

马氏珠母贝血清抗菌肽的初步分析

朱家萍, 雷倩楠, 梁海鹰*

(广东海洋大学 水产学院, 中国广东 湛江 524088)

摘要: 马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)是生产海水珍珠的主要经济贝类, 近年来马氏珠母贝因病害频繁发生而对我国珍珠产业造成巨大的经济损失。因此, 对于马氏珠母贝的免疫机制研究尤为重要。抗菌肽是贝类生物免疫机制中最重要的一个环节, 但目前对马氏珠母贝抗菌肽的报道甚少。为深入了解马氏珠母贝的抗菌肽分子组成及特征, 本实验采取多步高效液相色谱结合质谱分析, 对马氏珠母贝血清中具有抗菌活性的蛋白质分子开展了分离纯化及鉴定研究, 得到了5种有明显抗菌活性的蛋白, 其中3种相对分子质量在5 000 kD左右; 通过透射电镜进一步观察了抗菌活性蛋白对细菌的作用机制。上述研究为了解马氏珠母贝抗菌肽的分子多样性及抗菌机制奠定了基础。

关键词: 马氏珠母贝; 抗菌肽; 免疫机制; 质谱; 抑菌实验

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)05-0397-05

Analysis of Antimicrobial Peptides from Serum of *Pinctada martensii*

ZHU Jia-ping, LEI Qian-nan, LIANG Hai-ying*

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China)

Abstract: *Pinctada martensii* is a major economic shellfish for sea pearls. Due to the diseases annually, a large of *P. martensii* died every year and resulting in a huge economic losses on China's pearl industry. The immune system and the mechanism of *P. martensii* against pathogenic bacteria is not clear so far. Antimicrobial peptide is one of the most important immune molecular for shellfish, however, little sequence and characterization of antimicrobial peptides was reported from *P. martensii*. In order to understand the protein composition and molecular diversity of *P. martensii* antimicrobial peptide, multi-step high performance liquid chromatogram (HPLC) combined mass spectrometry were performed to exploring the peptides with antimicrobial activity. 5 components with significant anti-bacteria activity were isolated from the serum of *P. martensii* and 3 of them were homogeneous with molecular mass of around 5 kD proved by MALDI-TOF. Furthermore, the components caused significant morphological alterations in *E. coli* as shown by transmission electron microscopy (TEM). These results indicated that the peptides isolated from *P. martensii* serum with molecular mass of 5 kD were involved in the host immune response against bacterial infection and might contribute to the clearance of invading bacteria.

Key words: *Pinctada martensii*; antimicrobial peptides; the immune system; mass spectrometry; antibacterial experiments

(Life Science Research, 2015, 19(5): 397~401)

收稿日期: 2014-12-15; 修回日期: 2015-05-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31472306); 广东省科技计划资助项目(2012A031100010); 湛江市科技计划项目(2013A03022)

作者简介: 朱家萍(1987-), 女, 云南曲靖人, 硕士研究生, 主要从事贝类功能基因和蛋白质研究; *通讯作者: 梁海鹰(1971-), 女, 湖南怀化人, 广东海洋大学教授, 研究生导师, 博士, 主要从事海洋生物功能基因和蛋白质研究, Tel: 0759-2383124, E-mail: lianghy258@163.com。

