

牛乳铁蛋白素(1-15)-蜂毒素(5-12)杂合肽基因的合成及在大肠杆菌中的表达

毕重朋, 冯兴军, 单安山, 郭佳音

东北农业大学动物营养研究所, 哈尔滨 150030

摘要: 为了构建新型的杂合肽, 设计了一种新型杂合抗菌肽牛乳铁蛋白素(1-15)-蜂毒素(5-12), 由牛乳铁蛋白素(LfcinB)N端第1~15个氨基酸残基和蜂毒素(Melittin)N端第5~12个氨基酸残基组成。根据大肠杆菌密码子的偏爱性, 设计合成了杂合肽 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)的基因片段, 插入到表达载体 pET-32a 的 *Nco* I 和 *Sal* I 的酶切位点之间, 构建重组表达质粒。重组表达质粒转化到 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中, 经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 融合蛋白以可溶形式在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中获得成功表达, 表达量占菌体总蛋白的 35% 以上, 每升培养物可获得 35 mg 融合蛋白。带 His 标签的融合蛋白经 His-Bind 纯化试剂盒纯化、肠激酶切割和抑菌实验表明, 杂合肽具有明显的抑菌效果。这为利用基因工程方法生产抗菌肽奠定了理论基础。

关键词: 乳铁蛋白素, 蜂毒素, 杂合肽

Cloning and expression of a gene encoding shortened LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) hybrid peptide in *Escherichia coli* BL21(DE3)

Chongpeng Bi, Xingjun Feng, Anshan Shan, and Jiayin Guo

Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: In order to get new antibacterial peptide, we designed a hybrid peptide LfcinB(1-15)-Melittin(5-12), composed of 1–15 amino acid residues of bovine Lactoferricin and 5–12 amino acid residues of Melittin. According to the bias of codon utilization of *Escherichia coli*, We synthesized the gene encoding the hybrid peptide. We inserted the gene between the sites of *Nco* I and *Sal* I of pET-32a and obtained the recombinant expression vector for heterologous expression of LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) in *Escherichia coli*. We used *Escherichia coli* BL21(DE3) as expression host for the recombinant plasmid. After induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) under the optimized conditions, we realized the fusion protein was successfully expressed. The fusion protein was expressed in soluble form and the level was more than 35% of the total proteins. With (His)₆-Tag, the fusion protein was easily purified by His-Bind Purification Kit. After purification, we obtained 35 mg of fusion protein from 1 L of culture medium. At last, we accomplished that the peptide LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) was released from the fusion protein cleaved by enterokinase. The recombinant LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) showed antimicrobial activity assayed by agar diffusion test. This is the

Received: January 8, 2009; **Accepted:** April 1, 2009

Supported by: National Basic Research and Development Program (No. 2004CB11750-5), National Natural Science Foundation of China (No. 30671527), Innovation Project of Northeast Agricultural University (No. CXT006).

Corresponding author: Anshan Shan. Tel: +86-451-55190685; E-mail: asshan@mail.neau.edu.cn

国家重点基础研究发展计划项目(No. 2004CB11750-5), 国家自然科学基金(No. 30671527), 东北农业大学创新团队项目(No. CXT006)资助。

first report on the heterologous expression of the hybrid antibacterial peptide LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) in *Escherichia coli* and also provides basis for next cost-effective expression of other antimicrobial peptides in genetic engineering.

Keywords: LfcinB, melittin, hybrid peptide

抗菌肽(Antibacterial peptides, ABP)是指分子量小于 10 kD、带有静电荷、具有杀菌或者抑制细菌生长的一类小肽,是生物体防御系统产生的一类对抗外界病原体感染的肽类活性物质,是宿主免疫防御系统的重要组成部分^[1,2]。目前大量的抗菌肽被分离出来并且人们已经对其进行了广泛的研究。从天然产物中提纯抗菌肽耗时长,提纯效率低,化学方法合成抗菌肽价格昂贵^[3],因此基因工程生产抗菌肽成为研究的热点。抗菌肽具有稳定、广谱、高效且不易产生耐药性的特点,相信不久的将来会成为新型的绿色的抗生素替代品。

