

文章编号: 1674-7054(2016)03-0285-05

斜带石斑鱼 PKR 基因的克隆表达 及亚细胞定位分析

高 品¹ 魏京广^{2,3} 许 濛¹ 陈秀丽^{2,3} 秦启伟^{2,3} 周永灿¹

(1. 海南大学 海洋学院/海南省热带水生生物技术重点实验室 海口 570228; 2. 中国科学院
南海海洋研究所/中国科学院 热带海洋生物资源与生态重点实验室 广州 510301; 3. 中
国科学院 南海海洋研究所/广东省应用海洋生物学重点实验室 广州 510301)

摘 要: 根据实验室前期获得的斜带石斑鱼 PKR 基因的全长 cDNA, 对其原核表达、组织分布及亚细胞定位进行了研究分析。结果表明, 斜带石斑鱼 PKR 基因 cDNA 全长为 2 151 bp, 其中 ORF 区为 1 863 bp, 编码 621 个氨基酸, 表达蛋白的分子质量大小为 70 157.15 Da, PI 为 5.72。通过 NCBI 网站上 BLAST 软件比对发现, 斜带石斑鱼 PKR 与其他物种的 PKR 高度同源。通过构建原核表达载体 PKR-pET-32a, 获得了斜带石斑鱼 PKR 的融合蛋白, 经纯化后制备了斜带石斑鱼 PKR 鼠抗血清。利用荧光定量 PCR 对斜带石斑鱼 PKR 基因组织分布研究表明, 该基因在所有检测组织中均有表达, 其中肠的表达量最高, 头肾次之。以荧光显微镜对其亚细胞定位进行了分析, 该基因为全细胞分布, 但主要分布于细胞质中。

关键词: 斜带石斑鱼; 克隆表达; 亚细胞定位; PKR 基因

中图分类号: S 965.334

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.03.001

石斑鱼是我国东南沿海重要的海水养殖鱼类。近年来, 由于虹彩病毒、神经坏死病等多种病毒性病原在我国各主要石斑鱼养殖区爆发性流行, 导致养殖的石斑鱼大规模死亡, 对石斑鱼养殖产业造成了严重影响, 成为制约我国石斑鱼养殖产业发展的重要因素^[1-3]。由于对鱼类免疫系统及其作用机理缺乏深入了解, 加上缺少有效控制病毒性病原的安全高效药物, 对鱼类病毒性疾病一直没有有效的治疗方法^[4]。已有研究表明, 干扰素系统能抑制病毒复制, 不仅能快速识别机体的病毒感染, 还能协助激活机体特异性的免疫反应, 被认为是脊椎动物抵抗病毒入侵的第 1 道防线^[3,5]。近年来, 许多学者陆续从分子水平开展了鱼类干扰素系统的研究, 并取得了良好的进展, 其中, 双链 RNA 调节的蛋白激酶(protein kinase regulated by double-stranded RNA, PKR) 为鱼类干扰素系统诱导产生的环腺苷酸非依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶^[5-7], 它在各组织细胞中均有组成性表达, 通过与相关信号通路中的蛋白结合而发挥其调控功能^[8]。此外, PKR 还参与调控细胞凋亡和肿瘤发生^[9], 通过激活细胞的抗病毒能力而发挥广泛的抗病毒活性, 在生物机体抗病毒免疫反应中发挥重要作用^[10]。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 是我国常见养殖石斑鱼类, 目前, 尚未见其 PKR 的研究报道。为了解其 PKR 的有关情况, 笔者对斜带石斑鱼 PKR 基因序列全长、原位表达、组织分布及亚细胞定位等进行了研究, 旨在为石斑鱼抗病毒免疫机理及石斑鱼病毒病防治研究提供参考。

收稿日期: 2015-07-26

基金项目: 国家科技计划项目 973 计划(2012CB114402); 国家科技计划项目 863 计划(2012AA092201); 国家科技支撑计划星火计划项目(2013GA780001); 国家自然科学基金(31260644, 31202022); 国家海洋公益性项目(201205025); 高等学校博士学科点基金(20124601110006); 广东省科技计划项目(2014B030301064)

