

文章编号: 1004-7271(2006)04-0483-05
·综述·

水生动物溶菌酶的研究进展

郑清梅^{1,2}, 吴锐全¹, 叶 星¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 广东嘉应学院生物系, 广东 梅州 514015)

摘 要 近年来, 由于水产养殖过程病害日趋严重, 水产养殖对象的非特异性免疫因子的研究与开发引起了人们的重视。溶菌酶是生物体内重要的非特异性免疫因子之一。综述了水生动物包括鱼、虾和贝类溶菌酶的生物学功能, 溶菌酶的基因克隆、基因工程表达及其在机体内的表达规律等的研究进展, 并探讨了其在水产养殖病害防治方面的应用前景。

关键词 溶菌酶; 免疫因子; 水生动物; 基因克隆; 表达

中图分类号: Q 55; Q 176 文献标识码: A

The research advance of lysozyme in aquatic animals

ZHENG Qing-mei^{1,2}, WU Rui-quan¹, YE Xing¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Guangzhou 510380, China;
2. Biology Department, Jiaying University, Meizhou 514015, China)

Abstract: Diseases has become a serious problem in aquaculture recently years. The research of non-specific immune factors of the cultured aquatic animal have been taken into account. Lysozyme is one of the important non-specific immune factors in body. In this article, the biological function, molecular cloning, genetic engineering and expression in body of lysozyme were summarized. At the same time, the applications of lysozyme of aquatic animal in aquaculture disease prevention were discussed.

Key words: lysozyme; immune factor; aquatic animal; molecular cloning; expression

溶菌酶广泛存在于动物、植物和微生物的各种组织、体液及分泌物中, 是生物体内重要的非特异性免疫因子之一, 在抵抗外来病原入侵中起重要作用^[1,2]。近年来, 水生动物溶菌酶的研究日渐受到重视, 尤其是重要养殖品种溶菌酶的分子水平研究陆续有见报道。本文综述了水生动物溶菌酶生物学功能、基因克隆、基因工程表达以及溶菌酶基因在机体内的表达等方面的研究进展。

1 溶菌酶的生物学功能

溶菌酶是生物体内重要的非特异免疫因子之一, 在机体免疫过程中不仅能催化水解细菌细胞壁而导致细菌溶解死亡^[3,4], 还可诱导调节其他免疫因子的合成与分泌。溶菌酶水解细胞壁时所释放的肽聚糖碎片是合成与分泌各种抗菌蛋白包括溶菌酶的诱导物, 溶菌酶可清除其它抗菌因子作用后所残余

收稿日期: 2005-12-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(20010673)

作者简介: 郑清梅(1978-), 女, 讲师, 广东茂名, 主要从事水生生物技术研究。Tel: 0753-2352289 E-mail: zhqm78@163.com

的细菌细胞壁并增强其它免疫因子的抗菌敏感性,并协同其他免疫因子共同抵制外来病原的入侵^[5,6]。

水生动物血清溶菌酶活力的高低是衡量机体免疫状态的指标之一。血清溶菌酶活力提高,其免疫能力也相应提高。鄢庆彬等^[7]给大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)投喂免疫添加剂后,其溶菌酶、酚氧化酶的活力提高,非特异性免疫机能有所增强。刘树青等^[8]给中国对虾(*Penaeus chinensis*)腹腔注射海藻多糖和北虫草多糖后,对虾血清中溶菌酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶活力显著提高,中国对虾的免疫功能增强。相反,水生动物血清溶菌酶的活性降低,机体免疫力降低。丁美丽等^[9]认为对虾生活于有污染物胁迫的环境中,体内的溶菌酶、酚氧化酶等活力明显下降,导致虾体的抗病能力降低。水生动物血清溶菌酶的活性变化还可作为养殖环境污染程度的指标之一^[10]。Nilsen等^[11]从海产冰岛栉孔扇贝(*Chlamys islandica*)的内脏中分离到一种溶菌酶,能有效抑制革兰氏阳性与阴性菌的生长,但只能在pH 4.5~6.2和4~35℃的条件下高效水解微球菌(*Micrococcus luteus*)。

