



日本鳗鲡 TBK1 基因的克隆与免疫功能分析

徐元凯^{1,2}, 彭欣慰^{1,3,4}, 林鹏^{1,3,4}, 王艺磊^{1,3,4}, 冯建军^{1,3,4*}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 宁波海洋研究院, 浙江 宁波 315832;

3. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

4. 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: 为了阐明鱼类 TANK 结合激酶 1 (TBK1) 在免疫应答密切相关的 NF- κ B、I 型 IFN 及 MAPK 信号通路中的调控作用, 本实验通过 cDNA 末端快速扩增技术 (SMART RACE) 从日本鳗鲡中克隆了 TBK1 基因 cDNA 全长序列, 命名为 *AjTBK1*, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测了在体和离体状态下不同病原体相关分子模式 (PAMPs) 及嗜水气单胞菌对日本鳗鲡 *AjTBK1* 基因表达水平变化的影响, 通过构建绿色荧光蛋白 pEGFP-TBK1 和 pCMV-TBK1 真核表达质粒对 *AjTBK1* 亚细胞定位以及 *AjTBK1* 过表达对 NF- κ B、AP-1、IFN- β 启动子荧光素酶活性的激活作用进行研究。蛋白质序列分析显示, 日本鳗鲡 *AjTBK1* 编码 731 个氨基酸, 其三维丝带空间结构与人类 TBK1 相似, 具有保守的激酶结构域 (KD)、泛素样结构域 (ULD)、二聚化支架结构域 (SDD) 以及 C 端结构域 (CTD), 在系统发育树中与其他鱼类 TBK1 家族聚为一支。qRT-PCR 检测发现 *AjTBK1* 在多种组织中广泛表达, 且在肝脏和肠中高表达。经 LPS、poly I:C、嗜水气单胞菌免疫注射后, *AjTBK1* 基因表达水平在日本鳗鲡肝脏中显著提高, 而肾脏中的表达量则在 LPS 和 poly I:C 刺激后显著降低。离体实验中, 经 LPS、poly I:C、PGN 以及不同浓度嗜水气单胞菌刺激后的日本鳗鲡肝脏细胞 *AjTBK1* 基因表达水平均有显著升高。亚细胞定位结果显示, 天然状态下的 *AjTBK1* 在 HEK293 细胞质中分布, 经 LPS 和 poly I:C 刺激后呈聚集点状分布。此外, 双荧光素酶活性检测发现过表达的 *AjTBK1* 可显著增强 NF- κ B、AP-1 和 IFN- β 启动子荧光素酶活性。以上研究表明, *AjTBK1* 可以通过激活 NF- κ B、AP-1 和 I 型 IFN 信号通路, 在机体抗细菌和抗病毒先天免疫应答中发挥重要的调控作用。

关键词: 日本鳗鲡; TANK 结合激酶 1(TBK1); 信号通路; 亚细胞定位; 双荧光素酶活性

中图分类号: Q 785; S 942.5

文献标志码: A

TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1) 也称 NAK 或 T2K, 是 I κ B 激酶 (IKK) 家族重要的丝氨酸/苏氨酸激酶, 属于非经典 I κ B 激酶。TBK1 结构与经典的 I κ B 激酶 IKK α 、IKK β 相似,

含有 N 端激酶结构域 (KD)、泛素化结构域 (ULD)、二聚化支架结构域 (SDD), 以及 C 端结构域 (CTD), 其中 CTD 结构域替代了 IKK α 与 IKK β C 端的 NEMO 结合结构域 (NBD)^[1]。研究发现

收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-11-25

资助项目: 福建省自然科学基金 (2020J01671); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金 (RE202110); 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室开放基金 (2020ESHML02)

第一作者: 徐元凯 (照片), 从事水产动物免疫学研究, E-mail: 872016103@qq.com

通信作者: 冯建军, 从事水产动物病害免疫防治的研究, E-mail: fengjj@jmu.edu.cn



TBK1 中 KD、ULD 和 SDD 等 3 个结构域间存在相互作用, KD 对 TBK1 的激活至关重要, ULD 和 SDD 主要与 IFN- β 的诱导表达密切相关, 而 CTD 则可促进 TBK1 与 TANK 和其他适配子的相互作用^[2-3]。

哺乳动物中的研究表明, TBK1 可被 Toll 样受体、RIG-1 以及 MDA5 等模式识别受体激活, 激活的 TBK1 通过使 IRF3、IRF7 磷酸化入核, 诱导 I 型干扰素 IFN- α 、IFN- β 等细胞因子的表达, 在抗病毒免疫中发挥关键作用^[4-5]。小鼠 (*Mus musculus*)TBK1 能够增强 HEK293 细胞抵御水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus) 感染的的能力, 而 TBK1 基因敲除的小鼠易受到鼠 γ 疱疹病毒 68 (murine gammaherpes virus 68) 感染, 且发现该小鼠细胞在刺激物刺激下表现出明显的 IFN- β 产生缺陷^[6-8]。此外, TBK1 可以磷酸化 IKK β 和 I κ B α , 进而诱导 NF- κ B 亚基 RelA (p65) 的核易位, 或是同 TANK 和 TRAF2 形成三元复合物激活 NF- κ B, 参与对 NF- κ B 信号通路的调控^[9-11]。

迄今为止, TBK1 同源基因已在一些硬骨鱼类中被克隆报道, 包括大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[12]、青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[13]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[14]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[15]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[16]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[17] 及鲤 (*Cyprinus carpio*)^[18] 等。当鱼体受到不同病毒刺激后 TBK1 基因表达水平显著升高, 表明 TBK1 在机体抗病毒免疫应答中扮演重要角色^[13, 19-21], 因此有关鱼类 TBK1 抗病毒免疫功能的研究备受关注。有学者发现青鱼 TBK1 能强烈诱导 IFN1 活性^[19], 草鱼 TBK1 可以激活并促进 IRF7 的核易位诱导 I 型 IFN 和 PKR 基因的表达^[22], 而斑马鱼 TBK1 则可通过磷酸化 STING 和 IRF3 来激活 I 型 IFN 的表达^[23]。虽然以上研究表明 TBK1 对于 IRF3/IRF7 介导的 I 型干扰素信号通路具有重要的调控作用, 但鱼类 TBK1 对细菌免疫应答密切相关的 NF- κ B 及 MAPK 信号通路是否也具有调控作用还未见报道, 涉及水产养殖病原菌刺激鱼体 TBK1 基因水平变化的研究仅在大黄鱼中有所报道^[15]。因此, 研究在体和离体状态下主要病原模式分子和病原菌刺激后的鱼类 TBK1 基因的表达变化规律、以及鱼类 TBK1 过表达对于不同免疫相关信号通路的调控作用将有助于对硬骨鱼类 TBK1 的功能深入了解, 为鱼类免疫应答机制的阐明提供参考资料。

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*), 俗称白鳢、青鳢、鳗鱼。其味道鲜美、营养价值高, 被誉为“水中人参”, 在我国已形成了集养殖、加工、销售为一体, 年产值达百亿元的大产业, 主要集中在福建、广东、浙江三地^[24]。但目前大规模、集约化的养殖模式带来了鳗鱼病害的频发和流行, 造成巨额经济损失^[25]。与其他经济鱼类相比, 有关日本鳗鲡免疫学基础研究十分薄弱, 制约了鳗鲡产业的健康发展。本实验首次克隆了日本鳗鲡 TBK1 基因 (命名为 *AjTBK1*) 全长 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测了不同病原体相关分子模式以及鳗鲡主要病原菌嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 刺激后的日本鳗鲡主要免疫组织器官以及体外培养的日本鳗鲡肝脏细胞 TBK1 基因表达变化, 并通过绿色荧光亚细胞定位和双荧光素酶技术对 TBK1 蛋白分子的免疫功能进行了研究分析, 以期日本鳗鲡抗细菌、病毒免疫应答机制的阐明奠定分子基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验动物: 日本鳗鲡, 体重为 45~50 g, 购自福建福清鳗鱼养殖场, 在实验室于 25 °C, 1 000 L 循环水中饲养 1 周后备用。

细胞: 人体肾脏细胞系 (HEK293 细胞) 培养在含 10% 胎牛血清的高糖培养液中, 于 37 °C, CO₂ 含量 5% 的培养箱中进行培养; 日本鳗鲡肝脏细胞为实验室所有, 于 27 °C 培养箱中培养。本研究获得了集美大学科技伦理委员会 (编号: JMU202203022) 批准, 实验过程中操作人员严格遵守集美大学科技伦理委员会伦理规范, 并按照集美大学科技伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验试剂

DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司 (日本), E.Z.N.A.TM Total RNA Kit I I、无内毒素质粒提取试剂盒购自 Omega 公司 (美国), 胎牛血清购自 PAN-Biotech 公司 (德国), DMEM 高糖培养液、胰蛋白酶、Opti-MEM 低血清培养基 (1 \times) 购自 Gibco 公司 (美国), qPCR SYBR[®] Green Master Mix 购自 Vazyme 公司 (中国), Lipofectamine[™] 3 000 购自 Invitrogen 公司 (美国), Dual-Glo luciferase assay system 购自 Promega 公司 (美国)。

1.3 组织采集与在体实验免疫刺激

日本鳗鲡于实验室暂养 1 周后进行实验, 浸入含有 1×10^2 mg/L 丁香酚的水中 (中国上海第二试剂厂) 麻醉后, 解剖取日本鳗鲡各组织样品, 包括肝脏、脾脏、鳃、肾脏、肠、心脏、皮肤和肌肉, 用于 RNA 提取。

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为本实验室所有^[26], 将其接种于胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 中, 28 °C 振荡培养 24 h。收集细菌, 并于 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS, pH = 7.4) 中稀释至 4×10^4 CFU/mL。LPS 和 poly I:C (Sigma 公司, 美国) 用 PBS 溶解稀释至终浓度分别为 4 和 2 mg/mL。将日本鳗鲡分成 4 组, 实验组分别腹腔注射 250 μ L LPS、250 μ L poly I:C 和 250 μ L 4×10^4 CFU/mL 嗜水气单胞菌液, 对照组注射 250 μ L 灭菌 PBS。于免疫后 0、6、12、24、48 和 72 h 每组随机选取 4 尾的肝脏、脾脏和肾脏 3 种组织器官, 保存用于后续实验。

1.4 细胞培养及免疫刺激

离体实验中, 按照实验室已有研究进行日本鳗鲡肝脏细胞系培养^[27]。实验组细胞分别用 30 μ g/mL LPS、50 μ g/mL poly I:C、30 μ g/mL CpG-DNA (Sangon Biotech, 中国)、30 μ g/mL 肽聚糖 (PGN, Sigma, 美国) 或 3 种不同浓度的嗜水气单胞菌 (1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 CFU/mL) 处理细胞, 对照组用等剂量灭菌 PBS 处理, 每组在不同时间相取 4 个平行样品。按照说明书, 使用 E.Z.N.A.™ Total RNA Kit II 试剂盒在细胞处理后 0、3、6、12、24 和 48 h, 从细胞中分离提取总 RNA。

