

鳊鱼诺卡氏菌动力蛋白调节蛋白 $robl/LC7$ 的 亚细胞定位和功能初步研究

夏立群^{1,2}, 陈锐敏², 廖保山², 苏泽杰²,
徐亮², 童邦卓², 黄嘉慧², 鲁义善^{1,2,3*}

(1. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518108;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 鱼类诺卡氏菌病是一种慢性系统性肉芽肿疾病, 鳊鱼诺卡氏菌是其主要病原。鳊鱼诺卡氏菌全基因组生物信息学分析, 发现了一个可能靶向定位于宿主细胞线粒体的分泌蛋白——动力蛋白调节蛋白 $robl/LC7$ 。为了对鳊鱼诺卡氏菌 $robl/LC7$ 的亚细胞定位和功能进行初步研究, 实验对鳊鱼诺卡氏菌 $robl/LC7$ 进行了基因克隆、真核表达重组质粒构建、分泌蛋白鉴定、亚细胞定位、过表达和凋亡检测。结果显示, 成功克隆了鳊鱼诺卡氏菌 $robl/LC7$ 基因并构建了其真核表达质粒pEGFP- $robl/LC7$ 和pcDNA- $robl/LC7$; 鳊鱼诺卡氏菌分泌蛋白质谱鉴定证实 $robl/LC7$ 为分泌蛋白; 亚细胞定位研究显示 $robl/LC7$ -GFP融合蛋白呈全细胞分布, 不与线粒体共定位; 凋亡检测发现 $robl/LC7$ 过表达能诱导FHM细胞凋亡。研究表明, 鳊鱼诺卡氏菌 $robl/LC7$ 是一个不与线粒体共定位的分泌蛋白, 其可能通过参与细胞凋亡调控, 协助鳊鱼诺卡氏菌在宿主体内存存和免疫逃避, 并在鳊鱼诺卡氏菌的致病过程中具有重要作用。

关键词: 鳊鱼诺卡氏菌; 动力蛋白调节蛋白 $robl/LC7$; 分泌蛋白; 亚细胞定位; 细胞凋亡
中图分类号: S 941.42 **文献标志码:** A

鱼类诺卡氏菌病是一种慢性系统性肉芽肿疾病, 主要症状为皮肤脓肿溃烂及内部器官形成肉芽肿, 可导致鱼类慢性衰竭死亡, 在淡水鱼和海水鱼中都有报道, 近年来对海淡水养殖鱼类的危害颇大^[1-3]。该病的病原体是抗酸、革兰氏阳性诺卡氏菌, 已分离到的病原有3种: 鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)、杀鲑诺卡氏菌(*N. salmonicida*)和星形诺卡氏菌(*N. asteroides*)。值得注意的是近几年鱼类诺卡氏菌病的相关研究报道, 其致病菌以鳊鱼诺卡氏菌为主^[4-5]。

鳊鱼诺卡氏菌在分类学上属放线菌目(Actinomycetales)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、诺卡氏

菌属(*Nocardia*)^[6]。鳊鱼诺卡氏菌为兼性胞内病原, 其进入鱼体后既可以在胞内寄居、繁殖, 又可在细胞外生长。其感染特征为兼性细胞内寄生、低毒性、呈慢性过程、往往有肉芽肿形成, 并多伴有迟发型超敏反应。该菌感染鱼体后, 主要侵染吞噬细胞, 且可在该细胞内持久生存^[1, 7]。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)等兼性胞内病原在被巨噬细胞吞噬后, 能抵抗巨噬细胞的杀伤作用, 并在巨噬细胞内存活下去。在这一过程中兼性胞内病原会分泌一些毒力蛋白到宿主细胞内, 调控改变线粒体、细胞骨架等的状态, 创造有益的生存条件, 从

收稿日期: 2017-01-19 修回日期: 2017-04-20

资助项目: 广东省自然科学基金(2017A030313179); 广东省科技发展专项(2016A050502061); 深圳市科技计划(JCYJ20170306161613251); 深圳大鹏新区产业发展专项(KY20160207); 广东海洋大学自然科学研究项目(C13454); 广东省大学生创新创业训练计划(201710566042)

通信作者: 鲁义善, E-mail: fishdis@163.com

而在宿主细胞内生长繁殖^[8-10]。兼性胞内菌往往在其早期感染时抑制宿主细胞凋亡,而在感染晚期阶段则能明显诱导细胞凋亡,以利于进一步的扩散感染^[11-13]。

根据鲫鱼诺卡氏菌ZJ0503全基因组^[14]生物信息学分析预测,ORF6185编码一个动力蛋白调节蛋白*robl/LC7*的同源类似物,该蛋白可能是一个靶向定位于宿主细胞线粒体的分泌蛋白。动力蛋白(dynein)是细胞质中的分子马达,可将ATP高能磷酸键的化学能转化为机械能,从而介导向着微管负端“行走”的胞质运输,在胞内细胞器(如线粒体、溶酶体、高尔基体)的运输、有丝分裂等过程中发挥重要功能。动力蛋白是一个大的蛋白质复合体,动力蛋白轻链(dynein light chain, DLC)是该复合体中的组成单位之一,*robl/LC7*则是目前已经鉴定出的3种轻链之一,其功能是介导与“货物”的相互识别,从而具有调节动力蛋白的功能^[15-17]。本研究克隆了鲫鱼诺卡氏菌*robl/LC7*基因,并进行了分泌蛋白鉴定、亚细胞定位、过表达和凋亡检测等研究,以期对鲫鱼诺卡氏菌*robl/LC7*的功能进行初探,并为了解鲫鱼诺卡氏菌的分子致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株与细胞 鲫鱼诺卡氏菌ZJ0503菌株从海水网箱养殖的患病卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)中分离到并由本实验室保存;胖头鲤细胞(Fat-head minnow cells, FHM)、质粒pEGFP-N1、质粒pcDNA 3.1-His A、大肠杆菌受体菌DH5 α 由本实验室保存提供。

工具酶和主要试剂 KOD-Plus-NEO高保真聚合酶购自Toyobo公司;限制性核酸内切酶*EcoRI*、*BamHI*、*XhoI*、T4连接酶和DNA片段纯化试剂盒均购自TaKaRa公司;细菌基因组DNA

