

美洲拟鲈抗菌肽 Pleurocidin 在大肠杆菌中的高效分泌表达及优化

徐雪姣¹, 查向东¹, 车媛媛¹, 马利娟¹, 吴思群¹, 杨培龙², 黄火清², 姚斌²

1 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100081

徐雪姣, 查向东, 车媛媛, 等. 美洲拟鲈抗菌肽 Pleurocidin 在大肠杆菌中的高效分泌表达及优化. 生物工程学报, 2016, 32(3): 365-374.

Xu XJ, Zha XD, Che YY, et al. Expression of Pleurocidin from winter flounder in *Escherichia coli* and optimization of culture conditions. Chin J Biotech, 2016, 32(3): 365-374.

摘要: 为在大肠杆菌中分泌表达 Pleurocidin, 并提高融合蛋白的分泌效率, 将 Pleurocidin 基因和 Cherry DNA 序列通过平末端连接融合, 再将融合基因整合到 pET22b(+) 载体中, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3); 乳糖诱导表达。成功构建含 pET22b(+)-CP 重组质粒的基因工程菌, 用乳糖诱导获得高效表达。在诱导 16 h 时加入甘氨酸可以显著提高融合蛋白 Cherry-Pleurocidin 的分泌效率。用稀盐酸水解融合蛋白的酸敏感位点, 再进一步分离纯化即得到 r-Pleurocidin, 其对大肠杆菌 DH5 α 和枯草芽孢杆菌 BS168 具有明显的抑菌活性。结果表明成功构建了高效表达 Pleurocidin 的大肠杆菌基因工程菌, 获得有活性的 r-Pleurocidin。

关键词: Pleurocidin, 分泌表达, Asp-Pro 酸敏感位点, 抑菌活性

Received: June 19, 2015; **Accepted:** October 16, 2015

Supported by: Anhui Provincial Natural Science Foundation (No. 1408085MC50).

Corresponding authors: Xiangdong Zha. Tel: +86-551-63861281; E-mail: xdcha@163.com

Peilong Yang. E-mail: yangpeilong@caas.cn

安徽省自然科学基金 (No. 1408085MC50) 资助。

网络出版时间: 2015-12-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20151222.1415.001.html>

Expression of Pleurocidin from winter flounder in *Escherichia coli* and optimization of culture conditions

Xuejiao Xu¹, Xiangdong Zha¹, Yuanyuan Che¹, Lijuan Ma¹, Siqun Wu¹, Peilong Yang²,
Huoqing Huang², and Bin Yao²

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: To express Pleurocidin in *Escherichia coli* and to enhance the secretory efficiency of the fusion protein, the gene encoding Pleurocidin was ligated with Cherry DNA sequence via blunt-end ligation. Then this fusion gene was cloned into pET22b (+) vector and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Lactose was used to induce expression of fusion protein. The recombinant plasmid pET22b (+) -CP was successfully constructed and high-level expression of fusion protein was induced with lactose. Statistics showed that addition of glycine after 16 h of induction significantly enhanced the secretory efficiency of the fusion protein. After hydrolysis of the fusion protein by diluted hydrochloric acid and some further purification steps, r-Pleurocidin was obtained with antibacterial activity against *E. coli* DH5 α and *Bacillus subtilis* BS168. In conclusion, the fusion protein was expressed in *E. coli* and biologically active r-Pleurocidin was obtained after hydrochloric acid cleavage and purification.

Keywords: Pleurocidin, secretory expression, Asp-Pro acid-sensitive sites, antibacterial activity

阳离子抗菌肽是由植物和动物产生的阳离子型的两亲性分子,一般由 12–50 个氨基酸残基组成,相对分子质量小,水溶性好,等电点在 8.9–10.7 之间,具有两亲 α -螺旋和 (或) 两亲 β -折叠结构^[1]。

海洋生物抗菌肽存在独特的翻译后修饰,例如半胱氨酸结、卤化作用、组氨酸和丙氨酸桥,这些修饰可以使海洋生物抵抗严酷的生活环境^[2]。Pleurocidin 是从美洲拟鲈 *Pseudopleuronectes americanus* 的皮肤粘液中分离出的含 25 个氨基酸残基的线性 α -螺旋多肽,具有广谱的抗菌活性,能够抑杀多种细菌和真菌,如肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和白色念珠菌^[3–4]。Pleurocidin 的等电点为 10.05,可以形成两亲的 α -螺旋,通过在细菌细胞膜上形成离子通道,不可逆地破坏细胞膜,从而杀死细菌^[5]。

