DOI:10.13350/j.cjpb.221204

· 论著 ·

融合抗菌肽 SUMO-PK34 的优化表达、纯化及鉴定*

路亚德,李昕彤,李智慧,曲玲霖,杨斌斌**
(潍坊医学院医学检验学院,山东潍坊 261053)

【摘要】 **目的** PK34是一类来源于分枝杆菌噬菌体的抗菌肽,可与结核分枝杆菌表面的TDM蛋白特异性结合,从而精确杀灭结核分枝杆菌。且原核表达具有诸如表达量大、成本较低等一系列优点。本研究利用大肠埃希菌表达目的蛋白—融合抗菌肽SUMO-PK34,并纯化获得大量具有活性的融合抗菌肽。 **方法** 从GenBank中获取抗菌肽PK34序列后进行密码子优化,通过合成引物,PCR获得带有酶切位点的抗菌肽PK34基因片段,酶切、连接后构建重组质粒并进行酶切和测序鉴定。将重组质粒转化入大肠埃希菌BL21菌株中进行诱导表达,并对诱导培养温度、IPTG浓度和时间进行优化。将转化菌接种入含有kana抗性的LB液体培养基中扩大培养,在最适条件下进行诱导表达,通过AKTA-His-Ni column纯化目的蛋白,采用SDS-PAGE电泳和Western blot方法进行鉴定。 **结果** 获得融合抗菌肽SUMO-PK34重组质粒pET-28a-SUMO-PK34,并在BL21中初步表达融合抗菌肽SUMO-PK34。经过优化,确定其最适表达条件为温度24 ℃,IPTG终浓度为1.0 mmol/L,时间为9 h。在优化的条件下表达重组蛋白,通过纯化,获得大量融合抗菌肽SUMO-PK34。经Western blot鉴定,表达的融合多肽相对分子质量为20×10^3,活性良好。 **结论** 通过优化表达条件,使得融合抗菌肽SUMO-PK34在原核系统(大肠埃希菌)中得到高效表达,纯化获得具有活性的融合抗菌肽,对PK34的低经济成本、低时间成本的大量获取及抗结核杆菌药物的开发奠定了基础。

【关键词】 抗菌肽;PK34;结核分枝杆菌;原核表达
【中图分类号】 R378.911 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2022)12-1381-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Dec;17(12):1381-1386.]

Optimization of expression, purification and identification of fused antibacterial peptide SUMO-PK34

LU Ya-de, LI Xin-tong, LI Zhi-hui, QU Ling-lin, YANG Bin-bin (*School of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang, Shandong* 261053, *China*)**

【Abstract】 **Objective** PK34 is a class of antimicrobial peptides derived from *Mycobacterium* bacteriophages, which can specifically bind to TDM protein on the surface of *Mycobacterium tuberculosis*, thus killing *M. tuberculosis* accurately. In addition, prokaryotic expression has a series of advantages such as large amount of expression and low cost. In this study, *Escherichia coli* was used to express the target protein-the fusion antibacterial peptide SUMO-PK34, and obtains a large number of active fusion antimicrobial peptides after purification. **Methods** The sequence of antimicrobial peptide PK34 was obtained from GenBank, and the codon was optimized. The gene fragment of antimicrobial peptide with enzyme digestion site was obtained by synthetic primers and PCR. After enzyme restriction and linking, recombinant plasmid was constructed and identified by enzyme restriction and sequencing. Then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 to induce expression, and the induction temperature, IPTG concentration and time were optimized. After that, the transformants were inoculated into LB liquid medium containing kana resistance to expand the culture, induced expression under the optimal conditions, and purified the target protein through AKTA-His-Ni column. SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting were used for identification. **Results** The recombinant plasmid pET-28a-SUMO-PK34 was obtained; the fusion antibacterial peptide SUMO-PK34 was preliminarily expressed in BL21. After optimization, the optimal expression condition was 24 ℃ , and 9 h. Under the optimal temperature of 24 ℃, there is no significant difference when the IPTG concentration is 1.0 mmol/L and 1.2 mmol/L, so the optimal IPTG concentration is 1.0 mmol/L. Let it express the recombinant protein under optimal conditions, a large amount of fusion antibacterial peptide SUMO-PK34 was obtained by purification. Western blotting showed that the fusion peptide was successfully expressed and had good activity. **Conclusion** By optimizing the expression conditions, the fusion antibacterial peptide SUMO-PK34 was highly ex-

