

文章编号: 1674-7054(2021)02-0139-08



鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 重组蛋白的表达及其体外抑菌活性特征

唐佳^{1,2}, 倪兴振³, 邢皓程⁴, 王佑笑³, 杨倩曦³,
闫慧聪³, 周智³, 赵建民¹

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 海南大学海洋学院, 海口 570228; 4. 海南华侨中学, 海口 570226)

摘要: 珊瑚疾病的大规模爆发已严重威胁到珊瑚礁生态系统的结构和功能。溶菌酶是无脊椎动物固有免疫应答中的重要效应分子之一。本研究从鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)中克隆得到了1个溶菌酶基因(*PdLYZ*), 随后体外诱导表达并纯化 PdLYZ 重组蛋白, 同时测定 PdLYZ 重组蛋白对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)和溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*)的抑菌活性, 还探究了 PdLYZ 重组蛋白在高温条件下对病原菌溶珊瑚弧菌抑制活性变化。研究结果: *PdLYZ* 的 cDNA 开放阅读框长 648 bp, 编码 215 个氨基酸残基, 其序列与其他生物的溶菌酶相似性为 25.54%~49.15%; 生物信息学预测 PdLYZ 推导蛋白具有 1 个类溶菌酶超家族结构域(Ile31-Gly214); PdLYZ 重组蛋白能显著抑制大肠杆菌、变异链球菌和溶珊瑚弧菌的生长; PdLYZ 重组蛋白在高温条件下会在前期显著抑制溶珊瑚弧菌的生长。这些结果表明, 溶菌酶 PdLYZ 可能参与珊瑚免疫防御。本研究为进一步理解珊瑚免疫机制提供了理论参考。

关键词: 鹿角杯形珊瑚; 溶菌酶; 原核表达; 抗菌活性

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A

引用格式: 唐佳, 倪兴振, 邢皓程, 等. 鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 重组蛋白的表达及其体外抑菌活性特征[J]. 热带生物学报, 2021, 12(2): 139-146. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.02.001

珊瑚礁生态系统是重要的海洋生态系统之一, 栖息着全球多达四分之一的海洋生物, 被誉为“海洋中的热带雨林”, 为人类提供了食物、生态和社会经济文化等服务^[1-2]。造礁石珊瑚是珊瑚礁生态系统的支柱生物, 其通过与虫黄藻和细菌等微生物共生来适应强光照寡营养的礁区环境, 因此维持健康的微生物群落结构对造礁石珊瑚的健康尤为重要。当前全球气候变暖导致的海水升温迫使造礁石珊瑚外排共生虫黄藻, 珊瑚因营养短缺而免疫力下降, 机会致病菌 [例如: 溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*)] 的致病力相对显著提升, 造成了某些珊瑚疾病的爆发率显著升高^[3]。因此, 亟需开展造礁石珊瑚免疫防御机制的相关研究, 尤其是高温对珊瑚免疫的影响。造礁石珊瑚与其他无脊椎动物一样, 依靠固有免疫应答来识别和清除入侵的病原菌等微生物^[4]。此外, 珊瑚还能通过固有免疫应答控制共附生菌群中病原菌的数量和比例, 进而降低病原菌的潜在威胁^[5]。珊瑚的凋亡、自噬、抗菌肽、氧化还原系统、酚氧化酶系统和补体系统等均参与了致病微生物的控制和清除^[6-7]。抗菌肽是生物中普遍存在的一类阳离子活性多肽, 是机体非特异性免疫的关键因子之一, 目前已从多种无脊椎动物中分离出具有活性的抗菌肽^[8]。近年来, 分子生物学和基因组学的迅猛发展促进了免疫相关基因的挖掘, 更好地推动珊瑚固有免疫应答和共附生菌群

收稿日期: 2020-10-01

修回日期: 2021-01-27

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1406500); 国家自然科学基金(31772460); 海南省自然科学基金(2019RC067)

第一作者: 唐佳(1996-), 女, 中国科学院烟台海岸带研究所 2018 级硕士研究生. E-mail: tangjia185@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 周智(1983-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 海洋生物学. E-mail: zhouchi@hainu.edu.cn; 赵建民(1978-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 海洋生物学. E-mail: jmzhao@yic.ac.cn

