

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211109001

http://www.yykxjz.cn/

张子威, 王磊, 李开敏, 卢昇, 郑卫卫, 陈松林. 牙鲆 *rnd1* 基因克隆、表达模式及与抗病力的关系. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 52–63

ZHANG Z W, WANG L, LI K M, LU S, ZHENG W W, CHEN S L. Cloning and expression pattern of *rnd1* and its involvement in disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(3): 52–63

牙鲆 *rnd1* 基因克隆、表达模式及与抗病力的关系*

张子威^{1,2} 王磊² 李开敏^{2,3} 卢昇^{1,2} 郑卫卫² 陈松林^{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; 3. 山东师范大学 山东 济南 250014)

摘要 迟缓爱德华氏菌病是海水鲆鳎鱼类的主要病害,发掘抗病分子标记辅助育种是十分有效的策略。本研究以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) *rnd1* 基因(*Pornd1*)为对象,对该基因在牙鲆抗病免疫方面的作用进行系统分析。首先对 *Pornd1* 基因进行克隆鉴定和抗病相关单核苷酸多态性位点的定位,然后利用荧光定量 PCR (qRT-PCR)对 *Pornd1* 基因的组织分布、细菌感染后表达情况以及在抗病和易感家系中的表达水平进行检测。结果显示, *Pornd1* cDNA 开放阅读框为 699 bp, 编码 232 个氨基酸。结合前期 GWAS 分析数据,本研究对 *Pornd1* 基因扩增和测序,确定 *Pornd1* 基因内含子 2 上存在一个抗迟缓爱德华氏菌病相关单核苷酸多态性位点,该位点在易感家系和抗病家系中分别是 C/T, 抗病家系($\text{freq}_T=0.92$)高于易感家系($\text{freq}_T=0.20$),具有显著性差异($P<0.05$)。 *Pornd1* 在心、肝和肾中的相对表达量较高;迟缓爱德华氏菌感染后肝、肾和脾中 *Pornd1* 的表达量在 6 h 降低后逐渐升高,在 48 h 达到最高。 *Pornd1* 在抗病家系肝脏中的表达量显著高于易感家系。在蛋白水平,利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统表达 PoRnd1 重组蛋白,检测其抑菌活性,发现 PoRnd1 重组蛋白对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)均具有一定抑菌活性。本研究揭示了 *Pornd1* 在牙鲆免疫抗病方面的作用,为开展牙鲆抗病分子育种提供了一个有效标记,并为解析其抗病性状的遗传机制提供理论基础。

关键词 牙鲆; *rnd1*; 迟缓爱德华氏菌; 抗病免疫; 抑菌活性

中图分类号 S942.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)03-0052-12

Rho 相关 GTP 结合蛋白 Rho6 (Rho-related GTP-binding protein Rho6), 又名 Rnd1, 为分子量只有 20~30 kDa 的小分子蛋白。作为小 G 蛋白家族的非典型成员, Rnd 分子与 GTP 结合后, 不能水解 GTP, 以持续与 GTP 结合的模式发挥生物功能(Nobes *et al*, 1998; Shutes *et al*, 2004; Dong *et al*, 2019; Wennerberg *et al*, 2005)。Rho-GTP 酶家族基因参与许多重要的细

胞过程, 如细胞骨架构建、囊泡运输、细胞黏附、细胞增殖、分化、吞噬、凋亡和 NADPH 氧化酶的激活等, 并在抵御病原体感染过程中起到一定作用(Kwon *et al*, 2004; Xiu *et al*, 2019)。

鱼类中 Rnd1 研究很少, 仅有斑马鱼(*Danio rerio*) Rnd1 等基因序列的报道(Salas-Vidal *et al*, 2005)。与 Rnd1 同属 Rho-GTP 酶超家族的 Rac 亚家族基因在鱼

* 国家重点研发计划项目蓝色粮仓科技创新专项(2018YFD0900301-02)、山东省重点研发计划-重大科技创新工程项目(2021LZGC028)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD20)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助。张子威, E-mail: 602220472@qq.com

① 通信作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-11-09, 收修改稿日期: 2022-01-29

类免疫抗病中的研究较多。*Rac1* 和 *Rac2* 基因陆续在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、斑马鱼、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等鱼类中被鉴定出来。细菌感染后 *Rac1* 和 *Rac2* 在主要免疫组织中的表达量有明显升高, 说明 Rho-GTP 酶家族参与了鱼体的免疫防御过程(Han *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2017; Salas-Vidal *et al.*, 2005; Xiu *et al.*, 2019)。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种重要的海水养殖鱼类, 广泛养殖于中国、日本和韩国等亚洲国家。近年来, 随着牙鲆养殖业的不断壮大, 各类疾病频繁暴发, 从苗种到养成阶段均有病害发生, 造成了巨大的经济损失。其中, 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染引起的腹水病是牙鲆的主要病害。

本研究以牙鲆 *rnd1* 基因为对象, 首次对 *Pornd1* 基因进行克隆鉴定和抗病性状关联分析。分析该基因在牙鲆健康组织中的表达量以及在迟缓爱德华氏菌感染后的表达变化, 通过检测 *Pornd1* 基因在抗病家系和易感家系中的表达水平, 分析该基因与抗病力的关系。进一步通过抑菌活性实验, 检测 *PoRnd1* 重组蛋白的抑菌活性, 从而为系统解析牙鲆抗病性状遗传机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 正常牙鲆及细菌感染实验

在中国水产科学研究院黄海水产研究所海阳实验基地(下称海阳基地)随机选取 6 尾健康牙鲆, 麻醉后取肝、脾、肾、肠、鳃、肌肉、皮肤、心脏、脑及血液等 10 种组织, 放入冻存管中, 立即投入液氮中速冻, 随后转移到 -80°C 冰箱, 用于 RNA 的提取。

根据本实验室前期建立的方法(Wang *et al.*, 2017), 对牙鲆进行迟缓爱德华氏菌感染, 感染后分别取 5 个时间点(0、6、12、24 和 48 h)的牙鲆各 6 条。以 PBS 组为对照, 在相同时间点各取 6 条。麻醉后解剖取肝脏、脾脏和肾脏等组织, 分别放入装有 RNA 保存液的 1.5 mL 离心管中保存, 随后转移到 -80°C 冰箱, 用于 RNA 的提取。

1.2 抗病家系及易感家系筛选及样品采集

2014 年 9—10 月在海阳基地实验隔离区进行的牙鲆感染实验, 筛选牙鲆抗病家系 F1421 和易感家系

F1441, 2 个家系的感染存活率分别为 47.06% 和 11.11% (孙何军等, 2015)。2015 年筛选牙鲆抗病家系 F1501 和易感家系 F1544, 2 个家系的感染存活率分别为 80.72% 和 8.54% (郑卫卫等, 2016)。每年在感染实验后, 采集抗病家系和易感家系未经感染的鱼苗各 5 条, 麻醉后取肝脏组织, 在液氮中速冻后放入 -80°C 冰箱中保存, 用于提取 RNA。同时, 采集鱼苗的鳍条, 放入酒精中保存, 用于提取 DNA。

