

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00554

鲈鱼 *hepcidin* 原核表达及生物学活性测定

陈吉刚 杨季芳 任 萍 周晶晶

(浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100)

摘要: 采用 RT-PCR 方法扩增和克隆了鲈鱼 *hepcidin* (*LjFishep*) 的编码阅读框。该编码阅读框由 261 个核苷酸组成, 编码由 86 个氨基酸组成的前体蛋白。遗传进化分析表明, *LjFishep* 与条石鲷和河鲈 *hepcidin* 的亲缘关系最近。将去除 *LjFishep* 信号肽的编码序列克隆到原核表达载体 pET-28a(+), 实现了 *LjFishep* 在大肠杆菌的表达。可溶性分析表明表达蛋白大部分以包涵体形式存在, 部分以可溶性形式存在, 非变性电泳可见可溶性蛋白存在单体和多聚体组分。镍柱亲和层析法纯化的鲈鱼 *hepcidin* 重组表达蛋白(r*LjFishep*), 利用 ÄKTA FPLC (快速蛋白分离纯化系统) 进行逐级分离, 非变性电泳可见单一 r*LjFishep* 可溶性蛋白单体。体外生物学活性分析显示可溶性 r*LjFishep* 蛋白单体具有抑制鲈鱼哈维氏弧菌繁殖的能力。这为进一步研究鲈鱼 *Hepcidin* 的生物学功能及临床应用奠定了基础。

关键词: 鲈鱼; 抗菌肽; 克隆; 表达; 生物学活性

中图分类号: Q785; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)03-0554-08

抗菌肽(Antibacterial Peptides, AMP)是由动植物细胞产生的一类具有广谱抗菌活性的小分子多肽, 其生成和释放是机体炎症反应的组成部分, 是宿主防御细菌、真菌等病原微生物入侵的重要分子屏障。目前已发现的真核生物体内的抗菌肽达 1000 种之多 (<http://www.bbcm.units.it/~antimic/researchAMPs.html>)。其中, 具 β 片层结构的富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽家族广泛分布于动植物组织, 参与宿主非特异性免疫。Hepcidin (Hepatic bactericidal protein, Heph) 又称 LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) 于 2000 年首次由 Kruase, *et al.*^[1] 从人血清中分离到, 次年 Park, *et al.* 又从人尿液中分离到该物质^[2]。其后从其他哺乳动物、两栖类和鱼类等物种中均发现了其同源基因。2002 年, Shike, *et al.*^[3] 首次从杂交石斑鲈鱼中获得 *hepcidin* 基因, 随后大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[4]、美洲拟鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*)^[4]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[5]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[6]、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)^[7,8]、真鲷 (*Pagrus major*)^[9]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[10]、

长鳍叉尾鲷 (*Ictalurus furcatus*)^[11,12]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[13]、河鲈 (*Perca fluviatilis*)^[14]、奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[15,16]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[17]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[18]、条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*)^[19] 等几十种鱼类的 *hepcidin* 基因序列相继被成功克隆。类似于哺乳动物 *Hepcidin*, 鱼类 *Hepcidin* 具有广谱的抗菌活性, 是鱼类非特异性免疫防御系统的主要成员之一, 在防御细菌和病毒入侵方面发挥重要作用^[10,15,19—21]。

海水养殖鲈鱼 (*Lateolabrax japonica*) 是我国重要的海水养殖经济鱼类。近年来, 随着鲈鱼养殖业的迅猛发展, 鲈鱼病害日趋严重, 能有效防治病害的疫苗缺乏, 化学合成药物的大量使用造成了巨大的环境代谢压力。因此, 寻找能够有效的替代化学合成药物的天然免疫产物十分必要^[22,23]。本研究在已报道的鱼类 *Hepcidin* 的研究基础上, 通过克隆海水养殖鲈鱼 *hepcidin* 基因的编码序列, 进行体外表达 *hepcidin*, 并分析表达产物的体外生物学活性, 为