2 水生动物溶菌酶的分子生物学

溶菌酶按其氨基酸序列的差异可分为六类:鸡蛋清溶菌酶(c-型)、鹅溶菌酶(g-型)、噬菌体溶菌酶(p-型)、无脊椎动物溶菌酶(i-型)、植物溶菌酶和细菌溶菌酶^[12,13]。其中c-型溶菌酶分布最广泛,脊椎动物与无脊椎动物中均有存在^[14],包括钙结合溶菌酶和非钙结合溶菌酶两种亚型^[15]。在有些生物中同时存在两种类型的溶菌酶,如鸟类和鱼类有c-型与g-型溶菌酶^[12]。

2.1 水生动物溶菌酶的基因克隆

对人、鸡、昆虫等生物的c-型溶菌酶基因的研究较多。已报道的人、鸡、昆虫等的c-型溶菌酶基因的推导氨基酸残基130~140个,都具有保守的酶活性位点谷氨酸(Glu)残基和天冬氨酸(Asp)残基与结构氨基酸残基8个半胱氨酸(Cys)残基。水生动物溶菌酶的研究起步较晚,但近年来已取得可喜的进展。

2.1.1 鱼类溶菌酶基因的克隆及其同源性分析

目前已从几种鱼中克隆了c-型溶菌酶基因。Dautigny等^[16]分别从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的肝脏和肾脏cDNA文库中获得长1 kb的c-型溶菌酶基因片段(I型和II型),其中包括开放阅读框(ORF)432 bp,编码成熟肽129个氨基酸残基。I型和II型只在第86位氨基酸不同,I型的为天冬氨酸残基,II型的为丙氨酸残基。Mitra等^[17]进一步研究表明,虹鳟溶菌酶基因(I型和II型)具有4个外显子和3个内含子,但只有II型溶菌酶基因编码的溶菌酶具有潜在的抗菌活性。Hikima等^[18]从日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的肾脏cDNA文库中获得编码143氨基酸残基的c-型溶菌酶基因。其推导氨基酸序列与虹鳟、鸡、人的同源性分别为72.9%、57.4%和65.4%,且酶活性位点、半胱氨酸残基完全保守。

鱼类也克隆到g-型溶菌酶基因。Hikima等^[12]从DNA文库中首次克隆了日本牙鲆的长为1 252 bp的g-型溶菌酶基因。该基因具有5个外显子和4个内含子,编码成熟肽195个氨基酸残基。Yin等^[19]从斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的血细胞cDNA文库中克隆了编码194氨基酸残基的g-型溶菌酶全序列。该序列与日本牙鲆的g-型溶菌酶基因的同源性为72.2%。这两种鱼与鲤的g-型溶菌酶基因与鸟类的g-型溶菌酶基因相似,具有保守的酶活性位点及相邻序列,但缺乏鸟类g-型溶菌酶保守的4个半胱氨酸残基^[12,19]。鱼g-型溶菌酶与c-型溶菌酶的同源性很低,只有10%。

2.1.2 虾类溶菌酶基因的克隆及其同源性分析

虾类溶菌酶基因的研究较鱼类的晚些。2001年Tassanakajorn等研究了哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染斑节对虾(*Penaeus monodon*)后的血细胞基因表达情况,首次获得了长542 bp的类似溶菌酶基因cDNA片段(GenBank, BI784440)。Soma等克隆了日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)类似溶菌酶的基因(AB074894)。Gross等^[20]采用表达序列标签法(expressed sequence tag, EST)研究凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*)和大西洋白对虾(*L. setiferus*)的血细胞和肝胰脏的免疫相关基因表达,获得类似溶菌酶基因片段(BE188312)。郑清梅等^[21]从斑节对虾血细胞中克隆到长为658 bp的c-型溶菌酶基因(AF539466),包括开放阅读框(ORF)477 bp(从起始密码子ATG到终止密码子TAA)和3'端非编码区的181 bp,并具有

