

大黄鱼免疫球蛋白 M 重链基因全长 cDNA 序列的克隆与表达

刘卫刚¹, 韩坤煌^{1,2}, 谢芳靖¹, 邹鹏飞¹, 张子平^{2,3}, 王艺磊^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 大黄鱼育种国家重点实验室, 宁德市富发水产有限公司, 福建 宁德 352103; 3. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

[摘要] 从本实验室自建的大黄鱼表达标签数据库中获取了大黄鱼免疫球蛋白 M 重链 (*LcIgMH*) 基因片段, 并以此设计 SMART-RACE 引物, 最终得到 1917 bp 的全长 cDNA 序列。经分析发现其含 6 bp 的 5' 非编码区 (5'UTR)、176 bp 的 3'UTR 以及 1738 bp 的开放阅读框 (ORF); 预测的 ORF 共编码 584 个氨基酸, 蛋白质分子量为 65.2 ku, 等电点为 5.84; 利用 SignalP 4.1 Server 发现其 5' 端含有信号肽 (1-19 aa); BlastP Server 的结果显示, 其与红笛鲷的 IgMH 序列一致性最高, 达到 64%; 利用 IMGT/Domain Gap Align 进行重链可变区与恒定区预测, 发现含有 1 个重链可变区与 4 个重链恒定区, 同时, 预测还发现可变区含有典型的 3 个高变区与 4 个骨架区结构。实时荧光定量 PCR 结果显示该基因在头肾与脾脏中大量表达, 并显著高于其他各组织, 同时雌雄鱼 *LcIgMH* 在各组织中表达量均无显著性差异, 表明 *LcIgMH* 表达与性别无关。注射副溶血弧菌进行感染 4 d 后, 脾脏内 *LcIgMH* 表达量最高, 并且与对照组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 但感染后第 8 天的表达水平已与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 显示 *LcIgMH* 与大黄鱼的免疫应答反应相关。

[关键词] 大黄鱼; IgMH; 副溶血弧菌; 基因表达; 定量 PCR

[中图分类号] Q 78; S 917.4

Full-length cDNA Cloning and Expression of *LcIgMH* Gene from *Larimichthys crocea*

LIU Weigang¹, HAN Kunhuang^{1,2}, XIE Fangjing¹, ZOU Pengfei¹, ZHANG Ziping^{2,3}, WANG Yilei^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Ningde Fufa Fisheries Company Limited, Ningde 352103, China; 3. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Based on a fragment of the immunoglobulin heavy chain (*LcIgMH*) gene from *Larimichthys crocea* expressed sequence tags database of our lab, a full-length *LcIgMH* cDNA was obtained by the SMART-RACE. The full-length cDNA is 1917 bp, containing a 6 bp 5' untranslated region (5' UTR), a 176 bp 3' UTR, and a 1738 bp open reading frame (ORF) which encodes 584 amino acids. The relative molecular weight of the protein is 65.2 ku, and its isoelectric point is 5.84. A signal peptide (1-19 aa) was found in its N ter-

[收稿日期] 2018-04-13

[修回日期] 2018-05-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31772878); 福建省自然科学基金项目 (2015J06019)

[作者简介] 刘卫刚 (1990—), 男, 硕士生, 主要从事水产动物功能基因研究。通信作者: 王艺磊 (1963—), 女, 教授, 博导, 主要从事水产动物功能基因研究。E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

minimal sequence by SingalP4.1 Server. The BlastP result showed that the sequence identity between *LcIgMH* and *Lutjanus sanguineus* IgMH was the highest, reaching 64%. A heavy chain variable region and 4 heavy chain constant regions were found by the IMGT/DomainGapAlign Server. The predicted variable region contains typical 3 hypervariable regions and 4 framework regions. The expression of *LcIgMH* in tissues was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results show that *LcIgMH* is extremely highly expressed in the head kidney and spleen, while almost no expression in other tissues. There is no significant difference of *LcIgM* expression between tissues from male and female, indicating that the expression of *LcIgM* is not related to gender. After 4 days of infection with *Vibrio parahaemolyticus*, the expression level of *LcIgMH* in spleen was significantly increased compared to the control group ($P < 0.05$). However, the expression level of the experimental group and control group had no significant difference at 8 days after injection.

Keywords: *Larimichthys crocea*; IgMH; *Vibrio parahaemolyticus*; gene expression; qRT-PCR

0 引言

脊椎动物通过自身的先天免疫与获得性免疫系统来抵抗外界多种病原的侵袭,以保证机体的正常生命活动,而免疫球蛋白是在脊椎动物获得性免疫中发挥重要作用的组成成分^[1]。

当前对哺乳动物免疫球蛋白的相关研究较为深入,而针对鱼类免疫球蛋白的研究则明显不如哺乳动物。很长一段时间内在硬骨鱼类中仅发现有 IgM^[2]或者仅同时含有 IgD^[3],后来又陆续在虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 中发现 IgT^[4],斑马鱼 (*Danio rerio*) 中发现 IgZ^[5],但最后发现二者为同一类型,甚而发现 IgM-IgZ 的嵌合体^[6-7]。与此同时,在软骨鱼类中也先后发现 IgNAR、IgNARC^[8]与 IgX^[9]等免疫球蛋白,显示硬骨鱼类与软骨鱼类间的免疫球蛋白类型存在一定差异。

