

黄沙鳖 β -防御素基因家族的鉴定及生物信息学分析

杨廷雅¹, 魏 华¹, 蒙兰丽², 吴志刚¹, 谭雯予¹, 杨祖鹏¹, 唐潇毅¹, 廖 幸¹, 莫昱铭¹, 梁静真^{1*}

¹广西大学动物科学技术学院, 广西水生动物病害诊断实验室, 广西 南宁

²田东县水产技术推广站, 广西 百色

收稿日期: 2022年1月28日; 录用日期: 2022年2月11日; 发布日期: 2022年2月25日

摘 要

β -防御素是一种富含半胱氨酸的小分子阳离子抗菌肽, 在生物机体天然免疫中发挥重要的作用。本研究基于黄沙鳖转录组数据库和PCR验证鉴定了黄沙鳖 β -防御素基因(*Hs-BDs*)家族, 并对其进行了蛋白理化性质、蛋白结构和进化关系等生物信息学分析。实验结果表明, 共鉴定出18个具有完整蛋白编码区的*Hs-BDs*家族成员, 这些*Hs-BDs*编码蛋白的氨基酸残基数在59~94之间, 蛋白分子量介于6759.13~10731.32 Da, 等电点在8.82~10.45之间。系统进化树分析可将18个*Hs-BDs*家族成员分为4个亚类(Class I~IV)。随机选择部分*Hs-BDs*进行蛋白结构分析, 这些*Hs-BDs*前体蛋白二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠片和无规则卷曲3种结构组成; 成熟蛋白三级结构预测结果显示6个保守的半胱氨酸残基分别以Cys1-Cys5、Cys2-Cys4和Cys3-Cys6的方式连接形成3个分子内二硫键。本文结果可为进一步研究黄沙鳖 β -防御素基因家族的详细功能以及抗菌肽的研发提供基础数据。

关键词

黄沙鳖, β -防御素基因家族, 序列分析, 生物信息学

Identification and Bioinformatics Analysis of β -Defensin Gene Family in Huangsha Soft-Shell Turtle

Tingya Yang¹, Hua Wei¹, Lanli Meng², Zhigang Wu¹, Wenyu Tan¹, Zupeng Yang¹, Xiaoyi Tang¹, Xing Liao¹, Yuming Mo¹, Jingzhen Liang^{1*}

¹Guangxi Aquatic Animal Disease Diagnosis Lab, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning Guangxi

*通讯作者。

文章引用: 杨廷雅, 魏华, 蒙兰丽, 吴志刚, 谭雯予, 杨祖鹏, 唐潇毅, 廖幸, 莫昱铭, 梁静真. 黄沙鳖 β -防御素基因家族的鉴定及生物信息学分析[J]. 水产研究, 2022, 9(1): 1-12. DOI: 10.12677/ojfr.2022.91001

²Tiandong Station of Aquaculture Technology Extension, Baise Guangxi

Received: Jan. 28th, 2022; accepted: Feb. 11th, 2022; published: Feb. 25th, 2022

Abstract

β -defensin is a small cationic antimicrobial peptide rich in cysteine, which plays an important role in innate immunity of the living organism. In this study, the β -defensin genes of Huangsha soft-shelled turtle (*Hs-BDs*) family were identified based on transcriptome database of Huangsha soft-shelled turtle and PCR validation, and the physicochemical properties of protein, protein structure and evolutionary relationship were also analyzed. The results showed that a total of 18 members of *Hs-BDs* family with complete coding regions were identified. The number of amino acid residues of these *Hs-BDs* proteins ranged from 59 to 94, the molecular weight ranged from 6759.13 to 10,731.32 Da, and the isoelectric point ranged from 8.82 to 10.45. The 18 members of *Hs-BDs* family were divided into four subgroups (Class I~IV) according to the phylogenetic tree analysis. Some *Hs-BDs* were randomly selected for protein structure analysis and the results showed that the secondary structures of *Hs-BDs* preprotein are mainly composed of α -helix, β -sheet and random coil. Six conserved cysteine residues were linked to form three intramolecular disulfide bonds in the form of Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 and Cys3-Cys6, respectively. The results of this study can provide basic data for further research on the detailed functions of β -defensin gene family and the development of antimicrobial peptides.

Keywords

Huangsha Soft-Shelled Turtle, β -Defensin Gene Family, Sequence Analysis, Bioinformatics

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

β -防御素是一种富含半胱氨酸(6~8个Cys残基)的小分子(3~5 kDa)阳离子短肽[1],是生物体天然免疫的重要组成部分。 β -防御素具有广谱的抗微生物活性,无论在细胞内或细胞外,都可以直接杀死细菌、真菌、病毒等病原微生物[2],例如大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) β -防御素 SmBD [3]对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、链球菌(*Streptococcus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)均具抗菌活性,鸡 β -防御素 *AvBD-1*、*AvBD-4*、*AvBD9*、*AvBD-10* 能抑制真菌生长繁殖,对白色念珠菌(*Candida albicans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*)表现出不同浓度的抑菌活性[4] [5];重组小鼠 β -防御素 3 (*rMBD3*)对甲型流感病毒感染小鼠有保护作用;鸭 β -防御素 16 (*AVDI6*)重组蛋白具有抗鸭肝炎病毒的活性等。 β -防御素还能通过诱导细胞因子的释放和介导未成熟树突状细胞协同刺激分子的表达上调,促进未成熟树突状细胞的成熟,进而活化 T 细胞,触发特异性免疫应答,还能杀灭一些诸如 HIV、疱疹病毒、水泡型口炎病毒等的被膜病毒[6] [7] [8] [9]。 β -防御素能与多个趋化受体结合,诱导促炎因子的表达,通过阻止脂多糖诱发的炎症来起到抗炎的作用[9],部分 β -防御素还可以促进伤口的愈合,参与生物机体的生长和发育进程[10]。迄今为止,国内外在 β -防御素方面进行了大量的研究, β -防御素在

基因工程和医药领域呈现广泛的应用前景[11]。

β -防御素的研究逐渐成为生物分子领域研究的热点，其研究体系逐渐完整，然而爬行动物 β -防御素的研究起步相对较晚。首个爬行动物的 β -防御素 *TBD-1* 发现于欧洲池塘龟(*Emysorbicularis*)的白细胞中。后来分别在鳄蜥(*Shinisaurus crocodilurus*)、响尾蛇(*Crotalus durissus terrificus*)、乌龟(*Mauremys reevesii*)、鳄鱼(*Crocodylus siamensis*)、密西西比鳄(*Alligator mississippiensis*)、刺鳖(*Apalone spinifera*) [12]中也发现了结构类似 β -defensin 的阳离子小肽。中华鳖(*Trionyx Sinensis*) β -防御素 *Ps-BD2* 重组蛋白对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 08032706、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 08042313 和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) 09021325 抑菌效果较好，并且其最小抑菌浓度(MIC)低于氨苄青霉素[13]。黄沙鳖 β -防御素基因 *Hs-BD1* [14]在温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)攻毒后，其基因相对表达量也有显著的上调，表明其可能在抗菌过程中发挥一定的作用。