1.3 DNA、RNA 提取及 cDNA 第一链合成

DNA 提取使用海洋动物组织基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)进行, 实验方法参照说明书。RNA 提取使用 Trizol 法(TaKaRa, 大连), 实验方法参照说明书。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察各组织 RNA 条带, 检测其完整度, 使用 DNA/Proteins Analyzer P100 测定 RNA 浓度及相关比值, 选择质量较好、条带完整的 RNA 用于后续 cDNA 的合成。

使用 TaKaRa Prime Script RT reagent kit with gDNA eraser 合成 cDNA 第一链, 首先去除基因组 DNA, PCR 体系: gDNA clean reagent 1 μL , 5 \times gDNA clean buffer 2 μL , 总 RNA 1 mg, RNase-free 水补足 10 μL 体系; 反应条件 42°C 2 min。再进行反转录反应, PCR 体系: 上一步反应液 10 μL , *Evo M-MLV* RTase enzyme mix 1 μL , RT primer mix 1 μL , 5 \times RTase reaction buffer mix I 4 μL , RNase-free 水 4 μL ; 反应条件 37°C 15 min, 85°C 5 s。合成的 cDNA 使用 β -actin 内参基因引物进行 PCR 验证质量(表 1), PCR 体系: cDNA 1 μL , TaKaRa Ex *Taq* 10 μL , 正反引物各 1 μL , ddH₂O 7 μL ; 反应 34 个循环: 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s; 72°C 5 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察条带, 选择质量好的 cDNA 用于后续基因克隆及荧光定量实验。

1.4 生物学分析

使用 DNASTAR 7.0 和 DNAMAN 软件进行序列合成, 得到 *Pornd1* 基因 cDNA 序列, NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 确定其开放阅读框并预测氨基酸序列, 从 NCBI 上检索不同生物的 Rnd 和 Rac 家族蛋白序列, 使用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对, 使用 BioEdit 软件进行氨基酸序列比对, 运用 MEGA 7 软件、采用邻位相接法(NJ 法)构建氨基酸系统发育树, 并设置 bootstrap 重复 1 000 次, 计算各分支的置信度。

表1 本实验所用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
rnd1-RT-F	GCTCCAGACAGGCTGTGTAG	qRT-PCR
rnd1-RT-R	GTCCAATCAGAAACAGAGTC	
β -actin-F	ACTGCTGCCTCCTCCTCT	内参 Internal reference
β -actin-R	TCTGGACAACGGAACCTCTC	
Ex-rnd1-F	ATGAAGGAGAGAAGACTCCCCAGCCTT	验证内部片段 Partial fragment verification
Ex-rnd1-R	CATGATGGAGCAACTCTTGGACTTGTCC	
SNP-rnd1-F	CAGAGGAACAGCGGAATAGT	验证 SNP 位点 SNP verification
SNP-rnd1-R	GCTCCCCAAAAGGTAAGATA	

1.5 *Pornd1* 基因中抗病相关 SNP 位点的定位和多态性分析

实验室前期对连续多年建立的牙鲆家系进行迟缓爱德华氏菌感染实验,挑选感染后的 931 个个体进行全基因组重测序,开展了 GWAS 分析,得到一个定位在 *Pornd1* 基因上的 SNP 位点(Lu *et al*, 2020)。本实验设计引物,利用 PCR 方法扩增 SNP 位点所在区域,进行测序验证。利用 2014 年牙鲆抗病家系和易感家系 DNA 样品,进行 SNP 位点验证和 SNP 位点与抗病力的关联性分析。

1.6 荧光定量 PCR

1.6.1 正常牙鲆组织中 *Pornd1* 的表达模式 根据 *Pornd1* 基因的 ORF 序列,合成 qRT-PCR 引物(表 1),以牙鲆 β -Actin 基因为内参基因,使用 TaKaRa TB Green[®] Premix Ex Taq[™],采用染料法在 ABI 7500 fast 荧光定量 PCR 仪上荧光定量实验,测定 *Pornd1* 基因在脾、肝、肾、头肾、肠、心、鳃、皮肤、肌肉和血液中的相对表达量,PCR 体系: cDNA 1 μ L, TB Green Premix Ex Taq 10 μ L, Rox reference Dye II 0.4 μ L, 正反引物各 0.8 μ L, ddH₂O 7 μ L; 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。每个组织设置 5 个生物重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *Pornd1* 的相对表达量,利用 Origin 软件绘制各组织相对表达量图,利用 SPSS 软件 Duncan 法进行显著性检验。

1.6.2 迟缓爱德华氏菌感染后 *Pornd1* 的表达模式

以牙鲆 β -Actin 为内参基因,采用 1.6.1 的方法测定 *Pornd1* 基因在 PBS 注射、迟缓爱德华氏菌感染处理后 0、6、12、24、48 h 肝、脾和肾中的相对表达量,反应体系同 1.6.1。每组设置 5 个生物重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *Pornd1* 的相对表达量,利用 Origin 软件绘制不同时间点相对表达量对比图,使用 SPSS

软件独立样本 *T* 检验进行显著性分析。

1.6.3 *Pornd1* 在 2 个家系肝脏中的表达 以牙鲆 β -Actin 为内参基因,使用 1.6.1 的方法测定 *Pornd1* 在抗病及易感家系肝中的表达量,反应体系同 1.6.1。每组设置 6 个生物重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *Pornd1* 的相对表达量,绘制 2 个家系相对表达量对比图,使用 SPSS 软件独立样本 *T* 检验进行显著性分析。

1.7 *Pornd1* 基因原核表达及抑菌活性实验

1.7.1 重组质粒构建及蛋白表达 对 *Pornd1* 基因编码的蛋白进行结构分析,设计引物,以牙鲆肝脏 cDNA 为模板扩增 *rnd1* 编码区全长序列 696 bp,将 PCR 产物纯化后连入 pET-T1 载体,送擎科生物(青岛)测序,将测序正确的阳性质粒(pET-T1-rnd1)进行扩增和纯化,双酶切后连入同样酶切的 pET-his 载体。将 pET-his-rnd1 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta2 (DE3),挑取单克隆测序。将阳性单克隆扩大培养,在菌液 OD_{600 nm}=0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 18 $^{\circ}$ C 振荡培养 18 h,诱导蛋白表达。确定培养温度和培养时间后,使用 200 mL 菌液进行蛋白大量表达和纯化,采用镍柱法纯化重组蛋白,测定蛋白浓度为 1 mg/mL。使用 SDS-PAGE 检测蛋白表达。

1.7.2 PoRnd1 重组蛋白的体外抑菌实验 采用牛津杯法,检测 PoRnd1 重组蛋白对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的抑菌活性。取 1 mL 菌液加入到 200 mL LB 液体培养基中进行活化,37 $^{\circ}$ C 180 r/min 恒温振荡培养 6 h。取 2 mL 菌液用 PBS 缓冲液洗涤,使用分光光度计测定菌液 OD_{600 nm} 值。将菌液稀释 1 000 倍,取 100 μ L 均匀涂布到 TSB 固体培养基上。用无菌镊子将灭菌干燥后的牛津杯置于平板表面,轻轻按压固定。吸取 100 μ L PoRnd1 蛋白(0.5 mg/mL)加入牛津杯中,阴性对照组为 100 μ L

