

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210518002

http://www.yykxjz.cn/

扶晓琴, 王娜, 王佳林, 陈松林, 赵法箴. 半滑舌鲷颗粒酶 B 基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 136–146
FU X Q, WANG N, WANG J L, CHEN S L, ZHAO F Z. Characterization and expression analysis of *granzyme B like* gene in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 136–146

半滑舌鲷颗粒酶 B 基因的克隆和表达分析*

扶晓琴^{1,2} 王娜² 王佳林² 陈松林^{1,2} 赵法箴^{1,2①}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 颗粒酶(*granzyme*, *Gzm*) B 是免疫炎症反应必不可少的介质,可激活半胱天冬酶 3, 进而诱导靶细胞的凋亡。本研究通过 PCR 扩增和 RACE 技术获得了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)颗粒酶 B 基因(*CsGzmBI*)的全长 cDNA 序列,并对其序列特征和表达水平进行了分析。结果显示,*CsGzmBI* cDNA 全长为 923 bp, 开放阅读框长度为 780 bp, 编码 259 个氨基酸(前 19 个氨基酸残基为信号肽序列), 5'非编码区为 49 bp, 3'非编码区为 94 bp。*CsGzmBI* 的基因组结构比较保守, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成。*CsGzmBI* 蛋白包含 2 个 N 端糖基化位点、1 个催化三联体“His63Asp112Ser207”、1 个“PHSRPYMA”结构域及 6 个保守的半胱氨酸。荧光定量 PCR 结果显示, *CsGzmBI* 在半滑舌鲷健康成鱼不同组织中均有表达, 其中, 在脾脏中表达量最高, 头肾、中肾、肝脏和鳃中表达量次之, 在肌肉中表达量最低。与对照组 0 h 相比, *CsGzmBI* 在哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染后的不同时间点的脾脏、肠、肝脏、皮肤、鳃和肾脏中的表达水平均有不同程度的上调。研究表明, *CsGzmBI* 基因在半滑舌鲷抵御哈维氏弧菌感染过程中发挥重要作用。

关键词 半滑舌鲷; 哈维氏弧菌; 颗粒酶 B 基因; 表达分析

中图分类号 Q522 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0136-11

细胞毒性淋巴细胞(CLTs)可以识别感染病毒或转化的细胞, 并随后诱导其凋亡, 是免疫系统的重要组成部分(Naneh *et al*, 2014)。CLTs 包括细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和自然杀伤(NK)细胞, CTL 和 NK 细胞在其自身分泌的细胞毒性颗粒的帮助下, 介导病原体或病毒感染的细胞以及肿瘤细胞的死亡(Bolitho *et al*, 2007)。细胞毒性颗粒的主要内容物包括穿孔素以及颗粒酶等可溶性的细胞毒蛋白(Sutton *et al*, 2016)。颗粒酶(*granzyme*, *Gzm*)是以 His-Asp-Ser 三联体催化位点为特征的丝氨酸蛋白酶, 具有底物特异性

(Wernersson *et al*, 2006)。到目前为止, 在人类(*Homo sapiens*)中发现有 5 种 *Gzms* (*Gzm A*、*B*、*H*、*K* 和 *M*), 在小鼠(*Mus musculus*)中发现有 11 种 *Gzms* (*Gzm A~G*、*K~N*) (Bots *et al*, 2006)。鱼类 *Gzms* 与哺乳动物相应 *Gzms* 的相似性较低, 其 *Gzms* 的鉴定与命名存在争议, 例如, 首次在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中发现的 *Gzm* 被命名为 *Gzm-like* (Wernersson *et al*, 2006), 而其他鱼类中存在 5 种被明确命名为 *Gzms* 的基因(*Gzm A*、*B*、*H*、*K* 和 *M*) (Chaves-Pozo *et al*, 2019)。每种 *Gzm* 分别由不同的细胞表达且拥有不同

* 国家自然科学基金(31530078; 31973006)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD20)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31530078; 31973006), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD20)]. 扶晓琴, E-mail: qinxiaoqinxiao@163.com

① 通信作者: 赵法箴, E-mail: zhaofz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-05-18, 收修改稿日期: 2021-06-08

的特异性底物和功能(Turner *et al*, 2019a)。

GzmB 是目前研究最深入、含量最丰富的丝氨酸蛋白酶之一(Turner *et al*, 2019a、b), 它是免疫炎症反应必不可少的介质, 可诱导靶细胞的凋亡(Trapani, 2001; Matsuura *et al*, 2014)。活化的 CTL 识别靶细胞后, 从细胞毒颗粒中释放成熟的 GzmB, 然后, 与穿孔素通过内吞作用进入细胞质基质中(Darmon *et al*, 1996), 可激活 caspase-3, 进而诱导靶细胞凋亡。除了 caspase 依赖途径, GzmB 也参与 caspase 非依赖途径的靶细胞凋亡(Boivin *et al*, 2009)。人类 GzmB 长度约 3500 bp, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 其 ORF 编码 247 个氨基酸, 包含 2 个 6 链 β 折叠和 3 个反式结构域片段(Klein *et al*, 1989; Estébanez-Perpiñá *et al*, 2000)。目前, 关于 GzmB 功能的研究在人类和小鼠中已有不少报道(Turner *et al*, 2019b; Smyth *et al*, 1995; Larimer *et al*, 2017)。然而, 在鱼类中, 关于 GzmB 的研究仅在鲤 (*Cyprinus carpio*)、银鲫 (*Carassius auratus langsdorfi*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大西洋鲑(*Atlantic salmon*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)和大西洋鳕(*Gadus morhua*)等中有报道(Huang *et al*, 2010; Wernersson *et al*, 2006; Praveen *et al*, 2006; Matsuura *et al*, 2014)。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水养殖经济鱼类之一, 主要分布在我国沿海地区, 其肉质鲜美、营养丰富, 深受广大消费者喜爱, 具有良好的市场需求和养殖开发潜力。然而, 高密度集约化养殖以及环境污染等导致半滑舌鳎多种疾病频繁暴发。其中, 最严重的是由哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)引起的细菌性疾病, 严重制约了半滑舌鳎养殖业的健康发展(陈政强等, 2012; 于孟君等, 2017; 王双艳等, 2019)。近年来, 以提高鱼体抗病力为目标的良好选育, 被认为是当下解决半滑舌鳎病害的一种行之有效的方法(Zhou *et al*, 2019)。长期以来, 鱼类免疫机制及抗病分子机制的基础研究比较薄弱, 严重阻碍了鱼类抗病育种的发展(陈松林, 2004; 周欣等, 2021)。因此, 对半滑舌鳎抗病分子机制的研究迫在眉睫, 这将其病害防治提供重要的理论依据。目前, 关于 GzmB 基因在半滑舌鳎中的研究尚未见报道。因此, 本研究对半滑舌鳎 GzmB 基因(*CsGzmB1*)的全长 cDNA 序列进行克隆, 采用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测了该基因在健康半滑舌鳎不同组织中的表达模式, 以及哈维氏弧菌感染后不同组织的表达水平, 旨在为进一步研究该基因在半滑舌鳎免疫应答中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

