

一种新型 IIa 类细菌素的克隆表达和活性鉴定

谢燕, 陈海琴, 张秋香, 田丰伟, 陈永泉, 张灏, 陈卫

江南大学食品学院, 无锡 214122

摘要: *NB-C1* 为一种潜在的 IIa 类细菌素基因, 为实现其在大肠杆菌中的高效可溶表达, 首先构建了 *NB-C1* 蛋白与绿色荧光蛋白 (GFP) 的融合表达载体 pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1, 然后将构建的表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS, 经诱导表达后, 重组蛋白 GFP-NB-C1 以可溶的形式存在于细胞内。经 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化后, 重组融合蛋白的纯度大于 95%, 产量达 36.1 mg/L。抑菌试验表明, 纯化后的重组蛋白对单核细胞增生李斯特氏菌具有明显的抑制作用。

关键词: IIa 类细菌素, 融合表达, 蛋白质纯化, 活性鉴定

Expression and characterization of a new class IIa bacteriocin

Yan Xie, Haiqin Chen, Qiuxiang Zhang, Fengwei Tian, Yongquan Chen, Hao Zhang, and Wei Chen

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: *NB-C1* gene is a potential class IIa bacteriocin gene. To obtain its soluble expression, *NB-C1* was fused with the green fluorescent protein (GFP) gene and a recombinant expression vector pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 was constructed, which was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. The expressed fusion protein GFP-NB-C1 was purified by Ni-NTA affinity chromatography and the bioactivity was examined using *Listeria monocytogenes* as the indicator bacteria. The results showed that the expressed fusion protein GFP-NB-C1 was soluble and the final concentration of the purified fusion protein was 36.1 mg/L *E. coli* culture and had the purity above 95%. The antimicrobial assay of GFP-NB-C1 was analyzed and showed its high activity against *Listeria monocytogenes*.

Keywords: class IIa bacteriocin, fusion expression, protein purification, activity identification

细菌素 (Bacteriocin) 是某些细菌产生的具有抗菌活性的多肽、蛋白质或蛋白质复合物, 一般只对亲缘关系较近的细菌有毒害作用。产生菌对其产

生的细菌素具自身免疫性^[1]。很多微生物均可产生细菌素, 其中乳酸菌细菌素研究得最为深入。IIa 类细菌素是乳酸菌细菌素的一个亚类, 为抗李斯特氏

Received: September 6, 2010; Accepted: January 26, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20706023, 20836003).

Corresponding author: Wei Chen. Tel/Fax: +86-510-85912155; E-mail: weichen@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20706023, 20836003) 资助。

菌的多肽。近年来世界范围内发生多起由单核细胞增生李斯特氏菌引起的中毒事件, 具有很大的危害性, 预防和控制食品中的李斯特氏菌则成为了人们关注的热点, 而 IIa 类细菌素对李斯特氏菌具有特异的抗菌活性, 并且还具有安全性、酶稳定性、热稳定性、免疫性等优点^[2], 因此在食品领域具有很好的应用前景。但目前仅有几个细菌素在食品和生物药物领域中得到应用, 因此从乳酸菌天然资源中挖掘更多高效的细菌素已成为研究热点。

采用传统的菌种筛选法寻找新的细菌素, 存在乳酸菌出发菌株细菌素产量低, 分离纯化困难等问题^[3]。我国有丰富的乳酸菌资源, 随着乳酸菌基因组序列报道的日趋增多, 利用基因搜索工具寻找新的细菌素已成为一条快速有效的途径。根据细菌素氨基酸的保守序列及其结构基因上下游的特征编码基因, 如调节基因、转运基因、免疫基因等的特征, 利用生物信息学工具设计 IIa 类细菌素基因的搜索比对脚本, 在已测序乳酸菌基因组数据库中搜索潜在的 IIa 类细菌素基因, 然后通过比对分析, 排除错误基因和已报道的乳酸菌细菌素基因, 从而确定新