PBS; 迟缓爱德华氏菌、哈维氏弧菌组阳性对照组为 100 μ L 氨苄青霉素(1.0 mg/mL); 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌组阳性对照组为 50 μ L 卡那霉素(1.0 mg/mL)。恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 观察细菌生长状况及有无抑菌圈出现。

2 结果

2.1 *Pornd1* 基因序列

Pornd1 cDNA 的开放阅读框为 699 bp, 编码 232 个氨基酸(图 1)。预测蛋白分子量为 26 kDa。根据结构分析, 牙鲆 Rnd1 蛋白和人类(*Homo sapiens*) Rnd1 具

有相似的结构域, 包括 GTP/Mg²⁺结合位点(22~28 位、70~73 位、125~126 位和 168~170 位); Switch I region 和 Switch II region (48~50 位、69~70 位和 86~87 位), 以及 G1 box、G2 box、G3 box、G4 box 和 G5 box 位点(20~27 位、45~47 位、67~70 位、125~128 位和 168~170 位)(图 2)。

2.2 *Pornd1* 基因的进化分析

使用 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *Pornd1* 基因编码的氨基酸序列与其他物种 *rnd1* 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较, 结果显示, 其与大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)

```

      10      20      30      40      50      60
1 ATGAAGGAGAGAAGACTCCCCAGCCTTTTGTAGCGAGGTGTAAACTGGTCTGGTGGGA
1 M K E R R L P Q P F V A R C K L V L V G

      70      80      90     100     110     120
61 GACGTCCAGTGCGGGAAGACAGCGATGTTACAAGTGTGGCCAAGGACTGTTACCCAGAG
21 D V Q C G K T A M L Q V L A K D C Y P E

      130     140     150     160     170     180
121 ACGTATGTCCCTACTGTGTTTGAGAACTACACAGCCTGTCTGGAGCTTGAAGACCAGCGG
41 T Y V P T V F E N Y T A C L E L E D Q R

      190     200     210     220     230     240
181 GTGGAGCTCAGTCTCTGGGACACATCAGGTTCTCCATACTACGACAACGTGACCCCTG
61 V E L S L W D T S G S P Y Y D N V R P L

      250     260     270     280     290     300
241 TGTTACAGTGAAGTCAAGTGTGCTCTTGTGCTTTGACATCAGCCGACCTGACACAGTC
81 C Y S D S D A V L L C F D I S R P D T V

      310     320     330     340     350     360
301 GACGGTGCCTTGAAGAAGTGGAAAGCAGAGATCCAGGACTTCTGCCCGAGCACACGGATC
101 D G A L K K W K A E I Q D F C P S T R I

      370     380     390     400     410     420
361 CTGCTAATAGGCTGTAAGACAGACCTGCGCACGGACGTGTGCACACGCATGGAGCTGTCC
121 L L I G C K T D L R T D V C T R M E L S

      430     440     450     460     470     480
421 AATCAGAAAACAGAGTCCCATCTCCATGAACAGGGCTCGTCTTGGCCAAGCAGCTCGGA
141 N Q K Q S P I S H E Q G S S L A K Q L G

      490     500     510     520     530     540
481 GCAGAGGCTTACCTGGAGTGCTCGGCCTTACGTCAGAGAAGAGCATCCACAGTGTTTTC
161 A E A Y L E C S A F T S E K S I H S V F

      550     560     570     580     590     600
541 CGTACCGCAGCTCAGGCGTGCATGAACAAACTCAAGCCTGCCAGTAAACCCAGCCCCGTC
181 R T A A Q A C M N K L K P A S K P S P V

      610     620     630     640     650     660
601 CGCCGCTATCCAAGAGACTGCTCCACCTGCCAGCAAGACAGACCTGCTCTCTCCACC
201 R R L S K R L L H L P S K T D L L S S T

      670     680     690
661 TTCAGCAAGGACAAGTCCAAGAGTTGCTCCATCATGTGA
221 F S K D K S K S C S I M *

```

图 1 *Pornd1* cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Pornd1*

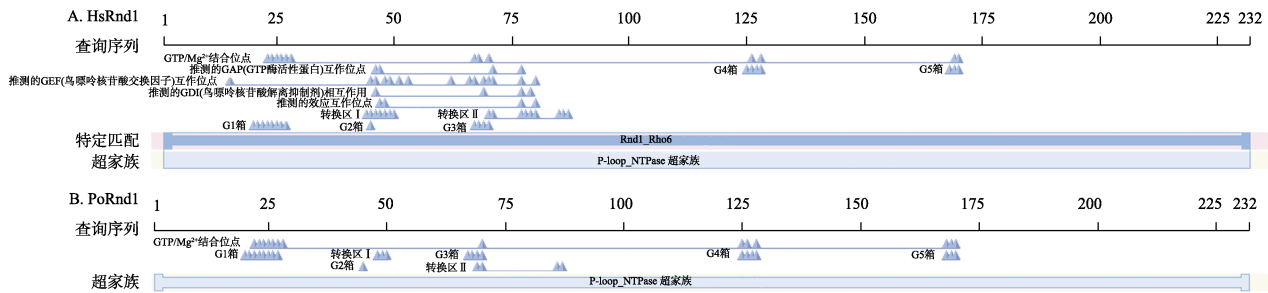


图2 人类 Rnd1 蛋白(A)和预测的牙鲆 Rnd1 蛋白(B)
Fig.2 Protein structure of human rnd1 (A) and Pornd1 protein (B)

同源性最高, 达到了 98.28%。使用 ClustalX 对牙鲆 Rnd1 氨基酸序列与其他物种进行多重比对, 可见 Rnd1 氨基酸序列在不同物种间的保守性非常高, 尤其是在 N 端 90 个氨基酸的相似度达到 90% 以上(图 3)。

利用 ClustalX 多对物种 Rnd1 及同家族 Rnd2、Rnd3、Rac1、Rac2 氨基酸序列进行比对, 利用 MEGA7 软件进行系统进化分析, 并构建 NJ 系统进化树, 结果显示, 牙鲆 Rnd1 氨基酸序列与其他生物 Rnd1 聚为一簇, Rnd2、Rnd3 和 Rac 分别单独成为一簇(图 4)。

2.3 *Pornd1* 基因 SNP 位点与抗病力的关联分析

与牙鲆抗迟缓爱德华氏菌相关的位点位于牙鲆 14 号染色体的 4 575 720 bp 处, 该位点的信息为 C/T, 在所检测的抗病家系和易感家系中, 等位基因 T 和等位基因 C 出现的频率存在显著差异 ($P < 0.05$), 抗病家系中等位基因 T 出现的频率 ($\text{freq}_T = 0.92$) 高于易感家系 ($\text{freq}_T = 0.20$)。利用牙鲆基因组进行 SNP 位点的精细定位, 该位点定位在 *Pornd1* 基因的 4 157 bp 处(Lu *et al.*, 2020)。经过基因结构分析和序列比对发现, *Pornd1* 基因包含 5 个外显子, 分别为 123、87、108、136 和 245 bp; 4 个内含子分别为 647、3 700、201 和 126 bp, SNP 位点位于内含子 2 上(图 5)。在 SNP 位点上、下游设计引物, 以牙鲆 2014 年抗病和易感家系 DNA 为模板, 进行了 SNP 位点区域扩增, 确定了 SNP 位点的位于第 2 内含子上。

