

# 大黄鱼两种 c 型溶菌酶分子特征研究

李 威<sup>1,2</sup>, 肖 遥<sup>1,2</sup>, 韩 芳<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 从大黄鱼的转录组数据中鉴定出两种新型 c 型溶菌酶, 分别命名为 LcLyz1 与 LcLyz2, 对其进行序列分析、同源比对, 详细研究这两种溶菌酶的蛋白质三级结构, 并进行基因克隆、原核表达和蛋白质溶解性分析。结果表明, LcLyz1 与 LcLyz2 的开放阅读框分别为 429 和 432 对碱基对, 编码 142 和 143 个氨基酸序列, 它们的活性中心均定位于 Glu50 和 Asp67, 并且含有信号肽和保守的 HLH (helix-loop-helix) 结构。通过原核表达系统, 观察到这两种蛋白均以包涵体的形式在沉淀中表达。

[关键词] 大黄鱼; c 型溶菌酶; 分子特征; 蛋白表达

[中图分类号] S 917.4; Q 78

## Molecular Characteristics of Two c-Type Lysozymes from Large Yellow Croaker *Larimichthys crocea*

LI Wei<sup>1,2</sup>, XIAO Yao<sup>1,2</sup>, HAN Fang<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this study, two novel c-type lysozymes, LcLyz1 and LcLyz2, were identified within the large yellow croaker transcriptome. Sequence analysis, homologous alignment were performed, including an examination of their tertiary protein structures, alongside gene cloning, prokaryotic expression, and solubility assessments. The open reading frames (ORFs) of LcLyz1 and LcLyz2 are 429 and 432 bp, respectively, encoding 142 and 143 amino acids. Both sequences exhibit active sites located at Glu50 and Asp67, along with signal peptides and a conserved helix-loop-helix (HLH) structure. Prokaryotic expression revealed that both lysozymes were expressed in the form of inclusion bodies in the precipitate.

**Keywords:** *Larimichthys crocea*; c-type lysozyme; molecular characteristics; protein expression

## 0 引言

溶菌酶 (lysozyme, EC3.2.1.17), 亦称为 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶 (N-acetyl muramide glycanohydrolase), 是一种具有抑菌效果的蛋白水解酶<sup>[1]</sup>。溶菌酶的分布极为广泛, 自然界中的植物、动物和微生物体内都有溶菌酶的存在<sup>[1]</sup>。鱼类体内只有 c 型和 g 型溶菌酶存在<sup>[3]</sup>。溶菌酶能够通过酶解途径破坏细菌细胞壁的肽聚糖中连接 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键来发挥作用<sup>[1]</sup>, 同时还可以通过非酶途径对多种致病微生物起到抑制的作用<sup>[1,4]</sup>, 在鱼类抵抗外来细菌、真

[收稿日期] 2024-01-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目“大黄鱼抗虹彩病毒病性状的遗传解析”(32072969); 福建省自然科学基金项目“MMP17 在大黄鱼抗弧菌免疫中的作用机制”(2022J01325)

[作者简介] 通信作者: 韩芳 (1981—), 博士, 教授, 博导, 从事鱼类生物技术方向研究。E-mail: hanfangyc@jmu.edu.cn

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

菌、病毒、寄生虫等病原体方面发挥着重要的作用<sup>[5-7]</sup>。作为非特异性免疫因子,溶菌酶不仅在机体抵御外来病原体方面发挥着重要作用,在生物体内的数量和活性方面还被作为免疫状态的评判指标之一<sup>[8]</sup>。c 型溶菌酶存在一个具有杀菌活性的螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 结构域。HLH 结构域对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌等多种微生物均有杀菌活性。其原理是 HLH 结构域及其 C 末端的螺旋区可以通过耗散脂质膜的电化学电势形成离子通道,以此来破坏磷脂双分子层结构<sup>[5,9]</sup>。由于溶菌酶具有宽抗菌谱且不会产生耐药性,具有替代抗生素的潜力,因此,溶菌酶在饲料添加剂、食品工业保鲜剂等领域有着广泛的生产应用前景<sup>[1]</sup>。

