

# 大弹涂鱼皮肤转录组测序及抗菌肽基因分析

张毓霞<sup>1</sup>, 石 戈<sup>1</sup>, 王日昕<sup>2</sup>, 宫廷斌<sup>1</sup>, 范美华<sup>1</sup>, 廖 智<sup>1\*</sup>

(1. 浙江海洋大学 海洋科学与技术学院 海洋生物蛋白质工程实验室, 中国浙江 舟山 316022; 2. 宁波大学 海洋学院, 中国浙江 宁波 315211)

**摘 要:** 抗菌肽是鱼类用于抵御外界微生物入侵的天然防御多肽,也是开发新型药物的重要先导分子。大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)是一种特殊的可以营两栖生活的鱼类,其皮肤表面具有丰富的粘液,其中所含抗菌肽对其免疫防御和适应两栖生活具有重要意义。为深入了解大弹涂鱼皮肤组织基因表达谱并从中筛选抗菌肽相关基因,采用新一代 Illumina 高通量测序平台对大弹涂鱼皮肤组织进行了转录组测序。利用 Trinity 软件从头组装,从测得的 78 608 366 条双端测序读长(paired-end read)共计 6 GB 的序列数据中获得 119 848 条高质量的蛋白质编码基因(unigene)。经公共数据库序列检索和比对,发现 7 个 unigene 编码的多肽与已知的鱼类 5 大家族的抗菌肽高度同源,即  $\beta$ -防御素 ( $\beta$ -defensin)、hepcidin、NK-lysin、piscidin 和肝表达抗菌肽-2 (liver-expressed antimicrobial peptide-2, LEAP-2)。最后,对上述抗菌肽相关 unigene 开展了组织表达差异分析、序列比对及进化树分析。研究结果为进一步了解大弹涂鱼适应两栖生活的免疫防御机制和利用新鉴定的抗菌肽开发新型抗菌药物奠定了基础。

**关键词:** 大弹涂鱼; 皮肤; 转录组; 抗菌肽; 序列分析

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)01-0026-10

## Transcriptome of *Boleophthalmus pectinirostris* Skin and Analysis of Antimicrobial Peptide Related Unigenes

ZHANG Yu-xia<sup>1</sup>, SHI Ge<sup>1</sup>, WANG Ri-xin<sup>2</sup>, GONG Yan-bin<sup>1</sup>, FAN Mei-hua<sup>1</sup>, LIAO Zhi<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory of Marine Biology Protein Engineering, Marine Science and Technical College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China; 2. Marine Science College, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

**Abstract:** Antimicrobial peptides (AMPs) are employed by fish as the innate defense peptides to protect against the invasion of foreign microorganisms and are important lead molecules for the development of novel drugs. *Boleophthalmus pectinirostris* is a special fish that can live in amphibious environment; and the mucus from its skin is speculated to be rich in AMPs and has great significance to its immune defense and adaptation to the amphibious life. For understanding the gene expression patterns of *B. pectinirostris* skin and screening for antibacterial peptide related genes, the transcriptome analysis of the adult *B. pectinirostris* skin was performed by Illumina sequencing. A total of 78 608 366 paired-end reads amounting to 6 GB of sequence data were generated and further *de novo* assembled with Trinity software, yielding a total of 119 848 high-quality skin unigenes. When these unigenes were annotated in the available databases, 7 unigenes were found to encode peptides homologous with the reported fish AMPs of 5 families with significant hits ( $E$ -value<1.00E-05), i.e.  $\beta$ -defensin, hepcidin, NK-lysin, piscidin, and liver-expressed antimicrobial peptide-2(LEAP-2). Their differential expression in different tissues, sequence alignment and phylogenetic analysis were performed. The results provide a foundation for further understanding the immune defense mechanism for *B. pectinirostris* to

收稿日期: 2017-05-09; 修回日期: 2017-07-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31472279)

作者简介: 张毓霞(1990-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物转录组和蛋白质组学研究; \* 通讯作者: 廖智(1973-), 男, 湖南长沙人, 博士, 浙江海洋大学教授, 主要从事海洋生物蛋白质化学和蛋白质组学研究, E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn.

adapt to the amphibious environment and developing novel antibiotics using the newly identified AMPs.

**Key words:** *Boleophthalmus pectinirostris*; skin; transcriptome; antimicrobial peptide; sequential analysis

(*Life Science Research*, 2018, 22(1): 026-035)

抗菌肽是生物在进化过程中,为抵御外界致病微生物入侵而产生的具有免疫保护作用的蛋白质类成分。抗菌肽研究既有助于了解生物的免疫防御机制,也有助于开发新型生物抗生素,因而具有重要的意义。水生生物是抗菌肽研究的一个重要领域。目前,对鱼类抗菌肽和两栖类抗菌肽的研究比较多。鱼类(主要为硬骨鱼)中已鉴定的抗菌肽主要包括 $\beta$ -防御素( $\beta$ -defensin)、cathelicidin、piscidin、hepcidin、肝表达抗菌肽-2 (liver-expressed antimicrobial peptide-2, LEAP-2)、组蛋白来源抗菌肽等代表性家族,其已报道的成员数超过 100 种<sup>[1,2]</sup>。鱼类皮肤粘液是鱼类抗菌肽的一个重要来源,与上述五类经典的鱼类抗菌肽家族相比,鱼类皮肤抗菌肽显示出较强的分子多样性,且序列较短,抗菌活性更为广谱,抗真菌活性明显<sup>[3]</sup>,但目前从鱼类皮肤中鉴定到的抗菌肽种类相对于两栖类而言并不多,已报道的序列仅十余种<sup>[2]</sup>。两栖类皮肤抗菌肽表现出极强的分子多样性,且从目前的报道来看,两栖类中发现的抗菌肽种类数目已经超过 1 000 种,其分子多样性远大于鱼类抗菌肽分子<sup>[4]</sup>。由此可见,从鱼类到两栖类的进化过程中,特别是从水生向陆生的进化过程中,抗菌肽也在不断进化以适应生活环境的变化。

弹涂鱼属于鲈形目(Perciformes),虾虎鱼科(Gobiidae),是一种可以进行两栖生活的鱼类。目前,世界上共发现有 25 种弹涂鱼。现阶段对弹涂鱼的研究主要集中在弹涂鱼的养殖技术、生活习性及其相关分子机制等方面。考虑到弹涂鱼主要在泥滩中生活,且其生活习性与两栖类相似,因此,推测弹涂鱼的皮肤粘液中存在丰富的抗菌肽分子。但截止目前,尚未发现有弹涂鱼皮肤抗菌肽的研究报道。考虑到弹涂鱼的特殊进化地位,有必要对弹涂鱼皮肤抗菌肽开展系统研究,为此,我们采取 Illumina 深度测序策略,针对大弹涂鱼皮肤组织构建转录组数据库,从中筛选到与已知鱼类抗菌肽具有较高序列相似性的大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因 7 条,并对这 7 条基因开展了序列分析和组织表达差异性分析。上述工作为探明弹涂鱼皮肤抗菌肽的分子组成、结构和功能特点并探讨弹涂鱼的免疫防御机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 大弹涂鱼的采集以及皮肤组织总 RNA 的提取