收稿日期: 2008-12-29; 修订日期: 2009-10-27

基金项目: 浙江省科技厅支撑与引导项目(2008C22059); 国家自然科学基金(30800856); 宁波市海洋与渔业局项目(甬海办[2008]39号); 浙江万里学院人才引进启动资金(1741000171)资助

通讯作者: 陈吉刚(1977—), 理学博士, 副教授; 主要从事水产病害防控技术研究。E-mail: genomic@163.com; Tel: 0574-88222679

鲈鱼 *Hepcidin* 的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

受体菌 *E. coli* Top10、表达菌 *E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存; 克隆用载体 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司; 鲈鱼哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)NB2008 为本实验室分离保存。

1.2 工具酶及试剂

Not I、*Nco* I、*Taq* Plus DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、dNTP Mix、DNA Marker、青霉素、卡那霉素、IPTG 和蛋白 Marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司; M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 为 TaKaRa 产品; Gel DNA Midi Purification Kit 购自尚能生物科技有限公司; PVDF 膜($\Phi 0.22\mu\text{m}$)为美国 Millipore 公司产品; 转膜滤纸为 Whatman 公司产品; 抗 6×His 单克隆抗体为 Invitrogen 公司产品; Trizol 试剂购自 Gibco 公司; LPS 购自 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自晶美生物技术有限公司; AEC 显色试剂盒购自华美生物工程有限公司; 琼脂糖凝胶 FF 柱购自卓冠科技有限公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。LPS 以 0.85% 生理盐水培养液配成 1 mg/mL 的溶液, 过滤除菌, -20°C 保存备用。

1.3 RNA 提取和 RT-PCR

取 LPS 胸腔注射($20\mu\text{g}/\text{尾}$)6h 后的鲈鱼肝脏组织 100 mg 置于研钵中, 加入液氮研磨成粉末状后, 转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL Trizol 试剂进行总 RNA 的抽提, 提取步骤按 Trizol 操作说明书进行。以抽提的 RNA 为模板, 以引物 oligo(dT)₁₆ 为反转录引物, 采用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 反转录合成第一链 cDNA。根据 GenBank 中注册的鲈鱼 *hepcidin* 序列 (GenBank accession No. AF294323), 设计 1 对 PCR 扩增用引物: 上游引物 (hepF) 5'-AATACTAGCACAGAGACAACCAG-3' 和下游引物 (hepR) 5'-TTACTGAAATTTATTAATATCATCTA-3'。以 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增, 程序为: 95°C 预变性 3min, 95°C 变性 1min, 52°C 退火 45s, 72°C 延伸 2min, 共 30 个循环进行 PCR, 最后延伸 10min。

1.4 鲈鱼 *hepcidin* cDNA 的克隆与序列分析

用 Gel DNA Midi Purification Kit 纯化回收目的

PCR 产物片段, 利用 T-A 克隆策略连接于 pMD18-T vector 载体, 连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 在含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上初步筛选阳性克隆。PCR 和酶切鉴定阳性克隆。选择 3 个阳性克隆进行测序。OMIGA2.0 预测编码蛋白分子量和等电点。SignalP V1.1 World Wide Web Server 的 neural networks method 用于编码蛋白的信号肽序列预测。DNASTAR5.0 软件中的 Jotun Hein 法用于鲈鱼 *hepcidin* 成熟蛋白的序列比较。MEGA 4 软件用于 *hepcidin* 成熟蛋白的进化分析。参与序列比较和进化分析的 *hepcidin* 序列均来自 GenBank, 其序列收录号为: 南极美露鳕 (*Dissostichus mawsoni*) (EU221599)、尖头裸龙鳕 (*Gymnodraco acuticeps*) (EU221600)、青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) (DQ177321)、智利油南极鱼 (*Eleginops maclovinus*) (ABY84826)、头带冰鱼 (*Chaenocephalus aceratus*) (EU221594)、河鲈 (*Perca fluviatilis*) (EF602303)、条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) (EU809942)、奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) (AY725227)、大菱鲆 (*Psetta maxima*) (AJ890151)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) (AY669377)、真鲷 (*Pagrus major*) (AY557619)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) (DQ307050)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*) (EU334514)、南极黏鱼 (*Lycodichthys dearborni*) (EU221609)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) (AY533022)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) (NM_001140849)、斑马鱼 (*Danio rerio*) (AY258137)、蓝鳃 (*Ictalurus furcatus*) (AY834210)、爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) (EF140888)、人 (*Homo sapiens*) (NP_066998)、猪 (*Sus scrofa*) (AF516143) 和鼠 (*Mus musculus*) (AY232841)。

