

文章编号: 1674 - 5566(2012)04 - 0495 - 07

草鱼 *hepcidin* 基因 cDNA 克隆、序列分析与表达

韦友传, 黄荣俊, 陆专灵, 陈代建, 姬永杰, 程光平

(广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 运用 RT-PCR 和快速扩增 cDNA 末端 (rapid amplification of cDNA Ends, RACE) 技术获得草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) *hepcidin* 基因全长 cDNA, 为 774 bp, 包括 ORF 282 bp, 5' UTR 117 bp 和 3' UTR 383 bp, 3' UTR 存在 1 个多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA) 和 1 个 mRNA 不稳定基序 (ATTTA)。推定编码 93 个氨基酸, 与其它鱼类 *hepcidin* 的序列同一性为 27.9% ~ 51.6%; SignalP 4.0 软件预测信号肽位于 1 ~ 24 位。在邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建的系统进化树中, 草鱼 *hepcidin* 前体肽和其他已报导的鱼类 *hepcidin* 前体肽聚为一枝。实时定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 检测结果显示 *hepcidin* 基因 mRNA 主要表达于肝脏、脾脏、头肾和眼等组织; 柱状黄杆菌注射后 4 ~ 48 h, *hepcidin* 基因在肝脏、脾脏和头肾中表达均显著上调。

研究亮点: 克隆到草鱼抗菌肽 *hepcidin* 一个新基因的全长 cDNA, 阐明了其所编码的 *hepcidin* 与其它脊椎动物 *hepcidin* 具有类似的结构与功能; 证明其广泛分布于各组织中, 参与了对细菌的免疫应答, 是固有免疫的重要组成部分。

关键词: 草鱼; *hepcidin*; 表达; 免疫应答

中图分类号: S 917.4; Q 78

文献标志码: A

抗菌肽在动物界和植物界广泛分布, 是宿主固有免疫的重要组成部分, 在防御病原入侵中发挥着重要作用^[1-2]。它具有分子量小、抗菌谱广、对很多抗性菌及其突变株有特效且不产生选择性、不会导致宿主产生脓毒症等优点, 具有很好的药用前景^[3]。*Hepcidin* 基因转录翻译后形成早期多肽 (preprohepcidin, PP), 经酶切去除其信号肽 (signal peptide, SP), 余下的氨基酸残基组成前体肽 (prohepcidin, PH), 并通过转运进入血液循环, 最后由前肽转化酶 (propeptide convertase) 在 N 端剪接生成成熟肽 (22 ~ 25 aa)。成熟肽具有高度保守的二硫键结构。*Hepcidin* 是固有免疫的重要分子, 在体内和体外具有抵制多种病原生物的能力^[1-2, 4]。*Hepcidin* 还是调节铁稳态的重要调控分子, 与膜铁转运蛋白 (ferroportin) 相互作用, 引起膜铁转运蛋白的内化和降解, 降低铁在血液循环中的含量, 与铁代谢紊乱性疾病如炎

症性贫血、遗传性血色素沉着病等密切相关^[5-6]。

目前, *Hepcidin* 基因已在人、鼠、马、牛以及杂交石斑鲈鱼 (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*)^[7]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)^[9-10]、真鲷 (*Pagrus major*)^[11]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[12]、斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*)、长鳍叉尾鲟 (*Ictalurus furcatus*)^[13-14]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[15]、河鲈 (*Perca fluviatilis*)^[16]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[17]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[18]、条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*)^[19]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[20] 等多种生物中得到了鉴定, 但迄今草鱼的 *hepcidin* 研究未见报道。草鱼是我国最大宗的重要经济养殖鱼类, 高密度养殖条件下由柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)、草鱼呼肠弧病毒 (grass carp reovirus) 引起的烂

收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-02-15

基金项目: 广西大学科研基金 (XBZ111496, XBZ111482); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (GXLFY-02); 科技部科技支撑计划项目 (2008BADB9B05)

