

# 扎那纹胸鲃 g 型溶菌酶的 cDNA 克隆及组织表达分析

王运娇,吕 梦,蔡莎莎

**摘要** 目的 鉴定扎那纹胸鲃 g 型溶菌酶(GzLysG)编码序列,分析其在宿主免疫系统中的作用。方法 通过巢氏 PCR 技术克隆了 GzLysG cDNA 序列,通过 ExPASy、SignalP 5.0、CDD、Clustal Omega 等在线软件对 GzLysG 蛋白进行生物信息学分析,利用 RT-qPCR 技术分析了 GzLysG mRNA 在不同组织中的表达情况。结果 GzLysG cDNA 的开放阅读框全长 558 bp,编码 185 个氨基酸,其蛋白序列分子量为 20 478.20 u,理论等电点为 9.16,是一种稳定的碱性亲水性蛋白质。该蛋白无信号肽,含有 g 型溶菌酶典型的催化活性位点、GEWL 结构域和 SLT 结构域。高级结构分析发现,GzLysG 蛋白以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲结构为主,其分子表面有一条与溶菌酶活性密切相关的狭长裂缝。系统进化分析表明溶菌酶在物种进化过程中较为保守,且 GzLysG 与斑马鱼来源的溶菌酶表现出较近的亲缘关系。组织表达谱分析发现,GzLysG mRNA 在免疫保护相关的皮肤、肌肉和鳃组织中具有较高表达量。结论 GzLysG 在扎那纹胸鲃固有免疫防御中可能发挥重要作用。

**关键词** 扎那纹胸鲃;g 型溶菌酶;生物信息学分析;组织表达谱

**中图分类号** Q 956

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0711-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.002

溶菌酶最初以水解细胞壁而闻名<sup>[1]</sup>,根据分子结构、催化机制及免疫特性的不同,动物溶菌酶分为 3 种:c 型溶菌酶、g 型溶菌酶和 i 型溶菌酶<sup>[2]</sup>。鱼类溶菌酶主要有 c 型溶菌酶和 g 型溶菌酶 2 种,且这 2 种类型的溶菌酶在组织分布、基因组结构和分子特征方面都存在很大的不同<sup>[2]</sup>。目前针对鱼类溶菌酶的研究主要集中在 c 型,对 g 型溶菌酶的报道局限于鲤形目鲤鱼、草鱼<sup>[3]</sup>,鲈形目石首鱼科、鲷科<sup>[4]</sup>,鲟形目鲟科<sup>[5]</sup>,鲽形目牙鲆科和鳕形目鳕

科<sup>[6]</sup>等。目前尚无关于鲇形目鲃科鱼溶菌酶的报道研究。扎那纹胸鲃隶属鲃科、纹胸鲃属主要分布于我国澜沧江中游及怒江上中游水网系统,是当地重要的经济渔获之一<sup>[7]</sup>。近年来,由于过度捕捞、栖息地退化或环境污染,该物种的自然种群数量急剧下降,引起人们对其长期可持续性的日益关注。人工驯养是保护扎那纹胸鲃种质的一种可行方式,但目前扎那纹胸鲃的人工养殖技术还不成熟,难以实现规模化,且常有各种感染性疾病的发生。鉴于溶菌酶在鱼类感染性疾病控制中的重要作用<sup>[8]</sup>,该研究利用 PCR 克隆和生物信息学的方法分析鉴定了扎那纹胸鲃 g 型溶菌酶(*G. zainaensis g-type Lysozyme*, GzLysG)基因,并利用实时定量 PCR 技术分析了其在扎那纹胸鲃不同组织中的表达特征,为进一步阐明 g 型溶菌酶在扎那纹胸鲃免疫防御抵抗病原菌中的功能奠定了重要基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 扎那纹胸鲃 6 条,4 雄 2 雌,体质量 100~200 g,采自四川怒江,液氮速冻,干冰运输。解剖取其肝脏、肠、肌肉、鳃、皮肤和脾脏组织,置于液氮中,保存备用。

**1.2 药品与试剂** TRIzol RNA 分离试剂购自美国 Invitrogen 公司;SMARTTM cDNA Library Construction Kit(Clontech)、PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green<sup>®</sup> Premix DimerEraser<sup>TM</sup> (Perfect Real Time)以及 PCR 克隆用的 Taq 酶均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;引物合成、测序由上海生工生物工程有限公司完成。

