



苏丹鱼甘露糖受体的基因克隆表达和免疫特性

何 昕¹, 秦真东¹, 张 凯¹, 梁日深¹, 杨 森¹,
伍剑标², 赵丽娟^{1*}, 林 鑫^{1*}

(1. 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室,
仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225;
2. 佛山市南海区标记鱼苗场, 广东 佛山 528200)

摘要: 为了解苏丹鱼MR(*LhMR*)的结构特点及其在抗感染免疫反应中的作用, 本研究克隆并分析了*LhMR*基因, 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测了*LhMR*在正常及柱状黄杆菌感染苏丹鱼组织中的表达。结果显示, *LhMR*开放阅读框4 296 bp, 编码1 431个氨基酸(aa)。LhMR的氨基酸序列和分子结构与其他物种高度相似, 胞外1个富含蓖麻类β型三叶草的结构域(RICIN)、1个纤连蛋白II型结构域(FN II)、8个串连的C型凝集素样结构域(CLECTs)、1个跨膜区和1个胞内区。通过qRT-PCR检测显示, *LhMR*在脾脏、体肾、心脏、脑、皮肤、肌肉、鳃、肝脏、后肠、前肠和中肠11种组织中均有表达, 其中脾脏中表达量最高; 经柱状黄杆菌感染苏丹鱼后, 脾脏、肠、体肾和鳃中*LhMR*基因的相对表达量显著升高。通过免疫组织化学(IHC)检测发现, 在脾脏、肾脏和鳃中的LhMR蛋白表达水平提高。通过苏木精-伊红染色病理组织切片表明, 在体肾、肠、肝脏和鳃中均有不同程度的病变。体肾的肾小管有大量的血细胞浸润, 上皮细胞发生坏死; 肠壁变薄, 组织大量弥散坏死; 肝脏组织中有多个空泡; 鳃小片肿胀、混乱、坏死和脱落。研究表明, *LhMR*在苏丹鱼感染柱状黄杆菌免疫反应中发挥重要作用, 为苏丹鱼柱形病的防控提供新的参考。

关键词: 苏丹鱼; 柱状黄杆菌; 甘露糖受体; 克隆; 基因表达

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

苏丹鱼(*Leptobarbus hoevenii*), 学名何氏细须鲃, 是我国新近从马来西亚引进的名优淡水养殖鱼类。柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnarium*)是苏丹鱼的常见病原, 其感染可导致苏丹鱼患柱形病。研究鱼类感染的免疫特性是开展鱼病高效防控的基础。甘露糖受体(mannose receptor, MR), 又称CD206, 是C型凝集素受体家族甘露糖受体亚家族的一员, 在鱼类先天性免疫和适应性免疫中都发挥重要作用, 属于钙依赖性I型跨膜蛋白受体, 于20世纪80年代在兔巨噬细

胞中被首次发现^[1-2]。随后研究发现MR广泛分布在各种组织中^[3]。随着研究的不断深入, 发现MR在宿主免疫应答中发挥重要作用^[4-5]。MR具有多个胞外结构域, 能识别和结合内源性或外源性配体, 从而激活下游的信号通路, 在诱导NO和多种细胞因子的生成、抗原的呈递和转运以及维持内环境的稳态等过程中发挥着重要作用, 同时在介导抗病毒[登革热病毒(dengue virus)^[6]]、细菌[新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)^[7]]、肺炎链球菌(*Streptococcus*

收稿日期: 2019-02-26 修回日期: 2019-04-22

资助项目: 中国-东盟海上合作基金; 国家自然科学基金(31872606, 31572657, U1701233); 广东省海洋与渔业局基金(GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); 广东省教育厅基金(KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604)

通信作者: 赵丽娟, E-mail: 406856929@qq.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

pneumoniae^[8]]和寄生虫[利什曼原虫(*Leishmania donovani*)^[9]]等病原体免疫中也发挥重要作用。

虽然对MR在哺乳动物中的研究比较深入,但是在鱼类中是最近才开展。尽管有学者开展了鱼类甘露糖受体的相关研究,但是他们只是推测其功能,并没有克隆和测定甘露糖受体的序列。本团队在国际上第一次克隆并测定鱼类甘露糖受体的序列,第1种测定的鱼类是草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[10],随后发现甘露糖受体普遍存在于多种鱼类中,包括团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[11]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[12]和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[13]。随后其他学者在淇河鲫(*Carassius auratus*)^[14]中也克隆和测定了甘露糖受体。

