

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

海洋动物抗菌肽的毕赤酵母表达技术及抗菌肽饲料添加剂的研发

The optimized expression technology of marine animal-sourced antimicrobial peptides in *Pichia pastoris* and the development of antimicrobial peptide as feedstuff additive

彭 会

工作完成日期 2015 年 6 月

报告提交日期 2015 年 7 月

厦门大学

2015 年 7 月

海洋动物抗菌肽的毕赤酵母表达技术及抗菌肽饲料添加剂的研发

The optimized expression technology of marine animal-sourced antimicrobial peptides in *Pichia pastoris* and the development of antimicrobial peptide as feedstuff additive

博 士 后 姓 名 彭 会

流动站（一级学科）名称 海洋科学

专 业（二级学科）名称 海洋生物

研究工作起始时间 2012 年 1 月

研究工作期满时间 2015 年 6 月

厦 门 大 学

2015 年 7 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（）， 2、不保密（）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 2015年7月10日

导师签名： 日期： 2015年7月10日

摘要

抗生素污染问题是目前影响我国水产养殖业可持续健康发展的重大科技问题，抗生素（antibiotics）作为常用抗菌药物，被广泛应用于水产养殖业，但是抗生素超标所引起的细菌耐药性问题已成为全球公共健康问题，因此寻找抗生素的有效替代品是目前国内外本领域的研究热点之一。抗菌肽（antimicrobial peptide）是先天性免疫的重要组分，广泛存在于生物界的各个门类，进化上相对保守，具有广谱抗菌活性、且不会产生细菌耐药性，被预言为最有希望替代抗生素的天然药物，具有广阔的应用前景。但直接从动物体内提取抗菌肽不适用于未来产业化的要求，目前公认的最有效方法是基因工程表达，但考虑到在水产养殖业应用时大肠杆菌的潜在风险性，需增加去除大肠杆菌的过程，相应成本提高。本论文主要是优化毕赤酵母表达发酵的方法和工艺，实现海洋动物抗菌肽在毕赤酵母中高表达，研究抗菌肽毕赤酵母表达产物的抗菌活性与抗菌谱，进一步优化毕赤酵母基因工程产品的加工工艺，制备成新型抗菌肽饲料添加剂。本研究为未来海洋抗菌肽在水产养殖上的应用提供技术支撑，具有产业化前景。主要研究成果如下：

1. 黑鲷Hepcidin 2的毕赤酵母表达及其抗菌活性：前期没有实现黑鲷Hepcidin 2在毕赤酵母中的直接的高表达，本实验构建了真核表达载体pPIC9K-scy/hepc2，在毕赤酵母中诱导表达融合蛋白Scy-hepc2，经诱导表达条件优化，表达量约32 mg/l。获得的融合蛋白Scy-hepc2用肠激酶酶切，二次亲和纯化获得抗菌肽Hepcidin 2纯品，产量为9 mg/l。抗菌活性结果显示，真核表达的黑鲷Hepcidin 2对革兰氏阳性和阴性菌都具有显著抑杀菌活性（MIC<10 μ M），且显著高于原核表达产物的抗菌活性。该方法为对宿主具有毒性的抗菌肽在毕赤酵母中的高表达提供了可行的解决方法，同时获得了高产量的黑鲷抗菌肽Hepcidin 2纯品，为其功能的深入研究和应用奠定基础。

2. 联合多肽Scy-sphistin的真核表达、抗菌活性及其作为抗菌肽饲料添加剂的研发：采用重叠PCR的方法，体外构建了scy-sphistin联合基因的真核表达载体pPIC9K-scy-sphistin，转化毕赤酵母GS115，筛选获得高表达菌株GS115/pPIC9K-scy-sphistin。进一步建立了青蟹抗菌肽scy-sphistin的毕赤酵母规模化发酵工艺，利用喷雾干燥技术制备的抗菌肽饲料添加剂具有高效抗菌活性，研发的抗菌肽scy-sphistin基因工程产品用于制备饲料添加剂，可降低饲料中抗生素用量。