调控的深入研究。溶菌酶属于抗菌肽家族,是生物体内一种具有杀菌作用的重要抗菌蛋白,其通过催化水解细胞壁中 N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸之间形成的 β -1,4 糖苷键而破坏细菌的细胞壁^[9-12]。目前,已有许多研究聚焦于无脊椎动物的溶菌酶,但对造礁石珊瑚,甚至刺胞动物中溶菌酶的了解还不清楚,仅有类溶菌酶活性的相关报道,且缺乏确切的分子证据^[13-14]。例如,有研究表明受黄带病影响的珊瑚 (*Orbicella faveolata*) 中具有较高的类溶菌酶活性^[15];海扇可能通过增加类溶菌酶和壳多糖酶活性抵抗微生物入侵^[16];华丽黄海葵 (*Anthopleura elegantissima*) 和等指海葵 (*Actinia equina*) 的粘液均具有类溶菌酶活性^[17-18]。鹿角杯形珊瑚 (*Pocillopora damicornis*) 隶属动物界 (Animalia)、刺胞动物门 (Cnidaria)、珊瑚纲 (Anthozoa)、石珊瑚目 (Scleractinia)、杯形珊瑚科 (Pocilloporidae)、杯形珊瑚属 (*Pocillopora*), 广泛分布于太平洋和印度洋的热带和亚热带浅海海域。鹿角杯形珊瑚已作为模式生物用于探究造礁石珊瑚对病原菌,以及病原菌和高温交互作用的响应研究中。例如, BEN-HAIM 等^[19] 分离出一种温度依赖型的溶珊瑚弧菌,该病原菌在水温超过 26 °C 时,可在 2 周内迅速破坏鹿角杯形珊瑚的组织^[19]。笔者克隆了鹿角杯形珊瑚的溶菌酶基因 *PdLYZ*, 随后体外诱导表达并纯化 *PdLYZ* 重组蛋白,同时测定 *PdLYZ* 重组蛋白对大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 和溶珊瑚弧菌 (*V. coralliilyticus*) 的抑菌活性,还探究了 *PdLYZ* 重组蛋白在高温条件下对病原菌溶珊瑚弧菌抑制活力的变化,从而揭示溶菌酶在珊瑚免疫应答中扮演的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验生物 鹿角杯形珊瑚采自文昌市铜鼓岭岸礁,采后置于盛有 500 L 天然海水的玻璃缸中暂养 1 个月。暂养条件:温度 26 °C,盐度 35,光照:黑暗时间为 12 h:12 h。受试菌株:大肠杆菌 (*E. coli*, ATCC 25922)、变异链球菌 (*S. mutans*, ATCC 700610) 和溶珊瑚弧菌 (*V. coralliilyticus*, SCSIO 43001)。

1.2 实验试剂 DNA 提取试剂 Trizol 购自美国 invitrogen 公司;逆转录试剂盒 M-MLV Reverse Transcriptase Kit 购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;PCR 试剂、PCR 克隆试剂盒 (PMD19-T Vector Cloning Kit 和 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit) 购自宝生物工程(大连)有限公司;Trans5 α 感受态细胞、Trans BL21(DE3)pLysS 化学感受态细胞和连接转化试剂盒 (pEASY-E1 Expression Kit) 购自全式金生物技术有限公司;镍琼脂糖凝胶 FF 购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司;其他试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司或北京索莱宝科技有限公司。

1.3 鹿角杯形珊瑚总 RNA 提取和 cDNA 合成 将珊瑚小枝置于液氮中充分研磨后加入 1 mL Trizol, 收集研磨液,将研磨液在 5 000 g 4 °C 下离心 5 min 后去除珊瑚的碳酸钙骨骼,然后参考 STEFANIK 等^[20] 报道的方法提取鹿角杯形珊瑚的总 RNA。利用 M-MLV Reverse Transcriptase Kit 将 RNA 反转获得 cDNA 第一链,将获得的 cDNA 稀释 100 倍后用于 *PdLYZ* 基因的克隆。

1.4 *PdLYZ* 基因的克隆和序列分析 基于本实验室已测序和组装的鹿角杯形珊瑚转录组文库,采用局部序列排比检索基本工具 (basic local alignment search tool, BLAST) 检索到 1 条与其他已鉴定的溶菌酶基因同源的转录本,且该转录本的序列含有 1 个完整的开放阅读框。为了扩增 *PdLYZ* 基因开放阅读框的序列,利用引物设计软件 (Primer premier 5.0) 设计 2 条特异性引物 *PdLYZ*_F (5'-AAATGTGACCCAAAACC ATCGA -3') 和 *PdLYZ*_R (5'-AATCAGCATCCAGCTTTAATGATT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μ L。扩增条件:94 °C 5 min, 35 个循环 (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min。扩增产物 4 °C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 进行纯化,然后将该片段连接到 PMD19-T 载体中并转化至 Trans5 α 感受态细胞。挑选 PCR 鉴定为阳性的单克隆菌落进行测序以验证序列。

使用 BLAST 工具在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>) 中检索 *PdLYZ* 的同源基因和蛋白。利用 ExPASy 数据库 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 计算 *PdLYZ* 蛋白的理论等电点和相对分子量,采用 SignalP 4.1 数据库 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 NCBI 数据库的保守结构域数据库