本团队自2011年开始从马来西亚引进6 cm规格的苏丹鱼3 500尾,并开展了其人工养殖和繁殖研究,2015年人工繁育获得成功,并逐渐推广其养殖。在研究过程中,观察到苏丹鱼比较活泼、跳跃能力强,容易造成体表损伤,易感染柱状黄杆菌等常见细菌性病原。柱状黄杆菌是一种世界范围内流行的淡水鱼类致病菌^[15-16],其感染导致鱼类的柱形病,给全球渔业带来重大的经济损失。为了研究苏丹鱼MR在细菌感染中的免疫特性,实验克隆并测定了苏丹鱼甘露糖受体(LhMR)的基因序列,并对其进行了生物信息学分析。通过组织分布、表达模式、组织病理以及免疫组化等相关技术探究了柱状黄杆菌感染条件下,LhMR的免疫学功能,为苏丹鱼的病害防控提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用苏丹鱼由佛山南海区标记鱼苗场提供,暂养于淡水循环养殖系统,24 h持续供氧,保持水温在26 °C~28 °C。至少适应2周后开展实验。取5尾健康的苏丹鱼肝脏(鱼体质量25~30 g),分装于RNAisoPlus试剂(TaKaRa, 大连)和磷酸盐缓冲液(PBS)中,冻存于-80 °C下备用。

1.2 苏丹鱼甘露糖受体基因的克隆

总RNA的提取按照RNAiso Plus试剂盒说明书进行提取,各组织的总RNA用Nano 200分光光度计(ALLSHENG杭州奥盛仪器有限公司)测定其纯度和浓度;然后使用HIScript® Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme)

合成cDNA,在-20 °C保存备用。通过同源克隆技术,找到同源物种的开放读码框(ORF)设计引物(表1)。PCR反应体系20 μL:模板cDNA 1 μL,上下游引物各1 μL(10 μmol/L),2×Taq Mix 10 μL,ddH₂O 7 μL。反应程序:95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,35个循环;最后72 °C延伸10 min,4 °C保存30 min。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR反应产物,根据Marker的大小切下含有目的基因条带的凝胶,然后使用琼脂糖凝胶回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]回收目的条带,并连接到pMDTM18-T Vector(TaKaRa, 大连),转化到*Escherichia coli* DH5α中,涂布于含氨苄(50 μg/mL)的LB培养基平板,静置2 min后倒扣放置于37 °C恒温培养箱中培养12~16 h。挑取单菌落5 mL于含氨苄的LB培养基中扩大培养,然后进行菌液PCR检测,使用质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]对阳性菌液进行质粒提取后,送公司测序。不同片段进行序列拼接,以获得全长MR基因。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primers	序列(5'-3') sequence	应用 application
Lh-F1	AGACTGCAGAAGCTCAGCCA	片段扩增
Lh-R1	CGCCCAAATGCATTTCCATCA	
Lh-F2	ATAACTGCGACCCACTCACT	片段扩增
Lh-R2	AGCCTGGACTTGTAATAATCGT	
Lh-F3	TCTGCCAAAGAGGCCATTCT	片段扩增
Lh-R3	GTACAGCCATTATCGCAA	
Lh-F4	CAGACAACAGCGTGGTAGA	qRT-PCR
Lh-R4	ACAAGAACACAGCCAAACCG	
β-actin-F	CCACCTTCAACTCAATCAT	qRT-PCR
β-actin-R	AGGGCCAGACTCATCGTAC	

1.3 苏丹鱼甘露糖受体的生物信息学分析

LhMR全长是以提取肝脏组织RNA反转录合成的cDNA为模板克隆获得,根据克隆所得的LhMR cDNA全序列,用BLASTn程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列同源性比对,使用Emboss(<http://emboss.Bioinformatics.NI/>)软件预测氨基酸序列;利用ProtParam蛋白质理化性质在线分析软件对MR预测的ORF氨基酸序列进行理化特性预测(<http://web.expasy.org/protParam/>);

SMART软件(<http://samrt.emblheidelberg.de>)预测蛋白质的结构域; TMHMM法分析蛋白质的跨膜区(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 信号肽预测SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); MR基因ORF氨基酸序列的同源性分析和用于系统进化树构建的不同物种间氨基酸序列用Blast进行预测(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>); 多重序列比对采用Clustal X程序, 使用Clustal X程序和MEGA 6.0软件, 构建Neighbor-Joining(NJ)系统进化树, 方法参考文献^[17]。

