

团头鲂 β -防御素 1 基因 cDNA 的克隆、序列分析及表达特征

张涓 陈思思 何玉慧 黄金海 刘小玲 陈孝煊 袁改玲

华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 从团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)中克隆出 β -防御素 1(*maBD-1*)基因, 检测该基因在组织中的分布, 及在病原菌感染后该基因表达量的变化情况。将 *maBD-1* 基因重组到 pGEX-KG 原核表达载体上, 构建重组质粒 pGEX-KG-maBD-1, 重组质粒经转化至 BL21 感受态细胞中进行诱导表达, 将融合蛋白免疫日本大耳白兔, 制备该融合蛋白的多克隆抗体, 并检测血清效价。结果表明: *maBD-1* 基因 ORF 全长为 204 bp, 编码 67 个氨基酸。该基因在组织中广泛分布, 病原菌感染后头肾和脾脏组织 *maBD-1* 基因表达量显著上调。经间接酶联免疫分析(ELISA)获得的抗血清效价为 1:3 200, 在肝脏、鳃和心脏组织中用 Western blot 可检测到 β -防御素的表达。

关键词 团头鲂; *maBD-1*; 克隆; 表达

中图分类号 Q 959.46⁺⁸ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0097-07

近十几年来, 水产动物重大病害频频发生以及病急乱用药、滥用药产生水产品食品安全等隐患, 探讨鱼类等水产动物免疫机制及防治措施已成为当务之急。鱼类作为低等脊椎动物类群, 其特异性免疫系统还不完善, 在保护机体抵抗病原微生物入侵过程中, 主要还是依赖先天性免疫^[1-2]。Ganz 等^[3]首次将在人和兔白细胞中发现的一类结构相似的抗菌肽命名为“防御素”, 之后研究发现防御素几乎广泛分布在所有的生物体中。目前研究发现, 防御素(defensin)是物种亿万年进化中保留的有效天然免疫因子, 在先天性免疫防御中扮演着重要角色。根据防御素半胱氨酸的位置及形成二硫键的连接方式不同可将防御素分为 α 、 β 、 θ 3 种, 在鱼类中只发现 β -防御素(β -defensin, BD)。与高等脊椎动物相比, 鱼类防御素研究起步较晚, 2007 年, Zou 等^[4]才从斑马鱼中分离鉴定出 BD, 之后国内外学者分别从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[5]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[6]、鱥(*Siniperca chuatsi*)^[7]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[7]等多种鱼类中分离鉴定出 BD。与哺乳动物的防御素研究相比, 对鱼类防御素的研究还不够深入, 其抗菌能力还有待进一步研究。

对于中国主要的淡水养殖品种——团头鲂(*Megalobrama amblycephala*), 国内已经做了不少有关疾病和免疫方面的研究^[8-10], 本研究克隆出团头鲂 β -防御素(*maBD-1*)基因, 检测该基因在组织中的分布和嗜水气单胞菌感染后该基因表达量的变化, 并且构建原核表达载体, 诱导重组蛋白的表达, 分离、纯化该重组蛋白制备多克隆抗体, 旨在为 *maBD-1* 的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

团头鲂购自黄冈市团风县百荣良种中心, 日本大耳白兔由中国科学院武汉病毒研究所动物实验中心提供。

1.2 菌株和质粒载体

大肠杆菌菌株(DH5 α)、大肠杆菌菌株(BL21)、质粒载体 pMD19-T 购自大连宝生物公司, 原核表达载体 pGEX-KG 由华中农业大学水产学院保存。

1.3 试 剂

T4 DNA 连接酶(T4 DNA Ligase)、限制性内切酶、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)等购自大

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302218); 华中农业大学国家大学生创新性实验项目(201310504040)

