

# 大黄鱼 *Rnd1* 基因表达载体构建及表达模式分析

朱鹏飞<sup>1,2</sup>, 李泽宇<sup>1,2</sup>, 崔晓莹<sup>1,2</sup>, 王志勇<sup>1,2</sup>, 李完波<sup>1,2</sup>

(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] 为探究 *Rnd1* 基因在大黄鱼免疫应答过程中的作用, 采用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 对该基因的表达模式进行分析, 同时构建原核表达载体 pET-28a-*Rnd1*, 并转化进大肠杆菌后诱导该蛋白的融合表达。研究表明: 大黄鱼 *Rnd1* 基因 ORF 为 699 bp, 编码 232 个氨基酸; 经序列多重比对和进化树构建发现, *Rnd1* 的氨基酸序列高度保守; 在健康大黄鱼的 8 个免疫组织中, *Rnd1* 在肝脏中相对表达量最高, 其次为脑, 而在肠中表达量最低; 变形假单胞菌攻毒后, *Rnd1* 在肝脏中 48 h 时达到最高值, 为对照组的 25 倍; 在脾脏中则持续上调表达, 尤其在 48 h 后升高更为明显。

[关键词] 大黄鱼; *Rnd1* 基因; 表达分析; 原核表达

[中图分类号] S 917.4

## Construction of Expression Vector and Expression Analysis of *Rnd1* Gene in *Larimichthys crocea*

ZHU Pengfei<sup>1,2</sup>, LI Zeyu<sup>1,2</sup>, CUI Xiaoying<sup>1,2</sup>, WANG Zhiyong<sup>1,2</sup>, LI Wanbo<sup>1,2</sup>

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

**Abstract:** RNA sequencing was performed on the spleen samples of *Larimichthys crocea* challenged by *Pseudomonas plecoglossicid* in our previous study. We found that the *Rnd1* gene was significantly up-regulated in the samples with relatively high bacterial load compared to those with relatively low bacterial load through differential gene expression analysis. The results suggested that this gene might play an important role in the infection of *P. plecoglossicid* to the *L. crocea*. In order to explore the function of *Rnd1* in the immune response of *L. crocea*, the expression pattern of *Rnd1* gene was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the prokaryotic expression vector of pET-28a-*Rnd1* was constructed to express the fusion protein in *E. coli*. The results showed that the full-length ORF of *Rnd1* was 699 bp, encoding 232 amino acids. Multiple sequence alignment and evolutionary tree results showed that the amino acid sequence of *Rnd1* was highly conserved. The expression level of *Rnd1* gene was the highest in liver, followed by brain, and the lowest expression was observed in intestine among the eight examined tissues. The relative expression of *Rnd1* gene peaked at 48h in liver after stimulated by *P. plecoglossicid*, which was 25 times as the control group. The gene expression of *Rnd1* in spleen was continuously upregulated, especially after 48h of the infection.

**Keywords:** large yellow croaker (*Larimichthys crocea*); *Rnd1* gene; expression analysis; prokaryotic expression

[收稿日期] 2021-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31872562, U1705231)

[作者简介] 朱鹏飞 (1995—), 女, 硕士生, 从事水产动物遗传与育种研究。通信作者: 李完波 (1982—), 男, 副教授, 硕导, 从事水产动物遗传与育种研究。E-mail: li.wanbo@jmu.edu.cn

## 0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国养殖规模最大的海水鱼。据中国渔业统计年鉴记载,2019 年我国大黄鱼全国海水养殖产量为 22.5 万吨,比上一年增加了 13.93%。近几年,由病害造成的经济损失也不断增加。目前,大黄鱼人工养殖阶段的常见病害有细菌性、病毒性、寄生虫性和不明病因的疾病等,其中内脏白点病是危害大黄鱼的一种较为严重的细菌性疾病<sup>[1-2]</sup>。这些疾病每年都给大黄鱼养殖业造成巨大的经济损失,因此研究大黄鱼免疫防御系统将为其病害的防控提供依据。

鱼类是特异性免疫和非特异性免疫并存的脊椎动物。先天性免疫系统包括物理屏障(如皮肤、胃肠道)、细胞成分(如模式识别受体和巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞)和体液成分(如补体系统),获得性免疫系统包括免疫细胞和适应性免疫分子(如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、免疫球蛋白、主要组织相容性复合体(MHC))<sup>[3]</sup>。由于免疫系统在鱼类等水生动物的防御反应中的重要作用,近年来有关鱼类免疫功能相关基因的克隆及免疫调节机理的研究已引起科技界的高度关注,并成为当今世界鱼类分子免疫学和抗病机理研究的热点课题<sup>[4]</sup>。

