

鲨素 Tachyplesin I 在大肠杆菌中的重组表达及其抑菌活性

王若诚, 辛 瑜, 张 梁*

(江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘 要:为了高效制备抗菌肽, 本文将鲨素抗菌肽目的基因 *Tachyplesin-1* (TP1) 在大肠杆菌 BL21 中进行表达。首先构建表达质粒 pET32a-TP1 并转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 IPTG 诱导下进行目的融合蛋白表达, 并利用 His 标签与镍柱亲和层析对融合蛋白进行纯化。纯化后的融合蛋白经羟胺裂解液切割和质谱分析后, 获得单一的 TP1 重组蛋白, 最后对其抑菌活性进行表征。结果表明, 重组菌在 37 °C 经 IPTG 诱导后, 融合蛋白表达成功, TrxA-TP1 融合蛋白的分子量在 20 kDa 左右。经羟胺裂解得到的重组蛋白 TP1 对于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 均具有良好抑菌活性, 最小抑菌浓度分别为 6 和 10 mg/L。本研究为鲨素抗菌肽 TP1 的开发应用和大量生产奠定了基础。

关键词: 鲨素, 融合表达, 羟胺切割, 抑菌活性, 纯化, 大肠杆菌

Recombinant Expression of Tachyplesin I in *E.coli* and Its Antibacterial Activity

WANG Ruo-cheng, XIN Yu, ZHANG Liang*

(National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to obtain antimicrobial peptide efficiently, the recombinant expression of antimicrobial peptide target gene *Tachyplesin I* (TP1) in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was studied. The expression vector pET32a-TP1 was constructed and converted to *Escherichia coli* BL21 (DE3). IPTG induced the expression of target genes, and the fusion protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The purified TrxA-TP1 fusion peptide was released by hydroxylamine and recombinant TP1 was analyzed by mass spectrometry. Results showed that TrxA-TP1 fusion protein was induced successfully with IPTG at 37 °C. The molecular weight of TrxA-TP1 was about 20 kDa. The recombinant TP1 obtained by hydroxylamine cleavage showed strong antibacterial bioactivity against *S.aureus* and *B.subtilis*. The minimal inhibitory concentration was 6 and 10 mg/L respectively. These experiments established a useful system for further studies, application and mass production of antimicrobial peptide TP1.

Key words: Tachyplesin I; fusion expression; hydroxylamine cleavage; antibacterial activity; purification; *E.coli*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)19-0094-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.015

引文格式: 王若诚, 辛瑜, 张梁. 鲨素 Tachyplesin I 在大肠杆菌中的重组表达及其抑菌活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 94-98.

抗生素的广泛应用拯救了无数生命, 然而过度依赖抗生素导致药物残留与细菌耐药性问题日益严重^[1-2], 传统大分子抗生素开发逐渐停滞^[3]。因此, 寻找抗生素替代品成为社会发展与科技进步的必要方向。抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMPs) 作为生物先天免疫的第一道重要防线^[4-5] 逐渐进入大家的视野。作为小分子抗菌物质^[6], 抗菌肽作用机制多样^[7], 可

以参与细胞信号传导^[8], 具有抗氧化^[9] 与降血压^[10] 作用。

鲨是一种生活在海洋中的大型节肢动物, 从奥陶纪出现至今已有 4 亿多年的历史^[11]。鲨素作为鲨血细胞中的阳离子抗菌肽^[12], 对细菌与真菌均具有抑菌活性^[13-14]。此外, 研究表明鲨素还可以抗病毒^[15]、抑制肿瘤细胞增殖^[16] 和诱导癌细胞分化^[17]。

收稿日期: 2020-03-02

作者简介: 王若诚 (1995-), 男, 硕士, 研究方向: 发酵工学, E-mail: davidw95@163.com。

* 通讯作者: 张梁 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业微生物改造与应用, E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn。

