

抗菌肽 magainin II 的密码子优化及在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达

陈玉海¹, 陈庆煌², 陈科¹, 章亭洲³, 陈吉龙^{1,2}

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 福建农林大学动物科学学院 动物医学系, 福建 福州 350002

3 浙江工商大学环境科学与工程学院, 浙江 杭州 310035

陈玉海, 陈庆煌, 陈科, 等. 抗菌肽 magainin II 的密码子优化及在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达. 生物工程学报, 2014, 30(4): 615-624.

Chen YH, Chen QH, Chen K, et al. Optimization of coding sequences and expression of antimicrobial peptide magainin II in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 615-624.

摘要: Magainin II 是非洲爪蟾皮肤分泌的一种抗菌肽, 在低浓度下即能够对细菌、真菌、原虫、肿瘤等都具有杀伤作用, 并且与同是来源于非洲爪蟾皮肤的另一种抗菌肽 PGLa 在杀菌、抗肿瘤等方面具有很好的协同效应。文中分别按照大肠杆菌和毕赤酵母的密码子利用频率, 对抗菌肽 magainin II 以及杂合抗菌肽 magainin II-PGLa, 进行了密码子优化。构建了高效表达抗菌肽 magainin II 的原核表达载体, 经过蛋白酶切割获得纯化的抗菌肽 magainin II。同时进一步构建了杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 的分泌型毕赤酵母表达载体, 实现了杂合抗菌肽在毕赤酵母中的分泌表达。本研究为 magainin II 和 magainin II-PGLa 的生产与应用奠定了基础。

关键词: 抗菌肽, magainin II, 大肠杆菌, 毕赤酵母, 密码子利用频率

Received: August 29, 2013; **Accepted:** October 29, 2013

Supported by: National Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2013ZX10004-611).

Corresponding author: Tingzhou Zhang. Tel: +86-573-87969088; Fax: +86-573-87968631; E-mail: zhangtingzhou987@163.com

国家科技重大专项“传染病重大专项”(No. 2013ZX10004-611)资助。

网络出版时间: 2013-11-28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131128.1646.003.html>

Optimization of coding sequences and expression of antimicrobial peptide magainin II in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*

Yuhai Chen¹, Qinghuang Chen², Ke Chen¹, Tingzhou Zhang³, and Jilong Chen^{1,2}

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Department of Veterinary Medicine, College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 School of Environmental Science and Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, Zhejiang, China

Abstract: The antimicrobial peptide magainin II is expressed in the skin of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, and exhibits a broad spectrum of antimicrobial activity as well as tumoricidal properties at low concentrations. In addition, magainin II plays a synergistic role during antimicrobial and tumoricidal processes with another antimicrobial peptide PGLa that is also expressed in *Xenopus laevis*. The optimized cDNA sequence of magainin II and magainin II-PGLa hybrid peptide according to *E. coli* or *Pichia pastoris* codon usage frequency were synthesized and sub-cloned into prokaryotic expression vector pGEX and *Pichia pastoris* secreted expression vector pPIC9k. The resulting recombinant plasmids were named as pGEX-magainin II and pPIC9k-magainin II-PGLa. The GST-magainin II fusion protein was highly expressed in *E. coli*. Furthermore, magainin II was successfully purified by digestion with PreScission Protease to cleave the GST tag. Additionally, our data obtained from the ELISA revealed that magainin II-PGLa hybrid peptide was successfully expressed in *Pichia pastoris*. These experiments establish a useful system for further studies of these antimicrobial peptides.

Keywords: antimicrobial peptide, magainin II, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, codon usage frequency

抗菌肽是生命体抵御外界病原微生物入侵的过程中产生的一种小分子多肽，对细菌、真菌、原虫、病毒甚至癌细胞等都具有杀伤作用^[1-11]。抗菌肽种类繁多，广泛存在于动物、植物以及细菌体内，是机体抵抗外界病原微生物入侵的天然防御系统的重要组成部分，是机体天然免疫系统的重要效应分子^[12-17]。抗菌肽不同于传统抗生素，它具有独特的杀菌机制，不易使病原菌产生耐药性，且不会对机体正常细胞造成损害^[18]。因此，抗菌肽是一种具有广阔开发前景的抗菌制剂，在医药卫生、食品工业、畜牧业等行业中有广泛的应用和前景。目前，

