

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220726001

http://www.yykxjz.cn/

李佳程, 苟涛, 肖遥, 罗帅, 吴宝兰, 王志勇, 韩芳. 黄姑鱼转录因子激活蛋白 AP2 $\alpha$  的克隆和特征分析. 渔业科学进展, 2023, 44(5): 104–114

LI J C, GOU T, XIAO Y, LUO S, WU B L, WANG Z Y, HAN F. cDNA cloning and characterization of transcription factor activating protein AP2 $\alpha$  from yellow drum, *Nibea albiflora*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(5): 104–114

# 黄姑鱼转录因子激活蛋白 AP2 $\alpha$ 的克隆和特征分析\*

李佳程 苟涛 肖遥 罗帅 吴宝兰 王志勇 韩芳<sup>①</sup>

(集美大学水产学院 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室  
农业农村部东海海水健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021)

**摘要** 转录因子激活蛋白 AP2 $\alpha$  是一类能特异地结合 DNA 的核转录因子, 参与动物胚胎发育的调节、细胞生长、细胞凋亡、肿瘤发生以及免疫反应等多种生物过程。课题组前期通过基因组关联分析(GWAS)发现, AP2 $\alpha$  是黄姑鱼(*Nibea albiflora*)抗哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的候选基因。本研究克隆了黄姑鱼转录因子 AP2 $\alpha$ , 其开放阅读框(ORF)为 1 275 bp, 编码 424 个氨基酸; 所编码的 AP2 $\alpha$  蛋白质 N 端是富含脯氨酸和谷氨酰胺(P/Q-rich domain)的反式激活结构域, 中间是中心基本结构(central basic region), C 端为高度保守的 helix-span-helix 基序, 负责结合 DNA 和蛋白质二聚化。氨基酸序列多重比对表明, AP2 $\alpha$  保守性强, 与所检测的鱼类、两栖类、鸟类和哺乳动物同源性在 84.63% 以上。实时荧光定量 PCR 检测结果显示, AP2 $\alpha$  基因的 mRNA 广泛分布于所检测的黄姑鱼 9 种组织样品中, 其中血液中的表达量最高; 受哈维氏弧菌攻毒感染后, 肝脏、脾脏和头肾中 AP2 $\alpha$  表达量均明显升高, 特别是在肝脏中, AP2 $\alpha$  mRNA 表达水平在 24 h 时达到攻毒前的 39 倍。通过构建重组真核表达质粒 pGFP-AP2 $\alpha$  并转染 HEK293T 细胞进行亚细胞定位研究的结果显示, AP2 $\alpha$  分布于 HEK293T 细胞的细胞核中。进一步通过原核克隆表达获得了可溶性的 GST-AP2 $\alpha$  融合蛋白。以上结果表明, AP2 $\alpha$  在黄姑鱼抵御哈维氏弧菌感染过程中发挥重要作用。本研究对 AP2 $\alpha$  在硬骨鱼类先天免疫中的重要功能提供了新的见解, 为深入研究黄姑鱼的分子免疫机理和抗病分子育种奠定了基础。

**关键词** 黄姑鱼; 转录因子激活蛋白 AP2 $\alpha$ ; 哈维氏弧菌; 实时荧光定量 PCR; 亚细胞定位; 蛋白表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)05-0104-11

转录因子激活蛋白 2 $\alpha$  (transcriptional factor activating protein 2 $\alpha$ , TFAP2 $\alpha$ ) 又称激活蛋白 AP2 $\alpha$ , 是一类分子量为 46~52 kDa 核转录因子, 有物种细胞类型特异性, 能特异地结合 DNA, 通过结合多种基因的启动子特定位点, 参与基因的转录调控, 在组织

形态发育、细胞生长、分化、凋亡和肿瘤发生以及免疫反应中具有重要作用(Hoffman *et al.*, 2007)。很多肿瘤的重要病理特征为特定转录因子的异常高表达, 如乳腺癌中锌指蛋白转录因子高表达(吕昌新等, 2013), 上皮癌细胞中转录因子 Snail 高表达(Wakahashi *et al.*,

\* 蓝色粮仓国家重点研发计划(2018YFD0900301)、福建省自然科学基金(2022J01325)、福建省新世纪人才支持计划(B18223)和福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室开放研究基金(Z822280)共同资助。李佳程, E-mail: lj\_c\_jmu@163.com

① 通信作者: 韩芳, 教授, E-mail: hanfangyc@jmu.edu.cn

收稿日期: 2022-07-26, 收修改稿日期: 2022-09-02

2013)。乳腺癌 HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 基因的表达与转录因子 AP2 $\alpha$  的表达量增高相关(Berlato *et al*, 2011)。抑制转录因子 AP2 $\alpha$  的表达, 可以促进乳腺癌细胞的凋亡及对放疗及化疗的敏感性(Thewes *et al*, 2010)。HER-2 的启动子上具有 AP2 $\alpha$  结合位点, AP2 $\alpha$  是通过与结合癌基因 *HER-2* 的启动子结合并促进其转录而导致癌变(Hung *et al*, 2012), 免疫组化证实人乳腺癌组织中 AP2 $\alpha$  表达上调, 并与 HER-2 表达呈正相关(Powe *et al*, 2009)。此外, AP2 $\alpha$  参与乳腺癌、黑色素瘤、前列腺癌和大肠癌等癌变过程(Berlato *et al*, 2011)。

黄姑鱼(*Nibea albiflora*)是一种具有重要经济价值的海水鱼类, 在我国东南沿海地区(如浙江和福建省)广受欢迎(Liu *et al*, 2020; Xiang *et al*, 2020), 并有较大的养殖规模。近几年来, 黄姑鱼养殖遭受细菌病的严重困扰, 造成很高的死亡率, 特别是由哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)引起的“红头病”造成了严重的经济损失(Xiang *et al*, 2020; Yin *et al*, 2018)。哈维氏弧菌是一种革兰氏阴性菌, 在海水养殖产业中引发了多种细菌性疾病(沈桂明等, 2017)。因此, 本实验室用哈维氏弧菌对黄姑鱼进行了人工攻毒实验, 并对实验鱼群体进行全基因组重测序挖掘单核苷酸多态性(SNP)分子标记, 以攻毒后正常存活时间作为抗病力的表型值进行全基因组关联分析(GWAS), 结果显示, 黄姑鱼转录因子 AP2 $\alpha$  基因位于定位区间中(Luo *et al*, 2021)。然而, 目前尚无转录因子 AP2 $\alpha$  基因参与鱼类抗病免疫过程的相关研究报道。本研究从黄姑鱼中克隆到 AP2 $\alpha$  基因, 分析其分子结构特征, 利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术检测其在健康组织和哈维氏弧菌感染后不同组织的表达情况, 并研究 AP2 $\alpha$  蛋白的亚细胞定位, 进行蛋白质原核克隆和诱导表达, 旨在阐明黄姑鱼 AP2 $\alpha$  基因在黄姑鱼抵御哈维氏弧菌过程中的作用, 并为深入研究黄姑鱼抗病分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用黄姑鱼幼鱼 [(3.28 $\pm$ 1.71) g, (4.56 $\pm$ 1.39) cm, 3 月龄]取自福建省宁德市金铃水产科技有限公司。攻毒前, 所有幼鱼在充气海水中驯养 1 周, 水温保持在(27.1 $\pm$ 2.1)  $^{\circ}$ C, 盐度 30, 水深 1.0 m。每天在固定时间(07:00 和 18:00)饲喂 2 次市售的黄姑鱼配合饲料(天马水产科技有限公司)。攻毒实验所用哈维氏弧菌菌株分离于自然发病鱼, 由集美大学水产学院孙云章教授惠赠。

