



基因工程法在微生物系统表达抗菌肽的研究进展

邵长轩[#], 付艳雪[#], 方禹鑫, 董娜^{*}, 单安山^{*}

东北农业大学 动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

邵长轩, 付艳雪, 方禹鑫, 董娜, 单安山. 基因工程法在微生物系统表达抗菌肽的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3620-3632.

SHAO Changxuan, FU Yanxue, FANG Yuxin, DONG Na, SHAN Anshan. Research progress in the expression of antimicrobial peptides in microbial systems by genetic engineering[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3620-3632.

摘要: 近年来, 抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)作为抗生素替代品之一受到广泛关注。AMPs 具有诸多优势, 如抗菌谱广、来源丰富且不易产生耐药性等。其生产工艺主要包括生物体内提取纯化、化学合成以及基因工程表达 3 种途径。然而, 天然分离法与化学合成法存在工序繁杂, 成本昂贵及产量较低等缺点, 不易于在 AMPs 实际生产中实施。相比之下, 基因工程表达更具经济性、科学性及其有效性。本文对 AMPs 的多种表达系统及其差异进行了综述, 并总结了提高 AMPs 异源表达产量的多种策略, 以期为 AMPs 的低成本规模化生产提供理论支撑。

关键词: 抗菌肽; 表达系统; 基因工程法; 微生物

资助项目: 黑龙江省自然科学基金(YQ2022C015); 国家自然科学基金(32030101, U21A20252); 中国博士后科学基金资助项目(2022M720694); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z22007)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (YQ2022C015), the National Natural Science Foundation of China (32030101, U21A20252), the China Postdoctoral Science Foundation (2022M720694), and the Heilongjiang Postdoctoral Fund (LBH-Z22007).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: SHAN Anshan, asshan@neau.edu.cn; DONG Na, ndong@neau.edu.cn

ORCID: SHAN Anshan (0000-0003-2830-7509); DONG Na (0000-0002-7823-4697)

Received: 2024-04-02; Accepted: 2024-06-28; Published online: 2024-07-01

Research progress in the expression of antimicrobial peptides in microbial systems by genetic engineering

SHAO Changxuan[#], FU Yanxue[#], FANG Yuxin, DONG Na^{*}, SHAN Anshan^{*}

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

Abstract: In recent years, antimicrobial peptides (AMPs) are considered alternatives to antibiotics and have received increasing attention. AMPs have a broad antibacterial spectrum and extensive sources and are not prone to drug resistance. At present, AMPs are mainly produced with three methods: extraction from natural sources, chemical synthesis, and microbial expression *via* genetic engineering. The application of the former two methods is limited due to their complicated processes, high costs, and low yields. Microbial expression *via* genetic engineering is more economical, scientific, and effective than the above two methods. This article introduces and compares the various expression systems and summarizes the strategies for increasing the heterologous expression levels, with a view to providing theoretical support for large-scale production of AMPs with low costs.

Keywords: antimicrobial peptides; expression system; genetic engineering method; microorganisms

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)也称为宿主防御肽(host defense peptides, HDPs), 于1980年首次被发现, 并命名为天蚕素, 随后在昆虫、两栖动物、人类以及众多动植物体中相继被发现^[1], 是多细胞生物中重要的免疫防御分子。AMPs可通过多样化的机制展现其抗菌活性且诱导耐药性的可能性相对较低^[2]。此类抗菌物质在替代抗生素方面展现出巨大潜力, 如何实现AMPs的规模化生产成为当前的研究热点。

AMPs的传统生产方式包括天然提取法和化学合成法。天然提取法是一个耗时且烦琐的过程, 例如Al-Dhafri等^[3]从蕈藜(*Fagonia bruguieri*)的叶子中分离植物肽进行纯化和鉴定, 采用甲醇溶剂提取, 反相高效液相色谱法纯化多肽, 最后通过MALDI-TOF/TOF质谱仪和扫描电子显微镜鉴定并分析多肽的特性, 但该过程烦琐, 难以实现多肽的大量制备。化学合成法虽

然效率高, 但过程繁杂且成本昂贵, 本课题组Shao等^[4-5]在开展AMPs结构功能关系研究时多借助固相肽合成技术制备, 费时耗力, 大规模合成颇为不易, 尤其在涉及多种天然氨基酸的掺入以及长肽序列控制方面, 更是充满挑战。在微生物表达系统中借助基因工程技术构建微生物重组载体, 与生物组织提取和化学合成相比具有更高的产量及更低的成本优势, 大部分采用细菌和酵母表达系统。本文对AMPs不同重组表达系统和高效制备策略进行概述, 为未来AMPs的低成本大规模生产提供理论基础。

1 抗菌肽的表达系统

目前基因工程表达AMPs的体系主要有原核和真核表达体系。其中, 细菌和酵母是用于AMPs生产的主要宿主, 占异源表达AMPs的97.4%^[6]。除此之外, 植物和昆虫也被用于AMPs的表达(图1)。

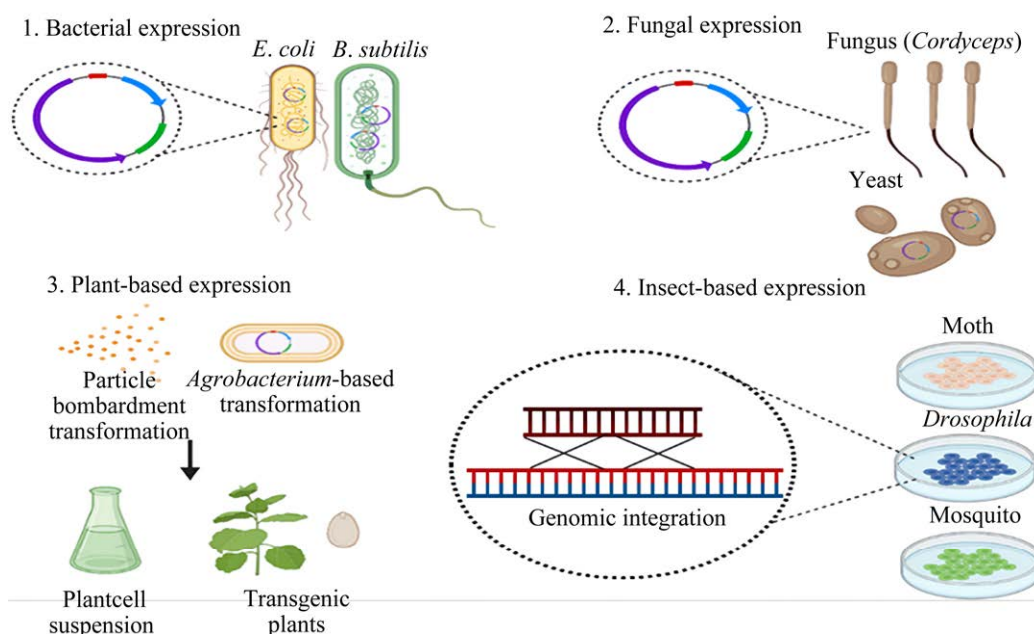


图 1 用于产生 AMPs 的不同细胞类型^[7]

Figure 1 Different cell types used to generate AMPs^[7].