小 G 蛋白(small GTPases)普遍存在于真核生物中,其与 GTP 结合后处于活跃状态,与 GDP 结合后处于失活状态,大多数小 G 蛋白在两种状态之间转换并参与真核生物的细胞信号转导过程<sup>[5]</sup>。小 G 蛋白主要分为五个亚家族: Ras、Rho、Rab、Arf/Sar 和 Ran<sup>[6]</sup>。*Rnd1* 基因编码的蛋白质属于 Rho GTPase 家族,该家族的成员受细胞外生长因子调控来调节肌动蛋白细胞骨架的组装,并参与细胞迁移和轴突生长,影响发育、免疫反应、炎症和肿瘤的侵袭和转移等生物学过程。除了 *Rnd1*, Rho 家族还有 5 个非典型成员: *Rnd2*, *Rnd3*, *RhoH*, *RhoBTB1* 和 *RhoBTB2*, 这类蛋白由于缺乏水解 GTP 的氨基酸,因此只与 GTP 结合,几乎不具备与 GDP 结合的能力<sup>[7]</sup>。*Rnd* 蛋白特殊的性质导致其独特的作用模式,目前已有研究表明 *Rnd1* 蛋白可以与不同的蛋白质相互作用,参与调控生物体多种生命活动过程。*Rnd1* 过度表达会抑制细胞中应力纤维的形成,降低细胞粘附力,改变细胞形态<sup>[8]</sup>。也有研究表明 *Rnd1* 参与肿瘤的发生<sup>[9]</sup>,调节神经细胞的生长分化和凋亡<sup>[10]</sup>。Rho 蛋白对细胞中肌动蛋白骨架的调控作用也成为宿主细胞抵抗细菌感染的免疫防线<sup>[11]</sup>。目前尚无证据表明 *Rnd1* 基因直接参与宿主免疫调控,而本实验室在转录组分析中,发现 *Rnd1* 基因在带菌量较高的样本中比带菌量低的显著上调。因此,为探究 *Rnd1* 基因在大黄鱼抵抗变形假单胞菌感染中的作用,本研究分析了 *Rnd1* 在不同组织中的表达模式,并尝试构建原核表达载体诱导该蛋白体外表达,以期后续研究大黄鱼免疫防御机制提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用大黄鱼于 2019 年 2 月采集于福建省宁德市金陵水产科技有限公司,变形假单胞菌 NZBD9 菌株由集美大学水产学院微生物实验室鄢庆枇教授惠赠。

对实验大黄鱼进行攻毒实验,添加细菌使养殖水体中细菌终浓度为  $1.0 \times 10^6$  cfu/mL<sup>[12]</sup>,实验鱼浸泡 3 h 后转移至正常水池中继续养殖,分别在攻毒后 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h 快速解剖大黄鱼,取其肾脏、脾脏和肝脏。并从未被攻毒的鱼体内采得鳃、鳍、头肾、脾、肾、脑、肝和肠等组织。所有样品放置于 RNA 保护液中, -80 °C 保存备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大黄鱼 *Rnd1* 基因组织分布

##### 1.2.1.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 TransZol Up Plus RNA 试剂盒(TransGen Biotech, Beijing, China)按照说明提取样本总 RNA。RNA 浓度通过测定其在 260nm 波长下的吸光度值来确定,按照  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  的标准检测其质量,用 1.0% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。cDNA 第一链由 GoScript™ 反转录系统(Promega, USA)合成。以  $\beta$ -actin 引物为内参,以 RT-PCR 产物为模板检测样本的 cDNA 含量。

1.2.1.2 qRT-PCR 检测组织表达差异

以  $\beta$ -actin 基因为内参基因（引物序列见表 1），使用 LightCycler 480（Roche，USA）荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应。反应体系为 20  $\mu$ L：2  $\times$  ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L；正向和反向引物 0.4  $\mu$ L；模板 cDNA 4  $\mu$ L；无菌水 5.2  $\mu$ L。反应程序为两步法标准程序：95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s；95  $^{\circ}$ C 变性 10 s，60  $^{\circ}$ C 退火 30 s，72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s，循环 40 次。实验设置 3 个生物学重复，每个样品做 3 个技术性重复。利用每个样品的  $C_T$  值，根据  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  公式计算相对表达量，分析 *Rnd1* 基因在不同组织和攻毒后不同时期的表达水平，结果用平均值  $\pm$  SE 表示。数据使用 SPSS19.0 进行单因素方差分析（one-way ANOVA）和 LSD Multiple Comparison Test 分析各样品间基因表达的差异，显著水平设为  $P < 0.05$ ，结果用 Origin 8.0 进行绘图表示。

表 1 实时荧光定量 PCR 和基因克隆所用到的引物  
Tab.1 Primers for qRT-PCR and gene cloning experiments

引物名称 Primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Purpose
qRnd1-F	ATCCACTGACTGACTGACTGA	荧光定量 PCR Quantitative real-time PCR
qRnd1-R	GCTCAACACGCTGGTCTTC	
$\beta$ -actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	
$\beta$ -actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	
pET-28a-Rnd1-F	atgggtgcgcgatccGAATTCATGAAGGAGAGGAGACTCAC	基因克隆 Gene cloning
pET-28a-Rnd1-R	gtgggtgggtgggtgCTCGAGCATGATGGAGCAGCTCTTGGA	

1.2.2 大黄鱼 *Rnd1* 基因原核表达

1.2.2.1 pET-28a-*Rnd1* 原核表达载体的构建

一步克隆即在引物两端加入载体的末端序列，使 PCR 产物 5' 和 3' 末端分别带有与线性化载体末端一致的序列，依靠碱基间的作用力将目的片段整合到线性化载体上，实现定向克隆。

从本实验室大黄鱼脾脏转录组测序数据库中获得 *Rnd1* 开放阅读框序列，根据 ClonExpress II One Step Cloning Kit（Vazyme）说明书设计 *Rnd1* 原核表达的引物 pET-28a-Rnd1-F/R（见表 1，其中小写序列部分为载体末端序列，在引物上下游分别带有 *EcoRI*（GAATTC）和 *XhoI*（CTCGAG）的酶切位点序列）。以大黄鱼脾脏 cDNA 为模板，使用高保真 Taq 酶扩增目的片段，来降低碱基错配率。PCR 程序为：95  $^{\circ}$ C 3 min；95  $^{\circ}$ C 30 s，55  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 30 s，循环 30 次；72  $^{\circ}$ C 10 min；10  $^{\circ}$ C 保存。割胶回收目的片段。用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切 pET-28a 载体，获得线性化载体。将目的片段与线性化载体连接，转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态。涂平板过夜培养，挑取阳性单克隆菌落送厦门瑞辰铂生物科技有限公司测序。

