

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180112001

http://www.yykxjz.cn/

白莉, 陈亚东, 夏永涛, 许式见, 胡谋, 沙珍霞. 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因的克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 20-26

Bai L, Chen YD, Xia YT, Xu SJ, Hu M, Sha ZX. Cloning and expression analysis of  $\beta$ -defensin gene from Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 20-26

## 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因的克隆及表达分析\*

白莉<sup>1,3</sup> 陈亚东<sup>2,3</sup> 夏永涛<sup>4</sup> 许式见<sup>4</sup> 胡谋<sup>4</sup> 沙珍霞<sup>2①</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 青岛大学生命科学学院 青岛 266071;

3. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

4. 杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司 杭州 311701)

**摘要**  $\beta$ -防御素是一类富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽, 在脊椎动物免疫系统中发挥重要作用。本研究基于转录组 Solexa 测序结果, 利用 PCR 和荧光定量 PCR 技术对俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)  $\beta$ -防御素基因进行了克隆和表达模式分析。结果显示, 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 cDNA 片段长度为 333 bp, 包含开放阅读框(Open reading frame, ORF) 213 bp, 推测编码 71 个氨基酸; SMART 分析显示, 该基因包含 23 个氨基酸的信号肽、1 个防御素- $\beta$ -2 结构域和 6 个保守的半胱氨酸残基, 此结构与其他物种极为相似, 在进化中比较保守。同源比对发现, 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素与鱼类的相似度最高, 为 54%~60%。 $\beta$ -防御素基因在健康俄罗斯鲟 11 种组织(肝、肠、脾、头肾、胃、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺)中均有表达, 其中, 在性腺和皮肤中表达量最高; 病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染后可强烈影响  $\beta$ -防御素基因在 6 种免疫组织(肝、肠、脾、头肾、血液和鳃)中的时空表达。其中, 在头肾中的上调表达最明显, 在感染后 72 h 为表达峰值, 达到 0 h 表达量的 700 倍。在脾、血液和肠中均有几倍至十几倍的上调, 而在肝中整体呈现下调表达趋势。研究表明,  $\beta$ -防御素基因参与了俄罗斯鲟的免疫应答过程, 本结果为俄罗斯鲟的免疫调控和病害防治研究奠定了基础。

**关键词** 俄罗斯鲟;  $\beta$ -防御素; 基因克隆; 基因表达; 嗜水气单胞菌

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0020-07

防御素是一类富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽, 广泛分布于植物、昆虫和脊椎动物中。根据对 6 个保守的半胱氨酸的位置和二硫键连接方式不同将防御素分为 3 个亚家族:  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\theta$ -防御素(Zhu *et al*, 2013)。 $\beta$ -防御素是动物防御素系统中最大的成员, 具有广谱的抗菌活性及不受传统抗生素耐药性菌株影响的抗菌机理, 同时, 与典型抗生素具有协同作用, 能中和

内毒素、调节机体免疫应答和炎症反应、调节组织创伤修复等而备受人们关注(张伟等, 2006)。

目前, 鱼类中只发现了  $\beta$ -防御素, 相对于其他脊椎动物, 研究处于起步阶段。2007 年首次在斑马鱼(*Danio rerio*)和河鲀(*Takifugu rubripes*)中分离鉴定出  $\beta$ -防御素(Zou *et al*, 2007)以来, 迄今仅在金头鲷(*Sparus aurata*) (Cuesta *et al*, 2011)、团头鲂(*Megalobrama*

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014A03XK01)资助项目 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (2014A03XK01)]. 白莉, E-mail: Baili\_soul@163.com

① 通讯作者: 沙珍霞, 研究员, E-mail: shazhenxia@163.com

收稿日期: 2018-01-12, 收修改稿日期: 2018-02-01

*amblycephala*)(Liang *et al.*, 2013)、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)(Zhu *et al.*, 2017)等 14 种鱼类上开展过基因表达和抗菌活性的研究。

