

# 大黄鱼 *Lcnkl3* 基因的分子结构、表达特征及多肽片段抗菌活性

周齐家<sup>1</sup>, 潘滢<sup>2</sup>, 陈佳<sup>2</sup>, 郑炜强<sup>2</sup>, 王军<sup>2</sup>

(1. 南宁师范大学北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室, 广西 南宁 530001; 2. 大黄鱼育种国家重点实验室, 宁德市富发水产有限公司, 福建 宁德 352103)

**摘要:** 作为重要的免疫基因, *NK-lysin* 参与了鱼类非特异性免疫系统对抗病原感染的免疫应答过程。在之前的研究中, 我们已经发现重要经济鱼类大黄鱼(*Larimichthys crocea*)体内存在 2 种类型的 *NK-lysin* 基因。在本文中我们报道了 1 种新型大黄鱼 *NK-lysin* 基因 *Lcnkl3*, 并对基因序列、表达特征及其多肽片段的抗菌活性进行了分析。*Lcnkl3* 基因的开放阅读框长度为 435 bp, 编码 144 个氨基酸残基, 其多肽序列 *Lcnkl3* 中包含 Saposin B 结构域及 6 个高度保守的半胱氨酸残基。系统进化分析表明 *Lcnkl3* 与大黄鱼 *Lcnkl2* 最为相似, 与其他鱼类 *NK-lysin* 多肽则差异较大。*Lcnkl3* 基因在未受感染的大黄鱼各组织中具有不同的基础表达量, 表达水平最高的组织为心脏。在病原诱导的免疫应答过程中, *Lcnkl3* 基因在各组织不同感染阶段的表达模式存在差异。源于 *Lcnkl3* 成熟肽序列的多肽片段对不同细菌的抑制和杀灭效果差异显著。以上结果表明 *Lcnkl3* 属于大黄鱼 *NK-lysin* 基因家族, 并参与了大黄鱼对抗病原感染的免疫过程。

**关键词:** *NK-lysin* 基因; 大黄鱼(*Larimichthys crocea*); 非特异性免疫系统; 抗菌活性

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)4-0025-12

DOI: 10.11759/hyxx20201106003

*NK-lysin* 是由毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes)和自然杀伤细胞(natural killer cells)产生的小分子多肽, 属于鞘脂激活蛋白样蛋白(saposin-like protein)家族成员<sup>[1-2]</sup>, 在鱼类免疫系统对抗病原感染的过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。*NK-lysin* 的多肽序列中具有鞘脂激活蛋白 B(Saposin B)结构域及 6 个半胱氨酸残基<sup>[4]</sup>, 该特征在鱼类到哺乳动物 *NK-lysin* 序列中高度保守。*NK-lysin* 具备广谱的抗病原活性, 不仅能够杀灭细菌、真菌、病毒、原生动物以及寄生虫<sup>[5-9]</sup>, 还能抑制肿瘤细胞生长<sup>[10-11]</sup>, 因此具备良好的应用前景。目前在脊椎动物体内已发现了多种类型的 *NK-lysin* 基因, 围绕其结构与免疫活性的研究也不断增加。

*NK-lysin* 最初被发现于猪(*Sus scrofa*)的小肠组织<sup>[1, 12]</sup>, 随后在脊椎动物体内陆续有 *NK-lysin* 基因得到鉴定。在硬骨鱼类中, *NK-lysin* 基因最先由 Wang 等发现于斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)体内<sup>[13-14]</sup>, 随后其他鱼类中的 *NK-lysin* 基因也相继得到分析, 特别是近几年在鱼类中发现的 *NK-lysin* 基因数量增长迅速。除斑点叉尾鮰外, 其他已被发现具有 *NK-lysin* 基因的种类有: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[15]</sup>、半滑舌鳎

(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[16]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[17]</sup>、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)<sup>[18]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[19]</sup>、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[20]</sup>、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[21]</sup>、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)<sup>[22]</sup>、达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)<sup>[23]</sup>、褐菖鲈(*Sebastes marmoratus*)<sup>[24]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[25-26]</sup>、弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)<sup>[27]</sup>、巴马拟缨鱼(*Pseudocrossocheilus bamaensis*)<sup>[28]</sup>、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)<sup>[29]</sup>、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[30]</sup>、大西洋鲷(*Sparus aurata*)<sup>[31]</sup>、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[31-32]</sup>等。

收稿日期: 2020-11-06; 修回日期: 2020-12-07

基金项目: 广西自然科学基金(2017GXNSFBA198107, 2018GXNSFAA050065); 南宁师范大学北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室开放课题(2016X03); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)

[Foundation: Guangxi Natural Science Foundation, Nos. 2017GXNSFBA198107, 2018GXNSFAA050065; The Opening Foundation of Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Ministry of Education, Nanning Normal University, No. 2016X03; China Agriculture Research System, No. CARS-47]

作者简介: 周齐家(1987—), 男, 山东济南人, 助理研究员, 博士, 主要从事鱼类免疫学研究, E-mail: zhouqijia@nynu.edu.cn; 王军(1953—), 通信作者, 女, 江苏扬州人, 教授, 硕士, 主要从事鱼类遗传多样性与育种研究, E-mail: junw@xmu.edu.cn

