

## 鳊 hepcidin cDNA 的分子克隆及序列分析

刘碧莲<sup>1,2</sup>, 白俊杰<sup>1</sup>, 劳海华<sup>1</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 简清<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东广州 510380; 2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:** Hpcidin 是近年来发现的一类具有独特性质的抗菌肽, 根据 GenBank 中收录的鱼类抗菌肽 hepcidin 的 cDNA 序列设计一对简并引物, 用 RT-PCR 方法从鳊 (*Siniperca chuatsi*) 肝脏组织中克隆到 hepcidin 的 cDNA, 并构建 pMD18-T-hepcidin 载体进行序列测定和分析。结果表明, 该 cDNA 长为 381 bp, 其中第 20~277 位是该基因的开放阅读框 (ORF), 编码 86 个氨基酸, 形成由信号肽 (24 个残基)、前肽 (42 个残基) 和成熟肽 (20 个残基) 3 部分序列组成的前体肽, 与已报道的其他鲈形目鱼类 hepcidin 相比较, 核苷酸序列的同源性为 72.2%~92.0%, 所推导的成熟肽与包括人类在内的其他生物 hepcidin 成熟肽的同源性在 50%~86.4%, 都含有 8 个保守的 cys 残基, 可形成 4 个链内二硫键。鳊 hepcidin cDNA 片段的获得为以后的重组表达奠定了实验基础, 也为抗菌肽 hepcidin 家族找到了新的成员。[中国水产科学, 2006, 13(6): 995-1000]

**关键词:** 抗菌肽; hepcidin; 鳊; cDNA 克隆; 序列分析

**中图分类号:** Q959.483 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)06-0995-06

近几十年, 国内外学者已在多种生物体发现并分离了 2 000 多种抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs)<sup>[1]</sup>, 它们对真菌<sup>[2-3]</sup>、原虫<sup>[4]</sup>、某些病毒 (如流感病毒、疱疹病毒、艾滋病病毒)<sup>[5]</sup> 和一些肿瘤细胞<sup>[6]</sup> 也有明显的杀伤作用。由于抗菌肽的作用机理不同于抗生素, 对真核细胞几乎没有作用<sup>[4]</sup>, 也不会使机体产生耐药性, 被认为是天然免疫的重要介质。有关鱼类抗菌肽或类似抗菌肽物质的报道证明, 抗菌肽对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、霉菌、螺旋体等病原菌均具有很强的杀伤活性<sup>[7-14]</sup>, 可望成为水产养殖业新的饲料添加剂、浸泡或口服药物, 具有广阔的应用前景。

Hepcidin (hepatic bactericidal protein, Hpc) 是一种由肝脏合成的小分子肽, 参与铁代谢, 是调节铁代谢的重要分子, 目前被认为是调节维持铁稳态极其重要的负激素<sup>[15]</sup>, 与许多富含半胱氨酸的抗菌肽类似, 具有显著的广谱抗菌活性<sup>[16-17]</sup>。其基因序列和蛋白结构在不同物种间高度保守, 均富含精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys) 等带正电的氨基酸残基和 8 个半胱氨酸残基 (Cys), 有独特的二硫键结构, 属防御素 (defensin) 蛋

白家族<sup>[17]</sup>。2000 年 Krause 等<sup>[16]</sup> 首次在人类血浆检测到 hepcidin。同年, Park 等<sup>[17]</sup> 在人类肝脏中发现 hepcidin, 并从尿道分离到该物质。2002 年 Shike 等首次从杂交条纹鲈的鳃分离出鱼类 hepcidin<sup>[18]</sup>, 分子量约为 2.256 kD, 21 个氨基酸残基, 其中 8 个推导的半胱氨酸, 形成 4 个分子内二硫键, 并从金眼狼鲈 (*Morone chrysops*) 克隆到其 cDNA 及全基因序列。现已在鼠<sup>[19]</sup>、青鲷 (*Oryzias latipes*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[20-21]</sup>、美洲拟鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[22]</sup>、斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[23]</sup>、真鲷 (*Pagrus major*)<sup>[24]</sup>、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 和长鳍叉尾鲷 (*Ictalurus furcatus*)<sup>[25-26]</sup> 等都发现有 hepcidin mRNA。