* 【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 81802055);山东省自然科学基金项目(No. ZR2016HB70);潍坊医学院大学生创新创业训练计划项目(No. X2021636)。
** 【通讯作者】 杨斌斌,E-mail:bin_bin_yang@126.com
【作者简介】 路亚德(2001-),男,山东聊城人,本科在读。E-mail:2689000240@qq.com。
李昕彤和路亚德并列第一作者。

pressed in the *E. coli*, and a large number of active fusion antibacterial peptides were purified, which laid the foundation for the mass acquisition of PK34 with low economic cost and low time cost and the development of anti-tuberculosis drugs.

【Key words】 The antibacterial peptide; PK34; *Mycobacterium tuberculosis*; prokaryotic expression

由结核分枝杆菌(MTB)感染所致的结核病是一种治疗较难、对药物敏感性较差[1]的慢性传染病。PK34来源于MTB噬菌体D29,是一种小分子抗菌肽[2]。作为一种多肽类物质,PK34具有毒性低、抗菌谱广且不易使MTB产生耐药性等优点[3],因此抗菌肽有望成为一种抗结核病的潜在的新型治疗药物[4]。小分子多肽可通过原核表达获得[5],具有操作简易、成本较低、表达量大等优点。但若表达的目的蛋白为抗菌肽等易杀伤宿主的高毒性蛋白,则会导致目的蛋白无法完成原核表达。SUMO是一种小泛素相关修饰物,近年来在大肠埃希菌中以N端融合标签的形式被广泛应用[6],常用方法是在细胞中过表达6-His-SUMO融合蛋白,从而在进行AKTA纯化时能够被His-Ni column吸附,进而实现目的蛋白的纯化[7]。SUMO不仅在靶蛋白分子的定位及功能调节上起重要作用,而且还能够调控转录进程、增强蛋白的表达和溶解性。此外,SUMO还可屏蔽某些毒性蛋白的毒性作用,从而在保护宿主菌不被杀伤的基础上防止目的蛋白降解,这些作用均可使得难表达蛋白的产量提高[8-10]。本实验利用大肠埃希菌低成本、高获取率的表达系统[11],实现融合抗菌肽SUMO-PK34的优化表达和鉴定,为抗菌肽PK34的生物活性研究及其产业化开发奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株及质粒 pET-28a(+)-SUMO质粒和*E. coli* BL21菌株均为本实验室保存。

1.2 主要试剂 质粒小提试剂盒和硫酸卡那霉素溶液均购自北京Solarbio科技有限公司;SDS-PAGE凝胶超快速配制试剂盒,考马斯亮蓝染色液,PVDF膜,SDS-PAGE Transfer Buffer Powder、Running Buffer Powder、TBS缓冲液及Tween20均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;限制性内切酶BamH Ⅰ和Xho Ⅰ均购自日本TaKaRa公司;KOD酶购自日本TOYOBO公司;ECL发光液购自上海Beyotime生物技术有限公司;Super DNA maker购自康维世纪生物有限公司;蛋白质分子质量Maker购于中国Biosharp公司;抗体为本实验室制备。

2 方法

2.1 PCR引物设计与合成 在数据库中(GenBank)获取PK34抗菌肽的基因序列,根据*E. coli* BL21菌株的密码子的偏好,优化PK34基因序列,根据GenBank数据库中的序列设计合成4条引物(表1),由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

表1 基因序列合成所需引物
Table 1 Primers required for gene sequence synthesis

引物编号 Primer number	引物序列(5′-3′) Primer sequence (5′-3′)
1	GAGAACAGATTGGTGGATCCCCGCGTGTTATCGAAACCAAAGTTCACGGTC
2	CTTACGTTACGCGCGAGACCGGTAACTTCACGACCGTGAACTTTGGTTTC
3	CTCGCGCGTAACGTAAGCGAAGAAAACGTTGACCGTCTGGCTAAACGTTG
4	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTTGATCCAACGTTTAGCCAGACGGCGG

