

中华鲟抗菌肽 Hecpidin 的克隆、表达及其抗菌活性分析

高宇 陈昌福 李大鹏 谭晶晶 袁改玲

(华中农业大学水产学院, 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 武汉 430070)

CLONING, EXPRESSION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY ANALYSIS OF HEPCIDIN FROM CHINESE STURGEON (*ACIPENSER SINENSIS*)

GAO Yu, CHEN Chang-Fu, LI Da-Peng, TAN Jing-Jing and YUAN Gai-Ling

(Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture, College of Fisheries,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词: 中华鲟; Hecpidin; 克隆; 表达; 抗菌活性

Key words: *Acipenser sinensis*; Hecpidin; Cloning; Expression; Antimicrobial activity

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)02-0798-06

Hecpidin 也称为铁调素, 是在肝脏中特异表达的一种阳离子小分子抗菌肽。2000年, Krause, *et al.* 首先从人血液中分离纯化得到了由25个氨基酸组成的LEAP-1抗菌肽^[1]。2002年, Shike, *et al.* 首次从杂交条纹鲈的鳃分离出鱼类Hecpidin, 并从金眼狼鲈(*Morone chrysops*)克隆到cDNA及全基因序列^[2]。目前国内外学者通过利用RT-PCR等分子生物学技术已从多种鱼类中成功克隆到Hecpidin cDNA, 如真鲷(*Chrysophrys major*)^[3]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[4]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[5]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[6]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[7]、鲈鱼(*Lateolabrax japonica*)^[8]、黄鳝(*Monopterus albus*)^[9]等。

中华鲟(*Acipenser sinensis*)在分类上属鲟形目(Acipenseriformes), 鲟科(Acipenseridae), 鲟属(*Acipenser*)是一种大型的溯河洄游性鱼类, 是我国特有的古老珍稀鱼类^[10]。另外, 虽然鲟科鱼类属于硬骨鱼类, 较为低等, 但其进化地位及许多身体结构都与软骨鱼类相近, 是生物免疫系统进化树上重要的分枝点^[11, 12], 具有特殊的地位, 因而对它的基础研究将引起人们的日益关注。近几年的研究认为抗菌肽是鱼、虾、贝等防御系统的主要成分之一^[13-16], 因此研究中华鲟的抗菌肽Hecpidin将具有重要

的理论意义和实用价值。

虽然Hecpidin可从尿液中分离获得, 但尿液中Hecpidin质量浓度仅为10—30 μg/L^[17], 因此, 采用基因工程方法制备Hecpidin将具有很大优势。本研究通过RT-PCR等分子生物学技术, 从中华鲟血液中克隆获得抗菌肽Hecpidin基因, 并利用基因工程技术建立该基因去信号肽后序列的高效表达融合载体, 通过转化到毕赤酵母中进行诱导表达, 并通过牛津杯法证实其实体外抗菌活性。本研究将为研制新型的、可替代抗生素的、有效抗水产养殖品种鱼类主要病原体(特别是耐药性细菌)的药物或饲料免疫添加剂等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华鲟由华中农业大学水产学院渔业资源与环境课题组所养殖。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115、酵母表达载体pPICZαA、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为本实验室保存; 大肠杆菌TOP10感受态细胞购自北京天根生物科技有限公司; *EcoR* I, *Not* I, *Bst*X I, *Taq*

收稿日期: 2011-02-16; 修订日期: 2011-12-06

基金项目: 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室课题资助

作者简介: 高宇(1985—), 男, 云南楚雄人; 硕士; 主要从事鱼类疾病与免疫方面的研究。E-mail: gaoyu_8848@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 袁改玲, E-mail: yuangailing@mail.hzau.edu.cn