基金项目: 江苏省渔业科技项目 (Y2018-26)。

鲎素 Tachyplesin I (TP1) 由 17 个氨基酸残基组成, 两个 β -折叠通过 β -转角连接在一起, 疏水的氨基酸残基定位于平面一侧, 分子中 6 个阳离子氨基酸残基主要分布在分子的尾部^[18]。Edwards 利用氨基酸残基修饰调节重组肽所带电荷和疏水性, 以评估鲎素及其类似物对于耐药菌的抑菌活性^[19]; Woodbum 等将 RP557 与鲎素抗菌肽共同使用, 降低伤口感染风险^[20]; Vernen 等研究发现鲎素与癌细胞具有很强的结合能力, 可以帮助化疗药物靶向针对癌细胞^[21]。这些研究说明鲎素在医学领域具有广阔的应用前景与巨大经济价值。目前, 抗菌肽主要通过生物提取、化学合成和基因工程 3 种方法获取。从生物体内分离纯化抗菌肽, 公众接受度高但步骤繁琐, 产率较低。鲎作为珍贵的海洋生物, 数量稀少, 从鲎血细胞中直接提取不能满足大量制备的需求^[22]。而利用化学方法固相合成, 产物纯度可得到保障, 但价格极其昂贵, 无法满足工业化应用。利用基因工程技术来生产鲎素, 能够减少环境负担, 大幅降低鲎素获取成本^[23], 为鲎素的理论研究与工业化应用创造良好环境。

本研究选用大肠杆菌作为宿主细胞, 为降低目的抗菌肽对宿主菌的杀伤作用, 将鲎素抗菌肽与硫氧还蛋白标签以可溶形式进行融合表达。并对经过蛋白纯化和羟胺切割获得的重组 TP1 蛋白进行质谱鉴定和抑菌活性表征, 为鲎素工业化应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

质粒 pET-32a(+)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、大肠杆菌 BL21 (DE3)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 本实验室保藏; 限制性内切酶 *Bam*H I / *Hind* III、预染蛋白 Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder 美国 Thermo 公司; *T*₄ DNA 连接酶 大连 Takara 公司; 2 × *Taq* Master Mix、2 × *Pfu* Master Mix 杭州宝赛生物科技有限公司; 质粒 DNA 小量提取、DNA 片段纯化、DNA 凝胶回收试剂盒 美国 Axygen 公司; 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 美国 INALCO 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 上海生工生物工程有限公司; 蛋白胨、酵母提取物 英国 OXOID 公司; 其他试剂 均为国产分析纯。

S100D 型 PCR 仪、Chemi Doc 凝胶成像仪 美国 Bio-Rad 公司; DYY-6C 核酸电泳仪 北京六一仪器厂; Pico17 高速离心机 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; MLS-3750 型全自动高压蒸汽灭菌锅 日本 SANYO 公司; HYL-C 型组合式摇床 太仓市实验设备厂; UV-3200 型紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; Sonic VCX-750 型超声波细胞破碎仪 南京新辰生物科技有限公司; SCG 蛋白纯化系统 苏州赛谱仪器有限公司; MALDI SYNAPT MS 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用仪 美国 Waters 公司; HH-2 数显恒温水浴锅 金坛市荣华仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的获得 参考 NCBI 数据库中鲎素抗菌肽 Tachyplesin I (TP1) 的全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: P14213.2), 根据大肠杆菌的密码子偏好性对编码其成熟肽进行密码子优化, 交由上海生工生物工程有限公司合成。将 TP1 基因序列克隆在 pUC57 质粒上, 命名为 pUC57-TP1。以质粒 pUC57-TP1 为模板, 设计正向引物 F1: 5'-CGGGATCC AACGGCAAATGGTGCCTTTCGCG-3', 反向引物 R1: 5'-CCAAGCTTTTCATTAGCCGTTGCGGCA GCGGCGATA-3', 下划线依次 *Bam*H I、羟胺切割位点和 *Hind* III 限制性内切酶位点。利用 *Pfu* DNA 高保真聚合酶扩增 TP1 基因片段。