2.2 PK34基因扩增与重组质粒的构建 1-4号引物各取1 μL,混匀。取上述混合物1 μL作为模板,加入1号和4号引物各1 μL,2.0 mmol/L dNTP 4 μL,10×KOD Buffer 4 μL,KOD酶1 μL,混合后进行PCR。反应程序:94 ℃预变性5 min;68 ℃ 30 s,98 ℃ 15 s,54 ℃ 30 s,共25次循环;68 ℃延长5 min。取PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳并胶回收。用NEB BamH Ⅰ和Xho Ⅰ内切酶酶切pET-28a(+)-SUMO载体并回收酶切载体片段。将PCR得到的目的基因片段和和酶切pET-28a(+)-SUMO载体进行连接,构建重组质粒pET-28a-SUMO-PK34并转化入*E. coli* DH5α。取适量菌液在LB固体培养基上三区划线,然后置于37 ℃二氧化碳培养箱中培养12 h。挑单菌落接种于5 mL含卡那霉素抗性的LB液体培养基中,37 ℃、180 r/min摇菌培养12 h后将菌液分装,分别小量提取质粒进行测序鉴定和Xho Ⅰ单酶切及BamH Ⅰ、Xho Ⅰ双酶切鉴定(酶切产物分别进行0.6%和1.2%琼脂糖凝胶电泳分析)。

2.3 感受态细胞的制备 取出-80 ℃冻存的*E. coli* BL21菌株,在无抗性的LB固体平板上进行三区划线,置于37 ℃二氧化碳培养箱中培养过夜。挑取生长状态良好的单菌落接种于5 mL无kana抗性的LB液体培养基中,置于37 ℃摇床,180 r/min过夜扩菌。向100 mL无kana抗性的LB液体培养基中加入2 mL菌液,摇菌培养至A_{600}值为0.4~0.5时,将菌液倒入50 mL离心管中冰浴20 min,4 ℃、4 000 r/min(离心半径10 cm)离心10 min,去上清。每管加入15

mL 冰浴的 0.1 mol/L 氯化钙溶液悬浮菌体，4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min，弃上清。在离心管中加入 2 mL 冰浴的氯化钙溶液重悬浮菌体。在超净工作台上将菌液分装 100 个 1.5 mL EP 管，加入适当体积的无菌甘油，封口膜封口，置于-80 ℃冰箱保存。

2.4 重组质粒的转化与鉴定 取感受态细胞置冰盒上融化 30 min。向其中加入 20 μL 目的质粒，温和混匀后置冰水浴 30 min，42 ℃水浴锅 1.5 min。向 1 mL 冰上预冷的 LB 液体培养基中加入 kana，然后转至 EP 管中轻轻吹打混匀，37 ℃、180 r/min 培养 1 h，10 000 r/min 离心 1 min，去部分上清，轻轻吹打沉淀使其混合均匀。取 20 μL 菌液滴于 kana 抗性的 LB 固体培养基中央，推板，于 37 ℃二氧化碳恒温培养箱过夜培养。

2.5 目的蛋白的诱导表达 设置培养温度为 37 ℃，IPTG 浓度为 1.0 mmol/L，时间 6 h，未经转化 pET-28a-SUMO-PK34 质粒的 *E. coli* BL21 菌株为阴性对照。挑取 2.3 步骤中生长状态较好的单菌落接种于含卡那霉素抗性的 5 mL LB 肉汤培养基，置于 37 ℃、180 r/min 摇菌培养过夜，作为表达条件优化试验的菌体来源。

2.5.1 温度对转化菌表达的影响观察 取 **2.4** 中的 pET-28a-SUMO-PK34 质粒转化菌 100 μL，加入到含有卡那霉素抗性的 5 mL LB 液体培养基中，置于 37 ℃摇床培养过夜；加入 24 μL 210 mmol/L 的 IPTG（终浓度为 1 mmol/L），分别于 16、24、37 ℃温度下诱导 6 h，采用 15% SDS-PAGE 电泳分析蛋白的表达情况，确定菌体的最适培养温度。

