

一种新型改良硫氧还蛋白融合表达体系的建立及 cathelicidin 家族 Lf-CATH2 的表达

鲁一灵¹, 高久香¹, 乔雪¹, 王义鹏², 于海宁¹

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

2 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

鲁一灵, 高久香, 乔雪, 等. 一种新型改良硫氧还蛋白融合表达体系的建立及 cathelicidin 家族 Lf-CATH2 的表达. 生物工程学报, 2015, 31(3): 403–410.

Lu YL, Gao JX, Qiao X, et al. Construction of novel thioredoxin fusion protein expression system and the production of recombinant Lf-CATH2. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 403–410.

摘 要: 通过改良硫氧还蛋白融合表达体系, 原核表达 cathelicidin 家族抗菌肽 Lf-CATH2。首先在 Lf-CATH2 基因上游加入凝血酶位点, 并去除 pET32 α 载体的凝血酶序列和 S 标签序列, 构建优化的 Lf-CATH2-pET32 α ^{TS} 载体, 于大肠杆菌中表达。产物融合蛋白经凝血酶切割释放 Lf-CATH2, 纯化后进行抗菌活性检测。结果表明改良的硫氧还蛋白融合表达体系显著提高酶切效率达 37%, Lf-CATH2 在新体系中获得可溶性高表达, 且保留了抗菌活性。因此该新型硫氧还蛋白融合表达体系, 有望为 cathelicidin 家族及其他阳离子活性肽提供更好的原核表达载体工具。

关键词: cathelicidin, Lf-CATH2, 硫氧还蛋白融合表达, 凝血酶切割

Received: April 17, 2014; **Accepted:** October 27, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 41206153), Growth Project for Liaoning Distinguished Young Scientists of Colleges and Universities (No. LJQ2013010), Dalian Distinguished Young Scientists Foundation (No. 2013J21DW013).

Corresponding author: Haining Yu. Tel/Fax: +86-411-84708850; E-mail: joannyyu@live.cn

国家自然科学基金 (No. 41206153), 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划 (No. LJQ2013010), 大连市优秀青年科技人才基金 (No. 2013J21DW013) 资助。

Construction of novel thioredoxin fusion protein expression system and the production of recombinant Lf-CATH2

Yiling Lu¹, Jiuxiang Gao¹, Xue Qiao¹, Yipeng Wang², and Haining Yu¹

¹ School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

² College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China

Abstract: The objective of this study was to construct an improved thioredoxin fusion protein expression system, and express the cathelicidin-derived peptide, Lf-CATH2. The improved fusion vector Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} was successfully constructed by firstly deleting the thrombin site and S tag from the pET-32 α vector, then inserting the Lf-CATH2 plus a thrombin site instead. Afterwards, Lf-CATH2 was expressed in *Escherichia coli* as fusion protein. After the cleavage by thrombin, Lf-CATH2 was released and subsequently separated using affinity chromatography. The antimicrobial activity of purified Lf-CATH2 was also examined. The improved expression vector significantly increased enzyme cleavage efficiency by 37%, and Lf-CATH2 could be expressed in high yield and maintain the biological activity. This novel thioredoxin fusion protein expression system enables a quick production of high-yield bioactive cationic peptides like cathelicidins.

Keywords: cathelicidin, Lf-CATH2, thioredoxin fusion protein, thrombin cleavage

Cathelicidins 是一类由生物体基因组编码的, 包括人类在内的大多数脊椎动物所特有的宿主防御肽, 由 N 端信号肽区域、中间保守 cathelin 结构域和 C 端高度特异的成熟肽区域构成, 在动物先天免疫系统中发挥极其重要作用^[1-3]。除了广谱抗菌活性, cathelicidins 还具有其他重要生物学功能, 如趋化多种免疫细胞、诱导肥大细胞脱颗粒和组胺释放、调节巨噬细胞转录、促进伤口愈合、诱导变异细胞系细胞凋亡和淋巴细胞活化等^[4-7]。Cathelicidins 不仅对普通革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌以及病毒具有非常强的抗性, 而且对许多临床耐药菌株同样具有作用^[8-9]。Cathelicidins 由于其特殊的杀菌机理, 不易产生耐药性, 且结构简单, 没有二硫键, 相比其他家族抗菌肽溶血性和细胞毒性小, 因此极具开发潜力^[10-13]。

