

一种鲷鱼诺卡氏菌酪氨酸蛋白磷酸酶基因的克隆及功能初步研究

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

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 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;

3. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518108)

摘要: 鲷鱼诺卡氏菌是鱼类诺卡氏菌病的主要病原, 可导致鱼类慢性系统性肉芽肿疾病。鲷鱼诺卡氏菌全基因组序列分析发现了一个酪氨酸蛋白磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)基因, 生物信息学分析显示该基因很可能编码一个靶向定位于宿主细胞线粒体的分泌蛋白。本实验对鲷鱼诺卡氏菌PTP进行了基因克隆、分泌蛋白鉴定、亚细胞定位、过表达和线粒体膜电位检测, 结果显示, 在鲷鱼诺卡氏菌胞外产物中质谱鉴定到了PTP肽段, 证实其为分泌蛋白。亚细胞定位研究观察到PTP-GFP融合蛋白均匀地分布在FHM细胞中, 与线粒体分布不重合, 说明鲷鱼诺卡氏菌PTP蛋白并未靶向定位于线粒体。亚细胞定位和过表达研究都显示PTP蛋白在FHM细胞中表达后, 细胞核出现固缩浓染、凋亡小体等明显的细胞凋亡特征。通过线粒体膜电位检测表明, 在pcDNA-PTP转染后48 h, 线粒体跨膜电位被明显破坏, 说明鲷鱼诺卡氏菌PTP很可能是一种可诱导细胞凋亡的细菌蛋白。通过对鲷鱼诺卡氏菌PTP开展基因克隆和功能初步研究, 为进一步揭示该基因的功能和深入了解鲷鱼诺卡氏菌的分子致病机理奠定了基础。

关键词: 鲷鱼诺卡氏菌; 酪氨酸蛋白磷酸酶; 分泌蛋白; 亚细胞定位; 细胞凋亡

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

鲷鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)是鱼类诺卡氏菌病的主要致病菌, 可通过饵料、鳃或伤口等途径感染鱼体, 并引发慢性系统性肉芽肿疾病^[1]。据报道, 鲷鱼诺卡氏菌可感染卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、大西洋白姑鱼(*Argyrosomus regius*)、乌鳢(*Channa maculata*)、加州鲈(*Micropterus salmoides*)等20多种海、淡水鱼类, 导致鱼类慢性死亡, 并引发体表溃疡而降低成鱼商品价值。近年来诺卡氏菌病在全球水产养殖业中时有报道, 在中国及

东南亚地区发病率呈逐年增加的趋势, 对水产养殖业危害越来越严重^[2-4]。

鲷鱼诺卡氏菌为革兰氏阳性菌, 在分类学上属放线菌目(Actinomycetales)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[5]。鲷鱼诺卡氏菌是一种兼性胞内寄生菌, 在其感染过程中, 菌体被鱼巨噬细胞吞噬后能抵抗巨噬细胞杀灭并在其内存活, 并随着巨噬细胞的迁移而扩散感染到鱼体各器官, 在组织中形成肉芽肿^[6]。病原菌逃避巨噬细胞杀灭的机制一直是相关疾病学

收稿日期: 2016-12-21 修回日期: 2017-03-23

资助项目: 广东省科技发展专项资金(2016A050502061); 广东省自然科学基金(2014A030313602); 深圳市科技计划项目(JCYJ20170306161613251); 深圳大鹏新区产业发展专项(KY20160207); 湛江市科技攻关计划(2014b01043); 广东省攀登计划(pdjh2016b0234)

通信作者: 鲁义善, E-mail: fishdis@163.com

研究的关注热点,有研究表明病原菌可通过传递到细胞内的分泌蛋白调控巨噬细胞的凋亡途径,进而影响其清除病原菌的能力^[7-8]。放线菌分泌蛋白质组学研究揭示,病原放线菌的分泌蛋白与其致病性紧密相关,特别是具有抑制巨噬细胞抗菌作用、改变宿主细胞信号转导以及基因表达调控等功能的分泌蛋白,是病原放线菌的重要致病因子^[9]。目前,鲮鱼诺卡氏菌逃避巨噬细胞杀灭及致病的机制尚不明确。

鲮鱼诺卡氏菌全基因组序列^[10]分析发现了一种酪氨酸蛋白磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)基因,生物信息学分析显示该基因很可能编码一个靶向定位于宿主细胞线粒体的分泌蛋白。蛋白酪氨酸磷酸化是细胞调控信号传导的一个最主要的手段,而PTP通过特异性地作用于蛋白上的磷酸酪氨酸(phosphate tyrosine, pTyr)使其去磷酸化,从而对细胞的生长、代谢、凋亡等起着极为重要的信号传导调节作用。有研究表明,病原菌可通过分泌磷酸酶改变宿主体内的信号转导物质的磷酸化状态,调节宿主的代谢、免疫等重要生命过程,干扰寄主的防御体系,从而有利于病原菌在宿主体内进行生存、定殖、繁殖以及持留性感染^[11]。本实验对鲮鱼诺卡氏菌PTP基因进行了克隆,并通过分泌蛋白鉴定、亚细胞定位、过表达、细胞凋亡检测等方法对其功能开展初步研究,以期为进一步揭示该基因的功能和深入了解鲮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

鲮鱼诺卡氏菌ZJ0503株、FHM细胞(fathead minnow cells)、质粒pEGFP-N1、质粒pCDNA3.1-

His A、大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存提供;KOD-Plus-Neo高保真聚合酶购自Toyobo公司;限制性核酸内切酶BamHI、EcoRI、XhoI, T4连接酶, DNA片段纯化试剂盒均购于TaKaRa公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自Tiangen公司;E.Z.N.ATM去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;细胞核染色剂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。

1.2 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因的克隆与重组质粒构建

鲮鱼诺卡氏菌ZJ0503总DNA的提取参照细菌基因组DNA提取试剂盒(Tiagen)说明书进行。根据鲮鱼诺卡氏菌ZJ0503全基因组^[10](accession number: JNCT000000000)PTP基因(ORF6448, nucleotide position: 20583-21357)的序列和质粒pEGFP-N1、pcDNA 3.1-His A的MCS酶切位点设计引物。引物设计采用的软件为Primer premier 5.0, 引物由上海生工股份有限公司合成(表1)。

