牙鲆肝脏抗菌肽-2 基因序列和表达分析

陈晓武,施志仪,李 倩,江 山

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室,上海 201306)

摘要: 抗菌肽是鱼类先天免疫的组成部分,发现新的抗菌肽对于动物抗病机理的研究和寻找新药物有重要意义。经过对 GenBank 数据库中牙鲆 EST 文库进行同源比对后,筛选得到一个具有完整编码框的抗菌肽 cDNA 序列,结果再经过 RT-PCR 进行验证,命名为 *LEAP-2*,对该序列进行注释,获得序列登录号 EU586111。该抗菌肽能编码 102 个氨基酸的多肽,前 28 个氨基酸组成信号肽。推测编码蛋白质分子量为 11 276.9 u,理论等电点(PI)为 9.33。其蛋白质序列与另外 9 种鱼类的同源抗菌肽序列比较发现,同源性介于 38.2% ~61.7%。其中 57 至 92 位氨基酸为高度保守区,是维持其空间结构的主要区域,其中包含有 4 个保守的半胱氨酸,可能组成 2 个二硫键。荧光定量 PCR 分析显示,*LEAP-2* 基因在肝脏中高表达,在牙鲆仔鱼不同发育时期中也有表达,但是表达水平存在明显差异,特别是在变态中期表达量比较高。

关键词: 牙鲆; 肝抗菌肽 2; 序列分析; 同源建模

中图分类号: Q785; S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2012)增刊-0012-06

Sequence and Expression Analysis of *LEAP-2* Gene from *Paralichthys olivaceus*

CHEN Xiao-wu, SHI Zhi-yi, LI Qian, JIANG Shan

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: Antimicrobial peptides are found in several kinds of tissues of many vertebrates and invertebrates. These peptides are predicted to operate as a first-line host defense mechanism exerting broad-spectrum activity against pathogenic bacteria, fungi, parasites, and enveloped viruses. Followed basic local alignment search to the flounder EST library of GenBank database by using *LEAP-2* from Oncorhynchus as probe sequence, an cDNA sequence owned a complete open reading frame of antimicrobial peptides was achieved. The sequence was verified by RT-PCR and named *LEAP-2*, accession number of EU586111 was acquired after sequence annotation and submitting to the GenBank database. Flounder *LEAP-2* gene encode a peptide of 102 amino acids with a 28 amino acids signal peptide and a mature peptide of 74 amino acids, with a predicted mulecular weight of 11 276.9 u and pI at 9.33. The amino acid and nucleotide sequences were conserved between flounder and other organisms and the homology ranged 38.2% -61.7%, the 57-92 amino acids are highly conserved region is to maintain the spatial structure, including four conserved cysteine, may be composed of two disulfide bonds. The flounder *LEAP-2* gene is expressed in a wide range of tissues and predominantly expressed in the liver. Its expression is developmentally regulated with no detection in early stages of metamorphosis but highly in the mid-metamorphosis.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; Liver-expressed antimicrobial peptide 2; Sequence analysis; Homology modelling

抗菌肽是具有抗菌功能基因编码的一类内源性的具有强抗菌作用的阳离子短肽,一般其分子量小于 5 ku,氨基酸数目小于 100 个,是生物先天免疫的重要组成成分。目前发现抗菌肽或类似抗菌肽的小分子肽类广泛存在于昆虫、两栖类、水产动物、哺乳动物以及包括植物在内的所有生命中,这种内源性抗菌肽经诱导而合成,在机体抵抗病原的入侵方面起着重要的作用,更被认为是缺乏特异性免疫功能

收稿日期: 2011-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172392);上海市教委科研创新项目(12YZ126);上海市自然科学基金(12ZR1412900)