在前期工作中, 从两栖类的脆皮大头蛙 *Limnonectes fragilis* 体内克隆到两条新型

cathelicidin 序列, 成熟肽分别是 Lf-CATH1 和 Lf-CATH2。化学合成的 Lf-CATH2 对 G⁺菌、G⁻菌以及真菌具有很好的广谱抗菌活性, 尤其对金黄色葡萄球菌, 其 MIC 仅为 8.3 $\mu\text{g/mL}$ ^[14]。为进一步探讨 Lf-CATH2 用于抗感染治疗的可行性, 构建了新型改良的硫氧还蛋白融合表达系统, 提高了酶切效率, 实现了在大肠杆菌细胞裂解上清液中高效表达 Lf-CATH2。通过镍柱亲和层析纯化融合蛋白; 使用凝血酶切割释放 Lf-CATH2, 对纯化后的可溶性 Lf-CATH2 进行生物学活性鉴定, 为以后大量生产及临床应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞与质粒

表达质粒 pET-32 α 、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株为本实验室保存。

1.1.2 引物

引物 (表 1) 合成和测序均由生工生物工程 (上海) 有限公司完成。

1.1.3 试剂

DNA 限制性内切酶 (*Kpn* I、*Eco*R I、*Xba* I、*Bgl* II)、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶和 DNA marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Protein marker 购自全式金生物技术有限公司; 胶回收试剂盒、质粒回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 购自 Merck Serono China 公司; 小牛凝血酶购自美国 Sigma 公司; Tris、甘氨酸和聚丙烯酰胺购自 Amresco 公司; HisTrapTM FF 镍柱购自 GE Healthcare 公司; 其他常用生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 克隆含有凝血酶序列的 *Lf-CATH2* 基因

以 *Lf-CATH2* 基因为模板, 使用引物 1 和 2, 对 *Lf-CATH2* 编码基因进行 PCR 扩增。引物 1、2 分别包含 *Kpn* I 酶切位点和凝血酶位点序列,

表 1 用于 *Lf-CATH2* 基因扩增和载体修饰的引物序列
Table 1 Primers used for *Lf-CATH2* gene amplification and vector modification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	CGGGGTACCCTGGTGCCACGCGGTC <i>Tagtctgactgagaattca</i> <i>Kpn</i> I thrombin
P2	CGCGAATTCCTAtccccgcggaagtacaac <i>Eco</i> R I
P3	CTAGTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT TTAAGAAGGA <i>Xba</i> I
P4	GGAAGATCTGGACCAGAAGAATGAT GATG <i>Bgl</i> II

The italic and bold sequence is thrombin site; the underlined sequences are restriction sites, with the name under the sequence; the lowercase sequences are part of *Lf-CATH2*.

以及 *Eco*R I 酶切位点。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 (Mg^{2+} Plus) 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 引物 1 和 2 (20 μmol/L) 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 加灭菌蒸馏水至 50 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s, 共 28 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 回收目的基因, 连接 T 载体转化测序验证。

1.2.2 *Lf-CATH2*-pET32α^{-TS} 融合表达载体的构建

如图 1 所示, 使用引物 3、4 以载体 pET32α 为模板进行 PCR 扩增, 得到从 *Xba* I 到 *Bgl* II, 去除了凝血酶和 S 标签的 pET32α 载体小片段, 再以 *Xba* I 和 *Bgl* II 对 pET32α 双酶切得到载体大片段。将得到的大小片段分别双酶切后连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 选取目的阳性克隆测序确定无误。以 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶分别双酶切上述载体及引物 1 和 2 克隆产物, 回收、连接、转化入大肠杆菌 DH5α, 进行菌落 PCR, 选取目的阳性克隆, 氨苄青霉素半固体 LB 培养基穿刺培养送样测序。由此, 表达的融合蛋白将仅含有一个凝血酶切割位点。

