

山羊睾丸和附睾头 β 防御素家族的表达谱及生物信息学分析

张春香[#], 杜海燕[#], 张彩霞, 郑亚琳, 任有蛇, 姜玉锁*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 为探明山羊睾丸和附睾头 β 防御素家族基因表达特点及其蛋白的特性。利用 3 只 7 日龄羔羊睾丸和 3 只成年种公羊睾丸和附睾头的 Illumina HiSeq™ 2000 高通量转录组测序数据, 筛选出 β 防御素家族基因并进行差异表达基因比较分析, 利用生物信息学对 β 防御素家族蛋白特性进行预测。结果显示: 在山羊 7 日龄睾丸、成年睾丸和附睾头中分别表达 7、12 和 33 种 β 防御素, 其表达量最高的分别是 *gDB123*、*gDB119* 和 *gDB124*, 成年睾丸中特异性表达是 *gDB33*, 附睾头中特异表达有 21 种 β 防御素。山羊 β 防御素分子量在 6.89~13.85 ku, 为小分子、极性、带正电荷、疏水性的强碱性多肽。山羊 β 防御素也是含高度保守 6 个半胱氨酸的空间构象, 基本结构-C-X₂₋₄₅-C-X₃₋₆-C-X₃₋₁₃-C-X₄₋₇-CC-, 其中 24 种 β 防御素结构为-C-X_{5,6}-C-X_{3,4}-C-X₉-C-X_{5,6}-CC-。有 16 种 β 防御素是分泌型糖蛋白, 除 *gDB126* 无磷酸化位点外, 其余的 β 防御素蛋白均有磷酸化位点。山羊附睾头特异性高度表达有丰富 β 防御素, 它们是一类抗微生物的阳离子肽, 在精子成熟过程中形成精子膜上糖被, 或精子运动获得的过程中发挥重要作用; 也可作为信号分子, 某些信号通路中发挥作用。

关键词: β 防御素家族; 表达谱; 生物信息; 睾丸; 附睾; 公山羊

中图分类号: S827.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)07-1122-12

Expression Profiles and Bioinformatics Analysis of beta-defensin Family Genes in the Testes and Epididymal Caput of Bucks

ZHANG Chun-xiang[#], DU Hai-yan[#], ZHANG Cai-xia, ZHENG Ya-lin, REN You-she, JIANG Yu-suo*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the expression characteristics and bioinformatics analysis of beta-defensin family genes in the testes and epididymal caput of bucks. The data were from the transcriptomes of three testes of 7-day-old kids, testes and epididymal caput of three adult bucks of known fertility analyzed by Illumina HiSeq™ 2000 high-throughput RNA sequencing. All beta-defensin family genes were sorted out according to annotation of unigenes and contigs for analysis of different expression. Protein profile of beta-defensins was analyzed by bioinformatics methods. The results showed that a total of 7, 12 and 33 β -defensins were discovered in testes of 7-day-old kids, testes and epididymal caput of adult bucks respectively, while *gDB123*, *gDB119* and *gDB124* were the highest expression in the testes of 7-day-old kids, testes and epididymal caput of adult bucks respectively. *gDB33* was specifically expressed in testes of adult bucks. Twenty-one β -defensins were specifically expressed in epididymal caput of adult bucks. The molecular weight of β -defensins was from 6.89 to 13.85 ku. The bioinformatics analy-

收稿日期: 2015-01-23

基金项目: 山西省科技攻关计划项目(20110311029; 20130311025-2)

作者简介: 张春香(1972-), 女, 山西侯马人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, Tel: 0354-6285990, E-mail: zhchx66@126.com。杜海燕(1978-), 女, 山西偏关人, 博士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: dhy782@126.com。张春香与杜海燕为并列第一作者

* 通信作者: 姜玉锁, 教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, Tel: 0354-6285990, E-mail: jiangys_001@126.com

sis showed that goat β -defensins protein were small molecular, polar, hydrophobicity and basic polypeptide with positive charge. A high degrees of conservation in spacing pattern was 6 cysteines in peptides sequence of β -defensins, which consensus pattern was $-C-X_{2-45}-C-X_{3-6}-C-X_{3-13}-C-X_{4-7}-CC-$. However, the pattern of 24 β -defensins was $-C-X_{5,6}-C-X_{3,4}-C-X_9-C-X_{5,6}-CC-$. A total of 16 β -defensins were secreted glycoprotein. Except for *gDB126*, the rest of 24 β -defensins had the phosphorylation sites. The goat β -defensins family protein were also the antimicrobial cationic peptides. The rich specific-epididymis β -defensins were expressed in epididymal caput, which could coat sperm plasma membrane with glycocalyx in sperm maturation and play a vital role in making sperm motion. And β -defensins may be were cell signal in some pathways.

Key words: β -defensins family; expression profiles; bioinformatics; testis; epididymal caput; bucks

β 防御素(beta-defensin, DB)是一种重要的内源性抗菌肽,作为新型的抗生素替代品,其功能的研究及其体外提纯对畜产品的安全生产具有重要意义。在雄性生殖器官中,免疫处于相对抑制状态,因此,在其中必须有一套可替代的有效保护机制,以保证生殖系统能够不受侵害。 β 防御素家族正是起到这种保护作用,雄性生殖器官表达有 30 多种 β 防御素,不仅保护精子免受微生物的侵袭^[1-2],而且对附睾中精子成熟和贮存也有重要作用^[3-4]。研究表明有 35 种 β 防御素在大鼠生殖器官中表达,仅大鼠附睾头中就有 29 种表达^[1],有 38 种 β 防御素在男性睾丸和附睾中表达^[2],29 种公猪 β 防御素中有 14 种是在睾丸中表达^[5]。F. Narciandi 等^[6]发现,牛 13 号染色体上编码的 19 种 β 防御素均在成年公牛生殖器官中表达,在 6 周龄公犊生殖器官中表达有 10 种。比较前人的研究发现哺乳动物(人、牛、猪)和啮齿类(大鼠、小鼠)生殖器官中 β 防御素表达差异很大,这种差异不仅体现在表达量上,而且也表现在种类上。然而有关山羊 β 防御素的研究报道很少,仅有 E. Bagnicka 等^[7]克隆了山羊舌头 β 防御素 1 和 β 防御素 2 基因,并比较了其在几个山羊品种间的变异。目前山羊生殖器官 β 防御素的表达特性尚未见报道。本研究利用 7 日龄和成年山羊睾丸、成年山羊附睾头组织的高通量转录组测序结果,分析了公羊繁殖器官中表达 β 防御素家族表达特点,利用生物信息学分析对附睾头表达的 β 防御素进行分类,为山羊附睾头生物学功能的研究提供宝贵的基因组数据;为研究 β 防御素功能、表达特性和体外表达生产等提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验样品采集及转录组数据获得

