

文章编号: 1000-0615(2017)10-1500-12

DOI: 10.11964/jfc.20160910553

草鱼 *NK-lysin* 基因的克隆、原核表达与活性分析

王改玲*, 王明成, 李传凤, 潘磊, 刘盼婷

(黄淮学院生物与食品工程学院, 河南驻马店 463000)

摘要: 为研究草鱼抗菌肽 *NK-lysin* 基因的组成结构、在组织中的表达差异及其抑菌活性, 实验根据已知鱼类 *NK-lysin* 基因保守区序列设计上下游引物, 采用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术克隆草鱼 *NK-lysin* 基因 (*Cinkl*), RT-PCR 进行各组织间的表达分析, 并构建 *Cinkl* 成熟肽的原核表达载体, 采用琼脂糖孔穴扩散法检测重组蛋白的抑菌活性。结果显示, *Cinkl* cDNA 全长 768 bp, 编码 121 个氨基酸; 基因组 DNA 全长 3 361 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子。经多序列比对分析和结构域预测表明, *CiNkl* 氨基酸序列具有 SAPLIP 家族的特征: 含有 6 个保守的半胱氨酸和 saposin B 蛋白结构域, 与斑马鱼 *Nklc*、*Nkld* 的相似性分别为 57.98% 和 63.03%。构建 *NK-lysin* 氨基酸序列系统进化树, 发现 *CiNkl* 与斑马鱼 *Nklc*、*Nkld* 聚为一支。RT-PCR 检测结果显示, *Cinkl* mRNA 在所有检测的草鱼组织中均有表达, 在脾脏中表达量最高, 心脏、鳃、中肾和头肾的表达量次之, 皮肤、脑、肝脏和肠有微量表达。pET-28b-MBP 与 *CiNkl* 成熟肽序列构建的原核表达质粒在宿主菌 Rosetta (DE3) 表达出约 57 ku 的可溶性融合蛋白, 利用 Ni-NTA His·Bind 树脂进行纯化, *CiNkl* 重组蛋白对 G⁻ 细菌如大肠杆菌 M15 株、嗜水气单胞菌, 以及 G⁺ 细菌如金黄色葡萄球菌均具有抑菌活性。基于草鱼 *NK-lysin* 的组织表达特征和重组蛋白的抑菌活性, 推测 *NK-lysin* 在草鱼的先天性免疫防御中发挥调节作用。

关键词: 草鱼; *NK-lysin*; 基因克隆; 组织表达; 抑菌活性

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是一类对细菌、真菌、病毒、寄生虫、原虫和肿瘤细胞等具有杀伤作用的小分子多肽 (12~50 个氨基酸), 是生物体先天性免疫防御系统的重要组成部分。抗菌肽具有抗菌谱广、生化性质稳定、毒副作用低、不易产生耐药性等诸多优点, 一直被人们认为是抗生素的理想替代品^[1]。迄今为止, 人们在细菌、真菌、植物、无脊椎动物以及脊椎动物中已发现的抗菌肽种类超过 2000 种, 其中已被鉴定的水产动物抗菌肽种类包括 hepcidin、defensin、pleurocidin、piscidin、moronecidin、misgurain、parasin、LEAP-2 和 *NK-lysin* 等^[2]。抗菌肽在水产养殖中的应用研究已取得一定成效, 通过在饲料中添加抗菌肽, 可提高

水产动物 (鱼类、虾和蟹) 的免疫力和抗病力^[3-5]。

NK-lysin 是机体自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞和细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) 中存在的一种被称为“颗粒溶素” (granulysin) 的抗菌肽, 与人颗粒溶素属于直系同源基因。*NK-lysin* 是鞘脂激活蛋白样蛋白 (saposin-like protein, SAPLIP) 家族的成员, 具有鞘脂激活蛋白 B (saposin B) 结构域和 6 个保守的半胱氨酸, 且富含带正电荷的氨基酸^[6]。*NK-lysin* 具有与膜结合的能力, 并能够改变细胞膜的完整性, 能够杀灭细菌、病毒、寄生虫和肿瘤细胞等^[7-9]。

自最早的人类 granulysin^[10] 和猪 *NK-lysin*^[11] 发现以来, 人们相继在牛 (*Bos taurus*)^[12]、马 (*Equus caballus*)^[13]、水牛 (*Bubalus bubalis*)^[14]、鸡 (*Gallus*

收稿日期: 2016-09-23 修回日期: 2016-11-30

资助项目: 国家自然科学基金 (31402334); 河南省基础与前沿技术研究计划 (142300410111)

通信作者: 王改玲, E-mail: wgl939@126.com

gallus)^[15]、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)^[16-17]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[18]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[8]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[19]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[20]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[21]等体内获得了NK-lysin的核苷酸序列全长。研究发现, NK-lysin在多数物种的基因组上只有单个拷贝, 如人、猪、鸡、马、牙鲆、半滑舌鳎等, 而在一些物种体内存在多个拷贝, 如斑点叉尾鮰体内存在3个^[22], 斑马鱼染色体17上有4个^[19], 牛是哺乳动物中第一个被发现的存在4个拷贝的物种^[23]。大多数鱼类NK-lysin基因的结构与哺乳类相似, 含有5个外显子和4个内含子, 最新研究发现斑马鱼的*nk1c*和*nk1d*基因由4个外显子和3个内含子组成^[19]。然而, 其他物种的基因组结构情况还需要获得更多的NK-lysin才能找到答案。

尽管NK-lysin在多种鱼类中已被发现, 但是其免疫功能的研究却鲜有报道。Zhang等^[8]和Zhou等^[20]分别对人工合成的半滑舌鳎NK-lysin的27个氨基酸(NKLP27)和大黄鱼的NK-lysin成熟肽段的活性进行了研究, 发现此两种抗菌肽段对G⁺和G⁻细菌均具有杀菌活性, 并初步阐述了NK-lysin的抗菌机制, 即通过破坏细胞膜的完整性, 深入细胞浆内, 进而导致细菌基因组降解^[8]。虽然化学合成抗菌肽与天然抗菌肽的生物活性较为一致, 但化学合成由于材料成本和技术的原因, 限制了抗菌肽的研制与应用。不断改进的基因工程表达方法, 成为大量获得抗菌肽的有效途径, 也是研究者普遍采用的技术。