1.4 苏丹鱼甘露糖受体基因的组织分布

随机选取5条健康苏丹鱼, 提取皮肤、肌肉、鳃、肝脏、后肠、前肠、中肠、脑、心脏、体肾和脾脏11个组织总RNA, 使用反转录试剂盒(Vazyme, 南京)得到cDNA。qRT-PCR(Light Cycler[®] 96实时荧光定量PCR仪, Roche)反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 60 °C 30 s, 共40个循环。每个样品做3个平行, 2^{-ΔΔC_T}法计算基因相对表达量。

1.5 柱状黄杆菌感染后苏丹鱼甘露糖受体的组织表达

感染实验在仲恺农业工程学院的鱼房养殖系统内进行。80尾的苏丹鱼[(34±1.5) g]随机均分为2组, 分别放养于准备好的实验桶内。柱状黄杆菌接种于Shieh液体培养基, 200 r/min、28 °C培养12 h, 感染实验前, 测定实验菌对苏丹鱼的半致死浓度为7.68×10⁷ CFU/mL, 感染实验采用的实验菌浓度为7.68×10⁷ CFU/mL, 按照5 μL/g鱼体质量腹腔注射, 对照组注射等体积Shieh培养液, 分别在注射后3、12、24和48 h取脾脏、肠、体肾和鳃组织, 每个时间点每组随机取5尾鱼, 注射前每组随机取5尾鱼的组织作为注射前的对照(0 h), 分离的组织用液氮速冻后-80 °C保存。RNA提取、cDNA合成、qRT-PCR条件及结果计算方法同“苏丹鱼甘露糖受体基因的组织分布”。

1.6 苏丹鱼感染柱状黄杆菌后的组织病理

健康苏丹鱼60尾[(34±1.5) g]随机均分为2组, 用浓度为7.68×10⁷ CFU/mL的柱状黄杆菌进行腹腔注射; 对照组注射等体积Shieh培养液。分别采集实验组和对照组的鳃、肝脏、肾脏和肠组织, 用4%的多聚甲醛固定。石蜡切片的步骤: ①材料脱水透明, 将组织置于75%酒精4 h, 85%酒精2 h, 90%酒精2 h, 95%酒精1 h, 无水乙醇 I 30 min, 无水乙醇 II 30 min, 二甲苯 I

5~10 min, 二甲苯 II 5~10 min, 蜡 I 1 h, 蜡 II 1 h, 蜡 III 1 h。②石蜡包埋: 选择好切片方向后, 将组织置于58 °C~62 °C高温液体石蜡中, 待石蜡凝固后, 修理石蜡。③切片: 将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片, 片厚4 μm。切片漂浮于摊片机40 °C温水上, 将组织展平, 用载玻片将组织捞起, 并放进60 °C烤箱内烤片。待水烤干、蜡烤化后取出常温保存备用。④染色: 染色过程主要包括脱蜡(梯度乙醇)—苏木素染细胞核—伊红染细胞质—脱水封片; ⑤盖片: 中性树脂胶封片, 烘干后镜检。

1.7 柱状黄杆菌感染后LhMR蛋白水平的表达变化

通过免疫组织化学(IHC)观察组织中LhMR的分布情况。将切片与含有3%双氧水的溶液于室温避光孵育25 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性。用PBST(1 L PBS中加500 μL Tween-20)洗涤后, 将载玻片在柠檬酸盐缓冲液(1.8 mmol/L柠檬酸, 8.2 mmol/L柠檬酸钠)中于95 °C~100 °C温育10 min。随后, 将切片与封闭缓冲液(PBST中的10%牛血清白蛋白)在室温下孵育1 h。此后, 将切片与本实验室制备的抗团头鲂特异性抗体以1:250的稀释度在室温下孵育1 h。用PBST洗涤后, 将载玻片与抗兔IgG-HRP一起温育30 min, 然后在DAB底物溶液(Guge Biology, China)中显色镜检。