1.5 *AjTBK1* 全长 cDNA 的克隆

按照说明书指示, 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 从日本鳗鲡组织中分离总 RNA。使用肝脏 RNA, 用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (TaKaRa, 日本) 合成用于 RACE 反应的 cDNA 第一条链。基于实验室掌握的日本鳗鲡转录组数据库中的 TBK1 部分序列, 使用 Primer premier 5.0 软件进行特异性引物设计 (表 1), 进行 PCR 以扩增 *AjTBK1* 的部分 cDNA 序列。将纯化的 PCR 产物插入 pMD19-T (Simple) 载体 (TaKaRa, 日本) 并转化至 DH5 α 感受态细胞中。挑取阳性克隆所得质粒由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 DNA 测序。根据克隆的 TBK1 部分基因序列, 进一步设计特异性引物 (表 1), 使用 5' 和 3' RACE

System for Rapid Amplification of cDNA Ends (TaKaRa, 日本) 进行 RACE PCR 扩增, 扩增产物经凝胶纯化, 克隆至 pMD19-T (simple) 载体, 并按上述方法测序。

1.6 生物信息学分析

BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列相似性分析; ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 分析 *AjTBK1* 的全长 cDNA 序列; ExPASy (<http://www.us.expasy.org/tools/>) 分析推导的氨基酸序列; CLUSTALW 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/clustaw/>) 进行多序列比对; NCBI CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html) 预测蛋白质结构域特征; MEGA 5 软件基于 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

1.7 基于 qRT-PCR 的 *AjTBK1* 表达分析

使用 PrimeScript™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara, 日本) 从总 RNA 合成 cDNA 第一条链。在该反应中, 由试剂盒提供的 gDNA Eraser (具有高效 DNAase 活性) 进行基因组 DNA 的去除。

将合成的 cDNA 用无核酸酶水稀释 10 倍, 于 -20 °C 储存。使用 Primer premier 5.0 软件设计 *AjTBK1* 与 β -actin (内参基因) 的引物 (表 1), 进行预实验以确保没有引物二聚体的单个离散带的扩增, 并对产物进行测序以验证 RT-PCR 的特异性。qRT-PCR 反应体系总体积为 20 μ L, 包含 10 μ L 2 \times AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix、1 μ L 稀释的 cDNA、正反引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L) 和 8 μ L 无核酸酶水。于 Roche Light Cycler 480 机器 (Roche, 英国) 上进行扩增, qRT-PCR 条件: 95 °C 孵育 1 min, 随后进行 40 个循环 (95 °C, 15 s, 60 °C, 1 min)。在每个 qRT-PCR 反应结束时进行扩增产物的解离分析, 以确认只有一个 PCR 产物被扩增和检测到。使用标准曲线评估目标基因和参考基因的相对定量。根据实验室已有研究^[27], 使用比较 C_T 法 (即 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法) 用于确定 *AjTBK1* 的 mRNA 相对表达水平。基因表达水平通过平均值和标准误差标识, 有 3 个样品重复。

1.8 亚细胞定位

将 *AjTBK1* 的 ORF 克隆并使用相应引物插入 pEGFP-N1 载体中 (表 1), 构建的重组质粒通过测

表 1 用于 *AjTBK1* 基因克隆和表达分析的引物Tab. 1 Primers used for *AjTBK1* gene cloning and expression analysis

类别 types	引物名称 primers name	引物序列 sequences
ORF克隆引物 primers for ORF cloning	5'ORF-TBK1	5'-ATGCAGAGCACAGCAAACCTACCTGTG-3'
	3'ORF-TBK1	5'-TTGTAATTATTAATACGGTCAGTATTTTCG-3'
RACE PCR特异性引物 specific primers for 3'RACE	TBK1-3'OUT	5'-TCCAGGCGAATGTGCTGTCTG-3'
	TBK1-3'IN	5'-TTGGGTCTTTAACCTTGGATGGTGCC-3'
RACE PCR通用引物 universal primers for RACE	UPM-Long	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
	UPM-Short	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
	NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
	5' CDS primer	5'-(T)25VN-3'
	3' CDS primer	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN-3'
	SMART II	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
qRT-PCR引物 specific primers for qRT-PCR	5'real-TBK1	5'-ACGCTATGACCTGGATTGGA-3'
	3'real-TBK1	5'-GAATGACCTCTGCCTTTTATGC-3'
	5'- β -actin	5'-ATCGTGCCTGACATCAAGGA-3'
	3'- β -actin	5'-GCTCGTTGCCGATGGTGAT-3'
质粒构建特异性引物 specific primers for recombinant expression plasmid	5'pEGFP-TBK1	5'-CTCGAGATGCAGAGCACAGCAAACCTACCTGTG-3'
	3'pEGFP-TBK1	5'-TGGATCCCCTGTGAAATTATTAATACGGTCAGTATTTTCG-3'
	5'pCMV-TBK1-His	5'-GGATCCATGCAGAGCACAGCAAACCTACCTGTG-3'
	3'pCMV-TBK1-His	5'-CTCGAGTTGTAATTATTAATACGGTCAGTATTTTCG-3'
通用引物 universal primers	Simple-19-T-F	5'-CAGAAACAGCTATGAC-3'
	Simple-19-T-R	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'
	pEGFP-F	5'-TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG-3'
	pEGFP-R	5'-CGTCGCCGTCAGCTCGACCAG-3'
	pCMV-C-His-F	5'-AATTAACCCTACTAAAGGG-3'
	pCMV-C-His-R	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

序确认。将 HEK-293 细胞接种在 6 孔板中, 使用 Lipofectamine 3000 试剂 (Invitrogen, 美国) 转染纯化后的质粒。用转染 pEGFP-N1 空载体的细胞作为对照。转染 12 h 后, 细胞用 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 或 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ poly I:C 处理, 用 PBS 处理的细胞作为载体对照。处理 24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞, 4% 多聚甲醛固定, 并用 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) (1 mg/mL) 染色, 具体方法参考文献^[28]所述, 在共聚焦荧光显微镜 (Leica TCS SP8) 下观察细胞。

1.9 双荧光素酶活性测定

为了研究 *AjTBK1* 对 NF- κ B、I 型 IFN 和 AP-1 启动子活性的调控作用, 以 pRL-TK 载体 (表达海肾荧光素酶) 作为转染效率标准化的内参对照, 使用 Dual-Glo 荧光素酶测定系统 (Promega, 美国) 进行荧光素酶测定。使用相应的引物将

AjTBK1 的 ORF 克隆并插入表达载体 pCMV-C-His 中 (Beyotime Biotechnology 公司)。HEK293 细胞在 48 孔板中以每孔 1×10^5 个细胞培养, 使用 Lipofectamine 3000 试剂, 转染 20 ng pRL-TK 内参质粒、100~300 ng pCMV-TBK1 和 80 ng NF- κ B-luc 荧光素酶报告质粒 (Genomeditech, 中国) 或 pAP1-luc (Beyotime Biotechnology, 中国) 或 IFN- β -luc (Beijing Qualityard Biotechnology, 中国)。用 pCMV-C-His 空载体转染的细胞作为对照。对于每次转染, 每孔 DNA 总量控制在 400 ng, 并用空载体进行平衡。在转染后 6、12 和 24 h 收获细胞并通过 Promega GloMax[®] 20/20 光度计 (Promega, 美国) 测量荧光素酶活性, 并计算与对应的海肾荧光素酶的活性比值得出转染细胞中荧光素酶的相对活性, 进而获得实验组与对照组荧光素酶相对活性的倍数变化^[29]。

1.10 统计学分析

使用 SPSS 15.0 对所得实验数据进行数据分析, 其中仅两组数据间的比较使用成组 *T*-检验分析, 多组数据间的比较使用单因素方差分析及 Duncan 多重比较。并用 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P < 0.01$ 则表示存在极显著差异。

2 结果

2.1 *AjTBK1* 基因全长克隆及序列分析

日本鳗鲡 *AjTBK1* (GenBank 登录号: MK 681481) 的 cDNA 全长为 3018 bp, 其中开放阅读框 (ORF) 为 2 196 bp, 5'非编码区 (UTR) 为 70 bp, 3'非编码区为 752 bp (图 1)。ORF 编码 731 个氨基酸 (aa), 预测的蛋白质分子量为 83.98 ku, 理论等电点为 6.27。SMART 程序预测 *AjTBK1* 具有保守的结构域, 包括 N 端的激酶结构域 (KD, 1~308 aa), 泛素样结构域 (ULD, 309~387 aa), 二聚化支架结构域 (SDD, 388~657 aa) 和 C 端结构域 (CTD, 658~731aa)。

2.2 *AjTBK1* 蛋白的结构分析

氨基酸多重比较图显示, 日本鳗鲡 *AjTBK1* 与斑马鱼、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*)、小鼠、智人 (*Homo sapiens*) 等其他物种 TBK1 氨基酸序列一样, 含有保守的激酶结构域、泛素样结构域、二聚化支架结构域以及 C 端结构域。激酶结构域中的 ATP 结合位点“LGQGATANV”用方框标记, 而与 TBK1 自磷酸化密切相关的丝氨酸残基 Ser172 高度保守。同源性分析显示, *AjTBK1* 与其他物种 TBK1 氨基酸序列一致性高达 66%~87% (图 2)。

采用 SWISS-MODEL 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模, 以人 TBK1 蛋白质三维结构为模板 (PDB 编号: 4imo.1.A) 预测日本鳗鲡 *AjTBK1* 蛋白质三级结构。预测所得的 *AjTBK1* 三维结构由 19 个 α 螺旋和 13 个 β 折叠组成, 并且与人 TBK1 的三维结构高度相似 (图 3)。

2.3 系统发育分析

使用 Mega 5.0 中的 Neighbor-Joining 方法构建了其系统发育树 (图 4)。系统发育树显示, 日本鳗鲡 *AjTBK1* 与亚洲龙鱼 (*Scleropages formosus*) 邻近, 并与其他硬骨鱼类 TBK1 聚为一个分支, 而

哺乳类、鸟类及两栖类 TBK1 则各聚为一支。

2.4 *AjTBK1* 基因在日本鳗鲡不同组织中的表达

AjTBK1 在日本鳗鲡肝脏、肠、腮、脾脏、皮肤、肾脏、心脏和肌肉中均有表达, 其中在肝脏中表达量最高, 肠、鳃和脾脏中表达量也较高, 而心脏和肌肉中的表达量相对较低 (图 5)。

