

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220228001

http://www.yyxxjz.cn/

徐倩, 王宁宁, 白莉, 史鲲鹏, 沙珍霞. 俄罗斯鲟肝脏表达抗菌肽2基因的分子特征及抗菌活性分析. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 37-51

XU Q, WANG N N, BAI L, SHI K P, SHA Z X. Molecular characterization and antimicrobial activity analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(3): 37-51

## 俄罗斯鲟肝脏表达抗菌肽2基因的 分子特征及抗菌活性分析\*

徐倩<sup>1</sup> 王宁宁<sup>2</sup> 白莉<sup>3</sup> 史鲲鹏<sup>1</sup> 沙珍霞<sup>1①</sup>

(1. 青岛大学生命科学学院水生生物技术研究院 山东 青岛 266071;

2. 青岛大学基础医学院 山东 青岛 266071; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023)

**摘要** 肝脏表达抗菌肽2 (liver-expressed antimicrobial peptide 2, LEAP-2)在鱼类先天免疫系统中发挥重要作用。本研究通过 RACE 技术获得了俄罗斯鲟 LEAP-2 (*Acipenser gueldenstaedti* LEAP-2, AgLEAP-2)的全长 cDNA 序列,对其序列特征和表达水平进行了分析;构建 AgLEAP-2 原核表达载体并对重组蛋白进行纯化;进一步采用琼脂稀释法初步检测 AgLEAP-2 蛋白的抑菌活性。结果显示, AgLEAP-2 基因 cDNA 全长为 622 bp, 开放阅读框(ORF)为 246 bp, 预测编码 81 个氨基酸, 分子量约为 11.2 kDa, 5'端非编码区为 184 bp, 3'端非编码区为 192 bp。AgLEAP-2 包含一个信号肽(1~25 aa)和一个成熟肽(26~81 aa), 成熟肽含有 4 个保守的半胱氨酸残基, 在 Cys58-Cys69 和 Cys64-Cys74 的相对位置之间各形成一个二硫键的核心结构。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)结果显示, AgLEAP-2 在所有健康组织中广泛表达, 在肝脏中表达水平最高, 在肠道和肌肉中表达水平次之, 在鳃中表达量最低。与 0 h 相比, AgLEAP-2 在感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后的不同时间点的肝脏、脾脏、肠道、头肾、鳃和血液组织中均显著上调。此外, 重组 AgLEAP-2 蛋白(rAgLEAP-2)在体外对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有抗菌活性并存在剂量效应。本研究表明, AgLEAP-2 可能在俄罗斯鲟的先天免疫系统中发挥重要作用且对多种病原菌有一定的抗菌效果, 本研究为开发新的抗菌制剂提供了依据。

**关键词** 肝脏表达抗菌肽2 (LEAP-2); 基因表达; 抗菌活性; 细菌感染; 俄罗斯鲟

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)03-0037-15

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)主要通过参与先天免疫系统来保护生物体免受病原体的侵害(Fjell *et al*, 2011; Nguyen *et al*, 2011)。不同种类的AMP对细菌、病毒和原生动物等均表现出一定杀伤作用(Boas *et al*, 2016; Hong *et al*, 2019; Mohammadi *et al*, 2020; Travkova *et al*, 2017; Shaykhiev *et al*, 2005;

Valero *et al*, 2020)。肝脏表达抗菌肽2 (liver-expressed antimicrobial peptide 2, LEAP-2)属于抗菌肽家族, 是脊椎动物先天免疫系统抵御病原体入侵的关键成分。LEAP-2在进化过程中高度保守, 含有4个高度保守的半胱氨酸残基和2个二硫键, 能破坏细菌细胞膜的结构完整性, 具有抗菌活性(Li *et al*, 2015)。

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014A03XK01)资助。徐倩, E-mail: 2217267555@qq.com

① 通信作者: 沙珍霞, 教授, E-mail: shazhenxia@163.com

收稿日期: 2022-02-28, 收修改稿日期: 2022-03-23

LEAP-2 在脊椎动物中得到了广泛研究, Krause 等(2003)从血液中首次分离出人类 LEAP-2, 并对其进行了鉴定。研究表明, 哺乳动物 LEAP-2 不仅具有抗菌、抗病毒功能, 还具有调节生长发育的作用(Omar *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2018)。鱼类 LEAP-2 的研究主要集中于分子特征和抗菌活性分析上, 最早关于 LEAP-2 的研究是克隆了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 的 LEAP-2A 和 LEAP-2B 基因(Zhang *et al.*, 2004)。进一步研究发现, 鲶鱼(*Silurus asotus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*) LEAP-2 均包含一个信号肽和一个成熟肽, 且成熟肽中包含 4 个高度保守的半胱氨酸残基(Bao *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2020)。

俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)在我国具有一定的养殖规模, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是鲟鱼的主要病原菌, 感染后会出现腹水和组织出血等症状, 导致鲟鱼大量死亡, 从而造成巨大经济损失(Di *et al.*, 2018)。水产养殖业中化学药物和抗生素的禁用, 使得重组抗菌肽研究引起重视。目前, 俄罗斯鲟 LEAP-2 (*AgLEAP-2*)基因的研究未见报道。本研究克隆并鉴定 *AgLEAP-2* 基因, 并对其组织分布情况、病原菌感染后的表达模式以及抗菌活性等进行研究, 旨在为进一步研究鲟鱼 LEAP-2 的病原防御机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鱼为体长(47.5±2.5) cm、体重(450±10) g、1.5 龄的健康俄罗斯鲟(杭州千岛湖鲟鱼集团有限公司提供)。在直径 2 m、水深 0.5 m、水温 17~20 °C 的圆形玻璃钢养殖箱中暂养 15 d, 以备后续实验使用。

实验菌包括用于感染俄罗斯鲟的嗜水气单胞菌, 以及用于体外抗菌活性检测的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、链球菌(*Streptococcus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和希瓦氏菌(*Shewanella*)。实验过程中所用到的菌种均为本实验室长期保存菌种, 冻存于-80 °C。

### 1.2 样品采集

**1.2.1 健康俄罗斯鲟组织样品采集** 选取 3 尾健康俄罗斯鲟个体, 分别收集肝脏、脾脏、肠道、鳃、血液、头肾、后肾、胃、皮肤、脑、心脏、肌肉和卵巢共 13 个组织, 立即置于液氮中冷冻, 然后转入

-80 °C 保存。

**1.2.2 嗜水气单胞菌感染及样品采集** 采用腹腔注射的方式, 注射体积为 100 μL 半致死浓度为  $2.07 \times 10^4$  CFU/g 的嗜水气单胞菌悬液。对照组注射等体积的 PBS 溶液。设定注射前 0 h 和注射后 6、12、24、48 和 72 h 共 6 个时间点, 每个时间点分别采集 3 尾俄罗斯鲟的肝、脾、鳃、血液、头肾和肠 6 种组织, 立即投入液氮中, 并转入-80 °C 保存, 用于 RNA 提取。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

取出冷冻组织, 根据 TransZol Up 试剂盒(全式金)的方法提取组织总 RNA。RNA 浓度和纯度通过微量分光光度计测定, RNA 完整性通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。确定 RNA 质量后, 用 PrimeScript™ 第一链 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA, 于 -20 °C 保存。

### 1.4 *AgLEAP-2* 基因全长 cDNA 的克隆

以俄罗斯鲟性腺转录组数据中筛选出的 *AgLEAP-2* 基因的部分 cDNA 序列为靶序列(Chen *et al.*, 2016), 通过 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 P1 和 P2 (表 1)。以健康俄罗斯鲟 13 个组织的混合 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 并验证其 ORF。普通 PCR 反应体系: 10 μL 2×Taq Master Mix (诺唯赞, 中国), 引物 P1 和 P2 各 1 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 30 个循环(94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min); 72 °C 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并使用胶回收试剂盒(天根, 中国)进行纯化回收。将胶回收产物与 pEASY-T1 载体(全式金, 中国)连接, 42 °C 热激转入 Trans-T1 感受态细胞, 过夜培养并选择阳性克隆进行测序, 获得 *AgLEAP-2* 的 ORF 序列。

按照获得的 *AgLEAP-2* 基因的 ORF 序列, 设计 2 条特异引物(GSP5'和 GSP3'), 通过 RACE 方法扩增未知 cDNA 序列。RACE 扩增的通用引物为 short primer 和 long primer (表 1)。使用 Smart™ RACE cDNA 扩增试剂盒(BD, 美国)进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增。Touchdown PCR 条件: 5 个循环(94 °C 2 min; 94 °C 5 s, 72 °C 3 min); 10 个循环(94 °C 5 s, 70 °C 10 s, 72 °C 3 min); 20 个循环(94 °C 5 s, 64 °C 10 s, 72 °C 3 min); 最后 72 °C 10 min。扩增得到的片段使用 Qiaex II 凝胶提取试剂盒(Qiagen, 德国)进行分离纯化, 纯化产物与载体连接, 转入感受态细胞, 过夜培养并选择阳性克隆进行测序, 获得 *AgLEAP-2* 全长 cDNA 序列。

