

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01188

褶纹冠蚌防御素基因特征与表达

王鹤, 胡宝庆, 文春根, 胡向萍, 程周玉, 宁瑞红

南昌大学 生命科学系, 生命科学研究院, 江西 南昌 330031

摘要: 褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)样本壳长(9.50 ± 1.05) cm、壳高(6.45 ± 0.81) cm, 暂养1周。40只随机分成试验组和对照组, 每组20只。用Trizol法提取经诱导刺激后0、6、12、24、36、48 h的血液、外套膜、鳃、肝胰腺组织RNA, 构建褶纹冠蚌cDNA文库并从中获得防御素基因cDNA全长序列。结果表明, 褶纹冠蚌防御素序列全长为514 bp, 其中5' UTR有57 bp; 3' UTR有242 bp, 含有一个poly(A)尾; 开放阅读框长度为192 bp, 编码63个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白N端为1个由23个氨基酸构成的信号肽, 成熟肽由40个氨基酸组成, 理论等电点为8.72, 分子量为7.13 kD。三级结构预测显示其由一个 α 螺旋和两个 β 折叠片组成, 形成典型的CS α β 结构。通过注射 10^9 cell/mL的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)刺激褶纹冠蚌, 半定量分析PCR对褶纹冠蚌血液、外套膜、鳃和肝胰腺组织的防御素基因表达, 结果表明, 诱导前防御素基因在外套膜组织中表达量最高, 约为血液和鳃的1.25倍, 肝胰腺次之。在诱导0、6、12、24、36、48 h后, 对照组的防御素基因表达量在血液和鳃中无明显变化, 而在外套膜和肝胰腺中则呈现先略有下降而后上升; 试验组防御素基因在血液中12 h时表达量最高, 随后略有下降, 而在外套膜、鳃和肝胰腺组织中表达量均在0 h时出现峰值, 而后呈现下降趋势; 外套膜和鳃的表达量分别在24 h和36 h略有上升。本研究通过分析褶纹冠蚌防御素基因全序列, 并利用嗜水气单胞菌对褶纹冠蚌进行注射感染, 探讨防御素基因的表达规律, 以期防御素对贝类非特异性免疫的影响提供基础依据。

关键词: 褶纹冠蚌; 防御素; 基因表达; 序列结构; 抗菌肽; 嗜水气单胞菌

中图分类号: Q959.215

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1188-09

抗菌肽(mytilin)是生物体内经诱导产生的一类小分子阳离子抗菌活性肽, 其具有强力的抗菌作用, 是宿主先天性免疫和适应性免疫防御系统的重要组成部分^[1]。Boman等将通过注射阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)及大肠杆菌(*Escherichia coli*)诱导惜古比天蚕蛹(*Hyatophora cecropins*)产生具有抗菌活性的多肽定名为Cecropins^[2]。已发现的抗菌肽超过2 000种, 其中一些抗菌肽对真菌、原虫、病毒及癌细胞等具有强有力的杀伤作用^[1, 3]。

防御素是抗菌肽家族中最具代表性的亚家

族。抗菌肽作用于病原体的酶, 防御素则直接作用于病原体细胞膜, 因而靶细胞不会对其产生抗性, 并且不会产生抗药性和毒副作用。另外, 防御素还可以作为免疫调节剂来调节机体免疫系统^[3]。根据来源不同可以将防御素分为哺乳动物类、昆虫类和植物类; 也可以根据防御素分子内精氨酸和半胱氨酸的位置、连接方式及表达位置的差异分为 α -防御素、 β -防御素、 θ -防御素、昆虫防御素和植物防御素5种类型^[4]; 还可以根据防御素的表达方式分为诱导型和组成型^[5]。1980年美国Lehrer实验室从兔(*Lepus hainanus*)肺巨噬

收稿日期: 2013-01-24; 修订日期: 2013-03-03.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960296; 31060359); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金项目(2013FB09); 江西省教育厅项目(GJJ12024; GJJ10378); 江西省科技攻关项目(2004).

作者简介: 王鹤(1989-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物疾病研究. E-mail: 728444930@qq.com

通信作者: 文春根, 教授, 博士, 从事水产动物疾病研究. E-mail: cgwen@ncu.edu.cn

细胞中首先分离得到阳离子性极强的小分子抗菌肽, 称之为 defensin, 后来被归为 α -防御素, 认为其是阳离子蛋白和溶酶体的重要活性组分, 在机体对外界感染中起关键作用^[1]。许多动物如兔、老鼠(*Suncus murinus*)、人(*Homo sapiens*)、豚鼠(*Cavia porcellus*)、短尾猿(*Macaca arctoides*)等的嗜中性粒细胞, 人和啮齿动物的小肠潘氏细胞(paneth cell)中发现了 α -防御素^[5]。 β -防御素在羊(*Capra ibex*)胃肠道, 小鼠(*Mus musculus*)及大鼠(*Rattus norvegicus*)的肾和肺, 人的气管、胃、皮肤以及牛(*Bos gaurus*)的巨噬细胞和嗜中性粒细胞中均有分布^[6]。 θ -防御素存在于猕猴(*Macaca mulatta*)的中性粒细胞和单核细胞中^[7]。

