

水产动物基因工程抗菌肽及其应用前景的研究

王海静, 王福生, 边艳青, 赵宝华

(河北师范大学生命科学学院, 河北石家庄 050016)

摘要: 抗菌肽是水产动物体内非特异性免疫系统的第一道防线, 在抵御外来病原微生物的过程中发挥着重要作用。来源于鱼、虾、蟹等水产动物的抗菌肽杀菌作用更强, 溶血效应小, 种类多样化, 显示出比其它种类更具优势的应用前景。介绍了一些水产动物抗菌肽的研究近况、基因工程研究进展以及转抗菌肽基因在水产动物中的研究进展, 并展望了其在水产领域的应用前景。

关键词: 抗菌肽; 水产动物; 基因工程; 应用前景

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2009)03-0100-05

近年来, 水产品的健康养殖越来越受到重视, 但是高密度、集约化的养殖方式却容易引起水产病害的频发, 其中水产动物细菌性疾病较为普遍, 我国曾经使用抗生素来防治水产动物细菌性疾病, 但抗生素会引起致病菌的耐药性, 影响水产养殖动物体内的正常菌群, 造成药物残留, 影响水产品的品质和风味, 并且会不同程度地破坏水体微环境, 故其应用越来越受到限制。随着国内外禁止抗生素使用法规的出台, 开发一种全新的环保型抗菌药物成为水产病害防治研究者的目标。

抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP) 是具有抗菌活性的肽类的总称, 是由生物机体免疫防御系统产生的一类对抗外源性病原体致病作用的防御性活性肽类物质。1975 年, 瑞典科学家 G Boman 等 (1991) 从惜古比天蚕蛹中分离出了世界上第一种真正意义上的具有抗菌活性的多肽, 即天蚕素 (Cecropins), 在以后的 30 多年, 人们从细菌、真菌、昆虫、高等植物、鱼类、两栖类、鸟类、哺乳动物乃至人类等生物体中均分离得到了抗菌肽。

水产动物抗菌肽是一类小分子多肽, 相对分子质量为 2 000~7 000, 一般由 20~60 个氨基酸组成。从已报道的水产动物抗菌肽序列来分析, 这些多肽的氨基酸序列的同源性比较低, 而且种间差异极大, 但也存在一些共同特征, 结构上具有一定共性, 比如分子带正电, 含有较多精氨酸、赖氨酸和疏

水氨基酸, 分子可折叠成 α 螺旋等。科研工作者已经从一些水产动物中分离得到了一些抗菌肽, 并且通过基因克隆的方法得到了一些抗菌肽基因, 构建了基因工程菌株以表达抗菌肽, 制备新型抗菌制剂, 在水产病害防治过程中展现出巨大的潜力。

1 水产动物抗菌肽的研究近况

水产动物长期生活在复杂的水体环境中, 但是却可以抵御水体中各种微生物的感染, 抗菌肽在水产动物抵御外来病原微生物的过程中发挥着重要作用。当水产动物受到外源微生物的刺激后, 血细胞中抗菌肽基因会大量表达, 合成的抗菌肽能以颗粒物的形式贮存, 也可以迅速、灵活的扩散到身体的其它部位发挥作用。研究显示, 来源于水产动物自身的抗菌肽杀菌作用更强, 溶血效应小, 种类多样化, 显示出了广阔的应用前景。

1.1 甲壳动物抗菌肽

甲壳动物的抗菌肽主要存在于血液中, 目前研究较多的是鲎源抗菌肽和虾、蟹的抗菌肽。鲎源抗菌肽主要包括 Tachyplesins, Polyphenusins, Tachystatins, Tachycitin 和 Big defensin。关于虾类抗菌肽研究较多的是 Penaeidins, 它是进行了全面鉴定的第一种甲壳动物抗菌肽, 具有抗真菌、细菌的活性, 并且具有与几丁质相粘连的特性。当受到外界刺激, Penaeidins 被释放入血液, 通过血液循环与全身的几个几丁质结合, 覆盖身体甲壳, 起到保护全身的作用 (Destoumieux D et al 1997)。关于蟹抗菌肽, 目前已经从三叶真蟹的颗粒细胞, 蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 血细胞、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 精液中分离出了抗菌肽 (Relf JM et al 1999, Khoo L 1999, Jayasankar V & Subramoniam T, 1999)。

收稿日期: 2008-03-17

基金项目: 河北省科技攻关项目 (N067805003D)。

通讯作者: 边艳青, 副教授。E-mail: bianyanqing151@sohu.com; 赵宝华, 教授。E-mail: zhao_baohua86178@sohu.com

