

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22620070153921

廈門大學

博士学位论文

大黄鱼与海水青鳉抗菌肽 **Hepcidin** 基因表达特性与功能的比较研究

Comparative study of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and marine medaka (*Oryzias melastigma*) Hepcidin gene expression and peptide functions

蔡 灵

指导教师姓名: 王克坚 教授

专业名称: 环境科学

论文提交日期: 2011 年 9 月

论文答辩时间: 2011 年 9 月

2011 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

缩略词中英文对照表.....	A
摘要.....	I
Abstract.....	V
第一章 绪论	1
第一节 抗菌肽的来源及特性	1
1.1 抗菌肽来源于细菌.....	2
1.2 抗菌肽来源于真菌.....	3
1.3 抗菌肽来源于植物.....	3
1.4 抗菌肽来源于动物.....	4
1.5 抗菌肽的特性.....	7
第二节 抗菌肽的生物活性以及作用机理	8
2.1 抗菌肽的抗细菌活性.....	9
2.2 抗菌肽的抗真菌活性.....	10
2.3 抗菌肽的抗病毒活性.....	10
2.4 抗菌肽的抗肿瘤活性.....	10
2.5 抗菌肽的其他生物活性.....	11
第三节 抗菌肽的应用	12
3.1 抗菌肽在食品添加剂中的应用.....	12
3.2 抗菌肽的医学临床应用.....	12
3.3 抗菌肽在畜禽生产中的应用.....	13
3.4 抗菌肽在水产养殖中的应用.....	14
第四节 Hepcidin抗菌肽研究进展	14
4.1 Hepcidin 的结构特点.....	14
4.2 Hepcidin 抗菌肽组织器官特异分布及其功能.....	16
第五节 鱼类Hepcidin研究进展	19
第六节 本研究思路、目的和意义	25
6.1 研究思路.....	25

6.2 研究的目的和意义.....	26
本章参考文献.....	28
第二章 Pc-hepc基因的克隆与序列分析	41
第一节 材料与方法.....	41
1.1 材料.....	41
1.2 实验方法.....	44
第二节 实验结果.....	54
2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的第一链反转录反应.....	54
2.2 PCR 扩增 Pc-hepc cDNA 序列.....	54
2.3 Pc-hepc cDNA 的 5'和 3'端的获得.....	55
2.4 大黄鱼鳃组织器官扩增的 Hepsidin 核苷酸推导氨基酸序列分析	55
2.5 Pc-hepc 抗菌肽多肽的结构预测.....	57
2.6 Pc-hepc 氨基酸序列与其它已知鱼类 Hepsidin 氨基酸序列的比较...	59
2.7 Pc-hepc 基因组序列分析.....	60
2.8 反向 PCR 扩增 Pc-hepc DNA 侧翼片段	61
第三节 讨论.....	63
3.1 反向 PCR.....	63
3.2 Pc-hepc 的结构特点以及多序列对比分析.....	63
本章参考文献.....	68
第三章 Pc-hepc在正常养殖大黄鱼组织器官中分布以及LPS诱导	
下的组织器官表达特性研究.....	71
第一节 材料与方法.....	72
1.1 材料.....	72
1.2 实验方法.....	74
第二节 实验结果.....	79
2.1 大黄鱼 18s rRNA 与 β -actin 序列.....	79

2.2 实时荧光定量检测 Pc-hepc 基因表达状况方法的建立.....	80
2.3 大黄鱼各组织器官总 RNA 的提取.....	81
2.4 Pc-hepc mRNA 转录产物的组织器官分布.....	87
2.5 LPS 诱导下 Pc-hepc 基因的组织器官表达特性研究.....	89
第三节 讨论.....	89
3.1 实时荧光定量 PCR 方法.....	89
3.2 Pc-hepc 基因表达的组织器官特异性.....	92
本章参考文献.....	94

第四章 OM-hep1在海水青鲮组织器官中分布及副溶血弧菌诱导下

组织器官表达特性研究.....	97
第一节 材料与方法.....	97
1.1 材料.....	97
1.2 实验方法.....	102
第二节 实验结果.....	108
2.1 OM-hep1 基因 cDNA 序列的扩增.....	108
2.2 OM-hep1 原位杂交 cRNA 探针的制作.....	109
2.3 OM-hep1 组织器官分布研究.....	109
2.4 副溶血弧菌感染诱导下 OM-hep1 基因的表达特性.....	119
第三节 讨论.....	120
3.1 海水青鲮抗菌肽 OM-hep1.....	120
3.2 原位核酸分子杂交技术.....	121
3.3 免疫组织化学技术.....	121
本章参考文献.....	123

