



嗜水气单胞菌刺激下鲤血清质子转运载体 15a2 (Slc15a2) 的表达分析

姜洲¹, 薛亚果^{1,2}, 张猛¹, 朱雷¹,
王磊¹, 李学军¹, 董传举^{1*}

(1. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 为解析鲤质子转运载体 15a2 (Slc15a2) 在嗜水气单胞菌侵染过程中对机体免疫应答机制的影响, 实验通过制备鼠源 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 多克隆抗体, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 技术检测嗜水气单胞菌感染后鲤血清中 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 蛋白表达变化。结果显示, ①感染后 2 个拷贝的最高蛋白表达水平与空白对照组相比, 分别增加了 4.81 和 2.48 倍; 与 Slc15a2-1 相比 Slc15a2-2 的表达量从 0~48 h 一直处于较高表达水平。②从整体来看, Slc15a2 的 2 个拷贝具有相似的表达趋势, 均为先升高后降低、再升高再降低; 但 Slc15a2-1 在 3 h 达到第 1 个表达高峰, 而 Slc15a2-2 则在 6 h 达到第 1 个表达高峰。③ 6~24 h 的 4 个时期中, Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 蛋白表达呈现互补的表达趋势, 即在同一时期一个拷贝的表达量显著下降, 另一个拷贝的表达量显著升高, 但总体维持较高表达水平。结果表明, 本实验制备的鼠源 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 多克隆抗体具有较高的亲和力和特异性, 当鲤受到嗜水气单胞菌侵染后, 2 个拷贝整体具有相似的表达趋势, 说明可能具有相似的基因功能; 与 Slc15a2-1 相比, Slc15a2-2 在 0~48 h 之间具有显著的高表达量, 推测该基因为 2 个拷贝中的主效基因, 并且 6~24 h 时, 2 个拷贝一直呈现互补的表达方式, 导致 Slc15a2 表达量维持在高水平, 面对病原侵害时能做有效响应。本研究为深入了解鲤 Slc15a2 的免疫防御机制提供一定的研究基础。

关键词: 鲤; Slc15a2; 抗体; 嗜水气单胞菌

中图分类号: Q 78; S 941.4

文献标志码: A

质子转运载体 15 家族 (Solute carrier15 family, Slc15) 能够利用质子梯度和负膜电位进行二/三肽及拟肽分子的跨膜运输^[1], 因此也被称为寡肽转运载体家族 (POT)^[2-3]。鲤 Slc15 家族包含 Slc15a1 (PEPT1)、Slc15a2 (PEPT2)、Slc15a3 (PHT2)、Slc15a4 (PHT1) 和 Slc15a5, 共 5 个亚基^[4]。其中 Slc15a2 是一种低容量、高亲和力的转运载体, 广

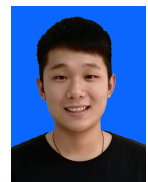
泛分布于肾脏、脑和肾小管上皮细胞等多种组织^[5]。Slc15a2 具有较大的分子量, 由 729 个氨基酸残基组成^[6]。目前研究发现, Slc15a2 介导 MDP 和 γ -iE-DAP 的转运可激活 NOD1 和 NOD2 依赖的炎症因子表达, 促使下游促炎细胞因子的生成, 在机体免疫防御机制中发挥着重要作用^[7]。同时 Slc15a2 能转运约 400 种二肽和 8 000 种三肽, 并

收稿日期: 2020-11-26 修回日期: 2021-06-08

资助项目: 国家自然科学基金 (31801032); 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室开放课题 (KF-2016-03); 河南师范大学博士基金 (qd16159)

第一作者: 姜洲 (照片), 从事进化基因组学研究, E-mail: jz491154021@foxmail.com

通信作者: 董传举, 从事水产动物遗传育种和环境资源保护法研究, E-mail: cjd1989@126.com



参与机体对青霉素类头孢菌素类和凝血酶素抑制剂等肽类药物的吸收^[8]。

鲤 (*Cyprinus carpio*) 作为经历过 4 轮全基因组复制的异源四倍体代表性物种, 具有重要研究价值^[9-11]。同时, 鲤作为全球淡水养殖产业中重要的经济物种, 其肉质口感独特、营养价值丰富, 因此具有很大的商业价值。但近年来, 由于高度集约化养殖和环境问题导致嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 病害频发, 其高致病和高感染性严重影响了鲤养殖产业的可持续发展^[12]。

