

应用 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定布鲁菌*

俞静, 陈峰, 李媛睿, 刘瑛[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院检验科, 上海 200092)

摘要:目的 利用 MicroflexTM LT 型 MALDI-TOF 质谱仪建立布鲁菌蛋白质量指纹图谱数据库, 并评估其在布鲁菌临床分离株鉴定中的应用价值。方法 2013 年 10 月该院微生物实验室分离到 1 株疑似布鲁菌, 经 VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物分析系统及 16S rDNA 基因测序确认为马耳他布鲁菌, 按照厂家推荐方法自建了布鲁菌蛋白质量指纹图谱数据库。对 2015 年 4 月及 2016 年 6 月该实验室分离到的 2 株疑似布鲁菌进行革兰染色、柯氏染色及氧化酶、触酶、快速尿素酶等生化反应试验。使用 MicroflexTM LT 型质谱仪收集这 2 株及外院 3 株布鲁菌疑似菌株的质量图谱, 比对分析图谱时在 MALDI Biotyper 数据库基础上添加自建数据库, 同时使用 16S rDNA 基因测序法鉴定上述细菌。结果 按照自建库推荐操作流程成功获得了基于 BRUxh1 的自建布鲁菌质量指纹图谱数据库。2015 年 4 月及 2016 年 6 月分离到的布鲁菌疑似菌株, 涂片染色镜检均为革兰阴性短小球杆菌, 氧化酶阳性, 触酶阳性, 尿素酶阳性(5 min 内)。这 5 株疑似菌株的质谱鉴定结果均为布鲁菌(质谱评分分别为 2.407、2.475、2.436、2.466、2.397), 16S rDNA 基因测序确认这 5 株细菌为布鲁菌。其中来自外院的 2 株细菌于外院 VITEK[®] 2 Compact 系统鉴定时均错误地鉴定为吉氏玫瑰单胞菌。结论 联合 MALDI Biotyper 数据库与自建布鲁菌数据库对临床分离株进行质量图谱比对分析, 可以实现对布鲁菌属细菌的准确鉴定, 该方法快速、灵敏, 对布鲁菌病的临床快速诊断具有较高的应用价值。

关键词: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 自建库; 布鲁菌; 鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.12.010

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)12-1443-05

文献标识码: A

Rapid identification of *Brucella* by MALDI-TOF MS*YU Jing, CHEN Feng, LI Yuanrui, LIU Ying[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinhua Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Objective To establish *Brucella* peptide mass fingerprint database by MicroflexTM LT MALDI-TOF mass spectrometer, and evaluate its application value in the identification of clinical isolates of *Brucella*. **Methods** In October 2013, a suspected *Brucella* strain was isolated in the microbiology laboratory of the hospital. It was confirmed as *Brucella* melitensis by VITEK[®] 2 Compact automatic microbial analysis system and 16S rDNA gene sequencing. *Brucella* peptide mass fingerprint database was established with this strain according to the manufacturer's recommended method. Two suspected *Brucella* strains isolated in the laboratory in April 2015 and June 2016 were tested for Gram stain, Kozlowski stain and biochemical reactions such as oxidase, catalase and rapid urease activity. MicroflexTM LT mass spectrometer was used to collect the mass spectrums of these two strains and three suspected *Brucella* strains isolated from other hospitals. When these spectrums were comparatively analyzed, self-built database was added on the basis of the MALDI Biotyper database. The 16S rDNA gene sequencing was also used to identify the above-mentioned bacteria. **Results** According to the recommended self-built database construction process, *Brucella* peptide mass fingerprint database based on BRUxh1 was obtained successfully. The suspected *Brucella* strains isolated in April 2015 and June 2016 showed small Gram-negative coccobacillus under microscopic examination of stained smear, and were positive for oxidase, catalase, urease activity (within 5 min). The identification results of mass spectrom-

* 基金项目: 上海申康医院发展中心市级医院临床辅助科室能力建设项目(SHDC22014003)。

作者简介: 俞静, 女, 助理研究员, 主要从事临床微生物耐药机制及流行病学研究。 [△] 通信作者, E-mail: liuying01@xinhuaemed.com.cn。

本文引用格式: 俞静, 陈峰, 李媛睿, 等. 应用 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定布鲁菌[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(12): 1443-1447.

