

日本鳗鲡抗菌蛋白 *BPI* 基因的克隆、鉴定与表达

王 佩¹, 段明珠¹, 黄 贝¹, 熊 静¹, 梁 英¹, 黄文树^{1,2,3}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;
3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361005)

[摘要] 为探究鱼类抗菌肽—杀菌/通透性增强蛋白(bactericidal/permeability increasing protein, BPI)的功能, 从日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)中克隆和鉴定了两个 *BPI* 基因, 命名为 *AJBPI-1* 和 *AJBPI-2*。这两个抗菌肽均具有 BPI 超家族特征性的 LPS 结合结构域和脯氨酸富集区, 其中 *AJBPI-1* 和 *AJBPI-2* 的 N-端碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)的数量分别为 12 和 35, 表明前者对 LPS 的结合力较后者弱。Real-time PCR 检测结果显示, *AJBPI-1* 在正常养殖鳗鲡的肝脏中转录表达量最高, 其次是头肾, 而 *AJBPI-2* 则在中肾和头肾中转录表达量最高, 其次是血液。Poly I: C 和 *E. tarda* 诱导后, 鳗鲡脾脏中 *AJBPI-1* 和 *AJBPI-2* 的表达量均显著上调($P < 0.05$), *AJBPI-1* 约为 PBS 对照组的 4.0 倍和 3.3 倍, *AJBPI-2* 为 PBS 对照组的 2.3 倍和 1.7 倍; 经 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 刺激后, 鳗中 *AJBPI-2* 表达量显著上调($P < 0.05$), 上调幅度最高可达到 PBS 组的 2.5 倍、17.0 倍和 7.0 倍; 而中肾只在 LPS 和 Poly I: C 刺激时, *AJBPI-1* 和 *AJBPI-2* 的表达量显著上调($P < 0.05$), *AJBPI-1* 约为 PBS 对照组的 3.0 倍和 2.2 倍, *AJBPI-2* 为 PBS 对照组的 2.0 倍和 2.2 倍。

[关键词] 日本鳗鲡; 抗菌肽; BPI 基因; 迟缓爱德华氏菌

[中图分类号] Q 344+.1

Molecular Cloning and Expression Analysis of Two Genes Encoding Bactericidal/Permeability-Increasing Protein in Japanese Eel, *Anguilla japonica*

WANG Pei¹, DUAN Mingzhu¹, HUANG Bei¹, XIONG Jing¹, LIANG Ying¹, HUANG Wenshu^{1,2,3}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. Fujian Collaborative Innovation Center for Development and Utilization of Marine Resources, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to clarify the biological function of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) counterpart in teleost, two *BPI* genes named *AJBPI-1* and *AJBPI-2* have been cloned and characterized from the Japanese eel (*Anguilla japonica*) in this study. Both of the predicted peptides shared LPS binding domain and Pro-rich domain, and contained N-basic amino acids (arginine and lysine) which the numbers were 12 and 35, respectively, indicating the weaker binding capability of *AJBPI-1* to LPS. Subsequently, their tissue specific expression was also tested by real-time PCR. Results showed that the highest expression of *AJBPI-1* was liver, followed by the head kidney. However, the highest expression of *AJBPI-2* was middle and head kid-

[收稿日期] 2018-05-08

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2018J01452); 鳗鲡工程中心科研基金资助项目(RE201809); 福建省教育厅项目(JA170301)

[作者简介] 王佩(1991—), 女, 硕士生, 主要研究方向为鱼类免疫学。通信作者: 黄文树(1973—), 教授, 博士。E-mail: wshuang@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

neys, followed by the blood. Moreover, their expressions changed in multiple tissues post different stimuli challenge were analyzed. When Poly I: C and *E. tarda* were used for stimulating individually, the expression levels of *AJBPI-1* and *AJBPI-2* in spleen were significantly up-regulated ($P < 0.05$), which were approximately 4.0/3.3 folds and 2.3/1.7 folds than those stimulated by PBS, respectively. Only when it was stimulated by LPS, Poly I: C and *E. tarda*, the expression levels of *AJBPI-2* in gill were significantly up-regulated ($P < 0.05$), which were about 2.5 folds, 17.0 folds and 7.0 folds, respectively. While the expression levels of *AJBPI-1* and *AJBPI-2* in middle kidney were significantly up-regulated after stimulation with LPS and Poly I: C ($P < 0.05$), which were about 3.0/2.2 and 2.0/2.2 folds than those stimulated by PBS, respectively. The results will provide some data for the classification and functional analysis of *BPI/LBP* genes in fish.

Keywords: *Anguilla japonica*; antimicrobial peptides; bactericidal/permeability increasing protein gene; *Edwardsiella tarda*

0 引言

抗菌肽 (antimicrobial peptides) 又称宿主防御肽, 是生物体天然免疫系统的重要成分, 广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中, 是一类广谱抗微生物活性的多肽^[1-3]。杀菌/渗透性增强蛋白 (Bactericidal/permeability increasing protein, BPI) 是一类重要的抗菌肽, 是 Weiss 等^[4]1975 年从兔子中性粒细胞中首次分离出来的, 是一种可迅速杀死大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的多肽。1977 年, Weiss 等^[5]从人类的中性粒细胞中也分离得到了该抗菌肽, 其 Isoelectric Point (pI) 值为 9.8, 分子质量为 58 ~ 60 ku, 当 pH 值达到 7.0 时, 其杀菌和增强渗透性活性均最大, 可杀死革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌和沙门氏菌 (*Salmonella* spp.), 因此, 命名为杀菌/渗透性增强蛋白。哺乳动物 BPI 是一类胞外蛋白质^[6], 其 N 端富含精氨酸和赖氨酸, 以及两个位置保守的半胱氨酸。精氨酸和赖氨酸均为阳离子氨基酸, 可与含有带负电荷的 LPS 结合, 从而杀菌, 或结合/中和内毒素^[7]。其 C 端和 N 端中间有脯氨酸富集中心连接, 该区域可促进 BPI 分子与 LPS 结合, 并介导 BPI-LPS 复合物向特定宿主细胞转运^[8-9]。BPI 被学者称为未来的“超级抗生素”^[10]。

除 BPI 外, 哺乳动物的脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 也可识别 LPS, 二者均属于脂质转移和脂多糖结合蛋白家族成员^[11]。人类的 LBP 和 BPI 序列相似性高达 45%, 其晶体结构相似^[12-13]。LBP 是一种胞浆蛋白质, 与细菌脂多糖特别是类脂 A 高度亲和^[14]。在 LPS 刺激的炎症反应中 LBP 表达量增多, 且可调节 LPS 颗粒使其与吞噬细胞表面的 CD14 结合^[14]。

在哺乳动物中 BPI 和 LBP 的基因序列和功能明显不同, 但是, 在硬骨鱼类中目前尚无法明确区分 BPI 和 LBP^[15-16], 因此, 常以 BPI/LBP 表示。迄今为止, 已在多种硬骨鱼中克隆和鉴定了 BPI/LBP 基因, 如虹鳟 (*Onchorhynchus mykiss*)^[17]、锦鲤 (*Cyprinus carpio*)^[18]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[19]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[20]、香鱼 (*Plecoglossus altivelis altivelis*)^[15]、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)^[21]、条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*)^[22]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[16] 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[23] 等。与哺乳动物 BPI 基因主要在中性粒细胞和各种黏膜上皮细胞中表达不同, 鱼类 BPI/LBP 基因的组织表达模式较多样。如鲤科鱼类: 草鱼 BPI 在鳃中表达量最高, 其次是头肾和中肾^[16]; 锦鲤 BPI 基因在肝脏和脾脏中表达量最高^[18]; 团头鲂 BPI/LBP 基因在肾脏中表达量最高^[23]。又如石鲷科鱼类: 条石鲷 BPI-1 在脾脏和肝脏中表达量最高, BPI-2 在肾脏中表达量最高^[22]。此外, 外源刺激物刺激后, 鱼类 BPI 转录表达变化规律也不同。如受 LPS 刺激 3 h 后, 锦鲤肝脏和头肾中的 BPI 均微弱上调^[18], 而受 LPS 刺激 2 h 后, 团头鲂脾脏中 BPI/LBP 上调达到最高值^[23]。

