

中图分类号: Q953

单位代码: 10231

学 号: 2016300646



硕士学位论文

褐鱒抗菌肽 *LEAP-2* 基因 ORF 的克隆和原核表达

学科专业: 动物学

研究方向: 脊椎动物学

作者姓名: 刘晨斌

指导教师: 王炳谦 研究员

哈尔滨师范大学

二〇二〇年六月

中图分类号：Q953

单位代码：10231

学 号：2016300646

硕士学位论文

**褐鱒抗菌肽 *LEAP-2* 基因 ORF 的克
隆和原核表达**

硕 士 研 究 生：刘晨斌

导 师：王炳谦 研究员

学 科 专 业：动物学

答 辩 日 期：2020 年 5 月

授 予 学 位 单 位：哈尔滨师范大学

A Thesis Submitted for the Degree of Master

**CLONING AND PROKARYOTIC
EXPRESSION OF *LEAP-2* GENE ORF
FROM *SALMO TRUTTA***

Candidate : Chenbin Liu
Supervisor : Researcher Bingqian Wang
Speciality : Zoology
Date of Defence : May, 2020
Degree-Conferring-Institution : Harbin Normal University

目 录

摘 要.....	III
Abstract.....	IV
第 1 章 绪 论	1
1.1 褐鳟概况.....	1
1.2 抗菌肽简介.....	2
1.3 抗菌肽的分类.....	2
1.3.1 昆虫抗菌肽.....	2
1.3.2 鱼类抗菌肽.....	3
1.3.3 哺乳动物抗菌肽.....	3
1.3.4 两栖类动物抗菌肽.....	3
1.3.5 其他来源动物抗菌肽.....	3
1.3.6 植物源抗菌肽.....	4
1.3.7 微生物源抗菌肽.....	4
1.4 抗菌肽的生物活性.....	4
1.4.1 抗细菌活性.....	4
1.4.2 抗真菌活性.....	4
1.4.3 抗病毒活性.....	5
1.4.4 抗原虫活性.....	5
1.4.5 抗肿瘤活性.....	5
1.5 抗菌肽的作用机理.....	5
1.5.1 对细胞膜损伤.....	5
1.5.2 细胞内损伤.....	6
1.6 <i>LEAP-2</i> 的研究进展.....	6
1.7 研究的目的与意义.....	7
第 2 章 材料与方法	8
2.1 实验材料.....	8
2.1.1 样品采集.....	8
2.1.2 主要仪器与设备.....	8
2.1.3 实验试剂与试剂盒.....	9
2.1.5 常用分析软件与网站.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因 ORF 的克隆.....	11
2.2.2 荧光定量 PCR 检测褐鳟不同组织中 <i>LEAP-2</i> 基因的表达情况.....	15
2.2.3 原核表达载体 pET32a-m <i>LEAP-2</i> 的构建.....	16
2.2.4 褐鳟抗菌肽基因 <i>LEAP-2</i> 成熟肽在大肠杆菌中的表达与纯化.....	20

第 3 章 结果与分析.....	23
3.1 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因 ORF 的克隆与分析.....	23
3.1.1 总 RNA 的提取鉴定.....	23
3.1.2 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因 ORF 的扩增.....	23
3.1.3 重组子阳性克隆筛选.....	23
3.1.4 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因 ORF 序列分析.....	24
3.1.5 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 氨基酸序列生物信息学分析.....	25
3.1.6 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 系统进化分析.....	35
3.2 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因的表达.....	35
3.3 褐鳟抗菌肽基因 <i>LEAP-2</i> 成熟肽在大肠杆菌中的表达与纯化.....	36
3.3.1 原核表达载体的构建.....	36
3.3.2 抗菌肽 <i>LEAP-2</i> 融合蛋白可溶性分析.....	38
3.3.3 IPTG 浓度的优化.....	40
3.3.4 诱导时间的优化.....	40
3.3.5 重组蛋白的纯化.....	41
第 4 章 讨 论.....	43
4.1 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因 ORF 的克隆.....	43
4.2 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 氨基酸序列的生物信息学分析.....	43
4.3 褐鳟 <i>LEAP-2</i> 基因的表达.....	45
4.4 褐鳟抗菌肽基因 <i>LEAP-2</i> 成熟肽在大肠杆菌中的表达与纯化.....	45
结 论.....	48
参考文献.....	49
攻读学位期间发表的学术论文.....	55
哈尔滨师范大学学位论文原创性声明.....	56
哈尔滨师范大学学位论文授权使用授权书.....	56
致 谢.....	57

摘要

褐鳟 (*Salmo trutta*) 原产于欧洲、北非和西亚地区, 在我国仅分布于西藏亚东地区, 由于过度捕捞和对生境的人为破坏, 导致其野生资源急剧减少。*LEAP-2* (liver-expressed antimicrobial peptide-2) 是一类主要在肝脏表达的抗菌肽, 其具有较强的抗微生物活性, 能够帮助机体抵抗外源微生物的入侵。

本研究以褐鳟为研究对象, 通过同源克隆的方法得到抗菌肽基因 *LEAP-2* 的 ORF 序列, 并分析序列特征。利用荧光定量 PCR 技术检测其在褐鳟不同组织中的表达情况。构建褐鳟 *LEAP-2* 基因成熟肽的原核表达载体, 通过大肠杆菌进行表达, 优化表达条件, 为进一步研究 *LEAP-2* 的功能奠定了基础。主要研究结果如下:

1. 褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列全长 291 bp, 编码 96 个氨基酸, 相对分子量为 10.78 KDa, 等电点为 9.19, 带有 5 个正电荷。多序列氨基酸对比分析显示, 褐鳟 *LEAP-2* 由信号肽、前体肽和成熟肽三部分组成, 在成熟肽上存在 4 个高度保守的半胱氨酸, 可形成两对二硫键。氨基酸结构和功能位点分析显示, 褐鳟 *LEAP-2* 存在 4 个糖基化位点和 7 个磷酸化位点, 二级结构主要以 α 螺旋和无规则蜷曲为主, 三级结构与人类 *LEAP-2* 相似。系统进化分析显示, 褐鳟 *LEAP-2* 与其他硬骨鱼类具有较高的同源性, 其中与大西洋鲑的亲缘关系最近, 而与鸟类和哺乳类同源性较低, 处于不同的分支上。

2. 荧光定量 PCR 结果显示, *LEAP-2* 在褐鳟各组织中均有不同程度的表达, 其中肝脏的表达量最高, 其次是脾和肠, 在肾、心脏、肌肉和鳃中的表达量较低, 而在脑和皮肤中几乎不表达。

3. 成功构建 pET32a-m*LEAP-2* 原核表达载体, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 得到原核表达菌株, 分析重组蛋白可溶性, 对 IPTG 诱导浓度和诱导时间进行优化, 纯化重组蛋白。在 pET32a-m*LEAP-2* 重组表达体系中, 重组蛋白主要以可溶性蛋白形式存在于上清液中, 少量以包涵体形式存在于沉淀中, 分子量为 22.61 KDa。改变 IPTG 诱导浓度和诱导时间, 发现通过 0.25 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后, 重组蛋白的表达量最高。

关键词 褐鳟; *LEAP-2*; 基因结构; 基因表达; 原核表达

Abstract

Brown trout (*Salmo trutta*) is native to Europe, North Africa, and Western Asia. It is only distributed in the Yadong region of Tibet in China. Due to overfishing and man-made damage to habitats, its wild resources have drastically decreased. *LEAP-2* (liver-expressed antimicrobial peptide-2) is a type of antibacterial peptide mainly expressed in the liver. It has strong antimicrobial activity and can help the body resist the invasion of foreign microorganisms.

In this study, brown trout was used as the research object. The ORF sequence of the antibacterial peptide gene *LEAP-2* was obtained by homologous cloning, and the sequence characteristics were analyzed. Real-time PCR was used to detect its expression in different tissues of brown trout. The prokaryotic expression vector of the mature peptide of the brown trout *LEAP-2* gene was constructed and expressed by *E. coli* to optimize the expression conditions, which laid the foundation for further research on the function of *LEAP-2*. The main findings are as follows:

1. Brown trout *LEAP-2* gene ORF sequence is 291 bp in length, encoding 96 amino acids, relative molecular weight is 10.78 KDa, isoelectric point is 9.19, and has 5 positive charges. Multi-sequence amino acid comparative analysis showed that brown trout *LEAP-2* was composed of a signal peptide, a precursor peptide, and a mature peptide. There were four highly conserved cysteine residues on the mature peptide, which could form two disulfide bonds. The analysis of amino acid structure and functional sites showed that brown trout *LEAP-2* had 4 glycosylation sites and 7 phosphorylation sites. The secondary structure was mainly α -helix and irregular curl, and the tertiary structure was similar to human *LEAP-2* is similar. Phylogenetic analysis shows that brown trout *LEAP-2* has high homology with other teleost fishes. Among them, the relationship with Atlantic salmon is the closest, while it has low homology with birds and mammals, and it is on a different branch.

2. Quantitative real-time PCR results showed that *LEAP-2* was expressed to varying degrees in brown trout tissues, with liver expression being the highest, followed by spleen and intestine, and expression in kidney, heart, muscle, and gills was relatively

high. Low, while hardly expressed in the brain and skin.

3. The pET32a-m*LEAP-2* prokaryotic expression vector was successfully constructed and transferred into *E. coli* BL21 (DE3) to obtain a prokaryotic expression strain. The recombinant protein was analyzed for solubility, the IPTG induction concentration and induction time were optimized, and the recombinant protein was purified. In the pET32a-m*LEAP-2* recombinant expression system, the recombinant protein mainly exists in the supernatant as a soluble protein, and a small amount exists in the precipitate in the form of inclusion bodies with a molecular weight of 22.61 KDa. After changing the IPTG induction concentration and induction time, it was found that the expression of recombinant protein was the highest after 4 h induction with 0.25 mmol / L IPTG.

Key words *Salmo trutta*; *LEAP-2*; gene structure; gene expression; prokaryotic expression

第1章 绪论

1.1 褐鳟概况

褐鳟 (*Salmo trutta*)，隶属于鲑形目 (Salmoniformes) 鲑科 (Salmonidae) 鲑亚科 (Salmoninae) 鲑属 (*Salmo*)，其个体大，生长周期短，肉质鲜美，营养物质丰富，市场经济价值高，是开发前景广阔的冷水性鱼类^[1,2]。褐鳟体型呈纺锤状，头小而尖，上下颌等长，由细小的圆形鳞片包被周身，鱼腹呈银白色，蓝色小圆斑主要分布于褐鳟的尾鳍、背鳍、头背位置。胸鳍、腹鳍偏外侧部位颜色较白，内侧部位颜色较浅。牙齿小而尖，舌大且宽，假腮发达^[3]。褐鳟多于水温较低的淡水中栖息，主要以水生昆虫为食，产卵时间多为秋冬季节，产卵地多为缓流浅水处^[4]。

褐鳟多产于西亚、欧洲、非洲北部等地区，1866年由英国人从欧洲引入我国西藏亚东地区，又称为亚东鲑^[2,5]。迄今为止，经过多年对环境的适应，褐鳟已可在亚东河生长并进行自然繁衍，种群数量稳定，已成为地方性鱼类品种。因褐鳟具有良好的经济价值导致野生褐鳟被过度捕捞，随人类活动范围增加，其栖息地遭到人类行为破坏致使野生褐鳟的数量急剧减少。针对野生东亚鲑被过度捕捞的现象，西藏自治区、亚东县出台了一系列法律法规以达到保护褐鳟以及褐鳟栖息地的效果，西藏自治区在1992年将褐鳟列入了水生野生动物的二级保护动物名单^[6]。为了提高褐鳟的数量，保护褐鳟增长的稳定性以及安全性，人们还对褐鳟开展了人工繁育研究，并取得了显著的成果。褐鳟人工养殖的成功不仅满足了市场的需求，使得野生褐鳟不会被过度捕捞，还通过增殖放流的方式使得其野生资源得到恢复。

现在，褐鳟人工养殖技术成熟，已经成为亚东县的一大特色优势产业^[7]。近几年褐鳟养殖业因西藏交通运输逐渐优化而得到发展，但是也面临褐鳟发病率持续增加的问题，可能导致养殖户较大的经济损失^[8]。为控制病害，抗生素等化学类药物被大量使用，这使得病原微生物对药物产生较强抗药性，导致疾病无法被有效的治疗和控制，并且抗生素在水中的残留也污染了水生环境和鱼体。使用新型抗生素往往难有实质性的突破，并且新型抗生素的开发速度、成本和难度都是要面临的问题^[9]。在这样的形式下，迫切需要的是寻找代替抗生素的抗菌药物，抗菌肽

的优势较明显。广谱的抗菌性，无残留、较小的分子量，从作用机制来看，抗菌肽不会像抗生素一样导致病原微生物的抗药性，从这个方面来看，抗菌肽能有效替代抗生素^[10,11]。

1.2 抗菌肽简介

抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 是一类生物体为抵御外源病原体侵袭，由自身免疫系统所分泌的多肽物质^[12]。20 世纪 80 年代瑞典科学家 Boman 等从惜古比天蚕的滞育蛹体内分离得到了第一个抗菌肽^[13]，后续不断有抗菌肽被研究者从两栖动物、植物、昆虫、微生物、人体等多种机体分离得到，美国内布拉斯加州医学中心将目前已发现的 3000 多种抗菌肽进行收录，建立了抗菌肽数据库 (The Antimicrobial Peptide Database, APD)^[14]。

1.3 抗菌肽的分类

抗菌肽数量繁多，不同的抗菌肽功能、来源、结构不同仅靠单一划分标准对其进行分类较为困难，故而对抗菌肽的划分存在多种方式。1996 年，Hoffmann 等人主要依据抗菌肽的空间结构进行分类，主要分为线型、环型抗菌肽两类^[15]。1998 年，Boman 依据当时抗菌肽基因研究结果，对其进行重新划分为不含半胱氨酸的线肽、含有等量半胱氨酸的环肽以及含有 1~2 种氨基酸的抗菌肽三大类^[16]。近年来人类医疗水平逐步升高，核磁应用越来越成熟，部分学者将核磁技术应用于抗菌肽三维结构的分类，主要包括：半胱氨酸修饰量丰富的抗菌肽、某种氨基酸修饰量丰富的抗菌肽、被稀有氨基酸修饰的抗菌肽、 α -螺旋抗菌肽、 β -折叠抗菌肽^[17]。而最常见的抗菌肽分类方法即根据来源进行划分。

1.3.1 昆虫抗菌肽

昆虫抗菌肽是昆虫在遭受刺激或侵袭后由其血淋巴生成的具广谱抑菌活性的多肽^[18]。目前，已有 290 多种昆虫抗菌肽发现，其中有不含半胱氨酸残基的天蚕素，如来自柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 的 cecropin B 和 cecropin D 等，呈 α -螺旋结构，可有效抑制革兰氏阴性菌以及阳性菌的生长^[19]；有富含半胱氨酸残基的防御素、死亡素，如从白蚁 (*Pseudacanthotermes spiniger*) 中得到的抗菌肽 termicin 为 β -折叠结构，主要对革兰氏阳性菌具备良好的抑制性，而对革兰氏阴性菌抑制性差^[20]。还有富含甘氨酸残基的攻击素、麻蝇毒素和从膜翅目昆虫中发现的蜜蜂肽等富含脯氨酸残基的抗菌肽等^[21]。

1.3.2 鱼类抗菌肽

鱼类抗菌肽是鱼类其自身非特异性免疫系统中的重要组成部分, 在其遭到损害或病原菌侵染时, 它能快速生成并在内部广泛扩散以抵挡病原微生物的入侵^[22]。鱼类抗菌肽的数目和种类也很丰富, 已报道的鱼类抗菌肽多数是从其表皮或黏液中分离获得, 也有从鱼类组织脏器等中分离获得, 如 Richards 等人以大西洋鲑为研究对象, 在肝胃肠分离出抗菌肽 Histone H1^[23], Lin W 等以石斑鱼为研究对象, 分离出抗菌肽 Epinecidin-1^[24]。不同鱼类体内分离得到的抗菌肽分子结构、作用机理大不相同, 主要分为 Cathelicidins 类、Pleurocidin 类、Hepcidin 类、Chrysophins 类、LEAP-2 类 5 类抗菌肽^[25,26]。

1.3.3 哺乳动物抗菌肽

目前从哺乳动物体内分离的抗菌肽主要来源于黏膜、上皮、中性粒细胞的分泌物中, 主要包括 cathelicidins 和防御素 (defensins)^[27]。防御素由 3 个二硫键以及 β -折叠所构成, 根据氨基酸数量、Cys 的连接方式不同又分为 α 和 β 两类防御素^[28], α -防御素主要在人、猴等啮齿动物的巨噬细胞、嗜碱性粒细胞被发现, 由 29-35 个氨基酸组成。 β -防御素主要由 38-42 个氨基酸构成, 在机体呼吸道防御过程中起重要作用。cathelicidin 是 N 端都含有与 cathelin 相似结构而 C 端极具结构差异的一类抗菌肽。猪的白细胞中分离得到的 protegrin^[29]、牛的气管黏膜上皮细胞中发现 TAP^[30]等都是 cathelicidin。

1.3.4 两栖类动物抗菌肽

相关研究显示两栖类动物体内的抗菌肽主要存在于胃肠黏膜、皮肤颗粒腺体内, 发挥机体免疫功效^[31]。1987 年 Zasloff 在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的皮肤内部分泌得到了抗菌肽, 这是首次在两栖动物体内发现的抗菌肽, 称为 Magainins^[32]。据统计结果显示目前两栖类动物体内分离得到的抗菌肽约 1000 种, Conlon 等通过研究发现两栖类动物皮肤约分布 250 种颗粒腺体, 此类腺体主要集中于动物背部, 可合成分泌多种抗菌肽, 主要表现为两性 α -螺旋结构^[33]。研究显示从两栖动物体内分离得到的抗菌肽具备广谱抗菌性, Brogden 等人以池蛙和腹斑蛙为研究对象, 分离得到抗菌肽 brevinin-2, 结果显示该抗菌肽不仅可抑制革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的活性, 对真菌白色念珠菌也其作用^[34]。除了抗菌, 两栖类抗菌肽在抗病毒和胚胎毒性等方面也具有作用^[35]。

