



JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

DOI: 10.11964/jfc.20210612931



### 日本鳗鲡 TBK1 基因的克隆与免疫功能分析

徐元凯<sup>1,2</sup>, 彭欣慰<sup>1,3,4</sup>, 林 鹏<sup>1,3,4</sup>, 王艺磊<sup>1,3,4</sup>, 冯建军<sup>1,3,4\*</sup>
(1.集美大学水产学院,福建厦门 361021;
2.宁波海洋研究院,浙江宁波 315832;
3.鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心,福建厦门 361021;
4.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:为了阐明鱼类 TANK 结合激酶 1 (TBK1) 在免疫应答密切相关的 NF-κB、I型 IFN 及 MAPK 信号通路中的调控作用,本实验通过 cDNA 末端快速扩增技术 (SMART RACE) 从日本鳗鲡中克隆了TBK1 基因 cDNA 全长序列,命名为 AjTBK1,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测了在体和离体状态下不同病原体相关分子模式 (PAMPs) 及嗜水气单胞 菌对日本鳗鲡 AjTBK1 基因表达水平变化的影响,通过构建绿色荧光蛋白 pEGFP-TBK1 和 pCMV-TBK1 真核表达质粒对 AiTBK1 亚细胞定位以及 AiTBK1 过表达对 NF-κB、AP-1、 IFN-β 启动子荧光素酶活性的激活作用进行研究。蛋白质序列分析显示、日本鳗鲡 AjTBK1 编码 731 个氨基酸,其三维丝带空间结构与人类 TBK1 相似,具有保守的激酶结 构域 (KD)、泛素样结构域 (ULD)、二聚化支架结构域 (SDD) 以及 C 端结构域 (CTD),在 系统发育树中与其他鱼类 TBK1 家族聚为一支。qRT-PCR 检测发现 AjTBK1 在多种组织中 广泛表达,且在肝脏和肠中高表达。经LPS、poly I:C、嗜水气单胞菌免疫注射后, AjTBK1 基因表达水平在日本鳗鲡肝脏中显著提高,而肾脏中的表达量则在 LPS 和 poly I:C 刺激后显著降低。离体实验中,经 LPS、poly I:C、PGN 以及不同浓度嗜水气单胞菌刺 激后的日本鳗鲡肝脏细胞 AjTBK1 基因表达水平均有显著升高。亚细胞定位结果显示,天 然状态下的 AfTBK1 在 HEK293 细胞质中分布, 经 LPS 和 poly I:C 刺激后呈聚集点状分布。 此外, 双荧光素酶活性检测发现过表达的 AjTBK1 可显著增强 NF-κB、AP-1 和 IFN-β 启动 子荧光素酶活性。以上研究表明、AiTBK1可以通过激活 NF-KB、AP-1和 I型 IFN 信号通 路,在机体抗细菌和抗病毒先天免疫应答中发挥重要的调控作用。

关键词:日本鳗鲡; TANK 结合激酶 1(TBK1); 信号通路; 亚细胞定位; 双荧光素酶活性 中图分类号:Q 785; S 942.5 文献标志码: A

TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1) 也称 NAK 或 T2K,是 IκB 激酶 (IKK) 家族 重要的丝氨酸/苏氨酸激酶,属于非经典 IκB 激酶。 TBK1 结构与经典的 IκB 激酶 IKKα、IKKβ 相似, 含有 N 端激酶结构域 (KD)、泛素化结构域 (ULD)、 二聚化支架结构域 (SDD),以及 C 端结构域 (CTD),其中 CTD 结构域替代了 IKKα 与 IKKβ C 端的 NEMO 结合结构域 (NBD)<sup>[1]</sup>。研究发现

版权所有 ©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0) 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0) https://www.china-fishery.cn



收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-11-25

**资助项目**: 福建省自然科学基金 (2020J01671); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金 (RE202110); 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室开放基金 (2020ESHML02)

第一作者: 徐元凯 (照片), 从事水产动物免疫学研究, E-mail: 872016103@qq.com

通信作者: 冯建军, 从事水产动物病害免疫防治的研究, E-mail: fengjj@jmu.edu.cn

TBK1 中 KD、ULD 和 SDD 等 3 个结构域间存在 相互作用, KD 对 TBK1 的激活至关重要,ULD 和 SDD 主要与 IFN-β 的诱导表达密切相关,而 CTD 则可促进 TBK1 与 TANK 和其他适配子的相 互作用<sup>[2-3]</sup>。

哺乳动物中的研究表明,TBK1可被Toll样 受体、RIG-1以及MDA5等模式识别受体激活, 激活的TBK1通过使IRF3、IRF7磷酸化入核,诱 导 I型干扰素 IFN-α、IFN-β等细胞因子的表达, 在抗病毒免疫中发挥关键作用<sup>[4-5]</sup>。小鼠 (*Mus musculus*)TBK1能够增强HEK293细胞抵御水泡性口 炎病毒 (vesicular stomatitis virus)感染的能力,而 *TBK*1基因敲除的小鼠易受到鼠 γ疱疹病毒 68 (murine gammaherpes virus 68)感染,且发现该小 鼠细胞在刺激物刺激下表现出明显的IFN-β产生 缺陷<sup>[6-8]</sup>。此外,TBK1可以磷酸化IKKβ和IκBα, 进而诱导 NF-κB 亚基 RelA (p65)的核易位,或是 同 TANK 和 TRAF2 形成三元复合物激活 NF-κB, 参与对 NF-κB 信号通路的调控<sup>[9-11]</sup>。

迄今为止,TBK1 同源基因已在一些硬骨鱼 类中被克隆报道,包括大西洋鳕 (Gadus morhua)<sup>[12]</sup>、青鱼 (Mylopharyngodon piceus)<sup>[13]</sup>、草 鱼 (Ctenopharyngodon idella)<sup>[14]</sup>、大黄鱼 (Larimichthys crocea)<sup>[15]</sup>、斑马鱼 (Danio rerio)<sup>[16]</sup>、斜带石斑 鱼 (Epinephelus coioides)<sup>[17]</sup> 及鲤 (Cyprinus carpio)<sup>[18]</sup> 等。当鱼体受到不同病毒刺激后 TBK1 基因表达 水平显著升高,表明 TBK1 在机体抗病毒免疫应 答中扮演重要角色<sup>[13, 19-21]</sup>,因此有关鱼类 TBK1 抗 病毒免疫功能的研究备受关注。有学者发现青鱼 TBK1 能强烈诱导 IFN1 活性<sup>[19]</sup>, 草鱼 TBK1 可以 激活并促进 IRF7 的核易位诱导 I型 IFN 和 PKR 基因的表达<sup>[22]</sup>,而斑马鱼 TBK1 则可通过磷酸化 STING 和 IRF3 来激活 I 型 IFN 的表达<sup>[23]</sup>。虽然以 上研究表明 TBK1 对于 IRF3/IRF7 介导的 I 型干扰 素信号通路具有重要的调控作用,但鱼类 TBK1 对细菌免疫应答密切相关的 NF-κB 及 MAPK 信号 通路是否也具有调控作用还未见报道,涉及水产 养殖病原菌刺激鱼体 TBK1 基因水平变化的研究 仅在大黄鱼中有所报道[15]。因此,研究在体和离 体状态下主要病原模式分子和病原菌刺激后的鱼 类 TBK1 基因的表达变化规律、以及鱼类 TBK1 过表达对于不同免疫相关信号通路的调控作用将 有助于对硬骨鱼类 TBK1 的功能深入了解,为鱼 类免疫应答机制的阐明提供参考资料。

日本鳗鲡 (Anguilla japonica),俗称白鳝、青 鳝、鳗鱼。其味道鲜美、营养价值高,被誉为"水 中人参",在我国已形成了集养殖、加工、销售为 一体,年产值达百亿元的大产业,主要集中在福 建、广东、浙江三地<sup>[24]</sup>。但目前大规模、集约化 的养殖模式带来了鳗鱼病害的频发和流行,造成 巨额经济损失<sup>[25]</sup>。与其他经济鱼类相比,有关日 本鳗鲡免疫学基础研究十分薄弱,制约了鳗鲡产 业的健康发展。本实验首次克隆了日本鳗鲡 TBK1 基因 (命名为 AjTBK1) 全长 cDNA,利用实 时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 技术检测了不同病原 体相关分子模式以及鳗鲡主要病原菌嗜水气单胞 菌 (Aeromonas hydrophila) 刺激后的日本鳗鲡主要 免疫组织器官以及体外培养的日本鳗鲡肝脏细胞 TBK1 基因表达变化,并通过绿色荧光亚细胞定位 和双荧光素酶技术对 TBK1 蛋白分子的免疫功能 进行了研究分析,以期为日本鳗鲡抗细菌、病毒

### 1 材料与方法

免疫应答机制的阐明奠定分子基础。

### 1.1 实验材料

实验动物:日本鳗鲡,体重为45~50g,购自 福建福清鳗鱼养殖场,在实验室于25℃,1000 L循环水中饲养1周后备用。

细胞:人体肾脏细胞系 (HEK293 细胞) 培养 在含 10% 胎牛血清的高糖培养液中,于 37 ℃, CO<sub>2</sub> 含量 5% 的培养箱中进行培养;日本鳗鲡肝 脏细胞为实验室所有,于 27 ℃ 培养箱中培养。 本研究获得了集美大学科技伦理委员会 (编号: JMU202203022) 批准,实验过程中操作人员严格 遵守集美大学科技伦理委员会伦理规范,并按照 集美大学科技伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 实验试剂

DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司 (日本), E.Z.N.A.TM Total RNA Kit I I、无内毒素质 粒提取试剂盒购自 Omega 公司 (美国), 胎牛血清 购自 PAN-Biotech 公司 (德国), DMEM 高糖培养 液、胰蛋白胨、Opti-MEM 低血清培养基 (1×) 购 自 Gibco 公司 (美国), qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 购自 Vazyme 公司 (中国), Lipofectamine<sup>™</sup> 3 000 购 自 Invitrogen 公司 (美国), Dual-Glo luciferase assay system 购自 Promega 公司 (美国)。

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

### 1.3 组织采集与在体实验免疫刺激

日本鳗鲡于实验室暂养1周后进行实验,浸 入含有1×10<sup>2</sup> mg/L 丁香酚的水中(中国上海第二 试剂厂)麻醉后,解剖取日本鳗鲡各组织样品,包 括肝脏、脾脏、鳃、肾脏、肠、心脏、皮肤和肌 肉,用于 RNA 提取。

嗜水气单胞菌 (Aeromonas hydrophila) 为本实 验室所有<sup>[26]</sup>,将其接种于胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 中,28°C 振荡培养24h。收集细菌,并于0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS, pH = 7.4)中稀 释至4×10<sup>4</sup> CFU/mL。LPS和 poly I:C (Sigma 公司, 美国)用 PBS 溶解稀释至终浓度分别为4和2 mg/mL。将日本鳗鲡分成4组,实验组分别腹腔 注射250 μL LPS、250 μL poly I:C 和250 μL 4×10<sup>4</sup> CFU/mL 嗜水气单胞菌液,对照组注射250 μL 灭 菌 PBS。于免疫后0、6、12、24、48和72h每组 随机选取4尾的肝脏、脾脏和肾脏3种组织器官, 保存用于后续实验。

### 1.4 细胞培养及免疫刺激

离体实验中,按照实验室已有研究进行日本 鳗鲡肝脏细胞系培养<sup>[27]</sup>。实验组细胞分别用 30  $\mu$ g/mL LPS、50  $\mu$ g/mL poly I:C、30  $\mu$ g/mL CpG-DNA (Sangon Biotech,中国)、30  $\mu$ g/mL 肽聚糖 (PGN, Sigma,美国)或3种不同浓度的嗜水气单 胞菌 (1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>7</sup>和 1×10<sup>8</sup> CFU/mL)处理细胞, 对照组用等剂量灭菌 PBS 处理,每组在不同时相 取4个平行样品。按照说明书,使用 E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II 试剂盒在细胞处理后 0、3、6、 12、24 和 48 h,从细胞中分离提取总 RNA。