本研究通过对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)抗菌肽NK-lysin基因(*Cinkl*)的克隆, 探索NK-lysin在不同物种之间基因组结构的差异, 经RT-PCR检测其在健康草鱼各组织中的表达差异, 并构建原核表达载体, 初步探索CiNkl重组蛋白的免疫功能, 为预防和治疗草鱼疾病开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象 选用规格均匀的健康草鱼为实验用鱼, 在实验室暂养2周, 每天早晚各投喂1次, 24 h充氧, 养殖用水为经曝气的自来水, 实验期间水温(20±2) °C, 日换水量约为总水量的

1/3。驯养结束后, 挑选平均体质量约为115 g的草鱼3尾, 用于提取草鱼各组织总RNA。

仪器和试剂 台式冷冻高速离心机(eppendorf 5430R), 凝胶成像系统(北京君意电泳JYO4S-3C), 超微量紫外可见分光光度计(上海元析BD-500), PCR仪(eppendorf Mastercycler pro), 荧光定量PCR仪(罗氏Light Cycler[®] 96), 蛋白质电泳系统(美国BIO-RAD Mini-PROTEA[®] Tetra System)。

cDNA第一链合成试剂盒购自Fermentas; RNAiso Plus、SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit、Ex Taq酶、pMD18-T、PrimerScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus)、限制性内切酶BamH I和Hind III购自TaKaRa; 质粒小量提取试剂盒, DNA纯化回收试剂盒购自Omega; 引物由Sangon合成; Ni-NTA His-Bind树脂购自Novagen。其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

总RNA的提取及cDNA第一链的合成 分别取3尾健康草鱼的鳃、心脏、脾脏、肝脏、头肾、中肾、肠、皮肤和脑9个组织各100 mg, 用于提取总RNA。总RNA提取方法按照RNAiso Plus的操作步骤, 首先进行研磨, 组织裂解后用氯仿抽提法提取各组织总RNA, 紫外分光光度计测定RNA的浓度和纯度。将脾脏总RNA分别按照cDNA第一链合成试剂盒和SMARTer[®] RACE 5'/3'试剂盒进行反转录, 用于扩增*Cinkl*基因的cDNA中间片段和全长序列。RT-PCR反应的组织cDNA按照Primer Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser第一链合成试剂盒说明进行, 用于检测*Cinkl*基因在各组织的分布情况。合成的cDNA于-80 °C保存备用。

草鱼NK-lysin cDNA全长的扩增 根据斑马鱼获得的NK-lysin基因序列, 设计保守区域引物NKF和NKR (表1), 扩增得到特异性片段并测序验证后, 作为中间序列。根据已知中间序列, 采用Primer Premier 5.0软件设计巢式引物(表1), 引物 $T_m > 64$ °C。RACE共进行2轮PCR反应。以SMART cDNA为模板, 使用基因特异引物和通用引物UPM进行第一轮扩增。PCR反应体系为25 μL, 反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 70 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 68 °C退火30 s, 72 °C延伸

表 1 草鱼 *NK-lysin* 基因扩增所用引物及其序列
 Tab. 1 Nucleotide sequences of primers used in cloning *C. idella NK-lysin*

引物 primer	序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
NKF	GGKVTGTGCTGGGSKTGYAART	部分序列扩增
NKR	ATCKSTRGTGGWRAGYTCYTC	cDNA fragment of partial NK-lysin
NK51	CATCACAGACATGTGACAGCG	5'RACE扩增
NK52	CTGGAGATTAGGCCTTTCAC	5'RACE amplification
NK31	GTGAAAGGCCTAATCTCCAG	3' RACE扩增
NK32	CGGGCGCTGTACATGTCTGTGATG	3' RACE amplification
gNKF	GATGCTCCCGTGTATCTTCT	基因组扩增
gNKR	CATTTACTCTATGCTCTTTAT	genomic amplification
RTGcNK-F	TATTTCTCTGGCCACCCTGC	荧光定量PCR
RTGcNK-R	CAAGCCCAGCACAAATCCAG	specific primers for RT-PCR
GcActinF	GAGAGGGAAATCGTGCCTGA	荧光定量PCR内参引物
GcActinR	CATACCGAGGAAGGAAGGCTG	β -actin primers
ExNKF	AGGGAATTCTTTGACATGGAAATGCAC	原核表达
ExNKR	AGGAAGCTTTTAGCAAACACCAACATG	expression in <i>Escherichia coli</i>
UPM long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT	RACE-PCR的通用引物 RACE adaptor primers
UPM short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	

1 min, 25个循环;最后72 °C延伸10 min。第一轮PCR扩增产物用无菌蒸馏水稀释25倍后,取1 μ L用作第二轮扩增反应的模板,使用下游引物和UPM进行第二轮PCR反应,反应条件同上。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒进行回收,与pMD18-T载体连接过夜后,转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,PCR检测,将阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

草鱼 *NK-lysin* 基因组全长的获得 采用蛋白酶K法提取草鱼脾脏基因组DNA。根据已获得的cDNA序列设计引物,扩增DNA全长。PCR条件:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸3 min,35个循环;72 °C终延伸10 min。PCR产物纯化和鉴定采用上述方法。

序列分析 采用Conting Express软件将中间序列、5'和3'端序列拼接得到 *Cinkl* 基因全长cDNA序列;使用DNASTar软件搜索开放阅读框并翻译出相应的氨基酸序列;采用NCBI网站的BLASTN和BLASTP软件对 *Cinkl* 基因序列和其推断的氨基酸进行同源性搜索。草鱼和其他鱼类

NK-lysin 的序列比对采用Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalomega/>)进行;信号肽分析采用SignalP 4.1软件进行;蛋白分子量和等电点的预测采用ExPASy网站中的pI/Mw工具分析;saposin B区域利用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行分析;利用MEGA6.0软件,以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)进行不同物种 *NK-lysin* 系统进化树的构建。同源性比对和构建系统发育树所用的氨基酸序列登录号见表2。

草鱼不同组织 *NK-lysin* 基因 mRNA 的表达分析 根据草鱼 *NK-lysin* 基因的全长cDNA设计荧光定量引物RTGcNK-F和RTGcNK-R(表1),根据草鱼内参基因 β -actin 序列设计一对引物GcActinF和GcActinR(表1),采用双标准曲线的方法检测草鱼不同组织 *NK-lysin* 的表达差异。RT-PCR反应体系:SYBRPremix 10 μ L,上下游引物(浓度为10 μ mol/L)各0.5 μ L,模板1 μ L, ddH₂O 8 μ L。反应条件:95 °C预变性30 s,三步法扩增40个循环,95 °C变性10 s,60 °C退火10 s,72 °C延伸10 s,循环结束后,绘制溶解曲线,95 °C变性5 s,65 °C

