

团头鲂*NK-lysin*基因鉴定和表达分析

詹柒凤^{1,2}, 丁祝进^{1,2}, 崔 蕾^{1,2}, 范 君^{1,2}, 王卫民¹, 刘 红^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为研究抗菌肽NK-LYSIN在团头鲂免疫系统中的可能功能, 本实验从团头鲂转录组中钓取到2个*NK-lysin*基因(*nkla*和*nklb*), 通过PCR扩增并测序验证其ORF序列。通过荧光定量PCR检测其在健康组织和嗜水气单胞菌感染后免疫组织中的表达, 并构建其原核表达体系。结果显示, 团头鲂*nkla*和*nklb*分别编码122和136个氨基酸, NKLA和NKLB均属于鞘脂激活蛋白样蛋白家族成员, 各含有6个高度保守的半胱氨酸及1个SapB结构域。在健康团头鲂各组织中, *nkla*在脾脏中表达量极高, 在肌肉和血液中表达量极低; 而*nklb*则在肠中表达量较高, 在头肾中表达量较低, 在其他组织均有表达。*nkla*和*nklb*不同的表达模式暗示它们可能存在功能上的分化。经嗜水气单胞菌感染后, 团头鲂*nkla*与*nklb*表达变化模式相似, 头肾中, 表达量在4 h时显著下降; 肝脏中, 表达量在4 h达到最高, 而后回落到正常水平; 在脾脏和肠中4 h时开始下降, 72 h时达到峰值, 暗示NK-lysin可能在团头鲂抗嗜水气单胞菌感染过程中发挥重要作用。另外, 本实验对*nkla*和*nklb*进行了原核表达, 为进一步研究NK-lysin的功能奠定了基础。

关键词: 团头鲂; 嗜水气单胞菌; 抗菌肽; NK-lysin; 荧光定量; 原核表达

中图分类号: Q 786; S 917.1

文献标志码: A

NK-LYSIN是机体自然杀伤细胞(natural killer cells, NK)和毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)分泌的小分子抗菌肽, 和人类颗粒溶素是同源多肽, 具有广谱的抗菌活性, 在机体免疫系统中发挥重要作用^[1]。

1996年, Andersson等^[2]从猪(*Sus Scrofa*)肠道组织中分离出与人颗粒溶素具有相似结构和抗菌特性的抗菌肽, 并命名为NK-LYSIN, 后在牛(*Bos taurus*)^[3]、马(*Equus caballus*)^[4]、鸡(*Gallus gallus*)^[5]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[6]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[7]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[8]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[9]等体内均被鉴定, 然而, 在大鼠(*Rattus norvegicus*)体内却没有发现NK-lysin同系物^[10]。且NK-lysin在哺乳动物中只有1个拷贝, 而在一些鱼类体内则有多个拷

贝, 例如斑点叉尾鲷体内有3个^[11], 斑马鱼体内有4个拷贝^[9]。人类颗粒溶素基因均具有5个外显子和4个内含子^[12], 斑点叉尾鲷^[11]、半滑舌鳎^[8] NK-lysin基因结构亦相同。NK-LYSIN是鞘脂激活蛋白样蛋白(saposin-like proteins, SAPLIP)家族的成员, 因此它具有与细胞膜结合的能力, 并能够改变细胞膜的完整性^[13]。大量研究证明NK-LYSIN能够直接杀灭细菌、真菌、原生动物等^[5, 14], 且具有抗癌活性^[15]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲂属(*Megalobrama*), 俗称武昌鱼, 是我国重要的淡水养殖鱼类^[16]。由嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染引起的细菌性败血症是团头鲂的主要病害, 可导致鱼体出血、溃疡、肠道出

收稿日期: 2016-01-18 修回日期: 2016-04-28

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD26B02); 中央高校基本科研业务费(2014PY042, 2015PY134)

通信作者: 刘红, E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

血、肝脏发白、腹腔积水等严重症状,最终导致鱼类大量死亡,造成巨大经济损失^[17]。而抗菌肽具有广谱抗菌活性,且不产生耐药性,被认为是替代抗生素的新型药物,具有广阔的开发前景^[18]。本实验拟从团头鲂转录组中钓取*NK-lysin*基因,研究其在健康团头鲂各组织中的表达差异,及对细菌刺激的免疫应答反应,并摸索*nkla*和*nk1b*的原核表达,为深入研究其蛋白功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用5月龄团头鲂均采自湖北百容水产良种有限公司,将鱼充氧打包带回华中农业大学水产学院实验室进行暂养,待其适应环境后开始取样。实验设置3个生物学重复,每个重复含7尾鱼,将待取样的鱼用乌来糖进行麻醉,在冰上取健康团头鲂的肝脏、脾脏、肾脏、头肾、肠、鳃、心脏、肌肉、血液和脑10个组织,取样后立即放入液氮中进行速冻,置于-80℃长期保存。感染实验所用的嗜水气单胞菌菌株为实验室保存菌种。用浓度为 1.0×10^6 CFU/mL的嗜水气单胞菌对实验鱼进行腹腔注射感染,每尾鱼注射0.1 mL,对照组注射等量0.75%的生理盐水。在注射后0、4、12、24、72和120 h分别采集对照组和实验组的肝脏、脾脏、肠和头肾等组织,取样后立即放入液氮中进行速冻,置于-80℃长期保存。

1.2 主要试剂

cDNA反转录试剂盒PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连), PCR 纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒(Axygen, 美国), T₄ DNA连接酶(艾德莱, 北京), Taq酶、Rosetta (DE3)(康为, 北京), Trans5α菌株(全式金, 北京), Trizol试剂、限制性内切酶EcoR I 和Xho I (Invitrogen, 美国), SYBR Green Mix (罗氏, 瑞士), pGEX-4T-1载体由本实验室保存;合成引物及测序均由擎科生物(武汉)完成。

1.3 总RNA提取及cDNA合成

用Trizol法提取各组织总RNA,取1 μL RNA,用紫外分光光度计(Nanodrop 2000, 美国)测定其

浓度以及OD₂₆₀/OD₂₈₀的值。另取1 μL RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品的纯度及完整度。提取的RNA按照TaKaRa公司反转录试剂盒说明书进行反转录,得到cDNA第一链。

