

黄鳍金枪鱼抗菌肽 YFGAP 在大肠杆菌中融合表达及其活性检测

李慧 陈云华 张光亚 李夏兰*

(华侨大学 化工学院 福建 厦门 361021)

摘要:【目的】抗菌肽 YFGAP 由 32 个氨基酸组成, 分子量为 3.4 kD, 对革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)表现出强效的抑制作用, 不具有溶血活性。在大肠杆菌中表达抗菌肽 YFGAP, 分离纯化抗菌肽并鉴定其生物学活性。【方法】化学合成 EK-YFGAP 和 L-EK-YFGAP 基因序列, 构建表达载体 pET22b-ELP20-EK-YFGAP、pET22b-ELP40-EK-YFGAP 和 pET22b-ELP40-L-EK-YFGAP, 分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达, 可逆相变循环纯化融合蛋白。肠激酶酶切, 经 Vivaspin Turbo 纯化柱纯化, 测定重组抗菌肽的抑菌活性和溶血活性。【结果】纯化出两种融合蛋白 ELP40-EK-YFGAP 和 ELP40-L-EK-YFGAP, 肠激酶酶切纯化后获得重组抗菌肽 YFGAP, 对 4 种病原菌均有抑制效果, 溶血活性较低。【结论】以 ELPs 作为非色谱纯化标签, 实现了抗菌肽 YFGAP 的融合表达, 具有操作简单、成本低、易于扩大的优势, 为重组抗菌肽的量化制备及应用提供了理论基础和技术支持。

关键词: 抗菌肽, 类弹性蛋白, 融合蛋白, 抑菌活性

Expression and purification of an antimicrobial peptide, YFGAP from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) in *Escherichia coli* and characterization of its biological activity

LI Hui CHEN Yun-Hua ZHANG Guang-Ya LI Xia-Lan*

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Objective] The antimicrobial peptide, YFGAP from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*), consisted of 32 amino acid residues, shows broad-spectrum antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria without hemolytic activity. Clone and express the antimicrobial peptides, YFGAP in *Escherichia coli* BL21(DE3) and characterize its bioactivity. [Methods] Based on the amino acids of EK-YFGAP and L-EK-YFGAP, the genes were synthesized and ligated into pET-22b to construct these expression vectors, pET22b-ELP20-EK-YFGAP, pET22b-ELP40-EK-YFGAP and pET22b-ELP40-L-EK-YFGAP. The vectors were transformed into *E. coli* BL21(DE3) to express the fusion proteins. The fusion proteins were purified using the Elastin-like

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376103); 福建省自然科学基金项目(No. 2013J01048)

*通讯作者: 信箱: xialan@hqu.edu.cn

收稿日期: 2014-11-14; 接受日期: 2014-12-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-22

polypeptides (ELPs) as a purification tag by the method called inverse transition cycling (ITC) and digested by enterokinase. Then the recombinant YFGAP was purified using Vivaspin Turbo. Bioactivity of the peptide was tested. **[Results]** The fusion proteins, ELP40-EK-YFGAP and ELP40-L-EK-YFGAP were expressed and purified by two rounds of ITC. After digested by enterokinase, the recombinant YFGAP was purified using Vivaspin Turbo. Antimicrobial activity assay demonstrated the recombinant YFGAP exhibited high antibacterial activity against four fish pathogens without significant hemolytic activity. **[Conclusion]** The recombinant YFGAP was successfully expressed in *E. coli* using ELPs as a purification tag. This strategy does not require the use of chromatography, so that it is cost effective, easy to scale up and to multiplex. This study provides theoretical foundation and technical means for scale-up preparation of antimicrobial peptides by engineering method.

Keywords: Antimicrobial peptides, Elastin-like polypeptides, Fusion protein, Antibacterial activity