以鲮鱼诺卡氏菌ZJ0503总DNA为模板进行PCR扩增,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 for KOD-Plus-Neo 5 μ L, dNTP (2 mmol/L) 5 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 3 μ L, 引物pEGFP-F (10 μ mol/L)和pEGFP-R (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扩增条件: 98 $^{\circ}$ C预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 共

表 1 本研究中所使用的引物

Tab. 1 Primers used for the experiments

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence	限制性内切酶 restriction enzyme	用途 usage
pEGFP-F	GGAATTCATGGTCACCATCGCCCTGTC	EcoRI	构建GFP融合表达质粒
pEGFP-R	CGGGATCCGGGAAAGCAGTTTCGCCTTCAG	BamHI	
pcDNA-F	GGAATTCATGGTCACCATCGCCCTGTC	EcoRI	构建真核过表达质粒
pcDNA-R	CCGCTCGAGGGAAAGCAGTTTCGCCTTCAG	XhoI	

注: 下划线部分为限制性酶切位点

Notes: the underline shows the restriction enzyme cutting site

30个循环;68℃延伸5 min。将PCR产物通过1%琼脂凝胶电泳检测。PCR产物经DNA片段纯化试剂盒纯化后,与质粒pEGFP-N1进行双酶切后16℃连接。连接产物转化入大肠杆菌DH5 α 。经菌落PCR鉴定后,阳性克隆送上海生工股份有限公司测序。构建成功的融合表达载体命名为pEGFP-PTP。

按照与上述相同的方法构建鲮鱼诺卡氏菌PTP基因的真核表达载体pcDNA-PTP:使用的引物为pcDNA-F和pcDNA-R(表1)。并以上述相同的PCR体系与PCR条件进行基因克隆,然后将PCR产物与质粒pcDNA 3.1-His A双酶切并连接,选取阳性克隆送测序,构建成功的真核表达重组质粒为pcDNA-PTP。

1.3 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因的生物信息学分析

根据鲮鱼诺卡氏菌PTP基因测序结果,用DNASTAR、DNASIS软件翻译核苷酸序列、分析蛋白质的分子质量、等电点、疏水性、二级结构等;用clustalX和GeneDoc软件进行氨基酸多重序列比对分析;利用NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对PTP的蛋白序列进行序列同源性比对和相似性分析;运用MEGA6进行生物进化树的构建;采用LocTree 3(<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/loctree/query>)进行蛋白亚细胞定位的预测;用SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽的预测;用NetNES分析核转运信号。用Intropro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和PredictProtein(<http://www.predictprotein.org>)预测蛋白质结构域。

1.4 鲮鱼诺卡氏菌胞外产物的制备与鉴定

将鲮鱼诺卡氏菌在改良培养基平板上培养3~5 d后,挑取单菌落制备成菌悬液。将灭菌后的玻璃纸平铺在改良培养基平板上,并使其紧贴培养基。取100 μ L菌悬液均匀涂布于铺有玻璃纸的培养基上,于28℃恒温培养箱培养3~5 d。待菌落长满后,用镊子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,于8000 $\times$ g、4℃、离心20 min。离心后的上清液,经0.22 μ m微孔滤膜除菌后,转移至透析袋中,超纯水中4℃透析10~16 h,期间换透析液3次。透析后的样品转入50 mL离心管,于-80℃冷冻后,放入真空冷冻

干燥机中冻干。冻干后的胞外产物样品送深圳微菲生物科技有限公司进行蛋白质shotgun LC-MS质谱鉴定。

1.5 鲮鱼诺卡氏菌PTP的亚细胞定位

按去内毒素质粒提取试剂盒说明书提取无内毒素质粒pEGFP-PTP和pEGFP-N1质粒。FHM细胞用含10%小牛血清的L-15培养液培养,将FHM细胞传代至24孔细胞培养板中,于25℃恒温培养箱中培养,当细胞覆盖率约为70%时进行转染。转染方法参照Lipofectamin 2000说明书进行,每孔转染需0.8 μ g质粒和2 μ L转染试剂(Lipofectamin 2000)。转染48 h后,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℃的MitoTracker Red CMXRos工作液(300 nmol/L,使用无血清细胞培养液稀释),于28℃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%多聚甲醛固定30 min,用PBS漂洗2~3次。用预冷至-20℃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。

1.6 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因真核过表达对FHM细胞的影响

将FHM细胞传代至24孔细胞培养板中,于25℃恒温培养箱中培养,当细胞覆盖率约为90%时,将去内毒素质粒pcDNA-PTP和pcDNA 3.1-His A分别转染FHM细胞,转染参见“1.5”中的方法。在转染后48 h,将细胞固定、透化后经DAPI(1 μ g/mL)避光染核10 min,于在荧光显微镜(Leica)下观察转染后FHM细胞核的变化情况,在相同视野下白光观察细胞生长状况,并拍照。

1.7 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因真核表达对线粒体膜电位的影响

将质粒pcDNA-PTP和pcDNA 3.1-His A转染培养于24孔板的FHM,每种质粒设置6个平行孔。转染后24和48 h,分别收集3个孔细胞进行线粒体膜电位检测。另取2组各3个孔未转染质粒的FHM细胞,在相应的2个时间点,用分别终浓度10 μ mol/L碳酰氰基-对-氯苯腙(carbonyl cyano-to-chlorobenzene hydrazone, CCCP)处理20 min,作为

诱导线粒体膜电位下降的阳性对照,测定线粒体膜电位。线粒体膜电位检测实验方法参见线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)说明书,具体如下:吸出细胞培养液后,胰酶消化收集细胞于1.5 mL离心管,600×g 4 °C离心4 min,弃上清,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600×g 4 °C离心4 min,弃上清,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,避光转移入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时分别测量绿色荧光和红色荧光强度。分析红/绿荧光比值。

2 结果

2.1 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因的克隆与重组质粒构建结果

分别用引物pEGFP-F/pEGFP-R和pcDNA-F/pcDNA-R对鲮鱼诺卡氏菌PTP基因进行高保真PCR扩增,扩增产物用1%的琼脂糖凝胶作电泳分析,均获得长度大小约为750 bp左右的目的条带(图1),与理论长度774 bp相符合。测序结果证明重组质粒pEGFP-PTP、pcDNA-PTP的插入片段序列与鲮鱼诺卡氏菌ZJ0503全基因组测序的PTP基因(ORF 6448)序列完全一致,表明重组质粒pEGFP-PTP和pcDNA-PTP构建成功。