1.4 序列验证

根据团头鲂转录组注释信息,检索到2条*NK-lysins*序列,并通过NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)及ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析其ORF区域。用Primer premier 5.0软件设计特异性引物ORF.nkla-F/R和ORF.nk1b-F/R扩增ORF序列(表1),以脾脏cDNA为模板扩增PCR体系:cDNA模板1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL, dNTP 0.4 μL, Taq酶0.15 μL, 10×Taq Buffer 1 μL,用ddH₂O将总体积补充至10 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min;32个循环:95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s;72℃终延伸5 min。按照DNA快速回收纯化试剂盒说明书回收DNA片段,并用紫外分光光度计测其浓度和纯度,之后取1.5 μL目的产物与0.5 μL pBlue-T载体在23℃下快速连接30 min,连接产物经热激转入Trans 5α中,挑选阳性克隆测序验证。

1.5 NK-lysin序列分析及系统进化树构建

序列验证正确后,用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)推测氨基酸的分子量大小及其理论等电点,用DNASTAR翻译得到氨基酸序列,用SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽,SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测其结构域。不同物种NK-lysins氨基酸序列用Clustal W2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行多重序列比对,对其保守性进行分析。用MEGA 6.0软件构建NJ系统进化树。

1.6 荧光定量PCR

设计荧光定量PCR特异引物nkla-F/R和nk1b-F/R(表1),根据苏利娜等^[19]方法选择18S rRNA作为本实验内参基因,采用双标准曲线的方法检测*nkla*和*nk1b*在团头鲂不同组织及感染后主要免疫组织中的相对表达量。荧光定量体系包括10 μL SYBR Green Mix、上下游引物各0.8 μmol/L、模板1 μL,用ddH₂O将体系补充至20 μL,其反应条

表 1 本研究所用的引物
Tab. 1 Information of primers used in the study

引物名称 primers' names	序列(5'-3') primers' sequences	目的 purposes
ORF.nkla-F	ATGCTGCGAAGTATCATCTGG	ORF序列验证
ORF.nkla-R	GAACTAACCATTCTCCATGCC	
ORF.nklb-F	CTGGTTAGAGATCATCTGCGAAG	
ORF.nklb-R	TTTCACAACTGTAAAAAGCAAGA	
nkla-F	GAAGCTGTCGATGGTCTGTGAT	荧光定量
nkla-R	TGGTCTGGCATCATCAGTAGTT	
nklb-F	TCTGCGAAGATGCTCCGAAAC	
nklb-R	CCTCAGCAGAGTCCACTTCACG	
18S rRNA-F	CGGAGGTTCTGAAGACGATCA	原核表达
18S rRNA-R	GGGTCGGCATCGTTTACG	
Ma.p nkla-F	CGGAATTCTTTCCTACTGGGAAATGCACAAG	
Ma.p nkla-R	CCGCTCGAGTTTCTTGCAAACACTTATGTTAA	
Ma.p nklb-F	CGGAATTCGCTCACTGGGAGATTCGTGAA	
Ma.p nklb-R	CCGCTCGAGCAAACCTGTAAAAAGCAAGAATGA	

件：95 ℃预变性30 s；40个循环：95 ℃变性5 s，58 ℃退火20 s；72 ℃延伸2 min。目的基因和内参基因的表达式根据标准曲线进行计算，然后用目的基因表达式与内参基因表达式的比值作为目的基因的相对表达式。数据用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，并用Graphpad进行多重比较和作图，其显著性水平设为 $P < 0.05$ ，极显著性水平设为 $P < 0.01$ 。

1.7 原核表达体系构建

以去掉信号肽序列和终止密码子的成熟肽序列为模板设计nkla和nklb的原核表达扩增引物Ma.p-nkla-F/R和Ma.p-nklb-F/R(表1)，在上游引物添加EcoR I酶切位点及保护碱基CG，下游引物添加Xho I酶切位点及保护碱基CCG。普通PCR扩增后，液体回收DNA片段，将产物和pGEX-4T-1载体同时用EcoR I和Xho I双酶切10 h，琼脂糖凝胶电泳检测。双酶切成功后，将其纯化回收，按照基因与载体体积比为5：1的比例，在T₄连接酶作用下，23 ℃快速连接30 min，热激转化到原核表达菌株Rosetta (DE3)中，挑选阳性克隆测序验证。载体构建成功后，进行原核表达诱导，以菌液与LB培养基体积比为1：50的比

例，在37 ℃、180 r/min摇床中培养，当OD₆₀₀值为0.6时，加入IPTG诱导剂诱导6 h后取出菌液，超声波破碎，4 ℃、10 000 r/min离心10 min，分离上清液和沉淀，SDS-PAGE检测其融合蛋白表达情况，并用BandScan软件分析目的蛋白比例。