1.3.5 其他来源动物抗菌肽

另外甲壳动物、软体动物、原索动物、鸟类等体内均可分离得到抗菌肽, 目前从甲壳动物体内分离得到了抗菌肽 penaeidin、crustin。从原索动物中也发现了一

部分来源于海鞘的抗菌肽，鸟类抗菌肽则相对较少，且发现的多为 β -防御素类，如从火鸡 (*Meleagris gallopavo*) 异嗜白细胞中得到的抗菌肽 THP1、2^[36]，和从哺乳动物体内分离得到的 β -防御素同源，具备多重抑菌功效。

1.3.6 植物源抗菌肽

因植物自身不具备特异性免疫系统调节，因此非特异性免疫调节对植物尤为重要，当植物遭受到病原微生物或生物入侵时，其自身会快速分泌一类活性菌以达到抑菌的目的^[37]。研究发现植物体内最早分离的抗菌肽为硫素 (thionin)，其抑制真菌、细菌的生长、繁殖从而发挥自身保护的功能。目前从植物体内分离得到了多种抗菌肽，主要包括植物防御素、硫素以及蜕皮素等，上述物质均具备 2~6 个二硫键，结构稳定^[38]。

1.3.7 微生物源抗菌肽

微生物源抗菌肽主要包括来源于细菌的细菌素和病毒源抗菌肽，可杀死或抑制竞争菌，而对微生物自身生长无影响。其中细菌素主要在细菌代谢过程中由核糖体所产生，具有疏水性或两亲性阳离子。Sumi 等从粘类芽孢杆菌 CP7 中分离得到抗菌肽如 cpacin，具备多种抗菌疗效^[39]。病毒内分离得到的抗菌肽与细菌相比明显偏少，Li 等从丙型肝炎病毒 (HCV) NS5A 内分离得到 α -螺旋抗菌肽，可阻碍 HCV 病毒的从头感染以及进行性感染^[40]。

1.4 抗菌肽的生物活性

抗菌肽具有广谱的抗菌活性，其不仅对革兰氏阳性菌和阴性菌具有高效的抗菌活性，在对抗其他类型的病原微生物时也有很好的效果，另外其还能间接地作用于免疫系统。

1.4.1 抗细菌活性

抗菌肽具有广泛的抗菌功效，多数抗菌肽可抑制革兰氏阳性菌以及阴性菌的生长^[34]。抗菌肽的抗菌疗效显著，但不同抗菌肽因结构不同活性也不近相同，如昆虫体内分离得到的抗菌肽在抑制革兰氏阳性菌方面效果更好^[41]。抗菌肽自身抗菌活性强，联合其他抗菌肽干预或抗生素干预可达到协同或者叠加作用，提高抗菌肽或抗生素治疗的效果^[42]。对 Synerporin C2 采用抗菌肽联合抗生素综合干预，结果显示这种方式减少了抗生素的用量^[43]。

1.4.2 抗真菌活性

抑菌肽不仅抑制细菌活性，还具有抗真菌的效果。目前已发现大量抗菌肽具有抗真菌的效果，研究显示天蚕素可有效抑制曲霉菌属和镰刀菌属的病原菌^[44]，

另有研究以东北大黑鳃金龟幼虫为研究对象，可从中分离得到具有抗真菌活性的抑菌肽 holotricin III^[45]。

1.4.3 抗病毒活性

目前已发现大量的抗病毒的抗菌肽，这些抗菌肽主要针对病毒膜的特点，作用于病毒的多个靶点从而对抗病毒，抑制病毒活性。研究显示从美洲鲨素分离得到的抑菌肽 polyphemusin^[46]，天蚕丝分离得到的 Acecropin A 以及蜂毒素 melittin^[47]等可有效抑制机体 HIV 病毒的活性。防御素具有损伤水泡性口膜炎病毒（VSV）的效果^[48]。

1.4.4 抗原虫活性

相关研究显示部分抗菌肽可有效抑制寄生于活体内的寄生虫，使寄生虫致死。Leite 等以巴西青蛙为研究对象，发现其皮肤分泌液中可以分离得到抑菌肽 Phylloseptin，而该抑菌肽可抑制抗克氏锥虫的活性^[49]。Efron 等发现 dermaseptin 类抗菌肽能够杀死疟原虫^[50]。抗菌肽对寄生虫的作用机制与其抗细菌的方式相似，也是通过破坏膜结构，来杀死原虫^[51]。

1.4.5 抗肿瘤活性

研究显示部分抗菌肽在不损伤机体正常细胞的前提下可选择性的作用于肿瘤细胞，从而损伤和抑制其生长、繁殖。部分阳离子抗菌肽具有广泛的抗肿瘤效果。如抗菌肽 magainins 可以溶解消灭机体内的实体瘤细胞以及肿瘤内的血管细胞，而对机体内部的发挥正常免疫功能的淋巴细胞无损伤^[52]。从果蝇体内分离得到抗菌肽 SK48 对多种肿瘤细胞的生长、增殖具有抑制作用，且不会出现溶血现象^[53]。抗菌肽主要对肿瘤细胞发挥特异性作用从而发挥抗肿瘤效果，为临床癌症疾病的治疗提供新的方向。

1.5 抗菌肽的作用机理

关于抗菌肽的作用方式目前还未有一个统一的说法，因抗菌肽种类不同其发挥作用效果的机制原理也不尽相同，目前主要包括以下两种：一是对细胞膜损伤，抗菌肽通过自身的两亲性结合到细菌的膜结构，改变膜结构构象，形成通道，使细胞内外物质可以流动，导致细菌死亡；二是细胞内损伤，抗菌肽穿透到细胞内部，结合相应的物质，影响细胞的生命活动，从而达到致死的效果。

1.5.1 对细胞膜损伤

阳离子抗菌肽主要通过静电作用从而损伤细胞膜，具体作用机理如下：阳离子吸附于细胞膜表面，疏水部在细胞膜中的脂质部位插入，亲水部主要和细胞膜内

脂质相结合从而形成通道从而破坏细胞膜，致使大量细胞外液进入细胞，而细胞内的液体流失进而导致细胞死亡^[54]。目前细胞膜穿透的模型主要分为环孔、桶板、地毯以及凝聚模型四类^[55,56]。在环孔模型中抗菌肽的极性端会与脂质双分子的极性端相结合，呈螺旋结构继而垂直插入细胞膜内，而细胞膜表面的脂单层则会向内侧弯曲，抗菌肽与弯曲的脂单层形成孔状结构，从而破坏细胞膜，引起细胞死亡；在桶板模型中，抗菌肽吸附于细胞膜表面形成多聚体，多聚体主要以垂直插入的方式进入脂质双分子结构中的疏水位，肽分子在细胞膜的表面呈束状分布，疏水的部分朝向细胞外侧，亲水部分在内侧形成孔状间隙，形成类似于桶板状的离子通道，该通道会跨越细胞膜结构，从而使细胞裂解死亡。在地毯模型中，抗菌肽在静电作用下吸附于细胞膜的表面位置，细胞膜表面的结构与抗菌肽相互作用从而使细胞膜的构象发生改变，导致疏水一侧朝向细胞内部，亲水一侧则朝向细胞外侧，排列形状如地毯，当胞膜表面的抗菌肽浓度足够时，孔状间隙被临时打开，抗菌肽由此进入细胞内部从而损伤、杀死细菌。在凝聚模型中，抗菌肽在静电作用下吸附于细胞膜表面，随吸附抗菌肽的增多，抗菌肽浓度逐步升高，当其达到一定浓度时则会改变自身的结构方向从而插入细胞膜中，抗菌肽与细胞膜中的脂质相结合形成胶束样的复合物，复合物聚集形成一个跨膜状的离子通道结构，破坏细胞膜的完整性从而引起细胞死亡。

1.5.2 细胞内损伤

细胞内损伤的作用机制具体如下：抗菌肽进入细胞，影响其生命活动从而杀死病原体。研究显示此类抗菌肽在细胞内部影响不同的靶点。可作用靶点主要包括核苷酸、蛋白质、胞膜等，影响核苷酸合成；蛋白质折叠、合成；细胞壁合成；扰乱细胞内线粒体结构，导致能量合成障碍，从而影响细胞代谢导致细胞死亡^[57]。

1.6 *LEAP-2* 的研究进展

2003年 Krause 等在人体的血液系统内发现了一类新的抗菌肽，称为肝脏表达抗菌肽 2 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptide-2, *LEAP-2*)^[58]。*LEAP-2* 的羧基端存在 4 个半胱氨酸残基，其中 C1 与 C3 相结合形成二硫键、C2 与 C4 相结合形成二硫键。*LEAP-2* 的转录表达位置主要为人类肝脏部分，因此称为肝脏表达抗菌肽 2。在血液系统中，*LEAP-2* 多被加工成为不同长度的多肽链从而抑制细菌的生长、繁殖，发挥抗菌疗效^[59]。另有学者采用重组的 *LEAP-2* 刺激巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)，结果显示该细菌的生长、繁殖菌被抑制。且其抗菌活性的表达与细胞膜自身的亲和力具有一定的相关性^[60]。

2004年 Zhang 等以虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 为研究对象, 克隆得到 *LEAP-2A*、*LEAP-2B* 两个 *LEAP-2* 的基因序列, 结果显示 *LEAP-2* 的成熟肽前存在可切割的 RXXR 位点, 且 *LEAP-1*、*LEAP-2* 均在肝脏内呈高表达状态, 采用细菌刺激后, 肠管、皮肤中的 *LEAP-2* 表达量上调^[61]。在这之后, 多种鱼类体内的 *LEAP-2* 基因被克隆, 主要包括: 斑马鱼 (*Danio rerio*)^[62]、蓝鲶 (*Ictalurus furcatus*)^[63]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[64]、牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)^[65]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[66]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[67] 等 13 种鱼。高等哺乳动物体内 *LEAP-2* 的表达主要在肝脏, 而鱼类中 *LEAP-2* 的表达情况与高等哺乳动物的表达情况差异性大。团头鲂内 *LEAP-2* 的表达主要集中于中肠, 其次聚集于脑垂体部位^[64]。采用灭活的嗜水气单胞菌刺激草鱼 4h 结果显示草鱼肝脏内部的 *LEAP-2* 基因表达上调, 可增加至原来的数倍^[66]。而采用灭活的嗜水气单胞菌刺激团头鲂 72 h, 其肝脏内部的 *LEAP-2* 基因表达才上调至高峰上, 提示硬骨鱼类体内 *LEAP-2* 基因的表达具有一定的种属特性^[64]。

1.7 研究的目的与意义

褐鳟, 又名亚东鲑, 是西藏亚东地区重点养殖鱼种。作为西藏二级重点保护的野生水生动物, 当地政府对其一直推行保护与开发协调发展政策。近年来, 西藏交通运输环境逐渐优化, 促进褐鳟养殖业发展, 但同时褐鳟发病率也持续增加。为控制病害, 抗生素等化学类药物大量使用, 病原微生物对药物产生较强抗药性, 导致无法有效控制疾病, 且抗生素在水中残留污染水生环境。因此, 需要开发一种新型抗菌药物来应对这种情况。抗菌肽因其作用形式不同, 不会使病原微生物产生抗药性, 并且还具有良好的广谱抗菌性和无残留等特点, 能有效替代抗生素。

鱼类非特异免疫系统较特异免疫系统发达, 抗菌肽作为非特异免疫系统的重要组成部分, 对于鱼类免疫系统和疾病防控具有重要意义。本研究以褐鳟 *LEAP-2* 基因为研究对象, 对其进行序列分析, 研究其在褐鳟不同组织中的表达情况, 探究其成熟肽部分在大肠杆菌中的原核表达, 为进一步研究褐鳟 *LEAP-2* 的功能奠定基础, 也为褐鳟抗菌药物的开发与应用提供理论依据, 有利于褐鳟的健康养殖和野生资源保护。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 样品采集

成年健康褐鳟（平均体长 37~38 cm，体重 700~750 g）取自黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。经麻醉后迅速解剖，分别取肝脏、肾、脾、肌肉、鳃、心脏、脑、肠、皮肤等组织约 400 mg，装于 1.5 ml 离心管，液氮速冻，之后转移到 -80 °C 冰箱保存备用，用于总 RNA 的提取。

2.1.2 主要仪器与设备

PCR 仪，Bio-Rad

凝胶成像系统，Protein simple

恒温水槽，上海一恒

恒温培养箱，上海一恒

恒温摇床，上海培因

-80 °C 超低温冰箱，中科美菱

超净台，NuAire

台式高速冷冻离心机，SIGMA

瞬时离心机，上海宝予德

旋涡混合器，江苏其林贝尔

电子天平，北京赛多利斯

移液器，Eppendorf

高压灭菌锅，TOMY

干燥箱，上海一恒

冰箱，青岛海尔

制冰机，宁波格兰特

超纯水机，成都艾柯

荧光定量 PCR 仪，Bio-Rad

水平电泳槽，北京君意东方

垂直电泳槽，Bio-Rad

电泳仪, 北京君意东方

蛋白胶成像系统, Bio-Rad

超声波细胞破碎仪, 宁波新芝

紫外分光光度计, Thermo Scientific

2.1.3 实验试剂与试剂盒

DEPC, 北京博奥拓达

Trizol, Invitrogen

RNA 保护液, Takara

RNA 反转录试剂盒, 杭州博日

DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific

10×Loading Buffer, Takara

DL2000/8000 DNA Marker, 北京博奥龙

胶回收试剂盒, Takara

pMD-18T 质粒, Takara

DH5 α 感受态细胞, Transgen

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX), Roche

限制性内切酶, Takara

T4 DNA 连接酶, Takara

pET32a 载体, 湖南丰晖生物

BL21 (DE3) 感受态细胞, Transgen

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X), 碧云天

BeyoBlue 考马斯亮蓝超快染色液, 碧云天

SDS-PAGE 电泳液, 碧云天

SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒, 碧云天

预染彩虹蛋白 Marker, 大连美仑生物

Biospin Plasmid DNA Extraction Kit, 杭州博日

过硫酸铵 (AP), 天津福晨化学

Ni-NTA 亲和层析介质, 南京金斯瑞

IPTG, 碧云天

Ampicillin, Biofroxx

咪唑 (imidazole), Solarbio

其他试剂为进口或国产分析纯试剂

2.1.4 常用试剂配制

DEPC 水 (0.1%) : 将 1 ml DEPC 溶于 1000 ml 去离子水中, 37 °C 摇床过夜, 121 °C 高压灭菌, 之后于超净台内分装入灭菌的 1.5 ml EP 管中, -20 °C 保存。

氨苄储存液的配置: 用电子天平称取氨苄西林 (Ampicillin) 5 g, 用无菌水使之完全溶解, 定容至 50 ml, 得到 100 mg/ml 的氨苄储存液; 在超净台内用 0.22 μm 的滤膜过滤后, 分装入灭菌的 EP 管中, -20 °C 保存。

LB 液体/固体培养基: 酵母粉 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 加入去离子水定容至 1 L, 高压湿热灭菌后于 4 °C 保存备用。固体培养基为每 100 ml LB 液体培养基中加入 1.5 g 琼脂粉, 与培养皿一起高压湿热灭菌, 灭菌后放入超净台, 待温度冷却至 56 °C 左右 (不烫手) 时加入相应抗生素, 氨苄固体培养基中抗生素加入量为每 100 ml 培养基加入 100 μl 氨苄储存液, 然后将培养基倒入培养皿中, 静置 1 h, 待完全凝固后于 4 °C 保存备用。

50%甘油: 量取 5 ml 甘油, 用无菌水定容至 10 ml, 混匀, 121 °C 高压灭菌, 4 °C 保存。

IPTG 溶液配制: 称取 2.383 g IPTG, 用无菌水定容至 10 ml, 在超净台内用 0.22 μm 的滤膜过滤, 分装入灭菌的 1.5 ml EP 管中, -20 °C 保存。

灭菌水的配置: 将去离子水加入洗净的蓝口瓶中, 放入高压灭菌锅内 121 °C 灭菌 20 min (瓶盖切勿拧紧, 应保持一定松度), 在超净台内分装入灭菌的 1.5 ml EP 管中, -20 °C 保存。

TAE (50x) 缓冲液: 57.1 ml 冰乙酸, 242 g Tris base, 100 ml EDTA, 用去离子水定容至 1 L, 避光保存。

PBS (5x) : NaCl 40 g, KCl 1 g, Na₂HPO₄ 7.1 g, KH₂PO₄ 1.35 g, 去离子水定容至 1 L, 用 0.22 μm 的滤膜过滤后室温保存。

Lysis 平衡缓冲液 (LE Buffer) : 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, pH 8.0 (用磷酸调)。

洗涤缓冲液: 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, pH 8.0。

梯度咪唑洗脱缓冲液: 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 50/100/200/250 mmol/L imidazole, pH 8.0。

SDS-PAGE 上下层蛋白胶的配制如表 2-1 所示。

表 2-1 SDS-PAGE 蛋白胶配制

Table 2-1 The preparation of SDS-PAGE protein gel

(单位: ml)	去离子水	30%ACR	缓冲液	10%过硫酸铵	TEMED
上层浓缩胶(5%)	5.8	1.7	2.5	0.1	0.01
下层分离胶 (15%)	3.6	7.5	3.75	0.15	0.006

2.1.5 常用分析软件与网站

序列分析与比对: DNAMAN 9.0

引物设计与筛选: Primer 5.0

进化树构建: MEGA 5.0

基因信息获取与查找: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

蛋白质理化性质分析: <https://web.expasy.org/protparam/>

蛋白质疏水性预测: <https://web.expasy.org/protscale/>

蛋白质跨膜结构预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

蛋白质信号肽区域预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>

蛋白质亚细胞定位分析: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php>

蛋白质二级结构预测: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/?page=npsa_sopma.html