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是经济价值很高的名贵经济鱼类, 在国际水产品市场上享有“淡水石斑”之誉, 但各种疾病的发生严重影响其产量<sup>[27-28]</sup>。本研究成功克隆 hepcidin 基因的 ORF 和 3' 端 cDNA 片段, 并推导出 hepcidin 蛋白的一级结构, 旨在为进一步研究 hepcidin 的功能及其开发应用奠定理论基础。

收稿日期: 2006-02-09; 修订日期: 2006-04-10.

基金项目: 国家科技基础条件平台工作项目 (2005DKA21103).

作者简介: 刘碧莲 (1980-), 女, 硕士, 从事鱼类功能基因研究. E-mail: liubilian@sohu.com

通讯作者: 白俊杰. Tel: 020-81616129; E-mail: jbjbai@163.net

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鳊1尾,鱼体质量400 g左右,从广州市芳村区茶滘市场购得。大肠杆菌DH<sub>5</sub>α由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 鳊肝脏总RNA的提取** 按照Promega公司SV Total RNA Isolation System试剂盒的方法提取鳊肝脏总RNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度。

### 1.2.2 鳊抗菌肽hepcidin cDNA克隆

#### (1)引物合成和cDNA扩增

根据在GenBank上登录的鲈形目鱼类hepcidin的cDNA序列的保守区域设计5'端引物P<sub>1</sub>和3'端巢式引物P<sub>2</sub>,用去离子双蒸水将两引物溶解至终浓度为20 μmol/L。3'端引物采用由试剂盒提供的M13 primer M4。

P<sub>1</sub>:5' - GCA GTC AAA CCC TC (C/T) TAA GAT G -3';

P<sub>2</sub>:5' - TCA TTG GCT CCT CC(A/G) G(C/T) T(C/T)TT -3';

M13 primer M4:5' - GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'。

按照TaKaRa公司RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1试剂盒的方法进行RT-PCR。反转录条件为50℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min;PCR扩增条件为:94℃预变性3 min后进行28个循环反应:94℃变性30 s,42℃退火30 s,72℃延伸1.5 min。循环结束后72℃延伸7 min。取5 μL PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,预计在约400 bp处有一条特异的扩增带。

#### (2)hepcidin cDNA的克隆与测序

根据北京天为时代的DNA凝胶回收试剂盒方法回收和纯化目的扩增片段。并以P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>为引物PCR验证回收产物。按T载体说明书将回收产物克隆到pMD 18-T载体,氯化钙转化法,将连接好的重组质粒pMD 18-T-hepcidin转化到大肠杆菌DH<sub>5</sub>α感受态细胞,通过蓝白斑筛选重组子,提取其质粒DNA,用EcoR I和Hind III双酶切鉴定出阳性质粒,再进行序列测定。

#### (3)序列分析

利用DNA分析软件Vector NTI 9.0以及国际互联网上有关生物信息网站如NCBI([\[ncbi.nlm.nih.gov\]\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov\)\)、ExpASy\(<http://www.expasy.org/>\)、SignalP 3.0 Server\(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>\)进行序列分析,内容包括核苷酸序列中ORF的寻找,编码氨基酸序列的推导及其保守结构域的预测。](http://www.</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

## 2 结果

### 2.1 鳊肝脏总RNA的提取

电泳检测所提鳊肝脏总RNA,可见28S和18S两条带,表明所获得的总RNA无明显的降解。

**2.1.2 鳊抗菌肽hepcidin cDNA的克隆** 鳊总RNA经RT-PCR扩增后,电泳检测到约400 bp的片段(含M13 primer M4的17个碱基),与预期长度相符。胶回收400 bp的片段后用P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>进行验证,电泳检测有130 bp的片段,与预期长度相符。经T/A克隆,提取质粒,双酶切得到1个含460 bp插入片段(含载体上的部分序列)的阳性质粒。

