

尼羅吳郭魚抗菌胜肽 β -防禦素之基因選殖與分子特性研究

陳力豪·胡鄴方·朱惠真·吳嘉哲·張錦宜*

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘 要

本研究利用表現序列標誌 (EST) 篩選法自尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 選殖到一個屬於 β -防禦素的抗菌胜肽基因，並命名為 OnBD 基因。完整的 OnBD 基因可轉譯出由 66 個胺基酸組成的 prepeptide，此 prepeptide 又可分為兩個功能單位：N-端的 24 個胺基酸組成訊息胜肽，C-端的 42 個胺基酸則為成熟的 OnBD 抗菌胜肽。OnBD 抗菌胜肽的分子組成具有魚類 β -防禦素的家族特徵，其中包含會影響分子構型的 6 個半胱胺酸，此外，OnBD 為同時具有親水端與疏水端的兩性分子，帶正電 (淨電荷為+3)，不超過 100 個胺基酸序列，這些分子特徵均與抗菌胜肽相符。本研究以即時定量 RT-PCR 方法，分析尼羅吳郭魚 OnBD 之基因表現組織分布，在各組織 (包括血液、鰓、頭腎、腸道、肝、肌肉、皮膚及脾臟) 均可檢測到 OnBD 所表現的 mRNA，其中又以皮膚的表現程度最高。而化學合成的 OnBD 胜肽則用來針對 8 種常見水產病原菌進行最小抑制濃度 (MIC) 的測定，結果顯示 OnBD 對吳郭魚主要的病原菌 *Edwardsiella tarda* 及 *Streptococcus iniae* 均有較佳之抑制活性 (其 MIC 可達 4 μ M)。綜合以上分子特性與生理活性，可推斷抗菌胜肽 OnBD 在尼羅吳郭魚的先天免疫系統中扮演重要的功能，並後續研究將可應用於水產細菌性疾病的防治。

關鍵詞： β -防禦素、抗菌胜肽、尼羅吳郭魚、分子選殖、先天免疫

前 言

多細胞生物所處的環境充斥著各式各樣的病原菌，所以必須發展出一套具廣效性且能夠立即反應的防禦機制，才能在長期演化的戰爭中存活至今，抗菌胜肽 (antimicrobial peptide, AMP) 即是多細胞生物據以對抗微生物的重要防線之一 (Malmsten, 2014)。抗菌胜肽由 5 ~ 100 個胺基酸組成 (Parachin and Franco, 2014)，一般均為帶正電的兩性分子 (同時具有疏水性與親水性)，在過去的 30 年內，已有超過 2300 種抗菌胜肽被發表並收錄於 AMP database 中 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)。

抗菌胜肽可根據其二級結構及胺基酸組成概

分為四大類型 (Hancock, 2001)：Class 1 為帶有特殊重複胺基酸的線型 α -螺旋分子；Class 2 為不具有半胱胺酸 (cysteine) 組成的線型分子；Class 3 為具有 1 對半胱胺酸，可形成 1 個分子內雙硫鍵 (intramolecular disulfide bond) 的胜肽；Class 4 為具有 2 對以上分子內雙硫鍵的胜肽。許多屬於 Class 4 的抗菌胜肽，因具有多個分子內雙硫鍵，二級結構穩定，在演化過程中保留了共通的分子特徵 (molecular signature)，而形成跨物種的抗菌胜肽家族 (AMP family)；防禦素 (defensin) 即是其中一個備受學者矚目的重要家族 (Semple and Dorin, 2012)。防禦素由 18 ~ 45 個胺基酸組成，帶有 +1 ~ +11 正電荷，主要分子特徵為具有 6 個半胱胺酸，可形成 3 對分子內雙硫鍵。防禦素的物種分布極廣，從植物 (Vriens *et al.*, 2014)、無脊椎動物 (Zoysa *et al.*, 2010) 到哺乳類動物 (Selsted and Ouellette, 2005)，均可分離到其家族成員。魚類防禦素的相關研究始自 2007 年 (Zou *et al.*,

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2462-2101
轉 2801; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: cichang@mail.tfrin.gov.tw

2007)，至今已有斑馬魚 (Zou *et al.*, 2007)、河豚 (Zou *et al.*, 2007)、虹鱒 (Falco *et al.*, 2008)、日本稻田魚 (Zhao *et al.*, 2009)、比目魚 (Nam *et al.*, 2010)、鯉魚 (Marel *et al.*, 2012)、點帶石斑 (Guo *et al.*, 2012) 及鱖魚 (Wang *et al.*, 2012) 等魚種的防禦素陸續被選殖出來，並登錄於 Genbank 資料庫中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)；然而，吳郭魚為全球舉足輕重之養殖經濟魚種，其免疫相關的研究文獻眾多 (Huang *et al.*, 2013)，但多數學者針對吳郭魚的抗菌肽研究，均聚焦於其他的抗菌肽家族，如 piscidin (Peng *et al.*, 2012) 和 hepcidin (Chang *et al.*, 2013) 等，至今尚無吳郭魚防禦素家族成員公開發表的研究報告。

表現序列標誌 (expressed sequence tag, EST) 資料庫係由數以千萬計、大小約 500 ~ 800 bp 的 cDNA 片段序列所組成，近年來，許多魚類 EST 被收錄在公開的基因資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) 中，研究者因此能以更省時有效的方法選殖出目標物種的特定基因 (Falco *et al.*, 2008)。本研究即採用 EST 基因選殖策略，先蒐集已發表之魚類防禦素基因序列，包括虹鱒 (Genbank accession no. NP001117906)、斑馬魚 (Genbank accession no. NP001075022)、河豚 (Genbank accession no. CAJ57646)、日本稻田魚 (Genbank accession no. EU676010)、比目魚 (Genbank accession no. GQ414989) 及點帶石斑 (Genbank accession no. JN698964) 等，與尼羅吳郭魚 EST 基因庫進行比對後，篩選出一條未定義且不完整的基因片段 (Genbank accession no. XR_269520)，經初步分析其轉譯之胺基酸序列，確認其具 β -防禦素的分子架構，依其基因序列，設計出適合選殖尼羅吳郭魚防禦素完整基因的引子對，以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 完成基因選殖。

本研究除完整選殖出尼羅吳郭魚 β -防禦素 (*Oreochromis niloticus* β -defensin; OnBD) 基因，並進行其序列結構、分子特性、組織分布、基因表現及系統演化之分析外，亦依其胺基酸序列進行化學合成，最後以化學合成肽實際驗證其對水產常見病原菌之抗菌活性。

