

# 棕点石斑鱼 Piscidin 样肽基因的克隆及其成熟肽的原核表达

陈大玮<sup>1</sup> 邓利<sup>1\*</sup> 何凡<sup>1</sup> 邱聪龄<sup>1</sup> 马一见<sup>1</sup> 刘志刚<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>深圳大学生命科学学院, 518060)

(<sup>2</sup>深圳大学医学院, 518060)

**摘要** 以简并引物通过 RT-PCR 从重要经济海水鱼类棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus* 白细胞中扩增出一条 388bp 具有完整编码框的 cDNA 序列。Blast 分析初步显示, 该序列属于鱼类抗菌肽 Piscidin 家族的一员, 将其命名为棕点石斑鱼 Piscidin 样肽 (GU592793), 推导氨基酸序列具有界定鱼类 Piscidin 的以下共同特征: (1) 预测的信号肽序列与其他 Piscidin 的同源性较高, 在 60%~95% 之间; (2) 推测的成熟肽 N 端 6 个氨基酸残基富含 Phe、Ile 及 His; (3) 成熟肽第 8 个和第 13 个氨基酸位点均为 Gly。NJ 进化树分析表明, 该 cDNA 推导的氨基酸序列与赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* piscidin-like peptide (ACE78290)、斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* Piscidin-like peptide (ACE78291) 以高达 81% 的支持率聚为一支。也表明本研究成功克隆到棕点石斑鱼首条 Piscidin cDNA 序列。推测的成熟肽为两亲性阳离子肽, 等电点 12.48, Schiffer-Edmunson 预测其二级结构呈  $\alpha$  螺旋构型。将推测的成熟肽序列亚克隆至 pET-32a 构建融合表达载体 pET-32a-pis(EF), 并在大肠杆菌 *E. coli* Origami(DE3) 中成功表达出融合蛋白, 以 1mmol/ml IPTG 于 30°C 进行诱导表达, 4 h 可获得大量表达, 目的蛋白以包涵体形式存在。

**关键词** 抗菌肽 Piscidin 基因克隆 原核表达 棕点石斑鱼

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2011)04-0126-08

## Cloning of antimicrobial piscidin-like peptide and prokaryotic expression of the putative mature peptide in *Epinephelus fuscoguttatus*

CHEN Da-wei<sup>1</sup> DENG Li<sup>1\*</sup> HE Fan<sup>1</sup> QIU Cong-ling<sup>1</sup>

MA Yi-jian<sup>1</sup> LIU Zhi-gang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Shenzhen University, 518060)

(<sup>2</sup>Shenzhen University, School of Medicine, 518060)

**ABSTRACT** A 388bp cDNA sequence with complete open reading frame was amplified by RT-PCR with degenerate primers from leucocytes of *Epinephelus fuscoguttatus*, an important commercial marine fish species. Blast analysis preliminarily suggested that the obtained sequence, which was named as *Epinephelus fuscoguttatus* piscidin-like peptide (GU592793), is a member of fish antimicrobial peptide piscidin family. The deduced amino acid sequence was found to have the common features

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA100308)和广东省大学生创新实验项目(1059010021)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: lideng03@szu.edu.cn

收稿日期:2010-10-17;接受日期:2010-12-22

作者简介:陈大玮(1987-),男,硕士研究生,主要从事海洋动物抗菌肽研究。E-mail: chen\_da\_wei\_sx@163.com

for defining the fish piscidin, including: (1) signal peptide sequence had 60%~95% similarity to other piscidins; (2) six amino acid residues in N-terminal part of the putative mature peptide are rich in isoleucine, phenylalanine, and histidine; (3) the amino acid residues both at position 8 and 13 of the mature peptide are glycines. The phylogenetic neighbor-joining tree showed that the present sequence cluster within the clade of piscidin-like peptide of *Epinephelus akaara* and *Epinephelus coioides* (ACE78290, ACE78291) with 81% bootstrap support. Accordingly, the first piscidin precursor cDNA from *Epinephelus fuscoguttatus* was amplified and reported here. The present putative mature peptide is an amphiphilic and cationic peptide with the calculated isoelectric points of 12.48. A Schiffer-Edmunson plot suggested the peptide had the potential to form an amphipathic  $\alpha$ -helix. The prokaryotic fusion expression vector of predicted mature peptide (pET-32a-pis(EF)) was constructed and expressed in *E. coli* Origami(DE3). The fusion protein containing the present mature peptide was efficiently expressed in the form of inclusion body after 1mmol/ml IPTG induction at 30°C for 4h.