作者简介: 王海静, 1982 年生, 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物疾病防治研究。

1.2 贝类抗菌肽

贝类抗菌肽中研究较多的是贻贝和鲍抗菌肽。贻贝中存在多种抗菌肽,其显著特点是富含 Cys 残基,能够形成多个二硫键。N 端具有一个阳离子的信号肽,紧接成熟肽序列,C 端含有阴离子残基。抗菌肽以前蛋白原 (preproprotein) 的形式在血淋巴中合成,在缺乏刺激物时,成熟肽前体以活性方式储存在血液中,当受到感染后便参与组织反应。根据抗菌肽的一级结构和半胱氨酸的不同分为 4 种:防御素 (defensins)、贻贝素 (mytilins)、贻贝肽 (mytilins) 和贻贝霉素。

对鲍血淋巴抗菌肽进行研究发现,杂色鲍的血淋巴经大肠杆菌诱导可产生具有免疫功能的蛋白和多肽,随着菌诱导时间的增加,血淋巴的抑菌活性也增强(李晔等,2005)。

1.3 鱼类抗菌肽

鱼类抗菌肽是一大类,数目和种类繁多,在鱼的体表粘液、皮肤、鳃、血液、血清、小肠和肝脏等组织均分离得到了抗菌肽。同一种鱼的不同组织可能产生不同类型的抗菌肽,不同鱼类的抗菌肽分子结构和作用机制差异比较大。另外,Huang 等(2007)研究发现,一些鱼类抗菌肽的表达量受到炎症及右旋糖苷铁的影响。

2 水产动物基因工程抗菌肽的研究

抗菌肽抗菌效果明显,但获得途径有限。天然抗菌肽产量很低,而化学合成抗菌肽成本较高;采用基因工程手段生产抗菌肽,具有成本低、易于工业化大规模生产等特点,成为国内外研究者的首选。目前的研究思路主要集中在 2 个方面:第一,在分子水平上研究抗菌肽在动物免疫防御系统中的发生机制以及调控机制,为抗菌肽相关产品的开发利用提供理论基础。第二,克隆抗菌肽基因,利用微生物系统表达抗菌肽,然后利用蛋白质操作的技术平台进行收集和提纯,为临床研究及应用奠定基础。

2.1 水产动物抗菌肽基因克隆

科学家已经从一些水产动物中克隆得到了一些抗菌肽基因。Cole 等(2000)对美洲拟鲈皮肤 cDNA 文库及精巢基因组文库进行筛选得到 pleurocidin cDNA 片段及上游启动子序列。该基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成,此种结构与哺乳动物抗菌肽 PR239 的结构十分相似,成熟肽序列有 25 个氨基酸,含有 4 个赖氨酸残基,表现出显著的阳离子特性;Douglas 等(2001)从美洲拟鲈中克隆得到 4 个

pleurocidin 样基因 WF1、WF2、WF3、WF4 其在不同组织中表达量不同,在成体的皮肤或小肠中表达量很少或者只在特殊环境诱导下,在特定生活期进行表达。王克坚等(2004)从海水养殖鲈鱼的肝脏中,扩增得到了 Hepsidin 抗菌肽前体基因。康翠洁等(2002)已获得了对虾的抗菌肽基因 cDNA 克隆,片段长度 543bp,可译框(ORF)长 156bp。Pan 等(2000)从白滨对虾和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的组织提取液中分离出具有抗 DNA 病毒和 RNA 病毒活性的抗菌肽。相建海(2001)从中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 中克隆到抗菌肽基因,推测其氨基酸序列,发现其氨基端富含甘氨酸和脯氨酸。Pamparyupa 等(2008)从斑节对虾中克隆得到 crustin-like 抗菌肽,成熟肽包括 124 个氨基酸,其 N 端有一段富含 Gly 的区域,C 端有 12 个保守的 Cys 残基。

除了基因克隆,近年来的研究重点正在向建立水产动物免疫特异性 cDNA 文库和表达序列标签 (ESTs) 方面转移,这将有助于发现更多的抗菌肽基因。Nan 等(2002)构建了日本鳎类鱼的 cDNA 和 ESTs 文库,从中鉴定了许多免疫相关基因;Gross 等(2001)构建了凡纳对虾和白滨对虾血细胞和肝脏的 cDNA 文库,随机选择 2 045 个克隆进行测序,发现与免疫功能基因相对应的表达序列标签 (EST) 268 个。随着水产动物相关文库和蛋白表达谱的建立及基因工程技术的发展,表达和利用抗菌肽基因将会更加方便。