蛋白质三级结构预测: <https://www.swissmodel.expasy.org/>

蛋白质 O-糖基化位点预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

蛋白质 N-糖基化位点预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

蛋白质磷酸化位点预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

蛋白质结构预测: <https://www.predictprotein.org/home>

克隆基因序列提交: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>

2.2 实验方法

2.2.1 褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 的克隆

2.2.1.1 克隆引物的设计及合成

根据 NCBI 中虹鳟抗菌肽基因 *LEAP-2A* 的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 序列, 进行引物设计, 用以扩增褐鳟 *LEAP-2* 基因的 ORF 序列, 引物序列见表 2-2。引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成并纯化。

表 2-2 RT-PCR 扩增褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 引物序列

Table 2-2 The amplification of ORF primer sequence of *LEAP-2* gene in *Salmo trutta* by RT-PCR

引物	序列 (5'-3')
L2-F	TGCAGGACCGTCAACACTAC
L2-R	GATGGGTTGGCTGAACATGC

2.2.1.2 组织总 RNA 的提取

利用 Trizol 提取成年健康褐鳟各组织（肝脏、肾、脾、肌肉、鳃、心脏、脑、肠、皮肤）中的总 RNA。RNA 提取方法如下：

(1) 匀浆处理：将褐鳟各组织在液氮中磨碎，每 100 mg 加入 1 ml Trizol 并反复震荡，样品体积不应超过 Trizol 体积的 10%。

(2) 将匀浆样品在室温放置 10 min，目的使核酸与蛋白复合物完全分离。

(3) 4 °C 12000 g 离心 10 min，取上清液体加入新的 EP 管中。

(4) 加入 200 μl 氯仿，剧烈震荡 30 s，冰上放置 5 min。

(5) 4 °C 条件下，12000g 离心 15 min，之后将上清水相液体转移到新的 EP 管中。

(6) 加入 500 μl 异丙醇，轻轻混合均匀，冰上放置 10 min。

(7) 4 °C 条件下 12000 g 离心 10 min，离心后的 EP 管底会出现白色沉淀，弃上清。

(8) 加入 1 ml 75%乙醇，洗涤沉淀，4 °C 7500 g 离心 5 min，弃上清，注意不要倒掉沉淀。

(9) 用枪头吸尽残存乙醇，打开管盖，室温放置干燥 RNA 沉淀，大约 5~10 min，注意不要让 RNA 干透，之后加入 30 μl DEPC 水，将 RNA 沉淀溶解。

(10) 利用琼脂糖凝胶电泳检查所提取的 RNA 片段完整性，用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度，选择质量较好的用于后续实验，并保存于 -80 °C。

注意事项：

(1) 实验用塑料器材经未高压灭菌的 DEPC 水浸泡过夜，121 °C 高压湿热灭菌，50 °C 烘干；玻璃器皿和金属器具用铝箔包裹，180 °C 烘烤 3 小时以上；所需试剂均用无 RNase 的 DEPC 水配制。

(2) 实验过程中佩戴口罩，并及时更换手套，操作速度尽量快，减少 RNA 的降解。

2.2.1.3 RNA 反转为 cDNA

以提取得到的 RNA 作为模板，使用杭州博日科技有限公司的 BioRT Master HiSensi cDNA First Strand Synthesis Kit 试剂盒进行反转录，反应体系如表 2-3。

表 2-3 反转录反应体系

Table 2-3 The reaction system of reverse transcription

试剂	体积 (μl)
RNA	3.0
Hybrid mix	5.0
Enzyme mix	0.5
Nuclease-free H ₂ O	1.5
Total	10.0

反应条件：37 °C，20 min；98 °C，5 min。

反转之后的 cDNA，分装好保存于 -20 °C 中，尽量避免反复冻融。

2.2.1.4 RT-PCR 扩增褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列

以褐鳟肝脏组织 cDNA 为模板，利用引物 L2-F 和 L2-R 进行 RT-PCR，扩增褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列，反应体系如表 2-4。

表 2-4 ORF 序列扩增体系

Table 2-4 The amplification system of ORF sequence

试剂	体积 (μl)
cDNA	3
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	25
Forward primer (L2-F)	1
Reverse primer (L2-R)	1
Nuclease-free H ₂ O	20
Total	50

将上述试剂加入 PCR 管中，混合均匀后在瞬时离心机上短暂离心，置于 PCR 仪上，按照以下程序进行反应：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共计 30 个循环；最后 72 °C 再延伸 10 min，4 °C 保存 PCR 产物。

反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，110 V，35 min。凝胶成像系统，拍照后，对目的条带进行切胶。

2.2.1.5 PCR 反应产物胶回收

PCR 产物回收, 采用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒, 具体实验操作如下:

(1) 切取琼脂糖凝胶中的目的 DNA 条带, 放入灭菌的离心管中称重 (0.1 g=100 μ l)。

(2) 加入 3 倍体积溶液 Buffer GM, 均匀混合后室温 15~25 $^{\circ}$ C 溶解胶块 (胶浓度较大或比较难溶时可以在 37 $^{\circ}$ C 加热)。此时间断振荡混合, 使胶块充分溶解 (约 5~10 分钟)。当胶块完全融化后, 观察溶胶液的颜色, 如果溶胶液颜色由黄色变为橙色或粉色, 向上述胶块溶解液中加入 3M 醋酸钠溶液 (pH 5.2) 10 μ l, 均匀混合至溶液恢复黄色。分离小于 400 bp 的 DNA 片段时, 在此溶液中再加入终浓度为 20% 的异丙醇。

(3) 将试剂盒中的 Spin Column 安置于 Collection Tube 上。

(4) 将融化的凝胶溶液转移至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。

(5) 将 700 μ l 的 Buffer WB 加入 Spin Column 中, 室温 12000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。

(6) 重复步骤 (5)

(7) 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 室 12000 rpm 离心 1 分钟。

(8) 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 30 μ l 提前水浴预热的灭菌水, 室温静置 1 分钟。

(9) 室温 12000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA, 洗脱纯化的 DNA, 用于后续实验。

2.2.1.6 产物的连接与转化

PCR 产物与 pMD-18T 载体进行连接, 连接体系如表 2-5。

表 2-5 pMD-18T 载体连接体系

Table 2-5 The connection system of pMD-18t vector

试剂	体积 (μ l)
pMD-18T 载体	1
DNA 回收产物	4
Solution I	5
Total	10

连接条件为: 16 $^{\circ}$ C, 过夜。

在获得连接产物后，借助 Trans-5 α 感受态细胞进行转化。

- (1) 制冰。
- (2) 从-80 °C冰箱取出感受态细胞，冰融助融 2 min。
- (3) 将连接产物加入 Trans-5 α 感受态细胞中，冰上放置 30 min。
- (4) 42 °C热激 90s，再在冰中放置 2 min。
- (5) 加入 500 μ l LB 培养基，37 °C条件下，振荡培养 60 min。

(6) 5000 rpm 离心一分钟收菌，去除 500 μ l 上清，剩余上清用于悬浮菌体，将重悬后的菌液涂布在含有抗生素的琼脂平板培养基上，正置培养 1 h 后倒置，37 °C培养 12~16 h。

2.2.1.7 菌落 PCR 筛选阳性克隆

用高压灭菌后的枪头在长有菌落的平板上挑取长势良好的单一菌落，先在划好格子的抗性平板上轻轻划线保留菌落，再在装有 10.5 μ l Nuclease-free H₂O 的 PCR 管中搅合一下，之后加入预先混合的酶和引物的混合液，反应体系如表 2-6。

表 2-6 菌落 PCR 反应体系

Table 2-6 The reaction system of colony PCR

试剂	体积 (μ l)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	12.5
Forward primer (L2-F)	1.0
Reverse primer (L2-R)	1.0
Nuclease-free H ₂ O	10.5
Total	25.0

将试剂混合均匀后在瞬时离心机上短暂离心，置于 PCR 仪上，按照以下程序进行反应：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共计 30 个循环；最后 72 °C 再延伸 10 min，4 °C 保存 PCR 产物。

将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，挑取检测为阳性的单菌落，过夜培养，之后将菌液送至苏州泓迅生物科技股份有限公司进行测序。

2.2.2 荧光定量 PCR 检测褐鳟不同组织中 LEAP-2 基因的表达情况

根据 NCBI 和已克隆得到的序列，以 β -actin 作为内参基因，设计褐鳟 LEAP-2 基因的荧光定量 PCR 引物和内参引物，引物序列见表 2-7。

表 2-7 荧光定量 PCR 所用引物序列

Table 2-7 The primer sequences for fluorescent quantitative PCR

引物	序列 (5'-3')
L2RT-F	CTAGAAGAGAAGACGGAGTAACGC
L2RT-R	GGCTATGTAGAGGAGAGGGAGG
β -actin-F	ATGGAAGATGAAATCGCC
β -actin-R	TGCCAGATCTTCTCCATG

以成年健康褐鳟不同组织（肾、肝脏、脾、肌肉、鳃、心脏、脑、肠、皮肤）的 cDNA 为模板，通过荧光定量 PCR 技术检测上述组织中 *LEAP-2* 基因的表达情况。反应体系采用 Roche 公司（瑞士）的 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 10 μ L 体系，反应体系如表 2-8。

表 2-8 荧光定量 PCR 反应体系

Table 2-8 The reaction system of fluorescence quantitative PCR

试剂	体积 (μ l)
Forward Primer (L2RT-F/ β -actin-F)	0.2
Reverse Primer (L2RT-R/ β -actin-R)	0.2
cDNA	0.5
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	5
H ₂ O	4.1
Total	10

反应程序为：预变性 95 $^{\circ}$ C，10 min；95 $^{\circ}$ C，10 s；60 $^{\circ}$ C，30 s；共计 40 个循环。PCR 反应结束后，分析熔解曲线，检查反应特异性，并对数据进行处理用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的表达量^[68]。使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析（One-Way ANOVA）和 Duncan 检验进行数据处理，利用 Origin 2017 软件对统计结果进行作图， $P < 0.01$ 表示具有极显著差异性， $P < 0.05$ 表示具有显著差异性。

2.2.3 原核表达载体 pET32a-m*LEAP-2* 的构建

2.2.3.1 pET32a 质粒的提取

将 1 μ l pET32a 质粒转化到 DH5 α 感受态细胞中，37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 之后，挑取单菌落，将菌落接种到 20 ml LB 液体培养基（含 100 μ g/ml 氨苄青霉素）中，37 $^{\circ}$ C，120 rpm 摇床过夜培养。采用 Biospin Plasmid DNA Extraction Kit 质粒小提试剂盒（杭州博日科技有限公司）进行质粒提取，具体步骤如下：

(1) 取 1~1.5 ml 过夜培养的菌液加入 1.5 ml 离心管中, 10000 rpm 离心 30 s, 去上清。可多次重复收集菌液, 但勿过量。

(2) 加入 250 μ l Resuspension Buffer (已加入 RNase solution), 重悬细菌体沉淀, 直至菌块全部消融。

(3) 加入 250 μ l 细胞 Lysis Buffer, 轻柔地上下颠倒 4~6 次 (不要剧烈振动, 防止基因组 DNA 被剪切) 使菌体充分裂解, 形成透明溶液。反应时间不要超过 5 min。

(4) 加入 350 μ l Neutralization Buffer, 立即轻柔颠倒 4~6 次, 溶液出现白色絮状物, 室温静置 2 min。

(5) 13000 rpm 离心 10 min, 在离心管底部形成白色沉淀 (如果离心机转速不够可延长离心时间, 直至形成紧密的白色沉淀)。

(6) 用移液枪将离心后得到的上清液转移到离心柱内, 转移过程中注意尽量不要吸出沉淀。6000 rpm 离心 1 min, 弃去接液管内液体。

(7) 向离心柱内加入 650 μ l Wash Buffer (已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 30~60 秒, 弃去接液管内液体。

(8) 重复第 7 步一次。

(9) 12000 rpm 空离 1 分钟, 去除残留液体, 然后将离心柱转移到无菌的 1.5 ml 离心管中。

(10) 向离心柱内加入 50 μ l 提前预热的灭菌水 (于 30~60 $^{\circ}$ C 温育, 可提高洗脱效率), 并于室温静置 1 分钟, 然后 12000 rpm 离心 1 分钟, 收集质粒溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.3.2 酶切引物的设计及合成

本研究利用 pET32a 作为外源表达系统的载体, 根据其多克隆位点, 采用 EcoR I 和 Xho I 限制性内切酶位点进行连接。根据已克隆的褐鳟 *LEAP-2* 基因序列设计成熟肽区域序列扩增引物, 并分别在上、下游 5'端加入酶切位点和保护碱基, 引物序列见表 2-9。引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成并纯化。

表 2-9 酶切引物序列

Table 2-9 The sequence of digested primers

引物	序列 (5'-3')
L2YH-F	CCGGAATTCATGACCCCGTTGTGGAGG
L2YH-R	CCGCTCGAGATGTTTGGCTATGTAGAGGAGAGG

2.2.3.3 褐鳟 *LEAP-2* 基因成熟肽区域序列的扩增与纯化

以褐鳟肝脏组织 cDNA 为模板，利用引物 L2YH-F 和 L2YH-R 进行 RT-PCR，扩增褐鳟 *LEAP-2* 基因成熟肽区域序列，反应体系如表 2-10。

表 2-10 成熟肽区域序列扩增体系

Table 2-10 The amplification system of mature peptide region sequence

试剂	体积 (μl)
cDNA	3
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	25
Forward primer (L2YH-F)	1
Reverse primer (L2YH-R)	1
Nuclease-free H ₂ O	20
Total	50

将上述试剂加入 PCR 管中，混合均匀后在瞬时离心机上短暂离心，置于 PCR 仪上，按照以下程序进行反应：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 30 s，59 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共计 30 个循环；最后 72 °C 再延伸 10 min，4 °C 保存 PCR 产物。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，利用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒进行切胶回收，具体方法同 2.2.1.5。

2.2.3.4 PCR 产物的连接与转化

同 2.2.1.6。

2.2.3.5 菌落 PCR 筛选阳性克隆

利用 pMD18-T 载体的通用引物 M13F (-47) 和 M13R (-48) 进行菌落 PCR 鉴定，引物序列见表 2-11，挑取阳性克隆进行测序，具体方法同 2.2.1.7，退火温度为 57 °C。

表 2-11 pMD18-T 载体通用引物序列

Table 2-11 The universal primer sequence of pMD18-T vector

引物	序列 (5'-3')
M13F (-47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13R (-48)	AGCGGATAACAATTCACACAGGA

2.2.3.6 pMD18-T-mLEAP-2 质粒的提取

挑取测序正确的单菌落，使用 20 ml LB 液体培养基（含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素）进行扩大培养。使用 Biospin Plasmid DNA Extraction Kit 质粒小提试剂盒（杭州博日科技有限公司）提取 pMD18-T-mLEAP-2 质粒，具体方法同 2.2.2.1。

2.2.3.7 pMD18-T-mLEAP-2 质粒和 pET32a 质粒的双酶切与纯化

利用限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 分别对 pMD18-T-mLEAP-2 质粒和 pET32a 质粒进行双酶切，反应体系如表 2-12。

表 2-12 酶切反应体系

Table 2-12 The reaction system of enzyme cutting

试剂	体积 (μl)
10×H Buffer	10
EcoR I	5
Xho I	5
pMD18-T-mLEAP-2 质粒/pET32a 质粒	40
H ₂ O	40
Total	100

将上述试剂混合均匀之后离心，放入水浴锅中，37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 12 h。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，利用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒进行切胶回收，具体方法同 2.2.1.5。

2.2.3.8 重组质粒的构建与鉴定

将双酶切后纯化得到的带有相同粘性末端的褐鳟 LEAP-2 成熟肽片段（mLEAP-2）和 pET32a 载体片段进行连接，构建 pET32a-mLEAP-2 重组质粒，反应体系如表 2-13。

表 2-13 pET32a 载体连接体系

Table 2-13 The connection system of pET32a vector

试剂	体积 (μl)
T4 DNA lineage	1
T4 DNA lineage buffer	1
褐鳟 LEAP-2 成熟肽片段	4
pET32a 载体片段	4
Total	10

16 °C 连接过夜。将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中，具体方法同 2.2.1.6。从 LB 固体培养基（含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素）上挑取单菌落，过夜培养之后进行质粒提取，对提取的质粒进行双酶切鉴定，反应体系如表 2-14。

表 2-14 酶切鉴定反应体系

Table 2-14 The reaction system of enzymatic identification

试剂	体积 (μl)
10 \times H Buffer	2
EcoR I	1
Xho I	1
pET32a-mLEAP-2 重组质粒	6
H ₂ O	10
Total	20

37 °C 酶切 3 h。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切片段，将酶切鉴定正确的重组质粒送至苏州泓迅生物科技股份有限公司进行测序，测序正确的质粒转入 BL21 (DE3) 感受态细胞中，37 °C 12 h 之后，进行质粒提取，酶切鉴定正确的菌液分装收集于 2 ml EP 管中，加入等体积的 50% 甘油后于 -20 °C 保存。

2.2.4 褐鳕抗菌肽基因 LEAP-2 成熟肽在大肠杆菌中的表达与纯化

2.2.4.1 重组蛋白的可溶性分析

(1) 将 300 μl 含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液接种到 30 ml LB 液体培养基（含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素）中，37 °C，120 rpm 振荡培养 3 h 之后，用分光光度计对菌液进行 OD 值测定，当 OD 值达到 0.5 时，取出 3 ml 菌液作为对照。

(2) 在剩余菌液中加入终浓度为 0.25 mM 的 IPTG。37 °C，120 rpm 继续振荡培养 4 h 后取出 3 ml 菌液作为样品。

(3) 每组菌液，12000 rpm 离心 2 min，弃上清，加入 500 μl 的 PBS (1X) 悬浮底层菌种。将菌液置于冰上，使用细胞超声波破碎仪破碎，1 s 破碎，3 s 暂停，共作用 30-45 min。

(4) 大肠杆菌细胞破碎后，在 4 °C 下，12000 r/min 离心 15 min，分离上清和沉淀，沉淀用 500 μl 的 PBS (1X) 吹打混匀。分别加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液，吹打均匀，煮沸 15 min 之后，准备进行 SDS-PAGE 电泳。

