

杂合抗菌肽牛乳铁蛋白素-天蚕素在大肠杆菌中的高效表达及其活性鉴定

宋雪莹 冯兴军* 李静 许文杉

(东北农业大学 动物科学技术学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】菌株耐药性问题日益突出, 研制新型安全高效的抗菌药物成为目前的研究热点之一。抗菌肽具有多种优良特性, 高活性抗菌肽的开发及其重组表达对解决菌株耐药性问题具有重要意义。【方法】根据牛乳铁蛋白素与天蚕素的结构, 设计一种新型的杂合抗菌肽牛乳铁蛋白素-天蚕素(LfcinB-Cecropin), 根据 *Escherichia coli* 密码子偏爱性合成其编码基因, 利用同尾酶法构建含有不同 LfcinB-Cecropin 基因片段拷贝数的重组表达载体, 转化到 *E. coli* BL21(DE3)进行重组表达。【结果】经 IPTG 诱导, LfcinB-Cecropin 融合蛋白成功获得表达。经超声破碎、包涵体纯化、甲酸裂解后, 获得具有明显抑菌活性的杂合肽 LfcinB-Cecropin。【结论】获得一种高活性的新型抗菌肽 LfcinB-Cecropin, 并实现了在 *E. coli* 中的高效重组表达。

关键词: 抗菌肽, 牛乳铁蛋白素, 天蚕素, 重组表达

High-level expression of a hybrid antimicrobial peptide LfcinB-Cecropin in *Escherichia coli* and its activity

SONG Xue-Ying FENG Xing-Jun* LI Jing XU Wen-Shan

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] Resistant strains have become increasingly prominent issues, and the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800794); 黑龙江省青年科学基金项目(No. QC08C05); 黑龙江省博士后科研启动基金项目(No. LBH-Q10145)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191395; 信箱: fengxingjun2008@163.com

收稿日期: 2011-12-29; 接受日期: 2012-04-11

development of safe and efficient antimicrobial agents becomes the focus one of researches so far. Antimicrobial peptides possess many attractive features. Exploration and recombinant expression of antimicrobial peptides with high activity have important significance for solving resistant strains problem. **[Methods]** A novel hybrid antimicrobial peptide LfcinB-Cecropin was designed based on the structures of LfcinB and Cecropin. The gene encoding LfcinB-Cecropin was synthesized according to codon preference of *E. coli*. Tandem expression plasmids contained multicopy tandem LfcinB-Cecropin genes were constructed by the method of isocaudarner, and expressed them in *E. coli*. **[Results]** LfcinB-Cecropin was successfully expressed as fusion protein by IPTG induction. After sonication, inclusion body purification, formic acid cleavage, the recombinant LfcinB-Cecropin was obtained and showed obvious antibacterial activity. **[Conclusion]** A novel antimicrobial peptide LfcinB-Cecropin was obtained and recombinantly expressed in *E. coli* in high level.

Keywords: Antimicrobial peptides, LfcinB, Cecropin, Recombinant expression

抗菌肽是一类具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫、抑制肿瘤细胞及免疫调节活性的小分子多肽^[1-2], 热稳定性好, 无免疫原性, 不易产生耐药性^[3]。同时作用机制独特、理化性质稳定、只作用于病原微生物而对人正常细胞无副作用^[4]。迄今为止, 已在许多生物包括昆虫、鸟类、动物、植物及原核生物中发现 800 多种抗菌肽, 它们多由 30-50 个氨基酸残基组成^[5]。牛乳铁蛋白素 LfcinB (FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRAF) 是来源于牛乳铁蛋白 N 端第 17-41 位氨基酸残基的活性多肽, 分子结构由 α -螺旋和 β -折叠构成。研究发现 LfcinB 与牛乳铁蛋白相比, 除不能结合铁离子外, 具备乳铁蛋白其他大部分生物活性, 如抗细菌、抗真菌、抗病毒、抑制癌细胞生长、消除炎症及参与免疫反应等功能^[6]。Cecropin 是发现最早、研究最多的一类抗菌肽, 可作用于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌^[7]。Cecropin 对革兰氏阴性菌的作用强于革兰氏阳性菌, 在抑菌的浓度范围内, 没有溶血性^[8]。Cecropin 具有分子量小、水溶性好、热稳定性强等特点, 具有很强的阳离子特征, 且对较低或较高的 pH 值和较强的离子