表 2 同源性比对和构建系统进化树所用的氨基酸序列登录号

Tab. 2 The Genbank accession number of amino acid sequences for identity and phylogenetic tree

物种和基因	species and gene	登录号	GenBank accession number	物种和基因	species and gene	登录号	GenBank accession number
草鱼	<i>C. idella</i> Nk1		KT877168	斑点叉尾鲷	<i>I. punctatus</i> Nk11		NP-001187137
半滑舌鳎	<i>C. semilaevis</i> Nk1		AGM21637	斑点叉尾鲷	<i>I. punctatus</i> Nk12		NP-001187147
斑马鱼	<i>D. rerio</i> Nkla		KP100115	斑点叉尾鲷	<i>I. punctatus</i> Nk13		NP-001187232
斑马鱼	<i>D. rerio</i> Nk1b		KP100116	鸡	<i>G. gallus</i> NKL		NP-001038145
斑马鱼	<i>D. rerio</i> Nk1c		KP100117	鹌鹑	<i>Coturnix coturnix</i> NKL		BAN78656
斑马鱼	<i>D. rerio</i> Nk1d		KP100118	猪	<i>S. scrofa</i> NKL		NP-001265684
牙鲆	<i>P. olivaceus</i> Nk1		AU260449	马	<i>E. caballus</i> NKL		NP-001075398
大西洋鲑	<i>Salmon salar</i> Nk1		ACI68092	牛	<i>B. taurus</i> NKL		NP-001068611
大黄鱼	<i>L. crocea</i> Nk1		KJ865299	人	<i>Homo sapiens</i> GNL		NP-006424

退火 60 s, 升温至 97 °C 过程中连续检测。每个组织样品做 3 次重复, 采用仪器自带的 LightCycler® 96 SW 1.1 软件进行熔解曲线分析, 荧光定量的实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量, 计量数据均用(平均值±标准误)表示, 将最低组织表达量设为 1, 其余各组织表达量是相对该组织表达量的倍数, 利用 SPSS 18.0 软件中单因素方差分析数据显著性, 显著性水平设为 $P < 0.05$, 利用 Graphpad 进行多重比较和作图。

原核表达载体的构建和蛋白纯化 根据草鱼成熟肽序列设计 *CiNk1* 原核表达扩增引物 ExNKF 和 ExNKR (表 1), 上游引物 ExNKF 中含有 *BamH* I 酶切位点, 下游引物 ExNKR 中含有 *Hind* III 酶切位点, PCR 扩增目的片段, 切胶回收, 将产物和 pET-28b-MBP 载体分别用 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切产物纯化回收, T_4 连接酶连接过夜, 转化到 DH5 α 感受态细胞中, 将菌液涂布在含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 挑选阳性克隆测序鉴定。提取阳性克隆质粒, 转化到表达菌株 Rosetta (DE3) 中, 挑选阳性克隆进行原核表达诱导。阳性菌液按 1:50 比例接种至含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 在 37 °C、180 r/min 摇床中培养, 当 OD₆₀₀ 值为 0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 放入 20 °C、180 r/min 摇床中继续培养 5 h 后取出菌液, 离心收集菌体, 加入适量 PBS 重悬, 超声破碎 5 min (超声条件: 20%, 超声 5 s, 间歇 5 s), 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min, 分离上清液和沉淀, 沉淀用适量 PBS 重悬, 分别加入等体积 2×SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 5 min,

SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达情况。

融合蛋白采用 Ni-NTA His·Bind 树脂进行纯化, 具体操作步骤: 离心收集大量诱导表达菌体, 加入适量结合缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 超声破碎, 13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 加入 Ni-NTA His·Bind 树脂纯化, 整个过程在 4 °C 条件下完成。蛋白经漂洗液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 漂洗去除杂蛋白后, 加入洗脱液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗脱样品, 洗脱蛋白的处理同上述方法。SDS-PAGE 检测蛋白的纯化效果, 并按照 Bradford 法测定蛋白浓度。

抗菌活性分析 抗菌活性检测采用琼脂糖孔穴扩散法^[24], 具体操作: 选择 G⁺ 细菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和 G⁻ 细菌大肠杆菌 M15 (*Escherichia coli* M15)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 用于抑菌实验。制作抑菌平板, 将培养的新鲜菌液离心后, 用 PBS 稀释至 OD₆₀₀ 为 0.2 时, 取 100 μ L 菌液加入经高压灭菌、冷却至 42 °C 的 10 mL 含 1% 琼脂糖、30 mg TSB 的溶液中, 立即混匀, 倒入直径为 9 cm 的平皿中, 待琼脂糖凝固后, 用孔径为 5 mm 不锈钢打孔器打孔, 每个平皿均匀打 3 个孔, 分别加入蛋白洗脱液 (阴性对照)、*CiNk1* 重组蛋白和抗生素样品 (阳性对照) 各 20 μ g, 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌置于 37 °C、嗜水气单胞菌置于 28 °C 培养箱, 培养约 12 h 出现抑菌圈时, 加入考马斯

亮蓝R-250染液，置于4℃，染色24 h，观察抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 草鱼NK-lysin基因全长cDNA和基因组的克隆与序列特征

草鱼*Cinkl*的cDNA全长768 bp，GenBank登录号为KT877168，包含366 bp的开放阅读框，编码121个氨基酸，包含17个氨基酸的信号肽和104个氨基酸的成熟肽(图1)，成熟肽中含有75个氨基酸大小的saposin B区域。预测的成熟肽分子量和等电点分别为11.7 ku和5.54。

*Cinkl*的基因组全长3 361 bp，GenBank登录号为KX631937，由4个外显子和3个内含子组成，外显子的长度分别为43、65、99、159 bp，内含子的长度分别为724、1 794、125 bp，位于外显子的43和44 bp、108和109 bp、207和208 bp之间(图2)。*Cinkl*与斑马鱼*nklc*、*nkl*d基因组结构

相同，并且*Cinkl*基因组的第1个内含子长度(724 bp)比其他鱼类(99~159 bp)长一些，与人NKG5第1个内含子长度(849 bp)相近。

2.2 草鱼NK-lysin和其他鱼类NK-lysin蛋白序列的同源性、进化关系的比较

草鱼与斑马鱼、斑点叉尾鲷、牙鲆、半滑舌鳎、大西洋鲑(*Salmon salar*)等NK-lysin氨基酸序列相似性比对结果显示，草鱼*CiNkl*与斑马鱼*Nklc*、*Nkld*的相似度比较高(图3)，与其同源性分别为57.98%、63.03%。草鱼与其他鱼类的NK-lysin一样，含有6个保守的半胱氨酸(cysteine, Cys)残基(C49、C52、C80、C90、C115、C121)，预测的二硫键连接方式：C49-C121，C52-C115，C80-C90。