材料與方法

一、試驗用魚及微生物

本研究使用本所繁養殖的尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 為基因選殖物種，隨機選取體重約 100 g 的魚蓄養於循環水系統中，每日投以人工飼料，組織採樣前 1 日停止餵食。抗菌活性分析之供試菌株則選用 8 株水產常見病原菌，均購自 American Type Culture Collection (ATCC)，包括 5 株革蘭氏陰性菌：*Aeromonas hydrophila* ATCC7966、*Edwardsiella tarda* ATCC15947、*Vibrio alginolyticus* ATCC17749、*V. parahaemolyticus* ATCC27969、*V. harveyi* ATCC14126 及 3 株革蘭氏陽性菌：*Streptococcus iniae* ATCC29178、*S. epidermidis* ATCC12228、*Lactococcus garvieae* MT2055 (自 FRS Marine Laboratory, UK 取得)。 *A. hydrophila*、*E. tarda*、*S. iniae*、*S. epidermidis* 及 *L. garvieae* 以 Tryptic Soy Agar (以下簡稱 TSA; BD, Sparks, MD, USA) 培養，*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* 及 *V. harveyi* 以 Marine Agar 2216 (以下簡稱 MA; BD, Sparks, MD, USA) 培養，培養溫度均為 28 °C。

二、尼羅吳郭魚體基因 DNA、總 RNA 之萃取與 cDNA 之製備

尼羅吳郭魚之體基因 DNA (採自背鰭組織) 係以商業套組 DNeasy[®] Blood & Tissue kit (Qiagen, USA) 進行萃取。不同組織 (包括血液、鰓、頭腎、腸道、肝、肌肉、皮膚、脾等) 的總 RNA 則是以 Trizol[®] (Invitrogen, USA) method 萃取，初純化的 total RNA 經分光光度計確認其 A260 : A280 > 1.8 後，再以 M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus Point Mutant kit (Invitrogen, USA) 進行 RT-PCR，製備成 cDNA，定量後於 -20 °C 備用。

三、尼羅吳郭魚抗菌肽 OnBD 之體基因選殖

取前述尼羅吳郭魚體基因 DNA 樣本，以去離子水將濃度調整為 0.25 mg/ml，以專一性引子對 OnBD_F14/OnBD_R5 進行 OnBD 體基因的 PCR

Table 1 Primers used for cloning and sequencing of the OnBD gene in Nile tilapia

Name	Sequence (5' → 3')
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCAGCGTGGT
BA_801F	TCCACCGCAAGTGCTCTAA
BA_885R	GTTGTTTTGCACAGAGCTGAAGTT
GR5P	CGACUGGAGCACGAGGACACUGA
GR5NP	GGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA
GR3P	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
GR3NP	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
GeneRacer™ Oligo dT	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₄
OnBD_18F	GGTTGTTTTGGCACTTTTGGTT
OnBD_135R	TGTTGGGAGGCAAACCTTTCT
OnBD_F5	CCGTGGTCATGCCTCAGTCTAAGTG
OnBD_F14	GTTATCGTGTGGTTGTTTTGGCACTT
OnBD_R4	UCCCACAGCCCAGAGGUCCA
OnBD_R5	AGTGCTTTCTGTTTGCCTCATCCTC
OnBD_R6	CUACAUACUCCACUUAGACUGAGGC
OnBD_R21	TCTGTCTGTTTCAGTCAGAACG
OnBD_R22	TCAGAACGGAGCAGAGGAC
M13F	TGTA AACGGCCAGT
M13R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

擴增。OnBD 體基因的核心片段選殖成功後，再以 GenomeWalker™ kit (Clontech, USA) 搭配一次 PCR 引子對 AP1/OnBD_R21，與二次 PCR 引子對 AP2/ OnBD_R22 選殖出 OnBD 完整基因。PCR 反應體積為 50 μ l，包括：0.5 μ l *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l, Promega, USA)、2 μ l 之 10 mM dNTP 混合液、2 μ l 之前置引子 (forward primer)、2 μ l 之反置引子 (reverse primer)、2 μ l 尼羅吳郭魚體基因 DNA、5 μ l 之 10 \times PCR 緩衝液、10 μ l 之 10 mM MgCl₂ 及 26.5 μ l 之去離子水。反應條件為 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘；再進行 94 $^{\circ}$ C 2 分鐘、55 $^{\circ}$ C 1 分鐘 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，共進行 35 個循環；最後以 72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘。PCR 產物以 QIA quick PCR 純化套組 (Qiagen, USA) 純化後，連接到 pGEM-T easy 載體 (Promega, USA) 並轉形到 *E. coli*，再以 M-13F 及 M-13R (如 Table 1) 為引子進行分子選殖，然後隨機篩選 3 個插入片段大小與 PCR 產物相仿的質體進行 DNA 定序。

四、尼羅吳郭魚抗菌肽 OnBD 之完整 cDNA 選殖

取前述尼羅吳郭魚 cDNA 樣本，以蒸餾水將濃度調整為 0.25 mg/ml，再以專一性引子對 OnBD_F14/OnBD_R5 進行 OnBD cDNA 的 PCR 擴增。OnBD 的 5' 端完整 cDNA 序列選殖，係以 GeneRacer kit™ (Invitrogen, USA) 重新製備去除 5' 端多餘序列的 mRNA (truncated mRNA)，並在轉錄起始點接上一段已知的改編序列 (adaptor)，反轉錄成 RACE-ready cDNA，搭配一次 PCR 引子對 GR5P/OnBD_R4，與二次 PCR 引子對 GR5NP/OnBD_R6 進行 5' RACE PCR 擴增。OnBD 的 3' 端完整 cDNA 序列選殖，則以 GeneRacer kit™ (Invitrogen, USA) 所附的 GeneRacer™ Oligo dT primer 及反轉錄酶 SuperScript™ III RT，在反轉錄時於 poly-A 的 3' 端接上一段已知的改編序列，反轉錄成 RACE-ready

cDNA，搭配一次 PCR 引子對 OnBD_F14/GR3P，與二次 PCR 引子對 OnBD_F5/GR3NP，進行 3' RACE PCR 擴增。比對上述三段 PCR 序列的重複片段則可選殖出 OnBD 全長 cDNA。

五、尼羅吳郭魚抗菌胜肽 OnBD 之基因表現分析

將前述取自尼羅吳郭魚各組織之 cDNA，以即時定量 RT-PCR 方法，分析正常情形下尼羅吳郭魚 OnBD 抗菌胜肽之基因表現組織分布。PCR 反應體積為 20 μ l，包括：10 μ l Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems, USA)、0.4 μ l 之前置引子、0.4 μ l 之反置引子、1 μ l 尼羅吳郭魚 cDNA 及 8.2 μ l 之去離子水。反應條件分別為：恆溫階段 (holding stage)：50 $^{\circ}$ C 20 秒進行 DNA 預變性；循環階段 (cycling stage)：進行 95 $^{\circ}$ C 1 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒共 40 個循環以擴增 DNA；溶解曲線階段 (melt curve stage)：進行 95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、95 $^{\circ}$ C 15 秒生成解離曲線。採三重覆試驗，各實驗組得到之循環閾值數 (cycle threshold value, C_T value)，先經過各組織樣本之 β -actin 表現量標準化後，再進行 OnBD 基因表現量分析。尼羅吳郭魚 OnBD 即時定量 PCR 使用的專一性引子為 OnBD_18F 及 OnBD_135R， β -actin 即時定量 PCR 使用的專一性引子為 BA_801F 及 BA_885R。