黄沙鳖属于脊索动物门爬行纲中的无孔亚纲，是中华鳖的地方品种[15]，主要分布在广西左江、右江和广东的西江流域，是西江水系的特有鳖种[16]。黄沙鳖体色金黄，裙边宽厚，肌肉紧实，肉质鲜美，富含多种维生素和人体必需的氨基酸，其中维生素生 A、谷氨酸、门冬氨酸和赖氨酸等含量较高，具有较高的营养价值和经济效益[17]。近些年来，由于养殖户过度追求经济效益，不断扩大黄沙鳖养殖规模和养殖密度，导致黄沙鳖细菌性疾病大量爆发，加上抗生素的滥用导致部分病原菌产生了耐药性，影响药物治疗效果，甚至产生食品质量与安全的问题，对广西黄沙鳖养殖业的健康发展构成了严重的威胁[18] [19] [20]。

目前，许飘尹等[14]已成功克隆了首个黄沙鳖 β -防御素基因 *Hs-BD1*，但黄沙鳖 β -防御素基因家族的其他成员特征尚未有系统研究。鉴于此，本文基于黄沙鳖转录组数据库鉴定黄沙鳖 β -防御素基因家族成员，并对其进行蛋白理化性质、蛋白结构和进化关系等生物信息学分析，可为进一步深入研究这些基因的详细功能以及抗菌肽的研发提供基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

健康黄沙鳖购于广西南宁市雷康黄沙鳖养殖场，平均体质量为 150 ± 20 g，规格均一，转移至广西大学水产养殖基地检疫养殖一个月无异样后，采取随机抽样的方式选取 3 只生长状况良好的黄沙鳖进行实验。在无菌室取心、肝、脑、脾、肾、肺、肠、肌肉、表皮组织保存于 Sample Protector for RNA/DNA (Takara, 大连)并放置于 -80°C 备用。

2.2. RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 RNApure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒(Aidlab, 北京)提取黄沙鳖总 RNA，以超微量分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度，检验总 RNA 是否符合反转录条件。使用反转录试剂盒 Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, 大连)，将总 RNA 反转录为 cDNA，随后放置于 -80°C 超低温冰箱冷冻保存备用。

2.3. 黄沙鳖 β -防御素基因序列的获取和验证

委托上海元莘生物有限公司进行黄沙鳖转录组测序，获得完整的转录组数据。以已发表的中华鳖 β -防御素[21]以及 NCBI 上已公布的相近物种 β -防御素基因序列为参考，从黄沙鳖全长转录组数据基因注释文件中筛选 β -防御素基因，在在线预测软件 NCBI ORF Finder 查看预测的基因是否包含整个完整蛋白编码(CDS)区，并获得对应的蛋白序列。

基于从黄沙鳖转录组中筛选出 β -防御素基因序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1), 以黄沙鳖 9 个组织混合 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增验证。将扩增产物连接至 pMD18-T (Takara, 大连)载体, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 对阳性克隆子进行测序。

Table 1. Primer sequences of PCR reaction
表 1. PCR 反应引物序列

引物名称	引物(5'-3')	引物名称	引物序列(5'-3')
Hs-BD1-F1	ATGAAGAWTCTCTACCTTYTMTTGG	Hs-BD10-F1	ATGAAGATCCTTCATCTAGTCTTTG
Hs-BD1-R1	TCCTCCATAAACCTTCTCTGCGGC	Hs-BD10-R1	CTACCGCTTCTGACAGCAGTGGC
Hs-BD2-F1	ATGAAGATTCTCTACCTTCTCTT	Hs-BD13-F1	ATGAAGATCCTTTATCTGCTCTCTGC
Hs-BD2-R1	TGATCTTCCTCGATTACAGCAGC	Hs-BD13-R1	TCAGTCAAAATCTCGCAATTTACA
Hs-BD3-F1	ATGAAGATCCTTTGCCTGATCCTTG	Hs-BD14-F1	ATGAAGATCCTTTACCTTCTTTTTG
Hs-BD3-R1	TCACCTTTGACAGCACATATACTG	Hs-BD14-R1	TCTACAGCAAATGCTCGACCAGC
Hs-BD4-F1	ATGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCG	Hs-BD15-F1	ATGAGGATTCTTTACCTTCTCTTTG
Hs-BD4-R1	TTAGCCTTGTCTCCATGTTTTACA	Hs-BD15-R1	CTAGAACTTCCTTCTACAGCAAG
Hs-BD5-F1	ATGAAGATCCTTTATCTGCTCTTTG	Hs-BD17-F1	ATGAAGATTCTCTACCTTCTCTTTGCA
Hs-BD5-R1	TCAGGATCTCCAGAGACAGCA	Hs-BD17-R1	TCACTCTTTGATCTTCCTCGATTCA
Hs-BD6-F1	ATGAAGATTCTTTATCTGCTCTTTG	Hs-BD18-F1	ATGAAGATTCTCTTCCTTCTCTTTG
Hs-BD6-R1	TCAGTCAAATAATTTCTTTGACA	Hs-BD18-R1	TCACTCTGCAATCCTTCTCATT
Hs-BD7-F1	ATGAAGATCCTTTATCTTCTCGTTGC	Hs-BD19-F1	ATGAAGATTCTCCAATTCTCTT
Hs-BD7-R1	TCAGAAAATCACCTCAGAGGAC	Hs-BD19-R1	TTAATTATCTCCGCTGCCCTCG
Hs-BD8-F1	ATGAAGATCCTTTACCTGCTCTTCT	Hs-BD23-F1	ATGAAGATTCTCTACCTTCTCTTTG
Hs-BD8-R1	CTACTTCTTGCAGCAGCAGTGG	Hs-BD23-R1	TCATCTCCTCCTCCTGCAGCAAT
Hs-BD9-F1	ATGAAGATCCTCCATCGGCTCTTTG	Hs-BD25-F1	ATGAAGATCCTTTGCCTTCTCTTC
Hs-BD9-R1	TCATCTGAGGTAATCAGTCAA	Hs-BD25-R1	TCAGCCACGACTTCGCAAGCA