1.2.2 原核表达质粒的构建和鉴定 扩增得到的 PCR 产物纯化后使用 *Bam*H I 与 *Hind* III 进行双酶切, 酶切产物经过纯化后与同样双酶切纯化后的 pET-32a 片段按摩尔比 (5:1) 用 *T*₄ DNA 连接酶 16 ℃ 连接过夜, 连接产物即 pET-32a-TP1。表达设计框架为: TrxA + 羟胺切割位点 (aacggc) + TP1 目的抗菌肽。连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞并过夜培养, 挑取菌落为模板, 以 F1 和 R1 为引物, 通过菌落 PCR 与酶切验证目的片段是否连接到目的载体上, 将筛选得到的阳性转化子送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 融合蛋白的诱导表达 将鉴定正确的 pET32a-TP1 质粒转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 在含有 100 μ g/mL 氨苄的 LB 培养基中, 分别在 37、30、25 ℃ 下, 200 r/min 转速下培养至对数生长期时 (OD_{600} = 0.6), 加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 发酵结束后 12000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min 收集菌体重悬于磷酸盐缓冲液中, 洗涤 3 次在冰浴中进行超声破碎, 功率为 400 W, 共 15 min (工作 1 s, 间隔 2 s)。然后在 4 ℃ 下 12000 r/min 离心 20 min, 分别收集上清与沉淀, 通过 15% SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.4 目的蛋白纯化 将诱导后离心收集的菌体经 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 超声破碎后离心收集上清, 将样品通过 HisTrap FF 亲和层析凝胶柱进行纯化。进样前, 利用 50 mL 平衡缓冲液 (500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Na₂HPO₄、20 mmol/L 咪唑, pH7.4) 平衡柱子。进样后, 用 5 ~ 10 倍体积的洗脱缓冲液 (500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Na₂HPO₄、500 mmol/L 咪唑, pH7.4) 洗脱, 收集洗脱峰的洗脱液。

1.2.5 羟胺切割与产物质谱鉴定 将 1.2.4 中收集到的洗脱液注入透析袋中, 用磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 透析过夜以除去高浓度咪唑。透析后样品 12000 r/min 离心 20 min 收集得到的上清液冻干后, 加入羟胺切割液 (200 mmol/L Tris, 2 mol/L 盐酸羟胺, pH9.0) 中, 在 45 ℃ 条件下反应 4 h^[24]。切割获得的产物利用透析袋进行脱盐处理。然后将样品利用冷冻干燥仪进行浓缩。使用 LC-MS TOF 超高效液相色谱串联质谱联用仪对浓缩样品进行质谱检测, 以鉴定切割产物成分。

色谱条件:液相系统:Waters ACQUITY UPLC;色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 × 150 mm, 1.7 μm);柱温:45 °C;流动相 A:乙腈;流动相 B:0.1% 甲酸;流速 0.30 mL/min;总分析时间 15.00 min;进样体积:5.0 μL。

质谱条件:质谱系统:Waters SYNAPT MS 检测仪;软件:Waters Masslynx V4.1 质谱工作站;离子源:ESI 电离源;电离模式:ESI⁺;扫描 m/z 范围:20~2000;毛细管电压:3.5 kV;锥孔电压:20 V;离子源温度:100 °C;脱溶剂气温度:400 °C;脱溶剂气流量:700 L/h;锥孔气流量:50 L/h。

1.2.6 重组 TP-1 的抑菌活性检测 用琼脂孔扩散实验对重组表达的鲨鱼素抗菌肽 TP1 检测抑菌活性。将金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌分别培养至对数期(OD₆₀₀ = 0.4~0.6),利用灭菌后的 PBS 溶液,将菌液浓度稀释至 5 × 10⁵ CFU/mL。将无菌 LB 固体培养基冷却至 50 °C,按照 1% 的比例接种指示菌,混匀后倾注平板。等平板凝固后用打孔器进行打孔,分别标记数字 1、2、3、4、5。1 号孔加入化学合成的 TP1 (40 mg/L),2 号孔加入 TrxA-TP1 融合蛋白(40 mg/L),3 号孔切割后的 TP1 重组蛋白(40 mg/L),4 号孔加入 10 mg/mL 氨苄青霉素,5 号孔加入灭菌后的 PBS 溶液。每孔上样 50 μL 液体,37 °C 静置培养过夜,观察抑菌圈情况。