前期研究发现, 在鲤中 *Slc15a2* 存在 2 个拷贝, 分别为 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2*, 2 个拷贝在感染性疾病及炎症反应中具有相似的表达趋势^[4]。截至目前, 高质量鲤 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 抗体仍未面世, 这很大程度上限制了对 *Slc15a2* 基因免疫调控及不同基因拷贝间表达关系的深入研究。因此, 针对 *Slc15a2* 的蛋白表达和功能研究具有重要意义。在本研究中, 我们通过原核表达技术获得鲤 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 目的蛋白, 纯化后注射至小鼠 (*Mus musculus*) 体内进而成功制备出相应的多克隆抗体。在鲤被嗜水气单胞菌感染后, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 技术检测血清中 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 的表达水平, 本研究可为鲤 *Slc15a2* 的免疫防御机制提供一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 RNA 提取及 cDNA 合成

随机挑取 3 尾河南师范大学水产基地养殖的体长为 (13.5 ± 1.0) cm, 体质量为 (35.0 ± 1.5) g 的健康鲤。对其心脏、肝胰腺、脾脏、头肾、肾脏、肌肉、皮肤、血液、性腺、大脑、鳃和肠进行 RNA 提取。根据 cDNA 反转录试剂盒 (Fermentas, 美国) 操作步骤获得 cDNA。

1.2 重组表达质粒的构建

通过 DNASTAR 软件对 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 进行抗原表位分析, 使用 Primer 6.0 软件设计含有特殊酶切位点和保护碱基的特异性扩增引物 (表 1), PCR 反应条件除退火温度为 62 °C/60 °C 30 s 外, 其他参照董传举等^[13] 的方法, 按照生工生物工程 (上海) 股份有限公司 DiaSpin 柱式胶回收试剂盒操作步骤进行 DNA 回收。成功回收后加入表达载体 pET32a, 参照 *BamH I* 和 *Hind III* 限制性酶 (TaKaRa, 大连) 说明书进行双酶切, 经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳质检后再次胶回收。采用 T4 DNA 连接酶将 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 连接到 pET32a (+) 载体中以此构建重组表达质粒体系, 并转化至 DH5 α 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, 按照生工生物工程 (上海) 股份有限公司 SanPrep 柱式试剂盒方法进行重组表达质粒抽提, 并对重组表达质粒 pET32a-*Slc15a2-1* 和 pET32a-*Slc15a2-2* 进行测序鉴定。

1.3 原核表达及蛋白纯化

将质粒 pET32a-*Slc15a2-1* 和 pET32a-*Slc15a2-2* 转化至 BL21 (DE3) 中, 挑取单菌株至 LB 液体培养基中, 振荡培养 2 h (37 °C)。在无菌条件下, 加入氨苄青霉素 (Amp, 100 μ g/mL), 待菌液 OD₆₀₀ 值达 0.5~0.6 时加入 IPTG (1 mmol/L), 继续振荡诱导 5 h。经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 检测融合蛋白条带后, 离心收集沉淀, 使用 15 mL 变性缓冲液悬浮菌体并进行超声波破碎 (运行条件: 超声波 3 s, 间隔 3 s, 持续 60 min; 50 W), 离心收集上清液并逐次加入 His Trap HP 柱中。根据 His Trap HP 柱的说明方法进行洗脱纯化, 过柱流速控制在 1 mol/min。将收集的融合蛋白经透析袋透析后通过 SDS-PAGE 进行质检。

表 1 引物序列及相关信息

Tab. 1 Primer sequences and related information

基因 genes	引物序列 primer sequences	内切酶 restriction enzyme	表达载体 expression vector	感受态细胞 component cells	序列号 GenBank
<i>Slc15a2-1</i>	CGGGATCCAATCCCAGCTCTACACAGTT	<i>BamH I</i>	pET32 ^a	BL21 (DE3)	MN447401
	CCAAGCTTCATTTGATTCTCCCCTGGT	<i>Hind III</i>	pET32 ^a	BL21 (DE3)	
<i>Slc15a2-2</i>	CGGGATCCAGTGTGGACTCACGTTCA	<i>BamH I</i>	pET32 ^a	BL21 (DE3)	MN447402
	CCAAGCTTACCGAAATCAAGAAGTCCC	<i>Hind III</i>	pET32 ^a	BL21 (DE3)	

注: 下划线部分分别为 *BamH I* 和 *Hind III* 的酶切位点; a. BL21(DE3) 菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体 (如 pET 系列) 的基因; 普通大肠杆菌没有 t7 RNA 聚合酶, 所以不能表达载体上的基因

