

虾夷扇贝 C 型凝集素母源传递与抑菌作用的初步研究

吴彪^{1,2}, 迟长风³, 杨爱国^{2*}, 张士瑾¹, 刘志鸿², 周丽青²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 浙江海洋学院海洋科学学院, 浙江 舟山 316000)

摘要: 为研究虾夷扇贝 C 型凝集素的母源传递及其抑菌作用, 实验运用 qRT-PCR 技术检测了经鳃弧菌刺激后虾夷扇贝卵巢中 C 型凝集素的表达模式, 比较分析了 C 型凝集素基因在正常虾夷扇贝和鳃弧菌刺激的虾夷扇贝所产的卵及其胚胎发育前期的存在与变化; 通过抑菌实验研究了卵胞浆中 C 型凝集素抑制细菌存活的作用。结果表明, 鳃弧菌刺激能够诱导虾夷扇贝卵巢中的 C 型凝集素 mRNA 表达量显著变化, 最高表达量出现在刺激 8 h 后, 为对照组的 6.2 倍; 母体中 C 型凝集素可以传递给卵和胚胎, 刺激组表达量极显著高于正常组, 且表达量都随胚胎发育逐渐降低, 至受精 36 h 时分别为正常对照卵的 0.3 和 0.2 倍; 蛋白终浓度为 200 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卵无细胞体系都具有一定的抑菌作用, 与 C 型凝集素家族抗体反应后, 细菌存活率显著上升, 说明母源 C 型凝集素在抑制细菌存活方面发挥了重要的作用。

关键词: 虾夷扇贝; C 型凝集素; 母源传递; 抑菌作用

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

母源性免疫是指母体通过胎盘、母乳或者卵子向子代传递的免疫力。由于新生个体在发育早期免疫系统尚未成熟, 故母源免疫对保护新生体早期发育过程中免受各类病原体的侵害具有重要作用。目前, 有关母源免疫因子的报道多集中于抗体、补体、溶菌酶、急相反应蛋白及过氧化物酶等, 而且这些因子对子代的免疫保护作用已经在哺乳动物^[1]、鸟类^[2]和两栖动物^[3]等多种动物中得到证明, 禽类中已经应用并取得了良好的效果^[4]。在水产动物中, 只有在鱼^[5-8]、虾^[9]、文昌鱼^[10]等物种中有相关报道, 且主要集中于检测卵或子代中母源免疫因子的存在、对子代的保护作用等, 如 Wang 等^[7]运用 ELISA 证明了斑马鱼 (*Danio rerio*) 母源抗体的传递, 并检测了母源 IgM 在受精后的持续时间及对早期胚胎的保护作用。由于多数水产动物的繁殖模式为体外受精、体外发育, 卵和受精卵完全暴露于开放的水环境中, 而且大多数胚胎发育前期自身免疫系统还没

有开始形成或者并不完善, 卵和新生胚胎会面临着水环境中的细菌^[11]、病毒^[12]和寄生虫^[13]等很多病原体的威胁, 因此, 母源免疫对水产动物具有更加重要的作用。

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 原产于日本北海道、俄罗斯远东地区及朝鲜东岸等沿海, 在上世纪 80 年代引入中国, 近些年年产量 25 万 t, 现已经成为我国主要的大型经济养殖贝类之一。虾夷扇贝苗种繁育过程中, 孵化及培育用水一般只经过沙滤处理, 这种水环境很容易滋生病原微生物, 而卵以及胚胎的发育自始就处在这种水中。C 型凝集素是动物凝集素家族的重要成员, 对主要依靠非特异性免疫进行机体免疫防御的贝类具有重要的免疫学意义^[14]。业已证明, 凝集素在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[15]、金枪鱼 (*Katsuwonus pelamis*)^[16]、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[17]、大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)^[18] 等多种鱼中存在

收稿日期: 2012-12-04 修回日期: 2013-01-25

资助项目: 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题 (20110201); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (20603022011013)

通信作者: 杨爱国, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

母源传递现象,并在卵或受精卵发育期间发挥了凝集活性、调理吞噬细胞吞噬等作用^[19-20]。探索虾夷扇贝 C 型凝集素的母源传递,对认识贝类胚胎发育早期的免疫防御机制具有重要意义,能够为贝类母源免疫研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 虾夷扇贝来源与暂养