etry for the 5 suspected strains were all *Brucella* (mass spectrometry score: 2.407, 2.475, 2.436, 2.466 and 2.397). The 5 strains were confirmed as *Brucella* by 16S rDNA gene sequencing. Two strains among bacteria from other hospitals were falsely identified as *Roseomonas gilardii* by the VITEK[®] 2 Compact system. **Conclusion** The combination of MALDI Biotyper database and self-built *Brucella* database can be used to comparatively analyze the mass spectrometry of clinical isolates. Accurate identification of *Brucella* can be achieved by this means. The method which is fast and sensitive has high application value for rapid clinical diagnosis of Brucellosis.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; self-built database; *Brucella*; identification

布鲁菌病又名波状热,是由布鲁菌感染引起的自然疫源性疾病,临床上主要表现为病情轻重不一的发热、多汗、乏力、骨关节和肌肉疼痛等^[1]。已知有 60 多种动物(羊、牛、猪、犬、鹿、马、骆驼等)可以作为布鲁菌贮存宿主。布鲁菌病的主要传染源为病畜,人类通过接触或食用病畜肉、奶及奶制品而被感染^[2]。近年来,随着经济发展、国内外交流日益频繁,布鲁菌病的发病率呈上升趋势^[3]。布鲁菌对人体的致病力极强,常导致实验室获得性感染,被认为是潜在的生物恐怖病原菌。因此,快速、准确地鉴定布鲁菌显得尤为重要。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术因具有快速、准确、灵敏、自动化及高通量等特点已广泛应用于病原微生物的鉴定^[4-6]。德国布鲁克公司生产的 MALDI-TOF Biotyper 质谱仪及其配备的 Biotyper 数据库具有快速简单的工作流程和强大可靠的数据处理能力,已被许多临床微生物实验室作为病原菌鉴定的常规仪器。但遗憾的是, Biotyper 常见菌数据库并不含有布鲁菌属细菌的特征指纹图谱。本研究按照布鲁克公司推荐的方法,对 1 株已确定为布鲁菌的临床分离株建立了布鲁菌的质量指纹图谱,并将其运用于布鲁菌的临床鉴定工作中。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本院微生物实验室 2013 年 10 月在 1 份患者血培养阳性标本中分离到 1 株布鲁菌 BRUxh1。2015 年 4 月、2016 年 6 月分别在血培养阳性标本中分离到布鲁菌疑似菌株 BRUxh2 和 BRUxh3。2014 年 10 月(BRUru1)、2015 年 5 月(BRUre1)、2017 年 6 月(BRUru2)2 所上海三级甲等医院未能准确鉴定而送至本院的布鲁菌疑似菌株共 3 株。

1.1.2 试剂 需氧血培养瓶和厌氧血培养瓶(美国, BD 公司);血平板、麦康凯平板(中国,上海伊华生物技术有限公司);巧克力平板(法国, BioMérieux 公司);甲酸、乙腈和三氟乙酸(德国, Sigma-Aldrich 公

司); α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)基质、IVD 细菌测试标准品(德国, Bruker Daltonik 公司);PCR 引物合成(中国,生工生物工程上海公司);PCR 试剂盒(中国,宝生物工程大连有限公司)。

1.1.3 仪器 BACTEC[™] FX 血培养系统(美国, BD 公司); Microflex[™] LT 型 MALDI-TOF MS 仪和 MSP 96 靶板(德国, Bruker Daltonik 公司);Mastercycler Eppgradient PCR 仪(德国, Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 首株布鲁菌的鉴定 2013 年 10 月本院微生物实验室分离到一株布鲁菌疑似菌株 BRUxh1,经涂片革兰染色及柯氏染色判断其疑似布鲁菌,使用 VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物分析系统 GN 革兰阴性菌鉴定卡及 16S rDNA 基因测序确认该菌株为马耳他布鲁菌,后续实验中 BRUxh1 被用于自建 MALDI-TOF MS 布鲁菌蛋白质质量指纹图谱数据库。

