

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210510001

http://www.yykxjz.cn/

刘晓飞, 张爽爽, Hendriansyah Endri, 李英瑞, 苏琳, 李相前, 修云吉, 顾伟. 牙鲆半乳糖凝集素 6 基因的克隆、表达及功能研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 147-157

LIU X F, ZHANG S S, HENDRIANSYAH E, LI Y R, SU L, LI X Q, XIU Y J, GU W. Cloning, expression and function of *Galectin-6* from *Paralichthys olivaceus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 147-157

牙鲆半乳糖凝集素 6 基因的克隆、 表达及功能研究*

刘晓飞^{1,2} 张爽爽² Endri Hendriansyah¹ 李英瑞^{1,2}
苏琳² 李相前³ 修云吉² 顾伟^{1①}

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院 江苏 南京 210023;

2. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 山东 青岛 266109;

3. 淮阴工学院 江苏省益生制剂重点建设实验室 江苏 淮安 223003)

摘要 半乳糖凝集素 6 (*Galectin-6*) 是 β -半乳糖苷结合凝集素家族的成员之一。本研究首次分离并鉴定了牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *Galectin-6* (*PoGalectin-6*), 分析了其分子特征和表达模式, 并对其免疫相关功能进行了研究。*PoGalectin-6* 基因的开放阅读框长为 1089 bp, 共编码 362 个氨基酸, 其中包含 2 个糖识别结构域 (CRDs)。同源序列比对和系统进化树分析显示, *PoGalectin-6* 与大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) *Galectin-4* 的相似性为 80.9%。组织分布结果显示, *PoGalectin-6* 基因主要在肠组织中特异性表达。迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染后, *PoGalectin-6* 基因在肠组织中的表达显著升高, 感染后 12 h 表达量最高, 随后逐渐降低并恢复至正常水平。细菌结合实验证实, *PoGalectin-6* 重组蛋白 (r*PoGalectin-6*) 能够结合枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*), 但并不结合短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)。此外, r*PoGalectin-6* 以钙离子依赖的方式对短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、杀鲑气单胞菌和迟缓爱德华氏菌表现出明显的凝集作用。研究表明, *PoGalectin-6* 基因参与了由迟缓爱德华氏菌感染引起的免疫应答, 这一发现为探索 *Galectin-6* 在硬骨鱼类中的免疫功能奠定了基础。

关键词 糖凝集素 6; 牙鲆; 迟缓爱德华氏菌; 免疫应答

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0147-11

半乳糖凝集素 (galectins) 是一种能够体外结合 β -半乳糖苷的可溶性凝集素, 其家族成员按分子结构特征可分为原型、嵌合型和串联重复型 (Thijssen *et al.*, 2015)。半乳糖凝集素广泛存在于动物中, 目前, 共

有 15 种半乳糖凝集素被分离、鉴定并命名, 其相关功能已在许多物种中被广泛研究, 包括真菌 (Butschi *et al.*, 2010)、刺胞动物门 (Hwang *et al.*, 2010)、昆虫 (Rao *et al.*, 2016)、线虫 (Takeuchi *et al.*, 2016)、软体动物 (Bai

* 国家自然科学基金项目 (32002421) 资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (32002421)]. 刘晓飞, E-mail: lxf370784@163.com

① 通信作者: 顾伟, 副教授, E-mail: skywei426@sina.com

收稿日期: 2021-05-10, 收修改稿日期: 2021-06-04

et al, 2018)、头索动物(Yu et al, 2007)和尾索动物(Vizzini et al, 2012)等。研究发现,半乳糖凝集素在生物体的许多生物过程中发挥作用,如细胞粘附(Ferragut et al, 2019)、细胞凋亡(Liu et al, 2011)、炎症反应(Nita-Lazar et al, 2015)和肿瘤转移(Shatz-Azoulay et al, 2020)等。

半乳糖凝集素 6 (*Galectin-6*)是一种典型的串联重复型半乳糖凝集素, *Galectin-6* 在动物体内的功能研究尚不全面。研究发现,埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)体内的 *Galectin-6* 能阻碍 cry11aa [苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)产生的一种晶体毒素,对埃及伊蚊有致命毒性]与碱性磷酸酶 1 (ALP1)和氨肽酶 N (APN2)结合,对埃及伊蚊体起到保护作用(Hu et al, 2020)。对小鼠(*Mus musculus*) *Galectin-6* (*Lgals6*)研究发现, *Lgals6* 是一种新型的抗菌蛋白(antimicrobial proteins, AMPs),可能起到调节皮肤纤维化的作用,其表达水平受皮肤微生物组的影响(Natsuga et al, 2016)。此外, Gitt 等(1998)研究发现, *Lgals6* 和小鼠 *Galectin-4* (*Lgals4*)具有高度的同源性,在小鼠消化道中, *Lgals6* 与 *Lgals4* 的表达模式几乎相同,且 *Lgals6* 和 *Lgals4* 在核酸水平和氨基酸水平的一致性分别高达 93%和 83%,暗示它们在小鼠体内可能具备相似的功能。研究表明, *Galectin-4* 参与炎症反应、肠上皮伤口愈合(Paolik et al, 2008)和肠道中表达人类血型抗原的大肠杆菌(*Escherichia coli*)杀灭过程(Stowell et al, 2010),但 *Galectin-6* 是否具有类似功能,还需要进一步验证。事实上, *Galectin-6* 可能有一些尚未证实的潜在功能。Houzelstein 等(2013)推测, *Galectin-6* 的潜在功能并不是由其表达模式的改变引起的,而可能是由其特异性结合新配体的独特蛋白结构引起的。

目前,有关 *Galectin-6* 的报道主要集中在哺乳动物中,而在硬骨鱼类中缺乏相关研究。本研究在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中发现一种 *Galectin-6* (*PoGalectin-6*),对 *PoGalectin-6* 的基因序列和氨基酸序列进行分析鉴定,构建 *PoGalectin-6* 与串联重复型 galectins (*Galectin-6*、*Galectin-4*、*Galectin-8* 和 *Galectin-9*)的系统进化树,验证 *PoGalectin-6* 在免疫组织中的分布和表达水平,表达纯化重组 *PoGalectin-6* 蛋白用于细菌结合和凝集实验,可为进一步研究 *PoGalectin-6* 的相关功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆购自山东烟台,平均体重为(120±10) g,平

均体长为(22±3) cm。健康牙鲆在 15℃水温海水循环养殖系统中暂养 7 d。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为本实验室保存菌种,经 16S rRNA 测序进行菌种鉴定。