试验动物为 7 日龄,2 岁太行青山羊((47.8 ±

2.5)kg)公羊各 3 只。采用手术去势采集其睾丸和附睾头,液氮保存后,干冰包裹冻存管后送深圳华大基因科技有限公司进行转录组测序。转录组数据获取及分析方法参照张春香等^[8]基于高通量转录组测序的睾丸和附睾差异基因分析。注释后总 Unigene 分为两部分,一部分是 singletons(以 Unigene 开头),另一部分是 clusters(以 CL 开头)。将获取部分 β 防御素的序列整理后递交 NCBI 数据库(KJ508072-KJ508084)。

1.2 生物信息学分析

利用 EditSeq 程序(DNAStar Lasergene V5.02)预测山羊 β 防御素的氨基酸数量、组成和蛋白质分子量;应用在线软件 InterProScan 预测 β 防御素的结构域和功能区域。通过 NetOGlyc 3.1 和 NetNGlyc 1.0 预测 β 防御素潜在 O、N 糖基化位点。用在线 Scansite 网站中 motif Scan 软件预测潜在磷酸化位点;在线网站 PSORT 上进行 β 防御素蛋白的信号肽预测和亚细胞定位;应用在线软件 protscale 程序预测山羊 β 防御素的疏水性(Hydrophobic constants derived from HPLC peptide retention times);利用在线 iTOL 软件(Version 2.1)构建人、牛、猪和山羊 β 防御素系统进化树^[9-10]。

2 结果

2.1 山羊附睾头和睾丸 β 防御素种类及表达特点

山羊附睾头和睾丸中表达的无可变剪接的 β 防御素(Goat beta-defensin, *gDB*)种类及表达特点见表 1,7 日龄山羊睾丸中表达的有 6 种:*gDB123* > *gDB104* > *gDB114* > *gDB120* > *gDB108* > *gDB107*; 在成年山羊睾丸中表达的有 7 种,其表达量顺序:*gDB119* > *gDB123* > *gDB120* > *gDB15* > *gDB104* > *gDB29* > *gDB107*; 7 日龄和成年山羊睾丸中 β 防御

素表达的种类和表达量不同。成年山羊附睾头中表达的有 25 种,表 1 中 β 防御素顺序按照附睾头中由高到低的排列,从表 1 可以看出附睾头特异表达有 16 种: *gDB124*、*gDB109*、*gDB110 like*、*gDB116*、*gDB121*、*gDB132*、*gDB118*、*gDB130*、*gDB134*、*gDB126*、*gDB127*、*gDB131*、*gDB103B*、*gDB117*、*gDB115* 和 *SPAG11V*。在这些 β 防御素中表达量

最高的是在附睾头中特异性表达的 *gDB124*,其片段长度 494 bp;其次是 *gDB109*,长度 611 bp。表达量排名第 3 的是在 7 日龄山羊睾丸和附睾头中均表达的 *gDB108*,长度 483 bp,其在附睾头的表达量分别是 7 日龄山羊睾丸的表达量 10 875 倍。成年公羊睾丸中仅有 *gDB119* 和 *gDB123* 的表达量显著高于附睾头。

表 1 山羊睾丸和附睾头中 β 防御素基因(单一)表达量 (FPKM 值^a)

Table 1 The expression of beta-defensins mRNA (singletons) in testes and epididymal caput of bucks (FPKM^a)

基因注释 Unigene A	基因名称 ^b Gene name	片段长度/bp Sequence length	7 日龄睾丸 ^a 7-day-old testes	成年睾丸 ^a Adult testes	成年附睾头 ^a Adult caput
Unigene43242	<i>gDB124</i>	494	0.00	0.00	11 552.00
Unigene43246	<i>gDB109</i>	611	0.00	0.00	6 029.00
Unigene43252	<i>gDB108</i>	483	0.43	0.00	5 220.39
Unigene17754	<i>gDB120</i>	750	0.84	47.76	4 914.00
Unigene43253	<i>gDB110 1</i>	508	0.00	0.00	3 433.00
Unigene43251	<i>gDB116</i>	499	0.00	0.00	2 695.00
Unigene43258	<i>gDB114</i>	434	0.96	0.00	2 569.00
Unigene43268	<i>gDB15</i>	277	0.00	2.35	1 835.00
Unigene43249	<i>gDB121</i>	376	0.00	0.00	1 335.00
Unigene43267	<i>gDB104</i>	989	1.27	1.97	945.00
Unigene43279	<i>gDB107</i>	1 483	0.14	0.14	569.00
Unigene43272	<i>gDB132</i>	1 868	0.00	0.00	485.00
Unigene43270	<i>gDB118</i>	1 448	0.00	0.00	303.00
Unigene43313	<i>SPAG11V</i>	2 176	0.00	0.00	151.00
Unigene43229	<i>gDB130</i>	1 293	0.00	0.00	70.34
Unigene30879	<i>gDB119</i>	410	0.00	143.00	64.83
Unigene43476	<i>gDB134</i>	467	0.00	0.00	42.24
Unigene43645	<i>gDB127</i>	437	0.00	0.00	28.98
Unigene43697	<i>gDB126</i>	411	0.00	0.00	27.28
Unigene43789	<i>gDB129</i>	599	0.00	0.36	24.26
Unigene43844	<i>gDB131</i>	297	0.00	0.00	23.77
Unigene44321	<i>gDB1031</i>	298	0.00	0.00	19.51
Unigene44307	<i>gDB117</i>	384	0.00	0.00	13.52
Unigene44540	<i>gDB115</i>	333	0.00	0.00	11.84
Unigene47293	<i>gDB123</i>	455	4.15	71.09	1.82

a. UnigeneA 表达量计算使用 FPKM(Fragments per kb per million fragments)法: $FPKM = (1\ 000\ 000 * C) / (N * L * 1\ 000)$ 。C. 比对到 Unigene A 上片段数;N. 所有 Unigene 中总片段数;L. A 基因的碱基数。FPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响,可直接用于比较样品间的表达差异。b. Unigene A 比对到 Nt 数据库中的序列描述。表 2 同

a. Expression levels of Unigene A are calculated using FPKM method: $FPKM = (1\ 000\ 000 * C) / (N * L * 1\ 000)$. C. The number of fragments uniquely aligned to gene A; N. The total number of fragments uniquely aligned to all genes; L. The number of bases on gene A. The FPKM method can eliminate the effect of different gene length and sequencing discrepancy on the calculation of gene expression. Thus, the calculated gene expression can be directly used for comparing the difference of gene expression among samples. b. Nt sequence annotation of Unigene A. The same as table 2