作者简介: 高品(1991-) 男, 海南大学海洋学院 2012 级硕士研究生. E-mail: 740686449@qq.com

通信作者: 周永灿(1968-) 男, 教授, 研究方向: 水产病害. E-mail: zychnu@163.com;

秦启伟(1964-) 男, 研究员, 研究方向: 分子病毒学与功能基因组学. E-mail: qinqw@scsio.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料 供试的斜带石斑鱼健康个体购自海南省文昌市,每尾体质量 50~60 g,在实验室循环养殖系统中饲养 2 周后备用。雄性 BALB/c 小鼠购自广东省实验动物中心 4 周龄,饲养于中山大学生命科学学院时珍堂 SPF 级饲养室。细胞系 FHM (Fathead minnow) 培养于 10% FBS 的 M199 培养基中(28℃);原核表达载体 pET-32a、真核表达载体 pEGFP-N3、大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 均为本实验室保存。

1.2 斜带石斑鱼 PKR 表达载体的构建 根据获得的斜带石斑鱼 PKR 全长 cDNA 序列,设计原核表达引物 F: 5'-CGCTCGAGCTATCTGTAAAGCTGTGCGTTCAC-3' (下划线为 BamH I 酶切位点); R: 5'-GCGGATCCATGGATGTTTCCGATATCTGTTATA-3' (下划线为 Xho I 酶切位点)。PCR 扩增到基因片段后,用 BamH I 及 Xho I (Takara) 将斜带石斑鱼 PKR 基因切下,定向插入质粒 pET-32a,构建重组表达载体 pET-32a-PKR。转化大肠杆菌 DH5 α ,提取阳性克隆,送测序公司测序(上海立菲生物技术有限公司),得到阳性菌落。用类似的方法设计真核表达引物及构建真核表达载体, F: 5'-CGAAGCTTCGATGGAAACAGGACAGTATGTTGCTG-3' (下划线为 Hind III 酶切位点) 和 R: 5'-GCGGATCCGGCAGTTGCATTTTCCCGGCTCAT-3' (下划线为 BamH I 酶切位点),得到重组载体 pEGFP-N3-PKR。

1.3 原核表达 将阳性克隆菌放大培养,提取质粒(Takara 质粒提取试剂盒)。将质粒转化大肠杆菌 BL21,小量诱导筛选阳性表达菌,然后进行大量诱导表达蛋白。方法如下:挑取多个单克隆接种到氨苄(Amp)浓度为 1 mmol·L⁻¹的 LB/Amp + 中培养过夜;次日 1/100 转接于 5 mL 的相同培养基中,37℃培养至对数期,IPTG(终浓度 1 mmol·L⁻¹)诱导 3~4 h;收集菌体,超声破碎,离心取上清和沉淀,SDS-PAGE 分析。将鉴定为表达阳性的菌落进行大量诱导,表达的融合蛋白在变性条件下通过 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化(Novagen),-80℃保存备用。

1.4 Western blot 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶(溶于 TBST 中)封闭 1 h,以 1:500 的比例加入抗 PoHRI 多克隆抗体,室温反应 1 h。TBST(25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5,150 mmol·L⁻¹ NaCl,0.1% Tween 20)洗涤 3 次,以 1:1 000 的比例加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体(Vector)室温孵育 1 h,洗去 2 抗后,在 BCIP/NBT(Promega)底物中显色。为了进一步鉴定鼠抗 PKR 多克隆抗体对 PKR 蛋白的特异性识别,将鼠抗 PKR 多克隆抗体与纯化的 PKR-N/His 融合蛋白于 4℃中和 16 h,然后进行 Western blot 分析。

1.5 斜带石斑鱼 PKR 基因组织分布研究 取斜带石斑鱼肝、脾、肾、脑、肠道、心脏、皮肤、肌肉、胃、鳃和头肾等 11 种组织,提取组织 RNA 并逆转录成 cDNA,用 Real-time PCR 检测各组织中 PKR 的表达情况,以 18S rRNA 为内参,每个样品重复 3 次,计算标准差。

