

论著·基础研究

复合抗菌肽在毕赤酵母中的表达及其活性研究*

杨桂茂,陶元勇,孙万里,张旭光[△]

(潍坊医学院附属医院检验科/临床检验诊断学省级重点实验室,山东潍坊 261031)

摘要:目的 构建天蚕素 A-死亡素复合基因工程抗菌肽基因 CA(1-7)-T(4-19),并在毕赤酵母中表达。
方法 采用重叠区基因扩增法(SOE)人工合成复合肽基因,同载体 pPICZ α A 连接后转化毕赤酵母受体菌 X-33,通过博莱霉素抗性筛选得到的阳性克隆用甲醇诱导表达,并对产物进行抗菌活性检测,建立抗菌谱。
结果 复合肽基因 CA(1-7)-T(4-19)成功克隆到载体 pPICZ α A 上,鉴定结果与预先设计的基因序列一致,在甲醇诱导下复合肽基因得到表达,并得到临床分离的 76 株革兰阴性和革兰阳性耐药致病菌的最小抑菌浓度,最小抑菌浓度可达到 5 μ g/mL。
结论 成功获得了具有抑菌活性的复合基因工程抗菌肽,且该复合肽对临床常见多重耐药菌株均有明显的抑杀作用。

关键词:复合抗菌肽; 天蚕素 A; 死亡素; 毕赤酵母表达系统; 抑菌活性**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.12.009**中图法分类号:**R93; Q78**文章编号:**1673-4130(2018)12-1439-05**文献标识码:**A

Study on expression and activity of combinant antimicrobial peptide in *Pichia pastoris**

YANG Guimao, TAO Yuanyong, SUN Wanli, ZHANG Xuguang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics/Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261031, China)

Abstract: Objective To construct cecropin A-thanatin combinant gene engineering antimicrobial peptide gene CA(1-7)-T(4-19) for expression in *Pichia pastoris*. **Methods** The combinant antimicrobial peptide gene was artificially synthesized via gene splicing by overlap extension (SOE). The gene was cloned into the pPICZ α A vector and transformed into *Pichia pastoris* X-33 by electroporation. The positive clones obtained by the screening of bleomycin resistance were induced by methanol, and the antibacterial activity of the products was detected and the antimicrobial spectrum was established. **Results** The combinant peptide gene CA(1-7)-T(4-19) was successfully cloned on the carrier pPICZ α A. The identification results were consistent with the pre-designed gene sequence. The combinant peptide gene was expressed under the induction of methanol, and the minimum inhibitory concentration of 76 strains of Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria isolated from the clinic was obtained, and the minimum inhibitory concentration was up to 5 μ g/mL. **Conclusion** A combinant genetic engineering antimicrobial peptide with antibacterial activity was obtained successfully and it had obvious inhibition effect on clinical common multidrug-resistant strains.

Key words: combinant antimicrobial peptide; cecropin A; thanatin; *Pichia pastoris* expression system; antibacterial activity

抗菌肽是一种普遍存在于生物体内,由机体自身产生的具有多种生物学活性的多肽类物质^[1]。一般抗菌肽具有相对分子质量小,热稳定性好,不易产生耐药性,抗菌谱广,作用机制独特等特点^[2]。目前已被分离的抗菌肽中有数十种具有抗菌活性,包括单一肽和复合肽,它们不仅可以杀灭细菌,对真菌、病毒和

原虫也有一定杀灭作用^[3-4]。在作用于细胞方面,仅对发生病变的真核细胞有明显杀伤作用,对正常细胞几乎无损伤,对机体具有保护作用。近年来,对抗菌肽的研究越来越重视,力求寻找其替代抗生素的可能性。有研究表明,抗菌肽的生物活性除了由自身序列决定外,还受净正电荷数、疏水性、 α 螺旋结构稳定性

* 基金项目:潍坊医学院科技创新基金资助项目(K1302023)。

作者简介:杨桂茂,男,主管技师,主要从事病原体的分子诊断研究。 △ 通信作者,E-mail:13953620962@163.com。

本文引用格式:杨桂茂,陶元勇,孙万里,等.复合抗菌肽在毕赤酵母中的表达及其活性研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(12):1439-1442.

