

美洲鳗鲡 *nk-lysin* 基因克隆及其抗菌活性

汲广硕¹, 李东利^{1,2,3}, 梁英^{1,2,3}, 熊静^{1,2,3}, 黄贝^{1,2,3}, 黄文树^{1,2,3}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;
3. 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为探究美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*) 阳离子型抗菌肽 Nk-lysin 的功能, 克隆了美洲鳗鲡 *nk-lysin* 基因 (*Arnk-lysin*), 其开放阅读框为 396 bp, 编码 131 个氨基酸。序列预测分析发现 *ArNk-lysin* 含一个信号肽, 一个 Sap B 结构域和 6 个保守的半胱氨酸 (Cys)。抗菌活性研究结果表明: *ArNk-lysin* 的 79—98 位氨基酸肽段 (*ArNk-lysin*₇₉₋₉₈) 能显著抑制革兰氏阳性菌 (如金黄色葡萄球菌), 以及多种革兰氏阴性菌 (如嗜水气单胞菌、鳗弧菌、铜绿假单胞菌、哈维氏弧菌、变形杆菌和大肠杆菌) 的生长; 同时, *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 可增强嗜水气单胞菌的细菌外膜通透性, 并破坏其细胞膜, 引起细胞质外泄, 导致细菌死亡。说明美洲鳗鲡 *ArNk-lysin* 具有一定的抗菌、杀菌活性。

[关键词] 美洲鳗鲡; Nk-lysin; 抗菌活性; 膜通透性

[中图分类号] S 917.4

Cloning and Antimicrobial Activity of *nk-lysin* Gene from American Eel (*Anguilla rostrata*)

JI Guangshuo¹, LI Dongli^{1,2,3}, LIANG Ying^{1,2,3}, XIONG Jing^{1,2,3}, HUANG Bei^{1,2,3}, HUANG Wenshu^{1,2,3}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. Engineering Research Center of Aquaculture Breeding and Healthy of Fujian, Xiamen 361021, China)

Abstract: Nk-lysin is a cationic antimicrobial peptide that plays a significant role in the innate immunity of fish. To investigate the function of Nk-lysin in the American eel (*Anguilla rostrata*), the *nk-lysin* gene (*Arnk-lysin*) of American eel was cloned and analyzed in the present study, which has an open reading frame (ORF) of 396 bp encoding 131 amino acids. Sequence prediction analysis revealed that *ArNk-lysin* contains a signal peptide, a Sap B domain, and six conserved cysteines (Cys). The antimicrobial activity study showed that the peptide segment *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈, consisting of amino acids 79 to 98, significantly inhibited the growth of Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, as well as Gram-negative bacteria including *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, *Proteus bacteria* and *Escherichia coli*. Additionally, *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ enhanced the permeability of the bacterial outer membrane of *Aeromonas hydrophila* and disrupted its cell membrane, leading to cytoplasmic leakage and bacterial death. These results indicate that the *ArNk-lysin* of the American eel possesses antimicrobial and bactericidal activities.

Keywords: *Anguilla rostrata*; Nk-lysin; antibacterial activity; membrane permeability

[收稿日期] 2024-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (32073011, 32373163); 福建省自然科学基金项目 (2021J02047)

[通信作者] 黄文树 (1973—), 博士, 教授, 从事水产动物免疫与病害防控研究。E-mail: wshuang@jmu.edu.cn

[共一作者] 李东利 (1987—), 博士, 讲师, 从事水产动物免疫与病害防控研究。E-mail: donglili@jmu.edu.cn

0 引言

Nk-lysin 是 Andersson 等^[1]在 1995 年从猪小肠中发现的一种具有三对二硫键的多肽, 是一种由机体自然杀伤细胞和毒性 T 细胞分泌的抗菌肽^[2], 为鞘脂激活蛋白样蛋白 (saposin-like protein, SAP-LIP) 家族成员, 具有鞘脂激活蛋白 B (saposin B, Sap B) 结构域和 6 个保守的半胱氨酸^[3]。Nk-lysin 由细胞分泌^[4], 在机体受病原体刺激后被激活, 对细菌^[5]、病毒^[6]、寄生虫^[7], 甚至肿瘤细胞^[8]都具抑制或杀灭作用。目前, 已在多种鱼类中发现 Nk-lysin, 如有斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[9]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[10]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[11]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[12]、欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[13]、金鲷 (*Trachinotus ovatus*)^[14]和许氏平鲉 (*Sebastes schlegelii*)^[15]等。当细菌感染时, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[16]和巴马缨鱼 (*Pseudocrossocheilus bamaensis*)^[2]Nk-lysin 在其免疫器官中显著上调。牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[17]和大黄鱼^[11]Nk-lysin 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等多种细菌具抵抗活性。综上所述, Nk-lysin 具有较强的杀菌活性, 在鱼类先天免疫反应中发挥重要作用。

鳗鲡是我国重要的淡水养殖品种, 但其养殖遭受细菌等多种病害的威胁^[18]。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。本研究对美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*) nk-lysin (*Arnk-lysin*) 进行基因克隆和生物信息学分析, 并合成肽段 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈, 研究其抗菌机制, 为美洲鳗鲡细菌性病害防控提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (菌种编号: ATCC25923)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (菌种编号: ATCC25922), 购自中国科学院菌种保藏中心。阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*)、希瓦氏菌 (*Shewanella*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、变形杆菌 (*Proteus bacteria*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 由集美大学病害实验室鉴定并提供。