1.1.1 正常组织样品采集 本实验所用半滑舌鳎均购自山东省海阳市黄海水产公司, 在 22℃ 循环海水中养殖。选取 5 尾健康、体重为(104.9±4.6) g 的半滑舌鳎个体, 分别收集鳃、头肾、肝脏、肠、皮肤、脑、中肾、肌肉和脾脏共 9 个组织, 立即置于液氮中冷冻, 然后转入-80℃ 保存。

1.1.2 哈维氏弧菌感染与样品采集 采用 Wei 等(2018)的方法, 对 10 月龄健康半滑舌鳎进行哈维氏弧菌感染实验。首先定量培养哈维氏弧菌(Wang *et al*, 2017), 然后用无菌 PBS 将哈维氏弧菌稀释至终浓度为 1.0×10^4 CFU/mL, 用于半滑舌鳎腹腔注射实验, 对照组注射等体积的无菌 PBS。分别在感染前 0 h 与感染后 12、24、48、72 及 96 h 共 6 个时间点取样, 每个时间点分别取 3 尾半滑舌鳎, 取其肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃和皮肤共 6 个组织, 放入液氮中速冻, 随后转入-80℃ 保存。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取各组织的总 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。RNA 质量鉴定合格后, 使用 Prime Script^{RT} reagent kit with gDNA eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA。使用 SmartTM RACE cDNA amplification kit (TaKaRa, 日本)合成 RACE-Ready cDNA。

1.3 *CsGzmB1* 基因全长 cDNA 的克隆

根据半滑舌鳎全基因组测序结果(Chen *et al*, 2014), 获得 *CsGzmB1* 基因的预测序列(登录号: XM_008328902.3), 以该序列片段设计引物(表 1), 先进行普通 PCR 扩增, 验证其 ORF 区。普通 PCR 扩增体系: 2×ExTaq Mix(TaKaRa, 日本) 25 μ L, CsPRF11-ORF-F/R 引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 扩增条件: 94℃ 4 min; 35 个循环(94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min 45 s); 72℃ 10 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并使用 DNA 胶回收试剂盒(天根, 中国)进行纯化回收。将纯化的片段连接到 pEasy-T1 载体(全式金, 中国), 通过 42℃ 热激法转入到 Trans-T1 感受态细胞中(全式金, 中国), 最后挑取单克隆, 送华大基因进行测序, 成功获得 *CsGzmB1* 的 ORF 区序列。

以得到的 ORF 区序列设计 RACE 引物(表 1), 以

合成的 RACE-Ready-cDNA 为模板, 通过降落 PCR 进行 5'-RACE 和 3'-RACE PCR 扩增。第 1 轮反应体系为 10 μ L, 按照 *Taq*TM hot start (TaKaRa, 日本)说明书加样。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将第 1 轮的 PCR 反应产物稀释 50 倍后作为第 2 轮普通 PCR 的模板, 普通 PCR 体系和程序均同上所述。扩增完成后, 进行分子克隆实验, 并挑取单克隆送测序。成功获得 5'和 3'端序列, 然后, 通过 DNASTar 软件进行拼接, 最终获得 *CsGzmBl* 的 cDNA 全长序列。

1.4 序列分析

利用在线程序 ORFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)推导 *CsGzmBl* 基因的氨基酸序列。使用 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对不同物种 *GzmB* 的氨基酸序列进行同源性搜索。使用 ExPASy 在线软件的 ProtParam 程序(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算 *CsGzmB* 的相对分子质量和理论等电点等理化参数。基于 SMART 4.0 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测该蛋白的信号肽序列及功能结构域。使用在线程序 SoftBerry-Psite

(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=psite&group=programs&subgroup=proloc>)预测该蛋白的功能位点。使用 Predict Protein (<https://www.predictprotein.org/>)预测该蛋白的二级结构。使用在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>)比较不同物种 *GzmB* 的基因组结构。使用 BioEdit 软件进行脊椎动物 *GzmB* 的氨基酸序列比对。使用 MEGA 7.0 软件通过 NJ 法-邻位相连法构建 *GzmB* 的系统进化树。

1.5 检测 *CsGzmBl* 基因的表达模式

应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *CsGzmBl* 基因在半滑舌鲷健康成鱼不同组织以及哈维氏弧菌刺激后免疫相关组织中的表达水平。选用 β -actin 作为内参基因, 用于 qRT-PCR 的引物均列在表 1 中。使用 SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM (TaKaRa, 日本)试剂盒, 按照说明书在 ABI 7500 Fast Real-time (Applied Biosystems, 美国)仪器上进行 *CsGzmBl* 基因的定量分析。每个样品设置 3 个平行, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Livak *et al*, 2001)计算目的基因的相对表达量。所有实验数据以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示, 使用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较。当 $P < 0.05$ 时为差异显著($P < 0.05$); 当 $P < 0.01$ 时为差异极显著($P < 0.01$)。

表 1 本研究所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

| 引物 Primer | 序列 Sequence (5'~3') | 用途 Application |
|------------------------|-------------------------------|------------------|
| <i>CsGzmBl</i> -ORF-F | ATGCACATATTCTGCATTTTGTGG | ORF verification |
| <i>CsGzmBl</i> -ORF-R | TCAGACAGCATTTTCTCTCTCTG | ORF verification |
| <i>CsGzmBl</i> -GSP5' | TGTCTTTCACGGGTAACCTTGATGGTCTG | 5'RACE |
| <i>CsGzmBl</i> -GSP3' | CAGTTCAAGGATGAATGTGTATGGATTGG | 3'RACE |
| <i>CsGzmBl</i> -NGSP5' | CCACTTGATGGATTGTTGACTT | 5'RACE |
| <i>CsGzmBl</i> -NGSP3' | GACTCTGGAGGACCGCTAATCT | 3'RACE |
| <i>CsGzmBl</i> -RT-F | ATCTTGAGTCTACGCAGCCCAT | qRT-PCR |
| <i>CsGzmBl</i> -RT-R | TCACGGGTAACCTTGATGGTCTG | qRT-PCR |
| β -actin-F | GCTGTGCTGTCCCTGTA | qRT-PCR |
| β -actin-R | GAGTAGCCACGCTCTGTC | qRT-PCR |

2 结果

2.1 *CsGzmBl* 基因的 cDNA 序列分析

CsGzmBl 基因的 cDNA 全长为 923 bp, 其开放阅读框(ORF)为 780 bp, 5'非编码区(UTR)为 49 bp, 3'UTR 为 94 bp (在 polyA 尾部上游 5 bp 处存在一个多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA))。ORF 编码一个由