(5) 同时做空质粒对照，观察表达情况。

2.2.4.2 IPTG 浓度的优化

(1) 将 300 μl 含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液接种到 30 ml LB 液体培养基

(含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 3 h 之后, 用分光光度计对菌液进行 OD 值测定, 当 OD 值达到 0.5 时, 取出 3 ml 菌液作为对照。

(2) 将剩余菌液平均分成 3 管, 分别加入终浓度为 0.25 mM、0.375 mM、0.5 mM 的 IPTG。37 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm 继续振荡培养 4 h 后分别取出 3 ml 菌液作为样品。

(3) 每组菌液, 12000 rpm 离心 2 min, 弃上清, 加入 500 μl 的 PBS (1X) 悬浮底层菌种。将菌液置于冰上, 使用细胞超声波破碎仪破碎, 1 s 破碎, 3 s 暂停, 共作用 30-45 min。

(4) 大肠杆菌细胞破碎后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 12000 r/min 离心 15 min, 分离上清和沉淀, 沉淀用 500 μl 的 PBS (1X) 吹打混匀。分别加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液, 吹打均匀, 煮沸 15 min 之后, 准备进行 SDS-PAGE 电泳。

2.2.4.3 诱导时间的优化

(1) 将 300 μl 含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液接种到 30 ml LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm 振荡培养 3 h 之后, 用分光光度计对菌液进行 OD 值测定, 当 OD 值达到 0.5 时, 取出 3 ml 菌液作为对照。

(2) 在剩余菌液中加入终浓度为 0.25 mM 的 IPTG。37 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm 继续振荡培养, 每隔一小时取菌液 3 ml, 其余菌液继续进行诱导, 直到诱导后 6 小时。

(3) 每组菌液, 12000 rpm 离心 2 min, 弃上清, 加入 500 μl 的 PBS (1X) 悬浮底层菌种。将菌液置于冰上, 使用细胞超声波破碎仪破碎, 1 s 破碎, 3 s 暂停, 共作用 30-45 min。

(4) 大肠杆菌细胞破碎后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 12000 r/min 离心 15 min, 分离上清和沉淀, 沉淀用 500 μl 的 PBS (1X) 吹打混匀。分别加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液, 吹打均匀, 煮沸 15 min 之后, 准备进行 SDS-PAGE 电泳。

2.2.4.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

(1) 将制胶玻璃板洗净后放入 56 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中, 烘干。

(2) 安装制胶板, 将玻璃板对齐后垂直夹入制胶板上, 下面垫有橡胶垫, 防止漏胶, 选择合适的蛋白胶厚度进行制作。

(3) 首先配制下层分离胶 (15%), 沿玻璃板慢慢注射入制胶槽, 避免有气泡的产生。到刻度位置停止, 之后加入去离子水进行封层, 封层可防止下层胶变形。当去离子水与下层胶中间出现明显界限时, 表明下层胶已凝固, 可将上层去离子水倒掉。

(4) 配制上层浓缩胶 (5%), 将上层胶缓缓注入制胶槽, 直到与制胶玻璃板上层边缘平齐, 根据实验需要, 插入相应制胶梳, 室温下大约 20 min 之后, 待上

层胶凝固后可将制胶梳取下。

(5) 将制胶架与蛋白胶一起放入垂直电泳槽中，每个胶孔最多加入 20 μl 蛋白样品，同时加入蛋白 marker，连接电泳仪，开始进行电泳。

(6) 上层胶定压 60 V，下层胶定压 90 V，大约 2 小时后，观察 marker 跑开之后，停止电泳。

(7) 根据 marker 条带位置，将目的蛋白大小的下层胶部分切下，放置与平皿中进行考马斯亮蓝染色，大约 1 h 之后，倒掉染色液，用去离子水洗去凝胶表面多余的染料，将胶放入去离子水中煮沸，反复换水 2-3 次，直至背景无色。

(8) 蛋白胶充分脱色后，放入蛋白胶成像系统中，观察蛋白条带，并进行拍照。

2.2.4.5 重组蛋白的纯化

(1) 将 500 μl 包含重组质粒 pET32a-LEAP-2 的表达菌 BL21 (DE3) 菌液接种到 50 ml LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素) 中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，120 rpm 振荡培养 3 h 之后，用分光光度计对菌液进行 OD 值测定，当 OD 值达到 0.5 时，加入终浓度为 0.25 mM 的 IPTG 进行诱导。诱导 4 小时之后，5000 r/min 离心 5 min，收集菌体。

(2) 加入 8 ml LE buffer 重新悬浮菌体，将菌液置于冰上，使用细胞超声波破碎仪进行破碎。

(3) 大肠杆菌 经过超声波破碎后，细菌破碎液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，12000 r/min 离心 15 min，沉淀细胞碎片，收集上清液，上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤。

(4) 将上清上样至 Ni-NTA 亲和层析柱中，流速控制为 0.5-1 ml/min，收集流出液。

(5) 用 8 倍柱体积的洗涤缓冲液洗涤柱子以去除杂蛋白，流速控制为 1 ml/min，收集洗涤液。

(6) 用 5-10 倍柱体积的梯度咪唑洗脱缓冲液洗脱蛋白，咪唑浓度分别为 50、100、200、250 mM，流速控制为 0.5-1 ml/min，收集洗脱液。

(7) 取少量上清过柱液、洗涤液和各梯度洗脱液，进行 SDS-PAGE 电泳分析，验证蛋白的纯化程度。洗脱液经过透析袋脱盐后获得纯化的重组抗菌肽，并对其浓度进行测定。

第3章 结果与分析

3.1 褐鲟 *LEAP-2* 基因 ORF 的克隆与分析

3.1.1 总 RNA 的提取鉴定

将提取的褐鲟各组织总 RNA 进行凝胶电泳检测, 电泳结果显示为三条带, 从上到下分别为 28S、18S 和 5S RNA, 其中 28S、18S 条带清晰, 5S 条带较模糊, 隐约可见, 表明提取的 RNA 较为完整 (如图 3-1)。利用紫外分光光度计检测所提总 RNA 的 A260/A280 值为 2.01, 表明提取的 RNA 纯度较高。

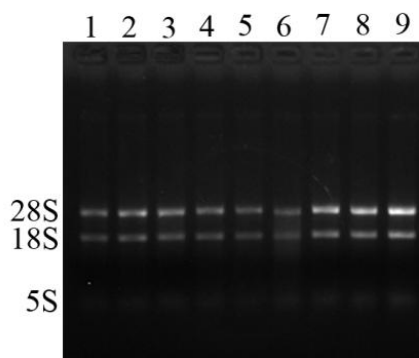


图 3-1 褐鲟各组织总 RNA 电泳图

Fig.3-1 The electrophoretogram of total RNA in tissues of *Salmo trutta*

1~9 按顺序分别为肝脏, 脾, 肠, 肾, 心脏, 肌肉, 鳃, 脑, 皮肤

1~9 are liver, spleen, intestine, kidney, heart, muscle, gill, brain, and skin in order

3.1.2 褐鲟 *LEAP-2* 基因 ORF 的扩增

根据 Genbank 中虹鲟 *LEAP-2A* 基因的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 序列设计引物, 利用褐鲟肝脏组织的 cDNA 模板, 通过 RT-PCR 扩增出褐鲟 *LEAP-2* 基因 ORF 区片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后可见大小在 291 bp 左右的特异性条带, 与预期的相符 (如图 3-2)。

3.1.3 重组子阳性克隆筛选

将褐鲟 *LEAP-2* 基因 ORF 区片段 PCR 产物纯化后插入 pMD-18T 载体, 挑取 5 个菌落, 以菌落为模板, 利用引物 L2-F 和 L2-R 进行 PCR 鉴定。结果显示, 从

5 个单克隆中获得了 4 个阳性克隆（如图 3-3），并把这 4 个单克隆送测序公司进行测序分析。

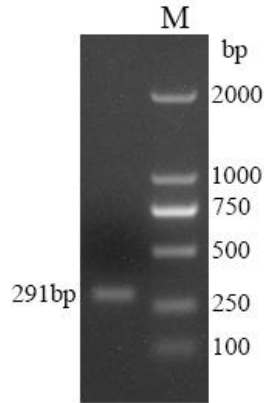


图 3-2 褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 区片段扩增产物

Fig.3-2 The amplification products of ORF region of *LEAP-2* gene of *Salmo trutta*

M 为 DNA Marker DL2000

M is DNA Marker DL2000

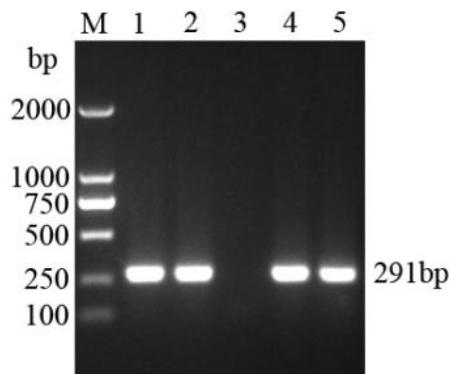


图 3-3 菌落 PCR 扩增产物

Fig.3-3 The amplification products of colony PCR

M 为 DNA Marker DL2000

M is DNA Marker DL2000

3.1.4 褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列分析

将测序得到的褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列通过 DNAMAN 9.0 软件与虹鳟 *LEAP-2A* 基因 ORF 序列进行对比，发现相似性达到 94.85%（如图 3-4）。将褐鳟 *LEAP-2* 基因的 ORF 序列通过 BankIt 提交到 Genbank 上，得到登陆号 MN442344。

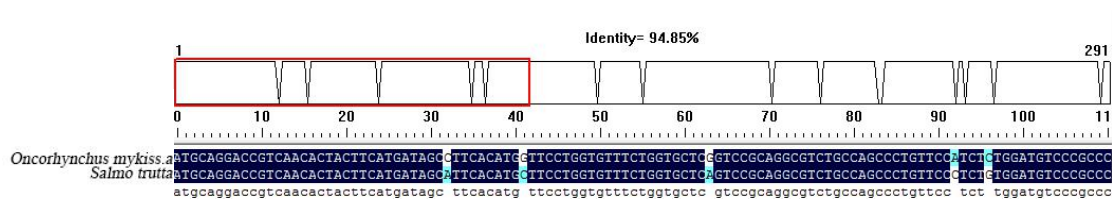


图 3-4 褐鳟 *LEAP-2* 与虹鳟 *LEAP-2A* 基因 ORF 序列的对比结果

Fig.3-4 The comparison of the ORF sequences of the *Salmo trutta LEAP-2* and *O. mykiss LEAP-2A* genes

3.1.5 褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列生物信息学分析

将得到的核酸序列通过 DNAMAN 9.0 软件翻译成氨基酸序列，再利用 ExPASy 的 ProtParam 工具对其进行理化性质分析，其氨基酸组成见表 3-1，褐鳟 *LEAP-2* 蛋白质分子式为 $C_{478}H_{739}N_{133}O_{130}S_{11}$ ，编码 96 个氨基酸残基，总原子数为 1491 个。相对分子量为 10.78 KDa，理论 PI 值为 9.19。带负电荷的残基总数（天冬氨酸+谷氨酸）为 4 个，正电荷（精氨酸+赖氨酸）为 9 个，蛋白质的不稳定系数为 63.71，亲水性平均系数为-0.123。不稳定系数小于 40 被认为是稳定蛋白，否则视为不稳定^[69]，所以推测 *LEAP-2* 属于不稳定蛋白。

表 3-1 褐鳟 *LEAP-2* 基因编码蛋白质的氨基酸组成

Table 3-1 The amino acid composition of the protein encoded by the *Salmo trutta LEAP-2* gene

氨基酸	数量	含量	氨基酸	数量	含量
丙氨酸	5	5.2%	亮氨酸	7	7.3%
精氨酸	6	6.2%	赖氨酸	3	3.1%
天冬酰胺	1	1.0%	蛋氨酸	6	6.2%
天冬氨酸	2	2.1%	苯丙氨酸	5	5.2%
半胱氨酸	5	5.2%	脯氨酸	9	9.4%
谷氨酰胺	6	6.2%	丝氨酸	9	9.4%
谷氨酸	2	2.1%	苏氨酸	5	5.2%
甘氨酸	7	7.3%	色氨酸	1	1.0%
组氨酸	4	4.2%	酪氨酸	4	4.2%
异亮氨酸	3	3.1%	缬氨酸	6	6.2

蛋白质中存在亲水性和疏水性的氨基酸，其驱使蛋白质发生折叠，因此其分布可以反映蛋白质的折叠情况。在折叠的过程中蛋白质会形成疏水内核和亲水表面，并在潜在跨膜区出现高疏水值区域^[70]。

用 ExPASy 的 ProtScale 在线程序对 *LEAP-2* 蛋白质的疏水性进行预测（如图 3-5），结果显示：*LEAP-2* 蛋白疏水性的最大值是 3.022，最小值是-1.867，分别位于 17 位和 44 位氨基酸。11-21 位氨基酸之间为高分值区域（score>1.5），2 个低分值区域（score<-1.5）分别位于 44 位和 48 位氨基酸附近。在疏水性图谱中，正值越大越疏水，负值越大越亲水，由此可见，*LEAP-2* 序列中大多数氨基酸属于亲水性氨基酸，所以认为 *LEAP-2* 为亲水性蛋白质，这与 ProtParam 给出的亲水性平均系数相符合（正值表明为疏水蛋白，负值表明为亲水蛋白）。

利用 TMHMM Server v. 2.0 在线分析程序对 *LEAP-2* 的氨基酸序列进行跨膜结构预测（如图 3-6），结果显示 *LEAP-2* 在 7-26 位氨基酸之间存在潜在的跨膜区。

利用 ExPASy 在线信号肽分析工具 SignalP-3.0 对褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列进行信号肽区域预测（如图 3-7），预测结果显示褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列存在信号肽序列的可能性为 98.4%，存在信号锚序列的可能性为 1.6%。其序列在 N 端包含一个由 27 个氨基酸残基组成的信号肽，剪切位点位于 Ala²⁷-Ser²⁸ 之间（ASA-SP）。

蛋白质二级结构指蛋白质的多肽链构象有规则的重复，但只限主链不包括侧链构象。运用 ExPASy 的 SOPMA 工具，对褐鳟 *LEAP-2* 蛋白的二级结构进行预测。结果显示：褐鳟 *LEAP-2* 蛋白质的二级结构中， α 螺旋（27 个氨基酸残基参与）占 28.12%， β 转角（7 个氨基酸残基参与）占 7.29%，无规则蜷曲（50 个氨基酸残基参与）占 52.08%，延伸链（12 个氨基酸残基参与）占 12.50%（如图 3-8）。可见褐鳟 *LEAP-2* 蛋白质二级结构的主要元件为 α 螺旋和无规则蜷曲， β 转角只在局部出现。

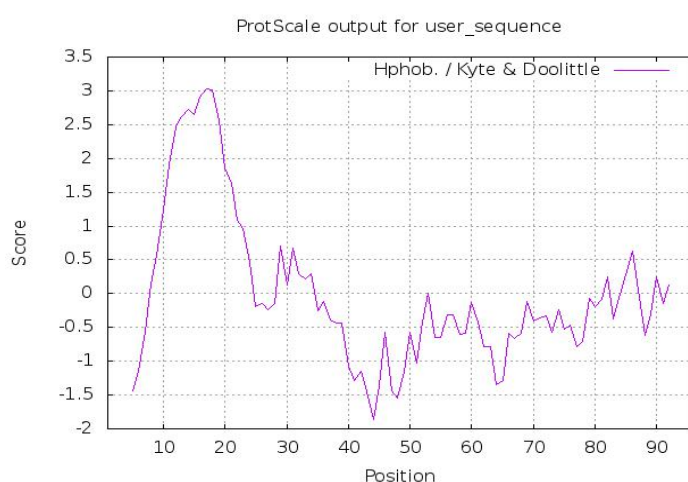


图 3-5 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白疏水性分析

Fig.3-5 The hydrophobicity analysis of *Salmo trutta LEAP-2* protein

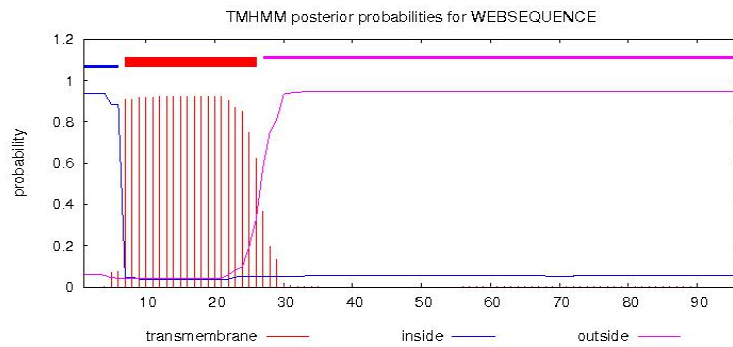


图 3-6 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白跨膜区分析

Fig.3-6 The transmembrane region analysis of *LEAP-2* protein in *Salmo trutta*

transmembrane 表示跨膜区, inside 表示膜内区, outside 表示膜外区

transmembrane represents the transmembrane region, inside represents the inner membrane region, and outside represents the outer membrane region