1.5 鲈鱼 *hepcidin* 原核表达载体的构建

根据已获得的鲈鱼 *hepcidin* 核苷酸序列及 pET-28a(+) 多克隆位点, 设计引物 P(5'-GCCATGGTCCCGGTCAGTGAAGTG-3') 和引物 F(5'-TAGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGTCAGAATCTGCAGCACAA-3')。引物 P 引入 *Nco* I 酶切位点, 引物 F 引入 *Not* I 酶切位点和 6×His 纯化标签。以含 *hepcidin* 序列的重组 T 载体 (T-LjFishep) 为模板, 用 P 和 F 引物进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳回收纯化后, 经 *Not* I 和 *Nco* I 双酶切后, 克隆于表达载体 pET-28a(+) 载体, 转化感受态细胞 *E. coli* Top10 细胞, 并利用卡那霉素抗性平板初步筛选阳性克隆, 挑选阳性克隆并小量抽提质粒, 利用 PCR 和双酶切进行

鉴定。

1.6 重组表达蛋白的诱导表达与鉴定

利用携带目的基因的重组质粒 pET-LjFishep 转化表达受体菌 *E. coli* BL21(DE3), 挑选单个阳性克隆接种于 LB 培养基(含 Kan 40 μg/mL), 37℃, 250 r/min, 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例接种于含 10 mL 新鲜 LB 培养基(含 Kan 40 μg/mL)的 100 mL 锥形瓶中, 37℃, 250 r/min 振荡培养, 当菌液 A_{600} 达 1.0 左右时加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4h, 同时取诱导 0h 的菌液做对照, 于 4℃, 8000 r/min 离心 10min 收集菌体, 按 Zhou, et al. [24] 的方法进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

1.7 重组表达蛋白的可溶性分析及层析法纯化

将诱导表达 4h 的菌液离心沉淀后, 按湿重 1 mg/mL 比例悬浮于亲和层析纯化蛋白裂解液中, 组织匀浆器充分匀浆后, 置冰水浴进行超声波破碎, 设置程序为每破碎 2s, 间隔 1s, 功率为 40W, 裂解时间 90s。菌液裂解液于 4℃, 12000 r/min 离心 10min, 取上清和沉淀分别进行 15% 的 SDS-PAGE 分析。

按 QIAGEN 公司的 QIAexpressionist™ 蛋白纯化系统操作指南进行亲和层析法纯化[25]。非变性电泳的操作步骤基本类似 SDS-PAGE 变性电泳。只是上样缓冲液, 电泳缓冲液, 浓缩胶, 分离胶配方均不含有 SDS。电泳过程在 4℃ 条件下进行。电泳胶片进行染色固定后快速脱色拍照。

1.8 重组表达蛋白的分离与定量

镍柱亲和层析法纯化的可溶性鲈鱼 hepcidin 重组表达蛋白离心后用 0.22 μm 的滤器过滤, 经葡聚糖 Superdex 75 HR26/60 层析柱进一步层析分离, 连于快速蛋白分离纯化系统—AKATA FPLC 上, 控制流速为 1 mL/min。收集的样品进行非变性电泳分析, 单体的浓度通过 UV 光谱法测定 [Concentration Hepcidin (mg/mL)=0.5× A_{280}], 其中 0.5 是通过 OMIGA 软件分析的目的蛋白的吸光系数。鲈鱼 hepcidin 蛋白单体进一步通过 Sephadex G-50 分子筛过柱脱盐。

