

DOI: 10.11758/yykxjz.20170123001

http://www.yykxjz.cn/

王玉红, 尹晓雪, 丁明媚, 付胜利, 陈萌, 郭政, 叶剑敏. 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 73–82

Wang YH, Yin XX, Ding MM, Fu SL, Chen M, Guo Z, Ye JM. Molecular cloning and expression analysis of *Xbp1-S* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 73–82

尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析

王玉红¹ 尹晓雪¹ 丁明媚¹ 付胜利¹
陈萌¹ 郭政^{1,2} 叶剑敏^{1,2}①

(1. 广东省水产健康安全养殖重点实验室 华南师范大学生命科学学院 广州 510631;
2. 广东省水产优质环保养殖工程技术研究中心 华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

摘要 为了了解尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)细胞转录因子 *Xbp1-S*(*OnXbp1-S*)的基因序列特征及其在无乳链球菌(*Streptococcus alactolyticus*)应激和在 B 细胞分化中的作用,应用 RACE 克隆技术获得的 *OnXbp1-S* 基因全长 1380 bp, 包括开放阅读框 ORF 为 1155 bp, 5'端非编码区(5' UTR)长 127 bp, 3'端非编码区(3'UTR)长 98 bp。 *OnXbp1-S* 序列分析推测该基因编码 384 个氨基酸, 分子量为 41.32 kDa, 理论等电点为 4.36。 同源性分析显示, *OnXbp1-S* 基因与其他鱼类的聚为一支, 其中, 与南极鳕(*Notothenia coriiceps*)相似性最高。 荧光定量 PCR 及 Western-blot 结果显示, *OnXbp1-S* 在各组织中均有表达, mRNA 水平上在肝脏中表达量最高, 蛋白水平上在胸腺中表达量最高, 而在肌肉中表达量最低。 无乳链球菌应激后, *OnXbp1-S* 基因在肝脏和脾脏中的表达趋势相似, 均在应激期间出现表达量上调, 在 192 h 出现峰值。 另外, 免疫组化分析发现, *OnXbp1-S* 因子在不同分化程度 B 细胞亚类中的表达呈现差异, 在成熟 B 细胞中呈现高表达, 而在未成熟 B 细胞中几乎不表达。 研究结果表明, *OnXbp1-S* 参与尼罗罗非鱼对无乳链球菌的免疫防御, 和在 B 细胞分化中起作用。 本研究将为进一步研究 *OnXbp1-S* 因子应答病原菌感染的机理及促进 B 细胞分化机制提供理论依据。

关键词 尼罗罗非鱼; *Xbp1-S*; 基因克隆; 组织表达; 无乳链球菌

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)01-0073-10

X 盒结合蛋白 1(Xbp1, X-box binding protein 1)是一种重要的细胞转录因子, 与人体许多机能密切相关, 如 B 细胞、肝细胞和树突状细胞的发育分化, 心肌细胞的存活及肝脂肪的调节等(Wang *et al*, 2008; Iwakoshi *et al*, 2007; Tellier *et al*, 2016)。 Xbp1 为碱性亮氨酸拉链蛋白, 有剪切型 Xbp1(Xbp1 spliced, Xbp1-S)和未剪切型 Xbp1(Xbp1 unspliced, Xbp1-U)两种类型。 两种不同剪切类型的 Xbp1 具有不同的转录活性, 其

中, Xbp1-S 的转录活性明显高于 Xbp1-U (Zhou *et al*, 2008)。 Xbp1-S 是 CREB/ATF 蛋白家族的成员, 最早由 Liou 等(1990)在研究人类 B 细胞的时候发现的一种转录因子。 随后在内质网应激时的研究发现不同于 Xbp1-U 的另一种剪切形式 Xbp1-S, 是由 I 型跨膜蛋白激酶核酸内切酶(Type I transmembrane protein kinase, IRE1)剪切 Xbp1-U 的 mRNA 所产生(Yoshida *et al*, 2001; Calfon *et al*, 2002)。 Xbp1 参与 B 细胞向浆细胞

* 国家自然科学基金面上项目(31472302; 31172432)和广东省自然科学基金项目(2014A030313437)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31472302 and 31172432), and Natural Science Foundation of Guangdong (2014A030313437)]. 王玉红, E-mail: wyhong1121@126.com

① 通讯作者: 叶剑敏, 教授, E-mail: yjmying@126.com

收稿日期: 2017-01-23, 收修改稿日期: 2017-02-14

的分化,是经过调控 IL-6 的生成并通过进一步非折叠蛋白质应答(Unfolded protein response, UPR)途径所促进的(Calfon *et al.*, 2002; Iwakoshi *et al.*, 2003)。在哺乳动物中, Xbp1 的异常活动也可以促进恶性浆细胞的分化(Reimold *et al.*, 2001)。作为剪切后的 Xbp1-S 具有更高的转录活性,能进去细胞核调节未折叠的蛋白质反应。

Xbp1-S 是一种高度保守的蛋白,从低等酵母到高等哺乳动物中均有存在(Liou *et al.*, 1990)。在硬骨鱼中, Xbp1-S 的研究逐步增加, 现已报道的鱼类包括斑马鱼(*Danio rerio*)(Hu *et al.*, 2007; Bennett *et al.*, 2007)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(彭少卿等, 2013)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(Ohtani *et al.*, 2006)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Barr *et al.*, 2011)和大西洋鲑(*Salmo salar*)(Leong *et al.*, 2010)等。Hu 等(2007)在斑马鱼的胚胎细胞中发现,当 UPR 应对内质网应激时, Xbp1 可以通过 IGF1/Akt 激活凋亡信号发挥抑制作用; Barr 等(2011)利用 Xbp1 作为标记分子进行鉴定不同分化程度的 B 细胞亚类; Zwollo 等(2005、2008)利用 Xbp1 以及 Pax-5 等转录因子对虹鳟鱼的肾脏进行分区,并进一步揭示虹鳟鱼 B 细胞的发育分化与 Xbp1 的表达相关。但关于尼罗罗非鱼 Xbp1-S 的研究还未见相关报道。另外,与哺乳动物相比,有关硬骨鱼 Xbp1-S 的研究还处于起步阶段,其在宿主应对病原感染中的作用尚待进一步明确。