从各种生物中筛选、鉴定以及人工改造与合成抗菌肽已成为抗菌物质发展的热点领域之一^[19-24]。然而，抗菌肽的表达与纯化困难制约了它们的应用。

1987年Zasloff从非洲爪蟾皮肤中分离出了两种具有广谱抗菌活性的抗菌肽，即magainin I和magainin II^[25]；随后Giovannini等证实抗菌肽magainin大量储存于非洲爪蟾皮肤的颗粒腺中^[26]。其中抗菌肽magainin II有23个氨基酸组成，分子量为2.47 kDa，具有两性性和螺旋结构，在低浓度下即能够对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、原虫、肿瘤等都具有杀伤作

用^[4,8,25,27]。有趣的是,同是来源于非洲爪蟾的另一种抗菌肽 PGLa 与 magainin II 在杀菌、抗肿瘤方面具有很好的协同效应^[28-33]。基于抗菌肽 magainin II、PGLa 的上述功能,本文主要探讨抗菌肽 magainin II 和杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 在细菌和毕赤酵母中的表达以及纯化策略,为后续生产应用提供一定前期指导。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌种

毕赤酵母表达载体 pPIC9k 表达菌株 KM71 为中国科学院微生物研究所邱并生研究员惠赠;原核表达载体 pGEX-5x-3,表达菌株大肠杆菌 Rostta(DE3)为本室保存。

1.1.2 试剂

限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB (北京)有限公司;质粒提取试剂盒,凝胶纯化回收试剂盒,酵母基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Flag、his 等抗体购自 Sigma-Aldrich 等公司;Glutathione Sepharose 4B 购自 GE Healthcare 公司。

1.1.3 密码子优化前后的基因与对应氨基酸序列

抗菌肽 magainin II 以及杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 分别按照大肠杆菌和毕赤酵母偏好性密码子进行优化。

magainin II 按照大肠杆菌偏好性密码子进行优化,优化前后序列如下:

```
Before optimization GGA ATT GGT AAA TTT TTG CAC TCA GCA AAA AAA TTT
After optimization GGT ATC GGT AAA TTC CTG CAC TCT GCT AAA AAA TTC
G I G K F L H S A K K F
GGA AAA GCT TTT GTG GGA GAG ATA ATG AAT TCA
GGT AAG GCT TTC GTT GGT GAA ATC ATG AAC TCT
G K A F V G E I M N S
```

magainin II-PGLa 按照毕赤酵母偏好性密码子进行优化,优化前后序列如下:

```
Before optimization GGA ATT GGT AAA TTT TTG CAC TCA GCA AAA AAA TTT GGA
After optimization GGT ATC GGT AAG TTT TTG CAT TCT GCT AAG AAG TTT GGT
G I G K F L H S A K K F G
AAA GCT TTT GTG GGA GAG ATA ATG AAT TCA GGT GGA TGT
AAG GCT TTT GTT GGT GAA ATT ATG AAC TCT GGT GGA TGT
K A F V G E I M N S G G C
TGT GGT GGA CTT GCT AAA CTA GCT GTT AAA GCT ATT AAA
TGT GGT GGA TTG GCT AAG TTG GCC GTT AAA GCC ATC AAA
C G G L A K L A V K A I R
GGA GCA ATT GCA GGA GCT AAA TCT GCA ATG GGA
GGA GCC ATC GCC GGT GCC AAG TCT GCT ATG GGA
G A I A G A K S A M G
```

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽 magainin II 以及杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 的基因序列优化与合成

利用 Jcat (<http://www.jcat.de/>) 等软件,按照大肠杆菌 *E. coli* 密码子偏好性优化 magainin II 的基因序列,同时,按照毕赤酵母密码子偏好性优化 magainin II-PGLa 杂合抗菌肽的基因序列,并在北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成优化后的序列。

合成的 magainin II 序列氨基端含有 his/flag 标签,表达后可以用肠激酶切割得到天然的不带任何其他氨基酸残基的 magainin II 抗菌肽,为进一步研究表达的抗菌肽 magainin II 的活性提供保证。为便于后续检测,合成的杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 氨基端也含有 his/flag 标签。

