

文章编号: 1000-0615(2017)02-0161-10

DOI: 10.11964/jfc.20160610440

环境胁迫对大菱鲆C-型凝集素功能的影响

夏丹丹^{1,2}, 马爱军^{1,2*}, 黄智慧^{1,2}, 王新安^{1,2},
孙志宾^{1,2}, 崔文晓^{1,2}, 曲江波³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 烟台开发区天源水产有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 大菱鲆C-型凝集素(*SmLec1*)是一种重要的免疫因子, 本实验通过分析其活性特点以及环境胁迫对其表达调控的影响, 探讨其在大菱鲆先天免疫应答过程中的潜在功能以及养殖环境中的应用。实验利用原核表达系统进行重组表达, 并通过纯化获得19 ku重组目的蛋白; 活性分析结果显示, *SmLec1*对所选6种细菌的凝集作用存在差异, 其中对鳃弧菌和爱德华氏菌具有明显的凝集作用; 在选取的8种糖类中, 木糖、果糖、蔗糖、乳糖和甘露糖能够抑制*SmLec1*的凝集活性; 在理化因子(pH、温度)中, pH<7和温度>37 °C时对*SmLec1*的凝集活性产生抑制; 鳃弧菌感染实验显示, 感染6 h时肝组织的*SmLec1*表达量明显上升, 在12 h时达到最高值, 随后有所下降; 温度胁迫时肝组织的*SmLec1* mRNA表达量受到温度的影响显著, 在19 °C开始升高, 22~27 °C呈降低趋势, 其他组织变化不显著。盐度胁迫对*SmLec1*在各盐度的表达量变化不显著。研究表明, *SmLec1*能够抑制鳃弧菌的感染, 其表达受到温度的影响, 本研究为进一步明确*SmLec1*蛋白的抗菌机理和探索对大菱鲆疾病的免疫学防治途径提供科学依据。

关键词: 大菱鲆; C-型凝集素; 鳃弧菌; 蛋白重组; 凝集活性; 环境胁迫

中图分类号: Q 754; S 931.3

文献标志码: A

凝集素最早发现于1888年, 俄国科学家Stillmark发现蓖麻种子的提取物能够凝集血细胞, 后经研究发现, 许多来自于植物种子中的蛋白均能够凝集红血球, 因而这一类蛋白被称为凝集素。随着凝集素的独特性质被大家发现, 越来越多的学者对其产生兴趣, 不仅仅只限于植物, 很多生物体中都有凝集素的发现。C-型凝集素是最早发现的动物凝集素之一, 其结构中含有一个长度约为130个氨基酸残基的保守碳水化合物结合域(carbohydrate binding domains, CDRs), 具有Ca²⁺依赖性, 分布广泛、功能复杂, 涉及体内许多重要的生理、病理过程, 成为越

来越多国内外学者的研究热点^[1]。C-型凝集素作为模式识别受体行使了一系列重要的生理功能, 参与“非己”识别和对入侵病原的清除, 在先天性免疫防御中具有重要作用^[2-4]。通过识别微生物细胞壁的糖(病原相关分子模式)而启动机体免疫应答途径, 主要功能: 通过调理作用, 参与免疫识别和对微生物的凝集吞噬作用; 介导细胞之间的粘附、迁移和细胞之间的相互作用; 参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等一系列作用; 引发凝集素补体途径的激活等。近几年, C-型凝集素在海洋动物中的研究逐渐增多, 目前已在异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、栉

收稿日期: 2016-06-08 修回日期: 2016-09-22

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-50-G01); 中国博士后科学基金(2015M572096); 山东省自然科学基金(ZR2014CP001); 青岛市博士后科学基金(2014-2016); 现代农业人才支撑计划(2016-2020)

通信作者: 马爱军, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

孔扇贝(*Chlamys farreri*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[2, 5-9]等中展开了较为深入的研究。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是原产欧洲沿海的一种特有的名贵低温经济鱼类, 目前已成为我国北方沿海工厂化养殖的主导品种之一^[10]。然而由于大菱鲆养殖业所产生的良好经济和社会效益, 盲目追求经济发展、片面扩大养殖规模、高密度养殖和过剩投饵等使大菱鲆的生存环境恶化, 导致鱼体产生一系列的应激反应和保护机制。如果外界胁迫没有及时解除, 持续的应激状态会影响机体的免疫能力, C-型凝集素作为免疫因子自然会受到环境胁迫的影响, 进而被削弱作用。因此, 了解环境胁迫对大菱鲆C-型凝集素的影响, 对有效提高大菱鲆本身的抗病能力起着关键作用。目前鱼类凝集素方面的研究已有报道, 但环境胁迫对鱼类凝集素影响的报道较为鲜见, 为此, 本实验采用分子生物学及生物化学的方法研究大菱鲆C-型凝集素的环境胁迫对鱼体蛋白功能的影响, 为进一步研究大菱鲆C-型凝集素蛋白的抗菌机理和探索大菱鲆疾病的免疫学防治途径提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用大菱鲆均来自本实验室在山东烟台天源水产有限公司构建的大菱鲆选育家系, 选取300尾幼鱼, 规格均一、健康无伤, 体长(8.5±0.3) cm, 体质量(90±1.5) g。实验前于60 L的玻璃钢桶中暂养1周, 并保持温度为(13±0.5) °C的循环水体系中, 氧气泵连续通氧, 溶解氧含量大于7.3 mg/L, 盐度为28, 每天早晚各1次投喂配合饵料。