2 结果与分析

2.1 团头鲂nkla和nklb的序列分析

从团头鲂转录组中获得nkla和nklb序列，并验证其ORF序列，nkla ORF全长369 bp，编码122个氨基酸(图1-a)，DNASTAR预测其等电点为6.71，分子质量为14 ku；nklb ORF全长411 bp，编码136个氨基酸(图1-b)，DNASTAR预测其等电点为6.72，分子质量为15.6 ku。多氨基酸序列比对分析显示(图2)，NK-lysin的N端均含有信号肽，6个高度保守半胱氨酸及1个SapB结构域，它属于鞘脂激活蛋白样蛋白家族成员，6个半胱氨酸可形成3对分子内二硫键，这对于NK-lysin的生物学功能具有重要意义。系统进化分析显示，鱼类NK-lysin单独聚为一支，团头鲂NK-lysin基因与斑马鱼亲缘关系最近，其次是半滑舌鳎和斑点叉尾鲷，哺乳动物则聚为另一支(图3)。

```

1   ATGCTGCGAAGTATCATCCTGGTCACCCTGCTGATATCCTCAGTTTGTGCTTTTCACTGGGAAATGCACAAGGAA
1   M L R S I I L V T L L I S S V C A F H W E M H K E
76  GAGTCTAATGAAATGAAATTGAAGAAAGCTCTGGTGATATACAAACAGAACAACTCCCTGGAATGTGCTGGGTT
26  E S N E N E I E E S S G D I Q T E Q L P G M C W V
151 TGCAAGTGGGCCATGAAGAAGGTGAAAAACAGATATCCAATGGAACAACTCAGGACGAAATTAAGAAGCTG
51  C K W A M K K V K K Q I S N G T T Q D E I K K K L
226 TCGATGGTCTGTGATCAGATCGGGTTCCTAAAGTCACTGTGTAGGAAGTTTGTGAACAAGTACACGGATACCCCTG
76  S M V C D Q I G F L K S L C R K F V N K Y T D T L
301 GTCGAAGAAGTTCAACTACTGATGATGCCAGAACCATCTGTGTTAACATAAGTGTGTCAGAAATAG
101 V E E L S T T D D A R T I C V N I S V C K K *
(a)

1   ATGCTCCGAAACGTCCTTTCTTGTCAGCTTGCTCATATATGCAGTCTGTGCAGCTCACTGGGAGATTGCGTGAAGTG
1   M L R N V F L V S L L I Y A V C A A H W E I R E V
76  GACTCTGCTGAGGATGAACCTTGAAGAAATCCTTGCTGACATGACGGAACAGCAAATATTTGATAAGTGCAGGATA
26  D S A E D E L E E I L A D M T E Q Q I F D K C A I
151 TGTAATACATCATGAAGAAGGTGAAAAAAGAATCCCTCTAATGCAACGCCGGATGAAATCAAAACCAAGCTG
51  C K Y I M K K V K K R I P S N A T P D E I K T K L
226 AACAAACCTGTGAGAAGGCCAGGCTGCTGAAATCTAAGTGCAAGCACTTTGTTGAGAAGTATTTGAGCACTCTG
76  N N T C E K A R L L K S K C K H F V E K Y L S T L
301 ATTGATGAGCTGATGACTGATGACGGGCCAAAACCATCTGTATTAACTTAATGCCTGCAAGCCAGAACCACCC
101 I D E L M T D D G P K T I C I K L N A C K P E P P
376 ATAAAGGAGTTCATTCTTGCTTTTAACAGTTTGTGA
126 I K E F I L A F N S L *
(b)

```

图 1 团头鲂 *nkla* (a) 和 *nk1b* (b) 基因 ORF 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 1 The ORF sequence and encoded amino acids of the blunt snout bream *nkla* (a) and *nk1b* (b) genes

2.2 *nkla* 和 *nk1b* 的组织分布

荧光定量 PCR 结果显示, *nkla* 在脾脏中表达量极高, 为其他组织中的数百倍, 而在肌肉、血液中表达量极低, 在脑、肾脏、头肾、肠、鳃、心脏和肝脏中均有明显表达(图4); *nk1b* 的组织表达模式则不相同, 在肠中表达量相对较高, 在脾脏、头肾中表达相对较低, 在其他组织中均有表达。*nkla* 和 *nk1b* 不同的表达模式暗示着不同的 NK-lynsins 可能存在功能上的分化。

2.3 *nkla* 和 *nk1b* 在嗜水气单胞菌感染后的表达

嗜水气单胞菌感染后, 团头鲂 *nkla* 和 *nk1b* 两个基因在不同组织中的表达变化模式相似, 在头肾中, *nkla* 在感染后表达量始终呈显著下降水平, *nk1b* 则在 4、24 及 120 h 时呈显著下降水平。*nkla* 在肝脏中, 4 h 时上升到最高水平, 之后回落; 在脾脏中呈先下降后上升的趋势, 72 h 时升到最高水平, 120 h 恢复正常。在肠中, *nkla*、*nk1b* 表达量在 4 h 时显著降低, 并分别在 72 h 和 24 h 时达到最高值, 120 h 则回到正常水平图 5。*nkla* 和 *nk1b* 在主要免疫组织中的表达变化暗示着它们可能在团头鲂抗嗜水气单胞菌感染过程中发挥重要作用。

2.4 *nkla* 和 *nk1b* 的原核表达

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 同时双酶切 pGEX-4T-1 载

体质粒和目的片段, 琼脂糖凝胶可检测是否酶切完全。而 *nkla* 和 *nk1b* 片段中双酶切位点在两端, 且片段较短, 因此酶切后无法用琼脂糖凝胶检测, 但在酶切位点两端加保护碱基, 可提高酶切效率和准确性。在 *T*₄ 连接酶作用下, 将目的片段连接并转化到 Rosetta (DE3) 表达载体中, 测序结果显示正确构建了重组质粒 *nkla*-pGEX 和 *nk1b*-pGEX。

在 37 °C、180 r/min 的条件下, 当菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时, 加入不同浓度 IPTG 诱导剂诱导 6 h, 浓度梯度设置为 0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L。离心收集菌体, 并用超声波破碎, 分离上清液和沉淀, 用 12 % SDS-PAGE 检测融合蛋白表达情况。*nkla* 和 *nk1b* 成熟肽大小分别为 12.2 和 13.7 ku, GST 标签蛋白大小约 26 ku, 因此 *nkla* 和 *nk1b* 融合蛋白大小分别约为 38.2 和 39.7 ku, 与图中条带位置基本一致。由图 6 可知, IPTG 诱导剂浓度对融合蛋白的表达影响不大, 融合蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中。用 BandScan 软件扫描结果显示, *nkla*-pGEX 融合蛋白在 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L 时, 目的蛋白占菌体总蛋白比率最高, 为 33.8 %; *nk1b*-pGEX 融合蛋白在 IPTG 浓度为 0.02 mmol/L 时, 这一比率最高, 为 48.8 %。