1.1 原核生物表达系统

1.1.1 大肠杆菌表达系统

大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统在蛋白表达领域具有显著的优势,例如清晰的遗传结构、迅速的增殖速度以及较低的培养基成本等^[6]。然而,*E. coli*在实际应用过程中也面临诸多挑战,包括目标产物产量低下、烦琐的纯化环节、缺乏真核生物的修饰能力以及复杂的包涵体结构可能导致内毒素含量增加等^[7]。Schreiber 等^[8]基于 *E. coli* 的组合质粒库开发出了一种表达筛选平台,该平台能够避免复杂的反复试验来筛选适宜的表达载体,通过运用该筛选平台,可以挑选出生产力优越的表达菌株,有效解决了 *E. coli* 目的产物量低下问题。尽管 *E. coli* 表达系统仍面临许多难题,但在基因克隆、工艺规模化和自动化方面已经积累了丰富的经验,因此它仍然是规模化生产 AMPs 的有效途径。

小泛素相关修饰物(small ubiquitin-related modifier, SUMO)和谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GST)技术已广泛应用于 *E. coli* 表达系统中。Mo 等^[9]利用 *E. coli* 成功表达了富含脯氨酸的 AMPs apidaecins (APs);该研究采用 SUMO 融合技术和 ZYM-5052 自诱导培养基,使每升培养物可生产出 23 mg 重组融合蛋白 smt3AP2;经过裂解、亲和层析和阳离子交换柱层析等步骤对重组 AP2 进行进一步纯化,计算得出纯化后的重组 AP2 的分子量为 2.23 kDa,产率为 2.7 mg/L(表 1)。Feng 等^[27]利用 *E. coli* 基因编码技术,成功使 AMPs LfcinB-W10 与 GST 融合,构建了重组载体;从 1 L 培养物中得到 20 mg 纯度达 90%的融合蛋白;通过肠激酶消化,重组 AMPs LfcinB-W10 的产率达到 300 $\mu\text{g/L}$;将 AMPs 与 SUMO 和 GST 标签融合,可以提高目的基因的可溶性,从而使目的基因更易于表达。

表 1 AMPS 在不同表达系统中的生产
Table 1 Production of antimicrobial peptides in different expression systems

Expression system	Antimicrobial peptide	Source	Fusion partner	Host strain	Yields (mg/L)	References
<i>Bacillus subtilis</i>	Sublancin	<i>B. subtilis</i> ytl68-6	NP	<i>B. subtilis</i> ytl68-6	1 581.00	[10]
<i>Pichia pastoris</i>	Cathelicidin-BF	Silver ring snake	NP	<i>P. pastoris</i> X-33	500.00	[11]
<i>P. pastoris</i>	Hex-Mag	Synthetic	NP	<i>P. pastoris</i> GS115	260.00	[12]
<i>P. pastoris</i>	Protegrin-1	Pig	6×His	<i>P. pastoris</i> X-33	156.00	[13]
<i>P. pastoris</i>	Lactoferrin	Person	NP	<i>P. pastoris</i> KM71	115.00	[14]
<i>P. pastoris</i>	Fowlicidin-2	Chicken	NP	<i>P. pastoris</i> X-33	85.60	[15]
<i>P. pastoris</i>	Snakin-1	<i>Solanum tuberosum</i>	NP	<i>P. pastoris</i> GS115	40.00	[16]
<i>E. coli</i>	LL-37	Person	Trx	<i>E. coli</i> RV308ai	40.00	[17]
<i>P. pastoris</i>	EF-1	Hybrid peptide	6×His	<i>P. pastoris</i> X-33	32.65	[18]
<i>B. subtilis</i>	T9W	Pig	6×His	<i>B. subtilis</i> WB800N	32.00	[19]
<i>B. subtilis</i>	Cecropin AD	Hybrid peptide	6×His-SUMO	<i>B. subtilis</i> WB800N	26.40	[20]
<i>P. pastoris</i>	LfcinB-hLY	Hybrid peptide	NP	<i>P. pastoris</i> GS115	15.70	[21]
<i>Lactobacillus</i>	Plf	Pig	NP	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i>	12.50, 10.80, 9.90, 9.60	[22]
<i>E. coli</i>	Fowlicidin-2	Chicken	NP	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	6.00	[23]
<i>P. pastoris</i>	LIG	Person	6×His	<i>P. pastoris</i> GS115	5.90	[24]
<i>B. subtilis</i>	PR-FO (SP _{sacB}), PR-FO (SP _{amyQ})	Hybrid peptide	6×His	<i>B. subtilis</i> WB800N	4.00, 3.00	[25]
<i>B. subtilis</i>	Cathelicidin-BF	Silver ring snake	6×His-SUMO	<i>B. subtilis</i> WB800N	3.00	[26]
<i>E. coli</i>	Apidaecins	Apis mellifera	SUMO	<i>E. coli</i> DH5α and <i>E. coli</i> Rosetta	2.70	[9]
<i>E. coli</i>	LfcinB-W10	LfcinB	GST	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	0.30	[27]

NP: Not provide.