鲟鱼被称为“水中活化石”，近年来，俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)养殖业在我国发展较快，由于其性成熟周期较长，养殖过程一旦发生病害，将对养殖业产生巨大影响，而嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是致病的主要病原体之一(杨治国, 2001)。但俄罗斯鲟的免疫基因发掘及免疫机制鲜有报道。本研究在前期俄罗斯鲟性腺转录组(Chen *et al.*, 2016)中挖掘到  $\beta$ -防御素部分序列的基础上，克隆了俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 cDNA 序列，推导出包含信号肽的完整蛋白序列，研究其组织表达及响应病原菌刺激后在免疫组织中的时空表达模式，为俄罗斯鲟免疫机理研究、病害防治和健康养殖提供有价值的研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康 1.5 龄俄罗斯鲟，体长为(47.5±2.5) cm，体重为(450±10) g。取自杭州千岛湖鲟龙集团有限公司，暂养于直径 2 m、水深 0.5 m 的圆形玻璃钢养殖缸中，至少 15 d 后方可进行实验。养殖用水引自乌溪江，水温为 17~20℃。嗜水气单胞菌为实验室保存菌种，分离自俄罗斯鲟病鱼组织，经 16S rRNA 测序进行菌种鉴定。

### 1.2 组织收集

分别收集 3 条健康俄罗斯鲟的肝、肠、脾、头肾、胃、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺 11 种组织，立即放入液氮中，随后将组织转移至-80℃冰箱中保存，用于总 RNA 提取。采用腹腔注射方法按照半致死剂量( $2.07 \times 10^4$  CFU/g)进行病原感染。对照组注射同等体积的 1×PBS 溶液。收集感染 0、6、12、24、48、72 h 实验组和对照组，各取 3 条俄罗斯鲟的肝、脾、鳃、血液、头肾和肠组织，保存方式同上所述。

### 1.3 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

采用液氮研磨收集的组织，参照总 RNA 提取试剂盒(天根, 北京)说明书进行组织总 RNA 提取。使用 Agilent 2100 生物分析仪(Applied Biosystems, 美国)检测其质量和浓度，通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照 Prime Script™ RT reagent kit (Perfect Real time)(宝生物, 大连)试剂盒合成 cDNA，-20℃ 保存备用。

### 1.4 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因 cDNA 片段克隆

从俄罗斯鲟性腺转录组中筛选出  $\beta$ -防御素基因部分 cDNA 序列，采用 Primer Premier 5.0 在线软件([www.bio-soft.net](http://www.bio-soft.net))设计特异性引物 P1 和 P2(表 1)，以俄罗斯鲟 11 个组织混合 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。扩增产物连接 T 载体，转化到 T1 感受态细胞中，对阳性克隆进行测序。

表 1 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因克隆和表达分析所用引物  
Tab.1 Primers used for cloning and expression of *A. gueldenstaedti*  $\beta$ -defensin

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
P1	TCTCCGAGGACAGCCATGGTAAC	克隆 $\beta$ -防御素基因
P2	GTGTCCTCTCTGACCACAGGTCC	克隆 $\beta$ -防御素基因
P3	GCTGTTGTTACTGGCATCTGT	定量表达引物
P4	TGAAGAAAAGCCCATCTCCAT	定量表达引物
18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	定量表达内参引物
18S-R	CTCATTCCAATTACAGGGCCTC	定量表达内参引物

### 1.5 生物信息学分析

将测序拼接获得的基因序列运用 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)Protein Blast 进行  $\beta$ -防御素氨基酸同源性比对，使用在线软件 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构域；信号肽预测采用 SignalP3.0Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)，应用 ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)、DNASTar(<http://www.dnastar.com/>)、ClustalX1.83 (<http://www.genome.jp/tools/clustalx/>)和 DNAMAN(<http://www.lynnon.com/>)等软件进行俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因开放阅读框的查找及氨基酸多重序列比对分析。利用 MEGA 5.1 重复 1000 次构建 N-J 进化树。应用 CPHmodels3.2server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)在线软件预测  $\beta$ -防御素蛋白的三维结构。

### 1.6 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因表达的实时定量分析

基因实时定量表达分析参照已报道的方法进行(路颺等, 2013; 于孟君等, 2017)。根据测序得到的俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物为 P3、P4(表 1)，以俄罗斯鲟 18S rRNA 基因为内参设计特异引物 18S-F 和 18S-R(表 1)。用 SYBR Green 荧光定量试剂盒(天根, 北京)按照说明书在 ABI PRISM 7500Fast 实时定量扩增仪上(ABI, 美国)进行该基因的实时定量分析(qRT-PCR)。每个样品设置 3 个生物学重复，使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因相对表达量， $C_t$

值取 3 个平行样品的平均值。qRT-PCR 检测结果使用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)的 Duncan 法对多组样本均数进行两两比较分析, P<0.05 时, 认为存在显著性差异。