虾夷扇贝取自于山东省长岛县大长山海区,扇贝运回实验室后室内充气暂养一周,暂养水温控制在 $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$,每天投喂硅藻 3 次,换水 2 次。实验处理前 2 天停止投喂饵料。

1.2 鳗弧菌刺激实验

将经过复苏与活化的鳗弧菌用 pH 7.5 的 TBS-CaCl₂ (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂) 重悬,调整浓度至 OD₆₀₀ 为 0.5,用一次性无菌医用注射器向每只虾夷扇贝闭壳肌注射 50 μL 菌悬液,注射完成后在原驯养条件下继续进养殖。注射 50 μL TBS-CaCl₂ 的扇贝作为对照组,未进行注射处理的作为空白组。

1.3 虾夷扇贝卵巢中 C 型凝集素基因对细菌感染的响应

细菌刺激后,分别在 2、4、8、16、32 和 48 h 时随机各取 5 只虾夷扇贝的卵巢用于提取 RNA,以消除个体之间的差异。RNA 提取采用常规 Trizol 法进行,提取的 RNA 用 DEPC 处理的水进行溶解并加入 DNA 酶去除其中的 DNA, -80°C 保存备用。RNA 浓度、完整性分别通过超微量分光光度计(Thermo)和 1.5% 琼脂糖电泳检测。以 2 μg 总 RNA 为模版,运用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 进行反转录获得单链 cDNA,反应体系及操作步骤按照试剂盒说明书进行,并用 β -actin 检测 cDNA 质量。根据 GenBank 数据库中虾夷扇贝 C 型凝集素基因 cDNA 序列,运用 Primer Premier 5.0 设计引物用于 qRT-PCR 检测,内参基因 β -actin 引物来自于鲍相渤等^[21],引物序列信息及产物长度见表 1。

运用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 进行实时荧光定量 PCR 反应,反应体系为 25 μL ,其中包括 Ex Taq 12.5 μL 、正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL 、模板 2 μL 、灭菌蒸馏水 9.5 μL 。反应在 BIOER LineGene 9600 上进行,程序为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s;62 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s;72 $^\circ\text{C}$ 延

伸 30 s,40 个循环。在 72 $^\circ\text{C}$ 时采集荧光信号。内参基因与目的基因分管同时进行,设置阴性对照(无模板),每个样品 3 个重复,数据取平均值。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 1 Primers for real-time PCR

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence	长度/bp length	产物/bp product
CTL	F:TAGGCTGCCGAGTCGTGTT	19	231
	R:TGTCCGATACAGAAGCAA	18	
β -actin	F:AGTCCCAATCTACGAAGGTTATG	23	224
	R:CCAGTGATGAGGAGGAAGCAG	21	

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[22] 对基因的相对表达量进行分析,其中 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{处理组})} - \Delta C_{t(\text{对照组})}$, $\Delta C_{t(\text{处理组})} = C_{t(\text{目的基因(处理组)})} - C_{t(\text{内参基因(处理组)})}$, $\Delta C_{t(\text{对照组})} = C_{t(\text{目的基因(对照组)})} - C_{t(\text{内参基因(对照组)})}$ 。

利用 SPSS 11.5 对数据进行单因素方差分析,显著水平为 $P < 0.05$,极显著水平为 $P < 0.01$ 。

1.4 母源 C 型凝集素在虾夷扇贝卵和胚胎发育早期过程中表达量的变化

将待产雌性虾夷扇贝随机分为 2 组,每组数量 10 只以上。细菌感染运用上述方法进行,根据上述 1.3 实验结果选择 C 型凝集素基因高表达时进行催产,获得 5 只以上个体的卵子,并进行人工受精,之后在 14 $^\circ\text{C}$ 的海水中充气孵化。在受精 0、4、12、20、28 和 36 h 分别收集样品用以提取 RNA。方法为:将卵或胚胎放入 1.5 mL 离心管中,自然沉降后吸除海水,超纯水快速洗卵 3 次。RNA 提取及 cDNA 合成按上述方法进行。不进行细菌感染的为正常组,其他操作过程如同感染组。用 1.2 中所述的 qRT-PCR 法检测 2 组卵及受精卵中 C 型凝集素基因表达变化情况。