Notes: the underlined parts were the restriction sites of *BamH I* and *Hind III*, respectively; a. BL21 (DE3) strain was used to efficiently express the gene cloned in an expression vector containing the bacteriophage T7 promoter, such as the pET series; ordinary *E. coli* does not have t7 RNA polymerase and therefore cannot express those vector genes

1.4 多克隆抗体的制备及效价检测

经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京博迈德生物技术有限公司) 检测纯化后的蛋白质置于 -80°C 保存备用。用 $1 \times \text{PBS}$ 溶液将蛋白质稀释为 $500 \mu\text{g/mL}$, 初次注射将蛋白质溶液与弗氏完全佐剂 (1:1, 体积比) (Sigma, 美国) 混匀达到乳化状态后, 对小鼠进行腹部注射。7 d 后使用蛋白质溶液与弗氏不完全佐剂 (1:1) 混匀注射, 注射时间每隔 7 天 1 次, 共注射 4 次 (单次每只小鼠腹腔注射量为 $100 \mu\text{L}$ 蛋白质溶液+ $100 \mu\text{L}$ 弗氏完全/不完全佐剂)。参照冯军厂等^[14]的方法通过 ELISA 技术对小鼠血清进行抗体效价检测。

1.5 攻毒实验

将体质量为 $(35.0 \pm 1.5) \text{ g}$ 的鲤, 随机分为空白对照组和攻毒组, 设置 3 个生物学重复, 均放养 40 尾鲤。饲养条件: 水温 $(26 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 ± 0.5 , 氨氮 $< 0.01 \text{ mg/L}$ 。每天定点投喂饲料 3 次。饲养 7 d 后, 对空白对照组鲤腹腔注射 $150 \mu\text{L}$ PBS, 攻毒组注射等量的嗜水气单胞菌 ($1.47 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$)。分别在 3、6、9、12、24 和 48 h 随机选取 3 尾鲤进行尾部取血, 4°C 过夜, 离心收集血清, 并置于 -80°C 保存备用。

1.6 鲤血清中 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 表达量的测定

将鲤血清用 $2 \times$ 包被液等比稀释后加入酶标板 (4°C 过夜), 采用 ELISA 技术检测血清中 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 的表达量。除一抗孵育部分, 将血清按 1:10 000 稀释后加入酶标板, 其余均参照“多克隆抗体的制备及效价检测”中的 ELISA 方法部分, 对鲤血清中蛋白表达量进行检测。

2 结果

2.1 抗原决定簇片段克隆及重组表达载体验证

根据已有 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 核心序列设计引物。将第一步获得的鲤 12 个组织 cDNA 等比例混合后作为模板, 经 PCR 扩增后得到的片段大小分别为 294、309 bp (图 1)。对 pET-32a (+) 质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶进行双酶切 (图 2), 后将 *Slc15a2-1* 和 *Slc15a2-2* 连接到 pET-32a (+) 载体中。结果显示, pET-32a-Slc15a2-1 和 pET-32a-Slc15a2-2 均为阳性重组表达载体。后将阳性重组表达载体转化至 DH5 α 的菌体中, 经培

养后随机挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 验证并测序鉴定, 测序结果与 NCBI 数据库已有序列一致。