2.2 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因序列及其编码蛋白质生物信息学分析

鲮鱼诺卡氏菌PTP基因是长774 bp的开放阅读框,编码258个氨基酸(图2),利用DNAMAN分析得到PTP编码的蛋白质分子质量为26.8 ku,理论等电点值为4.63。

LocTree预测鲮鱼诺卡氏菌PTP基因编码蛋白的亚细胞定位,结果表明其在原核细胞中很可能为分泌蛋白,而在真核生物细胞中有较大几率定位于线粒体,推测PTP可能是靶向定位于宿主线粒体的鲮鱼诺卡氏菌分泌蛋白。应用SignalP 4.0进行信号肽的预测,1~18位氨基酸是鲮鱼诺卡氏菌PTP信号肽,而18~19位氨基酸之间是信号肽剪切位点(图2)。去掉信号肽后,

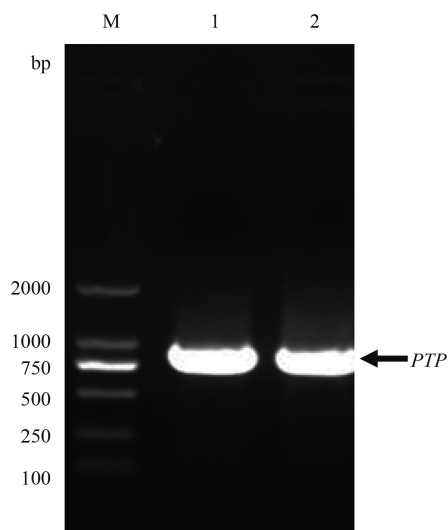


图1 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因PCR扩增电泳结果

M: 标准物质2000; 1. 引物pEGFP-F/pEGFP-R的高保真PCR产物; 2. 引物pcDNA-F/pcDNA-R的高保真PCR产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of PTP gene from *N. seriolae*

M: DL2000 DNA Marker; 1. PCR product using primers pEGFP-F/pEGFP-R; 2. PCR product using primers pcDNA-F/pcDNA-R

LocTree预测其在真核生物细胞中定位于细胞质。用NetNES分析PTP编码的蛋白质,发现70~83位的氨基酸可能是核输出信号(图2)。

应用Pfam在线软件以及Protein BLAST比对分析,结果发现鲮鱼诺卡氏菌PTP与Y_phosphatase3蛋白家族最为相近,且具有Oca4多功能位点。Y_phosphatase3家族能够特异性地作用于蛋白上的磷酸酪氨酸(pTyr),并使其去磷酸化,因此该家族在细胞的生长、分化、代谢、细胞周期等方面起着极为重要的信号传导调节作用。Oca4是一类酪氨酸/丝氨酸蛋白磷酸酶,既识别含有磷酸酪氨酸(pTyr)的蛋白,也可以识别含磷酸丝氨酸(phosphate serine, pSer)的蛋白,并催化脱磷反应,在细胞信号传导机制中具有中重要作用。

2.3 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因的同源性及进化分析

通过NCBI的Protein BLAST对鲮鱼诺卡氏菌PTP的氨基酸序列进行分析,选取7个代表性放线菌目物种的PTP氨基酸序列,利用DNAMAN程序进行多序列比较(图3),再用NJ法(Neighbor-Joining)构建进化树(图4)。结果显示,在以上8个物种的PTP中,有67个氨基酸是高度保守的(相似性100%),相似性为75%以上的氨基酸高达47%(图3),说明PTP在放线菌目是较为保守的蛋


```

1      GTGTCACCATCGCCCTGTCCGCGAGCCTGGGCTCGGCGGCGACCGCCCTCGCCGCCGACCCGCCCGCCGCCACCGGCAGCGTGCTGGTC
1      V V T I A L S A S L G S A A T A L A A A D P P A A T G S V L V
91     AACACCGACAGCGGTGTGCTCGGCTGACCGGTGTCTGAACGCCCGGACGCGGGCGGCTACCGGACCGCGACGCGCGACCGGTGCGC
31     N T D S R V L G L T G V L N A R D A G G Y R T A D G R T V R
181    ACCGGCTGGTCTTCCGACCGGTGATCTGTCAAGGCCACCGGTGACGACCTGGCCAAGCTCACCCTGGACGGCGTTGTCTCCGTGCAT
61     T G L V F R T G D L S K A T G D D L A K L T V D G V V S V H
271    GATCTGCGCAGAGCTACGAGCAGCAGCTCATGGGTGTGGACAAGATCCCGCGGCGGACCGCGCACCACGACGACATCATCGGCGAG
91     D L R T S Y E Q Q L M G V D K I P A G A T A H H D D I I G Q
361    GCCCCGCCGCGAGGTGATGGCTCCACCGTGTCCGCGGCGACCGACCTGTACCGCGCCTTCATCACCGCCCGCGCGGACGAGGGGTTTC
121    A P P Q V M A S T L S A G T D L Y R A F I T A P G A S E G F
451    GCGAACGTGCTGCGGACATCGCCTACAACCGGGCGGTGTCTGTTCCTGCAACCGCGGCAAGGACCGACCGCTGGACCTCGGCC
151    A N V L R D I A Y N P G G V L F H C T A G K D R T G W T S A
541    GTGCTGCTACCATCCTGGGCGTCGACAAGGACACCGTCTACTACGACTACCTGTGTGAACTACTACCGCGGCGCAAGGACGGGAC
181    V L L T I L G V D K D T V Y Y D Y L L S N Y Y R G A K D G D
631    ATGATGAACGGCGTCACCGCCGCCCGCTGGACTCCGCCCTTCGACCAGGTGAACAGAGCTACGGCAGCTTCGACAACCTACGTCGCGAC
211    M M N G V T A A A L D S A F D Q V N Q S Y G S F D N Y V R D
721    GGCCTGCAGTCTCCGACGCGCGCTGGCCGCGCTGAAGGCGAACTGCTTTCCTGA
241    G L Q L S D A D V A A L K A K L L S *

```

图2 鲮鱼诺卡氏菌PTP基因的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

方框中的氨基酸序列为预测的信号肽, 下划线表示预测的核输出信号, *表示终止密码子

Fig. 2 Full-length nucleotide and putative amino acid sequences of PTP gene from *N. serioleae*

The amino acid sequence in the box is a predicted signal peptide, the underline shows the predicted nuclear export signal, and the asterisk indicates the stop codon

