

花鲈肝脏 hepcidin 相关 cDNA Heps2 的克隆及序列分析^{*}

陈君慧 王克坚^{**} 周红玲 任洪林 杨明

(厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361005)

摘要 Hepsidin(Heps)是一类性质独特的抗菌肽,具有广谱的抗革兰氏阳性、阴性细菌和真菌等作用。利用 RT-PCR 和 RACE 等技术,从经过多种细菌攻毒的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)肝组织中克隆出 Heps 全长 cDNA,命名为 Heps2, Genbank 登录号为 AY604195。Heps2 有 581 个碱基,其中阅读框有 258 个碱基,编码 86 个氨基酸。预测氨基酸序列和白鲈及其他鱼种在相同保守的区域有 8 个半胱氨酸,相对分子量为 9418.55dal。在 3' 非编码区有 225bp,包含终止密码子下游 189nt 处的多腺苷酸化 AATAAA 信号和 212nt 处的 polyA 信号。预测蛋白的信号肽断裂位点在第 24 和第 25 个密码子之间。通过与白鲈(*Morone chrysops*)、人和其他鱼种来源的 Heps cDNA 和蛋白质同源性分析表明,从花鲈肝中分离的 Heps2 cDNA 属于 Heps 基因家族的新成员。

关键词 花鲈 Hepsidin 抗菌肽 基因克隆 序列分析

Cloning and sequence analysis of hepcidin-like cDNA Heps2 from liver of *Lateolabrax japonicus*. CHEN Jun-Hui, WANG Ke-Jian, ZHOU Hong-Ling, REN Hong-Lin, YANG Ming(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China), *CJEA*, 2007, 15(3): 129 ~ 132

Abstract Hepsidin is a unique antimicrobial peptide which exerts broad-spectrum antimicrobial action against Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as fungi. A Heps-like cDNA was amplified from the liver of *Lateolabrax japonicus* challenged with a mixed bacteria solution. Using RT-PCR and RACE with a specific primer pair, a full length cDNA sequence Heps2 of the Heps-like antimicrobial peptide (GenBank accession number: AY604195) was obtained. Heps2 cDNA is composed of 581 bases which contains an ORF of 258 bases encoding 86 amino acids. The deduced amino acid sequence is conserved between white bass and other fish species, which share eight cysteines at the identical conserved position. The relative molecular weight of the protein is 9418.55dal. The 3' non-coding region is composed of 225bp with a polyadenylation signal AATAAA sequence appearing at position 189 nt, and poly(A) tail at 212 nt, downstream codon TAA. The signal peptide cleavage site of its deduced protein is presumed between codon 24 and 25. High homologies with Heps cDNAs and proteins of white bass (*Morone chrysops*), human and other fish are shown. It indicates that Heps2 cDNA from *Lateolabrax japonicus* liver is a new member of the Heps gene family.

Key words *Lateolabrax japonicus*, Hepsidin, Antimicrobial peptide, Gene cloning, Sequence analysis

(Received May 28, 2006; revised June 30, 2006)

鱼类抗菌肽是鱼体天然免疫的重要组成部分,当鱼体受到损伤或病原微生物侵袭时,能迅速产生抗菌肽以预防和杀伤病原微生物,但它对真核细胞几乎没有作用^[1]。其分子量小,合成速度快,在体内扩散迅速^[2]。因此,抗菌肽产品在疾病防治上将是一种应用前景广阔的抗菌和治疗药物,可作为抗生素添加剂的良好替代品在水产养殖业中发挥不可估量的作用。Hepsidin 是近年来发现的一类具广谱抗革兰氏阳性和阴性细菌、真菌作用的抗菌肽^[3],因发现其主要在肝脏中表达且有抗菌特性,所以首先命名为 Heps。本研究利用 RT-PCR、RACE 等技术,从我国南方海水养殖花鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)肝脏中扩增 Heps cDNA 序列,为研究 Heps 的诱导表达机制及利用生物技术手段人工表达抗菌肽等奠定基础。

1 实验材料与方法

实验花鲈购自厦门龙海海水养殖场,体长 35cm。攻毒菌株溶壁微球菌(*Micrococcus lysodikicus*)、副溶

^{*} 福建省重大科技项目(20031005)和厦门市高新技术项目(3502Z20021052)资助

^{**} 通讯作者

收稿日期:2006-05-28 改回日期:2006-06-30

血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及大肠杆菌 ER1647 感受态细胞均为厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室保存菌种。根据已发表的白鲈 (*Morone chrysops*) Hcpc cDNA^[5] 设计引物 S1 为 5'CGAAGCAGTCAAACCTCCTAAGATG 3', A1 为 5'GAACCTGCAGCAGACA CCACATCCG 3', LYH5GSP2 为 5'ACTGATGTCTCCTCATGTGCAGC 3', 引物由上海博亚生物工程公司合成。