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 是我国重要的养殖鱼类^[24]。然而, 细菌性疾病一直困扰着鳗鲡养殖业发展。迄今为止, 关于鳗鲡的抗细菌免疫应答的研究较为缺乏。BPI 是重要的抗细菌免疫因子, 是鱼类天然免疫系统的重要组成部分, 目前未见鳗鲡属 BPI 的相关研究。基于此, 本研究运用

SMARTer™ RACE 技术,从日本鳎中克隆、鉴定 *BPI* 基因序列,并进一步利用 Real-time PCR 技术,研究在正常养殖和人工免疫物刺激下, *BPI* 基因在日本鳎体内表达量变化的规律,以期阐明鳎 *BPI/LBP* 基因的分类、命名及其结构功能等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

日本鳎(203 ± 53)g,购于福建省集美大学水产养殖基地。于水温(28 ± 2)℃暂养1周后,采集日本鳎血液、鳃、心脏、肝脏、胃、肠、脾脏、头肾、中肾、鳔、性腺和皮肤等组织/器官用于试验。

免疫刺激试验:腹腔注射,设 PBS 对照组、LPS 刺激组(0.01 mg/g, Sigma)、Poly I: C 刺激组(0.01 mg/g, Sigma)、迟缓爱德华氏菌刺激组(2×10^5 cfu/g),在注射后 8 h、16 h、24 h 和 72 h 采样。每组每个时间点随机取鳎 8 尾。

1.2 *BPI* 基因 cDNA 序列的克隆

将约 100 mg 日本鳎肝脏组织用 Trizol® Rreagent 试剂盒提取其总 RNA,具体操作参考相关研究^[25]。用琼脂糖凝胶电泳法和分光光度法(NanoDrop2000,美国 Thermo)检测所提取总 RNA 的完整性和纯度,即 RNA 的 28 S 和 18 S 条带清晰且 D_{260}/D_{280} 为 1.8 ~ 2.0 时,方可用于下一步实验。随后,总 RNA 经 RNase-free DNase I(New England Biolabs Inc, 美国)处理,反转录(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, 美国)获得第一链模板。

通过分析已制备的日本鳎肝脏和肾脏 cDNA 文库,获得 *BPI* 基因的 EST 序列,设计引物(见表 1),进行巢式 PCR 扩增,获得 *BPI* 基因的 5'和 3'末端 cDNA 序列,进一步设计引物,再经 PCR 扩增,验证其全长 cDNA 序列。

1.3 *BPI* 基因组序列的扩增

取日本鳎的肌肉,参照 MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 4.0 试剂盒(TaKaRa, 日本)说明书,提取日本鳎基因组 DNA。根据已经获得的基因全长 cDNA 序列设计特异性引物(见表 1),扩增 *BPI* 的基因组 DNA。

1.4 Real-time PCR

取 4 μg 健康日本鳎组织的总 RNA,经 DNA 酶处理及反转录(GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, 美国)用以制备 Real-time PCR 模板,用 RNAase free water 稀释一定倍数后保存、备用。

以 β -actin 为内参基因,在 LightCycler 480 II 实时定量 PCR 仪上进行实时检测与分析。qPCR 反应体系如下:2 × LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix 10.0 μL,稀释后的 cDNA 模板 4.0 μL,正、反向引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL,PCR-Grade water 5.0 μL。反应条件:95℃变性 20 s,58℃退火 20 s,72℃延伸 25 s,40 个循环。荧光信号采集温度为 81℃。反应结束后分析产物的溶解曲线,判断其特异性。以 β -actin 作为内参基因,梯度稀释已知拷贝数的 *AJBPI* 和 β -actin 质粒样品及组织/器官样品分别进行 PCR 扩增,绘制标准曲线进而计算各基因的扩增效率。

1.5 生物信息学分析

利用 NCBI 网站中的 Blast 进行序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);通过 ExPASy 的翻译工具获得 *BPI* 的氨基酸序列(<http://web.expasy.org/translate/>),再用 ExPASy 预测 *BPI* 氨基酸的分子量和 pI 值(http://web.expasy.org/compute_pi/);用 SignalP 4.1 Server 程序分析信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);用 Pfam 程序分析 *BPI* 的结构域(<http://pfam.xfam.org/>);利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列的多重比对;应用 MEAG5.0 软件,采用邻位相接法(NJ 法)构建系统发育树。

1.6 数据统计分析

用 Excel 和 Spss18.0 软件进行数据计算,用单因素变量方差分析法(ANOVA)分析 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 刺激后样品间的表达量差异,利用 Dunnett - Test (2-sided) 进行多重比对。所有数据

均用平均值 ± 标准误差（SEM）的方式表示， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异极显著。利用 GraphPad. Prism. v5.0 软件进行作图。

表 1 引物序列
Tab.1 List of primer sequences

引物名称 Names of primer	序列(5′-3′) Primer Sequences	退火温度 Annealing temperature/℃	用途 Applicant
AJBPI-1F1	AAGCTGAAGCACGGCCTTCCTATCC	60	第一轮 5′RACE 5′RACE 1 st round PCR
AJBPI-1R1	CGTCTTTAATGGCAGGGATAGGAAGGC		第一轮 3′RACE 3′RACE 1 st round PCR
AJBPI-1F2	ACAACGATGGCATTGCCTTGGCTCAA	58	第二轮 5′RACE 5′RACE 2 nd round PCR
AJBPI-1R2	CAGAGCTGTCCTTCCTCCAGTGATGAGA		第二轮 3′RACE 3′RACE 2 nd round PCR
AJBPI-2F1	AGGACTGAGCATCACCTCTCGCATCAC	60	第一轮 5′RACE 5′RACE 1 st round PCR
AJBPI-2R1	TTTCCGCTCCCGCATTGCCAAGG		第一轮 3′RACE 3′RACE 1 st round PCR
AJBPI-2F2	TGCTGAGTTGACGGTGAAGGAGGACA	58	第二轮 5′RACE 5′RACE 2 nd round PCR
AJBPI-2R2	CCCCCGGTGGAAGTTGACTTTGAC		第二轮 3′RACE 3′RACE 2 nd round PCR
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG - TGGTATCAACGCAGAGT	60	第一轮 RACE RACE 1 st round PCR
NUPM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	60	第二轮 RACE RACE 2 nd round PCR
AJBPI-1F	ATGAGTGGGGATGTCAGTCTC	56	序列验证 Sequence confirmation
AJBPI-1R	TCAGAGCTGTCCTTCCTCCAG		序列验证 Sequence confirmation
AJBPI-2F	ATGTTGACCGCGTGGTGTGT	54	序列验证 Sequence confirmation
AJBPI-2R	GGTGACATCCCTTGATGCTCA		序列验证 Sequence confirmation
qAJBPI-1F	<u>CCGATAAAATG</u> <u>ATTCCCCAC</u>	58	荧光定量 PCR Real-time PCR
qAJBPI-1R	<u>CAGAGGCAGGCT</u> <u>CGAAAAAG</u>		荧光定量 PCR Real-time PCR
qAJBPI-2F	<u>CACTGAATG</u> <u>TGCTTGCCC</u>	58	荧光定量 PCR Real-time PCR
qAJBPI-2R	<u>CTTGCCAAT</u> <u>CTCGGGGATG</u>		荧光定量 PCR Real-time PCR
AJ-actinF	TCACCACCACAGCCGAAAGG	62	荧光定量 PCR Real-time PCR
AJ-actinR	<u>CGCAGGATTCCATT</u> <u>CCAGGA</u>		荧光定量 PCR Real-time PCR
M13F	CGCCAGGGTTTCCCACTCAGCAC	62	测序 Sequencing
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA		测序 Sequencing

