

抗菌肽Mytimacin-4在大肠杆菌中的高效表达及其活性鉴定

赵难难^{1,2}, 黄佳苹¹, 崔金明¹, 贾爱卿¹, 朱选¹, 林影², 王健^{1*}

(1. 广东海大集团股份有限公司, 广东广州 511400) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 511400)

摘要: 已有研究表明, *Mytilus galloprovincialis* 来源的 macin-4 对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌均有较强的抑菌活性, 但关于其生产的研究甚少, 限制了其后续的产品开发及应用。该研究通过对 mytimacin-4 进行大肠杆菌密码子优化并构建在 pET-28a 表达载体上, 将构建成功的 pET-28a-mytimacin-4 分别和含不同组合分子伴侣的表达载体 pG-KJE8、pKJE7、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16 共转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达宿主, 进行诱导表达及活性鉴定。结果表明, 共表达分子伴侣可显著提高 Mytimacin-4 在大肠杆菌中的可溶性表达, 其中, 重组菌株 BL21(DE3)/pET-28a-mn4/pG-KJE8 优化后的产量可达 200~400 mg/L, 是目前已报道的最高产量。表达产物经金属离子亲和层析, 得到的纯化产物 Mytimacin-4 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和副溶血弧菌均有较强的抑菌活性。该研究构建了一株高效表达 Mytimacin-4 的工程菌株, 为 Mytimacin-4 在兽药和水产饲料领域的应用提供了技术支持。

关键词: 抗菌肽 mytimacin-4; 分子伴侣; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2025)05-114-123

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0276

High-level Expression of Antimicrobial Peptide Mytimacin-4 in *Escherichia coli* and Identification of Its Activity

ZHAO Nannan^{1,2}, HUANG Jiaping¹, CUI Jinming¹, JIA Aiqing¹, ZHU Xuan¹, LIN Ying², WANG Jian^{1*}

(1. Guangdong Haid Group Company Limited by Shares, Guangzhou 511400, China)

(2. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 511400, China)

Abstract: Mytimacin-4 from *Mytilus galloprovincialis* has strong bacteriostatic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. However, the production of mytimacin-4 has been rarely studied, which limits its subsequent product development and application. In this study, the gene sequence of mytimacin-4 was codon optimized in *Escherichia coli* and constructed in the expression vector pET-28a. Then, pET-28a-mytimacin-4 and each of the expression vectors containing different combinations of molecular chaperones (pG-KJE8, pKJE7, pGro7, pG-Tf2, and pTf16) were co-transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for induced expression and activity identification. The results showed that the co-expression of molecular chaperones significantly improved the soluble expression of mytimacin-4 in *Escherichia coli*. Notably, the optimized

引文格式:

赵难难,黄佳苹,崔金明,等.抗菌肽Mytimacin-4在大肠杆菌中的高效表达及其活性鉴定[J].现代食品科技,2025,41(5):114-123.

ZHAO Nannan, HUANG Jiaping, CUI Jinming, et al. High-level expression of antimicrobial peptide mytimacin-4 in *Escherichia coli* and identification of its activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 114-123.

收稿日期: 2024-03-07

基金项目: 番禺区产业人才政策项目创新领军团队项目 (2021-R01-4)

作者简介: 赵难难 (1992-), 女, 博士研究生, 研究方向: 多肽生物合成, E-mail: zhaonn@haid.com.cn

通讯作者: 王健 (1990-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 水产动保技术及产品开发, E-mail: wangj24@haid.com.cn

yields of the recombinant strain BL21(DE3)/pET-28a-mn4/pG-KJE8 ranged from 200 to 400 mg/L, the highest reported. Purified mytimacin-4 was obtained by metal-ion affinity chromatography product of the expression products. The purified mytimacin-4 showed strong inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, and *Vibrio parahaemolyticus*. In this study, an engineering strain with high expression of mytimacin-4 was constructed, which provided technical support for applying mytimacin-4 in veterinary medicine and aquatic feed.

Key words: antimicrobial peptide mytimacin-4; molecular chaperone; bacteriostatic activity

近几十年来, 抗生素的频繁和不规律使用, 使得药残和耐药问题愈发突出, 给生态环境及食品安全带来了巨大的挑战^[1,2]。随着“禁抗、减抗、无抗”政策的实施执行, 畜牧水产养殖业的发展也急需寻找抗生素的有效替代品。抗菌肽 (Antimicrobial Peptides, AMPs), 又称宿主防御肽, 是自然界中广泛存在的一类具有生物活性的短肽, 对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性细菌、真菌、病毒和寄生虫具有抑制或杀伤作用^[3,4]。与传统抗生素的单一靶点杀菌原理不同, 抗菌肽可对病原体进行多靶点破坏, 极大程度降低耐药菌的产生, 且抗菌肽分子量小, 容易被降解, 不会对人体健康和养殖环境造成危害^[5,6]。由于抗菌肽的广谱抗菌性以及独特的杀菌机制, 使细菌难以产生耐药性, 有望成为养殖产业新一代的抗菌药物。经研究证明, 抗菌肽作为新型的饲料添加剂, 在畜禽养殖中能够起到提高生产性能、增强免疫力、防治疾病、改善肠道健康等积极作用^[7,8]。同时, 研究表明抗菌肽还具有良好的预防和治疗水产疾病的效果^[9-11]。根据 Antimicrobial Peptide Database (APD3) (<https://aps.unmc.edu/>) 统计的数据, 截止到 2024 年 1 月已确定的抗菌肽数量有 3 940 种, 其中抗细菌肽有 3 588 种, 占比约 91%, 并在其制备、抗菌活性、作用机理研究等方面取得了巨大的进展^[12-14]。

Macins 是一类分泌型、带正电的抗菌肽, 它们的特征是含 8~12 个保守半胱氨酸, 最初在环节动物整嵌晶蛭 (*Theromyzon tessulatum*) 和水蛭 (*Hirudo medicinalis*) 中被鉴定, 后来在刺胞动物大乳头水螅 (*Hydra magnipapillata*)、软体动物三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 和紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 中被鉴定^[15,16], 且研究表明 Macins 对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性菌都能执行有效的防御活动^[16]。Mytimacin-4 的基因序列, 最初由 Lv 等根据 EST 序列从紫贻贝中测序得到, 并尝试将 Mytimacin-4 在大肠杆菌中进行表达, 表达产物主要以包涵体形式存在, 经过变性处理后, 经