DNA 聚合酶, Trizol, RNase free H₂O, X-gal, IPTG, DNA Marker DL2000, T4 DNA 连接酶, 反转录试剂盒, pMD19-T 克隆载体购自 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收试剂盒, 质粒小量提取试剂盒购自 Axygen Biosciences 公司; 氨苄青霉素(Amp)购自 Amresco 公司; ZeocinTM 购自 Invitrogen 公司; Gel-red 核酸染液购自 Biotum 公司; 胰化蛋白胨(bacto-tryptone)、酵母提取物(bacto-yeast extract) 购自英国 OXOID 公司; 脑心浸液 BHI 培养基购自美国 BD 公司; 琼脂糖为西班牙进口分装; 琼脂粉为 Agar 日本分装; 其他常规试剂都为国产分析纯配制。

1.2 引物设计

根据 NCBI/GenBank 上已登录鱼类 Hecpudin 序列信息, 根据序列的保守性, 用 Primer Premier 5.0 软件在 cDNA 序列 ORF 的上下游区域, 设计一对兼并引物(F1, R1); 表达引物加入酶切位点和终止密码子(F2, R2); 酵母通用引物为 5'AOX 和 3'AOX。所有引物均由华大基因生物公司合成。序列如下: F1: 5'-ACAYCAGAACWAACAYTC-3'; R1: 5'-CYACTTTTAYAGGCWTA-3'; F2: 5'-CGGAATTCAYCAGAACWAACAYTCG-3'(EcoR I); R2: 5'-TAGCGGCCGCTTAATTACAGCAATATCCAC-3'(Not I); 5'AOX: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'; 3'AOX: 5'-GCAAAATGGCATTCTGACATCC-3'。

1.3 中华鲟血液总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

试验用的玻璃器皿经 150℃ 烘烤 4h。塑料器皿经 0.1% DEPC 水处理。金属用具用 1 mol/L 的 NaOH 和 0.01% 的 DEPC 水处理。实验试剂均用无 RNase 的 0.1% DEPC 处理后的水配置。从中华鲟尾动脉用无菌一次性注射器吸取血液, 常温下 1000 r/min 离心 30min, 弃上清, 取 200.0 μL 血细胞加入 1.0 mL Trizol 试剂, 用匀浆器冰上研磨, 具体抽提步骤按 Trizol 试剂说明书进行。

经 1.0% 琼脂糖检测所提取 RNA 的质量, 微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度, 取 5.0 μg 总 RNA 作为模板, 采用 TaKaRa PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒中提供的 Oligo dT Primer 和 PrimeScriptTM RTase 逆转录酶在 40.0 μL 体系中合成 cDNA 链。

1.4 中华鲟 Hecpudin 基因的 PCR 扩增及克隆

Hecpudin cDNA 的 PCR 扩增反应体系(50.0 μL): Premix Taq 25.0 μL, 100.0 μmol/L F1、R1 各 0.5 μL, cDNA 2.0 μL, RNase free H₂O 22.0 μL。反应条件: 94℃ 下预变性 3min; 然后进行 30 个循环反应: 94℃ 下变性 30s, 55℃ 下退火 30s, 72℃ 下延伸 45min; 循环结束后在 72℃ 下延伸 10min。按 pMD19-T 克隆载体试剂盒说明书将目的基因与 pMD19-T 载体 16℃ 连接过夜, 然后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑筛选。经 PCR 鉴定后, 将阳性克隆送往华大基因生物工程技术服务有限公司测序。

1.5 重组表达质粒 pPICZαA-Hecpudin 的构建

用表达引物进行 PCR 扩增, 用 EcoR I 和 Not I 分别

酶切消化该扩增产物和表达载体 pPICZαA, 切胶回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶进行 16℃ 连接过夜, 转化 TOP10 感受态细胞, 在含有 25.0 μg/mL ZeocinTM 的 LLB 平板上进行筛选, 挑取菌落, 扩大培养, 用载体通用引物 5' AOX 和 3' AOX 进行 PCR 鉴定, 将鉴定正确的菌株送华大基因生物工程技术服务有限公司测序, 测序正确的质粒命名为 pPICZαA-Hecpudin。