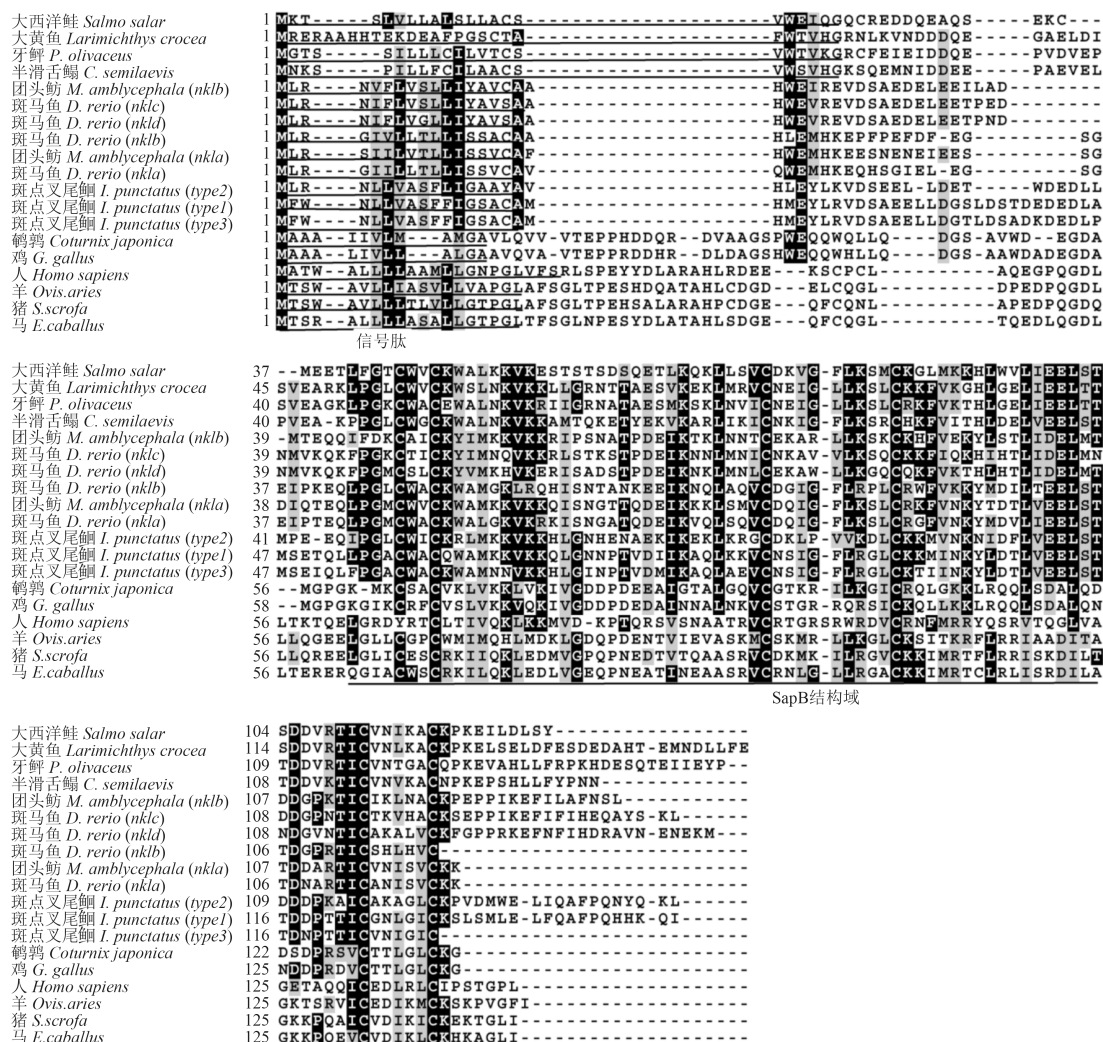


图2 团头鲂与其他物种NK-LYSIN氨基酸多序列比对

用Clustal W2比对, Boxshade进行阴影标识, 信号肽和SapB结构域分别用下划线标识, 基因登录号: ACI68092(大西洋鲑 *S. salar*)、NP_001290252(大黄花 *L. crocea*)、AU260499(牙鲈 *P. olivaceus*)、AGM2163799(半滑舌鲷 *C. semilaevis*)、KP100115(斑马鱼 *D. rerio nkla*)、KP100116(斑马鱼 *D. rerio nklb*)、KP100117(斑马鱼 *D. rerio nkld*)、KP100118(斑马鱼 *D. rerio nkla*)、NP_001187137(斑点叉尾鲷 *I. punctatus nk11*)、NP_001187232(斑点叉尾鲷 *I. punctatus nk12*)、NP_001187147(斑点叉尾鲷 *I. punctatus nk13*)、BAN78656(鸬鹚 *C. japonica*)、NP_001038145(鸡 *G. gallus*)、NP_006424(人 *H. sapiens*)、NP_001265684(猪 *S. scrofa*)、NP_001075398(马 *E. caballus*)、JX559777(羊 *O. aries*)

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of NK-LYSIN from blunt snout bream and other species

Clustal W2 and Boxshade are used to make this figure, signal peptide and SapB domain are underlined, GenBank Accession number: ACI68092(*S. salar*), NP_001290252(*L. crocea*), AU260499(*P. olivaceus*), AGM2163799(*C. semilaevis*), KP100115(*D. rerio nkla*), KP100116(*D. rerio nklb*), KP100117(*D. rerio nkld*), KP100118(*D. rerio nkla*), NP_001187137(*I. punctatus nk11*), NP_001187232(*I. punctatus nk12*), NP_001187147(*I. punctatus nk13*), BAN78656(*C. japonica*), NP_001038145(*G. gallus*), NP_006424(*H. sapiens*), NP_001265684(*S. scrofa*), NP_001075398(*E. caballus*), JX559777(*O. aries*)

3 讨论

本研究从团头鲂转录组中钓取到了2个NK-lysin基因(*nkla*和*nklb*), 并测序验证, 通过序列比对发现*nkla*和*nklb*有69%同源性, 与斑马鱼序列相似性较高。鱼类中存在多个拷贝的NK-lysin, 哺乳动物只有1个拷贝, 本实验进一步证实NK-lysin在骨鳔总目(Ostariophysi)^[20-21]中可能存在特异

性分化。序列分析显示, NK-LYSIN在进化过程中高度保守, 含6个半胱氨酸, 可形成3个分子内二硫键^[22], 而NK-lysin的抗菌活性高度依赖其二硫键^[23], 研究证明鞘脂激活蛋白样家族SapB结构域参与鞘脂的降解代谢^[24], NK-lysin的这一功能域与其抗菌功能和抗癌功能的实现密切相关。对猪的NK-LYSIN蛋白研究发现, 其空间结构由