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)分别预测 PdLYZ 蛋白的信号肽和结构域。PdLYZ 蛋白和其他生物溶菌酶的多序列比对通过 ClustalX 软件完成, 然后通过多序列对比显示工具(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)进行可视化展示。PdLYZ 蛋白和其他溶菌酶的进化分析利用 MEGA-X 软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)完成, 节点上的数字表示 1 000 次复制的自展值, 用于检验进化树分支的可信度。

1.5 PdLYZ 重组蛋白的表达、纯化和复性 以 pMD19-T-PdLYZ 质粒作为模板, 并使用特异性引物 PdLYZ_F 和 PdLYZ_R 扩增编码 PdLYZ 成熟肽的序列, 将扩增的 PdLYZ 成熟肽插入 pEASY-E1 表达载体中, 然后将构建好的重组质粒 pEASY-E1-PdLYZ 转化至 Trans BL21(DE3)pLysS 化学感受态细胞中。挑选阳性单克隆菌落接种到 200 mL 含氯苄青霉素($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的卢里亚-贝尔塔尼培养基(LB 培养基)培养至 OD_{600} 约 0.6, 并添加异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)(终浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导 PdLYZ 重组蛋白表达。离心、收集菌细胞进行超声破碎(工作 5 s, 间隙 20 s, 功率 200 W), 破碎至菌液澄清后, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min, 收集上清液用于蛋白纯化。

采用镍琼脂糖凝胶 FF 对带有 His 标签的 PdLYZ 重组蛋白进行纯化, 将纯化后的 PdLYZ 蛋白装入透析袋中, 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下依次用含有 $8, 6, 4, 2, 1, 0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素透析液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA-2Na, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型谷胱甘肽, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型谷胱甘肽, $133 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸)中进行复性。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检验 PdLYZ 重组蛋白的表达, 纯化和复性结果。最后, 参考 BCA 快速蛋白定量试剂盒说明书测定 PdLYZ 重组蛋白的浓度。

1.6 PdLYZ 重组蛋白对大肠杆菌和变异链球菌抑菌活性的测定 PdLYZ 重组蛋白对大肠杆菌和变异链球菌抑菌活性的测定参考 ZHOU Z 等^[21]的方法并稍有修改。将供试菌(大肠杆菌和变异链球菌)在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养至对数生长期, 再将对数生长期的供试菌菌液在 $10\,000 \text{ g}$ $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 15 min 收集细胞, 将收集的细胞用 PBS 缓冲液洗 2 次后重悬至菌浓度为 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取 $50 \mu\text{L}$ 菌液, 加入 $250 \mu\text{L}$ PdLYZ 重组蛋白, 混匀后 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h, 采用等浓度的牛血清蛋白(BSA 蛋白)作为对照。然后取 $20 \mu\text{L}$ 混合液加入 $200 \mu\text{L}$ 培养基(大肠杆菌: LB 培养基; 变异链球菌: 脑心浸出液肉汤(BHI)培养基), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养, 每隔 1 h 在 600 nm 处测定吸光度的变化。

1.7 PdLYZ 重组蛋白在不同温度下对溶珊瑚弧菌抑制活性的测定 溶珊瑚弧菌 $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至对数生长期, 按照 1.6 部分的方法获取 PdLYZ 重组蛋白和溶珊瑚弧菌共孵育的菌液, 然后取 $20 \mu\text{L}$ 混合液加入 $200 \mu\text{L}$ 2216E 液体培养基, 分别于 $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养, 每隔 1 h 在 600 nm 处测定吸光度的变化。

2 结果与分析

2.1 PdLYZ 基因的分子特征 PdLYZ 的开放阅读框长 648 bp, 编码 215 个氨基酸。利用 SignalP 4.1 数据库预测 PdLYZ 推导蛋白的 N 末端有 23 个氨基酸残基组成的信号肽。NCBI-CDD 保守结构分析结果表明, PdLYZ 蛋白含有 1 个类溶菌酶超家族结构域(Ile31-Gly214)。ExPASy 数据库分析结果揭示 PdLYZ 成熟肽的分子量标准和理论等电点分别为 22.05 kDa 和 8.84。

多序列比对的结果显示, PdLYZ 与萼柱珊瑚(*Stylophora pistillata*)中的溶菌酶(XP_022779194.1)有 41.47% 的相似性; 与指状鹿角珊瑚(*Acropora digitifera*)中的溶菌酶(XP_015770608.1)有 43.33% 的相似性; 与海绵 *Amphimedon queenslandica* 的溶菌酶(XP_011407575.1)具有 30.65% 相似性。上述 4 种生物溶菌酶序列的多重比较共揭示 5 个保守的半胱氨酸(Cys26, Cys41, Cys116, Cys197, Cys204)(图 1)。