1.9 鲈鱼 Hepcidin 可溶性单体的生物学活性测定

用生理盐水将蛋白浓度调至 0.1 mg/mL。采用琼脂平板扩散法(牛津杯)测定鲈鱼 hepcidin 可溶性蛋白单体对鲈鱼哈维氏弧菌的抑菌效果。将挑取固体平板活化的哈维氏弧菌单菌落分别接种于 2216E 液体培养基, 28℃ 震荡培养至菌悬液浓度为 1.0×10^7

cfu/mL。每个平皿倒入 15 mL 2216E 固体培养基, 冷却后, 加入 200 μL 菌悬液并涂板后, 放置牛津杯, 并向每个牛津杯中加入倍比稀释的鲈鱼 Hepcidin 可溶性蛋白单体, 同时加入 0.85% 的生理盐水作为阴性对照。28℃ 培养过夜。

2 结果

2.1 鲈鱼 hepcidin cDNA 序列的测定与分析

Trizol 试剂从鲈鱼肝脏中提取的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 可获得大小约为 300 bp 左右的条带, 符合预期大小(图 1)。测序结果显示, 此序列全长 261 bp(去除引物序列)(GenBank accession No. FJ518814), 为鲈鱼 hepcidin 的完整阅读框。序列分析显示, 克隆的鲈鱼 hepcidine cDNA 序列编码 86 个氨基酸组成的前体多肽, 前体多肽序列的第 24 和 25 位氨基酸之间(A²⁴-V²⁵)存在一个潜在信号肽酶识别位点, 以及一个可被前体肽转化酶识别的 RX(K/R)R 基序(R⁶¹H⁶²K⁶³R⁶⁴)。因此, 鲈鱼的前体蛋白由 24 个氨基酸的信号肽、40 个氨基酸的前结构域和 22 个氨基酸的成熟肽组成。该前体蛋白的分子量为 9.4 kD、等电点为 4.5, 成熟蛋白的分子量则为 2.3 kD, 等电点为 7.9。鲈鱼 Hepcidin 成熟蛋白含有 8 个疏水性氨基酸残基(A⁶⁵F⁷⁰G⁷³P⁷⁷G⁷⁸V⁷⁹L⁸²F⁸⁶), 以及 8 个保守的半胱氨酸(C⁶⁸C⁷¹C⁷²C⁷⁴C⁷⁵C⁸⁰C⁸³C⁸⁴), 参与形成 4 个分子内二硫键。

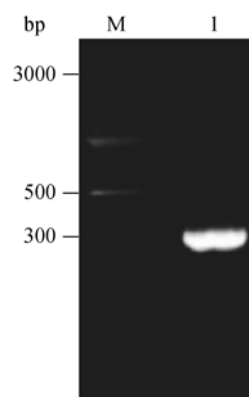


图 1 鲈鱼 hepcidin 基因 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR products of hepcidin of *Lateolabrax japonica*
M. Marker; 1. 鲈鱼 hepcidin 扩增产物
M. Marker (100—3000 bp); 1. hepcidin of *Lateolabrax japonica*

2.2 与其他动物 Hepcidin 蛋白的一致性及亲缘关系
与 GenBank 中登录的 22 种动物的 Hepcidin 氨基酸序列进行比较发现, 鲈鱼 Hepcidin 前体蛋白与

SDS-PAGE 电泳后,多聚体被还原成单一条带(图 4-3)。

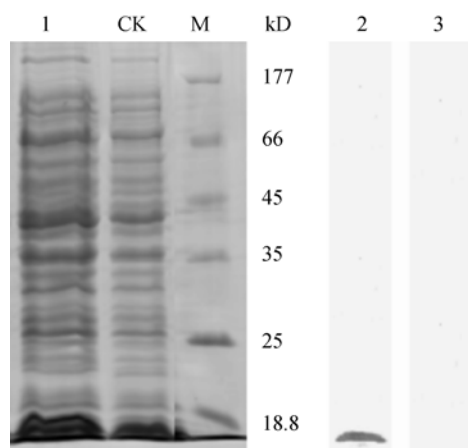


图 3 SDS-PAGE 和 Western-blotting 鉴定鲈鱼 hepcidin 在 pET28a(+)表达系统中的表达

Fig. 3 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of *LjFishep* expressed in pET28a(+) system

