

[引用格式] 张志新, 黄丹妮, 陈依婷, 等. 大黄鱼 *cd22* 基因的克隆、表达及抗体制备[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2026, 31(1): 1-15. DOI: 10.19715/j.jmuzz.2026.01.01.

大黄鱼 *cd22* 基因的克隆、表达及抗体制备

张志新^{1,2}, 黄丹妮^{1,2}, 陈依婷², 敖敬群^{2,3}, 黄文树¹

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 自然资源部第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005;

3. 福建农林大学海洋学院、福建省海洋生物技术重点实验室, 福建 福州 350002)

[摘要] 克隆得到了大黄鱼 *cd22* (*Larimichthys crocea cd22*, *Lccd22*) 的基因序列。其 ORF 全长含 1941 个核苷酸, 编码 646 个氨基酸, 具有典型的 I 型膜蛋白结构和特征性的 CD22 蛋白结构域, N 端有 20 个氨基酸组成的信号肽, 胞质区内有 2 个 Ig 超家族结构域、2 个 Ig C2 结构域和 1 个 Ig-like 结构域, 胞质尾部有两个酪氨酸免疫受体抑制基序 ITIM。大黄鱼 *cd22* 基因具有 20 个外显子和 19 个内含子, 在染色体上与 *scx* 和 *hpn* 等基因相邻。大黄鱼 *cd22* mRNA 在体外分离培养的原代 IgM⁺ B 淋巴细胞和粒细胞中转录水平较高。在大肠杆菌中重组表达并纯化获得了重组大黄鱼 *cd22* 去信号肽胞外段, 利用其制备了特异性抗大黄鱼 Cd22 的多克隆抗体, 该抗体可识别体外分离培养的原代大黄鱼头肾淋巴细胞表面的天然 Cd22 蛋白。

[关键词] 大黄鱼; CD22; 分子特征; 头肾淋巴细胞; 抗体

[中图分类号] S 917.4 [文章编号] 1007-7405(2026)01-0001-15 DOI: 10.19715/j.jmuzz.2026.01.01

Molecular Cloning, Expression and Antibody Production of Large Yellow Croaker *cd22*

ZHANG Zhixin^{1,2}, HUANG Danni^{1,2}, CHEN Yiting², AO Jingqun^{2,3}, HUANG Wenshu¹

(1. Fishery College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources,

Third Institute of Oceanography, Ministry of National Resources, Xiamen 361005, China;

3. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Fujian Province & College of Marine Sciences,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this study, the large yellow croaker *cd22* (*Larimichthys crocea cd22*, *Lccd22*) was cloned and characterized. The open reading frame (ORF) of *Lccd22* contains 1941 nucleotides, encoding a protein with 646 amino acids. The *Lccd22* exhibited a typical structure of type I transmembrane protein as well as the characteristic CD22 signature motif with a signal peptide, a transmembrane domain, an intracellular region containing two Ig domains, two Ig C2 domains and an Ig-like domain. In the cytoplasmic tail, there are two conserved typical immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs). The *Lccd22* shares a similar genomic structure and gene synte-ny with other teleost *cd22*, but are quite different from that of mammalian *CD22*. The mRNA of *Lccd22* was highly

[收稿日期] 2024-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (42076104)

[通信作者] 黄文树, 教授, 博导, 从事水产病害防控研究, E-mail: wshuang@jmu.edu.cn;

敖敬群, 教授, 博导, 从事海洋鱼类分子免疫研究, E-mail: ajingqun2003@aliyun.com

transcribed in *in vitro* cultured primary granulocytes and IgM⁺ B lymphocytes. The recombinant *Lccd22* was expressed, purified in *E. coli* and was used as antigen to produce the specific polyclonal antibody against *LcCd22*, which could recognize the native *LcCd22* on the membrane of *in vitro* cultured primary head kidney lymphocytes.

Keywords: large yellow croaker; CD22; molecular characteristic; head kidney lymphocyte; antibody

0 引言

CD22, 又称为 Siglec-2, 是一种与 B 淋巴细胞抗原受体 (B-cell antigen receptor, BCR) 相关的 I 型跨膜蛋白, 为唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 (Siglecs) 家族成员, 广泛表达于成熟 B 淋巴细胞中, 可与 α -2, 6 唾液酸连接的糖蛋白结合, 参与细胞间黏附、信号转导、胞内信号的调节, 为 B 淋巴细胞的活化提供共刺激信号^[1]。哺乳动物 CD22 最初被认为是起负调控作用的抑制性受体, 其胞质区酪氨酸免疫受体抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIM) 中的酪氨酸可在 BCR 激活早期迅速磷酸化从而减弱 BCR 信号, 抑制免疫系统的过度激活和自身免疫疾病的发生^[2]。后续研究发现 CD22 也可正向调控 B 淋巴细胞抗原受体信号通路。CD22 缺陷小鼠的 B 细胞表现出慢性炎症的细胞表面表型和增强的细胞内钙反应特征, 如同酪氨酸磷酸酶 SHP-1 缺陷小鼠的表型一样, 说明 CD22 在未受抗原刺激时负调控抗原-受体信号传导^[3]。然而, 与 IgM 的长时间交联激活 CD22 缺陷型 B 淋巴细胞, 可导致 B 细胞适度增殖, 这表明 CD22 在抗原存在时可正向调控抗原-抗体信号传导^[4-5]。在用胸腺依赖性 I 型抗原免疫时, CD22 缺失的小鼠体内抗体的产生显著减少^[6], 这也表明 CD22 在 BCR 介导的信号转导中发挥正向调控作用。

有研究^[7-11]表明, 不依赖于 BCR 的 TLR 信号传导可诱导并增强 B 淋巴细胞的增殖、抗原呈递和免疫球蛋白产生, 而 CD22 可组成型地负调控 B 淋巴细胞内的 TLR 信号传导。CD22 缺陷型小鼠的 B 淋巴细胞在受到 TLR 家族成员配体 Poly (I:C)、LPS、CpG 刺激时 B 淋巴细胞的增殖大大增强, 在该细胞中过表达 CD22 可抑制这一增殖加强, 一旦 CD22 抗体耗竭, CD22 又可使增殖恢复^[12-13]。与这一现象伴随的是 CD22 缺陷型小鼠体内 T 淋巴细胞活化必须的共刺激分子 CD86 与 MHC II 型分子的表达上调, 而非 TLR3、TLR4 与 TLR9 的表达增加^[13]。CD22 与自身抗原的结合可增强其与 TLR7 在内体中的结合, 从而促进其对 TLR7 信号传导的抑制^[14]。因此, CD22 可同时调控 B 淋巴细胞中介导先天性免疫与适应性免疫信号传导的受体。

牙鲆 *cd22* 和半滑舌鳎 *cd22* 都具有 CD22 分子家族的 B 细胞共受体序列和结构特点, 与淋巴细胞的增殖和胞吞作用相关。尼罗罗非鱼 *cd22* 在 HEK-293T 细胞中的过表达会显著增强 NF- κ B 转录因子的活性, 在 FHM 细胞中可抑制 *ifn1* 和 *ifn3* 的表达, 激活 STAT1。这意味着其可与配体相互作用, 抑制干扰素信号通路, 并可能与下游的 *ifn1* 和 *ifn3* 反应的相应模式识别受体活性有关^[15]。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国重要的海水经济鱼类, 广泛分布于我国沿海地区。随着大黄鱼养殖业的快速发展, 由病毒、细菌和寄生虫引发的疾病频频暴发, 给大黄鱼产业造成了巨大的经济损失^[16-17], 而传统药物治疗又会引发环境污染、病原菌耐

药性增强、抗生素残留超标等次生问题。在这种背景下, 深入研究大黄鱼免疫系统的功能及机制, 尤其是 *cd22* 等关键免疫调控分子的功能, 对于开展免疫治疗、进行病害防控具有重要的现实意义。前期研究已经获得了抗大黄鱼 IgM 的单克隆抗体, 可用于 IgM⁺ B 淋巴细胞的识别与分选^[18]。在此基础上, 克隆鉴定 B 淋巴细胞辅助分子 Cd22, 研究其分子特征, 制备获得可用于其功能研究的多克隆抗体, 将有助于阐明 Cd22 在大黄鱼淋巴细胞功能及信号传导过程中的作用, 为深入认识鱼类细胞免疫并应用于病害防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用大黄鱼购自福州市洪山桥菜市场, 鱼体长 (32.5 ± 2.5) cm、体重 (500 ± 50) g。原核表达载体 pET-28a、真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 *E. coli* BL21、DH5α 菌株购自上海生工生物工程有限公司; HEK-293T 细胞购自中国典型培养物保藏中心 (China center for type culture collection, CCTCC), 由本实验室保存。

