



鱼类组蛋白核苷酸的多态性及其在杀鱼爱德华氏菌感染中的作用

武小曼, 方红, 聂品, 昌鸣先*

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 组蛋白是染色体核小体的重要组分, 在调控染色质结构、基因转录、个体发育等不同生物学过程中起着重要作用。为了研究鱼类组蛋白基因是否存在核苷酸的多态性以及组蛋白核苷酸多态性是否会影响鱼类的抗病力, 本实验以斑马鱼和草鱼为研究对象, 通过 PCR 扩增克隆了组蛋白 H2A 的全长开放阅读框; 利用过表达技术、菌落平板计数、感染存活分析以及荧光定量 PCR 技术, 研究了斑马鱼和草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性不同变异体在杀鱼爱德华氏菌感染中的作用。在本研究中, 实验发现鱼类组蛋白 H2A 存在着丰富的核苷酸多态性。序列分析结果显示斑马鱼和草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性的变异体核苷酸序列相似性为 90%~100%; 而两两 H2A 核苷酸多态性变异体氨基酸序列之间最多只有 3 个位点存在差异。通过体内和体外抗菌实验可知, 斑马鱼和草鱼组蛋白 H2A 核苷酸的多态性显著影响 H2A 的抗菌活性。此外, 筛选出的抗菌组蛋白 H2A 核苷酸多态性的变异体在斑马鱼体内的过表达, 不仅具有免疫增强的作用, 还能显著增强斑马鱼对杀鱼爱德华氏菌感染的抗病力。本研究为筛选具有抗病作用的组蛋白 H2A 免疫保护原奠定了重要基础。

关键词: 斑马鱼; 草鱼; 杀鱼爱德华氏菌; 组蛋白 H2A; 核苷酸多态性; 抗菌活性; 免疫调控
中图分类号: S 917.1
文献标志码: A

组蛋白是染色质核小体的重要组分, 根据分子量和氨基酸成分不同, 组蛋白可分为 H1、H2A、H2B、H3 和 H4。在这 5 种组蛋白中, 组蛋白 H1 富含赖氨酸; H2A 和 H2B 具有较为丰富的赖氨酸; H3 和 H4 具有含量丰富的精氨酸。组蛋白是已知蛋白质中最保守的蛋白。在亲缘关系较远的不同种属中, 组蛋白 H1 蛋白序列变化较大; 组蛋白 H3 和 H4 蛋白序列变化最小。在哺乳动物中, 组蛋白已被报道存在多种翻译后修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化、ADP-核糖基化、羧基化和类泛素化修饰等^[1-2], 多发生在组蛋白的 N-端尾部。组蛋白的翻译后修饰不仅与染色体的重塑和功能紧密

相关^[3], 而且在基因转录^[4]、DNA 修复^[5]、有丝分裂^[6]、减数分裂^[7]、发育^[8]、凋亡^[9-10] 以及致癌作用^[11] 等多种过程中发挥重要作用。除了翻译后修饰外, 组蛋白的变异体也参与调控染色质结构、基因转录、个体发育等不同的生物学过程。

在硬骨鱼类中, 已有一些研究揭示了组蛋白的翻译后修饰和组蛋白的变异体在发育以及基因转录调控中的作用^[12-13]。如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的组蛋白在精子形成期间的磷酸化和乙酰化修饰能改变其与 DNA 的结合^[14]; 斑马鱼 (*Danio rerio*) 组蛋白 H3 的三价甲基化修饰在早期胚胎形成中起着重要作用^[15]; 鲤 (*Cyprinus carpio*) H2A.Z 的泛素化富集在自然条件下起着调控染色

收稿日期: 2020-07-07 修回日期: 2020-08-10

资助项目: 国家自然科学基金 (31873046); 武汉市应用基础前沿项目 (2019020701011467)

通信作者: 昌鸣先, E-mail: mingxianchang@ihb.ac.cn

质结构的作用^[16]。关于组蛋白变异体的功能,主要报道了银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和斑马鱼卵母细胞特异的H2A变异体H2af1o具有维持细胞同步分裂的作用^[17-18];斑马鱼H2afza变异体导致颅骨发育畸形^[19];斑马鱼MacroH2A变异体涉及斑马鱼的胚胎发生^[20];鲤的MacroH2A变异体参与核糖体基因的转录调控^[13]。组蛋白的杀菌活性也很早被发现,在硬骨鱼类中关于组蛋白衍生的抗菌肽有较多的研究报道。如组蛋白H2A衍生的抗菌肽包括来自于鲑(*Parasilurus asotus*)的Parasin I^[21]、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)的Hipposin^[22]、海洋硬骨鱼类如半带舌鳎(*Cynoglossus semifasciatus*)的Teleostin抗菌肽^[23],以及淇河鲫(*C. auratus*)的Ca-L-hipposin^[24]。组蛋白H2B衍生的抗菌肽包括斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的HLP-1(histone-like proteins-1)和HLP-3(histone-like proteins-3)^[25],以及鲤、鲫和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的HLP-1^[26-27]等。组蛋白衍生的抗菌肽大多数直接具有广谱、高效的抗菌活性。

已有一些研究显示了免疫基因核苷酸的多态性与疾病的易感性或者抗感染相关^[28]。如发现IFN- γ (Interferon-gamma)+874T/A基因的多态性与视网膜脉络膜炎弓形体病的易感性相关^[29];TLR2(Toll-like receptor 2)和TLR4(Toll-like receptor 4)信号通路中的重要接头蛋白TIRAP(Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein)的C539T多态性与肺结核的易感性相关^[30];TLR3(Toll-like receptor 3)的Leu412Phe多态性位点(rs3775291)对病毒性心肌炎易感染、但对脑炎病毒和艾滋病病毒抵制^[31-33];MyD88(myeloid differentiation factor 88)的rs6853多态性位点和TIRAP的rs8177374多态性位点抵制肺结核的感染^[34]等。在硬骨鱼类中,研究人员发现TLR3的-764 G/T位点多态性与草鱼抵制GCRV(grass carp reovirus)感染相关^[35];通过全转录组筛选的方法,从GCRV感染的草鱼个体和CIK细胞系中分别鉴定出413和832个GCRV抵制相关的单核苷酸多态性(SNP)位点、1 381和1 606个GCRV敏感相关的SNP位点^[36]。尽管关于鱼类组蛋白变异体在发育以及基因转录调控中的作用、鱼类组蛋白衍生的抗菌肽及其抗菌功能有较多的报道,但鱼类组蛋白基因是否存在核苷酸的多态性、组蛋白核苷酸序列的多态性是否会影响鱼类的抗病力以及

易感性还少见报道。本研究通过同源克隆斑马鱼和草鱼组蛋白H2A全长ORF,从群体水平研究了鱼类组蛋白H2A是否存在核苷酸的多态性。在此基础上,在鱼类胚胎或者细胞系中过表达其中的6个斑马鱼H2A核苷酸多态性的变异体(简称为zfH2A-1~zfH2A-6)和8个草鱼H2A核苷酸多态性的变异体(简称为gcH2A-1~gcH2A-8),研究了这些组蛋白H2A核苷酸多态性变异体在杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)感染中的作用。该研究结果对于筛选具有抗杀鱼爱德华氏菌感染的组蛋白具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼和草鱼组蛋白H2A基因的克隆及序列分析

扩增斑马鱼组蛋白H2A的cDNA模板来自于50尾感染有杀鱼爱德华氏菌的斑马鱼幼鱼,感染浓度为 2×10^8 CFU/mL,感染后24 h收集50尾左右的幼鱼(受精后第5天)用于RNA提取。扩增草鱼组蛋白H2A的cDNA模板来自于3尾感染有柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、体长12 cm左右、体质量50~75 g的草鱼,感染浓度为 5×10^6 CFU/mL,感染后30 h收集3尾草鱼的鳃组织用于RNA提取。扩增引物使用以往报道的引物H2AF/H2AR^[37]。斑马鱼和草鱼组蛋白H2A核苷酸多态性变异体核苷酸和氨基酸序列的比较使用Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)。序列相同性比较使用MegAlign软件。