鱼类和其他脊椎动物NK-lysin氨基酸序列的系统进化树显示，所有鱼类NK-lysins聚为一支，哺乳类和鸟类各自聚为一支。草鱼*CiNkl*与斑马鱼*Nklc*、*Nkld*聚类在一起，亲缘关系较近(图4)。



图1 草鱼NK-lysin的cDNA序列和推断的氨基酸序列

翻译起始密码子ATG、终止密码子TAA和多聚腺苷酸加尾信号aataaa不稳定信号用加粗和下划线表示；“*”表示翻译终止；“▲”表示信号肽切割位点；阴影部分表示saposin B区域

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequence of *C. idella* NK-lysin

ATG, TAA and polyadenylation signal sequence aataaa are bold and underlined; “*” means the stop condon; “▲” means the signal peptide cleavage site; saposin B domain is shown by gray shadow

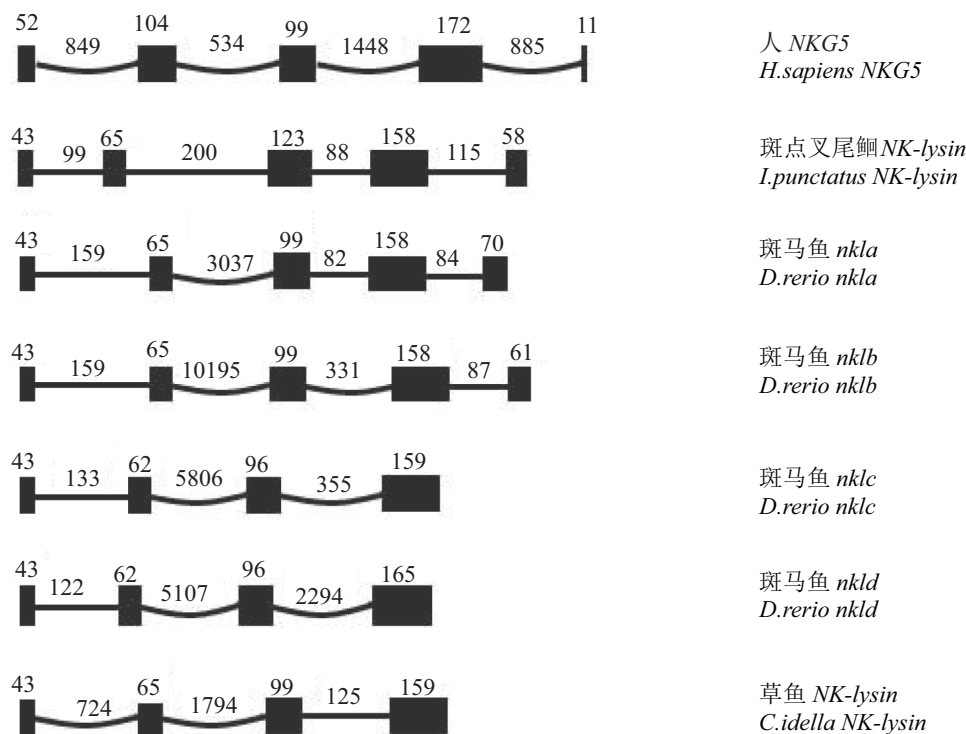


图2 人和几种鱼类NK-lysin基因组结构示意图

黑框表示外显子, 黑框之间的连线表示内含子, 数字表示外显子和内含子的长度; 基因组序列登录号: 人NKG5: M85276; 斑点叉尾鲷NK-lysin: AY934593; 草鱼NK-lysin: KX631937; *D. rerio nkla*、*nklb*、*nklc*、*nkld*来自于斑马鱼基因组BX323450.8

Fig. 2 Genomic structure and organization of NK-lysin from *H. sapiens*, *I. punctatus*, zebrafish and *C. idella*

Black boxes represent exons and lines adjacent to exons represent introns, the number of nucleotides in each exon and intron is shown above the corresponding element; the genomic accession number is M85276 of *H. sapiens* NKG5; AY934593 of *I. punctatus* NK-lysin, KX631937 of *C. idella*; *D. rerio nkla*, *nklb*, *nklc* and *nkld* genes are from BX323450.8

2.3 草鱼抗菌肽NK-lysin基因在健康草鱼各个组织中的表达

利用RT-PCR研究了*Cinkl* mRNA在健康草鱼各个组织的表达情况, 用含有草鱼 β -actin和*Cinkl*片段的质粒标准样品所检测出的荧光强度 C_t 值作图, 软件分析得到基因的溶解曲线、扩增曲线、标准曲线。溶解曲线分别显示 β -actin和NK-lysin为单一峰, 表明扩增产物特异性很好; 2个基因扩增效率分别为100%和104%; 标准曲线回归系数均接近于1.0, 显示出极好的线性关系, 扩增效果良好。

RT-PCR研究*Cinkl* mRNA的组织表达特征, 设定*Cinkl*在肠组织中的表达量为1, 根据*Cinkl* mRNA在各个组织器官中的相对表达量作柱形图(图5)。结果显示, *Cinkl* mRNA在所有检测组织中均有不同程度的表达, 在脾脏中表达量最高, 约为肠组织表达量的350倍, 在心脏、鳃、中肾和头肾中均有明显表达, 而在皮肤、脑、

肝脏、肠中有微量表达。

2.4 草鱼抗菌肽NK-lysin重组蛋白的鉴定和纯化

草鱼NK-lysin的成熟肽由104个氨基酸组成, 理论分子量为11.7 ku, 表达载体pET-28b-MBP的标签蛋白大小45.8 ku。经IPTG诱导后, SDS-PAGE分析诱导的空载体在约46 ku处有蛋白表达, pET-28b-MBP和*CiNkl*的融合蛋白大小约57 ku(图6-a), 与预期大小一致, 并且部分融合蛋白以可溶形式表达, 经Ni-NTA His-Bind树脂纯化得到纯度较高的目标蛋白(图6-b)。

2.5 草鱼抗菌肽NK-lysin重组蛋白的活性分析

Bradford法测定草鱼NK-lysin重组蛋白浓度为500 μ g/mL, 采用琼脂糖孔穴扩散法进行活性测定。结果显示, 在大肠杆菌M15、嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌的琼脂糖平板上, *CiNkl*重组蛋白加样孔的周围出现透明的抑菌圈, 而阴性对照蛋白洗脱液的加样孔周围未出现抑菌