作者简介: 陈晓武(1976-),男,安徽六安人,副教授,博士,主要从事鱼类组织学研究。

通讯作者: 施志仪(1954-),男,上海人,教授,博士生导师,主要从事细胞分子生物学及水生生物分子遗传学方面的研究。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生物的重要防御成分[1]。抗菌肽具有广谱抗菌能力，有的对真菌、病毒及癌细胞也有一定的抑杀作用。有的抗菌肽具有热稳定性，在 100℃ 下加热 10～15min，仍能保持其良好的抗菌活性[2]。此外，还具有水溶性好、抗菌机理独特、对高等动物正常细胞无害等特点。多数抗菌肽的等电点在 8.9～10.7 之间，表现出较强的阳离子特性，对较大的离子强度和 pH 值均具有较强的耐受性。在虾和鱼类中也已经有较多抗菌肽的研究报道[3-4]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国重要的海水养殖鱼类之一，属近海温水性底栖鱼类。近年来，牙鲆的海水养殖和淡水驯化均发展迅速。随着牙鲆养殖业的发展，牙鲆的疾病时有发生。在对病害防治途径的探索中，抗菌肽以其不易产生耐药性、具有广谱抗菌活性的特点受到越来越多的关注，在水产养殖动物病害防治中展现出重要的应用潜力[5-6]。本试验研究了 *LEAP-2* 基因在牙鲆的不同发育时期和成鱼不同组织中的表达，为了解牙鲆免疫功能和免疫机制积累了资料，同时为进一步研究牙鲆的非特异性免疫奠定了基础。

1　材料和方法

1.1　试验动物和试剂

1.1.1　试验动物　牙鲆受精卵取自北戴河中心实验站，空运到上海海洋大学室内自动水循环系统人工喂养，室温 19℃，海水盐度 3%，每天换水 1/3 并且定时清除污物。仔鱼变态发育期按照 Minami 的划分方法[7]，在变态前后共 6 个时期取材。

1.1.2　试剂　Trizol 试剂购自 Promega 公司。克隆载体 pUCm-T、T4 连接酶、X-gal、IPTG 购自上海生工生物工程有限公司。核酸电泳 Marker、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自北京天根生物公司。荧光定量 PCR 试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品。大肠杆菌 DH5α 感受态细胞由本实验室保存。其它生化试剂均为国产分析纯。

1.2　试验方法

总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成　将牙鲆仔鱼处死取出后迅速放入液氮预冷的研钵，加液氮迅速研磨成均匀粉末，再移至 1.5 mL 离心管中；加入 1 mL Trizol，充分混匀后，放置 5 min；加入 0.2 mL 氯仿，剧烈涡旋 15 s 后室温放置 12 min；4℃，12 000 r/min 离心 15 min，小心取出上清；加入 0.5 mL 异丙醇，混匀后 20℃ 放置 30 min 以沉淀总 RNA；4℃，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清；加 1 mL 75% 乙醇清洗；4℃，12 000 r/min 离心 5 min，弃上清后将沉淀置于室温干燥 10 min；根据 RNA 量加入 20～50 μL 水溶解，即得到总 RNA 提取液。采用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性；使用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。取适量总 RNA 进行反转录反应，cDNA 合成采用 AMV 酶进行反转录。合成后的 cDNA 冻存于 -20℃ 下备用。

下载 GenBank 数据库中牙鲆的 EST 序列，组成本地化的核苷酸序列库，同时下载 NCBI 的 BLASTn 检索程序。利用虹鳟鱼的 *LEAP-2* 基因序列对牙鲆的 EST 库进行本地化 BLAST 检索，获取一条同源 EST 序列(NCBI 编号 CX286418.1)，根据该序列设计引物：S1(5′-GAGGAAAAGATGCAGCAGAG-3′)和 A1(5′-CAAGCGATACTTCTCATTTT-3′)。以牙鲆肝组织 cDNA 第一链为模板，进行 PCR 扩增。PCR 体系总体积为 25 μL，其反应程序为：94℃，5 min；(94℃，45 s；58℃，1 min；72℃，45 s)×32 cycles；72℃ 延伸 12 min。取 20 μL PCR 反应液，用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测，对目的条带进行胶回收。将纯化后的 PCR 产物与 pUCm-T 载体用 T4 DNA 连接酶进行连接，16℃ 过夜，次日将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，37℃、180 r/min 摇床内培养 18 h，取 160 mL 菌液，均匀涂布于含有 50 μg/mL 的氨卞青霉素的 LB 平板上，37℃ 过夜培养。挑取阳性克隆菌落并且经过菌落 PCR 验证，PCR 产物送上海生工生物有限公司测序。测序结果经过分析后使用 NCBI 的 BankIt 程序提交 GenBank 数据库。