2.2 PdLYZ 蛋白的进化分析 基于 PdLYZ 蛋白的氨基酸序列采用 Blastp 检索 NCBI 中的 Genbank 数据库中的同源蛋白, 发现 PdLYZ 蛋白与其他无脊椎动物的溶菌酶相似性为 30.65% ~ 44.78%; 与细菌和藻类的溶菌酶相似性为 25.54% ~ 49.15%。其中与细菌 *Gammaproteobacteria bacterium*(RKZ98632.1)的溶

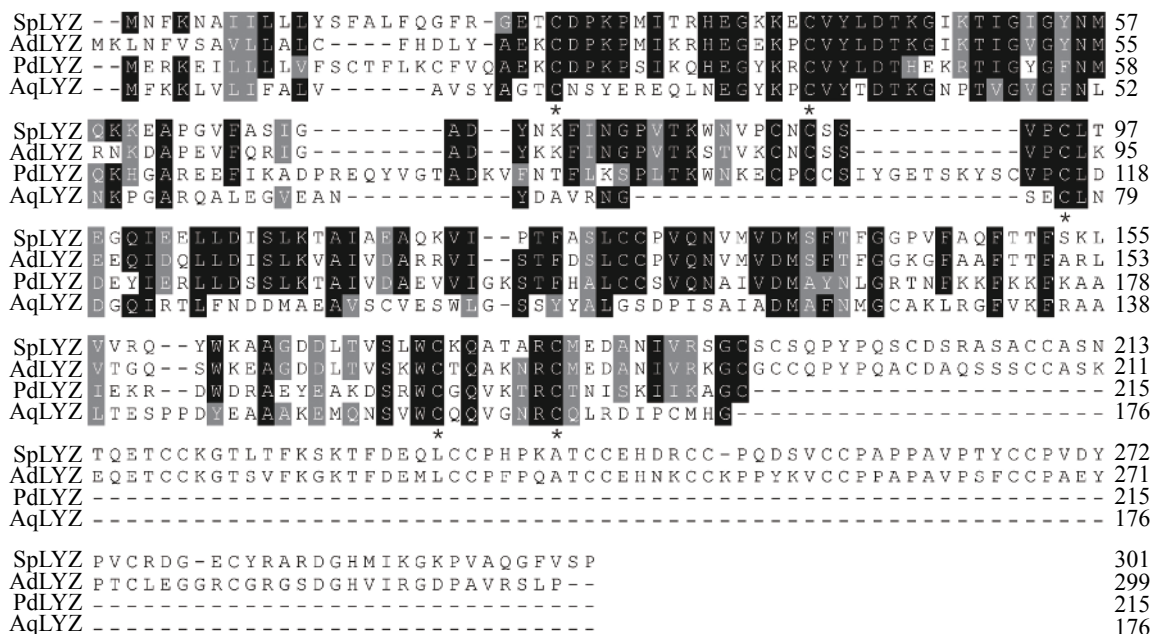


图1 PdLYZ序列与其他生物溶菌酶序列比对结果

Fig. 1 Multiple alignment of PdLYZ amino acid sequence with that of other animals in GenBank.

Sp: 柱状珊瑚 *Stylophora pistillata*; Ad: 鹿角珊瑚 *Acropora digitifera*; Pd: 杯形珊瑚 *Pocillopora damicornis*; Aq: 海绵 *Amphimedon queenslandica*。*代表保守的半胱氨酸。The asterisk below indicates conserved cysteine residues.

菌酶相似性最高,达 49.15%。利用 MEGA-X 软件的 NJ 方法构建了系统进化树(图 2)。在进化树中, PdLYZ 首先和珊瑚、海绵的溶菌酶聚成一支,而细菌、藻和贝类的溶菌酶则聚成另一个独立的分支。

2.3 PdLYZ 重组蛋白的表达与纯化 为了进一步揭示 PdLYZ 在鹿角杯形珊瑚中的生物学功能,利用 IPTG 诱导已转化重组质粒 pEASY-E1-PdLYZ 的 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞表达 PdLYZ 重组蛋白。采用镍柱纯化体外表达的 PdLYZ 重组蛋白, SDS-PAGE 分析结果表明, PdLYZ 分子量为 22.05 kDa(图 3),与 ExPASy 数据库预测的蛋白相对分子量一致。测定纯化透析后的 PdLYZ 重组蛋白浓度为 0.1 g·L⁻¹。

2.4 PdLYZ 重组蛋白对大肠杆菌和变异链球菌的抑制活性 在 37 °C 下, PdLYZ 重组蛋白能抑制大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和变异链球菌(革兰氏阳性菌)的生长。PdLYZ 重组蛋白在 3、4 h 能显著抑制大肠杆菌的生长,抑制率分别为 49.48% 和 22.46%(图 4)。PdLYZ 重组蛋白在 3、4 h 能显著抑制变异链球菌的生长,抑制率分别为 53.64% 和 26.45%(图 5)。