2.4. 黄沙鳖 β -防御素基因序列的生物信息学分析

使用 ProtParam 服务器(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线预测 *Hs-BDs* 分子量和等电点(pI), 等性质, 使用生物分析软件 DNAMAN 对 *Hs-BDs* 基因进行氨基酸序列比对, 利用 DNA Star 软件中的 Megalign 比较 β -防御素基因的相似性。在 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)数据库下载其他物种 β -防御素序列。采用 DNASTar 软件进行蛋白分析并使用 Clustal X 和 MEGA5.0 软件构建系统发育树。

前体蛋白二级结构使用 PSIPRED 服务器(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)预测, *Hs-BDs* 成熟蛋白三维结构由 Robetta 服务器(<http://rosetta.bakerlab.org>)预测并使用 PyMOL 软件对该服务器预测的三维分子模型进行显示, 标记 α 螺旋, β 折叠和特殊的二硫键。

3. 实验结果与分析

3.1. 黄沙鳖 β -防御素(*Hs-BDs*)基因家族的鉴定

在黄沙鳖转录组中数据基因注释文件中筛选 25 个疑似 β -防御素基因序列, 依次命名为 *Hs-BD1*~*Hs-BD25*。经 PCR 验证后, 获得 18 个具有完整蛋白编码区的黄沙鳖 β -防御素 *Hs-BDs*, 即 *Hs-BD1* (已发表[14])、*Hs-BD2* (NCBI 登录号: MW981708)、*Hs-BD3*~*Hs-BD10*、*Hs-BD13*~*Hs-BD15*、*Hs-BD17*~*Hs-BD19*、*Hs-BD23* 和 *Hs-BD25*。*Hs-BDs* ORF 框长度在 177 bp~219 bp 之间, 其中 *Hs-BD15* 的 ORF 框编码氨基酸数量最少, 仅有 59 个; *Hs-BD19* 的 ORF 框编码氨基酸数量最多, 高达 73 个。

3.2. *Hs-BDs* 家族成员理化性质

Hs-BDs 家族成员分子量和等电点等理化性质预测结果如表 2 所示。结果显示 *Hs-BDs* 编码蛋白平均氨基酸残基数量为 66; 分子质量在 6759.13~10,731.32 Da 之间, 分子质量平均值为 7698.22 Da, 等电点在 8.82~10.45 之间; 且 *Hs-BDs* 氨基酸净电荷量均为正数。亲水性平均系数除 *Hs-BD1*、*Hs-BD6*、*Hs-BD19* 为负值外, 其余家族成员的亲水性平均系数均为正值, 即 *Hs-BD1*、*Hs-BD6*、*Hs-BD19* 为亲水性蛋白, 其余 *Hs-BDs* 家族成员编码蛋白均为疏水性蛋白。

Table 2. Physicochemical properties of *Hs-BDs* preprotein

表 2. *Hs-BDs* 前体蛋白理化性质

家族成员	氨基酸数量	分子式	分子质量	等电点	净电荷量	亲水性平均系数
<i>Hs-BD1</i>	66	C ₃₄₅ H ₅₄₉ N ₁₀₅ O ₈₆ S ₇	7768.23	10.09	+10	-0.008
<i>Hs-BD2</i>	66	C ₃₄₇ H ₅₃₈ N ₉₄ O ₈₆ S ₈	7659.15	9.18	+6	0.298
<i>Hs-BD3</i>	62	C ₃₂₃ H ₅₀₄ N ₈₄ O ₇₉ S ₁₁	7180.73	9.14	+6	0.313
<i>Hs-BD4</i>	66	C ₃₃₃ H ₅₃₄ N ₁₀₀ O ₈₄ S ₇	7506.94	9.77	+8	0.168
<i>Hs-BD5</i>	65	C ₃₄₀ H ₅₂₃ N ₉₁ O ₈₇ S ₈	7533.93	9.10	+5	0.208
<i>Hs-BD6</i>	67	C ₃₄₃ H ₅₃₈ N ₁₀₀ O ₈₈ S ₈	7727.14	9.69	+8	-0.093
<i>Hs-BD7</i>	79	C ₄₀₂ H ₆₄₆ N ₁₁₈ O ₁₀₆ S ₈	9084.73	9.33	+6	0.118
<i>Hs-BD8</i>	63	C ₃₃₆ H ₅₀₆ N ₈₆ O ₇₇ S ₈	7238.72	9.42	+7	0.284
<i>Hs-BD9</i>	68	C ₃₄₇ H ₅₄₅ N ₉₇ O ₉₂ S ₇	7772.16	9.30	+6	0.243
<i>Hs-BD10</i>	63	C ₃₂₆ H ₅₀₈ N ₈₈ O ₇₉ S ₇	7148.58	9.30	+6	0.270
<i>Hs-BD13</i>	66	C ₃₂₁ H ₅₃₀ N ₁₀₀ O ₈₈ S ₇	7422.78	9.89	+9	0.012
<i>Hs-BD14</i>	60	C ₃₁₆ H ₄₉₂ N ₉₄ O ₇₂ S ₁₁	7112.63	9.77	+9	0.218
<i>Hs-BD15</i>	59	C ₃₀₅ H ₄₈₁ N ₈₇ O ₇₃ S ₇	6759.13	9.69	+7	0.458
<i>Hs-BD17</i>	66	C ₃₃₈ H ₅₃₆ N ₉₄ O ₈₇ S ₈	7565.03	9.18	+6	0.259
<i>Hs-BD18</i>	73	C ₃₇₈ H ₅₇₈ N ₉₈ O ₉₅ S ₁₀	8335.95	8.82	+4	0.548
<i>Hs-BD19</i>	94	C ₄₇₃ H ₇₂₉ N ₁₃₉ O ₁₃₂ S ₈	10,731.32	9.49	+7	-0.312
<i>Hs-BD23</i>	62	C ₃₀₃ H ₅₀₀ N ₉₆ O ₈₀ S ₇	6992.32	10.45	+10	0.160
<i>Hs-BD25</i>	63	C ₃₁₄ H ₅₀₄ N ₉₀ O ₇₇ S ₈	7028.49	9.73	+8	0.392

