

密级: _____



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

博士学位论文

日本鳗鲡血红蛋白源抗菌肽的分离和 cathelicidin
的克隆与原核表达

作者姓名: _____ 张东玲 _____

指导教师: 关瑞章 教授 集美大学、中国科学院水生生物研究所

学位类别: _____ 理学博士 _____

学科专业: _____ 水生生物学 _____

培养单位: _____ 中国科学院水生生物研究所 _____

二零一二年十二月

**Isolation of an Antibacterial Peptide
Derived from Hemoglobin Alpha, and Cloning,
Prokaryotic Expression of Cathelicidin in *Anguilla japonica***

By

[Zhang Dongling]

**A Dissertation Submitted to
University of Chinese Academy of Sciences
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of Doctor of Science**

[Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences]

December, 2012

日本鳗鲡血红蛋白源抗菌肽的分离和 cathelicidin 的克隆与原核表达

博士研究生：张东玲

指导教师：关瑞章 教授

摘要

鳗鲡是世界主要水产养殖种类之一，中国是最大的生产国，总产量约占世界的 70%。随着养殖集约化程度的提高，病害及药物残留问题日益突出，并严重制约着鳗鲡产业的可持续性发展。抗菌肽具有高效广谱的抗菌活性和不易产生耐药性等特点，可在鱼病防治中起重要作用，因此倍受关注。本研究采用高效液相色谱和分子生物学技术，从日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 肝脏分离鉴定了一个血红蛋白源性的抗菌肽；并克隆和原核表达了两个 cathelicidin 基因变体。主要研究成果如下：

1 抗菌肽的分离与纯化

本研究分离纯化得到一个血红蛋白源抗菌肽。实验采用醋酸浸提，阳离子交换和反相高效液相层析分离技术，从养殖的健康日本鳗鲡肝脏内获得一个单一组分。该组分为 11.30 μM 时，对迟钝爱德华氏菌抗菌活性较强，杀菌指数 (Ki%) 为 $88.64\% \pm 3.91\%$ 。经质谱分析，分子量为 2388.05，Edman 降解法测定 N-末端 18 个氨基酸残基序列为 H-FAHWPD LGPGSPSVKKHG-OH。与欧鳗 (*A. Anguilla*) 的血红蛋白 α 链部分序列相似度达 94%，可能为血红蛋白的降解片段，因此，命名为 AjHb α 。

2 AjHb α 氨基酸的全长序列分析

本研究获得 AjHb α 完整的氨基酸序列。实验根据已知的 18 个氨基酸序列，设计简并引物，利用 RACE 技术，克隆获得 AjHb α 完整的 cDNA 序列，结合质谱所测 AjHb α 的分子量，推测 AjHb α 完整的氨基酸序列为 H-FAHWPD LGPGS

PSVKKKHGKVM-OH。应用生物学软件分析该抗菌肽为一两亲性的弱阳离子抗菌肽，电荷为+2，pI 为 9.27。

3 AjHb α 的抗菌活性分析

本研究发现 AjHb α 具有较强的抗菌活性。实验采用微孔液体培养法检测人工合成的 AjHb α 的抗菌活性，结果表明 AjHb α 具有广谱的抗革兰氏阳性和阴性细菌的活性。浓度为 83.72 μ M 时，可杀灭革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌和溶壁微球菌）和阴性菌（迟钝爱德华氏菌、哈维氏弧菌、豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌、简达气单胞菌、威隆气单胞菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌），Ki%达到 95%以上。浓度为 41.86 μ M 时，对上述革兰氏阴性菌的后六株抗菌活性较强，Ki%达到 70%以上。

4 Cathelicidin 基因的克隆

本研究克隆得到两个 cathelicidin 基因变体。实验根据已知的日本鳗鲡 cathelicidin EST 标签，设计引物，克隆得到两条 cathelicidin cDNA 序列，分别命名为 Ajcath1、Ajcath2（GenBank 登录号为 AFP72291 和 AFP72292）。两条 cDNA 序列都包含完整的 cathelicidin 编码区及非编码区，序列末端都具有明显的多腺苷酸化加尾信号。根据推导的氨基酸序列，两条均由信号肽、结构域和成熟肽三部分组成，靠近 C 端有四个保守的半胱氨酸序列。根据已知鱼类的 cathelicidin 成熟肽序列及嗜中性粒细胞弹性蛋白酶酶切位点，推测 Ajcath1 成熟肽序列为 H-RMRRSKAGKGS GG NKG NKG SGG NKG NKG SR PGG GSSIAGRDKG DSGTRTA-OH，分子量为 4818.2 Da，pI 值为 12.02，电荷+11，是一个富含甘氨酸的强阳离子抗菌肽。Ajcath2 成熟肽序列为 H-TDPEERKKLSEPPSWTKYFSN W-OH，分子量为 2726.0 Da，pI 值为 5.93，电荷为 0。Ajcath2 与其他已知鱼类 cathelicidin 无相似性，具有其它鱼类罕见的 cathelin 高度保守区，可能为新发现的鱼类抗菌肽。

5 Ajcath1 和 Ajcath2 重组蛋白的表达

本研究获得日本鳗鲡 cathelicidin 重组表达产物。实验根据 Ajcath1 和 Ajcath2 cDNA 序列，经过引物末端加接头除去信号肽序列，分别构建了 pET-28a

/cathelicidin 表达载体,并在大肠杆菌内成功表达出 cathelicidin 重组蛋白。Ajcath1 在菌体密度为 OD600=0.3, 诱导剂浓度为 0.1 mM, 42 °C 诱导表达 7 h 条件下, 重组蛋白表达量最高; Ajcath2 表达条件为: 菌体密度为 OD600=0.3, 诱导剂浓度为 0.1 mM, 37 °C 诱导表达 4 h。对以包涵体形式存在的重组蛋白, 应用亲和层析柱、AKTA-purifier 100 纯化系统及透析法, 得到较高纯度的 cathelicidin 重组蛋白, 为进一步研究 cathelicidin 成熟肽序列及抗菌活性奠定基础。

本研究从日本鳗鲡肝脏分离得到一个具有广谱抗菌活性的血红蛋白源抗菌肽, 并克隆得到两个 cathelicidin 基因变体, 在大肠杆菌内表达出两个重组蛋白。该成果为抗菌肽作为鱼类疾病防治新途径奠定了基础。

关键词: 日本鳗鲡, 肝脏, 抗菌肽, 血红蛋白, cathelicidin, 重组蛋白

**Isolation of an Antibacterial Peptide
Derived from Hemoglobin Alpha, and Cloning,
Prokaryotic Expression of Cathelicidin in *Anguilla japonica***

Zhang Dongling

Directed by Guan Ruizhang

Abstract

Eel is one of the main aquaculture species over the world. China is the largest eel producer with 70% of the world total output. However, with the increase of intensive aquaculture, diseases and drug residue problems became more seriously, which has restricted the sustainable development of the eel farming industry. Antibacterial peptides are regarded as the most potential antibiotics alternatives and would play an important role in aquaculture diseases control. In this study, using the method of HPLC and molecular techniques, an antibacterial peptide was purified and identified, which was derived from hemoglobin alpha chain. Furthermore, two variants of cathelicidin were cloned and recombinant proteins of both genes were acquired. The main achievement of the study is shown as follows:

1 Isolation and purification of antibacterial peptide

An antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha chain was isolated and purified. Using the method of cation exchange liquid chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), an antibacterial peptide was purified from acetic acid extraction of *A. japonica* liver. It exhibited strong antibacterial activity against *Edwardsiella tarda*, with a killing index (Ki%) of $88.64\pm 3.91\%$ at concentration of $11.30\ \mu\text{M}$. Its molecular weight is 2388.05 Da detected by MALDI-TOF MS. The N-terminal 18-residue sequence of the peptide was H-FAHWPD LGPGSPSVK KHGKVIM-OH determined by Edman degradation. The sequence was highly identity (94%) to hemoglobin alpha chain of *A. Anguilla*. Thus it

was deduced to be fragment of hemoglobin, and was named as AjHb α .

2 Analysis of AjHb α full-length amino acid sequence

A complete N-terminal amino acid sequence of the AjHb α was obtained. Based on the N-terminal 18-residue sequence of the peptide determined by Edman degradation, the full-length sequence of hemoglobin alpha was cloned. According to molecule weight of MALDI-TOF MS, the deduced amino acid sequence of the AjHb α was H-FAHWPD LGPGSPSVKKH GKVIM-OH. The peptide was an amphiphilic and weak cationic antibacterial peptide, with net charge of +2, and pI of 9.27.

3 Analysis of AjHb α antibacterial activities

Antibacterial activities of artificially synthetic AjHb α were studied. The synthetic AjHb α exhibited a strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Micrococcus lysodeikticus*) and Gram-negative bacteria (*Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *A. caviae*, *A. jandaei* and *A. veronii*), with killing index (Ki%) of over 95% at the concentration of 83.72 μ M; It exhibited strong antibacterial activity against later 6 strains Gram-negative bacterial above mentioned, with Ki% of over 70% at the concentration of 41.86 μ M.

4 Cloning of cathelicidin gene

Basing on the known Expressed Sequence Tag (EST), two variants of cathelicidin were cloned from the liver of *A. Anguilla*. They were named Ajcath1 and Ajcath2 (GenBank AFP72291 and AFP72292) respectively. Both cDNAs contained a 3' untranslated region with a polyadenylation signal. The deduced amino acid sequence of both cathelicidin contained the same three domains: a signal peptide, a prodomain and a mature peptide with a conservative four-cysteine-residue closing to the C-terminal. The deduced mature peptide sequence of Ajcath1 was H-RMRRSKAGK GSGGNKGNK GSGGNKGNK GSRPGGSS IAGRDKGDSGTRTA-OH. It was a strong cationic glycine-rich peptide, with MW of 4818.2 Da, pI of 12.02 and net charge of +11. The deduced mature peptide sequence of Ajcath2 was H-TDPEERKK

LSEPPSWTKYFSNW-OH, with MW of 2726.0 Da, pI of 5.93 and net charge of 0. Interestingly, the sequences of Ajcath2 is total different from that of other fish cathelicidin, and has a rare cathelin highly conservative region in other fish. It perhaps is a new antibacterl peptide of cathelicidin in fish.

5 Recombinant expression of Ajcath1 and Ajcath2 in *E.coli*.

The recombinant expression vector of Ajcath1 and Ajcath2 were constructed and the recombinant proteins were expressed in *E.coli*. The recombinant protein Ajcath1 was over-expressed in *E. coli* after 7 h of 0.1mM IPTG induction at 42 °C with OD600=0.3; The recombinant protein Ajcath2 was expressed in *E.coli* after 4 h of 0.1 mM IPTG induction on 37 °C with OD600=0.3. The inclusion body proteins were purified with Ni column with AKTA-purifier 100. This study laid the foundation for further study cathelicidin mature peptide sequence and its antibacterial activity.

In this study, we successfully isolated and identified an antibacterial peptide derived from hemoglobin in *A.Anguilla* liver, which has broad-spectrum antimicrobial activity. Meanwhile two variants of cathelicidin were cloned and prokaryotic expression. This study laid the foundation for the prevention and control of fish disease.

Key words: *Anguilla japonica*, liver, antibacterial peptide, hemoglobin, cathelicidin, recombinant protein.

缩略语中英文对照表

AMPs	Antimicrobial peptides	抗菌肽
ACN	Acetonitrile	乙腈
TFA	CF ₃ CO ₂ H	三氟乙酸
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
MHB	Mueller-Hinton Broth	MHB 培养基
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography	反相高效液相色谱
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight	基质辅助激光解吸/离子化飞行时间
MS	Mass spectrometry	质谱
RT-PCR	Real time PCR	实时荧光定量 PCR
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基本局域联配搜寻工具
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
bp	Base pair	碱基对
Da	Dalton	道尔顿
MW	Molecular weight	分子量
pI	Isoelectric point	等电点
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺电泳
MIC	Minimum inhibitory concentration	最小抑菌浓度
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
IFN	Interferon	干扰素
TAE	Tris-acetic acid-EDTA buffer	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液

ORF	Open reading frame	开放阅读框
EST	Expressed Sequence Tag	表达序列标签
Kan	Kanamycin sulfate	硫酸卡那霉素
DDT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸盐缓冲液
dNTP	Deoxy-ribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
His	Histidine	组氨酸
UTR	Untranslated region	非翻译区
Ser (S)	Serine	丝氨酸
GST	Glutathione S-transferase	谷光氨肽 S-转移酶

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	V
缩略语表中英文对照.....	I
中文目录.....	i
英文目录.....	v
第一章 绪论.....	1
1 抗菌肽的分类.....	1
1.1 线性 α 螺旋抗菌肽.....	1
1.2 富含半胱氨酸的抗菌肽.....	2
1.3 富含特定氨基酸的抗菌肽.....	2
1.4 阴离子抗菌肽.....	2
1.5 大分子蛋白的肽段/片段.....	3
2 血红蛋白源抗菌肽的研究进展.....	3
2.1 血红蛋白源抗菌肽的研究.....	3
2.2 血红蛋白源抗菌肽的抗菌活性.....	12
2.3 血红蛋白源抗菌肽的抗菌机制.....	16
3 鱼类 cathelicidin 抗菌肽的研究进展.....	17
3.1 鱼类 cathelicidin 基因结构特征.....	17
3.2 蛋白酶对 cathelicidin 的酶解作用.....	20
3.3 鱼类 cathelicidin 基因的组织表达特性和诱导表达机制.....	22
3.4 鱼类 cathelicidin 成熟肽的生物活性.....	23
4 本论文研究背景、主要内容与目的.....	25
4.1 研究背景.....	25
4.2 主要研究内容.....	26
4.3 研究目的与意义.....	26
第二章 日本鳗鲡肝脏抗菌肽的分离与纯化.....	27
1 前言.....	27

2 材料与amp;方法.....	27
2.1 试验材料.....	27
2.2 试验方法.....	29
3 结果.....	33
3.1 肝脏粗提物的提取和抗菌活性检测.....	33
3.2 离子交换层析分离.....	34
3.3 反相液相色谱分离.....	35
3.4 反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化.....	37
3.5 抗菌肽质谱分析.....	38
3.6 抗菌肽氨基酸序列测定.....	39
4 讨论.....	39
4.1 日本鳗鲡肝脏抗菌物质的粗提.....	39
4.2 日本鳗鲡肝脏抗菌物质的多样性分析.....	40
4.3 AjHb α 的表达分布及作用的探讨.....	40
5 小结.....	41
第三章 日本鳗鲡 AjHb α 抗菌肽的鉴定和抗菌活性分析.....	42
1 前言.....	42
2 材料与amp;方法.....	42
2.1 试验材料.....	42
2.2 试验方法.....	45
3 结果.....	52
3.1 总 RNA 的提取.....	52
3.2 3' RACE 和 5' RACE 扩增.....	53
3.3 AjHb α 氨基酸序列分析.....	54
3.4 人工合成 AjHb α 抗菌肽的抗菌活性.....	55
4 讨论.....	56
4.1 AjHb α 为一两亲性弱阳离子抗菌肽.....	56
4.2 AjHb α 可能为日本鳗鲡血红蛋白酶解产物.....	58
4.3 AjHb α 抗菌活性分析.....	59

5 小结.....	59
第四章 日本鳗鲡 cathelicidin 基因的克隆和序列分析.....	60
1 前言.....	60
2 材料与方法.....	60
2.1 试验材料.....	60
2.2 试验方法.....	61
3 结果.....	64
3.1 总 RNA 的提取.....	64
3.2 Ajcath1 的 5' RACE 扩增结果.....	64
3.3 Ajcath2 的 5' RACE 扩增结果.....	65
3.4 Ajcath1 cDNA 推导的氨基酸序列分析.....	67
3.5 Ajcath2 cDNA 推导的氨基酸序列分析.....	68
3.6 推导的 Ajcath1 和 Ajcath2 氨基酸序列与其它已知 cathelicidin 的比对	69
4 讨论.....	73
4.1 推导的 Ajcath1 成熟肽抗菌机制的探讨.....	73
4.2 Ajcath2 可能为新发现的鱼类亲水性抗菌肽.....	75
4.3 Cathelicidin 的功能.....	75
5 小结.....	76
第五章 Ajcath1 和 Ajcath2 的原核表达.....	79
1 前言.....	79
2 材料与方法.....	79
2.1 试验材料.....	79
2.2 试验方法.....	84
3 结果.....	92
3.1 pET-28a 表达载体和目的 cDNA 片段的酶切.....	92
3.2 pET-28a/Ajcath1 和 pET-28a/AJcath2 表达载体的鉴定及测序.....	93
3.3 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达.....	95
3.4 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达.....	99

3.5 重组蛋白表达形式的鉴定.....	103
3.6 重组蛋白表达的纯化及 Western-blot 鉴定.....	105
3.7 重组蛋白的复性.....	107
4 讨论.....	108
4.1 Cathelicidin 的诱导表达.....	108
4.2 Cathelicidin 的纯化和包涵体复性.....	109
4.3 Cathelicidin 重组蛋白表达的相关研究.....	109
5 小结.....	110
第六章 总结与展望.....	111
1 论文主要成果.....	111
2 论文主要创新点.....	112
3 论文不足之处和展望.....	112
参考文献.....	114
附录.....	128
致谢.....	139

CONTENTS

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	V
Lists of abbreviation.....	I
Contents in Chinese.....	i
Contents in English.....	v
Chapter 1: Introduction.....	1
1 The classification of AMPs.....	1
1.1 Linear α -helical AMPs.....	1
1.2 AMPs enriched in cysteine residue.....	2
1.3 AMPs enriched in specific amino acids.....	2
1.4 Anionic AMPs.....	2
1.5 Fragments of larger peptides.....	3
2 The research progress of AMPs derived from hemoglobin.....	3
2.1 The advance in AMPs derived from hemoglobin.....	3
2.2 Antibacterial activity of AMPs derived from hemoglobin.....	12
2.3 Antibacterial mechanism of AMPs derived from hemoglobin.....	16
3 The research progress of AMP cathelicidin.....	17
3.1 Structure characteristics of cathelicidin in fish.....	17
3.2 Proteolytic activation of cathelicidins.....	20
3.3 Organization express characteristics and induced expression mechanism of cathelicidin in fish.....	22
3.4 The biologic activity of mature peptides in cathelicidins.....	23
4 Research background, main content and purpose of the paper.....	25
4.1 Research background.....	25
4.2 Main content.....	26
4.3 Purpose and Significance of research.....	26
Chapter 2: Isolation and purification of AMP from <i>A. japonica</i> liver.....	27

1 Introduction.....	27
2 Materials and methods.....	27
2.1 Materials.....	27
2.2 Methods.....	29
3 Results.....	33
3.1 Liver crude extract extraction and antimicrobial activity detection.....	33
3.2 Cationic exchange chromatography isolation.....	34
3.3 HPLC isolation.....	35
3.4 RP-HPLC isolation.....	37
3.5 Analysis of mass spectrometry on AMP	38
3.6 Determination of AMP amino acid sequence.....	39
4 Discussions.....	39
4.1 Extraction of antimicrobial substances from <i>A.japonica</i> liver.....	39
4.2 Diversity analysis of antimicrobial substances from <i>A.japonica</i> liver.....	40
4.3 Express distribution and function discussion of AjHb α from <i>A.japonica</i> liver.....	40
5 Brief summary.....	41
Chapter 3: Identification of AjHb α from <i>A.japonica</i> and analysis of antimicrobial activity	42
1 Introduction.....	42
2 Materials and methods.....	42
2.1 Materials.....	42
2.2 Methods.....	45
3 Results.....	52
3.1 Isolation of total RNA.....	52
3.2 3' RACE and 5' RACE amplification.....	53
3.3 Analysis of AjHb α Amino Acid Sequence.....	54
3.4 Antibacterial activity of artificially synthetic AjHb α	55
4 Discussions.....	56
4.1 AjHb α is weak cationic AMP with amphipathic property.....	56

4.2 AjHb α is possible enzymic digestion of hemoglobin.....	58
4.3 Analysis of AjHb α antibacterial activity.....	59
5 Brief summary.....	59
Chapter 4: Cloning and sequence analysis of cathelicidin gene from <i>A.japonica</i>	60
1 Introduction.....	60
2 Materials and methods.....	60
2.1 Materials.....	60
2.2 Methods.....	61
3 Results.....	64
3.1 Isolation of total RNA.....	64
3.2 Results of 5' RACE amplification on Ajcath1.....	64
3.3 Results of 5' RACE amplification on Ajcath2.....	65
3.4 Analysis of Ajcath1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence.....	67
3.5 Analysis of Ajcath1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence.....	69
3.6 Multiple alignment of deduced Ajcath1 and Ajcath2 amino acid sequences with other known cathelicidins.....	69
4 Discussions.....	74
4.1 Discussion on antibacterial mechanism of deduced Ajcath1 mature peptide.....	74
4.2 Ajcath2 is possible new and hydrophilic AMP from fish.....	76
4.3 Function of cathelicidin.....	77
5 Brief summary.....	77
Chapter 5: Prokaryotic Expression of Ajcath1 and Ajcath2.....	79
1 Introduction.....	79
2 Materials and methods.....	79
2.1 Materials.....	79
2.2 Methods.....	84
3 Results.....	92

3.1 Enzyme digestion of pET-28a and purpose cDNA fragments.....	92
3.2 Identification and sequencing of pET-28a/Ajcath1 and pET-28a/ Ajcath2.....	93
3.3 Expression of recombinant protein pET-28a/Ajcath1 in <i>E.coli</i> with IPTG induction.....	95
3.4 Expression of recombinant protein pET-28a/Ajcath2 in <i>E.coli</i> with IPTG induction.....	99
3.5 Identification of Recombinant protein expression form.....	103
3.6 Identification and purification of fusion protein.....	105
3.7 Renaturation of recombinant protein.....	107
4 Discussions.....	108
4.1 Inducible expression of Cathelicidin.....	108
4.2 Purification and inclusion body renaturation of Cathelicidin.....	109
4.3 Related research of recombinant protein expression on Cathelicidin.....	109
5 Brief summary.....	110
Chapter 6: Summary and prospect.....	111
1 The main achievements of the paper.....	111
2 The main innovation of the paper.....	112
3 The deficiencies and prospects of the paper.....	112
References.....	114
Appendix.....	128
Acknowledgements.....	139

第一章 绪论

抗菌肽也称宿主防御肽，作为生物体非特异性免疫中一个重要的组成部分，广泛分布于动植物、昆虫和细菌等多种生物体内。抗菌肽抗菌谱广，其不仅能够杀灭革兰氏阳性细菌和阴性细菌（包括对大多抗生素具有耐药性的菌株），而且对真菌、寄生虫、病毒甚至对肿瘤细胞都具有杀伤作用，此外还有免疫调节、或直接作为免疫佐剂、制备灭活疫苗等多重功能(Bell 2011; Hancock 2001; Rajanbabu & Chen 2011)。近年来，抗生素的大量使用导致细菌耐药性的产生，且耐药性越来越严重，此现象更加引起了人们的重视。人们正在努力寻找一种可以替代抗生素且不易产生耐药性的药物，而抗菌肽成为解决问题的最有效的武器之一。大量研究发现，抗菌肽不易对细菌产生耐药性，且作用效果好，因此，不同物种的抗菌肽成为研究的热点，迄今，已鉴定或推导并登陆的抗菌肽序列有 1700 多条(APD: <http://aps.unmc.edu/AP/about.php>)。

1 抗菌肽的分类

抗菌肽一般被定义为小于 10 kDa，或由 12–50 个氨基酸组成的阳性、两亲性的抗菌肽。它的一些特征，诸如抗菌肽大小、电荷、疏水性和二级结构决定了其抗菌活性和杀菌模式。现今对于抗菌肽的分类比较混杂，但较为大多数学者接受的分类是根据其二级结构分为以下 5 大类。

1.1 线性 α 螺旋抗菌肽

这类抗菌肽通常含有不到 40 个氨基酸的线性结构，有亲水性和疏水性氨基酸残基分离现象，尽管在水溶液中呈无序状态，但当与细菌细胞膜相互作用时可形成 α 螺旋构象， α 螺旋含量的多少与抗菌活性大小有着直接的联系（Broden 2005）。另外这类抗菌肽一般不含半胱氨酸，有些分子有铰链或“Kink”结构，可形成螺旋-卷曲-螺旋结构。这类抗菌肽分布极为广泛，首先在两栖动物（magainins）和昆虫（cecropins）中报道，后发现还包括猪骨髓抗菌肽（PMAP）、蜜蜂毒液中的 melittin、LL-37、及海鞘的 Clavanins、Dicynthaurin、Halocytin、Papillosin、Styelins 和鱼类的 Piscidins 等。

1.2 富含半胱氨酸的抗菌肽

最能代表这类抗菌肽特征的是 defensin, 包括 α -defensin, β -defensin 和 θ -defensin, 其含有 6 个半胱氨酸, 可形成 3 个二硫键, 及 β 折叠结构 (Zou *et al*, 2007)。但随着抗菌肽的不断被发现, 并不是所有富含半胱氨酸的抗菌肽都有这些典型的特征, 如 Hecpudin, 其在磷酸缓冲液中可形成两个稳定的 β 折叠结构, 但 Hecpudin 含有 4、6、7、8 个半胱氨酸, 可形成 2-4 个二硫键 (Xu *et al*, 2008; Yang M *et al*, 2007)。再如 crustins, 其也是一个富含半胱氨酸的抗菌肽 (含有 8 个半胱氨酸), 形成 4 个二硫键, 而不是由 6 个半胱氨酸构成的 β 折叠结构 (Cui *et al*, 2012)。

1.3 富含特定氨基酸的抗菌肽

目前, 已鉴定的这类抗菌肽大约有 44 种, 这类抗菌肽大多是线性的, 富含某种特定的氨基酸, 缺乏半胱氨酸, 在水溶液呈松散状态, 少数可形成延伸结构 (Hancock *et al*, 2006)。其主要包括四类: (1) 富含脯氨酸和精氨酸的抗菌肽, 这类抗菌肽含有 (33%-49%) 的脯氨酸和 (13-33%) 的精氨酸。Bactenecins 和 PR-39 就是富含脯氨酸/精氨酸肽的重复片段, Bactenecins 含有高比例脯氨酸 (约 45%) 和精氨酸 (约 23%); PR-39 含脯氨酸 (约 50%), 精氨酸 (约 23%)。(2) 富含精氨酸 (57%) 和苯丙氨酸 (19%) 的 prophenin。(3) 富含脯氨酸的抗菌肽, 如蜜蜂的 abaecin 具有抗革兰氏阴性菌和阳性菌的活性, 蓝蟹的 callinectin, 太平洋牡蛎的 Cg-prp 也同样是富含脯氨酸的抗菌肽。(4) 富含色氨酸的 indolicidin。

1.4 阴离子抗菌肽

尽管大部分抗菌肽呈现阳离子特征, 仍有一部分陆续发现的抗菌肽带有负电荷, 其典型的特征是 pI 小于 7.0 (通常为 3.0~6.5)。它们的抗菌活性需要锌作为辅助因子, 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抗菌活性, 有人猜测锌的作用有可能是形成阳离子盐桥, 使得阴离子抗菌肽克服细菌表面的负电荷, 穿入外膜而不引起任何形态学的变化。这类抗菌肽大多出现在表面活性物质的提取物, 支气管肺泡灌洗液和呼吸道表皮细胞内。Brogden (1996) 从人分离得到三个羊肺表面活性因子相关的阴离子肽, 在锌存在下对部分革兰氏阳性菌和阴性菌有抗菌活性。Lai 等 (2002) 从蟾蜍 (*Bombina maxima*) 中分离得到一种阴离子抗菌肽——

Maximin H5, 含 20 个氨基酸残基, pI 为 3.10, 带有-3 电荷。该多肽只能抑制革兰氏阳性细菌——金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 但抗菌活性不需要金属离子如 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 等, 因此对于阴离子抗菌肽抗菌机制有待进一步探讨。

1.5 大分子蛋白的肽段/片段

还有一类小肽, 尽管它们具有抗菌活性, 但不被认为是免疫相关因子, 统称为“源于其他作用的大分子蛋白的肽段/片段 (peptides or fragments derived from proteins of other function)” (Smith *et al*, 2010)。如血红蛋白 (Belmonte *et al*, 2012)、组蛋白 (Kathryn *et al*, 2012)、血蓝蛋白 (Lee *et al*, 2003)、乳铁蛋白 (Tasumi *et al*, 2002) 和神经肽 (Ikhlas *et al*, 2008) 等, 它们均具有广谱的抗菌活性。

事实上, 还存在许多抗菌肽不能划分在以上几大类抗菌肽中, Ovchinnikova 等 (2004) 从海蚯蚓 (*Arenicola marina*) 免疫细胞分离纯化得到一种抗菌肽——arenicin, 含 21 个氨基酸残基, 两个单独的 β 折叠和一个二硫键形成一个由 18 个氨基酸残基组成的环状结构, 同时通过带有正电荷的精氨酸侧链构成一个很强的疏水区域, 因此它们不属于以上任何一类, 认为是一种新的抗菌肽结构。Arenicins 在浓度为 $5 \mu\text{M}/\text{mL}$ 时 5 min 内即可杀死大肠杆菌。沙蚕 (*Perinereis aibuhitensis*) 的 perinerin, 含有 4 个半胱氨酸残基构成 2 个二硫键, 同时富含精氨酸。其不能归类为富含某种氨基酸的抗菌肽, 因为也是富含半胱氨酸的抗菌肽, Perinerin 抗革兰氏阳性菌 (MIC 为 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$), 抗革兰氏阴性菌 (MIC 为 $3.1 \mu\text{g}/\text{mL}$), 抗真菌 (MIC 为 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Pan *et al*, 2004)。

2 血红蛋白源抗菌肽的研究进展

血红蛋白最初被定位是一种重要的呼吸蛋白, 广泛存在于脊椎动物和部分无脊椎动物, 及细菌、真菌和植物中。后来发现血红蛋白除载氧作用以外还有众多生物学特性, 如促生长激素释放、促肾上腺皮质激素释放、阿片肽样、止痛等作用 (Schally *et al*, 1978; Brantl *et al*, 1986; Karelin *et al*, 1995)。此外血红蛋白具有可形成多个抗菌肽的特点, 已成为国内外学者研究的热点。

2.1 血红蛋白源抗菌肽的研究

2.1.1 人类血红蛋白源抗菌肽

人体主要有 4 种血红蛋白链，即 Hb α 、Hb β 、Hb γ 和 Hb δ ，但已报道有抗菌活性的血红蛋白链只有前 3 种。如表 1-1 所示，其中 Hb α 源抗菌肽较多，几乎任意裂解片段都有抗菌活性，Hb β 相对会少一些，Hb γ 只有一条，但可能存在更多的 Hb β 和 Hb γ 源抗菌肽。早在 1958 年，Hobson 等就发现人血红蛋白的抗菌特性，并从 pH、温度、孵育时间等多个方面探讨了血红蛋白抑菌或杀菌作用，血红蛋白对某些革兰氏阴性菌最小抑菌浓度（MIC）在 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小，在酸性条件下抗菌效果更佳，后续的研究结果也证明了这些特性，这也与人体阴道酸性环境是不谋而合的。此研究成果一经公布就引起学术界的质疑，因为当时一些学者认为血红蛋白通过提供铁离子或干扰白细胞的氧气代谢机制可以抑制白细胞杀菌作用，进而可能促进细菌的生长。事实上有些血红蛋白片段的确是促进某些细菌生长，但是绝大多数血红蛋白片段是抑制细菌生长或杀灭细菌的（Welch *et al*, 1982; Hand *et al*, 1984; Olczak *et al*, 2005）。此后越来越多研究证明了血红蛋白源片段具有抗菌活性，并命名为 hemocidins，其对革兰氏阳性细菌、阴性细菌和真菌均起作用（Mak *et al*, 2000; Parish *et al*, 2001）。Liepke 等（2003）应用离子交换和反相高效液相色谱，从人类胎盘纯化得到血红蛋白源抗菌肽 Hb β 111-146 和 Hb γ 130-246，第一次证明了人体内存在着天然的血红蛋白源抗菌肽。此后 Mak 等（2004）在女性月经血中分离纯化得到约 27 个血红蛋白源抗菌肽，它们均对大肠杆菌有抑菌或杀菌作用。Deng 等（2009）从子宫内膜粘液分离纯化得到 Hb α 32-93，并建立了感染大肠杆菌的大鼠阴道模型，表明血红蛋白源抗菌肽可以减轻由大肠杆菌导致的大鼠阴道炎。

表 1-1 人类血红蛋白源抗菌肽结构特征

Tab.1-1 The structural characteristics of antibacterial peptides derived from human hemoglobin

抗菌肽	分子量	电荷	疏水性	二级结构预测
Hb α 1-32	3321.76	0	43%	71.88% α 螺旋；18.75%任意卷曲
Hb α 33-76	4755.38	0	38%	47.73% α 螺旋；34.09%任意卷曲
Hb α 1-76	8079.13	0	40%	56.58% α 螺旋；30.26%任意卷曲

续表 1-1

Hb α 77-141	7023.24	+2	49%	67.69% α 螺旋; 21.54 任意卷曲
Hb α 1-20	2043.35	+2	45%	60% α 螺旋; 30%任意卷曲
Hb α 1-25	2520.83	+1	40%	64% α 螺旋; 20%任意卷曲
Hb α 1-26	2591.91	+1	42%	53.85% α 螺旋; 23.08%任意卷曲
Hb α 1-27	2721.02	0	40%	51.85% α 螺旋; 25.93%任意卷曲
Hb α 1-28	2792.1	0	42%	57.14% α 螺旋; 21.43%任意卷曲
Hb α 1-29	2905.26	0	44%	65.52% α 螺旋; 20.69%任意卷曲
Hb α 1-31	3190.56	0	41%	74.19% α 螺旋; 16.13%任意卷曲
Hb α 1-32	3321.76	0	43%	71.88% α 螺旋; 18.75%任意卷曲
Hb α 1-33	3468.94	0	45%	81.82% α 螺旋; 15.15%任意卷曲
Hb α 1-40	4237.85	+1	42%	65% α 螺旋; 27.50%任意卷曲
Hb α 17-31	1430.5	-2	35%	100%任意卷曲
Hb α 18-44	2923.31	-1	38%	57.69% α 螺旋; 34.62%任意卷曲
Hb α 35-56	2483.77	+1	27%	22.73%延伸链; 59.09%任意卷曲
Hb α 35-58	2677.96	+1	25%	20.83%延伸链; 58.33%任意卷曲
Hb α 35-60	2863.19	+2	23%	23.08% β 转角; 57.69%任意卷曲
Hb α 35-72	4054.54	+2	34%	42.11% α 螺旋; 42.11%任意卷曲
Hb α 35-77	4606.16	0	34%	46.51% α 螺旋; 39.53%任意卷曲
Hb α 35-78	4720.27	0	34%	43.18% α 螺旋; 34.09%任意卷曲
Hb α 35-79	4791.35	0	35%	42.22% α 螺旋; 42.22%任意卷曲
Hb α 35-80	4904.51	0	36%	45.65% α 螺旋; 36.96%任意卷曲
Hb α 35-90	5964.68	0	37%	58.93% α 螺旋; 28.57%任意卷曲
Hb α 35-97	6752.61	0	38%	52.38% α 螺旋; 34.92%任意卷曲
Hb α 106-141	3843.49	+1	50%	77.78% α 螺旋; 19.44%任意卷曲
Hb α 107-140	3574.14	0	50%	79.41% α 螺旋; 17.65%任意卷曲
Hb α 107-141	3687.30	0	51%	80% α 螺旋; 17.14%任意卷曲
Hb α 110-131	2281.61	-1	54%	68.18% α 螺旋; 31.82%任意卷曲
Hb α 110-141	3416.93	+1	46%	68.75% α 螺旋; 28.12%任意卷曲

续表 1-1

Hb α 32-93	6724.70	+1	41%	54.84% α 螺旋; 22.58%任意卷曲
Hb α 33-95	6799.71	0	39%	52.38% α 螺旋; 31.75%任意卷曲
Hb α 77-141	7023.24	+2	49%	67.69% α 螺旋; 21.54%任意卷曲
Hb β 1-55	6045.89	-4	43%	43.64% α 螺旋; 32.73%任意卷曲
Hb β 56-146	9791.41	+3	45%	76.92% α 螺旋; 10.99% β 转角;
Hb β 56-72	1732.05	+4	35%	41.18%延伸链; 41.18%任意卷曲
Hb β 116-146	3404.886	+2	41%	64.52% α 螺旋; 29.03%任意卷曲
Hb β 1-30	3156.55	-2	40%	40.00% α 螺旋; 36.67%任意卷曲
Hb β 16-30	1499.64	-1	33%	100%任意卷曲
Hb β 43-83	4210.68	0	36%	31.71% α 螺旋; 36.59%任意卷曲
Hb β 46-64	1882.13	0	31%	21.05% β 转角; 63.16%任意卷曲
Hb β 113-146	4803.67	+3	52%	68.18% α 螺旋; 15.91%任意卷曲
Hb β 115-146	4500.31	+3	52%	66.67% α 螺旋; 16.67%任意卷曲
Hb β 111-146	3890.54	+2	50%	61.11% α 螺旋; 19.44%任意卷曲
Hb γ 130-146	1869.15	+2	47%	94.12% α 螺旋

注: 血红蛋白源抗菌肽的分子量、电荷和疏水性用 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 软件分析; 二级结构用 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html 软件分析。

Note: Molecular weight, net charge, and hydrophobic ratio of antibacterial peptide were analysed with software http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php. Secondary structure was analysed with software http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html.

2.1.2 其他哺乳动物血红蛋白源抗菌肽

对于其他哺乳动物血红蛋白源抗菌肽, 如表 1-2 所示, 研究最多的是牛血红蛋白, 其次是兔子和马。Fogaca 等 (1999) 从寄生于牛体的脾肠内容物里分离纯化得到具有抗菌活性的牛血红蛋白源片段, 认为这是脾利用宿主血红蛋白片段的抗菌活性来防御病原微生物的侵害。Froidevaux 等 2001 年首次应用胃蛋白酶水解牛血红蛋白到 90%, 得到一个能杀灭藤黄微球菌 A270 的 Hb α 片段; 2005

年其实验室用胃蛋白酶水解牛血红蛋白到 3%，再次分离纯化得到第二个 Hb α 抗菌肽 (Daoud *et al*, 2005)；2006 年又一次分离纯化得到 3 个 Hb α ，1 个 Hb β 抗菌肽 (Nedjar-Arroume *et al*, 2006)；2008 年再次报道分离纯化到 24 个新的牛血红蛋白源抗菌肽 (Nedjar-Arroume *et al*, 2008)；2011 年在标准胃蛋白酶水解液中加入 40% 甲醇、30% 乙醇、20% 丙醇、10% 丁醇以改变牛血红蛋白二级结构，水解血红蛋白得到 26 段血红蛋白源抗菌片段，其中 13 段是新发现的 (Adje *et al*, 2011)；随后又发现牛 Hb α 最小抗菌肽为 KYR，Hb β 最小抗菌肽为 RYH (Catiau *et al*, 2011)。由此我们不难发现牛血红蛋白如同人类血红蛋白一样是一个“血红蛋白源抗菌肽库”。兔子阴道组织结构与人类极其相似，因此兔子是临床评估阴道杀菌药物首选动物模型。Patgaonkar 等 (2011) 从兔阴道腺液内纯化得到一个 Hb α 抗菌肽 RVFHb α P，并合成了包含 25 个氨基酸的该肽，其对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌、化脓性链球菌、白色念球菌均具有抗菌活性，RT-PCR 和免疫组化分析 RVFHb α P 在兔阴道内大量表达；体外实验表明 RVFHb α P 能够阻碍由脂多糖 (LPS) 引起的阴道细胞炎症。此外马的完整血红蛋白也具有抗菌活性 (Parish *et al*, 2001)。猪血中也存在抗菌物质，但并没有提纯到单一的抗菌肽 (张艳梅等, 2008; 王延卓, 2010)。

表 1-2 牛血红蛋白源抗菌肽结构特征

Tab.1-2 The structural characteristics of antibacterial fragments derived from bovine hemoglobin

抗菌肽	分子量	电荷	疏水性	二级结构预测
Hb α 33-61	3206.6	+2	31%	24.29%延伸链, 62.07%任意卷曲
Hb α 1-23	2236.51	+1	47%	52.17% α 螺旋, 21.74%任意卷曲
Hb α 1-27	2656.93	0	44%	59.26% α 螺旋, 29.81%任意卷曲
Hb α 1-28	2728.01	0	46%	67.86% α 螺旋, 29.29% β 转角
Hb α 1-29	2841.17	0	48%	68.97% α 螺旋, 13.79% β 转角;
Hb α 1-32	3257.67	0	46%	71.88% α 螺旋, 12.50% β 转角;
Hb α 1-33	3404.85	0	48%	72.73% α 螺旋, 12.12% β 转角;
Hb α 1-46	4960.65	+1	43%	58.70% α 螺旋, 26.09%任意卷曲
Hb α 3-36	2597.94	-1	50%	67.65% α 螺旋, 20.59%任意卷曲

续表 1-2

Hb α 33-45	1573.82	+1	30%	100%任意卷曲
Hb α 33-46	1721.00	+1	35%	100%任意卷曲
Hb α 33-66	3620.13	+2	41%	32.35% α 螺旋, 44.12%任意卷曲
Hb α 33-83	5404.29	-1	41%	49.02% α 螺旋, 33.33%任意卷曲
Hb α 33-97	6980.92	-1	40%	50.77% α 螺旋, 36.92%任意卷曲
Hb α 33-98	7128.10	-1	40%	50% α 螺旋, 36.36%任意卷曲
Hb α 34-46	1573.82	+1	30%	100%任意卷曲
Hb α 34-65	3359.80	+2	37%	18.75% α 螺旋, 18.75%延伸链; 18.75% β 转角, 43.75%任意卷曲
Hb α 34-66	3472.96	+2	39%	33.33% α 螺旋, 48.48%任意卷曲
Hb α 34-83	5256.96	-1	40%	50% α 螺旋, 34%任意卷曲
Hb α 34-98	6980.92	-1	40%	50.77% α 螺旋, 38.46%任意卷曲
Hb α 36-45	1226.41	+1	20%	100%任意卷曲
Hb α 36-97	6633.50	-1	38%	53.23% α 螺旋, 33.87%任意卷曲
Hb α 37-46	1226.41	+1	20%	100%任意卷曲
Hb α 37-98	6633.50	-1	38%	53.23% α 螺旋, 27.42%任意卷曲
Hb α 67-106	4316.98	-2	43%	58.97% α 螺旋, 23.08%任意卷曲
Hb α 73-105	3639.18	-2	42%	42.42% α 螺旋, 36.36%任意卷曲
Hb α 86-109	2745.31	+2	50%	45.83%延伸链, 33.33%任意卷曲
Hb α 96-106	1270.54	+1	54%	100%任意卷曲
Hb α 99-105	796.96	+1	42%	100%任意卷曲
Hb α 99-106	910.12	+1	50%	100%任意卷曲
Hb α 100-105	668.79	0	50%	100%任意卷曲
Hb α 106-291	3888.49	+1	44%	72.22% α 螺旋, 16.67%任意卷曲
Hb α 107-128	2341.66	-1	45%	63.64% α 螺旋, 22.73%任意卷曲
Hb α 107-133	2826.21	-1	48%	70.37% α 螺旋, 18.52%任意卷曲
Hb α 107-136	3139.61	-1	50%	73.33% α 螺旋, 16.67%任意卷曲
Hb α 107-291	3775.33	+1	42%	68.57% α 螺旋, 17.29%任意卷曲

续表 1-2

Hb α 133-291	1054.21	+2	22%	100%任意卷曲
Hb α 137-291	653.72	+1.91	0	100%任意卷曲
Hb α 110-291	4539.27	+1	45%	76.19% α 螺旋, 29.29%任意卷曲
Hb α 138-291	552.61	+1.91	0	100%任意卷曲
Hb α 139-291	465.53	+1.91	0	100%任意卷曲
Hb β 77-125	5425.35	-2	48%	51.02% α 螺旋, 20.41%延伸链 18.37% β 转角
Hb β 62-91	3296.74	0	36%	93.33% α 螺旋, 6.67% β 转角
Hb β 1-13	1381.61	-1	61%	100%任意卷曲
Hb β 1-30	3176.68	-1	50%	60% α 螺旋, 20%任意卷曲
Hb β 79-104	2935.35	-2	42%	50% α 螺旋, 19.23% β 转角, 19.23%任意卷曲
Hb β 129-124	1259.43	+1	36%	100%任意卷曲
Hb β 129-295	3550.05	+2	46%	75% α 螺旋, 18.75%任意卷曲
Hb β 121-295	2747.16	+1	52%	76% α 螺旋, 24%任意卷曲
Hb β 126-295	2195.47	+1	50%	95% α 螺旋, 5%任意卷曲
Hb β 290-295	795.9	+1	33%	100%任意卷曲
Hb β 293-295*	474.5	+1.07	0	100%任意卷曲

注: 血红蛋白源抗菌肽的分子量、电荷和疏水性用 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 软件分析; 二级结构用 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html 软件分析。

Note: Molecular weight, net charge, and hydrophobic ratio of antibacterial peptide were analysed with software http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php. Secondary structure was analysed with software http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html.

