

黄姑鱼 *NK-lysin* 基因的克隆及表达分析

吴宝兰^{1,2}, 罗 帅^{1,2}, 韩 芳^{1,2}, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 从黄姑鱼转录组数据库中筛选出 *NK-lysin* 基因, 命名为 *YdNkl-2*。*YdNkl-2* 基因 cDNA 全长 600 bp, 其中开放阅读框为 456 bp, 编码 151 个氨基酸。*YdNkl-2* 具有一个信号肽和一个鞘脂激活蛋白 B (saposin B) 结构域。亚细胞定位结果显示, *YdNkl-2* 分布于细胞质和细胞核。实时荧光定量 PCR 结果表明, *YdNkl-2* 的 mRNA 广泛分布于黄姑鱼各组织, 其中在鳃和脾脏中的表达量最高。经哈维氏弧菌感染后, 头肾、肝脏和脾脏中的 *YdNkl-2* 表达量均明显升高, 提示 *YdNkl-2* 在哈维氏弧菌感染黄姑鱼过程中发挥重要作用。

[关键词] 黄姑鱼; *NK-lysin* 基因; 亚细胞定位; 组织表达

[中图分类号] S 965.325; Q 786

Molecular Cloning and Expression Analysis of *NK-lysin* from Yellow Drum *Nibea albiflora*

WU Baolan^{1,2}, LUO Shuai^{1,2}, HAN Fang^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea of Ministry Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, *NK-lysin* gene was cloned from the transcriptome database of *Nibea albiflora*, which was named *YdNkl-2*. The full length of *YdNkl-2* cDNA was 600 bp, including an open reading frame (ORF) of 456 bp, encoding 151 amino acids. *YdNkl-2* contains a signal peptide and a saposin B domain. The subcellular localization of *YdNkl-2* was distributed in the cytoplasm and nucleus. The results of qRT-PCR showed that the mRNA transcripts of *YdNkl-2* were ubiquitously distributed in all the detected tissues, and the expression was the highest in the gill and spleen. After infection with *Vibrio harveyi*, the expression of *YdNkl-2* in head kidney, liver, and spleen increased significantly, suggesting that *YdNkl-2* may play an important role in the process of *V. harveyi* infection.

Keywords: *Nibea albiflora*; *NK-lysin* gene; subcellular localization; tissue expression

0 引言

NK-lysin 是一种由细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T-lymphocytes, CLT) 和自然杀伤淋巴细胞 (natural killer lymphocytes, NKL) 分泌的抗菌肽, 属于鞘脂激活蛋白样蛋白 (saposin-like protein) 家族^[1]。越来越多的鱼类 *NK-lysin* 被研究, 如: 王改玲等^[2] 通过原核表达纯化出了草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的 *NK-lysin* 可溶性融合蛋白, 并证明了该重组蛋白对部分革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌具有

[收稿日期] 2021-04-02

[基金项目] 蓝色粮仓国家重点研发计划项目 (2018YFD0900301); 国家海水鱼产业技术体系项目 (CARS-47-G04)

[作者简介] 吴宝兰 (1995—), 女, 硕士生, 从事鱼类遗传育种方向研究。通信作者: 王志勇 (1963—), 男, 教授, 博导, 从事水产生物遗传育种与生物技术方向研究。E-mail: zywang@jmu.edu.cn

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

抑菌活性; 许巧情等^[3]在真核毕赤酵母体系中表达了黄鳝 (*Monopterus albus*) 的 *NK-lysin* 蛋白, 并表明对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和维氏气单胞菌 (*Aeromonas vertebro*) 具有明显抑制作用; 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的 *NK-lysin* 蛋白具有调节免疫、抑制细菌和病毒增长的功能^[4]; 人工合成的大菱鲂 (*Scophthal musmaximus*) *NK-lysin* 蛋白具有较强的抗寄生虫活性^[5]。大量研究证明, *NK-lysin* 具有较强的杀菌^[6]、抗病毒^[7]和抗寄生虫作用^[8], 在鱼类抵抗病原体感染的先天免疫反应中发挥重要作用。

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 是一种重要的海水经济鱼类, 主要分布于我国沿海^[9]。由弧菌引起的黄姑鱼细菌性疾病日趋严重, 其病原菌主要包括哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)^[10]、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)^[11]和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)^[12]等。长期以来主要使用抗生素预防和治疗鱼类疾病, 导致药物残留和耐药性细菌滋生等问题越来越严重。*NK-lysin* 等抗菌肽具有分子量小、抗菌谱广和不易产生耐药性等优点, 可作为一种新型高效的抗菌药物。研究 *NK-lysin* 等抗菌肽有助于探明鱼类的免疫功能, 对开发新型抗生素具有重要意义^[13]。到目前为止, 尚未有关于黄姑鱼抗菌肽基因的研究报道。本研究尝试从黄姑鱼中克隆 *NK-lysin* 基因, 分析其分子结构特征和系统进化树, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术进一步检测和分析该基因在健康组织和哈维氏弧菌感染后的不同组织的表达情况, 同时分析 YdNkl-2 蛋白的亚细胞定位, 为进一步研究 YdNkl-2 的功能及开发黄姑鱼 *NK-lysin* 等抗菌肽药物奠定基础, 并为开辟黄姑鱼病害预防新途径提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 实验材料

实验所用黄姑鱼幼鱼 ((3.28 ± 1.71) g) 购自福建省宁德市金铃水产科技有限公司。攻毒前, 所有鱼在充气海水中驯养两周, 水温 (27.1 ± 2.1) °C, 盐度 30, 水深 1.0 m。每天在固定时间(每天早上 7:00 和下午 6:00)饲喂两次市售的黄姑鱼配合饲料 (天马水产科技有限公司)。人工攻毒实验所用的哈维氏弧菌菌株分离于自然发病鱼, 由孙云章教授惠赠。