目前已经报道了兔防御素 NP-1^[8]、鸡(*Gallus gallus domesticus*)和猪(*Sus scrofa*) β -防御素^[9-10]、小鼠防御素 Defb48^[11]、以及菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[12]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[13]、紫贻贝(*Mytilus edulis*)^[14-16]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)^[17]、家蝇(*Musca domestica*)^[18]和石斑鱼(*Epinephelus drumondhayi*)防御素^[19]。淡水贝类仅见三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[20]防御素的报道。褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)是中国重要的“淡水育珠蚌”之一, 容易受到病原体感染而引发疾病。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是导致水产养殖动物暴发性疾病发生的主要病原体, 本研究在分析褶纹冠蚌防御素基因全序列的基础上, 利用嗜水气单胞菌对褶纹冠蚌进行注射感染, 分析防御素基因的表达规律, 以期防御素对贝类非特异性免疫的影响提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

褶纹冠蚌于 2012 年 8 月 13 日采自鄱阳湖, 选择壳长为(9.50 ± 1.05) cm、壳高(6.45 ± 0.81) cm 的健康蚌, 在水簇箱中充氧暂养 1 周以上, 水温控制在(25 ± 1)°C, 每天换水 1 次。嗜水气单胞菌菌种(编号 XS91-4-1)由中国科学院水生生物研究所赠送, 于牛肉膏-蛋白胨培养基上培养 2~3 d, 温度为 28~30°C, 4°C 冰箱中保存备用。

1.2 实验仪器和试剂

UV-3100 型紫外可见分光光度计, Gel Doc XR 凝胶成像系统, PCR 扩增仪(K640 型), 台式冷冻离心机(5417R), 超净工作台(VD-650 型), 恒温生化培养箱(MCO-15AC 型), 电泳仪(DYY-10C 型、JY600PJ 型)。丙烯酰胺、琼脂糖、EDTA 和 Typetone 等其他试剂均购自上海生工生物科技公司。

1.3 方法

1.3.1 实验设计 将褶纹冠蚌 40 只随机分成试验组和对照组, 每组 20 只。试验组分别用微量注射器从每只蚌后闭壳肌注射浓度为 10^9 cell/mL 的嗜水气单胞菌菌液 0.1 mL, 对照组注射等量的 PBS。

1.3.2 总 RNA 提取 用 Trizol 法分别提取试验组、对照组在诱导刺激后 0、6、12、24、36、48 h 的血液、外套膜、鳃、肝胰腺组织 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测分析 RNA 的质量。最后将各组织中提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 褶纹冠蚌防御素基因的 PCR 扩增 根据褶纹冠蚌防御素基因(GenBank: KC290726)和内参基因 β -actin 的 cDNA 序列, 设计特异性引物(表 1)。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系为 H₂O 18.4 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L, defensinF 0.6 μ L, defensinR 0.6 μ L, exTaq 酶 0.3 μ L。扩增条件为 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 1 min, 进行 35 循环, 最后 72°C 延伸 10 min。内参基因 β -actin 的 PCR 扩增条件为 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1min, 进行 35 循环; 最后 72°C 延伸 10 min。

表 1 用于 PCR 扩增的褶纹冠蚌防御素和内参 β -actin 基因的特异引物

Tab. 1 The special primers of defensin and β -actin for PCR amplification in *Cristaria plicata*

引物 primer	序列(5'-3')sequence(5'-3')
β -actinF	CTTGACTTGGCAGGTAGAGA
β -actinR	CAGACAGCACAGTGTAGCA
defensin BF	GCATATGCATTTGCACTCC
defensin BR	ATGTCCAGTTGGGGATGTC

PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统中拍照。PCR 产物电泳条带的亮度强弱指示 mRNA 表达水平的高低。试验重复 3 次。

1.3.4 防御素基因的生物信息学分析 从构建的褶纹冠蚌血液 cDNA 文库中获得防御素基因 cDNA 全长序列,运用 ExPASy(<http://expasy.pku.edu.com>)上的软件进行防御素氨基酸序列分析(开放阅读框搜索、氨基酸序列的推断等)和生物信息学分析(蛋白质序列的磷酸化位点、糖基化位点等)。利用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行序列同源性比对和相似性搜索。SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽序列。

利用 Clustal W1.83 软件比较褶纹冠蚌与其他动物的防御素氨基酸序列同源性;采用 CLUSTAL X 1.83 和 MEGA 4 软件的邻接法构建基于氨基酸序列的系统进化树;利用在线软件 MotifScan 和 SMART 进行功能域分析;表 2 为进化树中 25 个物种的名称和拉丁名及其在 GenBank 的序列登录号。