的细菌素基因。目前已从乳酸菌基因组中鉴定出多种细菌素基因^[4-6]。Diep 等^[7]从一株戊糖片球菌中得到一条新的类片球菌素基因, 在沙克乳杆菌中表达并获得较高的产量和活性。国外已有关于细菌素同源表达的研究^[8-10], 其重组表达宿主以大肠杆菌居多, 其中不乏理想的研究成果^[11-14]。利用基因搜索工具筛选细菌素基因并结合基因工程重组表达, 定能加强新型高效乳酸菌细菌素的开发和应用, 这对食品安全和保藏具有重要意义。

IIa 类细菌素通常含有 37~48 个氨基酸残基, 并且拥有相似的序列, 如表 1 所示, N 端具有共同的 YGNGVXaaC 保守序列 (Xaa 为出现频率高的残基), 保守区含有 2 个半胱氨酸残基, 可形成 1 个二硫键, 研究表明此二硫键对抑制李斯特氏菌是必需的^[15]; 序列的 C 端只有 34%~80.5% 的相似性。本研究中的 NB-CI 基因通过生物信息学方法从乳酸菌基因组数据库中筛选得到, 与 IIa 类乳酸菌细菌素同源性较高, 人工合成其成熟肽的全基因序列, 并命名为 NB-CI (GenBank Accession No. HQ 015716)。NB-CI 的成熟肽序列含有 42 个氨基酸残基, 序列为

表 1 IIa 类乳酸菌细菌素的氨基酸序列分析^[2]
Table 1 Sequence alignment of class IIa bacteriocins^[2]

Bacteriocin	Amino acid sequence
Leucocin A	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
Mesentericin Y105	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHRLANGGNGFW
Mundticin	KYYGNGVSCNKKGCSDVWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWSK
Piscicolin 126	KYYGNGVSCNKNCTVDWSKAIGIIGNNAAANLTTGGAAAGWNKG
Bavaricin A	KYYGNGVHGCKHSCVTDWGTALGNIGNNAAANXATGXNAGG
Sakacin P	KYYGNGVHCGKHCSTVDWGTALGNIGNNAAANWATGGNAGWNK
Pediocin PA-1	KYYGNGVTCGKHCSDVWGKAATTCITNNGAMAATGGHQNHKC
Bavaricin MN	TKYYGNGVYCNSSKCVWDWQAAGGIQGTVVXGWLGGAIIPGK
Divercin V41	TKYYGNGVYCNSSKCVWDWQAASGCIQGTYYGGWLGGAIPGKC
Enterocin A	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKAATTCIAGMSTGGFLGGAIIPGKC
Enterocin P	ATRSYGNGVYCNNSKCVWNWGEAKENIAGTIVISGWASGLAGMGH
Carnobacteriocin BM1	AISYGNGVYCNKEKCVWNKAENKQAIITGIVIGGWASSLAGMGH
Sakacin A	ARSYGNGVYCNKKCVWNRGEATQSIIGGMI SGWASGLAGM
Carnobacteriocin B2	VNYGNGVSCSKTKCSVNWQAIFQERYTAGI NSFVSGVAISGAGS IGRRP
Bacteriocin 131	ATYYGNGLYCNKQKCVVDWVNKASREIGKII VNGVWQHGPWAPR
Acidocin A	KTYYGNTNGVHCTKRS LWGKVR LKNV I PGTL CRKQSLPIKQDLKILLGWATGAFGKTFH

KYYGNGVHCGKKTCTCYVDWGQATASIGKIIVNGW TQHGPAHR。其 N 端保守区序列为 YGNGVHC，且 N 端含有 2 个半胱氨酸，可形成 1 个二硫键，C 端序列则与已知的 IIa 类细菌素同源性较差。根据 *NB-C1* 氨基酸组成的特点，可推断其很可能为一种潜在的新型 IIa 类细菌素基因。在抗菌肽重组表达研究中，为避免其对宿主的毒性作用，多采用融合表达方式^[11-14,16-17]。我们曾将 *NB-C1* 基因进行直接表达，但未能检测到目的蛋白及其活性，推测该细菌素对宿主可能具有一定的毒性作用，另外目的蛋白为约 5 kDa 的小肽，易被内源蛋白酶降解^[18-19]，稳定性较差，故本文尝试融合表达。本文以绿色荧光蛋白 (GFP) 作为融合载体蛋白，在大肠杆菌中进行融合表达并获得足够的活性重组蛋白 GFP-NB-C1。这为 NB-C1 生物学性质的进一步研究提供了物质基础，以及为新型 IIa 类细菌素的发掘和研究提供了一种新的路径和方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