## 1.3 方法

**1.3.1 扎那纹胸鲃溶菌酶基因的克隆** 利用 TRIzol RNA 分离试剂提取扎那纹胸鲃肝脏组织总 RNA,分别利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop GX 分光光度计分析 RNA 的完整性和纯度。选以高质量的 RNA 为模板,严格按照说明书要求,利用建库试剂盒 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 构建 cDNA 文库。参考已知鱼类 g 型溶菌酶的基因序列,借助 Primer Premier 5.0 在线软件,设计两条 5'上

2022-12-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31900328);济宁医学院教育教学研究项目(编号:Y2020018)

作者单位:山东第一医科大学(山东省医学科学院)研究生院,济南 250000

作者简介:王运娇,女,硕士研究生;

蔡莎莎,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:bio-caishasha@mail.jnmc.edu.cn

游引物 (P1: 5'-ATGGCTKGCATTTTTGGAGAC-3', P2: 5'-ATGATCTGAAGARGATGGA-3'), 然后利用试剂盒内的 CDS III/3' PCR Primer 为 3' 随机引物进行目的基因的 PCR 克隆, 挑选阳性克隆测序, 将测序结果序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对鉴定分析。

**1.3.2 生物信息学分析** 使用 ExPASy 中的 Translate 软件 (<https://web.expasy.org/translate/>) 推导氨基酸序列。对推导的氨基酸序列, 利用 SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 进行信号肽的查找分析。利用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对溶菌酶序列的理化性质进行分析。利用 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析溶菌酶的保守结构域。在 NCBI 中查找已报道的其他物种来源的溶菌酶的序列信息, 利用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 在线软件对扎那纹胸鲑溶菌酶与其他物种的氨基酸序列进行多物种序列比对。利用 MEGA 6.0 软件, 选以邻接法构建系统发育树, 参数设置选择 Poisson Correction 模型, bootstraps 设置为 1 000<sup>[9]</sup>。

**1.3.3 结构分析** 利用在线预测软件 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 分析蛋白的二级结构。利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测扎那纹胸鲑溶菌酶的高级结构。

**1.3.4 组织表达谱分析** 按照“1.3.1”所述方法提取扎那纹胸鲑脾脏、肝脏、肠、肌肉、鳃和皮肤 6 个组织的总 RNA, 然后按照 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书, 合成 cDNA 一链序列。反转录的 cDNA 模板用 EASY Dilution 稀释 10 倍后使用。利用 Primer Premier 5.0 软件设计扎那纹胸鲑溶菌酶基因和内参基因  $\beta$ -actin 的引物。GzLysG 的上下游引物分别为 5'-AGTACAAGGCCACCATCGTC-3' 和 5'-TCACTGT-TCCAGGCTCCTTT-3',  $\beta$ -actin 的上下游引物分别为 5'-GCTGTCTTCCCTTCCATTGT-3' 和 5'-CTGAGCCT-CATCACCAACAT-3'。按照 TB Green<sup>®</sup> Premix DimerEraser<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 试剂盒说明书在 Quant-Studio 7 Flex real-time PCR System (Applied Biosystems, USA) 上进行 qPCR 反应。反应体系为: 12.5  $\mu$ l 的 TB Green Premix DimerEraser (2 $\times$ ), 0.75  $\mu$ l 的 PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L), 0.75  $\mu$ l 的 PCR

Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ l 的模板 cDNA, 9  $\mu$ l 的灭菌双蒸水。qPCR 的反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 40 个循环, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s。各样品的目的基因反应产物经熔解曲线确认是否为单一特异性的扩增条带。目的基因的转录水平变化采用  $\Delta\Delta$ Ct 法分析处理。

**1.4 统计学处理** 所有的数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析并作图。数据以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示。利用非配对 *t* 检验分析两组样本间是否存在显著性差异性。P < 0.05 示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GzLysG cDNA 的克隆及分子特征** 以肝脏总 RNA 为模板, 利用巢氏 PCR 技术, 成功克隆到一条编码 GzLysG 的全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: OP881998, 图 1)。按照溶菌酶的类型和扎那纹胸鲑拉丁名 *G. zainaensis* 的前两个首字母将克隆得到的溶菌酶命名为 GzLysG。GzLysG 的 cDNA 序列全长 558 bp, 编码 185 个氨基酸 (图 1)。蛋白保守功能结构域的预测结果表明, GzLysG 含有 g 型溶菌酶典型的鹅蛋清溶菌酶 (goose egg white lysozyme, GEWL) 结构域和可溶性裂解转糖苷酶 (soluble lytic transglycosylases, SLT) 结构域。