259 个氨基酸残基组成的蛋白, 分子量为 29.06 kDa, 理论等电点为 9.23, 总平均疏水系数为-0.353, 脂肪系数为 77.53, 不稳定指数(II)为 42.36, 表明该蛋白不稳定。信号肽预测显示, 该蛋白的 N 端存在一个由 19 个氨基酸残基组成的信号肽。功能位点预测发现, 该蛋白包含 2 个 N 端糖基化位点(分别为 NSSH 和 NNSK)以及 5 个二硫键。亚细胞定位预测发现, *CsGzmBl* 属于胞外分泌蛋白(图 1)。

```

                                agtctgagtcaaactgcacactgacacgcacactgacgcggtgacaatc 49
ATGCACATATTCTGCATTTTGGTGGCTTTTCAGCTCTGCTCCCCATCTGGACAGACTGAGGATGGCATAAGTGAAT 124
M H I F C I L L A F Q L C S P S G Q T E D G I V N 25
GGTCAGGTTTCAAAGCCTCATTCCAGGCCCTACATGGCTTCACTGCAGTACAGTGGAAAAACAACCTGTGGTGGGA 199
G Q V S K P H S R P Y M A S L Q Y S G K H N C G G 50
CTCCTTGTTTCAGGAGGACTTTGTTCTGACAGCAGCACACTGTAAAAATGGAAATCTTGAGTCTACGCAGCCCATG 274
L L V Q E D F V L T A A H C K N G N L E S T Q P M 75
ACGGTGGTACTCGGGGCCCACTTAAACATAAAGAAAAAGTCAACAATCCATCCAAGTGGCCGCTTCTAT 349
T V V L G A H N L K H K E K S Q Q S I Q V A A F Y 100
GCTCATCCAAAGTACCATGGAAAGTTTGATAATGATATTGCTACTCAAGCTGGAAAAGAAAGCTCGACTGAAC 424
A H P K I H G K F D N D I M L L K L E K K A R L N 125
AAGTTTGTGCAGACCATCAAGTTACCCGTGAAAGACAAGACCATTTCGAGCTAAGGTCGCCTGTGTTGTCGCTGGC 499
K F V Q T I K L P V K D K T I R A K V A C V V A G 150
TGGGGCCAAAAAGGCAGAAAGTGAACCTTCTCAGATGTCCTGAAGGAGGCCACAGAGTGGACTCAGTTCAAGGAT 574
W G Q K G R S E P S S D V L K E A T E W T Q F K D 175
GAATGTGTATGGATTTGGAATATCTACTTCAACAGCAGTCACATGATCTGCACCAGGTTTGACAAAAACAAAGGA 649
E C V W I W N I Y F N S S H M I C T R F D K N K G 200
GGCCTCTGCCAGGGTACTCTGAGGACCGCTAATCTGTAAGGATAAACTGGTGGGAATAACTGCCTTCACGCAT 724
G L C Q G D S G G P L I C K D K L V G I T A F T H 225
GGAGAAGACTGCAATAATTCCAAGTTTCCATCATGTTTTCTACTAGGATAGGTCACCTTTCTTCCATGGATCAAGAA 799
G E D C N S K F P H V F T R I G H F L P W I K K 250
ACTTTGCAGAGAGAAAAATGCTGTCTGAgaaaaaagtggttttccataatactctttcaattctccacaaca 874
T L Q R E K N A V * 259
tatagatgtcaagc aaataaaatacc aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 949
    
```

图 1 CsGzmB1 基因的核苷酸与氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CsGzmB1

非编码区用小写字母表示, 编码区用大写字母表示。2 个预测的 N 端糖基化位点(NSSH 和 NNSK)用灰色阴影标注。起始密码子和终止密码子用红色加粗字母表示。聚腺苷酸化信号和多聚腺苷酸加尾信号分别用方框和下划线标出。

UTR is in lowercase, and ORF is in uppercase. Two predicted N-glycosylation sites (NSSH and NNSK) are shaded in greys. The start codon and stop codon are red in bold. The polyadenylation signal and polyadenylation tail are boxed and underlined, respectively.

2.2 多氨基酸序列比对和进化分析

对不同物种的 GzmB 氨基酸序列进行比对发现, 在脊椎动物 GzmB 中比较保守的一些功能域及位点也同样存在于 CsGzmB1 中。CsGzmB1 具有一个典型的丝氨酸蛋白酶家族所特有的“催化三联体 His63Asp112Ser207”, 一个保守的蛋白活性中心, 一个保守的前导肽(ED), 一个保守的“PHSRPYMA”序列以及 6 个保守的半胱氨酸(Cys)(图 2)。保守的 Cys 分别为 Cys 48、Cys 64、Cys 146、Cys 177、Cys 192 和 Cys 213, 其中, Cys 48 与 Cys 64, Cys 146 与 Cys 213, Cys 177 与 Cys 192 分别各自形成了二硫键。此外, CsGzmB1 的 Cys 5 与 Cys 13, Cys 203 与 Cys 229 也分别各自形成了二硫键。CsGzmB1 5 个二硫键位置如图 2 所示。

BLAST 同源性搜索发现, CsGzmB1 与其他硬骨鱼类的 GzmB 氨基酸序列的一致性在 41.00%~63.35% 之间, 如大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)(63.35%)、黄鳍 (*Monopterus albus*)(61.66%)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)(61.39%)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) (60.41%)、小丑鱼(*Amphiprion ocellaris*) (59.92%)、金

头鲷(*Sparus aurata*)(59.85%)、剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)(59.06%)、弹涂鱼 (*Periophthalmus magnuspinnatus*)(57.54%)、荫平鲷(*Sebastes umbrosus*) (57.31%)、青鳉(*Oryzias melastigma*)(56.69%)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (58.66%)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(48.24%)和斑点叉尾鲷(41.00%)。此外, CsGzmB1 氨基酸序列与哺乳动物及爬行动物 GzmB 蛋白的氨基酸序列同一性低于 43%, 大约在 38.31%~42.80% 之间, 如人(40.15%)、大鼠(42.80%)、小鼠 (40.43%)、马(*Equus caballus*)(40.86%)和海龟(*Chelonia mydas*)(38.31%)。

为更明确 CsGzmB1 的进化地位, 选用 CsGzmB1 与其他物种的 GzmB、GzmA 及 GzmM 的氨基酸序列, 构建系统发育树。如图 3 所示, 所有物种的 GzmA 聚为一大支; CsGzmB1 与其他物种的 GzmB 聚为另一大支, 其中, 部分物种的 GzmM 与 GzmB 聚在一起。在 GzmB 这一支中, 发现有 2 个主要的不同分支, 其中, 所有硬骨鱼类的 GzmB 聚为一支, 其他脊椎动物的 GzmB 聚为一支, 这 2 大支最终汇聚在一起。因此, 脊椎动物 Gzm 氨基酸的同源性符合进化规则。