1.2.2 MALDI-TOF MS 布鲁菌质量指纹图谱的采集 将 BRUxh1 接种至血平板, 35℃ 孵育 16~24 h,挑取单个菌落于 75% 的乙醇溶液(100 μ L 左右)中混匀, 14 000 r/min 离心 2 min 后弃上清,在菌落沉淀中加入 70% 甲酸溶液和乙腈各 10 μ L,混匀裂解细菌,各取 1 μ L 裂解液点样至 MSP 96 靶板的 8 个靶位上,室温下自然干燥后,每个靶位加入 1 μ L α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)基质,自然干燥后放入 Microflex[™] LT 型 MALDI-TOF MS 仪进行检测。采用 IVD 细菌测试标准品校正仪器参数,利用 Flex control 3.0 软件获得蛋白指纹图谱,每个靶位采集 3 份图谱,将 24 份图谱保存至同一个文件夹内。参数设置:采用线性正离子模式,离子源电压 1 为 20 kV,离子源电压 2 为 18 kV,离子源透镜电压 6 kV,脉冲离子引出时间为 100 ns,检测质量范围 2 000~20 000 m/z,激光衰减器偏置 20%,激光衰减器范围 30%,激光强度 60%~80%,激光解析至少 100 次/孔,累加至信号强度大于 10 000 arb. Unit(每份图谱)。

1.2.3 布鲁菌质量指纹图谱数据的处理 在 MicroFlex[™] Biotyper3.0 鉴定分析软件中打开 BRUxh1 的 24 份质量指纹图谱,评估其质量并删除重复性不

佳的低质量图谱,使用“Create MSP”功能将剩余的合格图谱转化成主要质量图谱(MSP),最后把新生成的MSP添加到新创建的数据库中。

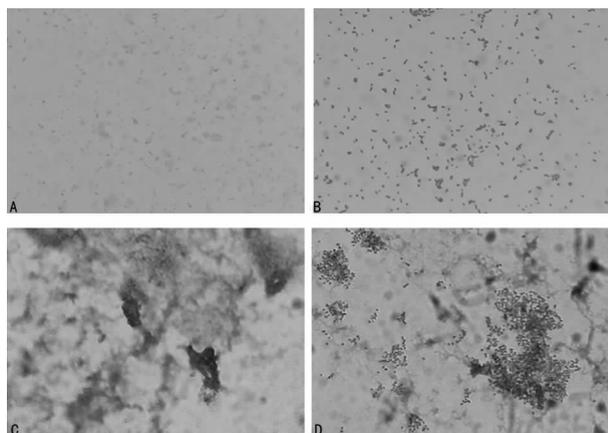
1.2.4 布鲁菌临床分离株的鉴定 对临床分离株 BRUxh2 和 BRUxh3 对应的血培养阳性标本行革兰染色及柯氏染色^[7],纯培养菌落进行氧化酶、触酶、尿素酶等生化反应试验。对 BRUxh2 和 BRUxh3 及外院送交的 BRUru1、BRUru2 和 BRUre1 共 5 株细菌进行 MALDI-TOF MS 检测,参数设置同上。将图谱导入 MicroFlex™ Biotyper 3.0 鉴定分析软件,与 MALDI Biotyper 数据库及自建布鲁菌数据库进行对比,记录排名第一位的鉴定结果和质谱评分以确定细菌分类。

1.2.5 16S rDNA 基因测序 对上述菌株进行细菌 16S rDNA 基因 PCR 及测序,16S rDNA 通用引物序列为 F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', R:5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT-3'。具体过程同文献^[5],PCR 产物送至生工生物工程上海公司进行测序。测序结果提交美国国立生物技术信息中心 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行 blast 对比,分析得出细菌最可能所属的菌种。

1.2.6 血清学试验 采集患者血清送上海市疾病预防控制中心行布鲁菌试管凝集试验。

2 结 果

2.1 涂片染色及生化反应 临床分离株 BRUxh2 和 BRUxh3 菌落涂片革兰染色及柯氏染色镜检为革兰阴性短小球杆菌,血培养阳性标本染色镜检可见菌体细沙样堆积(图 1),布鲁菌革兰染色着色弱,而柯氏染色效果较好,菌体镜下清晰可见,其生化反应结果均为氧化酶阳性,触酶阳性,尿素酶阳性。以上结果说明 BRUxh2 和 BRUxh3 疑似布鲁菌属细菌。

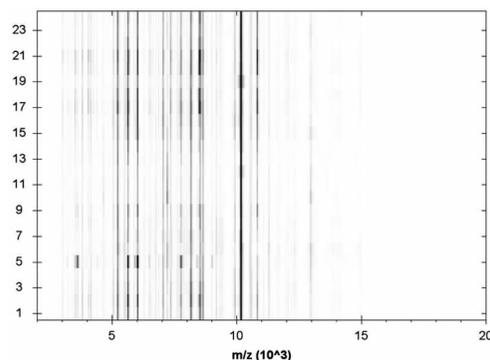


注:A. 菌落革兰染色;B. 菌落柯氏染色;C. 血培养阳性标本革兰染色;D. 血培养阳性标本柯氏染色

图 1 布鲁菌菌落及血培养阳性标本革兰染色及柯氏染色(1 000×)