1.1.2 枯草芽孢杆菌表达系统

除 *E. coli* 外, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus*

subtilis)也是一种卓越的基因工程菌, 其优点包括表达稳定、成本低廉、可用作饲料添加剂等

各个方面; *B. subtilis* 168 基因组序列的测定有益于菌株的改良和工程菌的构建, 使其应用前景更为广阔^[7]。主要手段为通过失活 *B. subtilis* 168 的主要编码蛋白酶基因, 解决 *B. subtilis* 目的蛋白易被降解问题; 例如 WB800N 就是 *B. subtilis* 168 失活了 8 个蛋白酶基因的突变株, 是常用的表达菌株^[28]。Zhang 等^[19-20]以 *B. subtilis* WB800N 作为宿主菌, 将 AMPs T9W 和融合了 SP_{sacB} 信号肽的 AMPs Cecropin AD 分别与 6×His-SUMO 基因连接, 并克隆至麦芽糖诱导载体中, 经过诱导培养后, 重组 T9W、Cecropin AD 的纯化后表达量分别为 32、26.4 mg/L。枯草三十七肽(sublancin)是我国首个获得批准的新型 AMPs 饲料添加剂, 由 37 个氨基酸组成^[29]。刘扬科等^[10]通过对 *B. subtilis* YT168-6 进行摇瓶发酵条件与培养基组分的优化, 显著提升了 sublancin 的产量, 达到了 1 581 μg/mL, 相比优化前的 756 μg/mL, 提高了 2 倍以上。然而, *B. subtilis* 同样存在原核表达系统的共性问题, 例如, 多数 AMPs 表达产量过低、缺乏真核修饰(但可以进行脂酰化修饰)等缺点, 未来仍需进一步优化 *B. subtilis* 高密度发酵技术。

1.1.3 乳酸杆菌表达系统

乳酸杆菌(*Lactobacillus*)作为一种新兴的异源表达体系, 相较于 *E. coli* 表达体系, 其优势在于不产生内毒素, 并且表达的 AMPs 可与菌体共同投喂给动物, 其显著特征包括对乙醇、盐、低 pH 值以及宽温度范围的高度耐受性^[30]。已经有研究报道了 AMPs 在 *Lactobacillus* 中成功表达的案例, 如 Yu 等^[22]将猪乳铁蛋白(porcine lactoferrin, Plf)成熟肽的编码序列连接到表达载体 pPG612.1 的 *Xho* I/*Bam*HI 位点, 将重组质粒 pPG612.1-Plf 分别转入干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus casei*) ATCC393、戊糖乳植杆

菌(*Lactiplantibacillus pentosus*) KLDS1.0413、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) KLDS1.0344 和副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) KLDS1.0652; 经木糖诱导后, 结果显示, Plf 在上述 4 种重组 *Lactobacillus* 中均成功表达, 分子量约为 73 kDa; 重组 *L. casei*、*L. pentosus*、*L. plantarum*、*L. paracasei* 对 Plf 的表达量分别为 9.6、10.8、12.5、9.9 μg/mL。Hodaei 等^[31]从临床样本中提取人乳头瘤病毒 16 型主要衣壳蛋白 L1 的遗传物质, 通过特异性引物扩增 L1 基因, 并与载体 pNZ7021 连接构建质粒; 将质粒转入到 *Lactobacillus* 中后, 采用蛋白质印迹(Western blotting)法检测目的基因 L1 的蛋白表达, 结果表明重组 L1 蛋白分子量约为 55 kDa。*Lactobacillus* 能够在人体肠道内定殖存活, 并能与肠道屏障黏液层结合, 因此是重组蛋白生产的理想候选者^[32]。然而, 与 *E. coli* 和 *B. subtilis* 相比, *Lactobacillus* 在 AMPs 表达方面的研究相对较少, 未来仍需进一步深入探索。

1.2 真核表达系统

现阶段, AMPs 的真核表达系统中最广泛应用的是毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。相对于原核系统, *P. pastoris* 具备高效的启动子, 杂蛋白相对较少, 并且表达产物易于分泌至细胞外部, 方便分离纯化^[33]。Dong 等^[11]研究了 AMPs cathelicidin-BF (CBF) 在 *P. pastoris* X-33 中的表达, 并证实了其对高致病性 *E. coli* 菌株的活性, AMPs 的最佳表达量达到了 0.5 g/L, 表达产物在治疗 *E. coli* 感染的三黄肉鸡中显示出优异的抗菌效应。乙醇氧化酶 1 (alcohol oxidase 1, AOX1) 是一种常见的甲醇诱导型启动子, 在 α-信号肽的协助下, AOX1 能使细胞外蛋白达到高水平表达^[34]。Niu 等^[13]将 AMPs Protegrin-1 基因序列与 6×His 标签融合, 克隆到启动子为

AOX1 的 pPIC α -A 载体上, 并转化到 *P. pastoris* X-33 中, 经过 28 °C 下 1% 甲醇培养 96 h 后诱导表达, 最终表达量为 156 mg/L。

此外, *P. pastoris* 作为真核细胞具有翻译后修饰功能, 能够对含有特殊结构的蛋白进行二硫键修饰, 从而提高了 AMPs 表达的可变性^[35]。李桂平等^[12]在具有铰链结构“Gly-Ile-Gly”的 AMPs Magainin 1-12 的 N 端连接上强碱性的六肽 RRWQWR 进行修饰以增强其活性; 通过基因拼接扩增合成 AMPs Hex-Mag 并在 *P. pastoris* GS115 中实现稳定表达, 最终融合肽 Hex-Mag 产量约 260 mg/L。Kuddus 等^[16]将 AMPs Snakin-1 的 DNA 片段克隆到 pPIC9 载体中, 并转入 *P. pastoris* GS115 中, 重组得到表达产物约 40 mg/L。Snakin-1 是一种富含半胱氨酸的小阳离子肽, 包含 6 个分子内二硫键, 这表明 *P. pastoris* 表达系统可用于大规模生产具有 6 个二硫键的生物活性肽。

同时, 鉴于 *P. pastoris* 具有较强的好氧性且在发酵过程中毒副作用较弱, 使得该方法适用于大规模高密度发酵。Ying 等^[14]通过高密度发酵评估人乳铁蛋白基因在重组 *P. pastoris* 中的表达, 将目的基因克隆到 pPIC3.5K 载体并转入到 *P. pastoris* KM71 中进行分批补料高密度发酵, 结果显示, 人乳铁蛋白的最高表达量为 115 mg/L, 是摇瓶培养量的 7.67 倍。近年来, 高密度发酵已成为微生物酶高效生产的关键。Dai 等^[36]采用多因素调控策略来提高嗜热内切葡聚糖酶在 *P. pastoris* 中的异源表达; 利用 5 L 发酵罐进行中试发酵, 通过监测内切葡聚糖酶活力、溶解氧水平及微生物量优化发酵过程; 在甲醇发酵期, 内切葡聚糖酶蛋白质含量和活性分别为 15.8 g/L 和 9 640 IU/mL, 酶活水平与摇瓶相比提升约 85.3 倍。这证明了高密度发酵