从暂养群体中采集用于黄姑鱼组织表达分析的组织 (脑、心脏、鳃、肾脏、肝脏、皮肤、鳃、胃、头肾、脾脏、小肠和肌肉)。哈维氏弧菌感染实验采用浸泡感染的方法进行: 在一个面积为 4 m², 深度为 1.5 m 的混凝土水池中, 将 8 L 细菌悬浮液 (10^9 CFU/mL) 均匀泼洒在水中, 使其与鱼充分接触, 细菌感染过程持续 3 h, 之后, 将所有鱼转移到装有新曝气海水的池子中, 用次氯酸钠对原来的池子进行消毒。分别在哈维氏弧菌感染黄姑鱼后 6, 12, 24, 48, 72, 96 h 采集头肾、肝脏和脾脏, 置于 RNA 保护液中, 随后保存在 -80 °C 的冰箱中。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 (*TransZol Up Plus RNA Kit*) 购自北京全式金生物技术有限公司; 逆转录试剂盒 (*GoScript™ Reverse Transcription System Protocol*, Promega) 购自上海泰京生物技术有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和无内毒素质粒小量提取试剂盒购自北京天漠科技发展有限公司; 一步克隆试剂盒 (*ClonExpress® II One Step Cloning Kit*) 和荧光定量染料 (*ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix*) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Lipo8000™* 转染试剂、GFP Rabbit Monoclonal Antibody、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L)、蓝色荧光染料 (DAPI)、BeyoColor™ 彩色预染蛋白分子量标准 (15 ~ 120 ku)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)、BeyoBlue™ 考马斯亮蓝快速染色液和 BeyoECL Plus 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司 (Beyotime); 胎牛血清 (FBS) 为 Gibco 公司产品; PBS (pH = 7.4) 缓冲液、胰蛋白酶消化液 Trypsin EDTA Solution A (0.25% 胰酶和 0.02% EDTA) 和 DMEM High Glucose 均为 BI 公司产品; 双抗 (Penicillin 10000 IU/mL-Streptomycin 10 mg/mL) 为 MP 公司产品。本研究所用引物均在厦门铂瑞生物科技有限公司合成。

1.3 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用 *TransZol Up Plus* RNA Kit 进行组织样品的 RNA 提取, 用逆转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链, 并用内参基因 β -actin 对 cDNA 合成质量进行检测。

1.4 *YdNkl-2* 开放阅读框序列的克隆和载体构建

从本实验室构建的黄姑鱼转录组数据库中获得 *YdNkl-2* 的开放阅读框序列。根据 ClonExpress[®] II 一步克隆试剂盒设计了具有 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性位点的特异性引物 (见表 1)。PCR 的步骤如下: 95 ℃, 3 min 预变性, 进行 30 个扩增循环 (95 ℃ 变性 15 s, 58 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 1 min), 72 ℃ 彻底延伸 5 min。将纯化后的 *YdNkl-2* 产物连接到 pEGFP-N1 (本实验室保存), 送往铂瑞生物技术有限公司测序。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5' - 3')	作用 Purpose
qYdNkl-2-F	ATGTTCTGTCTGGACTGTC	qRT-PCR analysis
qYdNkl-2-R	AACCTGGAAGCCTCCTAG	
β -actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	
β -actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	subcellular localization
sNkl-2-F	CTACCGGACTCAGAT <u>CTCGAG</u> ATGAACACCTCTTCTGTTCTTTGT	
sNkl-2-R	GTACCGTCGACTGCA <u>GAATTC</u> TTCAAACAGACTTTGGAGAAGGTCA	

注: *EcoR* I (GAATTC) 和 *Xho* I (CTCGAG) 的酶切位点用下划线标注。

Note: *EcoR* I restriction site (GAATTC) and *Xho* I enzyme restriction site (CTCGAG) are underlined.

1.5 生物信息学分析

通过 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的理化性质, 包括分子量、理论等电点和氨基酸组成; 通过 SignalP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 通过 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> 预测蛋白磷酸化; 通过 NetGlycate 在线工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/>) 进行蛋白质的糖基化位点分析; 通过 http://www.detaibio.com/sms2/color_align_prop.html 和 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 进行氨基酸序列多重比对; 通过 http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1 预测蛋白质的结构域; 通过 <http://swissmodel.expasy.org/interactive> 预测蛋白质的三级结构, 并用 VMD 1.9.2 beta 1 编辑蛋白质三级结构; 利用 MEGA 6.06 软件的 Maximum-Likelihood 法进行系统进化树分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析 *YdNkl-2* mRNA 的表达

设计了特异性引物 qYdNkl-2-F 和 qYdNkl-2-R (见表 1), 选择黄姑鱼 β -actin 作为内参基因, 以稀释 80 倍的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR。用 StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪, 按照荧光定量染料 ChamQ[™] Universal SYBR[®] qPCR Master Mix 说明书进行 PCR。PCR 反应体系 (20 μ L): 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L; 正向、反向引物各 0.5 μ L; cDNA 模板 4 μ L; 无菌水 5.0 μ L。PCR 反应程序: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s; 循环 40 次。最后熔解曲线步骤: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s。每个样品进行 3 个生物学重复, 4 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法结合 SPSS 20.0 中的 one-way ANOVA 及 LSD Multiple Comparison Test 进行基因差异表达分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