研究显示 IgM 在所有鱼类的体液免疫中都具有重要作用^[7]。目前已对多种鱼类的 IgM 进行了不同程度的研究,然而作为我国最重要的海水养殖经济鱼类之一的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*),却较少见到相关研究报道。此外,近年来由于环境污染与养殖密度过大等原因,人工养殖的大黄鱼种质不断退化,抗病力下降,大黄鱼养殖业遭受较为严重的病害侵袭^[10]。因此,克隆大黄鱼免疫球蛋白重链 (immunoglobulin mu heavy chain, *LcIgMH*) 基因,将为阐明大黄鱼的相关抗病分子机制提供更多信息,并为我国大黄鱼养殖业防治病害提供一定的指导依据,具有重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用鱼来自宁德市富发水产有限公司鱼排,鱼体体重 180~250 g。1) 取雌雄大黄鱼各 5 尾,分别取如下组织:性腺、头肾、肌肉、肝脏、脾脏、脑、鳃、胃、眼、肠和心脏,并将各组织样品置于 RNAlater 中 4℃ 处理一段时间,后放 -80℃ 冰箱长期冻存。2) 将 100 尾健康大黄鱼均分为两组,一组注射含有浓度为 6.6×10^8 cfu/mL (为半致死浓度的 20%^[11]) 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的海水;另一组则注射等量的已灭菌海水,且于注射后 2、4、8、12 d 对脾脏进行取样 (实验组与对照组各时相都取 5 条鱼),样品保存方法同 1)。

主要试剂有:RDP 试剂^[12] (实验室自配),SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司),逆转录试剂盒 (Promega 公司),DNA 胶回收试剂盒 (上海捷瑞公司),pMD-19T 质粒载体 (大连 TaKaRa 公司),SYBR Green Realtime PCR Master Mix (上海 TOYOBO 公司)。引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

用 RDP 试剂对约 50 mg 大黄鱼不同组织样本提取 RNA, 详细方法参考文献 [12]。用 ND-1000 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 并用 1.0% (体积分数) 琼脂糖进行凝胶电泳以检测 RNA 质量。

1.2.2 *LcIgMH* cDNA 克隆

从本实验已有大黄鱼表达标签数据库 (EST) 中获取 *LcIgMH* 基因的部分片段, 用 Primer 5.0 等软件设计相关基因引物 (见表 1), 并用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 获取 cDNA 第一条链并最终实现目的基因扩增。相关产物采用 1.5% (体积分数) 的琼脂糖进行电泳, 并用胶回收试剂盒对目的片段胶进行回收纯化。将 PMD19-T 与纯化产物于 16 ℃ 连接过夜, 后与 DH5 α 感受态细胞进行转化, 随后将感受态细胞用含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基置于 37 ℃ 过夜培养, 挑取单克隆菌落利用 M13 引物进行 PCR 检测, 最后将呈阳性的菌落用含氨苄青霉素的 LB 进行扩大培养, 取培养物 400 μ L 送至上海生工公司进行 DNA 测序。

1.2.3 *LcIgMH* 序列的生物信息学分析

用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析测序结果, 确定 *LcIgMH* 基因并拼接全长 cDNA 序列; 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 预测 ORF; 用 SignalP4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测其信号肽区域; 用 ExPASy (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测 *LcIgMH* 等电点与分子量; 用 NetNGlyc1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对 *LcIgMH* 潜在的糖基化位点进行预测; 用 TMHMM Server V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对 *LcIgMH* 进行跨膜区域预测; 用 NetPhos3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点; 用 IMGT/DomainGapAlign (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>) 预测 *LcIgMH* 的可变区与恒定区。

1.2.4 qRT-PCR

取 1 μ g 总 RNA 进行逆转录, 最终获取 cDNA, 以大黄鱼 18S rRNA (*Lc18S*) 为内参基因, 将 cDNA 稀释 100 倍用于 qRT-PCR。反应体系包括: SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μ L、cDNA 模板 9 μ L 及正反引物各 0.5 μ L。反应程序: 95 ℃ 15 s; 60 ℃ 1 min, 共进行 40 个循环。目标基因的相对表达量数据分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 数据结果表示为平均值 \pm 标准差。用 SPSS 20.0 统计软件对所有数据进行 ANOVA 单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P < 0.01$ 表示存在极显著性差异。

表 1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	引物用途 Use
IgM 5'outer	5'GCAAAGCAGGAGAAGGAAGC 3'	5' Race 第一轮 First round
IgM 5'inner	5'CCCAGAACCACATTGCGAC 3'	5' Race 第二轮 Second round
IgM 3'outer	5'TTTTGTGGCAGGACGAGAATG 3'	3' Race 第一轮 First round
IgM 3'inner	5'ATCTACGAAAGGAGTATTGGAGGAC 3'	3' Race 第二轮 Second round
M13F	5'CAGGAAACAGCTATGACC 3'	单克隆检测 Monoclonal detect
M13R	5'GTAAAACGACGGCCAG 3'	单克隆检测 Monoclonal detect
Universal Primer Mix (UPM)	5'CTAATACGACTCACTATAGGGC	Race 通用引物 General primer
Lyc18s - RT - SP	5'ACAGCGAAAGGATTGACTGATAG 3'	qRT - PCR
Lyc18s - RT - SP	5'CAGACAAATGCCTCCAGCAA 3'	qRT - PCR
IgMHF	5'CATTGAGCGGGAAGTGGACAGG 3'	qRT - PCR
IgMHR	5'AGCAAAGCAGGAGAAGGAAGCC 3'	qRT - PCR