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)养殖业在我国水产养殖业中占据重要地位,但其发展长期受养殖病害问题制约,而不断深化对大黄鱼免疫功能基因的了解则可为制定并优化具有针对性的病害防控策略提供支持。在前期的研究中,我们在大黄鱼组织中发现了 2 种 *NK-lysin* 基因,对其基因序列结构及表达调控趋势的分析表明 *Lc-nk-lysin* 为典型的硬骨鱼类 *NK-lysin* 成员<sup>[33]</sup>,而 *Lcnkl2* 则属于新型的鱼类 *NK-lysin* 基因<sup>[34]</sup>。在本文中,我们对在大黄鱼组织中发现的第 3 种 *NK-lysin* 基因——*Lcnkl3* 进行了研究,分析了该基因的序列特征、组织表达特性、诱导表达趋势及其多肽片段的抗菌活性,通过将其与另外 2 种大黄鱼 *NK-lysin* 基因进行比较,发现该基因与 *Lcnkl2* 更为相似。本文围绕 *Lcnkl3* 基因开展分析研究,以期增进对于大黄鱼 *NK-lysin* 基因家族的了解,为后续进一步探索大黄鱼 *NK-lysin* 的免疫调控机制及其多肽序列组成与抗病原活性的关系提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 大黄鱼 *Lcnkl3* 基因的克隆与序列分析

实验用鱼购买自福建宁德三都澳大黄鱼养殖区,暂养两周至其状态稳定并随机分组,随后利用刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)感染实验组大黄鱼并采集各组织样品保存,同时采集未感染大黄鱼各组织样品保存,用于转录组测序以及基因的组织表达与诱导表达测定,采集方法如前文所述<sup>[33, 35]</sup>。测序后

利用生物信息学分析方法在大黄鱼肝脏转录组数据库中筛选获得了 *Lcnkl3* 的参考基因序列,以该序列为模板克隆验证 *Lcnkl3* 基因并分析序列结构,主要步骤如下:在未受感染的大黄鱼肝脏组织中提取总 RNA 并立即将其反转录为 cDNA,通过特异性引物(Nk13-F1 与 Nk13-R1)扩增 *Lcnkl3* 基因序列。PCR 扩增程序为:首先于 94 °C 预变性 5 min,随后以 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 1 min 为一个循环,共进行 30 个循环,最后于 72 °C 下延伸 10 min。将 PCR 扩增产物加至浓度为 1% 的琼脂糖凝胶(Biowset),将凝胶放置于 TBE 电泳缓冲液中分离基因片段,随后切下包含 *Lcnkl3* 基因片段的凝胶条带并使用 DNA 回收试剂盒(Tiangen)回收和纯化目的基因片段。将纯化的 *Lcnkl3* 基因片段与 pMD19-T 载体(TaKaRa)连接后转入化学感受态细胞(TransGen),使用 LB 培养基于 37 °C 恒温培养箱中将包含目的基因片段的菌液培养 8~10 h。随机挑取单个菌落,使用通用引物扩增验证后送交上海生工生物工程公司测定重组阳性克隆的基因序列。获得经过验证的 *Lcnkl3* 基因片段后以该序列片段为模板设计特异性引物,利用 cDNA 末端快速扩增技术扩增 *Lcnkl3* 基因片段的 3' 端及 5' 端的序列,用于扩增 *Lcnkl3* 基因 cDNA 3' 端序列的引物的退火温度分别为 59 °C、57 °C、59 °C,用于扩增 *Lcnkl3* 基因 cDNA 5' 端序列的引物退火温度为 57 °C。*Lcnkl3* 基因克隆步骤所使用的引物序列见表 1。

表 1 用于 *Lcnkl3* 基因克隆与荧光定量 PCR 检测的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for gene cloning and quantitative PCR detection of *Lcnkl3*

引物名称	引物序列(5'→3')	作用
Nk13-F1	GCAGTTGTTGTGAAGTCGTGGGA	基因片段克隆
Nk13-R1	TCTTTGCTAIGTAGTTGCTCAGTCT	基因片段克隆
Nk13-F31	CATCGCTCTTCTCCTGCTCTCCG	cDNA 3' 扩增
Nk13-F32	CCGCAGTTGTTGTGAAGTCGTGG	cDNA 3' 扩增
Nk13-F33	GGGCTCCTGTTATGCCTGTCGGT	cDNA 3' 扩增
Nk13-R51	GCCTGCCGCTTTACTTTGGACAC	cDNA 5' 扩增
Nk13-R52	ATGTACCGACAGGCATAACAGGAGC	cDNA 5' 扩增
Nk13-R53	CTTCCTCCTTTCAGTTTCGTCCTC	cDNA 5' 扩增
RA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC	cDNA 5' 扩增
dT-RA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	反转录
Nk13-FL-F	ATCGCTCTTCTCCTGCTCTC	序列拼接验证
Nk13-FL-R	CCTTCTCAATAAAGCTTTACACGC	序列拼接验证
Nk13-FQ	CGCCTGCAAGAAGGTCACCA	荧光定量 PCR

续表

引物名称	引物序列(5'→3')	作用
Nkl3-RQ	AAATTCTCCGGGAAGATCCGTT	荧光定量 PCR
ActinF	AAGCCAACAGGGAGAAGATGAC	荧光定量 PCR
ActinR	ACGACCAGAGGCATACA	荧光定量 PCR

使用 BioEdit 软件对获得的 *Lcnkl3* 基因片段进行拼接, 使用 VecScreen(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>)识别 *Lcnkl3* 基因序列及 pMD19-T 载体序列, 使用 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序分析和比较不同基因序列的相似性, 开放阅读框位置及其编码的多肽序列利用 ORFfinder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行预测, 使用 SignalP 预测 LcNkl3 多肽的信号肽区

域, 利用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)和 SMART(<http://smart.embl.de/>) 预测 LcNkl3 多肽的二级结构, 利用 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)比对不同 NK-lysin 多肽序列的相似性, 利用 MEGA-X 进行系统进化分析, 计算方法使用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)。本文中用于多肽序列比对以及系统进化分析的物种名称见表 2。

表 2 用于同源性比对和系统进化分析的鱼类 NK-lysin 多肽序列登录号及参考文献

Tab. 2 Accession numbers of the teleost NK-lysin polypeptide sequences used for the homology and phylogenetic analyses

