

综述

抗菌肽在大肠杆菌中的融合表达

张学敏, 金莉莉, 王铮, 王秋雨

辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036

张学敏, 金莉莉, 王铮, 等. 抗菌肽在大肠杆菌中的融合表达. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1172-1181.

Zhang XM, Jin LL, Wang Z, et al. Fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1172-1181.

摘要: 抗菌肽作为新一代抗生素的潜在应用价值使其备受关注, 大量高纯度的抗菌肽是开展基础及临床实验的关键。天然来源的抗菌肽资源有限、纯化困难, 化学合成抗菌肽成本高、活性不稳定, 因此通过基因重组表达得到大量抗菌肽是低成本、高效益的方法。目前采用大肠杆菌表达系统获得抗菌肽已成为研究者的首选, 通常以形成融合蛋白的方式表达, 这不仅可避免抗菌肽对宿主的杀伤作用, 也保护了抗菌肽免受蛋白酶降解。文章结合课题组的研究工作, 综述了近年来抗菌肽在大肠杆菌中表达的融合载体、融合蛋白的裂解方法及表达条件优化的研究进展。

关键词: 抗菌肽, 载体蛋白, 融合表达, 裂解方法, 条件优化

Fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*

Xuemin Zhang, Lili Jin, Zheng Wang, and Qiuyu Wang

Life Science School, Liaoning University, Shenyang 110036, Liaoning, China

Abstract: Due to their potential application as novel antibiotics, antimicrobial peptides are attracting much attention. Large quantities of highly purified peptides are crucial to basic and clinical studies. Natural resources of antimicrobial peptides are limited and hard to purify, chemical synthesis is of high-cost and unstable, so recombinant expression of antimicrobial peptides is a cost-effective way. *Escherichia coli* has been the most widely used as host to express

Received: October 10, 2013; **Accepted:** November 21, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31071916), Project of Shenyang Science and Technology Plans (No. F12-277-1-40).

Corresponding author: Qiuyu Wang. E-mail: qiuyuwang@lnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31071916), 沈阳市科技计划项目 (No. F12-277-1-40) 资助。

网络出版时间: 2013-12-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131217.1121.003.html>

antimicrobial peptides with fusion protein, which can not only avoid the lethal effect towards the host, but also protect the peptide from degradation by proteases. Combined with our research, the present article reviews the progress of fusion vector, cleavage methods and optimization options for antimicrobial peptides production with fusion protein in *Escherichia coli*.

Keywords: antimicrobial peptides, carrier protein, fusion expression, cleavage methods, condition optimizing

抗菌肽是由生物防御系统产生的一类小分子肽类物质^[1], 通常由 10–50 个氨基酸组成, 大多带有一定量的正电荷。抗菌肽具有广谱抗菌活性, 对细菌、真菌及一些包膜病毒都表现出显著活性, 而且抗菌肽主要与微生物膜作用, 阻碍了微生物产生抗药性的能力。由于抗菌肽本身的优势, 它作为一种新型抗生素引起了人们广泛的兴趣, 低成本生产大量抗菌肽是对其进行基础研究及广泛应用的前提。重组 DNA 技术为蛋白生产提供了一种经济有效的方式, 许多抗菌肽已经通过基因重组技术在多种异源宿主中成功表达^[2], 如酵母、昆虫、大肠杆菌等。酵母表达系统具有完备的基因表达调控机制和对产物的加工修饰能力, 毕赤酵母表达系统是其中的典型代表, 该系统表达的抗菌肽多为分泌表达, 产物对宿主菌没有明显的抑制作用, 但存在着表达效率低、发酵周期长和易污染等弱点^[3]。昆虫表达系统是另一类应用广泛的真核表达系统, 如以杆状病毒为载体, 在昆虫细胞 Sf-9 中表达抗菌肽 Shiva-1a^[4], 该表达系统具有同大多数高等真核生物相似的翻译后修饰、加工以及转移外源蛋白的能力, 蛋白表达水平较高、成本低, 但缺点是翻译后加工修饰体系操作繁琐^[5]。大肠杆菌是表达异源重组蛋白应用最为广泛的宿主, 与酵母表达系统及昆虫表达系统相比, 大肠杆菌表达系统具有能在较短的时间内高水平地表达多种蛋白、发酵条件易掌控