3.3. *Hs-BDs* 氨基酸序列比对结果

将 18 个黄沙鳖 β -防御素基因序列与其他龟鳖目 β -防御素(表 3)进行序列比对, 结果如图 1 所示。可见这些龟鳖目 β -防御素前体蛋白均包含较为保守的信号肽、以及相似度较低的前肽和成熟肽部分。虽然这 18 个基因编码蛋白的氨基酸种类和数量各不相同, 但是它们均具有由 6 个半胱氨酸残基组成的固定结构(C-X₆-C-X₃₋₄-C-X₆₋₈-C-X₄₋₆-CC-X₀₋₁₀), 该结构符合 β -防御素典型特征, 表明所获得的 18 个基因属于 β -防御素基因家族。

Table 3. Relevant information of β -defensin gene of turtles in sequence alignment

表 3. 序列比对中龟鳖类 β -防御素基因的相关信息

GenBank 登录号	GenBank 编号全称	物种名称
CCA62932	CCA62932.11-60 beta-defensin-like protein [<i>Apalone spinifera</i>]	角鳖
CCA62932	CCA62932.11-61 beta-defensin-like protein [<i>Apalone spinifera</i>]	角鳖
KAG6934142	KAG6934142.11-62 defensin beta 6 [<i>Chelydra serpentina</i>]	拟鳄龟
KAG6934142	KAG6934147.11-64 beta-defensin 1-like [<i>Chelydra serpentina</i>]	拟鳄龟
XP_006127561	XP_006127561.1 beta-defensin 8-like isoform X2 [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_006127561	XP_006127561.11-62 beta-defensin 8-like isoform X2 [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_006127561	XP_006127561.11-64 beta-defensin 8-like isoform X2 [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_023964254	XP_023964254.11-61 beta-defensin 5-like [<i>Chrysemys picta bellii</i>]	锦龟
XP_023964254	XP_023964254.11-62 beta-defensin 5-like [<i>Chrysemys picta bellii</i>]	锦龟
XP_023968966	XP_023968966.11-61 beta-defensin 4A-like [<i>Chrysemys picta bellii</i>]	锦龟
XP_023968966	XP_023968966.11-63 beta-defensin 4A-like [<i>Chrysemys picta bellii</i>]	锦龟
XP_025038922	XP_025038922.120-77 gallinacin-3-like [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_025042692	XP_025042692.1 beta-defensin 9-like [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_025042692	XP_025042692.11-60 beta-defensin 9-like [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_025042692	XP_025042692.11-64 beta-defensin 9-like [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	中华鳖
XP_026517292	XP_026517292.11-67 beta-defensin 1-like [<i>Terrapene carolina triunguis</i>]	三趾箱龟
XP_034619769	XP_034619769.11-61 beta-defensin 4A-like [<i>Trachemys scripta elegans</i>]	巴西红耳龟
XP_034619769	XP_034619769.11-63 beta-defensin 4A-like [<i>Trachemys scripta elegans</i>]	巴西红耳龟
XP_039384683	XP_039384683.11-60 beta-defensin 5-like [<i>Mauremys reevesii</i>]	乌龟
XP_039384683	XP_039384683.11-61 beta-defensin 5-like [<i>Mauremys reevesii</i>]	乌龟
XP_039388104	XP_039388104.11-79 beta-defensin 5-like [<i>Mauremys reevesii</i>]	乌龟

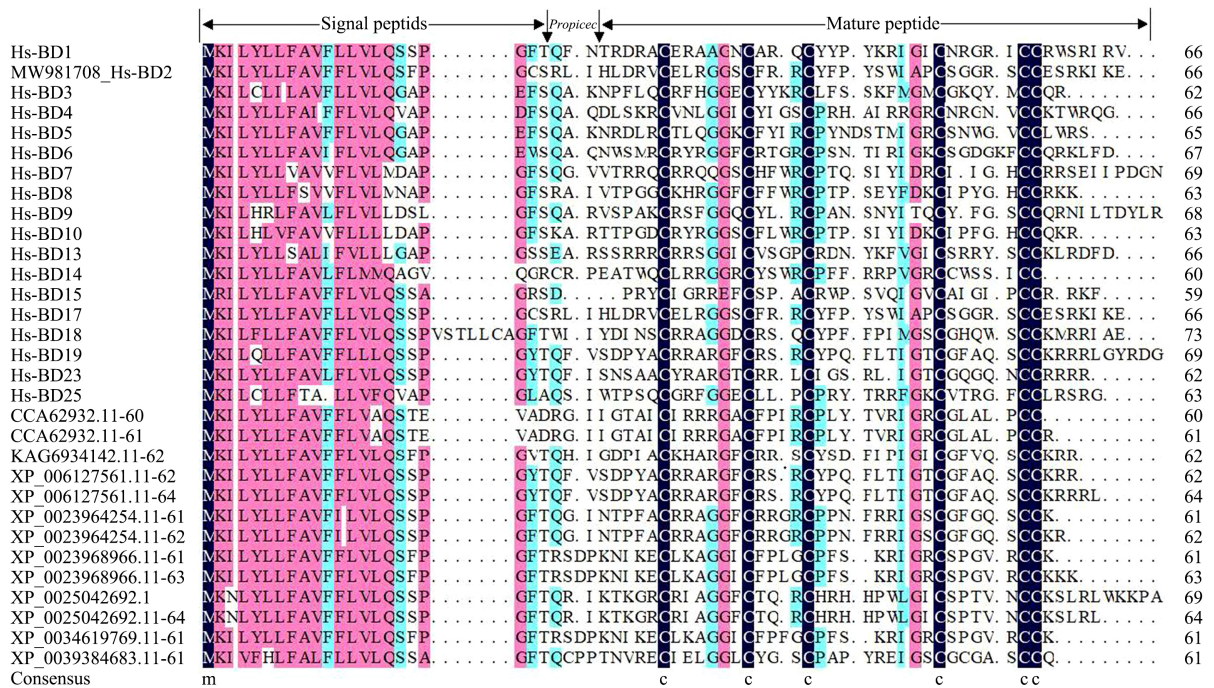


Figure 1. Amino acid sequence alignment between *Hs-BDs* and β -defensin in other turtles

图 1. *Hs-BDs* 与其他龟鳖类 β -防御素氨基酸序列比对

3.4. *Hs-BDs* 同源性比较和系统发育树

同源性比较结果, *Hs-BDs* 家族不同成员的推导氨基酸序列相互之间的同源性差异较大, 介于 11.9% (如 *Hs-BD15* 与 *Hs-BD25*)至 97.0% (如 *Hs-BD2* 与 *Hs-BD17*)之间, 推测同源性差异大的 *Hs-BDs* 成员可能在某些功能方面会有较大差异; *Hs-BD19* 与中华鳖 beta-defensin 8-like (XP_006127561.1)的同源性高达 97.9%, 推测这 2 基因的编码蛋白功能和生物活性可能会有较高的相似性。