**KEY WORDS** Antimicrobial peptide    Piscidin    Molecular cloning  
Prokaryotic expression    *Epinephelus fuscoguttatus*

棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus* 俗称“老虎斑”,属鲈形目 Perciformes、鲷科 Serranidae、石斑鱼属 *Epinephelus*, 主要分布于太平洋和印度洋热带及亚热带海区,资源量稀少。由于其肉味鲜美、生长快,市场潜力大,养殖前景看好,近年来已经成为福建、广东、海南等地海水养殖的重要名优品种之一(郭永军等 2009)。

在养殖过程中,石斑鱼容易受到包括细菌、真菌以及病毒多种病原体的侵害(邱英华 2007)。在病原感染早期,鱼类主要依赖非特异性体液免疫因子作为抵御各种微生物及其有毒、有害物质等感染与侵蚀的第一道防线(李凌等 2001)。其中,抗菌肽在鱼类防御环境中病原微生物入侵的方面起着重要作用(Jia *et al.* 2000; Dunham *et al.* 2002)。人们已先后从多种鱼类中分离出多种类型的抗菌肽,其中一类是 Piscidin。Silphaduang 等(2001)首次从海洋鱼类杂交条纹鲈(*M. chrysops* × *M. saxatilis*)肥大细胞中分离出 Piscidin,发现该抗菌肽对鱼类的几种病原菌最小抑制浓度低达  $1.2\mu\text{mol/L}$ 。随后人们发现 Piscidin 具有广谱的抗菌活性,而且对病毒、真菌乃至寄生虫也均有一定的抑制作用(Noga *et al.* 2003; Chinchar *et al.* 2004; Colorni *et al.* 2008; Noga *et al.* 2009)。

Corrales 等(2010)通过 Western Blotting 方法在多种重要的养殖鱼类中检测到 Piscidin。目前,有关鱼类石斑鱼 Piscidin 的研究报道较少,本研究根据已报道鱼类 Piscidin cDNA 序列设计简并引物,以棕点石斑鱼白细胞为材料,通过 RT-PCR 扩增出 Piscidin cDNA 序列,构建其推测的成熟肽表达载体,并进行初步表达,以期对棕点石斑鱼抗菌肽 Piscidin 进一步研究及其应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

实验动物棕点石斑鱼于 2010 年 1 月购自深圳市南山区水产品市场。

#### 1.1.2 菌株和载体

pMD18-T、大肠杆菌 Top10 购自 TaKaRa 公司;pET-32a、Origami(DE3)由深圳大学生命科学学院刘士德老师惠赠。

#### 1.1.3 试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司;AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 BBI 公司;pfu 酶、DNA 平端加 A 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;Ex-Taq 酶、限制性内切酶 *Bam*H I 与 *Eco*R I 及 T<sub>4</sub> DNA 连接酶

购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 引物的设计

根据已报道的鱼类 Piscidin 基因序列设计简并引物,上游引物:5'-ATGAGGTGCATCGCSCTCTTT-3';下游引物:5'-GCTTTTGGCTARACAGATTC-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2.2 棕点石斑鱼白细胞总 RNA 的提取

采用尾部静脉取血的方法抽取 2ml 静脉血,按 1:7 的比例加入 10%柠檬酸钠溶液,充分混合后冰上静置。将血液样品 3 000r/min 离心 5min,吸出上层血浆后,将处于血细胞沉淀上层的半透明细胞层(含白细胞)小心分离,置于新的 Eppendorf 管中。采用 Invitrogen 公司 Trizol 试剂提取白细胞总 RNA,提取过程按照试剂说明书进行。通过琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 样品质量。

### 1.2.3 RT-PCR 及其目的基因的克隆与鉴定

取总 RNA 3 $\mu$ g,使用 AMV First Strand 试剂盒,根据试剂盒说明书的实验步骤,合成 cDNA 的第 1 链,以此为模板,采用简并引物进行 PCR 扩增。使用高保真 pfu 酶、以降着 PCR(Touchdown PCR)方法扩增目的基因。

PCR 产物经过 1.5%琼脂糖凝胶电泳后,用 Gel Extraction 试剂盒回收纯化,使用末端加 A 试剂盒在目的 DNA 3'末端加 A,然后与 pMD18-T 载体连接,重组质粒转化入 *E. coli* Top10。菌落 PCR 法初步鉴定阳性克隆,阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.2.4 测序结果比对分析

多个克隆的测序结果经过 ClustalW 软件比对,分析下游引物区域序列的差异。鉴于下游引物为简并引物,根据测序结果中显示出的差别,重新设计特异性引物进行 PCR 验证,回收 PCR 产物进行测序,确定最终的下游序列。

将测序所得最终序列通过 GenBank 进行序列比对,分析其序列同源性,并根据已报道的 Piscidin 成熟肽氨基酸序列比对结果,推测序列中的成熟肽段。信号肽用 SignalP V2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>)在线预测。采用 BioEdit 7 进行序列比对分析,然后用 MEGA 4.1 构建推导氨基酸序列的 Neighbor-joining(NJ)系统进化树,以 Bootstrap 方法对进化树进行评估。本研究分析所用的序列信息见表 1。