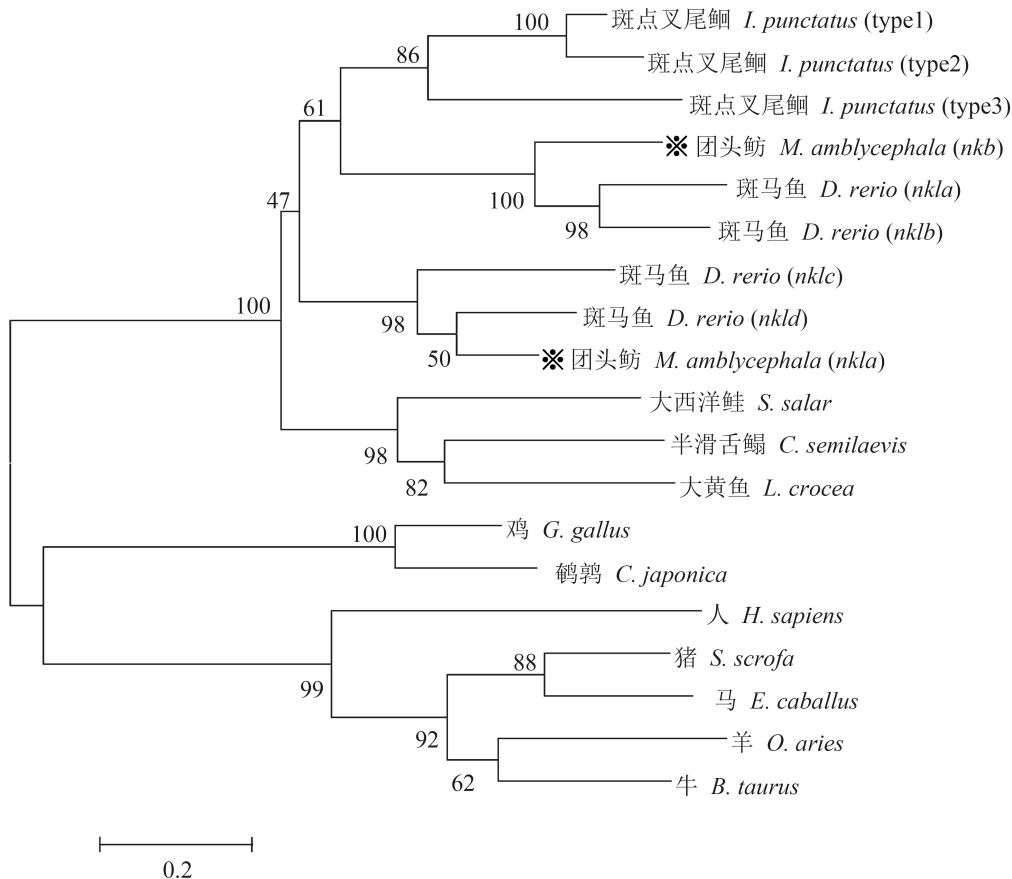


图 3 *NK-lysins*基因编码氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by *NK-lysins*

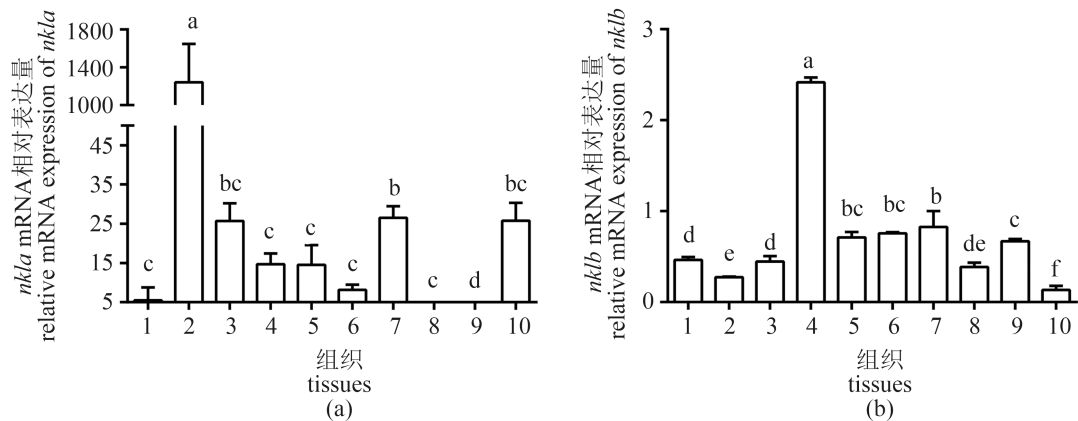


图 4 团头鲂不同组织中 *nkla* (a)和 *nkla* (b)基因mRNA的相对表达量

不同字母表示有显著性差异。1.肝脏；2.脾脏；3.肾脏；4.肠；5.鳃；6.心脏；7.脑；8.肌肉；9.血液；10.头肾

Fig. 4 The relative expression levels of the *nkla* (a) and *nkla* (b) genes in different tissues of blunt snout bream

Different letters mean significant differences. 1. liver; 2. spleen; 3. kidney; 4. intestine; 5. gill; 6. heart; 7. brain; 8. muscle; 9. blood; 10. head kidney

5个 α 螺旋组成^[19]。事实上，NK-LYSIN的肽链长度、 α 螺旋结构、疏水性、两亲性、净电荷等都与其活性相关^[25-26]。在进化树分析中*nkla*和*nkla*不是首先聚为一支，而是与斑马鱼不同的*NK-lysins*聚为一支，且*nkla*与其他物种基因亲缘关系更