Ni²⁺ 亲和层析纯化, 再经过复性后获得一定活性的 Mytimacin-4 重组肽, 最小抑菌浓度 (MIC) 结果表明重组 Mytimacin-4 肽对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌均有较强的抑菌活性^[17]。

Mytimacin-4 成熟肽富含二硫键, 由于大肠杆菌细胞质中含有二硫键还原酶, 利用大肠杆菌生产具有生物活性的重组二硫键蛋白充满挑战^[18]。近年来, 利用分子伴侣或引入二硫键从头形成体系, 使多二硫键蛋白在大肠杆菌中的表达成为可能^[19]。一般宿主细胞自身的分子伴侣含量或许无法满足新生肽链正确折叠的需求, 导致目标蛋白可溶性降低, 甚至形成包涵体, 共表达分子伴侣可能有效辅助二硫键蛋白折叠, 增加蛋白可溶性^[20,21]。据此, 本研究在上述学者对 mytimacin-4 基因进行克隆及其组织表达分析的基础上, 拟通过表达载体、表达宿主优化及共表达分子伴侣等策略获得 Mytimacin-4 的高表达菌株, 以期为贝类来源的抗菌肽产品的开发提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)、C43(DE3)、Rosetta2(DE3)、Rosetta-gami 2 (DE3) 和 SHuffle T7 感受态, 购买睿必特生物科技 (上海) 有限公司, 质粒 pET-28a(+) 和 pGEX-6P-1-H(RBS), 购自金斯瑞生物科技 (南京) 有限公司, pCold™ II DNA, 购买自生工生物工程 (上海) 有限公司, 分子伴侣系列质粒 pG-KJE8、pKJE7、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16, 购买自宝日医生物技术 (北京) 有限公司 (Takara)。副溶血弧菌为实验室筛选分离的野生菌株, 金黄色葡萄球菌 (BNCC 238481) 和大肠杆菌 (BNCC 269342), 购自商城北纳创联生物科技有限公司。本研究用菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用的质粒和菌株
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株 / 质粒	注释	来源
pET-28a-mytimacin-4-ori	Kan ^r , 衍生于 pET-28a, 过表达 <i>Mytilus galloprovincialis</i> 来源的 mytimacin-4	本研究构建
pET-28a-mytimacin-4-opt	Kan ^r , 衍生于 pET-28a, 过表达经大肠杆菌密码子优化的 mytimacin-4	本研究构建
pGEX-mytimacin-4-opt	Amp ^r , 衍生于 pGEX-6P-1-H(RBS), 过表达经大肠杆菌密码子优化的 mytimacin-4	本研究构建
pCold- mytimacin-4-opt	Amp ^r , 衍生于 pCold™ II DNA, 过表达经大肠杆菌密码子优化的 mytimacin-4	本研究构建
pG-KJE8	<i>Chl^I</i> , 表达伴侣蛋白: <i>dnaK-dnaJ-grpE</i> 和 <i>groES-groEL</i> , 诱导物: L-Arabinose 和 Tetracyclin	购自 Takara
pGro7	<i>Chl^I</i> , 表达伴侣蛋白: <i>groES-groEL</i> , 诱导物: L-Arabinose	购自 Takara
pKJE7	<i>Chl^I</i> , 表达伴侣蛋白: <i>dnaK-dnaJ-grpE</i> 诱导物: L-Arabinose	购自 Takara
pG-Tf2	<i>Chl^I</i> , 表达伴侣蛋白: <i>dnaK-dnaJ-tig</i> , 诱导物: Tetracyclin	购自 Takara
pTf16	<i>Chl^I</i> , 表达伴侣蛋白: <i>tig</i> , 诱导物: L-Arabinose	购自 Takara
DH5α	大肠杆菌克隆宿主	购自上海睿必特
BL21 (DE3)	大肠杆菌表达宿主, λDE3 溶原菌, 带有 T7 RNA 聚合酶, 可用于表达 T7 启动子控制的目的基因	购自上海睿必特
Rosseta-gami (DE3)	大肠杆菌表达宿主, 携带有 TrxB 和 Gor 基因突变, 可提高含二硫键正确折叠蛋白的高效表达	购自上海睿必特
Rosetta2 (DE3)	大肠杆菌表达宿主, 含有氯霉素抗性的 pRARE2 质粒, 可补充大肠杆菌缺乏的 7 种稀有密码子 (AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA 和 CGG) 对应的 tRNA, 提高外源基因的表达水平	购自上海睿必特
C43 (DE3)	大肠杆菌表达宿主, 起源于 BL21(DE3), 其优点是可以高效表达毒性蛋白或疏水性蛋白	购自上海睿必特
SHuffle T7	大肠杆菌表达宿主, 该菌株的染色体中整合了一个拷贝的二硫键异构酶 DsbC 基因, 可以促进含有二硫键蛋白的正确折叠; 同时该菌株可降低目的基因的本底表达, 适合于毒性基因的原核表达	购自上海睿必特
BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4	Kan ^r , pET-28a-mytimacin-4-opt	本研究构建
BL21(DE3)/pCold- mytimacin-4-	Amp ^r , pCold- mytimacin-4-opt	本研究构建
BL21(DE3)/ pGEX-mytimacin-4-	Amp ^r , pGEX-mytimacin-4-opt	本研究构建
Rosseta-gami(DE3)/pET-28a-mytimacin-4	Kan ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt	本研究构建
Rosseta2/pET-28a-mytimacin-4	Kan ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt	本研究构建
C43(DE3)/pET-28a-mytimacin-4	Kan ^r , pET-28a-mytimacin-4-opt	本研究构建
BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 /pG-KJE8	Amp ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt 和 pG-KJE8	本研究构建
BL21(DE3)/pG-KJE8	<i>Chl^I</i> , pG-KJE8	本研究构建
BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 /pKJE7	Kan ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt 和 pKJE7	本研究构建
BL21(DE3)/pKJE7	<i>Chl^I</i> , pKJE7	本研究构建
BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 /pGro7	Kan ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt 和 pGro7	本研究构建
BL21(DE3)/pGro7	Kan ^r , pGro7	本研究构建
BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 /pG-Tf2	Kan ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt 和 pG-Tf2	本研究构建
BL21(DE3)/pG-Tf2	<i>Chl^I</i> , pG-Tf2	本研究构建
BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 /pTf16	Kan ^r , <i>Chl^I</i> ; pET-28a-mytimacin-4-opt 和 pTf16	本研究构建
BL21(DE3)/pTf16	<i>Chl^I</i> , pTf16	本研究构建