物种及序列名称	GenBank 登录号	参考文献
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> Lc-Nk-lysin	KJ865299	[33]
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> <i>Lcnkl2</i>	KP301138	[34]
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> <i>Lcnkl3</i>	KP301139	[本文]
斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i> type1	NM_001200208	[14]
斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i> type2	DQ153186	[14]
斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i> type3	DQ153187	[14]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> Nkla	KP100115	[17]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> Nklb	KP100116	[17]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> Nklc	KP100117	[17]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> Nkld	KP100118	[17]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> Nk-lysin-1	NM_001141110	[25]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> Nk-lysin-2	EG932844	[25]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> Nk-lysin-3	EG810337	[25]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> Nk-lysin-4	EG819316	[25]
巴马拟缨鱼 <i>Pseudocrossocheilus bamaensis</i> Nkla	MH910093	[28]
巴马拟缨鱼 <i>Pseudocrossocheilus bamaensis</i> Nklb	MH916607	[28]
巴马拟缨鱼 <i>Pseudocrossocheilus bamaensis</i> Nklc	MH916605	[28]
巴马拟缨鱼 <i>Pseudocrossocheilus bamaensis</i> Nkld	MK263337	[28]
巴马拟缨鱼 <i>Pseudocrossocheilus bamaensis</i> Nkle	MH916606	[28]
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> Nkl1	XM_019120973	[20]
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> Nkl2	KX034213	[20]
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> Nkl3	XM_019071085	[20]
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> Nkl4	XM_019092430	[20]

续表

物种及序列名称	GenBank 登录号	参考文献
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> Nkl5	XP_018952410.1	[20]
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> Nkl6	XP_018970060	[20]
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i> Nkla	/	[18]
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i> Nklb	/	[18]
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AU260449	[15]
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	KC346974	[16]
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	KT877168	[19]
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	MF67882	[21]
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	KU705506	[22]
卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	MN648454	[29]
弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	XM_020919797	[27]
褐菖鲉 <i>Sebastiscus marmoratus</i>	MK913633	[24]
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	MN131138	[30]
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	ASD56696	[32]
大西洋鲷 <i>Sparus aurata</i>	MN240490	[31]
达氏鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	AZL56981	[23]

## 1.2 *Lcnk13* 基因的组织表达与诱导表达

在组织表达测定实验中,采集 3 尾未感染大黄鱼的皮肤、鳃、头肾、脑、心脏、肝脏、脾脏、胃、肠、肌肉等 10 种组织,分别在上述组织中提取总 RNA 并立即反转录为 cDNA,利用  $\beta$ -actin 作为内参基因,设计特异性引物用于检测 *Lcnk13* 基因在未感染大黄鱼上述 10 种组织中的表达情况,以肝脏组织中 *Lcnk13* 基因的表达量为基准,计算不同组织中 *Lcnk13* 基因的基础表达量。随后,分别以大黄鱼受病原感染 6 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 的鳃、头肾、脾脏和肝脏为模板提取总 RNA 并立即将其反转录为 cDNA,利用  $\beta$ -actin 作为内参基因,以未感染大黄鱼相应组织中基因的表达量为基准,测定 *Lcnk13* 基因在大黄鱼 4 种组织中的诱导表达情况。使用 ABI 7500-FAST 荧光定量 PCR 仪进行基因表达量的测定,根据使用说明书设定扩增程序为:95 °C 预变性 30 s,之后以 95 °C 5 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s 为一个扩增循环,共进行 40 次循环。反应设置空白对照及 3 个平行对照,通过标准曲线评估特异性引物与内参基因引物的扩增效率,通过熔解曲线检验扩增的特异性,使用 SPSS 21 软件中的单因素方差分析以及  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对获得的数据进行计算,显著性水平设定为  $P$  值

<0.05,数据以平均值±标准误表示。荧光定量 PCR 检测所使用的引物序列见表 1。

## 1.3 *Lcnk13* 多肽片段合成与抗菌活性测定

通过分析已有的鱼类 NK-lysin 多肽序列特征,选取了一段位于 *Lcnk13* 成熟肽区域的序列片段 (VCNGFRSRFVRSACKKVTRRYQYR),由苏州强耀生物科技有限公司利用化学方法合成。经过高效液相色谱仪分离纯化和质谱检测,将以干粉形态保存的 *Lcnk13* 多肽片段溶解于超纯水中,并通过 2 倍稀释法将多肽溶液稀释为不同浓度(3  $\mu$ mol/L, 6  $\mu$ mol/L, 12  $\mu$ mol/L, 24  $\mu$ mol/L, 48  $\mu$ mol/L, 96  $\mu$ mol/L, 192  $\mu$ mol/L)用于后续实验。

测定了不同浓度的 *Lcnk13* 多肽溶液对于常见的革兰氏阳性细菌及革兰氏阴性细菌的抑制与杀灭效果,所用细菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、副溶血弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*),实验细菌菌株由集美大学水产学院赠予并于本实验室保存。测定前,将保存于-80 °C 环境中的菌株复苏、活化并培养至对数期,其中金黄色葡萄球菌和大肠杆菌放

置于 37 °C 环境中培养, 其他菌株放置于 28 °C 环境中培养。多肽片段的抗菌实验步骤参照文献中方法操作<sup>[33, 36]</sup>, 主要步骤如下: 使用浓度为 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液洗脱经活化的细菌菌落并将其吸光度值稀释调节至 0.001 8, 将菌液与不同浓度的多肽溶液等体积混匀后转入 96 孔板, 空白对照组中使用无菌超纯水代替不同浓度的多肽溶液与细菌悬浮液等体积混合, 阴性对照组中使用 3 μmol/L 的多肽溶液与无菌的液体培养基等体积混合, 各浓度均设置 3 次平行对照实验。将 96 孔板放置于 37 °C 或 28 °C 环境中培养 24 h 并记录不同浓度多肽溶液对细菌的抑制作用, 之后再将 96 孔板中的悬浮液吸出并均匀涂布于固体培养基继续培养 12 h, 记录各浓度多肽溶液对细菌的杀灭作用, 抗菌活性实验进行 3 次重复测定。