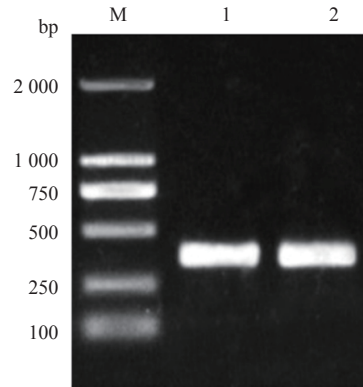


图 1 PCR 产物凝胶电泳分析

M. 标准物质 2000; 1. *Slc15a2-1*; 2. *Slc15a2-2*; 下同

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of PCR product

M. marker 2000; 1. *Slc15a2-1*; 2. *Slc15a2-2*; the same below

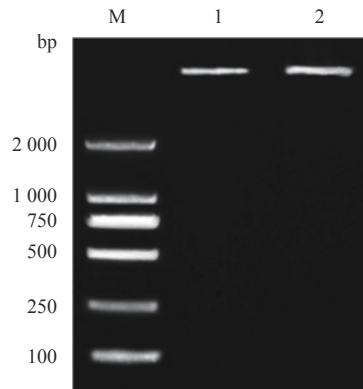


图 2 重组表达质粒的双酶切验证

Fig. 2 the double enzyme digestion of recombinant expression plasmid

2.2 融合蛋白的表达和纯化

将 pET-32a-Slc15a2-1 和 pET-32a-Slc15a2-2 转化至 BL21 (DE3) 表达菌株中。经过前期的诱导条件摸索, 实验选取在 37°C 下, 将 IPTG 诱导 5 h 作为重组蛋白表达的最优条件, 以 IPTG 诱导的菌液为阳性对照, 未添加 IPTG 诱导的菌液作为阴性对照。SDS-PAGE 结果显示, 经 IPTG 诱导后得到 2 个目的条带, 大小分别为 31.68 和 32.23 ku, 与预期一致 (图 3)。离心收集菌体, 超声破碎前加入 15 mm 的结合缓冲液重悬菌体, 经 His 柱多次纯化洗脱后, 使用透析袋去除融合蛋白中的有害元素。经 SDS-PAGE 质检, 多次纯化洗脱后的蛋白溶液与对照组相比, 杂蛋白条带大量减少, 含量显著降低。

2.3 抗体效价检测

经 ELISA 法检测，当 2 个多克隆抗体血清被稀释至 2.7×10^5 时，处理组与阴性对照组的吸光度比值依旧大于 2 (表 2, 表 3)。因此，本次制备的多克隆抗体的效价均为 2.7×10^5 ，符合后续血清中表达量测定标准。

2.4 嗜水气单胞菌感染后血清中 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 的表达水平

为探究鲤 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 在嗜水气单胞菌感染后血清中的表达水平，对照组使用 PBS，

攻毒组使用嗜水气单胞菌对鲤腹腔进行注射。分别在 3、6、9、12、24 和 48 h 检测鲤血清中 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 表达水平。结果显示，与空白对照组相比，Slc15a2-2 在鲤感染前期表达量不断升高，直至 6 h 后出现下降趋势，而在 24 h 时又重新上升至最高表达水平。与 Slc15a2-2 相比，Slc15a2-1 在攻毒 3 h 时表达量出现短暂升高后随即下降，9 h 再次升高直至 12 h 时达到最高表达量；在 6 和 24 h 时 Slc15a2-1 的表达量突然出现下降，但与此同时 Slc15a2-2 的表达量却上升至较高的表达水平；与 Slc15a2-1 相比，Slc15a2-2 表达

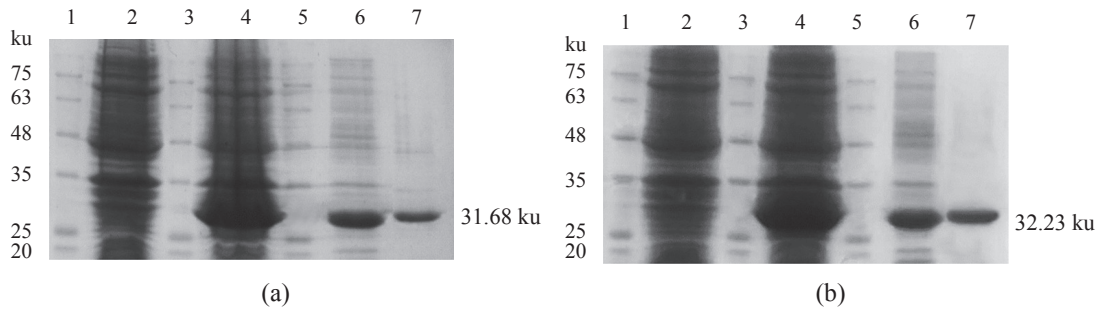


图 3 Slc15a2-1 (a) 和 Slc15a2-2 (b) 融合蛋白的原核表达及纯化

1. 蛋白质相对分子质量标准；2. 未经 IPTG 诱导的合成组；3. 蛋白质相对分子质量标准；4. 经 IPTG 诱导的合成组；5. 蛋白质相对分子质量标准；6. 纯化后蛋白；7. 透析后蛋白

Fig. 3 Prokaryotic expression and purification of Slc15a2-1 (a) and Slc15a2-2 (b) fusion proteins

1. protein marker; 2. group without IPTG induction; 3. protein marker; 4. group induced by IPTG; 5. protein marker; 6. purified protein; 7. postdialysis protein

表 2 ELISA 方法测定多克隆抗体 Slc15a2-1 效价

Tab. 2 Detection of Slc15a2-1 polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 items	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	0.927	0.723	0.622	0.427	0.295	0.153	0.089	0.064
阴性对照组 negative control	0.169	0.067	0.065	0.061	0.057	0.053	0.053	0.051
空白对照组 blank control	0.054	0.054	0.052	0.051	0.052	0.051	0.051	0.050
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	5.485	10.791	9.569	7.000	5.175	2.887	1.679	1.255