1.2 斑马鱼组蛋白H2A核苷酸多态性变异体体内抗菌活性分析

斑马鱼组蛋白H2A核苷酸多态性变异体zfH2A-1~zfH2A-6质粒的构建方法以及扩增引物见以往报道^[37]。将所构建的斑马鱼组蛋白H2A核苷酸多态性变异体zfH2A-1~zfH2A-6以及空质粒FLAG(p3×FLAG-CMV-14, Siga-Aldrich)稀释到100 ng/ μ L。将这些质粒分别在1细胞期显微注射到斑马鱼的受精卵,典型注射量为2 nL。注射后的胚胎维持在斑马鱼养殖系统的水中,放置在28°C水浴箱中孵化。在受精后的第4天,将孵化出的幼鱼用于杀鱼爱德华氏菌的感染。感染浓度和方法参考以往的研究^[38],感染浓度设置为 2×10^8 CFU/mL。在感染后的第24和48 h,每

组分别收集 10 尾幼鱼用于菌落平板计数。

1.3 草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体外抗菌活性分析

草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体 gcH2A-1~gcH2A-8 质粒的构建方法以及扩增引物见报道^[37]。将所构建的草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体 gcH2A-1~gcH2A-8 以及空质粒 FLAG 稀释到 500 ng/ μ L。将这些质粒分别用 Lipofectamine[®] 2000 转染到过夜铺板的 24 孔 CIK 细胞中 (3×10^5 /孔)。24 h 后用杀鱼爱德华氏菌感染。感染复数和具体方法参考以往的研究^[39], 感染复数设置为 10。在感染后的 3 和 6 h, 分别用 PBS 清洗 CIK 细胞 4 次后, 每孔加入 500 μ L 含有 1%(V/V) Triton X-100 的 PBS, 室温裂解 20 min。将细胞裂解液充分振荡混匀后, 使用 TBS 培养基按照适当的比例进行稀释后, 涂布于 TSA 平板上。将 TSA 平板倒置于 28 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后进行计数, 根据稀释度计算每孔细胞的胞内细菌数量。

1.4 荧光定量 PCR 分析

将抗菌组蛋白 zfH2A-5 以及空质粒 FLAG 稀释到 100 ng/ μ L。将这些质粒分别在 1 细胞期显微注射到斑马鱼的受精卵中, 分别在受精后的第 1 和第 5 天, 每组分别取 50 尾胚胎或者幼鱼用于 RNA 提取。来自于不同样品的 2 μ g RNA 用 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, #K1622) 在 42 $^{\circ}$ C 用 oligo(dT)₁₈ 引物进行反转录。荧光定量 PCR 在 ABI Prism 7000 system 仪器上, 使用 SYBR[®] Green Master Mix (BioRad) 进行。检测的基因包括 NOD1 (nucleotide binding oligomerization domain containing 1)、NOD2 (nucleotide binding oligomerization domain containing 2)、pglyrp2 (peptidoglycan recognition protein 2)、pglyrp5 (peptidoglycan recognition protein 5)、pglyrp6 (peptidoglycan recognition protein 6)、defbl1 (defensin, beta-like 1)、defbl3 (defensin, beta-like 3)、lyzc (lysozyme)、rnase12 (ribonuclease like 2) 和 rnase13 (ribonuclease like 3)。荧光定量的引物见文献^[37, 40]。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 52~58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量, 使用 GraphPad Prism 6 软件绘制柱状图。数据分析使用 *t* 检验 (Student's *t* test)。“*”代表 $P < 0.05$; “**”代表 $P < 0.01$; “ns”代表差异

不显著。

1.5 感染存活分析

将斑马鱼组蛋白 zfH2A-1、zfH2A-3 以及空质粒 FLAG 稀释到 100 ng/ μ L。将这些质粒分别在 1 细胞期显微注射到斑马鱼的受精卵中。在受精后的第 4 天, 将孵化出的幼鱼用于杀鱼爱德华氏菌的感染, 感染浓度为 2×10^8 CFU/mL。对于 zfH2A-1 注射组及相应的 FLAG 空质粒对照组, 每组各 3 个重复, 每个重复 35 尾幼鱼, 每组共计 105 尾幼鱼。对于 zfH2A-3 注射组及相应的 FLAG 空质粒对照组, 每组各 3 个重复, 每个重复 26 尾幼鱼, 每组共计 78 尾幼鱼。感染后每天统计死亡个数, 连续统计 6 d。用 GraphPad Prism 6 软件绘制感染存活曲线; 生存曲线的比较使用 Log Rank 检验。

2 结果

2.1 斑马鱼组蛋白 H2A 基因的克隆及其核苷酸多态性变异体序列分析

通过 CRISPR/Cas9 系统, 获得了斑马鱼 NOD1 和 RIP2 敲除的纯合子品系; 通过转录组测序的方法, 研究了斑马鱼 NOD1 和 RIP2 基因的敲除对免疫信号传导通路的影响^[38, 41]。结果发现, NOD1 和 RIP2 基因的敲除显著影响多个组蛋白基因的转录。为了揭示组蛋白 H2A 在 NOD1 和 RIP2 信号通路中的作用及其机制, 建立在转录组数据的基础上, 设计 1 对引物, 克隆组蛋白 H2A 的全长 ORF 序列以构建其真核表达质粒, 结果意外发现斑马鱼组蛋白 H2A 存在着丰富的核苷酸多态性序列 (图 1)。

实验中对获得的 10 个差异的斑马鱼 H2A 核苷酸多态性变异体 (GenBank 登录号: MT723830~MT723834、MT726195~MT726199) 进行序列相似性分析, 结果显示, 这 10 个 H2A 核苷酸多态性变异体之间的相似性为 90.2%~99.5%。10 个 H2A 核苷酸多态性变异体编码的氨基酸序列差异不大, 总共只有 6 个位点存在差异, 两两之间最多只有 2 个氨基酸位点存在差异 (图 2-a); 氨基酸序列的相似性为 97.7%~100%。其中, 斑马鱼组蛋白 H2A-1、H2A-3、H2A-4 和 H2A-10 的氨基酸序列完全相同 (图 2-b)。在 10 个差异的斑马鱼 H2A 核苷酸多态性变异体中, 同义突变所占的比例为 40%, 非同义突变所占的比例为 60%。