1.2.2 抗菌肽 magainin II 的原核表达及纯化

利用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 将合成的抗菌肽 magainin II 基因构建到原核表达载体 pGEX-5x-3 中。测序无误后,利用大肠杆菌 Rostta(DE3)菌株在 22 °C、IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 的条件下诱导抗菌肽 magainin II 表达,超声裂解后的上清部分含有融合蛋白 GST-magainin II,上清利用 Glutathione Sepharose 4B 进行亲和层析,并用前切割蛋白酶 (PreScission Protease) 进行柱上切割 (On-column cleavage),之后用 PBS (Phosphate buffered solution) 缓冲液洗脱,得到纯化的抗菌肽,即不含 GST 标签的可溶性抗菌肽 magainin II。

1.2.3 含天门冬氨酸-脯氨酸二联氨基酸抗菌肽(DP-magainin II)的原核表达与纯化

据文献报道,稀酸可以切割天门冬氨酸和脯氨酸之间的肽键,可以用于重组蛋白特别是包涵体蛋白的纯化^[10,34-35]。以合成的密码子优化过的抗菌肽基因为模板,构建氨基端含有天门冬氨酸-脯氨酸的magainin II抗菌肽DP-magainin II,采用大肠杆菌 Rostta (DE3)菌株在 37 °C、IPTG 浓度为 0.6–1.0 mmol/L 的条件下诱导抗菌肽 DP-magainin II 的表达,并利用不同浓度的盐酸对表达的 GST 融合抗菌肽进行切割。

1.2.4 杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 毕赤酵母表达载体的构建

将合成的 magainin II -PGLa 杂合抗菌肽,克隆到毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9k 中,获得 pPIC9k-magainin II -PGLa 以及 pPIC9k-his/flag-magainin II -PGLa。

1.2.5 毕赤酵母 KM71 的电转化与杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 在毕赤酵母 KM71 中的整合情况检测

利用限制性内切酶 *Sal* I 将毕赤酵母表达载体 pPIC9k、pPIC9k-magainin II -PGLa、pPIC9k-his/flag-magainin II -PGLa (各 5 μg) 分别线性化,利用电转仪转化毕赤酵母 KM71 感受态细胞(参数:1.5 kV, 200 Ω, 25 μF),涂布 MD (Minimal Dextrose) 平板,待菌落长出,挑单克隆传 3 代后用含 0–4.0 g/L G418 的 YPD (Yeast extract peptone dextrose) 平板进行筛选。同时提取所筛选酵母的基因组 DNA,并利用 Invitrogen 公司说明书中提供的 5'*AOX1* 和 3'*AOX1* 引物序列,合成引物,检测杂合抗菌肽在毕赤酵母基因组中的整合情况。

1.2.6 杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 在毕赤酵母中的表达及检测

挑纯化后的稳定整合杂合抗菌肽基因的酵母菌单克隆于 BMGY (Buffered glycerol-complex medium) 培养基中,28 °C、200 r/min 培养至对数期,然后转接至 BMMY (Buffered methanol-complex medium) 培养基,每 24 h 加入 0.5% 的甲醇诱导表达。在不同时间点取上清,采用双抗夹心 ELISA 方法检测杂合抗菌肽的表达情况,具体方法如下:1) 用碳酸盐缓冲液在 ELISA 板中包被一抗(flag 抗体),4 °C 过夜;2) 第 2 天,用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗液充分冲洗后加入 200 μL 封闭液(PBS+1% BSA) 37 °C 封闭 1 h;3) 用洗液充分冲洗后加入毕赤酵母表达的抗菌肽 100 μL (含有 his 和 flag 标签) 37 °C 孵育 1 h;4) 用洗液充分冲洗后加入酶标二抗(His-HRP 抗体),37 °C 孵育 1 h;5) 用洗液充分洗脱后加入 TMB 底物溶液 100 μL,37 °C 避光反应 15 min;6) 加入 2 mol/L 硫酸溶液 50 μL 终止反应,3–5 min 后用酶标仪检测,波长和参考波长分别是 450 nm 和 630 nm。

1.2.7 抗菌肽活性检测方法

抗菌肽活性检测方法如下:将过夜培养的大肠杆菌 DH5α 接种于 LB 培养基中,加入抗菌肽浓缩液(10 倍浓缩,以空载体表达产物作对照),37 °C 振荡培养,在不同时间点取菌液测定菌体浓度,比较实验组和对照组的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽 magainin II 的原核表达