通过 MEGA5 对龟鳖目 β -防御素家族成员的系统进化关系进行比较, 并构建系统进化树, 结果如图 2 所示, 可见这些龟鳖目 β -防御素家族成员可分成 2 大分支、4 个亚类(Class I-IV), 相同亚类的 β -防御素成员之间具有较高的相似性。在亚类 I 中, *Hs-BD15* 与中华鳖(XP_025038922)和角鳖 β -防御素(CCA62932.11-60)亲缘关系较近, 与中华鳖 Gallinacin-3-like (XP_025038922.120-77)同源性高达 99%。在亚类 II 中, *Hs-BD18*、*Hs-BD19* 与中华鳖(XP_006127561)和拟鳄龟(KAG6934142)的 β -防御素亲缘关系较近, *Hs-BD19* 与中华鳖 β -防御素 8 (XP_006127561、XP_006127561.11-62、XP_006127561.11-62)同源性均为 81%。在亚类 III 中, *Hs-BD1*、*Hs-BD2*、*Hs-BD13* 和 *Hs-BD17* 与中华鳖 β -防御素 9 (XP_025042692.1、XP_025042692.11-64、XP_025042692.11-64)亲缘关系较近。在亚类 IV 中, *Hs-BD3*、*Hs-BD5*、*Hs-BD4*、*Hs-BD6* 和三趾箱龟(XP_026517292.11-67)聚为一分支, *Hs-BD3*~*Hs-BD10*、*Hs-BD25* 和拟鳄龟(KAG6934147.11-64)聚为另一分支。

3.5. 部分 *Hs-BDs* 前体蛋白二级结构预测结果

参考系统进化树的分析结果, 从 4 个亚类中随机挑选 6 个家族成员 *Hs-BD2* (Class III)、*Hs-BD5* (Class IV)、*Hs-BD7* (Class IV)、*Hs-BD15* (Class I)、*Hs-BD18* (Class II)、*Hs-BD19* (Class II)进行二级结构预测(图 3)。可见, *Hs-BD2*、*Hs-BD5*、*Hs-BD7*、*Hs-BD15*、*Hs-BD18*、*Hs-BD19* 前体蛋白二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠片和无规则卷曲 3 种结果组成, 其中, α -螺旋结构占比分别为 31.82%、29.23%、22.78%、27.12%、

35.62%、17.02%； β -折叠片结构占比分别为 10.61%、20.00%、8.86%、18.64%、12.33%、9.57%。*Hs-BDs* 前体蛋白的 α -螺旋结构主要分布于多肽链的氨基端(N 端)，而 β -折叠片结构多分布于羧基端(C 端)。

3.6. 部分 *Hs-BDs* 成熟蛋白三级结构预测结果

部分 *Hs-BDs* 成熟蛋白三级结构预测结果如图 4 所示。*Hs-BD7* 和 *Hs-BD19* 成熟蛋白只含有 β -折叠片和无规则卷曲 2 种结构，*Hs-BD2*、*Hs-BD5*、*Hs-BD15* 和 *Hs-BD18* 的成熟蛋白则具有 α -螺旋、 β -折叠片和无规则卷曲结构 3 种结构。除 *Hs-BD7* 成熟肽区三级结构不含 α -螺旋结构、与二级结构预测结果稍有不同之外，其余 5 个基因家族成员的二级和三级结构预测结果相符。6 个被测的 *Hs-BDs* 成熟蛋白均具有反向平行的 β -折叠片结构，6 个保守的半胱氨酸残基均以 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 的方式连接形成 3 个分子内二硫键，进一步证明 *Hs-BDs* 属于 β -防御素家族。