**2.1.3 测序结果及序列分析** 测序结果表明,插入片段序列长为398 bp(包括引物M13 primer M4的17个碱基),见图1。用Vector NTI 9.0分析可知ORF为258 bp编码86个氨基酸。与已报道的其他鲈形目鱼类hepcidin ORF序列相比较,同源率为72.2%~92%。将所推导的氨基酸序列提交SignalP 3.0 Server在线软件推断出信号肽的切割位点在Ala24和Val25之间,从而产生含24个氨基酸的信号肽。根据对金眼狼鲈(*Morone chrysops*)<sup>[18]</sup>和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[22]</sup>加工位点的分析,推测鳊hepcidin成熟肽是从Gln67开始的20个氨基酸QCRF-CCGCTPGVCGVCCRF。利用在线分子生物学软件ProtParam(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)预测其理论分子量为145.6 D,等电点pI约为8.23,含两个碱性氨基酸残基Arg,且富含Cys和Gly。信号肽与成熟肽之间的42个氨基酸则为hepcidin的前肽。

将推导的含20个氨基酸的hepcidin成熟肽氨基酸序列与GenBank数据库序列进行比较,结果显示,该序列与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、真鲷、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和金眼狼鲈的hepcidin氨基酸序列具有高度的同源性,相似性分别为86.4%、81.8%、66.7%、62.5%、62.5%和53.8%;与人和老鼠的相似性也较高,均为50%(图2),说明hepcidin在不同动物间有高度

的同源性。

### 3 讨论

与其他抗菌肽一样, hepcidin 也是以前体 (pre-propeptide) 的形式转录<sup>[29]</sup>, 最终以成熟肽 (mature peptide) 的形式贮存。前体含有一段信号肽 (signal

peptide), 其功能是使抗菌肽从胞内分泌出来。在信号肽和成熟肽之间还有一段序列称为前肽 (prodomain), 具有保护自身免受酶解及调节生物活性的作用。本实验所获得的鳊 hepcidin 的 cDNA 序列也具有相应的结构。

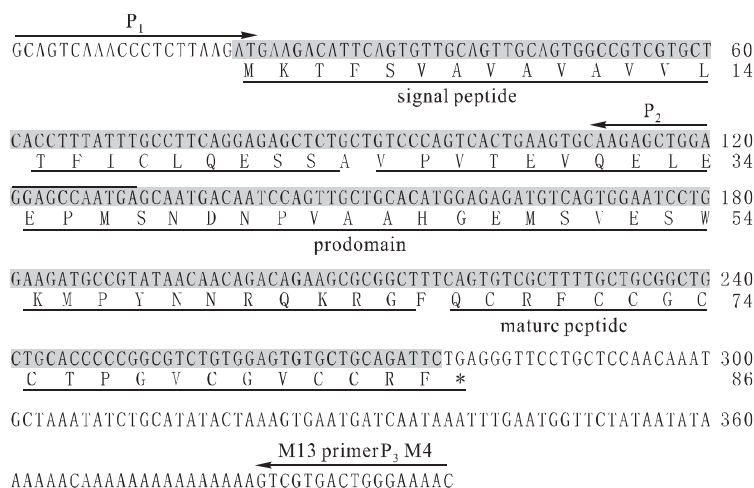


图1 鳊 hepcidin cDNA 序列和预测的氨基酸序列

阴影部分显示的是 ORF, 引物结合位点用箭头标注 (5'→3'), 信号肽、前肽、成熟肽分别用下划线表明, 终止子用星号 (\*) 表示。

Fig. 1 Nucleotide sequence of the mandarin fish hepcidin cDNA and the predicted amino acid sequence

The ORF is shown by shades. Binding sites for primers are shown with arrows (5'→3'). The predicted organization of the peptide domains (signal peptide, prodomain and mature peptide) is shown by bars. The stop codon is indicated with an asterisk (\*).