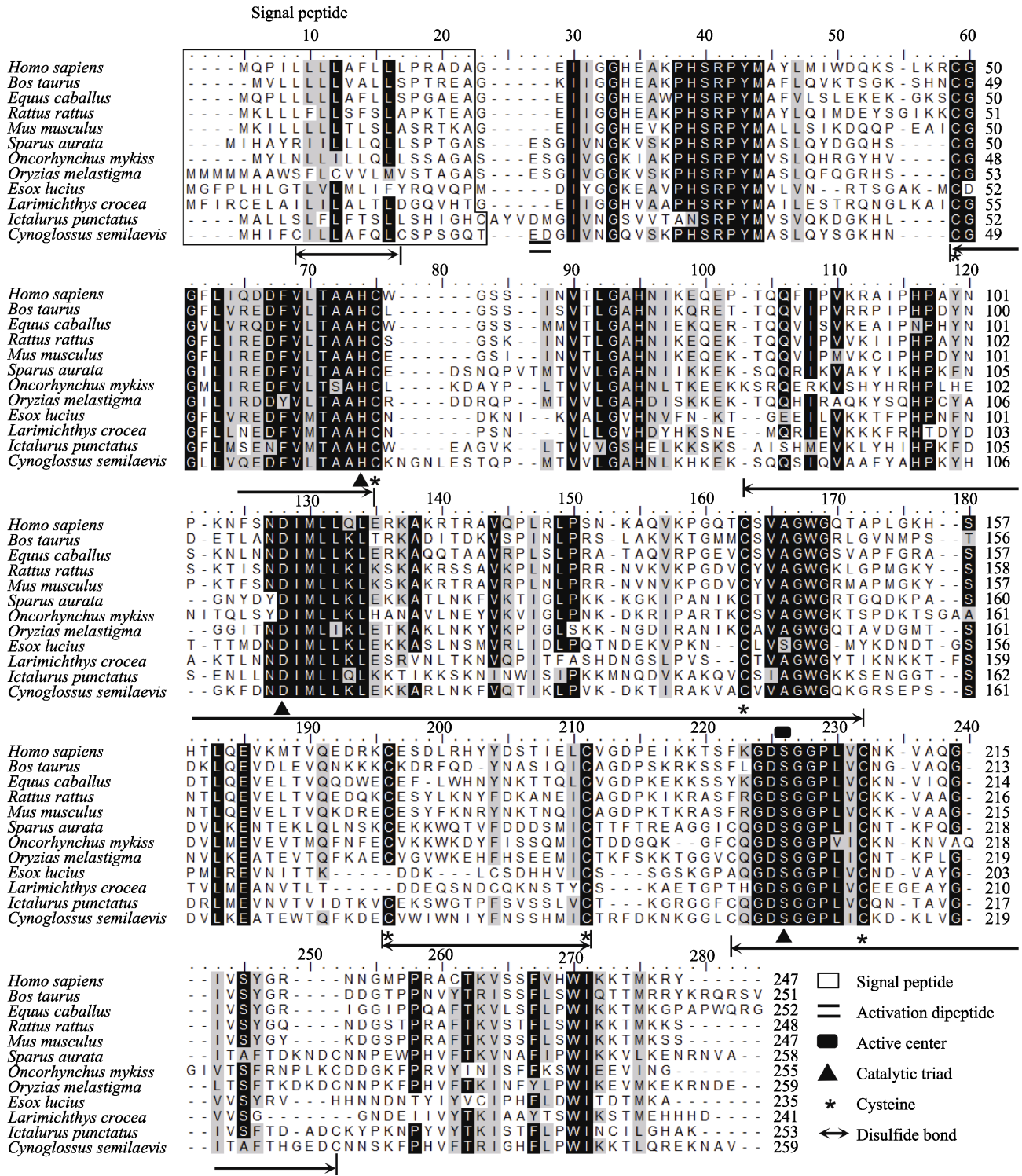


图 2 CsGzmB1 基因与其他脊椎动物 GzmB 基因的多氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple alignment of the GzmB amino acid sequences among vertebrates

相同氨基酸和相似氨基酸分别用黑色和浅灰色阴影表示。星号表示 6 个保守的半胱氨酸的位置，三角形表示保守的催化三联体，黑色长方形表示保守的蛋白活性中心。不同物种信号肽的位置用白色框标注。

CsGzmB1 蛋白的二硫键由双箭头表示，其前导肽由双线表示。

Identical and similar amino acids are shaded in black and light gray, respectively. Asterisks indicate 6 conserved cysteines, black triangles indicate conserved catalytic triads, and black rectangles indicate conserved protein active centers. The positions of signal peptides of different species are marked with white boxes. The disulfide bond of the CsGzmB1 protein is represented by a double arrow, and its activation di-peptide is represented by a double line.

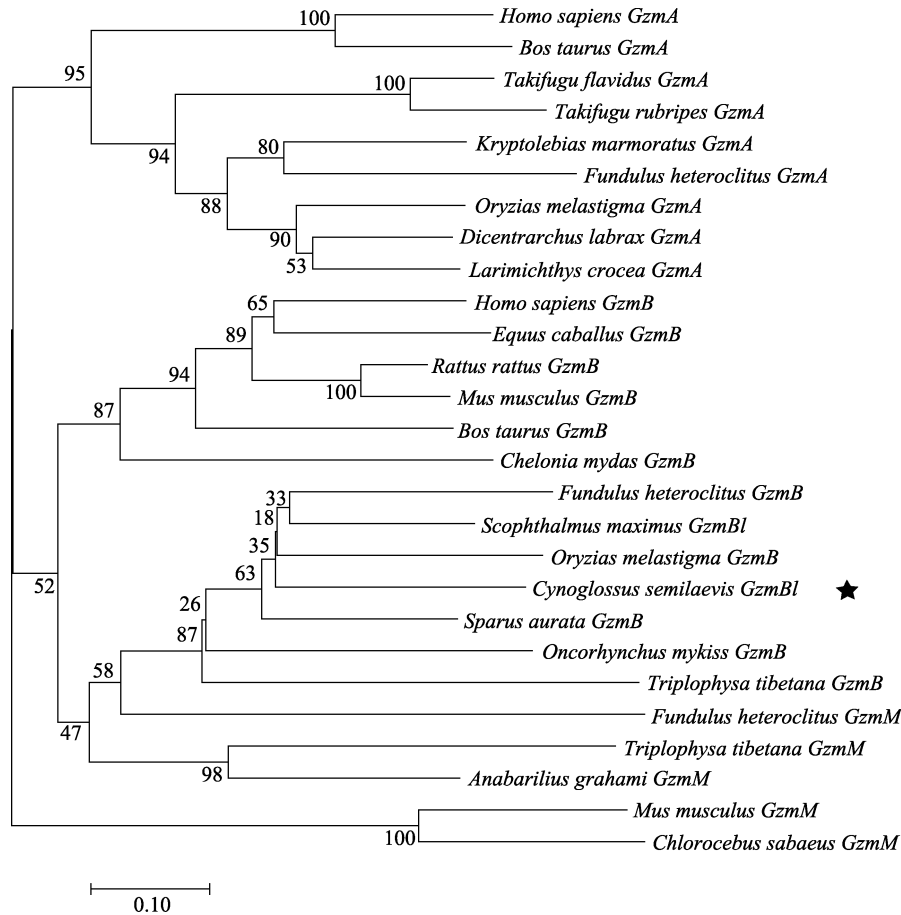


图 3 GzmB、GzmA 以及 GzmM 氨基酸序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of GzmB, GzmA and GzmM from various species

CsGzmBl 用黑色五角星表示。

CsGzmBl was marked with a black five-pointed star.