1.2 实验方法

组织特异性表达分析 提取各组织(鳃、脾、肝、头肾、肾、肠、皮肤和肌肉)总RNA(方法依照TIANGEN动物组织总RNA提取试剂盒说明书); 测定提取的RNA浓度, 取适量反转录成cDNA, 取1 μL cDNA作为模板, 利用Primer 5.0, 根据C-型凝集素*SmLec1* (GenBank accession no:

GU385827)^[11]基因序列设计C-型凝集素特异引物C-YGDL-AS-100和C-YGDL-S-100(表1), 并在*Taq polymerase*的作用下进行特异性扩增。扩增结束后, 利用1.2%琼脂糖凝胶电泳系统对PCR产物进行检测, 利用凝胶成像软件(UV-systems)对条带强度进行分析。以上述所制备的cDNA为模板, 以C-YGDL-AS-100、C-YGDL-S-100、β-actin-F和β-actin-R为引物进行目的基因和内参基因的荧光定量PCR, 反应体系为20 μL, 包含2 μL cDNA, 10 μL Fast SYBR® Green Master Mix, 引物(1 μmol/L)各1 μL, 6 μL双蒸水。反应参数: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共35个循环, 72 °C延伸2 min, 内参基因扩增条件同上, 反应重复3次。使用SYBR®Premix ExTaq™(TaKaRa)染料。

表1 实验中所用引物序列

Tab. 1 Primers used in experiments

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')
C-YGDL-AS-100	GAAGAAGAACATCCTACATCGTCC
C-YGDL-S-100	GGTGTCCAAAAGAACCTGATAATA
β-actin-F	GTAGGTGATGAAGCCAGAGC
β-actin-R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT

温度胁迫对C-型凝集素表达量的影响 升温方法参考Ndong等^[12], 稍作改动: 设计5个温度, 即(13±0.5) °C(常温)、19、22、25、27 °C, 从正常水温(13±0.5) °C按每12 h增加1 °C的速率升高至实验水温, 每个温度设3个平行组, 每组投放15尾大菱鲆幼鱼。采用静水法, 自动恒温加热器控温, 保证几个温度组同时进行升温。实验鱼在实验温度下喂养48 h后取组织(鳃、脾、肝、头肾、肾、肠、皮肤和肌肉), 保存在液氮中, 以备后续实验。提取各组织的RNA后经过反转录得到cDNA, 进行PCR后经琼脂糖凝胶电泳实验, 检测其质量后进行荧光定量PCR, 步骤同上。

盐度胁迫对C-型凝集素表达量的影响 设计4个实验盐度, 即盐度5、10、30(正常)、50, 实验盐度是由正常盐度(30)的海水用清水稀释或人工海盐调配获得。每个盐度设3个平行组, 每组投放15尾大菱鲆幼鱼。采用静水法, 自动恒温加热器控温, 保证实验在(13±0.5) °C(常温)下进行。盐度用密度计(三立, 中国)测量。该实验进行48 h。实验鱼在实验温度下喂养48 h后取组织

(鳃、脾、肝、头肾、肾、肠、皮肤和肌肉), 保存在液氮中, 以备后续实验。提取各组织的RNA后经过反转录得到cDNA, 进行PCR后经琼脂糖凝胶电泳实验检测其质量后进行荧光定量PCR, 步骤同上。

鳃弧菌感染对C-型凝集素表达量的影响

参考马爱军等^[13]的实验方法并改进: 设置2组体质量、健康状况一致的大菱鲆, 一组作为对照组腹腔注射PBS, 一组进行鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)腹腔注射感染; 将鳃弧菌菌悬液稀释至半致死浓度(10^6 CFU/mL)进行大菱鲆幼鱼腹腔注射, 注射剂量=实验鱼的体质量(g) \times 1 μ L/g稀释菌液; 另一组的大菱鲆幼鱼腹腔注射相应剂量PBS, 设置为对照组; 每组实验设置3个平行。感染期间水温控制在(13 \pm 1) $^{\circ}$ C, 正常饲喂、充气并保持微循环水。实验持续32 h, 每隔2 h观察并取样1次, 所取组织为鳃、皮肤和肠, 并保存在有1 mL的RNA保存液的冻存管中, -80° C保存。提取各个组织的RNA后经过反转录得到cDNA, 进行PCR后经琼脂糖凝胶电泳实验检测其质量后进行荧光定量PCR, 步骤同上。