1.1.2 主要生化试剂

蛋白胨和酵母提取物, 购买自英国 Oxoid 公司; 葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、咪唑、甘油和琼脂粉等试剂, 均购买自生工生物工程(上海)有限公司; 2×KOD FX, 购买自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 2×Utaq PCR Mix, 购买自北京庄盟国际生物公司; 即用型无缝克隆试剂盒, 购买自生工生物工程(上海)有限公司; PCR 产物微量回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒, 购买自天根生化科技(北京)有限公司, Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 购买自北京索莱宝科技有限公司。

LB 液体培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、氯化钠 10。

LB 固体培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、氯化钠 10、琼脂粉 20。

TB 培养基 (g/L): 蛋白胨 12、酵母粉 24、甘油 10、磷酸二氢钾 2.30、磷酸氢二钾 12.50。

Buffer A(pH 值 7.4): 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液、500 mmol/L 氯化钠、1 mmol/L DTT。

Buffer B(pH 值 7.4): 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液、500 mmol/L 氯化钠、1 mmol/L DTT、500 mmol/L 咪唑。

1.2 主要仪器设备

ProFlex™ Base 三槽独立基因扩增仪, 美国 Thermo 公司; DYY-6D 多用电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; GenoSens 2100 凝胶成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; NanoDrop1000 紫外可见分光光度计, 美国 Thermo 公司; 5804R 低温高速离心机、5810R 台式超速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; DHP-9051 微生物培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; SW-CJ-1FD-II 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; BSA224S-CW 分析天平, 美国梅特勒公司; ZQZY-88C 全温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; AKTApurifier™ 10 蛋白纯化系统, 美国 GE 公司。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物	DNA 序列 (5'-3')
mn4-ori-28a-S	GAAGGAGATATACCATGAATGTGATTGGTGATTGC
mn4-ori-28a-A	CTTTGTAGCAGCCGATTTAAAAACCGCACCACCATG
mn4-opt-28a-S	AAGAAGGAGATATACCATGAATGTAATAGGAGATTGTTGG
mn4-opt-28a-A	TTGTTAGCAGCCGATTTAAAAACCACACCACCAC
28a-S	ATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG
28a-A	CACATTCATGGTATATCTCCTTCTTAAAG
mn4-opt-pGEX-S	CAACTAGGAGGTATTTTCATGAATGTAATAGGAGATTGTTG
mn4-opt-pGEX-A	GTCAGTCAGTCACGATTTAAAAACCACACCACCACGGCTT
pGEX-H-S	ATCGTGACTGACTGACGATCT
pGEX-H-A	GAAATACCTCCTAGTTGTATAATTTTGCCG
mn4-opt-pCold-S	ATTAAGAGGTAATACACCATGAATGTAATAGGAGATTGTTGG
mn4-opt-pCold-A	GCTTTTAAGCAGAGATTACTTAAAAACCACACCACCACGG
pCold-A	GGTGTATTACCTCTTAATAATTAAGTGTGCC
pCold-S	GTAATCTCTGCTTAAAAGCACAG
PET-JD-A	CTAAAGGGAGCCCCGATTAGA
PET-JD-S	ACGCCGAAACAAGCGCTCATGA
pGEX-JD-S	TGCATAATTCGTGCTGCTCAAG
pGEX-JD-A	CAAGAATTATACACTCCGCTATCG
pCold-JD-S	GTCCGGGATCTCGACGCTCTC
pCold-JD-A	ATGTGTCAGAGGTTTTACCCGT

1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建

根据文献报道,参考 GenBank 数据库中的序列 JN935273,全基因合成原始基因序列 mytimacin-4-ori 和根据大肠杆菌密码子优化的序列 mytimacin-4-opt。分别以合成的 mytimacin-4-ori 和 mytimacin-4-opt 基因序列为模板,以 mn4-ori-28a-S/mn4-ori-28a-A、mn4-opt-28a-S/mn4-opt-28a-A 为引物分别扩增上下游含载体同源片段的 mn-4-ori-28a 和 mn-4-opt-28a 抗菌肽基因片段,以实验室保存的 pET-28a 质粒为模板,以 28a-S/28a-A 为引物扩增 pET-28a 线性载体片段,引物序列如表 2 所示。接着通过 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因和载体片段,然后通过即用型无缝克隆试剂盒将 mn-4-ori-28a 和 mn-4-opt-28a DNA 片段分别克隆到 pET-28a 质粒上并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中进行大量复制。重组成功的 pET-28a-mytimacin-4-ori 和 pET-28a-mytimacin-4-opt 质粒委托上海生工生物进行测序。用同样的方法,以 pET-28a-mytimacin-4-opt 质粒为模板,分别以 mn4-opt-pGEX-S/mn4-e-opt-pGEX-A、mn4-opt-pCold-S/mn4-e-opt-pCold-A 为引物分别获得上下游含 pGEX-6P-1-H(RBS) 和 pCold™ II DNA 载体同源片段的 mn4-opt-pGEX 和 mn4-opt-pCold 基因片段,以 pGEX-6P-1-H(RBS) 及 pCold™ II DNA 载体为模板,分别以 pGEX-H-S/pGEX-H-A 和 pCold-S/pCold-A 为引物获得 pGEX-6P-1-H(RBS) 和 pCold™ II DNA 线性载体片段,接着利用同源重组将 mn4-opt-pGEX DNA 片段克隆到 pGEX-6P-1-H(RBS) 质粒上,将 mn4-opt-pCold 片段克隆到 pCold™ II DNA 质粒上。重组成功的 pGEX-mytimacin-4-opt 和 pCold-mytimacin-4-opt 质粒委托上海生工生物进行测序。