Pleurocidin 热稳定性好、耐盐,对多种食品微生物有抑杀作用,可用于食品保鲜^[6]。在体外毒性研究中,Pleurocidin 表现出较低的溶血性,具有潜在的治疗价值^[7]。

Pleurocidin 天然来源有限,化学合成价格昂贵,利用基因工程方法合成 Pleurocidin 是一条高效低成本的生产途径。大肠杆菌表达系统目前应用最为广泛。但是用大肠杆菌表达抗菌肽却有一些困难,主要在于抗菌肽对大肠杆菌有毒性。本实验室曾尝试在大肠杆菌内非融合表达 Pleurocidin 未获成功。

本文利用来源于大鼠肝脏细胞色素 b_5 的亲水结构域 Cherry^[8],它与信号肽 pelB 共同作用,一方面抑制 Pleurocidin 对宿主细胞的毒性,另一方面促进融合蛋白分泌至胞外;对分泌的重组融合蛋白用酸水解特异性切割 Asp-Pro 位点,

获得有活性的 r-Pleurocidin。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

质粒 pET22b (+) 购自 Novagen 公司 (Darmstadt, Germany); 大肠杆菌 DH5 α , BL21 (DE3) 和枯草芽孢杆菌 BS168 均为本实验室保存。

1.2 工具酶和试剂

Nco I 和 *Eco*R I 限制性内切酶购自 MBI Fermentas (北京, 中国); T4 PNK 和 T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小量快速提取试剂盒购自爱思进公司; 改良型 Lowry 法蛋白定量试剂盒、胰蛋白酶、酵母提取物、IPTG、DNA Marker、*Pfu* DNA 聚合酶等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。其他试剂为国产分析纯。

1.3 重组质粒 pET22b(+)-CP 的构建

1.3.1 *Pleurocidin* 基因的扩增

根据 *Pleurocidin* 基因的氨基酸序列 GWGSFFKKAHVGKHHVKGKAALTHYL, 依据大肠杆菌密码子的偏爱性, 设计并合成 *Pleurocidin* 基因的编码序列 5'-GGTTGGGGT AGCTTTTTCAAGAAAGCAGCACATGTTGGT AAACATGTTGGTAAAGCAGCACTGACCCAT TATCTG-3'。以 *Pleurocidin* 基因为模板, 设计上、下游引物 ple1 和 ple2 (表 1)。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 30 次; 72 °C 10 min。实验中 PCR 产物和质粒均经 1.4% 琼脂糖电泳检测, 试剂盒纯化回收。

1.3.2 *Cherry* DNA 序列的扩增

参考挪威大鼠细胞色素 *b*₅ DNA 序列 (GenBank 登录号: BC086945), 设计上、下游

表 1 PCR 反应引物

Table 1 PCR primers

Primers	Primer sequence (5'-3')	Underlined segment
ple1	GATCCGGGTTGGGG TAGCTTT	Asp-Pro encoding sequence
ple2	GGAATTCCTACAGA TAATGGGTCAG	<i>Eco</i> R I recognition site
C1	CATGCCATGGATCA CCATCATCATCAT	<i>Nco</i> I recognition site
C2	AAGGGTTTCCGAAG GCTTGG	—

引物 C1 和 C2 (表 1)。反应条件同 *Pleurocidin* 基因的扩增, 但退火温度为 60 °C。引物与基因的合成及质粒测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.3.3 *Cherry* DNA 序列和 *Pleurocidin* 基因平末端连接

将 *Pleurocidin* 基因和 *Cherry* DNA 的 PCR 扩增产物混合, 用 T4 多核苷酸激酶 37 °C 磷酸化 30 min, 再加入 T4 DNA 连接酶 37 °C 连接 1 h。

1.3.4 融合基因 *Cherry-pleurocidin* (CP) 的扩增

上述连接产物用无菌水稀释 20 倍后作为模板, 以 C1 和 ple2 为上、下游引物, PCR 扩增得到融合基因 CP。PCR 反应条件同 *Pleurocidin* 基因的扩增。