1.6 重组质粒电转化毕赤酵母 GS115 及阳性酵母菌落的筛选

将毕赤酵母感受态 GS115(80.0 μL)与经 BstX I 线性化后的 pPICZαA-Hecpudin 质粒(20.0 μL)相混合, 转移至预冷的 0.2 cm 电转杯(Bio-Red)中, 置于冰上 5min, 2kV, 25μF, 400Ω, 电击 8 毫秒后, 立即加入 1.0 mL 预冷的 1.0 mol/L 山梨醇, 取 200.0 μL 分别涂布于含 ZeocinTM(100.0 μg/mL, 500.0 μg/mL, 1000.0 μg/mL)的 YPDS 平板上, 28℃ 培养 72h。同时电转化 pPICZαA 空载体。挑取阳性菌落用 YPD+ZeocinTM 振荡培养后, 采用煮冻煮法提取重组酵母基因组 DNA, 用 5' AOX 和 3' AOX 引物进行 PCR 检测, 以 pPICZαA 空载体酵母菌为阴性对照。

1.7 重组酵母菌的诱导表达与表达上清的浓缩

选择 PCR 鉴定为阳性的重组酵母菌落和 pPICZαA 空载体酵母菌接种于 1.0 mL 含 ZeocinTM(100 μg/mL)的 YPD 培养液中, 28℃, 250 r/min 振荡培养 12—16h; 转移至含 20.0 mL BMGY 培养基的 250.0 mL 锥形瓶中, 28℃, 250 r/min 振荡培养 12—16h, 使 A₆₀₀=2—6, 离心收集菌体弃去 BMGY 培养基。把适量菌体转移到含 100.0 mL BMMY 培养基的 1000.0 mL 锥形瓶中, 4 层纱布包扎瓶口, 使起始 A₆₀₀ 为 1 左右。在 28℃, 250 r/min 条件下开始甲醇诱导表达。每隔 24h, 向锥形瓶中加入终浓度为 0.8% 的甲醇。甲醇诱导 72h 后, 4℃ 10000 r/min 离心收集表达上清, 并利用硫酸铵沉淀法浓缩上清。

1.8 表达产物抗菌活性检测

采用牛津杯法对重组酵母菌表达上清液进行抑菌活性测定: 在 LB 培养基上划线金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌, 在 BHI 培养基上划线无乳链球菌和嗜水气单胞菌, 培养至单克隆长出。用 0.65% 无菌生理盐水稀释待测菌株至 A₆₀₀ 为 0.5—1.0, 吸取 50.0 μL 待测菌液加至已冷却到 50℃ 以下的液态 LB 和 BHI 固体培养基和中, 混匀后倒平板。在凝固的平板上放置已灭菌的牛津杯, 向牛津杯中加入 100.0 μL 浓缩诱导表达上清, 分别以同体积的 Amp(0.005 μg/μL)为阳性对照, pPICZαA 空载体转化酵母表达蛋白为阴性对照。培养至菌体长出, 观察抑菌圈大小。金黄色葡萄球菌培养温度为 37℃, 枯草芽孢杆菌、无乳链球菌和嗜水气单胞菌培养温度为 28℃。

2 结果

2.1 中华鲟 Hecpudin cDNA 的 PCR 扩增与序列分析

经测序鉴定, 以中华鲟 cDNA 为模板, F1、R1 为引

物扩增出 327 bp 的 PCR 产物(图 1)。通过 NCBI 中 BLAST, 查找 GenBank 中已登录的同源序列。结果显示试验获得的序列与 Hepcidin cDNA 序列之间具有很高的同源性。为了追踪中华鲟 Hepcidin 的分子进化, 以核苷酸序列为分子标记, 利用 MEGA4 软件中邻接法(NJ)构建 11 个物种 Hepcidin 系统发育树(图 2)。结果表明, 以哺乳类(人类和小家鼠)为外群, 可以识别出 2 个单系类群: 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)、小口黑鲈(*Micropterus dolomieu*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、三长棘赤鲷(*Pagrus auriga*)聚类为类群 I (bootstrap 100); 非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、中华鲟(*Acipenser sinensis*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)聚类为类群 II (bootstrap 99)。