本研究使用的所有氨基酸序列登录号为：人 GzmA (NP_006135.2)，牛 GzmA (*Bos taurus*, XP_019838691.1)，鲈鱼 GzmA (*Dicentrarchus labrax*, AIK66548.1)，红树林鲷 GzmA (*Kryptolebias marmoratus*, XP_017267744.1)，青鳉 GzmA (XP_024131649.1)，底鳉 GzmA (*Fundulus heteroclitus*, XP_036000696.1)，大黄鱼 GzmA (TMS12193.1)，菊黄东方鲀 GzmA (*Takifugu flavidus*, TWW60312.1)，红鳍东方鲀 GzmA (*Takifugu rubripes*, XP_029685142.1)，小鼠 GzmM (XP_031205327.1)，绿猴 GzmM (*Chlorocebus sabaes*, XP_037852248.1)，西藏高原鳅 GzmM (*Triplophysa tibetana*, KAA0712223.1)，底鳉 GzmM (*Fundulus heteroclitus*, JAR24158.1)，鳊白鱼 GzmM (*Anabarilius graham*, ROL48139.1)，人 GzmB (AAA75490.1)，牛 GzmB (ACI15823.1)，马 GzmB (XP_001488563.1)，黑鼠 GzmB (*Rattus rattus*, XP_032773918.1)，小鼠 GzmB (CAJ18480.1)，金头鲷 GzmB (AXK15893.1)，虹鳟 GzmB (XP_021453743.2)，

青鳉 GzmB (XP_024142756.1)，半滑舌鲷 GzmBl (XP_008327124.1)，高原鳅 GzmB (*Triplophysa tibetana*, KAA0715657.1)，底鳉 GzmB (*Fundulus heteroclitus*, XP_035995441.1)，海龟 GzmB (EMP28509.1)，大菱鲆 GzmBl (XP_035506996.1)，玛丽鱼 GzmBl (*Poecilia latipinna*, XP_014907818.1)，南美石头鱼 GzmB (*Thalassophryne amazonica*, XP_034036171.1)，斑点叉尾鲷 GzmB (XP_017334488.1)，黄鳝 GzmBl (XP_020450483.1)，大黄鱼 GzmB (XP_019124463.2)，小丑鱼 GzmBl (XP_023130983.1)，荫平鲉 (*Sebastes umbrosus*, XP_037644834.1)，尖吻鲈 GzmBl (XP_037644834.1)，剑尾鱼 GzmBl (XP_023193185.1)，孔雀鱼 GzmB (XP_008401229.1)，弹涂鱼 GzmB (XP_033842823.1)，白沙鳉 GzmB (*Cyprinodon tularosa*, XP_038131404.1)。

2.3 GzmB 的基因组结构

以 CsGzmB 基因的全长 cDNA 序列与半滑舌鲷全

基因组序列进行比对, 获得 *CsGzmBl* 的基因组 DNA 序列, 将之与 *CsGzmBl* 的 ORF 序列进行比较分析, 得到 *CsGzmBl* 的基因结构。*CsGzmBl* 基因由 1890 个碱基组成, 包括 5 个外显子与 4 个内含子。外显子-内含子边界均符合 AG/GT 拼接规则, 所有的 3' 末端

受体位点具有共同的 AG 序列, 所有的 5' 末端供体位点部位都有共同的 GT 序列。将半滑舌鳎与其他物种的 *GzmB* 基因组结构进行比较, 发现 *GzmB* 的基因组结构比较保守, 均是由 5 个外显子和 4 个内含子组成 (图 4)。

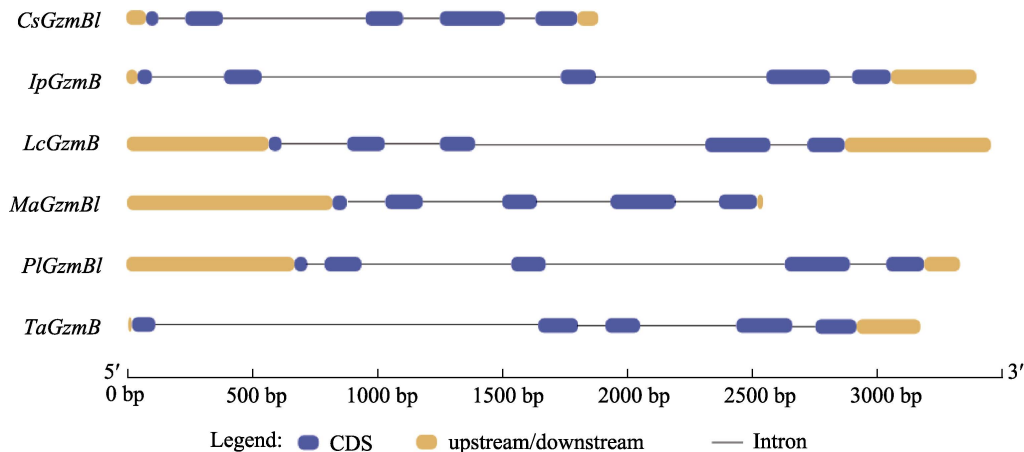


图 4 *CsGzmBl* 和其他物种 *GzmB* 基因的外显子-内含子结构比较

Fig.4 Comparison of the exon/intron structure of between the *CsGzmBl* and *GzmB* genes among vertebrates

外显子用蓝色的圆角矩形标注, 5'和 3'非编码区均用橙色的圆角矩形表示, 黑色的线代表内含子。不同物种 *GzmB* 基因的 mRNA 序列和基因组序列登录号: *CsGzmBl*: XM_008328902.3, NC_024322.1; 斑点叉尾鲷: XM_017478999.1, NC_030425.1; 大黄鱼: XM_019268918.2, NC_040028.1; 黄鳝: XM_020594827.1, NW_018127904.1; 玛丽鱼: XM_015052332.1, NW_015113718.1; 南美石头鱼: XM_034180280.1, NC_047112.1

Exons are in blue rounded rectangles; 5'UTR and 3'UTR are in orange rounded rectangles. Lines indicate the introns. The mRNA and gene accession numbers of different species *GzmBs* are as follows: *CsGzmBl*: XM_008328902.3, NC_024322.1; *IpGzmB* (*Ictalurus punctatus GzmB*): XM_017478999.1, NC_030425.1; *LcGzmB* (*Larimichthys crocea GzmB*): XM_019268918.2, NC_040028.1; *MaGzmBl* (*Monopterus albus GzmBl*): XM_020594827.1, NW_018127904.1; *PlGzmBl* (*Poecilia latipinna GzmBl*): XM_015052332.1, NW_015113718.1; *TaGzmB* (*Thalassophryne amazonica GzmB*): XM_034180280.1, NC_047112.1