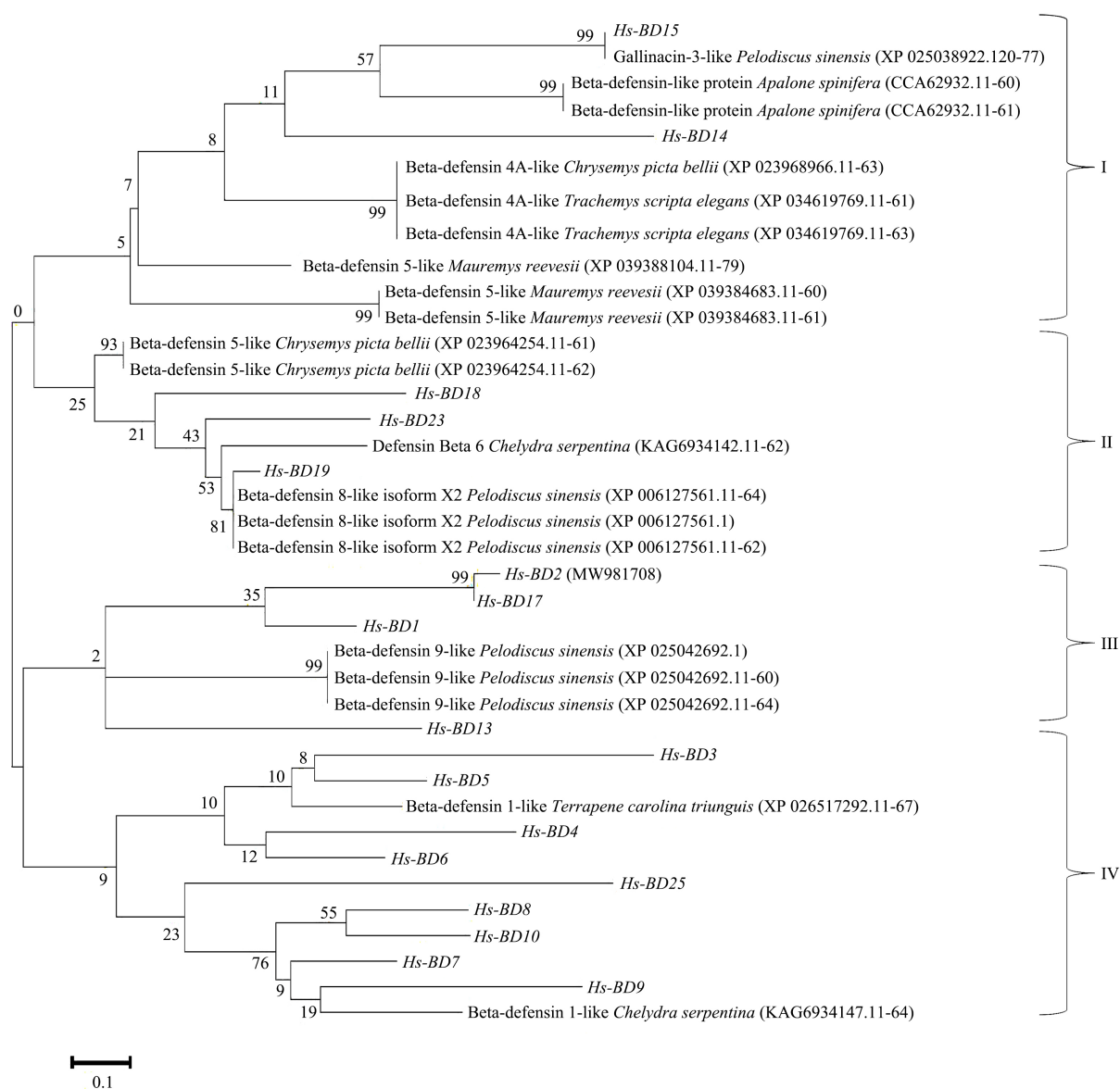


Figure 2. Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *Hs-BDs*

图 2. 基于 *Hs-BDs* 氨基酸序列构建系统发育树

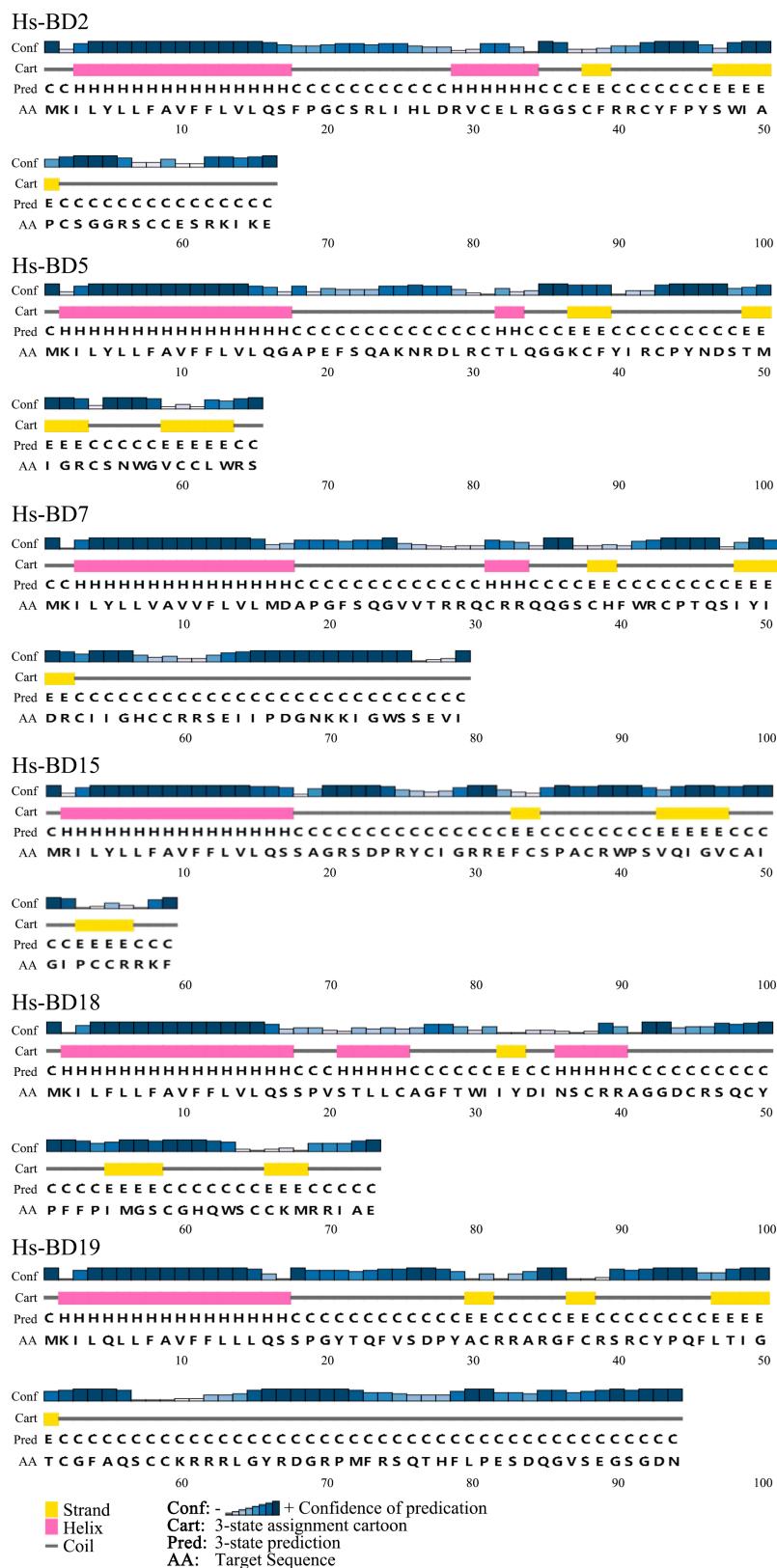
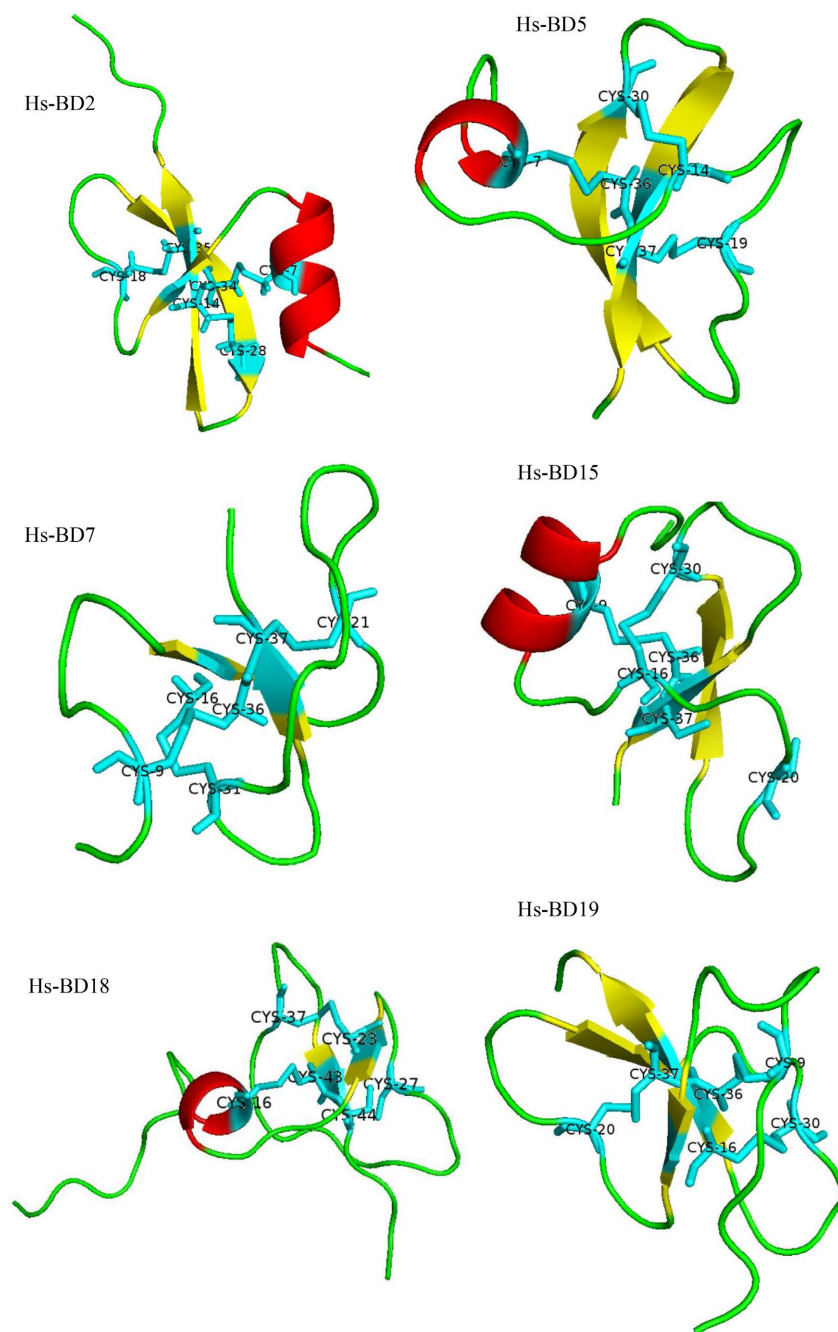


