

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.60053

# 重组抗菌肽 Plectasin 的原核表达高密度发酵条件优化及抑菌活性

苏 琰<sup>1</sup> 李 融<sup>2</sup>

(1. 合肥职业技术学院, 安徽 巢湖 238000; 2. 巢湖学院, 安徽 巢湖 238000)

**摘要:** [目的] 构建重组工程菌表达抗菌肽 Plectasin, 优化重组工程菌的高密度发酵条件, 并对优化生产所得重组抗菌肽进行抑菌活性研究。[方法] 为提高目的蛋白可溶性表达, 依据原核表达系统的密码子偏爱性优化合成 *plectasin* 基因, 切除信号肽部分, 选择 pET32a(+) 表达载体, 构建重组质粒 pET32a-*plectasin*, 导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 BL21(DE3)/pLysS。设计单因素试验和正交试验对重组工程菌的 20 L 高密度发酵参数进行优化。对优化条件后生产获得 Plectasin 进行纯化鉴定并对其抑菌活性进行分析。[结果] 研究成功构建 *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET32a-*plectasin* 表达菌株, 优化后 20 L 高密度发酵工艺条件为: 诱导温度 30 °C, 接种量 2%。发酵时长 15 h, 纯化后重组蛋白质量浓度为 (0.62±0.02) g/L。表达产物对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) 的最小抑菌质量浓度为 32 μg/mL。[结论] 通过优化原核表达高密度发酵条件提高了重组 Plectasin 的可溶性表达产量, 发酵产物对金黄色葡萄球菌表现出一定的抑菌活性。

**关键词:** 高密度发酵; 可溶性表达; Plectasin; 分批补料培养; 抑菌活性

## Prokaryotic expression of recombinant Plectasin optimization of high-density fermentation conditions and antibacterial activity

SU Yan<sup>1</sup> LI Rong<sup>2</sup>

(1. Hefei Vocational and Technical College, Chaohu, Anhui 238000, China;

2. Chaohu College, Chaohu, Anhui 238000, China)

**Abstract:** [Objective] To construct a recombinant strain expressing the antimicrobial peptide Plectasin, optimize the high-density fermentation conditions of the recombinant strain, and evaluate the antibacterial activity of the purified recombinant peptide produced under optimized conditions. [Methods] To improve soluble expression of the target protein, the *plectasin* gene was synthesized and optimized based on codon preference of the prokaryotic expression system with signal peptide deletion. The optimized gene was cloned into the pET32a(+) expression vector to construct the recombinant plasmid pET32a-*plectasin*, which was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pLysS competent cells. Single-factor and orthogonal experiments were designed to optimize the parameters of 20 L high-density fermentation for the recombinant strain. The recombinant Plectasin produced under optimized conditions was purified and its antibacterial activity was analyzed. [Results] The *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET32a-*plectasin* expression strain was successfully constructed. The optimized 20 L high-density fermentation conditions were induction temperature of 30 °C, inoculum size of 2%, and fermentation duration of 15 h. After purification, the recombinant protein concentration reached (0.62±0.02) g/L. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the expressed product against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was 32 μg/mL. [Conclusion] Optimization of prokaryotic high-density

**基金项目:** 安徽省教育厅高校自然科学重点研究项目 (编号: KJ2021A1386); 安徽省高校青年骨干人才国内访学研修项目 (编号: gxgnfx2021199); 合肥职业技术学院产学研团队项目 (编号: 2024CXYPD02); 合肥职业技术学院生物医药协同创新平台项目 (编号: 2024PTKJA01)

**通信作者:** 苏琰 (1983—), 女, 合肥职业技术学院副教授, 硕士。E-mail: sy@hte.edu.cn

**收稿日期:** 2025-04-13 **改回日期:** 2025-07-24

**引用格式:** 苏琰, 李融. 重组抗菌肽 Plectasin 的原核表达高密度发酵条件优化及抑菌活性[J]. 食品与机械, 2025, 41(8): 39-45.

**Citation:** SU Yan, LI Rong. Prokaryotic expression of recombinant Plectasin optimization of high-density fermentation conditions and antibacterial activity[J]. Food & Machinery, 2025, 41(8): 39-45.

fermentation conditions improved the soluble expression yield of recombinant Plectasin, and the fermentation product exhibited antibacterial activity against *S. aureus*.