最小抑菌浓度的测定:将处于对数期的金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌稀释至 10⁴ ~ 10⁵ CFU/mL,取 1 mL 菌液和 10 μL 不同浓度的重组 TP1 加入到 EP 管中,以 PBS 缓冲液作阴性对照,37 °C、200 r/min 振荡培养 3 h,测菌液的 OD₆₀₀,以吸光度值无变化处所对应的 TP1 浓度为最小抑菌浓度(MIC)。

1.3 数据处理

本研究中涉及的实验内容均重复 3 次;应用 Waters Masslynx V4.1 软件分析质谱数据与 Adobe Illustrator CC2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 目的抗菌肽 TP1 基因获得

TP1 基因的开放阅读框编码的氨基酸序列为 KWCFRVCYRGICYRRRCR,该基因编码的抗菌肽长度为 17 个氨基酸残基。以重组质粒 pUC57-TP1 为模板,通过 PCR 扩增获得目的基因,其凝胶电泳结果如图 1 所示,在 3% 琼脂糖凝胶电泳上可以看到大小约为 80 bp 的清晰条带,与目的片段大小一致。

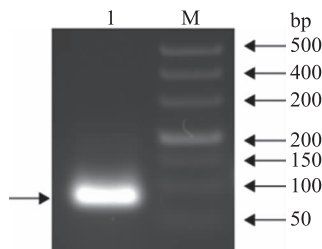


图 1 TP1 基因的克隆

Fig.1 Cloning of TP1 gene

注:M:DNA Marker;1:TP1 gene(81 bp)。

2.2 鲨鱼素 TP1 原核表达载体的构建与鉴定

对构建的 pET32a-TP1 表达载体进行双酶切验证,双酶切后出现两条特异性条带,其中小片段与 TP1 大小一致,另一条带与双酶切后的 pET-32a 大小相同,结果如图 2 所示,表明基因 TP1 已经成功连接到 pET-32a 载体上。提取重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,筛选获得重组菌。由于目的抗菌肽 TP1 对于宿主大肠杆菌可能存在一定的杀伤作用,为提高目的抗菌肽的产量,利用 TrxA 蛋白融合标签与目的抗菌肽融合表达,以此降低 TP1 的毒性,保护宿主菌生长。后期再通过羟胺裂解液分离 TrxA 蛋白与目的抗菌肽,释放 TP1 的抑菌活性。

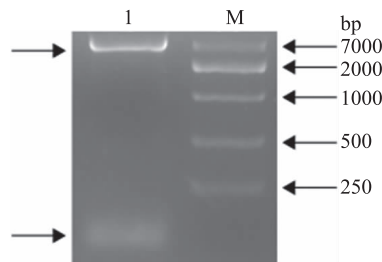


图 2 pET32a-TP1 重组质粒的双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pET32a-TP1 by double-enzyme digestion

注:M:DNA Marker;1:pET32a-TP1。

2.3 融合蛋白的诱导表达

结果如图 2 显示,在 37 °C 培养条件下的菌体破碎上清中,20 kDa 左右处有明显特异表达的蛋白条带,与预期的 TrxA-TP1 融合蛋白的大小基本一致,表明融合蛋白成功表达并以可溶形式存在。

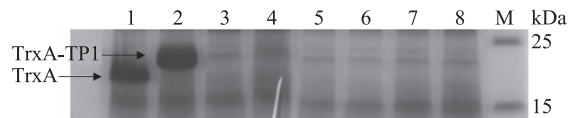


图 3 TrxA-TP1 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of TrxA-TP1 fusion protein

注:M:Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder;

1:pET32a 空载上清;2~4:分别表示 25、30、37 °C

诱导表达破碎上清;5~7:分别表示 25、30、37 °C

诱导表达破碎沉淀;8:未诱导全细胞。

2.4 融合蛋白 TrxA-TP1 的纯化

收集菌体超声破碎后的上清,使用 HisTrap FF 柱进行分离纯化。将洗脱缓冲液洗脱后获得后的样品进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果如图 3 所示,进样流出部分无目的蛋白析出,说明目的蛋白与镍柱有效结合;当洗脱液中咪唑浓度为 100 mmol/L 时,剩余杂蛋白充分洗脱;当洗脱液中咪唑浓度为 200 mmol/L 时,大量目的蛋白析出,SDS-PAGE 分析显示为单一条带,大小约为 20 kDa。结果表明利用镍柱纯化后能够获得纯度较高的 TrxA-TP1 融合蛋白。