六、尼羅吳郭魚抗菌胜肽 OnBD 之合成與抗菌能力評估

根據選殖出之抗菌胜肽 OnBD 基因，推算其胺基酸序列，分析主要抗菌活性區域 (antimicrobial domain) 之後，以固相肽合成法 (9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis) 合成出 OnBD 抗菌胜肽，再以逆相高效液相層析法 (reverse phase high performance liquid chromatography) 將化學合成之 OnBD 抗菌胜肽純化至純度 90% 以上，提供後續試驗使用。

OnBD 抗菌能力的分析採用美國臨床實驗室標準研究所 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 於 2012 年公告之最小抑制濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 測定方

法，並依 Chang *et al.* (2006) 的研究，略加修改如下：抗菌胜肽以緩衝液 (含 0.2% bovine serum albumin 及 0.01% acetic acid) 調配成 2 倍連續稀釋液，逐一添加 8 μ l 在 96 孔培養盤的孔槽中；另將培養至對數期的供試菌株以 Mueller Hinton Broth (以下簡稱 MHB；BD, Sparks, MD, USA) 調整成濃度為 10⁵ CFU/ml 的細菌懸浮液，亦逐一添加 20 μ l 菌液在前述 96 孔培養盤的孔槽中，於 22 $^{\circ}$ C 培養 48 小時，最後以波長 600 nm 測定其 OD 值 (optical density value)。若試驗組細菌懸浮液測得之 OD 值小於對照組 (無添加抗菌胜肽組) 的 1/2，即判定為具抑菌活性，依此方法測定抗菌胜肽 OnBD 對不同菌株的最小抑制濃度。