1.3.5 融合基因与质粒 pET22b (+) 连接及转化

融合基因 CP 和质粒 pET22b (+) 经 *Nco* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶酶切, 胶回收后用 T4 DNA 连接酶连接。将连接产物转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 37 °C 过夜培养, 菌液 PCR 鉴定阳性克隆。对重组质粒 pET22b(+)-CP (*Cherry-Pleurocidin*) 进行测序。

1.4 诱导表达

挑测序正确的阳性克隆接种至含有 50 μ g/mL

氨苄青霉素钠的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 过夜振荡培养, 按 1%量接入新鲜的 LB 抗性培养基扩大培养, 37 °C 振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加入终浓度 4 g/L 的乳糖, 37 °C、30 °C 和 25 °C 分别诱导 20 h, $9\ 000 \times g$ 离心 1 min, 收集上清液和菌体。诱导期间, 每隔 4 h 取样, Lowry 法^[9]测定培养上清中的总蛋白浓度。用 BandsScan 软件扫描分析 SDS-PAGE 图谱, 估算融合蛋白 CP 在总蛋白中所占的比例。

1.5 不同浓度甘氨酸对融合蛋白 CP 分泌效率的影响

诱导 16 h 时加入不同浓度的甘氨酸, 使终浓度分别为 1、2、3、4、5 g/L, 诱导 20 h 时离心收集上清液。对乳糖诱导组和乳糖+甘氨酸诱导组培养上清中融合蛋白 CP 浓度进行比较分析。诱导期间, 每隔 4 h 取样, Lowry 法^[9]测定培养上清中的总蛋白浓度。

1.6 融合蛋白 CP 的酸特异性切割

向培养上清中滴加 1 mol/L 盐酸, 至终浓度为 100 mmol/L, 65 °C 恒温水浴 72 h; 每隔 24 h 取 1 mL 水解液, 4 °C、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min。在上清液中, 加 5 倍体积的丙酮, -20 °C 下静置 30 min, 4 °C、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 弃去上清丙酮, 自然风干后加 100 μ L 还原性 SDS-PAGE 上样缓冲液, Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳检测水解效果。

1.7 Pleurocidin 纯化及质谱鉴定

1.7.1 离子交换层析

利用 Sephadex CM-FF 5 mL 阳离子交换柱在 AKTA Explorer100 进行分离纯化。条件为: 波长 214 nm 和 280 nm, 流速 1 mL/min, 平衡缓冲液为 20 mmol/L PB (pH 7.0), 洗脱缓冲液为 20 mmol/L PB、1 mol/L NaCl、pH 8.0。0.2 mol/L

NaCl 洗脱, 收集洗脱峰样品, 用 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析。

1.7.2 电洗脱

1) 凝胶切割: 将 SDS-PAGE 胶用蒸馏水彻底冲洗, 切下目的条带, 捣碎, 放入透析袋内, 注入 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.3), 置 4 °C 冰箱; 2) 洗脱: 将透析袋放入盛有预冷 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.3) 的核酸电泳槽 (冰浴) 中, 100 V 电泳 1 h 左右; 待考马斯亮蓝完全从凝胶条带上跑出时, 将透析袋放入预冷的 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中透析; 3) 沉淀: 取出透析袋内的液体用丙酮过夜沉淀, 透析液与丙酮体积比为 1 : 5; 最后用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测电洗脱纯化效果。纯化后样品经透析脱盐后冻干, 再用二维液相色谱多级质谱联用仪 (2DLC-MS) 进行质谱分析。

1.8 Pleurocidin 的抑菌活性检测

利用琼脂糖扩散法进行抑菌实验, 取 10 mg 纯化后的 Pleurocidin 溶于 4 mL PB 缓冲液 (pH 7.0) 中, 过滤灭菌, 备用。将过夜活化的大肠杆菌 DH5 α 和枯草芽胞杆菌 BS168, 均匀涂布于 LB 固体培养基上, 取制备好的 Pleurocidin 进行抑菌实验, 以融合蛋白 CP 和无菌水作阴性对照, 氨苄青霉素钠作阳性对照, 37 °C 恒温培养, 20 h 后观察抑菌效果, 并测量抑菌圈直径。