### 1.2.5 棕点石斑鱼 Piscidin 成熟肽 pET-32a 融合表达载体的构建

根据推测得到的成熟肽序列片段设计特异性引物,引物 5'添加 BamH I 酶切位点序列,3'端添加 EcoR I 酶切位点序列。以测序载体为模板,Ex-Taq 酶进行 PCR 扩增成熟肽片段,PCR 产物连接至 pMD-T 载体,测序正确后用限制性内切酶 BamH I 与 EcoR I 分别进行单酶切,回收目的片段,与 pET-32a 载体连接,构建 pET-32a-piscidin 原核表达载体,菌落 PCR 法初步鉴定阳性克隆,阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.2.6 棕点石斑鱼 Piscidin 成熟肽 pET-32a 融合表达载体的初步表达

分析测序结果,选择正确构建的棕点石斑鱼 Piscidin 成熟肽 pET-32a 融合表达载体质粒 DNA 转化大肠杆菌 Origami(DE3),从平板上挑取单克隆,接种 20 ml 含有 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基,过夜培养。以未转化质粒的大肠杆菌 Origami(DE3)作为空白对照。过夜培养物按 1:100 接种至 20 ml 新的 LB 培养基(含 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素),培养至 OD<sub>550</sub> 达 0.4~0.6 时,取 1ml 菌液作为诱导前样品,剩余菌液加入 1mol/L IPTG 至终浓度为 1mmol/ml,于 30 $^{\circ}$ C 150r/min 振荡培养进行诱导表达。分别于诱导后 2、4h 取 1ml 菌液,于 7 000 r/min 离心 1min,收集菌体,用 1ml 去离子水重悬,洗去残留的培养基后,再次离心收集菌体,用 100  $\mu$ l 去离子水重悬菌体后,加入 25  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-PAGE 载样缓冲液,混匀后于沸水浴加热 10min,取 6  $\mu$ l 上样进行 SDS-PAGE 电泳分析。取 1ml 诱导 4h 的菌液进行表达产物可溶性分析,按同样方法收集菌体后用 3 ml PBS 重悬菌体,置于冰上超声破碎 30min,取 200  $\mu$ l 超声破碎液,于 12 000 r/min 离心 2min,将上清液移入一个新的 Eppendorf 管中,加入 40  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-PAGE 载样缓冲液,混匀后于沸水浴加热 10min,取 8  $\mu$ l 上样。离心后的沉淀用 100  $\mu$ l 去

表 1 本研究分析所用的序列

Table 1 Information of peptides used in this study

GenBank 登录号 Accession number	名称 Name	物种 Species	GenBank 登录号 Accession number	名称 Name	物种 Species
ADE06665 *	Piscidin-like peptide (PisL)	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	AAX58115	Antimicrobial protein plp (PLP)	<i>Hippocampus kuda</i>
ACE78289	Piscidin-like peptide (PisL)	<i>Larimichthys crocea</i>	Q90ZY0	Pleurocidin (Ple)	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>
ACE78290	Piscidin-like peptide (PisL)	<i>Epinephelus akaara</i>	ABB70232	Pleurocidin (Ple)	<i>Limanda limanda</i>
ACE78291	Piscidin-like peptide (PisL)	<i>Epinephelus coioides</i>	AAP55800	Pleurocidin-like peptide (PleL)	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>
ACS91329	Piscidin (Pis)	<i>Gadus morhua</i>	AAP55796	Pleurocidin-like peptide (PleL)	<i>Limanda ferruginea</i>
ADP37960	Piscidin-4 (Pis4)	<i>Morone chrysops</i> × <i>Morone saxatilis</i>	AAL57318	Moronecidin (Mor)	<i>Morone chrysops</i>
AAU10467	Epinecidin-1 (Epi1)	<i>Epinephelus coioides</i>	AAL49496	Moronecidin (Mor)	<i>Morone saxatilis</i>
ACQ57928	Moronecidin (Mor)	<i>Anoplopoma fimbria</i>	ACQ58110	Dicentracin (Dic)	<i>Anoplopoma fimbria</i>
AAP58960	Dicentracin (Dic)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAV65044	Moronecidin (Mor)	<i>Siniperca chuatsi</i>

注: \* 指本研究序列

Note: \* Sequence obtained in this study

离子水重悬,然后加入 20 μl 5×SDS-PAGE 载样缓冲液,混匀后于沸水浴加热 10min,取 8 μl 上样。SDS-PAGE 电泳条件:20V 预电泳 30min,上样后恒压 80V,直至溴酚蓝指示带进入分离胶后,将电压改为 110V 至结束。