### 2 结果

#### 2.1 俄罗斯鲟 β-防御素基因序列分析

克隆测序得到的俄罗斯鲟 β-防御素基因部分 cDNA 片段长度为 333 bp, 用 ORF finder 软件分析其 ORF 长度为 213 bp, 编码 71 个氨基酸(图 1), 与其他物种的同源序列所包含的 ORF 长度相当。信号肽和结构域分析结果显示, 该基因序列包含 23 个氨基酸的信号肽、完整的 β-防御素-2 结构域(82~234)。

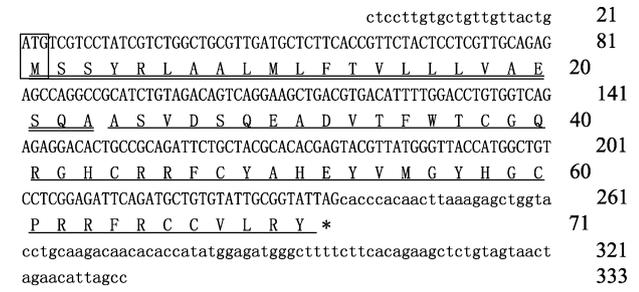


图 1 俄罗斯鲟 β-防御素 cDNA 序列和推测的氨基酸序列  
Fig.1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *A. gueldenstaedti* β-defensin

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方, 用大写字母表示; 双下划线(=)所示为信号肽; 方框所示为起始密码子(ATG)、星号(\*)所示为终止密码子(TAG); 下划线(—)为 defensin-β-2 结构域

Translated amino acid sequence was shown under nucleotide sequence as uppercase; The iniation codon and termination codon were marked by a box and an asterisk, respectively; Signal peptide was shown with double solid line(=); Defensin-β-2 domain was shown with underline(—)

#### 2.2 俄罗斯鲟 β-防御素基因同源比对及系统进化分析

推导的俄罗斯鲟 β-防御素氨基酸序列和其他物

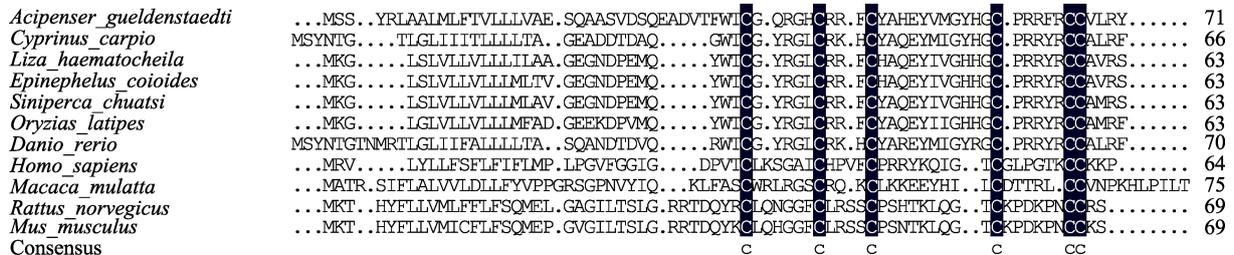


图 2 推导的俄罗斯鲟 β-防御素氨基酸与其他物种已知同源序列比对

Fig.2 Multiple alignment of *A. gueldenstaedti* β-defensin deduced amino acid sequence with other known orthologs

图中标黑处表示 6 个保守的半胱氨酸残基及位置, 分别是 C38、C44、C48、C60、C66 和 C67  
Six conserved Cysteine residues (C38, C44, C48, C60, C66 and C67) in β-defensin protein were highlighted by black color

种的 β-防御素氨基酸序列如斑马鱼(*Danio rerio*, NP\_001075024.1)、青鳉(*Oryzias latipes*, ACG55699.1)、鳊(*Epinephelus coioides*, AFA41485.1)、鲤(*Cyprinus carpio*, AGZ03658.1)、梭鱼(*Liza haematocheila*, AIK66783.1)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, AFA41485.1)、福鼎蝾螈(*Cynops fudingensis*, AHF22421.1)、原鸡(*Gallus gallus*, ALI16124.1)、小鼠(*Mus musculus*, EDL32923.1)、大鼠(*Rattus norvegicus*, AAC61871.1)、恒河猴(*Macaca mulatta*, AAC61871.1)和人(*Homo sapiens*, AAH93985.1)等进行同源比对。结果显示, 俄罗斯鲟 β-防御素与其他物种的氨基酸序列同源性在 39%~60%之间, 其中, 与斑马鱼和鲤鱼的同源性最高, 为 60%, 其次是鳊鱼 59%, 与青鳉的同源性最低, 为 54%。但在不同的物种之间, 都具有 6 个保守的半胱氨酸残基(图 2)。