### 1.2 主要试剂

*Trans Zol Up Plus* RNA kit 购于北京全式金生物技术有限公司; *GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System Protocol* 购于 Promega 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和无内毒素质粒小量提取试剂盒购自北京天漠科技发展有限公司; *ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit* 和 *ChamQ<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix* 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Lipo8000<sup>TM</sup>* 转染试剂、*GFP Rabbit Monoclonal Antibody*、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、*DAPI*、*BeyoColor<sup>TM</sup>* 彩色预染蛋白 Marker (15~120 kDa)、*SDS-PAGE* 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$ )、*BeyoBlue<sup>TM</sup>* 考马斯亮蓝快速染色液、EGFP 抗体和 GST 抗体和 *BeyoECL Plus* 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清(FBS)购于 Gibco 公司; PBS (pH=7.4)缓冲液、胰蛋白酶消化液(0.25% 胰酶和 0.02% EDTA)和 *DMEM High Glucose* 购于 BI 公司; 双抗(青霉素 10 000 IU/mL-链霉素 10 mg/mL)购于 MP 公司; 本研究所用引物均在厦门铂瑞生物科技有限公司合成。

### 1.3 样本采集

攻毒前, 采集用于组织表达分析的 6 尾正常黄姑鱼的器官或组织(包括心脏、肾脏、肝脏、皮肤、鳃、胃、脾脏、肠和血), 存于 RNA 保护液中, 随后-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用于 RNA 提取。

哈维氏弧菌感染实验采用浸泡感染的方法进行: 在一个面积为 4 m<sup>2</sup>、深度为 1.5 m 的混凝土水池中, 将 8 L 细菌悬浮液(10<sup>9</sup> CFU/mL)均匀泼洒到池水中, 不间断充气, 使其与受试幼鱼充分接触, 细菌感染过程持续 3 h, 之后, 将所有幼鱼转移到一个新的洁净海水的水泥池中; 攻毒水池用次氯酸钠消毒。分别在哈维氏弧菌感染黄姑鱼后 0、6、12、24、48、72 和 96 h 采集黄姑鱼各 6 尾, 采集头肾、肝脏和脾, 置于 RNA 保护液中, 随后保存在-80  $^{\circ}$ C 的冰箱中, 用于 RNA 提取。动物实验操作遵循集美大学水产学院动物伦理委员会的要求进行。

### 1.4 RNA 提取及 cDNA 的合成

按照说明书步骤, 使用 *Trans Zol Up Plus* RNA kit 对组织样品进行 RNA 提取并使用 *GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System Protocol* 逆转录合成 cDNA 的第一条链, 黄姑鱼内参基因  *$\beta$ -actin* 用于 cDNA 合成质量的检测。

### 1.5 黄姑鱼 *AP2α* 开放阅读框序列的克隆和载体构建

从本实验室构建的黄姑鱼转录组数据库中获得 *AP2α* 的开放阅读框序列。根据 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 设计了具有 *Xho* I 和 *Eco*R I 限制性位点的特异性引物(表 1)。PCR 的步骤: 95 °C, 3 min 预变性; 30 个循环(95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s), 72 °C 彻底延伸 5 min。将纯化

后的 *AP2α* 产物分别连接到 pEGFP-N1 载体和 pGEX-6P-1 载体上(本实验室保存), 并转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 中, 抗性平板筛选阳性克隆并进行菌液 PCR 鉴定, 然后送厦门铂瑞生物科技有限公司测序。其中, 重组质粒 pEGFP-N1-*AP2α* 用于转染人胚胎肾细胞 293T (HEK 293T)进行亚细胞定位, pGEX-6P-1-*AP2α* 用于原核表达蛋白质。

表 1 黄姑鱼 *AP2α* 基因克隆、RT-qPCR 及亚细胞定位所用的引物序列

Tab.1 Primers used for the cloning, RT-qPCR and subcellular localization of *AP2α* gene in the study

| 引物 Primer                 | 引物序列 Primer sequence (5'~3')                   | 用途 Usage                 |
|---------------------------|--|--------------------------|
| q- <i>AP2α</i> -F         | GTGTCTTTATCCAAGAACAACAAC                       | RT-qPCR                  |
| q- <i>AP2α</i> -R         | GCGTCTCTGCACCTCCGCCACCTG                       |                          |
| $\beta$ -actin-F          | TTATGAAGGCTATGCCCTGCC                          |                          |
| $\beta$ -actin-R          | TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT                         |                          |
| pEGFP- <i>AP2α</i> -F     | CTACCGGACTCAGATCTCGAGATGTTAGTGCACAGTTTTTCCG    | 亚细胞定位                    |
| pEGFP- <i>AP2α</i> -R     | GTACCGTCTGACTGCAGAAATTCCTTTCTTGCTTCTCGTCTTTGTC | Subcellular localization |
| pGEX-6P-1- <i>AP2α</i> -F | CCCCTGGGATCCCCGGAATTCATGTTAGTGCACAGTTTTTCCG    | 原核表达                     |
| pGEX-6P-1- <i>AP2α</i> -R | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGCTTTCTTGCTTCTCGTCTTTGTC   | Prokaryotic expression   |

注: *Eco*R I (GAATTC)和 *Xho* I (CTCGAG)的酶切位点用下划线标注。

Note: *Eco*R I enzyme restriction site (GAATTC) and *Xho* I enzyme restriction site (CTCGAG) are underlined.

### 1.6 生物信息学分析

使用 ExPASy-Translate (<https://web.expasy.org/translate/>)对编码的氨基酸序列进行推导; 扩增出的序列与推导的氨基酸序列经 NCBI 在线 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与其他物种进行相似性比对; 不同物种 SPHK1 氨基酸序列在 NCBI 数据库中搜索获得, 并利用 ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对其进行同源性比对; 黄姑鱼与其他物种的 *AP2α* 蛋白系统发育进化树使用 MEGA v6.06 的最大似然法 (ML)进行构建; 蛋白质的理化性质, 包括理论分子量、理论等电点和氨基酸组成等使用 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行分析(张志华等, 2022); 蛋白中的结构域、信号肽切割位点和跨膜区域, 分别使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行预测; 亚细胞定位预测在 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)中进行; 磷酸化位点预测在 NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)中进行; 使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)和 tFold (<https://drug.ai.tencent.com/console/cn/tfold/>)对蛋白的三级结构进行预测, 并结合 VMD 1.9.2

(<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.2>)进行蛋白三级结构可视化。

### 1.7 RT-qPCR

设计黄姑鱼 *AP2α* 特异性引物 q-*AP2α*-F 和 q-*AP2α*-R, 选择  $\beta$ -actin (引物为  $\beta$ -actin-F/  $\beta$ -actin-R, 表 1)为内参基因, 以稀释 80 倍的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR。使用 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪, 按照荧光定量染料 ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix 说明书进行, 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$  ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L; 正向、反向引物各 0.5  $\mu$ L; cDNA 模板 4  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 5.0  $\mu$ L。反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次; 最后为熔解曲线步骤(95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s)。每个样品设置 3 个生物学重复。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法结合 SPSS 20.0 中的单因素方差分析(one-way ANOVA)及 LSD Multiple Comparison Test 进行基因差异表达分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

