

黄颡鱼 *IgM* 基因的个体发生和抗体的代间传递

李春涛^{1,2}, 张其中^{3*}, 曾伯平²

(1. 遵义师范学院生命科学学院, 贵州 遵义 563002;

2. 西南大学生命科学学院, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室, 重庆 400713;

3. 暨南大学水生生物研究所, 热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广东 广州 510632)

摘要: 为了解黄颡鱼 *IgM* 基因表达的个体发生和 *IgM* 抗体代间传递机制, 实验利用 Real-time PCR 和 ELISA 等技术研究了黄颡鱼 *IgM* 重链基因在卵巢、胚胎和仔鱼的表达变化, 以及黄颡鱼 *IgM* 抗体在卵巢、胚胎和仔鱼中的含量变化。结果显示, 黄颡鱼 3~7 d 仔鱼中, 没有检测到 *IgM* mRNA; 14 d 仔鱼 *IgM* 基因开始表达。用细菌免疫亲鱼后, 对仔鱼 *IgM* mRNA 表达没有影响。黄颡鱼 *IgM* 抗体在卵巢、胚胎和仔鱼中都有分布, 且呈现下降趋势, 至 9 d 仔鱼中抗体水平最低(是卵抗体含量的 0.31 倍)。14 d 仔鱼中 *IgM* 抗体水平上升(是 9 d 仔鱼抗体含量的 1.6 倍)。用细菌免疫亲鱼后, 能显著提高胚胎、仔鱼中的 *IgM* 抗体水平, 在卵中抗体含量提高了 2.3 倍, 9 d 仔鱼中提高了 1.8 倍。研究表明, 黄颡鱼 *IgM* 抗体可以在母本和后代之间传递, 早期仔鱼 *IgM* 抗体主要来自于亲本; 因此, 免疫亲鱼能显著增加子代的抗体水平。

关键词: 黄颡鱼; *IgM*; 基因表达; 抗体传递

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 是介导体液免疫的重要免疫分子, 是 B 淋巴细胞受抗原刺激后分化而成的浆细胞所产生的糖蛋白, 通过与相应抗原特异性结合, 发挥体液免疫功能。根据 Ig 重链 (heavy chain, H) 恒定区的差异, 哺乳动物 Ig 被划分为 5 种类型: IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD^[1], 而硬骨鱼类被划分为 IgM、IgD、IgZ/T 和 IgM-IgZ^[2] 等类型。IgM 存在于所有有颌类脊椎动物中, 它的重链序列变化体现了从软骨鱼类到哺乳类的一个进化过程^[3]。鱼类免疫球蛋白中, IgM 含量最丰富, 在鱼类体液免疫中起主要作用。

一般认为, 鱼类 *IgM* 基因在孵化后 1~10 周开始表达^[4]。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*) *IgM* 基因在孵化后 1 周开始表达^[5]; 鲤 (*Cyprinus carpio*) *IgM* 基因在孵化后 2 周开始表达^[6]; 鳊 (*Gadus morhua*) *IgM* 基因在孵化后 8~10 周开始表达^[7]。许多研究表明, 鱼卵及仔鱼中自主 *IgM* 表达之前就有活性免

疫球蛋白的存在^[8]。研究已经证明, 比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*)、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 以及其他鲤科鱼类也存在母源 Ig 的转移^[9-10], 但在早期鳕仔鱼中没有发现 Ig 的存在^[11]。IgM 在不同鱼类仔鱼中的表达存在显著差异, 对子代的保护作用也存在明显不同, 因此, 需要更多相关研究才能深入揭示 *IgM* 等免疫分子表达的个体发生和代间的传递机制。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson), 属于鲇形目 (Siluriformes), 鲿科 (Bagridae), 在中国有广泛的分布, 是重要的养殖经济鱼类。本实验利用 Real-time PCR 和 ELISA 等技术, 研究了黄颡鱼 *IgM* 在卵、胚胎和仔鱼等的转录表达和蛋白表达情况, 旨在为黄颡鱼及其他鱼类母源性免疫和 *IgM* 的发生奠定基础, 也为深入揭示母源性保护分子对子代的免疫作用提供更多依据。