T 载体 pGM-T 购自天根生化有限科技 (北京) 公司；表达载体 pIVEX 2.4d 购自 Roche 公司；质粒 pEGFP-C1 由本实验室提供；表达菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS 购自 Stratagene 公司；抑菌试验的指示菌单核细胞增生李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes*，由江南大学食品学院姚卫蓉实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司；限制性内切酶购自 NEB 公司；GeneRuler DNA Leader Mix Maker 购自 Fermentas 公司；低分子量标准蛋白 Marker 购自国药集团化学试剂有限公司；三 (羟甲基) 氨基甲烷 (Tris)、N-[三 (羟甲基) 甲基]甘氨酸 (Tricine)、质粒抽提试剂盒、氨苄青霉素以及氯霉素均购自上海生工生物工程有限公司；胶回收试剂盒购自北京索来宝科技有限公

司；PCR 仪购自 Gene Technologies 有限公司；电泳仪和凝胶成像系统购自 BIO-RAD 公司；引物由上海博尚公司合成；DNA 测序由北京华大基因有限公司完成。

1.3 方法

常规分子生物学操作参照《分子克隆手册》^[20] 进行。

1.3.1 *NB-C1* 的全基因合成

根据 *NB-C1* 基因序列设计寡核苷酸链，合成多条具有互补序列的引物 (表 2)，然后通过重叠延伸 PCR 技术反应合成其全基因序列 (GenBank Accession No. HQ 015716)。将 *NB-C1* 的成熟片段与 pGM-T 载体连接，构建克隆载体 pGMT-NB-C1。

表 2 *NB-C1* 全基因合成的寡核苷酸片段引物

Table 2 Primers of *NB-C1* oligonucleotides for gene synthesis

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>NB-C1</i> -S1	GTACTCGAGTCATTATCTATGTGCCCAAGG CCCCTGTTGT
<i>NB-C1</i> -S2	GTCCATCCGTTCACTATAATTTTTCCAATG CTAGCTGTAGCTTGCCCA
<i>NB-C1</i> -S3	GTCCACATAGCAAGTCTTTTTACCACAATG CACTCCGTTACCGTAATACT
<i>NB-C1</i> -S4	TTCCTCCTACGACATTTTTTAGTTCCTTAT CGTTTAGTACTTTAATTCA
<i>NB-C1</i> -A1	ATTTGCGGCCGATGACTGAAATTAAGTA CTAAACGATAAG
<i>NB-C1</i> -A2	GAATAAAAAATGTCGTAGGAGGAAAGTAT TACGGTAAACGGAGTGCATTG
<i>NB-C1</i> -A3	TGGTAAAAAGACTTGCTATGTGGACTGGGG ACAAGCTACAGCTAGCATTG
<i>NB-C1</i> -A4	GAAAAATTATAGTGAACGGATGGACACAAC ACGGGCCTTGGGCACATAGA

1.3.2 融合表达载体的构建

根据 pIVEX 2.4d 质粒多克隆区的酶切位点进行引物设计，*GFP* 和 *NB-C1* 的融合顺序为 *GFP-NB-C1*，其 N 端为质粒自带的 6×His 标签编码序列。

以测序正确的 pGMT-NB-C1 为模板，利用表 3 中引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增，产物回收、纯化后进行 *Nco* I/*Xma* I 双酶切，酶切产物连接至经同样