C-型凝集素蛋白重组 根据C-型凝集素SmLec1 (GenBank accession no: GU385827)^[11]基因序列设计上游引物ATATACATATGCACCATCACCATCACCATGATGAC和下游引物GCCGCAAGCTTTCATTAATGACTTGCTTTAC(其中酶切位点用下划线标出), 合成基因并通过Nde I/Hind III限制性酶切位点将其亚克隆到表达载体pET43.1 a中, 采用酶切法和测序确认最终表达载体构建的准确性。将上述构建的质粒转入BL21(DE3)感受态细胞(北京, 天根), 进行SDS-PAGE蛋白电泳检测。利用Ni-IDA柱进行蛋白纯化, 通过不同浓度咪唑洗脱后取上清液进行SDS-PAGE蛋白电泳检测。包涵体纯化通过脲和咪唑利用Ni-IDA柱, 洗脱目标蛋白, 并收集每个咪唑梯度的洗脱液组分。进行SDS-PAGE蛋白电泳检测, Western blot法检测重组蛋白。

细菌凝集实验 参考王锐等^[14]FITC标记的方法, 将待标记细菌培养到指数生长中后期, 4° C 5000 r/min离心10 min, 弃上清液, 用PBS(0.01 mol/L、pH 7.4)洗涤3次, 4° C 5000 r/min离心10 min, 之后用碳酸盐缓冲液(0.5 mol/L、pH 9.5)配成浓度为 0.5×10^9 CFU/mL的悬菌液, 加入2 μ L FITC溶液, 常温搅拌1~2 h, 5000 r/min离

心10 min, 弃上清液, 用PBS洗涤2次, 5000 r/min离心10 min, 取管内细菌用PBS配成浓度为 1×10^9 CFU/mL的菌悬液。荧光标记后经荧光显微镜检查确认, 4° C避光保存。细菌荧光标记的显微观察, 取5 μ L荧光标记的细菌悬液涂于载玻片上, 盖上盖玻片在荧光显微镜(Nikon eclipse 80 i)下观察细菌的荧光图像, 以出现清晰细菌荧光视野时视为标记成功。

所用革兰氏阴性细菌包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鳃弧菌、爱德华氏菌(*Edwardsiella* sp.)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*); 革兰氏阳性菌包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 参考Arasu等^[15]的方法并加以改进: 利用FITC标记的菌液加入到40 μ L C-型凝集素重组蛋白中, 连续的稀释浓度(5、25、50、100和200 μ g/mL), 用TBS稀释, 作为对照的稀释液中含有10 mmol/L CaCl₂。混合物在 4° C下静置过夜, 荧光显微镜下观察。

糖特异性结合实验 选取葡萄糖(glucose)、D-木糖(D-xylose)、D-果糖[D(-)-fructose]、蔗糖[D(-)-fructose]、麦芽糖(D-maltose monohydrate)、乳糖(a-lactose)、半乳糖(galactose)、甘露糖(galactose)共8种单糖观察其对大菱鲆C-型凝集素蛋白细菌凝集活性的影响。参考Arasu等^[15]的方法, 利用FITC标记的菌液25 μ L加入到25 μ L C-型凝集素重组蛋白中(200 μ g/mL), 不同种类、浓度的糖均为25 μ L, 用TBS稀释, 作为对照的稀释液中含有10 mmol/L CaCl₂。混合物在 4° C下静置过夜, 荧光显微镜下观察。

物理因子对细菌凝集的影响

(1) 酸碱度对细菌凝集的影响。

调节TBS溶液pH为2、3、4、5、6、7、8、9, 将FITC标记的菌液25 μ L加入到C-型凝集素重组蛋白中(25 μ L, 200 μ g/mL), 用不同pH的TBS稀释, 作为对照的稀释液中含有10 mmol/L CaCl₂。混合物在 4° C下静置过夜, 荧光显微镜下观察。

(2) 温度对细菌凝集的影响。

将FITC标记的菌液25 μ L加入到C-型凝集素重组蛋白中(25 μ L, 200 μ g/mL), TBS稀释, 作为对照的稀释液中含有10 mmol/L CaCl₂。混合物分别在4、10、25、37、45和60 $^{\circ}$ C下静置2 h, 荧光显微镜下观察。

数据处理 定量PCR结束后, 所得数据以ABI7500SDS软件(美国应用生物系统公司)进行分

析, 根据目的基因和 β -actin的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算SmLec1在不同组织的相对表达量。采用SPSS 20.0软件对数据作单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间若有显著差异, 再做Duncan氏多重比较, 结果都以平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

2.1 组织特异性表达结果

根据荧光定量PCR的结果(图1), 在选取的8个组织中C-型凝集素在肝脏中的表达量显著, 在其他组织中均不显著。

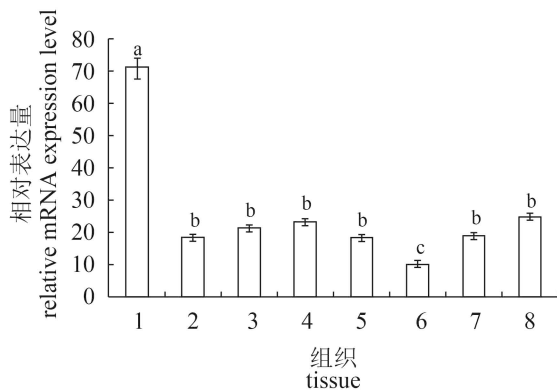


图1 大菱鲆C-型凝集素在不同组织中的表达情况

β -actin作为内参。将 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值作为标准化数据。此结果是在3次独立的实验后得出。平均标准偏差以误差线的形式表示出, 字母不同说明存在显著性差异($P < 0.05$), 下同

