

人源抗菌肽 LL-37 表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达

陆建荣^{1*}, 王惠民², 吴 萍¹, 黄松平¹, 常秋月³, 凌勇武¹, 倪晓蓉¹

(1. 南通市第三人民医院感染病实验室, 南通 226006; 2. 南通大学附属医院检验科, 南通 226001; 3. 南通市中心血站, 南通 226006)

[摘要] **目的:**构建人源抗菌肽 LL-37 的表达载体 pPIC9-LL-37, 将其转化毕赤酵母 GS115, 诱导 LL-37 表达。**方法:**根据抗菌肽 LL-37 氨基酸序列及毕赤酵母偏爱密码子, 应用互补延伸 PCR 技术扩增抗菌肽 LL-37 基因, 定向克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9 上, 转化 *E. coli* DH5 α , 构建重组分泌型酵母表达载体 pPIC9-LL-37, PCR 鉴定并测序; 原生质球法转化毕赤酵母 GS115, PCR 扩增鉴定; 甲醇诱导 LL-37 表达, 筛选最高表达株, 检测表达产物对大肠杆菌的抑菌活性, 并对其进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹分析。**结果:**pPIC9-LL-37 载体构建成功; 转化毕赤酵母后 PCR 鉴定出 LL-37 基因; 0.5% 甲醇能诱导 LL-37 高表达, 筛选出最高表达株, 发酵上清约含 LL-37 0.5 μ g/ml, 对 *E. coli* 具有较强的抑菌活性, 电泳及 Western 印迹分析证实表达产物为 LL-37。**结论:**成功构建 pPIC9-LL-37 载体, 转化毕赤酵母后, 经甲醇诱导能高表达分泌 LL-37, 表达的 LL-37 蛋白具有较强的抑菌活性。

[关键词] LL-37; 毕赤酵母; 遗传载体; 基因表达

[中图分类号] Q 78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0833-05

Construction of human antimicrobial peptide LL-37 vector and its expression in *Pichia pastoris*

LU Jian-rong^{1*}, WANG Hui-min², WU Ping¹, HUANG Song-ping¹, CHANG Qiu-yue³, LING Yong-wu¹, NI Xiao-rong¹

(1. Lab of Infectious Diseases, The Third Hospital of Nantong, Nantong 226006, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; 3. Nantong Blood Center, Nantong 226006)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a eukaryotic expression vector of human antimicrobial peptide LL-37 (pPIC9-LL-37) and to express it in *P. pastoris*. **Methods:** The full-length gene encoding antimicrobial peptide LL-37 was synthesized by overlap extension-PCR method using the sequence of LL-37 and *P. pastoris* biased codon. The full-length gene was cloned into pPIC9 vector and the product was transformed into *E. coli* DH5 α to construct expression vector pPIC9-LL-37. After identification by PCR and sequencing, pPIC9-LL-37 was used to transfect *P. pastoris*. The expression of LL-37 was induced by methanol and the highest expressing strain was screened. The concentrated fermentation product was analyzed by Tricine-SDS-PAGE and Western-blot, and the antibacterial activity of the expression product on *E. coli* DH5 α was tested. **Results:** The eukaryotic expression vector pPIC9-LL-37 was successfully constructed. The fusion of LL-37 gene into *P. pastoris* was confirmed by PCR. High expression of LL-37 was expressed by 0.5% methanol and the highest expressing strain was screened out. The fermentation supernatant contained 0.5 μ g/ml LL-37 and had strong antibacterial activity against *E. coli*. Tricine-SDS-PAGE and Western-blot analysis confirmed that the product was LL-37. **Conclusion:** We have successfully constructed pPIC9-LL-37 for transfecting *P. pastoris*. Methanol can induce the high expression of LL-37 and the expressed LL-37 has strong antimicrobial activity.

