

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2014.03.009

## 鲢抗菌肽 Hecpidin 的基因克隆和表达及抑菌活性分析

周卫军<sup>1,2</sup>, 刘振兴<sup>2</sup>, 柯浩<sup>2</sup>, 马艳平<sup>2</sup>, 郝乐<sup>2</sup>, 徐明芳<sup>1</sup>

(1. 暨南大学生物工程学系实验室, 广东广州 510630; 2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东广州 510640)

**摘要:** 利用同源克隆的方法从鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)的肝脏中克隆出抗菌肽 Hecpidin cDNA (GenBank 登入号 KF312213)后, 通过 pET32a(+) 构建含抗菌肽 Hecpidin 的重组质粒的 pET-Hep/Rosetta 菌株, 在 37 °C、28 °C 和 16 °C 下分别用 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 和 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达, 产物用 Ni Sepharose™ 亲和层析柱纯化并进行体外抑菌试验。鲢 Hecpidin cDNA 总长度 755 bp, ORF 为 282 bp, 5'UTR 为 108 bp, 3'UTR 为 365 bp, 编码 93 氨基酸, 信号肽 24 个氨基酸, 前域 42 个氨基酸和成熟肽 27 个氨基酸。pET-Hep/Rosetta 在 28 °C 和 16 °C 主要是可溶性表达, 37 °C 主要是包涵体表达。纯化的产物经 15% SDS-PAGE 电泳验证为目的产物。目的产物、pET32/Rosetta 产物以及氟苯尼考的体外抑菌试验表明, 目的表达产物对无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 等具有很好的抑菌效果。

**关键词:** 鲢; Hecpidin; 基因克隆; 原核表达; 抑菌效果

中图分类号: Q 785

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)03-0058-07

## Cloning, expression and antimicrobial activity of Hecpidin from *Hypophthalmichthys molitrix*

ZHOU WeiJun<sup>1,2</sup>, LIU Zhenxing<sup>2</sup>, KE Hao<sup>2</sup>, MA Yanping<sup>2</sup>, HAO Le<sup>2</sup>, XU Mingfang<sup>1</sup>

(1. Biology Engineering Laboratory, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. Guangdong Public Lab. of Veterinary Public Health, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The full-length Hecpidin cDNA sequence GenBank No. KF312213 was amplified from the liver of chub (*Hypophthalmichthys molitrix*) by semi-Nested PCR [rapid amplification of cDNA ends (RACE)]. According to prodomain and mature peptide of the Hecpidin cDNA sequence, we designed an upstream primer with *Eco*R I restriction site and downstream primers with *Sal* I restriction site, and cloned the target gene into the expression vector pET-32a(+). The recombinant plasmid was transformed into the expression strain *E. coli* Rosetta and expressed inducibly at different temperatures (37 °C, 28 °C and 16 °C) and of different IPTG concentrations (0.5 mmol·L<sup>-1</sup> and 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>). The protein was purified by Ni Sepharose™ affinity chromatography column. The full-length of the Hecpidin cDNA gene was 755 bp, which included a 282-bp ORF encoding a 93-amino acid prepropeptide. The prepropeptide contained a signal peptide (24 amino acids), a prodomain (42 amino acids) and a mature peptide (27 amino acids). The purified product displayed a single protein band through 15% SDS-PAGE electrophoresis. The purified production of pET-Hep/Rosetta had obvious antibacterial effect on *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophila*, but the control group showed no inhibitory effect.