1.3.5 数据统计 通过 Quantity One 软件计算目的条带和 β -actin 条带的光密度比值,结果用 SPSS 13.0 软件统计分析。

2 结果与分析

2.1 防御素基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列分析

褶纹冠蚌防御素基因的 cDNA 全长序列为 514 bp,其中 5' UTR 有 57 bp;3' UTR 有 242 bp,含有一个 poly(A)尾;开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)长度为 192 bp,编码 63 个氨基酸组成的蛋白质(图 1)。经 SignalP 3.0 软件分析,该蛋白 N 端为 1 个由 23 个氨基酸构成的信号肽 MRVAVVLALVLLLAVIDIPQAAA,成熟肽由 40 个氨基酸组成。该蛋白理论等电点为 8.72,分子量为 7.13 kD,氨基酸序列中含有 8 个半胱氨酸残基,一个丝磷酸化位点 Ser27,2 个负电荷残基和 7 个正电荷残基,为小分子阳离子多肽。利用在线软件 MotifScan 和 SMART 软件进行功能域分

表 2 25 种动物 cDNA 序列登录号
Tab. 2 GenBank numbers of 25 species

物种 species	GenBank 登录号 GenBank Accession number
菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	AFP50008
欧洲医蛭 <i>Hirudo medicinalis</i>	ABV56569
整嵌晶蛭 <i>Theromyzon tessulatum</i>	AAR12065
海蜗牛 <i>Aplysia californica</i>	ABF21076
大乳头水螅 <i>Hydra magnipapillata</i>	ABE26989
三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingi</i>	ACQ90304
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus</i>	FJ864724
毛白钝缘蜱 <i>Ornithodoros moubata</i>	BAB41028
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	ACS91537
紫贻贝 <i>Mytilus edulis</i>	P81610
欧洲纸黄蜂 <i>Polistes dominulus</i>	ADB85559
中华按蚊 <i>Anopheles sinensis</i>	AAAY21793
致倦库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	XP001842945
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	AAD40115
古铜异丽金龟 <i>Anomala cuprea</i>	BAD77967
全须夜蛾 <i>Hyblaea puera</i>	ABQ08056
奢锦天牛 <i>Acalolepta luxuriosa</i>	AAK35160
蚊 <i>Notostigma carazzii</i>	ACB46515
俄蚊 <i>Rossomyrmex minuchae</i>	ACB46514
箭蚁 <i>Cataglyphis velox</i>	ACB46513
日本毛蚁 <i>Lasius japonicus</i>	ACB46519
家蝇 <i>Musca domestica</i>	ABM66377
厩螫蝇 <i>Stomoxys calcitrans</i>	AAD56536
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	AAF58855
褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	KC290726

析显示含有一个 Defensin-2 Arthropod defensin 结构域。以太平洋牡蛎防御素蛋白为模板进行三级结构预测显示其均由一个 α 螺旋和两个 β 折叠片组成,其重叠性表明 α 螺旋和 β 折叠结构是高度保守的(图 2)。

2.2 防御素基因的系统进化树

系统进化树结果显示防御素基因主要聚成两个大支。其中节肢动物和软体动物聚成一小支,腔肠动物和环节动物聚成另一小支。帘蛤科的菲律宾蛤仔与牡蛎科的长牡蛎聚为 1 支,然后与贻贝科的紫贻贝聚为 1 支,褶纹冠蚌与节肢动物毛白钝缘蜱 (*Ornithodoros moubata*)聚成一小支,再与紫贻贝等软体贝类聚成一大支,而三角帆蚌与欧洲医蛭

```

1   TATACAGATTCATACAACATTTAACTATTCTTTACAGAAAAATCTCGAACATAAAGG
58  ATGAGGGTTGCTGTTGTATTGGCTCTGGTTTTGCTGCTTGCTGTAATAGATATACCACAA
1   M R V A V V L A L V L L L A V I D I P Q
118 GCTGCTGCTTCCAGTTGGGGATGTCCTTCAATCAGAAACTGTGCAACAATAATTGTATA
21   A A A S S W G C P F N Q K L C N N N C I
178 GTAATTCGAAAATGCAGAGGTGG CTATT GTA AGC CTA GCAGTTTATGGTTGGAGTGCAAA
41   V I R K C R G G Y C K P S S L W L E C K
238 TGCATATGCTGATCTTCAAACGAGAATCG AGTTTCAAGTTTGGAGTTTGACAAGACAG
61   C I C *
298 CAATAACGATATAATGAAGATTCTTCACGTATCTTAATACTGTTTGCAACCAAGTTATAT
358 TTCATTTCATATTCCCACACTAAAATTAACGTATTCACTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
418 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
478 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A

```

图 1 褶纹冠蚌防御素核苷酸及推导的氨基酸序列

方框(星号)表示起始和终止密码子; 下划线代表信号肽序列.