[KEY WORDS] LL-37; *Pichia*; genetic vectors; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 833-837]

LL-37 是目前人体内发现的唯一的 cathelicidins 家族抗菌肽^[1]。LL-37 的前体 hCAP-18 (human cathelicidin antimicrobial peptide with a molecular size 18 kD) 的 N 端为 100 个氨基酸左右的保守性序列, 即所谓 cathelin 结构, C 端则为其活性部位^[2]。在外来刺激(感染、外伤等)作用下, hCAP-18 被释放到胞外, 在蛋白酶的作用下水解第 103 与 104 位氨基酸(Ala 与 Leu)间的肽键, 脱去 N 端的保守片段, 成为 37 个氨基酸的成熟多肽, 因其 N 端为两个亮氨酸(L)残基, 故命名为 LL-37。LL-37 主要表达于某些骨髓源性细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴

细胞等)、角质形成细胞、组织上皮细胞及某些腺体等易于与微生物发生接触的部位^[3]。作为天然免疫的重要成分, LL-37 在机体遭受外来微生物侵袭时能与其他抗菌肽一起提供迅速有效的第一线防御。

随着新传染病和多药耐药性病原体不断产生, 免疫力低下人群持续增多, 开发新型抗感染药物和

[基金项目] 江苏省南通市科学技术委员会资助项目(No. S40032). Supported by the Project of Science and Technology Committee of Nantong, Jiangsu Province(No. S40032).

[作者简介] 陆建荣, 副主任技师。

* Corresponding author. E-mail: ljrntsy@yahoo.com.cn

新的治疗策略已引起广泛关注。LL-37 具有抗菌活性高,抗菌谱广,靶菌株不易产生抗性等特点,基因工程生产 LL-37 具有诱人的前景。治疗性蛋白药物能否进入临床试验乃至进入医药市场,其关键在于寻求合适的蛋白表达系统,用量较大或需长期使用的更是如此。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*, *P. pastoris*)具有表达率高、产物可分泌、背景蛋白少易于纯化、可高密度发酵等优点^[4-6],适合外源蛋白的表达。本实验室将 LL-37 基因构建到穿梭质粒 pPIC9 上,将其在 *P. pastoris* 中进行异源表达,并对其生物活性进行检测。

1 材料和方法

1.1 菌株与试剂 克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本室保存,Original *Pichia* Expression Kit 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I、*Bgl* II 及 Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Wizard Genomic DNA Purification Kit 购自 Promega 公司,消解酶 Lyticase 购自 Sigma 公司,山羊抗人 LL37 购自 Santa Cruz 公司,LL-37 标准品购自 Hycult biotechnology 公司,酵母培养基 YNB 和 Casamino acid 为 Difco 公司产品,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 单链 DNA 及引物合成 根据 LL-37 氨基酸序列及毕赤酵母基因翻译的偏爱密码子^[7-8]合成两条单链 DNA 及引物。LL1: 5'-CTC TCG AGA AGA GAG AGG CTG AGG CTT TGT TGG GTG ACT TCT TCA GAA AGT CCA AGG AGA AGA TCG GTA AGG AG-3'; LL2: 5'-GGG AAT TCC TAG GAC TCA GTT CTT GGA ACC AAG TTT CTC AAG AAG TCC TTG ATT CTT TGA ACG ATT CTC TGA ACT CCT TAC CGA TCT TCT CCT-3'。LL1 与 LL2 的 3'端有 20 bp 的互补序列。引物 P1: 5'-CTC TCG AGA AGA GAG AGG C-3', P2: 5'-GGG AAT TCC TAG GAC TCA GTT C-3',由上海英骏生物公司合成。根据 pPIC9 的特点,在 PCR 扩增过程中,在 LL1 5'端引入 *Xho* I 及 *KeX*₂ 酶切位点,并重新构建了谷氨酸-丙氨酸(Glu-Ala)间隔区(diamino peptidase 识别位点),在 LL2 5'端加上 TAG 终止密码子和 *Eco*R I 酶切位点。

1.3 LL-37 基因的扩增和 pPIC9-LL-37 重组载体的构建

1.3.1 LL-37 基因的扩增 取 LL1、LL2 各 50 pmol 混合,反应体系: Pfu 2 U, 1 $\times$ PCR Buffer, 200 μ mol/L dNTPs, 反应体积 50 μ l, 94 $^{\circ}$ C 3 min, 58 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 互为模板形成双链。然后取双链