人 hepcidin 前体由 84 个氨基酸残基组成, 信号肽含 24 个氨基酸残基。金眼狼鲈和斑马鱼的 hepcidin 前体的信号肽切割位点都在 Ala24 和 Val25 之间<sup>[18,23]</sup>, 也含有 24 个氨基酸残基的信号肽。鳊 hepcidin 的 ORF 编码 86 个氨基酸的前体, 用分析软件推测出信号肽切割位点也在 Ala24 和 Val25 之间, 产生 24 个氨基酸的信号肽, 且具有典型的信号肽特征: 一个富含 Ala 和 Val 的疏水区。该信号肽序列与大菱鲃、真鲷完全一致, 与尼罗罗非鱼、金眼狼鲈、花鲈、黑鲷也只有 1~2 个氨基酸不同, 与已报道的其他鱼的同源性也很高。进一步证明 hepcidin 的信号肽序列在鱼类中是高度保守的。

信号肽被切除后余下的部分进一步加工形成成

熟的 hepcidin。人 hepcidin 有 3 个加工位点, 形成 20、22 或 25 个氨基酸残基的 hepcidin<sup>[17]</sup>, 而从金眼狼鲈只分离出一种 21 个氨基酸残基的 hepcidin, 且这 1 个加工位点在人 hepcidin 中也被识别<sup>[18]</sup>, Shike 预测斑马鱼也只有 1 个与金眼狼鲈相似的加工位点<sup>[23]</sup>。因此可预测鳊 hepcidin 成熟肽是从 Gln67 开始的 20 个氨基酸, 如图 2 所示。该成熟肽与包括人类在内的其他生物 hepcidin 成熟肽有 50%~86.4% 的同源性, 且也含 8 个高度保守的 Cys 残基, Park 等经质谱和化学分析方法研究证实, 8 个 Cys 残基间形成 4 个链内二硫键, 分子呈发夹结构<sup>[19]</sup>。4 个链内二硫键可使 β-折叠结构保持稳定<sup>[21]</sup>。

|                    |     | Signal peptidase   |  |
|--------------------|-----|--|--|
|                    |     | ↓  |  |
| Mandarin fish      | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSAVPVTEVQELEEPMSNDNPVAAHGEMS            |  |
| Nile tilapia       | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICVQQSSAVPTE-QELEEPMMDYPAAAHFEAS              |  |
| Turbot 1           | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICIQESSAVPVTEVQELEEPMSNDNPVAHEETS             |  |
| Turbot 2           | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICIQESSAVPVTEVQELEEPMSNDNPVAHEETS             |  |
| White bass         | (1) | MKTFSVAVAVAVLAFICLQESSAVPVTEVQELEEPMSN-----EYQEMP            |  |
| Black sea bream    | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSAGSFTEVQEPEEPMNNEPVAAHHEEK             |  |
| Japanese sea perch | (1) | MKTFSVTAVAVAVLTFICLQESSAASFTEVQELIEEPMNSNGSPVAHHEEM          |  |
| Red sea bream 1    | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSAASFTEVQELEEPMSNGSPVAHHEEMP            |  |
| Red sea bream 2    | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSAASFTEVQELEEPMSNGSPVAHHEEMP            |  |
| Red sea bream 3    | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSAASFTEVQELEEPMSNGSPVAHHEEMP            |  |
| Puffer             | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSAASFTEVQELEEPMSNGSPVAHHEEMP            |  |
| Mummichog          | (1) | MKAFTAVAVTLVLAFTIEESSAVPFTGVGELIEEAGGNDTPVEAHQEMS            |  |
| Atlantic halibut   | (1) | MKTFRVAGTVAVLVFICTIQQ-SSATFPPEVQELIEEAVSNDNAHHEQETS          |  |
| Japanese flounder  | (1) | MKTFSVAVTVAVLVFICTIQQ-SSATSPPEVQELIEEAVSSDNAHHEEQETS         |  |
| Turbot 3           | (1) | -----VVLAFIWIQE-SAATHGAQPEEAVSNEDPAADPQETP                   |  |
| Atlantic salmon    | (1) | MKAFTAVAVLVIACTFLEST--AVPFSEVRT-EEVGSFDSVGEHQQPG             |  |
| zebrafish          | (1) | MKLSNFI <del>AVV</del> ILTCVCFQTAVPPTQVQDEIHIVESEE-I.QENQHIT |  |
| rainbow trout      | (1) | -----I.QVLT-EEVGSIDSPVGEHQQPG                                |  |
| Human              | (1) | M-----ALSSQTWAACLLLLLSITSGSVFPQQTGQLAEIQPDRAGA               |  |
| house mouse        | (1) | MM---ALSTRTQAACLLLL-LASLSSTTYLQQMQRTELQPLHGEES               |  |
| Consensus          | (1) | MKTFSVAVAVAVLTFICLQESSA TEVQELEEPMSND PVAAH E S              |  |