和表达成本低等优势, 但其也具有翻译后加工修饰体系不完善、表达产物的生物活性较低等弱点^[5]。鉴于抗菌肽分子量较小, 且基本不需要翻译后的加工修饰, 所以综合考虑大肠杆菌表达系统应是抗菌肽重组表达的第一选择。

另外, 抗菌肽一般是阳离子小分子多肽, 它极易被蛋白酶降解, 且对宿主细胞具有一定的杀伤作用, 因此在抗菌肽异源表达时经常会将目的肽与融合载体连接, 融合载体的作用类似于天然抗菌肽产生过程中能够保护抗菌肽及宿主细胞的前导肽部分, 在生物合成中保护肽和宿主免受伤害^[6]。融合蛋白形成以后, 可以通过酶解法或化学裂解方法进行切割, 然后进一步分离纯化获取抗菌肽。在大肠杆菌中常用的载体蛋白主要包括两类: 促进可溶性表达的载体蛋白和促进包涵体形成的载体蛋白。此外, 自身可降解蛋白和信号肽由于可自动切割标签, 引导分泌表达, 亦可分别作为载体蛋白应用^[7]。本文结合课题组的研究工作, 综述了近年来抗菌肽在大肠杆菌体系中重组表达使用的融合载体、融合蛋白的裂解方法及表达条件优化的研究进展。

1 协助抗菌肽可溶性表达的载体蛋白

硫氧还蛋白是一个常用的分泌表达抗菌肽的载体蛋白, 它不仅能够增加重组蛋白的可溶性, 降低重组蛋白被宿主蛋白酶降解的机率,

而且能够催化胞质中重组蛋白二硫键的形成^[8]。抗菌肽重组生产数据库数据显示, 硫氧还蛋白载体蛋白的使用频率最高, 大约占融合表达总数的 25%以上, 它分子质量小 (11.8 kDa), 且高度可溶, 这些性质使硫氧还蛋白成为在大肠杆菌细胞质中表达重组抗菌肽广泛使用的融合载体^[9-10], 而且会提高融合蛋白的产量。最近的一项研究表明, 在被测的 13 种不同的载体蛋白中, 尽管硫氧还蛋白整体表达水平并不是最高的, 但其融合肽的产量却是最高的^[11]。Li 在大肠杆菌中成功表达了与硫氧还蛋白融合的人源性抗菌肽 LL-37, 融合蛋白的产量为 31.5 mg/L^[12]。Xia 等将硫氧还蛋白与抗菌肽 cecropinXJ 在大肠杆菌中融合表达, 镍柱纯化后, 融合蛋白的产量为 10 mg/L, 对金黄色葡萄球菌具有抑菌活性, 最小抑菌浓度 (MIC) 为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ^[13]。Aleinein 等将抗菌肽 ranalexin 与硫氧还蛋白融合表达, 经过两次亲和层析纯化后, 融合蛋白的产量为 1 mg/L, 该融合蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及酿脓链球菌都显示了较好的抑菌活性^[14]。硫氧还蛋白需要与亲和标签融合以便于目的蛋白的分离纯化, 最常用的亲和标签是 His 标签。

谷胱甘肽转移酶 (GST) 是另一种常用的融合蛋白表达载体, 有助于保护重组蛋白免受胞外蛋白酶的降解, 提高其稳定性、可溶性, 并可作为标签, 通过亲和层析纯化表达产物。所以抗菌肽同 GST 标签融合表达将显著提高其表达量、降低生产成本。但是由于 GST 分子量比较大 (27 kDa), 而抗菌肽通常是小分子量多肽, 这样会造成抗菌肽在融合蛋白中比例偏低, 降低表达效率^[15]。