1.2.2.2 重组蛋白诱导表达及纯化

将测序结果与参考序列进行比对，选取与参考序列一致的菌液扩大培养并提取质粒。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21（DE3）感受态。将菌液于 37 $^{\circ}$ C 培养至其光密度值  $A_{600}$  约为 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mol/L，于 16  $^{\circ}$ C 继续培养 16 h。将菌体置于冰上超声破碎，破碎条件为功率 130 W 下破碎 5 s、间隙 5 s，总破碎时间为 30 min。再分别取上清和沉淀蛋白质，用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。采取 Ni Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow（GE Healthcare，USA）对 His 标签融合蛋白进行纯化。

1.2.3 生物信息学分析

通过 GeneDoc (<https://github.com/karl nicholas/GeneDoc>) 进行基因序列分析；使用在线工具 (<http://wormweb.org/exonintron>) 绘制基因结构图；用 DNAMAN (<https://www.lynnon.com/dnaman.html>) 预测蛋白质分子量及等电点；通过网站 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线预测蛋白质信号肽；用 ExPASy PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) 分析蛋白质结构域；用 ClustalX (<http://www.clustal.org/>) 进行氨基酸多重序列比对；通过 MEGA 7.0 软件，用最大似然法构建系统进化树，bootstrapping 设置为 1000 次。

2 实验结果

2.1 *Rnd1* 基因序列分析

大黄鱼 *Rnd1* 基因 ORF 全长为 699 bp, 编码 232 个氨基酸, 包含 5 个外显子、4 个内含子。其中 Gly<sup>70</sup> 残基重叠于剪接位点 (见图 1), 内含子两侧碱基均为 GT-AG。这结果与其他鱼类结果类似 (见图 2, 表 2)。预测 *Rnd1* 蛋白无信号肽序列, 蛋白质的分子量约为 26.03 ku, 理论等电点为 8.4。SMART 在线分析软件显示该蛋白含有一个 Rho 蛋白结构域 (L<sup>16</sup>—K<sup>190</sup>), 该区域包含两条可动的多肽段: Switch I 和 Switch II (见图 3)。

1            ATGAAGGAGAGAGACTCACGCAGCCGTTTGTAGCGAGGTGTAAACTAGTGCTCGTCCGGGACGTCCAATGCGGTAAACAGCGATGTTA

1            M K E R R L T Q P F V A R C K L V L V G D V Q C G K T A M L

91           CAAGTCTTGGCCAAGGACTGCTATCCAGAGACGTACGTCCCGACTGTGTTTGAGAACTACACGGCCTGTCTGGAGCTTGAAGACCGCGT

31           Q V L A K D C Y P E T Y V P T V F E N Y T A C L E L E D Q R

181           GTTGAGCTCAGCCTTTGGGACACATCAGGTTCTCCTTATTATGACAACGTCAGACCACTCTGCTACAGCGACTCAGATGCAGTGCTCTTA

61           V E L S L W D T S G S P Y Y D N V R P L C Y S D S D A V L L

271           TGCTTCGACATCAGCCGACCAGACACAGTAGACAGTGCCTGAAGAAGTGAAAGCAGAGATCCAGGACTTCTGTCCAGCACACGGATT

91           C F D I S R P D T V D S A L K K W K A E I Q D F C P S T R I

361           TTGTTAATAGGCTGCAAGACAGACCTGCGCACAGCGTATGCACTCGCATGGAGCTATCCAATCAGAAACAGACTCCCATCTCCCATGAG

121           L L I G C K T D L R T D V C T R M E L S N Q K Q T P I S H E

451           CAGGGTTCGTCCATGGCGAAGCAGGTTGGAGCGGAGGCCTACCTGGAGTGCTCGGCCTTCACATCAGAGAAGAGCATCCACAGTGTTC

151           Q G S S M A K Q V G A E A Y L E C S A F T S E K S I H S V F

541           CGTACTGCGGCTCTGGCCTGCATGAACAACTTCAGCCTGCCAATAAACCAGTCCCATCCGCGCCTCTCCAAGAGACTCCTACACCTT

181           R T A A L A C M N K L Q P A N K P S P I R R L S K R L L H L

631           CCCAGCAAGACAGAGCTGCTCTCCTCCACCTTTAGCAAGGACAAGTCCAAGAGCTGCTCCATCATGTGA

211           P S K T E L L S S T F S K D K S K S C S I M \*

\* 为终止密码子; 下划线残基为 Rho 蛋白结构域(L16-L190); 黑色方框部分分别为 Switch I 和 Switch II

\*is the termination codon; the underlined residue is the Rho protein domain(L16-L190); black box part are respectively the Switch I and Switch II