等多种理化因素及空间结构的影响^[5-6]。

天蚕素A来自于家蚕,为阳离子型抗菌肽,其蛋白结构为双亲α螺旋结构,具有广谱的杀菌能力,热稳定性好且对正常细胞无杀灭作用。有研究发现,天蚕素A的N端序列对于其抗菌活性具有重要作用^[7-9]。死亡素是在昆虫斑腹刺益蝽中发现的小分子抗菌肽^[10],结构简单,对革兰阳性菌、革兰阴性菌和某些真菌都有抑制作用,但是对金黄色葡萄球菌的抗性较低^[11]。因此,探寻一些长度显著缩短但仍具广谱抗菌活性且对人体无害的多肽就成了人们努力的目标。

本研究选取抗菌肽天蚕素A的第1~7个氨基酸残基及死亡素的第4~19个氨基酸残基,以毕赤酵母偏爱的密码子设计合成了复合肽CA(1-7)-T(4-19)基因。此设计既避免了在体内应用时引起免疫反应,又增强了其杀菌的活性,通过优化该复合肽在酵母表达体系中的表达条件,使其达到高效稳定的蛋白表达量,从而建立新型复合基因工程抗菌肽的高效毕赤酵母表达体系及生产工艺,并初步探讨其抑菌活性,为临床后期选择理想的抗菌药物提供新的领域。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 毕赤酵母受体菌X-33由南京农业大学提供,表达载体pPICZ α A购于Invitrogen公司,DH5 α 、实验菌株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DNA标准相对分子质量Marker、T4 DNA连接酶、限制性内切酶购自TaKaRa公司;PCR试剂盒、细菌DNA提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒购自Promega公司。

1.2 复合抗菌肽基因引物的设计与合成 以现有的抗菌肽的作用机制假说为根据,利用重叠区扩增基因拼接法(SOE)^[12]人工合成复合肽基因,并在两端分别引入Xho I、Xba I酶切位点。自行设计特异性引物,序列如下。P1:5'-CCG CTC GAG ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT AAA AGA AAG TGG AAG CTG TTC AAG AAG ATC GGT CCA GGT-3';P2:5'-TAG TCT AGA CTA GAA CTT CTT CTT CTT GTG CAG GAA CTT ACC TGG ACC GAT CTT CTT-3'。另设计合成另一对引物用于重组载体及重组酵母菌的鉴定,序列如下。F1:5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC -3';F2:5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'。P1、P2和F1、F2均由上海生物工程公司合成。

应用SOE法,以P1、P2互为模板、互为引物采用降落PCR(TD-PCR)技术进行扩增。TD-PCR反应体系(25 μL):P1 1 μL,P2 1 μL,2×PCR Master Mix 12.5 μL,双蒸水(ddH₂O)10.5 μL。扩增条件:94 °C 1 min;94 °C 30 s,退火温度从65 °C降至50 °C,每个循环1 min,每个循环降低0.5 °C,72 °C 30 s,循环30

次;延伸72 °C 5 min。2.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.3 重组表达载体的构建和鉴定 合成的复合抗菌肽基因和pPICZ α A均用Xho I、Xba I双酶切,分别电泳胶回收后用T4 DNA连接酶连接,连接产物转化E. coli DH5 α ,涂布于含25 μg/mL Zeocin的LB平板37 °C过夜,挑转化子培养抽提质粒后进行酶切鉴定,并送Invitrogen公司测序。

1.4 重组载体转化毕赤酵母X-33及转化后的筛选鉴定 测序确认后的阳性克隆提取质粒后用Sac I处理使其线性化,取5 μg与80 μL感受态的毕赤酵母X-33相混合,1.5 kV、25 μF、200 Ω电击后,均匀涂布于YPDZ培养平板上,置30 °C培养箱至单菌落出现。采用煮-冻-煮法制备PCR模板^[13],以F1、F2为引物,反应体系同上,反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s;52 °C 45 s;72 °C 45 s,30个循环;72 °C 6 min。以能扩出607 bp的克隆定为阳性转化子。以同样方法将pPICZ α -A空载体酶切线性化后电转化X-33酵母菌,作为质粒对照。

1.5 复合抗菌肽在摇瓶中的诱导表达及浓度和初步抗菌活性测定 将筛选到的阳性克隆酵母菌接种到5 mL BMGY培养基中,30 °C振荡培养至OD₆₀₀达到3~6;室温2 000 r/min离心5 min收集菌体,悬于25 mL BMMY培养基中继续振荡培养,期间每隔24 h补加终浓度为2% (V/V)的甲醇。72 h后,10 000 r/min离心5 min收集培养液上清,用BCA法测定浓度,并将培养液加到已接种待检菌的琼脂平板小孔内进行初步抑菌活性测定。