表 1 本研究中使用的引物及序列  
Tab.1 The primers used in this study

引物 Primers	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'~3')	应用 Application
P1	GCCTTGCTTGGTTCCC	普通 PCR
P2	GTGGTGATACTATGCTGGTT	Regular PCR
P3	ATGAGGACAGTAATCTGCAG	重组表达
P4	CTAAGAAGAAAACACTCGGA	Recombinant expression
P5	TTGCTATCAGCCTCATACTCTT	qRT-PCR
P6	GGTAATCCAGCGCCACA	
P7	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	18S rRNA
P8	CTCATTCCAATTACAGGGCCTC	
长引物 Long primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
短引物 Short primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
GSP5'	CTAAGAAGAAAACACTCGGATTGAGCA	
GSP3'	ATGAGGACAGTAATCTGCAGAGTGT	

### 1.5 生物信息学分析

使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 将 AgLEAP-2 和其他物种 LEAP-2 的氨基酸序列进行同源性比对。采用在线软件 SMART (<http://SMART.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构域。使用在线软件 ExPASy (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 计算 AgLEAP-2 的相对分子量。通过 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找 AgLEAP-2 的开放阅读框。通过 DNAMAN (<http://www.Lynnon.com/>) 进行氨基酸序列比对。通过 MEGA-X 软件, 基于 AgLEAP-2 及其他鱼类 LEAP-2A、LEAP-2B 和 LEAP-2C 的氨基酸序列, 使用 NJ 法构建系统发育树。使用软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 AgLEAP-2 和人类 LEAP-2 蛋白的三维结构。

### 1.6 AgLEAP-2 基因 mRNA 表达水平分析

基于测序获得的 AgLEAP-2 部分 cDNA 序列, 将 qRT-PCR 引物为 P5 和 P6 (表 1), 并将俄罗斯鲟的 18S rRNA 作为内参基因, 引物为 P7 和 P8 (表 1) (Livak *et al*, 2001; Lu *et al*, 2015)。根据 Talent qPCR PreMix (SYBR Green) (天根, 中国) 的说明书, 在 ABI 7500 快速实时定量扩增仪 (ABI, 美国) 进行目的基因 qRT-PCR 检测。每个样本设置 3 个生物重复, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因在不同组织中的相对表达量。

### 1.7 rAgLEAP-2 蛋白的表达和纯化

根据 CDS (coding domain sequence) 区序列, 设计特异性引物 P3 和 P4 (表 1), 用健康俄罗斯鲟 13 种组

织的混合 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增反应。将阳性克隆产物连接到 pEASY-Blunt E1 (全式金, 中国) 上。然后将连接产物转入 BL21 (DE3) 感受态细胞过夜培养, 挑取阳性克隆并测序。

将测序正确的阳性克隆在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中培养, 当 OD<sub>600 nm</sub> 达到 0.6~0.8 时, 使用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 28 °C 条件下, 转速 200 r/min 过夜诱导 12 h。4 °C 条件下, 转速 12 000 r/min 离心 5 min, 收集细菌沉淀。向收集的菌体沉淀中加入 15 mL 裂解液、终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 和 0.3 mg/mL 的溶菌酶, 充分混合并通过离心收集沉淀。将预冷的溶解液加入到沉淀物中, 4 °C 条件下, 磁力搅拌 2 h, 直到溶液透明。离心收集上清液, 用 His Trap FF 1 mL 纯化柱纯化 rAgLEAP-2 蛋白。

### 1.8 体外抗菌活性实验

大肠杆菌、鳃弧菌、希瓦氏菌、链球菌和金黄色葡萄球菌的培养条件见表 2。当菌液吸光度 OD<sub>600 nm</sub>

表 2 实验菌的培养条件  
Tab.2 Culture conditions of experimental bacteria

细菌 Bacteria	培养条件 Culture conditions	
	培养基 Medium	温度 Temperature/°C
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	LB	37
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	2216E	28
希瓦氏菌 <i>Shewanella</i>	LB	30
链球菌 <i>Streptococcus</i>	THY	37
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	LB	37

为 0.6~0.8 时,将菌液稀释至  $10^2\sim 10^3$  CFU/mL。1×PBS 为对照组,将 rAgLEAP-2 蛋白以 100、200、300、400 和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度梯度混合溶解于琼脂培养基中,然后将不同细菌的菌液分别涂布于混合不同浓度 rAgLEAP-2 蛋白的琼脂培养基表面。根据不同菌种的适宜温度培养过夜,第 2 天进行菌落计数并统计分析 rAgLEAP-2 蛋白对不同细菌的抗菌效果。

### 1.9 统计分析

qRT-PCR 结果均以平均值±标准误(Mean±SE)表示,为确保实验过程中数据的准确性,设置 3 个生物学重复,每个生物学重复设置 3 个技术重复。采用 SPSS 26.0 统计软件对嗜水气单胞菌感染组和 PBS 组之间 AgLEAP-2 基因的相对表达量结果进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较,并认为  $P<0.05$  时,具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 AgLEAP-2 基因克隆

通过 RACE 获得 AgLEAP-2 基因全长,其 cDNA 全长为 644 bp,5'-UTR 为 184 bp 和 3'-UTR 为 192 bp。AgLEAP-2 的 ORF 长度为 246 bp,编码 81 个氨基酸。AgLEAP-2 蛋白的分子量为 11.2 kDa,理论等电点为 9.15。信号肽和结构域分析结果显示,该氨基酸序列包含由 25 个氨基酸组成的信号肽和由 43 个氨基酸组成的成熟肽(图 1)。蛋白质结构预测分析表明(图 2A、B),AgLEAP-2 和人类(*Homo sapiens*) LEAP-2 蛋白质均含有 4 个保守的半胱氨酸残基,AgLEAP-2 在 Cys58-Cys69 和 Cys64-Cys74 的相对位置之间分别形成 1 对二硫键,人类 LEAP-2 在 Cys54-Cys65 和 Cys60-Cys70 的相对位置之间分别形成 1 对二硫键,AgLEAP-2 符合 LEAP-2 家族的结构特征。



图 1 AgLEAP-2 基因的核苷酸与氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of AgLEAP-2

大写字母: 开放阅读框; 小写字母: 非编码区; 下划线: 信号肽; 蓝色框: 成熟肽;  
黑色框: 起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG); 灰色阴影: 半胱氨酸残基(C)。

Uppercase letters: ORF; Lowercase letters: UTR; Underline: Signal peptide; Blue box: Mature peptide;  
Black box: Start codon (ATG) and stop codon (TAG); Gray shadow: Cysteine residue (C).

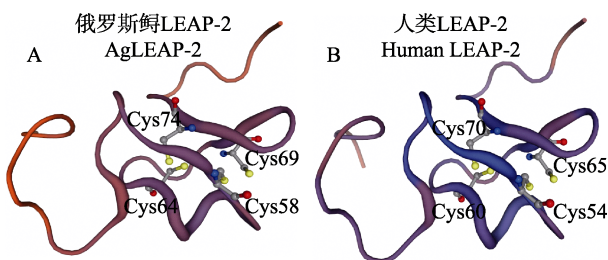


图 2 俄罗斯鲟(A)和人类(B) LEAP-2 蛋白质的空间结构  
Fig.2 Spatial structure of LEAP-2 protein of  
A. gueldenstaedtii (A) and human (B)

### 2.2 氨基酸多重序列比对和系统发育分析

利用 BLAST 和 DNAMAN 软件比较了包含信号肽和去除信号肽的 AgLEAP-2 与哺乳动物、两栖动

物、鸟类和鱼类等 14 种动物的氨基酸序列。氨基酸多重序列比对结果显示,包含信号肽的 AgLEAP-2 与其他物种 LEAP-2 的序列相似性在 38.24%和 100%之间(表 3)。AgLEAP-2 与鱼类的亲缘关系更近,其中与小体鲟(*Acipenser ruthenus*)相似性最高(100%),与欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)相似性最低(55.56%);与哺乳动物、两栖动物和鸟类相比,与人类相似性最高,与热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)相似性最低(38.24%) (图 3A)。去除信号肽的 AgLEAP-2 与其他物种 LEAP-2 序列的相似性为 45.83%~100% (表 4)。其中,与小体鲟和长江鲟(*Acipenser dabryanus*)的相似性最高(100%),与大眼海鲢(*Megalops cyprinoides*)的相似性最低(60.71%);与人类的相似性最高(55.88%),与原鸡(*Gallus gallus*)的相似性最低(45.83%) (图 3B)。