牛乳铁蛋白素(Bovine lactoferricin, LfcinB)是牛乳铁蛋白在酸性环境下经胃蛋白酶作用 N 端释放的一段多肽,来源于牛乳铁蛋白的第 17~41 位氨基酸,由 25 个氨基酸组成,其氨基酸序列为 Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe,分子量是 3124 kD,是一种新型的阳离子抗菌肽^[4,5]。LfcinB 具有抗菌^[6,7]、抗真菌^[8]、抗病毒^[9,10]、抗寄生虫^[11]、抑制癌细胞转移^[12]及参与免疫调节^[13]等多种生物学功能。线性 LfcinB(1-15)具有 LfcinB 的大部分活性。蜂毒素(Melittin)最早是由 Habermanm 等^[14]从意大利蜜蜂蜂毒中分离出来的,由 26 个氨基酸组成,其序列为 Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln,具有广谱抗菌^[15,16]、抗肿瘤^[17]、抗病毒^[18]、免疫调节^[19]等多种生理功能。在极低的浓度下就能达到很好的抑菌效果,但其有溶血性,需对其进行改造,才能使其应用价值更加广阔。蜂毒素活性部位为第 5~12 个氨基酸。

目前没有关于 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)杂合表达的报道,将两者活性部分的基因相连接,克隆到 pET-32a 中,是否能够表达出具有抑菌活性的杂合肽。本实验将 LfcinB 的 1~15 个氨基酸与 Melittin 的 5~12 个氨基酸串联表达,将 2 个活性部分相链接,目的是表达出具有明显抑菌活性的杂合肽,探讨这种方法的可行性。本试验设计了 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)的杂合基因片段,并对其进行了改造,

将 LfcinB 第 10 个氨基酸由 Met 替换为 Trp; Melittin N 端第 5 个氨基酸由 Val 替换成 Arg,将 LfcinB 的前 15 个氨基酸与 Melittin 的 5~12 个氨基酸的基因片段串联起来,成功克隆到载体中,成功表达了具有抑菌活性的杂合抗菌肽,为表达其他抗菌肽奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

克隆宿主 *Escherichia coli* DH5 α 、表达宿主 *Escherichia coli* BL21(DE3)、表达载体 pET-32a,均由东北农业大学动物营养研究所保存;金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 购于中国兽医药品监察所。

1.1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、限制性内切酶 *Sal* I、*Nco* I、dNTP、碱性磷酸酶、*Taq* DNA 聚合酶等均购自于宝生物工程(大连)有限公司(大连 TaKaRa 公司);DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自于 Qiagen 公司;低熔点琼脂糖、ATP、SDS、Tris、Tricine 等均购自于 Sigma 公司;蛋白纯化试剂盒、重组肠激酶购自于 Novagen 公司;IPTG 购于 Merck 公司;胰蛋白酶购于 Oxoid 公司;DNA marker、低蛋白分子量标准购自于天根生化科技(北京)有限公司;酵母提取物购于 Difco 公司;尿素、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等均购自于 Genview 公司;其他试剂均为国产分析纯。多核苷酸片段由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 杂合肽基因的设计与合成

根据 GenBank 中的 LfcinB N 端第 1~15 个氨基酸残基,将第 10 个氨基酸由 Met 替换为 Trp; Melittin N 端第 5~12 个氨基酸残基,对蜂毒素第 5 个氨基酸进行了改造由 Val 替换成 Arg。根据大肠杆菌密码子偏爱性^[20],设计杂合肽 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)的基因序列,基因分为 4 段合成 F1、F2、F3、F4。

为了便于将基因片段克隆到 pET-32a 的 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切位点之间, 在两端正反链的 5' 端分别加上 CATG 和 TCGA 的粘性末端。为了使重组融合蛋白羧基端不产生额外氨基酸残基, 在杂合肽编码序列后面加入终止密码子 TAG、TAA。整个基因片段由 4 段多核苷酸片段拼接而成, F1、F2、F3、F4 四段多核苷酸片段为:

F1: 5'-CATGTTCAAATGCCGTCGTTGGCAGTGGCGTTGGAAAAAAGTGGGT-3';

F2: 5'-GCGCGTCTGAAAGTTCTGACCACCGGTTAGTAA-3';

F3: 5'-TCGATTACTAACC GGTTGGTCAGAAC TTT CAGACGCGCACCCAGTTTTT-3';

F4: 5'-TCCAACGCCACTGCCAACGACGGCA TTTGAA-3'.