提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒购自Tiangen公司;PCR产物回收试剂盒购自TransGen生物技术有限公司;质粒微量提取试剂盒购自U-gene公司;无内毒素质粒提取试剂盒购自Omega公司;L-15细胞培养液、胰酶购自Gibco公司;转染试剂Lipofectamine 2000、Opti-MEM、线粒体红色荧光探针MitoTracker Red CMXRos购自Invitrogen公司;细胞核荧光染料DAPI购自Sigma公司;透析袋(截留分子量3500)、玻璃纸购自上海源叶生物科技有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自碧云天生物技术公司;其他试剂均为国产分析纯。抗生素使用浓度为卡那霉素(Kan)50 mg/mL、氨苄青霉素(Amp)100 mg/mL。

1.2 鲫鱼诺卡氏菌总DNA的提取

参照夏洪丽等^[18]方法,将鲫鱼诺卡氏菌接种于改良培养基平板上,28℃倒置培养24~36 h。挑取适量的菌落于离心管中,按照细菌基因组DNA提取试剂盒(Tiangen)说明书进行细菌基因组DNA提取。-20℃保存备用。

1.3 鲫鱼诺卡氏菌*robl/LC7*基因的PCR扩增与重组质粒构建

根据GenBank登录的鲫鱼诺卡氏菌ZJ0503全基因组(accession number: JNCT00000000)中*robl/LC7*基因的序列(ORF6185, nucleotide position: 97545-97955),采用Primer premier 5.0设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,相应的特异性引物见表1。

参照KOD-Plus-Neo高保真聚合酶说明书设置PCR扩增体系:10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTP (2 mmol/L)5 μ L, MgSO₄(25 mmol/L)3 μ L, 引物P1/P2(10 μ mol/L)或P3/P4(10 μ mol/L)各2 μ L, 模板DNA 1 μ L, KOD-Plus-Neo高保真聚合酶(1 U/ μ L) 1 μ L, 加ddH₂O补足至50 μ L。PCR扩增反应程序:98℃预变性2 min;98℃变性10 s、55℃退

表1 本研究中所使用的引物

Tab. 1 primers used in this study

名称 name	引物序列 primer sequence	用途 usage
P1	5'-GGAATTCATGACCGAGACTCAGCGCAC-3'(EcoRI)	构建GFP融合表达质粒
P2	5'-CGGGATCCCGGAAGCTGTGCGGGCGGTG-3'(BamHI)	
P3	5'-GGAATTCATGACCGAGACTCAGCGCAC-3'(EcoRI)	构建真核过表达质粒
P4	5'-CCGCTCGAGGGAAGCTGTGCGGGCGGTG-3'(XhoI)	

火15 s、68 °C延伸15 s, 共30个循环; 68 °C延伸5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。用PCR回收试剂盒回收PCR扩增片段, 用相应的限制内切酶分别双酶切PCR回收产物和质粒pEGFP-N1、pcDNA 3.1-His A, T4连接酶16 °C连接过夜, 转化DH5 α 感受态细胞, 37 °C培养过夜。经菌落PCR鉴定, 阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。构建成功的重组质粒分别命名为pEGFP-robl/LC7和pcDNA-robl/LC7。

1.4 生物信息学分析及进化树构建

采用NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源比对和相似性分析; 使用ClustalX、GenDoc进行氨基酸同源性比对分析; 运用ExPASy Proteomics Server (<http://web.expasy.org/protparam/>)推导氨基酸序列、确定开放阅读框、分子量计算(Mw)和理论等电点(pI)预测等; 通过Signal 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列; 应用TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测跨膜结构域; PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?disopred=1>)预测二级结构; LocTree3(<https://roslab.org/services/loctree3/>)预测亚细胞定位; 通过Intropro (<http://www.ebi.ac.uk/intropro/>)对蛋白家族成员进行分析和功能预测。使用ClustalX 2.0及MEGA 6.0构建系统进化树。

1.5 鲷鱼诺卡氏菌分泌蛋白的制备与鉴定

将保种鲷鱼诺卡氏菌于改良培养基平板上划线培养3~5 d后, 挑取单菌落制备成菌悬液。取100 μ L菌悬液均匀涂布于铺有无菌玻璃纸的改良培养基平板上, 于28 °C恒温培养3~5 d。将生长有菌落的玻璃纸从培养基上剥离, 用无菌PBS将玻璃纸上的菌落冲洗入50 mL离心管中, 4 °C、8000 g离心20 min。将上清液用0.22 μ m微孔滤膜除菌后, 转移至透析袋中, 超纯水中4 °C透析16 h, 期间换透析液3次。透析后的蛋白样品用真空冷冻干燥机冻干。分泌蛋白样品送深圳微纳菲生物科技有限公司进行蛋白质shotgun LC-MS质谱鉴定。

1.6 去内毒素质粒的提取和转染

按Omega公司无内毒素质粒提取试剂盒说明书, 提取无内毒素质粒pEGFP-N1、pEGFP-robl/LC7、pcDNA3.1-His A和pcDNA-robl/LC7。将

FHM细胞传代至24孔细胞培养板中, 于25 °C细胞培养箱中培养, 亚细胞定位和过表达分别待细胞约长满单层的70%和90%开始转染。每孔转染需0.8 μ g质粒, 2 μ L转染试剂(Lipofectamin 2000)。将质粒和转染试剂分别用Opti-MEM培养基稀释至50 μ L, 二者混匀后静置25 min。在静置期间, 吸走培养板孔中的培养液, 加入500 μ L无血清L-15细胞培养液。每孔加入100 μ L质粒和Lipofectamin 2000的混合液, 轻摇培养板。25 °C培养6 h后, 吸走混合液, 加入500 μ L含有10%胎牛血清的L-15培养液, 转染完成。

1.7 鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7的亚细胞定位

转染质粒pEGFP-robl/LC7后48 h, 参照MitoTracker Red CMXRos说明书进行线粒体红色荧光探针染色和细胞核染色, 具体步骤如下: 吸出细胞培养液后, 每孔加入125 μ L预热至28 °C的MitoTracker Red CMXRos工作液(300 nmol/L, 使用无血清L-15细胞培养液稀释), 于28 °C避光孵育45 min。染色结束后用PBS漂洗2~3次, 用预热至室温的3.7%多聚甲醛避光固定30 min, 用PBS漂洗2~3次。用预冷至-20 °C的冰乙醇透化细胞7 min, 用PBS漂洗2~3次。每孔加入200 μ L DAPI (1 μ g/mL)避光染细胞核10 min, PBS漂洗3次后, 在荧光显微镜(Leica)下观察拍照。实验以质粒pEGFP-N1为对照。