2.2 重组表达质粒 pPICZαA-Hepcidin 的构建

经测序鉴定, 以 Hepcidin 质粒为模板, F2、R2 为引物扩增出约 171 bp 的 PCR 产物。经 *EcoR* I 和 *Not* 双酶切后, 连接到同样经过 *EcoR* I 和 *Not* 酶切的质粒 pPICZαA 上, 经酶切鉴定(图 3)和 DNA 测序结果证明核苷

酸序列和插入方向完全正确。这说明已成功构建出毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZαA-Hepcidin。

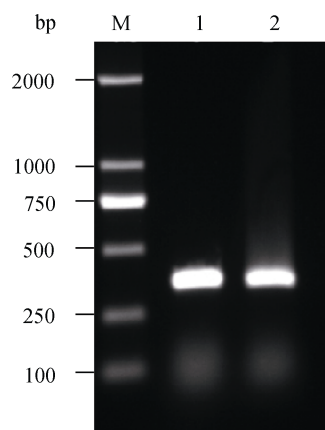


图 1 中华鲟 Hepcidin 基因 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR products of Hepcidin of *Acipenser sinensis*
M. DL2000 DNA 标准; 1、2. 中华鲟 Hepcidin 扩增产物
M. DL2000 DNA marker; 1, 2. Hepcidin of *Acipenser sinensis*

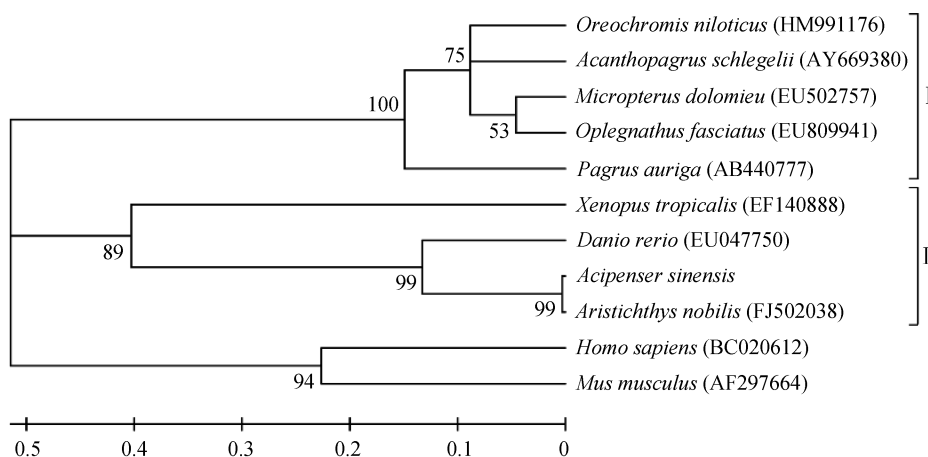


图 2 用邻接法(NJ)构建的 11 个物种 Hepcidin 核苷酸序列系统发育树

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

Oreochromis niloticus: 尼罗罗非鱼; *Acanthopagrus schlegelii*: 黑鲷; *Micropterus dolomieu*: 小口黑鲈; *Oplegnathus fasciatus*: 条石鲷; *Pagrus auriga*: 三长棘赤鲷; *Homo sapiens*: 人类; *Mus musculus*: 小家鼠; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Acipenser sinensis*: 中华鲟; *Aristichthys nobilis*: 鳙; *Xenopus tropicalis*: 非洲爪蟾

2.3 阳性酵母菌落的筛选与鉴定

PCR 扩增结果显示, 阳性重组子扩增出 2.2 kb (AOX)和 500 bp 左右的(pPICZαA 上、下游引物之间序列长度与插入的目的片段长度之和)两条带(图 4), 与预期结果相符。