成年大弹涂鱼(体长 12~15 cm)采集于浙江省台州三门海域,置于恒温(25 °C)水族箱中静养 24 h 后,选择生命力旺盛的个体(6 个),经液氮速冻 30 s 后,剥取其身体两侧部位完整的皮肤组织。材料经液氮研磨后采用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen 公司,美国)以 Trizol 法提取其总 RNA。对于所提取的总 RNA 样品,利用 Nanodrop 2000 核酸检测仪(Thermo 公司,美国)检测 RNA 纯度;以核酸分析仪 Agilent 2100 (安捷伦科技公司,美国)检测总 RNA 的浓度、RNA 质量(RIN 值)以及 28S/18S RNA 比值。

### 1.2 大弹涂鱼皮肤组织转录组文库的构建及测序

以带有 Oligo(dT)的磁珠(Invitrogen 公司,美国)从总 RNA 样品中分离富集 mRNA。将 mRNA 随机断裂成 200 bp 左右的小片段,在逆转录酶的作用下,利用随机引物,以 mRNA 片段为模板反转录合成第一链 cDNA,随后进行第二链合成,形成稳定的双链结构。加入 End Repair Mix 试剂(Invitrogen 公司,美国)将其补成平末端,随后在 3' 末端添加连接接头。PCR 扩增 15 个循环以进行文库富集,随后以 2% 琼脂糖电泳回收目的条带,经定量后在 cBot (cBot Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS, Illumina 公司,美国)上进行桥式 PCR 扩增,生成 clusters,最后开展测序。测序工作由上海美吉生物公司利用 Illumina HiSeq 4000 测序平台(Illumina 公司,美国)完成。

### 1.3 数据拼接与功能注释

将 Illumina 测序得到的原始图像数据经 Base Calling 转化为序列数据<sup>[5]</sup>。采用 SeqPrep 软件(<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)和 Sickle 软件(<https://github.com/najoshi/sickle>)对原始测序数据进行过滤,得到高质量的测序数据。序列的从头组装采用 Trinity 软件<sup>[6]</sup> (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net>, 版本号: trinityrnaseq-r 2013-02-25)完成,并最终转化为 unigenes 数据集。对于拼接所得全部 unigenes,采用 Blast2GO 软件(版本号 2.2.25)<sup>[7]</sup>,分别与非冗余蛋白质数据库(non-redundant protein da-

tabase, NR)、欧洲生物信息学研究所维护的蛋白质数据库(Swiss-Prot)、京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Gnomes, KEGG)和蛋白质直系同源簇数据库(COG)进行序列比对和信息分析(期望值  $E < 1.00E-05$ )。在此基础上完成全部 unigene 序列的方向定位和同源序列信息汇总。

#### 1.4 序列筛选和分析

从大弹涂鱼皮肤组织转录组 unigene 的序列注释结果中, 筛选与目前已知抗菌肽在序列上高度相似的序列。采用 Lasergene 软件的 Editseq 模块进行序列开放阅读框分析; 采用 Clustal W2 软件开展多序列比对分析和进化树分析; 采用 SignalP 4.1 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线进行信号肽预测。

#### 1.5 抗菌肽基因的序列验证和组织表达差异性分析

针对筛选出的大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因序列设计引物, 引物序列见表 1, 以大弹涂鱼  $\beta$ -actin 为对照。采用 Trizol 法从大弹涂鱼皮肤、肌肉、腮、肝脏、脾脏和肾脏共 6 种组织进行总 RNA 的提取, 利用 PrimeScript<sup>®</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(TaKaRa 公司, 日本)对各组织总 RNA 中的 mRNA 进行逆转录, 获得 cDNA, 再以该组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 采取 25  $\mu$ L 反应体系, 包括 12.5  $\mu$ L 2 $\times$  SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 缓冲液(TaKaRa 公司, 日本)、1  $\mu$ L 模板液、11  $\mu$ L 去离子水, 以及 0.5  $\mu$ L 引物。扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 之后为循环反应, 包括 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 54~60  $^{\circ}$ C (根据引物退火温度不同而分别设置)退火 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 设置 35 个循环。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

## 2 结果

### 2.1 大弹涂鱼皮肤转录组的大规模测序及序列组装

利用 Illumina Hiseq 4000 平台测序, 总计产生 78 608 366 条 raw reads, 从中获得 clean reads 共计 74 507 596 条; 碱基错误率为 0.019%; Q20 及 Q30 比值(Phred 数值大于 20 和 30 的碱基占总体碱基的百分比)分别为 96.08% 和 88.22%; GC 含量为 47.00%。经过序列拼接和组装, 共计获得 119 848 条 unigene。总碱基数为 113 351 787; 最长 unigene 为 20 305 bp, 最短 unigene 为 201 bp; 平

表 1 用于大弹涂鱼皮肤转录组中抗菌肽相关基因差异表达分析的引物序列

Table 1 The sequences of primers used for differential expression analysis of the antimicrobial peptide related unigenes from *B. pectinirostris* skin

Unigene	Primer sequences
c3062_g1_i1	F: 5'-GGACTTGTGGGTATAGAGG-3' R: 3'-GGTGCTGTGCCATACG-5'
c3062_g1_i2	F: 5'-GGACTTGTGGGTATAGAGG-3' R: 3'-GGTGCTGTGCCATACG-5'
c51384_g1_i1	F: 5'-CCAGGAGAGCTCTGCCCA-3' R: 3'-TGACGAGTCCGTCCTACA-5'
c80636_g1_i1	F: 5'-CGGAGGAAGCAGGGAG-3' R: 3'-GTTGTAAGTCTGCCC-5'
c21735_g1_i1	F: 5'-GGTGATGATGGCTGAG-3' R: 3'-GGATAAGCAGCAGGACTACCCC-5'
c46663_g1_i1	F: 5'-CCTCCCTTGTGGTCTCT-3' R: 3'-GGAAGTACCACCACCG-5'
c51674_g1_i1	F: 5'-GGACTCTGCTCATTCA-3' R: 3'-GGACTCTGCAGGGCAGG-5'
$\beta$ -actin	F: 5'-GGGAGTATGTTGTTGATGG-3' R: 3'-CCATTGACACGGTATTGTG-5'

均长度为 945 bp; N50 值为 1 888。上述结果表明测序结果较好, 所获得的 unigene 序列较长。本次所测大弹涂鱼皮肤转录原始数据已上传 SRA (Sequence Read Archive) 数据库, 编号为 SRR3937968。