表 3 ELISA 方法测定多克隆抗体 Slc15a2-2 效价

Tab. 3 Detection of Slc15a2-2 polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 items	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	1.029	0.671	0.564	0.492	0.353	0.209	0.113	0.081
阴性对照组 negative control	0.263	0.089	0.063	0.062	0.061	0.061	0.059	0.057
空白对照组 blank control	0.069	0.061	0.057	0.051	0.054	0.053	0.053	0.051
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	3.913	7.539	8.952	7.935	5.787	3.426	1.915	1.421

量一直处于高表达水平; 与对照组相比, Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 的最高蛋白表达水平分别出现了 4.81 和 2.48 倍增加 (图 4), 说明本实验制备的抗体符合标准, 具有较高的亲和力和特异性。

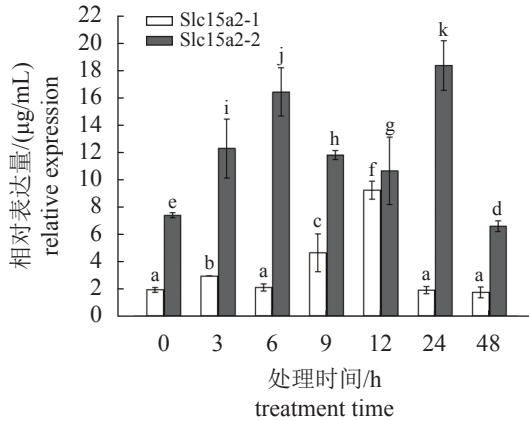


图 4 血清中 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 的表达水平

图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Detection of Slc15a2-1 and Slc15a2-2 protein expression levels in serum

different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

质子转运载体 15 家族 (Slc15) 在许多动物中被广泛研究, 该家族分布广泛, 功能差异也较大^[15-17]。目前, 人们对 Slc15a2 的底物亲和力研究较多^[18-19], 对免疫调节功能研究较少^[4,7]。本研究首次对鲤 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 进行原核表达分析, 选择低价但高效的 pET32a (+) 作为表达载体, 经过 IPTG 诱导表达后, 构建的原核表达产物主要以不溶于水的包涵体形式存在, 产物纯度更高。而后期选用尿素变性缓冲液对重组蛋白进行多次洗脱, 其优点是价格低廉, 复性后蛋白不会出现大量沉淀, 再通过透析袋法过滤有害元素。经 SDS-PAGE 检测, 纯化后的蛋白溶液与对照组相比, 杂蛋白条带大量减少, 含量显著降低。随后采用完全/不完全弗氏佐剂作为免疫增强剂, 经过 4 次免疫小鼠后成功获得了鼠源 pET-32a-Slc15a2-1 和 pET-32a-Slc15a2-2 抗体。为确保抗体的有效性, 采用不同的方法进行验证^[14, 20-22]。首先通过制备的多克隆抗体分析 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 在蛋白水平上的表达, 经间接 ELISA 法检测抗体效价均为 2.7×10^5 。通过对比空白对照和感染后 Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 的蛋白表达最高水平, 发现两者分别增加了 4.81 和 2.48 倍。上述结果说明本实验制备方法可

得到具有较强亲和性和特异性的抗体。

基因拷贝在生物进化的跃迁历程中起到了非常重要的作用, 相比其他物种, 鱼类的基因复制十分频繁, 大部分鱼类具有较多的基因数量^[23-25]。尽管大多数基因拷贝会因突变失去功能, 甚至在全基因组复制后从基因组中消失, 但那些“存活”的旁系同源物可能经历不同的进化命运^[26]。它们可能分化出相同功能的基因拷贝或在序列和功能上出现分歧导致新基因产生^[27]。本研究发现, 在嗜水气单胞菌感染后, Slc15a2-1 和 Slc15a2-2 整体表达相似, 都呈现先升高后降低, 再升高再降低的表达趋势。前期研究同样发现, 2 个拷贝在 12 个组织中具有相似的组织特异性表达模式, 且都在肠道中有显著性表达^[4]。上述研究表明 Slc15a2 的 2 个拷贝之间可能具有相似的功能, 并在机体免疫防御上发挥积极作用。而在其他基因拷贝间的功能研究中也发现了类似现象, 如鲤 *ApoEb1* 和 *ApoEb2* 的功能都与胚胎早期发育有关, 该 2 个拷贝基因在胚胎发育期和仔鱼期的瞬时表达水平也类似^[28]。在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[29] 和花鲈 (*Lateolabrax maculatus*)^[30] 上也有类似研究结果, 在细菌感染时, 大黄鱼 *ISG15* 的 2 个拷贝基因 *LcISG15-1* 和 *LcISG15-2* 在宿主对细菌感染的免疫防御中发挥相似功能, 且 2 个拷贝的表达趋势基本一致。花鲈盐度胁迫的研究中, *nkaa1a/β1b* 在花鲈盐度适应过程主要发挥离子转运功能, 而 *nkaa1a* 和 *nkaβ1b* 的 2 个拷贝基因的表达趋势趋于一致。因此, 在嗜水气单胞菌感染后, 鲤 *Slc15a2* 的 2 个拷贝之间可能具有相似的基因功能, 并在机体免疫防御上发挥积极作用。