目前许多经济鱼类都有 c 型溶菌酶的报道,如斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[10]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[11]</sup>、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[12]</sup>、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)<sup>[13]</sup> 和菱鲆 (*Scophthalmus rhombus*)<sup>[7]</sup>。鱼类 c 型溶菌酶通常有两个保守的催化残基 (Glu 和 Asp),同时它们的位置往往也是高度保守的。从虹鳟的肝脏和肾脏中克隆获得了两种 c 型溶菌酶,这两种溶菌酶均含有信号肽<sup>[11]</sup>,其中 c-2 型溶菌酶对藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 均具有抗菌活性<sup>[14]</sup>。牙鲆的 c 型溶菌酶,对迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和  $\beta$  链球菌 ( $\beta$ -streptococcus) 有一定的杀灭作用<sup>[15]</sup>。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属鲈形目、石首鱼科、黄鱼属,是我国养殖量最大的海水经济鱼类<sup>[16]</sup>。大黄鱼的病害主要有细菌性、病毒性和寄生虫性疾病<sup>[17]</sup>。但关于大黄鱼 c 型溶菌酶的研究尚未见报道。本研究从大黄鱼转录组数据库内筛选获得了两种 c 型溶菌酶,进行分子生物学分析,研究其蛋白质三级结构特点,并进行基因克隆、原核表达及蛋白质可溶性分析,以期为深入研究溶菌酶的功能和作用机制奠定基础,也为揭示大黄鱼抗病性状的遗传基础提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用大黄鱼于 2019 年 2 月采集自福建省宁德市金陵水产科技有限公司。各组织样品放置于 RNA 保护液中,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。表达载体 *pGEX-6P-1* 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达菌株为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 (*Trans Zol Up Plus RNA Kit*) 购自北京全式金生物技术有限公司;逆转录试剂盒 (*GoScript™ Reverse Transcription System Protocol*, Promega) 购自上海泰京生物技术有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和无内毒素质粒小量提取试剂盒购自北京天漠科技开发有限公司;一步克隆试剂盒 (*ClonExpress® II One Step Cloning Kit*) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)、BeyoBlue 考马斯亮蓝快速染色液购自上海碧云天生物技术有限公司 (Beyotime)。本研究所用引物均在厦门铂瑞生物科技有限公司合成。

### 1.3 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用 *Trans Zol Up Plus RNA Kit* 进行组织样品的 RNA 提取,用逆转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链,并用内参基因  $\beta$ -actin 对 cDNA 合成质量进行检测。

### 1.4 LcLyz1 和 LcLyz2 开放阅读框序列的克隆和载体构建

从本实验室构建的大黄鱼转录组数据库中获得 *LcLyz1* 和 *LcLyz2* 基因的开放阅读框序列。根据 *ClonExpress® II* 一步克隆试剂盒设计了具有 *EcoR I* 和 *Xho I* 限制性位点的特异性引物 (见表 1)。PCR 的步骤如下:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 min 预变性,进行 30 个扩增循环 ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 40 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min),  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  彻底延伸 5 min。将纯化后的基因产物连接到 *pGEX-6P-1* 载体,转化至大肠杆菌 BL21 (DE3),筛选菌落 PCR 阳性的菌株,送往铂瑞生物技术有限公司测序。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in this study

引物名	序列 (5' - 3')
LcLyz-F	ccccctgggatccccc <u>GAATTC</u> ATGAAAGTCTACCAGCGTTGTGAA
LcLyz1-R	gtcacgatgcggccg <u>CTCGAGT</u> TAAAGGCCACATCCT
LcLyz2-R	gtcacgatgcggccg <u>CTCGAGT</u> TAAAGGCCACAATCTGCCAC

注: *EcoR* I (GAATTC) 和 *Xho* I (CTCGAG) 的酶切位点用下划线标注。

1.5 生物信息学分析

本实验多序列比对和进化树构建所使用到的氨基酸序列均来源于 NCBI 数据库。通过 SignalP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 蛋白质的跨膜结构域分析在网站 [https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) 进行; 蛋白质结构域预测在网站 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi> 和 [http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi) 进行; 蛋白质的三级结构预测在网站 <http://swissmodel.expasy.org/interactive> 和 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> 进行; 用 VMD 1.9.2 beta 1 软件进行蛋白质三级结构建模。重组载体经测序后的结果比对和分析使用 DNAMAN 进行; 系统进化树的构建使用 MEGA 7.0 软件的 Maximum-Likelihood 法进行 (Bootstrap = 100); 氨基酸序列的多重序列比对使用 Bioedit 软件进行。