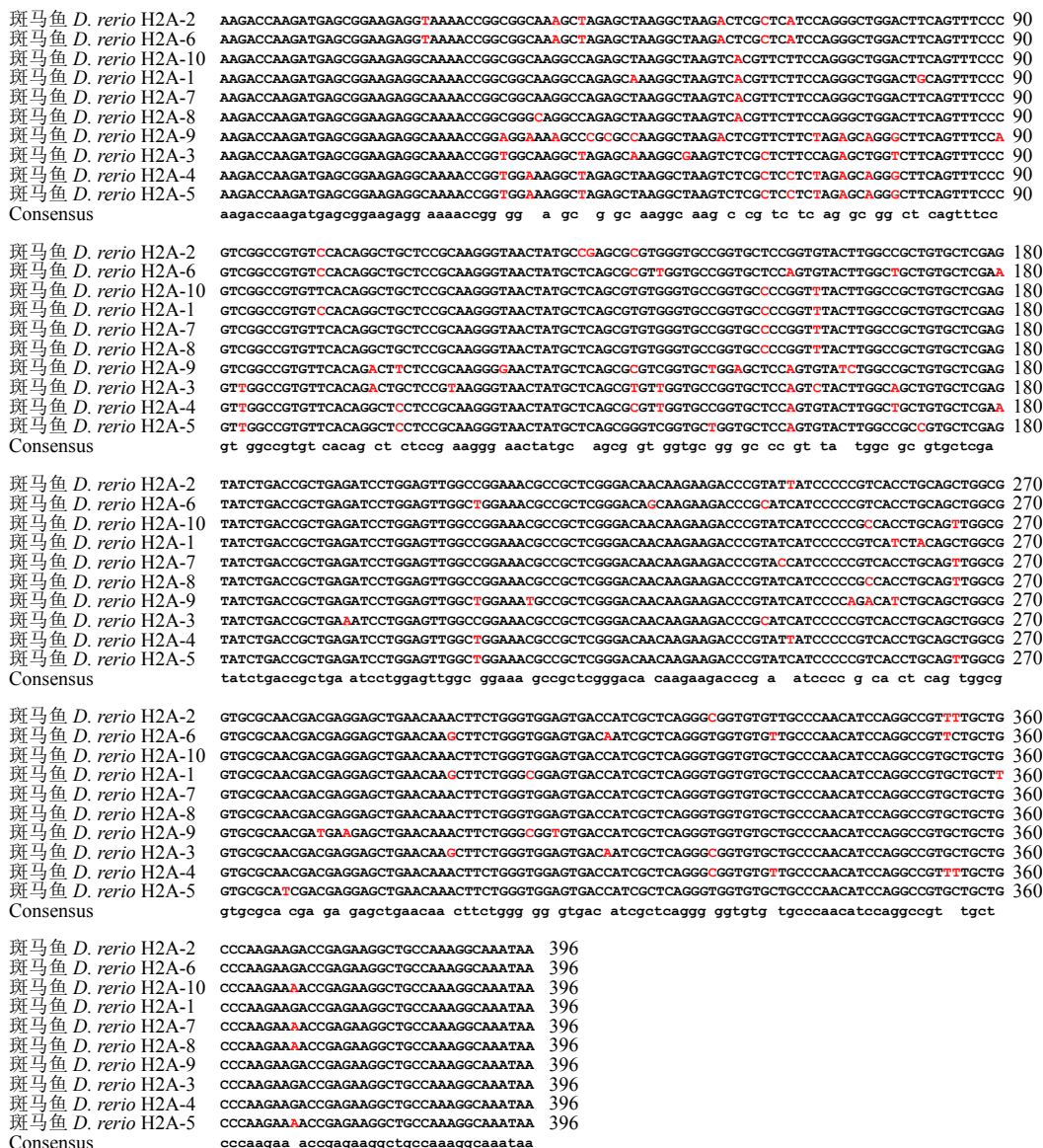


图 1 斑马鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变量核苷酸序列比较

核苷酸多态性变异的位点用红色标出

Fig. 1 Multiple nucleotide sequence alignments of *D. rerio* histone H2A variants with nucleotide polymorphism

The variation sites of nucleotide polymorphism are indicated in red

2.2 草鱼组蛋白 H2A 基因的克隆及其核苷酸多态性变异体序列分析

以草鱼细菌感染的 cDNA 为模板，从鳃组织中获得超过 10 个 H2A 核苷酸多态性的变异体 (图 3, GenBank 登录号为 MT723835~MT723844)。实验对其进行序列相似性分析，结果显示这 10 个 H2A 核苷酸多态性变异体之间的相似性为 93.5%~99.7%。这 10 个 H2A 核苷酸多态性变异体编码的氨基酸序列共有 7 个位点存在差异，两两之间最多只有 3 个氨基酸位点存在差异 (图 4-a)；氨基酸序列的相似性为 96.1%~100%。其中，草鱼

组蛋白 gH2A-2 和 gH2A-6 的氨基酸序列完全相同 (图 4-b)；gH2A-5、gH2A-8 和 gH2A-9 的氨基酸序列完全相同 (图 4-c)。在 10 个差异的草鱼 H2A 核苷酸多态性变异体中，同义突变所占的比例为 30%，非同义突变所占的比例为 70%。

2.3 斑马鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体在杀鱼爱德华氏菌感染中的作用

实验选取了 6 个斑马鱼 H2A 核苷酸多态性变异体，在斑马鱼胚胎中过表达之后，初步分析了野生型斑马鱼和 H2A 变异体过表达的斑马鱼幼鱼在杀鱼爱德华氏菌感染中的作用，结果

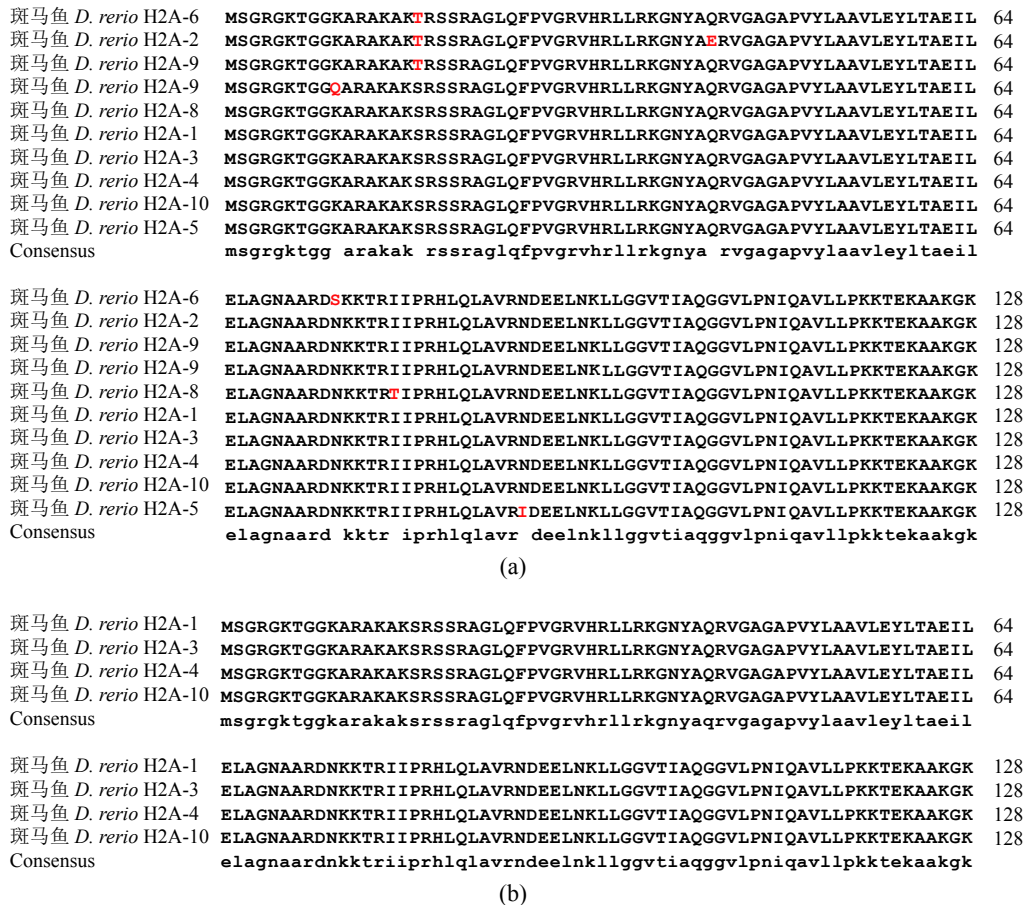


图 2 斑马鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变量氨基酸序列比较

(a) 所获得的斑马鱼 10 个组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变量氨基酸序列比较, 氨基酸发生变异的位点用红色标出; (b) 斑马鱼组蛋白 H2A-1、H2A-3、H2A-4 和 H2A-10 的氨基酸序列比较

Fig. 2 Multiple amino acid sequence alignments of *D. rerio* histone H2A variants with nucleotide polymorphism

(a) amino acid sequence alignments of 10 histone H2A variants with nucleotide polymorphism from zebrafish. The variation sites of amino acids are indicated in red; (b) amino acid sequence alignments of H2A-1, H2A-3, H2A-4 and H2A-10

显示斑马鱼组蛋白 zfH2A-1、zfH2A-5 和 zfH2A-6 的过表达显著抑制杀鱼爱德华氏菌在体内的增殖; zfH2A-2、zfH2A-3 和 zfH2A-4 的过表达显著促进杀鱼爱德华氏菌在体内的增殖 (图 5)。和野生型的对照组相比, zfH2A-1 过表达的实验组在感染后的 24 h, 细菌数量降低了 15.8 倍; 在感染后的 48 h, 细菌数量降低了 59.6 倍 (图 5-a)。和相应的野生型对照组相比, zfH2A-2 过表达的实验组在感染后的 24 h, 细菌数量增加了 10.4 倍; 在感染后的 48 h, 细菌数量增加了 22.6 倍 (图 5-b)。zfH2A-3 过表达的实验组在感染后的 24 h, 细菌数量增加了 3.6 倍; 在感染后的 48 h, 细菌数量增加了 11.2 倍 (图 5-c)。zfH2A-4 过表达的实验组在感染后的 24 h, 细菌数量增加了 25.6 倍; 在感染后的 48 h, 细菌数量增加了 121.7 倍 (图 5-d)。zfH2A-5 过表达的实验组在感染后的 24 h, 细菌