罗非鱼是联合国推荐养殖的优质水产养殖品种之一。我国是最大的罗非鱼生产国,近些年,因养殖规模扩大、高密度养殖、水体污染等,导致罗非鱼鱼病大规模暴发,如链球菌病,造成巨大经济损失

(卢迈新, 2010)。本研究选用尼罗罗非鱼为实验鱼,旨在克隆 Xbp1-S 基因 cDNA 全长并序列比对,从基因和蛋白水平上分析无乳链球菌应激胁迫后尼罗罗非鱼各组织的时空表达模式,并查明该因子在不同分化程度 B 细胞亚类中的表达水平,为进一步研究尼罗罗非鱼 Xbp1-S 在防御链球菌感染中所起作用及其调控 B 细胞发育分化机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼购自广东省渔业种质保护基地,健康尼罗罗非鱼的体重为(200±10) g,体长为(13±2) cm。养殖温度为(29±1)℃,早晚投喂饲料,加气泵供氧,饲养 14 d 使其充分适应养殖环境,观察鱼体外观和活动能力,确认完全健康后用于实验。无乳链球菌菌株为本实验室保存菌株。PCR 反应体系所用试剂、pMD-18T Vector、限制性内切酶、Trizol、反转录试剂盒(PrimeScript™RT reagent kit with gDNA eraser)和荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™)均购自 TaKaRa 公司; *E.coli* DH5α 感受态、*E.coli* BL21(DE3)感受态、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(TIANprep mini plasmid kit)购自 TIANGEN 公司; pET32a(+) Vector 由本实验室保存, SMART™ RACE cDNA amplification kit 购自 BD Biosciences Clontech 公司。Trizol、2×Prime Mix、Ex Taq、10×Buffer、dNTP、pMD 18-T Vector、Solution I 和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。氨苄青霉素、氯仿和异丙醇等试剂购自广州化学试剂公司,其余实验试剂均为国产分析纯。引物(表 1)由华大基因科技服务有限公司合成。

表 1 基因克隆和表达所用的引物

Tab.1 Primers used in the cloning and expression

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
Xbp1-F1	ATGGTGGTTGTAGCAGCTGGG	qPCR
Xbp1-R1	TCAGACACTGATAAGCTGGGGG	
Xbp1-F2	CAGGTTATGTTGTCCACCGGGAACG	3'-RACE
Xbp1-F3	GTCCGCAGCACTCAGGCTACGTGTG	
Xbp1-R2	AGCAGGCCATTTGTTTTTCCCAGAA	5'-RACE
Xbp1-R3	CTGAATCCGACGACACTTGGCTGGC	
β-actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA	qPCR
β-actin-R	TTCTCCATGTCGTCCAGT	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	菌液 PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	
Xbp1-F4	CCCGGATCCATGGTGGTTGTAGCAGCTGGG	原核表达酶切
Xbp1-R4	CCCAAGCTTGTGGTGGTGTGCTGCGGACTCAGAAGACC	
Xbp1-qF	GCCTTTCCTGTTACGGAGGTTGTG	RT-PCR
Xbp1-qR	GCCAGGCAGGCTTCTTTCTCC	

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 采用 Trizol(Invitrogen)法进行总 RNA 提取。取健康尼罗罗非鱼头肾, 用匀浆器充分研磨, 并按照 Trizol 试剂的使用说明书提取总 RNA, RNA 完整性和纯度用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用微量分光光度计 NANO2000 检测其浓度, -80°C 保存。利用普通的反转录试剂盒进行反转录合成 cDNA 模板, 使用 SMARTTM RACE cDNA amplification kit 将总 RNA 逆转录成 5'、3'-RACE cDNA 模板(Yao *et al.*, 2016)。反转录结束后对模板进行有效性的检测, 以 β -actin 作为内参基因进行 PCR 鉴定, 合格后 -20°C 保存。

1.2.2 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的基因全长 cDNA 的克隆和测序 在 NCBI 搜索尼罗罗非鱼的 *Xbp1* 基因, 根据预测序列(XM_013276886.1), 应用软件 Primer Premier 5.0 进行引物 Xbp1-F1 和 Xbp1-R1 设计(表 1), 以尼罗罗非鱼头肾 cDNA 为模板, 以 Xbp1-F1 和 Xbp1-R1 为引物进行 *Xbp1-S* 的 cDNA 的扩增, PCR 反应的体系为 25 μl , 反应程序: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 58.0°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1.0 min; 30 个循环。扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往北京六合华大基因公司进行测序。测序结果经 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比对, 获得尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的 cDNA 序列。

1.2.3 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的基因 3' 和 5'-RACE 扩增

根据获得的 *Xbp1-S* 的 CDS 序列, 设计 *Xbp1-S* 的 5'-RACE PCR 和 3'-RACE PCR 的引物 Xbp1-F2、Xbp1-F3、Xbp1-R2 和 Xbp1-R3(表 1), 采用巢式 PCR 方法进行 3' 和 5'-RACE 的扩增, 先分别用 Xbp1-F2、Xbp1-R2 和 UPM 混合引物(混合浓度参照试剂盒说明书)进行首轮扩增, 然后利用首轮扩增的 PCR 产物稀释 10 倍作为第二轮模板, 再分别用 Xbp1-F3、Xbp1-R3 和 NUP 为引物进行第二轮扩增, 全长克隆采用 20 μl PCR 反应体系(Yao *et al.*, 2016)。反应程序: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 68°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min, 35 个循环。扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往北京六合华大基因公司进行测序。测序结果与 *Xbp1-S* 的 cDNA 序列比对结果见图 1, 找出起始密码子和 polyA 加尾信号。

1.2.4 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的序列分析 用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序去克隆载体, 将 3'、5' 测序结果结合 CDS 序列进行拼接分析, 进一步确认 *Xbp1-S* 扩增获得 CDS 的全长。用 NCBI 网站的 BLAST 程序进行编码蛋白序列的碱基同源性分析; 用 Bioedit 软

件将尼罗罗非鱼与其他鱼类的 *Xbp1-S* 的氨基酸序列进行多重比对; 应用 MEGA 6.0 软件, 采用邻位相接法(NJ 法)构建系统发育树, 并用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。蛋白质理化性质预测使用 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>), 使用 NCBI 网站保守结构域(CDD)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行氨基酸序列的保守结构域预测。