SUMO 是一种新型的融合载体, SUMO 与泛素结构类似但功能不同, 已经证明它能提高目的蛋白的折叠效率和溶解度^[16-17]。SUMO 分子质量小 (11.2 kDa), 有利于提高抗菌肽的产量。SUMO 蛋白酶能够特异识别 SUMO 的三级结构, 这样就能够完全避免对目的抗菌肽的切割, 使酶切后的目的蛋白具有天然的 N-端结构, 这对于保持抗菌肽活性至关重要^[17-19]。2008 年, 美国乔治亚州埃默里大学的一个研究小组获得了 SUMO 表达系统生产抗菌肽的专利^[20]。近日, 该研究小组进一步证明在大肠杆菌中使用该系统生产抗菌肽具有低成本高效益特点^[21]。研究证明应用 SUMO 融合系统, 一些比较难表达的蛋白质如非典型肺炎病毒蛋白已经在大肠杆菌中成功表达^[22]。同硫氧还蛋白一样, SUMO 也需要与亲和标签融合方便目的蛋白的分离纯化, 最常用的亲和标签是 His 标签。

2 协助抗菌肽包涵体表达的载体蛋白

与可溶性表达相比, 包涵体表达减轻了抗菌肽对宿主的毒性作用, 而且保护目的肽免受降解。然而, 正如前文所述, 很多抗菌肽都成功地以可溶的方式融合表达, 这说明促使融合蛋白形成包涵体对保护宿主和目的肽并不是必要的。不过包涵体表达产量高、蛋白稳定、融合蛋白易于纯化仍是其难以替代的优势。包涵体是不溶性组分, 裂解细胞后通过离心可以初步提取, 再通过清洗、固定化金属亲和层析 (IMAC) 进一步纯化。类固醇异构酶^[23]、PurF 片段^[24]、PaP3.30^[25]和 TAF12 组蛋白折叠结构域^[26]属于这类载体蛋白。Lee 等将 PurF 片段与抗菌肽 MSI-344 融合, 融合蛋白以包涵体形式表达,

表达量约占细胞总蛋白的 30%^[24]。Majerle 等将乳铁蛋白与类固醇异构酶融合, 高效获得了易纯化, 稳定性较高的融合蛋白^[23]。本文课题组将东北林蛙皮抗菌肽 Dybowski-2CDYa、抗菌肽 AWRK6 分别与 hEGF (人表皮生长因子) 基因融合, 在大肠杆菌体系内成功以包涵体形式表达了融合蛋白, 表达量高、易纯化, 实验数据显示在未酶切的状态下融合蛋白即具有抑菌功能又有促成纤维细胞分裂功能 (未发表数据)。

3 可自我剪切的载体蛋白

内含肽(Intein)是内含子对应的多肽序列, 能够自我催化蛋白质的剪接, 使自身从前体蛋白中切除, 并将两侧外显肽连接形成成熟蛋白^[27]。利用内含肽的自我剪接特性, 可以构建亲和标签-内含肽-抗菌肽体系, 表达目标蛋白后, 利用亲和标签进行融合蛋白的纯化, 通过改变温度、pH 或加入巯基试剂等方法诱导内含肽自我剪切, 从而实现蛋白质“一步一柱法纯化”。至今有多种抗菌肽通过内含肽载体实现了表达, 如 Gu 等构建了内含肽介导 PHB 纯化人源抗菌肽 LL-37 体系, 高效表达 LL-37 融合蛋白, 并成功纯化了目的蛋白^[28]。自我剪接的内含肽消除了外源蛋白酶及化学试剂的消耗, 同时也简化了纯化过程。不过它也存在一些缺点, 如自我剪切的诱导条件不易控制, 而且有些自我剪切的诱导剂如巯基试剂会影响目标蛋白的二硫键及相应结构^[29]。另外内含肽的分子量较大, 影响目的肽的表达量。

