增加抗菌肽母肽序列中色氨酸(Trp)的比例,可提高其抗 G^- 的活性^[29-30]。将天然抗菌肽 chensinin-1 序列中的甘氨酸(Gly)替换成 Trp,即为突变体 MC1-1。研究发现,MC1-1 对部分菌种的 MIC 值明显下降,突变体 MC1-3 在 MC1-1 基础上将组氨酸(His)替换成精氨酸(Arg),其 MIC 值高于 MC1-1^[31]。对抗菌肽多肽链上的氨基酸进行替换,有利于揭示结构和抑菌活性间的关系,为进一步阐明抗菌机理提供指导。

3.2 截取短序列抗菌肽

有些天然抗菌肽氨基酸分子质量较大、数量多、成分复杂,影响后期的分离、纯化和生产。对这些抗菌肽的结构和活性进行分析后发现,截取多肽链某一部分后,其抗菌活性并没有降低,若只生产具有抗菌活性的多肽分子,不仅降低成本,也便于生产、提高产量。截取抗菌肽 PMAP-36 N 端 16 个氨基酸残基后仍具有完美的两亲性。两亲性是衡量抗菌肽活性的重要参数之一,完美的两亲性对抗菌肽的活性有促进作用,但细胞毒性也会相应增加。抗菌肽的分子改造要综合多个因素,才能在原有基础上研制出优良的抗菌肽^[32]。

3.3 改变短肽的结构参数

抗菌肽的电荷量和亲、疏水性等理化参数对抗菌活性具有重要的调节作用。在一定范围内,增加抗菌肽携带的正电荷量,有利于增强抗菌肽的抗菌活性,但携带的正电荷过多会导致抗菌肽与磷脂头部结合过牢,使其穿膜效率下降,抗菌肽的抗菌活性也随之减弱。此外,疏水性和亲水性的比例也影响抗菌肽的生物活性。疏水性过低,导致抗菌肽的脂亲和能力下降,使得短肽远离疏水性的细胞膜;疏水性过高会使细胞毒性增强,并引起短肽自身发生聚合效应,也会使抗菌活性下降。因此,要适当增加抗菌肽的疏水性。在抗菌肽 LGR16 多肽链的亲水面设计 Arg,疏水面设计亮氨酸(Leu)和缬氨酸(Val),有助于降低其溶血活性^[33]。对抗菌肽 V13KL 序列亲、疏水性与抗菌活性关系的研究发现,用疏水值高的 Leu 替换或减少疏水值低的丙氨酸(Ala)的比例,均可增加多肽链的疏水性,但疏水性越高,抗菌肽的溶血性也越高,因此要保持适当疏水值,才能更好地利用抗菌肽的抗菌活性^[34]。

3.4 合成杂合肽

对不同抗菌肽的功能区域和抗菌活性的研究发现,截取 2 种或 2 种以上抗菌肽的功能区域,然后进行拼接,得到的新型杂合抗菌肽具有多种抗菌肽的优点,且毒性小,抗菌活性高。如:抗菌肽 Cecropin A 的第 1~8 个氨基酸和 Magainin2 的第 1~12 个氨基酸进行拼接后,不仅增加了表达的稳定性,杂合肽的抗菌活性也得到了提高^[35]。将 Cecropin A 和 Cecropin B 的第 1~7 个氨基酸分别与 Melittin 的第 4~11 个氨基酸拼接得到 CAM 和 CBM,这两种不同的杂合肽不仅具有原抗菌肽的特征,同时溶血活性也变弱了^[36]。将抗菌肽 bovine lactoferricin(LB)与 progetrin(PG)的功能区域进行拼接,得到的杂合肽 LB-PG 的细胞毒性下降,抗菌活性明显变强^[37]。

4 问题和展望

抗菌肽作为天然免疫系统的重要组成部分,对机体感染和炎症有重要的预防和治疗作用。围绕抗菌肽的研究虽然有了很大发展,但是仍然存在一些问题。

1) 与传统抗生素相比,抗菌肽的抗菌活性一般较弱。

2) 抗菌肽的生物合成效率不高。使用原核表达系统表达时,抗菌肽对宿主菌的蛋白酶敏感,容易被蛋白酶分解。真核表达系统虽然弥补了原核表达系统中蛋白折叠和翻译修饰的不足,但酵母系统的制作周期较长,多拷贝和高表达量宿主菌的筛选有相当的难度,导致抗菌肽的生物合成效率难以提高。