强度有一定抗性^[9]。分子量约为 4 000 D, 分子内不形成二硫键, 主要为螺旋构象, 形成 2 个两亲 α -螺旋^[10], 这种 α -螺旋是破坏裂解细菌的主要结构。

Andersen 与 Vorland 等^[11]研究表明 LfcinB 的前 15 氨基酸与 LfcinB 具有同样的抗菌活性。增加 Trp 含量能够明显提高 LfcinB 的抗菌活性^[12]。天蚕素的前 8 个氨基酸序列 KWKLFFKKI 为 α 螺旋结构, 是其功能活性部位, 与蜂毒素、马盖宁杂合设计得到全新抗菌肽活性较母本抗菌肽显著提高^[13-14]。本研究根据 LfcinB 与 Cecropin 的结构与功能间的关系, 选取 LfcinB 前 15 个氨基酸序列, 并将第 10 位的 Met 替换为 Trp, 与 CecropinA 的前 8 个氨基酸序列杂合, 二者间通过 3 个氨基酸(GSG)连接, 设计一种新的杂合肽 LfcinB-Cecropin; 并利用大肠杆菌重组表达系统成功实现了其高效重组表达, 表达的融合蛋白经甲酸裂解, 获得了具有活性的 LfcinB-Cecropin 单体。本研究通过构建抗菌肽高效重组系统, 获得大量的杂合抗菌肽 LfcinB-Cecropin, 为抗生素替代物的研发奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 质粒 pGEX-4T-2 和 pUC18、克隆感受态 *E. coli* DH5 α 、表达感受态 *E. coli* BL21(DE3)均由本实验室保存。

1.1.2 DNA 修饰酶类与其他生化试剂: 限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*Bgl* II、*Hind* III和连接试剂盒均购于大连宝生物公司; *Taq* DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒, DNA Marker 均购于北京康为生物公司; 胰蛋白胨、酵母提取物为 OXID 产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物合成及 DNA 测序: 由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 LfcinB-Cecropin 编码基因的设计与合成: 根据 *E. coli* 密码子偏爱性设计编码 LfcinB-Cecropin 的基因片段, 在编码 LfcinB-Cecropin 基因片段前后加入了编码甲酸的密码子。为了便于载体构建, 在 5'端加入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点, 3'端加入 *Bgl* II 和 *Hind* III。

编码基因片段正链为: 5'-GAATTCGGATCCGACCCGTTCAAATGCCGTCGTTGGCAGTGGCGATTGAAAAAGCTGGGTGCTGGCTCTGGCAAATGGAAGCTGTTCAAGAAAATCGACCCGAGATCTAAGCTT-3'; 反链为: 5'-AAGCTTAGATCTCGGGTCGATTTTCTTGAACAGCTTCCATTTGCAGAGCCAGCACCCAGCTTTTTCATACGCCACTGCCAACGACGGCATTGTAACGGGTCGGATCCGAATTC-3'。将等摩尔的正反链混合、退火后, 2%的熔点琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段。

1.2.2 重组表达载体的构建: 将纯化的 LfcinB-Cecropin 基因连接入 pUC18 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点间, 获得含有单拷贝 LfcinB-Cecropin 基因的克隆载体。利用 *Bam*H I、*Bgl* II 同尾酶法构建含

有不同 LfcinB-Cecropin 基因拷贝数的克隆, 方法参考文献[15]。

将构建好的含有不同拷贝数的克隆载体用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后纯化回收目的片段, 与利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后的 pGEX-4T-2 连接。转化到 *E. coli* DH5 α 中, PCR 方法筛选含有目的基因的重组表达载体, 所用引物为 P₁: 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'; P₂: 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG-3'。