1.2 样品处理和采集

随机取 9 条健康牙鲆进行组织取样,每 3 条鱼的肝、脾、肾、脑、鳃、肠、皮肤和肌肉组织混合作为 1 个生物学重复,样品在液氮中快速冷冻后转移至 -80℃保存,用于总 RNA 提取。

采用浸泡法对健康牙鲆进行迟缓爱德华氏菌(6×10^7 CFU/mL)感染实验,感染 2 h 后转入海水循环养殖系统正常养殖。在感染之前,随机抽取 9 条健康牙鲆的肠组织作为对照(0 h),恢复养殖后的 2、8、12、24、48 和 72 h 分别取 9 条鱼的肠组织,按上述方法冷冻保存,留待实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析。

1.3 RNA 提取和 cDNA 制备

根据 TRIzol 试剂盒(Invitrogen, 美国)的说明书,进行组织的总 RNA 提取,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的完整性,用超微量分光光度计(Thermo Scientific, 中国)检测其纯度和浓度。用 PrimeScript™ RT reagent kit (TaKaRa, 日本)反转录合成 cDNA,反应体系: 2 μL 5× PrimeScript Buffer, 0.5 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I, 0.5 μL Oligo dT Primer, 0.5 μL Random 6 mers, Total RNA 用量为 500 μg,补充 RNase Free dH₂O 至 10 μL。上述反应体系在 37℃条件下反转录 15 min,然后,于 85℃反应 5 s,使反转录酶失活。将 cDNA 在 -20℃冰箱保存备用。

1.4 *PoGalectin-6* 基因序列分析

利用 NCBI 网站 Blast 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *PoGalectin-6* 基因序列进行核苷酸同源性比对;利用 Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 ORF;使用 SMART (simple modular architecture research tool)在线软件分析 *PoGalectin-6* 蛋白结构域。

1.5 *PoGalectin-6* 同源序列比对与系统进化树构建

利用 NCBI 网站查询不同物种的串联重复型 galectins (*Galectin-6*、*Galectin-4*、*Galectin-8* 和 *Galectin-9*)的氨基酸序列。采用 DNAMAN 软件对 *PoGalectin-6* (XP_019943943.1)与硬骨鱼类 *Galectin-6* 和 *Galectin-4* 的氨基酸序列进行多重序列比对,包括斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*) *Galectin-6* (XP_023009370.2)、白斑狗鱼(*Esox lucius*) *Galectin-6* (XP_019900129.1)、

秀美花鲈(*Poecilia formosa*) Galectin-6 (XP_016527155.1)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) Galectin-4 (AXR99075.1)、乌鳢(*Channa argus*) Galectin-4 (KAF3693285.1)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) Galectin-4 (XP_025753881.1)。

利用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-joining 法构建 PoGalectin-6 与其他硬骨鱼类串联重复型 galectins 的系统进化树, 包括上述硬骨鱼类 Galectin-6 和 Galectin-4 以及半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) Galectin-4 (XP_008307038.1)、眼斑双锯鱼(*Amphiprion ocellaris*) Galectin-8 (XP_023152887.1)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*) Galectin-8 (ANN46245.1)、斑马拟丽鱼 Galectin-8 (XP_004561164.1)、大西洋鲑(*Salmo salar*) Galectin-8 (NP_001133778.1)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) Galectin-9 (ACO08221.1)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) Galectin-9 (NP_001187343.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) Galectin-9 (XP_010754381.2) 和乌鳢 Galectin-9 (KAF3692519.1)。

1.6 PoGalectin-6 基因 qRT-PCR 分析

根据 PoGalectin-6 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PoGalectin-6 特异性引物 (PoGalectin-6-qF 和 PoGalectin-6-qR), 以牙鲆 *EF1 α* 基因作为内参, 引物序列见表 1。使用 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa, 日本) 试剂盒, qRT-PCR 按照说明书于 BioRad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系为 10 μ L: 5 μ L TB Green Premix Ex Taq II (2 \times), 0.4 μ L 上游引物, 0.4 μ L 下游引物, 0.8 μ L 模板 cDNA, 3.4 μ L ddH₂O。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 35 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 0.5 $^{\circ}$ C/cycle。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 PoGalectin-6 基因的相对表达量, 每个样品设置 3 个重复。使用 SigmaPlot 11.0 软件作图以及单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

1.7 重组 PoGalectin-6 的表达纯化

根据 PoGalectin-6 基因序列合成一对引物 PoGalectin-6-eF 和 PoGalectin-6-eR (表 1), 用于扩增 PoGalectin-6 基因。PCR 扩增体系为 25 μ L: 12.5 μ L 2 \times Taq PCR Mix, 0.5 μ L 上游引物, 0.5 μ L 下游引物, 2 μ L 模板 cDNA, 9.5 μ L ddH₂O。反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 34 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 4 $^{\circ}$ C 冷却。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 结果进行检测, 检测结果无误后, 将 PCR 产物回收, 并利用超微量分光光度计检测其纯度和浓度。使用相同的限制性内切酶(*EcoR* I 和 *Hand* III)对 PCR 产物和 *pet32a* 质粒进行处理, 使用 T4 DNA 连接酶将 PCR 产物与 *pet32a* 质粒连接, 构建 *pet32a-PoGalectin-6* 重组质粒。将重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 表达感受态细胞, 使用 0.5 mmol/L IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 4 h 诱导蛋白表达, 同时, 以未加 IPTG 诱导的细胞作为对照组, 通过超声破碎法提取 PoGalectin-6 重组蛋白(rPoGalectin-6)。将破碎后的菌液于 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后, 收集沉淀进行变性及复性, 然后经 Ni-NTA 树脂纯化, 并利用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定。rPoGalectin-6 蛋白浓度通过 Bradford 法进行测定。

1.8 rPoGalectin-6 与微生物的亲合力检测

通过酶联免疫吸附法检测 rPoGalectin-6 对 3 株革兰氏阳性菌[枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)]及 3 种革兰氏阴性菌[杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)]的亲合力。上述细菌均取自本实验室保存菌种, 将上述细菌于磷酸盐缓冲液(PBS)中重悬至 1 \times 10⁸ CFU/mL, 各取 100 μ L 的细菌悬液置于 96 孔 EIA/RIA 板(康宁, 中国), 4 $^{\circ}$ C 下过夜培养。然后每孔

表 1 PoGalectin-6 基因克隆和荧光定量所用引物
Tab.1 Primers for PCR and qRT-PCR of PoGalectin-6 gene

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Application
PoGalectin-6-qF	ATCAGCCCGTCTATGGACCT	qRT-PCR 扩增
PoGalectin-6-qR	ACTTTGTCCCAGCCGTCAA	qRT-PCR 扩增
PoEF1 α -qF	CATGGTCGTGACCTTCGCTC	qRT-PCR 内参
PoEF1 α -qR	CTCGGGCATAGACTCGTGGT	qRT-PCR 内参
PoGalectin-6-eF	CCGGAATTCATGACCTTTGTTGCTCCTCCTG	PCR 扩增
PoGalectin-6-eR	CCCAAGCTTGAAGTGGATGTACGAGATCTGC	PCR 扩增

