

## 中国林蛙皮肤丝氨酸蛋白酶抑制剂 RCSP12 的基因克隆和原核表达

张曙光 张哲文 张丽芳 王孝敏 尚德静

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 大连 116029)

### CLONING AND PROKARYOTIC EXPRESSION OF THE SERINE PROTEASE INHIBITOR RCSP12 FROM THE SKIN OF CHINESE BROWN FROGS, *RANA CHENSINENSIS*

ZHANG Shu-Guang, ZHANG Zhe-Wen, ZHANG Li-Fang, WANG Xiao-Min, SHANG De-Jing

(Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

关键词: 中国林蛙; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 基因克隆; 原核表达

**Key words:** *Rana chensinensis*; RCSP12; Serine protease inhibitor; Gene cloning; Prokaryotic expression

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0629-05

丝氨酸蛋白酶抑制剂广泛存在于动物、植物及微生物体内<sup>[1]</sup>, 是一类丝氨酸蛋白酶活性调节剂, 能调节生物体内许多重要的生命过程, 如蛋白质折叠、血凝、补体激活、炎症反应、细胞迁移、细胞基质重建、以及肿瘤抑制等<sup>[2,3]</sup>, 很多已被开发为新药, 在临床上有广泛应用。基于其序列、拓扑结构及功能的相似性, 能分成 16 个家族<sup>[4]</sup>, 是一个蛋白超家族, 每个家族成员都具有相似的氨基酸顺序、保守的三级结构和独特的作用机制<sup>[5]</sup>。

两栖类动物是由从不同水生鱼类演化到陆生爬行动物的过渡类群<sup>[6]</sup>, 其皮肤对维持自身生存和适应栖息地多样化环境以及防御微生物入侵起着重要作用。过去人们一直把研究聚集在两栖类皮肤的生物活性多肽上, 大量结构多样, 功能迥异的生物活性多肽被获得, 分为抗菌肽和调节肽<sup>[7]</sup>。最近, 在两栖类动物的皮肤分泌物中, 也分离鉴定出丝氨酸蛋白酶抑制剂, 如来自欧洲铃蟾(*Bombina orientalis*)的 BSTI<sup>[8]</sup>, 由 60 个氨基酸组成, 包括 10 个半胱氨酸残基, 其分子结构模型和从线虫及猪蛔虫中得到的蛋白酶抑制剂相同, 是胰蛋白酶和凝血酶抑制剂,  $K_i$  值从 0.1 到 1  $\mu\text{mol/L}$ 。大蹼铃蟾白蛋白 BMTI 来自于大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)<sup>[9]</sup>, 由 60 个氨基酸组成, 是胰蛋白酶抑制剂, 与 BSTI 的同源性达 81.7%, 具有独特

的空间结构及抑制机制, 是一类新的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员。来源于番茄蛙(*Dyscophus guineti*)皮肤的丝氨酸蛋白酶抑制剂属于 Kunitz 型, 由 57 个氨基酸组成, 与典型的 Kunitz 型蛋白酶抑制剂 BPTI 同源性为 38%, 含两个与胰蛋白酶作用的活性位点, 推测在番茄蛙皮肤内合成的丝氨酸蛋白酶抑制剂有可能是其抵御微生物侵袭的一种防御措施<sup>[10]</sup>。到目前为止, 在两栖类中发现分子量最小的丝氨酸蛋白酶抑制剂是来源于无指盘臭蛙皮肤中的 TIL<sup>[11]</sup>, 氨基酸序列为 CWTKSIPPKPC, N 端半胱氨酸和 C 端半胱氨酸形成二硫键, 所以整个分子呈环形, 基于 TIL 设计的多肽, 同时具有抗菌活性与胰蛋白酶抑制剂活性。中国林蛙(*Rana chensinensis*)是我国东北地区资源优势的经济蛙种, 其皮肤在复杂多变的生态环境中起着调节水平衡、抵抗猎食者、抗菌、外分泌等多方面的功能<sup>[12]</sup>。目前, 国内对中国林蛙皮肤生物活性成分缺少系统的研究<sup>[13]</sup>。