草鱼 <i>C.idella</i> CiNkl	MLPCILLATLLISSVCAFDMEMHRGNFTEDELEQIS-----GEMAPAQQLPGLCWA	52
牙鲆 <i>P.olivaceus</i> PoNkl	MGTSSI-LLLCILVTCs-VWTVKGRCF-EIEIDDQE---PVDVPSVVEAGKLPGLCWA	53
半滑舌鳎 <i>C.semilaievis</i> CsNkl	MNKSPI-LLFCILAACS-VWSVHGKSQ-EMNIDDEE---PAEVELPVEA-KPPGLCWA	52
大西洋鲑 <i>S.salar</i> SsNkl	MKTSLV-LLALSLLACS-VWEIQGQCR-EDDQEAQS---EKC----MEETLFGTCWA	48
大黄鱼 <i>L.crocea</i> LcNkl	MNSSSVL-FVCILGACS-VWTVHGRNLKVNDDDQEG----AELDISVEARKLPGLCWA	53
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNkla	MLRNI FLVGLLIYAVSAAHWEVREVDSAEDELLEETPN-----DNMVKQKFPGLCWA	52
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNklb	MLRNI FLVSLLIYAVSAAHWEVREVDSAEDELLEETPE-----DNMVKQKFPGLCWA	52
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNklc	MLRGIVLLTLLISSACAAHLEMHKEPFPEDFEG-----SGEIPKEQLPGLCWA	50
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNkl	MLRGI ILLTLLISSVCAVQWEMHKEQHSGEIELEG-----SGEIPTEQLPGLCWA	50
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl3	MLRNLVASFLLIGAAVAVHLEYLKVDSSEELL-DET----WDEDLLMPE-EQIPGLCWA	53
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl1	MFWNLLVASFLLIGSACAMHMEYLRVDSAEELLDGSLDSTDEDEDLAMSETQLPGLCWA	60
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl2	MFWNLLVASFLLIGSACAMHMEYLRVDSAEELLDGSLDSADKDEDLPMSEIQLPGLCWA	60
	* . : . : . : * * *	
草鱼 <i>C.idella</i> CiNkl	KWAMGKVKGLISRTATPSDIKRALSHVCDIEIGFLKFMCRIFVNKYLGVLIIEELSTDDAR	112
牙鲆 <i>P.olivaceus</i> PoNkl	KWALNKVKRI IGRNATAESMKSLNVIDCNEIGLLKSI CRKFVKTHLGELEELTTDDVR	113
半滑舌鳎 <i>C.semilaievis</i> CsNkl	KWALNKVKKAMTQKETYEKVKARLIKICNKI GFLKSRCHKFVI THLDELVEELSTDDVK	112
大西洋鲑 <i>S.salar</i> SsNkl	KWALKKVKESTSTSDSQETLQKLLSVCCDKVGF LKSMCKGLMCKHLVWVIEELSTDDVR	108
大黄鱼 <i>L.crocea</i> LcNkl	KWSLNKVKKLLGRNTAESAESVKEKLMRVCCNEIGLLKSI CKKFVKHGLGELIEELTTDDVR	113
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNkla	KYVMKHVKERISADSTPDEIKNKLMMNICAKAWLLKGCQKQFVKTHLHTLIDELMTNDGVR	112
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNklb	KYIMNQVKRLSTKSTPDEIKNNLMNICNKAVVLKSCCKKFIQKHIHTLIDELMNDGPN	112
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNklc	KWAMGKLRQHSNTANKEIKNQLAQVCDGIGFLRPLCRWFVKKYMDILTEELSTDDGR	110
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNkl	KWALGKVKRKISNGATQDEIKVQLSQVCDQIGFLKSI CRGFVNKYMDVLIIEELSTDDNR	110
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl3	KRLMKVKKHLGNHENAERIKKELKRGCDKLPVVKDLCCKMVKNIIDFLVEELSTDDDPK	113
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl1	QWAMKVKKQLGNPNPTVDIIKAQLKVKVNSIGFLRGLCKKMINKYLDLVEELSTDDPT	120
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl2	KWAMNNVKKHLGINPTVDMIKAQLAEVNSIGFLRGLCKTI INKYLDLVEELSTDDNPT	120
	: : . : . : . : * * * : : : * : : : * : * * . *	
草鱼 <i>C.idella</i> CiNkl	TICVHVGVG-----	121
牙鲆 <i>P.olivaceus</i> PoNkl	TICVNTGACQPKEVAHLLFRPKHDESQTEIIEYP--	147
半滑舌鳎 <i>C.semilaievis</i> CsNkl	TICVNVKACNPKEPSSHLLFPYNN-----	135
大西洋鲑 <i>S.salar</i> SsNkl	TICVNIKACKPKELDLDSY-----	127
大黄鱼 <i>L.crocea</i> LcNkl	TICVNLKACKPKELSELDFESDEDAHT-EMNDLLFE	148
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNkla	TICAKALVCKFGPPRPFNFIFH-DRAVNEKEM---	144
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNklb	TICTKVHACKSEPPIKEFIFIH-EQAYSKL-----	141
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNklc	TICSHLHV-----	119
斑马鱼 <i>D.rerio</i> DrNkl	TICANISVCKK-----	121
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl3	AICAKAGLCKPVDMWELIQAF--PQNYQKL-----	141
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl1	TICGNLGI CKLSMLELQA-----	140
斑点叉尾鲴 <i>I.punctatus</i> IpNkl2	TICVNIIGI-----	129
	: * * . *	

图3 草鱼与其他鱼类NK-lysin氨基酸序列的同源性比较

“*”表示完全相同的氨基酸；“:”和“.”分别表示相似度较高和较低的氨基酸；6个半胱氨酸用方框标出

Fig. 3 Multiple amino acid alignment comparing the *C. idella* NK-lysin with other fishes

“*” indicates identical amino acids, while those with high and low similarity are indicated by “:” and “.”, respectively; the six cysteine (C) residues are shown by box

圈,说明该蛋白对大肠杆菌M15(图7-a)、嗜水气单胞菌(图7-b)和金黄色葡萄球菌(图7-c)有抑菌作用。在相同蛋白量的情况下,CiNkl对G-细菌大肠杆菌M15和嗜水气单胞菌的抑制作用较强(图7)。