MS 222、细胞培养用的 L-15 培养基、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 FBS 等购自 GIBCO 公司; 原代免疫细胞分离与分选用的 Percoll、MACS Running Buffer、anti-FITC 免疫磁珠及 LS 柱等购自德国美天妮生物技术公司。

FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂逆转录试剂盒、连接试剂盒 (DNA Ligation Kit) 购自天根生化科技北京有限公司; 胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 和质粒提取试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 购自美国 Omega Bio-Tek 公司; 各种限制性内切酶、DL2000 Marker、DL5000 Marker、pMD19-T 载体、PrimeSTAR[®] 高保真 *Taq* 酶、dNTPs 购自 Takara 公司; TRIzol[™] 购自美国 Invitrogen 公司; Poly (I:C) 购自 Sigma 公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自 OXOID 公司; 其他试剂和药品均为分析纯, 购自上海生工生物工程有限公司或西陇科学股份有限公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 大黄鱼 *cd22* 基因克隆

根据本实验室前期所测得的大黄鱼全基因组序列信息, 设计扩增 *Lccd22* ORF 序列的引物 *cd22*-1-F (F: 5'-CTGCTCTGTTTGACTGACTG-3')、*cd22*-1-R (R: 5'-AGCAATCAAATA-AGCCTGT-3'), 以大黄鱼头肾 cDNA 为模板, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增得到 *Lccd22* 的开放阅读框 (ORF) 序列, 连接到 pMD19-T 载体后送至上海生工生物工程有限公司测序。具体步骤参照前人实验方法^[19]。

1.2.2 序列及结构分析软件

使用 NCBI 网站中的 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行氨基酸序列的预测、一致性分析及多序列比对; 使用 Expasy 在线工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测大黄鱼 Cd22 的相对分子质量、等电点等; 通过 SignalP 在线软件预测分析大黄鱼 Cd22 的信号肽 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>); 通过 SMART 在线软件 (http://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 进行蛋白结构域分析; 运用 NetNGlyc-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>)

dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/) 在线预测其潜在的糖基化位点; 在 GenBank 中搜索不同物种来源的 *CD22* 基因组序列信息, 使用 Splign 在线软件进行基因组结构分析 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi?textpage=online&level=form>); 通过 Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv>) 进行基因共线性分析。采用 MEGA10 软件, 选择 Neighbor-Joining 模型, 构建不同物种来源的 *CD22* 氨基酸序列的系统进化树, Bootstrap 值设为 1000^[20]。

1.2.3 原代头肾免疫细胞的体外分离与培养

将健康大黄鱼用 MS 222 麻醉后, 从尾静脉抽去血液, 解剖大黄鱼并取出头肾, 置于 75% 乙醇中杀菌 30 s, 随后快速转移至无菌 $1 \times \text{PBS}$ 溶液中漂洗 3 遍, 遂浸润在含 12.5 U/mL 肝素钠的 L-15 培养液中, 置于 70 μm 的细胞滤网中研磨, 获得头肾单细胞悬液。按照本实验室已建立的方法^[21]分离原代巨噬细胞、粒细胞及淋巴细胞, 所有细胞分离后均置于含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基中, 放入 CO_2 培养箱 28 $^\circ\text{C}$ 培养。用本实验室制备的特异性抗大黄鱼 IgM 的单克隆抗体, 按文献 [18] 方法, 从原代头肾淋巴细胞中分离获得 $\text{IgM}^+ \text{B}$ 淋巴细胞及除此之外的 IgM^- 头肾淋巴细胞。

分离得到的免疫细胞按每 10^6 细胞加入 1 mL TRIzolTM 试剂, 于冰上充分匀浆/裂解后, 按照 Invitrogen 公司产品说明提取细胞总 RNA, 用 DEPC 水溶解 RNA。根据 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂逆转录试剂盒说明书, 进行 cDNA 模板的制备。

1.2.4 *Lccd22* 在大肠杆菌中的重组表达、纯化及特异性抗体制备

根据 1.2.1 中测得的 *Lccd22* ORF 序列, 设计引物 pET-28a-*cd22*-F (5'-GTTGTGGTTCATAACGGATCCATGAGGTGGAGTGTGACA-3')、pET-28a-*cd22*-R (5'-GATGTCGTTTCAGACCCTCGAGCTTAAGACGACCTCTGAC-3') 进行 PCR 扩增, 获得 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码区, 通过 *Bam*HI/*Xho*I 双酶切连接至原核表达载体 pET28a, 获得重组表达载体 pET28a-*Lccd22*, 转化 *E. coli* BL21 宿主菌后获得原核工程菌 BL21/pET28a-*Lccd22*。该工程菌在 37 $^\circ\text{C}$ 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后, 离心收集菌体, 用 $1 \times \text{PBS}$ 重悬, 置于冰上超声破碎, 离心分离超声后, 对上清与沉淀分别进行 SDS-PAGE 与 Western-blot 分析, 检测 *Lccd22* 的重组表达情况。

确认 *Lccd22* 去信号肽胞外段在工程菌中正确表达后, 按同样条件大量诱导培养工程菌 BL21/pET28a-*Lccd22*, 离心收集菌体, 在变性条件下按 Invitrogen 公司 ProBondTM 镍螯合树脂产品说明书获得纯化的 *LcCd22* 重组蛋白, 将其送至上海吉尔生化有限公司作为抗原免疫新西兰兔, 制备特异性抗 *LcCd22* 的多克隆抗体。

1.2.5 *Lccd22* 在 HEK-293T 细胞中的重组表达及抗体特异性检测

为检测兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体的特异性, 设计引物 pcDNA3.1-*cd22*-F (5'-GAATTCATGAGGTGGAGTGTGACA-3') 和 pcDNA3.1-*cd22*-R (5'-AAGCTTCTTAAGACGACCTCTGAC-3'), 扩增 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码序列并克隆至真核表达载体 pcDNA3.1, 获得重组表达质粒 pcDNA3.1-*Lccd22*。随后, 在碧云天公司 Lipofectamine 8000TM 脂质体转染试剂的介导下, 转染体外培养的 HEK-293T 细胞, 48 h 后收集并裂解细胞, 取细胞总蛋白制样进行 SDS-PAGE 分析, 并分别以鼠抗 His-tag 单抗和兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体为一

抗同时进行 Western-blot 检测, 比较两种抗体的检测结果, 以确定兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体能否识别变性 *LcCd22* 蛋白。同时以转染空载体 pcDNA3.1 的 HEK-293T 细胞为阴性对照。

1.2.6 免疫荧光实验

吸弃体外分离培养的大黄鱼原代头肾淋巴细胞的培养液, 加入 4% 多聚甲醛 (1 × PBS 配置) 溶液悬浮细胞, 在室温下固定 10 min, 离心收集细胞, 用 3% BSA 溶液封闭 30 min 后, 加入 100 μL 含 2% BSA 的 1 × PBS 溶液重悬, 随后加入终质量浓度为 500 ng/mL 的兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体, 于 4 °C 孵育 1 h, 与 Alexa Fluor[®]488 标记的羊抗兔二抗 (1:400 稀释) 于 4 °C 避光孵育 1 h, 用 DAPI (2 μg/mL) 避光染色。每次处理后均用 1 × PBS 溶液洗涤 3 次。最后将细胞滴在载玻片上, 并加入适量的抗淬灭剂, 盖上盖玻片在激光共聚焦显微镜下进行观察。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼 *cd22* 的分子特征及多序列比对分析

大黄鱼 *cd22* 的 ORF 全长 1941 bp, 编码一条由 646 个氨基酸组成的蛋白多肽 (GenBank 登录号: XP 019112357.1), 含胞外段 (1—499 aa)、跨膜区 (500—522 aa) 和胞质区 (523—646 aa), N 端有 20 个氨基酸组成的信号肽。其理论相对分子质量约为 70.80 ku, 预测的等电点 (PI) 为 9.11, 有 4 个潜在的 *N*-糖基化位点 (N³⁰⁹、N³³⁴、N³⁶⁶、N⁴³⁷)。SMART 在线分析显示 *LcCd22* 含有 2 个 Ig 超家族结构域 (28—135 aa、322—401 aa)、2 个 Ig C2 结构域 (238—299 aa、418—483 aa) 和 1 个 Ig-like 结构域 (146—230 aa), 在胞质尾部有两个 ITIM 基序 (⁶⁰⁶VHYSKL⁶¹¹, ⁶³⁶VVYTLL⁶⁴¹), 与哺乳动物和其他鱼类 CD22 的结构相似 (见图 1~2)。