2.5 免疫刺激对肝脏、肾脏和脾脏中 *AjTBK1* 基因表达的影响

为了研究 *AjTBK1* 在抗细菌和抗病毒免疫应答中的作用, 我们通过 qRT-PCR 分别检测了经 LPS, poly I:C 和嗜水气单胞菌刺激日本鳗鲡 0、6、12、24、48 和 72 h 后, 日本鳗鲡肝脏、肾脏和脾脏中 *AjTBK1* 基因表达水平。

LPS 刺激后, 日本鳗鲡肝脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 6 h 显著上升至峰值 (1.8 倍, $P < 0.01$), 而在 24 h 表达量显著降低 (0.71 倍, $P < 0.05$); 肾脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 48 h (0.61 倍, $P < 0.05$) 和 72 h (0.51 倍, $P < 0.05$) 均显著降低; 脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 6 h (0.65 倍, $P < 0.01$) 和 12 h (0.72 倍, $P < 0.01$) 显著降低 (图 6-a)。

poly I:C 免疫后, 日本鳗鲡肝脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 6 h 显著升高并达到峰值 (1.8 倍, $P < 0.01$); 肾脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 48 h (0.56 倍, $P < 0.01$) 和 72 h (0.62 倍, $P < 0.05$) 显著降低; 脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 24 h (1.4 倍, $P < 0.01$) 显著提高, 在 6 h (0.82 倍, $P < 0.05$) 和 72 h (0.81 倍, $P < 0.05$) 显著降低 (图 6-b)。

嗜水气单胞菌感染后, 日本鳗鲡肝脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 48 h (1.9 倍, $P < 0.01$) 和到 72 h (1.6 倍, $P < 0.01$) 显著上升; 肾脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 12 h (1.9 倍, $P < 0.05$) 和 24 h (1.6 倍, $P < 0.01$) 表达量显著上调; 脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平在 24 h (1.2 倍, $P < 0.05$) 出现显著上升, 但在 6 h (0.87 倍, $P < 0.01$) 和 72 h (0.66 倍, $P < 0.01$) 显著降低 (图 6-c)。

2.6 不同 PAMPs 及嗜水气单胞菌对日本鳗鲡肝脏细胞 *AjTBK1* 基因表达的影响

为进一步研究离体状态下不同病原体相关分子模式 (PAMPs) 及鱼类病原菌对 TBK1 基因表达的影响, 我们用 LPS、poly I:C、CpG-DNA、PGN 以及不同浓度的嗜水气单胞菌刺激日本鳗鲡肝脏细胞系, 在 0、3、6、12 h、24 和 48 h 通过 qRT-

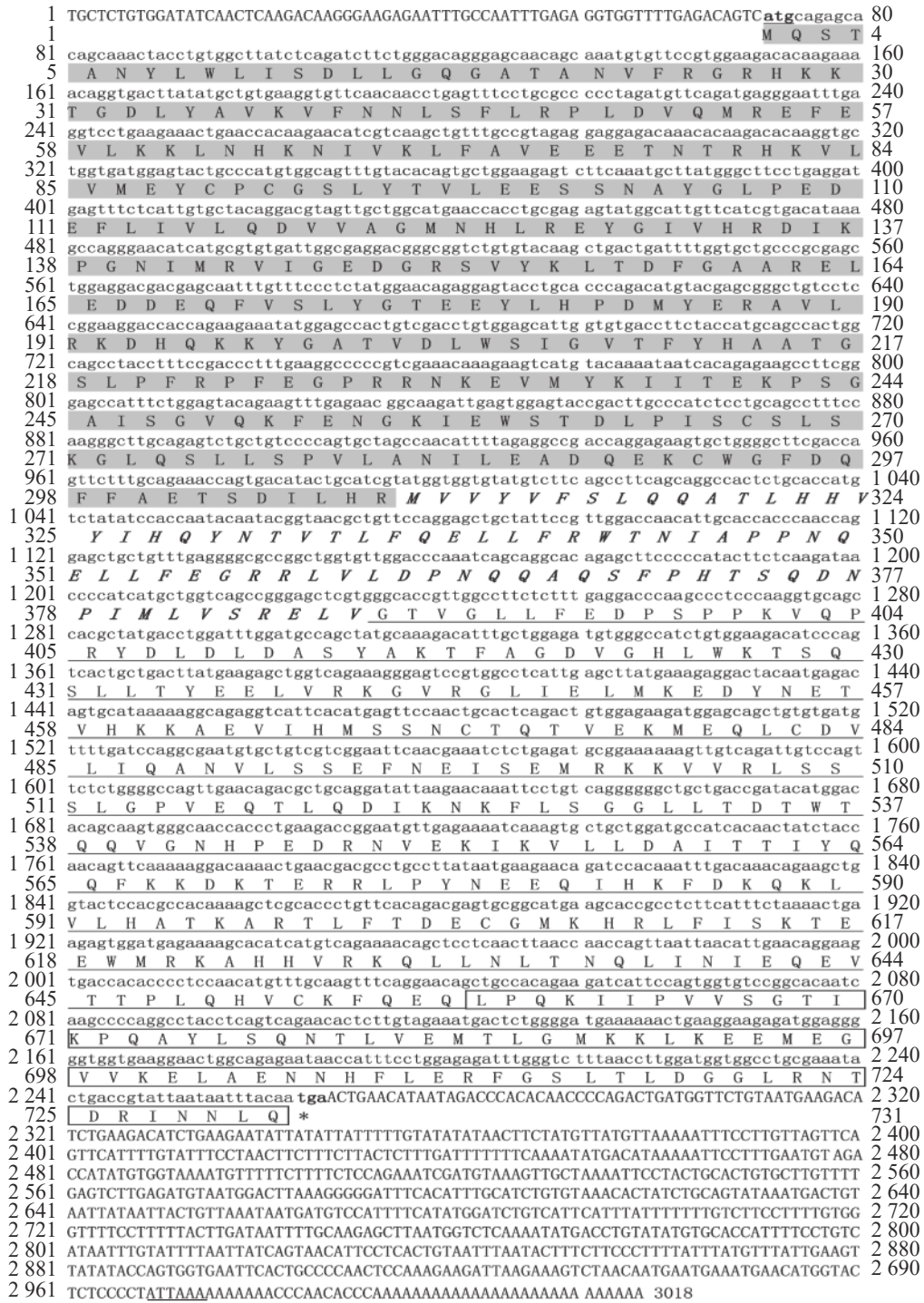


图 1 日本鳗鲡 *AjTBK1* cDNA 及推导的氨基酸序列图

大写字母分别代表 5' 和 3' 非编码区序列, 小写字母代表编码区序列; 上面为核苷酸序列, 对应下面为编码的氨基酸序列; 起始密码子 (atg) 以加粗及单下划线标示, 终止密码子 (tga) 以加粗标示, 多腺苷酸化信号 (ATTAATA) 以双下划线标示; 激酶结构域 (KD) 灰色标示, 泛素样结构域 (ULD) 为加粗斜体标示, 二聚化支架结构域 (SDD) 用单线标示, C 端结构域 (CTD) 用方框标示。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *AjTBK1* gene from *A. japonica*

Capital letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region separately. Lowercase letters represent the coding sequence, with nucleotide sequence above and coded amino sequence below. The start codon (ATG) was underlined in bold, and the stop codon (TAA) was marked with an asterisk in bold. The polyadenylation signal (ATTAATA) is double-underlined. The kinase domain (KD) was shaded in grey. The ubiquitin-like domain (ULD) was italic in bold. The scaffold dimerization domain (SDD) was underlined. The C-terminal domain (CTD) was boxed.

PCR 检测 *AjTBK1* 基因表达水平变化。

日本鳗鲡肝脏细胞系经 LPS 刺激后, *AjTBK1* 基因表达水平在 6 h 表达显著下降 (0.55 倍,

$P < 0.05$), 在 12 h (15.3 倍, $P < 0.01$) 和 48 h (1.9 倍, $P < 0.05$) 显著升高; poly I:C 处理后, *AjTBK1* 基因表达量在 12 h (5.8 倍, $P < 0.05$) 显著提高; PGN

日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	MQSTANYLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNLSFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	MQSTANYLWMMSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNLSFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	MQSTTNYLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNLSFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	MQSTANYLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNLSFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	MQSTANYLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNLSFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	MQSTTNYLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNLSFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	MQSTANYLWMLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNSLSFQRPADVQMRFEFVLEK	60
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	MQSTSNHLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNISFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
小鼠 <i>M. musculus</i>	MQSTSNHLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNISFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
智人 <i>H. sapiens</i>	MQSTSNHLWLLSDLLGGGATANVYFRGRHKKTGDLYAVEKVFNNISFLRPLDVQMRFEFVLEK	60
←————— —————▶ 激酶结构域(Kinase domain)		
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	KLNHKNIKVLFAVEEENTNRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFILVLDQDVV	120
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	KLNHKNIKVLFAVEEESNTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEEFPTNAYGLPEDEFILVLDQDVV	120
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	KLNHKNIKVLFAVEEENTNRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFILVLDQDVV	120
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	KLNHKNIKVLFAVEEESNTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFILVLDQDVV	120
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	KLNHKNIKVLFAVEEESNTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFILVLDQDVV	120
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	KLNHKNIKVLFAVEEESNTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFILVLDQDVV	120
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	KLNHKNIKVLFAIEEEMSSRHKVLVMEYFCPCASLYSVLEEFPTNSYGLPESEFLVLRDQVV	120
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	KLNHKNIKVLFAIEEETTTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEEFPSNAYGLPESEFLVLRDQVV	120
小鼠 <i>M. musculus</i>	KLNHKNIKVLFAIEEETTTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEEFPSNAYGLPESEFLVLRDQVV	120
智人 <i>H. sapiens</i>	KLNHKNIKVLFAIEEETTTRHKVLMVEYFCPCGSLYTVLEEFPSNAYGLPESEFLVLRDQVV	120
————— ————— AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGRSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL		
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGRSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GDDGFSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGHSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGRSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGRSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	AGMNHLEREYGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGRSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	AGMNHLERENGI VHRDIKPGNIMREI GEDGQSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	AGMNHLERENGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGQSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
小鼠 <i>M. musculus</i>	AGMNHLERENGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGQSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
智人 <i>H. sapiens</i>	AGMNHLERENGI VHRDIKPGNIMRVI GEDGQSVYKLTDFGAARELDDDEQFVSLYGT E EYL	180
————— ————— HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE		
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE	240
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE	240
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE	240
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE	240
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE	240
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITE	240
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYSATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITAG	240
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITG	240
小鼠 <i>M. musculus</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSVGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITG	240
智人 <i>H. sapiens</i>	HPDMYERAVLRKDHQKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGFRNKVEMYKIITG	240
————— ————— KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA		
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	KPPGATISGHQKFKENGKIEWSSEMPISCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
小鼠 <i>M. musculus</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
智人 <i>H. sapiens</i>	KPSGATISGVQKFKENGKIEWSTDLPISSCSLSKGLQSLLPVLANILEADQEKWGFDPQFFA	300
————— ————— ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNIAPFNQELLFEGRRLV		
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNIAPFNQELLFEGRRLV	360
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTANLQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTAALQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTAAVHQLVYKQTKIPSGQELLFEGRRLV	360
小鼠 <i>M. musculus</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTAAVHQLVYKQTKIPSGQELLFEGRRLV	360
智人 <i>H. sapiens</i>	ETSDILHGMVVYVFSLQQAATLHGQVYIHQYNTATLQELLFRRTNITPSHQELLFEGRRLV	360
————— ————— LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRLVGTVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG		
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRLVGTVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
绿头鸭 <i>A. platyrhynchos</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
小鼠 <i>M. musculus</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420
智人 <i>H. sapiens</i>	LDPNRQAQSPFHTSQDNPIMLVSRRESVATVGLIFEDPSPPKVQFRYDLDLDASYAKTFAG	420