2 结果与分析

2.1 大黄鱼各组织总 RNA

用 RDP 试剂所提取出的各组织 RNA, 琼脂糖凝胶电泳结果显示具 18S rRNA 与 28S rRNA 条带都很完整。图 1 为本研究提取的大黄鱼性腺总 RNA 电泳图, 其他各组织电泳结果与之相似。

2.2 *LcIgMH* 基因序列分析

利用本实验室自建的大黄鱼 cDNA 文库筛选 *IgM* 重链的片段, 应用 5'RACE 和 3'RACE-PCR 技术得到其全长 cDNA。使用 BLAST 2 软件进行拼接后, 最终得到长为 1917 bp 的 *LcIgMH* cDNA 全长序列 (GenBank 登陆号: FJ589726.1), 其中: 3'非编码区 (3'Untranslated Region, UTR) 176 bp, 5'UTR 6 bp, 以及 ORF 1738 bp (见图 2)。同时, 在 polyA 尾前 30 bp 处存在一个 AATAAA 加尾信号, 可知 3'UTR 扩增较为完整。对获得的 ORF 进行相关预测, 发现其编码 584 个氨基酸 (见图 2), 所编码的蛋白分子量约为 65.2 ku, 等电点为 5.84。SignalP4.1 server 预测结果显示, 其 N 端含有信号肽 (1-19 aa)。NetPhos 3.1 Server 预测显示该序列中含有 29 个丝氨酸潜在磷酸化位点, 8 个苏氨酸潜在磷酸化位点, 9 个酪氨酸潜在磷酸化位点。NetNGlyc 1.0 的预测显示 *LcIgMH* 含有 3 个糖基化位点 (N242、N340 与 N550) (见图 2)。推测 *LcIgMH* 蛋白共含 13 个半胱氨酸残基, 与其他物种 *IgMH* 蛋白氨基酸序列进行多重比对之后发现多个半胱氨酸残基高度保守 (见图 3)。TMHMM 2.0 预测结果显示, *LcIgMH* 不含跨膜区域, 显示本研究获得的 *LcIgMH* 为分泌型而非膜结合型。BlastP 结果显示 *LcIgMH* 与红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) *IgMH* (ADX01345.1) 序列一致性最高, 达到 64%, 与多种硬骨鱼类 *IgMH* 也具有较高的一致性; 而与人类 (*Homo sapiens*) *IgMH* (P0DOX6.1) 的一致性仅有 30%, 同非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) *IgMH* (AAA49774.1) 的一致性也只有 32%。用 IMGT/DomainGapAlign 对 *LcIgMH* 进行可变区与恒定区预测, 发现其含有 1 个 VH 及 4 个 CH 区域 (见图 2), 同时可变区含有典型的 3 个 CDR 区域与 4 个 FR 区域 (见图 3), 显示其具有鱼类 *IgMH* 的典型结构。

2.3 *LcIgMH* 的同源性分析和系统发育分析

利用已经报道的其他多种硬骨鱼类、人和非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的 *IgMH* 蛋白质氨基酸序列进行多重序列比对, 结果发现大黄鱼与其他硬骨鱼类的 *IgMH* 保守性远高于人和非洲爪蟾。由比对结果可知上述各物种的 *IgMH* 可变区及恒定区序列都存在一定的保守性, 且恒定区的保守性较可变区更高。此外, 对可变区的保守性分析显示其保守性主要集中于 4 个 FR 区域, 而 3 个 CDR 区域的变异性则非常大 (见图 3)。

利用上述物种的 *IgMH* 蛋白氨基酸序列, 使用 MEGA7 软件, 以 N-J 法构建系统进化树 (见图 4)。进化树分析显示, 大黄鱼、红笛鲷、金头鲷 (*Sparus aurata*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)、条纹婢鲮 (*Lates lineata*)、南极鳕 (*Notothenia coriiceps*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 及虹鳟聚为一支, 而斑马鱼独立成一支, 人类及非洲爪蟾独立成另一支。

2.4 *LcIgMH* 基因在各组织中的表达

如图 5 所示, 大黄鱼 *LcIgMH* 在脾脏和头肾中表达量显著高于其他各组织 ($P < 0.05$), 虽然脾脏中 *LcIgMH* 重链基因的表达量雄鱼高于雌鱼, 头肾中雌鱼高于雄鱼, 但都未形成显著性差异。而在性腺、肌肉、肝脏、脑、鳃、胃、眼、肠及心脏中 *LcIgMH* 的表达量极低, 表明相关组织可能较少参与机体的免疫反应。