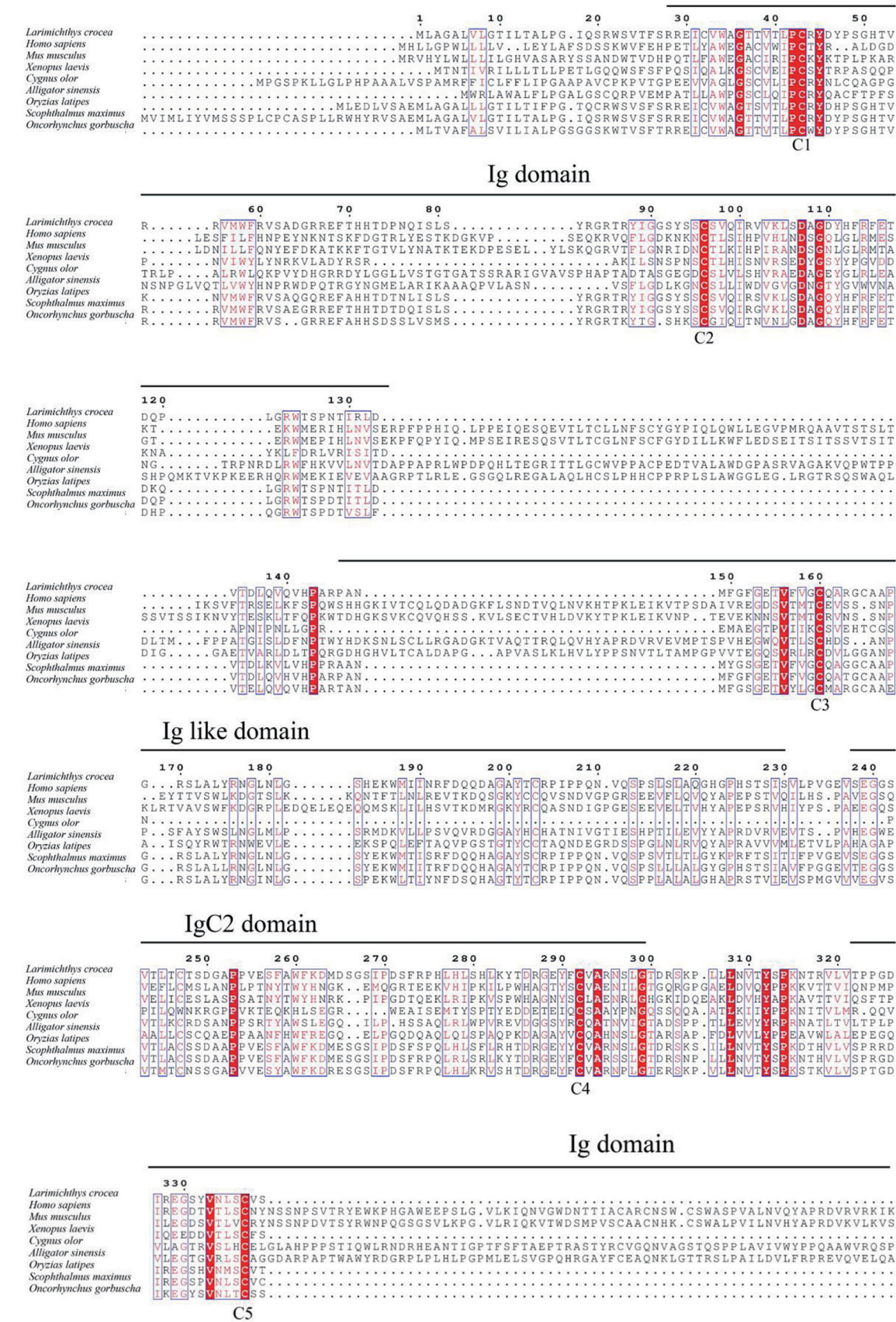
```
1    AAATCACCTCCATCACCAGTCGGGTCGTAGGCGTCCTTTAAACCCTGCTCTGTTTGACTGACTGAGCTGAATGAA
76   GATACTTTAAGGGAGCTTGTGTCAGCGGAGATGTTGGCAGGTGCGTTAGTTCTGGGCACCATCCTTACAGCTTTA
1    M L A G A L V L G T I L T A L
151  CCAGGTATCCAGAGCAGGTGGAGTGTGACATTTTCAAGGAGGGAGATCTGTGTGTGGGCAGGAACAACGTGCACT
16   P G I Q S R W S V T F S R R E I C V W A G T T V T
226  CTGCCCTGCCGTTATGACTACCCATCAGGTCATACTGTGAGGCGGGTCATGTGGTTCCGTGTGTCTGCAGACGGT
41   L P C R Y D Y P S G H T V R R V M W F R V S A D G
301  CGCAGAGAGTTCACTCACCACACTGACCCGAACCAGATCAGCCTCTCGTACCGTGGACGTACACGTACATCGGT
66   R R E F T H H T D P N Q I S L S Y R G R T R Y I G
376  GGCAGCTATTCCAGCTGTTCCGGTCCAGATTCCGGTTGTGAAACTGAGTGATGCAGGTGACTACCACCTTCAGGTTT
91   G S Y S S C S V Q I R V V K L S D A G D Y H F R F
451  GAGACAGACCAACCACTGGGAGATGGACCTCCCCTAACACCATCAGACTTGATGTAACAGACCTTCAGGTCCAG
116  E T D Q P L G R W T S P N T I R L D V T D L Q V Q
526  GTTCATCCAGCAAGACCTGCCAACATGTTGGCTTTGGAGAGACTGTGTTTGTGGGCTGCCAGGCCAGGATGT
141  V H P A R P A N M F G F G E T V F V G C Q A R G C
601  GCTGCTCCAGGAAGGAGTCTCGCACTGTACAGGAACGGACTGAACCTTGCTCGCATGAGAAGTGGATGATAATC
166  A A P G R S L A L Y R N G L N L G S H E K W M I I
676  AACCGCTTTGACCAGCAGGATGCTGGAGCGTACACCTGTCGTCCAATCCCACCACAGAATGTCCAGTCACCATCA
191  N R F D Q Q D A G A Y T C R P I P P Q N V Q S P S
751  CTCTCTTGCCACAGGACACGGTCTCACTCCACCTCCATATCAGTGTTACCAGTGGGAGAGGTGTCCGAGGGG
216  L S L A Q G H G P H S T S I S V L P V G E V S E G
826  GGTTCGGTCACTCTGACCTGCACTAGTGATGGAGTCCACCTGTAGAGAGCTTTGCATGGTTCAAAGACATGGAC
```

