

大黄鱼 *Rac2* 基因的克隆及其抗病免疫作用分析

刘岚萍, 韩芳, 张宇, 王小龙, 王志勇

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 克隆了大黄鱼 ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (*Rac2*) 基因 (命名为 *lycRac2*), 并从本实验室大黄鱼基因组数据库中获得了 *lycRac2* 基因的全长序列。*lycRac2* 基因全长 1670.427 kb, 包含 7 个外显子、6 个内含子, 其 cDNA 序列全长 1221 bp, ORF 为 579 bp, 编码 192 个氨基酸。同源性比较结果显示, 从鱼类到哺乳动物, RAC2 蛋白的氨基酸序列相当保守, 其基因均具有 7 个外显子和 6 个内含子, 但不同物种之间 7 个外显子和 6 个内含子的长度都不一致。实时定量 PCR 检测结果显示, *lycRac2* 基因在肝脏、脾脏、肠、胃、肾、头肾、肌肉、皮肤、脑、鳃、心脏、血液中均有不同程度表达, 其中在头肾中表达量最高, 肌肉中表达量最低。大黄鱼受到 LPS (脂多糖)、polyI:C、副溶血弧菌刺激后, 肝脏、脾脏、头肾中 *lycRac2* 基因表达量明显上调, 显示 *lycRac2* 基因参与了大黄鱼的免疫反应, 其可能具有对细菌和病毒的抗病免疫作用。通过原核表达还获得 *lycRAC2* 蛋白, 为进一步研究其性质和功能奠定了基础。

[关键词] 大黄鱼; *Rac2*; 基因结构; 免疫应答

[中图分类号] Q 786; S 942.5; S 965.322

Cloning and Analysis of *Rac2* Gene in Disease-Resistant in the Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)

LIU Lanping, HAN Fang, ZHANG Yu, WANG Xiaolong, WANG Zhiyong

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (*Rac2*) gene, was cloned from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) (named as *lycRac2*), and its full length was obtained by comparing with the genome database of *L. crocea* in our laboratory. The full length of *lycRac2* gene was 1670.427 kb, including 7 exons and 6 introns. And the cDNA of *lycRac2* was 1221 bp, containing a 579 bp open reading frame (ORF) which encoded a deduced protein of 192 amino acids. Homology comparison showed that RAC2 is a very conserved protein in both fish and mammal and all the genes have 7 exons and 6 introns with different lengths. Quantitative real time PCR revealed that *lycRac2* gene expressed in liver, spleen, intestines, stomach, kidney, head-kidney, muscle, skin, brain, gill, heart and blood, and the highest expression was in head-kidney while the lowest expression was in muscle. After stimulated by LPS, polyI:C and *Vibrio parahaemolyticus*, the expression of *lycRac2* gene in liver, spleen, head-kidney was up regulated obviously, this indicated that *lycRac2* would participate in the immune activity and play a crucial role in defence against bacteria and virus. In this study, *lycRac2* gene was expressed successfully in *Escherichia coli*, which would lay the foundation for further study of character and function of the protein.

[收稿日期] 2017-02-20

[修回日期] 2017-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31402339); 福建省高校杰出青年科研人才培育计划基金项目 (2015)

[作者简介] 刘岚萍 (1989—), 女, 硕士生, 从事遗传育种研究。通信作者: 王志勇 (1963—), 男, 教授, 博导, 从事水产生物遗传育种学、水产生物技术方向研究。E-mail: zywang@jmu.edu.cn

Keywords: large yellow croaker; *Rac2*; gene structure; immune response

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*), 又名黄瓜鱼、黄花鱼, 在分类上属鲈形目石首鱼科黄鱼属, 是中国近海最重要的海水经济鱼类之一, 主要分布于东南沿海地带^[1]。但是, 随着养殖规模扩大, 病害问题也日趋严重, 成为影响其养殖效益的主要因素, 每年的疾病爆发都给大黄鱼养殖业造成了巨大的经济损失^[2-3]。因此, 亟需研究大黄鱼的免疫防御机制。

小 G 蛋白 (small G-Protein or small GTPase) 是细胞内的分子开关, 它由 150 多个成员组成, 这些成员被划分为 Ras、Rho、Rab、Arf/Sar 和 Ran 5 个亚家族^[4]。小 G 蛋白可以调控很多细胞功能, 例如细胞增殖和分化、细胞骨架重排、核质运输等^[5]。RAC 蛋白是属于 Rho 家族的小 G 蛋白, 参与很多调节通路, 如基因表达、细胞增殖、细胞粘附、细胞骨架形成等^[6], 主要包括三种不同的亚家族, 分别为 RAC1、RAC2 和 RAC3^[7]。这三种蛋白有不同的表达形式, 而且参与到很多生物功能的调节过程中^[8]。研究表明, *Rac2* 是细胞信号传导和肌动蛋白形成细胞骨架中重要的调节因子^[9], 它主要定位于吞噬体膜上, 可以参与造血细胞的形成, 在头部表达量最高并且在颈部鳞状细胞癌中有较高表达量, *Rac2* 在调节细胞信号传导和肌动蛋白骨架中发挥作用^[10]。*Rac2* 也可以在造血细胞和内皮细胞上整合素和抗体信号传递发挥作用^[11], 大黄鱼中如 *Rab5A*^[12]、*Ran*^[13] 等基因已得到研究, 但在大黄鱼中 *Rac2* 基因研究较少。

本研究克隆了大黄鱼 *lycRac2* 基因 cDNA 全长, 研究了其组织表达谱, 以及大黄鱼受到脂多糖 (LPS)、polyI:C、副溶血弧菌免疫刺激后肝脏、脾脏、头肾中 *lycRac2* 基因的表达变化, 并构建了重组质粒进行原核表达获得 *lycRAC2* 蛋白, 对其功能和性质的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼的来源和处理

实验用大黄鱼采自福建省宁德市三都澳海区养殖网箱, 体长为 (18.0 ± 2.0) cm, 体重 (66.62 ± 4.55) g, 从网箱取回后放在室内水泥池中暂养 1 周使其适应环境, 期间海水温度为 23 ~ 26 °C, 盐度为 27 ~ 28, 以散气石连续充气。