1.2 方法

1.2.1 *Arnk-lysin* 基因克隆和生物信息学分析

根据鳗鲡转录组库基因序列, 设计 *ArNk-lysin* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 特异性扩增引物 *Arnk-lysin*-F (5'-ATGAAGCCTTCCATCATC-3') 和 *Arnk-lysin*-R (5'-TCACACTGGCCCTTG-3')。引物均由厦门铂瑞生物技术有限公司合成。PCR 扩增运行程序: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增体系如下: 2 × Green Master Mix (Promega) 25 μL, *Arnk-lysin*-F 和 *Arnk-lysin*-R 各 2.5 μL, cDNA (肝脏) 2 μL, ddH₂O 18 μL。用 SignalP 5.0 软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 在线预测信号肽及其切割位点; 在 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构域; 通过 ProtParam tool 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线预测蛋白质分子量和理论等电点 (pI); 使用 GeneDoc 软件进行多序列比对, 使用 MEGA11 软件构建系统进化树。

1.2.2 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 最小抑菌和杀菌浓度分析

通过 CAMPR3 抗菌肽数据库网站 (<https://ngdc.cnecb.ac.cn/databasecommons/database/id/1767>) 预测 *ArNk-lysin* 抗菌肽段, 并结合 APD3 抗菌肽数据库网站 (<https://aps.unmc.edu/AP/>), 设计合成预测的 *ArNk-lysin* 抗菌肽段 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈, 并由上海生工生物工程股份有限公司合成。将活化的金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、鳗弧菌、铜绿假单胞菌、哈维氏弧菌、变形杆菌、大肠杆菌、希瓦氏菌、阴沟肠杆菌、豚鼠气单胞菌和维氏气单胞菌, 用 Mueller-Hinton (MH) 培养基和磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释, 调整菌悬液浓度至 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL。参照 Wiegand 等的

研究方法^[19], 在 96 孔细胞培养板中, 依次加入不同浓度的 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 抗菌肽 (0、6、12、24、48 和 96 $\mu\text{mol/L}$) 和稀释的上述菌悬液 ($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) 各 50 μL 。每个样品设置 3 个平行, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 ~ 24 h, 然后测定其 600 nm 下的吸光度值 $A(600)$ 。培养 18 ~ 24 h 后, 当肉眼观察到微孔中细菌与培养前没有明显浊度变化, 且 $A(600)$ 值与阴性对照 (MH 培养基) 相比没有显著变化, 则以其所对应的 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 浓度作为最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。从上述阴性对照组和待测实验组各孔中分别取 5 μL 菌液滴于含有 MH 固体培养基的培养板上, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 正置培养 24 ~ 48 h, 分析其最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC)。

1.2.3 膜通透性分析

将过夜培养的嗜水气单胞菌, 3000g 离心 3 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 调整菌悬液浓度为 1×10^5 CFU/mL, 然后与 96 $\mu\text{mol/L}$ 的 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 孵育 1、3、6 h, 用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色, 最后参照文献 [20] 的方法通过流式细胞仪进行检测分析。结果的分析依据: 以处理前细菌的荧光信号为对照, 若实验组荧光信号明显增强, 即 PI 染料通过细胞膜大量进入细胞内, 说明抗菌肽导致细胞膜通透性增强。

1.2.4 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 分析

为进一步探究 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对嗜水气单胞菌细胞膜的影响, 用扫描电镜按文献 [21] 的方法进行观察分析。将 1 mL 1×10^5 CFU/mL 的嗜水气单胞菌 3000g 离心 3 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 随后与 96 $\mu\text{mol/L}$ 的 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 室温孵育 1 h, 再 3000g 离心 3 min, 去除上清液后加入戊二醛固定。将固定后的样品送至中科百测公司进行 SEM 分析, 观察经 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 处理后的嗜水气单胞菌细胞膜结构是否破损。

1.2.5 基因组 DNA 影响分析

为进一步探究 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对嗜水气单胞菌基因组 DNA 的影响, 将嗜水气单胞菌过夜培养后, 利用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取其基因组 DNA, 然后取不同浓度 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ (0、6、12、24、48 和 96 $\mu\text{mol/L}$) 各 5 μL , 与 5 μL 嗜水气单胞菌基因组 DNA (质量浓度为 60 ng/ μL) 分别混匀, 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 最后通过 1% (体积分数) DNA 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。结果的分析依据: 若嗜水气单胞菌基因组 DNA 随 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 浓度的增加, 条带迁移明显滞后, 说明 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 已与细菌基因组 DNA 结合。

2 实验结果与分析

2.1 *Arnk-lysin* 基因克隆及其生物信息学分析

以美洲鳗鲡肝脏 cDNA 作为模板, 用 PCR 技术成功克隆到 *Arnk-lysin* 基因 ORF 序列。*Arnk-lysin* 基因 ORF 序列大小为 396 bp, 编码 131 个氨基酸。生物信息学分析结果显示: *ArNk-lysin* 前体蛋白质分子量大小约为 14.8 ku, pI 值为 9.26; *ArNk-lysin* 包含一个信号肽, 一个 Sap B 结构域, 6 个保守的半胱氨酸 (见图 1)。

选取具代表性的哺乳类和鱼类 *Nk-lysin* 与 *ArNk-lysin* 进行多序列比对分析, 结果 (见表 1) 表明: *ArNk-lysin* 与鲤 *Nk-lysin* 4 序列同源性最高, 为 87%; 与鲤 *Nk-lysin* 3 同源性为 75%, 居其次; 与斑马鱼 *Nk-lysin* 1、