1.8 鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7转染后细胞的凋亡检测

转染pcDNA-robl/LC7后48 h, 将细胞固定、透化处理后用DAPI (1 μ g/mL)避光染核10 min, 在荧光显微镜下观察过表达robl/LC7后FHM的细胞核变化, 在相同视野下白光观察细胞生长状况, 并照相。以转染pcDNA3.1-His A的FHM细胞为对照。

将质粒pcDNA-robl/LC7和pcDNA 3.1-His A分布转染FHM细胞。于转染后24、48和72 h, 各收集3个平行孔细胞进行线粒体膜电位检测。每个时间点各取3个孔未转染的FHM细胞, 用终浓度10 μ mol/L碳酰氰基-对-氯苯胺(carbonyl cyano-tochlorobenzene hydrazone, CCCP)处理20 min, 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。线粒体膜电位检测使用碧云天线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1), 方法如下: 吸出细胞培养液后, 胰酶消化收集细胞于1.5 mL离心管, 4 °C、600 g离心

4 min, 弃上清液, 用0.5 mL含10%小牛血清的L-15细胞培养液重悬细胞。加入0.5 mL JC-1染色工作液, 混匀后于恒温培养箱中25 °C避光孵育20 min。孵育结束后4 °C、600 g离心4 min, 弃上清液, 细胞沉淀用1 mL 4 °C预冷1×JC-1染色缓冲液洗涤2次。用200 μL 1×JC-1染色缓冲液重悬细胞后, 转入96孔板, 用Perkin Elmer EnSpire 2300多功能酶标仪在激发光490 nm、发射光530 nm和激发光525 nm、发射光590 nm时分别检测绿色荧光和红色荧光强度。分析红/绿荧光比值, 即JC-1多聚体/单体荧光比值, 该比值低, 则线粒体膜电位降低、出现细胞凋亡。

2 结果

2.1 鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因的克隆与重组质粒构建

分别用引物P1/P2和P3/P4进行鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因的高保真PCR扩增, 扩增产物用1%的琼脂糖凝胶作电泳分析(图1), 均得到长度大小约400 bp的目标条带, 与理论长度408 bp结果相符合。将 *robI/LC7* PCR产物1、2分别与pEGFP-N1、pcDNA 3.1-His A载体连接, 转化大肠杆菌DH5α、菌落PCR鉴定、挑取阳性克隆送测序, ClustalX 2.1的比对分析结果显示, 重组质粒的插入片段序列与鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因

(ORF 6185)序列完全一致, 表明重组质粒pEGFP-*robI/LC7*和pcDNA-*robI/LC7*构建成功。

2.2 鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因生物信息学分析

鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因是长408 bp的开放阅读框, 编码136个氨基酸(图2)。利用Ex-PASy软件对鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 蛋白进行分

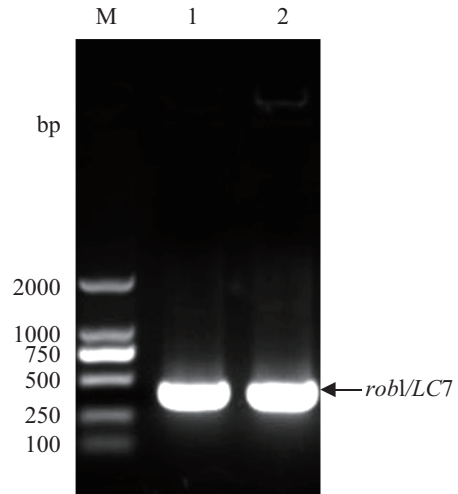


图1 鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因PCR扩增电泳结果
M: 标准物质2000; 1: 引物P1/P2的高保真PCR产物; 2: 引物P3/P4的高保真PCR产物

Fig. 1 agarose gel electrophoresis of PCR product of *robI/LC7* from *N. seriolae*

M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product using primers P1/P2; 2: PCR product using primers P3/P4

```

1   ATGACCGAGACTCAGCGCACCACCACGGATGAGAATCTGAACTGGCTGGTCACCCGCTTCACCCGGGAGGTTG
1   M T E T Q R T T T D E N L N W L V T R F T R E V
73  CCGGGCGTCTCGCACGCCGTCCTGGTCTCCGCGGACGGTCTGCTGCAGGCCACCAGCCCGCACCTGCCGTCC
25  P G V S H A V L V S A D G L L Q A T S P H L P S
145 GATCGCGGTGAGCAGCTGGCCGCGTGACCGCGGTCTGGCCAGCCTGTCCGCCGTGCCGCACAGCTTTTC
49  D R G E Q L A A V T A G L A S L S A G A A Q L F
217 GAGGGCGCAAGGTGATGCAGTCCATCGTCGAGATGCAGCGGGCTACCTGCTGGTCATGAGCGTGGGCAAT
73  E G G K V M Q S I V E M Q R G Y L L V M S V G N
289 GGCTCGCACCTGGCGGTGCTGGCCAACAAGCAACACGACATCGGCCGCGATCGGCTACGAGATGGCCCTGCTG
97  G S H L A V L A N K Q H D I G R I G Y E M A L L
361 GTCACCGGGTCGGTTCGGTCTCGGCCACCGCCCGCACAGCTTCCTGA
121 V D R V G S V V S A T A R T A S *
  
```

图2 鲷鱼诺卡氏菌 *robI/LC7* 基因的核苷酸序列及其推定的氨基酸序列

阴影区的氨基酸序列(14-104aa)为预测的RobI_LC7结构域, *表示终止密码子

Fig. 2 full-length nucleotide and putative amino acid sequences of *robI/LC7* gene from *N. seriolae*

The amino acid sequence (14-104aa) in shaded region is the predicted RobI_LC7 domain, *indicates the stop codon

析,结果显示其原子总数为2020,理论分子量为14.33 kDa,理论等电点为6.04,不稳定系数为19.50,脂肪系数为98.24,总平均亲水性为0.098,蛋白总体呈疏水性。Signal 4.1 Server程序对robl/LC7氨基酸序列进行N端信号肽结构的预测,未发现明显的信号肽位点。TMHMM Server 2.0程序预测该蛋白无跨膜区。LocTree3蛋白质亚细胞定位预测结果显示,robl/LC7蛋白定位于原核生物的胞外区(GO:0005576),其在细菌中为分泌蛋白的可能性为90%,而其在真核细胞中定位于线粒体(GO:0005739)的可能性为81%。