张涓, 硕士研究生。研究方向: 水产动物疾病与免疫学。E-mail: juanzh88@126.com

通信作者: 袁改玲, 博士, 副教授。研究方向: 水产动物疾病与免疫学。E-mail: yuangailing@mail.hzau.edu.cn

连宝生物公司; Easy *Taq*DNA 聚合酶 (Easy *Taq*DNA polymerase) 购自北京全式金公司; RNA 提取试剂盒、反转录酶 (reverse transcriptase) 购自 Invitrogen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.4 团头鲂防御素的克隆与序列分析

取健康团头鲂肝脏组织, 按 Trizol 试剂盒说明方法提取肝脏总 RNA, 取肝脏总 RNA, 根据 M-MLV 反转录使用说明进行 RT 反应。

根据 GenBank 中已登录团头鲂防御素基因序列(登录号 KC351182.1)设计 1 对克隆引物, 上游引物: 5'-GCCATTCATCCGAAGAAC-3'; 下游引物: 5'-TTCCAAATCAAAGGCATG-3'。进行 PCR 扩增, PCR 条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增结束后, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

将 PCR 产物切胶回收, 连接到 pMD19-T 载体上, 转化至 DH5 α 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选后, 获得阳性重组质粒进行 PCR 鉴定, 筛选阳性重组子, 送华大基因公司进行序列测定。

在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性检索, 用 DNASTar 5.0、ClustalW 2 等软件进行团头鲂防御素核苷酸及其相应氨基酸的序列分析。

1.5 团头鲂 maBD-1 基因 mRNA 不同组织表达水平的检测

取正常团头鲂肝脏、脾脏、头肾、体肾、脑、心脏、皮肤、肌肉、血液、鳃、肠等组织, Trizol 法提取组织总 RNA。测定 RNA 浓度, 20 μ L 体系下加入等量的总 RNA 进行 RT-PCR。反应结束后, 进行电泳鉴定, 观察 maBD-1 在不同组织中的分布情况。

1.6 嗜水气单胞菌对团头鲂 maBD-1 基因表达的影响

随机选择 300 尾健康的团头鲂, 大小为 50~60 g。分为试验组、对照组和空白组, 试验组和对照组各设 3 个平行组。暂养 1 周后, 试验组注射浓度为 10^7 cfu/mL 的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 注射量为 1 μ L/g, 对照组注射生理盐水, 注射量为 1 μ L/g, 空白组不做任何处理。

在注射 4、8、12、24、48、72 h 后取样。每个时间点随机取 15 尾, 以终质量浓度为 0.5 mg/L 的 MS-222 麻醉, 取样组织为肝脏、脾脏、头肾和肠, 样品置于液氮冻存备用。

取冻存的试验组和对照组团头鲂组织用 Trizol 法提取总 RNA, 按照 SYBR[®] PrimeScript[™] RT-

PCR Kit 使用说明, 进行逆转录反应, 然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应, 以团头鲂 β -Actin 为内参, 检测团头鲂防御素-1 mRNA 在肝脏中的表达水平。

试验数据用 SPSS 11.5 统计软件包中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan's 多重比较进行分析。所有结果均以平均值土标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 表示。

1.7 团头鲂 maBD-1 的原核表达及纯化

1) 原核表达载体的构建。根据团头鲂 maBD-1 基因 ORF 设 1 对表达引物, 上、下游引物分别为: maBD-1 F: 5'-AAAGGATCC ATGAAACCACAGAG-TATACT -3' (*Bam* HI); maBD-1 R: 5'-AAACTC-GAGAAGAAAATGTGATACACAGC -3' (*Xho*I)。以重组 pMD19-maBD-1 质粒为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 条件同上, 扩增结束后进行电泳鉴定。

将目的产物切胶回收, 用限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Xho* I 分别对原核表达载体 pGEX-KG 质粒和 PCR 产物进行双酶切, 清洁试剂盒回收酶切产物。在 T4 连接酶的作用下, 16 °C 连接过夜。将 maBD-1 基因 ORF 序列重组至 pGEX-KG 载体上, 构建重组质粒。

将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆, 提取质粒进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pGEX-maBD-1。