1.6 重组蛋白诱导表达及可溶性分析

将测序正确的重组菌株进行摇床培养 (200 r/min, 37 ℃), 当 OD<sub>600</sub> 值约为 0.6 时, 加入诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 0.1 mmol/L, 再 100 r/min、16 ℃继续培养 16 h。菌在 12 000 × g、4 ℃条件下离心 3 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次, 沉淀用 PBS 重悬, 置于冰水中超声破碎 30 min (功率 75%, 脉冲 3 s, 间隔 3 s), 再 12 000 × g、4 ℃离心 20 min。将收集的未诱导、诱导、上清和沉淀样本进行 SDS-PAGE 电泳 (分离胶 12.5%, 电压 120 V), 用考马斯亮蓝快速染色液对凝胶进行染色。

2 结果

2.1 LcLyz1 和 LcLyz2 氨基酸序列分析

*LcLyz1* 基因的 cDNA 长 548 bp, 其中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 区域长度为 429 bp 编码 142 个氨基酸 (见图 1a); *LcLyz2* 基因的 cDNA 长度为 680 bp, 其中 ORF 长 432 bp 编码 143 个氨基酸 (见图 1b)。磷酸化位点分析发现, *LcLyz1* 共有 9 个丝氨酸 (Ser)、4 个苏氨酸 (Thr) 和 2 个酪氨酸 (Tyr), 共计 15 个磷酸化位点; *LcLyz2* 共有 10 个磷酸化位点, 分别为 7 个 Ser、2 个 Thr 和 1 个 Tyr。两种 c 型溶菌酶的糖结合位点的数量均为 12 个; 活性位点均为 2 个, 且位置相同, 均为位于 50 位的 Glu (谷氨酸) 及 67 位的 Asp (天冬氨酸)。分析蛋白质的保守结构域, 发现 *LcLyz1* 和 *LcLyz2* 均含有一个保守的 c 型溶菌酶结构域。信号肽分析发现, 大黄鱼 *LcLyz1* 和 *LcLyz2* 均具有信号肽序列 (见图 1 灰色部分), 它们的信号肽结构均位于前 15 位氨基酸处, 且均不含跨膜结构。

2.2 c 型溶菌酶系统进化树和序列同源性分析

选取了鱼类、哺乳类和鸟类代表物种的 c 型溶菌酶进行氨基酸序列比对, 发现各序列间相似性较高, 其中大黄鱼与鱼类的同源性为 73.61% ~ 97.18% (见表 2)。c 型溶菌酶的两个催化残基 Glu 和 Asp 在本次多序列比对的所有氨基酸序列中均为保守残基, 此外其 HLH 结构的氨基酸序列也有相当高的保守性, 可见 c 型溶菌酶在不同物种间具有较高的同源性 (见图 2)。

Atgaggtctctgggtctctctgctcttggtaactttggccagcgctaaagtctacacagctg  
M R **S** L L V F L L L V L A L **S** R K V Y Q R  
tggatggccgagcatgatgaggtatggctggagcgctctacggttctacagctgacgctg  
C E W A R V M R D N G L D G F H G Y **S** L  
gcacaatgggtttgtctgctcaagtgggagctgacgtcaaacaccagcagcgtcaaccac  
A N W V C L **S** K W **E** **S** G **T** Y T R A I N H  
aacactgatggatcctcatgactctggcattctccagatcaaacgcgctgtgtggtgcaat  
N T D G S T **D** F G I F Q I I N S R W C N  
gacggcatcatcattatcaaatgatgcccacatccagctgcagccagctcttgactgat  
D G I I H S **S** N A C H I Q C S Q L L **T** D  
gatgtgctgtggcgatcaactgtgcacaaagtgtctgcagatcccaacgycgatgaaa  
D V S G T A I N C A K R V V Q D P N G M K  
gcttggtggcctggcgctcactgcgagaaacgtgcagctgagtgccattgtggcagat  
A W V A W R R H C E N R D V **S** A Y V A  
tgtggccttaaa  
C G L -