山羊睾丸和附睾头中表达有可变剪接的 β 防御素种类及表达特点见表 2。在成年公羊睾丸和附睾头中共有 9 种有可变剪切的 β 防御素。在 7 日龄公羔睾丸中有 *gDB128* 的 2 个转录本和 *gDB112* 的 1 个转录本,其表达量均较低,FPKM 值 <1 。在成年公羊睾丸中表达有 5 种可变剪接的 β 防御素,其中 *gDB122* 的 2 个转录本,为睾丸最高表达量,有可变剪接的 β 防御素;*gDB33* 转录本 1 和 2 是成年睾丸

中特异性表达的;除此之外,还有 *gDB128* 的转录本 1、*gDB112* 的转录本 2 和 *gDB105* 的转录本 5。在成年公羊附睾头中有 8 种可变剪切的 β 防御素,其中可变转录本 *gDB122a* 的表达量最高,是成年睾丸中表达量的 54 倍。在附睾头中特异性表达的有 *gDB1081* 的 3 个转录本、*gDB112* 的转录本 1、*gDB105* 的转录本 1~5、*gDB30* 的 2 个转录本、*gDB110* 的 2 个转录本和 *SPAG11E* 的 2 个转录本。

表 2 山羊睾丸和附睾头中 β 防御素基因(可变剪切)表达量

Table 2 The expression of beta-defensin mRNA (clusters) in testes and epididymal caput of bucks

基因注释 Unigene A	基因名称 ^b Gene name	片段长度/bp Sequence length	7 日龄睾丸 ^a 7-day-old testes	成年睾丸 ^a Adult testes	成年附睾头 ^a Adult caput
CL3170 tr1	<i>gDB122a</i>	330	0.00	94.07	449.30
CL3170 tr2	<i>gDB122a</i>	509	0.00	83.84	45 380.00
CL1294 tr1	<i>gDB128</i>	2 694	0.07	0.24	54.95
CL1294 tr2	<i>gDB128</i>	1 353	0.46	0.00	891.00
CL3610 tr1	<i>gDB1081</i>	861	0.00	0.00	17.12
CL3610 tr2	<i>gDB1081</i>	756	0.00	0.00	62.70
CL3610 tr3	<i>gDB1081</i>	656	0.00	0.00	311.00
CL2324 tr1	<i>gDB112</i>	521	0.00	0.00	1.99
CL2324 tr2	<i>gDB112</i>	1 583	0.93	7.95	128.00
CL229 tr1	<i>gDB105</i>	4 077	0.00	0.00	2.75
CL229 tr2	<i>gDB105</i>	3 772	0.00	0.00	0.60
CL229 tr3	<i>gDB105</i>	2 899	0.00	0.00	5.08
CL229 tr4	<i>gDB105</i>	2 594	0.00	0.00	44.51
CL229 tr5	<i>gDB105</i>	376	0.00	2.88	1.10
CL912 tr1	<i>gDB30</i>	832	0.00	0.00	9.73
CL912 tr2	<i>gDB30</i>	303	0.00	0.00	27.41
CL1216 tr1	<i>gDB33</i>	436	0.00	47.32	0.00
CL1216 tr2	<i>gDB33</i>	334	0.00	1.95	0.00
CL681 tr1	<i>gDB110</i>	609	0.00	0.00	110.00
CL681 tr2	<i>gDB110</i>	488	0.00	0.00	419.00
CL4230 tr1	<i>SPAG11E</i>	1 051	0.00	0.00	492.00
CL4230 tr2	<i>SPAG11E</i>	513	0.00	0.00	1 515.00

2.2 山羊 β 防御素家族生物信息学分析

2.2.1 山羊 β 防御素蛋白的理化性质分析 从表 3 可以看出,山羊附睾头中 β 防御素为小分子、极性和疏水性蛋白,分子量在 6.89~13.85 ku,其中分子量最高的是 *gBD112*,分子量最低的是 *gBD121*。除 *gBD134* 和 *gBD1081tr3* 为酸性 AA 外,其余的 β 防御素均为碱性 AA,其中碱性最强的 AA 是 *gBD129*,等电点 9.729。当 pH=7.0 时,*gBD117*

带电量最大 11.855(正电荷);其次是 *gBD129*,带电量 11.617;*gBD110tr2* 带电量最低(正电荷)0.898。*gBD108tr3* 和 *gBD134* 是带负电荷,带电量分别为 -1.928 和 -1.296。

2.2.2 β 防御素家族系统发育分析 将从 NCBI 数据库中获取的 37 个人 β 防御素(Human defensins, hDBs)、28 个牛 β 防御素(Cattle defensins, cDBs)、14 个猪 β 防御素(Pig defensins, pDBs)和山

表 3 山羊睾丸和附睾头中 β 防御素蛋白理化性质

Table 3 The physical and chemical characteristics of beta-defensin protein in testes and epididymal caput of bucks