组织表达谱分析样品的采集: 取健康活鱼的肝脏、脾脏、肠、胃、肾脏、头肾、心脏、鳃、脑、皮肤、肌肉、血液, 迅速置于 RNA 保护液中, 运回实验室后 -80 °C 保存待用。

免疫刺激实验及样品采集: 将暂养 1 周后的大黄鱼分为 1 个对照组和 3 个实验组, 每组各 60 尾; 实验组分别于每尾鱼腹腔注射 250 μ L LPS (L2880, Sigma, USA)、250 μ L polyI:C (1 mg/mL, Sigma, USA) 和 250 μ L 副溶血弧菌 (1.0×10^8 cell/mL) 进行免疫刺激, 对照组腹腔注射 250 μ L pH 7.4 的 PBS。在注射后的 3, 6, 12, 24, 48, 72 h 时, 分别取 5 尾鱼, 解剖取肝脏、脾脏和头肾, 迅速置于 RNA 保护液中, 运回实验室后于 -80 °C 保存待用。

1.1.2 主要试剂

逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 和 pMD19-T、PGEX-4T-2 载体购自大连宝生物公司, 荧光定量试剂盒 TransStart® Top qPCR SuperMix、质粒提取试剂盒 EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit、DNA 纯化试剂盒 EasyPure® Quick Gel ExtRaction Kit 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 引物

根据本实验室大黄鱼全转录组测序获得 *lycRac2* 序列, 用 Primer Primer 5.0 设计扩增 *lycRac2* 基因开放阅读框全长引物和荧光定量 PCR 引物, 并用 Oligo6 对所设计引物进行分析。所有引物均由深圳

华大基因科技有限公司合成。

表 1 主要引物及其序列
Tab. 1 Oligonucleotide primers

引物 Premiers	序列(5' - 3') Sequence	退火温度 $T_M/^\circ\text{C}$
<i>lycRac2</i> -F	CGCGGATCCATGCAGGCTATCAAACG	58
<i>lycRac2</i> -R	CCGCTCGAGCAGCAGTGAAGCATGGC	58
RT- <i>lycRac2</i> -F	TGGACAGGAAGACTACGACAG	60
RT- <i>lycRac2</i> -R	GCTCACCAGGGAGAAACAGA	60
β -actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	60
β -actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	60

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和第一条 cDNA 链的合成

总 RNA 利用 Trizol (Invitrogen, 美国) 法提取, 并将 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察 18S rRNA 和 28S rRNA 的强度, 确定 RNA 的完整性, 利用逆转录试剂盒合成 cDNA 第一条链, 模板合成后, 通过内参基因 β -actin 的 PCR 扩增检测其制备效果。

1.2.2 *lycRac2* 基因开放阅读框扩增

以 cDNA 第一条链为模板, 用 *lycRac2* 基因特异引物 *lycRac2* - F 和 *lycRac2* - R 进行 PCR 扩增, 退火温度为 58 $^\circ\text{C}$, PCR 反应条件如下: 94 $^\circ\text{C}$ 3 min; 94 $^\circ\text{C}$ 45 s, 58 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 8 min; 4 $^\circ\text{C}$ 5 min。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

利用 Roche480 仪器、RT-*lycRac2*-F 和 RT-*lycRac2*-R 引物进行荧光定量 PCR 反应, 检测 *lycRac2* 基因在不同组织中的表达, 包括健康大黄鱼的肝脏、脾脏、肠、胃、肾脏、头肾、心脏、鳃、脑、皮肤、肌肉、血液的样品和受到 LPS、polyI:C、*V. parahemolyticus* 刺激后各组肝脏、脾脏、头肾中 *lycRac2* 基因的表达量; 内参基因为 β -actin。反应体系包括 10 μL Top Green qPCR SuperMix, 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正向和反向引物, 8 μL cDNA 第一条链。定量反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 30 s; 94 $^\circ\text{C}$ 5 s, 60 $^\circ\text{C}$ 15 s, 72 $^\circ\text{C}$ 10 s, 40 个循环。分别检测各基因的熔解曲线和扩增曲线, 每个样品 3 个生物学重复, 4 个统计学重复。

根据仪器罗氏 Light Cycler480 软件分析每个实验的各个样品的 RQ (real time quant itative) 值, 基因表达水平由 RQ 的平均值士标准误差的平均值 (mean \pm mean of standard error, $M \pm \text{SEM}$) 表示, 用 SPSS 18.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异显著的标准。

1.2.4 生物信息学分析

使用 DNASTAR 软件确定开放阅读框, 测序结果的分析采用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 根据 *lycRac2* 核酸序列用 Mega 5.0 软件中的 N-J (Neighbor-Joining) 构建系统进化树, 氨基酸序列多重比对用 Bioedit 软件。基因结构分析用 DNAMAN 和 DNASTAR 软件, 信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、蛋白质等电点和分子量预测, 以及 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 蛋白质跨膜区域分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/s/TMHMM-2.0/>) 分别由在线软件完成。