加入 250 μL 封闭缓冲液(5%脱脂奶粉溶于 PBST), 继续在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭 1 h。用 PBS 将 rPoGalectin-6 稀释至终浓度分别为 0.1、1 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 PBS 作为对照, 各取 100 μL rPoGalectin-6 加入孔中, 并在 22 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 h, 每个蛋白浓度均设置 3 个平行。接着将小鼠抗 His 抗体(全式金, 中国)按照 1:2000 的比例稀释至 5%脱脂奶粉中, 分别向每孔中加入 100 μL 小鼠抗 His 抗体, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。然后, 将羊抗鼠 IgG(全式金, 中国)按照 1:4000 的比例稀释至 5%脱脂奶粉中, 分别向每孔中加入 100 μL 含 HRP 标签的羊抗鼠 IgG, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。在上述每一步结束时, 均用 300 μL PBST 洗涤 3 次。以上反应结束后, 分别向每孔加入 100 μL TMB 溶液显色 5 min, 最后每孔加入 100 μL 浓度为 1 mol/L 硫酸终止反应, 在 450 nm 处测定吸光值。

1.9 rPoGalectin-6 与微生物的凝集活性检测

利用 2 株革兰氏阳性菌(短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌)和 2 株革兰氏阴性菌(杀鲑气单胞菌和迟缓爱德华氏菌)检测 rPoGalectin-6 的细菌凝集活性, 上述细菌均取自本实验室保存菌种。将细菌培养至对数中期后重悬于 Tris 缓冲盐溶液(TBS)中至终浓度为 1×10^8 CFU/mL。实验组处理方法: 将 25 μL rPoGalectin-6 蛋白(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与 25 μL 各菌液在室温下混合均匀, 并加入 5 μL 浓度为 0.1 mol/L 的 CaCl_2 溶液, 置于 200 r/min 摇床中培养 1 h。同时, 将 rPoGalectin-6 蛋白和细菌混合培养作为对照组, 验证无 Ca^{2+} 存在的情况下 rPoGalectin-6 蛋白的微生物凝集活性。在相同条件下, 用相同体积和浓度的牛血清白蛋白(BSA)代替 rPoGalectin-6 蛋白作为空白对照组。微生物凝集实验结果均在光学显微镜下观察得到。

2 结果

2.1 PoGalectin-6 基因序列分析和结构特征

通过 NCBI 网站对 PoGalectin-6 的核酸序列进行鉴定发现, PoGalectin-6 的 ORF 长 1089 bp, 共编码 362 个氨基酸(aa), 预测其分子量为 39.11 kDa, 理论等电点(pI)为 5.89。利用 SMART 软件对其氨基酸序列分析, 显示 PoGalectin-6 是一个串联重复型半乳糖凝集素, 在其 ORF 两端各有 1 个糖识别结构域(CRD), 长度分别为 127 aa 和 126 aa。2 个 CRD 之间通过一个长度为 65 aa 的富含甘氨酸的连接区域连接。此外, PoGalectin-6 的 2 个 CRD 均含有一个典型的 β -半乳糖苷结合基序(HXNPR, X 代表任何氨基酸)(图 1)。

2.2 PoGalectin-6 的同源比对和系统进化分析

将 PoGalectin-6 与其他硬骨鱼类的 Galectin-6 和 Galectin-4 进行同源比对, 显示其相似性为 58.10%~80.90%。其中, PoGalectin-6 与大菱鲆 Galectin-4 的相似性最高, 为 80.90%; 与尼罗罗非鱼 Galectin-4 的相似性最低, 为 58.10%。将 PoGalectin-6 与上述 6 种串联重复型 galectins 进行多重序列比对, 结果显示, 不同硬骨鱼类的 Galectin-6 和 Galectin-4 的 2 个 CRD 并不保守, 但在每个 CRD 上都存在一段高度保守的氨基酸基序 HXNPR (X 代表任何氨基酸)(图 2)。

利用 MEGA 5.0 软件对 PoGalectin-6 与其他硬骨鱼类的串联重复型 galectins (Galectin-6、Galectin-4、Galectin-8 和 Galectin-9)的氨基酸序列比对, 构建了系统进化树(图 3)。系统进化树由两大分支组成, Galectin-6 和 Galectin-4 聚为一支, Galectin-8 和 Galectin-9 聚为一支。PoGalectin-6 在进化上与大菱鲆 Galectin-4 亲缘关系最为密切, 与其他物种的 Galectin-8 和 Galectin-9 亲缘关系较远。

2.3 PoGalectin-6 的组织分布

利用 qRT-PCR 方法分析 PoGalectin-6 在不同组织(肝、脾、肾、脑、肠、鳃、皮肤和肌肉)中的表达水平。结果显示, PoGalectin-6 在组织中的表达具有明显的特异性(图 4), PoGalectin-6 主要在牙鲆的肠组织中有大量表达。相对于肠组织中的表达量, 在脑、皮肤以及肌肉组织中表达量非常低, 而在肝、脾、肾和鳃组织中均不表达。

2.4 迟缓爱德华氏菌感染后 PoGalectin-6 在肠组织中的表达

迟缓爱德华氏菌感染牙鲆能够诱导 PoGalectin-6 在肠组织中的表达变化。在感染 0、2、8、12、24、48、72 h, PoGalectin-6 在肠组织中的表达水平如图 5 所示, PoGalectin-6 呈现出先升高后降低的表达趋势。其表达水平在感染后 12 h 呈现显著上调, 并达到峰值, 是 0 h 表达量的 4.2 倍。感染后 48 h 达到第 2 个峰值, 是 0 h 表达量的 2.4 倍, 随后 PoGalectin-6 表达水平下降, 并在感染后 72 h 恢复至正常水平。

2.5 重组 PoGalectin-6 蛋白的表达纯化

以 pet32a 为表达载体, 重组 PoGalectin-6 蛋白经镍柱分离纯化, 纯化的 rPoGalectin-6 蛋白包含来自 pet32a 载体质粒约 15 kDa 的标签蛋白和 39.11 kDa 的 PoGalectin-6 蛋白。重组蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳分析(图 6), 在 55 kDa 处有条带, 与预测目的条带

大小基本一致。阴性对照和上清液中均未发现目的条带, 说明成功表达并分离纯化了 rPoGalectin-6 蛋白。

2.6 rPoGalectin-6 蛋白与微生物结合能力

rPoGalectin-6 蛋白与微生物结合实验验证了对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的结合能力。结果如图 7