基于上述物种 LEAP-2 的氨基酸序列, 通过 NJ 法构建系统进化树。结果显示, 系统发育树分成 2 个分支, AgLEAP-2 和鱼类为一个分支, 而哺乳动物、两栖动物和鸟类聚集在另一个分支。与 AgLEAP-2 关系最密切的是小体鲟 LEAP-2 (图 4)。基于 AgLEAP-2 和其他鱼类 LEAP-2A、LEAP-2B 和 LEAP-2C 的氨基酸序列构建系统发育树。结果显示, AgLEAP-2 和 LEAP-2C 聚为一个分支。LEAP-2A 和 LEAP-2B 被集中到另一个分支。AgLEAP-2 与中华鲟和小体鲟 LEAP-2C 的亲缘关系最近。

### 2.3 AgLEAP-2 在不同组织中的表达水平

利用 qRT-PCR 分析健康俄罗斯鲟 13 个组织的总 RNA 分布情况(表 1)。结果显示, AgLEAP-2 在不同组织中广泛表达。在鳃中的表达量最低, 其表达量设定为标准值 1.0。表达水平最高的组织是肝脏(80 倍), 其次是肠(55 倍)、肌肉(24 倍)和卵巢(20 倍)。在脾脏、

血液、皮肤和其他组织中的表达水平较低(图 6)。

### 2.4 嗜水气单胞菌感染后 AgLEAP-2 在不同免疫组织中的表达模式

利用 qRT-PCR 技术对俄罗斯鲟 6 种免疫组织中 AgLEAP-2 在不同时间点的 mRNA 表达模式结果进行分析(图 7)。AgLEAP-2 在 6 种免疫组织中的表达在 72 h 内整体呈上调表达趋势( $P < 0.05$ ), 表达量达到峰值的时间点集中在 48 h 和 72 h。肝脏、脾脏、头肾、鳃和血液中的表达量在 72 h 达到峰值。鳃中 72 h 的表达量最高, 是 0 h 的 5 000 倍; 脾脏中的表达量在 72 h 达到峰值, 是 0 h 的 1 500 倍; 头肾中的表达量在 72 h 达到峰值, 是 0 h 的 1 100 倍; 血液中的表达量在 72 h 达到峰值, 是 0 h 的 950 倍; 肝脏的表达量同样在 72 h 达到峰值, 为 0 h 的 150 倍。而肠道中的表达量在 48 h 达到峰值, 是 0 h 的 900 倍, 并且在 72 h 仍保持较高水平, 为 0 h 的 600 倍。

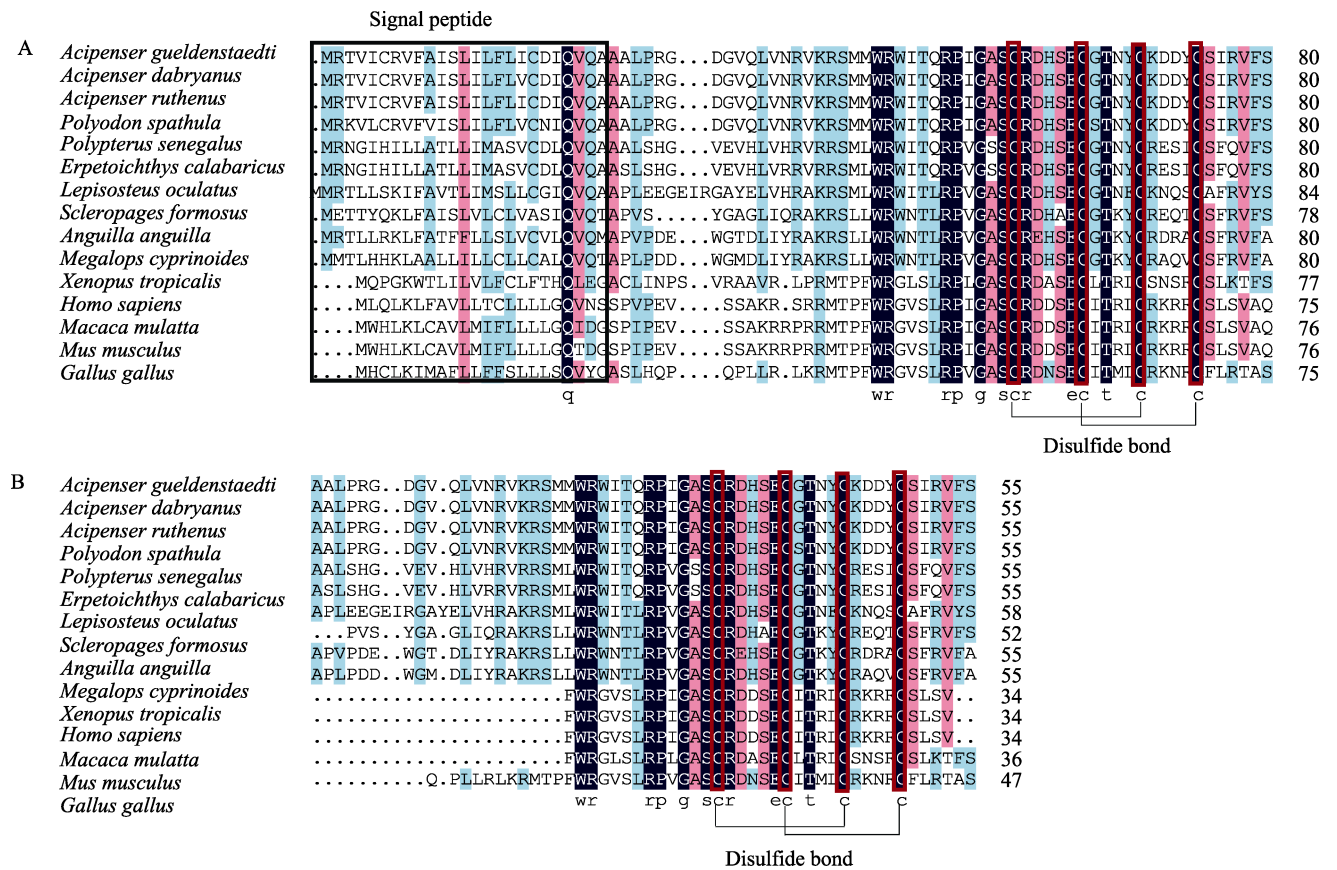


图 3 包含信号肽(A)和去除信号肽(B)的 AgLEAP-2 与其他物种 LEAP-2 多重序列比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of AgLEAP-2 with (A) and without (B) signal peptides with LEAP-2 from other species

100%相同的残基用黑色阴影表示,  $\geq 75\%$ 相同的残基用粉色阴影表示。信号肽用黑框表示。用红框标记的 c 代表半胱氨酸残基, 2 个相邻残基之间形成的二硫键被标记。分析中使用的序列列于表 3 和表 4 中。

100% identical residues are indicated by black shading,  $\geq 75\%$  identical residues are indicated by pink shading. Signal peptides are indicated by black boxes. c marked with red box represents conserved cysteine residue, and disulfide bonds formed between two opposite residues are marked. The sequences used in the analysis are listed in Tab.3 and Tab.4.

表3 含有信号肽的LEAP-2蛋白的两两相似性比较/%  
Tab.3 Pairwise similarity of selected LEAP-2 proteins with signal peptide/%

	俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedti</i>	小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	长江鲟 <i>A. dabryanus</i>	匙吻鲟 <i>P. spatula</i>	塞内加尔多鳍鱼 <i>P. marmorata senegalus</i>	芦鳎 <i>A. formosus</i>	大眼海鲢 <i>M. cyprinoids</i>	雀鳝 <i>A. anguilla</i>	红龙鱼 <i>S. formosus</i>	欧洲鳗鲡 <i>A. sapientis</i>	智人 <i>H. sapiens</i>	原鸡 <i>G. gallus</i>	猕猴 <i>M. mulatta</i>	小鼠 <i>M. musculus</i>	非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>
俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedti</i>	100.00	98.77	92.59	64.20	62.96	61.67	60.71	58.02	55.56	55.88	42.62	41.18	40.35	38.24	
小体鲟 <i>A. ruthenus</i>		98.77	92.59	64.2	62.96	61.67	60.71	58.02	55.56	55.88	42.62	41.18	40.35	38.24	
长江鲟 <i>A. dabryanus</i>			93.83	65.43	64.20	61.67	60.71	59.26	56.79	55.88	42.62	41.18	40.35	38.24	
匙吻鲟 <i>P. spatula</i>				60.49	59.26	60.00	58.33	55.56	54.32	55.88	45.83	41.18	40.35	36.11	
塞内加尔多鳍鱼 <i>P. senegalus</i>				97.53	60.00	60.00	57.14	54.32	53.09	50.00	40.00	47.92	48.94	40.68	
芦鳎 <i>A. marmorata</i>					60.00	60.00	55.95	54.32	53.09	50.00	43.33	52.38	48.94	42.37	
大眼海鲢 <i>M. cyprinoids</i>							55.95	67.90	76.54	58.82	53.49	41.94	45.90	52.78	
雀鳝 <i>A. spatula</i>								57.14	57.14	52.94	40.32	40.00	44.30	40.00	
红龙鱼 <i>S. formosus</i>									67.90	55.88	41.38	36.99	41.43	42.22	
欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>										58.82	51.16	38.96	47.54	51.43	
智人 <i>H. sapiens</i>											77.27	98.70	84.42	54.93	
原鸡 <i>G. gallus</i>												77.27	60.27	68.89	
猕猴 <i>M. mulatta</i>													84.42	54.93	
小鼠 <i>M. musculus</i>														64.71	
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>															