### 1.5 AjTBK1 全长 cDNA 的克隆

按照说明书指示,使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen,美国)从日本鳗鲡组织中分离总 RNA。使用 肝脏 RNA,用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (TaKaRa,日本)合成用于 RACE 反应的 cDNA 第 一条链。基于实验室掌握的日本鳗鲡转录组数据 库中的 TBK1 部分序列,使用 Primer premier 5.0 软件进行特异性引物设计 (表 1),进行 PCR 以扩 增 *AjTBK*1 的部分 cDNA 序列。将纯化的 PCR 产 物插入 pMD19-T (Simple)载体 (TaKaRa,日本)并 转化至 DH5α 感受态细胞中。挑取阳性克隆所得 质粒由生工生物工程 (上海)股份有限公司进行 DNA 测序。根据克隆的 *TBK*1 部分基因序列,进 一步设计特异性引物 (表 1),使用 5'和 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (TaKaRa, 日本)进行 RACE PCR 扩增, 扩增产物 经凝胶纯化, 克隆至 pMD19-T (simple)载体, 并 按上述方法测序。

### 1.6 生物信息学分析

BLAST 程序 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast. cgi) 进行序列相似性分析; ORF Finder (http://www. ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) 分析 *Aj*TBK1 的 全 长 cDNA 序列; ExPASy (http://www.us.expasy.org/ tools/) 分析推导的氨基酸序列; CLUSTALW 程序 (http://www.ebi.ac.uk/clustaw/) 进行多序列比对; NCBI CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/ cdd/docs/cdd\_search.html) 预测蛋白质结构域特征; MEGA 5 软件基于 Neighbor-Joining 方法构建系统 发育树。

### 1.7 基于 qRT-PCR 的 AjTBK1 表达分析

使用 PrimeScript<sup>™</sup> RT 试剂盒和 gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara,日本) 从总 RNA 合成 cDNA 第一条链。在该反应中,由试剂盒提供的 gDNA Eraser (具有高效 DNAase 活性)进行基因组 DNA 的去除。

将合成的 cDNA 用无核酸酶水稀释 10 倍, 于-20 ℃储存。使用 Primer premier 5.0 软件设计 *AjTBK*1 与 β-actin (内参基因) 的引物 (表 1),进行 预实验以确保没有引物二聚体的单个离散带的扩 增,并对产物进行测序以验证 RT-PCR 的特异性。 qRT-PCR 反应体系总体积为 20 μL, 包含 10 μL 2×AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix、1 µL 稀 释的 cDNA、正反引物各 0.5 µL (10 µmol/L)和 8 μL 无核酸酶水。于 Roche Light Cycler 480 机器 (Roche, 英国) 上进行扩增, qRT-PCR 条件: 95 °C 孵育1min, 随后进行40个循环(95℃, 15 s, 60°C, 1 min)。在每个 qRT-PCR 反应结束时进行 扩增产物的解离分析,以确认只有一个 PCR 产物 被扩增和检测到。使用标准曲线评估目标基因和 参考基因的相对定量。根据实验室已有研究[27], 使用比较 CT 法 (即 2<sup>-△△Cr</sup>方法)用于确定 AjTBK1 的 mRNA 相对表达水平。基因表达水平通过平均 值和标准误差标识,有3个样品重复。

### 1.8 亚细胞定位

将 AjTBK1 的 ORF 克隆并使用相应引物插入 pEGFP-N1 载体中 (表 1),构建的重组质粒通过测

类别 types	引物名称 primers name	引物序列 sequences
ORF克隆引物 primers for ORF cloning	5'ORF-TBK1	5'-ATGCAGAGCACAGCAAACTACCTGTG-3'
	3'ORF-TBK1	5'-TTGTAAATTATTAATACGGTCAGTATTTCG-3'
RACE PCR特异性引物 specific primers for 3'RACE	TBK1-3'OUT	5'-TCCAGGCGAATGTGCTGTCGT-3'
	TBK1-3'IN	5'-TTGGGTCTTTAACCTTGGATGGTGGC-3'
RACE PCR通用引物 universal primers for RACE	UPM-Long	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
	UPM-Short	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
	NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
	5' CDS primer	5'-(T)25VN-3'
	3' CDS primer	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN-3'
	smart II	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
qRT-PCR引物 specific primers for qRT-PCR	5'real-TBK1	5'-ACGCTATGACCTGGATTTGGA-3'
	3'real-TBK1	5'-GAATGACCTCTGCCTTTTTATGC-3'
	5'-β-actin	5'-ATCGTGCGTGACATCAAGGA-3'
	3'-β-actin	5'-GCTCGTTGCCGATGGTGAT-3'
质粒构建特异性引物 specific primers for recombinant expression plasmid	5'pEGFP-TBK1	5'-CTCGAGATGCAGAGCACAGCAAACTACCTGTG-3'
	3'pEGFP-TBK1	5'-TGGATCCCGTTGTAAATTATTAATACGGTCAGTATTTCG-3'
	5'pCMV-TBK1-His	5'-GGATCCATGCAGAGCACAGCAAACTACCTGTG-3'
	3'pCMV-TBK1-His	5'-CTCGAGTTGTAAATTATTAATACGGTCAGTATTTCG-3'
通用引物	Simple-19-T-F	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
universal primers	Simple-19-T-R	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
	pEGFP-F	5'-TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG-3'
	pEGFP-R	5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'
	pCMV-C-His-F	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
	pCMV-C-His-R	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

#### 表1 用于 AjTBK1 基因克隆和表达分析的引物

### Tab. 1 Primers used for AjTBK1 gene cloning and expression analysis

序确认。将 HEK-293 细胞接种在 6 孔板中,使用 Lipofectamine 3 000 试剂 (Invitrogen,美国)转染纯 化后的质粒。用转染 pEGFP-N1 空载体的细胞作 为对照。转染 12 h 后,细胞用 30 µg/mL LPS 或 50 µg/mL poly I:C 处理,用 PBS 处理的细胞作为 载体对照。处理 24 h 后,用 PBS 洗涤细胞,4% 多聚甲醛固定,并用 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) (1 mg/mL)染色,具体方法参考文献<sup>[28]</sup>所述, 在共聚焦荧光显微镜 (Leica TCS SP8) 下观察细胞。

### 1.9 双荧光素酶活性测定

为了研究 *Aj*TBK1 对 NF-κB、I型 IFN 和 AP-1 启动子活性的调控作用,以 pRL-TK 载体 (表达 海肾荧光素酶)作为转染效率标准化的内参对照, 使用 Dual-Glo 荧光素酶测定系统 (Promega,美 国)进行荧光素酶测定。使用相应的引物将 AjTBK1的 ORF 克隆并插入表达载体 pCMV-C-His 中 (Beyotime Biotechnology 公司)。HEK293 细 胞在48孔板中以每孔1×105个细胞培养,使用 Lipofectamine 3000 试剂,转染 20 ng pRL-TK 内参 质粒、100~300 ng pCMV-TBK1 和 80 ng NF-кBluc 荧光素酶报告质粒 (Genomeditech, 中国) 或 pAP1-luc (Beyotime Biotechnology, 中国) 或 IFN-βluc (Beijing Qualityard Biotechnology, 中国)。用 pCMV-C-His 空载体转染的细胞作为对照。对于 每次转染,每孔 DNA 总量控制在 400 ng,并用空 载体进行平衡。在转染后 6、12 和 24 h 收获细胞 并通过 Promega GloMax<sup>®</sup> 20/20 光度计 (Promega, 美国)测量荧光素酶活性,并计算与对应的海肾荧 光素酶的活性比值得出转染细胞中荧光素酶的相 对活性,进而获得实验组与对照组荧光素酶相对 活性的倍数变化<sup>[29]</sup>。

### 1.10 统计学分析

使用 SPSS 15.0 对所得实验数据进行数据分析,其中仅两组数据间的比较使用成组 *T*-检验分析,多组数据间的比较使用单因素方差分析及 Duncan 多重比较。并用 *P*<0.05 表示存在显著性 差异,*P*<0.01 则表示存在极显著差异。

### 2 结果

### 2.1 AjTBK1 基因全长克隆及序列分析

日本鳗鲡 *Aj*TBK1 (GenBank 登录号: MK 681481)的 cDNA 全长为 3018 bp,其中开放阅读 框 (ORF)为 2 196 bp,5'非编码区 (UTR)为 70 bp, 3'非编码区为 752 bp (图 1)。ORF 编码 731 个氨基 酸 (aa),预测的蛋白质分子量为 83.98 ku,理论等 电点为 6.27。SMART 程序预测 *Aj*TBK1 具有保守 的结构域,包括 N 端的激酶结构域 (KD, 1~308 aa),泛素样结构域 (ULD, 309~387 aa),二聚化 支架结构域 (SDD, 388~657 aa)和 C 端结构域 (CTD, 658~731aa)。

### 2.2 AjTBK1 蛋白的结构分析

氨基酸多重比较图显示,日本鳗鲡 AjTBK1 与斑马鱼、非洲爪蟾 (Xenopus laevis)、绿头鸭 (Anas platyrhynchos)、小鼠、智人 (Homo sapiens) 等其他物种 TBK1 氨基酸序列一样,含有保守的 激酶结构域、泛素样结构域、二聚化支架结构域 以及 C 端结构域。激酶结构域中的 ATP 结合位点 "LGQGATANV"用方框标记,而与 TBK1 自磷酸 化密切相关的丝氨酸残基 Ser172 高度保守。同源 性分析显示, AjTBK1 与其他物种 TBK1 氨基酸序 列一致性高达 66%~87% (图 2)。

采用 SWISS-MODEL 软件 (http://swissmodel. expasy.org/) 进行同源建模,以人 TBK1 蛋白质三 维结构为模板 (PDB 编号: 4imo.1.A) 预测日本鳗 鲡 *Aj*TBK1 蛋白质三级结构。预测所得的 *Aj*TBK1 三维结构由 19 个 α 螺旋和 13 个 β 折叠组成,并 且与人 TBK1 的三维结构高度相似 (图 3)。

### 2.3 系统发育分析

使用 Mega 5.0 中的 Neighbor-Joining 方法构 建了其系统发育树 (图 4)。系统发育树显示,日本 鳗鲡 AjTBK1 与亚洲龙鱼 (Scleropages formosus) 邻 近,并与其他硬骨鱼类 TBK1 聚为一个分支,而 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries 哺乳类、鸟类及两栖类 TBK1 则各聚为一支。

### 2.4 AjTBK1 基因在日本鳗鲡不同组织中的表达

*AjTBK*1 在日本鳗鲡肝脏、肠、腮、脾脏、皮肤、肾脏、心脏和肌肉中均有表达,其中在肝脏中表达量最高,肠、鳃和脾脏中表达量也较高,而心脏和肌肉中的表达量相对较低(图 5)。

# 2.5 免疫刺激对肝脏、肾脏和脾脏中 AjTBK1 基因表达的影响

为了研究 AjTBK1 在抗细菌和抗病毒免疫应 答中的作用,我们通过 qRT-PCR 分别检测了经 LPS, poly I:C 和嗜水气单胞菌刺激日本鳗鲡 0、6、 12、24、48 和 72 h 后,日本鳗鲡肝脏、肾脏和脾 脏中 AjTBK1 基因表达水平。