加粗 ATG 和 TGA 分别代表起始密码子和终止密码子; 方框内为引物序列; 下划线序列为信号肽; 阴影部分为 Sap B 结构域; 圆圈为保守的半胱氨酸。

图 1 *ArNk-lysin* 序列分析
Fig.1 *ArNk-lysin* sequential analysis

Nk-lysin 4 同源性均为 62%；与红鳍东方鲀 Nk-lysin-like 同源性为 58%；与金鲳 Nk-lysin 同源性为 57%。

多序列比对结果（见图 2）显示：ArNk-lysin 与其他鱼类和哺乳类一样都含有一个保守的 Sap B 结构域，且有 6 个半胱氨酸（Cys50、Cys53、Cys80、Cys91、Cys116、Cys122），说明 ArNk-lysin 是鞘脂激活蛋白样蛋白（saposin-like protein，SAPLIP）家族成员。

进化树分析结果（见图 3）发现：哺乳类和鱼类 NK-lysin 分为两大支；在鱼类中，ArNk-lysin 与鲤 Nk-lysin 1、斑马鱼 Nk-lysin 2 和 Nk-lysin 3 归为一小支。

表 1 NK-lysin 多重序列比对结果及系统发育分析序列登录号

Tab. 1 NK-lysin multiple sequence alignments result and phylogenetic analysis sequences accession numbers

物种	基因	登录号	相似度/%
金鲳 <i>Trachinotus ovatus</i>	<i>nk-lysin</i>	QGR15361.1	57
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>nk-lysin</i>	APD51552.1	36
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	<i>nk-lysin-like</i>	AIL25791.1	5
欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>nk-lysin</i>	ASD56696.1	5
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	<i>nk-lysin-like</i>	XP_003962755.1	58
大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	<i>nk-lysin-like</i>	XP_020775456.1	44
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	<i>nk-lysin</i>	NP_001	32
大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	<i>nk-lysin-like</i>	XP_012678094.2	41
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>nk-lysin</i>	AOT80798.1	53
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>nk-lysin 2</i>	AOT80800.1	52
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>nk-lysin 3</i>	XP_018926630.1	75
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>nk-lysin 4</i>	XP_018947975.1	87
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>nk-lysin 5</i>	AKT74324.1	6
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>nk-lysin 1</i>	XP_021328759.1	62
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>nk-lysin 4</i>	AKT74323.1	62
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	<i>nk-lysin 3</i>	ABC17995.1	53
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	<i>nk-lysin 1</i>	AAY16122.1	37
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	<i>nk-lysin 2</i>	ABC17994.1	53
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>nk-lysin 1</i>	XP_018976518.2	45
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>nk-lysin 2</i>	AKT74321.1	44
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>nk-lysin 3</i>	AKT74322.1	52
人 <i>Homo sapiens</i>	<i>GNLY(granulysin)</i>	NP_006424.2	4
马 <i>Equus caballus</i>	<i>NK-lysin</i>	AAN10122.3	39
猪 <i>Sus scrofa</i>	<i>NK-lysin</i>	NP_001265684.1	14