不仅如此,天然抗菌肽基因经过有目的地人工设计和改造,可以产生具有更强活性的抗菌肽,从而获得自然界原本不存在的抗菌药物。对抗菌肽基因筛选、改造设计以及表达载体筛选方面的深入研究,以提高基因表达的稳定性,基因工程抗菌肽替代天然抗菌肽在理论和实践上完全可行。

2.2 利用原核系统表达抗菌肽

基于大肠杆菌的原核表达系统是迄今在基因工程领域中应用最多、最完善的系统,其主要优点是成本低、产量高、易于操作,但由于抗菌肽对原核细胞具有很强的杀菌作用,故一般采用融合表达方式。Pierce 等(1997)在大肠杆菌中以融合蛋白的形式表达了鲎血细胞抗菌肽 Polyphenusins 的类似物 rLin1,它具有与天然抗菌肽相似的活性,可以对牡蛎的一种寄生原虫产生明显的抑制作用;张春义和范云六(1998)人工设计并合成了抗真菌多肽鲎素基因,克隆到原核表达载体上,诱导表达融合蛋白 GST-鲎

素融合蛋白,纯化后的融合蛋白具有抑制黄曲霉孢子萌发的生物活性。李伟等(2007)从大菱鲂肝脏中分离得到的 hepcidin 基因,构建了谷胱甘肽-S 转移酶抗菌肽(GST₂-hep)融合表达载体,实现了在大肠杆菌中的融合表达。

采用原核表达系统能够实现抗菌肽的高效表达,但也存在诸多问题,主要表现在 3 个方面,一是抗菌肽的宿主细胞毒性。宿主细胞表达的抗菌肽会反馈性地抑制宿主细胞的增殖,从而影响抗菌肽的进一步表达,因此多采用融合表达的形式;二是容易被降解。由于抗菌肽在增殖过程中对蛋白酶非常敏感,在宿主细胞中抗菌肽本身带有大量正电荷容易被降解,难以实现大量表达。三是大肠杆菌缺乏翻译后修饰加工机制。表达的蛋白质往往不能进行正确的折叠,多以包涵体状态存在,影响产物的活性,需要进行变性、复性等操作才能得到活性蛋白,不适合用于表达结构复杂的蛋白质。

2.3 利用真核系统表达抗菌肽

近年来,以酵母作为工程菌表达外源蛋白技术日益发展,酵母作为低等真核生物,具有细胞生长快、营养要求低、易于规模化生产、遗传操作简单等特点,能够对表达的蛋白质进行正确加工、修饰及合理的空间折叠,不会产生内毒素,并且一些类型的酵母其表达产物可分泌至胞外,既可以减轻宿主细胞代谢负荷,又可减少宿主细胞蛋白酶对外源蛋白的降解,提高表达蛋白的活性,且可获得较高的表达量,利于表达产物的分离纯化,非常有利于真核生物基因的表达。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)最先作为外源基因表达的酵母宿主。1981 年用酿酒酵母表达了第一个外源基因-干扰素基因,随后又有一系列外源基因在该系统得到表达;后来又发展了以甲基营养型酵母(*Methylotrophic yeast*)为代表的第二代酵母表达系统,如巴斯德毕赤酵母表达系统,能够更好的满足商业化生产的需要。

利用酵母表达系统进行水产动物抗菌肽的基因工程研究,主要方法是对水产动物抗菌肽基因进行修饰,构建水产动物抗菌肽基因的胞内型酵母基因工程载体,使其在酵母工程菌体内高效表达;或者直接将酵母工程菌作为新型抗菌制剂,用于水产养殖品的防病抗病。Destoumieux 等(1999)将南美白对虾抗菌肽 Panaeidins 的编码基因克隆到酿酒酵母中进行表达,表达产物尽管与天然抗菌肽在结构上有一些差异,但具有相似的杀菌活性。仲燕等(2005)应用毕赤酵母表达系统能较好地表达贻贝抗菌肽

Mycin A, 抗革兰氏阳性菌,且能抑制肿瘤细胞生长。Burnowes 等(2005)尝试在毕赤酵母表达系统中表达 pleurocidin, 结果在转录水平检测到了 pleurocidin 的表达,但未能在培养上清液中检测到蛋白。Chen 等(2003)从真鲷脾脏 cDNA 文库筛选得到一种 H hepcidin 基因,确定了其结构及其在不同组织中表达水平,同时构建了真鲷 H hepcidin 表达载体并首次在酵母中表达,生产了鱼类重组抗菌肽。在以上研究中,大都实现了抗菌肽的表达,并且产物没有对工程菌产生明显的抑制作用,这为以后应用基因工程技术表达水产动物抗菌肽提供了思路。当然,抗菌肽是否适合在酵母中表达要据其活性特点具体分析,并且针对不同的类型要采取不同策略来构建表达载体,从而实现抗菌肽高质高效的表达。