七、生物資訊分析

引用自基因資料庫 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 之 27 種脊椎動物，包括綠頭鴨 (*Anas platyrhynchos*)、鴻雁 (*Anser cygnoides*)、狗 (*Canis lupus familiaris*)、山羊 (*Capra hircus*)、梅花鹿 (*Cervus nippon*)、野鴿 (*Columba livia*)、鸚鵡 (*Coturnix coturnix*)、鯉魚 (*Cyprinus carpio*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、點帶石斑 (*Epinephelus coioides*)、驢 (*Equus asinus*)、雞 (*Gallus gallus*)、人類 (*Homo sapiens*)、獼猴 (*Macaca mulatta*)、家鼠 (*Mus musculus*)、虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*)、日本稻田魚 (*Oryzias latipes*)、綿羊 (*Ovis aries*)、猩猩 (*Pan troglodytes troglodytes*)、東非狒狒 (*Papio anubis*)、比目魚 (*Paralichthys olivaceus*)、馴鹿 (*Rangifer tarandus*)、褐鼠 (*Rattus norvegicus*)、鱖魚 (*Siniperca chuatsi*)、野豬 (*Sus scrofa*)、河豚 (*Takifugu rubripes*) 及樹鼩 (*Tupaia belangeri*) 等，併同本研究選殖出的尼羅吳郭魚防禦素胺基酸序列，先以 CLUSTAL W 軟體 (Thompson *et al.*, 1994) 進行多重序列比對，再以 Mega version 5 軟體 (<http://www.megasoftware.net/>) 選擇鄰接法 (Neighbor-joining Method)，並執行 1,000 次 bootstrap test，進行基因類源分析 (Saitou and Nei, 1987)。尼羅吳郭魚 OnBD 轉譯之完整胺基酸序列，N-端訊息胜肽 (signal peptide) 及 C-端成熟抗菌胜肽 (mature peptide)，係以 SignalP 4.0

```

+1  ggggttcgcattgtgtcctctgctccgttctgactgaaacagacagatccacatcaaacc
                                     (Exon1)
+61  ctgatttctggagcaaaactgagagacgcgagaATGTTTTGTTATCGTGTGGTTGTTTTG
                                     M F C Y R V V V L    9
+121 GCACTTTTGG TTGTCTTACT GCTAAATGgt aagtacctctgcagattttttctgcccag
      A L L V V L L L N    18
+181 tctatgacca agaggattg aagtttttca agcttaaagc aaaaggattt tacctaaaac
                                     (Exon2)
+241 tacagtaaat ttttttg ttt cttttttttc taaattacag TTGCTCAAAA TGAGGCTGCA
                                     V A Q N E A ↑ A    25
                                     signal peptidase
+301 TCCTTCCCGT GGTCATGCCT CAGTCTAAGT GGAGTATGTA GAAAGGTTTG CCTCCCAACA
      S F P W S C L S L S G V C R K V C L P T    45
+361 GAGTTGTTCT TTGGACCTCTGGGCTGTGGG AAAGGCTCCC Tgta agtgta atgttcatat
      E L F F G P L G C G K G S L    59
+421 gcagcatgtg agtacaccagt gtatatgta tagttgctaa tacacattttttcaatgtta
                                     (Exon 3)
+481 ttcttagGTG TTGCGTGTCT CACTTTCTAT GAggagagca tgtctggact gaagtcagag
      C C V S H F L -    66
+541 ataccagatg acctaccaag cctgacagag gatgaggcaa acagaaagca ctgttggtgga
+601 gggttgaatt tagcattcta acactatgta acatggcaga ctttgtaata ttaaattaac
+661 gtcttgtgtt aacttgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Nile tilapia OnBD. Numbering is on the left for nucleotides and on the right for amino acids. Exons are shown in uppercase, introns are shown in lowercase. The predicted translation of exon-coding regions is given. The putative cleavage site for the signal peptidase is indicated, and the signal peptide is underlined. Features in bold represent the start/stop codons.

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 軟體分析而得。OnBD 分子構型的電腦模擬分析，則以美國密西根大學計算醫學與生物資訊學系 (Department of Computational Medicine and Bioinformatics) 及生物化學系 (Department of Biological Chemistry) 兩系所成立之線上蛋白質三維結構模擬網站 I-TASSER ONLINE (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 進行分析，提供序列資訊後系統會以蛋白質資料庫 RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) 中已登載的蛋白質結構為基礎模組，進行 OnBD 之分子構型模擬，並提供多個帶有評估分數 C-score 的模擬結果，其中該值越接近 2 (即越大) 則可信度越高，因此可藉由 RCSB PDB 模擬結果選取基礎模板之蛋白質序列組成及摺疊樣態，預測 OnBD 之分子構型及其可能的功能。

結 果

一、尼羅吳郭魚抗菌胜肽基因 OnBD 序列

以引子對 OnBD_F14/OnBD_R5 可以自尼羅吳郭魚的體基因 DNA 擴增出 492 bp 大小的 PCR 產物，也可以自尼羅吳郭魚皮膚的 cDNA 樣本擴增出 274 bp 大小的 PCR 產物，此即為 OnBD 基因的核心序列。以核心序列為基礎，再經過 Genome Walker PCR 與 RACE PCR 的交叉比對，選殖出完整的 OnBD 基因 (如 Fig.1)。OnBD 基因全長 697 bp，具有 3 個可轉錄序列 (exon)，完整 cDNA 全長 201 bp，可轉譯出 66 個胺基酸 (NH₃-MFCYRVVVLLALLVLLLNVAQNEAASFPSCLSLSGVCRKVCLPTELFPGPLGCGKGSLLCCVSHFL-COOH)。其中 N-端 24 個胺基酸組成訊號序列 (signal peptide)，C-