241 G S V T L T C T S D G A P P V E S F A W F K D M D
901 AGTGGCAGCATCCCAGACAGTTTTAGGCCTCATCTGCACCTGTCCCACCTCAAATACAGACAGAGGAGAGTAC
266 S G S I P D S F R P H L H L S H L K Y T D R G E Y
976 TTCTGTGTCGCACGTAACTCGCTGGGAACAGACCGCTCCAAACCGCTTCTACTCAATGTCACTTACTCTCCAAAG
291 F C V A R N S L G T D R S K P L L L N V T Y S P K
1051 AACACGCGTGTGCTGGTGACTCCTCCAGGTGACATCAGGGAAGGATCATATGTAAACCTGAGCTGTGTCAGCCAC
316 N T R V L V T P P G D I R E G S Y V N L S C V S H
1126 GCCCACCCTCCTGCCAGCAGGTATGCTTGGTATCGTATCCTAGGAGACCAGGTGTTGGCTAAAGGAACCATCCAG
341 A H P P A S R Y A W Y R I L G D Q V L A K G T I Q
1201 AACCTGACTTTCCTGTAGTGCCTGCTCACCATGCTGGCCAGTACTACTGTACAGCATGGAACCGTTAGGATAC
366 N L T F P V V R A H H A G Q Y Y C T A W N R L G Y
1276 CAAACCTCCCTTGTACCACCCTCTCTATACTTTACCCTCCTAAGAACACCTCAGTTCTGGCTCGTCCCTCCAGT
391 Q T S L V T T L S I L Y P P K N T S V L A R P S S
1351 GTGGTAGATGCTGGTCGACCTTTGACCTTAACCTGCAGCAGTCAGGCCAACCCAGCAGTGGACAACCTTACATGG
416 V V D A G R P L T L T C S S Q A N P A V D N F T W
1426 CACCGATTAACCTCTGGACGGGGCTCTGTACAATCGTGGGGCACCAAGTCGGGTCTGTCTTCACCTTCTCAGAG
441 H R L T L D G G S V Q S W G T K S G P V F T F S E
1501 GTGGTCTCTGGAGAGAGCGGTCACTTACTGTGAGGCCAGGAATCGAATCGGAGTCCACAGCTCTCCTGTCTCTC
466 V G P G E S G Q Y Y C E A R N R I G V H S S P V L
1576 ACCGTACGAGTCAGAGGTCGTCTTAAGGTCATTGCCTTGGCTCAGCAGTAGCGGTGTCTGCTGGACTCATCACT
491 T V R V R G R L K V I A L A S A V G V S A G L I T
1651 CTCACAGTGCCATTATGATCAGTAAGAACATGCACAGAGTAGACATGGAGTCAGGAGAAGCAGCAAACAAGCGT
516 L T V A I M I S K N M H R V D M E S G E A A N K R
1726 CCGTCAGTGACAGCTGACACCATTGTTCTATGAGTCAGCCCAACAGACCTTTCAGTCAGAAAGGGCAAGATGTCC
541 P S V T A D T M F Y E S A Q Q T F P V R K G K M S
1801 GACATACCGGAAGAGCCAGAGGAGTTAAGTGACAGCTCCACCCCGCCATCGTCCCTCTGAAGGATGCTCCACCA
566 D I P E E P E E L S D S S H P A I V P L K D A P P
1876 ATCACAGAAGCTGAAAGTCACAGCCCTGCCCCTCACTACATCACTGTGCACTACTCCAAATATCCAGTGGGGAC
591 I T E A E S H S P A R N Y I T **V H Y S K L** S S G D
1951 CAGGTGCAGGTCCACAACCTGCCACTTGGCGGTGATAAAAGCCGAAGGATTCTCCAAAGTTGTTTACACGTTA
616 Q V Q V H N L P L G G D K K P K D S S K **V V Y T L**
2026 CTGCAACAACCTCACAAC**T**AAAAAGAGAAATCAGACCACAGAGCTGAACAACACATCAGCCTTCTCGTGTGAAC
641 **L** Q Q P H N *
2101 CAGTCGCTTTACATCCATTACCCAGAGAGGATTGTGGGACAGGAAATGACTCCTTGTGGACTCTGACGATGCCT
2176 TATGCTTTTCTGGGTCAGACATGTTGTGATGGATTCTCCACAGTTCATCAGACCATGAGGACAACATGTGGTCCC
2251 GGTCTCACTGGGAGTCCAGCTCTTAACTGAGTTGCATGTCTTTCCTTTTGTCTTACCATGTGTGCTGCC
2326 TGAGGAAGTAGAAATGCTTCAAAACAAAAAAGTTTAAAAAAGTAACGTTATGCTGTTGGTTGCTTGCGTTCA
2401 TATTCACAGTACAGACTATATCCGCTGCTGCTTTTGTAGTTGATAGTTGACACTGAAGTTCCTAACCCAGGTAATA
2476 TAGAAGACACAGTATTCCTGGTTGCTACAGCATTATTTGAAGCGTGTTCATCATTTGTATTACACATAGTTGTC
2551 TCTAATACACATGACATACTAGTAGAAAAAAGCTTTTGTACATCAATAAAGCATATGCAATATTTGCCACATATGAA
2626 TTTCCATAAAGCTTAAATTGTTAACAGGCTTATTTGATTGCTGATCCTCAACATTTATTCAATTGATAAAGCTT
2701 GCTTCCATGAAATCAATAAGCAATAATGTAGATATACATGTTGTGGTTTGCTACATTAAGAAAAAATAAAACAAT
2776 TACAATGGAACAAATGGTACGTTGAATGTATGGTGGATTTTCTCCAGTCAAC

灰色高亮表示起始密码子；双下划线加灰色高亮表示终止密码子；实线下划线部分为预测的信号肽序列；虚线下划线为预测的 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码序列；斜体加下划线序列为预测的跨膜区跨膜结构域；红色加粗序列为潜在的 *N*-糖基化位点；绿色高亮表示酪氨酸免疫受体抑制基序 ITAM。

图 1 *Lccd22* 的核苷酸序列与氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Lccd22*



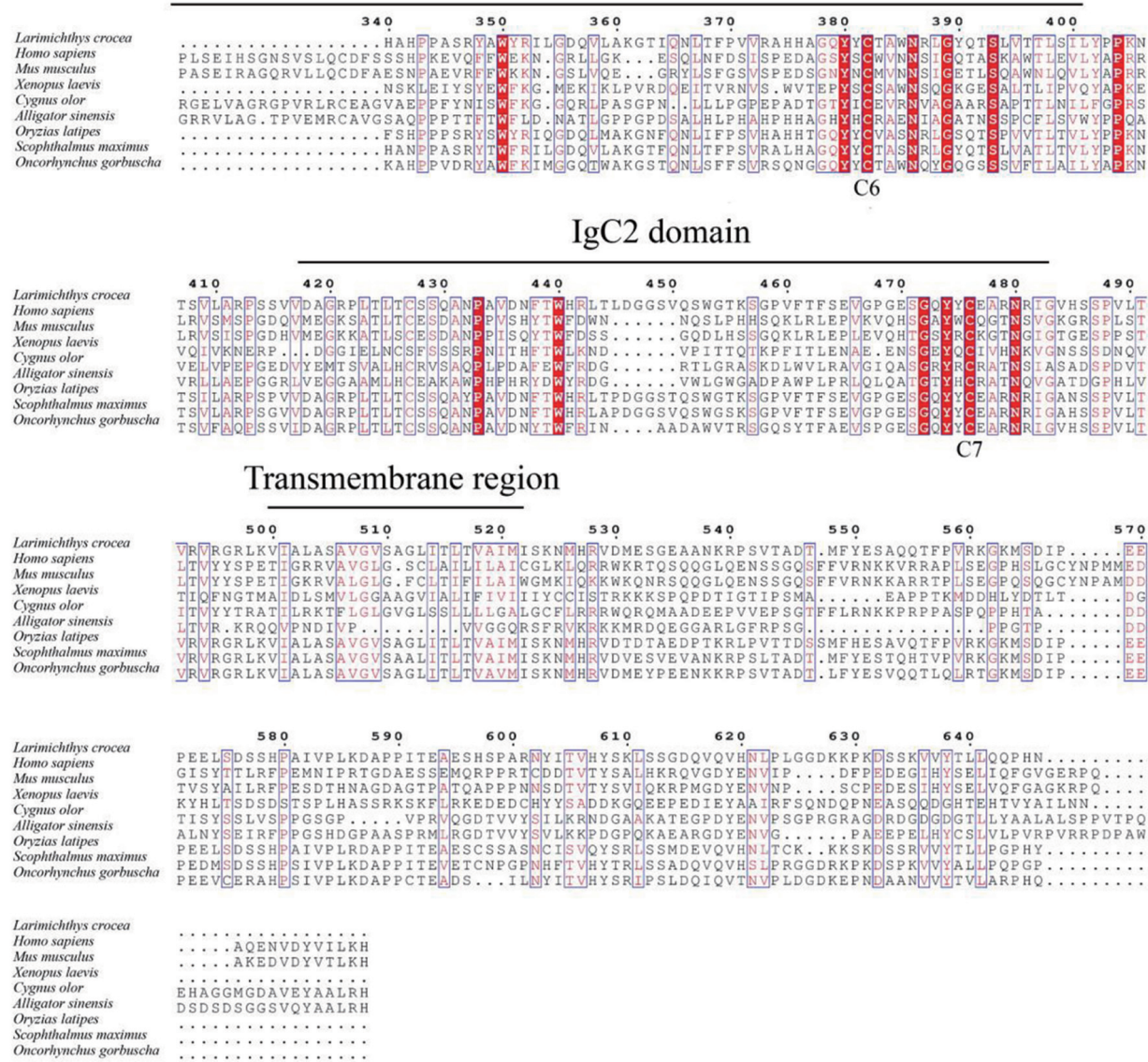


图 2 大黄鱼与其他物种 CD22 的氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequence comparison of CD22 from large yellow croaker and other species