保守的酶活性位点和 8 个半胱氨酸残基。其它虾类如日本对虾^[22]、短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*)^[23]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[24]的 c-型溶菌酶基因也相继被克隆。

亲缘关系较近的虾类溶菌酶基因的同源性较高,如斑节对虾和凡纳对虾溶菌酶基因的推测氨基酸序列之间的同源性为 94.3%,罗氏沼虾和日本沼虾的为 98.1%^[24]。鱼、虾与其它几种生物的 c-型溶菌酶的同源性比较见表 1。对虾的 c-型溶菌酶基因比脊椎动物、昆虫等生物的 c-型溶菌酶稍大,约由 158 个氨基酸残基组成,包括成熟肽 140 个氨基酸残基和信号肽 18 个氨基酸残基,其 c-端具有海洋无脊椎动物溶菌酶所特有的氨基酸残基^[25]。

表 1 虾、鱼溶菌酶与其它类群 c-型溶菌酶的推测氨基酸序列同源性比较

Tab.1 Identities of the deduced amino acid sequences of the shrimps and fish lysozymes and c-type lysozyme of other species

	短沟对虾	南美白对虾	斑节对虾	日本对虾	虹鳟	鸡	按蚊
南美白对虾	88.6						
斑节对虾	94.3	93.0					
日本对虾	88.6	87.3	90.5				
罗氏沼虾	80.2	80.6	81.5				
虹鳟	55.8	52.8	54.0	52.1			
鸡	50.9	52.1	50.3	51.5	72.8		
按蚊	47.9	51.5	49.1	49.1	48.7	46.1	
人	47.6	50.0	48.8	50.0	71.6	72.3	49.7

注 短沟对虾 *Penaeus semisulcatus*(AAN86085),南美白对虾 *Litopenaeus vannamei*(AAN86086),斑节对虾 *Penaeus monodon*(AAN16375),日本对虾 *Marsupenaeus japonicus*(BAC57467),罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*(AAP13577),虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*(AAC34564),鸡 *Gallus gallus*(NP-990612),按蚊 *Anopheles darlingi*(AAB61345),人 *Homo sapiens*(NP-000230)

2.1.3 海产贝类溶菌酶基因的克隆

来源于海产贝类的 i-型溶菌酶基因与 c-型溶菌酶基因差异较大,但具有同源外显子。Nilsen 等^[26]克隆了冰岛栉孔扇贝 i-型溶菌酶基因。该基因长 4.2 kb,编码 137 个氨基酸残基,包括 4 个长 38~252 bp 外显子和 4 个 0.8~1.5 kb 的内含子,与脊椎动物的 c-型溶菌酶基因相似。但三个外显子的结构与无脊椎动物的 c-型溶菌酶基因不同。Bachali 等^[27]克隆了 6 种双壳类的溶菌酶 cDNA,并进行同源性比较,其中贻贝(*Mytilus edulis*)的溶菌酶基因的一个外显子与鸡的 c-型溶菌酶的第二个外显子同源。系统进化树分析显示,溶菌酶的 i-型与 c-型的进化距离较远^[28],i-型溶菌酶可能起源于一个独立的家族^[27]。不同类型溶菌酶的氨基酸序列虽然有差异,但有着相似的酶活性位点。

2.2 水生动物溶菌酶的基因工程表达及重组蛋白的抗菌谱

溶菌酶基因工程的研究始于二十世纪 80 年代中期,在大肠杆菌和酵母中分别表达了具有生物活性的人溶菌酶和鸡蛋清溶菌酶。水生动物溶菌酶的基因已分别在大肠杆菌和昆虫细胞表达系统中表达,且表达产物具相近的抗菌谱,对革兰氏阴性菌具有溶菌活性作用。Minagawa 等^[29]利用杆状病毒(baculovirus)表达系统在昆虫细胞中表达了日本牙鲆 c-型溶菌酶。该重组溶菌酶能对鳗弧菌(*V. anguillarum*)、溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*)等有明显的溶菌作用,但对引起养殖日本牙鲆严重病害的重要病原体爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和链球菌(*Streptococcus sp.*)的活力很低。重组鱼 g-型溶菌酶也具有溶解革兰氏阴性病原菌的能力^[12,19]。