2.1.3 爬行类血红蛋白源抗菌肽

现今一个非常有趣的问题引起各国学者的注意, 鳄鱼即使生活在沼泽地里, 这种病原高度滋生的地方也不会感染疾病; 另外鳄鱼之间或与其他动物争斗后伤

口可以在短时间内自愈，甚至不会受病原的侵染，这说明鳄鱼体内应该含有一定的抗菌物质。Hoffman 等（2002）发现美洲鳄（*Alligator mississippiensis*）完整的 Hb α 和 Hb β 链可以抑制大肠杆菌、铜绿假单胞菌及白色念珠菌的生长。Parish（2001）等也有研究表明美洲鳄完整的血红蛋白具有抗菌活性。另外有研究发现美洲鳄血浆能够抑制细菌和病毒的生长（Merchant *et al*, 2003; 2004; 2005）。Srihongthong 等（2012）研究发现暹罗鳄（*Crocodylus siamensis*）完整的血红蛋白及 Hb α 、Hb β 链片段对枯草芽孢杆菌 TISTR008、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、解淀粉芽孢杆菌 TISTR1045、短小芽孢杆菌 TISTR905 均有明显的抗菌活性，其结构特征如表 1-3。

表 1-3 暹罗鳄血红蛋白源抗菌肽结构特征

Tab.1-3 The structural characteristics of antibacterial fragments derived from

C.siamensis hemoglobin

抗菌肽	分子量	电荷	疏水性	二级结构预测
Hb α 1-19	2022.37	+1	52%	57.89% α 螺旋, 26.32%任意卷曲
Hb α 1-13	1377.58	0	46%	100%任意卷曲
Hb α 16-26	1173.29	-1	36%	100%任意卷曲
Hb β 15-22	991.11	0	50%	100%任意卷曲
Hb α 67-72	705.73	-1	33%	100%任意卷曲
Hb β 69-80	1260.37	-1	41%	100%任意卷曲
Hb β 69-82	1259.72	0	42%	100%任意卷曲
Hb α 107-121	1542.81	-1	46%	100%任意卷曲
Hb α 107-124	1838.11	-1	44%	100%任意卷曲
Hb α 107-128	2341.71	-1	45%	100%任意卷曲
Hb α 110-123	1453.63	-1	35%	100%任意卷曲
Hb α 110-129	2157.47	-1	40%	100%任意卷曲
Hb β 115-124	1112.26	0	40%	100%任意卷曲

注：血红蛋白源抗菌肽的分子量、电荷和疏水性用 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 软件分析；二级结构用 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html 软件分析。

Note: Molecular weight, net charge, and hydrophobic ratio of antibacterial peptide were analysed with software http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php. Secondary structure was analysed with software http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html.

2.1.4 鱼类血红蛋白源抗菌肽

上述血红蛋白源抗菌肽研究均仅涉及它们的抗细菌和真菌特性,尚不清楚其是否抗寄生虫。Ullal 等(2008)从叉尾鲷(*ctalurus punctatus, Rafinesque*)鳃中分离纯化得到三个抗菌肽:Hb β P-1、Hb β P-2、Hb β P-3,其中 Hb β P-1 抗菌活性最强,其次是 Hb β P-2 和 Hb β P-3, Hb β P-1 不仅能够抑制或杀灭革兰氏阴性菌,而且对小瓜子虫的滋养体有致死作用。Fernandes 等(2004)发现虹鳟红细胞内包含抗菌活性物质,但没有提纯到单一的物质。我们实验室从日本鳗肝脏内分离纯化得到一个由 22 个氨基酸组成的 Hb α 抗菌肽,其对爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)具有明显的抗菌活性,在浓度为 11.30 μ M 时对爱德华氏菌有 88.64% (杀菌指数) 抑菌作用,人工合成的 Hb α 抗菌片段在浓度为 41.86 μ M 时对 6 株革兰氏阴性菌有明显抑菌或杀菌作用。天然的和合成的抗菌活性之所以差别这么大,可能是由于其结构上有一定的差异性。

2.1.5 贝类血红蛋白源抗菌肽

大多数贝类含有与铜离子结合的血蓝蛋白,只有部分贝类含有血红蛋白,主要包括毛蚶、泥蚶、魁蚶、厚满月蛤等(汪青等,2011)。对于完整的血蓝蛋白及血蓝蛋白片段有抗菌活性的研究较为普遍,但对于贝类血红蛋白抗菌活性的研究鲜为少见。荆昭(2011)曾研究发现毛蚶 HbI、HbII 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、四联微球菌有抑菌活性。Bao 等(2011)研究发现泥蚶在副溶血弧菌、脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)刺激下 12 h 后血细胞内 HbI 表达量显著提高,表明 HbI 可能涉及到泥蚶免疫学反应。江青等(2012)的研究也表明泥蚶血红蛋白可能在抗菌免疫方面起重要作用,弧菌组、LPS 组和 PGN 组三个实验组泥蚶血液 Tg-HbIIA mRNA 表达量均在 1.5 h 后显著上升,说明泥蚶 HbIIA 对刺激因子有快速的应答,可能是一种急性期反应蛋白,泥蚶血红蛋白是否具有直接抗菌功能还需进一步验证。

2.2 血红蛋白源抗菌肽的抗菌活性

血红蛋白源抗菌肽的抗菌谱非常广，涉及菌株繁多，较常见菌有：革兰氏阳性菌，如藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、粪肠球菌 (*Streptococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌 (*Streptococcus aureus*)、溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、肉葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus Epidermidis*)、无害李斯特菌 (*Lsteria innocua*) 和海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)；革兰氏阴性菌，如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、沙门氏菌属 (*Salmonella sp*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)、弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)、爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)，简氏气单胞菌 (*A. jandaei*) 和维氏气单胞菌 (*A. veronii*)；真菌，如白色念珠菌 (*Canidia Albicans*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 和啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。此外，抗寄生虫的有：多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiiis*) 和四膜虫 (*Tetrahymena pyriformis*)。MIC 多在 1-90 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ，不同血红蛋白源的抗菌肽抗菌活性差距很大 (见表 1-4、1-5)。

表 1-4 人血红蛋白源抗菌肽对 6 株细菌的 MIC[μ M]值

Tab.1-4 MIC of antibacterial peptides derived from human hemoglobin against six strains bacterial

抗菌肽	革兰氏阳性菌 (G ⁺)			革兰氏阴性菌(G ⁻)		
	粪肠球菌 <i>S.faecalis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	藤黄微球菌 <i>M.luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K.pneumoniae</i>	白色念珠菌 <i>C.albicans</i>
Hb α 1-32	>30	>30	ND	>30	ND	>30
Hb α 33-76	21	>73.6	ND	21	ND	14.7
Hb α 1-76	37.1	>58.2	ND	>58.2	ND	>58.2
Hb α 77-141	>14.2	>14.2	ND	>14.2	ND	4.3
Hb α 35-56	293	222	281	105	146	>300
Hb β 1-55	1.3	26.5	ND	0.8	ND	4.1
Hb β 56-146	1.5	9.9	ND	100.1	ND	2.6
Hb β 56-72	1443.4	28.9	ND	1.2	ND	5.8
Hb β 116-146	2937	ND	ND	5.9	ND	4405.4
Hb β 115-146	140	61	48	27	37	>300
Hb β 111-146	25.6	38.5	8	16	51.3	ND
Hb γ 130-146	>300	77.5	1100	52	>130	ND

注：ND 表示没有检测抗菌活性。

Note: ND indicates that antibacterial activity of the bacterium has not been detected.

表 1-5 牛血红蛋白源抗菌肽对 4 株细菌的 MIC[μ M]值Tab.1-5 MIC of antibacterial peptides derived from bovine hemoglobin
against four strains bacterial

抗菌肽	革兰氏阳性菌 (G ⁺)		革兰氏阴性菌(G ⁻)	
	藤黄微球菌	无害李斯特菌	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
	<i>M.luteus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
Hb α 33-61	5	ND	ND	ND
Hb α 1-23	100	54	54	27
Hb α 1-27	38	27	54	38
Hb α 1-28	54	27	54	27
Hb α 1-29	54	27	54	27
Hb α 1-32	90	38	154	38
Hb α 1-33	73	73	146	ND
Hb α 1-46	100	25	100	ND
Hb α 3-36	70	35	70	ND
Hb α 33-45	5	1	9	5
Hb α 33-46	5	1	9	5
Hb α 33-66	9	1	1	5
Hb α 33-83	45	80	80	45
Hb α 33-97	90	49	90	90
Hb α 33-98	90	49	90	90
Hb α 34-46	5	1	9	5
Hb α 34-65	9	9	5	ND
Hb α 34-66	5	1	9	5
Hb α 34-83	45	80	80	45
Hb α 34-98	90	49	90	90
Hb α 36-45	1	1	9	9
Hb α 36-97	49	49	87	87
Hb α 37-46	1	1	9	9

续表 1-5

Hb α 37-98	49	49	87	87
Hb α 67-106	141	35	35	ND
Hb α 73-105	43	43	171	ND
Hb α 86-109	45	11	11	ND
Hb α 96-106	24	24	46	ND
Hb α 99-105	39.2	39.2	78.4	ND
Hb α 99-106	34	34	68	ND
Hb α 100-105	46.78	187.1	46.78	ND
Hb α 106-141	64	32	64	ND
Hb α 107-128	53	53	26	ND
Hb α 107-133	9	37	73	37
Hb α 107-136	76	38	76	76
Hb α 107-141	87	43	87	87
Hb α 133-141	15	2	8	8
Hb α 137-141	9	1	9	5
Hb α 110-141	72	36	72	ND
Hb α 138-141	4	1	4	4
Hb α 139-141	2	1	1	1
Hb β 77-125	-	-	183	ND
Hb β 62-91	18	5	5	ND
Hb β 1-13	4	6	4	6
Hb β 1-30	45	45	45	45
Hb β 79-104	170	42	170	ND
Hb β 114-124	6	6	12	ND
Hb β 114-145	85	85	73	ND
Hb β 121-145	85	73	73	73
Hb β 126-145	71	35	35	35
Hb β 140-145	9	10	2	9

续表 1-5

Hb β 143-145	4	1	4	1
--------------------	---	---	---	---

注：-表示没有活性; ND 表示没有检测抗菌活性。

Note:- no antibacterial activity; ND , not to determine antibacterial activity to the bacterium.

2.3 血红蛋白源抗菌肽的抗菌机制

目前对于血红蛋白源抗菌肽的抗菌机制尚不明确，国内外研究主要集中在这些抗菌肽的结构、长度及蛋白酶对血红蛋白的水解作用。内源性抗菌肽是由胚系基因编码的内源性活性肽分子，抗菌机制涉及到三个显著特征： α 螺旋结构、阳离子电荷和高含量的疏水性氨基酸，这三个特征对于抗菌肽抗菌活性是至关重要的，如 mellitin、cecropinspardaxin 和 LL-37。如表 1、2、3 所示，一些血红蛋白源抗菌肽带有正电荷和大量（>35%）的疏水性氨基酸，同时二级结构含有大比例的 α 螺旋结构，该类抗菌肽通过静电作用，带有正电荷的抗菌肽与带有负电荷的细胞膜结合，肽分子中的疏水基团插到磷脂双分子层的疏水核心部分，并以与膜表面垂直的方式排列，肽的亲水区域则形成具有极性的孔或通道，外界的水分即可渗入细胞内部，细胞质也可渗透到外部，致使细菌死亡；但有一些血红蛋白源抗菌肽带有正电荷和少量（<35%）的疏水氨基酸，却是任意卷曲结构，这类抗菌肽可能在与细胞膜相结合的时候可以形成 α 螺旋结构(Nicolas *et al*, 1995; Corbier *et al*, 2001); 还有一些血红蛋白源抗菌肽不带电荷或带有负电荷，其片段很短，其组成和结构与典型的 α 螺旋抗菌肽抗菌具有显著差异，探索这类片段的抗菌机制可能带来具有原始创新意义的发现。

Mak 等提出血红蛋白源抗菌肽抗菌活性可能与片段的长度有关，一般要长于 16 个氨基酸，因为太短的片段可能会丧失抗菌活性，甚至会促进细菌的生长，如来源于牛血红蛋白的包含 5 个氨基酸的片段能够促进恶臭假单胞菌的生长 (Zhao *et al*, 1996)。这也许是因为较长的片段有利于形成 α 螺旋结构，但是如图表 1、2、3 所示，一些短的片段抗菌性很强，抗菌机制尚不明确。

血红蛋白片段发挥抗菌作用有可能与机体的一些蛋白酶水解作用相关，Ivanov 等 (1997, 1998, 2000) 提出一个“组织特异性肽库”概念，推测血红蛋白可能在红细胞内降解，然后被不同的组织蛋白酶水解成多个片段。随后 Mak 等 (2004) 进一步研究表明基质金属蛋白酶和白细胞蛋白酶直接负责组织消化和

形成月经排放物。Liepke 等 (2003) 也证实酶解作用发生在红细胞内部。我们实验室分离到的 Hb α 片段经 [http://au.expasy.org/tools/peptide cutter/](http://au.expasy.org/tools/peptide_cutter/) 软件分析, 推测糜蛋白酶可能参与蛋白水解作用。

3 鱼类 cathelicidin 抗菌肽的研究进展

脊椎动物有两大类抗菌肽家族, 一类是 defensin 家族, 另一类就是 cathelicidin 家族 (Panyutich *et al*, 1997; Gennaro *et al*, 2000; Zaiou *et al*, 2002; Anderson and Yu, 2003; Dürre *et al*, 2006; Hao, 2012)。cathelicidin 家族抗菌肽具有广谱抗病原微生物的作用, 对革兰氏阳性细菌和阴性细菌、真菌、原生动物以及病毒都有很好的杀灭效果。除此以外, cathelicidin 还有其他一些生物学活性, 如促使血管的生成、趋化功能 (使导致炎症的细胞聚集到病灶部位)、伤口修复和抑制机体过氧化物的生成等作用 (王中强等, 2003)。由于其具有如此多重作用, 致使国内外学者对其研究与日俱增。Cathelicidin 类抗菌肽已在多种哺乳动物, 如人 (Cowland *et al*, 1995; Sigurdardottir *et al*, 2012)、猴 (Zhao *et al*, 2001)、牛 (Mookherjee *et al*, 2006)、猪 (Scocchi *et al*, 2005)、马 (Kerlavaj *et al*, 2001)、羊 (Giacometti *et al*, 2004)、兔 (Zarembek *et al*, 2002)、鼠 (Döring *et al*, 2012)、鹿 (Treffers *et al*, 2005)、袋鼠 (Carman *et al*, 2009) 和熊猫 (Yan *et al*, 2012) 等, 及几种鱼类中确认。迄今, 关于哺乳类 cathelicidin 抗菌肽的研究已较为深入, 鱼类却相对贫乏。

3.1 鱼类 cathelicidin 基因结构特征

迄今鱼类 cathelicidins 已在盲鳗 (*Myxine glutinosa*) (Uzzell *et al*, 2003)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Chang *et al*, 2005; 2006)、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) (Chang *et al*, 2006)、北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus*) (Maier *et al*, 2008)、大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*) (Maier *et al*, 2008; Broekman *et al*, 2011)、美洲红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) (Maier *et al*, 2008)、大鳞大马哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Maier *et al*, 2008)、亚东鲑 (*Salmo trutta fario*) (Scocchi *et al*, 2009)、茴鱼 (*Thymallus thymallus*) (Scocchi *et al*, 2009) 和香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) (Lu *et al*, 2011) 中确认 (如表 1-6)。哺乳动物除人类仅有一个 LL37 外, 其他哺乳动物 cathelicidin 基因存在多个变体现象, 鱼类也同样含有多个 cathelicidin

基因变体。鱼类 cathelicidin 包括 Pre, Pro 和 C 端成熟肽三个区域, Pre 区域(也称信号肽)含有 19~26 个 AA 残基的信号肽; Pro 区域含有 60~128 个 AA 残基, blast 分析目前已发表的鱼类 cathelididins 基因, 发现鱼类除盲鳗, 所有的鱼类 cathelicidin 并不像哺乳动物一样含有一段高度保守的 cathelin 结构域。Pro 区域 C 端的成熟肽是一个高度变异的抗菌区域, 含有 29~77 个 AA 残基, 靠近 C 端有 4 个半胱氨酸形成两个分子内二硫键, 直接影响到整个分子的结构, 但在北极红点鲑和美洲红点鲑却只有 2 个半胱氨酸, 鱼类 cathelicidin 基因是否如同 hepcidin 一样具有多种半胱氨酸结构, 有待进一步考证。另外鱼类 cathelicidin 基因包含 4 个外显子 3 个内含子, 1-3 个外显子编码 Pro 区域, 第 4 个外显子编码成熟肽区域, 但北极红点鲑鱼和美洲红点鲑第 3 个外显子缺失。采用 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html 软件预测鱼类 cathelicidin 成熟肽二级结构, 结果如表 1-6 所示, 除盲鳗外, 其他鱼类 cathelicidin 尽管可以形成 α -螺旋、 β 折叠和延伸结构, 但形成任意卷曲结构的可能性更大, 没有哺乳动物 cathelicidin 样抗菌肽的延伸螺旋, 环状和 β 折叠结构特征。

表 1-6. 鱼类 cathelicidin 物种来源、名称, 信号肽、pro 区域和成熟肽氨基酸数目, 及预测的成熟肽二级结构

Table 1-6. List of cathelicidin from fish, origin, name, and signal, pro, mature peptide amino acid amounts, and prediction for second structure of mature peptide

来源, 名称	信号肽氨基酸数目	Pro 区域氨基酸数目	成熟肽氨基酸数目	预测的成熟肽二级结构
盲鳗 (<i>Myxine glutinosa</i>) MgCath37	26	115	38	68.42% α 螺旋, 15.79%任意卷曲
盲鳗 (<i>Myxine glutinosa</i>) MgCath29	26	115	30	50% α 螺旋, 20%延伸链, 20% β 转角
虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>) RTcath1	22	123	71	40.85%任意卷曲, 33.99%延伸链
虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>) RTcath2	22	120	66	74.24%任意卷曲, 21.21% β 转角

续表 1-6

大西洋鲑鱼 (<i>Salmo salar</i>) AScath1	22	122	63	38.1% 任意卷曲, 28.27% α 螺旋
大西洋鲑鱼 (<i>Salmo salar</i>) AScath2	22	127	53	69.81% 任意卷曲, 24.53% β 转角
大西洋鳕鱼 (<i>Gadus morhua</i>) ACcath1	19	105	69	88.41%任意卷曲, 11.59%延伸链
大西洋鳕鱼 (<i>Gadus morhua</i>) ACcath2	19	105	70	100%任意卷曲
大西洋鳕鱼 (<i>Gadus morhua</i>) ACcath3	19	105	76	92.11%任意卷曲
北极红点鲑 (<i>Salvelinus alpinus</i>) ACHcath1	19	60	53	69.81%任意卷曲, 22.64% β 转角, 51.67%任意卷曲
亚东鲑 (<i>Salmo trutta fario</i>) BTcath1	22	122	60	26.67% 延伸链, 21.67% β 转角
美洲红点鲑 (<i>Salvelinus fontinalis</i>) BRcath1	22	85	53	69.81% 任意卷曲, 22.64% β 转角
美洲红点鲑 (<i>Salvelinus fontinalis</i>) BRcath2	22	123	77	67.53%任意卷曲, 23.38%延伸链
大鳞大马哈鱼(<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>) CScath2	—	117	47	53.19%任意卷曲, 29.79%延伸链
茴鱼 (<i>Thymallus thymallus</i>) GRcath2	22	123	42	69.05%任意卷曲, 19.0% β 转角
香鱼 (<i>Plecoglossus altivelis</i>) AYcath2	20	110	61	85.25%任意卷曲,

注：—表示数据缺失

Note:— indicates absent data

3.2 蛋白酶对 cathelicidin 的酶解作用

Cathelicidin 必须在蛋白酶酶解作用下释放抗菌成熟肽部分，如图 1-1 所示，首先 cathelicidins 在信号肽引导下进入到细胞内部，然后被信号肽酶切除信号肽，剩余的部分称 propeptide，这一部分仍然没有抗菌活性，必须把剩余部份的 pro 区域切除，这主要依靠某种蛋白酶的水解作用。牛和猪的这一过程是通过嗜中性粒细胞的弹性蛋白酶来完成的 (Gennaro *et al*, 2000)，弹性蛋白酶是丝氨酸蛋白酶家族中的一员，对丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)、异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L) 或缬氨酸 (V) 等含羧基的多肽键起催化水解的作用。哺乳动物中缬氨酸 (V) 经常出现在这一酶切位点，丙氨酸 (A) 和异亮氨酸 (I) 也经常会出现。此外，人类 LL-37 是通过蛋白酶 3 水解作用释放出来 (Sørensen *et al*, 2001)。有研究证明鱼类 cathelicidin 可以通过人嗜中性粒细胞内的弹性蛋白酶酶切释放抗菌成熟肽 (Chang *et al*, 2005; Chang *et al*, 2006; Lu *et al*, 2011)。如表 1-7 所示，苏氨酸 (T)、缬氨酸 (V) 经常出现在这一酶切位点，甘氨酸 (G)、和异亮氨酸 (I) 也有出现。但盲鳗 pro 区域和成熟肽之间为 4 个精氨酸，一些激原转化酶如 Kex2 和 furin 蛋白酶可以特异性酶切这一位点，推断 Kex2 和 furin 蛋白酶可能为潜在的酶原 (Rockwell *et al*, 2002)。因此，蛋白酶水解 cathelicidin 释放抗菌成熟肽这一关键步骤，不同的物种蛋白酶是不同的。除此之外，也有不需要蛋白酶作用的，如兔的两种 cathelicidin 的 p15a 和 p15b 是在细胞外活化的，它们没有弹性蛋白酶的酶切位点，不需要经过酶切就可以形成成熟肽 (Ooi *et al*, 2006)。

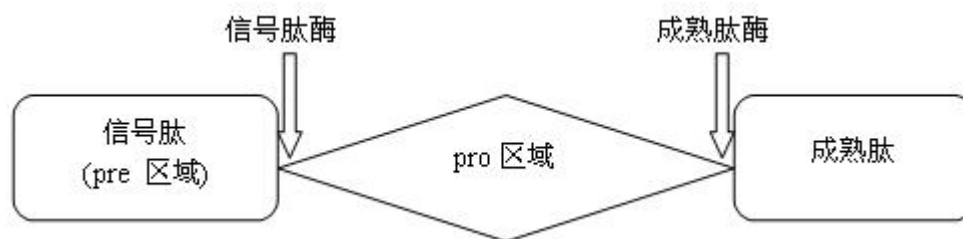


图 1-1 鱼类 cathelicidin 结构

Fig. 1-1 The structure of fish cathelicidin

表 1-7 鱼类 cathelicidin 成熟肽切割位点

Table 1-7 The cleavage sites of fish cathelicidin mature peptide

物种来源、名称	成熟肽氨基酸序列
盲鳗 (<i>Myxine glutinosa</i>) MgCath37	RRRR ↓ GWFKKAWRKVKHAGRRVLDTAKGVGRHYLNN WLNRYRG
盲鳗 (<i>Myxine glutinosa</i>) MgCath29	RRRR ↓ GWFKKAWRKVKNAGRVLKGVGIHYGVGLIG
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) RTcath1	KIRT ↓ RRSKVRICSRGKNCVSRPGVGSIIIGRPGGGSLIGRP GGGSVIGRPGGGSPGGGGSFNDEFIRDHSDGNRFA
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) RTcath2	KIRT ↓ RRGKDSGGPKMGRKDSKGGWRGRPGSGSRPGF GSGIAGASGVNHVGTLPASNSTTHPLDNCKISPQ
大西洋鲑鱼 (<i>Salmo salar</i>) AScath1	KIRT ↓ RRSQARKCSRNGGKIGSIRCRGGGTRLGGGSLI GRLRVALLLVAPFLDLSQINVMEIAFA
大西洋鲑鱼 (<i>Salmo salar</i>) AScath2	KIRT ↓ RRGKPSGGSRGSKMGSKDSKGGWRGRPGSGS RPGFGSSIAGASGRDQGGTRNA
大西洋鳕鱼 (<i>Gadus morhua</i>) ACcath1	LTRV ↓ RRSRSGRSGKGGRRGGSRGSSGSRGSKGPSGSRGS SGSRGSKGSRGGRSGRSGSTIAGNGNRNNGGTRTA
大西洋鳕鱼 (<i>Gadus morhua</i>) ACcath2	LTRV ↓ RRSRSGRSGKGGRRGGSRGSRGSKGPSGSRGS KGSRGSKGSRGGRSLRGSTIGRNLKKRRTVPVRPL
大西洋鳕鱼 (<i>Gadus morhua</i>) ACcath3	LTRV ↓ RRSRSGRSGKGGRRGGSRGSSGSRGSKGPSGSRG SSGSRGSKGSSGSRGSKGSRGGRSGRSGSTIAGNGN RNNGGTR
北极红点鲑 (<i>Salvelinus alpinus</i>) ACHcath1	KIRT ↓ RRGKASGGSSDSNMGRRDSKGGRRGRPGSGSRP GFGSSIAGASGVNHGGTRTA
亚东鲑 (<i>Salmo trutta fario</i>) BTcath1	KIRT ↓ RRSQARKCSRNGGGGIRCPGGGIRLGGGSLIGR PKGGSPGGGSFTAGFIRDQRDGNRFA
美洲红点鲑 (<i>Salvelinus fontinalis</i>) BRcath1	KIRT ↓ RRGKASGGSSGSNMGRKDSKGGRRGRPGSGSRPG FGSSIAGASGVNHGGTRTA

续表 1-7

美洲红点鲑(<i>Salvelinus fontinalis</i>) BRcath2	KIRT ↓	RRSKARICSRGKDCKFRSNGRHGSGSRLGGGSLIG RPGGGSRPGSSSVIGRPGGGSRLGSGSLIGRPGGGS RTGVAP
大鳞大马哈鱼 (<i>Oncorhynchus tshawtscha</i>)CScath2	KIRT ↓	RRGKDSGGSRGSKMWGWRGRPGSRSRPGVGSIGI AGASGGNHVGTLLTA
茴鱼 (<i>Thymallus thymallus</i>) GRcath2	KFRT ↓	RRSKSSSNGGRKGSKGGSKGRPGSGSSIAGASGV NHGGTRTA
香鱼 (<i>Plecoglossus altivelis</i>) AYcath2	KQKI ↓	RMRRSKSGKSGGSKGSGSKGSKGSKGSGSKGS GSKGGSRPGGSSSIAGGGSKGKGGTQTA

注: ↓ 表示成熟肽与结构域的酶切位点

Note: ↓ indicates cleavage sites

3.3 鱼类 cathelicidin 基因的组织表达特性和诱导表达机制

大部分 cathelicidin 的表达是在骨髓细胞分化的过程中进行的, 因此 cathelicidin 主要存在于哺乳动物未成熟的嗜中性粒细胞中。如 LL-37 首先在人的白细胞内发现, 但在机体其他组织和器官也有少量表达, 在睾丸、肺脏、母乳、指甲和新生儿的皮肤等多处都有表达(Agerberth *et al*, 1995; Gudmundsson *et al*, 1996; Bals *et al*, 1998; Ramanathan *et al*, 2002; Dorschner *et al*, 2003 ; Armogida *et al*, 2004; Dorschner *et al*, 2004) ; 再如鸡的 cathelicidin 样抗菌肽, CMAP27 在骨髓和淋巴组织中大量表达, 但在睾丸、脾、肾、肝和胸腺也有一定的表达(Dijk *et al*, 2005)。盲鳗既没有脾脏也没有骨髓, MgCath37 仅表达在肠粘膜静脉管周围的造血细胞内, 与哺乳动物 cathelicidin 的表达是一致的(Uzzell *et al*, 2003)。头肾和脾脏是鱼类免疫细胞的主要分布场所, 因此绝大多数鱼类 cathelicidin 在头肾和脾脏大量表达, 但虹鳟 rtcath1 却在健康鱼类组织和器官中没有表达, 只有在注射细菌的情况下才表达, 这也许是因为 Northern-blot 分析方法不够灵敏, 也或者是因为不同种鱼类的 Cathelicidin 表达图谱不一致(Chang *et al*, 2005)。

细菌可以诱导 cathelicidin 表达量的增加, Maier 等(2008)报道给大西洋鳕

鱼注射杀鲑气单胞菌无色亚种 (*A.salmonicida ssp. achromogenes*) 可以诱导 cathelicidin 在肝、幽门垂和肠的表达量, 鳃部的表达量也有少量增加; Lu 等(2011) 报道给大黄鱼注射鳗利斯顿弧菌 (*Listonella aguiillarum*), 头肾 cathelicidin 表达量为对照组的 251.7 倍。

3.4 鱼类 cathelicidin 成熟肽的生物活性

迄今, 鱼类 cathelicidin 生物活性的研究仅涉及抗菌特性, 其具有广谱抗菌活性, 对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和真菌均有抗菌活性。对于不同的菌株 cathelicidin 抗菌能力不同, 不同鱼类的 cathelicidin 的抗菌活性也不尽相同, 见表 1-8。

表 1-8 已报道的鱼类 Cathelicidin 抗菌肽 MIC [μ M]值

Table 1-8 MIC [μ M] of fish cathelicidin reported antimicrobial

抗菌肽	菌株	MIC
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) RTcath1	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) NCIMB 12210	1
	杀鲑气单胞菌(<i>Aeromonas salmonicida</i>) MT004	5
	杀鲑气单胞菌 (<i>A. salmonicida</i>) MT423	10
	美人鱼发光杆菌 (<i>Photobacterium damsela</i>) MT1415	1
	美人鱼发光杆菌(<i>P. damsela</i>) EPOY 8803II	2.5
	溶血弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) MT1741	0.5
	副溶血弧菌 (<i>V. Anguillarum</i>) MT1742	2
	鲁氏耶尔森菌 (<i>Yersinia ruckeri</i>) MT252	8
	格氏乳球菌(<i>Lactococcus garvieae</i>) MT2055	4
	格氏乳球菌 (<i>L.garvieae</i>) MT2059	2
	格氏乳球菌 (<i>L.garvieae</i>) MT2290	0.2
	格氏乳球菌 (<i>L.garvieae</i>) MT2291	0.1
	虹鳟 (<i>oncorhynchus mykiss</i>) RTcath2	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) NCIMB 12210
杀鲑气单胞菌(<i>A. salmonicida</i>) MT004		1
杀鲑气单胞菌 (<i>A. salmonicida</i>) MT423		5
美人鱼发光杆菌 (<i>P. damsela</i>) MT1415		0.5

续表 1-8

虹鳟	美人鱼发光杆菌(<i>P. damsela</i>) EPOY 8803II	1
(<i>oncorhynchus</i>	溶血弧菌 (<i>V. anguillarum</i>) MT1741	2.5
<i>mykiss</i>) RTcath2	副溶血弧菌 (<i>V. Anguillarum</i>) MT1742	4
	鲁氏耶尔森菌 (<i>Y. ruckeri</i>) MT252	8
	格氏乳球菌(<i>L. garvieae</i>) MT2055	8
	格氏乳球菌 (<i>L.garvieae</i>) MT2059	4
	格氏乳球菌 (<i>L.garvieae</i>) MT2290	0.2
	格氏乳球菌 (<i>L.garvieae</i>) MT2291	0.1
香鱼	鳎利斯顿氏菌 (<i>Listonella anguillarum</i>) Ayu-H080701	2.3
(<i>Plecoglossus</i>	杀鲑气单胞菌 (<i>A. salmonicida</i>)	9.20
<i>altivelis</i>)	嗜水气单胞菌 (<i>A. hydrophila</i>)	0.3
AYcath2	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	2.3
	鲶鱼爱德华氏菌 (<i>E. ictaluri</i>)	4.6
	创伤弧菌 (<i>V. vulnificus</i>)	18.4
	河流弧菌(<i>V. fluvialis</i>)	0.6
	溶藻弧菌 (<i>V. alginolyticus</i>)	1.1
	拟杆菌 (<i>Bacteroides spp.</i>) ATCC29771, 43935 和 12290	0.5-4
盲鳗 (<i>Myxine</i>	宋内氏志贺菌 (<i>Shigella sonnei</i>)	2-4
<i>glutinosa</i>)	嗜麦芽黄单胞菌 (<i>Xanthomonas maltophilia</i>)	2-8
MgCath37	沙门氏菌 (<i>Salmonella Group</i>) B	4-8
	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) ATCC27853	8
	鲍氏不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	8-16
	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) ATCC25922	8
	产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>)	8
	阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	8
	肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	8-16
	奇异变形杆菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)	>256
	粘质沙雷菌 (<i>Serratia marcescens</i>)	>256

续表 1-8

盲鳗 (<i>Myxine glutinosa</i>)	疮疱丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i>) ATCC11827 和 33179	2
MgCath37	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidi</i>)	2-4
	化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	4
	屎肠球菌 (<i>Enterococcus faecium</i>)	4-8
	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC29213	8
	产气荚膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) ATCC9081 和 13124	4-32
	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	32
	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) ATCC 90028	>256

4 本论文研究背景、主要内容与目的

4.1 研究背景

我国是世界上主要鳗鲡生产国之一，在多年的养殖过程中，病害发生较为频繁，病原复杂，其中以细菌性和寄生虫疾病最为严重 (Neto *et al*, 2010; Cao *et al*, 2011; Guan *et al*, 2011; Joh *et al*, 2011; Arafa *et al*, 2012)。鳗鲡人工养殖过程中多采用化学类药物，如抗生素等，导致细菌和寄生虫耐药性增强、水产品药残超标及对水环境污染，这些均严重制约着我国鳗业的健康发展 (Bergwerff *et al*, 2003)。中草药和疫苗无疑给当前养鳗业带来全新的希望，但中草药作用慢、用药量大，疫苗作用不安全、给苗困难。因此，如何控制病害发生，同时确保鳗鱼品质，促进我国养鳗业的可持续发展已成为当前养鳗业关注的焦点。

鱼类免疫系统分为先天性免疫和获得性免疫，其中先天性免疫是生物体抵御外源病原体的第一道防线。相对于高等脊椎动物，鱼类代谢速率非常缓慢，缺少淋巴结或生发中心，免疫球蛋白种类又非常有限 (主要是 IgM)；鱼类是变温动物，其特异性免疫应答受到多重外界因素的影响，如环境温度、季节、光照周期以及溶解于水中的有机物、重金属离子等，这些因素使得鱼类特异性免疫很难发挥作用 (张艳秋等, 2005)。同时鱼类非特异性免疫系统成分较哺乳类相对复杂，

如鱼类的补体系统成分特别是 C3 更具有多样性、鱼类抗菌肽等免疫物质能够快速应对病原体等。这些特点提示, 鱼类非特异性免疫在抵抗病原体感染中作用极为重要 (Magnadottir, 2010)。抗菌肽作为生物体自身合成的一类非特异性免疫物质在近年来备受关注, 其攻击细菌细胞膜的作用方式使人们相信细菌不易对其产生抗性, 被认为可能是传统抗生素最佳替代品。它对耐药菌株的抑杀效果被证实后, 更鼓舞了围绕它的理论研究与实践应用, 已有多个抗菌肽进入临床试验或应用。养殖业上抗菌肽的应用主要是以注射或饲喂动物, 或通过转基因技术将抗菌肽基因导入动物体内, 增加动物对病原菌的抵抗力。本研究通过色谱纯化和分子克隆 2 种方法分离确认了日本鳎 2 种抗菌肽, 为今后鳎细菌性疾病防治提供新策略和新思路。

4.2 主要研究内容

采用醋酸浸提, 阳离子交换层析和反相高效液相层析技术从日本鳎肝脏内分离纯化得到一个新的抗菌肽; 采用 Race 技术扩增出日本鳎这一新的抗菌肽全长 cDNA, 获得完整的氨基酸序列, 同时验证了其拥有广谱的抗菌活性; 克隆得到 2 个 cathelicidin 基因变体, 并在大肠杆菌内大量表达出重组蛋白, 利用亲和层析, 透析复性得到较高纯度的重组蛋白。

4.3 研究目的与意义

抗菌肽是一类广泛存在于生物体内且具有广谱抗菌活性的小分子多肽, 是先天性免疫中宿主抵御外源病原菌入侵的关键因子。抗菌肽不易产生耐药性, 且进入机体后不产生有害残留, 符合人类食品安全的要求, 这也与我国养鳎业可持续发展目标是一致的。本论文以日本鳎肝脏为研究对象, 采用色谱纯化和分子生物学两种技术手段从日本鳎肝脏内分离确认了两种抗菌肽, 为今后有效控制鳎细菌性疾病提供新途径, 同时也为鱼类抗菌肽的研究提供重要的参考价值。

第二章 日本鳎肝脏抗菌肽的分离与纯化

1 前言

鳎一直是我国水产养殖的重要品种之一，而疾病是制约我国养鳎业发展的一个重要因素。对于鳎疾病防治的研究各国学者主要集中在病原的分离鉴定、疫苗和药物的防治，而对于免疫因子的报道却极少，只有少数抗菌肽或抗菌物质被确认。迄今，两种类型的 Lectins, AJL-1 和 AJL-2 在日本鳎表皮粘液中确认，前者对链球菌有凝集活性，后者对大肠杆菌有凝集活性 (Tasumi *et al*, 2002; 2004)。一个 45 kDa 糖蛋白在欧洲鳎的表皮粘液中确认，其对嗜水气单胞菌最小抑菌浓度 (MIC) 为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ebran *et al*, 2000)；抗菌肽 Parasin I 也在日本鳎表皮粘液中确认 (Cho *et al*, 2002)。我们实验室前期在日本鳎表皮粘液中分离得到一个抗菌肽 AJN-10，其对嗜水气单胞菌有抗菌活性，但其氨基酸序列是不确定的 (Liang *et al*, 2011)。以上所述抗菌肽或抗菌物质均是在鳎表皮粘液中确认，鳎其它部位是否也同样存在抗菌肽或抗菌物质至今未见报道。

肝脏一直被视为机体最大的消化与代谢器官，后随着对肝脏的深入研究发现：肝脏不仅具有内分泌功能，而且可能参与机体局部或整体水平的免疫调节，肝脏是胸腺以外的 T 细胞分化的重要场所。一些免疫相关因子（包括急性期反应蛋白）和抗菌肽已在其它鱼类的肝脏内确认 (Bayne *et al*, 2001; Bo *et al*, 2012; Guo *et al*, 2012)，至今未见有关鳎肝脏抗菌肽的报道。我们前期实验发现，日本鳎各脏器酸性提取物，包括肝、鳃、脾、肾、胆汁、血浆，其中肝脏酸性提取物对迟钝爱德华氏菌 (B09)、气单胞菌属 (B18) 和嗜水气单胞菌 (B27) 抗菌活性最强 (徐同玲等, 2010)，因此我们选择肝脏作为原始材料提取抗菌肽。本实验，我们在日本鳎肝脏内分离纯化得到一个新的抗菌肽，来源于血红蛋白 α 链，对迟钝爱德华氏菌 (B09) 有较强的抗菌活性。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 日本鳎肝脏的采集与保存

冰冻的日本鳎肝脏来源于福建莆田东源烤鳎有限公司,采集日本鳎肝脏低温状态下转移至实验室, -80°C 超低温冰箱保存待用。

2.1.2 实验菌株

迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda* 编号 B09);

气单胞菌属 (*Aeromonas sp.* 编号 B18);

嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila* 编号 B27);

以上菌株均为本实验室菌种库提供, 编号均为本库编号。

2.1.3 主要仪器设备

匀浆机 (T10basic, IKA, 德国);

蛋白质核酸纯化系统 (AKTA-purifier 100, GE, 美国);

高速冷冻离心机 (3k18, Sigma, 德国);

切向流超滤系统 (90152 M, GE, 美国);

真空冷冻干燥机 (FREEZONE6, 6 L, LABCONCO, 美国);

酶标仪 (CliniBio 128C ELISA plate reader, Bio-Rad, 美国);

-80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo Forma);

阳离子交换柱 (HiTrap™ CM FF, GE Healthcare, 瑞典);

反相预装柱 (Source 5R RPC-ST-4.6/150, Amersham Bioscience, 瑞典);

反相 C18 高效液相色谱柱 (StableBond 300SB, 0.46×25 cm, 5 μm, Agilent, 美国);

摇床 (THZ-420)、恒温培养箱 (SHP-250)、烘箱 (9203A) 为上海精宏实验有限公司产品。

2.1.4 主要试剂

三氟乙酸 (TFA, SIGMA-ALDRICH, 美国), >98%;

乙腈 (ACN, Merck Darmstadt, 德国), 色谱级;

牛血清白蛋白 (BSA, Amresco, 美国), 分子生物学纯;

考马斯亮蓝 G250 (BIO BASIC INC, 加拿大), 分析纯;

冰醋酸、乙酸钠、乙酸铵 (NH₄AC)、37%盐酸、氯化钠、95%乙醇、85%磷酸、细菌学蛋白胨、牛肉浸膏、Mueller-Hinton Broth (MHB) 培养基等其它常用试剂均为国产分析纯。

2.1.5 试剂配制

(1) 10%冰醋酸:

冰醋酸 100 mL

加水至 1000 mL。

(2) 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液:

乙酸钠×3H₂O 136.1 g

加水至 1000 mL。

(3) 50%乙腈缓冲液:

乙腈 500 mL

加水至 1000 mL。

(4) Bradford 试剂:

95%的乙醇 25 mL

考马斯亮蓝 G-250 50 mg

85%的磷酸 50 mL

加水至 500 mL。

2.2 试验方法

2.2.1 肝脏抗菌活性物质的粗提

(1) 肝脏抗菌活性物质的初提

称取肝脏 150 g, 用剪刀剪碎, 生理盐水清洗, 加入 900 mL 10%冰醋酸, 匀浆 10 min (6000 r/min)。匀浆液用磁力搅拌器 4 °C 搅拌过夜, 次日 4 °C, 10000 g 离心 35 min, 收集上清液; 沉淀物加入 500 mL 10%冰醋酸, 4 °C 搅拌 3 h, 于 4 °C, 10000 g 离心 35 min, 收集上清液, 沉淀弃掉, 合并收集的上清液冻干, 备用。

(2) 肝脏抗菌活性物质的次提

初提冻干品加入 500 mL 10%冰醋酸，磁力搅拌器 4 °C 搅拌 3 h，再于 4 °C，10000 g 离心 35 min，收集上清液。沉淀加入 300 mL 10%冰醋酸，于 4 °C，10000 g 离心 35 min，收集上清液。合并收集的上清液，沸水浴 10 min，迅速置于冰水中冷却，于 4 °C，10000 g 离心 35 min，收集上清液冻干，备用。

(3) 超滤次提的醋酸提取物

将次提冻干品溶于 500 mL Milli-Q 水中，10000 g 离心 10 min，取上清液，置于冰上，并用 10 kDa 超滤纤维柱切向流超滤，整个系统压力保持 8-10 Psig，收集分子量小于 10 kDa 样品，冻干，-80 °C 保存备用。

以上醋酸初提上清液、次提上清液和小于 10 kDa 样品各保留 2 mL，冻干，以备抗菌活性检测。

2.2.2 离子交换层析分离

Milli-Q 水溶解分子量小于 10 kDa 的冻干样品，4 °C，10000 g 离心 10 min。取上清，用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤，滤液用 HiTrap™ CM FF 5 mL 阳离子交换层析柱纯化。纯化系统为 ÄKTA Purifier 100，流速 2 mL/min，检测波长为 280 nm。流动相：缓冲液 A 为 0.1 mol/L 乙酸钠 (pH 7.4)；缓冲液 B 为 4 mol/L 乙酸铵。色谱条件：未结合的样品用 A 液洗脱 20 mL；结合的样品用 B 液 0-100% 线性洗脱 50 mL，按体积每管 2 mL 收集洗脱液，实验重复 30 次。将收集的样品冷冻干燥后，用 Milli-Q 水重新溶解，取一小份检测抗菌活性。

2.2.3 反相液相色谱分离

将收集得到的 28-32 管样品合并，Milli-Q 水溶解后，4 °C，10000 g 离心 10 min。取上清，用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤，滤液用 Source 5R RPC-ST-4.6/150 反相预装柱纯化。纯化系统为 ÄKTA Purifier 100，流速 1 mL/min，检测波长为 A280 nm。预装柱预先用 A 液 (2% ACN, 0.1% TFA) 平衡 17.5 mL，再用 B 液 (50% ACN) 0-100% 梯度洗脱 50 mL。按体积收集，每管 1 mL，实验重复 20 次。各组分冻干后，用 Milli-Q 水溶解，检测抗菌活性。

2.2.4 反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化

(1) 第一次 RP-HPLC 纯化

取反相液相层析后抗菌活性较高的第 39 管洗脱液，冻干、Milli-Q 水溶解、离心、过滤（0.22 μm 滤膜）后，进行反相高效液相色谱纯化。高效液相色谱仪：Agilent 1100。色谱柱：Zorbax 300SB-C18 Column（4.6x250 mm，Agilent）。流动相：A 为 0.1%TFA，B 为 100% ACN。色谱条件：色谱柱用 0.1%TFA 平衡，取上述处理过的样品上样，每次 0.1 mL，5 min 内 B 从 0 到 17%；5-36 min，31 min 内 B 从 17%到 27%；36-41 min，5 min 内 B 从 17%到 100%；总的运行时间 41 min，流速：1 mL/min，检测波长：280 nm。按峰手动收集洗脱液，实验重复 21 次，真空冷冻干燥，让其中的 TFA 和 ACN 充分挥发。样品冷冻干燥后，Milli-Q 水溶解，检测抗菌活性。