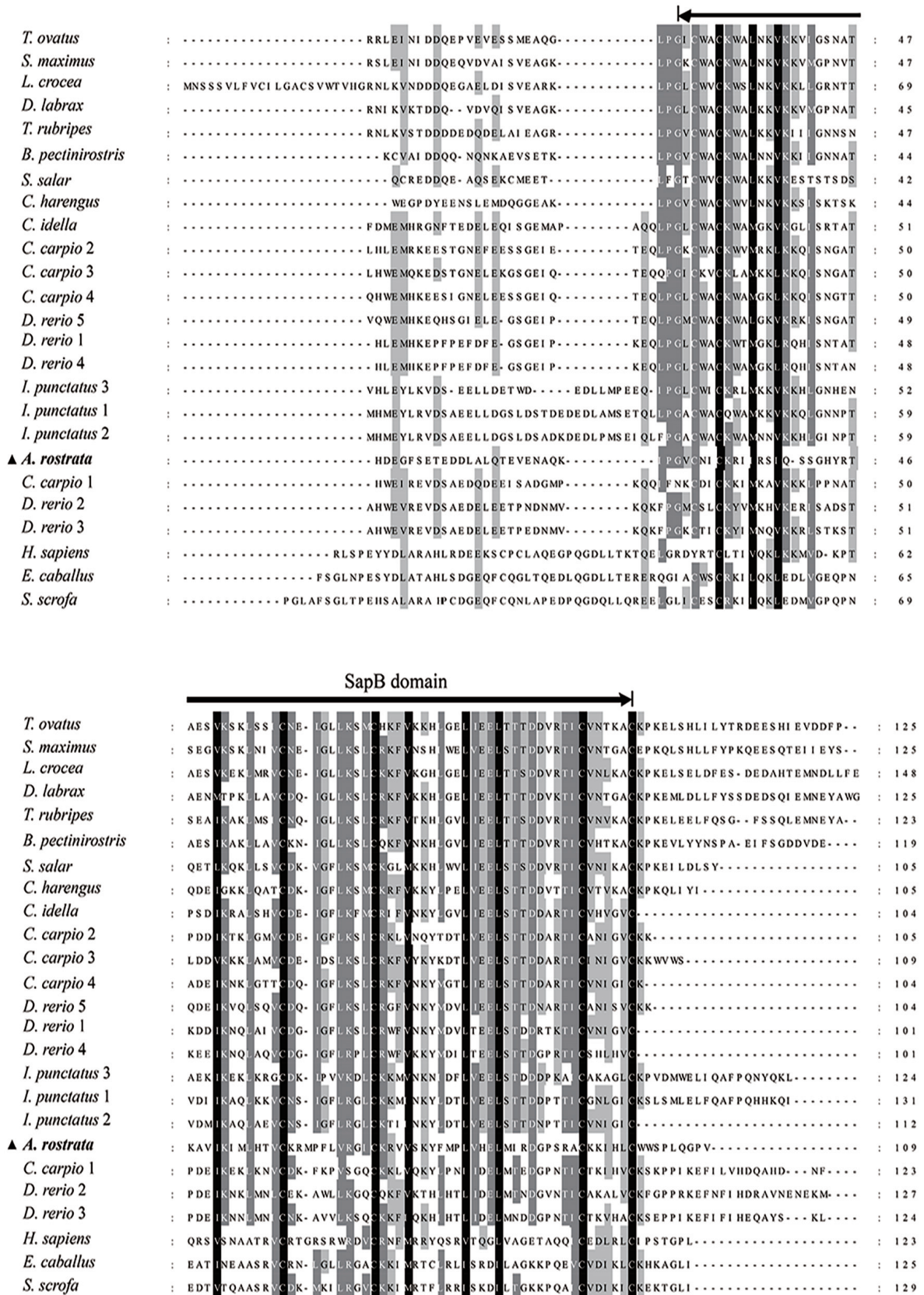


图2 ArNk-lysin 与其他物种 Nk-lysin 成熟肽多序列比对分析结果

Fig.2 Alignment result of ArNk-lysin mature peptide amino acid sequences and other species

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

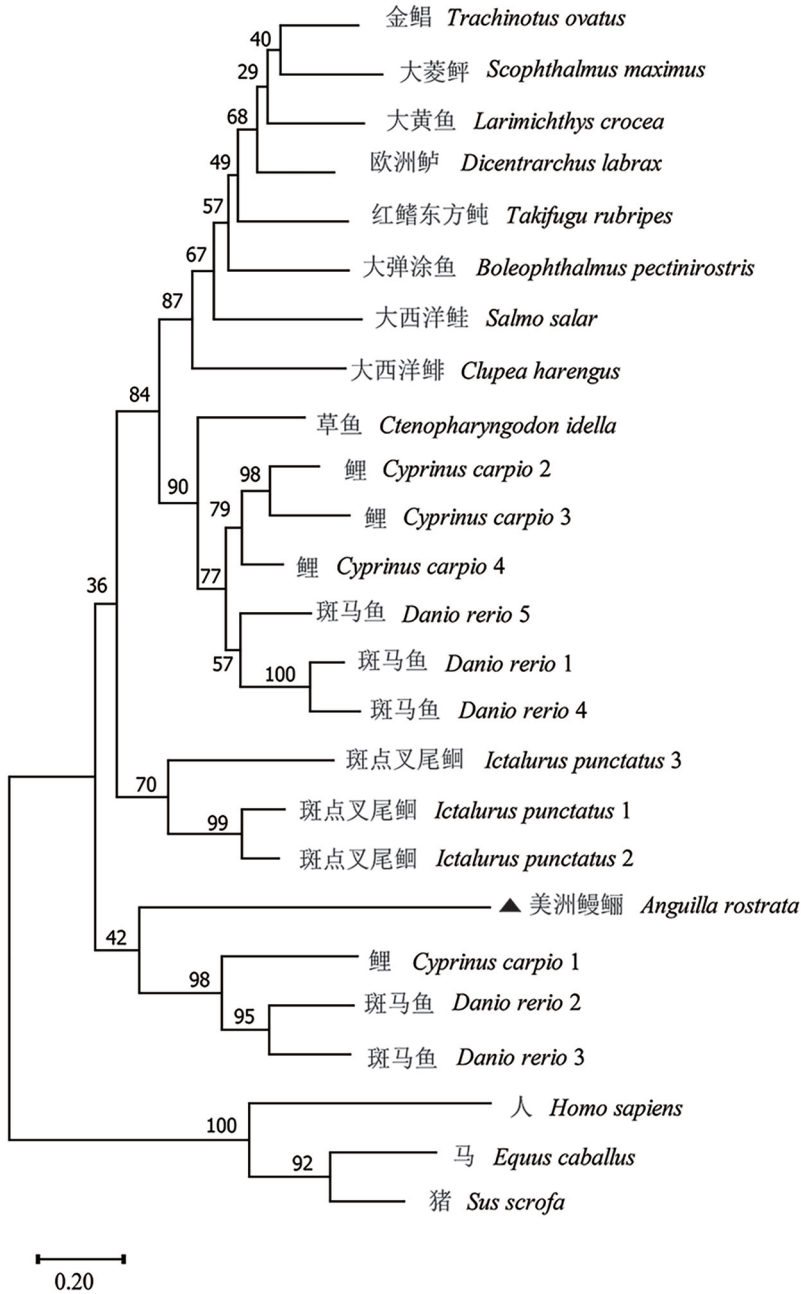


图 3 脊椎动物 Nk-lysin 成熟肽系统进化分析结果

Fig.3 Phylogenetic analysis result of Nk-lysin mature peptide amino acid sequences from vertebrate