## 2 实验结果

### 2.1 棕点石斑鱼白细胞 Piscidin cDNA 扩增及序列分析

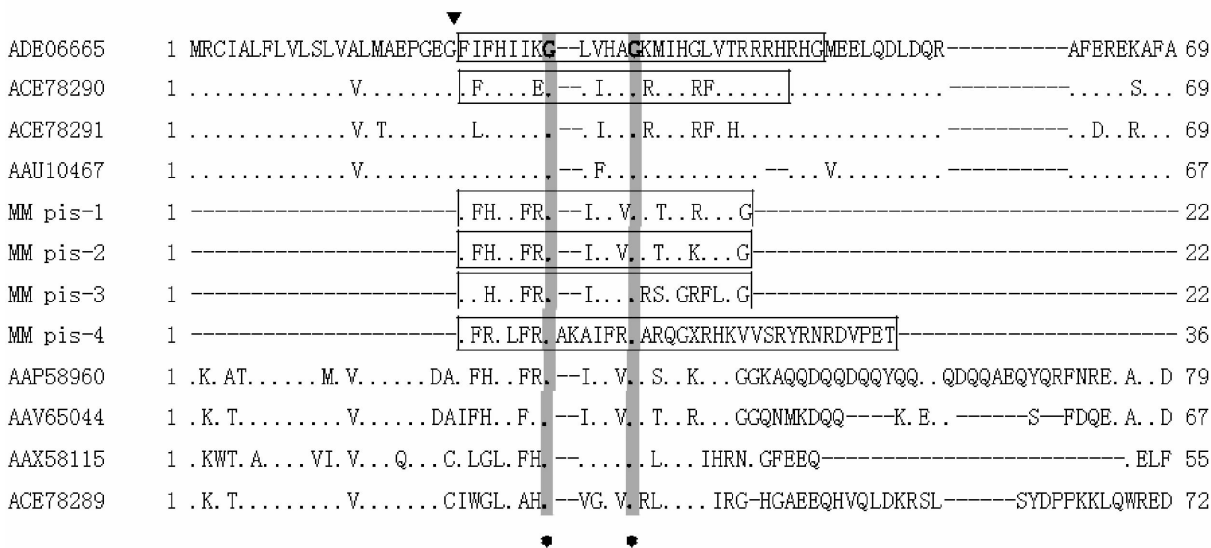
提取棕点石斑鱼白细胞总 RNA,进一步以此为模板进行反转录,采用高保真 pfu 酶 PCR 扩增目的片段,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示,存在与预期目的基因接近的约 390bp 大小的条带,将目的 DNA 条带回收纯化后连接测序载体,测序表明获得一条 388bp 具有完整编码框的 cDNA 序列。该序列现已在 GenBank 注册,登录号为 GU592793。序列经 Blast 比对分析,发现与已知 Piscidin 家族成员具有较高相似性,因此将其命名为棕点石斑鱼 Piscidin 样肽(Piscidin-like peptide)。该序列的 cDNA 序列及其推导出的氨基酸序列见图 1。推导的氨基酸序列与 GenBank 中已登录的赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara*

```

1      atg agg tgc atc gcc gtc ttt ctt gtg ttg tcg ctg gtg gcc ctc
1      M  R  C  I  A  L  F  L  V  L  S  L  V  A  L
                                     Signal peptide
46     atg gct gaa ccc ggg gag ggt ttt atc ttc cac atc atc aaa gga
16     M  A  E  P  G  E  G  F  I  F  H  I  I  K  G
91     ctc gtt cac gct ggc aag atg atc cat gga ctt gtc acc agg aga
31     L  V  H  A  G  K  M  I  H  G  L  V  T  R  R
136    cga cat cha cat ggc atg gaa gag ctg caa gac ctg gac caa cgt
46     R  H  R  H  G  M  E  E  L  Q  D  L  D  Q  R
181    gcc ttt gaa cga gag aaa gct ttt gcc tga gtccatgatagcccagtga
61     A  F  E  R  E  K  A  F  A  *
230    aggagccactcattgttaacacaaaaaagaattttgttttgagtataggaagta
290    tagggtaacaaaataatttacactgacaaatgatattggaaaagcicaattatgtta
350    gttattgaaataaactggaaactgtgttacgcaaaag
    
```

图 1 棕点石斑鱼 Piscidin-样肽 cDNA 及其推导的氨基酸序列  
Fig. 1 The cDNA and its deduced amino acid sequences from *E. fuscoguttatus* piscidin-like peptide

Piscidin-like peptide(ACE78290)、斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* Piscidin-like peptide(ACE78291)及 Epinecidin-1(AAQ57624)同源性较高,分别高达 88%、86%、93%。通过 SignalP V2.0 World Wide Web Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>)在线预测,该 cDNA 所推导氨基酸序列的信号肽切割位点在 22<sub>Gly</sub>/23<sub>Phe</sub> 之间,信号肽序列与所比对的其他 Piscidin 信号肽的同源性较高,在 60%~95% 之间。在信号肽之后的 6 个氨基酸残基富含 Ile、Phe 及 His,而且第 8 个和第 13 个氨基酸位点均为 Gly,这符合大多数鱼类 Piscidin 氨基酸序列的典型特征(图 2)。