1.2.5 *lycRac2* 基因的原核表达

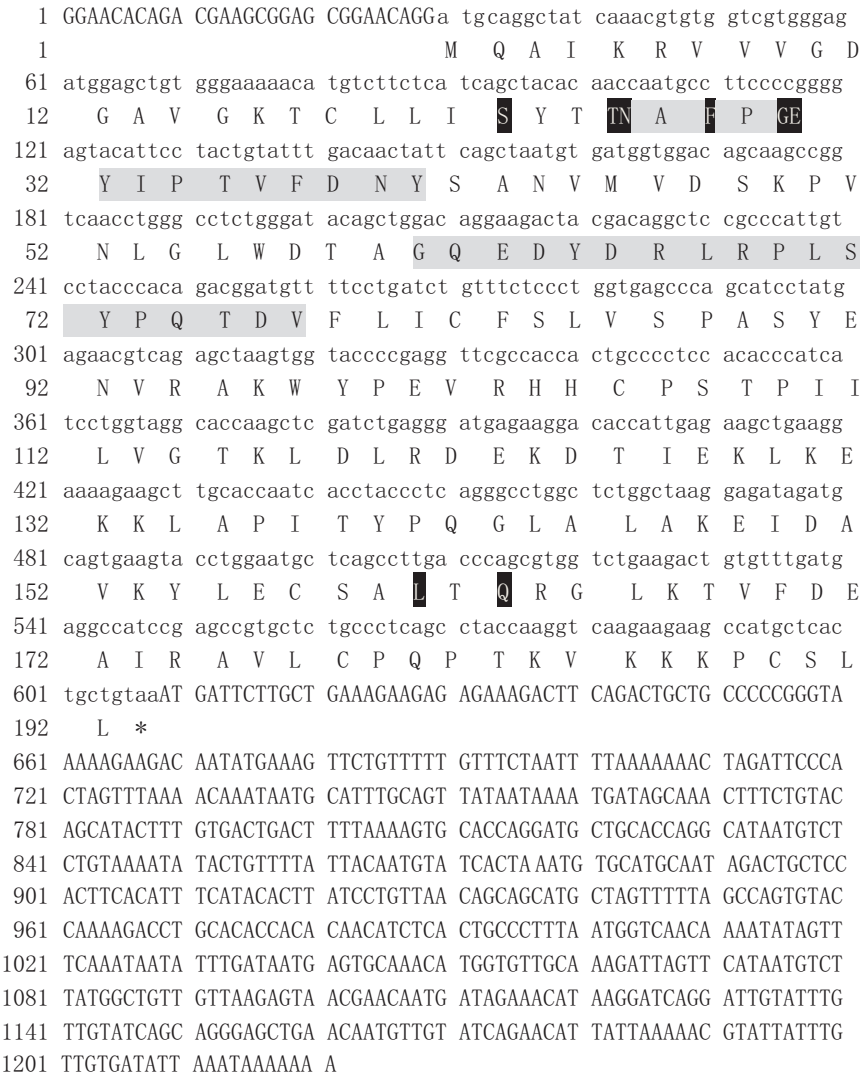
根据本实验室大黄鱼全转录组数据库通过序列功能注释信息获得 *lycRac2* 序列, 通过 Primer Primer5.0 软件分析 *lycRac2* 基因包含阅读框, 结合 PGEX-4T-2 多克隆位点, 设计上、下游引物 *lycRac2*-F 和 *lycRac2*-R (见表 1), 两引物分别包含 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。将 *lycRac2* 的 cDNA 克隆进 PGEX-4T-2 载体并在 BL21 中表达, 再对重组质粒进行测序验证。37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养后, 以 1:100 的比例将含重组质粒和不含目的基因的空质粒表达菌分别接种入新的培养基中扩大培养, 至 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8

时, 吸取 1mL 未诱导菌液做对照, 向剩余菌液中加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 37 ℃ 100 r/min 振荡培养 4 h, 将诱导前后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 *lycRac2* 基因开放阅读框序列分析

克隆获得的 *lycRac2* 基因 cDNA 全长为 1221 bp, 包括 579 bp 开放阅读框, 编码 192 个氨基酸, 如图 1 所示。预测的 *lycRAC2* 蛋白不含信号肽和跨膜结构, 等电点为 8.45, 分子量为 21.43 ku。



说明: 起始密码子和终止密码子用粗体表示, 灰色阴影部分是 switch I 和 switch II 结构域, p67PhoxTPR 受体互作位点用黑色阴影突出显示。

Notes: The start and stop codons are indicated with bold; the carbohydrate recognition domains (switch I and switch II) are highlighted in gray shade; P67PhoxTPR effector interaction sites are in black shade.

图 1 *lycRac2* 基因的 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.1 The full length of *lycRac2* cDNA and the deduced amino acid sequence