基因名称 Gene name	分子量/ku Molecular weight	强碱性 AA Strongly basic amino acids	强酸性 AA Strongly acidic amino acids	极性 AA Polar amino acids	亲/疏水性 Hydrophobicity	等电点 Isoelectric point	pH 7.0 时带电量 Charge at pH 7.0
gDB15	9.71	13	8	24 极性	疏水性	8.584	4.867
gDB104	11.82	16	7	31 极性	疏水性	9.651	8.730
gDB105tr3	7.03	9	5	20 极性	疏水性	8.257	3.637
gDB107	7.63	11	6	17 极性	疏水性	8.774	4.733
gDB108	8.22	6	8	27 极性	疏水性	8.464	4.233
gDB112	13.85	19	10	38 极性	疏水性	9.053	9.000
gDB114	7.64	10	8	18 极性	疏水性	7.929	1.865
gDB116	10.85	10	6	40 极性	疏水性	8.483	4.228
gDB117	11.13	17	5	33 极性	疏水性	9.722	11.855
gDB118	10.59	13	8	32 极性	疏水性	8.728	4.734
gDB120	9.19	11	9	22 极性	疏水性	8.000	1.735
gDB121	6.89	7	4	18 极性	疏水性	8.289	3.064
gDB123	7.78	12	1	23 极性	疏水性	9.686	10.881
gDB124	7.65	8	4	21 极性	疏水性	8.500	4.058
gDB126	9.73	10	5	35 极性	疏水性	8.606	4.696
gDB127	11.85	18	9	31 极性	疏水性	9.472	9.234
gDB129	13.02	20	9	37 极性	疏水性	9.729	11.617
gDB131	8.06	13	5	19 极性	疏水性	9.242	7.723
gDB132	9.05	14	3	20 极性	疏水性	9.679	10.884
gDB134	7.46	5	6	21 极性	疏水性	4.962	-1.296
gDB108ltr3	7.96	6	8	20 极性	疏水性	5.602	-1.928
gDB109tr1	11.20	14	6	29 极性	疏水性	9.068	7.997
gDB110like	7.82	12	3	16 极性	疏水性	9.725	9.390
gDB110tr2	7.53	9	8	15 极性	疏水性	7.630	0.898
gDB119tr1	7.10	10	7	19 极性	疏水性	8.273	2.731
gDB122tr1	7.81	9	5	23 极性	疏水性	8.481	4.054
gDB128tr2	10.59	14	9	30 极性	疏水性	8.654	4.725

羊附睾头中 38 个 β 防御素(包括转录本)(gDBs)共 117 个蛋白质序列用在线构建系统发育树(图 1)。从进化树分析可以看出,4 个物种的 β 防御素蛋白被划分为类群 A~类群 H 共 8 个类群, β 防御素 129、123 和 132 单独形成进化支。其中类群 A 和 E 成员数较少,类群 A 包含 β 防御素 123 和 122;类群 E 包含 β 防御素 117、118 和 125。类群 G 包含 15 种共 19 个 β 防御素:8 种牛 β 防御素聚为一个次级分支,人和猪的 β 防御素 1、2 和 103 各聚一个次级分支,人 β 防御素 136 和 137 聚为一个次级分支。大多数进化树末端分支是不同物种的同一种类 β 防御素,说明 β 防御素种间保守性较强。从基因组家族进化历史分析,最先 β 防御素 129,其次是 β 防御素

123 和 132,类群由 A~H 发生历史越来越晚。

2.2.3 β 防御素蛋白的结构特点及其功能区域

从表 4 可以看出山羊的无可变剪切的单一 β 防御素蛋白都具有 6 个半胱氨酸残基(阴影区域),其结构为-C-X_n-C-X_n-C-X_n-C-X_n-CC-。除 gBD112 为-C-X₁₅-C-X₆-C-X₃-C-X₇-CC-,gBD114 为-C-X₁₄-C-X₃-C-X₁₃-C-X₆-CC-,gBD107 为-C-X₆-C-X₃-C-X₉-C-X₇-CC-,gBD130 为-C-X₂-C-X₅-C-X₁-C-X₅-CC-外,其余 β 防御素蛋白均为 C-X₆-C-X₃-C-X₉-C-X₅-CC-。

从表 5 可以看出山羊可变剪切 β 防御素蛋白具有 2~8 个半胱氨酸残基(阴影区域)。其中 gBD105 转录本 2 和 gBD110 转录本 1 仅含有 2 个半胱氨酸残基;gBD128tr1 和 gBD105tr1 含有 3 个半胱氨酸残基;