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of defensin cDNA from *Cristaria plicata*

The letters in boxes(Asterisk)represented initiation codon(ATG)and termination codon(TAA); Underline showed Signal peptide sequence.

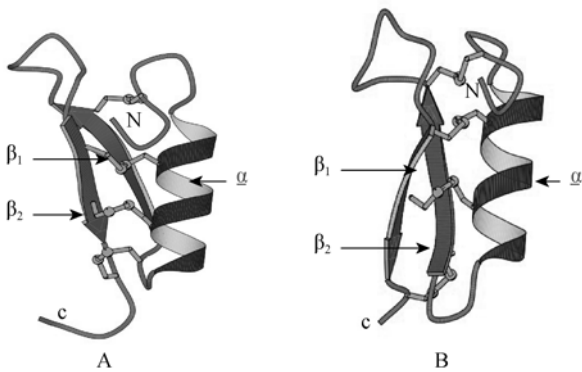


图 2 褶纹冠蚌和太平洋牡蛎防御素蛋白的三维结构比较

A. 表示太平洋牡蛎防御素^[13], B. 表示褶纹冠蚌防御素
α. 表示螺旋结构, B. 表示折叠结构.

Fig. 2 Three dimensional structure comparison of defensin protein from *Cristaria plicata* and *Crassostrea gigas*
A. indicates *Crassostrea gigas* defensin^[13]; B. indicates *Cristaria plicata* defensin. α. indicates helix structure; β. indicates folding structure.

(*Hirudo medicinalis*)和整嵌晶蛭(*Theromyzon tessulatum*)聚集为同一分支(图 3)。

2.3 防御素基因在褶纹冠蚌组织中的表达

褶纹冠蚌防御素基因在各组织中均有表达。

血液与鳃组织的表达量相当, 外套膜组织的表达量最高, 约为血液和鳃的表达量 1.25 倍, 肝胰腺的表达量次之(图 4)。

2.4 PBS 刺激后防御素基因在褶纹冠蚌组织中的表达

以褶纹冠蚌不同组织为模板, 扩增出防御素片段 120 bp 和 β-actin 片段 370 bp, 发现 PBS

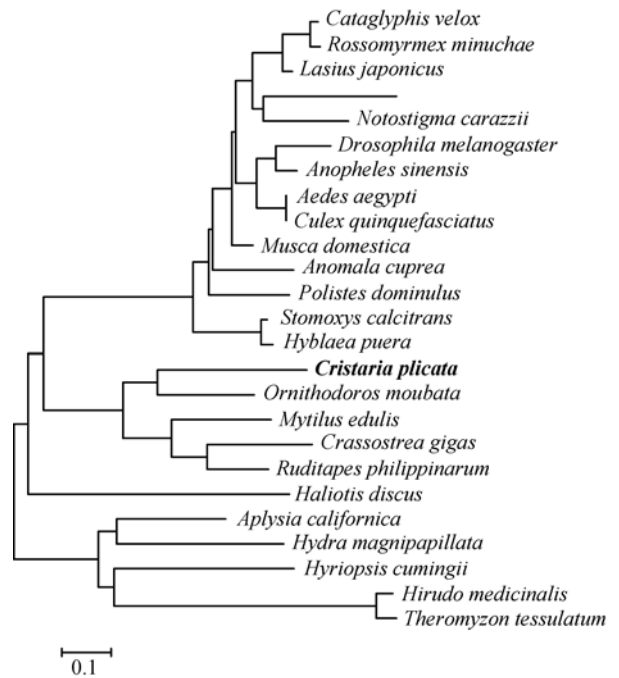


图 3 基于 25 种动物防御素氨基酸序列构建的 NJ 系统树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of defensin amino acid sequences based on 25 species animals

刺激后, 防御素基因在血液、外套膜、肝胰腺和鳃组织中均有表达(图 5)。

2.5 嗜水气单胞菌刺激后防御素基因在褶纹冠蚌组织中的表达

经嗜水气单胞菌刺激后, 血液中的防御素基因表达量在 12 h 时达到峰值, 随后呈现逐渐下降趋势, 到 48 h 时其与对照组表达量基本持平 (图 6a);

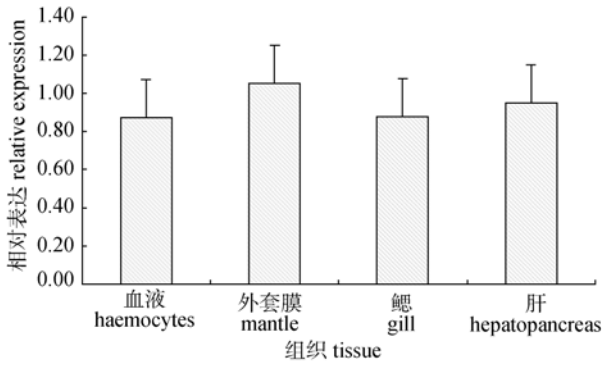


图 4 褶纹冠蚌防御素基因在组织中表达
各组织间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, $\bar{x} \pm SD$)