1.2.3 *Lf-CATH2*-pET32α^{-TS} 融合蛋白的诱导表达与鉴定

将含有重组质粒 *Lf-CATH2*-pET32α^{-TS} 的单菌落接种于含氨苄的 LB 培养基中, 37 °C 培养至对数期, 以 1:100 接种于相同培养基, 培养至对数期, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 4 h, 4 °C 离心 (5 000 r/min) 10 min 收集菌体。菌体沉淀 (~4.5 g) 溶解于 30 mL 磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 中, 冰浴超声破碎 30 min, 破碎条件为: 400 W, 破碎 5 s, 间隔 5 s。待菌液由浑浊变清澈透亮时, 将悬浮液于 4 °C,

14 000 r/min 离心 30 min, 分别收集上清及沉淀, 加 1×SDS 上样缓冲溶液混匀, 煮沸, 离心取上清

进行 SDS-PAGE 检测融合蛋白表达情况, 确定融合蛋白在细胞中的表达部位。

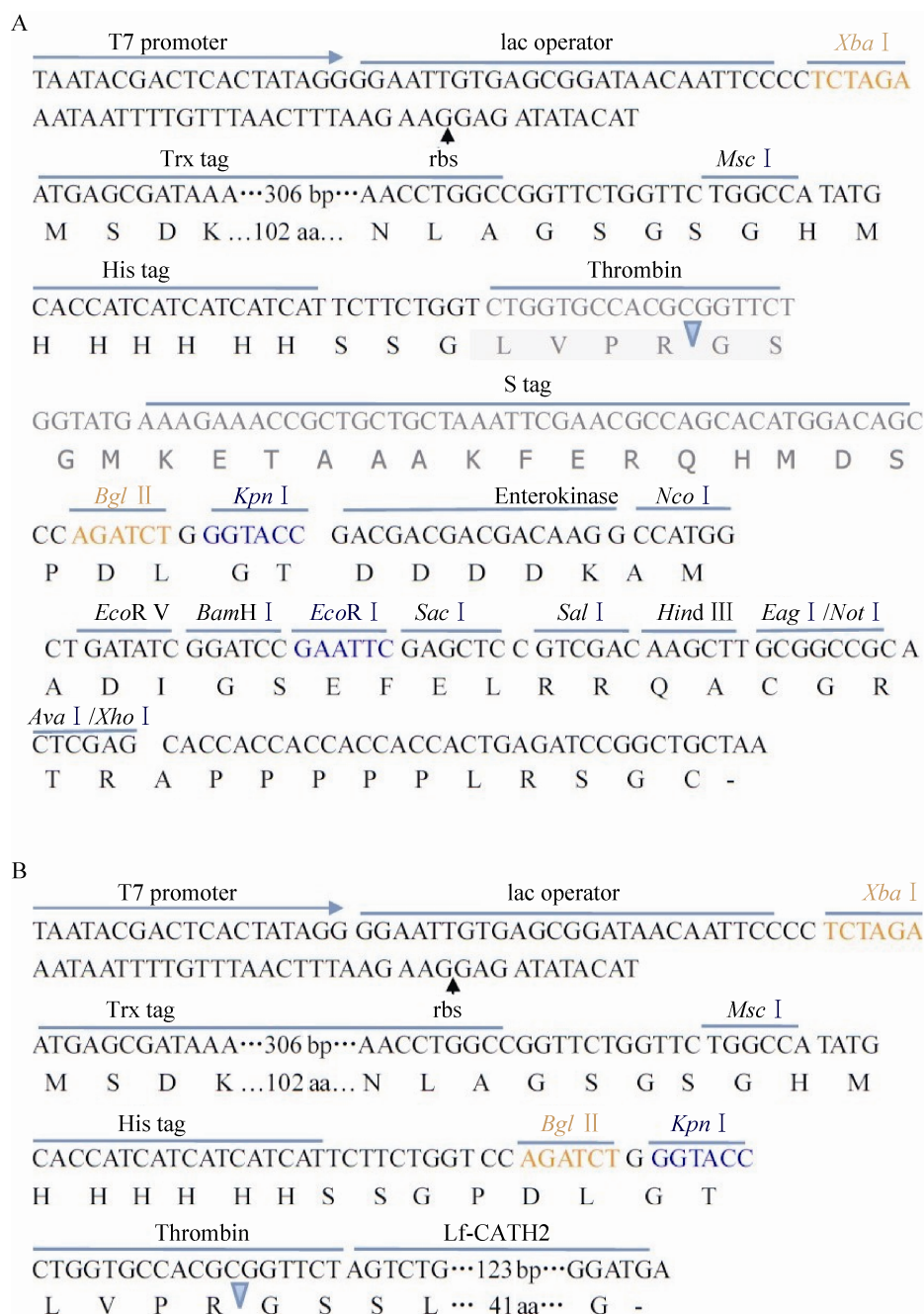


图 1 重组优化载体改造图

Fig. 1 Expression/cloning region of pET-32α (A) and Lf-CATH2-pET32α^{TS} (B). The sequence in gray was deleted from the commercial vector before the coding sequence for Lf-CATH2 was inserted.

1.2.4 Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} 融合蛋白的分离纯化

收集 1 L 经 IPTG 诱导后的菌液离心, PBS 洗涤, 重悬, 冰浴超声破碎, 离心收集上清溶液, 0.22 μ m 滤膜过滤后加入平衡好的 ÄKTA HPLC System 上的 HisTrapTM FF 镍柱, 流速 1 mL/min。用含 60 mmol/L 咪唑的缓冲溶液洗脱杂蛋白 (1 mL/min), 至 A_{280} 基线稳定后, 用含 300 mmol/L 咪唑的缓冲溶液对融合蛋白进行洗脱、收集。采用 Bradford 检测法测定融合蛋白浓度, 根据标准曲线, 计算 1 L 菌液中融合蛋白的含量。

