

刺参杀菌通透性增强蛋白 N 末端结构域重组蛋白的制备及功能分析

车钟杰, 邵铨娜, 李成华*, 张卫卫

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 通过克隆刺参杀菌通透性增强蛋白(Bactericidal Permeability-increasing Protein, BPI) N 末端的 cDNA 序列并进行原核表达, 获得了 N 端活性片段体外重组蛋白, 分析其抑菌谱。结果表明: 刺参 BPI 蛋白 N 末端 cDNA 全长 642 bp, 编码 214 个氨基酸; 体外表达获得了分子量为 30 kDa 的重组蛋白, 该蛋白对副溶血弧菌、哈维氏弧菌和藤黄微球菌均具有明显的杀菌作用, 其中对副溶血弧菌活性最强, 抑菌圈直径达 2.5 cm。

关键词: 刺参; 杀菌通透性增强蛋白; 原核表达; 抑菌活性

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 03-0034-05

刺参(*Apostichopus japonicus*)是棘皮动物门的重要经济动物, 2014 年该物种的总产量已超过 19.7 万吨, 产值超过 400 亿元, 成为我国产值最大的单一海水养殖品种。然而, 伴随着水产养殖集约化程度的提高, 养殖密度不断增大, 投饵量也随着不断加大, 破坏了养殖环境原有的生态平衡, 养殖动物的生长能力及抗病力急剧下降, 大规模的病害问题日益凸显。据不完全统计, 2004~2013 年每年由于病害造成的刺参养殖业直接经济损失在 30~40 亿元, 涉及到的病害有苗期胃萎缩病、越冬期囊膜病毒、烂边病、化板病、腐皮综合症等^[1]。因此, 科学控制病害发生成为重要的研究课题。

杀菌通透性增强蛋白(Bactericidal Permeability-increasing Protein, BPI)是嗜中性粒细胞(Polymorphonuclear Neutrophils, PMNs)分泌的一种阳离子抗菌糖蛋白, 具选择性杀伤革兰氏阴性细菌(Gram-negative Bacteria, G⁻)和中和内毒素等功能^[2-3]。BPI 作为机体自身抗菌系统的一种产物, 是迄今为止唯一被认为同时具有杀菌和中和内毒素 2 种功能的抗菌物质^[4]。研究发现, BPI 的 N 端片段具有与 BPI 同等的功能。BPI N 端富含阳离子, 能与内毒素

的毒性成分类脂质 A 区域特异结合, 进而改变细菌细胞壁的通透性而杀死细菌^[5-7]。随着研究的深入发现, BPI 还具有抗革兰氏阳性菌和真菌、中和肝素、促进补体活化及抗血管生成和免疫调节等多种生物学功能, 在机体内被称为“超级抗生素”^[8-10]。文献^[11]采用基因克隆的方法率先获得了刺参杀菌通透性增强蛋白全长 cDNA 序列, 并进一步研究了其参与调控体腔细胞 ROS 产生介导免疫防疫的新途径。本文基于获得的刺参杀菌通透性增强蛋白全长序列, 体外重组获得刺参 BPI 基因 N 末端结构域蛋白, 阐明了该蛋白对刺参典型病原的抑菌活性, 为开发新颖的免疫防治制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验样本

实验刺参(200±10) g 购于浙江省宁波博旺水产养殖有限公司。鲜活运至实验室后, 于 16 °C 环境下暂养 1 d, 海水盐度 30‰左右, 充氧。之后取其体腔液离心收集血细胞提取总 RNA。

1.2 主要试剂

表达载体 pET28(a)、宿主细胞 BL21(DE3)购自

收稿日期: 2016-01-03.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金 (31522059)。

第一作者: 车钟杰 (1993-), 男, 浙江台州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物技术. E-mail: 64269227@qq.com

*通信作者: 李成华 (1978-), 男, 山东济宁人, 博士/研究员, 主要研究方向: 海洋生物技术. E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn

Novagen 公司; 实验用 RNAiso Plus、M-MLV cDNA Synthesis Kit、pMD18-T 载体和 PCR 扩增试剂购自大连宝生生物公司; PCR 产物回收试剂盒为百泰克公司产品; DH5 α 感受态细胞由实验室自行制备; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 位点购于 NEB 公司; 其他试剂均为分析纯; 供试菌株副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)由实验室保存。

1.3 实验方法

1.3.1 刺参体腔细胞 RNA 的提取和 cDNA 制备

本实验采用无菌剪刀解剖刺参获得其体腔液 1.0 mL 800 g, 离心 5 min 后收集体腔细胞并加入 1.0 mL 的 Trizol 试剂用于 RNA 提取。RNA 提取步骤为: 首先震荡混匀加有 Trizol 试剂的样品, 室温放置 5 min 后加入 0.2 mL 氯仿, 颠倒混匀并室温静置 10 min 后于 4℃离心 15 min (12 000 r·min⁻¹)。离心后吸取上清至干净离心管, 并加入与所取上清等体积的异丙醇, 混匀, 室温静置 5 min 于 4℃离心 10 min (12 000 r·min⁻¹)。弃上清, 在沉淀中加入体积浓度为 75% 的乙醇 1 mL, 于 4℃离心 5 min (12 000 r·min⁻¹)。随后去上清, 并在室温静置 5~10 min 以挥发残留乙醇。最后加入 20 μ L 无 RNA 酶水, 溶解沉淀得到 RNA 提取液。用 Nanodrop 2000 微量分光光度计(Nanodrop Technologies, 美国)分析提取 RNA 浓度, 参照 cDNA 合成试剂盒(Takara)说明书, 制备刺参体腔细胞 cDNA 第一链作为基因克隆的模板。

1.3.2 刺参 BPI 基因 N 末端的克隆

根据已获得的刺参 BPI 基因全长序列(序列号: KP881741), 设计含 *Bam*H I 限制性内切酶位点的 BPI 基因 N 末端上游扩增引物(BPI N-F)5'-CGGGA TCCCGAATCACTCCCAACGGATTTCG-3'和包含 *Not* I 位点的下游扩增引物(BPI N-R)5'-TTGCGGC CGCATGGCCAGTTGCATAAACCTCCC-3'。用上述获得的 cDNA 为模板扩增刺参 BPI 基因 N 末端 cDNA 序列。PCR 反应体系包括 2.5 μ L 10×PCR 缓冲液、2.0 μ L MgCl₂ (25 mmol)、2.0 μ L dNTP (2.5 mmol)、1.0 μ L 正反引物(10 μ mol)、0.2 μ L DNA 聚合酶(5 U· μ L⁻¹)、15.3 μ L 灭菌水以及 1.0 μ L cDNA。扩增条件为: 94℃ 3 min、94℃ 30 s、60℃ 30 s、

72℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。

1.3.3 重组表达载体的构建

扩增反应后, 用胶回收试剂盒(百泰克)回收 PCR 产物并与载体 pMD18-T(Takara 公司)连接, 转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α (Takara 公司)。连接产物在含有氨苄质量浓度为 50 μ g·mL⁻¹ 的 LB(胰蛋白胨 10 g·L⁻¹、酵母提取物 5 g·L⁻¹、NaCl 10 g·L⁻¹)固体平板中培养 8~12 h, 挑取单克隆进行 PCR 验证和测序鉴定, 得到正确的阳性克隆质粒。将 PCR 阳性克隆质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收分子量约在 650 bp 的目的条带, 与经同样酶切的 pET28(a)原核表达载体酶切产物连接, 转化 *E. coli* 感受态, PCR 筛选阳性克隆, 经测序鉴定获得编码框正确的表达载体 pET28(a)-BPIN 重组质粒。