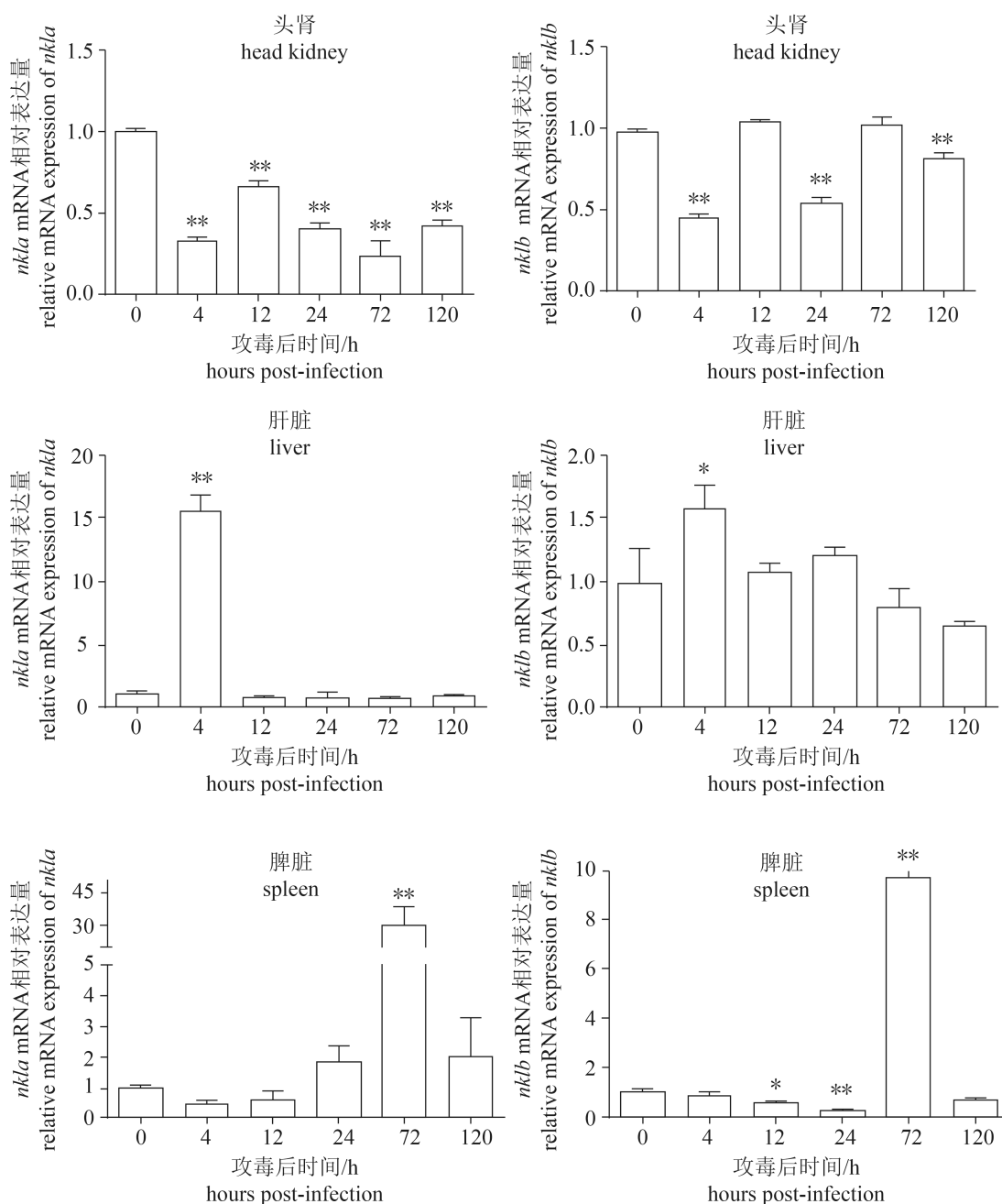
近，说明*nkla*在进化过程中更为保守。因此，*NK-lysins*序列和结构的分析对研究*NK-lysins*的生物学功能具有重要意义。

团头鲂组织表达结果显示，*nkla*在脾脏中的表达量极高，而在肌肉和血液中表达量极低，

在其他组织中均有表达。与 *nkla* 的表达模式不同, *nkla* 的组织表达差异较小, 表现在肠中相对较高, 在头肾中相对较低。 *nkla* 和 *nkla* 不同的组织表达模式与斑马鱼中的结果相似^[9], 这暗示 *NK-lysin* 在基因复制和进化过程中可能存在功能上的分化。其他鱼类中, 半滑舌鳎 *NK-lysin* 在免疫组织中高表达^[8]; 牙鲆 *NK-lysin* 主要在鳃、心脏、头肾、肠中表达较高, 在脑、皮肤和胃中基本不表达^[7]; 斑点叉尾鲷 *NK-lysin* 在鳃、头肾、肠、肾脏等组织中高表达, 而在肌肉中不表达^[11], 这与本研究中 *nkla* 的组织表达结果相似。在哺乳

动物中, 牛 *NK-lysin* 在脾脏和淋巴结中表达相对较高, 而在肝脏和肾脏中表达相对较低^[3]; 马 *NK-lysin* 在不同的白细胞系中均有表达^[4]; 鸡 *NK-lysin* 在小肠上皮淋巴细胞中有较高表达, 在脾脏及外围的血淋巴细胞中有中等表达, 而在胸腺和囊淋巴细胞中表达量最低^[5]。 *NK-lysin* 在免疫组织中的高表达, 暗示着其功能可能与机体免疫应答有关。

嗜水气单胞菌感染后, 相对于对照组, 团头鲂 *nkla* 在头肾中始终呈下降表达, 在 72 h 时下降到最低水平; *nkla* 则在 4、72 和 120 h 呈显著性



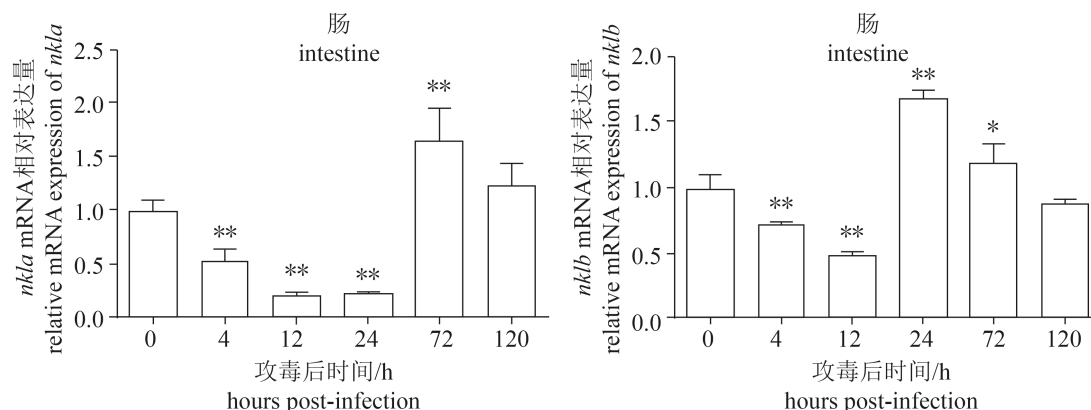


图 5 团头鲂 *nkla* 和 *nk1b* 基因在嗜水气单胞菌感染后的头肾、肝脏、脾脏、肠中的相对表达量

*. 差异显著 ($P < 0.05$), **. 差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 5 Relative expression of *nkla* and *nk1b* transcripts in head kidney, liver, spleen and intestine after infection of *A. hydrophila* in blunt snout bream

*. statistical differences ($P < 0.05$), **. extremely significant differences ($P < 0.01$)