2.5 融合蛋白的切割与质谱鉴定

将纯化后的 TrxA-TP1 融合蛋白进行羟胺切割,经过除盐与浓缩处理后利用 LC-MS TOF 对切割产物进行分析。结果如图 4 所示,切割产物分子质量

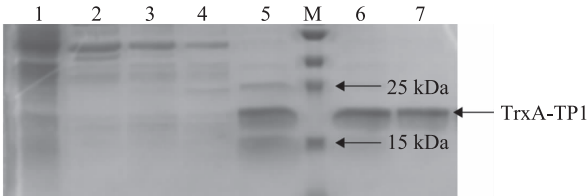


图4 纯化后的融合蛋白 TrxA-TP1 的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified of TrxA-TP1 fusion protein

注:M:Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder;1:进样;2~4:100 mmol/L 咪唑洗脱;5~7:200 mmol/L 咪唑洗脱。

为 2330.55 u,与预测结果一致。根据上述结果以及 SDS-PAGE 分析,表明了重组菌 BL21-pET32a-TP1 能够成功表达 TrxA-TP1 融合蛋白,且可以利用羧胺切割的方法将 TrxA 蛋白与目的抗菌肽 TP1 分开,从而能够获得单一的 TP1 重组蛋白。

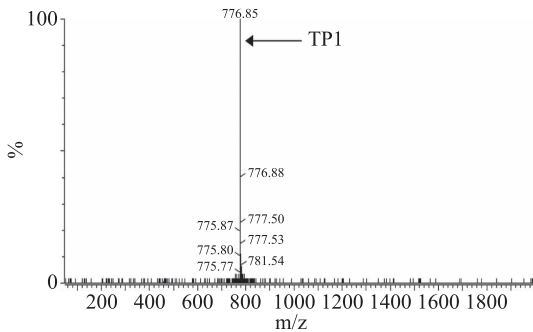


图5 重组 TP1 的质谱分析

Fig.5 Mass spectrometry analysis of recombinant TP1

2.6 重组 TP1 的抑菌活性检测

为了检测羧胺切割后重组 TP1 的抗菌活性,以氨苄青霉素为阳性对照,灭菌后的 PBS 溶液为阴性对照,使用金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌作为实验菌,利用琼脂糖孔扩散法对获得的重组 TP1 蛋白的抗菌活性进行测定。结果如图 5 所示,通过对抑菌圈大小与透明程度进行比较,表明 TrxA-TP1 融合蛋白对金黄色葡萄球菌与枯草芽孢杆菌均不具有抑菌活性,而切割后获得的重组蛋白 TP1 对这两种菌均具有抑菌活性。由此表明了 TP1 蛋白与 TrxA 蛋白融合表达后,利用羧胺切割可以获得具有抗菌活性的单一 TP1 重组蛋白。通过液体抑制测定法确定了重组 TP1 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度分别为 6 和 10 mg/L。

3 讨论与结论

本研究成功利用大肠杆菌表达系统对螯素 TP1 进行了高效表达。在菌体破碎液上清中,检测到重组融合蛋白的条带大小约为 20 kDa,表明 TrxA-TP1 融合蛋白在大肠杆菌中以可溶形式进行了融合表达。融合蛋白经过镍柱纯化,能够获得条带较为单一的融合蛋白,纯化后的样品利用羧胺裂解液进行切割后,质谱分析证明了羧胺切割后能够成功的将 TrxA 蛋白标签与螯素 TP1 抗菌肽分开,从而获得单一的 TP1 抗菌肽。后期抑菌活性实验表明,融合蛋白 TrxA-TP1 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌没