关键词：抗菌肽；联合多肽；毕赤酵母；抗菌活性；饲料添加剂

Abstract

Antibiotic pollution is the major scientific and technological problem affecting the sustainable and healthy development of aquaculture industry in China. Antibiotics as antimicrobial drug, is widely used in aquaculture. However, the abuse of antibiotics has caused numerous problems, such as the bacterial resistance, which has become a global public health problem. Therefore, how to control the abuse of antibiotics has become a problem that we must resolve as fast as possible. Antimicrobial peptides are important components of the natural defenses of living organisms, which are relatively conserved in evolution and have a broad spectrum of antibacterial activities and can not generate drug resistance of bacteria. Thus the antimicrobial peptide is predicted to be the most promising alternative to antibiotics. It suggested that antimicrobial peptide could be used as a substitute for antibiotics. But the peptide extracted directly from the animal is not suitable for industrial requirements. The most effective solution is to use genetic engineering expression technology. Considering the future utilization of these identified functional AMPs from marine animals, an effective *Pichia pastoris* expression system is more adequate for producing large quantities of biological active peptides for both research and agricultural application than *Escherichia coli*. In this study, the optimal expression condition of marine animal-sourced antimicrobial peptide was determined and the antimicrobial activities of AMPs were analyzed. Furthermore the processing technology of genetic engineering product was determined and the recombinant products were developed to be as feedstuff additive. The feed additive with AMP substituted for antibiotics will greatly benefit to aquaculture, thus suggesting that the AMP-made products will have a broad market in future commerce. The results are showed as follows:

1. Scygonadin fusion technology for difficult-to-express protein of hepcidin 2 from black porgy in *P. pastoris*: A 192 bp cDNA sequence of hepcidin 2 was cloned into a secretion vector of pPIC9K, however, direct secretory expression of hepcidin 2 in *P. pastoris* was found not practical. Here, a new approach was developed to express hepcidin 2 successfully by co-expressing the antimicrobial peptides of scygaondin and hepcidin 2 in *P. pastoris*. Hepcidin 2 was linked with scygonadin by a designed short linker that could be cleaved by enterokinase. A total of 32 mg secreted fusion protein/l was obtained under optimum conditions and 9 mg hepcidin 2/l was achieved by affinity chromatography. The purified hepcidin 2 remained high activity against bacteria. And *P. pastoris*-derived hepcidin 2 exhibited higher antimicrobial activities against bacteria than *E. coli*-derived hepcidin 2. This may be an effective technique to express other antimicrobial peptides with toxicity to *P. pastoris*.

2. Expression and antimicrobial activity of recombinant hybrid peptide Scy-sphistin in *P.*

pastoris and the development of Scy-sphistin as feedstuff additives: a 450 bp cDNA sequence encoding the hybrid peptide of scy-sphistin was cloned into a secretion vector of pPIC9K using overlap PCR, and a high-level of the recombinant scy-sphistin was achieved in *P. pastoris*. A stable fermentation process was established and the antimicrobial peptide of Scy-sphistin as feedstuff additive was prepared by spray drying technology. Also it still exhibited high antimicrobial activities against bacteria. The antimicrobial peptide of Scy-sphistin as feedstuff additive can reduce the dosage of antibiotics in aquaculture.

Key words: Antimicrobial peptide; Hybrid peptide; *Pichia pastoris*; Antimicrobial activity; Feedstuff additive

目 录

第一章 引言	1
第二章 黑鲷 Heparin 2 的毕赤酵母表达及其抗菌活性	6
第一节 材料与方法	6
1.1 实验材料	6
1.2 方法	9
第二节 结 果	18
2.1 真核表达载体 pPIC9K 和目的基因片段 Scy-hepc2 的制备	18
2.2 重组表达载体的鉴定及测序	19
2.4 Scy-hepc2 在毕赤酵母中的表达	20
2.5 Scy-hepc2 的大量表达和纯化	22
2.6 Heparin 2 的纯化	22
2.7 Heparin 2 的肽指纹图谱鉴定	23
2.8 真核表达的抗菌肽 Heparin 2 的抗菌活性	24
第三节 讨 论	26
3.1 黑鲷 Heparin 2 的原核表达及抗菌活性	26
3.2 黑鲷抗菌肽 Heparin 2 的真核表达及其抗菌活性	26
3.3 Scygoandin 可以作为真核表达的融合蛋白标签	27
第三章 联合多肽 Scy-sphistin 的真核表达、抗菌活性及抗菌肽饲料 添加剂的研发	33
第一节 材料与方法	33
1.1 实验材料	33
1.2 方法	34
第二节 结 果	37
2.1 真核表达载体 pPIC9K 和目的基因片段 scy-sphistin 的制备	37
2.2 重组表达载体 pPIC9K-scy-sphistin 的构建	38