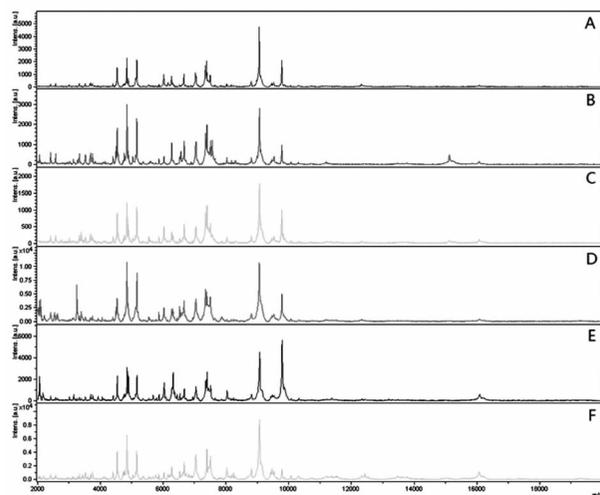
2.2 自建布鲁菌数据库及临床分离株的鉴定 通过

方法 1.2.2 得到了 24 份布鲁菌 BRUxh1 的质量指纹图谱, MicroFlex™ Biotyper 3.0 鉴定分析软件显示 24 份图谱之间相似度高(图 2),无低质量图谱,则未删除任何图谱。应用该软件“Create MSP”功能将此 24 份图谱转化成主要质量图谱,但因软件未提供该功能所生成主要质量图谱的导出或显示等功能,故选取 24 份图谱中 1 份代表性的 BRUxh1 质量指纹图谱见图 3A,获得的 BRUxh2、BRUxh3、BRUru1、BRUru2 和 BRUre1 质量图谱见图 3B~F,可见此 6 份质量指纹图谱较为一致。



注:纵坐标为质量指纹图谱编号,横坐标为质荷比

图 2 24 份布鲁菌 BRUxh1 的 MALDI-TOF MS 凝胶视图



注:A. BRUxh1;B. BRUxh2;C. BRUxh3;D. BRUru1;E. BRUru2;F. BRUre1

图 3 布鲁菌临床分离株质量指纹图谱

使用 MicroFlex™ Biotyper 3.0 鉴定分析软件将这 5 株临床分离株的质量图谱与 MALDI Biotyper 数据库及自建布鲁菌质量指纹图谱进行对比,发现与 5 株细菌相似度高即质谱评分最高的鉴定结果为布鲁菌 BRUxh1,各分离株的质谱评分分别为 2.407、2.475、2.436、2.466 和 2.397。布鲁克公司推荐的质谱鉴定结果 3 分制标准:分值 2.000~3.000 时鉴定结果“种”水平可信,分值 1.700~1.999 时鉴定结果“属”水平可信,分值 ≤ 1.699 时鉴定结果不可信。但是,由于布鲁菌属细菌种间差异较小,且在并未获得

其他种类布鲁菌如流产布鲁菌(即牛种布鲁菌)、猪布鲁菌、狗布鲁菌的自建质谱数据库情况下,本实验针对自建布鲁菌数据库设定评分标准:分值 1.700~3.000 时“属”水平可信,分值 \leq 1.699 时鉴定结果不可信。根据上述标准,5 株细菌被判断为布鲁菌属细菌。

VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物分析系统对 BRUru1 和 BRUre1 的鉴定结果均为吉氏玫瑰单胞菌(*Roseomonas gilardii*),生物编码为 0000001300401001,可信度 99%。

2.3 16S rDNA 基因测序 BRUxh2、BRUxh3、BRUru1、BRUru2 和 BRUre1 的 16S rDNA 基因测序结果表明它们均为布鲁菌属,与上述质谱结果相符。

2.4 血清学试验 根据上海市疾病预防控制中心报告,检出 BRUxh2、BRUxh3 的患者血清中布鲁菌抗体效价为 1:800、1:800(抗体效价 \geq 1:100 为阳性)。