(2) 第二次 RP-HPLC 纯化

为进一步纯化得到日本鳎肝脏抗菌物质的纯品，取第一次 RP-HPLC 得到具有抗菌活性的洗脱样品，Milli-Q 水溶解、离心、过滤（0.22 μm 滤膜）后进行第二次 RP-HPLC 纯化。除所用洗脱梯度改变外，所有条件和方法都与第一次 RP-HPLC 相同。洗脱样品所用的洗脱梯度：0-5 min 内 B 从 0 到 19.5%；5-55 min，50 min 内 B 从 19.5%到 24.5%；55-60 min，5 min 内 B 从 24.5%到 100%。样品冷冻干燥后，Milli-Q 水溶解，检测抗菌活性。

2.2.5 蛋白浓度测定

Bradford 法测定蛋白含量 (Bradford, 1976)，0.5 mg/mL 牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准品，实验采用酶标板在酶标仪上测定。分别取 0.5 mg/mL BSA 标准品 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 按梯度加如入到酶标板中，生理盐水补足至 20 μL ，每孔再依次加入 200 μL Bradford 试剂，实验设有 3 个平行组。室温放置 3-5 min，用酶标仪测定 A595 nm，根据牛血清白蛋白 A595 nm 值，做标准曲线和线性回归方程，计算出待测样品的蛋白浓度。

2.2.6 抗菌活性检测

(1) 琼脂板扩散法检测抗菌活性

醋酸初提、次提和超滤冻干样品采用琼脂板扩散法检测抗菌活性，取对数生长期的细菌用生理盐水调至浓度为 1×10^8 cfu/mL，再制作成 20 mL 含细菌浓度

为 1×10^5 cfu/mL 的混菌平板。待平板冷却后, 每个平板打 4 个孔径为 3 mm 的孔, 前 3 个孔内分别加入 8 μ g 的蛋白样品, 第 4 个孔内加入 16 μ L Milli-Q 水, 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 观察并测定抑菌圈大小, 抑菌半径指示抗菌活性大小。

(2) 微孔液体培养法检测抗菌活性

色谱纯化的肽样品用微孔液体培养法检测抗菌活性, 参考 Anderson & Beaven (2001) 的方法略加改动。将对数生长期的细菌悬液用生理盐水调至浓度为 1×10^6 cfu/mL。抗菌活性的检测采用 96 孔板检测, 实验分作实验组、空白组和细菌组。实验组中加入 20 μ L 待检测样品和等体积的细菌悬液, 样品空白组中加入 20 μ L 待检测样品和等体积的 0.85% 生理盐水; 细菌组中加入 20 μ L 细菌悬液和等体积的 0.85% 生理盐水, 细菌空白组加入 40 μ L 0.85% 生理盐水。而后将 96 孔培养板置于 28 $^{\circ}$ C 培养, 3 h 后每孔中加入 50 μ L 无菌的 MHB 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 21 h, 在酶标仪上检测 OD₆₂₀ 的值。实验重复 2 次, 按下列公式计算杀菌指数 (Ki%)。

$$\text{杀菌指数 Ki\%} = \left(1 - \frac{\text{实验组 OD}_{620} - \text{样品空白 OD}_{620}}{\text{细菌 OD}_{620} - \text{细菌空白 OD}_{620}} \right) \times 100\%$$

2.2.7 抗菌肽的纯度及分子量分析

采用质谱分析检测。将 1 μ L (浓度为 10 pmol/L) 的样品溶液加入到 1 μ L 的 MALDI 基质饱和溶液中, 基质饱和溶液包括适量芥子酸 (Bruker, Daltonics, Germany) 溶于 0.1% TFA (Fluka, Buchs, Schweiz): 乙腈 (Merck Darmstadt) 水溶液 (V/V 1: 2) 小管中。取 0.5 μ L 的样品加入到 MALDI 靶上, 室温蒸发后用于 MALDI-TOF-MS 分析。质谱分析过程由厦门大学分析测试中心生物专项实验室完成, 质谱仪为 REFLEX III 质谱仪 (BRUKER, Germany), 检测方式为线性正离子, TOF: 1.6 m; 加速高压: 20 kV; 检测器电压: 1.8 kV; 聚集电压: 9.8 kV。

2.2.8 抗菌肽氨基酸的序列测定

将纯化的抗菌肽电转到 PVDF 膜, 采用氨基酸自动分析仪检测 N-末端部分序列 [Applied Biosystems ABI 492cLC protein sequencer (ABI, USA)] 由上海基康公司测定, 测定方法为 Edman 降解法。

3 结果

3.1 肝脏粗提物的提取和抗菌活性检测

150 g 冷冻的肝脏经醋酸初次提取，冻干后得到 18.75 g 干物质。次提去除了一些大的杂蛋白，上清液冻干得到 7.25 g 干物质。超滤后，分子量小于 10 kDa 样品冻干后得到 4.76 g 干物质。粗提物均对三种菌株 B09、B18、B27 具有一定的抗菌活性（表 2-1，图 2-1），每次处理后抗菌活性有所提高。

表 2-1 琼脂板扩散法检测 8 μg 粗提物样品对 1×10^5 cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株的抗菌活性（抑菌半径，mm）

Tab. 2-1 Antibacterial activities of 8 μg extracted samples against 1×10^5 cfu/mL B09, B18 and B27 with agar plate diffusion method (radius of inhibition zone, mm)

菌株	抑菌圈半径(mm)		
	初提后样品	次提后样品	小于 10 kDa 样品
B09	3.00 \pm 0.57	4.00 \pm 0.42	11.00 \pm 0.85
B18	6.50 \pm 1.98	8.30 \pm 1.56	13.20 \pm 1.27
B27	9.00 \pm 1.70	10.00 \pm 1.41	15.50 \pm 3.11



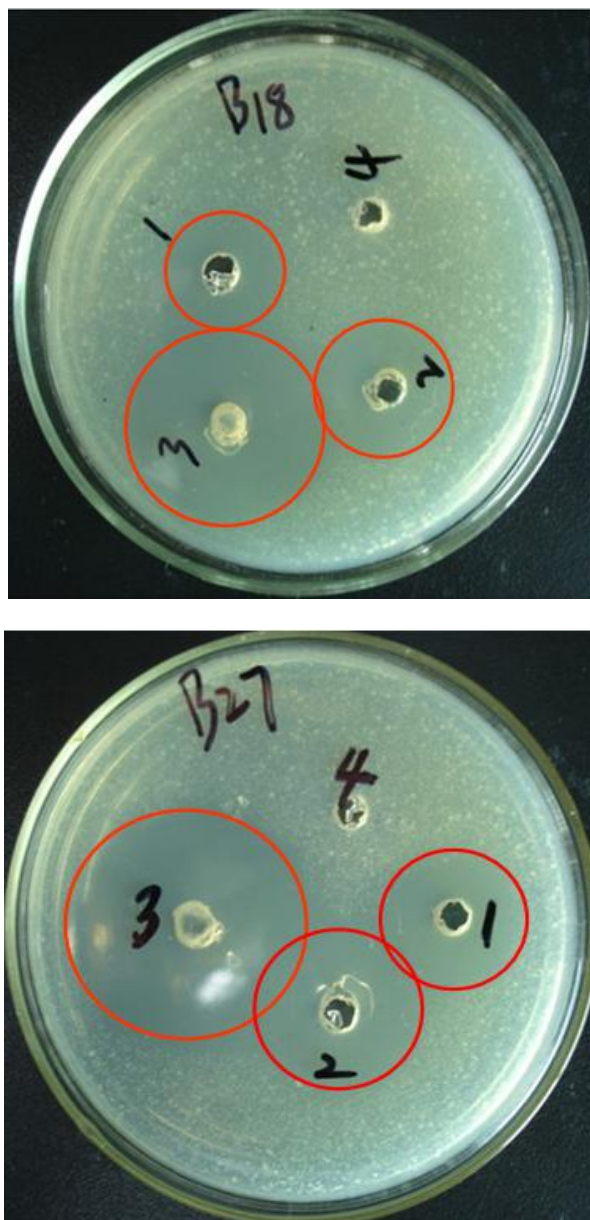


图 2-1 日本鳗鲡肝脏酸性粗提液的抗菌活性。1. 初提后样品；2. 次提后样品；3. 小于 10 kDa 样品；4. Milli-Q 水。圆圈表示抑菌圈。

Fig.2-1 Antibacterial activities of the acidic extraction from Japanese eel liver. 1. the first acidic extraction; 2. the second acidic extraction; 3. protein of MW < 10 kDa; 4. Milli-Q water. circle indicates inhibition zone.

3.2 离子交换层析分离

离子交换层析分离分子量小于 10 kDa 的蛋白样品，结合到层析柱上的样品较少，出现明显的两个洗脱峰，我们收集 28-32 管洗脱组份，对应乙酸铵浓度为 (1.27~2.08) mol/L (图 2-2B)。28-32 管洗脱组分均对 B09、B18、B27 菌株

具有较强的抗菌活性(图 2-2A)。除 30 号管对 B18 杀菌指数 Ki%为 $82.49 \pm 9.42\%$ ，其余各管对 B09、B18、B27 的 Ki%值均在 99%以上。

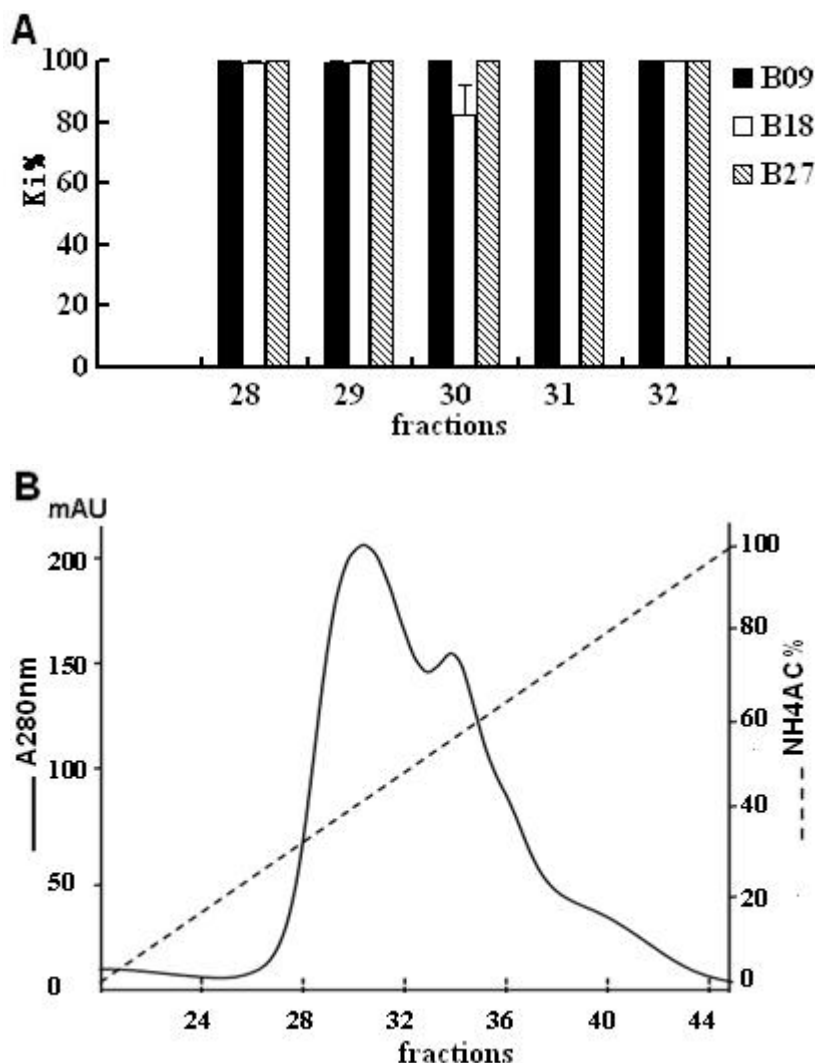


图 2-2 分子量小于 10 kDa 样品经离子交换层析分离的洗脱色谱图。A: 洗脱 28-32 管组份对 B09、B18 和 B27 的杀伤指数 Ki%；B: 分子量小于 10 kDa 蛋白样品的阳离子交换层析洗脱曲线。

Fig. 2-2 Elution profile for the cation-exchange chromatography on peptides of MW < 10 kDa from the liver of Japanese eel. A: Antibacterial activity of the 28th to 32nd tubes on cation-exchange chromatography; B: Cation-exchange chromatography on peptides of MW < 10 kDa.

3.3 反相液相色谱分离

收集离子交换层析洗脱的 28-32 管，冻干，MilliQ 水重新溶解。经 Source 5R RPC-ST-4.6/150 预装柱进行反相液相层析，洗脱曲线（图 2-3B）。在这一层析过

程，各组份并没有完全分开，很多抗菌活性物质混在一起。洗脱各组份对 B09、B18、B27 菌株均有不同程度的抗菌活性(图 2-3A)，其中 39 号管样品对 B09、B18、B27 杀菌指数 Ki% 分别为 $77.65 \pm 13.6\%$ 、 $99.54 \pm 0.66\%$ 和 $91.25 \pm 5.73\%$ ，抗菌活性较强，我们用做后续实验，分离单一的抗菌肽。

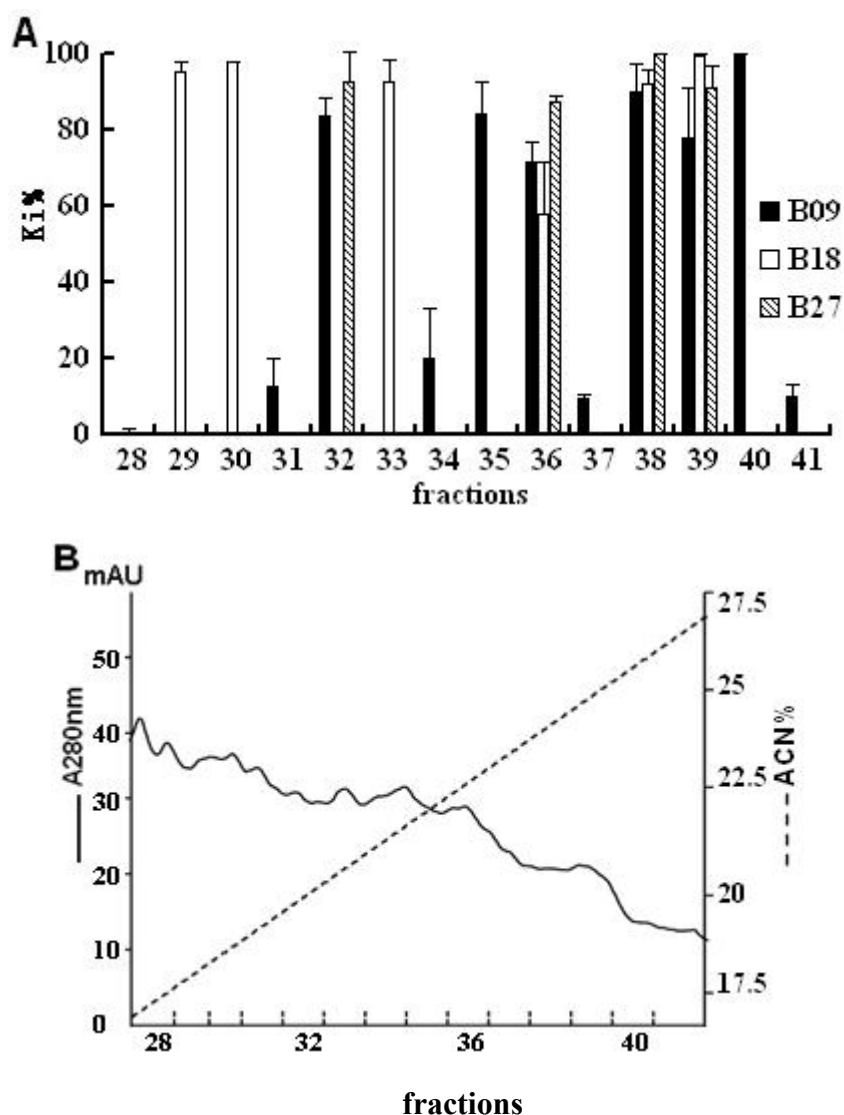


图 2-3 离子交换层析收集到的 28-32 管样品经 Source 5R RPC-ST-4.6/150 柱反相液相层析分离色谱图。A: 洗脱 28-41 管组份对 B09、B18 和 B27 的杀伤指数；B: 离子交换层析收集的 28-32 管样品经 Source 5R RPC-ST-4.6/150 柱反相液相层析洗脱曲线。

Fig.2-3 Elution profile for reversed phase chromatography of the 28th to 32nd fractions obtained from cation-exchange chromatography. A: Antibacterial activity of the 28th-41st tubes reversed on phase chromatography; B: the 28th to 32nd tubes of cation-exchange chromatography was subjected to a Source 5R RPC-ST-4.6/150 column.

3.4 反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化

重复收集 39 号管样品，合并冻干，MilliQ 水重新溶解，经 C18 柱第一次反相液相层析，洗脱图谱（图 2-4）。洗脱部分有三个活性峰，我们集中研究 peak3，peak3 样品对 B09、B18、B27 杀菌指数 Ki% 分别为 $85.87 \pm 3.27\%$ 、 $10.9 \pm 1.53\%$ 、 $2.9 \pm 1.55\%$ 。

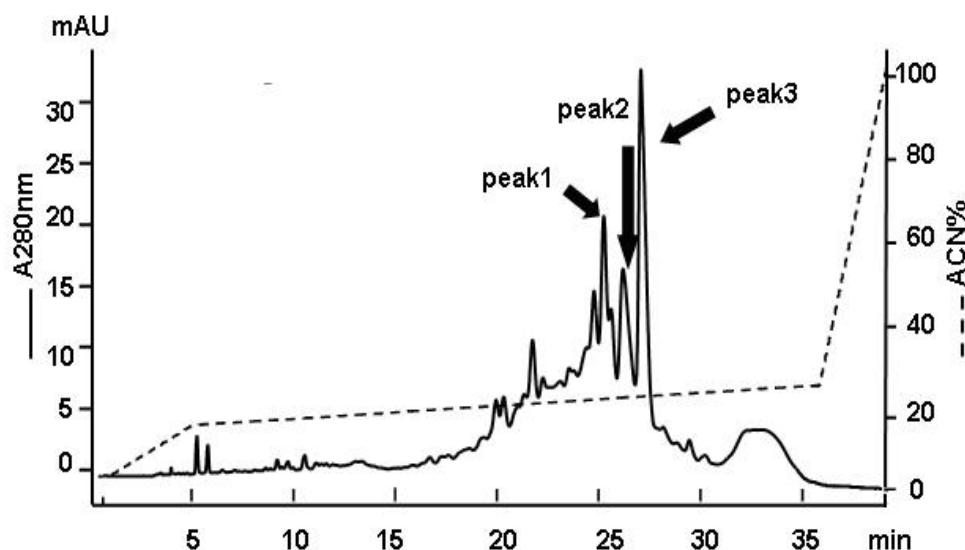


图 2-4 Source 5R RPC-ST-4.6/150 柱反相纯化收集的 39 号管组份，经 C18 柱第一次 RP-HPLC 纯化色谱图。箭头指示活性峰。

Fig.2-4 Purification profile of the pooled 39th fractions by the first RP-HPLC. The fractions from peak3 denoted by the arrow were pooled, and subjected to further purification.

重复收集 peak3 组份，冻干，MilliQ 水重溶，第二次 C18 柱 RP-HPLC 纯化，洗脱图谱（图 2-5）。在 26-28 min 时出现单一活性峰，对应乙腈浓度为 21.6%-21.8%，该样品浓度为 $27 \mu\text{g/mL}$ ，对 B09、B18、B27 杀菌指数 Ki% 分别为 $88.64\% \pm 3.91\%$ 、 $17.57\% \pm 5.75\%$ 、 $8.06\% \pm 7.30\%$ 。该峰左右对称，基本判定为单一物质，可以进一步进行质谱分析来确认其纯度和测定精确分子量，进而测定氨基酸序列。

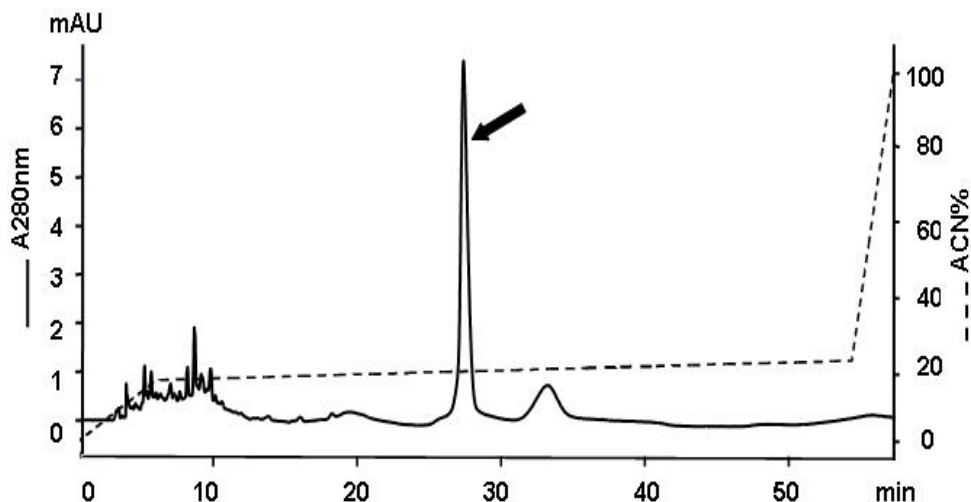


图 2-5 第一次 RP-HPLC 纯化收集的 peak3 组份，经第二次 RP-HPLC 纯化的色谱图。箭头指示活性峰。

Fig.2-5 Purification profile of the pooled peak3 fractions by the second round of RP-HPLC. The fractions denoted by the arrow were pooled and submitted for further chemical characterization and antibacterial spectrum assay.

3.5 抗菌肽质谱分析

在飞行时间质谱分析仪上的分析结果显示，在 1000-10000m/z 范围内检测到约 2388.05 Da 的生物大分子物质（图 2-6）。

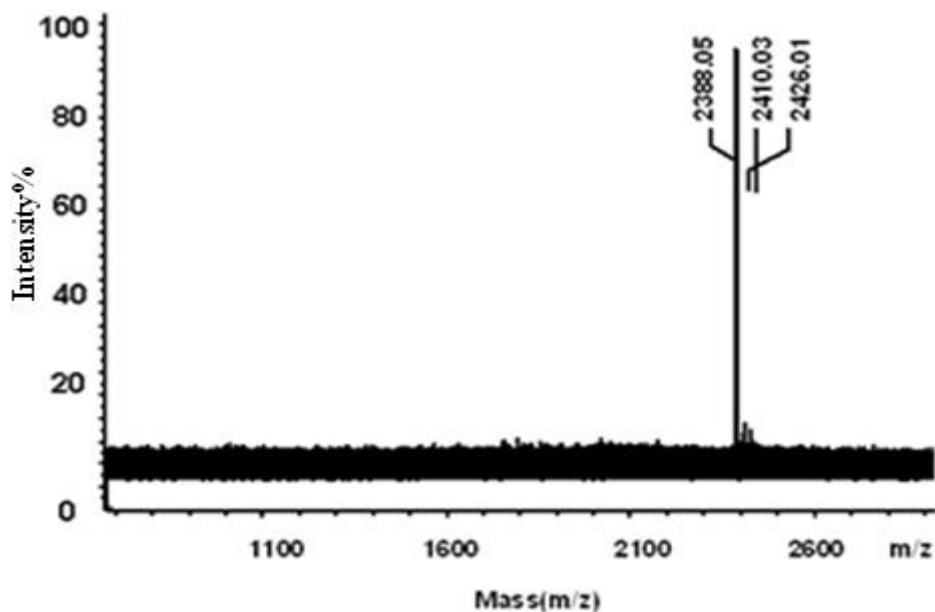


图 2-6 第二次 RP-HPLC 纯化 26-28min 样品的质谱分析图

Fig. 2-6 Mass spectrogram of the second RP-HPLC 26-28min fraction

3.6 抗菌肽氨基酸序列测定

将抗菌肽样品转印到 PVDF 膜上, 用 Edman 降解方法测定该多肽的 N-末端 18 个氨基酸残基序列为 H-FAHWPD LGPGSPSVK KHG-OH (氨基酸图谱见附录二)。该序列与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中欧鳗的血红蛋白 α 链部分序列相似度达 94%, 因此命名为 AjHb α 。

4 讨论

4.1 日本鳗鲡肝脏抗菌物质的粗提

抗菌肽常存在于胞浆颗粒中, 其分子量较小, 且在组织中的含量比较低, 因而分离和纯化比较困难。提取小分子多肽的方法主要有: 盐溶液提取、酸溶液提取、碱溶液提取和有机溶剂提取法等。抗菌肽多呈弱碱性, 为增加其溶解度, 故常用稀酸溶液提取。Noga 等 (2009) 应用 1% 醋酸溶液从杂交条纹鲈的鳃分离纯化得到 Piscidin 4, 其抗菌谱非常广, 对鱼类和人类病原均有较强的抗菌活性; Bonetto 等 (1999) 应用 3% 醋酸从猪的脾脏分离纯化得到 PR-39 和 NK-lysin 的两个亚型, 三个抗菌肽对大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌都有一定的抗菌活性; Lauth 等 (2002) 应用 10% 醋酸从杂交条纹鲈的皮肤和鳃分离纯化得到 moronecidin, 其对部分革兰氏阳性细菌和阴性细菌 MIC 小于 20 μM , 并对耐药菌株金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) MIC 为 1.25–2.5 μM ; Abbassi 等 (2008) 用 10% 醋酸从北非蛙 (*Pelophylax saharica*) 皮肤分离纯化得到三个 temporins 亚型, temporins-1Sa 对革兰氏阴性菌、真菌 MIC 为 2–30 μM , 且对寄生虫有一定的杀灭作用, 对利曼原虫 (*Leishmania infantum*) 的前鞭毛体半数致死浓度约为 20 μM 。本实验采用 10% 醋酸粗提肝脏, 可以获得较高含量的抗菌活性物质 (图 2-1)。在多次的实验中发现, 肝脏组织的酸性提取液在冻干后重新溶解时, 有一部分物质不能再溶解到同样的醋酸溶液中, 这说明肝脏组织的醋酸粗提液中有部分生物大分子物质很容易变性沉淀, 这样有利于抗菌肽的浓缩和进一步纯化, 于是实验中采用了两次冻干重溶进行日本鳗鲡肝脏抗菌物质的粗提。目前已知多种抗菌肽具有很高的热稳定性 (Oren *et al*, 1996), 沸水浴处理可以消除热稳定性较差的抗菌活性物质的干扰, 同时可以去除一些大分子杂蛋白物质 (王晓露等, 2009)。本实验

中, 沸水浴可以使粗提液中一部分物质沉淀, 能够去除一部分杂质, 没有降低抗菌活性, 相反抗菌活性反而有所提高(表 2-1), 这也说明我们提取的抗菌肽 AjHb α 为一热稳定性抗菌肽。另外, 抗菌肽分子量多小于 10kDa, 故用纤维柱切向流超滤, 收集小于 10 kDa 的部分。

4.2 日本鳗鲡肝脏抗菌物质的多样性分析

尽管利用免疫组化、原位杂交、RT-PCR、Dot-blot 等方法证实了抗菌肽存在于多种组织和器官内, 但鱼类大多数抗菌肽是从粘液、皮肤和鳃中分离纯化得到, 这也许因为鱼类生活的水环境复杂, 粘液、皮肤和鳃构成了鱼类抵抗病原的第一道防线, 故粘液、皮肤和鳃形成一个巨大的抗病原肽库。本实验选用肝脏作为天然纯化材料, 也发现肝脏内存在多种抗菌物质(图 2-2, 2-3, 2-4)。我们仅分离纯化得到 AjHb α , 一些没有确定的肽物质可能对 B09、B18、B27 抗菌活性更强或者对其它病原有抗菌活性。抗菌肽彼此之间有协同作用, 包括血红蛋白。经 Source 5R RPC-ST-4.6/150 预装柱反相液相层析分离得到的 39 号管对 3 种菌株均有较强的抗菌活性, 可是我们最终得到的 AjHb α 只对 B09 抗菌活性较强, 一些对 B18、B27 抗菌活性较强的抗菌肽我们并没有分离纯化得到。另外我们只分析了 AjHb α 的抗菌活性, 其它的一些血红蛋白源抗菌肽除能够抑制或杀灭细菌外, 还能抗真菌、寄生虫, 对于 AjHb α 的其它特性我们以后再分析。

4.3 AjHb α 的表达分布及作用的探讨

血红蛋白源抗菌肽不仅具有广谱的抗菌活性, 而且数目之多也是其他抗菌肽不能比拟的。自 1958 年首次发现血红蛋白具有抗菌活性到至今, 每年都会发现一定量新的血红蛋白源抗菌肽。那么如此多的血红蛋白源抗菌肽都分布在哪里? 传统上我们认为脊椎动物血红蛋白是红细胞内负责运载氧的一种蛋白, 可是最近的研究颠覆了这一理论。Liu 等(1999)发现小鼠巨噬细胞在 LPS 和 γ -IFN 诱导下表达 β 球蛋白基因, 并推测血红蛋白可能是氧气与 NO 感应器; Nishi 等(2008)报道血红蛋白存在于鼠肾脏的球内系膜细胞内, 其作用可能涉及抗氧化作用; Bhaskaran(2005), Newton(2006)等报道血红蛋白存在于鼠的 II 型肺泡细胞内, 并推测其可能有三种作用: 1) 有助于跨过血气屏障运输氧气, 2) 作为氧气感应器, 3) 保护肺泡上皮细胞, 防止其被氧化或硝酸化。另外在大脑的神经元和神

神经元细胞内也发现了血红蛋白的存在 (Schelshorn *et al*, 2009; He *et al*, 2010)。Ullal 等 (2008) 应用免疫组化和原位杂交, 发现血红蛋白表达在鳃和皮肤的上皮细胞内。这些部位的血红蛋白作用至今尚未清楚, 但有一点是明确的, 它们的作用并不是单纯的运输氧气。我们在本实验中分离得到一抗菌肽 AjHb α , 其分布我们并不清楚, 除抗菌作用外, 是否还存在其它作用有待进一步研究。

5 小结

本研究分离纯化得到一个新颖的血红蛋白源抗菌肽 AjHb α 。该抗菌肽在浓度为 11.30 μ M 时, 对迟钝爱德华氏菌 (B09) 抗菌活性较强。质谱分析可见分子量为 2388.05, Edman 降解法测定 N-末端 18 个氨基酸残基序列为 H-FAHWPD LGP GSPSVKKHG-OH。因与欧鳗血红蛋白 α 链相似, 因此命名为 AjHb α 。迄今, 这是首次发现鱼类血红蛋白源 α 链的抗菌肽。

第三章 日本鳗鲡 AjHb α 抗菌肽的鉴定和抗菌活性分析

1 前言

AjHb α 是在日本鳗鲡肝脏新发现的一种抗菌肽，目前仅获得其部分氨基酸序列，因此，进一步鉴定该抗菌肽，揭示其编码核苷酸序列和氨基酸序列以及阐明该基因结构十分重要。本研究分子克隆得到 AjHb α 完整的氨基酸序列，同时合成该抗菌肽，分析其抗菌谱。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 实验动物

日本鳗鲡来源于集美大学海水养殖试验场，体重约 300 g，外观健康，无明显病变和损伤。

2.1.2 实验菌株

金黄色葡萄球菌 (*S. aureus* 编号 1.879 G⁺);

溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus* 编号 1.634 G⁺);

溶藻弧菌 (*V. alginolyticus* 编号 1.18333 G⁻);

副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus* 编号 1.164 G⁻);

哈维氏弧菌 (*V. harveyi* 编号 1.1600 G⁻);

以上菌株为鄢庆枇老师馈赠，编号为中国科学院微生物研究所编号。

迟钝爱德华氏菌 (*E. tarda* 编号 B09 G⁻);

豚鼠气单胞菌 (*A. caviae* 编号 B14 G⁻);

嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila* 编号 B27 G⁻);

简达气单胞菌 (*A. jandaei* 编号 B29 G⁻);

威隆气单胞菌 (*A. veronii* 编号 B69 G⁻);

以上菌株均为本实验室菌种库提供，编号均为本库编号。

2.1.3 引物

(1) 用于扩增 AjHb α 的简并引物

S1: 5'-CTCCCTCYGTCAAGAAGCAYGG -3';

相对应的 AjHb α 氨基酸序列为: H-Pro-Ser-Val-Lys-Lys-His-Gly-OH;

简并性: Y = T + C;

A1: 5'-CAGCGTCTTGAAGTTGCCAGGGTCG -3';

A2: 5'-GCACCCAGAGCTGCAAGGAATTTAT-3'。

以上引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成

(2) 筛选重组质粒的引物

M13 (+) primer: 5'-GGACACACTTTATAACAATAGGCGAG-3';

M13 (-) primer: 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'。

(3) 3'-Full RACE Core Set 试剂盒中提供的 3' RACE 引物

Out primer: 5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3' ;

Adaptor primer: Containing the dT region designed by TaKaRa and Adaptor primer part 。

(4) SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 提供的 5' RACE 引物

SMARTer IIA oligo primer:

5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAAGTAC $\times\times\times\times$ -3');

5'- RACE CDS Primer A: (5' (T)25VN 3');

10 \times Universal Primer A Mix (UPM):

Long: (5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACG-CAGAGT -3');

Short: (5' -CTAATACGACTCACTATAGGGC -3');

Nest primer: (5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')。

2.1.4 主要试剂盒、载体、工具酶和克隆菌株

TRIZOLR Reagent Total RNA Isolation Reagent, Invitrogen 公司;

DNA 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司；
3' Full RACE Core Set Kit、pMD18-T 载体试剂盒、DNA Marker、dNTPs、
Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司；
SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司；
克隆菌株 DH5 α 为本实验保存。

2.1.5 主要仪器

紫外分光光度计 (NaNoDROP 2000) 为基因公司产品；
PCR 扩增仪 (ABI Veriti) 为基因公司产品；
凝胶成像系统 (Tannon 1600) 为天能公司产品；
冷冻离心机 (5424R) 为 Eppendorf 公司产品；
高速冷冻离心机 (22331R) 为 Eppendorf 公司产品；
- 80℃ 超低温冰箱为美国热电 Thermo Forma 产品；
电泳仪、电泳槽购自北京六一试验仪器厂；
摇床 (THZ-420)、电热恒温水浴锅 (DK-600)、恒温培养箱 (SHP-250)、
烘箱 (9203A) 为上海精宏实验有限公司产品。

2.1.6 主要溶液配制

(1) 50×TAE 电泳缓冲液：pH8.0

Tris-HCl 40 mM

NaAc 20 mM

EDTA 2 mM

加水至 1000 mL。

(2) 0.1 mol/L CaCl₂：

CaCl₂ 11.102 g

加水至 100 mL，用 0.45 μ m 滤膜滤过除菌。

(3) LB 液体培养基 (pH 7.5)：

蛋白胨 10 g

酵母浸出粉 5 g

NaCl 5 g

121 °C 灭菌 20 min。

(4) LB 固体培养基:

LB 液体培养基 1000 mL 中加入琼脂粉 15 g, 121 °C, 灭菌 20 min。

2.2 试验方法

2.2.1 总 RNA 的提取

利用 Trizol 试剂盒提取日本鳗鲡肝脏总 RNA, 具体方法如下:

- (1) 称取约 50 mg 肝脏, 加入 1ml trizol, 匀浆机匀浆;
- (2) 充分混匀后, 于室温静置 5 min, 4 °C, 12000 g 离心 10 min;
- (3) 吸出粉红色上清液于另一离心管, 然后加入 200 μ L 氯仿, 剧烈震荡 (使用振荡器), 混匀后, 室温静置 3 min, 4 °C, 12000 g 离心 15 min;
- (4) 取上清 (无色水相层) 于一新的离心管中, 加 500 μ L 的异丙醇轻轻混匀, 冰上静置 10 min, 4 °C, 12000 g 离心 15 min;
- (5) 弃上清, 离心管底部及管壁上成凝胶状的沉淀用 1 ml 75% 乙醇洗涤, 4 °C, 7500 g 离心 5 min;
- (6) 弃上清, 沉淀于室温下晾干, 加入 75 μ L DEPC 处理水溶解沉淀, 即得总 RNA 提取液;
- (7) 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用紫外分光光度法检测 RNA 的浓度和纯度。

2.2.2 3' RACE 扩增日本鳗鲡血红蛋白基因

参照 TaKaRa 公司 3'-Full RACE Core Set 试剂盒说明书进行。

(1) cDNA 第一链合成

取 1 μ L (约 1 μ g) 日本鳗鲡肝脏总 RNA 于 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管中, 于 70 °C 加热 10 min, 立即置于冰上。

按序依次加入下列试剂:

5 \times M-MLV buffer	1.0 μ L
MgCl ₂ (25 mM/L)	2.0 μ L

RNase inhibitor (40 U/ μ L)	0.25 μ L
dNTP Mixture (10 mM/L each)	1.0 μ L
Adaptor primer (5 μ M/L)	1.0 μ L
DEPC 处理水	3.5 μ L
AMV Reverse Transcriptase XL(5 U/ μ L)	0.25 μ L
总反应体积	10.0 μ L

混合均匀后, 稍许离心, 置于 PCR 仪上, 运行下列程序:

42 °C, 60 min 退火, 70 °C, 15 min 延伸, 4 °C 停止。 -20 °C 保存备用。

(2) PCR 反应

取 2 μ L 第一链反应液作为模板加入到 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管中, 再依次加入以下 PCR 反应组分:

1 \times cDNA Dilution Buffer II	3.0 μ L
Gene specific primer S1	0.25 μ L
Outer primer	0.25 μ L
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	2.5 μ L
MgCl ₂ (25 mM/L)	2.0 μ L
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)	0.25 μ L
灭菌水	14.75 μ L
总反应体积	25.0 μ L

混合均匀后, 在热循环仪上按照下列程序进行 PCR 反应:

① 94 °C 2 min

② 35 个循环:

94 °C 40 s

56 °C 40 s

72 °C 60 s

③ 72 °C 5 min

④ 4 °C 停止

(3) 电泳

取扩增产物(3~5) μ L 进行 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳鉴定,用 100 bp ladder DNA Marker 作标准分子量对照,在紫外灯下观察电泳结果并进行拍照。

2.2.3 5' RACE 扩增日本鳗鲡血红蛋白基因

(1) cDNA 第一链合成

参照 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。取日本鳗鲡肝脏总 RNA 约 2.75 μ L, 加入 1.0 μ L 5'-CDS 引物混匀, 72 °C 孵育 3 min, 42 °C 孵育 2 min。按照顺序依次再加入下列试剂配置反应液:

SMARTer IIA oligo	1.0 μ L
5 \times First-Strand Buffer	2.0 μ L
DTT(20 mM)	1.0 μ L
dNTP(10 mM)	1.0 μ L
RNase inhibitor(40 μ M)	0.25 μ L
PowerScript Reverse Transcriptase	1.0 μ L
总反应体积	10 μ L

混合均匀, 42 °C 孵育 90 min, 72 °C 孵育 10 min。

反应结束后, 加入 100 μ L Tricine-EDTA Buffer 稀释第一链反应产物, -20 °C 保存。

(2) 第一轮 PCR 反应

取 1.25 μ L 第一链反应液作为模板加入到 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管, 再依次加入以下 PCR 反应组分:

10 \times Advantage PCR Buffer (无 Mg ²⁺)	1.5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.0 μ L
dNTPs (10 mM each)	0.5 μ L
50 \times Advantage Polymerase Mix	0.5 μ L
10 \times UPM (0.4 μ M) long	2.5 μ L
下游引物 A2 (10 μ M/ μ L)	0.5 μ L
灭菌水	17.25 μ L
总反应体积	25 μ L

混合均匀，在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应：

- ① 94 °C 2 min
- ② 25 个循环：
 - 94 °C 30 s
 - 65 °C 30 s
 - 72 °C 3 min
- ③ 72 °C 5 min
- ④ 4 °C Pause

(3) 第二轮 PCR 反应

取第一轮 PCR 反应液稀释 50 倍的产物 2 μL 作为模板加入到 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管中，依次按序加入下列组分：

10× Advantage PCR Buffer (无 Mg^{2+})	1.5 μL
MgCl_2 (25 mM)	1.0 μL
dNTPs (10 mM each)	0.5 μL
50× Advantage Polymerase Mix	0.5 μL
NUPM (10 $\mu\text{M}/\text{L}$)	0.5 μL
下游引物 A1 (10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$)	0.5 μL
灭菌水	18.5 μL
总反应体积	25 μL

混合均匀，在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应：

- ① 94 °C 2 min
- ② 5 个循环：
 - 94 °C 30 s
 - 72 °C 2 min
- ③ 5 个循环：
 - 94 °C 30 s
 - 70 °C 30 s
 - 72 °C 2 min
- ④ 25 个循环：

- 94 °C 30 s
69 °C 30 s
72 °C 3 min
⑤ 72 °C 5 min
⑥ 4 °C Pause

(4) 电泳

反应终止后,取扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳鉴定,用 2000 bp ladder DNA Marker 作标准分子量对照,在紫外灯下观察电泳结果并进行拍照。

2.2.4 PCR 产物回收和纯化

将 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶-TAE 电泳中分离后,于紫外灯下用干净的手术刀切下目的 DNA 的琼脂块,放入 1.5 mL 离心管中。用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段,按 OMEGA 公司 Gel Extraction Kit 说明书要求操作。具体步骤如下:

(1) 使用新鲜 TAE 电泳缓冲液,不要重复使用电泳缓冲液,旧的电泳缓冲液 pH 会增加而降低 DNA 的回收量。

(2) 电泳足够时间后,在紫外灯下小心地把所需 DNA 片段切下来,并尽量去除多余的凝胶,注意 DNA 在紫外灯下的曝光时间不要超过 30 s。

(3) 将含有目的片段的琼脂糖凝胶置于 1.5 mL 离心管中,按 100 mg 胶相当于 100 μ L 的体积,加入等体积的 Binding Buffer;

(4) 55~65 °C 加热 7 min 至胶完全融化,期间隔 2-3 min 混匀一次,检查溶液是否为黄色,若为橙色或红色,则需要用 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 调节使溶液呈黄色;

(5) 转移 700 μ L 的 DNA 琼脂糖溶液到一个 HiBind DNA 柱子,并把柱子装在一个干净的 2 mL 收集管内,室温下,10000 g 离心 1 min,弃去液体;

(6) 将柱子重新套回收集管中,加 300 μ L Binding Buffer 至 HiBind DNA 柱子中,室温下,10000 g 离心 1 min,弃去液体;

(7) 将柱子重新套回收集管中,加 700 μ L Spw wash buffer 至 HiBind DNA 柱子中,室温下,10000 g 离心 1 min,弃去液体;

(8) 将柱子重新套回收集管中，重复加 700 μL Spw wash buffer 至 HiBind DNA 柱子中，室温下，10000 g 离心 1 min，弃去液体，将空柱子重新套回收集管中，13000 g 离心 1 min，以甩干柱基质残余的液体。

(9) 把柱子装在一个干净的收集溶液 1.5 mL 离心管中，加入 30-50 μL 洗脱液或灭菌水到柱子膜上，13000 g 离心 1 min，离心管中的溶液即是纯化的 DNA 产物，保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，用分光光度计及电泳检测样品的纯度及含量。

2.2.5 目的片段与 pMD18-T 载体的连接

按照 pMD18-T 载体试剂盒说明书将纯化后的 PCR 产物与载体连接，反应体系如下：

Ligation Solution I	5.0 μL
pMD18-T 载体	1.0 μL
回收目的片段	3.0 μL
总反应体积	10.0 μL

于 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应过夜（约 16 h）。

2.2.6 感受态细胞的制备与重组质粒的转化

(1) 感受态细胞的制备

采用传统的 CaCl_2 方法制备大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，具体方法如下：

- ① 挑取 DH5 α 单克隆于 5 mL LB 液体培养基中， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，160 r/min 摇床振荡过夜；
- ② 取 0.5 mL 菌液加入 50 mL LB 液体培养基中， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，剧烈振荡 1-2 h，OD600 为 0.3-0.4 左右；
- ③ 菌液分装于 50 mL 灭菌离心管中，冰浴 10 min； $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，4000 g 离心 10 min，弃上清，回收细胞，应尽量流尽残余培养液；
- ④ 加入 10 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 溶液，重悬菌液， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，4000 g 离心 10 min，弃上清；
- ⑤ 加入 10 mL 预冷的 CaCl_2 溶液，小心悬浮细胞，冰浴 30 min；
- ⑥ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，4000 g 离心 10 min，弃上清；
- ⑦ 加入 2 mL 预冷的 CaCl_2 溶液，小心悬浮细胞，分装于 Eppendorf 管中，留一份进行下一步转化，其余加入 20% 甘油， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 热击法转化大肠杆菌 DH5 α 重组质粒的转化

- ① 取连接好的重组 DNA 10 μ L 至 100-200 μ L 的 DH5 α 感受态细胞中, 轻吹混匀, 冰浴 30 min;
- ② 42 $^{\circ}$ C 热冲击 90 s, 转移速度要快, 且温度要准确;
- ③ 冰浴 1~2 min;
- ④ 加入 1 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min 振荡 1 h;
- ⑤ 取 100-250 μ L 转化液涂在含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 琼脂平板上, 菌液涂皿操作时, 应避免反复来回涂布以免过多的机械压力使细胞破裂, 影响转化率;
- ⑥ 待液体被吸收后倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 观察菌落生长情况。

2.2.7 pMD18-T/目的片段重组质粒的鉴定及序列测定

(1) 采用 PCR 快速鉴定阳性克隆

从转化培养的平板中挑取生长良好的单克隆菌落 6~8 个, 无菌条件下接种于含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm/min 振荡培养过夜, 用于鉴定。取上述菌液 1.0 μ L 作为模板加入到 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管中, 依次按序加入下列组分

10 \times Mg ²⁺ free buffer	2.5 μ L
MgCl ₂ (25 mM/L)	2.0 μ L
dNTPs (10 mM/L)	0.25 μ L
M13 (+) primer (10 μ M /L)	0.5 μ L
M13 (-) primer (10 μ M /L)	0.5 μ L
无菌 MilliQ 水	19.05 μ L
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)	0.2 μ L
总反应体积	25.0 μ L

混匀后, 在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应

① 94 $^{\circ}$ C 5 min

② 30 个循环:

94 $^{\circ}$ C 30 s

60 °C 60 s

72 °C 60 s

③ 72 °C 5 min

PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

(2) 核酸序列测定

将上述检测阳性菌液进行放大培养，按比例加入 20% (V/V) 甘油，-80 °C 保存，同时送一份样品到 Invitrogen 公司测定序列。

2.2.8 生物信息学分析

序列同源性比对和相似性搜索用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 在线软件搜索；多肽分子量及理论等电点的计算用 ExPASy (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>) ProtParam tool 在线计算，多序列比较用 ClustalX1.83 软件；构建系统进化树用 Mega 3.1 软件；信号肽预测用 SIGNALP 在线查找 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)。

2.2.9 人工合成 AjHb α 抗菌肽的抗菌活性测定

AjHb α 抗菌肽由西安联美生物科技有限公司合成，抗菌活性的检测同第二章微孔液体培养法检测抗菌活性，不同的是所有菌液浓度均调至 OD₆₂₀ 0.1，合成肽的浓度稀释成 83.72 μ M、41.86 μ M、20.93 μ M、10.47 μ M 4 组。

3 结果

3.1 总 RNA 的提取

取 1 μ L 总 RNA 提取液进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (图 3-1)，从阴极到阳极依次呈现三条带，分别为 28S、18S 和 5S rRNA，这证明提取的总 RNA 完整。同时利用紫外分光光度计测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的 OD 值，证明 RNA 纯度也符合要求。

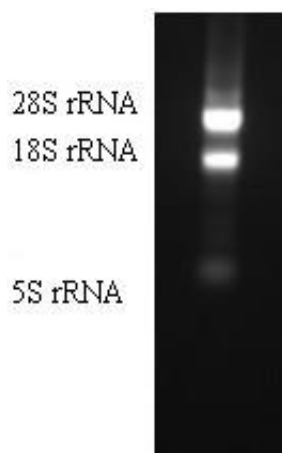


图 3-1 日本鳗鲡中提取的总 RNA 电泳图谱。

Fig. 3-1 Electrophoresis pattern of a total RNA isolated from the liver of Japanese eel.