LEAP-2 基因的序列分析　使用 NCBI 网站的 ORFfinder 搜索开放阅读框，推算编码的蛋白序列(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)。使用 MEGA 软件对 LEAP-2 蛋白序列与其同源序列进行系统分析[8]。Proteinpredict 在线计算蛋白的分子量和等电点等化学特性(http://www.predictprotein.org/)。SignalP 3.0 预测信号肽的长度和位置(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)。使用 CPHmodels 远程服务器，以人 LEAP-2 蛋白结构(PDB 编号：2L1Q)为模板构建牙鲆 LEAP-2 蛋白质三维结构[9]，Pymol 软件对其结构进行可视化处理[10]。

LEAP-2 基因表达分析方法如下，反转录和定量 PCR 的条件和体系参考 TAKARA 公司 SYBR Ex-Script RT2PCR Kit 说明书，PCR 体系改为 20 μL，其他组分的量相应降低。定量 PCR 在 BIO-RED iCycler 荧光定量 PCR 仪上进行，对样品和标准品进行 PCR 扩增、检测和相对定量分析。标准品 DNA 设置 2 个重复，待测样品 3 个重复。标准曲线和基因表达水平由系统分析，基线由软件自动设置。在

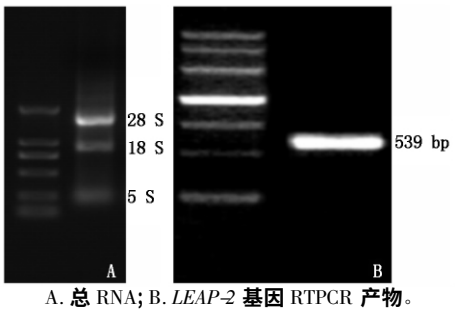
© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

LEAP-2 的 3′端非编码区设计定量 PCR 引物: *LEAP-2F* (5′-GAACTTACCCAGGCTCTTTA-3′) ; LEAP-2R (5′-CAATAGCGTGCTTTTCTTAC-3′) 。内标 β-actin 引物序列为: *β-actin*-F (5′-GGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3′) ; *β-actin*-R (5′-CCTCTGGACAACGGAACCTCT-3′) 。

2 结果与分析

2.1 牙鲆 *LEAP-2* 基因 cDNA 全长克隆与序列分析

所有提取的 RNA 样品都经过紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280},比值都在 1.8 ~2.0 之间,表明所提取的总 RNA 纯度较高。电泳检测总 RNA 的 28S、18S 和 5S 条带清晰,RNA 没有降解(图 1-A) 。利用特异性上下游引物 S1 和 A1 对牙鲆总 RNA 进行 RT-PCR 扩增,获得 539 bp 的扩增条带(图 1-B) 。PCR 产物克隆后的测序结果表明其与原 EST 模板一致。对其开放读码框预测可推测编码 102 个氨基酸的多肽,蛋白质分子量约 11 276.9 u,理论等电点(pI) 为 9.33,前 29 个氨基酸为信号肽序列(图 2) 。



A. 总 RNA; B. *LEAP-2* 基因 RTPCR 产物。
A. total RNA; B. *LEAP-2* PCR products using cDNA transcripted reversely from total RNA.

图 1 牙鲆肝脏总 RNA 和 *LEAP-2* 基因克隆

Fig. 1 The electrophoretogram shows total RNA of liver and coding sequence cloning of *LEAP-2* from *P. olivaceus*

```
     GAGGAAAAG
   1 ATGCAGCAGAGAAGAAGTTTCGTCCAAAGCAGAGCAGCGGTGGCTCTGTGCATTGTGCTG
   1 M  Q  Q  R  R  S  F  V  Q  S  R  A  A  V  A  L  C  I  V  L
  61 TTGATGCTGGCTCAGCAGGTGTGTGCGGGTCCGCTGGCCTCTCGGCCGGAGTCCGACTCC
  21 L  M  L  A  Q  Q  V  C  A  G  P  L  A  S  R  P  E  S  D  S
 121 GACCAGAGTTCAGACTCAAGCGTCCACACGCTGAGGAGGGTCGCTCGGATGACCCCGCTG
  41 D  Q  S  S  D  S  S  V  H  T  L  R  R  V  A  R  M  T  P  L
 181 TGGAGAATCATGAGCAGTAAACCATTCGGAGCGTACTGCCAAAACAACTACGAGTGCTCC
  61 W  R  I  M  S  S  K  P  F  G  A  Y  C  Q  N  N  Y  E  C  S
 241 ACAGGACTCTGCAGGGCGGGTCACTGCTCCACCAGCCATCGTTCCCCCGCCGAGCCTGTG
  81 T  G  L  C  R  A  G  H  C  S  T  S  H  R  S  P  A  E  P  V
 301 AAGTACTGA
 101 K  Y  *
ACGTCCTCGGGACACGTTGACCTGAGAGGACAGACGTGATCCGTACGAGGGGTTCTGATGACTG
GAACTTACCCAGGCTCTTTAATCGGACTTTTGTATTTATATGTACCAATTTGTTTCTGTGTTAT
CTAAAGGTTTCTATGGATTCACACAAGCAAGTAGCTCATATGTAAGAAAAGCACGCTATTGATC
CACCGATTGAAAATGAGAAGTATCGCTTG
```