抗菌肽是由宿主产生的一类能够抵抗外界病原体感染的小分子多肽,广泛存在于各种生物体内,具有非特异性抗病原体作用,部分抗菌肽还具有抗肿瘤细胞以及抗病毒活性^[1],一直以来是研发生物抗生素的先导分子。抗菌肽相对分子质量一般在 10 kD 以下^[2],并具有一些共同的特点:例如在生物体内合成迅速;通常具有广谱抗菌活性,对真核细胞无毒害作用等^[3]。由于无脊椎动物缺乏后天免疫系统,因此抗菌肽对于无脊椎动物而言具有更为重要的意义。海洋生物,特别是海洋无脊椎动物含有丰富的抗菌肽分子。目前对海洋生物抗菌肽的研究多集中在双壳贝类和甲壳类等低等生物。其中双壳贝类抗菌肽分子的研究又多集中在贻贝属。研究者通过对紫贻贝(*Mytilus edulis*)和地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)的抗菌肽的研究,已鉴定的抗菌肽种类包括 8 个家族,分别为防御素(Defensins)^[4]、贻贝肽(Mytilins)^[5]、贻贝素(Mytilins)^[6]、贻贝霉素(Mytimycins)^[7]、大防御素(Big defensin)^[8]、Macin^[9]、Myticusin^[10]以及最近发现的 Mytichitin^[11]。贻贝已成为海洋生物中发现抗菌肽家族最多的物种,这表明双壳贝类是研究海洋生物抗菌肽的极好材料,但同为双壳贝类的珠母贝属,相关抗菌肽的研究目前尚不多见。

马氏珠母贝是我国广东、广西和海南海区主要的经济贝类之一,主要用于培育海水珍珠。关于马氏珠母贝抗菌肽的研究很少,目前仅张英霞等报道马氏珠母贝鳃组织中存在具有抗菌活性的组分^[14];于文媛等比较了不同处理方法制备马氏珠母贝外套膜和鳃组织抗菌肽粗提液的抗菌活性^[15],上述研究均为对珠母贝属抗菌肽进行纯化和鉴定。目前美国国立医学图书馆(NCBI)的蛋白质数据库中尚未见珠母贝属抗菌肽分子的序列报道。本研究从马氏珠母贝血清中分离提取出具有抗菌活性的多肽,测定其分子组成特征和抗菌活性,为后续开展马氏珠母贝抗菌肽的研究以及其免疫防御机制奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂

1.1.1 实验动物

成体马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)采集于湛江市徐闻县承梧村珍珠养殖基地,以洁净的海水在充氧的情况下饲养 3 d (25 °C)以适应实验室的养殖环境后进行血清的提取。

1.1.2 试剂

色谱纯乙腈购自美国 TEDIA 公司;三氟乙酸(TFA)、 α -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA)购自美国 Sigma 公司;配制 LB 液体培养基和 PBS 的试剂均为国产分析纯试剂;试验用去离子水由 Millipore synergy 纯水系统(法国 Millipore 公司)制取;抑菌试验所测试的菌种购于广东省微生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 马氏珠母贝的诱导与血清的收集

马氏珠母贝饲养 3 d 后,以加热灭活的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)注入马氏珠母贝的闭壳肌内进行诱导,每只注射 30 μ L (10 μ L 的 *E.coli* 和 20 μ L 的 *M.luteus*),重新放入海水中饲养 12 h 后用无菌的注射器从马氏珠母贝的闭壳肌处收集血液,离心 (4 °C, 800 \times g, 15 min),取上清液,冷冻干燥置于 4 °C 保存。

1.2.2 马氏珠母贝血清抗菌肽的分离纯化

含 0.05% 三氟乙酸(TFA)的去离子水按 1 mg/mL 的比例对马氏珠母贝的血清干粉稀释,搅拌 30 min 充分溶解后离心 (4 °C, 10 000 \times g, 20 min),收集上清液用 0.22 μ m 的滤膜过滤,用于 HPLC (high performance liquid chromatogram, HPLC)分离。

马氏珠母贝的抗菌肽分离纯化采用高效液相色谱法,在 Waters 600E 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)上完成,配备在线紫外检测器为 Waters 2478 型紫外检测器(美国 Waters 公司),采用 280 nm 和 220 nm 双波长检测。

第一步:反相色谱柱为半制备型 C18 反相色谱柱 (Sunfire™Prep, 10 \times 250 mm, Waters 公司),上样后分别以含 0.05% (V/V)TFA 的 5% 乙腈、18% 乙腈、40% 乙腈和 60% 乙腈进行充分洗脱,流速为 1 mL/min,手动收集各浓度比例乙腈的洗脱组分,经冷冻干燥对各组进行抑菌活性实验。测试菌株分别为大肠杆菌(*Escherichia coli*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。