白。其中鲮鱼诺卡氏菌PTP与另一种鱼诺卡氏菌病致病菌——星状诺卡氏菌的PTP氨基酸同源性最高, 为66%; 其次与两种人类致病菌——肺炎诺卡氏菌和巴西诺卡氏菌同源性较高, 分别为65%和63%; 鲮鱼诺卡氏菌PTP与成团链霉菌同源性最低, 为38%。从进化树上可以看出, 诺卡氏菌属细菌先聚为一支, 之后与红球菌属和戈登菌属细菌聚为一支, 最后和链霉菌属细菌相聚(图4)。

2.4 鲮鱼诺卡氏菌PTP为分泌蛋白的鉴定

通过制备鲮鱼诺卡氏菌胞外产物并进行质谱鉴定, 结果显示多次鉴定到了属于鲮鱼诺卡氏菌PTP的一个肽段“DGLQLSDADVAALK”, 证明鲮鱼诺卡氏菌PTP出现在鲮鱼诺卡氏菌的胞外产物中, 是分泌蛋白。

2.5 鲮鱼诺卡氏菌PTP的亚细胞定位

将重组质粒pEGFP-PTP转染FHM细胞后, 通过PTP-GFP融合蛋白绿色荧光在细胞内的分布

来研究PTP的亚细胞定位。将pEGFP-PTP和pEGFP-N1转染FHM细胞, 转染后48 h, 用MitoTracker Red CMXRos和DAPI染色, 并于荧光显微镜下观察。结果显示, pEGFP-PTP和pEGFP-N1转染的FHM细胞, 其绿色荧光都呈全细胞分布, 但pEGFP-N1转染的FHM细胞中, 细胞核边缘较光滑, 染色均匀, 无细胞凋亡特征, 线粒体围绕细胞核呈环状分布(图5-a); pEGFP-PTP转染FHM细胞后, 其表达的绿色荧光与线粒体分布不重合, 说明鲮鱼诺卡氏菌PTP蛋白并非靶向定位于线粒体, 而有绿色荧光的细胞中, 其细胞核常出现固缩浓染、凋亡小体等明显的细胞凋亡特征, 推测PTP可能会诱导细胞凋亡(图5-b)。

2.6 鲮鱼诺卡氏菌PTP诱导细胞凋亡的检测

为了确认鲮鱼诺卡氏菌PTP是否能诱导细胞凋亡, 实验将重组质粒pcDNA-PTP和空质粒转染pcDNA3.1 his A分别转染FHM细胞, 转染后48 h, 核染观察细胞核及细胞形态。结果显示转染pcDNA3.1 his A的FHM细胞, 细胞核边缘光滑,

鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i>	: ---VVTIALSASLSGAATAALADPPA-----ATGSVLVN-----TDSRVLGLTGVLNARDAGGYRTADGRTVR : 60
肺炎诺卡氏菌 <i>N. pneumoniae</i>	: ---MAHR---FRAP IAMAAGLAVAFGP-----VTGVALADPPAAPAISVDPSLPLHGQVQARDIGGYRTTGGRTVR : 65
巴西诺卡氏菌 <i>N. brasiliensis</i>	: ---MTQFSMRGP IALAAGLAVAFGP-----VAGVALADPPAASAVAFDPSLPLHGQVQARDIGGYRTVDGKTVR : 66
星状诺卡氏菌 <i>N. asteroides</i>	: ---MIRSRVAVHASLAATGMAVLLGPV-----VAGPALAAPVGGETTADRLGLSGVQVQARDAGGYRTVDGQHV : 68
马红球菌 <i>R. equi</i>	: ---MS---NR IARPAATLCAVILSCGVPV PALAGGIPALDHAGPTAAQVAADPSLHLEGASNARDIGGYRTTGGRTVR : 72
红串红球菌 <i>R. erythropolis</i>	: ---MS---NR IARPAATVLCVILSCGVPV PALAGGIPALEQAGPAAQVAADPSLHLEGASNARDIGGYRTTGGRTVR : 72
支气管戈登菌 <i>G. bronchialis</i>	: ---MSLHRLIRAAAVTTAVTLATAPA---LVASATSGIATAAPAPAGPVA---VALAGTENTRTFEAYRTGDGRLVR : 69
成团链霉菌 <i>S. agglomeratus</i>	: MSRTRTLGLATGAVVSAALATGCLPAS---AFAPVETATTSAVAQGETARF---TPLQGAIVNRDLGGYRTYGGQEV : 72
鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i>	: TGLVFRITGDLSSATGDLAKLIVDGVSVVDLRTSYEQQLMGVDKIPAGAT-----AHHDDIIGQAPP : 123
肺炎诺卡氏菌 <i>N. pneumoniae</i>	: TGLVYRTIGQLNNAEADLALDRVRVSVDLRTVYERAG-PDRVPAGAT-----ARWADVIGQAPP : 127
巴西诺卡氏菌 <i>N. brasiliensis</i>	: TGLVYRTIGQLNNAEADLALDRVRVSVDLRTVYERAG-PDRVPAGAV-----ANWDDVIGQAPP : 128
星状诺卡氏菌 <i>N. asteroides</i>	: TGLVFRITGDLSSATGDLAKLIVDGVSVVDLRTSYEQQLMGVDKIPAGAT-----GHSYDVIGQAPP : 130
马红球菌 <i>R. equi</i>	: WGKVFRRSNDLNTLPSDLASLSEGVESVDLRTVYERAG-PDRVPAGAR-----SNWFDVIGTNEA : 134
红串红球菌 <i>R. erythropolis</i>	: WGKVFRRSNDLNTLPSDLASLSEGVESVDLRTVYERAG-PDRVPAGAR-----SNWFDVIGTNEA : 134
支气管戈登菌 <i>G. bronchialis</i>	: ---DLVLRSDNLSRLTPADQALQRRLATITDLRTGIERALQ-PDRVPAGAH-----TEVFDVIGATPP : 130
成团链霉菌 <i>S. agglomeratus</i>	: YGQVYRADALSRLTDSVAAALRLGLAKVDFRVAAEIQYDGADRLPAGLTPTSRPVTDNGLFARLMTAIGSRD : 147
鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i>	: QVMASTLSAG-----TDLYRAFITAPGASEGANVLR---DIAYNPGG---VLFHCTAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 188
肺炎诺卡氏菌 <i>N. pneumoniae</i>	: EVLATTLTGG-----DGLYRAFITAPGANEAFAVLR---SIT---DTDGA---LLFHCTAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 192
巴西诺卡氏菌 <i>N. brasiliensis</i>	: EVLASTLTGG-----DSLYRAFITAPGANEAFAVLR---DITGAEDGA---VLFHCTAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 194
星状诺卡氏菌 <i>N. asteroides</i>	: LILAGALFGG-----EGYRAFITAPGANEAFAVLR---DITGAEDGA---VLYHCSAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 196
马红球菌 <i>R. equi</i>	: NL---PALVDM---PTMYALMVDTPGASRAFHDAV---NVANTDGA---VLYHCSAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 197
红串红球菌 <i>R. erythropolis</i>	: NL---PALVDM---PTMYALMVDTPGASRAFHDAV---NVANTDGA---VLYHCSAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 197
支气管戈登菌 <i>G. bronchialis</i>	: ---STLVDL---PSAYRAFITAPGANEAFAVLR---DITGAEDGA---VLYHCSAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 194
成团链霉菌 <i>S. agglomeratus</i>	: VRQEELLGDGRAAAMFRDNYRTEVTS---ENRAREAETLR---DIADSDRRSP---LHCTAGKDRGTGWTSAVLLTILGW : 220
鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i>	: DRDTVYDYLLSNRYRGAQKG-----DMNGVITAAALDSAFDQVNSYGSFDFNYVRDGLQLS : 245
肺炎诺卡氏菌 <i>N. pneumoniae</i>	: DRATVTEDYLLSNRYRGAQKG-----DPLNGVQQSILDAAFDQANQTYGSFDFNYVRDGLQLS : 249
巴西诺卡氏菌 <i>N. brasiliensis</i>	: DRATVNQDYLLSNRYRGAQKG-----DALNGVQQPWLDAAFDQANQTYGSFDFNYVRDGLQLS : 251
星状诺卡氏菌 <i>N. asteroides</i>	: DRATVTADYLLSNRYRGAQKG-----DPLNGVQQSILDAAFDQANQTYGSFDFNYVRDGLQLS : 253
马红球菌 <i>R. equi</i>	: SRTDVNADYLLSNRYRGAQKG-----AFIDGVEQSILDTSEATVDRVYGNFDFNYVRDGLQLS : 256
红串红球菌 <i>R. erythropolis</i>	: SRADVNADYLLSNRYRGAQKG-----AFIDGVEQSILDTSEATVDRVYGNFDFNYVRDGLQLS : 256
支气管戈登菌 <i>G. bronchialis</i>	: DRTAVERDFLASNTFRHASAN-----DPLNGVNIAWLRATATANSTYGSFDFNYVRDGLQLS : 251
成团链霉菌 <i>S. agglomeratus</i>	: PSRTAERDYLLSNRYRGAQKG-----DPLNGVNIAWLRATATANSTYGSFDFNYVRDGLQLS : 295
鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i>	: DADVAAKAKLLS----- : 258
肺炎诺卡氏菌 <i>N. pneumoniae</i>	: DGETGALRAELLA----- : 262
巴西诺卡氏菌 <i>N. brasiliensis</i>	: TADIAALRAKLLA----- : 264
星状诺卡氏菌 <i>N. asteroides</i>	: GADITLRAALLS----- : 266
马红球菌 <i>R. equi</i>	: EDDVAQLRDTLLV----- : 269
红串红球菌 <i>R. erythropolis</i>	: DGDIAQLRDTLLA----- : 269
支气管戈登菌 <i>G. bronchialis</i>	: MSDVAALKKNLSTAPHTTFSVLRWGTEA : 280
成团链霉菌 <i>S. agglomeratus</i>	: RRTLAKRLRAGLLRH----- : 309