2.4 *CsGzmBl* 在不同组织中的表达模式

半滑舌鳎健康成鱼鳃、头肾、肝脏、肠、皮肤、脑、中肾、肌肉、脾脏共 9 个组织中 *CsGzmBl* 的表达情况如图 5 所示。从图 5 可以看出, *CsGzmBl* 在这些组织中呈现出不同的表达情况, 其中, 在脾脏中表达量最高, 在头肾、中肾、肝脏和鳃中表达量次之, 在其他组织中表达量较低, 在肌肉中表达量最低。

2.5 哈维氏弧菌刺激后 *CsGzmBl* 基因的表达变化

哈维氏弧菌刺激后, 与对照组 0 h 相比, *CsGzmBl* mRNA 的表达水平在脾脏、肠、肝脏、皮肤、鳃和肾脏中均有不同程度的上调。如图 6 所示, 在脾脏、肠和鳃中, *CsGzmBl* 的表达水平仅在细菌感染 48 h 后有明显的上调趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在其他时间点无明显变化。在皮肤中, *CsGzmBl* mRNA 的表达量在细菌感染 72 h 后显著增加 ($P < 0.05$), 在其余时间点

与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。在肝脏和肾脏中, 细菌感染后 96 h, *CsGzmBl* 的表达水平显著上升 ($P < 0.05$), 其余时间点与对照组相比也无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究通过 RACE 方法获得了 *CsGzmBl* 基因的 cDNA 全长, 并对其序列进行分析, 发现 *CsGzmBl* 基因具有一些保守的功能域或功能位点。*CsGzmBl* 具有一个序列为 “His63Asp112Ser207” 的催化三联体, 催化三联体是胰凝乳蛋白酶的典型特征, 是形成可实现精确三维定向的支架所必需的部分 (Branden *et al*, 1991), 在 *Gzm* 蛋白家族成员中高度保守 (Smyth *et al*, 1996), 如大西洋鳕 *GzmA/K*、尼罗罗非鱼 *Gzm* 及银鲫 *Gzm* 中均具有催化三联体 “His57Asp102Ser195” (Matsuura *et al*, 2014; Praveen *et al*, 2006; Wernersson

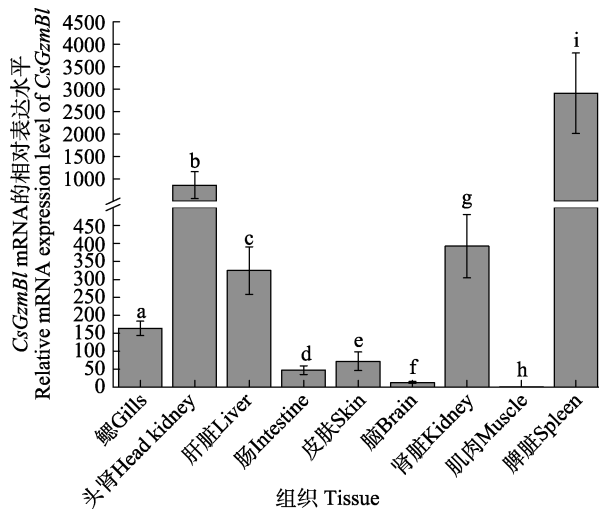


图 5 *CsGzmBl* mRNA 在健康半滑舌鲷成鱼不同组织中的表达水平

Fig.5 Expression of *CsGzmBl* mRNA in different tissues of healthy adult *C. semilaewis*

数据均以平均值±标准误差表示($n=3$)。柱状图上方的不同字母表示各个组织之间存在显著性差异($P<0.05$)。

All data are shown as Mean±SE ($n=3$). Different letters above the bars indicate significant difference at the level of $P<0.05$.

et al, 2006)。此外, *CsGzmBl* 蛋白还具有一个保守的前导肽 ED(GluAsp), 在携带翻译信息的酶转移到粗面内质网和胞外颗粒过程中起不可或缺的作用(Praveen *et al*, 2004)。大多数哺乳动物, 如马、人、大鼠及小鼠的 *GzmB* 蛋白的 N 末端都具有一个高度保守的序列“GlyGlu(EG)或 Glu-Glu(GG)”的前导肽(Caputo *et al*, 1993)。研究表明, *Gzm* 氨基酸激活的前肽后面 1~4 位(IIGG)与 9~16 位(PHSRPYMA)高度保守(Trapani, 2001; Piuko *et al*, 2007; Pham *et al*, 1999)。哺乳动物, 如人、大鼠, 小鼠及马 *Gzm* 蛋白中均具有这 2 个保守结构域, 其中, IIGG 结构域是前肽裂解激活蛋白酶所必需的(Smyth *et al*, 1995)。本研究中, *CsGzmBl* 前导肽后 1~4 位为“IVNG”, 类似于哺乳动物 *Gzm* 蛋白的“IIGG”, 第 10~16 位是保守的“PHSRPYMA”结构域。

本研究发现, 从哺乳类到爬行动物, 各个物种 *GzmB* 均具有 6 个保守的 Cys, 参与形成 3 个二硫键。*Gzm* 蛋白家族成员具有多个高度保守的 Cys, 这对 *Gzm* 蛋白加工过程中的正确折叠和激活至关重要(Praveen *et al*, 2006)。据报道, 斑点叉尾鲷、大西洋鲑及鲤 *GzmA/K* 均含有 8 个高度保守的 Cys, 共形成 4 个二硫键(Huang *et al*, 2010; Wernersson *et al*, 2006)。由此可见, *Gzm* 蛋白家族每个成员之间的保守性 Cys 数目不同。

Huang 等(2010)报道称, 鱼类 *Gzms* 与哺乳动物的 *GzmA/B/K* 关系更近, 可能是因为 *GzmA/B* 是更古老的祖先基因。因此, 推测 *GzmB* 在进化上处于更高地位, 而 *GzmM* 可能由 *GzmB* 进化而来。本研究选择 A 和 M 作为进化分析的组成部分, 而最终的进化分析发现, 鱼类的 *GzmM* 与 *GzmB* 聚在一起, 证实了此推测。本研究还发现, 所有物种的 *GzmB* 始终聚在一起, 符合 *GzmB* 的同源进化规则。基因结构比较发现, *CsGzmBl* 与其他鱼类 *GzmB* 基因均由 5 个外显子与 4 个内含子组成。据报道, *Gzm* 家族所有成员的基因结构极其保守, 如鲤 *GzmA/K*、斑马鱼(*Danio rerio*)*Gzm*、尼罗罗非鱼 *Gzm* 及人 *GzmA* 与 *GzmK* 基因均由 5 个外显子和 4 个内含子组成(Huang *et al*, 2010; Praveen *et al*, 2006)。本研究中, *CsGzmBl* 的基因结构符合外显子和内含子法则(Mount, 1982), 但与其他鱼类 *GzmB* 基因相比, *CsGzmBl* 基因的长度明显较短。以上结果表明, *CsGzmBl* 既具备 *Gzm* 家族的典型特征, 也具有 *GzmB* 的特点, 进化上与 *Gzms* 家族其他成员有明确区别, 因此, 该基因属于硬骨鱼类 *GzmB* 同源基因。