注：“▼”示本研究序列信号肽切割位点，“.”表示对应位点与本研究序列氨基酸残基相同，“-”表示比对缺口(Alignment gaps)，“\*”指示为本研究序列信号肽之后以及 MM pis-1/2/3 成熟肽第 8 位和第 13 位的 Gly，文本框内序列是直接分离出的活性肽或预测的成熟肽。其中 MM pis-1、MM pis-2 MM pis-3 及 MM pis-4 为杂交条纹鲈(*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) piscidin-1、2、3(Noga *et al.* 2001)及 piscidin-4(Noga *et al.* 2009)，其他序列信息见表 1

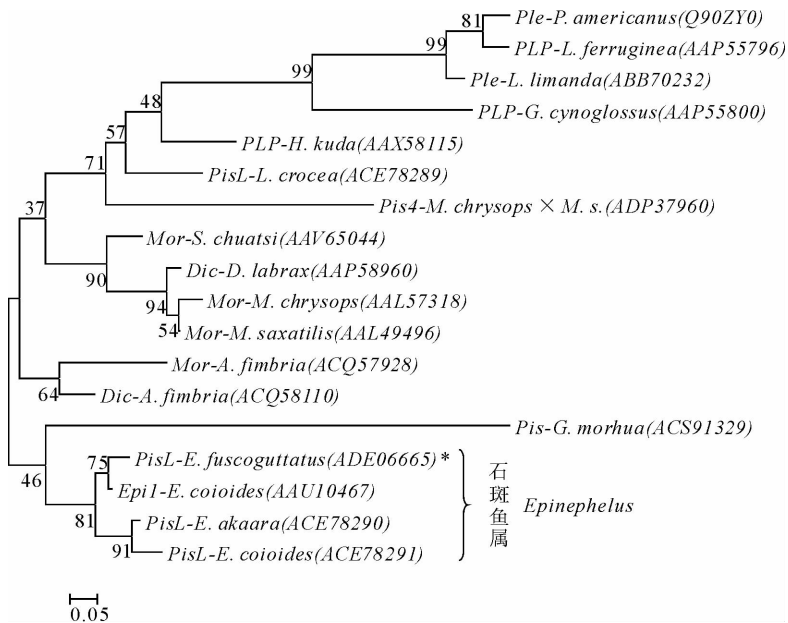
图 2 部分鱼类 Piscidin 样肽 cDNA 推导的氨基酸序列比对

Fig. 2 ClustalW multiple sequence alignment of deduced piscidin peptides from some species in teleost

以 NJ 法构建的鱼类 Piscidin 样肽推导氨基酸序列进化树见图 3，所分析的序列聚为两个大群，石斑鱼 Piscidin 样肽及 Epinecidin-1 与大西洋鳕 *Gadus morhua* 的 Piscidin 聚为 1 个群，而大黄鱼 *Larimichthys crocea* Piscidin 样肽及杂交条纹鲈 *M. chrysops* × *M. saxatilis* Piscidin-4 与多种鱼类的 Moronecin、Dicentracin、Pleurocin 及 Antimicrobial protein plp 聚为 1 个群；其中石斑鱼属 3 种鱼的 Piscidin 样肽及斜带石斑鱼 *E. coioides* Epinecidin-1 以高达 81% 的支持率聚为一枝。

### 2.2 重组 pET-32a-piscidin 表达载体的构建和初步表达

将棕点石斑鱼 Piscidin 预测成熟肽 cDNA (84bp) 亚克隆至 pET-32a 质粒构建表达载体 pET-32a-pis(EF)，转化入大肠杆菌 *Origami*(DE3) 菌株中进行培养，以 1mmol/ml



注：进化枝上数值表示 1 000 次重复抽样所得的支持率(百分率)；

\* 所指的是本研究获得的序列

Note: Numbers on the branch represent the percentage of 1 000 bootstrap samples supporting that branch; \*. Sequence obtained in the present study

图 3 以 NJ 法绘制的鱼类 Piscidin 样肽推导氨基酸序列进化树

Fig. 3 The phylogenetic neighbor-joining tree of deduced amino acid sequences of fish piscidin-like peptide

IPTG 于 30℃ 进行诱导表达。由于 pET-32a-pis (EF) 的表达产物理论上应为 Piscidin 成熟肽与硫氧还蛋白 (Thioredoxin, Trx) 及二者之间存在的蛋白纯化标签 (6×His-Tag、S-Tag)、蛋白酶消化位点等序列的融合蛋白,分子量约为 21kDa,由图 4 可见目的融合蛋白 (Trx-piscidin) 已被成功表达,诱导 4 h 可获得大量表达,目的蛋白以包涵体形式存在,可溶性蛋白比例极少。