2.2 *lycRac2* 与其他动物 *Rac2* 氨基酸序列的同源性及进化关系分析

由图 2 可见, 大黄鱼的 *lycRac2* 基因编码的氨基酸与其他物种的 *Rac2* 氨基酸序列比对结果见图 2。

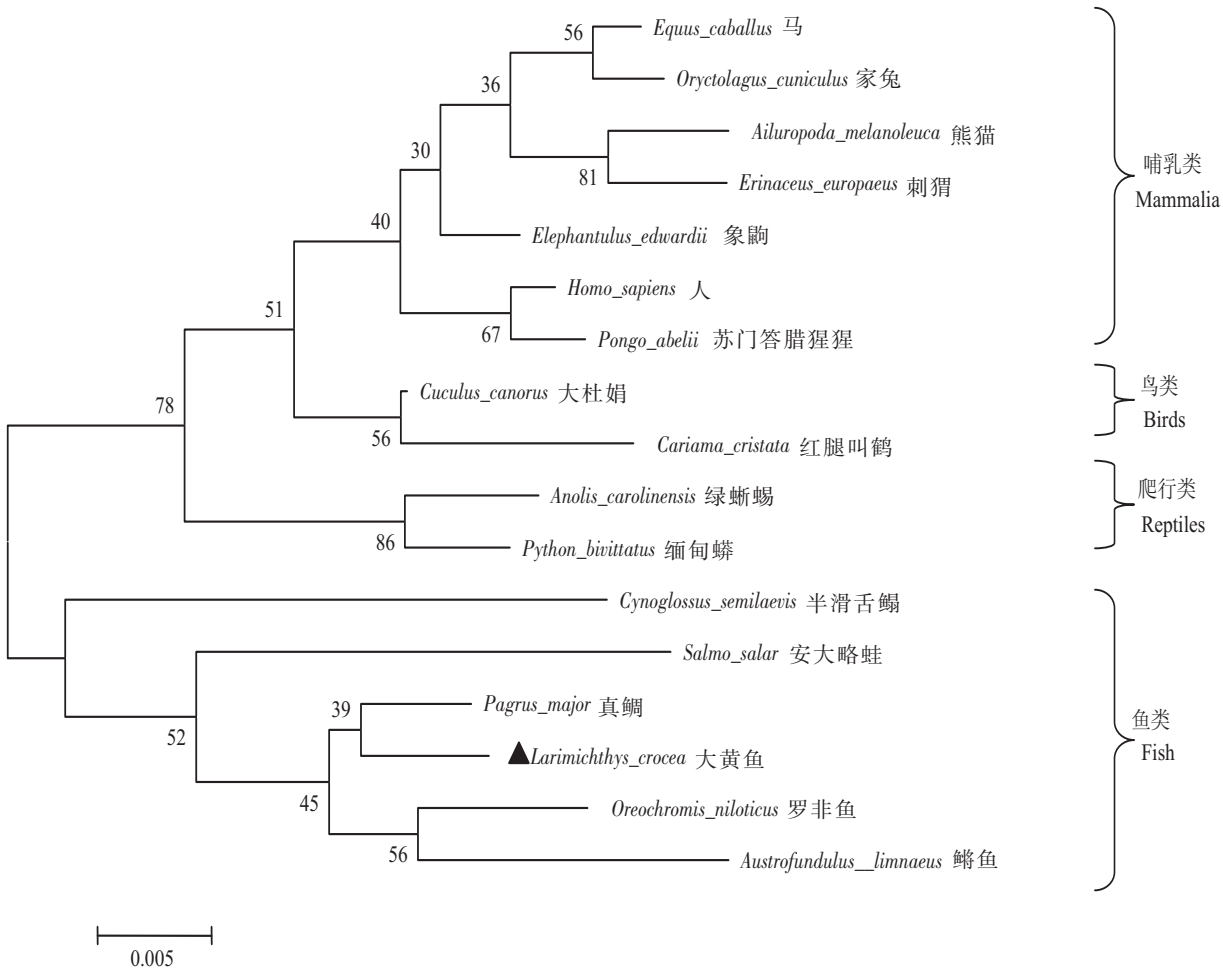
<i>Larimichthys crocea</i> ENVRAKWYPE	MQAIKRVVVG	DGAVGKTCLL	ISYTTNAPFG	EYIPTVF	DNY	SANVMVDSKP	VNLGLWD	TAG	QEDYDRLRPL	SYPTQTDVFLI	CFSLVSPASY	ENVRAKWYPE
<i>Cuculus canorus</i>	C	F.
<i>Homo sapiens</i>	C	F.
<i>Anolis carolinensis</i>	C	F.
<i>Python bivittatus</i>	C	F.
<i>Pagrus major</i>	C
<i>Oreochromis niloticus</i>	C
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	C
<i>Equus caballus</i>	C
<i>Salmo salar</i>	C	F.	.
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	C
<i>Oryzotagus cuniculus</i>	C
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	C	F.	.
<i>Erinaceus europaeus</i>	C	F.	.
<i>Elephantulus edwardii</i>	C	F.	.
<i>Pongo abelii</i>	C	F.	.
<i>Larimichthys crocea</i>	VRHHPSTPI	ILVGTKL	DLR	DEKDTIE	KLK	EKKLAPITYP	QGLALAKEID	AVKYLECSAL	TQRGLKT	VFD	EAIRAVLC	PTKVKKKPCS LL
<i>Cuculus canorus</i>	.	.	.	D	.	.	.	SRT	..RA.
<i>Homo sapiens</i>	.	.	.	D	.	.	.	SRQQ	..RA.
<i>Anolis carolinensis</i>	M	.	.	DT	..RG.
<i>Python bivittatus</i>	.	.	.	DT	..RG.
<i>Pagrus major</i>	.	.	.	ET	..RG.
<i>Oreochromis niloticus</i>	D	A
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	.	.	.	D	.	S	.	H	.	.	.	A
<i>Equus caballus</i>	.	.	.	D	.	.	.	SRTQ	..R
<i>Salmo salar</i>	.	.	E	SR	..L
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	E	.	.	.	AG
<i>Oryzotagus cuniculus</i>	.	.	D	.	.	.	SRQQ	..R
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	.	.	D	.	R	.	SRPQ	..R
<i>Erinaceus europaeus</i>	.	.	D	.	.	.	SARPQ	..R
<i>Elephantulus edwardii</i>	.	.	D	.	.	.	SRTQ	..RA
<i>Pongo abelii</i>	.	.	D	.	.	.	SRQQ	..RT

说明：“.”表示相同的氨基酸。Note：“.” represents the same amino acids.

图 2 大黄鱼 *lycRac2* 基因和其他物种 *Rac2* 氨基酸序列的多重比对
Fig.2 Multiple alignment of the *lycRac2* amino acid sequences among large yellow croaker and other species

lycRac2 与真鲷 (*Pagrus major*,99%)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*,98%)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*,97%)、马 (*Equus caballus*,96%)、安大略鲑 (*Salmo salar*,96%)、家兔 (*Oryctolagus cuniculus*,96%)、鲮鱼 (*Austrofundulus limnaeus*,97%)、大杜鹃 (*Cuculus canorus*,96%)、绿蜥蜴 (*Anolis carolinensis*,96%)、缅甸蟒 (*Python bivittatus*,96%)、象鼩 (*Elephantulus edwardii*,95%)、人 (*Homo sapiens*,95%)、苏门答腊猩猩 (*Pongo abelii*,95%)、大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*,95%)、红腿叫鹤 (*Cariama cristata*,95%)、刺猬 (*Erinaceus europaeus*,95%)、金色大鼠 (*Mesocricetus auratus*,96%) 的 Rac2 都有很高的同源性,其中与真鲷的同源性最高,达 99%;与马的 Rac2 同源性也达到 96%。说明 Rac2 的氨基酸序列在脊椎动物中高度保守。

从 GenBank 中下载更多物种的 Rac2 氨基酸序列 (见表 2),采用 Mega 5.03 软件,以 N-J 法构建系统发育树,结果如图 3 所示。lycRac2 与其他硬骨鱼类包括真鲷、罗非鱼等首先聚成一个亚群;两种鸟类 (大杜鹃和红腿叫鹤) 首先聚类后,再与爬行类 (绿蜥蜴、缅甸蟒) 聚成一大支;哺乳动物聚成另一个分支后,再与爬行类和鸟类聚合成与鱼类不同的一支。由 Rac2 氨基酸序列聚类分析结果所得的各个物种的分类与进化关系,与传统的分类方法所得结果一致。



说明:研究物种大黄鱼用黑三角标记;标尺(0.1)代表遗传距离;节点处的数字是用 bootstrapping 算法进行 1000 次重复计算出的支持率(%);分析所用物种的氨基酸序列 Genbank 登录号见表 2。

Notes: Large yellow croaker (*L. crocea*) is black triangled;the scale bar (0.1) represents the genetic distance;the numbers at the nodes indicate the support (%) by bootstrapping with 1000 replications;accession numbers of protein sequences used for phylogenic analysis are listed in Table 2.