下划横线表示信号肽序列,4 个保守的半胱氨酸用黑点注释 “* ”表示终止密码子。
The amino acids underlined sequence 1 -28 is signal peptide; The conserved cystein residues were doted; “* ”Represent termination codon.

图 2 牙鲆 *LEAP-2* 基因 cDNA 以及推测氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acids sequence of *LEAP-2* gene

2.2 牙鲆 *LEAP-2* 基因的系统进化分析与蛋白质结构模拟

应用 MEGA 软件将推导的氨基酸序列与已报道的其他鱼类 *LEAP-2* 基因氨基酸序列进行同源对比,其中有 27 个氨基酸高度保守,其中大部分位于羧基端,包括 4 个保守的半胱氨酸(图 3) 。显示其与已报道的鱼类 *LEAP-2* 家族抗菌肽序列同源性介于 38.2% ~61.7% 间,平均值为 40.46% 。分子系统进化分析结构表明牙鲆 *LEAP-2* 与黑斑鲀同源性较高(61.7%) ,处于同一小分支; 与斑马鱼类同源性稍低(40.1%) (图 4) 。

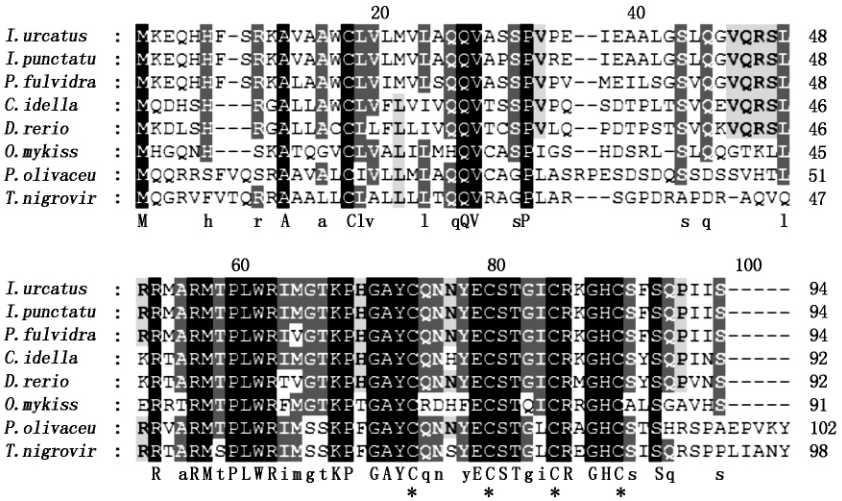
模拟得到的牙鲆 LEAP-2 的 57 至 92 位氨基酸组成了该蛋白质的核心结构域,包括 1 个螺旋和 6 个转角结构。该结构和人 LEAP-2 高度相似,能很好的进行重叠,特别是 73,79,84,89 位半胱氨酸分别对应于人的 17,23,28,33 位半胱氨酸的位置(图 5) 。

2.3 牙鲆 LEAP-2 基因在牙鲆不同生长时期的表达差异

荧光定量 PCR 对牙鲆不同发育时期和成鱼不

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

同组织内 *LEAP-2* 基因表达分析结果表明，*LEAP-2* 基因表达量在仔鱼变态发育中期时达到最大。不同组织的表达量比较可见，*LEAP-2* 基因在肝脏中表达量比较高；而在中肾、肌肉和皮肤的表达量比较低；在小肠和脑中更低。可见该基因的表达量有一定的时空差异（图 6）。



每种蛋白序列用其所来源的拉丁名表示：氨基酸的灰度深浅表示其保守性不同 “*”表示完全保守的氨基酸。

Latin name of species on the left hand side of each row marked the source of the selecled LHC proteins;

The gray level of every amino acid demonstrates lts homolog; “*”represents identical amino acid of the selcted protein.