最小抑菌浓度的测定^[10-11]: 将处于对数期的大肠杆菌 DH5 α 和枯草芽胞杆菌 BS168 稀释到 10^4 - 10^5 CFU/mL, 取 1 mL 菌液和 10 μ L 不同浓度的 r-Pleurocidin 加入到 EP 管中, 以 PB 缓冲液作阴性对照, 37 °C、200 r/min 振荡培养 3 h, 测菌液的 OD_{600} , 以吸光度值无变化处所对应的 r-Pleurocidin 浓度为最小抑菌浓度 (MIC)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

CP 融合基因片段的大小为 413 bp, 其 PCR 产物经电泳检测, 条带大小与预期一致 (图 1)。构建的重组质粒 pET22b (+)-CP 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得了阳性克隆, 测序证明碱基序列正确, *pelB* 编码序列、*Cherry* DNA 和 *Pleurocidin* 基因依次正确连接。

2.2 融合蛋白 CP 的诱导表达

SDS-PAGE 分析表明, 30 °C 恒温诱导条件下, 诱导组培养上清和菌体中均出现融合蛋白 CP, 信号肽完全切割, 而未诱导组在相同位置未发现相应条带 (图 2)。诱导组诱导 20 h 时上清中总蛋白浓度达到 520 μg/mL; 融合蛋白 CP 占总蛋白 67.2%, 融合蛋白 CP 浓度为 349 μg/mL; 菌体内也存在融合蛋白 CP, 根据 BandsScan 中的灰度值乘以总体积, 估算出胞外融合蛋白 CP 占总融合蛋白 CP 的 73.2%。诱导温度为 37 °C 时没有表达条带, 30 °C 表达效果优于 25 °C。

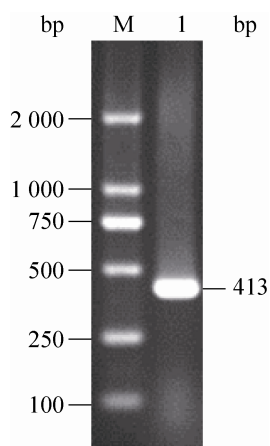


图 1 融合基因 *Cherry-Pleurocidin* 的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR product of *Cherry-Pleurocidin* fusion gene. M: DNA marker; 1: PCR products of fusion gene.

2.3 不同浓度甘氨酸对融合蛋白 CP 分泌效率的影响

在诱导 16 h 时加入甘氨酸, 当甘氨酸终浓度增加为 4 g/L 融合蛋白 CP 接近完全分泌 (图 3); 终浓度为 5 g/L 时, 分泌效果与 4 g/L 无明显

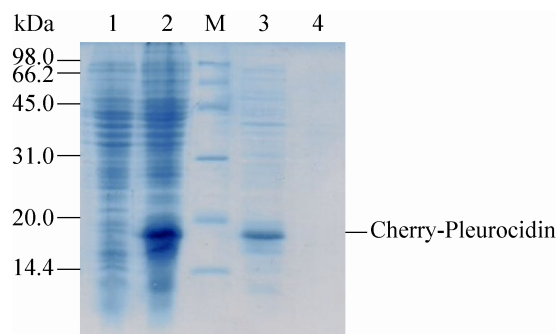


图 2 pET22b (+)-CP 工程菌诱导表达分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the induced expression in the engineering bacteria harboring pET22b (+)-CP. 1: cell pellet of the control group; 2: cell pellet of the lactose induction group; 3: culture supernatant of lactose induction group; 4: culture supernatant of the control group; M: protein marker (from bottom to top: 14.4, 20, 31, 45, 66.2 and 98 kDa).

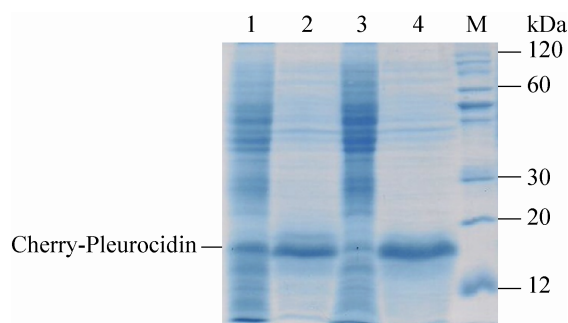


图 3 乳糖诱导组和乳糖+甘氨酸诱导组 SDS-PAGE 比较图

Fig. 3 Comparison between the lactose induction group and the lactose+glycine group by SDS-PAGE. 1: cell pellet of the lactose induction group; 2: culture supernatant of the lactose induction group; 3: cell pellet of the lactose + glycine group; 4: culture supernatant of the lactose + glycine group; M: protein marker (from bottom to top: 12, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 and 120 kDa).