### 3 讨论

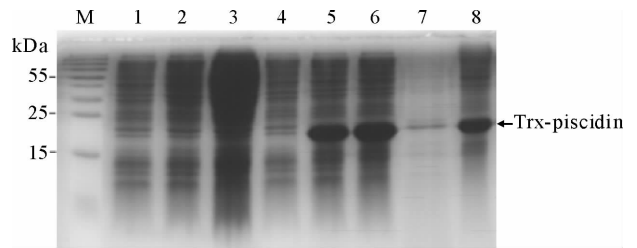
#### 3.1 获得棕点石斑鱼首条 Piscidin 样肽 cDNA 序列

Silphaduang 等 (2001) 首次从海洋鱼类杂交条纹鲈,肥大细胞中分离出 Piscidin。随后他们提出鱼类存在一个抗菌肽新家族即 Piscidin 家族,认为同一种鱼中可能存在不同的 Piscidin 基因亚型 (Isoform) (Noga *et al.* 2003)。至今报道的多数 Piscidin 样前体蛋白均存在较为保守的 22aa 信号肽、22~27aa 的成熟肽,以及一段长度不等、氨基酸残基多变的 C 端,成熟肽 N 端 6 个氨基酸残基富含 Phe、Ile、His (Fernandes *et al.* 2010)。本研究从棕点石斑鱼白细胞 cDNA 中扩增得到一条 388bp 具有完整编码框的 cDNA 序列 (GenBank Accession No. GU592793),所推导氨基酸序列与 GenBank 中已登录的赤点石斑鱼 Piscidin-like peptide (ACE78290)、斜带石斑鱼 Piscidin-like peptide (ACE78291) 及 Epinecidin-1 (AAQ57624) 同源性分别高达 87%、86%、93%,在线预测其信号肽为 N 端 22aa。紧随信号肽的 6 个氨基酸残基由 Phe (2 个)、Ile (3 个)、His (1 个) 组成,符合大多数鱼类 Piscidin 其氨基酸序列的典型特征。另外, Lee 等 (2007) 发现杂交条纹鲈鱼 Piscidin-1 (22aa) 的第 8 个和第 13 个氨基酸位点的 Gly 对于 Piscidin-1 螺旋结构的维持与生物活性的发挥有关键作用,由图 2 序列比对可见多种鱼类的 Piscidin 样抗菌肽在信号肽之后的第 8 个和第 13 个氨基酸位点几乎都是 Gly,本文序列也不例外。由此可见,本研究获得棕点石斑鱼首条 Piscidin 样肽 cDNA 序列。

近年来有学者提议,在某些鱼类发现的抗菌肽虽然最初是以其物种类型命名,但是由于其序列同源性及其成熟肽 N 端具有 Piscidin 的特征,可以将这些抗菌肽归入 Piscidin 家族,如金眼石鲷 *Morone chrysops* 等鱼类的 Moronecidin、狼鲈 *Dicentrarchus labrax* 等鱼类的 Dicentracin、美洲拟鲈 *Pseudopleuronectes americanus* 等鱼类的 Pleurocidin 以及大海马 *Hippocampus kuda* 的 Antimicrobial protein plp (Sun *et al.* 2007; Salger *et al.* 2010)。本研究以 NJ 法绘制的鱼类上述有关抗菌肽 cDNA 推导氨基酸序列进化树显示所分析的序列聚为两个群,大西洋鳕 *Gadus morhua* Piscidin 与石斑鱼多条 Piscidin 样肽及 Epinecidin-1 聚为 1 个群,其中石斑鱼属 3 种鱼的 Piscidin 样肽及斜带石斑鱼 Epinecidin-1 以高支持率聚为一支,进一步表明,本研究成功获得棕点石斑鱼的一条 Piscidin 样肽;而大黄鱼 *Larimichthys crocea* Piscidin 样肽和杂交条纹鲈 *M. chrysops* × *M. saxatilis* Piscidin-4 与多种鱼类的 Moronecidin、Dicentracin、Pleurocidin 及 Antimicrobial protein plp 聚为 1 个群。由此可见,该进化树支持上述学者的观点,应该将 Epinecidin-1、Moronecidin、Dicentracin、Pleurocidin 及 Antimicrobial Protein plp 归入鱼类抗菌肽 Piscidin 家族。就目前资料显示,尚未在除鱼类以外的其他动物中报道类似 Piscidin 的基因, Piscidin 是否为鱼类特有的抗菌肽值得进一步研究。

#### 3.2 棕点石斑鱼 Piscidin 成熟肽分析与表达

随着水产养殖业的迅速发展,鱼类病害显示出逐渐加重的态势。养殖中使用抗生素或化学性渔药,会导致



M: 标准蛋白分子量蛋白 Marker; 1~3: 分别为未转化质粒的大肠杆菌 Origami(DE3) 在诱导前菌体蛋白及诱导后 2h 与 4h 样品; 4~8: 分别为转化 pET-32a-pis(EF) 的大肠杆菌 Origami(DE3) 在诱导前、诱导后 2h 与 4h 的菌体蛋白样品, 以及诱导后 4h 菌体超声处理的上清及沉淀蛋白样品  
M: Protein marker; Lane 1~3 showed products from control *E. coli* Origami (DE3) without IPTG inducement, with IPTG inducing 2h and 4h respectively; Lane 4~8 showed products from expression vector pET-32a-pis(EF) transduced *E. coli* Origami (DE3) without IPTG inducement, with IPTG inducing 2h and 4h, and protein samples of supernatant and pellet of 4h-inducing-*E. coli* by ultrasonic treatment, respectively