### 2.2 功能注释

将上述 unigene 分别在 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、GO 数据库进行序列比对搜索, 获得期望值  $E < 1.00E-05$  的比对结果分别为 51 266、39 525、32 586、12 303、13 925 个。其中, 大弹涂鱼皮肤转录组的 unigene 在 NR 库搜索过程中所匹配的基因序列主要来自同为硬骨鱼类的雀鲷(*Stegastes partietis*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、斑马鱼(*Maylandia zebra*) 等鱼类物种。75% 的序列比对结果其序列相似性在 80% 以上。

采用软件 blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) 开展基因注释分析。将大弹涂鱼皮肤组织的 unigene 在 GO 数据库中进行序列比对搜索, 在分子功能(molecular function)、细胞成分(cellular component)和生物过程(biological process)3 个方面共获得 13 925 个搜索结果(图 1)。其中, 在分子功能方面分布最多的 unigene 是 binding、catalytic activity 以及 transporter activity 的基因; 在细胞成分方面, 数量最多的是 cell、cell part 以及 membrane 相关基因; 在生物过程方面, 参与 cellular process、single-organism process 和 metabolic process 的 unigene 所占比例最大。

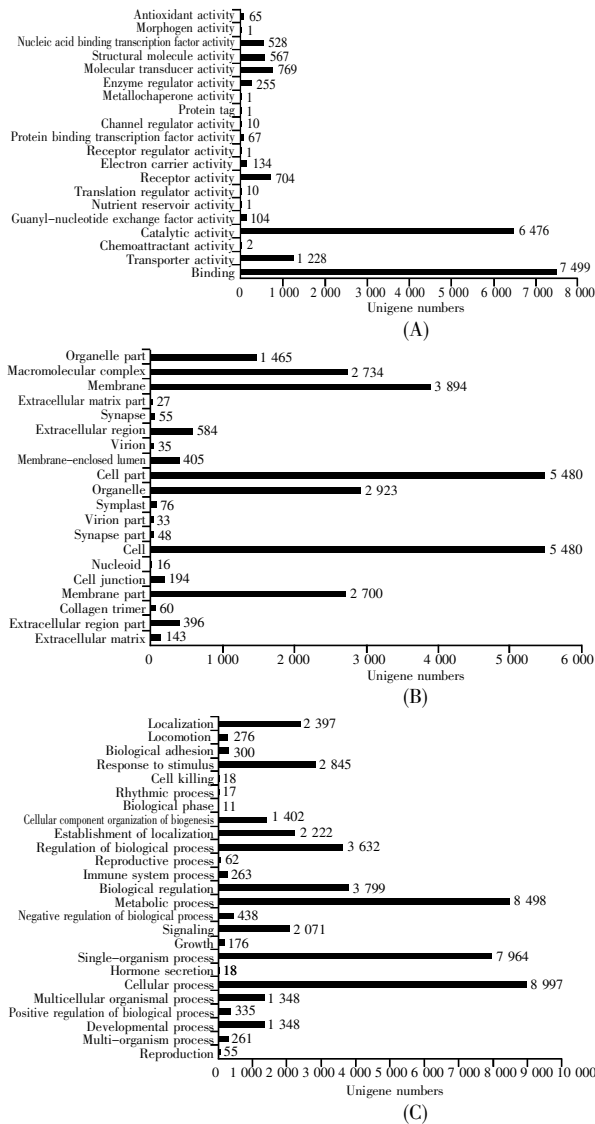


图 1 大弹涂鱼皮肤转录组 unigene 的 GO 分类 (A) 分子功能; (B) 细胞成分; (C) 生物过程。  
**Fig.1 GO classification of the skin unigene library of *B. pectinirostris*** (A) Molecular function; (B) Cellular component; (C) Biological process.

大弹涂鱼皮肤组织 unigene 经与 COG 数据库进行比对后, 共获得 12 303 个搜索结果, 可归属于 25 个大类(图 2)。其中 unigene 数量最多的为 general function prediction only, 达 1 315 条, 占比为 16.15%; 其余依次为: signal transduction mechanisms, 共计 844 条, 占比为 10.37%; posttranslational modification/protein turnover/chaperones, 共计 648 条, 占比为 7.96%; translation/ribosomal structure and biogenesis, 共计 568 条, 占比为 6.97%。此外, 有 386 条 unigene 被归属为未知功能类, 占 4.74%。

大弹涂鱼皮肤组织 unigene 经与 KEGG 数据库进行比对后, 共 32 586 个 unigene 获得注释,

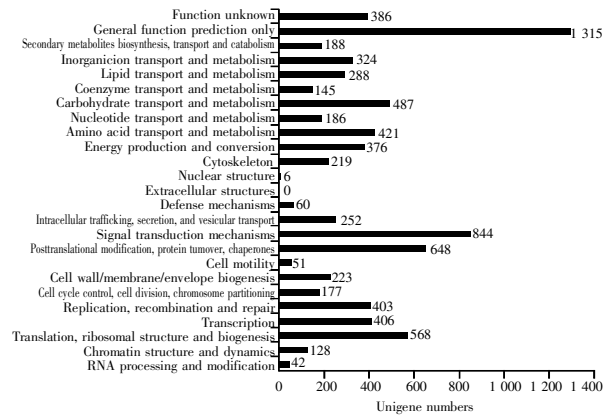


图 2 大弹涂鱼皮肤转录组 unigene 经 COG 分类  
**Fig.2 COG function classification of the skin unigene library of *B. pectinirostris***

涉及到 374 种代谢途径。其中, unigene 数量最多的 10 个代谢途径见图 3, 涉及新陈代谢、二级代谢产物合成、癌症、PI3K-Akt 信号通路、抗体合成、细胞内吞等。

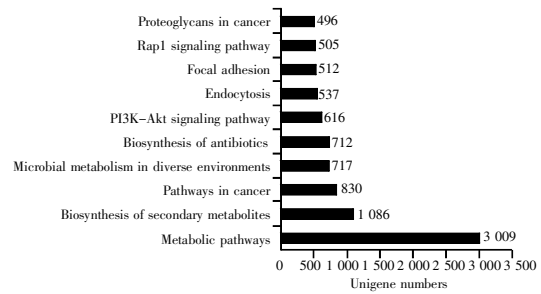


图 3 大弹涂鱼皮肤转录组 unigene 经 KEGG 库注释后表达最高的 10 个代谢通路  
**Fig.3 Top 10 KEGG pathways with high-abundance expression in the skin unigene library from *B. pectinirostris***