蛋白结构域预测结果表明,鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7蛋白有一个Robl_LC7结构域,从氨基酸序列的14位开始到104位结束(图2)。鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7属于Robl_LC7蛋白家族,该家族最早鉴定到的是黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的路障蛋白(roadblock)和衣藻(*Chlamydomonas*)外臂动力蛋白的轻链LC7^[15]。Robl_LC7蛋白家族成员大多为约100个氨基酸的蛋白质,与鞭毛外臂的动力蛋白和黑腹果蝇及大鼠(*Rattus norvegicus*)的细胞质动力蛋白相关,可能具有调节特定动力蛋白的功能。在非运动性细菌中也发现了Robl_LC7家族的成员,说明该蛋白还可能发挥结构或调节作用^[19]。

2.3 鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7的同源性及进化分析

通过NCBI对鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7的氨基酸序列进行Protein BLAST分析,发现在放线菌目细菌的主要类群中都存在robl/LC7同源类似物。选取10个放线菌目代表性物种的robl/LC7同源类似物,利用DNAMAN程序进行多序列比对(图3),再用N-J法构建进化树(图4)。结果显示,在这10个物种的robl/LC7同源类似物中,有71个氨基酸是高度保守的(相似性100%),而相似性为75%以上的氨基酸高达69.8%(图3),说明robl/LC7在放线菌目是非常保守的蛋白。鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7与其他诺卡氏属细菌的robl/LC7氨基酸序列同源性极高,为93%~95%,其中与康卡瓦诺卡氏菌(*N. concava*)的进化关系最近,同源性为95%;其次与红球菌属细菌同源性为73%~74%;与结核分枝杆菌同源性为68%;与链霉菌属细菌同源性为61%~62%。在进化树上可以看出,诺卡氏菌属、红球菌属、分枝杆菌属和链霉菌属分别各自聚为一支,红球菌属和分枝杆菌属细菌聚为一枝后,和诺卡氏菌属细菌相聚,最后

和链霉菌属细菌相聚,这与传统的形态学和生化特征分类一致。

2.4 鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7为分泌蛋白

通过制备鲷鱼诺卡氏菌分泌蛋白并进行shotgun质谱鉴定,结果显示多次鉴定到了属于鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7的一个肽段“VGSVVSATAR”,证明鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7出现在鲷鱼诺卡氏菌的分泌蛋白中,是一个分泌蛋白。

2.5 鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7的亚细胞定位

将真核表达重组质粒pEGFP-robl/LC7转染到FHM细胞后,通过绿色荧光来研究robl/LC7-GFP融合蛋白的分布。实验以空载体pEGFP-N1转染的FHM细胞为对照,用MitoTracker Red CMXRos和DAPI染色检测线粒体和细胞核分布情况。

荧光显微镜观察结果显示,pEGFP-N1转染的FHM细胞,其绿色荧光呈全细胞分布(图版 I-2),线粒体围绕细胞核呈环状分布(图版 I-6),细胞核边缘较光滑,染色均匀,无细胞凋亡特征(图版 I-4,图版 I-8);转染pEGFP-robl/LC7的FHM细胞,robl/LC7-GFP融合蛋白绿色荧光呈全细胞分布(图版 I-1),与红色荧光所示的线粒体分布并不重合(图版 I-7),说明robl/LC7蛋白不能靶向定位于线粒体。转染pEGFP-robl/LC7会改变线粒体分布,线粒体的分布常呈团块状(图版 I-5)。有robl/LC7-GFP融合蛋白绿色荧光的细胞,其细胞核常出现固缩浓染、核碎裂等情况(图版 I-3),推测robl/LC7蛋白很可能参与调控细胞凋亡。

2.6 鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7的过表达和凋亡检测

真核表达重组质粒pcDNA-robl/LC7转染到FHM细胞中,可持续高水平表达鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7。将pcDNA-robl/LC7和pcDNA3.1-His A分别转染FHM细胞后48 h,经DAPI染色,观察细胞核的状态。结果显示,转染pcDNA3.1-His A的FHM细胞,细胞核染色均匀、边缘光滑、无细胞凋亡特征(图版 II-1),光镜下细胞贴壁平整、状态良好(图版 II-2);而转染pcDNA-robl/LC7的FHM细胞核出现边缘褶皱、高亮浓染和凋亡小体等凋亡特征(图版 II-3)。在光镜下,可见发生细胞凋亡的细胞变圆、与邻近细胞脱离等现象(图版 II-4)。表明robl/LC7在FHM细胞的过表达会引起细胞凋亡。