2 结果

2.1 苏丹鱼甘露糖受体基因cDNA全长及序列特征

扩增产物经过克隆测序后, 通过DNASTar软件拼接, 去除重叠序列后得到苏丹鱼甘露糖受体基因的开放读码框(图1)。LhMR开放读码框4 296 bp, 5'端非编码区80 bp, 3'端非编码区117 bp。开放阅读框编码一条由1 431个氨基酸(aa)组成的多肽, 经SignalP 4.0软件预测6~12 aa为信号肽。使用ProtParam软件分析编码蛋白的理化性质, 推测LhMR的等电点为4.79, 蛋白大小为163.15 ku, 成熟的LhMR分子为一重跨膜蛋白。结构域预测采用SMART软件(图2), 结果显示LhMR蛋白在结构上出现甘露糖受体固有的结构域, 与已知的鱼类MR结构域相似, 其中苏丹鱼甘露糖受体基因胞外(氨基端)由1 365个aa组成, 跨膜区位于(1 366~1 388 aa)处, 胞质区尾巴很短(residues: 1 389~1 429 aa)。胞外区的功能域依次

(5' UTR) AGACTGCAGAAGCTCAGCCAAAGACAGATGATGACACTGGAATAAACCTGTGAGAAGCACATAGTATATTTTGAATCAAG 80

81 **atg**aagattataacagtagttgtgttctgtatagatataatcaagctgttgcacagtcagaagaaactttctaat 160
 1 **M**K I I T V V V L L V L D I S S C F A Q S E G N F L I 27

161 atataatgtggattctacaacatgcatgtcaaacctgcttgatcggtcgtcacctgtgaccatacagtaactcacaac 240
 28 Y N V D S N K **C** M S N S L D R L V T **C** D P Y S N S Q Q 54

241 agtttcgctggacttcaagaatgcattttgaacacttacacaagaatgccttggagtaggaagtaaacagctgagc 320
 55 F R W T S K N R I L N T Y T K K **C** L G V G S K A V S 80

321 aaaaaactgcagtgctgaaatgtgaagatgacagtgcttctgcagaagtggaatgccacaatgatacatgtgctgctc 400
 81 K K L Q W L K **C** E D D S V L Q K W E **C** H N D T L V V L 107

RICIN

401 aaagaatgagctctgtacctgtgtaataatctcggatgccagtgatctctgcagactctggaataaagacaaat 480
 108 K N E S L Y L A V N N L G M P V I S A D S G I K S K W 134

481 ggacaatctatggaacactggtcaatatttgcctccggccttatgaagaaatgtacaccattgatggaaatgcatttggg 560
 135 T I H G T L V N I C S R P Y E E M Y T I D G N A F G 160

561 cgtccatgcaactttcttttcgatatgagaataatggatgacagattgtaccagcgagcatgcaaaagtccatggg 640
 161 R P **C** N F P F R Y E N K W Y A D **C** T S E H A K S P W **C** 187

FN2

641 tgcaattgagctgattacagtgtaaccagctgtgggctactgccaacacctgacaatagctctggtccaaaaatc 720
 188 A I E S D Y S V N Q L W G Y **C** P T P D N T L W S K N P 214

721 ctctgacaaaatgtctattaccaactaaacgataagtcggcctgacatggcatcaagcaagaagagctgccagcagcag 800
 215 L T N V Y Y Q L N D K S A L T W H Q A R K S C Q Q Q 240

801 ggtggagagctcctgagtggttctgagcctcatgaacacacctttgttacaggaatgatcgaaatgcacaaatcact 880
 241 G G E L L S V S E P H E H T F V T G M I R N A Q I S L 267

881 atggacagagctgaacaaattagatgggtccagtgatggcagtggaaccaatggacagcctttacgttatctgaagtggc 960
 268 W T G L N K L D G S S G W Q W T N G Q P L R Y L K W H 294

CLECT 1

961 acagtgatccaacaacacaaccaggccagagctgtggtgctctgaaagcactcatggtctgaaatgacaaatgaa 1 040
 295 S G Y P T T Q P G Q S C G A L K A P H G S E W T N E 320

1 041 ctttggcagaaaatgatggatagctctgccaagaggccattctgttctattatccaccagttgtgaccactggatt 1 120
 321 L C S E K Y G Y V C **Q** R G H S V P I I P P V V T T G F 347

1 121 ttgcaaaagccctggattccatattcaggcaactgttatctgcttcacgcagcaagagaacgtggatggaagcacgag 1 200
 348 C Q S P W I P Y S G N C Y L L H R S K R T W M E A R D 374

1 201 atgcatgctctgagggaaggaggagactgctgagtatcctcaacacagaagagcaagcttgcacatcacacaacttgg 1 280
 375 A C L R E G G D L L S I L N T E E Q S F A I T Q L G 400