### 2.3 抗菌肽基因的筛选与组织表达差异性分析

根据大弹涂鱼皮肤转录组的注释信息, 从中筛选到与其他物种抗菌肽基因具有较高相似序列的 unigene 共计 7 条(表 2)。其中, c3062\_g1\_i1 和 c3062\_g1\_i2 与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)防御素高度同源; c51384\_g1 和 c80636\_g1 分别与与小口黑鲈(*Micropterus dolomieu*)抗菌肽 hepcidin-2 和拟丽斑马鱼(*Maylandia zebra*)抗菌肽 hepcidin-1 高度同源; c21735\_g1 与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)抗菌肽 piscidin 高度同源; c46663\_g1 和 c51674\_g1 分别与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)抗菌肽 NK-lysin 及牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肝表达抗菌肽高度同源。7 条大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因编码的前体蛋白质长度在 57~141 个氨基酸残基之间; 经 SignalP 软件预测, 均含有信号肽(表 2 下划线区域), 信号肽长度在 20~28 个氨基酸残基之间, 表

明上述抗菌肽基因编码产物均为分泌蛋白质。

表2中大弹涂鱼抗菌肽基因的组织表达分析结果见图4。不同基因在不同组织中的表达情况有所区别,其中,c3062\_g1\_i1、c3062\_g1\_i2、c80636\_g1\_i1呈组成型表达特征,即在所检测的6种组织中均有表达;而其他基因则存在组织表达差异。例如:c51384\_g1\_i1主要表达于皮肤、腮、脾和肾组织,在肌肉和肝脏中未检测到;C21735\_g1\_i1主要表达在皮肤、肌肉、肝和肾组织,在腮和脾中未检测到(图4)。尽管如此,图4的结果显示,文中所筛选出的7条大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因在皮肤组织中均有表达,说明上述基因的编码产物均参与了大弹涂鱼皮肤抗菌肽的分子组成,为大弹涂鱼提供了免疫防御功能。

#### 2.4 抗菌肽基因的序列比对和进化树分析

根据上述7条基因所编码前体蛋白质的BLAST序列搜索结果,筛选序列相似性在50%以上的同源序列(所用同源序列及物种名称见表3)进行多序列比对,并开展进化树分析,结果分别见图5和图6。由图5可见,这7条大弹涂鱼皮肤抗

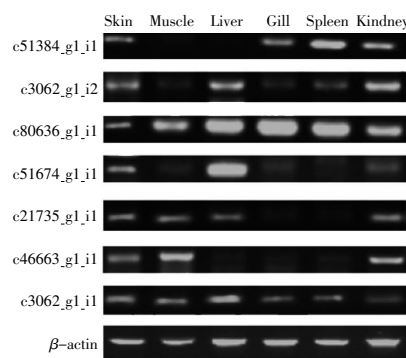


图4 大弹涂鱼皮肤7条抗菌肽 unigene 在6种组织中的表达差异

Fig.4 Differential expression of 7 antimicrobial peptide-related unigenes of *B. pectinirostris* skin in six tissues

菌肽基因与其他鱼类的已知抗菌肽基因均具有较高的序列相似性,表明其可能具有共同的分子起源。在进化树分析结果(图6)中,大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因主要位于进化树顶端,其进化距离较长。从聚类情况来看,大弹涂鱼因本身属于鲈形目,因此其皮肤抗菌肽多数与鲈形目同源基因具有较强的亲缘关系,如c3062\_g1\_i1、c3062\_g1\_i2、

表2 大弹涂鱼皮肤转录组经筛选后与已知抗菌肽同源的 unigene 编码多肽

Table 2 Unigene-coded peptides homologous with reported antimicrobial peptides in the skin unigene library of *B. pectinirostris*

Unigene	Length/bp	Protein sequence from ORF	GI No.	Description	E-value	Similarity/(%)
c3062_g1_i1	279	<u>MKGLSFVLLVLLLMPDGE</u> GTDPPEM QYWTCGYRGLCRRFCYAQEYFVGH HGCPRRYRCAIRA*	gil299507652	Beta-defensin [ <i>Oplegnathus fasciatus</i> ]	9.00E-28	86
c3062_g1_i2	207	<u>MKGLSFVLLVLLLMPDGE</u> GTDPPEM QYWTCGYRGLCRRFCYAQEYFVGH HGCPRRYR*	gil299507652	Beta-defensin [ <i>Oplegnathus fasciatus</i> ]	1.00E-24	86
c51384_g1_i1	400	<u>MKTVRVAAAVALLFAFVWIQ</u> ESSAQ ADAQMEEMEGPEDVDIPVELKVEEV SVDAMTSPSYRSRAKRLKCKLRCRL*	gil187480783	Hepcidin-2 [ <i>Micropterus dolomieu</i> ]	6.00E-18	71
c80636_g1_i1	400	<u>MRAFSIAVAVTLVLA</u> FVCFVEALPFA GVPEPEEAGSNDTPVAAYPDMLAQL MMPGHVREKRQSHLSMCRWCCNC CRGNKCGPCKF*	gil498985636	Hepcidin-1-like [ <i>Maylandia zebra</i> ]	4.00E-35	88
c21735_g1_i1	341	<u>MKLTLMFLVFGMVVMAE</u> PGEFFH KIIQGVGRVHGVFQKDRADDQDL QMYMDKQDYDPDAPNTSK*	gil461495559	Piscidin [ <i>Oplegnathus fasciatus</i> ]	9.00E-07	67
c46663_g1_i1	556	<u>MDRSSLVVL</u> CVLLSCSVVMVQKCV AIDDQNNQKAEVSETKLPVCWAC KWALNNVKKIIGNNATAESIKAKLLA VCKNIGLLKSLCQKFVNKHLGVLIIE LTTDDVVRTICVRTKACKPKEVLYYN SPAEIFSGDDVDE*	gil410898539	Antimicrobial peptide NK-lysin-like [ <i>Takifugu rubripes</i> ]	5.00E-41	81
c51674_g1_i1	758	<u>MDQKLW</u> SLRKAALLLVWTLIIQQIS AGPVVPAGGPDSPVPAQSQVRTLRRRT ARMTPLWRILNSKPFAYCQNNYEC STGLCRAGFCATMHRSATVSVTN*	gil182636874	Liver-expressed antimicrobial peptide-2 [ <i>Paralichthys olivaceus</i> ]	7.00E-24	74

注: 预测信号肽区域用下划线标出,\*代表终止密码子。

Notes: The predicted signal peptides are underlined. \* denotes the termination codon.

c21735\_g1\_i1 和 c80636\_g1\_i1 等与鲈形目同源基因聚为一支(图 6)。但也有部分大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因与其他非鲈形目同源基因具有较高相似度,如 c51384\_g1\_i1 与鲟形目同源基因聚为一支; c46663\_g1\_i1 与鲇形目同源基因聚为一支;而 c51674\_g1\_i1 则主要与鲾形目同源基因聚为一支(图 6),表明大弹涂鱼的皮肤抗菌肽基因在进化过程中出现了分化。