数量降低了 14.1 倍; 在感染后的 48 h, 细菌数量降低了 3.5 倍 (图 5-e)。zfH2A-6 过表达的实验组在感染后的 24 h, 细菌数量降低了 2.1 倍; 在感染后的 48 h, 细菌数量降低了 1.5 倍 (图 5-f)。

2.4 草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体在杀鱼爱德华氏菌感染中的作用

实验选取了 8 个草鱼 H2A 核苷酸多态性变异体, 在草鱼 CIK 细胞中过表达后, 初步分析了空质粒转染的对照组和 H2A 变异体转染的实验组在杀鱼爱德华氏菌感染中的作用, 结果显示草鱼组蛋白 gcH2A-2、gcH2A-3、gcH2A-4 和 gcH2A-8 在 CIK 细胞中的过表达显著抑制杀鱼爱德华氏菌的增殖; gcH2A-1、gcH2A-5、gcH2A-6 和 gcH2A-7 在 CIK 细胞中的过表达对杀鱼爱德华氏菌的增殖没有显著的作用 (图 6)。其中,

草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	ATGAGCGGAAGAGGCAAACCGGTGGAAGGCTAGAGCTAAGGCTAAGTCTCGTCCCTAGAGCAGGGCTTCAGTTTCCCGTTGGCCGT	90
Consensus	atg gcggaagaggcaaaaccggg g aaggc agagctaaggctaagtc cg to tc ag gc gg cttcagtttcccggt ggcgct	
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	GTTACACAGGCTCTCCGCAAGGTAACATATGCTCAGCGGTGCGGTGCTGGTGTCCAGTGTACTTGGCCGCGGTGCTCGAGTATCTGACC	180
Consensus	gttcacaggctctccgcaaggtaactatgctcagcgggtcgggtgctgggtgtccagtgtacttggccgcggtgctcgagtatctgacc	
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	TCTGAGATCCTGGAGTTGGCTGGAAACGCCGCTCGGGACAACAAGAAGACCCGTATCATCCCCCGTACACCTGCAGTTGGCCGTTGGCAATC	270
Consensus	ctgagatcctggagttggctggaaacgccgctcgggacacaagaagaccggtatcatcccccggtacacctgcagttggccggtggcaatc	
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	GACGAGGAGCTGAACAAACTTCTGGTGGAGTGACATCGCTCAGGGTGGTGTGCTGCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAAGAAA	360
Consensus	gacgaggagctgaacaaacttctgggtggagtgacctcgctcaggggtggtgtgctgccaacatccaggccgtgctgctgccaaagaaa	
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	ACCGAGAAGGCTGCCAAGGCCAATAA	387
Consensus	accgagaaggctgccaaaggccaataa	

图 3 草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变核核苷酸序列比较

核苷酸多态性变异的位点用红色标出

Fig. 3 Multiple nucleotide sequence alignments of *C. idella* histone H2A variants with nucleotide polymorphism

The variation sites of nucleotide polymorphism are indicated in red

gH2A-2 过表达的 CIK 细胞只是在感染后的 6 h 才显著抑制杀鱼爱德华氏菌的增殖 (图 6-b); gH2A-3 和 gH2A-4 过表达的 CIK 细胞在感染后的 3 和 6 h 均能显著抑制杀鱼爱德华氏菌的增殖 (图 6-c, 图 6-d); gH2A-8 过表达的 CIK 细胞只是在感染后的 3 h 抑制杀鱼爱德华氏菌的增殖 (图 6-h)。

2.5 抗菌组蛋白 zH2A-5 对免疫基因的表达调控

在筛选出来的 3 个斑马鱼抗菌组蛋白 zH2A-1、zH2A-5 和 zH2A-6 中, 使用具有中等抗菌作用

的抗菌组蛋白 zH2A-5 真核表达质粒, 通过荧光定量 PCR 技术研究了 zH2A-5 对一些抗菌相关的模式识别受体 PRRs 以及抗菌蛋白的表达调控。结果显示, 在过表达的第 1 天, zH2A-5 显著诱导 NOD1 (6.1 倍)、NOD2 (4.6 倍), pglyrp2 (5.7 倍) 和 pglyrp5 (3.5 倍) 的表达; 对 pglyrp6 的表达没有明显调控作用。随着过表达时间的延长, zH2A-5 从第 1 天 6.1 倍的增加降到第 5 天 3.1 倍的增加。在过表达的第 5 天, zH2A-5 仍能显著诱导 NOD1 和 pglyrp2 的表达; 对 NOD2 和 pglyrp5 的表达没有明显的诱导作用; 对 pglyrp6 的表达

草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA R RVGAGAPVYLAAVLEYLT S EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	MSGRGKT G DKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	M RGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRL F RKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRL F RKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
Consensus	m grgktg karakaksrssraglqfpvgrvhrll rkgnya rvgagapvylaavleylt eil	
(a)		
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-1	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVR I DEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-4	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQ G CVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-3	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVR I DEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVR I DEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-7	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-10	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
Consensus	elagnaardnkktriiiprhlqlavr deelnklggvtiaqggvlpniqavllpkktekaakgk	
(b)		
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
Consensus	msgrgktggkarakaksrssraglqfpvgrvhrll rkgnyaqrvagapvylaavleyltaeil	
(c)		
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-2	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVR I DEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-6	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVR I DEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
Consensus	elagnaardnkktriiiprhlqlavr deelnklggvtiaqggvlpniqavllpkktekaakgk	
(b)		
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYA Q RVGAGAPVYLAAVLEYLT A EIL	60
Consensus	msgrgktggkarakaksrssraglqfpvgrvhrll rkgnyaqrvagapvylaavleyltaeil	
(c)		
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-5	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-8	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
草鱼 <i>C. idella</i> H2A-9	ELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKA A KGK	128
Consensus	elagnaardnkktriiiprhlqlavrndeelnklggvtiaqggvlpniqavllpkktekaakgk	
(c)		

图 4 草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变体氨基酸序列比较

(a) 所获得的草鱼 10 个组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变体氨基酸序列比较, 氨基酸发生变异的位点用红色标出; (b) 草鱼组蛋白 H2A-2 和 H2A-6 的氨基酸序列比较; (c) 草鱼组蛋白 H2A-5、H2A-8 和 H2A-9 的氨基酸序列比较

Fig. 4 Multiple amino acid sequence alignments of *C. idella* histone H2A variants with nucleotide polymorphism

(a) amino acid sequence alignments of 10 histone H2A variants with nucleotide polymorphism from *C. idella*. The variation sites of amino acids are indicated in red; (b) amino acid sequence alignments of H2A-2 and H2A-6; (c) amino acid sequence alignments of H2A-5, H2A-8 and H2A-9

增强(图 7-a)。在过表达的第 1 天, zfH2A-5 显著诱导抗菌蛋白 defbl1、defbl3、lyzc 和 mase13 的表达, 对 mase12 的表达没有显著作用。在过表达的第 5 天, zfH2A-5 弱微增强 mase12 的表达; 弱微减少 mase13 的表达; 对 defbl1、defbl3 和 lyzc 的表达没有明显作用(图 7-b)。

2.6 抗菌组蛋白 zfH2A-1 在斑马鱼体内的过表达对感染幼鱼存活率的影响

在筛选出来的 3 个斑马鱼抗菌组蛋白 zfH2A-1、zfH2A-5 和 zfH2A-6 中, 使用具有较强抗菌作用

的抗菌组蛋白 zfH2A-1 真核表达质粒, 将其显微注射到斑马鱼胚胎中; 通过过表达以及评估感染存活率的方法研究了抗菌组蛋白 zfH2A-1 在斑马鱼体内的过表达对感染幼鱼存活率的影响。和显微注射空质粒 FLAG 的对照组相比, zfH2A-1 在斑马鱼体内的过表达显著提高了感染有杀鱼爱德华氏菌幼鱼的存活率(图 8-a)。其中, 注射空质粒组的存活率为 12.38%, 注射抗菌组蛋白 zfH2A-1 组的存活率为 84.76%。抗菌组蛋白 zfH2A-1 已经被本团队申请并授权了国家发明专利^[42]。