将花鲈置于沙滤海水中暂养 3d 后, 在含有溶壁微球菌、大肠杆菌和副溶血弧菌的 LB (Luria-Bertani) 液体培养基浸泡 5min, 继续置于沙滤海水中养 27h 后, 解剖取其肝组织, 分成适当大小的几份, 用锡纸包好, 立刻置于液氮中。称取保存于 -80℃ 的肝组织 100mg, 用 1mL Trizol 试剂提取总 RNA; 取适量总 RNA、下游引物 A1 和 AMV 反转录酶, 42℃ 温育 60min; 取适量反转录产物、引物 A1、S1 和 Taq DNA 聚合酶, 94℃ 预变性 2min; 94℃ 变性 40s, 60℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 60s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5min 完成 PCR 反应; 取适量总 RNA 利用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 完成 5'-RACE, 以及 3'-Full RACE Core Set 完成 3'-RACE。用 QIAquick Gel Extraction Kit 回收目的片段, 与 pMD18-T 载体连接, 经转化、酶切鉴定, 在上海博亚生物工程公司测序。将测序结果利用 GeneTool 软件校正引物 A1 和 S1 区序列并拼接获得完整 Hcpc2 cDNA 序列。应用 DNASIS v2.5 Demo 分析核酸、氨基酸序列。在 Genbank 和 Swiss-prot 中, 利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 的 BlastN 和 BlastP 进行同源序列检索分析, 将同源序列应用 DNASTar5.0 和 ClustalX1.83 进行一致性和差异性分析并绘制系统进化树。应用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 网站上 SignalP 3.0 进行信号肽断裂位点预测。

2 结果与分析

2.1 花鲈肝 Hcpc 全长 cDNA Hcpc2 核酸和预测氨基酸序列

利用特异性引物 A1、S1, 以花鲈肝组织提取的 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 反应, 电泳结果检测到 300bp 左右的片段 (图 1a)。经测序和序列比对确认为 Hcpc-like cDNA 后, 利用 3' RACE、5' RACE 试剂盒, 以所提取的 RNA 为模板分别扩增得到 500bp、200bp 左右的特异条带 (图 1b, 1c)。经过多次验证, 序列拼接获得 Hcpc2

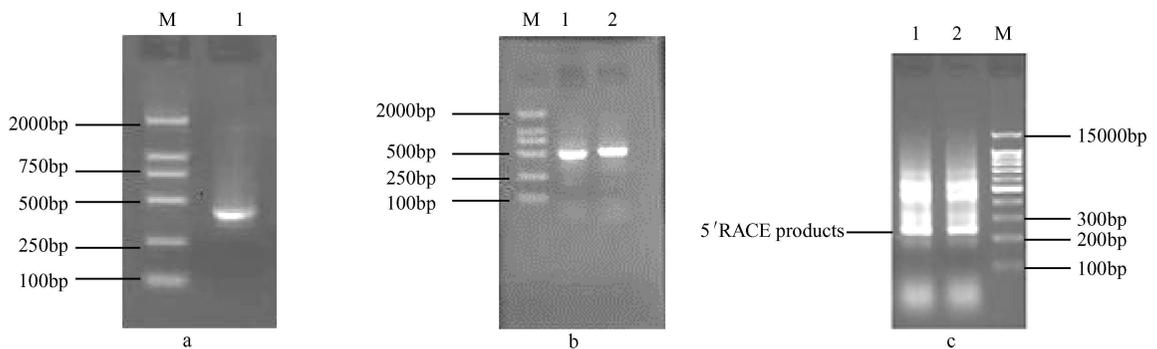


图 1 Hcpc2 RT-PCR、3' RACE、5' RACE 产物琼脂糖电泳图 *

Fig. 1 Picture of agarose gel electrophoresis for RT-PCR, 3' RACE, 5' RACE products