4 信号肽载体蛋白

大肠杆菌周质是一个比细胞质的氧化性更

高的环境, 有利于外源蛋白的正确折叠。信号肽介导的分泌表达简化了蛋白纯化工艺。此外, 分泌表达后会切除信号序列, 外源蛋白前端的甲硫氨酸残基不复存在, 保证了外源蛋白 N-端无多余残基。大肠杆菌中常用的信号序列包括 OmpA、PelB、PhoA 和 HlyA 等。用大肠杆菌分泌表达抗菌肽需要考虑抗菌肽对宿主菌的杀伤作用。也有研究表明信号序列的存在可能无法保证目的蛋白的分泌表达, 表达的蛋白仍然可以只形成包涵体^[30]。Wu 等以分泌的形式在大肠杆菌中成功表达了信号肽 PelB、Cherry 标签和抗菌肽 metchnikowin 融合蛋白, 该融合蛋白在诱导 18 h 后表达量为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[31], Cherry 标签的存在抑制了抗菌 metchnikowin 对宿主的杀伤作用。Cherry 标签是细胞色素的血红素结合域^[32], 具有可视化特点, 利用这一特性目前已开发了 Cherry 标签可视化蛋白表达系统, 表达出的融合蛋白会带有 Cherry 的红色标签, 这样不仅可以简单快速检测出目的蛋白的浓度, 而且由于 Cherry 标签的高溶解度也提高了目的蛋白的溶解性。表 1 列举了大肠杆菌中融合表达的部分抗菌肽及其融合载体。

5 融合蛋白的裂解方法

抗菌肽融合表达有助于目标蛋白的正确折叠和溶解, 但也可能会产生不利影响, 融合标签的存在可能会影响目的蛋白的结构, 抑制目的蛋白的活性。因此, 在研究抗菌肽性质或功能时, 需要考虑融合标签移除的必要性。除了裂解后进行自我裂解的内含肽和信号肽, 其他融合蛋白都需要外源性的化学物质或是蛋白酶来释放目标抗菌肽。

表 1 在大肠杆菌中融合表达的部分抗菌肽及其融合载体

Table 1 A part of fusion antimicrobial peptides expressed in *E. coli* and its carrier

Antimicrobial peptides	Size	Carriers	Fusion solubility	Yield (mg/L)
β -Defensin2 ^[33]	41	Thioredoxin	Soluble	346.0
Divercin V41 ^[34]	43	Thioredoxin	Soluble	23.0
Cecropin ^[35]	36	Thioredoxin	Soluble	11.2
ABP-CM4 ^[36]	35	Thioredoxin	Soluble	1.2
Viscotoxin-A3 ^[11]	46	Thioredoxin	Soluble	5.2
LL-37 ^[12]	37	Thioredoxin	Soluble	31.5
cecropinXJ ^[13]	38	Thioredoxin	Soluble	10.0
Ranalexin ^[14]	20	Thioredoxin	Soluble	1.0
Lactoferricin B ^[37]	25	GST	Soluble	2.0
Puroindoline-A ^[38]	118	GST	Soluble	1.8
CRAMP ^[39]	34	GST	Soluble	1.5
hEGF ^[40]	53	SUMO	Soluble	16.7
PTH(1-34) ^[41]	34	SUMO	Soluble	3-4
GLP-1(7-37) ^[41]	31	SUMO	Soluble	1.5
Exendin-4 ^[41]	49	SUMO	Soluble	1.5
Histonin ^[42]	21	PurF fragment	Insoluble	167.0
Buforin-2B ^[43]	22	PurF fragment	Insoluble	131.0
hBNP ^[44]	32	Intein	Insoluble	2.4
Bin-1b ^[45]	49	Intein	Partially soluble	3.2
Hepcidin I ^[46]	26	OmpA	Soluble	NA
Metchnikowin ^[31]	26	PelB	Soluble	300

Size represents the number of amino acid residues; NA: not available.