## 2 结果

### 2.1 *Lcnk13* 基因序列特征

通过基因克隆, 获得了一段包含完整开放阅读

框区域的大黄鱼 *Lcnk13* 基因序列(图 1)。*Lcnk13* 基因序列全长 604 bp, 其中 5'非翻译区长度 27 bp, 开放阅读框区域长度 435 bp, 3'非翻译区长度 142 bp。开放阅读框区域能够编码由 144 个氨基酸残基组成的多肽序列, 多肽序列具有信号肽区域和 Saposin B 结构域。预测的信号肽切割位点位于第 21 与第 22 个氨基酸残基(VKS-WE)之间, Saposin B 结构域起始于第 63 个氨基酸残基, 终止于第 139 个氨基酸残基。*Lcnk13* 基因已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 KP301139。*Lcnk13* 多肽的 6 个半胱氨酸残基分别位于序列的第 65, 68, 96, 108, 133, 139 位, 与其他鱼类 NK-lysin 多肽序列的多重比对结果显示 6 个半胱氨酸残基在不同鱼类物种间高度保守(图 2)。系统进化分析表明, *Lcnk13* 与 *Lcnk12* 最先聚为一类, 而与其他鱼类 NK-lysin 序列的相似程度则较低(图 3)。

### 2.2 *Lcnk13* 基因的组织表达及诱导表达特征

*Lcnk13* 基因在未受感染的大黄鱼 10 种组织中的表达量差异较为明显, 其表达量最高的组织为心脏, 其次为脾脏、头肾、鳃。肝脏与肌肉中也检测到 *Lcnk13*

```

1   gtacctttgctgactgaaaaactgagaATGACCATGAGTCTGCCATCAGCATC
1   M T M S P A I S I
55   GCTCTTCTCCTGCTCTCCGCGAGTTGTTGTGAAGTCGTGGGAGTCCCCGAGGAC
10  A L L L L S A V V V K S W E S P E D
109  GAAACTGAAGAGGAGGAAGACGATTCTTCAGCCGAGTTGAACCATGACATGAAG
28  E T E E E E D D S S A E L N H D M K
163  GAGAGAGCTGACCATGATGCAGAGGAGATACTGCAGGATCAAGCTTTCCCGGGC
46  E R A D H D A E E I L Q D Q A F P G
217  TCCTGTTATGCCTGTCCGTACATTGTGTCCAAAGTAAAGCGGCAGGCAGGCAGA
64  S C Y A C R Y I V S K V K R Q A G R
271  GATCACTCAAAGCAAGAATCCGATGTCTGATGATGGGAGTCTGCAATGGCTTT
82  D H S K A R I R C L M M G V C N G F
325  CGATCTAGATTTCGTACAGATCCGCCTGCAAGAAGTCCACAGGAGGTACCAATAC
100 R S R F V R S A C K K V T R R Y Q Y
379  AGACTGAGCAACTACATAGCAAAGAACGGATCTTCCCGGAGAATTTGCGCTAGA
118 R L S N Y I A K N G S S R R I C A R
433  CTTCTGCTCTGCAGGAGAGTTTCTCAG TAAatcatacatataatgcatctctgc
136 L R L C R R V S Q *
487  aaaacagcaaaactaaagtgtaccagtacatgtttgaactctttctgtcttctct
541  tgtttttttcttctc aataaaagcttttacacgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
595  aaaaaaaaaa
    
```

图 1 大黄鱼 *Lcnk13* 基因的 cDNA 及其编码的多肽序列

Fig. 1 cDNA and the encoded polypeptide sequence of *L. crocea Lcnk13*

注: 开放阅读框区域以及预测的多肽序列以大写字母表示, 非翻译区以小写字母表示, 转录起始位点 ATG、终止位点 TAA、6 个半胱氨酸残基及多腺苷酸化终止信号 aataaa 通过下划线标出, 信号肽区域及 Saposin B 区域以阴影标出。

Table with 2 columns: Species names and their corresponding amino acid sequences. Species include Larimichthys crocea, Ictalurus punctatus, Danio rerio, Salmo salar, Pseudocrossocheilus bamaensis, Cyprinus carpio, and Megalobrama amblycephala. Sequences are aligned and include a 6-residue conserved region highlighted in grey.

Table with 2 columns: Species names and their corresponding amino acid sequences. Species include Larimichthys crocea, Ictalurus punctatus, Danio rerio, Salmo salar, Pseudocrossocheilus bamaensis, Cyprinus carpio, and Megalobrama amblycephala. Sequences are aligned and include a 6-residue conserved region highlighted in grey.