显差异。诱导 20 h 后上清中总蛋白浓度达到 608 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；融合蛋白 CP 占总蛋白浓度的 84.5%，融合蛋白 CP 浓度为 513 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。配对数据 *t* 检验分析表明：乳糖+甘氨酸诱导组（甘氨酸终浓度 4 g/L）胞外融合蛋白 CP 产量极显著高于乳糖诱导组。

不同时间点诱导培养上清中的总蛋白浓度变化曲线如图 4 所示。乳糖+甘氨酸诱导组加入甘氨酸后，培养上清中总蛋白浓度显著增加，随后也一直高于乳糖诱导组。

2.4 融合蛋白 CP 的酸特异性切割

盐酸浓度为 100 mmol/L，水解温度 65 $^{\circ}\text{C}$ ，水解时间 24 h、48 h、72 h，均有目的条带出现；48 h 和 72 h 目的条带含量没有明显差异（图 5）。

2.5 Pleurocidin 纯化、SDS-PAGE 电泳检测和质谱检测

盐酸水解后的培养上清用 Sephadex CM-FF 层析柱吸附，用 0.2 mol/L NaCl 洗脱，洗脱液经电泳检测出现多个条带，对 r-Pleurocidin 条带利用电泳洗脱进一步纯化，经 SDS-PAGE 检测可以达到电泳纯（图 6）。样品进行 2DIC-MS 质谱分析，样品的离子模式为 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ ，对应的分子量为 2 809.26 Da；与理论分子量 2 808.2 Da 相符，

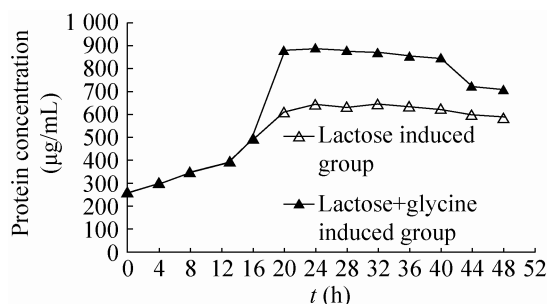


图 4 培养基中总蛋白浓度随诱导时间变化曲线图
Fig. 4 Time course of the total protein concentration in culture supernatant.

误差在仪器测量允许范围内（图 7）。样品的实际二级碎片离子与 MS2 理论碎片离子一致，证实样品为 r-Pleurocidin（图 8、9）。

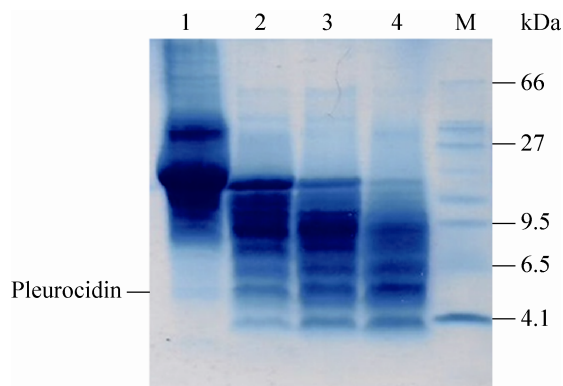


图 5 融合蛋白 Cheery-Pleurocidin 酸切割的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 5 Tricine-SDS-PAGE analysis of Cheery-Pleurocidin Asp-Pro cleavage. 1: control sample incubated at the same condition without any acid added for 72 hours; 2-4: the supernatant of the hydrolysis solution at the time point of 24 h, 48 h and 72 h; M: low range protein marker (from bottom to top: 4.1, 6.5, 9.5, 14.4, 20, 27, 35, 45, and 66 kDa).