2.4 表达产物抗菌活性检测

通过抑菌平板实验表明: 氨苄青霉素和重组抗菌肽 Hepcidin 均对金黄色葡萄球菌和无乳链球菌产生了较大的抑菌圈(图 5); 重组抗菌肽 Hepcidin 对嗜水气单胞菌作用明显, 但氨苄青霉素作用不明显(图 6); 重组抗菌肽 Hepcidin 对枯草芽孢杆菌作用不明显, 抑菌圈仅出现边

缘模糊, 但氨苄青霉素作用明显(图 7); 用转化 pPICZαA 空载体均无抑菌圈产生。这表明重组抗菌肽 Hepcidin 对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和嗜水气单胞菌具有较强的抑菌活性。

3 讨论

Hepcidin 是一类新颖的小分子抗菌多肽, 属于防卫素蛋白家族, 是机体天然免疫的重要效应分子。有关 Hepcidin 及其生理学作用的基础性研究国内外已有了很大的进展, 但是, 天然抗菌肽来源有限, 化学合成也存在成本高、批量生产困难, 且无抗菌活性或者活性很弱^[2, 18],

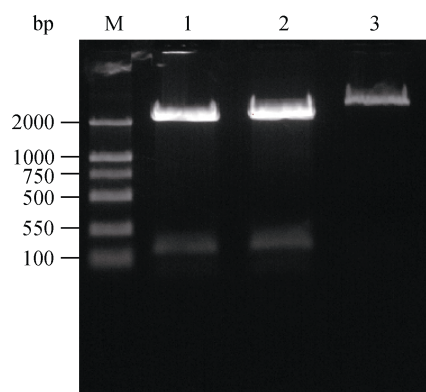


图 3 重组酵母载体 pPICZαA-Hepcidin 的酶切分析

Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant yeast expression vector pPICZαA-Hepcidin

M. DL2000 DNA 标准; 1, 2. 重组质粒 pPICZαA-Hepcidin *EcoR* I 和 *Not* 酶切产物; 3. 重组质粒 pPICZαA-Hepcidin

M. DL2000 DNA marker; 1, 2. Digested product of the Recombinant plasmid pPICZαA-Hepcidin with *EcoR* I and *Not* I; 3. Recombinant plasmid pPICZαA-Hepcidin

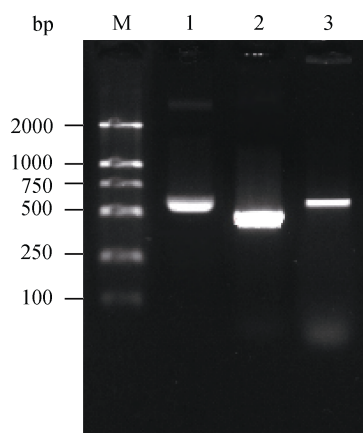


图 4 PCR 鉴定酵母重组子

Fig. 4 Identification of recombinant *Pichia pastoris* by PCR

M. DL2000 DNA 标准; 1. 重组酵母 GS115 转化子(pPICZαA-Hepcidin); 2. GS115 转化子(pPICZαA 空载体); 3. 重组质粒 pPICZαA-Hepcidin 为阳性对照的 PCR 产物

M. DL2000 DNA marker; 1. *Pichia pastoris* GS115 transformants with pPICZαA-Hepcidin; 2. *Pichia pastoris* GS115 transformants with pPICZαA as negative control; 3. PCR products of recombinant plasmid pPICZαA-Hepcidin as positive control

抗菌肽抗菌活性与肽分子的空间结构密切相关, 体外合成的抗菌肽与天然抗菌肽虽然一级结构一致, 但空间结构却不尽相同, 因而造成活性较差^[19]。因此, 采用基因工程方法制备 Hepcidin 将具有很大优势。根据 Hepcidin 自身的特点和用途, 如果采用真核表达系统且将产物分泌到胞外将会是一种更为理想的方式。巴斯德毕赤酵母由于兼有原核细胞良好的可操作性和真核系统的翻译后加工、修饰的特点, 且发酵条件简单, 表达水平高, 适合高密度培养, 为工业化和纯化提供极大的方便^[20]。