第二步:对上述步骤中获得的具有抗菌活性的组分进一步用分析型 C18 反相色谱柱 (Vydac 218, 4.6 \times 250 mm)进行分离,采用含 0.1% 的去离子水(A 液)和含 0.1% TFA 的乙腈(B 液)为洗脱液;洗脱梯度为:5%~20% B 液洗脱 5 min, 20%~60% B 液洗脱 35 min, 60%~95% B 液洗脱 5 min。手动收集各洗脱组分,经冷冻干燥后开展抗菌活性测试。测试菌株分别为大肠杆菌(*Escherichia coli*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。

1.2.3 抗菌活性的检测

参考 Charlet^[6]的方法测定各洗脱组分的抗菌活性。用 LB 液体培养基培养至细菌的对数生长期,然后用相应培养基稀释至光密度值 OD_{600} 为 0.001;在预先经灭菌处理的 96 孔板中每个孔加入 90 μL 菌液和 10 μL 样品溶液混合(将干粉状的样品粉末用超纯水稀释),以去离子水做为阴性对照组;加入样品后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h,以酶标仪测定样品加入前以及加入后不同时间段的 OD_{600} 值,每个样品设 3 组平行试验。

1.2.4 马氏珠母贝血清抗菌肽的质谱分析

用串联飞行时间质谱仪(ABI 4800 plus, 美国 ABI 公司)测定蛋白精确相对分子质量。采用阳离子模式; N_2 光源 337 nm;离子加速电压为 20 000 V。基质为 α -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA),通过以下方式制备样品:取 1 μL 样品液加入到 9 μL CCA (含 0.1% TFA) 的 50%乙腈饱和溶液,混合后取 1 μL 点样,室温干燥后测定。

1.2.5 马氏珠母贝抗菌肽的透射电镜的观察

通过 JEM-1400 (Japan Electronics Corp)透射电子显微镜观察抗菌肽作用细菌后的形态变化。用去离子水溶解蛋白组分,37 $^{\circ}\text{C}$ 下与处于对数期的菌液共孵育 60 min (对照组加 PBS 孵育)。1 000 $\times g$ 离心 10 min 收集菌液,用 200 μL 3%的戊二醛固定过夜,加入 200 μL 2%磷钨酸钠水溶液,制成混合的菌悬液;用毛细吸管吸取混合菌悬液滴在铜网上;3~5 min 后,用滤纸吸去余水,待样品干燥后,置透射显微镜下观察。

2 结果

2.1 马氏珠母贝血清抗菌肽的分离纯化

经分离纯化后得到结果如图 1A 所示,马氏珠母贝血清经 5%乙腈溶液洗脱的组分吸收值较高且峰面积较大,这表明马氏珠母贝血清中含有较多的亲水性物质。本轮洗脱共收集 5 组成分,分别命名为 C1~C5 (图 1A)。经冷冻干燥后进行抑菌活性测试,结果表明 40%乙腈洗脱的组分,即 C4 组分具有较强的抑菌活性。对该部分组分进一步经分析型 C18 反相色谱柱分离,结果见图 1B。由图 1B 可见,马氏珠母贝血清 C4 组分中成分复杂,共收集超过 20 种洗脱峰。所收集的各洗脱峰经冷冻干燥后分别进行抑菌活性检测。共有 6 个洗脱组分具有明显的抑菌活性,这 6 个洗脱组分均在乙腈梯度 30%~45%之间洗脱,分别命名为 P1~P6 (图 1B)。