### 1.8 细胞培养及黄姑鱼 *AP2α* 的亚细胞定位和 Western blot

将构建成功的真核表达质粒 pEGFP-YdSPHK1 转染至人胚胎肾细胞 293T (HEK 293T)中进行亚细胞

定位,同时转染 pEGFP-N1 作为阴性对照。HEK 293T 细胞接种到 12 孔板中,培养基为含有 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 恒温培养 24 h 之后,使用 Lipo8000™ 转染试剂进行转染。转染 24 h 后,收集细胞进行 Western blot 验证以检测黄姑鱼 AP2 $\alpha$  在 HEK 293T 细胞中表达。步骤如下:先用细胞裂解缓冲液裂解,制备蛋白样品,蛋白质样品通过 12% SDS-PAGE 分离,然后转移到 PVDF 膜上;将膜用含有 5% 胎牛血清白蛋白的 TBST 缓冲液在室温下封闭孵育 2 h,然后转移到 GFP 一抗稀释液中 4 °C 过夜;用 TBST 洗涤 5 次(每次 5 min),将膜与二抗稀释液一起孵育 2 h,然后用 TBST 洗涤 7 次(每次 5 min)。膜用 BeyoECL Plus 化学发光试剂盒检测,用 Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare)拍照。同时,用 4% 的多聚甲醛固定细胞,0.2% 的 Triton X-100 透化细胞,最后用 0.2% 的 DAPI 进行细胞核染色。使用共聚焦荧光显微镜 Leica TCS SP8 系统(Leica, 德国)观察绿色荧光蛋白在细胞中的分布。

### 1.9 黄姑鱼 GST-AP2 $\alpha$ 重组蛋白诱导表达和检测

将测序正确的重组质粒(pGEX-6P-1-AP2 $\alpha$ )转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,在含氨苄青霉素(100 g/mL)的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.6。加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半苷(IPTG)至终浓度 0.25 mmol/L,37 °C 继续振荡培养 6 h。菌液 5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。冰浴条件下超声裂解细菌,

裂解液为含 1% Triton X-100 的冰冷 PBS,超声时间为 10 s,间隔时间为 10 s,功率为 200 W,超声直至菌液清亮。4 °C 下 15 000 r/min 离心 20 min,收集上清液(含 GST-AP2 $\alpha$  融合蛋白)。样品分别与 2 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,煮沸 5 min,12% SDS-PAGE 凝胶电泳,同时设转化空载体的大肠杆菌 BL21 进行对照,电泳结束后,用 0.025% 考马斯亮蓝 R250 进行显色观察。同时,对转化 pGEX-6P-1 空载体的菌和 pGEX-6P-1-AP2 $\alpha$  重组载体的菌进行 SDS-PAGE 电泳分离,电转至 PVDF 膜,利用 GST 抗体进行 Western blot 检测以验证 AP2 $\alpha$  蛋白表达,Western Blot 的方法同 1.8。

## 2 结果

### 2.1 黄姑鱼 AP2 $\alpha$ 基因序列分析

AP-2 $\alpha$  基因在基因组上由 7 个外显子组成(图 1),本研究克隆到 AP2 $\alpha$  的基因开放阅读框(ORF)为 1 275 bp,编码 424 个氨基酸(图 3)。软件预测该蛋白的理论分子量为 46.43 kDa,理论等电点(pI)为 8.57。预测得到的 AP2 $\alpha$  蛋白结构与 AP2 $\alpha$  蛋白家族的共有结构类似,在 N 端为反式激活结构域,在中部为中心基本结构及在 C 端高度保守的 helix-span-helix 基序(图 2)。SignalIP-5.0 Server 预测黄姑鱼 AP2 $\alpha$  不含信号肽。NCBI 蛋白保守结构域的预测显示,黄姑鱼 AP2 $\alpha$  基因上的 AP2 $\alpha$  超家族保守结构域位于 197~392 aa,黄姑鱼 AP2 $\alpha$  蛋白的三级结构预测如图 4 所示。

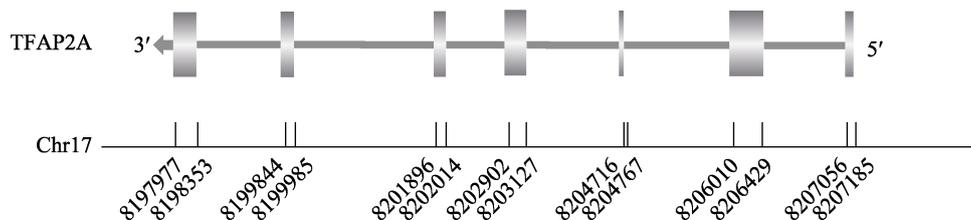


图 1 黄姑鱼 AP2 $\alpha$  的基因组结构  
Fig.1 Genome structure of AP2 $\alpha$  in *N. albiflora*

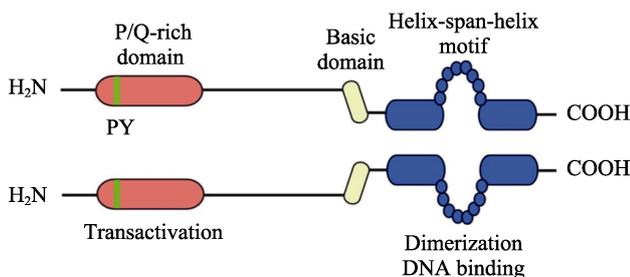


图 2 黄姑鱼 AP-2 $\alpha$  的蛋白结构分析  
Fig.2 Protein structures analysis of AP2 $\alpha$  in *N. albiflora*