本实验首次成功的从中国林蛙皮肤中克隆出具有胰蛋白酶抑制活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂 RCSP12 全长 cDNA 序列, 并将其编码区连接到表达载体 pET32a 上进行原核表达, 经过多种诱导条件的筛选, 获得了 RCSP12 的稳定表达。经  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱纯化及分步透析复性, 得到

收稿日期: 2009-07-31; 修订日期: 2010-01-24

基金项目: 辽宁省优秀人才项目(2007R27) 资助

作者简介: 张曙光(1984—), 女, 汉族, 辽宁葫芦岛人; 在读硕士; 主要从事分子生物学研究。E-mail: shuguang\_0329@sohu.com

通讯作者: 尚德静, E-mail: djshang@lnnu.edu.cn

了高纯度的具有生物活性的重组蛋白 RCSP12。采用 BAPNA 方法对重组蛋白 RCSP12 的生物活性进行了研究,期望本实验为两栖动物丝氨酸蛋白酶抑制剂的开发和应用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及主要试剂

中国林蛙,购自辽宁省抚顺市新宾县; *E.coli* BL21(DE3)和表达载体 pET32a 购自 Invitrogen 公司; *Taq* DNA 聚合酶及各种限制性内切酶购自 Takara 公司; His-Trap HP 组氨酸标记亲和层析柱购自通用电气医疗集团生命科学部; IPTG、Ampicilline、咪唑、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺 (BAPNA)、胰蛋白酶为 Sigma 产品,其余试剂为国产或进口分析纯。

### 1.2 方法

**RCSP12 基因全长克隆** 根据本实验室已构建的中国林蛙皮肤 cDNA 文库和 EST 数据库,获得高表达的丝氨酸蛋白酶抑制剂 RCSP12 基因的部分 cDNA 序列(包括完整的 poly(A)尾),按照此序列设计并合成引物, GSP1: GGGGAAGCGGAAGCCCAGGTGTAT 和 GSP2: AGAATG-AGATGAACTGAACCACC, 引物由 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司合成。以中国林蛙皮肤总 RNA 为模板,进行 RT-PCR 和 5'-RACE。PCR 程序如下: 94℃预变性 3min 后开始循环, 98℃变性 10s, 51℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 共 30 个循环后, 72℃延伸 10min, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。回收 5'-RACE 产物, 与 pMD20-T Vector 连接, 热转化至 *E.coli* JM109 中, 使用 BcaBEST Primer M13-47 进行序列测定。

**RCSP12 基因的序列分析** 首先经 <http://us.expasy.org/tools/> 将其翻译成相应的氨基酸序列, 运用 ExPASy 中的 ProtParam tool 程序对 RCSP12 蛋白氨基酸序列的分子量、等电点等理化性质进行预测分析, 并采用 <http://expasy.org/tools/> 中的 Geno3d 软件对蛋白质的三级结构进行预测以及利用 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>、<http://www.predictprotein.org> 进行氨基酸序列及功能分析。

**重组蛋白 RCSP12 表达载体的构建** 根据已获得的目的基因 RCSP12 ORF 区序列和表达载体 pET32a(+)的特征设计引物 P1: 5'-GTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGCTATGACAACTATACGTTCTCTT-3' (下划线为 *Nco* 酶切位点); P2: 5'-TGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGTCATTTGCGTGATTGTCAGGTG-3' (下划线为 *Xho* 酶切位点), 引物由日本 TaKaRa 大连公司合成。以 P1/ P2 为引物, 以重组质粒 pMD19-T-RCSP12 为模版, 进行 PCR 扩增, PCR 程序如下: 94℃预变性 1min 后开始循环, 98℃变性 10s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 共 30 个循环后,