LPS 刺激后,日本鳗鲡肝脏 *AjTBK*1 基因表 达水平在 6 h 显著上升至峰值 (1.8 倍, *P*<0.01), 而在 24 h 表达量显著降低 (0.71 倍, *P*<0.05);肾 脏 *AjTBK*1 基因表达水平在 48 h (0.61 倍, *P*<0.05) 和 72 h (0.51 倍, *P*<0.05)均显著降低; 脾脏 *AjTBK*1 基因表达水平在 6 h (0.65 倍, *P*<0.01)和 12 h (0.72 倍, *P*<0.01)显著降低 (图 6-a)。

poly I:C 免疫后,日本鳗鲡肝脏 *AjTBK*1 基因 表达水平在 6 h 显著升高并达到峰值 (1.8 倍, *P*<0.01);肾脏 *AjTBK*1 基因表达水平在 48 h (0.56 倍,*P*<0.01)和 72 h (0.62 倍,*P*<0.05)显著降低; 脾脏 *AjTBK*1 基因表达水平在 24 h (1.4 倍,*P*< 0.01)显著提高,在 6 h (0.82 倍,*P*<0.05)和 72 h (0.81 倍,*P*<0.05)显著降低 (图 6-b)。

嗜水气单胞菌感染后,日本鳗鲡肝脏 AjTBK1 基因表达水平在48h(1.9倍,P<0.01)和 到72h(1.6倍P<0.01)显著上升;肾脏AjTBK1基 因表达水平在12h(1.9倍,P<0.05)和24h(1.6倍, P<0.01)表达量显著上调;脾脏AjTBK1基因表达 水平在24h(1.2倍,P<0.05)出现显著上升,但 在6h(0.87倍,P<0.01)和72h(0.66倍,P<0.01) 显著降低(图 6-c)。

### 2.6 不同 PAMPs 及嗜水气单胞菌对日本鳗鲡 肝脏细胞 AjTBK1 基因表达的影响

为进一步研究离体状态下不同病原体相关分子模式 (PAMPs) 及鱼类病原菌对 TBK1 基因表达的影响,我们用LPS、poly I:C、CpG-DNA、PGN 以及不同浓度的嗜水气单胞菌刺激日本鳗鲡肝脏细胞系,在0、3、6、12 h、24 和 48 h 通过 qRT-

1		00
1	TGCTCTGTGGATATCAACTCAAGACAAGGGAAGGAATTTGCCAATTTGAGA GGTGGTTTTGAGACAGTC <u>atg</u> cagagca	80
1	M Q S T	4
81	cag caa a ctacctg tgg cttatct cag a tcttctgg ga cag gg ag caa cag c a a a tg tg tt ccg tgg aa ga ca caa ga a a tg tg tt ccg tgg aa ga ca caa ga a a tg tg tt ccg tgg aa ga ca caa ga a a tg tg tt ccg tgg aa ga ca caa ga a a tg tg tt ccg tgg aa ga ca caa ga a a tg tg tt ccg tgg aa ga ca caa ga a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a tg tg tt ccg tgg aa ga caa a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a a a a a a a a tg tg tt ccg tgg aa a a a a a a a a a a a a a a a a	160
5	A N Y L W L I S D L L G Q G A T A N V F R G R H K K	30
161	a caggtgacttatatgctgtgaaggtgttcaacaacctgagtttcctgcgcccccctagatgttcagatgagggaatttga	240
31	T C D I V A V K V F N N I S F I R P I D V O M R F F F	57
2/1		320
50	ggteetgaagaaactgaaccaaagaaaategteaagetgttgeegtagag gaggagacaaaacacaaggacacaaggtge	94
201	V L K K L N H K N I V K L F A V E E E I N I K H K V L	400
321	tggtgatggagtactgcccatgtggcagtttgtacacagtgctggaagagt cttcaaatgcttatgggcttcctgaggat	400
85	V M E Y C P C G S L Y T V L E E S S N A Y G L P E D	110
401	$gagttteteattgtgetacaggacgtagttgetggeatgaaccacctgegag\ agtatggeattgtteategtgacataaa$	480
111	EFLIVLQDVVAGMNHLREYGIVHRDIK	137
481	gccagggaacatcatgcgtgtgattggcgaggacggcggtctgtgtacaag ctgactgattttggtgctgcccgcgagc	560
138	P G N I M R V I G E D G R S V Y K L T D F G A A R E L	164
561	tggaggacgacgagcaatttgtttccctctatggaacagaggagtacctgca cccagacatgtacgagegggctgtcctc	640
165	F D D F Q F V S I V G T F F V I H P D M V F R A V I	190
6/1		720
101	b v b u o v v v c A t v b i w c t c v t c v t c v A t c	217
721	R R D H W R R I G A I V D L W S I G V I F I H A A I G	21/
210	cagcetacettlecgaceettlgaaggececegtegaaacaaagaagteatg tacaaaataatcacagagaageettegg	244
210	S L P F K P F E G P K K N K E V M Y K I I I E K P S G	244
801	gagccatttctggagtacagaagtttgagaac ggcaagattgagtggagtaccgacttgcccatctcctgcagcctttcc	880
243	A I S G V Q K F E N G K I E W S T D L P I S C S L S	2/0
881	$a agggcttg cag agt ctg ctg tccc cag tg ctag ccaa catt ttag agg ccg \ accag gag ag tg ctg gg gc tt cg accag agg ctg gg gc tt cg accag agg agg ag tg ctg gg gc tt cg accag agg agg agg agg agg agg agg ag$	960
271	K G L Q S L L S P V L A N I L E A D Q E K C W G F D Q	297
961	gttetttgcagaaaccagtgacatactgcatcgtatggtggtgtgtgt	1 040
298	F F A E T S D I L H R M V V Y V F S L Q Q A T L H H V	324
1 0 4 1	tctatatccaccaatacaatacggtaacgctgttccaggagctgctattccg ttggaccaacattgcaccaaccag	1 1 2 0
325	Y I H Q Y N T V T L F Q E L L F R W T N I A P P N Q	350
1 121	gagetgetgetgtttgaggggcgccggetggtgttggacccaaatcagcaggcac agagettcccccatacttctcaagataa	1 200
351	F L L F F G R R L V L D P N Q Q A Q S F P H T S Q D N	377
1 201	concatestartagteageeggagetegtgggeacegttggcettetettt gaggaceeaa geetteeaaggtgeage	1 280
378	<b>PIWIVS REFIVE TVE TVE TIFE DPS PKVOP</b>	404
1 281		1 360
405	P V D I D I D A S V A K T E A C D V C U I W K T S O	1300
1 261		1 440
1 301	teactgetgaettatgaagagetggteagaaaggggateegtggeeteattg agettatgaaagaggaetaeaatgagae	1 440
431	<u>SLLLIYEELVKKGVKGLIELMKEDYNEI</u>	457
1 441	agtgcataaaaaggcagaggtcattcaactgagttccaactgcagtcagact gtggagaagatggagcagctgtgtgatg	1 320
438	V H K K A E V I H M S S N C I Q I V E K M E Q L C D V	1 600
1 321	ttttgatccaggcgaatgtgctgtcgtcgtcggaattcaacgaaatctctgagat gcggaaaaaaagttgtcagattgtccagt	510
485	L I Q A N V L S S E F N E I S E M R K K V V R L S S	510
1 601	tctctggggccagttgaacagacgctgcaggatattaagaacaaattcctgt caggggggctgctgaccgatacatggac	1 080
511	<u>S L G P V E Q T L Q D I K N K F L S G G L L T D T W T</u>	33/
1 681	a cag caagt gg g caaccaccct g a ag accgg a at gt t g a g a a a at caa ag t g ct g c	1 760
538	Q Q V G N H P E D R N V E K I K V L L D A I T T I Y Q	564
1 761	aa cagtt caa aa agga caa aa ctg aa cg acg cctg cct	1 840
565	_ Q F K K D K T E R R L P Y N E E Q I H K F D K Q K L	590
1 841	$gtactccacgccacaaaaagctcgcaccctgttcacagacgagtgcggcatga\ agcaccgcctcttcatttctaaaactga$	1 920
591	<u>V L H A T K A R T L F T D E C G M K H R L F I S K T E</u>	617
1 921	agagtggatgagaaaaagcacatcatgtcagaaaacagctcctcaacttaacc aaccagttaattaacattgaacaggaag	2 0 0 0
618	E W M R K A H H V R K Q L L N L T N Q L I N I E Q E V	644
2 001	tgaccacaccccctccaacatgtttgcaagtttcaggaacagctgccacagaa gatcattccagtggtgtccggcacaatc	2 0 8 0
645	T T P L Q H V C K F Q E Q L P Q K I I P V V S G T I	670
2 081	aagccccaggcctacctcagtcagaacactcttgtagaaatgactctgggga tgaaaaaactgaaggaagagagggg	2 1 6 0
671	K P Q A Y L S Q N T L V E M T L G M K K L K E E M E G	697
2 161	ggtggtgaaggaactggcagagaataaccatttectggagagatttgggtetttaacettggatggtggaggagtgaaggaactggcagagaataaccatttectggagagagatttgggtetttaacettggatggtggtggatgag	2 2 4 0
698	V V K F I A F N N H F I F R F G S I T I D G G I R N T	724
2 241		2 320
725	h D I N N I O *	731
2 321	<b>DK I N N D W T</b>	2 400
$\frac{5}{2} \frac{521}{101}$	CITCA AUTOCIDADA A ACTOUTOCIDA CONTROLA A ALA CICLATO LA ALA AUTOCIDADA ALA ALA AUTOCIDADA ACA	2 480
2 701	Ο ΠΟΛΤΗΤΗ ΟΤΑΛΤΗ ΤΟ ΠΑΛΟΤΗΤΗ ΤΗ ΠΑΙΟΤΗΤΗ ΤΗ ΠΑΛΑΛΤΑΙΘΑ CATA ANA AT A USA CATA ANA AT TO CHI I GAA I GA CATA ANA CATA ANA ANA	2 560
2 401	CALIFICITIES A CONTRACT A CONTRACT OF A CONT	2 500
2 301	GAGTET TGAGATGTA A IGGACTTAAAGGGGGATTICACATTIGCATCTGTGTAAACACTATCTGCCGCAGTATAAATGACTGT	2 040
2041	AA II AI AA II ACIG ITAAAI AATGA IGI GICCAITTI CATA IGGATCIGTCATT CATTTATTITITTI GTCTTCCTTTIGTGG	2 /20
2 /21	GTTTLCCTTTTTACTTGATAATTTTGCAAGAGCTTAATGGTCTCAAAATATGACCTGTATATGTGCACCATTTTCCTGTC	2 800
2 801	ATAATTTGTATTTTAATTATCAGTAACATTCCTCACTGTAATTTAATACTTTCCTCTCCCTTTTATTTA	2 880
2 881	TATATACCAGTGGTGAATTCACTGCCCCAACTCCAAAGAAGATTAAGAAAGTCTAACAATGAATG	2 690
1 461		

### 图 1 日本鳗鲡 AjTBK1 cDNA 及推导的氨基酸序列图

大写字母分别代表 5'和 3'非编码区序列,小写字母代表编码区序列;上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;起始密码子 (atg)以加粗及单下划线标示,终止密码子 (tga)以加粗标示,多腺苷酸化信号 (ATTAAA)以双下划线标示;激酶结构域 (KD) 灰色标示, 泛素样结构域 (ULD)为加粗斜体标示,二聚化支架结构域 (SDD)用单线标示,C端结构域 (CTD)用方框标示。

#### Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of AjTBK1 gene from A. japonica