1.2.5 Lf-CATH2 的释放和纯化

以 Tris 缓冲液 (pH 8.0) 溶解凝血酶, 25 $^{\circ}$ C 切割 18 h 后, 进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。用 C18 柱 (Hypersil BDS C18, 30 \times 0.46 cm) RP-HPLC 纯化。以均含有 1% 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 的去离子水和乙腈, 作为流动相线性梯度洗脱 (1 mL/min), 214 nm 检测吸收峰。收集目的蛋白, 使用 Bradford 检测法测定目的蛋白浓度, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 中, 供活性测定使用。

2 结果

2.1 重组优化载体 Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} 的构建

测序结果显示成功构建了去除凝血酶和组氨酸标签的优化载体 pET32 α ^{-TS}。使用引物 1、2 扩增含有凝血酶和酶切位点的 *Lf-CATH2* (171 bp) 目的基因。将目的基因片段和优化载体经 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切后连接, 转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆进行菌落 PCR。分别使用引物 1、2 和 3、4 进行菌落 PCR 鉴定, 条带大小与理论值 171 bp (图 2, 泳道 1)、432 bp (不含有凝血酶和组氨酸标

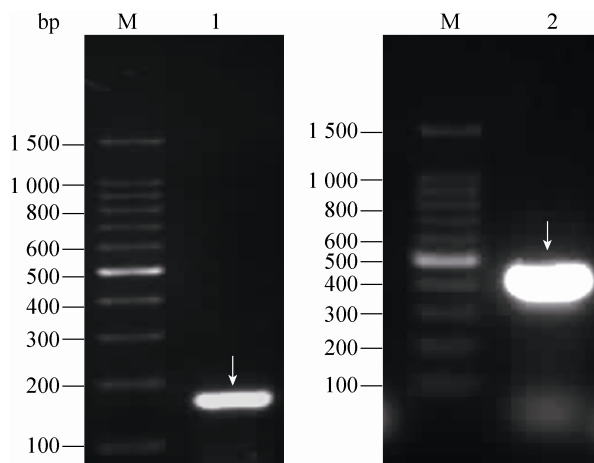


图 2 重组优化载体菌落 PCR 电泳图

Fig. 2 PCR gel electrophoresis of recombinant optimization strain. M: DL 1 500; 1: *Lf-CATH2* for the use of primers 1 and 2; 2: optimization of vector fragment for the use of primers 3 and 4.