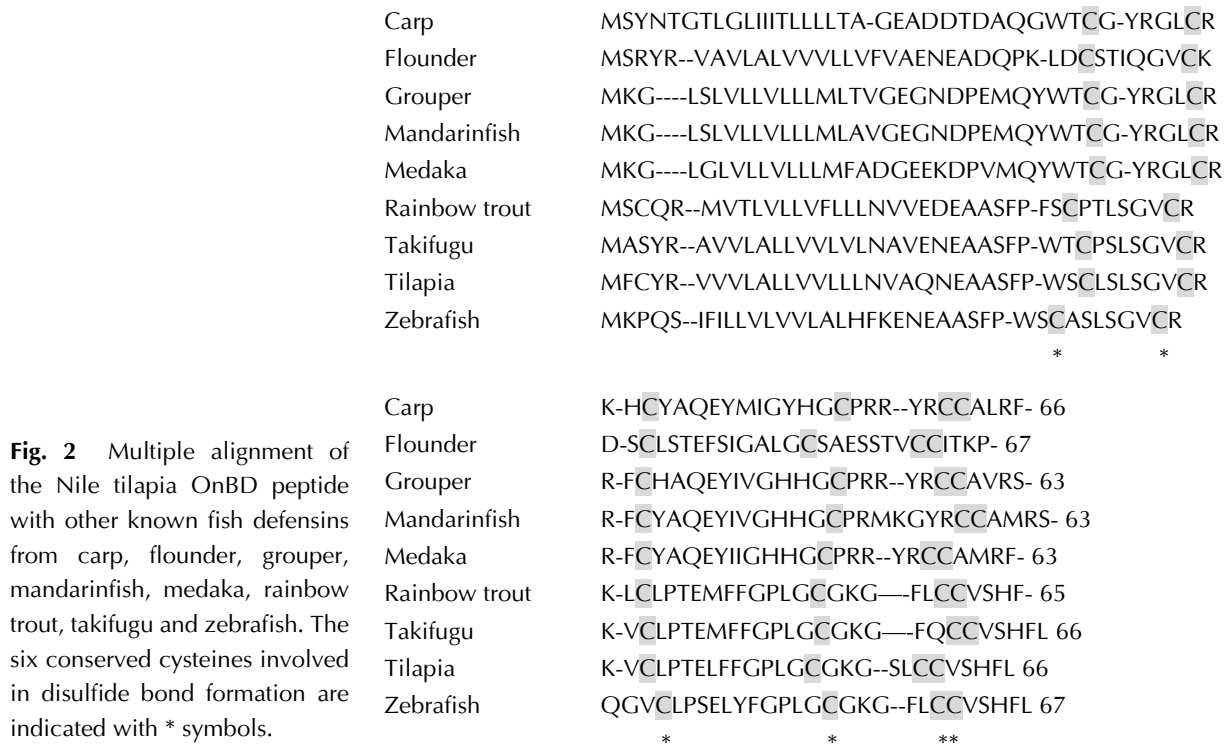


Fig. 2 Multiple alignment of the Nile tilapia OnBD peptide with other known fish defensins from carp, flounder, grouper, mandarinfish, medaka, rainbow trout, takifugu and zebrafish. The six conserved cysteines involved in disulfide bond formation are indicated with * symbols.

端 42 個胺基酸組成具抗菌活性的成熟序列 (mature peptide)。

尼羅吳郭魚 OnBD 成熟序列的胺基酸組成與目前研究發表之魚類 defensin 抗菌胜肽 (包括鯉魚、比目魚、點帶石斑、鱸魚、日本稻田魚、虹鱒、河豚及斑馬魚等), 均具有相似的基因結構 (如 Fig. 2), 特別是會影響蛋白質分子構型的 6 個半胱胺酸 (cysteine), Cys³¹, Cys³⁸, Cys⁴², Cys⁵⁴, Cys⁶⁰ 及 Cys⁶¹, 其所形成的 3 對分子內雙硫鍵 (disulfide bond) 均位於同樣的相對位置上, 符合魚類防禦素家族特徵 (family signature), C¹-[X₅₋₆]-C²-[X₃₋₄]-C³-[X₁₁]-C⁴-[X₅₋₇]-C⁵-C⁶, 因此可證明尼羅吳郭魚 OnBD 確為防禦素家族成員之一。

根據鄰接法的演化類源分析, 9 種魚類 (河豚、虹鱒、斑馬魚、比目魚、日本稻田魚、點帶石斑、鯉魚、鱸魚及尼羅吳郭魚等) 之防禦素胺基酸序列在演化樹上關係密切, 歸屬於同一類群 (如 Fig. 3)。與尼羅吳郭魚 OnBD 基因位於同一個演化分枝 (clade) 上的魚類有河豚、虹鱒、斑馬魚及比目魚等, 其中以河豚 defensin 之基因序列與 OnBD 相似度最高達 82%, 而日本稻田魚、點帶石斑、鯉魚及鱸魚等之 defensin 基因位於另一個演化分枝上, 其中以點帶石斑 defensin 之基因序列與

OnBD 相似度最低僅 69%。

二、OnBD 基因在尼羅吳郭魚各組織之表現分布

利用即時定量 RT-PCR 自正常健康之尼羅吳郭魚各組織 (包括血液、鰓、頭腎、腸道、肝、肌肉、皮膚、脾等) 均可檢測到 OnBD 基因持續表現 (constitutive expression)。但是 OnBD 的 mRNA 在尼羅吳郭魚各組織之表現差異很大 (如 Fig. 4), 相對表現量最高的組織是皮膚, 其次是脾臟與頭腎, 而肌肉與血液的相對表現量較低。

三、OnBD 抗菌胜肽的分子特性

經電腦分析 OnBD 胜肽的 66 個胺基酸序列組成, 其中 N-端 24 個胺基酸的訊號序列 (signal peptide), C-端 42 個胺基酸組成抗菌序列 (antimicrobial peptide)。成熟的抗菌胜肽序列分子量為 4.45 kDa, 具有 4 個帶正電胺基酸及 1 個帶負電胺基酸, 淨電荷為 +3, pI 值為 8.12, 同時具有親水結構與疏水結構, 為兩性分子 (如 Fig. 5A)。此外, OnBD 的組成胺基酸具有符合防禦素

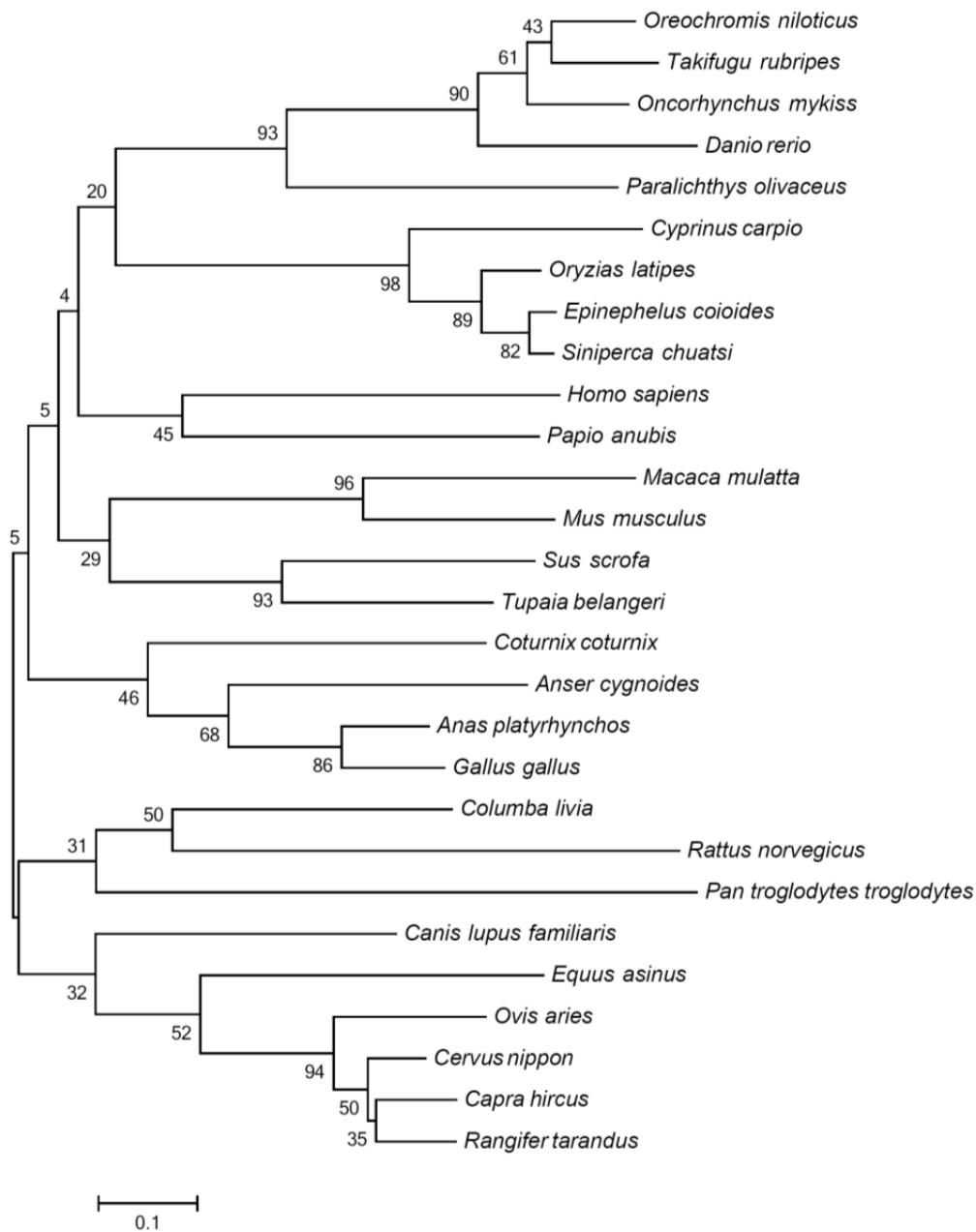


Fig. 3 Phylogenetic tree estimated by using the amino acid sequences of vertebrate defensins with the neighbour-joining method based on the multiple sequence alignment of ClustalW. The resulting tree was bootstrapped 1,000 times. The scale bar corresponds to 0.2 estimated amino-acid substitutions per site.

家族特徵的 6 個半胱胺酸，經電腦立體結構模擬分析顯示 (如 Fig. 5B)，這 6 個半胱胺酸可形成 1-5, 2-4, 3-6 鍵結的 3 對雙硫鍵，其分子構型屬於典型的 β -defensin 抗菌胜肽家族 (如 Fig. 5C)。

四、OnBD 抗菌胜肽的抗菌能力分析

將化學合成之 OnBD 成熟抗菌片段 (由 C 端

42 個胺基酸組成) 分別針對 8 種水產常見病原菌進行最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 試驗，結果顯示 OnBD 對革蘭氏陰性菌與革蘭氏陽性菌均具有抗菌活性，但抗菌能力因菌種不同而有差異 (如 Table 2)，OnBD 對革蘭氏陰性之 *E. tarda* 及革蘭氏陽性之 *S. iniae* 抑菌效果最佳，其 MIC 可達 4 μ M；對革蘭氏陰性之 *V. harveyi* 及革蘭氏陽性之 *L. garvieae* 抑菌效

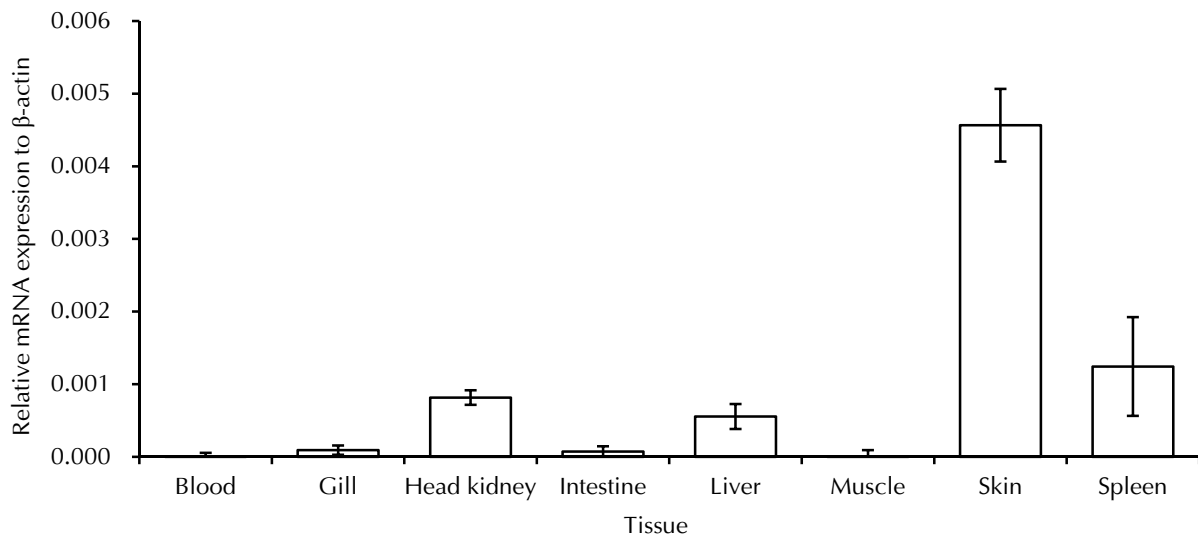


Fig. 4 Tissue distribution of OnBD mRNA according to real-time quantitative RT-PCR analysis. The mRNA expression results are presented as log-plot relative to tilapia β -actin expression. Error bars represent standard error of mean (n=3).

Table 2 Minimum inhibitory concentrations (MICs) of OnBD against different pathogens

Organism	Strain	MIC (μ M)
Gram negative		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC7966	32
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC15947	4
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC17749	16
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC27969	16
<i>V. harveyi</i>	ATCC14126	8
Gram positive		
<i>Streptococcus iniae</i>	ATCC29178	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	16
<i>Lactococcus garvieae</i>	MT2055	8

果次之，其 MIC 為 8 μ M；而 OnBD 對革蘭氏陰性之 *A. hydrophila* 抑菌效果較差，MIC 達 32 μ M。

討 論

表現序列標誌 (EST) 資料庫是將不同組織取得的 mRNA，以反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 反轉錄出 cDNA，再經適當的限制酶處理後，分別選殖到單一質體中，最後以有系統的方式，對每一個質體的插入片段，進行單一次自動化定序 (single-pass automatic sequencing)，所得之序列即被收錄於 EST database (Adams *et al.*, 1991)。由於

EST database 收錄的資料量相當龐大，每一物種均有上百萬的 cDNA 片段序列可供比對，因此 EST 資料庫已逐漸成為學者用以發現與選殖新基因的高效率工具之一 (Parkinson and Blaxter, 2009)。但是，因為 EST 只進行單一次與單向定序，並未經過雙向定序確認，也未以人工方式校正機器自動判讀錯誤，而且所選殖的 cDNA 均先以限制酶切割過，通常不會是一個完整且序列無誤的基因，所以在使用 EST 資料庫的序列時，需要以反轉錄自生物材料的 cDNA 進行一次涵蓋完整基因的錨定 PCR (anchored PCR)，才不致發生序列上的錯漏 (Chang *et al.*, 2005)。