1. 诱导 4h 后的重组菌; CK. 诱导 0h 后的重组菌; M. 蛋白 Marker; 2. 重组表达蛋白被抗 6×His 单抗识别; 3. 阴性对照菌体蛋白不被抗 6×His 单抗识别

1. BL21(DE3)(+)/pET- *LjFishep* induced for 4h; CK. BL21(DE3)(+)/pET- *LjFishep* induced for 0h; M. protein molecular weight marker; 2. rLjFishep protein recognized by mAb against 6×His; 3. extracts of negative control bacteria didn't react with mAb against 6×His

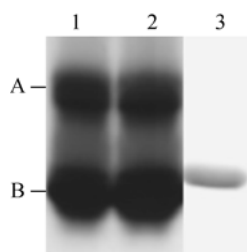


图 4 可溶性 rLjFishep 非变性(1、2)及对应变性电泳(3)

Fig. 4 Soluble rLjFishep by native-PAGE (lane 1, 2) and SDS-PAGE(lane 3)

A. 重组表达蛋白多聚体; B. 重组表达蛋白单体

A. rLjFishep multimers; B. rLjFishep monomer

2.5 可溶性蛋白单体的分离

利用 ÄKTA FPLC 对可溶性单体进行分离后得到 3 个主要的峰,经非变性电泳分析得知,峰 A 为一些细胞碎片的污染物,峰 B 为重组表达蛋白的多聚体和单体的混合物,峰 C 为可溶性蛋白的单体组分(图 5)。UV 光谱法测得单体的浓度为 1.2 mg/mL。

2.6 可溶性蛋白单体的体外抑菌试验

对获得的重组鲈鱼 Hepcidin 单体蛋白进行倍比稀释,采用琼脂平板扩散法进行活性测定,每稀释度 3 个重复。结果显示,鲈鱼 Hepcidin 蛋白单体对

致病性鲈鱼哈维氏弧菌具有抑菌作用,且呈剂量依赖性,可溶性蛋白单体抑制哈维氏弧菌的最低剂量为 6.25 $\mu\text{g/mL}$ (图 6)。

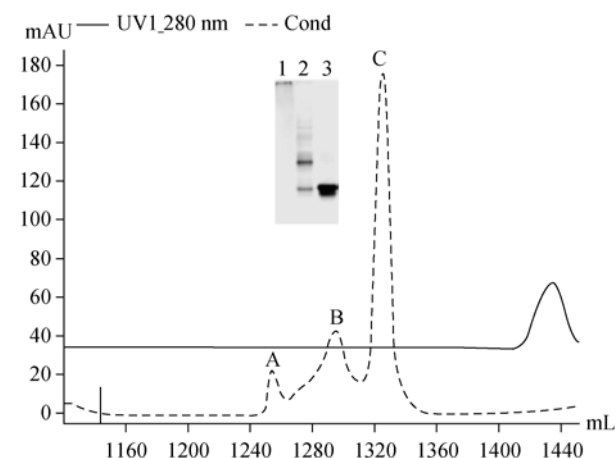


图 5 色谱和非变性电泳分析可溶性 rLjFishep 蛋白

Fig. 5 Chromatogram and native electroresis analysis of the soluble rLjFishep fractioned by ÄKTA FPLC

A. 细胞碎片污染物; B. 重组蛋白多聚体; C. 重组蛋白单体; 1. 峰 A 样品; 2. 峰 B 样品; 3. 峰 C 样品

A. cell debris contaminant; B. rLjFishep multimers; C. rLjFishep monomer; 1. Fractions from peak A; 2. fractions from peak B; 3. fractions from peak C