将构建好的原核表达载体 pGEX-magainin II 转化 Rosetta(DE3)菌株,在 22 °C、IPTG 浓度为

0.1 mmol/L 的条件下, 诱导抗菌肽 magainin II 表达。分别在 0、2、4、6、8、10 h 取样检测融合蛋白表达情况, 如图 1 所示, 结果显示 GST 融合抗菌肽得到了高效表达, 约在 8 h 表达量达到最高, 经超声后 SDS-PAGE 检测分析, 蛋白主要以可溶性形式存在, 利用前切割蛋白酶切割后获得特异的目标条带 (含有 his 和 flag 标签, 其中 flag 标签内部含有肠激酶的切割位点)。

如图 1 所示, 图 1A 是在不同的诱导时间下表达的 GST-magainin II 融合蛋白的 SDS-PAGE 结果, 图 1B 是利用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析后的融合蛋白 SDS-PAGE 结果, 图 1C 是利用前切割蛋白酶切割后的 Tricine-SDS-PAGE

结果, 图 1D 是 GST 融合蛋白的结构示意图。

2.2 抗菌肽 DP-magainin II 的原核表达与酸切割

在 37 °C 用 IPTG 诱导抗菌肽 DP-magainin II 在大肠杆菌中的表达, 初步纯化后用不同浓度的盐酸切割, 纯化和切割结果如图 2 所示。

结果表明, 抗菌肽 DP-magainin II 在大肠杆菌中没有形成包涵体, 重组蛋白以可溶形式存在, 超声后上清利用 0.000 1–1.0 mmol/L HCl 在 85 °C 条件下切割 8 h, 发现在 1.0 mmol/L (pH 约为 2.5) 盐酸进行切割时出现弥散条带 (Smear bands), 这与文献报道的最佳 pH 相符^[10], 表明这一技术可以获得 magainin II 多肽。

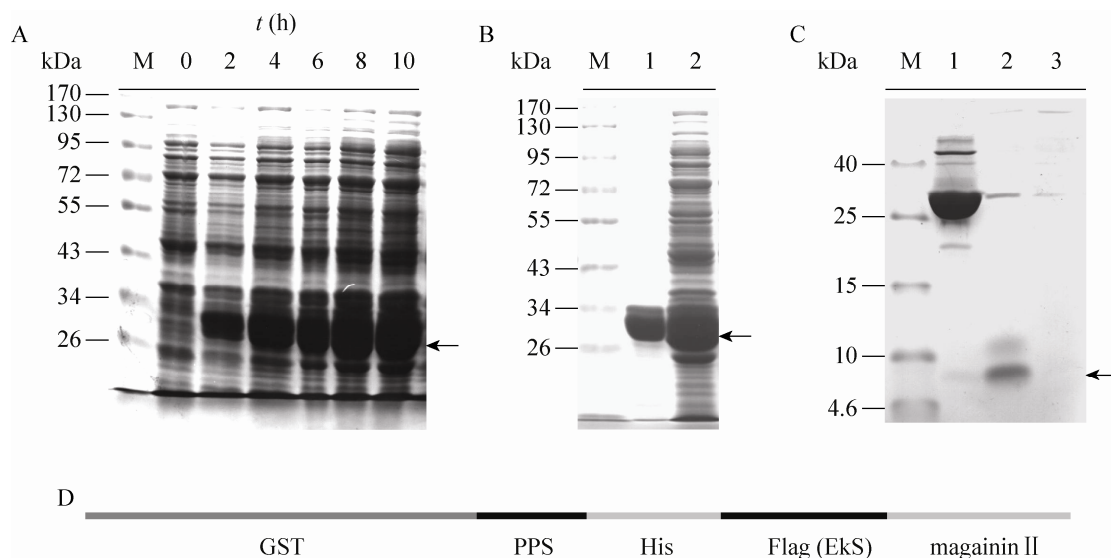


图 1 抗菌肽 magainin II 的原核表达与纯化

Fig. 1 Expression and purification of recombinant magainin II fusion protein. (A) The expression of recombinant magainin II fusion protein under different time gradient. M: prestained protein ladder (Fermentas, SM0671). (B) Purified recombinant magainin II fusion protein. M: prestained protein ladder (Fermentas, SM0671); 1: recombinant magainin II fusion protein after purification; 2: recombinant magainin II fusion protein before purification. (C) Digestion of recombinant magainin II fusion protein with PreScission Protease. M: prestained protein ladder (Fermentas, SM1861); 1: recombinant magainin II fusion protein after purification; 2: recombinant magainin II protein after digestion; 3: control. (D) The structure of the GST-magainin fusion protein. GST: glutathione S-transferase; PPS: preScission protease cleavage site; His: his tag; Flag: flag tag; EkS: enterokinase cleavage site.