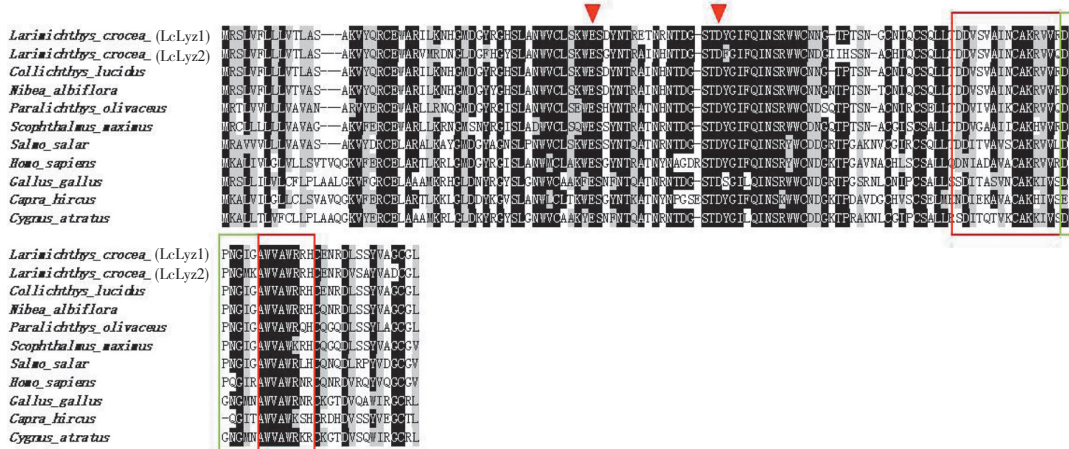
b) LcLyz2

终止密码子对应的氨基酸用“-”表示; 预测活性位点以红色字母显示; N端信号肽序列用灰色标明; 红色框表示丝氨酸(Ser)磷酸化位点; 绿色框表示酪氨酸(Tyr)磷酸化位点; 蓝色框表示苏氨酸(Thr)磷酸化位点。

图1 大黄鱼LcLyz1和LcLyz2的ORF序列及对应的氨基酸序列  
Fig.1 ORF sequences and amino acid sequences of LcLyz1 and LcLyz2 in *L. crocea*

表 2 大黄鱼 c 型溶菌酶与其他脊椎动物 c 型溶菌酶的氨基酸序列一致性  
Tab. 2 Amino acid sequence identity between c-type lysozymes of different vertebrates

物种	一致性/%	GenBank 登录号
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> (LcLyz1)	100	XP_019114157.2
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	97.18	TKS84091.1
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	94.41	KAG8010952.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> (LcLyz2)	81.12	XP_010737565.1
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	79.72	XP_019959997.1
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	76.92	XP_035464844.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	73.61	XP_014000972.1
人 <i>Homo sapiens</i>	64.00	AAA59536.1
家鸡 <i>Gallus gallus</i>	58.11	ACL81750.1
山羊 <i>Capra hircus</i>	56.38	AGF69230.1
黑天鹅 <i>Cygnus atratus</i>	56.08	XP_035400200.1



红色三角形代表溶菌酶催化位点；方框内为 c 型溶菌酶的 HLH 结构；两个红色方框内分别对应 HLH 结构的两个螺旋(Helix)部分；中间绿色方框内为环状结构(Loop)。

图 2 c型溶菌酶的氨基酸序列同源性比较

Fig.2 Multiple sequence alignment of c-type lysozyme amino acid sequences

利用以上物种的氨基酸序列构建出系统进化树（见图3），以研究 LcLyz 与其他物种的系统进化关系。由图3可见，各个物种的c型溶菌酶各自聚为一支，与传统的动物进化关系相符合；大黄鱼 LcLyz1 与棘头梅童鱼的c型溶菌酶氨基酸序列具有最高的同源性；LcLyz2 与黄姑鱼的c型溶菌酶氨基酸序列具有最高的同源性；大黄鱼的两种c型溶菌酶与其余鱼类的c型溶菌酶氨基酸序列相比较，也具有较高的同源性。