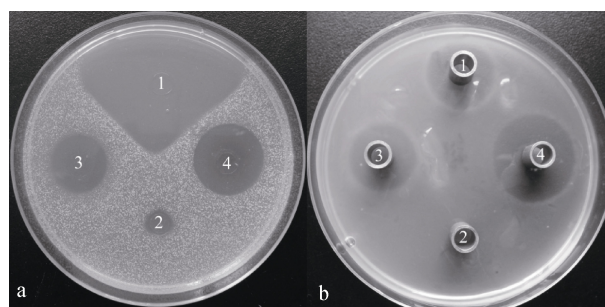


图 5 重组 Hepcidin 对金黄色葡萄球菌和无乳链球菌的抑菌活性测定

Fig. 5 Antibacterial activity of recombinant Hepcidin against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*

a, b 分别为重组 Hepcidin 对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌的抑菌活性测定; 1. 氨苄青霉素 0.5 μg; 2. pPICZαA 酵母转化子诱导产物; 3. pPICZαA-Hepcidin 转化子诱导产物; 4. pPICZαA-Hepcidin 转化子诱导产物

A and b are antibacterial activity of recombinant Hepcidin against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, respectively; 1. Ampicillin 0.5 μg; 2. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZαA; 3. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZαA-Hepcidin; 4. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZαA-Hepcidin

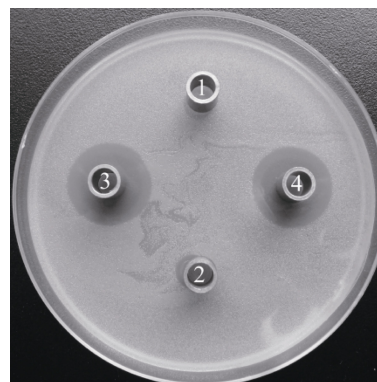


图 6 重组 Hepcidin 对嗜水气单胞菌的抑菌活性测定

Fig. 6 Antibacterial activity of recombinant Hepcidin against *Aeromonas hydrophila*

1. 氨苄青霉素 0.5 μg; 2. pPICZαA 酵母转化子诱导产物; 3. pPICZαA-Hepcidin 转化子诱导产物; 4. pPICZαA-Hepcidin 转化子诱导产物

1. Ampicillin 0.5 μg; 2. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZαA; 3. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZαA-Hepcidin; 4. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZαA-Hepcidin

酵母表达载体 pPICZαA 是酵母分泌型表达载体, 带有来自酿酒酵母 α-因子信号肽序列, 有报道表明此种信号肽有利于外源蛋白的表达尤其是小分子多肽的表达^[21]。pPICZαA 上带有 ZeocinTM 抗性基因, 通过 ZeocinTM 抗性梯度筛选能够快速筛选出高拷贝的转化子。本次研究在外源蛋白的基因末端设计有终止密码子(TTA), 在分泌的过程中将外源蛋白的 C-端不必要的载体氨基酸切掉, 使得

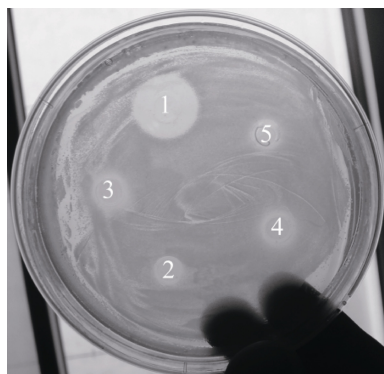


图7 重组 Hepcidin 对枯草芽孢杆菌的抑菌活性测定

Fig. 7 Antibacterial activity of recombinant Hepcidin against *Bacillus subtilis*