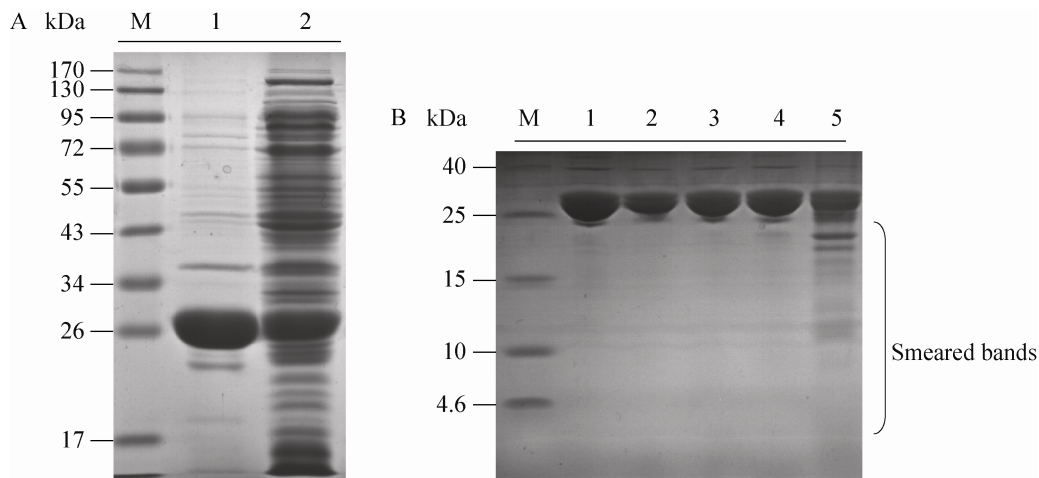


图 2 抗菌肽 DP-magainin II 的原核表达与纯化

Fig. 2 Expression and acid digestion of DP-magainin II fusion protein. (A) The purification of recombinant DP-magainin II fusion protein. M: prestained protein ladder (Fermentas, SM0671); 1: recombinant DP-magainin II fusion protein after purification; 2: recombinant DP-magainin II fusion protein before purification. (B) Digestion of recombinant DP-magainin II fusion protein with hydrochloric acid. M: prestained protein ladder (Fermentas, SM1861); 1-5: different concentrations of hydrochloric acid; 1: 0.000 1 mmol/L; 2: 0.001 mmol/L; 3: 0.01 mmol/L; 4: 0.1 mmol/L; 5: 1 mmol/L.

2.3 杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 在毕赤酵母中的表达及检测

2.3.1 杂合抗菌肽的一级结构

杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 一级结构见图 3, 其中 5'端为抗菌肽 magainin II, 3'端为抗菌肽 PGLa, 中间用氨基酸序列为 Gly-Gly-Cys-Cys-Gly-Gly 含有二硫键的 linker 将两种抗菌肽连接起来。

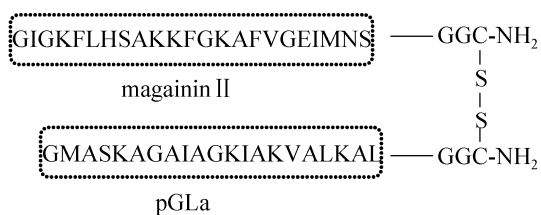


图 3 杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 的一级结构

Fig. 3 Primary structure of the magainin II -PGLa hybrid antibacterial peptide.

2.3.2 稳定表达杂合抗菌肽的毕赤酵母高产菌株的筛选

利用 *Sal* I 线性化 pPIC9k-magainin II -PGLa, pPIC9k-his/flag-magainin II -PGLa 以及空载体对照 pPIC9k, 电转化毕赤酵母 KM71 并传代, 利用 0-4.0 g/L 的 G418 进行筛选, 得到稳定整合杂合抗菌肽的酵母菌单克隆。由于转化 KM71 得到的毕赤酵母表型都是甲醇利用缓慢型 (Muts), 所以无需进行表型筛选, 转化后毕赤酵母高产菌株的筛选流程见图 4。