DNA 的千分之一稀释物 2 μ l 为模板,进行 PCR 扩增,体系为: P1、P2 各 50 pmol, Pfu 2 U, 1 $\times$ PCR Buffer, 200 μ mol/L dNTPs, 体积 50 μ l, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min; 55 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min 35 循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。合并 3 管 PCR 产物乙醇沉淀,溶于 20 μ l TE, 1% 琼脂糖电泳后,华舜胶回收试剂盒回收,获得 LL-37 双链基因。

1.3.2 pPIC9-LL-37 重组质粒的构建与鉴定 LL-37 双链基因与载体 pPIC9 以 *Xho* I、*Eco*R I 酶切,分别电泳回收后进行连接反应,连接反应体系: 4 ng 双酶切 PCR 产物, 200 ng 双酶切 pPIC9 载体, 1 $\times$ ligase Buffer, 1 μ l T4 DNA 连接酶, 体积 20 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α 细胞,涂布于 37 $^{\circ}$ C 预热的含 100 μ g/ml 氨苄西林的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑选转化子接种于含 60 μ g/ml 氨苄西林的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。少量抽提质粒 DNA 用于 PCR 鉴定。经 PCR 鉴定的克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 重组质粒 pPIC9-LL-37 的酵母转化及转化后的筛选鉴定

1.4.1 酵母转化 测序确认后的阳性克隆,用质粒抽提试剂盒抽提质粒,取 30 μ g 用 *Bgl* II 酶切过夜,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀后以 pH 8.0 TE 溶解,调节浓度 1 μ g/ μ l。采用原生质球方法转化 *P. pastoris* GS115。30 $^{\circ}$ C 培养 6 d 后,将上层琼脂刮下,破碎琼脂释放酵母,重悬后涂布于 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养至菌落出现。

1.4.2 阳性克隆的筛选及鉴定 线性化重组载体转化 *P. pastoris* GS115 后整合于酵母染色体,用无菌牙签随机挑选 100 个转化子对应接种于 MM、MD 平板,筛选 His⁺Mut^s 及 His⁺Mut⁺ 克隆,随机挑取 His⁺Mut^s、His⁺Mut⁺ 克隆各 12 个分别接种于 1.5 ml MD 培养基,培养 20 h,取 1 ml 离心悬浮于 293 μ l 50 mmol/L EDTA,加 7.5 μ l 20 mg/ml Lyticase, 37 $^{\circ}$ C 60 min,用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取酵母 DNA,以 P1、P2 为引物行 PCR 鉴定。

1.5 转化后 LL-37 蛋白的诱导表达及活性测定

1.5.1 诱导表达 挑取筛选到的 His⁺Mut^s 9 个阳性克隆接种于 10 ml MD 培养基(于 100 ml 三角瓶), 28~30 $^{\circ}$ C、280 r/min 振荡培养 24 h, 3 000 r/min 离心收获菌体,悬于 10 ml BMGY 培养基振荡培养 12 h,离心收获菌体,悬于 10 ml BMGY 培养基(含 1% casamino acid),振荡培养 8 h,离心收获菌体,悬浮于 MM 培养基(含 1% casamino acid)调节 D₆₀₀ 为 20,取 10 ml 振荡培养,进行甲醇诱导表达,

每隔 24 h 取样 50 μ l,同时补加 100%甲醇至终浓度为 0.5%,培养 144 h 结束。所有样品离心上清液参照 Hultmark 等^[9]的方法进行抗菌肽 LL-37 对 *E. coli* DH5 α 的杀菌效价检测,得到最高表达克隆。选用不同的甲醇浓度诱导培养,得到最佳诱导浓度。选最高表达克隆扩大培养,培养方法与条件最优化,体积为 100 ml(于 1 000 ml 三角瓶),培养 96 h 结束,离心收获上清。