图3 不同物种PTP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: 肺炎诺卡氏菌(WP_040780230.1), 巴西诺卡氏菌(WP_014986653.1), 星状诺卡氏菌(GAD84513.1), 马红球菌(WP_065455682.1), 红串红球菌(WP_019748244.1), 支气管戈登菌(WP_012833986.1), 成团链霉菌(WP_069929223.1)

Fig. 3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of PTP among different species

Shaded regions indicate residues sharing homology: Black regions indicate 100% homology, and gray regions indicate homology above 75%. GenBank accession number: *Nocardia pneumonia* (WP_040780230.1), *Nocardia brasiliensis* (WP_014986653.1), *Nocardia asteroides* (GAD84513.1), *Rhodococcus equi* (WP_065455682.1), *Rhodococcus erythropolis* (WP_019748244.1), *Gordonia bronchialis* (WP_012833986.1), *Streptomyces agglomeratus* (WP_069929223.1)

染色均匀, 无细胞凋亡特征(图6-a), 光镜下细胞贴壁平整, 状态良好(图6-b)。与转染空质粒的对照组相比, 转染pcDNA-PTP的FHM细胞中明显能看到许多凋亡小体(图6-c); 相同视野切换到光镜下观察, 可以发现发生细胞凋亡的细胞变圆, 与邻近细胞脱离, 折光率变高(图6-d), 说明鳊鱼卡氏菌PTP在FHM细胞中表达后, 可以诱导细胞

凋亡。

线粒体跨膜电位被破坏是细胞凋亡过程的特征之一。为了进一步对鳊鱼诺卡氏菌PTP在FHM细胞过表达后细胞凋亡的情况进行定量检测, 实验将pcDNA-PTP和pcDNA3.1 his A转染FHM细胞后, 分别在转染后24和48 h两个时间点, 收集细胞样品并通过JC-1荧光探针进行线粒

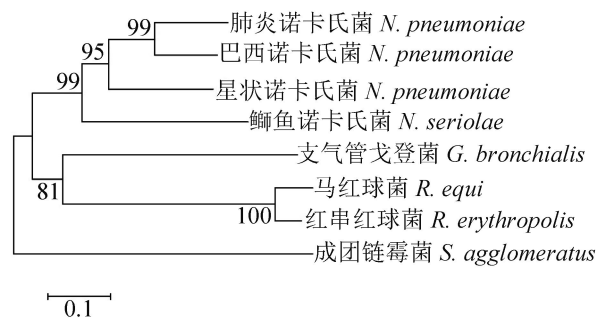


图 4 基于PTP同源类似物氨基酸序列绘制的系统发生树

GenBank注册号同图3

Fig. 4 Phylogenetic tree of PTP based on the homologous amino acids

GenBank accession numbers are the same as in Fig. 3

体电位膜变化的检测。当膜电位正常时, JC-1通过线粒体膜极性进入线粒体内并形成发射红色荧光的多聚体, 而凋亡细胞线粒体膜电位低时, JC-1从线粒体内释放并逆转为发射绿色荧光