2) 团头鲂 maBD-1 融合蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 检测。分别将重组表达质粒 pGEX-KG-maBD-1 和空载质粒 pGEX-KG 转入表达宿主菌大肠杆菌 BL21。在不同的诱导时间、IPTG 浓度和诱导温度进行诱导表达, 以筛选和优化诱导表达条件。收集诱导表达的菌体, 向菌体加入适量缓冲液沸水浴 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶浓度为 5%, 分离胶为 12%)。电泳结束后, 染色、脱色观察结果。

3) 团头鲂 maBD-1 融合蛋白的分离、纯化。依照优化条件大量诱导表达目的蛋白。收集细菌, 超声破碎。离心, 弃上清。将沉淀溶解于 buffer A (50 mmol/L Tris-base, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L DTT, 5% 的甘油) 中, 变性、复性后, PBS(pH 8.0) 透析, 收集透析液, -20 °C 保存备用。取适量透析液进行 SDS-PAGE, 以空载体和重组载体诱导产物作为对照, 观察纯化结果。

1.8 团头鲂 maBD-1 融合蛋白多克隆抗体的制备及检测

以纯化的融合蛋白为抗原,免疫日本大耳白兔,免疫程序为:首免后,每隔10 d免疫1次,共免疫4次。首免的蛋白剂量为200 μg ,加强免疫时蛋白剂量为100 μg 。最后一次以不含佐剂的纯抗原从静脉免疫,7 d后常规动脉放血,制备抗血清,−80 °C冻存备用。

1)ELISA法测定抗血清效价。将抗原用包被缓冲液稀释成10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经包被、封闭后,加入稀释的抗血清孵育。并设阳性对照、空白对照和阴性对照。加入稀释的HRP标记的山羊抗兔抗体(1:5 000)孵育1 h,TMB底物避光显色20 min。用酶标仪测定 D_{450} 值。

2)Western-blot法检测maBD-1在组织中的表达。分别取适量团头鲂组织(肝脏、脾脏、头肾、肾、肠、鳃、脑、肌肉和心脏),提取组织总蛋白。

将组织蛋白样品经16.5%Tricine SDS-PAGE胶分离,电泳结束后,将蛋白转移至孔径为0.22 μm 的PVDF膜上;PVDF膜加入封闭液(TBST+5%的BSA)中室温封闭3 h;加入1:1 000稀释的maBD-1抗血清,4 °C孵育过夜,TBST漂洗3次,每次10 min;加入1:5 000稀释的HRP标记的山羊抗兔抗体,37 °C孵育1 h;TBST漂洗3次,每次10 min,加入DAB避光显色3~5 min。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 maBD-1 基因的克隆及序列分析

取团头鲂肝脏总RNA进行RT-PCR扩增得到

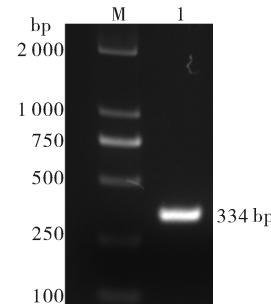
GCCATCATCCGAAGAAACCAAC	ATG	AAACCA	CAGAGTATA	TGTCTTGCTT	GCTTC	TT	58
M	K	P	Q	S	I	L	12
GTCGTCTTAGCATTCGACTGCAAAGAGAATGAGGCAGCATATTCCCTGGAGCTGTGCA							118
V	V	L	A	L	H	C	
C	K	E	N	E	A	A	32
AGTCTGAGTGGAGTTGAGACAAGGAGTGTCTGCCTTCAGAGCTTAACTTGGACCC							178
S	L	S	G	V	C	R	
R	Q	G	V	C	L	P	52
TTAGGCTGTGGCAAGGGATTCTTATGCTGTATCACAITTCTT	TGA	GA	ACTGAAAATG				238
L	G	C	G	K	G	F	*
C	C	V	S	H	F	L	67
ATGTAGCAGAAGTCTCAAAAGTCACCATGTGAAACCCAGTCTTACCTAACAGTTT							298
CTGTACTTTAACATCACATGCCTTGATTTGGAA							334

起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)用方框标出,保守的6个半胱氨酸用阴影表示。The translation start codon ATG and termination codon TGA are both shown in box. The asterisk indicates termination. The six cysteines are shown in shadow.