2.4 *Pornd1* 基因的表达模式

2.4.1 *Pornd1* 基因的组织表达分布 利用 qRT-PCR 测定 *Pornd1* 基因在不同组织中的相对表达量, 分析组织表达特异性, 发现 *Pornd1* 在牙鲆的心脏表达最高, 在肝、肾和头肾中表达量较高, 在皮肤、血液、鳃和肌肉中表达量较低(图 6)。

2.4.2 细菌感染对 *Pornd1* 基因表达的影响 利用 qRT-PCR 法, 检测迟缓爱德华氏菌感染前和感染后不同时间, *Pornd1* 基因在肝、肾和脾中的相对表达量。

在肝、肾和脾中, PBS 对照组与 0 h 组表达量无明显差异。细菌感染 6 h 后 *Pornd1* 基因的表达量显著低于 0 h 组 ($P < 0.05$), 之后表达量逐渐升高; 在肾和脾中细菌感染 48 h 后 *Pornd1* 表达量极显著高于 6 h、12 h 时 ($P < 0.01$) (图 7)。

2.4.3 *Pornd1* 基因在抗病和易感家系中的表达模式

利用 qRT-PCR 法, 分别检测 2014 和 2015 年牙鲆抗病家系和易感家系肝中 *Pornd1* 基因的表达, 分析 *Pornd1* 基因在 2014 和 2015 年抗病和易感家系肝组织中的表达水平, 发现该基因在抗病家系中的表达量均显著高于易感家系 ($P < 0.05$), 在抗病家系中的表达量是易感家系的 3~5 倍(图 8)。

2.5 PoRnd1 重组蛋白表达和纯化

经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 在 18 °C 振荡培养 18 h 后, 对培养基上清液和菌体进行蛋白检测, 结果表明, 重组蛋白在上清液中表达。重组蛋白大小为 32 kDa, 与预期大小一致。根据重组蛋白中的 His 标签, 进行 Ni 柱纯化, 得到 PoRnd1 重组蛋白, 纯化后 PoRnd1 重组蛋白调整浓度为 1 mg/mL, 分别用 4、2 和 1 μ L 纯化 PoRnd1 蛋白溶液进行 SDS-PAGE 电泳检测, 在 32 kDa 的位置有明显的蛋白条带(图 9)。

2.6 PoRnd1 重组蛋白的抑菌活性

观察牛津杯法重组蛋白体外抑菌实验中细菌生长状况, 发现 PoRnd1 重组蛋白对培养的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌、哈维氏弧菌均有一定的抑菌活性(图 10)。

3 讨论

Rho-GTP 酶属于小 G 蛋白超家族, 在哺乳动物中已发现大约 20 种, 分为 5 个亚家族, 包括 Rho 亚家族、Rac 亚家族、Cdc42 亚家族、Rnd 亚家族和 Rho BTB 亚家族。Rho-GTP 酶家族成员均具有 GTP 结合功能区, 按作用形式可分为典型成员与非典型成员

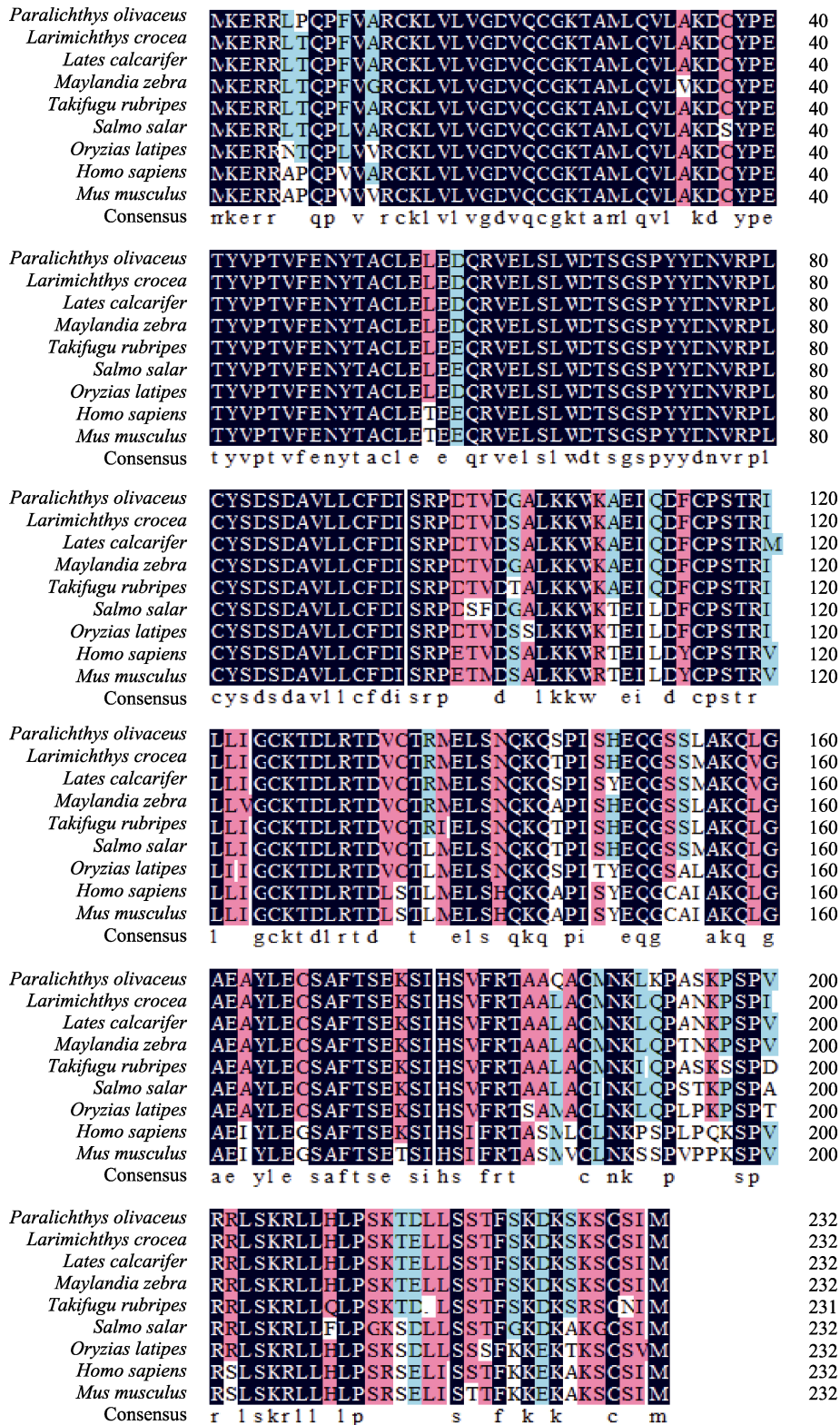


图 3 牙鲈与其他物种 *Rnd1* 氨基酸序列多重比对

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acids of *Rnd1* among *P. olivaceus* and other different species

黑色区域表示氨基酸位点同源性为 100%，粉色区域表示氨基酸位点同源性至少为 75%，蓝色区域表示氨基酸位点同源性至少为 50%。

The black region indicates that the homology of amino acid locus is 100%. The pink region indicates that the homology of amino acid locus is at least 75%. The blue region indicates that the homology of amino acid locus is at least 50%.