1.6 斜带石斑鱼 PKR 基因的细胞定位分析 FHM 细胞培养于 25 cm³ 的培养瓶中,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化液,充分振荡消化至显微镜下观察为单个细胞后,转移至 24 孔细胞培养板(每孔 500 μ L)。轻微振荡使细胞充分覆盖细胞培养板的底壁,25℃培养 16 h,取出以显微镜观察,待细胞几乎长满单层后,将 PKR 连接到真核表达载体 pEGFP-N3 上构建重组质粒 pEGFP-PKR,与准备好的空载体质粒 pEGFP-N3 分别进行细胞转染,荧光显微镜观察其亚细胞定位情况。

2 结果与分析

2.1 斜带石斑鱼 PKR 基因的序列分析 从图 1 可知,斜带石斑鱼 PKR 基因 cDNA 全长为 2 151 bp,其中 ORF 区为 1 863 bp,编码 621 个氨基酸,蛋白的分子质量为 70 157.15 Da,PI 为 5.72。

2.2 斜带石斑鱼 PKR 基因的组织表达分析 从图 2 可知,该基因在检测的 11 种组织中均有表达,其中肠道的表达量最高,头肾次之,肌肉最低。

2.3 PKR 的原核表达和抗体制备 从图 3 可知,其融合蛋白主要位于超声破碎的上清中,经过纯化得到了较纯的 PKR 重组蛋白。该重组蛋白表达产物大小约为 70 KD,与预测分子质量一致。以融合蛋白作为免疫原制备了鼠抗 PKR 多克隆抗体,Western blot 检测表明,该抗体能识别 HRI-N/His 融合蛋白(图 4)。