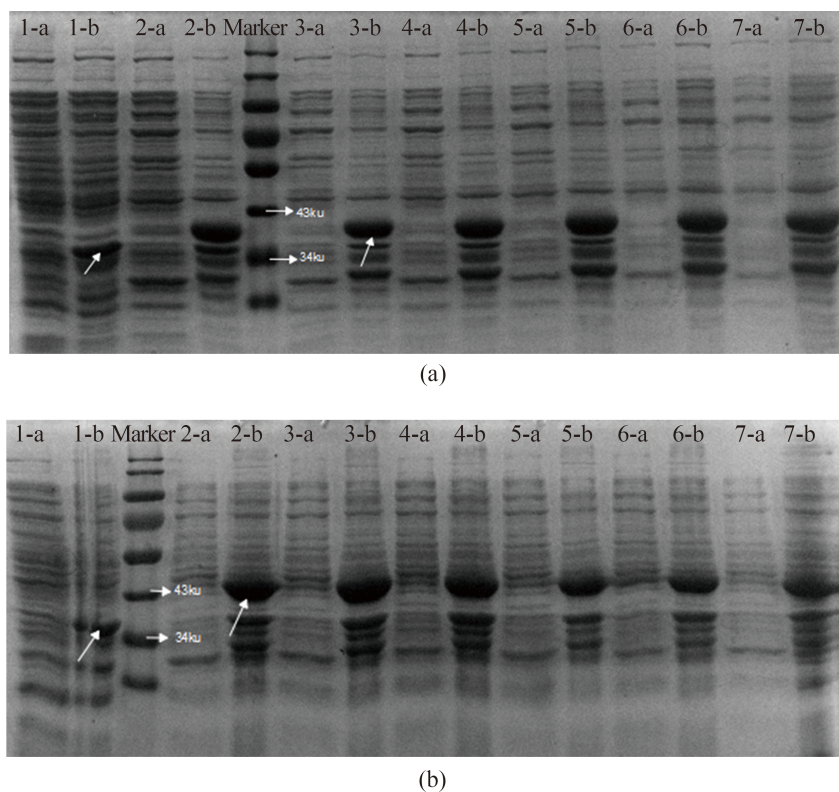


图 6 SDS-PAGE 检测不同浓度 IPTG 对 *nkla* (a) 和 *nk1b* (b) 重组蛋白表达的影响

1~7 代表 IPTG 浓度: 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mmol/L, (a) 细菌破碎后的上清液, (b) 细菌破碎后的沉淀

Fig. 6 Effects of IPTG concentrations on production of *nkla* (a) and *nk1b* (b) recombinant proteins

1~7 represent IPTG concentrations: 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mmol/L. (a) supernatant, (b) precipitate

降低, 这可能由于头肾是鱼类最主要的免疫组织; 在肝脏和脾脏中, *nkla* 和 *nk1b* 分别在 4 和 72 h 时上升到最高水平, 而后恢复正常, 这与在半滑舌鲷中的研究结果相似^[27]; 在肠中, 其表达量

则是从 4 h 开始显著性下降, 而后在 72 和 24 h 时分别达到最高。在细菌感染后的 4 h 时, *nkla* 和 *nk1b* 的快速变化暗示着它们在团头鲂抗嗜水气单胞菌的先天性免疫作用中发挥着一定的作用。

与其他抗菌肽不同, *NK-LYSIN*由CTL细胞和NK细胞分泌, 它不仅参与机体非特异性免疫, 与机体特异性免疫也有关^[1], 然而其在免疫系统中的具体功能及作用机制尚不清楚。正如Sarson等^[28]的实验中, 马立克氏病毒感染鸡后, *NK-lysin*基因表达上调; 而Rauf等^[29]则发现, 传染性法氏囊病感染后, *NK-lysin*基因表达明显受到抑制。所以对于不同的免疫刺激, *NK-lysin*的反应和保护能力是不同的。

另外, 本实验还构建了*nkla*和*nk1b*的原核表达系统, 因为生物体内的天然抗菌肽含量低, 提纯过程繁琐、得率低, 人工合成的抗菌肽成本高且效果差, 因此, 近年来主要通过基因工程技术在宿主细胞内进行抗菌肽基因表达, 以期获得相应蛋白, 且通过基因工程技术还可以修饰改造基因序列, 为实现大规模生产提供理论基础。而大肠杆菌表达系统则成为表达抗菌肽的首选, 提供融合表达标签, 且操作简单, 效益较高。但由于抗菌肽本身具有抗菌作用, 可能抑制菌株的繁殖和表达, 且分子量较小, 容易被分解, 所以一般采用融合表达的方式, 融合抗菌肽的标签可以暂时改变抗菌肽的分子构象, 从而降低其对宿主菌的毒性^[30]。本研究构建了*nkla*和*nk1b*的pGEX-4T-1的原核表达体系, 融合蛋白主要以包涵体的形式在沉淀中检出, 且占菌体总蛋白比率较高, 表明通过原核表达的方式获得抗菌肽*NK-LYSIN*蛋白质是可行的, 为实现团头鲂抗菌药物的开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Fischer U, Koppang E O, Nakanishi T. Teleost T and NK cell immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 197-206.
- [2] Andersson M, Gunne H, Agerberth B, *et al.* *NK-lysin*, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 54(1-4): 123-126.
- [3] Endsley J J, Furrer J L, Endsley M A, *et al.* Characterization of bovine homologues of Granulysin and NK-lysin[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(4): 2607-2614.
- [4] Davis E G, Sang Y M, Rush B, *et al.* Molecular cloning and characterization of equine *NK-lysin*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, 105(1-2): 163-169.
- [5] Hong Y H, Lillehoj H S, Dalloul R A, *et al.* Molecular cloning and characterization of chicken *NK-lysin*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 110(3-4): 339-347.
- [6] Wang Q, Bao B L, Wang Y P, *et al.* Characterization of a *NK-lysin* antimicrobial peptide gene from channel catfish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(3): 419-426.
- [7] Hirono I, Kondo H, Koyama T, *et al.* Characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) *NK-lysin*, an antimicrobial peptide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 567-575.
- [8] Zhang M, Long H, Sun L. A *NK-lysin* from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 40(3-4): 258-265.
- [9] Pereiro P, Varela M, Diaz-Rosales P, *et al.* Zebrafish *NK-lysins*: first insights about their cellular and functional diversification[J]. *Development & Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 148-159.
- [10] Clayberger C, Finn M W, Wang T H, *et al.* 15 kDa *granulysin* causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188(12): 6119-6126.
- [11] Wang Q, Wang Y P, Xu P, *et al.* *NK-lysin* of channel catfish: Gene triplication, sequence variation, and expression analysis[J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(10): 1676-1686.
- [12] Houchins J P, Kricek F, Chujor C S N, *et al.* Genomic structure of *NKG5*, a human NK and T cell-specific activation gene[J]. *Immunogenetics*, 1993, 37(2): 102-107.
- [13] Ruyschaert J M, Goormaghtigh E, Homblé F, *et al.* Lipid membrane binding of *NK-lysin*[J]. *FEBS Letters*, 1998, 425(2): 341-344.
- [14] 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.
- [15] Fan K H, Li H Q, Wang Z R, *et al.* Expression and purification of the recombinant porcine *NK-lysin* in *Pichia pastoris* and observation of anticancer activity in vitro[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 36(3): 251-258.