图 3　牙鲆 LEAP-2 蛋白质序列与其同源基因的序列比较

Fig. 3　Sequence alignment of the selected LEAP-2 proteins

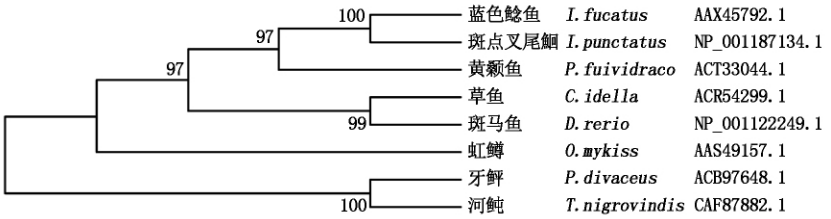
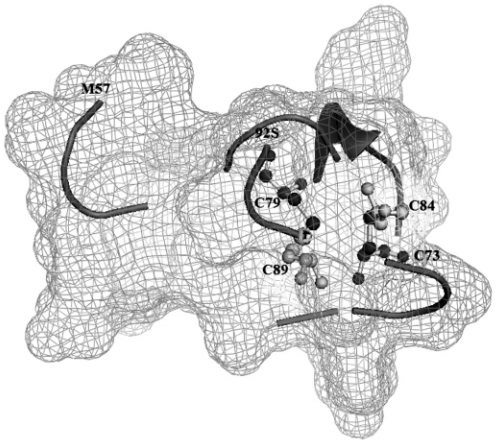


图 4　牙鲆 LEAP-2 与已报道的几种鱼类 LEAP-2 的分子系统进化分析

Fig. 4　Phylogenetic tree showing relationship within selected LEAP-2s based on amino acid sequances



其中 4 个半胱氨酸（C73，C79，C84 和 C89）显示为球棒模型；螺旋区和转角为卡通模型。

The four cystein (C73, C79, C84 and C89) were shown in ball and stick model; Helix and coils were shown in carton model.

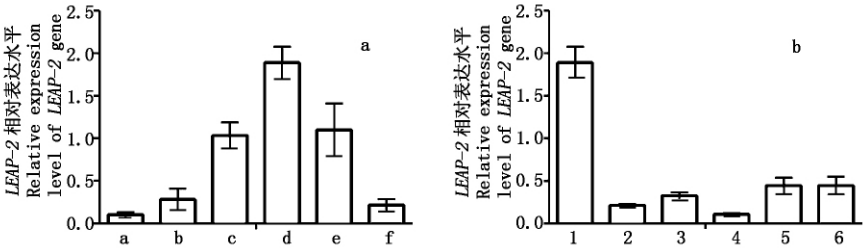
图 5　牙鲆 LEAP-2 蛋白质三维网线结构模型

Fig. 5　Tertiay mesh structure of LEAP-2 from *Paralichthys olivaceus*

3　讨论

自 Steiner 等[10] 1981 年在天蚕蛹中发现第一个抗菌肽 cecropin 以来，人们在动物体内发现多种抗菌肽。其中，在鱼体内发现了 Hepcidin、Pleurocidin、Pardaxin、Parasin、Hipposin、Cathelicidin、Misgurin、Moronecidin、LEAP-2、Chrysophsin、Oncorhyncin 和 Piscidin 等抗菌肽[13]。在鲆鲽类体内较早发现的抗菌肽是 25 个氨基酸的 Pleurocidin，它分布在牙鲆皮肤粘液细胞内，体外条件下对大肠杆菌的生长有明显的抑制作用[13]。相比较而言，牙鲆体内抗菌肽的分离和鉴定的研究工作还较少。在已发现的鱼类抗菌肽中，Cathelicidin 较长，由 216 个氨基酸残基组成[14]。其他鱼类抗菌肽一般比较短，长度在 100 个氨基酸以下。其中 hepcidin 前体肽由 80 ~ 100 个氨基酸残基组成[15]，而 parasin 只有 19 个氨基酸残基组成[16]。较长的抗菌肽，比较容易获得其空间结构，从而更容易去理解其抗菌机理，如 Hepcidin 能通过二硫键形成 β 折叠结构，从而增加细菌细胞膜的通透性，从而起到杀菌的效果。而 Pleurocidin、Pardaxin、Misgurin 和一些短的抗菌肽的抗菌机理还有待于深入研究。随着越来越多的抗菌肽结构被揭示，比