|                    |      | Processing site   |  |
|--------------------|------|---|--|
|                    |      | ↓   |  |
| Mandarin fish      | (51) | VESWKMPYNN---RQKRG---FQCRFCGCGCTPG-VCGVCCRF-              |  |
| Nile tilapia       | (50) | VDSWKMLYNS---RHKRG---IKCRFCGCGCTPG-ICGVCCRF-              |  |
| Turbot 1           | (51) | VDSWKMPYNS---RHKRA---IKCKFCGCGCTPG-VCGVCCRF-              |  |
| Turbot 2           | (51) | VDSWKMPYNS---RIKRA---IKCKFCGCGCTPG-VCGVCCRF-              |  |
| White bass         | (46) | VESWKMPYNN---RHKRHSSPGGCRFCNCCPNMSSGCGVCCRF-              |  |
| Black sea bream    | (51) | EESWKMPYNN---RHKRS--PAGCRFCGCGCPNMRGCGVCCRF-              |  |
| Japanese sea perch | (51) | EESWKMPYNN---RHKRS--PADCRFCGCGCIDVSGCGVCCRF-              |  |
| Red sea bream 1    | (51) | EESWKMPYNN---RHKRS--PAGCRFCGCGCPNMRGCGVCCRF-              |  |
| Red sea bream 2    | (51) | EESWKMPYAS---RRWR-----CRFCCRCPMRGCGGLCCQRR                |  |
| Red sea bream 3    | (51) | EESWKMPYAS---RRWR-----CRFCCRCPMRGCGGLCCQRR                |  |
| Puffer             | (51) | DDSWKTPYTN---RHKRS--PARCRFCGCGCPMIGCGTCKCF-               |  |
| Mummichog          | (51) | MESWMPKHV---REKRQSHLSLCRYCCKCKNK-GCGFCCKF-                |  |
| Atlantic halibut   | (50) | VDLWMPYNN---RQKRG---FKCKFCGCGCRPG-VCGLCCKF-               |  |
| Japanese flounder  | (50) | ADSWMPQX---RQKRD---VKCGFCC---KDG-GCGVCCNF-                |  |
| Turbot 3           | (39) | VDSWMPSN---RQKRG---MKCKFCNCCNLN-GCGVCCRF-                 |  |
| Atlantic salmon    | (48) | GESMHI <del>PEPF</del> ---RFKRQTHLSLGLCCNCCNHT-GCGFCCKF-  |  |
| Zebra fish         | (50) | EAEHRLDPLVLFRTKRQSHLSLCRFCCCKCRNK-GCGYCKCF-               |  |
| Rainbow trout      | (23) | GESMRL <del>PEHF</del> ---RFKRXSHLSLCRWCCNCCNHT-GXGFCCKF- |  |
| Human              | (46) | RASWMPMFQR---RRRDTHFPICIFCCGCCCHRS-KCGMCKCT-              |  |
| House mouse        | (46) | RADIAIPMQK---RRKR <del>DIN</del> FCRFCCQCCNK-SCGICCEE-    |  |
| Consensus          | (51) | ESWKMPYNN R KR CRFCCGCC GCGVCCRF                          |  |