第五章 OM-hep2在海水青鲮组织器官中分布及副溶血弧菌诱导下

组织器官表达特性研究.....	125
第一节 材料与方法.....	125

1.1 材料.....	126
1.2 实验方法.....	126
第二节 实验结果.....	128
2.1 OM-hep1 与 OM-hep2 cDNA 核酸杂交探针的制备.....	128
2.2 OM-hep1 与 OM-hep2 cDNA 核酸杂交探针的特异性验证.....	129
2.3 OM-hep2 基因实时荧光相对定量方法的建立.....	129
2.4 OM-hep2 mRNA 转录本在正常鱼组织器官中的分布.....	129
2.5 原位核酸分子杂交检测 OM-hep2 在肝脏中的表达.....	130
2.6 副溶血弧菌诱导下 OM-hep2 基因的组织器官表达特性研究.....	131
2.7 OM-hep1 与 OM-hep2 的比较研究.....	132
第三节 讨论.....	134
3.1 海水青鳉 OM-hep2 抗菌肽.....	134
3.2 OM-hep 与其他 Hecpidin 比较分析.....	135
本章参考文献.....	139
第六章 OM-hep1的抗菌机理与抗菌、抗病毒和抗肿瘤细胞的活性研究.....	140
第一节 材料与方法.....	140
1.1 材料.....	142
1.2 实验方法.....	146
第二节 实验结果.....	146
2.1 OM-hep1 成熟肽的合成.....	146
2.2 不同 pH 下 OM-hep1 合成肽最小抑菌浓度 (MIC) 的检测.....	147
2.3 细菌细胞膜结构完整性实验检测 OM-hep1 的抗菌机理.....	158
2.4 OM-hep1 对小鼠成骨细胞 3T3E1 的细胞毒性检测.....	150
2.5 OM-hep1 对人肝癌细胞 HepG2 增殖的影响.....	152
2.6 OM-hep1 对 WSSV 侵染 Hpt 细胞的抑制作用.....	152
第三节 讨论.....	156
3.1 OM-hep1 抗菌作用.....	156

3.2 Hepcidin 抗菌肽的抗菌机制研究.....	157
3.3 OM-hep1 抗病毒活性研究.....	159
3.4 OM-hep1 抗肿瘤细胞活性研究.....	159
本章参考文献.....	160
第七章 抗菌肽Pc-hepc灌胃后对鲈鱼肠道菌的影响	163
第一节 材料与方法.....	163
1.1 材料.....	163
1.2 实验方法.....	165
第二节 实验结果.....	169
2.1 DGGE 检测鱼类肠道菌方法的建立	169
2.2 DGGE 方法检测 4 种养殖鱼类肠道菌状况	170
2.3 绝对实时荧光定量 PCR 检测 4 种鱼类肠道菌丰度.....	177
2.4 饲喂 Pc-hepc 对鲈鱼肠道菌的影响.....	178
2.5 定量分析 3 组不同状况下鲈鱼肝脏中的 Hepcidin 基因的表达.....	182
第三节 讨论.....	184
3.1 肠道菌研究方法.....	184
3.2 口服抗菌肽对鱼类肠道菌的影响.....	185
本章参考文献.....	187
第八章 灌胃Pro-OMhep1的吸收和对黑鲷生理的影响研究	189
第一节 材料与方法.....	189
1.1 材料.....	189
1.2 实验方法.....	190
第二节 实验结果.....	191
2.1 灌胃 Pro-OMhep1 后黑鲷的肠道中吸收状况	191
2.2 灌胃 Pro-OMhep1 多肽后黑鲷血清中存在状况	191
2.3 灌胃 Pro-OMhep1 多肽至黑鲷后血清中 MDA 的检测	191
2.4 灌胃 Pro-OMhep1 多肽黑鲷血清中 CAT 的检测.....	192

第三节 讨论.....	193
3.1 鱼类抗口服抗菌肽的吸收以及应用.....	193
3.2 灌胃抗菌肽对鱼类氧化应激反应影响.....	194
本章参考文献.....	196
结语.....	198
第一节 研究成果.....	198
第二节 主要创新点.....	201
第三节 研究展望.....	201
在学期间参加的科研项目及成果	203
致谢.....	205

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

List of abbreviations	A
Abstract in Chinese	I
Abstract in English	V
Chapter 1 Introduction	1
Section 1 The resources and characters of AMPs	1
1.1 AMPs derived from bacteria	2
1.2 AMPs derived from fungi	3
1.3 AMPs derived from plants	3
1.4 AMPs derived from animals	4
1.5 Characterations of AMPs	7
Section 2 Bio-activities and their mechanisms of AMPs 88	8
2.1 Anti-bacteria activity of AMPs	9
2.2 Anti-fungi activity of AMPs.....	10
2.3 Anti-virus activity of AMPs	10
2.4 Anti-tumor activity of AMPs	10
2.5 Other bio-activities of AMPs	11
Section 3 The applications of AMPs	12
3.1 AMPs as food additives	12
3.2 AMPs for clinic applications.....	12
3.3 AMPs using in animal industry.....	13
3.4 AMPs using in aquatic product.....	13
Section 4 Development and progress in Hepcidin	14
4.1 The structure of Hepcidin	14
4.2 The distribution of Hepcidin and its function	16
Section 5 Development and progress in fish Hepcidin	19
Section 6 Technical proposal, aims and significance of present study	25
6.1 Technical proposal	25