GzLysG 蛋白无信号肽序列, 表明该溶菌酶为非分泌表达的蛋白质 (图 2)。GzLysG 蛋白的氨基酸序列中含有 20 种常见氨基酸, 其中 Lys 的含量最高 (11.9%), 其次是 Gly (10.8%) 和 Ala (8.1%)。其分子量为 20 478.20 u, 理论等电点为 9.16, 经 ExPASy-ProtParam 分析判断为一种稳定的碱性亲水性蛋白质。

**2.2 多物种溶菌酶基因序列比对** 多物种序列比对结果发现, GzLysG 与日本鳗鲡 (AJLysG2) 和斑马鱼 (DRLysG) 来源的溶菌酶的同源性相对较高。且在 GzLysG 序列中也发现了 g 型溶菌酶高度保守的催化活性位点 Glu (E73)、Asp (D86) 和 Asp (D97) (图 3)。

**2.3 GzLysG 的结构特征分析** GzLysG 二级结构中含有 6 个大小不一的  $\alpha$  螺旋结构, 占比 43.24%,  $\beta$  折叠占比 11.35%,  $\beta$  转角占比 4.86%, 无规则卷曲结构占比 40.54% (图 4A)。Swiss model 模型进一步验证了上述结果, GzLysG 与鹅蛋蛋白溶菌酶 (PDB: 153l.1.A) 结构相似, 都有 6 个  $\alpha$  螺旋结构 (图 4B)。3D 结构模型显示, GzLysG 分子表面有一

```

atg gct tgc att ttt ggc gac gtc acc aag atc gaa acg acc ggg gca tct gaa aaa acg 60
M A C I F G D V T K I E T T G A S E K T 20
gct tca caa gat aag ctc acc gtt aaa ggg gtg gag get tgc cat aaa ctg gct gag aat 120
A S Q D K L T V K G V E A S H K L A E N 40
gat ctg aag aag atg gaa gag tac aag gcc acc atc gtc aaa gtt ggc aaa gct aag aag 180
D L K K M E E Y K A T I V K V G K A K K 60
atg gac cca gcc gtg atc gcg gct atc ata tcc aga gag tcc agg gtc ggg aca gtt ctt 240
M D P A V I A A I I S R E S R V G T V L 80
aaa aat ggc tgg gga gac gaa ggc aac ggc ttc gga ctc atg cag gtt gac aag aga cac 300
K N G W G D E G N G F G L M Q V D K R H 100
cac act cca aaa gga gcc tgg aac agt gag gac aac atc gtc caa ggc acc gat att cta 360
H T P K G A W N S E D N I V Q G T D I L 120
ata gac ttt atc aaa caa att cag aag aaa ttc ccg agc tgg acc aag gag cag cac ttt 420
I D F I K Q I Q K K F P S W T K E Q H F 140
aaa ggt gga atc tca gcc tac aac ggc ggc gcc gga aat gtc cgc acg tat gag cgc atg 480
K G G I S A Y N G G A G N V R T Y E R M 160
gac gag ggc acc ccg ggg aat gat tat tct cat gat gtg gtg gcc cgg gct cag tgg ttc 540
D E G T P G N D Y S H D V V A R A Q W F 180
aaa cgc aag ggt tat tga 558
K R K G Y * 185
    
```