图2 鱼类 NK-lysin 多肽序列多重比对

Fig. 2 Multiple alignments of the NK-lysin polypeptide sequences of fish species

注: 多肽序列引自相关研究论文, 序列间完全保守的 6 个半胱氨酸残基通过阴影标出。

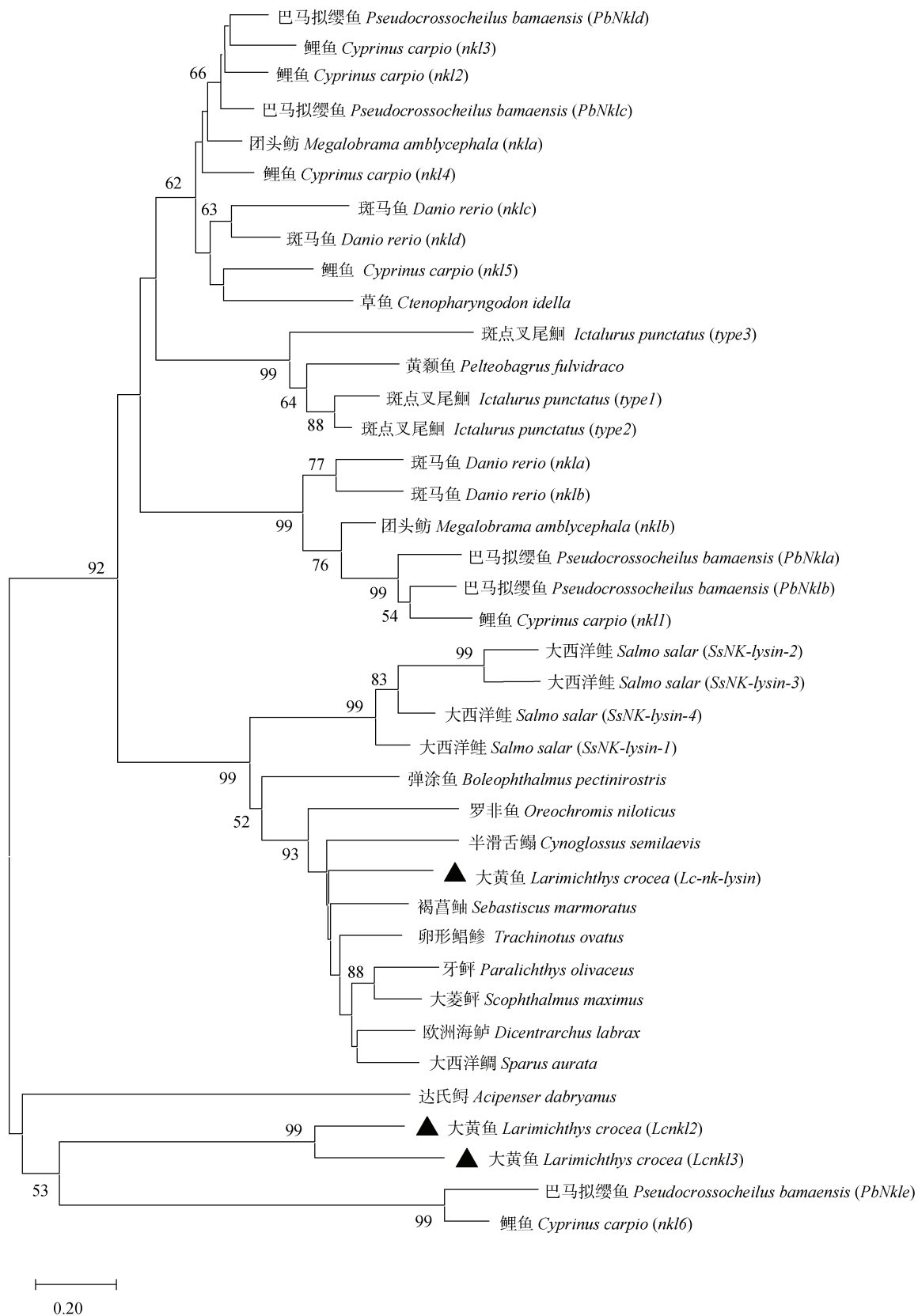


图 3 硬骨鱼类 NK-lysin 系统发育分析  
 Fig. 3 Phylogenetic analysis of NK-lysin in teleosts  
 注: 数字表示置信度, 只显示置信度>50 的聚类结果。

基因的表达,但在皮肤、肠、胃及脑组织中 *Lcnk13* 基因的表达量较低(图 4)。

在受病原感染的大黄鱼 4 种组织中, *Lcnk13* 基因在不同组织中的表达趋势存在显著差异。在鳃组织与头肾组织中, 0 h 时 *Lcnk13* 基因表达量最高, 此后总体呈现出持续下调的变化趋势(图 5a、5b)。在脾脏中, 感染后 72 h 内 *Lcnk13* 基因的变化不显著( $P>0.05$ ), 到 96 h 时则显著上调表达( $P<0.05$ ), 在 120 h 至 168 h 又恢复至基础表达水平(图 5c)。在肝脏中, *Lcnk13* 基因表达量在 6 h 和 24 h 时显著上调表达( $P<0.05$ ), 在 48 h 和 72 h 时的表达量又显著下调( $P<0.05$ ), 96 h 时恢复至基础表达水平, 此后又于 120 h 和 168 h 时再次上调表达( $P<0.05$ )(图 5d)。

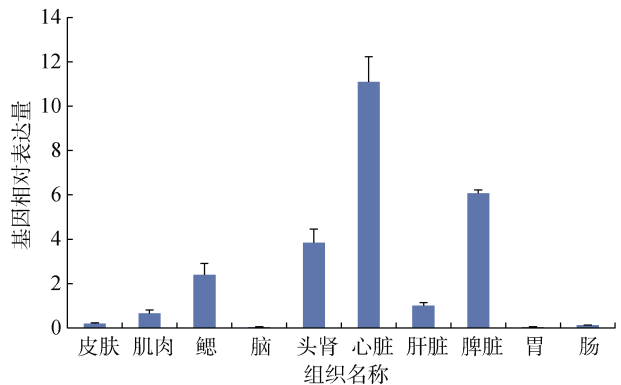


图 4 未受病原感染的大黄鱼组织中 *Lcnk13* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression profiles of *Lcnk13* in tissues of uninfected large yellow croaker