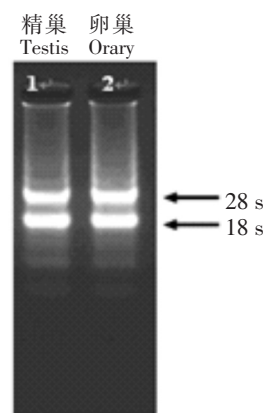


图 1 大黄鱼性腺总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from the gonads of *L. crocea*

```

1 AACATGatggactataggacaggactgctgcttttaactatctgctgggcagggtgttgatggtcagact 69
   Leader
1 M D Y R T G L L L L T I C W A G V D G Q (T) 21
70 ctgacagaatctgaaccagcgattaaaagtcctggagaatctcacagattgacctgtacagcctctgga 138
22 L (T) E S E P A I K (S) P G E (S) H R L T C T A S G 44
139 atgtcaatcagtagcaactggatggctgctggatcagacaggctcctggaaaaggactggagtggtcgt 207
45 M (S) I S S N W M V W I R Q A P G K G L E W L A 67
208 cttatcaatagtgtctagtagcagcaatactactctcagtcagtcagcaaggccggtttaccatctccaga 276
68 L I N S A S (S) S K (Y) Y (S) Q (S) V K G R F (T) I (S) R 90
277 gacaacagcagagagcagctgttttctgcagatgaacagtcctgaagactgaagattctgctgtttattat 345
91 D N (S) R E Q L F M L K T E D S A V Y Y 113
346 tgtgctcagagcgtagcaatgcttttgactactgggaaaaggcacaatggtcacagttacatcagcc 414
   DH JH CH1
114 C A R E R S N A F D (Y) W G K G T M V T V T S A 136
415 actccatctggaccaactgtgtttcctctgtcgcgaatgtggttctgggactgacaacgcgatcactctt 483
137 (T) P S G P T V F P L (S) Q C G (S) G T D N A I T L 159
484 ggctgtttatgccaccggcttcacacctcctcactgacgctatgcatggaccaagagggtgactgccttg 552
160 G C Y A T G F T P S S L T (Y) A W T K E G T A L 182
553 acaaactctattcagtagcctcctgtacagaaaaacagcctttattctggaatcagtcacaaatccaagt 621
182 T N S I Q Y P P V Q K N S L Y (S) G I S Q I Q V 205
622 agcaaacaggactgggacgcaatgaagactttccaatgtgccgtgacacattcagcggaagtggacag 690
206 (S) K Q D W D A M K T F Q C A V T H S A G (S) G Q 228
691 gctaatttccagaagacaaagctgcattatcaaatgccaaatattagtgtgtcgccctctccccctct 759
   CH2
229 A N F Q K T K L H (Y) Q M P (N) I S V (S) A (S) (S) P (S) 251
760 gatgacaaaagcagggttccttctcctgtcgtttgctaaagattttcaccaaaagatcacaaactgaca 828
252 D D K (S) E A (S) F S C F A K D F (S) P K D H K L T 274
829 ttgctgaaagataatgcggacatcaccaacaaaatatacagaggtcacacacctgttcaggaagagag 897
275 W L K D N A D I T N K I (Y) E V T (T) P V Q G R E 297
898 gagaacggatatactgtatcacagtgacgaagttttctcagtgtagcgtccgatggcttgaataaggac 966
298 E N G (Y) T V Y S A A S F L S V P S D G L N K D 320
967 actcggtttacatgtctgtttgaggggaaaggtgaaggcggtcattaaacatacgtgaatgaatctgtg 1035
321 T R F T C L F E G G K G E G G I K T Y V (N) E (S) V 343
1036 acctacggttgtccaacaatatcatgttcttgaggagatgtggacataactatcatcgccctacaaat 1104
   CH3
344 T (Y) G C P T I S C (S) G G D V D I T I I G P T N 366
1105 caggacatgtttattagcggaaacggaagatacatattgtcaagtccaagaaaacaaacctctgttctg 1173
367 Q D M F I S G N G K I H C Q V Q E N K P S V L 389
1174 agtgttttgtggcaggacgagaatggacacaccttgattgagtactcaaagtcaccgataatggaaaa 1242
390 (S) V L W Q D E N G H T L I E Y S K (S) T D N G K 412
1243 aaagtaataaatcttgcacttgacatcacatataatgaatggaaccaggggatcaagcgtactgtgtt 1311
413 K V I D N I T Y N E W N Q G I K R Y C V 435
1312 gttgaacactcagagtggcttgagccagtcagaaaatctacgaaaggagtattggaggacagactcag 1380
   CH4
436 V E H S E W L E P V K K I Y E R S I G G Q (T) 458
1381 cgctccttcagtggtttatgatgcctccagtagaactagaaaaagaaatggtagccctgacttgcttt 1449
459 R P (S) V F M M P P V E H (T) R K E M V T L T C F 481
1450 gtgaaagacttcttccctcaggaagtttatgtgtcttggttgatgatgaagaagtagattcaact 1518
482 V K D F F P Q E V (Y) V S W L V D D E E V D (S) T 504
1519 tacgagttccataaccacaaacgctgtcgaaagctacggatcctattctgcttatagccagttattact 1587
505 (Y) E F H T T N A V E (S) Y G (S) Y (S) A Y S Q L L L 527
1588 agccttcagcagtggaaggaatgtgtgtgttagctgttagttcaccacagctgtgtggataac 1656
528 S L Q Q W K R N D V V Y S C V V H H E S V D (N) 550
1657 acaactaaagctattgtcaggtctattggatacagaacatttgagaaaaacaccaacctgtgtcaacctc 1725
551 T T K A I V R S I G Y R T F E K N T N L V N 573
1726 aacatgaacgtccctaacacgtgcaagccccagtagATGTTTTTGTGTTGTTGTGCTTCTGCTGTTT 1794
574 N M N V P N (T) C K P Q * 584
1795 GATGTTTAATGTTTGTGCTTGTGATATGACATTGTGTTTGTCTTTTCATGCAGATCTAAAATCAAAA 1863
1864 TAAAAAAAAAAGCACTTTGCAATTCTGTTGATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1917