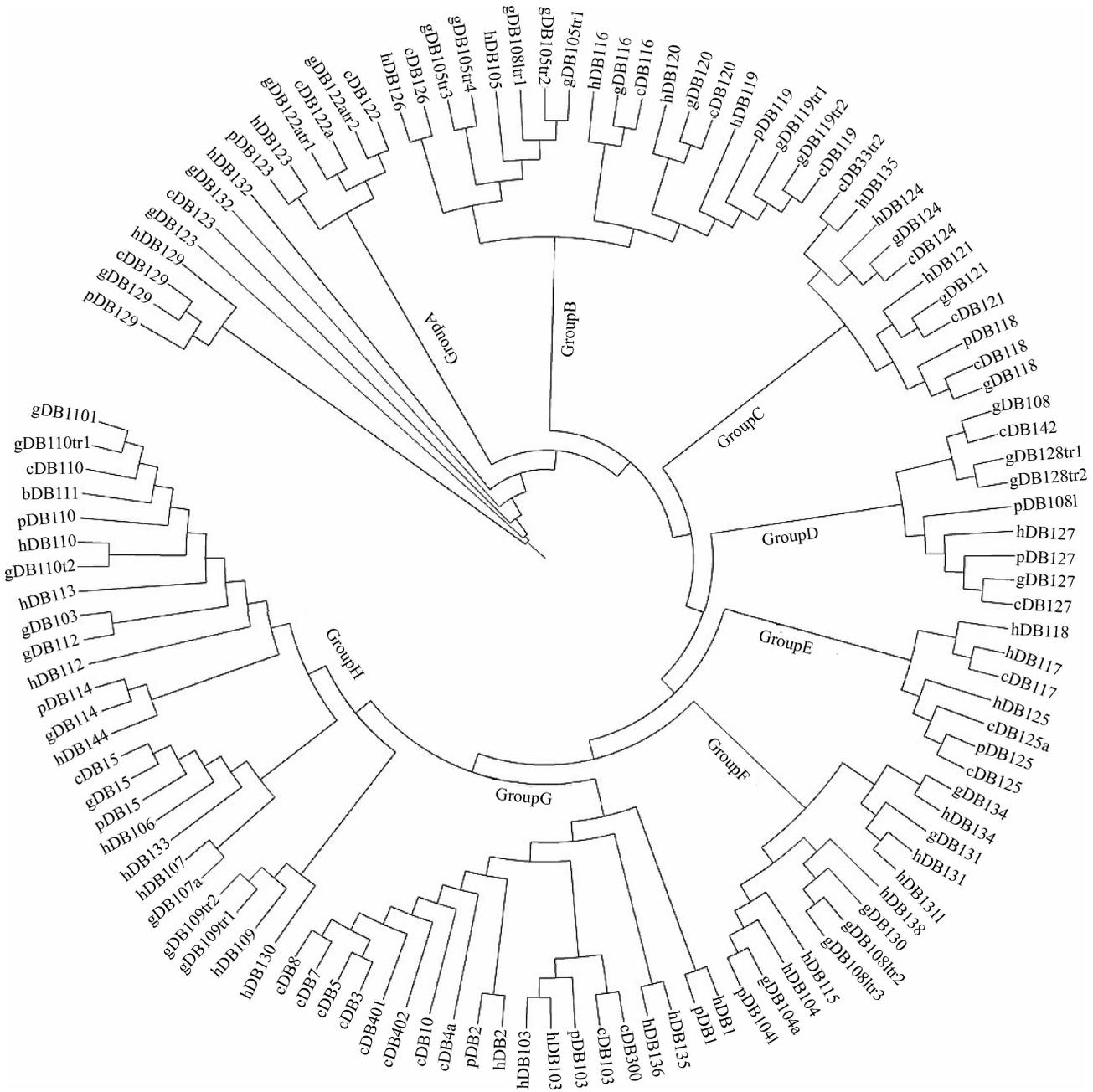


图 1 人、牛、猪和山羊 β 防御素家族的进化树 (NJ 法, 自展值 >80)

Fig. 1 A phylogenetic analysis of beta-defensin genes among humans, cattle, pigs and goats (Neighbor joining method, Bootstrap >80)

gBD105tr3 和 4 的结构特殊, 有 8 个半胱氨酸残基: $-C-X_{17}-C-X_2-C-X_6-C-X_3-C-X_9-C-X_5-CC-$, gBD108ltr3 为 $-C-X_2-C-X_8-C-X_6-C-X_3-C-X_9-C-X_5-CC-$; SPAG11Etr 2 有 5 个半胱氨酸残基, 结构为 $-C-X_9-C-X_9-C-X_6-CC-$ 。其余 β 防御素均为 $-C-X_{5,6}-C-X_{3,4}-C-X_9-C-X_{5,6}-CC-$ 。

InterProScan 预测除 gBD105tr1 和 tr2, gBD110tr1, gBD128tr1 外, 其余 β 防御素蛋白的功能区域在 6

个半胱氨酸残基的区域内, 具有 β 防御素抗微生物的三级结构特征。

2.2.4 山羊附睾头 β 防御素蛋白糖基化位点和磷酸化分析 从表 6 可知, gDB117, gDB116, gDB129, gDB112, gDB118, gDB127, gDB131, gDB134, gDB126 和 gDB108ltr3 均有 N 糖基化位点。除 gDB107, gDB114, gDB120 ~ 124, gDB131, gDB134, gDB105tr4, gDB1101, gDB110tr2,

表 4 山羊睾丸和附睾头中β防御素(单一序列)蛋白序列

Table 4 The sequence of beta-defensin protein(singletons) in testes and epididymal caput of bucks

名称Name	氨基酸序列 Amino acid sequence																														
gDB15	MVHFLAPARSGFHDEK	F	K	L	K	G	K	I	E	S	Q	I	N	E	E	L	I	G	F	CC	VALQFCGVNKEGS										
gDB33	MRSLLVVMVLLSYVHPVKSQANARRRNF	W	R	T	K	G	I	R	K	S	Y	K	S	E	I	Y	H	V	F	CC	IDKRDLPSPMVGK										
gDB104	MRIISLIFAVFFHAPVGSDDLDAARI	G	Y	G	T	A	R	R	R	N	K	R	Q	E	F	R	V	G	K	CC	LKRWNVNSLNLFQDKGPKKGAGLLE										
gDB107	MKTIFFMEAAILLQGFSAFRLQRI	L	K	M	D	G	R	E	V	E	L	S	F	E	D	K	I	G	G	CC	RKRVNN										
gDB108	MKNLPKRQMEKEKK	E	N	N	E	G	F	R	K	K	K	A	E	E	V	E	F	R	Y	CC	ISTYSLITLYLEKETVDTIKHHTTSSQHVY										
gDB112	MKLLFFSIFSHFDVFPVGSRSVGSIVPSS	-	E	K	L	S	E	T	R	N	S	S	I	F	I	M	F	G	G	H	CC	IRQCKPKKYK									
gDB114	MIKIFYYLFLHEL	Y	A	T	F	L	P	A	L	V	D	P	E	R	S	K	L	K	K	R	C	A	R	Y	E	K	Q	E	L	CC	IERAFEDD
gDB116	MIIVLILVHKIRGGLRSYVYGSQSESWNP	Q	L	H	Q	G	T	R	N	A	R	K	Y	E	L	Q	Y	L	T	CC	LKFFVKVAIANNVKEESNSSSLVITMLSNYSQI										
gDB117	MKFLLLILVHLILFQMLPVCRGRKS	W	I	I	K	G	H	R	K	D	K	S	G	E	Q	V	K	K	P	CC	VPSKTVSQPRPTQITTRKYQIFIDKMKSNALLFQIPMIF										
gDB118	MRLLLLIFVIVLFPQVTPAYGGRKR	W	N	N	S	G	R	K	K	K	A	A	D	E	V	I	R	A	V	CC	VSQLAFFVKEITSSPSTNGWEEEMDRVSVASTIYLE										
gDB120	MKFLFLFLAILLAMEPVVSEEE	W	M	K	G	K	R	L	V	C	K	N	D	E	D	S	V	T	R	CC	ILSRYLTIIVPMTIDRMLPWTTPQVTOGDS										
gDB121	MKFLLLITVTLILLAQVTPAMK	W	N	N	L	G	R	R	E	T	E	Q	N	E	V	F	H	I	M	CC	ISPKHLPARN										
gDB123	MKLLSLILAGLLLSQLTPGGSLK	W	N	Y	H	G	K	R	Q	K	F	K	K	E	K	V	Y	V	Y	CC	VKSRYLPKNLPWQI										
gDB124	MTQLLLMALVILGHVPTGRSEFR	W	N	G	Q	G	A	R	A	Y	T	K	Y	E	T	Y	M	H	L	CC	LPYGLKPVKTEKV										
gDB126	MKSLFLIILFLLYLQVSGNWNVRK	A	N	K	A	G	N	R	S	T	R	N	G	E	K	M	I	N	P	T	G	M	CC	ILDDGCSIPSVKNIPISGGSGMISAATEGSITGSS							
gDB127	MRLLLIHAILLFQKFTVTEQLKR	W	N	Q	Y	H	G	Y	R	K	I	R	T	T	E	V	R	E	V	L	CC	INLAELFEERKKIKPRPKLRILALITFSQDYLIEQNSITSHR									
gDB129	MKLLFFFAIQLMQLQVNWNIETGLRR	L	M	G	L	G	R	K	E	H	N	M	D	E	K	E	L	D	K	CC	IRSKVVQLKNTQYNEMLHMLKEDSQEVLKTKNVSYM										
gDB130 ¹	MCREIPIHSGWNHFFHQKSNQSGSIFL	A	A	V	L	S	P	F	C	N	P	M	D	S	P	P	G	S	CC	—————											
gDB131	MKLLSLLGLVALLSIVPQARSLFQEG	P	P	G	Y	Y	N	R	M	K	N	V	N	E	Y	A	V	R	Y	CC	KEKKKFEKKKW										
gDB132	MKLLLVFTALGFLVTPAKGGGTTI	G	R	K	I	A	G	H	K	L	E	G	S	L	E	K	T	V	F	M	CC	VKGLFAKPMVMPPTQKPKPKPYRKYTVG									
gDB134	MASHFVIVLWVFDIGLACINLSSELYRR	Y	K	N	G	T	R	L	E	C	F	G	S	E	M	L	V	A	Y	CC	LKGNPDF										