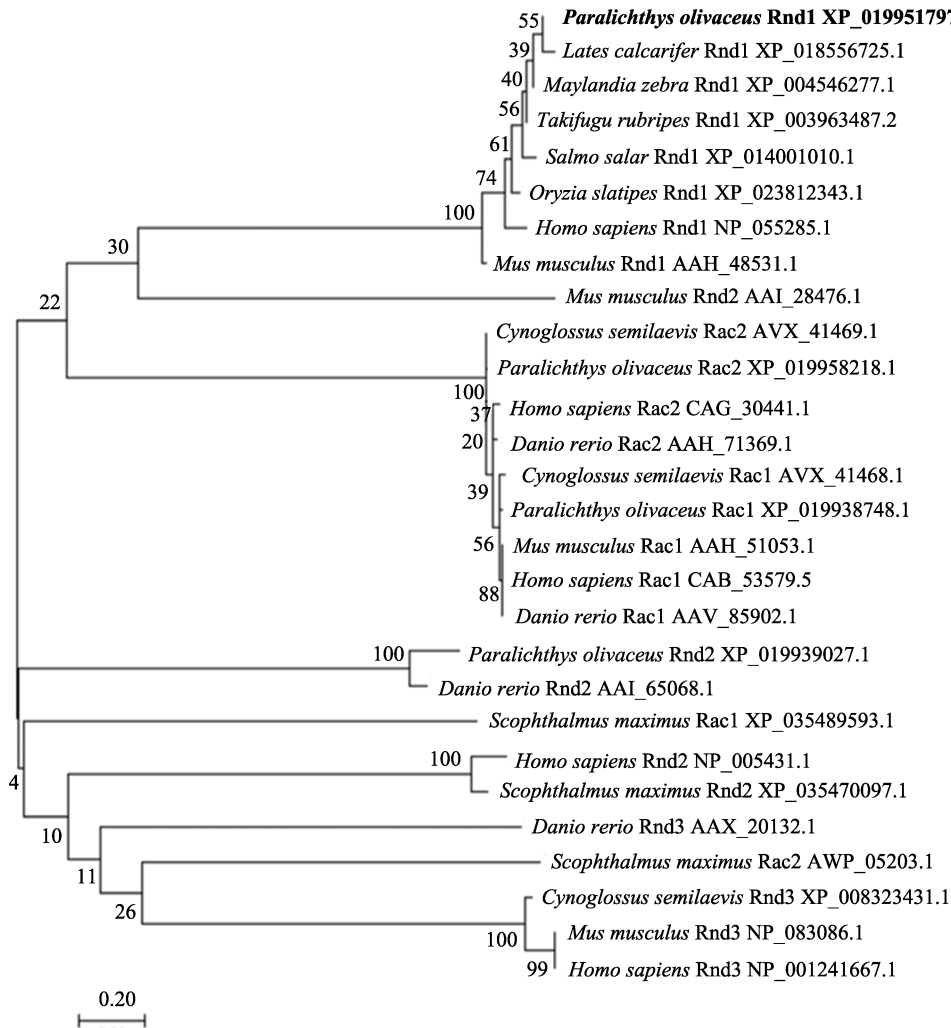
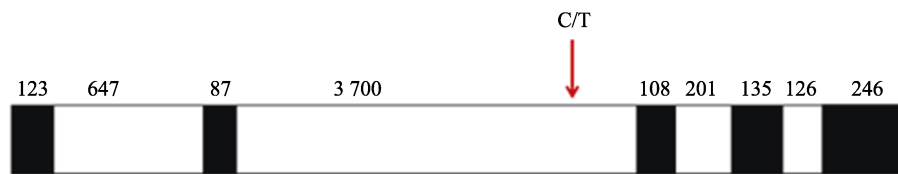


图 4 Rnd1 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on Rnd1 amino acid sequences by neighbor-joining method

图 5 *Pornd1* 基因中抗病相关 SNP 位点的定位Fig.5 Location of SNPs related to disease resistance in *Pornd1*

黑色区域表示外显子区域，白色区域表示内含子区域。

The black region represents the expressed region, and the white region represents the intron region.

(Bustelo *et al*, 2007; Bustelo, 2018)。典型成员如 Cdc42、Rac 和 Rho，在与 GTP 结合的活性状态和与 GDP 结合的非活性状态之间循环(Boettner *et al*, 2002)；非典型成员如 Rnd，主要以持续 GTP 结合状态存在(Nobes *et al*, 1998)。与人类 Rnd1 蛋白结构类似，PoRnd1 也具有 GTP 结合结构域、Switch I region、Switch II region 和多个 G box，推测与人类

Rnd1 具有类似的功能。

在哺乳动物的研究中证明，Rnd1 参与细胞形态、神经细胞成熟、基因转录、细胞迁移、细胞凋亡、肿瘤发生迁移。Nobes 等(1998)研究发现，Rnd1 蛋白通过结合 p190RhoGAP、Syx 和生长因子受体结合蛋白 7 (Grb7)等分子，降低 RhoA 活性，抑制应力纤维形成，降低肌动球蛋白的收缩性，影响细胞形态

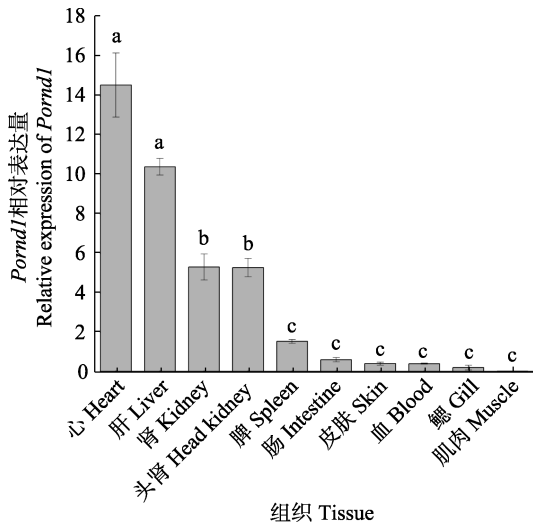


图 6 *Pornd1* 在健康牙鲈组织中的相对表达量
Fig.6 Relative expression of *Pornd1* in normal tissues of *P. olivaceus*

以脾中 *Pornd1* 的表达量为标准值 1; 数值用平均值±标准差表示($n=5$); 相同字母的表达水平无显著性差异($P<0.05$)。Take the expression level of *Pornd1* in the spleen as 1; Values are indicated as Mean±SD ($n=5$). The expression levels with the same letter are not significantly different ($P<0.05$).