图 1 大黄鱼 *Rnd1* cDNA 及氨基酸推导序列

Fig.1 cDNA and deduced amino acid sequences of *Rnd1* in *Larimichthys crocea*

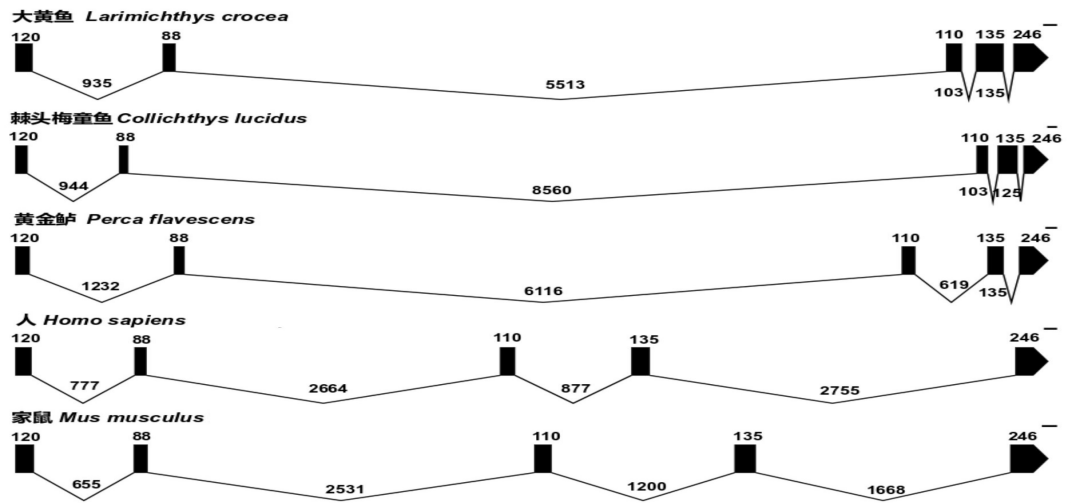


图 2 大黄鱼与其他物种 *Rnd1* 基因结构图

Fig.2 The *Rnd1* gene structural diagram of *Larimichthys crocea* compared to other species



表 2 大黄鱼 Rnd1 推导氨基酸序列与其他物种的一致性分析

Tab.2 Identity analysis of amino acid sequences of Rnd1 in *Larimichthys crocea* and other species

物种 Species	一致性 Identity/%	GeneBank 检索号 Accession number
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	99.57	TKS77832.1
黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	97.84	XP_028438828.1
龙胆石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	96.98	XP_033484051.1
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	96.55	XP_003439020.1
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	95.69	XP_019951797.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	90.95	XP_014001010.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	90.52	XP_021471290.2
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	89.66	NP_001037861.1
野猪 <i>Sus scrofa</i>	82.33	XP_003481615
家牛 <i>Bos taurus</i>	81.90	NP_001039481
家马 <i>Equus caballus</i>	81.47	XP_001504179
人 <i>Homo sapiens</i>	81.90	NP_055285
东非狒狒 <i>Papio anubis</i>	81.47	XP_003906356
家鼠 <i>Mus musculus</i>	80.17	NP_766200
蜥蜴 <i>Anolis carolinensis</i>	78.45	XP_008102225
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	78.02	NP_001008073
虎皮鹦鹉 <i>Melopsittacus undulatus</i>	77.59	XP_033927421
斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	75.86	XP_030115416
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	75.00	XP_015128666

	Switch I	Switch II	
<i>Larimichthys crocea</i>	MKERRLTQPFVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Collichthys lucidus</i>	MKERRLTQPFVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Perca flavescens</i>	MKERRLTQPFVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Oreochromis niloticu</i>	MKERRLTQPFVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Epinephelus lanceola</i>	MKERRLTQPFVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Paralichthys olivaceo</i>	MKERRLTQPFVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Salmo salar</i>	MKERRLTQPLVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDSYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MKERRLTQPLVARCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDSYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Danio rerio</i>	MKIERRNAQPLVVRCKLVLVGDVQCGKTAMLQVLAKDCYPETYVPTVFENYTA	CGSPYYDYNVRPLCYSDSDAVLL	90
<i>Clustal Consensus</i>	***** , * : * ***** , * : ***** , * : ***** , * : *****		
<i>Larimichthys crocea</i>	CFDI SRPDI VDSALKKWKAETIQDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTRMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Collichthys lucidus</i>	CFDI SRPDI VDSALKKWKAETIQDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTRMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Perca flavescens</i>	CFDI SRPDI VDSALKKWKAETIQDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTRMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Oreochromis niloticu</i>	CFDI SRPDI VDSALKKWKAETIQDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTRMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Epinephelus lanceola</i>	CFDI SRPDI VDSALKKWKAETIQDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTRMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Paralichthys olivace</i>	CFDI SRPDI VDSALKKWKAETIQDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTRMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Salmo salar</i>	CFDI SRPDSFDGALKKWKTEILDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTLMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CFDI SRPDSFDGALKKWKTEILDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTLMELSNQKQTPISHEQGSSMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Danio rerio</i>	CFDI SRPDI VDSGALKKWKRAETILDFCPSTRILLIGCKTDLRTDVCTLMELSNQKQTPITHEQGSSAMAKQVGA	EAYLECSAFTSEKSIHSVF	180
<i>Clustal Consensus</i>	***** , * : * ***** , * : ***** , * : ***** , * : *****		
<i>Larimichthys crocea</i>	RTAALACMNLQPAKPSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Collichthys lucidus</i>	RTAALACMNLQPAKPSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Perca flavescens</i>	RTAALACMNLQPAKPSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Oreochromis niloticu</i>	RTAALACMNLQPAKPSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Epinephelus lanceola</i>	RTAALACMNLQPAKPSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Paralichthys olivace</i>	RTAAACMNLKPKAPKSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Salmo salar</i>	RTAAACMNLKPKAPKSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	RTAAACMNLKPKAPKSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Danio rerio</i>	RTAAACMNLKPKAPKSPVRRRLSKRLLHLPSTKTELLSSSTFSKDKSKSCS	IM 232	
<i>Clustal Consensus</i>	***** , * : * ***** , * : ***** , * : ***** , * : *****		

阴影部分为 RHO 保守结构域;黑色划线标注部分为 Switch I 和 Switch II 区域  
The shaded part is RHO conserved domain; the part underlined in black is Switch I and Switch II area