说明：直下划线部分位于前一个外显子，加粗波浪线的部分位于后一个外显子
Notes: Nucleotides sequence underlined is located in the former exon, that with wavy line is located in the latter exon

2 结果

2.1 日本鳎 AJBPI 基因序列分析

从日本鳎的肝脏和肾脏 cDNA 文库中筛选到两条 BPI 的 EST 序列，通过 RACE、PCR 克隆和序列拼接，获得日本鳎两条 BPI 的 cDNA 序列，分别命名为 AJBPI-1 和 AJBPI-2。AJBPI-1 cDNA 全长 1617 bp，包括 5′UTR 207 bp，开放阅读框（ORF）1278 bp（编码 425 个氨基酸残基），3′UTR 132 bp（见图 1），预测其前体肽分子质量为 46.26 ku，pI 值为 8.58。AJBPI-2 cDNA 全长 1911 bp，包括 5′UTR 93 bp，开放阅读框（ORF）1422 bp（编码 473 个氨基酸残基），3′UTR 396 bp（见图 2），预测其前体肽分子质量为 51.74 ku，pI 值为 10.11。通过 Phyre2 对抗菌肽 AJBPI-1 和 AJBPI-2 二级结构预测，结果表明二者主要由 β-折叠构成，其含量分别高达 53% 和 48%，该结构有利于 AJBPI 抗菌肽构象的稳定；其次为 α-螺旋，其含量分别为 21% 和 26%。通过 SWISS-MODEL 预测，发现抗菌肽 AJBPI-1 和 AJBPI-2 的三级结构相似，即它们均有“桶状结构单元”，该桶状结构单元由 N-和 C-末端氨基酸残基中心的 β-折叠连接（见图 3）。

通过对两种 AJBPI 的 N 端氨基酸残基分析可知，AJBPI-1 含精氨酸和赖氨酸数量分别为 4 和 8，少于 AJBPI-2（12 和 35）（见图 1、2 和表 2）。

ACCCAGCAAGACAAC TCTAAGACGGTGTTG CTGCCGGCAGCCTGT TAAGATGTGCCGGTC
CCTGCTGCTCCTCCT CTCCCTGGCCGTTTG CGCCATGGCAGGCAA CCCC GCCATAAAGGC
TGTCCTCACGGACAA GGGACTTAAGTTCGG CACGAAGGTGGGACA GAGTGGCTCCAGGCC
CAGATTCTGCAAGCT CAAATCCCAGACATG AGTGGGGATGTCAGT CTCAGCATACTGGGC
TCCGTGCATTACACT CTGAGCAGGATGGGC GTGGCTAGGTTGAAC ATGCCCCCTCCCCTCC
S V H Y T L S (R) M G V A (R) L N M P L P S
GTGGTGTCTCTGAG GGGACGGGGGTGCAG GTGGACCTGACCGGC TTCAACATGGCAGTG
V V F S E G T G V Q V D L T G F N M A V
AAGGGCAGTGGAAC ACACGCTACTTATTT ATACGGGACGGAGGC ACCTTTCGGCTGGGT
(K) G Q W N T (R) Y L F I (R) D G G T F (R) L G
ATGTTCAACGTGGGC GTGTCCCTGCAGCTC CAGGTGGGCAGCGAT GAGAATGGCCACCTG
M F N V G V S L Q L Q V G S D E N G H L
TCTGTCTCTAGCGTC CAGTGCAAGTCCAGC ATCGGCGCAATGGAT ATCCTCTTCCATGGA
S V S S V Q C (K) S S I G A M D I L F H G
GGAGCCAGCTGGGTC CTCCAACAATTTGTG ACGCAGTTCAAACGT CAAATACAGTCCCAG
G A S W V L Q Q F V T Q F (K) (R) Q I Q S Q
GTTCAGGAGAAGGTC TGTCCGACGTTTGAG CGTGGAATCCAGCGC CTGGAGAGCCATCTA
V Q E (K) V C P T F E (R) G I Q (R) L E S H L
GCGGCCATGAATGTG TCCATCCCCTGTGAC CGCGTGCTGCTGTTA GACATGCCACTCACG
A A M N V S I P L Y R V L L L D M P L T
AGCTCTCTGCTATA CAGGCTTCGACCTC AGTCTGGATTTCAG GCGGAGTTCTACAGT
S S P A I Q A S D L S L D F K G E F Y S
GCCAGTGTCCCAAG GAACCGCGTGGTGTG TCCGAGAAGTTCAG CTGCCCCCGCAGGAG
A Q C P K E P P F V S E K F Q L P P Q E
CGCTTCATGCTGACT CTGGGCGTGTCCAAG TTCTGCCTCAACTCC GCGGCCTTCGCCTAC
R F M L T L G V S K F C L N S A A F A Y
ATGTCCACCGGCCTG CTCCAGATTAACATC ACCGATAAAATGATT CCCCCACATTTCCCC
M S T G L L Q I N I T D K M I P F H F P
ATCCACCTCAACACC TCCAGCTTCGGACAA TTGTCCACAGCTT CCAAGCTGTTCCTCC
I H L N T S S F G Q F V P Q L P K L F P
AACATGCTGATGCTG TTTCACGTGTACACG TCCAGCACGCCCCTG GTCTCCCTCCTGCCC
N M L M L F H V Y T S S T P L V S L L P
GATAATGCCACCCTG CTCCTGTCTGCCTCG GCCAAGGCCTACGCC ATCAAGCCCCAACTCC
D N A T L L L S A S A K A Y A I K P N S
TCCGCCCTCATCCCC CTCTTCAGACTCGAC CTGAGCGCCAACATT GGCGGTAAATTCTTT
S A L I P L F R L D L S A N I G G K F F
GTGGAGGACATGACG CTGAAGGATCACCG ATGCTGAACAACCTC ACGTGACTCTGGGA
V E D M T L K G S P M L N N F T L T L G
GCCTCTGAAGTGGGA ACTTTTTCGACCCTG CCTCTGCAGAACGTG CTGAATGTGGGGATA
A S E V G T F S T L P L Q N V L N V G I
ACAACGATGGCATTG CCTTGGCTCAATGCA AAGCTGAAGCACGGC CTTCCTATCCCTGCC
T T M A L P W L N A K L K H G L P I P A
ATTAAAGAGTCAAT TTGAGCAATACTGTC CTGAAAGTGATCAAG GGGTTTGTGGCCGTT
I K D V N L S N T V L K V I K G F V A V
GCTACGGACGCCGCA GTCTCATCACTGGAG GAAGGACAGCTCTGA AGAGGGACCACTCTT
A T D A A V S S L E E G Q L *
CAGCAAGTTCCAGA AAATGCTTCTCTTTT TTTTTTAAATATAAA TAAGTGCCTCAGCC
ACAACCTGACAATACA CATACCTTTTACAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA

说明:在核苷酸序列中,多腺苷化信号用粗体下划线表示,Poly(A)尾用斜体下划线表示。在氨基酸序列中,LPS 结合域用阴影表示,N-端和 C-端结构域分别以直下划线和波浪下划线表示,N-端精氨酸和酪氨酸以圆圈表示