实验中也研究了与斑马鱼 zfH2A-1 氨基酸

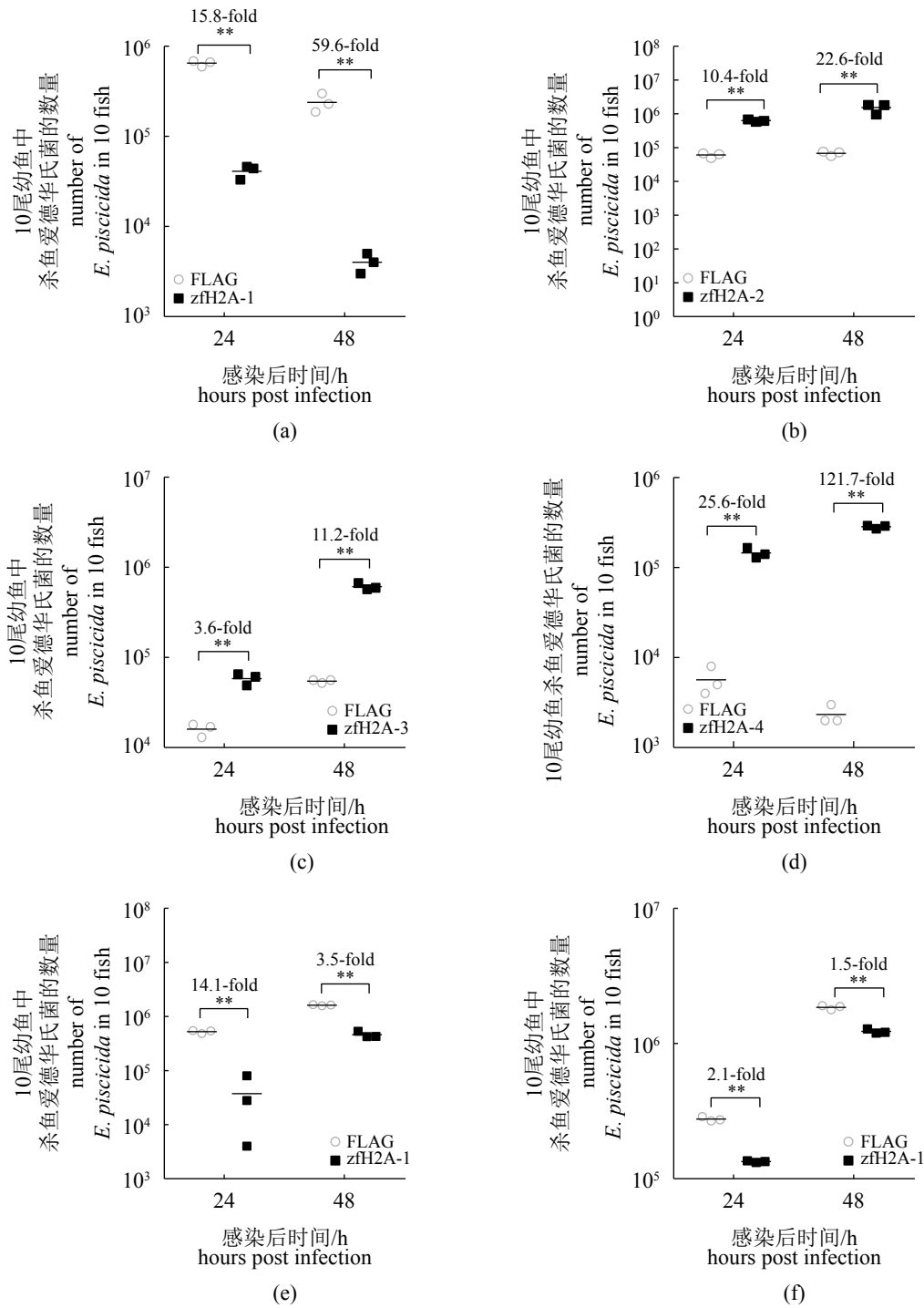


图 5 斑马鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性可変体体内抗菌作用

(a) 斑马鱼组蛋白 zfh2A-1 在鱼体内抑制细菌增殖的作用；(b) 斑马鱼组蛋白 zfh2A-2 在鱼体内促进细菌增殖作用；(c) 斑马鱼组蛋白 zfh2A-3 在鱼体内促进细菌增殖作用；(d) 斑马鱼组蛋白 zfh2A-4 在鱼体内促进细菌增殖作用；(e) 斑马鱼组蛋白 zfh2A-5 在鱼体内抑制细菌增殖作用；(f) 斑马鱼组蛋白 zfh2A-6 在鱼体内抑制细菌增殖作用。a~f 中, FLAG 为质粒空载骨架

Fig. 5 *In vivo* antibacterial activities of *D. rerio* histone H2A variants with nucleotide polymorphism

(a) the antibacterial effect of zebrafish histone zfh2A-1 *in vivo*; (b) the proliferative effect of zebrafish histone zfh2A-2 on the bacterial growth *in vivo*; (c) the proliferative effect of zebrafish histone zfh2A-3 on the bacterial growth *in vivo*; (d) the proliferative effect of zebrafish histone zfh2A-4 on the bacterial growth *in vivo*; (e) the antibacterial effect of zebrafish histone zfh2A-5 *in vivo*; (f) the antibacterial effect of zebrafish histone zfh2A-6 *in vivo*. For a-f, FLAG is the empty plasmid used for plasmid construction. "**" . $P < 0.05$; "***" . $P < 0.01$; "ns". not significant difference, the same below