2.2 大黄鱼 Cd22 的多序列比对及进化分析

将鱼类和其他物种来源的 CD22 氨基酸序列进行同源比对，结果显示：大黄鱼 Cd22 与低等软体动物、线虫、刺胞动物、哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类的 CD22 氨基酸序列一致性比较低，仅为 24.27% ~ 29.75%；但与其他硬骨鱼类 Cd22 的氨基酸序列一致性均在 60% 以上，其中与大菱鲆（*Scophthalmus maximus*）Cd22 的氨基酸序列一致性最高（87.89%）。

系统进化分析显示：所有物种的 CD22 聚为一支，其中哺乳动物、两栖动物 CD22 与鱼类来源的 Cd22 又各自聚为一支，而大黄鱼 Cd22 与大菱鲆 Cd22 的亲缘关系最近（见图 3）。

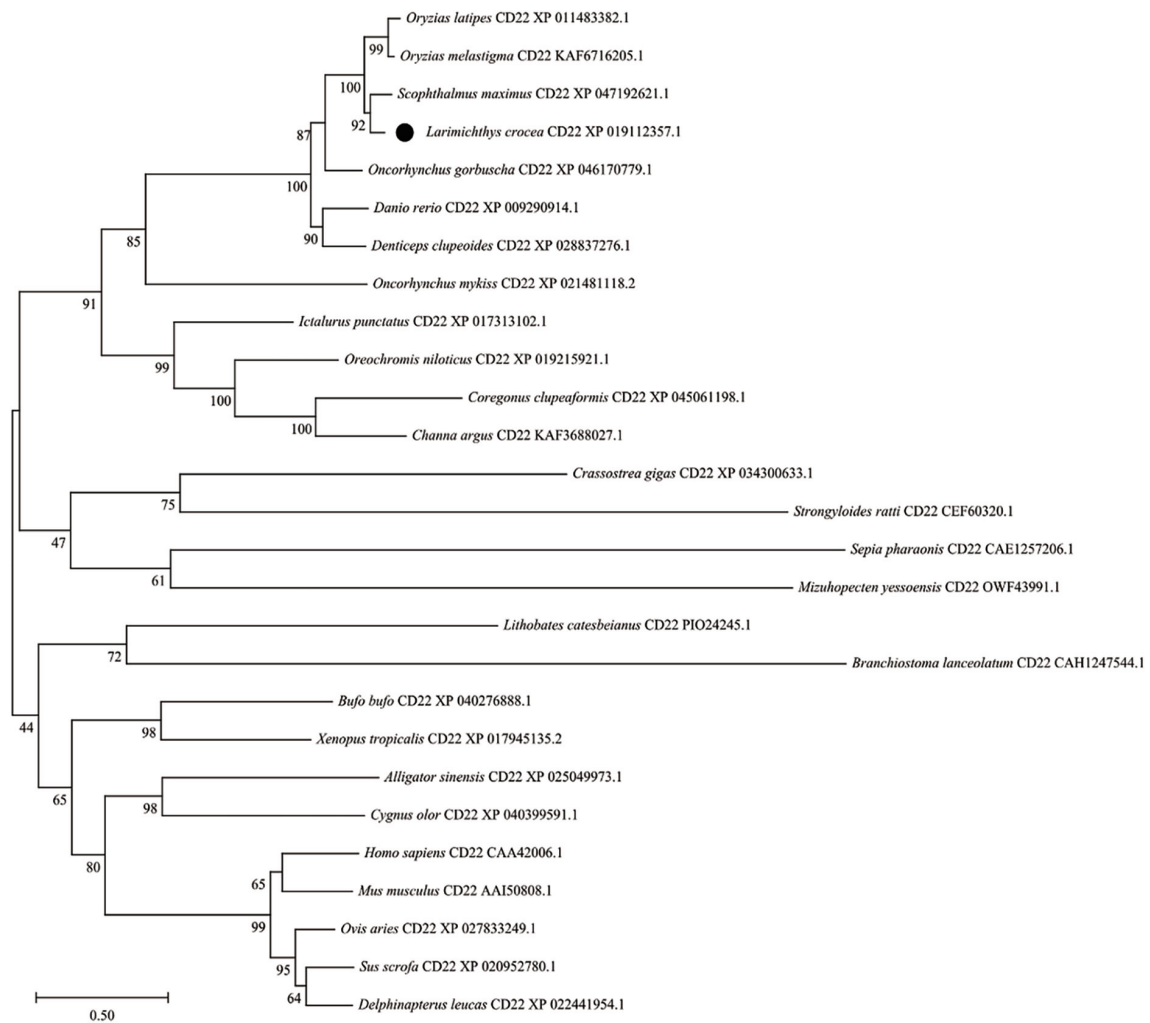


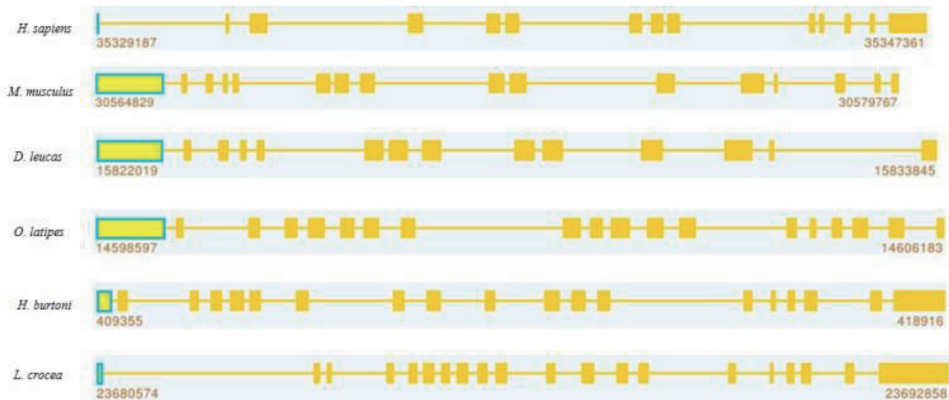
图 3 基于不同物种来源 CD22 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of CD22 from different species

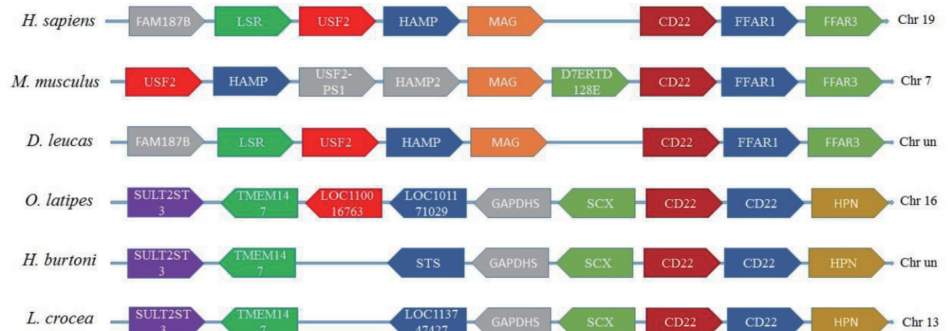
2.3 大黄鱼 *cd22* 的基因组结构分析和共线性分析

大黄鱼 *cd22* 基因组序列全长 12 285 bp (GenBank 登录号: NC_040023.1)。通过 Splign 在线软件对其基因组序列和扩增测得的 ORF 序列进行比对分析,发现 *LcCd22* 具有 20 个外显子和 19 个内含子,与青鳉 (*Oryzias latipes*)、伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*) *cd22* 的基因组结构基本类似。哺乳动物 *CD22* 的基因组结构与鱼类 *cd22* 的基因组结构差异较大,人 (*Homo sapien*) *CD22* 基因由 13 个外显子和 12 个内含子构成,小鼠 (*Mus musculus*) *CD22* 基因由 16 个外显子和 15 个内含子构成,白鲸 (*Delphinapterus leucas*) *CD22* 基因由 14 个外显子和 13 个内含子构成 (见图 4a)。