72℃延伸 10min, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。以 *Nco* /*Xho* 酶切后的回收产物使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的 Solution 与经过相同双酶切的载体 pET32a(+)连接, 连接产物分别热转化至 *E.coli* JM109 中, 涂布平板, 37℃过夜培养。挑取阳性菌落植菌, 提取质粒, 使用载体上 T7 和 T7 引物对质粒测序。

重组蛋白 RCSP12 在大肠杆菌中表达条件的筛选将 pET-32a-RCSP12 转化大肠杆菌 BL21(DE3)并涂布在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的平板上, 37℃过夜培养。挑取阳性克隆接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃培养至  $A_{600}$  约 0.6 时, 从 IPTG 浓度(0.5、0.8、1.0 mmol/L)、诱导温度(25、30、37℃)、诱导时间(3、5、7h)三方面进行表达条件筛选后, 4℃, 6500 r/min 离心 10min 收集菌体, 超声波破碎后, 4℃, 14000 r/min 离心 10min, 收集沉淀重悬于等体积 PBS 中, 分别取全细胞、上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测表达产物的存在形式。Western blot 中所用一抗为 Penta-His Antibody, 稀释比例 1:1000, 二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG, 稀释比例 1:1000。

重组蛋白 RCSP12 的纯化和复性 IPTG 诱导表达后的菌体超声破碎后, 4℃, 14000 r/min 离心 10min, 收集沉淀, 加入 8 mol/L 尿素过夜溶解包涵体。上清液过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱, 用含 50、200、400 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液梯度洗脱目的蛋白, SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度。经  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱纯化后的目的蛋白采用分步透析法对已变性的蛋白进行复性。以 Bradford 法测定复性前后蛋白含量, 计算复性率。先将纯化的蛋白变性液浓度稀释到 0.5 mg/mL 后, 按尿素浓度逐步递减(6、3、1、0.2、0 mol/L)的方法配好复性液(6mol/L 尿素、50mmol/L Tris-Cl、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, pH=8.0), 将稀释的蛋白变性液 10 mL 置于透析袋内, 于 1 L 复性液中 4℃缓慢搅拌透析。每 3h 更换一次尿素浓度逐渐降低的透析液, 最后在 pH 8.0 的 TE 缓冲液中透析过夜。复性后的蛋白保存于 -80℃待用。

**重组蛋白 RCSP12 的活性检测** 参考文献[14]方法并做了适当调整, 0.85 μmol/L 胰蛋白酶作底物, 依次加入 0.42—2.1 μmol/L 重组蛋白 RCSP12, 37℃保温 5min, 加入 1 mmol/L BAPNA, 37℃反应 5min, 410 nm 测 OD 值。胰蛋白酶活性单位定义为: 在实验条件下, 每分钟内水解 BAPNA 释放 1 μmol 对硝基苯胺所需的酶量; 重组蛋白 RCSP12 对胰蛋白酶的抑制活性定义为: 在相同条件下, 降低 1 个胰蛋白酶活性单位所需的抑制剂量。

## 2 结果

### 2.1 RCSP12 基因克隆及序列分析

以中国林蛙皮肤总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 和

5'-RACE, 获得了中国林蛙皮肤丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *RCSP12* 的 cDNA 全长序列, 全长为 876 bp, 5'-UTR 55 bp, 3'-UTR 221 bp, 阅读框由 603 bp 核苷酸组成(包括终止密码子), 编码 200 个氨基酸。该序列已被收录在 GenBank 核苷酸序列数据库中, 其登录号为 GQ303267。

