

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220830002

http://www.yykxjz.cn/

李兆龙, 王腾腾, 韩慧宗, 陈钰臻, 王斐, 张明亮, 孙硕, 解维俊, 姜海滨. 许氏平鲷蛋白激酶 B (*SsAkt*) 基因的克隆及其 mRNA 在细菌胁迫后的表达规律. 渔业科学进展, 2024, 45(1): 47-59

LI Z L, WANG T T, HAN H Z, CHEN Y Z, WANG F, ZHANG M L, SUN S, XIE W J, JIANG H B. Cloning of *SsAkt* in *Sebastes schlegelii* and its expression pattern after bacterial stimulation. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(1): 47-59

许氏平鲷蛋白激酶 B (*SsAkt*) 基因的克隆 及其 mRNA 在细菌胁迫后的表达规律*

李兆龙^{1,2} 王腾腾² 韩慧宗^{2①} 陈钰臻² 王斐²
张明亮² 孙硕² 解维俊^{1,2} 姜海滨^{2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东 烟台 264006)

摘要 为研究蛋白激酶 B (*Akt*) 在许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 应答细菌胁迫过程中的作用, 本研究应用 PCR 技术对许氏平鲷 *Akt* 基因 (*SsAkt*) 的编码区序列进行了克隆和特征分析, 并应用实时荧光定量 PCR 技术检测了健康许氏平鲷各组织和细菌胁迫后肾脏、血液和肝脏中 *SsAkt* mRNA 的表达规律。结果显示, *SsAkt* 的开放阅读框 (ORF) 的长度为 1 440 bp, 编码 479 个氨基酸, 预测其蛋白的相对分子质量为 55.80 kDa, 理论等电点 (pI) 为 5.64。SMART 分析显示, *SsAkt* 蛋白含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的 3 个特征性保守结构域和 2 个磷酸化位点。同源比对发现, *SsAkt* 与鱼类的同源性较高, 与尖嘴鲈 (*Lates calcarifer*) 的相似度最高, 为 99.37%。组织表达分析显示, *SsAkt* 在许氏平鲷健康组织 (血液、鳃、肝脏、肌肉、肾脏、脾脏、肠、脑和心脏) 中均有表达, 在肾脏、脑和血液中的相对表达量较高。许氏平鲷响应细菌胁迫的表达结果显示, 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 感染后, *SsAkt* 在 3 种组织中的表达明显上调, 呈先上升后下降的趋势; 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后, *SsAkt* 在 3 种组织中呈现不同的表达趋势: 在肾脏中, *SsAkt* 的表达趋势为先上升后下降又上升再下降, 而在血液和肝脏中的表达趋势为先上升后下降。以上研究表明, *SsAkt* 响应了外源微生物对许氏平鲷的胁迫, 在抵御外源微生物免疫应答过程中发挥重要作用。本研究结果为许氏平鲷的免疫机理研究奠定了基础。

关键词 许氏平鲷; 蛋白激酶 B; *Akt*; 基因克隆; 表达规律

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)01-0047-13

许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 俗称黑鲷, 隶属鲷形目 (Scorpaeniformes)、鲷科 (Scorpaenidae)、平鲷属 (*Sebastes*), 为冷温性近海底层卵胎生鱼类, 广泛分布于我国黄、渤海以及韩国和日本沿海 (刘阳等, 2019;

Feng *et al.*, 2014)。其肉质鲜嫩味美、营养丰富、药用价值高, 是我国北部沿海地区海水鱼类中最重要的经济种类之一 (王腾腾, 2017)。近年来, 我国深水网箱养殖发展较为迅速, 在适合我国北方网箱养殖的经济

* 财政部和农业农村部: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-47)、山东省重点研发计划项目 (2021LZGC028)、山东省自然科学基金 (ZR2020QC202) 和烟台市科技创新发展计划项目 (2020MSGY073; 2021XDHZ054) 共同资助。李兆龙, E-mail: w1211lzl@163.com

① 通信作者: 姜海滨, 研究员, E-mail: haibinjiang326@163.com; 韩慧宗, 副研究员, E-mail: hanhuizong729@163.com
收稿日期: 2022-08-30, 收修改稿日期: 2022-10-07

鱼种中,许氏平鲈是最为重要且具备优良品质和特性的本土养殖品种。但随着养殖产业规模的扩大,养殖病害时有发生,以细菌性疾病居多,如哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) (李赞等, 2021)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) (Mohamad *et al.*, 2019)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) (Takahashi *et al.*, 2008)等,这些病原菌侵染后会导致鱼体皮肤溃疡、体表充血,严重时会引起大量死亡,造成较大的经济损失,严重制约了许氏平鲈养殖产业的健康发展。开展细菌感染与免疫的分子机制研究,可以清楚地认识机体对抗细菌感染的应答机制,对许氏平鲈细菌性疾病的防治有重要意义。

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 又称 Akt 蛋白, 是一种丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)蛋白激酶, 它主要通过磷酸化其他蛋白质进行信号传导(Koul *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 1991), 是重要的细胞信号转导分子, 在细胞存活、细胞代谢、转录调控、细胞周期调控、免疫防御、胚胎发育等多种生物过程中发挥重要作用(姜华等, 2004)。活化的 Akt 可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、GSK-3、Caspase9、FoxO1、NF-KB 和 mTOR 等, 进而调节细胞的增殖、分化、凋亡及迁移等过程(徐丹丹等, 2014; 刘荣雕等, 2013)。目前, 有关水产生物 Akt 基因的研究主要集中在细胞存活和免疫防御方面, 如 Zhou 等(2020)对水蚤(*Daphnia pulex*) Akt 基因处理后发现, 其成活率和繁殖能力显著降低; 刘丽等(2020)研究发现, 仿刺参(*Apostichopus japonicus*) Akt 基因的转录表达水平在受到灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)感染刺激后显著上调; 明月等(2021)使用传染性脾坏死病毒(ISKNV)侵染鳊(*Siniperca chuatsi*), 发现 *ScAkt2* 表达可抑制 ISKNV 的增殖, 对病原的复制、增殖具有抑制作用。这些研究表明, Akt 基因可能在水生动物的病原胁迫调控中发挥重要作用。陈钰臻(2021)利用分离自患病许氏平鲈病灶处的哈维氏弧菌 P5W 开展了许氏平鲈应答弧菌胁迫后脾脏的转录组分析, 发现 Akt 是应答弧菌胁迫过程中的免疫差异基因。目前, 尚无有关许氏平鲈 Akt 基因(*SsAkt*)序列特征和蛋白结构与功能研究的报道。

本研究基于前期转录组数据, 应用 PCR 技术克隆 *SsAkt* 基因的编码区序列, 对其序列特征进行生物信息学分析, 并应用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析其 mRNA 在健康许氏平鲈各组织和响应细菌胁迫后的表达规律, 旨在探究 *SsAkt* 在许氏平鲈抵御细菌入侵过程中发挥的作用, 为许氏平鲈免疫机理研究提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