### 2.2 AP2 $\alpha$ 氨基酸同源性和系统进化关系分析

将黄姑鱼 AP2 $\alpha$  的氨基酸序列与选取的 16 个其他物种的 AP2 $\alpha$  的氨基酸序列比对后,发现其与其他物种的 AP2 $\alpha$  蛋白的氨基酸序列同源性在 80% 以上(表 2)。值得注意的是,黄姑鱼 AP2 $\alpha$  蛋白与同属于石首鱼科(Sciaenidae)的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的同源性高达 100%。选取鱼类、哺乳类、鸟类和两栖类中的代表物种,对它们的 AP2 $\alpha$  蛋白的氨基酸序

```

atg tta gtg cac agt ttt tcc gcg atg gac cgt cac gac gga acc agc aat ggg aca gcc 60
M L V H S F S A M D R H D G T S N G T A 20
agg cta cct cag ctg ggc ggc gtg ggc cag agt ccc tac acg agc gcc cct ccg ctc tcc 120
R L P Q L G G V G Q S P Y T S A P P L S 40
cac aca ccg aac tcg gac ttc cag ccc ccc tac ttc ccc ccg ccc tac cag ccc atc tac 180
H T P N S D F Q P P Y F P P P Y Q P I Y 60
ccg cag tct cag gac cct tac tcg cac gtc aac gac ccg tac tcc ctc aac tcc ctg cac 240
P Q S Q D P Y S H V N D P Y S L N S L H 80
gcc cag ccg cag ccg cag cac ccg gga tgg ccg ggc cag agg cag ggt cag gag agc ggc 300
A Q P Q P Q H P G W P G Q R Q G Q E S G 100
ctg ctg cac cag cac cgc agc ctg ccc cac cag ctg tgc cgg gag tac cgc agg gaa gtg 360
L L H Q H R S L P H Q L C R E Y R R E V 120
ctc cta ccg tcc ggc cac ggc atc gat acg gga ctg tcg gac tct atc cct atc cat gga 420
L L P S G H G I D T G L S D S I P I H G 140
ata cct cac tct tta gaa gac gtt cag cct gtt gag gag caa gga att cac att ccc gac 480
I P H S L E D V Q P V E E Q G I H I P D 160
cag act gta att aaa aaa ggt cca gtg tct tta tcc aag aac aac aac atc tcc gcc atc 540
Q T V I K K G P V S L S K N N N I S A I 180
ccc gta aat aag gac ggt ctt ttc gga ggg gtg gta aac ccc aac gag gtg ttc tgc tca 600
P V N K D G L F G G V V N P N E V F C S 200
gtt ccg ggt cgc ctg tcc ctc ctc agc tcc aca tca aag tac aag gtc acg gtg gcg gag 660
V P G R L S L L S S T S K Y K V T V A E 220
gtg cag aga cgc ctc tcg ccg ccc gag tgc ctg aac gcc tcg ctg ctg ggc ggg gta ctg 720
V Q R R L S P P E C L N A S L L G G V L 240
agg agg gcc aag tct aag aat gga gga aga tcc tta agg gag aag ctg gat aaa atc ggc 780
R R A K S K N G G R S L R E K L D K I G 260
ttg aat cta cct gcg ggc aga cgc aag gca gcc aac gtc acc ttg ctg acg tca cta gtc 840
L N L P A G R R K A A N V T L L T S L V 280
gaa ggc gag gcg gta cat ctt gcc agg gat ttt ggt tat gta tgc gag acc gag ttt cca 900
E G E A V H L A R D F G Y V C E T E F P 300
gcc aag gca gta gct gaa tat gta aac cgt cag cat tcc gac cca aac gaa caa gtc caa 960
A K A V A E Y V N R Q H S D P N E Q V Q 320
aga aaa aac atg cta ttg gcc acg aag caa gtc tgc aaa gag ttc aca gac ctg ctg tcc 1020
R K N M L L A T K Q V C K E F T D L L S 340
cag gac cgc tca ccg ctg gga aac tca cgg ccg cag ccc att ctt gaa ccg gga atc cag 1080
Q D R S P L G N S R P Q P I L E P G I Q 360
agc tgt ttg acc cac ttc agt cta atc tcg cat ggt ttc ggg acc ccg gcg ctg tgc gcg 1140
S C L T H F S L I S H G F G T P A L C A 380
gcc gtc acg gcc ctg cag aac tat ctg acc gag gct atc aaa gcc atg gac aaa atg tac 1200
A V T A L Q N Y L T E A I K A M D K M Y 400
ctc aac aac aac ccc aac agt cac tca gat aac ggc act aaa ggc gga gac aaa gac gag 1260
L N N N P N S H S D N G T K G G D K D E 420
aag cac aga aag tga 1275
K H R K - 424

```

图3 黄姑鱼 *AP2α* 开放阅读框(ORF)序列和预测的氨基酸序列

Fig.3 Predicted amino acid sequence and the ORF sequence of *AP2α* gene

起始密码子和终止密码子加粗表示。*AP2α* 超家族保守结构域使用灰色阴影突出显示。绿色框表示丝氨酸(Ser)磷酸化位点, 蓝色框表示苏氨酸(Thr)磷酸化位点, 黄色框表示酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。

The start codon and the stop codon are shown in bold. The *AP2α* superfamily conserved domain is highlighted with a grey shadow. The green boxes indicate serine (Ser) phosphorylation sites, the blue boxes indicate threonine (Thr) phosphorylation sites, and yellow boxes indicate tyrosine (Tyr) phosphorylation sites.

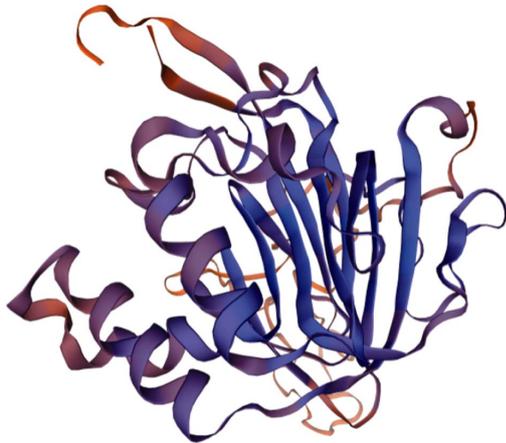


图 4 黄姑鱼 AP2 $\alpha$  蛋白三级结构预测  
Fig.4 Tertiary structure of AP2 $\alpha$  from *N. albiflora*

表 2 AP2 $\alpha$  系统发育进化树及序列多重比对所用的氨基酸序列

Tab.2 Amino acid sequences used in multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of AP-2 $\alpha$

| 物种<br>Species                           | 相似度<br>Identity/% | GenBank<br>Accession No. |
|---|-------------------|--------------------------|
| 黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>              | 100.00            |                          |
| 大黄鱼<br><i>Larimichthys crocea</i>       | 100.00            | XP_010734454.1           |
| 金头鲷 <i>Sparus aurata</i>                | 99.53             | XP_030254741.1           |
| 龙胆石斑鱼<br><i>Epinephelus lanceolatus</i> | 98.82             | XP_033494531.1           |
| 日本青鲷 <i>Oryzias latipes</i>             | 98.11             | XP_004081017.1           |
| 半滑舌鲷<br><i>Cynoglossus semilaevis</i>   | 97.88             | XP_008305748.1           |
| 大菱鲆<br><i>Scophthalmus maximus</i>      | 97.83             | XP_035475313.1           |
| 海水青鲷<br><i>Oryzias melastigma</i>       | 97.41             | XP_024135759.1           |
| 狭鳞庸鲷<br><i>Hippoglossus stenolepis</i>  | 96.93             | XP_034999004.1           |
| 红鳍东方鲀<br><i>Takifugu rubripes</i>       | 96.63             | XP_003967954.1           |
| 大马哈鱼<br><i>Oncorhynchus keta</i>        | 96.14             | XP_035612558.1           |
| 金鱼 <i>Carassius auratus</i>             | 95.29             | XP_026056606.1           |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>                  | 95.06             | NP_001306088.1           |
| 褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>            | 86.81             | NP_001100815.1           |
| 小鼠 <i>Mus musculus</i>                  | 86.52             | XP_006516965.1           |
| 黑天鹅 <i>Cygnus atratus</i>               | 86.05             | XP_035416161.1           |
| 人 <i>Homo sapiens</i>                   | 85.82             | NP_001358995.1           |
| 家马 <i>Equus caballus</i>                | 84.95             | XP_023480207.1           |
| 非洲爪蟾<br><i>Xenopus tropicalis</i>       | 84.87             | NP_001032335.1           |
| 家鸡 <i>Gallus gallus</i>                 | 84.63             | NP_990425.1              |

列进行多重比对, 结果如图 5 所示, 各物种 AP2 $\alpha$  蛋白中的 3 个重要的结构域相对较保守。

系统进化分析结果显示, 黄姑鱼 AP2 $\alpha$  在进化关系上与其他鱼类聚为一支; 哺乳类、鸟类和两栖类各自聚为一支(图 6)。

### 2.3 黄姑鱼 AP2 $\alpha$ 的组织表达谱及对哈维氏弧菌免疫刺激后的表达谱变化

如图 7A 所示, 黄姑鱼 AP2 $\alpha$  基因在所检测的黄姑鱼的 9 个组织或器官(皮肤、肝、心脏、鳃、肾脏、肠、脾脏、血液和胃)中均有表达, 属于广谱型表达, 但在不同组织中的表达量具有显著差异。其中, 在血液和鳃中表达量最高, 其次为肝脏、心脏和皮肤, 而肾脏中表达量最低。