溴化氰、甲酸和羟胺是 3 个主要用于融合标签去除的化学试剂。化学裂解的主要原理是：在目标蛋白与融合标签之间插入一个甲硫氨酸残基，诱导表达并纯化后，用溴化氰或羟胺处理所纯化的融合蛋白，使融合蛋白在插入的甲硫氨酸残基处断裂，从而使标签从目标蛋白脱离^[47]。Zhang 等制备新型降钙素时就用到了溴化氰裂解，裂解后的蛋白经过 S-Sepharose 纯化得到新型降钙素前体，纯度达到 97.6%^[48]。虽然溴化氰比其他两者应用得更广泛，不过抗菌

肽序列中甲硫氨酸的存在限制了它的应用。此外，载体中或是连接区域的甲硫氨酸可以使后续的纯化变得复杂且低效。甲酸和羟胺很少产生非特异性裂解。化学裂解法具有效率高、成本低等优点，不过却容易破坏目的蛋白的结构和功能，且化学裂解试剂具有毒性，不适合药用蛋白的处理及研究。

肠激酶、凝血酶、Xa 因子、TEV 蛋白酶、SUMO 蛋白酶是几种常用的融合蛋白裂解酶。它们可以识别蛋白质的特殊序列，在融合标签

和目的蛋白之间加入蛋白酶识别序列, 可以实现融合蛋白标签的移除。研究发现, 肠激酶、Xa 因子和凝血酶的切割效率较低, 可能是因为目的蛋白聚集使酶切位点不易接近^[49]或是周围残基的影响^[50]。对于切割效率低的蛋白酶, 通常需要延长酶切时间, 这样容易产生非特异性切割, 且长时间酶切可能会造成目的蛋白的失活^[51-52]。TEV 蛋白酶是一种不受低浓度尿素控制的蛋白酶, 在很多情况下可以产生原始的 N-末端^[53], 其生产方式相对容易, 成本相对较低。本课题组在 His 标签和 hEGF-AWRK6 融合蛋白之间加入了 TEV 蛋白酶识别位点, 已证明 TEV 蛋白酶在 4 °C 过夜条件下可将标签切掉。SUMO 蛋白酶只识别 SUMO 的三级结构, 此酶不在目的蛋白内部裂解, 而且目的蛋白具有原有的 N-末端^[54], 其在 2 mol/L 尿素中依然保持活力。酶切后可以利用酶的亲和标签二次过柱除去蛋白酶。几种常用的裂解融合蛋白的物质及特点见表 2。

6 表达条件的优化

为实现抗菌肽基因在大肠杆菌表达系统中成功表达并提高表达量, 对目的基因的密码子

以及环境条件如菌体生长温度、IPTG 的浓度、pH、通气量等的优化也是必要的研究内容。研究发现, 即使一个同义密码子的替换, 也可能影响基因的表达水平、蛋白质的折叠以及蛋白质结构及功能的改变^[55]。抗菌肽的小分子量意味着其编码基因可以廉价合成, 密码子的变化可能会导致大肠杆菌表达蛋白水平的巨大改善。Li 等根据大肠杆菌密码子的偏爱性, 改造了人 β 防御素基因, 使其在大肠杆菌中高效融合表达, 融合蛋白占细菌总蛋白的 50% 以上, 是野生型基因的 9 倍^[56]。

大肠杆菌最适生长温度是 37–39 °C, 在此温度下极易形成包涵体, 低温条件可增加外源蛋白可溶性表达的比例。如 Isopenicillin-N-synthase 在 25 °C 以可溶性形式表达的蛋白比 37 °C 高出 10%–29%^[57], Murine protein Mx 在 30 °C 时, 50% 以可溶性方式表达, 在 37 °C 则以包涵体表达^[58]。此外, 构建促进二硫键形成的宿主, 也将有可能极大地提高可溶蛋白的表达水平^[59]。某些外源蛋白的活性和稳定性与某些金属离子密切相关, 因此向培养基中添加外源蛋白所需金属离子也可能提高蛋白的可溶性和稳定性^[60]。