* a: M-DL2000marker, 1-RT-PCR 产物 (约 300bp); b: M-DL15000marker, 1-3' RACE 产物,

2-3' RACE 产物 (约 500bp); c: M-DL2000marker, 1-5' RACE 产物, 2-5' RACE 产物 (约 200bp)。

全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号 AY604195) 和预测的氨基酸序列 (见图 2)。Hcpc2 长 581 bp, 编码区 258 bp, 编码 86 个氨基酸, 由信号肽 (24aa)、前域 (41aa) 和成熟肽 (21aa) 3 部分组成, 在 C 末端, 包含 8 个半胱氨酸残基的保守序列。预测编码蛋白相对分子量为 9418.55dal。3' 端非编码区长 225 bp, 终止密码子 TAA 下游 189nt 出现 AATAAA 信号, poly(A) 尾巴出现在 AATAAA 信号下游 18nt (即终止密码子 TAA 下游 212nt)。<http://www.expasy.ch> 网站上 SignalP 3.0 分析显示, 编码的第 24 和 25 氨基酸之间为信号肽断裂位点 (见图 3)。

2.2 Hcpc2 cDNA 预测氨基酸序列同源性比较

将花鲈 Hcpc2 cDNA 所编码蛋白的氨基酸序列 (AAT09138) 做 Blastp 检索, 结果显示与多种生物 Hcpc 蛋白同源性较高, 并通过网站在数据库中取 24 个同源氨基酸序列, 应用 DNASTar 软件进行多序列联配对比及一致性和差异性分析 (见图 3), 应用 ClustalX1.83 绘制系统进化树 (见图 4)。

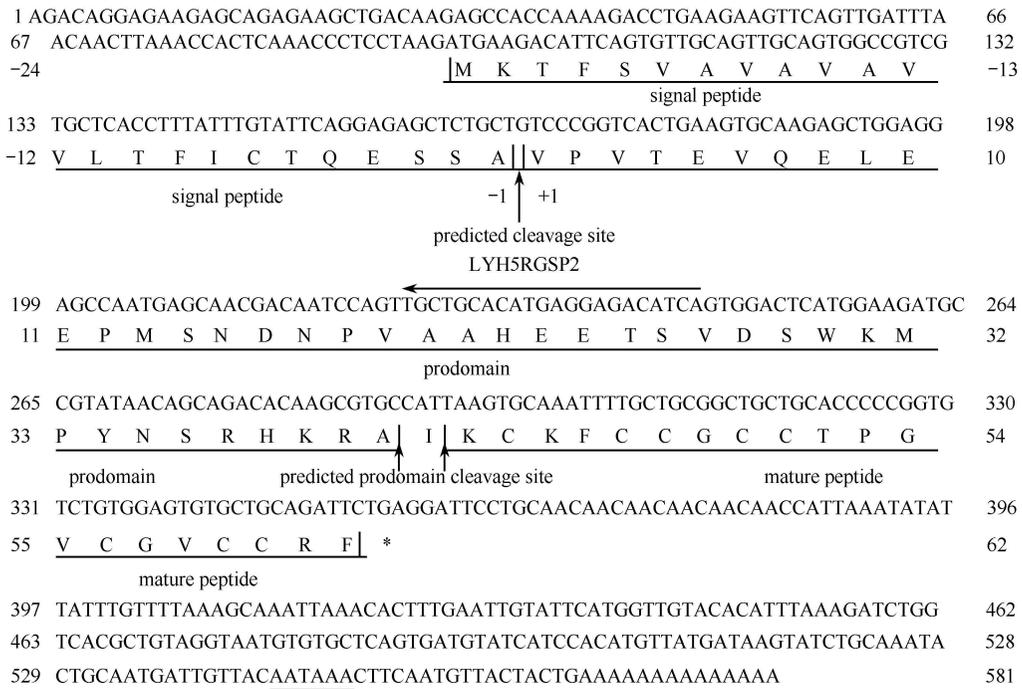


图 2 花鲈 Hepc 相关 cDNA Hepc2 及其预测氨基酸序列 *

Fig. 2 Hepc-like cDNA Hepc2 from *Lateolabrax japonicus* and the deduced amino acid sequence