序列完全相同的 zfh2A-3 在杀鱼爱德华氏菌感染存活中的作用。结果显示, 和显微注射空质粒 FLAG 的对照组相比, zfh2A-3 在斑马鱼体内的

过表达显著降低了感染有杀鱼爱德华氏菌幼鱼的存活率(图 8-b)。其中, 注射空质粒组的存活率为 60.26%, 注射组蛋白 zfh2A-3 组的存活率

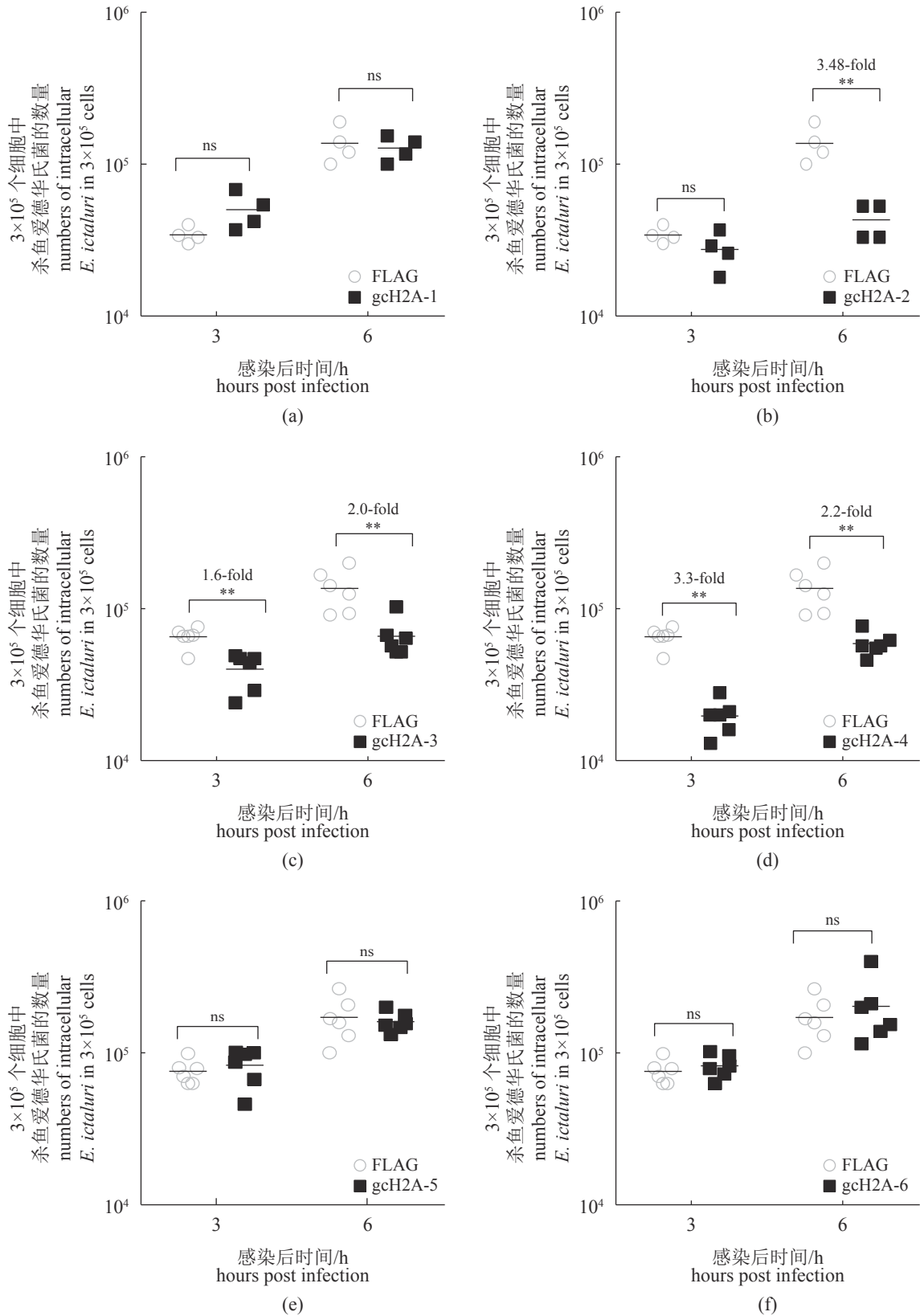


图 6 Fig. 6

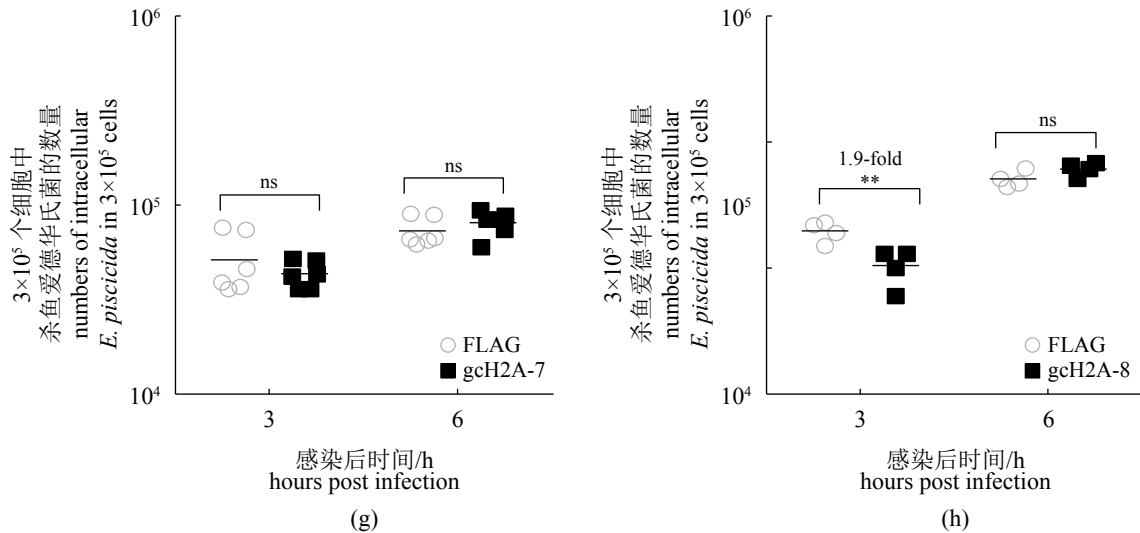


图6 草鱼组蛋白 H2A 核苷酸多态性可变量体外抗菌作用

(a) 草鱼组蛋白 gcH2A-1 对细菌增殖没有明显作用；(b) 草鱼组蛋白 gcH2A-2 体外抑制细菌增殖作用；(c) 草鱼组蛋白 gcH2A-3 体外抑制细菌增殖作用；(d) 草鱼组蛋白 gcH2A-4 体外抑制细菌增殖作用；(e) 草鱼组蛋白 gcH2A-5 对细菌增殖没有明显作用；(f) 草鱼组蛋白 gcH2A-6 对细菌增殖没有明显作用；(g) 草鱼组蛋白 gcH2A-7 对细菌增殖没有明显作用；(h) 草鱼组蛋白 gcH2A-8 体外抑制细菌增殖作用。a-h 中, FLAG 为质粒空载骨架

Fig. 6 *In vitro* antibacterial activities of *C. idella* histone H2A variants with nucleotide polymorphism

(a) no significant effect of gcH2A-1 on bacteria proliferation *in vitro*; (b) the antibacterial effect of gcH2A-2 *in vitro*; (c) the antibacterial effect of gcH2A-3 *in vitro*; (d) the antibacterial effect of gcH2A-4 *in vitro*; (e) no significant effect of gcH2A-5 on bacteria proliferation *in vitro*; (f) no significant effect of gcH2A-6 on bacteria proliferation *in vitro*; (g) no significant effect of gcH2A-7 on bacteria proliferation *in vitro*; (h) the antibacterial effect of gcH2A-8 *in vitro*. For a-h, FLAG is the empty plasmid used for plasmid construction

为 33.33%。

3 讨论

近年来,关于组蛋白衍生的抗菌肽成为研究的热点,这些组蛋白衍生的抗菌肽是在蛋白酶作用下由生物体内的组蛋白降解并分泌而来。在硬骨鱼类中,组蛋白 H2A 具有较高的同源性;组蛋白 H2A 衍生的抗菌肽源于 H2A 的 N 端。组蛋白 H2A 衍生抗菌肽的抗菌作用已在鲑和大西洋庸鲽等鱼类中报道,显示对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有广谱的抗菌活性^[21-22]。然而也有研究显示鱼类完整的组蛋白 H2A 具有一定的抗菌活性^[43]。但不同于组蛋白 H2A 衍生的抗菌肽,完整的组蛋白 H2A 由于分子量较大以及涉及参与染色质结构形成,其在细胞内作为抗菌因子时可能存在一些缺陷^[44]。在斑马鱼中,本团队已发表的研究结果显示完整的组蛋白 H2A 具有很强的抗菌活性,其在斑马鱼体内的过表达不仅能抑制细菌的增殖,还能增强感染幼鱼的存活率^[37]。本研究成功地从斑马鱼和草鱼中,分别至少克隆到了 10 个 H2A 核苷酸多态性

的变异体。这应该是硬骨鱼类 H2A 存在丰富核苷酸多态性的首次报道。

研究结果表明,斑马鱼 zfH2A-1、zfH2A-3 和 zfH2A-4 的氨基酸序列完全相同,zfH2A-1 具有抗菌活性,而 zfH2A-3 和 zfH2A-4 却起着相反的作用。草鱼组蛋白 gcH2A-2 和 gcH2A-6 的氨基酸序列完全相同;gcH2A-2 具有抗菌作用,而 gcH2A-6 没有作用。这表明鱼类 H2A 核苷酸的多态性显著影响 H2A 的抗菌活性。与抗菌活性相一致的是,斑马鱼 zfH2A-1 在鱼体内的过表达能显著增强感染有杀鱼爱德华氏菌幼鱼的存活率,其存活率提高了 72.38%。而促进杀鱼爱德华氏菌增殖的 zfH2A-3 在鱼体内的过表达则增加了对杀鱼爱德华氏菌的易感性,其存活率降低了 26.93%。这表明组蛋白 H2A 核苷酸的多态性还显著影响鱼类对杀鱼爱德华氏菌的抗病力或易感性。推测鱼类组蛋白 H2A 核苷酸的多态性通过影响组蛋白 H2A 的翻译后修饰,进而影响组蛋白 H2A 对免疫靶基因的转录调控。鱼类组蛋白 H2A 核苷酸多态性的变异体可能通过调控免疫基因的表达以及调控免疫靶基因功能的差异,从而最终影响其对杀鱼爱德华氏菌的抗菌