(Nobes *et al*, 1998; Wennerberg *et al*, 2003; Goh *et al*, 2010; Mouly *et al*, 2019)。在神经细胞中, *Rnd1* 与 plexinsA1、B1 作用, 激发其与下游蛋白 R-Ras 的活性, 导致生长锥塌陷, 影响轴突延伸(Oinuma *et al*, 2004; Mouly *et al*, 2019)。*Rnd1* 抑制 p53 蛋白表达, 影响 p53 蛋白与 BCL-2/BCL-x1 结合, 诱导神经细胞凋亡(董慧敏等, 2019)。*Rnd1* 蛋白表达水平受表皮生长因子(EGF)、转录生长因子 β (TGF β)、活化 T 细胞核因子(NFATc1)等多种生长因子及雌二醇、孕酮等激素诱导调控(Kim *et al*, 2005; Suehiro *et al*, 2014; Okada *et al*, 2015; Mouly *et al*, 2019)。目前在抗病免疫方面的研究尚未见报道。

哺乳动物 *rnd1* 基因表达具有组织特异性(Mouly *et al*, 2019), *rnd1* 在胎儿脑、肺、肝和肾中表达, 在成人脑组织和肝中高表达。大鼠(*Rattus norvegicus*) *rnd1* 主要在大脑、肝脏和睾丸中表达, 在肌肉中不表达(Nobes *et al*, 1998)。脾、肾均是鱼类重要的免疫器官(Zapata *et al*, 2006)。在本研究中, qRT-PCR 结果显示, *Pornd1* 在心、肝和肾中表达量显著高于其他组织($P<0.05$), 在肌肉中表达极低, 因此, 推测其可能在免疫抗病方面有一定作用。

在鱼类中, 对 *Rnd1* 同属 Rho-GTP 酶的 Rac 亚家族的研究较多。Xiu 等(2019)利用哈维氏弧菌感染半滑舌鳎发现, 感染后免疫组织中 *rac1* 和 *rac2* 基因表

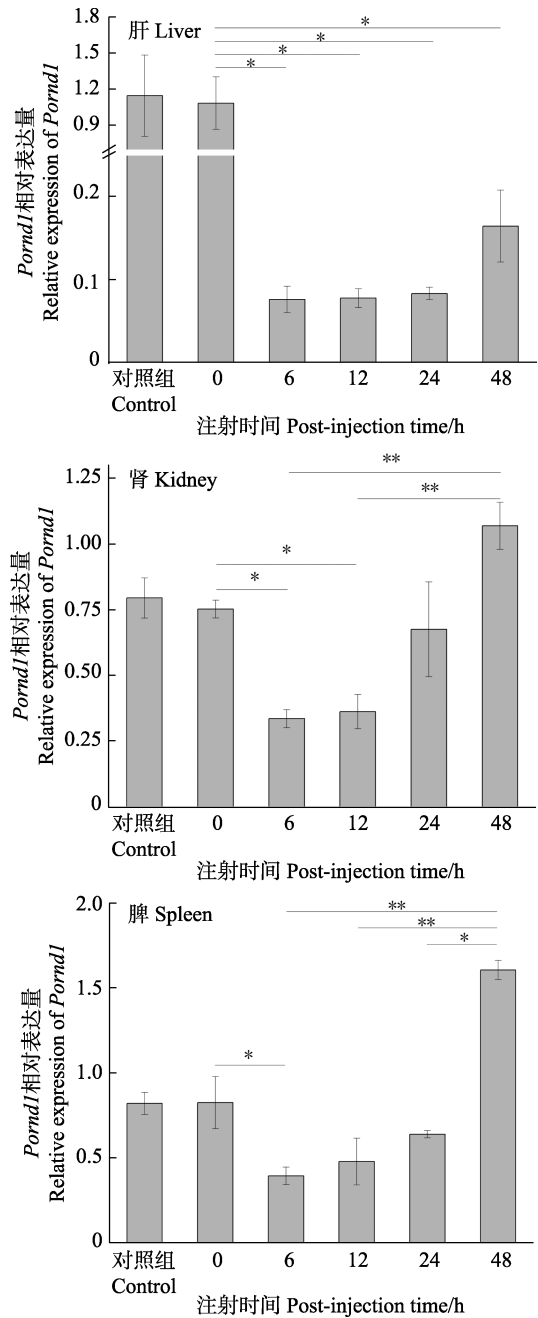


图 7 牙鲈感染迟缓爱德华氏菌后肝、肾和脾中 *Pornd1* 相对表达量

Fig.7 Relative expression of *Pornd1* in liver, kidney, spleen of *P. olivaceus* at different time points after *E. tarda* infection

以各组织对照组 *Pornd1* 的表达量为标准值 1; 数值用平均数±标准差来表示($n=5$); *为显著差异($P<0.05$); **为极显著差异($P<0.01$)。

Take the expression level of *Pornd1* in PBS as 1. Values are indicated as Mean±SD ($n=5$). Significant difference between different groups was indicated with the asterisks (“*” $P<0.05$; “**” $P<0.01$).

达量显著上调, 说明这, 2 个基因在鱼类先天免疫中发挥作用。Jia 等(2009)发现, 哈维氏弧菌感染后大菱

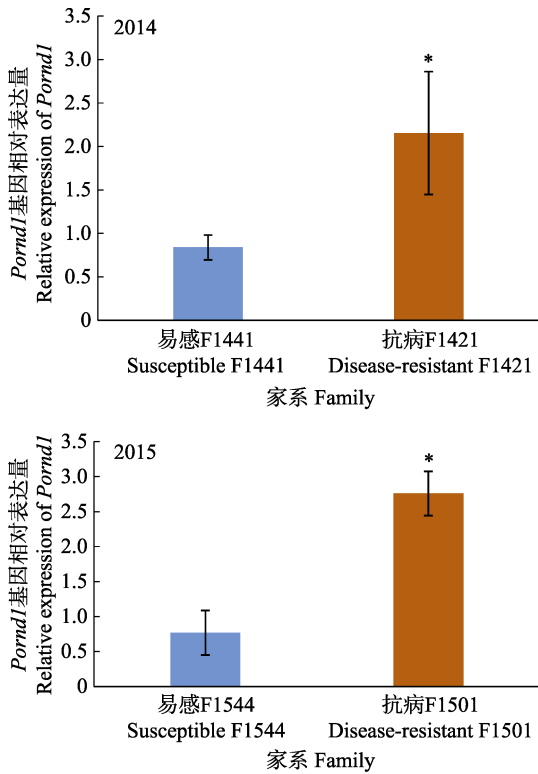


图8 *Pornd1* 在2014年和2015年抗病和易感家系肝脏中的表达差异

Fig.8 Difference of *Pornd1* expression in liver between resistant and susceptible families of year 2014 and 2015

数值用平均数±标准差来表示(n=6); *为显著差异(P<0.05)。

Values are indicated as Mean±SD (n=6); Significant difference was indicated with the asterisks (*P<0.05).