生长健康、活力良好的许氏平鲈幼鱼 192 尾, 体长为(18.25±0.52) cm, 体重为(41.83±3.57) g, 购于山东威海圣航海洋科技有限公司, 运至山东省海洋资源与环境研究院进行实验。实验鱼暂养于 15~17 °C 海水 7 d 后用于实验。随机选取 12 尾幼鱼个体, 麻醉后分别取血液、鳃、肝脏、肌肉、肾脏、脾脏、肠、脑和心脏组织, 液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱备用。180 尾幼鱼随机分为 3 组, 每组 3 个平行, 每个平行 20 尾; 3 组实验鱼分别腹腔注射 100 μL 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) (0.5×10^8 CFU/mL)、鳃弧菌(0.5×10^8 CFU/mL)和磷酸缓冲盐溶液(PBS), 分别在 0、6、12、24、48、72 和 96 h 选取 6 尾个体, 麻醉后采集肝脏、血液和肾脏组织, 液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取许氏平鲈各组织的总 RNA, 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop OneC 超微量分光光度计(Thermo, 美国)检测 RNA 完整性和浓度, 质量合格的总 RNA 保存于-80 °C 冰箱备用。用于 *SsAkt* 基因核心序列克隆的 cDNA 采用 TransScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒合成, 反应体系(20 μL): 1 μL Oligo dT Primer, 10 μL 2× ES Reaction Mix, 1 μL EasyScript® RT/RI, 1 μL 模板 RNA, 7 μL RNase-free H₂O; 反应程序: 42 °C 15 min; 85 °C 加热 5 s 失活 EasyScript® RT/RI, 合成后的 cDNA -20 °C 条件下保存备用。用于荧光定量分析的 cDNA 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)合成, 反应体系为 20 μL: 初始反应体系为 2 μL 5×gDNA Eraser Buffer、1 μL gDNA Eraser、1 μL Total RNA 和 6 μL RNase-free H₂O, 42 °C 反应 2 min; 后在反应液中依次加入 1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I、1 μL RT PrimerMix、4 μL 5×PrimeScript Buffer 2 和 4 μL RNase-free H₂O, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 反应样品 4 °C 保存。

1.3 *SsAkt* 基因核心序列的克隆

根据本实验室构建的许氏平鲈转录组预测的注释信息, 比对获取 *SsAkt* 的预测序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。以头肾的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获取 *SsAkt* 基因的 ORF。PCR 体系为 25 μL: 1 μL cDNA 模板, 正反向引物各 0.5 μL,

2×TransStart® FastPfu Fly PCR SuperMix 12.5 μL, ddH₂O 补足到 25 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。扩增完成后, 通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带, 将大小与目的片段一致的扩增条带使用 TaKaRa MiniBEST AgaroseGel DNA Extraction Kit V4.0 (TaKaRa, 中国) 切胶回收, 将回收产物连接 pEASY-E1 载体(全式金, 北京)后, 转化到 Trans-T1 感受态细胞(全式金, 北京)中, 加入无抗 LB 液体培养基振荡培养 1 h 后涂平板(含氨苄青霉素), 37 °C 过夜培养, 挑取 8 个阳性克隆扩大培养, PCR 验证合格后将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司青岛测序实验室测序。

1.4 生物信息学分析

使用 NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 确定 *SsAkt* 的开放阅读框, 使用 NCBI Blastx 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源分析, 使用 ExPASy 程序 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测其相对分子量和理论等电点, 使用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测氨基酸结构和功能结构域, 使用 DNAMAN 对同源蛋白进行多序列比对, 使用 MEGA 7.0 软件以邻接法

(neighbor-joining) 构建系统进化树, 利用 Phyre2 软件预测蛋白质二级结构 (Kelley *et al.*, 2015); 利用 SWISS-MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测三级结构, 利用 pyMOL 软件展示。

1.5 实时荧光定量 PCR

根据 *SsAkt* 基因的核心序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计一对荧光定量特异性引物 *SsAkt*-RT-F1 和 *SsAkt*-RT-R1 用于 RT-qPCR 检测; 以许氏平鲈 *β-actin* 为内参基因(表 1), 使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 中国) 试剂和 LightCycler® 480 II Real Time instrument (Roche, 瑞士) 进行 RT-qPCR, 每个 cDNA 样品设置 3 个技术重复。反应体系为 20 μL: 10 μL 2× TB Green Premix Ex Taq, 7.2 μL RNase-free H₂O, 0.4 μL 正向引物和 0.4 μL 反向引物, 2 μL cDNA 模板。反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 95 °C 5 s; 60 °C 1 min; 95 °C, 50 °C 30 s。所得实验数据采用相对 CT 法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 计算 *SsAkt* 基因 mRNA 相对表达量, 所得数据结果均以平均值±标准差 (Mean±SD) 表示, 使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 设定 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, 使用 Origin Pro 8.0 软件对定量结果作图。

表 1 *SsAkt* 基因克隆扩增引物
Tab.1 Amplification primers used for cloning *SsAkt* genes

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	扩增目标 Amplification target	产物大小 Product size/bp
<i>SsAkt</i> -F1	ATGAGCGATGTCACCATCGTTAGA	核心序列 Core sequence	1 440
<i>SsAkt</i> -R1	TCATTCCCGGCCGCTGG	核心序列 Core sequence	
<i>SsAkt</i> -RT-F1	GCTTCTTCTCTGGCGTTGACTGG	RT-qPCR	144
<i>SsAkt</i> -RT-R1	TCTCTGGTGGAGTGATCGTGATGG	RT-qPCR	
<i>β-actin</i> -F	GCATCACACCTTCTACAATGAGC	RT-qPCR	180
<i>β-actin</i> -R	GCTCATAGCTTCTCCAGGG	RT-qPCR	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	基因组验证 Verifying the genomic	1 647
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	基因组验证 Verifying the genomic	

2 结果与分析

2.1 *SsAkt* 基因核心序列的克隆及氨基酸序列分析

SsAkt 基因的开放阅读框(ORF)长度为 1 440 bp, 编码 479 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 55.80 kDa, 预测理论等电点(pI)为 5.64 (图 1)。蛋白结构域预测分析显示, *SsAkt* 蛋白包含 3 个保守结构域: PH 结构域(6~109 aa), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化(S_TKc)结构域(148~405 aa), 丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶

(S_TK_X)结构域(406~475 aa) (图 2)。保守的氨基酸位点出现在 S_TKc 结构域的中心处以及 S_TK_X 结构域的末端: Thr³⁰⁵ 和 Ser⁴⁷²。

蛋白质二级结构预测结果显示, *SsAkt* 由 α -螺旋和 β -折叠以及 TM 螺旋组成(图 3), 其中含有 31% 的 α -螺旋和 19% 的 β -折叠及 3% 的 TM 螺旋, 其余为无序结构。同源建模工具预测的三维结构模型显示, *SsAkt* 与其他物种 Akt 的三维结构具有较高相似度, 与智人 (*Homo sapiens*) Akt 蛋白 (Swiss-model 模板号: 6hhg.1.A) 的一致性较高, 为 81.18% (图 4)。