3 讨论

NK-lysin与人的颗粒溶素一样,属于脂结合蛋白(SAPLIP)家族成员,这一家族蛋白质序列的主要特征是含有6个保守的半胱氨酸和1个saposin B结构域[6]。本研究通过RT-PCR和RACE技术获得Cinkl基因的全长序列,编码121个氨基酸,通过多序列比对分析发现,CiNkl与斑马鱼Nklc、Nklb的相似性较高。无论是低等脊椎动物还是高等脊椎动物的NK-lysin氨基酸序列,均具有6个保守的半胱氨酸,可形成3个分子内二硫键促进

蛋白质二级结构的折叠,NK-lysin的抗菌活性高度依赖其二硫键[25]。此外,结构域预测发现CiNkl氨基酸序列中存在75个氨基酸的SAPLIP家族特有的saposin B结构域,研究证实saposin B参与鞘脂的降解代谢,与NK-lysin的抗菌功能和抗肿瘤功能密切相关[26],Cinkl基因保守的序列特征暗示其可能具有相关的生物学功能。

对NK-lysin的基因组结构研究发现,人颗粒溶素NKG5基因组由5个外显子和4个内含子组成[10],斑点叉尾鲴、牙鲆和半滑舌鳎NK-lysin、斑马鱼nkla、nklb基因结构亦相同,说明鱼类和哺乳类的NK-lysin在基因结构的演化上是相对保守的。然而,随着研究的不断深入,发现斑马鱼nklc、nkld的基因组由4个外显子和3个内含子组成[19]。本研究获得的Cinkl的基因组具有与斑马鱼nklc、nkld相似的结构,并且从系统发育树结

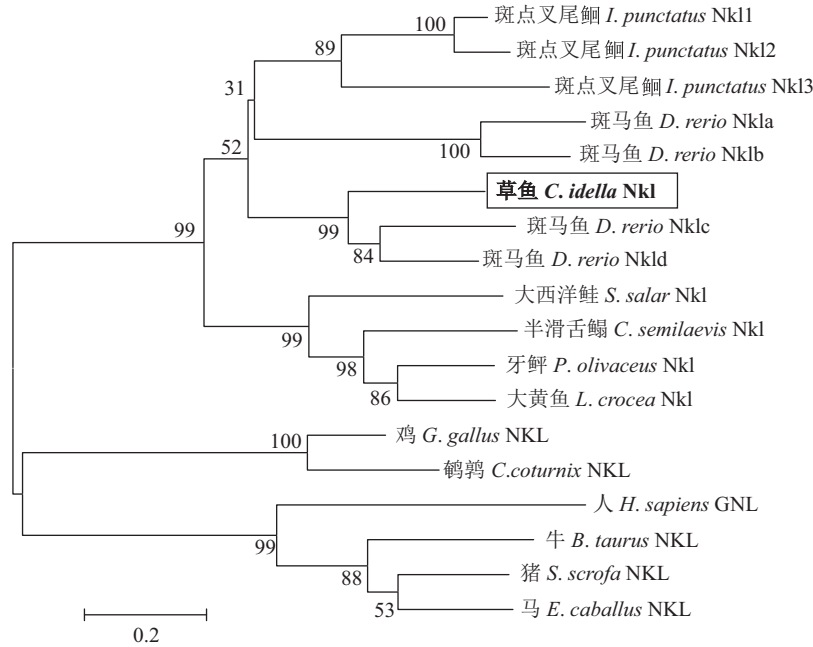


图4 基于NJ法构建的脊椎动物NK-lysins氨基酸序列的系统发育树

Bootstrap检验的重复次数为1000次

Fig. 4 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences from vertebrate NK-lysins

The tree is based on a 1000 bootstrap procedure.

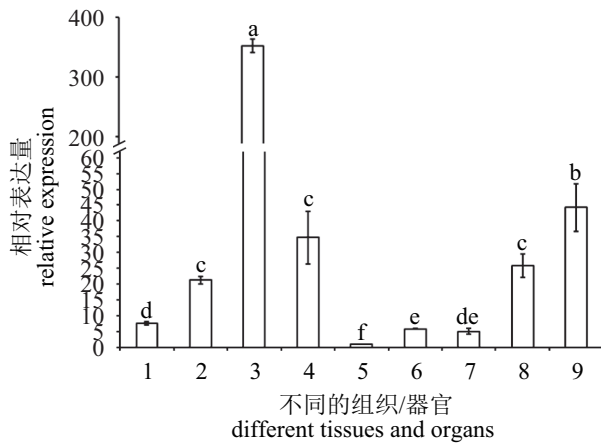


图5 草鱼NK-lysin在不同组织中的表达情况

1. 皮肤, 2. 头肾, 3. 脾脏, 4. 鳃, 5. 肠, 6. 肝脏, 7. 脑, 8. 中肾, 9. 心脏; 不同字母表示有显著性差异

Fig. 5 The relative expression of grass carp NK-lysin gene in different organs and tissues

1. skin, 2. head kidney, 3. spleen, 4. gill, 5. intestine, 6. liver, 7. brain, 8. trunk kidney, 9. heart; different letters indicate significant difference

果可见Cinkl与斑马鱼nklc、nkld的亲缘关系更近一些, 说明二者在演化上更为保守。

草鱼NK-lysin组织表达结果显示, 在脾脏中表达量极高, 在心脏、鳃、中肾和头肾中也有

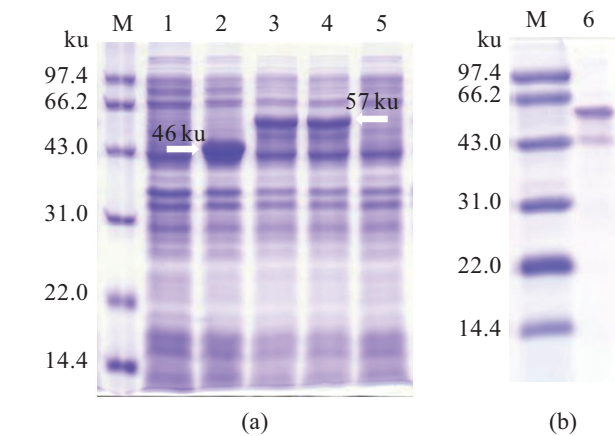


图6 SDS-PAGE检测草鱼NK-lysin重组蛋白表达和纯化

(a)和(b)分别为 12%和15%分离胶检测重组蛋白的表达和纯化; M. 标准分子量蛋白; 1和2分别为未诱导和诱导的空载体; 3和4分别为诱导的CiNkl重组蛋白沉淀和上清液; 5. 未诱导的CiNkl重组蛋白; 6. 纯化的CiNkl重组蛋白