利用 MEGA 5.1 以 N-J 法构建基于上述物种 β-防御素氨基酸序列的分子系统进化树。结果显示, 系统进化树分为两个大的分支, 俄罗斯鲟 β-防御素与斑马鱼、青鳉、鳊、梭鱼、点带石斑鱼聚为一大支, 其中俄罗斯鲟单独聚为一个亚支, 与斑马鱼和鲤进化关系最近; 小鼠、大鼠和人聚为另外一个大支, 其中, 鼠类按亲缘关系远近聚成相应的亚支; 两栖类福鼎蝾螈单独聚为一个分支(图 3)。

#### 2.3 β-防御素蛋白质空间结构预测

预测的俄罗斯鲟 β-防御素的 3D 结构如图 4 所示。结果显示, C38 和 C66、C44 和 C60 及 C48 和 C67 之间分别形成 3 对二硫键, 6 个保守的半胱氨酸残基按照箭头方向形成反向平行的 β 片层折叠结构, 对 β-防御素结构稳定具有重要作用。该结构与斑马鱼 β-防御素-2 非常相似, 从结构上判断, 获得的俄罗斯鲟 β-防御素基因应属于 β-防御素-2 基因。

#### 2.4 β-防御素基因在俄罗斯鲟健康组织中的表达分析

qRT-PCR 结果显示, β-防御素基因在检测的健康

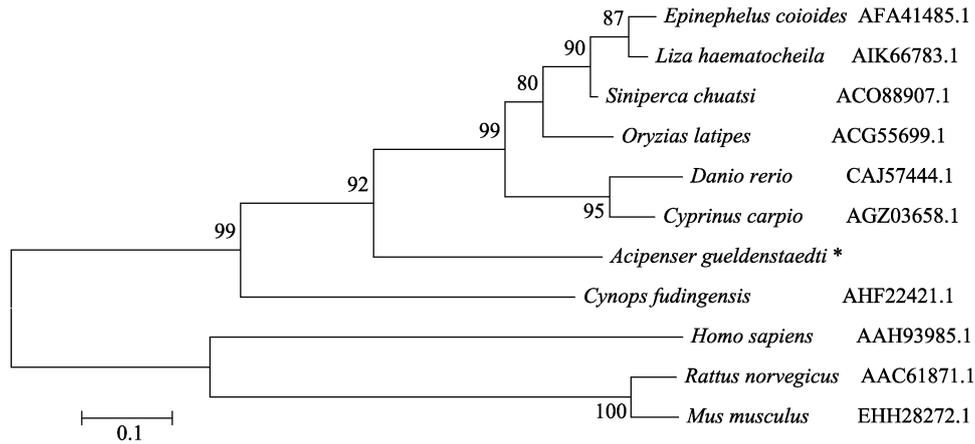


图 3 俄罗斯鲟与其他物种的  $\beta$ -防御素系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic tree of  $\beta$ -defensin of *A. gueldenstaedti* and other vertebrates

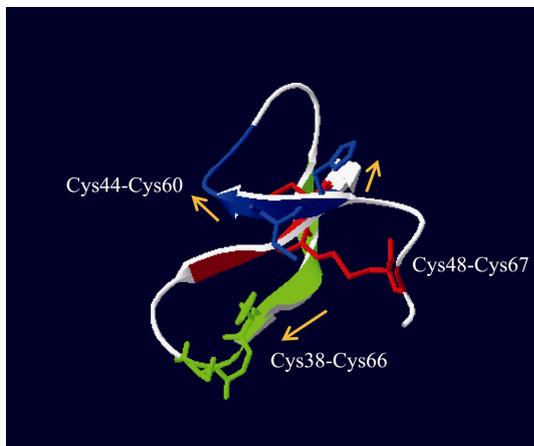


图 4 预测的俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素蛋白质三维结构

Fig.4 Three-dimensions structure of deduced protein of *A. gueldenstaedti*  $\beta$ -defensin

三个二硫键: C38 和 C66(绿色), C44 和 C60(蓝色)和 C48 和 C67(红色), 箭头方向表示  $\beta$ -片层折叠  
 Three disulfied bonds were formed C38-C66 (green), C44-C60 (blue) and C48-C67 (red), respectively  
 Arrow mark indicates  $\beta$ -sheet

俄罗斯鲟 11 种组织(肝、肠、脾、头肾、胃、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺)中均有不同程度的表达(图 5)。以表达量最低的血液(1.0)为对照, 相对表达量最高的组织是性腺(21.75), 其次是皮肤(10.05)、胃(2.5)、肌肉(2.4), 在肝(1.5)和脾(1.5)、鳃(1.05)、肠(1.2)、脑(1.25)及头肾(1.1)中的表达量相对较低,  $\beta$ -防御素基因在不同组织中表达存在特异性。