1.7 *YdNkl-2* 的亚细胞定位

将构建成功的表达质粒 GFP-*YdNkl-2* 转染至人类胚胎肾 293T (HEK 293T) 细胞进行亚细胞定位。把 HEK 293T 细胞接种到 12 孔板中, 培养基含有 10% (体积分数) FBS 和 1% (体积分数) 双抗的 DMEM, 维持 5% (体积分数) CO₂ 37 ℃ 恒温培养 24 h, 之后, 使用 Lipo 8000[™] 转染试剂分别将 GFP-*YdNkl-2* 和 pEGFP-N1 质粒 (对照组) 转染到细胞中。

在转染 24 h 后,收集细胞并用细胞裂解缓冲液裂解,然后通过 Western blot 验证 GFP-YdNkl-2 和 pEGFP-N1 蛋白。蛋白质印迹步骤如下:蛋白质样品通过 12% (质量分数) SDS-PAGE 处理后转移到 PVDF 膜上;将膜用含有 5% (质量分数) 牛血清白蛋白的 TBST 缓冲液在室温下封闭孵育 2 h,然后转移到 GFP 一抗稀释液中 4 ℃ 过夜;用 TBST 洗涤 5 次 (每次 5 min),将膜与二抗稀释液一起孵育 2 h,再用 TBST 洗涤 7 次 (每次 5 min)。膜用 BeyoECL Plus 化学发光试剂盒检测,用 ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) 拍照。

另外,用 4% (质量分数) 多聚甲醛固定细胞,0.2% (体积分数) Triton X-100 透化细胞,0.2% (体积分数) DAPI 染色。使用共焦荧光显微镜 Leica TCS SP8 系统 (Leica, 德国) 观察蛋白质的亚细胞定位。

2 结果与分析

2.1 YdNkl-2 基因序列分析

根据本实验室组装的黄姑鱼基因组数据 (未发表), *YdNkl-2* 基因 cDNA 全长为 600 bp, 包括 6 bp 的 5'非编码区 (UTR)、138 bp 的 3'非编码区 (UTR) 和 456 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 151 个氨基酸 (见图 1)。该蛋白质的理论相对分子质量为 17.04 ku, 理论 pI 为 5.21。采用 SignalP 5.0 Server 预测 YdNkl-2, 发现包含一个信号肽。SMART 蛋白结构域的预测表明, YdNkl-2 蛋白具有一个鞘脂激活蛋白 B (saposin B) 结构域 (见图 2)。通过 SWISS-MODEL 数据库建模, YdNkl-2 蛋白的三级结构如图 3 所示, 主要由多个 α -螺旋组成。

```

1 ccaacaatgaacacctcttctgttctcttgtgtgcatcctggtggcatgttctgtctgg
1 M N T S S V L F V C I L V A C S V W
61 actgtccacgggagaaactgaagatcaacatcgtatgcaggaggagcagaattggac
19 T V H G R N L K I N I D D Q E G A E L D
12latctctgtggaggctaggaggcttcagggtttgtgctgggtgtgcaagtggagcttagac
39 I S V E A R R L P G L C W V C K W S L D
18laggtgaagaaagtccctggacacaacgccactgtggagtttgtgaaaggaaagttagac
59 R V K K V L G H N A T V E F V K G K L I
24lggggtctgcgacgatattggcctcttgaatctctatgcaagaaattgtcaaggacat
79 G V C D D I G L L K S L C K K F V K G H
30lctttgggtgttaatcgaggagcttaccaccactgatgatgtgaggacgatctgtgtcaac
99 L W V L I E E L T T T D D V R T I C V N
36lctcaaagcctgcaagctgaaggagtgtttgagctggactttgaaagcgacgaggtatgacg
119 L K A C K L K E L F E L D F E S D E D A
42lcacgtgaaatgaatgaccttctccaaagtctgtttgaataattgaccttcatttagcaa
139 H A E M N D L L Q S L F E *
48lgaaaaacataaaccacaagtgttaagtgcacgctttttgtttttgttactgtcttg
54lctttgattgacattgcaatcgctgtattggttaatctctggatcatctgtgcagatgat

```

灰色阴影部分表示信号肽,黄色阴影部分表示鞘脂激活蛋白 B 结构域,紫色方框表示半胱氨酸,* 代表终止密码子

Signal peptide is shown by gray shadow,saposin B domain is shown by yellow shadow, the cysteines (C) are shown by purple box, * means the stop code

图 1 黄姑鱼 *YdNkl-2* 的 cDNA 序列及对应的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequences and amino acid sequences of *YdNkl-2* in *N.albiflora*

2.2 YdNkl-2 氨基酸同源性和系统进化关系分析

氨基酸同源比较结果表明:黄姑鱼与鱼类的同源性为 30.46% ~ 81.46% (见表 2), 具有较高



图 2 信号肽 (红色条带)、saposin B 结构域和低复杂度序列 (粉色条带)

Fig.2 The signal peptide (represent red band), the saposin B domain, and the low complexity (represent pink band)

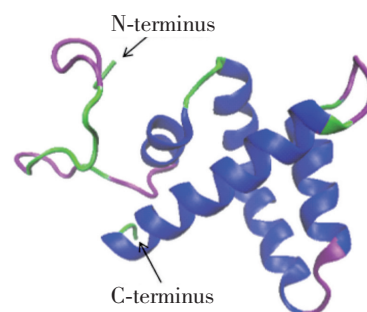


图 3 YdNkl-2 蛋白的三级结构

Fig.3 Tertiary structure of *YdNkl-2* protein

的同源性；与其他物种一样，含有 6 个保守的半胱氨酸（cysteine，C）（见图 4）。

系统进化分析表明：YdNkl-2 蛋白与鱼类的 NK-lysins 聚为一支（见图 5）；哺乳动物和鸟类各自聚为一支。结构相似性和保守进化关系表明：YdNkl-2 蛋白是鞘脂激活蛋白样蛋白家族的成员，并包含 NK-lysin 的基本特征。