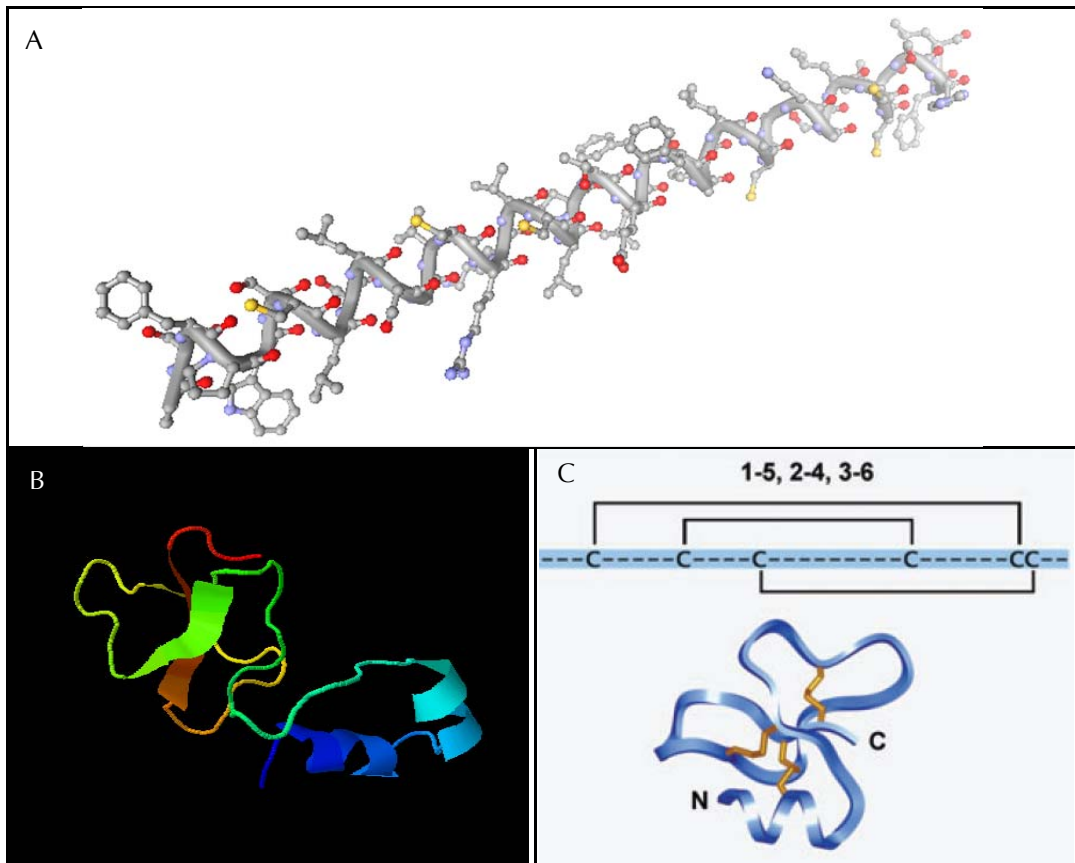


Fig. 5 The computer modelling structure of Nile tilapia defensin OnBD. (A) The three-dimensional diagram of OnBD shows an amphipathic conformation with both an aromatic circular hydrophobic part and an α -helical hydrophilic segment. (B) Ribbon representation of the protein model of Nile tilapia OnBD is similar to that of (C) human β -defensin-1 (citation from Selsted and Ouellette, 2005).

防禦素可依據組成胜肽的 6 個半胱胺酸所形成的 3 對雙硫鍵之配對位置，區分為 α 型 (1-6, 2-4, 3-5 配對)、 β 型 (1-5, 2-4, 3-6 配對) 及 θ 型 (1-4, 2-5, 3-6 配對)；目前僅在新世界猴 (new world monkeys) 有發現 θ 型防禦素，而絕大多數已發表的防禦素均屬於 α 型或 β 型 (Ganz, 2003)。 α 型與 β 型防禦素在二維核磁共振 (two-dimensional NMR) 及 X 光晶體繞射 (X-ray crystallography) 呈現的分子構型不同，主要的差別是組成胜肽的第 1 號半胱胺酸與第 2 號半胱胺酸間之胺基酸數量： α 型只有 1 個胺基酸 (其分子特徵為 $C^1-[X_1]-C^2$)， β 型有 5-6 個胺基酸 (其分子特徵為 $C^1-[X_{5-6}]-C^2$)。有趣的是，在哺乳類， α 型與 β 型防禦素均曾被發現 (Németh *et al.*, 2014)，但魚類迄今只有發現 β 型防禦素 (Masso-Silva and Diamond, 2014)；本研究所選殖的尼羅吳郭魚防禦

素，其組成胜肽的第 1 號半胱胺酸與第 2 號半胱胺酸之間有 6 個胺基酸，符合 $C^1-[X_{5-6}]-C^2$ 的分子特徵，而且經電腦模擬，其二級結構與典型的人類 β -防禦素 hBD-1 (Selsted and Ouellette, 2005) 極為相似 (如 Fig. 5B & 5C)，因此可以確定，本研究以分子選殖出的 OnBD 亦屬於 β -defensin。

抗菌胜肽與生物體存亡關係密切，其演化歷程往往成為分類研究上的重要依據，特別是跨物種的抗菌胜肽家族更可溯源至其遠祖基因 (ancestor gene)，分析其胺基酸組成的類源關係，即可得到與現行物種分類大致相符的樹狀圖 (Zhu and Gao, 2013)，如抗菌胜肽 cathelicidin 家族即是一例 (Chang *et al.*, 2006)。本研究分析 28 種脊椎動物的 β -防禦素基因序列 (如 Fig. 3)，結果根據其類源關係，可將 9 種硬骨魚 (鯉魚、斑馬魚、點帶石斑、虹鱒、日本稻田魚、比目魚、鱒魚、

河豚及尼羅吳郭魚)、4種偶蹄目(山羊、梅花鹿、綿羊、馴鹿)、4種鳥類(綠頭鴨、鴻雁、鸕鶿、雞)及2種靈長目(人類、東非狒狒)分別歸屬於各自的類群中,而屬於奇蹄目的驢,其 β -防禦素亦與偶蹄目之 β -防禦素類群有相當的距離,此分析結果與現代分類學理論相符,證明 β -防禦素基因歷經長期的演化,可以做為物種分類與系統發生學研究的重要參考指標。

α -防禦素可在靈長類及嚙齒動物的潘氏細胞(Paneth cell)、嗜中性白血球(neutrophil)及巨噬細胞(macrophage)被分離到; θ -防禦素則截至目前為止,只出現在新世界猴的白血球及骨髓組織; β -防禦素則普遍存在於脊椎動物的上皮細胞(epithelial cell)與嗜中性白血球中(Zhu and Gao, 2013)。大部分哺乳動物 β -防禦素的主要表達組織為皮膚、呼吸道、消化道及生殖泌尿道的黏膜組織(Ganz, 2003),相較於此,魚類 β -防禦素的組織表達分布顯得更多樣且複雜,無法歸納出一個特定的表達模式(Masso-Silva and Diamond, 2014)。儘管如此,在多數魚類的組織器官中,都可以用RT-PCR方法檢測到 β -防禦素的持續表現,通常皮膚是表現量最高的器官(Marel *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2007; Casadei *et al.*, 2009),胰臟及頭腎也有相當高的表現量(Wang *et al.*, 2012; Zhao, *et al.*, 2009; Casadei *et al.*, 2009),本研究在尼羅吳郭魚之各組織均能以即時定量RT-PCR檢測到OnBD的持續表現,其中又以皮膚表現量最高,胰臟次之,此結果與大部分魚類 β -防禦素的研究結果相符。

不同物種分離到的 β -防禦素抗菌能力各有差異,例如自點帶石斑分離到的EcBD對*Bacillus cereus*的抑制能力最強,其半致死濃度(LD₅₀)達1.0 μ M,對*Micrococcus luteus*的抑制能力最弱,其LD₅₀為10.6 μ M(Jin *et al.*, 2010);自日本稻田魚分離到的OIBD對*A. hydrophila*抑制能力最強,其LD₅₀達0.4 μ M,對*Staphylococcus aureus*的抑制能力最弱,其LD₅₀為6.7 μ M(Zhao *et al.*, 2009);本研究自尼羅吳郭魚分離到的 β -防禦素OnBD則分別對*E. tarda*與*S. iniae*均有較佳的抑制能力,其最小抑制濃度(MIC)可達4 μ M;其對*A. hydrophila*抑制能力反而較差,其MIC為32 μ M。此外,雖然Zhao *et al.* (2009)認為魚類 β -防禦素僅對革蘭氏陰性菌有顯著且專一的高抑制活

性,但Jin *et al.* (2010)以點帶石斑EcBD對8種水產病原菌測試的結果顯示,其最強抑制活性(*B. cereus*)及最弱抑制活性(*M. luteus*)均為革蘭氏陰性菌;Wang *et al.* (2012)自鱘魚分離到的 β -防禦素ScBD則分別對革蘭氏陰性之*A. hydrophila*、*Escherichia coli*及革蘭氏陽性之*S. aureus*均具抑制活性,反而對革蘭氏陰性之*E. tarda*無抑制能力;本研究以OnBD測試8株水產病原菌也發現其分別對革蘭氏陰性之*E. tarda*與革蘭氏陽性之*S. iniae*有較佳的抑制活性,反而對革蘭氏陰性之*A. hydrophila*抑制能力最差。綜合以上的研究結果顯示,魚類 β -防禦素對細菌的抑制活性可能與微生物的革蘭氏特性無關,而與物種環境中的常見病原菌更有關連;*E. tarda*會導致魚類系統性腸炎與敗血症(Aoki and Kitao, 1981),*S. iniae*則會造成水產動物急性眼球凸腫與出血性敗血症(Perera and Johnson, 1994),兩者均為吳郭魚的主要病原菌,所以尼羅吳郭魚之 β -防禦素OnBD對這2種病原菌的抑制活性較強,顯示OnBD在尼羅吳郭魚的抗病防線中扮演舉足輕重的角色。將來擬以此抗菌胜肽分子研究,建立免疫賦活劑效能的評估系統,並且利用重組蛋白質技術生產抗菌胜肽,應用於飼料添加或替代藥物等疾病防治用途,配合族群遺傳研究,亦可以作為高抗病品系種魚篩選的分子標記,進而開發出實用的分子選育工具,對臺灣水產養殖的永續發展將有莫大的助益。

謝 辭

本研究之經費係由行政院農業委員會水產種苗研究團隊—臺灣重要養殖魚貝類之抗病基因研究(102農科-11.3.3-水-A3(5))計畫項下支助。

參考文獻

- Adams, M. D., J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C. R. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno, A. R. Kerlavage, W. R. McCombie and J. C. Venter (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252(5013): 1651-1656.