Notes: In nucleotide sequence,poly-adenylation signal (AATAAA) is bold with a straight underline,and poly (A) tail is underlined and italic.In the amino acid sequence,LPS binding domain is shadowed,and domains in N-terminal and C-terminal are a underlined with straight and wavy,respectively.The arginine and tyrosine at the N-terminal are circled

图 1 *AJBPI-1* 基因 cDNA 全长

Fig.1 The full-length cDNA and the deduce amino acid sequences of *AJBPI-1* gene in *Anguilla japonica*

CAGTCTGTTAAGTTG CAAGCCAGAGTGTGA CTCCACTGAAAGCTG AGGACACGTTTGCAC
AGGACTCAACCACTC AAGCAGGTATCTGTG GTCATGTTGACCGCG TGGTGTGTGCTGGCT

M L T A W C V L A

CTGCTGGCTCTTCTA CCCCATCTCAGAGT GTCAACCCTGGTGC AAGGTACAGACTTACA

L L A L L P P S Q S V N P G V K V R L T

CAAAAAGGGCTGGAA TATGGCAGGCAGATA GGGATGGCTATTCTG CAGAGCAAGCTGAAG

Q K G L E Y G R Q I G M A I L Q S R L K

TCCATCAAGTTGCCT GACATGTCGGGAAAA GCGAAGGTGTCTCGC ATTGGCAAAGTCAAA

S I K L P D M S G K A K V S R I G K V K

TATAGCATAACAGG GATGAAGATTACTTCC CTTGGGCTGCCACG ACCGCCGTGGGGCTG

Y S I T G M K I T S L G L P T T C A V G L

GTGCCAGAACTGGA GTCAGTTTCTCCATT GCGAATGCCTTCAT CAGTATCCATGGCAAA

V P E T G V S F S I A N A F I S I H G K

TGGAAGGTCAGATT CAGTTTCATTAAGAAC AGGGGCTCATTTCGAC CTGGCCGTGAGAGGA

W K V R F K F I K N R G S F D L A V R G

CTGAGCATCACCTCT CGCATCACCTGCGA AGCGACGAGACGGGG CGGCCAACCGTCAGC

L S I T S R I T L R S D E T G R P T V S

AATGCCAACTGCGTG GCCAGGGTGGGCAGC GTCAAAGTCAAGTTC CACGGCGGGGCCAGC

N A N C V A R V G S V K V R F H G G A S

TGGCTGTACAACCTT TTCCGCTCCCGCATT GGCAAGGCTCTTCGT AAGGCTTTAGAAAA

W L Y N L F F R S R I G K A L R K A L E K

CAGATCTGCCCCCGG GTGGCTGATGCAGTA TCCGAGATGAACCCC CGCCTAAAAACACTG

Q I C P R V A D A V S E M N P R L K T L

AATGTGCTTGCCCAA GTGGACAAGTATGCA GAGATTGAATATTCTG ATGGTCGCACCTCCC

N V L A Q V D K Y A E I E Y S M V A P P

GTCACTACAAAAGAG TTCATCAATTTTGAC CTGAAGGGGGAGTTC TACAACATTGGAAAA

V I T K E F L N E D L K G E F Y N I L G K

CACCAGGAACCTCCG TTTGCTGCCACGCC TTCTCCCTGCTTGCC CAGAACACCAGCATG

H Q E P P F A A T P F S L L A Q N T S M

CTGTACTTTGGACTG TCCTCCTTCACCGTC AACTCAGCAGGTTTT GTCTACAACAAGGCT

L Y F G L S S F T V N S A G F V Y N K A

GGAATCCTCAGCCTC TACATCACAGACGAC ATGATCCCCCGGAAG TCACCCTCCGACTC

G I L S L Y I L T D D M I P P K S P L R L

AATACCAAGACATTC GGAGCCTTCATCCCC GAGATTGGCAAGCGT TTTCCCAACCTGATG

N T K T F G A F I P E I G K R F P N L M

ATGAAGCTGCTGGTG AAAACGTCCAGCCCC CCAACATCACCTTT GAGCGTGACAACATG

M K L L V K T S S P P N I T F E R D N M

ACCCTGCGTGCAAG GGCACCGTGACCGCC TATGCCATCCAACA AATGGCACCTGGCG

T L R A T G T V T A Y A I O T N G T L A

CCCCTCTTCATCCTC ATCCTGGACACCACT GTCACTGCTCGCGCT TACATCACCGGAGTT

P L F L L I L L D T S V S A R A Y I T G V

AAACTGGCTGGAACC GTGGCCCTCAACAG GATTGGCCTGACTGTG GGCACAAGCTATGTG

K L A G T V A L N R I G L T V G T S Y V

GGCCCATTCAG GTGAAATCGTTGAAAA ATCCTCCTGCTTGTT GTGAAAGTGGCTGTT

G P F O V K S L E N I L L L V L K V A V

ATCCCCCAGGTCAAT GCTCGCCTGCAGCAG GGCTTTCCGCTCCCC ACTCTCGGCAAGATG

I P Q V N A R L Q Q G F P L P T L G K M

AACCTGGTCAACCCT CAGCTGCAGGTTTCAG AAGGACTACATGCTG ATTGGAACAGATGTT

N L V N P Q L Q V Q K D Y M L I G T D V

CACTTTGAACCATGA GCATCAAGGGATGTC ACCTCACATGACCAC AAAGAATCCATTGCA

H F E P *

TTCGGTTATTAATGT GAGCACTGTACTCAA CGCTGTTTTCCGTGA CTGCATTTTGACTAT

TTTCGACACTTATGA GAATTCATAGGATGT ATAAATGCTACAACA TAGCCTCTCAGTATT

ATTCTGCTGTACCAT GATGTTAAAATTGA TTATTAATGAGTATA TCTGTTTGAATAAAA

ACCTAAATATTAGGA TCTCTTTTCAAAAGT GAGCTCTTGTAAGT ACTCATGCTTTTACT

TTGTGTTTACCTTTT ACTTGGCACTCACAG AACTTTAATTCCTCT TAGTTTGGATCTTAA

TAAAAGCTTCTATGA AAACACAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA

说明:在核苷酸序列中,多腺苷化信号用粗体下划线表示,Poly(A)尾用斜体下划线表示。在氨基酸序列中,LPS 结合域用阴影表示,N-端和 C-端结构域分别以直下划线和波浪下划线表示,N-端精氨酸和酪氨酸以圆圈表示

Notes:In nucleotide sequence,poly-adenylation signal (AATAAA) is bold with a straight underline,and poly (A) tail is underlined and italic.In the amino acid sequence,LPS binding domain is shadowed,and domains in N-terminal and C-terminal are a underlined with straight and wavy,respectively.The arginine and tyrosine at the N-terminal are circled

图 2 *AJBPI-2* 基因 cDNA 全长

Fig.2 The full-length cDNA and the deduce amino acid sequences of *AJBPI-2* gene in *Anguilla japonica*



图 3 用 SWISS-MODEL 预测两种 AJBPI 氨基酸的三级结构

Fig.3 The three-dimensional structure of AJBPI from *Anguilla japonica* predicted by the method of SWISS-MODEL