共线性分析结果显示 (见图 4b): 大黄鱼 *cd22* 在染色体上与 *scx* 和 *hpn* 等基因相邻,与其他硬骨鱼类 *cd22* 在染色体上的基因排列一致;人和其他哺乳动物的 *CD22* 在染色体上与 *FFAR1* 和 *FFAR3* 等基因相邻。这些结果表明: 大黄鱼 *cd22* 与其他鱼类 *cd22* 基因组结构相似,在基因组共线性上保守性较高;但与哺乳动物 *CD22* 基因组结构相差较大,并且在基因共线性上保守性较低。



a) 不同物种来源的 *CD22* 基因组结构分析



b) 不同物种来源的 *CD22* 基因共线性分析

所用基因组序列号：*Homo sapiens*—NC_000019.10；*Mus musculus*—NC_000073.7；
Delphinapterus leucas—NW_022098006.1；*Oryzias latipes*—NC_019874.2；
Haplochromis burtoni—NW_024582734.1；*Larimichthys crocea*—NC_040023.1。

图 4 不同物种来源的 *CD22* 基因组结构和基因共线性分析

Fig.4 Genome structure and gene synteny analysis of *CD22* from different species

2.4 *Lccd22* 在体外分离培养的原代免疫细胞中的表达情况

在体外分离培养的原代头肾巨噬细胞、粒细胞、IgM⁺/IgM⁻ B 淋巴细胞中，*Lccd22* mRNA 在粒细胞和 IgM⁺ B 淋巴细胞中转录水平较高，在巨噬细胞和 IgM⁻ 淋巴细胞中转录水平相对较低（见图 5）。

2.5 *Lccd22* 在大肠杆菌中的重组表达、纯化及特异性抗体制备

为了制备特异性抗 *LcCd22* 的多克隆抗体，本研究在大肠杆菌中重组表达了 *Lccd22* 的去信号肽胞外段（21—499 aa）编码区。原核工程菌 BL21/pET28a-*Lccd22* 经 IPTG 诱导后，全菌总蛋白及超声后上清、沉淀的 SDS-PAGE 结果

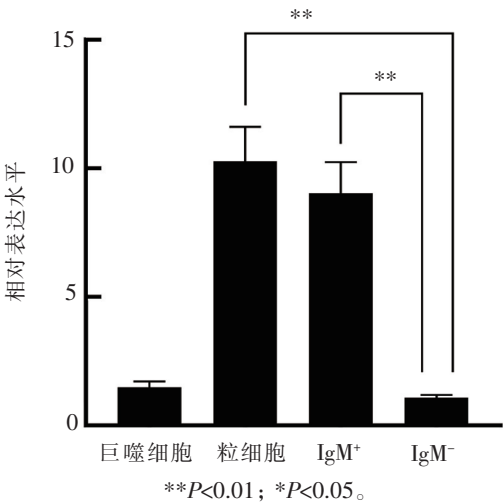


图 5 *Lccd22* 在体外分离培养的原代免疫细胞中的表达情况

Fig.5 The expression of *Lccd22* mRNA in *in vitro* cultured primary immune cells

显示, 在 55 ku 处存在明显表达条带 (见图 6a), 利用鼠抗 His-tag 单克隆抗体进行 Western-blot 实验, 在同样大小处出现明显阳性反应条带 (见图 6b), 说明 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码区在原核工程菌中得到正确表达。在变性条件下利用载体所带的 6 × His tag 标签纯化得到了 *LcCd22* 去信号肽胞外段重组蛋白 (见图 6c), 以该重组蛋白为抗原由上海吉尔生化有限公司制备获得了兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体。

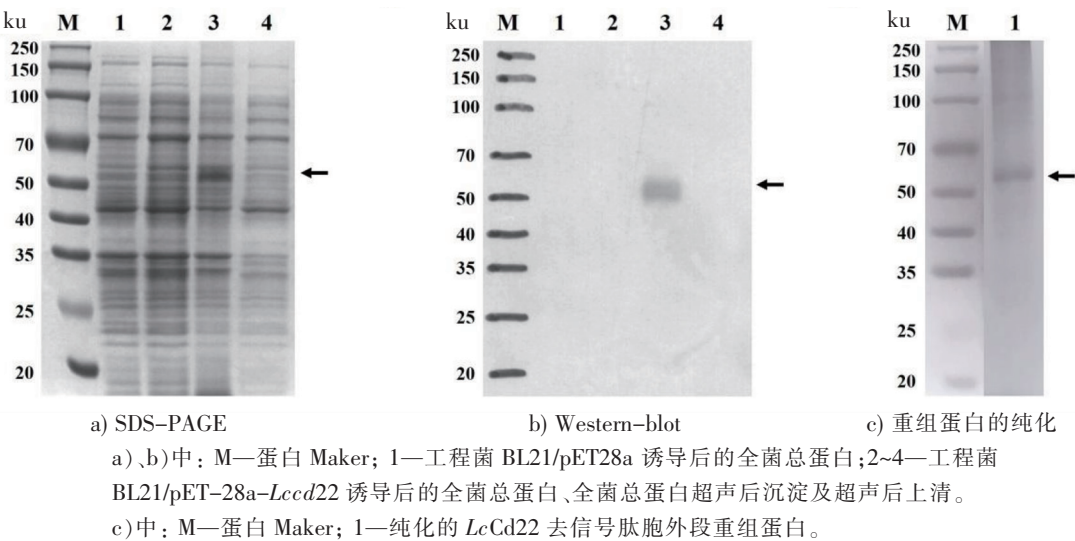


图 6 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码区在原核表达系统大肠杆菌中的重组表达与纯化

Fig.6 Recombinant expression and purification of *Lccd22* extracellular domain excluding signal peptide in *Escherichia coli*

2.6 *Lccd22* 在 HEK-293T 细胞中的重组表达及抗体特异性检测

为了检测所制备的兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体的特异性, 在真核 HEK-293T 细胞中进行了 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码区的瞬时表达。重组质粒 pcDNA3.1-*Lccd22* 转染 HEK-293T 细胞 48 h 后, 收集细胞裂解制样进行 SDS-PAGE 分析, 分别以鼠抗 His-tag 单抗和兔抗 *LcCd22* 多抗为第一抗体同时进行 Western-blot 检测, 结果显示在约 60 ku 处均出现阳性反应条带 (见图 7a、7b), 而以转染 pcDNA3.1 空载质粒的 HEK-293T 细胞总蛋白作为阴性对照, 未显示任何反应条带。这表明所制备的兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体具有良好的特异性, 可识

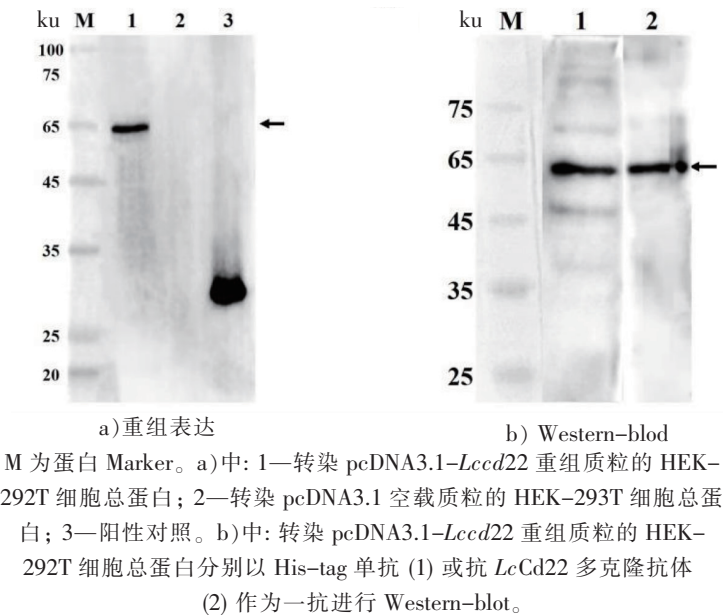


图 7 *Lccd22* 去信号肽胞外段编码区在 HEK-293T 细胞中的重组表达及抗 *LcCd22* 多克隆抗体的特异性检测

Fig.7 Recombinant expression of *Lccd22* in HEK-293T cells and detection on the specificity of anti-*LcCd22* polyclonal antibody