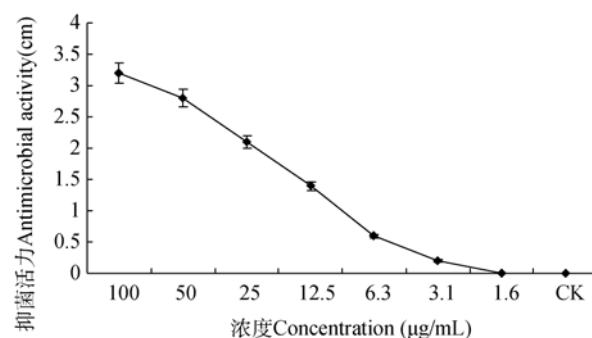


图 6 可溶性蛋白单体对鲈鱼哈维氏弧菌抑菌活性

Fig. 6 Antimicrobial activity of rLjFishep monomer against *Vibrio harveyi* from *Lateolabrax japonica*

CK 表示 0.85%生理盐水 CK indicate 0.85% physiological saline

3 讨论

通过对人 Hepcidin 早期的研究表明, Hepcidin 属于防卫素蛋白家族,因此与以往发现的抗菌多肽类似,人 Hepcidin 具有抑制细菌和真菌生长的作用,是人体“天然免疫”重要的效应分子。成熟 Hepcidin 体外可抑制大肠杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、B 族链球菌、白色念珠菌和曲霉菌的生长繁殖^[2,26]。LPS、poly I:C、多种细菌和病毒物质均可

显著提高鱼体内 hepcidin 基因的表达水平,且在实验过程中发现无论是天然的还是体外表达的 Hepcidin 均具有对多种细菌的杀菌效果,这说明鱼类 Hepcidin 可能在抵抗外来病原入侵方面发挥重要作用^[3—6,9,11—13,15,17,19—21,23]。鱼类 Hepcidin 是鱼体非特异性免疫系统的重要组成部分,当鱼体受到损伤或病原微生物侵袭时候,能迅速产生抗菌肽以预防和杀伤病原微生物的入侵,其合成速度快,在体内扩散迅速、灵活的特点是其他大分子蛋白质(如抗体等)和免疫细胞所不具备的^[26,27]。

尽管 Hepcidin 功能显著,应用前景广阔,但天然 Hepcidin 产量很低,无法从动植物体内大量提取;而化学合成肽价格昂贵。因此,利用基因工程技术生产 Hepcidin 就成为必然选择。近年来,基因工程重组表达鱼类 Hepcidin 抗菌肽的方法有了一些尝试,但是目前看来,要高水平地表达抗菌肽还有很大的难度。目前,原核表达系统表达鱼类 Hepcidin 的研究一般是采用融合蛋白的形式进行的,一是为了减少 Hepcidin 本身对宿主菌的毒害作用;二是为了降低 Hepcidin 对细菌内部的蛋白酶的敏感性^[23,28]。但上述研究表达的目的蛋白都携带了大分子量的外源基因,影响了目的蛋白的生物学活性,必须切除外源基因,才能恢复蛋白的生物学功能。本研究选择 pET-28a(+)表达载体进行表达,并在设计引物时分别添加 Nco I 和 Not I 酶切位点,不带有载体上大的标签序列(上游 His 标签、凝血酶蛋白和 T₇ 标签),只在蛋白 C 端添加 6×His 标签,降低大的外源蛋白序列对目的蛋白的影响。通过培养条件优化,发现当诱导前菌液 A₆₀₀ 达到 1.0 时用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4h 后表达量最高,且可获得相对较多的可溶性 Hepcidin 蛋白。利用镍柱特异性亲和 6×His 的特点,用镍柱亲和层析技术对可溶性蛋白进行了天然纯化,亲和层析法纯化的缓冲液中添加 5% 的甘油,大大提高了蛋白的稳定性,同时在整个纯化过程中均添加 1 mmol/L 的 β-巯基乙醇作为还原剂,防止 Hepcidin 分子内多个二硫键被氧化,使整个过程维持在还原的环境中,对维持蛋白活性起到很好的保护作用。

镍柱初步纯化的蛋白通过非变性电泳分析可知具有单体和各种多聚体组分,由于多聚体的存在能影响蛋白的活性,因此为了进一步分离得到可溶性蛋白单体,利用快速蛋白分离纯化系统和葡聚糖凝