作者简介: 韦友传 (1971—), 男, 博士, 研究方向为水产动物分子免疫学与病原学。E-mail: weiyc@gxu.edu.cn

通讯作者: 程光平, E-mail: cgp5@163.com

鳃病和出血病给养殖户造成巨大的经济损失^[21-22]。研究草鱼免疫的分子机制,将为病害防治提供新策略。本文克隆草鱼 *hepcidin* 基因全长 cDNA,运用生物信息学进行序列分析,应用 qPCR 研究其在健康组织中的表达情况,以及注射柱状杆菌后的表达变化,为草鱼 *hepcidin* 的开发应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 草鱼各组织样品的准备与 RNA 提取

健康草鱼(体重约 85~125 g)购自南宁市某网箱养殖场,实验前室内驯养两周,水温为(23±2)℃,每天投喂一次商品颗粒饲料并换水三分之二。两周后将鱼分为正常组、实验组和对照组。正常组随机抽取 5 尾草鱼,麻醉后分别取鳃、脑、头肾、心脏、中肾、脾脏、肝脏、肠、肌肉、皮肤和眼等组织,放入装有 TRIzol (Invitrogen, USA) 的 EP 管中,液氮冻存储备用。各组织总 RNA 的提取参照 TRIzol 试剂盒说明。实验组 35 尾,每尾腹腔注射 0.1 mL 5×10⁶ cfu/mL 柱状杆菌,分别于注射后 4、8、12、16、24 和 48 h 取鱼(每次 5 尾),采取肝脏、头肾和脾脏。对照组为 5 尾,每尾注射 0.1 mL PBS。组织采取与总 RNA 提取与正常组相同。

1.2 mRNA 中污染 DNA 处理和 RT-PCR

用 DNase I (MBI Fermentas, USA) 处理 RNA 后,使用逆转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, USA) 将 RNA 逆转录合成 cDNA,用于基因扩增和实时定量。根据 GenBank 数据库中鱼类 *hepcidin* 基因序列,设计简并引物,PCR 获取 *hepcidin* cDNA 部分序列。25 μL PCR 反应体系中 cDNA 模板 1 μL、引物 HepF 和 HepR(表 1)各 1 μL、H₂O 19 μL、dNTPs 0.25 μL、Taq 酶 0.25 μL 和 10×buffer 2.5 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 40 s,30 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 产物纯化后与 pMD-18T 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10,阳性克隆送武汉华大公司测序。

1.3 Hecpcidin cDNA 的 5'和 3'端的扩增

5'和 3' SMART cDNA 的合成参照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 说明书,根据所获得的 cDNA 部分序列,设计 5'和 3'

RACE 引物(表 1),利用所设计的引物与 UPM 扩增 *hepcidin* cDNA 的 5'和 3'端。RACE-PCR 反应条件为:94℃ 4 min;94℃ 30 s,70℃ 2.5 min,5 个循环;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 2.5 min 5 个循环;94℃ 30 s,66℃ 30 s,72℃ 2.5 min 25 个循环;72℃ 10 min。扩增产物纯化后与 pMD-18T 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10,阳性克隆送武汉华大公司测序。

表 1 本文所用引物的核苷酸序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers used in this paper

引物	序列	应用
HepF	KTTCAGCWYSAAGCGYCARAG	扩增中
HepR	TGCAGCAGWABCCRCAGCC	间片段
3'RACE1	CCATCTTCCCTGTGCAGGTAC	
3'RACE2	GTAAGTGCACATCAAATGCC	扩增
5'RACE1	CATCTGA	<i>hepcidin</i> cDNA 5'和 3'末端
5'RACE2	GATCAGAATTTACAGCAATATCCA	
UPM		
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCACTGGTATCAACGCAGAT	
Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
qHep-F	GGAGATTGAAACACCACAGC	
qHep-R	AGAAGTTACGACAGCAGTT GCAGCAGTA	实时定 量 PCR
qβ-actin-F	CCACCTTCAACTCCATCATGAAG	
qβ-actin-R	TTCTGCATCCTGTCAGCAATG	