表 2 鱼类 *BPI* 的序列信息

Tab. 2 Sequence information of *BPI* from teleost

物种 Species	登录号 Accession no.	基因 Gene	类型 Type	N 端赖氨 酸个数 The number of lysines at N - terminal	N 端精氨 酸个数 The number of arginines at N - terminal	pI 值 Isoelectric point	与 <i>AJBPI</i> - 1 的 相似性或 一致性/% Similarity with <i>AJBPI</i> - 1	与 <i>AJBPI</i> - 2 的 相似性或 一致性/% Similari with <i>AJBPI</i> - 2
日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	—	<i>BPI</i> - 1	I	4	8	8.58	100/100	44.70/32.70
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	ACI33182.1	<i>BPI</i>	I	7	4	5.48	56.47/44.47	50.10/36.78
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	BAM21037.1	<i>BPI</i>	I	10	4	4.65	56.00/44.47	49.47/35.94
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	AB032254.1	<i>BPI</i>	I	11	4	5.13	51.29/40.00	46.82/34.11
日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	—	<i>BPI</i> - 2	II	20	15	10.11	44.70/32.70	100/100
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	AIT76553.1	<i>BPI/LBP</i>	II	16	4	8.85	48.47/33.88	73.78/64.40
斑点叉尾鲷 <i>Ictaluru spunctatus</i>	AAX20011.1	<i>BPI/LBP</i>	II	17	7	8.19	48.7/35.52	73.99/63.84
锦鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	BAC56095.1	<i>BPI/LBP</i>	II	19	5	8.82	50.35/34.35	74.84/65.11
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	ACV74252.1	<i>BPI/LBP</i>	II	17	6	9.59	50.35/36.00	73.78/64.27
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	BAB91244.1	<i>BPI/LBP</i> - 2	II	19	6	9.34	50.11/36.23	76.53/67.65
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	BAB91243.1	<i>BPI/LBP</i> - 1	II	14	9	9.07	48.70/35.05	77.58/68.71
香鱼 <i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	BAH11125.1	<i>BPI/LBP</i>	II	19	15	9.67	52.00/36.23	77.91/69.21
胡瓜鱼 <i>Osmerus mordax</i>	AC009816.1	<i>BPI</i>	II	12	7	9.61	51.29/35.52	79.14/70.00
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	BAM21038.1	<i>BPI/LBP</i>	II	23	15	10.18	49.88/35.29	76.95/66.80
大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	AAM52335.1	<i>BPI/LBP</i> - 1	II	18	12	10.02	49.41/34.11	68.28/57.50
大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	AAM52336.1	<i>BPI/LBP</i> - 2	II	18	12	10.05	49.17/33.88	68.07/57.29

从两栖类、硬骨鱼类及哺乳动物中选取代表种的 *BPI* 序列（GenBank 登录号见表 3），进行多重比对，结果显示：所有物种 *BPI* 都具有保守的 LPS 结合结构域和一对位置固定的二硫键，以及脯氨酸富集中心结构域。序列相似性比对结果显示，*AJBPI* - 1 序列与大西洋鲑相似性最高（56.47%），其次为条石鲷（56.0%）；*AJBPI* - 2 序列与胡瓜鱼相似性最高（79.14%），其次为香鱼（77.91%）（见表 2）。利用 MEAG4.0 软件构建 NJ 系统进化树（Jones Taylor Thornton model, JTT 模型），系统进化树的拓扑结构显示：哺乳动物聚为一大支，硬骨鱼类聚为另一大支。其中硬骨鱼类又分为两小支：*AJBPI* - 1 与大西洋鲑、条石鲷和大黄鱼的阴离子 *BPI* 基因聚为一支；*AJBPI* - 2 与虹鳟等阳离子 *BPI* 基因聚为一支（见图 4）。

表 3 其他物种的登录号
Tab. 3 Accession number of other species

物种 Species	登录号 Accession NO.	物种 Species	登录号 Accession NO.
人 <i>Homo sapiens</i>	AAG42844. 1	牛 <i>Bos taurus</i>	CAA36797. 1
白颊长臂猿 <i>Nomascus leucogenys</i>	XP_003253614. 2	家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	NP_001182733. 1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_808518. 1	野猪 <i>Sus scrofa</i>	ABO34136. 1
火鸡 <i>Meleagris gallopavo</i>	XP_003212156. 1	马 <i>Equus caballus</i>	XP_001502529. 1
大熊猫 <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002915210. 1	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NP_001086208. 1
犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	XP_534417. 2	热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001107736. 1