GACAACGAAGGACACAAGCAGCGACAGGGCTGTGAGAAATAGTTTAGATGAATAGGGAAGAGAGACGTATCGTGAGGTTTGTACTTTTGTCTCACAATTTCGCTGAAATTCGCAGAC 120
CTTTATTTAAGATGTGAACAGAGCAGTATGTGCTGAACATAAGCAGTACGCCCTGTATAACACATCTGAGCGTGCAATTTGAGGACAGCTTGGCTGTGGACCTGACCATGATAAAATAT 240
M E T G Q Y V A E L N E Y A L I H S E L I H F E D L G S V P D H D K I F
TCACCGCAGAGGTTAGCTGCTGAATGGTAAAGCTCTATCCGCGGGGTGTGGAAAGCAACGAAGAACGCTGCTGCAAAAATGCGTTGAAATGCTTGTGTGGAGAAATGAACCTC 360
T Q R V V L N G K V Y P E G V G K N K K E A K N A K N A L K L C L E N P E Q
AGGACTCAGTTGAAACATCTGCAGATGAGCAACCTGATCTCAGGTCACGCCAAAGGAGAACTAAATGTAGATGTTTCCGATATCTGTTATAAGTTTCAAAGGCTCAAAGGCTGAAAGC 480
D S V E T S A D E N N C T S G P K E E L N V D V D S D I C Y K F K S L K V N A Q
AGCTTTACAGAGAAAGAGAAAAAGAGAGACAAATTTACATAGGAATTTGCAACCATCTGCTGCAAAAACAAAGGCGACCAATTCATACATTTGAAGAGAGGAGCATGTGGCCCAACTC 800
L Y R E K R K R E T N T Y I G I V N H Y G C K T K R S H S Y I E R T C G P T I C H
ACAACTCGGTTTTTCTACAAATTTAGTAATGTGCAAAAAGGAAATACCCTGAGGGCGAGGAGGACTGCAAGGAAGCCAGCAAAATGCAAGCTCGGTTAGCCTGGTCTCGCTCTCAG 720
N T R F F Y K L V I D K K E Y P E G E G R T V Y K E A R Q N A A R L A W S A L Q E
AACAGACTGACTGGGACAGCAAGGTGCCATTCGATCAACAGGTGCTGAAGATGGTGCACAATCTATGTGTCAGTGCCGTCAGCTACCCCGGAGTCCCTTGAATCATCAACACGAACA 840
Q T D W D S K V S I R S T V S E D G A Q S M L S V P S A T P E S L E S T Q S T
CGTCAGTATGACCAATTCACGAGTATCAACCCCTTCCGAGGCTCAGATGCGGCTCAGGTGCAACGAGCTGCTGAAGATGATGCAACAGGCGGCTCTCAACACCAACTCTCAGTGGATCTC 960
S V I T F T D S T S T P S Q A Q M P F R S T S E D D A P T G L S T P T S L D S L
TTTCATCTACACAGCAGATGCTCAACGGGCTCAAGTGGGCTCAGTAATATTCAGTATTCATCAAACTCTTCAAGAGTCAAGGATGCTGCGAGCAGCAAAATTTGGGAAATAGTCAGTATG 1080
S S H S M S T G T S G S V I F T D S S N S K D Q A V R D R N M G N S Q Y E
AGACATCCACCAGTCAGGTTTACCTCAGAAATTTGATTCATGGAGTGCCCTTGGCAAGAGGCGCTTCGGTTGTGTTTCAAGAGCAAGAGATATACAGCTGAAGATGGATATGCTGTAA 1200
T S T Q S R F T S E F D S M E C L L K G A F G C V K K A R D I Q L K M D Y A V K
AGATGCTGCTGCGAAGAGAAATCTCTTCAAGAAATAGAGCAATTTGTCAGGGCTCTCCACCGGATATTTAATGATACATACATATTTGGATGGAGAGATCAGGATACCAATGGAACA 1320
I V C C E E K S L Q E V R T L S L G L L H R N I I R Y T F W M E E S G Y Q W N I
TTTTAGCTGACAGTAACAGCTCTTCAAGCCGACGAGATAATTCATCGGCAAGGACTCTCTATATTTCAGATGGAGTATGTAAACACCAAAACCTTCGAGTGTGGATGTGATGAGAAGAACA 1440
L A D S N S S Q P R D N S S A K Y L Y I Q M E L K T N K T L R V C I D E K N I
CTCAAGCTCTGCAAGACTCCAAGAGAGAGAAAGATCTCAAGAAATGCTCAGCAAAATAGTCAGTGGAGTGCAGATCTCTCACTCGGAGAGCAATCCAGGAGGACCTTAAGCCGTGAA 1560
Q P L Q D S K R R E E S L R I A Q I V S G V E Y L H S E K H I R D L K P E N
ATATCTGTTTGGAGCATAGGAGAGGAGTGAAGATGGGGAGCTTTGGCTGCTGCTCAGAGAGATGCTGATGATGACTCTGCTTTGTATGAGAGATCAGAAAGAACAAAGGACCACTTACA 1680
I L F G L N G E V K I G D F G L V R T A D D D S A L M K R S E N K G T I T Y W
TGGCTCTGCAACAAAAGACAGAGAGGAACTATGGCCGTAAAGTGGACACATTTGCTCTGGGGCGATATATCTTTGAACCTCTCTGGCCACTCTCTATCGGCCACGAAAGAGGGAGATCT 1800
A P E Q K T E R Y V G R K V D T F A L G L I Y F E A L W Q L S T G H E R G K I W
GGGATGATGCCAGAAATCAGAAAGCTCCCTGAAGAGTTTTCTGAGCTGCTTCTGAGAGAGGACCAAAATCATCAAGTCAATGCTGTGTGGGAAGCCAGAGAGCCGACCTGAAGCAAGTCA 1920
D D A R S Q K L P E E F S L T F P E E D Q I K A S M L G C T P K E D P R E A S H L
TGAAGGCAAGCTGGAAGCAGTTGACGCGACAGCTAATGCGCAAAAATATGAGCGGGGAAATGCAAACTGCTGATAGGATGTAGTAAGTCTATAGGACGGCTGAAGATGATGATTTTGGCA 2040
K A K L E Q L T Q T L N A Q M S S R E N A T A *
TTATTATCTGTTTAAATCTGCATAGTATTTTAACCAAGTTAATGAAGGGGGCCCTATGTGGTTTTTAAATCAATGAATGAAGCGCAAAGTTTGAAGTCTATCATGATTT 2160