1.3.4 重组蛋白的诱导表达

利用质粒提取试剂盒(Omega 公司)纯化阳性菌株重组质粒 pET28(a)-BPIN, 转化到表达宿主 BL21(DE3) (Novagen 公司), 获得的阳性菌株即为工程菌株。将该工程菌株再接种到卡那霉素质量浓度为 50 μ g·mL⁻¹ 的 LB 培养液中, 37℃、200 r·min⁻¹ 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.6 时, 加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), 使其终浓度为 1 mmol·L⁻¹, 37℃诱导表达 3~6 h, 收集菌液, 经 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液, 获得重组刺参 BPIN 末端结构域蛋白。

1.3.5 重组蛋白的纯化和复性

采用 Ni-NTA SefinoseTM Resin 介质(上海生工)纯化目的蛋白, 方法参照说明书进行。对获得的纯化蛋白采用以下方法进行复性透析: 首先在 1 L 含有 50 mmol Tris-HCl、100 mmol NaCl₂、2 mmol 还原型谷胱甘肽、0.02 mmol 氧化型谷胱甘肽、10% 甘油和 3.5 mol 尿素的缓冲液中 4℃透析 12 h; 随后在含有 50 mmol Tris-HCl、100 mmol NaCl₂、2 mmol 还原型谷胱甘肽、0.02 mmol 氧化型谷胱甘肽、10% 甘油和 1 mol 尿素的缓冲液中 4℃透析 12 h; 最后在含有 50 mmol Tris-HCl、100 mmol NaCl₂、20% 甘油的缓冲液中 4℃透析 12 h, 即为复性蛋白。

1.3.6 重组蛋白抑菌活性分析

以藤黄微球菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、灿烂弧菌和溶藻弧菌为供试菌种, 具体方法为^[12]: 将

4 种受试阴性菌分别接种于 2216E 液体培养基(胰蛋白胨 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.6$)于 28°C , $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至 $OD_{600}=1.0$, 取 $100 \mu\text{L}$ 菌液涂平板(琼脂 $12 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 同时将受试阳性菌接种于营养琼脂液体培养基(胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 牛肉膏 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaCl } 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.3 \pm 0.1$)于 35°C , $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养, 将菌液与营养琼脂固体培养基(琼脂 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)混合倒平板, 使菌浓度为 $5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$. 本实验采用牛津杯法测定重组杀菌通透性增强蛋白的抗菌活性, 每种受试菌设置阴性对照组 1 (无菌培养基)、阴性对照组 2 (透析液)和重组蛋白实验组. 在上述所述平板中分别放置无菌牛津杯(直径 0.8 cm), 向每个牛津杯中加入 $100 \mu\text{L}$ 不同质量浓度重组杀菌通透性增强蛋白以及相等体积的无菌培养基和透析液, 并在各自适宜温度下分别培养 24 h , 观察抑菌圈形成.

2 结果与讨论

2.1 刺参 BPI 基因 N 末端克隆

以刺参 cDNA 第一链为模板、BPI N-F 和 BPI N-R 为引物扩增得到编码 BPI N 末端功能性结构域在内的 642 bp 的 cDNA 片段(图 1). 经测序分析表明该片段即为刺参 BPI 蛋白的 N 末端编码序列, 编码 214 个氨基酸残基. 研究表明, 脊椎动物 BPI N 末端片段具有完整 BPI 分子杀菌及中和内毒素的全部生物学活性^[4]. 为进一步验证海洋无脊椎动物刺参 BPI 蛋白质 N 端的生物学功能, 对该区域进行了原核表达以及后续的抑菌活性分析.