收稿日期: 2014-01-19 修回日期: 2014-02-27

资助项目: 国家自然科学基金 (31170474); 中央高校基本科研业务费专项 (21612111, 21613105); 黔科合 (J 字 LKZS [2012] 20 号); 黔科合人才团队 ([2012] 4004)

通信作者: 张其中, E-mail: zhangqzdr@126.com

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验鱼体质量为 (85 ± 8.3) g,均来自重庆市北碚,饲养于西南大学生命科学院实验基地鱼池。实验鱼在性成熟期间转移至室内鱼缸饲养,水温控制在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,每日投喂一定量的水蚯蚓饵料,并通气换水。

1.2 免疫注射

选取 50 尾健康的黄颡鱼,其中,用 25 尾进行免疫实验,25 尾进行对照实验。催产 4 周前,免疫组每尾鱼注射 $200 \mu\text{L } 1 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ 灭活的嗜水气单胞菌(菌悬液用 0.65% 生理盐水配制),催产 2 周前,免疫组每尾鱼注射同样量的灭活嗜水气单胞菌菌悬液进行加强免疫。给非免疫组(对照组)注射生理盐水进行对照实验。

1.3 人工催产繁殖

催产素为促黄体素释放激素 A2 (LHRH-A) (宁波第二激素厂),使用时用 0.65% 的生理盐水稀释 5 倍成工作液。每尾雌鱼腹腔注射 $200 \mu\text{L}$,每尾雄鱼注射 $100 \mu\text{L}$ 催产素工作液,24 h 后第二次注射相同剂量催产素工作液。待到雌鱼腹部有少量卵从生殖孔流出时,人工挤压腹部,用培养皿收集鱼卵,同时取出成熟雄鱼精巢,剪碎,与卵搅拌均匀,加水完成受精。把受精卵转移至漂浮的网格上,水温控制在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,并低通气,每日换 1/3 清水。孵化后,仔鱼用水蚯蚓碎末喂养。

整个试验中,把亲鱼、胚胎和仔鱼各分为 2 组。A 组为对照组(非免疫组),B 组为免疫组。

1.4 黄颡鱼卵巢、胚胎和仔鱼 *IgM* 转录变化

取每组黄颡鱼卵巢、非受精卵、1 h 的受精卵、1 d 时的胚胎、孵化 1、3、5、7、14、21、28 d 的仔鱼各 50 mg,50 d 稚鱼脾脏、头肾各 20 mg。平行取 5 份,组织匀浆后,按说明书提取总 RNA,核酸蛋白定量仪(Nanodrop 2000,美国)测定总 RNA 浓度。用 DNase I(不含 RNA 酶)处理后,合成第一链 cDNA。用 18S *rRNA* 基因作为内参(引物为 18SF-CCTGAGAAACGGCTACCACATCC 和 18SR-AGCAACTTTAATATACGCTATTGGAG),*IgM-H* 基因特异性引物为 IgM-F1464 (GGAAATGTGAACGGCTATGTGC) 和 IgM-R1678 (TAAGATGCGTTAT GGTGGGCG)。

参照 iQTM SYBR[®] Green PCR Supermix

(TOYOBO 公司)说明书配置 PCR 反应体系,总反应体积为 $20 \mu\text{L}$,含 cDNA $1 \mu\text{L}$ SYBR Green Real-time PCR Master Mix $10 \mu\text{L}$,上、下游引物各 $1 \mu\text{L}$,ddH₂O $8 \mu\text{L}$ 。构建的质粒按 1/10 倍数梯度稀释,绘制质粒 DNA 对 C_t 值的标准曲线。根据上述反应体系和条件分别进行目的基因 *IgM* 与内参基因 18S 扩增,形成以 C_t 值(达到阈值时的循环次数)为纵坐标,稀释度为横坐标的标准曲线。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[12] 分析黄颡鱼 *IgM* 基因的相对表达量。采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。