图2 团头鲂 maBD-1 基因的 cDNA 序列和推断的氨基酸序列

Fig. 2 DNA and the predicted amino acid sequence of maBD-1

300 bp左右的条带(图1),其中开放阅读框(ORF)区域为204 bp,编码67个氨基酸。在NCBI上BLAST检索,该cDNA序列和基因库中其它动物的BD-1序列非常相似,由该cDNA编码的氨基酸也与已知的BD-1蛋白序列有很高的相似性,因此确认该片段为团头鲂 β -防御素1,简写为maBD-1。团头鲂 maBD-1 具有 β -防御素家族典型的6个半胱氨酸特征(图2)。将团头鲂 maBD-1 氨基酸序列在NCBI上进行BLAST检索分析,发现与其他生物的 β -防御素具有较高的同源性。利用DNAStar和ClustalW软件对团头鲂 maBD-1 氨基酸序列与斑马鱼、鲤等动物的 β -防御素氨基酸序列进行同源性比较,结果表明:该氨基酸序列与斑马鱼和鲤的相似性最高,分别达到90.2%和86.3%,与泥鳅、大西洋鳕的同源性分别为78.4%和63.2%,黑色方框包含了由6个半胱氨酸构成的保守区域。图中所有序列均来自NCBI,黑色阴影表示氨基酸完全相同,灰色表示阴影氨基酸相似度较高(图3)。



M:DL 2000 标准 DL2000 DNA marker; 1:maBD-1 PCR 扩增产物 maBD-1 products by PCR.

图1 maBD-1 was amplified by PCR

Fig. 1 maBD-1 was amplified by PCR

		20	40	60	80	
		*	*	*	*	
<i>T.nigroviridis</i>	:	MKG---LSVLLVLILMIAAGEDSDS---EMQYWICG-YRGICRR-FCYAECYTVGHHRCPFR-R-YRCCAM-RD-				: 63
<i>O.latipes</i>	:	MKG---LGIVLVLVLLMIFADGEEKDP---VMQYWICG-YRGICRR-FCYAECYIIGHHCPR-R-YRCCAM-RE-				: 63
<i>M.ambycep</i>	:	MKPQPSILVILVVLVVAIHCCKENEAS---FP-WSCASISGVCRQGVCLPSELIFCPLGGKG-G-FIICCVS-HEL				: 67
<i>C.carpio</i>	:	MKPQPSILVILVVLVVAIHCCKENEAVS---FP-WSCASISGVCRQGVCLPSELIFCPLGGKG-G-FIICCVS-HFR				: 67
<i>D.rerio</i>	:	MKPQPSIIFILVVLVVAIHCCKENEAS---FP-WSCASISGVCRQGVCLPSELIFCPLGGKG-G-FIICCVS-HEL				: 67
<i>P.dabryanus</i>	:	MKPQCCILLFALVVVIIISKVNEAVS---FP-WSCASISGVCRQGVCLPSELIFCPLGGKG-G-FIICCVS-HEL				: 67
<i>T.rubripes</i>	:	MASYRAVVIALLVVVIVINAVENEAVS---FP-WTOPSISGVCRK-VCLPMPMFCCPLGGKG-G-FIICCVS-HEL				: 66
<i>O.mykiss</i>	:	-----MTVFLVVVFLLNVEDEAAS---FP-FSCPTIISGVCRK-LCDPMEMFFCPLGGKG-G-FIICCVS-HF				: 60
<i>G.morhua</i>	:	MSCHRVWVLLLAVIAINFVENEAA---FP-WSCPTIISGVCRK-VCLPMPMFCCPLGGKG-G-FIICCVS-HF				: 66
<i>P.olivaceus</i>	:	MRSYRVAVFLVLFVLLVFAEAEADQPKPDRFKLICRSTICGVCKRD-SCDSFESIAGCGSAESSTVCCII-KP-				: 72
<i>M.musculus</i>	:	---MKLLETTAALIILVSLTPGDAQ-----KCNNTGCRH-RSRSRSESVY--VYCTNG-KMCCVKPKWQPKPKPWNF				: 67
<i>Homo sapiens</i>	:	---MRTFLFIFAFATTPAKNAFFD-----ERONFNGTCKN-NCGKNEELIA-IQEF-LRCCFIQPCGSIID---				: 65
		1	v	1	6	CC
		C	G	C4	E	g
		C	g	gc		