1.3.2 重组肽的诱导表达

将测序成功的 pET-28a-mytimacin-4-ori 和 pET-28a-mytimacin-4-opt 分别转入 BL21(DE3) 感受态细胞中,通过卡那霉素筛选阳性克隆,挑取单菌落于 LB 液体培养基中过夜培养,接着按 1% (体积分数) 接种量转接到 50 mL LB 液体培养基中,于 37 °C, 200 r/min 继续培养,在菌体 OD₆₀₀ 值约为 0.6~0.9 时加入 0.5 mmol/L 的 IPTG,然后在 16 °C, 180 r/min 条件下诱导 16~20 h。BL21(DE3)/pGEX-mytimacin-4-opt 诱导表达条件与上述相同, BL21(DE3)/pCold-mytimacin-4-opt 诱导温度为 15 °C,在进行低温

诱导前用冰水快速将温度降低并于 15 °C 培养箱放置 30 min 以后再加入 IPTG 继续培养 24 h,其它发酵条件与上述相同。含不同组合分子伴侣质粒 pG-KJE8、pKJE7、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16 的 BL21(DE3) 和 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 重组菌株分别通过氯霉素及卡那霉素和氯霉素双抗性筛选阳性克隆子。然后挑取阳性克隆子于 LB 液体培养基中过夜培养,在转接发酵培养基时加入 0.5 mg/mL L-Arabinose 以及 (或者) 5 ng/mL Tetracyclin,培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.9 范围再加入 0.5 mmol/L IPTG,接着在 16 °C, 180 r/min 条件下诱导 16~20 h。发酵结束后,于 8 000 r/min、5 min 离心条件下收集菌体沉淀,加入 Buffer A (pH 值 7.4) 清洗两遍菌体后再加入 10 mL Buffer A 缓冲液进行超声破碎,超声破碎条件为: 30% 功率,超声 3 s,间歇 3 s,超声时间约为 20 min。超声结束后,在 12 000 r/min、5 min 的离心条件下分离破碎上清液和沉淀,然后将破碎上清液和沉淀进行 Tricine-SDS-PAGE 并分析 Mytimacin-4 表达情况。

1.3.3 重组肽在摇瓶发酵水平的条件优化

针对上述获得的重组菌株 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8、BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pGro7 和 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-Tf2 重组菌株,在摇瓶水平进行发酵参数的优化,具体包括以下操作步骤:

(1) 培养基的优化:控制其他条件不变,将发酵培养基更换成 TB 液体培养基 (蛋白胨 12 g/L,甘油 4 mL/L,酵母提取物 24 g/L,磷酸二氢钾 23.1 g/L,磷酸氢二钾 125.4 g/L)^[22,23]。

(2) 诱导剂浓度的优化:控制其他条件不变,优化 IPTG (0.1~1 mmol/L)、L-Arabinose (0.5~4 mg/mL) 以及 Tetracyclin (1~10 ng/mL) 的浓度。

(3) 诱导剂添加时间的优化:控制其他条件不变,分别在转接时或菌体 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.9 时加入 1 mg/mL L-Arabinose 以及 (或者) 0.5 ng/mL Tetracyclin。

1.3.4 重组肽的纯化

重组菌株 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 诱导发酵后,在 8 000 r/min、5 min 离心条件下收集 200 mL 发酵液的菌体沉淀,加入 20 mL Buffer A (pH 值 7.4) 缓冲液清洗两遍菌体后再加入 20 mL PBS 缓冲液进行超声破碎,超声破碎条件为: 30% 功率,超声 3 s,间歇 3 s,超声时间约

为 30 min。超声结束后,在 4 ℃、10 000 r/min、30 min 的离心条件下分离破碎上清液和沉淀,收集破碎上清液并通过 0.22 μm 滤膜过滤后置于冰上备用。通过 AKTApurifier™ 10 蛋白纯化系统进行 Ni²⁺ 亲和层析,具体步骤为:1) 清洗及管道准备,开机设定程序,进行系统管道清洗;2) 安装 Ni²⁺ 亲和层析树脂层析柱;3) 使用 5 个体积的 PBS 冲洗柱子,等待柱子平衡好,用泵上样,流速为 1 mL/min;4) 分别用含 50、100、150、300 和 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱样品,收集 150、300、500 mmol/L 咪唑洗脱下的样品;5) 清洗系统及卸下层析柱。最后通过 Tricine-SDS-PAGE 分析 Mytimacin-4 的洗脱和纯化效率。

1.3.5 重组肽的抑菌活性评价

挑取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和副溶血弧菌单菌落,接种于 LB 液体培养基中过夜培养,接着按 4% (体积分数) 接种量二次培养 4~5 h。分别配制琼脂含量 2% (质量分数) 和 0.5% (质量分数) LB 固体和半固体培养基,每个平板中先倒入体积约为 10 mL 的 LB 固体培养基,置于超净台中晾干,然后将菌液稀释至 10⁶,按 10% (体积分数) 接种量接种到温度小于 50 ℃ 的 LB 半固体培养基中,充分混匀后再倒取 5 mL 左右在晾干的 LB 固体培养基上,自然凝固。将透析-浓缩后的重组肽 Mytimacin-4 样品振荡混匀后,用移液枪吸取 100 μL 样品,加入对应标记的牛津杯中,平板置于 4 ℃ 预渗透 1.5~2 h,最后转入 30 ℃ 培养箱中过夜培养。

1.3.6 数据分析

所有试验均设置 3 个平行,通过 Image J 对 Tricine-SDS-PAGE 灰度分析定量蛋白浓度,所有图表均用 PowerPoint 进行处理加工。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的构建

首先通过全基因合成获得经密码子优化的 mytimacin-4-opt 和原始 mytimacin-4-ori 成熟肽的基因序列,按照上述 1.3.1 的方法进行抗菌肽基因片段和线性载体片段的扩增及重组,然后将 mn-4-ori-28a 和 pET-28a、mn-4-opt-28a 和 pET-28a、mn-4-opt-pGEX 和 pGEX-6P-1-H(RBS) 及 mn4-opt-pCold 和 pCold™ II DNA 的重组体系分别转化到大肠杆