注: GenBank No.: 小体鲟(XP\_033857035.1); 长江鲟(AWM12222.1); *P. spatula* (XP\_041086759.1); *P. senegalus* (XP\_039606710.1); *A. marmorata* (XP\_028658151.1); *M. cyprinoids* (XP\_036384452.1); *A. spatula* (XP\_006626723.2); *S. formosus* (XP\_018609728.1); *A. anguilla* (XP\_035246444.1); *H. sapiens* (2L1Q\_A); *G. gallus* (NP\_001001606.1); *M. mulatta* (NP\_001107582.1); *M. musculus* (NP\_694709.1); *X. laevis* (NP\_694709.1)。下表同。

Note: GenBank No.: *A. ruthenus* (XP\_033857035.1); *A. dabryanus* (AWM12222.1); *P. spatula* (XP\_041086759.1); *P. senegalus* (XP\_039606710.1); *A. marmorata* (XP\_028658151.1); *M. cyprinoids* (XP\_036384452.1); *A. spatula* (XP\_006626723.2); *S. formosus* (XP\_018609728.1); *A. anguilla* (XP\_035246444.1); *H. sapiens* (2L1Q\_A); *G. gallus* (NP\_001001606.1); *M. mulatta* (NP\_001107582.1); *M. musculus* (NP\_694709.1); *X. laevis* (NP\_694709.1)。The same as below.



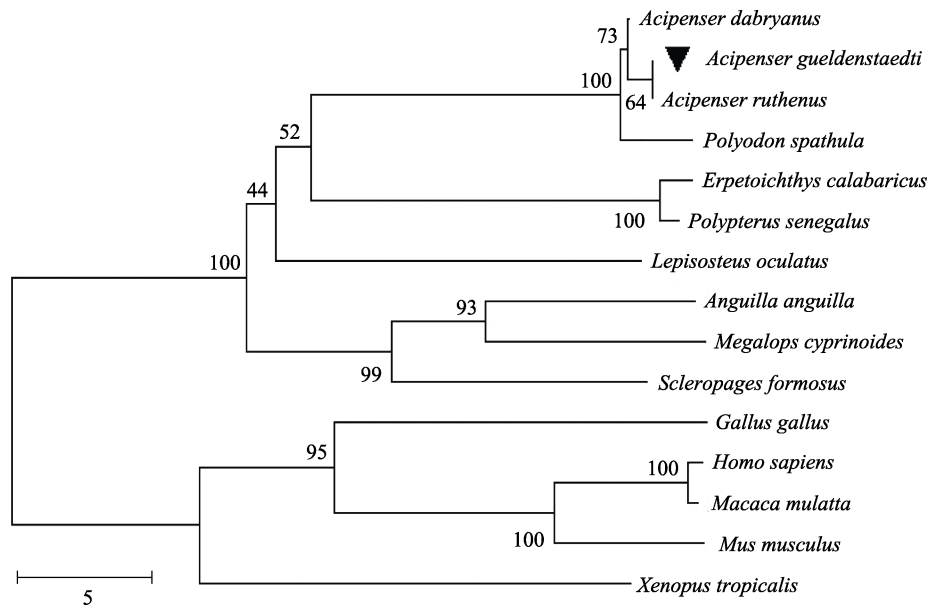


图4 基于 AgLEAP-2 和其他物种 LEAP-2 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of AgLEAP-2 and LEAP-2 from other species

利用 MEGA X 软件, 采用邻接法重复 1 000 次构建系统发育树。“▼”表示 AgLEAP-2。

每个节点代表一个分类单元。各物种的 GenBank 登录号见表 3。

Using MEGA X software, the phylogenetic tree was constructed by repeating the NJ method for 1 000 times.

AgLEAP-2 marked with “▼”. Each node represents a classification unit. The GenBank No. of species are same in Tab.3.

## 2.5 体外抗菌活性分析

采用 IPTG 诱导 AgLEAP-2 重组蛋白表达, SDS-PAGE 电泳显示, 位于 8~15 kDa 处出现一条与预期重组蛋白大小一致的条带。经过 His Trap FF 纯化柱纯化得到 rAgLEAP-2 蛋白条带单一, 其分子量约为 11.2 kDa, 与蛋白质的预测分子量一致(图 8)。rAgLEAP-2 蛋白对革兰氏阳性菌(链球菌和金黄色葡萄球菌)和革兰氏阴性菌(大肠杆菌、鳗弧菌和希瓦氏菌)都表现出良好的抗菌效果, 随着蛋白浓度的增加, 抑菌效果出现剂量依赖性(图 9、10、11、12 和 13)。rAgLEAP-2 蛋白的浓度达到 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 平板上只有少量细菌生长, 菌落数目明显少于空白对照组。

## 3 讨论

本研究对 AgLEAP-2 进行了序列鉴定、表达模式和抗菌活性分析。AgLEAP-2 基因全长 622 bp, cDNA 全长 246 bp, 编码 81 个氨基酸。与大多数哺乳动物和鱼类一样, 由一个信号肽和一个成熟肽组成。成熟肽 AgLEAP-2 包含 4 个保守的半胱氨酸, 并在 2 条链内形成 2 个二硫键。AgLEAP-2 基因序列在进化中高度保守。氨基酸多重序列比对和系统发育树研究发

现, AgLEAP-2 与鱼类的 LEAP-2C 聚集为一个分支, 与长江鲟和中华鲟的 LEAP-2C 相似性最高, 表明 AgLEAP-2 可能属于 LEAP-2C。长江鲟和中华鲟的 LEAP-2B 和 LEAP-2C 已被鉴定为其他鱼类 LEAP-2B 和 LEAP-2C 的同源物(Zhang *et al*, 2018)。鉴于俄罗斯鲟基因组测序研究尚未开展, 从目前我们团队俄罗斯鲟性腺转录组测序和俄罗斯鲟皮肤转录组测序结果未发现 AgLEAP-2 的其他同源物(Chen *et al*, 2016; Gong *et al*, 2019)。

LEAP-2 以不同的模式在脊椎动物的健康组织中广泛表达。研究表明, 鱼类的 LEAP-2 在肝脏中高度表达。LEAP-2A 和 LEAP-2B 基因在虹鳟肝脏中高度表达, 而在其他组织中不表达(Zhang *et al*, 2004)。LEAP-2 在卵形鲳鲹肝脏中的表达量最高, 但肠中表达量最低(Lei *et al*, 2020)。LEAP-2C 在健康长江鲟肝脏中高度表达(Zhang *et al*, 2018)。其他鱼类的 LEAP-2 或 LEAP-2C 也在肠中高度表达。例如, LEAP-2 在健康大黄鱼的肝脏中高表达, 而 LEAP-2C 在肠中高度表达(Li *et al*, 2014)。像大多数脊椎动物一样, AgLEAP-2 在俄罗斯鲟的 13 种健康组织中广泛表达, 在肝脏和肠道中表达水平最高。LEAP-2 在不同物种中表达模式相似, 说明 LEAP-2 在不同物种中功能可能一致, 但它也具有组织和物种特异性。