图1 GzLysG cDNA 及其编码的氨基酸序列  
 红色字体为半胱氨酸残基;黄色阴影为糖结合位点;框中为 SLT 结构域

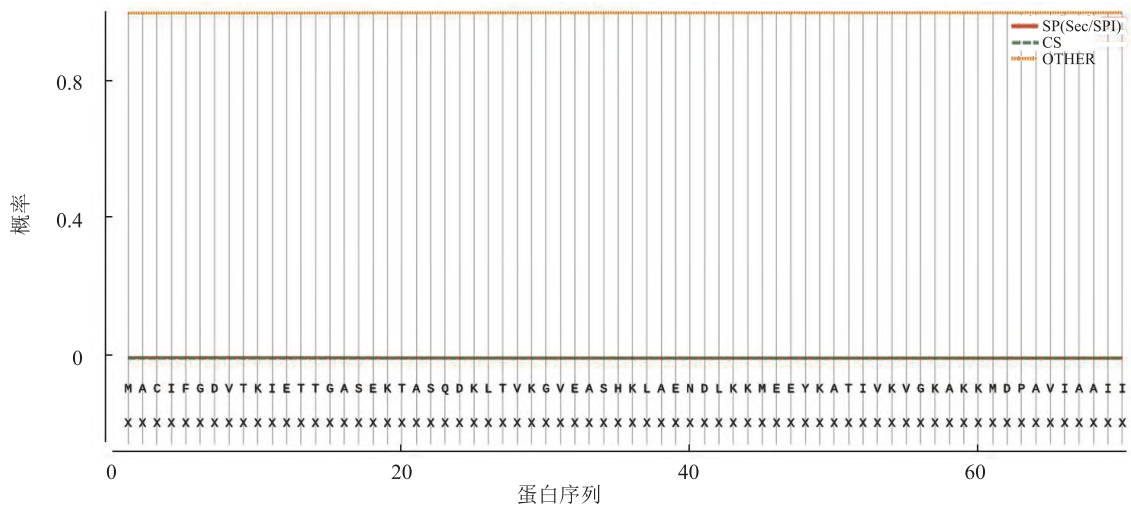


图2 GzLysG 的信号肽分析

条较深的裂缝,催化活性中心的3个残基均匀地分布在裂缝的两侧(图4B)。溶菌酶的这种特殊结构与其酶活性催化机制密切相关。

2.4 物种间溶菌酶的进化关联分析 基于溶菌酶

分子的蛋白序列,构建了扎那纹胸鲃与其他物种来源的溶菌酶的系统发生树。结果如图5所示,根据进化的亲缘关系,系统发生树可以被分为3个分支,c型溶菌酶,i型溶菌酶和g型溶菌酶。其中,

GzLysG 与斑马鱼来源的溶菌酶表现出较近的亲缘关系,且与其他物种的 g 型溶菌酶聚为一支。此外,通过进化发生树,还能发现不同物种的 g 型溶菌酶之间存在同一性高的特点,即使是同一物种的 g 型

和 c 型溶菌酶也存在各自的同一性和差异性。

**2.5 GzLysG 基因的组织表达谱分析** 以  $\beta$ -actin 基因为内参,利用实时定量 PCR 检测了 GzLysG 基因在扎那纹胸鲃不同组织中的表达情况。结果如图

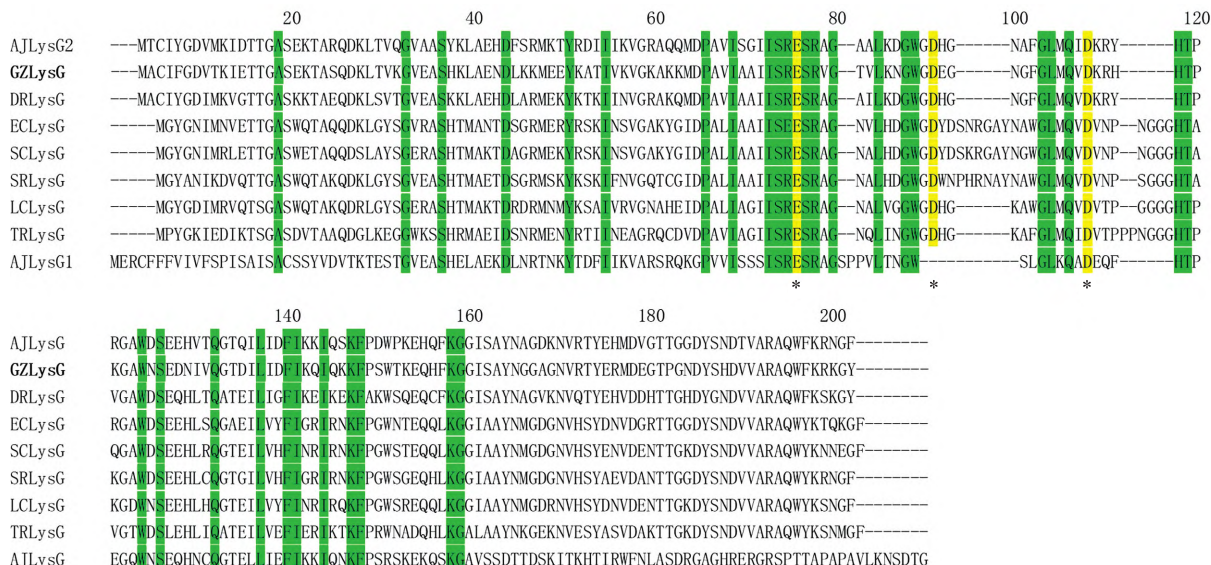
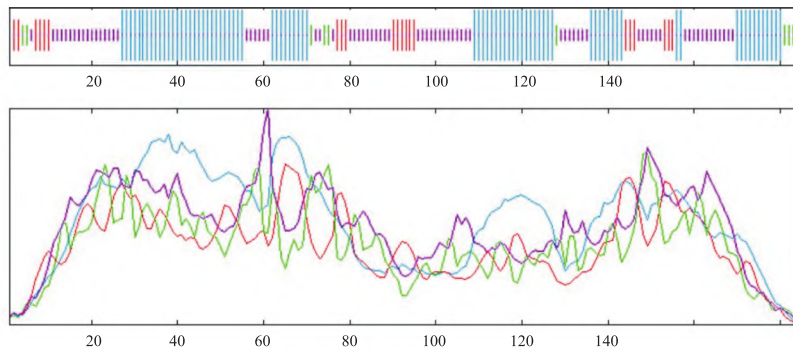