2.2 ArNk-lysin 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

根据 CAMPR3 抗菌肽数据库预测，将 ArNk-lysin₇₉₋₉₈ 分段肽（从信号肽开始的第 79—98 个氨基酸）委托上海生工生物工程股份有限公司进行固相合成。合成肽的氨基酸序列是 VCKRMPFLVR-GICKRVVSKY，合成肽的分子量为 2.38 ku，带正电荷的氨基酸数为 6，等电点为 10.47，合成纯度均超过 98%，并且易溶解于 ddH₂O、1×PBS（pH = (7.1 ± 0.1)）等常见溶剂，可用于后续实验。

本实验选择 11 种细菌进行抗菌活性研究，其中革兰氏阳性菌 1 种和革兰氏阴性菌 10 种。实验结果（见表 2）显示：ArNk-lysin₇₉₋₉₈ 对革兰氏阴性菌，如嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度（MIC 值）为 12 μmol/L，最小杀菌浓度（MBC 值）为 48 μmol/L；对鳗弧菌、铜绿假单胞菌、哈维氏弧菌和变形杆菌的 MIC 值为 24 μmol/L；对大肠杆菌的 MIC 值为 48 μmol/L；对表 2 中 7 种菌的 MBC 值为 48 ~

96 $\mu\text{mol/L}$, 或大于 96 $\mu\text{mol/L}$ (铜绿假单胞菌); 对革兰氏阳性金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 24 $\mu\text{mol/L}$, MBC 值为 48 $\mu\text{mol/L}$ 。此外, $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 对希瓦氏菌、阴沟肠杆菌、豚鼠气单胞菌、维氏气单胞菌无明显抑制作用 (结果未展示)。实验结果表明: $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 对革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌) 和革兰氏阴性菌 (嗜水气单胞菌、鳗弧菌、哈维氏弧菌等) 均具有抗菌活性。

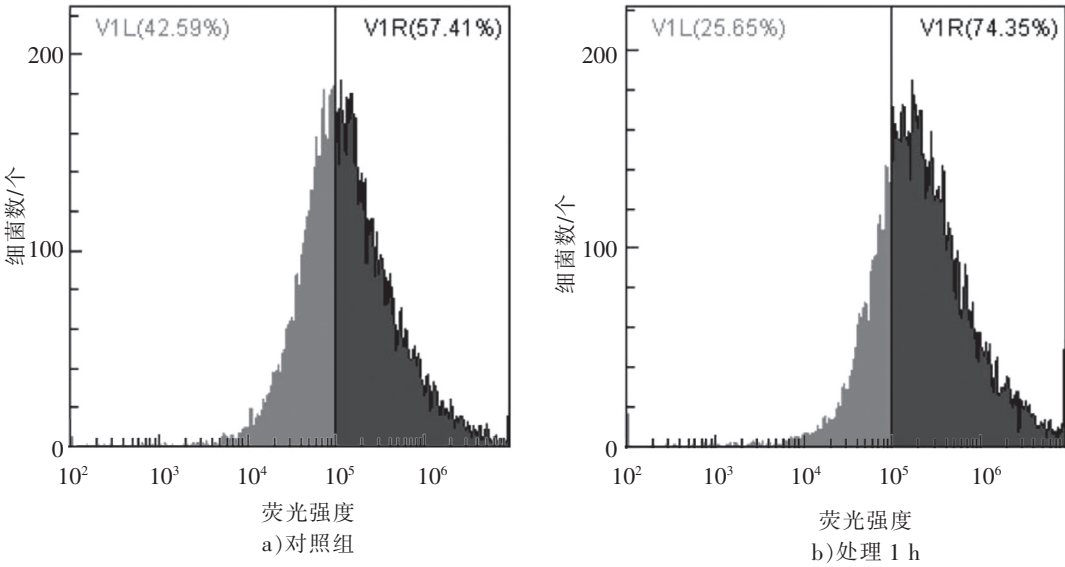
表 2 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 合成肽抗菌活性分析结果

Tab. 2 Analysis result of the antimicrobial activities of the synthetic peptide $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$

菌种		MIC/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MBC/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	24	48
	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	12	48
	鳗弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	24	48
革兰氏阴性菌	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	> 96
	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	24	48
	变形杆菌 <i>Proteus bacteria</i>	24	96
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	48	96

2.3 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 对嗜水气单胞菌膜通透性的影响

为探究 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 对细菌细胞膜通透性的影响, 选用嗜水气单胞菌作为研究对象进行实验。在细菌膜通透性增加后, PI 染料通过渗透细菌外膜进入细菌内, 并与细菌 DNA 结合产生荧光, 其荧光信号可被流式细胞仪检测到, 据以分析 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 对细菌细胞膜通透性的影响。实验结果 (见图 4) 显示: 对照组嗜水气单胞菌, 以 PI 荧光强度 10^5 为分界线, 分界线左侧细菌数量占总数的 42.59%, 分界线右侧细菌数量占总数的 57.41%; 将嗜水气单胞菌与 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 共同孵育 1 h 后, 分界线左侧细菌数量占总数的 25.65%, 分界线右侧细菌数量占总数的 74.35%; 将嗜水气单胞菌与 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 共同孵育 3 h 后, 分界线左侧细菌数量占总数的 15.05%, 分界线右侧细菌数量占总数的 84.95%; 将嗜水气单胞菌与 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 共同孵育 6 h 后, 分界线左侧细菌数量占总数的 10.04%, 分界线右侧细菌数量占总数的 89.96%。以上结果表明: 随着 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 与嗜水气单胞菌共同孵育时间的延长 (1、3、6 h), 流式细胞仪所检测的细菌 PI 荧光强度逐渐增大, 分界线右侧细菌数量逐渐增加, 表明 $\text{ArNk-lysin}_{79-98}$ 使嗜水气单胞菌的细胞膜通透性逐渐增强, 促进 PI 渗入。