图 3 根据 *lycRac2* 基因编码的氨基酸绘制的 N-J 系统发育树

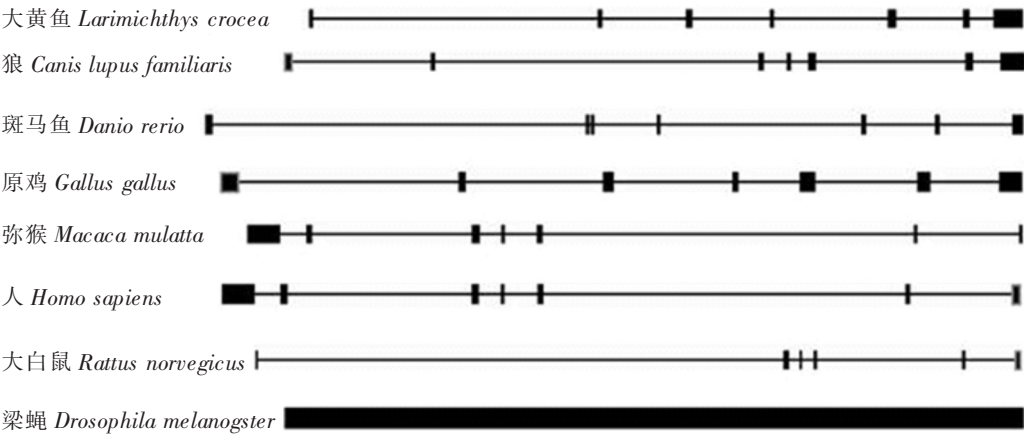
Fig.3 N-J phylogenetic tree constructed by amino acid sequence of *lycRac2* gene

表 2 *lycRac2* 系统进化树所用氨基酸序列及登录号
Tab. 2 GenBank accession numbers of sequences used in phylogenetic analysis of *lycRac2*

物种 Species	序列号 GenBank accession numbers	物种 Species	序列号 GenBank accession numbers
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	NP_ 001290327	绿蜥蜴 <i>Anolis carolinensis</i>	XP_ 003220991. 1
真鲷 <i>Pagrus major</i>	AAP20195. 1	缅甸蟒 <i>Python bivittatus</i>	XP_ 007421073. 1
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_ 003456613. 1	象鼯 <i>Elephantulus edwardii</i>	XP_ 006890209. 1
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_ 008314770. 1	人 <i>Homo sapiens</i>	NP_ 002863. 1
马 <i>Equus caballus</i>	XP_ 001500843. 1	苏门答腊猩猩 <i>Pongo abelii</i>	XP_ 002831136. 1
安大略鲑 <i>Salmo salar</i>	ACI33610. 1	大熊猫 <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_ 002914578. 1
家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_ 002723584. 1	红腿叫鹤 <i>Cariama cristata</i>	KFP67485. 1
鲮鱼 <i>Austrofundulus limnaeus</i>	XP_ 013870958. 1	刺猬 <i>Erinaceus europaeus</i>	XP_ 007519409. 1
大杜鹃 <i>Cuculus canorus</i>	XP_ 009566688. 1	金色大鼠 <i>Mesocricetus auratus</i>	XP_ 005067017. 1

2.3 *lycRac2* 基因的基因组序列结构

将本研究克隆、测序得到 *lycRac2* 的 ORF 序列, 与本实验室的大黄鱼基因组数据库进行比对后得到其完整的基因序列, 据此绘制基因结构图, 并与斑马鱼、原鸡、狼和人的 *Rac2* 基因的结构图(从 NCBI 上获得以上物种 *Rac2* 基因的完整序列)进行比较, 结果如图 4 显示。*lycRac2* 基因全长 1670.427 kb, 其 7 个外显子的长度分别为 64, 72, 118, 63, 159, 135, 610 bp; 6 个内含子的长度分别为 6500, 1938, 1827, 2586, 1550, 566 bp。从图 4 中可见, 其他脊椎动物的 *Rac2* 基因也都是由 7 个外显子与 6 个内含子构成, 但各物种各外显子和内含子长度都不一致, 甚至差异甚大。在所比较的 7 个物种中, 只有人类与猕猴的基因结构(各外显子与内含子长度)相似性较高。

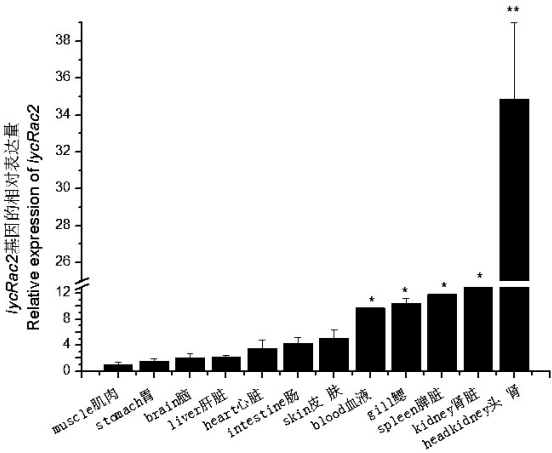


说明:方框代表外显子,线条代表内含子。
Notes: Boxes are representexons, and lines represent introns.

图 4 *lycRac2* 基因结构图及其与其他动物的比较
Fig.4 Comparison of the *lycRac2* gene structure of *L. crocea* with those of other animals

2.4 *lycRac2* 基因的组织表达谱

以 β -actin 为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 检测, 结果显示: *lycRac2* 基因在所检测的 12 种组织/器官中均有表达, 但表达量有显著差异。其中, 在头肾中表达量最高, 且显著高于其他组织表达量 ($P < 0.05$); 肾脏其次; 在肌肉中表达量最低(见图 5)。



说明: * 表示与其他组织中的表达水平有显著性差异($P<0.05$)。
Notes: * Indicates significant difference compared with other tissues($P<0.05$).