采用 <http://expasy.org/tools/> 中的 Geno3d 软件对重组蛋白 RCSP12 的三级结构进行了预测, RCSP12 属于 Kunitz 型抑制剂(图 1), 其三级结构和来自牛胰的 Kunitz 型蛋白酶抑制剂颇为相似, RCSP12 蛋白分子中  $\alpha$  螺旋(H)、 $\beta$  折叠(E)和无规则卷曲(L)所占比例分别为 18.00%, 20.00%, 62.00%, 其理论 pI 为 8.23, Mw 为 35.32 kD。经过 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan> 预测, 结果显示 RCSP12 蛋白包含三个功能域 P1、P2 和 P3, 分别位于第 27—79, 83—141, 145—197 氨基酸, 和 Kunitz\_BPTI 极为相似。它们都位于一个溶剂暴露的环上, 其中 P1 是抑制作用的关键活性位点, 其深深插入丝氨酸蛋白酶特异的束缚“口袋”S1 位置。对于胰蛋白酶, 由于这个位置的 Asp 残基在又窄又深的“口袋”底部, 它独特的位置和方向格外适合与 Lys 和 Arg 等碱性氨基酸残基作用<sup>[15]</sup>。经过 <http://www.predictprotein.org/> 预测, RCSP12 分子内能形成 5 对二硫键, 分别是 28—53、37—61、74—84、123—140、171—192。二硫键对 Kunitz 结构域的稳定至关重要, 另外 Kunitz 型家族都有很明确的  $\beta$ -折叠和 C 端  $\alpha$ -螺旋, 使整个分子变得更加紧凑、稳定。

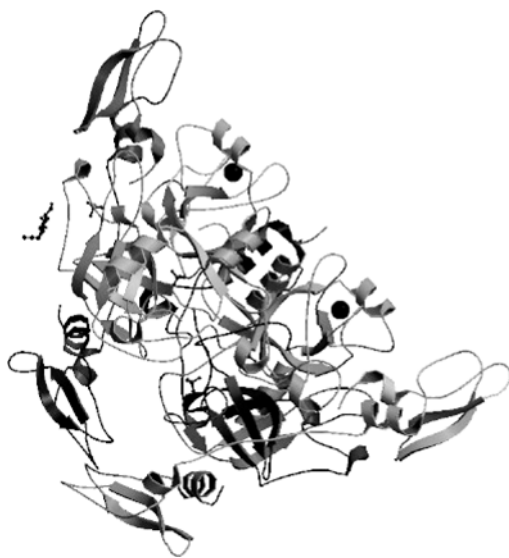


图 1 *RCSP12* 基因三级结构

Fig. 1 The tertiary structure of *RCSP12*

## 2.2 *RCSP12* 基因原核表达载体的构建

采用 PCR 法扩增出的 *RCSP12* 基因片段经 *Nco* / *Xho* 双酶切后, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了与预期大小(685 bp)相符的片段, 将该片段插入 pET32 a (+)质

粒 *Nco* 和 *Xho* 位点之间构建表达载体 pET-32a-*RCSP12*。筛选阳性克隆进行测序分析, 结果表明其编码序列正确。

## 2.3 重组蛋白 RCSP12 在大肠杆菌中的表达

经过 IPTG 诱导浓度、诱导温度、诱导时间三方面表达条件筛选后, 确定诱导条件如下: 阳性克隆在 37℃, 1 mmol/L IPTG 诱导 3h 后, 离心收集菌体, 超声破碎并离心后, 将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 和 western blot 分析检测(图 2), 36 kD 的目的蛋白以包涵体形式存在。

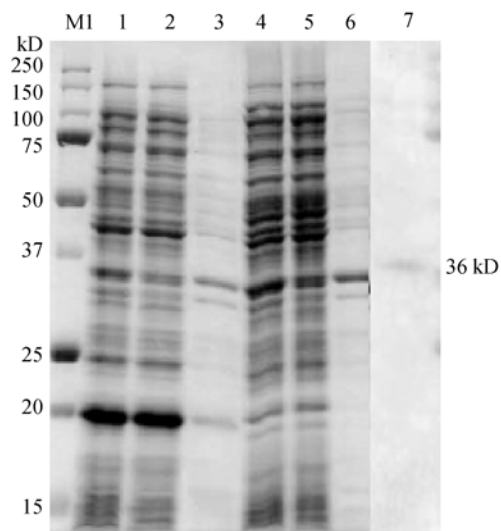


图 2 中国林蛙皮肤 *RCSP12* 重组载体表达产物的 SDS-PAGE 分析及 western blot 鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE and western blot analysis of the expressed protein