### 2.5 俄罗斯鲟感染嗜水气单胞菌后 $\beta$ -防御素基因在免疫组织中的表达分析

嗜水气单胞菌感染俄罗斯鲟 0、6、12、24、48 和 72 h 后,  $\beta$ -防御素基因在 6 种免疫组织(肝、肠、

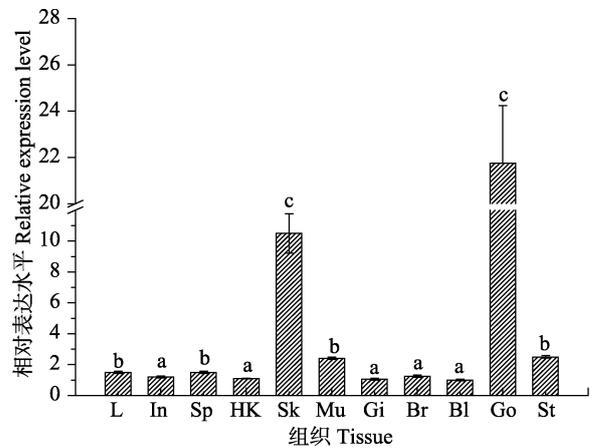


图 5  $\beta$ -防御素基因在健康俄罗斯鲟组织中的表达

Fig.5  $\beta$ -defensin gene expressions in 11 tissues of healthy *A. gueldenstaedti*

L: 肝; In: 小肠; Sp: 脾; HK: 头肾; Sk: 皮肤; Mu: 肌肉; Gi: 鳃; Br: 脑; Bl: 血液; Go: 性腺; St: 胃。字母“a, b, c”代表 SPSS 多重分析的不同分组, 有相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 无相同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同  
 L: Liver; In: Intestine; Sp: Spleen; HK: Head-Kidney; Sk: Skin; Mu: Muscle; Gi: Gill; Br: Brain; Bl: Blood; Go: Gonad; St: Stomach. The letters ‘a, b, c, d’ are subsets by Duncan algorithm. The same letters indicate insignificant difference ( $P>0.05$ ), the different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

脾、头肾、鳃和血液)中呈现不同的表达特征, 结果如图 6 所示。嗜水气单胞菌感染俄罗斯鲟后,  $\beta$ -防御素在头肾、血液、肠、脾和鳃 5 种组织中均呈现上调表达, 只是各组织中峰值出现的时间点不同, 在肝中则呈现下调趋势。其中,  $\beta$ -防御素基因在头肾中呈现最为显著的上调表达, 与 0 h 相比, 在感染后 6 h 后即出现了 10 倍的增加, 在感染后的 12~48 h, 基因表达表现为几十倍到上百倍不等的上调, 到感染 72 h 达到峰值, 为 0 h 表达量的 700 倍;  $\beta$ -防御素基因在