1.2.5 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 多克隆抗体的制备 根据 *Xbp1-S* 的 CDS 序列的锌指结构, 选取包含锌指结构的起始密码子甲硫氨酸开始的前 504 bp 的碱基进行原核表达分析, 构建 pET32A-XBP1 的蛋白表达载体, 并导入到 BL21 中特异性表达出约 40 kDa 的目的片段(包含 pPET32A 载体本身的分子量)。并进一步进行蛋白的大批量表达和纯化, 获得目的蛋白, 将纯化后的重组蛋白浓缩后与弗氏佐剂(Sigma)混合, 腹腔免疫小鼠(BALB/c, 8 周), 2 周免疫 1 次, 连续免疫 4 次, 首次免疫使用弗氏完全佐剂, 再次免疫使用弗氏不完全佐剂, 每次免疫蛋白用量为 50 μg /只。尾部静脉取血, 获得抗血清后检测抗性, 通过直接 ELISA 检测其效价。在第 4 次免疫后 4 d (达到抗体效价最高), 进行尾部静脉取血, 获得抗血清, 用于蛋白的检测和免疫组化等实验。

1.2.6 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 组织表达 采用荧光定量 PCR 的方法检测 *Xbp1* 在 mRNA 水平上在健康罗非鱼各组织中的表达量, 用 Western-blot 的方法检测 *Xbp1* 蛋白在各组织中的分布。取健康的 3 尾尼罗罗非鱼, 取头肾、后肾、脾脏、皮肤、鳃、肠、胸腺、肝脏和肌肉组织, 用液氮速冻后置于 -80°C 保存。并进行各组织 RNA 及组织蛋白的提取后进行 RT-PCR 和 Western-blot 组织蛋白的检测。用于 RT-PCR 检测尼罗罗非鱼不同组织中表达的引物见表 1。反应条件: 95°C 3 min; 95°C 1 min; 60°C 30 s; 72°C 30 s, 35 个循环。每个样本重复 3 次, 根据 C_t (Threshold cycles) 值 ($15 < C_t < 35$), 以 β -actin 基因为内参, 利用公式 $2^{-\Delta C_t}$ 得出每个样本 *Xbp1* 基因的相对表达值。

1.2.7 无乳链球菌应激实验 取 60 尾健康尼罗罗非鱼随机分成 2 组, 即应激组和对照组。应激组腹腔分别注射 100 μl 浓度为 5×10^5 CFU/ μl 的无乳链球菌(Tellez-Bañuelos *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2015); 对照组腹腔注射 100 μl 无菌 PBS, 注射 0、6、24、48、192、264 h 后, 分别在应激组和对照组随机取 3 尾鱼, 取各组织用液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱, 用于后续各组织 *Xbp1* 基因的 RT-PCR 分析检测。RT-PCR

扩增体系为 20 μ l, 试剂添加按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书进行。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对荧光定量 PCR 检测结果进行分析, 显著性用 SPSS 17.0 软件进行分析并用 SigmaPlot 10.0 作图。

1.2.8 Xbp1 免疫组化 选取健康尼罗罗非鱼的头肾白细胞用于免疫组化实验。头肾白细胞的分离采用 Percoll 密度梯度分离法进行, 根据尼罗罗非鱼 B 细胞的比重, 分别配制 Percoll 40、50、60 及 70 试剂, 叠加后配成 Percoll 密度梯度分离液, 从而分离发育分化程度不同的 B 细胞亚类。在超净工作台取健康尼罗罗非鱼的头肾并加入 3 ml 1640 细胞培养液进行充分研磨, 吸取上清液, 去除大的组织块, 备用。根据使用说明书, 首先把 Percoll(GE Healthcare)原液用 10 \times PBS(NaH₂PO₄·2H₂O 2.286 g, Na₂HPO₄·12H₂O 29.14 g, NaCl 87.75 g) 9 : 1 稀释为备用 Percoll 储存液, 然后用 1 \times PBS 进一步配成 Percoll 40、50、60 和 70, 进行叠加各层分离 B 细胞。把分离的细胞进一步细胞涂片后进行采用 EnVision[™] 免疫组织化学二步法, 主要步骤包括: 切片用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱苯, 去离子水水化; 3%过氧化氢溶液室温避光孵育 25 min 阻断内源性过氧化物酶; 3% BSA 室温封闭 30 min 后滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 荧光二抗室温孵育 30 min; 荧光显微镜镜检, 阳性细胞呈现明显的荧光, 并对图像采集分析。

2 结果与分析

2.1 *OnXbp1-S* 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

根据已经获得的 ORF 序列, 进一步设计特异性 RACE 引物 Xbp1-F2、Xbp1-F3 及 Xbp1-R2 和 Xbp1-R3 (表 1)。Xbp1-F2 和 Xbp1-R2 与通用引物 UPM 以及 Xbp1-F3 和 Xbp1-R3 与通用引物 NUP 分别配对, 进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增(Yao *et al.*, 2016), 所得产物经测序拼接后, 获得尼罗罗非鱼基因全长 cDNA 序列为 1155 bp, 3'端非编码区(3'UTR)长 98 bp, 5'端非编码区(5'UTR)长 127 bp, 3'端含有 polyA 尾以及多聚腺苷酸 AATAA 加尾信号(图 1)。氨基酸序列分析可知, *OnXbp1-S* 基因可以编码 384 个氨基酸残基, 其推导的分子量为 41.32 kDa, 理论等电点为 4.36。由蛋白质的功能预测可知, *OnXbp1-S* 含有 174 bp 的锌指结构区域(图 1 下划线部分), 该区域是比较保守的蛋白结构, 该蛋白属于碱性亮氨酸拉链结构蛋白。