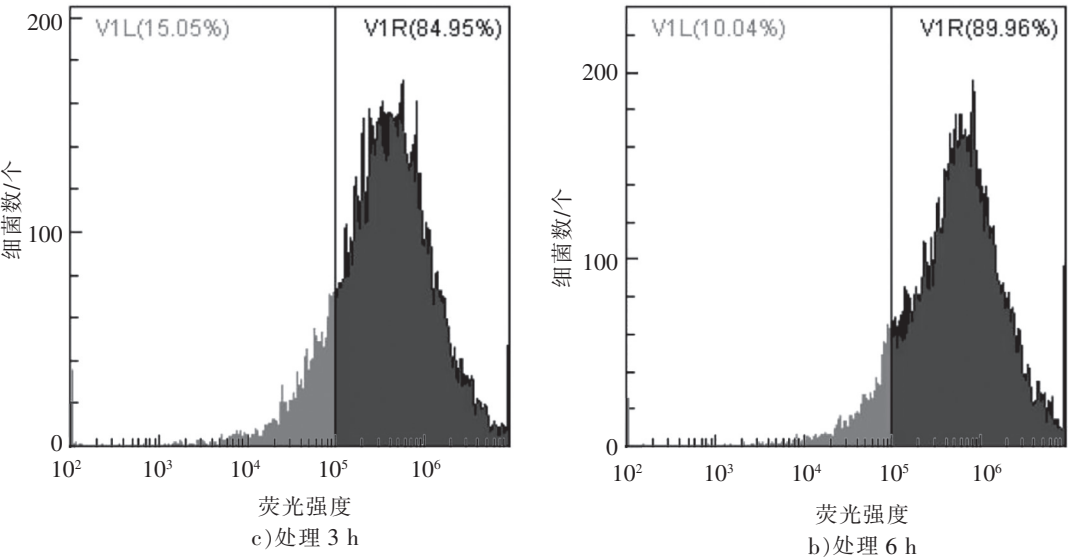
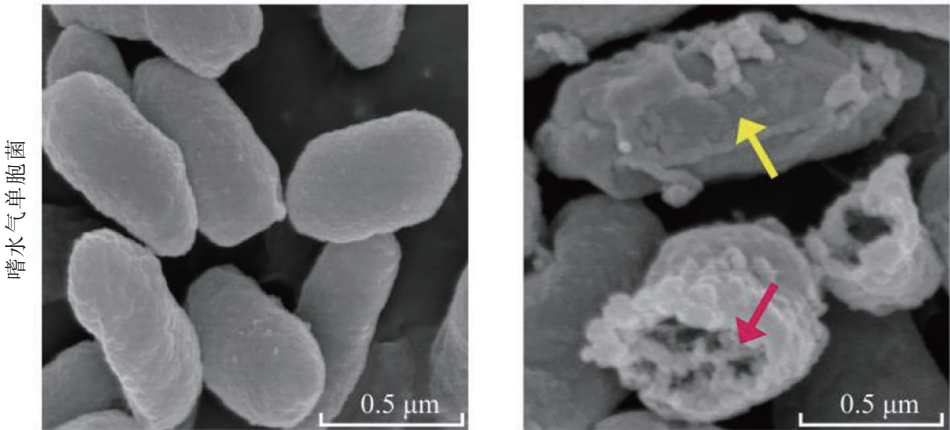


图 4 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对嗜水气单胞菌膜通透性的影响

Fig.4 The effect of *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ on the permeability of the *A. hydrophila* cell membrane

2.4 SEM 观察 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对嗜水气单胞菌形态结构的影响

为进一步研究 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对嗜水气单胞菌形态结构的影响，在 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与嗜水气单胞菌共同孵育处理后，用 SEM 观察其对细菌外膜结构的影响。结果（见图 5）显示：对照组嗜水气单胞菌表面光滑，外膜无破损，形态结构完整；而 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 处理后的嗜水气单胞菌细胞膜表面粗糙、皱缩，甚至产生穿孔。上述结果表明：*ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 具有引起嗜水气单胞菌细胞膜结构破损的活性，并可能导致细菌细胞内容物泄露，引起细菌死亡。



对照组 处理组

黄色箭头指示皱缩变形的细菌细胞膜；红色箭头指示细胞膜破损的嗜水气单胞菌。

图 5 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对嗜水气单胞菌细胞膜影响的 SEM 观察分析图

Fig.5 Analysis of the effect of *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ on the cell membrane of *A. hydrophila* by SEM

2.5 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与嗜水气单胞菌基因组 DNA 结合分析

将 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与提取的嗜水气单胞菌基因组 DNA 共同孵育，带正电荷的 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与带负电的细菌基因组 DNA 相互影响。孵育后进行琼脂糖凝胶电泳，若 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与细菌基因组 DNA 结合，将导致 DNA 移动阻力增加，条带迁移速率变慢。结果（见图 6）显示：在不同浓度的 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈（0、6、12、24、48、96 μmol/L）条件下，DNA 琼脂糖凝胶电泳条带的亮度和迁移

距离保持一致; 并且, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 其他各浓度对应的 DNA 条带并未出现明显阻滞现象。这说明美洲鳗鲡 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 合成肽不能结合嗜水气单胞菌基因组 DNA, 因此其抗菌、杀菌作用可能是通过破坏细菌细胞膜所致。