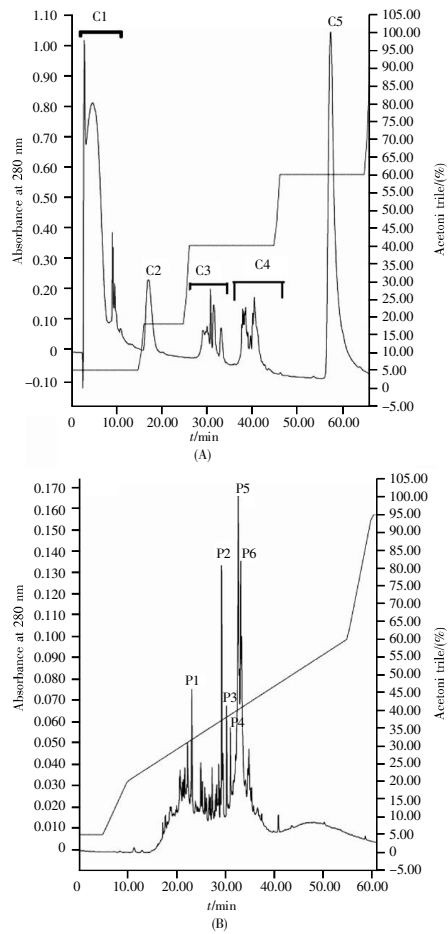


图 1 马氏珠母贝血清经反相色谱分离的图谱

(A) 马氏珠母贝血清用 SunfireTM Prep 半制备型 C18 柱分离所得色谱图。收集 5 个洗脱组分,命名为 C1~C5; (B) 具有抗菌活性的 C4 进一步用 Vydac218 分析型 C18 柱分离所得色谱图,收集 6 个具有抑菌活性的洗脱组分,命名为 P1~P6。

Fig.1 Elution profile of *Pinctada martensii* serum separated by reversed phase HPLC

(A) Chromatogram map of *P. martensii* serum separated by SunfireTM Prep semi-preparative C18 column. Five components were collected and named as C1~C5; (B) The component C4 with antimicrobial activity was further purified by Vydac218 analytic C18 column, and six proteins with antimicrobial activity were gained and designated as P1~P6.

2.2 马氏珠母贝血清抑菌活性的检测

采用酶标仪法,对照组去离子水,实验组为上述经 HPLC 分离后的组分,样品浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。以马氏珠母贝血清组分 P5 对藤黄微球菌和大肠杆菌的抑制作用为例,结果如图 2 所示。图 2A 为藤黄微球菌在加入样品后 0 h 和 12 h 所测得的 OD 值,由图 2A 可见,加入 P5 组分后,藤黄微球菌的生长受到明显抑制 ($P<0.05$);同时, P5 组分对大肠杆菌的生长液产生明显抑制作用 ($P<0.05$) (图 2B)。

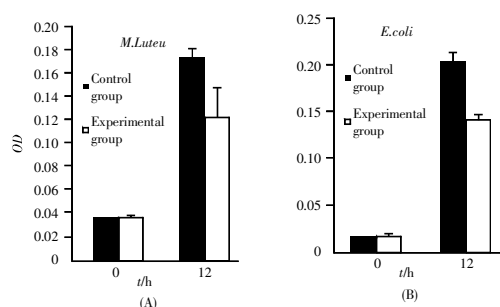


图2 马氏珠母贝血清分离组分对藤黄微球菌和大肠杆菌生长抑制

Fig.2 Inhibition assay of *Pinctada martensii* serum components for *M.luteus* and *E.coli*

2.3 马氏珠母贝血清抗菌肽的质谱鉴定

马氏珠母贝血清抑菌活性组分经质谱检测其精确相对分子质量,结果如图3所示,相对分子质量分布见表1。由图3及表1可见,本次利用高效液相色谱对马氏珠母贝分离后,具有抑菌活性的各组分相对分子质量主要分布在3 000~5 500 Da之间。其中,组分P1和P2成分较为复杂,出现多个质谱峰,而P1的相对分子质量集中分布在4 300 Da和5 200 Da,而P2的相对分子质量集中分布在3 000~4 000 Da以及6 500 Da左右;P3质谱图中,最大强度的相对分子质量为5 227 Da,同时,在5 300~5 400 Da也出现数个质谱峰;P4组分的质谱图表明其精确5 357 Da,且呈现单一峰型,表明其纯度较高;P5的质谱图中也只出现一个相对分子质量峰,其精确相对分子质量为5 286 Da;P6的主要相对分子质量为5 311 Da且纯度较高。