**Keywords:** high-density fermentation; soluble expression; Plectasin; fed batch culture; antibacterial activity

2023 年 6 月 22 日,世界卫生组织(WHO)发布了全球首个针对人类健康紧迫问题的抗微生物药物耐药性(AMR)全球研究议程,旨在共同努力解决 AMR。抗微生物药物耐药性已然成为一项紧迫的公共卫生和经济挑战<sup>[1]</sup>。应对日益加剧的耐药菌威胁,开发新的“替抗”生物制剂刻不容缓。

抗菌肽通过在菌膜上形成孔道(膜靶向)或进入菌内抑制核酸合成和干扰蛋白质折叠(非膜靶点)等多种独特作用机制<sup>[2]</sup>,如 Boman 等<sup>[3]</sup>分离得抗菌肽天蚕素(cecropins),即通过静电作用结合细胞膜从而破坏细菌。细菌难以通过单一突变对抗菌肽的多种破坏机制,因此具有较低耐药性风险等优点,使其在各领域潜力巨大。已被广泛应用于食品工业的乳酸链球菌素(nisin)<sup>[4]</sup>,较抗生素具有安全性高且不易产生耐药性等优点,保证了食品安全和品质。除此以外,获美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准的还有 Echinocandin 等多种抗菌肽药物<sup>[5]</sup>。

Mygind 等<sup>[6]</sup>发现由真菌 *Pseudoplectania nigrella* 产生的抗菌肽 Plectasin,其对革兰氏阳性菌株如肺炎链球菌等表现了抑菌性。Schneider 等<sup>[7-8]</sup>通过 X 射线晶体学和核磁共振解析了 Plectasin 的高分辨率结构,研究表明其主要通过结合脂质 II 从而抑制细菌细胞壁的合成。NZ2114 作为 Plectasin 的衍生物,最小抑菌浓度(MIC)可达 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[9]</sup>;在小鼠感染模型中对其药理学特性已有研究<sup>[10-11]</sup>,Ma 等<sup>[11]</sup>还基于 NZ2114 设计了 PLGA-PVA 药物递送系统。Hao 等<sup>[12]</sup>以 *plectasin* 基因为模板,通过序列比对,引入简并碱基,构建筛选库;经过 3 个不同水平的筛选,获得了候选序列 PN7。PN7 对几种革兰氏阳性菌具有很强的活性,且在体外各种条件下相对稳定,具有一定的替抗前景。Liang 等<sup>[13]</sup>通过 2A 肽组装构建了 *plectasin* 的 4 拷贝质粒载体,以进一步提高其在重组毕赤酵母中的表达水平。纯化后的 Plectasin 对常规金黄色葡萄球菌(ATCC 26001)和一些食源性抗生素耐药金黄色葡萄球菌显示出优异的稳定性和良好的抗菌活性。

传统制备抗菌肽的方法为生物提取和化学合成。从生物体提取方法面临着分离纯化过程复杂、生产成本高等问题,因为抗菌肽相对分子质量小、含量低,化学合成法则面临着产品活性不稳定、难以产业化生产等挑战<sup>[14]</sup>。重组表达技术已成为实现其规模化、工业化生产的有效途径。大肠杆菌表达系统的基因组和代谢途径研究较为透彻,其具有多种高效表达载体和启动子,具有成熟的基因克隆和转化技术体系,且生产周期短、培养成本低、发

酵工艺成熟、易于规模化生产、蛋白质分离和纯化技术成熟等优点。高密度发酵(high-density fermentation)是指利用发酵装置与特定培养技术,显著提高菌体密度并优化发酵效率,较普通培养能够大幅提高生物合成产物的产量<sup>[15]</sup>。目前重组 Plectasin 研究主要针对原核表达摇瓶培养和酵母工程菌高密度发酵工艺优化方面<sup>[16-17]</sup>,其原核表达高密度发酵工艺的研究较少。研究拟根据大肠杆菌的密码子偏爱性,对 *plectasin* 基因序列进行优化和合成,构建 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 表达菌株,并优化其 20 L 高密度发酵参数。旨在为其原核表达高密度发酵工业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