1 M S D V T I V R E G W L Q K R G E Y I K N W R P R
 1 ATGAGCGATGTCACCATCGTTAGAGAGGGATGGCTCCAGAAACGGGTGAATATATAAAGAACTGGCGCCGCGT
 26 Y F L L K T D G S F I G Y K E K P Q D A D L P Y P
 76 TACTTCCTGTTGAAGACAGACGGCTCCTTCATCGGCTACAAAGAGAACTCAGGACGCCGACCTGCCCTACCCC
 51 L N N F S V A K C Q L M K T E R P K P N T F I I R
 151 CTAATAACTTCTCTGTAGCAAAATGTCAGCTGATGAAGACGGAGAGCCGAAGCCAAACACCTTCATCATACGC
 76 C L Q W T T V I E R T F H V D S P D E R D E W T E
 226 TGCCTCCAGTGGACCACCGTCATCGAGAGGACCTCCACGTGGACTCGCTGACGAGAGATGAGTGGACAGAG
 101 A I Q M V A D K L Q R Q E E E R I Q S S P T S N I
 301 GCCATCCAGATGGTGGCTGACAAGCTGCAGAGACAAGAGGAGGAGGATTCAGAGCAGCCACCTCCAACATC
 126 D N M V E E E M D I S T T H H K R K T M S D **F D Y**
 376 GACAACATGGTCGAGGAAGAGATGGACATCTCCACCACACACCACAAACGAAGACAATGAGCGACTTTGACTAC
 151 **L K L L G K G T F G K V I L V R E K A S G K Y Y A**
 451 CTGAAGCTGCTGGGAAAGGGAACATTCGGAAGGTAATTCTTGCCGAGAAAAGCCAGCGGAAATACTACGCC
 176 **M K I L K K E V I I A K D E V A H T L T E S R V L**
 526 ATGAAAATCCTTAAAAAGAAGTCATCATAGCCAAGGATGAGGTGGCTCACACTCACAGAGAGAGAGTGTG
 201 **K N T R H P F L T S L K Y S F Q T K D R L C F V M**
 601 AAAAACACCAGACACCCCTTCTCACTTCAATGAAGTATTCATTCAGACTAAAGACCGCCTCTGTTTCGTCATG
 226 **E Y V N G G E L F F H L S R E R V F S E E R T R F**
 676 GAGTATGTGAATGGAGGAGAGCTGTTTTCCATTTGTCCAGAGAGCGGGTGTCTCAGAGAGCGCACGCGCTC
 251 **Y G A E I V S A L D Y L H S A K I V Y R D L K L E**
 751 TACGGCGCCGAGATCGTCTCGGCACTCGACTACCTGCATTAGCCAAGATTGTGTACCGGGACCTCAAGTTAGAA
 276 **N L M L D K D G H I K I T D F G L C K E G I T D A**
 826 AACCTGATGCTGGATAAAGACGGCCACATCAAATCACTGATTTCCGGCTCTGCAAGGAGGCATCACAGACGCT
 301 **A T M K T F C G T P E Y L A P E V L E D N D Y G R**
 901 GCTACCATGAAGACTTCTGTGGCAGCCCGAGTACCTCGCACCTGAGGTCCTGGAGGACAACGACTACGGTCGG
 326 **A V D W W G L G V V T Y E M M C G R L P F Y N Q D**
 976 GCGGTGGACTGGTGGGGTTGGGCGTGGTGACGTACGAGATGATGTGGCGCCGACTGCCGTTCTACAACCAGGAC
 351 **H E K L F E L I L M E D I K F P R T L S S D A K S**
 1051 CACGAGAAGCTGTTGAGCTCATCTCATGGAGGACATCAAGTCCCGCGCACTCTGTGCTCCGACGCCAAGTCC
 376 **L L S G L L I K D P N K R L G G G P D D A K E I M**
 1126 CTGCTGTCCGGCCTGCTCATCAAAGACCCCAACAAACGGCTCGGTGGAGGACCAGATGACGCTAAAGAAATAATG
 401 **R H S F F S G V D W Q D V Y D K K M V P P F K P Q**
 1201 AGACACAGCTTCTTCTGCGTGGACTGGCAGGATGTATATGATAAAAAGATGGTCCCTCCCTCAAGCCTCAG
 426 V T S E T D T R Y F D E E F T A Q T I T I T P P E
 1276 GTGACGTCGGAGACGGACACCAGATACTTCGACGAGGAGTTCACGGCCAGACCATCAGATCACTCCACCAGAG
 451 K F D E D G M D C L D N E R R P H F P Q F **S** Y S A
 1351 AAATTCGACGAGGACGGATGGACTGTCTGGACAACGAGAGACGACCGCACTCCCACAGTTCCTACTCCGCC
 476 S G R E *
 1426 AGCGGCCGGGAATGA

图1 *SsAkt* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *SsAkt*

波浪下划线表示 PH 结构域；阴影表示 S_TKc 结构域；

下划线表示 S_TK_X 结构域；红框表示保守的磷酸化位点。

Wavy underline represents PH domain; S_TKc domain is shaded, the underline shows S_TK_X domain, and the conserved phosphorylation sites are displayed in red frame.

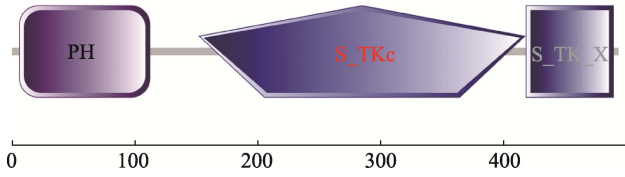


图 2 SsAkt 蛋白结构域预测

Fig.2 Structure prediction of SsAkt domains

水平灰条表示预测没有功能域的氨基酸序列, 框内则表示预测有功能域的区域。SsAkt 包含 3 个结构域:

PH 结构域, S_TKc 结构域, S_TK_X 结构域。

Horizontal gray bars represent amino acid sequences predicted to have no functional domains, and boxes represent regions predicted to have functional domains. SsAkt contains three domains: PH domain, S_TKc domain, and S_TK_X domain.

2.2 SsAkt 多序列比对和系统进化分析

通过 NCBI 的 BLAST 比对, 发现 SsAkt 蛋白序列与其他物种的 Akt 蛋白序列有较高的相似性(图 5)。将 SsAkt 氨基酸序列与青鳉(*Oryzias latipes*)(XP_023819560.1:1-479)、斑马鱼(*Danio rerio*)(NP_001268730.1)、凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)(AHY28871.1)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)(CAA81204.1)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)(XP_018087413.1)、贻贝(*Mytilus edulis*)(CAG2211774.1) 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(XP_010744471.1:1-479)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)(XP_018552530.1:1-479)、鲤(*Cyprinus carpio*)(CAA81204.1)、智人



图 3 SsAkt 蛋白的二级结构预测

Fig.3 Secondary structure prediction of the SsAkt

绿色螺旋表示 α -螺旋, 蓝色箭头表示 β -折叠, 金色螺旋表示 TM 螺旋。

Green helices indicate α -helices, blue arrows indicate β -sheets, and golden helices indicate TM helices.

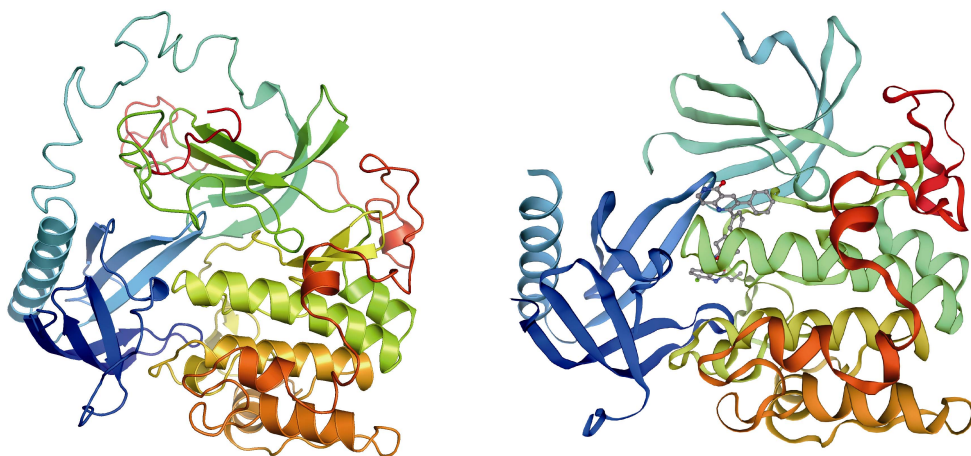


图 4 SsAkt 蛋白的三级结构预测(左)和智人 Akt 蛋白三级结构(右)

Fig.4 The predicted spatial structure of SsAkt (left) and the predicted 3D structure of human Akt protein (right)