1.5.2 LL-37 蛋白抑菌活性的测定 上清液冷冻干燥浓缩 20 倍,参照 Hultmark 等^[10]的方法对浓缩上清进行针对 *E. coli* DH5 α 抑菌活性检测。10 mmol/L pH 7.4 磷酸钠缓冲液 10 ml 加 0.1 g 琼脂糖及 0.3 mg Tryptic soy broth 干粉灭菌,冷却到 43℃,将对数生长期的细菌 *E. coli* DH5 α ($D=0.5$, 浓度约为 10^9 CFU/ml)以液体培养基稀释 100 倍,取 200 μ l 加入到上述琼脂糖培养基浇注平板,冷却后,打孔(3.2 mm),加 10 μ l 浓缩上清液,放置 3 h,上铺双倍营养琼脂糖培养基(10 mmol/L pH 7.4 磷酸钠缓冲液 10 ml 加 0.1 g 琼脂糖及 0.6 mg Tryptic soy broth 干粉灭菌,冷却到 43℃),37℃ 培养过夜,精确测量抑菌圈直径。并以 1 mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml 的 LL-37 标准品作为对照,绘制标准曲线,测定上清浓度。

1.5.3 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 及 Western 印迹分析 抗菌肽 LL-37 相对分子质量为 4 500,用常规 SDS-PAGE 难以得到理想的分辨率,本研究使用 Tricine-SDS-PAGE (16% Separating gel, 10% Spacer, 4% Stacking gel),使得 LL-37 能得到较好的分离。具体方法:上清液冷冻干燥浓缩 20 倍,参照 Schagger 等^[11]的方法,取 5 μ l 浓缩物进行 Tricine-SDS-PAGE,以商品合成肽 LL-37 为对照,凝胶采用硝酸银染色。电泳条件稳定后,参照 Kjeldsen 等^[12]方法,进行 Western 印迹分析。

2 结 果

2.1 LL-37 基因的扩增结果 通过 LL1、LL2 互补延伸形成双链、PCR 扩增,得到 LL-37 双链基因,基因长度为 148 bp(图 1)。

2.2 pPIC9-LL-37 重组质粒的构建与鉴定 由于双酶切线性化胶回收的 pPIC9 不可能自身环化,因此理论上讲 Amp 抗性菌落应含有所需要的重组质粒。随机挑选 1 个单菌落,培养后抽提质粒,以 pPIC9 为阴性对照,用 P1、P2 进行 PCR 扩增,结果发现有目的基因,大小为 148 bp(图 2)。经序列测试证明 LL-37 基因序列是正确的,并且位于 pPIC9

α -factor 信号肽的阅读框内,命名为 pPIC9-LL-37。

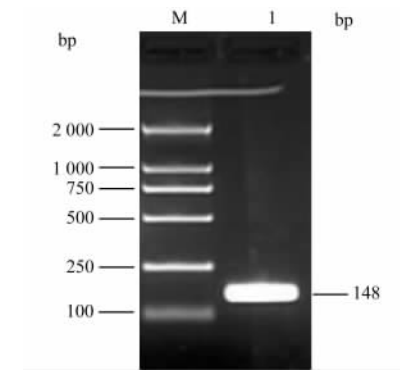


图 1 LL-37 PCR 产物

Fig 1 LL-37 PCR product

M:DL2000 marker;1:LL-37 PCR product

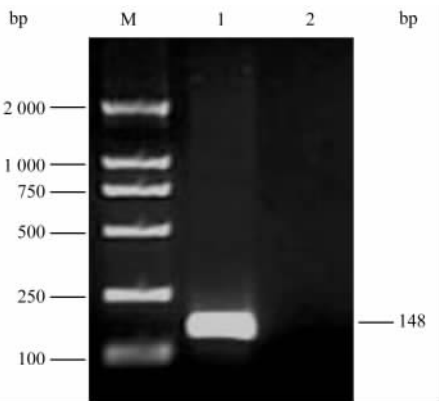


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig 2 Identification of recombinant plasmid by PCR

