

许氏平鲈蛋白激酶B(SsAkt)基因的克隆及表达分析

李兆龙^{1,2}, 王腾腾², 韩慧宗², 陈钰臻², 王斐², 张明亮², 孙硕², 解维俊^{1,2}, 姜海滨^{2*}
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 烟台 264006

引言

许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)是适合我国北方网箱养殖的经济鱼种中最为重要且具备优良品质的本土养殖品种。随着养殖产业规模的扩大,以细菌性疾病为主的养殖病害时有发生。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。开展细菌感染与免疫的分子机制研究,可以清楚的认识机体对抗细菌感染的应答机制。蛋白激酶B(PKB/Akt)是一种重要的细胞信号转导分子,在细胞存活与代谢、免疫调控与防御等多种生物过程中发挥重要作用。本研究基于前期转录组数据,克隆获得了许氏平鲈SsAkt基因的编码区序列,对其进行生物信息学分析,运用实时荧光定量PCR技术分析了其时空表达特征和响应细菌胁迫的表达规律,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。

方法

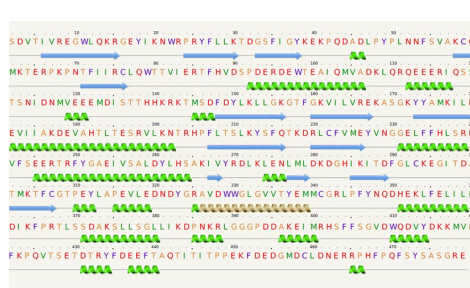
- 1、对健康鱼以及病原感染鱼麻醉后取样,用于核酸提取;
- 2、总RNA的提取及cDNA的合成,荧光定量PCR求得SsAkt基因mRNA相对表达量;
- 3、SsAkt基因核心序列的克隆,分析其编码氨基酸序列;
- 4、对所得序列进行同源分析,并对同源蛋白进行多序列比对以及构建进化树;
- 5、生物学信息分析,预测其相对分子量、理论等电点、二级结构以及三级结构;

结果

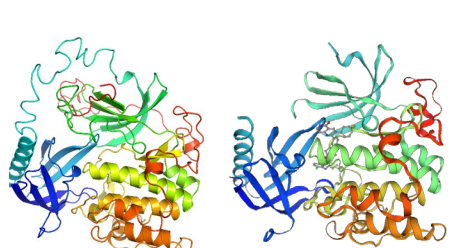
(1) SsAkt基因核苷酸及其编码的氨基酸序列

```
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 ATGAGCAGTGTCACCTGCTAGAGAGGATGGCTCCAGAAACGGGGTGAATATATAAAGACTGGCGCCGGT
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 TACTTCTGTTGAGACAGCGCTCCTCATGGCTACAAGAAGAACTCAGGACCGCCAGCTCCCTACCCC
51 L N N F S V A K C Q L M K T E R P K P N T F I R
151 CTAAATAACTTCTCTAGCAAAATGTCACTGATGAAGACGAGAGCGAAGCAAACTCCTCATCAGCC
76 C L Q V T T V I E R T F H V D S P D E R D E W T E
228 TGCTCCAGTGAGCACCGCTCCTCAGGAGCATCCAGCTGGACTCCCTCAGGAGAGAGATGAGTGAGCAG
101 A I Q M V A D K L Q R E E E R I Q S S P T S N I
301 GCATTCAGATGGTGCGACAGCTCAGAGACAGAGAGAGAGAGATTCAGAGCAGCCCACTCAGCAGC
126 N M V E E E M D I S T T H K R K T M S D F D Y
376 GACAAGATGTCAGGAGAGATGAGTCTCACCACACACCAACCAAGCAGCAATGAGGACCTTGATAC
151 L K L L K G T G T F G K V I L V R E A S G K Y Y A
451 CTGAAGCTCGGGAAAGGAACTTCGGAGGTAATTCTTGTCCGAGAAGCGAGCGGAAATACACGCC
176 N K L L K K E V I I A K D E V A H T L T E S R V L
526 ATGAAATCTTAAAAGAACTCATACATGCAAGATGAGTGGCTCACACTCACAGAGAGAGCGAGTCTG
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 AAACAGCAGACCCCTTCTCAGCTGATTGAAATGATTCAGACACTAAGACCGCTCTGTTCGTCTAG
226 Y V N G G E L F H L S R E R V F S E E R T R F
676 GATGATGTAAGGAGGAGCTGTTTCATTTTCCAGAGAGCGGCTTCTCAGAGAGCGCGCTTC
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 TACGGCGCAGAGTCTCTGGCACTCGACTACCTGACTCAGCAAGATTGTCACCGGACTCAGTGTAGA
276 N I M L D K D G H I K I T I D P F L C K E G I T D A
826 AACCTGATCGTGAATAAGAGCGCCACATCAAACTGATTCGGCTCTCAGAGAGGAGCATCAGACCGCT
301 A T M K F C G T P E Y L A P E V L E N D Y G R
901 GCATCATGAGCTCTCTGGCTGACTGGCAGGATGATATGATAAAGATGTCCTCCCTCGCAGCTCAG
426 V T S E F D R Y F D E E P T A Q T I T T P P E
1276 GTGAGCTCGAGACGACACCTACTGACAGGAGGATTCACCGCCACACATCGATCCTCCAGCAG
451 K F D E D G M D C L D N E R R P H F P Q F S I S A
1351 AATTCAGAGAGCGGATGACTGCTGGACAGGAGACCGCCACTCCACAGTTCCTACTCCGC
476 S G R E *
1426 AGCGCCGGGAATGA
```