(图 2 Fig. 2)

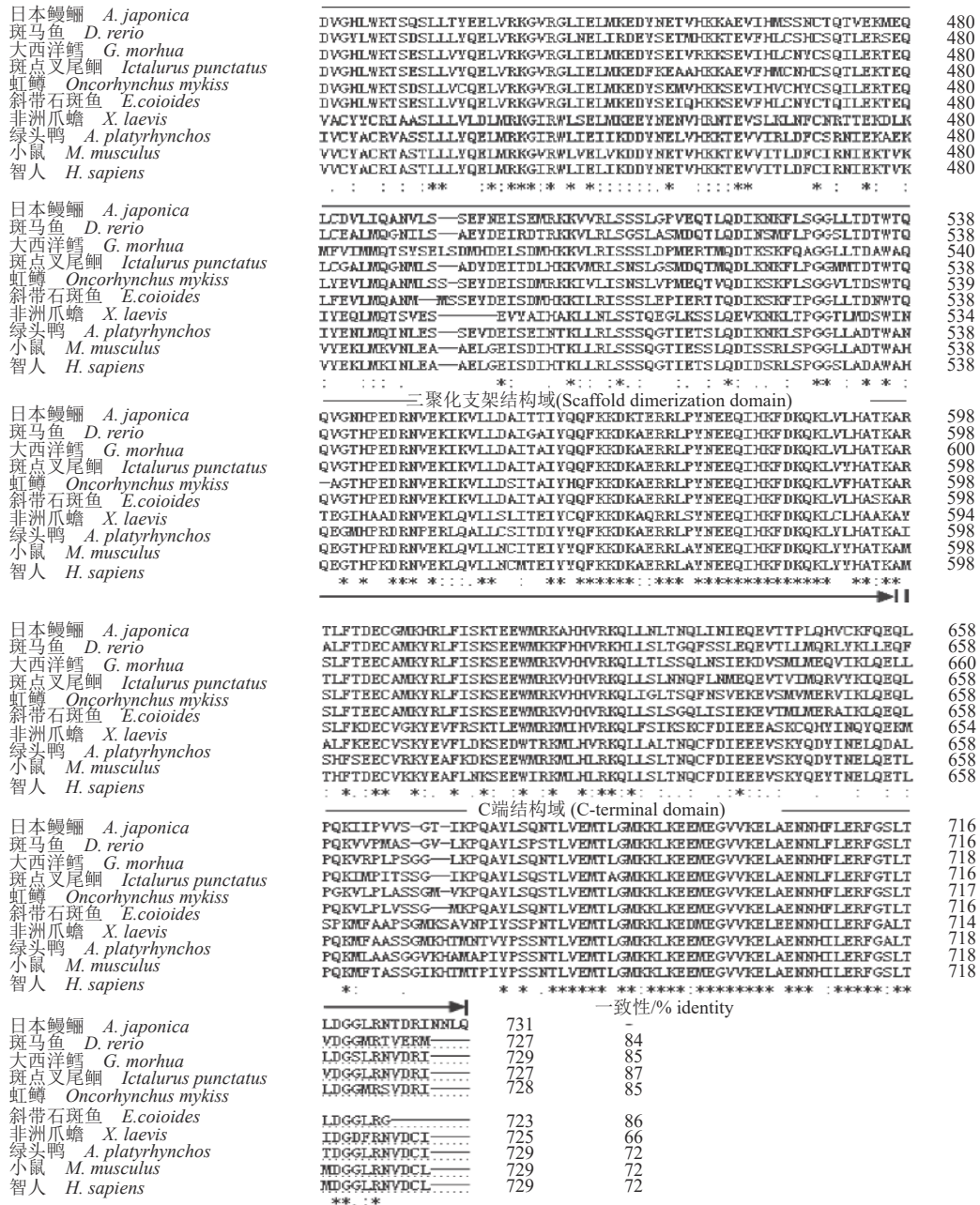


图2 日本鳗鲡 A/TBK1 与其他物种 TBK1 氨基酸序列的多重比对图

日本鳗鲡 (MK681481), 斑马鱼 (NP_001038213.2), 大西洋鲑 (ADL60136.1), 斑点叉尾鲷 (XP_017349490.1), 虹鳟 (XP_021448563.1), 斜带石斑鱼 (ATI15615.1), 非洲爪蟾 (NP_001086516.1), 绿头鸭 (XP_005029507.1), 小鼠 (NP_062760.3), 智人 (NP_037386.1); 激酶结构域中的 ATP 结合位点“LGQGATANV”用方框标记, 与 TBK1 自磷酸化密切相关的丝氨酸残基 Ser172 用灰色标示; “-”表示空位经手工优化, “*”表示相同的氨基酸残基, “:或.”表示相似的氨基酸残基; 各结构域所在区域用箭头标出。

Fig. 2 Multiple alignment of the TBK1 amino acid sequence between A. japonica and other species

Multiple alignment of the amino acid sequences of TBK1 from A. japonica (MK681481), D. rerio (NP_001038213.2), G. morhua (ADL60136.1), Ictalurus punctatus (XP_017349490.1), Oncorhynchus mykiss (XP_021448563.1), E. coioides (ATI15615.1), X. laevis (NP_001086516.1), A. platyrhynchos (XP_005029507.1), M. musculus (NP_062760.3), H. sapiens (NP_037386.1). The ATP binding site "LGQGATANV" in the kinase domain is marked with a box, and the serine residue Ser172, which is closely related to TBK1 autophosphorylation are marked in grey. Gap positions were manually optimized and are indicated by hyphens. Identical (*) and similar (: or .) residues were identified by the ClustalW program; different protein domains were indicated by arrows. Different protein domains were indicated by arrows.

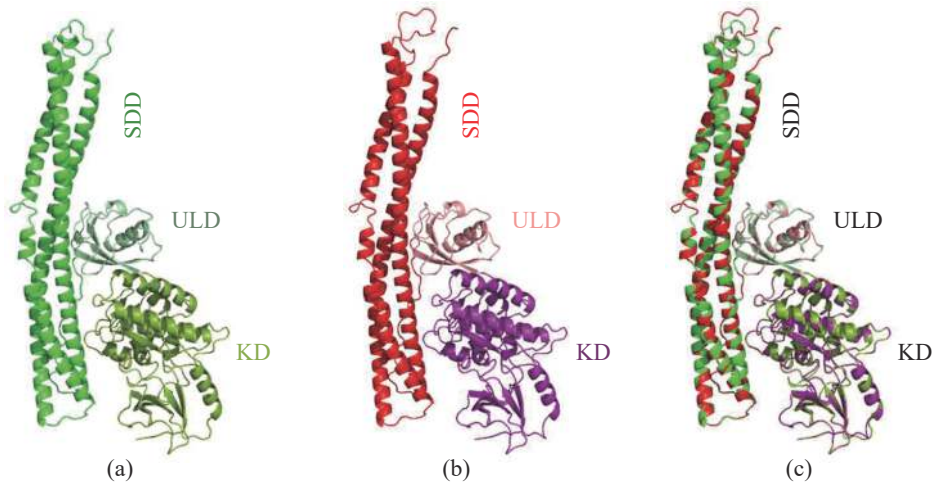


图3 *AjTBK1* 与人类 *TBK1* 空间结构的比较

(a) *AjTBK1* 三维结构图; (b) 人 *TBK1* 三维结构图; (c) 日本鳗鲡与人 *TBK1* 叠合的三维结构图。

Fig. 3 *TBK1* three-dimensional structure comparison between *A. japonica* and *H. sapiens*

(a) the predicted three-dimensional structure of *AjTBK1*; (b) the predicted three-dimensional structure of human *TBK1*; (c) the predicted three-dimensional structure of *AjTBK1* overlapped with human *TBK1*.

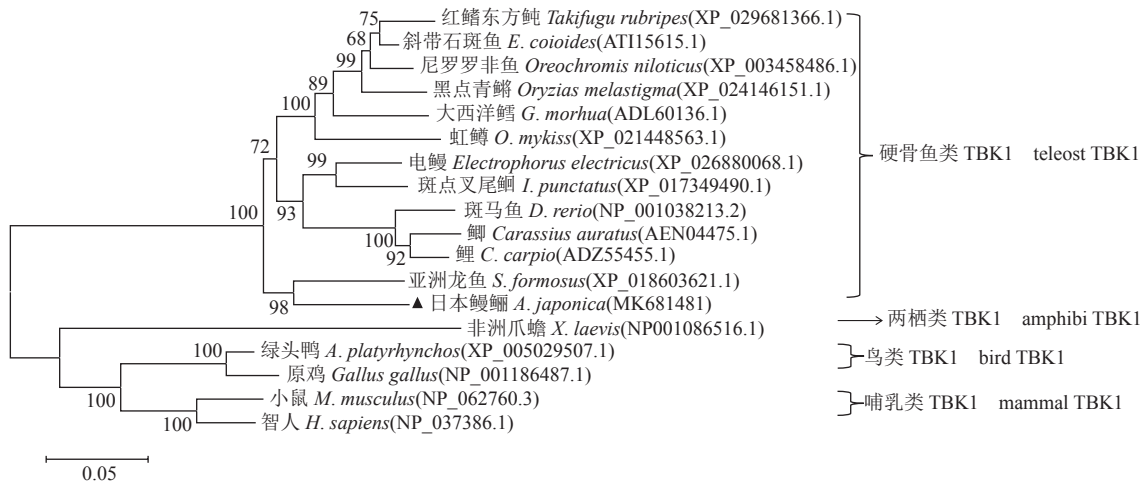


图4 日本鳗鲡 *AjTBK1* 与其他物种 *TBK1* 氨基酸序列系统发育树 (*AjTBK1* 用▲)

