

黄鳝皮肤黏液抗菌肽的分离纯化及其部分特性研究

李联泰 安贤惠 胡江 许宁 张晓磊 王静

(淮海工学院 江苏省海洋资源开发研究院, 连云港 222005)

摘 要 以黄鳝皮肤黏液为材料, 通过 Sephadex G-50 凝胶层析和 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析, 分离纯化了具有抗菌和镇痛活性的多肽 MAS-IV-4, 用 Tricine-SDS-PAGE 测得其分子量为 10.4 kD, 用显微熔点仪测得其熔点为 208~211 °C。用抑菌圈法测定其抑菌活性, 结果表明, MAS-IV-4 对嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有较强的抑菌效果。此外, 每只注射 0.75 ml 以上的 MAS-IV-4 样品液能显著提高小白鼠的痛阈值。MAS-IV-4 还具有微弱的溶血活性和丝氨酸蛋白酶抑制活性。

关键词 黄鳝 皮肤黏液 抗菌肽 痛阈值 溶血活性

中图分类号 S942.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0027-07

Isolation, purification and partial characterization of anti-bacteria peptide from the skin mucus of *Monopterus albus*

LI Lian-tai AN Xian-hui HU Jiang XU Ning ZHANG Xiao-lei WANG Jing

(Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang 222005)

ABSTRACT An anti-bacterial and analgesic bioactive peptide named MAS-IV-4 was isolated from the skin mucus of *M. albus* and purified by Sephadex G-50 gel chromatography and DEAE Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography. The molecular weight of MAS-IV-4 was estimated by Tricine-SDS-PAGE as 10.4 kD, and its melting point was measured by microscopic melting point meter as 208~211 °C. The anti-bacteria activity of MAS-IV-4 was assessed by determination of the inhibition zone. The results showed that the growth of *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* was strongly inhibited by MAS-IV-4. In addition, the pain threshold of the mice was significantly increased when 0.75 ml or more of MAS-IV-4 were injected. MAS-IV-4 also demonstrated weak hemolytic activity and serine protease inhibiting activity.

KEY WORDS *Monopterus albus* Skin mucus Anti-bacteria peptide
Pain threshold Hemolytic activity

在动物体内, 作为先天免疫最终效应物之一的抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs), 在防御和消除外来

病原体(如病原微生物等)对机体的侵袭和破坏等方面具有重要的作用,而且其结构和作用机制在进化上是非常保守的,这也揭示出它在先天免疫等方面扮演着重要的角色(Kozlov *et al.* 2006)。抗菌肽具有抗细菌、真菌、原虫和一些有被膜病毒的作用,作用机制独特,不易产生耐药性,在医药卫生和食品防腐等方面有着广阔的应用前景(Kamysz *et al.* 2005)。黄鳝 *Monopterus albus* 是我国名贵的淡水鱼类之一,其肉质细嫩,营养丰富,除食用价值外还具有一定的药用价值,也是我国出口创汇的重要水产品之一(胡王 2010)。黄鳝抗病力较强,除了在水质恶化或鳝体受伤时感病外,在自然条件下很少发病(王锐 2009),这种自身的适应能力预示着它在免疫防御方面有着独特的机制。近年来,黄鳝的人工养殖获得了迅速发展,但对黄鳝自身抵御外源病菌物质的研究却很少。本研究的目的是分离纯化黄鳝抗菌肽,对其性质进行初步研究,为黄鳝的综合开发利用、提高产品附加值奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料和菌株

黄鳝,购自江苏省连云港市水产品市场。

实验菌株:A组:嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、鲁克氏耶尔森菌 *Yersinia ruckeri* 和鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*。B组:大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和白色念珠菌 *Candida albicans*。以上均为本实验室保存。