Fig. 4 Expression of defensin gene in different tissues from *Cristaria plicata*
No significant difference among different tissues ($P>0.05$, $n=3$, $\bar{x} \pm SD$)

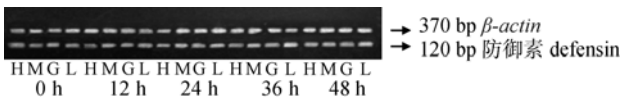


图 5 PBS 刺激后防御素基因在褶纹冠蚌组织中表达
H. 血液; G. 鳃; L. 肝胰腺; M. 外套膜.

Fig. 5 Expression of defensin in different tissues from *Cristaria plicata* by injecting PBS
H. haemocytes; G. gill; L. hepatopancreas; M. mantle.

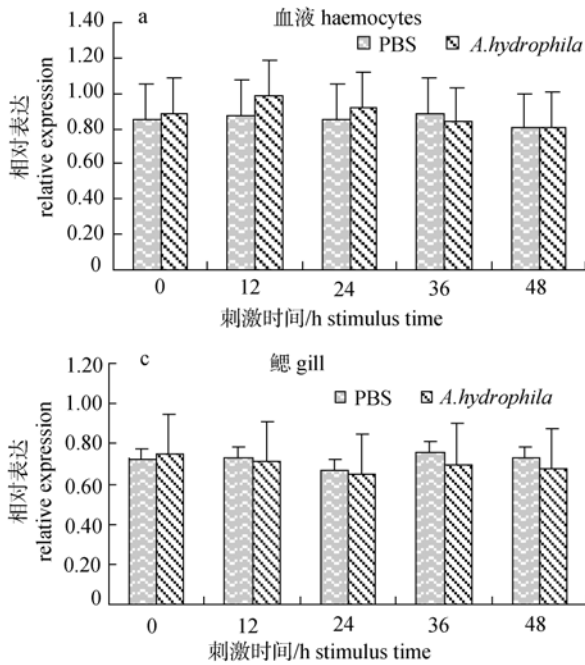


图 6 嗜水气单胞菌刺激后防御素基因在褶纹冠蚌各组织的表达

“*”表示与对照相比具有显著性差异($P < 0.05$, $n=3$, $\bar{x} \pm SD$).

Fig. 6 Expression of defensin in different tissues from *Cristaria plicata* by injection *Aeromonas hydrophila*
“*”showing significant difference($P < 0.05$, $n=3$, $\bar{x} \pm SD$) with control.

而外套膜组织中防御素基因表达量在 12 h 时出现较微弱的下降, 24 h 时出现最低表达量($P < 0.05$), 此后逐渐趋于稳定(图 6b); 鳃组织中防御素基因的表达水平未出现显著变化, 在 12、24 h 略有下降, 24 h 时达到最低值, 而后逐渐恢复, 但至 48 h 时, 其表达量仍略低于 0 h(图 6c); 肝胰腺中防御素基因的表达量呈现持续的下降趋势($P < 0.05$), 但仍高于 PBS 对照组, 到 48 h 时其表达量略低于 PBS 对照组(图 6d)。在 PBS 刺激下, 防御素基因在血液、外套膜、肝胰腺和鳃中的表达量没有显著变化($P > 0.05$)。PBS 刺激后, 血液中防御素基因的表达量略低于嗜水气单胞菌刺激的试验组, 随刺激时间的增长, 其防御素基因表达量略有提升, 至 48 h 时, 与试验组表达量相接近; 而外套膜、鳃和肝胰腺组织中, PBS 刺激后防御素基因表达量均呈现了先下降后上升的趋势, 且 48 h 表达量均高于试验组。