M1. 标准分子量; 1. 空质粒全细胞; 2. 空质粒上清; 3. 空质粒沉淀; 4. 重组质粒全细胞; 5. 重组质粒上清; 6. 重组质粒沉淀; 7. 重组质粒沉淀蛋白质杂交

M1. Marker; 1. Extracts from pET32a(+); 2. Supernatant from pET32a(+); 3. Deposit from pET32a(+); 4. Extracts from recombinant plasmid; 5. Supernatant from recombinant plasmid; 6. Deposit from recombinant plasmid; 7. Western blotting

## 2.4 重组蛋白 RCSP12 在大肠杆菌中的纯化、复性

目的蛋白经  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱纯化后, 获得了纯度高达 98% 的目的蛋白, 分步透析法对目的蛋白进行了复性, 复性率为 75%。SDS-PAGE 结果(图 3)。

## 2.5 重组蛋白 RCSP12 的活性检测

重组蛋白 RCSP12 的生物活性结果表明, RCSP12 对胰蛋白酶有较高的抑制作用, 且抑制活力曲线成剂量依赖关系(图 4)。

## 3 讨论

两栖类动物在受到外来微生物入侵时, 皮肤会产生多种抗菌肽保护自己免受伤害, 抗菌肽容易受到胰蛋白酶的水解作用而被灭活, 而丝氨酸蛋白酶抑制剂对胰蛋

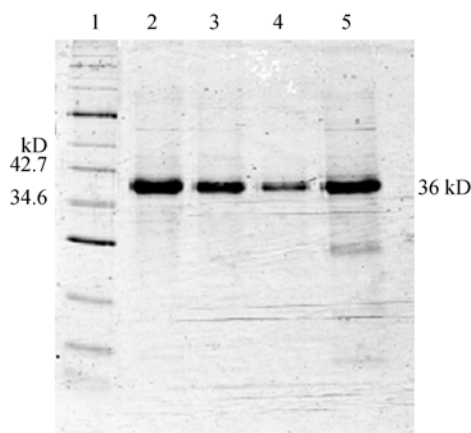


图3 中国林蛙皮肤 RCSP12 蛋白纯化和复性的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 SDS-PAGE showing the results of purification and renaturation

1. Marker; 2. 含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的目的蛋白; 3. 含 200 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的目的蛋白; 4. 含 400 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的蛋白; 5. 复性后的包涵体蛋白

1. Marker; 2. Target protein purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarose chromatography under 50mmol/L imidazole; 3. Target protein purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarose chromatography under 200mmol/L imidazole; 4. Target protein purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarose chromatography under 400mmol/L imidazole; 5. Refolding protein by dialysis