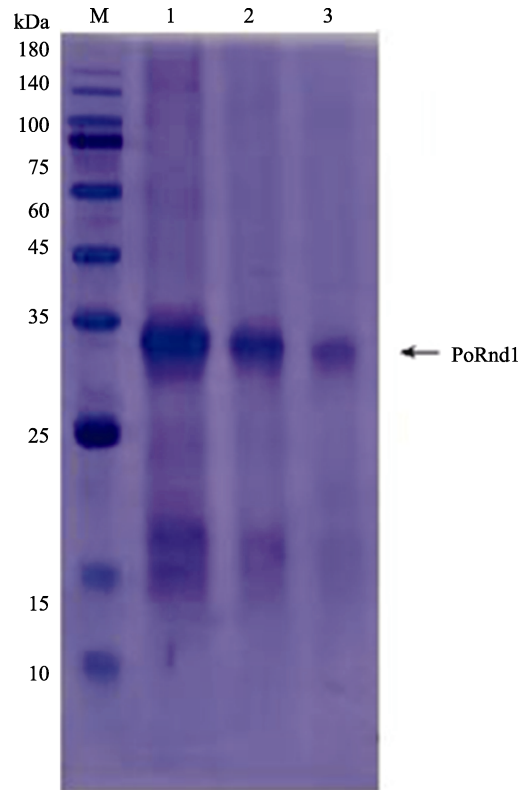


图9 PoRnd1 重组蛋白电泳

Fig.9 SDS-PAGE analysis of PoRnd1 protein

M: 蛋白分子 marker; 1~3 分别为 4、2 和 1 μL 纯化 PoRnd1 蛋白溶液。

M: Protein marker; 1~3: Purified PoRnd1 protein (4 μL, 2 μL and 1 μL).

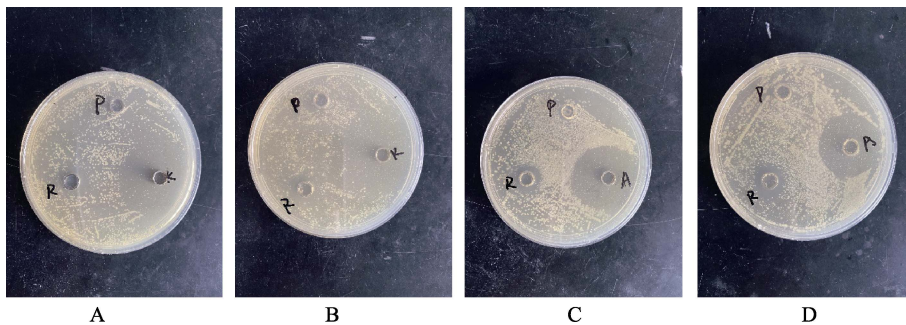


图10 牛津杯法 PoRnd1 蛋白抑菌实验

Fig.10 Bacteriostatic experiment of Rnd1 protein of Oxford cup French flounder

A: 金黄色葡萄球菌; B: 大肠杆菌; C: 迟缓爱德华氏菌; D: 哈维氏弧菌

R: Rnd1 蛋白; P: PBS 阴性对照; K: 卡那霉素阳性对照; A: 氨苄青霉素阳性对照

A: *S. aureus*; B: *E. coli*; C: *E. tarda*; D: *V. harveyi*

R: PoRnd1 protein; P: PBS negative control; K: Positive control (kanamycin); A: Positive control (ampicillin)

鲢肝脏中 *rac1* 基因表达量上调; Hu 等(2016)发现嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染后,草鱼的肝和脾中 *rac1* 基因表达量上调,并证明其在草鱼先天免疫中发挥作用。本研究对牙鲆进行迟缓爱德华氏菌

感染实验,分析其肝、肾和脾感染后不同时间点 *Pornd1* 的相对表达量,发现感染后细菌侵袭造成了组织 *Pornd1* 表达量先降低,推测可能是细菌侵袭造成组织损伤导致;随时间推移, *Pornd1* 表达量上升,

在 48 h 达到最高值。因此, 推测 *Pornd1* 可能与抵抗细菌侵袭相关, 但其参与免疫反应的作用通路需要进一步研究。

在动物和植物良种选育中, 进行分子标记辅助育种是一项十分重要的工作。大量经济性状相关基因的单核苷酸多态性位点陆续被开发出来, 但在鱼类中的研究还较少。本研究利用牙鲈抗病家系和易感家系重测序和等位基因频率分析, 结合 *Pornd1* 基因扩增和测序验证, 确定了 *Pornd1* 基因上定位一个抗迟缓爱德华氏菌病相关单核苷酸多态性位点, 以期能够为提高牙鲈抗病育种和种质资源鉴定提供有效的基因标记。本研究还发现, *Pornd1* 基因在抗病家系肝脏中的表达量显著高于易感家系, 而且 PoRnd1 重组蛋白对迟缓爱德华氏菌等细菌具有明显的抑菌活性, 推测 PoRnd1 蛋白在抗迟缓爱德华氏菌病方面发挥一定作用, 但 SNP 位点对基因表达的影响机制、蛋白与细菌互作的作用机制等问题仍需进一步研究。

4 结论

本研究首次克隆了 *Pornd1* 基因, 发现 Rnd1 在不同生物中高度保守, 发现一个抗病相关 SNP 位点在其内含子 2 上。*Pornd1* 基因在牙鲈免疫组织中表达较高, 在迟缓爱德华氏菌感染后表达量显著升高, 而且在抗病家系肝脏中的表达量显著高于易感家系。进一步从蛋白水平研究发现, PoRnd1 重组蛋白对迟缓爱德华氏菌等细菌具有抑菌活性。因此, 本研究为阐明 *Pornd1* 基因免疫抗病功能提供了研究基础, 为开展牙鲈抗病分子育种提供了一个有效标记, 并为解析牙鲈抗病性状的遗传机制提供了理论基础。

参 考 文 献

- BOETTNER B, VAN AELST L. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, 2002, 286(2): 155–174
- BUSTELO X R, SAUZEAU V, BERENJENO I M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: Regulation, effectors and functions *in vivo*. *BioEssays*, 2007, 29(4): 356–370
- BUSTELO X R. RHO GTPases in cancer: Known facts, open questions, and therapeutic challenges. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(3): 741–760
- DONG H M, LIU B H, SUN Q, *et al.* RhoE regulated neurocytes apoptosis in PC12 cells through p53 protein. *Stroke and Nervous Diseases*, 2019, 26(6): 649–652, 663 [董慧敏, 刘宝辉, 孙前, 等. RND1 通过 p53 蛋白促进 PC12 细胞凋亡. *卒中与神经疾病*, 2019, 26(6): 649–652, 663]
- DONG X, GAO J, ZHANG C Y, *et al.* Neutrophil membrane-derived nanovesicles alleviate inflammation to protect mouse brain injury from ischemic stroke. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 1272–1283
- GOH L L, MANSER E, OUCHI T. The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated *via* a Raf1-like ubiquitin-related domain. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12409
- HAN F, WANG X Q, YANG Q L, *et al.* Characterization of a RacGTPase up-regulated in the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 501–508
- HU M Y, SHEN Y B, XU X Y, *et al.* Identification, characterization and immunological analysis of Ras related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) from grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 54(1): 20–31
- JIA A R, ZHANG X H. cDNA cloning, characterization, and expression analysis of the Rac1 gene from *Scophthalmus maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(1): 80–84
- KIM Y, HORI M, YASUDA K, *et al.* Differences in the gestational pattern of mRNA expression of the Rnd family in rat and human myometria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2005, 142(4): 410–415
- KWON Y S, ANN H S, NABESHIMA T, *et al.* Selegiline potentiates the effects of EGb 761 in response to ischemic brain injury. *Neurochemistry International*, 2004, 45(1): 157–170
- LIU L, HUANG W W, WANG J H, *et al.* Anthraquinone derivative exerted hormetic effect on the apoptosis in oxygen-glucose deprivation-induced PC12 cells via ERK and Akt activated Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 262: 1–11
- LU S, LIU Y, YU X, *et al.* Prediction of genomic breeding values based on pre-selected SNPs using ssGBLUP, WssGBLUP and BayesB for Edwardsiellosis resistance in Japanese flounder. *Genetics Selection Evolution*, 2020, 52: 49
- MOULY L, GILHODES J, LEMARIÉ A, *et al.* The RND1 Small GTPase: Main functions and emerging role in oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3612
- NOBES C D, LAURITZEN I, MATTEI M G, *et al.* A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *Journal of Cell Biology*, 1998, 141(1): 187–197
- OINUMA I, ISHIKAWA Y, KATOH H, *et al.* The semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science*, 2004, 305(5685): 862–865
- OKADA T, SINHA S, ESPOSITO I, *et al.* The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. *Nature Cell Biology*,