Capital letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region separately. Lowercase letters represent the coding sequence, with nucleotide sequence above and coded amino sequence below. The start codon (ATG) was underlined in bold, and the stop codon (TAA) was marked with an asterisk in bold. The polyadenylation signal (ATTAAA) is double-underlined. The kinase domain (KD) was shaded in grey. The ubiquitin-like domain (ULD) was italic in bold. The scaffold dimerization domain (SDD) was underlined. The C-terminal domain (CTD) was boxed. PCR 检测 *AjTBK*1 基因表达水平变化。 日本鳗鲡肝脏细胞系经 LPS 刺激后, *AjTBK*1 基因表达水平在6h表达显著下降(0.55倍, P<0.05),在12h(15.3倍,P<0.01)和48h(1.9倍,P<0.05)显著升高;poly I:C处理后,AjTBK1基因表达量在12h(5.8倍,P<0.05)显著提高;PGN</li>

		60
口 华 曖 뽸 A. Japonica	MgSTANTLYLISDLLOGGATANYP ASAAAATGDLYAYNYP NNLSP LKP LDYGMREP EVLA	60
立 う 些 D. rerio	MQSTANYLWMMSDILLGQGATANYYRGRHKKTGDLYAVKYPNNLSPLRPLDVQMREFEVLK	00
云四法暫加G. morhua	MQSTTNYLWLISDLLGQGATANVYRGRHKKTGDLYAVKVFNNLSFLRPLDVQMREFEVLK	60
斑点义尾蛔 Ictalurus punctatus	MQSTANYLWLISDLLGQGATANVYRGRHKKTGDLYAVKVFNNLSFLRPLDVQMREFEVLK	60
<u> </u>	MQSTANYLWLISDLLGQGATANVYRGRHKKTGDLYAVKVFNNLSFLRPLDVQMREFEVLK	60
斜带右斑鱼 E.coioides	MQSTTNYLWLISDLLGQGATANYYRGRHKKTGDLYAVKVFNNLSFLRPLDVQMREFEVLK	60
非洲爪蟾 X. laevis	MQSTANYLWMLSDILGQGATANYYRGRNKKTGDLYAVKVFNSLSFQRPADVQMREFEVLK	60
绿头鸭 A. platvrhvnchos	MQSTSNYLWLLSDILGQGATANVFR3RHKKTGDLYAVKVFNSISFLRPVDVQMREFEVLK	60
小鼠 M. musculus	MOSTSNHLWLLSDTLGQGATANVFRGRHKKTGDLVAVKVFNNTSFLRPVDV0MREFEVLK	60
智人 H saniens	MOSTSNHIWLISDT GOGATANVERGRHEKTGDI FATEVENNTSFLEPVDVOMBEFEVIK	60
E) C II. suprens	ARAR A A A A A A A A A A A A A A A A A	00
	谢福结构插(Kingga domain)	
	一	120
口 尘 曖 뽸 A. Japonica	KLNAKNIVKLFAVEEEINIKAKVLVMEICPCGSLIIVLEESSNAIGLFEDEFLIVLQUVV	120
斑与巴 D. rerlo	KLNHKNIVKLFAVEEESNTRHKVLVMEICPCGSLITVLEEPTNAIGLPEDEFLIVLQUVV	120
入四注鳕。G. morhua	KLNHKNIVKLFAVEEETNTRHKVLVMEYCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFLIVLQDVV	120
斑点义尾蛔 Ictalurus punctatus	KLNHKNIVKLFAVEEESNTRHKVLVMEYCPYGSLYTVLEEPSNAYGLPEDEFLIVLQDVV	120
虹鳟_Oncorhynchus mykiss	KLNHKNIVKLFAVEEESNTRHKVLVMEYCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFLIVLQDVV	120
斜带石斑鱼 E.coioides	KLNHKNIVKLFAVEEESNTRHKVLVMEYCPCGSLYTVLEESSNAYGLPEDEFLIVLHDVV	120
非洲爪蟾 X. laevis	KLNHKNIVKLFAIEEEMSSRHKVLVMEFCPCASLYSVLEEPTNSYGLPESEFLIVSRDVV	120
绿头鸭 A platyrhynchos	KI NHKNTVKI FATFEFTTSRHKVI VMFFCPCGSI VTVI FFPSNAFGI PESEFI IVI RDVV	120
小鼠 M musculus	KI NMKNTIKI BATERETTTEMUM IMERCECCI VIN REPSNAVCI PESERI IN BUN	120
知人 H agniana	IN NUMBER OF A TREPTT DURING THE COORDER OF A DECEMBER OF THE DIAL	120
百八 H. supiens	ALMANI VALE ALEELI I I MARVILMETCI COSLI I VILEI SMATOLI ESEPLI VILADOV	120
	***************************************	
		100
日	AGMNHLKEYGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGRSVYKLTDFGAARELEDDEQFVSLYGTEEYL	180
斑马鱼 D. rerio	AGMNHLREYGIVHRDIKPGNIMRVIGDDGFSVYKLTDFGAARELEDDEQFVSLYGTEEYL	180
大西洋鳕 G. morhua	AGMINHLREYGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGHSVYKLTDFGAARELEDDEQFVSLYGTEEYL	180
斑点叉尾鲷 Ictalurus munctatus	AGMINHLREYGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGRSVYKLTDFGAARELEDDEQFVSLYGTEEYL	180
虹鳟 Oncorhynchus mykiss	AGMNHLREYGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGRSVYKLTDFGAARELDDDEOFVELYGTERVI.	180
斜带石斑角 F coioides	AGMNHLREYGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGRSVVKI TDEGAAREI EDDEGEVELVGTERVI	180
がIII/IIがL型 E.COIOIUES 北湖爪鹼 V Ia	ACMONI RENGTI WEDTROCHTINET COLORIAN TO BOARD TO THE AND THE A	180
ードの川川、端語 A. Idevis	YORDU DENCITIADIA ONIMETOEDOADYIALDU ADRALEDDERY SIIVIEETL	190
塚 当 鸭 「A. platyrhynchos	AGAMALKENGI VARDI KEGALMAVI GEDGQSVI KLI DEGARKELEDDEQFV3LIGI EEIL	100
小鼠 M. musculus	GGMNHLRENGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGQSVYKLTDFGAARELEDDEQFVSLYGTEEYL	180
智人 H. sapiens	GGMNHLRENGIVHRDIKPGNIMRVIGEDGQSVYKLTDFGAARELEDDEQFV <u>S</u> LYGTEEYL	180
*	*******	
日本鳗鲡 A. japonica	HPDMYERAVLRKDHQKKYGATVDL#SIGVTFYHAATGSLPFRPFEGPRRNKEVMYKIITE	240
斑马鱼 D. rerio	HPDMYERAVLRKDHQKKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGPRRNKEVMYKIITE	240
大西洋鳕 G morhua	HPDMYERAVLRKDHQKKYGATVDLWSIGVTFFHAATGSLPFRPFEGPRRNKEVMYKIITE	240
預占叉尾鮰 Ictalurus nunctatus	NPDWYFRAVI RKDHOKKYGATVDI WSTGYTFYHAATGSI PFRPFFGPRRNKFVMVKTTTF	240
虹髓 Oncorbunchus mukiss	WEIMWERANT REFNOREVCATION WEICHTRENAATGEL PREPRECERENKRIMVEITTE	240
刘带工斑舟 E soloidag	In District And Digital Control and Comparison and the particular for the particular of the particular	240
析用但 <u>如<u> </u></u>		240
手/们八 <sup>%</sup> ////////////////////////////////////	HPDMYERAVLRREHQRRYSATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGPRRNREVMYRIIAG	240
绿头鸭_A. platyrhynchos	HPDMYERAVLRKEHQKKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGPRRNKEVMYKIITG	240
小鼠 M. musculus	HPDMYERAVLRKDHQKKYGATVDLWSVGVTFYHAATGSLPFRPFEGPRRNKEVMYKIITG	240
智人 H. sapiens	HPDMYERAVLRKDHQKKYGATVDLWSIGVTFYHAATGSLPFRPFEGPRRNKEVMYKIITG	240
1	xalakalakalakalakalak i xakalakai xakalakalak i xakalak i xakalakalakalakalakalakalakalakalakalaka	
日本鳗鲡 A. japonica	KPSGAISGVQKFENGKIEWSTDLPISCSLSKGLQSLLSPVLANILEADQEKCWGFDQFFA	300
斑马鱼 D. rerio	KPPGAISGHQKFENGKIEWSSEMPISCSLSKGLQSLLTPVLANILEADQEKCWGFDQFFA	300
大西洋鳕 G morhua	KPSGTISG00KFENGNIEWSTEMPVSCSLAKGLOSLLTPVLANTLEAD0EKCWGFD0FFA	300
按占叉尾鮰 Ictalurus nunctatus	KPSGTISGARKFENGKTEWSTEMPVSCSLSKGLASLLTPVLANTLEADREKCWGFDRFFA	300
虹髓 Oncorbunchus multiss	KPSGTVSGOOKRENGKTEWSTEMPVSCNI SKGLOSLI TPVI ANTI RADORKEWGEDORRA	300
到带石斑角 F coioidas	KPSGTTSGHOKERNGKTRWSTRMPVSCSI SKGI OSI I TPVT ANTI RADORIZCIRODORIA	300
市山石地里 E.Coloues 非洲爪鹼 V Icania	KECATCCHORAENCETENCCELEATCHICHCICATETUT ANTI EADORRCHCEGOREA	300
一日初日11時 A. tdevis 得到的 A plat-mb	AT SOME SOME MORE THE SOLL FAT UNLONGED THE TATE AND ANTER ADDRESS OF THE ADDRESS	300
w大門 A. platyrhynchos	NFSGALSGLUKAENGFLEWSWEMFVSUSLSKGLUVLLTFVLANILEADUEKCWGFDQFFA	200
小鼠 M. musculus	KYSGALSGVQKAENGPIDWSGDMPLSCSLSQGLQALLTPVLANILEADQEKCWGFDQFFA	300
習人 H. sapiens	KPSGALSGVQKAENGPIDWSGDMPVSCSLSRGLQVLLTPVLANILEADQEKCWGFDQFFA	300
	** *::*** *: **** *:** ::* :* *: *** *::******	
	▶I◀	
	<u>Έντα ΤΙ ΜΕΙΠΛΙΙΝΤΑΙ Ι ΤΟ ΑΤΙ ΜΑΛΙΙΝΟΙΙ ΜΟΙ ΤΙ Ο Ο ΕΙ Ι ΕΘΜΟΝΤΑ ΕΘΝΟΣΙ Ι Έ</u> να το Ι	260
<u>日</u>	EISDILINMYYYYY FOLQQAILINYY INQYNY YY FORY TORAT NIAFFNQELLFEGKKLY	300
斑马鱼 D. rerio	FISDITUREAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	360
大西洋鳕 G. morhua	KTSDILHKTVVYVFSLQQAVLHHVYIHEYNTATLFQELLSRRTSIPPHNQELLYEGRRLV	360
斑点叉尾鮰 Ictalurus munctatus	ETSDILHRMVVYVFSLQQATLHHVYIHMYNTATLFQDLLFRRTNISPPNQELLYEGRHLT	360
虹鳟 Oncorhynchus mykiss	ETSDILHRTVVLVFSLQQATLHYIYIHQYNTATLFQELLSRRCSIPVHNQELLYEGRRLQ	360
斜带石斑角 Ecoloides	ETNDILHRTVVYVFSLQQATLHHVYIHEYNTAALFQELLSRRASIPLHNQELLYEGRCLV	360
非洲爪幡 X lanus	VTNDIFNRIVVHVFSLQQMTPHKIYINTYDKVPDFHDLVYKQTKIPGQNQELLFEGRRLV	360
示何用いって A. ulevis 会引版 A platimburshas	ETSDILHRIIIHIFSLOLMTLHKVYIHSYNTAAIPHELVYKOTKIPSONOFI TYFGRRI T	360
ふ大門 A. pluiyrnynchos 小鼠 M museubus	ETSDVLHEMVIHVFSLAHMTAHKIYIHSYNTAAVENEL VYKATKIVSSNAELIVEGERLV	360
AT L II		200
省入 H. sapiens	ETSDILHEMVIHVFSLQQMTAHKIYIHSYNTATIFHELVYKQTKIISSNQELIYEGRRLV	360
	*.*:::*:::*****	200
日木鰛鲡 <i>A japonica</i>	LDPNQQAQSEPHTSQDNPIMLVSRKLVGTVGLLERDPSPPKVQPRVDLDLDASVAKTEAG	420
南小云 m n. juponicu 南山岳 D rovia	I DENROADTEEKTSEDNETMI I CEDEVNTVALI EREDESERVORDADI DI DASHARTEAA	420
MJ巴 D. rerio 十西洋梅 C I	T DENETATOR DETERMENT LIGHTARIA Y OF LAPENFOR TRANSPORTED DE LIGHTAN ANTERNA.	420
会世法曹 <sub>编</sub> G. mornua	LDI MATARDEF AT I RUMFIMLYDREDYAT YGLIFEDFSFFKYQPKTDLDLDASTAKTFAG	420
姓显义伟则 Ictalurus punctatus	LUSINGAQTFFRTSKUNPIMLISKELVNTVGLIFEDPSPPKVQPRVDLDLDASYAKTFAG	420
虹	LEFNKQAQTFFRTSRDNFIMLLSRESVATVGLIFEDPSPFKVQPRYDLDLDASYAKTFAG	420
斜带石斑鱼 E.coioides	LDPNRQAKTFPKTSRDNPIMLVSRESVATVGLIFEDPSPPKVQPRYDLDLDASYAKTFAG	420
非洲爪蟾 X. laevis	LEQGRLAQHFPITTDENPIFVLTREMVSVIGLRFDEIVIPKPISHYDLDVDANMAKAVTG	420
绿头鸭 A. platvrhvnchos	LEPGRLAQHFPRTTEENPIFVVSREPVNIVGLIYEEVLLPKVHQRYDLDGDASMARSVTG	420
小鼠 M. musculus	LELGRLAGHFPETTEENPIFYTSREQLNTVGLRYEETSLPETHPRYDLDGDASMAKAVTG	420
知人 H saniars	LEPGRIAGHEPKTTERNPTEVVSREPINTIGI TVEKTSI PKVHPRVDI DGDASMAKATTC	420
百八 II. suprens	* · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	420
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