研究表明, 全基因组复制后, 基因之间的共表达关系会受到影响^[31]。但在不同情况、不同组织和不同物种中, 基因的表达水平及模式均与其功能密切相关^[32]。在本研究中, Slc15a2 的 2 个拷贝在 6~24 h 期间一直保持着互补的表达状态, 并维持较高的共表达水平。即在同一时期一个拷贝的表达量下降, 另一个拷贝的表达量就会出现升高, 如在 6 和 24 h 时 Slc15a2-1 的表达量突然下降, 但与此同时 Slc15a2-2 的表达量却上升至较高的表达水平。说明嗜水气单胞菌感染鲤后, 2 个拷贝的相互作用共同维持了 Slc15a2 的高表达量, 进而在免疫调控中发挥一定作用。在对嗜盐四联球菌 (*Tetragenococcus halophilus*) *clpB*、*dnaK* 在耐盐机制的研究中也发现, 嗜盐四联球菌的生长会逐

渐减弱 *clpB* 的调节作用, 但 *danK* 的表达量逐渐增加, 2 个基因通过相互作用促进菌体生长, 以此来应对高盐胁迫^[33]。

在嗜水气单胞菌感染鲤后, 与 *Slc15a2-1* 相比, *Slc15a2-2* 在 0~48 h 各时期均具有显著的较高水平表达。但整体趋势而言, *Slc15a2-1* 在 3 h 时率先达到第一个相对表达高峰, 而 *Slc15a2-2* 却在 6 h 达到第一个相对表达高峰。前期对于 *Slc15a2* mRNA 水平的表达研究也具有相似的表达趋势, 即 *Slc15a2-1* 在 6 h 率先达到第一个表达高峰, 而 *Slc15a2-2* 则在 12 h 时达到了第 1 个表达高峰, 但 *Slc15a2-2* 整体表达量均显著高于 *Slc15a2-1*^[4]。在脊椎动物中, 基因复制和全基因组加倍在很大程度上促进了物种的进化和适应性辐射^[34]。但复制后存在的拷贝基因会逐渐形成假基因, 进而从基因组中丢失或结构与功能出现较大变化^[13]。因此, 具有同等功能的基因在物种基因组中一般不能维持较长时间的稳定^[35]。在研究多拷贝基因对鲤胚胎发育功能上的作用时发现, *ApoE-b1* 和 *ApoE-b2* 具有相似表达趋势, *ApoE-b1* 表达量约是 *ApoE-b2* 的 3 倍, 提示不同基因拷贝在胚胎发育期和仔鱼期发挥的作用有主次之分^[28]。在本研究中, *Slc15a2-2* 可能是该基因拷贝中的主效基因, 在当机体受到侵害时能够做出有效反应, 减少机体损伤。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Verri T, Terova G, Dabrowski K, et al. Peptide transport and animal growth: the fish paradigm[J]. *Biology Letters*, 2011, 7(4): 597-600.
- [2] Smith D E, Cl  men  on B, Hediger M A. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(2-3): 323-336.
- [3] Herrera-Ruiz D, Knipp G T. Current perspectives on established and putative mammalian oligopeptide transporters[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 92(4): 691-714.
- [4] Dong C J, Jiang Z, Zhang X Y, et al. Phylogeny of *Slc15* family and response to *Aeromonas hydrophila* infection following *Lactococcus lactis* dietary supplementation in *Cyprinus carpio*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 705-714.
- [5] 赵东欣, 薛永亮, 卢奎, 等. 寡肽转运蛋白PepT2及其药物转运[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(1): 1-8.
- Zhao D X, Xue Y L, Lu K, et al. Role of oligopeptide transporter PePT2 in drug transportation[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 26(1): 1-8 (in Chinese).
- [6] 于辉, 李华, 关绣霞, 等. 小肽转运载体的分子营养学的研究进展[J]. *佛山科学技术学院学报(自然科学版)*, 2005, 23(3): 77-80.
- Yu H, Li H, Guan X X, et al. The molecular nutrition progress of small peptide transporters[J]. *Journal of Foshan University (Natural Science Edition)*, 2005, 23(3): 77-80 (in Chinese).
- [7] Sun D L, Wang Y Q, Tan F Q, et al. Functional and molecular expression of the proton-coupled oligopeptide transporters in spleen and macrophages from mouse and human[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2013, 10(4): 1409-1416.
- [8] Xiang J M, Chiang P P, Hu Y J, et al. Role of PEPT2 in glycylsarcosine transport in astrocyte and glioma cultures[J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 396(3): 225-229.
- [9] Dong C J, Chen L, Feng J Y, et al. Genome wide identification, phylogeny, and expression of *Aquaporin* genes in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0166160.
- [10] Dong C J, Jiang L K, Peng W Z, et al. Phylogenetic and evolutionary analyses of the frizzled gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) provide insights into gene expansion from whole-genome duplications[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144037.
- [11] 姜洲, 张猛, 刘凯月, 等. 鲤slc15a1基因的多克隆抗体制备及其表达分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(1): 19-28.
- Jiang Z, Zhang M, Liu K Y, et al. Preparation of polyclonal antibodies to *Cyprinus carpio* slc15a1 gene and its expression analysis[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(1): 19-28 (in Chinese).
- [12] Zhang J F, Dong C J, Feng J C, et al. Effects of dietary supplementation of three strains of *Lactococcus lactis* on *HIFs* genes family expression of the common carp following *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 590-599.
- [13] 董传举, 张江凡, 李胜杰, 等. 鲤和草鱼IL17受体基因家族的全基因组识别、起源进化及表达分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 1693-1703.
- Dong C J, Zhang J F, Li S J, et al. Genome-wide identification of IL17 receptor gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its expression analysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1693-1703 (in Chinese).