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A. 不同的发育阶段: a. 出膜 13 d; b. 出膜后 18 d; c. 出膜后 24 d; d. 出膜后 31 d; e. 出膜后 36 d; f. 出膜后 45 d; B. 不同组织: 1. 肝脏; 2. 脑; 3. 中肾; 4. 皮肤; 5. 肠; 6. 肌肉。

A. Diffrent stage: a. 13 DAH; b. 18 DAH; c. 24 DAH; d. 31 DAH; e. 36 DAH; f. 45 DAH. B. Different tissues: 1. Liver; 2. Kidnye; 3. Musele; 4. Skin; 5. Intestine; 6. Brain; Expression values were normalized to those of β-actin. Data were expressed as the ment fold difference (mean ± SD. n = 3) from the calibrator(C stage and liver).

图 6 牙鲆抗菌肽 *LEAP-2* 基因时空表达分析

Fig. 6 Stage and tissue expression of *LEAP-2* gene of *P. olivaseus*

如人的 β-防御素-2 (PDB 编号 1FQQ), 蛙皮素-2 (PDB 编号 2MAG), indolicidin (PDB 编号 1G89)[17], 采用同源建模的方法能够很快模拟出鱼的体内同源抗菌肽的三维结构。

LEAP-2 在人和脊椎动物体内普遍存在。从基因结构上看, 人[18]、小鼠[19]、虹鳟[20] 和斑点叉尾鮰[20] 的 *LEAP-2* 都包含 3 个外显子和 2 个内含子, 在鱼类中已经克隆了近十种 *LEAP-2* 基因, 最早发现于虹鳟体内, 它有两个 *LEAP-2* 序列(LEAP-2A 和 LEAP-2B), 都含有 3 个外显子和 2 个内含子。从蛋白质序列上看, 人 *LEAP-2* mRNA 编码含有 77 个氨基酸残基的蛋白质前体, 主要在肝脏中表达。蛋白质前体的氨基端有一条 22 个氨基酸残基的分泌性信号肽, 切割信号肽后可产生一条 55 个氨基酸残基的 LEAP-2 原蛋白。原蛋白被剪切后参与循环, 根据从 C 端到 N 端氨基酸的剪切位置又有多种形式[18]。它们均含有一个由 4 个半胱氨酸残基组成的环, 二硫键连接为 Cys17-Cys28 和 Cys23-Cys33。斑点叉尾鮰 *LEAP-2* 基因编码 94 个氨基酸残基的多肽, 包含信号肽、原肽结构域区和成熟肽结构区, 信号肽的切割点位于 29 号和 30 号氨基酸之间, 成熟的多肽含有 41 个氨基酸残基[21]。而牙鲆 *LEAP-2* 基因编码了 102 个氨基酸, 包含 28 个氨基酸的信号肽和 74 个氨基酸的成熟肽。综合 GenBank 中 LEAP-2 的记录可见已经报道的几种鱼类 LEAP-2 多肽序列一般在 90 ~ 100 个氨基酸之间, 哺乳动物的序列一般在 70 ~ 80 个氨基酸范围内, 鱼类的多肽序列较长。从基因拷贝数看, 虹鳟和斑马鱼有 2 个拷贝的 LEAP-2 基因, 而斑点叉尾鮰只有 1 个拷贝的 *LEAP-2* 基因[21]。可见, 但其拷贝数在不同生物体内有所不同, 体现了该基因在进化上的差异性。