- 2015, 17(1): 81–94
- SALAS-VIDAL E, MEIJER A H, CHENG X, *et al.* Genomic annotation and expression analysis of the zebrafish Rho small GTPase family during development and bacterial infection. *Genomics*, 2005, 86(1): 25–37
- SUEHIRO J, KANKI Y, MAKIHARA C, *et al.* Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(42): 29044–29059
- SHUTES A, BERZAT A C, COX A D, *et al.* Atypical mechanism of regulation of the Wrch-1 Rho family small GTPase. *Current Biology*, 2004, 14(22): 2052–2056
- SUN H J, CHEN S L, ZHENG W W, *et al.* Screening for resistance to *Edwardsiella tarda* in different families of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1115–1122 [孙何军, 陈松林, 郑卫卫, 等. 抗迟缓爱德华氏菌病牙鲆家系的筛选与分析. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1115–1122]
- WANG L, SHAO C W, XU W T, *et al.* Proteome profiling reveals immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Edwardsiella tarda* by iTRAQ analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 66: 325–333
- WENNERBERG K, ROSSMAN K L, DER C J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(Pt 5): 843–846
- WENNERBERG K, FORGET M A, ELLERBROEK S M, *et al.* Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Current Biology*, 2003, 13(13): 1106–1115
- XIU Y J, ZHANG H X, WANG S Y, *et al.* cDNA cloning, characterization, and expression analysis of the Rac1 and Rac2 genes from *Cynoglossus semilaevis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 998–1006
- ZAPATA A, DIEZ B, CEJALVO T, *et al.* Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 126–136
- ZHENG W W, CHEN S L, LI Z Y, *et al.* Analyzing of heritability and breeding value of disease resistance for *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(8): 1181–1189 [郑卫卫, 陈松林, 李泽宇, 等. 牙鲆抗迟缓爱德华氏菌性状的遗传力和育种值分析. *农业生物技术学报*, 2016, 24(8): 1181–1189]

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Pattern of *rnd1* and Its Involvement in Disease Resistance in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHANG Ziwei^{1,2}, WANG Lei², LI Kaimin^{2,3}, LU Sheng^{1,2}, ZHENG Weiwei², CHEN Songlin^{1,2}①

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 3. Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract *Edwardsiella tarda* is a major causative pathogen of bacterial ascites in Japanese flounder, leading to massive economic losses, and the discovery of molecular markers linked to disease resistance is an effective strategy in resistance breeding programs. The Rho GTPase family comprises small proteins with a molecular weight of 20~30 kDa. Rho GTPase family members are involved in diverse cellular processes, such as cytoskeleton, cell adhesion, vesicle transport, and proliferation. In addition, they play pivotal roles in infection by different pathogens. Rho-related GTP-binding protein Rho6 (Rnd1), a member of the Rho-GTPase family, participates in various biological functions, including neural junction formation, axonal extension, tumorigenesis, neuronal function, and apoptosis. Some members of the Rho family, such as Rac1 and Rac2, regulate immune response in grass carp, large yellow croaker, zebrafish, and half-smooth tongue sole. However, the function of Rnd1 in fish is poorly understood. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is greatly affected by *E. tarda* infections during the breeding process. In

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

previous studies, whole-genome sequencing and assembly of Japanese flounder were performed, and subsequently, various disease resistance genes were screened to support the improvement of Japanese flounder germplasm resources. To study the role of *Pornd1* in resistance against *E. tarda* infection in Japanese flounder, *Pornd1* was cloned and identified using PCR. The full-length *Pornd1* cDNA was 699 bp, containing an open reading frame encoding a 232-amino acid protein. The predicted molecular weight of PoRnd1 was 26 kDa. Sequence and homology analyses showed that the Rnd1 protein harbors a Rho-GTP superfamily structural domain, which is highly conserved in various species. PoRnd1 shares the highest homology with Rnd1 from *Hippoglossus hippoglossus* (98.28%). On phylogenetic tree, PoRnd1 was clustered with Rnd1 from other fish species. The single-nucleotide polymorphism (SNP) locus associated with *E. tarda* resistance is located at 4 575 720 bp on chromosome 14 of Japanese flounder. The frequency of the T allele in disease-resistant families ($\text{freq}_T=0.92$) was significantly higher than that in susceptible families ($\text{freq}_T=0.20$). The SNP was located at the 2nd intron of *Pornd1*. Real-time quantitative PCR was employed to characterize the expression profiles of *Pornd1* in the tissues of healthy and *E. tarda*-infected fish. *Pornd1* expression was the highest in the heart, followed by the liver, kidney, head kidney, and spleen, but its expression was low in the skin, blood, gills, and muscle. In *E. tarda*-infected fish, the expression of *Pornd1* mRNA decreased after 6 h, then gradually increased, and subsequently reached the highest level after 48 h in the liver, kidney, and spleen. *Pornd1* expression in the kidney and spleen in the 48 h group was significantly higher than that in the 6 and 12 h groups. Furthermore, *Pornd1* expression in the liver of resistant families was significantly higher than that in susceptible families. Based on its His tag, the PoRnd1 recombinant protein was purified using an Ni column and subjected to SDS-PAGE. The target band of PoRnd1 at 32 kDa was observed in the gel after Coomassie Blue staining. The PoRnd1 recombinant protein (0.5 mg/mL) was used to study antibacterial activity through the Oxford cup assay. PoRnd1 significantly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *E. tarda*, and *Vibrio harveyi*. In summary, *Pornd1* may be closely linked to disease resistance in Japanese flounder and can thus serve as an effective gene marker for disease resistance breeding. Our findings provide a theoretical basis for further elucidating the molecular mechanisms of immunity in Japanese flounder.

Key words *Paralichthys olivaceus*; *rnd1*; *Edwardsiella tarda*; Immunity; Antibacterial activity