对虾重组溶菌酶具有与鱼相近的抗菌谱。Hikima 等^[22]在昆虫细胞中表达的日本对虾重组溶菌酶对几种弧菌与鱼病原菌,包括一种引起日本对虾病害的弧菌(*V. penaeicida*)有溶菌作用。郑清梅等^[30]在大肠杆菌中表达的斑节对虾溶菌酶对溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、鳗弧菌(*V. anguillarum*)、爱德华氏菌(*E. tarda*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)等病原菌有溶菌活性。

溶菌酶的活性较稳定,这种热力学的稳定性与残基侧链的疏水性及大小关系有关^[31]。但不同来源的水生动物重组溶菌酶的溶菌活力的最适 pH 值与温度存在一定的差异(表 2)。

表 2 重组鱼和对虾溶菌酶的最适 pH 和最适温度比较

Tab. 2 Optimum pH and temperatures of recombinant lysozyme of fish and shrimps

种类	重组溶菌酶	最适 pH	最适温度℃	资料来源
日本牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	c-型	5.0-6.5	40	[29]
日本牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	g-型	6.0	25	[12][19]
斑节对虾 (<i>Penaeus monodon</i>)	c-型	6.0	40	[30]
日本对虾 (<i>Marsipenaeus japonicus</i>)	c-型	7.5	50	[22]

2.3 溶菌酶基因在水生动物机体内的表达研究

溶菌酶基因在机体内广泛分布,经细菌感染后在某些组织中的表达量明显提高。Hikima 等^[18]通过 Northern 杂交表明,在健康的日本牙鲆中,c-型溶菌酶在肾脏、脾脏、脑和卵巢等组织中有明显转录,经爱德华氏菌感染后,在头肾、脾脏和卵巢中的转录量显著提高。日本牙鲆的 g-型溶菌酶在体内多种组织均有表达,经爱德华氏菌感染后,其表达量在心脏、肠和血显著提高^[12]。高风英等^[24,32]利用 18S rRNA 生物素标记探针检测罗氏沼虾溶菌酶基因组织表达,结果表明经弧菌感染 6 h 后,溶菌酶基因 mRNA 在眼、肌肉、鳃、肝胰腺、肠管中的表达量均比未经感染的罗氏沼虾增加,其中肝胰腺中的增加量最大,约为对照组的 560%。受病原菌感染后水产动物体内溶菌酶基因转录量的增加,表明溶菌酶基因在非特异性免疫中的直接作用^[32]。

3 溶菌酶在水产养殖上的应用前景

已报道的水生动物重组溶菌酶抗菌谱与鸡蛋清溶菌酶等的有所不同,它不但能溶解革兰氏阳性菌,还能溶解革兰氏阴性菌。引起水产动物严重病害的病原菌通常是革兰氏阴性菌,因此,重组水产动物溶菌酶有可能应用于水生动物的病害防治,减少或替代水产养殖过程中化学药物的使用。同时溶菌酶基因也已作为抗病转基因品种培育的重要候选基因之一。纪伟等^[33]应用电脉冲精子介导法将溶菌酶基因导入到大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 受精卵内,获得原代转基因大菱鲂,在水生动物溶菌酶转基因研究中迈出了第一步。随着对水生动物免疫机制的研究的深入、生物技术如转基因等技术的提高,以及国际国内市场对水产品食用安全要求的不断提高,在水产养殖中应用重组溶菌酶作为绿色药物、培育转溶菌酶基因鱼虾或其它水生品种,将是实现水产健康养殖的途径之一。

参考文献:

- [1] Grinde B, Jollés J, Jollés P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Eur J Biochem, 1988, 173:169-273.
- [2] Bulet P, Hetru C, Dimarcq J L, et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function [J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23:329-344.
- [3] Mori K, Nakanishi T, Suzuki T, et al. Defense mechanisms in invertebrates and fish [J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1989, 34(3):214-223.
- [4] Boman H G, Faye I, Gudmundsson G H, et al. Cell-free immunity in cecropia. A model system for antibacterial proteins [J]. Eur J Biochem, 1991, 20(1):23-31.
- [5] Morishima I, Yamada K, Ueno T. Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1992, 22:363-367.
- [6] Fujimoto S, Toshimori-Tsuda T, Kishimoto K, et al. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* [J]. Comp Biochem and Physio Part B, 2001, 128:709-718.
- [7] 鄢庆彬, 苏永全, 王军, 等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(2):134-137.
- [8] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5):278-

283.

- [9] 丁美丽 林 林 李光友 等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7 - 11.
- [10] 高 健 李跃华. 甲壳类的体液免疫因子及其环境作用 [J]. 水产养殖, 1992, 6 : 21 - 23.
- [11] Nilsen I W, Overbo K, Sandsdalen E, et al. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity [J]. FEBS Lett, 1999, 464(3): 153 - 158.
- [12] Hikima J, Minagawa S, Hirono I, et al. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1520 : 35 - 44.
- [13] Bachali S, Jager M, Hassanin A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function [J]. J Mol Evol, 2002, 54(5): 652 - 664.
- [14] 贾向志 李 元 马文煜. 溶菌酶的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2002, 13(5): 374 - 377.
- [15] Feng L, Ziling W. Cloning and expression pattern of the lysozyme C gene in zebrafish [J]. Mechanisms of Development, 2002, 11 : 369 - 72.
- [16] Dautigny A, Prager E M, Pham-Dinh D, et al. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin [J]. J Mol Evol, 1991, 33(2): 187 - 98.
- [17] Mitra A, Foster-Frey J, Rexroad C E, et al. Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of gene duplication [J]. Anim Biotechnol, 2003, 14(1): 7 - 12.
- [18] Hikima J, Hirono I, Aoki T. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1997, 4(4): 339 - 44.
- [19] Yin Z X, He J G, Deng W X, et al. Molecular cloning, expression of orange-spotted grouper goose-type lysozyme cDNA, and lytic activity of its recombinant protein [J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(2): 117 - 23.
- [20] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25(7): 565 - 577.
- [21] 郑清梅 叶 星 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因克隆及序列分析 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(4): 413 - 417.
- [22] Hikima S, Hikima J, Rojtinakorn J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. Gene, 2003, 316 : 187 - 195.
- [23] 郑清梅 叶 星 白俊杰, 等. 短沟对虾和凡纳对虾溶菌酶 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 482 - 483.
- [24] Gao F Y, Ye X, Bai J J, et al. cDNA cloning and expression characterization of lysozyme gene in two freshwater prawn [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 615 - 620.
- [25] Sotelo-Mundo R R, Islas-Osuna M A, de-la-Re-Vega E, et al. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15(4): 325 - 31.
- [26] Nilsen I W, Overbo K, Sandsdalen E, et al. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity [J]. FEBS Lett, 1999, 464(3): 153 - 8.
- [27] Bachali S, Jager M, Hassanin A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function [J]. J Mol Evol, 2002, 54(5): 652 - 64.
- [28] Nilsen I W, Mymes B. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes [J]. Gene, 2001, 269 : 27 - 32.
- [29] Minagawa S, Hikima J, Hirono I, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25 : 439 - 445.
- [30] 郑清梅 叶 星 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因的原核表达与产物活性检测 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 20 - 24.
- [31] Veenstra D L, Kollman P A. Modeling protein stability: a theoretical analysis of the T4 lysozyme mutants [J]. Protein Eng, 1997, 10(7): 789.
- [32] 高风英 叶 星 白俊杰, 等. 罗氏沼虾 18S rRNA 基因生物素标记探针的制备及应用 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 124 - 127.
- [33] 纪 伟 张培军. 转“全鱼”溶菌酶基因大菱鲆的研究 [J]. 海洋科学, 2004, 28(5): 9 - 14.