经哈维氏弧菌浸泡攻毒后, 黄姑鱼头肾、脾脏和肝脏中的 AP2 $\alpha$  基因的 mRNA 表达水平随着时间的延长而呈现不同的变化趋势(图 7B)。肝脏中, 攻毒前后 AP2 $\alpha$  表达量变化最大, 攻毒后 12 h 开始上调, 在 24 h 达到最高水平, 是攻毒前的 39 倍( $P < 0.05$ ), 此后逐渐下降至攻毒前的 9.5 倍(48 h)~2.1 倍(96 h) ( $P < 0.05$ )。头肾中, 攻毒后 48 h 上调至攻毒前的 3.5 倍( $P < 0.05$ ), 其他时间点的表达量与攻毒前差异不显著; 脾脏中, 攻毒后 6 h 后 AP2 $\alpha$  的表达量就上调, 12 h 达到高峰, 为攻毒前的 3.4 倍, 24 h 恢复至 6 h 的水平, 48 h 后表达量低于攻毒前的水平。

### 2.4 黄姑鱼 AP2 $\alpha$ 的亚细胞定位

Western blot 表明 pEGFP-AP2 $\alpha$  蛋白在 HEK 293T 细胞中成功表达, 在 70 kDa 以上出现一条非常明显的蛋白条带(AP2 $\alpha$  蛋白预测大小为 46.43 kDa, EGFP 蛋白预测大小为 26 kDa), 与实际大小一致(图 8A)。AP2 $\alpha$  蛋白的亚细胞定位结果显示, pEGFP-AP2 $\alpha$  蛋白仅在细胞核中有分布, 而对照 pEGFP-N1 在细胞核及细胞质均有分布(图 8B)。

### 2.5 黄姑鱼 AP2 $\alpha$ 融合蛋白原核诱导表达和 Western blot 验证

将重组菌株 pGEX-6P-1-AP2 $\alpha$  转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后在 70 kDa 以上出现一条非常明显的蛋白条带, 而在表达载体 pGEX-6P-1 诱导和不诱导及重组质粒不诱导的对照中皆看不出此带, 此带的大小与 AP-2 $\alpha$  蛋白(46.43 kDa)及与其融合的 GST 蛋白的分子量(26 kDa)之和相符, 说明此基因插入表达载体 pGEX-6P-1 后在大肠杆菌中获得了高效表达。超声波破碎菌, 高速离心后将菌液上清液经

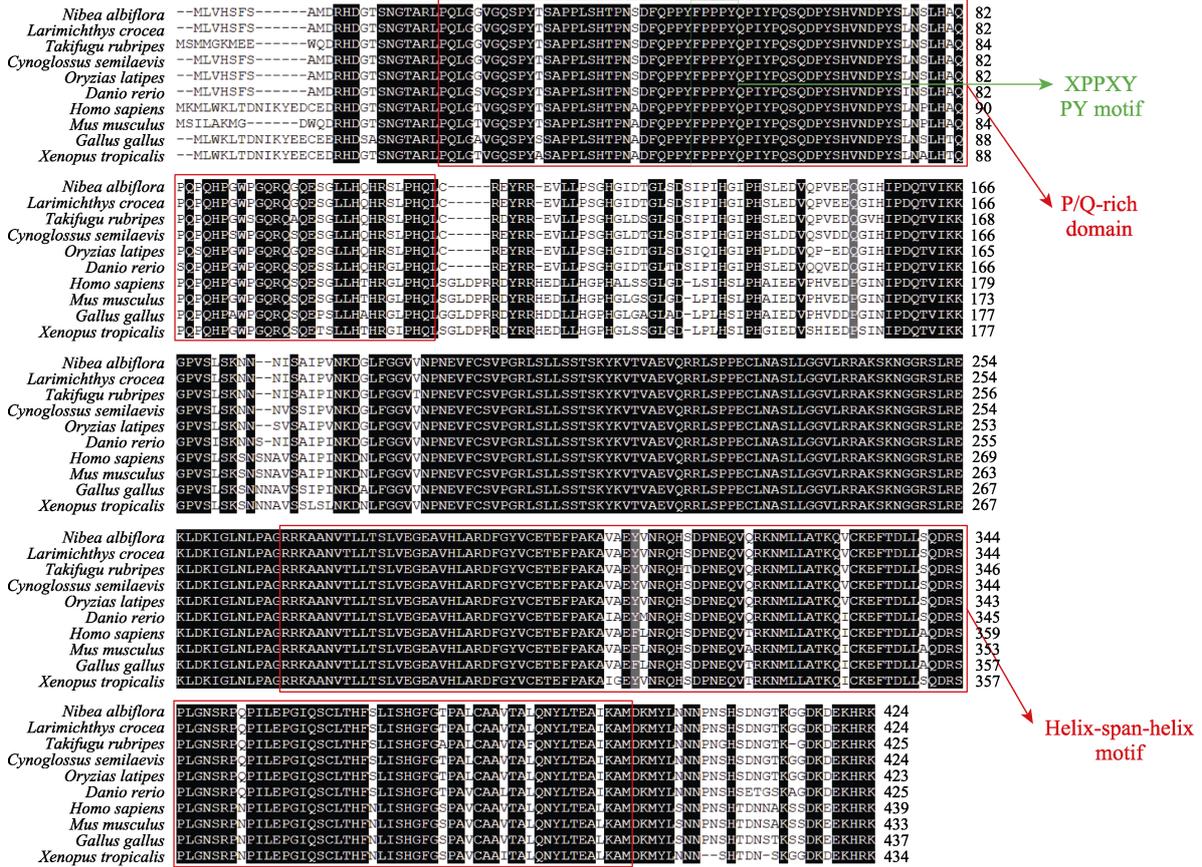


图 5 黄姑鱼 AP2α 的氨基酸序列的多重比对

Fig.5 Multiple sequence alignment of AP2α in *N. albiflora*

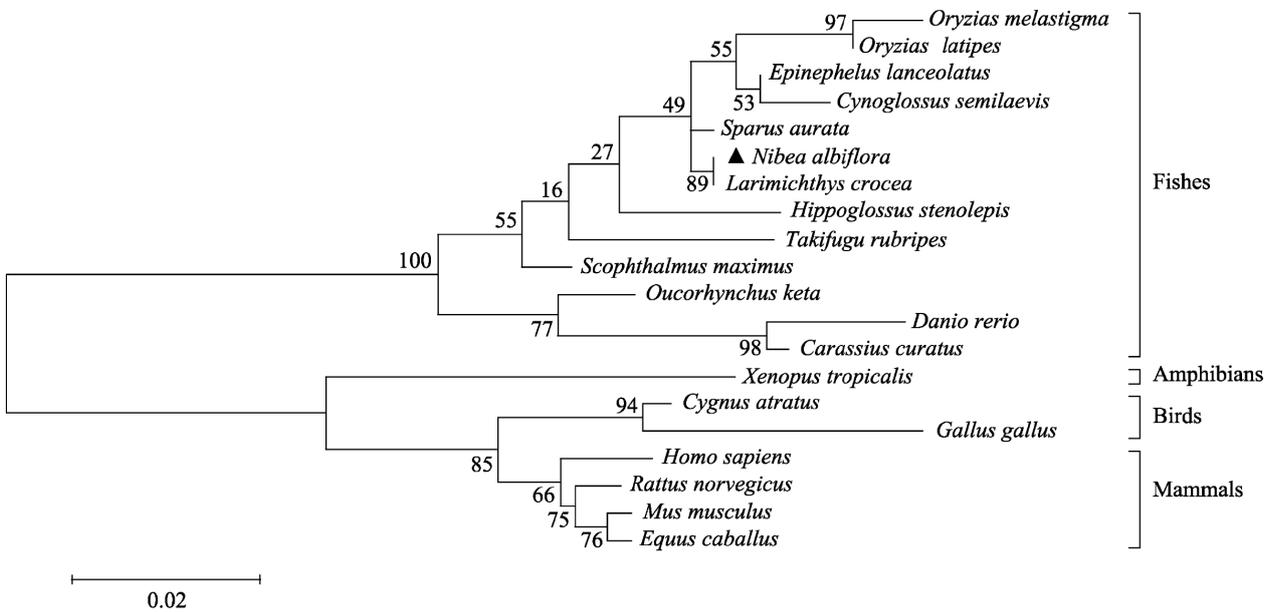


图 6 不同物种的 AP2α 氨基酸序列的 ML 系统发育进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on Maximum-Likelihood (ML) method of AP2α protein in different species