2.4 马氏珠母贝抗菌肽作用细菌的作用机制

透射电镜结果如图4所示,对照组(图4A)观察到的大肠杆菌的边缘清晰完整,内部具有3个致密状的结构。而实验组(图4B)可观察到大肠杆菌菌体的两端出现部分溶解现象(图2B箭头所示),内部结构和对照组相比也发生明显改变。同时,细胞壁表面也出现泡状结构(图4C、D),表明其细胞壁发生了崩解,导致细胞内容物的局部释放。

3 讨论

抗菌肽是贝类生物用以对抗外界致病微生物入侵的主要免疫手段。马氏珠母贝的抗菌肽研究目前尚不多见。由于贝类生物的抗菌肽主要存在于血清中,因此,本研究采用高效液相色谱对马氏珠母贝血清抗菌肽进行分离纯化和初步鉴定,发现了一批相对分子质量在5 000~6 000 Da之间的抗菌活性组分。目前,在贝类生物抗菌肽研究中,所鉴定

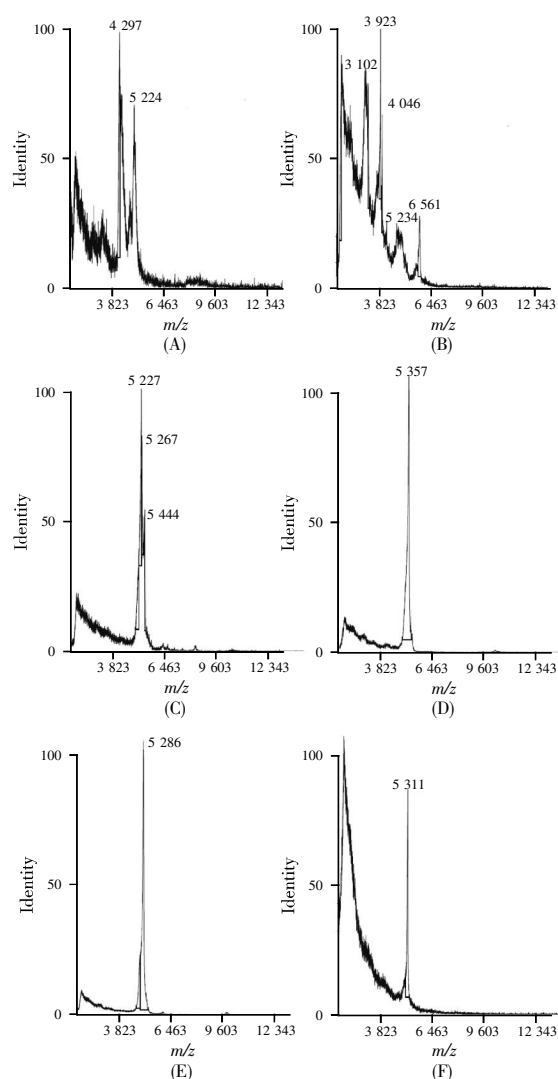


图3 马氏珠母贝血清抑菌组分P1~P6的质谱图谱 (A)~(F)分别代表组分P1~P6。

Fig.3 MASS maps of *Pinctada martensii* serum antibacterial component P1~P6

(A)~(F) represent the component P1~P6, respectively.

表1 马氏珠母贝血清抑菌组分的质谱鉴定相对分子质量分布表

Table 1 Molecular weight distribution table of *Pinctada martensii* serum antibacterial components by mass spectrometry

Components	Relative molecular mass/(Da)
P1	4 294.6, 5 224.7
P2	1 290.6, 3 102.5, 3 923.5, 4 046.1, 6 561.5
P3	5 037.0, 5 267.9, 5 444.8, 5 385.3
P4	5 354.1
P5	5 286.4
P6	5 311.8

的主要抗菌肽分子的相对分子质量集中分布在3 000~5 000 Da之间。例如,从贻贝属中分离鉴定到的抗菌肽 Mytilin^[6], Myticin^[5]以及防御素 MGD^[4, 9]等,其相对分子质量均为4 000 Da左右,其序列中