- Aoki, T. and T. Kitao (1981) Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish Pathol.*, 15(3/4): 277-281.
- Casadei, E., T. Wang, J. Zou, J. L. Gonzalez Vecino, S. Wadsworth and C. J. Secombes (2009) Characterization of three novel beta-defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Immunol.*, 46(16): 3358-3366.
- Chang, C.-I., Y.-A. Zhang, J. Zou, P. Nie and C. J. Secombes (2006) Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(1): 185-195.
- Chang, C.-I., O. Pleguezuelos, Y.-A. Zhang, J. Zou and C. J. Secombes (2005) Identification of a novel cathelicidin gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect. Immunol.*, 73(8): 5053-5064.
- Chang, W. T., C. Y. Pan, V. Rajanbabu, C. W. Cheng and J. Y. Chen (2013) Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1-5, shows antitumor activity in cancer cells. *Peptides*, 32(2): 342-352.
- CLSI (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard - 9th ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Falco, A., V. Chico, L. Marroqui, L. Perez, J. M. Coll and A. Estepa (2008) Expression and antiviral activity of a beta-defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences. *Mol. Immunol.*, 45(3): 757-765.
- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Rev. Immunol.*, 3(9): 710-720.
- Guo, M., J. Wei, X. Huang, Y. Huang and Q. Qin (2012) Antiviral effects of beta-defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol.*, 32(5): 828-838.
- Hancock, R. E. W. (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.*, 1(3): 156-164.
- Huang, B. F., L. L. Zou, J. G. Xie, Z. C. Huang, Y. W. Li and A. X. Li (2013) Immune responses of different species of tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*. *J. Fish Dis.*, 36(8): 747-752.
- Jin, J. Y., L. Zhou, Y. Wang, Z. Li, J. G. Zhao, Q. Y. Zhang and J. F. Gui (2010) Antibacterial and antiviral roles of a fish β -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS ONE*, 5(12): e12883. doi: 10.1371/journal.pone.0012883.
- Malmsten, M. (2014) Antimicrobial peptides. *Ups. J. Med. Sci.*, 119(2): 199-204.
- Marel, M., M. Adamek, S. F. Gonzalez, P. Frost, J. H. Rombout, G. F. Wiegertjes, H. F. Savelkoul and D. Steinhagen (2012) Molecular cloning and expression of two beta-defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after beta-glucan feeding. *Fish Shellfish Immunol.*, 32(3): 494-501.
- Masso-Silva, J. A. and G. Diamond (2014) Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, 7(3): 265-310.
- Nam, B. H., J. Y. Moon, Y. O. Kim, H. J. Kong, W. J. Kim, S. J. Lee and K. K. Kim (2010) Multiple beta-defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(2): 267-274.
- Németh, B.C., T. Várkonyi, F. Somogyvári, C. Lengyel, K. Fehértemplomi, S. Nyiraty, P. Kempler and Y. Mándi (2014) Relevance of α -defensins (HNP1-3) and defensin β -1 in diabetes. *World J. Gastroenterol.*, 20(27): 9128-9137.
- Parachin, N. S. and O. L. Franco (2014) New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance. *Front. Microbiol.*, 5:147, doi: 10.3389/fmicb.2014.00147.
- Parkison, J. and M. Blaxter (2009) Expressed sequence tags: an overview. *Methods. Mol. Biol.*, 533: 1-12.
- Peng, K.-C., S.-H. Lee, A.-L. Hour, C.-Y. Pan, L.-H. Lee and J.-Y. Chen (2012) Five different piscidins from tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions., *PLoS ONE* 7(11): e50263. doi: 10.1371/journal.pone.0050263.
- Perera, R.P. and S. K. Johnson (1994) *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* \times *T. aurea* hybrids. *J. Aquat. Anim. Health*, 6(4): 335-340.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425.