表 2 几种常用的裂解融合蛋白的物质

Table 2 Several commonly used substances to cleave fusion protein

Cleavage reagent	Recognition site	Other features
CNBr	M*	Exposure to formic acid may cause side chain modification
Formic acid	D*P	May cause esterification of serine and threonine residues
Hydroxylamine	N*G	Asn or Gln can be modified to their hydroxamate forms
Enterokinase	DDDDK*	Sensitive to pH and chaotropes
Thrombin	LVPR*GS	Sensitive to pH and chaotropes
Factor Xa	IDGR*	Sensitive to pH and chaotropes
TEV protease	EQLYFQ*G	Maintains 50% activity in 1 mol/L urea
SUMO protease	SUMO*	Maintains substantial activity in 2 mol/L urea

7 小结

与天然来源和化学合成生产抗菌肽相比,大肠杆菌融合表达的独特优势使其成为大规模生产抗菌肽最具成本效益的方式,硫氧还蛋白是融合表达生产抗菌肽使用最多的载体蛋白,在适宜条件下可以获得大量的可溶性融合蛋白,分子量小、高度的溶解性等优良性能使其特别适用于抗菌肽的生产。SUMO 被证明是一种能高效表达可溶性重组蛋白的载体蛋白,其具有高度的特异性和稳定性。去除融合蛋白标签的酶解法效率并不高,TEV 蛋白酶、SUMO 蛋白酶是两种活性和特异性相对较高的蛋白酶。化学裂解法虽然通常是有效的,却容易受到极端 pH 和高温的影响。为实现抗菌肽的高效表达,需要对其表达条件进行优化,进而生产大量满足需要的产物。

生产成本高依然是抗菌肽应用的主要障碍,虽然目前已经发现了很多提高生产效率和降低生产成本的系统和方法,但离商业上可接受的范围依然很远。因此,开发不同的系统、提高抗菌肽表达效率、简化分离纯化过程对于生产具有生物活性的抗菌肽依然具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Zhao XH, He XW, Luo ZG. Bioactivity, action mechanism and application of antimicrobial peptides. *China Brewing*, 2007, 26(4): 1-5 (in Chinese).
赵喜红, 何小维, 罗志刚. 抗菌肽的生物活性、作用机制及应用研究进展. *中国酿造*, 2007, 26(4): 1-5.
- [2] Ingham AB, Moore RJ. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 47(1): 1-9.
- [3] Fu DF, Hu JH, Liu XY. Research progress in genetic engineering expression of antimicrobial peptides. *China Anim Husband & Vet Med*, 2010, 37(9): 124-126 (in Chinese).
付登峰, 胡建和, 刘兴友. 抗菌肽基因工程表达技术研究进展. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 124-126.
- [4] Xu D, Xu XG, Wang ZS, et al. Expression of the Shiva-la Gene in recombinant baculovirus system and analysis of the peptide antimicrobial activity. *Acta Agri Boreali-occidentalis Sin*, 2011, 20(6): 33-37 (in Chinese).
许丹, 许信刚, 王志昇. Shiva-la 基因在杆状病毒中的表达及其表达产物抑菌活性的检测. *西北农业学报*, 2011, 20(6): 33-37.
- [5] Tang Y. Research progress in antimicrobial peptides gene expression systems. *China Feed*, 2013, 6: 7-9 (in Chinese).
唐勇. 抗菌肽基因表达系统研究进展. *中国饲料*, 2013, 6: 7-9.
- [6] Kozlov SA, Vassilevski AA, Grishin EV. Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies. *Rec Patents Inflamm All Drug Disc*, 2008, 2(1): 58-63.
- [7] Li YF. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr Purif*, 2011, 80(2): 260-267.
- [8] Stewart EJ, Åslund F, Beckwith J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J*, 1998, 17(19): 5543-5550.
- [9] LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Nat Biotechnol*, 1993, 11(2): 187-193.
- [10] LaVallie ER, Lu ZJ, DiBlasio-Smith EA, et al. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 2000, 326: 322-340.
- [11] Bogomolovas J, Simon B, Sattler M, et al. Screening of fusion partners for high yield