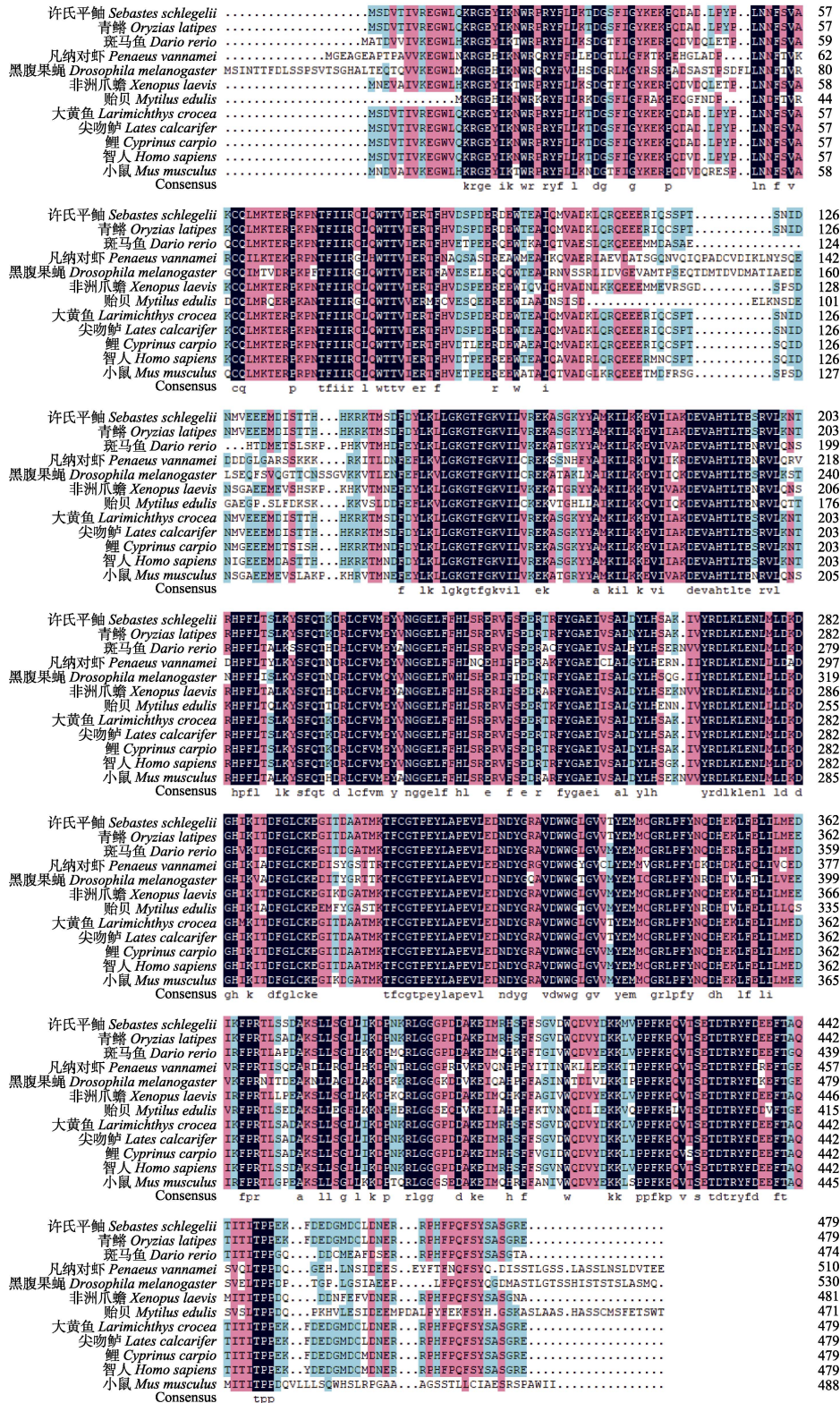


图5 许氏平鲈与其他物种 Akt 氨基酸序列的多重比对

Fig.5 Multiple alignment of the deduced amino acids of Akt among *S. schlegelii* and other different species

(KAI4085561.1) 和 小 鼠 (*Mus musculus*) (NP_001159366.1)的 Akt 氨基酸序列进行同源性比对,发现 SsAkt 蛋白序列与其他物种的 Akt 有较高的相似

性,相似性范围为 55.84%~99.37%。其中, SsAkt 与尖吻鲈的相似性最高,为 99.37%;而与凡纳对虾的相似性最低,为 55.84%。

根据 *SsAkt* 和 荫平鲷 (*Sebastes umbrosus*) (XP_037639240.1:1-479)、尖吻鲈 (XP_018552530.1:1-479)、大黄鱼 (XP_010744471.1:1-479)、鲤 (XP_042624730.1:1-479)、鲫 (*Carassius auratus*) (XP_026079993.1:1-479)、斑马鱼 (NP_001268730.1)、青鳉 (XP_023819560.1:1-479)、非洲爪蟾 (XP_018087413.1)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) (AHY28871.1)、凡纳对虾 (AHY28871.1)、青蟹 (*Scylla paramamosain*) (ASF83356.1)、黑腹果蝇 (CAA81204.1)、香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) (ALN96976.1)、贻贝 (CAG2211774.1)、智人 (XP_047287031.1)、小鼠 (NP_001159366.1)、绵羊 (*Ovis aries*) (NP_001155329.1) 和 欧亚野猪 (*Sus scrofa*) (BAH57696.1) 的 *Akt* 氨基酸序列, 以 MEGA 7.0 软件采用邻接法构建 *SsAkt* 的系统进化树。结果显示, 19 种 *Akt* 主要分成脊椎动物和无脊椎动物两大分支: 脊椎动物中, *SsAkt* 先与亲缘

关系相近的荫平鲷、大黄鱼以及尖吻鲈等海水鱼的 *Akt* 氨基酸聚群, 然后与青鳉、鲤、鲫、斑马鱼、非洲爪蟾、欧亚野猪、绵羊、小鼠和智人的 *Akt* 聚集在一支; 无脊椎动物的 *Akt*, 包括中国对虾、凡纳对虾、青蟹、黑腹果蝇、香港牡蛎和贻贝等聚为一个分支, 表明该基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致 (图 6)。

2.3 *SsAkt* 基因 mRNA 在健康组织中的表达分析

SsAkt 基因的 mRNA 在健康许氏平鲷不同组织中的表达分析结果显示, *SsAkt* 在血液、鳃、肝脏、肌肉、肾脏、脾脏、肠和心脏中均有表达, 但表达水平各不相同。其中, 肾脏中相对表达量最高, 是肌肉中的 50 倍 ($P < 0.05$); 在脑、血液、脾脏和心脏中表达量较高; 在肠道、鳃和肝脏中的表达较低; 在肌肉中的表达量最低 (图 7)。