1.1.2 器材

Sephadex G-50 和 DEAE Sepharose Fast Flow 填料(Amersham Biosciences),Biologic Duoflow 蛋白质层析系统(美国伯乐公司),LG-5 真空冷冻干燥机(上海市离心机械研究所),XA-3 显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司),BH22 型生物显微镜(日本 Olympus 公司),血细胞计数板(上海求精生化试剂仪器公司),Synergy HT 多功能微孔板检测仪(美国 BioTek 公司),美国 Corning Costar 48 孔酶标板(上海富众生物科学有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 皮肤黏液的制备

从市场购买中等大小的黄鳝,于自来水中暂养 0.5 d,以排除体内杂物。将黄鳝捞出用蒸馏水冲洗两次后,分别置于圆标本缸(120 mm×200 mm)中,在其体表撒上少许氯化钠,以刺激其分泌黏液,然后用手(带乳胶手套)轻捋其体表,获皮肤黏液,用高速冷冻离心机在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液冷冻保存备用。

1.2.2 Sephadex G-50 凝胶层析分离

选用 26 mm×1 000 mm 层析柱、Sephadex G-50 凝胶填料,按李建武等(1994)的方法处理、装柱,用 0.1 mol/L PBS (pH 6.0)平衡、上样、洗脱、收集,测定 280 nm 和 220 nm 处的紫外吸收值,以管号为横坐标、A 值为纵坐标作图,对收集的各峰进行抗菌活性检测。

1.2.3 透析除盐

将 Sephadex G-50 分离的各峰进行离心(12 000 r/min,4 °C,5 min),取上清液,放入透析袋(截留分子量 3 500 Da)中,用 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)透析约 3 h,中间更换缓冲液 1 次。

1.2.4 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析

选用 12 mm×200 mm(实装 160 mm)层析柱,DEAE Sepharose Fast Flow 填料,Biologic Duoflow 蛋白质层析系统,平衡 5 个柱体积,再上样、用洗脱液 A 和 B 梯度洗脱。洗脱液 A:0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8),洗脱液 B:洗脱液 A 中添加 0.8 mol/L NaCl。流速 1.0 ml/min。根据 Biologic Duoflow 蛋白质层析系统配套软件显示的分峰,分别进行收集,然后置-40 °C 冰箱中深度冷冻 24 h 以上,再用 LG-5 真空冷冻干燥机对其进行冷冻干燥,-40 °C 保存。

1.2.5 MAS-IV-4 分子量的测定

参照 Schagger 等(1987) Tricine-SDS-PAGE 电泳方法,胶浓度为 15%,交联度为 5%。电泳开始时采用 20 V 电压,样品进入浓缩胶中,逐渐被浓缩;当染料前沿进入分离胶时,调节电压至 50 V,继续电泳;溴酚蓝前沿走到离板约 2 cm 处,停止电泳,约需 4 h。用考马斯亮蓝 R250 染色 2 h,冰醋酸-甲醇(体积比 7:10)脱色液脱色直至凝胶背景蓝色褪去,显现清晰的蛋白质色带。

1.2.6 MAS-IV-4 熔点的测定

用 XA-3 显微熔点仪测定样品熔点(刘睿等 2006),具体方法按说明书进行。

1.2.7 抗菌活性检测

采用抑菌圈法(沈萍等 1999),将 7 种指示菌制成约 $A_{600\text{ nm}}=0.06$ 的菌悬液,分别取 100 μl 涂布于 LB 培养基上,用微量移液器取 20 μl 黄鳍皮肤黏液或分离纯化获得的各部分,浸润滤纸(直径 6 mm,2 层),将滤纸片放于涂布菌悬液的培养基上,重复 3 次。以无菌水作对照。A、B 组菌株分别置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 20 h,测定抑菌圈直径。

1.2.8 体外溶血活性检测

参考刘善庭等(2003)血细胞制备方法,取市场活鸡宰杀时流出的新鲜血液约 20 ml,与阿式液(Alsever solution)按 1:1 比例混合置于离心管中,2 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,第 1 次离心得到的上清液即为血浆,保留备用。将沉淀用生理盐水反复洗涤至上清液清澈无红色,然后用生理盐水稀释成 $10^7\sim 10^8$ 个红细胞/ml(显微镜下血细胞计数)的悬浮液备用。取红细胞悬浮液 30 μl ,加入样品溶液 30 μl ,用生理盐水补足至 1.6 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,2 000 r/min 离心 5 min,取上清液 400 μl 加入 48 孔 Costar 孔酶标板,重复 3 次,在 BioTek Synergy HT 酶标仪上测定其 540 nm 吸光值(以生理盐水替代样品为对照)。溶血活性以 A_{540} 表示, A_{540} 越大,说明溶血活性越强。