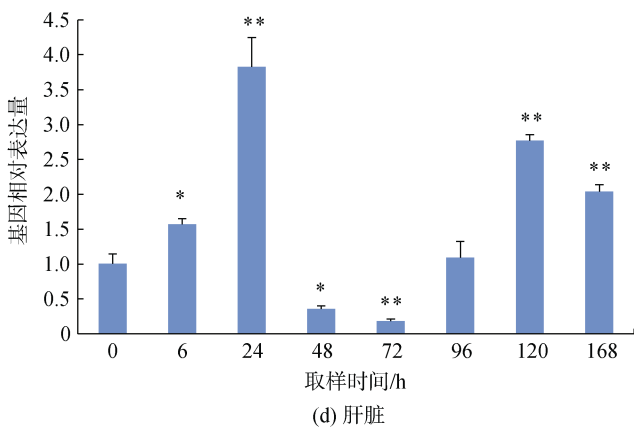
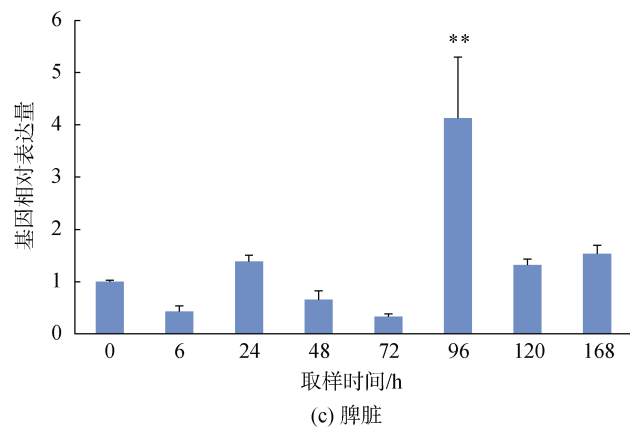
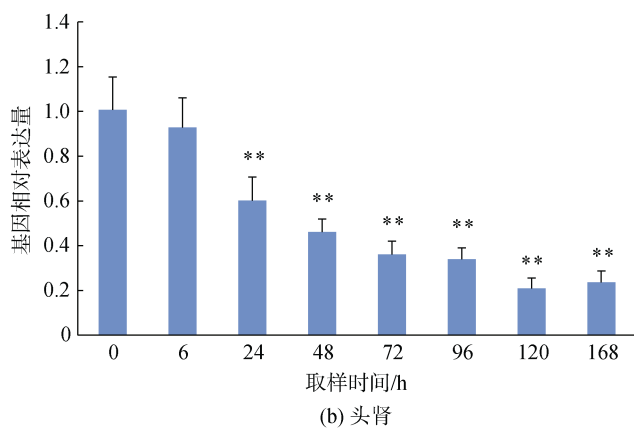
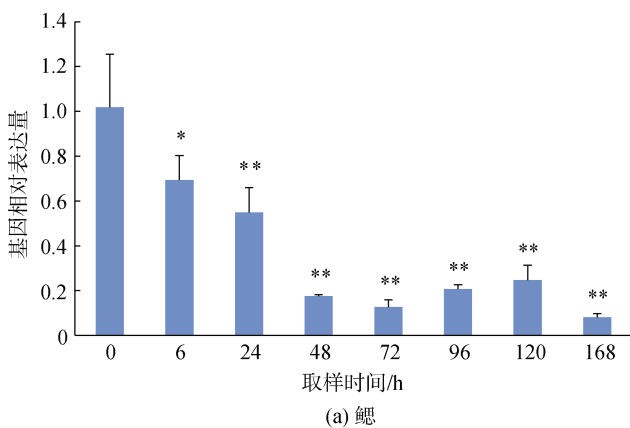


图 5 病原诱导过程大黄鱼鳃、头肾、脾脏、肝脏中 *Lcnk13* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression profiles of *Lcnk13* in the gill, head kidney, spleen, and liver of large yellow croaker during pathogen infection

注: 显著差异表达( $P<0.05$ )与极显著差异表达( $P<0.01$ )分别以 “\*” “\*\*” 表示。

### 2.3 *Lcnk13* 多肽片段的抗菌活性

经过色谱分离纯化及质谱鉴定, *Lcnk13* 多肽片段纯度为 99.16%, 多肽的抗菌活性测定结果表明 *Lcnk13* 多肽片段对金黄色葡萄球菌、哈维氏弧菌具有较强的抗菌活

性, 其最小抑菌浓度及最小杀菌浓度均低于  $1.5 \mu\text{mol/L}$ 。而浓度为  $12 \mu\text{mol/L}$  的多肽溶液能够有效抑制大肠杆菌与副溶血弧菌的生长。但对于嗜水气单胞菌和美人鱼发光杆菌, *Lcnk13* 多肽片段没有抑制效果(表 3)。



表 3 Lcnk13 多肽片段的抗菌活性  
Tab. 3 Antibacterial activity of the Lcnk13 polypeptide fragment

实验细菌菌株	Lcnk13 多肽片段抗菌活性	
	最小抑菌浓度( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	最小杀菌浓度( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	<1.5	<1.5
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	3~6	6~12
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	<1.5	<1.5
副溶血弧菌 <i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	3~6	6~12
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	>96	>96
美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	>96	>96

### 3 讨论

在前期的研究中,我们报道了 2 种类型的大黄鱼 *NK-lysin* 基因,即较为保守的 *Lc-nk-lysin* 以及相对不保守的 *Lcnk12*,在本研究中通过对大黄鱼 *Lcnk13* 基因结构进行分析预测,我们发现 *Lcnk13* 的成熟肽序列具有 *NK-lysin* 家族成员的主要特征,即具有 Saposin B 结构域以及 6 个在不同序列间高度保守的半胱氨酸残基,6 个半胱氨酸残基可形成 3 个分子内二硫键,而 Saposin B 结构域可参与鞘脂降解,这对于 *NK-lysin* 发挥其抗病原活性至关重要<sup>[37-38]</sup>。系统进化分析结果显示 *Lcnk13* 与 *Lcnk12* 最先聚类并形成独立的进化分支,两者与包括 *Lc-Nk-lysin* 在内的其他 *NK-lysin* 多肽序列相似性较低,表明 *Lcnk13* 与 *Lcnk12* 均属于相对不保守的大黄鱼 *NK-lysin* 序列。至今在大黄鱼组织中已鉴定出 3 种 *NK-lysin* 基因,其他已被证实存在多个 *NK-lysin* 家族成员鱼类有:团头鲂(2 种)<sup>[18]</sup>,斑点叉尾鲷(3 种)<sup>[14]</sup>,斑马鱼(4 种)<sup>[17]</sup>,大西洋鲑(4 种)<sup>[25]</sup>,巴马拟缨鱼(5 种)<sup>[28]</sup>,鲤鱼(6 种)<sup>[20]</sup>,以上结果表明 *NK-lysin* 在硬骨鱼类中可能出现了特异性分化。