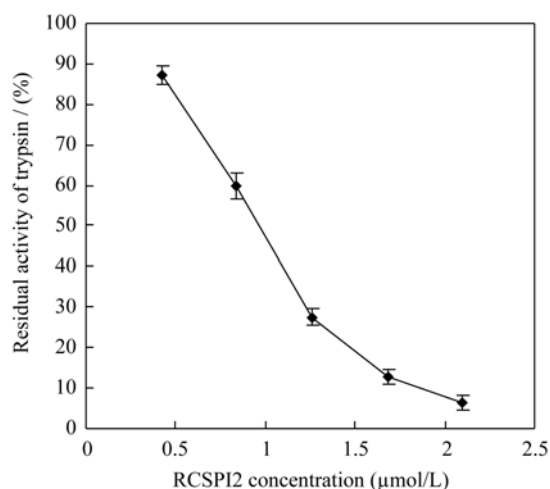


图4 中国林蛙皮肤 RCSP12 重组蛋白的抑制活力测定

Fig. 4 Inhibitory activity of recombinant protein RCSP12 to trypsin

白酶具有抑制作用,可以保护抗菌肽的生物活性,因此两栖类动物皮肤同时会分泌丝氨酸蛋白酶抑制剂防止多肽蛋白质不必要的水解<sup>[16]</sup>。另一方面,丝氨酸蛋白酶抑制剂可以作为多肽调节剂参与调节两栖类皮肤中其他生物活性肽的活性<sup>[8]</sup>;还有可能直接对微生物或其他寄生虫的生长、入侵和繁殖起抑制作用<sup>[17]</sup>。如来源于番茄蛙的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂对大肠杆菌的生长具有明

显的抑制作用<sup>[10]</sup>,经过氨基酸序列比对发现,中国林蛙皮肤丝氨酸蛋白酶抑制剂 RCSP12 与该抑制剂其中一个活性位点 IYGGCG 相比,有一个活性位点完全相同外,另一个为 IYGGCQ,除 Gly 替换为 Gln,其余氨基酸序列相同,很可能也参与防御微生物的入侵。RCSP12 的空间结构与 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 BPTI 比较发现,位于 RCSP12 蛋白 P1 活性位点的关键活性残基 Lys38 其侧链和 Gly35、pro36、Cys37 骨架有氢键相连,氢键是维系和促进蛋白质高级结构形成的重要作用力,对 RCSP12 发挥生物活性起关键作用。

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 方法成功地从中国林蛙皮肤中克隆出丝氨酸蛋白酶抑制剂 RCSP12 基因全序列, cDNA 全长为 876 bp, 阅读框由 603 bp 核苷酸组成(包括终止密码子), 编码 200 个氨基酸,是目前报道的氨基酸数目最多的两栖类丝氨酸蛋白酶抑制剂。RCSP12 属于 Kunitz 型抑制剂,抑肽酶 BPTI 是 Kunitz 型抑制剂的典型代表,它的空间结构目前研究的比较深入,分子内 6 个半胱氨酸以 1—6、2—4、3—5 的连接方式形成 3 对二硫键,而 RCSP12 分子全面的三维结构能形成 5 对二硫键,和 BPTI 二硫键连接方式颇为相似, Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂活性残基多半在 loop 区和  $\beta 2$  转角区,可以推断该型抑制剂的生物活性差异取决于溶剂暴露的氨基酸残基侧链在分子表面的拓扑变化<sup>[18]</sup>。本研究将 RCSP12 基因连接到表达载体 pET32a 中进行了原核表达,原核表达系统具有产量高、易操作、稳定性好等优点,且利用 pET32a 载体本身具有的 His<sub>6</sub> 标签利于重组蛋白的纯化。重组 RCSP12 蛋白以包涵体形式存在,包涵体蛋白的提取及纯化工艺虽然相对复杂<sup>[19]</sup>,但大肠杆菌的蛋白酶对包涵体基本不起降解作用,在一定程度上保持了表达产物的结构稳定,而且包涵体的水难溶性及致密性有利于目的蛋白的分离纯化。本研究在包涵体处理中用含 8 mol/L 尿素的缓冲液溶解包涵体,经  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱采用梯度洗脱法对重组蛋白进行纯化,先用低浓度的咪唑洗去非特异性吸附的杂蛋白,再用高浓度的咪唑洗脱重组蛋白,最后得到纯度高达 98% 的重组蛋白。通过分步透析法对重组蛋白进行复性,在复性过程中加入了氧化还原对 GSH/GSSG,为重组蛋白 RCSP12 二硫键的正确折叠提供了氧化还原条件。活性检测结果显示重组 RCSP12 蛋白对胰蛋白酶有较高的抑制作用。影响外源蛋白原核表达量大小的因素很多,如外源基因的长度、外源基因的拷贝数、外源基因中的 GC 含量,要表达的外源蛋白的亲疏水性等,另外,诱导表达条件的不同对表达量高低也有显著的影响<sup>[20]</sup>。因此,要得到更高表达量的重组蛋白 RCSP12,还应在很多方面进行进一步改进。本论文将为进一步深入研究两栖类丝氨酸蛋白酶抑制剂的理化性质、结构与功能的关系以及其在制药领域的开发和应用奠定