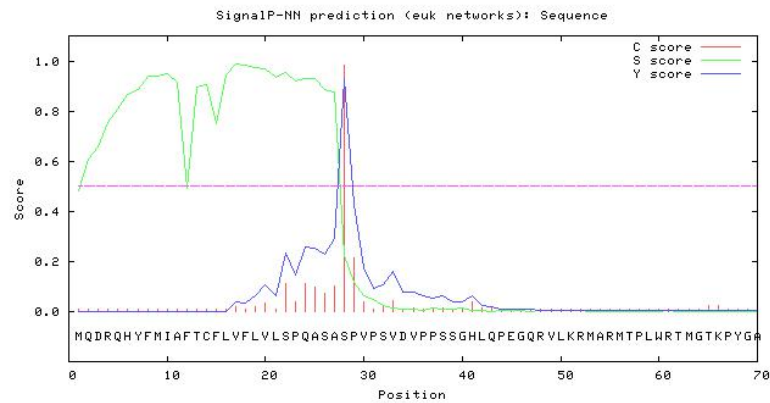


图 3-7 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白信号肽预测

Fig.3-7 The signal peptide prediction of *LEAP-2* protein in *Salmo trutta*

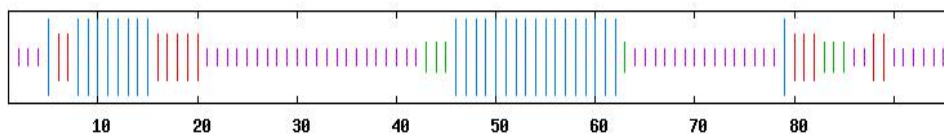


图 3-8 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白二级结构预测

Fig.3-8 The secondary structure prediction of *LEAP-2* protein in *Salmo trutta*

数据为氨基酸位点, 蓝色为 α 螺旋, 紫色为无规则卷曲, 红色为延伸链, 绿色为 β 转角

Data are amino acid sites, blue is alpha helix, purple is random curl, red is extended chain, green is beta rotation

借助 TargetP 1.1 预测褐鳟 *LEAP-2* 蛋白的亚细胞定位，序列来源选择 Non-plant，其它均采用默认参数。结果显示 *LEAP-2* 蛋白最有可能分泌到细胞外，其 SP 值为 0.967，可信度 RC 为 1（如表 3-2）。

表 3-2 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白定位分析

Table 3-2 The location analysis of *LEAP-2* protein in *Salmo trutta*

蛋白名称	Len 长度	mTP 线粒体靶向肽	SP 分泌途径信号肽	Other 其他	Loc 定位	RC 可信度
<i>LEAP-2</i>	96	0.023	0.967	0.028	S	1

利用 Swiss-model 软件对褐鳟 *LEAP-2* 蛋白的三级结构进行预测，预测结果如图 3-9。通过搜索发现，人类 *LEAP-2* (PDB number:2l1q.1.A) 是与褐鳟 *LEAP-2* 蛋白序列最匹配的模板，序列一致性为 41.03%，QMEAN 值为-1.61。从结构上看，褐鳟 *LEAP-2* 与人类 *LEAP-2* 相似，其中包括由两对二硫键组成的紧密中心以及无序的 N 端和 C 端。

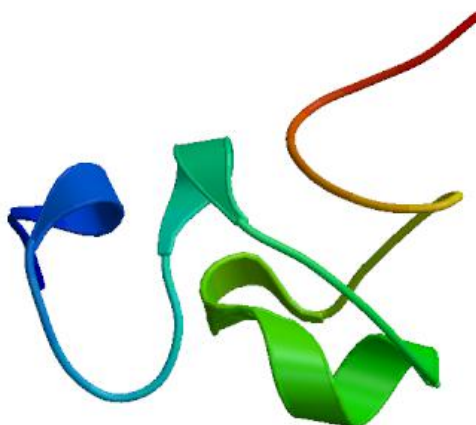


图 3-9 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白三级结构预测

Fig.3-9 The tertiary structure prediction of *LEAP-2* protein in *Salmo trutta*

经 NetOGlyc 4.0 Server 和 NetNGlyc 1.0 Server 分析后显示，在褐鳟 *LEAP-2* 蛋白中存在 4 个 O-糖基化位点（分别在第 32、38、39 和 62 位氨基酸位点），不存在 N-糖基化位点。通过 NetPhos-3.1 Server 对褐鳟 *LEAP-2* 蛋白磷酸化位点进行预测，结果显示褐鳟 *LEAP-2* 蛋白存在 4 个丝氨酸（Ser）和 3 个苏氨酸（Thr）磷酸化位点，但没有酪氨酸（Tyr）的磷酸化位点（如表 3-3）。

表 3-3 褐鳟 *LEAP-2* 蛋白磷酸化位点预测Table 3-3 The phosphorylation sites prediction of *LEAP-2* protein in *Salmo trutta*

序号	磷酸化位点		催化激酶 (得分)
	位点	氨基酸	
1	22	丝氨酸 (S)	p38MAPK (0.540), cdk5 (0.522), GSK3 (0.512)
2	28	丝氨酸 (S)	unsp (0.970), p38MAPK (0.608)
3	39	丝氨酸 (S)	unsp (0.805)
4	57	苏氨酸 (T)	unsp (0.923), p38MAPK (0.551), cdk5 (0.539)
5	65	苏氨酸 (T)	PKC (0.563)
6	80	苏氨酸 (T)	PKC (0.774)
7	91	丝氨酸 (S)	ATM (0.642), DNAPK (0.587), PKC (0.571)

p38MAPK 为丝裂原活化蛋白激酶 p38, cdk5 为细胞周期素依赖蛋白激酶 5, GSK3 为糖原合成酶激酶 3, PKC 为蛋白激酶 C, ATM 为 ATM 蛋白激酶, DNAPK 为 DNA 依赖性蛋白激酶, unsp 为非特异性蛋白激酶

p38MAPK is mitogen-activated protein kinase p38, cdk5 is cyclin-dependent protein kinase 5, GSK3 is glycogen synthase kinase 3, PKC is protein kinase C, ATM is ATM protein kinase, DNAPK is DNA-dependent protein kinase, unsp is Non-specific protein kinase

在 NCBI 上下载相关物种的 *LEAP-2* 氨基酸序列, 包括人 (*Homo sapiens*)、猪 (*Sus scrofa*)、牛 (*Bos Taurus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、猕猴 (*Macaca mulatta*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、狒狒 (*Papio anubis*)、狗 (*Canis lupus familiaris*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、红点鲑 (*Salvelinus alpinus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *LEAP-2A* 型、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *LEAP-2B* 型、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、黄颡鱼 (*Tachysurus fulvidraco*)、长鳍真鲷 (*Ictalurus furcatus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 以及斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*), 利用 DNAMAN 9.0 软件将这些氨基酸序列与褐鳟 *LEAP-2* 基因的氨基酸序列进行对比。结果显示褐鳟与大西洋鲑之间同源性最高, 达 99%; 与模式鱼种斑马鱼的同源性为 55.2%; 与红原鸡的同源性为 29.2%; 与人的同源性达 27.1%; 与小鼠的同源性最低, 为 22.5% (表 3-4)。由图 3-10 可以看出, 不同物种的 *LEAP-2* 蛋白均由信号肽 (Signal peptide)、前体肽 (Prodomain) 和成熟肽 (Mature peptide) 三部分组成。在前体肽和成熟肽切割位点之前存在四个比较保守的“RXXR”序列, 可为前体肽转化酶所识别^[61]。褐鳟 *LEAP-2* 成熟肽有 41 个氨基酸残基, 理论分子量为 4.63 kDa, 等电点为 8.86, 并带有 3 个净正电

荷，属于阳离子抗菌肽（表 3-5）。褐鳟与哺乳动物 *LEAP-2* 蛋白之间差别较大，其差异可能主要与前体区（Precursor region，信号肽+前体肽）有关，通过对比褐鳟与哺乳动物的 *LEAP-2* 前体区部分显示，其同源性在 14.6-23.6%（表 3-6）。在褐鳟 *LEAP-2* 蛋白的成熟肽区域存在 4 个高度保守的半胱氨酸，蛋白质结构预测（PredictProtein）分析表明 Cys-72 与 Cys-78 和 Cys-83 与 Cys-88 之间分别形成 2 对二硫键。

表 3-4 褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列的同源性分析

Table 3-4 The homology analysis of *LEAP-2* amino acid sequence of *Salmo trutta*

物种	GenBank 登录号	同源性/%
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	XP_014039283.1	99.0
虹鳟 (A) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117936.1	94.8
红点鲑 <i>Salvelinus alpinus</i>	XP_023996429.1	94.8
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	ACR54299.1	60.4
黄颡鱼 <i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_026990153.1	58.8
长鳍真鲷 <i>Ictalurus furcatus</i>	AAX45792.1	57.7
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001122249.1	55.2
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	NP_001187134.1	53.1
虹鳟 (B) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117937.1	49.0
牙鲈 <i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019960564.1	42.7
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	NP_001290271.1	40.8
红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_001001606.1	29.2
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_776984.1	28.1
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_443203.1	27.1
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	NP_001107582.1	27.1
狒狒 <i>Papio anubis</i>	NP_001162235.1	26.0
猪 <i>Sus scrofa</i>	NP_998953.1	26.0
狗 <i>Canis lupus familiaris</i>	XP_852172.1	24.0
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_694709.1	22.5

A 代表 *LEAP-2A*，B 代表 *LEAP-2B*，未注明的代表 *LEAP-2*

A for *LEAP-2A*, B for *LEAP-2B*, and unspecified for *LEAP-2*

表 3-5 不同物种 *LEAP-2* 基因成熟肽的特征Table 3-5 The characteristics of mature peptides of *LEAP-2* gene in different species

物种	总氨基酸	净电荷 (+)	分子量 (Da)	等电点
大西洋鲑	41	3	4627	8.86
虹鳟 (A)	41	3	4604	8.86
红点鲑	41	3	4604	8.86
草鱼	41	3	4657	8.86
褐鳟	41	3	4627	8.86
黄颡鱼	41	4	4600	9.16
长鳍真鲷	41	3	4617	8.88
斑马鱼	41	2	4579	8.48
斑点叉尾鲷	41	3	4617	8.88
虹鳟 (B)	41	3	4613	8.94
牙鲆	46	3	5167	8.86
大黄鱼	46	2	5188	8.48
红原鸡	40	4	4593	9.37
牛	40	4	4599	9.37
人	40	4	4585	9.37
猕猴	40	4	4585	9.37
狒狒	40	4	4585	9.37
猪	40	4	4599	9.37
狗	40	4	4601	9.37
小鼠	40	4	4585	9.37

A 代表 *LEAP-2A*, B 代表 *LEAP-2B*, 未注明的代表 *LEAP-2*

A for *LEAP-2A*, B for *LEAP-2B*, and unspecified for *LEAP-2*

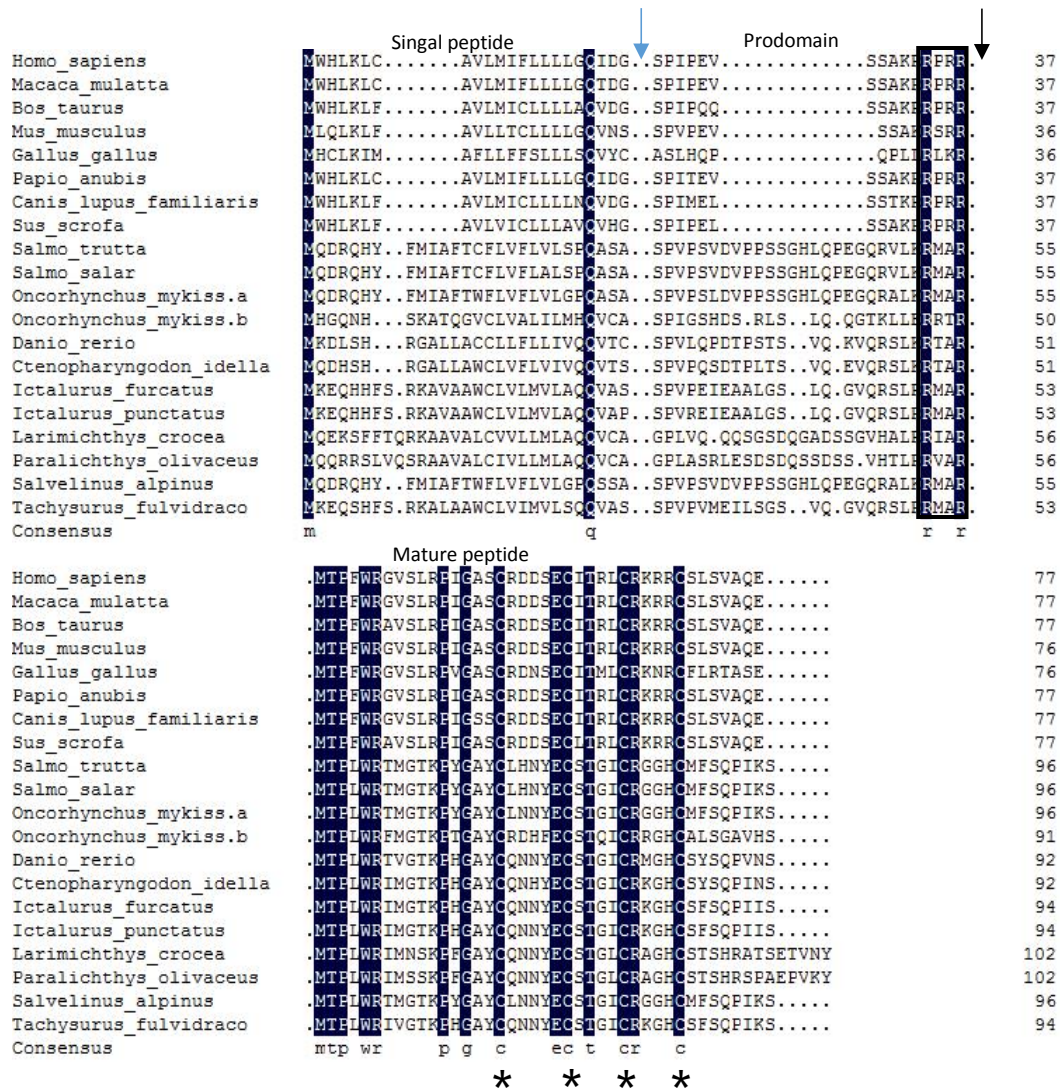


图 3-10 褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列的多重序列对比

Fig.3-10 The multiple sequence comparison of *LEAP-2* amino acid sequence in *Salmo trutta*

Singal peptide 表示信号肽区域, Prodomain 表示前导肽区域, Mature peptide 表示成熟肽区域, 蓝色阴影表示保守的氨基酸残基, 方框表示切割基序, 星号表示半胱氨酸残基, 蓝色箭头表示信号肽切割位点, 黑色箭头表示成熟肽断裂位点

Singal peptide indicates the signal peptide region, Prodomain indicates the leader peptide region, Mature peptide indicates the mature peptide region, blue shading indicates conserved amino acid residues, boxes indicate cleavage motifs, asterisks indicate cysteine residues, and blue arrows indicates the signal peptide cleavage site, and the black arrow indicates the mature peptide cleavage site

表 3-6 不同物种 *LEAP-2* 基因前体区以及成熟肽的相似度Table 3-6 The similarity of *LEAP-2* gene precursor regions and mature peptides in different species

前体区相似度/%																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	90.9	90.9	45.5	98.2	39.3	37.5	38.2	30.9	36.4	28.1	26.3	21.8	20.0	18.2	18.2	16.4	16.4	14.6	21.8	
2	97.6		96.4	47.3	92.7	39.3	41.1	36.4	39.3	34.6	28.1	28.1	21.8	20.0	18.2	18.2	16.4	20.0	16.4	21.8
3	97.6	100		47.3	92.7	41.1	41.1	36.4	39.3	34.6	28.1	28.1	20.0	20.0	20.0	20.0	18.2	18.2	14.6	23.6
4	78.1	80.5	80.5		47.3	58.5	54.7	80.4	50.9	33.3	33.3	33.9	19.6	21.6	23.5	23.5	21.6	13.7	19.6	33.3
5	100	97.6	97.6	78.1		41.1	39.3	38.2	37.5	36.4	28.1	26.3	21.8	20.0	18.2	18.2	16.4	16.4	14.6	23.6
6	82.9	85.4	85.4	90.2	82.9		81.1	52.8	77.4	34.0	32.1	44.8	17.0	20.8	20.8	20.8	20.8	28.3	22.6	28.3
7	82.9	85.4	85.4	92.7	82.9	95.1		45.3	96.2	37.7	33.9	39.3	15.1	28.3	24.5	20.8	18.9	32.1	26.4	34.0
8	78.1	80.5	80.5	87.8	78.1	87.8	85.4		45.3	31.4	25.0	28.6	25.5	25.5	25.5	21.6	29.4	7.84	19.6	31.4
9	82.9	85.4	85.4	92.7	82.9	95.1	100	85.4		37.7	33.9	44.8	17.0	26.4	18.9	18.9	18.9	30.2	26.4	30.2
10	65.9	65.9	65.9	68.3	65.9	63.4	65.9	65.9	65.9		33.9	30.4	26.0	22.0	24.0	24.0	24.0	28.0	30.0	22.0
11	60.9	63.0	63.0	63.0	60.9	67.4	67.4	60.9	65.2	50.0		64.9	14.3	26.8	21.4	21.4	21.4	21.4	16.1	19.6
12	58.7	60.9	60.9	65.2	58.7	65.2	67.4	63.0	67.4	52.2	87.0		23.2	28.6	19.6	25.0	19.6	26.8	19.6	21.4

13	39.0	39.0	39.0	39.0	39.0	43.9	41.5	41.5	41.5	46.3	43.5	43.5	35.1	32.4	32.4	32.4	29.7	32.4	36.1
14	39.0	39.0	39.0	43.9	39.0	46.3	43.9	43.9	43.9	48.8	41.3	41.3	77.5	93.8	83.8	81.1	83.8	86.5	67.6
15	39.0	39.0	39.0	43.9	39.0	46.3	43.9	43.9	43.9	48.8	41.3	39.1	80.0	97.5	97.3	97.3	78.4	81.1	67.6
16	39.0	39.0	39.0	43.9	39.0	46.3	43.9	43.9	43.9	48.8	41.3	41.3	80.0	97.5	100	94.6	78.4	81.1	67.6
17	39.0	39.0	39.0	43.9	39.0	46.3	43.9	43.9	43.9	48.8	41.3	39.1	80.0	97.5	100	100	75.7	81.1	64.9
18	39.0	39.0	39.0	43.9	39.0	46.3	43.9	43.9	43.9	48.8	41.3	41.3	75.0	97.5	95.0	95.0	95.0	83.8	67.6
19	36.6	36.6	36.6	41.5	36.6	43.9	41.5	41.5	41.5	46.3	39.1	37.0	77.5	95.0	97.5	97.5	97.5	92.5	64.9
20	39.0	39.0	39.0	43.9	39.0	46.3	43.9	43.9	43.9	48.8	41.3	39.1	80.0	97.5	100	100	100	95.0	97.5