节点处数字为 Bootstrap 检验设置重复取样 1 000 次计算出的自展值；标尺(0.02)代表遗传距离；所用的 AP2α 蛋白氨基酸序列的 GenBank 登录号信息见表 2。

The numbers at the nodes indicate the bootstrap confidence values of 1 000 replicates; The scale bar (0.02) indicates the genetic distance; The GenBank accession numbers of amino acid sequences used are listed in Tab.2.

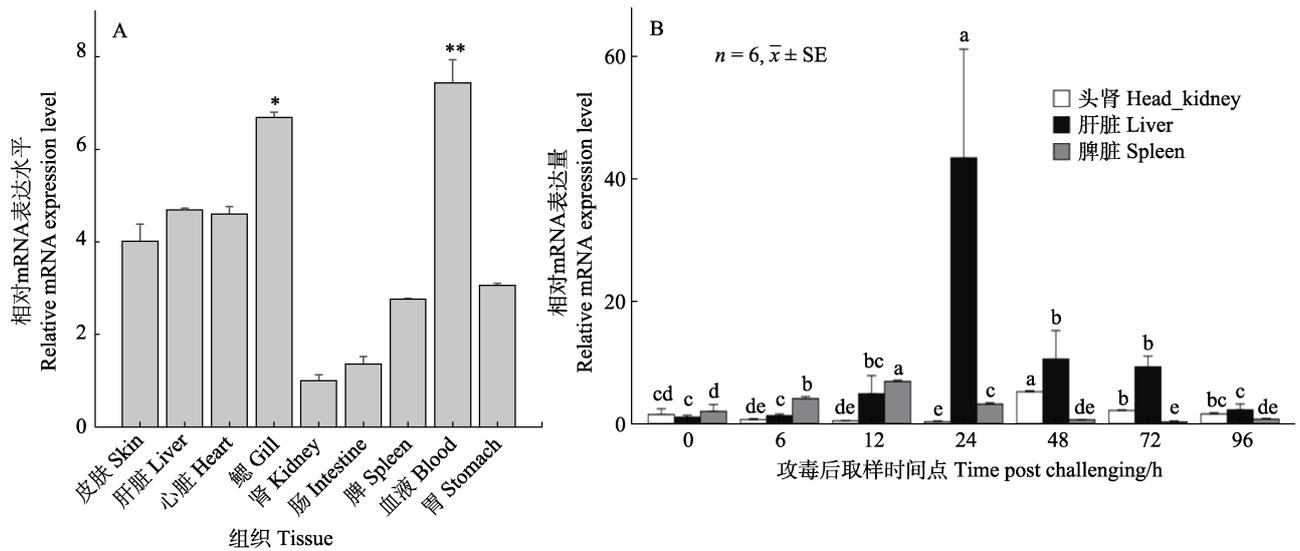


图 7 黄姑鱼 AP2 $\alpha$  组织表达谱及哈维氏弧菌攻毒后头肾、肝脏和脾脏中表达谱变化  
Fig.7 Expression profiles of AP2 $\alpha$  in tissues and the relative mRNA expressions in head-kidney, liver and spleen post *V. harveyi* challenging

A: AP2 $\alpha$  在健康黄姑鱼不同组织中的相对表达量; B: 哈维氏弧菌攻毒后 AP2 $\alpha$  基因的 mRNA 在头肾、肝脏和脾脏组织中的相对表达量。\*表示组织基因表达量与其他组织相比达到显著水平, \*\*表示组织基因表达量与其他组织相比达到极显著水平。不同字母表示 AP2 $\alpha$  基因在不同组织表达量存在显著性差异。

A: Tissue profiles of AP2 $\alpha$  expression in healthy yellow drum; B: Relative mRNA expressions of AP2 $\alpha$  in head-kidney, liver and spleen after *V. harveyi* infection. \* means that the gene expression level of the tissue has reached a significant level compared with other tissues, and \*\* means that the gene expression level of the tissue has reached a high significant level compared with other tissues. Different letters represent the significant difference of the AP2 $\alpha$  gene expression among these tissues.

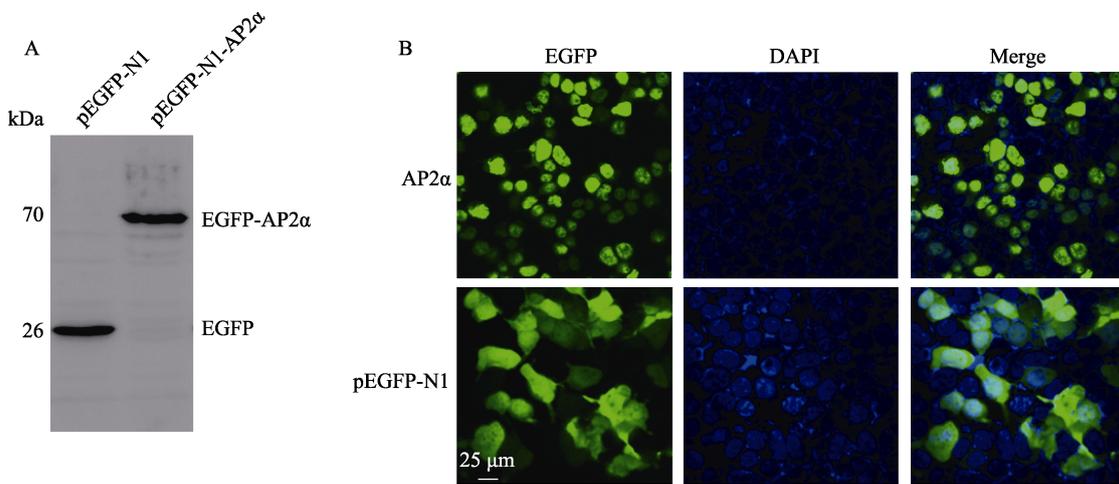


图 8 黄姑鱼 AP2 $\alpha$  的亚细胞定位  
Fig.8 The subcellular localization of AP2 $\alpha$

A: Western blot 检测 EGFP-AP2 $\alpha$  蛋白(72.43 kDa)与对照 EGFP(26 kDa);

B: 共聚焦荧光显微镜下观察到 EGFP-AP2 $\alpha$  蛋白在 HEK 293T 细胞中定位于细胞核

A: Western blot of EGFP-AP2 $\alpha$  protein (72.43 kDa) compared with control EGFP (26 kDa); B: Subcellular localization of EGFP-AP2 $\alpha$  protein in HEK 293T cells was found in cytoplasm observed under the confocal fluorescence microscopy