以上多核苷酸片段由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 杂合肽基因的构建

依据构建方法^[21]将 F2、F4 磷酸化后加入等摩尔量的 F1、F3 连接, 如图 1 所示。

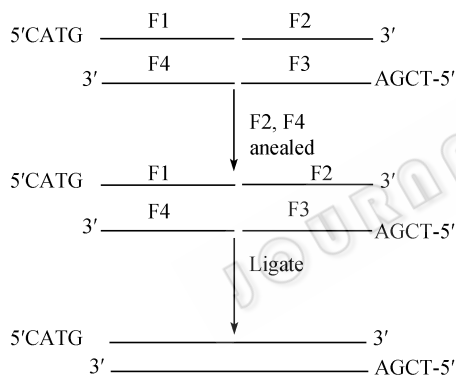


图 1 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)编码基因的构建策略
Fig. 1 Strategy of the construction of LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) encoding gene.

1.2.3 连接产物的回收

将连接液在 2% 的低熔点琼脂糖凝胶中电泳, 切下大小约为 80 bp 的目的连接片段, 按 QIAquick Gel Extraction Kit 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书进行回收。

1.2.4 重组表达质粒的构建

质粒 pET-32a 的 *Nco* I 和 *Sal* I 双酶切处理、线性质粒 pET-32a 的纯化回收、杂合肽 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)编码基因与线性质粒 pET-32a 的连接与转化 *E. coli* DH5 α , 以上过程均参照《分子克隆实

验指南》^[22]进行。PCR 方法进一步筛选阳性菌落, 引物 P1: 5'-CCCAAGGGGTTATGCTAGTT-3', P2: 5'-TGCACCATCATCATCAT-3', PCR 扩增条件: 94°C 预变性 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 阳性克隆进一步测序验证, DNA 序列由上海生工生物工程技术有限公司测定。

1.2.5 融合蛋白的诱导表达

重组表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 接种于 5 mL 含 100 μ g/mL 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 500 μ L 菌液转接于 50 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床培养至 $OD_{600}=0.8$ 左右, 加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 30°C 诱导 3 h。菌液 8000 r/min 离心 15 s, 收集菌体; 按每 100 mL 培养物的菌体沉淀加入 4 mL 的比例加入冰预冷的 Binding buffer (500 mmol/L 的 NaCl, 20 mmol/L 的 Tris, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.9), 吹打均匀, 超声波裂解, 加入 TritonX-100 至 1%, 冰浴 30 min; 4°C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清; 取样 5 μ L 于另一只离心管中, 用于 SDS-PAGE^[23]分析, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%。以母本 pET-32a 载体转化的 *E. coli* BL21(DE3)作对照。

1.2.6 亲和层析纯化融合蛋白

用 pET 系统表达的重组融合蛋白具有 His 标签, 可利用 Ni^{2+} 亲和层析的方法纯化融合蛋白, 采用 His-bind 纯化试剂盒纯化融合蛋白。按照 Novagen His-bind 纯化试剂盒说明书的纯化步骤纯化融合蛋白。吸取 5 μ L 洗脱的融合蛋白于另一只离心管中, 用于 SDS-PAGE^[23]分析, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%。

纯化的融合蛋白用葡聚糖凝胶层析脱盐柱进行脱盐, 用肠激酶的酶切缓冲液 Cleavage buffer (50 mmol/L 的 NaCl, 20 mmol/L 的 Tris, 2 mmol/L 的 $CaCl_2$, pH 7.4) 做流动相, 收集洗脱峰。Bradford 法^[24]测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度为 1 mg/mL。

1.2.7 融合蛋白的酶切与杂和肽的纯化

100 μ L 1 mg/mL 融合蛋白中加入 2 单位 Enterokinase, 23°C 温浴反应 16 h, 取样 5 μ L, 用于尿素-Tricine-SDS-PAGE 分析。将酶切液装入截留分