2.2 *OnXbp1-S* 基因的同源性分析

利用 Bioedit 软件对尼罗罗非鱼 *Xbp1* 基因编码的氨基酸序列与红鳍东方鲀、虹鳟、欧洲食用牡蛎 (*Ostrea edulis*)、斑马鱼、斑点雀鲷 (*Lepisosteus oculatus*)、墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、南极鳕 (*Nototothenia coriiceps*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 及人 (*Homo sapiens*) 进行同源比对, 与不同物种中锌指结构的同源性高达 79%(图 2)。如图 2 所示, 黑色阴影表示同源性大于 75% 的区域, 主要是集中在不同物种的锌指结构的保守区域。利用 MEGA 6.0 软件对已经公布的哺乳动物和常见的鱼类进行系统进化分析, 显示尼罗罗非鱼 *Xbp1* 与南极鳕同属一个分支, 同源性最高, 与其他无脊椎动物的 *Xbp1* 聚为一类。而在哺乳类动物、两栖类动物、鸟类和鱼类中有明显分化(图 3)。

2.3 原核蛋白的表达纯化及多克隆抗体的制备

以尼罗罗非鱼 *OnXbp1-S* 基因片段为模板, 使用特异性引物 Xbp1-F4、R4(表 1)成功扩增到长度为 504 bp 的目的片段, 将目的片段连接到 pET32a 质粒上, 获得重组质粒 pET32a-Xbp1。将重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)后, 将测序正确的阳性克隆进行诱导表达, 诱导前的目的蛋白表达较弱(图 4), 诱导后有明显表达的条带大小约为 40 kDa, 与融合蛋白的预测分子量一致(包括目的蛋白 18 kDa 和 pET-32a 标签蛋白 21 kDa)。融合蛋白的可溶性分析结果显示, 其主要以包涵体的形式存在。经 SDS-PAGE 检测, 纯化蛋白在 40 kDa 处有较为单一条带。用抗 His-tag 的单克隆抗体 Western-blot 检测纯化后的蛋白, 发现在 40 kDa 处存在单一条带, 确定此蛋白为 *OnXbp1-S* 表达的融合蛋白。浓缩纯化后的蛋白, 制作抗原免疫小鼠并获得抗血清, 直接 ELISA 法检测其抗体效价为 800,000(units/ml), 表明所制备的小鼠抗罗非鱼 *Xbp1-S* 多克隆抗血清效果良好。

2.4 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因和蛋白水平的组织分布以及链球菌应激表达分析

采用 Real-time qPCR 方法检测 *OnXbp1-S* mRNA 在健康尼罗罗非鱼不同组织中的相对表达量; 并利用所制备的 *OnXbp1-S* 多抗 Western-blot 检测 *OnXbp1* 蛋白在不同组织的相对表达水平。mRNA 相对表达量的结果显示, *OnXbp1-S* 在所检测的 8 个组织中的表达量, 由低到高依次为肌肉<胸腺<脾脏<皮肤<鳃<肠<头肾<肝脏, 在肝脏的表达量最高, 在头肾也有较高

的表达, 而在肌肉组织中几乎不表达(图 5 A)。OnXbp1-S 蛋白的相对表达量的结果显示(图 5 B), OnXbp1-S 蛋白在所检测的 9 个组织中的表达量, 由

低到高依次为肠<脾脏<肌肉<皮肤<肝脏<后肾<鳃<头肾<胸腺, 在胸腺的表达量最高, 在头肾、鳃中都有较高的表达, 而在肠道肌肉中几乎没有表达。

```

acatggggaggcattt gagaattgtcggggatcgggtcaatagggaaacctaaagtttctac
tgactttaa tagggacaccggtaatttctgatttcagacaacaccacaacaggatacatcaac
atggtggtttagcagctggggctggaggagcccaaaagtccttctcatatcagggaaag 60
M V V V A A G A G G A H K V L L I S G K
caatccggctcagacagggccctcagccggccatctctgtcgttttacgtcaacggcc 120
Q S G S Q T A L S R P I S V V L P S T A
agccaagtgtcgtcggattcagactccaactctctcagggcccggtgcgaaaaaga 180
S Q V S S D S D S N S S A G P P V R K R
cagagactcacacatttgagtctgaagaaaagcgttcgcaggaactcaagaacaga 240
Q R L T H L S P E E K A L R R K L K N R
gtggcagctcagacagccagagacagaaaaaagcaaaaatgggggagctggagcaacaa 300
V A A Q T A R D R K K A K M G E L E Q Q
gtcctagagtggagctggagaatcagaaacttcacattgaaacaggctacttcgggaa 360
V L E L E L E N Q K L H I E N R L L R E
aaaacaatggcctgctcacagaaaatgaggaactgagacaaagacttgattggacact 420
K T N G L L T E N E E L R Q R L G L D T
cttgactcaaaagagaagttcaggttatgttgccaccgggaacgatgcagatttgga 480
L D S K E K V Q V M L S T G N D A D L G
atcggctctctgagctccgagcaggtgcaggccagcagtcctaaatctgaagacttc 540
I G S S E S A A G A G P A V P K S E D F
ccaatggatcacagatagtcctgactcttcagacaatgagtctgatttgctactgggcatt 600
P M D T D S P D S S D N E S D L L L G I
ctggacatccttgaccagagttatttctcaagcttgtgaaccagactgccaggagccg 660
L D I L D P E L F L K S C E P D C Q E P
caggtcctgtgtcggaggagtgagccagctacccaccatctccaactatgggg 720
Q V L L L G G S E P V P A T P S P T M G
cccacatcagtttaagctggagaccctaatgaactgattcattttgaccacatctataca 780
P T S V K L E T L N E L I H F D H I Y T
aagcccgctggaggagtgagcagtgggcagcacaccgacttgagagcgacacaagtgag 840
K P V E E V S S G Q H T D L E S D T S E
aagaatgacgaggtggcctttcctgttacggaggttggtggaggaggagaccatctgc 900
K N D E V A F P V T E V V V E E E T I C
gtcaaagatgaaccacaggaagtggatccctgcagtaaatgtagcagctcaggtt 960
V K D E P Q E V V I P A C N S Q S Q A V
gagcttttctcctggaccttctcctcctcctcaacagcctggagaaagaagcctgcctg 1020
E L F S G P S S P A L N S L E K E A C L
gaggacacctacagcagctccgatatgaaggttcccttcccttccagcagatgtcg 1080
A D T Y S D S G Y E G S P S P F S D M S
tccccctgtgtcagagagcgcctgggatgacatgtttgctaataactattccccag 1140
S P L C A E S A W D D M F A N E L F P Q
cttatcagtgctgatacacatgtaaggttaatgtgtagccttataataaaatataaa 1155
L I S V -
ataaaaaaaaaaagtagtactcttgcgtaaaaactgcattgcctaaaa
    
```