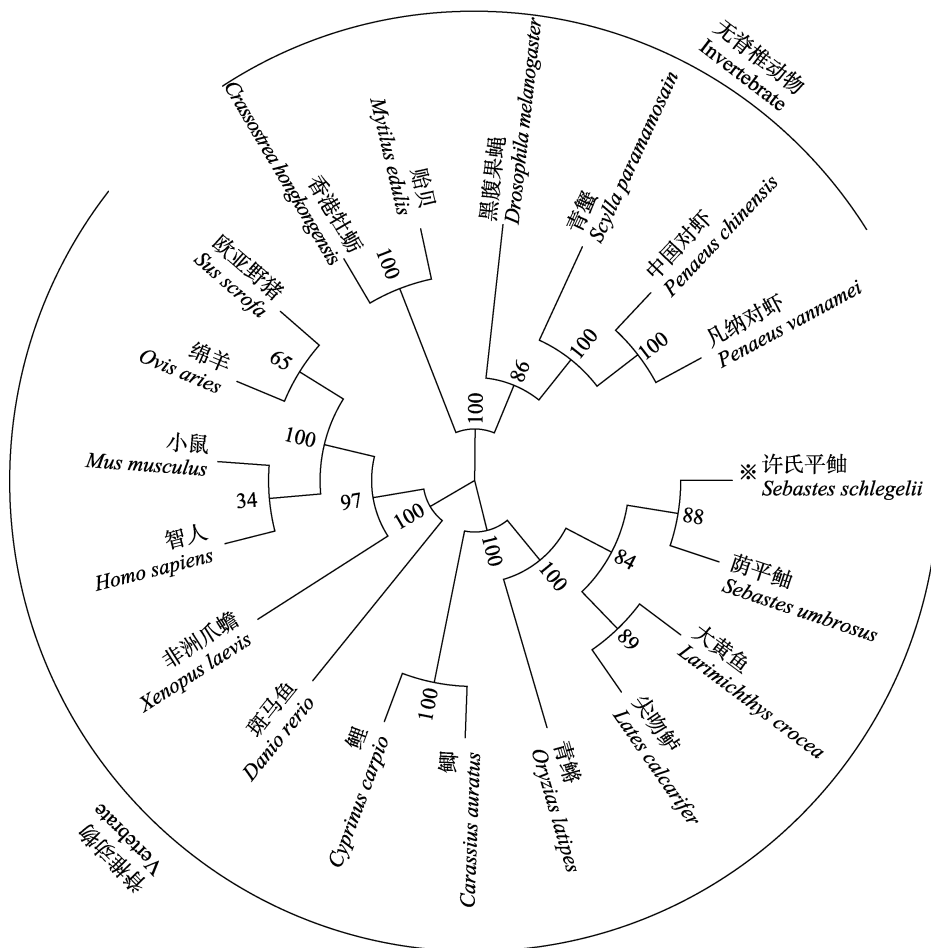


图 6 基于 *SsAkt* 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化分析

Fig.6 Neighbor-joining phylogenetic tree based on *Akt* amino acid sequence from *S. schlegelii*

用 “*” 标记 *SsAkt*; 树节点上的数字表示 1 000 次重复之后的百分比。

The *SsAkt* of *S. schlegelii* is marked with “*”, and the number on the tree nodes indicate the percentage after 1 000 replicates.

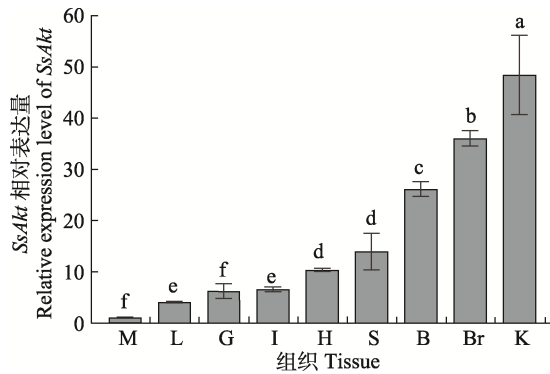


图7 *SsAkt* 基因在不同组织中的相对表达量
Fig.7 Relative expression level of *SsAkt* gene in different tissues of *S. schlegelii*

不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

M: 肌肉; L: 肝脏; G: 鳃; I: 肠道; H: 心脏;
S: 脾脏; B: 血液; Br: 脑; K: 肾脏

Different lower-case letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

M: Muscle; L: Liver; G: Gill; I: Intestine; H: Heart; S: Spleen;
B: Blood; Br: Brain; K: Kidney

2.4 细菌感染后 *SsAkt* 基因 mRNA 在免疫组织中的表达分析

藤黄微球菌、鳗弧菌感染后, *SsAkt* 在肾脏、血液和肝脏中均有显著性表达差异。在肾脏中, 藤黄微球菌和鳗弧菌刺激后, *SsAkt* 的表达模式不同: 藤黄微球菌刺激后, *SsAkt* 的表达呈先上升后下降的趋势, 具体表现为 12 h 时相对表达量显著升高($P < 0.01$), 达到表达量的峰值, 24 h 时表达量显著下降, 48 h 时恢复至对照组水平; 鳗弧菌刺激后, *SsAkt* 的表达呈先上升后下降又上升再下降的规律, 具体表现为 6 h 时 *SsAkt* 的相对表达量开始显著升高($P < 0.05$), 至 12 h 时升到最高, 24 h 时显著下降($P < 0.01$), 48 h 再次显著升高($P < 0.05$), 于 72 h 到达峰值($P < 0.01$), 96 h 时恢复至原有对照组水平(图 8)。在血液和肝脏中, 藤黄微球菌和鳗弧菌刺激后, *SsAkt* 的表达模式相似, 均呈先上升后下降的趋势。在血液中, 2 种细菌刺激后, 24 h 时 *SsAkt* 的相对表达量均显著升至最高($P < 0.05$), 48 h 时鳗弧菌刺激组恢复至对照组水平, 而藤黄微球菌组 48 h 时依然保持显著高表达($P < 0.05$), 72 h 时恢复至对照组水平(图 9); 在肝脏中, 藤黄微球菌刺激后, *SsAkt* 的相对表达量在 24 h 时显著升至最高($P < 0.05$), 至 48 h 时恢复至对照组水平; 而鳗弧菌刺激后, *SsAkt* 的相对表达量在 12、24、48 h 时显著持续升高($P < 0.01$), 48 h 时到达最高峰, 72 h 时表达量显著下降($P < 0.05$), 至 96 h 恢复至对照组水平(图 10)。

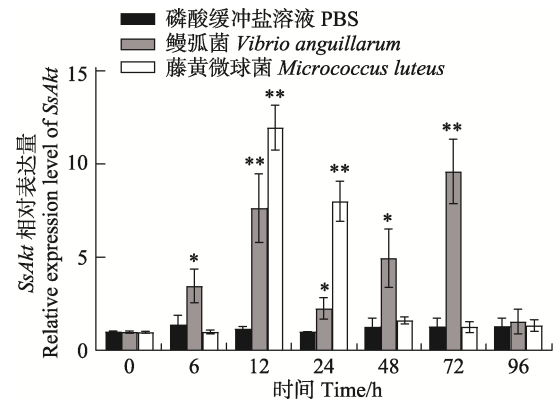


图8 细菌感染下许氏平鲉肾脏中 *SsAkt* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig.8 Relative expression level of *SsAkt* mRNA in kidney of *S. schlegelii* after pathogens infection

*: 差异显著($P < 0.05$); **: 差异极显著($P < 0.01$)。下同。
*: Significant difference ($P < 0.05$); **: Highly significant difference ($P < 0.01$). The same below.

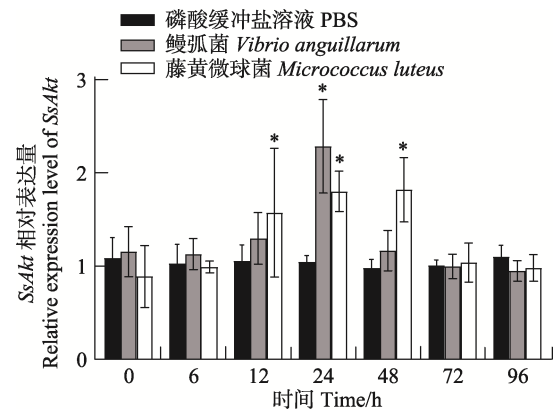


图9 细菌感染下许氏平鲉血液中 *SsAkt* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig.9 Relative expression level of *SsAkt* mRNA in blood of *S. schlegelii* after pathogens infection

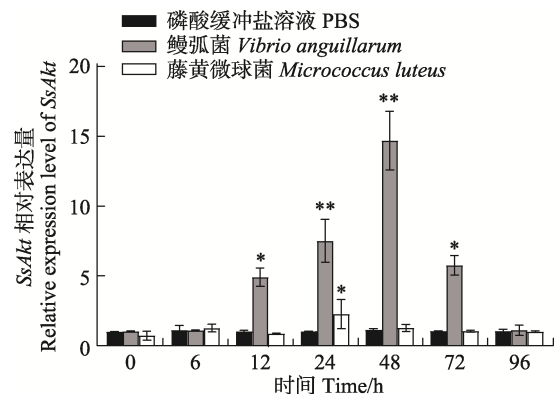


图10 细菌感染下许氏平鲉肝脏中 *SsAkt* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig.10 Relative expression level of *SsAkt* mRNA in liver of *S. schlegelii* after pathogens infection