(图 2 Fig. 2)

https://www.china-fishery.cn

日本鳗鲡 A. japonica 斑马鱼 D. rerio 大西洋鳕 G. morhua 斑鲸 Oncorhynchus mykiss 斜带石斑鱼 E. coioides 非洲爪蟾 A. laevis 经头跑 A. platvibuschos DVGHLWKTSQSLLTYEELVRKGVRGLIELMKEDYNETVHKKAEVIHMSSNCTQTVEKMEQ DVGVLWKTSDSLLLYQELVRKGVRGLNELIRDEYSETMHKKTEVFHLCSHCSQTLERSEQ  $480 \\ 480$  $480 \\ 480 \\ 480 \\ 480 \\ 480$ DVGHLWKTSESLLVYQELVRKGVRGLIELMKEDYSEIVRKKSEVIHLCNYCSQILERTEQ DVGHLWKTSESLLVYQELVRKGVRGLIELMKEDFKEAAHKKAEVFHMCNHCSQTLEKTEQ DVGHLWKTSDSLLVCQELVRKGVRGLIELMKEDYSEMVHKKSEVIHVCHYCSQILERTEQ DVGHLWKTSESLLVVQELVRKGVRGLIELMKEDYSEIQHKKSEVFHLCNVCTQILEKTEQ VACYYCRI AASLLIVIDIMRKGIRWISEIMKEEYNENVHRNTEVSIKINFCNRTTEKDIK 480 绿头鸭 A. platyrhynchos 小鼠 M. musculus 480 480 480 480 IVCYACRVASSLLLYQELMRKGIRWLIEIIKDDYNELVHKKTEVVIRLDFCSRNIEKAEK VVCVACRTASTILLVØBIMRKGVRWLVBLVKDDVNRTVHKKTEVVTTLDFCTRNTRKTVK 智人 H. sapiens VVCYACRIASTLLLYQELMRKGIRWLIELIKDDYNETVHKKTEVVITLDFCIRNIEKTVK : : :\*\* :\*:\*\*\*:\* \* \*:::: ::::\*\* 1 1 - AS \* : 日本鳗鲡 A. japonica 斑马鱼 D. rerio 大西洋鳕 G. morhua 斑点叉尾鲫 Jctalurus LCDVLIQANVLS-SEFNEISEMERKKVVRLSSSLGPVEQTLQDIKNKFLSGGLLTDTWTQ LCEALMQGNILS-AEYDEIRDTRKKVLRLSGSLASMDQTLQDINSMFLPGGSLTDTWTQ 538 538 540 NEPVINNQTSVSELSDMHDELSDMHKKVLRISSSLDPMERTMQDTKSKFQAGGLLTDAWAQ LCGALMQGNMLS—ADYDEITDLHKKVMRLSNSLGSMDQTMQDLKNKFLPGGMMTDTWTQ 人西洋理 現点又尾鲷 Ictalurus punctatus 虹鳟 Oncorhynchus mykiss 斜带石斑鱼 E.coioides 非洲爪蟾 X. laevis 绿头鸭 A. platyrhynchos 小鼠 M. musculus 538 539 538 534 LVEVLMQANMLSS-SEVDEISDMRKKIVLISNSLVPMEQTVQDIKSKPLSGGVLTDSWTQ LFEVLMQANM-MSSEVDEISDMUKKLLRISSSLEPIERTTQDIKSKFIPGGLLTDWVTQ IVEQLMETSVES-------EVVALNAKLINLSSTQEGLKSSLQEVKNKLTPGGTLMDSWIN IVENLMQINLES---SEVDEISEINTKLLRLSSSQGTIETSLQDIKNKLSPGGLLADTWAN VVEKLMKVNLEA----AELGETSDIHTKLLRLSSSQGTIESSLQDISSRLSPGGLLADTWAH 538 538 538 智人 H. sapiens VYEKLMKINLEA-ABLGEISDIHTKLLRLSSSQGTIETSLQDIDSRLSPGGSLADAWAH ···· \*: \*:: :\*.. 三聚化支架结构域(Scaffold dimerization domain) skok \* \* 日本鳗鲡 A. japonica 斑马鱼 D. rerio 大西洋鳕 G. morhua 斑点叉尾鲷 Ictalurus punctatus 598 QVGNHPEDRNVEKIKVILDAITTI YQQPKKDKTERRLPYNEEQIHKFDKQKLVLHATKAR QVGTHPEDRNVEKIKVILDAIGAI YQQPKKDKAERRLPYNEEQIHKFDKQKLVLHATKAR 598 600 OVGTHPEDRNVEKTKVLLDATTATYOOFKKDKAERRLPYNEEOTHKFDKOKLVLHATKAR 大四決理 斑点又尾鲫 Ictalurus punct 虹鬡 Oncorhynchus mykiss 斜带石斑鱼 E.coioides 非洲爪蟾 X. laevis 绿头鸭 A. platyrhynchos 小鼠 M. musculus レッカのniens 598 598 598 QVGTHPEDRNVEKIKVLLDAITAIYQQFKKDKAERRLPYNEEQIHKFDKQKLVYHATKAR -AGTHPEDRNVERIKVLLDSITAIYHOFKKDKAERRLPYNEEOIHKFDKOKLVFHATKAR QVGTHYEDRNVEKIKVLIDAITAIYQQPKKDKAERRLPYNEEQIHKFDKQKLVLHASKAR TEGIHAADRNVEKLQVLISLITEIYCQPKKDKAQRRLSYNEEQIHKFDKQKLCLHAAKAY 594 598 QEGMHPRDRNPERLQALLCSITDIYYQFKKDKAERRLPYNEEQIHKFDKQKLVLHATKAI QEGTHPRDRNVEKLQVLLNCITEIYYQFKKDKAERRLAYNEEQIHKFDKQKLVYHATKAM 598 598 日本鳗鲡 A. japonica 斑马鱼 D. rerio 大西洋鳕 G. morhua 斑点叉尾鲫 Ictalurus punctatus TLFTDECGMKHRLFISKTEEWMRKAHHVRKQLLNLTNQLINIEQEVTTPLQHVCKFQEQL 658 658 660 658 658 658 658 658 658 658 658 ALETTEC AMEVRLETSKSERWMEKENHVRENT I SUTGOESSLEDEVTLIMORLVELEOF SLFTEECAMKYRLFISKSEEWMRKVHHVRKQLLTLSSQLNSIEKDVSMLMEQVIKLQELL 筑点叉尾鮰 Ictalurus punc. 虹鳟 Oncorhynchus mykiss 斜带石斑鱼 E.coioides TLFTDECAMKYRLFISKSEEWMRKVHHVRKQLLSLNNQFLNMEQEVTVIMQRVYKIQEQL SLFTEECAMKYRLFISKSEEWMRKVHYVRKQLIGLISQFNSVEKEVSMVMERVIKLQEQL SLFTEECAMKYRLFISKSEEWMRKVHYVRKQLISLSGQLISIEKEVIMLMERAIKLQEQL 斜带石斑鱼 E.coioides 非洲爪蟾 X. laevis 绿头鸭 A. platyrhynchos 小鼠 M. musculus SLFKDECVGKYEVFRSKTLEWMRKMIHVRKQLFSIKSKCFDIEEEASKCQHYINQYQEKM ALFKEECVSKYEVFLDKSEDWTRKMLHVRKQLLALTNQCFDIEEEVSKYQDYINELQDAL SHFSEECVRKYEAFKDKSEEWMRKMLHLRKQLLSLTNQCFDIEEEVSKYQDYTNELQETL THFTDECVKKYEAFLNKSEEWIRKMLHLRKQLLSLTNQCFDIEEEVSKYQEYTNELQETL 智人 H. sapiens \*:. \* \*:::\*:\* \*:\*::::::C端结构域 (C-terminal domain) 日本鳗鲡 A. japonica 斑马鱼 D. rerio 大西洋鳕 G. morhua 斑点叉尾鲷 Ictalurus punctatus POKIIPVVS-GT-IKPOAYLSONTLVEMTLGMKKLKEEMEGVVKELAENNHFLERFGSLT 716 718 718 716 717 716 717 716 714 718 PQRVVPMAS-GV-LKPQAYLSPSTLVEMTLGMCKLKEEMEGVVKELAENNLFLERFGSLT PQKVRPLPSGG-LKPQAYLSQNTLVEMTLGMCKLKEEMEGVVKELAENNHFLERFGTLT PQKIMPITSSG—IKPQAYLSQSTLVEMTAGMKKLKEEMEGVVKELAENNLFLERFGTLT PGKVLPLASSGM—VKPQAYLSQSTLVEMTLGMKKLKEEMEGVVKELAENNHFLERFGSLT POKIMPITSSG-斑点叉尾鲫 Ictaturus punc. 虹鳟 Oncorhynchus mykiss 斜带石斑鱼 E.coioides 非洲爪蟾 X. laevis PORVLPLVSSG-MRFQAVLSQNTLVENTLGAUKKLKEEMEGVVKELEENNHFLERFGTLT SPRMFAAPSGMKSAVNPIVSSPNTLVENTLGAUKKLKEEMEGVVKELEENNHLLERFGALT PQRMFAASSGRUCHTMNTVVPSSNTLVENTLGAUKKLKEEMEGVVKELAENNHLLERFGALT 料用石焼 Z. laevis 非洲爪蟾 A. platyrhynchos 小鼠 M. musculus 718 718 POKMI AASGGVKHAMAPTVPSSNTI VEMTI GMKKI KEEMEGVVKEI AENNHTI EREGSI T PQKMFTASSGIKHTMTPIYPSSNTLVEMTLGMKKLKEEMEGVVKELAENNHILERFGSLT 智人 H. sapiens \* \* \* . \*\*\*\*\* \*\* picalcalcale : oloid side ·致性/% identity 731 727 729 727 728 本鳗鲡 A. japonica 马鱼 D. rerio 西洋鳕 G. morhua 点叉尾鲷 Ictalurus LIGGUENTIDETNNI O 日斑 84 85 87 85 VDGGMRTVERM-LDGSLRNVDRI-大斑 DGGLRNVDRI Ictalurus punctatus 虹鳟 Oncorhynchus mykiss LDGGMRSVDRI 社会 GRA E. Colorides 非洲爪蟾 X. laevis 绿头鸭 A. platyrhynchos 小鼠 M. musculus 723 725 729 729 86 LDGGLRG IDGDFRNVDCI 66 72 72 72 TDGGLRNVDCI MDGGLRNVDCL 智人 H. sapiens MDGGLRNVDCL