成熟肽相似度/%

Precursor region 表示前体区, Mature peptide 表示成熟肽, 由 1 到 20 分别为大西洋鲑、虹鳟 (A)、红点鲑、草鱼、褐鳟、黄颡鱼、长鳍真鲷、斑马鱼、斑点叉尾鲷、虹鳟 (B)、牙鲆、大黄鱼、红原鸡、牛、人、猕猴、狒狒、猪、狗和小鼠的 *LEAP-2* 氨基酸序列

Precursor region represents the precursor region, and Mature peptide represents the mature peptide. From 1 to 20, they are *Salmo salar*, *O. mykiss* (A), *S. alpinus*, *C. idella*, *Salmo trutta*, *T. fulvidraco*, *I. furcatus*, *Danio rerio*, *I. punctatus*, *O. mykiss* (B), *P. olivaceus*, *L. crocea*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Papio anubis*, *Sus scrofa*, *Canis lupus familiaris*, and *Mus musculus* *LEAP-2* Amino Acid Sequence

3.1.6 褐鳟 *LEAP-2* 系统进化分析

通过 MEGA 5.0 软件对上述 19 个物种的 20 条 *LEAP-2* 氨基酸序列构建 Neighbor-Joining 进化树 (图 3-11)。从结果来看, 进化树整体分为 2 大分支, 其中硬骨鱼类形成一个分支, 而鸟类和哺乳动物形成另一个分支, 说明鱼类与哺乳动物和鸟类的亲缘关系较远。在硬骨鱼类分支中, 褐鳟与大西洋鲑亲缘关系最近, 先形成一簇, 然后再和其他鱼类成簇。除了大西洋鲑之外, 褐鳟与同为鲑科的虹鳟 A 型和红点鲑的亲缘关系也较近。虹鳟 B 型与硬骨鱼中其他鱼类的亲缘关系较远, 自成一簇。

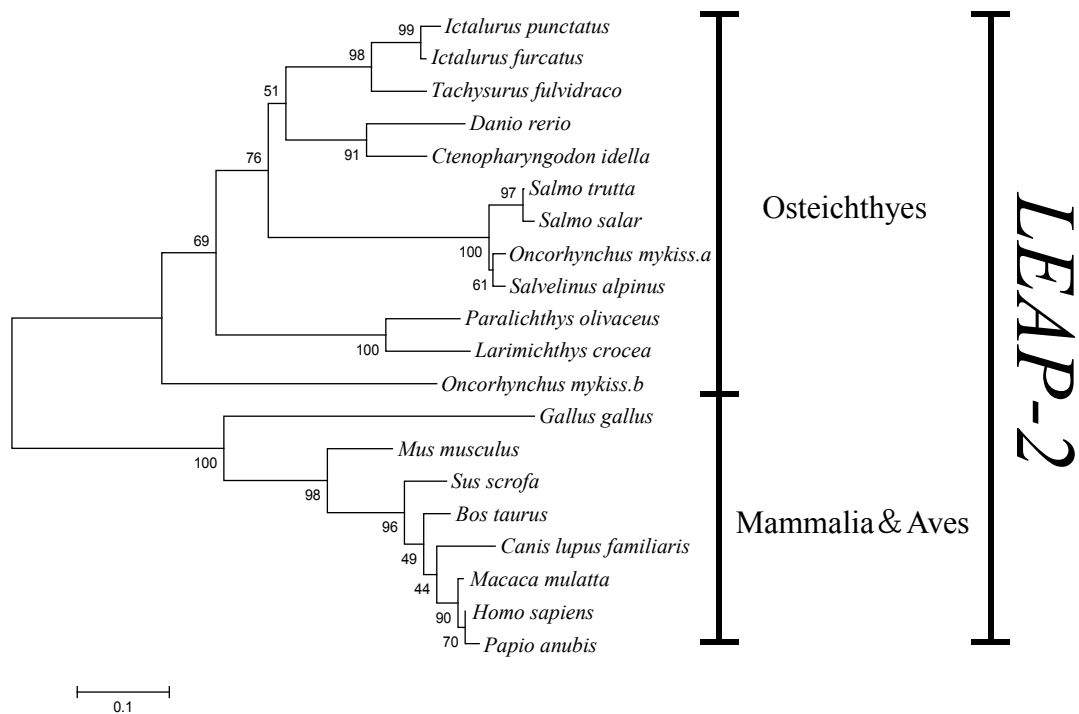


图 3-11 褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列系统进化树

Fig.3-11 The phylogenetic tree of *LEAP-2* amino acid sequence of *Salmo trutta*

3.2 褐鳟 *LEAP-2* 基因的表达

通过对 *LEAP-2* 基因在成年健康褐鳟不同组织中的相对表达量进行分析, 得出如下结果 (图 3-12), *LEAP-2* 基因在肾、肝脏、脾、肌肉、鳃、心脏、肠、脑、皮肤中均有表达, 但每个组织的表达水平明显不同。*LEAP-2* 基因在肝脏中的表达与其他组织差异极显著 ($P < 0.01$, 不考虑脾), 明显高于其他组织, 其次是脾、肾和肠, 而在脑和皮肤中的表达量极低。肾、肌肉、鳃、心脏、肠、脑、皮肤之

间的表达差异不显著 ($P>0.05$)。脾与肾、心脏和肌肉之间的表达差异显著 ($P<0.05$)，与脑、皮肤和鳃之间的表达差异极显著 ($P<0.01$)。

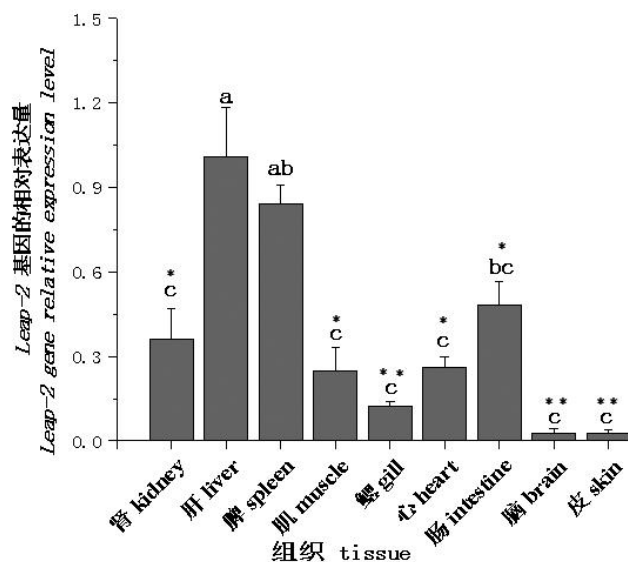


图 3-12 褐鳟各组织 LEAP-2 基因的相对表达

Fig.3-12 The relative expression of LEAP-2 gene in different tissues of Salmo trutta

标准差上方不同字母表示显著差异 ($P<0.05$)； * 表示与肝脏有极显著性差异 ($P<0.01$)； * * 表示与肝脏和脾均具有极显著性差异 ($P<0.01$)

Different letters above the standard deviation indicate significant difference ($P <0.05$); * indicates extremely significant difference with liver ($P <0.01$); * * indicates extremely significant difference with liver and spleen ($P <0.01$)

3.3 褐鳟抗菌肽基因 LEAP-2 成熟肽在大肠杆菌中的表达与纯化

3.3.1 原核表达载体的构建

以褐鳟肝脏组织 cDNA 为模板,通过设计的引物 LYH-F 和 LYH-R 进行 RT-PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳后,可见大小为 226 bp 的特异性条带(如图 3-13)。

将褐鳟 LEAP-2 基因成熟肽片段 PCR 产物纯化后连入 pMD-18T 克隆载体,利用克隆载体上的通用引物 M13F (-47) 和 M13R (-48) 对其进行菌落 PCR 鉴定。对鉴定得到的阳性克隆进行测序,经过测序验证正确后,选择正确的质粒进行双酶切,连入同样经过 EcoR I 和 Xho I 双酶切的 pET32a 载体的多克隆位点(图 3-14)。构建成功的原核表达载体命名为 pET32a-mLEAP-2,并通过限制性内切酶和测序进行验证(图 3-15)。

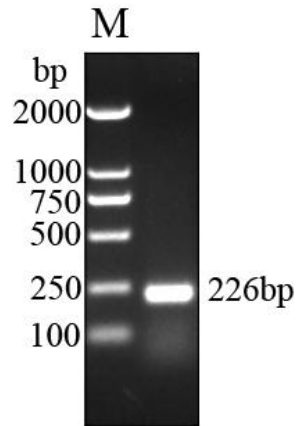


图 3-13 褐鳟 *LEAP-2* 基因成熟肽片段扩增产物

Fig.3-13 The amplification products of *LEAP-2* gene mature peptide fragment of *Salmo trutta*

M 为 DNA Marker DL2000

M is DNA Marker DL2000

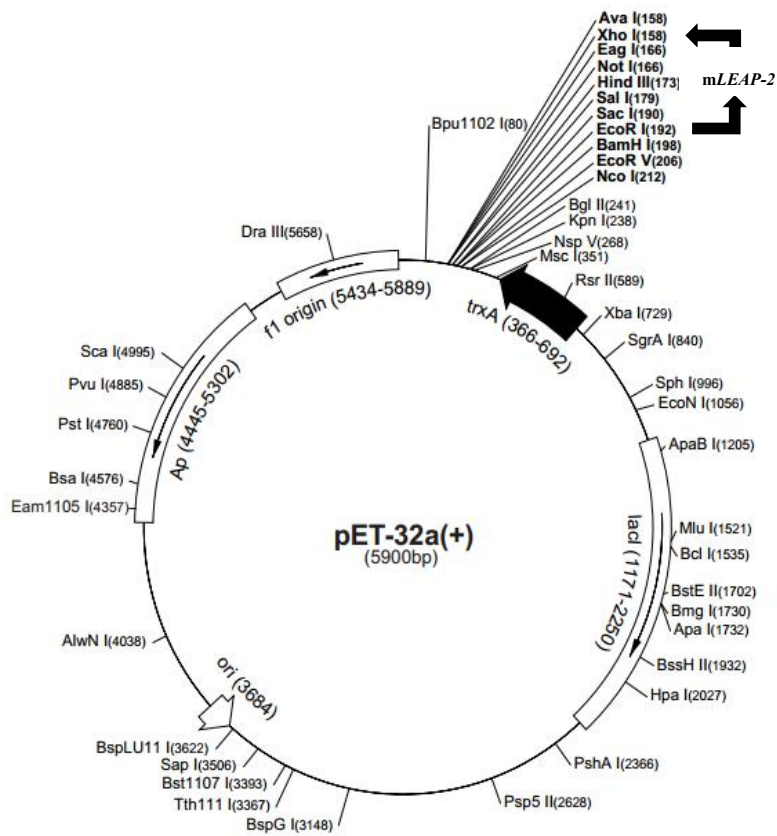


图 3-14 pET32a 质粒图谱

Fig.3-14 The map of pET32a vector

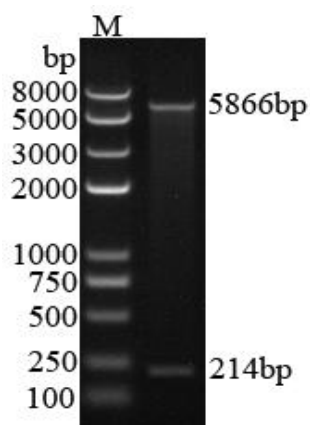


图 3-15 表达载体的酶切鉴定结果

Fig.3-15 The results of enzyme digestion of expression vector

M 为 DNA Marker DL8000

M is DNA Marker DL8000

3.3.2 抗菌肽 *LEAP-2* 融合蛋白可溶性分析

将分别含有重组质粒和 pET32a 空质粒的 BL21 (DE3) 菌液接种到 LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素) 中进行培养, 待菌液的 OD 值达到 0.5 时, 取部分菌液进行保存, 作为阴性对照, 之后加入 IPTG 进行诱导。37 $^{\circ}\text{C}$, 120rpm 振荡培养 4 h 后收集菌体, 使用细胞超声波破碎仪破碎, 破碎后分离上清和沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳验证。结果显示, 含重组质粒的菌体蛋白在分子量约 22.61 kDa 处有蛋白条带, 与预期的重组蛋白大小相符, 而在含 pET32a 空质粒的菌体蛋白上未见该条带, 说明插入的外源基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中能够表达。此外, 含重组质粒的菌体蛋白在上清和沉淀部分都存在 22.61 kDa 左右的条带, 但上清部分的条带更加明显, 说明表达产物大部分以可溶性蛋白形式存在于上清液中, 所以选用上清来进行纯化 (如图 3-16)。

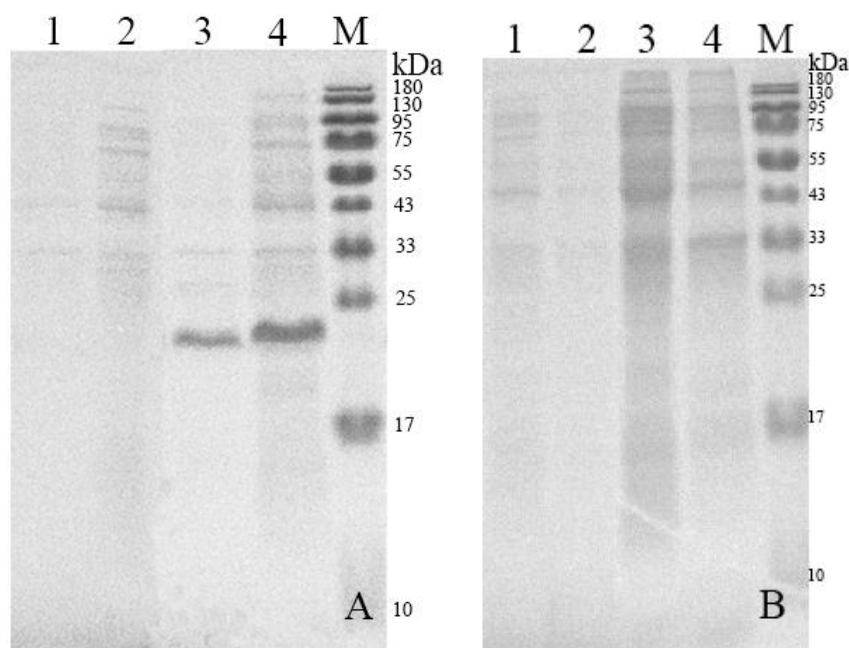


图 3-16 pET32a-mLEAP-2 重组质粒及 pET32a 空质粒的诱导表达

Fig.3-16 The induction expression of pET32a-mLEAP-2 recombinant vector and pET32a empty vector

M 为蛋白 Marker，图 A 为 pET32a-mLEAP-2 重组质粒诱导表达结果，其中 1 为含重组质粒 pET32a-mLEAP-2 的 BL21 菌体诱导 0 h 的沉淀，2 为含重组质粒 pET32a-mLEAP-2 的 BL21 菌体诱导 0 h 的上清，3 为含重组质粒 pET32a-mLEAP-2 的 BL21 菌体诱导 4 h 的沉淀，4 为含重组质粒 pET32a-mLEAP-2 的 BL21 菌体诱导 4 h 的上清；图 B 为 pET32a 空质粒诱导表达结果，其中 1 为含 pET32a 空质粒的 BL21 菌体诱导 0 h 的上清，2 为含 pET32a 空质粒的 BL21 菌体诱导 0 h 的沉淀，3 为含 pET32a 空质粒的 BL21 菌体诱导 4 h 的上清，4 为含 pET32a 空质粒的 BL21 菌体诱导 4 h 的沉淀

M is the protein marker, and figure a is the result of inducing expression of pET32a-mLEAP-2 recombinant plasmid, in which 1 is the precipitate of BL21 cell containing pET32a-mLEAP-2 for 0 h, 2 is the supernatant of BL21 cell containing pET32a-mLEAP-2 for 0 h, 3 is the precipitate of BL21 cell containing pET32a-mLEAP-2 for 4 h, 4 is the precipitate of BL21 cell containing pET32a-mLEAP-2 for 4 h; Fig. B is the result of induction expression of empty plasmid pET32a, in which 1 is the supernatant of BL21 containing empty plasmid pET32a for 0 h, 2 is the supernatant of BL21 containing empty plasmid pET32a for 0 h, 3 is the supernatant of BL21 containing empty plasmid pET32a for 4 h, 4 is the supernatant of BL21 containing empty plasmid pET32a for 4 h

3.3.3 IPTG 浓度的优化

加入不同终浓度 (0.25 mM, 0.375 mM, 0.5 mM) 的 IPTG, 37 °C, 120 rpm 诱导培养 4 h 后收集菌体, 使用细胞超声波破碎仪破碎, 破碎后分离上清和沉淀, 对上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳验证。结果显示, 随着 IPTG 浓度的增加, 目的蛋白的表达量并没有出现明显的变化, 而浓度过高的 IPTG 会影响大肠杆菌 BL21 (DE3) 的正常生长, 所以选择 0.25 mM 作为最佳诱导浓度 (如图 3-17)。

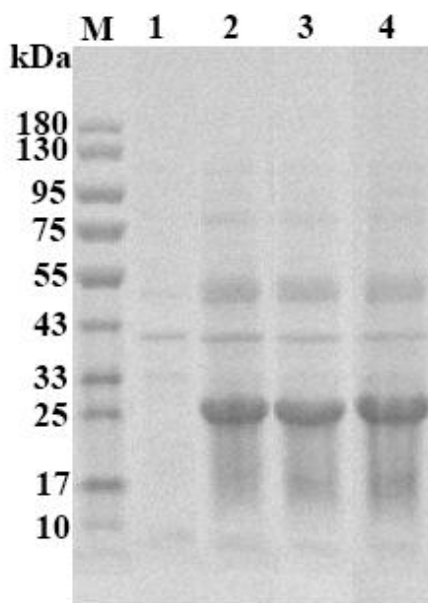


图 3-17 不同 IPTG 浓度对 pET32a-mLEAP-2 重组蛋白表达的影响

Fig.3-17 The effect of different IPTG concentrations on the expression of pET32a-mLEAP-2 recombinant protein