2.3 GS115/pPIC9K-scy-sphistin 菌株传代稳定性鉴定	39
2.4 抗菌肽基因工程产品 Scy-sphistin 的表达纯化和鉴定	40
2.5 基因工程产品 Scy-sphistin 的抗菌活性	43
2.6 基因工程产品的规模化发酵工艺技术优化	44
2.7 抗菌肽基因工程产品作为饲料添加剂的制备技术的研究	45
2.8 申请并获批抗菌肽 Scy-sphistin 中间试验批文	47
第三节 讨论.....	50
3.1 Scygonadin 和 Sphistin 的串联表达	50
3.2 抗菌肽饲料添加剂产业化的关键技术问题	51
参考文献	52
附录.....	55
承担的科研项目及科研成果	73
致谢.....	76

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Optimized production of scygonadin in <i>Pichia pastoris</i> and analysis of its antimicrobial and antiviral activities.....	6
Part 1 Materials and methods	6
1.1 Materials	6
1.2 Methods	9
Part 2 Results.....	18
2.1 The vecort constraction of pPIC9K-scy/hepc2.....	18
2.2 Identification and DNA seqencing of pPIC9K-scy/hepc2	19
2.4 The recombinant expression of Scy-hepc2 in <i>P. pastoris</i>	20
2.5 Expression and purification of Scy-hepc2.....	22
2.6 The purification of Hepcidin 2	22
2.7 The identification of Hepcidin 2 using MALDI-TOF-TOF MS	23
2.8 The antimicrobial activity of <i>P. pastoris</i> -derived Hepcidin 2	24
Part 3 Discussion.....	26
3.1 The expression of Hepcidin 2 in <i>E. coli</i> and its antimicrobial activity	26
3.2 The expression of Hepcidin 2 in <i>P. pastoris</i> and its antimicrobial activity....	26
3.3 Scygonadin fusion technology for difficult-to-express protein of antimicrobial peptides in <i>P. pastoris</i>	27
Chapter 3 Expression and antimicrobial activity of recombinant hybrid peptide Scy-sphistin in <i>P. pastoris</i> and the development of Scy-sphistin as feedstuff additives.....	33
Part 1 Materials and methods	33
1.1 Materials	33
1.2 Methods	34

Part 2 Results.....	37
2.1 The peptide of scy-sphistin and the vector of pPIC9K obtained	37
2.2 The vecort constraction of pPIC9K-scy/sphistin.....	38
2.3 The analysis of scy-sphistin stable integrated and expressed in GS115.....	39
2.4 The expresssin and purification of Scy-sphistin.....	40
2.5 The antimicrobial activity of Scy-sphistin.....	43
2.6 The Optimized fermentation technology of Scy-sphistin expressed in <i>P. pastoris</i>	44
2.7 The processing technology of genetic engineering products of Scy-sphistin as feedstuff additive	45
2.8 Application of the intermediate test of gene engineering products of Scy-sphsitin	47
Part 3 Disscusion.....	50
3.1 Fusion expression of the antimicrobial peptides of Scygonadin and Sphistin	50
3.2 Key technical problems in the industrialization of antimicrobial peptides as feed additive	51
References.....	52
Appendix.....	55
Research projects involved and achievements obtained in the period of postdoctoral study	73
Acknowledgements	76

说 明

博士后研究工作报告的排版以全国博士后管理委员会办公室制定的统一格式为准（参见以上排版范例），研究报告封面统一以彩色羊皮卡纸制作，颜色不限，内页用纸为普通 A4 打印纸，单面或双面打印不限，正文字体为宋体小四。

为更好地保护博士后研究报告的著作权，请各位博士后在博士后研究工作报告中文摘要前加做《厦门大学博士后研究报告著作权使用声明》（具体格式见附件 2），并在该声明中明确保密年限。