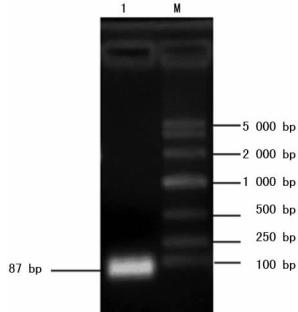
1.6 重组抗菌肽抗菌谱的完善 用液体生长抑制法测定重组抗菌肽对临床常见耐药致病菌的最小抑菌浓度(MIC)。将能完全抑制菌体生长的最低抗菌肽浓度确定为MIC。试验菌株来自潍坊医学院附属医院检验科分离的临床常见致病菌,均进行了药敏测试。具体操作:把处于对数生长期OD₆₀₀≈0.5的各个菌株用LB培养液稀释到10⁶ CFU/mL,分别接种到96孔细胞培养板上,每孔接种50 μL,然后分别加入稀释的不同浓度的抗菌肽50 μL,混匀。每组重复3个孔,设只加LB培养液的孔为阴性对照,不加抗菌肽接种细菌的LB培养液为阳性对照。37 °C培养20 h后取出,测量其OD值,以OD值无变化的孔中抗菌肽的浓度作为MIC。

2 结 果

2.1 复合抗菌肽基因的扩增 通过PCR扩增的复合抗菌肽基因经2%琼脂糖凝胶电泳,可观察到大小约为87 bp的单一一条带,与预期大小一致,见图1。

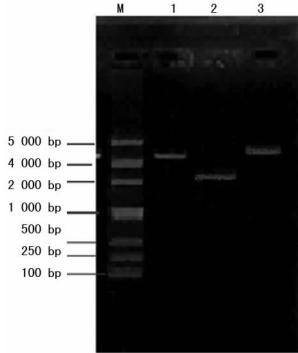
2.2 重组质粒的酶切鉴定和序列测定 取博莱霉素抗性筛选的转化子经培养后抽提重组质粒。分别用Xho I和EcoR I单酶切,重组质粒上Xho I、Xba I

间的 *EcoR* I 酶切位点缺失,限制性内切酶 *Xho* I 酶切可以使其线性化,而用 *EcoR* I 不能使其线性化,见图 2。经缺失酶切位点鉴定阳性的重组质粒测序,截取复合肽基因片断测序图谱见图 3,与预期设计一致。



注:1. PCR 产物;M. DNA Marker

图 1 复合抗菌肽基因



注:M. DNA Marker;1. pPICZ α A;2. 重组 pPICZ α A *Xho* I 单酶切;
3. 重组 pPICZ α A *Eco* R I 单酶切

图 2 单酶切鉴定

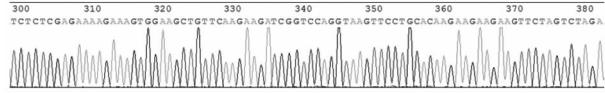
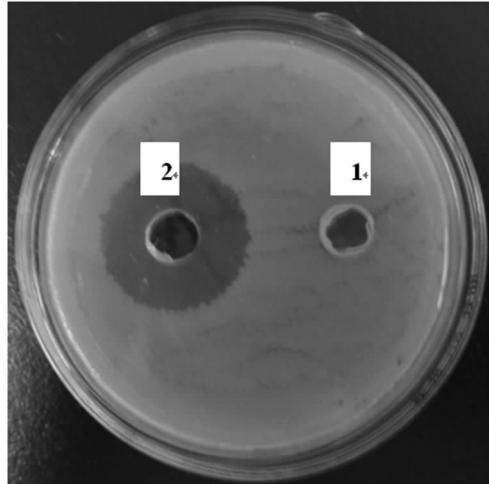