在生产异源内切葡聚糖酶方面具有高效率 and 低成本的效果。在某些情况下, AMPs 在 *P. pastoris* 中的表达效果更好一些。例如, Xing 等^[15]利用 *P. pastoris* X-33 构建了 fowlicidin-2 重组表达体系; 优化发酵条件后, 产量为 85.6 mg/L。Feng 等^[23]在 *E. coli* BL21(DE3) 中构建 Fowlicidin-2 重组表达载体, 产量为 6 mg/L, 对比结果显示, *E. coli* 产量低于 *P. pastoris* 表达系统。

2 融合蛋白表达策略

鉴于大多数 AMPs 皆属于两亲性多肽范畴, 可能对宿主工程菌产生潜在的细胞毒性。采用融合蛋白进行 AMPs 重组表达可以降低毒性, 进而提高 AMPs 的表达量。最后, 融合蛋白会被特异性蛋白酶剪切并分离出目标 AMPs^[37]。

2.1 包涵体生产融合蛋白

包涵体(inclusion bodies, IBs)是指外源基因在原核表达系统中诱导高效表达时, 由于转录翻译速度过快导致蛋白质发生错误折叠, 从而形成的由膜包裹的高密度、不溶性且无活性的蛋白质颗粒(图 2)^[39]。IBs 具备一些独特的优势, 例如, 借助超滤离心技术能够高效分离 IBs, 便于后续处理; 由于其坚固的结构, 能够抵御蛋白酶的降解^[40]。因此, 在保留重组蛋白(recombinant protein, rPOI)生物学功能的前提下, 可以直接将其作为下游产品使用^[41-42]。目前主要是利用易于形成包涵体的融合标签介导目的蛋白包涵体的形成。Achmüller 等^[43]利用 N^{Pro} 聚合标签促进了包涵体的聚集, 使得多肽 E-GFPuv 在 *E. coli* 中得以表达, 而且 N^{Pro} 不需要化学或酶法去除融合标签。通过标签与 IBs 结合, 使 rPOI 得到充分表达。

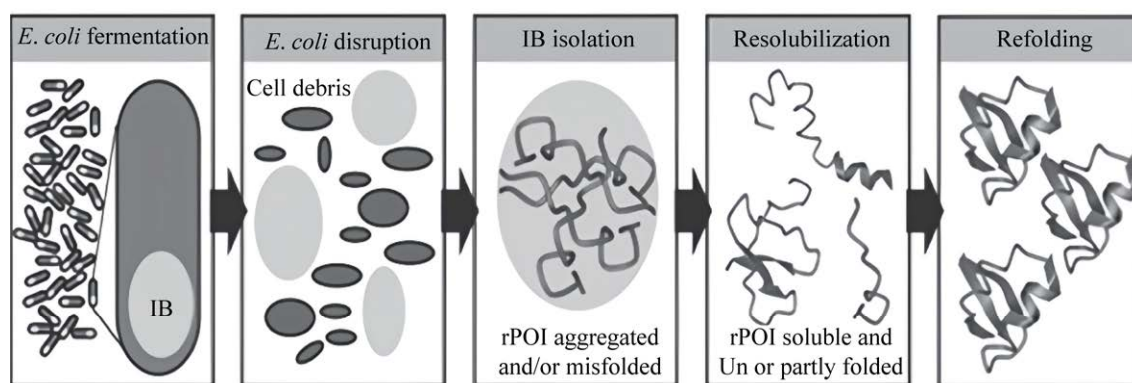


图 2 从 IBs 生产到 rPOI 重折叠的工艺步骤方案^[38]

Figure 2 Protocols of the process steps from IBs production to refolding of rPOI^[38].

2.2 融合标签的选择

原核表达系统在表达 AMPs 时面临两大挑战：(1) AMPs 含有丰富的碱性氨基酸残基，导致结构无序，因此极易被蛋白酶水解；(2) AMPs 作为目的蛋白单独表达可能对表达宿主细胞具有生物毒性；为了解决这两个问题，常用的策略是将 AMPs 附着在融合标签上^[44]。对于给定的 AMPs，仍然需要大量的试验来进行筛选，以选择合适的融合标签以在 IBs 中有效表达。此外，针对 IBs 的融合标签也需要不断扩展。Li 等^[45]对改进的融合标签 PagP 的聚集“热点”进行了结构分析，证明了 PagP 的 C 端区域含有大量的聚集“热点”，该“热点”能够作为有效的融合标签将 AMPs 靶向到 IBs；此外，异亮氨酸和亮氨酸具有大体积的疏水侧链，有助于分子间和分子内的相互作用，促进聚集体的形成。将聚集“热点”内部或附近的脯氨酸残基突变为疏水性的异亮氨酸残基和亮氨酸残基可以显著提高其作为 IBs 靶向融合标签的效力。

目前应用较多的融合表达系统还包括 β -半乳糖苷酶系统(β -galactosidase, β -gal)、GST、麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)系统、纯化标签融合系统及其他融合系统(如硫氧化还原蛋白)等^[46]。GST 已在 *E. coli* 中被证实能

够作为可溶性表达融合蛋白的载体。MBP 系统则具有提高表达水平、易于纯化和提高溶解性的优势^[47]。

2.2.1 硫氧化还原蛋白(thioredoxin, Trx)融合标签

硫氧化还原蛋白是一类存在于细菌、植物及动物等多种生物体内的耐热蛋白^[48]，其分子量约为 12 kDa，具有极高的可溶性。因此，Trx 常被用作融合载体，以提高 *E. coli* 中 rPOI/肽的可溶性表达^[49-50]。Trx 还能够防止 AMPs 被宿主蛋白酶降解，从而使得利用 Trx 标签表达的重组 AMPs 的产量相较于其他融合标签显著提升^[44]。Krahulec 等^[17]利用 Trx 标签在 *E. coli* RV308ai 中实现了 LL-37 的重组表达及纯化，表达量达到 40 mg/L，建立了一种自主研发的、适合大规模 rPOI 生产的重组表达系统。Panteleev 等^[51]则通过使用 Trx 标签成功重组生产了 tachyplesin I，有效抑制了其对宿主细胞的毒性作用并保护其免受蛋白水解。然而，由于肽的聚集，部分 Trx 可能会以 IBs 的形式积累，因此需要研究溶解度增强剂以克服不溶性作用^[52]。