图 3 大黄鱼与其他鱼类 Rnd1 氨基酸序列的多重比对分析结果

Fig.3 Multiple alignments of Rnd1 amino acid sequences in *Larimichthys crocea* and other species

2.2 序列多重比对及系统发育树构建

Clustal Omega 氨基酸序列多重比对结果显示,Rnd1 的氨基酸序列高度保守。其中:大黄鱼与棘头梅童鱼的 Rnd1 氨基酸的同源性最高,具有 99.57% 序列一致性;与其余鱼类也具有较高的序列一致性。进化树分析结果表明大黄鱼的 Rnd1 基因与其他鱼类聚为一支;两栖类,鸟类,哺乳类各自聚集并形成分支(见图 4)。

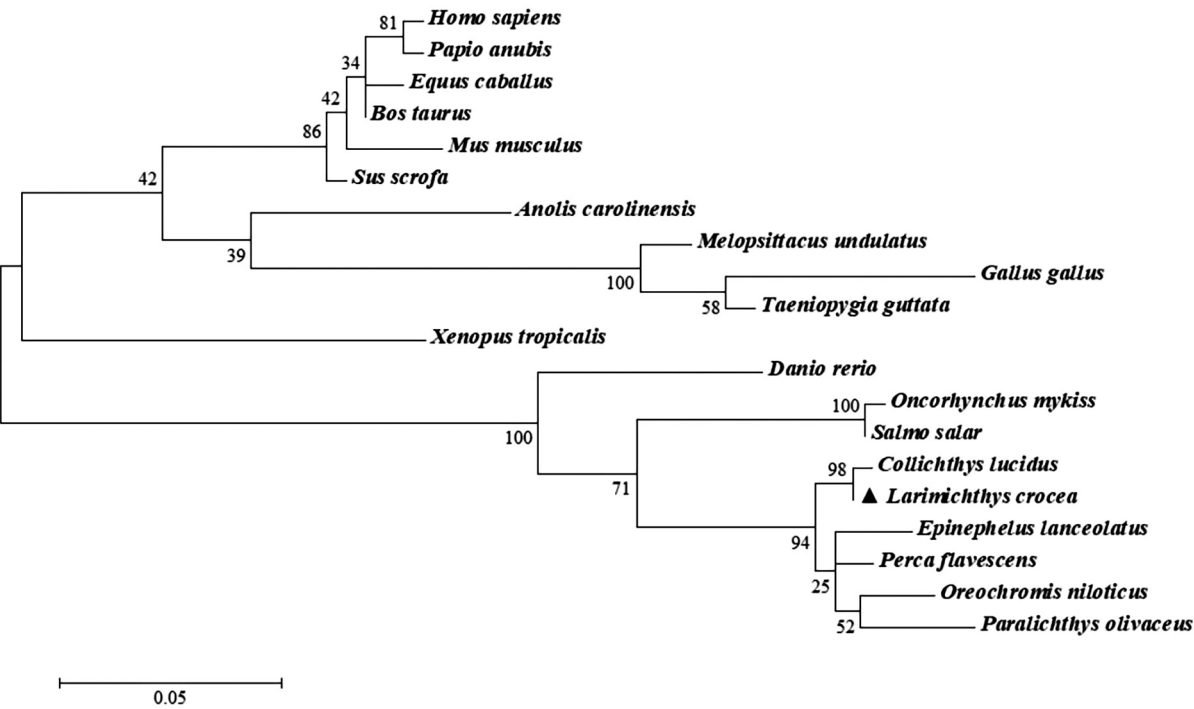


图 4 大黄鱼与其他物种 *Rnd1* 构建的系统进化树

Fig.4 The phylogenetic tree of *Rnd1* in *Larimichthys crocea* and other species

2.3 *Rnd1* 基因在不同组织的特异性表达

*Rnd1* 在健康大黄鱼各个组织中的分布情况如图 5 所示。从图 5 可知：在大黄鱼的 8 个免疫组织中，该基因在肝脏中相对表达量最高；其次为脑；在肠中表达量最低。为检测大黄鱼感染变形假单胞菌对 *Rnd1* 基因表达情况的影响，用变形假单胞菌攻毒后分别检测不同时间段该基因在肾脏、肝脏、脾脏的转录水平，结果如图 6 所示。由图 6 可知：大黄鱼肾脏中该基因的表达量在 24 h 前下降，在 72 h 时达到最大值。*Rnd1* 在肝脏中，0 ~ 24 h 小幅度上调表达；48 h 时达到最高值，为对照组的 25 倍；之后在肝脏中的表达量呈现下降趋势。而在脾脏中该基因持续上调表达，48，72，96 h 表达量升高更为明显，分别为对照组的 22，68，78 倍。

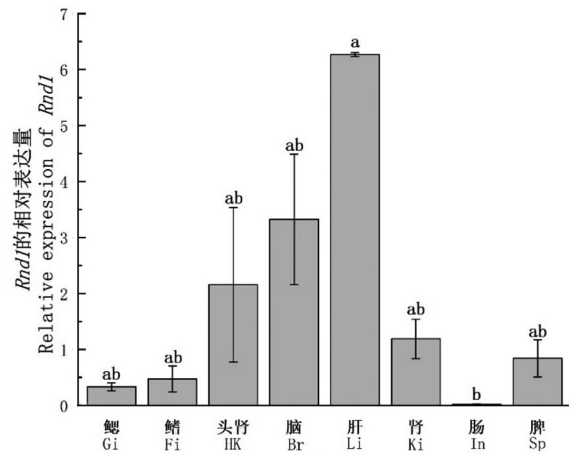


图 5 无刺激条件下 *Rnd1* 在大黄鱼各组织中的相对表达  
Fig.5 The relative expression of *Rnd1* in each tissues of *Larimichthys crocea* without stimulation