图1 斜带石斑鱼 PKR 全长序列及其所编码的氨基酸

Fig. 1 The cDNA sequence of PKR and its encoded amino acids

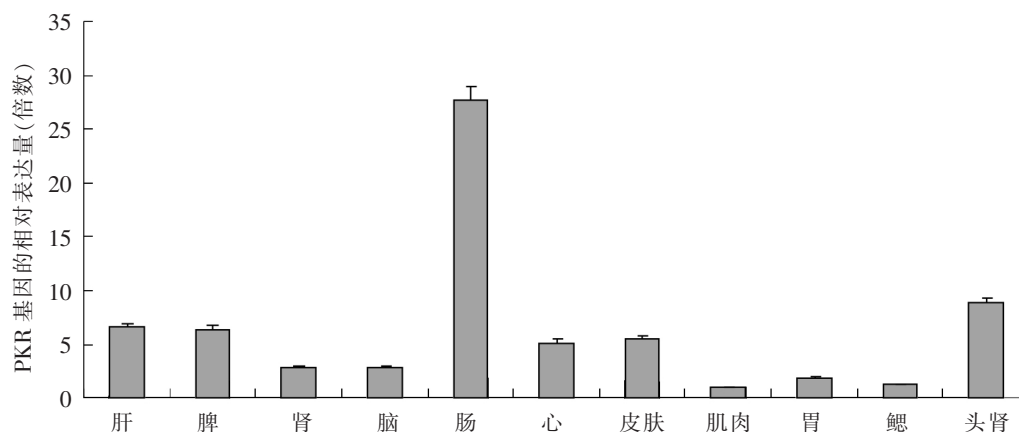


图2 斜带石斑鱼各组织中 PKR 的表达情况

Fig 2 Distribution of PKR in different tissues of *Epinephelus coioides*

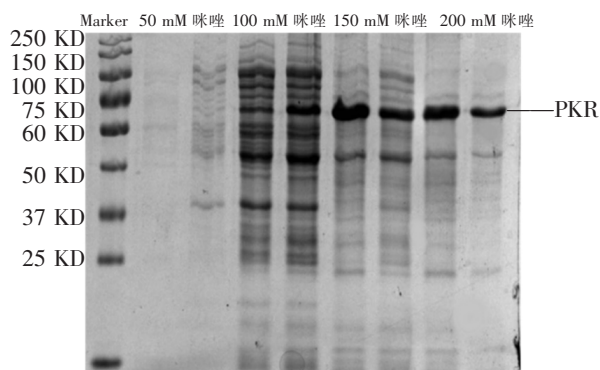


图3 纯化PKR重组蛋白

Fig.3 Purification of PKR recombinant protein

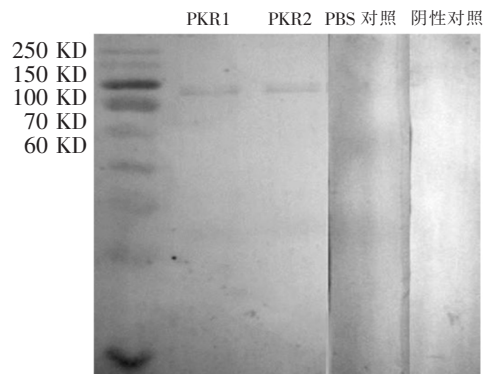


图 4 鼠抗斜带石斑鱼 PKR 多克隆抗体制备

Fig. 4 Preparation of mouse polyclonal antibody against PKR of *Epinephelus coioides*

2.4 石斑鱼 PKR 的亚细胞定位 构建斜带石斑鱼 PKR 基因的 pEGFP-N3 载体并通过转染,将带有 EGFP 标签的 PKR 融合蛋白转染到 FHM 细胞中,以 pEGFP-N3 的空载体做对照,荧光显微镜观察表明(图 5) pEGFP-N3 转染 FHM 后表达的 EGFP 在细胞核和细胞质中均有分布,且在细胞核中的绿色荧光比较强;而 pEGFP-PKR 转染 FHM 细胞表达的 PKR-EGFP 在细胞核和细胞质中均有分布,但主要在细胞质中。