2.2.2 谷胱甘肽硫转移酶(GST)融合标签

GST 是另一种用于融合表达 AMPs 的载体蛋白。与 Trx 类似，GST 在 *E. coli* 中被证实能

作为可溶性表达融合蛋白的重组载体蛋白。Fan 等^[53]利用 GST 融合系统将串联 PR-39 和 Protegrin-1 的 rPOI 在 *E. coli* 中成功表达, 纯化后验证其具有较高的抗菌活性。Fan 等^[54]还建立了新型阳离子肽 AIK 的最佳表达和纯化方法, 通过将目的序列插入到载体 pDEST15 中, 并转入到 *E. coli* BL21, 经 IPTG 诱导产生 GST-AIK 融合蛋白; 随后, 通过重组型 TEV 蛋白酶切割, 去除 GST 标签进行纯化, 最终获得了纯度超过 95% 的 rPOI。

2.2.3 小分子泛素样修饰蛋白(SUMO)融合标签

SUMO 融合标签在前文中已有提及, 它是一种与泛素结构相似但功能却有所不同的小分子量蛋白质, 能够协助目的蛋白正确折叠, 具有疏水核心及亲水外层, 能提高目的蛋白的可溶性和表达量^[55]。此标签不仅能够识别 SUMO 的三级结构, 而且切割底物时不会有多余氨基酸附着在产物上^[56-57]。SUMO 与 Trx 和 GST 有类似优势, 例如能以更高比例生成融合蛋白, 提高溶解度, 并且对宿主细胞无毒性作用。Kim 等^[58]利用 SUMO 的高溶解度, 在 SUMO 的 N 端又添加了 6×His 纯化标签, 成功地重组表达了 AMPs Abaecin; 并针对 6×SUMO-Abaecin 组合进行密码子优化, 发现天然 SUMO 序列与密码子优化 Abaecin 组合表达量最高, 而且大部分表达的融合蛋白能在可溶性部分被检测到。Luan 等^[26]将嵌合基因 His-SUMO-CBF 和 His-SUMO 蛋白酶 1 连接到载体 pHT43 中, 使 AMPs CBF 在 *B. subtilis* WB800N 中成功表达; 培养出来的上清经过纯化后, 重组融合蛋白 SUMO-CBF 产量为 22 mg/L, SUMO 蛋白酶 1 为 1 mg/L; 通过亲和层析和阳离子交换柱层析进一步纯化重组 CBF, 得到的 CBF 产量约为 3 mg/L。这些研究结果表明, 利用 SUMO 标签和适当的密码子优化策略, 可以高效表达

AMPs, 并且不影响宿主细胞活力。

2.3 融合蛋白的纯化

在过去的研究中, 蛋白质融合标签的纯化主要依赖于色谱法, 受到宿主表达及标签性质的影响, 具体的方法和条件则随标签种类的不同而有所差异。组氨酸标签(histidine-tag, His)是近年来在 AMPs 生产中最常用的纯化标签, 可通过亲和层析纯化不同的融合蛋白^[37]。Hou 等^[59]利用 His 标签标记 SUMO, 与 AMPs Scolopin 1 结合, 插入到 pSUMO 载体并转入到 *E. coli* BL21(DE3)中, 成功构建了重组表达载体; 采用亲和层析色谱法纯化重组蛋白, 最终纯度为 95%。然而, 一些新型的纯化标签正逐渐取代传统的色谱方法, 如弹性蛋白样多肽(elastin-like polypeptide, ELP); ELP 可通过改变盐浓度和温度条件, 在可溶态和聚集态之间进行转换, 从而实现快速分离融合蛋白的目的^[60]。Sousa 等^[61]利用 ELP 标签在 *E. coli* 中制备鱼类极性 AMPs, 将 ELP 与 AMPs Pa-MAP 2 融合, 以促进 AMPs 的聚集和分离, 实现 AMPs 的受控释放; 纯化后的 AMPs Pa-MAP 2 对 *E. coli* ATCC 8739 的 MIC 达到 25 μmol/L, AMPs Pa-MAP 2 的产量较 ELP 系统产生的其他 AMPs 高出 50 倍。

3 其他生产策略

3.1 抗菌肽的杂交表达策略

AMPs 杂交表达策略是通过将 2 种 AMPs 以偶联的方式串联到一起表达的技术手段。尽管已经研发出了各种融合蛋白技术以应对重组表达所带来的限制, 但 AMPs 对宿主的毒性作用以及对蛋白酶的敏感性可能会导致目标肽的表达量较低, 例如 1 g/L 融合蛋白和 40 mg/L 肽^[17]。近年来, 杂交表达已被视为一种提高 AMPs 表达水平及综合肽段功能特性的创新方法。在杂

交表达的概念中,两种不同性质的 AMPs 融合产生新的 AMPs,不仅具有高表达量,同时还具备较强的抗菌活性和对宿主细胞的低细胞毒性^[62]。例如,Zhang 等^[25]使用 PRW4 的前 16 个残基与 Fowlicidin-2 的后 15 个残基结合,组成 AMPs PR-FO,选择 AmyQ 和 SacB 信号肽在麦芽糖诱导的 *B. subtilis* 中表达,得到浓度分别为 16 mg/L (SP_{amyQ})和 23 mg/L (SP_{sacB})的融合蛋白,经纯化得到纯度为 90%的 PR-FO 3 mg (SP_{amyQ})和 4 mg (SP_{sacB});此重组 PR-FO 有较高抑菌活性,可抑制多种革兰氏阴性菌和阳性菌。Li 等^[18]在研究中将 PlnE 与 PlnF 杂交形成杂合肽 EF-1,提高了其对革兰氏阴性菌的抑菌活性,并在 *P. pastoris* 中实现了 PlnEF 的异源表达,最终 EF-1 的产量约为 32.65 mg/L,纯度达到了 94.9%。Sun 等^[21]利用组成型 GAP 启动子驱动牛乳铁蛋白和人溶菌酶在 *P. pastoris* GS115 中的融合表达,产量为 15.7 mg/L,通过阳离子交换柱层析和反相高效液相色谱纯化后,从 500 mL 细胞培养物中获得约 1.8 mg LfcinB-hLY;重组产生的融合肽对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌均有良好的抗菌活性。