2.5.2 时间对转化菌表达的影响观察 取转化菌液 100 μL，接种入 5 mL 含 kana 抗性的 LB 液体培养基中，置于 37 ℃摇床过夜培养；加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 分别诱导 3、6、9、12、15、18 h，15% SDS-PAGE 电泳分析蛋白的表达情况。

2.5.3 IPTG 浓度对转化菌表达的的影响观察 将 pET-28a-SUMO-PK34 质粒阳性菌液接种于含卡那霉素抗生素的 5 mL 培养基中，37 ℃培养过夜；分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L 的 IPTG 37 ℃诱导 6 h，15% SDS-PAGE 电泳分析转化菌在不同 IPTG 浓度诱导下的蛋白表达情况。

2.6 蛋白的提纯与纯化 将 400 mL 菌液置于 24 ℃，用终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 9 h；收集菌液，4 ℃离心，去培养基；加入 10 mL Binding Buffer 重悬菌休，置于冰上超声破碎，通过 AKTA-His-Ni column 层析纯化蛋白，选取峰值处收集管留存，15% SDS-PAGE 电泳验证纯化效果。

2.7 Western blot 鉴定重组蛋白 取经 AKTA 纯化的重组蛋白溶液 16 μL，加 4 μL 5×loading buffer，沸水煮 10 min。配制 15%下层胶和 5%上层胶，取全部样品上样至凝胶中，90 V 电泳 30 min 后改 180 V 继续电泳至结束。切下 Maker 对应位置（17-25 ku）的凝胶，用湿转法转至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜置于摇床（90～100 r/min），用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h；加入 PK34 多克隆抗体（1∶1500 稀释）中 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；加入工作浓度的 HRP 标记 PK34 二抗，于摇床孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次。洗膜结束在膜下垫透明一次性手套，放入成像仪，避光滴加 100 μL ECL 显色液，曝光。

结 果

1 重组质粒的构建及测序和酶切鉴定

PCR 扩增的目的基因片段与酶切 pET-28a（＋）-SUMO 载体连接，构建重组质粒 pET-28a-SUMO-PK34。重组质粒测序如图 1。重组质粒单酶切和双酶切结果见图 2A 和图 2B，分别得到 5 701 bp 片段和 102、5 599 bp 片段，与预期一致，重组质粒构建正确。

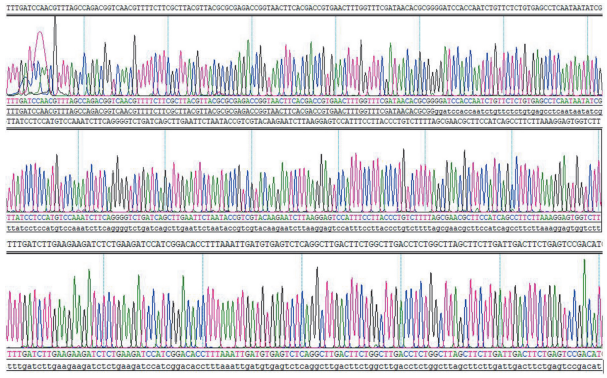
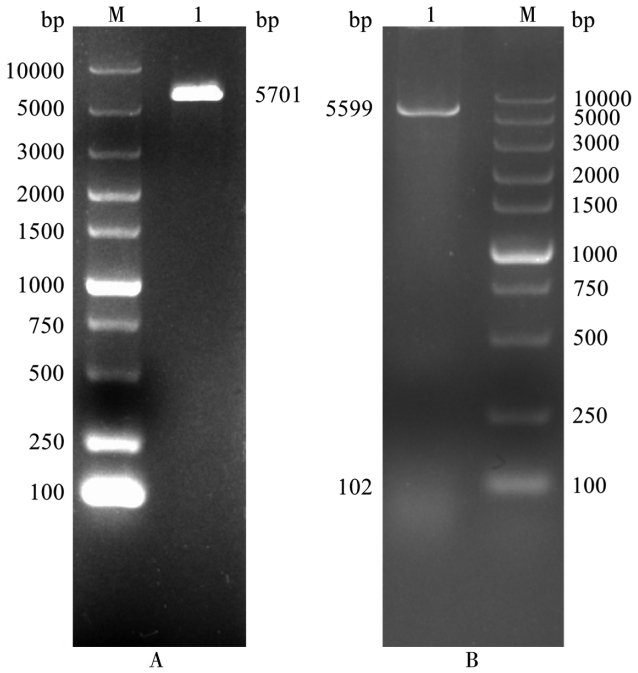