出站时，提交 1 份研究报告至厦门大学图书馆，2 份给厦门大学人事处博士后管理办公室（学校定期提交给国家图书馆）。

第一章 引言

多重耐药性的超级细菌频繁出现，威胁着人类健康和公共卫生安全，开发全新抗菌药物刻不容缓。近三十年来，一类由生物体基因编码的广谱抗微生物活性多肽，即“抗菌肽”或“抗微生物肽”（Anti-Microbial Peptides, AMPs）备受关注。抗菌肽是一类从生物体中分离得到的小分子多肽，是生物体在抵抗病原微生物的防御反应过程中产生的一类具有抗微生物活性的小分子多肽，是生物体天然免疫系统的重要组成部分。由于最初人们仅发现这类活性多肽对细菌的作用，所以命名为抗菌肽，但是后续深入研究表明绝大多数抗菌肽具有多重生物学功能，不仅抗革兰氏阳性菌和阴性菌，还具有抗病毒、真菌和寄生虫活性，以及具有抗肿瘤、调节铁代谢、中和毒素、趋化和免疫调节、促进血管生成和创伤修复等生物学功能。由于抗菌肽来源于生物体本身，同时病原菌不易对其产生耐药性，所以被视为一种抗生素的替代品。这些天然抗生素，可直接引起宿主先天性免疫应答，并能对广泛的病原菌做出高效而迅速的反应，甚至对成团细菌也起作用，因而有望在将来作为一种新型的生物药物替代现有的化学类抗生素^[1-4]。抗菌肽的研究已成为医药学、免疫学和分子生物学等相关学科的研究热点。

1. 抗菌肽的发现

抗菌肽的发现与研究只有几十年的历史，1981年Steiner等在Nature杂志上公布了Cecropin A、B 的氨基酸序列，这是世界上第一个真正意义上鉴定分离的抗菌肽^[5]。此后，越来越多的抗菌肽从细菌、真菌、动物和植物等多种物种中被鉴定出来。为了更好的对这些抗菌肽进行研究，各国学者建立了各种数据库来搜集抗菌肽的信息，如APD数据库、ANTIMIC数据库、SAPD数据库和AMSDb数据库等，极大地方便了不同生物源抗菌肽的比较研究和新抗菌药物的筛选。这些相关的抗菌肽数据库，都为抗菌肽的资源整合和应用做出了极大的贡献^[6-8]。同时，国际学术界早已高度认识到海洋动物中蕴藏着世界上丰富的抗菌活性物质，已从多种海洋动物中分离到多种多样的抗菌肽。

2. 主要研究热点和趋势

科学家早就意识到海洋生物中蕴藏着丰富的抗菌肽资源，地球生物物种的

80%生长在海洋特殊环境中，其中鱼类约有2.5万种，海洋贝类约有6万种，甲壳类约有3万种。在其生长和代谢过程中，产生并积累了大量具有特殊化学结构并具有特殊生理活性和功能的物质，是开发新型海洋药物（包括抗菌肽）和功能食品的重要资源。

海洋生物抗菌肽用途广阔，主要的研究热点和研究趋势：（1）作为饲料添加剂或者生物农药：可减少或替代某些违禁抗生素的应用，对于海水养殖业、畜禽养殖业的健康发展具有重要意义。（2）作为饲料原料长期储存的防霉变制剂：可有效杀死或抑制真菌致霉变作用。（3）源于海洋生物的抗菌肽不仅具有不同于陆地生物的特性，而且来源广、抗菌肽种类多，因而可筛选获得许多高效的抗细菌、真菌、寄生虫、病毒甚至抗肿瘤等特殊的抗耐药性候选药物，在医药上具有重大的开发应用价值。（4）作为食品添加剂：源于海洋生物的抗菌肽可以研制出无毒、无害等环保作用。（5）抗菌肽开发应用的关键技术：抗菌肽产品的产业化成本；抗菌肽产品的生物稳定性；抗菌肽产品的安全性；抗菌肽产品的高效利用等。

3. 国内外研发差距

在抗菌肽作为医药研究方面，我国在该方面几乎是空白，与国外具有很大的差距。

在抗菌肽作为畜牧、水产养殖业添加剂和防腐剂方面，国内已有的较雄厚的研究基础，尤其是鱼类、蟹类抗菌肽基因工程产品的研发和中试试验研究，目前还未见国外同类产品开发应用的报道。因此，针对我国是养殖业大国，而且具有广阔的市场需求，开发具有我国自主知识产权的海洋生物抗菌肽产品和建立抗菌肽基因工程生产平台是非常必要的，对于促进我国水产、畜牧养殖业的健康发展具有重要意义。