胶层析分离技术,设置各种参数体系,成功分离得到了单一的鲈鱼 Hepcidin 单体组分。生物学活性实验结果显示鲈鱼 Hepcidin 单体具有生物学活性,这为其后续体内外生物学功能研究及其临床应用奠定了基础。

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 activity [J]. *FEBS letters*, 2000, **480**(2-3): 147—150
- [2] Park C H, Valore E V, Waring A J, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(11): 7806—7810
- [3] 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
- [4] Douglas S E, Gallant J W, Liebscher R S, et al. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, **27**(6-7): 589—601
- [5] Zhang Y A, Zou J, Chang C I, et al. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, **101**(3-4): 259—269
- [6] Shike H, Shimizu C, Lauth X, et al. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, **28**(7-8): 747—754
- [7] Wang K J, Zhou H L, Yang M. A Novel hepcidin-like Antimicrobial Peptide Isolated from the Japanese Bass (*Lateolabrax japonicus* Cuvier et Valenciennes) [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, **43**(3): 237 [王克坚, 周红玲, 杨明. 海水养殖鲈鱼分离出一种 hepcidin 抗菌肽新基因. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**(3): 237]
- [8] Ren H L, Wang K J, Zhou H L, et al. Cloning and organisation analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, **21**(3): 221—227
- [9] 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, **49**(4): 1608—1612
- [10] Hirono I, Hwang J Y, Ono Y, et al. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *FEBS Journal*, 2005, **272**(20): 5257—5264
- [11] Bao B, Peatman E, Li P, et al. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection [J]. *Developmental and*

- Comparative Immunology*, 2005, **29**(11): 939—950
- [12] Bao B, Peatman E, Xu P, *et al.* The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated [J]. *Molecular Immunology*, 2006, **43**(4): 367—377
- [13] Zheng W, Liu G, Ao J, *et al.* Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with poly I:C [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, **21**(4): 414—430
- [14] Rossi F, Chini V, Cattaneo A G, *et al.* EST-based identification of genes expressed in perch (*Perca fluviatilis*, L.) [J]. *Gene Expression*, 2007, **14**(2): 117—127
- [15] 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
- [16] 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, **46**(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, **46**(3): 390—395]
- [17] Chen S L, Li W, Meng L, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, **22**(3): 172—181
- [18] Yang M, Wang K J, Chen J H, *et al.* Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, **23**(5): 1060—1071
- [19] Cho Y S, Lee S Y, Kim K H, *et al.* Gene structure and differential modulation of multiple rockbreem (*Oplegnathus fasciatus*) hepcidin isoforms resulting from different biological stimulations [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, **33**(1): 46—58
- [20] Lauth X, Babon J J, Stannard J A, *et al.* Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(10): 9272—9282
- [21] Cuesta A, Meseguer J, Esteban M A. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream [J]. *Molecular Immunology*, 2008, **45**(8): 2333—2342
- [22] Wang G L, Xue L Y, Jin S, *et al.* Epidemiological studies on the skin ulcer disease of *Lateolabrax japonicus* in marine cage culture [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2000, **24**(4): 392—395 [王国良, 薛良义, 金珊, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病的流行病学研究. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 392—395]
- [23] Li W, Chen S L. Fusion expression of hepcidin gene from *Paralichthys olivaceus* in *Escherichia coli* [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2007, **17**(7): 765—770 [李伟, 陈松林. 牙鲆抗菌肽 hepcidin 基因在大肠杆菌中的融合表达. 高技术通讯, 2007, **17**(7): 765—770]
- [24] Zhou J Y, Chen J G, Wang J Y, *et al.* cDNA cloning and functional analysis of goose interleukin-2 [J]. *Cytokine*, 2005, **30**(6): 328—338
- [25] Qi J, Chen J G, Wang J Y, *et al.* Expression of Goose Interleukin-2 gene in *Escherichia coli* and Isolation of Its Soluble Monomer [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, **24**(2): 183—187 [齐静, 陈志刚, 王金勇, 等. 鹅 IL-2 基因在大肠杆菌中的表达及其可溶性单体的分离. 生物工程学报, 2008, **24**(2): 183—187]
- [26] Hunter H N, Fulton D B, Ganz T, *et al.* The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(40): 37597—37603
- [27] Ai Q H, Mai K S. Advance on nutritional immunity of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(3): 425—430 [艾庆辉, 麦康森. 鱼类营养免疫研究进展. 水生生物学报, 2007, **31**(3): 425—430]
- [28] Srinivasulu B, Syvitski R, Seo J K, *et al.* Expression, purification and structural characterization of recombinant hepcidin, an antimicrobial peptide identified in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, **61**(1): 36—44