1.5 ELISA 方法检测黄颡鱼卵巢、胚胎和仔鱼中的 *IgM* 蛋白含量

取每组黄颡鱼卵巢、卵、受精 1 d 胚胎和孵化后 1、3、9、14 d 仔鱼约 100 mg,每个样品平行取 3 份。把组织置于研钵中,加适量液氮匀浆。称取研磨后的样品约 50 mg,加入 $500 \mu\text{L}$ PBS 后, $10\ 000 \times g$ 离心 10 min (4°C),取上清液于 -20°C 冻存备用。

一抗为黄颡鱼 *IgM* 兔抗血清(由本实验室制备, -20°C 保存),稀释 5 000 倍作为工作液。用包被缓冲液将组织提取液稀释至蛋白质含量为 $5 \mu\text{g/mL}$,在每个酶标板的反应孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 该浓度蛋白液(对照孔不含蛋白仅有 $100 \mu\text{L}$ 包被缓冲液),在 4°C 包被过夜,再将 $100 \mu\text{L}$ 一抗加入酶标板每孔中,置 37°C 温箱中孵育 1 h。洗涤后加入 1:10 000 的羊抗兔 IgG-HRP,每孔 $100 \mu\text{L}$ 37°C 60 min。最后加入新鲜配置的 TMB 显色液 $100 \mu\text{L}$,室温避光显色 10~30 min, $50 \mu\text{L}$ 终止液终止反应,用酶标仪测定样品 OD 值(波长 490 nm 紫外光)。同时设空白对照,采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 黄颡鱼卵巢、胚胎和仔鱼 *IgM* 转录表达

Real-time PCR 分析表明,非免疫组和免疫组胚胎到 3 d 仔鱼,*IgM* 基因表达量处于下降状态,胚胎期及 1 d 仔鱼,免疫组 *IgM* 基因表达量显著高于非免疫组(图 1)。在 3~7 d 的两组仔鱼中,没有检测到 *IgM* 基因的表达。14~28 d 的仔鱼中 *IgM* 基因表达量逐渐增加,两组没有明显的差异。

对亲鱼卵巢、刚产出的卵、胚胎、孵化 5、14、

28 d 的仔鱼与孵化后 50 d 的稚鱼头肾和脾脏 *IgM* 基因表达量进行比较研究(图 2)。胚胎期以前, *IgM* 表达量呈下降趋势, 免疫组显著高于非免疫组, 有显著性差异。两组 14 d、28 d 仔鱼、50 d 脾脏、50 d 头肾 *IgM* 基因表达量没有显著性差异。

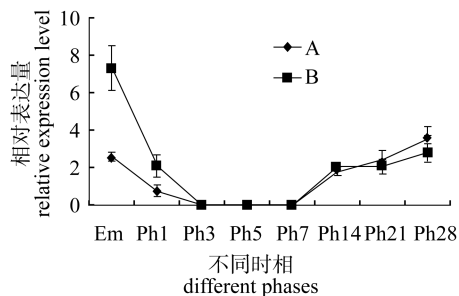


图 1 黄颡鱼 *IgM* 基因在胚胎、早期仔鱼中转录表达变化
Em. 受精 1 d 的胚胎; Ph1、Ph3、Ph5、Ph7、Ph14、Ph21、Ph28 分别表示孵化 1、3、5、7、14、21、28 d 时的仔鱼。Group A 为非免疫组, Group B 为免疫组。结果为 5 次转录的平均值 \pm 标准差

Fig. 1 *IgM* transcription change in *P. fulvidraco*
Em. fertilized embryos; Ph1, Ph3, Ph5, Ph7, Ph14, Ph21, Ph28. larvae at 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 d phase after incubation. Group A. normal group; Group B. Infected group. Values are expressed as means \pm standard error (SE) ($n=5$ each time)