3.2 多拷贝策略

另一种高水平表达 AMPs 的策略是多拷贝策略。该方法的原理是在宿主细胞中增加 AMPs 基因的拷贝数,从而提高基因转录水平和蛋白质表达量^[62]。Wang 等^[63]在黑曲霉 (*Aspergillus niger*)中成功构建了 CRISPR/Cas9 系统介导的米曲霉碱性丝氨酸蛋白酶(AoproS8)的多拷贝表达,通过敲除 *A. niger* FBL-B 的 3 个内源基因(*glaA*、*amyA* 和 *aamy*),首先在 *glaA* 位点替换 AoproS8 基因表达盒,测序证实为单拷贝 AoproS8 1.0,然后在单拷贝基础上进一步替换 *amyA* 转化成双拷贝 AoproS8 2.0,再从双拷贝基础替换 *aamy* 转化成三拷贝 AoproS8 3.0;经

过摇瓶发酵 5 d, AoproS8 3.0 在 *A. niger* 中的表达量是 AoproS8 1.0 的 2.1 倍。Zhao 等^[24]采用柔性连接子 Gly-Ser-Gly (G-S-G)对 AMPs LI 进行修饰,连接成二聚体 LIG,构建了 *P. pastoris* 表达载体 pPIC9K-6×His-3×FLAG-LIG,经肠激酶消化纯化后得到 5.9 mg/L 重组 LIG(rLIG);rLIG 具有高抗菌活性和低溶血活性。多拷贝策略表达的 AMPs 具有较高的表达率,是大规模生产 AMPs 的有效策略。

3.3 添加分子伴侣策略

分子伴侣是一类能够辅助蛋白质正确折叠和组装的蛋白质^[64]。由于分子伴侣可帮助蛋白质正确折叠、转运,实现遗传物质复制转录、生物信号转导等功能,因此通过添加分子伴侣可以显著提升蛋白质的表达水平^[65]。例如,Akbarian 等^[66]使用分子伴侣 α B-晶状体蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中重组表达人胰岛素,经纯化获得了大量重组蛋白。Bae 等^[67]开发了一种最佳融合伴侣筛选系统,成功表达了 hIL-2 和 hIL-32,研究结果显示这两种蛋白的产量能达到克级每升,这表明该系统可用于 rPOI 的高效分泌。因此,该筛选技术为生产各种难以表达的蛋白质提供了新的途径。

4 总结与展望

AMPs 的高度选择性以及不易产生微生物耐药性的特性,使得研究人员对其产生了浓厚的兴趣。尽管在 AMPs 的构建和开发方面已经取得了显著进展,然而,如何以低廉的成本大量获取纯品 AMPs 仍面临诸多技术障碍。当前,采用基因工程表达技术,如利用细菌或酵母等微生物,已被视为大规模表达 AMPs 的首选方式。在微生物表达系统中,可以从重组菌株的构建、表达产物的纯化、基因调控和蛋白分泌等多个方面进行优化。目前,选择融合蛋白标签、杂交表达、多

拷贝、添加分子伴侣等策略,均能在一定程度上提高 AMPs 的表达量,并且 AMPs 在微生物系统中的表达仍具有巨大的发展空间。例如,高通量表达筛选能够优化质粒特征和表达宿主;非色谱方法可替代色谱方法实现更具成本效益的蛋白质纯化;利用最佳融合伴侣筛选系统可分泌更多有价值的异源蛋白。在 AMPs 设计方面,将定量构效关系建模和计算机辅助设计与基因工程法相结合,也能进一步提高表达效率,使得 AMPs 的生产过程更加简便易行。这些方法可能无法提供一个固定的最终生产方案,需要根据不同 AMPs 的序列模式和结构功能关系进行选择,但所开发的各种策略对于重组生产 AMPs 和其他具有治疗价值的生物活性肽具有重要意义。相信随着技术的不断创新与完善,AMPs 可以实现大规模生产并更好地在农业、生物技术、制药和食品等领域得到广泛的应用。

参考文献

- [1] ZHANG QY, YAN ZB, MENG YM, HONG XY, SHAO G, MA JJ, CHENG XR, LIU J, KANG J, FU CY. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential[J]. *Military Medical Research*, 2021, 8(1): 48.
- [2] ZHU YY, HAO WJ, WANG X, OUYANG JH, DENG XY, YU HN, WANG YP. Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2022, 42(4): 1377-1422.
- [3] AL-DHAFRI KS, CHING CL. Isolation and characterization of antimicrobial peptides isolated from *Fagonia bruguieri*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(10): 4319-4332.
- [4] SHAO CX, TIAN HT, WANG TY, WANG ZH, CHOU SL, SHAN AS, CHENG BJ. Central β -turn increases the cell selectivity of imperfectly amphipathic α -helical peptides[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 69: 243-255.
- [5] SHAO CX, ZHU YJ, JIAN Q, LAI ZH, TAN P, LI GY, SHAN AS. Cross-strand interaction, central bending, and sequence pattern act as biomodulators of simplified β -hairpin antimicrobial amphiphiles[J]. *Small*, 2021, 17(7): e2003899.
- [6] PARACHIN NS, MULDER KC, VIANA AAB, DIAS SC, FRANCO OL. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides[J]. *Peptides*, 2012, 38(2): 446-456.
- [7] DEO S, TURTON KL, KAINTH T, KUMAR A, WIEDEN HJ. Strategies for improving antimicrobial peptide production[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 59: 107968.
- [8] SCHREIBER C, MÜLLER H, BIRRENBACH O, KLEIN M, HEERD D, WEIDNER T, SALZIG D, CZERMAK P. A high-throughput expression screening platform to optimize the production of antimicrobial peptides[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 29.
- [9] MO Q, FU A, LIN Z, WANG W, GONG L, LI W. Expression and purification of antimicrobial peptide AP2 using SUMO fusion partner technology in *Escherichia coli*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(6): 606-613.
- [10] 刘扬科, 赵天效, 卢晓颖, 李磊, 成鹏, 李松建, 解顺昌. 枯草芽孢杆菌 YT168-6 产抗菌肽 sublancin 的发酵工艺优化及培养基筛选的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(9): 3232-3241.
LIU YK, ZHAO TX, LU XY, LI L, CHENG P, LI SJ, XIE SC. Optimization of fermentation technology and selection of culture medium for antimicrobial peptide sublancin produced by *Bacillus subtilis* YT168-6[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(9): 3232-3241 (in Chinese).
- [11] DONG XF, SHAN H, WANG SB, JIANG ZJ, WANG SJ, QIN ZH. High expression of antimicrobial peptides cathelicidin-BF in *Pichia pastoris* and verification of its activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1153365.
- [12] 李桂平, 陈仪本. 一种新融合抗菌肽 Hex-Mag 基因的克隆、表达及其抗菌活性的研究[J]. *微生物学报*, 2021, 47(1): 115-120.
LI GP, CHEN YB. Cloning, expression and characterization of a new hybrid AMP gene of Hex-Mag[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 47(1): 115-120 (in Chinese).
- [13] NIU MF, CHAI SM, YOU XY, WANG WH, QIN CL, GONG Q, ZHANG TT, WAN P. Expression of porcine protegrin-1 in *Pichia pastoris* and its anticancer activity *in vitro*[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 9(3): 1075-1079.
- [14] 应革, 吴淑华, 王静, 赵小东, 陈建明, 张晓光, 侯云德. 重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达人乳铁蛋