注: R = A/G; S = C/G; Y = C/T。

1.4 序列分析

使用 NCBI 网站的 BLASTN 和 BLASTX 软件进行同源基因的搜索;使用 ExPASy 网站有关软件进行开放阅读框(open reading frame, ORF)的搜索、氨基酸序列的推断等。应用 SignalP 4.0、MEGA 5.0 和 DNASTAR 软件预测信号肽、构建系统进化树(Neighbor-joining tree)、推算蛋白分子量和分析同源性。

1.5 实时定量 PCR

根据草鱼 *β-actin* 和 *hepcidin* cDNA 序列设计 qPCR 引物,*β-actin* 的 qPCR 引物为 qβ-actin-F 和 qβ-actin-R,*hepcidin* 的为 qHep-F 和 qHep-R(表 1),分别进行 PCR 扩增。扩增片段克隆至 pMD-18T 载体(TaKaRa),测序确认插入片段正确性。qPCR 在 Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler 上进行。20 μL qPCR 反应体系包括:2 μL cDNA 模板;10 μL SYBR green Mix (Toyobo, Japan);引物各 0.3

μL;7.4 μL H₂O。引物序列见表 1。反应条件:95 °C 变性 3 min 后,94 °C 30 s,63 °C 20 s,72 °C 20 s,40 个循环,每次延伸后荧光读板;72 °C 延伸 3 min。最后进行溶解曲线分析,检测反应特异性。每个样品均设 3 个重复。以 β-actin 基因作为 qPCR 的内参。相对定量法参照 Pfaffl 法 [23-24]。

2 结果与分析

2.1 *Hepcidin* 基因的克隆与序列特征

以草鱼肝脏组织总 cDNA 为模板,通过简并引物进行巢式 PCR,获得 86 bp 扩增片段;通过 3' 和 5' RACE-PCR 扩增,分别获得长度为 438 bp 和 391 bp 扩增片段,序列拼接获得的 *hepcidin* 基因 cDNA 全长 774 bp (GenBank 登录号为 JQ246442),其 5' 和 3' 非翻译区长度分别为 117 bp 和 383 bp,在 3' 非翻译区发现一个 mRNA 不稳定信号 (ATTTA) 和一个多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA);其中开放阅读框 282 bp,推定编码 93 个氨基酸,预测分子量大小为 10.4 ku, pH 为 7.0 时理论等电点为 7.109;SignalP 4.0 软件预测存在的信号肽位于 1~24 位;在 N 端存在前肽转化酶 RX (K/R)R 基序 RTKR;预测成熟肽存在 8 个保守的半胱氨酸 (图 1)。

cggggggcagagaagaataaacctgaaaaagagcagcagcatatccctctag 60
ttcagagtgcatcaactcctcaagagaagaacaaccttcagcgttaacagaagagaagc 120
aaagtgccacacgctggctctgctgctgctcagctgctcctcgcgctcgtcgcctcctcag 180
K C A H V A L A A A V V L A C V C I L Q 21
accgcgacgcttcgcttccgacagcaggagcaggatgagcatcaaatggaagattgaaaca 240
T A A V P F V Q Q E Q D E H Q M E I E T 41
ccacagcagagaacgaacactcgacagagaacaacagagaacacagggacaaacaaatcccctg 300
P Q Q N E H S T E T T E T Q G Q T N P L 61
gcatttttcaggacaaaacgctcaaaacccatctttccctgtgagcaggtactgctgcaactgc 360
A F F R T K R Q S H L S L C R Y C C N C 81
tgtcgttaacaaagcgtggtgatattgtctgtaattctgtgacacatggcgatgtggtgc 420
C R N K G C G Y C C K F * 93
actgggaaaagagtttttgaacattactatttggaaattctgttttcaaaatccc 480
tgctgaaatgatttccctgtcgcaccatgttggtttaaaacgggtataaatgcaggctgt 540
gtctccatgcatatgctttgtaaaagtgcagctactttaaatttaacagacattatgagg 600
tgaactcacctacttttggtaactgtgttatgatgatttatataatttataacatggtggtat 660
atatatatattattcttctgtgacatagacatgttaaaccaatgattgttttagtataat 720
gaaaaaacatttttaataaaatgatttttaaacagaaaaaaacataaaa 774