Fig. 4 Phylogenetic tree of the *TBK1* amino acid sequences between *A. japonica* and other species (*AjTBK1* was marked with ▲)

刺激后的 *AjTBK1* mRNA 表达水平在 3 h (0.58 倍, $P < 0.05$) 显著降低, 在 6 h (9.3 倍, $P < 0.01$), 12 h (4.8 倍, $P < 0.01$), 24 h (1.4 倍, $P < 0.05$) 和 48 h (1.7 倍, $P < 0.01$) 均显著升高; 而 CpG-DNA 刺激下的基因表达水平在各时相均无显著变化 ($P > 0.05$) (图 7-a)。

日本鳗鲡肝脏细胞系经浓度为 1×10^6 CFU/mL 嗜水气单胞菌刺激后, *AjTBK1* 基因表达水平在 24 h (2.7 倍, $P < 0.05$) 和 48 h (4.7 倍, $P < 0.01$) 显著上调; 当嗜水气单胞菌浓度调整为 1×10^7 CFU/mL 后, *AjTBK1* 基因表达水平在 6 h (0.74 倍,

$P < 0.05$) 和 12 h (0.50 倍, $P < 0.01$) 显著下降, 但在 48 h (2.1 倍, $P < 0.01$) 显著提高; 浓度为 1×10^8 CFU/mL 嗜水气单胞菌刺激后, *AjTBK1* 基因表达水平 48 h (1.6 倍, $P < 0.01$) 显著升高 (图 7-b)。

2.7 *AjTBK1* 在 HEK293 细胞中的亚细胞定位

构建绿色荧光蛋白 pEGFP-*TBK1* 重组质粒, 以 pEGFP-N1 空载体为对照, 将其转染人类 HEK293 细胞进行表达。天然状态下, *AjTBK1* 在细胞质中均匀分布, 在细胞核中未见分布。LPS 和 poly I:C 刺激下, *AjTBK1* 在细胞质中出现聚集、并呈点状分布 (图版)。

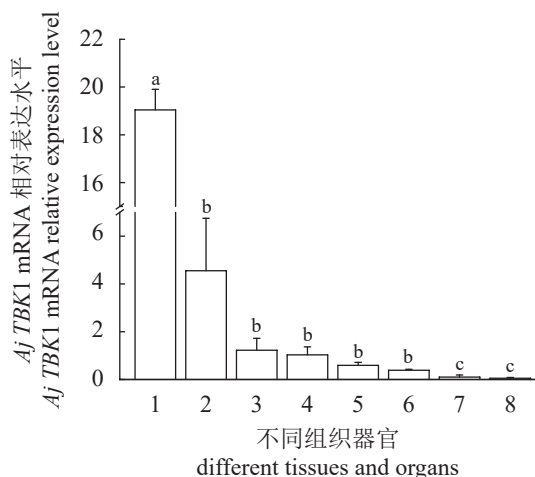


图5 健康日本鳗鲡不同组织中 *AjTBK1* 的相对表达量

1. 肝脏, 2. 肠, 3. 鳃, 4. 脾脏, 5. 皮肤, 6. 肾脏, 7. 心脏, 8. 肌肉; 不同的字母表示不同组织 *AjTBK1* 基因表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Relative expression levels of *AjTBK1* transcripts in different tissues of healthy *A. japonica*

1. liver, 2. intestine, 3. gills, 4. spleen, 5. skin, 6. kidney, 7. heart, 8. muscle; different letters indicated a significant difference of *AjTBK1* gene expression among tissues ($P < 0.05$).

2.8 *AjTBK1* 过表达对 NF- κ B、IFN1 和 AP1 启动子活性的影响

为研究 *AjTBK1* 对 NF- κ B、AP-1 和 I 型 IFN 信号通路的调控作用, 我们构建了 *AjTBK1* 的真核表达质粒 pCMV-TBK1, 同时以 pCMV-C-His 为对照质粒, pRL-TK 为内参质粒, 将 pCMV-TBK1 分别与 NF- κ B, AP-1 或 IFN- β 启动子荧光素酶报告质粒共转染 HEK 293 细胞。双荧光素酶检测结果显示, 过表达的 *AjTBK1* 对 NF- κ B、AP-1、IFN- β 启动子活性具有激活作用并呈剂量依赖性 (图 8)。

过表达的 *AjTBK1* 分别在 6 h (1.7 倍, $P < 0.01$)、12 h (1.6 倍, $P < 0.01$) 和 24 h (1.8 倍, $P < 0.01$) 显著增强了 NF- κ B 启动子荧光素酶活性 (图 8-a); 选取 24 h 作为转染时间, 将 NF- κ B 报告质粒与不同剂量的 pCMV-TBK1 质粒 (100 ng、200 ng 和 300 ng) 共转染, 发现 NF- κ B 启动子的荧光素酶活性分别提高了 1.5 倍 ($P < 0.01$), 1.7 倍 ($P < 0.01$) 和 2.4 倍 ($P < 0.01$) (图 8-b)。

过表达的 *AjTBK1* 在 6 h 对 AP-1 启动子无显著诱导 ($P > 0.05$), 而在 12 h (1.2 倍, $P < 0.01$) 和 24 h (1.1 倍, $P < 0.01$) 均能诱导 AP-1 启动子荧光素酶活性 (图 8-c); 当与不同剂量的 pCMV-TBK1 质粒 (100 ng 和 300 ng) 共转染时, AP-1 启动子的

荧光素酶活性在 12 h 分别提高了 1.03 倍 ($P < 0.01$) 和 1.13 倍 ($P < 0.01$), 而在 200 ng 剂量下无显著诱导效果 ($P > 0.01$) (图 8-d)。

过表达的 *AjTBK1* 在 6 h (1.4 倍, $P < 0.01$), 12 h (1.91 倍, $P < 0.01$) 和 24 h (1.92 倍, $P < 0.01$) 显著诱导 IFN- β 启动子荧光素酶活性 (图 8-e); 选取 24 h 作为转染时间, 将报告质粒 IFN- β 与不同剂量的 pCMV-TBK1 质粒 (100 ng、200 ng 和 300 ng) 共转染时, IFN- β 启动子的荧光素酶活性分别提高了 1.46 倍 ($P < 0.01$), 1.47 倍 ($P < 0.01$) 和 1.48 倍 ($P < 0.01$) (图 8-f)。

3 讨论

哺乳动物 TBK1 作为非经典 I κ B 激酶, 在激活 NF- κ B、I 型 IFN 信号通路中起着关键作用^[30]。目前的研究表明, 鱼类 TBK1 在 IRF3/IRF7 介导的 I 型干扰素信号通路具有重要的调控作用, 但有关鱼类 TBK1 对细菌免疫应答密切相关的 NF- κ B 及 MAPK 信号通路调控作用的研究还未见报道。为了深入了解 TBK1 在硬骨鱼类免疫应答中的作用机制, 本研究从日本鳗鲡中克隆了 *AjTBK1* cDNA 全长, 探究了在体和离体状态下主要病原模式分子和鱼类病原菌刺激后的 *AjTBK1* 基因表达的变化, 以及 *AjTBK1* 过表达对于不同免疫相关信号通路的调控作用。

AjTBK1 编码了 731 个氨基酸, 与斑点叉尾鲷、斑马鱼、大西洋鳕、虹鳟等 TBK1 氨基酸相似度高达 84%~87%, 具有 TBK1 蛋白家族典型的激酶结构域 (KD)、泛素样结构域 (ULD)、二聚化支架结构域 (SDD) 以及 C 端结构域 (CTD)^[1, 31]。*AjTBK1* 的激酶结构域中含有保守的 ATP 结合位点“LGQGATANV”, 以及与 TBK1 自磷酸化密切相关的丝氨酸残基 Ser172。此外, 日本鳗鲡 *AjTBK1* 空间结构与人类 TBK1 蛋白质在三维结构上高度相似, 并与其他鱼类 TBK1 在系统发育树中聚为一支, 反映出 TBK1 在进化过程中相对保守, 预示该分子具有类似于哺乳动物 TBK1 的免疫调节方面的功能。

AjTBK1 基因在日本鳗鲡各组织中广泛表达, 这种组成型基因表达模式也出现在大西洋鳕^[12]、青鱼^[13]、草鱼^[14]、大黄鱼^[15]、斜带石斑鱼^[17] 和鲤^[18] 中。*AjTBK1* 基因在肝脏、肠、鳃、脾脏等免

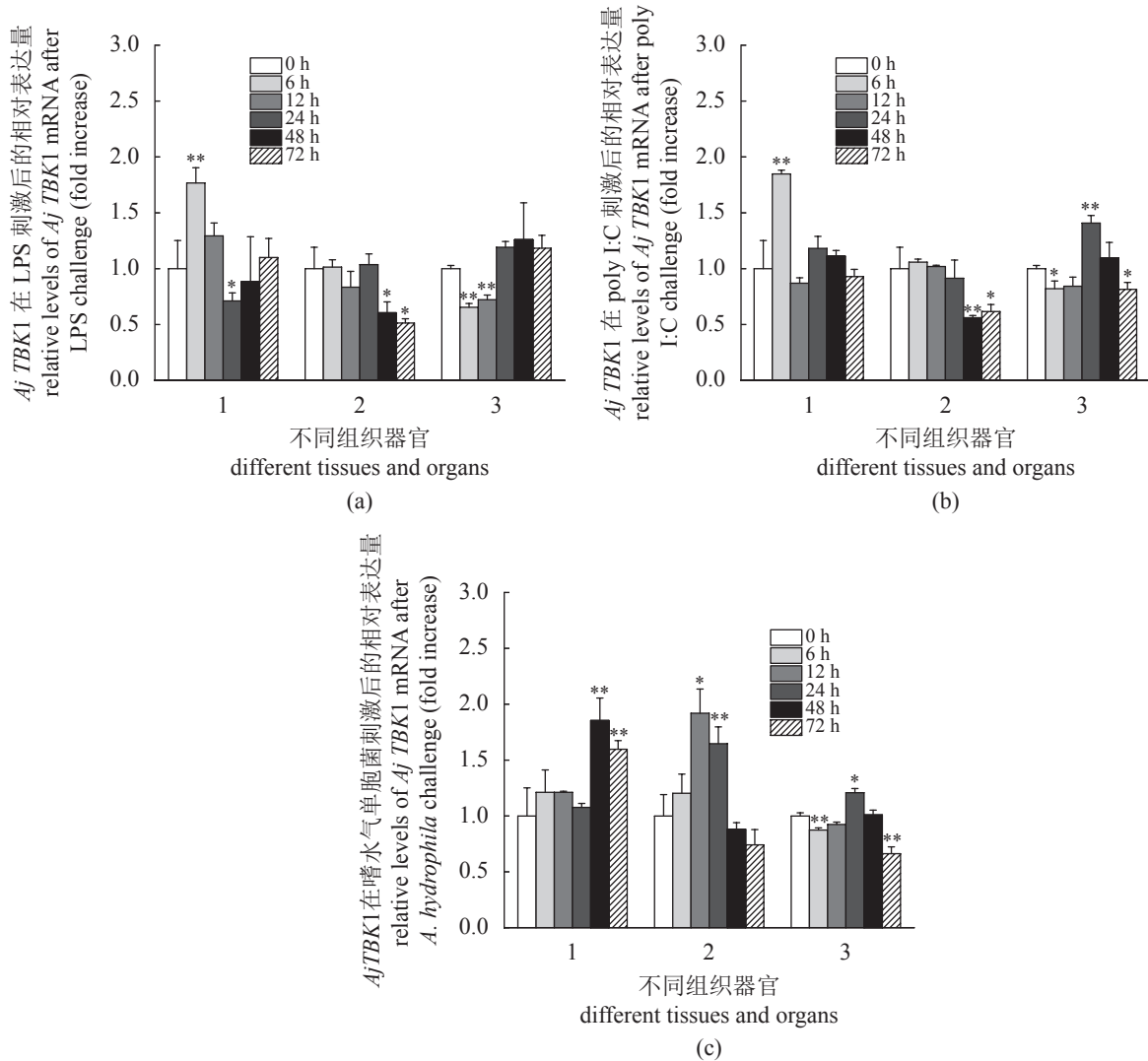


图 6 LPS、poly I:C 及嗜水气单胞菌对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平的影响