```

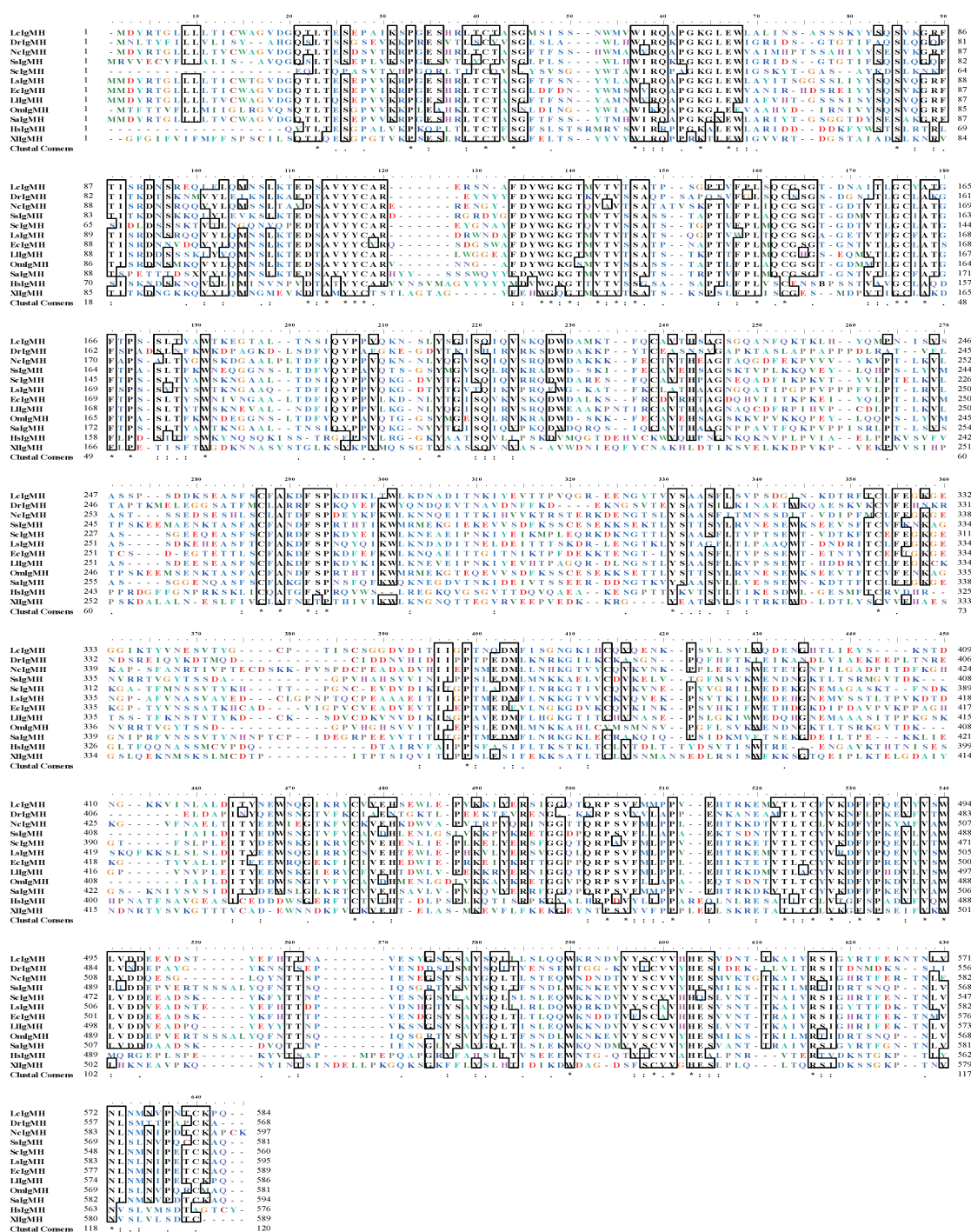
说明: 黑色矩形方框表示信号肽; 圆圈代表磷酸化位点; 绿色方框表示糖基化位; 粗体标注为 polyA 加尾信号; 星号标注为终止密码子; 箭头标注为 *LcIgMH* 各结构起始位置

Notes: Black rectangle—signal peptide; circle—phosphorylation site; green boxes—glycosylation site; bold—tailing signal; asterisk—terminator codon; grey arrows—initial position of *LcIgMH* different structures