1.2.3 融合蛋白的诱导表达: 将获得的含有 2-6 倍基因的重组表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 分别接种于 10 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床中振荡培养过夜; 次日吸取 300 μ L 菌液转接于 30 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 左右, 加入 0.3 mmol/L IPTG, 28 °C 诱导 4 h。取样 SDS-PAGE 分析, 筛选出表达量较高的重组表达载体转化子并离心收集该菌体, 超声波裂解菌体, 12 000 r/min 离心, 分别取沉淀和上清, 进行 SDS-PAGE, 分析融合蛋白表达形式。

1.2.4 包涵体的分离纯化: 细菌裂解液沉淀用 PBS (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0)洗涤, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀用 2 mol/L 尿素重悬, 4 000 r/min 离心 10 min, 留沉淀, 取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 LfcinB-Cecropin 蛋白的裂解与纯化: 将洗涤后的包涵体加入 70%甲酸, 30 °C 摇床裂解 2 h后冻干, 加入去离子水重悬; 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清作为纯化的样品, 利用 AKTA explorer 蛋白纯化仪凝胶过滤层析纯化蛋白, 流动相为磷酸盐缓冲液(0.5 mol/L Na₂HPO₄, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.0), 收集目的峰产物。然后进行脱盐, 以去离子水为流动相, 分离除去盐。将纯化获得的 LfcinB-Cecropin 蛋白冻干后取样进行尿素-

Tricine-SDS-PAGE 分析。利用反相高效液相色谱方法鉴定纯度, 色谱参数: C18 column (250 cm, 4.6 mm, 5 μ m), A 液为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液, B 液为含 0.1% 三氟乙酸的水溶液, 流动相在 30 min 内乙腈浓度由 20% 增到 50%, 流速 1 mL/min, 检测波长 214 nm。

1.2.6 最小抑菌浓度 MIC 的测定: 称取纯化冻干后的 LfcinB-Cecropin, 用 PBS 溶解后, 稀释得到以下不同浓度的蛋白: 2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8 和 4 mg/L。利用微量肉汤稀释法测定 MIC。将倍比稀释后不同浓度的抗菌溶液分别加到灭菌的 96 孔聚丙烯培养板中, 第 1 至第 10 孔加稀释的肽, 每孔 10 μ L, 第 12 孔加入 100 μ L MH 肉汤培养基, 作为阴性生长对照。将过夜培养的测试菌用 MH 肉汤培养基稀释至 $(2-5) \times 10^7$, 向 1-11 孔中分别加入 100 μ L, 第 11 孔作为阳性对照, 37 $^{\circ}$ C 空气培养 18-20 h, 测定 OD_{600} , 以无 OD 值变化的孔中抗菌肽的浓度定义为 MIC。

1.2.7 溶血性的测定: 静脉采集鸡血 1 mL, 3 000 r/min 离心 5 min 收集红细胞, PBS 洗涤 3 遍, 再用 10 mL PBS 重悬制成 8% (V/V) 血细胞悬浮液, 取 100 μ L 红细胞悬浮液与 100 μ L 用 PBS 溶解的不同浓度的 LfcinB-Cecropin 的溶液混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入到 96 孔板中, 酶标仪测定 540 nm 吸光值, 重复 3 次, 取平均值, PBS 作为阴性对照, 0.1% 的 Triton-100 做阳性对照。计算溶血率:

溶血率(%)=

$$\frac{\text{样品吸光值}-\text{PBS吸光值}}{0.1\% \text{ Triton-100吸光值}-\text{PBS吸光值}} \times 100。$$

2 结果

2.1 编码基因的设计与合成

完整的编码 LfcinB-Cecropin 为 115 bp, 经

2% 凝胶电泳盒回收后, 得到纯化的基因片段, 如图 1 所示。

2.2 多拷贝表达载体构建

pGEX-4T-2 的 5' 与 3' 通用引物分别与 pGEX-4T-2 的 869-891 bp、1 042-1 020 bp 间的碱基互补, 以该对测序引物筛选重组质粒, 2% 凝胶电泳后, 如图 2 所示, 阳性对照, 即以含有质粒

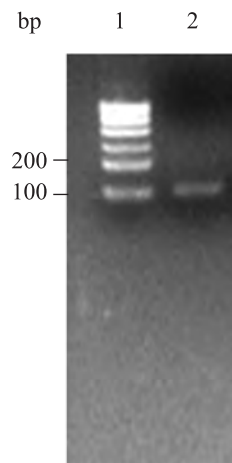


图 1 纯化的 LfcinB-Cecropin 编码基因

Fig. 1 Purified gene of LfcinB-Cecropin

注: 1: DNA 分子量标准; 2: 纯化的编码基因.