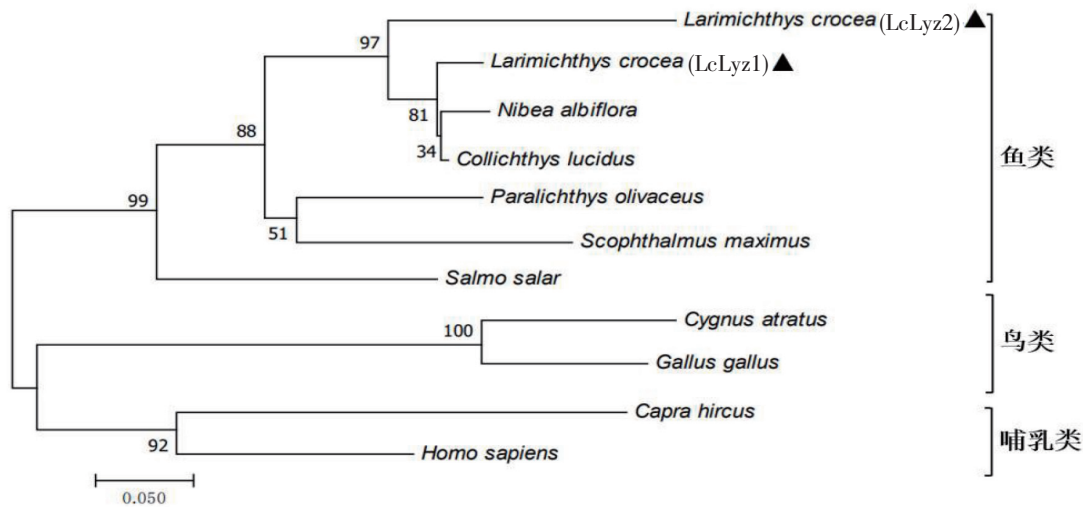


图 3 c 型溶菌酶的系统进化树  
Fig.3 Phylogenetic tree of c-type lysozyme

2.3 c 型溶菌酶的蛋白结构

分析大黄鱼 LcLyz1 和 LcLyz2 氨基酸序列的蛋白质三维结构,发现它们的两个活性位点均存在于溶菌酶蛋白质表面的裂隙结构内部 (见图 4)。针对大黄鱼与其他多种物种的 c 型溶菌酶内含有的 HLH 结构域建模,发现多种物种体内的 c 型溶菌酶均含有三级结构相似的 HLH 结构 (见图 5)。

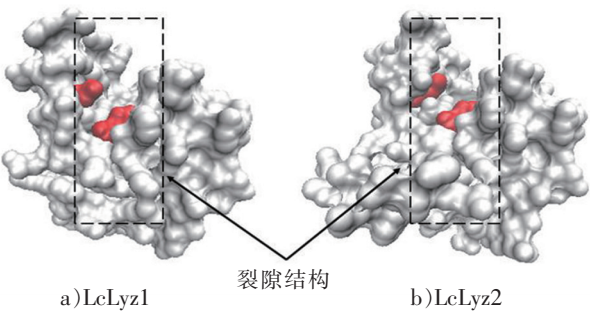


图 4 LcLyz1 与 LcLyz2 蛋白三级结构  
Fig.4 The tertiary structure of LcLyz1 and LcLyz2

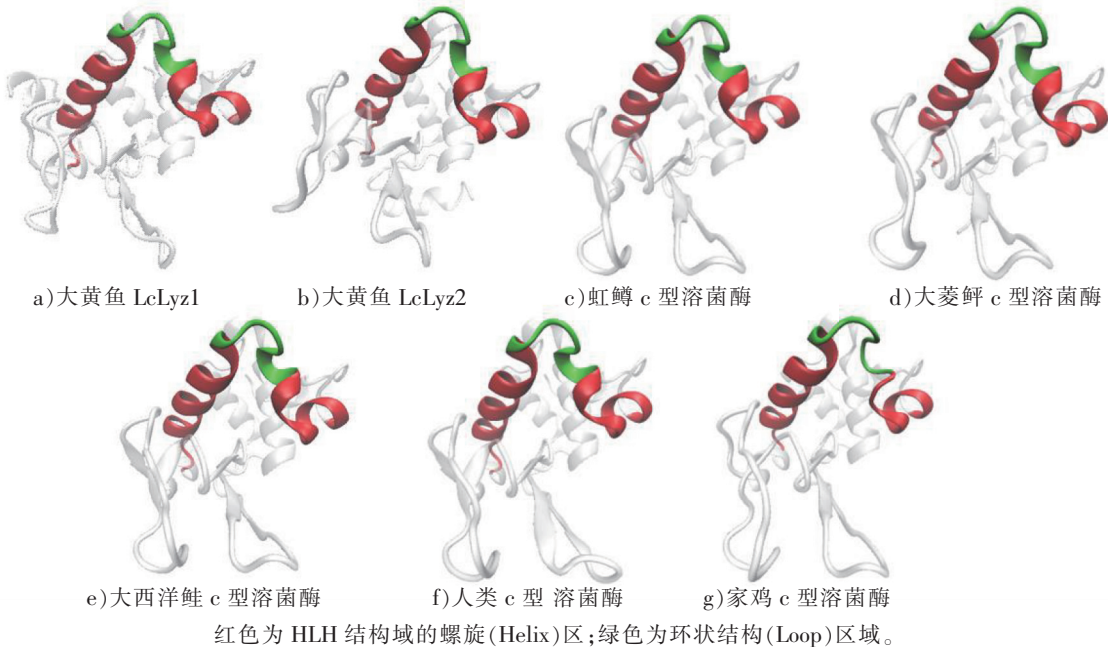


图 5 多个物种 c 型溶菌酶的 HLH 结构对比  
Fig.5 Comparison of HLH structures of c-type lysozyme from multiple species