1.5 母源 C 型凝集素的抑菌作用

卵无细胞体系总蛋白制备 升温刺激法获得刺激组和未刺激组的虾夷扇贝卵子,用预冷的 TBS-CaCl₂ 将卵冲洗干净并吸除多余水分后,置于预冷的 1.5 mL EP 管中,用研磨棒在冰上将其快速捣碎,制成均一混合物。混合物置于 4 $^\circ\text{C}$ 预冷的离心机中,12 000 $\times g$ 离心 15 min 后,弃沉淀,取上清液即为卵无细胞体系总蛋白。为防止蛋白质降解,向得到的上清液中加入蛋白酶抑制剂 cocktail, -80°C 保存备用。

抑菌效果比较 BCA 法测定卵无细胞体系的蛋白总浓度,并用 TBS-CaCl₂ 调整蛋白浓度

为 400 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每个浓度样品分为 2 组,加入等体积 C 型凝集素家族抗体 (1:3 000),并在室温反应 2 h 以中和总蛋白中的 C 型凝集素的为抗体反应组,另一组不加抗体为无抗体反应组。杀菌活性按照 Khan 等^[23]的方法稍作修改,通过菌落计数法进行测定。首先运用血球计数板计数 TBS 重悬清洗好的菌体,并将其稀释至 $10^4/\text{mL}$ 作为实验浓度。然后在各组中分别取 100 μL 样品与 100 μL 菌液混合后,在 12 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下分别振荡孵育 20、40、60 和 80 min,孵育结束每管样品涂布 3 个平板,每个平板涂布 50 μL 。100 μL 菌液与 100 μL TBS 的混合液不经孵育直接涂板作为初始组。平板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12~16 h,对长出的单菌落进行计数,以 3 个平板计数结果的平均值作为最后长出的细菌菌落数。实验组的存活率 (%) = 实验组的菌落数/初始组的菌落数 \times 100。实验 3 次重复,数据利用统计学软件 SPSS 11.5 进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 虾夷扇贝卵巢中 C 型凝集素基因对鳃弧菌注射感染的响应

鳃弧菌感染后,虾夷扇贝卵巢中 C 型凝集素的表达量结果见图 1。从图 1 可以看出,注射鳃弧菌后 2 h,虾夷扇贝卵巢中的 C 型凝集素基因表达量便开始上调,但与对照和空白组差异不显著;4 h 时表达量显著上升,8 h 时达到最高峰,是空白组的 6.2 倍,与其他时间的表达量存在差异显著;之后表达量开始明显下降,16 h 时下降至对照组 4.3 倍,32 h 时接近对照组水平。

2.2 C 型凝集素在虾夷扇贝卵子和早期胚胎的相对表达量

对虾夷扇贝卵子和早期胚胎中母源 C 型凝集素的 qRT-PCR 检测结果如图 2。从图 2 可以看出,在卵子和胚胎发育前期都能够检测到母源 C 型凝集素的存在;相对表达量方面,细菌刺激组的卵子中 C 型凝集素表达量是未刺激组的 6.9 倍,胚胎发育前 28 h 刺激组都极显著高于未刺激组,这说明母体中的 C 型凝集素通过卵子传递给了后代,而且其表达量高低与母体表达量水平相关;随着胚胎的发育,母源 C 型凝集素基因的表达量都逐步下降,受精 4 h 后下降幅度较大,至 36 h 时两组下降到较低水平且两组间无显著差异,分别为对照组的 0.2 和 0.3 倍。

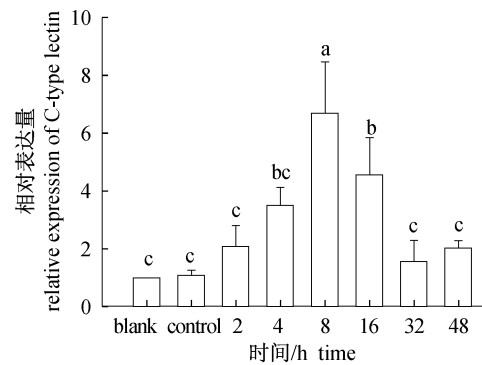


图 1 注射鳃弧菌后虾夷扇贝卵巢中 C 型凝集素 mRNA 在不同时间的表达量变化

不同字母代表差异显著。

Fig. 1 mRNA expression of C-type lectin in ovary at different time points after bacterial challenge by qRT-PCR analysis

Different letters mean the significant difference.