图 1 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因 cDNA 全序列以及由此推测的氨基酸序列
 Fig.1 The cDNA and putative amino acid sequence of *Xbp1-S* in *O. niloticus*

起始密码子和终止密码子由细线框标出; 下划线表示 *Xbp1-S* 的锌指结构区域;
 阴影部分表示原核表达的抗原结合区域; 短虚线表示 RACE 结果的加尾信号

Start codon (atg) and stop codon (tga) were marked with filament box; regular underline represented the basic-region leucine zipper (bZIP) domain of X-box binding protein 1 (Xbp1); shadow represented the Prokaryotic expressed sequence, short dash underline represented tailing signal of RACE

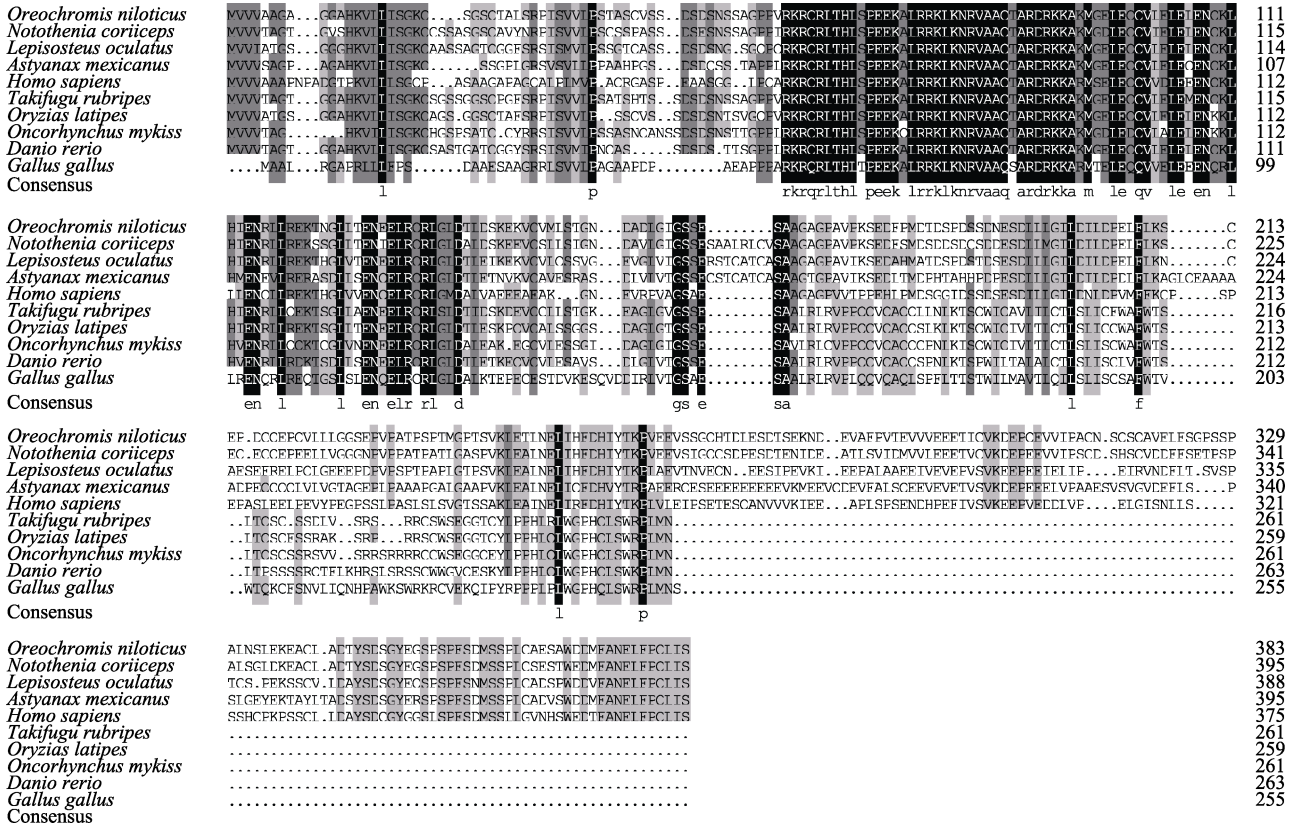


图 2 OnXbp1 氨基酸序列与其他物种 Xbp1 序列比对

Fig.2 Alignment of Xbp1 amino acid sequences of *O. niloticus* with other species