M 为蛋白 Marker, 1 为无 IPTG 诱导, 2 为 0.25 mM IPTG 诱导, 3 为 0.375 mM IPTG 诱导, 4 为 0.5 mM IPTG 诱导

M is protein marker, 1 is no IPTG induction, 2 is 0.25 mM IPTG induction, 3 is 0.375 mM IPTG induction, 4 is 0.5 mM IPTG induction

3.3.4 诱导时间的优化

加入终浓度为 0.25 mM 的 IPTG, 37 °C, 120 rpm 诱导培养。每隔一小时收集 3 ml 菌液, 诱导 6 小时后, 收集不同诱导时间的菌体, 使用细胞超声波破碎仪破碎, 破碎后分离上清和沉淀, 对上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳验证。结果显示,

随着诱导时间的增加，目的蛋白的表达量先上升后下降，其中诱导后 4 h 的诱导效果相对较好，所以选择 4 h 作为最佳诱导时间（如图 3-18）。

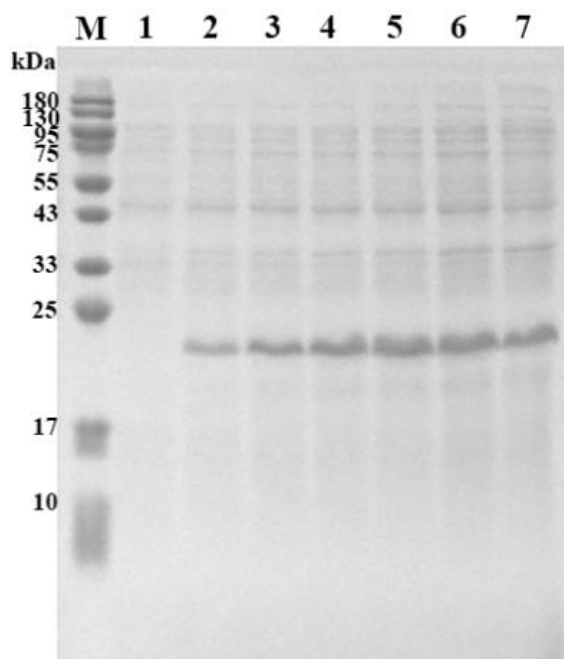


图 3-18 不同诱导时间对 pET32a-mLEAP-2 重组蛋白表达的影响

Fig.3-18 The effect of different induction times on the expression of pET32a-mLEAP-2 recombinant protein

M 为蛋白 Marker，1 为诱导 0 h，2 为诱导 1 h，3 为诱导 2 h，4 为诱导 3 h，5 为诱导 4 h，6 为诱导 5 h，7 为诱导 6 h

M is protein marker, 1 is induced 0 h, 2 is induced 1 h, 3 is induced 2 h, 4 is induced 3 h, 5 is induced 4 h, 6 is induced 5 h, 7 is induced 6 h

3.3.5 重组蛋白的纯化

重组表达质粒 pET32a-mLEAP-2 表达的融合蛋白带有 6XHis 标签，其可与 Ni^{2+} 特异性的结合，利用这一原理，可以通过金属螯和层析技术对融合蛋白进行纯化。确认融合蛋白正确表达后，诱导 pET32a-mLEAP-2 在大肠杆菌中表达，IPTG 诱导 4 小时后离心收集菌体，经过超声波细胞破碎仪振荡后分离上清和沉淀。收集上清液，并用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤，去除杂质（细胞碎片和包涵体蛋白）。将上清加入 Ni-NTA 亲和层析柱中，充分挂柱后，用洗涤液洗涤，之后用梯度的咪唑进行洗脱。对上清过柱液、洗涤液和各梯度洗脱液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析，验证纯化

蛋白的特异性。通过电泳结果表明，大部分杂蛋白已被洗脱下来，纯化效果较好，纯化后的蛋白大小符合预期（如图 3-19）。

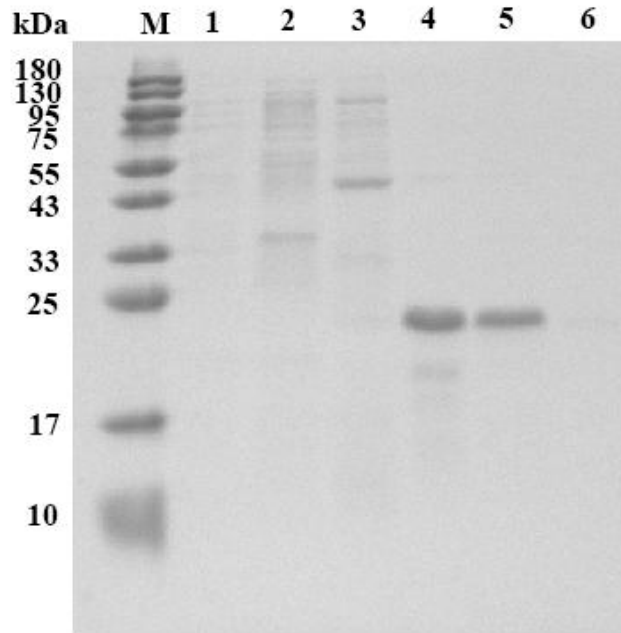


图 3-19 纯化 pET32a-mLEAP-2 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3-19 The SDS-PAGE results of purified pET32a-mLEAP-2 recombinant protein

M 为蛋白 Marker，1 为上清过柱液，2 为洗涤液，3 为 50 mM 咪唑洗脱液，4 为 100 mM 咪唑洗脱液，5 为 200 mM 咪唑洗脱液，6 为 250 mM 咪唑洗脱液

M is the protein marker, 1 is the supernatant through the column, 2 is the washing solution, 3 is the 50 mM imidazole eluate, 4 is the 100 mM imidazole eluate, 5 is the 200 mM imidazole eluate, and 6 is the 250 mM imidazole eluate

第4章 讨论

4.1 褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 的克隆

在实验过程中,模板 RNA 的质量对于实验十分重要。由于模板 RNA 在 RNA 酶作用下容易降解,而肝脏组织具有较其他组织中多的 RNA 酶,所以在提取过程中要防止外界 RNA 酶的污染,并抑制肝脏组织中 RNA 酶的活性。本实验采用 Trizol 法提取褐鳟肝脏组织总 RNA,Trizol 能够抑制 RNA 酶对于 RNA 的降解,在裂解细胞时保证 RNA 的完整性。提取到的总 RNA 经电泳检测,18S 和 28SRNA 条带清晰不弥散,并且 RNA 纯度测定结果显示 A260/A280 的比值为 2.01,表明提取的 RNA 没有发生降解,纯度较高,有利于 RT-PCR 进行。

抗菌肽基因 *LEAP-2* 最早被从人类血液的超滤产物中分离得到,之后被发现在肝脏中大量表达^[58],其在脊椎动物体内普遍存在,并在抗细菌免疫应答中起重要作用。最早的鱼类 *LEAP-2* 基因是在虹鳟体内被发现的,其具有两种类型,分别是 *LEAP-2A* 和 *LEAP-2B*^[61]。本研究根据虹鳟 *LEAP-2A* 基因 ORF 序列设计引物,以褐鳟肝脏组织 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 区片段,之后将该片段连入 pMD-18T 载体,通过菌落 PCR 筛选出带有目的片段的阳性克隆并进行测序。测序得到的序列与虹鳟 *LEAP-2A* 基因 ORF 序列相似度为 94.85%,说明扩增得到的序列为褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列。这是国内目前关于褐鳟 *LEAP-2* 基因的首次研究报道。

4.2 褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列的生物信息学分析

本研究通过 DNAMAN 9.0 软件将褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列翻译成氨基酸序列,并利用在线软件对其进行分析。利用 ProtParam 对褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列进行分析,发现褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列编码 96 个氨基酸残基,相对分子量为 10.78 KDa,等电点为 9.19,带有 5 个净正电荷。由 ProtScale 分析发现在褐鳟 *LEAP-2* 上存在一个明显的疏水区,其位于 11-21 位氨基酸之间,与利用 TMHMM Server v. 2.0 预测的潜在跨膜区相接近。蛋白质疏水区可作为评判潜在跨膜区的依据,但预测得到的疏水区并不一定就是跨膜区,其也有可能为信号肽区域。含有跨膜区的蛋白一般与细胞的功能状态有关,通常为膜受体、锚定蛋白或离子通道蛋白。经

SignalP-3.0 分析后发现褐鳟 *LEAP-2* 上存在信号肽，其位于 1-27 位氨基酸之间，并且亚细胞定位结果显示褐鳟 *LEAP-2* 蛋白最有可能分泌到细胞外。所以褐鳟 *LEAP-2* 不存在跨膜区，新合成的多肽通过信号肽分泌到细胞外发挥生理功能。经 NetPhos-3.1 Server 分析后显示褐鳟 *LEAP-2* 具有 7 个磷酸化位点，磷酸化对于蛋白的构象和稳定性具有调节作用^[71,72]，而褐鳟 *LEAP-2* 的理化性质分析结果显示其属于不稳定的亲水蛋白，其可能通过磷酸化来改变自身的构象，从而更好地发挥功能。经 SOPMA 工具分析，褐鳟 *LEAP-2* 的二级结构主要以 α 螺旋和无规则蜷曲为主，符合 *LEAP-2* 类抗菌肽的结构特点，而螺旋结构是抗菌肽发挥抗菌活性的重要结构基础^[73]，所以推测这些 α 螺旋是其发挥抗菌作用的结构基础。利用 Swiss-model 软件对褐鳟 *LEAP-2* 蛋白的三级结构进行预测，结果显示褐鳟 *LEAP-2* 结构与人类 *LEAP-2* 相似，因此推测褐鳟 *LEAP-2* 蛋白功能与人类 *LEAP-2* 类似，进一步表明其属于 *LEAP-2* 类抗菌肽。

利用 DNAMAN 9.0 软件将褐鳟 *LEAP-2* 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列进行比对，发现褐鳟与其他硬骨鱼类的同源性较高，其中与大西洋鲑之间同源性最高，达 99%，与模式鱼种斑马鱼的同源性为 55.2%，而与鸟类和哺乳类之间显示了较低的同源性，说明褐鳟 *LEAP-2* 在进化过程中相对保守。系统进化分析显示褐鳟与其他硬骨鱼类聚为一支，与鸟类和哺乳类进化关系则较远，说明鱼类与哺乳类和鸟类的亲缘关系较远。褐鳟与大西洋鲑最先形成一个分支，说明它们之间的亲缘关系比其他动物之间更近一些。

褐鳟 *LEAP-2* 与其他已报道的基因类似，也同样由信号肽、前体肽和成熟肽三部分组成。自 N 端起前 27 个氨基酸为信号肽部分，28-96 个氨基酸为原前体肽部分。第 27 个氨基酸残基与第 28 个氨基酸残基之间存在一个信号肽的酶切位点，使分泌性信号肽与原前体肽部分分开；原前体肽由前体肽和成熟肽组成，在前体肽和成熟肽之间存在可被前体肽转化酶所识别的切割位点（RMAR-MT）。褐鳟 *LEAP-2* 蛋白以前体形式合成，信号肽序列被切除后，蛋白酶切割 RMAR-MT 之间的肽键，从而形成成熟肽。褐鳟 *LEAP-2* 成熟肽含有 41 氨基酸残基，并带有 3 个净正电荷，属于阳离子抗菌肽。褐鳟 *LEAP-2* 与其他物种之间差异主要表现在前体区，而成熟肽部分较为保守，存在多个保守性位点或区域，其中包括高度保守的 4 个半胱氨酸残基，在其之间会形成两对二硫键，符合 *LEAP-2* 类抗菌肽的结构特征，并且这两对二硫键可能与 *LEAP-2* 的抗菌活性有关^[74]。综上所述，褐鳟 *LEAP-2* 属于分泌型阳离子抗菌肽，由信号肽、前体肽和成熟肽组成，存在 4 个糖基化位点和 7 个磷酸化位点，二级结构主要以 α 螺旋和无规则蜷曲为主，在成熟肽上存在 4

个高度保守的半胱氨酸，可形成两对二硫键，其氨基酸序列在进化上比较保守。

4.3 褐鳟 *LEAP-2* 基因的表达

LEAP-2 基因在脊椎动物各组织中广泛表达，并且主要在肝脏组织中表达。人类 *LEAP-2* 在肝、肠、心、气管和肾上腺等组织中表达^[58]。猪 *LEAP-2* 主要在肝脏表达，另外在肾和肠中也有一定表达^[75]。鸡 *LEAP-2* 在多个组织中表达，包括肝、肺和肾^[76]。鱼类 *LEAP-2* 的组织表达模式与哺乳动物相比更为复杂，其中多数是在肝脏中表达量最高，但也有部分存在在其他组织中大量表达的情况。例如在斑点叉尾鲷中，*LEAP-2* 在肝脏中的表达量相比于其他组织要低很多^[63]；团头鲂 *LEAP-2* 在中肠中表达量最高，之后是脑垂体、肝脏和后肠^[64]；鲤 *LEAP-2* 主要在脾脏中表达^[77]。这些研究结果表明 *LEAP-2* 基因在不同动物中具有不同的组织表达特性。本研究通过荧光定量 PCR 分析表明，*LEAP-2* 在褐鳟各组织中均有不同程度的表达，其中肝脏的表达量最高，其次是脾和肠，在肾、心脏、肌肉和鳃中的表达量较低，而在脑和皮肤中几乎不表达，表明 *LEAP-2* 基因在褐鳟中的表达模式与多数动物相同。

4.4 褐鳟抗菌肽基因 *LEAP-2* 成熟肽在大肠杆菌中的表达与纯化

随着抗生素的大量使用，使得越来越多的病原微生物对抗生素产生了抗药性，导致病害无法被有效的控制，并且抗生素残留也对水生环境造成了破坏。这种情况下使得寻找新型抗菌药物变得极为迫切，而对于先天性免疫系统的研究，则为病害防治提供了新的思路。水生动物生活的水生环境中存在着各种病菌，面对病菌的入侵，先天性免疫成为水生动物抵抗细菌性疾病的第一道防线。抗菌肽作为先天性免疫系统的重要组分，其具有抗菌谱广、无耐药性、无污染等优点，能有有效的代替抗生素，从而备受人们的关注。

由于天然抗菌肽合成量很低，以直接从生物体中提取纯化的方式，无法达到大量获取的目的。利用化学合成方法虽然可以生产抗菌肽，但其成本过高，无法进行大规模生产。而基因工程技术的应用很好地解决了上述问题，其为抗菌肽合成提供了一种经济有效且能够大规模生产的方式。基因工程技术中主要的外源表达系统包括大肠杆菌表达系统、酵母表达系统和杆状病毒表达系统等^[78]。其中，大肠杆菌表达系统因其具有操作简便，繁殖迅速，生产成本低，遗传背景清楚，能大量制造目的蛋白等优点，从而被广泛使用。但是抗菌肽由于自身分子量较小，

导致其极易被蛋白酶降解，并且抗菌肽对宿主菌本身具有毒性^[79]，同时表达后的蛋白纯化及复性过程复杂不易操作，这些因素导致目的蛋白的产量不甚理想。因此，构建合适的融合表达载体成为研究的热点之一。

目前对于 *LEAP-2* 基因的体外表达已有报道，张虹等在对斑点叉尾鲷 *LEAP-2* 基因全长 cDNA 进行改造后，将其插入 pET32a 载体上构建原核表达载体，之后经 BL21 菌表达和亲和层析获得高纯度的目的蛋白，再通过 Western blot 检测进一步证明斑点叉尾鲷 *LEAP-2* 在大肠杆菌 BL21 中的表达^[67]。蔡灿等将大黄鱼 *LEAP-2* 基因全长 cDNA 插入 pET32a 载体上构建原核表达载体，并成功在体外表达了大黄鱼 *LEAP-2* 重组蛋白^[80]。

本实验根据已克隆的褐鳟 *LEAP-2* 基因序列设计成熟肽区域序列扩增引物，并分别在上下游引物中加入限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 的酶切位点，PCR 扩增产物连入 pMD-18T 质粒，经测序验证为所需序列。测序正确的 pMD-18T 质粒与 pET32a 质粒经双酶切后进行连接，转入大肠杆菌 DH5 α 后提取质粒，质粒经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后显示有一条大小为 214 bp 的条带，说明目的片段已插入质粒，并且测序结果也显示质粒中含有褐鳟 *LEAP-2* 成熟肽 cDNA 序列。将构建成功的 pET32a-m*LEAP-2* 重组质粒转入宿主菌 BL21 (DE3) 中培养，用于后续的诱导表达。

在实验过程中，选择正确的载体和宿主菌十分重要。pET32a 载体全长 5900 bp，带有 Trx Tag 和 His Tag 标签，Trx Tag 可以促进蛋白正确折叠^[81]，提高其溶解性，减少包涵体蛋白的形成，提高表达产物的生物活性；His Tag 可以用于表达后蛋白的纯化，使纯化过程更加简便。另外，pET32a 载体还具有氨苄抗性，便于对阳性克隆的筛选。通过融合蛋白 pET32a-m*LEAP-2* 表达系统来表达蛋白，可以降低 *LEAP-2* 对宿主菌的毒性，并且使其对宿主菌内部的蛋白酶敏感性降低，从而避免被蛋白酶降解。抗菌肽 *LEAP-2* 成熟肽部分的大小仅为 4.63 kDa，不易被 SDS-PAGE 电泳检测，但通过与 pET32a 载体的结合，使表达蛋白分子量变大，更有利于检测。目的基因在 pET32a 载体上的转录和翻译受 T7 噬菌体信号的控制^[82]，在加入 IPTG 之后，大量 T7 RNA 聚合酶产生并与载体上的 T7 启动子结合，使目的重组蛋白得到高效的表达；而在没加入诱导剂之前，目的基因不发生表达，使宿主菌得到良好的生长。大肠杆菌 BL21 (DE3) 能够产生 T7RNA 聚合酶，是 pET32a 载体的常用受体菌株，因其缺少 lon 和 omp T 蛋白酶^[83]，从而能够减少对外源蛋白的降解，使得外源蛋白能够稳定的表达，提高外源蛋白的表达量。外源基因在大肠杆菌中的表达除了受到基因自身的影响外，还与诱导条件有关。通过对诱导条件的优化，