### 图 2 日本鳗鲡 AjTBK1 与其他物种 TBK1 氨基酸序列的多重比对图

日本鳗鲡 (MK681481), 斑马鱼 (NP\_001038213.2), 大西洋鳕 (ADL60136.1), 斑点叉尾鲷(XP\_017349490.1), 虹鳟 (XP\_021448563.1), 斜带 石斑鱼 (ATI15615.1), 非洲爪蟾 (NP\_001086516.1), 绿头鸭 (XP\_005029507.1), 小鼠 (NP\_062760.3), 智人 (NP\_037386.1); 激酶结构域中的 ATP 结合位点"LGQGATANV"用方框标记,与 TBK1 自磷酸化密切相关的丝氨酸残基 Ser172 用灰色标示; "-"表示空位经手工优化, "\*"表 示相同的氨基酸残基, ":或."表示相似的氨基酸残基;各结构域所在区域用箭头标出。

### Fig. 2 Multiple alignment of the TBK1 amino acid sequence between A. japonica and other species

Multiple alignment of the amino acid sequences of TBK1 from *A. japonica* (MK681481), *D. rerio* (NP\_001038213.2), *G. morhua* (ADL60136.1), *Ictalurus punctatus* (XP\_017349490.1), *Oncorhynchus mykiss* (XP\_021448563.1), *E. coioides* (ATI15615.1), *X. laevis* (NP\_001086516.1), *A. platy-rhynchos* (XP\_005029507.1), *M. musculus* (NP\_062760.3), *H. sapiens* (NP\_037386.1). The ATP binding site "LGQGATANV" in the kinase domain is marked with a box, and the serine residue Ser172, which is closely related to TBK1 autophosphorylation are marked in grey. Gap positions were manually optimized and are indicated by hyphens. Identical (\*) and similar (: or .) residues were identified by the ClustalW program; different protein domains were indicated by arrows. Different protein domains were indicated by arrows.



图 3 AfTBK1 与人类 TBK1 空间结构的比较

(a)AjTBK1 三维结构图; (b)人 TBK1 三维结构图; (c)日本鳗鲡与人 TBK1 叠合的三维结构图。

#### Fig. 3 TBK1 three-dimensional structure comparison between A. japonica and H. sapiens

(a) the predicted three-dimensional structure of A/TBK1; (b) the predicted three-dimensional structure of human TBK1; (c) the predicted three-dimensional sional structure of AjTBK1 overlapped with human TBK1.





Fig. 4 Phylogenetic tree of the TBK1 amino acid sequences between A. japonica and other species (AjTBK1 was marked with  $\blacktriangle$ )

刺激后的 AiTBK1 mRNA 表达水平在 3 h (0.58 倍, P<0.05)显著降低,在6h(9.3倍,P<0.01),12h (4.8 倍, P<0.01), 24 h (1.4 倍, P<0.05) 和 48 h (1.7 倍, P<0.01) 均显著升高; 而 CpG-DNA 刺激 下的基因表达水平在各时相均无显著变化 (P> 0.05) (**图 7-a**)₀

日本鳗鲡肝脏细胞系经浓度为 1×10° CFU/mL 嗜水气单胞菌刺激后, AjTBK1 基因表达水平在 24 h (2.7 倍, P<0.05) 和 48 h (4.7 倍, P<0.01) 显 著上调;当嗜水气单胞菌浓度调整为1×107 CFU /mL后, AjTBK1 基因表达水平在 6 h (0.74 倍,

P<0.05)和12h(0.50倍, P<0.01)显著下降,但 在 48 h (2.1 倍, P<0.01) 显著提高; 浓度为 1×10<sup>8</sup> CFU /mL 嗜水气单胞菌刺激后, AjTBK1 基因表达 水平 48 h (1.6 倍, P<0.01) 显著升高 (图 7-b)。

### 2.7 AjTBK1 在 HEK293 细胞中的亚细胞定位

构建绿色荧光蛋白 pEGFP-TBK1 重组质粒, 以 pEGFP-N1 空载体为对照,将其转染人类 HEK293 细胞进行表达。天然状态下, AjTBK1 在细胞质中 均匀分布,在细胞核中未见分布。LPS 和 poly I:C 刺激下, AjTBK1 在细胞质中出现聚集、并呈 点状分布(图版)。

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



**图 5 健康日本鳗鲡不同组织中***AjTBK*1的相对表达量 1. 肝脏, 2. 肠, 3. 鳃, 4. 脾脏, 5. 皮肤, 6.肾脏, 7. 心脏, 8. 肌肉; 不同的字母表示不同组织*AjTBK*1 基因表达水平存在显著差异 (*P*< 0.05)。

### Fig. 5 Relative expression levels of *AjTBK*1 transcripts in different tissues of healthy *A. japonica*

1. liver, 2. intestine, 3. gills, 4. spleen, 5. skin, 6. kidney, 7. heart, 8. muscle; different letters indicated a significant difference of AjTBK1 gene expression among tissues (P < 0.05).

## **2.8** *Aj*TBK1 过表达对 NF-κB、IFN1 和 AP1 启动子活性的影响

为研究 *Aj*TBK1 对 NF-κB、AP-1 和 I 型 IFN 信号通路的调控作用,我们构建了 *Aj*TBK1 的真 核表达质粒 pCMV-TBK1,同时以 pCMV-C-His 为 对照质粒, pRL-TK 为内参质粒,将 pCMV-TBK1 分别与 NF-κB, AP-1 或 IFN-β 启动子荧光素酶报 告质粒共转染 HEK 293 细胞。双荧光素酶检测结 果显示,过表达的 *Aj*TBK1 对 NF-κB、AP-1、IFNβ 启动子活性具有激活作用并呈剂量依赖性 (图 8)。

过表达的 *Aj*TBK1 分别在 6 h (1.7 倍, *P*<0.01)、 12 h (1.6 倍, *P*<0.01)和 24 h (1.8 倍, *P*<0.01)显 著增强了 NF-κB 启动子荧光素酶活性 (图 8-a);选 取 24 h 作为转染时间,将 NF-κB 报告质粒与不同 剂量的 pCMV-TBK1 质粒 (100 ng、200 ng和 300 ng)共转染,发现 NF-κB 启动子的荧光素酶活性 分别提高了 1.5 倍 (*P*<0.01), 1.7 倍 (*P*<0.01)和 2.4 倍 (*P*<0.01) (图 8-b)。

过表达的 *Aj*TBK1 在 6 h 对 AP-1 启动子无显 著诱导 (*P*>0.05),而在 12 h (1.2 倍,*P*<0.01)和 24 h (1.1 倍,*P*<0.01)均能诱导 AP-1 启动子荧光 素酶活性 (图 8-c);当与不同剂量的 pCMV-TBK1 质粒 (100 ng 和 300 ng)共转染时,AP-1 启动子的 荧光素酶活性在 12 h 分别提高了 1.03 倍 (P<0.01) 和 1.13 倍 (P<0.01),而在 200 ng 剂量下无显著诱 导效果 (P>0.01) (图 8-d)。

过表达的 *Aj*TBK1 在 6 h (1.4 倍, *P*<0.01), 12 h (1.91 倍, *P*<0.01)和 24 h (1.92 倍, *P*<0.01) 显著诱导 IFN-β 启动子荧光素酶活性 (图 8-e);选 取 24 h 作为转染时间,将报告质粒 IFN-β 与不同 剂量的 pCMV-TBK1 质粒 (100 ng、200 ng和 300 ng) 共转染时, IFN-β 启动子的荧光素酶活性分别 提高了 1.46 倍 (*P*<0.01), 1.47 倍 (*P*<0.01)和 1.48 倍 (*P*<0.01) (图 8-f)。

### 3 讨论

哺乳动物 TBK1 作为非经典 IκB激酶,在激 活 NF-κB、I型 IFN 信号通路中起着关键作用<sup>[30]</sup>。 目前的研究表明,鱼类 TBK1 在 IRF3/IRF7 介导 的 I型干扰素信号通路具有重要的调控作用,但 有关鱼类 TBK1 对细菌免疫应答密切相关的 NFκB 及 MAPK 信号通路调控作用的研究还未见报 道。为了深入了解 TBK1 在硬骨鱼类免疫应答中 的作用机制,本研究从日本鳗鲡中克隆了 *AjTBK*1 cDNA 全长,探究了在体和离体状态下主要病原 模式分子和鱼类病原菌刺激后的 *AjTBK*1 基因表 达的变化,以及 *Aj*TBK1 过表达对于不同免疫相 关信号通路的调控作用。

*AjTBK*1 编码了 731 个氨基酸,与斑点叉尾鮰、 斑马鱼、大西洋鳕、虹鳟等 TBK1 氨基酸相似度 高达 84%~87%,具有 TBK1 蛋白家族典型的激酶 结构域 (KD)、泛素样结构域 (ULD)、二聚化支架 结构域 (SDD)以及 C端结构域 (CTD)<sup>[1,31]</sup>。 *Aj*TBK1 的激酶结构域中含有保守的 ATP 结合位 点"LGQGATANV",以及与 TBK1 自磷酸化密切 相关的丝氨酸残基 Ser172。此外,日本鳗鲡 *Aj*TBK1 空间结构与人类 TBK1 蛋白质在三维结构 上高度相似,并与其他鱼类 TBK1 在系统发育树 中聚为一支,反映出 TBK1 在进化过程中相对保 守,预示该分子具有类似于哺乳动物 TBK1 的免 疫调节方面的功能。

*AjTBK*1 基因在日本鳗鲡各组织中广泛表达, 这种组成型基因表达模式也出现在大西洋鳕<sup>[12]</sup>、 青鱼<sup>[13]</sup>、草鱼<sup>[14]</sup>、大黄鱼<sup>[15]</sup>、斜带石斑鱼<sup>[17]</sup>和 鲤<sup>[18]</sup>中。*AjTBK*1 基因在肝脏、肠、鳃、脾脏等免 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



### 图 6 LPS、poly I:C 及嗜水气单胞菌对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 AjTBK1 基因表达水平的影响

(a) LPS 刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 AjTBK1 基因表达水平的影响; (b) poly I:C 刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 AjTBK1 基因表达 水平的影响; (c) A. hydrophila 刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏及脾脏 AjTBK1 基因表达水平的影响; 各图横坐标中 1, 2和 3分别代表日本鳗鲡 肝脏,肾脏和脾脏; "\*"表示相同时相实验组与对照组之间存在显著差异 (P<0.05), "\*\*"表示极显著差异 (P<0.01)。

### Fig. 6 Effect of LPS, poly I:C, or *A. hydrophila* on *AjTBK*1 gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*

(a) Effect of LPS on AjTBK1 gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*; (b) effect of poly I:C on AjTBK1 gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*; (c) effect of *A. hydrophila* on AjTBK1 gene expression in the liver, kidney, and spleen of *A. japonica*; 1,2 and 3 on the abscissa represent liver, kidney and spleen respectively; statistical differences between the expression level of each sample and that of the PBS control at the same sampling time are indicated with asterisks (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01).