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expression and purification of C. idella NK-lysin recombinant protein

SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression by 12% (a) and purification by 15% (b) separated gel; M. protein molecular standard; 1. non-induced bacterial cells with empty vector; 2. IPTG-induced bacterial cells with empty vector; 3. inclusion body of IPTG-induced bacterial cells with recombinant vector; 4. supernatant of cell lysates of IPTG-induced bacterial cells with recombinant vector; 5. non-induced bacterial cells with recombinant vector; 6. purified CiNkl protein

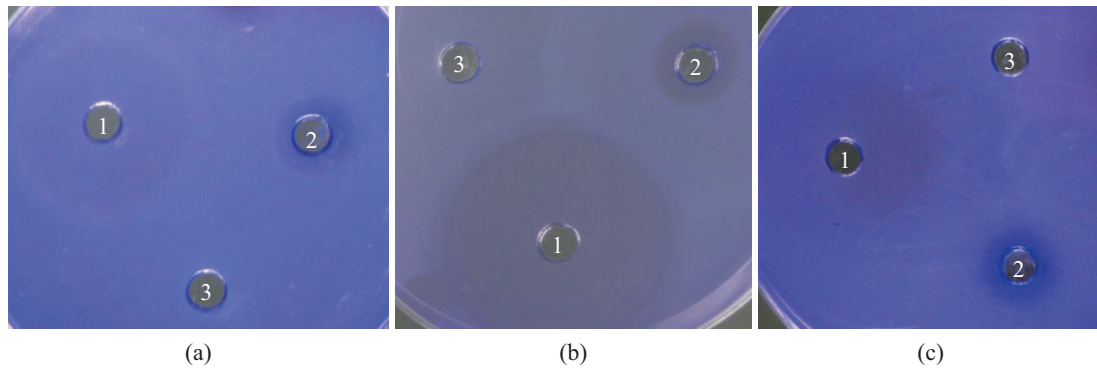


图7 草鱼NK-lysin重组蛋白的抑菌活性分析

(a)、(b)、(c)分别表示重组蛋白对大肠杆菌M15、嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性分析；1. 抗生素，图(a)和(c)中1为氨苄青霉素，图(b)中1为诺氟沙星；2. 重组蛋白；3. 蛋白洗脱液

Fig. 7 Antimicrobial activity analysis of *C. idella* NK-lysin recombinant protein

C. idella NK-lysin recombinant protein against *E. coli* M15 (a), *A. hydrophila* (b) and *S. aureus* (c) by inhibitory zone evaluation; 1. ampicillin in (a) and (c), and norfloxacin in (b); 2. CiNkl recombinant protein; 3. protein elution buffer

较高表达，而在皮肤、脑、肝脏、肠中表达量较少，这种组织表达模式与斑马鱼 *nklc*^[19] 和团头鲂 *nkla* 相似^[21]。在其他鱼类，牙鲆 *NK-lysin* mRNA 在鳃、心脏、头肾、外周血、脾脏和中肾中含量较高，而在脑和胃中没有检测出^[18]。斑点叉尾鲷 *NK-lysin* mRNA 在鳃、头肾、肠和脾脏中有较高的表达量，在皮肤和肝脏中微量表达，肌肉组织中不表达^[16]。半滑舌鳎 *NK-lysin* mRNA 在头肾中最高^[8]，斑马鱼 *nklc* 在鳃、中肾、脾脏中表达量较高^[19]，团头鲂 *nklb* 的组织表达差异较小，在肠中相对较高，在头肾中相对较低^[21]。鱼类与免疫相关的组织器官中，鳃的黏膜屏障构成了抗感染的第一道防线，同时脾脏和头肾是重要的免疫器官，*NK-lysin* 主要在这些器官高水平表达，说明该基因可能在鱼类抵御病原入侵方面发挥重要的免疫作用。在哺乳动物中，猪和马的 *NK-lysin* 主要在淋巴组织和细胞中有相对较高的表达水平^[11, 13]。牛的 NK1、NK2A 和 NK2B 在肠道的派尔集合淋巴结 (Peyer's patch) 中表达量较高，而 NK2C 在肺中表达量丰富^[23]。*NK-lysin* 主要在动物的免疫组织中进行表达，暗示其在宿主的免疫防御中发挥作用。

为了研究 CiNkl 蛋白的生物学功能，选择含有融合标签 MBP (麦芽糖结合蛋白) 的载体 pET-28b-MBP 构建了原核表达系统。采用融合表达的方式，融合标签可暂时改变抗菌肽的分子构象，从而降低其对宿主菌的毒性。CiNkl 融合蛋白部分以可溶形式表达，对其纯化后进行蛋白

的抑菌活性分析，该蛋白对 G⁺ 细菌金黄色葡萄球菌和 G⁻ 细菌大肠杆菌、嗜水气单胞菌均具有抑菌活性。近几年，对 NK-lysin 生物学功能的研究已在几种动物中开展。在高等物种中，猪 NK-lysin 抗菌肽对真菌、细菌、原生动物和肿瘤细胞均具有杀灭活性^[27-29]；鸡的 NK-lysin 具有抗肿瘤细胞和抗寄生虫的活性^[30]。而在鱼类中，研究主要集中在 NK-lysin 的抑菌活性方面，牙鲆 NK-lysin 仅对 G⁻ 细菌有杀灭作用^[18]，如大肠杆菌、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumonia*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等；半滑舌鳎 NKLP27 多肽能够杀灭 G⁺ 和 G⁻ 细菌：金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、哈氏弧菌 (*V. harveyi*) 和大肠杆菌等^[2]；大黄鱼 Lc-NK-lysin-1 对金黄色葡萄球菌和哈氏弧菌有较强的抑制作用，Lc-NK-lysin-2 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用明显^[20]。研究发现鱼类 NK-lysin 的抑菌种类中包括一些常见的水产动物病原菌，可见该抗菌肽有望用于鱼类抗菌药物的研发，为鱼类细菌性疾病的防治开辟新的途径，同时有望用于其他细菌病的防治。

参考文献：

- [1] 汪以真. 动物源抗菌肽的研究现状和展望[J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 2934-2941.