1.2.9 体外凝血活性检测

取样品 20 μl 于试管中,以等量 PBS 代替样品为对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min,加入 100 μl 鸡血浆(第 1 次离心得到的上清液,见 1.2.8)和 6.25 μl 0.4 mol/L 的 CaCl_2 ,开始计时,每隔 30 s 倾斜试管检查 1 次,当反应体系表面不再流动时,记录所需时间即为血浆凝固时间(刘善庭等 2003)。血浆凝固所需时间比对照短说明促凝血,比对照长说明抑制凝血。

1.2.10 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测

参照安贤惠等(2006)的方法,依次在 Costar 48 孔酶标板上加入 0.05 mol/L pH 7.8 Tris-HCl 410 μl ,0.4%胰蛋白酶(Trypsin) 50 μl ,样品 20 μl ,室温下准确静置 5 min,加发色底物 N-苯甲酰基-L-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐(NBLAN) 40 μl ,迅速震荡均匀,用酶标仪在 405 nm 处扫描 4 min,每 30 s 检测 1 次,计算酶动力学反应。以缓冲液代替样品为对照,通过比较趋势线斜率检测对丝氨酸酶的抑制活性。

1.2.11 对小白鼠痛阈值影响实验

参照陈奇等(1993)的热板法,取体重为 $19\pm 1\text{ g}$ 的雌性健康小白鼠。试验前 1 d,先筛选合格小鼠,取 1 个 1 000 ml 的烧杯替代热板,置于 $55\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中(烧杯底部一定要接触水面)。用左手轻轻抓住小白鼠背部,每次 1 只,将小白鼠放入烧杯内的同时用秒表计时。盖上烧杯,以免小白鼠因受热而从烧杯内跳出。小鼠自放进烧杯至出现因热刺激而舔后足所需的时间(s),作为该鼠的痛阈值,出现舔足反应后将小鼠取出。凡舔后足时间小于 5 s 或大于 30 s 或跳跃者弃之不用。间隔 1 h,重复测定其正常痛阈值,取两次正常痛阈平均值,作为该鼠的给药前基础痛阈值,以平均值不超过 30 s 为合格。

将上述合格的小白鼠分为 15 组,每组 10 只。给药组分别腹腔注射 0.25、0.50、0.75、1.00 ml 样品溶解液,对照组腹腔注射生理盐水 0.5 ml。分别在给药 15、30、60 min 后测定各组的痛阈值。将各组每个小白鼠所测的痛阈值按下列公式计算用药后痛阈值提高的百分率。同时对所得的试验数据采用 t 检验进行比较。

镇痛百分率 = (给药组动物痛阈值 - 对照组动物痛阈值) / 对照组动物痛阈值 $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 黄鳍皮肤黏液的 Sephadex G-50 分离及抑菌效果

黄鳍皮肤黏液经 Sephadex G-50 分离,结果如图 1。收集到 4 个部分,分别命名为 MAS-I、MAS-II、MAS-III 和 MAS-IV。

将分离的 4 个峰的收集液分别滴到滤纸上做抑菌实验,结果见表 1。

由表 1 看出,4 个峰的收集液对 7 种菌的抑菌性能不同,其中 MAS-IV 对嗜水气单胞菌、枯草杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 5 种菌的抑菌效果较好。因此以下试验对 MAS-IV 做进一步分离。