¹. gDB130 部分氨基酸序列¹. Part of amino acid sequence of gDB130

表 6 山羊 β 防御素蛋白修饰及亚细胞定位

Table 6 The modification and subcellular localization of beta-defensins protein in bucks

名称 Name	N 糖基化位点数 N-glycosylation site numbers	O 糖基化位点数 O-glycosylation site numbers	磷酸化位点数 Phosphorylation site number	信号肽预测 Signal peptide	亚细胞定位 Subcellular location
gDB104a	0	7	3	19/20	细胞外
gDB107	0	0	3	无	细胞质
gDB108	0	2	1	无	细胞核
gDB112	1	3	7	无	细胞核
gDB114	0	0	1	无	细胞质
gDB116	2	1	8	无	细胞核
gDB117	5	4	5	23/24	细胞核
gDB118	1	8	7	22/23	线粒体
gDB120	0	0	5	19/20	细胞外
gDB121	0	0	1	14/15	细胞外
gDB123	0	0	5	20/21	细胞核
gDB124	0	0	4	15/16	线粒体
gDB126	2	10	0	20/21	细胞外
gDB127	1	2	5	无	细胞核
gDB129	3	12	8	无	细胞核
gDB131	1	0	1	22/23	细胞核
gDB132	0	1	3	无	细胞质
gDB134	1	0	3	无	细胞质
gDB105tr4	0	0	2	27/28	细胞外
gDB108ltr3	1	3	3	22/23	细胞外
gDB109tr1	0	1	5	33/34	线粒体
gDB110like	0	0	2	无	细胞质
gDB110tr2	0	0	3	21/22	细胞外
gDB119tr1	0	0	4	无	细胞核
gDB122tr1	0	0	4	20/21	细胞外
gDB128tr2	0	1	8	无	细胞核
SPAG11Etr2	0	1	2	无	细胞核

gDB119tr1 和 gDB122tr1 无 O 糖基化位点,其余的 14 个 β 防御素蛋白均含有 O 糖基化位点。从 N 和 O 糖基化位点的情况看,gDB107、gDB114、gDB119~124 和 gDB105tr4 既无 N 糖基化位点,也无 O 糖基化位点,推测其不是糖蛋白。其余 16 个 β 防御素蛋白均可能是糖蛋白。除 gDB126 无磷酸化位点外,其余的 β 防御素蛋白磷酸化位点。

2.2.5 山羊附睾头 β 防御素蛋白信号肽预测及亚细胞定位 表 6 结果显示,gDB104、gDB120、gDB121、gDB126、gDB105tr4、gDB108ltr3、gDB110tr2 和 gDB122tr1 有信号肽,亚细胞定位到细胞外,是分泌蛋白。gDB117、gDB123 和 gDB131 也有信号肽,亚细胞定位在细胞核内。gDB118、gDB124 和 gDB109tr1 也有信号肽,亚细胞定位在线粒体内。

gDB108、gDB112、gDB116、gDB127、gDB129、gDB119tr1、gDB128tr2 和 SPAG 11Etr2 均定位在细胞核内。gDB107、gDB114、gDB132、gDB134 和 gDB110like 定位在细胞质中。PSORT 预测结果还显示在 gDB107、gDB112、gDB129、gDB131、gDB134 和 gDB122tr1 蛋白的 C 端有 ER 膜保留信号(ER Membrane Retention Signals):KKXX-like 元件,而 gDB119tr1 和 gDB109tr1 蛋白不仅 C 端有 ER 膜保留信号 KKXX-like 元件,N 端还有 ER 膜保留信号 XXRR-like 元件,因此,这些 β 防御素有可能是内质网膜的分子伴侣。

3 讨论

3.1 附睾头和睾丸 β 防御素种类及表达特点

在雄性生殖器官内 β 防御素发挥双重功能,它们不仅是内源性抗微生物肽而且还对精子的成熟发挥重要作用^[3-4,11-12]。S. H. Hall 等研究显示表达在男性生殖器官中 β 防御素有 38 种之多^[1],其中高度表达的有 19 种:*hDB120*、*hDB133*、*hDB104*、*hDB111*、*hDB118*、*SPAG11E*、*hDB105*、*hDB119*、*hDB107*、*hDB121*、*hDB108*、*hDB125*、*hDB126*、*hDB127*、*hDB128*、*hDB129*、*hDB132*、*hDB122p* 和 *hDB123*。J. S. Zhang 等^[13]用 RT-PCR 检测男性附睾 13 种 β 防御素中,其中附睾头中 *hDB104*、*hDB118* 和 *hDB119* 表达量较高,*hDB107*、*hDB108*、*hDB123* 和 *hDB1* 是在附睾头中特异表达的。在大鼠生殖器官中 β 防御素有 35 种^[14],RT-PCR 检测结果显示在睾丸中表达有 7 种,表达量顺序由高到低是:*rDB24*、*rDB14*、*rDB33*、*rDB27*、*rDB37*、*rDB29* 和 *rDB36*;附睾头有 29 种,其中特异性表达的有 *rSPAG11E*、*rDB12*、*rDB17* 和 *rDB18*,高度表达的有 *rDB39*、*rDB44*、*rDB25* 和 *rDB29*^[2]。家鼠附睾头表达 β 防御素种类与大鼠基本相同,大多数 β 防御素的表达部位和表达量也相同,仅有 *mDB15* 和 *rDB15*、*mDB1* 和 *rDB1*、*mDB44* 和 *rDB44* 的表达部位和表达量不同^[15],还有研究表明 *mDB11* 和 *mDB12* 是家鼠附睾头特异性表达的^[16]。M. K. Choi 等^[5]用 RT-PCR 方法检测到 2 周龄公猪睾丸中表达有 12 种 β 防御素,表达量顺序由高到低是:*pDB4*、*pDB119*、*pDB104*、*pDB122*、*pDB115*、*pDB108*、*pDB128*、*pDB112*、*pDB129*、*pDB124*、*pDB116* 和 *pDB118*,其表达 β 防御素种类多于本研究 7 日龄公羔睾丸中 8 种