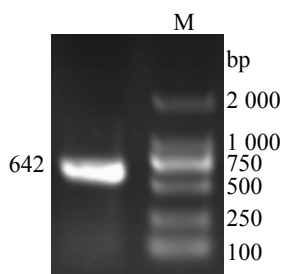
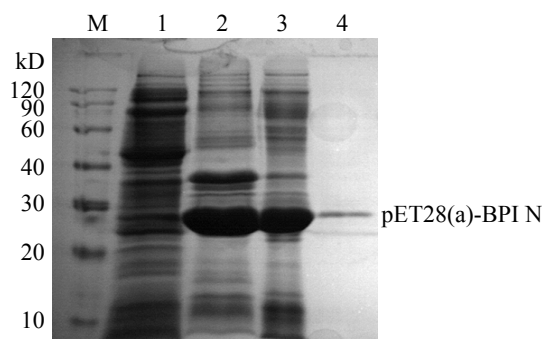


图 1 刺参 BPI 蛋白 N 末端结构域编码序列 PCR 扩增电泳图谱

2.2 刺参 BPI 基因 N 末端的重组表达

对扩增得到的 BPI N 末端功能性结构域通过 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 与同样双酶切的 pET28(a) 载体连接, 构建重组质粒, 挑取阳性克隆并经测序验证表明序列正确. 将该重组子转化 BL21(DE3)表

达感受态, 于 37°C , $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至 $OD_{600}=0.4 \sim 0.6$, 随后加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导 $3 \sim 6 \text{ h}$ 使目的蛋白表达. 离心收集菌体, 通过 SDS-PAGE 电泳检测阳性菌株诱导前后的表达产物. 实验表明, 阳性菌株在诱导前后有 1 条约 30 kDa 的目的蛋白条带明显变粗(图 2, 泳道 2 和 3). 随后对该菌体经超声破碎, 通过 Ni^{2+} 介质过柱, 获得了单一的条带(图 2, 泳道 4), 表明纯化后的蛋白即是目的蛋白, 且该蛋白分子量大小与网站预测大小相符. 由于目的蛋白以包涵体的形式存在(图 2 中未显示), 因此通过透析复性以获得具有活性的重组蛋白.



M 为蛋白质分子量标准, 1 为未诱导重组蛋白包涵体, 2 为诱导 3 h 重组蛋白包涵体, 3 为诱导 6 h 重组蛋白包涵体, 4 为纯化复性后重组蛋白

图 2 刺参 BPI 蛋白 N 末端结构域重组蛋白 SDS-PAGE 分析

2.3 刺参 BPI 基因 N 末端的重组蛋白抑菌活性

经复性的重组蛋白, 以 4 种受试阴性菌副溶血弧菌、哈维氏弧菌、灿烂弧菌、溶藻弧菌以及 1 种受试阳性菌藤黄微球菌为供试菌种, 进行杀菌活性试验. 杀菌试验结果表明, 重组蛋白对供试的 2 株革兰氏阴性菌及 1 阳性菌都表现出一定的抗菌活性(图 3~5), 而对灿烂弧菌及溶藻弧菌无杀菌活性. 其中, 重组蛋白对副溶血弧菌抑菌活性最强, 重组蛋白质量浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径达 2.1 cm ; 当重组蛋白质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径达 2.5 cm . 对哈维氏弧菌的杀菌活性相对较强, 当重组蛋白质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径达 1.9 cm ; 对阳性菌藤黄微球菌的杀菌活性次之, 重组蛋白质量浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径达 0.9 cm ; 当重组蛋白质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径达 1.2 cm . 前期我们通过对刺参 BPI N 末端结构域分析表明, 该片段含有 9 个精氨酸残基和 12 个赖氨酸残基^[11], N 端片段的高度阳离子化能够与革兰氏阴性菌胞膜表面带负

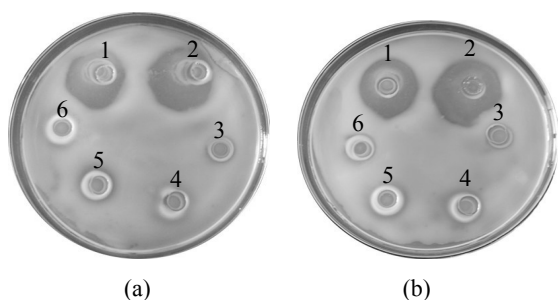


图3 刺参重组杀菌通透性增强蛋白对副溶血弧菌抑制效果
(a)中1和2为每牛津杯中重组蛋白质量浓度 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b)中1和2为每牛津杯中重组蛋白 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (a)和(b)中3和4为阴性对照组1(无菌培养基), (a)和(b)中5和6为阴性对照组2(透析液)