2.5 不同温度下 PdLYZ 重组蛋白对溶珊瑚弧菌的抑制活性 在 26 °C 和 32 °C 下测定了 PdLYZ 重组蛋白对溶珊瑚弧菌生长的抑制活性。PdLYZ 重组蛋白在 2 种温度下均能显著抑制溶珊瑚弧菌生长。26 °C 时 PdLYZ 重组蛋白在 7 h 对溶珊瑚弧菌生长的抑制率高达 70.50%(P<0.05), 32 °C 时 PdLYZ 重组蛋白在 6 h 对溶珊瑚弧菌生长的抑制率达 47.93%(图 6)。

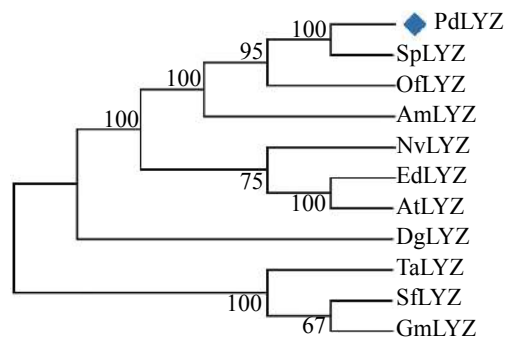


图2 不同生物溶菌酶的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of lysozymes from different organisms

Sp: 柱状珊瑚 *Stylophora pistillata*; Of: 星珊瑚 *Orbicella faveolate*; Am: 鹿角珊瑚 *Acropora millepora*; Nv: 海葵 *Nematostella vectensis*; Ed: 海葵 *Exaiptasia diaphana*; At: 海葵 *Actinia tenebrosa*; Dg: 软珊瑚 *Dendronephthya gigantea*; Ta: 锦蟾 *Thalassophryne amazonica*; Sf: 硬骨舌鱼 *Scleropages formosus*; Gm: 鳕鱼 *Gadus morhua*.

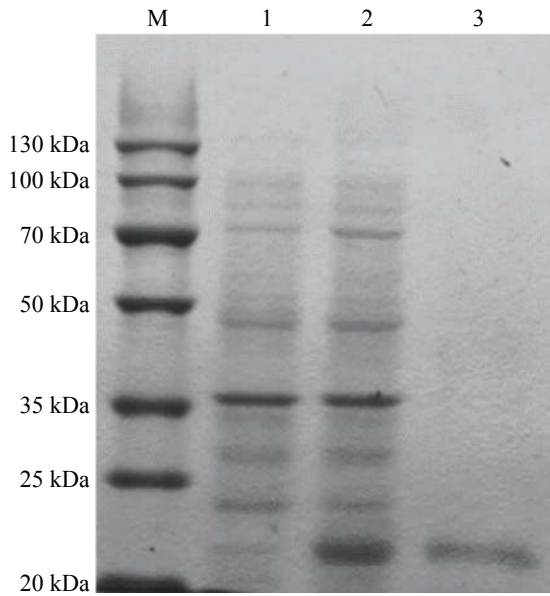


图 3 PdLYZ 重组蛋白的表达与纯化

M: 蛋白 marker; 1: 未诱导组蛋白的表达; 2: 诱导组蛋白的表达; 3: 镍柱纯化后的 PdLYZ 蛋白。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant PdLYZ protein.

Lane M: protein molecular weight marker. Lane 1: protein expression of control group, not induced; Lane 2: protein expression of induced group; Lane 3: PdLYZ protein purified by Ni²⁺ chelating Sepharose column.

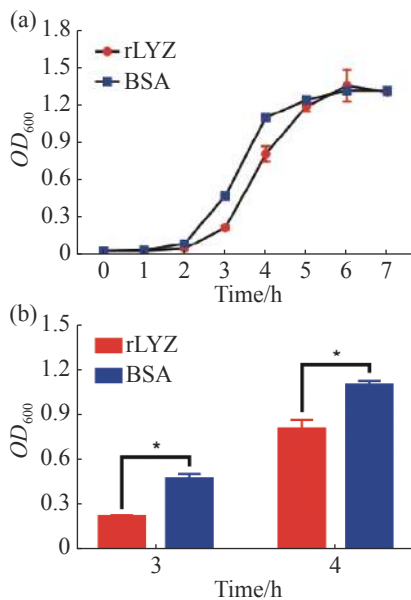


图 5 PdLYZ 重组蛋白对变异链球菌的抑菌活性,

rLYZ: PdLYZ 重组蛋白; BSA: 牛血清蛋白(CK)。数据以平均值±标准差表示($n=3$), *代表显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 5 Inhibitory activity of recombinant PdLYZ protein against *Streptococcus mutans*.

rLYZ: recombinant PdLYZ protein; BSA: bovine serum albumin (CK). Values are presented as the mean \pm SD ($n=3$), and * represents significant difference ($P<0.05$).