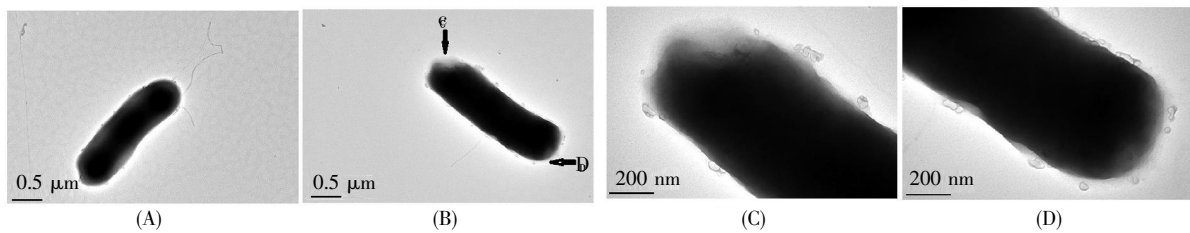


图 4 扫描电镜观察到的抗菌肽作用大肠杆菌的形态

(A) 对照组, 未加入实验样品在电镜下观察到的大肠杆菌的形态; (B) 实验组, 经过抗菌肽样品处理后在电镜下观察到的大肠杆菌的形态; (C)、(D): 图 B 的放大。

Fig.4 Morphological characteristics of *E. coli* to the role of antimicrobial peptides on scanning electron microscopy

(A) Control group: The morphology of control *E. coli* observed by scanning electron microscopy; (B) Experimental group: The morphology of *E. coli* observed by scanning electron microscopy after treated by antimicrobial peptide; (C) and (D) denote the amplification of (B).

通常含有 3~4 对二硫键, 形成一个致密的 α/β 结构域^[5]。此外, 部分贻贝属抗菌肽具有较大的相对分子质量, 例如来自厚壳贻贝的 Myticusin 的相对分子质量在 10 000 Da 以上^[11]。本研究获得马氏珠母贝血清抗菌活性蛋白经质谱鉴定, 发现其相对分子质量多集中在 5 000 Da 左右, 其中 P4、P5、P6 3 个组分纯度较高, 其相对分子质量分别为 5 354 Da、5 286 Da 和 5 331 Da, 但未发现有 7 000 Da 以上相对分子质量的成分存在, 这表明马氏珠母贝的抗菌肽在相对分子质量分布上与贻贝属有较大差异。本次研究所获得马氏珠母贝的活性组分均能明显抑制大肠杆菌和藤黄微球菌的生长, 表明本次研究所获得的马氏珠母贝抗菌肽对格兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用。这一点与贻贝属的抗菌肽研究结果一致。贻贝属中的抗菌肽包括 Mytilin、Myticin 等均表现出广谱的抑菌活性^[4-7]。

同时, 本研究也发现, 抗菌肽在马氏珠母贝血清中含量极低, 本实验从大约 1 000 mL 马氏珠母贝血清中分离到的抗菌活性组分总计不到 1 mg。此外, 贝类抗菌肽多呈现出明显的蛋白多态性, 例如贻贝属抗菌肽 Mytilin 目前已鉴定的家族成员包括 Mytilin-A、-B、-C、-D、-G 等多个成员, 且不同成员在氨基酸组成、抗菌谱等方面存在少量差异, 这种抗菌肽的多态性推测与贻贝面临不同的生存环境和不同类型的微生物威胁有关^[7, 17]。本次研究中, 我们发现马氏珠母贝血清的 P3 组分在质谱鉴定时出现多种相对分子质量, 且相对分子质量差异不大, 集中在 5 000~5 400 Da 之间; 此外, 纯度较高的 P4、P5、P6 组分在相对分子质量方面的差异也不大, 其差异在 1 000 Da 以内, 这与杨雨佳等对厚壳贻贝血清抗菌肽的组学分析结果^[12]类似。同时, 本研究获得马氏珠母贝血清抗菌肽在抑菌活性方面也非常类似。上述实验结果表明马氏珠