Note: 1: DNA marker; 2: Purified gene.

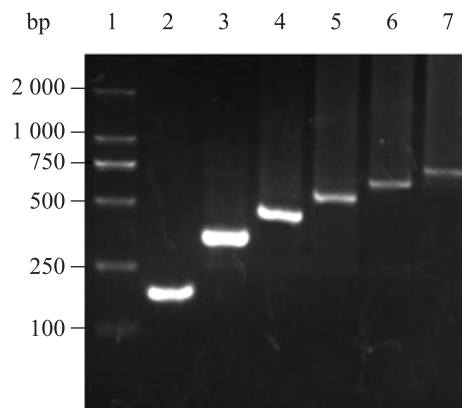


图 2 PCR 筛选的 2-6 倍重组 pGEX-LfcinB-Cecropin 表达载体

Fig. 2 PCR screening of 2-6 copies of the recombinant expression plasmid of pGEX-LfcinB-Cecropin

注: 1: DNA 分子量标准; 2: pGEX-4T-2 质粒; 3-7: 2-6 拷贝重组 pGEX-LfcinB-Cecropin 质粒.

Note: 1: DNA marker; 2: Plasmid of pGEX-4T-2; 3-7: 2-6 copies of recombinant plasmid of pGEX-LfcinB-Cecropin.

pGEX-4T-2 的菌落为模板的 PCR 产物为 174 bp 的 DNA 条带, 而含有 2-6 倍目的基因阳性重组质粒扩增产物大小分别为 360、450、550、650、750 bp 左右的 DNA 条带, 说明在重组质粒中已接入目的片段。

2.3 目的蛋白串联体的融合表达

SDS-PAGE 分析表明(图 3), 2 倍体基因重组质粒转化子产生一条大约 33 kD 特异的蛋白带, 与预期蛋白(26+2×3.6) kD 大小一致, 诱导 3 h 的非重组 pGEX-4T-2 转化子产生 26 kD 条带, 而未经 IPTG 诱导的培养物样品无特异诱导条带出现, 而 3-6 倍重组表达载体转化子表达产物中无明显的特异性条带。

2.4 包涵体的洗涤与纯化

将 2 倍体基因重组质粒转化子的细菌破碎后上清和沉淀分别取样分析, 发现目的蛋白多数存在于沉淀中(图 4, 泳道 2), 说明表达的蛋白是以包涵体形式存在。菌体裂解液沉淀经洗

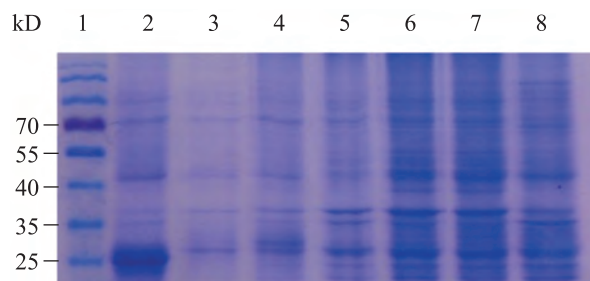


图3 不同拷贝重组子诱导表达产物 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression of *E. coli* BL21(DE3) transformed with different recombinant plasmids

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 诱导的 pGEX-4T-2 转化子表达产物; 3: 未诱导的 pGEX-4T-2 转化子表达产物; 4-8: 诱导的(pGEX-LfcinB-Cecropin)₂₋₆ 重组表达载体转化子表达产物。

Note: 1: Protein marker; 2: Induced expression of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pGEX-4T-2; 3: Non-induced expression of the *E. coli* BL21(DE3) transformed with pGEX-4T-2; 4-8: Induced expression of *E. coli* BL21(DE3) transformed with different recombinant plasmids.