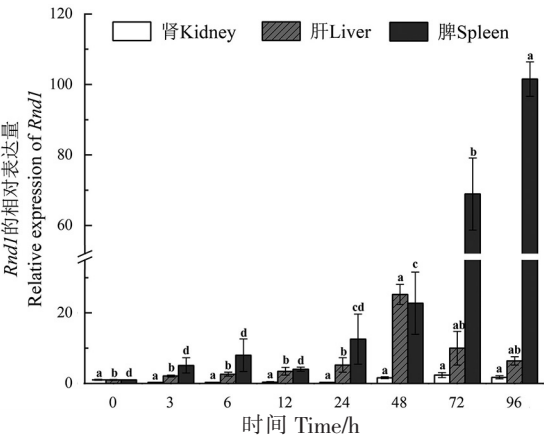


图 6 受变形假单胞菌刺激后 *Rnd1* 在大黄鱼肾肝脾中的表达  
Fig.6 The relative expression of *Rnd1* in kidney, liver and spleen of *Larimichthys crocea* after the challenge of *P. plecoglossicid*

2.4 pET-28a-Rnd1 重组蛋白原核表达

按照一步克隆试剂盒要求，针对 *Rnd1* 基因开放阅读框序列和 pET-28a 载体设计引物，以大黄鱼脾脏组织 cDNA 样品为模板进行 PCR 反应。电泳结果显示在 700 bp 左右有单一明亮条带，将其割胶回收。pET-28a 载体经 *EcoR* I、*Xho* I 内切酶双酶切后获得线性化载体，与目的片段进行连接。将 pET-28a-*Rnd1* 重组载体转化入 BL21（DE3）感受态。挑取单克隆菌落进行测序，选取测序结果正确的菌液进行扩大培养，提取质粒并进行双酶切验证。电泳结果显示出两条带，一条在 5300 bp 左右，另一条在 700 bp 左右，表明 pET-28a-*Rnd1* 重组表达载体构建成功（见图 7）。

以 1 : 100 的比例将菌液扩大培养，培养条件为 37 ℃、200 r/min，培养至菌液  $A_{600}$  约为 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L，16 ℃、120 r/min 继续培养 16 h。提取蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 8 所示，含有 pET-28a-*Rnd1* 重组质粒的表达菌株在 25 ku 至 35 ku 之间有明显条带，与预测重组蛋白大小（预测 *Rnd1* 蛋白分子量为 26 ku，His 标签蛋白大小约为 2.6 ku）相符，表明重组蛋白表达成功。诱导菌株超声裂解后，电泳条带显示目的蛋白存在于上清和沉淀中。使用镍柱对融合蛋白进行纯化，使用 30，100，250 mmol/L 咪唑梯度洗脱。纯化后经 SDS-PAGE 检测，条带较单一，表明得到了较高纯度的产物。

3 讨论

在本实验室前期研究中，对感染变形假单胞菌后带菌量极端的大黄鱼脾脏样本进行了转录组测序。从 Swissprot 蛋白质数据库中注释到 769 个差异表达基因，包括 487 个表达上调基因，282 个表达下调基因（上调基因是指在相对带菌量高的脾脏中表达量远高于相对带菌量低的基因；反之则为下调基因），其中 *IL1B*、*Rnd1*、*IL6* 等基因的表达量显著上调，*AQP4*、*SEMA3D* 等基因的表达量显著下调，提示这些基因或许在变形假单胞菌侵染宿主时发挥着免疫作用。

*Rnd1* 基因编码的蛋白质属于 Rho GTPase 家族中非典型的小 G 蛋白。经典的小 G 蛋白属于核苷酸依赖型分子开关，依靠附属蛋白的调控。大多数 G 蛋白本身具有 GTPase 活性，可以将 GTP 水解为 GDP，而 GTPase 活化蛋白（GTPase activating proteins，GAPs）能活化小 G 蛋白的水解活性，加快 GTP 的水解过程。鸟嘌呤核苷酸交换因子（guanine nucleotide exchange factors，GEFs）能催化小 G 蛋白与 GDP 解离，将 G 蛋白转化为利于结合 GTP 的构象。另外，鸟核苷酸解离抑制因子（guanine nucleotide dis-

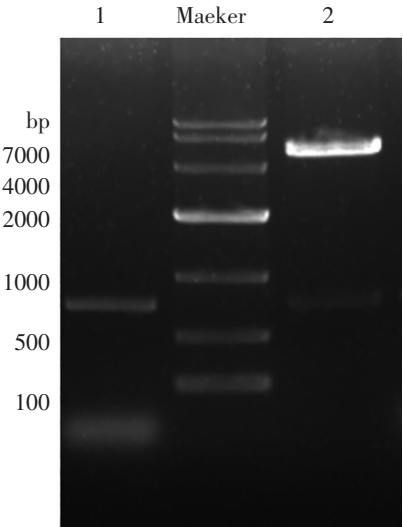
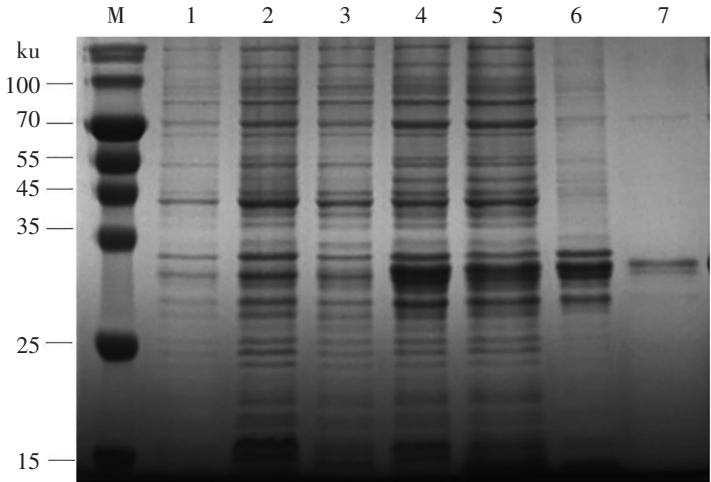