表 3 *NB-C1* 基因 PCR 扩增引物列表Table 3 PCR primers of *NB-C1*

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	CATGCCATGGTAAAGTATTACGGTAAC
P2	TCCCCGGGTTATCTATGTGCCCAA
P3	ATAAGAATGCGGCCGCGTGAGCAAGGGCGAG
P4	CATGCCATGGCCATCTTGTACAGCTCGTCCAT

酶切的 pIVEX 2.4d 载体, 构建重组表达载体 pIVEX 2.4d-NB-C1。同样, 以 pEGFP-C1 为模板, 利用 P3 和 P4 引物扩增 *GFP* 片段, 经过 *Not I*/*Nco I* 酶切和连接反应, 构建重组载体 pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 并进行 PCR 鉴定和酶切鉴定。将基因测序正确的重组质粒 pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 转化表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)pLysS, 构建重组菌 BL21(DE3)pLysS/pIVEX2.4d-GFP-NB-C1。

1.3.3 重组蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 检测

将重组菌株 BL21(DE3)pLysS/pIVEX2.4d-GFP-NB-C1 划线培养, 挑取单菌落接种于 LB (Luria-Bertani) 培养基中 (含 100 mg/L 氨苄青霉素和 34 mg/L 氯霉素), 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/L, 20 °C、200 r/min 诱导培养 20 h。离心收集菌体并重悬于 PBS 缓冲液中 (0.1 mol/L, pH 8.0), 在冰浴下进行超声破碎, 离心得上清和沉淀。将全细胞、上清和沉淀样品进行 SDS-PAGE 检测, 同时以质粒 pIVEX2.4d 转化的 BL21(DE3)pLysS/pIVEX2.4d 诱导表达产物作为空白对照。

1.3.4 融合蛋白 GFP-NB-C1 的纯化及鉴定

收集破碎上清液, 通过 0.45 μ m 滤膜过滤后, 上样于 5 mL 的 Ni-NTA 亲和层析凝胶柱, 首先采用 10 倍柱体积的清洗缓冲液 (20 mmol/L PBS, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗涤凝胶柱, 再用洗脱缓冲液 (20 mmol/L PBS, 500 mmol/L NaCl, 150~300 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 梯度洗脱并

收集, 样品进行 SDS-PAGE 检测和 Bradford 法测定蛋白质浓度。

1.3.5 融合蛋白 GFP-NB-C1 的抑菌活性测定

采用固体平板扩散法测定融合蛋白 GFP-NB-C1 对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌活性。向培养皿中倒入约 15 mL 含有 1.5% 琼脂的 FB (Fraser Broth Base) 培养基 (加有 1% 50 mg/mL 柠檬酸铁铵溶液), 将在 FB 液体培养基生长至对数中期的敏感菌按 1% 转接至 5 mL 0.5% 琼脂溶液中, 迅速混匀, 均匀铺在已凝固的平板培养基上, 制备双层固体培养基, 待凝固后小心放置 5 个牛津杯, 然后分别加入 100 μ L PBS (pH 8.0) (阴性对照), 以及不同浓度的 GFP-NB-C1 (40、60、80、100 mg/L) 纯化样品。培养皿于 4 °C 放置 6 h 后转移至 37 °C 培养箱, 培养 12 h 后观察抑菌圈情况。

2 结果

2.1 融合表达载体的构建和表达

将重组质粒 pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 分别用 *Nco I*/*Xma I* 和 *Not I*/*Nco I* 双酶切鉴定, 得到 150 bp 和 750 bp 的目的条带, 与预期结果一致 (图 1)。DNA 测序结果证明融合目标片段序列正确。重组菌 BL21(DE3) pLysS/pIVEX2.4d-GFP-NB-C1 进行 IPTG 诱导表达, 表达产物进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明, 在约 32 kDa 处有一条明显的目标蛋白条带 (图 2)。SDS-PAGE 分析细胞破碎的上清和沉淀, 表明 GFP-NB-C1 融合蛋白主要以胞内可溶形式存在。