3.2 3' RACE 和 5' RACE 扩增

根据 AjHb α N-末端 18 个氨基酸残基序列: H-FAHWPD LGPGSPSVK KHG-OH 设计了一条上游简并性引物 S1, 利用 3'-Full RACE Core Set 试剂盒所提供的通用引物 PCR 扩增。电泳分析产物, 结果在分子量约为 400 bp 处有一条清晰的产物条带 (图 3-2); 经纯化、连接、转化、鉴定和测序, 获得日本鳗鲡血红蛋白 370 bp 的片段 (图 3-4)。推导的氨基酸序列含有与预期 H-PSVKKHG-OH 结果一致。

采用 SMARTer RACE 试剂盒扩增日本鳗鲡血红蛋白上游 cDNA 序列。根据 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 提供的通用引物 UPM 和 Nest, 按照说明书的要求, 结合上述获得的血红蛋白序列, 设计了两个下游特异性引物 A2 和 A1, 巢式 PCR 扩增血红蛋白 cDNA, 产物电泳结果显示在约 400 bp 处有一条清晰的产物条带 (图 3-3), 经纯化、连接、转化、鉴定和测序, 获得 410 bp 血红蛋白 5' 端 cDNA 片段 (图 3-4)。最后经 3' 端和 5' 端序列拼接获得血红蛋白全长 cDNA (图 3-4)。提交国际 GenBank, GenBank 登录号为 JN558592。

用 ORF Finder 软件 (<http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析血红蛋白核苷酸序列, 发现蛋白编码区全长 429 bp, 可编码 143 个氨基酸残基。采用 SignalP 4.0 软件分析该蛋白不是分泌型蛋白, 没有信号肽。BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 搜索分析, 日本鳗鲡血红蛋白与其它鱼类血红蛋白相似度较高, 为 60-90%。

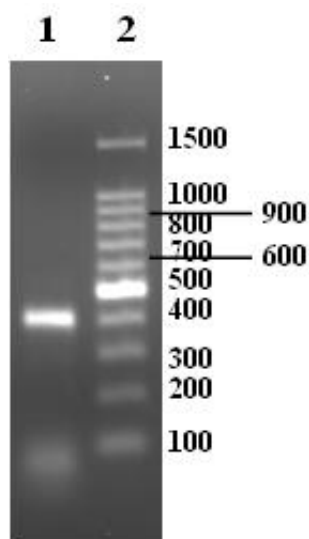


图 3-2 日本鳗鲡血红蛋白 3' RACE 产物的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of 3' RACE product from hemoglobin of Japanese eel.

- 1: 日本鳗鲡血红蛋白 3' RACE 产物
- 2: 100 bp ladder Marker

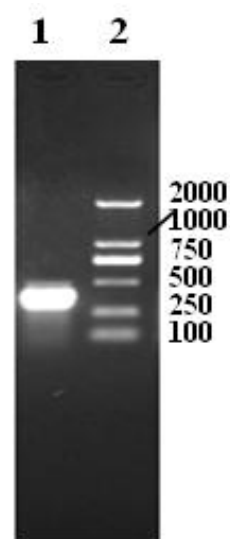


图 3-3 日本鳗鲡血红蛋白 5' RACE 产物的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of 5' RACE product from hemoglobin of Japanese eel.

- 1: 日本鳗鲡血红蛋白 5' RACE 产物;
- 2: 2000 bp ladder Marker

3.3 AjHb α 氨基酸序列分析

根据日本鳗鲡血红蛋白 α 链 cDNA 序列及质谱所测 AjHb α 分子量，获得 AjHb α 完整的氨基酸序列为 H-FAHWPD LGPGSPSVK KHGKVIM-OH（图 3-4）。ProtParam 工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析结果显示，AjHb α 理论分子量为 2388.8，这与质谱分析 AjHb α 可见分子量 2388.05 是相吻合的。AjHb α 理论等电点 pI 为 9.27，电荷+2，为一种弱阳离子抗菌肽。预测其在体外的不稳定性指数 (Instability index) 为 15.94，该抗菌肽为一种稳定型蛋白。AjHb α 没有糖基化修饰位点，很可能有 2 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点，即第 11 位丝氨酸 (Ser 11)，得分 0.899；第 13 位丝氨酸 (Ser 13)，得分 0.981。

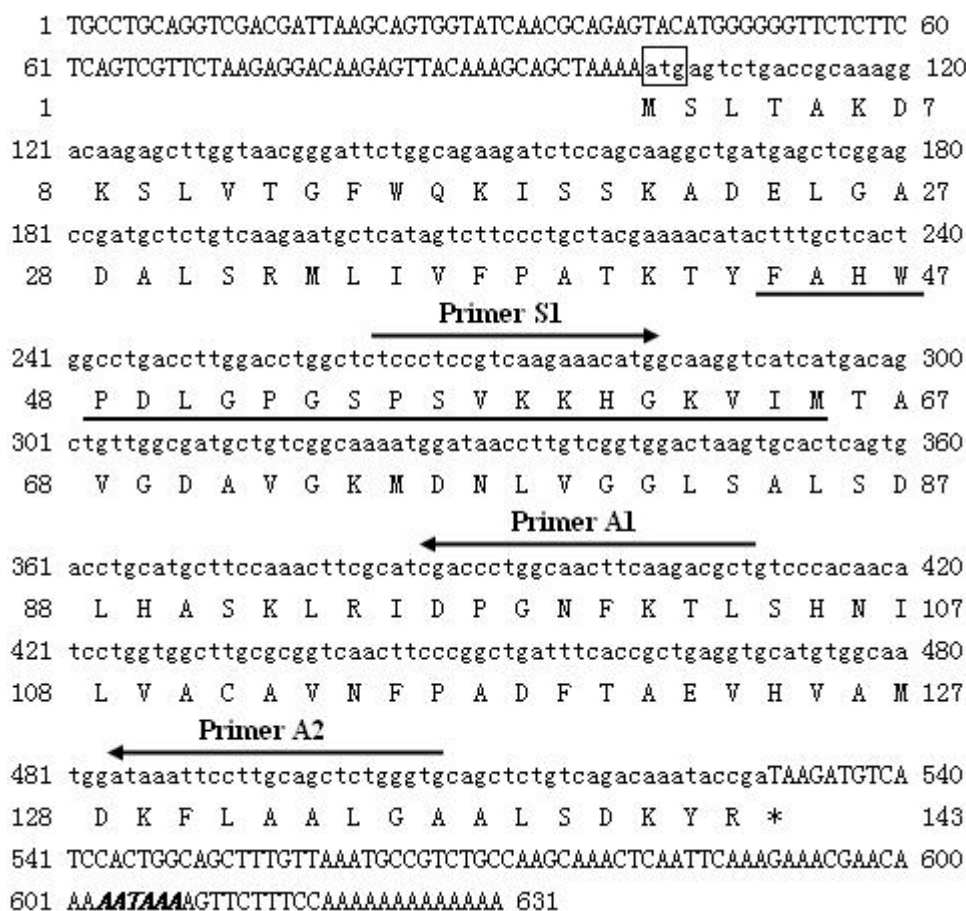


图 3-4 日本鳗鲡血红蛋白 α 链全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列。图中引物结合位点用箭头表示 (5' \rightarrow 3'); 起始密码子 ATG 用方框表示, 终止密码子 TAA 用*号表示; 聚腺苷酸化 AATAAA 用斜体字表记; 推导的 AjHb α 氨基酸序列用下划线表示。

GenBank 登录号为 JN558592.

Fig.3-4 Nucleotide and deduced amino acid sequence of α -chain of hemoglobin from Japanese eel, *A. japonica*. Primer binding sites are indicated with arrows (5' \rightarrow 3'); The start codon (ATG) is boxed. The stop codon (TAA) is asterisk. The polyadenylation signal motif (AATAAA) is bold italic. The underlined indicates the protein sequence of AjHb α as described in report, and the other residues are deduced from the nucleotide sequence.

3.4 人工合成 AjHb α 抗菌肽的抗菌活性

根据 AjHb α 完整的氨基酸序列人工合成该抗菌肽, 合成的抗菌肽对革兰氏阳性细菌和阴性细菌均有抗菌活性 (图 3-5), AjHb α 抗菌肽在浓度为 83.72 μ M 时对所有试验的细菌均有杀灭活性, Ki%达到 95%以上, 在浓度为 41.86 μ M 时对

6 株革兰氏阴性菌，即对豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae* B14)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila* B27)、简达气单胞菌 (*A. jandaei* B29)、威隆气单胞菌 (*A. veronii* B69)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus* 1.18333) 和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus* 1.164) 抗菌活性较强，Ki%达到 70%以上；浓度为 20.93 μM 和 10.47 μM 时，抗菌活性较弱，仅对溶藻弧菌和副溶血弧菌有抗菌活性，Ki%未达到 50%。

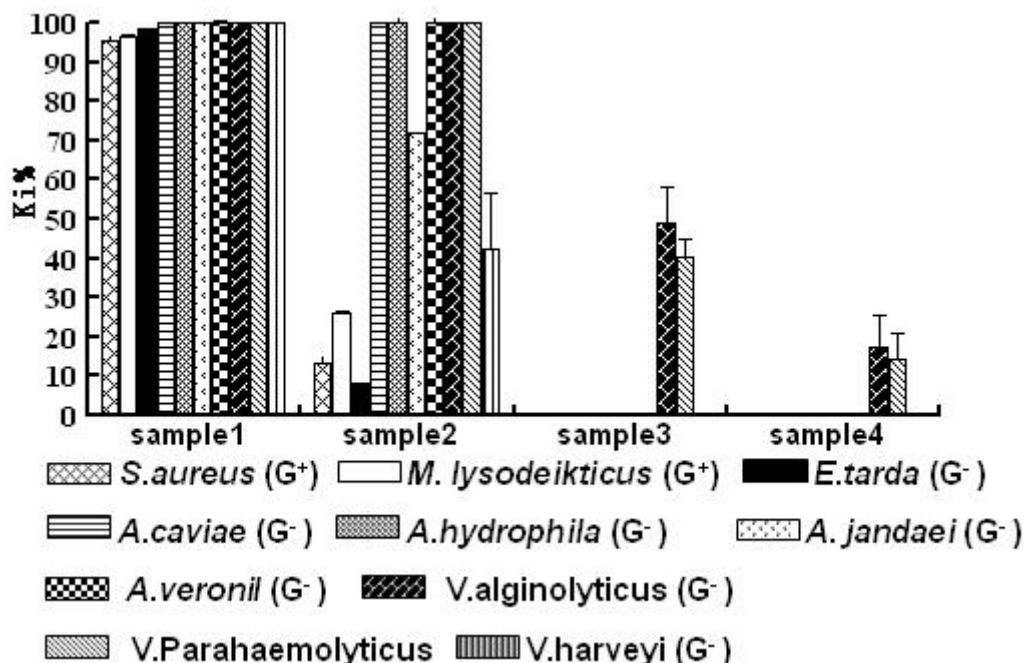


图 3-5 人工合成 AjHba 抗菌肽的对 10 株革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌抗菌活性结果。图中 Sample1、Sample2、Sample3、Sample4 分别代表浓度为 83.72 μM 、41.86 μM 、20.93 μM 和 10.47 μM 的合成抗菌肽；

Fig.3-5 Antimicrobial assays of synthetic peptide against ten bacterial strains. Sample1: synthetic peptide (83.72 μM); Sample2: synthetic peptide (41.86 μM); Sample3: synthetic peptide (20.93 μM); Sample4: synthetic peptide (10.47 μM).

4 讨论

4.1 AjHba 为一两性弱阳离子抗菌肽

反相液相层析纯化 AjHba 的结果显示 (图 2-5), 乙腈浓度为 21.6%-21.8% 时, AjHba 被洗脱下来, 说明 AjHba 具有一定疏水性, 或含有疏水性区域。抗菌肽预

测工具 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 分析其含有疏水性氨基酸残基异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、丙氨酸和色氨酸各 1 个，缬氨酸 2 个，疏水性比例 36%，抗菌肽电荷为 +2。同时，它能够溶解于 MilliQ 水，说明它也具有较强的极性。因此，该分子可能具有较强的亲水域和疏水域，是一种两亲的弱阳离子抗菌肽。DNASTar 软件分析（图 3-6），结果显示 AjHb α 的第 5-10，11-17 个氨基酸残基形成了两个亲水性较强的区域，没有 α 螺旋结构，形成 2 个明显的 β 折叠区域，及 2 个 α 两亲性区域和 3 个 β 两亲性区域。Geourjon and Deléage (1995) 方法分析，其形成延伸结构的比例为 18.18%， β 折叠比例为 36.36%，任意卷曲比例为 45.45%，没有 α 螺旋结构。抗菌蛋白两亲的结构域有利于抗菌蛋白与细菌的磷脂膜相互作用 (Khoo *et al*, 1999)，因此 AjHb α 两亲性的结构域可能对其抗菌功能十分重要的。大多两亲性抗菌肽都形成一个明显的 α 螺旋结构，但 AjHb α 却没有 α 螺旋结构，这类抗菌肽可能在与细菌细胞膜相结合的时候才可以形成 α 螺旋结构，这与 DNASTar 软件分析 AjHb α 没有 α 螺旋结构，却可以形成 2 个 α 两亲性区域是相符合的。

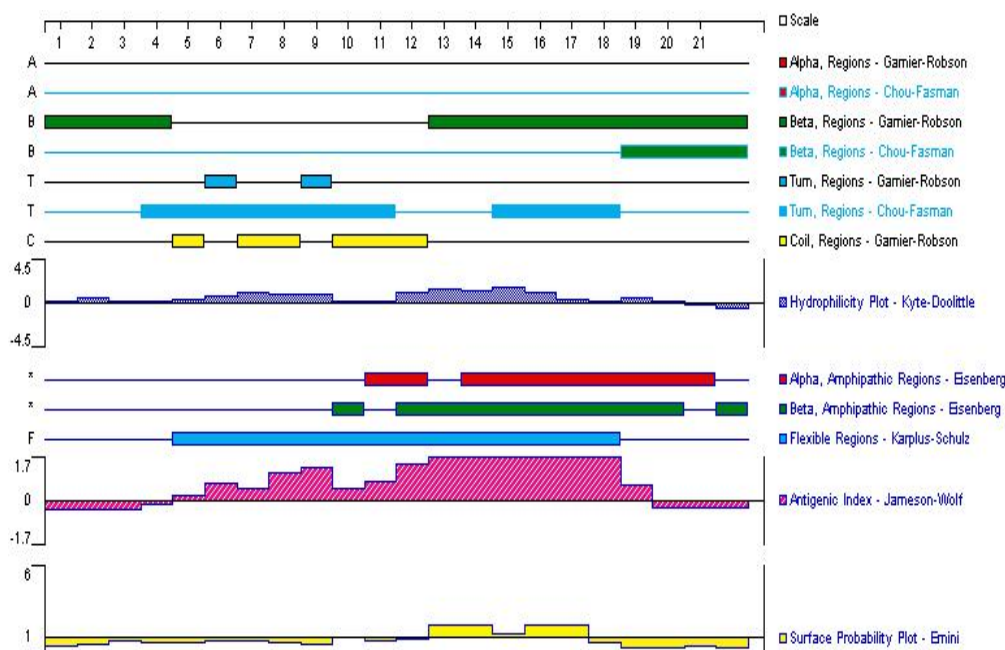


图 3-6 用 DNASTAR 的 Lasergene 序列分析软件中的 Protean™ 模块分析 AjHb α 抗菌肽的二级结构、疏水区和两亲的区域。

Fig.3-6 The secondary structure of the amino acid sequence of AjHb α from Japanese eel was predicted using Protean™ module in DNASTAR Lasergene software.

4.2 AjHb α 可能为日本鳗鲡血红蛋白酶解产物

有些抗菌肽来源于一些多功能的大蛋白，如血蓝蛋白（hemocyanin）、乳铁蛋白（lactoferricin）、组蛋白（histone）、溶菌酶（lysozyme）、泛素（ubiquitin）和补体（complement）。抗菌肽 parasin I 来源于 H2A，当鲑鱼皮肤受伤时，组织蛋白酶原 D 在因表皮损伤而诱导产生的基质金属蛋白酶 2（MMP2）的作用下被激活成有活性的组织蛋白酶 D（cathepsin D），它可裂解组蛋白 H2A 第 19 号 Ser 残基和 20 号 Arg 残基之间的肽键，从而生成 Parasin I (Cho *et al*, 2002); Birkemo 等（2003）在大西洋庸鲽皮肤粘液中提纯同样来源于组蛋白 H2A N 端的 hipposin 时，并没有在刮伤鱼体皮肤后等待一段时间再取其粘液，而是将鱼处死后迅速刮下粘液并直接冷冻待用。表明组蛋白 H2A 在衍生出抗菌肽的过程中，除可能被组织蛋白酶 D 降解外，还可能存在其它的酶在其相应的条件下参与降解活动。Kim 等（2000）在蟾蜍胃粘膜中发现的抗菌肽 buffin I，则是组蛋白 H2A 经胃蛋白酶（pepsin）的同工酶 pepsin Ca 和 Cb 的降解作用而产生的。Lee 等（2003）在小龙虾（*Crayfish Pacifastacus leniusculus*）血浆中加入几种蛋白酶抑制剂，结果抑制了血蓝蛋白源抗菌肽 astacidin 1 的产生，说明 astacidin 1 由蛋白酶水解血蓝蛋白产生的。当病原感染小球藻时，脂肪酶水解小球藻天然底物油酯产生游离脂肪酸抗菌肽，尽管此抗菌肽不能修复受损的小球藻，但是却能杀灭病原生物，保护了邻近的种群（Pohnert, 2002; Desbois *et al*, 2009）。

源于血红蛋白的抗菌肽也可能是由于蛋白酶的水解作用产生的。胃蛋白酶酶解牛血红蛋白得到 30 个抗菌肽，其中 24 个源于血红蛋白 α 链，6 个源于血红蛋白 β 链，它们对滕黄微球菌（*Micrococcus luteus* A270），无害利斯特菌（*Listeria innocu*），大肠杆菌（*E. coli*）和 肠炎沙门氏菌（*Salmonella enteritidis*）有抑菌作用（Nedjar-Arroume *et al*, 2008）。Ivanov 等（1997）也阐明血红蛋白在红细胞内可自然形成大约由 30 个氨基酸残基组成的片段，进而这些相对长的血红蛋白片段被蛋白酶酶解成更短的片段，形成具有生物活性的“血红蛋白肽库”。Fogaca（1999）和 Belmonte（2012）等从蜉蛄肠内容物里分离纯化得到具有抗菌活性的牛血红蛋白源片段 Hb α 33-61 和 Hb α 98-114，认为这是蜉蛄利用宿主血红蛋白片段的抗菌活性来防御病原微生物的侵害，Hb α 33-61 和 Hb α 98-114 可能由蜉蛄体内某种蛋白酶水解牛血红蛋白 α 链形成。Peptide Cutter 软件(<http://au.expasy.org/tools>

/peptide cutter/)分析日本鳗鲡血红蛋白 α 链, 糜蛋白酶可识别 Y^X 和 M^X (图 3-4), 糜蛋白酶酶解血红蛋白 α 链恰好形成 AjHb α 。

4.3 AjHb α 抗菌活性分析

纯化的 AjHb α 在浓度为 11.30 μ M 时, 对迟钝爱德华氏菌显示出很强的抗菌活性, 本实验合成的抗菌肽 AjHb α 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有很强的抗菌活性, 这表明抗菌肽 AjHb α 抗菌谱范围较广。AjHb α 在浓度为 41.86 μ M 对耐药菌株金黄色葡萄球菌, 及溶壁微球菌仍有抗菌活性, 在浓度为 10.47 μ M 对溶藻弧菌和副溶血弧菌也有抗菌活性。其它抗菌肽的抗菌活性, 如 hipposin 对浓度为 1×10^5 cfu/mL 金黄色葡萄球菌的 MIC 为 40-80 μ M, Pleurocidin 对同等浓度金黄色葡萄球菌的 MIC 为 5 μ M (Birkemo *et al*, 2003); 虹鳟的 2 个 cathelicidin 对浓度为 1×10^5 cfu/mL 副溶血弧菌的 MIC 为 0.5-4 μ M (Chang *et al*, 2006); 真鲷 (*Chrysophrys major*) 的 3 个 chrysophsin 对 2×10^5 cfu/mL 哈维氏弧菌的 MIC 为 2.5-10 μ M, 当 chrysophsin 浓度达到 40 μ M, 对同等浓度的嗜水气单胞菌和迟钝爱德华氏菌仍没有抗菌活性(Noriaki *et al*, 2003); 大黄鱼 hepcidin 在浓度为 38 μ M 对 1×10^6 cfu/mL 金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌有明显的抑菌活性 (Zhang *et al*, 2009)。这表明 AjHb α 抗菌肽相对于其它抗菌肽, 抗菌活力相当, 日本鳗鲡如同其它鱼类一样拥有一个抗病原的肽防御系统。

5 小结

本研究获得 AjHb α 完整的氨基酸序列 H-FAHWPD LGPGSPSVK KHGKVIM-OH, pI 为 9.27, 电荷为+2, 为一两亲性的弱阳离子抗菌肽。该抗菌肽可能为糜蛋白酶酶解日本鳗鲡血红蛋白 α 链形成。人工合成的抗菌肽 AjHb α 表现出广谱的抗菌活性, 对革兰氏阳性细菌和阴性细菌均有抗菌活性。

第四章 日本鳗鲡 cathelicidin 基因的克隆和序列分析

1 前言

目前抗菌肽的确认主要有天然材料的提取和分子克隆两种方法。天然材料的提取有利于发现新的抗菌生物活性物质,不失为一种好的创新方法,但其分离程序繁琐,而且涉及抗菌活性检测、质谱和氨基酸测序等技术。分子克隆技术比较成熟,相对获得抗菌肽比较简单、快捷。同时 cathelicidin 是目前发现的一个最大抗菌肽家族,其拥有强大的多重生物学功能。在鱼类,已陆续在盲鳗、大西洋鲑、大西洋鳕鱼、茴鱼、香鱼等多种鱼类中发现并确认。

本研究根据日本鳗鲡 cathelicidin 基因的 EST,克隆得到两个完整的 cathelicidin cDNA 序列,命名为 Ajcath1、Ajcath2。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 实验动物

日本鳗鲡来源于集美大学海水养殖试验场,体重约 300 g,外观健康,无明显病变和损伤。

2.1.2 引物

(1) 由上海捷瑞生物工程有限公司合成的引物

CA1: 5'-GTTTGCCTGTCTGTTCGTCTGTGCGTT -3';

CA2: 5'-GGGTGCCACTGTCTCCCTTGTCTC -3';

CA3: 5'-AGTGGCTGCGGCAAGGACATCTGTAAAG-3';

CA4: 5'-TTGCTGAAATATTTTGTCCAACCTTG -3'。

(2) SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 提供的 5'RACE 引物

同第三章 2.1.3 (4)。

2.1.3 主要试剂盒、载体、工具酶和克隆菌株

同第三章 2.1.4。

2.1.4 主要仪器

同第三章 2.1.5。

2.1.5 主要溶液配制

同第三章 2.1.6。

2.2 试验方法

2.2.1 总 RNA 的提取

同第三章 2.2.1。

2.2.2 5'RACE 扩增日本鳎肝脏 *Ajcath1* 基因

利用日本鳎的 *cathelicidin* EST (GeneBank:HS106475, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 设计引物, 扩增 *Ajcath1* 基因 5'端。

(1) cDNA 第一链的合成

同第三章 2.2.3 (1)。

(2) 第一轮 PCR 反应

取 1.25 μL 第一链反应液作为模板加入到 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管, 再依次加入以下 PCR 反应组分:

10 \times Advantage PCR Buffer (无 Mg^{2+})	1.5 μL
MgCl_2 (25 mM)	1.0 μL
dNTPs (10 mM each)	0.5 μL
50 \times Advantage Polymerase Mix	0.5 μL
10 \times UPM (0.4 μM) long	2.5 μL
下游引物 CA2 (20 pM/ μL)	0.5 μL
灭菌水	17.25 μL
<hr/>	
总反应体积	25 μL

混合均匀，在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应：

① 94 °C 2 min

② 25 个循环：

94 °C 30 s

65 °C 30 s

72 °C 3 min

③ 72 °C 5 min

④ 4 °C Pause

(3) 第二轮 PCR 反应

取第一轮 PCR 反应液稀释 50 倍的产物 2 μL 作为模板加入到 0.2 mL 薄壁 PCR 反应管中，依次按序加入下列组分：

10 \times Advantage PCR Buffer (无 Mg^{2+}) 1.5 μL

MgCl_2 (25 mM) 1.0 μL

dNTPs (10 mM each) 0.5 μL

50 \times Advantage Polymerase Mix 0.5 μL

NUPM(10 $\mu\text{M}/\text{L}$) 0.5 μL

下游引物 CA1 (20 pM/ μL) 0.5 μL

灭菌水 18.5 μL

总反应体积 25 μL

混合均匀，在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应：

① 94 °C 2 min

② 5 个循环：

94 °C 30 s

70 °C 2 min

③ 5 个循环：

94 °C 30 s

68 °C 30 s

72 °C 2 min

④ 25 个循环：

94 °C 30 s

67 °C 30 s

72 °C 3 min

⑤ 72 °C 5 min

⑥ 4 °C Pause

(4) 电泳

反应终止后,取扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳鉴定,用 2000 bp ladder DNA Marker 作标准分子量对照,在紫外灯下观察电泳结果并进行拍照。

2.2.3 5'RACE 扩增日本鳎肝脏 *Ajcath2* 基因

利用日本鳎的 *cathelicidin* EST (GeneBank:HS106389, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),设计引物扩增 *Ajcath2* 基因 5'端。

(1) cDNA 第一链的合成

同第三章 2.2.3 (1)。

(2) 第一轮 PCR 反应

同本章 2.2.2 (2),特异性引物改为 A4
T_m 为 58 °C。

(3) 第二轮 PCR 反应

同 2.2.2 (3),特异性引物改为 A3
T_m 为 73 °C、71 °C、69 °C。

(4) 电泳

同 2.2.2 (4)。

2.2.4 PCR 产物回收和纯化

同第三章 2.2.4。

2.2.5 目的片段与 pMD18-T 载体的连接

同第三章 2.2.5。

2.2.6 感受态细胞的制备与重组质粒的转化

同第三章 2.2.6。

2.2.7 pMD18-T/目的片段重组质粒的鉴定及序列测定

同第三章 2.2.7。

2.2.8 生物信息学分析

同第三章 2.2.8。

3 结果

3.1 总 RNA 的提取

结果同第三章 3.1。

3.2 Ajcath1 的 5' RACE 扩增结果

利用特异性引物 CA1、CA2 和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 提供的通用引物，从日本鳎肝脏扩增出一条约 300 bp 大小的片段（如图 4-1），经纯化、连接、转化、质粒提取和阳性克隆鉴定，得到阳性重组子测序。结果得到一条包含 5'UTR 和一部分编码在内的 349 bp 的片段，与日本鳎肝脏 Ajcath1 3'Race 产物比对，两者有一个 223bp 的重叠区，经过序列拼接和碱基校对最终得到 842 bp 全长的 Ajcath1 cDNA。Ajcath1 序列由 69 bp 5'UTR、567 bp ORF 和 206 bp 3'UTR 三部分组成，编码 189 个氨基酸（图 4-3）。经提交国际 GenBank 检索表明，从日本鳎肝脏分离得到的 Ajcath1 属于新的 cathelicidin 家族基因，GenBank 登录号为 AFP72291。

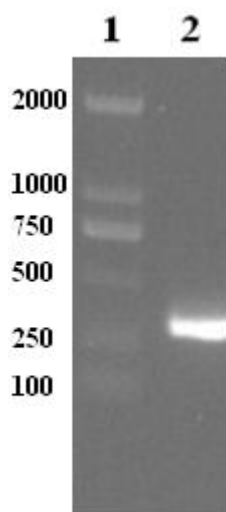


图 4-1 AJcath1 的 5' RACE 产物

Fig. 4-1 5' RACE product of Ajcath1

1: DL2000 Marker

2: AJcath1 的 5'RACE 产物

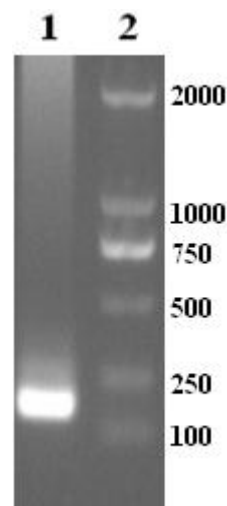


图 4-2 AJcath2 的 5' RACE 产物

Fig. 4-2 5' RACE product of Ajcath2

1: DL2000 Marker

2: AJcath2 的 5'RACE 产物

3.3 Ajcath2 的 5' RACE 扩增结果

利用特异性引物 CA3、CA4 和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 提供的通用引物，从日本鳎肝脏扩增出一条约 200 bp 大小的片段（如图 4-2），经纯化、连接、转化、质粒提取和阳性克隆鉴定，得到阳性重组子测序。结果得到一条包含 5'UTR 和一部分编码在内的 204 bp 的片段，与日本鳎肝脏 Ajcath2 3' Race 产物比对，两者有一个 127 bp 的重叠区，经过序列拼接和碱基校对最终得到全长为 633 bp 的 Ajcath2 cDNA。Ajcath2 序列由 49 bp 5'UTR、477 bp ORF 和 107 bp 3'UTR 三部分组成，编码 152 个氨基酸（图 4-4）。经提交国际 GenBank 检索表明，从日本鳎肝脏分离得到的 Ajcath2 基因属于新的 *cathelicidin* 家族基因，GenBank 登录号为 AFP72292。

```

1  AGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAT 60
61  GCTGAAACTatgaaggctatcggtgaaatcgctactggctgcactgaccgccttgctggcc 120
1        M K A I V K S L L V A L T A L L A       17
121 actgctcagcgtggagtgagtttagctacgaaggggtcatcgtagatgacaccaccgc 180
18        T A Q R G V E F S Y E G V I V D A T T R       37
181 tacgtacaacaggctggggaagaatacgccttcagaccgctgctgagagctctgcaagtt 240
38        Y V Q Q A G E E Y A F R P L L R A L Q V       57
241 gaaactgtgtccactgctgaatttggtgacaagccagtggtggctcaggaagctaacttc 300
58        E T V S T A E F V D K P V V V R K L T F       77
301 cctctgcatgagactatctgtgaacgcacagacgaacagacaggcaaacagtgctccctta 360
78        P L H E T I C E R T D E Q T G K Q C P L       97
361 aaaaggaatgggaaatcatttatgtgcaacatggcgatttctcagccggtacttgagagc 420
98        K R N G K S F M C N M A I S Q P V L E S       117
421 agtataccccagagcactggcatcacatgtgaacccatgaccacgaatcagctacagcat 480
118       S I P Q S T G I T C E P M T T N Q L Q H       137
481 aagatccggatgagaagaagcaaggccggcaaaggctctggagggaacaaaggaataag 540
138       K I R M R R S K A G K G S G G N K G N K       157
541 ggctctgggggaaacaaaggaacaaggctctcgaccgggggtgggtccagcatcgct 600
158       G S G G N K G N K G S R P G G G S S I A       177
601 ggcagagacaagggagacagtgccacccgaactgcaTAGAAGCAGAGAGAAGGCATCACT 660
178       G R D K G D S G T R T A       * 189
661 AATCAAGCCCACCACGATTGGCACATCTTGTGTTATTCTGACTGCCAATCACTGAACTGC 720
721 ACCGTTTCTTTTTAATTTAGGTATGCACAGTAAAAATCATATTTTGCACATTTTCTGAATT 780
781 GTACAAAACACTGATTGTGAATAATACATTTCTGTGTTGATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 840
841 AA 842+

```

图 4-3 日本鳗鲡肝脏 Ajcath1 全长 cDNA 及由此推导出的氨基酸序列

Fig.4-3 The complete Ajcath1 cDNA and deduced amino acid sequence from Japanese eel liver

图中大写字母代表 5'和 3'UTR；小写字母代表编码区；阴影部分代表编码的氨基酸序列；阴影黑体字代表抗菌的成熟肽部分；红色字体代表 4 个半胱氨酸；起始密码子 ATG 用方框标明，*显示终止密码子 TAG；3'非编码区的多腺苷酸化信号 AATAA 用斜体字标明；信号肽用下划线标明。


```

1 AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGCATGGGGGCCAGTGTGCGACTGAGatgagaagtga 60
1 M R S D 4
61 tacacataagatgaagagctctgttgacacctctgctgctctctcccttgttgcctttgt 120
5 T H K M K S S V G P L L L L S L V A F V 24
121 ctctgtgacattggccaggagcgtcttcacctttacagatgtccttgcccgccactgc 180
25 S V T L A R S V F T F T D V L A A A T A 44
181 agacttcaaccagaaaagccaggagacaaaagcttttggacctccaaagcagggcgcttt 240
45 D F N Q K S Q E T K A F G P P K Q G A L 64
241 gcggtcaatgtcgggtgtttgagcccgagatggctccgtcatgatcaagtcattacgtt 300
65 R S M S V F E P G D G S V M I K S I T F 84
301 tacgcttaaggagacggtgtgccccaaatcagaagactacctaaggaagagtgcgtctt 360
85 T L K E T V C P K S E D Y L K E E C V F 104
361 caagggaaaatgggtctctgaagaagtgtccagctacagctacagctcctcaagtcacagcc 420
105 K E N G S L K K C S S T A T V L K S Q P 124
421 aggagaggcagcatctctgacagtgctcctgtcaggaggtcacagaccagaggagcgcaa 480
125 G E A A S L T V S C Q E V T D P E E R K 144
481 gaaactctcagagcctccaagttggacaaaatatttcagcaactggTGAAGCTGCCTGA 540
145 K L S E P P S W T K Y F S N W *
541 ACCCAGCATCTCCATTGTTTTGGCCCTATTTAATGTATTGGAATCAATAACAGTACT 600
601 TGTGGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 633

```

图 4-4 日本鳗鲡肝脏 Ajcath2 全长 cDNA 及由此推导出的氨基酸序列

Fig.4-4 The complete Ajcath2 cDNA and deduced amino acid sequence from Japanese eel liver

图中大写字母代表 5' 和 3' UTR；小写字母代表编码区；阴影部分代表编码的氨基酸序列；红色字体代表 4 个半胱氨酸；起始密码子 ATG 用方框标明，* 显示终止密码子 TGA；3' 非编码区的多腺苷酸化信号 AATAA 用斜体字标明；信号肽用下划线标明。

3.4 Ajcath1 cDNA 推导的氨基酸序列分析

日本鳗鲡肝脏 Ajcath1 cDNA 编码 189 个氨基酸，BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 搜索分析，Ajcath1 不含有 cathelin 保守区域，靠近 C 端有四个半胱氨酸，可在分子内部形成两个分子内二硫键结构。氨基酸结构由信号肽、结构域和成熟肽三部分组成。经 Signal 4.0 软件预测信号肽切割位点在第 19-20 氨基酸之间 (ATA-QR) (图 4-5)。根据已知其它鱼类成熟肽序列及嗜中性粒细胞弹性蛋白酶酶切位点，推测 Ajcath1 成熟肽为 H-RMRRSKAGKGSNGNKGNGKGSNGNKGNGKGSRPGGSSIAGRDKGDSGTRTA-OH (图 4-3)，与香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 成熟肽序列相似性最高，相似度为 65.57% (图 4-6)。Ajcath1

分子量为 4818.2 Da, pI 值为 12.02, 电荷+11, 为强阳离子抗菌肽。结构域 pI 值为 6.15, 带有负电荷, 可能参与中和成熟肽阳离子, 抑制其在细胞内的毒性作用。预测成熟肽在体外的不稳定指数 (Instability index) 为 50.69, 为一种不稳定型蛋白。同时没有糖基化修饰位点, 很可能有两个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点, 即第 35 位丝氨酸 (Ser 11), 得分 0.757; 第 45 位丝氨酸 (Ser 13), 得分 0.996。另外, 富含甘氨酸 (Gly), 含量为 32%, 属于富含某种特殊氨基酸的抗菌肽。

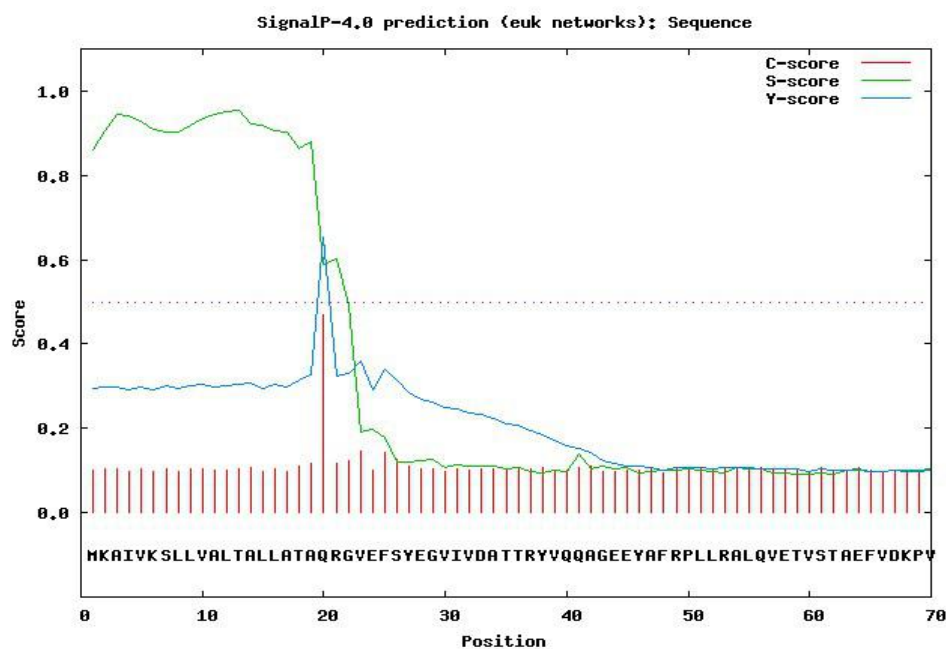


图 4-5 日本鳎鲷肝脏 Ajcath1 氨基酸信号肽切割位点预测

Fig.4-5 The prediction of signal peptide cleavage site for Ajcath1 from liver of Japanese eel

```

AJcath1  RMRRSKAGKGGGKGN--KSGGKGN--KGS-----RPGGGSSIAGR-DKGDSGTIRI 49
AYcath2  RMRRSKSGKGGGSKGSGSKGSKGSGSKGSGSKGSGSRPFGGGSSIAGGGSKGKGGTQI 60
*****:*****.*.  *** *.*.  ***  *****  .**.*:**

AJcath1  A 50
AYcath2  A 61
*
```

图 4-6 日本鳎鲷肝脏 Ajcath1 与香鱼(*Plecoglossus altivelis*) cathelicidin

成熟肽 AYcath2 氨基酸比对。

Fig.4-6 Alignment of amino acid sequence of Japanese eel Ajcath1 the mature peptide with ayu (*Plecoglossus altivelis*) AYcath2.