图 7 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.7 The result of agarose gel



M—蛋白 Marker；1—未经诱导的含 pET-28a 载体菌株；2—诱导后的含 pET-28a 载体菌株；3—未经诱导的含 pET-28a-*Rnd1* 重组载体菌株；4—诱导后 pET-28a-*Rnd1* 重组载体菌株；5—诱导重组菌株破碎后上清；6—诱导重组菌株破碎后沉淀；7—纯化的 *Rnd1*-His 融合蛋白  
M—Protein Marker；1—Non-induced strain containing pET-28a vector；2—Induced strain containing pET-28a vector；3—Uninduced strain containing recombinant vector pET-28a-*Rnd1*；4—Induced strain containing recombinant vector pET-28a-*Rnd1*；5—Induced supernatant；6—Induced precipitation；7—Purified *Rnd1*-His fusion protein

图 8 原核表达载体 pET-28a-*Rnd1* 的 SDS-PAGE 分析  
Fig.8 Analysis of prokaryotic expressed Lc*Rnd1* by SDS-PAGE



sociation inhibitors, GDIs) 负调控这些小 G 蛋白的 GTPase 活性<sup>[13]</sup>。而 *Rnd1* 蛋白缺乏 GTP 水解酶活性, 无法将 GTP 水解为 GDP。蛋白质的生理功能与其空间结构密切相关。为深入了解 *Rnd1* 蛋白的作用, 本研究针对大黄鱼 *Rnd1* 开放阅读框完成了体外表达, 其开放阅读框长度为 699 bp, 编码 232 个氨基酸, 理论等电点偏碱性。序列分析和同源性比较结果表明: 鱼类 *Rnd1* 氨基酸序列同源性较高, 与 Rho 蛋白类似, 核心区域含有一个经典的 Rho 蛋白结构域, 但是在鸟苷酸连接区的关键氨基酸位点上与经典小 G 蛋白存在不同, 这些不同的位点极有可能导致了蛋白质的不同特性和功能。例如多种 Ras 蛋白存在 Ala59 和 Gln61 位点, 而对应的 *Rnd1* 则被丝氨酸 (SGSP) 替代, 该结构抑制 GTP 水解并能稳定 Switch I、Switch II 与 GTP 结合的构象。系统进化分析结果表明, 大黄鱼 *Rnd1* 基因与棘头梅童鱼序列同源性达到 99.57%, 与鱼类尤其是硬骨鱼同源性较高, 聚为一支, 而鸟类、爬行类和哺乳类聚为另一大分支, 此结果表明大黄鱼 *Rnd1* 氨基酸序列的同源性传统的分类结果相符, 且在真核生物进化中, *Rnd1* 氨基酸序列高度保守, 体现了其在信号转导过程中的重要作用。

为研究 *Rnd1* 在大黄鱼免疫调控中的作用, 利用实时荧光定量 PCR 分析大黄鱼 *Rnd1* 在不同组织中的表达模式, 结果显示在该基因被检测的组织中均有分布, 在肝脏、脑中表达量最高, 其次为头肾, 在肠道中的表达量最低。哺乳动物中 *Rnd1*、*Rnd2* 和 *Rnd3* 这三个基因在各个组织中均有表达, 而 *Rnd1* 在脑和肝脏中表达最高<sup>[14]</sup>, 表明 *Rnd1* 在脑组织和肝组织的形成中具有重要作用。为了进一步了解 *Rnd1* 在大黄鱼抗病免疫中的作用机制, 本研究用变形假单胞菌刺激大黄鱼, 然后观察了肾脏、肝脏、脾脏中该基因的相对表达量。结果显示大黄鱼在受到变形假单胞菌刺激后, 肝脏中 *Rnd1* 基因的表达量在 48 h 时明显上调而随后下降, 最高表达量为对照组的 25 倍左右; 而肾脏中 *Rnd1* 基因在 3, 6, 12, 24 h 时表达量下降, 或许是细菌致病因子导致宿主细胞肌动蛋白细胞骨架重排及免疫反应紊乱<sup>[15-16]</sup>; 在脾脏中 *Rnd1* 基因则持续上调, 48 h 后上调更为显著。该基因在脾脏中的显著上调可能与脾脏作为变形假单胞菌感染的主要靶器官有关<sup>[2,17]</sup>。多种致病菌的 Fic 结构域都能引起 Rho 类蛋白 Switch I 或 Switch II 的氨基酸腺苷酰化<sup>[18-19]</sup>, 使 Rho 蛋白失活, 由此导致信号通路功能紊乱使宿主产生免疫功能障碍。在丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 中发现其 AvrB (avirulence protein B) 的 Doc 结构域, 与 Fic 结构域在序列和结构上有同源性<sup>[20]</sup>。*Rnd1* 蛋白作为肌动蛋白细胞骨架的重要调控蛋白质, 其相关的信号通路或许是变形假单胞菌毒力因子的作用靶点<sup>[21]</sup>。