3 讨论

防御素是近年来发现的一个新型抗菌肽家

族。其分子一般都由具两亲性的 α -螺旋和富含带正电荷残基防御素 β -折叠组成, 构成一个典型的 CS $\alpha\beta$ 结构, 即二硫键稳定的 α -螺旋和 β -折叠结构, 分子中保守的半胱氨酸残基形成的二硫键构成的支架, 支撑了这种序列的高度可变性^[21]。菲律宾蛤仔 cDNA 全长 201 bp, 编码 66 个氨基酸, 44 个成熟肽, N 端含有 22 个信号肽序列, 由一个 α 螺旋和两个反向平行的 β 折叠组成, 通过 8 个半胱氨酸形成的 4 个二硫桥(C₁~C₄, C₂~C₅, C₃~C₇, C₆~C₈)来维持结构稳定^[12]。长牡蛎防御素 Cg-def cDNA 全长为 323 bp, 包含一个 195 bp 的开放阅读框, 编码 65 个氨基酸, 在 N 端含有 22 个氨基酸组成的信号肽序列, 三级结构也是典型的 CS $\alpha\beta$ 结构和 8 个半胱氨酸形成的 4 个二硫桥^[13]。紫贻贝有 MGD1 和 MGD2 两种形式的阳离子防御素, 这两种防御素均由 21 个氨基酸残基的信号肽和 39 个残基的成熟肽组成, 三级结构由 CS $\alpha\beta$ 结构和 8 个半胱氨酸残基形成 4 个稳定的二硫桥^[15]。毛白钝缘蜆防御素基因 cDNA 全长 414 bp, 编码 73 个氨基酸残基, 理论分子量为 8 kD, 包括 37 个成熟肽和 N 端的一段信号肽序列, 三级结构由 CS $\alpha\beta$ 结构和 6 个半胱氨酸残基形成 3 个稳定的二硫桥(C₁~C₃, C₂~C₅, C₄~C₆)^[22]。褶纹冠蚌防御素 cDNA 全长为 514 bp, 开放阅读框为 192 bp, 编码 63 个氨基酸, 含有 23 个氨基酸编码的信号肽序列; 三级结构与其他贝类一样, 同样有典型的 CS $\alpha\beta$ 结构, 8 个半胱氨酸形成 4 个二硫键。软体动物与节肢动物防御素是由共同的祖先进化而来的; 软体动物防御素也是节肢动物防御素家族成员, 早在 1.5 亿年前, 节肢动物还没有进化时, 防御素就已经是无脊椎动物的主要防御系统^[14]。因此, 褶纹冠蚌与紫贻贝、长牡蛎、菲律宾蛤仔和毛白钝缘蜆等防御素基因具有较高的同源性, 系统发育树分析也显示褶纹冠蚌与毛白钝缘蜆、紫贻贝等具有较近的亲缘关系。然而, 整嵌晶蛭(登录号: AAR12065)防御素基因编码 97 个氨基酸, 含有一段 22 个氨基酸组成的信号肽, 由较小的 α 螺旋和 β 折叠构成其三级结构, 10 个半胱氨酸残基形成 5 个二硫桥: C₁~C₃、C₂~C₆、C₄~C₅; C₇~C₈、

C₉~C₁₀。三角帆蚌比褶纹冠蚌等软体动物防御素基因编码的多肽分子大, 其编码 113 个氨基酸的大分子多肽, 并且三角帆蚌与整嵌晶蛭防御素具有相同的三级结构^[20]。因而, 系统发育树显示三角帆蚌与其他贝类防御素基因亲缘关系较远, 却与整嵌晶蛭等具有较近的亲缘关系。

防御素是机体第一道防线抗菌肽家族的一份子^[23-24]。用金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 刺激转染 COS-7 细胞的人防御素基因 (human beta-defensin3, hBD3), 发现其在刺激后表达水平升高, 表明 hBD3 可以被诱导^[25]。利用大肠杆菌 ML-35p 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853 感染大鼠肺组织, 发现绿脓杆菌感染的鼠肺组织与正常的肺组织防御素基因具有相同的表达水平, 而大肠杆菌感染的肺组织却并未检测到防御素基因的表达, 表明大肠杆菌或其产物(如 LPS)通过直接或间接途径抑制肺上皮细胞抗菌肽的表达^[26]。分析鸡 β -防御素-3(Gal-3)的组织表达表明 Gal-3 基因在法氏囊、皮肤、舌头、肺脏、骨髓和气管等组织中广泛分布, 而在肾、脾、肝胰腺、胰腺组织中则没有检测到; 用灭活的卡介苗诱导发现 Gal-3 在气管上皮细胞中表达量有显著增长, 为诱导型表达, 而在法氏囊和肺上皮细胞中 Gal-3 在诱导前后表达量无明显变化属于组成型表达^[27]。用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的混合液刺激家蝇, 发现家蝇幼虫体内防御素 *Mdde* 基因主要表达于表皮和脂肪体, 在气管、肠和肌肉组织中则没有检测到 *Mdde* 基因的表达; 并且表皮中 *Mdde* 基因在微生物刺激前后均有表达, 而脂肪体中 *Mdde* 基因经微生物刺激后才表达, 刺激前不表达, 这表明 *Mdde* 基因在表皮中为组成型表达, 在脂肪体中为诱导型表达^[28]。三角帆蚌防御素(HcBD)基因在在外套膜、血液中表达量相对较高, 嗜水气单胞菌感染三角帆蚌后, 在 4 h 时, HcBD 在外套膜、肝、肠、鳃和斧足中的表达量较高, 72 h 时, HcBD 在血液中表达量最高^[20]。用鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和金黄色葡萄球菌刺激皱纹盘鲍, 发现防御素基因在未诱导时不表达, 而刺激后在肝胰