签, 图 2, 泳道 2) 吻合。同时筛选阳性克隆菌测序, 结果表明重组优化载体 Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} 被正确构建。

2.2 融合蛋白表达鉴定

SDS-PAGE 表明含有 Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} 的工程菌经过 IPTG 诱导后, 表达产物在 20 kDa 附近出现了一条明显的新条带, 与理论相对分子质量 19.3 kDa 相符 (图 3, 泳道 2), 未经诱导表达的工程菌, 无明显条带 (图 3, 泳道 1)。相同条件下诱导未优化载体菌 Lf-CATH2-pET32 α (图 3, 泳道 3) 和优化载体菌 Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} (图 3, 泳道 4)。前者理论表达蛋白约 22 kDa, 灰度扫描软件分析显示其表达量仅约占菌体总蛋白的 21.4%, 而优化载体 Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} 表达量约占菌体总蛋白的 46.2%, 为未优化载体的 2 倍以上, 表明含有优化质粒的工程菌为高效工程菌。

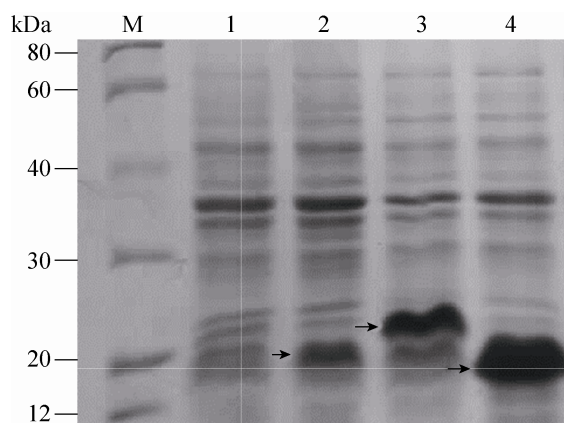


图3 不同条件下菌体全蛋白的表达情况

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the whole cell protein expressed under different conditions. M: protein marker; 1: non-induced recombinant optimization strain; 2: induced recombinant optimization strain; 3,4: Lf-CATH2-pET32 α and Lf-CATH2-pET32 α ^{-TS} strains in the same induced conditions.

2.3 融合蛋白的纯化

收集菌体，破碎离心后分别取细胞裂解上清 (图4, 泳道2)、沉淀 (图4, 泳道3) 进行电泳检测，显示融合蛋白大多为可溶性表达 (图4)。1 L 含 pET32 α -Lf-CATH2^{-TS} 重组质粒的菌体经 IPTG 诱导后，收集菌体裂解上清液，通过 ÄKTA HPLC System 镍柱纯化融合蛋白，采用 Bradford 检测法测定融合蛋白浓度为 487.8 mg/L。

2.4 目的蛋白释放、纯化与活性鉴定

凝血酶切割位点位于 R 与 G 之间: LVPR-GS, 优化载体融合蛋白切割后产生大小两个片段，理论分子量分别为 14.4 kDa 与 4.9 kDa (图4, 泳道4); 未优化载体表达融合蛋白切割大小两片段分别为 13.9 kDa 和 8.0 kDa (图4, 泳道5)。将优化和非优化酶切释放蛋白 (图4, 泳道4、5 下方箭头所指条带) 进行灰度扫描，结果显示优化后凝血酶切割效率提升约 37%。

凝血酶切割产物经过 ÄKTA HPLC System 镍柱纯化去除切割大片段和未成功切割片段，收集目的产物经 RT-HPLC 纯化，约 27 min 出现明显单一吸收峰，如图5箭头所示，且在线性洗脱梯度范围内无明显杂峰出现，说明 RT-HPLC 纯化所得的目标蛋白纯度较高。对纯化后的 Lf-CATH2 进行金黄色葡萄球菌 MIC 检测，其值可达 8.3 μ g/mL。