菌 DH5α 感受态中,通过抗性平板初筛后进行菌落 PCR 鉴定。用对应的 pET-JD-S/pET-JD-A、pGEX-JD-S/pGEX-JD-A 和 pCold-JD-S/pCold-JD-A 鉴定引物对重组菌株进行鉴定,成功扩增出对应大小的阳性目的条带,其中 DH5α/pET-28a-mytimacin-4-ori 和 DH5α/pET-28a-mytimacin-4-opt 阳性克隆子的条带大小为 788 bp, DH5α/pGEX-mytimacin-4-opt 阳性克隆子的目的条带大小为 620 bp, DH5α/pCold-mytimacin-4-opt 阳性克隆子的目的条带大小为 775 bp (图 1)。接着对重组菌株进行质粒的提取及测序确认,测序成功后获得 pET-28a-mytimacin-4-ori、pET-28a-mytimacin-4-opt、pGEX-mytimacin-4-opt 和 pCold-mytimacin-4-opt 表达质粒。

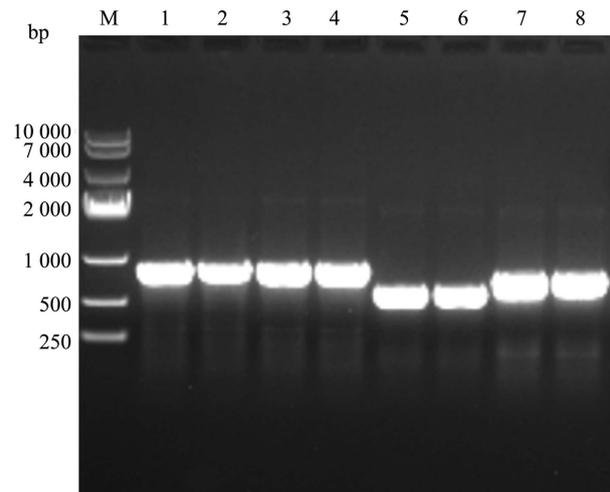


图 1 大肠杆菌 DH5α 重组菌株的菌落 PCR 鉴定电泳图

Fig.1 PCR colony identification of the recombinant strain

E. coli DH5α

注: M: DNA 分子质量标准; 1、2: DH5α/pET-28a-mytimacin-4-ori; 3、4: DH5α/pET-28a-mytimacin-4-opt; 5、6: DH5α/pGEX-mytimacin-4-opt; 7、8: DH5α/pCold-mytimacin-4-opt。

2.2 Mytimacin-4 在大肠杆菌中的表达

为了确定 Mytimacin-4 在大肠杆菌中的表达情况,首先以大肠杆菌常用表达载体 pET-28a 和表达宿主 BL21(DE3) 构建两株 Mytimacin-4 表达菌株 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4-ori 和 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4-opt。Mytimacin-4 成熟肽的理论蛋白分子量为 9.0 ku,重组菌株低温诱导发酵后,通过 Tricine-SDS-PAGE 分析 Mytimacin-4 的表达情况。实验结果表明,Mytimacin-4 在大肠杆菌中主要以包涵体的形式存在(图 2,泳道 7 和 8),密码

子优化后的 Mytimacin-4-opt 也没有改善其的可溶性表达 (图 2, 泳道 5 和 6)。

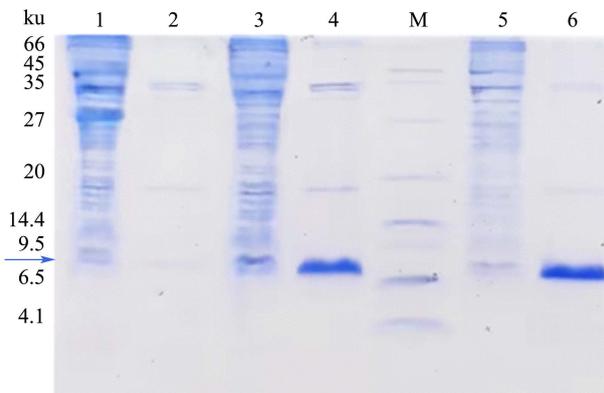


图 2 不同表达载体表达 Mytimacin-4 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.2 Tricine-SDS-PAGE analysis of different expression vectors expressing Mytimacin-4

注: M: 小分子蛋白质分子质量标准; 1: BL21(DE3)/pGEX-mytimacin-4-opt 破碎上清; 2: BL21(DE3)/pGEX-mytimacin-4-opt 破碎沉淀; 3: BL21(DE3)/pCold-mytimacin-4-opt 破碎上清; 4: BL21(DE3)/pCold-mytimacin-4-opt 破碎沉淀; 5: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4-opt 破碎上清; 6: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4-opt 破碎沉淀; 7: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4-ori 破碎上清; 8: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4-ori 破碎沉淀。

不同表达载体含有不同的启动子、终止子和拷贝数影响着重组肽合成过程中的稳定性及生产率。接着选择 pGEX-6P-1-H(RBS) 和 pCold™ II DNA 作为 Mytimacin-4 的表达载体。Tricine-SDS-PAGE 结果表明, pGEX-mytimacin-4 未实现 Mytimacin-4 在大肠杆菌中的表达 (图 2, 泳道 1 和 2), 说明 pGEX-6P-1-H(RBS) 可能不适用于 Mytimacin-4 的表达; 低温诱导型的 pCold-mytimacin-4-opt 也没有明显改善 Mytimacin-4 的可溶性表达 (图 2, 泳道 3 和 4)。随后选择密码子优化后的 mytimacin-4-opt 基因序列作为后续研究的基因材料, 选择 pET-28a 作为后续研究的表达载体。

2.3 Mytimacin-4 表达宿主的优化

选择合适的宿主是提高蛋白/肽表达效率的关键, 大肠杆菌有很多改良的表达宿主可用, 一些菌株经过修饰后可以提高重组蛋白的表达。将 pET-28a-mytimacin-4 分别转入 Rosseta-gami(DE3)、Rosetta2(DE3) 和 C43(DE3) 表达宿主中, 验证表达宿主对 Mytimacin-4 表达的影响。实验结果表明,