子量为 5 kD 的超滤管中, 12 000 r/min、4°C 离心 30 min, 滤过液体真空冷冻干燥获得杂和肽, 取样进行尿素-Tricine-SDS-PAGE^[23]分析。浓缩胶浓度为 16.5%, 间隔胶浓度为 10%, 分离胶浓度为 4%。

1.2.8 杂合肽的活性测定

琼脂扩散法^[25]: 配置 10 mL 含 0.8%琼脂糖的 LB 培养基, 加热溶解, 待温度降至 42°C 左右, 加入 10 μL 处于对数生长期的金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC25923, 充分混匀, 制备平板。用灭过菌的打孔器打孔 2 个, 直径约为 0.5 cm, 孔间距相等。然后一孔中加入 5 μL 待测杂合肽, 另一孔中加入 5 μL 肠激酶酶切缓冲液作为对照。将平板正面向上 37°C 培养 1 h 后, 倒置继续培养 18 h, 观察抑菌效果。

2 结果

2.1 编码基因的构建及连接产物的回收

编码基因 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)在 2%琼脂糖凝胶中电泳结果见图 2, 可见连接产物大小约为 80 bp, 与预期相符。

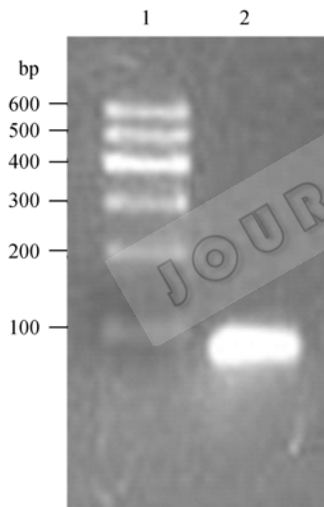


图 2 纯化的 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)编码基因
Fig. 2 Synthetic gene encoding LfcinB(1-15)-Melittin (5-12) after purification. 1: DNA molecular weight maker; 2: the synthetic gene encoding LfcinB(1-15)-Melittin(5-12).

2.2 重组质粒的 PCR 鉴定

重组质粒 pET-32a-LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)的 PCR 产物约为 350 bp(图 3, 第 4 泳道), DNA 序列分析进一步证明杂合肽基因正确地插入了质粒 pET-32a 中。

2.3 融合蛋白的表达

裂解上清经 15% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R-250

染色鉴定, 结果显示 pET-32a-LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3)产生一条大约 20 kD 特异的蛋白带(图 4, 第 4 泳道), 与理论值 20.1 kD 大小一致, 利用 BIO-RAD Quantity-one 软件分析, 融合蛋白约占 35%; pET-32a 的 *E. coli* BL21(DE3)在诱导 3 h 后产生大于 20 kD 的条带(图 4, 第 3 泳道), 与理论值 20.4 kD 也相吻合; 而未经 IPTG 诱导的重组质粒的培养物样品无特异诱导条带出现(图 4, 第 2 泳道)。

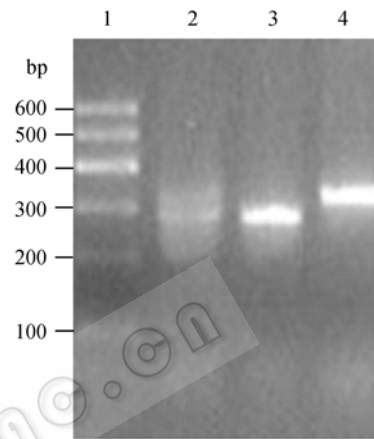


图 3 PCR 筛选重组质粒

Fig. 3 PCR screening of the recombinant plasmid. 1: DNA molecular weight maker; 2-4: PCR products of negative control, pET-32a, recombinant plasmid pET-32a-LfcinB(1-15)-Melittin (5-12), respectively.