构建 pET-28a-*Rnd1* 原核表达载体, 转入 BL21 (DE3) 感受态菌株中并诱导表达。大肠杆菌作为最常用的蛋白质表达体系之一, 在蛋白质大量纯化时, 其表达量与诱导温度、诱导时间及 IPTG 浓度有关<sup>[22]</sup>。实验结果表明, 诱导温度 16℃, 摇床 120 r/min, 诱导时间 16 h 时, 蛋白质在沉淀和上清中均有较高的表达量, 融合蛋白经镍柱纯化后条带较单一。纯化后的 *Rnd1* 融合蛋白在透析过程中容易形成白色絮状物, 这是由于 *Rnd1* 蛋白在水溶液中不稳定, 在溶液中易聚集成多聚体而沉淀、变性。Rho GTPase 有一个鸟苷酸连接区, 该区域的 Switch I 和 Switch II 在  $Mg^{2+}$  螯合下与 GTP 或 GDP 的磷酸根作用, 加入  $Mg^{2+}$  可以促进小 G 蛋白与 GTP (GDP) 结合并提高蛋白质的稳定性<sup>[23-24]</sup>。表达良好且高度纯化的蛋白质对于蛋白质结构和动力学的体外研究非常重要, 所以对 *Rnd1* 蛋白稳定性的优化, 对进一步研究 *Rnd1* 的功能有一定意义。

综上所述, 本实验探究了大黄鱼 *Rnd1* 基因的结构特点, 分析了 *Rnd1* 基因的在大黄鱼中的表达模式并构建原核表达载体, 实现了融合蛋白的大量纯化回收, 为后续制备该基因的抗体及进一步研究该蛋白的免疫功能提供了材料。

[ 参 考 文 献 ]

[1] 许斌福, 程海华, 池洪树, 等. 大黄鱼内脏白点病的病原分析与鉴定 [J]. 福建农业学报, 2015, 30(7): 631-635.

[2] 胡娇, 张飞, 徐晓津, 等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究 [J]. 海洋与



湖沼, 2014, 45(2): 409-417.

- [3] SMITH N C, RISE M L, CHRISTIAN S L. A Comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2292.
- [4] 徐钢春, 杜富宽, 卞超, 等. 鱼类基因组研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2017, 33(9): 23-31.
- [5] 石佰丽, 吕梦燕, 赵秋雁. 小 GTPase 蛋白家族的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(5): 2566-2569.
- [6] KAHN R A, DER C J, BOKOCH G M. The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature [J]. *The FASEB Journal*, 1992, 6(8): 2512-2513.
- [7] HALINA G, RIENTO K, PHELAN J P, et al. Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(20): 6303-6310.
- [8] CHARDIN P. Function and regulation of Rnd proteins [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(1): 54-62.
- [9] MOULY L, GILHODES J, LEMARIÉ A, et al. The RND1 small GTPase: main functions and emerging role in oncogenesis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3612.
- [10] 董慧敏, 刘宝辉, 孙前, 等. RND1 通过 p53 蛋白促进 PC12 细胞凋亡 [J]. *卒中与神经疾病*, 2019, 26(6): 649-652.
- [11] 武艳鸿, 李燕如, 其格乐很, 等. 细菌效应蛋白对宿主细胞 Rho 小 G 蛋白信号通路的调节作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(2): 202-209.
- [12] 崔晓莹, 李泽宇, 李完波, 等. 一种定量检测大黄鱼感染变形假单胞菌方法的建立与应用 [J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2019, 24(5): 328-334.
- [13] 闫慧娟, 勿呢尔, 莫日根, 等. Rho 小 G 蛋白相关激酶的结构与功能 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(7): 998-1008.
- [14] NOBES C D, LAURITZEN I, MATTEI M, et al. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 141(1): 187-197.
- [15] TAO Z, XU Y, ZHOU S, et al. Acquisition of a type VI secretion system is critical for *Pseudomonas plecoglossicida* induced granulomas in fish internal organs [J]. *Aquaculture*, 2020, 516: 734629.
- [16] 张杰, 毛芝娟. 大黄鱼内脏白点病病原杀香鱼假单胞菌及其毒力因子研究进展 [J]. *浙江万里学院学报*, 2015, 28(6): 69-76.
- [17] 罗罡. 基于 dual RNA-seq 识别变形假单胞菌与斜带石斑互作中的关键毒力基因 [D]. 厦门: 集美大学, 2018.
- [18] XIAO J, WORBY C A, MATTOO S, et al. Structural basis of Fic-mediated adenylylation [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(8): 1004-1010.
- [19] WORBY C A, MATTOO S, KRUGER R P, et al. The fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation [J]. *Molecular Cell*, 2009, 34(1): 93-103.
- [20] KINCH L N, YARBROUGH M L, ORTH K, et al. Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB [J]. *PLOS ONE*, 2009, 4(6): e5818.
- [21] 周伟, 杨俊齐. Rho GTPases 在感染与炎症中的免疫调节作用 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2017, 29(6): 807-813.
- [22] PATNAIK P R. Investigation of induction effect on the steady state performance of a continuous fermentation for recombinant  $\beta$ -galactosidase [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36(11): 1069-1074.
- [23] GAO S F, BUCK U. Optimization and stabilization of Rho small GTPase proteins for solution NMR studies: the case of Rnd1 [J]. *Small GTPases*, 2011, 2(6): 295-304.
- [24] SHUFEN C, XIAN M, DELI L, et al. Backbone assignment and secondary structure of Rnd1, an unusual Rho family small GTPase [J]. *Biomolecular NMR assignments*, 2013, 7(2): 121-128.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)