图 2 推导的鳊 hepcidin 氨基酸序列与其他动物 hepcidin 的同源性比较

相同的氨基酸残基以阴影表示,推导的信号肽用粗体字母表示,白鲈、斑马鱼和人的成熟肽加工位点用▲标注,方框内所示为推导的成熟肽,缺失的残基用下划线表示。

Fig. 2 Similarity of hepcidin prepropeptide amino acid sequences among mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and other animals

Identical or similar amino acid residues are shaded. The putative signal peptide is in bold. Mature peptide processing site for white bass (*Morone chrysops*), zebra fish (*Danio rerio*) and human are shown as ▲. The predicted mature peptide is marked in box. Conserved hepcidin residue is shaded. The lost hepcidin residue is underlined.

参考文献:

- [1] 于健,邱芳萍,张玲. 抗菌肽及其应用前景[J]. 长春工业大学学报(自然科学版), 2004, 25(1): 65-68.
- [2] Tsai H, Bobek L A. Human salivary histatins: promising anti-fun-

gal therapeutic agents[J]. Crit Rev Oral Biol Med. 1998; 9: 480-497.

- [3] Ganz T, rayner J R, Valore E V, et al. The structure of the rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression [J]. J Immunol. 1989; 143: 1358-1365.

- [4] Jaynes J M, Burton C A, Barr S B, et al. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* [J]. *FASEB J*, 1989, 2(13): 2 878 – 2 883.
- [5] Daher K A, Selsted E M, Lehrer R I, et al. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins [J]. *J Virol*, 1986, 60: 1 068 – 1 074.
- [6] Jaynes J M. Lytic peptides: A magic bullet [J]. *Biotechnol News*, 1990, 10: 8.
- [7] Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachius marmoratus* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 237(1): 303 – 310.
- [8] Azumi K, Yoshimizu M, Suzu K S, et al. Inhibitory effect of halocyanin, an antimicrobial substance from ascidian hemocytes, on the growth of fish viruses and marine bacteria [J]. *Experientia*, 1990, 46(10): 1 066 – 1 068.
- [9] Park C B, Lee J H, Park I Y, et al. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *FEBS Lett*, 1997, 411(2–3): 173 – 178.
- [10] 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 Lett*, 1998, 437(3): 258 – 262.
- [11] 叶 星, 白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景 [J]. *大连水产学院学报*, 2000, 15(4): 274 – 279.
- [12] 姜 兰, 白俊杰, 邓国成, 等. 重组抗菌肽的制备及其对水产养殖中常见病原菌的抑菌效果 [J]. *中国水产科学*, 2002, 9(2): 152 – 156.
- [13] Ge Y, MacDonald D L, Holroyd K J, et al. In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 782 – 788.
- [14] Steinberg D A, Hurst M A, Fujii C A, et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 1 738 – 1 742.
- [15] Fleming R E, Sly W S. Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8 160 – 8 162.
- [16] Krause A, Neitz S, Magert H J, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity [J]. *FEBS Lett*, 2000, 480: 147 – 150.
- [17] Park C H, Valore E V, Waring A J, et al. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 7 806 – 7 810.
- [18] Shike H, Lauth X, Westerman M E, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(8): 2 232 – 2 237.
- [19] Pigeon C, Iiyin 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]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7 811 – 7 819.
- [20] Inoue S, Nam B H, Hirono I, et al. A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1997, 6: 376 – 380.
- [21] Kim Y O, Hong S, Nam B H, et al. Molecular cloning and expression analysis of two hepcidin genes from olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(7): 1 411 – 1 414.
- [22] Douglas S E, Gallant J W, Liebscher R S, et al. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003(27): 589 – 601.
- [23] Shike H, Shimizu C, Lauth X, et al. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 747 – 754.
- [24] Chen S L, Xu M Y, Ji X Sh, et al. Characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(4): 1 608 – 1 612.
- [25] 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]. *Molecul Immunol*, 2006, 43(4): 367 – 377.
- [26] Bao B, Peatman E, Li P, et al. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(11): 939 – 950.
- [27] He J G, Zeng K, Weng S P, et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. *Aquaculture*, 2002, 204(1): 11 – 24.
- [28] Nie P. Co-occurrence and microhabitat of *Ancyrocephalus mogurnda* (Monogenea) and *Henneguya weishanensis* (myxosporea) on the gills of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [J]. *Folia Parasitol*, 1996, 43: 272 – 276.
- [29] Hoffmann J A. Innate immunity of insects [J]. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7: 4 – 10.