表 2 YdNkl-2 蛋白系统发育分析的序列登录号

Tab.2 Accession numbers of sequences used in phylogenetic analysis of YdNkl-2 protein

登录号 Accession number	物种 Species	相似度 Identity/%	登录号 Accession number	物种 Species	相似度 Identity/%
AII25791.1	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	81.46	AKT74321.1	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	30.46
QIJ31327.1	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	62.50	AFT64210.1	羊 <i>Ovis aries</i>	21.56
AGM21637.1	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	50.33	NP_001068611.1	牛 <i>Bos taurus</i>	20.96
ATW66454.1	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	49.67	NP_001038145.1	鸡 <i>Gallus gallus</i>	19.16
ACI68092.1	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	45.70	NP_001075398.2	马 <i>Equus caballus</i>	18.56
NP_001187137.1	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	32.91	NP_001265684.1	猪 <i>Sus scrofa</i>	16.07
AOT80798.1	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	31.58	NP_006424.2	人 <i>Homo sapiens</i>	12.57

<i>Nibea albiflora</i>	-MNTSSVLFVCILVACSVWTVHGRNLKINIDDQEGAELD-----ISVEARRLPGLCWVCKWSLDFVKKVL 64
<i>Larimichthys crocea</i>	-MNSSSVLFVCILGACSVWTVHGRNLKVNDDQEGAELD-----ISVEARRLPGLCWVCKWSLDFVKKLL 64
<i>Ictalurus punctatus</i>	-MFWNLLVASFFIGSACAMHMEYLRVDSAEELLDGSLDST-----DEDEDLAMSETQLLPACWACQWAMKLVKKQL 71
<i>Oreochromis niloticus</i>	-MEMPSLIFPCLVATFSVRVHGRTELEVSIDDEEDVDME-----VL--MG-LPGKCKWACKWILNKVKKLA 61
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	-MLPCILLATLLISSVCAFDMEMHRGNFTDELEQISG-----EMAPAQQLPGLCWACKWAMKLVKKLI 63
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	-MNKSPILLFCILAACSVWSVHGKSQEMNIDDEEPAEVE-----LPVEAK-PPGLCWGCKWALNKVKKAM 63
<i>Danio rerio</i>	-MLRNIFLVGLLIYAVSAHWEVREVDSAEDELLETPN-----DNMVKQKFPFGMCSLCKYVMKLVKKERI 63
<i>Salmo salar</i>	-MKTSLVLLALSLLACSVWEIQG---QCREDDQE-AQSE-----KCMET-LFGTCWVCKWALKVKKEST 59
<i>Sparus aurata</i>	-MEQSSVLLVLCILVTCCVWTVHGRTLQINTDDQEPVDIE-----ISGEAGKIPGICWACKWALNKVKKVI 64
<i>Bos taurus</i>	MTSWAVLLITSVLLVAPGLAFSGLTPESHDQATAHLCDGDELQGLALEDPQGDLLQGEELSRLQSGCRRIIQHMDKL 80
<i>Equus caballus</i>	MTSRALLLASALLGTPGLTFSGINPESYDLATAHLSDEGEQFCQGLTQEDLQGDLLTERERQGIACWSCRKILQHLEDLV 80
<i>Ovis aries</i>	MTSWAVLLIASVLLVAPGLAFSGLTPESHDQATAHLCDGDELQGLDPEDPQGDLLQGEELGLGCPWMIMQHMDKL 80
<i>Sus scrofa</i>	MTSWAVLLITLVLGTPGLAFSGLTPEHSALARAHPDGEQFCQNLAPEDPQGDQLQREELGLICESCRKIIQHLEDMV 80
<i>Gallus gallus</i>	MAAALIVLLALGAQVAVTEPPRDDRDLGASHWEQQWHLQDGSAAWDADEGDAMGPGKGIKRCFCVSLVKVQKIV 80
<i>Nibea albiflora</i>	GHNATVEFVKGLIGVDDIG-LLSLCKKFKVGHVWVIEELTTTDDVRTICVNLKACKLKELFELDFESDE-DAHAEM 142
<i>Larimichthys crocea</i>	GRNTTAESVKEKLMRVONEIG-LLSLCKKFKVGHVWVIEELTTTDDVRTICVNLKACKPKELSELDFESDE-DAHTEM 142
<i>Ictalurus punctatus</i>	GNNPTVDITKAQKKVNSIG-FLGGLCKMKINKYLDLVEELSTTDDPTTICGNLGIKSLSMLELQAFQHHKQI-- 148
<i>Oreochromis niloticus</i>	GPNPTAESLKSLLSVCDGIG-LLSLCKKFKVKAHLGELIEELTTTDDGVRTICVNMGACKSKE-LELLFYAENGGLIDV 139
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	SRTATPSDIKRALSHVDEIG-FLFMCRIFVNKYLGVVIEELSTTDDARTICVHVGVG----- 121
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	TQKETYEKVKARLIKICNKIG-FLSRCHKFVITHLDELVEELSTTDDVKTICVNVKACNPKPEKSHLLFYFNN----- 135
<i>Danio rerio</i>	SADSTPDEIKNKLMLNCEKAW-LLGQCKQKFKVTHLHTLIDELMTNDGVNTICAKALVCKFGPPRKEFNFIHRAVNE 142
<i>Salmo salar</i>	STSDSQETLKQKLLSVCDKVG-FLSMCKGLMKKHLVWVIEELSTTDDVRTICVNIKACKPKELDLDSY----- 127
<i>Sparus aurata</i>	GPNATTESVTTKLNSVONEIG-LLALCKKFKVKAHLGELIEELTTTDDVRTICVNTGACKPKENVNLLFYRSDVDKAFEM 143
<i>Bos taurus</i>	GDQPDENTVIEEASKVCKMR-LLGLCKSINKKFLRTIAEDIVAGKTSQVICVDIKMCKSKPVGFI----- 146
<i>Equus caballus</i>	GEQPNEATINEASRVCRNLG-LLGACKKIMRTCLRLSRDILAGKKPQEVCDIKLCKHK-AGLI----- 145
<i>Ovis aries</i>	GDQPDENTVIEVASKMCKMR-LLGLCKSITKFLRRITADITAGKTSRVICEDIKMCKSKPVGFI----- 146
<i>Sus scrofa</i>	GPQPNEDTQTQAASRVCKMK-ILGCVCKKIMRTFLRRISKDILTGGKPAICVDIKICKEK-TGLI----- 145
<i>Gallus gallus</i>	GDDPDEDAINNALNKVCTGR-RQSSICKQLLKKLRQQLSDALQNNDDPRDVCTTLGLCKG----- 140