图2 *LcIgMH* 的 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *LcIgMH*

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>



说明: 左侧物种名称与其 IgMH 对应登录号, *Lc*-大黄鱼, ACM24795.1; *Dr*-斑马鱼, AAI54614.1; *Nc*-南极鳕, AAL99933.1; *Ss*-大西洋鲑, ACN10898.1; *Sc*-鳕鱼, AAQ14863.1; *Ls*-红笛鲷, ADX01345.1; *Ec*-斜带石斑鱼, AAX78211.1; *Ll*-条纹婢鲈, ADC45387.1; *Om*-虹鳟, AAB27359.2; *Sa*-金头鲷, AFN20639.4; *Hs*-人类, PODOX6.1; *Xl*-非洲爪蟾, AAA49774.1

Notes: Species and respective IgMH ID, *Lc* - *Larimichthys crocea*, ACM24795.1; *Dr* - *Danio rerio*, AAI54614.1; *Nc* - *Nothotenia coriiceps*, AAL99933.1; *Ss* - *Salmo salar*, ACN10898.1; *Sc* - *Siniperca chuatsi*, AAQ14863.1; *Ls* - *Lutjanus sanguineus*, ADX01345.1; *Ec* - *Epinephelus coioides*, AAX78211.1; *Ll* - *Larix lineata*, ADC45387.1; *Sc* - *Siniperca chuatsi*, AAQ14863.1; *Om* - *Oncorhynchus mykiss*, AAB27359.2; *Sa* - *Sparus aurata*, AFN20639.4; *Hs* - *Homo sapiens*, PODOX6.1; *Xl* - *Xenopus laevis*, AAA49774.1

图 3 *LclgMH* 和其他物种 IgMH 氨基酸序列的多重比较

Fig.3 Alignment of the deduced amino acid sequence of *LclgMH* with homologs from other species

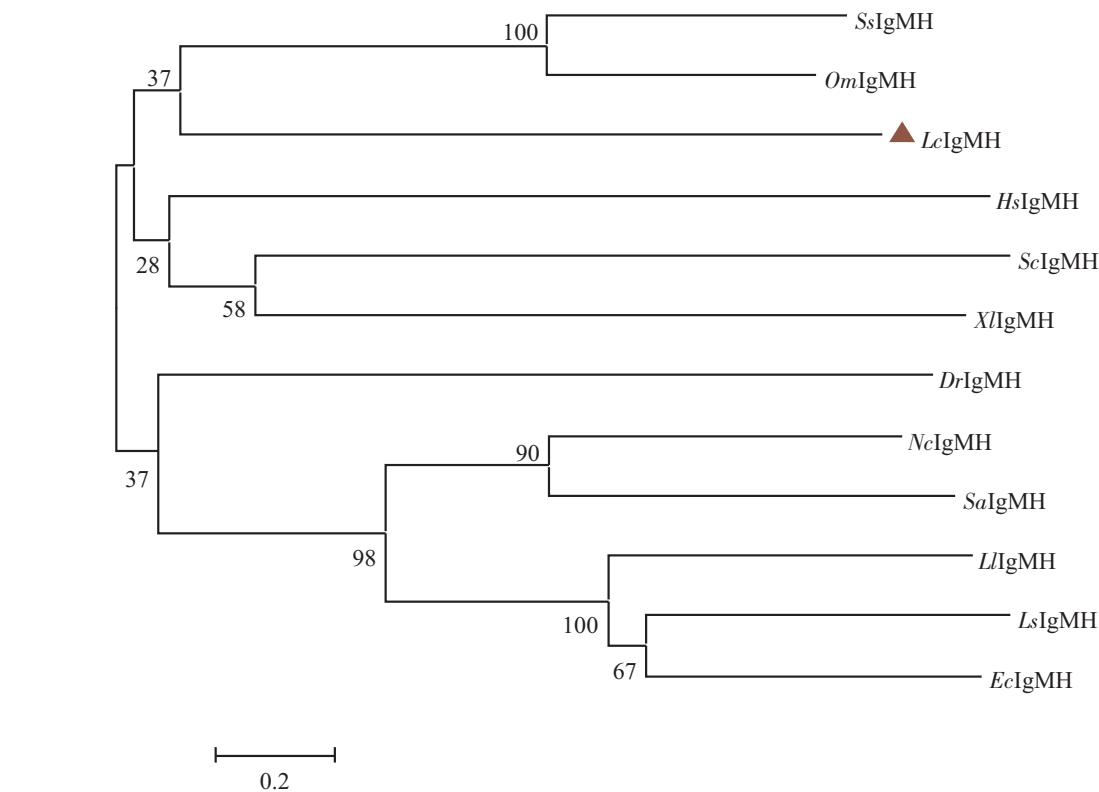
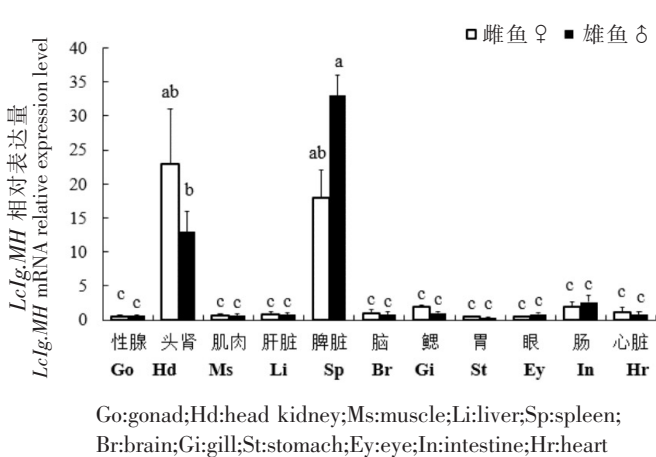