1.肝; 2.脾; 3.肾; 4.头肾; 5.肠; 6.肌肉; 7.皮肤; 8.鳃

Fig. 1 The expression of SmLec1 in different tissues

β -actin was amplified as internal control. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values were identified to normalize data. The results are based on three independent experiments and expressed as mean values \pm standard deviation. The differences between English letters show that there are significant differences ($P < 0.05$), the same below

1. liver; 2. spleen; 3. kidney; 4. head-kidney; 5. intestine; 6. muscle; 7. skin; 8. gill

2.2 环境胁迫对大菱鲆肝脏C-型凝集素mRNA表达量的影响

设置13、19、22、25、27 $^{\circ}\text{C}$ 5个温度组, 通过荧光定量PCR分析其表达情况, 在13 $^{\circ}\text{C}$ 时肝的mRNA表达量受到温度的影响, 在19 $^{\circ}\text{C}$ 开始升高, 22~27 $^{\circ}\text{C}$ 呈降低趋势(图2)。

设置5、10、30、50共4个盐度组, 取肝mRNA通过荧光定量分析其表达情况, 肝脏在盐

<http://www.scxuebao.cn>

度胁迫条件下, 表达量变化并不显著($P > 0.05$) (图3)。

2.3 鳃弧菌感染对C-型凝集素的表达量的影响

肝脏中SmLec1 mRNA的表达结果显示, C-型凝集素在注射PBS的对照组中有表达, 且在各个时间点的表达量基本相同。在鳃弧菌刺激2 h后C-型凝集素的表达量呈明显的梯度上升, 6 h时达到最高, 之后呈梯度下降趋势, 但较6 h前的上升趋势略有缓和, 到32 h后C-型凝集素的表达量恢复到与对照组大致相等的水平(图4)。

2.4 重组蛋白的诱导表达及产物分析

重组表达载体pET43.1a-DT1139-1(C-type lectin) (图5)转化宿主菌BL21(DE3)后, 经IPTG诱导4 h, 在分子量约19 ku处有明显的目的蛋白的表达(图6), 大小比预测重组蛋白分子量17.89 ku略大, 原因是重组蛋白在N端带有组氨酸标签(His-tag)。纯化后获得纯度高的目的蛋白。

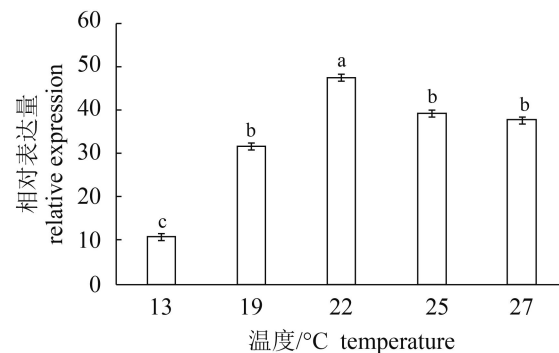


图2 SmLec1 mRNA在肝脏中不同温度下的表达情况

Fig. 2 SmLec1 mRNA expression of liver under different temperature conditions

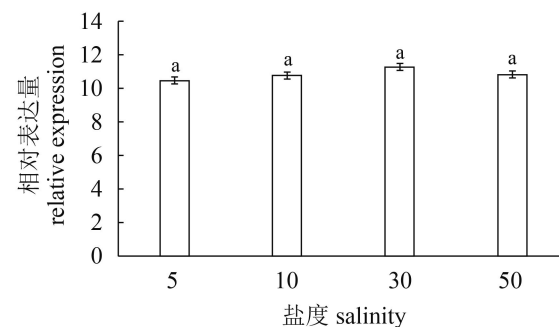


图3 SmLec1 mRNA在肝脏中不同盐度下的表达情况

Fig. 3 SmLec1 mRNA expression of liver under different salinity conditions

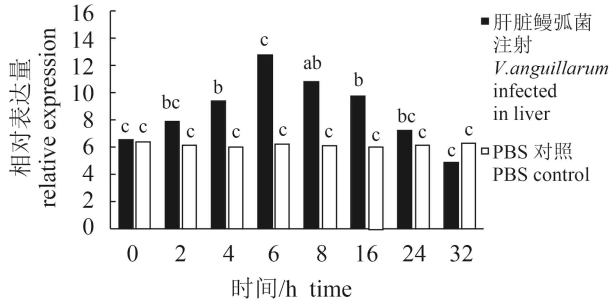


图4 鳎弧菌感染后不同时间在大菱鲆肝脏中 SmLec1 mRNA 的表达变化

Fig. 4 Relative quantification of SmLec1 gene expression by post-injection with V. anguillarum and PBS control