表达质粒载体:pET32a(+),通用生物(安徽)股份有限公司;

表达宿主:大肠杆菌 BL21(DE3)/pLysS,通用生物(安徽)股份有限公司;

金黄色葡萄球菌(ATCC 25923):实验室保存;

酵母提取物、胰蛋白胨、MH 琼脂培养基等:英国 OXOID 公司;

PrePack Ni-NTA Purose 6 FF:嘉兴千纯生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

发酵罐:BIOSTAT<sup>®</sup> Cplus 型,德国赛多利斯集团;

超纯水仪:Pro-UF 型,德国赛多利斯集团;

连续流离心机:Himac-CR22N 型,日本株式会社日立制作所;

蛋白纯化系统:Bio-Rad NGC Quest 100 plus 型,美国伯乐实验室股份有限公司;

台式冷冻离心机:Sorvall Stratos 型,赛默飞世尔科技公司;

压力破碎仪:Scientz-150 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

脱色摇床:SYC-2102 型,苏州精琪实验仪器有限公司;

微量紫外分光光度计:Nano-500 型,杭州奥盛仪器有限公司;

培养箱:GHP-9160 型,上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 pET32a-*plectasin* 重组质粒构建 根据 NCBI 提供的 Plectasin 的氨基酸序列:MQFTTILSIGITVFGLNTGA

FAAPQPVPEAYAVSDPEAHPDDFAGMDANQLQKRGF GCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY,委托通用生物(安徽)股份有限公司依据大肠杆菌密码子偏爱性对 *plectasin* 基因序列进行优化合成,并切除 N 端信号肽,设计合成引物:上游引物为 GACGACGACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCATGGTGCCGAGCCGGTTC,下游引物为 AGCCGGATCTCAGTGGTGTGGTGGTGGTCTCGAGTTAATGGTATGGTATGGTATGATGATAGCATTGACACACA。重组至 pET32a(+ ) 表达载体,并进行测序验证。

1.2.2 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 重组表达菌的构建 将 pET32a-*plectasin* 重组质粒与 BL21(DE3)pLysS 细胞混合,轻柔吹吸 3 次混匀,冰浴处理(30 min),热激反应(42 °C, 45 s),二次冰浴(2 min),加入 600  $\mu$ L 灭菌 LB 培养基,37 °C、200 r/min 振荡培养 40 min,5 000 r/min 离心 5 min。将 100  $\mu$ L 转化后菌液涂布于含氨苄抗生素的选择 LB 培养基,倒置 37 °C 过夜培养完成克隆筛选。

1.2.3 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 重组菌的摇瓶培养、诱导表达、纯化及鉴定 培养的菌液按体积分数 2% 的接种量接种到 500 mL LB 液体培养基,37 °C,200 r/min,培养约 3 h 后,OD<sub>600 nm</sub> 约 0.6~0.8,取 200  $\mu$ L 留样做诱前对照,剩下的培养液加入终浓度为 1 mmol/L IPTG,4 h 后离心收集菌。30 °C 诱导表达,200 r/min 条件下过夜表达。4 °C、6 000 r/min 离心 10 min,弃上清收集菌体后悬浮于 pH 7.4 的 PBS 溶液中,超声波破菌,破菌条件为变幅杆 6,超声功率 120 W,工作时间 3 s,暂停时间 8 s,持续 30 min。上述裂解液离心处理收集上清,8 000 r/min,40 min,待纯化。PrePack Ni-NTA Purose 6 FF 纯化裂解液上清,纯化后重组蛋白 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 重组表达菌的高密度发酵培养

(1) 重组菌株活化培养:挑取-80 °C 甘油保藏管中菌液分区划线法接种于 LB 筛选培养基。37 °C 恒温倒置培养 24 h。

(2) 一级种子培养:挑取单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基(含 100  $\mu$ g/mL 氨苄),37 °C、200 r/min 培养 6 h。

(3) 二级种子培养:按体积分数 2% 将一级种子液转接至 500 mL LB 液体培养基(含 100  $\mu$ g/mL 氨苄),37 °C,200 r/min 培养 6 h。