**Key words:** *Hypophthalmichthys molitrix*; Hecpidin; gene clone; prokaryotic expression; inhibitory effect

收稿日期: 2013-12-06; 修回日期: 2014-02-19

资助项目: 广州市农业科技攻关项目(GZCQC1202FG04002-01); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201201C01); 广州市科技计划项目(201300000064); 广东省科技计划项目(2008B020700006)。

作者简介: 周卫军(1988-)男, 硕士, 从事水产和分子生物学研究。E-mail: zhouweijun1988@126.com

通信作者: 柯浩(1965-)男, 研究员, 硕士, 从事水产病害研究。E-mail: keha@tom.com

徐明芳(1962-)女, 教授, 博士, 从事食品研究。E-mail: txm992005@yahoo.com.cn

目前由于抗生素的滥用, 导致许多病原菌产生了耐药性<sup>[1-2]</sup>。抗菌肽是自然界广泛存在的一类具有广谱抗菌活性的肽类, 具有广谱性、高效性、不易使细菌产生耐药性等特点, 已成为近年来生物和医学领域研究的大热点<sup>[3-6]</sup>。抗菌肽作为机体非特异性免疫系统的一道防线, 广泛存在于植物、昆虫、两栖类、鱼类、哺乳类等中<sup>[7-11]</sup>。Hecpidin 是一类具有调节铁代谢抗菌肽, 随着对鱼类抗菌肽研究的不断增多<sup>[12-14]</sup>, 目前已在许多鱼类中扩增出了 Hecpidin 基因<sup>[15]</sup>, 如尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[16]</sup>、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[17]</sup> 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[18]</sup> 等。

前人已报道了 Hecpidin 抗菌肽对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 具有很好的抑菌效果<sup>[19-20]</sup>。对真鲷<sup>[21]</sup> (*Pagrus major*)、黑鲷<sup>[21]</sup> (*Spargus macrocephalus*)、青石斑鱼 (*E. awoara*)、中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 等鱼类的 Hecpidin 表达产物的体外抑菌效果也有报道。但迄今为止, 未见有鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 的 Hecpidin 基因克隆和抑菌活性的报道。文章首次克隆表达鲢的 Hecpidin 基因, 开展了表达产物对无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、霍乱杆菌 (*Vibrio cholerae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、嗜水气单胞菌等 6 株菌的体外抑菌效果试验, 为研究鲢 Hecpidin 的作用和应用提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与菌株

鲢[体长(15±1)cm, 体质量(0.6±0.05)kg]购自清远某养殖场; 大肠杆菌 DH5α、pET32a (+)、大肠杆菌 Rosetta、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、蜡样芽孢杆菌(笔者实验室保存); E. Z. N. A Gel Extraction Kit、E. Z. N. A cycle-Pure kit (Omega); Sal I 和 EcoR I 内切酶、T4DNA 连接酶(Takara); 蛋白质 marker、质粒小量提取试剂盒(天根); Ni-NTA His·Bind 树脂(默克, 69755-3); 透析袋(spectrum, 132625, 截留分子量 2 000)。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 鲢总 RNA 提取和引物设计 用浓度为 10<sup>5</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 的无乳链球菌浸泡鲢诱导 Hecpidin 基因的表达。2 h 后取鲢的肝脏、头肾、后肠、鳃 4 个组织, 参照 Trizol 说明书提取总 RNA。采用 Prime Script II RTase 试剂盒反转录 cDNA 第一链。对 NCBI 中的 Hecpidin cDNA 序列, 用 clustalX 在线比对, 找出其在各物种间的保守序列, 设计简并引物 Hecpidin-F<sub>1</sub> 和 Hecpidin-R<sub>1</sub> (表 1)。

#### 1.2.2 Hecpidin cDNA 全长基因半巢式 PCR

利用简并引物扩增 Hecpidin cDNA 的中间片段, 反应条件为 94 °C, 10 min 预变性, 按以下条件进行 35 个循环, 94 °C, 35 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 35

