

养殖期中国对虾抗菌肽的表达

郭振宇, 董波, 焦传珍, 相建海

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用半定量 RT-PCR 方法, 根据中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 抗菌肽的 cDNA 序列, 设计一对特异引物, 首次对中国对虾养殖期 (PL11 期仔虾 ~ 稚虾) 抗菌肽的表达进行了研究。结果在各时期样本所提取的总 RNA 中, 均扩增出一条长度约为 200 bp 的特异性条带, 表明中国对虾养殖期不同阶段均有抗菌肽的表达, 提示中国对虾抗菌肽基因为组成型表达, 并可能是中国对虾抵抗微生物感染的一个重要分子基础。

关键词: 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*); 抗菌肽; 半定量 RT-PCR

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)01-0048-04

抗菌肽是由动物和植物细胞特定基因编码产生的一类小分子多肽, 具有广谱抗菌活性。自瑞典科学家 Boman^[1] 发现并首先测定了惜古比天蚕 (*Hyatophora cecropia*) 抗菌肽 Cecropin 的一级结构和抗菌谱以来, 人们相继在其它昆虫^[2]、两栖动物^[3,4]、哺乳动物^[5,6]、人^[7]、植物^[8]、甲壳动物^[9-11]、软体动物^[12] 等生物体内都发现存在类似的具有抗菌活性的多肽。随着研究工作的深入, 人们发现某些抗菌肽除了具有广谱高效杀菌活性外, 对部分真菌^[13]、原生动物的^[14]、病毒^[15] 及癌细胞^[16] 等均具有强有力的杀伤作用, 因此许多学者对这类活性多肽倾向于称之为 “antimicrobial peptides, AMP” 或 “peptide antibiotics”。

由于对虾生活环境的特殊性, 尤其是养殖期的对虾, 面对较为恶劣的养殖环境, 在其生存过程中需要不停地同大量快速繁殖的病原微生物作斗争, 但由于它没有 B 或 T 淋巴细胞, 体液因子中也没有免疫球蛋白存在, 在消灭入侵微生物时, 抗菌肽就起到至关重要的作用。近年来, 国内对于对虾病害的研究日益重视, 也取得了不少阶段性的成果, 在免疫机理^[17]、病原研究^[18]、种群遗传^[19]、繁殖发育^[20,21]、转基因^[22]、分子标记^[23] 等方面做了大量的工作。但是关于中国对虾不同发育阶段抗菌肽表达的研究, 国内外尚未有报道。本文通过半定量 RT-PCR 的方法研究了中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 养殖期不同阶段 (PL11 期仔虾 ~ 稚虾) 的抗菌肽表达情况, 并对其表达水平进行了比较。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验室海捕中国对虾亲虾产卵孵化后, 自 PL11 期幼体开始, 每隔半月取一次样, 每次取样处理条件

表 1 取样记录

Tab.1 Samples collection data

分组	日期 (年-月-日)	平均每尾质量 (g)	温度 (℃)	盐度
1	2002-05-15	0.006	20.8	32
2	2002-05-31	0.030	20.0	32
3	2002-06-14	0.056	21.4	22
4	2002-06-28	0.134	21.5	22
5	2002-07-19	0.292	24.5	24
6	2002-08-02	0.806	25.2	25
7	2002-08-19	1.436	26.4	24

收稿日期: 2003-06-04, 修回日期: 2003-06-16

基金项目: 国家重点基础研究专项经费 (G1999012007), 国家自然科学基金资助项目 (30140017), 欧盟第五框架协议项目 (ICA4-CT-2001-10023)

作者简介: 郭振宇 (1974-), 男, 山东文登人, 博士, E-mail: guozhenyu@ms.qdio.ac.cn; 相建海, 通讯作者, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

保持一致:早晨8时至下午2时不再喂食使之空胃,然后捞取幼体称取质量,置于冻存管中,液氮速冻,然后放入-80℃冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 提取