不同宿主的生长状态和发酵结束后的细胞密度各不相同, 其中 Rosseta-gami(DE3)、Rosetta2(DE3) 生长较慢, OD_{600} 只有 1.5 左右, C43(DE3) OD_{600} 可达 5.6 左右, 但是都未能明显改善 mytimacin-4 的可溶性表达 (图 3)。综合考虑 (C43(DE3) 的 OD_{600} 虽然高于 BL21(DE3), 但是总的 mytimacin-4 的表达量低于 BL21(DE3)), 选择 BL21(DE3) 作为后续研究的表达宿主。

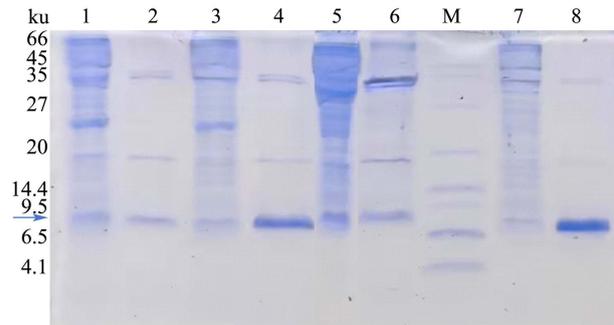


图 3 不同表达宿主表达 Mytimacin-4 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE analysis of different expression hosts expressing Mytimacin-4

注: M: 小分子蛋白质分子质量标准; 1: Rosseta-gami(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎上清; 2: Rosseta-gami(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎沉淀; 3: Rosseta2(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎上清; 4: Rosseta2(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎沉淀; 5: C43(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎上清; 6: C43(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎沉淀; 7: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎上清; 8: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎沉淀。

2.4 伴侣蛋白对 Mytimacin-4 表达的优化

根据文献调研, 不同伴侣蛋白在辅助蛋白折叠过程中扮演不同的角色, 不同伴侣蛋白协同作用可以进一步提高目的蛋白的正确折叠效率。目前常用的分子伴侣有 *dnaK-dnaJ-grpE*、*groES-groEL*、*groES-groEL-tig* 和 *tig*, 将含以上不同组合分子伴侣质粒 pG-KJE8、pKJE7、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16 分别转化到 BL21(DE3) 和 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 中, 并分别通过氯霉素及卡那霉素和氯霉素双抗性筛选阳性克隆。Tricine-SDS-PAGE 结果表明共表达分子伴侣质粒的 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 菌株目的蛋白表达情况各有不同。其中共表达 pG-KJE8、pGro7 和 pG-Tf2 明显增加了 Mytimacin-4 的可溶性表达 (图 4)。

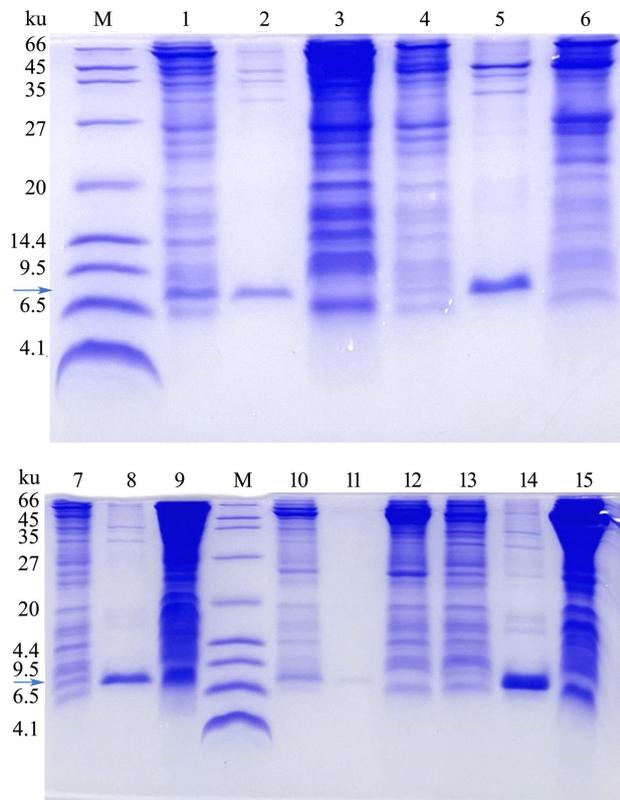


图4 Mytimacin-4 和含不同组合分子伴侣质粒共表达的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.4 Tricine-SDS-PAGE analysis of co-expression of Mytimacin-4 and plasmids containing different combinations of molecular chaperones

注: M: 小分子蛋白质分子质量标准; 1: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 破碎上清; 2: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 破碎沉淀; 3: BL21(DE3)/pG-KJE8 破碎上清; 4: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pKJE7 破碎上清; 5: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pKJE7 破碎沉淀; 6: BL21(DE3)/pKJE7 破碎上清; 7: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pGro7 破碎上清; 8: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pGro7 破碎沉淀; 9: BL21(DE3)/pGro7 破碎上清; 10: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-Tf2 破碎上清; 11: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-Tf2 破碎沉淀; 12: BL21(DE3)/pG-Tf2 破碎上清; 13: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pTf16 破碎上清; 14: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pTf16 破碎沉淀; 15: BL21(DE3)/pTf16 破碎上清。

2.5 高效表达Mytimacin-4重组菌株的摇瓶发酵条件的优化

为了提升 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8、BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pGro7 和 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-Tf2 重组菌

株在摇瓶水平的 Mytimacin-4 表达产量。针对上述获得的重组菌株, 对其发酵参数进行了优化, 具体包括对培养基、诱导剂浓度和诱导剂添加时间的优化。实验结果表明, 当发酵培养基为 TB 培养基, 在转接时同时加入 1 mg/mL L-Arabinose 以及 (或者) 5 ng/μL Tetracyclin, 继续培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.9 范围再加入 0.5 mmol/L IPTG, 然后在 16 °C, 180 r/min 条件下诱导 16~20 h 可获得较高可溶性表达量的 Mytimacin-4 重组肽, 其中共表达伴侣蛋白 dnaK-dnaJ-grpE 和 groES-groEL 的重组菌株 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 的可溶性表达量最高, 产量可达 200 mg/L (图 5)。