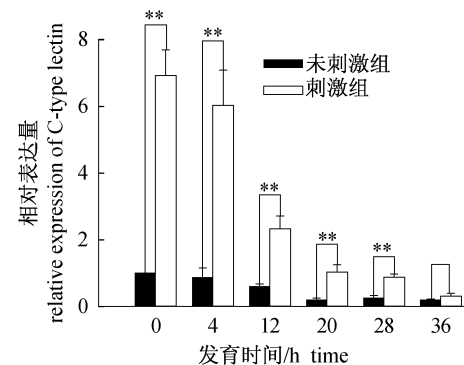


图 2 母源 C 型凝集素基因 mRNA 在受精后不同时间的表达量变化

** 表示 C 型凝集素基因表达量存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

Fig. 2 mRNA expression of C-type lectin in embryos at different time points after fertilization

** means the difference of mRNA expression of C-type lectin from two groups was extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.3 虾夷扇贝母源 C 型凝集素的抑菌作用

运用 BCA 法对获得的卵无细胞体系蛋白总浓度进行测定,得到蛋白总浓度为 1.2 mg/mL 。与不同组别的卵无细胞体系孵育后,鳃弧菌生长存活情况见表 2。结果表明,鳃弧菌存活率的范围是 $(28.84 \pm 1.18)\% \sim (60.03 \pm 2.24)\%$,总蛋白终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卵无细胞体系在与 C 型凝集素家族抗体反应后,与菌液孵育 20 min 时存活率最高,未加抗体、总蛋白终浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卵无细胞体系与菌液孵育 60 min 时存活率最低;孵育

时间相同时,加入抗体的卵无细胞体系抑菌作用小,鳗弧菌存活率显著高于未加抗体组(表 2,图 3),说明母源 C 型凝集素对鳗弧菌生长具有一定

的抑制作用;另一个方面,总蛋白浓度为 200 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卵无细胞体系,对鳗弧菌的抑制作用都随着与菌液孵育时间的延长而增强。

表 2 鳗弧菌与不同处理的卵无细胞体系孵育后的存活率

组别 groups	与初始组相比,各处理组的存活率($X \pm \text{SEM}$) survival rate of bacteria in different groups compared with the initial group			
	20 min	40 min	60 min	80 min
	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (无抗体反应)	42.73 \pm 1.93	35.48 \pm 1.46	33.19 \pm 1.71
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗体反应)	60.03 \pm 2.24 *	49.89 \pm 1.52 *	47.89 \pm 0.85 *	44.52 \pm 1.92 *
400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (无抗体反应)	33.9 \pm 0.86	31.13 \pm 1.96	28.84 \pm 1.18	29.32 \pm 1.23
400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗体反应)	53.76 \pm 1.48 *	41.36 \pm 1.21 *	42.78 \pm 1.44 *	40.01 \pm 1.32 *

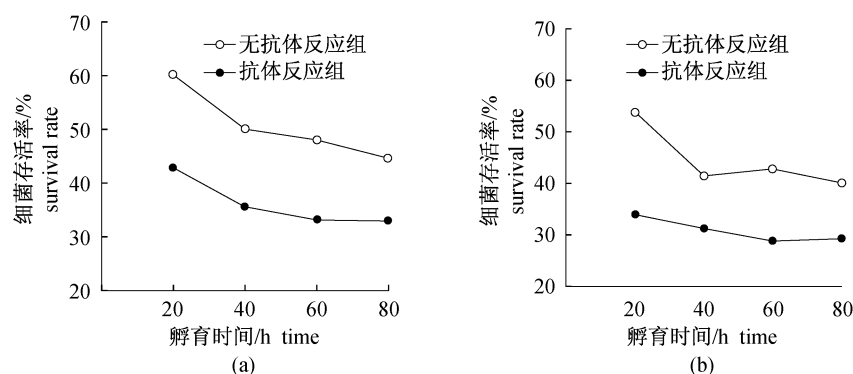


图 3 鳗弧菌与不同组别卵无细胞体系孵育后的存活率

(a) 表示总蛋白浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; (b) 表示总蛋白浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组。