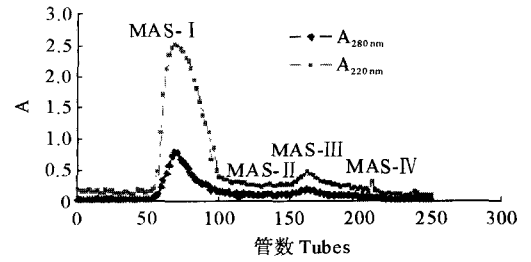


图 1 黄鳍皮肤黏液经 Sephadex G-50 的分离
Fig.1 Sephadex G-50 gel filtration of *M. albus* skin mucus

表 1 Sephadex G-50 分离的 4 个峰的抑菌效果

Table 1 Bacteriostatic activity of the elutes from sephadex G-50 gel filtration of *M. albus* skin mucus

分离峰编号 Separation peak	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone($\bar{x} \pm s, n=3$) (mm)						
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	鲁克氏耶尔森菌 <i>Y. rucker</i>
MAS-I	7.6±1.0	6.3±0.3	7.3±1.1	6.3±0.4	7.3±1.4	6.2±0.3	6.0±0.0
MAS-II	7.2±0.6	6.5±0.4	7.3±0.5	6.5±0.5	7.3±0.6	6.1±0.2	6.2±0.2
MAS-III	9.5±1.7	8.7±1.5	8.3±1.1	9.5±1.4	8.2±0.8	6.1±0.1	6.8±0.3
MAS-IV	10.5±1.8	9.5±1.7	10.3±0.9	10.3±0.8	9.8±0.9	6.2±0.2	6.6±0.4
蒸馏水(对照) Distilled water (Control)				6.0			

注:滤纸片直径为 6.0 mm Note: Diameter of filter papers: 6.0 mm

2.2 MAS-IV 的 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析分离及抑菌效果

将 MAS-IV 经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析分离,结果见图 2。共收集到 7 个峰,命名为 MAS-IV-1、MAS-IV-2、MAS-IV-3、MAS-IV-4、MAS-IV-5、MAS-IV-6 和 MAS-IV-7,图 2 中分别标注为 1、2、3、4、5、6、7。

将收集到的 7 个峰分别对嗜水气单胞菌、枯草杆菌、白色念珠菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行抑菌活性检测,结果见表 2。

从表 2 看出, MAS-IV-4 对嗜水气单胞菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果较好。

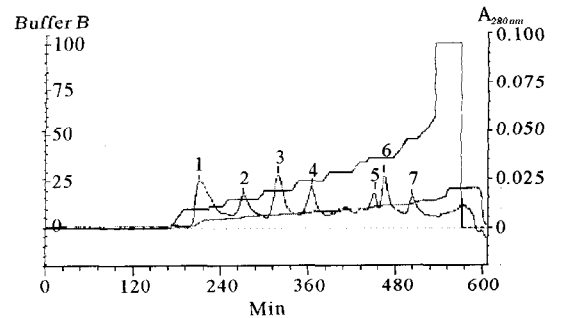


图 2 MAS-IV 经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析的分离结果

Fig.2 DEAE Sepharose Fast Flow filtration of MAS-IV

2.3 MAS-IV-4 的分子量测定

用 Tricine-SDS-PAGE 电泳测定 MAS-IV-4 分子量及纯度,结果见图 3。

由图 3 看出, MAS-IV-4 为单一条带,说明该抗菌肽已纯化。通过蛋白分子量与迁移率的回归方程,计算出 MAS-IV-4 抗菌肽的分子量为 10.4 kD。

表 2 MAS-IV 离子交换层析分离峰的抑菌效果

Table 2 Bacteriostatic activity of fractions of MAS-IV DEAE Sepharose Fast Flow filtration