(4) 发酵罐发酵:发酵罐内灭菌后,开机待罐体温度升至 37 °C,将二级种子液转接至发酵培养基,初始葡萄糖质量浓度为 20 g/L,控温 37 °C,溶氧设置为保持 30%,使用氨水自动控制将 pH 保持为 7.0。发酵罐搅拌速度设置为 350 r/min。当初糖耗尽,pH 逐渐升高时启动泵入补料培养基。当检测 OD<sub>600 nm</sub> 为 50,加入终浓度 1 mmol/L

IPTG 诱导表达。

1.2.5 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 重组表达菌的高密度发酵条件优化

(1) 单因素试验:重组菌按体积分数 2% 的接种量接种到 500 mL 发酵培养基,37 °C,培养至 OD<sub>600 nm</sub> 约 0.6~0.8,加入 1 mmol/L IPTG 诱导,30 °C 发酵 21 h。分别考察发酵时长(9.0, 12.0, 15.0, 18.0, 21.0 h)、诱导温度(24, 27, 30, 34, 37 °C)、接种量(1%, 2%, 3%, 4%, 5%)对重组 Plectasin 产量的影响。

(2) 正交试验:依据单因素试验结果,以发酵时长、接种量、诱导温度作为变量,重组 Plectasin 产量为考察对象,采用三因素三水平正交设计法优化重组 Plectasin 的高密度发酵条件。

1.2.6 20 L 发酵产物蛋白纯化及 SDS-PAGE 鉴定 菌液下罐,4 °C、7 000 r/min 离心 5 min,弃上清,称量菌体湿重,按  $m_{\text{菌体}}:V_{\text{PBS 溶液}}=1:20$  (g/mL) 加 PBS 溶液重悬菌体,采用  $8 \times 10^7$  Pa 高压均质破碎细胞。裂解液于 4 °C、8 000 r/min 离心 1 h,收集上清。上清加入终浓度为 0.02 mol/L 的咪唑,经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤,用蛋白层析纯化系统进行层析纯化,收集洗脱产物。SDS-PAGE 纯度分析。观察电泳条带。

1.2.7 重组 Plectasin 抑菌活性检测 以金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)为指示菌,调节菌液浓度至 0.5 麦氏浊度后涂板,晾干后放置牛津杯,牛津杯中分别加入 Amp 作为阳性对照、PBS 作为阴性对照以及纯化重组 Plectasin,35 °C 培养 16 h 后观察结果。

最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的测定:采用微量肉汤稀释法,纯化后的 Plectasin 超滤浓缩至 2.6 g/L,将重组蛋白溶液调整成 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08 mg/mL。待测孔每孔加入 180  $\mu$ L 稀释菌悬液,再各加入 20  $\mu$ L 各浓度重组蛋白溶液,使每孔重组蛋白终浓度为 128, 64, 32, 16, 8  $\mu$ g/mL,设置阳、阴性对照各一个,重复试验 3 次。将 96 孔板 37 °C 恒温培养 16 h,观察孔底是否有菌沉淀。

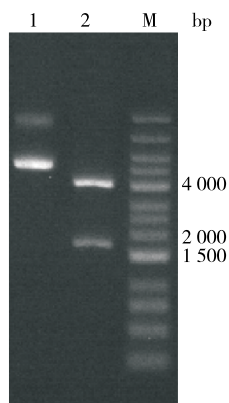
### 1.3 数据分析

采用 Origin 2024 软件绘图,单因素试验和正交试验分析采用正交试验助手 II V3.1 分析软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 重组表达菌的构建

pET32a-*plectasin* 经 Apa I/XHO I 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,酶切片段约 1 768 bp(见图 1),结果均符合预期。测序结果经与 Gen Bank 数据库公布基因序列比对符合。表明重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 构建成功。



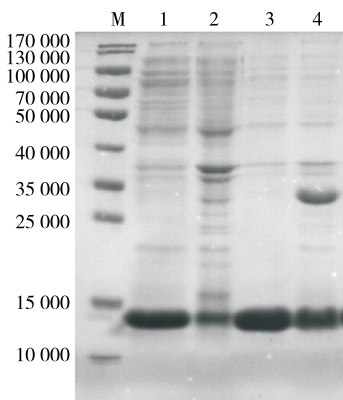
M. DNA Marker DL12000 1. pET32a-*plectasin* 2. *Apa* I /*Xho* I 双酶切