Fig. 3 The survival rate of bacteria reacted with different egg cytosol

(a) the protein concentration of this group was 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (b) the protein concentration of this group was 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3 讨论

C 型凝集素是凝集素家族中的重要成员,介导很多免疫反应。C 型凝集素结构域在线虫基因组中位列第 7,而在人类基因组中,其数量则仅为第 43 位,这足以说明 C 型凝集素在无脊椎动物的免疫作用中占有非常重要的地位。C 型凝集素在贝类免疫防御过程中也发挥了重要作用,学者已经在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[24-25]、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[26]、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)^[27] 等多个贝类中克隆获得了许多 C 型凝集素基因并对其免疫功能进行了研究,证实贝类某些组织中 C 型凝集素在受到病原体侵染后能够迅速做出上调响应以参与免疫反应。实验中,qRT-PCR 检测结果表明了细菌感染可以诱导虾夷扇贝卵巢中的 C 型凝集素基因的高表达,4~16 h 表达量显著高于对照组,并且在注射 8 h 时表达量达到最大值,32 h 时又基本降至到了正常水平,说明该 C 型凝集素参与了虾夷扇贝

机体的免疫防御反应,与上述几种贝类的研究结果相近。有关基因表达的响应时间和程度在不同研究中可能存在一定的差异,如本研究中鳗弧菌注射刺激后 8 h C 型凝集素基因表达量为对照组的 6.2 倍,而 Zhu 等^[26] 在研究海湾扇贝时最高表达量是对照的 4.9 倍。笔者认为造成这种差异的原因可能是多方面的,如选用的菌体毒力不同、实验动物的抗感染能力强弱不同、检测组织不同等情况都可能会引起上述的差异,但每个研究中,处理组 C 型凝集素基因相对于对照组基本一致的表达变化可以说明其参与了免疫防御反应,发挥了免疫保护作用。

目前,在水产领域中已开展有关母源免疫研究的种类不多,其中鱼类最多,研究最为深入。在硬骨鱼类中,业已证明的能够从母体传递给子代的免疫因子主要有抗体^[5,7,28]、补体^[29]、凝集素^[15-18]、溶菌酶^[30-31]等,而且这些免疫因子在胚胎发育早期发挥重要的抵御病原体的作用。其中,凝集素作为一种非特异性免疫因子的母源传

递及免疫作用在虹鳟、金枪鱼等多个鱼类中有过报道。开展母源免疫相关研究,首先应该检测免疫因子从母体到子代的传递规律。Jung 等^[16]利用凝胶过滤、亲和层析的方法,在金枪鱼未受精的卵中分离纯化到一种凝集素,并对其氨基酸成分、糖成分和亚基组成进行了分析,检测了其对红细胞的凝集作用,研究从蛋白质水平证实了凝集素的母源传递和免疫作用。C 型凝集素作为虾夷扇贝重要的免疫因子,从母体通过卵子向子代的传递在实验中得到证实。本研究中,选择细菌感染刺激后 C 型凝集素高表达时对亲贝进行升温催产,同时未进行感染的作为正常组,胚胎发育前 28 h 刺激组 C 型凝集素的表达量显著高于正常组,特别是在未受精的卵子中,刺激组表达量是未刺激组的 6.9 倍,与卵巢受感染后 8 h 时的响应值相差不大,这与 Olsen 等^[28]在大西洋鲑 (*Salmo salar* L.) 中证实的亲鱼、卵子、胚胎及仔鱼中的抗体含量与母源抗体含量呈正相关关系的研究结果一致,说明母体中的 C 型凝集素通过卵子传递给了后代。实验结果也表明,母源 C 型凝集素 mRNA 的表达量在胚胎发育过程中具有时间依赖性。随着胚胎的发育,C 型凝集素 mRNA 表达量逐渐减少,至受精 36 h 时未刺激组和刺激组表达量分别为正常未受精卵子的 0.2 和 0.3 倍,并且两组间没有显著差异。Wang 等^[7]在研究斑马鱼受精卵产出后母源性 IgM 的持续存在时间时发现,IgM 随时间增长逐渐减少,至第 5 天就检测不到母源 IgM 的存在。