3.5 Ajcath2 cDNA 推导的氨基酸序列分析

日本鳎鲷肝脏 Ajcath2 cDNA 编码 152 个氨基酸, BLAST (<http://www.ncbi>.

nlm.nih.gov/BLAST) 搜索分析, Ajcath2 同哺乳动物一样含有一个高度保守的 cathelin 区域, 靠近 C 端有四个半胱氨酸, 可在分子内部形成两个分子内二硫键结构。经 Signal 4.0 软件预测信号肽切割位点在氨基酸第 22-23 之间 (TLA-RS) (图 4-7)。Blast 搜索分析 Ajcath2 与已知其它鱼类成熟肽氨基酸序列无相似性, 故无法准确推测出成熟肽序列。根据弹性蛋白酶识别位点, 即对丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)、异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L) 或缬氨酸 (V) 等含羧基的多肽键起催化水解的作用, 所以推测 Ajcath2 成熟肽可能为 H-TDPEERKKLSEPPSWTKY FSNW-OH, 分子量为 2726.0 Da, pI 值为 5.93, 电荷为 0。

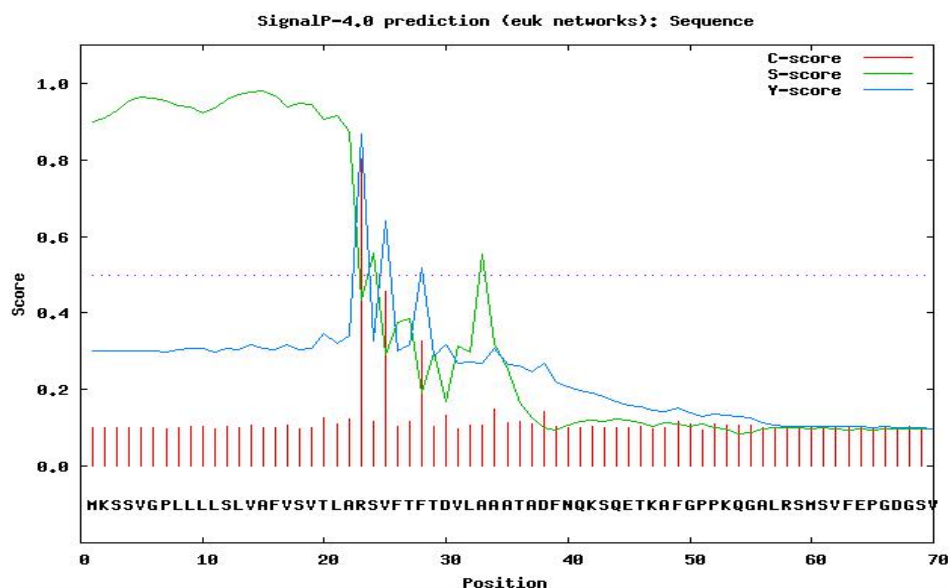


图 4-7 日本鳗鲡肝脏 Ajcath2 氨基酸信号肽切割位点预测

Fig.4-7 The prediction of signal peptide cleavage site for Ajcath2 from liver of Japanese eel

3.6 推导的 Ajcath1 和 Ajcath2 氨基酸序列与其它已知 cathelicidin 的比对

分离得到的 cathelicidin cDNA 推导的氨基酸序列与部分已分离到的或由核苷酸推导出的 cathelicidin 序列比对 (图 4-8), 显示出四个半胱氨酸保守位点上高度一致性。并且同一属的鱼类, cathelicidin 在信号肽氨基酸的组成上基本一致。将所有 cathelicidin 做系统进化树分析 (图 4-9), 结果显示日本鳗鲡 Ajcath1 与鱼类亲缘关系较近, 且与香鱼 AYcath2 相似性最高, 处在同一个分支上。Ajcath2 与哺乳类 cathelicidin 亲缘关系较近, 尤其与袋獾相似性最高, 处在同一个分支。

```

MgCath37      -----MKS LCVPAVLSLVL ILLLDQAPTARADDSLSKEQVENAVDEALD-----KLNK
MgCath29      -----LCVPAVLSLVL ILLLDQAPTARADDSLSNEQVENAVDEALD-----KLNN
ACcath1       -----MTTQMRLLCFAAVTLLAE AQMIPDPF IFP-----LKN
ACcath3       -----MTTQMRLLCFAAVTLLAE AQMIPDPF IFP-----LKN
ACcath2       -----MTTQMRLLCFAAVTLLAE AQMIPDPF IFP-----LKN
BTcath1       -----MKMKVQVRS L ILLAVAVLLVRSQDQTGTRYEDIISVALPQLL--PGEEQA
AScath2       -----MKMKVQVRS L ILLAVAVLQVRSQNTETRYEDIILVALPQLL--PGEEQA
RTcath1       -----MKMKVQVRS L ILLAVAVLQVRSQNTETRYEDIILVALPQLL--PGEEQA
BRcath2       -----MKMKVQVRS L TLLAVAVLLVRSQNTETRYEDIISVALPQLL--PGKEQA
ACHcath1      -----DDIITAASNQLL--PVEEQA
BRcath1       -----MKMKALVRS LLLLTVASLLVRGQTQTETRYEDIITAASNQLL--PVEEQA
AScath1       -----MKMKALVRS LLLLAVASLLVRGQTQTETRYEDIITAASNQLL--PVEEQA
RTcath2       -----MKMKALVRS LLLLAVANLLVRGQTQTETRYEDIITAASNQLL--PMEEQA
CScath2       -----TETRYEDIITAASNQLL--PVKEQA
GRcath1       -----MKMKVQVRS LLLLAVAGLLVRGQTQTVTRYEDIITAASTQLL--PGEEQA
AYcath2       -----MKTQIQSYLLLSVA ILLVNAQTSSKLSYENILSDLFASG---DVEGRT
AJcath1       -----MKAIVKS-LLVALTALLATAQRGVEFSYEGVIVDATTRYVQQAGEEYA
Cebus         ---MKTQRDGP SLGRWS--LVLLLLGLT MPLAITAQVLSYQEA VLR AVDGLN-----QRS
Homo          MGMTKTQRDGHSLGRWS--LVLLLLGLV MPLAIIAQVLSYKEAVLR AIDGIN-----QRS
Equus         ---METQRDSCSLGRWS--LLLLLLGLV IPLATT-QTLSYKEAVLR AVDGLN-----QRS
Bac5          ---METQGASLSLGRWS--LWLLLLGLV LPSASA-QALSYREAVLR AVGQLN-----ERS
Bubalus       ---MQTQRASLSLGRWS--LWLLLLGLV VPSASA-QDLSYREAVLR AVDQLN-----ERS
Mus           ---MQFQRDVPSLWL WRSLSLLLLLGLGFS-----QTPSYRDAVLR AVDDFN-----QQS
Sarcophilus  ---MER-----GWIMWLP LLLLFLSMVTFAPA-QTLSYQNLVNRFI INYN-----KKL
AJcath2       -----MKSSVGPLLLL SLVAFVSVTLARSVFTFDVLA AATADFNQKSQETKA
    
```

```

MgCath37      QQVSTRKLALSEQQDIQAEDTDVEGQFTIKFDVVE TECNAD- DPRDWADCP IATDSTPVD
MgCath29      QQVSTRKLALSEQQDIQAEDTDVEGQTTIFVYVVE TECNAD- DPRDWADCP IATDSPPGI
ACcath1       FRPLLDQLRVETVYP-EGVDLSTMSVRKMTFPAQELDCSQVNTSMPGQQCPLKENGKMMN
ACcath3       FRPLLDQLRVETVYP-EGVDLSTMSVRKMTFPAQELDCSQVNTSMPGQQCPPKENGRRMMN
ACcath2       FRPLLDQLRDETVYP-EGVDLSTMSVRKMTFPAQELDCSQVNTSMPRQQCPLKENGKIMN
BTcath1       FRPILNQLQVETLNT-EDVDQSEVSV-RLTFPMQETFCSKS-QGQPGKPCPLKKNGLM
AScath2       FRPILNQLQVETLNT-EDVDQSEVSV-RLTFPMQETFCSKS-PGQPGKPCPLKKNGLM
RTcath1       FRPILNQLQVETLNT-EDVDQSEVSV-RLTFPIQETFCSKS-QGQPGKPCPLKKNGLM
BRcath2       FRPILNQLQVETLNT-EDVDQSEVSV-RLSFPMQETFCSKS-QGQPGKPCPLKKNGLM
ACHcath1      FHPLLNLQLEVE TLNT-EDVDQSEVSV-RLSFPLQETLCSKA-QGQQGQPCPLKKNG----
BRcath1       FHPLLNLQLEVE TLNT-EDVDQSEVSV-RLSFPLQETLCSKA-QGQQGQPCPLKKNG----
AScath1       FHPLLNLQLEVE TLNT-EDVDQSEVTV-RLSFPLQETLCSKA-QGQQGQPCPLKKNGRMM
RTcath2       FHPLLNLQLEVE TLNT-EDVDQSEVSV-RLSFPLQETLCSKA-QGQRGQPCPLKKNGRMM
CScath2       FHPLLNLQLEVE TLNT-EDVDQSEVSV-RLSFPLQETLCSKA-QGQRGQPCLLKKNGRMM
GRcath1       FRPLLNLQLEVENLNT-EDVDQSEVSV-RLSFPLQETLCSKT-QEQQGKPCPLKKNGLIM
AYcath2       FHPLIEELQVETLDS-EAKS-----LSFVARESVCSVA-QKQQGMPCPLKQNGEVLS
AJcath1       FRPLLRLALQVETVSTAEFVDKPVVVR-KLTFPLHETICERT-DEQTGKQCPLKRNKGSFM
Cebus         LDANLYRLLDLDP RPTLDGDPDTPKP--VSFTVKETVCPRT-IQRSPEECDFKKDG LVKR
Homo          SDANLYRLLDLDP RPTMDGDPDTPKP--VSFTVKETVCPRT-TQQSPEDCDFKKDGLV KR
Equus         SDENLYRLLLELD PLPKEDEDPDTPKP--VSFTVKETVCPRT-TQQPLEECDFKENGLVKQ
Bac5          SEANLYRLLLELD P APNDEVDPGTRKP--VSFTVKETVCPRT-TQQPEECDFKENGLVKQ
Bubalus       SEANLYRLLVLD P PLKDDADLGRKP--VSFTVKETVCPRT-TQQPAEQCDFKEKGRVKQ
Mus           LD TNL YRLLDLDP EPGDEDPDTPKS--VRFRVKETVCGKA-ERQLPEQCAFKEQGVVKQ
Sarcophilus  VSGNLFRLVLNL PPGTNDPSIPRP--LNFTIMETVCPKT-KPHNLDECNFKENGLVKE
AJcath2       FGPPKQGA LRSMVFEPGDGSVMIKS--ITFTLKETVCPKS-EDYLKEECVFKENGLSKK
    
```

: * * * * *

```

MgCath37      AQCEVTVLSTEDS----LDVGDATCDFNRTDG-----NARRRRGWFKKAWR---
MgCath29      AQCEVTVLSTEDS----LDVGDATCDFNSTGG-----NARRRRGWFKKAWR---
ACcath1       CNFTLSYINQDAD----IQGFQFNCDAAIKEA-----TLTRVRRSRSGRSGKGG
ACcath3       CNFTLSYINQDAD----IQGFQFNCDAAIKEA-----TLTRVRRSRSGRSGKGG
ACcath2       CNFTLSYINQDAD----IQGFQFNCDAAIKEA-----TLTRVRRSRSGRSGKGG
BTcath1       CSMMVRHP ILEASNLDLTKTNC EYMEAE-----AMQ-KIRTRRSQARKCSR--
AScath2       CSMMVRHP ILEASNLDLTKTNC EYMEAE-----AMQ-KIRTRRSQARKCSR--
RTcath1       CSMKVRHP ILEASNLDLTKTNC EYMEAE-----ALQKIRTRRSKVRICSRGKN
BRcath2       CSMKVRHP ILEASNLDLTKTNC EYMEAE-----AMQKIRTRRSKARICSRGKD
ACHcath1      -----QKIRTRRGKA-----
BRcath1      -----QKIRTRRGKA-----
AScath1       CSMEVRHP ILETGNTLNTDRSD ISCEYMEAEAMP---VLSTQKIRTRRGKP-----
RTcath2       CSMEVRHP ILETGNTLNTDRSD ISCEYMEAE-----EVQKIRTRRGKD-----
CScath2       CSMEVRHP ILETGNTLNTDRSD ISCEYVEAE-----EVQKIRTRRGKD-----
GRcath1       CSMEVRHP ILEASNLDLTKTNC EYMEAE-----AMQKFRTRRSKSK-----
AYcath2       CNLVLSHADQENG---NIDTSKLSQSMGKED-----ALKQKIRMRRSKSGK-----
AJcath1       CNMAISQPVLESS---IPQSTGITCEPMTTNQ-----LQHKIRMRRSKAGK-----
Cebus         CVGTVILNQARDS-----FDISCDKDERK-----VARLGGFLQKAREKIARGFK--
Homo          CMGTVTLNQARG-----FDISCDKDNKR-----FALLGDFFRKSKEKIGKEFKR--
Equus         CVGTVVLDPAKDY-----FDISCDKQP-----IKRRHWFLPSFQE--
Bac5          CVGTVTLDPNDQ-----FDINCNELQS-----VRFRRPIRRPIRPPFRP--
Bubalus       CVGTVTLDPNDQ-----FDLNCNALQS-----VGLPWILLR---WLFRRG--
Mus           CMGAVTLNPAADS-----FDISCNPEGAQPFRRFKKISRLAGLLRKGGEKIGELKK--
Sarcophilus  CYGTISLEATRPS-----ISISCEEPEELK---REDFLDQIRDFRNF IYQYRR--
AJcath2       CSSTATVLKSQPG---EAASLTVSCQEVTDPE-----ERKKLSEP-----

```

```

MgCath37      -----KVKHAGRR-----VLDTAKGVGRHYLNMWLNRYR
MgCath29      -----KVKNAGR-----VLKGVGIHYGVGLIG---
ACcath1       RGGSRGSSGSRGSKGPSGSRGSSGSRGSKGS-----RGGSRGRGSTIAGMGN-RNN
ACcath3       RGGSRGSSGSRGSKGPSGSRGSSGSRGSKGS-----RGGSRGRGSTIAGMGN-RNN
ACcath2       RGGSRGSSGSRGSKGPSGSRGSKGS-----RGGSRGRGSTIAGMGN-RNN
BTcath1       ---NGG---GIRCPGGG---IRLGGGS-----LIGRPKGGSPGGGSFTAGFIRDQD
AScath2       ---NGGKIGSIRCRGGG---TRLGGGS-----LIGRLRVALLLGVAPFLDLDSQINVM
RTcath1       CVS-RPGVGSIIIGRPGGGLIGRPGGGS-----VIGRPGGSPGGGSFNDEFIRDHSD
BRcath2       CKFRSNGRHGSGSRLGGGSLIGRPGGGSRPGSSSVIGRPGGGSRGSGSLIGRPGGGSRT
ACHcath1      ---SGGSSDSNMGRDSDK---GGRR-----GRPGSGSRPFGGSS IAGASGVNHG
BRcath1      ---SGGSSGNSMGRKDSK---GGGR-----GRPGSGSRPFGGSS IAGASGVNHG
AScath1      ---SGGSRGSKMGSKDSK---GGWR-----GRPGSGSRPFGGSS IAGASGRDQG
RTcath2      ---SGGPK---MGRKDSK---GGWR-----GRPGSGSRPFGGSG IAGASGVNHV
CScath2      ---SGGS-----RGSKM---WGWR-----GRPGSRSRPVGSG IAGASGGNHV
GRcath1      ---SSNG-----GRKGS---GGSK-----GRPGS-----GSS IAGASGVNHG
AYcath2      ---SGGSKGSGSKGSKS---KSGS-----KSGSKGSRPGGGSS IAGGSKGKG
AJcath1      ---SGGN-----KGNKGS---GGN-----KGNKGSRPGGGSS IAG-RDKGDS
Cebus        -----IGQKIND-----FLGKLAPRTEA---
Homo         -----IVQRIKD-----FLRNLVPRTES---
Equus        -----FLEQLRR-----FRDQLPFP-----
Bac5         -----PFRPPVRP-----PIRPPFRPPFRPP IGPFFPG
Bubalus      -----
Mus          -----IGQKIKN-----FFQKLVQPQE---
Sarcophilus -----LRDEFRK-----LRDILSG-----
AJcath2      -----PSWTKYFSNW-----

```

```

MgCath37      G-----
MgCath29      -----
ACcath1       GGTRTA-----
ACcath3       GGTR-----
ACcath2       VPVRPL-----
BTcath1       GNRFA-----
AScath2       EIAFA-----
RTcath1       GNRFA-----
BRcath2       GVAP-----
ACHcath1      GTRTA-----
BRcath1      GTRTA-----
AScath1      GTRNA-----
RTcath2      GTLPASNSTTHPLDNCKISPQ
CScath2      GTLTA-----
GRcath1      GTRTA-----
AYcath2      GTQTA-----
AJcath1      GTRTA-----
Cebus        -----
Homo         -----
Equus        -----
Bac5         RR-----
Bubalus      -----
Mus          -----
Sarcophilus  -----
AJcath2      -----

```

图 4-8 日本鳎肝脏 Ajcath1 和 Ajcath2 与其它已知 cathelicidin 氨基酸序列的比对

Fig.4-8 Alignment of the whole protein of Japanese eel Ajcath1-2 amino acid sequence with other those known and predicted cathelicidin

“*”标出具有完全一致的氨基酸位置；“:”和“.”标出具有相似性质的氨基酸的位置；各序列 SwissProt 或者 GenBank 登陆号为: 北极红点鲑 ACHcath1 (*Salvelinus alpinus*, ACE96052), 大西洋鲑 AScath1 (*Salmo salar*, AAR13366), 大西洋鲑 AScath2 (*Salmo salar*, NP_001117045), 美洲红点鲑 BRcath1 (*Salvelinus fontinalis*, CAQ60111), 美洲红点鲑 BRcath2 (*Salvelinus fontinalis*, CAQ60110), 虹鳟 RTcath1 (*Oncorhynchus mykiss*, AAT67998), 虹鳟 RTcath2 (*Oncorhynchus mykiss*, AAR13365), 大鳞大马哈鱼 CScath2 (*Oncorhynchus tshawytscha*, ABW96220), 茴鱼 GRcath1 (*Thymallus thymallus*, CAQ60112), 河鳟 BTcath1 (*Salmo trutta fario*, ABW16872), 香鳎 AYcath2 (*Plecoglossus altivelis*, CBV36822), 大西洋鳕鱼 ACcath1 (*Gadus morhua*, 1ACE96051), 大西洋鳕鱼 ACcath2 (*Gadus morhua*, 2ACE96051) 大西洋鳕鱼 ACcath2 (*Gadus morhua*, 3ACE96051), 袋獾 (*Sarcophilus harrisi*, XP_003762993), 小鼠 (*Mus musculus*, EDL09033), 绵羊 Bac5 (*sheep* P79362), 牛 (*Bubalus bubalis*, CAH23217), 马 (*Equus caballus*, CAA12227), 卷尾猴 (*Cebus capucinus*, ABE96621), 人类 (*Homo sapiens*, EAW64854), 盲鳗 MgCath37 (*Myxine glutinosa*, AAQ04688), 盲鳗

MgCath29 (*Myxine glutinosa*, AAQ04687)。

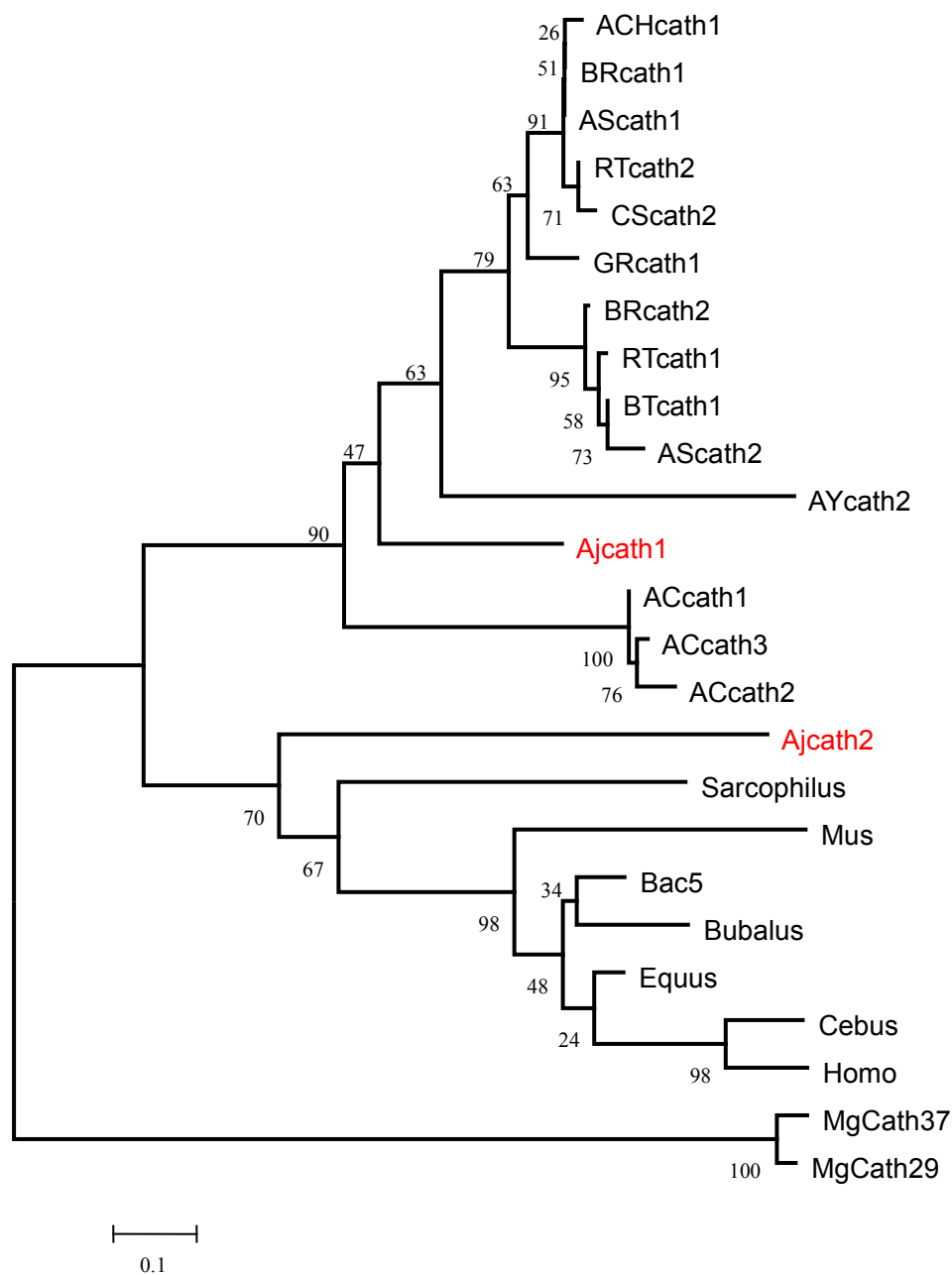


图 4-9 日本鳗鲡 Ajcath1 和 Ajcath2 氨基酸序列与其它已知 cathelicidin 氨基酸序列系统进化树分析

Fig.4-9 Molecular phylogenetic tree showing the relationship among cathelicidin family

4 讨论

4.1 推导的 Ajcath1 成熟肽抗菌机制的探讨

Cathelicidin 根据成熟肽二级结构的不同分为以下四大类：第一类是 α -螺旋结构（如鼠的 CRAMP）；第二类是延伸螺旋结构（如牛的 indolicidin），一般含有大量的脯氨酸（13%-49%）和精氨酸（13-33%）；第三类是环状结构（如牛的 bactenecin），这一类分子中由于含有一个二硫键而形成环状；第四类是 β 折叠结构（如猪的 protegrin1），这一类分子中通常含有 2~3 个二硫键，这些分类结构有利于抗菌肽与细菌细胞膜结合（Ramanathan *et al*, 2002）。抗菌肽预测工具 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 分析 Ajcath1 成熟肽含有疏水性氨基酸残基蛋氨酸 1 个，丙氨酸 2 个，疏水性比例为 10%，电荷为 +11。DNASTar 软件分析（图 4-10），结果显示整个成熟肽形成亲水性很强的区域，Ajcath1 为亲水性强阳离子抗菌肽，没有 α 螺旋结构，形成延伸和任意卷曲的可能性比较大。Garnier（1996）方法分析，Ajcath1 形成延伸结构的比例为 18%，任意卷曲的比例为 82%。Geourjon and Deléage（1995）方法分析，Ajcath1 形成延伸结构的比例为 16%，任意卷曲的比例为 84%。Frishman and Argos（1996）方法分析，Ajcath1 形成任意卷曲的可能性为 100%。该抗菌肽与以往的抗菌肽结构有一定的差异，其是否在水溶液中形成任意卷曲结构，而在与生物膜接触时形成 α 螺旋结构有待进一步考证，因此抗菌作用机制还有待通过圆二色谱及定位圆二色谱法、固相核磁共振技术、中子衍射和 X-光散射等技术进一步研究。

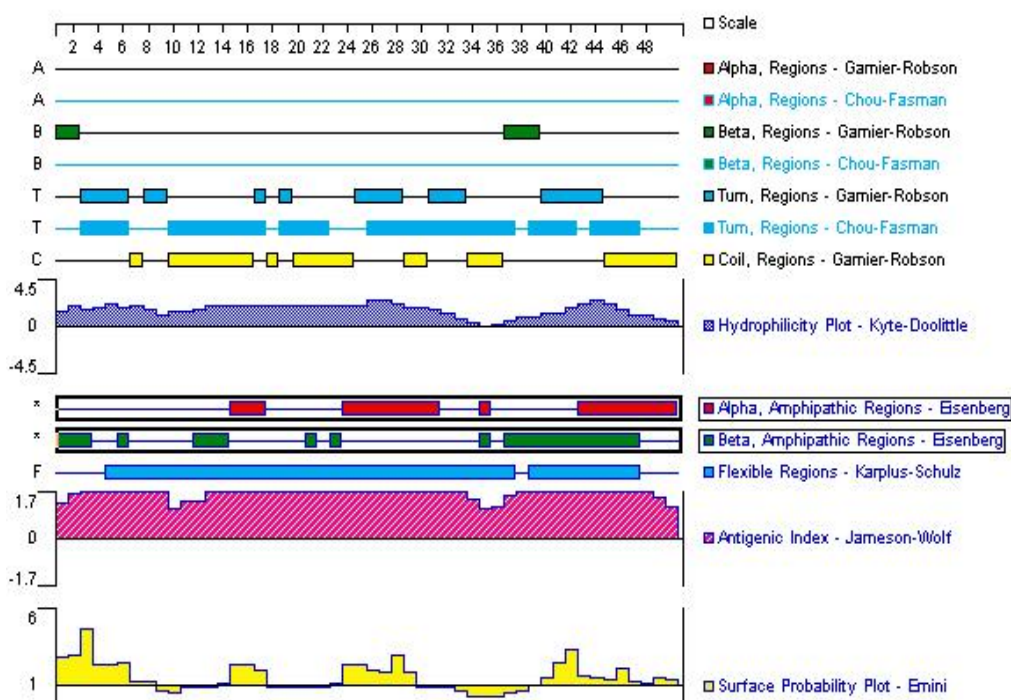


图 4-10 用 DNASTAR 的 Lasergene 序列分析软件中的 Protean™ 模块分析 Ajcath1 抗菌

肽的二级结构、疏水区和两亲的区域。

Fig.4-9 The secondary structure of the amino acid sequence of Aj cath1 from Japanese eel was predicted using Protean™ module in DNASTAR Lasergene software.

4.2 Ajcath2 可能为新发现的鱼类亲水性抗菌肽

抗菌肽预测工具 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 分析 Ajcath2 成熟肽含有疏水性氨基酸残基亮氨酸 (L) 1 个, 苯丙氨酸 (F) 1 个, 色氨酸 (W) 2 个, 疏水性比例为 18%, 电荷为 0。DNASTAR 软件分析 (图 4-11), 结果显示成熟肽形成亲水性很强的区域, 为亲水性抗菌肽, 且可以形成一个明显的 α 螺旋结构。Geourjon and Deléage (1995) 方法分析, 形成 α 螺旋结构的比例为 22.73%。Blast 搜索分析 Ajcath2 与其他已知鱼类 cathelicidin 无相似性, pI 值为 5.93, 电荷为 0, 具有其它鱼类罕见的 cathelin 高度保守区, 可能为新发现的鱼类亲水性抗菌肽。

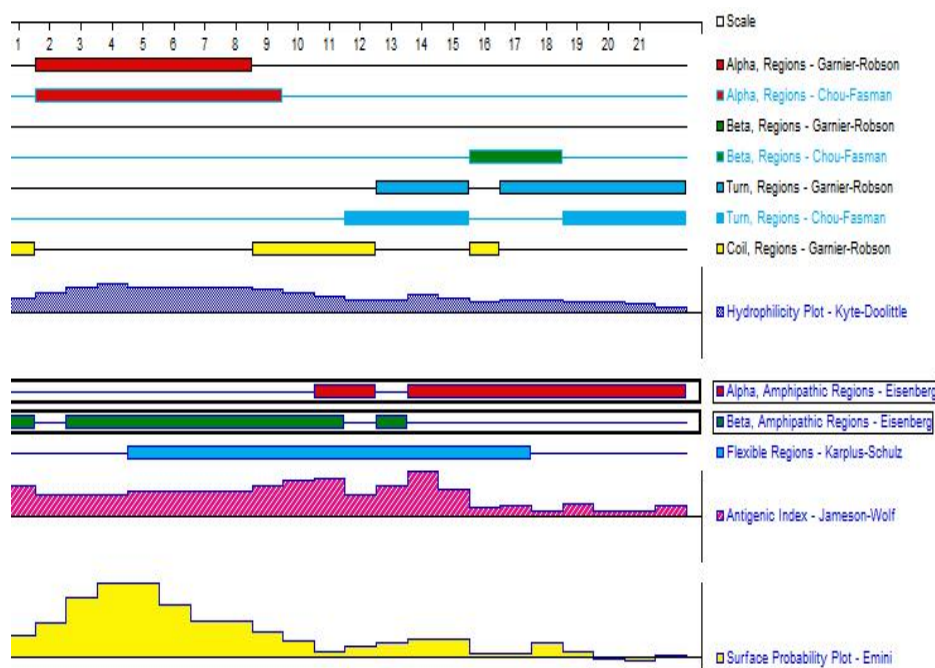


图 4-11 用 DNASTAR 的 Lasergene 序列分析软件中的 Protean™ 模块分析 Ajcath2 抗菌肽的二级结构、疏水区和两亲的区域。

Fig.4-11 The secondary structure of the amino acid sequence of Ajcath2 from Japanese eel was predicted using Protean™ module in DNASTAR Lasergene software.

4.3 Cathelicidin 的功能

Cathelicidin 家族的抗菌肽都具有高效广谱的抗菌活性。对革兰氏阳性菌和阴性菌 (如大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、链球菌等)、真菌 (如白色念珠菌、隐球菌等)、原生动物以及病毒都有很强的杀灭效果。猪的 cathelicidin, 一个富含脯氨酸 (proline) 和精氨酸 (arginine) 的抗菌肽 PR-39, 对部分革兰氏阴性菌 (结核分歧杆菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、醋酸不动杆菌) 和部分革兰氏阳性菌 (巨大芽孢杆菌和化脓链球菌) 有抗菌效果 (Heller *et al*, 1998; Linde *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2000)。大熊猫的 Cathelicidin-AM 具有 α 螺旋结构, 其对部分革兰氏阳性菌 (包括耐药菌株金黄色葡萄球菌)、革兰氏阴性菌、真菌 MIC 为 1.2-6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Yan *et al*, 2012)。Sang 等 (2007) 化学合成犬科 cathelicidin 抗菌肽 K9CATH, 同样具有 α 螺旋结构, 不仅抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌, 且对脲原体 (*Ureaplasma canigenitalium*) MIC 为 0.06 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。具有环状结构的 Dodecapeptide 是从牛的嗜中性粒细胞分离得到的 cathelicidin 类抗菌肽, 天然的 dodecapeptide 和合成的环状肽 dodecapeptide 抗菌活性不同。天然 Dodecapeptide 在 10^{-7} - 10^{-5} mol/L 浓度下对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌表现出强大的杀菌活性, 而当合成肽 dodecapeptide 为环状时, 只抗革兰氏阴性菌, 不抗革兰氏阳性菌 (Wu *et al*, 1999)。环状 dodecapeptide 与脂多糖的结合比线性 dodecapeptide 更有效, 更能提高外膜的渗透性 (Wu *et al*, 1999)。

Cathelicidin 成熟肽除具有抗菌活性外, 还有促进组织修复作用, 早期研究工作过程中, 在伤口的渗透液中发现有类似 PR-39 蛋白分子的存在, PR-39 透过诱导 syndecans-1 和 syndecans-4 生成, 进而发挥组织修复作用 (Gallo *et al*, 1994)。另外, cathelicidin 还有抑制组织损伤, 趋化、细胞溶解等作用, 有报道某些 cathelicidin 还能选择性杀死癌细胞 (Schweizer, 2009)。

5 小结

PCR 扩增获得日本鳎肝脏 Ajcath1 和 Ajcath2。Ajcath1 成熟肽序列可能为 H-RMRRSKAGKKGSGGNKGNKGSNGNKGSRPGGGSSIAGRDKGDSGTRT A-OH, 分子量为 4818.2 Da, pI 值为 12.02, 电荷+11, 为亲水性强阳离子抗菌肽, 同时也是一个富含 32% 甘氨酸的抗菌肽; Ajcath2 成熟肽序列可能为 H-TDPEERKKLSEPPSWTKYFSNW-OH, 分子量为 2726.0 Da, pI 值为 5.93, 电

荷为 0，可能为新发现的鱼类亲水性抗菌肽。

第五章 Ajcath1 和 Ajcath2 的原核表达

1 前言

目前抗菌肽的制备主要有天然材料提取、化学合成和基因工程表达三种方法。但抗菌肽提取原料有限，产量低，提取过程又非常复杂；化学合成成本高，价格昂贵，不利于投入实际应用。因此借助目前比较成熟的基因工程技术获得抗菌肽，使其药用价值得到开发，是比较可行且有效的方法。

Cathelicidin 氨基酸结构除信号肽外，N 端还有一段结构域，必须把 cathelicidin 结构域切除掉，才能获得抗菌成熟肽部分。为了确认蛋白裂解位点，本实验构建了原核表达载体，在大肠杆菌中诱导表达重组蛋白，通过纯化后得到目的蛋白。该研究为确定日本鳎 *cathelicidin* 成熟肽，体外大量表达成熟肽，研究其抗菌活性，及研究 *cathelicidin* 基因的表达分布情况奠定了基础。同时也为研究 *cathelicidin* 的其它生物学功能提供了材料。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 实验动物

日本鳎：集美大学海水养殖试验场，体重约 300 g，外观无明显病变和损伤。

2.1.2 由上海捷瑞生物工程有限公司合成的引物

CS1: 5'- GCGCCATGGGC CAGCGTGGAGTGGAGTTTAG-3';

CA5: 5'- GGGCTCGAG TGCAGTTCGGGTGCCACT-3';

CS2: 5'- GCGCCATGGGC AGGAGCGTCTTCACCTTTAC-3';

CA6: 5'- GGGCTCGAG CCAGTTGCTGAAATATTTTGTCC-3'。

2.1.3 原核表达载体、宿主菌、工具酶和克隆菌株

DNA 胶回收试剂盒、少量质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司；

pfu 聚合酶、Nco I、Xho I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；
PVDF 膜为 Roche 公司产品；
DAB 染色试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司；
表达菌株 BL21 为本实验保存；
pET-28a 载体为厦门大学海洋环境科学国家重点实验室彭会馈赠。

2.1.4 主要试剂

dNTPs、DNA Marker DL2000，DNA Marker DL10000 购自 TaKaRa 公司；
溴化乙啶（EB）、琼脂糖购自上海生工；
硫酸卡那霉素（Kan）、IPTG、考马斯亮兰 R250 均购自 Solarbio 公司；
丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺为 BBI 公司产品；
二硫苏糖醇（DDT）、过硫酸铵（APS）、TEMED 为 Amresco 公司产品；
SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker、预染 Marker 购自 Fermentas 公司；
咪唑为 Sigma 公司产品；
Western-blot 一抗（His-Tag 单抗）为 Roche 公司产品；
二抗（山羊抗鼠 IgG-AP）购自上海捷瑞生物工程有限公司；
牛血清白蛋白为北京元亨马生物技术研究所产品；
胰蛋白胨(Tryptone)、酵母粉(Yeast Extract)、氯化钙、氯化钠、无水乙醇、
Trisbase、尿素、磷酸氢二钠等其它常用试剂均为国产分析纯。

2.1.5 主要仪器

蛋白质核酸纯化系统（AKTA-purifier 100，GE，美国）；
紫外分光光度计（NaNoDROD 2000）为基因公司产品；
PCR 扩增仪（ABI Veriti）为基因公司产品；
凝胶成像系统（Tannon 1600）为天能公司产品；
冷冻离心机（5424R）为 Eppendorf 公司产品；
高速冷冻离心机（22331R）为 Eppendorf 公司产品；
-80℃超低温冰箱为美国热电 Thermo Forma 产品；
电泳仪、电泳槽购自北京六一试验仪器厂；
摇床（THZ-420）、电热恒温水浴锅（DK-600）、恒温培养箱（SHP-250）、

烘箱（9203A）为上海精宏实验有限公司产品。

2.1.6 主要试剂配制

(1) SDS-PAGE 电泳试剂

30%丙烯酰胺:

丙烯酰胺 14.5 g

双丙烯酰胺 0.5 g

加热至 37 °C 溶解，补加水至终体积为 50 mL，用 0.45 μm 滤器除菌，查
实 pH 质应小于 7.0，置于棕色瓶中保存。

10%SDS:

SDS 5 g

加热至 68 °C 助溶，定容至 50 mL。

1.5 M Tris-HCL pH 8.8（分离胶缓冲液储存液）:

Trisbase 18.165 g

加入浓盐酸调 pH 值，定容至 100 mL。

1.0 M Tris-HCL pH6.8（浓缩胶缓冲液储存液）:

Trisbase 12.11 g

加入浓盐酸调 pH 值，定容至 100 mL。

5×Tris -Gly 电泳缓冲液储存液:

Trisbase 3.775 g

甘氨酸 23.5 g

10%SDS 12.5 mL

加水定容至 250 mL。

考马斯亮蓝 R-250 染色液:

即溶于甲醇: 冰醋酸: 水 (50: 10: 40, V/V) 的 0.25% 溶液;

90mL 甲醇: 水(即 50 mL 甲醇和 40 mL 水) 与 10 mL 冰醋酸混合, 加入
0.25 g 考马斯亮蓝 R-250, 用 Whatman1 号滤纸过滤除去颗粒物。

甲醇-乙酸脱色液:

取 180 mL 甲醇: 水 (90 mL 甲醇和 90 mL 水) 和 20 mL 冰醋酸混合, 总

体积为 200 mL。

2×SDS（蛋白）凝胶加样缓冲液：

Tris-HCl (pH6.8)	100 mM
SDS	4%
溴酚蓝	0.2%
甘油	20%
β-巯基乙醇	10%

15% 分离胶：

30%丙烯酰胺	7.5 mL
1.5 M Tris·HCl (pH8.8)	3.8 mL
10%SDS	150 μL
10%APS	150 μL
TEMED	6 μL
水	3.4 mL

5% 压缩胶：

30%丙烯酰胺	0.83 mL
1.0 M Tris HCl (pH6.8)	0.63 mL
10%SDS	50 μL
10%APS	50 μL
TEMED	5 μL
水	3.4 mL

(2) 层析试剂

200 mM 硫酸镍：

硫酸镍	26.29 g
-----	---------

溶于 400 mL 蒸馏水中，0.45 μm 滤膜过滤。

A 液（结合缓冲液）：pH 8.0

Na ₂ HPO ₄	20 mM
NaCl	500 mM
咪唑	20 mM

尿素 8 M

加水定容 1000mL。

B 液（洗脱缓冲液）：pH 8.0

Na₂HPO₄ 20 mM

NaCl 500 mM

咪唑 500 mM

尿素 8 M

加水定容 1000 mL。

裂解缓冲液（pH 8.0）：

NaCl 100 mM

EDTA 2 mM

Trisbase 50 mM

加水定容 1000 mL。

0.5 M 尿素洗涤液：

Trisbase 20 mM

尿素 0.5 M

加水定容 1000 mL。

(3) Western-blot 试剂

TBST（pH 7.5）：

Trisbase 6.05 g

NaCl 8.76 g

Tween-20 1 mL

加水定容 1000 mL

Western 封闭液：

TBST 加入 1%BSA

电转液：

Trisbase 3.05 g

Glycine 14.25 g

甲醇 20 %

加水定容至 1000 mL

显色液 DAB:

将 100 mg DAB 干粉从棕色离心管中转移到装有 5 mL DAB 稀释液的塑料瓶中,充分振荡混匀,所得溶液即是 20×DAB 浓缩液,此溶液分装成小管,在-20 °C 避光保存

(4) 其它缓冲液

50×TAE (Tris-乙酸) :

242 g Tris-HCl

57.1 mL 冰乙酸

200 mL 0.5mol/L EDTA (pH 8.0)

加水补至 1000 mL

(5) 培养基

LB 液体培养基:

蛋白胨 10 g

酵母浸出粉 5 g

NaCl 5 g

加水补至 1000 mL, 以 10 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0-7.5, 121 °C 灭菌 20 min。

LB 固体培养基:

LB 液体培养基 1000 mL 中加入琼脂粉 15 g, 121 °C, 灭菌 20 min。

2.2 试验方法

2.2.1 载体的处理

克隆目的基因前, 将 pET-28a 原核表达载体转化至 DH5 α 感受态细胞中, 大量提取质粒, 具体操作方法如下。

(1) 菌体收集

如前所述制备 DH5 α 感受态细胞, 取 1 μ L pET-28a 空载体转化至 BL21, 涂布在含有硫酸卡那霉素 (Kan, 50 μ g/mL) 的 LB 琼脂板平板上培养过夜。次日挑取单菌落, 并扩大培养至 20 mL 培养。

(2) 提取质粒 DNA

用少量质粒提取试剂盒提取质粒，按 OMEGA 公司 Plasmid Extraction Kit 说明书要求操作。具体步骤如下：

- ①室温下用 1.5 mL 离心管装菌液，10000 g 离心 1 min，收集沉淀；
- ②用 250 μ L SolutionI/RNA 重悬细菌，在旋涡混合仪上混合均匀，越充分越好；
- ③加入 250 μ L SolutionII，上下反复颠倒 7-10 次，轻轻混匀，直到裂解液变澄清，室温静置 2 min；
- ④加入 350 μ L SolutionIII，立刻上下反复颠倒数次，直到形成白色沉淀；
- ⑤室温下，13000 g 离心 10 min；
- ⑥取一个干净的 HinBind miniprep column,置于 2 mL 收集管上，小心地移吸上清液到 column 中，10000 g 离心 1 min；
- ⑦弃掉收集管中的液体，收集管可重复使用，加入 500 μ L Buffer HB 到 column 中，10000 g 离心 1 min；
- ⑧弃液体，加入 100 μ L DNA wash buffer 于 column 中，10000 g 离心 1 min；
- ⑨重复步骤⑧
- ⑩室温下，13000 g 离心空柱 2 min，干燥柱子基质，将柱子置于一个干净的 1.5 mL 离心管上，直接加入 30-50 μ L elution buffer 或水静置 2 min，13000 g 离心 1 min，收集洗脱的 DNA。

(3) 载体的酶切

将质粒提取的 pET-28a，用 NcoI 和 XhoI 进行双酶切，反应液至于 37 °C 水浴中反应 6 h。酶切体系为：

10 \times 酶切缓冲液 K+	12 μ L
NcoI	4 μ L
XhoI	4 μ L
pET28a	30 μ L
0.1%BSA	12 μ L
灭菌水	58 μ L
总反应体积	120 μ L

反应结束后，用 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳检测酶切效率。

2.2.2 目的基因的获得

(1) PCR 扩增日本鳎 Ajcath1 表达序列

以日本鳎 Ajcath1 (cDNA) 重组 pMD18-T 阳性质粒为扩增模板，以 CS1, CA5 为上下游引物，用 pfu 高保真 Taq 酶扩增目的片段，反应体系为：

10× Mg ²⁺ free buffer	10 μL
MgCl ₂ (25 mM/L)	8 μL
dNTPs (10 mM/L each)	1 μL
CS1	2 μL
CA5	2 μL
pMD18-T/Ajcath1 质粒	4 μL
PCR-Grade Water	72 μL
pfu 高保真 Taq 酶 (5U/ μL)	1 μL
总反应体积	100 μL

混合均匀，在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应：

①94 °C 2 min

②35 个循环：

94 °C 30 s

58 °C 30 s

72 °C 1 min

③72 °C 5 min

反应结束后，将所有反应液进行 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳，再用 OMEGA 试剂盒回收特异性片段。

(2) PCR 扩增日本鳎 Ajcath2 表达序列

以日本鳎 Ajcath2 (cDNA) 重组 pMD18-T 阳性质粒为扩增模板，以 CS2, CA6 为上下游引物，用 pfu 高保真 Taq 酶扩增目的片段，反应体系为：

10× Mg ²⁺ free buffer	10 μL
MgCl ₂ (25 mM/L)	8 μL

dNTPs (10 mM/L each)	1 μ L
CS2	2 μ L
CA6	2 μ L
pMD18-T/Ajcath2 质粒	4 μ L
PCR-Grade Water	72 μ L
<u>pfu 高保真 Taq 酶 (5U/ μL)</u>	<u>1 μL</u>
总反应体积	100 μ L

混合均匀，在热循环仪上按照以下程序进行 PCR 反应：

①94 °C 2 min

②35 个循环：

94 °C 30 s

59 °C 30 s

72 °C 1 min

③72 °C 5 min

反应结束后，将所有反应液进行 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳，再用 OMEGA 试剂盒回收特异性片段。

(3) 预连接 DNA 片段的制备

将回收的 PCR 产物，用 NcoI 和 XhoI 进行双酶切，反应液至于 37 °C 水浴中反应 6 h。酶切体系为：

10 \times 酶切缓冲液 K ⁺	2 μ L
NcoI	1 μ L
XhoI	1 μ L
PCR 回收产物	10 μ L
0.1% BSA	2 μ L
灭菌水	4 μ L
<u>总反应体积</u>	<u>20 μL</u>

反应结束后，用 1.0%琼脂糖凝胶 TAE 电泳检查酶切效率，再用 OMEGA 试剂盒回收特异性片段。

(4) 表达载体的构建、转化和鉴定

将酶切过的载体与目的基因连接，反应体系如下：

pET-28a	2 μ L
DNA 片段	4 μ L
T4 buffer(缓冲液)	1 μ L
T4 连接酶 (50 U/ μ L)	0.5 μ L
灭菌水	2.5 μ L
总反应体积	10 μ L

16 °C 孵育 16 h。PCR 双酶切产物与载体双酶切产物摩尔比保持在 3-10 倍，可由紫外分光光度计测定浓度，也可由琼脂糖电泳条带估计浓度。次日，取反应液转化至 200 μ L BL21 感受态细胞中，涂布在含有硫酸卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 琼脂糖平板上培养过夜。次日挑取单菌落，以 CS1, CA5 和 CS2, CA6 为引物用 PCR 法鉴定阳性克隆，阳性菌液进行放大培养，按比例加入 20% (V/V) 甘油，-80 °C 保存，同时送一份样品到上海英俊 (Invitrogen) 公司测定序列。

2.2.3 pET-28a/ Ajcath1 和 pET-28a/ Ajcath2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

(1) 诱导温度对重组质粒表达的影响

取过夜培养的含有重组质粒 pET-28a/ Ajcath1 和 pET-28a/ Ajcath2 的宿主菌 BL21，按 1:100 的比例加入到新鲜的 LB/Kan 培养液中，37 °C，250 rpm 剧烈震荡培养至 OD600 为 0.5-0.6 时，加入终浓度为 1.0 mM 的 IPTG，分别于 28 °C，37 °C 和 42 °C，150 rpm 继续培养 6 h 后进行蛋白表达检测。同时设空载体，未加 IPTG 的重组质粒作对照。