表 1 引物序列表

Tab. 1 Primers used in cloning and PCR

引物名称 primer name	序列(5'→3') primer sequence
上游简并引物 Hecpidin-F <sub>1</sub>	CAGACCGCAGCYGTTCCVTT
下游简并引物 Hecpidin-R <sub>1</sub>	AGTTGCAGCAGTAYCTGCAC
3'race 上游引物 Hecpidin-F <sub>2</sub>	ACAGCAGGAGCAGGATGAG
3'race 上游引物 Hecpidin-F <sub>3</sub>	GCATCAAATGGAGATCGAAA
3'race 下游引物 RAP	GGCCACCGCTCGACTAGTAC(T) <sub>17</sub>
3'race 下游引物 AP	GGCCACCGCTCGACTAGTAC
5'race 下游引物 Hecpidin-R <sub>2</sub>	GTTCGTACAGCAGGAGCAGG
5'race 下游引物 Hecpidin-R <sub>3</sub>	GGAGATCGAAACACCACAGC
5'race 上游引物 FAP	ACGCGTCTCGACTAGTA(C) <sub>17</sub>
5'race 上游引物 AP	GGCCACCGCTCGACTAGTAC
表达上游引物 Hecpidin-F <sub>4</sub>	ggGAATTCgAAACGTCAAAGCCATCTT
表达下游引物 Hecpidin-R <sub>4</sub>	ggGTCGACgTTAGAATTTACAGCAATATC

s, 最后 72 °C, 延伸 9 min。PCR 结束后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳和切胶回收, pMD18-T 载体连接, 转入到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, PCR 鉴定为阳性的克隆送上海生工测序。根据扩增的中间片段设计 3'RACE 的引物: Hepcidin-F<sub>2</sub>、Hepcidin-F<sub>3</sub>、RAP 和 AP(表 1)。先用 F<sub>2</sub>/RAP 进行第一轮扩增, 再将扩增产物作为模板, 采用 F<sub>3</sub>/AP 进行第二轮扩增, 电泳切胶回收扩增产物, 参照上述中间片段进行连接、转化并测序。根据 3'RACE 扩增的序列和中间片段序列, 设计 5'RACE 的引物: Hepcidin-R<sub>2</sub> 和 Hepcidin-R<sub>3</sub> 以及 FAP。扩增方法参照 3'RACE, 先用 FAP/R<sub>2</sub> 进行一扩, 以一扩产物做二扩模板用 AP/R<sub>3</sub> 引物进行扩增。

**1.2.3 Hepcidin 基因的原核表达** 根据 signal P 分析推测抗菌肽的前域和成熟肽序列设计引物, 分别设计含有 *EcoR* I 的酶切位点和 *Sal* I 的酶切位的上下游引物: Hepcidin-F<sub>4</sub> 和 Hepcidin-R<sub>4</sub> (表 1), 进行 PCR 扩增, 扩增产物采用 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切后插入质粒 pET32a(+), 构建的载体命名为 pET-Hep。将 pET-Hep 转入到 Rosetta 的感受态细胞中, 送上海生工测序。以转入 pET32a 质粒的 Rosetta 菌株为对照。将试验组和对照组的构建菌分别接种到含有 AMP 和氯霉素(Chl)的 LB 培养基中, 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养, 过夜培养物按照 1:100 的比例扩大培养。当培养的光密度(OD<sub>600 nm</sub>) 达到 0.7~0.8 时分成 6 管, 分别编号 1、2、3、4、

5 和 6。第 1 与第 2 管, 第 3 与第 4 管, 第 5 与第 6 管分别在 37 °C、28 °C 和 16 °C 下培养。在 1、3 和 5 管中加入 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG; 在 2、4 和 6 管中加入 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 诱导表达。在第 0~第 5 小时内每隔 0.5 h 从培养管中收集 1 mL 的菌液于 4 °C、10 000 × g、离心 1 min 收集菌体后用 1 mL PBS 重悬, 再离心收集菌体。裂解后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确认最佳的表达条件。

**1.2.4 表达产物的抑菌试验** 将扩大培养的菌体用超声波破碎细胞, 在 4 °C、10 000 × g、离心 10 min 后收集上清液, 纯化表达蛋白, 纯化过程参照默克 His·Bind 树脂纯化说明书。收集纯化后的样品, 采用透析袋进行透析, 透析袋扁平宽度为 27 mm, 每隔 1 h 换超纯水 1 次, 直到在透析液中加入 1% 硝酸银(AgNO<sub>3</sub>) 检测不到有氯化钠(NaCl) 和氯化钾(KCl) 为止。将透析的表达产物浓缩后检测蛋白浓度, 采用牛津杯法分析上述表达产物对无乳链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等 6 株菌的抑菌效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲢 Hepcidin 基因序列分析