3) 选择性差,某些抗菌肽毒性较强。随着对抗菌肽结构、功能的不断深入了解,对抗菌肽的结构进行分子改造成为可能,降低抗菌肽的毒性以及增加抗菌肽对宿主的选择性成为新的研究方向^[38]。提高对细菌的选择性以及抗肿瘤靶向性是当前抗菌肽研究的另一热门领域。目前,抗肿瘤肽主要有线性 AMPs、杂合肿瘤肽和人工合成的抗肿瘤肽、 α -螺旋 AMPs 和 β -折叠 AMPs 几类。

抗菌肽具有良好、广谱的抗菌活性,不易产生耐药性,并且几乎没有副作用,可望成为抗菌、抗病毒和抗癌症的新型药物。此外,在食品、化妆品和饲料生产领域上的推广应用,也使抗菌肽展现出独特的商业价值。因此,对抗菌肽的研发不仅具有突出的科学意义,而且具有广阔的应用前景。

参考文献/References:

- [1] JOHN J J, STEED L L. Antibiotic resistance: A clinical danger beyond 2013[J]. Journal of the South Carolina Medical Association, 2013, 109(2): 54-58.
- [2] HEE-KYOUNG K, CHEOLMIN K, CHANG HO S, et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): A patent review[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(1): 1-12.
- [3] SUN Yazhou, ZHOU Yahui, LIU Xiao, et al. Antimicrobial activity and mechanism of PDC213, an endogenous peptide from human milk[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 484(1): 132-137.
- [4] TANIGUCHI M, OCHIAI A, KONDO H, et al. Pyrrhocoricin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(5): 591-598.
- [5] LEE J K, PARK S C, HAHM K S, et al. A helix-PXXP-helix peptide with antibacterial activity without cytotoxicity against MDRPA-infected mice[J]. Biomaterials, 2014, 35(3): 1025-1039.
- [6] BARCHINGER S E, ADES S E. Regulated proteolysis: Control of the *Escherichia coli* σ (E)-dependent cell envelope stress response[J]. Subcellular Biochemistry, 2013, 66: 129-160.
- [7] SONG J, ZHANG W, KAI M, et al. Design of an acid-activated antimicrobial peptide for tumor therapy[J]. Molecular Pharmaceutics, 2013, 10(8): 2934-2941.
- [8] FRECER V, HO B, DING J L. De novo design of potent antimicrobial peptides[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2004, 48(9): 3349-3357.
- [9] CHOU H 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]. International Journal Antimicrobial Agents, 2008, 32(2): 130-138.
- [10] MUSA M, RADMAN M, KRISKO A. Decreasing translation error rate in *Escherichia coli* increases protein function[J]. BMC Biotechnology, 2016, 19(21): 16-28.
- [11] HERBEL V, SCHAFFER H, WINK M. Recombinant production of snak-in-2 (an antimicrobial peptide from tomato) in *E. coli* and analysis of its bioactivity[J]. Molecules, 2015, 20(8): 14889-14901.
- [12] SUN Yan, LI Qian, LI Zhi, et al. Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of palustrin-2CE, an antimicrobial peptide of *Rana chensinensis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(1): 157-162.
- [13] 陈爱春, 彭伟, 汪生鹏. 亲和和标签在重组蛋白表达与纯化中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(12): 93-103.
CHEN Aichun, PENG Wei, WANG Shengpeng. Progress in the application of affinity tags for the expression and purification of recombinant proteins[J]. China Biotechnology, 2012, 32(12): 93-103.
- [14] SKOSYREV V S, KULESSKIY E A, YAKHNIN A V, et al. Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(2): 350-356.
- [15] LI Jianfeng, ZHANG Jie, ZHANG Zhen, et al. SUMO mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from two joined genes in *Escherichia coli*[J]. Current Microbiology, 2011, 62(1): 296-300.
- [16] LI Baocun, ZHANG Shuangquan, DAN Wenbing, et al. Expression in *Escherichia coli* and purification of bioactive antibacterial peptide ABP-CM4 from the Chinese silk worm, *Bombyx mori*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(7): 1031-1036.
- [17] LI Yifeng. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2009, 54(1): 1-9.
- [18] SOUNDARAJAN N, CHO H S, AHN B, et al. Green fluorescent protein as a scaffold for high efficiency production of functional bacteriotoxic proteins in *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20661.
- [19] 刘悦, 詹忠根, 朱兵, 等. 棘胸蛙抗菌肽 Spinosan-C 的串联表达与活性检测[J]. 生物工程学报, 2018, 34(1): 132-139.