黄色部分表示半胱氨酸 The cystines (C) are shown by yellow shadow

图 4 YdNkl-2 氨基酸序列的多重比较

Fig.4 Multiple sequence alignment of YdNkl-2 protein

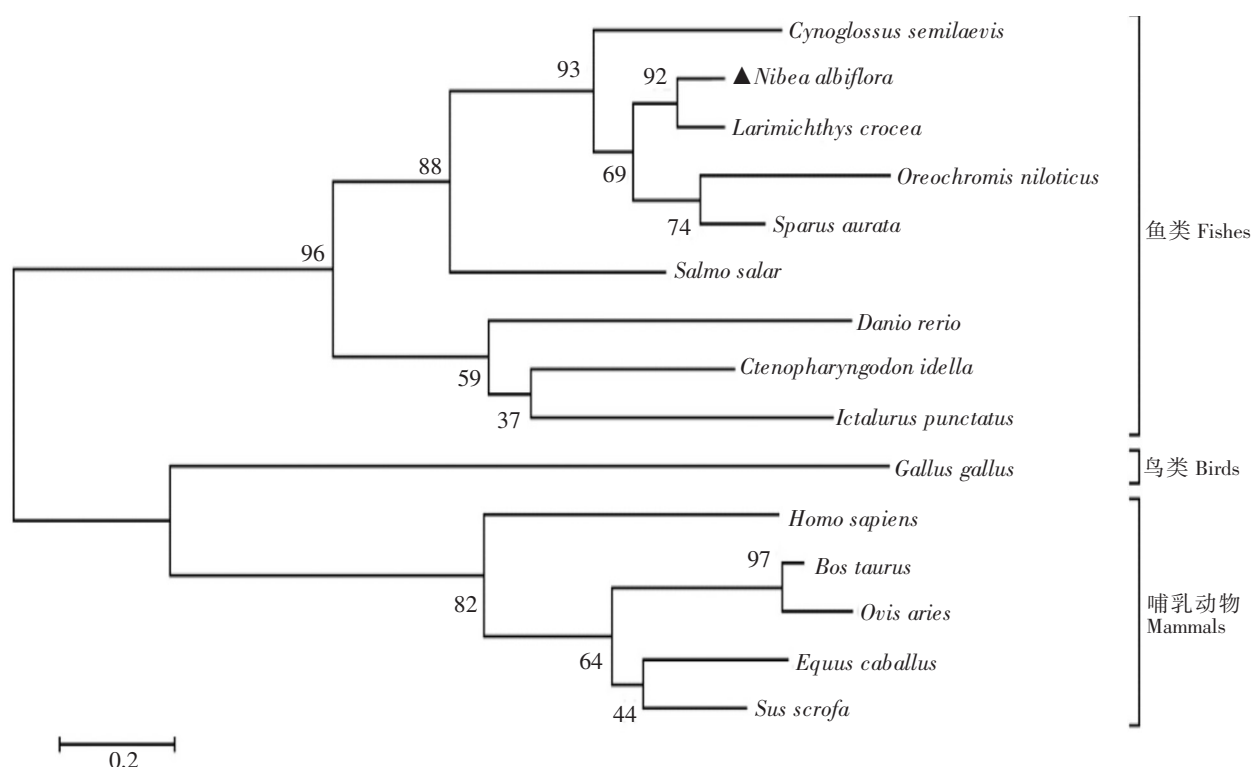


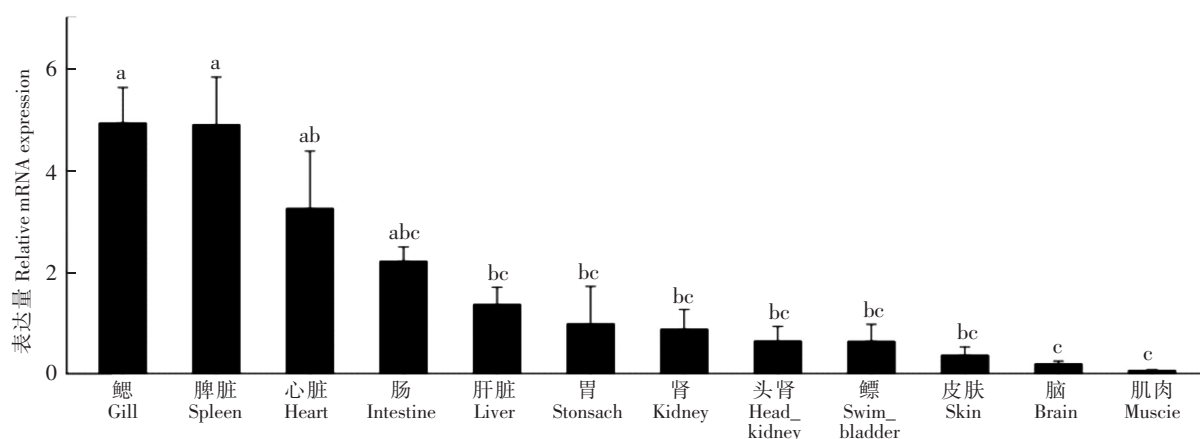
图5 黄姑鱼 YdNkl-2 的系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of YdNkl-2 protein

2.3 YdNkl-2 的组织表达图谱及哈维氏弧菌感染后的表达变化

用 qRT-PCR 检测 YdNkl-2 在健康组织中的表达情况, 结果如图6所示, YdNkl-2 的 mRNA 普遍分布于各个组织, 但不同组织/器官中的表达量存在差异, 在鳃和脾脏中的表达量较高, 而在脑和肌肉中的表达量较少。