Figure 3. Prediction of secondary structure of some *Hs-BDs* preprotein
图 3. 部分 *Hs-BDs* 前体蛋白二级结构预测



注：红色标记 α -螺旋结构，黄色标记 β -折叠片结构，绿色标记不规则卷曲结构，天蓝色标记二硫键结构。

Figure 4. Tertiary structure prediction of some *Hs-BDs* mature proteins

图 4. 部分 *Hs-BDs* 成熟蛋白三级结构预测

4. 讨论

已有文献表明， β -防御素是研究最深入、广泛的一类防御素[22]，不同生物的 β -防御素编码氨基酸的数量各不相同，如人的 β -防御素编码氨基酸数量为 36~65 个、中华鳖 36~94 个、马鹿 64 个、绵羊 35~50 个、小鼠 38~42 个[23]、鱼类 39~45 个，它们的共同特点是具有 6 个高度保守的半胱氨酸残基[24]。本文

经 PCR 验证后, 获得 18 个黄沙鳖 β -防御素基因, 其编码氨基酸的数目在 59~73 个之间, 相对分子质量平均值为 7698.22 Da, 等电点平均值为 9.5, 净电荷量平均值为 7.1, 经过序列比对分析后确定这些 *Hs-BDs* 均具有由高度保守的半胱氨酸残基组成的结构(C-X₆-C-X₃₋₄-C-X₆₋₈-C-X₄₋₆-CC-X₀₋₁₀), 与前人的研究结果相似。已报道的黄沙鳖 β -防御素 *Hs-BD1* [14]为亲水性蛋白, 本研究中不仅发现了另外几种 β -防御素亲水性蛋白, 还发现了一些 β -防御素疏水性蛋白, 如 *Hs-BD2*、*Hs-BD7* 和 *Hs-BD23* 等均为疏水性蛋白; *Hs-BD1* 的成熟肽由 41 个氨基酸组成, 本研究中黄沙鳖 *Hs-BDs* 成熟肽氨基酸最少有 35 个(*Hs-BD14*), 最多有 44 个(*Hs-BD7*)。可以预测本研究中新获得的 *Hs-BDs* 可能在某些蛋白活性方面与 *Hs-BD1* 不同, 需要更进一步后续验证。

通过分析不同龟鳖目 β -防御素氨基酸序列的相似性和进化关系, 可以看出相同亚类的 *Hs-BDs* 其相互之间相似性较高, 来自不同亚类的 *Hs-BDs* 其相互之间的相似性较低, 如同为亚类 III 的 *Hs-BD2* 与 *Hs-BD17* 其氨基酸序列的同源性达 97.0%, 但来自亚类 I 的 *Hs-BD15* 与亚类 IV 的 *Hs-BD25* 其氨基酸序列的同源性仅为 11.9%。推测不同的 β -防御素成员在生理作用上可能具有一定的差异性。

Hs-BDs 家族成员基本理化性质预测结果显示, *Hs-BDs* 都是含有正电荷的阳离子短肽, 有研究表明, β -防御素多肽净正电荷量越高, 其抗菌活性越强, 对盐离子的耐受能力亦越强, 在一定范围内成正比。带正电荷的 β -防御素分子或其多聚体可与细菌质膜上带负电荷的磷脂头部和水分子相互作用, 显著地增加生物膜的通透性[25], 可以起到破坏细胞膜的化学作用, 这也是 β -防御素具有抑菌活性的一个重要原理, 推测本文获得的 *Hs-BDs* 均具一定的抑菌活性。

蛋白二级结构预测结果表明被测的 *Hs-BDs* 家族成员均具有 β -防御素的典型二级结构, 即包括 α -螺旋, β -折叠片和无规则卷曲。 α -螺旋和 β -折叠片结构具有一定的刚性, 一起构成 β -防御素整体构象的基本骨架, 对于一些蛋白质的整体构象起着支撑作用[26], *Hs-BD2*、*Hs-BD5*、*Hs-BD7* 和 *Hs-BD18* 前体蛋白的螺旋-无规则卷曲-螺旋结构特点对保持抗菌活性具有特殊的重要性[2]。 β -折叠片结构自身相互集聚, 构成稳定结构, 能保证多肽生物活性的稳定[27], 本文三级结构预测结果显示, 6 个被测的 *Hs-BDs* 成熟蛋白均具有反向平行的 β -折叠片结构, 这对维持 β -防御素结构的稳定性起重要作用。综上, *Hs-BDs* 多肽的空间结构的构成具有一定稳定性, 在保证自身结构稳定的同时, 也可以保证 β -防御素多肽发挥稳定的蛋白活性, 在生产上具有较高的应用潜力。