(2) 诱导剂浓度对重组质粒表达的影响

取过夜培养的含有重组质粒 pET-28a/Ajcath 和 pET-28a/Ajcath 的宿主菌 BL21，按 1:100 的比例加入到新鲜的 LB/Kan 培养液中，37 °C，250 rpm 剧烈震荡培养至 OD600 为 0.5-0.6 时，分别加入 IPTG 溶液使其浓度分别为 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM，于 42 °C (pET-28a/ Ajcath1) 或 37 °C (pET-28a/ Ajcath2)，150 rpm 继续培养 6 h 后进行蛋白表达检测。同时设空载体，未加 IPTG 的重组质粒作对照。

(3) 诱导时间对重组质粒表达的影响

取过夜培养的含有重组质粒 pET-28a/ Ajcath1 和 pET-28a/ Ajcath2 的宿主菌 BL21, 按 1:100 的比例加入到新鲜的 LB/Kan 培养液中, 37 °C, 250 rpm 剧烈震荡培养至 OD600 为 0.5-0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG, 于 42 °C (pET-28a/ Ajcath1) 或 37 °C (pET-28a/ Ajcath2), 150 rpm 继续培养 3 h、4 h、5 h、6h、7 h 和 8 h 进行蛋白表达检测。同时设未加 IPTG 的重组质粒作对照。

(4) 诱导起始生长量对重组质粒表达的影响

取过夜培养的含有重组质粒 pET-28a/ Ajcath1 和 pET-28a/ Ajcath2 的宿主菌 BL21, 按 1:100 的比例加入到新鲜的 LB/Kan 培养液中, 37 °C, 250 rpm 剧烈震荡培养至 OD600 为 0.3、0.6、1.0、1.3 时, 加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG, 于 42 °C (pET-28a/ Ajcath1) 或 37 °C (pET-28a/ Ajcath2), pET-28a/ Ajcath1 继续培养 7 h、pET-28a/ Ajcath2 继续培养 4 h 后进行蛋白表达检测。同时设空载体, 未加 IPTG 的重组质粒作对照。

2.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白表达量

取若干份对照组及实验组 IPTG 诱导前后的 1 mL 菌液, 分别离心收集菌体, 用 30 μ L 无菌水溶解, 加入 30 μ L 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 12000 rpm 离心 1-3 min, 取上清进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。

SDS-PAGE 电泳操作参照分子克隆 (第三版) 中方法。采用 5% 积层胶和 15% 分离胶, 60 V 电压电泳, 当溴酚蓝前沿进入分离胶 (15% 分离胶) 后, 以 120 V 电压电泳, 当溴酚蓝电泳至分离胶底部后, 取出凝胶, 考马斯亮蓝染色, 脱色后扫描分析。

2.2.5 重组蛋白表达形式的鉴定

含有重组质粒 pET-28a/Ajcath1 的宿主菌 BL21, 在诱导剂 IPTG 浓度为 0.1 mM, 诱导温度为 42 °C, 诱导起始量为 OD600=0.3 时, 诱导表达 7 h。含有重组质粒 pET-28a/Ajcath2 的宿主菌 BL21, 在诱导剂 IPTG 浓度为 0.1 mM, 诱导温度为 37 °C, 诱导起始量为 OD600=0.3 时, 诱导表达 4 h。取上述表达菌体经超声波破碎后, 于 4 °C, 4000 g 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀, 取样品进行

SDS-PAGE 电泳检测。

2.2.6 表达产物亲和层析

(1) 上柱样品的制备

将表达 Ajcath1 或 Ajcath2 的菌株,大量诱导表达 2-3 L, 4000 g 离心 20 min 收集菌体。用预冷的裂解缓冲液 (10 mL/250 mL 培养的菌液) 悬浮菌体, 加入适当的蛋白酶抑制剂 PMSF。冰浴下超声破碎菌体至菌液较清无粘性 (功率 400-480 W, 5 秒间隔 10 秒, 25 min)。4000 g 离心 20 min, 收集沉淀, 再用 10 mL 0.5 M 尿素, PBS 洗涤液各清洗一次, 4000 g 离心 20 min 取沉淀。沉淀用结合缓冲液 A 充分溶解后, 10000 g 离心 10 min, 取上清用 0.45 μ m 滤膜过滤, 至此准备好了上柱样品。

(2) 准备金属镍螯合层析柱

彻底清洗层析柱:

2 倍体积 6 mol/L 盐酸胍;

5 倍体积的水;

2 倍体积 2% (M/V) SDS;

1 倍体积 25%、50%和 70%乙醇;

5 倍体积 100%乙醇;

1 倍体积 75%、50%和 20%乙醇;

1 倍体积的水;

5 倍体积 100 mM/L EDTA;

1 倍体积水。

再生层析柱:

用小于 2 倍体积的 0.1mol/L 硫酸镍溶液再生, 用水清洗, 用适当的层析缓冲液 A 平衡。EDTA 冲洗后的树脂呈白色, 再生后变回淡蓝色。

(3) 上柱纯化

用 5-10 个柱体积的结合缓冲液 A 平衡柱子, 同时将过滤后的样品上柱, 用 3 个体积结合缓冲液 A 洗去未结合的蛋白, 再用 5 个柱体积的洗脱缓冲液 B 洗

脱目标蛋白, 流速 1mL/min, 检测波长 A280。收集洗脱峰, 取少量进行 SDS-PAGE 电泳。

2.2.6 重组表达蛋白的复性

采用透析法, 将洗脱缓冲液中的 8 mol/L 尿素逐步降低至 6 mol/L、4mol/L、2 mol/L、1 mol/L 透析重组表达蛋白, 最后用 PBS 溶液透析 1 次, 将目的蛋白溶液中的尿素完全去除。由于蛋白在变性状态时疏水残基暴露, 一般水溶性很差, 大多会形成可见的沉淀析出。复性后的蛋白溶解度增加, 但仍然会有一些没有复性成功的蛋白沉淀, 10000 g 离心 10 min, 收集上清。同时取少量上清进行 SDS-PAGE 电泳检测复性后的重组蛋白是否发生断裂。

2.2.7 蛋白免疫印迹 (Western-blot) 鉴定表达产物

(1) PVDF 膜处理

- ① 用甲醇浸泡 PVDF 膜 5 min;
- ② 用电转液浸泡 PVDF 膜 10 min;

(2) SDS-PAGE 胶处理

① 取纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 在凝胶上样起始端右下角切一个小角用作标记。

② 用水漂洗干净胶上面的电泳液, 再浸泡在电转液中 15 min;

③ 按一下顺序: 阴极 1 张厚滤纸—SDS-PAGE 胶—PVDF 膜—1 张厚滤纸阳极放置。用一玻璃棒作滚筒以挤出所有气泡, 确保各层之间精确对齐没有气泡, 添加适量电转缓冲液使均匀湿润。100 mA 下, 转移 1 h, 将蛋白印迹至 PVDF 膜上, 然后进行蛋白印迹杂交。

(3) 蛋白印迹杂交

① 取出 PVDF 膜放置在 Western-blot 洗涤液中, 漂洗 1-2 min, 以洗去膜上的电转液, 将转好的膜浸于封闭液中室温封闭 1 h;

② 一抗孵育。将 PVDF 膜浸于含有一抗的封闭液 (1:6000) 室温轻摇 1h, 或 4 °C 在摇床上孵育过夜;

③ 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min;

④ 二抗孵育。将 PVDF 膜浸于含有二抗的封闭液 (1:10000) 室温轻摇 1h;

⑤ 用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min；

⑥ 显色反应。将 PVDF 膜浸转移到 DAB 显色液中，室温平缓摇晃，细心观察蛋白条带的颜色变化，显色到满意程度（一般需要 2-3 min，具体和蛋白浓度密切相关），迅速将 PVDF 膜用清水洗净，观察。

3 结果

3.1 pET-28a 表达载体和目的 cDNA 片段的酶切

大量纯化的 pET-28a 质粒（图 5-1-A）经过双酶切处理后线性化，电泳迁移速度加快并成为单一的清晰条带（图 5-1-B）；以重组 pMD18-T/Ajcath1 或 pMD18-T/Ajcath2（cDNA）阳性质粒为模板，PCR 扩增 Ajcath1-prodomain 或 Ajcath2-prodomain 表达片段，得到 PCR 产物 Ajcath1 长度为 518 bp，Ajcath2 长度为 398 bp；用 NcoI 和 XhoI 酶切 PCR 产物后切胶回收目的条带，得到具有和双酶切好的 pET-28a 互相配对的预连接 cDNA 片段（图 5-2，5-3）。

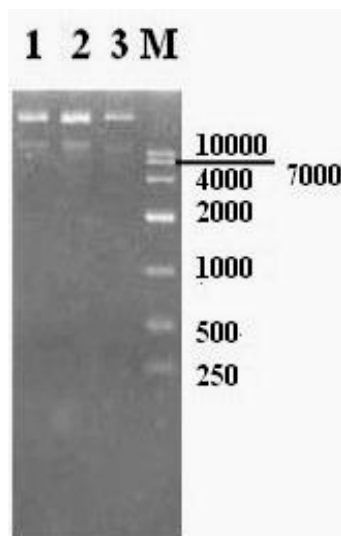


图 5-1-A pET-28a 表达载体电泳

Fig.5-1-A Gel electrophoresis of pET-28a vector

1,2,3: 载体酶切前

M: 10000 DNA Marker

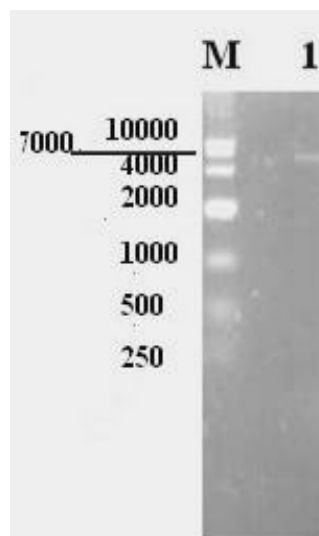


图 5-1-B pET-28a 表达载体电泳

Fig.5-1-B Gel electrophoresis of pET-28a vector

1: 载体酶切后

M: 10000 DNA Marker



图 5-2 预连接的 AJcath1 片段

Fig.5-2 AJcath1 fragment for ligation

1: 预连接的 AJcath1 片段

M: 2000 DNA Marker

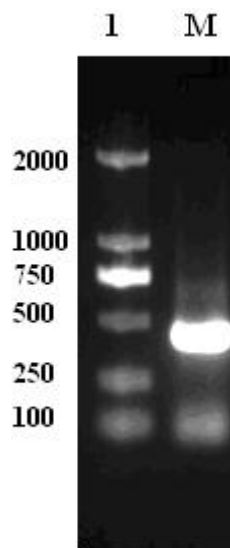


图 5-3 预连接的 AJcath2 片段

Fig.5-3 AJcath2 fragment for ligation

1: 预连接的 AJcath2 片段

M: 2000 DNA Marker

3.2 pET-28a/AJcath1 和 pET-28a/AJcath2 表达载体的鉴定及测序

在转化的 LB 平板上挑取若干单克隆，PCR 鉴定阳性克隆重组子，可见阳性克隆重组率很高（图 5-4，图 5-5）。取单克隆测序，结果证明连接正确，核苷酸的开放阅读框(ORF)编码连续，最终获得正确构建的 pET-28a/AJcath1 和 pET-28a/AJcath2 表达载体（图 5-6，图 5-7）。

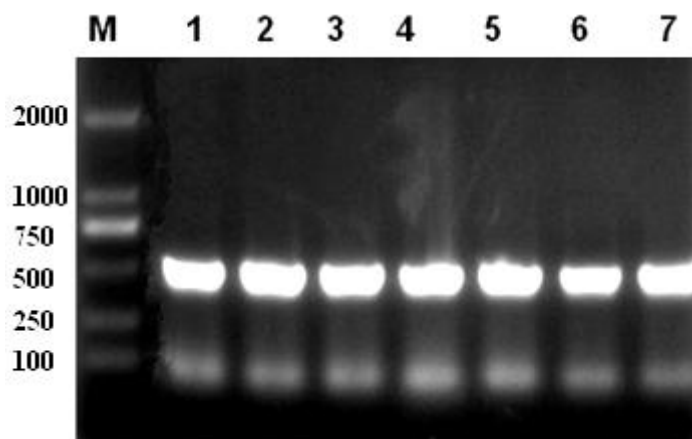


图 5-4 PCR 鉴定阳性重组克隆 pET-28a /AJcath1

Fig.5-4 PCR products of recombinant pET-28a /AJcath1

M: DL2000 Marker; 1-7: 阳性克隆 pET-28a /AJcath1 PCR 产物

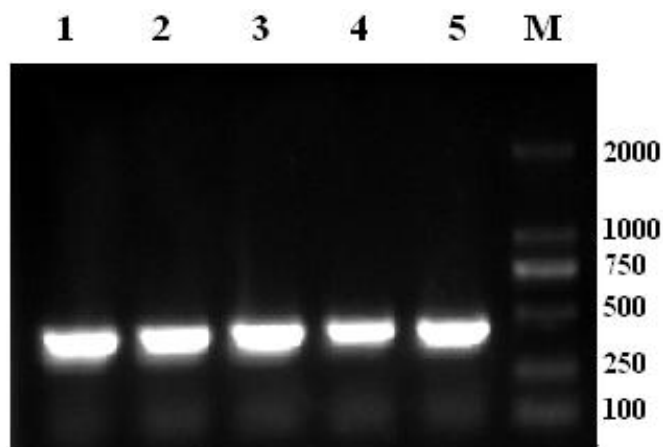


图 5-5 PCR 鉴定阳性重组克隆 pET-28a /Ajcath2

Fig.5-5 PCR products of recombinant pET-28a /Ajcath2

M: DL2000 Marker; 1-5: 阳性克隆 pET-28a /Ajcath2 PCR 产物

```

1 CCATGGGCcagcgtggagtgagtttagctacgaaggggtcatcgtagatgcgaccaccc 60
1  Q R G V E F S Y E G V I V D A T T R 18
61 gctacgtacaacaggctggggaagaatacgccttcagaccgctgctgagagctctgcaag 120
19  Y V Q Q A G E E Y A F R P L L R A L Q V 38
121 ttgaaactgtgtccactgctgaatttggtgacaagccagtggtggtcaggaagctaact 180
39  E T V S T A E F V D K P V V V R K L T F 58
181 tccctctgcatgagactatctgtgaacgcacagacgaacagacaggcaaacagtgtcct 240
59  P L H E T I C E R T D E Q T G K Q C P L 78
241 taaaaaggaatgggaaatcatttatgtgcaacatggcgtatttctcagccggtacttgaga 300
79  K R N G K S F M C N M A I S Q P V L E S 98
301 gcagtataccccagagcactggcatcacatgtgaacccatgaccacgaatcagctacagc 360
99  S I P Q S T G I T C E P M T T N Q L Q H 118
361 ataagatccggatgagaagaagcaaggccggcaaaggttctggaggaacaaaggggaata 420
119  K I R M R R S K A G K G S G G N K G N K 138
421 agggctctgggggaaacaaaggggaacaagggctctcgacccgggggtgggtccagcatcg 480
139  G S G G N K G N K G S R P G G G S S I A 158
481 ctggcagagacaagggagacagtggcacccgaactgcaCTCGAGcaccaccaccaccacc 540
159  G R D K G D S G T R T A H H H H H H 178
541 acTGA 545
    
```

*

图 5-6 pET-28a /Ajcath1 重组质粒测序鉴定

Fig.5-6 The sequence of recombinant pET-28a /Ajcath1 vector

图中小写字母代表测序获得的核苷酸序列；大写字母阴影部分代表编码的氨基酸序列；下划线标出目的基因与载体连接处；6个串联的组氨酸标签用阴影黑体字标出；*代表终止密码子。

```

1 CCATGGGCaggagcgtcttcacctttacagatgtccttgccgcgccactgcagacttca 60
1      R S V F T F T D V L A A A T A D F N 18
61 accagaaaagccaggagacaaaagcttttgacctccaaagcagggcgctttgcggtcaa 120
19  Q K S Q E T K A F G P P K Q G A L R S M 38
121 tgtcgggtgtttgagcccggagatggctccgctcatgatcaagtcattacgtttacgctta 180
39  S V F E P G D G S V M I K S I T F T L K 58
181 aggagacgggtgtgccccaaatcagaagactacctaaggaagagtgcgtcttcaaggaaa 240
59  E T V C P K S E D Y L K E E C V F K E N 78
241 atgggtctctgaagaagtgtctccagtacagctacagtccctcaagtcacagccaggagagg 300
79  G S L K K C S S T A T V L K S Q P G E A 98
301 cagcatctctgacagtgtcctgtcaggaggtcacagaccagaggagcgcaagaaactct 360
99  A S L T V S C Q E V T D P E E R K K L S 118
361 cagagcctccaagttggacaaaatatttcagcaactggCTCGAGcaccaccaccaccacc 420
119  E P P S W T K Y F S N W      H H H H H H 138
421 acTGA 425
*
```

图 5-7 pET-28a /Ajcath2 重组质粒测序鉴定

Fig.5-7 The sequence of recombinant pET-28a /Ajcath2 vector

图中小写字母代表测序获得的核苷酸序列；大写字母阴影部分代表编码的氨基酸序列；下划线标出目的基因与载体连接处；6个串联的组氨酸标签用阴影黑体字标出；*代表终止密码子

3.3 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

3.3.1 不同诱导温度对重组质粒表达的影响

将 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在 1.0 mM IPTG，起始浓度 OD600 为 0.5-0.6，诱导温度分别为 28 °C，37 °C，42 °C 条件下进行诱导表达，取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-8），可见三者诱导后较诱导前都具有明显的表达蛋白带，并以 42 °C 的表达量最高；并且重组质粒和空质粒相比，具有明显的表达蛋白带，重组质粒表达蛋白分子量在 19.0 kDa 左右，与计算的理论分子量 19.575 kDa 相似。

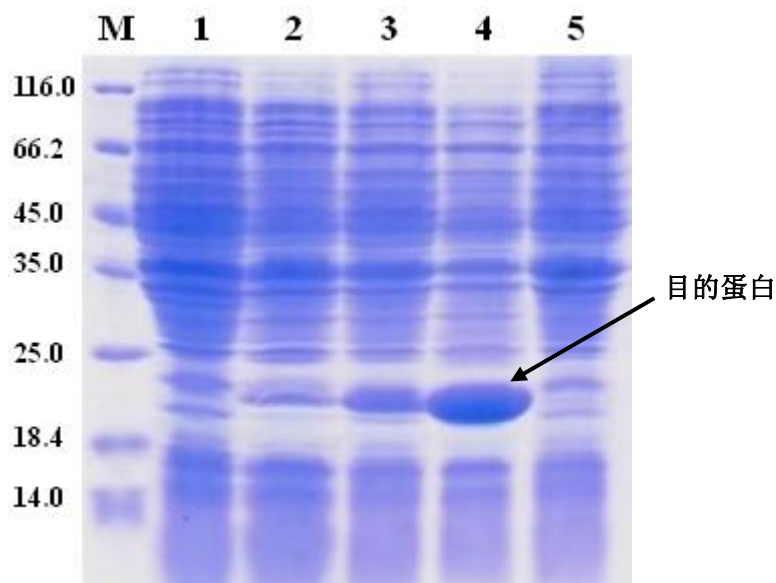


图 5-8 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在不同温度下的表达结果

Fig.5-8 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression

in *E.coli* with different temperature

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath1 重组质粒未诱导;

2-4: 依次为 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在 28 °C, 37 °C, 42 °C 诱导 6 h;

5: pET28a 空载体 42 °C 诱导 6 h。

3.3.2 不同诱导剂浓度对重组质粒表达的影响

在其它条件一致的情况下, 将 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在 IPTG 浓度分别为 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM 条件下进行诱导表达, 取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳 (图 5-9), 可见三者诱导后较诱导前都具有明显的表达蛋白带, 三条蛋白带表达量无明显差异; 重组质粒和空质粒相比, 具有明显的表达蛋白带。

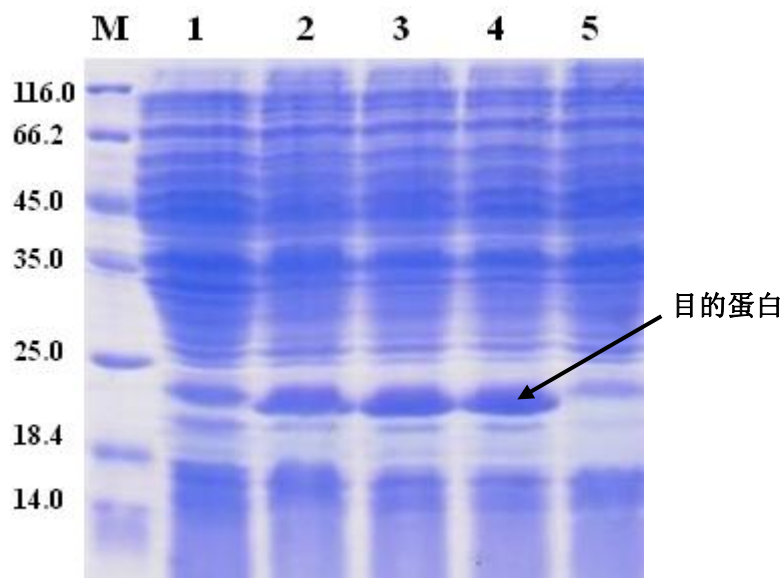


图 5-9 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在不同诱导剂浓度下的表达结果

Fig.5-9 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression in *E.coli* with different concentration of IPTG

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath1 重组质粒未诱导;

2-4: 依次为 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在 IPTG 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM 诱导 6 h;

5: pET28a 空载体 42 °C 诱导 6 h。

3.3.3 不同诱导时间对重组质粒表达的影响

在其它条件一致的情况下，将 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在诱导时间分别为 3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h 条件下进行诱导表达，取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-10），可见 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在诱导 3 h 时开始表达，7 h 时表达蛋白量达到最高值，8 h 时蛋白表达量开始衰减。

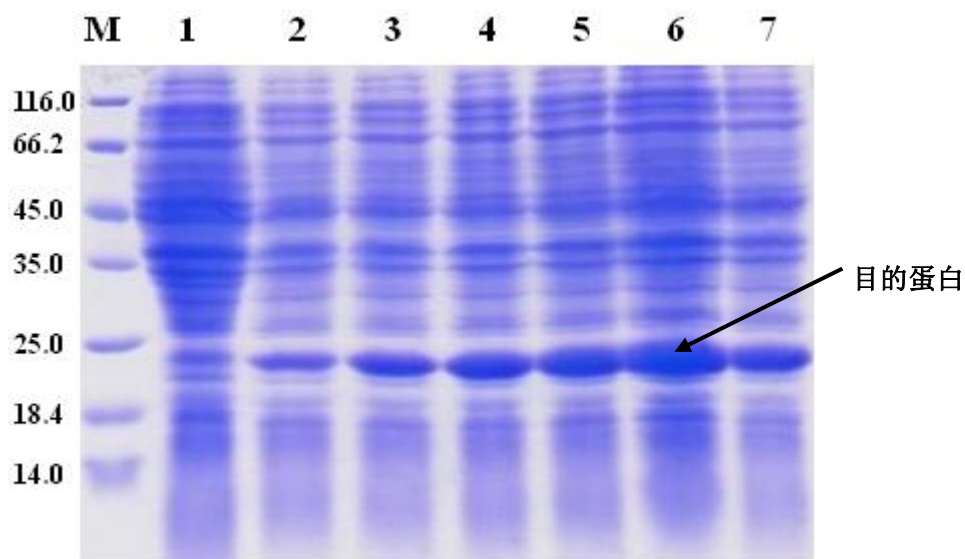


图 5-10 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在不同诱导时间下的表达结果

Fig.5-10 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression
in *E.coli* with different time

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath1 重组质粒未诱导;

2-7: 依次为 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在诱导时间为 3 h、4 h、
5 h、6 h、7 h 和 8 h 的诱导表达蛋白;

3.3.4 诱导起始生长量对重组质粒表达的影响

在其它条件一致的情况下，分别在菌体密度 $OD_{600}=0.3$ 、 0.6 、 1.0 、 1.3 时加入 IPTG 开始诱导，取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-11），可见 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在四个不同的菌体起始生长量时，重组蛋白诱导后较诱导前有明显的表达蛋白带， OD_{600} 为 0.3 、 0.6 、 1.0 蛋白表达量没有差异，在 OD_{600} 为 1.3 时表达量衰减；重组质粒和空质粒相比，具有明显的表达蛋白带。

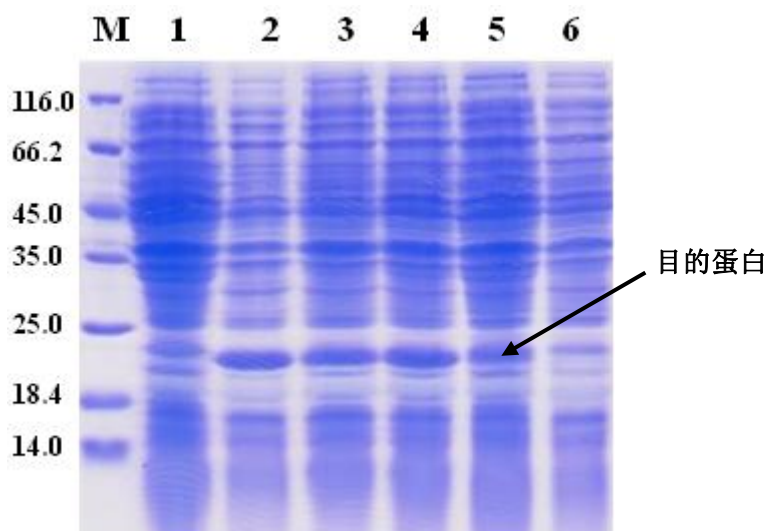


图 5-11 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在不同菌体起始生长量的表达结果

Fig.5-11 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression

in *E.coli* with Different initial bacteria growth

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath1 重组质粒未诱导;

2-5: 依次为 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在菌体起始密度为 OD600=0.3、

0.6、1.0 和 1.3 时的诱导表达蛋白;

6: pET28a 空载体 42 °C 诱导 7 h。

3.4 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

3.4.1 不同诱导温度对重组质粒表达的影响

将 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在 1.0 mM IPTG, 起始浓度 OD600 为 0.5-0.6, 诱导温度分别为 28 °C, 37 °C, 42 °C 条件下进行诱导表达, 取总菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳 (图 5-12), 可见诱导温度为 37 °C 和 42 °C 在诱导后较诱导前具有明显的表达蛋白带, 42 °C 的表达量较 37 °C 稍高些, 但考虑到表达蛋白的可溶性, 我们后续实验选择 37 °C 作为诱导温度; 重组质粒和空质粒相比, 具有明显的表达蛋白带, 重组质粒表达蛋白分子量在 15.0 kDa 左右, 与计算的理论分子量 15.582 kDa 相似。

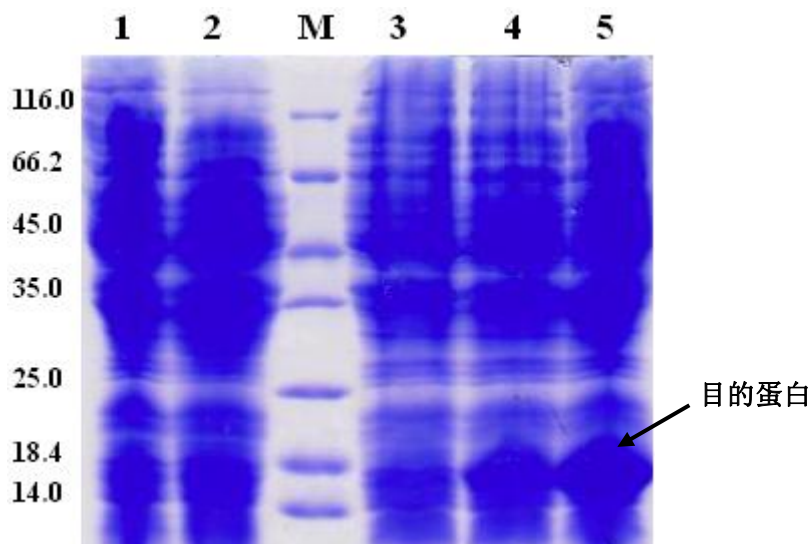


图 5-12 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在不同温度下的表达结果

Fig.5-12 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression in *E.coli* with different temperature

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath2 重组质粒未诱导;

2: pET28a 空载体 42 °C 诱导 6 h;

3-5: 依次为 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在 28 °C, 37 °C, 42 °C 诱导 6 h。

3.4.2 不同诱导剂浓度对重组质粒表达的影响

在其它条件一致的情况下, 将 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在 IPTG 浓度分别为 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM 的表达条件下进行诱导表达, 取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳 (图 5-13), 可见三者诱导后较诱导前都具有明显的表达蛋白带, 三条蛋白带表达量无明显差异; 重组质粒和空质粒相比, 具有明显的表达蛋白带。

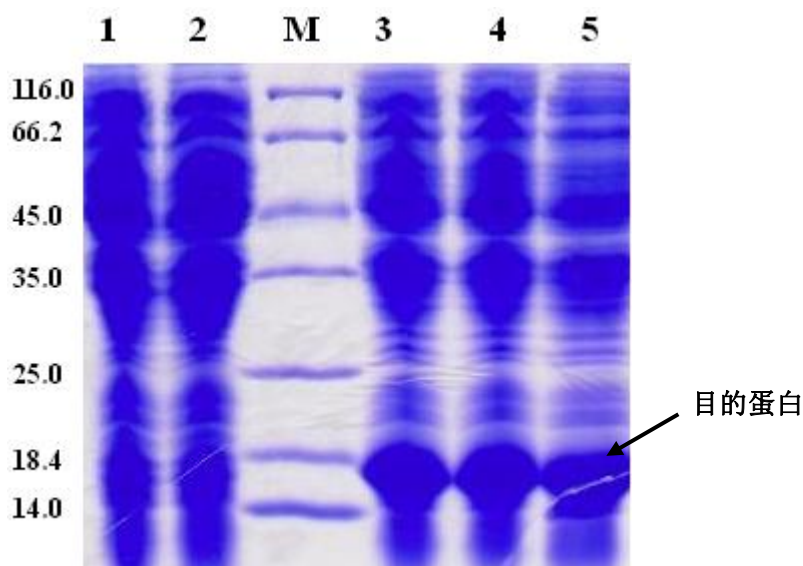


图 5-13 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在不同诱导剂浓度下的表达结果

Fig.5-13 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression in *E.coli* with different concentration of IPTG

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath2 重组质粒未诱导;

2: pET28a 空载体 37 °C 诱导 6 h;

3-5: 依次为 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在 IPTG 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM 诱导 6 h。

3.4.3 不同诱导时间对重组质粒表达的影响

在其它条件一致的情况下，将 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在诱导时间分别为 3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h 的表达条件下进行诱导表达，取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-14），可见 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在诱导 3 h 时开始表达，4 h 时表达蛋白量达到最高值，8 h 时蛋白表达量开始衰减。

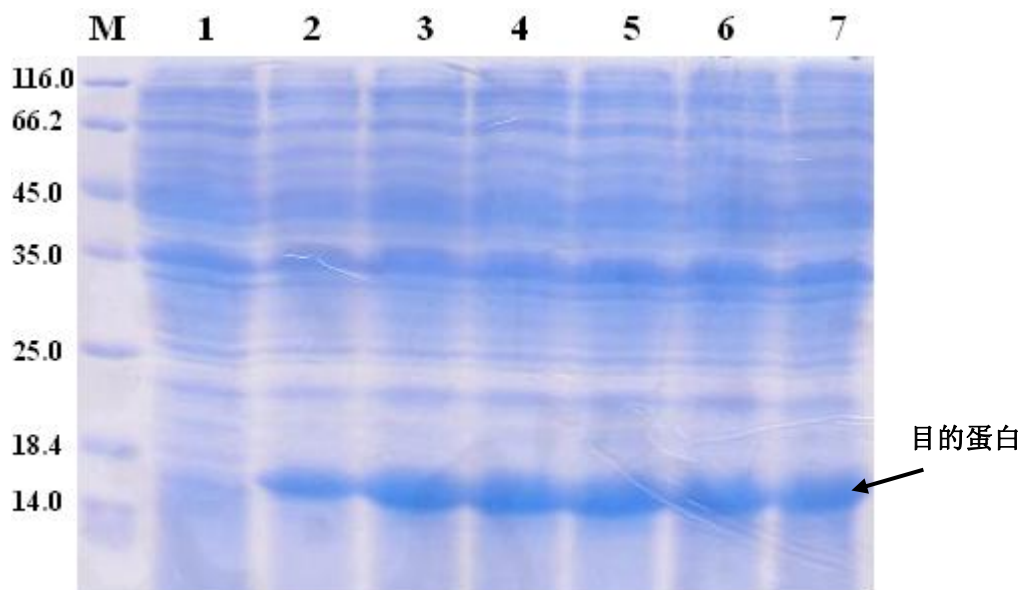


图 5-14 pET-28a /Ajcath1 重组质粒在不同诱导时间下的表达结果

Fig.5-14 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 recombinant plasmids expression in *E.coli* with different time

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath2 重组质粒未诱导;

2-7: 依次为 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在诱导时间为 3 h、4 h、5 h、6 h、

7 h 和 8 h 的诱导表达蛋白;

3.4.4 诱导起始生长量对重组质粒表达的影响

在其它条件一致的情况下，分别在菌体密度 OD600=0.3、0.6、1.0、1.3 时加入 IPTG 开始诱导，取总菌体进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-15），可见 pET-28a /Ajcath2 重组质粒在四个不同的菌体起始生长量时，重组蛋白诱导后较诱导前有明显的表达蛋白带，但四条带表达量没有明显差异。

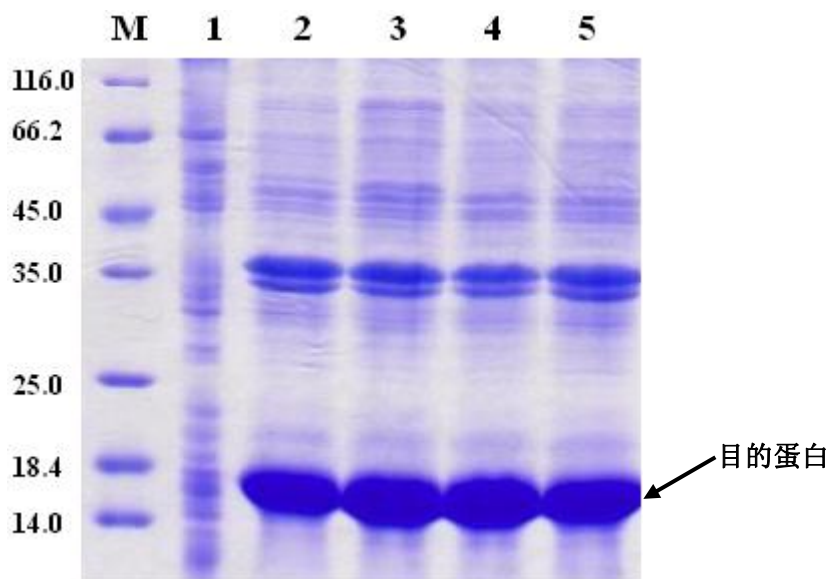


图 5-15 pET-28a /AJcath2 重组质粒在不同菌体起始生长量的表达结果

Fig.5-15. SDS-PAGE analysis of pET-28a /AJcath2 recombinant plasmids expression in *E.coli* with Different initial bacteria growth

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /AJcath2 重组质粒未诱导;

2-5: 依次为 pET-28a /AJcath2 重组质粒在菌体起始密度为 OD₆₂₀=0.3、0.6、1.0 和 1.3 时的诱导表达蛋白。

3.5 重组蛋白表达形式的鉴定

取表达菌体超声波破碎并离心后的上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-16，5-17），可见表达产物绝大部分以包涵体形式存在于菌体沉淀中，菌体上清中几乎没有可溶状态的表达产物存在。

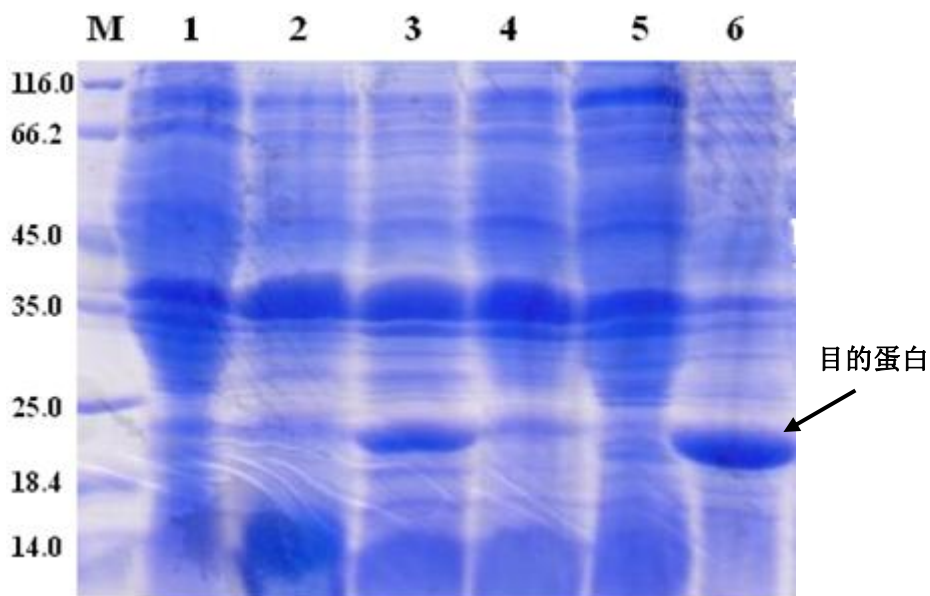


图 5-16 重组表达 pET-28a /Ajcath1 蛋白主要以包涵体形式存在

Fig.5-16 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath1 insoluble fusion bodies

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath1 未诱导菌体总蛋白;

2: pET28a 空载体 42 °C 诱导 7 h;

3,6: pET-28a /Ajcath1 诱导菌体超声波破碎后沉淀;

4,5: pET-28a /Ajcath1 诱导菌体超声波破碎后上清。

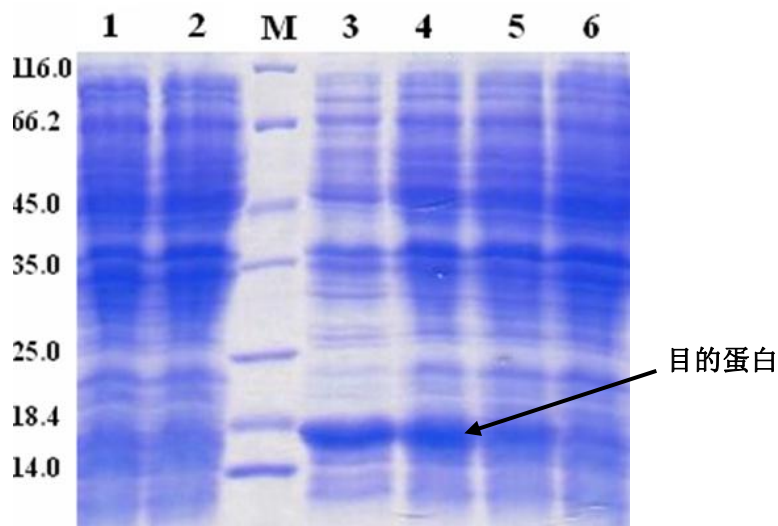


图 5-17 重组表达 pET-28a /Ajcath2 蛋白主要以包涵体形式存在

Fig.5-17 SDS-PAGE analysis of pET-28a /Ajcath2 insoluble fusion bodies

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1: pET-28a /Ajcath2 未诱导菌体总蛋白;

- 2: pET28a 空载体 37 °C 诱导 4 h;
- 3,4: pET-28a /Ajcath2 诱导菌体超声波破碎后沉淀;
- 5,6: pET-28a /Ajcath2 诱导菌体超声波破碎后上清。

3.6 重组蛋白表达的纯化及 Western-blot 鉴定

为了得到 Ajcath1 和 Ajcath2 表达产物，将准备好的样品过镍离子螯合亲和层析柱，用咪唑洗脱螯合的融合蛋白，280 nm 检测紫外吸收曲线，可见到明显的洗脱蛋白峰（图 5-18，5-19）。收集洗脱部分进行 SDS-PAGE 电泳（图 5-20），两个蛋白洗脱峰中均含有目的蛋白 Ajcath1 和 Ajcath2。以 6-His-tag 单克隆抗体做 Western blot 鉴定纯化产物，结果显示为阳性条带（图 5-21，5-22）。

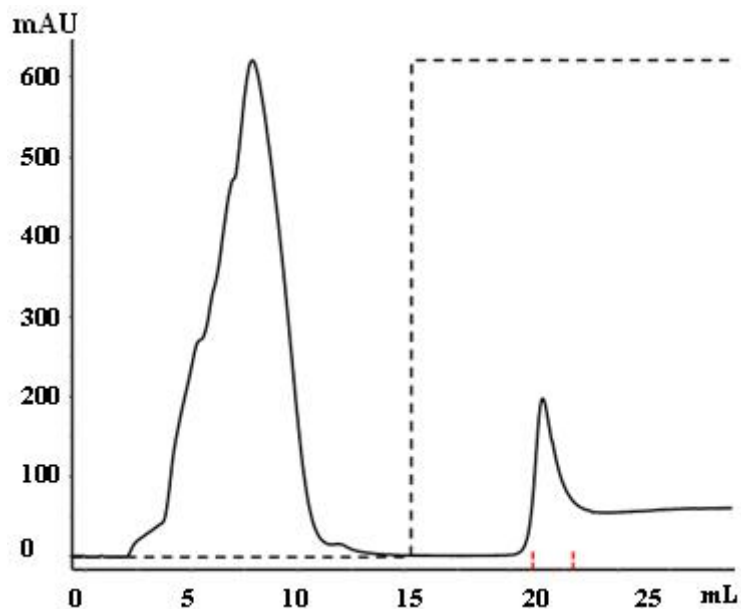


图 5-18 亲和层析柱 (IMAC) 纯化目的蛋白 Ajcath1

Fig.5-18 Purification of Ajcath1 by IMAC chromatography

实线代表 A280 nm 紫外吸收曲线，虚线代表咪唑浓度

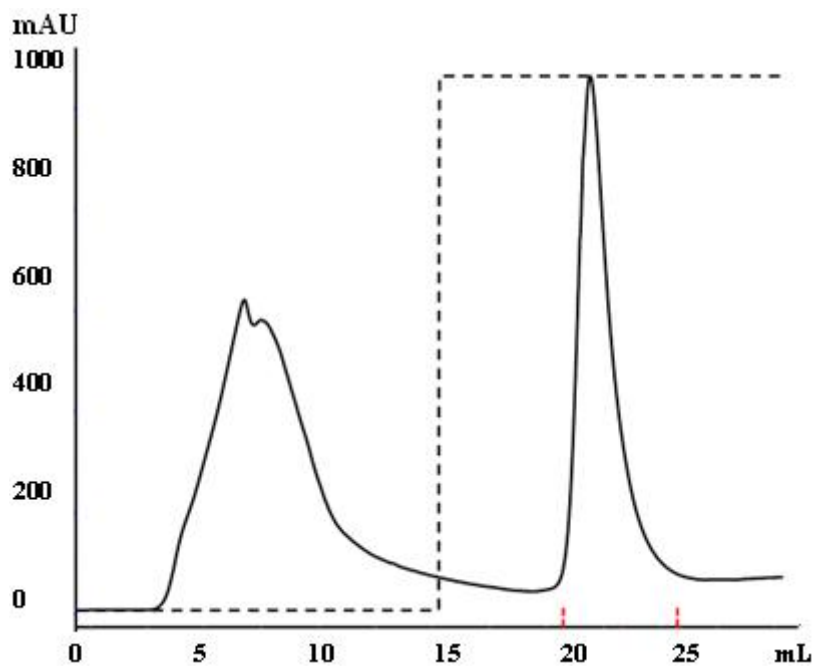


图 5-19 亲和层析柱 (IMAC) 纯化目的蛋白 Ajcath2

Fig.5-19 Purification of Ajcath2 by IMAC chromatography

实线代表 A280 nm 紫外吸收曲线，虚线代表咪唑浓度

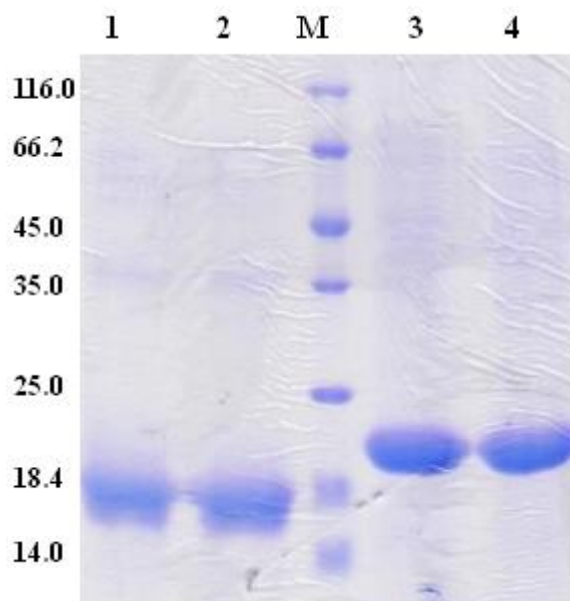


图 5-20 IMAC 洗脱蛋白电泳

Fig.5-20 SDS-PAGE analysis of purified Ajcath1 and Ajcath2

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker;