涤剂、尿素洗涤后, 获得纯度较高的目的融合蛋白, 经凝胶薄层扫描, 其纯度在 85% 以上(图 4, 泳道 3)。

2.5 融合蛋白的裂解与纯化

将融合蛋白的包涵体用甲酸裂解后(图 5), 利用凝胶过滤层析纯化杂合抗菌肽 LfcinB-Cecropin, 如图 6 所示, 产生了与预计大小 3.6 kD 一致的条带, 获得纯度较高的杂合抗菌肽 LfcinB-Cecropin, RP-HPLC 分析表明, 其纯度大于 95%。

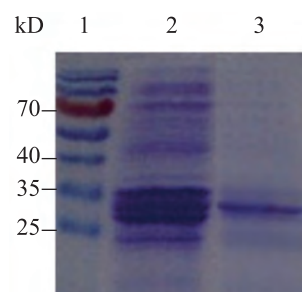


图4 洗涤的包涵体

Fig. 4 Washed inclusion bodies

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 2 倍重组子转化子表达产物破碎沉淀; 3: 2 mol/L 尿素洗涤后的沉淀。

Note: 1: Protein marker; 2: Broken precipitation of *E. coli* BL21(DE3) transformed with 2-copy plasmid; 3: Inclusion bodies washed by 2 mol/L of urea.

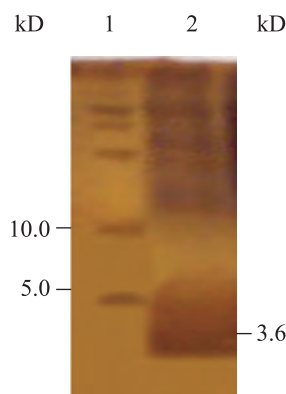


图5 甲酸裂解的融合蛋白

Fig. 5 Fusion protein cleaved by formic acid

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 裂解的融合蛋白。

Note: 1: Protein marker; 2: Cleaved fusion protein.

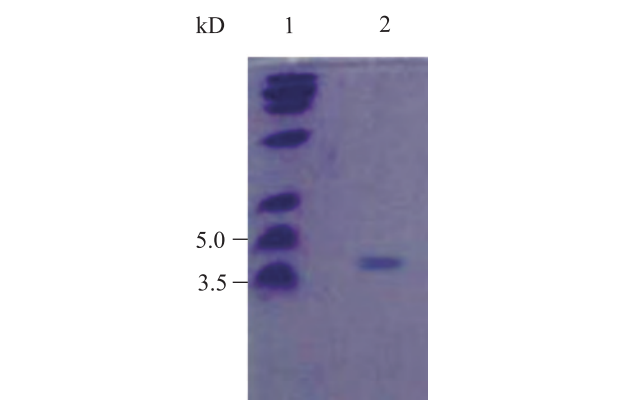


图 6 甲酸裂解后纯化的杂合肽 LfcinB-Cecropin

Fig. 6 The hybrid antimicrobial peptide LfcinB-Cecropin purified from fusion protein cleaved by formic acid

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 纯化的 LfcinB-Cecropin.

Note: 1: Protein marker; 2: Purified LfcinB-Cecropin.

2.6 重组抗菌肽 LfcinB-Cecropin 抑菌活性

利用肉汤稀释法测定重组抗菌肽对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923 与革兰氏阴性菌大肠杆菌 ATCC25922、绿脓杆菌 ATCC27853、鼠伤寒沙门氏菌 C77-31 的最小抑菌浓度, 并与 LfcinB、Cecropin 单体的最小抑菌浓度进行对比, 结果如表 1 所示, 表明设计的杂合肽 LfcinB-Cecropin 具有明显的抗菌活性。

2.7 重组抗菌肽的溶血活性

在抑菌浓度范围内, 重组杂合抗菌肽 LfcinB-Cecropin 对鸡血红细胞的溶血率很低(表 2), 数值均<5%, 因此可以认为 LfcinB-Cecropin 抑菌浓度范围内无溶血作用^[16]。