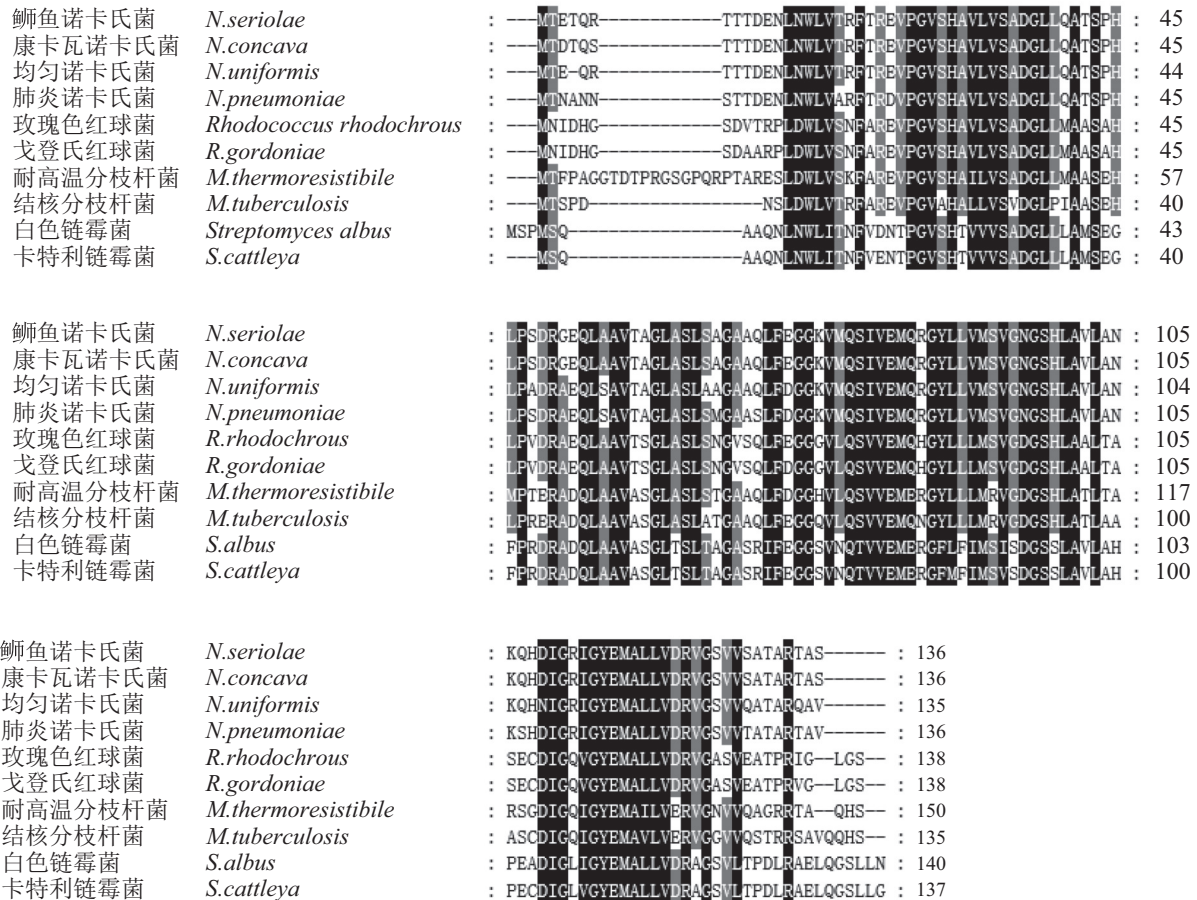


图3 不同物种robl/LC7氨基酸序列多重比对分析

阴影区表示同源性氨基酸, 其中黑色区表示氨基酸同源性为100%, 灰色区表示氨基酸的同源性在75%以上。各物种的基因注册号如下: 康卡瓦诺卡氏菌(WP_040812791.1), 均匀诺卡氏菌(WP_067518248.1), 肺炎诺卡氏菌(WP_039801134.1), 玫瑰色红球菌(WP_003936637.1), 戈登氏红球菌(WP_006550917.1), 耐高温分枝杆菌(WP_003928099.1), 结核分枝杆菌(WP_044484050.1), 白色链霉菌(AJE82075.1), 卡特利链霉菌(WP_014145082.1)

Fig. 3 multiple alignment of the deduced amino acid sequences of robl/LC7 among different species

Shaded regions indicate residues sharing homology: black regions indicate 100% homology, and gray regions indicate homology above 75%. GenBank accession number: *N. concava* (WP_040812791.1), *N. uniformis* (WP_067518248.1), *N. pneumoniae* (WP_039801134.1), *R. rhodochrous* (WP_003936637.1), *R. gordoniae* (WP_006550917.1), *M. thermoresistibile* (WP_003928099.1), *M. tuberculosis* (WP_044484050.1), *S. albus* (AJE82075.1), *S. cattleya* (WP_014145082.1)

为了进一步对鲫鱼诺卡氏菌robl/LC7调控细胞凋亡的情况进行定量检测, 在pcDNA-robl/LC7转染FHM细胞后24、48和72 h 3个时间点, 收集细胞样品并通过线粒体膜电位变化检测细胞凋亡。结果显示, 转染pcDNA-robl/LC7后24 h, FHM细胞中荧光染料JC-1的多聚体/单体荧光比值较pcDNA3.1阴性对照组相差不多(图5); 转染pcDNA-robl/LC7后48和72 h, 检测到JC-1的多聚体/单体荧光比值均较阴性对照组显著下降, 说明FHM细胞中的线粒体跨膜电位已被明显破坏, 发生了细胞凋亡。转染pcDNA3.1-His A的阴性对照组FHM细胞, 其荧光探针JC-1的多

聚体/单体荧光比值在转染后24、48和72 h均无显著变化。线粒体电子传递链抑制剂CCCP诱导线粒体膜电位下降的阳性对照组, 在3个时间点检测到的JC-1多聚体/单体荧光比值均较低(图5)。综合过表达后的细胞核观察和线粒体膜电位检测实验结果, 我们可以初步得出结论: robl/LC7对细胞凋亡起到了促进的作用。

3 讨论

本研究成功克隆了鲫鱼诺卡氏菌robl/LC7基因, 并鉴定其所编码的蛋白为一种分泌蛋白。通常认为经典分泌途径的分泌蛋白都含有信号

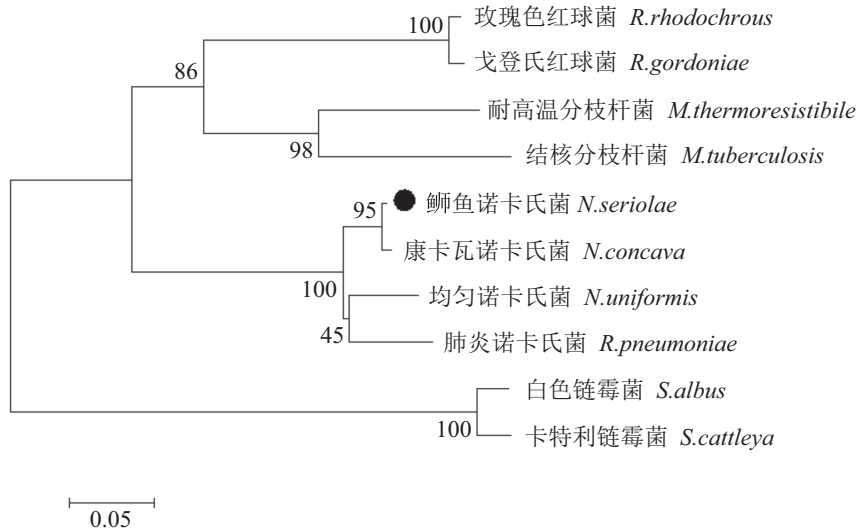


图 4 基于robl/LC7同源类似物氨基酸序列绘制的系统进化树

GenBank注册号同图3

Fig. 4 phylogenetic tree of robl/LC7 based on the homologous amino acids

GenBank accession numbers are the same as Fig. 3

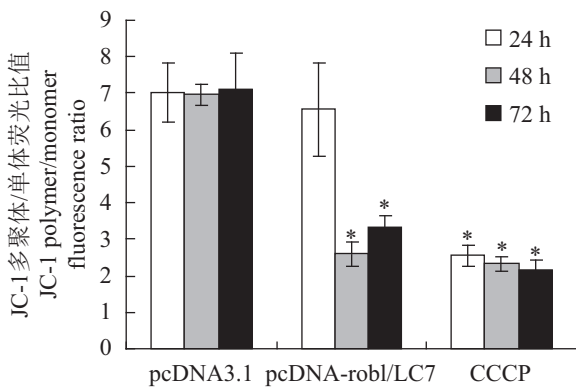


图 5 转染pcDNA- robl/LC7后FHM细胞的线粒体膜电位检测

*. 显著性差异(P<0.05)