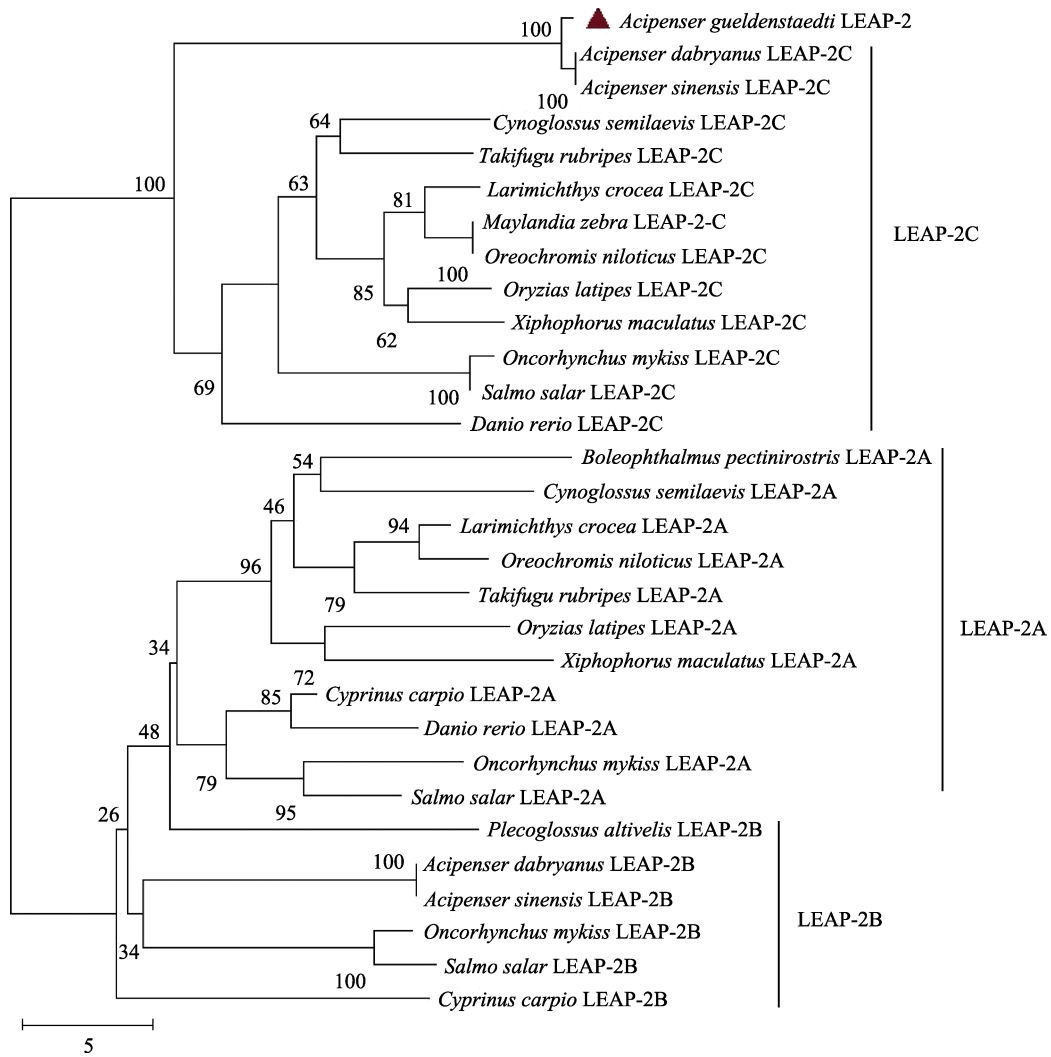


图 5 基于 AgLEAP-2 与其他鱼类 LEAP-2A、LEAP-2B 和 LEAP-2C 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of AgLEAP-2 and LEAP-2A, LEAP-2B and LEAP-2C from other fishes

利用 MEGA X 软件, 采用邻接法重复 1 000 次构建系统发育树。红色三角形表示 AgLEAP-2。每个节点代表一个分类单元。LEAP-2A、LEAP-2B 和 LEAP-2C 来源及 GenBank 登录号如下, LEAP-2A: 大弹涂鱼(ANO39624.1)、锦鲤(AGK89728.1)、滨岸虹鳟(NP\_001117936.1)、大黄鱼(AHY01375.1)、青鳉(XP\_004080006.1)、剑尾鱼(XP\_005806470.1)、红鳍东方鲀(XP\_003966912.1)、斑马鱼(AAI62807.1)、大西洋鲑鱼(XP\_014062864.1)、尼罗罗非鱼(XP\_003457771.1)、半滑舌鳎(XP\_008318762.1); LEAP-2B: 锦鲤(AGK89729.1)、滨岸虹鳟(NP\_001117937.1)、香鱼(AIZ00779.1)、大西洋鲑鱼(XP\_013985003.1)、长江鲟(AWO14378.1)、中华鲟(AWO14379.1); LEAP-2C: 滨岸虹鳟(ADN34603.1)、大黄鱼(AHY01377.1)、青鳉(XP\_004074868.1)、斑马拟丽鱼(XP\_004538259.1)、剑尾鱼(XP\_005810076.1)、红鳍东方鲀(XP\_011603261.1)、斑马鱼(NP\_001373333.1)、大西洋鲑鱼(ADN34604.1)、尼罗罗非鱼(XP\_013126243.1)、半滑舌鳎(XP\_008322564.1)、中华鲟(AWO14380.1)。

Using MEGA X software, the phylogenetic tree was constructed by repeating the NJ method for 1 000 times. The red triangle indicates AgLEAP-2. Each node represents a classification unit. The sources and GenBank No. of LEAP-2A, LEAP-2B and LEAP-2C are as follows, LEAP-2A: *Boleophthalmus pectinirostris* (ANO39624.1), *Cyprinus carpio* (AGK89728.1), *Oncorhynchus mykiss* (NP\_001117936.1), *Larimichthys crocea* (AHY01375.1), *Oryzias latipes* (XP\_004080006.1), *Xiphophorus maculatus* (XP\_005806470.1), *Takifugu rubripes* (XP\_003966912.1), *Danio rerio* (AAI62807.1), *Salmo salar* (XP\_014062864.1), *Oreochromis niloticus* (XP\_003457771.1), *Cynoglossus semilaevis* (XP\_008318762.1); LEAP-2B: *Cyprinus carpio* (AGK89729.1), *Oncorhynchus mykiss* (NP\_001117937.1), *Plecoglossus altivelis* (AIZ00779.1), *Salmo salar* (XP\_013985003.1), *Acipenser dabryanus* (AWO14378.1), *Acipenser sinensis* (AWO14379.1); LEAP-2C: *Oncorhynchus mykiss* (ADN34603.1), *Larimichthys crocea* (AHY01377.1), *Oryzias latipes* (XP\_004074868.1), *Maylandia zebra* (XP\_004538259.1), *Xiphophorus maculatus* (XP\_005810076.1), *Takifugu rubripes* (XP\_011603261.1), *Danio rerio* (NP\_001373333.1), *Salmo salar* (ADN34604.1), *Oreochromis niloticus* (XP\_013126243.1), *Cynoglossus semilaevis* (XP\_008322564.1), *Acipenser sinensis* (AWO14380.1).

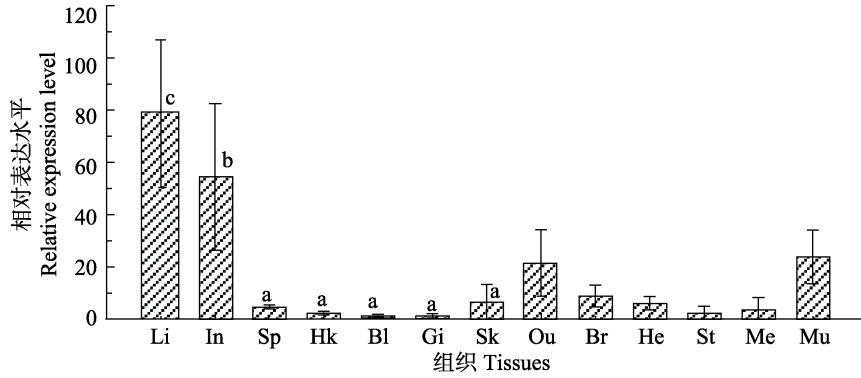


图 6 不同组织中 *AgLEAP-2* 的相对表达量(平均值±标准差,  $n=3$ )

Fig.6 Relative expression levels of *AgLEAP-2* in different tissues (Mean±SD,  $n=3$ )

Li: 肝脏; In: 肠道; Sp: 脾脏; Hk: 头肾; Bl: 血液; Gi: 鳃; Sk: 皮肤; Ov: 卵巢; Br: 脑; He: 心脏; St: 胃; Me: 后肾; Mu: 肌肉。柱上不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Li: Liver; In: Intestine; Sp: Spleen; Hk: Head kidney; Bl: Blood; Gi: Gill; Sk: Skin; Ov: Ovary; Br: Brain; He: Heart; St: Stomach; Me: Metanephros; Mu: Muscle. The different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