荧光定量 PCR 测定结果显示 *Lcnk13* 基因在大黄鱼不同组织以及受病原刺激不同阶段的表达量存在显著差异。*Lc-nk-lysin* 和 *Lcnk12* 主要在大黄鱼免疫相关组织中表达,两者表达量最高的组织分别为鳃与头肾,而 *Lcnk13* 在心脏中的表达量最高,这与在牙鲆中发现的 *NK-lysin* 基因具有相似的表达模式<sup>[15]</sup>。此外,*Lc-nk-lysin*、*Lcnk12* 与 *Lcnk13* 在各组织及各诱导时间点并未呈现出相似的表达调控规律,而是具有各不相同的表达趋势,提示 3 种类型的 *NK-lysin* 基因均参与了大黄鱼免疫应答,并且三者在大黄鱼免疫应答

过程中可能存在着功能分化。在其他硬骨鱼类中,不同类型的 *NK-lysin* 基因也具有不同的表达模式,例如在巴马拟缨鱼 5 种 *NK-lysin* 基因(*PbNkla*、*PbNklb*、*PbNklc*、*PbNkld*、*PbNkle*)中,*PbNkla* 在肠组织中高表达,*PbNklc* 在皮肤中高表达,*PbNkld* 在脑组织中高表达,*PbNkle* 在鳃、脾脏和头肾中表达量较高,而 *PbNklb* 在未感染的鱼体内不表达,仅在受嗜水气单胞菌诱导后表达<sup>[28]</sup>。

多肽片段的抗菌活性测定结果表明 *Lcnk13* 的活性与 *Lcnk12* 较为相似,两者整体上优于 *Lc-Nk-lysin* 的 2 种多肽片段<sup>[33-34]</sup>。*Lcnk13* 与 *Lcnk12* 均能有效抑制和杀灭金黄色葡萄球菌和哈维氏弧菌,但抑制嗜水气单胞菌和美人鱼发光杆菌的能力较弱。相较于 *Lcnk12* 多肽片段,更低浓度的 *Lcnk13* 多肽溶液即可有效抑制并杀灭大肠杆菌,而 *Lcnk13* 多肽溶液对副溶血弧菌的最小杀菌浓度则要高于 *Lcnk12*。相关研究表明 *NK-lysin* 的抗菌活性与肽段的氨基酸组成及其二级结构密切相关,例如源自哺乳动物的 P-NK-2 对于革兰氏阳性菌的致死浓度远低于源自牙鲆的 JF-NK-2<sup>[15]</sup>;半滑舌鲷 NKLP27 能够通过破坏细胞膜的完整性实现对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的杀灭,然而由 NKLP27 末端截短 5 个氨基酸残基所生成的衍生肽(NKLP22)则可能由于  $\alpha$ -螺旋结构的缩短而导致其活性降低<sup>[5]</sup>。目前有关鱼类 *NK-lysin* 对病原菌作用构效关系的研究仍相对较少,因此需进一步围绕大黄鱼 3 种 *NK-lysin* 的多肽结构及其抗菌能力开展研究。

### 4 结论

对 *Lcnk13* 序列结构的分析表明其与除 *Lcnk12* 之外的鱼类 *NK-lysin* 基因存在较大差异,但仍属于大

黄鱼 *NK-lysin* 基因家族。对 *Lcnk13* 基因表达特征及 *Lcnk13* 成熟肽片段抗菌活性的分析则提示 *Lcnk13* 可能在大黄鱼对抗细菌感染的免疫应答过程中发挥了免疫防御作用,有必要围绕 *Lcnk13* 成熟肽抗菌活性的构效关系开展深入研究。

参考文献:

- [1] ANDERSSON M, GUNNE H, AGERBERTH B, et al. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity[J]. The EMBO Journal, 1995, 14(8): 1615-1625.
- [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] FISCHER U, KOPPANG E O, NAKANISHI T. Teleost T and NK cell immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 197-206.
- [4] LIEPINSH E, ANDERSSON M, RUYSSCHAERT J M, et al. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 1997, 4(10): 793-795.
- [5] ZHANG M, LI M F, SUN L. NKLP27: a teleost NK-lysin peptide that modulates immune response, induces degradation of bacterial DNA, and inhibits bacterial and viral infection[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106543.
- [6] PEREIRO P, ROMERO A, DÍAZ-ROSALES P, et al. Nucleated teleost erythrocytes play an Nk-lysin- and autophagy-dependent role in antiviral immunity[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1458.
- [7] 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.
- [8] GELHAUS C, JACOBS T, ANDRÄ J, et al. The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(5): 1713-1720.
- [9] SHAN Z G, YANG Y P, GUAN N, et al. NKL-24: A novel antimicrobial peptide derived from zebrafish NK-lysin that inhibits bacterial growth and enhances resistance against *Vibrio parahaemolyticus* infection in Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 431-440.
- [10] SCHRÖDER-BORM H, BAKALOVA R, ANDRÄ J. The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine[J]. FEBS Letters, 2005, 579(27): 6128-6134.
- [11] 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 & Biotechnology, 2016, 46(1): 65-70.
- [12] ANDERSSON M, CURSTEDT T, JÖRNVALL H, et al. An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B[J]. FEBS Letters, 1995, 362(3): 328-332.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] ZHANG M, LONG H, SUN L. A NK-lysin from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 40(3/4): 258-265.
- [17] PEREIRO P, VARELA M, DIAZ-ROSALES P, et al. Zebrafish Nk-lysins: First insights about their cellular and functional diversification[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2015, 51(1): 148-159.
- [18] 詹柴凤, 丁祝进, 崔蕾, 等. 团头鲂 *NK-lysin* 基因鉴定和表达分析[J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1145-1155. ZHAN Qifeng, DING Zhujin, CUI Lei, et al. Identification, characterization and expression of NK-lysin in *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1145-1155.
- [19] 王改玲, 王明成, 李传凤, 等. 草鱼 *NK-lysin* 基因的克隆、原核表达与活性分析[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1500-1511. WANG Gailing, WANG Mingcheng, LI Chuanfeng, et al. The cDNA cloning, expression and antibacterial activity of *NK-lysin* from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(10): 1500-1511.
- [20] WANG G L, WANG M C, LIU Y L, et al. Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 11-21.
- [21] HUANG Y, ZHENG Q, NIU J Z, et al. NK-lysin from