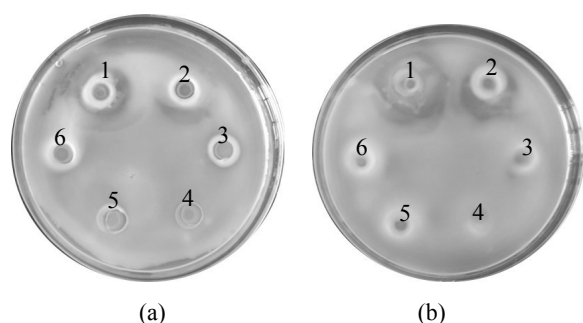


图4 刺参重组杀菌通透性增强蛋白对哈维氏弧菌抑制效果
(a)中1和2为每牛津杯中重组蛋白 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b)中1和2为每牛津杯中重组蛋白 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; (a)和(b)中3和4为阴性对照组1(无菌培养基); (a)和(b)中5和6为阴性对照组2(透析液)

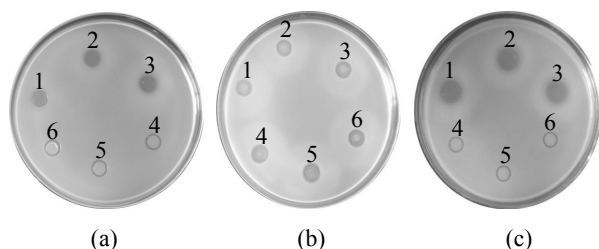


图5 刺参重组杀菌通透性增强蛋白对藤黄微球菌抑制效果
(a)中1、2、3为每牛津杯中重组蛋白 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c)中1、2、3为每牛津杯中重组蛋白 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (a)中4、5、6, (b)中1、2、3为阴性对照组1(无菌培养基), (b)中4、5、6, (c)中4、5、6为阴性对照组2(透析液)

电荷的脂多糖(LPS)紧密结合, 竞争性替换外膜二价 Mg^{2+} , 以此干扰 LPS 分子排列规律, 最终引起细菌膜通透性的改变, 从而杀死细菌^[13-14]。而且随着 BPI 蛋白浓度的提高, 杀菌活性明显增加。本研究中刺参 BPI N 端蛋白对灿烂弧菌及溶藻弧菌无杀菌活性, 这主要与细菌膜表面 LPS 的长度和结构有关, 长链 LPS 对 BPI 的抵抗力较强, 由于它们特有的特异性多糖链能够通过空间位阻作用, 使 BPI 不能与细菌 LPS 的脂质 A 结合, 因此无法影响膜的通透性^[15]。目前, 天然或重组的 BPI 蛋白在体

内外的杀菌作用已被众多试验所证实, 被誉为“超级抗生素”, 具有广阔的应用前景。我们通过对刺参 BPI N 端蛋白的抑菌分析表明, 该重组蛋白具有高效杀灭水产致病菌弧菌属的作用, 对研制新型高效抗生素药物具有重要价值, 可以作为绿色抗生素应用于刺参养殖中。

3 结论

本研究通过 PCR 扩增克隆得到编码刺参 BPI N 端活性结构域的 cDNA 片段, 该片段编码的多肽由 214 个氨基酸残基组成。选择 pET-28(a)作为原核表达质粒, 将 BPI N 端片段插入质粒, 通过菌落 PCR、*Bam*HI 和 *Not*I 双酶切反应以及 DNA 测序, 证明重组表达质粒“pET28(a)-BPI N”已被成功构建, 转化至工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)后无任何 DNA 变异。利用基因工程技术获得的重组蛋白经纯化复性后对 2 株水产病原菌副溶血弧菌、哈维氏弧菌以及阳性菌藤黄微球菌具有较为明显的抑制作用, 显示出其在水产养殖抗菌药物研发中的潜在应用价值。