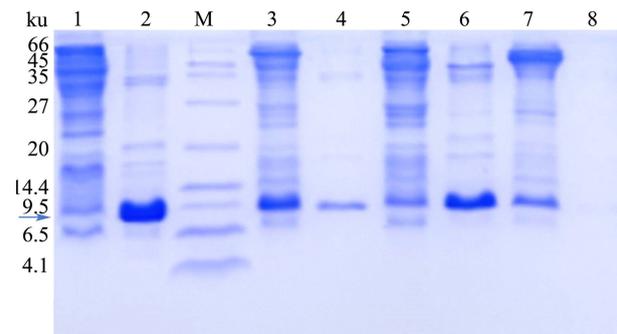


图5 发酵条件优化后的高表达 Mytimacin-4 重组菌株的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.5 Tricine-SDS-PAGE analysis of highly expressed Mytimacin-4 recombinant strain with optimized fermentation conditions

注: M: 小分子蛋白质分子质量标准; 1: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎上清; 2: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4 破碎沉淀; 3: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 破碎上清; 4: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 破碎沉淀; 5: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pGro7 破碎上清; 6: BL21(DE3)/pGro7 破碎上清; 7: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-Tf2 破碎上清; 8: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-Tf2 破碎沉淀。

2.6 重组肽Mytimacin-4的纯化

由于 Mytimacin-4 肽的 C 端含 6HIS 标签, 因此可通过 Ni²⁺ 亲和层析树脂对其进行纯化, 然后通过 Tricine-SDS-PAGE 分析 Mytimacin-4 的洗脱和纯化效率。实验结果表明, 在咪唑浓度为 150~500 mmol/L 的洗脱条件下可将 Mytimacin-4 肽洗脱下来, 其中 150 mmol/L 和 300 mmol/L 咪唑浓度下洗脱得到的样品含有其他杂带, 而在 500 mmol/L 咪唑浓度洗脱条件下可获得较纯的得 Mytimacin-4 肽 (图 6)。

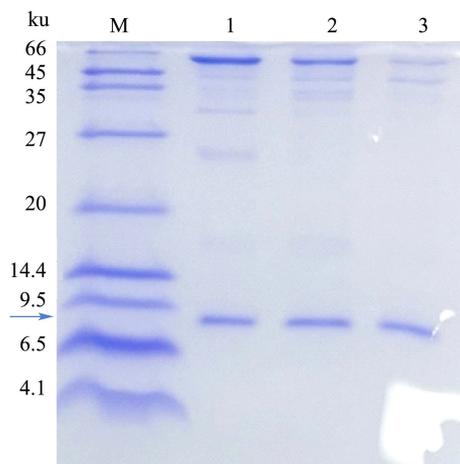


图6 纯化后的重组肽 Mytimacin-4 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.6 Tricine-SDS-PAGE analysis of purified recombinant peptide Mytimacin-4

注: M: 小分子蛋白质分子质量标准; 1: 洗脱缓冲液中咪唑浓度为 150 mmol/L 的纯化产物; 2: 洗脱缓冲液中咪唑浓度为 300 mmol/L 的纯化产物; 3: 洗脱缓冲液中咪唑浓度为 500 mmol/L 的纯化产物。

2.7 重组肽 Mytimacin-4 的抑菌活性评价

参照 1.3.5 的方法, 对重组肽 Mytimacin-4 的抑菌活性进行评价。实验结果表明, Mytimacin-4 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和副溶血弧菌均有抑菌活性, 从抑菌圈的大小可以看出 Mytimacin-4 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性高于副溶血弧菌和大肠杆菌 (图 7)。

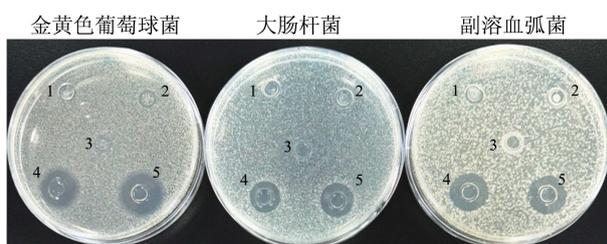


图7 重组肽 Mytimacin-4 的牛津杯抑菌实验分析

Fig.7 Analysis of recombinant peptide Mytimacin-4 in Oxford cup inhibition assay

注: 标记 1: 含 50 mmol/L 咪唑的 PBS 对应的抑菌圈; 标记 2: 含 100 mmol/L 咪唑的 PBS 对应的抑菌圈; 3: 空白对照 PBS 对应的抑菌圈; 标记 4 和 5: Mytimacin-4 样品对应的抑菌圈。

2.8 SHuffle T7/pET-28a-mytimacin-4 重组菌株的构建及 Mytimacin-4 的表达

为了考察本研究提供的方法在提高 Mytimacin-4 可溶性表达方面的优越性, 进一步选择工程菌株

SHuffle T7 作为表达宿主进行比较。SHuffle T7 的染色体中整合了一个拷贝的二硫键异构酶 DsbC 基因, 可以促进含有二硫键蛋白的正确折叠; 此外 DsbC 还是一个分子伴侣, 可以帮助不含二硫键蛋白正确折叠, 形成正确构象, 同时该菌株可降低目的基因的本底表达, 适合于毒性基因的原核表达。SHuffle T7 菌株染色体中整合了一个拷贝的 T7 RNA 聚合酶基因, 可以表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶, 适合于 T7 启动子诱导的蛋白表达。

基于 SHuffle T7 的优势, 将上述构建的 pET-28a-mytimacin-4 重组质粒转入到 SHuffle T7 中, 然后在同样条件下进行诱导表达。实验结果表明, 和 BL21(DE3) 作为表达宿主 (图 2) 相比, SHuffle T7 作为表达宿主, 虽然在一定程度上提高了 Mytimacin-4 的可溶性表达, 但仍满足不了后续纯化需求, 且菌体生长较缓慢, 达到诱导前 OD₆₀₀, 相比 BL21(DE3) 需要多 1 h 左右。而本研究优化后的 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 重组菌株重新发酵后, Mytimacin-4 的可溶性表达量最大可以达到 400 mg/L, 是 SHuffle T7/pET-28a-mytimacin-4 (50 mg/mL) 的 8 倍 (图 8), 说明本研究提供的 Mytimacin-4 高表达重组菌株的构建方法具有很大优势。