随机从每个时期样品中取出部分样品,液氮中研磨后放入预冷的 RNA 变性缓冲液(4 mol/L 异硫氰酸胍,26 mmol/L 柠檬酸钠(pH4.0),0.5% 十二烷基肌氨酸钠,1%β-巯基乙醇)中匀浆,冰浴5 min;依次加入2 mol/L 醋酸铵(pH4.0)1.5 mL,酸性酚10 mL,氯仿5 mL,剧烈振荡,冰浴10 min;在4℃下,12 000 r/min 离心30 min;吸取上清液,加入等体积的异丙醇或2倍体积的无水乙醇,-20℃放置30 min;再次4℃12 000 r/min 离心30 min;弃上清,将 RNA 沉淀用70%乙醇1 mL 清洗,然后在4℃12 000 r/min 下,15 min 离心2次;风干沉淀,用适量的无 RNase 的水溶解,通过测定 A_{260nm} 的值计算 RNA 的浓度,用 A_{260nm} 和 A_{280nm} 的比值判定纯度,用 RNA 变性凝胶电泳检测完整性。

1.3 RT-PCR

1.3.1 mRNA 的反转录

利用 mRNA 的 polyA 尾可以与 Oligo(dT)₁₈ 结合的特点,完整性较好的 RNA 用紫外分光光度计定量后,将各时期总 RNA 样品稀释到同一浓度(0.5 g/L),就可用来做反转录反应,以下为反应体积为 25 μL 的体系:总 RNA(0.5 g/L),3 μL; Oligo(dT)₁₈ (50 μmol/L),1 μL; 超纯水(DEPC 处理),12.75 μL; M-MLV RT 5× Reaction Buffer,5 μL; rRNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/μL),1 μL; dNTP (10 mmol/L),1.25 μL; M-MLV Reverse Transcriptase (5 U/μL),1 μL。

首先将总 RNA、Oligo(dT)₁₈ 和超纯水加入到用 DEPC 处理的薄壁管中,70℃变性5 min 至冰上骤冷,离心,依次加入余下的试剂后,42℃温浴2 h,94℃5 min 使反转录酶失活。

1.3.2 以 cDNA 为模板的 PCR 扩增

直接以反转录产物为模板,以β-actin 为内对照进行 PCR 扩增。所用中国对虾抗菌肽引物由山东大学王金星教授提供:正向引物 AMP₁ 5'ATGCCCTCGTGTCTGCCTG3'; 反向引物 AMP₂ 5'ACAGCAACGTC-CAAACCGAC3'。PCR 扩增产物长 192 bp。β-actin 由上海生工合成:正向引物 5'AGTAGCCGCCCTGGTTGTA-GAC3'; 反向引物 5'TTCTCCATGTCGTCACAGT3'。

反应体系 25 μL:10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL, AMP₁ (1.25 g/L) 1 μL, AMP₂ (1.25 g/L) 1 μL, Taq DNA Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL, cDNA 模板 3 μL, 超纯水 15.25 μL。

PCR 反应条件:94℃变性2 min,1个循环;94℃变

性30 s,60.5℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min,1个循环。

1.4 PCR 产物电泳和分析

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,用 Image-Master VDS (Pharmacia Biotech) 成像系统成像,并用图像分析处理系统 (Storm Image Analysis System, Amersham, UK) 对电泳结果进行扫描分析。

2 结果

2.1 养殖期不同阶段中国对虾总 RNA 的提取

提取完整的总 RNA 是成功检测基因表达情况的关键。取不同时期中国对虾(PL11 期仔虾~稚虾)采用异硫氰酸胍抽提的方法提取其总 RNA,得率较高,用紫外分光光度计测 A_{280nm} 发现其蛋白质也很少,完全可以直接作为反转录的模板。通过变性胶电泳可以看出 RNA 的完整性很好(图1)。

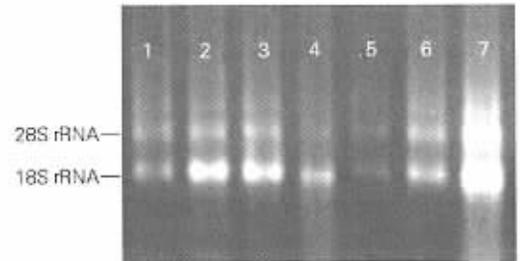


图1 中国对虾总 RNA 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of total RNA from the shrimp