## Cloning and sequence analysis of cDNA encoding hepcidin, an antimicrobial peptide from mandarin fish *Siniperca chuatsi*

LIU Bi-lian<sup>1,2</sup>, BAI Jun-jie<sup>1</sup>, LAO Hai-hua<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>, JIAN Qing<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Hepcidin is a new kind of antimicrobial peptide with a special character. In the present study, cDNA encoding hepcidin was amplified from the total RNA of liver of mandarin fish, *Siniperca chuatsi*, by means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with degenerate oligonucleotide primers based upon the homology DNA sequence in GenBank. The fragment including 3'-end was cloned into pMD18-T vector and sequenced. The length of the cloned cDNA is 381 bp with an ORF ranging from 20th to 277th bp, which encodes 86 amino acids. The prepropeptide consists of a signal peptide (24 amino acid), a prodomain (42 amino acid) and a mature peptide (20 amino acid). According to the blast result in GenBank database, the cDNA nucleotides and the deduced amino acid sequence of ORF share 72.2% - 92.0% and 59.6% - 88.5% identity with those of other species in Percomorpha. The predicted processed 20-amino acid hepcidin mature peptide shares 50.0% - 86.4% identity with other hepcidin including human hepcidin with perfect conservation of eight cysteine residues which are proposed to form four disulphide bonds. The purpose of this study is to set the base for recombinant expression of *Siniperca chuatsi* hepcidin. And a new member has been found for the hepcidin family. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6):995 - 1 000]

**Key words:** antimicrobial peptide; hepcidin; *Siniperca chuatsi*; cDNA cloning; sequence analysis

**Corresponding author:** BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net

---

### 欢迎订阅《水产学杂志》

《水产学杂志》是中国水产科学研究院黑龙江水产研究所主办,主要报道水产科学领域的最新进展、最新成果、最新方法与技术的国内外公开发行的学术期刊。国内统一刊号:CN2 - 1183/S,国际标准刊号:ISSN1005 - 3832。已正式编入《中国学术期刊(光盘版)》及“中国期刊网”。本刊主要刊载水产养殖、鱼类遗传育种、生物技术、渔业资源与增殖、渔业环境保护、营养与饲料、病害防治、水生生物、设施渔业等方面的研究论文、调查报告、综述和学术动态等文稿。其宗旨是为水产科研、教学、生产及管理人员等提供学术交流的平台,传播水产新技术、新成果,为水产科研及渔业发展提供服务。

《水产学杂志》为半年刊,每期96页,5月、11月出版,每期定价8元,全年16元。有订阅的单位或个人请直接与本编辑部联系。

编辑部地址:哈尔滨市道里区河松街232号《水产学杂志》编辑部

邮政编码:150070

联系电话:0451 - 84861626

传真:0451 - 84604803

E-mail: zazhi2000@126.com