2.4 两种 c 型溶菌酶重组质粒的构建

PCR 扩增大黄鱼 *LcLyz1* 与 *LcLyz2* 基因的 ORF，得到 500 bp 左右的单一亮带（见图 6a），并经测序确认。对扩增的 *pGEX-6P-1* 菌液进行质粒提取和电泳检测，与 *pGEX-6P-1* 载体质粒 4984 bp 的大小相符（见图 6b）。重组的带 GST 标签的 *pGEX6P-1-LcLyz1* 和 *pGEX6P-1-LcLyz2*（见图 6c、6d）菌株扩增后用测序引物进行菌液 PCR 验证，将扩增出目的条带的菌株送至铂瑞生物技术有限公司测序，经验证重组质粒序列正确。

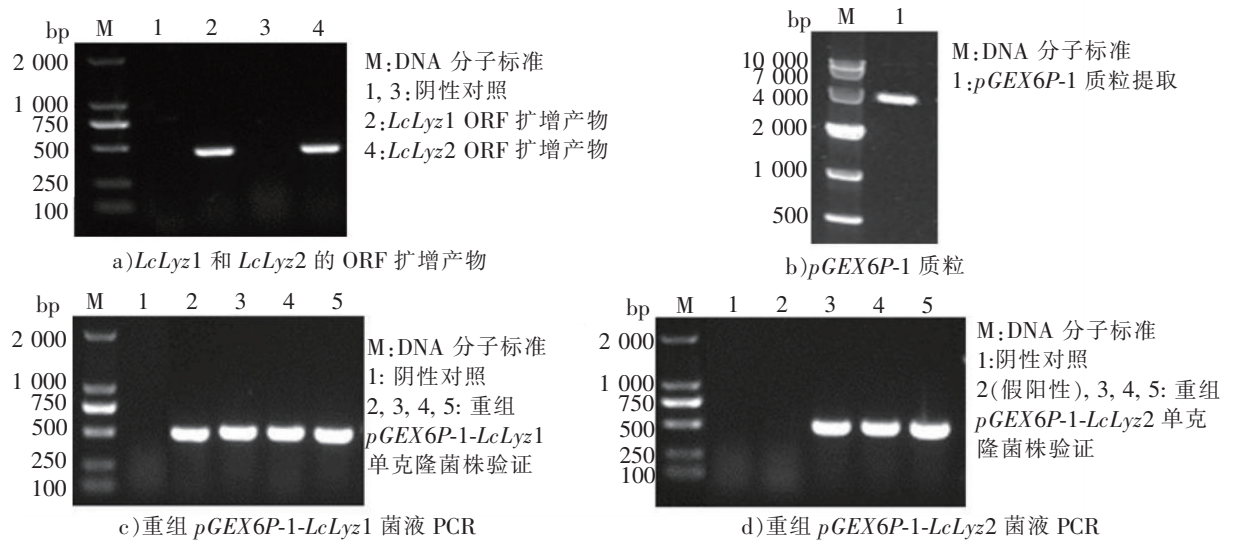


图 6 *pGEX6P-1-LcLyz1* 和 *pGEX6P-1-LcLyz2* 重组质粒构建  
Fig.6 Recombinant plasmids *pGEX6P-1-LcLyz1* and *pGEX6P-1-LcLyz2* construction

2.5 重组蛋白的诱导表达和可溶性分析

*GST-LcLyz1* 和 *GST-LcLyz2* 重组菌株经 IPTG 诱导后出现的蛋白质条带大小约为 40 ku，与预测的蛋白质大小相符（见图 7）。经蛋白质可溶性分析发现，诱导后的重组菌体经超声破碎后离心为不可溶的包涵体表达（见图 7）。

3 讨论

在大部分生物体内，通常只发现一种 c 型溶菌酶，但有些生物体内存在多种 c 型溶菌酶。本研究揭示大黄鱼体内存在两种 c 型溶菌酶，这一发现与大西洋鲑和虹鳟<sup>[11,14]</sup>体内存在两种 c 型溶菌酶的情况一致，而在奥利亚罗非鱼（*Oreochromis aureus*）中则发现了 3 种 c 型溶菌酶<sup>[18]</sup>。本研究序列分析发现，大黄鱼的两种 c 型溶菌酶 *LcLyz1* 与 *LcLyz2* 均含有一段长度为 15 个氨基酸的信号肽序列。大部分物种的 c 型溶菌酶 N 端含有信号肽，表明这些蛋白是分泌型蛋白<sup>[19]</sup>。大黄鱼的两种溶菌酶 *LcLyz1* 与 *LcLyz2* 具有相同数量、位置和种类的酶活性位点，均为 Glu50 和 Asp67。鱼类的 c 型溶菌酶通常具有两个保守的催化残基 Glu 和 Asp，它们的位置往往也是高度保守的，例如大菱鲆、菱鲆、大西洋鲑、虹鳟的 c 型溶菌酶的催化残基均为 Glu50 和 Asp67<sup>[7,11,13,20]</sup>，草鱼 c 型溶菌酶的 Glu 和 Asp 催化残基则分别位于第 53 和第 70 位<sup>[21]</sup>。