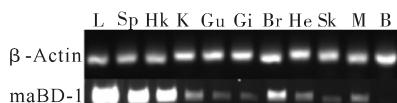
Tetraodon nigroviridis(CAJ57645)青斑河豚、*Oryzias latipes*(NM_001160438)青鳉、(*Megalobrama amblycephala*)团头鲂、*Cyprinus carpio*(JF343439)鲤、*Danio rerio* (NM_001081553)斑马鱼、*Paramisgurnus dabryanus* (KC494301)泥鳅、*Takifugu rubripes* (CAJ57646)红鳍东方鲀、*Oncorhynchus mykiss* (ABR68250)牙鲆、*Gadus morhua* (JF733714)大西洋鳕、*Paralichthys olivaceus* (GQ414991)虹鳟、*Mus musculus* (AF297664)小鼠、*Homo sapiens* (BC020612)人类。

图3 团头鲂与其他鱼类 β -defensin 氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Multiple alignment of *maBD-1* amino acid sequence with other similar peptide sequences

2.2 团头鲂 *maBD-1* 基因的组织表达分析

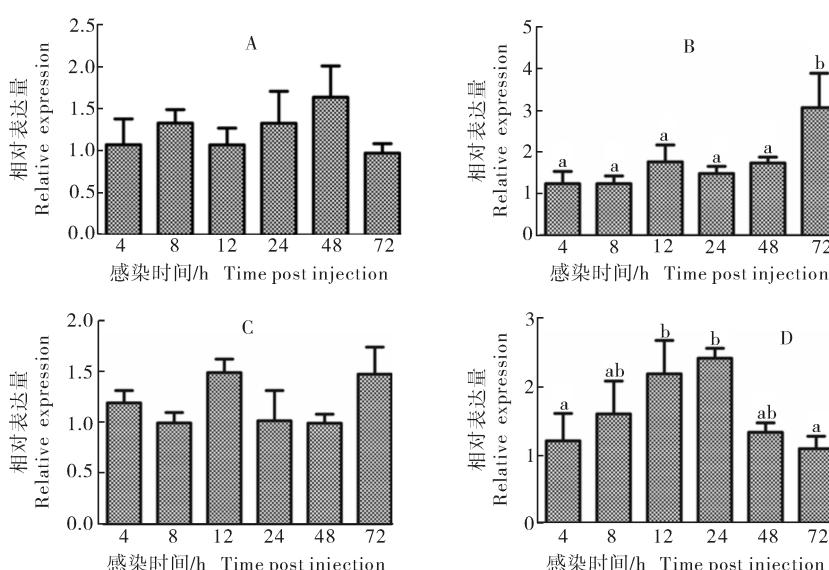
用半定量 RT-PCR 技术检测 *maBD-1* 基因的 mRNA 在团头鲂组织中的分布,结果显示:*maBD-1* 基因在各个组织中广泛表达,但表达量有



L:肝脏 Liver; Sp:脾脏 Spleen; Hk:头肾 Head kidney; K:肾 Kidney; Gu:肠 Gut; Gi:鳃 Gill; Br:脑 Brain; He:心 Heart; Sk:皮肤 Skin; M:肌肉 Muscle; B:血液 Blood.

图4 用 RT-PCR 检测 *maBD-1* 基因在各组织中的表达

Fig. 4 Detection of *maBD-1* gene expression in different tissues by RT-PCR



A:肝脏 Liver; B:脾脏 Spleen; C:肠 Gut; D:头肾 Head kidney.