理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Hibbetts K, Hines B, Williams D. An overview of proteinase inhibitors [J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1999, **13**(4): 302—308
- [2] Laskowski M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1980, **49**: 593—626
- [3] Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, *et al.* Canonical protein inhibitors of serine proteases [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, **60**: 2427—2444
- [4] Irving J, Pike R, Lesk A, *et al.* Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function [J]. *Genome Research*, 2000, **10**: 1845—1864
- [5] Silverman G, Bird P, Carrell R, *et al.* The Serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(36): 293—296
- [6] Duellman W E, Trueb L. *Biology of Amphibians* [M]. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986, 670
- [7] Bevins C L, Zasloff M. Peptides from frog skin [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, **59**: 395—414
- [8] Mignogna G, Pascarella S, Wechselberger C, *et al.* BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes [J]. *Protein Science*, 1996, **5**: 357—362
- [9] Lai R, Liu H, Lee WH, *et al.* Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **131**: 47—53
- [10] Conlon J M, Kim J B. Protease inhibitor of the Kunitz family from skin secretions of the tomato frog, *Dyscophus guineti* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **279**(3): 961—964
- [11] Li J, Zhang C, Xu X, *et al.* Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides [J]. *FASEB Journal*, 2007, **21**(10): 2466—2473
- [12] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview [J]. *Biopolymers*, 1999, **47**: 413—433
- [13] Lai R, Zhao Y, Liu H, *et al.* Bioactive substance of amphibian skin and a study on exploitation and utilization of Chinese amphibian resources [J]. *Zoological Research*, 2002, **23**: 65—70 [赖切, 赵宇, 刘衡, 等. 两栖类动物皮肤活性物质的利用兼论中国两栖类资源开发的策略. 动物学研究, 2002, **23**: 65—70]
- [14] Godbole S A, Krishna T G, Bhatia C R. Purification and characterization of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L) Millsp) seeds [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1994, **64**: 87—93
- [15] Krowarsch D, Otlewski J. Amino-acid substitutions at the fully exposed P1 site of bovine pancreatic trypsin inhibitor affect its stability [J]. *Protein Science*, 2001, **10**(4): 715—724
- [16] Han Y P. Identification and cloning of three bioactive polypeptides from skin and eggs of *Batrachuperus pachunii* and *Rana grahami* [D]. Thesis for Ph.D of Science. Nanjing Agricultural University, Nanjing. 2006 [韩曜平. 无指盘臭蛙和山溪织皮肤及卵中生物活性多肽的分离鉴定和克隆. 博士学位论文, 南京农业大学, 南京. 2006]
- [17] Laskowski M, Qasim M A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1477** (1—2): 324—337
- [18] Yuan C H, Liang S P. Research on the Structure-function Relationship of Kunitz-type Serine Protease Inhibitors [J]. *Life Science Research*, 2003, **7**(2): 110—115 [袁春华, 梁宋平. Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构与功能研究. 生命科学研究, 2003, **7**(2): 110—115]
- [19] Sun Y N, Wu D, Zhou M, *et al.* Cloning expression and activity analysis of A, E, F genes of anabaena PCC 7120 pec-operon [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 275—278 [孙亚楠, 武栋, 周明, 等. 鱼腥藻 PCC7120 藻红蓝蛋白操纵子 A、E 和 F 基因的克隆、表达和活性分析. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 275—278]
- [20] Nie F, Dai H C, Long L Q, *et al.* Cloning and expression of *silurus meridionalis obese* gene in pichia pastoris [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(1): 112—115 [聂芬, 戴汉川, 龙良启, 等. 大口鲶 *ob* 基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达. 水生生物学报, 2008, **32**(1): 112—115]