疫相关组织中有较高表达,与大西洋鳕<sup>[12]</sup>、草鱼<sup>[14]</sup> 和鲤<sup>[18]</sup>的研究结果一致。但也有学者发现大黄鱼 *TBK*1 基因表达水平在脑、肌肉和心脏中较高<sup>[15]</sup>, 而斜带石斑鱼心脏 *TBK*1 表达量明显高于肝脏、 脾脏、头肾等免疫器官<sup>[17]</sup>,提示 *TBK*1 在硬骨鱼 类中的表达模式具有种属特异性,其免疫功能也 可能存在差异。

硬骨鱼类 TBK1 在抗病毒免疫功能中的研究 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries 已有不少报道。例如鲤春病毒血症病毒 (SVCV)、 草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 可诱导青鱼肝脏、脾脏、 肾脏以及青鱼鳍细胞中 *TBK1* 基因表达水平显著 提高<sup>[13]</sup>, GCRV 感染草鱼后,其脾脏、头肾以及 肾脏细胞中 *TBK*1 表达量显著上升<sup>[14]</sup>,而赤点石 斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 和新加坡石斑鱼虹 彩病毒 (SGIV) 感染后可使斜带石斑鱼脾脏细胞 中 *TBK*1 表达量显著升高<sup>[17]</sup>。本实验发现 poly I:C





(a) 不同 PAMPs 刺激对日本鳗鲡肝脏细胞内 AjTBK1 基因表达水平的影响;(b) 不同浓度嗜水气单胞菌刺激对日本鳗鲡肝脏细胞内 AjTBK1 基因表达水平的影响;"\*"表示相同时相实验组与对照组之间存在显著差异 (P<0.05),"\*\*"表示极显著差异 (P<0.01)。



(a) Effect of different PAMPs on AjTBK1 gene expression of A. *japonica* liver cells; (b) effect of different concentrations of A. *hydrophila* on AjTBK1 gene expression of A. *japonica* liver cells; statistical differences between the expression level of each sample and that of the PBS control at the same sampling time are indicated with asterisks (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01).

可诱导日本鳗鲡肝脏、脾脏以及日本鳗鲡肝脏细 胞中 *AjTBK*1 表达水平显著提高,表明 *Aj*TBK1 参 与日本鳗鲡抗病毒免疫应答,但其免疫调控机制 尚需进一步研究。

目前,有关鱼类 TBK1 参与抗病原菌感染的 研究仅在大黄鱼中有所报道,其结果显示,灭活 的副溶血性弧菌 (Vibrio parahaemolyticus) 可以诱 导大黄鱼免疫相关组织中 TBK1 的表达水平提高[15]。 我们发现养殖鳗鲡主要病原菌嗜水气单胞菌能够 诱导日本鳗鲡肝脏、脾脏、肾脏以及日本鳗鲡肝 脏细胞 TBK1 基因表达水平显著升高,从在体和 离体两个方面支持了鱼类 TBK1 在抗细菌免疫应 答反应中的重要作用。此外,我们还发现革兰氏 阴性和阳性细菌的主要病原模式分子 LPS 和 PGN 均能引起日本鳗鲡肝脏细胞 AiTBK1 的表达水平 提高,与草鱼肾脏细胞的研究结果相符<sup>[14]</sup>。但也 有学者发现青鱼鳍细胞 TBK1 的表达水平经 LPS 刺激后却无显著变化[13-14],提示不同鱼类细胞对 于不同的主要病原模式分子刺激后的免疫应答机 制有所不同。

亚细胞定位对于蛋白质功能的深入研究具有 重要意义。天然状态下 AjTBK1 主要分布于细胞 质中,与青鱼<sup>[13]</sup>、斜带石斑鱼<sup>[17]</sup>的研究结果相一 致。目前,尚未有研究表明病原体相关分子模式 能够引起 TBK1 在细胞中的定位变化,而本研究 证实了 LPS 和 poly I:C 能够引起 *Aj*TBK1 在细胞 质中聚集表达,与日本鳗鲡 *Aj*IKKα 的文献报道一 致<sup>[32]</sup>,提示 *Aj*TBK1 对抗病原微生物免疫应答的 调控作用主要在细胞质中进行。哺乳动物中的研 究表明,IKKα/β可以通过磷酸化对 TBK1/IKKε进 行活化以完成抗病毒信号的进一步传递<sup>[33]</sup>,日本 鳗鲡 *Aj*TBK1 与 *Aj*IKKα 在抗细菌和抗病毒先天免 疫应答中是否也存在类似的相互作用机制还有待 进一步研究。

TBK1是调节 IFN-β 表达的重要激酶,在介导人类先天免疫中具有不可替代的作用<sup>[34]</sup>。与人类 TBK1 功能相似,草鱼<sup>[14]</sup>、青鱼<sup>[19]</sup>以及斑马鱼<sup>[16]</sup> 等硬骨鱼类的 TBK1 过表达后也能激活自身 I型 IFN 的表达。此外,硬骨鱼类 TBK1 也被证明与 IRF 家族中多个转录因子如 IRF3、IRF5、IRF6、 IRF7 之间存在相互作用,并可通过这些相互作用 参与调节 I型 IFN 信号通路<sup>[19-20, 35-37]</sup>。本实验中 *Aj*TBK1 过表达显著激活 IFN-β 的启动子活性,并 呈剂量依赖性进一步证明鱼类 TBK1 在抗病毒免



图版 AjTBK1 在 HEK293 中的亚细胞定位

1~3. 天然状态下绿色荧光蛋白亚细胞定位;4~6. 天然状态下 *Aj*TBK1 绿色荧光融合蛋白亚细胞定位;7~9. LPS 刺激后 *Aj*TBK1 绿色荧光融 合蛋白亚细胞定位;10~12. polyI:C 刺激后 *Aj*TBK1 绿色荧光融合蛋白亚细胞定位;蓝色部分为 DAPI 染色,示细胞核;绿色部分为绿色荧光蛋白,示 EGFP 或 EGFP-*Aj*TBK1 在细胞中的位置;3、6、9 和 12 分别为1 和 2、4 和 5、7 和 8、9 和 10 的合并图像。

Plate Subcellular localization of AjTBK1 intransfected HEK293 cells

1-3. subcellular localization of EGFP protein in the natural state; 4-6. subcellular localization of EGFP-*Aj*TBK1 fusion protein in the natural state; 7-9. subcellular localization of EGFP-*Aj*TBK1 fusion protein after LPS stimulation; 10-12. subcellular localization of EGFP-*Aj*TBK1 fusion protein after poly I:C stimulation; nucleus were stained with DAPI, were shown in blue; the green part shows the location of EGFP-*Aj*TBK1 in cells; 3, 6, 9 and 12 are the merged images of 1 and 2, 4 and 5, 7 and 8, 9 and 10 respectively.

疫功能方面的保守性。此外,在绿头鸭和原鸡中 的研究发现缺失 KD 或 ULD 的 TBK1 的突变体丧 失了对 IFN-β 的激活能力<sup>[38-39]</sup>,而缺失 KD 的斜带 石斑鱼 TBK1 的突变体也缺乏对 IRF3、IRF7 启动 子活性的激活能力<sup>[17]</sup>,因此,进一步通过构建日 本鳗鲡 TBK1 不同结构域突变体,研究其对 IFNβ 的启动子活性的影响,将有助于深入了解 TBK1 所介导的抗病毒调控机制。

NF-κB 是细胞中的关键核转录因子,可参与 调节细胞内多种免疫和炎症反应。虽然人类 TBK1 和绿头鸭 TBK1 的过表达可激活 NF-κB 的 启动子活性<sup>[10,38]</sup>,但硬骨鱼类 TBK1 是否参与调 节 NF-κB 信号通路尚未见报道。本实验通过双荧 光素酶检测发现,*Aj*TBK1 过表达显著增强了 NFκB 启动子荧光素酶活性,并呈现剂量依赖性,表 明鱼类 TBK1 也参与了细胞内 NF-κB 信号通路的 激活,但其调控机制尚需进一步研究。

AP-1 属于 MAPK 信号通路中的重要细胞因 子,其转录活性在细胞增殖、凋亡、炎症及迁移 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries 等过程中发挥复杂而又重要的作用,且受 JNK、 ERK、p38 MAPK、PI3K/AKT 的调控<sup>[40]</sup>。早期的 研究表明,哺乳动物中 AKT 可调控 MAPK 信号 通路下游因子 AP-1,TBK1 可通过激活 P13K 实 现对 AKT 的磷酸化<sup>[4041]</sup>。我们首先在日本鳗鲡中 观察到 TBK1 能够对 AP-1 启动子荧光素酶活性有 一定的增强作用,提示硬骨鱼 TBK1 很可能也参 与了对 MAPK 信号通路的调控作用,但尚需在其 他鱼类中进一步证实。

本实验从日本鳗鲡克隆鉴定出 *AjTBK*1 基因 的 cDNA 全长, qRT-PCR 显示嗜水气单胞菌和 poly I:C 能够诱导日本鳗鲡肝脏、脾脏以及日本鳗 鲡肝脏细胞 *AjTBK*1 基因水平显著提高,亚细胞 定位结果显示,经 LPS 和 poly I:C 刺激后 *Aj*TBK1 在细胞质中呈聚集点状分布,双荧光素酶活性检 测发现过表达的 *Aj*TBK1 可激活 NF-κB、AP-1 和 IFN-β 启动子,以上结果表明,*Aj*TBK1 是激活 NF-κB、I型 IFN 和 MAPK 信号通路中的正调节 剂,在机体抗细菌和抗病毒免疫应答中发挥重要





(a) 不同时相下 *Aj*TBK1 对 NF-κB 的激活; (b) 不同转染剂量的 *Aj*TBK1 转染 24 h 对 NF-κB 的激活; (c) 不同时相下 *Aj*TBK1 对 AP-1 的激活; (d) 不同转染剂量的 *Aj*TBK1 转染 12 h 对 AP-1 的激活; (e) 不同时相下 *Aj*TBK1 对 IFN-β 的激活; (f) 不同转染剂量的 *Aj*TBK1 转染 24 h 对 IFN-β 的激活。图 (b)、(d)、(f) 中的 1、2、3、4 分别代表转染 pCMV 300 ng、转染 pCMV 200 ng 和 pCMV-TBK1 100 ng、转染 pCMV 100 ng 和 pCMV-TBK1 200 ng、转染 pCMV-TBK1 300 ng。"\*"表示相同时相下实验组与对照组之间存在显著差异 (*P*<0.05), "\*\*"表示极显著差 异 (*P*<0.01); "#"表示不同转染剂量的实验组之间存在显著差异 (*P*<0.05), 而"##"表示极显著差异 (*P*<0.01)。

### Fig. 8 Activation of NF-κB, AP-1, and IFN-β response by *Aj*TBK1 overexpression

(a) activation of NF-кB by AjTBK1 in different phases; (b) activation of NF-кB by different doses of AjTBK1 after 24 h transfection; (c) activation of AP-1 by AjTBK1 in different phases; (d) activation of AP-1 by different doses of AjTBK1 after 12 h transfection; (e) activation of IFN- $\beta$  by AjTBK1 in different phases; (f) activation of IFN- $\beta$  by different doses of AjTBK1 after 24 h transfection; 1, 2, 3, 4 in Fig B, D, F are referred to the plasmid transfection of 300 ng pCMV, 200 ng pCMV and 100 ng pCMV-TBK1, 100 ng pCMV and 200 ng pCMV-TBK1, and pCMV-TBK1 300 ng, respectively; statistical differences between the expression level of each sample and that of the pCMV control are indicated with asterisks (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01); hashtags indicate statistically significant differences between two transfection doses of AjTBK1 as specified in the figure (#, P < 0.05; ##, P < 0.01). https://www.china-fishery.cn