4. 研发水平

目前对抗菌肽的研究多集中在基础研究，如抗菌肽的疏水性、所带净电荷、结构以及抗菌肽抗菌机理的研究等，对抗菌肽产品开发应用较少。由于抗菌肽的生产成本高，极大的限制了抗菌肽的研究开发和临床应用。目前批准上市的抗菌肽药物并不多，生产成本低是制约抗菌肽临床应用的重要因素之一。抗菌肽的生产成本高，通过固相合成抗菌肽每克费用高达100-600美金，极大的限制了抗菌肽的研究开发和临床应用。因而构建商业化的抗菌肽生产平台，通过在细菌、真菌甚至植物和动物中进行DNA重组以获得大量稳定的抗菌肽基因工程表达产物

是有效的解决方法之一。抗菌肽的生产，目前公认的最有效方法是在细菌或酵母中重组表达，选择在昆虫、植物以及无细胞系统表达，其生产成本将更加高昂。

一些抗菌肽可以在原核表达系统中直接表达，但绝大多数抗菌肽对于表达宿主具有毒性作用，难以直接表达。为了降低抗菌肽对表达宿主的毒性作用及其被蛋白酶降解的程度，常采用抗菌肽的融合表达，融合技术可提高蛋白的可溶性，避免抗菌肽降解以及对表达细胞的毒性^[9]。目前常用的融合标签如谷胱甘肽硫转移酶（GST）^[10,11]、硫氧化还原蛋白（Trx）^[12,13]、CMP-3-脱氢-D-甘露-辛酮糖酸合成酶（CKS）^[14]，小分子泛素样修饰蛋白（SUMO）融合标签^[15,16]等。

有关抗菌肽基因的表达研究主要是在原核表达系统中进行的，但由于抗菌肽对原核细胞有一定的毒性，且原核表达系统不能进行的翻译后修饰加工，近年来以毕赤酵母等为基因工程宿主进行抗菌肽的真核表达已受到广泛重视，为抗菌肽的开发应用奠定了良好的基础。海洋动物抗菌肽基因工程表达及其抗菌谱的研究举例说明如下：

抗菌肽Hepcidin: 由于Hepcidin 结构域中含有8个半胱氨酸，可形成4个二硫键，因此，用化学的方法合成具有正确二硫键位置的Hepcidin技术难度非常大。化学合成的Hepcidin表现为无活性或者活性很低，可能的原因就是没有形成正确的二硫键，且化学合成的方法价格昂贵，因而限制了Hepcidin的应用。大肠杆菌具有生长繁殖快、可高密度培养、遗传背景清楚、成本低廉、操作简单、可大规模地发酵等优点，成为众多外源蛋白表达系统的首选。目前，大部分Hepcidin体外表达采用大肠杆菌表达系统。如Zhang将Hepcidin连接到pET-28a+原核表达载体上，表达了约10.5 kDa的His-Hepcidin融合蛋白，对枯草芽孢杆菌具有活性^[17]。Srinivasulu将鱼类褐牙鲈Hepcidin连到pET-21a+原核表达载体上在大肠杆菌中诱导表达，表达产物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等具有抗菌活性^[18]。但目前通过大肠杆菌表达系统获得的Hepcidin表达产物多为包涵体形式存在，需经过复杂的变性复性过程才能获得有活性的Hepcidin蛋白，因而限制了Hepcidin的规模化开发和利用。

毕赤酵母是一种能以甲醇为唯一碳源的单细胞真核生物，具有遗传操作简单、与历史悠久的啤酒酵母遗传背景相似、生长快、表达量高、可以高密度培养、培养成本低，还能进行原核表达系统不能进行的翻译后修饰、糖基化、形成二硫

键等优点，因此毕赤酵母可能是表达Hepcidin的更好的选择。但目前关于抗菌肽Hepcidin在毕赤酵母表达的文章报道较少。2007年，Zhang设计合成了人Hepcidin基因序列，构建了分泌型表达载体pPICZaA-Hepc，在毕赤酵母GS115菌株中高表达，表达量达到100 mg/L，目的蛋白分子量大小为2.7kDa，其对枯草芽孢杆菌具有一定的抗菌活性，不抗大肠杆菌^[19]。2008年，Koliaraki成功的将人Hepc20 和Hepc25在毕赤酵母中表达，表达量为5-7 mg/L，具有抗菌活性和铁代谢能力^[20]。2014年，Di根据毕赤酵母密码子偏爱性，设计合成了猪Hepcidin基因序列，构建了分泌型重组酵母表达载体pGAPZaA-hepcidin，在毕赤酵母X33菌株中表达，表达量为86 mg/L，其对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌等具有高效抗菌活性^[21]。