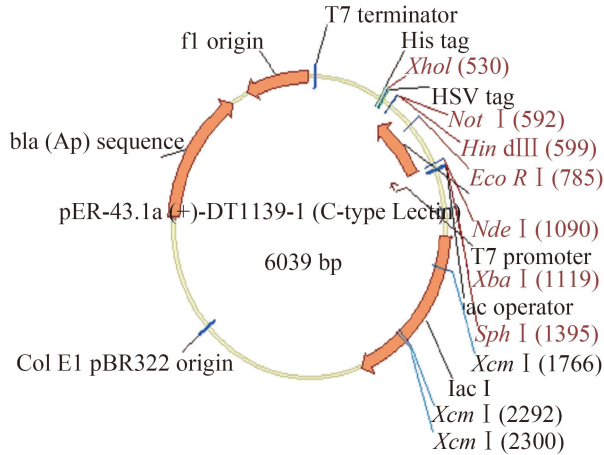


图5 pET43.1a-DT1139-1 (C-type lectin) 重组表达载体图谱

Fig. 5 Recombinant expression vector pattern of pET43.1a-DT1139-1 (C-type lectin)

2.5 重组蛋白凝集活性

SmLec1对所选6种细菌的凝集作用存在差异, 其中对爱德华氏菌和鳎弧菌具有明显的凝集作用(图7), 而对嗜水气单胞杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均无凝集现象。

2.6 糖特异性结合实验

通过糖特异性结合实验, 分析SmLec1蛋白参与糖识别的信息, 实验中选用凝集作用较为明显的鳎弧菌进行糖特异性结合实验(表2)。葡萄糖、麦芽糖和半乳糖对SmLec1的凝集活性没有抑制, 而木糖、果糖、蔗糖、乳糖和甘露糖能够抑制SmLec1的凝集活性。

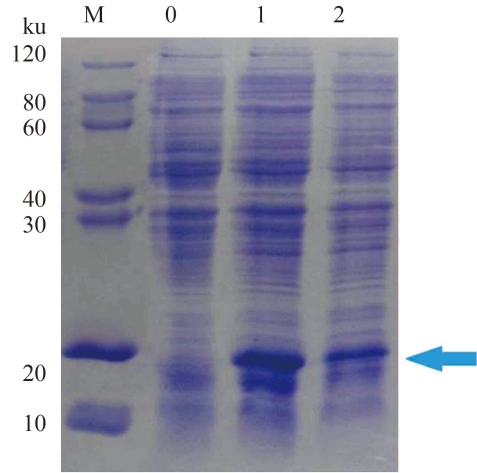


图6 SDS-PAGE分析C-type Lectin蛋白于 BL21 (DE3)表达情况

M. SDS-PAGE protein marker; 0. 对照; 1. 15 °C 诱导过夜; 2. 37 °C 诱导4 h

Fig. 6 SmLec1 expressed in BL21 (DE3) analyzed by SDS-PAGE

M. SDS-PAGE protein marker; 0. control; 1. 15 °C induction overnight; 2. 37 °C induction 4 h

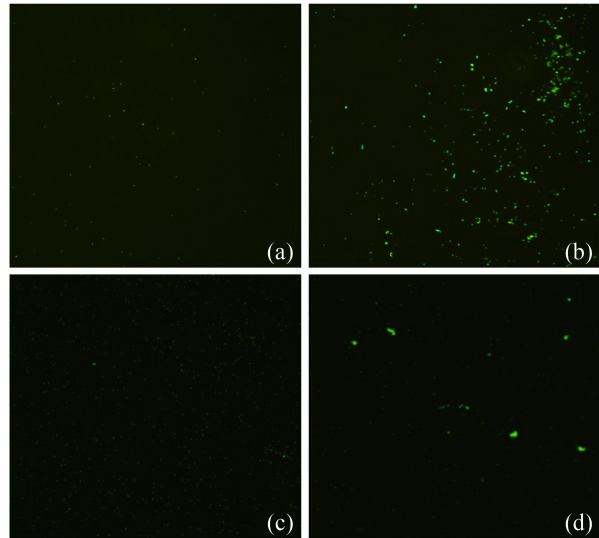


图7 SmLec1对爱德华氏菌和鳎弧菌的凝集作用(×40) (a)爱德华氏菌在无SmLec1蛋白下的正常对照; (b)爱德华氏菌与SmLec1蛋白发生凝集; (c)鳎弧菌在无SmLec1蛋白下的正常对照; (d)鳎弧菌与SmLec1蛋白发生凝集

Fig. 7 Pathogens agglutinating activity of SmLec1 protein(×40)

(a) Edwardsiella sp. of control; (b) Edwardsiella sp. agglutinated with SmLec1; (c) V. anguillarum of control; (d) V. anguillarum agglutinated with SmLec1

2.7 理化因子对C-型凝集素稳定性影响

分析SmLec1蛋白受pH和温度的影响, 选用

表 2 糖特异性结合重组蛋白凝集鳗弧菌的活性

Tab. 2 Carbohydrates recognition activity of *SmLec1* protein

糖类 carbohydrate	最小抑菌浓度 minimum inhibitory concentration
葡萄糖 glucose	NI ^a
D-木糖 D-xylose	NI ^b
D-果糖 D(-)-fructose	NI ^b
蔗糖 D(-)-fructose	NI ^b
麦芽糖 D-maltose monohydrate	NI ^a
乳糖 a-lactose	NI ^b
半乳糖 galactose	NI ^a
甘露糖 galactose	NI ^b