### 的调控作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- Larabi A, Devos J M, Ng S L, *et al.* Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1[J].
   Cell Reports, 2013, 3(3): 734-746.
- [2] Li F X, Xie X Q, Wang Y L, et al. Structural insights into the interaction and disease mechanism of neurodegenerative disease-associated optineurin and TBK1 proteins[J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 12708.
- [3] Ahmad L, Zhang S Y, Casanova J L, *et al.* Human TBK1: a gatekeeper of neuroinflammation[J]. Trends in Molecular Medicine, 2016, 22(6): 511-527.
- [4] Shu C, Sankaran B, Chaton C T, et al. Structural insights into the functions of TBK1 in innate antimicrobial immunity[J]. Structure, 2013, 21(7): 1137-1148.
- [5] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection[J]. Immunological Reviews, 2009, 227(1): 75-86.
- [6] Wang L Y, Li S T, Dorf M E. NEMO binds ubiquitinated TANK-binding kinase 1 (TBK1) to regulate innate immune responses to RNA viruses[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e43756.
- [7] Miyahira A K, Shahangian A, Hwang S, et al. TANKbinding kinase-1 plays an important role during *in vitro* and *in vivo* type I IFN responses to DNA virus infections[J]. The Journal of Immunology, 2009, 182(4): 2248-2257.
- [8] Tenoever B R, Ng S L, Chua M A, et al. Multiple functions of the IKK-related kinase IKKε in interferon-mediated antiviral immunity[J]. Science, 2007, 315(5816): 1274-1278.
- [9] Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, *et al.* NAK is an IkB kinase-activating kinase[J]. Nature, 2000, 404(6779): 778-782.
- [10] Pomerantz J L, Baltimore D. NF-κB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase[J]. The EMBO Journal, 1999, 18(23): 6694-6704.
- [11] Harris J, Olière S, Sharma S, *et al.* Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKKε[J]. The Journal of Immunology, 2006, 177(4): 2527-2535.
- [12] Chi H, Zhang Z B, Bøgwald J, et al. Cloning, expres-中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

sion analysis and promoter structure of TBK1 (TANKbinding kinase 1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L. )[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4-5): 1055-1063.

- [13] Yan C Z, Xiao J, Li J, et al. TBK1 of black carp plays an important role in host innate immune response against SVCV and GCRV[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 69: 108-118.
- [14] Feng X L, Su J G, Yang C R, et al. Molecular characterizations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TBK1 gene and its roles in regulating IFN-I pathway[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 45(2): 278-290.
- [15] Zhang D L, Yu D H, Chen J, et al. Expression profiles and interaction suggest TBK1 can be regulated by Nrdp1 in response to immune stimulation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 745-752.
- [16] Zhang L, Chen W Q, Hu Y W, et al. TBK1-like transcript negatively regulates the production of IFN and IFN-stimulated genes through RLRs-MAVS-TBK1 pathway[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 135-143.
- [17] Hu Y, Huang Y H, Liu J X, *et al.* TBK1 from orangespotted grouper exerts antiviral activity against fish viruses and regulates interferon response[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 92-99.
- [18] Feng H, Liu H, Kong R Q, *et al.* Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4-5): 1159-1169.
- [19] Yang C, Liu L Q, Liu J, et al. Black carp IRF5 interacts with TBK1 to trigger cell death following viral infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 100: 103426.
- [20] Jiang Y Y, Liu L Q, Yang S S, et al. Black carp PRMT6 inhibits TBK1-IRF3/7 signaling during the antiviral innate immune activation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 108-115.
- [21] Li J, Yan C Z, Liu J, et al. SIKE of black carp is a substrate of TBK1 and suppresses TBK1-mediated antiviral signaling[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 90: 157-164.
- [22] Yu N L, Xu X W, Qi G Q, et al. Ctenopharyngodon idella TBK1 activates innate immune response via IRF7[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 80: 521-

527.

- [23] Li S, Lu L F, LaPatra S E, et al. Zebrafish STAT6 negatively regulates IFN
  µ1 production by attenuating the kinase activity of TANK-binding kinase 1[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 67: 189-201.
- [24] 罗鸣钟,关瑞章, 靳恒. 五种鳗鲡的含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(4): 714-722.
  Luo M Z, Guan R Z, Jin H. Analysis on the ratio of flesh content and the nutritional composition in the muscle of five species of eel[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(4): 714-722 (in Chinese).
- [25] 刘常标,高飞. 福建省鳗鲡产业发展回顾与思考[J]. 渔业研究, 2020, 42(2): 179-184.
  Liu C B, Gao F. Some thoughts on the development of eel industry of Fujian Province[J]. Journal of Fisheries Research, 2020, 42(2): 179-184 (in Chinese).
- [26] Feng J J, Lin P, Wang Y L, *et al.* Identification of a type I interferon (IFN) gene from Japanese eel and its expression analysis *in vivo* and *in vitro*[J]. Agri Gene, 2017, 5: 19-26.
- [27] Feng J J, Guo S L, Lin P, et al. Identification of a retinoic acid-inducible gene I from Japanese eel (Anguilla japonica) and expression analysis in vivo and in vitro[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 249-256.
- [28] Wang T T, Lin P, Guo S L, et al. Molecular characterization and expression analysis of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in Japanese eel Anguilla japonica[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 86: 956-964.
- [29] Feng J J, Lin P, Wang Y L, et al. Molecular characterization, expression patterns, and functional analysis of tollinteracting protein (Tollip) in Japanese eel Anguilla japonica[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 90: 52-64.
- [30] Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang T H, et al. Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKKε and TBK1 on type I IFN production[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94999.
- [31] Tu D Q, Zhu Z H, Zhou A Y, *et al.* Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1[J]. Cell reports, 2013, 3(3): 747-758.

- [32] Feng J J, Xu Y K, Lin P, *et al.* Fish IKKα from Japanese eel (*Anguilla japonica*) can activate NF-κB, AP1, and type I IFN signaling pathways[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 982-992.
- [33] Fang R, Jiang Q, Zhou X, et al. MAVS activates TBK1 and IKKε through TRAFs in NEMO dependent and independent manner[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(11): e1006720.
- [34] Fitzgerald K A, McWhirter S M, Faia K L, et al. IKKe and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway[J]. Nature Immunology, 2003, 4(5): 491-496.
- [35] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, et al. Fish MITA serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7[J]. The Journal of Immunology, 2011, 187(5): 2531-2539.
- [36] Rao Y L, Ji J F, Liao Z W, et al. GCRV hijacks TBK1 to evade IRF7-mediated antiviral immune responses in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 492-499.
- [37] Li S, Lu L F, Wang Z X, et al. Fish IRF6 is a positive regulator of IFN expression and involved in both of the MyD88 and TBK1 pathways[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 262-268.
- [38] Hua K X, Li Y Q, Chen H J, *et al.* Functional characterization of duck TBK1 in IFN-β induction[J]. Cytokine, 2018, 111: 325-333.
- [39] Cheng Y Q, Ma J J, Liu Y X, *et al.* Chicken TBK1 interacts with STING and is involved in IFN-β signaling regulation[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 77: 200-209.
- [40] Yang C M, Lee I T, Lin C C, *et al.* c-Src-dependent MAPKs/AP-1 activation is involved in TNF-α-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heartderived H9c2 cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2013, 85(8): 1115-1123.
- [41] Xie X D, Zhang D H, Zhao B, et al. IκB kinase ε and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(16): 6474-6479.

### Molecular cloning and immune functional analysis of TBK1 gene in Japanese eel (*Anguilla japonica*)

XU Yuankai<sup>1,2</sup>, PENG Xinwei<sup>1,3,4</sup>, LIN Peng<sup>1,3,4</sup>, WANG Yilei<sup>1,3,4</sup>, FENG Jianjun<sup>1,3,4\*</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Ningbo Institute of Oceanography, Ningbo 315832, China;

3. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

4. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: As an important serine/threonine kinase in the IKK family, TANK Binding Kinase 1 (TBK1) plays a critical role in innate immune response by activating NF- $\kappa$ B and type I IFN signaling pathways in mammals. Although several studies have reported that fish TBK1 was involved in the regulation of type I IFN production, information on TBK1's close association with antimicrobial immune responses in the regulation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways is still limited in teleost fish. In order to elucidate the regulation of fish TBK1 in NFκB, I IFN, and MAPK immune response signaling pathways, the full-length cDNA of a TBK1 homologue, AiTBK1, was cloned by SMART RACE from Japanese eel, and its characteristics of expression in response to various PAMPs and Aeromonas hydrophila infection were investigated both in vivo and in vitro by quantitative realtime polymerase chain reaction (qRT-PCR). In addition, the subcellular localization of AjTBK1 GFP fusion protein and the induction of  $A_i$ TBK1 overexpression in the activation of NF- $\kappa$ B, AP1 and type I IFN performed by Dual-Glo luciferase assay system were also detected. Amino acid sequence analysis indicated that AjTBK1 encodes a polypeptide of 731 amino acids, which has the conserved N-terminal kinase domain (KD), a ubiquitinlike domain (ULD), a scaffold dimerization domain (SDD), and a C-terminal domain (CTD). The predicted threedimensional structure of A/TBK1 is similar to that of human TBK1, and A/TBK1 is clustered with other fish families in the phylogenetic tree. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis revealed that AjTBK1 is broadly expressed in a wide range of tissues, with high expression in liver and intestine. In vivo, the expression of AjTBK1 in the liver of Japanese eel was significantly increased by 1.8- fold at 6h, 1.8-fold at 6 h, and 1.9-fold at 48 h after injection with LPS, viral mimic poly I:C and A. hydrophila infection, respectively. The AjTBK1 expression in kidney was found to increase at 12 h and 24 h with 1.9- and 1.6-fold after A. hydrophila infection, but decreased following the stimulation of LPS and poly I:C. In vitro, the AjTBK1 transcripts of Japanese eel liver cells were significantly enhanced to its peak by the treatment of LPS, poly I:C, PGN, or the 10<sup>6</sup> CFU/mL A. hydrophila, being up to the 15.3-, 5.8-, 9.3- and 4.7-fold, respectively. Subcellular localization studies showed that A/TBK1 was evenly distributed in the cytoplasm of HEK293 cells in natural state. A/TBK1 was found to aggregate into spots in the cytoplasm upon the stimulation of LPS or poly I:C in HEK293 cells. Additionally, luciferase assays demonstrated that the  $A_i$ TBK1 overexpression significantly enhanced the activation of NF- $\kappa$ B, AP1, and IFN $\beta$ -responsive promoters in HEK293 cells, and robustly up-regulated the activation of NF- $\kappa$ B, AP1, and IFN $\beta$ -responsive promoter, which were 1.8-, 1.2-, and 1.92-fold induced at 24 h, 12 h, and 24 h after cotransfection, respectively. These results collectively suggest that AiTBK1 may function as important positive regulation in innate immunity of host against antibacterial and antiviral infection likely via the activation of NF-κB, AP1, and type I IFN signaling pathways.

**Key words**: *Anguilla japonica*; TANK binding kinase 1 (TBK1); signal pathway; subcellular localization; dualluciferase reporter gene assay

Corresponding author: FENG Jianjun. E-mail: fengjj@jmu.edu.cn

**Funding projects**: Nature Science Foundation of Fujian Province (2020J01671); Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, P. R. China (RE202110); Key Laboratory and Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China (2020ESHML02)