抑菌活性实验已广泛应用于检测活性蛋白的抑菌(杀菌)免疫功能研究。实验中,与未加 C 型凝集素抗体反应的卵无细胞体系相比,加入抗体组的细菌存活率显著上升,说明卵子中存在母源 C 型凝集素蛋白,并发挥了抑菌作用,间接表明母源 C 型凝集素对子代的具有保护作用。随着卵无细胞体系与菌液孵育时间的延长,细菌存活率呈下降趋势,但是差异不显著,而且总蛋白浓度越高,细菌存活率越低。卵无细胞体系中 C 凝集素的抑菌作用具有浓度依赖,实验中所用卵子数量较多,所以对于每个卵子来讲,C 型凝集素含量有限,提高卵子中包括 C 型凝集素在内的多种免疫因子的含量是提高子代免疫能力的重要措施。本文初步研究了虾夷扇贝 C 型凝集素的母源传递和抑菌作用,为进一步探讨提高虾夷扇贝子代免

疫能力提供了基础资料,这在虾夷扇贝人工苗种繁育工作中对提高子代成活率具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Leach L, Eaton B M, Firth J A, *et al.* Uptake and intracellular routing of peroxidase-conjugated immunoglobulin-G by the perfused human placenta [J]. *Cell and Tissue Research*, 1990, 261 (2): 383 - 388.
- [2] Hamal K R, Burgess S C, Pevzner I Y, *et al.* Maternal antibodies transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens [J]. *Poultry Science*, 2006, 85 (8): 1364 - 1372.
- [3] Poorten T J, Kuhn R E. Maternal transfer of antibodies to eggs in *Xenopus laevis* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(2):171 - 175.
- [4] 徐汉祥. 畜禽母源抗体的传递与作用[J]. *江苏农业科学*, 1991(1):62 - 63.
- [5] Swain P, Dash S, Bal J, *et al.* Passive transfer of maternal antibodies and their existence in eggs, larvae and fry of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4):519 - 527.
- [6] Sin Y M, Ling K H, Lam T J. Passive transfer of protective immunity against *Ichthyophthiriasis* from vaccinated mother to fry in Tilapias, *Oreochromis aureus* [J]. *Aquaculture*, 1994, 120 (3 - 4): 229 - 237.
- [7] Wang H M, Ji D R, Shao J Z, *et al.* Maternal transfer and protective role of antibodies in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Molecular Immunology*, 2012, 51 (3 - 4): 332 - 336.
- [8] Bly J E, Grimm A S, Morris I G. Transfer of passive immunity from mother to young in a teleost fish: Haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L. [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1986, 84(2):309 - 313.
- [9] Huang C C, Song Y L. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23(7 - 8):545 - 552.
- [10] Liang Y J, Zhang S C, Wang Z P. Alternative