图 1 SUMO-PK34 测序结果
Fig. 1 Sequencing results of SUMO-PK34

2 目的蛋白诱导表达的最适条件

2.1 温度 不同温度下的表达菌液各取 5 mL，离心，去上清，加入 1.0 mL Binding Buffer 重悬菌体沉淀；取 16 μL 菌悬液于新的 EP 管中，加入 4 μL 上样缓冲液煮沸 10 min，SDS-PAGE 电泳检测蛋白条带位于约 20 ku 处，与预期相符。其中 24 ℃条件下蛋白条带最为明显，16 ℃条件下菌体表达蛋白量较少（图 3）。故后续试验设 24 和 37 ℃两个温度条件进行 IPTG 和时间的优化。

2.2 IPTG 浓度 在 37 ℃条件下，IPTG 终浓度为 0.8～1.0 mmol/L 时 20 ku 处蛋白条带最浓，因此确定 37 ℃条件下转化菌表达的最适 IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L（图 4A）；在 24 ℃条件下，1.2 mmol/L 为最适 IPTG 终浓度（图 4B）。



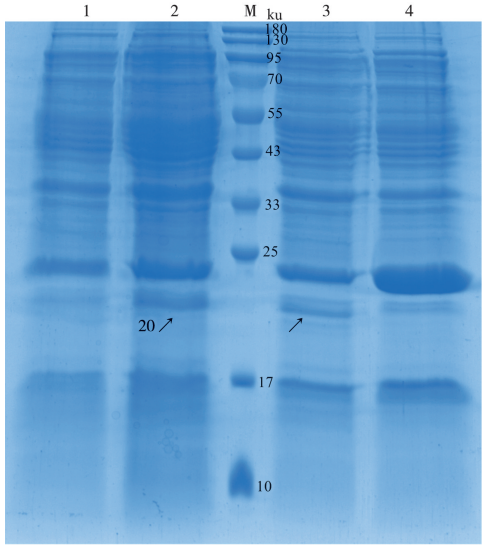
M DNA标志物 1 重组质粒酶切产物

图2 重组质粒单酶切(A)和双酶切(B)鉴定

M Maker 1 The digestion product of recombinant plasmid

Fig. 2 The identification of recombinant plasmid by single and double enzyme digestion

2.3 诱导表达时间 重组质粒转化菌在设定的温度和IPTG浓度下诱导培养3、6、9、12、15、18 h后进行SDS-PAGE电泳分析。结果显示,在37 ℃条件下诱导9～12 h目的条带最为明显,因此确定转化菌37℃条件下的最适表达时间为9 h(图5A);在24 ℃条件下诱导9 h目的条带最为清晰,因此确定转化菌24 ℃条件下的最适表达时间为9 h(图5B)。