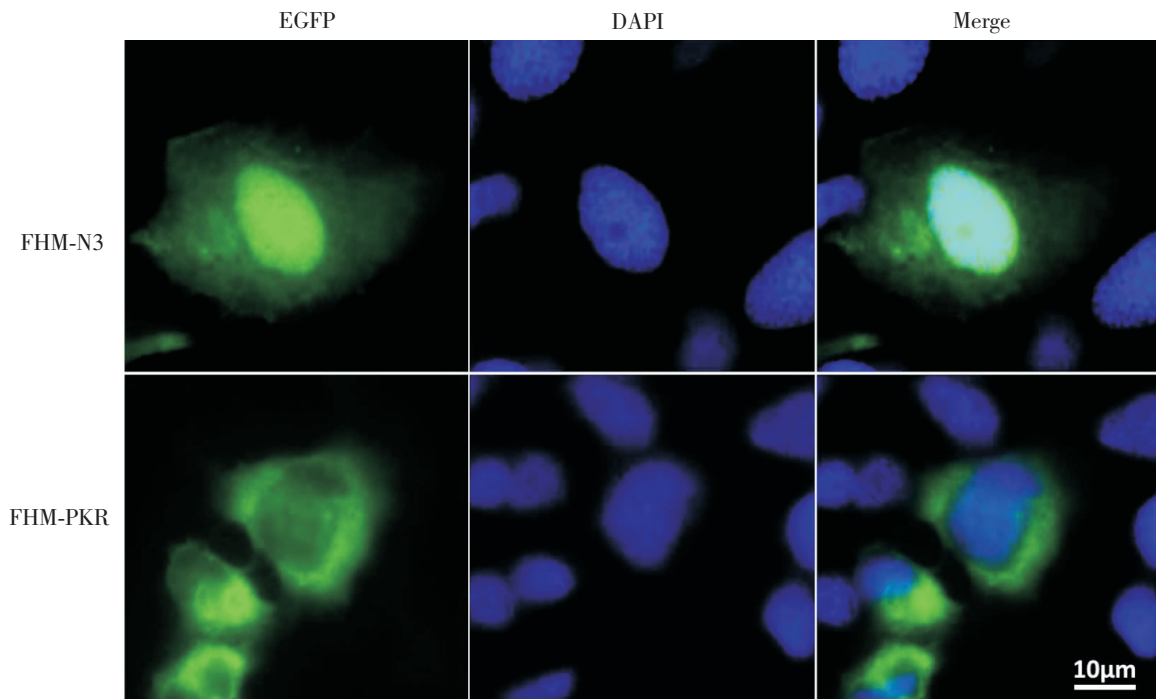


图 5 PKR 的亚细胞定位

上排为 FHM 细胞转染 FHM-N3 质粒(对照);下排为 FHM 细胞转染 FHM-PKR 质粒

Fig. 5 The subcellular localization of PKR

FHM cells were transfected with FHM-N3 (Upper row) and FHM-PKR (Lower row)

3 讨 论

PKR 蛋白对细胞生理变化可作出迅速反应,通过调控多条信号转导通路而影响细胞的多种生理活动,如控制细胞增殖、促进细胞凋亡等^[7-8]。石斑鱼 PKR 基因全长为 2 151 bp,其中 ORF 区为 1 863 bp,编码 621 个氨基酸,蛋白的相对分子质量为 7 0157.15,PI 为 5.72。