(3) SsAkt蛋白二级结构

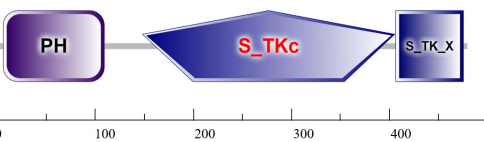


(4) SsAkt蛋白三级结构(左) 智人Akt蛋白三级结构(右)



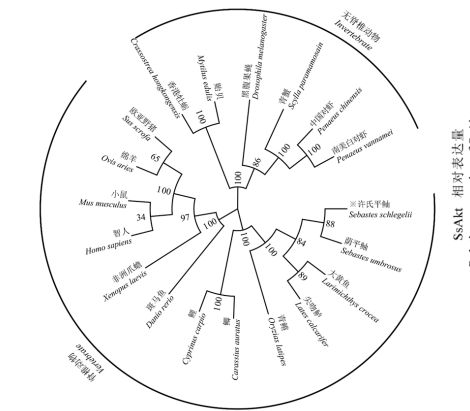
SsAkt由31%的 α -螺旋和19%的 β -折叠及3%的TM螺旋和无序结构组成;与其他物种Akt的三维结构具有较高相似度,与智人蛋白相似性为81.18%

(2) SsAkt蛋白结构域预测



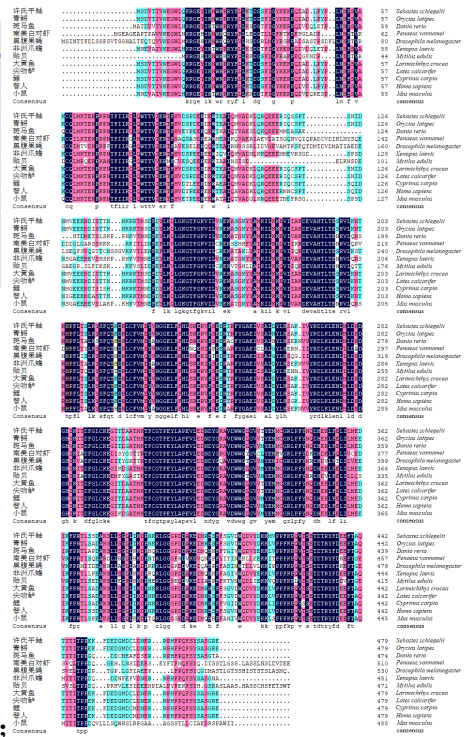
SsAkt基因的开放阅读框(ORF)长度为1440 bp,编码479个氨基酸;蛋白相对分子质量为55.80kDa,预测理论等电点(pI)为5.64;SsAkt蛋白含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的3个特征性保守结构域(PH结构域、S_TKc结构域和S_TK_X结构域)和2个磷酸化位点(Thr³⁰⁵和Ser⁴⁷²)。