注: NI^a表示在>400 mmol/L浓度仍不抑制凝集; NI^b表示在50 mmol/L浓度时即可抑制凝集,下同

Notes: NI^a recombinant protein could not inhibit the bacterial agglutination under the maximum detectable concentration (>400 mmol/L); NI^b recombinant protein could inhibit the bacterial agglutination under the 50 mmol/L detectable concentration, the same below

凝集作用较为明显的鳗弧菌进行该实验,在pH值从7.0至9.0之间凝集素表现出耐受性(表3),温度从4℃至25℃范围内凝集活性稳定(表4)。

3 讨论

目前在许多生物体内都发现C-型凝集素,C-型凝集素有与特异性糖类结合的能力,并且在识别和清除病原体的过程中发挥非常重要的作用^[3-4]。本实验利用荧光定量PCR技术研究环境胁迫(高温、盐度及鳗弧菌感染)对肝脏表达量的影响;通过体外重组技术得到了C-型凝集素重组蛋白,并进行了细菌凝集实验检测其细菌凝集活性及糖特异性结合活性。

通过组织特异性表达可知,*SmLec1*在肝脏中表达显著,这与其分泌蛋白的功能相关。鱼类肝脏能够合成分泌胶原蛋白、激活蛋白A(activin A)、甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)、胶原凝集素(collectin)、甘露糖结合凝集素样蛋白(MBL-like protein)等多种大分子物质,其中多种成分参与机体的免疫应答、激活补体凝集素途径、调节吞噬作用、对病原体产生杀伤作用^[16]。基于组织特异性表达的结果,在之后的工作中应着重讨论*SmLec1*在肝脏中的作用,以深入研究*SmLec1*对免疫机制中的重要影响。

高温对*SmLec1*在肝脏中的表达影响显著,

表 3 pH对C-型凝集素稳定性的影响

Tab. 3 pH affecting the stability of *SmLec1* protein

pH	凝集活性 agglutination activity
2	NI ^b
3	NI ^b
4	NI ^b
5	NI ^b
6	NI ^b
7	NI ^a
8	NI ^a
9	NI ^a

表 4 温度对C-型凝集素稳定性的影响

Tab. 4 Temperature affecting the stability of *SmLec1* protein

温度/℃ temperature	凝集活性 agglutination activity
4	NI ^a
10	NI ^a
25	NI ^a
37	NI ^b
45	NI ^b
60	NI ^b

并随温度的升高先上升再下降,这是由于随着温度的升高分泌增强,22℃表达量达到最大值,说明22℃以后*SmLec1*的分泌受到高温的限制。此结果也印证了鱼体通过调节机体的生理活性来适应环境高温的变化^[17],大菱鲆受到高温影响,通过调节*SmLec1*的分泌来适应环境,以保护自身不受外源微生物的侵害,细菌凝集实验发现,温度的升高对C-型凝集素凝集细菌的作用产生了抑制。姚占娟等^[18]研究认为,斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)IgZ重链基因的表达随温度的升高表现为先增加再减少的趋势;李猛等^[9]认为,温度、盐度在一定的变化幅度内能诱导文蛤C-型凝集素的表达,起免疫保护作用,但超出一定范围则免疫功能将受到抑制。温度的改变是养殖生产中最为常见的环境胁迫情况,通过高温对重组蛋白与细菌凝集情况的影响及环境胁迫对C-型凝集素的表达量的影响可以看出,高温对C-型凝集素凝集功能影响较为显著,这在

日后对C-型凝集素的进一步应用起着很大的指导作用。

不同盐度下, *SmLec1*在肝脏中的*SmLec1*表达量基本维持不变并且保持正常水平, 说明盐度对肝脏分泌*SmLec1*没有影响。这与大菱鲆本身的广盐性有关, 使其不受盐度的影响。

鳃弧菌是导致大菱鲆产生疾病的重要病原。当大菱鲆受到了鳃弧菌的感染后, 肝脏中*SmLec1*的表达量逐渐增加, 并在6 h达到最大, 随后逐渐减弱, 到32 h后恢复到原来的水平。根据Olafsen等^[19]报道, 鳃弧菌在体外感染长牡蛎(*Crassostrea gigas*)时, 牡蛎血清凝集素对血细胞的凝集效价成倍数增加。刘志鸿等^[20]利用弧菌制成的菌悬液对毛蚶(*Scapharca subcrenata*)进行注射刺激后, 能够明显提高毛蚶血清的凝集效价。中国明对虾FcLec3在注射鳃弧菌后第2小时, 其表达量开始上升, 并于第12小时达到最高值^[21]。这说明凝集素基因的表达可以受微生物刺激的诱导, 也表明凝集素参与对微生物入侵的免疫应答, 在一定时间内有助于提高大菱鲆的免疫防御能力, 这对抑制鳃弧菌有重要意义。