- 白的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(2): 181-185.
- YING G, WU SH, WANG J, ZHAO XD, CHEN JM, ZHANG XG, HOU YD. Producing human lactoferrin by high-density fermentation recombinant *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2004, 18(2): 181-185 (in Chinese).
- [15] XING LW, TIAN SX, GAO W, YANG N, QU P, LIU D, JIAO J, WANG J, FENG XJ. Recombinant expression and biological characterization of the antimicrobial peptide fowlicidin-2 in *Pichia pastoris*[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 12(4): 2324-2330.
- [16] KUDDUS MR, RUMI F, TSUTSUMI M, TAKAHASHI R, YAMANO M, KAMIYA M, KIKUKAWA T, DEMURA M, AIZAWA T. Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 122: 15-22.
- [17] KRAHULEC J, HYRŠOVÁ M, PEPELIAEV S, JÍLKOVÁ J, ČERNÝ Z, MACHÁLKOVÁ J. High level expression and purification of antimicrobial human cathelicidin LL-37 in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(1): 167-175.
- [18] LI ZX, CHENG Q, GUO HN, ZHANG RJ, SI DY. Expression of hybrid peptide EF-1 in *Pichia pastoris*, its purification, and antimicrobial characterization[J]. Molecules, 2020, 25(23): 5538.
- [19] ZHANG LC, LI GQ, ZHAN N, SUN TT, CHENG BJ, LI YB, SHAN AS. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa*-targeted antimicrobial peptide T9W in *Bacillus subtilis* using a maltose-inducible vector[J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 22-27.
- [20] ZHANG LC, LI XD, ZHAN N, SUN TT, LI JP, SHAN AS. Maltose induced expression of cecropin AD by SUMO technology in *Bacillus subtilis* WB800N[J]. The Protein Journal, 2020, 39(4): 383-391.
- [21] SUN J, JIANG J, LIU LF, WANG Z, WEI C. Expression of the hybrid antimicrobial peptide lactoferrin-lysozyme in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, 66(2): 202-208.
- [22] YU H, JIANG YP, CUI W, WU X, HE J, QIAO XY, LI YJ, TANG LJ. Comparison of expression and antibacterial activities of recombinant porcine lactoferrin expressed in four *Lactobacillus* species[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(9): 1372-1380.
- [23] FENG XJ, XU WS, QU P, LI XC, XING LW, LIU D, JIAO J, WANG J, LI ZQ, LIU CL. High-yield recombinant expression of the chicken antimicrobial peptide fowlicidin-2 in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(2): 369-374.
- [24] ZHAO L, LI L, HU MY, FANG YX, DONG N, SHAN AS. Heterologous expression of the novel dimeric antimicrobial peptide LIG in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2024, 381: 19-26.
- [25] ZHANG LC, WEI DD, ZHAN N, SUN TT, SHAN BD, SHAN AS. Heterologous expression of the novel α -helical hybrid peptide PR-FO in *Bacillus subtilis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(9): 1619-1627.
- [26] LUAN C, ZHANG HW, SONG DG, XIE YG, FENG J, WANG YZ. Expressing antimicrobial peptide cathelicidin-BF in *Bacillus subtilis* using SUMO technology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3651-3658.
- [27] FENG XJ, LIU CL, GUO JY, BI CP, CHENG BJ, LI ZY, SHAN AS, LI ZQ. Expression and purification of an antimicrobial peptide, bovine lactoferricin derivative LfcinB-W10 in *Escherichia coli*[J]. Current Microbiology, 2010, 60(3): 179-184.
- [28] JEONG HY, JEONG DE, PARK SH, KIM SJ, CHOI SK. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain WB800N, an extracellular protease-deficient derivative of strain 168[J]. Microbiol Resour Announc, 2018, 7(18): e01263-18.
- [29] GARCIA de GONZALO CV, ZHU LY, OMAN TJ, van der DONK WA. NMR structure of the S-linked glycopeptide sublancin 168[J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9(3): 796-801.
- [30] 孙白荷, 吴悦, 赵芮, 楼雨馨, 李婉婷, 李延飞, 马琳琳. 不同表达系统的治疗性纳米抗体研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(11): 43-55.
- SUN BH, WU Y, ZHAO R, LOU YX, LI WT, LI YF, MA LL. Research progress of therapeutic nanobodies with different expression systems[J]. China Biotechnology, 2023, 43(11): 43-55 (in Chinese).
- [31] HODAEI MH, ANDUHJERDI RB, FALLAH MEHRABADI J, ESMAEILI D. Cloning and expression of the L1 immunogenic protein of human papillomavirus genotype 16 by using *Lactobacillus* expression system[J]. Gene Reports, 2019, 17: 100521.