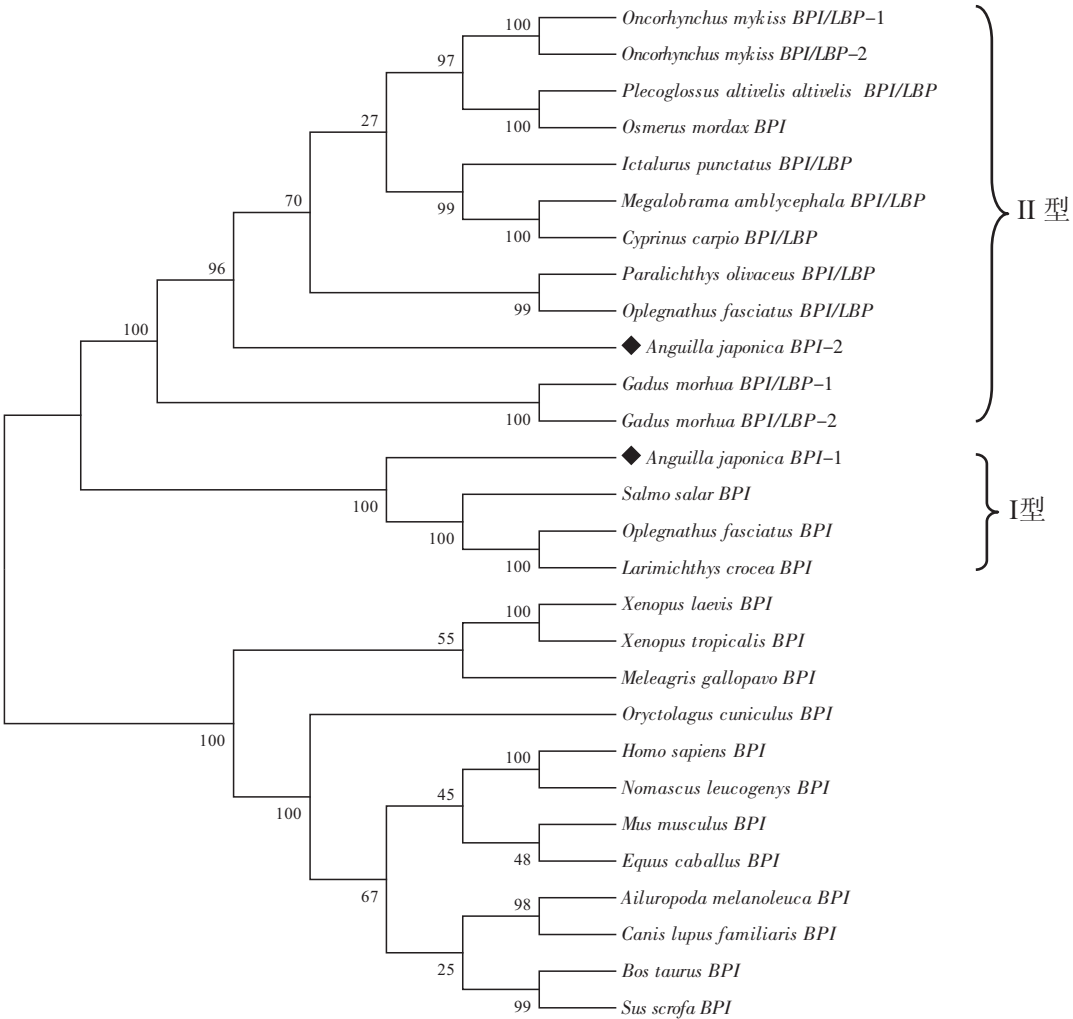


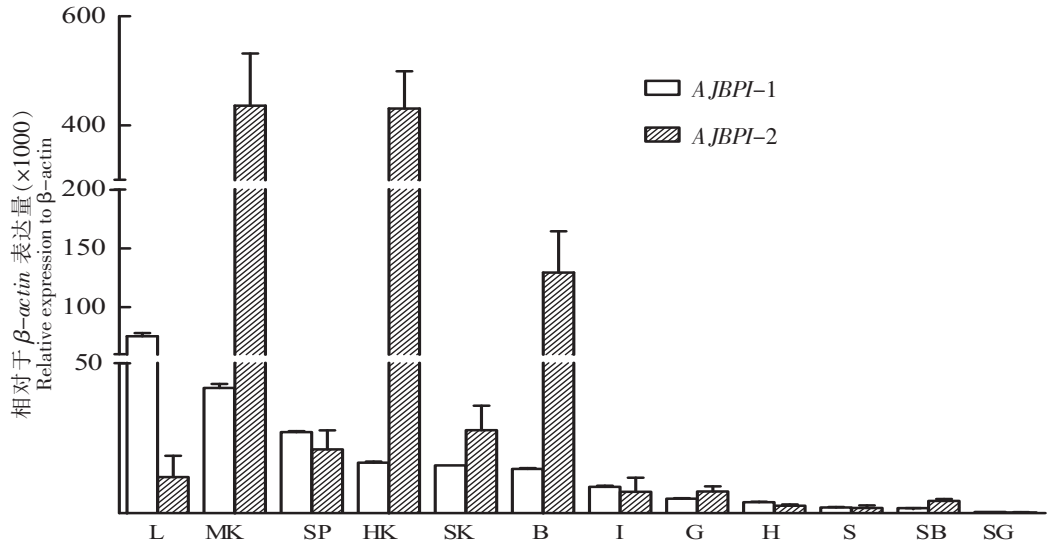
图 4 日本鳗鲡 *AJBPI* 与其他物种的 *BPI* 基因系统发育分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of *BPI* amino acid sequences from *Anguilla japonica* and other species

2.2 *AJBPI* - 1 和 *AJBPI* - 2 基因在不同组织中的分布

利用 Real - time 方法分析 *AJBPI* - 1 和 *AJBPI* - 2 在正常鳗鲡不同组织中的表达规律。结果显示：二者在日本鳗鲡肝脏、肠、皮肤、心脏、血液、胃、头肾、中肾、脾脏、鳃等组织/器官表达中均有转录表达，尤其是在肝脏、中肾、脾脏、头肾、皮肤、血液中表达量较高。*AJBPI* - 1 在肝脏中转录表达量最高，是 $\beta - actin$ 的 0.075 倍；而 *AJBPI* - 2，在头肾和中肾中表达量较高，是 $\beta - actin$ 的

0.44 倍。中肾、头肾和血液中的 *AJBPI*-2 极显著高于 *AJBPI*-1 ($P < 0.001$), 而肝脏中的 *AJBPI*-1 却极显著高于 *AJBPI*-2 ($P < 0.01$) (见图 5)。



指标 Item	L	MK	SP	HK	SK	B	I	G	H	S	SB	SG
<i>AJBPI</i> -1	75.28	41.75	27.06	16.88	15.97	14.79	8.81	4.90	3.72	1.94	1.71	0.46
<i>AJBPI</i> -2	12.04	435.65	21.28	430.51	27.74	129.38	7.13	7.28	2.47	1.79	4.14	0.26
<i>AJBPI</i> -1/ <i>AJBPI</i> -2	6.25	0.10	1.27	0.04	0.58	0.11	1.24	0.67	1.50	1.08	0.41	1.80
	**	***		***		**						

说明:数据以平均值±标准误表示($N=6$)。L—肝脏;MK—中肾;SP—脾脏;HK—头肾;SK—皮肤;B—血液;I—肠;G—鳃;H—心脏;S—胃;SB—鳔;SG—性腺。*AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 表达量的比值也列在表中,同一组织内两个基因的表达量经 t -检验后,* $P < 0.05$, $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

Notes: Data are shown as mean \pm SEM ($N=6$). L—Liver, MK—Middle Kidney, SP—Spleen, HK—Head Kidney, SK—Skin, B—Blood, I—intestine, G—Gill, H—Heart, S—Stomach, SB—Swim Bladder, SG—Sexual Gland. Expression ratios of *AJBPI*-1/*AJBPI*-2 are also shown in the table.* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, by t -test

图 5 *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 基因在日本鳗鲡不同组织/器官中相对表达量

Fig.5 Expression level of *AJBPI*-1 and *AJBPI*-2 in multiple tissues/organs from Japanese eel

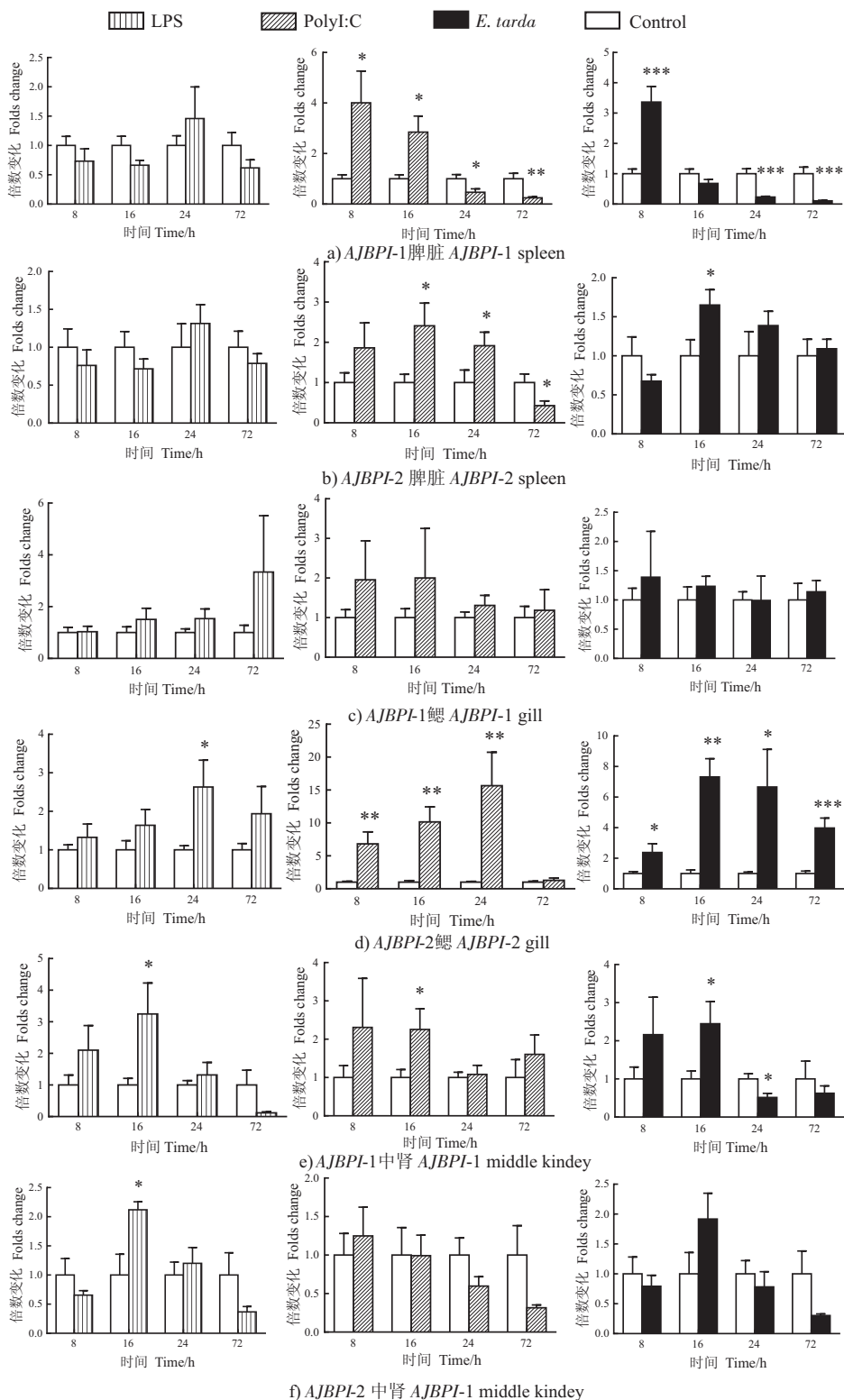
2.3 免疫刺激后 *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 的基因表达变化