所示, rPoGalectin-6 与微生物的结合能力与细菌种类有关, 其对枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、杀鲑气单胞菌、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌均表现出较强的结合能力, 且蛋白浓度越高, 其结合能力越强, 而 rPoGalectin-6 蛋白与短小芽孢杆菌并没有表现出明显的结合能力。

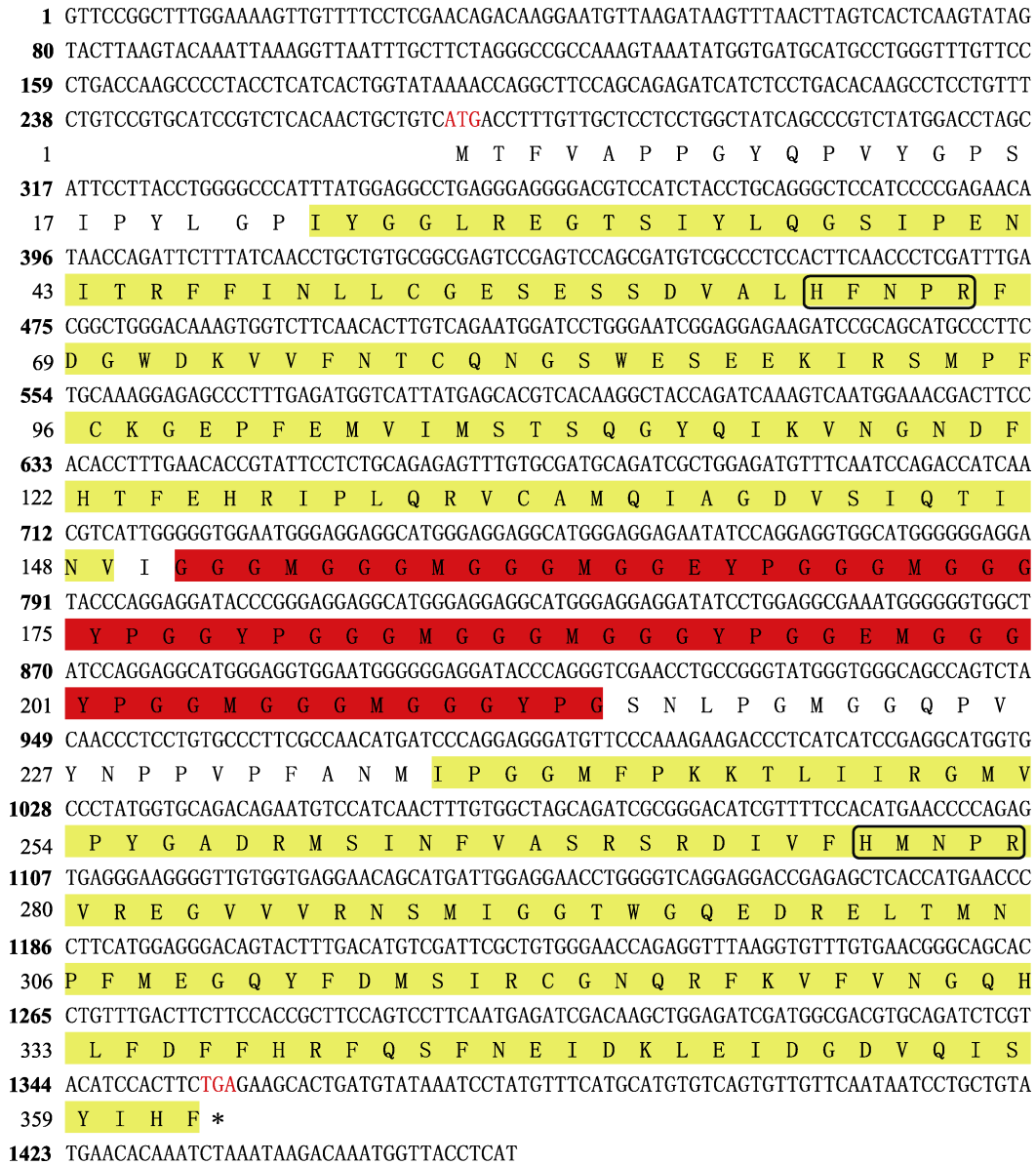


图 1 牙鲈 Galectin-6 ORF 序列和推测的氨基酸序列
 Fig.1 The ORF and deduced amino acid sequences of PoGalectin-6

左边的数字代表核苷酸和推测的氨基酸序列。红色字体表示起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)。黄色阴影的氨基酸序列代表 2 个 CRD。红色阴影的氨基酸序列代表连接区域。黑框代表 CRD 中的保守基序 HXNPR(X 代表任何氨基酸)。The numbers on the left represent the nucleotide and deduced amino acid sequences. Red font indicates the start codon (ATG) and the stop codon (TGA). The yellow shaded amino acid sequence represents two CRDs. The red shaded amino acid sequence represents the linker. The black boxes represent the conserved motifs HXNPR (X represents any amino acid) in the CRD.