图3 GzLysG 与其它代表性 g 型溶菌酶的多物种序列比对  
绿色阴影为高度保守的氨基酸,黄色阴影和星号指示催化位点残基

- A  $\alpha$ -螺旋 (Hh) : 80 (43.24%)
- $3_{10}$  螺旋 (Gg) : 0 (0.00%)
- $\pi$ -螺旋 (Ii) : 0 (0.00%)
- $\beta$ -桥 (Bb) : 0 (0.00%)
- 延伸链 (Ee) : 21 (11.35%)
- $\beta$ -转角 (Tt) : 9 (4.86%)
- 弯曲区域 (Ss) : 0 (0.00%)
- 无规则卷曲 (Cc) : 75 (40.54%)
- 模糊状态 (?) : 0 (0.00%)
- 其他状态 : 0 (0.00%)



B

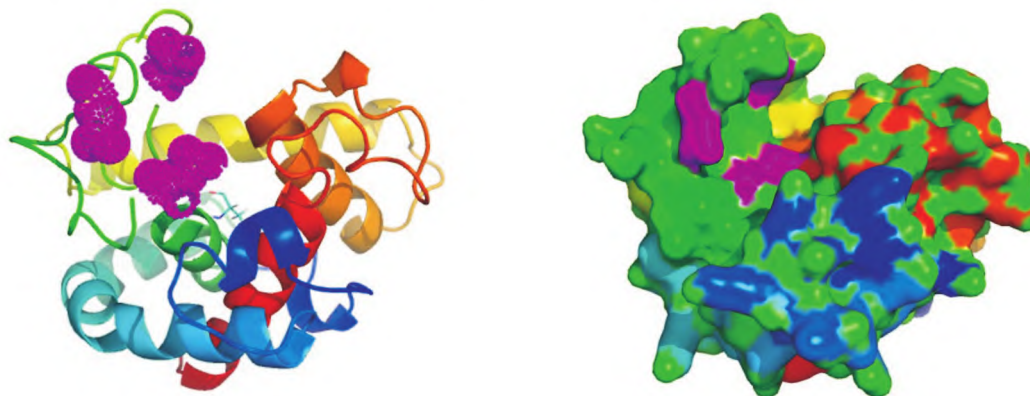


图4 GzLysG 的结构预测结果

A: GzLysG 的二级结构预测结果;B: GzLysG 的 3D 结构模型;催化位点残基 Glu(73)、Asp(86) 和 Asp(97) 以点和洋红色表示