图 3 复合肽基因序列测定



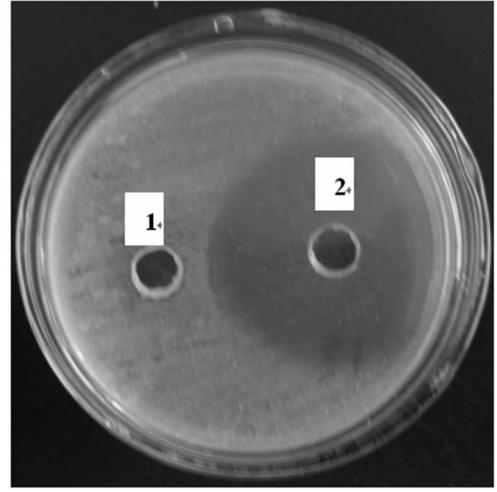
注:1. pPICZ α A;2. 重组体

图 4 复合抗菌肽对大肠埃希菌(*G*⁻ 菌)的抑菌活性

2.3 复合抗菌肽初步抗菌活性测定 抑菌活性测定结果显示,在加有 30 μ L 重组酵母表达产物的孔周

围形成一透明抑菌圈,加有 30 μ L pPICZ α A 空载体转化酵母的上清的孔周围无抑菌圈。研究表明抗菌肽对革兰阴性菌(*G*⁻ 菌)大肠埃希菌和革兰阳性菌(*G*⁺ 菌)金黄色葡萄球菌均具有明显的抑菌活性,抑菌圈直径分别为 32 mm 和 46 mm,而 pPICZ α A 空载体转化的酵母菌表达产物没有抑菌活性,见图 4、5。通过 BCA 法测定复合抗菌肽终浓度为 150 mg/L。

2.4 重组抗菌肽抗菌谱的完善及 MIC 测定 用菌体液体生长抑制法测得该复合肽对临床分离的 76 株耐药致病菌的 MIC 分别见表 1、2。结果显示,复合肽对多重耐药的 *G*⁺ 菌和 *G*⁻ 菌均具有良好的抑菌作用。



注:1. pPICZ α A;2. 重组体

图 5 复合抗菌肽对金黄色葡萄球菌(*G*⁺ 菌)的抑菌活性

表 1 复合肽对临床分离的 55 株 *G*⁻ 菌的 MIC(μg/mL)

菌株名称	MIC	菌株名称	MIC
鲍曼不动杆菌 1	15.0	肺炎克雷伯菌 8	10.0
鲍曼不动杆菌 2	5.0	肺炎克雷伯菌 9	7.5
鲍曼不动杆菌 3	5.0	嗜水气单胞菌 1	7.5
鲍曼不动杆菌 4	7.5	铜绿假单胞菌 1	7.5
鲍曼不动杆菌 5	15.0	铜绿假单胞菌 2	7.5
产酸克雷伯菌 1	7.5	铜绿假单胞菌 3	15.0
产酸克雷伯菌 2	10.0	铜绿假单胞菌 4	15.0
产酸克雷伯菌 3	7.5	铜绿假单胞菌 5	15.0
产酸克雷伯菌 4	7.5	铜绿假单胞菌 6	5.0
产酸克雷伯菌 5	10.0	铜绿假单胞菌 7	15.0
大肠埃希菌 1	10.0	铜绿假单胞菌 8	15.0
大肠埃希菌 2	7.5	洋葱伯克霍德菌 1	10.0
大肠埃希菌 3	10.0	洋葱伯克霍德菌 2	7.5
大肠埃希菌 4	5.0	洋葱伯克霍德菌 3	10.0
大肠埃希菌 5	10.0	阴沟肠杆菌 1	7.5
大肠埃希菌 6	10.0	阴沟肠杆菌 2	7.5
大肠埃希菌 7	7.5	阴沟肠杆菌 3	7.5
大肠埃希菌 8	10.0	阴沟肠杆菌 4	15.0
大肠埃希菌 9	10.0	阴沟肠杆菌 5	7.5

续表1 复合肽对临床分离的55株G⁻菌的MIC(μg/mL)

菌株名称	MIC	菌株名称	MIC
大肠埃希菌10	7.5	阴沟肠杆菌6	7.5
大肠埃希菌11	10.0	阴沟肠杆菌7	7.5
肺炎克雷伯菌1	7.5	阴沟肠杆菌8	5.0
肺炎克雷伯菌2	7.5	阴沟肠杆菌9	7.5
肺炎克雷伯菌3	7.5	阴沟肠杆菌10	7.5
肺炎克雷伯菌4	7.5	阴沟肠杆菌11	15.0
肺炎克雷伯菌5	7.5	阴沟肠杆菌12	7.5
肺炎克雷伯菌6	7.5	黏质沙雷菌1	10.0
肺炎克雷伯菌7	7.5	黏质沙雷菌2	7.5

注:同种名称细菌不同编号代表来自不同标本的菌株

表2 复合肽对临床分离的21株G⁺菌的MIC(μg/mL)