3 讨论

布鲁菌病是全世界最常见的动物源性传染病之一,全球估计每年约新增 50 万病例,给人类健康和畜牧业发展带来严重的威胁和极大的损失^[8-9]。布鲁菌是导致布鲁菌病的病原菌,人群对布鲁菌普遍易感。疫苗是布鲁菌病的主要传染源,我国大部分地区羊是主要传染源,有些地方则为牛、猪,鹿和犬属于次要传染源。通常,布鲁菌患者发病前与家畜或畜产品、布鲁菌培养物发生过密切接触,也可能生活在疫区。2015 年 4 月血培养阳性标本中检出布鲁菌 BRUxh2 的患者并非来自于疫区,但补充询问病史时,他表示近期曾食用羊肉,而另一名检出布鲁菌 BRUxh3 的患者则来自牛羊养殖专业区。外院 3 个病例亦存在类似情况。布鲁菌病一年四季均可发生,羊种即马耳他布鲁菌流行有明显的季节性,我国北方牧区人群发病高峰为 4-5 月,但猪种、牛种布鲁菌引起的布鲁菌病季节性不明显^[10]。本研究涉及菌株数量较少,但有 4 株布鲁菌的检出时间为 4-6 月,推测这些菌可能是马耳他布鲁菌。通过临床表现及病原学检查结果诊断为布鲁菌病后,这 5 例患者转院至上海市公共卫生临床中心进行下一步针对性治疗。

布鲁菌常规鉴定方法为生化表型法即通过 VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物分析系统使用 GN 革兰阴性菌鉴定卡进行菌种鉴定,此方法耗时较长,需孵育过夜才能获得鉴定结果,而且因该菌为潜在的生物恐怖病原菌,所以从生物安全角度考虑,不建议大量活菌试验如使用 GN 卡鉴定细菌。另外,基于 16S rDNA 基因序列测定和比对而建立的细菌鉴别分类方法,被称为细菌鉴定的“金标准”,但此方法步骤烦琐、对人员的技术水平要求较高。外院送交的菌株 BRUru1 和 BRUre1^[11]被 VITEK[®] 2 Compact 系统

错误地鉴定为吉氏玫瑰单胞菌。布鲁菌也曾被其他国内外微生物实验室错误地鉴定为人苍白杆菌、苯丙酮酸莫拉菌、支气管败血鲍特菌及吉氏玫瑰单胞菌等^[12-13]。VITEK[®] 2 Compact 系统误鉴定布鲁菌可能是由于血培养阳性标本所分离的初代细菌生长速度等特性与正常传代培养的标准菌株不同,导致生化反应结果有差异,还可能是因为全自动微生物分析系统会提前判读鉴定结果,而布鲁菌生长缓慢,提前判读可导致鉴定结果错误。16S rDNA 序列测定法也可能误鉴定布鲁菌,其原因是布鲁菌与误鉴定菌种如人苍白杆菌具有高度的同源性,仅通过 16S rDNA 基因序列无法区别二者。

MALDI-TOF MS 技术在细菌快速鉴定方面已得到越来越广泛的应用^[14-15]。许多国内医疗机构的临床微生物实验室已配备或计划购置这类仪器,但考虑到生物恐怖等风险因素,商用质谱仪标配的常用数据库中并没有加入布鲁菌的质量指纹图谱。实际上,布鲁克公司生产的质谱仪具有自建数据库等开放性功能,可将菌种未知的临床分离株质量图谱与自建库中的图谱进行比较从而得到鉴定结果,这间接弥补了上述缺憾。这一功能不仅可以应用于布鲁菌,也可以应用于常用数据库中所没有的其他菌种特别是临床工作中少见的病原菌。对于后期得到的布鲁菌临床分离株,笔者也按照本研究所描述的方法构建了相应的自建数据库图谱,随着自建数据库中布鲁菌蛋白指纹图谱越来越丰富,不同类型的布鲁菌临床分离株与自建库图谱相匹配而得到准确鉴定的概率也随之提高。而且,本机构的自建数据库图谱等数据可以保存并植入其他机构的布鲁克公司质谱仪数据库系统中,这种数据共享也有利于提高此类细菌的鉴定率。当然,这一方法得以正确应用的关键前提是需使用其他方法对建库菌株进行准确鉴定,可以通过多种方法确认该菌株所属菌种,如染色镜检、生化反应、基因测序等。该公司软件还可提供建库质谱图中出现的特异峰数据,如各峰的质荷比、强度、出现频率等,这些信息对于研究各菌株或细菌分型的 MALDI-TOF 质谱特异峰具有重要的提示作用,而深入研究某些特异峰所对应的蛋白可能揭示该类微生物的生物学特性。