### 3 讨论

大弹涂鱼作为一种营两栖生活的鱼类,其皮

肤组织抗菌肽是研究鱼类进化到两栖类的过程中抗菌肽分子进化的一个极好样本。目前,针对大弹涂鱼皮肤抗菌肽的研究尚不多见,仅 Li 和 Chen 等人分别报道了大弹涂鱼 hepcidin 和 LEAP-2 的基因序列及功能<sup>[8,9]</sup>。为深入研究大弹涂鱼皮肤抗菌肽的分子组成及多样性特征,结合新一代 Illumina 测序技术的高准确性、高通量、高灵敏度和低运行成本等突出优势,采用 Hiseq 4000 System 平台以及 *de novo* 组装策略构建了大弹涂鱼皮肤组织的转录组数据库,从中获得 unigene 共计 119 848 条。该数据库为深入研究大弹涂鱼皮肤粘液

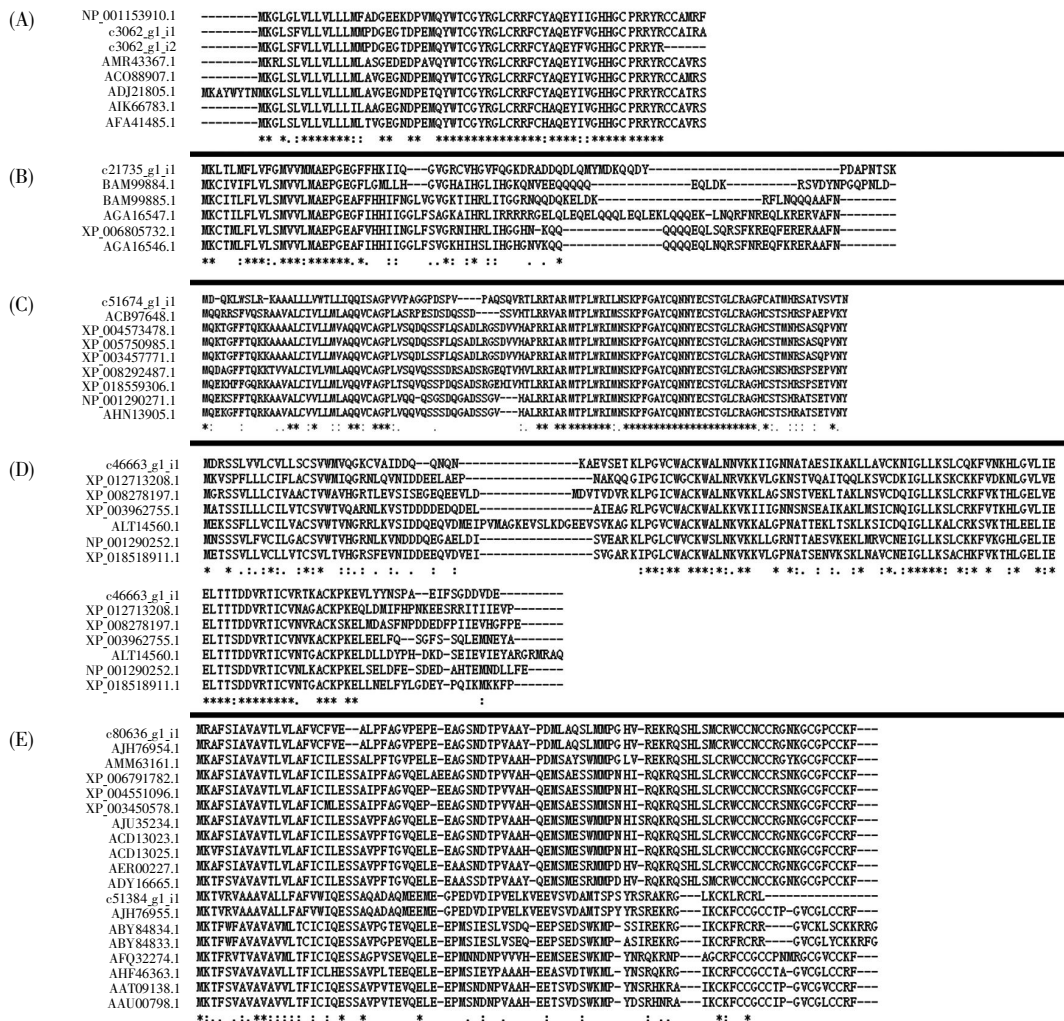


图 5 大弹涂鱼皮肤转录组 unigene 编码抗菌肽与鱼类已知抗菌肽的序列比对

(A) c3062\_g1\_i1、c3062\_g1\_i2 及其同源基因的多序列比对; (B) c21735\_g1\_i1 及其同源基因的多序列比对; (C) c51674\_g1\_i1 及其同源基因的多序列比对; (D) c46663\_g1\_i1 及其同源基因的多序列比对; (E) c80636\_g1\_i1 和 c51384\_g1\_i1 及其同源基因的多序列比对。“\*”代表相同的氨基酸;“:”和“.”代表相似氨基酸;“-”代表序列中间隙。用于多序列比对的同源基因名称及来源物种见表 3。

Fig.5 Sequence alignment of antimicrobial peptides encoded by the skin unigenes of *B. pectinirostris* with the reported sequences of antimicrobial peptides from other fishes

(A) c3062\_g1\_i1 and i2; (B) c21735\_g1\_i1; (C) c51674\_g1\_i1; (D) c46663\_g1\_i1; (E) c80636\_g1\_i1 and c51384\_g1\_i1. “\*” represents the identical amino acid; “:” and “.” represent similar amino acids; “-” represents the gaps inserted in the sequence. The homologs used for multiple sequence alignment are listed in Table 3.

表3 用于大弹涂鱼皮肤转录组7条 unigene 多序列比对和进化树分析的同源基因编码多肽  
 Table 3 The homologous peptides used for multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis of the 7 unigenes from *B. pectinirostris* skin transcriptome