- LIU Yue, ZHAN Zhonggen, ZHU Bing, et al. Tandem expression and activity determination of antibacterial peptide Spinosan-C from *Paa spinosa*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(1): 132-139.
- [20] 曲小露,张福欣,王述柏,等. 抗菌肽 Fowlicidin-3 在枯草芽孢杆菌中表达及活性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(18): 143-146.
- [21] BERLA B M, SAHA R, IMMETHUN C M, et al. Synthetic biology of cyanobacteria: Unique challenges and opportunities[J]. Nucleic Acids Research, 2013; 10.3389/fmicb.2013.00246.
- [22] VOGL T, GEBBIE L, PALFREYMAN RW, et al. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(6):1-37.
- [23] XIANG La, WANG Qinrong, ZHOU Yuling, et al. High-level expression of a ZEN-detoxifying gene by codon optimization and biobrick in *Pichia pastoris*[J]. Microbiological Research, 2016, 193: 48-56.
- [24] 李青,周晓宏. 新型生物防腐剂——多聚阳离子抗菌肽在毕赤酵母中的表达[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 161-166.
LI Qing, ZHOU Xiaohong. Expression of polycationic antibacterial peptides in *Pichia pastoris*[J]. Food Science, 2013, 34(5): 161-166.
- [25] WANG Aiping, WANG Song, SHEN Mingqiang, et al. High level expression and purification of bioactive human alpha-defensin 5 mature peptide in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2009, 84(5): 877-884.
- [26] MATTANOVICH D, BRANDUARDI P, DATO L, et al. Recombinant protein production in yeasts [J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 824: 329-358.
- [27] MU Feiyun, LI Hui, HU Zhangli. Expression of tandem repeat cecropin B in *Chlamydomonas reinhardtii* and its antibacterial effect [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2012, 39(4): 344-351.
- [28] SUN Shiyu, ZHAO Guangxu, HUANG Yibing, et al. Enantiomeric effect of d-amino acid substitution on the mechanism of action of α -helical membrane-active peptides[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1): 67.
- [29] TRIPATHI A K, KUMARI T, TANDON A, et al. Selective phenylalanine to proline substitution for improved antimicrobial and anticancer activities of peptides designed on phenylalanine heptad repeat[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 57: 170-186.
- [30] SUN Yue, DONG Weibing, SUN Li, et al. Insights into the membrane interaction mechanism and antibacterial properties of chensinin-1b [J]. Biomaterials, 2015, 37: 299-311.
- [31] BI Xiaonan, WANG Che, DONG Weibing, et al. Antimicrobial properties and interaction of two Trp-substituted cationic antimicrobial peptides with a lipid bilayer[J]. Journal of Antibiotics, 2014, 67(5): 361-368.
- [32] ZHAO Xueliang, SHI Zhenxia. Research progress in preparation and mechanism of antibacterial peptides[J]. Food Research and Development, 2014, 35(1):1-4.
- [33] DONG Weibing, MAO Xiaonan, GUAN Yue, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of three chensinin-1 peptides containing mutation of glycine and histidine residues[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40228.
- [34] 马清泉,董娜,曹艳萍,等. 利用精氨酸和缬氨酸设计新型 α -螺旋抗菌肽[J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 346-351.
MA Qingquan, DONG Na, CAO Yanping, et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with Val and Arg residues [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(3): 346-351.
- [35] CHEN Y, GUARNIERI M T, VASIL A I, et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(4): 1398-1406.
- [36] XU Xiaoxia, JIN Fengliang, YU Xiaoqiang, et al. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression & Purification, 2007, 55(1): 175-182.
- [37] CAO Yu, YU Rongqing, LIU Yi, et al. Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides[J]. Current Microbiology, 2010, 61(3): 169-175.
- [38] FOX M A, THWAITE J E, ULAETO D O, et al. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II [J]. Peptides, 2012, 33(2): 197-205.