在 *LcLyz1* 与 *LcLyz2* 蛋白质的三维建模中，除了发现其活性位点位置的裂隙结构外，还发现了与鸡蛋清溶菌酶相似的 HLH 结构。Ibrahim 等<sup>[22]</sup>使用梭菌蛋白酶对鸡蛋清 c 型溶菌酶进行消化，发现了

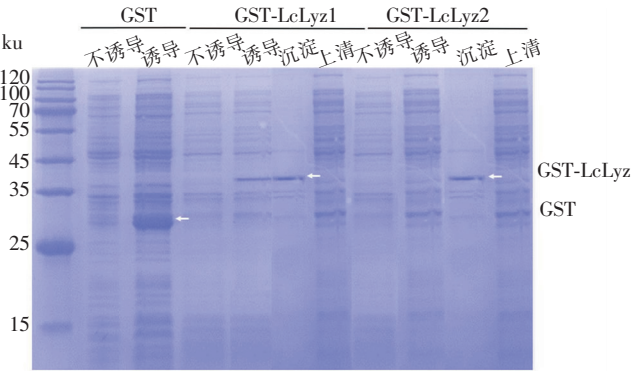


图 7 *GST-LcLyz1* 和 *GST-LcLyz2* 重组蛋白的原核表达及可溶性分析  
Fig.7 Prokaryotic expression and solubility analysis of recombinant proteins *GST-LcLyz1* and *GST-LcLyz2*

鸡蛋清 c 型溶菌酶的 HLH 结构是一个活性结构,该结构区域对多种革兰氏阳性菌具有抗菌效果,如有枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、金黄葡萄球菌、兽疫链球菌 (*Streptococcus zooepidemicus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 和迟缓葡萄球菌 (*Staphylococcus lentus*);此外,其对部分的革兰氏阴性菌也具有抑菌效果,如有支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 等。HLH 结构的 N 端螺旋对革兰氏阳性菌有抑菌活性,而 C 端螺旋对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑菌活性。以人类 c 型溶菌酶模板合成的 HLH 结构域对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、支气管败血症博德氏杆菌、肺炎克雷伯氏菌和铜绿假单胞菌的抑菌效果要高于人 c 型溶菌酶全蛋白<sup>[23]</sup>。通过氨基酸序列比对和蛋白质三维结构构建,本研究还在多种鱼类的 c 型溶菌酶中发现类似的 HLH 结构,并且不同物种溶菌酶的 HLH 在三级结构方面具有一致性。目前还未见关于鱼类 c 型溶菌酶 HLH 结构域的结构和功能的深入报道,后续可以开展相关研究,将有助于深入了解鱼类 c 型溶菌酶的功能和作用机制。