* 预测氨基酸序列包括信号肽、前域和成熟肽 3 部分。多聚腺苷酸加尾信号

用下划线标出, 终止密码用星号标出。

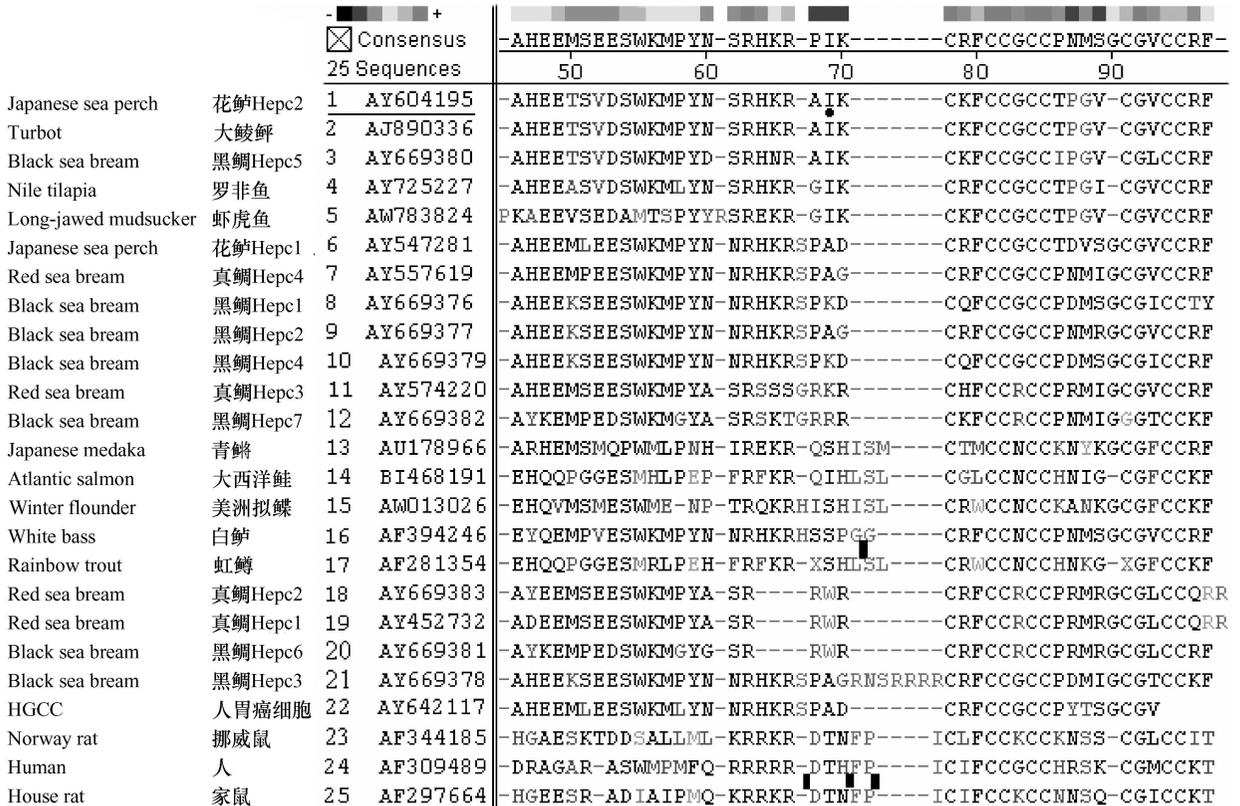


图 3 预测花鲈 Hepc2 氨基酸序列结构域部分与相似蛋白同源比对分析 *

Fig. 3 Domain comparison of amino acid sequence deduced from *Lateolabrax japonicus* Hepc2 cDNA with some similar protein sequence

* 成熟肽 C 末端有相对保守的 7~8 个半胱氨酸残基, 花鲈 Hepc2 推导氨基酸序列用下划线标出, 黑点标出其成熟肽可能的断裂位点,

黑色矩形标出白鲈(AF394246)和人(AF309489)的 Hepc 成熟肽断裂位点, 其他蛋白均为预测结果。

经蛋白同源性对比分析,花鲈肝 Hepc2 预测氨基酸序列与多数鱼类(除虹鳟 AF281354、大西洋鲑 BI468191)的 Hepc 相关蛋白的一致性较高(57.0%~100.0%),与大鲈鲑(AJ890336)的 Hepc 相关蛋白一致性为 100.0%,与白鲈(AF394246)Hepc 相关蛋白一致性为 74.1%和花鲈 Hepc1 相关蛋白的一致性为 77.9%。蛋白进化树聚类分析表明,花鲈 Hepc2 与大鲈鲑、罗非鱼、黑鲷 Hep5 等多数鱼类属于亲缘关系更近的一族,鱼类与哺乳动物(人 AF309489、家鼠 AF297664、挪威鼠 AF344185)的 Hepc 相关蛋白不在同一侧支(见图 4)。但发现 Hepc2 与人胃癌细胞表达的一个蛋白 DADS2 有 67.9%的一致性。