1,2: IMAC 洗脱 Ajcath2 蛋白;

3,4: IMAC 洗脱 Ajcath1 蛋白。

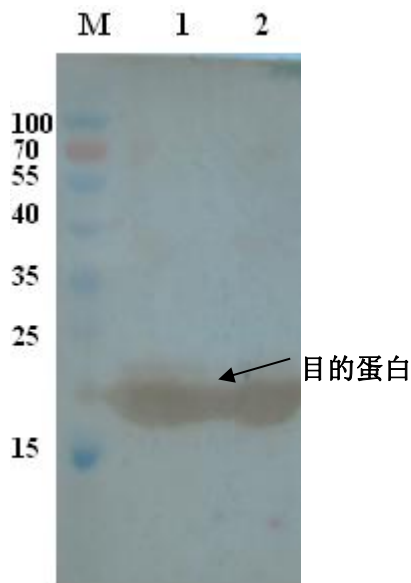


图 5-21 Western-blot 鉴定 AJcath1

Fig.5-20 The result of Western-blot

M: 低分子量标准蛋白质 Marker;
1,2: 硝酸纤维素杂交膜印迹

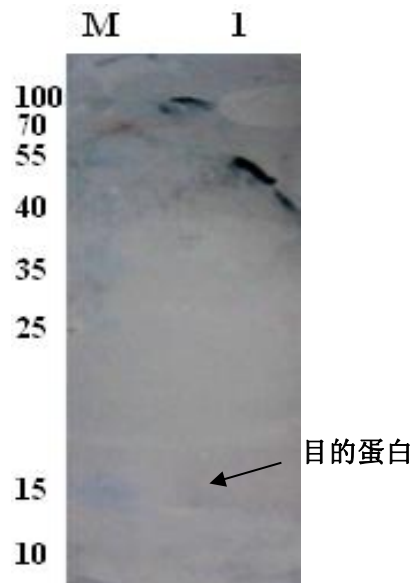


图 5-22 Western-blot 鉴定 AJcath2

Fig.5-22 The result of Western-blot

M: 低分子量标准蛋白质 Marker;
1,2: 硝酸纤维素杂交膜印迹

3.7 重组蛋白的复性

通过粘度和浊度判断蛋白复性效果，重组蛋白最终溶解于 PBS 溶液中，呈现透明状态，说明复性成功。SDS-PAGE 电泳检验（图 5-23），均有目的条带，说明蛋白复性过程中基本没有发生降解和断裂情况。

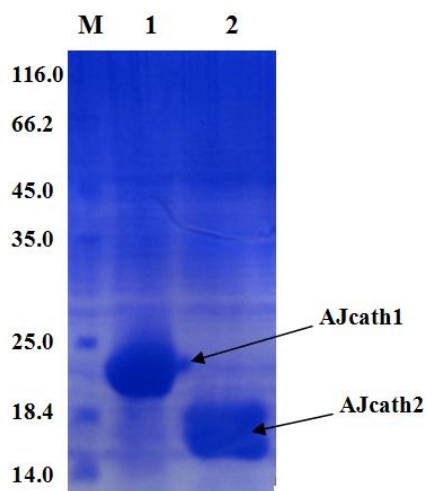


图 5-23 重组蛋白复性分析

Fig.5-23 Renaturation analysis of recombinant protein

M: 低分子量标准蛋白质 Marker; 1,2: 复性后的重组蛋白

4 讨论

4.1 Cathelicidin 的诱导表达

原核表达系统中,大肠杆菌是当前最常用的外源蛋白表达系统。大肠杆菌表达系统具有培养简便、繁殖速度快、遗传背景清楚、操作简单、成本低、表达量大、表达的重组蛋白易于纯化,并且能够具有与天然产物相似的生物学活性等优点。但真核外源基因在大肠杆菌中的表达受到诸多因素的影响,其中表达载体的选择是一个十分重要的环节,不但要考虑到多克隆位点、启动子,抗性标记、诱导方式等,还要顾及目的蛋白的表达量、产物的可溶性、纯化难易程度等因素。因此,一个好的表达载体对重组蛋白的获得将起到事半功倍的作用。目前,用于大肠杆菌表达系统的基因工程载体主要分为非融合表达载体和融合表达载体,后者又以携带 6×His Tag 和日本血吸虫谷胱甘肽转移酶标签(GST Tag)的载体应用最为广泛。本试验选用了高效融合表达载体 pET-28a, pET-28a 为含有 T7 强启动子的原核高效表达载体,可将目的序列插入多克隆位点,表达出目的蛋白,同时载体携带有 6 个 His 标签,便于后续的纯化。在实验中我们曾经尝试用 pGEX-4T-1 表达载体,通过控制培养条件,诸如 IPTG 浓度、培养温度和诱导时间等来增加蛋白的表达量,但多次试验证明了 pGEX-4T-1 质粒无法表达重组蛋白。

诱导条件对重组蛋白的表达也有不同程度的影响,如 IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度、大肠杆菌起始浓度、培养基的组成、pH 和溶解氧等。王沛珍(2010)报道低温 16 °C 可以增加 thanatin 抗菌肽表达量和可溶性,同时诱导 9 h 为最佳诱导时间。Ramos 等(2010)报道将诱导温度从 37 °C 降到 30 °C 可以增加满月蛤(*Lucina pectinata*) rHbII 的表达量。Ma 等(2005)报道在 YT 培养基中加入 0.5% (w/v) 的葡萄糖可以显著增加 adenoregulin 抗菌肽的表达量。本实验发现诱导温度和诱导时间对 cathelicidin 蛋白的表达量有比较显著影响。Ajcath1 在温度为 42 °C,诱导时间为 7 h 蛋白表达量最高, Ajcath2 在温度为 37 °C,诱导时间为 3 h 蛋白表达量最高。

在原核表达过程中导致包涵体形成的原因有很多(Villaverda 2003, Ventura 2005, 王增 2009)。(1)重组蛋白的表达量过高,此时由于蛋白质合成速度太快,没有足够的时间进行折叠,二硫键不能正确配对;(2)宿主细胞内的还原性环境

使工程蛋白的二硫键无法形成；(3) 与外源蛋白的氨基酸组成也有关，一般来说外源蛋白中含硫氨基酸和脯氨酸越多越易形成包涵体；(4) 与重组蛋白所处的细胞内外环境有关，培养温度较高或胞内接近蛋白质等电点时易形成包涵体。另一方面 pET-28a 载体具有 T7 启动子，载体本身没有溶解性高的融合蛋白，也不含有信号肽序列，用这种载体表达蛋白形成包涵体的可能性会更大。本实验最终得到目的蛋白是以包涵体的形式存在，包涵体存在也有优点，如蛋白质表达量高，可避免宿主细胞蛋白酶对目的蛋白降解，包涵体易从宿主细胞中纯化，可避免毒性蛋白(如毒素蛋白)对宿主细胞的毒性等优势。

4.2 Cathelicidin 的纯化和包涵体复性

pET-28a 载体表达产物 C 端融合 6 个 His-tag 蛋白，由于空间位阻关系可以与 Ni 特异性结合，因此应用金属螯合层析可纯化表达的融合蛋白。洗脱目的蛋白的方法有两种，一种是降低 pH 洗脱，降低 pH 值可以减弱组氨酸和镍离子之间的作用力，从而对蛋白进行洗脱，降低 pH 值洗脱不会在洗脱的蛋白中带入高浓度的咪唑，但很可能引起目标蛋白在等电点附近的沉淀。另一种方法是升高咪唑的浓度，竞争目的蛋白与 Ni²⁺结合，从而洗脱蛋白。此方法简单易行，但同时洗脱的目的蛋白含有高浓度的咪唑。此外也有用咪唑和降低 pH 值相结合的方法进行洗脱，Zhang 等(2005)先用 60 mM pH 8.0 的咪唑洗脱杂蛋白，再用 pH 4.0 的缓冲液洗脱目的蛋白 hepcidin。本实验采用了一步咪唑洗脱方法，最终得到大量的 Ajcath2 蛋白，但所得 Ajcath1 蛋白较少(图 5-18, 5-19)。

包涵体复性的方法有很多，如稀释复性、透析复性、超滤复性、层析柱复性、温度跳跃式复性等。本实验采用了透析复性、最终灭菌水溶解冻干的目的蛋白澄清，说明复性成功，SDS-PAGE 电泳检测蛋白完整性很好。

4.3 Cathelicidin 重组蛋白表达的相关研究

LL-37 是人类唯一的 cathelicidin 类抗菌肽，具有广谱的抗菌活性、化学趋化性、及促进血管生成和伤口修复性等特点，致使许多学者采用不同的方法体外表达重组蛋白，包括采用 GST 和 pET 系列载体及不同的纯化方法。冯云等(2003)表达了 GST-FALL-39(最开始推测的人类 cathelicidin 成熟肽，其比 LL-37 多 2 个氨基酸)抗菌肽，GST-FALL-39 存在于菌体裂解液的上清中，通过凝胶 4B 柱

及 AU-PAGE 得到高纯度的蛋白。Moon 等 (2006) 应用与冯云等相似的方法表达出 GST-LL-37 融合蛋白, 并发现低温 30 °C, 及低 IPTG 浓度 (0.1 mM) 可以显著增加可溶性重组蛋白的产量。Li 等 (2006) 应用 pET32a 载体也表达出可溶性的 LL-37 重组蛋白, 应用亲和色谱和反相色谱去除硫氧还原蛋白及其它杂蛋白, 得到含有 6 个 His-tag 的 LL-37 蛋白。

鱼类 cathelicidin 至今只发现具有抗菌功能, 且如同哺乳动物一样只有成熟肽部分具有抗菌活性。一些学者原核表达出 cathelicidin prodomain, 再用弹性蛋白酶酶解重组蛋白, 确认出成熟肽序列。至今大西洋鳕鱼、虹鳟、香鱼 cathelicidin 成熟肽已得到确认, 成熟肽均具有较强的抗菌活性 (Lu *et al*, 2011; Chang *et al*, 2006; Broekman *et al*, 2011)。

5 小结

本研究成功表达出 Ajcath1 和 Ajcath2, 表达产物以包涵体形式存在。Ajcath1 最佳表达条件为: 菌体密度为 OD₆₀₀=0.3, 诱导剂浓度为 0.1 mM, 42 °C 诱导表达 7 h。Ajcath2 诱导表达条件为: 菌体密度为 OD₆₀₀=0.3, 诱导剂浓度为 0.1 mM, 37°C 诱导表达 4 h。纯化、Western-blot 鉴定和复性后, 获得高纯度的复性后重组蛋白。

第六章 总结与展望

1 论文主要成果

1.1 日本鳗鲡肝脏血红蛋白源抗菌肽的分离与纯化

采用醋酸浸提,并联合阳离子交换和反相高效液相层析技术从日本鳗鲡肝脏内获得一个对迟钝爱德华氏菌具有明显抑菌作用的单一组分,经质谱分析该抗菌肽可见分子量为 2388.05, Edaman 降解法测定 N-末端 18 个氨基酸残基序列,因与欧鳗血红蛋白 α 链部分序列高度相似,可能为血红蛋白降解片段,因此,命名为 AjHb α 。

1.2 获得 AjHb α 全长的氨基酸序列

经 3' RACE 和 5' RACE 扩增,获得 AjHb α 完整的氨基酸序列,该抗菌肽为一两亲性的弱阳离子抗菌肽,电荷为+2, pI 为 9.27。生物软件分析该抗菌肽可能为糜蛋白酶酶解日本鳗鲡血红蛋白 α 链形成。

1.3 AjHb α 抗菌肽具有较强的抗菌活性

人工合成的抗菌肽 AjHb α 表现出广谱的抗菌活性,对革兰氏阳性菌和阴性菌均具有较强的抗菌活性。AjHb α 抗菌肽在浓度为 83.72 μ M 时对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌和溶壁微球菌)及革兰氏阴性菌(迟钝爱德华氏菌、哈维氏弧菌、豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌、简达气单胞菌、威隆气单胞菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌)均有杀灭活性, Ki%达到 95%以上;在浓度为 41.86 μ M 时对后 6 株革兰氏阴性菌抗菌活性较强, Ki%达到 70%以上; 20.93 μ M 和 10.47 μ M 抗菌活性较弱,仅对溶藻弧菌和副溶血弧菌有抗菌活性, Ki%未达到 50%。

1.4 克隆得到两个 cathelicidin 基因变体

日本鳗鲡 cathelicidin 的两个变体 Ajcath1、Ajcath2 氨基酸序列均由信号肽、结构域和成熟肽三部分组成,靠近 C 端有四个保守的半胱氨酸序列。Ajcath1 成熟肽序列可能为 H-RMRRSKAGKGS GG NKG NKG SGG NKG NKG SRPGGGSSIA GRDKGDSGTRTA-OH, 分子量为 4818.2 Da, pI 值为 12.02, 电荷+11, 为强阳

离子抗菌肽，同时也是一个富含 32%甘氨酸的亲水性抗菌肽。Ajcath2 成熟肽序列可能为 TDPEERKKLSEPPSWTKYFSNW，分子量为 2726.0 Da，pI 值为 5.93，电荷为 0。与其它鱼类 cathelicidin 无相似性，具有其它鱼类罕见的 cathelin 高度保守区，可能为新发现的鱼类亲水性抗菌肽。

1.5 获得日本鳗鲡 cathelicidin 重组表达产物

构建了 pET-28a-his/cathelicidin 表达载体，在大肠杆菌内表达出 cathelicidin 重组蛋白，重组蛋白以包涵体的形式存在。利用亲和层析柱、AKTA-purifier 100 纯化系统及透析法，得到较高纯度的 cathelicidin 重组蛋白，为进一步确认 cathelicidin 成熟肽部分奠定了基础。

2 论文主要创新点

- (1) 首次从日本鳗鲡肝脏内分离纯化得到一个血红蛋白源性的抗菌肽；
- (2) 从日本鳗鲡肝脏内分离得到 2 个 cathelicidin 基因变体，命名为 Ajcath1 和 Ajcath2，Ajcath2 为新发现的鱼类抗菌肽。

3 论文不足之处和展望

3.1 继续寻找鱼类血红蛋白源抗菌肽

本研究只获得一段血红蛋白源抗菌肽，但前人研究哺乳动物血红蛋白源抗菌肽过程中发现，其是一个很大的抗菌肽库，且抗菌谱广。鱼类是最大的一个脊椎动物群体，其血红蛋白源抗菌片段的研究非常有限，是否鱼类也如同哺乳动物一样存在多个血红蛋白源抗菌片段？值得进一步探索。今后有必要开展如直接从鱼类血液中提取抗菌肽，以期获得多个血红蛋白源抗菌肽。

3.2 探讨日本鳗鲡血红蛋白源抗菌肽的产生机制

各国学者多有发现血红蛋白源抗菌肽，但对其产生机制尚不清楚，通过揭示血红蛋白源抗菌肽产生机制，将有助于更好理解血红蛋白在动物机体内如何发挥抗菌作用。今后有必要探索哪种酶可以酶解鱼类血红蛋白得到抗菌肽/片段；或者应用免疫组化和原位杂交等方法探索 AjHb α 表达部位，以期阐明血红蛋白源

抗菌肽的产生机制。

3.3 确认日本鳗鲡 cathelicidin 成熟肽

本研究克隆得到日本鳗鲡两个 cathelicidin 基因变体，并推测出成熟肽序列。今后要在前期原核表达的基础上，应用嗜中性粒细胞弹性蛋白酶酶切复性后的重组蛋白，质谱检测分子量来确认 cathelicidin 成熟肽，人工合成成熟肽检测其抗菌活性。

3.4 原核或真核表达 cathelicidin 成熟肽

抗菌肽在抗菌药物开发中具有潜在的应用价值，随着日本鳗鲡 cathelicidin 成熟肽的确认，构建基因工程载体表达重组蛋白，以产业化生产抗菌肽，开发替代抗生素的抗菌肽产品，将有望研发出抗水产养殖主要病原体特别是耐药菌的新型药物。从而探索一条解决目前困扰我国鱼类养殖生产中的细菌耐药性及水环境和水产品抗生素污染等新问题的新途径。

3.5 探讨 Cathelicidin 基因在日本鳗鲡各组织器官的表达情况

在对健康日本鳗鲡肝脏的研究中发现，cathelicidin 基因存在多变体现象，而肝脏并不是 cathelicidin 唯一高效表达的器官。在今后的实验中有必要开展细菌感染或寄生虫感染及多因子协同作用，以探明鳗鲡多个器官组织中 cathelicidin 的诱导表达情况。

参考文献

- Abbassi F, Oury B, Blasco T, *et al.* Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid *Pelophylax saharica*. *Peptides*. 2008, 29(9):1526-1533.
- Adje EY, Balti R, Kouach M, *et al.* Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin [J]. *Int J Bio Macromol*. 2011, 49: 143-153.
- Agerberth B, Odeberg HGJ, Kogner P, *et al.* FALL-37, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92: 195-199.
- Anderson RS, Beaven AE. Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma [J]. *Aquac. Living Resour*. 2001,14:343-349.
- Anderson RC, Yu PL. Isolation and characterisation of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils [J]. *Biochem and Biophys Res Commun*. 2003, 312: 1139-1146.
- Arafa SZ, Reda ES. Surface features of the monogenean gill parasites *Pseudodactylogyryrus anguillae* and *Pseudodactylogyryrus bini* from the European eel *Anguilla anguilla* in Egypt [J]. *Parasitol Res*. 2012, 110:127-133.
- Armogida SA, Yannaras NM, Melton AL, *et al.* Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk [J]. *Allergy Asthma Proc*. 2004, 25: 297-304.
- Bals R, Wang X, Zasloff M, *et al.* The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95: 9541-9546.
- Bao Y, Wang Q, Lin Z. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbI) is involved in the immune response against bacterial infection [J]. *Fish Shell Immunol*. 2011, 31: 517-523.

- Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki L, *et al.* Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization [J]. *Dev Comp Immunol.* 2001, 25: 205-217.
- Bell A. Antimalarial peptides: the long and the short of it [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17: 2719-2731.
- Belmonte R, Cruz CE, Pires JR, *et al.* Purification and characterization of Hb 98-114: a novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [J]. *Peptides.* 2012, 37(1):120-7. doi: 10.1016/j.
- Bergwerff AA, Scherpenisse P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003, 788: 351-359.
- Bhaskaran M, Chen H, Chen Z, *et al.* Hemoglobin is expressed in alveolar epithelial type II cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 333:1348-1352.
- Birkemo GA, Lüders T, Andersen Ø, *et al.* Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L*) [J]. *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1646(1-2): 207-215.
- Bo J, Giesy JP, Ye R, *et al.* Identification of differentially expressed genes and quantitative expression of complement genes in the liver of marine medaka *Oryzias melastigma* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2012, 3: 1-10.
- Bonetto V, Andersson M, Bergman T, *et al.* Spleen antibacterial peptides: high levels of PR-39 and presence of two forms of NK-lysin [J]. *Cell Mol Life Sci.* 1999, 56 (1-2):174-178.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem.* 1976, 72: 248-254.
- Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, *et al.* Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins [J]. *Eur J Pharmacol.* 1986, 125: 309-310.

- Broekman DC, Frei DM, Gylfason GA, *et al.* Cod cathelicidin: Isolation of the mature peptide, cleavage site characterization and developmental expression [J]. *Dev Comp Immunol.* 2011, 35: 296-303.
- Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, *et al.* Isolation of ovine pulmonary surfactant-association anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93:412-416.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria [J]? *Nat Rev Microbiol.* 2005, 3: 238-250.
- Cao W, Zhou Y, Ma Y, *et al.* Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2005, 40(2):404-10.
- Cao HP, He S, Wei RP, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens*G1: A potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 82104:1-7.
- Carman RL, Old JM, Baker M, *et al.* Identification and expression of a novel marsupial cathelicidin from the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009, 127: 269-276.
- Catiau L, Traisnel J, Delval-Dubois V, *et al.* Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR [J]. *Peptides*, 2011, 1-6.
- Catiau L, Traisnel J, Delval-Dubois V, *et al.* RYH: A minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity [J]. *Peptides.* 2011, 32: 2963-2968.
- Chang CI, Pleguezuelos O, Zhang YA, *et al.* Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Infect Immun.* 2005, 73: 5053-5064.
- Chang CI, Zhang YA, Zou J, *et al.* Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Antimicrob Agents.* 2006, 50: 185-195.
- Cho J, Park I, Kim M, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa [J].

- FEBS Lett. 2002, 531:459–463.
- Cho JH, Park IY, Kim HS, *et al.* Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish [J]. FASEB J. 2002, 16: 429–431.
- Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules [J]. FEBS Lett. 1995, 368: 173-176.
- Cui Z, Song C, Liu Y, *et al.* Crustins from eyestalk cDNA library of swimming crab *Portunus trituberculatus*: Molecular characterization, genomic organization and expression analysis [J]. Fish Shell Immunol. 2012, 33(4):937-945.
- Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, *et al.* New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin [J]. Peptides. 2005, 26:713-719.
- Deng LX, Pan XL, Wang Y, *et al.* Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina [J]. Human Reproduction. 2009, 24: 211-218.
- Desbois A, Mearns-Spragg A, Smith V. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Mar Biotechnol. 2009, 11: 45-52.
- Dijk AV, Veldhuizen Edwin JA, Asten van Alphons JAM, *et al.* CMAP27, a novel chicken cathelicidin-like antimicrobial protein [J]. Vet Immunol Immunop. 2005, 106: 321–327.
- Döring Y, Drechsler M, Wantha S, *et al.* Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice [J]. Circ Res. 2012, 110(8):1052-1056.
- Dorschner RA, Lin KH, Murakami M, *et al.* Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response [J]. Pediatr Res. 2003, 53: 566-572.
- Dorschner RA, Lopez-Garcia B, Massie J, *et al.* Innate immune defense of the nail unit by antimicrobial peptides [J]. J Am Acad Dermatol. 2004, 50: 343-348.
- Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides [J]. Biochim Biophys Acta. 2006, 1758 (9):1408-25.

- Ebran N, Julien S, Orange N, *et al.* Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities [J]. *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1467: 271-280.
- Fernandes JMO, Smith VJ. Partial purification of antibacterial proteinaceous factors from erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish Shell Immunol*. 2004, 16: 1-9.
- Fogaca AC, da Silva PI Jr, Miranda MT, *et al.* Antimicrobial activity of bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus* [J]. *J Bio Chem*. 1999, 274: 25330-25334.
- Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, *et al.* Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment [J]. *FEBS Letters*. 2001, 491: 159-163.
- Gallo RL, Ono M, Povsic T, *et al.* Syndecan, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a praline-rich antimicrobial peptide from wounds [J]. *PNAS*. 1994, 91: 11035-11039.
- Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides [J]. *Biopolymers*. 2000, 55(1): 31-49.
- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, *et al.* Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide-29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock [J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004, 169: 187-194.
- Guan R, Xiong J, Huang W, *et al.* Enhancement of protective immunity in European eel (*Anguilla anguilla*) against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by a recombinant *Aeromonas* outer membrane protein [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011; 43: 79-88.
- Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, *et al.* The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes [J]. *Eur J Biochem*. 1996, 238: 325-332.
- Guo M, Wei J, Huang X, *et al.* Antiviral effects of β -defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Fish Shell Immunol*. 2012, 32:

- 828-838.
- Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials [J]. *Lancet Infect Dis*, 2001, 1: 156–164.
- Hancock RE, Brown KL, Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates emerging antimicrobial strategies [J]. *Immunobiology*. 2006, 211: 315-322.
- Hand WL. Inhibition of cell-free oxidative bactericidal activity by erythrocytes and hemoglobin [J]. *Infect Immun*. 1984, 44: 465-468.
- Hao X, Yang H, Wei L, *et al*. Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate. *Amino Acids*. 2012, 43(2):677-685.
- Heller WT, Waring AJ, Lehrer RL, *et al*. MultiPle states of β -sheet peptide protegrin in lipid bilayers [J]. *Biochemistry*.1998, 37:17331-17338.
- He YD, Hua Y, Lee JY, *et al*. Brain alpha- and beta-globin expression after intracerebral hemorrhage. *Transl Stroke Res*. 2010, 1: 48–56.
- Hobson D, Hirsch JG. The antibacterial activity of hemoglobin [J]. *J Exp Med*. 1958, 107: 167-183.
- Hoffman, Binah BF, Ofer. Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infections [P]. US 6340667B1, 2002.
- Ikhlas A. El Karim, Gerard J, *et al*. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of microorganisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites [J]. *Journal of Neuroimmunology*. 2008, 200:11-16.
- Ivanov VT, Karelin AA, Blischenko EY, *et al*. Proteolytic degradation of hemoglobin in vivo. Role in formation of tissue specific peptide pool [J]. *Pure Appl Chem*. 1998, 70: 67-74.
- Ivanov VT, Karelin AA, Philippova MM, *et al*. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool [J]. *Biopolymers*. 1997, 43: 171-188.
- Ivanov VT, Yatskin ON, Kalinina OA, *et al*. Tissue-specific peptide pools. Generation and function [J]. *Pure Appl Chem*. 2000, 72: 355-363.
- Joh SJ, Kim MJ, Kwon HM, *et al*. Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea [J]. *J Vet*

- Med Sci. 2011, 73:7-11.
- Karelin AA, Philippova MM, Ivanov VT. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides [J]. *Peptides*. 1995, 16: 693-697.
- Kathryn E. Pavia, Sara A. *et al.* Novel histone-derived antimicrobial peptides use different antimicrobial mechanisms [J]. *BBA*. 2012, 1818: 869- 876.
- Kerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, *et al.* Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, 45(3): 715–722
- Khoo LH, Robinet DW, Noga EJ. Callinectin an antibacterial peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*, hemocytes [J]. *Mar Biotechnol*. 1999, 1: 44-51.
- Kim HS, Yoon H, Minn Il, *et al.* Pepsin-Mediated Processing of the Cytoplasmic Histone H2A to Strong Antimicrobial Peptide Buforin I [J]. *J Immunol*. 2000, 165: 3268-3274.
- Lai R, Liu H, Lee WH, *et al.* An anionic antibacterial peptide from toad *Bombina maxima* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, 295(4):796-799.
- Lauth X, Shike H, Burns JC, *et al.* Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass [J]. *J Biol Chem*. 2002, 277(7):5030-5039.
- Lee S, Lee B, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from haemocyanin of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* [J]. *J Biol Chem*. 2003, 278: 7927–7933.
- Lee SY, Lee BL, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the fresh water crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Biol Chem*. 2003, 278: 7927-7933.
- Li Y, Li X, Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expr Purif*. 2006, 47(2):498-505.
- Liang Y, Guan. RZ, Huang WS. Isolation and identification of a novel inducible antibacterial peptide from the skin mucus of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J].

- Protein J. 2011, 30: 413–421.
- Liepke C, Baxmann S, Heine C, *et al.* Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides [J]. J Chromatogr B. 2003, 791: 345-356.
- Linde CM, Hoffner SE, Refai E, *et al.* In vitro activity of PR-39, a Proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Antimicrob Chemother. 2001, 47: 575-580.
- Liu L, Zeng M, Stamler JS, *et al.* Hemoglobin induction in mouse macrophages [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 96: 6643–6647.
- Lu XJ, Chen J, Huang ZA, *et al.* Identification and characterization of a novel cathelicidin from ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. Fish Shell Immunol. 2011:1-6.
- Ma YS, Cao W, Zhou YX, *et al.* Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif. 2005, 40:404-410.
- Magnadottir B. Immunological control of fish disease. Mar Biotechnol. 2010, 12:361-379.
- Maier VH, Dorn KV, Gudmundsdottir BK, *et al.* Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 3723-3730.
- Maier VH, Schmitt CN, Gudmundsdottir S, *et al.* Bacterial DNA indicated as an important inducer of fish cathelicidin [J]. Mol Immunol. 2008, 45: 2352-2358.
- Mak P, Wojcik K, Wicherek Ł, *et al.* Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood [J]. Peptides. 2004, 25: 1839-1847.
- Mak P, Wojcik K, Silberring J, *et al.* Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins [J]. Antonie Van Leeuwenhoek. 2000, 77:197- 207.
- Merchant ME, Roche C, Elsey RM, *et al.* Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. Comp Biochem Physiol. 2003, 136: 505-513.
- Merchant ME, Thibodeaux D, Loubser K, *et al.* Amoebacidal effects of serum from

- the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. J Parasitol. 2004, 90: 2980-2983
- Merchant ME, Pallansch M, Paulman RL, *et al.* Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. Antivir Res. 2005, 66: 35-38.
- Mookherjee N, Wilson H L, Doria S, *et al.* Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopoly saccharide [J]. J Leukoc Bio. 2006, 80(6): 1563-1574.
- Moon JY, Henzler-Wildman KA, Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 2006, 1758 (9): 1351-1358.
- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, *et al.* Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides [J]. Peptides, 2008, 29: 969-977.
- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, *et al.* Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin [J]. Peptides. 2006, 27: 2082-2089.
- Neto AF, Costa JL, Costa MJ, *et al.* Epidemiology and pathology of *Anguillicoloides crassus* in European eel *Anguilla anguilla* from the Tagus estuary (Portugal) [J]. Dis Aquat Organ. 2010, 88: 225-233.
- Newton DA, Rao KM, Dluhy RA, *et al.* Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells [J]. J Biol Chem. 2006, 281: 5668-5676.
- Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates [J]. Annu Rev Microbiol 1995; 49:277-304.
- Nishi H, Inagi R, Kato H, *et al.* Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress [J]. J Am Soc Nephrol. 2008, 19: 1500-1508.
- Noga EJ, Silphaduang U, Park NG, *et al.* Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2009, 152(4): 299-305.
- Noriaki LJ, Norio T, Yohko E, *et al.* Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major* [J]. Eur J Biochem. 2003, 270: 675-686.

- Olczak T, Simpson W, Liu X, *et al.* Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis* [J]. FEMS Microbiol Rev. 2005, 29: 119-294.
- Ooi CE, Weiss J, Levy O, *et al.* Isolation of two isoforms of a novel 15 kDa protein from rabbit polymorphonuclear leukocytes that modulate the antibacterial actions of other leukocyte proteins [J]. J Biol Chem. 1990, 265: 15956-15962.
- Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin: a pore-forming peptide isolated from moses sole fish *pardachirus marmoratus* [J]. Eur J Biochem. 1996, 237(1): 303-310.
- Ovchinnikova TV, Aleshina GM, Balandin SV, *et al.* Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* [J]. FEBS Lett. 2004, 577(1-2): 209-14.
- Pan W, Liu X, Ge F, *et al.* Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aibuhitensis* grube and its partial characterization [J]. J Biochem. 2004, 135(3):297-304.
- Panyutich A, Shi J, Boutz PL, *et al.* Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidases [J]. Infect Immun. 1997, 65(3): 978-985
- Parish CA, Jiang H, Tokiwa Y, *et al.* Broad-Spectrum antibacterial activity of hemoglobin [J]. Bioorganic Medicine Chemistry. 2001, 9: 377-382.
- Patgaonkar M, Aranha C, Bhonde G, *et al.* Identification and characterization of antimicrobial peptides from rabbit vaginal fluid [J]. Vet Immunol and Immunop, 2011, 139: 176-186.
- Pohnert G. Phospholipase A2 activity triggers the wound-activated chemical defense in the diatom *Thalassiosira rotula* [J]. Plant Physiol. 2002, 129:103–111.
- Rajanbabu V, Chen JY. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future [J]. Peptides, 2011, 32: 415–420.
- Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, *et al.* Cathelicidin: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity [J]. Microbes Infect, 2002, 4:361-372.
- Ramos C, Pietri R, Lorenzo W, *et al.* Recombinant Hemoglobin II From *Lucina*

- pectinata*: A Large-Scale Method For Hemeprotein Expression in *E. coli* [J]. Protein J. 2010, 29(2):143-51.
- Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T, *et al.* Precursor processing by kex2/furin proteases [J]. Chem Rev. 2002, 102(12):4525-4548.
- Sang Y, Teresa Ortega M, Rune K, *et al.* Canine cathelicidin (K9CATH): gene cloning, expression, and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide [J]. Dev Comp Immunol. 2007, 31(12):1278-1296.
- Schally AV, Huang WY, Redding TW, *et al.* Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the alpha-chain of porcine hemoglobin [J]. Biochem Biophys Res Commun. 1978, 82: 582-588.
- Schelshorn DW, Schneider A, Kuschinsky W, *et al.* Expression of hemoglobin in rodent neurons [J]. J Cereb Blood Flow Metab. 2009, 29:585-595.
- Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity [J]. Eur J Pharmacol. 2009, 625(1-3):190-194.
- Scocchi M, Pallavicini A, Salgaro R, *et al.* The salmonid cathelicidin: A gene family with highly varied C-terminal antimicrobial domains [J]. Comp Biochem Physiol B. 2009, 152: 376-381.
- Scocchi M, Zelezetsky I, Benincasa M, *et al.* Structural aspects and biological properties of the cathelicidin PMAP-36 [J]. FEBS J. 2005, 272(17):4398-406.
- Sigurdardottir SL, Thorleifsdottir RH, Guzman AM, *et al.* The antimicrobial peptide LL-37 modulates immune responses in the palatine tonsils where it is exclusively expressed by neutrophils and a subset of dendritic cells [J]. Clin Immunol. 2012, 142: 139-149.
- Skerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, *et al.* Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides [J]. Antimicrob Agents Chemother. 2001, 45(3):715-722.
- Smith VJ, Desbois AP, Dyrinda EA. Conventional and Unconventional antimicrobials from Fish, Marine Invertebrates and Micro-algae[J]. Mar.Drugs. 2010, 8: 1213-1262.
- Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, *et al.* Human cathelicidin, hCAP-18, is processed

- to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3 [J]. *Blood*. 2001, 97(3): 951-959.
- Srihongthong S, Pakdeesuwan A, Daduang S, *et al*. Complete amino acid sequence of globin chains and biological activity of fragmented crocodile hemoglobin (*Crocodylus siamensis*) [J]. *Protein J*. 2012. 31(6):466-476.
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, *et al*. Primary Structure and Characteristics of a Lectin from Skin Mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *J Biol Chem* 2002; 277: 27305-27311.
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, *et al*. Primary Structure and Characteristics of a Lectin from Skin Mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *J Biol Chem*. 2002, 277: 27305-27311.
- Tasumi S, Yang WJ, Usami T, *et al*. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Dev Comp Immunol*. 2004, 28: 325-335.
- Treffers C, Chen L, Anderson RC, *et al*. Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils [J]. *Int J Antimicrob Agents*. 2005, 26(2): 165-169.
- Ullal AJ, Litaker RW, Edward J, *et al*. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, *Rafinesque*) [J]. *Dev Comp Immunol*. 2008, 32: 1301-1312.
- Uzzell T, Stolzenberg ED, Shinnar AE, *et al*. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidin [J]. *Peptides*, 2003, 24: 1655-1667.
- Ventura S. Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility [J]. *Microb Cell Fact*. 2005, 4(1):11-18.
- Villaverde A, Carril M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(17):1385-1395.
- Welch WD, Rose DM, Carlson R. Reduced hemoglobin as an inhibitor of human polymorphonuclear leukocyte bacterial killing. Role of hemoglobin oxygen tension in polymorphonuclear function [J]. *Surgery*, 1982, 91:75-80.
- Wu M, Hancock RE. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide

- bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 29-35.
- Wu M, Hancock REW. Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide [J]. *J Antimicrob Chemother*. 1999, 43:1274-1276.
- Xu QH, Cheng Christina CH, Hu P, *et al*. Adaptive Evolution of Hecpidin Genes in Antarctic Notothenioid Fishes [J]. *Mol Biol Evol*. 2008, 25(6):1099-1112.
- Yan XW, Zhong J, Liu H, *et al*. The cathelicidin-like peptide derived from panda genome is a potential antimicrobial peptide [J]. *Gene*. 2012, 492: 368-374.
- Yang M, Wang KJ, Chen JH, *et al*. Genomic organization and expression analysis of a hepcidin-like gene from black porgy (*spargrus macrocephalus*) [J]. *Fish Shell Immunol*. 2007, 23:1060-1071.
- Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidin, essential gene-encoded mammalian antibiotics [J]. *J Mol Med*. 2002, 80: 549-561.
- Zarembek KA, Katz SS, Tack BF, *et al*. Host defense functions of proteolytically processed and parent (unprocessed) cathelicidin of rabbit granulocytes [J]. *Infect Immun*. 2002, 70(2): 569-576.
- Zhang GL, Ross CR, Blehna F. Porcine antimicrobial Peptides: new ProsPeets for ancient moleeules of host defense [J]. *Vet Res*. 2000, 31:277-296.
- Zhang H, Yuan QP, Zhu YP, *et al*. Expression and preparation of recombinant hepcidin in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*. 2005, 41:409-416.
- Zhang JJ, Yan QP, Ji RX, *et al*. Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Fish Shell Immunol* . 2009, 26:864-870.
- Zhao C, Nguyen T, Boo L M, *et al*. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the Rhesus monkey [J]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, 45 (10): 2695-2702.
- Zhao QY, Piot JM, Gautier V, *et al*. Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45: 778-784.
- Zou J, Mercier C, Koussounadis A, *et al*. Discovery of multiple beta-defensin like

- homologues in teleost fish [J]. *Mol Immunol.* 2007, 44:638-647.
- 冯云, 杨云霞, 黄宁等. 人抗菌肽 FALL-39 在大肠杆菌中高效表达[J]. *生物医学工程杂志*, 2003, 20(4):634-637.
- 荆昭, 毛蚶 (*Scapharca Kagoshimensis*) 血红蛋白的类酚氧化酶性质及其抗菌活性研究[D]. 博士论文, 中国海洋大学, 2011.
- 汪青, 林志华, 包永波等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)血红蛋白基因(Tg-HbIIA)克隆、分析及免疫表达研究[J].*海洋与湖沼*, 2012, 43: 88-94.
- 汪青, 项荣花, 包永波等. 动物血红蛋白研究进展 [J]. *宁波大学学报*, 2011, 24(2):20-23.
- 王沛珍. Thanatin 的原核表达、纯化及其抗菌活性的检测[D]. 硕士论文, 南方医科大学, 广州. 2010.
- 王晓露. 大黄鱼抗菌肽的分离纯化及其在大肠杆菌中 GST 融合表达[D]. 硕士论文, 集美大学, 2009.
- 王延卓. 猪血中抗菌肽的提取及体外抗菌活性研究[D]. 硕士论文, 吉林农业大学, 长春. 2010.
- 王增, 马会勒, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29 (7): 102-107.
- 王中强, 汪以真. Cathelicidin 类抗菌肽研究进展[J].*中国兽药杂志*, 2003, 37(11): 30-34.
- 徐同玲, 关瑞章, 黄文树, 等. 日本鳗鲡不同组织器官的抗菌活性比较[J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2010,15 (3): 172-178.
- 张艳梅, 余锐萍, 刘天龙等. 猪血中抗菌肽类物质的分离纯化和抗菌活性研究[J]. *科技导报*, 2008,26:33-37.
- 张艳秋, 詹勇, 许梓荣. 鱼类免疫机制及影响因子[J]. *水产养殖*, 2005; 26:1-5.

附录

一 在学期间科研情况

1 攻读学位期间论文发表情况

- 1) Zhang DL, Guan RZ, Huang WS, *et al.* Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha in the liver of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2012, DIO. 10.1016/j.fsi. 2012. 08.022.
- 2) 张东玲, 宋振荣. “问题式教学法在组织胚胎学教学中的体会”. *黑龙江畜牧兽医杂志*, 2012, 1: 41-42.
- 3) 刘玉琴, 杨彩然, 张东玲, 佟恒敏. 中药防治鸡传染性支气管炎的实验观察. *中国兽医杂志*, 2009, 45(6):47-49.
- 4) 熊静, 关瑞章, 王艺磊, 张东玲. 鱼类实验动物研究概况及标准化研究过程面临的主要问题. *实验动物与比较医学*, 2012, 32(4):366-370

2 攻读学位期间参加的科研项目

- 1) “农业部公益性行业（农业）科研专项”子项目—“鳗鱼抗菌肽和免疫球蛋白的研发”
- 2) “国家自然科学基金”（面上）项目—“拟穴青蟹一种阴离子抗菌肽在精子和卵子成熟过程中的作用研究”
- 3) “省科技厅重点”——“鲍健康种苗培育关键技术示范与推广”

3 获奖情况

获得刘瑞玉海洋科学奖学金（2012）

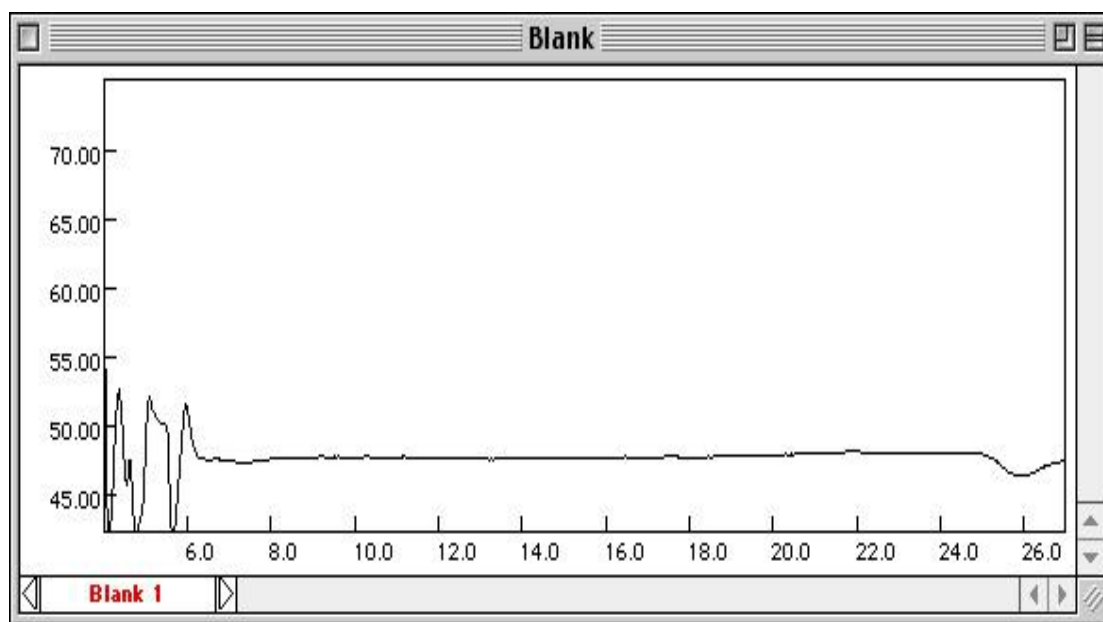
二 AjHb α 的 N-末端测序结果

图 1 AjHb α 的 N-末端测序结果。空白样品图谱。结果显示基线稳定。

Fig.1 N-terminal sequencing of AjHb α . Blank. The result showed that base line was stable.

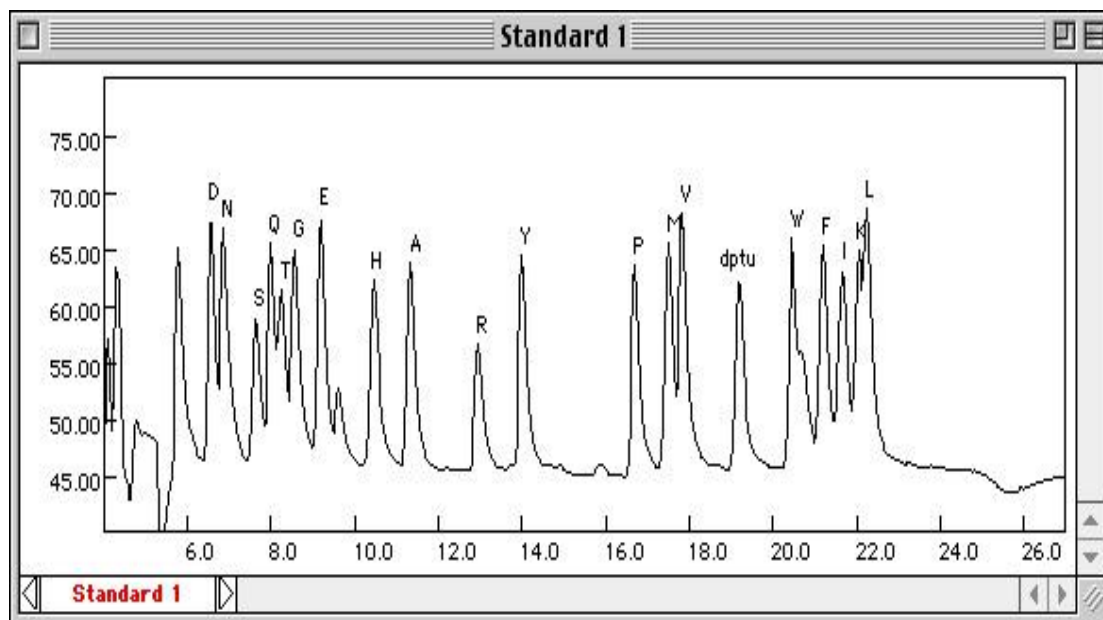


图 2 AjHb α 的 N-末端测序结果。氨基酸标准样品图谱。

Fig. 2 N-terminal sequencing of AjHb α . Standard amino acid.