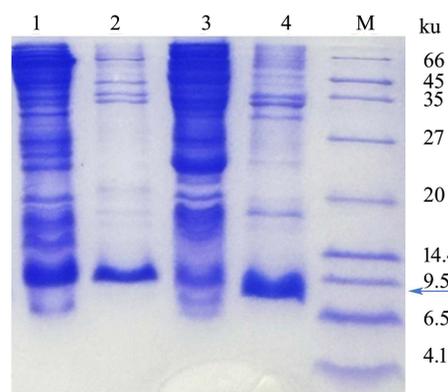


图8 SHuffle T7 中 Mytimacin-4 的表达情况分析

Fig.8 Analysis of Mytimacin-4 expression in SHuffle T7

注: M: 小分子蛋白质分子质量标准; 1: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 破碎上清; 2: BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8 破碎沉淀; 3: SHuffle T7/pET-28a-mytimacin-4 破碎上清; 4: SHuffle T7/pET-28a-mytimacin-4 破碎沉淀。

3 结论

本研究以 Mytimacin-4 为研究对象, 通过对其表达载体和表达宿主进行选择, 确定了其最适表达

载体为 pET-28a, 最适表达宿主为 BL21(DE3)。然而, 通过更换表达载体和表达宿主对 Mytimacin-4 可溶性表达的改善很有限, 接着我们将含不同组合分子伴侣的质粒分别和 pET-28a-mytimacin-4 共转化到大肠杆菌 BL21(DE3), 在摇瓶发酵参数优化后, 得到一株可以高效生产 Mytimacin-4 的大肠杆菌重组菌株 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8, 可溶性 Mytimacin-4 重组产量可达 200~400 mg/mL。最后对其抑菌效果进行评价, 结果表明, 本研究获得的重组抗菌肽 Mytimacin-4 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和实验室筛选的副溶血性弧菌具有较强的抑制活性。为了突出本研究提供的方法在提高 Mytimacin-4 可溶性表达方面的优越性, 本实验选择了含二硫键从头合成途径的工程菌株 SHuffle T7 *E.coli* 作为表达宿主进行比较。结果表明, 重组菌株 SHuffle T7/pET-28a-mytimacin-4 仅获得 50 mg/L 的 Mytimacin-4 可溶性表达量, 远低于本研究构建的 BL21(DE3)/pET-28a-mytimacin-4/pG-KJE8, 说明共表达不同分子伴侣蛋白的策略对获得 Mytimacins 家族抗菌肽的高产菌株具有很大优势。总的来说, 本研究构建的 Mytimacin-4 高表达菌株为其在兽药和水产饲料领域的应用提供了技术支撑, 同时本研究涉及的表达优化策略也为其他抗菌肽在大肠杆菌中的生物合成提供了参考。

参考文献

- [1] ROSSOLINI G M, ARENA F, PECILE P, et al. Update on the antibiotic resistance crisis [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, 18: 56-60.
- [2] XIONG W, SUN Y, ZENG Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(19): 18377-18384.
- [3] CHUNG C R, JHONG J H, WANG Z, et al. Characterization and identification of natural antimicrobial peptides on different organisms [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 986
- [4] LOO K Y, LETCHUMANAN V, LAW J W F, et al. Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2590-2608.
- [5] WANG S, ZENG X, YANG Q, et al. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 603.
- [6] LEE J-K, LUCHIAN T, PARK Y. New antimicrobial peptide kills drug-resistant pathogens without detectable resistance [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(21): 15616.
- [7] SILVEIRA R F, ROQUE-BORDA C A, VICENTE E F. Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview [J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(3): 896-904.
- [8] PATYRA E, KWIAŁTEK K. Insect meals and insect antimicrobial peptides as an alternative for antibiotics and growth promoters in livestock production [J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(6): 854
- [9] BHAT R A H, KHANGEMBAM V C, PANT V, et al. Antibacterial potential of a de-novo designed peptide against bacterial fish pathogens [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2023, 29(5): 85.
- [10] LV X, LI S, YU Y, et al. Crustin defense against *Vibrio parahaemolyticus* infection by regulating intestinal microbial balance in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(2): 130.
- [11] NAIEL M A, GHAZANFAR S, NEGM S S, et al. Applications of antimicrobial peptides (AMPs) as an alternative to antibiotic use in aquaculture-A mini-review [J]. *Annals of Animal Science*, 2023, 23(3): 691-701.
- [12] WANG G, LI X, WANG Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D1087-D93.
- [13] WIBOWO D, ZHAO C X. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 659-671.
- [14] ZHANG W, XU X, ZHANG J, et al. Discovery and characterization of a New Crustin antimicrobial peptide from *Amphibalanus amphitrite* [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 413.
- [15] ZHONG J, WANG W, YANG X, et al. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica* [J]. *Peptides*, 2013, 39: 1-5.
- [16] GERDOL M, VENIER P. An updated molecular basis for mussel immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 17-38.
- [17] LV J, ZHAO J, YANG D, et al. Tissue distribution and functional characterization of mytimacin-4 in *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 166: 107215.
- [18] DEO S, TURTON K L, KAINTH T, et al. Strategies for improving antimicrobial peptide production [J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 59: 107968.
- [19] 王彦婷, 黄智刚, 郭西英, 等. 多二硫键蛋白在大肠杆菌中的表达研究 [J]. *生命科学研究*, 2015, 19(3): 258-264.
- [20] CHEN Y, SONG J, SUI S F, et al. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 32(2): 221-31.
- [21] KYRATSOS C A, PANAGIOTIDIS C A. Heat-shock protein fusion vectors for improved expression of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *Recombinant Gene Expression*, 2012, 824: 109-129.
- [22] 陈咪咪. 代谢工程改造大肠杆菌合成 MLM 型结构脂 [D]. 北京: 北京化工大学, 2023.
- [23] 李英, 刘伟, 朱丽英, 等. 丝状自组装蛋白支架介导的双酶级联催化体系构建促进 D-塔格糖合成 [J]. *现代食品科技*, 2023, 39(11): 48-57.