M:DL2000 marker;1:PCR product of pPIC9-LL-37;2:Negative control

2.3 酵母转化后阳性克隆的筛选与鉴定 重组质粒 pPIC9-LL-37 经 *Bgl* II 线性化后用原生质球法转化 *Pichia pastoris* GS115, 取 His⁺ Mut⁺、His⁺ Mut^s 克隆各 12 个行 PCR 扩增鉴定,结果分别有 10 和 9 个克隆检测到目的基因的插入。其中 1 例阳性克隆的鉴定结果见图 3。

2.4 酵母转化后 LL-37 的诱导表达及活性检测 His⁺ Mut⁺、His⁺ Mut^s 两种表型分别进行甲醇诱导表达,His⁺ Mut^s 表达量较高(数据未显示),通过小体积培养及对 *E. coli* DH5 α 杀菌效价检测,获得一最高表达菌株,最佳诱导甲醇浓度为 0.5%,扩大培养。表达上清冷冻干燥浓缩 20 倍后进行抑菌活性检测,结果显示浓缩上清对 *E. coli* DH5 α 有抑菌活性。用系列稀释的 LL-37 标准品作对照,绘制标准曲线(图 4),测出浓缩后 LL-37 浓度约为 10 μ g/ml,考虑到已经浓缩 20 倍,发酵上清原液表达量约 0.5 μ g/ml。

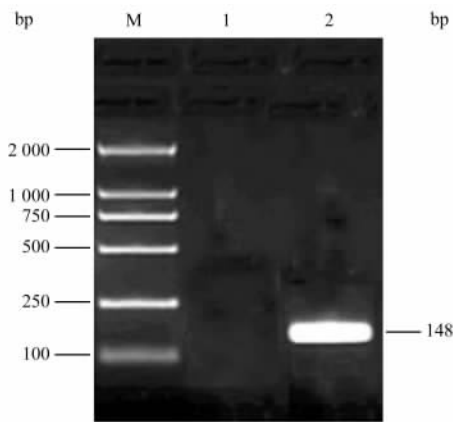


图 3 毕赤酵母转化后阳性克隆的 PCR 鉴定

Fig 3 PCR analysis of positive clones of *P. pichia* after transfection

M;DL2000 marker;1:Negative control from *P. pastoris* harboring pPIC9;2: PCR product of *P. pastoris* harboring pPIC9-LL37

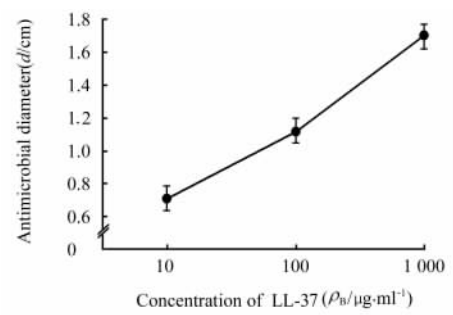


图 4 LL-37 抑菌活性标准曲线的绘制

Fig 4 Standard curve of LL-37 antimicrobial activity

$n=3,\bar{x}\pm s$

2.5 转化产物的 Tricine-SDS-PAGE 及 Western 印迹分析 以 LL-37 标准品及转化空载体 pPIC9 的 *P. pastoris* 培养上清作阳、阴性对照,电泳银染色结果显示:甲醇诱导表达上清在 4 500 处出现 1 条带(图 5A)。Western 印迹结果表明产物为 LL-37(图 5B)。

3 讨 论

抗菌肽最早是在昆虫体内发现的一类小分子多肽,具有相对分子质量小,热稳定性强,水溶性好,无免疫原性,有广谱抗菌性等特点,还可以抑杀某些真菌、病毒及原虫,并对多种癌细胞及动物实体瘤有明显的杀伤作用而不破坏正常细胞^[13-14],有望成为新一代抗菌、抗病毒、抗癌药物。目前已有一些抗菌肽开发成抗生素进入临床试验^[15-17]。但抗菌肽在生物组织中含量很少,分离获得大量天然产物困难很大,人工合成则成本很高。基因工程生产是一个较为理想的选择,但其表达产物对原核宿主菌有害,因此不能在原核系统中直接表达^[18];融合表达虽可大量生产带有抗菌肽片段的融合蛋白并极大地降低了其对