(a) LPS 刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平的影响; (b) poly I:C 刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平的影响; (c) *A. hydrophila* 刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 *AjTBK1* 基因表达水平的影响; 各图横坐标中 1, 2 和 3 分别代表日本鳗鲡肝脏、肾脏和脾脏; “*”表示相同时相实验组与对照组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), “**”表示极显著差异 ($P < 0.01$)。

Fig. 6 Effect of LPS, poly I:C, or *A. hydrophila* on *AjTBK1* gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*

(a) Effect of LPS on *AjTBK1* gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*; (b) effect of poly I:C on *AjTBK1* gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*; (c) effect of *A. hydrophila* on *AjTBK1* gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*; 1, 2 and 3 on the abscissa represent liver, kidney and spleen respectively; statistical differences between the expression level of each sample and that of the PBS control at the same sampling time are indicated with asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

疫相关组织中有较高表达, 与大西洋鳕^[12]、草鱼^[14]和鲤^[18]的研究结果一致。但也有学者发现大黄鱼 *TBK1* 基因表达水平在脑、肌肉和心脏中较高^[15], 而斜带石斑鱼心脏 *TBK1* 表达量明显高于肝脏、脾脏、头肾等免疫器官^[17], 提示 *TBK1* 在硬骨鱼类中的表达模式具有种属特异性, 其免疫功能也可能存在差异。

硬骨鱼类 *TBK1* 在抗病毒免疫功能中的研究

已有不少报道。例如鲤春病毒血症病毒 (SVCV)、草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 可诱导青鱼肝脏、脾脏、肾脏以及青鱼鳍细胞中 *TBK1* 基因表达水平显著提高^[13], GCRV 感染草鱼后, 其脾脏、头肾以及肾脏细胞中 *TBK1* 表达量显著上升^[14], 而赤点石斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 和新加坡石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 感染后可使斜带石斑鱼脾脏细胞中 *TBK1* 表达量显著升高^[17]。本实验发现 poly I:C

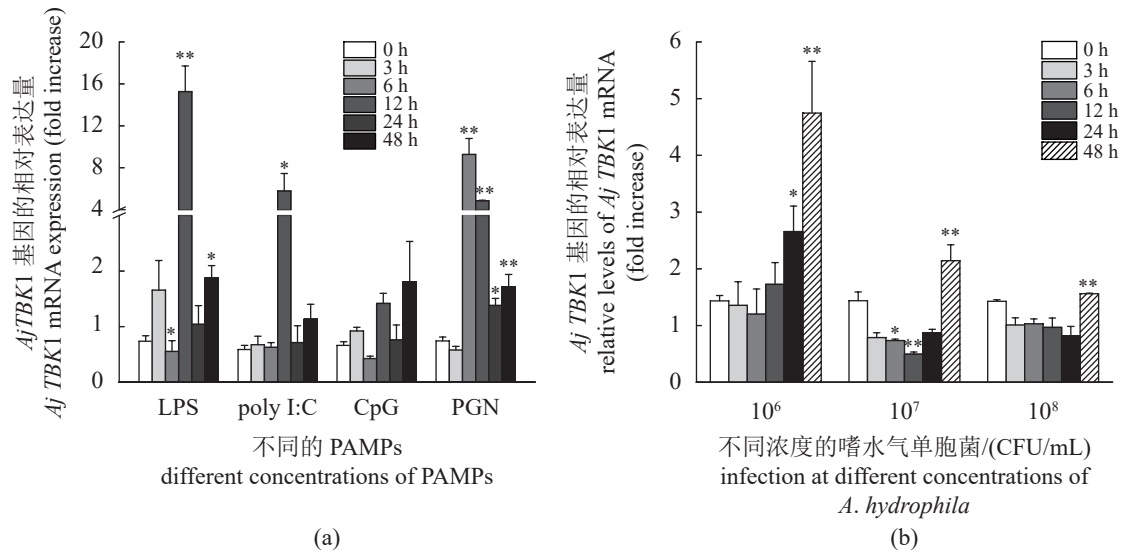


图7 不同PAMPs及不同浓度嗜水气单胞菌刺激对日本鳊肝细胞*AjTBK1*基因表达水平的影响 (a) 不同PAMPs刺激对日本鳊肝细胞内*AjTBK1*基因表达水平的影响; (b) 不同浓度嗜水气单胞菌刺激对日本鳊肝细胞内*AjTBK1*基因表达水平的影响; “*”表示相同时间实验组与对照组之间存在显著差异($P < 0.05$), “***”表示极显著差异($P < 0.01$)。

Fig. 7 Effect of different PAMPs, or different concentrations of *A. hydrophila* on *AjTBK1* gene expression of *A. japonica* liver cells

(a) Effect of different PAMPs on *AjTBK1* gene expression of *A. japonica* liver cells; (b) effect of different concentrations of *A. hydrophila* on *AjTBK1* gene expression of *A. japonica* liver cells; statistical differences between the expression level of each sample and that of the PBS control at the same sampling time are indicated with asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

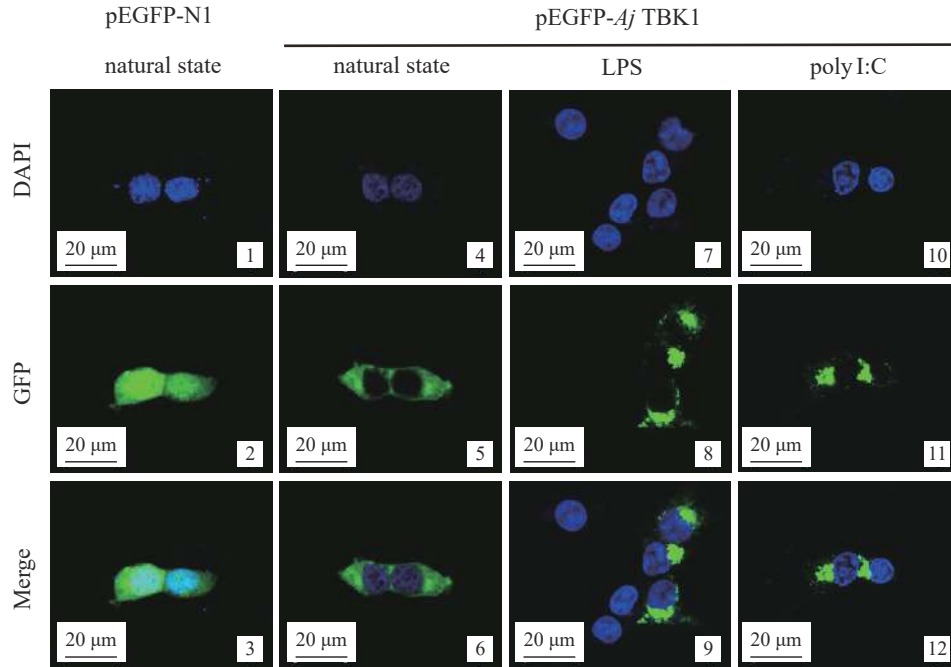
可诱导日本鳊肝脏、脾脏以及日本鳊肝细胞中*AjTBK1*表达水平显著提高, 表明*AjTBK1*参与日本鳊抗病毒免疫应答, 但其免疫调控机制尚需进一步研究。

目前, 有关鱼类TBK1参与抗病原菌感染的研究仅在大黄鱼中有所报道, 其结果显示, 灭活的副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)可以诱导大黄鱼免疫相关组织中TBK1的表达水平提高^[15]。我们发现养殖鳊主要病原菌嗜水气单胞菌能够诱导日本鳊肝脏、脾脏、肾脏以及日本鳊肝细胞TBK1基因表达水平显著升高, 从在体和离体两个方面支持了鱼类TBK1在抗细菌免疫应答反应中的重要作用。此外, 我们还发现革兰氏阴性和阳性细菌的主要病原模式分子LPS和PGN均能引起日本鳊肝细胞*AjTBK1*的表达水平提高, 与草鱼肾脏细胞的研究结果相符^[14]。但也有学者发现青鱼鳍细胞TBK1的表达水平经LPS刺激后却无显著变化^[13-14], 提示不同鱼类细胞对于不同的主要病原模式分子刺激后的免疫应答机制有所不同。

亚细胞定位对于蛋白质功能的深入研究具有重要意义。天然状态下*AjTBK1*主要分布于细胞

质中, 与青鱼^[13]、斜带石斑鱼^[17]的研究结果相一致。目前, 尚未有研究表明病原体相关分子模式能够引起TBK1在细胞中的定位变化, 而本研究证实了LPS和poly I:C能够引起*AjTBK1*在细胞质中聚集表达, 与日本鳊*AjIKK α* 的文献报道一致^[32], 提示*AjTBK1*对抗病原微生物免疫应答的调控作用主要在细胞质中进行。哺乳动物中的研究表明, *IKK α / β* 可以通过磷酸化对TBK1/*IKK ϵ* 进行活化以完成抗病毒信号的进一步传递^[33], 日本鳊*AjTBK1*与*AjIKK α* 在抗细菌和抗病毒先天免疫应答中是否也存在类似的相互作用机制还有待进一步研究。