腺组织中有表达,并且早期表达微弱,中晚期表达量最大,后期表达量下降,24 h 时检测不到鲍防御素基因的表达,表明皱纹盘鲍防御素属于诱导型表达^[17]。长牡蛎防御素基因只在外套膜组织中有较高表达,而血液、心脏、消化腺和鳃中均未见表达或少量表达,溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)刺激长牡蛎 24 h 和 48 h 后,外套膜组织的防御素基因表达量没有出现明显变化,推测其为组成性表达^[13]。菲律宾蛤仔防御素基因 *MCdef* 在鳃、外套膜和消化管都有较高表达,而在性腺及其相邻组织的表达量则较低,抑菌活性检测发现其和长牡蛎一样对革兰氏阳性菌海豚链球菌(*Streptococcus iniae*) KCTC3651 和金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) KCTC1916 的抑制活性较高,对其他革兰氏阳性菌和阴性菌则较低^[12]。细菌刺激纯绿蜱(*Ornithodoros tick*)后,防御素对革兰氏阳性菌包括粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)有较强的杀灭作用,而对革兰氏阴性菌只有微弱效果^[29]。从长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)分离出 Hlgut 和 Hlsal 两种防御素类似物,并各自分别纯化到两种活性组分 G1、G2 和 S1、S2,其中 G1、S1 分别包含一个环状结构域,G2、S2 C 端都包含 α 螺旋和 β 折叠,其中 G1 和 S1 没有抗菌活性,而包含 α 螺旋和 β 折叠的 G2 和 S2 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现了较高的抑菌活性;Hlgut 和 Hlsal 防御素的活性位点可能位于 α 螺旋和 β 折叠区域^[30]。毛白钝缘蜱防御素基因在中肠的表达量最高,用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌刺激后,中肠的表达量得到显著上调,而在脂肪体和生殖系统的表达量只有小幅提升,脂肪体和生殖系统防御素被认为可能属于组成型,中肠防御素属于诱导型^[22]。用藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)感染紫贻贝血细胞后并没有检测到显著的表达上升,在刺激 7、24 h 后都只检测到较低水平的防御素 *MGD1* 基因的表达,48 h 时其表达量反而有所下降;而对照组生理盐水刺激组在 24 h 时表达量明显上升,48 h 时达到

最大表达量;空白对照组表明贻贝防御素基因在诱导前即有表达;用革兰氏菌刺激贻贝防御素基因 *mytilin B* 和 *MGD2* 后表达量均呈现先下降而后略有所恢复的趋势^[14-16]。嗜水气单胞菌刺激褶皱纹冠蚌后,各组织的防御素基因表达均有变化,其中血液组织的防御素基因在刺激后表达量略微提升,12 h 达到最大表达量;而外套膜和肝胰腺组织中防御素基因在 12 h 表达量有所下降;鳃组织中防御素基因的表达水平在 24 h 达到最低。因此,推测褶皱纹冠蚌防御素基因可能也属于诱导型。然而褶皱纹冠蚌鳃、外套膜和肝胰腺组织中的防御素基因同贻贝血细胞防御素一样在细菌刺激后表达量出现下降趋势,而不同于皱纹盘鲍、毛白钝缘蜱等大多数诱导型防御素基因在细菌刺激后表达量提升。褶皱纹冠蚌组织防御素基因的调节机制是否不同于其他大多数诱导型防御素还有待深入研究。

参考文献:

- [1] 徐灵龙,王云峰,石星明,等. 抗菌肽及其功能研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(1): 115-118.
- [2] 屠利民,彭开松,王莹莹,等. 防御素研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 9(4): 204-207.
- [3] 李涛,杨银凤. 防御素的研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报, 2009, 1(4): 321-324.
- [4] 陈皓文,魏玉西,郭道森. 贻贝防御素的研究进展[J]. 广西科学, 2003, 10(2): 129-134.
- [5] Risso A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity[J]. J Leukoc Biol, 2000, 68(6): 785-792.
- [6] 张辉华,曹永长,毕英佐. 鸡 β -防御素 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(3): 185-187.
- [7] 谭淑樱,彭开松,祁克宗,等. 动物源防御素的功能研究进展[J]. 生物学杂志, 2008, 4(3): 1-3.
- [8] 张秀海,郭殿京,张利明,等. 兔防御素 *NP-1* 基因在转基因番茄中表达的初步研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(11): 953-958.
- [9] 刘胜旺,李一经,马得莹,等. 鸡 β -防御素基因的克隆、序列分析及其在组织中的分布[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(8): 1033-1039.
- [10] 于宾宾,何启盖. 猪 β -防御素(pBD)的研究进展[C]. 格莱姆抗菌肽—抗菌肽开发与应用技术研讨会论文集, 2009(4): 157-161.