- complement activity in the egg cytosol of amphioxus *Branchiostoma belcheri*; evidence for defense role of maternal complement components [J]. *Plos One*, 2009, 4(1) : e4234.
- [11] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(6) : 1435 – 1446.
- [12] Mushiaki K, Nishizawa T, Nakai T, *et al.* Control of VNN in striped jack; selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) [J]. *Fish Pathology*, 1994, 29(3) : 177 – 182.
- [13] Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections; from innate immunity to immunoprophylactic prospects [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 126(3 – 4) : 171 – 198.
- [14] 陈政强, 黄健, 战文斌, 等. 贝类凝集素的特性与功能 [J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2007, 12(4) : 314 – 321.
- [15] Tateno H, Yamaguchi T, Ogawa T, *et al.* Immunohistochemical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26(6) : 543 – 550.
- [16] Jung W K, Park P J, Kim S K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* [J]. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003, 35(2) : 255 – 265.
- [17] Dong C H, Yang S T, Yang Z A, *et al.* A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish [J]. *Developmental Biology*, 2004, 265(2) : 341 – 354.
- [18] Voss EW Jr, Fryer J L, Banowetz G M. Isolation, purification, and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1978, 186(1) : 25 – 34.
- [19] Nosek J, Krajhanzl A, Kocourek J. Binding of the cortical granule lectin to the jelly envelope in mature perch ova [J]. *The Histochemical Journal*, 1984, 16(4) : 429 – 431.
- [20] Olafsen J A. Lectins; models of natural and induced molecules in invertebrates [J]. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 1996, 24 : 49 – 76.
- [21] 鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量 PCR 中表达稳定性的比较 [J]. *水产科学*, 2011, 30(10) : 603 – 608.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4) : 402 – 408.
- [23] Khan Sattar M A, Nakamura S, Ogawa M, *et al.* Bactericidal action of egg yolk phosphovitin against *Escherichia coli* under thermal stress [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(5) : 1503 – 1506.
- [24] Zhang H, Wang H, Wang L L, *et al.* Cflec-4, a multidomain C-type lectin involved in immune defense of Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(6) : 780 – 788.
- [25] Wang H, Song L S, Li C H, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(5) : 722 – 731.
- [26] Zhu L, Song L S, Xu W, *et al.* Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3) : 231 – 238.
- [27] 胡钰婷, 张殿昌, 崔淑歌, 等. 合浦珠母贝 C-型凝集素基因的序列特征和功能分析 [J]. *水产学报*, 2011, 35(9) : 1327 – 1336.
- [28] Olsen Y A, Press C M. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localisation of immunoglobulin in the egg [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1997, 7(2) : 81 – 91.
- [29] Wang Z P, Zhang S C, Tong Z, *et al.* Maternal transfer and protective role of the alternative complement components in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Plos One*, 2009, 4(2) : e4498.
- [30] Yousif A N, Albright L J, Evelyn T P T. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1991, 10 : 45 – 49.
- [31] Wang Z P, Zhang S C. The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Danio rerio*) egg cytosol [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(5) : 773 – 777.

A preliminary study on the maternal transfer and bacteriostasis of a C-type lectin in scallop (*Patinopecten yessoensis*)

WU Biao^{1,2}, CHI Changfeng³, YANG Aiguo^{2*}, ZHANG Shicui¹, LIU Zhihong², ZHOU Liqing²

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. School of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: Maternal transfer of immune factors from mother to eggs has been reported in many aquatic species, and these factors played important immune roles in developing embryos and larvae. However, the study on maternal immunity of shellfish remains lacking. In this study, maternal transfer and bacteriostasis of a C-type lectin in scallop (*Patinopecten yessoensis*) were analyzed. We detected the mRNA expression pattern of the C-type lectin gene in ovary and early developing larvae using the real-time quantitative PCR method, and tested the antibacterial activity of maternal C-type lectin in eggs by colony-forming unit (CFU) assay. The results of qRT-PCR showed that the expression of C-type lectin gene in ovary after bacterial challenge was time-dependent, and it was up-regulated gradually from 2 h after injection of bacteria and reached the peak at 8 h which was 6.2 times compared to the control group, and then dropped progressively to the original level. On the other hand, the fact that mRNA was found both in the eggs and larvae indicated that it could be transferred from mother to offspring. The mRNA expression in bacterial challenge group was significantly higher than those in normal group except for the 36 h point. The CFU assay revealed that the cytoplasm of eggs with protein concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had lethal effect on the bacteria *Vibrio anguillarum*, and the function weakened significantly once the antibody of C-type lectin was added, which indicated the C-type lectin from mother had antibacterial activity. It is concluded that the maternal C-type lectin can transfer from mother to the offspring and has antibacterial activity.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; C-type lectin; maternal transfer; bacteriostasis

Corresponding author: YANG Aiguo. E-mail: yangag@ysfri.ac.cn