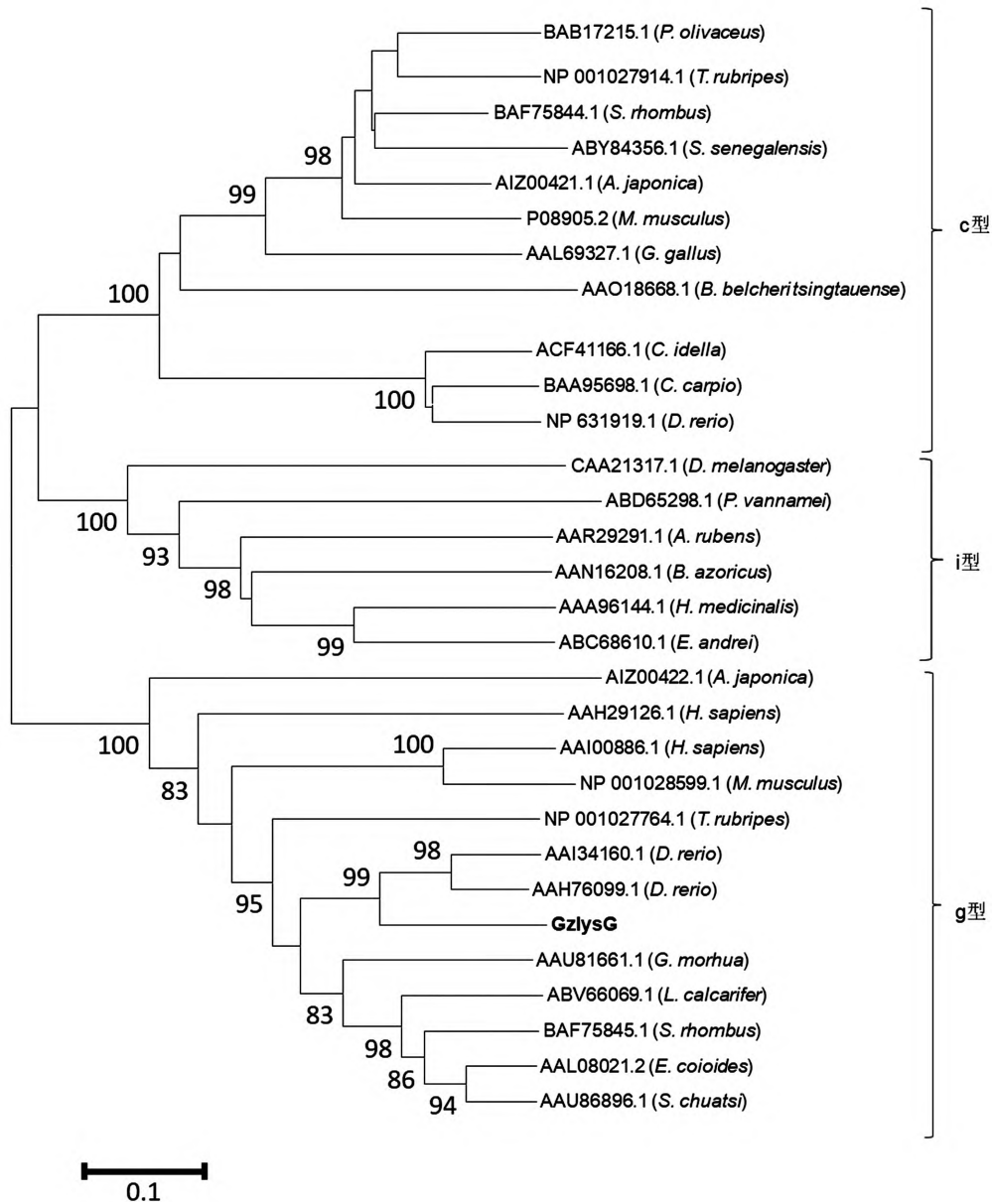


图5 GzLysG的进化分析

6所示,GzLysG基因在多个组织中均有表达,其在不同待检组织中的表达量差异性较大。GzLysG基因在皮肤中的表达量最高,表达量约为在肠中表达量的633倍;在肌肉和鳃中的表达量次之,分别为在肠中表达量的476和81倍;其在肝脏、脾脏和肠中的表达量较低。

### 3 讨论

近年来,随着水产养殖生态环境的恶化,鱼类病害发生率居高不下。水产养殖对于抗生素的过度依赖已在全球范围内造成了严重的微生物耐药性问题。因此,提高鱼类自身免疫防御能力,研发安全高

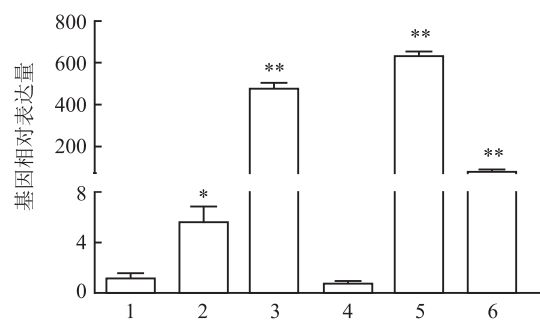


图6 GzLysG mRNA在扎那纹胸鲃不同组织中的相对表达量  
1:肠;2:肝脏;3:肌肉;4:脾脏;5:皮肤;6:鳃;以β-actin基因为内参,与肠组织比较:\* P<0.05,\*\* P<0.01