- [11] 陈立瑾, 田利源, 李秀丽, 等. 小鼠附睾分泌的防御素 Defb48 的原核表达及纯化[J]. 生物技术通讯, 2010, 6(4): 790-793.
- [12] Adhya M, Jeung HD, Kang HS, et al. Cloning and localization of MCdef, a defensin from Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) [J]. CBP, 2012, 12(161): 25-31.
- [13] Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* [J]. J Biol Chem, 2006, 281(1): 313-323.
- [14] 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]. J Biol Chem, 1996, 271(36): 21808-21813.
- [15] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, et al. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge [J]. J Cell Science, 1999, 12(112): 4233-4242.
- [16] Mitta G, Hubert F, Dyrzynda EA, et al. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 4(24): 381-393.
- [17] 洪旭光, 孙修勤, 郑明刚, 等. 新型皱纹盘鲍防御素 hd-def 的 cDNA 序列分析、基因组克隆及表达研究 [J]. 高技术通讯, 2008, 18(3): 299-305.
- [18] 王来城, 王金星, 王来元, 等. 家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 动物学报, 2003, 49(3): 408-413.
- [19] 金俊琰, 周莉, 桂建芳. 石斑鱼 β -防御素的酵母表达及其产物抗菌活性分析 [J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 739-743.
- [20] 董妹君, 汪桂玲, 白志毅, 等. 三角帆蚌 Big defensin 基因 cDNA 全序列克隆及表达分析 [C]//2011 中国遗传学会大会论文摘要汇编, 2011.
- [21] 王少然, 杨雅麟, 张军, 等. 防御素构效关系研究进展 [J]. 生物技术通报, 4(1): 40-45.
- [22] Nakajima Y, Taylor D, Yamakawa M, et al. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) [J]. Insect Biochem Molec, 2001, 8(31): 747-751.
- [23] Otvos LJr. Antibacterial peptides isolated from insects [J]. J Pept Sci, 2000, 10(6): 497-511.
- [24] Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24(6): 536-547.
- [25] 虞晓晔, 柴家科, 徐明达, 等. 人 β -防御素 3 基因在 COS-7 细胞中的表达 [J]. 军事医学科学院院刊, 2004, 28(4): 344-346.
- [26] 陈新年, 黄宁, 吴琦, 等. 大肠杆菌感染对大鼠肺组织 β -防御素-2 基因表达的负相调节作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(1): 83-85.
- [27] 张辉华, 毕英佐, 曹永长, 等. 鸡 β -防御素-3 的克隆与诱导表达 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(4): 401-404.
- [28] 李殿香, 康翠洁, 张伟, 等. 家蝇幼虫消减文库的构建及差异表达基因的鉴定 [J]. 昆虫学报, 2010, 53(6): 601-610.
- [29] Nakajima Y, Ishibashi J, Yukuhiro F. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria [J]. BBA, 2003, 1624(1): 125-130.
- [30] Zhou JL, Liao M, Ueda M, et al. Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis* [J]. Peptides, 2007, 5(28): 1304-1310.

Gene characterization and expression of defensin in *Cristaria plicata*

WANG He, HU Baoqing, WEN Chungen, HU Xiangping, CHEN Zhouyu, NING Ruihong

Department of Bioscience, Institute of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China

Abstract: The specimen of *Cristaria plicata* with shell length(9.50 ± 1.05) cm and shell height(6.45 ± 0.81) cm were temporally cultured for one week. We designed test trial and control trial with 20 individuals for each. We obtained the full-length cDNA sequence of defensin from the cDNA library of *Cristaria plicata*. The full-length cDNA was 514 bp, consisting of a 5'-terminal untranslated region(UTR)of 57 bp, a 3'-terminal UTR of 242 bp with a poly(A)tail, and an open reading frame of 192 bp which encoded a polypeptide of 63 amino acids residues, including 23 signal peptides and 40 mature peptides. The predicted molecular weight was 7.13 kD, the theoretical isoelectric point was 8.72. The predicted structure revealed that defensin gene contained a conserved cysteine-stabilized α -helix and two β -sheet(CS $\alpha\beta$)structural motif. We measured the expression defensin in the hemocytes, mantle, gill, and hepatopancreas of *C. plicata* by semi-quantitative RT-PCR following stimulation by *Aeromonas hydrophila*(10^9 cell/mL). Before stimulation, the expression of defensin was highest in the mantle and was about 1.25 times that in hemocytes and gill. After injection(at 0, 6, 12, 24, 36, 48 h), the relative expression first decreased in the mantle and hepatopancreas then increased significantly in the control group. There was no change in defensin expression in the hemocytes and gill. In the experimental group, expression peaked after 12 h in the hemocytes then decreased. Conversely, defensin expression was highest in the other tissues at 0 h, and then decreased gradually. Expression increased slightly in the mantle and gill at 24 h and 36 h.

Key words: *Cristaria plicata*; defensin; gene expression; sequence structure; mytilin; *Aeromonas hydrophila*

Corresponding author: WEN Chungen. E-mail: cgwen@ncu.edu.cn