Fenneropenaeus chinensis

泳道1~7,分别代表取自不同时间的对虾总 RNA

Lane 1~7, Total RNA from shrimp collected on May 15 (Post larvae PL11), May 31, Jun 14, Jun 28, Jul 19, Aug 2, and Aug 19 (Juvenile)

2.2 半定量 RT-PCR

通过改变模板及 Mg²⁺ 的浓度、退火温度等优化 PCR 反应条件,以中国对虾抗菌肽特异引物 AMP(5'ATGCCCTCGTGTCTGCCTG3') 和 AMP(5'ACAGCAAC-GTCAAACCGAC3') 分别作为正向和反向引物,以不同时期中国对虾 cDNA 为模板,PCR 产物电泳结果表明,扩增产物只在 200 bp 附近有一特异性条带,大小同预期设计一致(图2左),说明抗菌肽基因在养殖期不同阶段中国对虾均有表达。同时,每一组样品均以β-actin 作为内参照,分别在相同反应条件下进行 PCR 扩增,扩增产物电泳结果见图2。

通过图像分析处理系统(Storm Image Analysis System, Amersham)对电泳结果进行分析,比较中国对虾

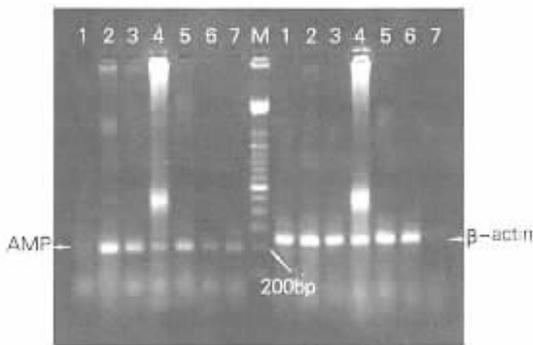


图2 中国对虾养殖期不同阶段抗菌肽基因 RT-PCR 结果

Fig.2 Developmental expressions of AMP gene in the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* detected with RT-PCR

泳道 1~7, 分别代表取自不同时间的对虾样品, M(Marker) 左侧是抗菌肽的表达情况, 右侧为各组样品的 β -actin 对照

M, Marker; Lane 1~7, Expressions of AMP in shrimp samples collected in different time

抗菌肽和同组 β -actin 基因扩增产物的荧光强度, 计算出中国对虾抗菌肽在养殖期不同阶段表达的相对含量。结果如图 3 所示。

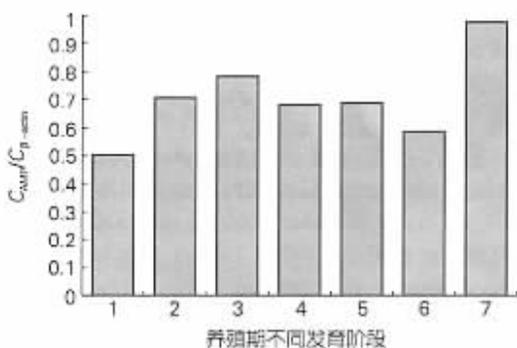


图3 中国对虾养殖期不同阶段抗菌肽的表达相对含量

Fig.3 Developmental expression of AMP in the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

$C_{AMP} / C_{\beta-actin}$ 代表抗菌肽比较 β -actin 的相对含量

3 讨论

用 RT-PCR 研究基因的表达, 其操作简便, 时间短, 所需要的样品量少。如需检测某种特异性基因的表达, 可通过以表达相对稳定的基因如 β -actin 或

GAPDH 作为内标准, 作相应的 RT-PCR 定量对照, 通过特定基因扩增产物的荧光强度同内参照的比值, 可计算出待测基因的相对含量。有文献将内参照基因同待检测抗菌肽基因放置于同一 PCR 管中进行扩增, 以减少系统误差。本文作者也曾这样做过, 但结果不理想, 由于所检测的目的基因和选用的 β -actin 基因片段大小较为接近, 两对引物在同一管中扩增, 是一个竞争性的系统, 对于内参照基因来说扩增不受影响, 但对于待检测基因往往扩增效果不佳, 尤其是对于抗菌肽这种低拷贝基因更是如此。用 RT-PCR 对基因表达进行定量, 最关键的是要优化实验条件。其中 RNA 的纯度、完整性, 引物的选择设计, 模板量和循环数的多少, 无不直接与 PCR 产物的荧光强度能否充分反映模板的量, 即基因表达情况密切相关。所以需要反复摸索, 不断优化实验条件, 最终才能建立一个理想的反应体系, 得到一个准确可靠的实验结果。为减少误差本文采取了下列措施: 逆转录及 PCR 反应中的通用试剂均先混合后再等量分装于各反应体系; 经预试验确定 25~30 个循环较为理想, 即 PCR 产物条带密度与循环数呈线性关系; 每个 PCR 反应均重复一次, 只有两次反应的结果相差小于 10% 者, 才用于半定量分析。