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是两性带电分子,一般由 6–50 个氨基酸构成,广泛存在于多种生物体内,具有广谱抗菌、调节免疫、杀伤肿瘤细胞、病毒等多种生物学功能^[1-2]。由于 AMPs 抑制细菌生长的机理不同于抗生素,不易使病原菌产生耐药性,被认为是抗生素的理想替代物^[3-5]。动物饲喂试验证明,抗菌肽不仅可以促进动物发挥免疫调节功能,提高动物的存活率,还对其生长有促进作用^[6-9]。因此,抗菌肽作为一种新型的抗菌制剂,在医药、食品、畜牧养殖等行业中具有广泛的应用和市场前景^[10-11]。目前,天然提取抗菌肽资源有限,化学合成成本高,因此异源表达抗菌肽已成为抗菌肽研究的热点^[12]。基因工程表达抗菌肽常采用融合表达的方式,可减弱抗菌肽对宿主的毒性,同时提高一些抗菌肽的表达量和稳定性^[13]。类弹性蛋白多肽(Elastin-like polypeptides, ELPs)来源于弹性蛋白的疏水区,由五肽重复序列单元(Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, VPGXG)构成,其中第 4 位氨基酸 Xaa 为除 Pro 以外的任一氨基酸^[14]。ELPs 具有温度诱导的反复相变过程,当环境温度低于该相变温度(Inverse transition temperature, T_i)时,ELPs 在水溶液中为高度可溶;当高于 T_i 时,ELPs 多肽链结构改变,开始聚集,形成沉淀^[15]。利用 ELPs 的反复相变循环(Inverse transition cycling, ITC)纯化重组蛋白,具有操作简单、回收率高、蛋白浓度可控等优势,明显优于色谱等传统蛋白纯化方法,在简化实验步骤的同时,也极大提高了目标蛋白的纯度^[16-17]。

抗菌肽 YFGAP 是 Seo 等^[18]从黄鳍金枪鱼皮酸化后的提取液中分离出的分子量为 3.4 kD 的多肽,由 32 个氨基酸组成,含有 2 个酸性氨基酸残基(Asp、Glu)和 7 个碱性氨基酸残基(包括 3 个 Lys、3 个 Arg 和 1 个 His)。YFGAP 的 N-端和 C-端形成伸展链和无规则卷曲结构,而中间的氨基酸(13–20)易形成两亲的 α -螺旋结构,对革兰氏阳性(G^+)和革兰氏阴性(G^-)菌表现出强效的抑制作用,不具有溶血活性,是药物研制、食品和饲料添加剂的理想选择。有关抗菌肽 YFGAP 的基因表达研究还未见报道。本研究使用课题组自行设计的 ELP[KV8F-20]作为纯化标签,研究抗菌肽 YFGAP 在大肠杆菌中的表达,为抗菌肽 YFGAP 的应用提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:质粒 pET-22b、*Escherichia coli* BL21(DE3),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒 pUC19-ELP20 为华侨大学张光亚老师惠赠;迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为本实验室保藏;副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* MCCC 1A02609)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* MCCC 1H00066),购自国家海洋局第三海洋研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶(*Nde* I、*Bgl* I、*Hind* III、*Pfl* M I、*Xho* I),购自 Fermentas 公司;Boine Enterokinase、T4 DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒,购自生工生物工程(上海)股

份有限公司; 标准蛋白质 Marker (14.4–116 kD)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 购自碧云天生物技术研究所; 超低分子量蛋白质 Marker I (3.3–22 kD), 购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司; 鲫鱼, 市售; IEC Micromax RF 和 EC Mcromax RF 冷冻离心机、酶标仪, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; Vivaspin Turbo (MWCO, 10 kD, Sartorius), 购自精艺兴业科技有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建: 根据 EK-YFGAP 和 L-EK-YFGAP 的氨基酸序列, 以 *E. coli* 标准密码子优化设计基因序列, 并在基因序列的 5'端引入 *Hind* III 酶切位点, 3'端引入 *Xho* I 酶切位点, 化学合成基因序列。用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切 pUC19-ELP20, *Hind* III 和 *Xho* I 酶切 EK-YFGAP, *Nde* I 和 *Xho* I 酶切 pET-22b, 用 T4 DNA 连接酶连接形成 pET22b-ELP20-EK-YFGAP 并转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。由于 *Pf*II M I 和 *Bgl* I 是同尾酶, 所以采用 *Nde* I 和 *Bgl* I 酶切 pUC19-ELP20, 获得的 ELP20 片段与 *Nde* I 和 *Pf*II M I 酶切后的 pET22b-ELP20-EK-YFGAP 连接, 形成 pET22b-ELP40-EK-YFGAP。*Hind* III 和 *Xho* I 酶切 L-EK-YFGAP 和质粒 pET22b-ELP40-EK-YFGAP, 连接后形成 pET22b-ELP40-L-EK-YFGAP, 构建的融合蛋白表达载体如图 1 所示。筛选出的阳性克隆子进行质粒酶切验证, 或由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 融合蛋白的表达和纯化: 鉴定正确的甘油菌按照 1:100 (体积比)接种到含 Amp (100 mg/L)的 LB 培养基^[17]中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 次日按照 1:100 接种到 1 L 含 Amp (100 mg/L)的 TB 培养基^[17]中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 1.5, 加入 IPTG 诱导(终浓度为 0.5 mmol/L) 4 h, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 菌体用 PBS 缓冲液(pH 7.3, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2 mmol/L KH_2PO_4)洗涤 2 次, 然后用 30 mL 预冷的 PBS 缓冲液重悬菌体, 置冰浴中超声破碎(300 W, 工作 2 s, 间隔 2 s, 共 20 min)。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。