图 5 *lycRac2* 基因组织表达谱

Fig.5 The expression profile of *lycRac2* gene in tissues

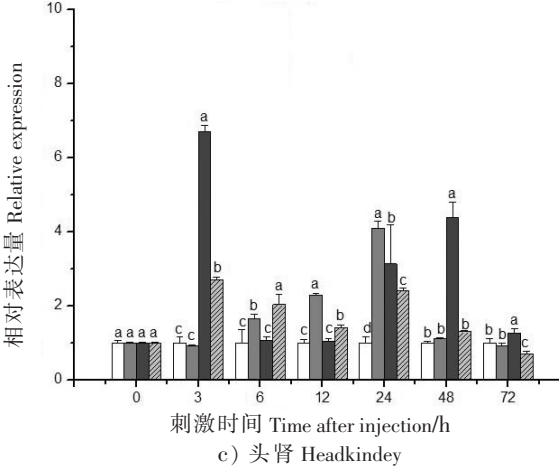
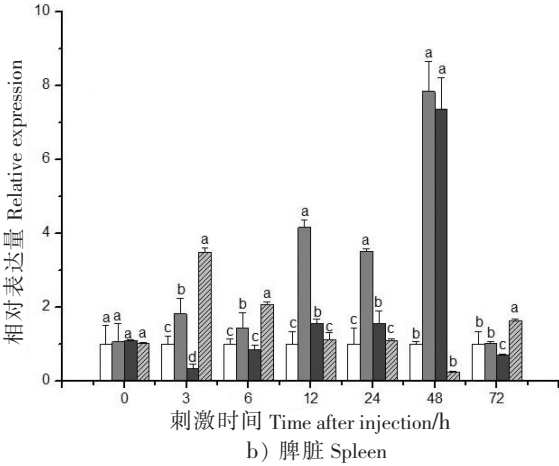
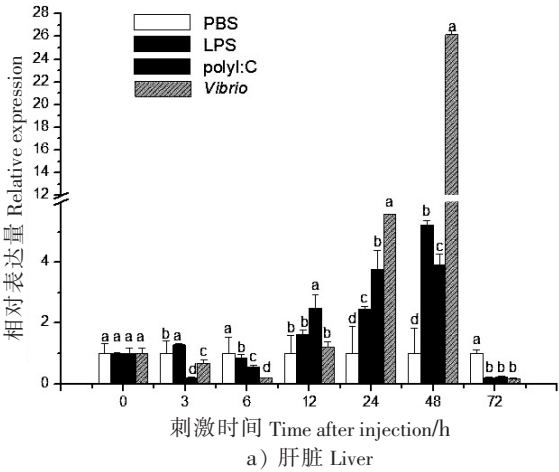
2.5 LPS 和 polyI:C、副溶血弧菌刺激后 *lycRac2* 基因在大黄鱼肝脏、脾脏、头肾中的表达变化

大黄鱼受到 LPS、polyI:C 和副溶血弧菌刺激后 *lycRac2* 基因在肝脏、脾脏、头肾中的表达量均明显升高。

如图 6a 所示, 大黄鱼肝脏受到 LPS 刺激后, *lycRac2* 基因的表达量从 6 h 开始逐步升高, 在 48 h 时达到最大值且显著高于对照组 ($P < 0.05$) ; 受到 polyI:C 刺激后, *lycRac2* 基因从 6 h 开始表达量逐步升高, 48 h 时达到最大且显著高于对照组 ($P < 0.05$) , 接着表达量逐步递减; 而受到弧菌 (*Vibrio*) 刺激后, 肝脏 *lycRac2* 基因在 48 h 时表达量达到最大且显著高于对照组 ($P < 0.05$) 。

如图 6b 所示, 大黄鱼脾脏受到 LPS 刺激后, *lycRac2* 基因表达量 3 h 后均高于对照组, 在 48 h 时达到最大值且显著高于对照组 ($P < 0.05$) ; 受到 polyI:C 刺激后, *lycRac2* 基因 48 h 内表达量逐步升高, 在 48 h 时达到最大值且显著高于对照组 ($P < 0.05$) , 接着表达量逐步递减; 受到 *V. parahaemolyticus* 刺激后, 脾脏中 *lycRac2* 基因在 3 h 时显著高于对照组 ($P < 0.05$) 接着逐步下降。

如图 6c 所示, 大黄鱼头肾受到 LPS 刺激



说明: 含有相同字母表示各时相的处理组之间 *lycRac2* 基因表达水平不存在显著性差异($P>0.05$)。
Note: Stages with the same letter indicate no significant difference among different treatment groups($P>0.05$).

图 6 polyI:C、LPS、*V. parahaemolyticus* 对大黄鱼 *lycRac2* 基因在肝脏、脾脏、头肾中的表达影响

Fig.6 The effect of polyI:C, LPS and *V. parahaemolyticus* on *lycRac2* gene expression of *L. crocea* in liver, spleen and headkidney

后, *lycRac2* 基因表达量在 24 h 内表达量持续升高, 24 h 达到顶端且显著高于对照组 ($P < 0.05$), 接着表达量逐步下降; 受到 polyI:C 刺激后, 实验组 *lycRac2* 基因的表达量在 3 h 时表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 接着表达量下降, 从 12 h 开始表达量再次逐步升高, 在 48 h 达到第二个高峰, 接着表达量逐步递减; 受到副溶血弧菌刺激后, 头肾中 3 h 时表达量达到最大且显著高于对照组 ($P < 0.05$), 接着到 12 h 逐步下降, 24 h 表达量再次升高, 接着逐步下降。