图5 *maBD-1* 表达量的变化情况

Fig. 5 Changes of the expression quantity of *maBD-1*

组织差异性。*maBD-1* 基因在肝脏、脾脏、头肾中表达量比较高,在肾、肠、鳃、脑、心脏、皮肤、肌肉中表达量不高,在血液中不表达。

2.3 嗜水气单胞菌对团头鲂 *maBD-1* 基因表达的影响

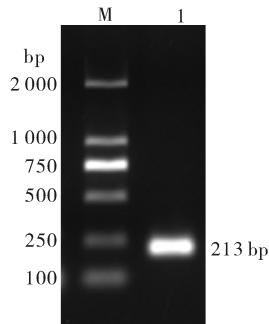
用嗜水气单胞菌刺激团头鲂后,*maBD-1* 基因在肝脏、肠中的表达量相比对照变化不明显 ($P>0.05$)。在头肾中,嗜水气单胞菌感染后 12 h 和 24 h *maBD-1* 基因的表达量出现显著地上调,48 h 开始下降,72 h 后趋于正常。在脾脏中,嗜水气单胞菌在感染后 72 h,出现极显著地上调 ($P<0.05$)。

2.4 原核表达载体的构建

PCR扩增获得的目的片段大小约为200 bp,经酶切鉴定和测序分析,该目的片段为maBD-1 ORF区域,证明原核表达载体构建成功。

2.5 团头鲂 maBD-1 融合蛋白的诱导表达及纯化

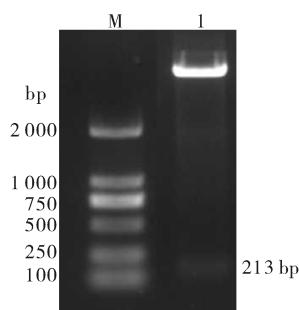
分别取含 pGEX-KG 质粒和 pGEX-KG-maBD-1 重组质粒的大肠杆菌诱导产物进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示:pGEX-KG 空载体在 26 ku 处有明显条带,为 GST 蛋白。pGEX-KG-maBD-1 重组菌株在 32 ku 处有明显条带,为融合蛋白 GST-maBD-1。在 37 °C, IPTG 浓度为 1 mmol/L 的条件下,分别诱导 3、4、5 h,对蛋白表达无明显差别,蛋白经纯化后获得纯度较高的融合蛋白。



M: DL2000 标准 DL2000 marker; 1: 团头鲂 *maBD-1* 基因 ORF 扩增 *maBD-1* ORF was amplified by PCR.

图 6 PCR 扩增 *maBD-1* ORF

Fig. 6 *maBD-1* ORF was amplified by PCR



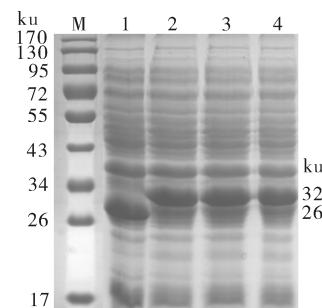
M: DL2000 标准 DL2000 marker; 1: 重组质粒 pGEK-KG-maBD-1 双酶切结果 Digestion of pGEK-KG-maBD-1.

图 7 重组质粒酶切鉴定

Fig. 7 Digestion of pGEK-KG-maBD-1 ORF

2.6 ELISA 法检测抗血清效价

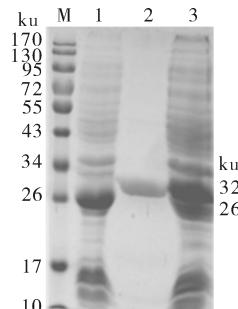
用 ELISA 法测定抗血清效价。结果显示,免疫前的兔血清未测出抗 GST-maBD-1 融合蛋白的抗体,而免疫后抗血清效价达 1:3 200 以上。



M: 170 ku protein marker; 1: pGEX-KG 空载体诱导产物 Induced expression product of pGEX-KG; 2, 3, 4: 重组载体 pGEX-KG-maBD-1 诱导 3、4、5 h 产物 Induced expression product 3 h, 4 h, 5 h of pGEX-KG-maBD-1, respectively.