关于鱼类 *Gzms* 基因组织表达模式的研究十分有限, 仅在几种鱼中有报道。鲤中 *GzmA/K* 基因在脾脏、鳃及头肾中高表达(肾脏中最高), 其次是肾脏和肠, 在肝脏和皮肤及肌肉中表达量最低(Huang *et al*, 2010)。尼罗罗非鱼的 *Gzm* 仅在肾脏和血液中被检测到, 在肝脏、脾脏、鳃及肌肉中均未发现表达(Praveen *et al*, 2006)。在银鲫中, *Gzm* mRNA 在鳃和脾脏中表达量最高, 在肝脏中表达量最低(Matsuura *et al*, 2014)。虽然鱼类 *Gzm* 基因呈现出不同的组织表达模式, 但它总能在免疫相关组织中被检测到。本研究发现, *CsGzmBl* mRNA 在半滑舌鲷健康成鱼 9 个组织中呈现不同的表达水平, 其中, 在脾脏中表达量最高, 头肾、中肾、肝脏和鳃中表达量次之, 肌肉中表达量最低。综合表明, *CsGzmBl* 基因可能在半滑舌鲷先天性免疫中具有重要作用。

许多研究表明, *Gzms* 基因在病毒和细菌感染过程中发挥重要作用, 相关研究在哺乳动物中有大量报道。然而, 关于鱼类 *Gzms* 基因在细菌感染后的表达研究十分有限。在鲤中发现 *GzmA/K* 可以被 SVCV 病毒所诱导(Huang *et al*, 2010)。鲫鱼的 *Gzm* 基因可以被迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)所调节。本研究发现, 哈维氏弧菌感染后, *CsGzmBl* 基因在肝脏、肾脏、脾脏、肠、鳃及皮肤 6 个组织中均显著上调, 说明 *CsGzmBl* 参与半滑舌鲷的免疫防御作用, 但其具体的功能和作用机制尚不清楚, 还需进一步研究。

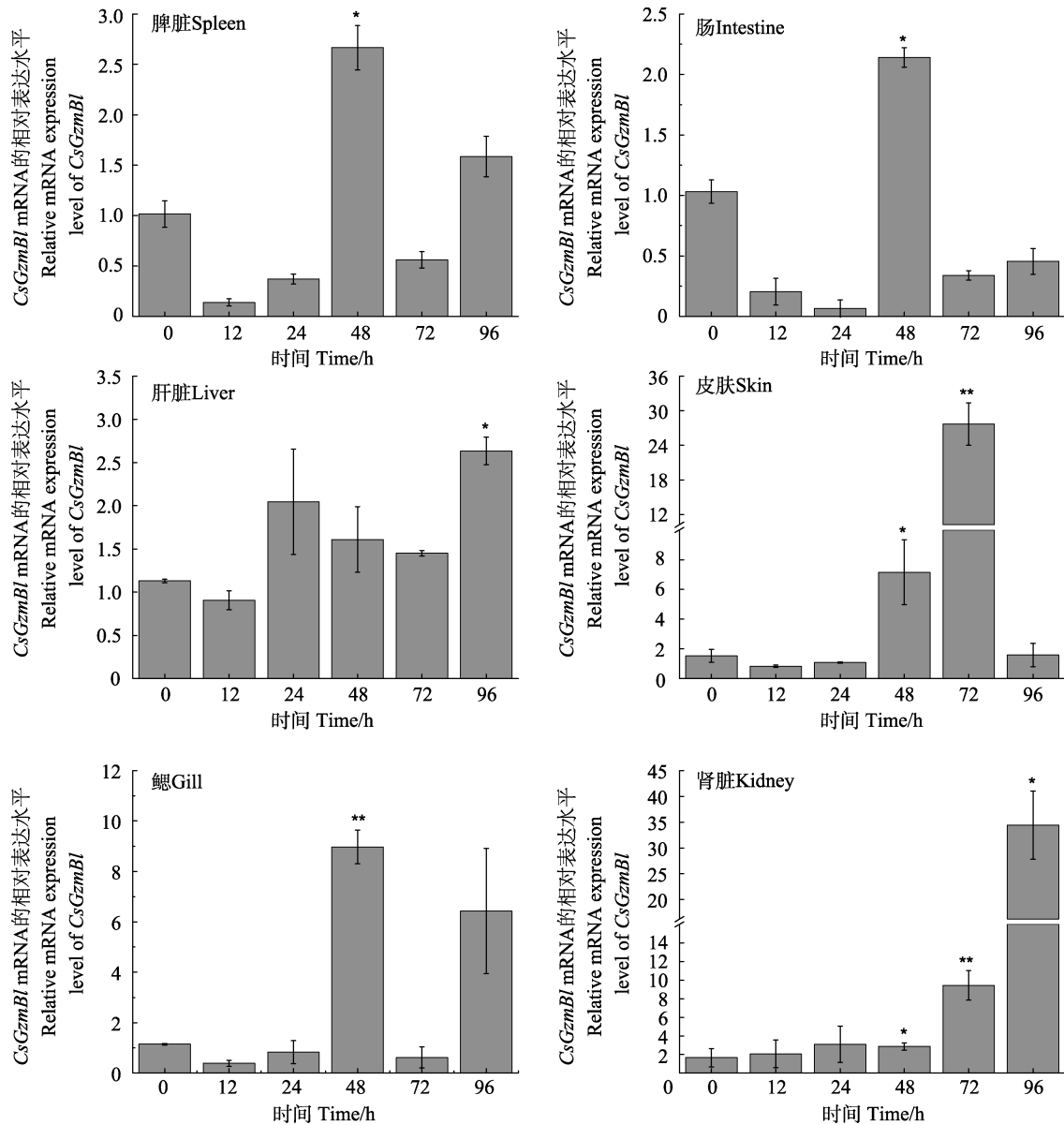


图6 哈氏弧菌感染后脾脏、肠、肝脏、皮肤、鳃和肾脏中 *CsGzmBl* mRNA 的表达情况

Fig.6 Expression pattern of *CsGzmBl* mRNA in the liver, spleen, kidney, intestine, gills and skin after *V. harveyi* infection

样品取自感染后 0、12、24、48、72 及 96 h。数值以平均值±标准误表示($n=3$)。

星号表示显著性差异(** $P<0.01$, * $P<0.05$)。

The samples are tested at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h after infection. All the data are shown as Mean±SE ($n=3$).

The asterisk indicates a significant difference (** $P<0.01$, * $P<0.05$).