2.6 *lycRac2* 基因原核表达

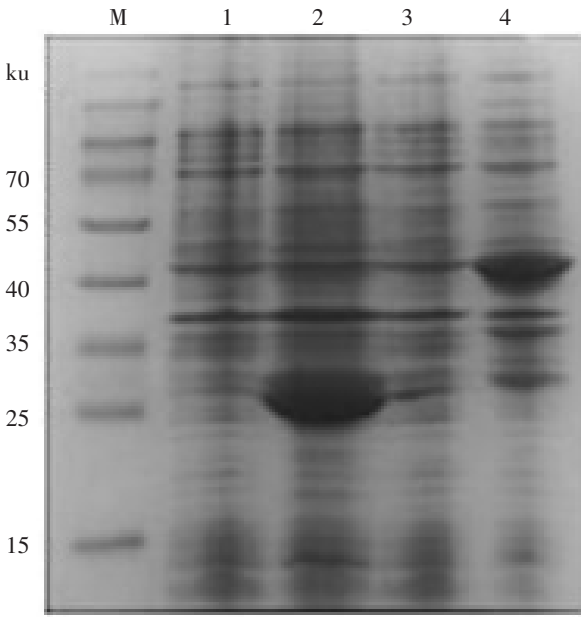
在 IPTG 诱导下, 37 ℃, 80 r/min 振荡培养 4 h 后, 在带有重组质粒的大肠杆菌 BL21 中可检测到有 GST-*lycRAC2* 融合蛋白表达, 而在对照组中未有蛋白条带, 如图 7 所示。质粒 PGEX-4T-2 含有谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的基因, 可编码一个 26 ku GST 蛋白, 当插入外源基因后, 可表达出外源基因和 GST 基因的融合蛋白。SDS-PAGE 电泳结果显示: 重组菌株受到 IPTG 诱导后在 45 ku 左右有明显条带, 说明有目的蛋白表达, 且大小与结果一致。

3 讨论

RAC 蛋白是很重要的分子开关, RAC 可以使一些蛋白质转移至细胞膜上^[14], 这对免疫应答至关重要, 如在中性粒细胞中, RAC 引起 p67phox 蛋白转移至细胞膜, 而这对过氧化物的形成非常重要^[15]。本研究从大黄鱼中分离出 *lycRac2* 基因, 其 ORF 为 579 bp, 编码 192 个氨基酸, 与斑马鱼^[16]、鼠^[17]的 *Rac2* 氨基酸数目一致。 *lycRac2* 有 Ras 家族典型的结构, 含有分子开关 1 (switch region I) 和分子开关 2 (switch region II) 结构域, 有 GTP 结合位点和 p67Phox 受体互作位点, 表明 *lycRac2* 属于小 G 蛋白家族。对从鱼类到人类的 *Rac2* 氨基酸序列进行比较发现, *Rac2* 的结构在各种脊椎动物中高度保守, 提示大黄鱼 *Rac2* 可能与其他脊椎动物的 *Rac2* 具有同样或相似的功能。大黄鱼 *lycRac2* 基因含有 7 个外显子、6 个内含子, 这点与其他脊椎动物的 *Rac2* 基因完全一致; 但是不同物种中各个内含子与外显子的长度并不相同, 同样是鱼类, 大黄鱼 *lycRac2* 基因 7 个外显子和 6 个内含子的长度与斑马鱼都不一样, 提示其基因的作用或表达调控方面可能与其他脊椎动物、包括斑马鱼等其他鱼类可能存在着一定的差异。

实时荧光定量 PCR 的结果显示, *lycRac2* 基因在大黄鱼各组织中均有不同程度的表达, 属于组成型基因表达, 但在不同的组织/器官中表达量不一致。其中 *lycRac2* 基因在头肾中表达量最高, 且显著高于其他各组织 ($P < 0.05$), 表明 *lycRac2* 基因的表达具有一定的组织特异性, *lycRac2* 在头肾中表达量最高, 头肾是鱼类重要的免疫组织, 说明 *lycRac2* 可能参与免疫过程。

当小鼠受到酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*) 的感染后, *Rac2* 的缺失会使病情恶化, 因此认为 *Rac2* 是免疫相关基因^[18]。Jia 等^[19]研究发现大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 受到哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 刺激后, *Rac1* 基因在肝脏中表达量明显升高。Han 等^[6]曾报道, 大黄鱼受到 LPS、polyI:C 与副溶血弧菌刺激后, 其 *Rac* 基因在肝脏和脾脏中的表达量均在 3 h 就显著上调, LPS 刺激在肝脏中



说明: M—蛋白质 marker; 1—非重组菌株未诱导; 2—非重组菌株诱导; 3—重组菌株未诱导; 4—重组菌株诱导。

Notes: M—Page ruler prestained protein; Line 1—PGE-4-2, without induction; Line 2—PGEX-4T-2, after induction; Line 3—recombinant bacteria, without induction; Line 4—recombinant bacteria, after induction.

图 7 IPTG 诱导后 *lycRAC2* 蛋白表达

Fig.7 The expression of *lycRAC2* after induction with IPTG

6 h、在脾脏中 24 h 表达量达到高峰, polyI:C 在脾脏中 24 h、在肝脏中 48 h 表达量达到高峰, 副溶血弧菌刺激在肝脏和脾脏中均 6 h 就达到高峰。在本研究中, 总体上, 大黄鱼在受到该 3 种免疫因素刺激后, *lycRac2* 在肝脏和脾脏的表达量均显著上调, 这与 Han 等^[6]的报道基本一致; 但本研究中大黄鱼在受到 LPS、polyI:C 刺激后, *lycRac2* 在肝脏和脾脏的表达量均在 12 h 才显示显著上调、48 h 时达到高峰, 副溶血弧菌刺激后在脾脏中 3 h 就上调并达到高峰, 而在肝脏中 24 h 才显著上调、48 h 表达量才达到高峰。LPS、polyI:C 刺激后开始上调和表达量达到高峰的时间、以及上调的倍数与 Han 等^[6]的报道不同, 这可能与实验时鱼类的生理状况及所处的环境条件不尽一致有关。此外, 本研究还检测了 3 种免疫因素刺激后大黄鱼头肾中 *lycRac2* 的表达情况, 发现在 polyI:C 和副溶血弧菌刺激后 3 h 头肾中 *lycRac2* 的表达量就显著上调, LPS 刺激后 12 h 头肾中 *lycRac2* 的表达量也显著上调。*Rac1* 和 *Rac2* 均属于 Rac 亚家族, 它们具有相似功能。头肾、脾脏和肝脏都是鱼类的免疫 (相关) 器官, 这些器官在受到免疫因素刺激后 *lycRac2* 的表达量均显著上调, 表明 *lycRac2* 基因参与了免疫应答, 在大黄鱼抵御细菌和病毒的感染过程中发挥着重要作用。Rac 家族在调控肌动蛋白重排中发挥作用, 这一过程是由吞噬细胞介导的^[20], 研究表明, *Rac2* 定位于吞噬体膜上^[21], 所以 *lycRac2* 很可能与吞噬作用有关。