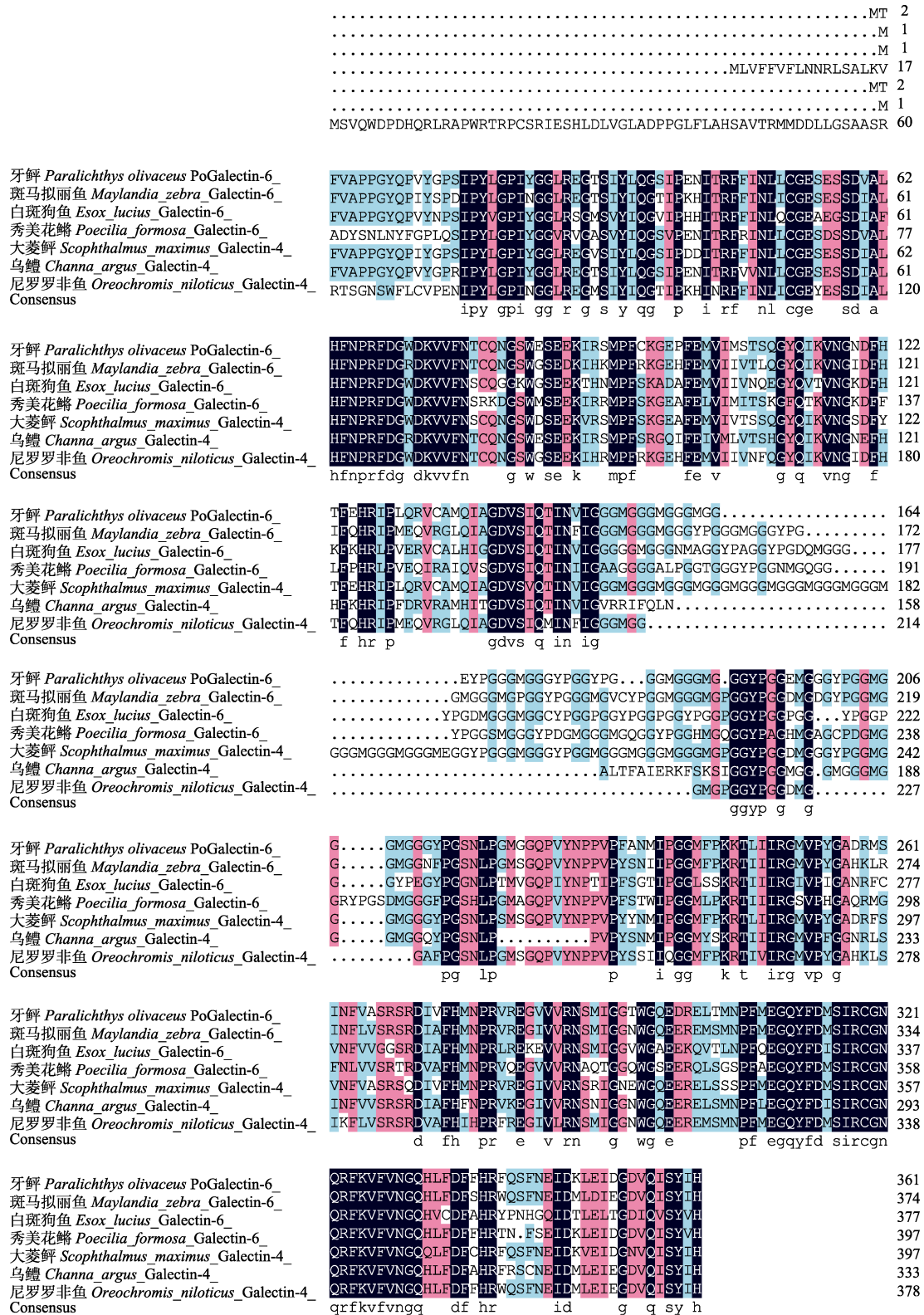


图 2 *PoGalectin-6* 多序列比对
 Fig. 2 Multiple sequence alignment of *PoGalectin-6*

氨基酸序列比对采用 DNAMAN 软件构建。红框代表 2 个 CRD。
 黄框代表 CRDs 中的保守基序 HXNPR (X 代表任何氨基酸)。

The amino acid sequence alignment was constructed by the DNAMAN. Red boxes represent two CRDs.
 The yellow boxes represent the conserved motifs HXNPR (X represents any amino acid) in CRDs.

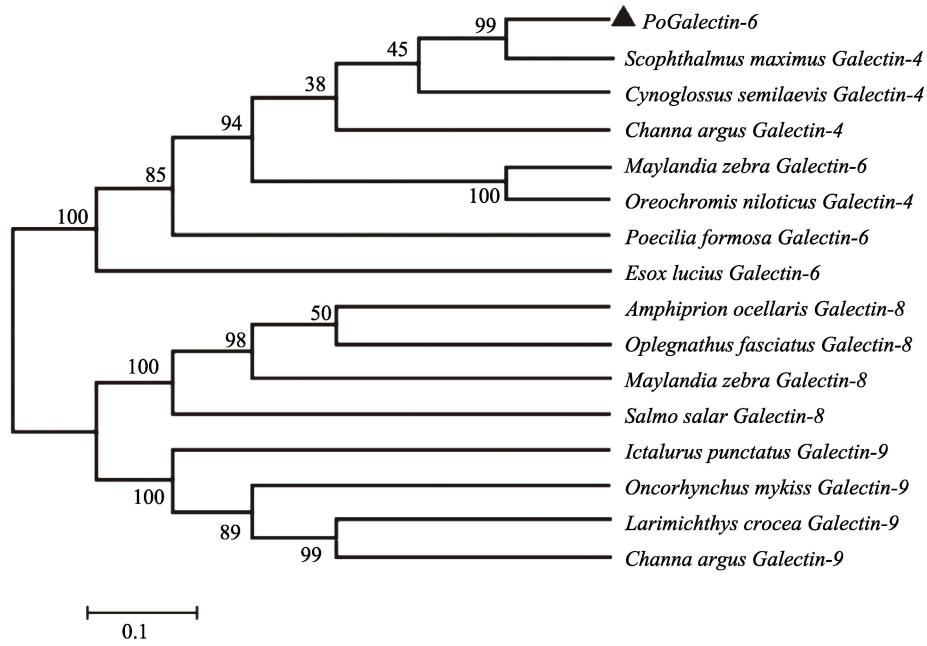


图 3 *PoGalectin-6* 与其他硬骨鱼类的串联重复型 galectins 的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree showing the relationship between *PoGalectin-6* with tandem repeat galectins of other teleost

使用 MEGA 5.0 中的 neighbor-joining 方法构建系统进化树, 构建了 *PoGalectin-6* 和 *Galectin-4*、*Galectin-6*、*Galectin-8* 和 *Galectin-9* 等串联重复型 galectins 的系统进化树。

Phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining algorithm in MEGA 5.0. The phylogenetic trees of *PoGalectin-6* and other tandem repeats galectin was constructed, including *Galectin-4*, *Galectin-6*, *Galectin-8*, and *Galectin-9*.

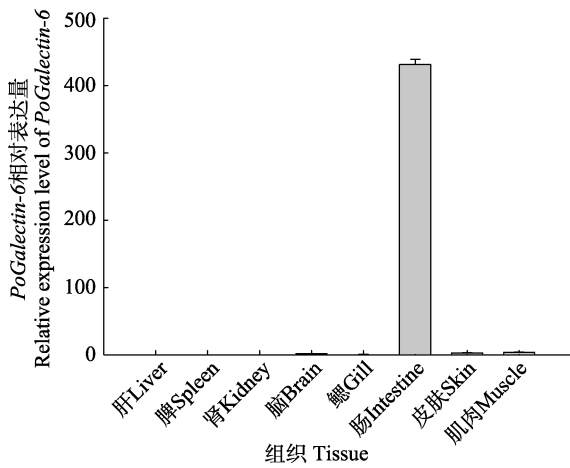


图 4 *PoGalectin-6* 在牙鲆正常组织中的相对表达量

Fig.4 The relative expression of *PoGalectin-6* gene in normal tissues of *P. olivaceus*