2.2 重组融合蛋白 GFP-NB-C1 的纯化和鉴定

SDS-PAGE 分析蛋白质纯化样品, 结果显示, 目的条带大小为约 32 kDa (图 3)。Quantity one 软件分析表明其纯度大于 95%。以 BSA 为标准样品, Bradford 法测定蛋白质浓度, 结果表明经过一步纯化后, 最终可获得 36.1 mg/L 纯化的 GFP-NB-C1 融合蛋白。

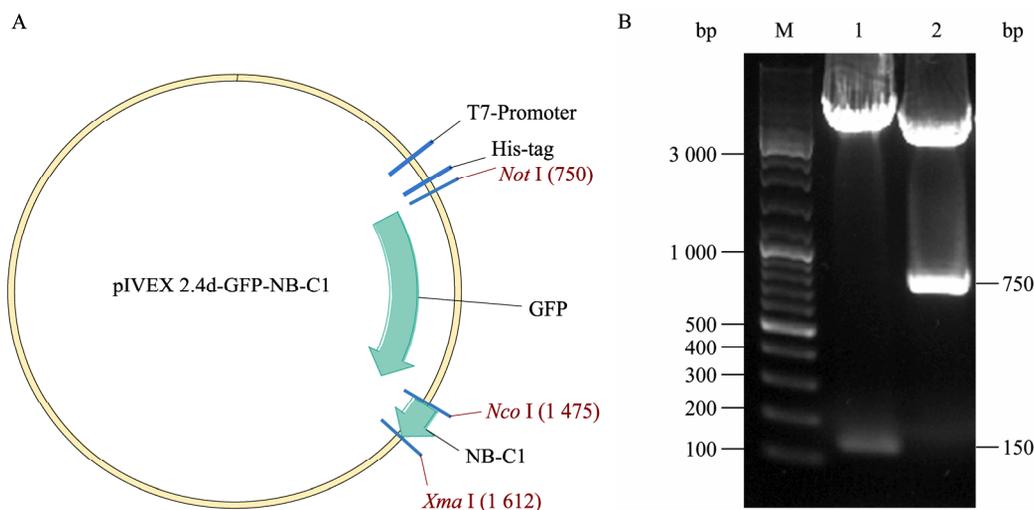


图1 质粒 pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 图示 (A) 及酶切鉴定电泳图 (B)

Fig. 1 Schematic map of the recombinant plasmid pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 (A) and restriction analysis of the recombinant plasmid pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 (B). M: DNA marker; 1: pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 digested with *Nco* I/*Xma* I; 2: pIVEX 2.4d-GFP-NB-C1 digested with *Not* I/*Nco* I.

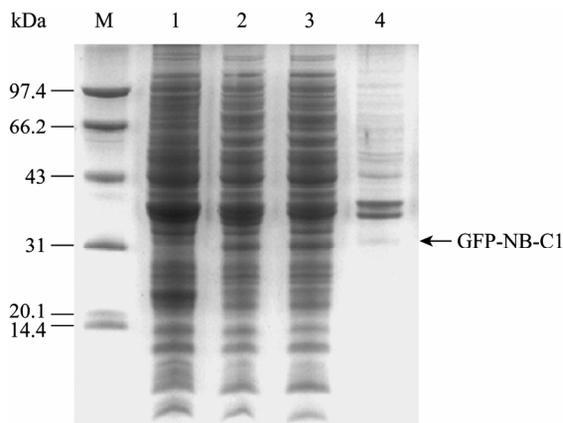


图2 GFP-NB-C1 融合蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the fusion protein GFP-NB-C1. M: protein marker; 1: negative control; 2: whole proteins of cell lysate; 3: soluble fraction of cell lysate; 4: insoluble fraction of cell lysate.