表 1 重组抗菌肽 LfcinB-Cecropin 对不同测试菌的 MIC				
Table 1 MIC of LfcinB-Cecropin for different tested bacteria				
测试菌 Tested bacteria	金黄色葡萄球菌 ATCC25923 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	大肠杆菌 ATCC25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	绿脓杆菌 ATCC27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	鼠伤寒沙门氏菌 C77-31 <i>Salmonella typhimurium</i> C77-31
重组抗菌肽 LfcinB-Cecropin 最小抑菌浓度	16	32	64	64
MIC of LfcinB-Cecropin (mg/L)				
LfcinB 最小抑菌浓度	16	32	32	32
MIC of LfcinB (mg/L)				
Cecropin 最小抑菌浓度	64	16	32	32
MIC of Cecropin (mg/L)				

表 2 不同浓度的重组抗菌肽 LfcinB-Cecropin 对鸡血红细胞的溶血率							
Table 2 Hemolysis rate of chicken blood erythrocyte at different concentrations of LfcinB-Cecropin							
杂合肽浓度 Concentration of LfcinB-Cecropin (μg/mL)	8	16	32	64	128	256	512
溶血率 Hemolysis rate (%)	0.16	0.30	0.54	0.97	1.13	1.32	1.67

3 讨论

大肠杆菌表达系统具有生长速度快、结构简单、易于培养等优点, 成为重组制备抗菌肽的主要表达系统之一。但在利用大肠杆菌表达抗菌肽时存在两个问题: (1) 目标产物对工程菌的毒性;

(2) 抗菌肽分子量小, 表达产物不稳定^[17]。本研究采用构建串联体的方法, 以融合方式表达, 在提高表达产物稳定性的同时, 又能够借助串联体的空间折叠来屏蔽抗菌肽单体对工程菌的毒性作用; 之后利用串联单体间化学裂解位点将融合蛋白裂解成单体, 从而提高表达抗菌肽的产率。

重组蛋白在 *E. coli* 中表达, 其表达形式一般可分为: (1) 细胞外的分泌表达; (2) 细胞内可溶性表达; (3) 细胞内不溶性表达, 即产物以包涵体的形式存在^[18]。经鉴定, 本研究表达的融合蛋白为包涵体形式。以包涵体形式进行表达不仅有利于重组蛋白质的复性, 还能简化后续的纯化步骤^[19]。洗涤后, 获得了较高纯度的包涵体蛋白, 直接与裂解试剂甲酸作用, 成功释放出目的抗菌肽片段, 省略了包涵体溶解复性的繁冗程序, 节省大量成本。

对于抗菌肽的活力单位到目前为止还没有明确的规定, 许多研究根据对比抗菌肽与抗生素抑菌圈的大小关系, 将其换算成相当于抗生素的单位。但是有些菌株对抗生素有耐药性也显示了这一方法的局限性, 而且简单的抑菌圈测量难以精准地定义其单位^[20]。由于不同抗菌肽的相对分子质量的差异, 表达量的高低也不能作为衡量活性强弱标准。本研究利用浓度单位来衡量抑菌能力具有一定的现实意义。

Liu 等通过研究 LfcinB 的前 9、13、15 个氨基酸衍生物的抑菌活性, 发现 LfcinB 的前 15 个氨基酸衍生物的抑菌活性最强^[21]。Cao 等构建了 CA(1-7)-M(4-11) 和 CB(1-7)-M(4-11) 两种杂合抗菌肽并在毕赤酵母中成功表达, 研究表明这两种杂合抗菌肽对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌都具有较强的抑菌活性^[22]。Zhao 等设计合成了杂合抗菌肽 LFM23, 由 LfcinB 的前 15 个氨基酸和蜂毒素的 8 氨基酸杂合而成, 研究发现, 杂合抗菌肽 LFM23 具有较强的抑菌活性, 且无溶血性质^[23]。本实验获得的重组杂合抗菌肽 LfcinB-Cecropin 对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC 为 16 mg/L, 对大肠杆菌 ATCC25922 的 MIC 为 32 mg/L。明显提高了对革兰氏阳性菌的抑菌能力。