的单体形式。故而可以通过检测JC-1的红色和绿色荧光强度的比值来定量检测线粒体膜电位的变化。结果表明, 转染pcDNA-PTP后24 h, FHM细胞中的红绿色荧光比值与pcDNA3.1对照组相近; 转染pcDNA-PTP后48 h, JC-1红绿色荧光比值显著下降, 只有对照组的1/3左右, 说明FHM细胞的线粒体跨膜电位已被明显破坏。而转染pcDNA3.1 his A的FHM细胞, JC-1红绿色荧光比值在转染后24和48 h无显著变化, 一直保持在7左右(图7)。阳性对照组, 通过线粒体电子传递链抑制剂CCCP诱导线粒体膜电位下降, 在两个时间点检测到的JC-1红绿色荧光比值都保持在2.5左右的低值。综合细胞核观察和JC-1实验结果, 表明PTP对细胞凋亡具有促进作用。

3 讨论

本实验成功克隆了一个鳊鱼诺卡氏菌酪氨酸蛋白磷酸酶(PTP)基因, 对其蛋白功能预测发现,

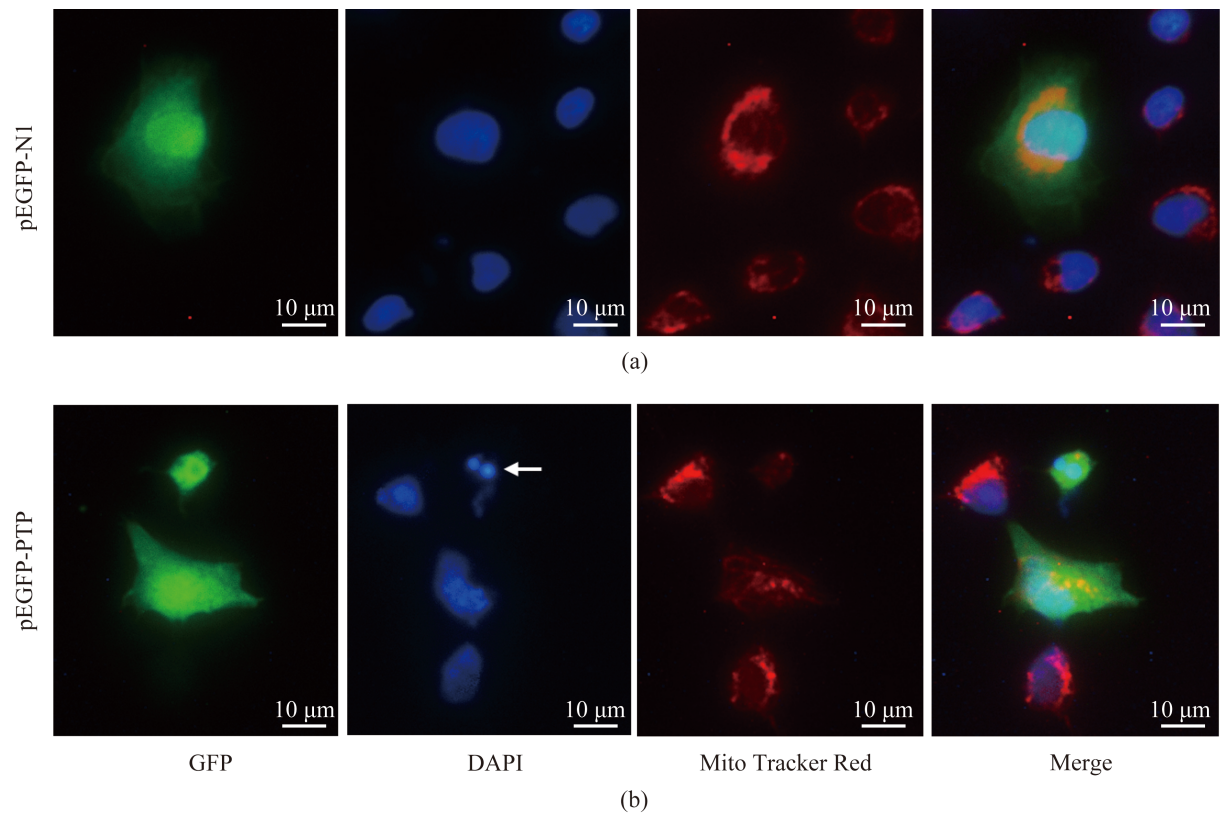


图 5 带GFP标签的鳊鱼诺卡氏菌PTP融合蛋白在FHM细胞内的定位

绿色荧光显示了PTP-GFP融合蛋白或GFP, 红色荧光显示了线粒体, 蓝色荧光显示细胞核, 箭头所指为凋亡小体

Fig. 5 Subcellular localization of PTP-GFP in FHM cell

Green fluorescence shows the PTP-GFP or GFP, red fluorescence shows the mitochondria, blue fluorescence shows the nucleus, and the arrow refers to the apoptotic bodies