PROKARYOTIC EXPRESSION AND FUNCTION ANALYSIS OF *LATEOLABRAX JAPONICA* *HEPCIDIN*

CHEN Ji-Gang, YANG Ji-Fang, REN-Ping and ZHOU Jing-Jing

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100)

Abstract: The cysteine-rich peptide Hecpidin was known to be an antimicrobial peptide and iron transport regulator that had been found in mammals. Numerous teleost *hepcidin* sequences had been published and showed that Hecpidin was widespread among fish. The teleost Hecpidins probably had a function in the defense against invading bacteria as several reports demonstrate an upregulation of the gene expression after treatment with LPS, bacterins or live bacteria. A direct antibacterial effect of some of the synthetic teleost Hecpidins was also demonstrated. Farming of *Lateolabrax japonica* was a growing industry in china. However, bacterial and viral infections were contributing to reduced production. The goal of the present study was to molecularly clone the *Lateolabrax japonica hepcidin* (*LjFishep*) open reading frame (ORF), to express the *LjFishep* ORF in prokaryotic expression, to purify recombinant *Lateolabrax japonica hepcidin* (rLjFishep), and to detect the bioactivity of the rLjFishep *in vitro*. cDNA encoding *LjFishep* ORF was cloned by RT-PCR. Sequencing results showed that the *LjFishep* ORF nucleotide sequence was 261 bp in length, encoding a pre-propeptide of 86 amino acids (aa) with a signal peptide of 24 aa. The predicted molecular weight of the peptide is 9.4 kD. A tentative RX(K/R)R motif for propeptide convertases was also identified suggesting a cleavage site located between Arg⁶⁴ and Glu⁶⁵. The deduced mature amino acid sequence of *LjFishep* was compared with those of the several avian and mammalian species. The results showed that the deduced mature rLjFishep amino acid sequence had 65%, 45.5% and 54.5% identities with *Homo sapiens*, *Xenopus tropicalis* and *Danio rerio* hepcidin in deduced mature amino acid sequence, and also had 82%–85% identities with other fish Hecpidin in deduced mature amino acid sequence. Phylogenetic analysis showed that the *LjFishep* had close relationship with *Oplegnathus fasciatus* and *Perca fluviatilis* hepcidin. Recombinant expression plasmid of pET-28a(+) was constructed by inserting the *LjFishep* ORF without the signal peptide sequence into the prokaryotic expression vector pET-28a(+). An expected protein band was observed on SDS-PAGE gel, recognized by monoclonal antibody against 6×His in western-blotting assay. In the pET-28a(+) expression system, many of the rLjFishep was found in inclusion bodies with a portion of soluble protein by SDS-PAGE. The monomer and multimers of soluble rLjFishep proteins were observed in native electrophoresis. The rLjFishep soluble protein was isolated by a quick protein isolation and purification system of ÄKTA FPLC and identified by native PAGE. Bioactivity analysis showed that the rLjFishep monomer had the antimicrobial activity against *Vibrio harveyi* from *Lateolabrax japonica* in a dose-dependent manner, and the minimal dose for inhibiting *Vibrio harveyi* was 6.25 µg/mL, it could establish a basis for further study the biological function and clinical application of *Lateolabrax japonica* Hecpidin.

Key words: *Lateolabrax japonica*; Hecpidin; Cloning; Expression; Biological function