TBK1是调节IFN- β 表达的重要激酶, 在介导人类先天免疫中具有不可替代的作用^[34]。与人类TBK1功能相似, 草鱼^[14]、青鱼^[19]以及斑马鱼^[16]等硬骨鱼类的TBK1过表达后也能激活自身I型IFN的表达。此外, 硬骨鱼类TBK1也被证明与IRF家族中多个转录因子如IRF3、IRF5、IRF6、IRF7之间存在相互作用, 并可通过这些相互作用参与调节I型IFN信号通路^[19-20, 35-37]。本实验中*AjTBK1*过表达显著激活IFN- β 的启动子活性, 并呈剂量依赖性进一步证明鱼类TBK1在抗病毒免



图版 *AjTBK1* 在 HEK293 中的亚细胞定位

1~3. 天然状态下绿色荧光蛋白亚细胞定位; 4~6. 天然状态下 *AjTBK1* 绿色荧光融合蛋白亚细胞定位; 7~9. LPS 刺激后 *AjTBK1* 绿色荧光融合蛋白亚细胞定位; 10~12. poly I:C 刺激后 *AjTBK1* 绿色荧光融合蛋白亚细胞定位; 蓝色部分为 DAPI 染色, 示细胞核; 绿色部分为绿色荧光蛋白, 示 EGFP 或 EGFP-*AjTBK1* 在细胞中的位置; 3、6、9 和 12 分别为 1 和 2、4 和 5、7 和 8、9 和 10 的合并图像。

Plate Subcellular localization of *AjTBK1* intranected HEK293 cells

1-3. subcellular localization of EGFP protein in the natural state; 4-6. subcellular localization of EGFP-*AjTBK1* fusion protein in the natural state; 7-9. subcellular localization of EGFP-*AjTBK1* fusion protein after LPS stimulation; 10-12. subcellular localization of EGFP-*AjTBK1* fusion protein after poly I:C stimulation; nucleus were stained with DAPI, were shown in blue; the green part shows the location of EGFP or EGFP-*AjTBK1* in cells; 3, 6, 9 and 12 are the merged images of 1 and 2, 4 and 5, 7 and 8, 9 and 10 respectively.

疫功能方面的保守性。此外, 在绿头鸭和原鸡中的研究发现缺失 KD 或 ULD 的 TBK1 的突变体丧失了对 IFN- β 的激活能力^[38-39], 而缺失 KD 的斜带石斑鱼 TBK1 的突变体也缺乏对 IRF3、IRF7 启动子活性的激活能力^[17], 因此, 进一步通过构建日本鳗鲡 TBK1 不同结构域突变体, 研究其对 IFN- β 的启动子活性的影响, 将有助于深入了解 TBK1 所介导的抗病毒调控机制。

NF- κ B 是细胞中的关键核转录因子, 可参与调节细胞内多种免疫和炎症反应。虽然人类 TBK1 和绿头鸭 TBK1 的过表达可激活 NF- κ B 的启动子活性^[10, 38], 但硬骨鱼类 TBK1 是否参与调节 NF- κ B 信号通路尚未见报道。本实验通过双荧光素酶检测发现, *AjTBK1* 过表达显著增强了 NF- κ B 启动子荧光素酶活性, 并呈现剂量依赖性, 表明鱼类 TBK1 也参与了细胞内 NF- κ B 信号通路的激活, 但其调控机制尚需进一步研究。

AP-1 属于 MAPK 信号通路中的重要细胞因子, 其转录活性在细胞增殖、凋亡、炎症及迁移

等过程中发挥复杂而又重要的作用, 且受 JNK、ERK、p38 MAPK、PI3K/AKT 的调控^[40]。早期的研究表明, 哺乳动物中 AKT 可调控 MAPK 信号通路下游因子 AP-1, TBK1 可通过激活 PI3K 实现对 AKT 的磷酸化^[40-41]。我们首先在日本鳗鲡中观察到 TBK1 能够对 AP-1 启动子荧光素酶活性有一定的增强作用, 提示硬骨鱼 TBK1 很可能也参与了对 MAPK 信号通路的调控作用, 但尚需在其他鱼类中进一步证实。

本实验从日本鳗鲡克隆鉴定出 *AjTBK1* 基因的 cDNA 全长, qRT-PCR 显示嗜水气单胞菌和 poly I:C 能够诱导日本鳗鲡肝脏、脾脏以及日本鳗鲡肝脏细胞 *AjTBK1* 基因水平显著提高, 亚细胞定位结果显示, 经 LPS 和 poly I:C 刺激后 *AjTBK1* 在细胞质中呈聚集点状分布, 双荧光素酶活性检测发现过表达的 *AjTBK1* 可激活 NF- κ B、AP-1 和 IFN- β 启动子, 以上结果表明, *AjTBK1* 是激活 NF- κ B、I 型 IFN 和 MAPK 信号通路中的正调节剂, 在机体抗细菌和抗病毒免疫应答中发挥重要

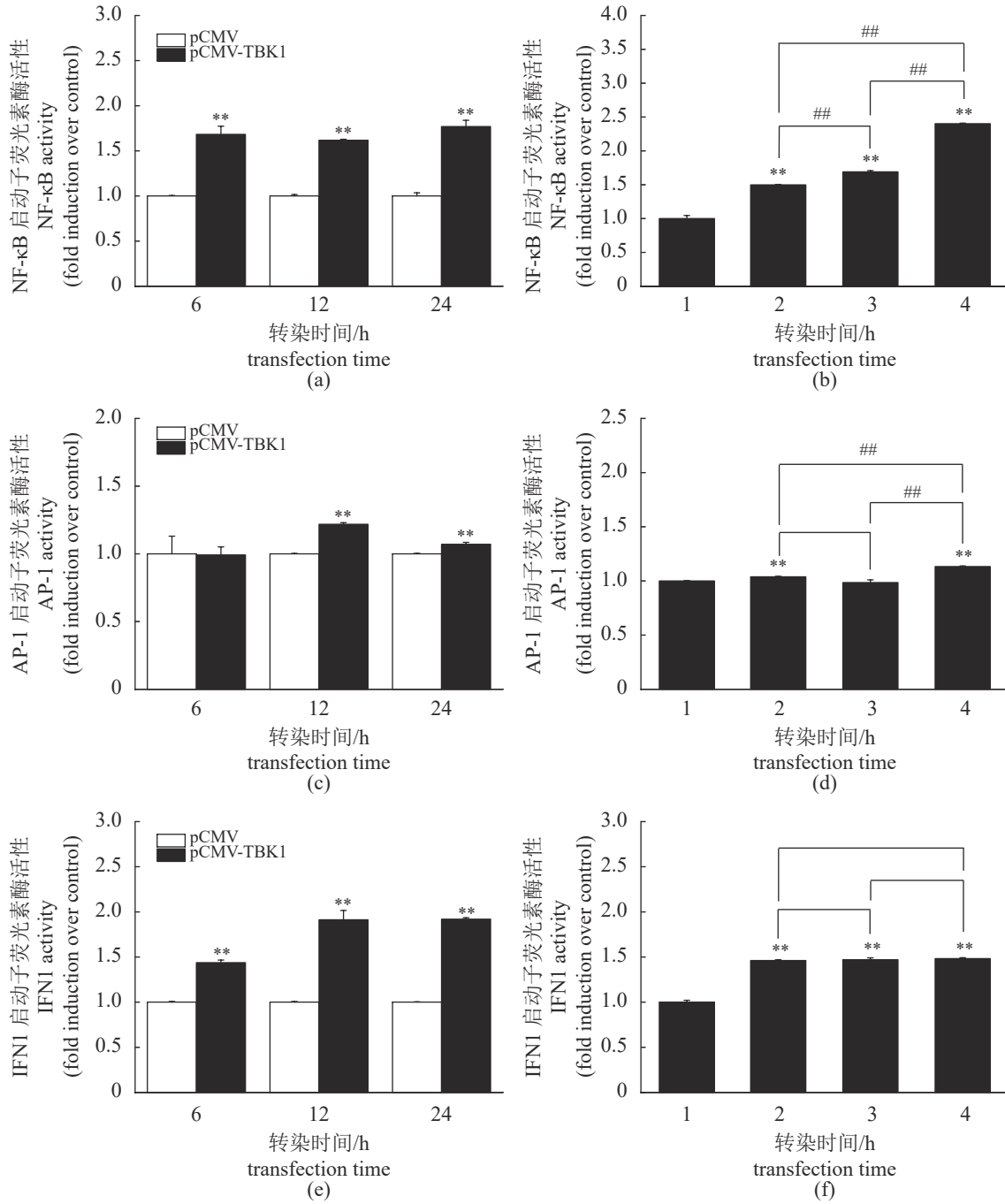


图 8 过表达 *AjTBK1* 对 NF-κB, AP-1 和 IFN-β 的激活作用

(a) 不同时下相 *AjTBK1* 对 NF-κB 的激活; (b) 不同转染剂量的 *AjTBK1* 转染 24 h 对 NF-κB 的激活; (c) 不同时下相 *AjTBK1* 对 AP-1 的激活; (d) 不同转染剂量的 *AjTBK1* 转染 12 h 对 AP-1 的激活; (e) 不同时下相 *AjTBK1* 对 IFN-β 的激活; (f) 不同转染剂量的 *AjTBK1* 转染 24 h 对 IFN-β 的激活。图 (b)、(d)、(f) 中的 1、2、3、4 分别代表转染 pCMV 300 ng、转染 pCMV 200 ng 和 pCMV-TBK1 100 ng、转染 pCMV 100 ng 和 pCMV-TBK1 200 ng、转染 pCMV-TBK1 300 ng。“*”表示相同时相下实验组与对照组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), “**”表示极显著差异 ($P < 0.01$); “#”表示不同转染剂量的实验组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 而“##”表示极显著差异 ($P < 0.01$)。

Fig. 8 Activation of NF-κB, AP-1, and IFN-β response by *AjTBK1* overexpression

(a) activation of NF-κB by *AjTBK1* in different phases; (b) activation of NF-κB by different doses of *AjTBK1* after 24 h transfection; (c) activation of AP-1 by *AjTBK1* in different phases; (d) activation of AP-1 by different doses of *AjTBK1* after 12 h transfection; (e) activation of IFN-β by *AjTBK1* in different phases; (f) activation of IFN-β by different doses of *AjTBK1* after 24 h transfection; 1, 2, 3, 4 in Fig B, D, F are referred to the plasmid transfection of 300 ng pCMV, 200 ng pCMV and 100 ng pCMV-TBK1, 100 ng pCMV and 200 ng pCMV-TBK1, and pCMV-TBK1 300 ng, respectively; statistical differences between the expression level of each sample and that of the pCMV control are indicated with asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$); hashtags indicate statistically significant differences between two transfection doses of *AjTBK1* as specified in the figure (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$).