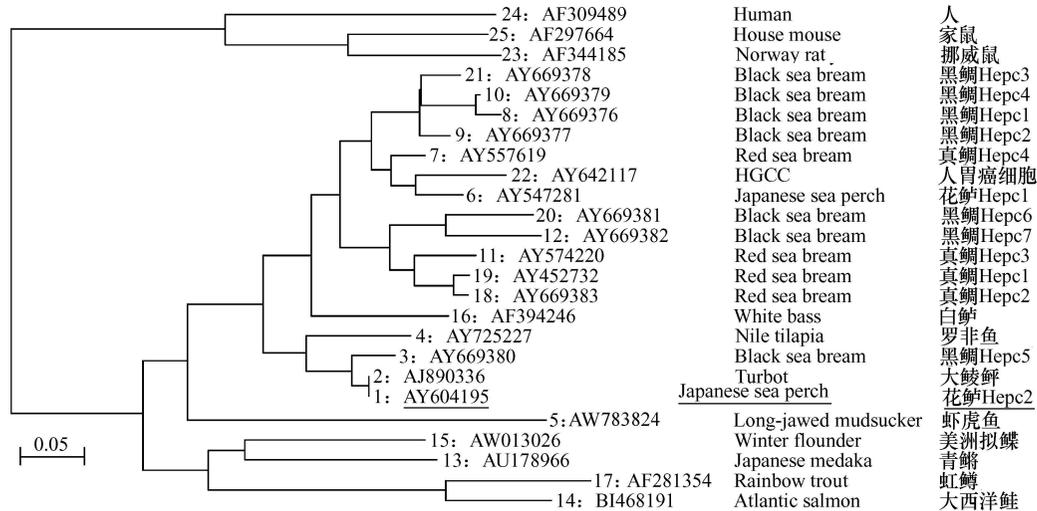


图 4 花鲈肝 Hepc2 预测氨基酸序列与同源蛋白序列进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of amino acid sequence deduced from *Lateolabrax japonicus* Hepc2 cDNA and some homologous creatures' Hepc precursor proteins

3 小结与讨论

本研究从经过多种细菌攻毒的花鲈肝组织中克隆出 Hepc 全长 cDNA, 命名为 Hepc2, 有 581 个碱基, 其中阅读框有 258 个碱基, 编码 86 个氨基酸。预测氨基酸序列 C 末端有 8 个半胱氨酸, 相对分子量为 9418.55dal。通过同源性分析, 表明从花鲈肝中分离的 Hepc2 cDNA 属于 Hepc 基因家族的新成员。

Hepc 具有广谱的抗菌活性在于其独特的结构性质。Hepc 由带正电荷的氨基酸构成其基本结构, 是一类在 C 末端富含 8 个半胱氨酸残基的保守肽家族, 能形成带 3~4 个分子内二硫键桥的 3 级结构。这种肽能作用于入侵微生物的膜, 使其产生穿孔现象, 从而达到抗菌或杀菌的效果^[6]。不同生物来源的 Hepc 组成相似, 为信号肽、前域和成熟肽 3 个部分。通过本研究结果预测花鲈前域与成熟肽的断裂位点可能在第 42 个氨基酸残基异亮氨酸(I)左右(见图 1 和图 3), 成熟肽包含 21 个氨基酸和白鲈的成熟肽大小一致。

Hepc 最早从人的血浆和尿液中分离纯化得到, 之后在鼠(*Mus musculus*)、鱼、猪、狗等多种动物体内均有发现^[7,8]。对预测的 Hepc2 蛋白和其他鱼以及哺乳动物的 Hepc 相关蛋白进行多序列联配对比, Hepc2 和多数鱼类的 Hepc 相关蛋白的同源性比来源于挪威鼠、家鼠 Hepc 相关蛋白高。利用 ClustalX1.83 绘制系统进化树, 鱼类 Hepc 相关蛋白在同一支, 而哺乳动物在另一支, 这可能和它们所处的进化地位相一致。至于花鲈肝脏 Hepc 相关基因的表达特性、生物活性及其相关功能有待于进一步研究。

参 考 文 献

- Douglas S. E., Gallant J. W., Gong Z., et al. Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus*(Walbaum). *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25 (2): 137~147
- Lehrer R. I., Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, 14 (1): 96~102
- Park C. H., et al. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (11): 7806~7810
- Hiroko Shikel, et al. Bass Hepc is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269 (8): 2232~2237
- Venga Falzacappa M. V., Muckenthaler M. U. Hepsidin: Iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene*, 2005, 364: 37~44
- Pigeon C., Ilyin G., Coursaud B., et al. A new mouse liver specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepsidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (11): 7811~7819
- Sanga Y., Ramanathan B., et al. Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hepsidin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30 (4): 357~366