- expression and purification of bioactive viscotoxins. *Protein Expr Purif*, 2009, 64(1): 16–23.
- [12] Li YF. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expr Purif*, 2012, 81(2): 201–210.
- [13] Xia LJ, Zhang FC, Liu ZY, et al. Expression and characterization of cecropinXJ, a bioactive antimicrobial peptide from *Bombyx mori* (Bombycidae, Lepidoptera) in *Escherichia coli*. *Exper Therap Med*, 2013, 5(6):1745–1751.
- [14] Aleinein RA, Hamoud R, Schäfer H, et al. Molecular cloning and expression of ranalexin, a bioactive antimicrobial peptide from *Rana catesbeiana* in *Escherichia coli* and assessments of its biological activities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(8): 3535–3543.
- [15] Li YF. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54(1): 1–9.
- [16] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*, 2004, 5(1/2): 75–86.
- [17] Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif*, 2005, 43(1): 1–9.
- [18] Bayer P, Arndt A, Metzger S, et al. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol*, 1998, 280(2): 275–286.
- [19] Zuo X, Mattern MR, Tan R, et al. Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. *Protein Expr Purif*, 2005, 42(1): 100–110.
- [20] Bommarius B, Sherman M, Kalman D, et al. Production of antimicrobial peptides: US, WO2008140582A2. 2008-11-20.
- [21] Bommarius B, Jenssen H, Elliott M, et al. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides*, 2010, 31(11): 1957–1965.
- [22] Xu ZN, Wang F, Li P, et al. Expression of human β -defensin-2 with multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 120(1): 1–13.
- [23] Majerle A, Kidrič J, Jerala R. Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: an application to the production of a ^{15}N -enriched fragment of lactoferrin. *J Biomol NMR*, 2000, 18(2): 145–151.
- [24] Lee JH, Kim JH, Hwang SW, et al. High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277(3): 575–580.
- [25] Rao XC, Li S, Hu JC, et al. A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, 36(1): 11–18.
- [26] Vidovic V, Prongidi-Fix L, Bechinger B, et al. Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification. *J Peptide Sci*, 2009, 15(4): 278–284.
- [27] Shao AY, Meng Q. Split intein: splicing mechanism, origin and evolution. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2008, 24(6): 512–521 (in Chinese).
邵爱云, 孟清. 断裂蛋白质内含子的剪接机制、起源和进化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24 (6): 512–521.
- [28] Gu YX, Zhou XZ, Song ZW, et al. System of intein-mediated PHB purified human antimicrobial peptide LL-37. *China Biotechnol*, 2008, 28(11): 72–76 (in Chinese).
顾银霞, 周学章, 宋振威, 等. 内含肽介导 PHB 纯化人源抗菌肽 LL-37 体系的构建. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(11): 72–76.
- [29] Mee C, Banki MR, Wood DW. Towards the elimination of chromatography in protein purification: expressing proteins engineered to