图 1 草鱼 *hepcidin* 基因核苷酸及推定的氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of C. idellus hepcidin gene

草鱼 *hepcidin* 基因推定的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方,为大写字母。右边的数字为核苷酸或氨基酸的位置。起始密码子 (atg) 和前肽转化酶基序 (RTKR) 加框;终止密码子 (tga) 用星号表示;信号肽下划双线;8 个保守的半胱氨酸用粗体;mRNA 不稳定基序 (ATTTA) 和多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA) 下划线。

2.2 序列同源性与遗传分析

将草鱼及其它脊椎动物的 *hepcidin* 早期多肽、信号肽和前体肽序列分别进行同源性分析,显示草鱼 *hepcidin* 早期多肽、信号肽和前体肽序列与其它鱼类的对应序列同一性分别为 27.9% ~ 51.6%、39.1% ~ 54.2% 和 10.5% ~ 58.8%;与哺乳类的同一性分别为 15.5% ~ 29.4%、13.0% ~ 18.2% 和 25.0% ~ 33.9%,与爪蟾相比为 29.6%、18.2% 和 39.0% (表 2)。应用 MEGA 5.0 软件对草鱼和 35 种其它脊椎动物的 *hepcidin* 前体肽氨基酸序列按邻接法构建系统发育树,结果显示所有鱼类的 *hepcidin* 聚为一枝,支持率为 98%,草鱼、斑点叉尾鮰、黄颡鱼聚类在其中的一个分枝上 (图 2)。

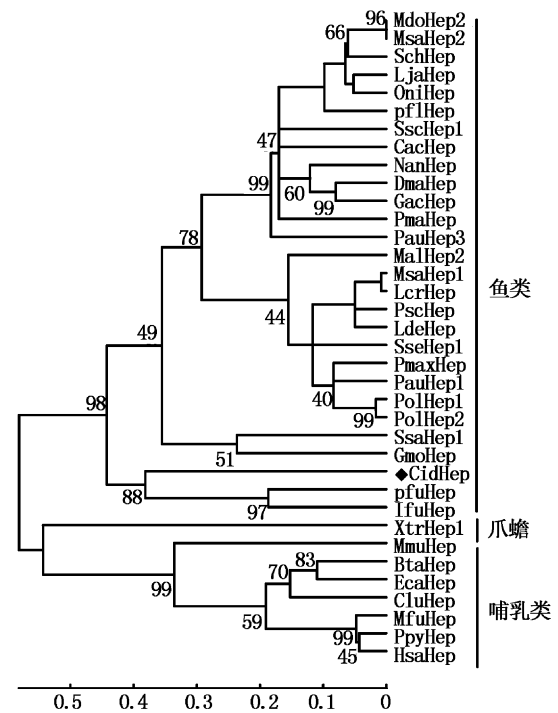


图 2 *Hepcidin* 前体肽系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on putative prohepcidin amino acid sequences

发育树上的 Bootstrap 值为 1 000 重复计算所得,草鱼 *hepcidin* 前体肽用实心的方形号 (◆) 表示。各序列 GenBank 登录号见表 2。

2.3 *Hepcidin* 在正常组织中的表达

对草鱼 *hepcidin* 在各个组织中的相对转录水平作柱状图,其中在脑组织中的转录水平最低,设定为 1 (图 3)。图 3 显示 *hepcidin* 在所检测的草鱼肠、肝脏、肌肉、脑、皮肤、脾脏、鳃、头肾、心

脏、眼和中肾组织中均有表达,其中肝脏中表达水平最高,其次为脾脏、头肾和眼,脑最低。

表 2 草鱼 *hepcidin* 基因推定的氨基酸序列与其它序列的同源性比较
Tab. 2 The sequence identity of inferred *C. idellus hepcidin* amino acid sequence in comparison with their respective counterparts