将扩增的 3'端、5'端和中间片段拼接起来, 得到完整的鲢 Hepcidin cDNA(图 1)。将该序列经 clustalX 1.83 和 NCBI blast 比对, 发现其与草鱼(*Ctenopharynodon idellus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和斑

图 1 鲢 Hepcidin cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

小写字母分别代表 5'-UTR 和 3'-UTR; “\*” 之间表示的是前域

Fig. 1 Complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *H. molitrix* Hepcidin

The lowercase letters represent complete 5'-UTR and complete 3'-UTR; the space between “\*” is prodomain.

马鱼 (*Danio rerio*) 的 Hepsidin cDNA 相似度最高, 与草鱼的相似度达到 99%, 与鲤的相似度达到 95%。将该序列登录到 GenBank 中 (登录号 KF312213)。通过 DNASTAR 分析发现, Cys 主要集中在其两端且分布在表面, 其中含有很多的酶切位点。利用 signal P 在线分析预测 (<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/swxxx/jakj/dianzi/Bioinf7/Expasy/Expasy21.htm>) 发现, 切除信号肽和前域之后的成熟肽带 4.2 个正电荷, 属于阳离子型抗菌肽。鲢的成熟肽含有 8 个 Cys, KRQSHLSLCRYCCNCCRNKGCGYCCKF。8 个 Cys 通过 4 个链内二硫键形成短的发卡结构。该 cDNA 序列 ORF 总共编码 93 aa, 信号肽有 24 aa, 前域有 42 aa, 成熟肽有 27 aa。根据多肽信号肽位点分析

可知, 在之间有一个信号切割位点, 同时在序列 63~66 位有 RXKR 的信号切割位点。

## 2.2 鲢 Hepsidin 系统进化分析

利用 MEGA 4.1 软件采用 construct phylogeny 的 N-J 法构建硬骨鱼类、软骨鱼类、两栖类、爬行类、鸟纲、哺乳纲物种 Hepsidin cDNA 序列系统进化树, 结果见图 2。鲢与鲤、草鱼等非常相近, 而两栖纲、爬行纲、哺乳动物的 Hepsidin 则在不同的分支上。即使是同一个纲, 硬骨鱼和软骨鱼也不同一个分支, 根据进化树可以看出, 鲤形目下不同亚科的鲢 Hepsidin 同鲤、草鱼、斑马鱼的比较近, 整体上与生物进化趋势相符合。

## 2.3 原核表达和纯化

通过构建原核表达载体 pET-Hep 后提取质粒

图 2 用 NJ 法构建 Hepsidin 进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on Hepsidin nucleotide sequences using NJ method

进行酶切,得到一条和目的片段大小一致的条带,说明构建成功了。重组质粒转入到 Rosetta 感受态细胞中,通过摸索诱导的条件,发现在 28 ℃、IPTG 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>条件下诱导表达量最高。并且 28 ℃和 16 ℃主要是可溶性表达,而在 37 ℃主要是包涵体表达。因此将条件设置为 28 ℃、IPTG 浓度 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>进行扩大培养。扩大培养菌液经过超声波破碎和 NI 柱纯化后,15% SDS-PAGE 电泳得到了一条 23 kD 的单一的目的条带(图 3)。

#### 2.4 表达产物的抑菌效果

重组菌 pET-Hep/Rosetta 诱导表达后收集菌体纯化,过 NI 柱纯化后的 Hepcidin 产物,其蛋白质质量浓度为 0.12 μg·μL<sup>-1</sup>。对纯化透析浓缩的目的蛋白、洗脱缓冲液和 pET/Rosetta 表达产物采用牛津杯法进行抑菌试验,以氟苯尼考(含量为 30 μg·片<sup>-1</sup>)为阳性对照,结果表明,经过纯化透析浓缩的 pET-Hep/Rosetta 产物对无乳链球菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、嗜水气单胞菌都产生抑菌圈,有一定的抑菌效果,其中对链球菌的抑菌效果最强,对大肠杆菌没有抑菌效果。洗脱缓冲液