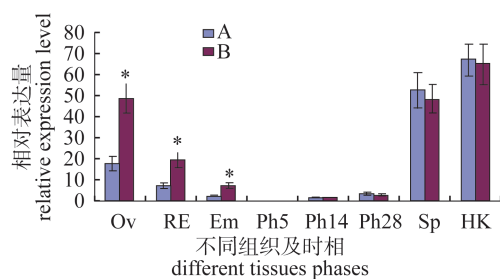


图 2 黄颡鱼 *IgM* 转录表达比较

Ov. 亲鱼卵巢; RE. 刚产的卵; Em. 受精 1 d 的胚胎; Ph5、Ph14、Ph28 表示孵化 5、14 和 28 d 时的仔鱼; Sp. 50 d 稚鱼脾脏; HK. 50 d 稚鱼头肾。“*”表示非免疫组与免疫组差异显著。结果为 5 次转录的平均值 \pm 标准差

Fig. 2 Comparison of *IgM* transcription of *P. fulvidraco*
Ov. ovary of parental generation; RE. released eggs; Em. fertilized embryos; Ph5, Ph14, Ph28. larvae at 5, 14, 28 d phase after incubation. Group A. normal group; Group B. Infected group. “*” are significantly different between Group A and Group B ($P < 0.05$). Values are expressed as means \pm standard error (SE) ($n=5$ each time)

2.2 ELISA 分析 *IgM* 蛋白水平

ELISA 分析表明, 黄颡鱼 *IgM* 蛋白在亲鱼卵巢、卵、胚胎和仔鱼各时间点都有不同程度的表

达。对照组与免疫组黄颡鱼 *IgM* 抗体在卵巢、胚胎和仔鱼中都有分布, 且呈现下降趋势, 孵化后 9 d 最低, 到孵化后 14 d, 表达量明显上升。对照组 9 d 仔鱼中抗体水平是卵抗体含量的 0.31 倍。14 d 仔鱼中 *IgM* 抗体水平是 9 d 仔鱼抗体含量的 1.6 倍。用细菌免疫亲本后, 能显著提高胚胎、仔鱼中的 *IgM* 抗体水平。在卵中抗体含量提高了 2.3 倍, 9 d 仔鱼中提高了 1.8 倍。免疫组在各时间点抗体水平均显著高于非免疫组。

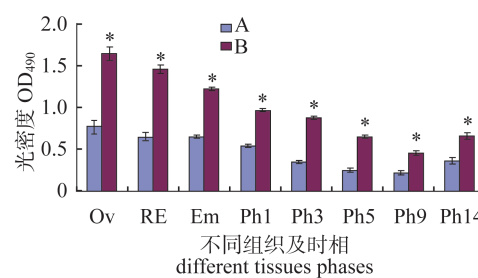


图 3 黄颡鱼 *IgM* 蛋白表达比较

Ov. 亲鱼卵巢; RE. 刚产的卵; Em. 受精 1 d 的胚胎; Ph1、Ph3、Ph5、Ph14 表示孵化 1、3、5、9、14 d 的仔鱼; “*”表示非免疫组与免疫组差异显著。结果为 3 次表达的平均值 \pm 标准差

Fig. 3 Comparison of *IgM* protein expression of *P. fulvidraco*

Ov. ovary of parental generation; RE. released eggs; Em. fertilized embryos; Ph1, Ph3, Ph5, Ph9, Ph14. larvae in 1 d, 3 d, 5 d, 9 d, 14 d phase after incubation. Group A. Not be infected group; Group B. Infected group. “*” are significantly different from Group A and Group B ($P < 0.05$). Values are expressed as means \pm standard error (SE) ($n=3$ each time)