本研究经分离纯化得到了斜带石斑鱼 PKR 基因的原核重组表达蛋白,并以此制备了鼠抗 PKR 多克隆抗体,为以后进一步研究 PKR 的功能奠定了基础。对斜带石斑鱼 PKR 组织分布研究结果表明,所采集的 11 种斜带石斑鱼组织中均有 PKR 的表达,其中肠道中 PKR 基因的表达量最高,表明 PKR 在斜带石斑鱼体内是普遍表达广泛分布的蛋白。另外,PKR 蛋白在石斑鱼免疫器官中的表达量较高而在肌肉中表达较少,推测该蛋白很可能参与了机体的免疫反应^[8,11]。对 PKR 进行亚细胞定位表明,PKR 在细胞核和细胞质中均有分布,但以细胞质中分布为主,推测斜带石斑鱼 PKR 与其他物种的 PKR 一样,也参与了细胞内多种生理功能,且在多种组织中可发挥翻译的调控作用^[7-8]。笔者通过克隆表达分析了石斑鱼的 PKR 基因,为研究 PKR 调控功能的分子机理以及石斑鱼相关免疫机理奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] Qin Q W, Chang S F, Ngoh-Lim G H, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauwina* [J]. Diseases Aquat Organ, 2003, 53: 1-9.
- [2] Qin Q W, Wu T H, Jia T L, et al. Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 131: 58-64.
- [3] Georgiadis M P, Gardner I A, Hedrick R P. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious

- diseases of fish [J]. Prevent Veterbrate Method ,2001 ,48: 287 – 302.
- [4] 秦启伟 吴灶和 周永灿. 饵料维生素 C 对青石斑非特异性免疫调节作用 [J]. 热带海洋 2000 ,19(1) : 58 – 63.
- [5] 张义兵 张奇亚 桂建芳. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定 [J]. 水生生物学报 2004 ,28(3) : 317 – 322.
- [6] Green S R ,Mathews M B. Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase , DAI [J]. Genes Dev ,1992 ,6(12B) : 2478 – 2490.
- [7] Zhang X , Li J , Sejas D P , et al. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR) [J]. J. Biol . Chem. ,2004 ,279(42) : 43910 – 43919.
- [8] Sharma K , Tripathi S , Ranjan P , et al. Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation [J]. PLoS One ,2011 ,6(6) : e20215.
- [9] Boo K H , Yang J S. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon [J]. Yonsei Med J. ,2010 ,51(1) : 9 – 17.
- [10] Delius H , Darai G , Flugel , R M. DNA analysis of insect iridescent virus 6: evidence for circular permutation and terminal redundancy [J]. Journal of Virology ,1984 ,49: 609 – 614.
- [11] Sudthongkong C , Miyata M , Miyazaki T. Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan , South China Sea and Southeast Asian countries [J]. Archives of Virology ,2002 ,147: 2089 – 2109.

Molecular Cloning , Expression and Subcellular Localization of PKR from *Epinephelus coioides*

GAO Pin¹ , WEI Jingguang^{2,3} , XU Meng¹ , CHEN Xiuli^{2,3} , QIN Qiwei^{2,3} , ZHOU Yongcan¹

(1. College of Marine Sciences , Hainan University/ Hainan Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology , Haikou , Hainan 570228 , China;
2. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization , South China Sea Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences ,
Guangzhou 510301; 3. Guangdong Key Laboratory of Applied Marine Biology , South China Sea Institute of Oceanology , Chinese Academy
of Sciences , Guangzhou , Guangdong 510301 , China)

Abstract: The full length cDNA of PKR gene was cloned from the liver of grouper , *Epinephelus coioides* , which is 2 151 bp , including 1 863 bp ORF area , encoding 621 amino acids. Its protein molecular weight is 70 157. 15 Daltons and PI is 5. 72. BLAST comparison on the NCBI web site found that the PKR of the grouper was highly homologous to that of other species. By constructing prokaryotic expression vector PKR-pET-32a , the fusion protein of PKR was obtained and purified. The mouse antiserum of PKR was also prepared. Real-time PCR analysis indicates that the PKR gene is expressed in all tissues of the grouper , most highly in the intestine and then in the head kidney. Subcellular localization of PKR showed that PKR was distributed in both nucleus and cytoplasm , but mainly in the cytoplasm.

Keywords: *Epinephelus coioides*; molecular cloning; subcellular localization; PKR