多数抗菌肽抑菌的主要方式是通过与病原体细胞结合, 破坏病原体的细胞膜, 或作用于细胞

内靶位点, 引起靶细胞新陈代谢的变化, 从而杀灭靶细胞^[24], 而抗生素的抑菌作用是通过与细胞上的特异性受体结合。所以抗菌肽抑菌不易产生耐药性。但活性高的抗菌肽通常具有较强的溶血性, 通过溶血试验证明, LfcinB-Cecropin 无明显的溶血活性。本研究获得了抑菌活性高且无溶血性的一种新型杂合抗菌肽 LfcinB-Cecropin, 利用大肠杆菌表达系统实现了其高效重组表达, 对抗菌肽的开发与实现量化制备具有重要的理论与实践意义。

参考文献

- [1] Knappe D, Stegemann C, Nimptsch A, et al. Chemical modifications of short antimicrobial peptides from insects and vertebrates to fight multi-drug resistant bacteria[J]. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 2009, 611: 395–396.
- [2] Xu P, Shi M, Chen XX. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*[J]. *PLoS one*, 2009, 4(1): e4239.
- [3] 汪银锋, 李素平, 陆东峰. 抗菌肽研究进展及其在饲料中的应用[J]. *养猪*, 2009(4): 14–16.
- [4] Chang TL, Klotman ME. Defensins: natural anti-HIV peptides[J]. *AIDS Reviews*, 2004, 6(3): 161–168.
- [5] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity[J]. *Nature*, 1981, 292(5820): 246–248.
- [6] Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1121(1/2): 130–136.
- [7] Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2006, 18(1): 24–30.
- [8] Boman HG, Wade D, Boman IA, et al. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids[J]. *FEBS Letters*, 1989, 259(1): 103–106.

- [9] Batas B, Schiraldi C, Chaudhuri JB. Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 68(2/3): 149–158.
- [10] Otvos L Jr. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets[J]. *Journal of Peptide Science*, 2005, 11(11): 697–706.
- [11] Rekdal Ø, Andesren J, Vorland LH, et al. Construction and synthesis of lactoferricin derivatives with enhanced antibacterial activity[J]. *Journal of Peptide Science*, 1999, 5(1): 32–45.
- [12] Strøm MB, Haug BE, Rekdal Ø, et al. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002, 80(1): 65–74.
- [13] Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, et al. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Peptides*, 2003, 24(9): 1315–1318.
- [14] Shin SY, Kang JH, Jang SY, et al. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1463(2): 209–218.
- [15] Rao XC, Hu J, Li S, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB-β as tandem multimers in *Escherichia coli*[J]. *Peptides*, 2005, 26(5): 721–729.
- [16] 刘昊. 新型脱细胞骨基质-壳聚糖骨组织工程支架的实验研究[D]. 北京: 军医进修学院硕士学位论文, 2011.
- [17] Brogden KA, Aekermann M, Mccray PB, et al. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2003, 22(5): 465–478.
- [18] Pires MJ, Aires-Barros MR, Cabral JMS. Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles[J]. *Biotechnology Progress*, 1996, 12(3): 290–301.
- [19] Batas B, Schiraldi C, Chaudhuri JB. Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 68(2/3): 149–158.
- [20] 王秀青. 六种天蚕素类基因工程抗菌肽的研制及应用[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2007.
- [21] Liu YF, Han FF, Xie YG, et al. Comparative antimicrobial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin-derived synthetic peptides[J]. *Biometals*, 2011, 24(6): 1069–1078.
- [22] Cao Y, Yu RQ, Liu Y, et al. Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropin-melittin hybrid antimicrobial peptides[J]. *Current Microbiology*, 2010, 61(3): 169–175.
- [23] Zhao XY, Yu DS, Gong HN, et al. Design, synthesis and antibacterial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFM23[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(8): 2107–2112.
- [24] Zhu WL, Song YM, Park Y, et al. Substitution of the leucine zipper sequence in melittin with peptoid residues affects self-association, cell selectivity and mode of action[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2007, 1768(6): 1506–1517.