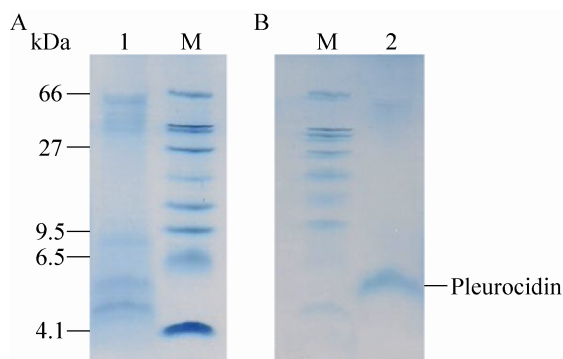


图 6 r-Pleurocidin 的纯化图

Fig. 6 Tricine-SDS-PAGE analysis of purified r-Pleurocidin. (A) Purification of r-Pleurocidin by cation exchange chromatography. (B) Purification of r-Pleurocidin by electroelution. 1: fractions from the Sephadex CM-FF 5 mL column; 2: purified r-Pleurocidin; M: low range protein marker (from bottom to top: 4.1, 6.5, 9.5, 14.4, 20, 27, 35, 45, and 66 kDa).

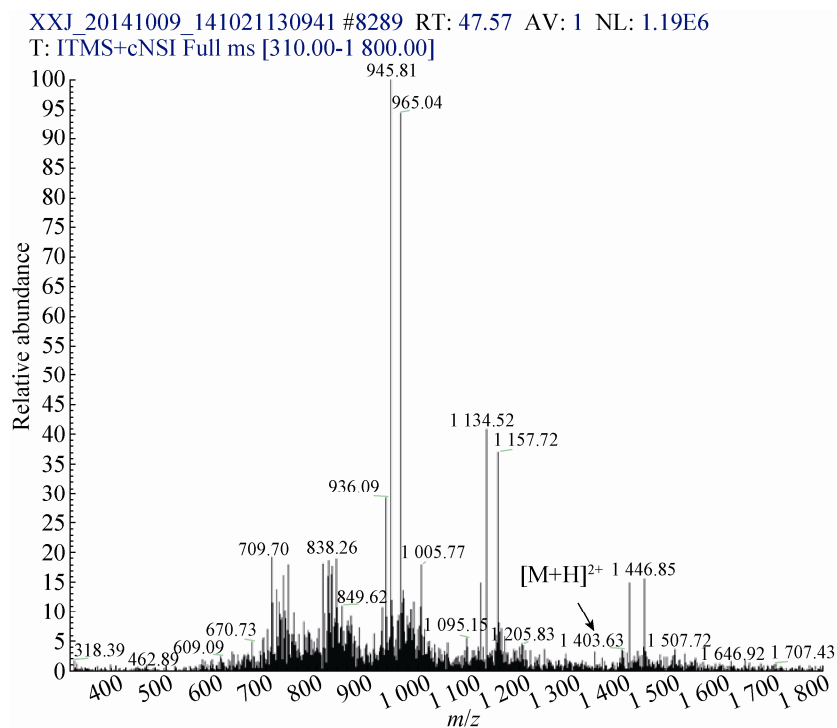


图 7 r-Pleurocidin 的一级质谱图

Fig. 7 Primary mass spectrometry (DIC-MS) of r-Pleurocidin.