效的抗生素替代品,是鱼类疾病防控的未来研究方向<sup>[8]</sup>。相较于特异性免疫,非特异性免疫系统在鱼类抵抗病原菌时发挥更为重要的作用<sup>[10]</sup>。作为宿主重要的非特异性免疫因子,鱼类溶菌酶因具有广谱、高效、生物安全的抗菌活性在防治水生动物病害方面展现出良好的应用前景<sup>[2,10]</sup>。本研究通过基因克隆和生物信息学方法获得一条扎那纹胸鲌溶菌酶 GzLysG 的编码序列。GzLysG 具有 g 型溶菌酶典型的结构特征,含有 3 个保守的活性催化位点、GEWL 结构域和 SLT 结构域。研究<sup>[2]</sup>发现,二硫键的存在有助于维持溶菌酶的结构稳定性,而 g 型溶菌酶中二硫键数目会因物种不同存在很大的变化。鸟类和哺乳动物 g 型溶菌酶均含有 4 个保守的半胱氨酸,可形成 2 个稳定的二硫键。鱼类中,大西洋鲑鱼中 g 型溶菌酶有 3 个半胱氨酸<sup>[11]</sup>,大菱鲂和日本鳊中 g 型溶菌酶有 2 个半胱氨酸,但不能形成二硫键<sup>[12]</sup>,而鲤鱼、牙鲆、条石鲷等多数鱼类中 g 型溶菌酶均无半胱氨酸。本研究中,GzLysG 序列中仅存在 1 个半胱氨酸残基。二硫键的缺失将会影响 g 型溶菌酶的结构特性,在温度变化时其活性也会改变,推测鱼类 g 型溶菌酶还存在其他维持结构稳定的机制。

除了抗菌活性,一些溶菌酶还被报道具有免疫调节、抗肿瘤、消化等功能<sup>[13-14]</sup>。GzLysG 是一种偏碱性的亲水性蛋白,无信号肽,编码该蛋白的氨基酸中以赖氨酸含量最高,说明 GzLysG 主要为胞内起抗菌活性的溶菌酶。值得注意的是,GzLysG 虽与斑马鱼 DRLysG、日本鳊 AJLysG2 具有较高的同源性,但与二者的组织表达模式差异明显。DRLysG 和 AJLysG2 被报道在鳃和免疫器官如肝脏、脾脏中具有较高的表达量<sup>[12]</sup>。而 GzLysG 基因虽在肠、肝脏、脾脏这些免疫器官中均有被检测到,但其在皮肤和肌肉组织中表达量最高,鳃中次之。鱼类的皮肤、鳃和肌肉等是阻挡病原菌入侵的重要机械屏障,也是参与其免疫应答反应的重要组织器官。GzLysG 基因在这些免疫相关组织中的高表达,提示了该溶菌酶在扎那纹胸鲌固有免疫防御中发挥着重要作用。

通过转基因技术转入溶菌酶基因,可获得抗病能力强的转基因鱼<sup>[8]</sup>。将溶菌酶作为饲料添加剂应用于水产养殖,可提高鳊鱼、草鱼等的生长性能和抗感染能力。将溶菌酶与凝结芽孢杆菌、丁酸梭菌等益生菌,与寡糖、中草药、植物精油、抗菌肽等功能性饲料添加剂共同使用,均具有良好的协同增效效果,是优秀的抗生素替代组合方案。本文克隆了

GzLysG 的 cDNA 序列,并对其分子结构特征、组织表达谱等进行了分析,初步探讨了 GzLysG 在扎那纹胸鲌先天免疫防御中的作用。该研究有助于扎那纹胸鲌的人工科学养殖,未来课题组将进一步围绕 GzLysG 的功能和作用机制开展研究。