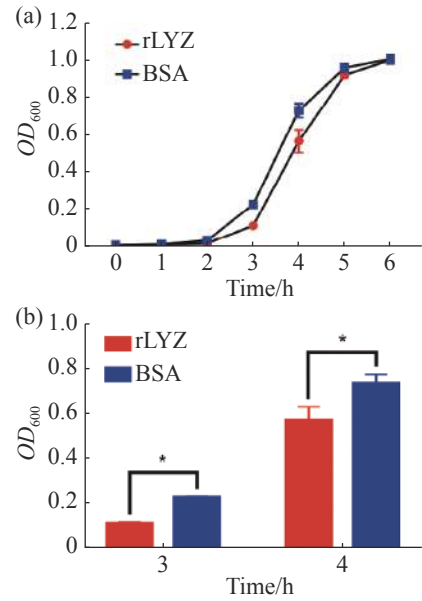


图 4 PdLYZ 重组蛋白对大肠杆菌的抑菌活性,

rLYZ: PdLYZ 重组蛋白; BSA: 牛血清蛋白(CK)。数据以平均值±标准差表示($n=3$), *代表显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Inhibitory activity of recombinant PdLYZ protein against *Escherichia coli*.

rLYZ: recombinant PdLYZ protein; BSA: bovine serum albumin (CK). Values are presented as the mean \pm SD ($n=3$), and * represents significant difference ($P < 0.05$).

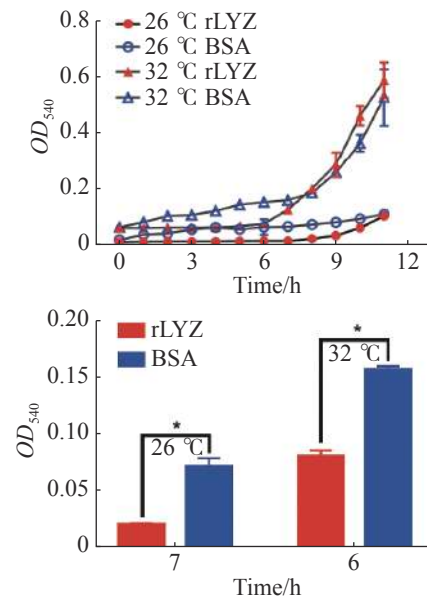


图 6 在 26 °C 和 32 °C 下, PdLYZ 重组蛋白对溶珊瑚弧菌的抑菌活性

rLYZ: PdLYZ 重组蛋白; BSA: 牛血清蛋白(CK)。数据以平均值±标准差表示($n=3$), *代表显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 6 Inhibitory activity of recombinant PdLYZ protein against *Vibrio coralliilyticus* at 26 °C and 32 °C.

rLYZ: recombinant PdLYZ protein; BSA: bovine serum albumin (CK). Values are presented as the mean \pm SD ($n=3$), and * represents significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

病原菌导致的珊瑚疾病对珊瑚礁生态系统造成的影响不容小觑,尤其是在全球气候不断变暖的背景下。溶菌酶是广泛存在于各种生物的一类抗菌分子,在无脊椎动物固有免疫应答中发挥着重要作用。本实验探究了鹿角杯形珊瑚溶菌酶的分子特征及其生物学功能,揭示了溶菌酶可能参与珊瑚免疫应答。鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 基因的 cDNA 开放阅读框长 648 bp, 编码 215 个氨基酸, 其序列与其他生物的溶菌酶相似性为 25.54% ~ 49.15%。鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 推导蛋白的 N 末端有 1 条由 23 个氨基酸残基组成的信号肽, 表明 PdLYZ 蛋白分泌到细胞外行使功能。此外, 鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 含有 1 个类溶菌酶超家族的结构域, 该结构域对于溶菌酶的抑菌功能可能至关重要。MEGA 软件构建鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 和其他生物溶菌酶的系统进化树的分析结果表明, 鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 和珊瑚、海绵的溶菌酶聚成 1 支, 而细菌、藻类和贝类的溶菌酶则聚成另外 1 个独立的分支; 系统进化树的分析结果表明, 鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 是溶菌酶在鹿角杯形珊瑚中的同源酶, 而且它可能拥有与其他动物中的同源酶相似的生物学活性。