Fig. 5 mitochondrial membrane potential assay of FHM cells transfected with pcDNA-robl/LC7

*. significant differences (P<0.05)

肽序列, 但生物信息学分析并未发现鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7具有信号肽。一方面, robl/LC7可能是通过不需要信号肽的非经典蛋白质分泌途径进行运输的, 另一方面, 已有研究发现无信号肽的分泌蛋白也可以通过经典分泌途径进行运输^[20]。对鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7进行功能预测, 结果显示其属于Robl_LC7蛋白家族。Robl_LC7蛋白家族成员在大多数已全基因组测序的古细菌和真核生物都有发现, 而在细菌中仅存在于少数种类, 有研究认为该家族成员在细菌和古细菌中

参与NTPase的酶活性调节, 在真核生物中调节动力蛋白活性^[21]。Robl_LC7蛋白还可与鞭毛动力蛋白、真核生物细胞质动力蛋白相结合, 参与微管运输、鞭毛运动和有丝分裂等过程^[15]。结核分枝杆菌的rv3364c基因编码一个含Robl_LC7结构域的蛋白, 研究证实结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 该蛋白可被过量表达且分泌到巨噬细胞中, 并参与细胞凋亡调控^[22]。鲷鱼诺卡氏菌与结核分枝杆菌同属于兼性胞内致病放线菌, 鲷鱼诺卡氏菌感染鱼体后, 很可能也会分泌robl/LC7蛋白到宿主细胞内, 并调控改变宿主细胞状态。结果显示, 病原菌可通过分泌蛋白进入宿主细胞发挥致病作用, 并通过改变宿主细胞的信号转导、调控细胞凋亡等方式, 改变细胞微环境, 以利于细菌的生存和增殖^[23]。

生物信息学预测鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7蛋白可靶向定位于宿主细胞线粒体, 但亚细胞定位研究表明robl/LC7蛋白在FHM细胞中呈全细胞分布, 并未定位于线粒体。这一结果也与结核分枝杆菌的相关研究相吻合, 结核分枝杆菌rv3364c基因所编码的robl/LC7同源类似物在U-937细胞中主要分布于细胞质, 也没有与线粒体共定位^[22]。亚细胞定位研究还发现有robl/LC7表达的细胞, 其细胞核常出现固缩、浓染、碎裂等情况, 线粒体的分布也发生改变, 这可能是由于鲷鱼诺卡氏菌robl/LC7蛋白调节动力蛋白等宿主细胞内的

功能蛋白及酶活性,进而影响了宿主细胞的胞内运输、信号传导和细胞凋亡,使线粒体分布和细胞核状态发生改变。

细胞凋亡检测发现鳊鱼诺卡氏菌*robl/LC7*蛋白过表达后,FHM细胞出现了诸如细胞变圆、细胞核边缘褶皱、凋亡小体等明显的细胞凋亡特征。JC-1法定量检测也发现*robl/LC7*蛋白过表达可导致细胞线粒体膜电位被明显破坏,推测鳊鱼诺卡氏菌*robl/LC7*是一种可诱导细胞凋亡的细菌蛋白。星状诺卡氏菌的研究表明星状诺卡氏菌具有诱导宿主细胞凋亡的能力,且与其分泌蛋白相关^[24]。结核分枝杆菌的*robl/LC7*同源类似物可与巨噬细胞的一种分布于膜系统上的丝氨酸蛋白酶(serine protease)——组织蛋白酶G (cathepsin G)相结合,并抑制其活性,进而调控细胞凋亡^[22, 25]。鳊鱼诺卡氏菌*robl/LC7*蛋白很可能也通过与宿主细胞内的凋亡相关蛋白相结合,并诱导细胞凋亡,这有助于鳊鱼诺卡氏菌在宿主体内的生存和免疫逃避。

本研究克隆了鳊鱼诺卡氏菌*robl/LC7*基因,并进行了分泌蛋白鉴定、亚细胞定位、过表达和凋亡检测等初步功能研究,为进一步研究该基因的功能奠定了基础,也为深入了解鳊鱼诺卡氏菌感染鱼体的致病机理提供了线索。

参考文献:

- [1] Ho P Y, Byadgi O, Wang P C, *et al.* Identification, molecular cloning of IL-1 β and its expression profile during *Nocardia seriolae* infection in largemouth Bass, *Micropterus salmoides*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1670.
- [2] Elkesh A, Kantham K P L, Shinn A P, *et al.* Systemic nocardiosis in a Mediterranean population of cultured meagre, *Argyrosomus regius*, Asso (Perciformes: Sciaenidae)[J]. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(2): 141-149.
- [3] Araki K, Matsumoto M, Hayashi K, *et al.* Induction of cell-mediated immune responses after vaccination with inactivated oil-emulsion *Nocardia seriolae* in amberjack *Seriola dumerili*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 53: 113.
- [4] Vu-Khac H, Duong V Q B, Chen S C, *et al.* Isolation and genetic characterization of *Nocardia seriolae* from snubnose pompano *Trachinotus blochii* in Vietnam[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 120(2): 173-177.
- [5] Wang P C, Tsai M A, Liang Y C, *et al.* *Nocardia seriolae*, a causative agent of systematic granuloma in spotted butterfish, *Scatophagus argus*, Linn[J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(38): 3441-3452.
- [6] 张建丽, 刘志恒. 诺卡氏菌型放线菌的分类[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 513-517.
Zhang J L, Liu Z H. Taxonomy of the *Nocardioform actinomycetes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(4): 513-517(in Chinese).
- [7] Kato G, Kato K, Jirapongpaioj W, *et al.* Development of DNA vaccines against *Nocardia seriolae* infection in fish[J]. Fish Pathology, 2014, 49(4): 165-172.
- [8] Forrellad M A, Klepp L I, Gioffré A, *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. Virulence, 2013, 4(1): 3-66.
- [9] Saint-Georges-Chaumet Y, Edeas M. Microbiota-mitochondria inter-talk: consequence for microbiota-host interaction[J]. Pathogens and Disease, 2016, 74(1): ftv096.
- [10] Spanò S, Galán J E. A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(1): 15-20.
- [11] Xia L Q, Liang H Y, Xu L, *et al.* Subcellular localization and function study of a secreted phospholipase C from *Nocardia seriolae*[J]. Fems Microbiology Letters, 2017, 364(17): fnx143.
- [12] Briken V. *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in regulation of host cell death[J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2013, 783: 93-102.
- [13] 夏立群, 童邦卓, 徐亮, 等. 一种鳊鱼诺卡氏菌酪氨酸蛋白磷酸酶的基因克隆及功能初步研究[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1017-1027.
Xia L Q, Tong B Z, Xu L, *et al.* Gene cloning and preliminary function study of protein tyrosine phosphatase from *Nocardia seriolae*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(7): 1017-1027.
- [14] Xia L Q, Cai J, Wang B, *et al.* Draft genome sequence of *Nocardia seriolae* ZJ0503, a fish pathogen isolated from *Trachinotus ovatus* in China[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01223-14.
- [15] Bowman A B, Patel-King R S, Benashski S E, *et al.* *Drosophila roadblock* and *Chlamydomonas LC7*: A conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis[J]. The Journal of Cell Biology, 1999, 146(1): 165-179.