- fication, phylogeny, and expression of IL17 receptor genes in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1693-1703 (in Chinese).
- [14] 冯军厂, 常绪路, 朱振祥, 等. 鲤细胞因子多克隆抗体的制备及检测[J]. *水产学报*, 2018, 42(10): 1615-1625. Feng J C, Chang X L, Zhu Z X, *et al.* Preparation and detection of cytokines polyclonal antibodies of *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(10): 1615-1625 (in Chinese).
- [15] 黎航航. 草鱼 PepT1 与 PepT2 基因全长 cDNA 克隆和 PepT2 组织表达研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012. Li H H. Full-length cDNA cloning of PepT1 and PepT2 and tissue expression of PepT2 gene from grass carp[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [16] 张云华, 单安山, 冯自科. 小肽转运载体(PepT1)及其活性的调控[J]. *东北农业大学学报*, 2003, 34(2): 205-209. Zhang Y H, Shan A S, Feng Z K. Peptide-transporters (PepT1) and it's activity regulation[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2003, 34(2): 205-209 (in Chinese).
- [17] 崔艳. 泌乳奶牛乳腺中小肽转运载体的鉴定及其生理特性的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015. Cui Y. Study on identification and physiological characteristics of peptide transporters in the mammary gland of lactating dairy cows[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [18] Terada T, Saito H, Sawada K, *et al.* N-terminal halves of rat H⁺/peptide transporters are responsible for their substrate recognition[J]. *Pharmaceutical Research*, 2000, 17(1): 15-20.
- [19] Groneberg D A, Nickolaus M, Springer J, *et al.* Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake[J]. *The American Journal of Pathology*, 2001, 158(2): 707-714.
- [20] 向军俭, 凌钦婕, 吕颂辉, 等. 四种赤潮藻多克隆抗体的制备及特异性分析[J]. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2005, 26(5): 700-704. Xiang J J, Ling Q J, Lü S H, *et al.* The preparation and characterisation analysis of polyclonal antibodies against the 4 kinds red-tide algae[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2005, 26(5): 700-704 (in Chinese).
- [21] 谢鹏. 重金属离子全抗原的合成, 多克隆抗体的制备与间接 ELISA 分析 [D]. 上海: 上海交通大学, 2009. Xie P. Synthesis of antigens for heavy metal ions, preparation of polyclonal antibodies and indirect ELISA analysis[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2009 (in Chinese).
- [22] 林娜. 蜂王浆致敏糖蛋白的结构表征及糖胺聚糖对其致敏性影响的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019. Lin N. Structural characterization of royal jelly sensitized glycoprotein and the effect of glycosaminoglycan on its sensitization[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2019 (in Chinese).
- [23] Wittbrodt J, Meyer A, Scharl M. More genes in fish?[J]. *BioEssays*, 1998, 20(6): 511-515.
- [24] Meyer A, Scharl M. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999, 11(6): 699-704.
- [25] Liang Z K, Schnable J C. Functional divergence between subgenomes and gene pairs after whole genome duplications[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(3): 388-397.
- [26] Fuchs C, Luckhardt A, Gerlach F, *et al.* Duplicated cytochrome genes in teleost fishes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 337(1): 216-223.
- [27] Wang X L, Mei J, Sun M, *et al.* Identification of three duplicated *Spin* genes in medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Gene*, 2005, 350(2): 99-106.
- [28] 崔润滋, 万玉美, 孙金生, 等. 鲤多拷贝基因 *Apo-14kDa* 和 *ApoE* 的系统学分析和其在胚胎发育中的功能探索[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 741-755. Cui R Z, Wan Y M, Sun J S, *et al.* Phylogenetic analysis and expression during embryonic development of multiple copies of *Apo-14kDa* and *ApoE* genes in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 741-755 (in Chinese).
- [29] Shen B, Wei K, Guo S Y, *et al.* Molecular characterization and expression analyses of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in *Larimichthys crocea* (Family: Sciaenidae)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 846-857.
- [30] Zhang X Y, Wen H S, Qi X, *et al.* Na⁺-K⁺-ATPase and *nka* genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their involvement in salinity adaptation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2019, 235: 69-81.
- [31] Li L, Briskine R, Schaefer R, *et al.* Co-expression network analysis of duplicate genes in maize (*Zea mays* L.)