象, 这说明只有在 Ca^{2+} 存在的情况下, r*PoGalectin-6* 才能展现出较强的微生物凝集活性。

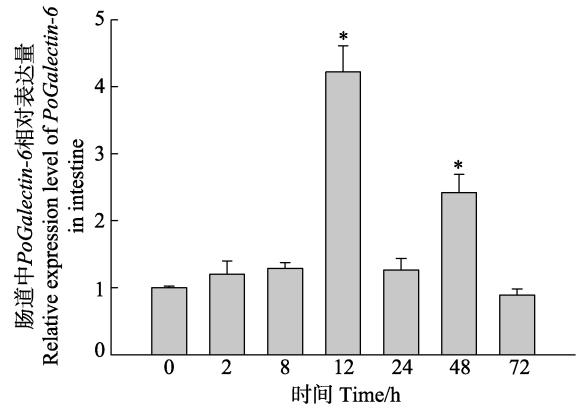


图 5 迟缓爱德华氏菌感染牙鲆后肠道中 *PoGalectin-6* 的表达水平

Fig.5 Expression level of *PoGalectin-6* in the intestine of *P. olivaceus* infected *E. tarda*

2.7 r*PoGalectin-6* 蛋白与微生物凝集活性

细菌凝集实验结果如图 8 所示, r*PoGalectin-6* 蛋白均能够显著凝集短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、杀鲑气单胞菌和迟缓爱德华氏菌。对照组中, BSA 并未展现出对细菌的凝集反应。此外, 在 Ca^{2+} 不存在的情况下, r*PoGalectin-6* 蛋白未表现出明显的细菌凝集现

以 0 h 时的表达水平为对照, 不同时间点(2、8、12、24、48 和 72 h)的表达量通过 qRT-PCR 获得。

*代表显著性差异($P < 0.05$)。

The data determined by qRT-PCR at different time points (0, 2, 8, 12, 24, 48, and 72 h) compared with the 0 h time point respectively. The symbol * represent $P < 0.05$.

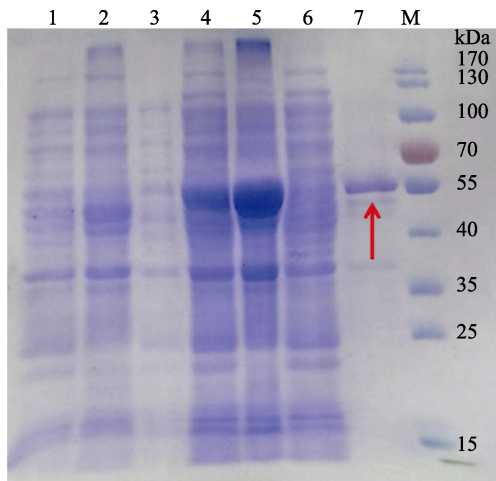


图 6 纯化 rPoGalectin-6 蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified rPoGalectin-6

M: 蛋白质 Marker; 1: 未诱导的细菌总提取物;
2: 未诱导的细菌提取物沉淀;
3: 未诱导的细菌提取物上清液; 4: 诱导的细菌总提取物;
5: 诱导的细菌提取物沉淀; 6: 诱导的细菌提取物上清液;
7: 纯化的 rPoGalectin-6 蛋白

Lane M: Molecular weight marker; Lane 1: Total soluble cellular extract from negative control; Lane 2: Total precipitation cellular extract from negative control; Lane 3: total supernatant cellular extract from negative control; Lane 4: Total soluble cellular extract from the experimental group; Lane 5: Total precipitation cellular extract from the experimental group; Lane 6: Total supernatant cellular extract from the experimental group; Lane 7: Concentrated purified recombinant *PoGalectin-6*

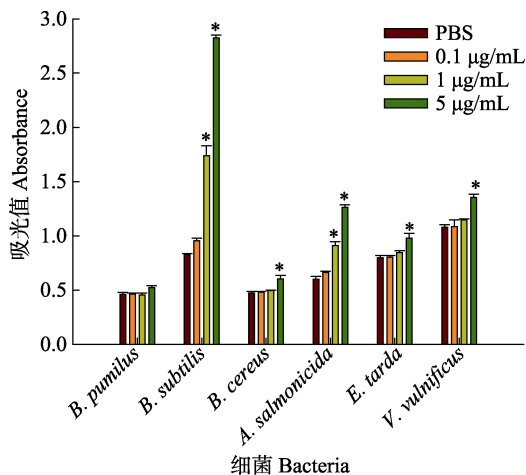


图 7 rPoGalectin-6 蛋白与微生物结合能力验证
Fig.7 Verification of bacterial binding capacity

*代表与 PBS 组相比具有显著性差异($P < 0.05$).
* indicates a significant difference compared with PBS ($P < 0.05$).

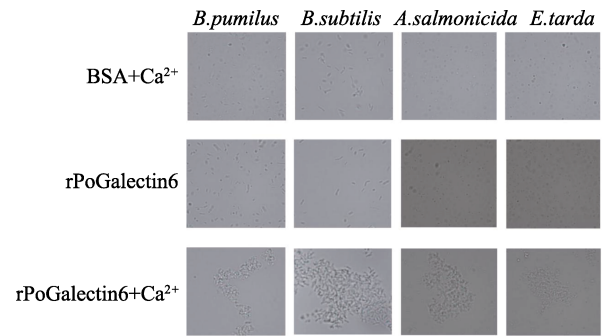


图 8 rPoGalectin-6 蛋白与微生物的凝集活性
Fig.8 Agglutinating activity of rPoGalectin-6 with microorganisms

3 讨论

半乳糖凝集素是一种具有保守 CRD 的可溶性凝集素，它们广泛存在于哺乳动物和昆虫体内，并在机体免疫过程中发挥重要作用。研究发现，在哺乳动物体内，半乳糖凝集素主要参与细胞粘附、生长调节和免疫等生物过程，尤其在疾病防控等方面起到关键作用(Oyanadel *et al*, 2018; Rao *et al*, 2016; Wdowiak *et al*, 2018)。虽然在哺乳动物中已经鉴定出 *Galectin-6*，但在硬骨鱼中尚无 *Galectin-6* 的相关研究，因此，其应对细菌感染的免疫功能尚不清楚。本研究通过分析 *PoGalectin-6* 的分子特征，探究其在体内发挥的相关功能，旨在为硬骨鱼类中 *Galectin-6* 的功能研究奠定基础。