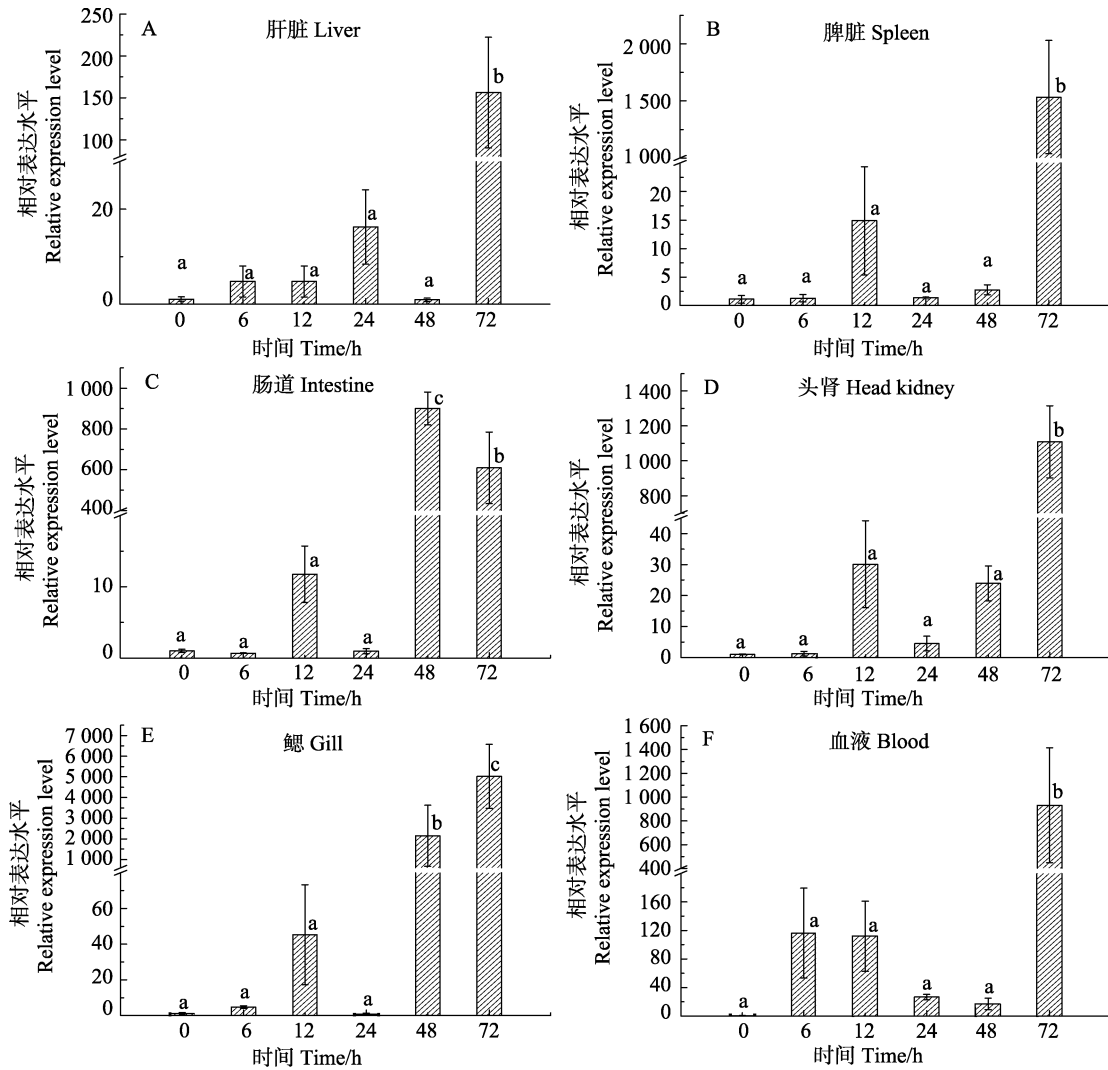


图 7 嗜水气单胞菌感染后 6 种免疫组织中 *AgLEAP-2* 的相对表达量(平均值±标准差,  $n=3$ )

Fig.7 Relative expression level of *AgLEAP-2* in hemocytes after *A. hydrophila* challenge (Mean±SD,  $n=3$ )

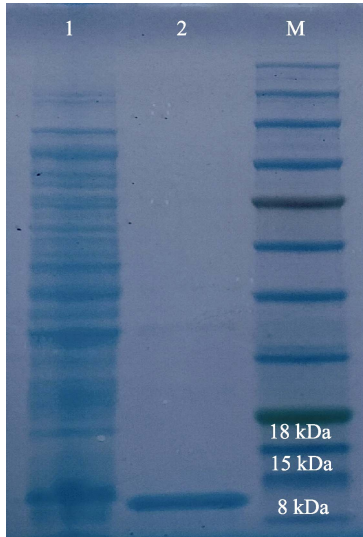


图 8 AgLEAP-2 的 SDS-PAGE 分析  
Fig.8 SDS-PAGE analysis of AgLEAP-2

泳道 M: 标准蛋白分子量标记物; 泳道 1: 纯化前的 rAgLEAP-2; 泳道 2: 纯化后的 rAgLEAP-2  
Lane M: Protein marker; Lane 1: rAgLEAP-2 before purification; Lane 2: Purified rAgLEAP-2

感染嗜水气单胞菌后, *AgLEAP-2* 在俄罗斯鲟的肝脏、脾脏、肠道、鳃、血液和头肾中显著上调, 与其他鱼类的研究结果一致。研究表明, *LEAP-2* 有助于抵抗病原菌的入侵。例如, 经嗜水气单胞菌攻击后, 长江鲟的肝脏、脾脏、血液和中肾中 *LEAP-2* 的表达量显著增加(Zhang *et al*, 2018)。黏膜免疫系统是鱼类整个免疫系统的重要组成部分, 具有独特的结构和功能, 是抵御感染的第一道防线。鳃、肠和皮肤是 3 个重要的黏膜免疫组织, 是鱼类抵抗病原体感染的第一道屏障(Magnadottir, 2006)。例如, 虹鳟感染杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)后, *LEAP-2* 在肠道中高度表达(Zhang *et al*, 2004)。草鱼感染嗜水气单胞菌后, *LEAP-2* 在肝脏、脾脏、皮肤、肌肉和肠道中的表达水平上调(Liu *et al*, 2010)。鲤鱼经过腹腔注射鳃弧菌后, *LEAP-2* 在皮肤中的表达水平显著上调(Yang *et al*, 2014)。本研究表明, 俄罗斯鲟在感染嗜水气单胞菌 72 h 后, *AgLEAP-2* 在鳃和肠中的表达水平分别为 0 h 的 5 000 倍和 600 倍, 显著高于其他组织。综上所述, *AgLEAP-2* 可能参与了俄罗斯鲟的黏膜免疫。

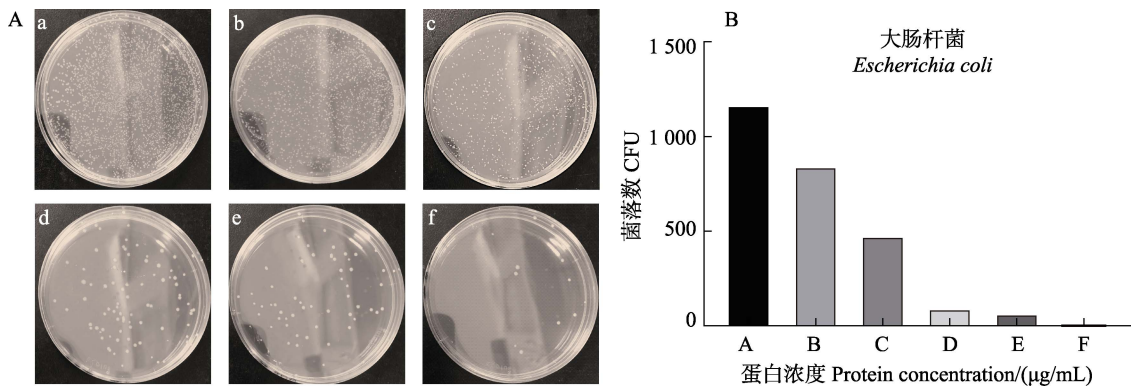


图 9 不同浓度 rAgLEAP-2 蛋白抑制大肠杆菌生长情况(A)及菌落数统计(B)

Fig.9 Different concentrations of rAgLEAP-2 protein inhibit the growth of *E. coli* (A) and CFU count (B)

a: 空白对照; b: 100 μg/mL; c: 200 μg/mL; d: 300 μg/mL; e: 400 μg/mL; f: 500 μg/mL。下同。  
a: No-treatment control; b: 100 μg/mL; c: 200 μg/mL; d: 300 μg/mL; e: 400 μg/mL; f: 500 μg/mL. The same as below.