图 1 pET32a-*plectasin* 双酶切鉴定结果

Figure 1 Results of double enzyme digestion of pET32a-*plectasin*

### 2.2 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 的摇瓶培养及诱导表达分析

重组工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET32a-*plectasin* 经过 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 将表达产物经超声破碎和 PrePack Ni-NTA Purose 6 FF 镍柱纯化后 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 2。诱导前菌液上清和沉淀均未能看到明显蛋白条带, 诱导后上清 (第 4 泳道) 的蛋白条带约 27 000, 与重组蛋白预测相对分子质量相符。表明 *E. coli* BL21 (DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 工程菌成功可溶性表达 Plectasin。重组蛋白因其自身结构复杂性和强疏水性在原核系统表达时易形成包涵体。因此, 优化密码子偏爱性、表达载体和表达宿主的选择、诱导温度及切除信号肽等均为提高其可溶性表达的有效策略<sup>[18-19]</sup>。



M. 蛋白质相对分子质量标准 1. 诱导前菌液沉淀 2. 诱导前菌液上清 3. 诱导后菌液沉淀 4. 诱导后菌液上清

图 2 SDS-PAGE 检测摇瓶培养表达重组 Plectasin

Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified recombinant Plectasin from shake-flask culture

### 2.3 *E. coli* BL21 (DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 发酵条件优化单因素试验

2.3.1 发酵时长对重组 Plectasin 的影响 设计发酵时长梯度试验确定最优发酵时长, 分别为 9.0, 12.0, 15.0, 18.0, 21.0 h, 结果表明, 发酵时长为 15.0 h 时, Plectasin 产量最高, 为  $(0.56 \pm 0.02)$  g/L (见图 3)。发酵时长直接影响重组表达菌增殖、代谢产物积累、重组蛋白表达效率和生产成本。重组蛋白等次级代谢产物表达一般在细菌培养的稳定期, 过长的发酵时长易导致乙酸积累, 抑制菌体生长和蛋白合成, 使高密度发酵培养后期可能因溶氧不足而引发厌氧代谢。此外也可能引起细胞膜损伤、自溶风险增加, 影响下游的蛋白纯化。

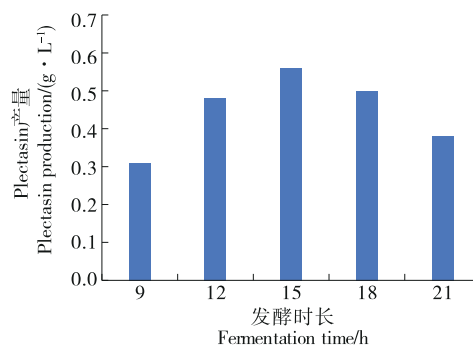


图 3 发酵时长对 Plectasin 产量的影响

Figure 3 Effect of fermentation time on Plectasin yield

2.3.2 接种量对 Plectasin 产量的影响 设计接种量梯度试验确定最优接种量, 分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%。结果表明, 接种量为 2% 时, Plectasin 产量最高, 为  $(0.51 \pm 0.02)$  g/L (见图 4)。接种量过低会延长培养高密度发酵周期, 易受杂菌污染, 稳定性较差; 接种量过高能够缩短迟缓期, 重组菌生长快速进入对数期, 提高发酵效率, 但细胞密度过高会导致培养基快速消耗, 代谢产物积累, 可能引发溶氧不足, 影响重组蛋白的表达。