综上所述,本研究通过对 *CsGzmBl* 基因的克隆、序列特征描述以及表达模型分析,初步表明 *GzmBl* 参与半滑舌鲷免疫应答过程,为进一步研究 *GzmBl* 在半滑舌鲷抗病免疫中的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

BOIVIN W A, COOPER D M, HIEBERT P R, *et al.* Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease:

Challenging the dogma. *Laboratory Investigation*, 2009, 89(11): 1195–1220

BOLITHO P, VOSKOBOINIK I, TRAPANI J A, *et al.* Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19(3): 339–347

BOTS M, MEDEMA J P. Granzymes at a glance. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(24): 5011–5014

BRANDEN C, TOOZE J. Introduction to protein structure. New York: Garland Publishing, 1991

CAPUTO A, GARNER R S, WINKLER U, *et al.* Activation of

- recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(24): 17672–17675
- CHAVES-POZO E, VALERO Y, LOZANO M T, *et al.* Fish granzyme A shows a greater role than granzyme B in fish innate cell-mediated cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2579
- CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(46): 253–260
- CHEN S L. Progress in molecular breeding for disease-resistant marine fishes and its prospects. *Science and Technology Review*, 2004(9): 10–13 [陈松林. 海水养殖鱼类抗病分子育种研究进展及前景展望. *科技导报*, 2004(9): 10–13]
- CHEN Z Q, YAO Z X, LIN M. Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 764–771 [陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病病原研究. *水产学报*, 2012, 36(5): 764–771]
- DARMON A J, LEY T J, NICHOLSON D W, *et al.* Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(36): 21709–21712
- ESTÉBANEZ-PERPIÑÁ E, FUENTES-PRIOR P, BELORGEY D, *et al.* Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue. *Biological Chemistry*, 2000, 381(12): 1203–1214
- HUANG R, ZHONG S, LIU H, *et al.* Identification and characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) granzyme A/K, a cytotoxic cell granule-associated serine protease. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(3): 388–398
- KLEIN J L, SHOWS T B, DUPONT B, *et al.* Genomic organization and chromosomal assignment for a serine protease gene (CSPB) expressed by human cytotoxic lymphocytes. *Genomics*, 1989, 5(1): 110–117
- LARIMER B M, WEHRENBURG-KLEE E, DUBOIS F, *et al.* Granzyme B PET imaging as a predictive biomarker of immunotherapy response. *Cancer Research*, 2017, 77(9): 2318–2327
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- MATSUURA Y, YABU T, SHIBA H, *et al.* Identification of a novel fish granzyme involved in cell-mediated immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 499–507
- MOUNT S M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research*, 1982, 10(2): 459–472
- NANEH O, AVČIN T, ZAVEC A B. Perforin and human diseases. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2014, 80: 221–239
- PHAM C T N, LEY T J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(15): 8627–8632
- PIUKO K, BRAVO I G, MÜLLER M. Identification and characterization of equine granzyme B. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 118(3/4): 239–251
- PRAVEEN K, EVANS D L, JASO-FRIEDMANN L. Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(4): 449–459
- PRAVEEN K, LEARY J H, EVANS D L, *et al.* Molecular characterization and expression of a granzyme of an ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Immunogenetics*, 2006, 58(1): 41–55
- SMYTH M J, MCGUIRE M J, THIA K Y T. Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. 1995, 154(12): 6299–6305
- SMYTH M J, O'CONNOR M D, TRAPANI J A. Granzymes: A variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 60(5): 555–562
- SUTTON V R, BRENNAN A J, ELLIS S, *et al.* Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates natural killer cell and cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity. *FEBS Journal*, 2016, 283(5): 947–961
- TRAPANI J A. Granzymes: A family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology*, 2001, 2(12): 1–7
- TURNER C T, HIROYASU S, GRANVILLE D J. Granzyme B as a therapeutic target for wound healing. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2019b, 23(9): 745–754
- TURNER C T, LIM D, GRANVILLE D J. Granzyme B in skin inflammation and disease. *Matrix Biology*, 2019a, 75/76: 126–140
- WANG L, FAN C, XU W, *et al.* Characterization and functional analysis of a novel C1q-domain-containing protein in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 322–332
- WANG S Y, WANG L, CHEN Z F, *et al.* Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鲷多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 51–57]
- WEI M, XU W T, LI K M, *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of dctn5 in immune response of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 77: 392–401
- WERNERSSON S, REIMER J, POORAFSHAR M, *et al.* Granzyme-like sequences in bony fish shed light on the

- emergence of hematopoietic serine proteases during vertebrate evolution. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(10): 901–918
- YU M J, SUN L M, CHEN Y D, *et al.* Cloning and expression of the c-Jun gene in immune response to pathogen challenge in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 31–39 [于孟君, 孙璐明, 陈亚东, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) c-Jun 基因的克隆及免疫应答分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 31–39]
- ZHOU Q, SU Z, LI Y, *et al.* Genome-wide association mapping and gene expression analyses reveal genetic mechanisms of disease resistance variations in *Cynoglossus semilaevis*. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1167
- ZHOU X, GAO F Y, LU M X. The progress of fish disease resistance breeding. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(3): 510–523 [周欣, 高风英, 卢迈新. 鱼类抗病性育种研究进展. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(3): 510–523]

(编辑 冯小花)

Characterization and Expression Analysis of *Granzyme B* like Gene in Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

FU Xiaoqin^{1,2}, WANG Na², WANG Jialin², CHEN Songlin^{1,2}, ZHAO Fazhen^{1,2}①

(1. *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081, China*; 2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao, Shandong 266071, China*)

Abstract *Granzyme B* is an indispensable mediator of the immune inflammatory response, which can induce apoptosis of target cells by activating caspase 3. In this study, we cloned the full-length cDNA of *Cynoglossus semilaevis granzyme B*-like gene (*CsGzmBl*) and analyzed its sequence characteristics and expression levels. The full-length cDNA of *CsGzmBl* was 923 bp, containing a 49 bp 5'UTR, 94 bp 3'UTR, and 780 bp ORF regions encoding 259 amino acid proteins with 19 amino acid signal peptides. The genome structure of *CsGzmBl* is highly conserved and consists of five exons and four introns. The *CsGzmBl* protein possesses two N-terminal glycosylation sites, a catalytic triad “His63Asp112Ser207,” a “PHSRPYMA” domain, and six conserved cysteines. qRT-PCR indicated that *CsGzmBl* was expressed in different tissues of healthy *C. semilaevis* adults, with the highest expression in the spleen, followed by that in the head kidney, kidney, liver, and gills, with the lowest expression in muscle. After infection with *Vibrio harveyi*, *CsGzmBl* was up-regulated to varying degrees in six immune-related tissues (spleen, intestine, liver, skin, gills, and kidneys) at different time points compared to the control group at 0 h. These results indicate that *CsGzmBl* plays an important role in the immune response of *C. semilaevis* against *V. harveyi* infection.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio harveyi*; *GranzymeB*; Expression analysis

① Corresponding author: ZHAO Fazhen, Email: zhaofz@ysfri.ac.cn