宿主的杀伤力,但需对融合蛋白进行切割处理,分离、纯化原始抗菌肽,程序比较烦琐。尽管目前已开发出多种能在靶蛋白和运载蛋白的连接处切割肽键的化学及酶学方法,但如何从融合蛋白上彻底去除标签或运载蛋白,仍是一个难题^[19]。

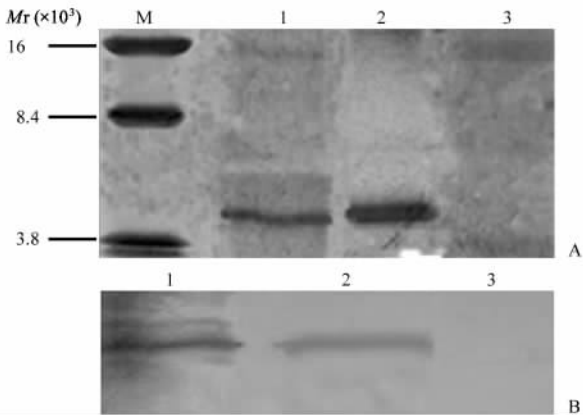


图 5 转化产物 Tricine-SDS-PAGE 银染色(A)及 Western 印迹分析(B)

Fig 5 Tricine-SDS-PAGE silver staining analysis(A) and Western blotting analysis (B) of LL-37

In FigA, M;Marker;1;Concentrated supernatant of recombinant *P. pastoris*;2;LL-37 control;3: Concentrated supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9. In FigB,1;Supernatant of recombinant *P. pastoris*;2;LL-37 control; 3;Supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9

巴斯德 *P. pastoris* 作为一种外源分泌蛋白和胞内蛋白表达的宿主菌,自 1985 年首次用于发酵生产乙肝表面抗原(HBsAg)以来,得到了越来越广泛的应用^[20]。与其他表达系统相比,*P. pastoris* 具有许多优点^[21]: (1) 利用受甲醇诱导的醇氧化酶(Alochol·oxidase I, AOX I)启动子可严格控制外源基因的表达,无论胞内、胞外均可实现外源基因的高表达;(2)生长快速,培养条件简单,适合高密度培养,发酵后每升培养液中细胞湿重达 450 g,有利于提高目的蛋白产量;(3)作为一种真核细胞生物,可进行翻译后的蛋白加工使外源蛋白得到正确的折叠和修饰;(4)不产生内毒素污染,适合医疗应用。*P. pastoris* 为真核细胞,对抗菌肽有较强的抵抗力,目前已有不少成功利用其表达抗菌肽的报道^[18,21-22]。因此,本研究选择 *P. pastoris* 作为宿主菌分泌表达人源多肽抗生素 LL-37。

蛋白质的生物活性与其氨基酸序列直接相关,一般表达都力求与天然蛋白尽可能一致。本研究通过 DNAssist2.0 软件分析发现,在众多载体中分泌型载体 pPIC9 具有唯一的 *Xho* I 位点。我们在 LL1 5'端引入 *Xho* I 限制性酶切位点及 KeX₂酶切位点

的核苷酸序列, 并重新构建了双谷氨酸-丙氨酸 (Glu-Ala) 间隔区, 形成 V-S-S-L-E-Lys-Arg-^{vKeX₂} Glu-Ala-^{vDAP} Glu-Ala-^{vDAP} fused 的蛋白结构, 在 LL2 的 5' 端加上 TAG 终止密码子和 *EcoR* I 酶切位点, 利用载体 pPIC9 上 α -factor 信号肽基因内的 *Xho* I 位点和该载体多克隆位点上的 *EcoR* I 位点将 LL-37 基因克隆到载体 pPIC9 上。转染后的 pPIC9 利用本身的 α -factor 信号肽能够分泌表达外源基因, 在分泌过程中在高尔基体内 KeX₂ 蛋白酶切割 KeX₂ 酶切位点 (Lys-Arg), 而谷氨酸-丙氨酸 (Glu-Ala) 间隔区则被 diamino peptidase 酶切割^[23], 最终分泌到培养基的蛋白为天然 LL-37 蛋白。由于酵母分泌到培养基的背景蛋白非常少, 有利于进一步分离纯化。