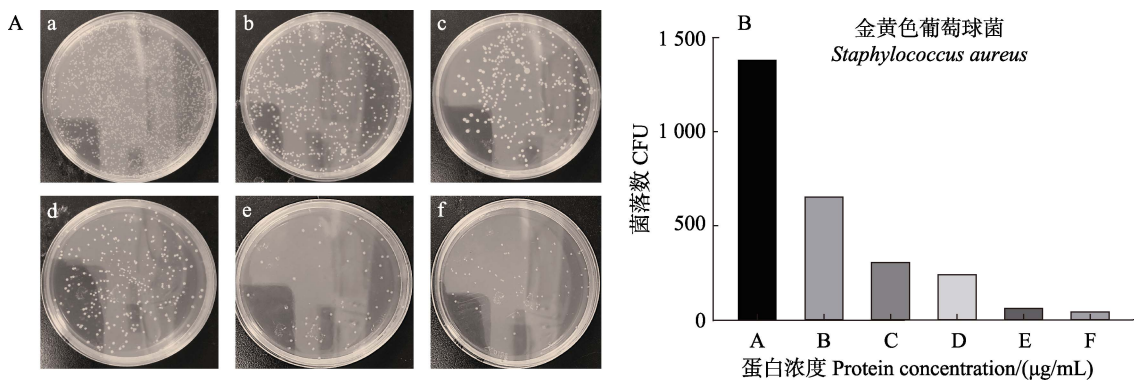


图 10 不同浓度 rAgLEAP-2 蛋白抑制金黄色葡萄球菌生长情况(A)及菌落数统计(B)

Fig.10 Different concentrations of rAgLEAP-2 protein inhibit the growth of *S. aureus* (A) and CFU count (B)

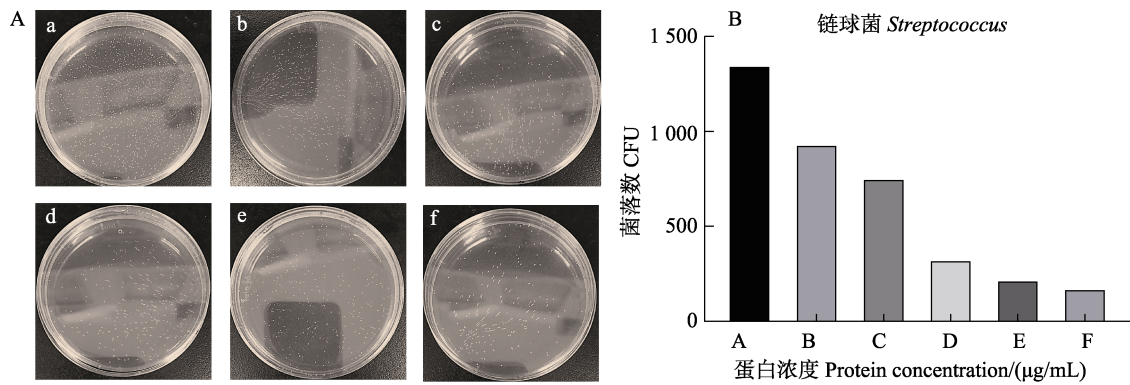


图 11 不同浓度 rAgLEAP-2 蛋白抑制链球菌生长情况(A)及菌落数统计(B)

Fig.11 Different concentrations of rAgLEAP-2 protein inhibit the growth of *Streptococcus* (A) and CFU count (B)

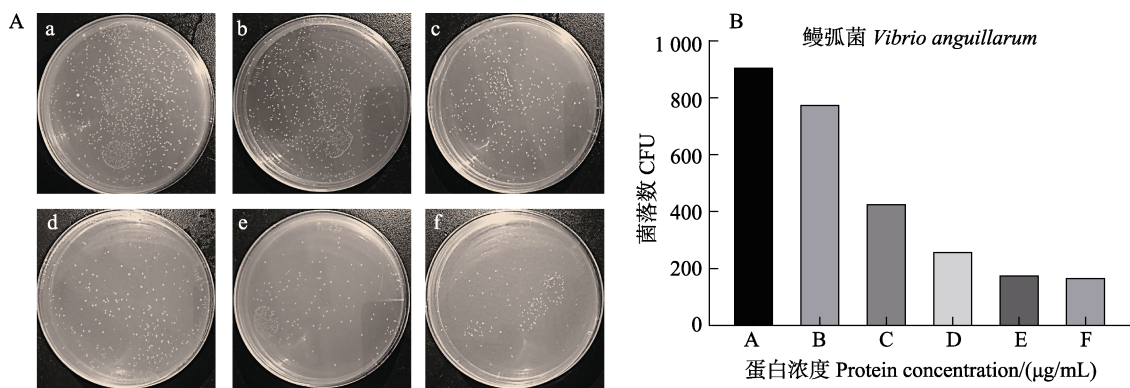


图 12 不同浓度 rAgLEAP-2 蛋白抑制鳃弧菌生长情况(A)及菌落数统计(B)

Fig.12 Different concentrations of rAgLEAP-2 protein inhibit the growth of *V. anguillarum* (A) and CFU count (B)

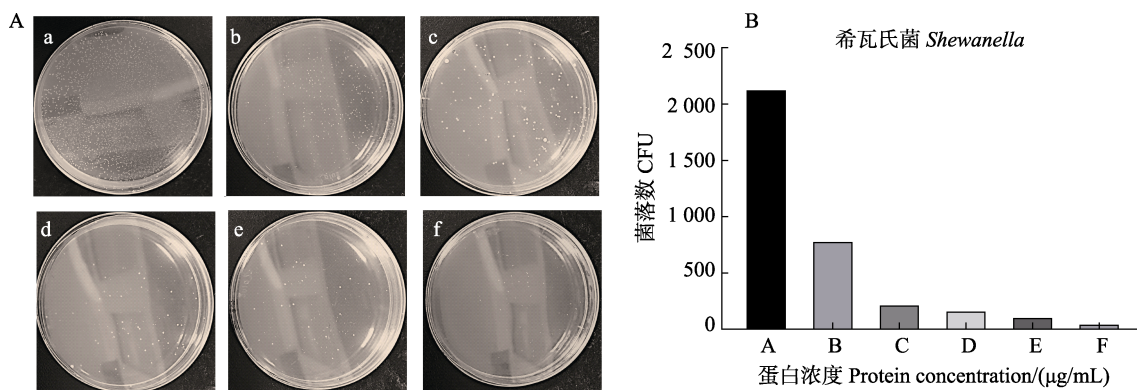


图 13 不同浓度 rAgLEAP-2 蛋白抑制希瓦氏菌生长情况(A)及菌落数统计(B)

Fig.13 Different concentrations of rAgLEAP-2 protein inhibit the growth of *Shewanella* (A) and CFU count (B)

LEAP-2 蛋白作为抗菌肽的一种, 主要具有防止病原菌入侵和抵抗感染的作用。大多数对哺乳动物和鱼类 LEAP-2 的研究主要集中在抗菌和抗病毒免疫活性上。重组 LEAP-2 蛋白显示出针对人类、家禽和鱼类病原体的选择抗菌功能(Krause *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Townes *et al.*, 2004)。研究发现, 随着草鱼 LEAP-2 蛋白浓度的增加, 其对嗜水气单胞菌的抗菌活性更显著(Liu *et al.*, 2010)。大菱鲆 LEAP-2 蛋白能

有效抑制藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和鳃弧菌生长, 且呈剂量依赖性(Zhang *et al.*, 2014)。鲢鱼 LEAP-2 蛋白能有效抑制迟缓爱德华氏菌和鳃弧菌, 最低抑菌浓度为 6.25 mg/mL (Li *et al.*, 2015)。卵形鲳鲹 LEAP-2 蛋白对无乳葡萄球菌(*Streptococcus agalactiae*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和金黄色葡萄球菌 3 种革兰氏阳性菌, 以及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧

菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*)、大肠杆菌 5 种革兰氏阴性菌的最低抑制浓度为 312.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Liu *et al.*, 2020)。与其他鱼类 LEAP-2 蛋白一样, rAgLEAP-2 蛋白能有效抑制革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的生长, 并呈剂量依赖性, 从而证明 AgLEAP-2 蛋白具有一定的抗菌活性。

综上所述, AgLEAP-2 的克隆和同源性分析证明, 该基因属于 LEAP-2C。AgLEAP-2 在抵御细菌感染的免疫反应中发挥重要作用, rAgLEAP-2 蛋白可以抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长。本研究加深了对鱼类非特异性免疫反应的认识, 为深入研究俄罗斯鲟 LEAP-2 的抗菌机制提供了研究基础。