造礁石珊瑚健康菌群的维持与珊瑚礁生态系统的健康密切相关。为探究溶菌酶在珊瑚免疫应答中的可能作用, 本研究测定了鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 重组蛋白对革兰氏阳性菌变异链球菌、革兰氏阴性菌大肠杆菌和病原菌溶珊瑚弧菌的抑制活性。结果表明, 鹿角杯形珊瑚溶菌酶 PdLYZ 重组蛋白对变异链球菌和大肠杆菌的生长均有显著的抑制作用。PdLYZ 重组蛋白可能通过破坏变异链球菌的细胞壁结构, 即催化水解细胞壁中 N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸之间形成的 β -1, 4 糖苷键^[22], 来抑制变异链球菌的生长。对于大肠杆菌和溶珊瑚弧菌而言, PdLYZ 重组蛋白可能通过与脂多糖(LPS)的结合活性发挥抑菌作用^[23]。相似的报道已证明海参、蟹、虾和贝等无脊椎动物中的溶菌酶也对革兰氏阳性菌和阴性菌均具有抑制作用^[9, 24-26]。海洋无脊椎动物的溶菌酶可能比陆地无脊椎动物的活性范围更广, 便于应对复杂海洋环境中多样性更高的病原菌^[27]。PdLYZ 重组蛋白广泛的抑菌活性表明溶菌酶可能参与珊瑚机体的防御免疫。

溶珊瑚弧菌是一种广为报道的珊瑚病原菌, 海水升温会加剧溶珊瑚弧菌对珊瑚的致病力^[28]。为探究溶菌酶在珊瑚应对未来全球气候变暖中的可能作用, 本研究测定了与 PdLYZ 重组蛋白(实验组)或 BSA 蛋白(对照组)共孵育后, 溶珊瑚弧菌在 26 °C 和 32 °C 下的生长曲线。结果表明, 高温会加速溶珊瑚弧菌的生长, 病原菌的快速生长可能触发珊瑚固有免疫应答, 溶菌酶作为固有免疫的关键组成部分, 通常被认为是抵抗病原菌感染的第一道防线。本研究结果表明, PdLYZ 重组蛋白在常温及高温条件下能显著抑制溶珊瑚弧菌的生长, 且其抑菌能力在高温条件下更强。这与在其他生物中的研究一致, STABILI^[17] 研究表明, 海葵 *A. equina* 粘液中类溶菌酶的抑菌活性在高温条件下较强, 黄金凤等^[29] 研究表明, 松浦镜鲤幼鱼溶菌酶活性随温度升高而显著增加。此外, PdLYZ 重组蛋白在高温条件下会在前期显著抑制病原菌生长。这些结果表明, PdLYZ 蛋白对于鹿角杯形珊瑚在未来气候变暖中可能会降低病原菌的数量和比例, 对抑制珊瑚疾病的爆发具有重要意义。综上所述, 本研究克隆得到一个鹿角杯形珊瑚的溶菌酶基因, 其蛋白含有类溶菌酶超家族结构域, 其重组蛋白对于大肠杆菌、变异链球菌和溶珊瑚弧菌均具有抑制作用, 且在高温条件下会在前期显著抑制溶珊瑚弧菌的生长。由此笔者推测溶菌酶在珊瑚免疫应答中可能扮演着重要作用。

参考文献:

- [1] COSTANZA R, DE GROOT R, SUTTON P, et al. Changes in the global value of ecosystem services [J]. *Global Environmental Change*, 2014, 26: 152 - 158.
- [2] 朱文涛, 秦传新, 马鸿梅, 等. 大亚湾珊瑚礁生态系统简化食物网的稳定同位素 [J]. *水产学报*, 2020, 44(7): 1112 - 1123.
- [3] WILLIAMS G J. Coral disease and the environment in the Pacific Ocean [D]. School of Biological Sciences · Te Kura Mātauranga Koiora, 2010.
- [4] STABILI L, RIZZO L, FANIZZI F P, et al. The jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria): biochemical composition of ovaries