3 讨论

早期黄颡鱼仔鱼 *IgM* 基因没有表达, *IgM* 是 B 淋巴细胞分化为的浆细胞所产生的, 而鱼类头肾和脾脏是 B 淋巴细胞主要的产生器官。黄颡鱼成熟卵排出体外, 就没有淋巴细胞的补充及浆细胞的形成, 随着 *IgM* mRNA 的不断消耗, *IgM* mRNA 量逐渐减少, 直至耗尽。孵化 14 d 的仔鱼, 自主性 *IgM* 基因开始活动, 幼鱼 *IgM* mRNA 开始合成。细菌刺激后, 免疫组受精卵和胚胎 *IgM* mRNA 表达水平也显著高于非免疫组, 表明免疫亲本可能以提高子代胚胎期 *IgM* mRNA 表达水平从而增加胚胎免疫能力。仔鱼免疫系统 *IgM* 基因开始表达后, 免疫组和非免疫组仔鱼 *IgM* 基因表达就处于相同起点, 因此, 细菌刺激对

子代3 d后仔鱼 *IgM* 转录表达没有影响。

对黄颡鱼 *IgM* 蛋白分析表明,虽然 *IgM* 在卵、胚胎、仔鱼中表现为时间消耗的过程,但在仔鱼 *IgM* mRNA 缺乏期,仍然有一定量 *IgM* 蛋白的存在。黄颡鱼 *IgM* 蛋白来自母体,母源性的 *IgM* 蛋白对仔鱼起着保护作用。细菌刺激后,*IgM* 蛋白在各个阶段显著上升,一直到仔鱼 *IgM* 基因开始转录,新的 *IgM* 蛋白开始形成。因此,对亲鱼免疫注射,能够提高仔鱼早期阶段的免疫力。

黄颡鱼卵巢、卵、胚胎和仔鱼的 *IgM* 转录变化,与鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[13]、真鲷 (*Sparus aurata*)^[14] 相似。鲈胚胎孵化 1~3 d 没有检测到 *IgM* mRNA,真鲷胚胎孵化后几天,也检测不到 *IgM* mRNA。Picchiatti 等^[13] 认为在胚胎发育的初期,*Ig* mRNA 的翻译使 *Ig* 得到合成,而这时母源性 *Ig* 逐渐被消耗。在胚胎发育中,母源性 *Ig* 和卵或胚胎中存留的 *Ig* mRNA 翻译出的 *Ig* 蛋白共同保护胚胎的发育。Picchiatti 等^[13] 还认为,卵母细胞中 *Ig* mRNA 转录是在许多卵巢因子调控下完成的,卵一旦排出,这些调控因子就不再存在,*Ig* 基因的转录也可能停止;转移到卵母细胞的 *Ig* mRNA,只有少量的翻译成了 *Ig* 蛋白,所以卵内的 *Ig* 蛋白有限。另一种可能是进入卵内的有限的 *Ig* mRNA 在胚胎发育初期合成 *Ig* 蛋白,时间可能延伸到母源性 *Ig* 的耗尽。Magnadottir 等^[11] 也认为,*IgM* 出现比较晚在一定程度上是依靠母源性免疫球蛋白作为补充。另外研究已经证明,在比目鱼^[15]、罗非鱼^[16]、鲤科鱼类^[9] 和鲑^[11] 也存在母源 *Ig* 的转移。Sin 等^[17] 的研究表明,在胚胎和仔鱼发育过程中,有许多类似于 *Ig* 的因子起着重要的保护作用,或者影响了仔鱼免疫系统的早期发育。

有研究表明,母源性 *Ig* 对子代的保护非常有限。对孵化期的大西洋鲑进行人工免疫,尽管卵和仔鱼存在特异性抗体,但其仔鱼并不能有效抵御耶尔森菌病 (*Yersiniosis*)^[18]。同样,针对抵御海洋弧菌 (*Vibrio vulnificus*),从免疫后的真鲷亲鱼转移到仔鱼的抗体不能起到有效的保护作用^[19],原因是仔鱼阶段的免疫球蛋白含量与卵母细胞阶段相比出现了剧烈的下降。例如鲈的母源性 *IgM* 卵黄生成期存积在卵巢中,到排卵时达最大值。孵化时母源性 *IgM* 已减少到 1/100,孵化第 5 天已经检测不到 *IgM*。相同的情况出现在罗