### 参 考 文 献

- 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. *Molecular Immunology*, 2006, 43(4): 367–377
- BOAS L C P V, LIMA L M P D, MIGLIOLO L, *et al.* Linear antimicrobial peptides with activity against Herpes simplex virus 1 and Aichi virus. *Biopolymers*, 2017, 108(2): e22871
- CHEN Y, XIA Y, SHAO C, *et al.* Discovery and identification of candidate sex-related genes based on transcriptome sequencing of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) gonads. *Physiological Genomics*, 2016, 48(7): 464–476
- DI J, ZHANG S, HUANG J, *et al.* Isolation and identification of pathogens causing haemorrhagic septicaemia in cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Aquaculture Research*, 2018, 49: 3624–3633
- FJELL C D, HIS J A, HANCOCK R E, *et al.* Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 11(1): 37–51
- GE X, YANG H, BEDNAREK M A, *et al.* LEAP2 is an endogenous antagonist of the ghrelin receptor. *Cell Metabolism*, 2018, 27(2): 461–469
- GONG Y, HU M, XU S, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals expression signatures of albino Russian sturgeon, *Acipenseriformes gueldenstaedtii*. *Marine Genomics*, 2019, 46: 1–7
- HONG Y, TRUONG A D, LEE J, *et al.* Identification of duck liver-expressed antimicrobial peptide 2 and characterization of its bactericidal activity. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32(7): 1052–1061
- KRAUSE A, SILLARD R, KLEEMEIER B, *et al.* Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Science*, 2003, 12(1): 143–152
- LEI Y, QIU R, SHEN Y, *et al.* Molecular characterization and antibacterial immunity functional analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 106: 833–843
- LI H X, LU X J, LI C H, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of two distinct liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 38: 330–339
- LI H X, LU X J, LI C H, *et al.* Molecular characterization of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*: Antimicrobial activity and molecular mechanism. *Molecular Immunology*, 2015, 65(2): 406–415
- LIANG T, JI W, ZHANG G R, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) and LEAP-2 genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35: 553–563
- LIU F, LI J L, YUE G, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 133(2/3/4): 133–143
- LIU B, LIU G D, GUO H Y, *et al.* Characterization and functional analysis of liver-expressed antimicrobial peptide-2 (LEAP-2) from golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758). *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 104: 419–430
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- LU X J, CHEN Q, YANG G J, *et al.* The TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) from ayu (*Plecoglossus altivelis*) exhibits TNF $\alpha$  shedding activity. *Molecular Immunology*, 2015, 63(2): 497–504
- MAGNADOTTIR B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 137–151
- MOHAMMADI M, MORADI HASAN-ABAD A, DEGHANI P, *et al.* Dicentracin-like from Asian sea bass fish and moronecidine-like from *Hippocampus comes*: Two candidate antimicrobial peptides against *Leishmania major* infection. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 27: 769–778
- NGUYEN L T, HANEY E F, VOGEL H J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(9): 464–472
- OMAR A M, TIMO M, MATTHIAS T, *et al.* Ghrelin and LEAP-2: Rivals in energy metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2018, 39(8): 685–694
- SHAYKHIEV R, BEISSWENGER C, KANDLER K, *et al.* Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway

- epithelial cell proliferation and wound closure. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005, 289(5): L842–848
- TOWNES C L, MICHAELIDIS G, NILE C J, *et al.* Induction of cationic chicken liver-expressed antimicrobial peptide 2 in response to *Salmonella enterica* infection. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 6987–6993
- TRAVKOVA O G, MOEHWALD H, BREZESINSKI G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 247: 521–532
- VALERO Y, ARIZCUN M, CORTES J, *et al.* NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 103: 103516
- YANG G, GUO H, LI H, *et al.* Molecular characterization of LEAP-2 cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and the differential expression upon a *Vibrio anguillarum* stimulus: Indications for a significant immune role in skin. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 37(1): 22–29
- 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 101(3/4): 259–269
- ZHANG J, YU L P, LI M F, *et al.* Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepcidin-1 and hepcidin-2 possess antimicrobial activity and promote resistance against bacterial and viral infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 127–134
- ZHANG S, XU Q, DU H, *et al.* Evolution, expression, and characterization of liver-expressed antimicrobial peptide genes in ancient chondrosteian sturgeons. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 79: 363–369

(编辑 冯小花)

## Molecular Characterization and Antimicrobial Activity Analysis of Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2 (LEAP-2) Gene in Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*)

XU Qian<sup>1</sup>, WANG Ningning<sup>2</sup>, BAI Li<sup>3</sup>, SHI Kunpeng<sup>1</sup>, SHA Zhenxia<sup>1</sup>①

(1. Aquatic Biotechnology Research Institute, College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. Basic Medicine College, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract** Antimicrobial peptides (AMPs) are an important part of the innate immune defense system; they can effectively kill viruses, fungi, and bacteria, preventing infection (and even sepsis). AMPs also have other functional roles in immune regulation, anti-tumor activity, angiogenesis, and wound healing. Liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) is an AMP that has been extensively studied in mammals, birds, and fishes. The earliest fish LEAP-2 study reported the cloning of LEAP-2A and LEAP-2B of rainbow trout. So far, LEAP-2 has been studied in various fishes, including blunt snout bream, grass carp, golden pompano, ayu, and large yellow croaker. These studies found that LEAP-2 generally contains four highly conserved cysteine residues and two disulfide bonds; it can disrupt the structural integrity of bacterial cell membrane, revealing its antibacterial activity with an important role in the innate immune system of fishes. Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) is cultivated on a certain scale in China, and *Aeromonas hydrophila* is its main pathogen. Hemorrhagic ascites and tissue hemorrhage appear after infection, causing huge economic losses to Russian sturgeon aquaculture. As an important innate immunity component, LEAP-2 research is of great significance. At present, studies on AgLEAP-2 have not been reported. To study the molecular characteristics and the transcriptional

① Corresponding author: SHA Zhenxia, E-mail: shazhenxia@163.com

expression patterns of *AgLEAP-2*, as well as its antibacterial activity *in vitro*, the full-length *AgLEAP-2* cDNA sequence was obtained by RACE. *AgLEAP-2* was cloned and its sequence characteristics were analyzed by bioinformatics. The qRT-PCR method was used to detect *AgLEAP-2* in 13 different tissues (liver, intestine, spleen, head kidney, blood, gill, skin, ovary, brain, heart, stomach, metanephros, and muscle) of healthy Russian sturgeon, and the *AgLEAP-2* transcriptional expression pattern in immune tissues after infection with *A. hydrophila*. The *AgLEAP-2* prokaryotic expression vector was constructed and the recombinant *AgLEAP-2* protein (designated r*AgLEAP-2*) was purified. The antibacterial activity of r*AgLEAP-2* was preliminarily detected by the agar dilution method. The results showed that the full-length cDNA of the *AgLEAP-2* gene was 622 bp in length, of which the 5'-UTR was 184 bp, the 3'-UTR was 192 bp, and the ORF was 246 bp in length, encoding an 81-amino acid peptide. The molecular mass of the r*AgLEAP-2* protein was predicted to be 11.2 kDa, and the theoretical isoelectric point was 9.15. *AgLEAP-2* contained a signal peptide (1~25 aa) and a mature peptide (26~81 aa). The mature peptide contained four conserved cysteine residues and formed a core structure is consistent with two disulfide bonds between the Cys58-Cys69 and Cys64-Cys74. The *AgLEAP-2* structure agreed with the LEAP-2 family characteristics. Moreover, the results showed that the *AgLEAP-2* sequence was highly evolutionary conserved. Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *AgLEAP-2* was clustered into a clade with the LEAP-2C of fishes, with the highest similarity with the LEAP-2C of Yangtze sturgeon and Chinese sturgeon. The qRT-PCR analysis showed that *AgLEAP-2* was widely expressed in all healthy tissues, with the highest expression level in the liver, followed by the intestine and muscle, with the lowest expression in the gill. The expression patterns of LEAP-2 in different fish species were slightly different, with the highest expression level in the liver of Russian sturgeon and the intestine of large yellow croaker. The similar LEAP-2 expression patterns in different species suggested that its functions may be consistent, although it also had tissue and species specificity. The *AgLEAP-2* expression reached its maximum within 72 h in the liver, spleen, head kidney, gill, and blood immune tissues. Among them, the expression *AgLEAP-2* changed most significantly on the gill, which increased 5 000-fold compared with 0 h. The highest relative expression level was observed in the spleen at 72 h, corresponding to a 1500-fold induction relative to 0 h, and in the intestine at 48 h, with a 900-fold induction compared to 0 h kept constant until 72 h. In addition, the r*AgLEAP-2* protein exhibited good antibacterial effects against both Gram-positive bacteria (*Streptococcus* sp. and *S. aureus*) and Gram-negative bacteria (*E. coli*, *Vibrio anguillarum*, and *Shewanella* spp.) in a dose-dependent manner *in vitro*. The r*AgLEAP-2* protein at 500 µg/mL could inhibit the growth of most bacteria, significantly reducing the number of colonies on the plate. In conclusion, cloning and homology analysis revealed that *AgLEAP-2* was closely related to LEAP-2C. *AgLEAP-2* plays an important role in the immune response of Russian sturgeon against bacterial infection, and the r*AgLEAP-2* protein could inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria *in vitro*. This study enhanced our current understanding of the nonspecific immune response in fish and provided a research basis for further studies on the antibacterial mechanism of LEAP-2 found in Russian sturgeon.

**Key words** Liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2); Gene expression; Antibacterial activity; Bacterial challenge; *Acipenser gueldenstaedti*