分离峰编号 Separation peak	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone($\bar{x} \pm s, n=3$)(mm)				
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
MAS-IV-1	6.8±0.3	7.0±0.4	7.0±0.5	6.5±0.2	6.8±0.2
MAS-IV-2	7.2±1.0	6.3±0.1	6.5±0.2	6.3±0.4	6.8±0.3
MAS-IV-3	9.5±1.0	8.2±0.6	7.2±0.6	7.5±0.7	8.7±1.7
MAS-IV-4	11.5±0.7	10.5±0.8	7.2±0.3	7.2±0.3	10.8±0.9
MAS-IV-5	7.3±0.2	6.5±0.2	6.5±0.3	7.2±0.6	7.0±0.5
MAS-IV-6	6.4±0.5	6.5±0.3	6.3±0.3	6.5±0.5	6.5±0.4
MAS-IV-7	6.2±0.3	6.2±0.2	6.0±0.2	6.5±0.3	6.7±0.5
蒸馏水(对照) Distilled water(Control)	6.0				

注:滤纸片直径为 6.0 mm Note: Diameter of filter papers: 6.0 mm

2.4 MAS-IV-4 的熔点

经 XA-3 显微熔点仪测定, MAS-IV-4 抗菌肽的熔点为 208~211 °C。该熔点范围较小, 进一步证明本实验分离的 MAS-IV-4 样品纯度较高。

2.5 MAS-IV-4 的溶血和凝血活性

按方法 1.2.8 对 MAS-IV-4 进行溶血活性检测, 结果见表 3。

从表中可以看出, MAS-IV-4 具有微弱的溶血活性。

按方法 1.2.9 对 MAS-IV-4 进行体外凝血活性试验, 未检测到凝血活性。

2.6 MAS-IV-4 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性

对 MAS-IV-4 进行丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测, 结果如图 4 所示。

由图 4 看出, MAS-IV-4 趋势线的斜率略小于对照, 表明 MAS-IV-4 有微弱的丝氨酸蛋白酶抑制剂活性。

表 3 MAS-IV-4 的溶血活性

Table 3 Hemolytic activity of MAS-IV-4

	MAS-IV-4 的溶血活性(A ₃₄₀) Hemolytic activity of MAS-IV-4(A ₅₄₀)			
	I	II	III	平均 Average
MAS-IV-4	0.021	0.036	0.027	0.030
对照 Control	0	0	0	0

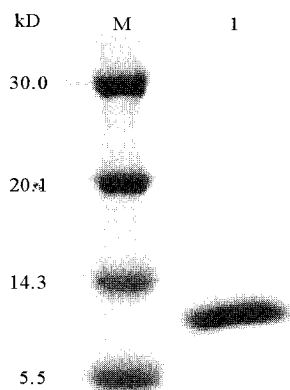
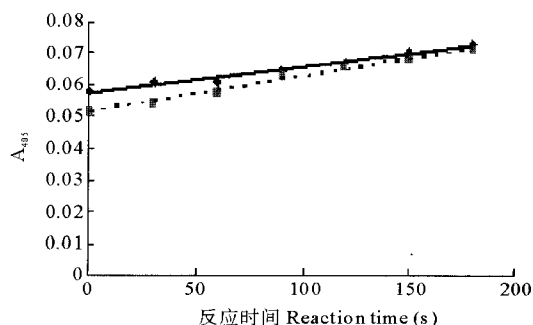


图 3 MAS-IV-4 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳
Fig. 3 Electrophoretogram of MAS-IV-4 by Tricine-SDS-PAGE



图中虚线为对照, 实线为 MAS-IV-4
Dotted line: Control; Solid line: MAS-IV-4
图 4 MAS-IV-4 的丝氨酸蛋白酶抑制剂活性
Fig. 4 Serine protease inhibiting activity of MAS-IV-4

2.7 MAS-IV-4 对小白鼠痛阈值的影响

按 1.2.11 描述的方法,测定 MAS-IV-4 对小白鼠痛阈值的影响,结果见表 4。

从表 4 可以看出,在给药 30 min 后,剂量为 0.75 ml/只和 1.00 ml/只的给药组与空白对照组动物的平均痛阈值有显著增高,差异达到显著水平($P<0.05$)。给药 60 min 后,剂量为 0.75、1.00 ml/只的给药组与空白对照组动物的平均痛阈值差异达到极显著水平($P<0.01$),最大镇痛百分率可达到 98%。但 0.75、1.00 ml/两个剂量组之间无论给药 30 min 还是 60 min,差异均未达到显著水平(表中未标出)。由此表明每只注射 0.75 ml 以上 MAS-IV-4 对小白鼠痛觉功能有明显的影