整个实验过程中, 磷酸缓冲盐溶液刺激后, *SsAkt* 在肾脏、血液和肝脏中的相对表达量均未发生显著变化 ($P>0.05$)。

3 讨论

PI3K-Akt 信号通路是细胞内重要信号转导通路之一, 在维持细胞增殖、存活和凋亡中发挥关键作用。*Akt* 作为 *PI3K-Akt* 信号通路中的核心分子, 能够通过磷酸化其他蛋白质的方式传导多种信号产生的刺激, 参与细胞增殖、细胞代谢、细胞凋亡等多种细胞过程, 在生物的生长发育、免疫应答过程中发挥重要作用 (刘丽等, 2019)。因此, 深入开展 *Akt* 基因在水产动物生长发育、免疫防御等过程中所介导或参与的主要细胞通路及调控网络研究, 对于水产动物种质保护、分子辅助育种及病害防控具有重要意义。本研究以许氏平鲈为研究对象, 成功克隆了 *SsAkt* 基因的核心片段, 预测了其编码蛋白的分子量为 55.81 kDa, 与已报道的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *Akt* 分子量 (55.76 kDa) (刘丽等, 2019)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) *Akt3* 分子量 (55.76 kDa) (于鸿燕, 2015)、九孔鲍 (*Haliotis diversicolor*) *Akt* 分子量 (55.35 kDa) (刘丽等, 2019)、仿刺参 *Akt* 分子量 (55.57 kDa) (刘丽等, 2020) 大小相近, 与中国对虾 *Akt* (迟艳红等, 2013) 的分子量 (58.92 kDa) 相差较大。研究表明, 斑马鱼 (谌爽等, 2011)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) (田志环等, 2018)、香港牡蛎 (Wang *et al.*, 2015) 等不同种类的水产动物的 *Akt* 蛋白氨基酸序列中均存在 PH 结构域、激酶催化结构域 (S_TKc) 和调节结构域 (S_TK_X), 且具有相同的排列顺序 (刘丽等, 2019)。本研究发现, 许氏平鲈 *SsAkt* 同样包含 3 个典型的保守结构域, 分别为 PH 结构域 (6~109 aa)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化 (S_TKc) 结构域 (148~405 aa) 和丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶 (S_TK_X) 结构域 (406~475 aa)。其中, PH 结构域可介导蛋白质-蛋白质或蛋白质-脂质之间的相互作用 (Bottomley *et al.*, 1998); S_TKc 结构域具有 *Akt* 活化所必需的 Thr³⁰⁵ 位点, 是催化丝氨酸/苏氨酸磷酸化活性的区域; 激酶 S_TK_X 结构域具有 *Akt* 完全活化所必需的第 2 个磷酸化位点 Ser⁴⁷ (Wang *et al.*, 2015)。保守的 *Akt* 结构组成特征决定了该蛋白在水产动物体内发挥相同或相似的生物学特征 (Ruan *et al.*, 2014)。氨基酸序列比对显示, *SsAkt* 的 S_TKc 结构域与其他生物的 S_TKc 结构域高度保守, 说明 *SsAkt* 与大多数生物的 *Akt* 同源性较高。值得注意的是, *SsAkt* 的氨基酸序列与尖吻鲈 *Akt* 的相似度最高, 达

99.37%, 与大黄鱼、青鲙、鲤的相似度高于 95%, 与哺乳动物智人和小鼠的相似度高于 75%, 与无脊椎动物凡纳对虾、贻贝的相似度高于 55%, 说明亲缘关系越近的物种, 同源性越高。许氏平鲈 *SsAkt* 的系统进化分析显示, *SsAkt* 先与尖吻鲈、大黄鱼、青鲙等鱼类聚为一类, 再与小鼠、智人等哺乳动物聚为一支, 最后与无脊椎动物聚为一支, 这与传统的许氏平鲈进化和分类地位一致, 也在一定程度上为许氏平鲈的进化位置提供了证据。

斑马鱼 (谌爽等, 2011)、仿刺参 (刘丽等, 2020)、中华绒螯蟹 (田志环等, 2018) 等水生生物 *Akt* 基因的组织表达具有广泛分布的特点, 与以上研究结果相似, 本研究发现, 许氏平鲈 *SsAkt* 在所检测的 9 种组织中均有分布, 表明 *Akt* 可能广泛参与机体各种生理活动。但 *SsAkt* 在不同组织中的表达存在显著的差异性, 在许氏平鲈肾脏中的表达水平最高, 在血液、脾脏等鱼类重要的免疫器官 (Zapata *et al.*, 2006) 中表达水平也相对较高, 推测其可能在免疫调控中发挥重要作用, 相同的推论在智人 (Meier *et al.*, 1997)、白绒山羊 (cashmere goat) (杨娇馥等, 2011)、长白猪 (Landrace pig) (钟宇等, 2014; 刘庆礼等, 2014)、凡纳对虾 (刘荣雕, 2013) 等生物 *Akt* 基因的组织表达谱中也能得出, 不同的是它们呈现高表达量的组织部位不同。此外, 本研究显示, *SsAkt* 在许氏平鲈脑组织中也呈现较高的表达量, 在 9 种检测组织中位居第二, 表明该基因与神经发育和神经细胞存活的维持等过程密切相关, 这与斑马鱼 (谌爽等, 2011)、小鼠 (Yang *et al.*, 2003) 的研究结果相似。*Akt* 在不同物种各组织中的广泛分布和表达特异性, 表明该基因在不同物种和不同组织中的表达都是相对保守的, 证实了其功能的重要性 (杨娇馥等, 2011)。

为了进一步探究 *SsAkt* 参与的免疫防御机制, 本研究使用藤黄微球菌 (G⁺) 和鳃弧菌 (G⁻) 感染许氏平鲈, 定量检测了肾脏、血液和肝脏中 *SsAkt* 的表达变化。结果发现, 经外源微生物刺激后, 3 个组织中 *SsAkt* 的表达水平相较于对照组 (PBS) 均呈显著上调趋势, 这与大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) (Wei *et al.*, 2020)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (孙璐明等, 2016) 等海水鱼 *Akt* 基因受外源微生物刺激后的表达模式相似, 表明 *Akt* 参与了海水鱼抵御外源微生物的过程。虽然 2 种细菌刺激后 *SsAkt* 的表达均呈显著上调趋势, 但 *SsAkt* 的表达模式、应答时间以及应答周期等方面存在差异, 表明 *SsAkt* 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的响应机理不同。通过比较 2 种细菌刺激许氏