参考文献:

- [1] 马悦欣, 徐高蓉, 常亚青, 等. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(1):13-18.
- [2] WEISS J, ELSBACH P, OLSSIN I, et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1978, 253(8):2664-2672.
- [3] LEVY O, SISSON R B, KENYON J, et al. Enhancement of neonatal innate defense: Effects of adding an N-terminal recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein on growth and tumor necrosis factor-inducing activity of gram-negative bacteria tested in neonatal cord blood ex vivo[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(9):5120-5125.
- [4] OOI C E, WEISS J, ELSBACH P, et al. A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262:14891-14894.
- [5] IOVINE N M, ELSBACH P, WEISS J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-

- increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94:10973-10978.
- [6] MARRA M N, WILDE C G, COLLINS M S, et al. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin[J]. Journal of Immunology, 1992, 148:532-537.
- [7] WILDE C G, SEILHAMER J J, MCGROGAN M, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269:17411-17416.
- [8] NEWMAN S L, GOOTEE L, GABAY J E. Human neutrophil-mediated fungistasis against histoplasma capsulatum localization of fungistatic activity to the azurophil granules[J]. Journal of Clinical Investigation, 1993, 92(2):624-631.
- [9] WITTMANN I, SCHÖNEFELD M, AICHELE D, et al. Murine bactericidal/permeability-increasing protein inhibits the endotoxic activity of lipopolysaccharide and gram-negative bacteria[J]. Journal of Immunology, 2008, 180(11):7546-7552.
- [10] LITTLE R G, KELNER D N, LIM E, et al. Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI23)[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269:1865-1872.
- [11] SHAO Y, LI C, CHE Z, et al. Cloning and characterization of two lipopolysaccharide-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI) genes from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* with diversified function in modulating ROS production[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 52:88-97.
- [12] 李成华. 栉孔扇贝核心组蛋白的基因结构及 H2A 抗菌活性的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2007.
- [13] BULLOW E, GULLBERG U, OLSSON I. Structural requirements for intracellular processing and sorting of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): Comparison with lipopolysaccharide-binding protein[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2000, 68(5):669-678.
- [14] CANNY G O, MCCORMICK B A. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(8):3360-3373.
- [15] 彭海英, 朱家勇. 杀菌/通透性增加蛋白的研究现状及展望[J]. 医学综述, 2006, 12(1):1-3.

Cloning and Characterization of N-terminal of BPI Protein from Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

CHE Zhong-jie, SHAO Yi-na, LI Cheng-hua*, ZHANG Wei-wei
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The cDNA fragment encoding N-terminal active domain of BPI is cloned from the coelomocytes of sea cucumber *Apostichopus japonicus* by RT-PCR. The cDNA is of 642 bp encoding 214 amino acid residues. The recombinant protein of the N-terminal BPI, around 30 kDa, is generated and purified to homogeneity by Ni-NTA Sepharose column. After recovery, the purified product shows significantly inhibitory activities towards *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Micrococcus luteus*, in which the highest activities are detected in *V. parahaemolyticus* group with lytic zone diameters of 2.5 cm. The present results further support the fact that the BPI-N is a broad-spectrum antibacterial peptide, and also extends our current understanding of antimicrobial peptide from aquaculture animals, as well as helps search the novel antimicrobial peptide drugs to treat drug-resistant pathogens in the fields of pharmaceutical industry, breeding industry and agriculture.

Key words: *Apostichopus japonicus*; bactericidal permeability-increasing protein; prokaryotic expression; antibacterial activity

(责任编辑 史小丽)