Unigene	Acc. Ver.	Name of homologs	Species
c3062_g1_i1	AIK66783.1	Beta-defensin	<i>Liza haematocheila</i> 鲃鱼
c3062_g1_i2	AC088907.1	Beta-defensin	<i>Siniperca chuatsi</i> 鳊鱼
	AFA41485.1	Beta-defensin	<i>Epinephelus coioides</i> 点带石斑鱼
	ADJ21805.1	Beta-defensin	<i>Oplegnathus fasciatus</i> 条石鲷
	NP_001153910.1	Beta-defensin	<i>Oryzias latipes</i> 青鳉
	AMR43367.1	Beta-defensin	<i>Nothobranchius guentheri</i> 贡氏圆尾鲂
c21735_g1_i1	BAM99884.1	Piscidin	<i>Oplegnathus fasciatus</i> 条石鲷
	BAM99885.1	Moronecidin	<i>Oplegnathus fasciatus</i> 条石鲷
	XP_006805732.1	Moronecidin-like	<i>Neolamprologus brichardi</i> 布氏新亮丽鲷
	AGA16546.1	Piscidin-3	<i>Oreochromis niloticus</i> 罗非鱼
	AGA16547.1	Piscidin-4	<i>Oreochromis niloticus</i> 罗非鱼
c46663_g1_i1	XP_003962755.1	NK-lysin-like	<i>Takifugu rubripes</i> 红鳍东方鲀
	NP_001290252.1	NK-lysin-like	<i>Larimichthys crocea</i> 大黄鱼
	XP_018518911.1	NK-lysin-like	<i>Lates calcarifer</i> 尖吻鲈
	XP_008278197.1	NK-lysin-like	<i>Stegastes partitus</i> 深裂眶锯雀鲷
	XP_012713208.1	NK-lysin-like	<i>Fundulus heteroclitus</i> 底鳉
	ALT14560.1	NK-lysin	<i>Hyporthodus septemfasciatus</i> 七带石斑鱼
c51384_g1_i1	AJH76955.1	Hepcidin-2	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i> 大弹涂鱼
c80636_g1_i1	AHF46363.1	Hepcidin	<i>Amatitlania nigrofasciata</i> 黑带娇丽鱼
	ABY84834.1	Hepcidin	<i>Gymnodraco acuticeps</i> 尖头裸龙躄
	AAT09138.1	Hepcidin-like	<i>Lateolabrax japonicus</i> 花鲈
	AAU00798.1	Hepcidin-5	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> 黑棘鲷
	ABY84833.1	Hepcidin	<i>Dissostichus mawsoni</i> 南极美露鲑
	AFQ32274.1	Hepcidin	<i>Chlorophthalmus bicornis</i> 双角青眼鱼
	AJH76954.1	Hepcidin-1	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i> 大弹涂鱼
	AMM63161.1	Hepcidin	<i>Bostrychus sinensis</i> 中华乌塘鳢
	XP_004551096.1	Hepcidin	<i>Maylandia zebra</i> 拟丽斑马鱼
	AER00227.1	Hepcidin	<i>Alphestes immaculatus</i> 无斑鸳鸯鲷
	XP_003450578.1	Hepcidin	<i>Oreochromis niloticus</i> 罗非鱼
	ADY16665.1	Hepcidin 5	<i>Epinephelus moara</i> 云纹石斑鱼
	ACD13023.1	Hepcidin-1	<i>Micropterus salmoides</i> 大口黑鲈
	AJU35234.1	Hepcidin-1	<i>Dicentrarchus labrax</i> 鲈鱼
	XP_006791782.1	Hepcidin-1	<i>Neolamprologus brichardi</i> 布氏新亮丽鲷
	ACD13025.1	Hepcidin-1	<i>Micropterus dolomieu</i> 小口黑鲈
c51674_g1_i1	XP_018559306.1	LEAP-2	<i>Lates calcarifer</i> 尖吻鲈
	NP_001290271.1	LEAP-2	<i>Larimichthys crocea</i> 大黄鱼
	AHN13905.1	LEAP-2	<i>Miichthys miiuy</i> 鳊鱼
	ACB97648.1	LEAP-2	<i>Paralichthys olivaceus</i> 牙鲆
	XP_005750985.1	LEAP-2	<i>Pundamilia nyererei</i> 红丽鱼
	XP_003457771.1	LEAP-2	<i>Oreochromis niloticus</i> 罗非鱼
	XP_004573478.1	LEAP-2	<i>Maylandia zebra</i> 拟丽斑马鱼
	XP_008292487.1	LEAP-2	<i>Stegastes partitus</i> 深裂眶锯雀鲷

的蛋白质组成以及皮肤抗菌肽的分子多样性奠定了基础。从这些 unigene 的注释结果中,我们筛选出7条与已知鱼类抗菌肽具有较高相似度的大弹涂鱼皮肤抗菌肽基因,分别与5种鱼类抗菌肽家族的代表成员具有较高序列相似度(表2)。但其他鱼类抗菌肽家族成员的同源序列未能在大弹涂鱼皮肤转录组数据中发现,推测可能是由于部分鱼类抗菌肽家族在其他组织中表达,而在皮肤组织中不表达或者表达量极低所导致。

鱼类皮肤不仅是介于鱼体与外界环境之间的

一道物理屏障,同时也是一个多功能的器官,其生物学功能涵盖免疫防御、细胞通讯、感觉传导、运动、呼吸、离子调节等<sup>[10]</sup>。鱼类皮肤通过分泌富含多种与免疫防御有关的分子黏液,其中包含抗菌肽、免疫球蛋白、补体分子、C-反应蛋白、蛋白酶、凝集素、裂解酶等多种蛋白质,从而形成了一套完善的免疫防御体系<sup>[2, 11-14]</sup>。抗菌肽作为一种主动防御分子,在鱼类皮肤黏液的免疫防御功能中占据着最重要的地位。目前,在鱼类皮肤中鉴定到的抗菌肽分子多数是通过基因克隆的方法来鉴

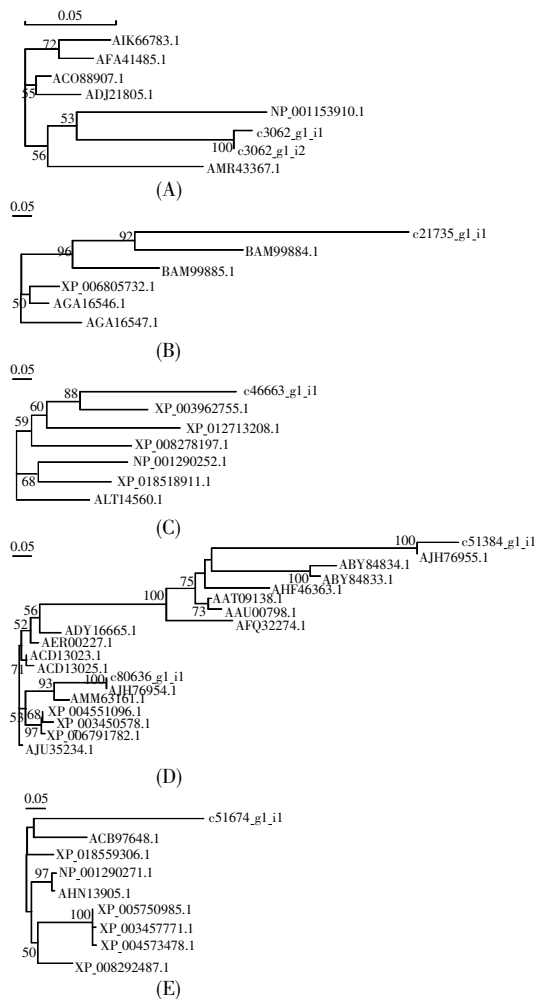


图 6 大弹涂鱼皮肤转录组中 7 条抗菌肽基因与其同源序列的进化树分析

(A) c3062\_g1\_i1 和 i2; (B) c21735\_g1\_i1; (C) c46663\_g1\_i1; (D) c80636\_g1\_i1 和 c51384\_g1\_i1; (E) c51674\_g1\_i1。用于进化树分析的同源基因名称及来源物种见表 3。

Fig.6 Phylogenetic analysis of antimicrobial peptide-coding unigenes from *B. pectinirostris* skin transcriptome

(A) c3062\_g1\_i1 and i2; (B) c21735\_g1\_i1; (C) c46663\_g1\_i1; (D) c80636\_g1\_i1 and c51384\_g1\_i1; (E) c51674\_g1\_i1. The homologs used for phylogenetic analysis are listed in Table 3.