图 4 重组表达载体 pET-32a-pis(EF) 在大肠杆菌 Origami(DE3) 中的表达

Fig. 4 Expression of recombinant vector pET-32a-pis(EF) in *E. coli* Origami(DE3)

细菌耐药性、食品安全以及环境残留等问题。鱼类抗菌肽是鱼体非特异性免疫的重要组成部分,而且抗菌肽独特的抗菌机制使其具有不易产生耐药性的特点,为新型抗菌药物的开发提供新来源和新思路,对于健康养殖有积极意义。抗菌肽在动物体内是以成熟肽的形式发挥生物学效应,关于 Piscidin 成熟肽的确定,尚未见文献对其深入讨论。鱼类另一类抗菌肽 Hepcidin 前体蛋白大多具有一个前体转化酶作用基序[RX(K/R)R](Hilton *et al.* 2008),Silphaduang 等(2001)从杂交条纹鲈鱼体直接分离出的活性多肽 Piscidin-1、2、3 长度均为 22aa,说明 Piscidin 成熟肽可能是 20 余个氨基酸,但是由本文序列比对可见,切除信号肽的 Piscidin N 端 20 余个氨基酸之后 C 端序列同源性较低,不具有一个高同源特征性前体转化酶作用基序。因此鱼类抗菌肽 Piscidin 前体肽转变为成熟肽的切割位点及机理有待研究。

Chen 等(2008)报道赤点石斑鱼 Piscidin-like 成熟肽为紧邻信号肽后的 27aa,但未见其确定依据。本研究获得的棕点石斑鱼 Piscidin 在信号肽之后有 22aa 与斜带石斑鱼和赤点石斑鱼 Piscidin-like 以及杂交条纹鲈 Piscidin-1、2、3(22aa)具相似性,紧随其后的序列则与斜带石斑鱼和赤点石斑鱼 Piscidin-like 高度同源,均存在“RR—RHG”序列,考虑到杂交条纹鲈 Piscidin-1、2、3 的 C 末位氨基酸均为 Gly,因此,本研究拟以“FIFHI-IKGLVHAGKMIHGLVTRRRHRHG”序列作为推测成熟肽进行下一步研究。对该肽段进行 Schiffer-Edmundson 螺旋构型图和疏水性分析,可见二级结构为典型  $\alpha$  螺旋,具两亲性,N 端疏水性高,而 C 端则亲水性较高,pI 理论值为 12.48,属阳离子多肽,表明其结构特点与 Piscidin-1、2、3 及 4 类似,属于  $\alpha$  螺旋构型的两亲性阳离子抗菌肽(Noga *et al.* 2003、2009)。Piscidin 的抗菌机理被认为是多个单体整合入细菌细胞膜形成超环面孔(Toroidal pore)而使细菌裂解(Campagana *et al.* 2007)。Piscidin 的抗菌谱广,包括对多个耐药菌株具有抑菌活性,而且对病毒、真菌乃至寄生虫也均有一定的抑制作用(Noga *et al.* 2003、2009; Chinchar *et al.* 2004; Colorni *et al.* 2008),近期的研究还显示,斜带石斑鱼 Epinephelus-like 1(作者建议将其列入 Piscidin 家族)的化学合成多肽具有抑制肿瘤细胞生长的作用(Lin *et al.* 2009),可见鱼类 Piscidin 展现出广阔应用前景。

尽管 Piscidin 的应用前景诱人,但从动物体内提取天然 Piscidin 难以达到产业水平,而直接通过化学合成则成本太高,因此利用现代生物技术生产基因重组 Piscidin 就成为必然选择。有关 Piscidin 重组表达的研究资料甚少,仅见 Moon 等(2007)进行 Piscidin-1 重组表达研究。Piscidin 重组表达研究尚在起步阶段,探索高活性、高水平表达是研究的重点。王 炜等(2009)采用 pET-32a 成功在大肠杆菌中高效表达了家蝇天蚕素,显示该表达载体硫氧还蛋白具有分子伴侣作用,掩蔽表达出的抗菌肽,从而减小表达时对原核宿主菌的伤害,能够实现高效表达。本研究将棕点石斑鱼 Piscidin 预测成熟肽序列亚克隆至表达质粒 pET-32a,成功构建了融合表达载体 pET-32a-pis(EF),目的融合蛋白(Trx-piscidin)已被成功表达,并且主要以包涵体的形式表达,可溶性蛋白比例极少。本研究结果为后续有关棕点石斑鱼 Piscidin 的生物活性及其应用研究奠定重要基础。