与 VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物分析系统、16SrDNA 序列测定法相比,MALDI-TOF-MS 技术可以通过自建数据库迅速并准确地鉴别布鲁菌属细菌,整个过程仅需数分钟。这一优点对于防控布鲁菌这种“生物恐怖战剂”引起的感染性疾病尤为重要,可尽早提示实验室工作人员做好个人防护,操作该患者标本及其培养物时应严格依照相关生物安全级别要求,减少实验室感染的风险。

综上所述,应用 MALDI-TOF MS 技术联合

MALDI Biotyper 数据库与自建布鲁菌数据库分析临床分离株,可以准确、快速、灵敏地鉴别布鲁菌,对布鲁菌病的临床诊断具有较高的应用价值,可使患者及时获得有效的治疗,并采取适当的医院内感染控制措施防止疫情扩散,加强生物安全管理避免实验室获得性感染。

参考文献

[1] DE FIGUEIREDO P, FICHT T A, RICE-FICHT A, et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions[J]. Am J Pathol, 2015, 185(6): 1505-1517.

[2] 毛景东,王景龙,杨艳玲. 布鲁氏菌病的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1): 222-227.

[3] 施旭光,凌锋. 布鲁氏菌病研究进展[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(6): 576-580.

[4] 王冰,任晓庆,褚美玲,等. MALDI-TOF 质谱仪在临床常见细菌鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16): 2228-2230.

[5] 刘瑛,俞静,陈峰,等. Microflex™ MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统对肠杆菌科细菌鉴定能力的比较[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 122-127.

[6] 刘瑛,俞静,陈峰,等. 比较 Bruker Microflex MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动分析系统对酵母菌的鉴定能力[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6): 382-386.

[7] 陈东科,陈丽,许宏涛. 柯氏染色法快速鉴别布鲁菌的方

法学探讨[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(11): 805-807.

[8] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, et al. The new global map of human brucellosis[J]. Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(2): 91-99.

[9] DEAN A S, CRUMP L, GRETER H, et al. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(10): e1865.

[10] 中华人民共和国卫生部. 布鲁氏菌病诊断标准 (WS269-2007) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 3.

[11] 卫颖珏,陈峰,秦娟秀,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定布鲁菌 1 例[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(1): 76-77.

[12] VILA A, PAGELLA H, VERA B G, et al. Brucella suis bacteremia misidentified as Ochrobactrum anthropi by the VITEK 2 system[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(4): 432-436.

[13] 徐金莲,陈学兵,肖学会,等. 马耳他布鲁菌错误鉴定 1 例[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(1): 77.

[14] 王卫萍,奚海燕,黄梅,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在临床病原菌鉴定中的应用[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(5): 337-340.

[15] SCHWARZ N G, LODERSTAEDT U, HAHN A A, et al. Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs)[J]. Acta Trop, 2017, 165: 40-65.

(收稿日期: 2017-12-28 修回日期: 2018-03-08)

(上接第 1442 页)

nism of action of alpha-helical antimicrobial peptides[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1398-1406.

[7] PARK Y, LEE D G, JANG S H, et al. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1645(2): 172-182.

[8] IBRAHIM H R, SUGIMOTO Y, AOKI T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1523(2/3): 196-205.

[9] BECHINGER B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin[J]. J Membr Biol, 1997, 156(3): 197-211.

[10] FEHLBAUM P, BULET P, CHERNYSH S, et al. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(3): 1221-1225.

[11] 蔡青松,张艳,翟朝阳. 新型抗菌肽分子的计算机辅助设计[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(3): 447-449.

[12] HORTON R M, HUNT H D, HO S N, et al. Engineering

hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. Gene, 1989, 77(1): 61-68.

[13] 剧海,梁东春,郭刚,等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较[J]. 天津医药, 2003, 31(5): 270-272.

[14] 黄音,刘飞鹏,周天鸿,等. 蛙皮素-蜂毒素杂合肽基因在大肠杆菌中的克隆与诱导表达[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 207-210.

[15] SHIN S Y, KANG J H, JANG S Y, et al. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic anti-microbial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1463(2): 209-218.

[16] SHIN S Y, LEE M K, KIM K L, et al. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides[J]. J Protein Chem, 1999, 50(4): 279-285.

(收稿日期: 2017-12-27 修回日期: 2018-03-07)