母贝血清抗菌肽可能也存在蛋白多态性现象。

目前对抗菌肽的研究结果表明, 抗菌肽作用细菌主要是通过两种方式, 一种方式是作用于细菌细胞膜, 即膜裂解型; 另一种方式则是进入到细菌内部发挥作用, 即非膜裂解型^[7]。但多数抗菌肽是通过作用于细菌细胞膜或者细胞壁而发挥抗菌活性, 例如, 研究发现, 天然爪蟾抗菌肽(Magainin)和蜂毒肽(Melittin)通过复杂的机制抑制靶细胞壁组分的合成, 从而杀死靶细胞^[18]; 有些抗菌肽可以通过抑制细胞呼吸, 抑制细胞外膜蛋白的合成来杀死细菌^[19]。本研究获得的马氏珠母贝抗菌活性组分 P5 可使大肠杆菌两头的细胞壁及细胞膜结构出现溶解现象, 同时部分细菌内的物质开始从菌体内释放, 形成附着于细菌表面的类似小泡状结构。本实验提取到的抗菌肽作用机理是类似膜裂解型, 且从菌体的两端开始溶解。这与其他抗菌肽的作用机制有所差别, 例如, 厚壳贻贝的 Myticusin-1 抑制大肠杆菌的机理是在细胞壁附近有薄片状中间体生成^[12]。而麻蝇素 II (Sar-cotoxin II) 能够抑制细菌细胞壁的形成, 使细菌不能维持正常的细胞形态而生长受阻, 并使细胞壁穿孔^[20]。上述结果表明马氏珠母贝血清抗菌肽具有某种特殊的作用机制。

相对于陆生生物抗菌肽研究, 如昆虫抗菌肽研究等, 目前从海洋生物分离纯化得到的抗菌肽并不多, 约有 20 余种报道^[12-17]。但海洋生物抗菌肽因其特殊的进化地位以及海洋生物本身生存环境的特殊性而日益受到重视。

尽管本研究未能确定马氏珠母贝抗菌肽的分子序列, 但本实验为马氏珠母贝的免疫研究和马氏珠母贝病害防治提供了新的资料。本研究建立的抗菌肽分离纯化方法以及所获得纯度较高且具有抑菌活性的 P4、P5、P6 等组分为后续的研究奠定了基础。

(下转第 421 页)

- [20] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其产品食用安全——大鼠 90 d 喂养实验[S]. 中华人民共和国农业行业标准(Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Safety assessment of genetically modified plant and derived products 90-day feeding test on rats[S]. Agriculture industry standard of the People's Republic of China) NY/T 1102-2006.
- [21] GONG J H, SI W, FORETER R J, *et al.* 16S rRNA genebased analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(2): 147-157.
- [22] YU Z, MORRISON M. Improved extraction of PCR 2 quality community DNA from digesta and fecal samples[J]. *Bio-Techniques*, 2004, 36(5): 808-812.
- [23] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [24] SIMPSON J M, MCCracken V J, GASKINS H R, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4705-4714.
- [25] 祝小枫, 熊德鑫, 李小燕, 等. 几种动物的膜菌群与肠内容物菌群比较[J]. 中国实验动物学杂志(ZHU Xiao-feng, XIONG De-xin, LI Xiao-yan, *et al.* Comparison of membrane microflora and intestinal microflora in several animals[J]. *Chinese Journal of Laboratory Animal Science*), 1995, 5(1): 30-32.
- [26] WOHLLEBEN W, AMOLD W, BROER I, *et al.* Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from the streptomyces hygroscopicus Tu 494 and its expression in *Nicotiana glauca* [J]. *Gene*, 1988, 70(1): 25-37.
- [27] 刘洪艳, 弭晓菊, 崔继哲. Bar 基因、PAT 蛋白和草丁膦的特性与安全性[J]. 生态学杂志(LIU Hong-yan, MI Xiao-ju, CUI Ji-zhe. Characteristics and safety of bar gene, PAT proteins and glufosinate[J]. *Chinese Journal of Ecology*), 2007, 26(6): 938-942.