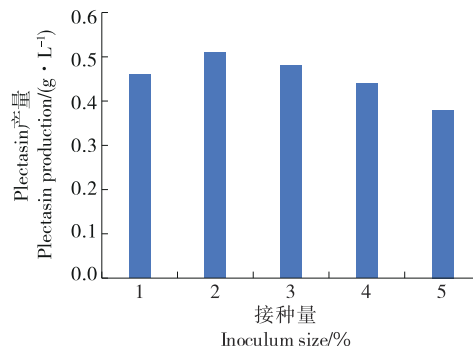


图 4 接种量对 Plectasin 产量的影响

Figure 4 Effect of inoculum size on Plectasin yield



2.3.3 诱导温度对Plectasin产量的影响 设计诱导温度梯度试验:分别为24, 27, 30, 33, 36 °C, 确定*E. coli* BL21 (DE3)pLysS/pET32a-*plectasin*的最优诱导温度。结果表明, 诱导温度为30 °C时, Plectasin产量最高, 为(0.58±0.03) g/L(见图5)。温度是影响大肠杆菌高密度发酵培养和代谢的重要因素, 会影响重组蛋白折叠、表达的速率及包涵体形成等方面。过高的诱导温度虽然能够缩短发酵时长, 加快蛋白表达速率, 但形成包涵体, 也会因乙酸积累引发代谢负担, 增加细胞应激反应, 抑制细菌生长及后期蛋白合成。

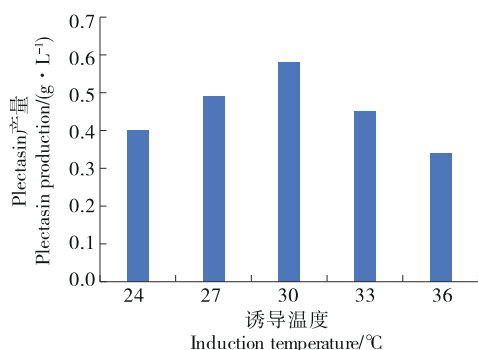


图5 诱导温度对Plectasin产量的影响

Figure 5 Effect of induction temperature on Plectasin yield

#### 2.4 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET32a-*plectasin* 高密度发酵条件优化的正交试验

依据单因素试验结果, 设计三因素三水平正交试验(见表1), 由正交试验结果(见表2)分析可知, 各因素对Plectasin产量的影响顺序为诱导温度>发酵时长>接种量, 优化后发酵条件组合为发酵时长15 h、接种量2%、诱导温度30 °C。经3次平行实验验证, 该条件下Plectasin产量为(0.62±0.02) g/L。

表1 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 高密度发酵条件优化正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels for orthogonal optimization of high-density fermentation conditions in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET32a-*plectasin*

水平	A 发酵时长/h	B 接种量/%	C 诱导温度/°C
1	12	1	27
2	15	2	30
3	18	3	33

#### 2.5 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET32a-*plectasin* 的培养产物纯化分析

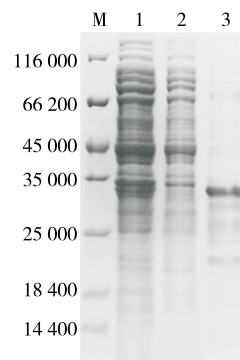
如图6所示, 第3泳道为纯化洗脱液, 有一条明显的蛋白条带, 与重组Plectasin预测相对分子质量一致。结果

表2 *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin* 高密度发酵条件优化正交试验

Table 2 Orthogonal experimental design for optimization of high-density fermentation conditions in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET32a-*plectasin*

试验号	A	B	C	Plectasin产量/(g · L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	0.22
2	1	2	2	0.45
3	1	3	3	0.31
4	2	1	2	0.61
5	2	2	3	0.52
6	2	3	1	0.42
7	3	1	3	0.19
8	3	2	1	0.40
9	3	3	2	0.58
$k_1$	0.327	0.340	0.347	
$k_2$	0.517	0.457	0.547	
$k_3$	0.390	0.437	0.340	
极差R	0.190	0.117	0.207	

表明, 采用优化后的20 L高密度发酵条件, 较前期发酵条件下, 重组蛋白上清表达产量提高了1.7倍。在高密度发酵过程中采用分批补料技术分阶段补充关键营养物质, 能有效提高规模化生产效率<sup>[20-22]</sup>。一方面, 避免发酵初始高浓度的培养基引起的抑制效应, 克服了葡萄糖分解代谢的阻遏作用, 避免代谢副产物积累。另一方面, 延长重组工程菌生长期, 维持其处于高效生产阶段, 从而提高重组蛋白产物浓度。除此以外, 通过精准控制补料速率, 溶氧(DO)控制、pH控制及温度控制, 更好地调控菌体细胞的数量和质量, 优化目标产物的合成。