- reveals no subgenome bias[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 875.
- [32] Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases[J]. *Immunology*, 2011, 134(1): 8-16.
- [33] 卢良坤. 嗜盐四联球菌 *clpB*, *dnaK*, *hrcA* 基因在耐盐机制中的相互作用 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
Lu L K. The role of *Tetragenococcus halophilus* gene *clpB*, *dnaK*, *hrcA* in saline adaption[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013 (in Chinese).
- [34] Gu X, Wang Y F, Gu J Y. Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate evolution[J]. *Nature Genetics*, 2002, 31(2): 205-209.
- [35] Zhang J Z. Evolution by gene duplication: an update[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18(6): 292-298.

Expression analysis of serum *Slc15a2* in common carp (*Cyprinus carpio*) stimulated by *Aeromonas hydrophila*

JIANG Zhou¹, XUE Yaguo^{1,2}, ZHANG Meng¹, ZHU Lei¹,
WANG Lei¹, LI Xuejun¹, DONG Chuanju^{1*}

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;
2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: To analyze the effect of the *Cyprinus carpio Slc15a2* gene on the immune response mechanism during *Aeromonas hydrophila* infestation, this experiment prepared rat-derived *Slc15a2-1* and *Slc15a2-2* polyclonal antibodies, and changes in protein expression of *Slc15a2-1* and *Slc15a2-2* in *C. carpio* sera following *A. hydrophila* infection was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that ① compared with the blank control the maximum protein expression levels of the two copies after infection were increased by 4.81 and 2.48 times, respectively. The protein expression of *Slc15a2-2* was consistently higher from 0 h to 48 h compared to that of *Slc15a2-1*. ② Overall, there was a similar expression trend between the two copies of *Slc15a2*, with both increasing, then decreasing, then increasing and then decreasing again. However, *Slc15a2-1* reached its first expression peak at 3 h, while *Slc15a2-2* reached its first expression peak at 6 h. ③ *Slc15a2-1* and *Slc15a2-2* protein expression showed complementary expression trends during the four periods from 6 h to 24 h. That is, the expression of one copy decreased significantly and the expression of the other copy increased significantly during the same period, but the overall expression level remained high. The results indicate that the two polyclonal antibodies prepared in this experiment have high affinity and specificity, and the overall similar expression trend between the two copies after infection with *A. hydrophila* suggests that they may have similar gene functions. *Slc15a2-2* had significantly higher expression between 0 h and 48 h than *Slc15a2-1*, possibly as the major gene in the copy. The two copies showed complementary expression from 6 h to 24 h, and the co-expression was maintained at a high level, enabling an effective response in the face of pathogen attack. This study may provide some basis for insight into the regulatory immune response mechanism of *C. carpio Slc15a2* gene.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Slc15a2*; antibody; *Aeromonas hydrophila*

Corresponding author: DONG Chuanju. E-mail: cjd1989@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31801032); Open Project of National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding (KF-2016-03); Ph.D. Foundation of Henan Normal University (qd16159)