本研究成功从牙鲆体内分离并鉴定了 *Galectin-6*，序列分析表明，*PoGalectin-6* 是一种标准的串联重复型半乳糖凝集素，它拥有 2 个能够特异性识别并结合糖的 CRD，每个 CRD 上都包含一个非常保守的糖结合基序(HXNPR，X 代表任何氨基酸)，CRD 之间是由 65 个氨基酸编码的富含甘氨酸的结合肽组成的连接区域。同源序列比对分析表明，*PoGalectin-6* 与大菱鲆 *Galectin-4* 相似性最高(80.90%)，在系统进化树上，*PoGalectin-6* 和 *Galectin-4* 分布在同一分支。同源序列比对和系统进化树实验结果证实，*PoGalectin-6* 与大菱鲆 *Galectin-4* 亲缘关系上更接近，这也与 Gitt 等(1998a)发现 *Lgals4* 和 *Lgals6* 高度相似的结论相一致。Gitt 等(1998b)是在研究小鼠 *Lgals4* 的过程中意外发现一个由 8 个外显子编码、具有 2 个 CRD 的新的串联重复型半乳糖凝集素，即 *Lgals6*。随后，将 *Lgals6* 与 *Lgals4* 进行比对分析发现，二者同源性非常高，不同之处在于，*Lgals6* 的 2 个 CRD 之间的连接区域相较于 *Lgals4* 缺少 24 个氨基酸。因此，Gitt 等(1998b)推测，连接区域长度的差异可能会

影响 CRD 间交联配体的功能活性, 进而导致小鼠 *Lgals6* 和 *Lgals4* 存在功能上的差异。这种现象在哺乳动物的 *Galectin-9* 中已有先例, 如哺乳动物肠道中的 *Galectin-9* 具有较长的连接区域, 而其他组织中的 *Galectin-9* 则具有较短的连接区域, 这表明连接区域的长度差异可能导致不同组织中 *Galectin-9* 的功能差异(Wada *et al*, 1997)。

为了明确 *PoGalectin-6* 是否在牙鲆机体免疫过程中发挥作用, 在迟缓爱德华氏菌感染牙鲆 72 h 内, 对 *PoGalectin-6* 的组织分布情况进行分析。结果显示, *PoGalectin-6* 主要在牙鲆肠组织中大量表达, 在其他组织中表达量非常低或基本不表达, 这与 Houzelstein 等(2013)发现的小鼠体内 *Lgals6* 仅在肠胃中有表达的结果一致。鉴于肠道是硬骨鱼体内能识别微生物并促进免疫排斥的主要粘膜相关淋巴组织(MALT)之一(Fermino *et al*, 2011), 且 *PoGalectin-6* 与 *Lgals6* 均在肠道组织中具有类似的表达分布, 因此, 对 *PoGalectin-6* 是否在牙鲆体内也作为抗菌蛋白在免疫中发挥重要作用进行进一步验证。攻毒实验显示, 迟缓爱德华氏菌感染牙鲆后 12 h 内, 肠组织内 *PoGalectin-6* 的表达量增加了 4 倍以上, 说明 *PoGalectin-6* 在迟缓爱德华氏菌入侵后参与了机体的免疫应答。

半乳糖凝集素作为模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 可以直接与细菌和寄生虫表面的多聚糖相互作用, 在抵抗微生物感染的过程中起到调节免疫应答的作用(Shi *et al*, 2018)。微生物结合实验表明, rPoGalectin-6 能广泛识别并结合革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 暗示 *PoGalectin-6* 可能参与牙鲆对细菌感染的先天免疫防御机制。此外, rPoGalectin-6 对微生物的结合能力具有浓度依赖性, 即高浓度的 rPoGalectin-6 对细菌的结合能力更强。虽然 rPoGalectin-6 与细菌的结合能力已被证实, 但 rPoGalectin-6 与细菌的作用机制尚不清楚。*Galectin-6* 已被证明具有 β -半乳糖苷结合活性(Gitt *et al*, 1998a), 然而, rPoGalectin-6 是否通过结合细菌表面的 β -半乳糖苷进而展现出与细菌的亲合力还有待进一步研究。

凝集活性是半乳糖凝集素最重要的特性, 它们可以通过结合细胞表面的糖蛋白和糖复合物来凝集细胞。细菌凝集实验结果表明, rPoGalectin-6 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有凝集活性, 这意味着 rPoGalectin-6 可能作为一种粘连相关的蛋白质, 通过识别、结合以及凝集微生物, 在牙鲆的先天性免疫防御过程中发挥作用。在对凝集素凝集活性的研究中, 认为 Ca^{2+} 是 C 型动物凝集素发挥凝集活性的重要因素(Su *et al*, 2020), 相反, 半乳糖凝集素曾被认为是

不依赖于 Ca^{2+} 的 S 型动物凝集素 (Hughes, 2001)。然而, 一些半乳糖凝集素确实表现出 Ca^{2+} 依赖性的凝集活性, 例如, 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)半乳糖凝集素 *Galectin (EsGal)* (Wang *et al*, 2016)和大黄鱼 *Galectin-9 (LcGal9)* (Zhang *et al*, 2016)。这些结果表明, 非 Ca^{2+} 依赖的凝集活性可能不是半乳糖凝集素不可或缺的特征。 Ca^{2+} 在 rPoGalectin-6 凝集过程中的作用机制可借鉴巨噬细胞甘露糖受体第 4 个 CRD (CRD-4) 与单糖的结合机制(Mullin *et al*, 1997)。CRD-4 与甘露糖的结合由 2 个 Ca^{2+} 参与, 其中一个 Ca^{2+} 仅起到定位作用, 另一个 Ca^{2+} 则与 CRD-4 侧链的羰基氧原子形成配位键, 然后与甘露糖的羟基 3 或 4 结合形成三元络合物, 完成 CRD-4 与甘露糖的结合。因此, Ca^{2+} 是 Ca^{2+} 依赖型凝集素白识别和结合碳水化合物过程中的一个重要因素, 这也解释了在没有 Ca^{2+} 存在的情况下, rPoGalectin-6 没有表现出理想的细菌凝集活性。

本研究识别并鉴定了 *PoGalectin-6*, 它主要在肠组织中大量表达, 并且经微生物刺激后, *PoGalectin-6* 在肠组织中的表达水平显著升高。在与细菌的互作实验中发现, rPoGalectin-6 具有较强的细菌结合能力和凝集活性。综上所述, *PoGalectin-6* 参与了由迟缓爱德华氏菌感染所引起的免疫应答, 为探索 *Galectin-6* 在硬骨鱼类中的免疫功能奠定了基础。

参 考 文 献

- BAI Y, NIU D, BAI Y, *et al*. Identification of a novel galectin in *Sinonovacula constricta* and its role in recognition of gram-negative bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 80: 1-9
- BUTSCHI A, TITZ A, WALT M A, *et al*. Caenorhabditis elegans N-glycan core beta-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(1): e1000717
- FERMINO M L, POLLI C D, TOLEDO K A, *et al*. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26004
- FERRAGUT F, CAGNONI A J, COLOMBO L L, *et al*. Dual knockdown of galectin-8 and its glycosylated ligand, the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166), synergistically delays *in vivo* breast cancer growth. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 2019, 1866(8): 1338-1352
- GITT M A, COLNOT C, POIRIER F, *et al*. Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. *Journal of Biological Chemistry*, 1998a, 273(5): 2954-2960