非鱼和大西洋鲑中。罗非鱼仔鱼前期 0~12 d,相对较高的母源性 *IgM* 就逐渐下降,12 d 时达最低点,这个时候恰好是在仔鱼淋巴器官成熟和自体 *IgM* 产生之前。大西洋鲑母源性 *IgM* 在胚胎孵化后迅速降低,在摄食开始和 *IgM* 产生之前就已检测不到。

鱼类 *IgM* 代间传递研究表明,不同鱼类之间母源性 *IgM* 传递量和对子代胚胎及亲鱼的保护有很大差异。母源性 *IgM* 对子代的保护需要更深入的研究。

除 *IgM* 抗体外,有许多类似于 *Ig* 的因子起着重要的保护作用,或者影响仔鱼免疫系统的早期发育。补体是广泛存在于脊椎动物中的一组非特异性体液免疫分子,激活后表现出生物活性,参与机体抗细菌、病毒等的免疫保护反应。免疫组化技术研究表明,鳕补体 C3 蛋白出现在孵化 5 d 的仔鱼中^[20];胚胎原位杂交技术研究表明,南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 补体 C3 mRNA 阳性信号最早出现在 39 h 胚胎中,补体 C9 mRNA 阳性信号最早出现在 33 h 胚胎中^[21]。Real-time 技术分析表明,虹鳟补体 C3 基因在胚胎期表达量上升,到出膜后卵黄吸收完时,C3 基因表达量开始下降^[22]。

溶菌酶是动物机体内重要的先天性免疫分子,是一种天然的杀菌(病毒)物质。Takemura 等^[22] 的研究表明,罗非鱼溶菌酶胚胎期已经开始合成,并证明这些酶不是母源性的。Seppola 等^[23] 的研究表明,溶菌酶基因转录水平在受精和卵裂期很稳定,而抗菌肽的表达水平逐渐下降,到原肠胚期消失。凝集素是一种糖蛋白,在免疫反应中参与抗原识别。研究证明,虹鳟、海参斑鱼卵母细胞、受精卵和胚胎有一定量的凝集素存在^[24-25]。

因此,在自主性抗体开始合成前,补体、溶菌酶、凝集素等许多先天性免疫分子对鱼类胚胎和早期仔鱼起着重要的保护作用。抗体开始合成后,先天性免疫分子的免疫作用逐渐下降,起次要作用。

4 结论

黄颡鱼早期仔鱼 *IgM* 基因没有表达,细菌刺激亲本后,对子代 *IgM* 基因表达没有影响,表明黄颡鱼 *IgM* 基因表达代间是不连续的。黄颡鱼

早期仔鱼 IgM 蛋白均有表达,且在代间连续,细菌刺激亲本后,能显著提高早期仔鱼 IgM 抗体表达水平。但免疫黄颡鱼亲本对子代胚胎和早期仔鱼的保护作用需进一步研究。

参考文献:

- [1] Jin B Q, Yu Y L, Si C P, *et al.* Medical immunology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008:34-46. [金伯泉,于永利,司传平等. 医学免疫学. 北京:人民卫生出版社,2008:34-46.]
- [2] Saha N R, Suetake H, Suzuki Y. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes* [J]. Molecular Immunology, 2005, 42(1):113-124.
- [3] Wilson M R, Wart G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1992, 2(1):201-221.
- [4] Magnadóttir B, Lange S, Gudmundsdóttir S, *et al.* Ontogeny of humoral immune parameters in fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(3):429-439.
- [5] Petrie-Hanson L, Ainsworth A J. Humoral immune responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fry and fingerlings exposed to *Edwardsiella ictaluri* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9(8):579-589.
- [6] Koumans-Van Diepen J C E, Taverne-Thiele J J, Van Rens B T T M, *et al.* Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B-cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.): an ontogenetic study [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4(1):19-28.
- [7] Schröder M B, Villena A J, Jørgensen T Ø. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1998, 22(5):507-517.
- [8] Scapigliati G, Scalia D, Marras A, *et al.* Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation [J]. Aquaculture, 1999, 174(3):207-212.
- [9] Huttenhuis H B T, Grou C P O, Taverne-Thiele A J, *et al.* Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4):586-596.
- [10] Swain P, Nayak S K. Role of maternally derived immunity in fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2):89-99.
- [11] Magnadóttir B, Lange S, Steinarsson A, *et al.* The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology, 2004, 19(7):429-439.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2-DDCt method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [13] Picchietti S, Taddei A R, Scapigliati G, *et al.* Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax* [J]. Cell and Tissue Research, 2004, 315(2):259-270.
- [14] Hanif A, Bakopoulos V, Leonardos I, *et al.* The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(4):345-361.
- [15] 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 & Shellfish Immunology, 1997, 7(2):81-91.
- [16] Kanlis G, Suzuki Y, Tauchi M, *et al.* Immunoglobulin in oocytes, fertilized-eggs, and yolk-sac larvae of red-sea bream [J]. Fisheries Science, 1995, 61(5):787-790.
- [17] 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):229-237.
- [18] Lillehaug A, Sevatdal S, Endal T. Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6(7):521-535.
- [19] Tanaka T, Furukawa K, Suzuki Y, *et al.* Transfer of maternal antibody from mother to egg may have no protective meaning for larvae of red sea bream *Pagrus major*, a marine teleost [J]. Fisheries Science, 1999, 65(2):240-243.
- [20] Lange S R, Bambir S, Dodds A W, *et al.* An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut

- (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28 (3): 593 – 601.
- [21] Zhu C K. Research for C3 and C9 gene clone and expression of *Silurus meridionalis* and *Coreius guichenoti* [D]. Chongqing: Southwest University, 2011. [朱成科. 南方鲇和圆口铜鱼补体 C3 和 C9 基因克隆及表达研究. 重庆: 西南大学, 2011.]
- [22] Takemura A. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Aquaculture*, 1993, 115(4): 233 – 241.
- [23] Seppola M, Johnsen H, Mennen S, *et al.* Maternal transfer and transcriptional onset of immune genes during ontogenesis in Atlantic cod [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(11): 1205 – 1211.
- [24] Kudo S, Yazawa S. Binding of bacterial toxins to glycoproteins in the envelopes of rainbow trout eggs [J]. *Histochemical Journal*, 1995, 27(4): 300 – 308.
- [25] Fletcher T C, White A, Baldo B A. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season [J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 1981, 57(4): 353 – 357.

The ontogenesis and transfer of *IgM* between generations in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

LI Chuntao^{1,2}, ZHANG Qizhong^{3*}, ZENG Boping¹

(1. School of Life Science, Zunyi Normal College, Zunyi 563002, China;

2. School of Life Science, Southwest University, Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;

3. Hydrobiology Institute of Jinan University, Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering, Ministry of Education, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to understand the mechanism of development of *IgM* gene expression and its antibody transfer between generations in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, *IgM* gene transcription change and its antibody level in ovary, eggs, embryos, and larvae of *P. fulvidraco* were investigated by using the Real-time PCR and ELISA techniques. Results were as follows: *IgM* mRNA not detected in 3 – 7 d larvae was found in 14 d larvae. Immunizing mother fish by bacteria did not influence *IgM* mRNA expression level in their larvae. *IgM* antibody in *P. fulvidraco* existed in eggs, embryos, and all early phases of larvae. These antibody expression level continued to decline and reached the lowest level in 9 d larvae (which is 0.31 times of eggs'), and began to increase in 14 d larvae (which is 1.6 times of 9 d larvae's). Immunizing mother fish by bacteria was able to significantly improve *IgM* antibody expression levels, which respectively increased to 2, 3 times and 1.8 times in eggs and 9 d larvae of *P. fulvidraco*. These studies indicate that *IgM* gene expression of *P. fulvidraco* between generations is discontinuity, while its antibody expression is continuous. The *IgM* antibody in early phases of larvae is from their mother fish. Immunizing may significantly improve antibody level of embryo and larvae.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; *IgM*; gene expression; antibody transfer

Corresponding author: ZHANG Qizhong. E-mail: zhangqzdr@126.com