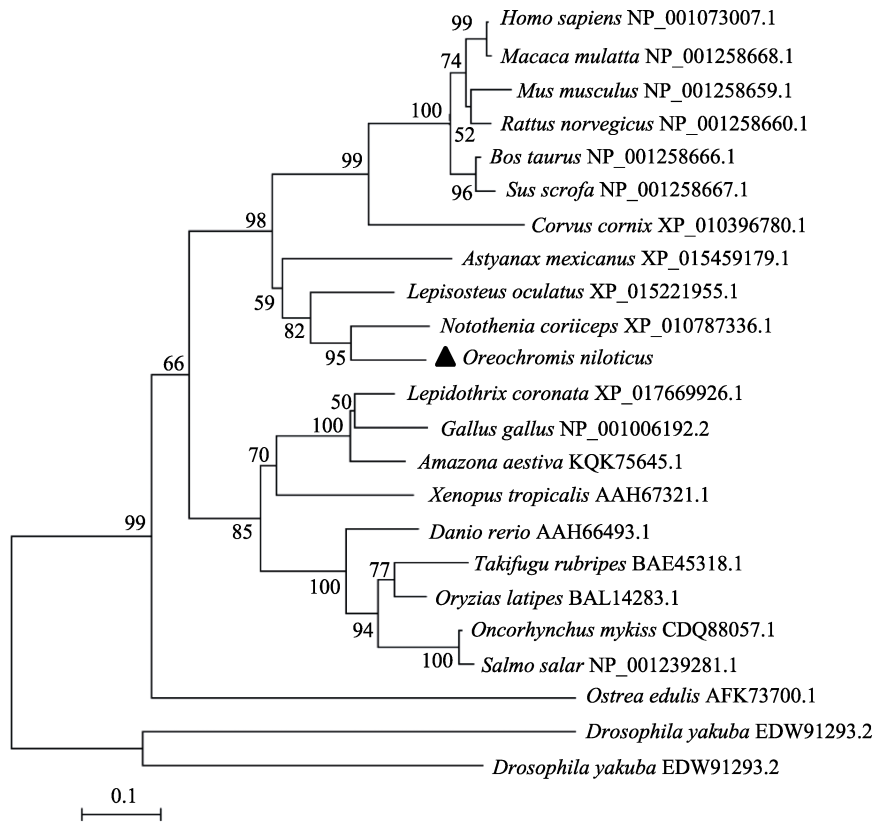


图 3 利用 MEGA 6.0 软件构建的基于 Xbp1 基因所编码氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree based on Xbp1 amino acid sequences by MEGA 6.0

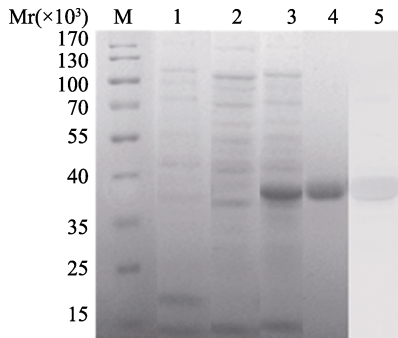


图 4 *Xbp1-S* 蛋白的原核表达及其纯化

Fig.4 Prokaryotic expression and purification of the *Xbp1* protein

M: 蛋白 Marker; 1: 空载菌蛋白; 2: 重组菌 IPTG 诱导前;
3: 重组菌 IPTG 诱导后; 4: 纯化后蛋白; 5: 纯化后蛋白
Western-blot

M: Protein Marker; 1: Protein of empty plasmid vector;
2: Protein before IPTG induction; 3: Protein after IPTG
induction; 4: Purification protein; 5: Western-blot of
purification protein

在经过腹腔注射链球菌后, 与对照组相比, 所检测的不同时间点里其肝脏和脾脏均呈上调表达的趋势, 且其趋势基本一致。在早期即腹腔注射 6 h 后, *OnXbp1-S* 基因的表达呈现显著性增高, 其后的 24 h 和 48 h 的表达量有所下降, 但在 192 h 达到基因表达量的最高水平(图 6A, 图 6B), 而后在 264 h 逐渐回落下降, 趋向对照组的水平。

2.5 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 在不同 B 细胞亚型中的免疫组化分析

根据 Zwollo 等(2005)报道的 Percoll 密度分离法, 分离出罗非鱼头肾 B 细胞不同亚类细胞: Percoll 40 细胞(多为浆细胞, 图 7A)、Percoll 50 细胞(多为原浆 B 细胞, 图 7B)、Percoll 60 细胞(初分化成熟的 B 细胞, 图 7C)、和 Percoll 70 细胞(多为未成熟的 B 细胞, 图 7D)。如图 7 所示, *OnXbp1-S* 蛋白在不同 B 细胞亚类中表达量水平可由其红色荧光所显示, 表达量的

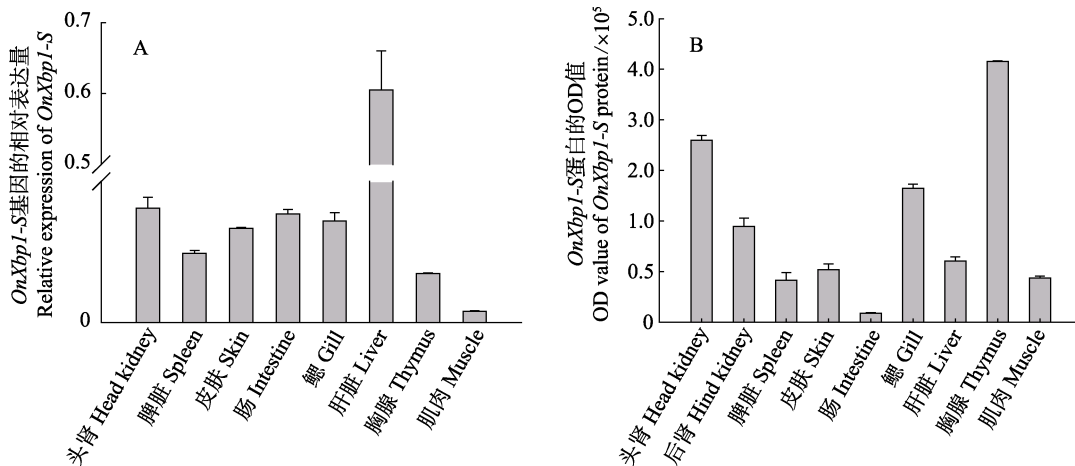


图 5 *Xbp1-S* 基因及蛋白水平在尼罗罗非鱼不同组织中的表达分布

Fig.5 The relative expression of *Xbp1-S* mRNA and protein in different tissues of *O. niloticus*

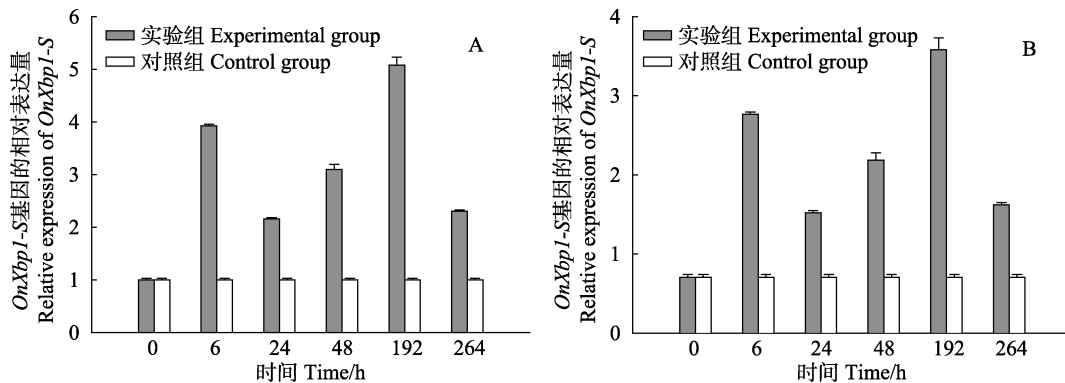


图 6 无乳链球菌应激后尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因的表达量变化

Fig.6 Expression of *Xbp1-S* gene in *O. niloticus* after *Streptococcus agalactiae* infection