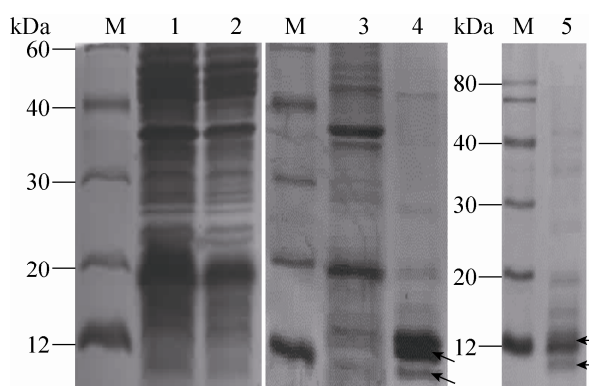


图4 重组优化载体全蛋白、裂解上清液、包涵体及融合蛋白切割后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of cell lysate supernatant and cell lysate pellet and thrombin-cleaved fusion protein in modified vector, with unmodified as control. M: protein marker; 1: whole-cell protein; 2: cell lysate supernatant protein; 3: inclusion; 4: two protein bands after cutting the fusion protein in modified vector; 5: two protein bands after cutting the unmodified fusion protein in unmodified vector.

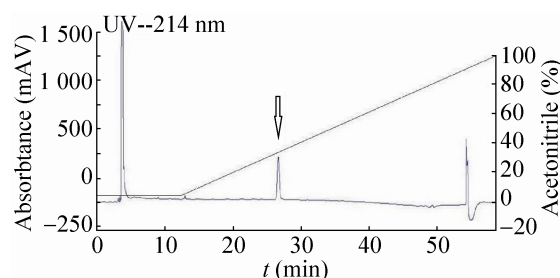


图5 RT-HPLC 纯化目的肽 Lf-CATH2

Fig. 5 RT-HPLC analysis of purified Lf-CATH2 with a C18 column.

3 讨论

抗菌肽由于其自身特点,如带正电,大多数为线性分子(含有的二硫键桥不稳定),自身又是一种天然杀菌剂,极易被宿主体内的酶降解等特性,很大程度上限制了其在宿主菌中的表达^[15-17]。而硫氧还蛋白原核表达系统产生的融合蛋白,类似于抗菌肽前体结构,大大增加了抗菌肽的稳定性和隐藏了抗菌肽的毒性^[15,18-20]。为了高效、低成本制备 Lf-CATH2,本实验选用硫氧还蛋白融合表达系统进行改造,它特别适用于在大肠杆菌中高产量表达可溶性蛋白质,从实验结果显示,大部分 Lf-CATH2 融合蛋白为可溶性表达,使得后续纯化步骤变得简便。

对于融合表达来说,酶切位点的选择也至关重要,正确而高效地切割能够促进多肽正确折叠和二硫键的形成^[19,21-24]。pET32 α 载体常应用于阳离子抗菌肽的融合表达,但有数据显示载体自身携带的凝血酶位点和 S 标签可能阻碍凝血酶的切割,不利于目的肽的释放^[25]。原因可能是表达体系中的酶切位点受邻近残基的影响,或者由于目的肽链的聚集使得凝血酶切割位点隐藏,很难与酶接触,致使切割效率不高,即使两个凝血酶位点都能暴露出来,对于切割下来的额外片段也会增多,不利于目的蛋白纯化^[19,26]。因此我们优化了 pET32 α 载体,去除了 S 标签与凝血酶位点,而在 Lf-CATH2 序列前加入凝血酶位点,连接到优化载体进行融合表达。诱导表达的融合蛋白在菌体总蛋白中含量高,经过凝血酶切割,镍柱和 RT-HPLC 纯化后得到的 Lf-CATH2 仍然显示较强的抗菌活性。本实验构建的新型的硫氧还蛋白原核表达系统,有效解决了原始载体酶切效率低下的问题,有望成