融合蛋白纯化采用 ITC 法, 即细胞破碎液, 冰浴 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 保留上清; 向上清液中添加 Na_2CO_3 溶液至终浓度为 2 mol/L, 50 °C 水浴 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 向沉淀中加入 500 μ L 预冷的 PBS 缓冲液充分悬浮沉淀, 冰浴 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min; 弃沉淀, 上清液即为一轮纯化产物。重复上述纯化步骤, 得二轮纯化产物。采用 15%的 SDS-PAGE 检测。

1.2.3 肠激酶酶切融合蛋白: 使用重组牛肠激酶在 25 °C 过夜酶切融合蛋白, 酶切体系为: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $CaCl_2$, 加酶量 10 U/mg 融合蛋白, 质量比为 1:500。采用 Vivaspin Turbo 纯化柱, 4 °C、12 000 r/min 离心收集酶切后目标蛋白溶液。采用 Tricine-SDS-PAGE 检测。

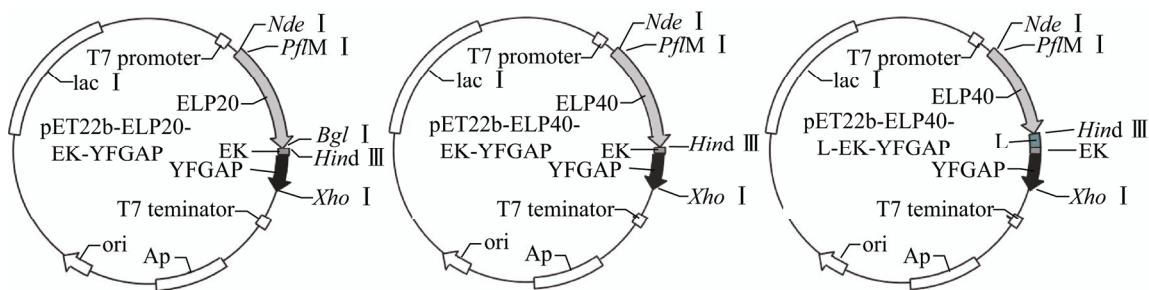


图 1 融合蛋白表达载体示意图

Figure 1 Schematic representation of the expression vector

1.2.4 重组多肽抑菌活性检测: 检测重组多肽对 4 种供试菌株的抑制作用。收集对数期细菌细胞,用新鲜 TSB 培养基^[18]稀释至 10^4 – 10^5 CFU/mL。向 96 孔酶标板中加入 100 μ L 菌悬液,再加入 100 μ L 系列稀释的重组蛋白溶液,以无菌肠激酶缓冲液为对照,于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养 16 h。酶标仪测定 600 nm 处吸收值,50%以上细菌生长被抑制的最低肽浓度定义为最低抑菌浓度(MIC)^[19]。

1.2.5 重组多肽溶血活性检测: 溶血活性根据 Seo 等^[18]方法进行测定。采集鲫鱼血液,4 $^{\circ}$ C、5 700 r/min 离心 5 min,用 PBS 缓冲液洗 3 遍后重悬为 3% 的红细胞悬液。将 100 μ L 的红细胞悬液与等体积的不同浓度的肽混匀,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,4 $^{\circ}$ C、5 700 r/min 离心 5 min。小心吸取上清 100 μ L 于 96 孔板内,用酶标仪测 405 nm 处吸光值。红细胞悬液中添加 0.5% 的 Triton X-100 作为最大的溶血率。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

构建了 pET22b-ELP20-EK-YFGAP、pET22b-ELP40-EK-YFGAP 和 pET22b-ELP40-L-EK-YFGAP 表达质粒。采用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果显示,酶切条带大小分别为 740、810 和 440 bp,与目标基因序列 *ELP40-EK-YFGAP*、*ELP40-L-EK-YFGAP* 和 *ELP20-EK-YFGAP* 大小吻合(图 2)。测序结果显示基因序列正确,重组表达载体构建成功。