- 2014, 46(1): 65-70.
- [16] 柯鸿文. 中国团头鲂的养殖[J]. 水产科技情报, 1986(5): 1-5.
Ke H W. The culture of Chinese blunt snout bream[J]. Fisheries Science & Technology Information, 1986(5): 1-5 (in Chinese).
- [17] 吴建军. 团头鲂细菌性败血症的防治[J]. 中国水产, 2007(10): 58-59.
Wu J J. The precaution of bacterial septicemia in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. China Fisheries, 2007(10): 58-59 (in Chinese).
- [18] Masso-Silva J A, Diamond G. Antimicrobial peptides from fish[J]. Pharmaceuticals, 2014, 7(3): 265-310.
- [19] 苏利娜, 丁祝进, 李鸿, 等. 团头鲂*Dmrt4*基因的克隆与表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 110-116.
Su L N, Ding Z J, Li H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt4* gene in *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(6): 110-116 (in Chinese).
- [20] Taylor J S, Braasch I, Frickey T, *et al.* Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish[J]. Genome Research, 2003, 13(3): 382-390.
- [21] de la Serrana D G, Mareco E A, Johnston I A. Systematic variation in the pattern of gene paralog retention between the teleost superorders Ostariophysi and Acanthopterygii[J]. Genome Biology and Evolution, 2014, 6(4): 981-987.
- [22] Liepinsh E, Andersson M, Ruyschaert J M, *et al.* Saposin fold revealed by the NMR structure of *NK-lysin*[J]. Natural Structural Biology, 1997, 4(10): 793-795.
- [23] Andersson M, Holmgren A, Spyrou G. *NK-lysin*, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(17): 10116-10120.
- [24] Vaccaro A M, Salvioli R, Tatti M, *et al.* Saposins and their interaction with lipids[J]. Neurochemical Research, 1999, 24(2): 307-314.
- [25] 张殿卿. 合成绵羊抗菌肽NK-Lysin的生物学功能及其对雏鸡沙门氏菌感染的治疗研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
Zhang D Q. The biological functions of sheep Synthetic antimicrobial peptide *NK-Lysin* and it's treatment studies in *Salmonella* contamination chicken[D]. Shihezi: Shihezi University, 2014 (in Chinese).
- [26] Vondenhoff G H M, van Aerschot A. Microcin C: biosynthesis, mode of action, and potential as a lead in antibiotics development[J]. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2011, 30(7-8): 465-474.
- [27] 王亚楠. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)两种抗菌肽和细胞因子*Midkine*的克隆与表达分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Wang Y N. Isolation and characterization of two antimicrobial peptides and *Midkine* in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [28] Sarson A J, Abdul-Careem M F, Read L R, *et al.* Expression of cytotoxicity-associated genes in Marek's disease virus-infected chickens[J]. Viral Immunology, 2008, 21(2): 267-272.
- [29] Rauf A, Khatri M, Murgia M V, *et al.* Expression of perforin-granzyme pathway genes in the bursa of infectious bursal disease virus-infected chickens[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(5): 620-627.
- [30] Barrell P J, Liew O W, Conner A J. Expressing an antibacterial protein in bacteria for raising antibodies[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 33(1): 153-159.

Identification, characterization and expression of *NK-lysin* in *Megalobrama amblycephala*

ZHAN Qifeng^{1,2}, DING Zhujin^{1,2}, CUI Lei^{1,2}, FAN Jun^{1,2}, WANG Weimin¹, LIU Hong^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: NK-LYSINs are small cationic antimicrobial peptides produced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. Antimicrobial peptides, the important components of innate immune systems, have attracted scientists' attention because they can be served as novel antimicrobials. *Megalobrama amblycephala* is an important freshwater fish cultured in our country. A serious disease, bacterial septicemia caused by *Aeromonas hydrophila* is a big threat to *M. amblycephala*, which might lead to a high mortality. In order to understand the possible function of *NK-lysin* in the *M. amblycephala* immune system, we amplified and characterized the *nkla* and *nklb* genes in *M. amblycephala*, which encode 122 and 136 amino acids respectively. Sequences analysis showed that *NK-lysin* belong to the saposin-like protein family, with 6 highly conserved cysteines and a SapB domain. In different healthy fish tissues, the *M. amblycephala nkla* was highly expressed in the spleen, lowly in the muscle and blood, While *nklb* had the highest expression in the intestine and the relative lower level in the head kidney. However, after *A. hydrophila* infection, the *M. amblycephala nkla* and *nklb* shared the same expression trend. In the head kidney, the mRNA level decreased remarkably at 4 h. In the liver, the expression increased to the peak significantly at 4 h and then fell down to the normal level. However, in the spleen and intestine, the expression fell to the bottom at 12 h and then reached the peak at 72 h. These results suggest that *NK-lysin* might play a vital role in the *M. amblycephala* defense against *A. hydrophila* infection. What's more, we constructed prokaryotic expression system and obtained the recombinant proteins of *M. amblycephala nkla* and *nklb*, which may provide information for *NK-lysin*'s further functional study.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *Aeromonas hydrophila*; antimicrobial peptides; *NK-lysin*; Real-time PCR; prokaryotic expression system

Corresponding author: LIU Hong. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: Key Technologies R&D Program of China (2012BAD26B02); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2014PY042, 2015PY134)