为了研究不同刺激物刺激后对 *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 基因表达情况的影响,本实验用 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 分别刺激日本鳗鲡。结果显示:

脾脏中,经 Poly I: C 和 *E. tarda* 刺激后, *AJBPI*-1 的表达量均迅速达到最高值,分别为 PBS 对照的 4.0 倍和 3.3 倍,刺激后 16 h, *AJBPI*-2 的表达量均显著上调 ($P < 0.05$),分别为 PBS 对照组的 2.3 倍和 1.7 倍。经 LPS 刺激后, *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 的表达水平无显著变化 ($P > 0.05$) (见图 6)。

鳃中,经 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 刺激后, *AJBPI*-2 的表达量均有上调。其中, LPS 和 Poly I: C 刺激后 24 h, *AJBPI*-2 表达量最高,分别为 PBS 对照组的 2.5 倍和 17.0 倍; *E. tarda* 刺激后 18 h, *AJBPI*-2 表达量最高,为 PBS 对照组的 7.0 倍。而该三种刺激物刺激后, *AJBPI*-1 的表达量均无显著变化 ($P > 0.05$) (见图 6)。

中肾中,经 LPS 和 Poly I: C 刺激后 16 h, *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 的表达量均显著上调 ($P < 0.05$)。其中, LPS 刺激后, *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 分别为 PBS 对照组的 3.0 倍和 2.0 倍;而 Poly I: C 刺激后, *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 均为 PBS 对照组的 2.2 倍。然而, *E. tarda* 刺激后,中肾中 *AJBPI*-2 的表达量无显著变化 ($P > 0.05$) (见图 6)。



说明:以 β -actin 为内参基因;误差线表示平均数 \pm SEM(N=6); t -检验, * $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$
Notes: Amplification of β -actin in each tissue is performed as an internal control. Vertical bars represented the mean \pm SEM(N=6).
* $P<0.05$,** $P<0.01$ and *** $P<0.001$, t -test

图 6 日本鳗鲡 AJBPI-1 和 AJBPI-2 受 LPS、Poly I:C 和 *E. tarda* 刺激后的表达量
Fig.6 The relative expression of AJBPI-1 and AJBPI-2 in *Anguilla japonica* after intraperitoneal injection with LPS, Poly I:C and *E. tarda*

3 讨论

BPI 是一类含有 LPS 结合结构域和脯氨酸富集区的阳离子抗菌肽。它通过 LPS 结合结构域与革兰氏阴性菌的脂多糖发生结合^[26], 从而发挥抗菌作用。

首先, 研究表明 *BPI* N 端碱性氨基酸可聚集成簇, 通过静电作用与 LPS 的脂质 A 区域的酸性位点结合, 进而中和内毒素, 增强抗菌活性^[27]。已有报道, 条石鲷 *BPI*-1 的 N 端含有 4 个精氨酸和 10 个赖氨酸; *BPI*-2 的 N 端含有 15 个精氨酸和 23 个赖氨酸^[22]。斑点叉尾鲷 *BPL/LBP* N 端含有 6 个精氨酸和 19 个赖氨酸^[28]。本研究 *AJBPI*-1 的 N 端也含有少数的阳离子氨基酸, 即 8 个精氨酸和 4 个赖氨酸, 而 *AJBPI*-2 的 N 端含有 15 个精氨酸和 20 个赖氨酸。该结果与已报道的条石鲷^[22]的 *BPI* 相似。现有数据分析可知, I 型 *BPI* 含有的阳离子数目少于 II 型 *BPI*。因此, 推测 *AJBPI*-2 与 LPS 的亲合力更强。其次, 同源性分析可知, *AJBPI*-1 与硬骨鱼类 *BPI/LBP* 相关基因相似性为 51.29% ~ 56.47%, 其中与大西洋鲑 *BPI* 基因相似性高达 56.47%, *AJBPI*-2 与硬骨鱼类 *BPI/LBP* 相关基因相似性为 68.07% ~ 79.14%, 其中与胡瓜鱼相似性高达 79.14%。最后, *AJBPI*-1 与硬骨鱼类 *BPI* 基因聚为一支, 而 *AJBPI*-2 与硬骨鱼类 *BPI/LBP* 基因聚为另一大支。根据以上结果可知, *AJBPI*-1 和 *AJBPI*-2 基因的特征序列、相似性等分别接近其他鱼类的 *BPI* 和 *BPI/LBP* 基因, 即鱼类 I 型 *BPI* 和 II 型 *BPI*。

鱼类 I 型 *BPI* 主要在中性粒细胞和上皮细胞中表达。如条石鲷 *BPI*-1 基因在肝脏、脾脏中高表达^[22], 大黄鱼 *BPI* 基因在肝脏、头肾、心脏中高表达^[21]。本研究的 *AJBPI*-1 在所检测的各个组织中均有表达, 且在肝脏、头肾和脾脏中高表达。这表明日本鳗鲡 *BPI*-1 基因的组织分布与上述鱼类 *BPI* 基因的组织分布相似。异源性抗原物质如 LPS、病毒和细菌刺激可显著诱导鱼类 *BPI* 基因的表达。如 *E. tarda* 和真鲷虹彩病毒 (red sea bream iridovirus, RSIV) 诱导后, 条石鲷 *BPI*-1 基因在头肾中表达量显著上调^[22]。受溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 刺激后, 大黄鱼头肾、脾脏、肠道、肾脏、鳃和肌肉中 *BPI* 基因的表达量显著上调^[21]。本研究发现, 用 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 分别刺激日本鳗鲡中肾、脾脏和鳃时, 中肾中 *AJBPI*-1 的表达量均有显著上调; 在 Poly I: C 和 *E. tarda* 刺激下脾脏中 *AJBPI*-1 的表达量具有显著性变化, 而鳃中 *AJBPI*-1 的表达量均无显著变化。根据以上结果可知, *BPI*-1 主要在脾脏、肾脏等造血器官中高表达。

II 型 *BPI* 基因与 I 型 *BPI* 基因表达模式不尽相同。虹鳟的 *BPI/LBP* 基因在肝脏和头肾中均有表达^[17]。香鱼的 *BPI* 基因主要在肾脏、皮肤、鳃、肠道和脾脏中高表达^[15]。条石鲷的 *BPI*-2 基因主要在肾脏、外周血及脾脏中高表达^[22]。锦鲤的 *BPI* 基因主要在头肾、肝脏、脾脏、肠道和鳃中表达^[18]。大西洋鲑的 *BPI* 基因主要在外周血和头肾中高表达^[19]。斑点叉尾鲷的 *BPI* 基因在头肾、中肾、皮肤、肠道中高表达^[28-29]。团头鲂的 *BPI/LBP* 基因主要在头肾、中肾、肌肉、脾脏、心脏中高表达^[23]。本研究的 *AJBPI*-2 在头肾、中肾、血液和皮肤中高表达。本文结果表明, 在健康鱼类组织中, 日本鳗鲡 *BPI*-2 基因的组织分布和上述鱼类 II 型 *BPI* 的组织分布相似。