哈维氏弧菌浸泡感染黄姑鱼后, YdNkl-2 在头肾、肝脏和脾脏中的表达如图7所示。头肾、肝脏和脾脏中 YdNkl-2 的表达量均明显升高。其中: 肝脏中, YdNkl-2 的 mRNA 表达量在 24 h 显著上升并达到峰值; 脾脏中, YdNkl-2 的 mRNA 表达量在 6 h 显著上升并达到峰值; 头肾中, YdNkl-2 的 mRNA 表达量在 12 h 显著上升并达到峰值。这些结果暗示 YdNkl-2 具有潜在的免疫功能。

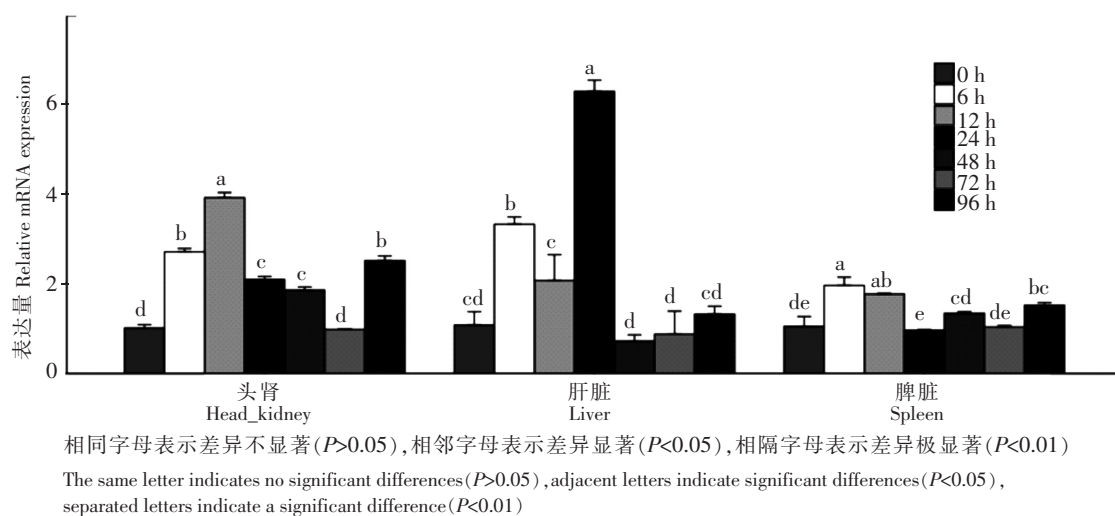


相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 相邻字母表示差异显著 ($P<0.05$), 相隔字母表示差异极显著 ($P<0.01$)

The same letter indicates no significant differences ($P>0.05$), adjacent letters indicate significant differences ($P<0.05$), separated letters indicate a significant difference ($P<0.01$)