细菌凝集实验发现*SmLec1*不能凝集大肠杆菌, 却能够凝集鳃弧菌; 糖特异性结合实验显示, 木糖、果糖、蔗糖、乳糖和甘露糖能够与*SmLec1*结合, 但与目前的报道不尽相同^[5-6, 9]。C-型凝集素的凝集作用是通过Ca²⁺结构域与糖结合的形式完成的, C-型凝集素共有4个Ca²⁺结构域, 根据其序列和三维结构形成不同的组合, 产生了特殊的结合能力, 这直接导致C-型凝集素与细菌结合能力的不同; 另外可能与细菌所分泌的胞外产物不同有关, 导致*SmLec1*对细菌的凝集与其他物种不同^[22]。

本研究对*SmLec1*基因进行蛋白重组纯化得到其蛋白, 进行了抑菌活性和功能验证实验。通过表达分析发现, *SmLec1*不仅能够在一定程度上抑制鳃弧菌的感染, 同时在一定高温范围内随温度的增加表达量增加。目前已有外源凝集素在鱼类疾病中的应用, 如刀豆素能够识别大菱鲆体表的粘孢子虫(*Enteromyxum scophthalmi*)^[23], Mahalingam等^[24]人工合成了一种外源性凝集素, 能够阻止人类免疫缺陷病毒进入宿主细胞, 阻止人类免疫缺陷病毒的感染。吴彪等^[25]将虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)C-型凝集素抗体加入到卵母细胞体系中, 鳃弧菌存活率

显著下降。以上研究表明, 通过外源凝集素治疗和预防鱼类疾病是可行的, 为大菱鲆C-型凝集素的应用提供了理论基础。根据外源凝集素在抑制细菌、病毒和寄生虫等方面的作用, 能够大大减少抗生素的使用, 解决大菱鲆养殖中存在的抗生素滥用问题, 为大菱鲆先天性免疫因子表达的调控以及大菱鲆病害的防控奠定基础。但目前外源凝集素的应用还局限于实验室中, 如何降低成本, 将其大量应用到实际养殖中还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 魏京广. 石斑鱼C型凝集素和两个凋亡相关基因的克隆与功能研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
Wei J G. Cloning and functional characterization of C-type lectin and two apoptosis related genes in grouper, *Epinephelus coioides*[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010(in Chinese).
- [2] 罗展, 张继泉, 李富花, 等. 凡纳滨对虾C-型凝集素LvLec2对不同刺激的免疫应答[J]. 海洋科学, 2010, 34(11): 103-110.
Luo Z, Zhang J Q, Li F H, et al. Cloning of a novel C-type lectin LvLec2 from the shrimp *Litopenaeus vannamei* and its immune response to different challenges[J]. Marine Sciences, 2010, 34(11): 103-110(in Chinese).
- [3] Dodd R B, Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity[J]. Glycobiology, 2001, 11(5): 71-79.
- [4] Vasta G R, Ahmed H, Odom E W. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2004, 14(5): 617-630.
- [5] 刘逸尘, 刘丽静, 张亦陈, 等. 中国明对虾C-型凝集素基因(Fclectin)的重组表达及活性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1493-1502.
Liu Y C, Liu L J, Zhang Y C, et al. Recombinant expression and functional characterization of a C-type lectin (Fclectin) from the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(10): 1493-1502(in Chinese).
- [6] 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.
- [7] 胥炜. 海湾扇贝和栉孔扇贝EST分析及C型凝集素基因的克隆与分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2004.
- Xu W. EST analysis of *Argopecten irradians* and *Chlamys farreri* and cloning and expression of C-type lectin gene in *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2004(in Chinese).
- [8] Kong H J, Park E M, Nam B H, *et al.* A C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(3): 311-314.
- [9] 李猛, 周素明, 刘璐, 等. 文蛤(*Meretrix meretrix*) C-型凝集素基因的分子克隆及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1186-1192.
- Li M, Zhou S M, Liu L, *et al.* Molecular clone and expression of C-type lectin in *Meretrix meretrix*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1186-1192(in Chinese).
- [10] 雷霖霖, 门强, 王印庚, 等. 大菱鲆"温室大棚+深井海水"工厂化养殖模式[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(4): 1-7.
- Lei J L, Men Q, Wang Y G, *et al.* Review of "green house+deep well seawater" industrialized culture pattern of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(4): 1-7(in Chinese).
- [11] Zhang M, Hu Y H, Sun L. Identification and molecular analysis of a novel C-type lectin from *Scophthalmus maximus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 82-88.
- [12] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(6): 686-694.
- [13] 马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲆选育家系抗鳃弧菌性能[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484-493.
- Ma A J, Guo J L, Wang X A, *et al.* Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 484-493(in Chinese).
- [14] 王锐, 王秀华, 王玉娟, 等. 异硫氰酸荧光素标记鳃弧菌条件优化及应用条件对荧光信号的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 593-600.
- Wang R, Wang X H, Wang Y J, *et al.* Optimizing conditions of fluorescein isothiocyanate labeled *Vibrio anguillarum* and the effect of application condition on fluorescence signal[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 593-600(in Chinese).
- [15] Arasu A, Kumaresan V, Sathyamoorthi A, *et al.* Fish lily type lectin-1 contains β -prism architecture: immunological characterization[J]. Molecular Immunology, 2013, 56(4): 497-506.
- [16] 黄布敏, 袁莉刚. 鱼类肝脏细胞外基质的功能及调节机制[J]. 生命的化学, 2013, 33(2): 44-48.
- Huang B M, Yuan L G. The function and regulation mechanism of hepatic extracellular matrix in fish[J]. Chemistry of Life, 2013, 33(2): 44-48(in Chinese).
- [17] 黄智慧, 马爱军, 雷霖霖. 鱼类体表粘液凝集素研究进展[J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 674-679.
- Huang Z H, Ma A J, Lei J L. Progress in study on the skin mucus lectin in fish[J]. Zoological Research, 2013, 34(6): 674-679(in Chinese).
- [18] 姚占娟, 张其中, 崔淼. 斜带石斑鱼IgZ重链基因的表达纯化和抗体制备[J]. 广东农业科学, 2013, 40(5): 149-152.
- Yao Z J, Zhang Q Z, Cui M. Prokaryotic expression, purification of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) IgZ heavy-chain protein and preparation of polyclonal antibody against IgZ[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(5): 149-152(in Chinese).
- [19] Olafsen J A, Fletcher T C, Grant P T. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge[J]. Developmental & Comparative Immunology, 1992, 16(2-3): 123-138.
- [20] 刘志鸿, 张士瑾, 杨爱国, 等. 毛蚶血清凝集素的凝集活性[J]. 海洋学报, 2003, 25(5): 92-96.
- Liu Z H, Zhang S C, Yang A G, *et al.* Properties of agglutinin in the serum of bivalve *Scapharca subcrenata*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 25(5): 92-96(in Chinese).
- [21] Wang X W, Xu W T, Zhang X W, *et al.* A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(4): 556-562.
- [22] Zelensky A N, Gready J E. The C-type lectin-like