## 参 考 文 献

- 王 炜,郑学礼,陈晓光. 2009. 应用伴侣分子在大肠杆菌表达系统高效表达家蝇天蚕素. 热带医学杂志, 9(2): 128~131,139
- 李 凌,吴灶和. 2001. 鱼类体液免疫研究进展. 海洋科学, 25(11):20~22
- 邱英华. 2007. 石斑鱼的病害与防治. 水产科技, 5: 11~13
- 郭永军,邢克智,徐大为,陈成勋,王庆奎,王晓雪,张树森,杨永海. 2009. 棕点石斑鱼的肌肉营养成分分析. 水产科学, 28(11): 635~638
- Campagana, S., Saint, N., Molle, G., and Aumelas, A. 2007. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry*, 46:1 771~1 778
- Chen, Y., Xu, B., and Su, Y. Q. 2008. The amplification and sequence analysis of piscidin-like gene from two marine fish *Epinephelus akaara* and *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Biotechnology*, 136(Supplement 1): S545
- Chinchar, V. G., Bryan, L., Silphaduang, U., Noga, E., Wade, D., and Rollins-Smith, L. 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*, 323: 268~275
- Colorni, A., Ullal, A., Heinisch, G., and Noga, E. J. 2008. Activity of antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *J. Fish Dis.* 31:423~432
- Corrales, J., Mulero, I., Mulero, V., and Noga, E. J. 2010. Detection of antimicrobial peptides related to piscidin 4 in important aquacultured fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 34: 331~343

- Dunham, R. A., Warr, G. W., Nichols, A., Duncan, P. L., Argue, B., and Middleton, D. 2002. Enhanced bacterial diseases resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol.* 4:338~344
- Fernandes, M. O. J., Ruangsri, J., and Kiron, V. 2010. Atlantic cod piscidin and its diversification through positive selection. *PLoS ONE* 5(3): e9501
- Hilton, K. B., and Lambert, L. A. 2008. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates. *Gene*,415(1-2): 40~48
- Jia, X., Patrzykat, A., Devlin, R. H., Ackerman, P. A., Iwama, G. K., and Hancock, R. E. 2000. Antimicrobial peptides protect *coho salmon* from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1 928~1 932
- Lee, S. A., Kim, Y. K., Lim, S. S., Zhu, W. L., Ko, H., Shin, S. Y., Hahm, K. S., and Kim, Y. 2007. Solution structure and cell selectivity of piscidin 1 and its analogues. *Biochemistry*, 46(12): 3 653~3 663
- Lin, W. J., Chien, Y. L., Pan, C. Y., Lin, T. L., Chen, J. Y., Chiu, S. J., and Hui, C. F. 2009. Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. *Peptides*, 30: 283~290
- Moon, W. J., Hwang, D. K., Park, E. J., Kim, Y. M., and Chae, Y. K. 2007. Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein Expression and Purification*, 51:141~146
- Noga, E. J., and Silphaduang, U. 2003. Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News Perspect*, 16: 87~92
- Noga, E. J., Silphaduang, U., Park, N. G., Seo, J. K., Stephenson, J., and Kozlowicz, S. 2009. Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 152: 299~305
- Salger, S. A., Reading, B. J., Baltzegar, D. A., Sullivan, C. V., and Noga, E. J. 2011. Molecular characterization of two isoforms of piscidin 4 from the hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1):420~424
- Silphaduang, U., and Noga, E. J. 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, 414: 268~269
- Sun, B. J., Xie, H. X., Song, Y., and Nie, P. 2007. Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family; the piscidins. *J. Fish Dis.* 30: 335~343

## 《海洋水产研究》期刊于 2009 年 1 月起更名为《渔业科学进展》

### 各有关单位、各位读者:

经国家新闻出版署 2008 年 11 月 13 日(新出报刊[2008]1324 号文)和山东省新闻出版局 2008 年 12 月 11 日(鲁新出批字[2008]325 号文)批准,从 2009 年 1 月起,《海洋水产研究》期刊更名为《渔业科学进展》(英文名:Progress in Fishery Sciences),ISSN 1000-7075,国内统一刊号:CN 37-1466/S,国内邮发代号:24-153,国外发行代号:4578Q。刊期仍为双月刊。

更名后,本刊栏目包括研究论文、研究综述和研究简报等,内容涵盖各类水域渔业科学研究最新成果,涉及与渔业科技有关的各学科门类的研究进展。本刊主要报道渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术、水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。希望各位领导、各位专家,一如既往地关心和支持我们的工作,踊跃为《渔业科学进展》刊物投稿。

祝愿各位领导、各位专家工作顺利、万事如意!

《渔业科学进展》编辑部

2011 年 8 月 20 日