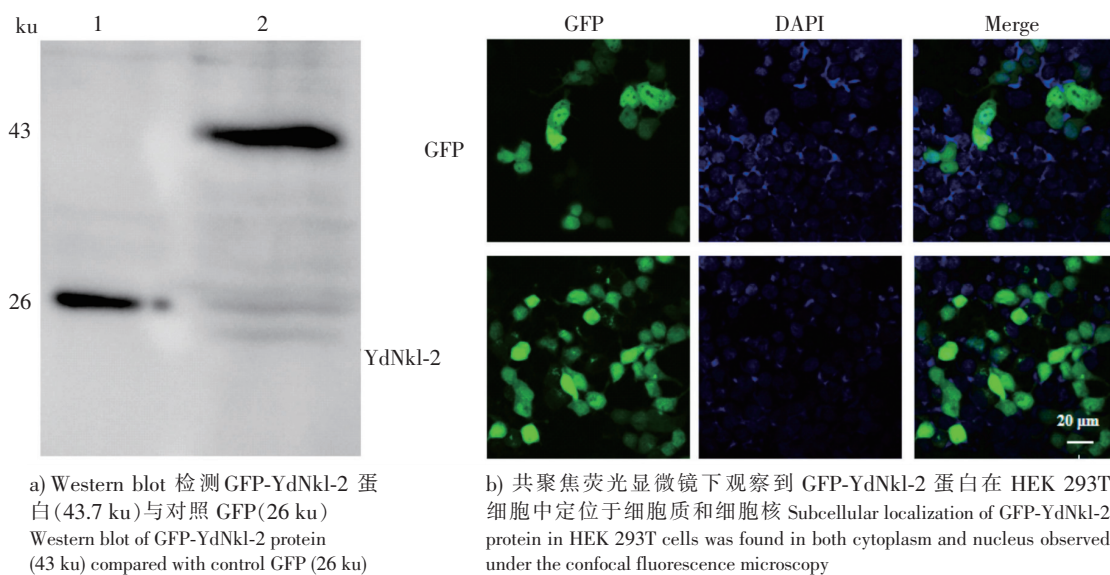
图6 YdNkl-2 在不同健康组织中的表达

Fig.6 Healthy tissue profiles of YdNkl-2 expression

图 7 *YdNkl-2* 在三种感染组织中的相对 mRNA 表达Fig.7 Relative mRNA expression of *YdNkl-2* after *V. harveyi* infection in three tissues

2.4 *YdNkl-2* 的亚细胞定位

YdNkl-2 蛋白的亚细胞定位结果 (见图 8) 显示, GFP-*YdNkl-2* 蛋白在 HEK 293T 细胞中成功表达, 与实际大小一致 (43 ku); GFP-*YdNkl-2* 蛋白在细胞质和细胞核都有分布, 与 pEGFP-N1 结果相似。

图 8 *YdNkl-2* 的亚细胞定位Fig.8 The subcellular localization of *YdNkl-2*

3 讨论

NK-lysin 的氨基酸序列具有多态性^[14], *YdNkl-2* 与其他鱼类的 NK-lysin 有较高的同源性 (30.46%~81.46%, 见表 2), 而与哺乳类和鸟类的同源性只有 12.57%~21.56%; 不过, *YdNkl-2* 在进化过程中还是具有高度保守的结构, 含有一个鞘脂激活蛋白 B (saposin B) 结构域和 6 个保守的半胱氨酸 (cysteine, C)。有研究证明 NK-lysin 的鞘脂激活蛋白 B (saposin B) 结构域与鞘脂的降解代谢有关^[15]; 6 个保守的半胱氨酸可形成 3 个分子内二硫键, 而二硫键是 NK-lysin 发挥抗菌活性的关键^[16]; *YdNkl-2* 与大多数鱼类^[17-18]、哺乳类 NK-lysin 基因的结构相似, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成。综上, *YdNkl-2* 具有保守的结构特征, 与其生物学功能密切相关。

黄姑鱼鳃和脾脏中的 *YdNkl-2* 表达量较高, 脑和肌肉中的较少。其他鱼类也有类似的研究结果,

例如:虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 *NK-lysin* 蛋白在鳃和脾脏中高表达^[19];团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[20]和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[21]的 *NK-lysin* 蛋白在鳃和脾脏中高表达,在肌肉中表达量极低。鳃是鱼类抵御病原体的第一道防线,同时脾脏是鱼类的主要免疫器官,这些结果提示 *YdNkl-2* 在黄姑鱼抵御病原体中发挥着重要作用。

哈维氏弧菌浸泡感染黄姑鱼后,黄姑鱼 *YdNkl-2* 在头肾、肝脏和脾脏中的 *YdNkl-2* 表达量均明显升高。在其他鱼类的研究中,用 lipopolysaccharide (LPS) 刺激黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*),头肾中 *NK-lysin* 的表达量显著上升并在 12 h 达到峰值^[17];卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 被美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*) 感染后,肝脏和脾脏中的 *NK-lysin* 表达量均显著上升^[6];大黄鱼被刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 刺激后,头肾、肝脏和脾脏中的 *NK-lysin* 表达量均明显升高^[22]。这些结果表明,对于不同的免疫刺激, *NK-lysin* 在头肾、肝脏和脾脏等免疫器官中的表达量均显著上升,提示 *NK-lysin* 在鱼类中参与重要的免疫功能。

通过 PSORT 在线工具 (<https://www.genscript.com/psort.html>) 预测 *YdNkl-2* 蛋白的亚细胞定位,结果显示在细胞质 (21.7%)、细胞核 (13.0%)、细胞外 (17.4%) 均有分布;通过构建真核表达质粒 GFP-*YdNkl-2* 进行亚细胞定位验证,与在线预测结果一致, GFP-*YdNkl-2* 蛋白在细胞质和细胞核均有分布。*NK-lysin* 含有一个信号肽,为分泌型蛋白,在病原体的刺激下,会被释放到细胞外,主要通过破坏病原体的细胞膜来发挥抗菌功能^[17,23-24]。

鱼类抗菌肽是鱼类先天免疫系统的一类效应分子,作为抵御微生物病原体入侵的第一道防线,具有抗菌活性高、抗菌谱广等优点,是一种极具应用前景的抗生素的替代品。直接从生物体分离纯化抗菌肽成本太高,且数量极少,而人工合成的抗菌肽较长时,又存在纯化困难和成本高等一系列问题。采用分子克隆和基因工程技术体外表达抗菌肽,在新型鱼病抗菌药物开发领域显示出巨大的潜力。2015 年我国审批通过第一个海洋动物(大黄鱼)抗菌肽基因工程产品生产应用安全证书,2016 年青蟹抗菌肽基因工程产品生产应用安全证书也获批。