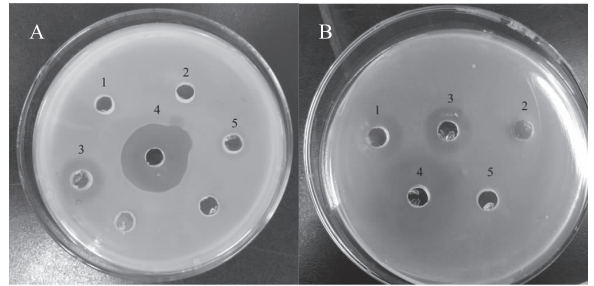


图6 重组 TP1 的抑菌效果检测

Fig.6 The bacteriostatic efficacy of recombinant TP1

注:A:金黄色葡萄球菌的抑菌效果检测;B:枯草芽孢杆菌的抑菌效果检测;1:化学合成的 TP1;2:TrxA-TP1 融合蛋白;3:重组 TP1;4:Amp;5:PBS 溶液。

有明显的杀伤作用,而裂解后获得的单一重组 TP1 单体蛋白对这两种菌均具有明显抑菌活性。

迄今为止,已有许多研究人员在不同宿主中成功表达抗菌肽^[25]。大肠杆菌作为目前应用最为广泛的表达系统^[26],具有在短时间内表达水平高和成本低廉等优点,非常适用于规模化生产,有望使抗菌肽成为帮助人类抵御疾病的新型药物。许多利用大肠杆菌重组表达的抗菌肽,如拟穴青蟹抗菌肽^[27]与 PlnF 抗菌肽^[28]都以包涵体形式存在。然而包涵体后续处理繁琐且复性后目的蛋白可能丧失活性^[29]。本文选取 TrxA 蛋白标签与螯素 TP1 抗菌肽进行融合表达,不仅促进融合蛋白的可溶性表达,更降低了重组 TP1 对于宿主大肠杆菌的杀伤作用,提高了融合蛋白的表达量,为螯素抗菌肽的大规模生产与其他抗菌肽的重组表达提供了一定理论依据。

参考文献

[1] Meade E, Slattery M A, Garvey M. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile? [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9 (1):1-18.

[2] Der Torossian Torres M, de la Fuente - Nunez C. Reprogramming biological peptides to combat infectious diseases [J]. Chem Commun (Camb), 2019, 55 (100):15020-15032.

[3] Chen C H, Lu T K. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9 (1):1-20.

[4] Lacerda A F, Pelegri P B, de Oliveira D M, et al. Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug Therapy [J]. Front Microbiol, 2016, 7 (91):1-11.

[5] Raheem N, Straus S K. Mechanisms of action for antimicrobial peptides with antibacterial and antibiofilm functions [J]. Front Microbiol, 2019, 10 (2866):1-14.

[6] 杨静,贾如涵,李文慧,等. 抗菌肽改良设计及抗炎作用的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38 (1):57-71.

[7] Cardoso M H, Orozco R Q, Rezende S B, et al. Computer-aided design of antimicrobial peptides: Are we generating effective drug candidates? [J]. Front Microbiol, 2019, 10 (3097):1-15.

[8] Cipolari O C, de Oliveira Neto X A, Conceição K. Fish bioactive peptides: A systematic review focused on sting and skin

- [J].Aquaculture,2020,515(734598):1-11.
- [9] Kim S K, Wijesekera I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review [J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2(1):1-9.
- [10] Ryan J T, Ross R P, Bolton D, et al. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and Fish [J]. Nutrients, 2011, 3(9):765-791.
- [11] 谢海伟. 鲎素抗菌活性和机理的研究以及鲎素串联基因在枯草杆菌 WB800 中高效表达 [D]. 广州: 华南理工大学, 2008.
- [12] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(32):16709-16713.
- [13] Hancock, Robert E W. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2001, 1(3):156-164.
- [14] Peschel A, Otto M, Jack R W, et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides [J]. J Biol Chem, 1999, 274(13):8405-8410.
- [15] Morimoto M, Mori H, Otake T, et al. Inhibitory effect of Tachyplesin-I on the proliferation of human-immunodeficiency-virus invitro [J]. Chemotherapy, 1991, 37(3):206-211.
- [16] 李祺福, 欧阳高亮, 鲍什登, 等. 中国鲎鲎素对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国海洋药物, 2002, 86(2):22-25.
- [17] Dai J G, Xie H W, Jin G, et al. Preliminary study on high-level expression of tandem-arranged Tachyplesin-encoding gene in *Bacillus subtilis* Wb800 and its antibacterial activity [J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(1):109-117.
- [18] Shen D, Wu B. Structure, biological properties and utilities of