CLECT 2

1 281 tatttgaagacagacaagttgtggattggtttcaatgaccgtaaaactcagatgctgtttgagtgagtgaccagcttag 1 360
 401 Y L K T D K L W I G F N D R K T Q M L F E W S D Q S S 427

1 361 cgtcccgtttgctcatgggaggtggggagccgagtcacaatgctgtccatgcagaggactgtgtttaatgaatggag 1 440
 428 V P F A S W E V G E P S H N A V H A E D C V L M N G E 454

1 441 aggagggaaagtggcgatgatgtttgtgagaacaagtatggattcatctgtaagaagaagaccagctcctaaagcctca 1 520
 455 E G K W A D D V C E N K Y G F I C K K K T S S K A S 480

1 521 aataatgacacagttgtaacaaaccaggatgcaaacaggttggaccaggtatgggtactactgctacatggcaggatc 1 600
 481 N N D T V V T N P G C K T G W T R Y G Y Y C Y M A G S 507

1 601 tgagacaaagacctcgaagaagcaaatcagatgtgtaaaacgctgactctcaactggttgatgttctctaggatag 1 680
 508 E T K T F E E A N Q M C K N A D S Q L V D V S S R I E 534

1 681 aaaatgcatctctggttagctagtagtaggagcagcaccagaaaagtacttctggcttggattgtctaatcagaagataag 1 760
 535 N A F L V S L V G A R P E K Y F W L G L S N Q K D K 560

CLECT 3

1 761 catgecttgaatggaccaactetaagcaagttccatttacacatttcaacactgggatgccaggacgaaaacaagggg 1 840
 561 H A F E W T N S K Q V P F T H F N T G M P G R K Q G C 587

1 841 tgttgcatgacaactggaattattgctgggcttgggatgtgctcagctgctcaataaggaaaaatacatctgcaagc 1 920