5. 结论

本文基于黄沙鳖转录组数据库和 PCR 验证, 共鉴定到 18 个具有完整蛋白编码区的 *Hs-BDs* 家族成员, 分属于 4 个亚类, 其理化性质、序列结构和蛋白结构各有异同。以本文提供的相关信息为基础, 后续通过转基因过表达或基因沉默等手段可以进一步探究这些基因在黄沙鳖抗病原以及参与机体的激素调节、免疫调节、降低炎症反应等过程中的作用机理, 亦可为黄沙鳖 β -防御素作为抗生素替代物的研发提供基础数据。

基金项目

广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA138167)、广西农业农村厅水产养殖病害测报项目(桂财预函[2019] 105 号)。

参考文献

- [1] 阮高伟. 动物防御素的研究进展[J]. 农业技术与装备, 2013(23): 71-73.
- [2] Sangeeta, K. and Yenugu, S. (2019) Male Reproductive Tract Antimicrobial Expression in the Extremes of Ages of Rats. *Gene*, **710**, 218-232. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.053>
- [3] Zhuang, C.J., Huo, H.J., Yang, N., et al. (2021) Characterization of Antibacterial Activities and the Related Mechan-

- isms of a β -Defensin in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **541**, Article ID: 736839. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736839>
- [4] 涂健, 李芳果, 李怡彤, 等. 稳定表达禽 β 防御素6的DF-1细胞系的建立及其抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 778-786.
- [5] 李怡彤, 耿姝, 殷冬冬, 等. 禽 β -防御素6和9基因的克隆、表达及活性分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(6): 996-1003.
- [6] 黄梦阳, 李杨, 张林云, 等. 瓢鸡3个防御素基因(*AvBD4*、*AvBD5*、*AvBD14*)的Bi-PASA分子标记与沙门菌易感性的相关性研究[J]. 中国家禽, 2019, 41(19): 10-15.
- [7] Wang, M.Z., Zeng, W.X., Zang, Z.G., et al. (2020) The Improvement of Immune Effect of Recombinant Human Beta-Defensin 2 on Hepatitis B Vaccine in Mice. *Viral Immunology*, **34**, 96-111. <https://doi.org/10.1089/vim.2020.0052>
- [8] Masuda, N., Mantani, Y., Yuasa, H., et al. (2018) Immunohistochemical Study on the Distribution of β -Defensin 1 and β -Defensin 2 throughout the Respiratory Tract of Healthy Rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, **80**, 395-404. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0686>
- [9] Kim, J., Yang, Y.L. and Jang, Y.-S. (2019) Human β -Defensin 2 Is Involved in CCR2-Mediated Nod2 Signal Transduction, Leading to Activation of the Innate Immune Response in Macrophages. *Immunobiology*, **224**, 502-510. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.004>
- [10] Zhang, L.Q. (2020) Disulfide Bonds Affect the Binding Sites of Human β Defensin Type 3 on Negatively Charged Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, **124**, 2088-2100. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10529>
- [11] 付蓝宝, 于嘉林, 刘伟华. 防御素的生物学特性及其抗病基因工程[J]. 遗传, 2011, 33(5): 512-519.
- [12] Benato, F., Dalla Valle, L., Skobo, T., et al. (2013) Biomolecular Identification of Beta-Defensin-Like Peptides from the Skin of the Soft-Shell Turtle *Apalone spinifera*. *Journal of Experimental Zoology. Molecular and Developmental Evolution*, **320**, 210-217. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22495>
- [13] 刘雪莲. 爬行纲 β -defensin基因多态性分析及基于真核表达的生物学功能验证[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连理工大学, 2017.
- [14] 许飘尹, 杨廷雅, 胡大胜, 等. 黄沙鳖 β -防御素基因克隆及其表达分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2269-2277.
- [15] 滕忠作, 叶香尘, 张盛. 黄沙鳖高密度健康养殖技术[J]. 农村百事通, 2018(11): 35-36.
- [16] 滕忠作, 叶香尘, 张盛, 等. 黄沙鳖高密度健康培育技术试验[J]. 科学养鱼, 2017(12): 41-42.
- [17] Li, A.C. and Peng, X.B. (2021) Comparison of the Force Fields on Monomeric and Fibrillar PHF6 of Tau Protein. *Biophysical Chemistry*, **277**, Article ID: 106631. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106631>
- [18] 刘杰, 黄艳华, 黄钧, 等. 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 698-706.
- [19] Fu, J.P., Chen, S.N., Zhao, X., et al. (2018) Identification and Characterization of the Interferon- γ -Inducible Lysosomal Thiol Reductase Gene in Chinese Soft-Shell Turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **90**, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.019>
- [20] 魏薇, 李海军, 王鑫, 等. 家畜防御素体内组织表达及体外表达研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(4): 52-57.
- [21] Natsumi, M., Youhei, M., Hideto, Y., et al. (2018) Immunohistochemical Study on the Distribution of β -defensin 1 and β -defensin 2 throughout the Respiratory Tract of Healthy Rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **80**, 395-404. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0686>
- [22] Chao, H., Yang, X., Jing, H., et al. (2019) Porcine Beta-Defensin 2 Provides Protection against Bacterial Infection by a Direct Bactericidal Activity and Alleviates Inflammation via Interference with the TLR4/NF- κ B Pathway. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article No. 2289. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01673>
- [23] 阮高伟. 动物防御素的研究进展[J]. 农业技术与装备, 2013(23): 71-73.
- [24] Victoria Gomez, M., Margarita, R., Philipp, N., et al. (2021) Insights into the Micelle-Induced β -Hairpin-to- α -Helix Transition of a LytA-Derived Peptide by Photo-CIDNP Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 6666. <https://doi.org/10.3390/ijms22136666>
- [25] 郑云峰. 抗菌肽的作用机理、生物学作用及其在畜牧中的应用研究[J]. 饲料与畜牧, 2012(5): 24-26.
- [26] Zhang, H.H. and Wong, E.A. (2019) Expression of Avian β -Defensin mRNA in the Chicken Yolk Sac. *Developmental and Comparative Immunology*, **95**, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.02.006>
- [27] Moura, T.A., Junior, R.L.R. and Rocha, M.S. (2021) Caffeine Modulates the Intercalation of Drugs on DNA: A Study at the Single Molecule Level. *Biophysical Chemistry*, **277**, Article ID: 106653. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106653>