别变性状态的 *LcCd22* 重组蛋白。

2.7 抗 *LcCd22* 多克隆抗体可识别天然 *LcCd22* 蛋白分子

在 Western-blot 检测证实兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体可特异性识别变性 *LcCd22* 重组蛋白的基础上，将兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体与体外分离培养的大黄鱼原代头肾淋巴细胞共同孵育，进行免疫荧光实验以检测该多克隆抗体能否识别淋巴细胞上的天然 Cd22 蛋白。激光共聚焦显微观察结果显示，部分头肾淋巴细胞孵育后细胞上出现绿色荧光，说明兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体可以识别头肾淋巴细胞上的天然 Cd22 蛋白，可用于后续实验以研究 *LcCd22* 的功能（见图 8）。

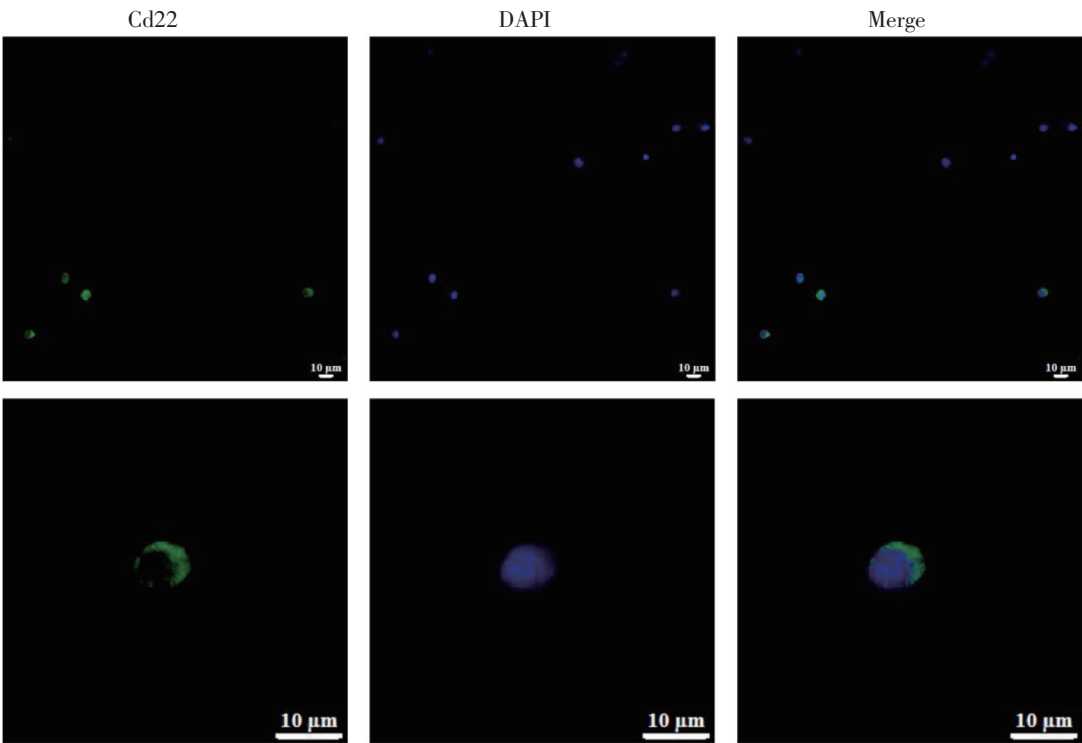


图 8 兔抗 *LcCd22* 多克隆抗体识别原代头肾淋巴细胞膜表面的天然 *LcCd22* 蛋白
Fig.8 Recognition of native *LcCd22* protein on primary head kidney lymphocytes membrane by rabbit anti-*LcCd22* polyclonal antibody

3 讨论

哺乳类 CD22 作为 Siglecs 家族的重要成员，是哺乳动物 B 淋巴细胞信号传导过程中的关键性辅助分子，可调节 B 淋巴细胞增殖、存活、分化等功能。CD22 的功能与其结构密切相关，在人和小鼠 CD22 分子的胞外区含有 7 个免疫球蛋白样结构域（immunoglobulin domain, Ig domain），包括 2 个 Ig 结构域、4 个 Ig C2 结构域和 1 个 Ig-like 结构域，该结构域可特异性结合唾液酸连接的糖蛋白配体。在其胞质区有 V/I-X-YXXL 的 ITIM 基序，以及 6 个酪氨酸残基（其中 3 个位于 ITIM 基序内）。BCR 激活早期，CD22 可与 BCR 结合并使胞质区的酪氨酸迅速磷酸化，招募 SH2 并与酪氨酸磷酸酶 SHP-1 结合，激活下游信号分子抑制钙离子内流而减弱 BCR 信号，进而抑制免疫系统的过度激活

和自身免疫疾病的发生^[2]。大黄鱼与哺乳类 CD22 具有相同的结构特征, 在其胞外区具有 2 个 Ig 结构域、2 个 Ig C2 结构域和 1 个 Ig-like 结构域, 有 4 个酪氨酸残基 (Y⁵⁵⁰、Y⁶⁰³、Y⁶⁰⁸、Y⁶³⁸) 位于胞质尾部的两个 ITIM 基序中, 这说明大黄鱼 Cd22 具有行使 B 淋巴细胞相关功能的序列结构基础。另一方面, 硬骨鱼类 Cd22 的氨基酸序列普遍比哺乳类 CD22 的短, 这主要是因为哺乳类 CD22 分子胞外区中的免疫球蛋白结构域数目通常比硬骨鱼类中的多。通过 SMART 在线分析比对不同物种 CD22 的氨基酸序列保守结构域 (见图 9), 结果显示, 人和小鼠等哺乳类 CD22 大多具有 7 个 Ig 样结构域, 但硬骨鱼类的 Cd22 通常只有 4~5 个 Ig 样结构域。如, 大黄鱼和青鳉 Cd22 有 2 个 Ig 结构域、2 个 Ig C2 结构域和 1 个 Ig-like 结构域; 而鲷形目的金头鲷 (*Sparus aurata*) 和鲈形目的牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 的 Cd22 都只有 2 个 Ig 结构域、2 个 Ig C2 结构域, 没有 Ig-like 结构域。Ig 样结构域的减少, 必然会影响到 Cd22 分子对唾液酸糖蛋白配体的识别与结合。在胞质区, 哺乳类 CD22 通常有 3 个 ITIM 基序、6 个酪氨酸残基, 而硬骨鱼类的 Cd22 只有 2 个 ITIM 基序、4 个酪氨酸残基, 抑制性基序的减少意味着硬骨鱼类 Cd22 的负调控功能可能不如哺乳类 CD22 强。同时, 大部分硬骨鱼中存在 *cd22* 基因重复 (见图 4)。这些结构上的细微区别, 提示硬骨鱼与哺乳类的 CD22 在功能上可能存在一定差异。