定<sup>[15]</sup>, 主要包括  $\beta$ -defensin 家族、piscidin 家族、肝表达抗菌肽家族(包括 hepcidin 和 LEAP-2)以及 cathelicidin 家族等<sup>[2]</sup>, 其蛋白质分子的主要结构特点在于富含二硫键, 且空间结构以  $\alpha$ -螺旋为主, 在功能上主要表现为广谱的抗菌活性<sup>[2]</sup>。

鱼类  $\beta$ -defensin 在分子结构及功能方面类似于哺乳动物的  $\beta$ -defensin, 最早鉴定自斑马鱼 *Danio rerio* 以及河豚 *Takifugu rubripes*<sup>[16]</sup>。鱼类  $\beta$ -defensin 通常在其序列中含有一段由 18~24 个氨基酸残基所组成的信号肽, 以及一段由 39~45 个氨基酸残基所组成的成熟肽, 其成熟肽的相对分子质量在 4~6 kD 之间。同时, 序列中还包括 6 个保

守的半胱氨酸并形成 3 对二硫键; 此外, 鱼类  $\beta$ -defensin 在序列中存在一段保守的-CPRRYK / R-模体结构(图 5A)。本研究从大弹涂鱼皮肤转录组序列中鉴定到两种  $\beta$ -defensin, 分别由 63 个(c3062\_g1\_i1)和 57 个(c3062\_g1\_i2)氨基酸残基组成。两者均含有一段由 20 个氨基酸残基所组成的预测信号肽序列(表 2)。此外, 两者序列中均含有 CPRRYR 保守区域(图 5)。与 c3062\_g1\_i1 相比, c3062\_g1\_i2 的成熟肽序列在 C 端出现截短现象, 缺失了包括双联半胱氨酸在内的 CCAIRA 肽段。以上信息提示大弹涂鱼的  $\beta$ -defensin 可能存在基因编辑现象并导致出现不同的变体。

Piscidin 是鱼类抗菌肽的一个重要家族, 包括 piscidin、pleurocidin、moronecidin、misgurin、epinecidin、gaduscidin 等多个成员<sup>[17-19]</sup>。Piscidin 通常由 64~89 个氨基酸残基所组成, 其前体序列中包括一段位于 N 端的信号肽区和一段位于 C 端的成熟肽后区(prodomain), 其成熟肽通常为 18~26 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约 2.5 kD<sup>[20, 21]</sup>。大弹涂鱼皮肤转录组中的 c21735\_g1\_i1 基因由 68 个氨基酸残基所组成, 其 N 端存在一段由 23 个氨基酸残基所组成的预测信号肽, 该信号肽区域与其他鱼类的 piscidin 具有较高相似性, 但成熟肽区域则差异较大(图 5)。Fernandes 等<sup>[22]</sup>曾推测, 不同鱼类的 piscidin 在进化过程中存在正选择现象, 这与鱼类为适应环境中微生物多样性, 特别是致病微生物的变化是相一致的, 也因此造成不同鱼类的 piscidin 家族成员在成熟肽区的序列差异性较大。

Hepcidin 是鱼类中最重要的抗菌肽之一, 且在大多数脊椎动物中, 包括人体内也有报道<sup>[23, 24]</sup>。鱼类 hepcidin 的前体序列通常包括 3 个区段, 分别是位于 N 端的由 22~24 个氨基酸残基组成的信号肽、40~47 个氨基酸残基组成的信号肽后区(proregion), 以及 20~26 个氨基酸残基组成的成熟肽区, 其成熟肽区通常含有 6~8 个半胱氨酸并形成 3~4 对二硫键<sup>[25-27]</sup>。在本研究的大弹涂鱼皮肤转录组中, 我们鉴定到两种 hepcidin 编码基因, 其中, c51384\_g1\_i1 编码的前体蛋白质序列较短, 由 76 个氨基酸残基组成, 其预测信号肽含 25 个氨基酸残基; 而 c80636\_g1\_i1 编码的前体蛋白质序列较长, 由 88 个氨基酸残基组成, 其预测信号肽由 23 个氨基酸残基组成。根据 c51384\_g1\_i1、c80636\_g1\_i1 与其他鱼类 hepcidin 的序列比对及



进化树分析来看,两者应分属于不同的 hepcidin 家族。其中 c80636\_g1\_i1 为 hepcidin-1 家族,而 c51384\_g1\_i1 为 hepcidin-2 家族(图 6),两者在半胱氨酸的分布特征方面具有明显差异(图 5)。

NK-lysin 是一种由细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T-lymphocytes, CLT)和自然杀伤淋巴细胞(natural killer lymphocytes, NKL)分泌的抗菌肽,对细菌及肿瘤细胞均具有较强的抑制作用<sup>[28-30]</sup>。NK-lysin 通常在序列中含有 6 个半胱氨酸并形成 3 对二硫键,被认为是粒溶素(granulysin)的同源蛋白,属于皂溶素蛋白(saposin-like protein)家族的成员<sup>[31]</sup>。其功能主要是针对微生物的细胞膜,通过打孔机制破坏细胞膜结构而发挥抑菌作用<sup>[31]</sup>。NK-lysin 在脊椎动物中广泛分布,鱼类的 NK-lysin 目前报道不多,主要发现于斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)以及斑马鱼(*Danio rerio*)等<sup>[32-34]</sup>。大弹涂鱼 c46663\_g1\_i1 所编码的 NK-lysin 前体蛋白质由 141 个氨基酸残基组成,含一段 23 个氨基酸残基组成的信号肽序列。与其他鱼类 NK-lysin 前体蛋白质(通常由 100~120 个氨基酸残基组成)相比,大弹涂鱼 NK-lysin 序列较长,且在 C 端具有一段富含酸性氨基酸的肽段(表 2),表明其在进化过程中具有特殊地位。