- marine-derived antimicrobial peptides [J]. Current Organic Chemistry, 2014, 18(7):793-803.
- [19] Edwards I A, Elliott A G, Kavanagh A M, et al. Structure-activity and toxicity relationships of the antimicrobial peptide Tachyplesin-1 [J]. ACS Infect Dis, 2017, 3(12):917-926.
- [20] Woodburn K W, Jaynes J M, Clemens L E. Evaluation of the antimicrobial peptide, RP557, for the broad-spectrum treatment of wound pathogens and biofilm [J]. Front Microbiol, 2019, 10(1688):1-11.
- [21] Vernen F, Craik D J, Lawrence N, et al. Cyclic analogues of horseshoe crab peptide Tachyplesin I with anticancer and cell penetrating properties [J]. ACS Chem Biol, 2019, 14(12):2895-2908.
- [22] Li H, Ali Z, Liu X, et al. Expression of recombinant tachyplesin I in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2019, 157:50-56.
- [23] 马青山, 余占桥, 韩冰, 等. 抗菌肽融合表达研究进展 [J]. 生物工程学报, 2011(10):1408-1416.
- [24] 周良范. 家蚕抗菌肽 CM4 在 *Escherichia coli* 中的串联表达 [D]. 南京: 南京师范大学, 2009.
- [25] Ingham A B, Moore R J. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2007, 47(Pt 1):1-9.
- [26] Musa M, Radman M, Krisko A. Decreasing translation error rate in *Escherichia coli* increases protein function [J]. BMC Biotechnol, 2016, 16(28):1-5.
- [27] 彭银辉, 蔡小辉, 熊向英, 等. 拟穴青蟹抗菌肽 hyastatin 基因原核表达条件的优化 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(7):138-142.
- [28] 朱剑威. 产抗菌肽乳酸菌筛选及抗菌肽 PlnF 基因的克隆与表达 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2018.
- [29] 陈长超. 基于包涵体的重组抗菌肽表达研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.

(上接第 93 页)

- insulin responses [J]. Journal of Cereal Science, 2010, 51:152-158.
- [31] Coda R, Rizzello C G, Gobbetti M. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 137(2-3):236-245.
- [32] 胡文斌, 邹佩, 李红歌, 等. 单宁及其微生物降解途径研究进展 [J]. 江西科学, 2015, 33(1):85-89.
- [33] Katina K, Laitila A, Juvonen R, et al. Bran fermentation as a mean to enhance technological properties and bioactivity of rye [J]. Food Microbiology, 2007, 24(2):175-186.
- [34] 周志磊, 徐志强, 周顺, 等. 还原糖与脯氨酸固相美拉德反应模型中焦糖香成分的形成及机理 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(1):30-34.
- [35] Harth H, Vanks, Vuyst L D, et al. Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslipped barleysourdough fermentations under laboratory and bakery

- conditions [J]. Journal of Food Microbiology, 2016, 228:22-32.
- [36] Rizzello C G, Coda R, Gobbetti M. Use of sourdough fermentation and nonwheat flours for enhancing nutritional and healthy properties of wheat based foods [J]. Fermented Foods in Health and Disease Prevention, 2016:433-452.
- [37] 唐茂妍. 胃蛋白酶-胰酶两步法体外评定加酶饲料蛋白质消化率的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [38] Charlene F B, Antonio C L, Evelyn Mae T M. Effect of condensed tannins on the *in vitro* protein digestibility of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33:1157-1159.
- [39] Kristen L D, Liyi Y, Audrey G, et al. Interaction of sorghum tannins with wheat proteins and effect on *in vitro* starch and protein digestibility in a baked product matrix [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63:1234-1241.
- [40] Marisela G, Juana F, Rosa D, et al. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation [J]. European Food Research and Technology, 2002, 214(3):226-231.