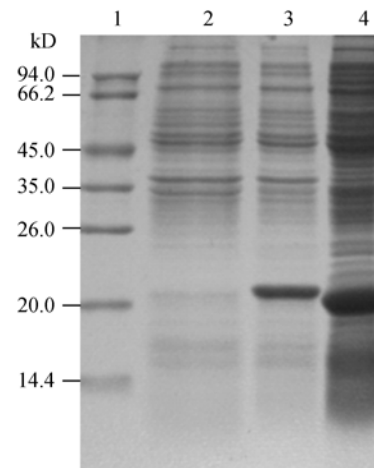


图 4 融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中表达的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of fusion proteins expressed in *E. coli* BL21 (DE3). 1: protein marker; 2: total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-32a-LfcinB (1-15)-Melittin(5-12) without IPTG induction; 3: total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-32a after induction with IPTG; 4: total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-32a-LfcinB(1-15)-Melittin(5-12) after induction with IPTG.

2.4 融合蛋白的纯化

菌体裂解上清液中融合蛋白经亲和层析纯化后, 经 15% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测, 结果产生约 20 kD 的一条清晰的蛋白条带, 与预期蛋白大小一致, 位置与诱导后重组菌表达特异性蛋白带相同。经凝胶薄层扫描分析, 其纯度大于 95%, 结果如图 5 所示。用 Bradford 法测得 1 L 培养物大约可获得 35 mg 融合蛋白。

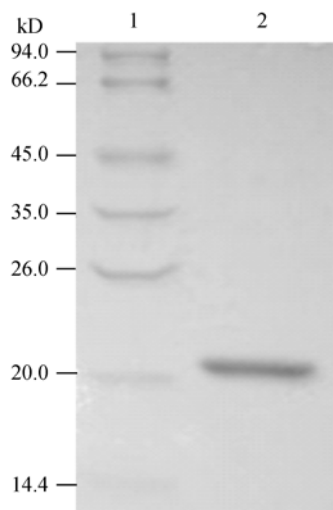


图 5 纯化的融合蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein. 1: protein molecular weight marker; 2: purified fusion protein.

2.5 肠激酶裂解融合蛋白

按照质量比为 1:100 的酶:蛋白质的比例, 利用肠激酶裂解融合蛋白。经 16.5% 尿素-Tricine-SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R-250 染色分析, 作用 16 h 的融合蛋白被肠激酶有效裂解, 释放出约 3.3 kD 的目的产物(图 6)。

2.6 抑菌实验检测

将纯化后的产物, 采用琼脂扩散法进行抑菌实验, 结果表明, 纯化的杂合肽有明显的抑菌活性(图 7)。

3 讨论

利用基因工程方法在大肠杆菌中直接表达抗菌肽, 一方面表达的抗菌肽对宿主有毒害作用; 另一方面由于编码基因小, 表达产物容易被宿主降解。所以在抗菌肽基因工程中, 一般采用融合蛋白形式表达抗菌肽^[26,27]。

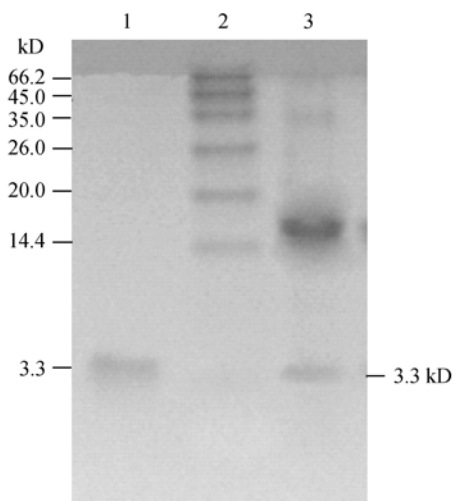


图 6 融合蛋白裂解的尿素-Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 6 Urea-Tricine-SDS-PAGE analysis of cleavage of the fusion protein. 1: hybrid antibacterial peptide purified by ultrafiltration; 2: protein molecular weight marker; 3: digestion product of fusion protein with enterokinase for 16 h.

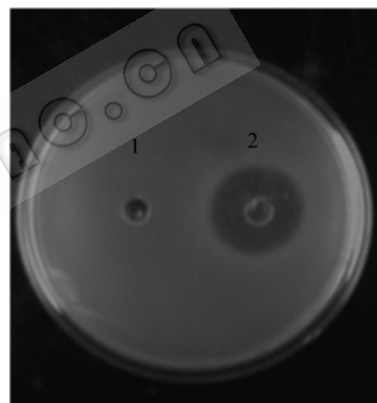


图 7 杂合肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 7 Antimicrobial activity of hybrid peptide to *Staphylococcus aureus* ATCC25923. 1: control assay; 2: treated assay.