序列名称	物种	蛋白	登录号	同一性/%		
				早期多肽 PP	信号肽 SP	前体肽 PH
MfuHep	猴 (<i>Macaca fuscata</i>)	Hepcidin	ABU75217	15.5	13.0	25.0
BtaHep	牛 (<i>Bos Taurus</i>)	Hepcidin	NP_001107980	25.6	13.0	28.8
CluHep	狗 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Hepcidin	AAW82336	29.4	14.3	26.2
HsaHep	人 (<i>Homo sapiens</i>)	Hepcidin	NP_066998	16.7	17.4	26.7
PpyHep	猩猩 (<i>Pongo pygmaeus</i>)	Hepcidin	ABU75212	16.7	17.4	26.7
EcaHep	马 (<i>Equus caballus</i>)	Hepcidin	NP_001161799	22.1	18.2	25.4
MmuHep	家鼠 (<i>Mus musculus</i>)	Hepcidin	NP_115930	28.9	18.2	33.9
XtrHep1	爪蟾 (<i>Xenopus tropicalis</i>)	Hepcidin1	NP_001090729	29.6	18.2	39.0
PfuHep	黄颡鱼 (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	Hepcidin	ABX46065	49.5	39.1	58.8
GmoHep	鳕 (<i>Gadus morhua</i>)	Hepcidin	ACA42769	44.1	40.9	31.7
PoliHep1	牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Hepcidin1	AAT01563	39.3	41.7	27.1
MalHep2	黄鳢 (<i>Monopterus albus</i>)	Hepcidin2	ACU26539	40.0	41.7	26.2
GacHep	南极龙鱼 (<i>Gymnodraco acuticeps</i>)	Hepcidin	ABY84834	27.9	45.8	10.5
MsaHep2	加州鲈 (<i>Micropterus salmoides</i>)	Hepcidin2	ACD13024	31.4	45.8	20.0
SseHep1	塞内加尔鳎 (<i>Solea senegalensis</i>)	Hepcidin1	BAG69595	33.3	45.8	21.3
PauHep3	三长棘赤鲷 (<i>Pagrus auriga</i>)	Hepcidin3	BAH03287	34.1	45.8	23.7
PflHep	河鲈 (<i>Perca fluviatilis</i>)	Hepcidin	ABR04075	37.2	45.8	20.0
PolHep2	牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Hepcidin2	BAE06235	38.2	45.8	27.1
PauHep1	三长棘赤鲷 (<i>Pagrus auriga</i>)	Hepcidin1	BAH03285	44.4	45.8	29.5
PscHep	须鲈 (<i>Pogonophryne scotti</i>)	Hepcidin	ABY84821	44.4	45.8	27.9
LerHep	大黄鱼 (<i>Larimichthys crocea</i>)	Hepcidin	ABC18307	45.6	45.8	27.9
LdeHep	断线真狼绵鳎 (<i>Lycodichthys dearborni</i>)	Hepcidin	ABY84842	46.1	45.8	31.1
MsaHep1	加州鲈 (<i>Micropterus salmoides</i>)	Hepcidin1	ACD13023	46.7	45.8	29.5
PmaHep	真鲷 (<i>Pagrus major</i>)	Hepcidin	AAS79104	47.8	45.8	19.7
DmaHep	南极牙鱼 (<i>Dissostichus mawsoni</i>)	Hepcidin	ABY84833	31.4	50.0	15.8
CacHep	冰鱼 (<i>Chaenocephalus aceratus</i>)	Hepcidin	ABY84828	31.8	50.0	20.0
MdoHep2	小口黑鲈 (<i>Micropterus dolomieu</i>)	Hepcidin2	ACD13026	32.6	50.0	20.0
LjaHep	花鲈 (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	Hepcidin	AAT09138	33.7	50.0	18.3
OniHep	吉富罗非鱼 (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Hepcidin	ABD46831	35.6	50.0	21.3
NanHep	南极鱼 (<i>Notothenia angustata</i>)	Hepcidin	ABY84831	37.9	50.0	20.3
PmaxHep	大菱鲆 (<i>Psetta maxima</i>)	Hepcidin	AAX92670	47.8	50.0	29.5
IfuHep	斑点叉尾鲷 (<i>Ictalurus furcatus</i>)	Hepcidin	AAX39714	51.6	52.6	48.5
SchHep	鳊鱼 (<i>SiniSiniperca chuatsi</i>)	Hepcidin	ACO88905	33.7	54.2	20.0
SscHep1	许氏平鲈 (<i>Sebastes schlegelii</i>)	Hepcidin1	ACD80120	35.2	54.2	21.7
SsaHep1	大西洋鲑鱼 (<i>Salmo salar</i>)	Hepcidin1	NP_00113432	151.1	54.2	37.7