2.3 重组融合蛋白 GFP-NB-C1 的活性鉴定

使用固体平板扩散法测定融合蛋白 GFP-NB-C1 对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌活性, 结果如图 4A 所示, 培养皿上出现明显的抑菌圈, 表明 GFP-NB-C1 对敏感菌 *L. monocytogenes* 具有明显的抑制作用, 并且抑菌圈直径与融合蛋白浓度具有一定的线性关系, 如图 4B。

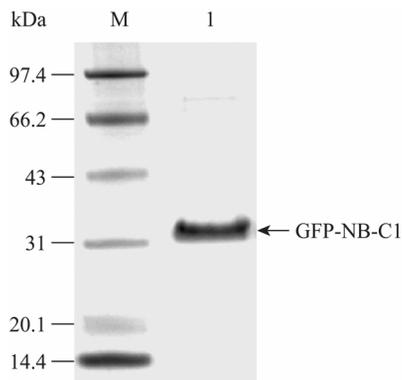


图3 纯化后融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified GFP-NB-C1 fusion protein. M: protein marker; 1: purified GFP-NB-C1.

3 讨论

近年来虽然诸多学者通过融合方式表达了抗菌肽, 但由于大多以包涵体形式存在^[13,21], 不利于后续的活性检测等工作。本文以 GFP 为融合载体蛋白, 在大肠杆菌中实现了重组蛋白的高效可溶表达, 并且 GFP 的使用有助于对重组蛋白表达和纯化过程的实时监测。为了使融合蛋白以可溶的形式表达, 本研究对表达条件进行了优化, 最终确定表达条件

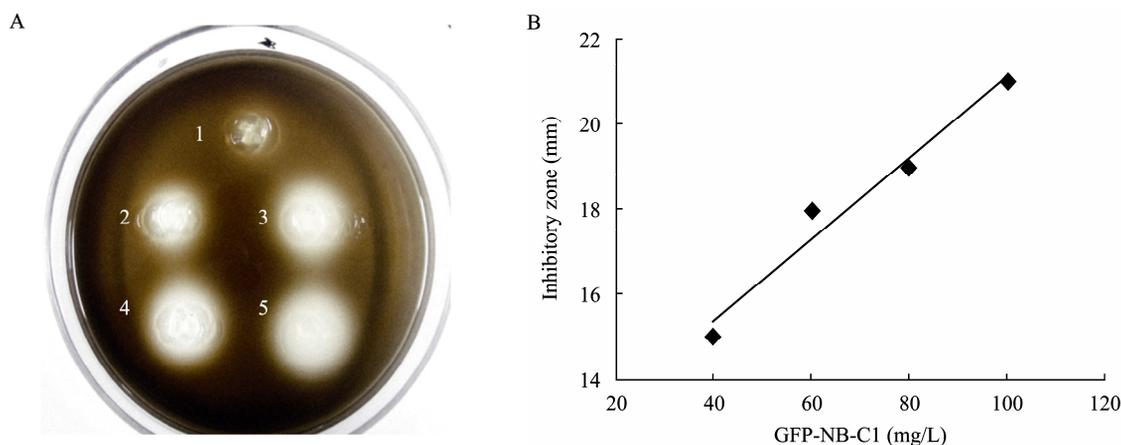


图4 不同浓度 GFP-NB-C1 融合蛋白对单核细胞增生李斯特菌的抑菌圈直径 (A) 及 GFP-NB-C1 浓度与抑菌圈直径曲线 (B)

Fig. 4 Inhibitory zone evaluation of GFP-NB-C1 fusion protein at different concentration on the growth of *L. monocytogenes* (A) and the concentration-inhibitory zone curve (B). 1: negative control; 2: 40 mg/L GFP-NB-C1; 3: 60 mg/L GFP-NB-C1; 4: 80 mg/L GFP-NB-C1; 5: 100 mg/L GFP-NB-C1.