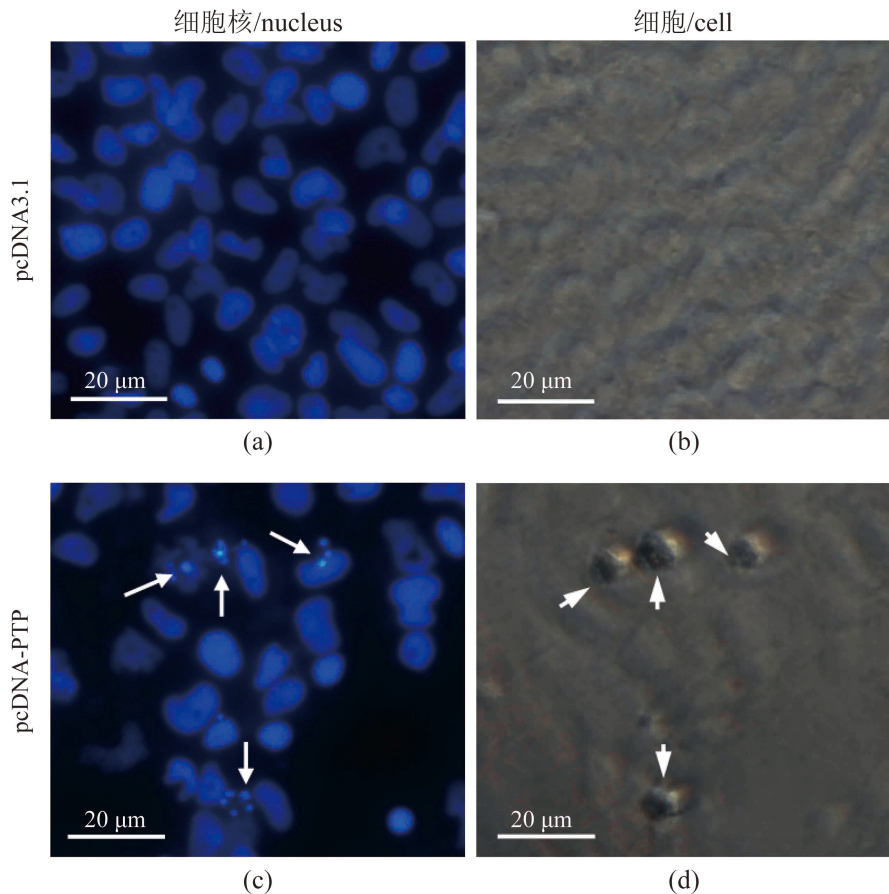


图 6 转染pcDNA-PTP后FHM细胞的细胞核观察

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

Fig. 6 Observation of nucleus in FHM cells transfected with pcDNA-PTP

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

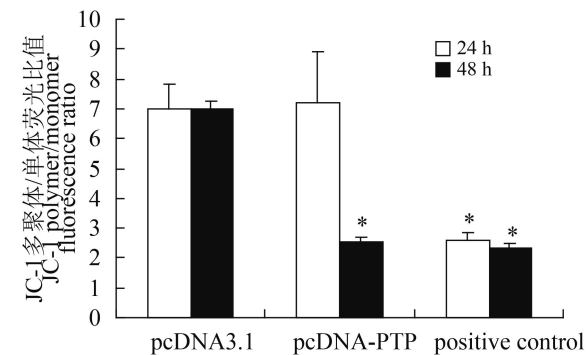


图 7 转染pcDNA-PTP后FHM细胞的线粒体膜电位检测

*表示显著性差异($P<0.05$)

Fig. 7 Mitochondrial membrane potential assay of FHM cells transfected with pcDNA-PTP

*means significant difference ($P<0.05$)

其与酪氨酸蛋白磷酸酶家族中的Y_phosphatase3蛋白家族最为相近, 且具有Oca4多功能位点,

能识别含有磷酸酪氨酸(pTyr)和磷酸丝氨酸(pSer)的蛋白, 并催化脱磷反应, 推测其在细胞信号传导机制中具有中重要作用, 很可能是鲫鱼诺卡氏菌的致病因子之一, 在鲫鱼诺卡氏菌的致病过程中具有一定的作用。研究证实结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的2个酪氨酸蛋白磷酸酶(PTP)——PtpA和mPTPB, 是其致病的关键毒力因子。当结核分枝杆菌被巨噬细胞吞噬后, 结核分枝杆菌可以分泌这两种PTP到巨噬细胞的细胞质中, 抑制宿主巨噬细胞的先天免疫反应并有助于病原菌的生存和繁殖^[12-13]。氨基酸序列比对表明, PTP在放线菌目是较为保守的蛋白, 鲫鱼诺卡氏菌PTP很可能也在逃避巨噬细胞杀灭、免疫逃避及致病等方面发挥了与结核分枝杆菌PTP类似的功能。

胞外产物质谱鉴定证实鲫鱼诺卡氏PTP是一个分泌蛋白。在对结核分枝杆菌和沙门氏菌

(*Salmonella typhimurium*)的研究中,也都发现酪氨酸蛋白磷酸酶为分泌蛋白^[13-14]。近年来,分泌蛋白已成为微生物病原体与宿主相互作用机制研究的焦点。细菌分泌蛋白可以通过受体、外毒素成孔、直接注入等多种机制被传递到宿主细胞内^[15],并在进入宿主细胞后转运到线粒体、内质网、溶酶体等靶目标处,通过改变宿主细胞的信号、转导调控细胞凋亡等方式,调控细胞微环境,以利于细菌的生存和增殖^[16]。LocTree和SignalP预测鳊鱼诺卡氏菌的PTP蛋白有一段信号肽,带信号肽的PTP有较大几率定位于线粒体,去掉信号肽后则很可能定位于细胞质。通过构建含鳊鱼诺卡氏菌PTP基因全长的融合表达质粒pEGFP-PTP,进行亚细胞定位研究,结果发现PTP蛋白呈全细胞分布,与线粒体分布并不重合,说明鳊鱼诺卡氏菌PTP蛋白并非靶向定位于线粒体,而是定位于细胞质。

在亚细胞定位和过表达研究中,发现鳊鱼诺卡氏菌PTP蛋白在FHM细胞中表达后,都出现了诸如细胞核固缩浓染、凋亡小体、细胞变圆、与邻近细胞脱离等明显的细胞凋亡特征。进一步通过JC-1法定量检测细胞凋亡,结果表明鳊鱼诺卡氏菌PTP蛋白在细胞表达后,细胞的线粒体膜电位被明显破坏,证明鳊鱼诺卡氏菌PTP是一种可诱导细胞凋亡的细菌蛋白。星状诺卡氏菌也是鱼类诺卡氏菌病的病原之一,星状诺卡氏菌GUH-2株活菌、培养液浓缩滤液分别与小鼠脑细胞、PC12细胞、Hela细胞等孵育后,都可导致细胞凋亡,说明星状诺卡氏菌具有诱导细胞凋亡的能力,且与其分泌蛋白相关^[17-18],但尚未确定是何种分泌蛋白诱导了细胞凋亡。已有研究证实病原体的PTP能通过其去磷酸化功能,调控宿主细胞凋亡^[19],如结核分枝杆菌的酪氨酸蛋白磷酸酶PtpA可通过对凋亡相关因子GSK3 α 的Tyr(279)去磷酸化,调控巨噬细胞的凋亡^[20];结核分枝杆菌PTP1B过量表达会使凋亡细胞增加,siRNA减少PTP1B表达则会抑制细胞凋亡^[21-22];毁侧沟茧蜂病毒(microplitis demolitor bracovirus, MdBV)的PTP-H2可诱导血液粒细胞、Sf-21细胞凋亡,并可抑制吞噬作用、有助于免疫抑制^[23]。因此,鳊鱼诺卡氏菌PTP蛋白很可能也是通过调控宿主细胞内的磷酸化状态来诱导细胞凋亡,而巨噬细胞凋亡能抑制巨噬细胞对病原菌的杀灭,有助于鳊鱼诺卡氏菌在宿主体内的生存和免疫逃避。