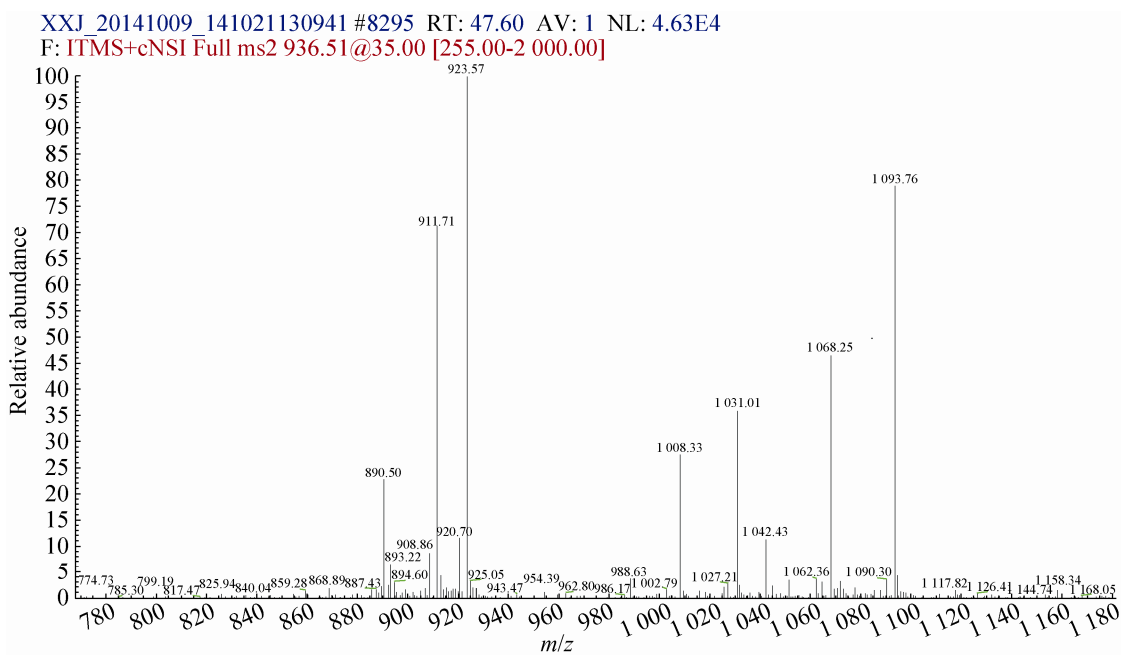


图 8 r-Pleurocidin 的二级质谱图

Fig. 8 The second grade mass spectrometry(DIC-MS) of r-Pleurocidin.

几个方面提高分泌效率：1) 宿主菌本身的遗传改造；例如 Wacker Biotech 公司开发 ESETEC[®] 系统，其宿主菌若干外膜蛋白被突变^[17]；2) 选择或改造信号肽序列^[18]；3) 目的蛋白的修饰或结构改变^[19]；4) 优化培养条件，如添加甘氨酸、Triton X-100，改变培养温度等^[20-21]。

II 型分泌系统是最常用的分泌系统，它先通过 SecB、SRP 或 TAT 通路，将含信号肽的蛋白质前体转运至周质，再通过 MTB 机制由 12-16 个蛋白质组成的 secreton 分泌到胞外^[15]。本实验成功构建了 PelB-Cherry-Pleurocidin 融合基因，表达过程中信号肽 PelB 切割完全，融合蛋白 CP 分泌到培养上清中。PelB 信号肽属于 II 型分泌系统的 SecB 途径，配合使用 Cherry 作为前导序列^[21]，一方面抑制抗菌肽 pleurocidin 对宿主细胞的毒性，另一方面促进融合蛋白 CP 直接分泌到胞外。另外，甘氨酸干扰大肠杆菌细胞壁肽聚糖层的合成，破坏细胞外膜的完整性^[22]，添加适量的甘氨酸促进了胞内蛋白质的释放，有效提高了产量和分泌效率。本实验中融合蛋白 CP 几乎全部分泌到胞外，在培养上清中的产量达 516 mg/L，在同类研究中 (20-500 mg/L) 处于较高水平^[23-26]。酸水解切割融合蛋白，成本低，安全性好，操作方便。本实验中融合蛋白盐酸水解效果优于甲酸和乙酸，但水解过程中出现了部分蛋白质沉淀的问题，需要进一步摸索条件加以改进。

本实验成功构建了含重组质粒 pET22b (+)-CP 的大肠杆菌工程菌，首次实现了 Pleurocidin 在大肠杆菌中高效分泌表达，结合下游高密度发酵，可以获得更高的产量，具有重要的应用价值。