3 讨论

在本研究中, 利用 PCR 技术成功克隆美洲鳗鲡 *Arnk-lysin* 基因。生物信息学分析发现, 在结构上, *Arnk-lysin* 基因编码的氨基酸序列与其他鱼类^[22-24] 及哺乳类^[25] 的 *Nk-lysin* 氨基酸序列有相似的结构特征, 包括一段信号肽序列和一个 Sap B 结构域。成熟肽多重序列比对发现, *ArNk-lysin* 有 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 *ArNk-lysin* 发挥抗菌活性的关键, 这进一步表明美洲鳗鲡 *ArNk-lysin* 是 *Nk-lysin* 家族成员。

本研究进化树分析发现, 哺乳类和鱼类的 *Nk-lysin* 分为两大支。在鱼类中, 美洲鳗鲡 *ArNk-lysin* 与鲤 *Nk-lysin* 1 及斑马鱼 *Nk-lysin* 2、*Nk-lysin* 3 聚为一支, 其他鱼类 *Nk-lysin* 聚为另一支。*Nk-lysin* 在斑马鱼中有 *Nk-lysin* 1、*Nk-lysin* 2、*Nk-lysin* 3、*Nk-lysin* 4 和 *Nk-lysin* 5 五个亚型, 鲤也有四个 *Nk-lysin* 亚型, 而本研究美洲鳗鲡中仅克隆到一个 *ArNk-lysin*, 因此美洲鳗鲡是否存在其他 *Nk-lysin* 亚型还需要进一步研究。美洲鳗鲡 *Nk-lysin* 分支距离长, 与其他物种差异较大, 表明基因进化过程中不同物种 *Nk-lysin* 存在不同的环境适应性。

为进一步研究 *ArNk-lysin* 的抗菌活性, 本研究通过 CAMPR3 网站对 *ArNk-lysin* 抗菌肽段进行分析, 发现其含有一段可能具有抗菌活性的肽段 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈, 然后通过抑菌活性研究发现 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 对革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌) 和革兰氏阴性菌 (嗜水气单胞菌、鳗弧菌、铜绿假单胞菌、哈维氏弧菌、变形杆菌和大肠杆菌) 均具有抑菌活性。已有研究发现, 黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) *Nk-lysin* 抗菌肽对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等具有抑菌活性^[26], 许氏平鲱 (*Sebastes schlegelii*) *Nk-lysin* 抗菌短肽对金黄色葡萄球菌、鳗弧菌也有抑制活性^[15]。本研究 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 抗菌活性实验表明, *ArNk-lysin* 作为美洲鳗鲡的一种小分子抗菌肽, 可能在鳗鲡抵御病原菌感染中发挥重要作用, 这与已有研究^[15,26] 的报道结果相似。

嗜水气单胞菌是水产养殖中常见的致病菌之一^[27], 影响鳗鲡养殖业的可持续发展。为进一步了解 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 的杀菌机制, 本研究通过流式细胞技术研究发现, 随着 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与细菌孵育时间 (1、3、6 h) 的延长, 荧光信号逐渐增强, 说明细菌细胞膜渗透性发生改变, 导致荧光染料渗透入细菌细胞; 进一步通过 SEM 观察发现, *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 能引起嗜水气单胞菌细胞膜结构破坏, 细菌细胞外膜萎缩破裂, 可能导致细菌细胞内容物泄露, 进而引起细菌死亡。这与许氏平鲱^[15] *Nk-lysin* 的研究结果相符。已有研究发现, 抗菌肽除了膜作用机制外, 也可靶向细菌细胞内成分, 通过影响细胞内代谢活性, 如结合细菌 DNA、阻断酶活性等, 抑制 DNA、RNA 或蛋白质的合成进而杀死细菌^[28-29]。本研究发现 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 在体外并不结合嗜水气单胞菌基因组 DNA, 因此其可能主要是通过膜作用机制进行杀菌, 而不是通过结合细菌 DNA 影响细胞活性来达到杀菌目的。

4 结论

本研究成功克隆了美洲鳗鲡 *Arnk-lysin* 基因, 其具有类似其他物种 *Nk-lysin* 的信号肽、Sap B 结构域以及 6 个保守半胱氨酸。研究发现其肽段 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 具有抗菌活性, 能显著抑制革兰氏阳性菌 (如金黄色葡萄球菌) 和革兰氏阴性菌 (如嗜水气单胞菌、鳗弧菌、铜绿假单胞菌、哈维氏弧菌、变

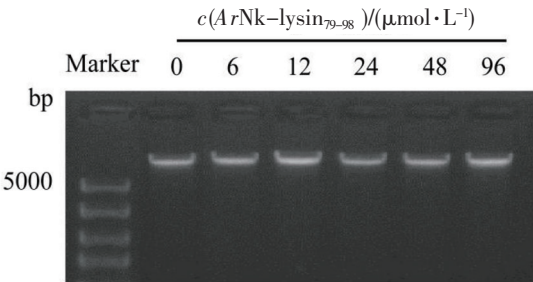


图 6 *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ 与嗜水气单胞菌基因组 DNA 结合琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.6 The analysis of *ArNk-lysin*₇₉₋₉₈ bound to *A. hydrophila* genomic DNA by agarose gel electrophoresis

形杆菌和大肠杆菌)的生长。进一步研究发现 *ArNk-lysin* 可改变嗜水气单胞菌外膜的通透性,引起外膜皱缩、结构破损、细菌细胞内容物泄露,最终导致细菌死亡。本研究为美洲鳗鲡先天免疫反应中 *ArNk-lysin* 抗菌肽的抗菌作用机制提供依据,其可能具有替代抗生素作为新型水产抗菌药物的潜在价值。