研究^[25]表明,将重组天蚕素抗菌肽 B 和天蚕素抗菌肽 P1 单细胞克隆入鲑鱼 (*Chinook salmon*) 胚胎细胞中,鲑鱼胚胎细胞表达出来的天蚕素抗菌肽对嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和安圭拉弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 等 3 种病原菌有很强的抑制作用。在水生动物饲料中,将抗菌肽制剂添加到鱼饲料中,不仅可以提高水产动物的免疫抗病力,而且可以提高水产品质量,缓解水产养殖中的细菌耐药性及水产品抗生素污染等问题。林鑫等^[26]将饲喂添加抗菌肽饲料的锦鲤感染维氏气单胞菌 10 d 后的累积死亡率显著降低,证实口服抗菌肽可以显著提高锦鲤的抗病能力。本实验首次从黄姑鱼中克隆到含 151 个氨基酸的抗菌肽,分子量小,结构简单,具有保守的结构特征;经哈维氏弧菌刺激后,可诱导 *YdNkl-2* 在黄姑鱼免疫器官中显著上调表达,为进一步研究其抗菌机制奠定了基础;同时通过酵母发酵和喷雾干燥工艺制成酵母制剂,可获得安全高效的饲料添加剂,也可作为饲料原料或者食品的防霉抑菌剂,能有效解决海水养殖中的抗生素污染和饲料原料易霉变等问题,还可以研制成新型药物,为我国水产养殖业提供能够替代抗生素的安全有效的抗菌药物。

[参 考 文 献]

- [1] WANG Q, BAO B, WANG Y, et al. Characterization of a *NK-lysin* antimicrobial peptide gene from channel catfish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(3): 419-426.
- [2] 王改玲,王明成,李传凤,等. 草鱼 *NK-lysin* 基因的克隆、原核表达与活性分析 [J]. *水产学报*, 2017, 41(10): 1500-1511.
- [3] 许巧情,汤东东,夏理海,等. 黄鳝 *NK-lysin* 基因的真核表达与体外活性分析 [J]. *生物技术*, 2019(4): 317-323.
- [4] ZHANG M, LONG H, SUN L. A *NK-lysin* from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 40(3/4): 258-265.

- [5] LAMA R, PEREIRO P, COSTA M M, et al. Turbot (*Scophthalmus maximus*) Nk-lysin induces protection against the pathogenic parasite *Philasterides dicentrarchi* via membrane disruption [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 82: 190-199.
- [6] LIU B, LIU G, GUO H, et al. Functional characterization of NK-lysin in golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2020, 107: 103658.
- [7] VALERO Y, ARIZCUN M, CORTÉS J, et al. NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 103: 103516.
- [8] LEE S H, LILLEHOJ H S, TUO W, et al. Parasiticidal activity of a novel synthetic peptide from the core α -helical region of NK-lysin [J]. Veterinary Parasitology, 2013, 197(1/2): 113-121.
- [9] 徐冬冬, 李三磊, 楼宝, 等. 黄姑鱼的生物学特征和养殖生态学的研究现状及养殖前景 [J]. 现代渔业信息, 2010, 25(10): 23-26.
- [10] 谢楚萍, 黄思韵, 郑仰思, 等. 养殖浅色黄姑鱼体表溃烂症病原菌的分离与鉴定 [J]. 应用海洋学学报, 2013, 32(3): 411-417.
- [11] 马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 等. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008(10): 960-964.
- [12] 黄志明. 从皮肤溃疡的 Mian 状黄姑鱼检出弧菌 [J]. 福建农业学报, 2002(4): 223-225.
- [13] 王青, 徐彦召, 刘保国, 等. 抗菌肽的特点及其基因工程研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(17): 5-8.
- [14] 张纯, 朱荫昌. 寄生虫鞘脂激活蛋白样蛋白的研究进展 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2010, 37(4): 236-240.
- [15] 吴文贤. 家蚕 saposin-like 初步研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2012.
- [16] 王亚楠. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 两种抗菌肽和细胞因子 Midkine 的克隆与表达分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [17] ZHU R, WU Y, LIU X, et al. Membrane disruptive antimicrobial potential of NK-lysin from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 571-580.
- [18] WANG G L, WANG M C, LIU Y L, et al. Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 11-21.
- [19] MA H, HAN Y, PALTI Y, et al. Structure and regulation of the NK-lysin (1/4) and NK-lysin like (a and b) antimicrobial genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 116: 103961.
- [20] 詹柒凤, 丁祝进, 崔蕾, 等. 团头鲂 NK-lysin 基因鉴定和表达分析 [J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1145-1155.
- [21] 周齐家. 大黄鱼抗菌肽 NK-lysin 的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2015.
- [22] ZHOU Q, WANG J, MAO Y, et al. Molecular structure, expression and antibacterial characterization of a novel antimicrobial peptide NK-lysin from the large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. Aquaculture, 2019, 500: 315-321.
- [23] 王艳, 丁雪, 赵晶, 等. 哺乳动物抗菌肽的生物信息学预测与分析 [J]. 广东农业科学, 2015, 42(3): 131-133, 139.
- [24] LEE M O, JANG H, HAN J Y, et al. Chicken NK-lysin is an alpha-helical cationic peptide that exerts its antibacterial activity through damage of bacterial cell membranes [J]. Poultry Science, 2014, 93(4): 864-870.
- [25] SARMASIK A, CHEN T T. Bactericidal activity of cecropin B and cecropin P1 expressed in fish cells (CHSE-214): application in controlling fish bacterial pathogens [J]. Aquaculture, 2003, 220(1/4): 183-194.
- [26] 林鑫, 毛述宏, 杨阳, 等. 饲料中添加抗菌肽对锦鲤生长、非特异性免疫力和抗病力的影响 [J]. 动物营养学报, 2013, 25(8): 1860-1865.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)