表 4 MAS-IV-4 对小白鼠痛阈值的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 4 Effect of MAS-IV-4 on the pain threshold of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 Group	注射剂量 Dose (ml/mice)	基础痛阈值 Basic pain threshold (s)	给药不同时间的痛阈值 Pain threshold at different time (s)		
			15 min	30 min	60 min
对照组 Control	生理盐水 0.5 ml Normal saline 0.5 ml	20.3±3.3	11.6±2.5	11.5±1.8	10.8±1.4
	0.25	21.2±2.4	12.5±2.4 (8%)	14.7±1.9 (28%)	14.2±1.9 (31%)
给药组 Treatment	0.50	19.6±3.6	15.1±3.3 (30%)	16.0±3.1 (39%)	17.2±2.2 (59%)
	0.75	20.8±4.1	18.0±2.3 (55%)	20.6±3.9* (79%)	19.4±2.0** (80%)
	1.00	20.6±4.5	20.8±3.6 (79%)	22.6±3.6* (97%)	21.4±2.8** (98%)

注:1. 与空白对照组比较. * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$; 2. 括号内为各给药组动物的镇痛百分率

Note: 1. Compared with the control group: * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$

2. Analgesia percentage of animals in treatment group was in brackets

3 讨论

鱼类(包括黄鳝在内)是低等脊椎动物,以血清免疫球蛋白为中心的系统免疫(Systematic immunity)尚不完善,由肠道、皮肤和鳃及其表面的黏液组成的黏膜免疫系统却很发达。其中皮肤能分泌大量黏液,这些黏液中含有多种活性物质,如黏多糖、糖蛋白、免疫球蛋白及各种水解性酶类、抗菌肽/蛋白等,是抵御病原入侵的第一道屏障,在其免疫中起重要作用。张静等(2007)从黄鳝血清和肠道黏液中分离纯化出免疫球蛋白,林树柱等(2007)从黄鳝血清中分离纯化了黄鳝血清免疫球蛋白,本研究从皮肤黏液中分离出了抗菌肽 MAS-IV-4,它不仅能抑制 G^- 嗜水气单胞菌,而且能抑制 G^+ 枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。这些活性物质的分离和研究,不仅有助于加深人们对黄鳝防御机制的了解,而且为黄鳝的病害防治,尤其是防治黄鳝受伤时嗜水气单胞菌导致的出血性败血症(陈怀青等 1991)提供了理论基础。

丝氨酸蛋白酶可断裂大分子蛋白质中的肽键,使之成为小分子蛋白质。其不仅在食物的消化过程中起重要作用,而且鱼体中肌原纤维会因丝氨酸蛋白酶的作用而产生自溶(胡新颖 2005)。丝氨酸蛋白酶抑制剂能与蛋白酶的活性部位和变构部位结合,抑制酶的催化活性或阻止酶原转化为有活性的酶从而抑制蛋白质的水解。具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的物质可起到防止肌原纤维自溶、提高产品质量的作用,本研究中 MAS-IV-4 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性微弱,其作用也有待提高。

黄鳝抗菌肽 MAS-IV-4 具有镇痛作用,说明其具有生物毒素的作用。生物毒素的存在是一种重要的生命现象,它是自然生物界长期进化发展的具有特殊生物活性的化学产物,而且在生源、化学、功能、作用机制等方

面表现出多重多样性。它的开发利用在农业、环境、灾害防治、医学、药学,尤其在新药研究中具有特殊的重要意义,对开拓药物的新化学结构类型和新作用靶位富有深厚潜力(陈冀胜 2009)。近年来生物毒素的研究主要集中在蛇毒、蜂毒和蝎毒等陆地动物毒素(余晓东 2001a),芋螺、海葵、海洋藻类、海蜇(余晓东 2001b;傅余强等 2000;尹伊伟等 2004;李联泰等 2009)以及河豚和一些贝类如扇贝、贻贝、蛭和蛤(李兆新等 2009)等海洋生物毒素的开发利用上。但对淡水动物毒素研究较少,黄鳍抗菌肽 MAS-IV-4 镇痛作用的研究将对认识淡水动物毒素起到一定的促进作用。