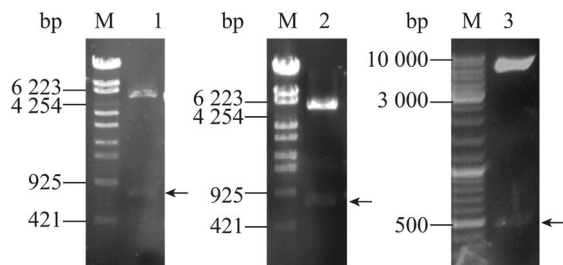


图 2 表达载体酶切电泳图

Figure 2 The cleavage map of the expression vector

Note: M: DNA marker; 1: pET22b-ELP40-EK-YFGAP; 2: pET22b-ELP40-L-EK-YFGAP; 3: pET22b-ELP20-EK-YFGAP. Digested by *Nde* I and *Hind* III.

2.2 表达蛋白的纯化

诱导融合蛋白表达,经两次 ITC 循环纯化后,SDS-PAGE 电泳检测,如图 3 所示。在 25.0 kD 和 27.0 kD 处有明显蛋白条带,与预期融合蛋白 ELP40-EK-YFGAP (E40EY) 和 ELP40-L-EK-YFGAP (E40LEY) 的大小相符,表明融合蛋白成功表达。通过两次 ITC 循环可以纯化出目标蛋白,纯度分别为 69.7% 和 50.4%,但依然会有两种杂蛋白存在。通过第 3 次和第 4 次纯化,SDS-PAGE 检测发现杂蛋白条带依然存在(结果未列出),表明该杂蛋白具有与 ELPs 相似的性质,所以通过 ITC 循环无法去除。融合蛋白 ELP20-EK-YFGAP (E20EY) 无法正常表达或者表达量较低,通过两次 ITC 纯化后,在 14 kD 处无明显条带,无法获得较纯的目标蛋白。

2.3 肠激酶酶切融合蛋白

采用 15% 的 SDS-PAGE 检测酶切后蛋白,如图 4 所示,箭头处融合蛋白条带消失,表明肠激酶可以成功酶切融合蛋白。经 Vivaspin Turbo 纯化柱纯化,Tricine-SDS-PAGE 电泳检测,如图 5 所示,在 3.3 kD 和 5.8 kD 之间有单一的条带,为目标蛋白 YFGAP。

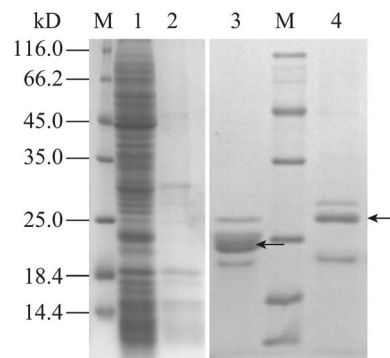


图 3 SDS-PAGE 分析纯化后融合蛋白

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the purified fusion protein expressed in *E. coli* BL21(DE3)

注: M: 蛋白分子量标准; 1: E20EY 一次纯化产物; 2: E20EY 二次纯化产物; 3: E40EY 二次纯化产物; 4: E40LEY 二次纯化产物。

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: The fusion protein E20EY after first round of ITC; 2: The fusion protein E20EY after second round of ITC; 3: The fusion protein E40EY after second round of ITC; 4: The fusion protein E40LEY after second round of ITC.

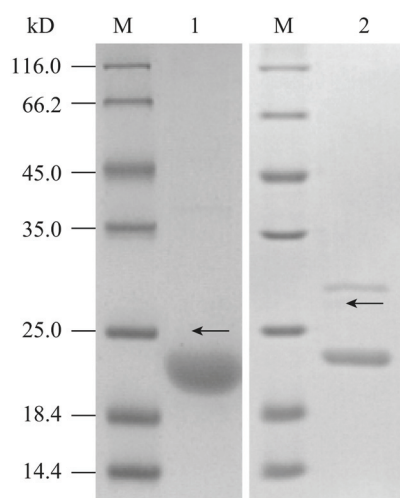


图4 SDS-PAGE 分析肠激酶酶切后融合蛋白

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the purified fusion protein cleaved by enterokinase

注: M: 蛋白分子量标准; 1: E40EY 酶切后蛋白; 2: E40LEY 酶切后蛋白。

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: The fusion protein E40EY cleaved by enterokinase; 2: The fusion protein E40LEY cleaved by enterokinase.