图 8 重组表达载体 pGEX-KG-maBD-1 诱导表达蛋白

Fig. 8 Induced protein of recombinant pGEX-KG-maBD-1



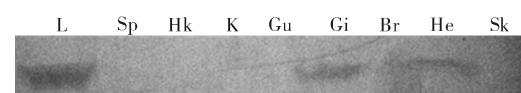
M: 170 ku protein marker; 1: pGEX-KG 空载体诱导产物 Induced expression product of pGEX-KG; 2: 纯化后的重组载体表达蛋白 Purified product of pGEX-KG-maBD-1; 3: 重组载体 pGEX-KG-maBD-1 诱导产物 Induced expression product of pGEX-KG-maBD-1.

图 9 重组表达载体 pGEX-KG-maBD-1 表达蛋白分离、纯化

Fig. 9 Purification of recombinant pGEX-KG-maBD-1 proteins expression

2.7 Western-blot 检测抗血清抗体特异性

将提取的组织总蛋白进行 Western-blot 检测,检测结果显示,团头鲂 β -防御素蛋白存在于肝脏、鳃和心脏,在其他组织中没有检测到。



L: 肝脏 Liver; Sp: 脾脏 Spleen; Hk: 头肾 Head kidney; K: 肾 Kidney; Gu: 肠 Gut; Gi: 鳃 Gill; Br: 脑 Brain; He: 心 Heart; Sk: 皮肤 Skin.

图 10 β -防御素蛋白在组织中的表达

Fig. 10 Tissue-specific expression detection of β -defensin

3 讨 论

本试验成功克隆了团头鲂 β 防御素 (β -defensin) 基因, 该基因与其它已知脊椎动物的 β -防御素基因一样, C 端成熟肽含有 6 个高度保守的半胱氨酸结构。该防御素与其它鱼类 β 防御素 1 具有较高的同源性, 命名为 *maBD-1*。*maBD-1* 与斑马鱼和鲤的相似性最高, 分别达到 90.2% 和 86.3%。

半定量 RT-PCR 显示, 团头鲂 *maBD-1* 在可以在各个组织中广泛表达, 这和 β 防御素 1 蛋白为组成型表达相一致, 其中 *maBD-1* 在肝脏、脾脏、头肾中表达量比较高。*BD* 在不同组织中表达, 通常预示着具有不同的生物学功能。Cuesta 等^[11] 将人类和鱼类 *BD* 通过生物信息学分析发现鱼类 *BD* 与人 *BD4(HBD4)* 的亲缘关系最近, 提示鱼类 *BD* 可能在结构和功能上与 *HBD4* 类似。但 *HBD4* 主要在睾丸、胃窦、子宫、甲状腺、肺、肾、牙龈和初级角质细胞中表达^[11], 而不同鱼类 *BD* 的不同亚型在不同组织中表达, 如斑马鱼 *BD3* 基因在皮肤、性腺、肠、鳃、脾、肝脏中均有表达, 但 *BD2* 基因仅在肠中表达; 青鳉的 *BD* 在眼睛中表达量最高^[6], 而石斑鱼的 *BD* 只在垂体和精巢中表达^[12]。

为了解机体在感染状态下 *maBD-1* 的表达情况, 本试验采用荧光定量 PCR 方法检测了团头鲂在嗜水气单胞菌刺激后, *maBD-1* mRNA 在组织中的表达变化, 结果显示, 嗜水气单胞菌感染后 12 h 和 24 h *maBD-1* 基因在头肾中的表达量出现显著地上调, 而在脾脏中, 则在感染后 72 h, 出现极显著地上调。说明团头鲂在受到病原入侵时, 能够激发 *maBD-1* 在机体中诱导表达, 进而参与抗感染反应。