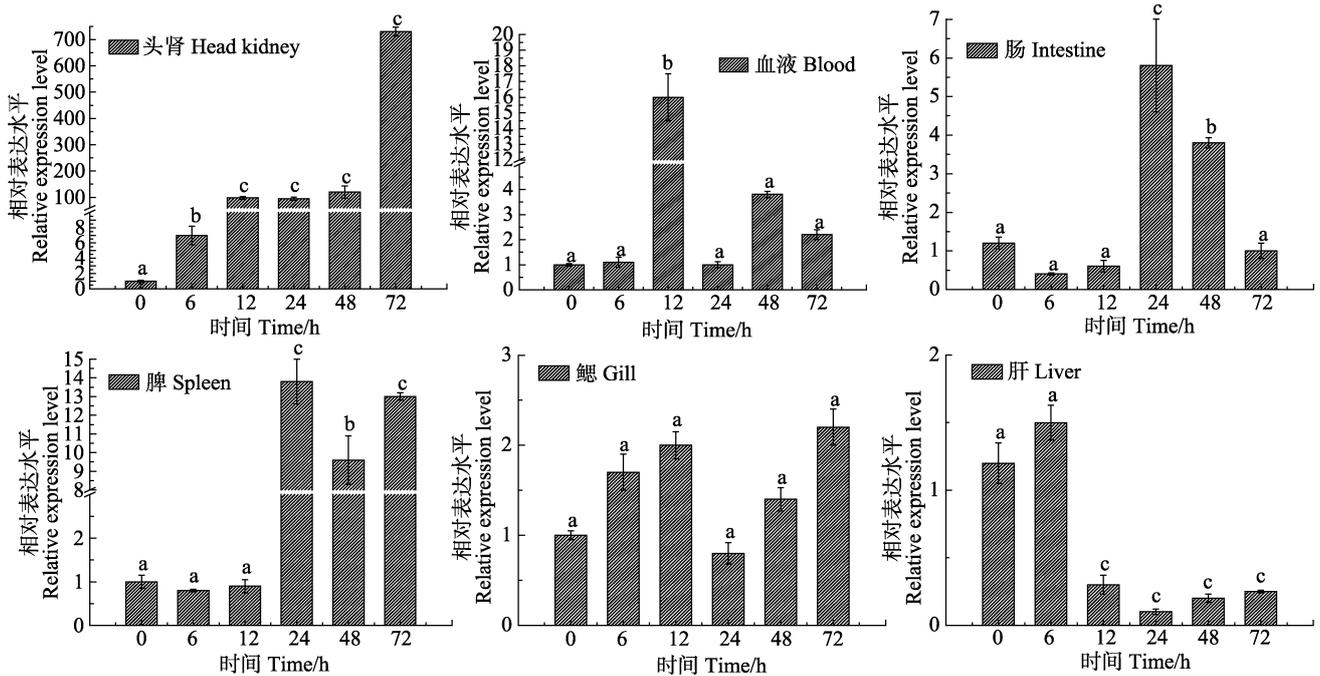


图 6 俄罗斯鲟感染嗜水气单胞菌后  $\beta$ -防御素基因在免疫组织中的表达

Fig. 6  $\beta$ -defensin gene expressions in immune tissues of *A. gueldenstaedti* after *Aeromonas hydrophila* challenge

每个时间点的  $\beta$ -防御素的表达量为感染组除以 PBS 组的相对表达量

The expression level of  $\beta$ -defensin at each timepoint was presented as relative expression in which the infected group divided by the PBS group

小肠、血液和脾中整体上表现为上调表达，最大表达峰值达到几倍到十几倍，在鳃中表达量变化不大，最高的表达量出现在感染后 12 h，为 0 h 表达量的 2 倍，其他时间点表达量与 0 h 相当； $\beta$ -防御素基因在肝脏中则总体呈现下调表达模式，感染 12~72 h 后，表达量与 0 h 相比，呈现近 5 倍的明显下调表达。

### 3 讨论

养殖环境的生态环保对鱼类健康养殖产业提出了严格要求，发展替代抗生素的绿色无污染的渔药如抗菌肽等势在必行。鱼类  $\beta$ -防御素已被证明具有明显的抗菌、抗病毒功能(Jin *et al.*, 2010; Casadei *et al.*, 2009)，具有广阔的应用前景。但目前鱼类  $\beta$ -防御素的研究不深入，亟待更多的鱼种和功能分析上进行更深入的研究。俄罗斯鲟是生产鱼子酱的主要鱼种之一，经济价值很高，开展免疫机理和绿色病害防治研究，对发展和稳定鲟鱼养殖产业具有重要意义。本研究关于俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因的克隆和表达研究，是俄罗斯鲟宿主免疫的首次报道。

俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因 cDNA 长度为 333 bp，ORF 为 213 bp，编码 71 个氨基酸，包含 23 个氨基酸

的信号肽和 48 个成熟肽，目前报道的不同鱼类的  $\beta$ -防御素前体分子一般由 62~77 个氨基酸残基组成，信号序列和前导序列含有 22~38 个氨基酸残基，成熟肽序列由 39~45 个氨基酸残基组成(Casadei *et al.*, 2009)，本研究结果与报道结果吻合。另外，俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 C 端包含 6 个保守的半胱氨酸残基，形成 3 个二硫键结构，与报道的鱼类  $\beta$ -防御素结构一致(Dong *et al.*, 2015; Ruangsri *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2012; Ellis, 2001)。俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素蛋白质空间结构预测形成 3 个  $\beta$ -片层折叠，与斑马鱼 BD-2 的结构(Ellis, 2001)很类似，SMART 结构域预测，俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素包含  $\beta$ -防御素-2 结构域，同源序列比对的结果也证实其与斑马鱼 BD-2 的相似度最高，为 60%，这些证据都指明所获得俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因应属于  $\beta$ -防御素-2，在进化上还是属于相对原始的类型。