异源性抗原物质刺激时, 灭活的鳗弧菌能诱导大西洋鲑的 *BPI/LBP* 基因在头肾、脾脏、外周血等多个组织中表达量上调^[19]。*E. tarda* 和海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 刺激后, 条石鲷 *BPI/LBP* 基因在头肾中表达量显著上调^[22]; 而 *E. tarda* 和真鲷虹彩病毒诱导后, 牙鲆的 *BPI/LBP* 基因在头肾、脾脏、肝脏、鳃和肠道中表达量显著上调^[20]。LPS 刺激 2 h, 团头鲂的 *BPI* 基因在脾脏中表达量显著上调^[23]。而且, LPS 体外刺激时虹鳟^[17]和锦鲤^[18]的 *LBP/BPI* 基因在 24 h 内立即发生响应, 而斑点叉尾鲷^[28] *LBP/BPI* mRNA 在细菌体外刺激 24 h 后才发生响应。此外, 细菌刺激后, 牙鲆^[20]肝脏中 *LBP/BPI* mRNA 表达量增加, 而 LPS 刺激后虹鳟^[17]肝脏中 *LBP/BPI* 无任何变化。本研究发现, 用 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 分别刺激日本鳗鲡中肾、脾脏和鳃时, 鳃中 *AJBPI*-2 的表达量均有显著上调; 在 LPS 和 Poly I: C 刺激下中肾中 *AJBPI*-2 的表达量均有显著上调; 在 Poly I: C 和 *E. tarda* 刺

激下脾脏中 *AJBPI-2* 的表达量也具有显著性变化。本文结果与 *E. tarda* 刺激后牙鲆^[20] 的 *BPI/LBP* 基因表达模式相似, 且其与虹鳟^[17] 和锦鲤^[18] 也相似, 即均在刺激物刺激 24 h 内发生响应。综上所述, *BPI-2* 在造血器官和其他组织器官如鳃和肠道等组织/器官中表达。此外, I 型和 II 型 *BPI* 基因在不同物种中的表达模式均有差异, 这些差异可能与诱导物的种类、LPS 浓度及鱼龄等^[22] 相关。

综上所述, 本研究从日本鳗鲡中克隆、鉴定了两类 *AJBPI* 基因。*AJBPI* 在所检测的组织中均有不同程度的表达, 用 LPS、Poly I: C 和 *E. tarda* 分别刺激时日本鳗鲡中的肾、鳃和脾脏中的 *AJBPI* 均有不同响应。该研究结果显示 *AJBPI* 可能参与日本鳗鲡的抗细菌和抗病毒免疫, 而且它将为鱼类的 *BPI/LBP* 基因的命名、分类及其功能分析等提供一定的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] REDDY K V, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 24(6): 536-547.
- [2] WANG G, LI X, WANG Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44 (Database issue): D1087-D1093.
- [3] NIBBERING P H, HIEMSTRA P, DRIJFHOUT J W. Antimicrobial peptide; US, US9562085 [P]. 2017.
- [4] WEISS J, FRANSON R C, BECKERDITE S, et al. Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of *Escherichia coli* [J]. The Journal of Clinical Investigation, 1975, 55(1): 33-42.
- [5] WEISS J, ELSBACH P, OLSSON I, et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1978, 253(8): 2664-2672.
- [6] SUN Y Y, LI S. A teleost bactericidal permeability-increasing protein kills gram-negative bacteria, modulates innate immune response, and enhances resistance against bacterial and viral infection [J]. Plos One, 2016, 11(4): e0154045.
- [7] OOI C E, WEISS J, ELSBACH P, et al. A 25-kDa NH2-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(31): 14891-14894.
- [8] MANNION B A, WEISS J, ELSBACH P. Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli* [J]. Journal of Clinical Investigation, 1990, 85(3): 853-860.
- [9] BEAMER L J, CARROLL S F, EISENBERG D. The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions [J]. Protein Science, 1998, 7(4): 906-914.
- [10] BALAKRISHNAN A, MARATHE S A, JOGLEKAR M, et al. Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization [J]. Innate Immunity, 2013, 19(4): 339-347.
- [11] BINGLE C D, CRAVEN C J. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins [J]. Trends in Immunology, 2004, 25(2): 53-55.
- [12] BEAMER L J, CARROLL S F, EISENBERG D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution [J]. Science, 1997, 276(5320): 1861-1864.
- [13] KIRSCHNING C J, AU-YOUNG J, LAMPING N, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins [J]. Genomics, 1997, 46(3): 416-425.
- [14] SCHUMANN R R, LEONG S R, FLAGGS G W, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein [J]. Science, 1990, 249(4975): 1429-1431.
- [15] SUZUKI K, IZUMI S, TANAKA H, et al. Molecular cloning and expression analysis of the BPI/LBP cDNA and its gene from ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis* [J]. Fisheries Science, 2009, 75(3): 673-681.
- [16] 杨春荣, 苏建国, 黄腾, 等. 草鱼 BPI/LBP 基因的克隆及特征研究 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2011, 39(7): 8-14.
- [17] INAGAWA H, HONDA T, KOHCHI C, et al. Cloning and characterization of the homolog of mammalian lipopolysac-

- charide-binding protein and bactericidal permeability-increasing protein in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Journal of Immunology, 2002, 168(11): 5638-5644.
- [18] KONO T, SAKAI M. Molecular cloning of a novel bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (BPI/LBP) from common carp *Cyprinus carpio* and its expression [J]. Molecular Immunology, 2003, 40(5): 269-278.
- [19] STENVIK J, SOLSTAD T, STRAND C, et al. Cloning and analyses of a BPI/LBP cDNA of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2004, 28(4): 307-323.
- [20] NAM B H, AHN K J, KIM Y O, et al. Molecular cloning and characterization of LPS-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI) from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2010, 133(2/4): 256-263.
- [21] HUANG Y, LOU H, WU X, et al. Characterization of the BPI-like gene from a subtracted cDNA library of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and induced expression by formalin-inactivated *Vibrio alginolyticus* and *Nocardia seriolae* vaccine challenges [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 740-750.
- [22] KIM J W, GERWICK L, PARK C I. Molecular identification and expression analysis of two distinct BPI/LBPs (bactericidal permeability-increasing protein/LPS-binding protein) from rock bream, *Oplegnathus fasciatus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(1): 75-84.
- [23] TANG L, LIANG Y, JIANG Y, et al. Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein of blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 630-640.
- [24] 刘增胜, 李书民. 中国渔业年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [25] 段明珠, 黄贝, 梁英, 等. 日本鳎肝脏表达抗菌肽 2 基因的克隆与表达 [J]. 水生生物学报, 2016, 40(2): 252-260.
- [26] BÜLOW E, GULLBERG U, OLSSON I. Structural requirements for intracellular processing and sorting of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): comparison with lipopolysaccharide-binding protein [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2000, 68(5): 669-678.
- [27] BEAMER L J, CARROLL S F, EISENBERG D. The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions [J]. Protein Science, 1998, 7(4): 906-914.
- [28] 王兴丽, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鲷 BPII 基因的原核表达及生物信息学分析 [J]. 水产学报, 2017, 41(1): 1-10.
- [29] XU P, BAO B, HE Q, et al. Characterization and expression analysis of bactericidal permeability-increasing protein (BPI) antimicrobial peptide gene from channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2005, 29(10): 865-878.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)