厦门大学海洋动物抗菌肽课题组利用基因工程技术已表达出海洋鱼类和蟹类多种抗菌肽，且保持高效抗菌活性，已经形成规模化生产工艺。研究发现大黄鱼抗菌肽Hepcidin (PC-hepc) 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有显著的选择抗性，对水产重要致病菌嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、哈氏弧菌和溶藻弧菌等具有很强的抑菌活性，同时对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等耐药性细菌具有显著抗菌活性^[22]。海水青鲮Hepcidin1(OM-hep1) 的基因工程产品具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤细胞的生物活性，最小抑菌实验结果其对抗革兰氏阳性菌如谷氨酸棒杆菌和金黄葡萄球菌具有较强的抗菌活性 (MIC<6 μ M)，同时对被测的革兰氏阴性菌如大肠杆菌MC1061，嗜水气单胞菌和施氏假单胞菌亦具有较强的抗菌活性 (MIC<12 μ M)，但对弧菌无抗性 (解藻弧菌和副溶血弧菌)。OM-hep1基因工程产品可以有效的抑制对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 对红螯螯虾的造血干细胞的侵染，同时在一定程度上能抑制人肝癌细胞HepG2生长繁殖^[23]。同样，对黑鯛AS-hepc2和AS-hepc6基因工程产品的研究发现，两种表达产物对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都表现很强的抗菌活性，对革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌、哈氏弧菌，革兰氏阳性菌溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌等都表现显著的抗菌活性 (3-12 μ M)。这些结果与其他鱼类Hepcidin 的抗菌特性不同，表明不同鱼类及不同变体的Hepcidin 具有选择性的抗菌特性和抗菌谱^[24]。这些研究工作为抗菌肽Hepcidin 产品的目标性应用奠定了基础。

抗菌肽Scygonadin: 本实验室黄文树直接从雄性拟穴青蟹精浆中分离纯化抗菌肽Scygonadin，体外抗菌活性结果显示其具有抗藤黄微球菌和嗜水气单胞菌的

抗菌活性^[25]。然而直接从雄性青蟹精浆分离纯化或利用化学方法合成抗菌肽 Scygonadin, 受到动物来源和化学合成方法的局限, 无法得到足够量的抗菌肽蛋白用于功能研究或规模化生产应用。因此, 本实验室构建了 Scygonadin 的原核与真核表达载体, 其真核表达产物与原核表达产物的抗菌谱相近, 但对某些菌的抗菌活性比原核表达产物强, 对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌以及谷氨酸棒状杆菌具有良好的抗菌活性^[26,27]。吴曼丽等将 Scygonadin 蛋白以灌胃的方式喂养海水养殖鱼类黑鲷, 观察该抗菌肽对靶动物免疫相关因子的影响及消化吸收规律。结果显示, 黑鲷灌胃 Scygonadin 蛋白对其免疫和抗氧化指标无显著性影响, 表明口服抗菌肽不会影响机体的正常免疫功能, 对机体无毒害作用, 具有安全性。因而, Scygonadin 抗菌肽产品在抗病原微生物新药和动物饲料添加剂的开发中也将具有应用价值。

5. 展望

抗菌肽的研发与应用, 不仅具有重要的医学开发前景, 而且还将是实现海水养殖动物健康养殖、减少抗生素污染的重要保障。近年来国内外学者高度认可海洋动物中蕴藏着丰富的抗菌活性物质, 从海洋动物中研究开发具有抗耐药性细菌的抗生素有效替代品将是未来医学、农业、药学等发展的必然方向。因此, 充分利用并发掘我国海洋动物的抗菌肽资源, 研发出高效抗微生物的抗菌肽基因工程产品, 抗菌肽基因工程产品可作为新型抗细菌无公害渔药替代传统抗生素制成饲料添加剂, 应用于水产养殖业可保障其健康发展和水产品安全, 还可作为高效抗耐药性细菌的候选药物。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.