鱼类  $\beta$ -防御素是抗菌肽的重要成员，在各组织中广泛表达，罗非鱼  $\beta$ -防御素在检测的 9 种组织(心、肝、脾、鳃、头肾、肠、胃、肌肉和皮肤)中都有表达，其中，在皮肤中表达量最高，其次是在脾、头肾和肌肉中有较高的表达，在肝、心、肠、胃和鳃中的表达量最低(Dong *et al.*, 2015)。 $\beta$ -防御素基因在健康斑点叉尾鲷前肠、肝脏、头肾、肾、鳃、后肠、皮肤、

胃中均有表达, 在皮肤中表达量最高(Zhu *et al.*, 2017)。俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因在检测的 11 种健康组织(肝、小肠、脾、头肾、后肾、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺)中均有表达, 其中, 在皮肤和性腺表达最高, 3 种鱼在共同检测到的组织中, 都是在皮肤中表达量最高, 表达模式相似但又不完全相同, 说明不同物种  $\beta$ -防御素的功能存在相似性, 但表达还具有组织特异性和物种特异性。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)  $\beta$ -防御素能够在睾丸和脑垂体中表达, 推断它可能参与内分泌系统和生殖系统的一些功能(Jin *et al.*, 2010), 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素的序列来自性腺转录组, 实时定量组织表达分析其在性腺中存在高表达, 在脑中有较高的表达, 暗示俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素同样可能具有内分泌和生殖系统的功能。

目前, 对鱼类  $\beta$ -防御素生物学活性的研究主要集中在抗菌和抗病毒等免疫活性方面, 石斑鱼的防御素对革兰氏菌(阳性或阴性)均具有抗菌活性, 并且还具抗 RGV 病毒活性(Jin *et al.*, 2010)。爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染斑点叉尾鲴 48 h 后,  $\beta$ -防御素在头肾、鳃和皮肤中都有明显的上调表达(Zhu *et al.*, 2017), 用停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)感染梭鱼 48 h 后,  $\beta$ -防御素在脾和肠中都有十几倍的上调表达(Qi *et al.*, 2016), 嗜水气单胞菌可强烈影响俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因的表达, 在头肾中的上调表达最明显, 72 h 到达表达峰值, 为 0 h 表达量的 700 倍。在脾脏、血液和肠中均有几倍至十几倍的上调, 本研究结果与报道的研究结果相似。说明俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素在响应细菌感染的免疫反应中发挥了重要作用。

本研究初步研究了俄罗斯鲟的克隆、组织表达及相应病原刺激的免疫应答, 后续研究尚需进一步深入。由于俄罗斯鲟的基因资源还远远不足, 缺乏基因组及多数组织的转录组数据, 加之俄罗斯鲟的基因组又极其复杂, 染色体数目多达 236 条(尹洪滨等, 2006),  $\beta$ -防御素有可能存在较多的同源基因和重复基因, 在一定程度上对俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因的克隆和精准分型造成困难。由于获得的俄罗斯鲟 cDNA 片段长度只有 333 bp, 缺乏合适的位点设计 RACE 引物, 我们尝试多次克隆, 仍无法获得完整的 5' 和 3' 全长, 但我们获得了完整的 ORF, 对进一步开展功能研究奠定了良好基础。在后续研究中, 将进一步验证其对不同病原(细菌、病毒)等的体内和体外抗菌活性的研究, 为俄罗斯鲟的绿色病害防治途径探讨可行之路。