- [32] BERLEC A, STRUKELJ B. Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2009, 3(2): 77-87.
- [33] XIANG L, WANG QH, ZHOU YL, YIN LF, ZHANG GM, MA YH. High-level expression of a ZEN-detoxifying gene by codon optimization and biobrick in *Pichia pastoris*[J]. *Microbiological Research*, 2016, 193: 48-56.
- [34] LEE JY, CHEN H, LIU AL, ALBA BM, LIM AC. Auto-induction of *Pichia pastoris* AOX1 promoter for membrane protein expression[J]. *Protein Expression and Purification*, 2017, 137: 7-12.
- [35] CEREGHINO JL, CREGG JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66.
- [36] DAI WL, DONG HF, ZHANG ZK, WU X, BAO TT, GAO L, CHEN XY. Enhancing the heterologous expression of a thermophilic endoglucanase and its cost-effective production in *Pichia pastoris* using multiple strategies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(19): 15017.
- [37] WIBOWO D, ZHAO CX. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(2): 659-671.
- [38] HOFFMANN D, EBRAHIMI M, GERLACH D, SALZIG D, CZERMAK P. Reassessment of inclusion body-based production as a versatile opportunity for difficult-to-express recombinant proteins[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(5): 729-744.
- [39] VERA A, GONZÁLEZ-MONTALBÁN N, ARÍS A, VILLAVERDE A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(6): 1101-1106.
- [40] SINGHVI P, SANEJA A, SRICHANDAN S, PANDA AK. Bacterial inclusion bodies: a treasure trove of bioactive proteins[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(5): 474-486.
- [41] CARRIÓ MM, CORCHERO JL, VILLAVERDE A. Dynamics of *in vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 169(1): 9-15.
- [42] SINGH SM, PANDA AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(4): 303-310.
- [43] ACHMÜLLER C, KAAR W, AHRER K, WECHNER P, HAHN R, WERTHER F, SCHMIDINGER H, CSERJAN-PUSCHMANN M, CLEMENTSCHITSCH F, STRIEDNER G, BAYER K, JUNGBAUER A, AUER B. N^{pro} fusion technology to produce proteins with authentic N termini in *E. coli*[J]. *Nature Methods*, 2007, 4: 1037-1043.
- [44] LI YF. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 54(1): 1-9.
- [45] LI XF, ZHANG BR, HU Q, CHEN CC, HUANG JH, LIU L, WANG SB. Refinement of the fusion tag PagP for effective formation of inclusion bodies in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e0380322.
- [46] ASHCHEULOVA DO, EFIMOVA LV, LUSHCHYK AY, YANTSEVICH AV, BAIKOV AN, PERSHINA AG. Production of the recombinant antimicrobial peptide UBI₁₈₋₃₅ in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 143: 38-44.
- [47] LÉNON M, KE N, REN GP, MEUSER ME, LOLL PJ, RIGGS P, BERKMEN M. A useful epitope tag derived from maltose binding protein[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2021, 30(6): 1235-1246.
- [48] HLAVAC F, ROUER E. Expression of the protein-tyrosine kinase p56lck by the pTRX vector yields a highly soluble protein recovered by mild sonication[J]. *Protein Expression and Purification*, 1997, 11(3): 227-232.
- [49] LaVALLIE ER, DiBLASIO EA, KOVACIC S, GRANT KL, SCHENDEL PF, McCOY JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 187-193.
- [50] LaVALLIE ER, LU Z, DiBLASIO-SMITH EA, COLLINS-RACIE LA, McCOY JM. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. *Methods in Enzymology*, 2000, 326: 322-340.
- [51] PANTELEEVA PV, OVCHINNIKOVA TV. Improved strategy for recombinant production and purification of antimicrobial peptide tachyplesin I and its analogs with high cell selectivity[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2017, 64(1): 35-42.
- [52] PANE K, DURANTE L, PIZZO E, VARCAMONTI M, ZANFARDINO A, SGAMBATI V, Di MARO A,

- CARPENTIERI A, IZZO V, Di DONATO A, CAFARO V, NOTOMISTA E. Rational design of a carrier protein for the production of recombinant toxic peptides in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146552.
- [53] FAN F, WU YM, LIU JX. 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.
- [54] FAN FF, SUN HY, XU H, LIU JW, ZHANG HY, LI YL, NING XL, SUN Y, BAI J, FU SB, ZHOU CS. Expression, purification of recombinant cationic peptide AIK in *Escherichia coli* and its antitumor activity[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(12): 1753-1763.
- [55] SUN ZY, XIA ZN, BI F, LIU JN. Expression and purification of human urodilatin by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3): 495-502.
- [56] BOMMARIUS B, JENSSEN H, ELLIOTT M, KINDRACHUK J, PASUPULETI M, GIEREN H, JAEGER KE, HANCOCK REW, KALMAN D. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*[J]. *Peptides*, 2010, 31(11): 1957-1965.
- [57] LEE CD, SUN HC, HU SM, CHIU CF, HOMHUAN A, LIANG SM, LENG CH, WANG TF. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2008, 17(7): 1241-1248.
- [58] KIM DS, KIM SW, SONG JM, KIM SY, KWON KC. A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using SUMO fusion tag[J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19(1): 13.
- [59] HOU HH, YAN WL, DU KX, YE YJ, CAO QQ, REN WH. Construction and expression of an antimicrobial peptide scolopin 1 from the centipede venoms of *Scolopendra subspinipes mutilans* in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner[J]. *Protein Expression and Purification*, 2013, 92(2): 230-234.
- [60] URRY DW, TRAPANE TL, PRASAD KU. Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of composition-temperature studies[J]. *Biopolymers*, 1985, 24(12): 2345-2356.
- [61] SOUSA DA, MULDER KCL, NOBRE KS, PARACHIN NS, FRANCO OL. Production of a polar fish antimicrobial peptide in *Escherichia coli* using an ELP-intein tag[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 234: 83-89.
- [62] DENG T, GE HR, HE HH, LIU Y, ZHAI C, FENG L, YI L. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems[J]. *Protein Expression and Purification*, 2017, 140: 52-59.
- [63] WANG SN, XUE YB, ZHANG P, YAN QJ, LI YX, JIANG ZQ. CRISPR/Cas9 system-mediated multi-copy expression of an alkaline serine protease in *Aspergillus niger* for the production of XOD-inhibitory peptides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(41): 15194-15203.
- [64] BOSE D, CHAKRABARTI A. Substrate specificity in the context of molecular chaperones[J]. *IUBMB Life*, 2017, 69(9): 647-659.
- [65] FREILICH R, ARHAR T, ABRAMS JL, GESTWICKI JE. Protein-protein interactions in the molecular chaperone network[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2018, 51(4): 940-949.
- [66] AKBARIAN M, YOUSEFI R. Human α B-crystallin as fusion protein and molecular chaperone increases the expression and folding efficiency of recombinant insulin[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206169.
- [67] BAE JH, SUNG BH, KIM HJ, PARK SH, LIM KM, KIM MJ, LEE CR, SOHN JH. An efficient genome-wide fusion partner screening system for secretion of recombinant proteins in yeast[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12229.