gDB123、*gDB104*、*gDB114*、*gDB120*、*gDB108*、*gDB107*、*gDB128* 和 *gDB112*。B. Guyonnet 等在公猪附睾中发现了 7 种 β 防御素,在附睾头中高度表达的有 *pDB109*、*pDB111*、*pSPAG11B*、*pDB121* 和 *pDB113*(按照由高到低排序),仅 *pDB129* 在附睾头中没有检测到^[17]。现研究发现在荷斯坦奶牛和挪威红牛的公牛附睾头中表达有位于 13 号染色体上 19 种 β 防御素,其中 *cDB142*、*cDB120*、*cDB122a*、*cDB116*、*cDB119* 和 *cDB117* 表达量最高,其次是 *cDB124*、*cDB122* 和 *cDB118*,然后是 *cDB127*、*cDB128*、*cDB129*、*cDB115*、*cDB121* 和 *cDB123*,表达量最低的是 *cDB132*、*cDB126*、*cDB125* 和 *cDB125a*^[6]。本研究转录组分析结果发现成年公羊附睾头中表达 25 种单一 β 防御素和 8 种有可变剪切 β 防御素(共 22 个转录本),其种类较男性生殖器官 38 种少,这可能是本研究没有检测附睾体和附睾尾而引起的种类上差异。与公牛附睾头中 β 防御素相比,除没有检测到 *DB142*、*DB125* 和 *DB125a*,其余 16 种均在公羊附睾头中检测到,但表达量高低有较大的差异,除了品种差异外,所检测的年龄阶段(18、24 月龄公羊)差异也有可能引起表达的差异。

3.2 山羊 β 防御素的生物信息学分析

3.2.1 β 防御素的理化性质 β 防御素是一类阳离子肽,分子量 4~10 ku^[18-20]。山羊睾丸和附睾头 β 防御素的理化性质分析结果显示当 pH 7.0 时,除 *gBD108tr3*(-1.928)和 *gBD134*(-1.296)是带负电荷,其余均是带正电荷,说明山羊 β 防御素是带阳离子短链多肽,均为碱性;山羊 β 防御素分子量在 6.89~13.85 ku,高于人、鼠上报道的 β 防御素的分子量,这可能是种间差异引起的。

3.2.2 β 防御素的结构特点 A. A. Patil 等^[2]研究发现人、大鼠、小鼠和狗 β 防御素都有由 6 个半胱氨酸构成的高度保守的空间模式,基本模式:-C-X₅₋₈-C-X₃₋₇-C-X₅₋₁₃-C-X₄₋₇-CC-,由此形成了严格的 3 个反平行 β 折叠^[21-23],这种结构有利于形成可与细胞膜相互作用的低聚体,使其通透性增加^[24],使 β 防御素具有了抗微生物的活性。本研究中山羊无可变剪切的单一 β 防御素蛋白也都具有 6 个半胱氨酸残基,基本结构为 -C-X₂₋₄₅-C-X₃₋₆-C-X₃₋₁₃-C-X₄₋₇-CC-。除 *gBD112*、*gBD114*、*gBD105* 和 *gBD130* 外,其余 β 防御素蛋白均为 C-X₆-C-X₃-C-X₉-C-X₅-CC-,该模式与现人、大鼠、小鼠和狗 β 防御素的基本结构

一致, gBD112 的 N 端比较长, 这可能会增强本身的免疫功能^[21]。对于有可变剪切 gBD105 转录本 3 和 4, gBD1081 有 8 个半胱氨酸残基, SPAG11E 有 5 个半胱氨酸残基, 这种现象在人 β 防御素也有, 例如 hDB105、hDB133 等, 半胱氨酸超出或缺失是否会引起三级空间结构的变化目前还尚待进一步研究。

3.2.3 β 防御素蛋白修饰与功能 现已报道的大鼠 rDB22 和猕猴 β 防御素 126 是糖蛋白^[3-4, 25], 在精子整个表面形成糖基化外壳, 可以与抗精子的抗体结合, 使其不受免疫识别^[26-27]。大鼠 rDB15 是包被精子头部顶体部分, 该基因敲除后精子运动能力下降, 受精率降低^[13]。任有蛇等^[28] 研究结果显示 gDB104a 也是糖蛋白, 包被在山羊精子的顶体部分和精子中段的线粒体上。在山羊睾丸和附睾头发现的 β 防御素有 16 种可能是糖蛋白, 有些是 N 糖基化位点, 有些是 O 糖基化位点, 还有一部分既有 N 糖基化位点也有 O 糖基化位点。山羊 gDB126 有 10 个 O 糖基化位点, 推测其功能与猕猴 β 防御素 126 相似^[29]。除 gDB126 无磷酸化位点外, 其余的 β 防御素蛋白磷酸化位点, 这说明 β 防御素蛋白可能还是信号分子^[30-31], 大鼠 Bin 1 可与未成熟精子质膜 Ca^{2+} 离子通道结合, 激活 Ca^{2+} 离子通道促进了 Ca^{2+} 吸收, 使精子获得了运动能力^[12]。人附睾中高度表达 hDB29 通过与趋化因子受体 CCR6 的作用促进精子运动及其亲 CCL20 的趋化运动^[32]。hDB3 通过 CCR6 作用激活 caspases 1 and 4、Smad3、MAPKs 和 NF- κ B 的通路增加皮肤角质细胞的 IL-37 的表达^[33]。已有研究显示 hDB5 行使细胞信号的功能^[34]。山羊附睾头中 β 防御素的功能还有待进一步深入研究。