由于遗传密码子具有简并性, 因此一个氨基酸通常由 2~6 个密码子编码。但密码子的使用并不是均匀的, 也不是随机的。即在每一物种中, 对于同义密码子的使用有偏爱性。产生密码子偏爱性的原因很多, 其中 tRNA 的丰度被认为影响力最大^[24]。高表达的基因, 要求密码子的使用要和 tRNA 的数量匹配, 尽量使用 tRNA 分子数量多的密码子, 因此, 本研究在 LL-37 基因合成时采用 *P. pastoris* 的偏爱密码子, 以期获得最高表达。本实验采用原生质球法将质粒转化 *P. pastoris*, 转化率达 79% (19/24), 较氯化锂法的转化率高 (57%); His⁺ Mut^s 表型较 His⁺ Mut⁺ 表型表达量高, 这可能是因为 His⁺ Mut^s 菌株高效的 AOX I 启动子充分启动外源基因的表达, 但 His⁺ Mut^s 菌生长较慢, 如何提高发酵效率是亟待解决的问题。

本研究在毕赤酵母中成功表达了重组 LL-37, 为进一步研究 LL-37 的结构与功能及进一步的研究奠定了基础。

(志谢: 本实验在完成过程中得到南通大学微生物与免疫学实验室沈爱国教授等的热情指导和帮助, 中国科学院上海生物化学研究所张倩也给予了技术支持, 在此一并表示感谢!)

[参考文献]

[1] Scott M G, Davidson D J, Gold M R, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses[J]. J Immunol, 2002, 169: 3883-3891.

[2] Sorensen O E, Follin P, Johnsen A H, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3[J]. Blood, 2001, 97: 3951-3959.

[3] Turner J, Cho Y, Dinh N N, et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 2206-2214.

[4] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, et al. Strategies for op-

timial synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Gene, 1997, 190: 55-62.

[5] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review[J]. Yeast, 1992, 8: 423-488.

[6] 王 勇, 刘哲伟. 毕赤酵母表达外源基因研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2004, 32: 62-66.

[7] 赵 翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16: 308-311.

[8] Sharp P M, Tuohy T M, Mosurski K R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14: 5125-5143.

[9] Hultmark D, Steiner H. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal protein from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.

[10] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae* [J]. Eur J Biochem, 1982, 127: 207-217.

[11] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166: 368-379.

[12] Kjeldsen T, Pettersson A F, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1999, 29(Pt1): 79-86.

[13] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 61-92.

[14] Boman H G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts[J]. J Intern Med, 2003, 254: 197-215.

[15] Hancock R E, Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics[J]. Curr Drug Targets Infect Disord, 2002, 2: 79-83.

[16] Diamond G. Natural antibiotics: the potential of antimicrobial peptides as new drugs[J]. Biologist (London), 2001, 48: 209-212.

[17] Bals R. Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. [Antimicrobial peptides and peptide antibiotics][J]. Med Klin (Munich), 2000, 95: 496-502.

[18] 张 杰, 吴 希, 岳圆圆, 等. 抗菌肽 CM4 基因克隆及在毕赤酵母中的表达鉴定[J]. 微生物学报, 2005, 45: 720-723.

[19] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1220-1224.

[20] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24: 45-66.

[21] 赖玉平, 彭沂非, 郁正艳, 等. DCD-1L 在毕赤酵母中的克隆和表达[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24: 61-65.

[22] 黄亚东, 郑 青, 李校堃, 等. 抗菌肽 AD 基因的改造及在毕赤酵母中的表达[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2002, 30: 13-16.

[23] Kurjan J, Herskowitz I. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor[J]. Cell, 1982, 30: 933-943.

[24] 赵 翔, 李 至, 陆身枫, 等. 酵母 *Yarrowia lipolytica* 的密码子用法分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, 38: 510-516.