[参 考 文 献]

- [1] ANDERSSON M, GUNNE H, AGERBERTH B, et al. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells; structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity [J]. The EMBO Journal, 1995, 14(8): 1615-1625. DOI:10. 1002/j. 1460-2075. 1995. tb07150. x.
- [2] ZHANG M, WANG Z, WANG C, et al. Identification and characterization of five Nk-lysins from *Pseudocrossocheilus bamaensis* and their diverse expression patterns in response to bacterial infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 346-354. DOI:10. 1016/j. fsi. 2019. 09. 014.
- [3] LIEPINSH E, ANDERSSON M, RUYSSCHAERT J M, et al. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin [J]. Nature Structural Biology, 1997, 4(10): 793-795. DOI:10. 1038/nsb1097-793.
- [4] KRENSKY A M. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells [J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 59(4): 317-320. DOI:10. 1016/s0006-2952(99) 00177-x.
- [5] 周齐家, 潘滢, 陈佳, 等. 大黄鱼 *Lenkl3* 基因的分子结构、表达特征及多肽片段抗菌活性 [J]. 海洋科学, 2023, 47(4): 25-36. DOI:10. 11759/hyxx20201106003.
- [6] 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. DOI:10. 1016/j. fsi. 2017. 11. 030.
- [7] JACOBS T, BRUHN H, GAWORSKI I, et al. NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(2): 607-613. DOI:10. 1128/AAC. 47. 2. 607-613. 2003.
- [8] 韩军, 杨汉春. 猪源抗菌肽的研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2004(5): 29-32. DOI:10. 3969/j. issn. 0529-6005. 2004. 05. 014.
- [9] 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. DOI:10. 1016/j. fsi. 2005. 05. 005.
- [10] ZHANG M, LONG H, SUN L. A NK-lysin from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 40(3/4): 258-265. DOI:10. 1016/j. dc. 2013. 03. 005.
- [11] ZHOU Q J, WANG J, LIU M, et al. Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 195-202. DOI:10. 1016/j. fsi. 2016. 05. 035.
- [12] 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. DOI:10. 1016/j. fsi. 2018. 08. 004.
- [13] 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 and Comparative Immunology, 2020, 103: 103516. DOI:10. 1016/j. dc. 2019. 103516.
- [14] LIU B, LIU G D, GUO H Y, et al. Functional characterization of NK-lysin in golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2020, 107: 103658. DOI:10. 1016/j. dc. 2020. 103658.
- [15] HAO D F, WANG G H, LI N Q, et al. Antimicrobial and immunoregulatory activities of the derived peptide of a natural killer lysin from black rockfish (*Sebastes schlegelii*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 123: 369-380. DOI:10. 1016/j. fsi. 2022. 03. 020.
- [16] HUANG Y, ZHENG Q, NIU J, et al. NK-lysin from *Oreochromis niloticus* improves antimicrobial defence against bacterial pathogens [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 259-265. DOI:10. 1016/j. fsi. 2017. 11. 002.
- [17] HIRONO I, KONDO H, KOYAMA T, et al. Characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NK-lysin, an anti-

- microbial peptide [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 567-575. DOI:10.1016/j.fsi.2006.08.003.
- [18] 杨金先,陈强,李英英,等. 美洲鳗鲡“出血性烂鳃病”及其综合防控[J]. *水产养殖*, 2021, 42(2): 76-77. DOI:10.3969/j.issn.1004-2091.2021.02.024.
- [19] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163-175. DOI:10.1038/nprot.2007.521.
- [20] RICCARDI C, NICOLETTI I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1458-1461. DOI:10.1038/nprot.2006.238.
- [21] SUN Y Y, SUN L. A teleost bactericidal permeability-increasing protein kills Gram-negative bacteria, modulates innate immune response, and enhances resistance against bacterial and viral infection [J]. *PLoS One*. 2016, 22; 11(4): e0154045. DOI:10.1371/journal.pone.0154045.
- [22] 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. DOI:10.11964/jfc.20160910553.
- [23] 吴宝兰,罗帅,韩芳,等. 黄姑鱼 *NK-lysin* 基因的克隆及表达分析 [J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2022, 27(3): 204-212. DOI:10.19715/j.jmuzr.2022.03.02.
- [24] 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, 29(4): 317-323. DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2019.04.0054.
- [25] 杭柏林,宁春妹,张伟,等. 鸡抗菌肽 NK-lysin 的 B 细胞表位、剪切位点、疏水性及进化分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(15): 86-89. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy2018.07.0256.
- [26] ZHU R, WU Y S, LIU X X, et al. Membrane disruptive antimicrobial potential of NK-lysin from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 571-580. DOI:10.1016/j.fsi.2019.10.046.
- [27] XIONG N X, MAO Z W, OU J, et al. Metabolite features and oxidative response in kidney of red crucian carp (*Carassius auratus* red var) after *Aeromonas hydrophila* challenge [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2022, 255: 109293. DOI:10.1016/j.cbpc.2022.109293.
- [28] 吴家明,李芹. 抗菌肽的分类、作用机制与应用研究 [J]. *安徽农学通报*, 2024, 30(2): 101-107. DOI:10.3969/j.issn.1007-7731.2024.02.021.
- [29] 闫洁熙. 哺乳动物源性蛋白 NK-lysin 核心功能片段 NK-18 细胞膜破坏和 DNA 结合双重作用机制的抗癌、抗菌活性研究 [D]. 兰州:兰州大学, 2016.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)