### 参考文献

- [1] 陈华,林晨韬,陈曦,等. 斑马鱼 g 型溶菌酶基因序列分析及其原核表达[J]. 南方农业学报, 2022, 53(1): 229-37.
- [2] Jiang L, Li Y, Wang L, et al. Recent insights into the prognostic and therapeutic applications of lysozymes[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 767642.
- [3] Mohapatra A, Parida S, Mohanty J, et al. Identification and functional characterization of a g-type lysozyme gene of *Labeo rohita*, an Indian major carp species[J]. *Dev Comp Immunol*, 2018, 92: 87-98.
- [4] Sun B J, Wang G L, Xie H X, et al. Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in *Escherichia coli*[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2/3/4): 106-13.
- [5] Zhang S H, Xu Q Q, Boscaro E, et al. Characterization and expression analysis of g- and c-type lysozymes in dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 76: 260-5.
- [6] Larsen A N, Solstad T, Svineng G, et al. Molecular characterisation of a goose-type lysozyme gene in atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(1): 122-32.
- [7] Zheng H T, Gong Y, Chen F, et al. Length-weight relationships for nine fishes in the nujiang river, southwest of China[J]. *J Appl Ichthyol*, 2018, 34(5): 1258-60.
- [8] 王美娟,刘丹丹,乔丹,等. 鱼类 g 型和 c 型溶菌酶及其在渔业生产上的应用[J]. 水产科学, 2014, 33(3): 195-200.
- [9] Liu Q N, Xin Z Z, Zhang D Z, et al. Molecular identification and expression analysis of a goose-type lysozyme (LysG) gene in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 58:423-8.
- [10] Saurabh S, Sahoo P K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system[J]. *Aquac Res*, 2008, 39(3): 223-39.
- [11] Myrnes B, Seppola M, Johansen A, et al. Enzyme characterisation and gene expression profiling of Atlantic salmon chicken- and goose-type lysozymes[J]. *Dev Comp Immunol*, 2013, 40(1): 11-9.
- [12] 杨勇,黄贝,黄文树,等. 日本鳊的 C 型和 G 型溶菌酶研究[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4): 807-18.
- [13] Zigdon M, Bel S. Lysozyme: a double-edged sword in the intestine [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(12): 1054-6.
- [14] Ferraboschi P, Ciceri S, Grisenti P. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(12): 1534.

## Molecular characterization and tissue expression of g-type lysozyme in *glytothorax zanaensis*

Wang Yunjiao, Lv Meng, Cai Shasha

[ Graduate School, Shandong First Medical University(Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250000 ]

**Abstract Objective** To identify and characterize the g-type lysozyme in *G. zanaensis* and analyze its role in host immune system. **Methods** GzLysG cDNA sequence was cloned by Nest PCR technology. Bioinformatics analysis of the GzLysG protein was carried out by ExPASy, SignalP 5.0, CDD, Cluster Omega and other online software. The GzLysG gene expression pattern in *G. zanaensis* tissues was detected by RT-qPCR. **Results** The results showed that open reading frame of GzLysG cDNA was 558 bp in length, encoding 185 amino acids. The molecular weight and theoretical isoelectric point of the reduced protein was 20 478.20 and 9.16, respectively. GzLysG was predicted to be a basic and hydrophilic protein, had no signal peptide and contained the typical catalytic active site, GEWL domain and SLT domain of g-type lysozyme. Advanced structural analysis revealed that GzLysG protein was mainly composed of  $\alpha$ -helix and random coil. There was a long and narrow crack on GzLysG molecular surface which was closely related to lysozyme activity. Lysozyme was highly conserved in evolution, with GzLysG showing a close topologic relationship with lysozyme from *Danio rerio*. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis indicated that GzLysG ubiquitously existed in all examined tissues, with higher mRNA expression levels observed in skin, muscle and gill. **Conclusion** All those results suggest that GzLysG plays a key role in *G. zanaensis* immune defensive system.

**Key words** *G. zanaensis*; g-type lysozyme; bioinformatics analysis; tissue expression profile

(上接第 710 页)

alcohol liquid diet to establish alcoholic liver injury model. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver index were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver. The relative expression levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expressions of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 and NF- $\kappa$ B p50 in liver were detected by Western blot. **Results** The serum ALT, AST vitality, liver index and hepatic TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA in EtOH group were significantly higher than those in Control group. EtOH group disorganized hepatocyte and hepatic lobules boundary was not clear, and the hepatocytes showed apparent inflammatory cells infiltration of liver cells and fat cavitation. NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p50 protein expression increased significantly. Compared with EtOH group, the serum ALT, AST vitality, liver index and hepatic TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA in EtOH + VitD<sub>3</sub> group decreased significantly. The pathological staining results showed that inflammatory cells infiltration and decrease in the number of fat vacuoles, and the liver cells returned to normal liver cell structure. At the same time the NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p50 protein expression level decreased significantly. **Conclusion** Vitamin D<sub>3</sub> has a certain protective effect on alcohol-induced liver injury in mice, and its main mechanisms are related to the inhibition of NF- $\kappa$ B pathway and the reduction of inflammatory response.

**Key words** vitamin D<sub>3</sub>; alcoholic liver injury; NF- $\kappa$ B pathway; inflammation