在昆虫中, 最早从鳞翅目和双翅目昆虫幼体鉴定出其抗菌肽合成部位为脂肪体^[24], 通常情况下抗菌肽基因处于关闭状态, 当受到微生物刺激时, 它们迅速合成并释放到体液中^[2]。Destoumieux 等^[10]首先从凡纳对虾 *Litopenaeus vannamei* 血淋巴中纯化得到一组抗菌肽 Penaeidins, 并以未受微生物刺激的凡纳对虾为研究对象, 通过 Northern Blot 比较了其不同组织间抗菌肽 mRNA 的水平差异^[25]。证实血细胞是抗菌肽 Penaeidins 的主要合成部位, Penaeidins 在血细胞中为组成性表达, 即持续不断地表达, 以成熟肽的形式存储于颗粒细胞中; 微生物刺激不会导致 Penaeidins 转录增强, 但会促使颗粒细胞脱颗粒, 将抗菌肽释放到血液中去。本实验以中国对虾抗菌肽特异引物 AMP₁ 和 AMP₂ 分别作为正向和反向引物, 以不同时期中国对虾 cDNA 为模板, β -actin 作为内标, 研究了中国对虾养殖期不同阶段抗菌肽 mRNA 的表达情况。结果显示, 在所检测的中国对虾各个不同发育时期(从 PL11 期仔虾到稚虾)均有抗菌肽表达, 说明抗菌肽是甲壳动物免疫体系中一个非常重要且必需的组成成分, 在其各个发育时期扮演着帮助机体抵御外来微生物入侵的角色。同时进一步证实本文所研究的中国对虾抗菌肽为组成性表达, 完全不同于昆虫抗菌肽诱导后合成的方式。

另外, 本文通过半定量 RT-PCR 的方法所得到的数据显示, 中国对虾抗菌肽在其不同发育时期的表达变化并没有一定的规律性。这可能与对虾本身个体差异有关, 不同的生理状态或个体间的遗传差异, 如 Destoumieux 通过 Northern Blot 比较凡纳对虾不同组织间抗菌肽 mRNA 的水平差异时, 同一组 10 个个体中检测的 Penaeidin 的相对量都是不同的, 表达水平较高和较低者之间的 RNA 相对量相差 5 倍^[25]。同时这也可能与取材背景不统一有关, 如温度和盐度的影响, 都有可能对导致抗菌肽表达发生差异。在本文所检测的样品中, 第 3 组和第 7 组的抗菌肽 mRNA 水平比其他各组要高, 从对照取样记录(表 1)可以发现, 第 3 组取样时, 盐度发生了明显下降, 而第 7 组取样时, 水温为各组最高。其中机制究竟是什么, 需要进一步实验加以研究。

中国对虾暴发性流行病是生态环境严重恶化下, 多种因子综合作用所导致的, 概括起来不外乎 3 个因素: 一是病原体的存在, 二是虾体抗病力下降, 三是环境质量(包括营养质量)的恶化。从目前国内生产条件来看, 完全使用无特异病原(SPF)虾苗尚有困难, 把池塘全部改为小型精养池塘, 从而达到使用不含病原体的池塘和水源也不现实。因此, 如何提高对虾自身抗病力成为当前科研工作者最为关心的问题。本文首次对中国对虾养殖期不同阶段抗菌肽的表达进行了研究, 希望通过对抗菌肽这一天然免疫关键分子的研究, 进一步揭示中国对虾免疫机理, 最终达到提高其自身抗病力, 从而解决对虾养殖病害防治的问题。

参考文献:

[1] Boman H G, Steiner H. Humoral immunity in cecropia pupae[J]. **Curr Top Microbial Immunol**, 1981, 94/95: 75-91.