- GITT M A, XIA Y R, ATCHISON R E, *et al.* Sequence, structure, and chromosomal mapping of the mouse *Lgals6* gene, encoding galectin-6. *Journal of Biological Chemistry*, 1998b, 273(5): 2961–2970
- HOUZELSTEIN D, REYES-GOMEZ E, MAURER M, *et al.* Expression patterns suggest that despite considerable functional redundancy, galectin-4 and -6 play distinct roles in normal and damaged mouse digestive tract. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2013, 61(5): 348–361
- HU X, CHEN H, XU J, *et al.* Function of *Aedes aegypti* galectin-6 in modulation of Cry11Aa toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 162: 96–104
- HUGHES R C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, 2001, 83(7): 667–676
- HWANG J S, TAKAKU Y, MOMOSE T, *et al.* Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18539–18544
- LIU F T, YANG R Y, SAEGUSA J, *et al.* Galectins in regulation of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2011, 705: 431–442
- MULLIN N P, HITCHEN P G, TAYLOR M E. Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(9): 5668–5681
- NATSUGA K, CIPOLAT S, WATT F M. Increased bacterial load and expression of antimicrobial peptides in skin of barrier-deficient mice with reduced cancer susceptibility. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(1): 99–106
- NATSUGA K, WATT F M. Galectin-6 is a novel skin anti-microbial peptide that is modulated by the skin barrier and microbiome. *Journal of Dermatological Science*, 2016, 84(1): 97–99
- NITA-LAZAR M, BANERJEE A, FENG C, *et al.* Galectins regulate the inflammatory response in airway epithelial cells exposed to microbial neuraminidase by modulating the expression of SOCS1 and RIG1. *Molecular Immunology*, 2015, 68(2 Pt A): 194–202
- OYANADEL C, HOLMES C, PARDO E, *et al.* Galectin-8 induces partial epithelial-mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(5): 557–574
- PACLIK D, LOHSE K, WIEDENMANN B, *et al.* Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14(10): 1366–1372
- RAO X J, WU P, SHAHZAD T, *et al.* Characterization of a dual-CRD galectin in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 60: 149–159
- SHATZ-AZOULAY H, VINIK Y, ISAAC R, *et al.* The animal lectin galectin-8 promotes cytokine expression and metastatic tumor growth in mice. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7375
- SHI W, XUE C, SU X Z, *et al.* The roles of galectins in parasitic infections. *Acta Tropica*, 2018, 177: 97–104
- STOWELL S R, ARTHUR C M, DIAS-BARUFFI M, *et al.* Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nature Medicine*, 2010, 16(3): 295–301
- SU Y, LIU Y, GAO F, *et al.* A novel C-type lectin with a YPD motif from *Portunus trituberculatus* (PtCLec1) mediating pathogen recognition and opsonization. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 106: 103609
- TAKEUCHI T, ARATA Y, KASAI K I. Galactosebeta1-4fucose: A unique disaccharide unit found in N-glycans of invertebrates including nematodes. *Proteomics*, 2016, 16(24): 3137–3147
- THIJSEN V L, HEUSSCHEN R, CAERS J, *et al.* Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1855(2): 235–247
- VIZZINI A, PARRINELLO D, SANFRATELLO M A, *et al.* Inducible galectins are expressed in the inflamed pharynx of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 101–109
- WADA J, KANWAR Y S. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(9): 6078–6086
- WANG M Q, WANG L L, HUANG M M, *et al.* A galectin from *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing microbe agglutination and haemocytes encapsulation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 55: 10–20
- WDOWIAK K, FRANCUZ T, GALLEGGO-COLON E, *et al.* Galectin targeted therapy in oncology: Current knowledge and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 210
- YU Y, YUAN S, YU Y, *et al.* Molecular and biochemical characterization of galectin from amphioxus: Primitive galectin of chordates participated in the infection processes. *Glycobiology*, 2007, 17(7): 774–783
- ZHANG D L, LÜ C H, YU D H, *et al.* Characterization and functional analysis of a tandem-repeat galectin-9 in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52: 167–178

Cloning, Expression and Function of *Galectin-6* from *Paralichthys olivaceus*

LIU Xiaofei^{1,2}, ZHANG Shuangshuang², HENDRIANSYAH Endri¹, LI Yingrui^{1,2},
SU Lin², LI Xiangqian³, XIU Yunji², GU Wei^{1①}

(1. College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210023, China;
2. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China;
3. Jiangsu Provincial Key Construction Laboratory of Probiotics Preparation,
Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223003, China)

Abstract Galectin-6 is a member of the β -galactoside-binding lectin family, which has been widely studied in mammals (e.g., *Lgals6*). *Galectin-6* has been cloned from several teleost fishes, such as *Maylandia zebra*, *Esox lucius*, and *Poecilia formosa*, but there are few studies on its function. In this study, we analyzed the molecular characteristics of *Galectin-6* extracted from *Paralichthys olivaceus* (*PoGalectin-6*) and studied its immune-related functions. The full length of the open reading frame (ORF) of *PoGalectin-6* cDNA is 1089 bp, encoding 362 amino acids containing two carbohydrate recognition domains (CRDs). Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *PoGalectin-6* is highly similar to *Scophthalmus maximus Galectin-4* (approximately 80.9%). Tissue distribution experiments demonstrated that *PoGalectin-6* is specifically expressed in intestinal tissues. The expression level of *PoGalectin-6* in the intestine significantly increased after *Edwardsiella tarda* stimulation, and the highest expression level was observed at 12 h after infection. Recombinant *PoGalectin-6* (r*PoGalectin-6*) exhibited binding ability to gram-positive (*Bacillus subtilis*, and *B. cereus*) and gram-negative (*Aeromonas salmonicida*, *E. tarda*, and *Vibrio vulnificus*) bacteria. r*PoGalectin-6* showed Ca^{2+} -dependent agglutination activity against *B. pumilus*, *B. subtilis*, *A. salmonicida*, and *E. tarda*. This study suggests that *PoGalectin-6* may play an important role in the immune response against *E. tarda* infection, laying the foundation for exploring the immune functions of *Galectin-6* in teleosts.

Key words *Galectin-6*; *Paralichthys olivaceus*; *Edwardsiella tarda*; Immune response

① Corresponding author: GU Wei, E-mail: skywei426@sina.com