基因表达变化是生命活动调控的重要机制。不同发育阶段、不同生理状态下基因的表达决定了生命过程变化, 包括发育和分化、内环境稳定、抗逆反应等。因此, 比较不同发育阶段的基因表达可为分析生命活动过程提供重要信息。斑点叉尾鮰 *LEAP-2* 基因在脑和胃以外的多种组织中广泛表达, 而发育早期不能检测到成熟 mRNA 的表达[21]。而虹鳟的 *LEAP-2A* 和 *LEAP-2B* 在肝中都有结构型表达, 而在小肠中略少, 皮肤中更少。牙鲆 *LEAP-2* 在肝脏中高表达, 显著高于脑、肾和肌肉等组织, 其结果与斑点叉尾鮰和虹鳟的报道类似。而牙鲆 *LEAP-2* 随发育时间的增加表达量逐渐增加, 在变态体中期时达到最大, 其原因可能是仔鱼组织器官的不断成熟, 也提示机体需要 *LEAP-2* 发挥一定生物学功能。在变体后期, 其表达量开始有所下降, 是由于变态后仔鱼生活习性改变还是内部基因调控的结果, 原因还需要进一步探讨。本研究充分利用 GenBank 中牙鲆的 EST 数据, 通过同源比对的方法获得牙鲆 *LEAP-2* 包含完整编码区的 cDNA 序列, 结果对于深入探讨牙鲆非特异性免疫因子、研究牙鲆免疫应答及调控机理提供了基础研究数据。

参考文献:

[1] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. Nature, 2002, 415(6870): 389 – 395.

[2] Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications [J]. Biotechnology Advances, 2003, 21(6): 465 – 499.

[3] 刘碧莲, 白俊杰, 劳海华, 等. 鳜 hepcidin cDNA 的分子克隆及序列分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 995 – 1000.

[4] 安贤惠, 梁建国, 李卫国, 等. 中国对虾中抗菌短肽的分离纯化与功能分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 1012 – 1016.

[5] 唐启升, 陈松林. 海洋生物技术前沿领域研究进展 [J]. 海洋科学进展, 2004, 22(002): 123 – 129.

[6] 杨 绒, 陈松林. 水产动物抗菌肽的研究进展 [J]. 生

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物技术通报，2005(002)：1－5.

[7] Minami T. The early life history of a flounder Paralichthys olivaceus. [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries，1982，48(11)：1581－1588.

[8] Kumar S，Tamura K，Nei M. MEGA：molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers [J]. Comput Appl Biosci，1994，10(2)：189.

[9] Nielsen M，Lundegaard C，Lund O，*et al*. CPHmodels-3.0-remote homology modeling using structure-guided sequence profiles [J]. Nucleic Acids Research，2010，38(Suppl 2)：W576.

[10] Delano W L. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos，CA：DeLano Scientific；2002 [Z]. Accessed 6/25/2007. Available at http://www.pymol.org，2010.

[11] Steiner H，Hultmark D，Engström A，*et al*. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity [J]. Nature，1981，292：246－248.

[12] 李 华，杨桂文，温武军. 鱼类抗菌肽研究概况 [J]. 科技信息，2010(2)：144.

[13] Cole A M，Weis P，Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin，an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder [J]. Journal of Biological Chemistry，1997，272(18)：12008－12013.

[14] Chang C I，Pleguezuelos O，Zhang Y A，*et al*. Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout，Oncorhynchus mykiss [J]. Infection and Immunity，2005，73(8)：5053－5064.

[15] Shike H，Lauth X，Westerman M E，*et al*. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge [J]. European Journal of Biochemistry，2002，269(8)：2232－2237.

[16] Park I Y，Park C B，Kim M S，*et al*. Parasin I，an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish，Parasilurus asotus [J]. FEBS Letters，1998，437(3)：258－262.

[17] Sussman J L，Lin D，Jiang J，*et al*. Protein Data Bank (PDB)：database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. [J]. Acta Crystallographica-Section A，1998，54：1078－1084.

[18] Krause A，Sillard R，Kleemeier B，*et al*. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2，a novel blood peptide expressed in the liver [J]. Protein Science，2003，12(1)：143－152.

[19] Pigeon C，Ilyin G，Courselaud B，*et al*. A new mouse liver-specific gene，encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin，is overexpressed during iron overload [J]. Journal of Biological Chemistry，2001，276(11)：7811－7819.

[20] Zhang Y A，Zou J，Chang C I，*et al*. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology，2004，101(3－4)：259－269.

[21] Bao B，Peatman E，Xu P，*et al*. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated [J]. Molecular Immunology，2006，43(4)：367－377.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net