2.3.3 杂合抗菌肽在毕赤酵母中的整合情况检测

提取毕赤酵母基因组 DNA, 利用 5'*AOX1* 和 3'*AOX1* 引物扩增, 电泳结果如图 5 所示, 其中整合 pPIC9K-magainin II -PGLa 的扩增片段为 642 bp, 整合 pPIC9K-his/flag-magainin II -PGLa 的扩增片段为 684 bp, 对照扩增片段为 492 bp。

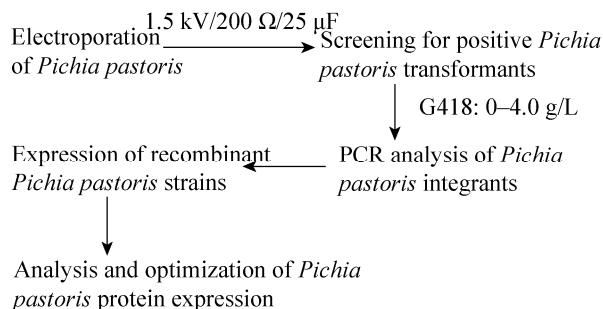


图 4 表达杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 的毕赤酵母高产菌株的筛选

Fig. 4 Screening of high-yielding strains of hybrid antibacterial peptide.

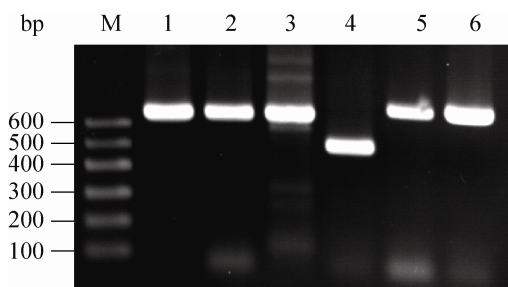


图 5 杂合抗菌肽在毕赤酵母中的整合情况检测

Fig. 5 PCR analysis of *Pichia pastoris* integrants. M: DNA marker; lane 1-3 show the 642 bp products from KM71/pPIC9K-magainin II-PGLa; lane 4 shows the 492 bp product from KM71/pPIC9K; lane 5-6 show the 684 bp products from KM71/pPIC9K-magainin II-PGLa-his/flag.

结果显示杂合抗菌肽已经稳定整合入了毕赤酵母基因组中。

2.3.4 杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 在毕赤酵母中的表达

分别在 0.5% 甲醇诱导 0、48、72、96 h 时取样，采用 ELISA 检测 3 株稳定整合杂合抗菌肽 his/flag-magainin II-PGLa 的酵母菌表达情况，结果如图 6A，结果显示，菌株 1 的表达水平明显高于其他菌株，且在 72 h 左右表达量达

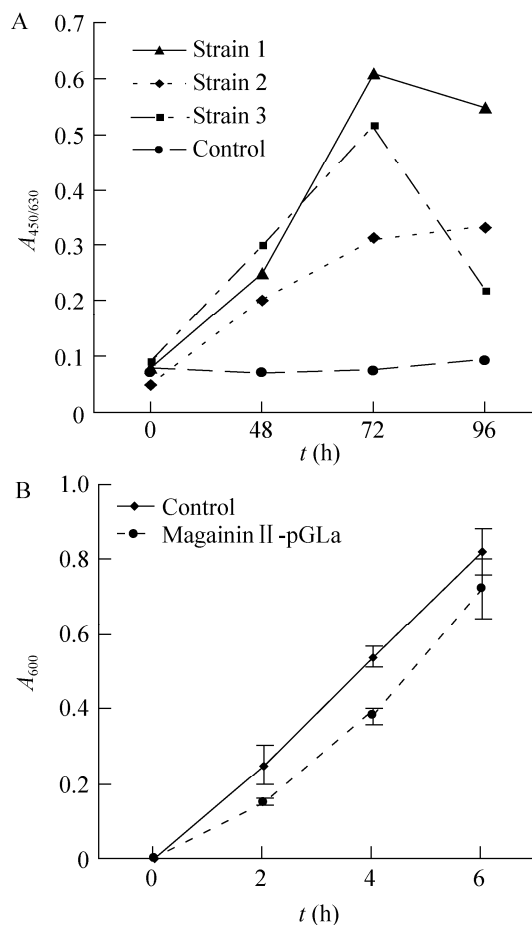


图 6 杂合抗菌肽在毕赤酵母中的表达水平及活性检测

Fig. 6 Expression level and antibacterial activity of hybrid antibacterial peptide magainin II-PGLa. (A) Expression level of hybrid antibacterial peptide in *Pichia pastoris*. (B) Antibacterial activity of hybrid antibacterial peptide to *E. coli*.