- Oreochromis niloticus* improves antimicrobial defence against bacterial pathogens[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 259-265.
- [22] LAMA R, PEREIRO P, COSTA M M, et al. Turbot(*Scophthalmus maximus*)Nk-lysin induces protection against the pathogenic parasite *Philasterides dicentrarchi* via membrane disruption[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 190-199.
- [23] HAN P P, TIAN G M, GAO W H, et al. Expression analysis of cathelicidin and NK-lysin in Dabry's sturgeon(*Acipenser dabryanus*)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2019, 35(4): 825-830.
- [24] BO J, YANG Y, ZHENG R H, et al. Antimicrobial activity and mechanisms of multiple antimicrobial peptides isolated from rockfish *Sebastes marmoratus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 1007-1017.
- [25] ACOSTA J, ROA F, GONZÁLEZ-CHAVARRÍA I, et al. In vitro immunomodulatory activities of peptides derived from *Salmo salar* NK-lysin and cathelicidin in fish cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 88: 587-594.
- [26] VALERO Y, CORTÉS J, MERCADO L. NK-lysin from skin-secreted mucus of Atlantic salmon and its potential role in bacteriostatic activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 410-413.
- [27] DING F F, LI C H, CHEN J. Molecular characterization of the NK-lysin in a teleost fish, *Boleophthalmus pectinirostris*: Antimicrobial activity and immunomodulatory activity on monocytes/macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 256-264.
- [28] ZHANG M, WANG Z G, WANG C G, et al. Identification and characterization of five Nk-lysins from *Pseudocrossocheilus bamaensis* and their diverse expression patterns in response to bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 346-354.
- [29] LIU B, LIU G D, GUO H Y, et al. Functional characterization of NK-lysin in golden pompano *Trachinotus ovatus*(Linnaeus 1758)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 107: 103658.
- [30] ZHU R, WU Y S, LIU X X, et al. Membrane disruptive antimicrobial potential of NK-lysin from yellow catfish(*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 571-580.
- [31] VALERO Y, CHAVES-POZO E, CUESTA A. NK-lysin is highly conserved in European sea bass and gilthead seabream but differentially modulated during the immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 435-441.
- [32] VALERO Y, ARIZCUN M, CORTÉS J, et al. NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 103: 103516.
- [33] ZHOU Q J, WANG J, LIU M, et al. Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 195-202.
- [34] ZHOU Q J, WANG J, MAO Y, et al. Molecular structure, expression and antibacterial characterization of a novel antimicrobial peptide NK-lysin from the large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 315-321.
- [35] NIU S F, JIN Y, XU X, et al. Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 513-524.
- [36] WANG K J, CAI J J, CAI L, et al. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish(*Pseudosciaena crocea*)and the antimicrobial activity of its synthetic peptide[J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 638-646.
- [37] ANDERSSON M, HOLMGREN A, SPYROU G. NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(17): 10116-10120.
- [38] OLMEDA B, GARCÍA-ÁLVAREZ B, PÉREZ-GIL J. Structure-function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins[J]. *European Biophysics Journal*, 2013, 42(2/3): 209-222.

# Molecular structure, expression characteristics, and antibacterial activity of polypeptide fragment of *Lcnkl3* in large yellow croaker

ZHOU Qi-jia<sup>1</sup>, PAN Ying<sup>2</sup>, CHEN Jia<sup>2</sup>, ZHENG Wei-qiang<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Ministry of Education, Nanning Normal University, Nanning 530001, China; 2. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Ningde Fufa Fishery Company Limited, Ningde 352103, China)

**Received:** Nov. 6, 2020

**Key words:** *NK-lysin*; *Larimichthys crocea*; non-specific immune system; antibacterial activity

**Abstract:** *NK-lysin* is an important immune gene involved in the non specific immune response against pathogen infection in teleosts. In previous studies, we found two types of *NK-lysin* genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), a commercially important fish. Herein, we report the gene sequence, expression characteristics, and antibacterial activity of the polypeptide fragment in the novel *NK-lysin* gene *Lcnkl3* of large yellow croaker. The open reading frame of *Lcnkl3* was 435 bp in length and coded 144 amino acid residues; it contained a Saposin B domain and six highly conserved cysteine residues in its polypeptide sequence (*Lcnkl3*). Phylogenetic analysis showed that *Lcnkl3* was most similar to *Lcnkl2* in large yellow croaker but was quite different from other teleost *NK-lysin* polypeptide sequences. The *Lcnkl3* gene exhibited different basic expression profiles in different tissues of uninfected large yellow croaker, and the expression was highest in the heart. The expression profiles of *Lcnkl3* differed in different tissues and at different infection stages during the pathogen-induced immune response. The polypeptide fragment derived from the mature *Lcnkl3* polypeptide sequence had different inhibitory and killing effects on different bacteria. These results indicate that *Lcnkl3* belongs to the *NK-lysin* gene family and plays a role in the immune response of large yellow croakers during pathogen infection.

(本文编辑: 杨 悦)