(5) SsAkt基因进化树的构建



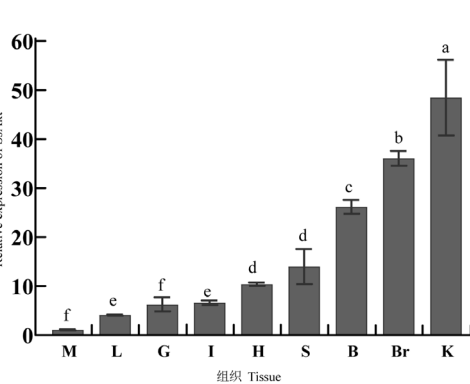
SsAkt先与尖吻鲈、大黄鱼、青鳉等鱼类聚为一类,再与小鼠、智人等哺乳动物聚为一支,最后与无脊椎动物聚为一支。

(6) 氨基酸序列的多重比对



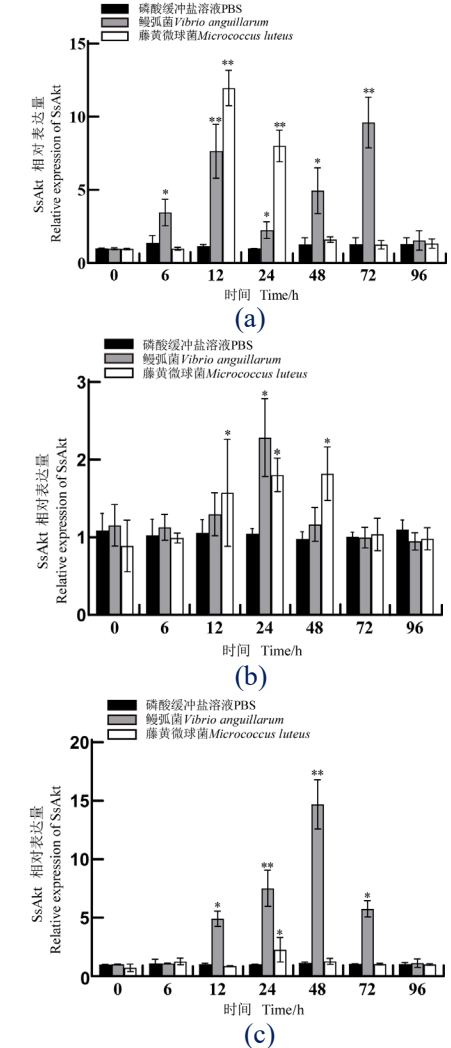
SsAkt蛋白序列与其它物种的Akt有较高的相似性,相似性范围为55.84%~99.37%。

(7) SsAkt在不同组织中的相对表达量



SsAkt在许氏平鲈健康组织(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,在肌肉中的相对表达量最低。

(8) 细菌感染下许氏平鲈肾脏(a)、血液(b)、肝脏(c)中SsAkt基因mRNA的相对表达量



在藤黄微球菌感染后和鳃弧菌刺激后血液和肝脏中SsAkt的表达模式相似,均呈现先上升后下降趋势;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,而鳃弧菌刺激后,SsAkt的表达呈现先上升后下降又上升再下降的趋势。

结论

本研究报道了许氏平鲈SsAkt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。SsAkt响应了外源微生物对许氏平鲈的刺激,在抵御外源微生物免疫应答过程中发挥重要作用。进一步丰富了海水鱼类Akt同源基因的研究数据,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。