到最高。活性分析表明杂合抗菌肽 magainin II-PGLa 对大肠杆菌 DH5 α 生长有一定抑制作用 (图 6B)。

3 讨论

抗菌肽 magainin II 是非洲爪蟾皮肤颗粒腺

分泌的一种抗菌肽,对细菌、真菌、原虫、肿瘤等都具有一定杀伤作用^[4-5,8,19,28]。在临床上,抗菌肽 magainin II 的衍生物 Pexiganan (MSI-78) 用于治疗糖尿病足溃疡 (Diabetic foot ulcers), 已完成了 3 期临床^[36]。

据文献报道同是来源于非洲爪蟾皮肤的抗菌肽 magainin II 和 PGLa 抗菌活性具有一定协同作用^[28-33], Katsumi Matsuzaki 等预测 Magainin 和 PGLa 形成一种对膜有很强通透能力的,由平行的螺旋线组成的异源二聚体,其进一步研究显示杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 抑菌活性明显高于单独或者等摩尔混合的两种抗菌肽,且在膜表面形成螺线管虫洞的速率顺序是 magainin II /PGLa 等摩尔混合 \geq PGLa $>$ magainin II, 而螺线管虫洞的持续时间则是 magainin II $>$ magainin II /PGLa 等摩尔混合 $>$ PGLa^[29-30]。固相核磁共振研究表明,在低浓度下抗菌肽 PGLa 以单体形式存在,在膜表面处于表面态 (Surface-state), 当 PGLa 浓度升高时,在膜表面处于倾斜态 (Tilted-state), 在抗菌肽 magainin II 存在时两者形成异源二聚体,处于插入状态 (Inserted-state), 进而在膜表面形成稳定的螺线管虫洞结构,使细菌内外的渗透压发生改变,从而起到协同杀菌的作用^[33]。

直接从生物体内分离和纯化天然抗菌肽的过程非常复杂,而且生产成本高。利用细菌或毕赤酵母生产抗菌肽有可能实现抗菌肽的工业化生产,而且可以利用基因工程技术对抗菌肽进行有目的的改造,使抗菌肽的活性升高,溶血性降低,从而在一定程度上克服抗菌肽分子量小、易降解等困难。

本文主要探讨了抗菌肽 magainin II 的表达

策略,首先采取原核 GST 融合表达抗菌肽 magainin II 以及 DP-magainin II,并分别用蛋白酶和稀酸进行切割纯化。进而采取毕赤酵母分泌表达杂合抗菌肽 magainin II -PGLa。我们成功在细菌中对抗菌肽 magainin II 实现了高效表达,原核融合表达虽然表达量比较高,但是一般处于天然状态的抗菌肽才具有最佳抗菌活性,而在此过程中用于切割的蛋白酶成本太高。为克服这一问题,我们尝试利用天门冬氨酸-脯氨酸二联氨基酸中肽键对酸的敏感性,设计了含有这两个氨基酸的抗菌肽 DP-magainin II,在初步纯化后进行了切割检测,结果显示利用酸切有切割效果,但尚需进一步优化条件,同时构建抗菌肽 magainin II 的串联体,以获得大量抗菌肽。

本研究还设计和构建了杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 载体,并在毕赤酵母中进行了表达实验,获得了预期的结果,通过 ELISA 分析抗菌肽 his/flag-magainin II -PGLa 成功获得了分泌表达。magainin II -PGLa 在酵母菌株 1 中比其他两个菌株分泌表达量高,原因可能是整合到酵母染色体上的目的基因拷贝数不同,从而使同一基因在不同菌株中的表达不尽相同。活性分析显示杂合抗菌肽 magainin II -PGLa 有一定抗菌活性。下一步需要进一步优化发酵条件,大量表达 magainin II -PGLa 杂合抗菌肽并优化纯化方式,进一步提高抗菌活性,为后续大规模发酵生产奠定基础。

REFERENCES

- [1] Mai JC, Mi Z, Kim SH, et al. A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7709-7712.
- [2] Dupuy JW, Bonami JR, Roch P. A synthetic