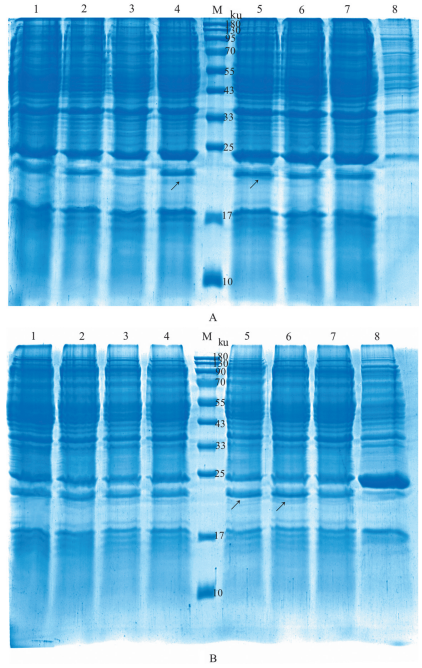


1～3 16、24、37 ℃诱导表达菌体 4 阴性对照

图3 不同温度对目的蛋白表达的影响

1-3 Thallus were induced at 16, 24 and 37 ℃ 4 Negative control

Fig. 3 The effect of different temperature on expression of target protein

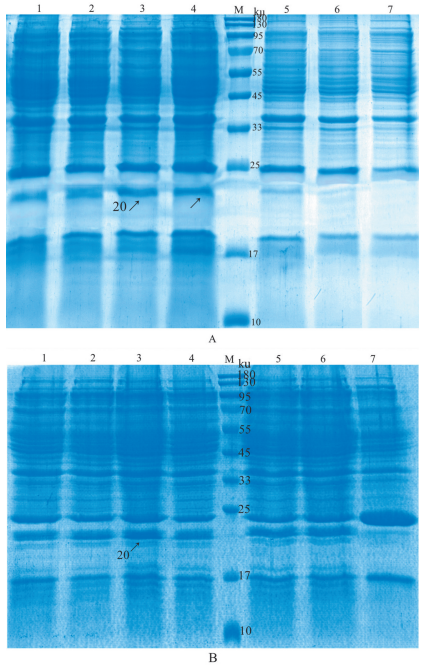


A、B 温度分别为37和24 ℃ 1～7 IPTG浓度依次为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L 8 阴性对照

图4 不同温度、不同IPTG浓度对PK34表达的影响

A, B The temperature were 37 and 24 ℃ 1-7 The cells induced by IPTG at concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2and 1.4 mmol/L 8 Negative control

Fig. 4 Effect of different temperature and IPTG concentration on PK34 expression



A、B 温度分别为37和24 ℃ 1～6 时间分别为3、6、9、12、15、18 h 7 阴性对照

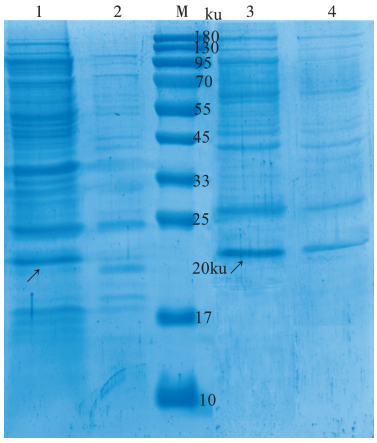
图5 不同温度、不同时间对重组菌PK34表达的影响

A, B The temperature were 37 ℃ and 24 ℃ 1-6 The expression of induced thallus at 37 ℃ for 3, 6, 9, 12, 15 and 18 h 7 Negative control

Fig. 5 The effect of different temperature and time on expression of recombinant PK34

3 目的蛋白的纯化

重组表达菌超声破碎后经 AKTA 纯化，峰值出现在收集管第 17-18 管，SDS-PAGE 电泳显示第 17 管蛋白相对分子质量约为 20×10^3，即为纯化的目的蛋白（图 6）。



1 PK34 阳性全菌液 2 阴性对照 3 纯化后第 17 管 4 纯化后第 18 管

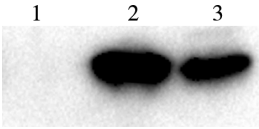
图 6 纯化目的蛋白的 SDS-PAGE 分析

1 PK34 positive whole bacterial fluid 2 Negative control 3 The 17th tube after purification 4 The 18th tube after purification

Fig. 6 Purified target protein

4 Western blot 鉴定

取纯化的 PK34 蛋白以相应的兔源性多克隆抗体为一抗进行 Western blot，结果如图 7。纯化的重组蛋白 PK34 能与相应一抗结合，即具有反应原性，反应条带位于 20 ku。