图1 Fig.1

598 V A M T T G I I A G L W D V L S C S N K E K Y I C K Q 614
 1 921 agagagctgaaggactagttacaactcctgccccgacaccatcctcccctgagctgtcctgaagaatggacgcaatt 2 000
 615 R A E G L V T T P A P T T H P P L S C P E E W T A I 640
 2 001 gcgtccaggactattgtgtcaagtactttaatgtaccttcaatttaaaatgaagacttgggatgaagctcttgactctg 2 080
 641 A S R D Y C V K Y F N V P S F K M K T W D E A L D F C 667
 2 081 ccgagagcttgggtgatctcctgagcatccatcatgaatctgatattccttggaaacaaggaggaggatccagcat 2 160
 668 R E L G G D L L S I H H E S D I P W K Q G G G Y P A W 694
 CLECT 4
 2 161 ggattggttacagaatgtacgatccctcggtgggttatgtctggagtgatggttctctgctcctatcaaaagctgggcc 2 240
 695 I G Y R M Y D P S V G Y V W S D G S S S S Y Q S W A 720
 2 241 agtgatgaaccgaacaatttgaacaacattgaaatgtgttgaatgagagtttcaatgggaaagtgatgaaatgtg 2 320
 721 S D E P N N L N N I E N C V E M R V S I W E S D G M W 747
 2 321 gaatgatgtcagctgtcatgacagaaaagactggctactgtcagattcgaagaaagaccaccaaggaagtgaatatta 2 400
 748 N D V S C H D R K D W Y C Q I R K G K T P K E V N I T 774
 2 401 caagtccagtttataacgaacagaggatggctggattgaatttaaagtagccagttatataatcacattatccagca 2 480
 775 S P V Y N E T E D G W I E F K G S Q Y Y I S H Y S A 800
 2 481 atgtctatgacagcagggcagggcactactgtaaaaatcacatggcgatcttgggtgatcagtgatgacgaagcgggt 2 560
 801 M S M H E A R A Y C K K S H G D L V V I S D D E E R V 827
 2 561 gttcatctggcatcaggctaaatcttcgcacaacgatgttatcattggatgacagttgatctggatgggtcttaccagt 2 640
 828 F I W H Q A K S S H N D V I I G M T V D L D G S Y Q W 854
 CLECT 5
 2 641 ggatggatgggtccctttagtgttcaagcttgggaagaaaatcagccggctttaaataagtgaggaaagtgtgtg 2 720
 855 M D G S P L V F Q A W E E N Q P A F K N S E E R C V 880
 2 721 atgatgaccacctcaaggactctgggaaagtgtcaactgtggatgaaataatttgtttgcaagcgaagtcagctc 2 800
 881 M M T T S Q G L W E S V N C G D E N N F V C K R S Q S 907
 2 801 tcctccagttaatgccacggtgctcccacacaaaagccaaaaggagctgtgctcctgagtgacagctttgatggaa 2 880
 908 P P V N A T V A P T Q K P K G G C A P E W T G F D G K 934
 2 881 aatgttacttggtaggaagacacgaaaaatggacagaagcaagaatctgcagagaaagtggtagatctggca 2 960
 935 C Y L V K E D T K K W T E A R E F C R E S G G D L A 960
 2 961 tctatcatgagtagaaaaatcaagccttttaaccacaatgattagagataaaaccagacttctggattgattcag 3 040
 961 S I M S R K H Q A F L T T M I R D K T T D F W I G F S 987
 3 041 caatttggcaaacgggaggttcaaatggacagatgggagtaaagttgcaatcacaatgtggccaaaggggagcctcaag 3 120
 988 N L A N G R F K W T D G S K V A F T M W A K G E P Q A 1 014
 CLECT 6
 3 121 cctatcatggcactactactattggacaaaatcacitttcaggggatcaggaatgtgctgttatggcagcagttca 3 200
 1 015 Y H W H Y Y Y W T K Y H F S G D Q E C A V M G T S S 1 040
 3 201 aactctttggcaagtgggtggcagttgactgtaattctactcagagtttcatctgcagtcgtgatgttgcctggat 3 280
 1 041 N S F G K W V A V D C N S T Q S F I C S R D V D P G I 1 067
 3 281 tgccccagcagactgaacttctaaaaccttgtcaagctcggaattcattttcaagtgatacaagagaacctaa 3 360
 1 068 A P A Q T E L P K T F V K L G N S S F K V I Q E N L T 1 094
 3 361 catggagtgaggcaagagtcgctgtgagaaggaggagctcatcttgcagcattcgggactcgataacacaagcttac 3 440
 1 095 W S E A K S R C E K E G A H L A S I R D S I T Q A Y 1 120
 3 441 cttgagctgcaggtcttcagagcccaacagccatgtggattggtctcaacagcttgaagtcaagagggtattttcaatg 3 520
 1 121 L E L Q V F R A Q Q P M W I G L N S L K S R G Y F Q W 1 147
 CLECT 7
 3 521 ggagaataactggccatgaatatggaagatggacaccttctgaaccactgccaaccgcttctgcatataatggata 3 600
 1 148 E N N W P M N M E R W T P S E P L P N R P C A Y M D I 1 174
 3 601 tagaaggagaatggaggacgactctctgcaatgaaacctctacagcatctgtgagcaaacacagacatcccccagcc 3 680
 1 175 E G E W R T T L C N E T F Y S I C E Q T T D I P P T 1 200
 3 681 ctccggctcagcaacctgggcattgcccaagaagggtgacagtcattgaggtggataccttataagacagttg 3 760
 1 201 L P A Q Q P G H C P Q E E G D S P L R W I P Y K D S C 1 227
 3 761 ctatgctttgtgacagataccaatcatggagcaaaagatctagactctgcatgacatggggagcactcttctgtcagca 3 840

图1 Fig.1

```

1 228 Y A F V T D T K S W S K A S R L C M T W G A S L V S I 1 254
3 841 ttagggatgaaggggaagagaagtttatagaggacaacctcatggtccttgacagtcacaagacttttgattggactt 3 920
1 255 R D E G E E K F I E D N L M V L D S H K D F W I G L 1 280
3 921 ttctacaccagaaaggacactggttatggacagacaacagcgtggttagattacactaactggcatctgcgagtatta 4 000
1 281 F Y T Q K G H W L W T D N S V V D Y T N W A S A S D Y 1 307
-----CLECT 8-----
4 001 tgatgatgaattgaagaccgtttttggagtcctgactgcgcattgatcttccaaaaataaaaaatggaaaaaacggc 4 080
1 308 D D E F E D R F W S P D C A L I S S S K N K K W K K R H 1 334
4 081 attgtgattacacagtcttaccgtttatctgcaaaacttccaaagaataaacctaaccgttgagaccatacatcaagat 4 160
1 335 C D Y T V L P F I C K T S K E I N L T V E T I H Q D 1 360
4 161 tctgaaactcaaagggtaataaccggtttggctgttcttctgtgttgcagtggtctgcgtattggagctctagcata 4 240
1 361 S E T Q R V N T G L A V F L C V A V V C V L G A L A Y 1 387
4 241 cattactatagaaattcaaaagacagcagttgcttacacttgaaaatcccatgtataataacacagattcttctctgc 4 320
1 388 I Y Y R N S K R Q Q L P T L E N P M Y N N T D S S A H 1 414
4 321 attctgaatataaagatacaaaacattgcttagccacattgaaattgctgaaatagACCTAATGTTTCTGTACTCGTATA 4 400
1 415 S E Y K D N K T L L S H I E I A E * 1 431
4 401 TACGTGTAGGATTATGTACTACTCAGCCGGTCATTATCATAAAAATAAACAATGACAGGAATCATCAGGTTTATTTTGCAT 4 480
4 481 AATGGCTGTA C T T (3' UTR)