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunol.*, 6(6): 551-557.
- Seemple, F. and J. R. Dorin (2012) Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun.*, 4(4): 337-348.

- Thompson J. D., D. C. Higgins and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22(22): 4673-4680.
- Vriens, K., B. P. A. Cammue and K. Thevissen (2014) Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, 19(8): 12280-12303.
- Wang, G., J. Li, P. Zou, H. Xie, B. Huang, P. Nie and M. Chang (2012) Expression pattern, promoter activity and bacterial property of beta-defensin from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(3): 522-531.
- Zhu, S. and B. Gao (2013) Evolutionary origin of β -defensins. *Dev. Comp. Immunol.*, 39(1-2): 79-84.
- Zoysa, M. D., I. Whang, Y. Lee, S. Lee, J.-S. Lee and J. Lee (2010) Defensin from disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(2): 261-266.
- Zou, J., C. Mercier, A. Koussounadis and C. Secombes (2007) Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol. Immunol.*, 44(4): 638-647.
- Zhao, J. G., L. Zhou, J. Y. Jin, Z. Zhao, J. Lan, Y. B. Zhang, Q. Y. Zhang and J. F. Gui (2009) Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF-kappa B and Sp1 of a medaka beta-defensin. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(4): 624-637.

Molecular Cloning and Characterization of a β -defensin Antimicrobial Peptide Gene in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Li-Hao Chen, Yeh-Fang Hu, Huei-Jen Ju, Chia-Che Wu and Chin-I Chang*

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

An antimicrobial peptide gene named OnBD, which belongs to the β -defensin family, was cloned in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the expressed sequence tag (EST) cloning method. The putative 66-residue OnBD prepeptide consists of two domains: an N-terminal 24-residue signal domain (signal peptide) and a 42-residue C-terminal antimicrobial domain (mature peptide). Annotation of the antimicrobial domain architecture showed that the OnBD peptide contains the signature motif and six conserved cysteines, a characteristic similar to that of β -defensins in other fish. The OnBD mature peptide shared other common features of antimicrobial peptides, such as being amphipathic and cationic (+3 charge) and having a small molecule (less than 100 a.a.). We also used real-time RT-PCR to investigate the expression pattern of the OnBD gene. The results showed that mRNA of OnBD could be detected in various tissues including the blood, gills, head kidney, intestine, liver, muscle, skin and spleen of Nile tilapia. Quantitative analysis revealed that skin had the highest expression level. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the chemically synthesized OnBD were examined against eight different aquatic bacterial pathogens and shown to exhibit potent antimicrobial activities to all of them, especially to *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*, the two most important pathogens to tilapia, with the MIC reaching as low as 4 μ M. The molecular characteristics and bioactivities of OnBD suggested that this antimicrobial peptide may play an important role in the innate immunity of Nile tilapia and that it has potential applications in the treatment of bacterial infections.

Key words: β -defensin, antimicrobial peptide (AMP), Nile tilapia, molecular cloning, innate immunity

*Correspondence: Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Road, Keelung 20246, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101 #2801; Fax: (02) 2462-8138; E-mail: cichang@mail.tfrin.gov.tw