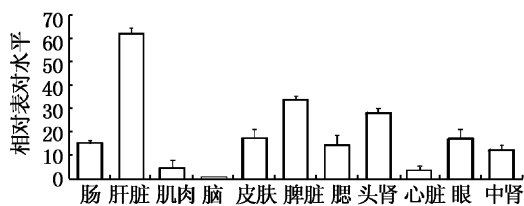


图 3 草鱼 *hepcidin* 在不同组织中的表达
Fig. 3 The expression of *C. idellus hepcidin* in different tissues

2.4 注射细菌后 *hepcidin* 在肝脏、脾脏和头肾中的表达变化

应用 qPCR 检测实验组和对照组草鱼肝脏、脾脏和头肾组织 *hepcidin* 基因的表达,将对对照组设定为 1,肝脏、脾脏和头肾组织 *hepcidin* 基因的表达相对于对照组 (注射 PBS 后 4 h) 显著上调 ($P < 0.01$)。注射 16 h 后脾脏和头肾 *hepcidin* 基因表达达到最高水平,分别上调 15.33 倍和 13.33 倍。注射后 24 h 肝脏 *hepcidin* 转录达最高水平

(上升 9.18 倍) (图 4)。

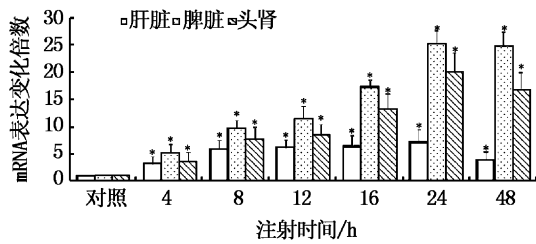


图 4 柱状黄杆菌注射后草鱼肝脏、脾脏和头肾 *hepcidin* 基因的表达变化

Fig. 4 Expression changes of *hepcidin* mRNA in liver, head kidney and head kidney of *C. idellus* post *F. columnare* infection

*表示与对照组表达水平比较,差异显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

Hepcidin 是最早在人的血液和尿液中发现的一类抗菌肽,具有广谱杀菌抑菌作用和铁代谢调节功能。本文应用 RT-PCR 和 RACE 技术测得草鱼 *hepcidin* 基因全长 cDNA 为 774 bp,开放阅读框为 282 bp,编码有 93 个氨基酸,相对分子质量为 10.4 ku。草鱼信号肽与其他哺乳动物及爪蟾的同一性 (13% ~ 18.2%) 远低于与其他鱼类的同一性 (39.1% ~ 54.2%),为此将信号切除后,分析 *hepcidin* 前体肽的同源性,结果显示草鱼 *hepcidin* 前体肽与黄颡鱼和斑点叉尾鲷的同一性最高,分别达 58.8% 和 48.5%。系统进化显示草鱼与黄颡鱼、斑点叉尾鲷在同一分支上,反映草鱼与黄颡鱼、斑点叉尾鲷亲缘关系最近,这与它们的系统进化地位相适应。

正常组织表达结果显示,草鱼 *hepcidin* 主要在肝脏组织中表达水平最高,这与其他鱼类和哺乳动物的研究结果相类似^[4, 7, 25];另外,草鱼 *hepcidin* 在脾脏和头肾等组织中表达水平较高,这在其他鱼类和哺乳动物也有报道,可能在动物抗外界病原感染过程中起重要作用^[17];在眼中表达较高,这可能与眼部很少感染病菌有关。