平鲈后 *SsAkt* 的表达趋势发现: 鳗弧菌刺激后, *SsAkt* 在肾脏中的表达相较于藤黄微球菌刺激的时间早、周期长、模式复杂, 在血液中达到峰值时表达量高, 在肝脏中表达时间早、周期长, 达到峰值时表达量高, 这些现象说明, *SsAkt* 更容易被革兰氏阴性菌诱导, 且对革兰氏阴性菌刺激的应答更迅速。在分析 *SsAkt* 应答外源微生物刺激后的响应趋势时, 发现 2 种细菌刺激后血液和肝脏中 *SsAkt* 的表达模式相似, 均呈先上升后下降的趋势; 但在肾脏中, 2 种细菌刺激后 *SsAkt* 的表达模式不同: 藤黄微球菌刺激后, *SsAkt* 的表达先上升后下降趋势, 而鳗弧菌刺激后, *SsAkt* 的表达呈先上升后下降又上升再下降的趋势, 表明许氏平鲈的肾脏是 *SsAkt* 发挥免疫防御功能的重要场所, 这一结论在许氏平鲈 *SsAkt* 不同组织的表达谱中同样可以被证实。鱼类抵抗病原的免疫应答中, 先天性免疫在感染初期发挥主要作用, 由肾脏、脾脏及黏膜相关淋巴组织执行(Ellis, 2001), 这可能是 *SsAkt* 在肾脏中响应细菌胁迫时间早于血液和肝脏的原因。灿烂弧菌感染仿刺参后, 体腔细胞中 *AjAkt* 的表达趋势(刘丽等, 2020)以及鳗弧菌感染中国对虾后头胸部 *FcAkt* 的表达呈先上升后下降又上升再下降的趋势, 与本研究鳗弧菌刺激后肾脏 *SsAkt* 的表达趋势一致, 但鳗弧菌感染香港牡蛎后, 血细胞中 *ChAkt1* 的表达趋势未出现二次上升和下降的趋势, 而真菌刺激后, *Akt* 却表现出先上升后下降又上升再下降的趋势(Wang *et al.*, 2015), 这表明 *Akt* 在不同生物中应答外源微生物刺激的响应方式不尽相同, 在外源微生物胁迫和适应中具有种间差异性。

综上所述, 本研究报道了许氏平鲈 *Akt* 基因的核心序列, 预测了 *SsAkt* 蛋白的结构和功能, 揭示了 *SsAkt* 进化的保守性, 分析了 *SsAkt* 在许氏平鲈不同组织以及细菌胁迫后的表达规律, 进一步丰富了海水鱼类 *Akt* 同源基因的研究数据。但 *SsAkt* 蛋白对外源微生物的作用方式尚不明确, 后续将进一步构建 *SsAkt* 编码蛋白的重组载体, 获取重组蛋白, 制备重组蛋白抗体, 进一步分析 *SsAkt* 编码蛋白的功能, 为研究 *Akt* 的免疫防御功能提供理论指导, 为许氏平鲈病害防控提供分子生物学数据参考。

参 考 文 献

- BOTTOMLEY M J, SALIM K, PANAYOTOU G. Phospholipid-binding protein domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1436(1/2): 165-183
- CHEN S, ZHOU J F, LU L, *et al.* Molecular cloning, expression and overexpression analysis of *AKT3 (PKB γ)* in zebrafish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 717-726 [湛爽, 周建峰, 卢玲, 等. 斑马鱼 *akt3* 基因的克隆及其表达图谱与过表达分析. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 717-726]
- CHEN Y Z. Isolation and characterization of *Vibrio harveyi* P5W and transcriptome analysis of its infections in *Sebastes schlegelii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2021 [陈钰臻. 哈维氏弧菌 P5W 的分离鉴定、特性分析及其感染后许氏平鲈的转录组分析. 上海海洋大学硕士学位论文, 2021]
- CHI Y H, LI S H, WANG D D, *et al.* Expression and function analysis of *Akt/PKB* in pathogens-challenged Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 611-617 [迟艳红, 李诗豪, 王冬冬, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) *Akt/PKB* 基因在病原刺激下的表达和功能分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 611-617]
- ELLIS A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25(8/9): 827-839
- FENG J, LIU L, JIANG H, *et al.* Histological observation of germ cell development and discovery of spermatophores in ovoviviparous black rockfish (*Sebastes schlegelii* Hilgendorf) in reproductive season. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(5): 830-836
- JIANG H, ZHANG X J. PKB/Akt: A protein kinase with multiple functions. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2004, 16(3): 148-153, 164 [姜华, 张学军. PKB/Akt: 一个具有多种功能的蛋白激酶. *生命科学*, 2004, 16(3): 148-153, 164]
- JONES P F, JAKUBOWICZ T, PITOSI F J, *et al.* Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(10): 4171-4175
- KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858
- KOUL D, SHEN R, BERGH S, *et al.* Inhibition of *Akt* survival pathway by a small-molecule inhibitor in human glioblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(3): 637-644
- LI Y, XU Y, CHEN W B, *et al.* Pathogen identification of bacterial disease in marine cage cultured *Sebastes schlegelii* and the study of pathogenicity. *Journal of Aquaculture*, 2021, 42(2): 18-23 [李赞, 许岩, 陈文博, 等. 海水网箱养殖许氏平鲈细菌性疾病病原鉴定及致病性研究. *水产养殖*, 2021, 42(2): 18-23]
- LIU L, CHEN Y, REN L Y, *et al.* Cloning, expression and biological function analysis of *Akt* gene from *Apostichopus japonicus*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5705-5717 [刘丽, 陈阳, 任丽媛, 等. 仿刺参 *Akt* 基因的

- 克隆及其表达和生物功能分析. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(12): 5705–5717]
- LIU L, SUN J X, CHANG Y Q, *et al.* Research progress on *Akt* gene in aquatic animals: A review. Journal of Dalian Fisheries University, 2019, 34(4): 602–609 [刘丽, 孙景贤, 常亚青, 等. 水产动物 *Akt* 基因研究进展. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 602–609]
- LIU Q L, LI J, WANG Y J, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of *Akt3* gene in pigs (*Sus scrofa*). Journal of Sichuan University (Natural Science), 2014, 51(4): 815–820 [刘庆礼, 李娟, 王亚军. 猪 *Akt3* 基因克隆、序列分析及组织表达图谱研究. 四川大学学报(自然科学版), 2014, 51(4): 815–820]
- LIU R D, RUAN L W. *PI3K-Akt* signaling pathway and viral infection. Biotechnology Bulletin, 2013(6): 53–62 [刘荣雕, 阮灵伟. *PI3K-Akt* 信号通路与病毒感染. 生物技术通报, 2013(6): 53–62]
- LIU R D. Characterization of immune-related genes, *LVAKT* and *LVFLOT*, from shrimp *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Third Institute of Oceanography, 2013 [刘荣雕. 凡纳滨对虾免疫相关分子 *LVAKT* 与 *LVFLOT* 的初步研究. 国家海洋局第三海洋研究所硕士研究生学位论文, 2013]
- LIU Y, HAN H Z, WANG T T, *et al.* Phenotypic analysis of the main morphological traits and body weight of black rockfish (*Sebastes schlegelii*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(5): 117–125 [刘阳, 韩慧宗, 王腾腾, 等. 许氏平鲈体质质量与形态性状的表型特征分析. 渔业科学进展, 2019, 40(5): 117–125]
- MEIER R, ALESSI D R, CRON P, *et al.* Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(48): 30491–30497
- MING Y, NIU Y J, FU X Z, *et al.* Role of *Siniperca chuatsi* AKT2 in proliferation of infectious spleen and kidney necrosis virus. Journal of Northwest A & F University (Natural Science), 2021, 49(2): 14–22 [明月, 牛银杰, 付小哲, 等. 鳊 *AKT2* 在传染性脾肾坏死病毒增殖中的作用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(2): 14–22]
- MOHAMAD N, AMAL M N A, YASIN I S M, *et al.* Vibriosis in cultured marine fishes: A review. Aquaculture, 2019, 512: 734289
- RUAN L W, LIU R D, XU X, *et al.* Molecular cloning and characterization of a threonine/serine protein kinase *lvakt* from *Litopenaeus vannamei*. Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(4): 792–798
- SUN L M, YU M J, CHEN Y D, *et al.* *AKT-interacting protein* gene cloning and its expression profile in response to pathogen infection in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(3): 467–473 [孙璐明, 于孟君, 陈亚东, 等. 半滑舌鳎 *AKT-interacting protein* 基因的克隆及免疫应答表达分析. 水生生物学报, 2016, 40(3): 467–473]
- TAKAHASHI H, MIYA S, KIMURA B, *et al.* Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. Microbial Pathogenesis, 2008, 45(2): 150–158
- TIAN Z H, JIAO C Z, CHENG Y X, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of serine/threoninekinases *Akt* from *Eriocheir sinensis*. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(4): 485–494 [田志环, 焦传珍, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹 *Akt* 基因的 cDNA 克隆、序列分析及表达特征. 水产学报, 2018, 42(4): 485–494]
- WANG F, XIAO S, ZHANG Y, *et al.* *ChAkt1* involvement in orchestrating the immune and heat shock responses in *Crassostrea hongkongensis*: Molecular cloning and functional characterization. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 47(2): 1015–1023
- WANG T T. Identification, characterization and application of a lactic acid bacteria isolated from intestine of *Sebastes schlegelii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [王腾腾. 一株许氏平鲈肠道乳酸菌的分离鉴定、特性分析及其应用研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- WEI Y, LIANG M, XU H. Fish protein hydrolysate affected amino acid absorption and related gene expressions of IGF-1/AKT pathways in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture Nutrition, 2020, 26(1): 145–155
- XU D D, TANG Y J, WANG G H, *et al.* Research progress on *Akt* gene. Biotechnology World, 2014(1): 8 [徐丹丹, 唐彦君, 王桂华, 等. *Akt* 基因的研究进展. 生物技术世界, 2014(1): 8]
- YANG J F, SHI J J, LIANG Y, *et al.* Cloning and expression pattern of protein kinase *B/AKT* gene in Inner Mongolia cashmere goat. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(13): 2787–2795 [杨娇馥, 史偈君, 梁燕, 等. 内蒙古白绒山羊蛋白激酶 *B/AKT* 基因的克隆及表达模式分析. 中国农业科学, 2011, 44(13): 2787–2795]
- YANG Z Z, TSCHOOP O, HEMMINGS-MIESZCZAK M, *et al.* Protein kinase *BaAkt1* regulates placental development and fetal growth. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(34): 32124–32131
- YU H Y. Cloning and expression analysis of three genes involved in *PI3K/AKT* pathway from *Ctenopharyngodon idella*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [于鸿燕. 草鱼三个 *PI3K/AKT* 通路相关基因的克隆和表达分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- ZAPATA A, DIEZ B, CEJALVO T, *et al.* Ontogeny of the immune system of fish. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 20(2): 126–136
- ZHONG Y, WANG Y J, LI J, *et al.* Molecular cloning and tissue expression of *Akt1* and *Akt2* gene inlandrace pigs. Journal of Sichuan University (Natural Science), 2014, 51(2): 365–370 [钟宇, 王亚军, 李娟. 猪 *Akt1*、*Akt2* 基因克隆与组织表达