- domain superfamily[J]. FEBS Journal, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [23] Redondo M J, Palenzuela O, Riaza A, *et al.* Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Parasitology, 2002, 88(3): 482-488.
- [24] Mahalingam A, Geonnotti A R, Balzarini J, *et al.* Activity and safety of synthetic lectins based on benzoboroxole-functionalized polymers for inhibition of HIV entry[J]. Molecular Pharmaceutics, 2011, 8(6): 2465-2475.
- [25] 吴彪, 迟长凤, 杨爱国, 等. 虾夷扇贝C型凝集素母源传递与抑菌作用的初步研究[J]. 水产学报, 2013, 37(5): 777-783.
- Wu B, Chi C F, Yang A G, *et al.* A preliminary study on the maternal transfer and bacteriostasis of a C-type lectin in scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 777-783(in Chinese).

Effect of environmental stress on the function of C-type lectin in turbot (*Scophthalmus maximus*)

XIA Dandan^{1,2}, MA Aijun^{1,2*}, HUANG Zhihui^{1,2}, WANG Xinan^{1,2},
SUN Zhibin^{1,2}, CUI Wenxiao^{1,2}, QU Jiangbo³

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture;
Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and

Biotechnology Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

3. Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, Yantai 264003, China)

Abstract: C-type lectin of *Scophthalmus maximus* (*SmLec1*) plays an important role in the non-self innate immune system. We analyzed the activity characteristics of *SmLec1*, and the effect of environmental stress on its expression and regulation, and explored its potential function and response in turbot innate immune system in culture environment. In this study, the molecular mass of the *SmLec1* with recombinant protein was found to be 19 ku as shown by SDS-PAGE, and the target protein was obtained after purification. *SmLec1* showed agglutination activity against *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella* sp. in the six kinds of selected bacteria to test *SmLec1* bacterial agglutination activity. On this basis, eight sugars were taken for the inhibitory agglutination studies. Among the carbohydrates tested, lactose, D-xylose, D-fructose, sucrose and D-mannose effectively inhibited the agglutination activity of *SmLec1*. In physical and chemical factors (pH, high temperature), the activity of *SmLec1* was inhibited at pH <7, T> 37 °C. QPCR was performed to examine the relative expression of the *SmLec1* in *V.anguillarum* challenge, the expression level of liver was relatively increased after pathogenic stimulation, the highest at 6 h, then gradually began to decline and returned to its original level at 32 h. Expression of *SmLec1* in high temperature stress was analyzed by qPCR, and results showed that the expression of liver mRNA starts to rise from 19 °C, and showed a decreasing trend from 22 °C to 27 °C, while expression of other tissues did not change significantly. The impact of salinity stress on expression was not significant. The study could provide a scientific basis for further study of antibacterial mechanism and immune mechanism of *SmLec1*.

Key words: *Scophthalmus maximus*; C-type lectin; *Vibrio anguillarum*; recombinant proteins; agglutination activity; environmental stress

Corresponding author: MA Aijun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

Funding projects: Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-50-G01); China Postdoctoral Science Foundation (2015M572096); Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2014CP001); Qingdao Postdoctoral Science Foundation funded project (2014–2016); Modern Agricultural Talent Support Program (2016–2020)