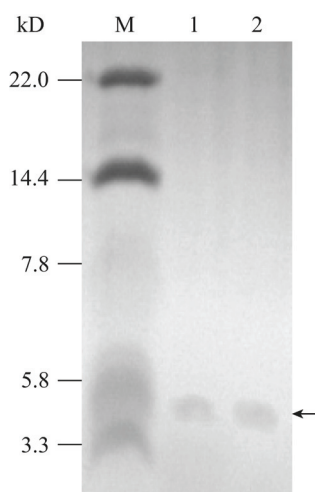


图5 Tricine-SDS-PAGE 分析纯化后抗菌肽 YFGAP

Figure 5 Tricine-SDS-PAGE analysis of the purified peptide YFGAP

注: M: 蛋白分子量标准; 1: E40EY 酶切纯化后多肽; 2: E40LEY 酶切纯化后多肽。

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: The recombinant peptide YFGAP after tag romving from E40EY; 2: The recombinant peptide YFGAP after tag romving from E40LEY.

2.4 重组多肽抑菌活性检测

微量稀释法检测重组抗菌肽 YFGAP 对 4 种病原菌的抑制作用结果见表 1, 抗菌肽 YFGAP 对 4 种供试菌株均有抑制作用。与 Magainin II 相比, 抗菌肽 YFGAP 抑制作用稍弱, 但都具有良好的抑制效果。

2.5 重组多肽溶血活性检测

重组抗菌肽 YFGAP 溶血活性如表 2 所示。在浓度低于 25 mg/L 时, 抗菌肽 YFGAP 无溶血活性, 当浓度达到 50 mg/L 时, 溶血活性为 5.5%, 这与 Magainin II (100 mg/L) 的溶血活性相似, 该重组抗菌肽 YFGAP 溶血作用微弱。

3 讨论

抗菌肽的来源问题是抗菌肽应用的最大限制瓶颈, 利用基因工程技术表达抗菌肽为实现抗菌肽的量化制备提供了有效途径。大肠杆菌表达系统具有培养周期短、表达量高、生产成本低等特点, 是

表 1 抗菌肽对不同致病菌的最低抑菌浓度

Table 1 Antibacterial assay of recombinant YFGAP and Magainin II against different pathogenic strains

测试菌株 Tested bacteria	最低抑菌浓度 MIC (mg/L)	
	YFGAP	Magainin II
<i>A. hydrophila</i>	50	25
<i>E. tarda</i>	50	50
<i>V. parahaemolyticus</i> MCCC 1A02609	50	25
<i>V. vulnificus</i> MCCC 1H00066	50	25

表 2 抗菌肽溶血活性

Table 2 Hemolytic activities of the recombinant YFGAP and Magainin II

蛋白浓度 Concentration (mg/L)	溶血率 Hemolysis (%)	
	YFGAP	Magainin II
6.25	0	0
12.50	0	0
25.00	0	0
50.00	5.5	0
100.00	—	5.4

生产抗菌肽的一种经济有效的方法^[13]。融合表达策略可以降低抗菌肽对宿主细胞的毒性,提高抗菌肽表达水平,同时利用融合蛋白中的特异性标签,便于蛋白的分离纯化^[12]。ELPs 由于其纯化方法简单,已用于抗菌肽的表达与分离,已有文献报道中使用的 ELPs 大都是 40–150 个重复序列^[20–23]。同时研究表明,在蛋白标签和目标蛋白之间插入 Linker,相当于标签蛋白与目标蛋白之间的屏障,减小蛋白之间的相互作用,获得有活性结构域的融合蛋白,同时有助于提高融合蛋白的表达量^[24]。本研究用课题组自行设计的较短的 ELP[KV8F-20]^[25]作为纯化标签,以抗菌肽 YFGAP 为研究对象,将该抗菌肽与不同长度的 ELPs (ELP20、ELP40)在 *E. coli* BL21(DE3)中连接,构建 3 种表达载体。另外,在 ELP40 和 EK-YFGAP 之间添加一段刚性 Linker (L)^[26],L 为一段五肽重复序列(EAAAK)₄,可以形成 α -螺旋结构,增加了 ELP40 和 EK 之间的空间距离,以期望减弱 ELPs 对肠激酶酶切位点的空间位阻效应,提高酶切效率。实验成功地表达出两种融合蛋白,如表 3 所示,经两轮 ITC 纯化,可以从 1 L 发酵液中获得 389 μ g E40EY 和 986 μ g E40LEY,纯度分别为 69.7%和 50.4%。纯化后 E40LEY 的蛋白量为 E40EY 的 2.5 倍,但是酶切去除 ELPs 标签得到的抗菌肽 YFGAP 较少(表 3)。推测原因可能是在蛋白标签 ELPs 和目标蛋白 YFGAP 之间插入刚性的 L,提高了蛋白的表达量,但刚性的 L 对肠激酶