参 考 文 献

- 王 锐. 2009. 黄鳍常见病害的发生及防治. 现代农业科技, (5): 233
- 尹伊伟, 王朝晖, 江天久, 骆育敏. 2004. 海洋藻类毒素的生态毒理学研究. 海洋环境科学, 23(2): 78~80
- 安贤惠, 梁建国, 李卫国, 徐春花, 吕 毅, 王 旭, 董 靖, 张崇星, 张克云. 2006. 中国对虾中抗菌短肽的分离纯化及功能分析. 中国水产科学, 13(6): 1 012~1 016
- 李兆新, 郭萌萌, 杨守国, 邢丽红, 谭志军. 2009. 蛤毒素的研究进展. 渔业科学进展, 30(4): 131~141
- 李联泰, 高 健, 安贤惠, 许 宁, 张晓磊, 阚 飞. 2009. 海蜇毒素的分离纯化及其性质的初步研究. 渔业科学进展, 30(1): 108~114
- 李建武, 肖能贻, 余瑞元, 袁明秀, 陈丽蓉, 陈雅惠, 陈来同. 1994. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 36~46
- 刘善庭. 2003. 药理学实验. 北京: 中国医药科技出版社, 117~118
- 刘 睿, 朱天骄, 朱伟明, 李 冬, 崔承彬, 顾谦群. 2006. 海洋放线菌 S1001 中抗肿瘤活性成分的研究. 中国抗生素杂志, 31(1): 36~38
- 陈怀青, 陆承平. 1991. 嗜水气单胞菌: 黄鳍出血性败血症的病原. 中国人兽共患病杂志, 7(4): 21~23
- 陈 奇. 1993. 药理实验研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 360~361
- 陈冀胜. 2009. 生物毒素——创新药物的源泉. 中国天然药物, 7(3): 161~161
- 沈 萍, 范秀容, 李广武. 1999. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 101~102
- 余晓东. 2001a. 当代生物毒素研究特点和发展趋势——参加第十三届国际动植物微生物毒素会议之感想. 重庆师范学院学报(自然科学版), 18(1): 25~92
- 余晓东. 2001b. 芋螺毒素 Conotoxins 的研究进展. 重庆师范学院学报(自然科学版), 18(4): 83~91
- 张 静, 安利国, 张福森, 谢 萍, 杨桂文. 2007. 黄鳍血清、肠黏液免疫球蛋白的分离纯化及部分特性分析. 水产科学, 26(3): 130~133
- 林树柱, 李万波, 刘先菊, 杨 帆, 全雄志, 宋铭晶, 全志云, 秦 川, 张连峰. 2007. 黄鳍 IgM 的分离纯化及兔抗黄鳍 IgM 抗血清的制备. 中国比较医学杂志, 17(11): 545~746
- 胡 王. 2010. 黄鳍养殖实用技术. 畜牧与饲料科学, 31(2): 104~107
- 胡新颖. 2005. 鲢鱼骨骼肌丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯化、性质鉴定及对肿瘤细胞增殖的影响. 见: 中国优秀博士学位论文全文数据库(博士), 中国农业大学
- 傅余强, 顾谦群, 方玉春, 管华诗. 2000. 海洋生物中蛋白质、肽类毒素的研究新进展. 中国海洋药物杂志, 19(2): 45~50
- Kamysz, W. 2005. Are antimicrobial peptides; an alternative for conventional antibiotics. Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur. 8(1): 78~86
- Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., Feofanov, A. V., Surovov, A. Y., Karpunin, D. V., and Grishin, E. V. 2006. Antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. J. Biol. Chem. 281(30): 20 983~20 992
- Schagger, H., and Von, J. G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368~379