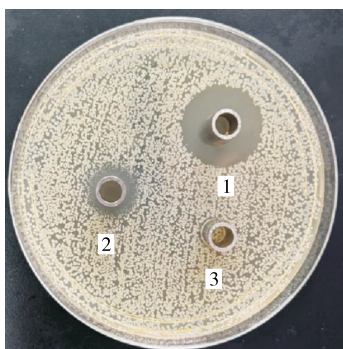
M. 蛋白质相对分子质量标准 1. 菌液上清 2. 流穿液 3. 洗脱液

图6 20 L发酵表达重组Plectasin蛋白纯化后SDS-PAGE检测结果

Figure 6 SDS-PAGE analysis of purified recombinant Plectasin from 20 L fermentation

### 2.6 重组 Plectasin 抑菌活性测定

牛津杯法作为抑菌活性初筛的常用方法,结果直观可靠且重复性好。重组 Plectasin 牛津杯法试验结果如图 7 所示,以 Amp 为阳性对照,PBS 作为阴性对照,其对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)的抑菌圈直径为(12.11±0.13) mm。MIC 检测结果见表 3,优化后高密度发酵生产制备的重组 Plectasin 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 32 μg/mL。以上试验结果表明,重组 Plectasin 对金黄色葡萄球菌具有一定的抑菌活性,但与抗生素相比抑菌能力较弱,仍需进一步优化抗菌肽结构和表达策略以提升活性。



1. Amp 2. 重组 Plectasin 3. 阴性对照

图 7 牛津杯法检测重组 Plectasin 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Figure 7 Detection of antibacterial activity of recombinant Plectasin against *Staphylococcus aureus* by Oxford cup method

表 3 最小抑菌浓度的测定

Table 3 Minimum inhibitory concentration of recombinant Plectasin against *Staphylococcus aureus*

Plectasin 质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	细菌生长情况
128	—
64	—
32	—
16	+
8	++

## 3 结论

该研究构建了重组 *E.coli* BL21(DE3)pLysS/pET32a-*plectasin*。依据原核表达系统密码子偏爱性优化基因序列,为提高重组 Plectasin 的可溶性表达,切除其预测的信号肽部分,并选择携带硫氧还蛋白(Trx)标签的 pET32a 表达载体,导入携带 pLysS 质粒的 BL21(DE3)表达菌株。设计单因素试验和正交试验探索 *E.coli* BL21(DE3)

pLysS/pET32a-*plectasin* 的 20 L 高密度发酵条件,发酵过程采用分批培养技术,通过正交试验结果分析 20 L 高密度发酵工艺条件:诱导温度 30 °C,接种量 2%,发酵时长 15 h,发酵获得的可溶性表达重组 Plectasin 质量浓度达(0.62±0.02) g/L,较前期发酵条件产量提高了 1.7 倍。重组表达产物经抑菌活性试验验证,对金黄色葡萄球菌表现出一定的抑菌活性。后续将进一步优化诱导表达策略,借助人工智能设计优化抗菌肽结构,提升其表达稳定性和抑菌效率,为抗菌肽在医疗、食品、农业等各领域的应用奠定产业化基础。

### 参考文献

- [1] 刘婷,肖园园. 世界卫生组织人类健康中抗微生物药物耐药性的全球优先研究议题[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(8): 995-998.  
LU T, XIAO Y Y. World Health Organization: global priority research agenda for antimicrobial resistance in human health[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2023, 22(8): 995-998.
- [2] 高楠,李逸涵,孙佳琦,等. 抗菌肽应用研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2025, 33(6): 1 382-1 397.  
GAO N, LI Y H, SUN J Q, et al. Research progress on the application of antimicrobial peptides[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2025, 33(6): 1 382-1 397.
- [3] BOMAN H G, BOMAN I A, ANDREV D, et al. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(10): 5 852-5 860.
- [4] POPA E E, MITELUT A C, RAPA M, et al. Antimicrobial active packaging containing nisin for preservation of products of animal origin: an overview[J]. Foods, 2022, 11(23): 3 820-3 820.
- [5] AL MUSAIMI O. FDA-approved antibacterials and echinocandins[J]. Antibiotics, 2025, 14(2): 166.
- [6] MYGIND P H, FISCHER R L, SCHNORR K M, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a Saprophytic fungus[J]. Nature, 2005, 437(7 061): 975-980.
- [7] SCHNEIDER T, KRUSE T, WIMMER R, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II [J]. Science, 2010, 328(5 982): 1 168-1 172.
- [8] JEKHMANE S, DERKS M G N, MAITY S, et al. Host defence peptide Plectasin targets bacterial cell wall precursor lipid II by a calcium-sensitive supramolecular mechanism[J]. Nature Microbiology, 2024, 9(4): 1 778-1 791.
- [9] OSTERGAARD C, SANDVANG D, FRIMODT M N, et al. High cerebrospinal fluid (CSF) penetration and potent bactericidal activity in CSF of NZ2114, a novel plectasin variant, during experimental pneumococcal meningitis[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(4): 1 581-1 585.