- [16] 苏旸, 陈颜, 吴晓静, 等. 动力蛋白轻链亚基LC8在人细胞内的亚细胞定位[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2008, 41(5): 37-42.
- Su Y, Chen Y, Wu X J, *et al.* Subcellular localization analysis of dynein light chain LC8 in human cells[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2008, 41(5): 37-42(in Chinese).
- [17] Hao W, He X L, Xu Y S. Molecular cloning of the Robl gene from *Bombyx mori* and studies of its developmental and physicochemical regulation[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(6): 6439-6447.
- [18] 夏洪丽, 鲁义善, 汤菊芬, 等. 鱼类致病杀鲑诺卡氏菌(*Nocardia salmonicida*)特异性PCR检测方法的建立[J]. 广东海洋大学学报, 2014, 34(4): 56-61.
- Xia H L, Lu Y S, Tang J F, *et al.* Establishment of a specific PCR assay to detect fish pathogenic *Nocardia salmonicida*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(4): 56-61(in Chinese).
- [19] Pfister K K, Shah P R, Hummerich H, *et al.* Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families[J]. *PLoS Genetics*, 2006, 2(1): e1.
- [20] 罗德朋, 蓝颖, 王金子, 等. 板栗疫病菌中一个依赖于经典分泌途径的无信号肽分泌蛋白的鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(11): 3034-3039.
- Luo D P, Lan Y, Wang J Z, *et al.* Identification of a conventional secretion route-dependent secretory protein without a signal peptide[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(11): 3034-3039(in Chinese).
- [21] Koonin E V, Aravind L. Dynein light chains of the Roadblock/LC7 group belong to an ancient protein superfamily implicated in NTPase regulation[J]. *Current Biology*, 2000, 10(21): 774-776.
- [22] Danelishvili L, Everman J L, Mcnamara M J, *et al.* Inhibition of the plasma-membrane-associated serine protease cathepsin G by *Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c suppresses caspase-1 and pyroptosis in macrophages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 281.
- [23] Arnoult D, Carneiro L, Tattoli I, *et al.* The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection[J]. *Seminars in Immunology*, 2009, 21(4): 223-232.
- [24] Barry D P, Beaman B L. *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells[J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(1): 86-96.
- [25] Parandhaman D K, Narayanan S. Cell death paradigms in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4(2): 31.

Subcellular localization and preliminary function study of dynein regulation protein robl/LC7 from *Nocardia seriolae*

XIA Liqun^{1,2}, CHEN Ruimin², LIAO Baoshan², SU Zejie²,
XU Liang², TONG Bangzhuo², HUANG Jiahui², LU Yishan^{1,2,3*}

(1. Shenzhen Research Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, China;