LEAP-2 最早于 2003 年发现于人体血细胞,是一种含有 4 个半胱氨酸并形成两对二硫键的抗菌肽<sup>[35-37]</sup>。由于该抗菌肽主要由肝脏表达,且鱼类 hepcidin 抗菌肽早期被称为肝表达抗菌肽-1 (LEAP-1),因此而得名。目前,人们在多种硬骨鱼类中发现了 LEAP-2 的存在,包括虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、鳊鱼(*Miichthys miiuy*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)以及香鱼(*Plecoglossus altivelis*)等<sup>[38-43]</sup>。鱼类 LEAP-2 的前体序列通常由 80~100 个氨基酸残基组成,包括一段 22~28 个氨基酸残基组成的信号肽区,一段 12~33 个氨基酸残基组成的信号肽后区,其成熟肽区通常由 32~46 个氨基酸残基组成。大弹涂鱼 LEAP-2 基因(c51647\_g1\_i1)编码一段由 100 个氨基酸残基组成的前体蛋白质,包括 N 端 28 个氨基酸残基组成的信号肽,其分子序列与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 LEPA-2 (ACB97648.1)具有 74% 的序列相似性(图 5)且在进化树中聚为一支,表明大弹涂鱼 LEAP-2 基因与鲽形目同源基因具有较近的

亲缘关系。

鱼类皮肤抗菌肽研究不仅有助于探明鱼类免疫防御分子机制,同时也对开发新型生物抗生素具有重要意义。大弹涂鱼作为一种可以营两栖生活的特殊鱼类,其皮肤抗菌肽在分子进化研究方面具有特殊意义。本研究开展了大弹涂鱼皮肤组织的转录组深度测序,所构建的大弹涂鱼皮肤转录组数据库为后续开展大弹涂鱼皮肤黏液的蛋白质组学鉴定,以及从中发现和筛选重要的大弹涂鱼皮肤抗菌肽奠定了基础。

### 参考文献(References):

- [1] Katzenback B A. Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in teleosts[J]. *Biology*, 2015, 4: 607-639.
- [2] Esteban M Á. An overview of the immunological defenses in fish skin[J]. *ISRN Immunology*, 2012, 2012(3-4): 853470.
- [3] Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: D933-D937.
- [4] Ladram A, Nicolas P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises[J]. *Frontiers in Bioscience, Landmark*, 2016, 21: 1341-1371.
- [5] Erlich Y, Mitra P P, Bastide M, et al. Alta-cyclic: a self-optimizing base caller for next-generation sequencing[J]. *Nature Methods*, 2008, 5: 679-682.
- [6] Cock P J, Fields C J, Goto N, et al. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(6): 1767-1771.
- [7] Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez J M, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [8] Li Z, Hong W S, Qiu H T, et al. Cloning and expression of two hepcidin genes in the mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) provides insights into their roles in male reproductive immunity[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 56: 239-247.
- [9] Chen J, Chen Q, Lu X J, et al. The protection effect of LEAP-2 on the mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) against *Edwardsiella tarda* infection is associated with its immunomodulatory activity on monocytes/macrophages[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 59: 66-76.
- [10] Marshall W S, Bellamy D. The 50 year evolution of *in vitro* systems to reveal salt transport functions of teleost fish gills[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 155(3): 275-280.
- [11] Whyte S K. The innate immune response of finfish a review of current knowledge[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(6): 1127-1151.
- [12] Palaksha K J, Shin G W, Kim Y R, et al. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(4): 479-488.

- [13] Fast M D, Sims D E, Burka J F, *et al.* Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 132(3): 645–657.
- [14] Yano T. Non-specific Immune System: Humoral Defence[M]// Iwama G, Nakanishi T. *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. San Diego: Academic Press, 1996: 105–157.
- [15] Massosilva J A, Diamond G. Antimicrobial peptides from fish[J]. *Pharmaceuticals*, 2014, 7(3): 265–310.
- [16] Zou J, Mercier C, Koussounadis A, *et al.* Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4): 638–647.
- [17] Sun B J, Xie H X, Song Y, *et al.* Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(6): 335–343.
- [18] Pan C Y, Chen J Y, Ni I H, *et al.* Organization and promoter analysis of the grouper (*Epinephelus coioides*) epinecidin-1 gene[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 150(4): 358–367.
- [19] Browne M J, Feng C Y, Booth V, *et al.* Characterization and expression studies of Gaduscidin-1 and Gaduscidin-2; paralogous antimicrobial peptide-like transcripts from Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(3): 399–408.
- [20] Peng K C, Lee S H, Hour A L, *et al.* Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50263.
- [21] Cole A M, Darouiche R O, Legarda D, *et al.* Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2000, 44(8): 2039–2045.
- [22] Fernandes J M, Ruangsri J, Kiron V. Atlantic cod piscidin and its diversification through positive selection[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9501.
- [23] Krause A, Neitz S, Magert H J, *et al.* LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity[J]. *FEBS Letters*, 2000, 480(2–3): 147–150.
- [24] Park C H, Valore E V, Waring A J, *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 7806–7810.
- [25] Wang K J, Cai J J, Cai L, *et al.* Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide[J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 638–646.
- [26] Huang P H, Chen J Y, Kuo C M. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(8): 1922–1934.
- [27] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2005, 49(4): 1608–1612.
- [28] Andersson M, Gunne H, Agerberth B, *et al.* NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(8): 1615–1625.
- [29] Andersson M, Gunne H, Agerberth B, *et al.* NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 54(1–4): 123–126.
- [30] Lee S H, Lillehoj H S, Tuo W, *et al.* Parasiticidal activity of a novel synthetic peptide from the core alpha-helical region of NK-lysin[J]. *Veterinary Parasitology*, 2013, 197(1–2): 113–121.
- [31] Henriques S T, Tan C C, Craik D J, *et al.* Structural and functional analysis of human liver-expressed antimicrobial peptide 2[J]. *Chembiochem*, 2010, 11(15): 2148–2157.
- [32] Wang Q, Bao B, Wang Y, *et al.* Characterization of a NK-lysin antimicrobial peptide gene from channel catfish[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(3): 419–426.
- [33] Hirono I, Kondo H, Koyama T, *et al.* Characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NK-lysin, an antimicrobial peptide[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 567–575.
- [34] Zhang M, Long H, Sun L. A NK-lysin from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(3–4): 258–265.
- [35] 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.
- [36] Howard A, Townes C, Milona P, *et al.* Expression and functional analyses of liver expressed antimicrobial peptide-2 (LEAP-2) variant forms in human tissues[J]. *Cell Immunology*, 2010, 261(2): 128–133.
- [37] Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, *et al.* Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2[J]. *Peptides*, 2010, 31(1): 58–66.
- [38] Li H X, Lu X J, Li C H, *et al.* Molecular characterization of the liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*: antimicrobial activity and molecular mechanism[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 65(2): 406–415.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Li H X, Lu X J, Li C H, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of two distinct liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 38(2): 330–339.
- [42] Liu T, Gao Y, Wang R, *et al.* Characterization, evolution and functional analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in miiuy croaker[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 191–199.
- [43] Yang G, Guo H, Li H, *et al.* Molecular characterization of LEAP-2 cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and the differential expression upon a *Vibrio anguillarum* stimulus; indications for a significant immune role in skin[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 37(1): 22–29.