为 cathelicidin 家族及其他阳离子抗菌肽的高效原核表达工具。

REFERENCES

- [1] Wang Y, Zhang Z, Chen L, et al. Cathelicidin-BF, a snake cathelicidin-derived antimicrobial peptide, could be an excellent therapeutic agent for acne vulgaris. PLoS ONE, 2011, 6(7): e22120.
- [2] Wong JH, Ye XJ, Ng TB. Cathelicidins: peptides with antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, angiogenic, anticancer and procancer activities. Current Protein Pept Sci, 2013, 14(6): 504-514.
- [3] Guang HJ, Li Z, Wang YP, et al. Progress in cathelicidins antimicrobial peptides research. Zool Res, 2012, 33(5): 523-526 (in Chinese). 广慧娟, 厉政, 王义鹏, 等. Cathelicidins 家族抗菌肽研究进展. 动物学研究, 2012, 33(5): 523-526.
- [4] Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. FEBS J, 2009, 276(22): 6497-6508.
- [5] Choi KY, Chow LN, Mookherjee N. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. J Innate Immun, 2012, 4(4): 361-370.
- [6] Nijnik A, Hancock RE. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. Curr Opin Hematol, 2009, 16(1): 41-47.
- [7] Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. J Immunol, 2013, 191(10): 4895-4901.
- [8] Ling G, Gao J, Zhang S, et al. Cathelicidins from the bullfrog *Rana catesbeiana* provides novel template for peptide antibiotic design. PLoS ONE, 2014, 9(3): e93216.
- [9] Li Z, Zhang S, Gao J, et al. Structural and functional characterization of CATH_BRALE, the

- defense molecule in the ancient salmonoid, *Brachymystax lenok*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(1): 1–7.
- [10] Zhang L, Falla TJ. Potential therapeutic application of host defense peptides. *Methods Mol Biol*, 2010, 618: 303–327.
- [11] Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(12): 1551–1557.
- [12] Wang Y, Hong J, Liu X, et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE*, 2008, 3(9): e3217.
- [13] Feng F, Chen C, Zhu W, et al. Gene cloning, expression and characterization of avian cathelicidin orthologs, Cc-CATHs, from *Coturnix coturnix*. *FEBS J*, 2011, 278(9): 1573–1584.
- [14] Yu H, Cai S, Gao J, et al. Identification and polymorphism discovery of the cathelicidins, Lf-CATHs in ranid amphibian (*Limnonectes fragilis*). *FEBS J*, 2013, 280(23): 6022–6032.
- [15] Piers KL, Brown MH, Hancock RE. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, 134(1): 7–13.
- [16] Hu F, Ke T, Li X, et al. Expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with elastin-like polypeptides in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(8): 2377–2387.
- [17] Hong I, Kim YS, Choi SG. Simple purification of human antimicrobial peptide dermcidin (MDCD-1L) by intein-mediated expression in *E. coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(2): 350–355.
- [18] Zhou L, Zhao Z, Li B, et al. TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2009, 64(2): 225–230.
- [19] Zhou QF, Luo XG, Ye L, et al. High-level production of a novel antimicrobial peptide perinerin in *Escherichia coli* by fusion expression. *Curr Microbiol*, 2007, 54(5): 366–370.
- [20] Wang J, Gao Q, Liu Q, et al. Expression of a modified antimicrobial peptide BhSGAMP-1-S (*Bradysia hygida*) in *Escherichia coli* and characterization of its activity. *Acta microbiol Sin*, 2010, 50(9): 1185–1193.
- [21] Zhang Z, Ke T, Zhou YL, et al. High expression of antimicrobial peptide Cecropin AD in *Escherichia coli* by fusion with EDDIE. *Chin J Biotech*, 2009, 25(8): 1247–1253 (in Chinese).
张贞, 柯涛, 周玉玲, 等. 利用融合蛋白 EDDIE 在大肠杆菌中高效表达抗菌肽 Cecropin AD. *生物工程学报*, 2009, 25(8): 1247–1253.
- [22] Lord ST, Fowlkes DM. Expression of a fibrinogen fusion peptide in *Escherichia coli*: a model thrombin substrate for structure/function analysis. *Blood*, 1989, 73(1): 166–171.
- [23] Moon WJ, Hwang DK, Park EJ, et al. Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein Expr Purif*, 2007, 51(2): 141–146.
- [24] Srinivasulu B, Syvitski R, Seo JK, et al. Expression, purification and structural characterization of recombinant hepcidin, an antimicrobial peptide identified in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Protein Expr Purif*, 2008, 61(1): 36–44.
- [25] Li Y. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expr Purif*, 2012, 81(2): 201–210.
- [26] Li Y, Li X, Li H, et al. A novel method for purifying recombinant human host defense cathelicidin LL-37 by utilizing its inherent property of aggregation. *Protein Expr Purif*, 2007, 54(1): 157–165.

(本文责编 郝丽芳)