- [10] ANDES D, CRAIG W, NIELSEN L A, et al. *In vivo* pharmacodynamic characterization of a novel plectasin antibiotic, NZ2114, in a murine infection model[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(7): 3 003-3 009.
- [11] MA X X, YANG N, MAO R Y, et al. Poly(lactic glycolic acid)-mediated delivery of plectasin derivative NZ2114 in *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. *Antibiotics*, 2024, 13(3): 228.
- [12] HAO Y, TENG D, MAO R Y, et al. Site mutation improves the expression and antimicrobial properties of fungal defense[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(8): 1-12.
- [13] LIANG X X, JIANG H, SI X D, et al. Boosting expression level of Plectasin in recombinant *Pichia pastoris* via 2A self-processing peptide assembly[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(5): 3 669-3 678.
- [14] 魏岱旭, 龚海伦, 张旭维. 抗菌肽的生物合成及医学应用[J]. *合成生物学*, 2022, 3(4): 709-727.  
WEI D X, GONG H L, ZHANG X W. Biosynthesis of antimicrobial peptides and its medical application[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(4): 709-727.
- [15] 张根林, 胡可心, 周超, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 G127 的高密度发酵工艺优化[J]. *西安工程大学学报*, 2025, 39(1): 17-25.  
ZHANG G L, HU K X, ZHOU C, et al. Optimization of high density fermentation process for *Bacillus velezensis* G127[J]. *Journal of Xi'an Polytechnic University*, 2025, 39(1): 17-25.
- [16] 宋士良, 陆克文. 菌丝霉素抗菌肽高密度发酵生产及其特性研究[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(7): 78-87.  
SONG S L, LU K W. Study on high-density fermentation production and characteristics of plectasin antimicrobial peptide[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2022, 50(7): 78-87.
- [17] 梁星星, 司先懂, 董格菲, 等. 菌丝霉素的发酵制备及其在饲料替抗中的潜在应用探究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(17): 64-68.  
LIANG X X, SI X D, DONG G F, et al. Study on preparation of Plectasin and its potential application in feed substitute resistance[J]. *Feed Research*, 2022, 45(17): 64-68.
- [18] 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(9): 33-45.  
MIAO C Y, DU L, WANG J Q, et al. Soluble expression strategies for production of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. *China Biotechnology*, 2023, 43(9): 33-45.
- [19] 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.  
ZHANG L, TANG Y K, LI H X, et al. Advances in promoting solubility of prokaryotic expressed proteins[J]. *China Biotechnology*, 2021, 41(2): 138-149.
- [20] MA R J, MA X, QIAO Y C, et al. Improved production of astaxanthin in heterotrophic *Chromochloris zofingiensis* through optimized culture conditions incorporating an efficient fed-batch strategy[J]. *Algal Research*, 2025, 86(4): 1-10.
- [21] GUO F Z, CHEN L X, ZHOU B, et al. Enhanced production of biotin in *Pseudomonas putillensis* with systematic culture optimization and fed-batch strategies[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2025, 30(11): 132-138.
- [22] 谢闰生, 李培骏, 蒋羽秋, 等. 抗菌肽偶联纳米银材料及其在医疗和食品领域的应用[J]. *食品与机械*, 2024, 40(5): 219-226.  
XIE R S, LI P J, JIANG Y Q, et al. Antimicrobial peptide-coupled silver nanomaterials and their applications in medical and food fields[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(5): 219-226.