与其切割位点的结合有阻碍作用,导致酶切效率低下。另外,经过两次 ITC 纯化后,依然有杂蛋白存在。实验中通过增加纯化次数也无法去除杂蛋白,说明该蛋白具有与 ELPs 融合蛋白相似的性质,增加纯化次数依然无法去除^[23]。但是,杂蛋白不会影响后续酶切实验。而无法纯化出 E20EY,可能是由于蛋白的表达量低^[27],且 ELPs 的相变温度受溶液的 pH、离子强度以及自身共价修饰的影响,导致较短的 ELPs 融合蛋白的 T_i 升高^[28],无法常温离心获得 E20EY。肠激酶酶切融合蛋白后,经 Vivaspin Turbo 纯化柱纯化,可得到天然氮端的高纯度抗菌肽 YFGAP,抑菌实验证明重组抗菌肽对 *A. hydrophila*、*E. tarda*、*V. parahaemolyticus* MCCC 1A02609 和 *V. vulnificus* MCCC 1H00066 均有抑制效果,溶血活性极低。

本文构建了一种以非色谱分离纯化方式得到高纯度重组 YFGAP 的方法,既解决了抗菌肽在表达过程中对宿主的毒害和表达产物易分解的问题,同时也解决了纯化方法繁琐、裂解后融合标签蛋白不易去除等问题。课题组探索了 ELP20 和 ELP40 对抗菌肽 YFGAP 分离纯化的影响,发现较短的 ELP20 不利于该抗菌肽的表达纯化,但 ELP40 可以成功纯化出目标蛋白。连接了刚性 L 可以提高融合蛋白的表达量,但是会阻碍肠激酶酶切作用,不利于重组多肽 YFGAP 的释放。后续将对融合蛋白的表达和纯化进行优化,期望进一步提高重组多肽的表达量。本研究为大规模、低成本制备抗菌肽 YFGAP 及其他抗菌肽提供了切实可行的方法。

参 考 文 献

- [1] Piotto SP, Sessa L, Concilio S, et al. YADAMP: yet another database of antimicrobial peptides[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 39(4): 346-351
- [2] Silva NC, Sarmiento B, Pintado M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(1): 5-10
- [3] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(3): 238-250
- [4] Lv JL, Wang BX, Zheng TL. Advance in study on active protein and peptide produced by marine bacteria-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(9): 1121-1128 (in Chinese)

表 3 蛋白表达量分析

Table 3 Yield of the recombinant protein

纯化步骤 Purification step	蛋白含量 ^a Total protein ^a		
	E20EY	E40EY	E40LEY
Sonicated supernatant (mg)	225.6	295.2	255.5
ITC purification (first round, mg)	27.3	18.2	22.3
ITC purification (second round, μ g)	270	389	986
Proteolytic cleavage (YFGAP, μ g)	—	33	18

注: ^a: Bradford 法分析蛋白表达量(1 L 发酵液, 5.5–6.5 g 菌体湿重)。

Note: ^a: Protein concentration was determined by Bradford protein assay (Based on 1 L of bacterial culture, 5.5–6.5 g wet weight).