SDS-PAGE 分析(图 9A)。Western blot 显示, pGEX-6P-1-AP2 $\alpha$  蛋白在 HEK 293T 细胞中成功表达, 在 70 kDa 以上出现一条非常明显的蛋白条带(AP2 $\alpha$  蛋白预测

大小为 46.43 kDa, GST 蛋白预测大小为 26 kDa), 与其实际大小一致(72.43 kDa) (图 9B), 表明表达的 GST-AP2 $\alpha$  融合蛋白在菌体里为可溶性表达。

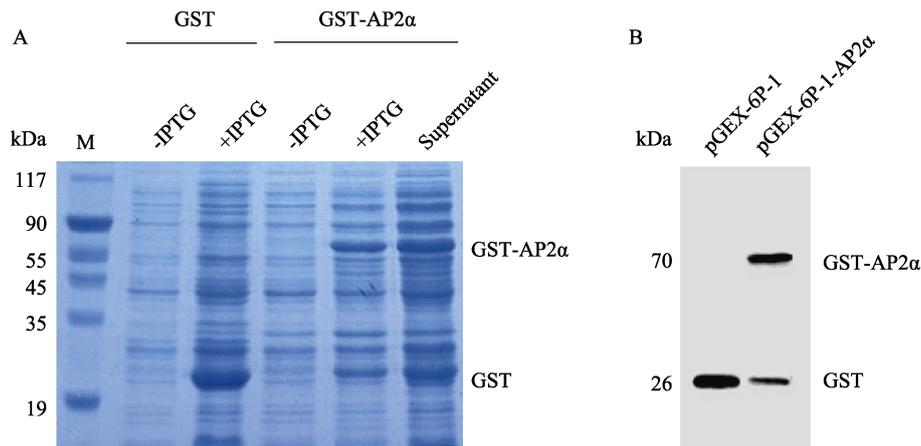


图9 SDS-PAGE分析AP2 $\alpha$ 融合蛋白的表达(A)和Western blot验证(B)

Fig.9 Expression analysis of the recombinant AP2 $\alpha$  fusion protein by SDS-PAGE (A) and verification by Western blot (B)

### 3 讨论

在人类和小鼠中发现转录因子激活蛋白 AP2 家族由 AP2 $\alpha$ 、AP2 $\beta$ 、AP2 $\gamma$ 、AP2 $\delta$  和 AP2 $\epsilon$  组成,在硬骨鱼中存在 AP2 $\alpha$ 、AP2 $\beta$ 、AP2 $\gamma$  和 AP2 $\epsilon$  的直系同源基因。AP2 $\alpha$  发现最早,通常以二聚体形式结合到 GC 含量丰富的 DNA 元件上,特异性调控基因表达,参与脊椎动物生长发育、细胞增殖分化、细胞凋亡、免疫反应和抑癌作用等(毕杨等,2011)。黄姑鱼 AP2 $\alpha$  蛋白由 7 个外显子编码,这与所有哺乳动物 AP2 蛋白均由 7 个外显子编码一致。AP2 $\alpha$  家族的所有成员中共有 3 个保守的结构域,在 N 端(H<sub>2</sub>N)是富含脯氨酸和谷氨酰胺(P/Q-rich domain)的反式激活结构域,其后是一个中心基本结构及在 C 端(COOH)高度保守的 helix-span-helix 基序,负责结合 DNA 和蛋白质二聚化。大多数 AP2 $\alpha$  蛋白在反式激活结构域中有一个 PY 基序(XPPXY)和其他高度保守的关键残基。AP2 $\alpha$  证实能与回文序列 5'-GCCN3GGC-3'及其相似变体 GCCN4GGC、GCCN3/4GGG 等结合,在不同的细胞和病毒中可以行使增强剂的作用,可以促进一些基因和蛋白的表达(Pirone *et al.*, 2019)。

序列同源比对显示,鱼类和哺乳动物 AP2 $\alpha$  蛋白在进化上高度保守,黄姑鱼 AP2 $\alpha$  与斑马鱼(*Danio rerio*) AP2 $\alpha$  蛋白具有 95.06%的相似性,与人类(*Homo sapiens*) AP2 $\alpha$  蛋白具有 85.82%的相似性(图 6、表 2)。从鱼类到哺乳类选取了代表性物种的 AP2 $\alpha$  蛋白的氨基酸序列构建了系统进化树,其结果与传统的分类结果基本一致,黄姑鱼 AP2 $\alpha$  与其他鱼类的 AP2 $\alpha$  聚为一支,以哺乳类、鸟类和两栖类为单位选取的其他物种的 AP2 $\alpha$  各自形成一个分支。有趣的是,黄姑鱼 AP2 $\alpha$  与大黄鱼 AP2 $\alpha$  序列同源性高达 100%,在分类

地位上,大黄鱼与黄姑鱼同隶属于石首鱼科。

本研究中,AP2 $\alpha$  在黄姑鱼各组织、器官中广泛表达,这与该基因在人和鼠等的组织中广谱型表达模式一致(Pirone *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2016),说明 AP2 $\alpha$  参与生命活动的多种过程,并发挥重要作用。受到哈维氏弧菌感染后,AP2 $\alpha$  基因在黄姑鱼头肾、肝脏和脾脏 3 种主要免疫器官中的表达量均显著上调,特别是肝脏中 AP2 $\alpha$  mRNA 表达量在攻毒后 24 h 升高到攻毒前的 39 倍,表明 AP2 $\alpha$  基因参与了黄姑鱼抵御哈维氏弧菌的抗病免疫过程。敲除小鼠的 AP2 $\alpha$  基因,可导致其神经管、面部、眼和四肢的胚胎形成受到影响而发育畸形甚至死亡(Sulkala *et al.*, 2002),说明 AP2 $\alpha$  参与生物免疫、发育等多种生命过程。在人类牙齿釉质形成的研究中,转录因子 AP2 $\alpha$  通过与基质金属蛋白酶 20 (matrix metalloproteinase-20, *Mmp-20*)基因的启动子进行结合和相互作用,调控 MMP-20 的表达水平,牙齿特异表达的基质金属蛋白酶 MMP-20 主要在成釉细胞分泌期降解釉质蛋白。分析发现,*Mmp-20* 基因启动子区含有 AP2 $\alpha$  结合位点,AP2 $\alpha$  可以通过结合到 *Mmp-20* 基因启动子区域来影响 *Mmp-20* 基因的转录水平,从而影响釉质形成。借助小鼠成釉细胞,转染 AP2 $\alpha$  基因的 siRNA 后,成釉细胞中 *Mmp-20* mRNA 的表达水平显著上调(赵娜等,2012)。

在脂肪生成过程中,AP2 $\alpha$  通过直接与 DNA 甲基转移酶 3a (*Dnmt3a*)近端启动子区域结合,转录上调 *Dnmt3a* 的表达,从而使前脂肪细胞具有分化能力,增殖细胞通过接触抑制阶段(CI)进入细胞周期。用 AP2 $\alpha$  特异性 siRNA 处理前脂肪细胞,会抑制前脂肪细胞的分化。此外,将 AP2 $\alpha$  基因敲低会导致脂肪生成受损,而 *Dnmt3a* 的过表达能在一定程度上挽救这

种脂肪生成受损。AP2 $\alpha$  是前脂肪细胞通过 CI 期 *Dnmt3a* 表达上调而分化的能力的重要调节剂(Guo *et al.*, 2016)。