- antibacterial peptide from *mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp. *J Fish Dis*, 2004, 27(1): 57–64.
- [3] Zhang J, Wu X, Zhang SQ. Antifungal mechanism of antibacterial peptide, abp-cm4, from *bombyx mori* against *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(12): 2157–2163.
- [4] Zasloff M, Martin B, Chen HC. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(3): 910–913.
- [5] Ohsaki Y, Gazdar AF, Chen HC, et al. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 1992, 52(13): 3534–3538.
- [6] Chernysh S, Kim SI, Bekker G, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12628–12632.
- [7] Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, et al. Human cathelicidin (ll-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res*, 2005, 30(5): 385–394.
- [8] Huang CM, Chen HC, Zierdt CH. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34(9): 1824–1826.
- [9] Oyston PC, Fox MA, Richards SJ, et al. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 8): 977–987.
- [10] Gavit P, Better M. Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2000, 79(2): 127–136.
- [11] Alan AR, Earle ED. Sensitivity of bacterial and fungal plant pathogens to the lytic peptides, msi-99, magainin II, and cecropin b. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15(7): 701–708.
- [12] Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 2003, 254(3): 197–215.
- [13] Zasloff M. Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(11): 2810–2816.
- [14] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 2004, 198: 169–184.
- [15] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(3): 238–250.
- [16] Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24(6): 536–547.
- [17] Wang Z, Wang G. Apd: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D590–D592.
- [18] Yount NY, Yeaman MR. Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein Pept Lett*, 2005, 12(1): 49–67.
- [19] Sarig H, Livne L, Held-Kuznetsov V, et al. A miniature mimic of host defense peptides with systemic antibacterial efficacy. *Faseb J*, 2010, 24(6): 1904–1913.
- [20] Chen C, Pan F, Zhang S, et al. Antibacterial activities of short designer peptides: a link between propensity for nanostructuring and capacity for membrane destabilization. *Biomacromolecules*, 2010, 11(2): 402–411.
- [21] Cao Y, Yu RQ, Liu Y, et al. Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides. *Curr Microbiol*, 2010, 61(3): 169–175.
- [22] Fjell CD, Jenssen H, Cheung WA, et al. Optimization of antibacterial peptides by genetic algorithms and cheminformatics. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 77(1): 48–56.
- [23] Vila-Farres X, Giralt E, Vila J. Update of peptides with anti-bacterial activity. *Curr Med Chem*, 2012, 19(36): 6188–6198.
- [24] Chen HX, Zou GY, Qu XM, et al. Cloning and expression of antibacterial peptide magainin in *Pichia pastoris*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2002, 18(4): 461–464 (in Chinese).
- 陈海旭, 邹冠玉, 屈贤铭, 等. 抗菌肽 Magainin 基

- 因的克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(4): 461–464.
- [25] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(15): 5449–5453.
- [26] Giovannini MG, Poulter L, Gibson BW, et al. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *xenopus laevis* prohormones. Biochem J, 1987, 243(1): 113–120.
- [27] Ge Y, MacDonald DL, Holroyd KJ, et al. *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(4): 782–788.
- [28] Westerhoff HV, Zasloff M, Rosner JL, et al. Functional synergism of the magainins pglA and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. Eur J Biochem, 1995, 228(2): 257–264.
- [29] Hara T, Mitani Y, Tanaka K, et al. Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study. Biochemistry, 2001, 40(41): 12395–12399.
- [30] Nishida M, Imura Y, Yamamoto M, et al. Interaction of a magainin-PGLa hybrid peptide with membranes: insight into the mechanism of synergism. Biochemistry, 2007, 46(49): 14284–14290.
- [31] Matsuzaki K, Mitani Y, Akada KY, et al. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. Biochemistry, 1998, 37(43): 15144–15153.
- [32] Tremouilhac P, Strandberg E, Wadhvani P, et al. Synergistic transmembrane alignment of the antimicrobial heterodimer PGLa/magainin. J Biol Chem, 2006, 281(43): 32089–32094.
- [33] Strandberg E, Tremouilhac P, Wadhvani P, et al. Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(8): 1667–1679.
- [34] Landon. Cleavage at aspartyl-prolyl bonds. Methods Enzymol, 1977, 47: 145–149.
- [35] Marcus F. Preferential cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in dilute acid. Int J Pept Protein Res, 1985, 25(5): 542–546.
- [36] Islam K, Hawser SP. MSI-78 magainin pharmaceuticals. IDrugs, 1998, 1(5): 605–609.

(本文责编 郝丽芳)