Wang Y Z. Antimicrobial peptides of animal origin: current situation and prospect[J]. Chinese Journal of

- Animal Nutrition, 2014, 26(10): 2934-2941(in Chinese).
- [2] 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.
- [3] 王四新, 李海峰, 刘辉, 等. 抗菌肽对草鱼生长性能的影响[J]. 饲料研究, 2011(4): 29-31.
Wang S X, Li H F, Liu H, *et al.* Effect of antimicrobial peptides on growth performance in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. Feed Research, 2011(4): 29-31(in Chinese).
- [4] 欧阳冰, 黄永彤, 黄自然, 等. 抗菌肽新型预混合剂饲养南美白对虾的效果试验[J]. 广东饲料, 2013, 22(8): 22-24.
Ouyang B, Huang Y T, Huang Z R, *et al.* Effect test of new premixture of antimicrobial peptides on feeding *Penaeus vannamei*[J]. Guangdong Feed, 2013, 22(8): 22-24(in Chinese).
- [5] 王一娟, 何义进, 谢骏, 等. 抗菌肽对河蟹生长、免疫及抗氧化能力的影响[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 340-343.
Wang Y J, He Y J, Xie J, *et al.* Effects of antibacterial peptide on growth, factors associated with immunity and antioxidation of *Eriocheir sinensis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(2): 340-343(in Chinese).
- [6] Fischer U, Koppang E O, Nakanishi T. Teleost T and NK cell immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 197-206.
- [7] Lee S H, Lillehoj H S, Tuo W, *et al.* Parasiticidal activity of a novel synthetic peptide from the core α -helical region of NK-lysin[J]. Veterinary Parasitology, 2013, 197(1-2): 113-121.
- [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] 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, 2016, 46(1): 65-70.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Endsley J J, Furrer J L, Endsley M A, *et al.* Characterization of bovine homologues of granulysin and NK-lysin[J]. The Journal of Immunology, 2004, 173(4): 2607-2614.
- [13] 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.
- [14] Kandasamy S, Mitra A. Characterization and expression profile of complete functional domain of granulysin/NK-lysin homologue (buffalo-lysin) gene of water buffalo (*Bubalus bubalis*)[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009, 128(4): 413-417.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 张卓娜, 陶妍. 斑点叉尾鲴NK-lysin基因的cDNA克隆及融合表达质粒构建[J]. 生物技术通报, 2012(9): 166-172.
Zhang Z N, Tao Y. cDNA cloning and construction of fusion expression plasmid for NK-lysin gene from channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(9): 166-172(in Chinese).
- [18] 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.
- [19] Pereiro P, Varela M, Diaz-Rosales P, *et al.* Zebrafish NK-lysin: first insights about their cellular and functional diversification[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 51(1): 148-159.
- [20] 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.
- [21] 詹柒凤, 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 Q F, Ding Z J, Cui L, *et al.* Identification, characterization and expression of NK-lysin in *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1145-1155(in Chinese).
- [22] 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.
- [23] Chen J F, Huddleston J, Buckley R M, *et al.* Bovine *NK-lysin*: copy number variation and functional diversification[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(52): E7223-E7229.
- [24] Wang G L, Li J H, Zou P F, *et al.* Expression pattern, promoter activity and bactericidal property of β -defensin from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(3): 522-531.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Andrä J, Berninghausen O, Wülfken J, *et al.* Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity[J]. FEBS Letters, 1996, 385(1-2): 96-100.
- [28] Yan J X, Wang K R, Chen R, *et al.* Membrane active antitumor activity of NK-18, a mammalian NK-lysin-derived cationic antimicrobial peptide[J]. Biochimie, 2012, 94(1): 184-191.
- [29] 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.
- [30] Lee M O, Kim E H, Jang H J, *et al.* Effects of a single nucleotide polymorphism in the chicken NK-lysin gene on antimicrobial activity and cytotoxicity of cancer cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(30): 12087-12092.

The cDNA cloning, expression and antibacterial activity of NK-lysin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WANG Gailing*, WANG Mingcheng, LI Chuanfeng, PAN Lei, LIU Panting
(College of Biological and Food Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

Abstract: NK-lysin is a cationic antimicrobial peptide mainly produced by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer (NK) cells and stored in cytolytic granules together with perforin and granzymes. NK-lysin is a member of saposin-like protein family and is orthologous with human granulysin. Mammalian NK-lysin is known to possess antibacterial and antitumor property. Homologues of *NK-lysin* have been identified in diverse organisms including human, pig, cattle, chicken, horse, water buffalo and teleost species. In fish, *NK-lysin* genes have been reported in five species, i.e. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), zebrafish (*Danio rerio*), half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). In this study, we aimed to explore the structure and expression difference in tissues, and the *NK-lysin* (*Cinkl*) was identified from grass carp *Ctenopharyngodon idella* using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE), and primers were designed according to the conserved sequence of known fish *NK-lysin* genes. The expression of the *Cinkl* gene in different tissues was analyzed by real-time quantitative PCR. In order to explore the antibacterial activity of *CiNkl*, the recombinant expression vector was constructed by cloning its mature peptide into the prokaryotic expression plasmid pET-28b-MBP. The antibacterial analysis of recombinant protein was evaluated using agar disc diffusion. The full-length cDNA sequence of *Cinkl* was 768 bp, encoding 121 amino acids. Genomic DNA was 3 361 bp including 4 exons and 3 introns that was similar to zebrafish *nklc* and *nkld* genome. The multiple sequence alignment analysis showed that the *CiNkl* shared 57.98% and 63.03% identity with zebrafish *Nklc* and *Nkld* respectively. *CiNkl* possesses a Saposin B domain of members of saposin-like protein (SAPLIP) family and six conserved cysteins (Cys) residues that in mammals are known to form three intramolecular disulfide bonds essential to antimicrobial activity. Phylogenetic tree suggested that *CiNkl* is clustered closely with *D. rerio* *Nklc* and *Nkld*. Quantitative RT-PCR results showed that *Cinkl* mRNA was expressed in all tissues examined and highly in the spleen, with small amount in heart, gill, kidney, head kidney and weakly in skin, brain, liver and intestine. In addition, SDS-PAGE showed that the molecular mass of recombinant *CiNkl* expressed in host bacteria Rosetta (DE3) was approximately 57 ku. The recombinant protein purified by Ni-NTA His·Bind resin showed the antibacterial activity against *Escherichia coli* M15, *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. The results indicate that grass carp NK-lysin has potential immunomodulatory effects in fish innate immunity.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *NK-lysin*; gene cloning; organization expression; antibacterial activity

Corresponding author: WANG Gailing. E-mail: wgl939@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402334); Basic and Frontier Technology Research Program of Henan Province (142300410111)