1. 氨苄青霉素 0.5 µg; 2. pPICZaA 酵母转化子诱导产物; 3. pPICZaA-Hepcidin 转化子诱导产物; 4. pPICZaA-Hepcidin 转化子诱导产物; 5. pPICZaA-Hepcidin 转化子诱导产物

1. Ampicillin 0.5 µg; 2. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZaA; 3. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZaA-Hepcidin; 4. The product induced by *Pichia pastoris* with pPICZaA-Hepcidin; 5. The product after induced of *Pichia pastoris* with pPICZaA-Hepcidin

表达的蛋白更接近天然的构象, 利用 α -交配因子信号肽成功将外源蛋白分泌到培养基中, 有利于后期对蛋白的分离与纯化。由于抗菌肽的分子量较小, 容易被酵母自身表达的胞外蛋白水解酶所降解, 所以诱导时间不宜过久, 诱导温度也不能太高, 本实验诱导时间为 72h, 诱导温度为 28℃。由于甲醇对宿主细胞有一定的伤害, 所以甲醇浓度也不能太高。本研究构建的表达载体, 在 0.8% 甲醇诱导下表达量最高。

本次研究的中华鲟重组 Hepcidin 对金黄色葡萄球菌表现出良好的抑制效果, 其结果与其他学者报道一致^[22]。另外, 本研究报道了抗菌肽对无乳链球菌的体外抑菌实验, 重组 Hepcidin 在体外可抑制无乳链球菌, 根据抑菌圈的大小推测其抑菌效果大概相当于 0.5 µg 氨苄青霉素。该研究最让人感兴趣的是我们所选用的嗜水气单胞菌对广谱抗生素氨苄青霉素已产生耐药性, 见本实验室前期报道^[23], 而该菌对重组 Hepcidin 仍然敏感, 提示该抗菌肽有望成为对付水产养殖品种耐药菌的新型药物。但是, Hepcidin 对枯草芽孢杆菌的抑制作用不明显, 与其他学者的报道不一致^[22, 24], 具体原因有待于进一步探讨。尽管本研究所测试细菌种类较少, 但仍可以初步说明中华鲟重组抗菌肽 Hepcidin 具有很好的生物活性, 对部分革兰氏阳性细菌、阴性细菌都有抑菌作用, 具有潜在的应用开发前景。

参考文献:

[1] Krause A, Neitz S, Mägert H J, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial ac-

tivity [J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2000, **480**(2-3): 147—150

- [2] Shike H, Lauth X, Westerman M E, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, **269**(8): 2232—2237
- [3] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**(4): 1608—1612
- [4] Wang K J, Cai J J, Cai L, et al. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide [J]. *Peptides*, 2009, **30**(4): 638—646
- [5] Yang R, Chen S L, Li W, et al. Expression analysis of hepcidin gene in fish tissues and embryos at various development stages of *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, (6): 84—87 [杨绒, 陈松林, 李伟, 等. 牙鲆抗菌肽 hepcidin 基因在成鱼组织和不同发育时期胚胎中的表达分析. 海洋水产研究, 2006, (6): 84—87]
- [6] Huang W S, Li S J, Cai L, et al. Cloning, sequence analysis and gene organization of antimicrobial peptide hepcidin gene from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, (3): 390—395 [黄文树, 李少菁, 蔡灵, 等. 尼罗罗非鱼 Hepcidin 基因结构与序列分析. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, (3): 390—395]
- [7] Shen W Y, Li W F, Lei K, et al. Molecular cloning of an antimicrobial peptide hepcidin gene from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and its expression analysis [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, (6): 972—978 [沈文英, 李卫芬, 雷凯, 等. 黄颡鱼抗菌肽 Hepcidin 基因的克隆和表达分析. 农业生物技术学报, 2009, (6): 972—978]
- [8] Chen J G, Yang J F, Ren P, et al. Prokaryotic expression and function analysis of *lateolabrax japonica* hepcidin [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(3): 554—561 [陈吉刚, 杨季芳, 任萍, 等. 鲈鱼 hepcidin 原核表达及生物学活性测定. 水生生物学报, 2010, **34**(3): 554—561]
- [9] Li W, Sun W X, Xiong T. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin gene from rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2009, (3): 304—308 [李伟, 孙文秀, 熊涛. 黄鳝抗菌肽 hepcidin 基因 cDNA 的克隆及表达分析. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, (3): 304—308]
- [10] Zhou X H, Xiang X, Chen J. Advances on the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) research [J]. *Reservoir Fisheries*, 2001, (3): 1—3 [周兴华, 向泉, 陈建. 中华鲟的研究进展. 水利渔业, 2001, (3): 1—3]
- [11] Amemiya C T, Litman G W. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost spe-