不仅可以提高表达量，还可以降低表达成本，提高表达效率。本实验对诱导时间和 IPTG 的浓度进行了优化，结果显示在 37 °C，0.25 mM IPTG 条件下诱导培养 4 h 后重组蛋白的表达量最高。另外，通过对重组蛋白的表达形式进行分析，发现 *LEAP-2* 重组蛋白主要以可溶性蛋白形式存在于上清液中，少量以包涵体形式存在于沉淀中。因此，在后续的重组蛋白的纯化实验中，选择对上清进行纯化，通过金属螯和层析技术，得到纯化的重组蛋白。

实验结果验证了通过原核表达获取抗菌肽 *LEAP-2* 蛋白的可操作性，为后续褐鳞鳟 *LEAP-2* 蛋白的功能研究奠定基础，为实现褐鳞鳟抗菌药物的开发及应用做了基础实验。

结 论

本研究以褐鳟为研究对象, 获得了抗菌肽基因 *LEAP-2* 的 ORF 序列, 对其进行了生物信息学分析, 研究了其成熟肽的原核表达。得到了下述结论:

1. 褐鳟 *LEAP-2* 基因 ORF 序列全长 291 bp, 编码 96 个氨基酸, 由信号肽、前体肽和成熟肽组成, 成熟肽上存在 4 个高度保守的半胱氨酸, 可形成两对二硫键。与其他物种氨基酸序列进行同源对比和系统进化分析, 发现褐鳟 *LEAP-2* 与其他硬骨鱼类具有较高同源性, 其中与大西洋鲑亲缘关系最近, 与鸟类和哺乳类同源性较低。

2. 采用荧光定量 PCR 检测 *LEAP-2* 基因在成年健康褐鳟不同组织中的表达情况, 结果表明, 其在肝脏中的表达量最高, 在其他组织中也有不同程度的表达, 与多数动物的表达模式相同。

3. 成功构建了 pET32a-m*LEAP-2* 原核表达载体, 并成功表达了 pET32a-m*LEAP-2* 重组蛋白, 其分子量为 22.61 KDa。在诱导温度固定为 37°C 的情况下, 对 IPTG 诱导浓度和诱导时间进行摸索, 发现在终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG 下, 诱导 4 h 后, 重组蛋白的表达量最高。

参考文献

- 1 李福贵, 邹曙明. 亚东鲑线粒体 CO I 与 CO II 基因遗传多样性分析. 安徽农业科学, 2014, 42(23): 7710~7713
- 2 张春霖, 王文滨. 西藏鱼类初篇. 动物学报, 1962, 14(4): 529~536
- 3 王芳. 亚东鲑若干养殖生物学特性研究. 上海海洋大学硕士论文, 2015
- 4 胡江伟, 阿地力. 我国棕鲟资源研究现状. 黑龙江水产. 2018, (5): 3~5
- 5 H. R. Maccrimmon, T. L. Marshall, B. L. Gots. *World distribution of brown trout*. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1970, 27(4): 811~818
- 6 彭仕盛. 西藏鱼类及其资源. 中国农业出版社, 1995: 32~33
- 7 王万良, 牟振波, 曾本和, 等. 亚东鲑的研究现状及展望. 西藏农业科技, 2019, 41(S1): 197~200
- 8 王万良, 周建设, 王建银, 等. 4 种水产药物对褐鲟(*Salmo trutta*)鱼苗的急性毒性试验. 西北农业学报, 2016, 25(7): 966~972
- 9 王玉堂. 鱼类抗菌肽的研究进展. 中国水产, 2016, (9): 82~85
- 10 C. J. P. Da, M. Cova, R. Ferreira, et al. *Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines?*. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(5): 2023~2040
- 11 S. Wang, X. Zeng, Q. Yang, et al. *Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry*. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 603
- 12 周婧然. 杂合抗菌肽 BM16-R 的泛素化融合表达及其活性研究. 吉林农业大学硕士论文, 2018
- 13 H. G. Boman, I. Nilsson, B. Rasmuson. *Inducible Antibacterial Defence System in Drosophila*. Nature, 1972, 237(5352): 232~235
- 14 G. Wang, X. Li, Z. Wang. *APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education*. Nucleic acids research, 2016, 44(Database issue): D1087~D1093
- 15 J. A. Hoffmann, J. M. Reichhart, C. Hetru. *Innate immunity in higher insects*. Current opinion in immunology, 1996, 8(1): 8~13
- 16 H. G. Boman. *Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review*. Scandinavian journal of immunology, 1998, 48(1): 15~25
- 17 K. V. R. Reddy, R. D. Yedery, C. Aranha. *Antimicrobial peptides: premises and promises*.

- International journal of antimicrobial agents, 2004, 24(6): 536~547
- 18 王义鹏, 赖仞. 昆虫抗菌肽结构、性质和基因调控. 动物学研究, 2010, 31(1): 27~34
- 19 Z. Qu, H. Steiner, A. Engström, et al. *Insect immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, Antheraea pernyi*. European journal of biochemistry, 1982, 127(1): 219~224
- 20 M. Lamberty, D. Zachary, R. Lanot, et al. *Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect*. The Journal of biological chemistry, 2001, 276(6): 4085~4092
- 21 C. Subbalakshmi, R. Nagaraj, N. Sitaram. *Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity*. FEBS letters, 1999, 448(1): 62~66
- 22 单红, 周国勤, 朱银安, 等. 鱼类抗菌肽的研究进展. 水产养殖, 2012, 33(1): 20~25
- 23 R. C. Richards, D. B. O'Neil, P. Thibault, et al. *Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (Salmo salar)*. Biochemical and biophysical research communications, 2001, 284(3): 549~555
- 24 W. J. Lin, Y. L. Chien, C. Y. Pan, et al.. *Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (Epinephelus coioides) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells*. Peptides, 2009, 30(2): 283
- 25 胡丰晓, 吴苗苗, 张伟妮. 水生动物抗菌肽的研究进展. 水产科学, 2019, 38(6): 874~880
- 26 吴玲梅, 顾杰, 温智清, 等. 太平洋鲷抗菌肽 Hecpidin 基因克隆及体外表达研究. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 83~88
- 27 苏华锋, 雷战, 郭中坤, 等. 哺乳动物抗菌肽的研究进展. 山东畜牧兽医, 2016, 37(2): 56~58
- 28 T. Ganz. *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nature reviews. Immunology, 2003, 3(9): 710~720
- 29 B. Strukelj, J. Pungercar, G. Kopitar, et al. *Molecular cloning and identification of a novel porcine cathelin-like antibacterial peptide precursor*. Biological chemistry Hoppe-Seyler, 1995, 376(8): 507~510
- 30 G. Diamond, M. Zasloff, H. Eck, et al. *Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(9): 3952~3956
- 31 陈雯, 叶书培, 李秋燕, 等. 两栖类动物抗菌肽对病原微生物作用研究进展. 广东农业科

- 学, 2012, 39(16): 175~178
- 32 M. Zasloff. *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(15): 5449~5453
- 33 J. M. Conlon, J. Kolodziejek, N. Nowotny. *Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents*. Biochimica et biophysica acta, 2004, 1696(1): 1~14
- 34 K. A. Brogden. *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?*. Nature reviews. Microbiology, 2005, 3(3): 238~250
- 35 李云香, 姚倩, 任玫, 等. 抗菌肽作用机制研究进展. 动物医学进展, 2019, 40(9): 98~103
- 36 C. W. Brockus, M. W. Jackwood, B. G. Harmon. *Characterization of beta-defensin prepropeptide mRNA from chicken and turkey bone marrow*. Animal genetics, 1998, 29(4): 283~289
- 37 C. E. Salas, J. A. Badillo-Corona, G. Ramírez-Sotelo, et al. *Biologically active and antimicrobial peptides from plants*. BioMed research international, 2015: 102129
- 38 王亚平, 余维维, 秦梦茹, 等. 抗菌肽的作用机理及应用. 湖北农业科学, 2018, 57(5): 9~13
- 39 C. D. Sumi, B. W. Yang, I. C. Yeo, et al. *Antimicrobial peptides of the genus Bacillus: a new era for antibiotics*. Canadian journal of microbiology, 2015, 61(2): 93~103
- 40 G. R. Li, L. Y. He, X. Y. Liu, et al. *Rational design of peptides with anti-HCV/HIV activities and enhanced specificity*. Chemical biology & drug design, 2011, 78(5): 835~843
- 41 P. Bulet, L. Urge, S. Ohresser, et al. *Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of Drosophila*. European journal of biochemistry, 1996, 238(1): 64~69
- 42 刘倚帆, 徐良, 朱海燕, 等. 抗菌肽与抗生素对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的体外协同抗菌效果研究. 动物营养学报, 2010, 22(5): 1457~1463
- 43 周义文. 生物抗菌肽研究进展及应用前景. 国外医学. 临床生物化学与检验学分册, 2004, (2): 131~133
- 44 A. J. DeLucca, J. M. Bland, T. J. Jacks, et al. *Fungicidal activity of cecropin A*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997, 41(2): 481~483
- 45 G. F. Cespedes, E. N. Lorenzón, E. F. Vicente, et al. *Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from Hypsiboas albopunctatus*. Protein and peptide letters, 2012, 19(6): 596~603

- 46 D. Andreu, L. Rivas. *Animal antimicrobial peptides: an overview*. Biopolymers, 1998, 47(6): 415~433
- 47 M. Wachinger, A. Kleinschmidt, D. Winder, et al. *Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit the replication of HIV-1 by suppressing viral gene expression*. Journal of General Virology, 1998, 79(Pt 4): 731~740
- 48 H. Tamamura, T. Ishihara, A. Otaka, et al. *Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance*. Biochimica et biophysica acta, 1996, 1298(1): 37~44
- 49 J. R. Leite, L. P. Silva, M. I. Rodrigues, et al. *Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus*. Peptides (New York), 2005, 26(4): 565~573
- 50 L. Efron, A. Dagan, L. Gaidukov, et al. *Direct Interaction of Dermaseptin S4 Aminoheptanoyl Derivative with Intraerythrocytic Malaria Parasite Leading to Increased Specific Antiparasitic Activity in Culture*. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(27): 24067~24072
- 51 H. G. Boman, D. Wade, I. A. Boman, et al. *Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids*. Febs Letters, 1989, 259(1): 103~106
- 52 R. A. Cruciani, J. L. Barker, M. Zasloff, et al. *Antibiotic Magainins Exert Cytolytic Activity Against Transformed Cell Lines Through Channel Formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(9): 3792~3796
- 53 J. Lu, Z. W. Chen. *Isolation, characterization and anti-cancer activity of SK84, a novel glycine-rich antimicrobial peptide from Drosophila virilis*. Peptides, 2010, 31(1): 44~50
- 54 G. Wang. *Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides*. Methods in molecular biology (Clifton, N. J.), 2015, (1268): 43~66
- 55 刘世财, 范琳琳, 郑珩, 等. 抗菌肽作用机制及应用研究进展. 中国生化药物杂志, 2016, 36(4): 20~23
- 56 汪吴晶, 高金燕, 佟平, 等. 抗菌肽的作用机制、应用及改良策略. 动物营养学报, 2017, 29(11): 3885~3892.
- 57 张晓巩, 方超, 白卉, 等. 抗菌肽作用机制的研究进展. 生理科学进展, 2011, 42(1): 11~15
- 58 A. Krause, R. Sillard, B. Kleemeier, et al. *Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver*. Protein science: a publication of the Protein Society, 2003, 12(1): 143~152
- 59 A. Howard, C. Townes, P. Milona, et al. *Expression and functional analyses of liver expressed*

- antimicrobial peptide-2 (LEAP-2) variant forms in human tissues*. Cellular immunology, 2010, 261(2): 128~133
- 60 A. Hocquellet, B. Odaert, C. Cabanne, et al. *Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2*. peptides, 2010, 31(1): 58~66
- 61 Y. A. Zhang, J. Zou, C. I. Chang, 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
- 62 R. L. Strausberg, E. A. Feingold, L. H. Grouse, et al. *Generation and initial analysis of more than 15, 000 full-length human and mouse cDNA sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(26): 16899~16903
- 63 B. Bao, E. Peatman, P. Xu, 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
- 64 T. Liang, W. Ji, G. R. Zhang, 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 & shellfish immunology, 2013, 35(2): 553~563
- 65 陈晓武, 施志仪, 李倩, 等. 牙鲮肝脏抗菌肽-2 基因序列和表达分析. 华北农学报, 2012, 27(S1): 12~17
- 66 F. Liu, J. L. Li, G. H. Yue, 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(2-4): 133~143
- 67 张虹, 陶妍. 斑点叉尾鮰(Ictalurus punctatus)肝脏表达的抗菌肽-2(LEAP-2)在 E.coli 中的融合表达. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(1): 70~76
- 68 K. J. Livak, T. D. Schmittgen. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods (San Diego, Calif.), 2001, 25(4): 402~408
- 69 黄艳青, 刘港彪, 王利. 鲷爱德华菌外膜蛋白 OmpLC 基因的生物信息学分析. 生物信息学, 2016, 14(2): 61~70
- 70 熊胜. 鹅 Lb-FABP 基因克隆及填饲对鹅 Lb-FABP、Apo-B 和 Apo-A1 基因表达的影响. 南京农业大学, 2013
- 71 章晓联. 蛋白糖基化与免疫. 中国免疫学杂志, 2004, (4): 290~293
- 72 刘东花, 卫阳飞. 牦牛 HSPB6 基因的生物信息学和表达分析. 华北农学报, 2016, 31(1):

35~39

- 73 董天堂, 田子罡, 王建华. α -螺旋型抗菌肽结构参数与功能活性的关系. 中国生物工程杂志, 2007, (9): 116~119
- 74 A. G. Rao. *Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachypleisin lacking disulfide bonds*. Archives of biochemistry and biophysics, 1999, 361(1): 127~134
- 75 Y. Sang, B. Ramanathan, J. E. Minton, et al. *Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hepcidin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection*. Developmental and comparative immunology, 2006, 30(4): 357~366
- 76 C. L. Townes, G. Michailidis, C. J. Nile, 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
- 77 G. W. Yang, H. Y. Guo, H. Li, 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
- 78 魏蕾, 刘运超, 白怡霖, 等. 信号肽对猪痘病毒 E2 蛋白在杆状病毒表达系统中分泌表达的影响. 畜牧兽医学报, 2020, 51(1): 120~127
- 79 周雍, 吴程程, 斯洪强, 等. 家蚕抗菌肽 moricin 基因的串联表达与切割产物的活性检测. 蚕业科学, 2015, 41(5): 864~869
- 80 蔡灿, 薛良义, 孙爱飞. 大黄鱼肝表达抗菌肽 2 基因的克隆和原核表达. 生物学杂志, 2012, 29(4): 55~59
- 81 万爱妮, 徐栋生, 蔡燕飞, 等. 硫氧还蛋白促进人胰岛素样生长因子-1 在大肠杆菌中高效可溶表达. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 50~57
- 82 苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16~23
- 83 雷荣悦, 乔玉欢, 闫继东, 等. 重组人 BMP6 在大肠杆菌中可溶表达、纯化及活性分析. 生物工程学报, 2008, (3): 452~459

攻读学位期间发表的学术论文

- 1 刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 褐鳕 *LEAP-2* 成熟肽在大肠杆菌中的融合表达. 东北农业大学学报, 2020, 51(4): 70~77

哈尔滨师范大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。因本学位论文引起的法律后果完全由本人承担。

论文题目：*金黄色葡萄球菌 LEAP-2 基因 ORF 的克隆和原核表达* 学位论文作者签名：*刘晔斌*
签字日期：2020 年 5 月 31 日

哈尔滨师范大学学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解哈尔滨师范大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权哈尔滨师范大学可以将学位论文的全部或部分内容编入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和《中国知识资源总库》进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，可以公开学位论文的全部或部分内 容。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：*刘晔斌*
签字日期：2020 年 5 月 31 日

导师签名：*刘晔斌*
签字日期：2020 年 5 月 31 日

致 谢

随着时间的流逝，我的硕士学习生活即将结束，回顾过去，心里感慨万千。在这段时间里我经历了很多，其中不乏艰难和逆境，而当我跨过这一切的时候，他们都将成为我人生中宝贵的财富。科研的道路上从来不缺少困难，但也有许多愿意帮助你的人，他们除了在科研上为我解疑答惑，在生活上也对我关怀备至，使我能够顺利的完成我的硕士学业，我要感谢他们。

首先，我要感谢我的导师王炳谦研究员。他的悉心指导，让我在言传身教下对科研有了进一步认识。他的信任和鼓励，让我重拾对科研的热情和信心。王老师严谨的科研精神，认真务实的工作态度，诚实宽厚的处事方式，都给我留下了难以磨灭的印象。在论文的选题、撰写和修改的过程中，老师每一步都认真负责，真诚地为本文提出批评和指正，为这篇论文的顺利完成提供了许多宝贵意见。可以说这篇论文倾注了恩师大量的心血和汗水，在这里对我的导师致以诚挚的谢意和祝福。

感谢黑龙江水产研究所的所有老师，感谢徐革锋老师、黄天晴老师、谷伟老师、张玉勇老师给予我科研上的指导和帮助，使我的硕士学习生涯得以顺利完成，在此，我表示真挚的谢意。

感谢实验室的刘洋师姐、程琳师妹和史秀兰师妹，感谢你们对我完成学业给予的帮助和关怀，因为你们的陪伴，使我的硕士生活充满欢笑与温暖，让我能够挺过科研道路上的一道道难关，这份感情我会一直珍藏于心。

最后，我还要感谢我的家人和朋友，每当我步履维艰的时候，是他们的鼓励和支持，使我能够有动力坚持下去，在此，祝愿他们平安健康。