- purify themselves. *Chem Eng J*, 2008, 135(1/2): 56–62.
- [30] Kovalskaya N, Hammond RW. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 2009, 68(1): 12–17.
- [31] Wu D, Lu YH, Huang HQ, et al. High-level secretory expression of metchnikowin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2013, 91(1): 49–53.
- [32] Falzone CJ, Wang Y, Vu BC, et al. Structural and dynamic perturbations induced by heme binding in cytochrome b5. *Biochemistry*, 2001, 40(15): 4879–4891.
- [33] Xu ZN, Peng L, Zhong ZX, et al. High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human β -defensin 2, in *Escherichia coli*. *Biotechnol Progr*, 2006, 22(2): 382–386.
- [34] Richard C, Drider D, Elmorjani K, et al. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2004, 186(13): 4276–4284.
- [35] Xu XX, Jin FL, Yu XQ, et al. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(2): 293–301.
- [36] Li BC, Zhang SQ, Dan WB, et al. Expression in *Escherichia coli* and purification of bioactive antibacterial peptide ABP-CM4 from the Chinese silk worm, *Bombyx mori*. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(7): 1031–1036.
- [37] Feng XJ, Wang JH, Shan AS, et al. Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, 47(1): 110–117.
- [38] Capparelli R, Ventimiglia I, Palumbo D, et al. Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (*acne vulgaris*). *J Biotechnol*, 2007, 128(3): 606–614.
- [39] Park E, Chae YK, Lee JY, et al. Expression and purification of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16(9): 1429–1433.
- [40] Su ZJ, Huang YD, Zhou QN, et al. High-level expression and purification of human epidermal growth factor with SUMO fusion in *Escherichia coli*. *Protein Peptide Lett*, 2006, 13(8): 785–792.
- [41] Bosse-Doenecke E, Weininger U, Gopalswamy M, et al. High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif*, 2008, 58(1): 114–121.
- [42] Kim JM, Jang SA, Yu BJ, et al. High-level expression of an antimicrobial peptide histonin as a natural form by multimerization and furin-mediated cleavage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(1): 123–130.
- [43] Pyo SH, Lee JH, Park HB, et al. Expression and purification of a recombinant buforin derivative from *Escherichia coli*. *Proc Biochem*, 2004, 39(11): 1731–1736.
- [44] Sun ZY, Chen JY, Yao HW, et al. Use of Ssp dnaB derived mini-intein as a fusion partner for production of recombinant human brain natriuretic peptide in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2005, 43(1): 26–32.
- [45] Diao H, Guo CY, Lin DH, et al. Intein-mediated expression is an effective approach in the study of β -defensins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4): 840–846.
- [46] Lee SJ, Park IS, Han YH, et al. Soluble expression of recombinant olive flounder hepcidin I using a novel secretion enhancer. *Mol Cells*, 2008, 26(2): 140–145.
- [47] Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 2006, 48(1): 1–13.
- [48] Zhang YB, Wu WT, WM, et al. Production and bioactive assessment of recombinant novel human calcitonin analogue. *Pharmac Biotechnol*, 2000, 7(1): 6–10 (in Chinese).
- 张玉彬, 吴梧桐, 王旻, 等. 新型降钙素的制备及活性测定. *药物生物技术*, 2000, 7(1): 6–10.

- [49] Li YF, Li X, Li H, et al. A novel method for purifying recombinant human host defense cathelicidin LL-37 by utilizing its inherent property of aggregation. *Protein Expr Purif*, 2007, 54(1): 157–165.
- [50] Zhou QF, Luo XG, Ye L, et al. High-level production of a novel antimicrobial peptide perinerin in *Escherichia coli* by fusion expression. *Curr Microbiol*, 2007, 54(5): 366–370.
- [51] Kenig M, Peternel S, Gaberc-Porekar V, et al. Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tag removal in purification of recombinant proteins. *J Chromatogr A*, 2006, 1101(1/2): 293–306.
- [52] Simons BL, King MC, Cyr T, et al. Covalent cross-linking of proteins without chemical reagents. *Protein Sci*, 2002, 11(6): 1558–1564.
- [53] Kapust RB, Tözsér J, Copeland TD, et al. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(5): 949–955.
- [54] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struc Funct Genomics*, 2004, 5 (1/2): 75–86.
- [55] Angov E. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol J*, 2011, 6(6): 650–659.
- [56] Peng L, Xu ZN, Fang XM, et al. Preferential codons enhancing the expression level of human beta-defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Peptide Lett*, 2004, 11(4): 339–344.
- [57] Sim BJ, Doreen S, Tan H, et al. Production of high levels of soluble recombinant *Streptomyces clavuligerus* Isopenicillin N Synthase in *Escherichia coli*. *J Mol Catal B: Enzym*, 1996, 2(2/3): 71–83.
- [58] Schein CH, Noteborn MHM. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperatures. *Nat Biotechnol*, 1988, 6: 291–294.
- [59] Derman AI, Prinz WA, Belin D, et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 1993, 262(5140): 1744–1747.
- [60] Han NS, Tao BY. A simple method to express soluble, highly active cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *E. coli*. *Biotechnol Technol*, 1999, 13(9): 631–635.

(本文责编 郝丽芳)