- 吕静琳, 王宾香, 郑天凌. 海洋细菌活性蛋白、活性肽研究的若干新进展[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1121-1128
- [5] Wang L, Ma QQ, Shan AS, et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptide with Leu and Lys residues[J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 312-318 (in Chinese)
- 王良, 马清泉, 单安山, 等. 利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 α -螺旋抗菌肽[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 312-318
- [6] Pan CY, Huang TC, Wang YD, et al. Oral administration of recombinant epinecidin-1 protected grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) from *Vibrio vulnificus* infection and enhanced immune-related gene expressions[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 947-957
- [7] Huang TC, Chen JY. Proteomic and functional analysis of zebrafish after administration of antimicrobial peptide epinecidin-1[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 593-598
- [8] Kuan YC, Sheu F, Lee GC, et al. Administration of recombinant Reishi immunomodulatory protein (rLZ-8) diet enhances innate immune responses and elicits protection against nervous necrosis virus in grouper *Epinephelus coioides*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 986-993
- [9] Pan CY, Chow TY, Yu CY, et al. Antimicrobial peptides of an anti-lipoplysaccharide factor, epinecidin-1, and hepcidin reduce the lethality of *Riemerella anatipestifer* sepsis in ducks[J]. Peptides, 2010, 31(5): 806-815
- [10] Rajanbabu V, Chen JY. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future[J]. Peptides, 2011, 32(2): 415-420
- [11] Zhong J. Nisin, from laboratory into people's daily life[J]. Microbiology China, 2014, 41(3): 572-576 (in Chinese)
- 钟瑾. 乳链菌肽——从实验室走进百姓生活[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 572-576
- [12] Ma QS, Yu ZQ, Han B, et al. Research progress in fusion expression of antimicrobial peptides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(10): 1408-1416 (in Chinese)
- 马青山, 余占桥, 韩冰, 等. 抗菌肽融合表达研究进展[J]. 生物工程学报, 2011, 27(10): 1408-1416
- [13] Parachin NS, Mulder KC, Viana AA, et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides[J]. Peptides, 2012, 38(2): 446-456
- [14] Urry DW. Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics[J]. Journal of Protein Chemistry, 1988, 7(1): 1-34
- [15] Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins[J]. Current Protocols in Protein Science, 2010, 6(11): 1-20
- [16] Lim DW, Trabbic-Carlson K, Mackay JA, et al. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(5): 1417-1424
- [17] Ge HH, Huang ZH, Wang WY, et al. Low concentration of salt triggers elastin-like polypeptides inverse transition to purify 1,3-propanediol oxidoreductase[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(4): 709-712 (in Chinese)
- 葛慧华, 黄志宏, 王文研, 等. 以弹性蛋白多肽为标签纯化 1,3-丙二醇氧化还原酶[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(4): 709-712
- [18] Seo JM, Lee MJ, Go HJ, et al. Purification and characterization of YFGAP, a GAPDH-related novel antimicrobial peptide, from the skin of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 743-752
- [19] Fan F, Wu Y, Liu J. Expression and purification of two different antimicrobial peptides, PR-39 and Protegrin-1 in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2010, 73(2): 147-151
- [20] Massodi I, Thomas E, Raucher D. Application of thermally responsive elastin-like polypeptide fused to a lactoferrin-derived peptide for treatment of pancreatic cancer[J]. Molecules, 2009, 14(6): 1999-2015
- [21] Hu F, Ke T, Li X, et al. Expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with elastin-like polypeptides in *Escherichia coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(8): 2377-2387
- [22] Chao YC. Preliminary study on molecular cloning, fusion expression and antibacterial activity of antimicrobial peptide NK-2[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2010 (in Chinese)
- 巢亦成. 抗菌肽 NK-2 的分子克隆、融合表达及其抑菌活性的初步研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2010
- [23] Yang K, Su Y, Li J, et al. Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides[J]. Protein Expression and Purification, 2012, 85(2): 200-203
- [24] Chen XY, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, 64(10): 1357-1369
- [25] Huang KZ, Li JJ, Li W, et al. *De novo* design, non-chromatographic purification and salt-effect of elastin-like polypeptides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(4): 661-666 (in Chinese)
- 黄凯宗, 李晶晶, 李巍, 等. 类弹性蛋白多肽的从头设计、非色谱纯化及盐效应[J]. 生物工程学报, 2011, 27(4): 661-666
- [26] Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of Tf-based fusion proteins[J]. Pharmaceutical Research, 2009, 26(3): 523-528
- [27] Cai HY, Li Y, Zhang H, et al. Effects of gene design on recombinant protein expression—a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(9): 1201-1213 (in Chinese)
- 蔡海莺, 李杨, 张辉, 等. 基因设计对重组蛋白表达的影响研究进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1201-1213
- [28] Reiersen H, Clarke AR, Rees AR. Short elastin-like peptides exhibit the same temperature-induced structural transitions as elastin polymers: implications for protein engineering[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 283(1): 255-264