#### 4 结论

基于之前的全基因组关联分析, 发现转录因子 AP2 $\alpha$  与黄姑鱼抗哈维氏弧菌病相关。本研究发现, 经哈维氏弧菌感染刺激后 AP2 $\alpha$  显著上调表达, 表明 AP2 $\alpha$  在黄姑鱼的抗哈维氏弧菌病免疫过程中可能具有重要作用, 其具体功能与机制还亟待更进一步的研究。

#### 参 考 文 献

- BERLATO C, CHAN K, PRICE A M, *et al.* Alternative TFAP2A isoforms have distinct activities in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2011, 13(2): R23
- BI Y, HE Y, GONG M, *et al.* Construction of recombinant adenovirus vector containing dominant negative mutant of transcriptional factor AP2 $\alpha$  and its expression and activity in mesenchymal stem cells. *Life Science Research*, 2011, 15(5): 402–409 [毕杨, 何昀, 龚敏, 等. 显性负性突变体对 AP2 $\alpha$  转录因子及其活性的影响. *生命科学研究*, 2011, 15(5): 402–409]
- GUO W, CHEN J N, YANG Y, *et al.* Epigenetic programming of *Dnmt3a* mediated by AP2 alpha is required for granting preadipocyte the ability to differentiate. *Cell Death and Disease*, 2016, 7(12): e2496
- HOFFMAN T L, JAVIER A L, CAMPEAU S A, *et al.* Tfp2 transcription factors in zebrafish neural crest development and ectodermal evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution*, 2007, 308(5): 679–691
- HUNG S W, CHIU C F, CHEN T A, *et al.* Recombinant viral protein VP1 suppresses HER-2 expression and migration/metastasis of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012, 136(1): 89–105
- LIU G, HAN Z, JIANG D, *et al.* Genome-wide association study identifies loci for traits related to swim bladder in yellow drum (*Nibea albiflora*). *Aquaculture*, 2020, 526: 735327
- LÜ C X, DING Y, LI L, *et al.* Analysis of clinical significance of KLF5 expression in breast cancer tissue. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2013, 20(11): 850–852 [吕昌新, 丁宇, 李良, 等. 乳腺癌组织 KLF5 表达临床意义分析. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(11): 850–852]
- LUO S, LI W, XIE Y, *et al.* A molecular insight into the resistance of yellow drum to *Vibrio harveyi* by genome-wide association analysis. *Aquaculture*, 2021, 543(4): 736998
- PIRONE L, SMALDONE G, SPINELLI R, *et al.* KCTD1: A novel modulator of adipogenesis through the interaction with the transcription factor AP2 $\alpha$ . *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(12): 158514
- POWE D G, AKHTAR G, HABASHY H O, *et al.* Investigating AP-2 and YY1 protein expression as a cause of high HER2 gene transcription in breast cancers with discordant HER2 gene amplification. *Breast Cancer Research*, 2009, 11(6): R90
- SHEN G M, LI C, SHI C Y, *et al.* Isolation and characterization of the extracellular products (ECPs) and secretory proteins of the pathogenic *Vibrio harveyi* strain ML01. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 25–33 [沈桂明, 李晨, 史成银, 等. 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) ML01 株胞外产物及分泌性蛋白的分离与特性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 25–33]
- SULKALA M, LARMAS M, SORSA T, *et al.* The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *Journal of Dental Research*, 2002, 81(9): 603–607
- THEWES V, ORSO F, JÄGER R, *et al.* Interference with activator protein-2 transcription factors leads to induction of apoptosis and an increase in chemo- and radiation-sensitivity in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2010, 10: 192
- WAKAHASHI S, SUDO T, OKA N, *et al.* VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of snail and slug: A potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer. *Translational Research*, 2013, 162(3): 181–190
- XIANG J, CHEN R, XU D, *et al.* Characterization of pathological changes and immune-related gene expression in yellow drum (*Nibea albiflora*) in response to *Pseudomonas plecoglossicida* and poly I:C challenge. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100350
- YIN F, LIU W, BAO P, *et al.* Food intake, survival, and immunity of *Nibea albiflora* to *Cryptocaryon irritans* infection. *Parasitology Research*, 2018, 117(8): 2379–2384
- ZHANG Z H, FENG B, ZHU T F, *et al.* Expression and regulation analysis of the p35a and p40c subunits of interleukin 12 in *Cynoglossus semilaevis* infected by *Vibrio harveyi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 12–23 [张志华, 冯博, 朱腾飞, 等. 半滑舌鲷白细胞介素 12 的 p35a 和 p40c 亚基在哈维氏弧菌感染下的表达和调控分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 12–23]
- ZHAO N, WANG Y M, SUN X L. Effects of AP-2 $\alpha$  on expression of matrix metalloproteinase-20. *Chinese Journal of Conservative Dentistry*, 2012, 22(4): 183–188 [赵娜, 王玉民, 孙学玲, 等. AP-2 $\alpha$  对基质金属蛋白酶-20 作用的研究. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2012, 22(4): 183–188]

## cDNA Cloning and Characterization of Transcription Factor Activating Protein AP2 $\alpha$ from Yellow Drum, *Nibea albiflora*

LI Jiacheng, GOU Tao, XIAO Yao, LUO Shuai, WU Baolan, WANG Zhiyong, HAN Fang<sup>①</sup>

(Fisheries College, Jimei University, Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Eco-environment, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

**Abstract** The transcription factor activating protein 2 $\alpha$  (AP2 $\alpha$ ) is a nuclear transcription factor that specifically binds to DNA and is involved in the regulation of animal embryonic development, cell growth, apoptosis, tumorigenesis, immunity, and other biological processes. In our previous study, the transcription factor AP2 $\alpha$  was discovered as a key disease-resistance candidate gene in the yellow drum, *Nibea albiflora*, in response to a *Vibrio harveyi* infection through genome-wide association analysis. In the present study, the AP2 $\alpha$  gene, which encodes a protein of 424 amino acids, was cloned from a yellow drum. The N-terminal is a trans-activation domain rich in proline and glutamine (P/Q-rich domain), and the middle is a central basic structure (central basic region), which is a highly conserved helix-span-helix motif responsible for DNA binding and protein dimerization. Multiple alignments of amino acid sequences showed that AP2 $\alpha$  was highly conserved, with a homology of more than 84.63% among the detected fish, amphibians, birds, and mammals. Quantitative RT-PCR demonstrated that AP2 $\alpha$  was widely distributed in the nine tested tissues, with the highest expression in the blood. Moreover, its transcription was significantly activated in the liver, spleen, and head kidney by *V. harveyi* infection, especially in the liver wherein the transcript level of AP2 $\alpha$  reached a peak at 24 h post infection. Subcellular localization by constructing the recombinant eukaryotic expression plasmid pGFP-AP2 $\alpha$  and transfection into HEK293T cells revealed that AP2 $\alpha$  was localized in the nucleus. In addition, the soluble GST-AP2 $\alpha$  fusion protein was expressed in *Escherichia coli* BL21. These results demonstrate that AP2 $\alpha$  plays an important role in the immune response against *V. harveyi* in *N. albiflora*. We provide new insights into the role of AP2 $\alpha$  in the innate immunity of teleost fishes and provide a basis for studies on immune mechanisms and disease-resistant breeding in *N. albiflora* and other marine fish.

**Key words** *Nibea albiflora*; Transcription factor activating protein 2 $\alpha$ ; *Vibrio harveyi*; Real-time quantitative PCR; Subcellular localization; Protein expression

<sup>①</sup> Corresponding author: HAN Fang, E-mail: hanfangyc@jmu.edu.cn