2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

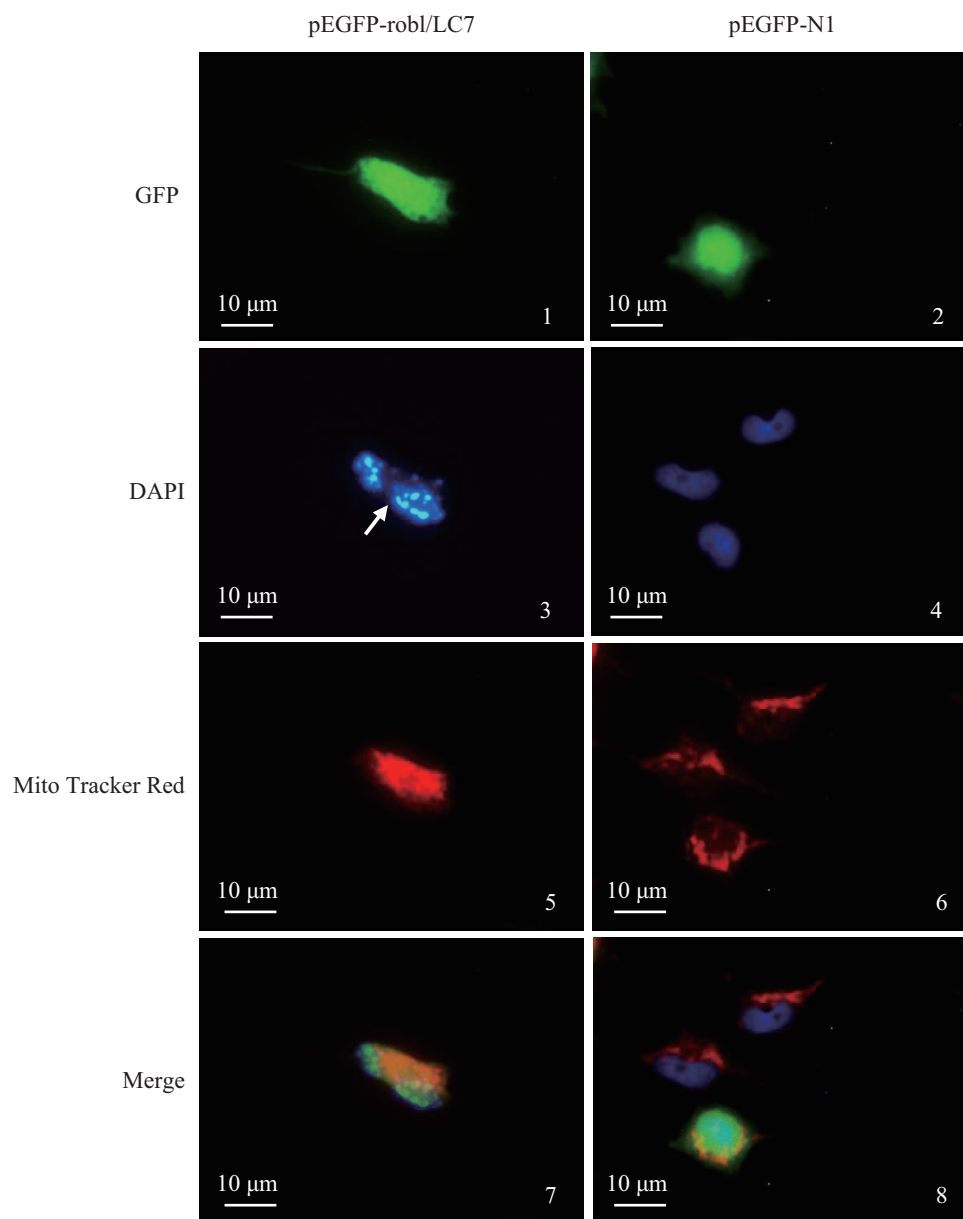
3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Fish nocardiosis is a chronic systemic granulomatous disease, and *Nocardia seriolae* is its main pathogen. A dynein regulation protein robl/LC7, which is likely to be secreted and to target host cell mitochondria, was found by the bioinformatics analysis on the whole genome sequence of *N. seriolae*. In order to determine the subcellular localization and study the preliminary function of robl/LC7 from *N. seriolae*, the gene cloning, eukaryotic expression plasmid construction, secreted protein identification, subcellular localization and apoptosis detection of robl/LC7 were carried out in this study. *robl/LC7* was successfully cloned from *N. seriolae* and the eukaryotic expression plasmid of pEGFP- robl/LC7 and pcDNA- robl/LC7 were constructed. Mass spectrometry analysis of extracellular products from *N. seriolae* confirmed that robl/LC7 was a secreted protein. Subcellular localization of robl/LC7-GFP fusion protein discovered that the green fluorescence was distributed in the whole cell and did not co-localize with mitochondria. In addition, apoptosis assay revealed that apoptosis was induced by the over-expression of robl/LC7 in FHM cell. robl/LC7 from *N. seriolae* is a secreted protein which does not co-localize with mitochondria. It may help the host cell survival and immune escape of *N. seriolae* by participating the cell apoptosis regulation and may play an important role in the pathogenesis of *N. seriolae*.

Key words: *Nocardia seriolae*; dynein regulation protein robl/LC7; secreted protein; subcellular localization; cell apoptosis

Corresponding author: LU Yishan. E-mail: fishdis@163.com

Funding projects: Guangdong Natural Science Foundation (2017A030313179); International S&T Cooperation Projects of Guangdong Province (2016A050502061); Shenzhen Science and Technology Project(JCYJ20170306161613251); Shenzhen Dapeng New District Special Fund for Industry Development (KY20160207); Natural Science Foundation of Guangdong Ocean University(C13454); Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship of Guangdong Province(201710566042)

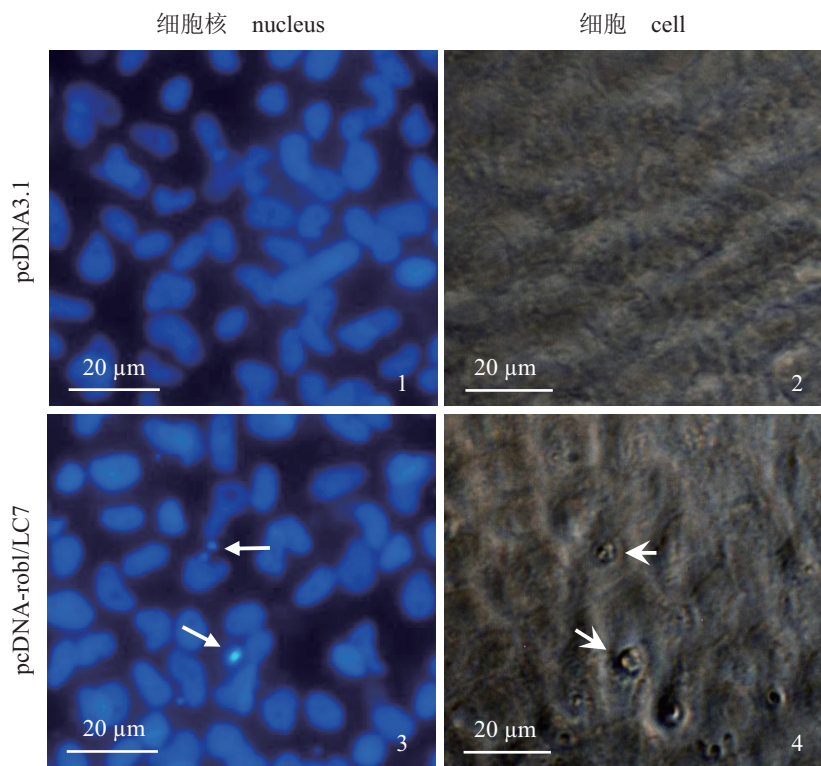


图版 I rob1/LC7蛋白在FHM细胞内的亚细胞分布

绿色荧光显示了rob1/LC7-GFP融合蛋白或GFP, 红色荧光显示了线粒体分布, 蓝色荧光显示细胞核, 箭头所指为碎裂、浓染的细胞核

Plate I Subcellular localization of rob1/LC7 in FHM cell

Green fluorescence shows the rob1/LC7-GFP or GFP, red fluorescence shows the mitochondria, blue fluorescence shows the nucleus, and the arrow refers to the nuclear fragmentation and condensation



图版 II 转染pcDNA-rob1/LC7后FHM细胞的细胞核观察

长箭头指示凋亡小体(碎裂的细胞核), 短箭头所指为光镜下的凋亡细胞

Plate II observation of nucleus in FHM cells transfected with pcDNA-rob1/LC7

Arrows indicate the apoptotic bodies (fragmented nucleus), arrow heads indicate the apoptotic cells