图 4 IgMH 氨基酸序列系统进化分析
Fig.4 Analysis of phylogenetic tree of IgMH amino acid sequences

2.5 大黄鱼脾脏 *LcIgMH* 基因在副溶血弧菌感染后的表达

由图 6 可知, 注射副溶血弧菌进行感染 4 d 后, 脾脏内 *LcIgMH* 表达量最高, 并且与对照组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 而从感染后 8 d 的结果显示其表达量已回落至对照组水平。在检测的各时间点中, 感染后的第 4 天, 是脾脏参与副溶血弧菌引起的免疫应答的一个重要节点。此外, 本文发现对照组从始至终都存在一定量的 *LcIgMH* 表达。



Go:gonad;Hd:head kidney;Ms:muscle;Li:liver;Sp:spleen;
Br:brain;Gi:gill;St:stomach;Ey:eye;In:intestine;Hr:heart
图 5 *LcIgMH* 在雌雄大黄鱼各组织器官中的表达
Fig.5 The *LcIgMH* expression level of different tissues in male and female large yellow croaker

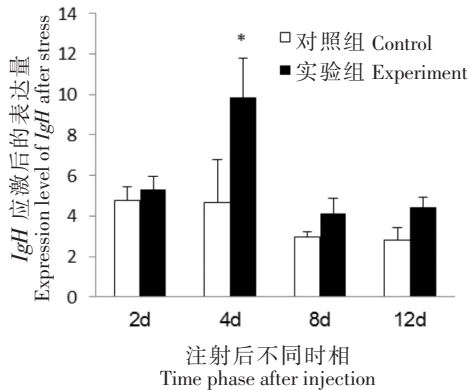


图 6 感染副溶血弧菌后 *LcIgMH* 基因在脾脏中的表达
Fig.6 Expression of *LcIgMH* gene in spleen after injection with *V. parahaemolyticus*

3 讨论

本研究成功克隆到大黄鱼 *LcIgMH* 基因的 cDNA 全长。多重序列比对分析发现,不同物种间 IgMH 蛋白的 CDR 区域差异性非常明显。CDR 区域主要作用是识别抗原,其序列具有高变性则更易于识别多种抗原,利于机体的免疫反应,增强对环境的适应性。同一脊椎动物,因为需要面对多种病原,倘若仅仅只产生一种 IgMH 是不可能满足机体免疫需求的。脊椎动物可以通过基因重排来改变 CDR 区域,并以此为基础使机体产生的免疫球蛋白可以识别多种抗原。同一脊椎动物,即使面对同一入侵病原也很可能产生多种 IgMH,而这些蛋白之间的差异主要是 CDR 区域。因为同一入侵病原,也可能具有不同的抗原表位,需要不同的 CDR 识别。

在生物的进化过程中,鱼类处于由低等向高等进化的过渡阶段,硬骨鱼类和软骨鱼类都已具备高等脊椎动物免疫系统的雏形,但与高等脊椎动物相比仍然不成熟^[13]。当前研究认为鱼类的肾脏、胸腺及脾脏是主要免疫器官,三者 in 鱼类免疫反应中起重要的作用^[14-17]。但是随着鱼类个体的生长,胸腺逐渐退化,其在免疫中发挥的功能也逐渐减小。如王欣欣^[7]发现草鱼中头肾、中肾与脾脏中 *IgMH* 的表达量远高于其他组织,而胸腺中 *IgMH* 的表达量与其他组织并无显著性差异,暗示成年草鱼的胸腺在机体免疫中的作用可能并不如脾脏与头肾重要。其他研究也显示,鱼类的肾脏与脾脏在鱼类的免疫应答中起重要作用^[18-20]。本研究利用荧光定量 PCR 技术初步分析了 *LcIgMH* 基因的表达情况,发现其在脾脏和头肾中的表达量均显著高于其他各组织,推测头肾与脾脏在大黄鱼的免疫应答中具有重要作用,并通过弧菌感染实验对脾脏中该基因的表达水平进行分析,发现其在感染 4 d 时的表达量显著高于未感染组,表明 *LcIgMH* 参与大黄鱼副溶血弧菌感染下的免疫应答。这与谢芳靖^[11]早前对大黄鱼感染副溶血弧菌后 *LcIgMH* 在头肾中的上调表达时间存在一定差异,提示头肾与脾脏在免疫应答中的作用可能并非完全一致。同时根据本实验结果可知,大黄鱼本身就具有一定的 *LcIgMH* 本底表达水平,显示鱼体在生长过程中已经发生过特异性免疫应答或者是为合成 BCR 服务,同时暗示 *LcIgMH* 在大黄鱼的整个生命活动中都具有重要意义。王亚凤等^[21]在对胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 早期发育各时期进行 IgM RNA 的检测,发现其在出膜后一个月就有明显的表达,表明自然状态下脊椎动物很早就可能开始接触抗原并产生相关免疫应答或者合成 BCR。