REFERENCES

- [1] Deng C, Wang LJ. Research advances in cationic antimicrobial peptides. *China Biotechnol*, 2008, 28(6): 100-107 (in Chinese).
邓超, 王联结. 阳离子抗菌肽的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(6): 100-107.
- [2] Ponnappan N, Budagavi DP, Yadav BK, et al. Membrane-active peptides from marine organisms-antimicrobials, cell-penetrating peptides and peptide toxins: applications and prospects. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2015, 7(1): 75-89.
- [3] Cole AM, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem*, 1997, 272(18): 12008-12013.
- [4] Burrowes OJ, Hadjicharalambous C, Diamond G, et al. Evaluation of antimicrobial spectrum and cytotoxic activity of pleurocidin for food applications. *J Food Sci*, 2004, 69(3): FM66-FM71.
- [5] Lee J, Lee DG. Structure-antimicrobial activity relationship between pleurocidin and its enantiomer. *Exp Mol Med*, 2008, 40(4): 370-376.
- [6] Cole AM, Darouiche RO, Legarda D, et al. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(8): 2039-2045.
- [7] Lee J, Lee DG. Influence of the hydrophobic amino acids in the N-and C-terminal regions of pleurocidin on antifungal activity. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(8): 1192-1195.
- [8] Falzone CJ, Wang YM, Vu BC, et al. Structural and dynamic perturbations induced by heme binding in cytochrome *b₅*. *Biochemistry*, 2001, 40(15): 4879-4891.
- [9] Fu YM, Xu JZ, Liao Q, et al. Research of Lowry determination of oligopeptides. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(4): 739-741 (in Chinese).
付玉梅, 许锦珍, 廖群, 等. Lowry 法测定寡肽的研究. *药物分析杂志*, 2011, 31(4): 739-741.
- [10] Li BC, Chen YQ, Liu P, et al. Expression of the antibacterial peptide CM4-like gene of Chinese

- silkworm bombyx mori in *Escherichia coli* and its antibacterial activity analysis. *J Mol Cell Biol*, 2007, 40(2): 98–102.
- [11] Liu XQ, Zha XD, Xiao YZ, et al. Efficient fusion expression of G13 domain derived from granulysin in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 235–242 (in Chinese).
刘小强, 查向东, 肖亚中, 等. 颗粒裂解肽 G13 结构域在大肠杆菌中的高效融合表达. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 235–242.
- [12] Bryksa BC, MacDonald LD, Patrzykat A, et al. A C-terminal glycine suppresses production of pleurocidin as a fusion peptide in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, 45(1): 88–98.
- [13] Burrowes OJ, Diamond G, Lee TC. Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. *J Biomed Biotechnol*, 2005, 2005(4): 374–384.
- [14] Brocal I, Falco A, Mas V, et al. Stable expression of bioactive recombinant pleurocidin in a fish cell line. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(6): 1217–1228.
- [15] Mergulhao FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(3): 177–202.
- [16] Low KO, Mahadi NM, Illias RM. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(9): 3811–3826.
- [17] Ostendorp R, Popp A, Fischer M. Expression of full length igg and secretion into the culture medium of prokaryotic cells: Germany, EP2176291 A1. 2009-02-19.
- [18] Zamani M, Nezafat N, Negahdaripour M, et al. *In silico* evaluation of different signal peptides for the secretory production of human growth hormone in *E. coli*. *Int J Pept Res Ther*, 2015, 21(3): 261–268.
- [19] Chen N, Hong FL, Wang HH, et al. Modified recombinant proteins can be exported via the Sec pathway in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e42519.
- [20] Liu ZM, Tian L, Chen YL, et al. Efficient extracellular production of κ -carrageenase in *Escherichia coli*: effects of wild-type signal sequence and process conditions on extracellular secretion. *J Biotechnol*, 2014, 185: 8–14.
- [21] 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.
- [22] Kaderbhai N, Karim A, Hankey W, et al. Glycine-induced extracellular secretion of a recombinant cytochrome expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, 25(1): 53–61.
- [23] Khushoo A, Pal Y, Mukherjee KJ. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(2): 189–197.
- [24] Wen CW, Wang ZR, Du P, et al. Secretion expression of recombinant glucagon in *Escherichia coli*. *Sci China C: Life Sci*, 2001, 44(3): 233–240.
闻崇炜, 王佐仁, 杜鹃, 等. 胰高血糖素在大肠杆菌中的分泌表达. *中国科学(C 辑)*, 2001, 31(1): 22–27.
- [25] Han ZH, Zhao QZ, Wang HL, et al. Characteristics of the secretory expression of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Escherichia coli*. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5(15): 2155–2159.
- [26] Songsiriritthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, et al. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1, 4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 20.

(本文责编 郝丽芳)