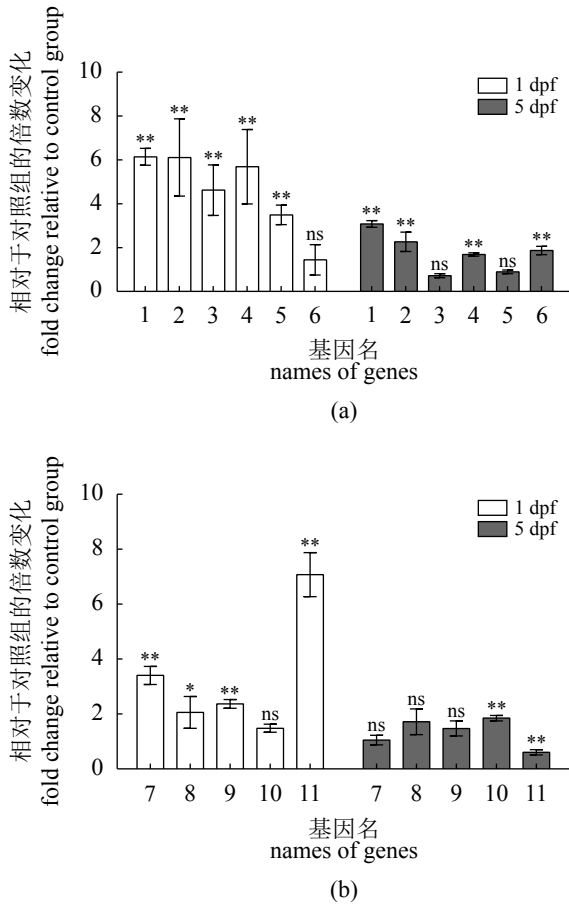


图 7 zfH2A-5 对细菌模式识别受体 (a) 和抗菌蛋白 (b) 的表达调控

Fig. 7 Regulation of zfH2A-5 on the expression of antibacterial PRRs (a) and antibacterial proteins (b)

(a) 1. *H2A*, 2. *NOD1*, 3. *NOD2*, 4. *pglyrp2*, 5. *pglyrp5*, 6. *pglyrp6*; (b) 7. *defb1*, 8. *defb3*, 9. *lyzc*, 10. *rnae12*, 11. *rnae13*

活性以及鱼类对杀鱼爱德华氏菌的抗病力或者易感性。鱼类组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体在细菌感染中功能差异的具体原因尚待进一步研究。

在哺乳动物中, 已有研究显示 H2A 变异体的 C 端对于启动炎症基因的表达至关重要^[45]。因此和组蛋白 H2A 衍生的抗菌肽相比, 完整的组蛋白 H2A 可能不仅具有抗菌作用, 可能还具有免疫调节的功能。*RIP2* 是 NODs 抗菌信号通路上的关键接头蛋白; 在没有被感染 (包括被杀鱼爱德华氏菌感染) 的情况下, *RIP2* 基因的敲除显著抑制多个组蛋白基因的转录^[37]。在本团队以往的研究中, 实验结果显示了完整的斑马鱼组蛋白 H2A 能和 *RIP2* 接头蛋白协同诱导一些抗菌基因以及 MHC 相关基因的转录; 斑马鱼组蛋白 H2A 也能直接诱导一些抗菌 PRRs 和抗菌蛋白的表达^[37]。类似于斑马鱼组蛋白 H2A, 抗菌组蛋白 zfH2A-5

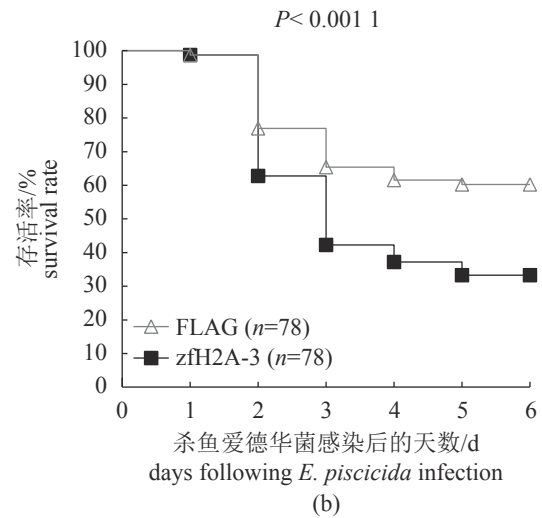
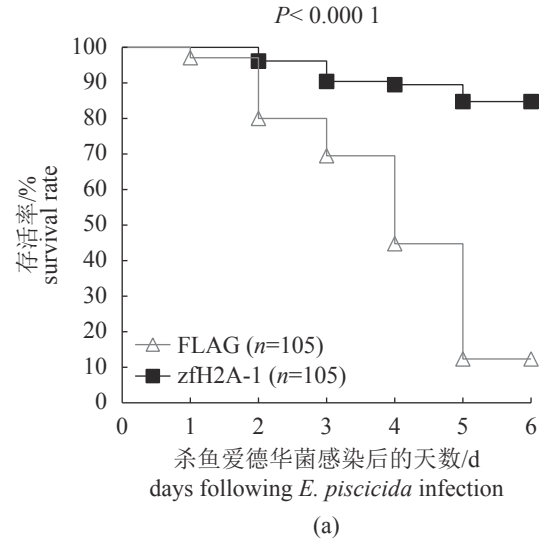


图 8 斑马鱼组蛋白 zfH2A-1(a) 和 zfH2A-3(b) 对感染有杀鱼爱德华氏菌幼鱼存活率的影响^[42]

Fig. 8 Effect of zfH2A-1 (a) and zfH2A-3 (b) on the overall survival rate of *D. rerio* larvae infected with *E. piscicida*

也具有免疫增强作用; 尤其在表达量高的时候, 对免疫基因的诱导作用更为显著。

在本研究中, 尽管已经获得斑马鱼和草鱼多个 H2A 核苷酸多态性的变异体, 但由于用于扩增的模板是来自于多尾鱼的混合 cDNA; 因此目前并不清楚这些 H2A 核苷酸多态性变异体是来自于同一个体还是来自于不同个体。此外, 尚不清楚在抗病以及易感的个体中 H2A 核苷酸多态性位点的差异变化。本团队已经在草鱼大规格鱼种中建立了草鱼烂鳃病病原柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)、出血病病原草鱼呼吸孤病毒的感染模型, 在后续的工作中将进一步解析并验证组蛋白 H2A 核苷酸多态性与草鱼

烂鳃病和出血病之间的关联。

总之, 尽管关于组蛋白变异体在发育以及基因转录调控中的作用、组蛋白衍生的抗菌肽及其生物学功能有较多的报道; 但组蛋白基因的多态性在病原感染中的作用还少见报道。在斑马鱼和草鱼中, 发现组蛋白 H2A 存在丰富的核苷酸多态性。而且, 鱼类组蛋白 H2A 核苷酸的多态性不仅影响 H2A 的抗菌活性, 还影响鱼类对杀鱼爱德华氏菌感染的抗病力或者易感性。本研究对于筛选具有抗病原体感染以及免疫增强作用的组蛋白、奠定鱼类组蛋白 H2A 核苷酸多态性变异体免疫防治的理论基础具有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] Fischle W, Wang Y M, Allis C D. Histone and chromatin cross-talk[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15(2): 172-183.
- [2] Fuchs J, Demidov D, Houben A, *et al.* Chromosomal histone modification patterns-from conservation to diversity[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(4): 199-208.
- [3] Waters R, van Eijk P, Reed S. Histone modification and chromatin remodeling during NER[J]. *DNA Repair*, 2015, 36: 105-113.
- [4] Miller J L, Grant P A. The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans[M]//Kundu T K. *Epigenetics: development and Disease*. Dordrecht: Springer, 2013: 289-317.
- [5] Messner S, Hottiger M O. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription[J]. *Trends in Cell Biology*, 2011, 21(9): 534-542.
- [6] Doenecke D. Chromatin dynamics from S-phase to mitosis: contributions of histone modifications[J]. *Cell and Tissue Research*, 2014, 356(3): 467-475.
- [7] Oliver C, Pradillo M, Corredor E, *et al.* The dynamics of histone H3 modifications is species-specific in plant meiosis[J]. *Planta*, 2013, 238(1): 23-33.
- [8] Li F F, Wan M, Zhang B P, *et al.* Bivalent histone modifications and development[J]. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2018, 13(2): 83-90.
- [9] Th'ng J P. Histone modifications and apoptosis: cause or consequence?[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2001, 79(3): 305-311.
- [10] Füllgrabe J, Hajji N, Joseph B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2010, 17(8): 1238-1243.
- [11] Sawan C, Hecceg Z. Histone modifications and cancer[J]. *Advances in Genetics*, 2010, 70: 57-85.
- [12] Cunliffe V T. Histone modifications in zebrafish development[J]. *Methods in Cell Biology*, 2016, 135: 361-385.
- [13] Araya I, Nardocci G, Morales J P, *et al.* MacroH2A subtypes contribute antagonistically to the transcriptional regulation of the ribosomal cistron during seasonal acclimatization of the carp fish[J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2010, 3(1): 14.
- [14] Sung M T, Dixon G H. Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1970, 67(3): 1616-1623.
- [15] Vastenhouw N L, Schier A F. Bivalent histone modifications in early embryogenesis[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2012, 24(3): 374-386.
- [16] Simonet N G, Reyes M, Nardocci G, *et al.* Epigenetic regulation of the ribosomal cistron seasonally modulates enrichment of H2A.Z and H2A.Zub in response to different environmental inputs in carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2013, 6(1): 22.
- [17] Wu N, Yue H M, Chen B, *et al.* Histone H2A has a novel variant in fish oocytes[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(2): 275-283.
- [18] Yue H M, Li Z, Wu N, *et al.* Oocyte-specific H2A variant H2af1o is required for cell synchrony before mid-blastula transition in early zebrafish embryos[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(4): 82.
- [19] Sivasubbu S, Balciunas D, Davidson A E, *et al.* Gene-breaking transposon mutagenesis reveals an essential role for histone H2afza in zebrafish larval development[J]. *Mechanisms of Development*, 2006, 123(7): 513-529.
- [20] Buschbeck M, Uribealago I, Wibowo I, *et al.* The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(10): 1074-1079.
- [21] Park I Y, Park C B, Kim M S, *et al.* Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*[J]. *FEBS Letters*, 1998, 437(3): 258-262.
- [22] Birkemo G A, Lüders T, Andersen Ø, *et al.* Hipposin, a

- histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2003, 1646(1-2): 207-215.
- [23] Chaithanya E R, Philip R, Sathyan N, *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of a histone-derived antimicrobial peptide teleostin from the marine teleost fishes, *Tachysurus jella* and *Cynoglossus semifasciatus*[J]. *International Scholarly Research Notices*, 2013, 2013: 185807.
- [24] 武向敏. 淇河鲫 *H2A* 与 Ca-L-hipposin 克隆和特征分析及其对细菌感染的表达响应 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2014.
- Wu X M. The study of cloning, characteristic analyses and the expression of response of a bacterial infection in *Carassius auratus* in Qihe river both of *H2A* and Ca-L-hipposin[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2014 (in Chinese).
- [25] Robinette D, Wada S, Arroll T, *et al.* Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1998, 54(5): 467-475.
- [26] 靳宇阳. 四种淡水鱼类组蛋白 *H2B* 及其衍生抗菌肽 *HLP-1* 的基因克隆、特征分析和原核表达 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
- Jin Y Y. The four freshwater fish histone *H2B* and its derived antimicrobial peptide *HLP-1* gene cloning, characteristic analyses and prokaryotic expression[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2012 (in Chinese).
- [27] 费威. 淇河鲫组蛋白 *H2B* 和 *HLP1* 的克隆、表达及抑菌分析 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2015.
- Fei W. The study of cloning, expression and analysis of antibacterial in *Carassius auratus* of histone *H2B* and *HLP1*[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2015 (in Chinese).
- [28] Singh D P, Bagam P, Sahoo M K, *et al.* Immune-related gene polymorphisms in pulmonary diseases[J]. *Toxicology*, 2017, 383: 24-39.
- [29] de Albuquerque M C, do Couto Aleixo A L Q, Benchimol E I, *et al.* The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility[J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, 104(3): 451-455.
- [30] Liu Q Q, Li W Z, Li D D, *et al.* TIRAP C539T polymorphism contributes to tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 27: 32-39.
- [31] Gorbea C, Makar K A, Pauschinger M, *et al.* A role for Toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(30): 23208-23223.
- [32] Kindberg E, Vene S, Mickiene A, *et al.* A functional Toll-like receptor 3 gene (TLR3) may be a risk factor for tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2011, 203(4): 523-528.
- [33] Sironi M, Biasin M, Cagliani R, *et al.* A common polymorphism in *TLR3* confers natural resistance to HIV-1 infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2012, 188(2): 818-823.
- [34] Capparelli R, De Chiara F, Di Matteo A, *et al.* The MyD88 rs6853 and TIRAP rs8177374 polymorphic sites are associated with resistance to human pulmonary tuberculosis[J]. *Genes & Immunity*, 2013, 14(8): 504-511.
- [35] Heng J F, Su J G, Huang T, *et al.* The polymorphism and haplotype of *TLR3* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their associations with susceptibility/resistance to grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 45-50.
- [36] Liao Z W, Wan Q Y, Shang X Y, *et al.* Large-scale SNP screenings identify markers linked with GCRV resistant traits through transcriptomes of individuals and cell lines in *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1184.
- [37] Wu X M, Cao L, Nie P, *et al.* Histone *H2A* cooperates with *RIP2* to induce the expression of antibacterial genes and MHC related genes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 101: 103455.
- [38] Wu X M, Chen W Q, Hu Y W, *et al.* *RIP2* Is a critical regulator for NLRs signaling and MHC antigen presentation but Not for MAPK and PI3K/Akt pathways[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 726.
- [39] Li J H, Yu Z L, Xue N N, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of peptidoglycan recognition protein 6 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 42(2): 244-255.
- [40] Fang H, Wu X M, Hu Y W, *et al.* *NLRC3*-like 1 inhibits

- NOD1-RIPK2 pathway via targeting RIPK2[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 112: 103769.
- [41] Hu Y W, Wu X M, Ren S S, *et al.* NOD1 deficiency impairs CD44a/Lck as well as PI3K/Akt pathway[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2979.
- [42] 昌鸣先, 武小曼, 曹璐. 核酸分子、表达载体及应用、抗菌药物和方法: 中国, 201910460046.4[P]. 2019-09-03.
- Chang M X, Wu X M, Cao L. Nucleic acid molecule, expression vector and application thereof, antibacterial drug and method thereof: CN, 201910460046.4[P]. 2019-09-03 (in Chinese).
- [43] Fernandes J M O, Kemp G D, Molle M G, *et al.* Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *The Biochemical Journal*, 2002, 368(2): 611-620.
- [44] Kim H S, Park C B, Kim M S, *et al.* cDNA cloning and characterization of Buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229(2): 381-387.
- [45] Contrepois K, Coudereau C, Benayoun B A, *et al.* Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14995.

Nucleotide polymorphism and function of piscine histone H2A in *Edwardsiella piscicida* infection

WU Xiaoman, FANG Hong, NIE Pin, CHANG Mingxian*

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Histones are central components of nucleosome and chromatin, which play critical roles in diversifying chromatin structure, transcriptional regulation, ontogenesis and so on. Although there were a lot of reports on the effects of piscine histones in the development, gene transcription regulation and anti-microbial properties of histone-derived antimicrobial peptides, the roles of histone nucleotide polymorphism in pathogen infection have not been reported in any species of vertebrates. In the present study, we found that nucleotide polymorphisms were abundant in zebrafish (*Danio rerio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) H2A. There was 90%-100% identity among *D. rerio* and *C. idella* H2A variants at the nucleotide level. At most 3 sites of amino acid mutation existed between H2A variants from *D. rerio* or *C. idella*. The results from the *in vitro* and *in vivo* studies showed that the nucleotide polymorphism of *D. rerio* and *C. idella* H2A significantly affected the antibacterial activities of H2A. Furthermore, the overexpression of *D. rerio* antibacterial H2A variants in *D. rerio* embryos and/or larvae not only has the immune enhancement effect, but also enhances the resistance of *D. rerio* larvae against *Edwardsiella piscicida* infection. The present study established the immunological basis of histone H2A variants with nucleotide polymorphism in disease susceptibility or disease resistance.

Key words: *Danio rerio*; *Ctenopharyngodon idella*; *Edwardsiella piscicida*; histone H2A; nucleotide polymorphism; antibacterial activities; immune regulation

Corresponding author: CHANG Mingxian. E-mail: mingxianchang@ihb.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31873046); Application Foundation Frontier Project of Wuhan (2019020701011467)