A: 肝脏; B: 脾脏

A: Liver; B: Spleen

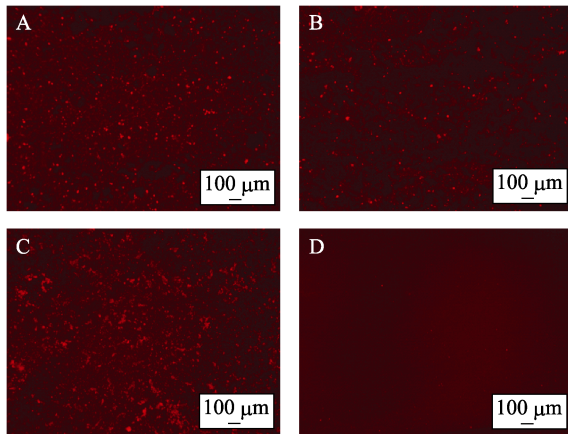


图 7 Xbp1 在尼罗罗非鱼不同 B 细胞亚类中的表达
Fig.7 Xbp1-S protein level in different B cell subclass of *O. niloticus*

A. Percoll 40; B. Percoll 50; C. Percoll 60; D. Percoll 70

变化从低到高依次为 Percoll 70<Percoll 60<Percoll 50<Percoll 40, 即 OnXbp1-S 在浆细胞中的表达最高, 在原浆细胞有较高水平的表达, 在初分化的 B 细胞中有少许表达, 而在未成熟的 B 细胞中几乎不表达。

3 讨论

细胞转录因子 Xbp1 表达与 B 细胞的发育分化及抗体的表达分泌息息相关(Zwollo *et al.*, 2005、2008; Tellier *et al.*, 2016)。Xbp1 是内质网应激中蛋白质折叠能力的主要调控者之一, 具有 2 种不同剪切类型(Xbp1-S 和 Xbp1-U), 其中, Xbp1-S 具有高度转录活性(Zhou *et al.*, 2008)。内质网具有调节蛋白质的折叠、转录后修饰基因表达等多种功能, 一旦发生错误的折叠将导致抗凋亡反应并促进肿瘤细胞的无限增值(Hendershot, 2004; Robinson *et al.*, 1994)。因此, Xbp1 研究对于 B 细胞的发育分化和调控以及其在防御病原菌侵染的免疫功能分析具有重要的意义。

本研究克隆尼罗罗非鱼 *OnXbp1-S* 的基因序列, 并利用外源蛋白原核表达系统(Salinas *et al.*, 2011)成功构建 *OnXbp1-S* 的体外表达系统, 制备多克隆抗体; 组织表达分析发现, *OnXbp1-S* 在尼罗罗非鱼的正常组织中广泛存在; 在无乳链球菌应激实验期, *OnXbp1-S* 在肝脏和脾脏表达具有较强的上调且反应趋于同步; 并证实了在尼罗罗非鱼中可能也存在 *OnXbp1-S* 对于浆细胞即成熟 B 细胞的发育分化调节作用。

Xbp1 在哺乳动物的体内广泛存在, 在各个组织分析中都有表达, 其中在肝细胞中高表达(Liou *et al.*, 1990; Calfon *et al.*, 2002)。本研究结果显示, 尼罗罗非鱼 *OnXbp1-S* 在各个检测组织中都有表达, 在 mRNA

水平上主要表达在肝脏中, 这与哺乳动物中的发现相类似。然而, 蛋白水平上的高表达主要在胸腺和头肾中, 表明 Xbp1-S 的表达与免疫细胞(B 细胞和 T 细胞)的发育分化可能有一定关联(Zwollo *et al.*, 2005、2008; Tellier *et al.*, 2016)。免疫系统中主要免疫细胞的发育分化与 Xbp1-S 表达的正相关反映了 Xbp1-S 转录因子可能在免疫反应中起重要调控作用, 因为 Xbp1-S 因子不仅参与体液免疫, 而且可能参与细胞免疫的促进作用。无乳链球菌应激实验显示, 在应激后 264 h 期间, *OnXbp1-S* 在脾脏和肝脏中都有明显的表达上调。腹腔注射链球菌 6 h 后, 肝脏和脾脏中 *OnXbp1-S* mRNA 表达显著上调出现第一个峰值, 这种应激后短时间内表达量激增的现象表明该因子很可能参与天然免疫反应。第二个更显著的表达高峰出现在链球菌应激后的 192 h (8 d), 这个显著上调很可能是由于参与适用性免疫反应的免疫细胞(B 细胞和 T 细胞)中 Xbp1-S 因子的表达明显上调。

硬骨鱼的头肾组织类似于哺乳动物的骨髓, 具有造血功能并且是免疫细胞发育的场所, 因此, 头肾组织含有不同血系的未成熟血细胞(Fange *et al.*, 1986; Zapata *et al.*, 1995)。头肾是免疫细胞发生、发育分化和增殖的重要场所, 也是捕获抗原和产生抗体的主要器官(Kaattari *et al.*, 1985; Bromage *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2013)。本研究尼罗罗非鱼的头肾组织采用 Percoll 密度梯度分离的方法获得不同发育分化程度的 B 细胞亚类(Zwollo *et al.*, 2005), 并采用免疫组化检测各类细胞荧光强度, 发现 *OnXbp1-S* 高表达在分化程度高的成熟浆细胞和原浆细胞中, 而在 naïve B 细胞和未成熟 B 细胞中表达量较低。尼罗罗非鱼不同 B 细胞亚类表达不同水平的 *OnXbp1-S* 现象, 与已报道的红鳍东方鲀(Ohtani *et al.*, 2006)和虹鳟鱼(Zwollo *et al.*, 2008)相类似。B 细胞分化程度与 Xbp1-S 因子的表达正相关表明, 该因子对于成熟浆细胞以及浆母细胞的发育具有重要的促进作用, 即对 B 细胞的分化起正调节作用, 调控原浆细胞是在特定的生态位中进一步发育分化为浆细胞(Ye *et al.*, 2011)。Xbp1-S 的免疫功能尤其对于 B 细胞分化的作用研究有利于探索体液免疫 B 细胞的发育分化调控机制。综上所述, 本研究将为进一步研究尼罗罗非鱼 Xbp1-S 因子应答病原菌侵染的机理及促进 B 细胞分化机制提供理论依据。