1 阴性对照 2 His-Ni column 纯化 PK34 与相应抗体反应条带 3 PK34 阳性菌液全菌蛋白与相应抗体反应条带

图 7 重组蛋白的 Western blot 鉴定

1 Negative control 2 PK34 was purified by His-Ni column 3 Total protein of PK34 positive bacterial solution

Fig. 7 Western blotting identification results of recombinant proteins

讨 论

抗菌肽起初发现于昆虫体内，是一种在无脊椎动物中广泛存在的免疫效应物质，具有重要的生物活性[12]。后经研究证实其他生物体内也存在抗菌肽[13]。抗菌肽有多种不同的分类方式：按结构形式可分为 α-螺旋 AMP 和 β-折叠 AMP 两种结构，不同结构有着不同的生物活性，且其活性差别较大[14]。按其对不同物种的作用分为抗肿瘤、抗病毒、抗真菌兼抗细菌肽等。按来源可分为微生物源性和植物源性等[15]。抗菌肽的优点较多，如热稳定性优良、分子质量较小、抗菌谱广泛、作用机制特殊等[16]。由于其来源广泛，作用强大，成为目前的研究热点之一，被寄予成为抗生素替代品的厚望[17]。

作为抗菌的新型药物，抗菌肽在抗结核方面的应用也被逐渐重视。结核病的传染性较强[18]，耐药性结核杆菌引起的结核病在全球范围内仍为一个重要的公共卫生问题，一直威胁着人类的健康[19]。小分子多肽 PK34 是在分支杆菌噬菌体 D29P63 上找到的，具有较强的特异性，能够较为精确地与结核分枝杆菌表面一种极为丰富的糖酯-海藻糖-6，6'-二分枝菌酸（TDM）结合，通过作用结核分枝杆菌表面的位点直接损伤菌株的细胞膜表面，从而杀灭结核杆菌[20-22]。卫林等[23]报道 PK34 抗菌肽在治疗小鼠结核方面具有与利福平相当的药用效果。此外，PK34 在抗炎症方面也具有一定的作用，其可通过抑制 MAPK 和 PKB 的活化抑制炎症因子的分泌，同时保持动物正常的免疫能力。这种高效专一的抗炎和杀菌作用使其有望成为一种辅助药物，靶向治疗结核杆菌所致的感染[23]。

本实验采用大肠埃希菌原核表达系统表达了融合抗菌肽 SUMO-PK34，观察了不同浓度 IPTG、温度和时间条件下的目的蛋白表达情况，优化了菌株表达条件，使得目的蛋白得以在较为适宜的条件下大量表达。不同的菌株、不同的载体以及不同的插入序列均有可能使菌株有相应的最适表达条件。在温度方面，pET-28a-SUMO-PK34 质粒阳性的 BL21 目的菌株最适诱导条件为 24 ℃。在 IPTG 浓度方面，相邻梯度间 IPTG 浓度的变化对菌株目的蛋白表达量的影响不大，但当浓度相差较大时（如 37 ℃条件下的 0.2 mmol/L 与 1.0 mmol/L），蛋白表达量的差异较明显。综合以上实验结果确定，37 ℃条件下该转化菌株诱导表达的的最佳 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L，在 24 ℃条件下最适 IPTG 浓度为 1.2 mmol/L，但以节约为原则，大量扩菌进行诱导表达并纯化时，可使用 1.0 mmol/L 的 IPTG 浓度。从时间方面看，15 h、18 h 的转化菌株所有蛋白的表达量均不高，可能是因为 37 ℃条件下培养 15 h 和 18 h 的菌株在试管底部出现沉淀，说明菌株可能有老化现象，影响了培养基中菌体的数量，从而影响目的蛋白的表达量。而 24 ℃条件下培养的菌体并无沉淀现象出现，可能是由于温度偏低，菌体的生长代谢较为缓慢[24]，因而未导致菌体的老化，但长时间诱导后蛋白的表达量仍低于 9 h，说明无论是 37 ℃和 24 ℃，该菌的最适诱导时间均为 9 h。综上得出 pET-28a-SUMO-PK34 阳性的 E. coli BL21 菌株最适诱导条件为温度 24 ℃，IPTG 浓度 1.0 mmol/L，培养表达时间为 9 h。

本研究在表达融合抗菌肽 SUMO-PK34 的基础

上探索了该蛋白表达的最适条件，实现了大量纯化，并使用抗-抗菌肽 PK34 抗体鉴定了纯化 SUMO-PK34 的反应原性，初步证明制备的融合抗菌肽 SUMO-PK34 具有 PK34 的多肽活性，为抗菌肽 PK34 的相关研究和临床应用奠定了基础。

【参考文献】

[1] 马屿. 耐多药结核病及其防治[J]. 临床肺科杂志，2005(02)：137-140.