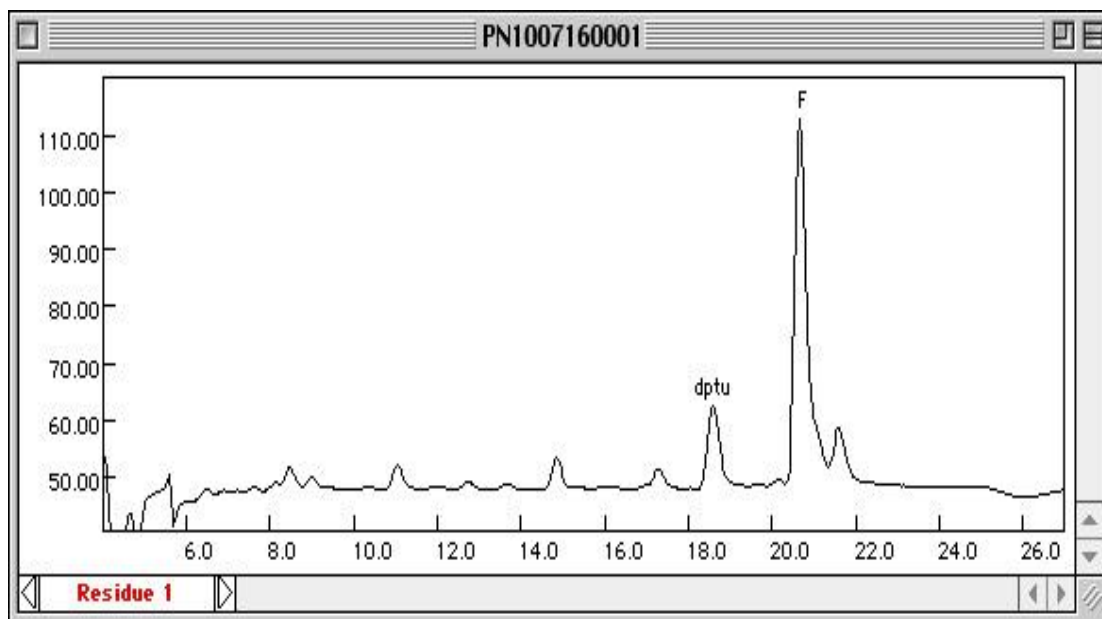


图 3 抗菌肽 AjHba N-末端第 1 个氨基酸残基的测序结果图。第 1 个氨基酸为苯丙氨酸。

Fig. 3 The 1st amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 1st amino acid was Phe.

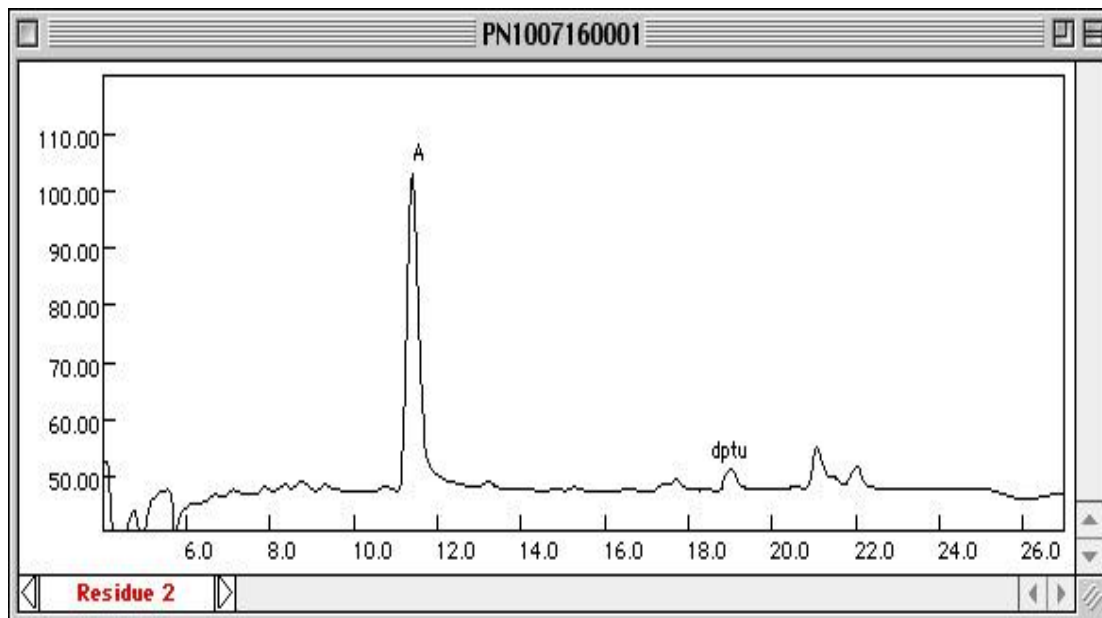


图 4 抗菌肽 AjHba N-末端第 2 个氨基酸残基的测序结果图。第 2 个氨基酸为丙氨酸。

Fig. 4 The 2nd amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 2nd amino acid was Ala.

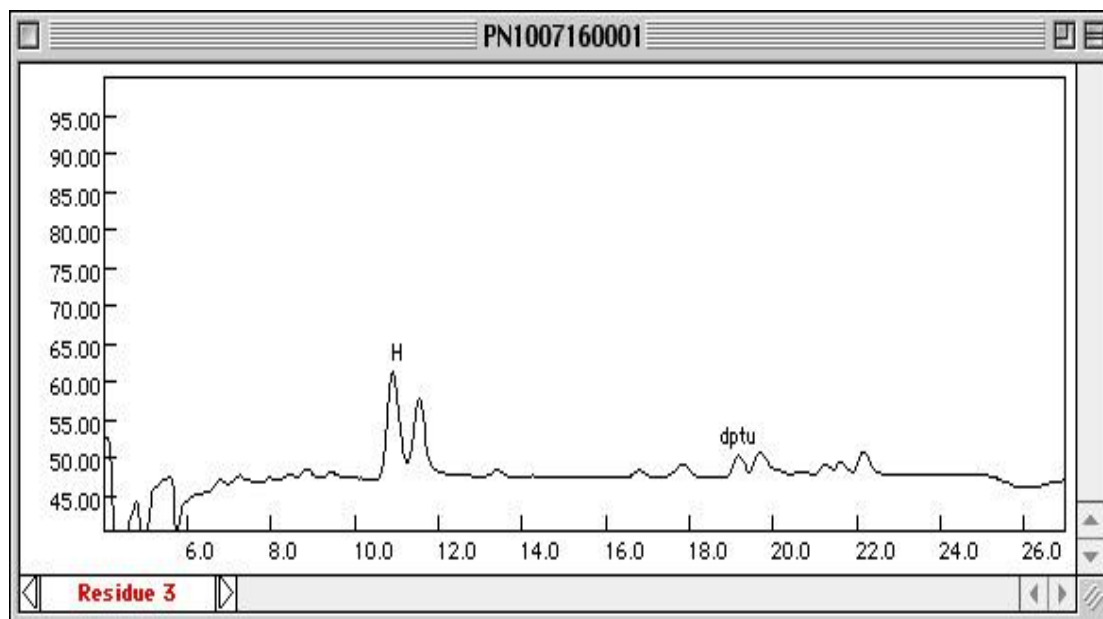


图 5 抗菌肽 AjHba N-末端第 3 个氨基酸残基的测序结果图。第 3 个氨基酸为组氨酸。

Fig. 5 The 3rd amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 3rd amino acid was His.

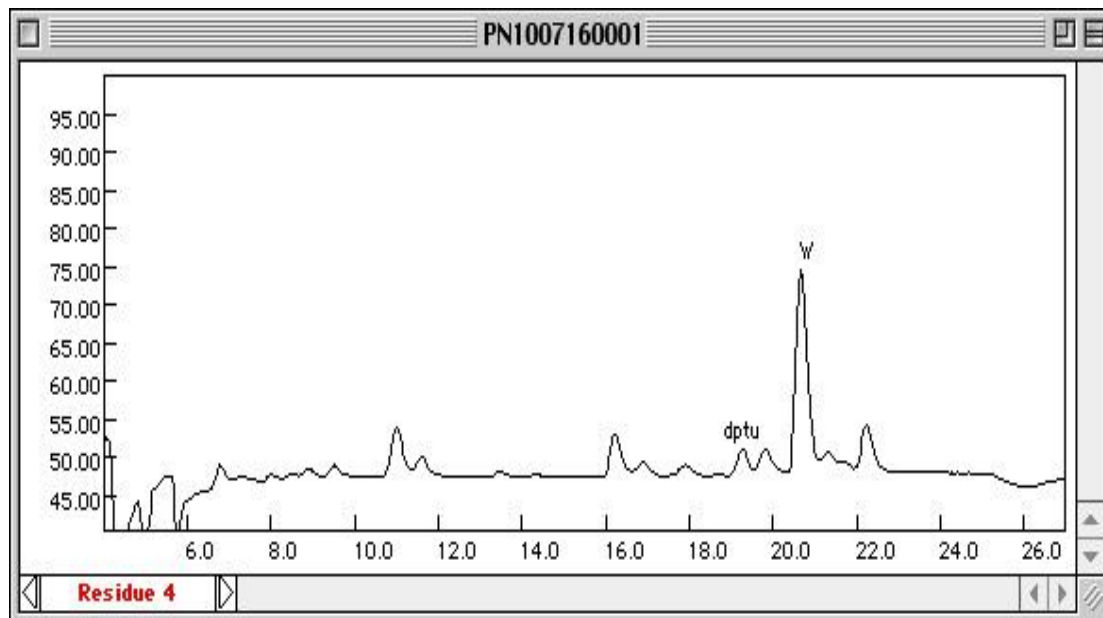


图 6 抗菌肽 AjHba N-末端第 4 个氨基酸残基的测序结果图。第 4 个氨基酸为色氨酸。

Fig. 6 The 4th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 4th amino acid was Trp.

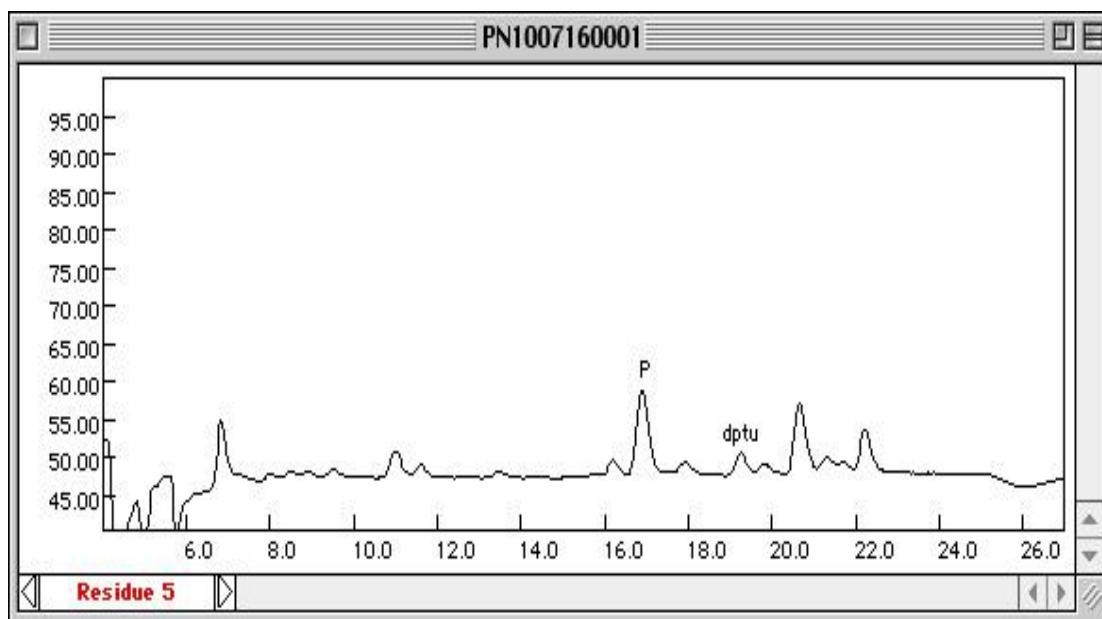


图 7 抗菌肽 AjHba N-末端第 5 个氨基酸残基的测序结果图。第 5 个氨基酸为脯氨酸。

Fig. 7 The 5th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 5th amino acid was Pro.

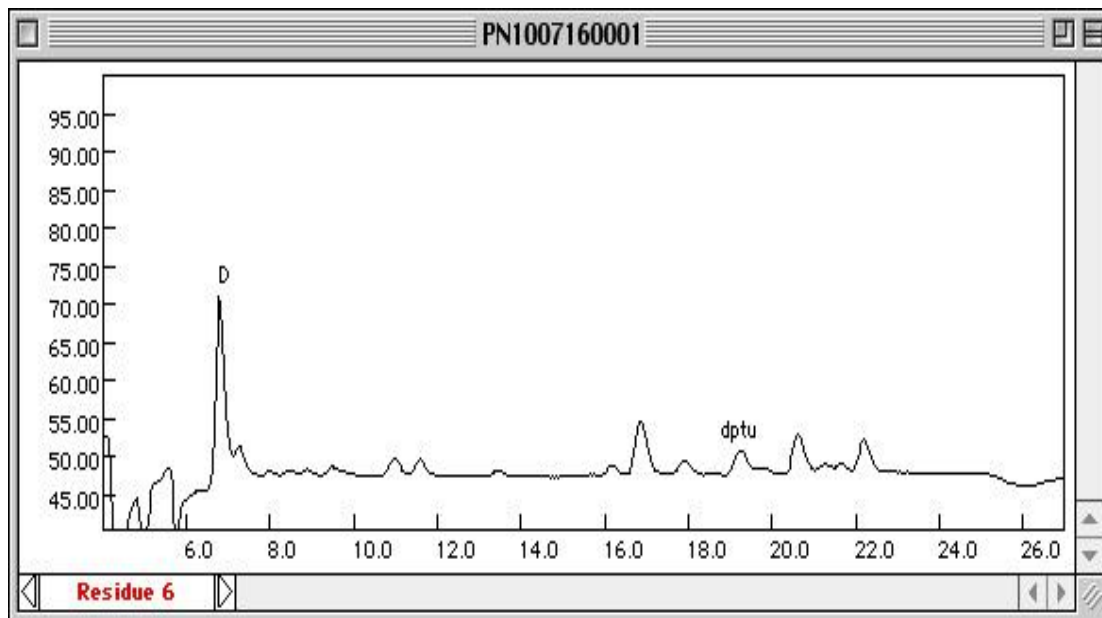


图 8 抗菌肽 AjHba N-末端第 6 个氨基酸残基的测序结果图。第 6 个氨基酸为天冬氨酸。

Fig. 8 The 6th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 6th amino acid was Asp.

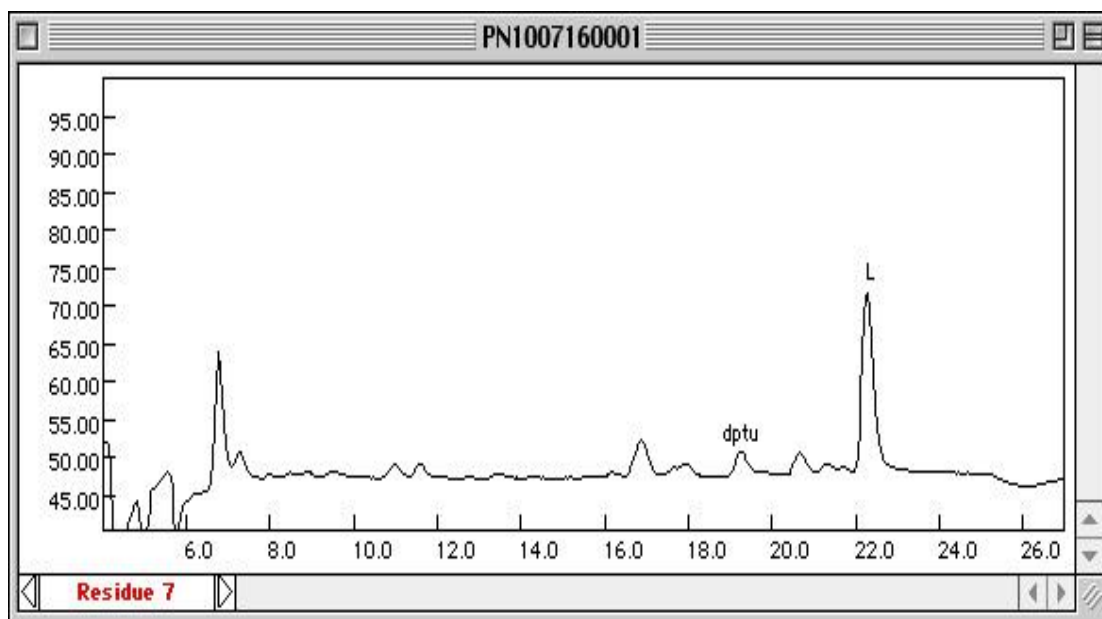


图 9 抗菌肽 AjHba N-末端第 7 个氨基酸残基的测序结果图。第 7 个氨基酸为亮氨酸。

Fig. 9 The 7th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 7th amino acid was Leu.

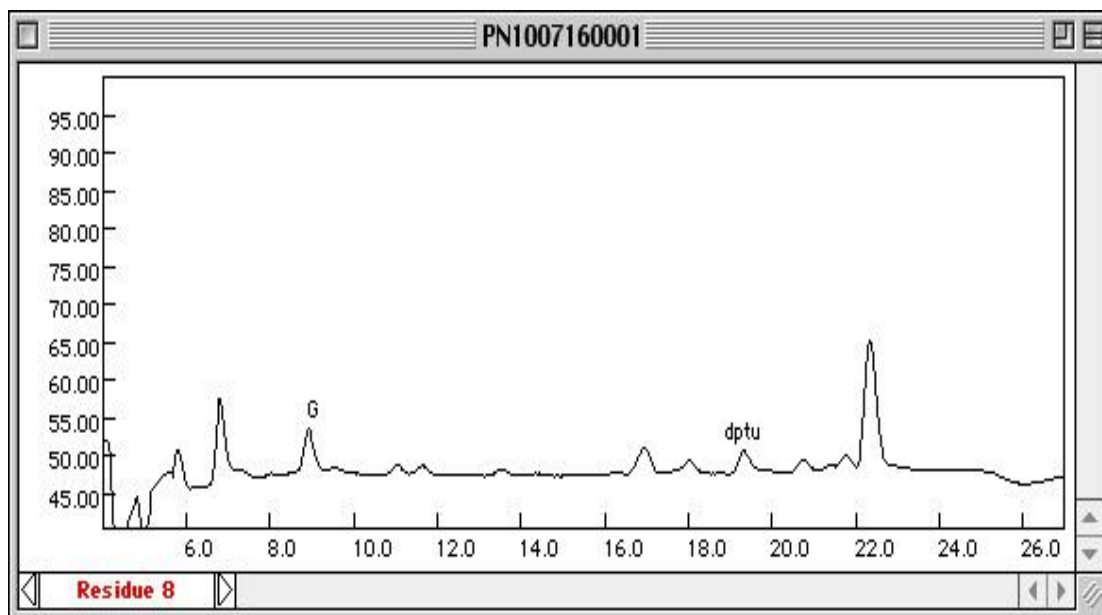


图 10 抗菌肽 AjHba N-末端第 8 个氨基酸残基的测序结果图。第 8 个氨基酸为甘氨酸。

Fig. 10 The 8th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 8th amino acid was Gly.

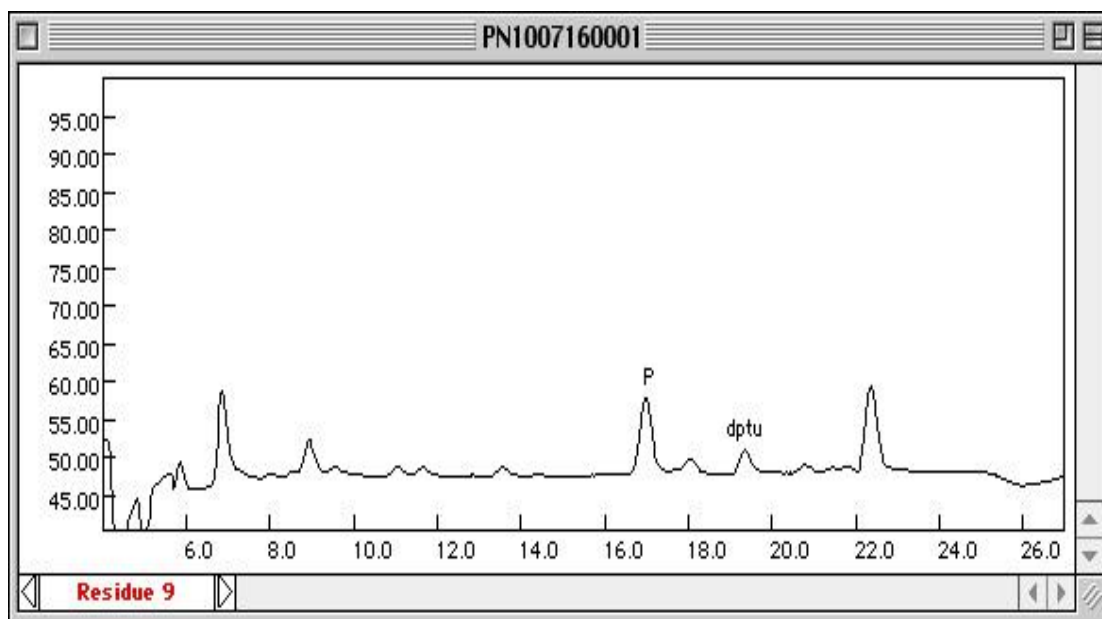


图 11 抗菌肽 AjHba N-末端第 9 个氨基酸残基的测序结果图。第 9 个氨基酸为脯氨酸。

Fig. 11 The 9th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 9th amino acid was Pro.

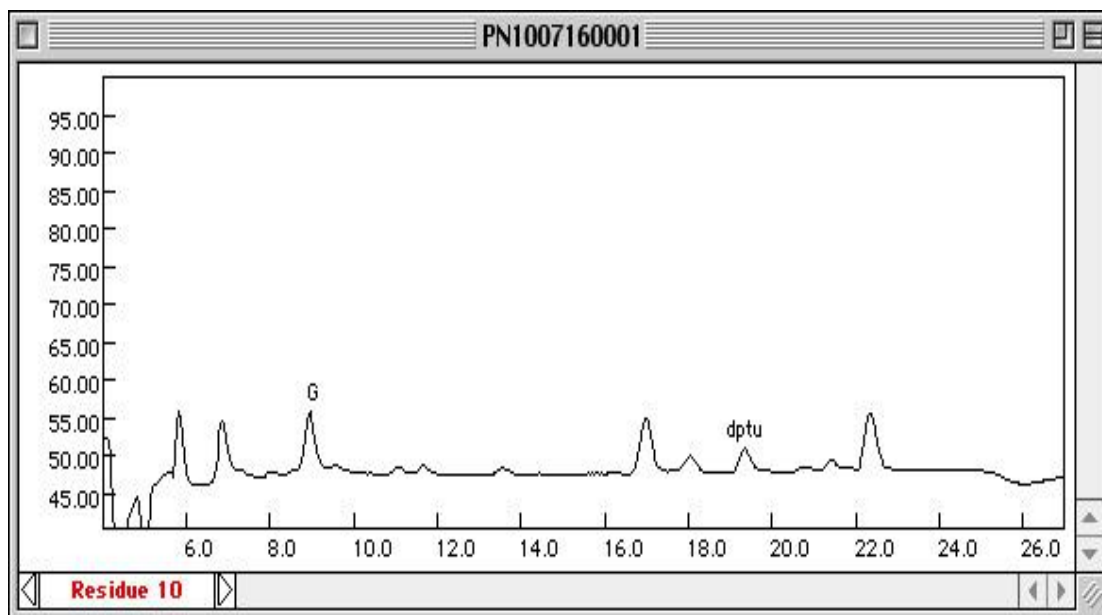


图 12 抗菌肽 AjHba N-末端第 10 个氨基酸残基的测序结果图。第 10 个氨基酸为甘氨酸。

Fig. 12 The 10th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 10th amino acid was Gly.

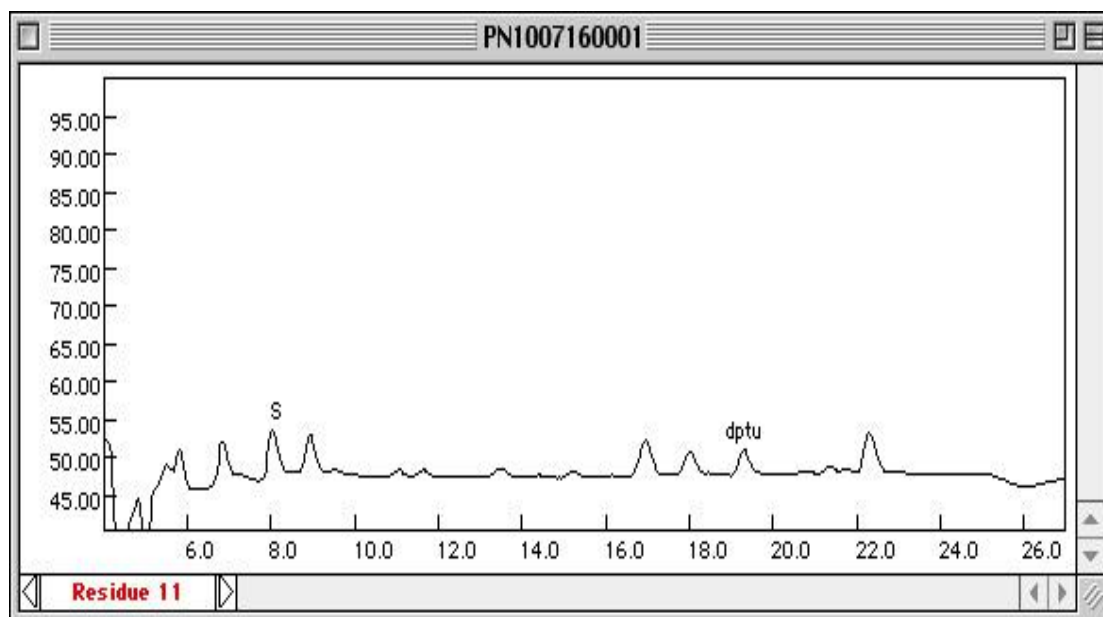


图 13 抗菌肽 AjHb α N-末端第 11 个氨基酸残基的测序结果图。第 11 个氨基酸为丝氨酸。

Fig. 13 The 11th amino acid residue of AjHb α N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 11th amino acid was Ser.

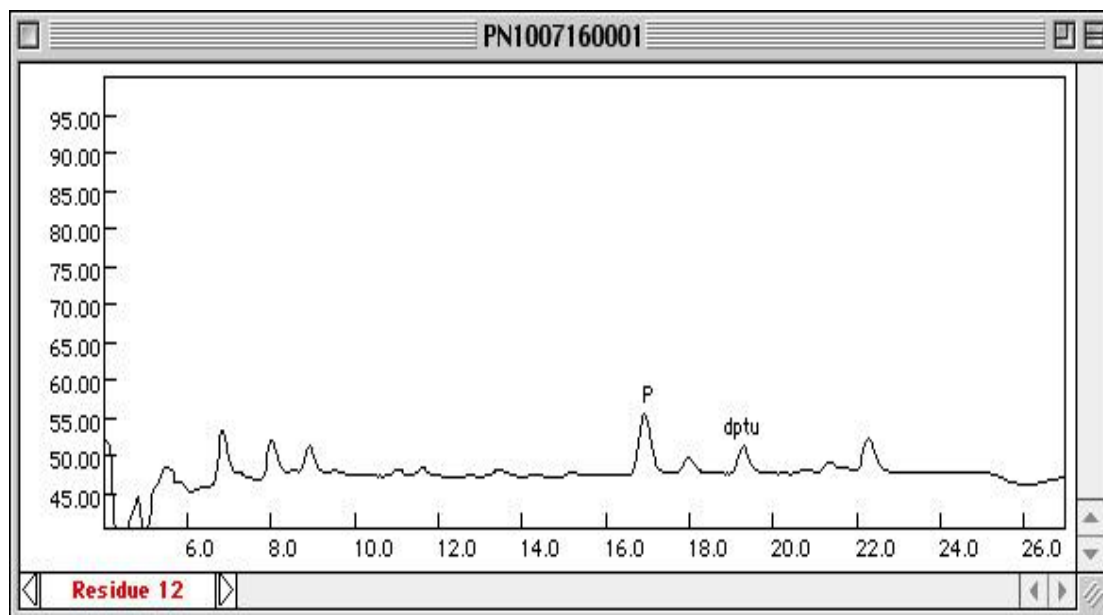


图 14 抗菌肽 AjHb α N-末端第 12 个氨基酸残基的测序结果图。第 12 个氨基酸为脯氨酸。

Fig. 14 The 12th amino acid residue of AjHb α N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 12th amino acid was Pro.

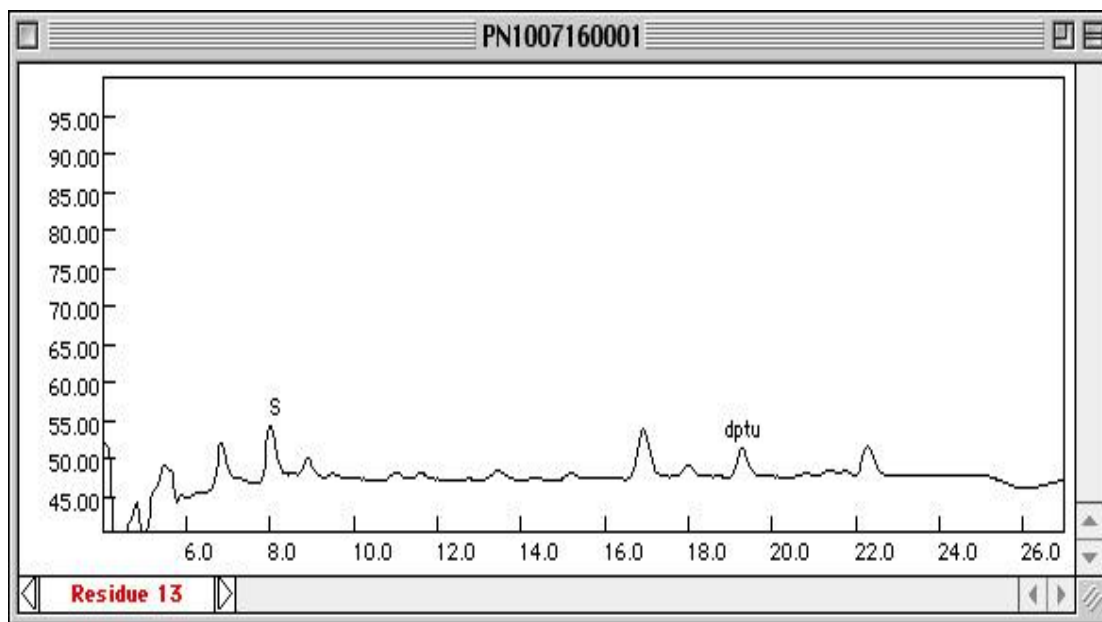


图 15 抗菌肽 AjHb α N-末端第 13 个氨基酸残基的测序结果图。第 13 个氨基酸为丝氨酸。

Fig. 15 The 13th amino acid residue of AjHb α N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 13th amino acid was Ser.

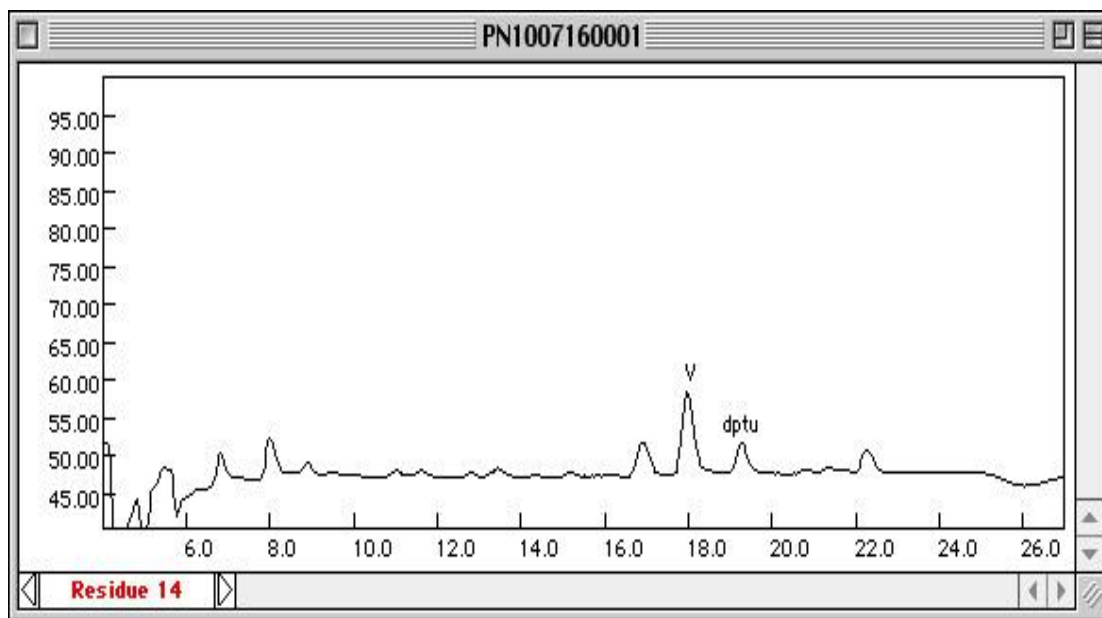


图 16 抗菌肽 AjHb α N-末端第 14 个氨基酸残基的测序结果图。第 14 个氨基酸为缬氨酸。

Fig. 16 The 14th amino acid residue of AjHb α N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 14th amino acid was Val.

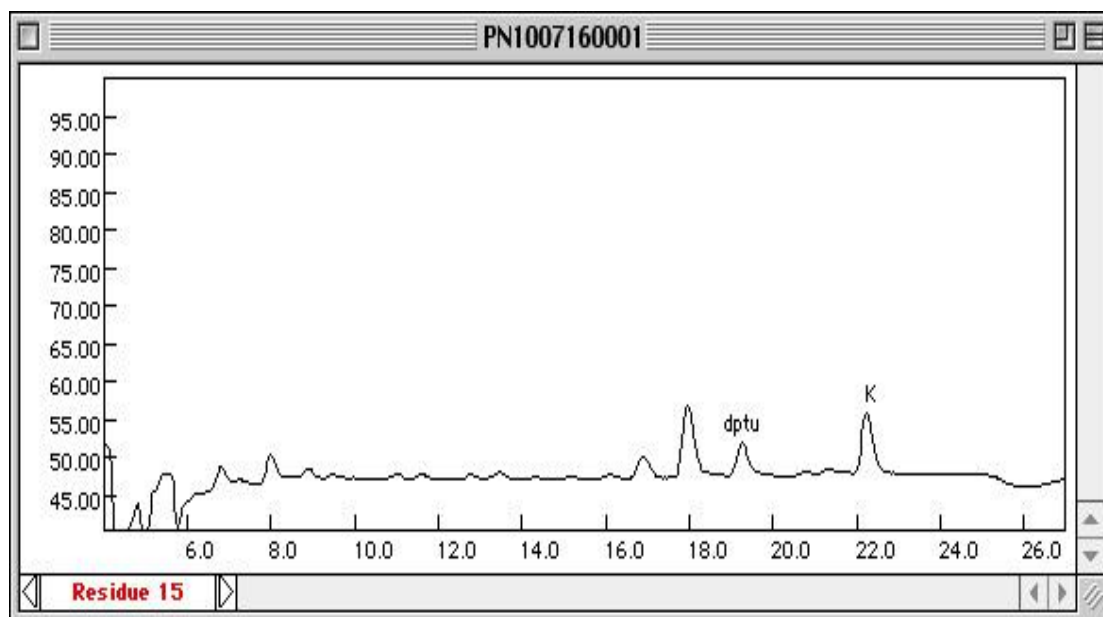


图 17 抗菌肽 AjHba N-末端第 15 个氨基酸残基的测序结果图。第 15 个氨基酸为赖氨酸。

Fig. 17 The 15th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 15th amino acid was Lys.

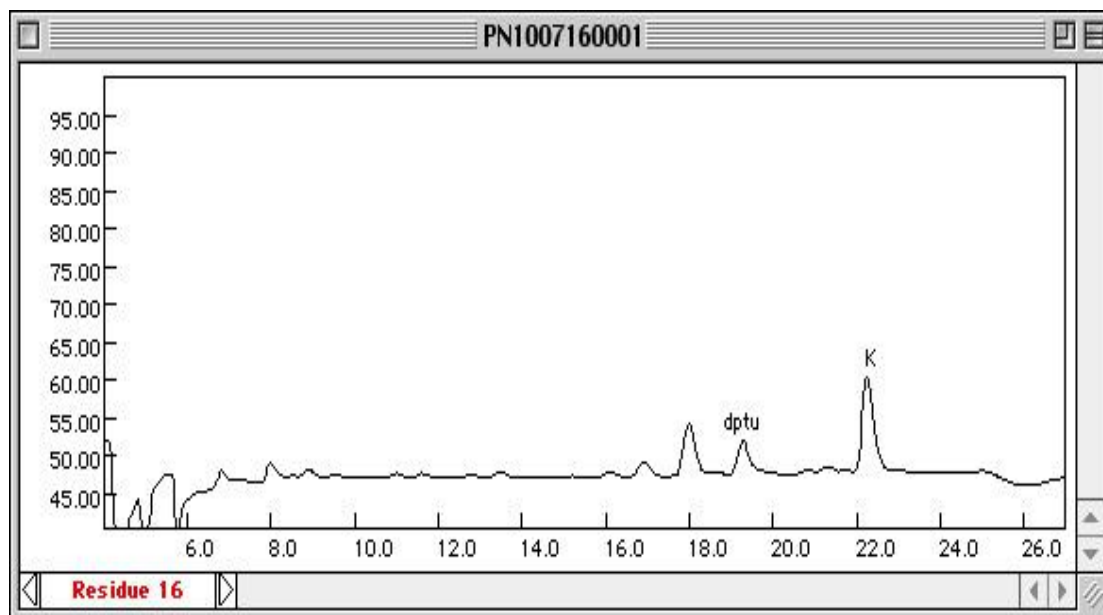


图 18 抗菌肽 AjHba N-末端第 16 个氨基酸残基的测序结果图。第 16 个氨基酸为赖氨酸。

Fig. 18 The 16th amino acid residue of AjHba N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 16th amino acid was Lys.

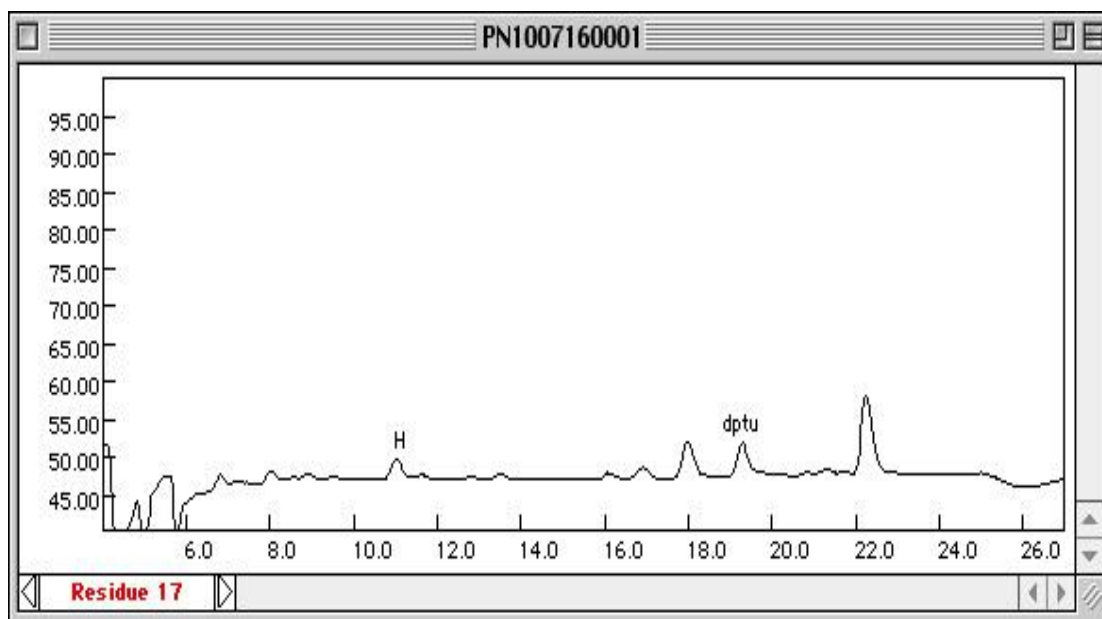


图 19 抗菌肽 AjHb α N-末端第 17 个氨基酸残基的测序结果图。第 17 个氨基酸为组氨酸。

Fig. 19 The 17th amino acid residue of AjHb α N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 17th amino acid was His.

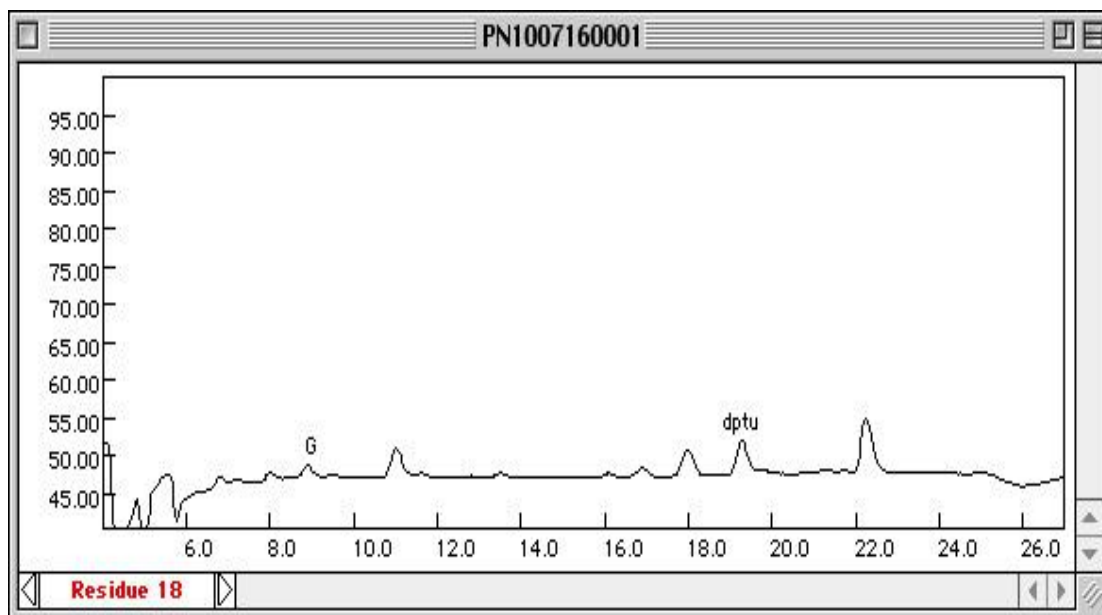


图 20 抗菌肽 AjHb α N-末端第 18 个氨基酸残基的测序结果图。第 18 个氨基酸为甘氨酸。

Fig. 20 The 18th amino acid residue of AjHb α N-terminal was analyzed using Edman degradation. The 18th amino acid was Gly.

致谢

感谢农业部公益性行业（农业）科研鳗鲡专项基金（nyhyzx07-043）对本论文的支持。

向培育我的中科院水生生物研究所和集美大学致以最崇高的敬意。

在论文完成之际，谨向给予我指导和帮助的所有老师、师弟、师妹、亲人和朋友表示衷心的感谢。

本文是在导师关瑞章悉心指导下完成的，我衷心的感谢我的恩师关瑞章教授对我的谆谆教诲与悉心关怀。在我博士的四年里，他开阔的胸怀，严谨的治学态度，对事业兢兢业业的追求精神，谦虚严谨的工作作风，律己恕人的人格品质，将使我永生难忘、受益终身，是我学习的楷模。在此向恩师致以深深的谢意！

借此机会，向黄文树老师表示感谢，衷心感谢黄文树老师几年来所给予的关心、指导和帮助。他待人诚恳、诲人不倦，学识渊博、治学严谨、技术全面。同时，感谢刘爱原老师、陈学豪老师、江兴龙老师、周立红老师、郭松林老师、冯建军老师、熊静老师、梁英老师、徐继松老师、刘宏伟老师、鄢庆枇老师、覃映雪老师、王志勇老师、李忠琴老师、姚翠鸾老师的大力支持和帮助；感谢靳恒等师弟师妹，学生姚志贤和段利朋试验期间及日常生活上的热情帮助和提供的诸多方便。特别感谢集美大学邹志华老师和韩芳老师在具体试验过程中提供的热情无私的指导和帮助。

特别感谢中科院水生生物研究所聂品教授与厦门大学彭会博士提供的热心指导和帮助，十分感谢研究生处冯玺、赵东辉、廖彩萍老师提供的诸多方便。

在此之际，感谢我的先生宋宝东，感谢你的包容和疼爱，是你让我懂得了什么是“爱”。当我身心疲惫的时候，是你给了我宽厚的臂膀让我依靠，跟你在一起真的很幸福。

感谢我的宝宝一宋明贤，你带给我太多的感动和欢乐。感谢我的婆婆、公公我的父母、亲人和朋友。特别是我的婆婆和公公多年来对我和孩子的照顾。

最后向百忙中来参加我论文答辩的全体专家和同学们表示感谢！