的调控作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Larabi A, Devos J M, Ng S L, *et al.* Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1[J]. *Cell Reports*, 2013, 3(3): 734-746.
- [2] Li F X, Xie X Q, Wang Y L, *et al.* Structural insights into the interaction and disease mechanism of neurodegenerative disease-associated optineurin and TBK1 proteins[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 12708.
- [3] Ahmad L, Zhang S Y, Casanova J L, *et al.* Human TBK1: a gatekeeper of neuroinflammation[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2016, 22(6): 511-527.
- [4] Shu C, Sankaran B, Chaton C T, *et al.* Structural insights into the functions of TBK1 in innate antimicrobial immunity[J]. *Structure*, 2013, 21(7): 1137-1148.
- [5] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection[J]. *Immunological Reviews*, 2009, 227(1): 75-86.
- [6] Wang L Y, Li S T, Dorf M E. NEMO binds ubiquitinated TANK-binding kinase 1 (TBK1) to regulate innate immune responses to RNA viruses[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43756.
- [7] Miyahira A K, Shahangian A, Hwang S, *et al.* TANK-binding kinase-1 plays an important role during *in vitro* and *in vivo* type I IFN responses to DNA virus infections[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(4): 2248-2257.
- [8] Tenover B R, Ng S L, Chua M A, *et al.* Multiple functions of the IKK-related kinase IKK ϵ in interferon-mediated antiviral immunity[J]. *Science*, 2007, 315(5816): 1274-1278.
- [9] Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, *et al.* NAK is an I κ B kinase-activating kinase[J]. *Nature*, 2000, 404(6779): 778-782.
- [10] Pomerantz J L, Baltimore D. NF- κ B activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(23): 6694-6704.
- [11] Harris J, Oliére S, Sharma S, *et al.* Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK ϵ [J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(4): 2527-2535.
- [12] Chi H, Zhang Z B, Bøgdal J, *et al.* Cloning, expression analysis and promoter structure of TBK1 (TANK-binding kinase 1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1055-1063.
- [13] Yan C Z, Xiao J, Li J, *et al.* TBK1 of black carp plays an important role in host innate immune response against SVCV and GCRV[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 69: 108-118.
- [14] Feng X L, Su J G, Yang C R, *et al.* Molecular characterizations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TBK1 gene and its roles in regulating IFN-I pathway[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 45(2): 278-290.
- [15] Zhang D L, Yu D H, Chen J, *et al.* Expression profiles and interaction suggest TBK1 can be regulated by Nrdp1 in response to immune stimulation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 745-752.
- [16] Zhang L, Chen W Q, Hu Y W, *et al.* TBK1-like transcript negatively regulates the production of IFN and IFN-stimulated genes through RLRs-MAVS-TBK1 pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 135-143.
- [17] Hu Y, Huang Y H, Liu J X, *et al.* TBK1 from orange-spotted grouper exerts antiviral activity against fish viruses and regulates interferon response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 92-99.
- [18] Feng H, Liu H, Kong R Q, *et al.* Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1159-1169.
- [19] Yang C, Liu L Q, Liu J, *et al.* Black carp IRF5 interacts with TBK1 to trigger cell death following viral infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 100: 103426.
- [20] Jiang Y Y, Liu L Q, Yang S S, *et al.* Black carp PRMT6 inhibits TBK1-IRF3/7 signaling during the antiviral innate immune activation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 108-115.
- [21] Li J, Yan C Z, Liu J, *et al.* SIKE of black carp is a substrate of TBK1 and suppresses TBK1-mediated antiviral signaling[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 90: 157-164.
- [22] Yu N L, Xu X W, Qi G Q, *et al.* *Ctenopharyngodon idella* TBK1 activates innate immune response via IRF7[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 521-

- 527.
- [23] Li S, Lu L F, LaPatra S E, *et al.* Zebrafish STAT6 negatively regulates IFN α 1 production by attenuating the kinase activity of TANK-binding kinase 1[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 67: 189-201.
- [24] 罗鸣钟, 关瑞章, 靳恒. 五种鳗鲡的含肉率及肌肉营养成分分析[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(4): 714-722.
- Luo M Z, Guan R Z, Jin H. Analysis on the ratio of flesh content and the nutritional composition in the muscle of five species of eel[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(4): 714-722 (in Chinese).
- [25] 刘常标, 高飞. 福建省鳗鲡产业发展回顾与思考[J]. *渔业研究*, 2020, 42(2): 179-184.
- Liu C B, Gao F. Some thoughts on the development of eel industry of Fujian Province[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(2): 179-184 (in Chinese).
- [26] Feng J J, Lin P, Wang Y L, *et al.* Identification of a type I interferon (IFN) gene from Japanese eel and its expression analysis *in vivo* and *in vitro*[J]. *Agri Gene*, 2017, 5: 19-26.
- [27] Feng J J, Guo S L, Lin P, *et al.* Identification of a retinoic acid-inducible gene I from Japanese eel (*Anguilla japonica*) and expression analysis *in vivo* and *in vitro*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 249-256.
- [28] Wang T T, Lin P, Guo S L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 956-964.
- [29] Feng J J, Lin P, Wang Y L, *et al.* Molecular characterization, expression patterns, and functional analysis of toll-interacting protein (Tollip) in Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 52-64.
- [30] Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang T H, *et al.* Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKK ϵ and TBK1 on type I IFN production[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94999.
- [31] Tu D Q, Zhu Z H, Zhou A Y, *et al.* Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1[J]. *Cell reports*, 2013, 3(3): 747-758.
- [32] Feng J J, Xu Y K, Lin P, *et al.* Fish IKK α from Japanese eel (*Anguilla japonica*) can activate NF- κ B, AP1, and type I IFN signaling pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 982-992.
- [33] Fang R, Jiang Q, Zhou X, *et al.* MAVS activates TBK1 and IKK ϵ through TRAFs in NEMO dependent and independent manner[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(11): e1006720.
- [34] Fitzgerald K A, McWhirter S M, Faia K L, *et al.* IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(5): 491-496.
- [35] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, *et al.* Fish MITA serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(5): 2531-2539.
- [36] Rao Y L, Ji J F, Liao Z W, *et al.* GCRV hijacks TBK1 to evade IRF7-mediated antiviral immune responses in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 492-499.
- [37] Li S, Lu L F, Wang Z X, *et al.* Fish IRF6 is a positive regulator of IFN expression and involved in both of the MyD88 and TBK1 pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 262-268.
- [38] Hua K X, Li Y Q, Chen H J, *et al.* Functional characterization of duck TBK1 in IFN- β induction[J]. *Cytokine*, 2018, 111: 325-333.
- [39] Cheng Y Q, Ma J J, Liu Y X, *et al.* Chicken TBK1 interacts with STING and is involved in IFN- β signaling regulation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 77: 200-209.
- [40] Yang C M, Lee I T, Lin C C, *et al.* c-Src-dependent MAPKs/AP-1 activation is involved in TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heart-derived H9c2 cells[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 85(8): 1115-1123.
- [41] Xie X D, Zhang D H, Zhao B, *et al.* I κ B kinase ϵ and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(16): 6474-6479.

Molecular cloning and immune functional analysis of TBK1 gene in Japanese eel (*Anguilla japonica*)

XU Yuankai^{1,2}, PENG Xinwei^{1,3,4}, LIN Peng^{1,3,4}, WANG Yilei^{1,3,4}, FENG Jianjun^{1,3,4*}

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

2. Ningbo Institute of Oceanography, Ningbo 315832, China;

3. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

4. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: As an important serine/threonine kinase in the IKK family, TANK Binding Kinase 1 (TBK1) plays a critical role in innate immune response by activating NF- κ B and type I IFN signaling pathways in mammals. Although several studies have reported that fish TBK1 was involved in the regulation of type I IFN production, information on TBK1's close association with antimicrobial immune responses in the regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways is still limited in teleost fish. In order to elucidate the regulation of fish TBK1 in NF- κ B, I IFN, and MAPK immune response signaling pathways, the full-length cDNA of a TBK1 homologue, *AjTBK1*, was cloned by SMART RACE from Japanese eel, and its characteristics of expression in response to various PAMPs and *Aeromonas hydrophila* infection were investigated both *in vivo* and *in vitro* by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). In addition, the subcellular localization of *AjTBK1* GFP fusion protein and the induction of *AjTBK1* overexpression in the activation of NF- κ B, AP1 and type I IFN performed by Dual-Glo luciferase assay system were also detected. Amino acid sequence analysis indicated that *AjTBK1* encodes a polypeptide of 731 amino acids, which has the conserved N-terminal kinase domain (KD), a ubiquitin-like domain (ULD), a scaffold dimerization domain (SDD), and a C-terminal domain (CTD). The predicted three-dimensional structure of *AjTBK1* is similar to that of human TBK1, and *AjTBK1* is clustered with other fish families in the phylogenetic tree. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis revealed that *AjTBK1* is broadly expressed in a wide range of tissues, with high expression in liver and intestine. *In vivo*, the expression of *AjTBK1* in the liver of Japanese eel was significantly increased by 1.8- fold at 6h, 1.8-fold at 6 h, and 1.9-fold at 48 h after injection with LPS, viral mimic poly I:C and *A. hydrophila* infection, respectively. The *AjTBK1* expression in kidney was found to increase at 12 h and 24 h with 1.9- and 1.6-fold after *A. hydrophila* infection, but decreased following the stimulation of LPS and poly I:C. *In vitro*, the *AjTBK1* transcripts of Japanese eel liver cells were significantly enhanced to its peak by the treatment of LPS, poly I:C, PGN, or the 10⁶ CFU/mL *A. hydrophila*, being up to the 15.3-, 5.8-, 9.3- and 4.7-fold, respectively. Subcellular localization studies showed that *AjTBK1* was evenly distributed in the cytoplasm of HEK293 cells in natural state. *AjTBK1* was found to aggregate into spots in the cytoplasm upon the stimulation of LPS or poly I:C in HEK293 cells. Additionally, luciferase assays demonstrated that the *AjTBK1* overexpression significantly enhanced the activation of NF- κ B, AP1, and IFN β -responsive promoters in HEK293 cells, and robustly up-regulated the activation of NF- κ B, AP1, and IFN β -responsive promoter, which were 1.8-, 1.2-, and 1.92-fold induced at 24 h, 12 h, and 24 h after cotransfection, respectively. These results collectively suggest that *AjTBK1* may function as important positive regulation in innate immunity of host against antibacterial and antiviral infection likely via the activation of NF- κ B, AP1, and type I IFN signaling pathways.

Key words: *Anguilla japonica*; TANK binding kinase 1 (TBK1); signal pathway; subcellular localization; dual-luciferase reporter gene assay

Corresponding author: FENG Jianjun. E-mail: fengjj@jmu.edu.cn

Funding projects: Nature Science Foundation of Fujian Province (2020J01671); Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, P. R. China (RE202110); Key Laboratory and Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China (2020ESHML02)