通过对鳊鱼诺卡氏菌PTP的基因克隆和功能初步研究,为进一步揭示该基因的功能和深入了解鳊鱼诺卡氏菌的分子致病机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] Nayak S K, Shibasaki Y, Nakanishi T. Immune responses to live and inactivated *Nocardia seriolae* and protective effect of recombinant interferon gamma (rIFN γ) against nocardiosis in gibel carp, *Carassius auratus langsdorffii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2): 354-364.
- [2] 黄郁葱, 简纪常, 吴灶和, 等. 卵形鲳鲹结节病原的分离与鉴定[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 49-53. Huang Y C, Jian J C, Wu Z H, et al. Isolation and identification of the pathogen causing sarcoidosis of *Trachinotus ovatus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(4): 49-53(in Chinese).
- [3] Labrie L, Ng J, Tan Z, et al. Nocardial infections in fish: An emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia[M]//Bondad-Reansato M G, Mohan C V, Crumlish M, et al. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section. Philippines: Asian Fisheries Society, 2008: 297-312.
- [4] 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.
- [5] 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).
- [6] Kato G, Kato K, Jirapongpaiboj W, et al. Development of DNA vaccines against *Nocardia seriolae* infection in fish[J]. Fish Pathology, 2014, 49(4): 165-172.
- [7] Saint-Georges-Chaumet Y, Edeas M. Microbiota-mitochondria inter-talk: Consequence for microbiota-host interaction[J]. Pathogens and Disease, 2016, 74(1): ftv096.
- [8] 罗云蔓, 郭晓奎, 姜叙诚. 病原菌逃避单核-巨噬细胞杀灭策略的研究进展[J]. 微生物与感染, 2010, 5(2): 117-120. Luo Y M, Guo X K, Jiang S C. Research advances in

- bacterial strategies for evading the killing by mononuclear macrophages[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2010, 5(2): 117-120(in Chinese).
- [9] Forrellad M A, Klepp L I, Gioffré A, *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *Virulence*, 2013, 4(1): 3-66.
- [10] 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.
- [11] 朱培, 李鑫强, 李振轮. 磷酸酶在病原菌感染宿主中的作用[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(2): 154-163.
- Zhu P, Li X Q, Li Z L. Roles of phosphatases in pathogen infection: A review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(2): 154-163(in Chinese).
- [12] Margenat M, Labandera A M, Gil M, *et al.* New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: Hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8819.
- [13] Dhanjal J K, Grover S, Sharma S, *et al.* Structural insights into mode of actions of novel natural *Mycobacterium* protein tyrosine phosphatase B inhibitors[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(S): S3.
- [14] Kaniga K, Uralil J, Bliska J B, *et al.* A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(3): 633-641.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Loeffler D A, Camp D M, Qu S, *et al.* Characterization of dopamine-depleting activity of *Nocardia asteroides* strain GUH-2 culture filtrate on PC12 cells[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2004, 37(2): 73-85.
- [19] Kuban-Jankowska A, Gorska M, Knap N, *et al.* Protein tyrosine phosphatases in pathological process[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2015, 20(2): 377-388.
- [20] Poirier V, Bach H, Av-Gay Y. *Mycobacterium tuberculosis* promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(42): 29376-29385.
- [21] González-Rodríguez Á, Escibano Ó, Alba J, *et al.* Levels of protein tyrosine phosphatase 1B determine susceptibility to apoptosis in serum-deprived hepatocytes[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 212(1): 76-88.
- [22] Morales L D, Pavón E A C, Shin J W, *et al.* Protein tyrosine phosphatases PTP-1B, SHP-2, and PTEN facilitate Rb/E2F-associated apoptotic signaling[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97104.
- [23] Suderman R J, Pruijssers A J, Strand M R. Protein tyrosine phosphatase-H2 from a polydnavirus induces apoptosis of insect cells[J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(6): 1411-1420.

Gene cloning and preliminary function study of protein tyrosine phosphatase from *Nocardia seriolae*

XIA Liquan^{1,2}, TONG Bangzhuo¹, XU Liang¹, SU Zejie¹,
CHEN Ruimin¹, LIAO Baoshan¹, LU Yishan^{1,2,3*}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

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

3. Shenzhen Research Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, China)

Abstract: *Nocardia seriolae* is the main pathogen of fish nocardiosis, which is a chronic systemic granuloma disease of fish. A gene of protein tyrosine phosphatase (PTP) was found by analyzing the whole genome sequence of *N. seriolae*, and bioinformatics analysis showed that the PTP gene may encode a secreted protein which could possibly target host cell mitochondria. In this study, the gene cloning, subcellular localization, over-expression and mitochondrial membrane potential detection were carried out. The results showed that the protein PTP was identified in the extracellular products of *N. seriolae*, which confirmed that PTP was a secreted protein. Subcellular localization of PTP-GFP fusion proteins were evenly distributed in the whole cell of FHM cells, and did not coincide with the distribution of mitochondria, which indicated that the protein PTP was not targeted at mitochondria. Typical apoptotic features, such as nuclear pyrosis and apoptotic bodies, were found when PTP protein was expressed in FHM cells by both subcellular localization and over-expression studies. The mitochondrial membrane potential was significantly damaged in FHM at 48h after the transfection of pcDNA-PTP, which confirmed that PTP was a bacterial protein which can likely induce cell apoptosis. The gene cloning and preliminary function study of PTP from *N. seriolae* have laid the foundation for further research on the gene and for promoting the understanding of the pathogenic mechanism of *N. seriolae*.

Key words: *Nocardia seriolae*; protein tyrosine phosphatase (PTP); secreted protein; subcellular localization; cell apoptosis

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

Funding projects: International S&T Cooperation Projects of Guangdong Province (2016A050502061); Guangdong Natural Science Foundation (2014A030313602); Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20170306161613251); Shenzhen Dapeng New District Special Fund for Industry Development (KY20160207); Zhanjiang science and technology Program (2014b01043); Guangdong Province Climb Plan (pdjh2016b0234)