3 抗菌肽在水产养殖上的应用前景

随着对各种水产动物抗菌肽结构与功能的深入研究,通过基因工程技术实现抗菌肽的体外批量生产,将有希望生产出防治水产病害的新型药物。抗菌肽在水产养殖中的应用主要有以下几个方面。

3.1 抗菌肽的药用价值

在临床应用研究方面,国外起步较早,迄今已构建一系列高产抗菌肽的基因工程菌株或生物反应器,并有多抗菌肽已进入临床前的可行性研究阶段,已经取得了一些效果。1990 年,美国马盖宁制药公司对抗菌肽蛙皮素 magainin 进行结构与分子设计,筛选出对病毒和肿瘤细胞均有较强杀伤作用的小肽;加拿大的 IntraBiotics 公司利用从蚕或牛分离到的 protegrin1 开发出一种抗细菌和真菌的制剂,通过喷雾用于呼吸道感染及口腔黏膜炎的治疗,取得了较为满意的疗效。我国起步稍晚,迄今也成功构建了一些抗菌肽工程菌,但表达量均较低,离生产要求远,与国外相比差距大,基础研究和开发应用领域都迫切期待原创性突破。

目前,有关水产领域病害防治的抗菌肽制品报道较少,但是研究开发水产抗菌肽制剂有很好的理论基础和实践基础。随着对水产动物抗菌肽的分离,结构与功能的研究,改造并合成具有稳定、高效、特异抗菌活性且对宿主无害的抗菌肽基因,并通过基因工程在原核生物、真核生物或某些藻类中进行表达,以实现批量生产,将有希望成为对付水产养殖品种病原体的新型药物。

3.2 抗菌肽作为水产饲料添加剂

抗菌肽产品具广谱抗菌作用,对水产品具有促

生长、保健和治疗疾病的功能, 属无毒副作用、无残留、无致细菌耐药性的一类环保型制剂。对抗菌肽基因表达调控及抗菌肽添加剂应用的研究表明, 用基因工程方法生产环保型抗菌肽饲料添加剂, 或通过日粮因素调控抗菌肽基因的表达而使水产品不再使用抗生素是可行的。

目前, 国内外养殖业和饲料加工业发展很快, 抗菌肽作为新型饲料添加剂具有极大的开发潜力和应用前景。抗菌肽能耐受生产饲料时的高温, 利用基因工程技术, 尤其是酵母表达系统, 规模化发酵生产抗菌肽时经高温浓缩工序, 可充分杀灭酵母菌体而不导致抗菌肽失活, 产品在推广应用后不会出现工程菌的扩散而导致环境生态问题。将无公害的抗菌肽添加到鱼饲料中, 不仅可以提高鱼体的免疫抗病力, 而且可以提高水产品质量, 缓解海水养殖生产中的细菌耐药性及水产品中抗生素污染等问题。

3.3 培育转抗菌肽基因新品种

从已报道的抗菌肽基因序列来看, 其基因编码序列很短, 只有 100~200bp 内含子少或不含内含子, 这对转基因操作非常有利。依据现有的转基因理论和操作水平, 移植功能强大的抗菌肽基因获得转基因鱼、虾类抗病品种, 通过提高自身的免疫能力增强抗病力, 应是可行的。目前已经有关于转移抗菌肽基因获得新的鱼类和虾类抗病新品种的报道。Rex AD & Dregory WW (2002) 将惜古比天蚕的抗菌肽 Cecropin B 基因导入到如斑点叉尾鲷, 获得的子代鱼抗病原菌能力明显增强。

4 结语

水产动物抗菌肽的研究加深了人们对低等脊椎动物免疫防御机制的认识, 为日益严重的鱼类病害防治开辟了新的途径; 同时, 随着转基因技术的发展, 有可能通过转抗菌肽基因获得抗病新品种, 使得水产品的自身免疫能力增强。水产养殖业提倡的健康养殖理念已深入人心, 生产无公害水产品是一种趋势。因此, 加快对主要水产养殖品种免疫防御的基础研究, 调动、开发其自身的防御潜力, 是开展健康养殖、实现养殖业可持续发展的重要战略之一。有理由相信, 随着研究的不断深入, 水产动物抗菌肽将对世界水产业的可持续发展起到重要的作用。

参考文献:

康翠洁, 王金星, 赵小凡, 等. 2002 中国对虾抗菌肽成熟肽的 cDNA 克隆 [J]. 山东大学学报 (理学版), 37(6): 552-

- 李伟, 陈松林, 赵晓杰. 2007. 大菱鲆 hepcidin 抗菌肽基因的克隆及在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 长江大学学报 (农学卷), 4(3): 84-87
- 李晔, 苏秀榕, 李太武, 等. 2005. 鲍血淋巴抗菌肽的研究 [J]. 食品科学, 26(5): 67-70
- 王克坚, 周红玲, 杨明. 2004. 海水养殖鲈鱼分离出一种 hepcidin 抗菌肽新基因 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 43(3): 286-287
- 相建海. 2001. 海水养殖生物病害发生与控制 [M]. 北京: 海洋出版社, 111-117.
- 张春义, 范示六. 1998. 抗真菌萤素基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 农业生物技术学报, 6(3): 211-216
- 仲燕, 刘军华, 张建鹏, 等. 2005. 东海贻贝抗菌肽 Myticin A 基因的克隆表达及其生物学活性 [J]. 第二军医大学学报, 26(1): 65-67.
- Bom an HG, et al 1991. Antibacterial Peptides Key Components Needed in Immunity [J]. Cell 65: 205-207.
- Burrows OJ, Diamond G, Lee TC. 2005. Recombinant Expression of Pleurocidin cDNA Using the *Pichia pastoris* Expression System [J]. J Biomed Biotechnol (4): 374-384
- Chen SL, Xu MY, Su SF, et al 2003. Proceedings at 6th International Marine Biotechnology Conference.
- Cole AM, Rahn OD, Diana L, et al 2000. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2: 039-2045
- Destumieux D, Bulet P, Loew D, et al 1997. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) [J]. The Journal of Biological Chemistry 45: 28398-28406
- Destumieux D, Bulet P, Stubb JM, et al 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptide from penaeid shrimp [J]. Eur J Biochem, 266: 335
- Douglas SE, Gallant JW, Gong Z, et al 2001. Developmental and Comparative Immunology 25: 137-147
- Gross PS, Bartlett TC, Bowdy CL, et al 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Atlantic White Shrimp *L. setiferus* [J]. Developmental and Comparative Immunology 25: 565-577.
- Huang HH, Chen JY, Kuo CM. 2007. Three different hepcidins from tilapia *Oreochromis mossambicus*: Analysis of their expressions and biological functions [J]. Mol Immunol 44: 1922-1934
- Jayasankar V & Subramoniam T. 1999. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 236: 253-259

- Khoo L. 1999. Callinectin: an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus* hemocytes [J]. *Marine Biotechnology* (1): 44–51
- Nam BH, Yamamoto E, Hirano J et al. 2002. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hiramanabodovirus* [J]. *Dev Comp Immunol* 24(1): 13.
- Pamparyun H, Kondq I, Hirano et al. 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Molecular Immunology* 45: 1085–1093.
- Pan J, Kurosky A, Xu B et al. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans [J]. *Antiviral Res* 48: 39–47.
- Pierce JC, Maloy WL, Dungan CF. 1997. Recombinant expression of the antimicrobial peptide polyphemusin and its activity against the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus* [J]. *Mol Marine Biol Biotechnol* 6(3): 248.
- Relf JM, Chisholm JR S, Kemp GD, et al. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular hemocytes of the shore crab *Carcinus maenas* [J]. *Eur J Biochem*, 264: 350–357.
- Rex AD & Dregory WW. 2002. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic Channel catfish *Ictalurus punctatus* processing cecropin gene [J]. *Marine Biotech*, (4): 338.

(责任编辑 万月华)

Genetic Engineering Research Development of Antimicrobial Peptides in Aquatic Animals and its Application Prospects

WANG Hai-jing WANG Fu-sheng BIAN Yan-qing ZHAO Bao-hua

(College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang Hebei 050016 China)

Abstract Antimicrobial peptide is the first line of defense of non-specific immune system in aquatic animals. It plays an important role in the process of resisting foreign pathogenic microorganisms. Antimicrobial peptide from aquatic animals, such as fish, shrimps, crabs etc., has stronger bactericidal action, activity, smaller hemolytic effect, and diversified species, which show more advantages than antimicrobial peptides of other types. This review focuses on recent research on the antimicrobial peptide from some aquatic animals, progress in genetic engineering and transgenic aquatic animals, as well as prospects of its application in the field of aquaculture prospects.

Key words Antimicrobial peptide, Aquatic animal, Genetic engineering, Application prospects