综上所述, 大黄鱼 *Rac2* 基因 (*lycRac2*) 全长 1670.427 kb, 包含 7 个外显子、6 个内含子, 其 cDNA 全长 1221 bp, ORF 为 579 bp, 编码 192 个氨基酸残基, 蛋白质无跨膜区和信号肽。从鱼类到哺乳动物包括人类, RAC2 蛋白的氨基酸序列相当保守, *Rac2* 基因均具有 7 个外显子和 6 个内含子, 但不同物种之间 7 个外显子和 6 个内含子的长度都不一致。*lycRac2* 基因在大黄鱼 12 种组织中均有表达, 但在头肾中表达量最高。大黄鱼受到免疫刺激后其在肝脏、脾脏和头肾中的表达量明显上调。通过原核表达得到了 *lycRAC2* 蛋白, 为进一步研究其性质与功能奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] WANG Z Y, WANG Y L, LIN L M, et al. Genetic polymorphisms in wild and cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* using AFLP fingerprinting [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9: 198-202.
- [2] WANG X W, AO J Q, LI Q G, et al. Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 133: 76-81. DOI:10.1016/j.jviromet.
- [3] CHEN X H, LIN K B, WANG X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China [J]. Fish Diseases, 2003, 26: 615-619. DOI:10.1046/j.1365-2761.
- [4] BISCHOFF F, MOLENDIJK A, RAJENDRAKUMAR C S, et al. GTP binding proteins in plants [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999, 55: 233-256. DOI:10.1007/s000180050287.
- [5] JEON H, ZHENG L T, LEE S, et al. Comparative analysis of the role of small G proteins in cell migration and cell death: cytoprotective and promigratory effects of RalA [J]. Experimental Cell Research, 2011, 317: 2007-2018. DOI:10.1016/j.yexcr.2011.05.021.
- [6] HAN F, WANG X, YANG Q, et al. Characterization of a RacGTPase up-regulated in the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* immunity [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30: 501-508. DOI:10.1016/j.fsi.2010.11.020.
- [7] 章硕, 姜浩, 苏琦. Rac1 与肿瘤的研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(5): 410-414.
- [8] LUI W Y, LEE W M, CHENG C Y. Rho GTPases and spermatogenesis [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2003, 1593: 121-129. DOI:10.1016/S0167-4889(02)00348-8.
- [9] DE P, PENG Q, DMITRY T, et al. Expression of RAC2 in endothelial cells is required for the postnatal neovascular response [J]. Experimental Cell Research, 2009, 315(2): 248-63. DOI:10.1016/j.yexcr.2008.10.003.
- [10] ALKHAIRY O K, REZAEI N, GRAHAM R R, et al. RAC2 loss-of-function mutation in two siblings with characteristics of common variable immunodeficiency [J]. Journal of Allergy Clinical Immunology, 2015, 135(5): 1380-1384. DOI:10.1016/j.jaci.2014.10.039.

- [11] PRADIP D, PENG X, DURDEN D L. Rac2 specificity in macrophage integrin signaling: potential role for Syk kinase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(43): 41661-41669. DOI:10.1074/jbc.M306491200.
- [12] HAN F, ZHANG Y, ZHANG D L, et al. The *Rab5A* gene of marine fish, large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), and its response to the infection of *Cryptocaryon irritans* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 364-373. DOI:10.1016/j.fsi.2016.04.025.
- [13] HAN F, WANG X Q, YAO C L, et al. Molecular characterization of *Ran* gene up-regulated in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) immunity [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(2): 327-333. DOI:10.1016/j.fsi.2010.04.005.
- [14] WEED S A, DU Y, PARSONS J T. Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1 [J]. Journal of Cell Science, 1998, 111(16): 2433-2443.
- [15] LEUSEN J H, DE KLEIN A, HILARIUS P M, et al. Disturbed interaction of p21-Rac with mutated p67-phox causes chronic granulomatous disease [J]. J Exp Med, 1996, 184(4): 1243-1249.
- [16] WU C C, TSAI T H, CHANG C, et al. On the crucial cerebellar wound healing-related pathways and their cross-talks after traumatic brain injury in *Danio rerio* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e97902. DOI:10.1371/journal.pone.0097902.
- [17] THIAGO B N, GLAUCIA E, CALLERA A C, et al. Vascular injury in diabetic db/db mice is ameliorated by atorvastatin: role of Rac1/2-sensitive nox-dependent pathways [J]. Clinical Science, 2015, 128(7): 411-423. DOI:10.1042/CS20140456.
- [18] FATTOUH R, GUO C H, LAM G Y, et al. Rac2-deficiency leads to exacerbated and protracted colitis in response to *Citrobacter rodentium* infection [J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e61629. DOI:10.1371/journal.pone.0061629.
- [19] JIA A, ZHANG X H. cDNA cloning, characterization, and expression analysis of the *Rac1* gene from *Scophthalmus maximus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 154: 80-84. DOI:10.1016/j.cbpb.
- [20] TOBAR N, CACERES J F, SANTIBANEZ P C, et al. RAC1 activity and intracellular ROS modulate the migratory potential of MCF-7 cells through a NADPH oxidase and NFκB-dependent mechanism [J]. Cancer Letters, 2008, 267(1): 125-132. DOI:10.1016/j.canlet.2008.03.011.
- [21] BAPTISTA M P, WESTERBERG L S. Activation of compensatory pathways via Rac2 in the absence of the Cdc42 effector Wiskott-Aldrich syndrome protein in Dendritic cells [J]. Small GTPases, 2017: 1-8. DOI:10.1080/21541248.2016.1275363.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)