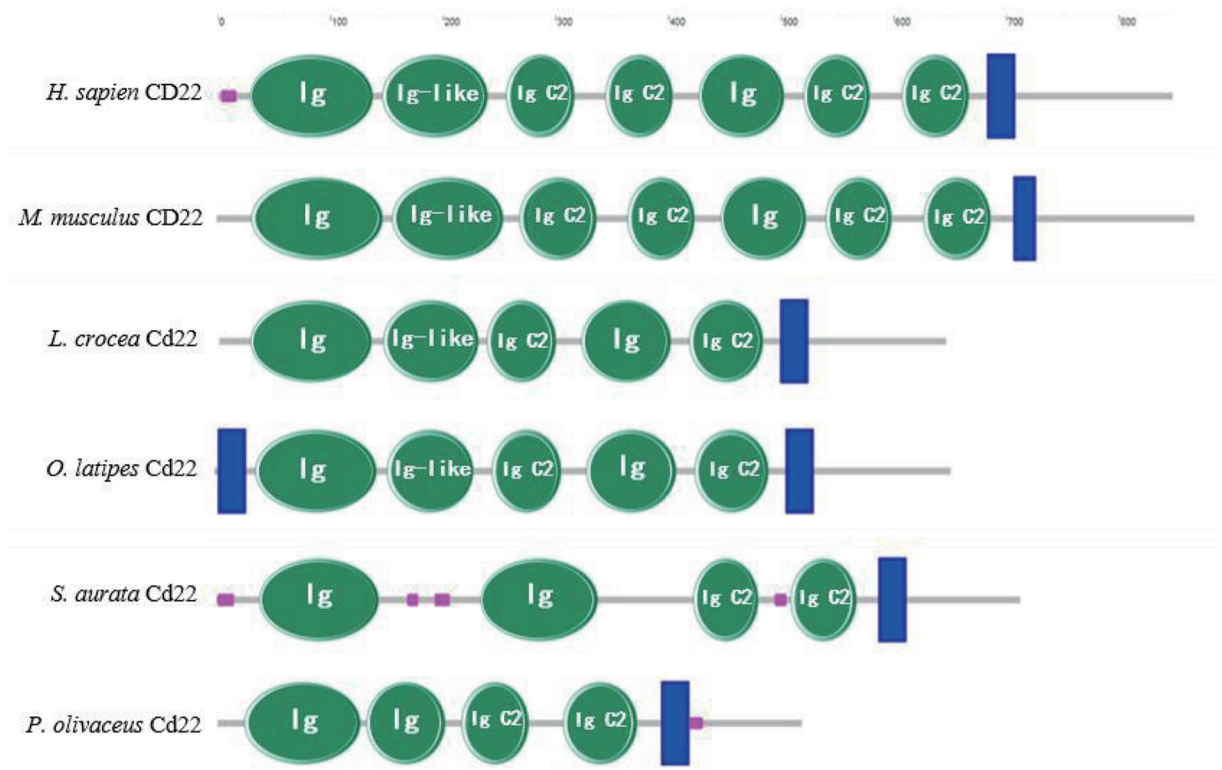


图 9 不同物种 CD22 的氨基酸序列保守结构域对比

Fig.9 Comparative analysis of conserved domains in CD22 amino acid sequences across different species

哺乳动物 *CD22* 在原 B 细胞和前 B 细胞中表达水平较低, 而在成熟 B 细胞中表达水平较高。利用本实验室制备的特异性针对 IgM 的单克隆抗体, 分离获得了头肾来源

IgM⁺ B 淋巴细胞、IgM⁻ 淋巴细胞、粒细胞和巨噬细胞, 通过荧光定量 PCR 检测证实大黄鱼 *cd22* mRNA 在 IgM⁺ B 淋巴细胞和粒细胞中的转录水平较高, 在 IgM⁻ 淋巴细胞中表达水平较低, 说明 *Lccd22* 主要在 B 淋巴细胞中表达。由于 CD22 存在跨膜区, 难以通过重组表达获得全长重组蛋白, 因此很多 CD22 的相关研究利用其特异性抗体阻断 CD22 来反向验证其功能。本研究通过原核表达、抗体制备获得了特异性抗大黄鱼 Cd22 的多克隆抗体, 该抗体不仅能在体外特异性识别变性的重组大黄鱼 Cd22 蛋白, 也可识别原代头肾淋巴细胞中的天然 Cd22 蛋白, 这为进一步开展大黄鱼 Cd22 的功能研究奠定了基础。

哺乳动物中, CD22 既可负向调控也可以正向调控 B 细胞的生物学功能^[22-23]。硬骨鱼中, 仅在牙鲆和半滑舌鳎中有关于 Cd22 的功能报道。牙鲆中, 抗 Cd22 抗体与 B 淋巴细胞孵育后可显著增强脾脏来源 IgM⁺ B 淋巴细胞的胞吞作用和细胞内 ROS 活性, 而使外周血来源 IgM⁺ B 淋巴细胞的胞吞作用和细胞内 ROS 活性显著减弱^[24]。相反, 抗半滑舌鳎 Cd22 的多克隆抗体阻断则可显著增强其外周血白细胞的增殖、吞噬及抗细菌活性^[25]。这说明在不同硬骨鱼类中, 甚至在同一鱼体内, 针对不同来源的 IgM⁺ B 淋巴细胞, Cd22 的功能也存在较大差异。因此, 有必要开展多种硬骨鱼类 Cd22 的功能研究, 以全面深入认识鱼类 Cd22 在 B 淋巴细胞及抗原-抗体信号传导过程中的功能。

[参 考 文 献]

- [1] CLARK E A. CD22, a B cell-specific receptor, mediates adhesion and signaltransduction[J]. Journal of Immunology, 1993, 150(11):4715-4718.
- [2] POE J C, TEDDER T F. CD22 and Siglec-G in B cell function and tolerance[J]. Trends in Immunology, 2012, 33(8):413-420.
- [3] DOODY G M, JUSTEMENT L B, DELIBRIAS C C, et al. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP [J]. Science, 1995, 269(5221):242-244.
- [4] OTIPOBY K L, ANDERSSON K B, DRAVES K E, et al. CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells[J]. Nature, 1996, 384(6610):634-637.
- [5] SATO S, MILLER A S, INAOKI M, et al. CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction; altered signaling in CD22-deficient mice [J]. Immunity, 1996, 5(6):551-562.
- [6] NITSCHKE L, CARSETTI R, OCKER B, et al. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signaling [J]. Current Biology, 1997, 7(2):133-143.
- [7] MEYER-BAHLBURG A, RAWLINGS D J. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity[J]. Autoimmunity Reviews, 2008, 7(4):313-316.
- [8] PATTERSON H C K, KRAUS M, KIM Y M, et al. The B cell receptor promotes B cell activation and proliferation through a non-ITAM tyrosine in the Igα cytoplasmic domain[J]. Immunity, 2006, 25(1):55-65.
- [9] PASARE C, MEDZHITOV R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors[J]. Nature, 2005, 438(7066):364-368.
- [10] GAVIN A L, HOEBE K, DUONG B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling[J]. Science, 2006, 314(5807):1936-1938.
- [11] MARSHAK-ROTHSTEIN A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(11):823-835.
- [12] JELLUSOVA J, WELLMANN U, AMANN K, et al. CD22 × Siglec-G double-deficient mice have massively increased B1 cell numbers and develop systemic autoimmunity[J]. The Journal of Immunology, 2010, 184(7):3618-3627.
- [13] KAWASAKI N, RADEMACHER C, PAULSON J C. CD22 regulates adaptive and innate immune responses of B cells[J].

- Journal of Innate Immunity,2011,3(4):411-419.
- [14] GILTIAY N V, SHU G L, SHOCK A, et al. Targeting CD22 with the monoclonal antibody epratuzumab modulates human B-cell maturation and cytokine production in response to Toll-like receptor 7 (TLR7) and B-cell receptor (BCR) signaling[J]. Arthritis Research & Therapy,2017,19:1-18.
- [15] 牛继敏. 尼罗罗非鱼 CD22 基因的克隆表达和功能研究[D]. 湛江:广东海洋大学,2020.
- [16] MU Y N, LI M Y, DING F, et al. De novo characterization of the spleen transcriptome of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and analysis of the immune relevant genes and pathways involved in the antiviral response[J]. PLoS One,2014,9(5):e97471.
- [17] CHEN X H, LIN K B, WANG X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China[J]. Journal of Fish Diseases,2003,26(10):615-619.
- [18] HUANG Y, YUAN X, MU P, et al. Development of monoclonal antibody against IgM of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and characterization of IgM⁺ B cells[J]. Fish & Shellfish Immunology,2019,91:216-222.
- [19] 丁扬,敖敬群,艾春香,等. 大黄鱼白细胞介素 17 受体 E-LIKE 的分子特征及进化分析[J]. 应用海洋学学报,2016,35(1):107-115.
- [20] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution,2018,35(6):1547-1549.
- [21] MU P, WANG Y, AO J, et al. Molecular cloning and bioactivity of an IL-2 homologue in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Fish & Shellfish Immunology,2018,81:309-317.
- [22] LUMB S, FLEISCHER S J, WIEDEMANN A, et al. Engagement of CD22 on B cells with the monoclonal antibody epratuzumab stimulates the phosphorylation of upstream inhibitory signals of the B cell receptor [J]. Journal of Cell Communication and Signaling,2016,10:143-151.
- [23] CHAPPELL C P, DRAVES K E, CLARK E A. CD22 is required for formation of memory B cell precursors within germinal centers [J]. PloS One,2017,12(3):e0174661.
- [24] LI Y, SUN L, LI J. Macropinocytosis-dependent endocytosis of Japanese flounder IgM⁺ B cells and its regulation by CD22 [J]. Fish & Shellfish Immunology,2019,84:138-147.
- [25] LI Y, ZHANG J, LI J, et al. First characterization of fish CD22: an inhibitory role in the activation of peripheral blood leukocytes[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2017,190:39-44.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)