[2] 张雯雯，刘涵. 结核杆菌噬菌体中含抗菌肽[N]. 中国科学报，2013-05-28(004).

[3] 岳俊伊，张健. 抗菌肽抗结核作用的研究进展[J]. 重庆医学，2010，39(19)：2673-2675.

[4] 陈吉，殷玉和，李玲玲，等. 合成多肽对结核分枝杆菌的胞内抑制作用[J]. 生物技术通报，2016，32(4)：222-227.

[5] 张磊，唐永凯，李红霞，等. 促进原核表达蛋白可溶性的研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2021，41(2)：138-149.

[6] 亓燕红，邹竹荣，邹华英，等. SUMO 基因的内在原核启动子活性及其在大肠埃希菌蛋白表达系统中的应用[J]. 生物工程学报，2011，27(6)：952-962.

[7] 焦少灼. 融合蛋白标签在检测 SUMO 化修饰中的应用[D]. 上海：中国科学院上海生命科学研究院，2011.

[8] Marblestone JG，Edavettal SC，Lim Y，et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems：Enhanced expression and solubility with SUMO[J]. Protein Sci，2006，15(1)：182-189.

[9] Lee CD，Sun HC，Hu SM，et al. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins[J]. Protein Sci，2008，17(7)：1241-1248.

[10] 吴希，张双全. 抗菌肽对细菌杀伤作用的分子机制[J]. 生物化学与生物物理进展，2005，32(12)：1109-1113.

[11] 解庭波. 大肠埃希菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报(自科版)医学卷，2008(03)：77-82.

[12] 尹文，徐晨，马戈甲. 抗菌肽的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2005，21(z1)：136-138.

[13] 王建纲，夏乐先，刘晓辉. 生物抗菌肽研究进展[J]. 生物技术通报，2003(2)：26-28.

[14] 文加才，秦永忠，宋爱刚. 阳离子抗菌肽的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册)，2002，23(6)：267-271.

[15] 郑晓雪，杨雅琪，王星玥，等. 抗菌肽治疗结核分枝杆菌感染的研究进展[J]. 医学检验与临床，2020，31(10)：35-39.

[16] 布冠好，李宏基，杨国宇，等. 抗菌肽的作用特点及应用前景[J]. 动物医学进展，2005，26(3)：26-28.

[17] 李冠楠，夏雪娟，隆耀航，等. 抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 动物营养学报，2014，26(1)：17-25.

[18] Yan LP，Qin LH，Zhang Q，et al. Transmission of extensively drug-resistant and multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in families identified by genotyping[J]. Chin Med J (Engl)，2013，126 (3)：521-525.

[19] 欧洋华，江咏梅. 结核分枝杆菌分子诊断方法研究进展[J]. 医学综述，2021，27(23)：4730-4735.

[20] 李燕. 抗菌肽 ORBK、抗结核杆菌蛋白 D29P63 和 PK34 的基因工程制备法及模拟细胞膜 Nanodiscs 体系的建立[D]. 北京：中国科学院大学，2014.

[21] Wei L，Wu J，Liu H，et al. A mycobacteriophage-derived trehalose-6，6′-dimycolate-binding peptide containing both antimycobacterial and anti-inflammatory abilities[J]. FASEB J，2018，27(8)：3067-3077.

[22] 岳俊伊. 抗菌肽抗结核作用的研究进展[J]. 重庆医学，2010，39(19)：2673-2675.

[23] 卫林. 两种抗菌肽(PK34 和 cathelicidiN-PY)的功能与作用机理研究[D]. 南京：南京农业大学，2013.

[24] 吴三桥，赵冠杰，万健，等. 抗菌肽 SMAP-29 在大肠埃希菌中表达条件的优化及纯化研究[J]. 江苏农业科学，2018，46(9)：44-47.

【收稿日期】 2022-08-30 **【修回日期】** 2022-10-15