和 pET/Rosetta 表达产物没有抑菌效果,氟苯尼考抑菌效果最好(表 2)。

图 3 SDS-PAGE 电泳

M. 蛋白分子质量标准; 1. 对照质粒(pET/Rosetta); 2. pET-hep/Rosetta 表达产物; 3、4. Ni 柱子洗脱纯化的表达产物

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis

M. standard weight of molecular protein; 1. control plasmid (pET/Rosetta); 2. expression protein of pET-Hep/Rosetta; 3, 4. purified product of protein

表 2 抗菌肽对 6 种菌抑菌圈大小(直径)

Tab. 2 Antibacterial ability of six antimicrobial peptides (diameter)

mm

菌种 strain	纯化产物 purified product	缓冲液 buffer solution	对照组 control	氟苯尼考 Florfenicol
无乳链球菌 ( <i>Streptococcus agalactiae</i> )	19	0	0	29
蜡样芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> )	6	0	0	20
霍乱弧菌 ( <i>Vibrio cholerae</i> )	0	0	0	18
嗜水气单胞菌 ( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	10	0	0	20
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	7	0	0	17
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	0	0	0	20

注:涂布在平板上的菌浓度为 10<sup>7</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>,取 1 mL 涂布在培养基上,链球菌放在 30 ℃培养,其余放在 37 ℃培养。Purified product 加入 250 μL 蛋白质质量浓度为 0.12 μg·μL<sup>-1</sup>; buffer solution 加入 250 μL; 对照组加入 150 μL,蛋白质质量浓度为 0.2 μg·μL<sup>-1</sup>,氟苯尼考加入一片,每片 30 μg

Note: The bacteria amount was about 10<sup>7</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>. We took 1 mL coating on the medium and cultured the *Streptococcus* at 30 ℃; the other five bacteria were cultured at 37 ℃. Purified product, 0.12 μg·μL<sup>-1</sup>, 250 μL; buffer solution, 250 μL; control, 0.2 μg·μL<sup>-1</sup>, 150 μL; florfenicol, each tablet 30 μg.

### 3 讨论

鱼类抗菌肽在鱼类非特异性防御<sup>[22-23]</sup>中起非常重要的作用。通过 clustalX1.83 比较鲢、斑马鱼、草鱼以及鲤的 Hepcidin 基因编码的蛋白(图 4),发现鲢和鲤、草鱼的 Hepcidin 差异性主要在前域。编码蛋白在成熟肽部分与鲢和草鱼完全相

似,但斑马鱼与前三者在成熟肽部分有明显差异性。通过比较大部分鱼类的 Hepcidin 发现,除了 *Solea senegalensis* 和 *Pongo abelii* 等少数几种鱼类外,大部分的鱼类都含有 8 个 Cys,可以形成 4 个二硫键。在鲢、鲤和草鱼中,第 4 个二硫键是一个特殊的二硫键,这个二硫键可能具有更高的化学能和反应的活化能,可能与多肽的抗菌活性有直接的

图4 鲢、草鱼、鲤和斑马鱼 Hecpidin 编码蛋白质序列差异性比较

Fig. 4 Comparison of protein sequences of *H. molitrix*, *C. idellus*, *C. carpio* and *D. rerio* Hecpidin