为诱导前 OD_{600} 为 0.6, IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L, 20 °C 低温诱导 20 h, 目的蛋白以胞内可溶形式表达, 避免了包涵体形成。

表达载体 pIVEX 2.4d 具有 6 个 His 组成的标签, 所以重组蛋白可以通过 Ni-NTA 亲和层析凝胶柱纯化。为得到较纯的目的蛋白, 洗脱时采用 150~300 mmol/L 咪唑梯度洗脱, 当洗脱液中咪唑浓度为 250 mmol/L 和 300 mmol/L 时, 目的蛋白被洗脱下, SDS-PAGE 分析显示为单一条带。本研究中纯化条件温和, 步骤简单, 这均有利于蛋白活性的保持, 并大大简化了纯化过程和降低了纯化难度, 纯化后样品可直接用于活性检测。图 4 表明目的蛋白对指示菌形成了明显的抑菌圈, 而在其边界外还具有有一层界限模糊的外圈, 这可能是由于少量抑菌物质向平皿内部扩散后对边界周围的菌具有一定的抑制作用而形成, 抑菌圈直径按照具有清晰边界的内圈进行计算。抑菌实验表明融合蛋白 GFP-NB-C1 对单核细胞增生李斯特氏菌具有较好的抑菌活性, 说明经 GFP 融合后 NB-C1 保留了生物活性。

本文成功构建并表达了可溶性融合蛋白 GFP-NB-C1, 经一步纯化, 可获得 36.1 mg/L 纯度大

于 95% 的融合蛋白, 为其生物学性质进行进一步的探讨奠定了基础。另外本研究建立了一条 IIa 类细菌素从基因搜索、重组表达获得活性蛋白的通路, 这对新型细菌素的挖掘和研究提供了新的思路和借鉴。

REFERENCES

- [1] Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 1995, 59(2): 171-200.
- [2] Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, et al. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 85-106.
- [3] Muriana PM, Klaenhammer TR. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lacobacillus acidophilus* 11088. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(1): 114-121.
- [4] Hoskins J, Alborn Jr WE, Arnold J, et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol*, 2001, 183(19): 5709-5717.
- [5] Saizieu AD, Gardes C, Flint N, et al. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *Bacteriol*, 2000, 182(17): 4696-4703.
- [6] Nes IF, Johnsborg O. Exploration of antimicrobial

- potential in LAB by genomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(2): 100–104.
- [7] Diep DB, Godager LD, Brede D, et al. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology*, 2006, 152: 1649–1659.
- [8] Axelsson L, Katle T, Mslett MB, et al. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 168(1): 137–143.
- [9] Biet F, Berjeaud JM, Worobo RW, et al. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology*, 1998, 144(10): 2845–2854.
- [10] Kawai Y, Arakawa K, Itoh A, et al. Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Anim Sci J*, 2003, 74(1): 45–51.
- [11] Moon GS, Pyun YR, Kim WJ. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. *Int J Food Microbiol*, 2006, 108(1): 136–140.
- [12] Beaulieu L, Tolkatchev D, Jetté JF, et al. Production of active pediocin PA-1 in *Escherichia coli* using a thioredoxin gene fusion expression approach: cloning, expression, purification, and characterization. *Can J Microbiol*, 2007, 53(11): 1246–1258.
- [13] Lu HR, Li GD, Wu HY, et al. Fusion expression of antimicrobial peptide GK1 in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(1): 21–26.
陆海荣, 李国栋, 吴宏宇, 等. 抗菌肽 GK1 在大肠杆菌中的融合表达. *生物工程学报*, 2008, 24(1): 21–26.
- [14] Chen HQ, Fan LM, Xu ZN, et al. Efficient production of soluble human beta-defensin-3-4 fusion proteins in *Escherichia coli* cell-free system. *Process Biochem*, 2007, 42(3): 423–428.
- [15] Drider D, Fimland G, Héchard Y, et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(2): 564–582.
- [16] Klocke M, Mundt K, Idler F, et al. Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*. *Appl Microbiol Biot*, 2005, 67(4): 532–538.
- [17] Chen HQ, Xu ZN, Xu NZ, et al. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *J Biotechnol*, 2005, 115(3): 307–315.
- [18] Valore EV, Ganz T. Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation. *Methods Mol Biol*, 1997(78): 115–131.
- [19] Piers KL, Brown MH, Hancock REW. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, 134(1): 7–13.
- [20] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [21] Barrell PJ, Liew OW, Conner AJ. Expressing an antibacterial protein in bacteria for raising antibodies. *Protein Expr Purif*, 2004, 33(1): 153–159.