6.2 Aims and significance of present study	26
References.....	28
Chapter2 Cloning and sequence analysis of Pc-hepc	41
Section 1 Material and methods	41
1.1 Material.....	41
1.2 Methods.....	44
Section 2 Results.....	54
2.1 RNA extraction and first cDNA chain reverse transcription	54
2.2 Amplification of Pc-hepc cDNA sequence.....	54
2.3 Pc-hepc cDNA 5'and 3 UTR amplification.....	55
2.4 Amino acids sequence analysis of Pc-hepc.....	55
2.5 Predicted structures of Pc-hepc peptide.....	57
2.6 Comparison of Pc-hepc and other fish Hecidins	59
2.7 Amplification of Pc-hepc genomic DNA	60
2.8 The flanking sequence amplification for Pc-hepc genomic DNA	61
Section 3 Discussion	63
3.1 Reverse PCR amplification.....	63
3.3 The structure character and alignment of Pc-hepc peptide	63
References.....	68
Chapter 3 Tissue-specific and LPS challenged expressions of Pc-hepc mRNA transcripts.....	71
Section 1 Material and methods	72
1.1 Material.....	72
1.2 Methods.....	74
Section 2 Results.....	79
2.1 Sequence of 18s rRNA and β -actin from large yellow croaker.....	79
2.2 Establishment of relative quantity real-time PCR detection for Pc-hepc	

mRNA transcripts.....	80
2.3 RNA extraction of large yellow croaker tissues	81
2.4 Tissue-specific distribution of Pc-hepc	87
2.3 Expression of Pc-hepc mRNA transcripts challenged by LPS	89
Section 3 Discussion	89
3.1 Real-time PCR	89
3.2 Expression characterization of Pc-hepc	92
References	94

Chapter 4 Tissue-specific and *Vibro* challenged expressions of

OM-hep1 mRNA transcripts	97
Section 1 Material and methods	97
1.1 Material.....	97
1.2 Methods.....	102
Section 2 Results.....	108
2.1 Ampilificaiton of OM-hep1 cDNA.....	108
2.2 cRNA probes for ISH.....	109
2.3 Tissue-specific expression of OM-hep1 mRNA transcripts.....	109
2.4 Expression of OM-hep1 mRNA transcripts challenged by <i>Vibro</i>	119
Section 3 Discussion	120
3.1 Marine medaka Hepsidin1	120
3.2 Technique of ISH	121
3.3 Technique of immunohistochemistry.....	121
References	123

Chapter 5 Tissue-specific and *Vibro* challenged expressions of

OM-hep2 mRNA transcripts	125
Section 1 Material and methods	126

1.1 Material.....	126
1.2 Methods.....	126
Section 2 Results.....	128
2.1 Preparation probes of OM-hep1 and OM-hep2	128
2.2 Hybridization of OM-hep1 and OM-hep2	129
2.3 Establishment of relative quantity real-time PCR detection for OM-hep2 mRNA transcripts.....	129
2.4 Tissue-specific expression of OM-hep2 mRNA transcripts.....	129
2.5 ISH of OM-hep2 mRNA in marine medaka liver	130
2.6 Expression of OM-hep2 mRNA transcripts challenged by <i>Vibro</i>	131
2.7 Copmparative study of OM-hep1 and OM-hep2	132
Section 3 Discussion	134
3.1 Marine medaka Hepcidin2.....	134
3.2 Alignment of OM-hep and other Hepcidins.....	135
References.....	138
Chapter 6 Bio-activity of OM-hep1 and its mechanism research... 140	
Section 1 Material and methods	140
1.1 Material.....	140
1.2 Methods.....	142
Section 2 Results.....	146
2.1 Synthesis of mature peptide of OM-hep1	146
2.2 MIC by synthetical OM-hep1 in different pH values	147
2.3 Membrane integrity assay of OM-hep1	148
2.4 Cell toxicity of OM-hep1 cultured with mouse 3T3E1 cells.....	150
2.5 Cell viability assay of OM-hep1 cultured with HepG2 cells.....	152
2.6 OM-hep1 anti-WSSV infection of Hpt cells.....	152
Section 3 Discussion	156
3.1 Anti-bacteria activity of OM-hep1	156

3.2 Mechanism of Anti-bacteria activity of OM-hep1	157
3.3 Anti-virus activity of OM-hep1	159
3.4 Anti-tumor activity of OM-hep1	159
References.....	160

Chapter 7 Gut microbiota diversity of Japanese sea bass fed with recombinant Pc-hepc

Section 1 Material and methods	163
1.1 Material	163
1.2 Methods.....	165
Section 2 Results.....	169
2.1 Establishment of DGGE method	169
2.2 Four fish gut microbiota analysis by DGGE.....	170
2.3 Fish gut bacteria number detected by absolutely quantity real-time PCR	177
2.4 Gut bacteria community diversity analysis of Japanese sea bass fed with Pc-hepc.....	178
2.5 Detection of Japanese sea bass Hcpidin.....	182
Section 3 Discussion	184
3.1 The research methods of gut microbiota	184
3.2 AMPs applications in agriculture.....	185
References.....	187

Chapter 8 Absorption of gastric-delivery Pro-OMhep1 and physiology affections in black porgy.....

Section 1 Material and methods	189
1.1 Material	189
1.2 Methods.....	190

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库