参 考 文 献

Barr M, Mott K, Zwollo P. Defining terminally differentiating B cell populations in rainbow trout immune tissues using the

- transcription factor Xbp1. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 727–735
- Bennett JT, Joubin K, Cheng S, *et al.* Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation. *Developmental Biology*, 2007, 304(2): 525–540
- Bromage ES, Ye J, Owens L, *et al.* Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(7–8): 803–814
- Calfon M, Zeng H, Urano F, *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 2002, 415(6867): 92–96
- Fänge R. Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1986, 12(1–4): 153–161
- Gan Z, Wang B, Lu Y, *et al.* Molecular characterization and expression of Lck in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2376–2389
- Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 2004, 71(5): 289–297
- Hu MC, Gong HY, Lin GH, *et al.* XBP-1, a key regulator of unfolded protein response, activates transcription of IGF1 and Akt phosphorylation in zebrafish embryonic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 359(3): 778–783
- Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunological Reviews*, 2003, 194(1): 29–38
- Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(10): 2267–2275
- Kaattari SL, Irwin MJ. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental and Comparative Immunology*, 1985, 9(3): 433–444
- Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR *et al.* *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 279
- Liou HC, Boothby MR, Finn PW, *et al.* A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 1990, 247(4950): 1581–1584
- Lu MX. Review of research on streptococcosis in Tilapia. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(1): 75–79 [卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展. *南方水产*, 2010, 6(1): 75–79]
- Ma C, Ye J, Kaattari SL. Differential compartmentalization of memory B cells versus plasma cells in salmonid fish. *European Journal of Immunology*, 2013, 43(2): 360–370
- Ohtani M, Miyadai T, Hiroishi S. Identification of genes encoding critical factors regulating B-cell terminal differentiation in torafugu (*Takifugu rubripes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics*, 2006, 1(1): 109–114
- Peng SQ, An LG, Zhang Z, *et al.* Cloning and tissue-specific expression analysis of Xbp1 gene in *Cyprinus carpio* L. *Journal of University of Jinan*, 2013, 27(2): 1671–3359 [彭少卿, 安利国, 张珍, 等. 鲤鱼 Xbp1 基因克隆与组织特异性表达分析. *济南大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(2): 1671–3359]
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 2001, 412(6844): 300–307
- Robinson AS, Hines V, Wittrup KD. Protein disulfide isomerase overexpression increase secretion of foreign protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology*, 1994, 12(4): 381–384
- Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1346–1365
- Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, *et al.* Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 105–111
- Tellier J, Shi W, Minnich M, *et al.* Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nature Immunology*, 2016, 17(3): 323–330
- Wang H, Zhang Y, Yehuda-Shnaidman E, *et al.* Liver X receptor alpha is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype. *Molecular and Cell Biology*, 2008, 28(7): 2187–2220
- Yao WL, He YY, Liu P, *et al.* The cDNA cloning and expression analysis of P38 MAPK gene of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 91–98 [姚万龙, 何玉英, 刘萍, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) p38 MAPK 基因克隆及表达分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 91–98]
- Ye J, Bromage ES, Kaattari SL. Plasma blasts and plasma cells and the organization of the teleost immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1273–1281
- Ye J, Bromage ES, Kaattari SL. The strength of B cell interaction with antigen determines the degree of IgM polymerization. *Journal of Immunology*, 2010, 184(2): 844–850
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, *et al.* XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001, 107(7): 881–891
- Zapata AG, Torroba M, Vicente A, *et al.* The relevance of cell

- microenvironments for the appearance of lymphohaemopoietic tissues in primitive vertebrates. *Histology and Histopathology*, 1995, 10(3): 761–778
- Zhou M, Jacob A, Ho N, *et al.* Downregulation of protein disulfide isomerase in sepsis and its role in tumor necrosis factor-alpha release. *Critical Care*, 2008, 12(4): R100
- Zwollo P, Cole S, Bromage E, *et al.* B cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *Journal of Immunology*, 2005, 174(11): 6608–6616
- Zwollo P, Haines A, Rosato P, *et al.* Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(12): 1482–1496

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Expression Analysis of *Xbp1-S* of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WANG Yuhong¹, YIN Xiaoxue¹, DING Mingmei¹, FU Shengli¹,
CHEN Meng¹, GUO Zheng^{1,2}, YE Jianmin^{1,2①}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; 2. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Environmentally-Friendly Aquaculture, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract X-box binding protein 1-S (*Xbp1-S*) is a key transcript factor mainly associated with B cell development and differentiation. The 1380 bp full-length cDNA of *OnXbp1-S* including 1155 bp ORF, 127 bp 5'UTR and 98 bp 3'UTR was cloned with RACE, which encodes 384 amino acids with a molecular weight of 41.32 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.36. Homology analysis revealed that the *OnXbp1-S* gene was homologous to other fish with the most similarity with *Notothenia coriiceps*. *OnXbp1-S* expresses in all tested tissues, with the highest mRNA expression in liver, and the highest protein level in thymus and the lowest protein level in muscle. *Streptococcus agalactiae* stimulation induced the expression of *OnXbp1-S* with the highest level at 192 h post-infection. In addition, mature B cells have a much higher *OnXbp1-S* level than naive B cells. Taken together, the results indicated that *OnXbp1-S* might be involved in the immune response in Nile tilapia against *S. agalactiae* infection, and play a role in B cell development and differentiation.

Key words *Oreochromis niloticus*; *Xbp1-S*; Gene cloning; Tissue expression; *Streptococcus agalactiae*

① Corresponding author: YE Jianmin, E-mail: yjmying@126.com