菌株名称	MIC	菌株名称	MIC
表皮葡萄球菌1	7.5	金黄色葡萄球菌5	7.5
表皮葡萄球菌2	7.5	金黄色葡萄球菌6	7.5
表皮葡萄球菌3	7.5	人葡萄球菌1	3.7
表皮葡萄球菌4	5.0	人葡萄球菌2	10.0
表皮葡萄球菌5	7.5	人葡萄球菌3	5.0
鸡心肠球菌1	10.0	溶血葡萄球菌1	5.0
鸡心肠球菌2	7.5	溶血葡萄球菌2	7.5
金黄色葡萄球菌1	3.0	溶血葡萄球菌3	7.5
金黄色葡萄球菌2	7.5	溶血葡萄球菌4	7.5
金黄色葡萄球菌3	3.0	屎肠球菌1	10.0
金黄色葡萄球菌4	10.0		

注:同种名称细菌不同编号代表来自不同标本的菌株

3 讨 论

利用巴斯德毕赤酵母表达系统表达蛋白质是近年发展起来的一种新兴分子生物学技术。巴斯德毕赤酵母是一种能高效表达重组蛋白的表达受体,该系统在DNA重组技术中已被广泛地应用。另外,真菌表达系统中的酵母菌与其他菌不同,酵母菌分泌到细胞外培养基中蛋白几乎都是分泌表达的外源蛋白,其自身的内源蛋白很少分泌到胞外,从而可以从培养基中获得较高表达量的目的蛋白,且利于表达产物的后期分离纯化。

近年来,为了提高抗菌肽的表达量和抑菌能力,研究人员尝试对抗菌肽蛋白结构进行氨基酸的修饰,从而寻找决定抗菌肽活性的关键序列,并进一步进行分子设计,以获得抗菌肽的最佳活性。同时,将不同功能和结构的多肽杂合在一起进行研究,国内外也有相关报道^[14-16]。本研究截取了天蚕素A和死亡素的部分发挥作用的序列,串联重组后利用酵母表达系统进行甲醇诱导表达,结果复合肽CA(1-7)-T(4-19)以

分泌形式释放到培养基中,成功实现了复合抗菌肽在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达。

本研究中,从抗菌谱实验结果可以看出,所合成的复合肽对临床常见耐药致病菌株均有很好的抑制和杀灭作用,尤其是对一些临床分离的多种耐药鲍曼不动杆菌及泛耐药鲍曼不动杆菌均有明显的抑杀活性,MIC达到5 μg/mL,而且与细菌的耐药率无关,如鲍曼不动杆菌5与来自其他标本的4株鲍曼不动杆菌相比,其耐药率明显低于其他4株,但MIC却比其他4株要高。

MIC测定结果还显示,该复合肽对临床常见的鲍曼不动杆菌、产酸克雷伯菌、铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍德菌、阴沟肠杆菌、黏质沙雷菌等G⁻菌及表皮葡萄球菌、鸡心肠球菌、金黄色葡萄球菌、人葡萄球菌、溶血葡萄球菌、屎肠球菌等G⁺菌均有明显的抑菌活性。在实验阶段内,尚未发现对该复合肽不敏感的临床标本分离细菌菌株。

本研究成功构建了重组载体并顺利电转化到表达宿主毕赤酵母X-33中,获得了具有抑菌活性的复合基因工程抗菌肽。抑菌活性试验显示,复合抗菌肽对临床常见致病菌株均有较好的抑杀活性。它的出现为人们寻找理想的抗菌药物提供新的领域,虽然人们不断研制新型抗菌药物或改造原有抗菌药物来杀灭耐药致病菌,但是常规抗菌药物研制速度较慢,且容易使细菌产生耐药性,因此治疗耐药菌感染的局限性越来越明显。抗菌肽由于其独特的抗菌机制有望替代抗菌药物应用于耐药菌感染的治疗,从而为解决细菌耐药性这一棘手难题提供了新途径。因此,很有可能成为临幊上最有前景的抗菌药物。

参考文献

- [1] 单安山,马得莹,冯兴军,等. 抗菌肽的功能、研发与应用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2249-2259.
- [2] 卫旭彪,武如娟,郑召君,等. 抗菌肽的免疫调节功能及其作用机制[J]. 饲料工业, 2015, 36(22): 55-58.
- [3] LAKSHMAIAH NARAYANA J, CHEN J Y. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents[J]. Peptides, 2015, 72: 88-94.
- [4] HU ROTHAN H A, Bahrani H, SHANKAR E M, et al. Inhibitory effects of a peptide-fusion protein(Latarcin-PAP1-Thanatin) against chikungunya virus [J]. Antiviral Res, 2014, 108(4): 173-180.
- [5] LEE E, JEONG K W, LEE J, et al. Structure-activity relationships of cecropin-like peptides and their interactions with phospholipidmembrane[J]. BMB Reports, 2013, 46(5): 282-287.
- [6] CHEN Y, GUARNIERI M T, VASIL A I, et al. Role of peptide hydrophobicity in the mecha-(下转第1447页)