- cies [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, **87**(2): 811—815
- [12] Wang D, Liu H B. A research on Ig heavy chain constant region of five acipenseridae [J]. *Hereditas*, 2006, (10): 1247—1253 [王荻, 刘红柏. 5 种鲟鱼免疫球蛋白重链恒定区序列研究. *遗传*, 2006, (10): 1247—1253]
- [13] Cole A M, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(18): 12008—12013
- [14] Li X H, Tao R, Sun J. Research advances on the antibacterial peptide of prawn and its application prospects in aquatic farming [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, (1): 167—168 [李晓华, 陶冉, 孙杰. 对虾抗菌肽的研究进展及其在水产养殖业的应用前景. *安徽农业科学*, 2009, (1): 167—168]
- [15] Li Y, Su X R, Li T W, et al. Research progress of antimicrobial peptides in invertebrate such as molluscs [J]. *Fisheries Science*, 2004, (9): 40—43 [李晔, 苏秀榕, 李太武, 等. 贝类等无脊椎动物抗菌肽的研究进展. *水产科学*, 2004, (9): 40—43]
- [16] Ye X, Bai J J. Researches on anti-microbial peptides and its application perspective in aquaculture [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2000, (4): 274—279 [叶星, 白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景. *大连水产学院学报*, 2000, (4): 274—279]
- [17] Park C H, Valore E V, Waring A J, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(11): 7806—7810
- [18] Huang P H, Chen J Y, Kuo C M. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions [J]. *Molecular immunology*, 2007, **44**(8): 1922—1934
- [19] Yu J, Zhao R J. Research progress of antimicrobial peptides in antiprotozoal activities [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2008, (11): 1395—1396 [于娟, 赵瑞君. 抗菌肽抗原虫作用研究进展. *中国公共卫生*, 2008, (11): 1395—1396]
- [20] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. *Bio/technology* (Nature Publishing Company), 1993, **11**(8): 905—910
- [21] Yu P. Advance in *Pichia pastoris* expression system [J]. *Industrial Microbiology*, 2005, (3): 50—54 [于平. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展. *工业微生物*, 2005, (3): 50—54]
- [22] Farzana R, Ijaz A, Yuan Q P, et al. Secretory expression and purification of a human hepcidin in *P. pastoris* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009, (9): 121—124 [Farzana Rashid, Ijaz Ali, 袁其朋, 等. 人类抗菌肽 hepcidin 在毕赤酵母中的分泌表达和纯化. *生物技术通报*, 2009, (9): 121—124]
- [23] Tian T. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* strains from freshwater fish and their antibacterial resistance [D]. Thesis for Master of Science. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 2010 [田甜. 鱼源嗜水气单胞菌的分离鉴定及耐药性研究. 硕士学位论文. 华中农业大学水产学院, 武汉. 2010]
- [24] Zhang H, Yuan Q P. Cloning and secretion expression of hepcidin in *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, (3): 381—385 [张卉, 袁其朋. Hepcidin 的基因克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达. *生物工程学报*, 2007, (3): 381—385]