Rekdal 等^[28]研究发现线性 LfcinB(1-15)具有 LfcinB 的大部分活性, 具有明显的抑菌活性。Strøm 等^[29]研究色氨酸替代寻求抗菌活性更高的衍生肽, 合成了一系列 LfcinB15 衍生肽, 结果发现 LfcinB15-W4,10 的抗菌活性最高, 表明色氨酸在抑菌活性中起着重要作用, 因此, 提高色氨酸残基数量可能会增强 LfcinB15 的抑菌活性。但色氨酸数量不是越多越好。赵亚华等^[30]对蜂毒素进行改造后把第 5 位的 Val 替换为 Arg, 第 15 位的 Ala 替换为 Arg, 同时删除了 16 位的 Leu, 表达的蜂毒素溶血性降低, 抑菌性较高。将 LfcinB 的活性部位 LfcinB(1-15)与 Melittin 的活性部位 5~12 个氨基酸串联, 根据大肠

杆菌密码子的偏好性^[20], 设计合成杂合肽 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)的编码基因片段。因此合成基因时, 将 LfcinB 的 N 端第 10 个氨基酸由 Met 替换为 Trp; Melittin 的第 5 个氨基酸进行了改造, 由 Val 替换成 Arg, 而且在编码序列后加入终止密码子, 避免了利用载体上的终止密码子而产生在目的蛋白中加入额外氨基酸残基的问题。以 pET-32a 为载体构建重组表达载体时, 在合成基因两端分别加入限制性酶切位点。本实验采用酶促合成法, 将正反链分 4 条链退火连接后, 两个末端分别有 *Nco* I 和 *Sal* I 的酶切位点的粘性末端, 直接与双酶切后的 pET-32a 连接, 成功地构建 pET-32a-LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)表达载体。

pET 表达系统是有史以来在 *E. coli* 中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统, 本研究所采用的原核表达载体 pET-32a 即使用 T7 聚合酶启动子的原核表达载体, 将外源基因克隆到有 T7 启动子的原核表达载体中, 置于 T7 启动子控制下, 转化可表达 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌, 在 IPTG 的诱导下, T7 RNA 聚合酶得到表达, 启动 T7 启动子控制的外源基因合成 mRNA, 表达外源蛋白^[31]。BL21(DE3)缺失细菌外源蛋白酶 *Omp* T 和 *Lon* 蛋白酶, 这 2 种蛋白酶的缺失增加了所表达外源蛋白的稳定性^[32]。pET-32a 载体中有 His 标签, 便于用亲和层析的方法将融合蛋白纯化出来。本试验选用 pET-32a 表达载体使其表达融合蛋白, 通过优化实验, 37°C 摇床培养至 OD_{600} 约为 0.8, 加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 在诱导时将温度降到了 30°C, 诱导 3 h, 成功实现了融合蛋白的可溶性表达, 表达量占菌体蛋白总量的 35%以上。由 pET-32a 质粒图谱分析对照蛋白由 189 个氨基酸组成, 经蛋白质分析得出其分子量大约为 20.4 kD, 而由于编码杂合肽链末端加入终止密码子, 由重组质粒图谱分析得知重组蛋白由 183 个氨基酸组成, 分析其分子量约为 20.1 kD, 所以图上分析得出的重组融合蛋白比对照蛋白略小的结论可靠。

肠激酶识别的酶切位点为 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, 克隆位点前的前导蛋白具有肠激酶的酶切位点, 而设计的杂合肽链上没有肠激酶的酶切位点, 表达的融合蛋白被肠激酶成功切割, 得到了杂合肽 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12), 且纯化后的杂合肽有较强的抑制金黄色葡萄球菌的作用, 达到了预想的