## 参 考 文 献

Cuesta A, Meseguer J, Esteban M $\acute{A}$ . Molecular and functional

- characterization of the gilthead seabream  $\beta$ -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, 2011, 48(12–13): 1432–1438
- Casadei E, Wang T, Zou J, *et al.* Characterization of three novel  $\beta$ -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Immunology*, 2009, 46(16): 3358–3366
- Chen Y, Xia Y, Shao C, *et al.* Discovery and identification of candidate sex-related genes based on transcriptome sequencing of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) gonads. *Physiological Genomics*, 2016, 48(7): 464
- Dong JJ, Wu F, Ye X, *et al.* B-defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides. *Gene*, 2015, 566(1): 23–31
- Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative immunology*, 2001, 25(8–9): 827–839
- Guo M, Wei J, Huang X, *et al.* Antiviral effects of  $\beta$ -defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 828–838
- Jin JY, Zhou L, Wang Y, *et al.* Antibacterial and antiviral roles of a fish  $\beta$ -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS One*, 2010, 5(12): e12883
- Liang T, Wang DD, Zhang GR, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of two beta-defensin genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 166(1): 91–98
- Lu Y, Wang QL, Li M, *et al.* Expression analysis of TLR20 and TLR21 genes in channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged by different bacteria and virus. *Progress in Fisheries Science*, 2013, 34(6): 44–51 [路飏, 王启龙, 李敏, 等. 斑点叉尾鲴TLR20 和 TLR21 基因在不同细菌和病毒感染后的表达特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 44–51]
- Qi Z, Xu W, Meng F, *et al.* Cloning and expression of  $\beta$ -defensin from soiny mullet (*Liza haematocheila*), with insights of its antibacterial mechanism. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157544
- Ruangsi J, Kitani Y, Kiron V, *et al.* A novel beta-defensin antimicrobial peptide in Atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62302
- Yang ZG. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from sturgeons. *Freshwater Fisheries*, 2001, 31(5): 43–44 [杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定. *淡水渔业*, 2001, 31(5): 40–41]
- Yin HB, Sun ZW, Sun DJ *et al.* Cytogenetic analysis of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 181–184 [尹洪滨, 孙中武, 孙大江, 等. 俄罗斯鲟的细胞遗传学分析. *水产学报*, 2006, 30(2): 181–184]
- Yu MJ, Sun LM, Chen YD *et al.* Cloning and expression of the c-Jun gene in immune response to pathogen challenge in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress*

- in Fisheries Science, 2017, 38(2): 31–39 [于孟君, 孙璐明, 陈亚东, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) c-Jun 基因的克隆及免疫应答分析. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 31–39]
- Zhu S, Gao B. Evolutionary origin of beta-defensins. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 39: 79–84
- Zou J, Mercier C, Koussounadis A, *et al.* Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 638–647
- Zhu J, Wang H, Wang J, *et al.* Identification and characterization of a  $\beta$ -defensin gene involved in the immune defense response of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Molecular Immunology, 2017, 85: 256
- Zhang W, Zhu LQ, Zhao FL, *et al.* Progress on  $\beta$ -defensin. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(5): 47–50 [张伟, 朱连勤, 赵凤立, 等.  $\beta$ -防御素研究进展. 动物医学进展, 2006, 27(5): 47–50]

(编辑 冯小花)

## Cloning and Expression Analysis of $\beta$ -Defensin Gene from Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*)

BAI Li<sup>1,3</sup>, CHEN Yadong<sup>2,3</sup>, XIA Yongtao<sup>4</sup>, XU Shijian<sup>4</sup>, HU Mou<sup>4</sup>, SHA Zhenxia<sup>2①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071; 3. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. Hangzhou Qiandaohu Xunlong Sci-Tech Co. Ltd. Hangzhou 311701)

**Abstract**  $\beta$ -defensins are cysteine, cationic, antibacterial peptides that play very important roles in the vertebrate immune system. In this study, the cDNA fragment of  $\beta$ -defensin gene from *Acipenser gueldenstaedti* was cloned using a PCR method based on the Solexa sequencing results of gonad transcriptome, and gene expression was performed by qRT-PCR. The results showed that cDNA of  $\beta$ -defensin was 333 bp in length and contained an open reading frame (ORF) with 213 bp, which was deduced to encode a precursor peptide of 71 amino acids consisting of a signal peptide of 23 amino acid residues and a mature peptide of 48 amino acid residues. Russian sturgeon  $\beta$ -defensin possessed six conserved cysteine residues, forming three disulfide bridges at C38~C66, C44~C60 and C48~C67, and containing 1 defensin- $\beta$ -2 domain. This structure is very similar to other species and conserved in evolution. Homologous alignment revealed that Russian sturgeon  $\beta$ -defensin had the highest sequence identity with fish species, about 54%~60%. qRT-PCR analysis showed the  $\beta$ -defensin transcript is constitutively expressed in 11 tissues (liver, intestine, spleen, head-kidney, gill, blood, brain, skin, muscle and gonad, stomach) in healthy fish, with highest expression in the gonads and skin. Artificial infection of *A. gueldenstaedti* with *Aeromonas hydrophila* resulted in a significantly upregulated expression in the intestine, spleen, head kidney, blood, and gill while downregulating expression in the liver. The most significant upregulated expression and the peak level at 72 h reached 700 times baseline in the head-kidney. The results indicate *Acipenser gueldenstaedti*  $\beta$ -defensin genes are involved in the immune response.

**Key words** *Acipenser gueldenstaedti*;  $\beta$ -Defensin; Gene cloning; Gene expression; *Aeromonas hydrophila*

① Corresponding author: SHA Zhenxia, E-mail: shazhenxia@163.com