为了研究 *maBD-1* 的功能, 本研究将成熟肽连接入原核表达载体, 虽然 β -防御素对大肠杆菌有毒性, 但在大肠杆菌中以无活性的包涵体形式存在, 一方面避免了对大肠杆菌的毒害作用, 不会影响宿主菌的正常生长。另一方面保护目的蛋白不受蛋白酶的降解。蛋白经分离、纯化后直接免疫日本大耳白兔, 制备抗 GST-*maBD-1* 融合蛋白的多克隆抗体, 经 ELISA 检测, 抗体效价为 1 : 3 200 以上。Western-blot 分析显示 *maBD-1* 蛋白在肝脏、鳃和心脏中表达, 在其他的组织中不表达, 该结果与 *maBD1* 基因在大多数组织中表达不一致。推测原因可能是

基因的表达水平和蛋白表达水平有一定的差异性, 也可能是基因水平的检测灵敏度要高于蛋白检测的灵敏度等。另外, 团头鲂 β -防御素多克隆抗体的制备, 也为下一步在蛋白水平上研究 *maBD-1* 的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] SCHRØDER M B, VILLENA A J, JØRGENSEN T O. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1998, 22(5/6): 507-517.
- [2] CASTILLO A, SÁNCHEZ C, DOMINGUEZ J, et al. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17(5): 419-424.
- [3] GANZ T, SELSTED M E, SZKLAREK D, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils [J]. J Clin Invest, 1985, 76(4): 1427-1435.
- [4] ZOU J, MERCIER C, KOUSSOUNADIS A, et al. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish [J]. Mol Immunol, 2007, 44(4): 638-647.
- [5] FALCO A, CHICO V, MARROQUI L, et al. Expression and antiviral activity of a beta-defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences [J]. Mol Immunol, 2008, 45(3): 757-765.
- [6] ZHAO J G, ZHOU L, JIN J Y, et al. Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF- κ B and Sp1 of a medaka beta-defensin [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(4): 624-637.
- [7] WANG G, LI J, ZOU P, et al. Expression pattern, promoter activity and bactericidal property of beta-defensin from the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(3): 22-531.
- [8] 韦新兰, 张杰, 陈丽萍, 等. 团头鲂 SPATA4 基因的分子克隆及表达分析 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3): 99-104.
- [9] 苏利娜, 丁祝进, 李鸿, 等. 团头鲂 *Dmrt4* 基因的克隆与表达分析 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 110-116.
- [10] 鄢明君, 刘立春, 张涓, 等. 3 种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 72-77.
- [11] CUESTA A, MESEGUR J, ESTEBAN M A. Molecular and functional characterization of the gilthead seabream β -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity [J]. Mol Immunol, 2011, 48(12/13): 1432-1438.
- [12] GARCIA J R, KRAU S E A, SCHULZ S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity [J]. FASEB J, 2001, 15(10): 1819-1821.

Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern of β -defesin 1 in *Megalobrama amblycephala*

ZHANG Juan CHEN Si-si HE Yu-hui HUANG Jin-hai
LIU Xiao-ling CHEN Xiao-xuan YUAN Gai-ling

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University / Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture / Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract The maBD-1 cDNA partial sequence of *Megalobrama amblycephala* was cloned using RT-PCR, its distribution in different tissues and expression after pathogen invasion was investigated. The target gene was then ligated with the Plasmid pGEX-KG vector and the pGEX-KG-maBD-1 was transformed into the prokaryotic cell BL21 and expressed by chemical inducer. The polyclonal antibody of the fusion protein was acquired by the immunity to rabbit and the titer of the antibody was measured. The results showed that the length of maBD-1 open reading frame was 204bp, encoding 67 amino acids. The maBD-1 gene was widely expressed in many tissues, and the expression in the head kidney and spleen was upregulated along with the pathogen invasion. Western-blotting analysis showed that the anti-serum had the ability to combine with the GST-maBD-1 protein.

Key words *Megalobrama amblycephala*; *maBD-1*; cloning; expression

(责任编辑:边书京)