[2] Cociancich S, Bulet P, Hetru C, *et al.* The inducible antibacterial peptides of insects[J]. **Parasitology Today**, 1994, 10(4): 132-138.

[3] Park C B, Kim M S, Kim S C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1996, 218: 408-413.

[4] Fehlbaum P, Bulet P. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1996, 93: 1 221-1 225.

[5] Ryan L K, Rhodes J, Bhat M, *et al.* Expression of beta-defensin genes in bovine alveolar macrophages[J]. **Infect Immun**, 1998, 66: 878-881.

[6] Zhang G, Wu H, Shi J, *et al.* Molecular cloning and

tissue expression of porcine β -defensin 1[J]. **FEBS Letters**, 1998, 424: 37-40.

[7] Harder J, Bartels J, Ckristophers E, *et al.* A peptide antibiotic from human skin[J]. **Nature**, 1997, 387: 861.

[8] Francisco G, Antonio M. Plant defense peptides[J]. **Biopolymers (Peptide Science)**, 1998, 47: 479-491.

[9] Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions[J]. **J Biochem**, 1998, 123: 1-15.

[10] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda)[J]. **J Biol Chem**, 1997, 272: 28 398-28 406.

[11] 康翠洁, 王金星, 赵小凡, 等. 对虾抗菌肽成熟肽 cDNA 克隆[J]. **山东大学学报**, 2002, 37 6.

[12] Charlet M, Chemys 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: 21 808-21 813.

[13] Ganz T. The structure of the rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression[J]. **J Immunol**, 1989, 143: 1 358.

[14] Jaynes J M. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*[J]. **FASEB J**, 1989(2): 2 878-2 883.

[15] Daher K. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins[J]. **J Virol**, 1986, 60: 1 068-1 074.

[16] Lichtenstein A K. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins-Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity[J]. **J Immunol**, 1988, 140: 2 686-2 694.

[17] 王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化物酶活力的测定及其特性研究[J]. **海洋与湖沼**, 1995, 26(2): 179-185.

[18] 雷质文, 黄 史成银, 等. 白斑综合症病毒(WSSV)的宿主调查[J]. **海洋与湖沼**, 2002, 33(3): 250-258.

[19] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 用 RAPD 标记研究对虾属六个种间的亲缘关系[J]. **动物学报**, 1998, 44(3): 353-359.

[20] 李富花, 相建海. 中国对虾促雄性腺形态结构和功能的初步研究[J]. **科学通报**, 1996, 41(5): 1 418-1 422.

[21] 吴长功, 周令华, 相建海, 等. 中国对虾输精管结构及精子形成[J]. **海洋与湖沼**, 2001, 32(1): 23-29.

[22] 刘志毅, 相建海, 周国瑛, 等. 用基因枪将外源 DNA 导入中国对虾(*Penaeus chinensis*)[J]. **科学通报**, 2000, 45(23): 2 539-2 544.

(下转封三)

(上接第 51 页)

- [23] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选 [J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255 – 259.
- [24] Boman H G, Hultmark D. Cell free immunity in insects [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41: 103 – 126.

- [25] Destoumieux D. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin – binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113: 461 – 469.

Expression of antimicrobial peptide during the growth period of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

GUO Zhen – yu, DONG Bo, JIAO Chuan – zhen, XIANG Jian – hai

(Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Jun., 4, 2003

Key words: shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*); antimicrobial peptide; semi – quantitative RT – PCR

Abstract : Antimicrobial peptides are important for non – specific host defence in many animals. This research considers the developmental expression of antimicrobial peptide gene in maturation period of *Fenneropenaeus chinensis*. Total RNA samples from different developmental stages (PL11 – juvenile shrimp) were isolated and relative mRNA contents were detected using the semi – quantitative RT – PCR method. Results showed that antimicrobial peptide transcripts were present in all detected samples during different developmental stages from PL11 to adult shrimp. This suggests that antimicrobial peptide is constitutively expressed in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and it may also play an important role in innate defense against infection.

(本文编辑: 刘珊珊)