结果。此方法成功表达了具有抑菌活性的杂合肽 LfcinB(1-15)-Melittin(5-12)。

REFERENCES

- [1] Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, **24**(6): 536-547.
- [2] Koczulla AR, Bals R. Antimicrobial peptides: Current status and therapeutic potential. *Drugs*, 2003, **63**(4): 389-406.
- [3] Pazgier M, Lubkowski J. Expression and purification of recombinant human alpha-defensins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, **49**(1): 1-8.
- [4] Tomita M, Bellamy W, Takase M, et al. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci*, 1991, **74**(12): 4137-4142.
- [5] Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, et al. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 1993, **182**(2): 97-105.
- [6] Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, et al. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol*, 1992, **73**(6): 472-479.
- [7] Wakabayashi H, Teraguchi S, Tamura Y. Increased *Staphylococcus*-killing activity of an antimicrobial peptide, lactoferricin B, with minocycline and monoacylglycerol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**(10): 2161-2167.
- [8] Wakabayashi H, Uchida K, Yamauchi K, et al. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **46**(4): 595-602.
- [9] Andersen JH, Jenssen H, Gutteberg TJ. Lactoferrin and lactoferricin inhibit herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Res*, 2003, **58**(3): 209-215.
- [10] Mccann KB, Lee A, Wan J, et al. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *J Appl Microbiol*, 2003, **95**(5): 1026-1033.
- [11] Isamida T, Tanaka T, Omata Y, et al. Protective effect of lactoferricin against toxoplasma gondii infection in mice. *J Vet Med Sci*, 1998, **60**(2): 241-244.
- [12] Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv Exp Med Biol*, 1998, **443**: 285-291.
- [13] Håversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, et al. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol*, 2002, **220**(2): 83-95.
- [14] Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science*, 1972,

- 177(46): 314–322.
- [15] Lazarev VN, Shkarupeta MM, Titova GA, *et al.* Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* infections *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**(2): 946–950.
- [16] Lazarev VN, Stipkovits L, Biro J, *et al.* Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes and Infection*, 2004, **6**(6): 536–541.
- [17] Kubo H, Loegering DA, Adolphson CR, *et al.* Cytotoxic properties of eosinophil granule major basic protein for tumor cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, **118**(2-4): 426–428.
- [18] Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, *et al.* Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*, 1997, **27**(5): 1131–1139.
- [19] Wachinger M, Saermark T, Erfle V. Influence of amphipathic peptides on The HIV-1 production in persistently infected T lymphoma cells. *FEBS Lett*, 1992, **309**(3): 235–241.
- [20] Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: The optimal codon–anticodon interaction energy and selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene*, 1982, **18**(3): 199–209.
- [21] Zhu JM, Liu FP, Li YQ, *et al.* Cloning and expression of a gene encoding shortened cecropin A-melittin hybrid in *Escherichia coli*. *Hereditas*, 2002, **24**(1): 31–34.
朱嘉明, 刘飞鹏, 李月琴, 等. 天蚕抗菌肽 A 与蜂毒素杂合肽基因的合成及在大肠杆菌中的克隆与表达. *遗传*, 2002, **24**(1): 31–34.
- [22] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2003: 76–99.
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 第三版. 北京: 科学出版社, 2003: 76–99.
- [23] Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Anal Biochem*, 1987, **166**(2): 368–379.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [25] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, *et al.* Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods*, 1991, **137**(2): 167–173.
- [26] Fiordalisi JJ, Fetter CH, TenHarmsel A, *et al.* Synthesis and expression in *Escherichia coli* of a gene for kappa-bungarotoxin. *Biochemistry*, 1991, **30**(42): 10337–10343.
- [27] Latham PW. Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(8): 755–757.
- [28] Rekdal Ø, Andersen J, Vorland LH, *et al.* Construction and synthesis of lactoferricin derivatives with enhanced antibacterial activity. *J Peptide Sci*, 1999, **5**(1): 32–45.
- [29] Strøm MB, Haug BE, Rekdal O, *et al.* Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem Cell Biol*, 2002, **80**(1): 65–74.
- [30] Zhao YH, Dong JN, Cui H, *et al.* Molecular designing and secretion expression of the melittin gene in *pichia pastoris*. *Life Sci Res*, 2005, **9**(2): 124–128.
赵亚华, 董竟南, 崔红, 等. 改造的蜂毒素基因在毕赤酵母中分泌表达培养条件研究. *生命科学研究*, 2005, **9**(2): 124–128.
- [31] Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 1986, **189**(1): 113–130.
- [32] Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 1996, **260**(3): 289–298.