关系<sup>[12]</sup>。

常用的表达系统主要是毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的真核表达和大肠杆菌的原核表达系统。有人只表达成熟肽<sup>[24-26]</sup>,也有人表达前域和成熟肽2个部分<sup>[15]</sup>,该试验采用后者。有文献采用20℃和37℃这2组温度进行诱导表达<sup>[27]</sup>。该试验在16℃、28℃和37℃下,分别用浓度0.5 mmol·L<sup>-1</sup>、1.0 mmol·L<sup>-1</sup>的IPTG进行诱导表达,发现在37℃条件主要是包涵体表达,28℃和16℃主要是可溶性表达。16℃虽然也是可溶性表达,但在16℃条件下构建菌株生长缓慢。在28℃、1.0 mmol·L<sup>-1</sup>条件下可溶性表达/包涵体表达蛋白比例达到87%~93%,单位体积菌液得到的表达蛋白更多。因此选择了28℃、1.0 mmol·L<sup>-1</sup>诱导表达。

进行Ni Sepharose™亲和层析柱纯化,纯化产物进行抑菌试验。由于试验过程中要确保pET-Hep/Rosetta表达纯化浓缩产物(purified product)和氟苯尼考(每片30 μg)浓度的一致性,因此采用牛津杯或者琼脂孔扩散法。杨明<sup>[21]</sup>通过养殖真鲷、

黑鲷抗菌肽 Hecpidin 的表达产物对大肠杆菌(G<sup>-</sup>)、金黄色葡萄球菌(G<sup>+</sup>)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)(G<sup>-</sup>)、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)(G<sup>+</sup>)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)(G<sup>+</sup>)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)(G<sup>+</sup>)6株菌进行了抑菌试验,发现表达产物对链球菌的抑菌效果最好,其次是大肠杆菌。邓尚龙<sup>[28]</sup>用石斑鱼 Hecpidin 的原核表达产物进行了抑菌试验,发现石斑鱼 Hecpidin 表达产物对革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌)具有抑制作用,同时对革兰氏阴性菌(如大肠杆菌)也具有抑制作用,但对溶壁微球菌无抑菌活性。但是石斑鱼的表达产物经过酶切之后,对溶壁微球菌有抑菌效果。蔡晶晶等<sup>[29]</sup>研究黑鲷抗菌肽 Hecpidin 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性时发现,表达的产物对革兰氏阳性菌[金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶壁微球菌、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)]和革兰氏阴性菌[大肠杆菌、哈氏弧菌(*V. harvryi*)]都具有抑菌效果。高宇等<sup>[30]</sup>研究中

图5 鲢、黑鲷和青石斑鱼编码蛋白质之间的差异

Fig. 5 Comparison of protein of *H. molitrix*, *S. macrocephalus* and *E. awoara* Hecpidin

华鲟抗菌肽 Hecpeidin 的表达及抑菌试验发现, 表达产物对金黄色葡萄球菌和无乳链球菌有抑菌效果, 但是表达产物对枯草芽孢杆菌没有抑菌效果。通过比较鲢、黑鲟和石斑鱼编码蛋白质之间的差异(图5), 发现这3种鱼编码蛋白在信号肽区域同源性较高, 但在前域和成熟肽区域蛋白质序列有很大的差异, 这些差异可能是导致它们抑菌差异性的主要原因之一。

笔者试验成功地将鲢 Hecpeidin 基因导入到 Rosetta 中表达, 尽管表达产物对大肠杆菌没有抑菌效果, 但是对其他的革兰氏阳性菌和阴性菌具有很好的抑菌效果, 尤其对无乳链球菌抑菌效果更佳, 具有潜在的应用开发前景。