对雌雄大黄鱼各组织中 *LcIgMH* 的表达水平进行检测分析,本研究发现不同性别的大黄鱼并不会差异性地表达 *LcIgMH*。在对大西洋鳕鱼的研究^[22]中亦发现体长相近但性别不同的个体,与免疫相关的待检测指标都不存在明显差异。上述结果暗示鱼类的性别差异并不会对其 *IgMH* 的表达产生显著性影响。

免疫球蛋白在体内发挥相关生物学作用,是一个十分复杂的过程。国内外已经有诸多文献指出各组织 mRNA 的表达量,并不一定能准确反映相关蛋白在生物体内的含量及其发生相应生物学作用的场所。利用 Western Blot 检测胭脂鱼各组织中 IgM 蛋白的表达情况时,发现在用 qRT PCR 并未检测出 *IgM* 转录本的皮肤与心脏中,却可以检测出胭脂鱼 IgM 蛋白,推测可能是机体血液循环将 IgM 蛋白运送至上述组织所致^[21]。此外,ELISA 也是常用的检测 IgM 蛋白的手段,但是人们认为前者比后者更灵敏且可信度更高。如 Jirapongpairon 等^[23]设计 2 种抗鱼 IgMH 血清,同时利用上述两种方法对 7 种鱼类血清进行检测,发现 Western blot 的灵敏度远高于 ELISA。因此,后续深入探究大黄鱼 *LcIgMH* 在体内从表达达到发挥相应的生物学作用的过程,需要结合核酸与蛋白质的相关技术研究手段进行系统分析。

[参 考 文 献]

- [1] 吕翠,安利国,杨桂文. 硬骨鱼新型免疫球蛋白的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(8): 905-913.
- [2] 陈孔茂. 大菱鲆免疫球蛋白 D 重链基因的克隆与表达研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [3] WILSON M, BENGTAËN E, MILLER N W, et al. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(9): 4593-4597.

- [4] HANSEN J D, LANDIS E D, PHILLIPS R B, et al. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(19): 6919-6924.
- [5] DANILOVA N, BUSSMANN J, JEKOSCH K, et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z [J]. Nature Immunology, 2005, 6(3): 295-302.
- [6] SAVAN R, AMAN A, SATO K, et al. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu [J]. European Journal of Immunology, 2005, 35(11): 3320-3331.
- [7] 王欣欣. 草鱼免疫球蛋白重链基因的克隆 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.
- [8] GREENBERG A S, HUGHES A L, GUO J, et al. A novel "chimeric" antibody class in cartilaginous fish: IgM may not be the primordial immunoglobulin [J]. European Journal of Immunology, 1996, 26(5): 1123-1129.
- [9] ANDERSON M K, STRONG S J, LITMAN R T, et al. A long form of the skate IgX gene exhibits a striking resemblance to the new shark IgW and IgNARC genes [J]. Immunogenetics, 1999, 49(1): 56-67.
- [10] 张彩兰, 刘家富. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策 [J]. 上海海洋大学学报, 2002, 11(1): 77-83.
- [11] 谢芳靖. 大黄鱼抗病功能基因的克隆与分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2007.
- [12] 岳亮, 王艺磊, 张子平, 等. 日本囊对虾性腺蛋白质双向电泳的样品制备方法的改进 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2011, 16(4): 246-251.
- [13] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况 [J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648-654.
- [14] HUANG B, HUANG W S, NIE P. Cloning and expression analyses of interferon regulatory factor (IRF) 3 and 7 genes in European eel, *Anguilla anguilla* with the identification of genes involved in IFN production [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 37(2): 239-247.
- [15] BUONOCORE F, RANDELLI E, FACCHIANO A M, et al. Molecular and structural characterisation of a macrophage migration inhibitory factor from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2010, 136(3): 297-304.
- [16] 刘云. 牙鲆免疫系统形态结构、发育和感染病理反应的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [17] WANG T T, SONG X H, BAO G M, et al. Molecular characterization, expression analysis, and biological effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(5): 1421-1432.
- [18] CASTRO R, JOUNEAU L, PHAM H P, et al. Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection [J]. Plos Pathogens, 2013, 34(6): 1643-1644.
- [19] KOCABAS A M, LI P, CAO D, et al. Expression profile of the channel catfish spleen: analysis of genes involved in immune functions [J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(6): 526-36.
- [20] NEUMANN N F, STAFFORD J L, BELOSEVIC M. Biochemical and functional characterisation of macrophage stimulating factors secreted by mitogen-induced goldfish kidney leucocytes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(2): 167-186.
- [21] 王亚凤, 张小萍, 李焕, 等. 胭脂鱼 IgM 重链基因克隆与表达分析 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(3): 192-198.
- [22] MAGNADÓTTIR B, JÓNSDÓTTIR H, HELGASON S, et al. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II: the effects of size and gender under different environmental conditions [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 1999, 122(2): 173-180.
- [23] JIRAPONGPAIROJ W, HIRONO I, KONDO H. Development and evaluation of polyclonal antisera for detection of the IgM heavy chain of multiple fish species [J]. Journal of Immunological Methods, 2017, 449: 71-75.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)