MALDI Biotyper 数据库与自建布鲁菌数据库分析临床分离株,可以准确、快速、灵敏地鉴别布鲁菌,对布鲁菌病的临床诊断具有较高的应用价值,可使患者及时获得有效的治疗,并采取适当的医院内感染控制措施防止疫情扩散,加强生物安全管理避免实验室获得性感染。

参考文献

- [1] DE FIGUEIREDO P, FICHT T A, RICE-FICHT A, et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions[J]. Am J Pathol, 2015, 185(6): 1505-1517.
- [2] 毛景东,王景龙,杨艳玲.布鲁氏菌病的研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(1):222-227.
- [3] 施旭光,凌峰.布鲁氏菌病研究进展[J].浙江预防医学,2014,26(6):576-580.
- [4] 王冰,任晓庆,褚美玲,等. MALDI-TOF 质谱仪在临床常见细菌鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(16):2228-2230.
- [5] 刘瑛,俞静,陈峰,等. MicroflexTM MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统对肠杆菌科细菌鉴定能力的比较[J]. 检验医学,2015,30(2):122-127.
- [6] 刘瑛,俞静,陈峰,等. 比较 Bruker Microflex MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动分析系统对酵母菌的鉴定能力[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(6):382-386.
- [7] 陈东科,陈丽,许宏涛.柯氏染色法快速鉴别布鲁菌的方法探讨[J].临床检验杂志,2015,33(11):805-807.
- [8] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, et al. The new global map of human brucellosis[J]. Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(2): 91-99.
- [9] DEAN A S, CRUMP L, GRETER H, et al. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(10): e1865.
- [10] 中华人民共和国卫生部.布鲁氏菌病诊断标准(WS269-2007) [M]. 北京:人民卫生出版社,2007:3.
- [11] 卫颖珏,陈峰,秦娟秀,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定布鲁菌 1 例[J].临床检验杂志,2016,34(1):76-77.
- [12] VILA A, PAGELLA H, VERA B G, et al. Brucella suis bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(4): 432-436.
- [13] 徐金莲,陈学兵,肖学会,等.马耳他布鲁菌错误鉴定 1 例[J].临床检验杂志,2015,33(1):77.
- [14] 王卫萍,奚海燕,黄梅,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在临床病原菌鉴定中的应用[J].临床检验杂志,2015,33(5):337-340.
- [15] SCHWARZ N G, LODERSTAEDT U, HAHN A A, et al. Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs)[J]. Acta Trop, 2017, 165: 40-65.

(收稿日期:2017-12-28 修回日期:2018-03-08)

(上接第 1442 页)

- nism of action of alpha-helical antimicrobial peptides[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4):1398-1406.
- [7] PARK Y, LEE D G, JANG S H, et al. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1645(2):172-182.
- [8] IBRAHIM H R, SUGIMOTO Y, AOKI T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1523(2/3):196-205.
- [9] BECHINGER B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin[J]. J Membr Biol, 1997, 156(3):197-211.
- [10] FEHLBAUM P, BULET P, CHERNYSH S, et al. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(3):1221-1225.
- [11] 蔡青松,张艳,翟朝阳.新型抗菌肽分子的计算机辅助设计[J].华西医科大学学报,2002,33(3):447-449.
- [12] HORTON R M, HUNT H D, HO S N, et al. Engineering

hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. Gene, 1989, 77(1): 61-68.

- [13] 剧海,梁东春,郭刚,等.用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较[J].天津医药,2003,31(5):270-272.
- [14] 黄音,刘飞鹏,周天鸿,等.蛙皮素-蜂毒素杂合肽基因在大肠杆菌中的克隆与诱导表达[J].生物工程学报,2001, 17(2):207-210.
- [15] SHIN S Y, KANG J H, JANG S Y, et al. Effects of the hinge region of cecropinA(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic anti-microbial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1463(2): 209-218.
- [16] SHIN S Y, LEE M K, KIM K L, et al. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin2 and cecropin A-melittin hybrid peptides[J]. J Protein Chem, 1999, 50(4):279-285.

(收稿日期:2017-12-27 修回日期:2018-03-07)