本研究对 LcLyz1 与 LcLyz2 的重组蛋白进行表达和可溶性分析,结果表明其融合蛋白主要以包涵体形式存在。奥利亚罗非鱼体内存在的三种 c 型溶菌酶也均为包涵体表达,需经过变性与复性来获得纯化蛋白。近年来,鱼类 c 型溶菌酶的相关研究建立了多种蛋白质纯化体系,如有:针对鲤鱼、草鱼、鲫鱼 (*Carassius auratus*) 和斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*) 的 c 型溶菌酶构建了基于重组毕赤酵母的真核表达系统<sup>[24-27]</sup>。酵母细胞的蛋白质表达系统还应用于青蛤 i 型溶菌酶以及人类 c 型溶菌酶的高效表达过程中<sup>[28-29]</sup>。这为大黄鱼 LcLyz1 与 LcLyz2 及其他类似的包涵体表达的溶菌酶蛋白的纯化提供了可供参考的技术路线。本研究为进一步探索大黄鱼 c 型溶菌酶的功能、作用机制及其商业化应用提供了基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] SONG Q, XIAO Y, XIAO Z, et al. Lysozymes in fish[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(50): 15039-15051.
- [2] CROSS M, MANGELSDORF I, WEDEL A, et al. Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85(17): 6232-6236. DOI: 10.1073/pnas.85.17.6232.
- [3] LI L, CARDOSO J C R, FÉLIX R C, et al. Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 114: 103772.
- [4] VILLA T G, FEIJOO-SIOTA L, RAMA J L R, et al. Antivirals against animal viruses[J]. Biochemical Pharmacology, 2017, 133: 97-116.
- [5] WHANG I, LEE Y, LEE S, et al. Characterization and expression analysis of a goose-type lysozyme from the rock bream *Oplegnathus fasciatus*, and antimicrobial activity of its recombinant protein[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 532-542.
- [6] 张琇, 吴发兴, 孙谧, 等. 海洋微生物溶菌酶体外抗菌抗病毒活性研究[J]. 中国农业科学, 2007(11): 2626-2631.
- [7] JIMÉNEZ-CANTIZANO R M, INFANTE C, MARTIN-ANTONIO B, et al. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1): 57-65.
- [8] WATTS M, MUNDAY B, BURKE C. Immune responses of teleost fish[J]. Australian Veterinary Journal, 2001, 79(8): 570-574.
- [9] IBRAHIM H R. On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen egg-white lysozyme: a conformation-dependent activity[J]. Nahrung Food, 1998, 42(3/4): 187-193.
- [10] WEI S, HUANG Y, CAI J, et al. Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 186-196.
- [11] DAUTIGNY A, PRAGER E M, PHAM-DINH D, et al. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin[J]. Journal of Molecular Evolution, 2001, 52(1): 1-11.

1991,32(2):187-198.

- [12] HIKIMA J, HIRONO I, AOKI T. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1997, 6(4): 339-344.
- [13] YU L, SUN B, LI J, et al. Characterization of a c-type lysozyme of *Scophthalmus maximus*: expression, activity, and antibacterial effect [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 46-54.
- [14] MITRA A, FOSTER-FREY J, REXROAD C E, et al. Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of gene duplication [J]. Animal Biotechnology, 2003, 14(1): 7-12.
- [15] MINAGAWA S, HIKIMA J, HIRONO I, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(5): 439-445.
- [16] 韩承义, 吴雄飞, 许斌福, 等. 2020 年中国大黄鱼产业现状分析及发展建议 [J]. 渔业研究, 2022, 44(4): 395-406.
- [17] 李安涵. 网箱养殖大黄鱼常见病害防治技术 [J]. 黑龙江水产, 2023, 42(6): 500-502.
- [18] 瞿兰, 叶星, 田园园, 等. 罗非鱼 3 种 C 型溶菌酶重组蛋白的制备及与几种鱼虾溶菌酶溶菌谱的比较 [J]. 生物技术通报, 2012, (11): 161-166.
- [19] CALLEWAERT L, MICHELIS C W. Lysozymes in the animal kingdom [J]. Journal of Biosciences, 2010, 35(1): 127-160.
- [20] LEONG J S, JANTZEN S G, von SCHALBURG K R, et al. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 279.
- [21] YE X, ZHANG L, TIAN Y, et al. Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(5): 501-509.
- [22] IBRAHIM H R, THOMAS U, PELLEGRINI A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(47): 43767-43774.
- [23] IBRAHIM H R, IMAZATO K, ONO H. Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59(18): 10336-10345.
- [24] 杨悦, 陶妍, 谢晶, 等. 基于重组毕赤酵母的草鱼 C 型溶菌酶生物合成及其抑菌活性 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(12): 169-179.
- [25] 颜倩倩, 陶妍, 李雯, 等. 鲤鱼 c 型溶菌酶在毕赤酵母中的重组表达及其抑菌活性 [J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(11): 1912-1922.
- [26] 冯亚东, 陶妍, 李雯, 等. 斑点叉尾鲷 C 型溶菌酶在毕赤酵母中的表达及其抑菌活性 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 195-202.
- [27] 宋玉芳, 陶妍, 谢晶, 等. 基于重组毕赤酵母的鲫鱼 c 型溶菌酶生物合成及其特性 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(11): 2177-2188.
- [28] 冯付霁, 赵震, 陶妍, 等. 青蛤 I 型溶菌酶在毕赤酵母中的重组 DNA 表达 [J]. 水产科学, 2022, 41(5): 836-843.
- [29] 徐艳艳, 廖志银, 王珍, 等. 密码子优化的人溶菌酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及抗菌活性分析 [J]. 浙江大学学报(理学版), 2022, 49(6): 753-759.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)