图谱分析. 四川大学学报(自然科学版), 2014, 51(2): 365–370]
ZHOU X, CHENG S, ZHAO C, *et al.* Expression and functional

analysis of the *Akt* gene from *Daphnia pulex*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 248/249: 110462

(编辑 冯小花)

Cloning of *SsAkt* in *Sebastes schlegelii* and Its Expression Pattern after Bacterial Stimulation

LI Zhaolong^{1,2}, WANG Tengpeng², HAN Huizong^{2①}, CHEN Yuzhen², WANG Fei²,
ZHANG Mingliang², SUN Shuo², XIE Weijun^{1,2}, JIANG Haibin^{2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China)

Abstract *Sebastes schlegelii* is a cold temperate ovoviviparous fish found near the seabed layer and is widely distributed in the Yellow Sea and Bohai Sea of China, as well as in the coasts of South Korea and Japan. It is characterized by its tender meat, delicious taste, rich nutrition, and high medicinal value, thus it is an economically important marine fish species in the northern coastal areas of China. In recent years, deep-water cage cultures have rapidly developed in China. Among the economically important fish species suitable for cage culture in northern China, *S. schlegelii* is the most important local breed with excellent quality and characteristics. However, with the expansion of the scale of the aquaculture industry, aquaculture diseases including those caused by *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, occur frequently. The authors isolated and identified a dominant pathogenic bacterium, the P5W of *V. harveyi*, from the lesions of diseased *S. schlegelii* and studied the response of *S. schlegelii* to *V. harveyi* infection. Multitissue transcriptome analysis screened the immune differential gene protein kinase B. Protein kinase B, also known as Akt protein, is a serine or threonine protein kinase, which mainly conducts signal transduction by phosphorylating other proteins. It plays an important role in various biological processes such as cell metabolism, transcriptional regulation, cell cycle regulation, immune defense, and embryonic development. Many studies have shown that during viral infection of cells, the *Akt* pathway is activated, thereby inhibiting viral proliferation. To clarify the sequence information, evolutionary characteristics, and biological functions of the *Akt* gene in *S. schlegelii* and to understand the immune response mechanism of *S. schlegelii* to bacterial invasion, the full-length cDNA of the *SsAkt* gene was obtained using molecular biology, and the sequence characteristics, tissue expression rules of the gene, and the response rules to *Micrococcus luteus* and *V. anguillarum* were studied. The results showed that the length of the open reading frame was 1 440 bp. The predicted relative molecular mass of the *SsAkt* protein was 55.80 kDa and the isoelectric point was 5.64. Sequence analysis revealed that the *SsAkt* protein contains three conserved domains: the PH domain (residues 6–109), serine/threonine protein kinase catalytic (S_TKc) domain (residues 148–405), and serine/threonine protein kinase (S_TK_X) domain (residues 406–475). The conserved amino acid site appears in the center of the S_TKc domain and at the end of the S_TK_X domain: Thr³⁰⁵ and Ser⁴⁷². Homologous alignment showed that the amino acid sequence of this gene was highly conserved among different species. Phylogenetic tree

① Corresponding author: JIANG Haibin, E-mail: haibinjiang326@163.com; HAN Huizong, E-mail: hanhuizong729@163.com

analysis showed that *SsAkt* is closely related to Akt in vertebrates, such as *Sebastes umbrosus*, *Lates calcarifer*, *Larimichthys crocea*, and *Cyprinus carpio*. The relative expression of *SsAkt* in different tissues of *S. schlegelii* was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that *SsAkt* was expressed in all tested healthy tissues of *S. schlegelii*, which indicated the relative expression of the *SsAkt* gene in *S. schlegelii*. This expression has distinct tissue specificity. The expression of *SsAkt* in the kidney is the highest, and in the blood and brain, it is also higher than that in other tissues. Therefore, it is speculated that higher expression of *SsAkt* in the kidney and brain is closely related to immune defense, neurodevelopment, and other processes. To study the role of *SsAkt* in the immune response of *S. schlegelii*, we designed a bacterial challenge experiment. The results showed that the transcription level of *SsAkt* changed significantly, and the relative expression of *SsAkt* in the three tissues increased after stimulation with *M. luteus* and *V. anguillarum* compared with the control group (PBS). After infection with *M. luteus*, its expression only increased sharply in the kidney, whereas its expression increased slowly in the blood and liver. In the experimental group infected with *V. anguillarum*, the expression increased significantly in the liver and kidney, and the two relative expression peaks in the kidney occurred at 12 h and 72 h after infection, respectively. The results revealed that the *SsAkt* gene may play an important role in the immune defense of *S. schlegelii*, which can further enrich the sequence information and evolutionary data of the *Akt* gene in marine fish and provide reference materials for an in-depth study of the biological function of this gene. In follow-up experiments, we will explore the specific mechanism of *SsAkt* in the innate immune defense of *S. schlegelii* to provide theoretical guidance for the study of the immune signaling pathway of *S. schlegelii* and to lay a theoretical foundation for revealing the role of *SsAkt* in other important biological functions in growth and development.

Key words *Sebastes schlegelii*; Protein kinase B; *Akt*; Gene cloning; Expression pattern