4 结 论

山羊 7 日龄睾丸、成年睾丸和附睾头中分别表达有 7、12 和 33 种 β 防御素, 表达量最高的 β 防御素依次是 gDB123、gDB119 和 gDB124。成年睾丸中特异性表达是 gDB33, 附睾头中特异表达有 21 种 β 防御素。山羊 β 防御素分子量在 6.89~13.85 ku, 为小分子、极性、带正电荷的、疏水性的强碱性多肽。 β 防御素结构-C-X₂₋₄₅-C-X₃₋₆-C-X₃₋₁₃-C-X₄₋₇-CC-。有 16 种 β 防御素是糖蛋白, 除 gDB126 外其余 β 防御素具有磷酸化位点, 可作为信号分子。这些 β 防御素在精子成熟和母畜生殖道内运输过程中发挥重要作用。

参考文献 (References):

- [1] HALL S H, YENUGU S, RADHAKRISHNAN Y, et al. Characterization and functions of beta defensins in the epididymis[J]. *Asian J Androl*, 2007, 9 (4): 453-462.
- [2] PATIL A A, CAI Y, SANG Y, et al. Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene expression in the male reproductive tract family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract[J]. *Physiol Genomics*, 2005, 23(1): 5-17.
- [3] YUDIN A I, TOLLNER T L, TREECE C A, et al. Beta-defensin 22 is a major component of the mouse sperm glycocalyx[J]. *Reprod*, 2008, 136(6): 753-765.
- [4] YUDIN A I, TREECE C A, TOLLNER T L, et al. The carbohydrate structure of DEF126, the major component of the cynomolgus macaque sperm plasma membrane glycocalyx[J]. *Membrane Biol*, 2005, 207 (3): 119-129.
- [5] CHOI M K, LE M T, NGUYEN D T, et al. Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β -defensin genes[J]. *BMC Genet-ics*, 2012, 13: 98.
- [6] NARCIANDI F, LLOYD A T, CHAPWANYA A, et al. Reproductive tissue-specific expression profiling and genetic variation across a 19 gene bovine β -defensin cluster[J]. *Immunogen*, 2011, 63(10): 641-651.
- [7] BAGNICKA E, PRUSAK B, KOŚCIUCZUK E, et al. A note on the organization and expression of β -defensin genes in Polish goats[J]. *Appl Genetics*, 2013, 54: 125-127.
- [8] 张春香, 张国林, 郭丽娜, 等. 基于高通量转录组测序的山羊睾丸和附睾头差异表达基因分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 44(3): 391-401.
ZHANG C X, ZHANG G L, GUO L N, et al. The analysis of differentially expressed genes between caprine testes and caput of epididymis based on transcriptomes with high-throughput RNA-seq technology[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*. 2014, 44(3): 391-401. (in Chinese)
- [9] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. *Bioinformatics*, 2006, 23(1): 127-128.
- [10] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, W475-478, doi: 10.1093/nar/gkr201.

- [11] YENUGU S, HAMIL K G, RADHAKRISHNAN Y, et al. The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin [J]. *Endocrinol*, 2004, 145(7):3165-3173.
- [12] ZHOU C X, ZHANG Y L, XIAO L, et al. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(5):458-464.
- [13] ZHAO Y, DIAO H, NI Z, et al. The epididymis-specific antimicrobial peptide β -defensin 15 is required for sperm motility and male fertility in the rat (*Rattus norvegicus*) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68:697-708.
- [14] ZHANG J S, LIU Q, LI Y M, et al. Genome-wide profiling of segmental-regulated transcriptomes in human epididymis using oligo microarray [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 250(1-2):169-177.
- [15] JELINSKY S A, TURNER T T, BANG H J, et al. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(4):561-570.
- [16] YAMAGUCHI Y, NAGASE T, MAKITA R. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5):2516-2523.
- [17] GUYONNET B, MAROT G, DACHEUX J L, et al. The adult boar testicular and epididymal transcriptomes [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:369.
- [18] LEHRER R I, GANZ T. Defensins of vertebrate animals [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14:96-102.
- [19] BAUER F, SCHWEIMER K, KLÜVER E, et al. Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity [J]. *Protein Sci*, 2001, 10:2470-2479.
- [20] HOLLOX E J, BARBER J C, BROOKES A J, et al. Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1 [J]. *Genome Res*, 2008, 18(11):1686-1697.
- [21] GANZ T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3:710-720.
- [22] GANZ T. Defensins: Antimicrobial peptides of vertebrates [J]. *C R Biol*, 2004, 327(6):539-549.
- [23] LEHRER R I. Primate defensins [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2:727-738.
- [24] HOOVER D M, RAJASHANKAR K R, BLUMENTHAL R, et al. The structure of human defensin-2 sows evidence of higher order oligomerization [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:32911-32918.
- [25] YENUGU S, HAMIL K G, BIRSE C E, et al. Antibacterial properties of the sperm-binding proteins and peptides of human epididymis 2 (HE2) family; salt sensitivity, structural dependence and their interaction with outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli* [J]. *Biochem J*, 2003, 372(Pt 2):473-483.
- [26] RAO J, HERR J C, REDDI P P, et al. Cloning and characterization of a novel sperm-associated isoantigen (E-3) with defensin- and lectin-like motifs expressed in rat epididymis [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68:290-301.
- [27] YUDIN A I, GENERAO S E, TOLLNER T L, et al. Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73:1243-1252.
- [28] 任有蛇, 张国林, 郭丽娜, 等. 公山羊 β 防御素 104a 生物信息学分析及表达特性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 45(2):41-49.
- REN Y S, ZHANG G L, GUO L N, et al. Bioinformatic analysis and expression characteristics of goat beta-defensin 104a gene in adult bucks [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(2):41-49. (in Chinese)
- [29] TOLLNER T L, YUDIN A I, TARANTAL A F, et al. Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia [J]. *Biol Reprod*, 2008, 78:400-412.
- [30] YANG D, CHEN Q, HOOVER D M, et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3 display antimicrobial activity [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 74:448-455.
- [31] YANG D, CHERTOV O, BYKOVAKAIA S N, et al. Beta-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [J]. *Science*, 1999, 286(5439):525-528.
- [32] CABALLERO-CAMPO P, BUFFONE M G, BENENCIA F, et al. A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(1):68-78.
- [33] SMITHRITHEE R, NIYONSABA F, KIATSURAYANON C, et al. Human β -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 2015, 77(1):46-53.
- [34] LU W, DE LEEUW E. Functional intersection of Human defensin 5 with the TNF receptor pathway [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(10):1906-1912.