- and antibacterial lysozyme-like activity of the oocyte lysate [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(1): 17.
- [5] KVENNEFORS E C E, LEGGAT W, KERR C C, et al. Analysis of evolutionarily conserved innate immune components in coral links immunity and symbiosis [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(11): 1219 – 1229.
- [6] ZHOU Z, ZHAO S, TANG J, et al. Altered immune landscape and disrupted coral-Symbiodinium symbiosis in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* by *Vibrio coralliilyticus* challenge [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 366.
- [7] MYDLARZ L D, FUESS L, MANN W, et al. Cnidarian immunity: from genomes to phenomes[M]. *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Cham: Springer, 2016: 441 – 466.
- [8] 赵建民. 扇贝大防御素和 G 型溶菌酶的基因克隆与重组表达[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2006.
- [9] TIAN Y, LIANG X, CHANG Y, et al. Expression of c-type lysozyme gene in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is highly regulated and time dependent after salt stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 180: 68 – 78.
- [10] YANG X, CONG L, LU M, et al. Characterization and structure analysis of a gene encoding i-type lysozyme from sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(7): 542.
- [11] 赵丹, 周丽青, 吴彪, 等. 魁蚶各组织溶菌酶活性对鳃弧菌侵染的响应[J]. *水产学报*, 2020, 44(3): 480 – 486.
- [12] 李雪雪, 阮灵伟. 超深渊钩虾 *Eurythenes gryllus* i 型溶菌酶的基因克隆与表达[J]. *应用海洋学学报*, 2020, 39(1): 42 – 48.
- [13] ADAMO S A. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 50(2/3): 209 – 216.
- [14] ANDERSON R S, COOK M L. Induction of lysozymelike activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eridania* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1979, 33(2): 197 – 203.
- [15] MYDLARZ L D, COUCH C S, WEIL E, et al. Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montastraea faveolata* during a natural bleaching event [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 87(1/2): 67 – 78.
- [16] COUCH C, MYDLARZ L, HARVELL C, et al. Variation in measures of immunocompetence of sea fan coral, *Gorgonia ventalina*, in the Florida Keys [J]. *Marine Biology*, 2008, 155(3): 281 – 292.
- [17] STABILI L, SCHIROSI R, PARISI M G, et al. The mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): An unexplored resource for potential applicative purposes [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(8): 5276 – 5296.
- [18] MULLEN K M, PETERS E C, HARVELL C D. Coral resistance to disease[M]. *Coral health and disease*. Berlin: Springer, 2004: 377-399.
- [19] BEN-HAIM Y, THOMPSON F, THOMPSON C, et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 309 – 315.
- [20] STEFANIK D J, WOLENSKI F S, FRIEDMAN L E, et al. Isolation of DNA, RNA and protein from the starlet sea anemone *Nematostella vectensis* [J]. *Nature protocols*, 2013, 8(5): 892 – 899.
- [21] ZHOU Z, JIANG Q, WANG M, et al. Modulation of haemocyte phagocytic and antibacterial activity by alpha-adrenergic receptor in scallop *Chlamys farreri* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 825 – 832.
- [22] WU T, JIANG Q, WU D, et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review [J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 698 – 709.
- [23] WHANG I, LEE Y, LEE S, et al. Characterization and expression analysis of a goose-type lysozyme from the rock bream *Oplegnathus fasciatus*, and antimicrobial activity of its recombinant protein [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 532 – 542.
- [24] BU X, DU X, ZHOU W, et al. Molecular cloning, recombinant expression, and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(5): 723 – 732.
- [25] DING J, WANG R, YANG F, et al. Identification and characterization of a novel phage-type like lysozyme from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 47(1): 81 – 89.
- [26] ZHOU J, ZHAO S, FANG W-H, et al. Newly identified invertebrate-type lysozyme (Splys-i) in mud crab (*Scylla paramamosain*) exhibiting muramidase-deficient antimicrobial activity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 74: 154 – 166.
- [27] HIKIMA S, HIKIMA J-I, ROJTINNAKORN J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio species* [J]. *Gene*, 2003, 316: 187 – 195.
- [28] VIDAL-DUPIOL J, DHEILLY N M, RONDON R, et al. Thermal stress triggers broad *Pocillopora damicornis* transcriptional remodeling, while *Vibrio coralliilyticus* infection induces a more targeted immuno-suppression response [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107672.
- [29] 黄金凤, 徐奇友, 王常安, 等. 温度和饲料蛋白质水平对松浦镜鲤幼鱼血清生化指标的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(2): 185 – 190.

Recombinant Protein Expression and Bacteriostatic Activity of *Pocillopora damicornis* Lysozyme *in Vitro*

TANG Jia^{1,2}, NI Xingzhen³, XING Haocheng⁴, WANG Youxiao³, YANG Qianxi³,

YAN Zhicong³, ZHOU Zhi³, ZHAO Jianmin¹

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

4. Hainan Overseas Chinese Middle School, Haikou, Hainan 570226, China)

Abstract: Large-scale outbreaks of coral diseases have been seriously threatening the health of coral reef ecosystems. Lysozyme is one of the important effectors in the innate immune response of invertebrates. A lysozyme gene, *PdLYZ*, was cloned from *Pocillopora damicornis*. The recombinant protein of PdLYZ (rPdLYZ) was expressed and purified *in vitro*, and its bacteriostatic activities against the Gram-positive bacteria *Streptococcus mutans* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* were determined. The effect of high temperature on the bacteriostatic activity of rPdLYZ against the pathogenic bacteria *Vibrio coralliilyticus* was further explored. The identified *PdLYZ* was comprised of 215 amino acid residues and predicted to contain one lysozyme-like superfamily domain (Ile31-Gly214), and its sequence was 25.54%–49.15% similar to those of lysozymes from other organisms. Results showed that rPdLYZ had lytic activities against *E. coli*, *S. mutans* and *V. coralliilyticus*. The rPdLYZ inhibited the growth of *V. coralliilyticus* at the early stage under high temperature. These results suggest that PdLYZ be involved in the immune defense of corals, and this study provides a theoretical reference for further understanding of the immune mechanism of corals.

Keywords: *Pocillopora damicornis*; lysozyme; prokaryotic expression; bacteriostatic activity

(责任编辑:罗启香 责任编辑:叶 静)