#### 参考文献:

- [1] 戴秀美, 常维山. 2012 年我国部分地区猪源大肠杆菌耐药性分析[J]. 兽医研究, 2013(1): 50-52.
- [2] 凌保东. 鲍曼不动杆菌抗生素多重耐药性耐药机制与感染治疗对策[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(4): 241-254.
- [3] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69-72.
- [4] 叶星, 白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 274-279.
- [5] SHI Jishu, CAMUS A C. Hecpeidins in amphibians and fishes: antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 30(5): 746-755.
- [6] KRAUSE A, NEITZ S, MAGERT H J, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity[J]. FEBS Lett, 2000, 480(2/3): 147-150.
- [7] 王琼, 何清君. 植物抗菌肽研究进展[J]. 四川师范学院学报, 2000, 21(2): 141-145.
- [8] ZHAI P, HAN J H, HUO L X, et al. Housefly bacteriostatic dynamics research of antibacterial peptide and its mechanism[J]. Chin Biotechnol, 2006, 26(11): 33-39.
- [9] 单红, 周国勤, 朱银安, 等. 鱼类抗菌肽的研究进展[J]. 水产养殖, 2012, 33(1): 20-25.
- [10] 王延卓, 董晓庆, 曲桂娟, 等. 猪血中抗菌肽的提取[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(5): 15-17.
- [11] MAISETTA G, PETRUZZELLI R, BRANCATISANO F L, et al. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 28(3): 321-336.
- [12] 王克坚. 海洋鱼类和青蟹抗菌肽 Hecpeidin 和 Scygonadin 的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2011, 50(2): 418-424.
- [13] 温武军. 鲤鱼抗菌肽基因的克隆及其功能的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2011.
- [14] SOW F B, FLORENCEW C, SATOSKAR A R, et al. Expression and localization of Hecpeidin in macrophages, a role in host defense against tuberculosis[J]. J Leukoc Bio, 2007, 82(4): 934-9451.
- [15] PARK C H, VALORE E V, WARING A J, et al. Hecpeidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. J Biol Chem, 2001, 276(11): 7806-7810.
- [16] 高宇, 陈昌福, 李大鹏, 等. 中华鲟抗菌肽 Hecpeidin 的克隆、表达及其抗菌活性分析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 798-803.
- [17] 黄文树, 李少菁, 杨明, 等. 尼罗罗非鱼 Hecpeidin 基因结构与序列分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 390-395.
- [18] 陈大玮, 邓利, 李荔, 等. 点带石斑鱼抗菌肽 Hecpeidin 基因克隆及其成熟肽的原核融合表达[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(2): 117-121.
- [19] 沈文英, 李卫芬, 雷凯, 等. 黄颡鱼抗菌肽 Hecpeidin 基因的克隆和表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(6): 972-978.
- [20] 陈大玮, 邓利, 刘志刚, 等. 斜带石斑鱼抗菌肽 Hecpeidin 基因克隆及其成熟肽的原核融合表达[J]. 南方水产科学, 2011, 7(1): 2-7.
- [21] 杨明. 养殖真鲷、黑鲟抗菌肽 hecpeidin 的基因克隆、表达特性及其抗菌活性研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2006.
- [22] HUNTER H N, FULTON D B, GANZ T, et al. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis[J]. Eur J Biochem, 2002, 277(40): 37597-37603.
- [23] SHIHE H, LAUTH X, WESTERMAN M E, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(8): 2232-2237.
- [24] 李静, 冯兴军, 宋雪莹, 等. 抗菌肽酵母表达系统的研究进展[J]. 中国饲料, 2011, 7(8): 4-6.
- [25] 黄莹, 张守纯, 赵越, 等. 抗菌肽基因工程研究进展及其在畜牧生产体系中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 4(2): 4-7.
- [26] 李伟, 陈松林, 赵晓, 等. 大菱鲆 hecpeidin 抗菌肽基因的克隆及在大肠杆菌中的高效表达[J]. 长江大学学报: 自科版, 农学卷, 2007, 4(3): 84-87.
- [27] 赵华, 张艳艳, 汤加勇, 等. 重组鲢抗菌肽 parasin I 原核表达、纯化与抗菌活性[J]. 动物营养学报, 2012, 24(9): 1731-1736.
- [28] 邓尚龙. 石斑鱼抗菌肽 Hecpeidin 基因的克隆、表达与抗菌活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [29] 蔡晶晶, 杨明, 蔡灵, 等. 黑鲟抗菌肽 Hecpeidin 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2009, 48(5): 738-743.
- [30] 高宇, 陈昌福, 李大鹏, 等. 中华鲟抗菌肽 Hecpeidin 的克隆、表达及其抗菌活性分析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 798-803.