Hepcidin 合成时产生早期多肽,经过前肽转化酶在 N 端的 RX (K/R) R 基序处剪接生成 *hepcidin* 成熟肽。哺乳动物 *hepcidin* 成熟肽中含有 8 个保守的半胱氨酸,这在鱼类中也很保守^[26-27]。这 8 个保守的半胱氨酸残基形成 4 个链内二硫键后形成 β 折叠片和发夹结构,这种结构与杀菌效果有关^[28-30]。本文草鱼 *hepcidin* 氨

基酸序列中 N 端存在 RTKR 基序,为典型的 RX (K/R)R 基序,在成熟肽中也存在 8 个半胱氨酸,表明草鱼 *hepcidin* 具有与其他鱼类和哺乳动物 *hepcidin* 的类似功能。

应用柱状黄杆菌感染草鱼后,qRT-PCR 检测表明肝脏、脾脏和头肾组织的 *hepcidin* mRNA 表达均显著上调,注射 16 h 后脾脏和头肾达到峰值,24 h 后肝脏达到峰值,这与前人的研究结果不尽相同。SOLSTAD 等应用福尔马林灭活鳃利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 免疫大西洋鲑鱼 (*Gadus morhua* L.) 后肝脏和头肾 *hepcidin* 表达量均上升,24 h 后头肾达最高,48 h 后肝脏达最高,为对照组的 4.5 倍^[31];而鳃利斯顿氏菌感染香鱼 12 h 后,肝脏 *hepcidin* mRNA 就上升了 8.12 倍 (峰值)。BAO 等^[13] 应用爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 注射斑点叉尾鲷显著诱导 *hepcidin* 在脾脏和头肾中的表达,但肝脏没有上调,而 HU 等应用爱德华氏菌感染斑点叉尾鲷 48 h 后,肝脏 *hepcidin* mRNA 的表达量上调 22 倍^[32]。这种表达差异可能容易受到感染细菌种类、致病机制、鱼的种类、体质、年龄和养殖条件等因素影响。本文为研究草鱼 *hepcidin* 的铁代谢机制、抗菌活性和草鱼病害防治奠定基础。

感谢中国科学院水生生物研究所鱼类免疫与寄生虫学学科组聂品研究员为序列克隆给予的支持;感谢高谦副研究员在论文撰写方面提出的建议。

参考文献:

- [1] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-395.
- [2] HANCOCK R E, SCOTT M G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2000, 97(16): 8856-8861.
- [3] NOGA E J, ULLAL A J, CORRALES J, et al. Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: exploitation of downregulation and upregulation responses [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(1): 44-54.
- [4] BADIALL P R, OLIVEIRA FILHO J P, CUNHA P H, et al. Identification, characterization and expression analysis of *hepcidin* gene in sheep [J]. *Research in Veterinary Science*, 2011, 90(3): 443-450.
- [5] BEUTLER E. Iron storage disease: facts, fiction and progress [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2007, 39(2): 140-147.
- [6] VALORE E V, GANZ T. Posttranslational processing of

- hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2008, 40(1): 132–138.
- [7] SHIKE H, LAUTH X, WESTERMAN M E, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(8): 2232–2237.
- [8] ZHANG Y A, ZOU J, CHANG C I, et al. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (Leap-2) genes in rainbow trout [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 101(3/4): 259–269.
- [9] 王克坚, 周红玲, 杨明. 海水养殖鲈鱼分离出一种 hepcidin 抗菌肽新基因 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2004, 43(3): 237.
- [10] REN H L, WANG K J, ZHOU H L, et al. Cloning and organisation analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 21(3): 221–227.
- [11] 杨明, 王克坚, 曲海东, 等. 真鲷组织 cDNA 文库的构建与 hepcidin 抗菌肽基因序列的扩增 [J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 627–632.
- [12] HIRONO I, HWANG J Y, ONO Y, et al. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *FEBS Journal*, 2005, 272(20): 5257–5264.
- [13] BAO B, PEATMAN E, LI P, et al. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29(11): 939–950.
- [14] BAO B, PEATMAN E, XU P, et al. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (Leap-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated [J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(4): 367–377.
- [15] ZHENG W, LIU G, AO J, et al. Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with Poly I:C [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 21(4): 414–430.
- [16] ROSSI F, CHINI V, CATTANEO A G, et al. Est-based identification of genes expressed in perch (*Perca fluviatilis*, L.) [J]. *Gene Expression*, 2007, 14(2): 117–127.
- [17] CHEN S L, LI W, MENG L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 172–181.
- [18] YANG M, WANG K J, CHEN J H, et al. Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(5): 1060–1071.
- [19] CHO Y S, LEE S Y, KIM K H, et al. Gene structure and differential modulation of multiple rockbream (*Oplegnathus fasciatus*) hepcidin isoforms resulting from different biological stimulations [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(1): 46–58.
- [20] 陈大玮, 邓利, 刘志刚, 等. 斜带石斑鱼抗菌肽 hepcidin 基因克隆及其成熟肽的原核融合表达 [J]. *南方水产科学*, 2011, 7(1): 1–7.
- [21] 刘毅, 隗黎丽, 李莉, 等. 福尔马林灭活柱状杆菌对草鱼免疫相关基因表达的影响 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32(6): 794–801.
- [22] 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析 [J]. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 790–795.
- [23] WEI Y C, PAN T S, CHANG M X, et al. Cloning and expression of toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 141(3/4): 173–182.
- [24] 韦友传, 高谦, 昌明先, 等. 斜带石斑鱼 myd88 基因的克隆与表达 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(3): 288–295.
- [25] LAUTH X, BABON J J, STANNARD J A, et al. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(10): 9272–9282.
- [26] HILTON K B, LAMBERT L A. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates [J]. *Gene*, 2008, 415(1/2): 40–48.
- [27] WANG K J, CAI J J, CAI L, et al. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide [J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 638–646.
- [28] FRY M M, LIGGETT J L, BAEK S J. Molecular cloning and expression of canine hepcidin [J]. *Veterinary Clinical Pathology*, 2004, 33(4): 223–227.
- [29] HUNTER H N, FULTON D B, GANZ T, et al. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(40): 37597–37603.
- [30] KLUVER E, SCHULZ-MARONDE S, SCHEID S, et al. Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(28): 9804–9816.
- [31] SOLSTAD T, LARSEN A N, SEPPOLA M, et al. Identification, cloning and expression analysis of a hepcidin cDNA of the atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 298–310.
- [32] HU X, CAMUS A C, AONO S, et al. Channel catfish hepcidin expression in infection and anemia [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2007, 30(1): 55–69.

Cloning, sequence analysis and expression of hepcidin in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*

WEI You-chuan, HUAN Rong-jun, LU Zhuan-ling, CHEN Dai-jian, JI Yong-jie, CHENG Guang-ping
(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: The full cDNA sequence of hepcidin in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* has been isolated by using RT-PCR and RACE method. The hepcidin consists of 774 bp, including an 282 bp open reading frame (ORF), a 117 bp 5' UTR and a 383 bp 3' UTR. The 3' UTR contains a polyadenylation-tailed signal (AATAAA) and 1 mRNA instable motifs (ATTTA). The deduced hepcidin protein comprised 93 amino acid residues with a signal peptide predicted by using SignalP 4.0 program. Putative amino acid sequence of hepcidin shared 27.9% - 51.6% identity with its counterparts from other fish species. Phylogenetic tree constructed by using neighbor-joining method revealed that prohepcidin was clustered with that from other teleost fish reported previously. The transcription of hepcidin was examined by quantitative real-time PCR, and its mRNA was mainly expressed in liver, spleen and head kidney, and increased significantly in liver, spleen and head kidney between 4 h and 48 h after injection with *Flavobacterium columnare*.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; hepcidin; expression; immunoresponse