(上接第 401 页)

参考文献(References):

- [1] GILL D, NICHOLAS B, AARON W, *et al.* The roles of antimicrobial peptides in innate host defense[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15(21): 2377-2392.
- [2] 丁云超, 张士瑾. 海洋动物抗菌肽研究进展[J]. 中国海洋药物(DING Yun-chao, ZHANG Shi-cui. Antimicrobial peptides from marine invertebrates and fish[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*), 2013, 32(6): 87-96.
- [3] 李晔, 苏秀榕, 李太武, 等. 贝类等无脊椎动物抗菌肽的研究进展[J]. 水产科学(LI Ye, SU Xiu-rong, LI Tai-wu, *et al.* Research progress of antimicrobial peptides in invertebrate such as molluscs[J]. *Fisheries Science*), 2004, 23(9): 40-43.
- [4] HUBERT F, NOEL T, ROCH P, *et al.* A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 240(1): 302-306.
- [5] MITTA G, HUBERT F, NOEL T, *et al.* Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265(1): 71-78.
- [6] CHARLET M, CHERNYSH S, PHILIPPE H, *et al.* Innate immunity Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 271(36): 21808-21813.
- [7] VENIER P, VAROTTO L, ROSANI U, *et al.* Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 69.
- [8] WEI Y X, GUO D S, LI R G, *et al.* Purification of a big defensin from *Ruditapes philippinensis* and its antibacterial activity [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(12): 1145-1148.
- [9] TORRADO M, MIKHAIIOV A T. Male-associated polypeptide (MAP) expression in different compartments of the reproductive system of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: immunocytochemical and Western blot study [J]. *Cell and Tissue Research*, 1998, 294(3): 537-547.
- [10] BOMAN H G, NISSON I, RASMUSON B. Inducible antibacterial defense system in *Drasophila* [J]. *Nature*, 1972, 237(5352): 232-235.
- [11] LIAO Z, WANG X C, LIU H H, *et al.* Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus Coruscus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 610-616.
- [12] 杨丽佳, 武梅, 王信超, 等. 厚壳贻贝血细胞及血清抗菌肽的分析[J]. 中国农学通报(YANG Li-jia, WU Mei, WANG Xin-chao, *et al.* Analysis of antimicrobial peptides from blood and serum of *Mytilus coruscus* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2011, 27(23): 58-64.
- [13] 张英霞, 邹瑗徽, 满初日嘎, 等. 马氏珠母贝鳃组织抗菌活性的研究[J]. 水产科学(ZHANG Ying-xia, ZOU Ai-hui, MAN-CHU Ri-ga, *et al.* Antimicrobial activity in gills of shellfish *Pinctada martensii* [J]. *Fisheries Science*), 2010, 29(8): 465-468.
- [14] 于文媛, 王世锋, 谢珍玉, 等. 合浦珠母贝抗菌肽粗提液制备方法的优化[J]. 热带生物学报(YU Wen-yuan, WANG Shi-feng, XIE Zhen-yu, *et al.* Optimization of the preparation methods for antimicrobial peptides from *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Tropical Organisms*), 2011, 2(1): 14-19.
- [15] BONMATIN J M, BONNAT J L, GALLET X, *et al.* Two-dimensional ¹H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding [J]. *Journal of Biomolecular NMR*, 1992, 2(3): 235-256.
- [16] MITTA G, VANDENBULCKE F, HUBERT F, *et al.* Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(17): 12954-12962.
- [17] WIMLEY W C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model [J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5(10): 905-917.
- [18] MAHER S, MCCLEAN S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells *in vitro* [J]. *Biochemistry Pharmacology*, 2006, 71(9): 1289-1298.
- [19] FEHLBAUM P, BULLETT P, CHERNYSH S, *et al.* Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(3): 1221-1225.
- [20] 刘先凯, 赵彤言. 昆虫抗菌肽的研究进展 [J]. 寄生虫与昆虫学报(LIU Xian-kai, ZHAO Tong-yan. The progress of studies on insect antibacterial peptide [J]. *Acta Parasitologica Et Medica Entomologica Sinica*, 2001, 8(2): 115-121.