```

图 1 LhMR cDNA 全长及推导的氨基酸序列

粗体“atg”和“tag”分别代表起始密码子和终止密码子; “*”代表蛋白翻译结束; 矩形框内序列为跨膜区; 带有灰色阴影的氨基酸是 RICIN 区的 5 个保守半胱氨酸残基; 带有紫色阴影的氨基酸是 FN2 区的 4 个保守半胱氨酸残基

Fig. 1 Full length of LhMR cDNA and deduced amino acid sequence

Bold "atg" and "tag" represent start codon and stop codon respectively; "*" represents the end of protein translation; the sequence in the rectangle is a transmembrane region; the amino acids with gray shadow are the five conserved cysteine residues in the RICIN region; the amino acid with purple shadow is the four conservative cysteine residues in the FN2 region

为 1 个蓖麻类β型三叶草的结构域(RICIN区: residues 22~137 aa)、1 个纤连蛋白 II 型结构域(FN II 区: 156~202 aa)和 8 个串连的 C 型凝集素样结构域(CLECT1: 202~331、CLECT2: 348~472 aa、CLECT3: 491~613 aa、CLECT4: 633~761 aa、CLECT5: 781~903 aa、CLECT6: 924~1 060 aa、CLECT7: 1 074~1 192 aa、CLECT8: 1 209~1 345 aa)。

2.2 LhMR 的系统进化树分析

为了分析 LhMR 在进化中的分类地位, 利用 MEGA 6.0 和 DNAMAN 软件, 对苏丹鱼和其他 5 个物种进行氨基酸序列比对分析(图 3), 表明苏丹鱼 MR 氨基酸序列与其他生物的 MR 氨基酸序列具有较高的同源性, 不同的鲤科(Cyprinidae)鱼类之

间的 MR 序列保守性较高, 与草鱼的 MR 同源性最高, 为 83%, 其次为团头鲂 81%、鲫 78%、斑马鱼 75%, 在系统进化树上可以看到, 苏丹鱼 MR 与鲤科鱼类聚为一支(图 4)。

2.3 健康鱼不同组织内 LhMR 基因的表达

采用 qRT-PCR 检测了 LhMR 在组织中的表达情况, LhMR 在健康苏丹鱼的皮肤、肌肉、鳃、肝脏、后肠、前肠、中肠、脑、心脏、体肾和脾脏 11 个组织中均有表达, 其中脾脏中的表达量最高, 其次是体肾, 皮肤中的表达量最低(图 5)。

2.4 柱状杆菌感染 LhMR 基因的组织表达分析

通过 qRT-PCR 检测柱状杆菌感染条件下苏

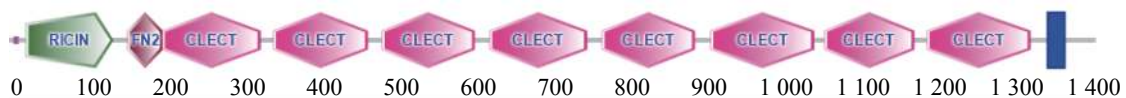


图 2 苏丹鱼甘露糖受体结构域

RICIN. 蓖麻类β型三叶草的结构域, FN2. 纤连蛋白 II 型结构域, CTECT. C 型凝集素样结构域

Fig. 2 Domains of mannose receptor of L. hoevenii

RICIN. ricin-type beta-trefoil domain, FN2. fibronectin type 2 domain, CTECT. C-type lectin (CTL) or carbohydrate-recognition domains

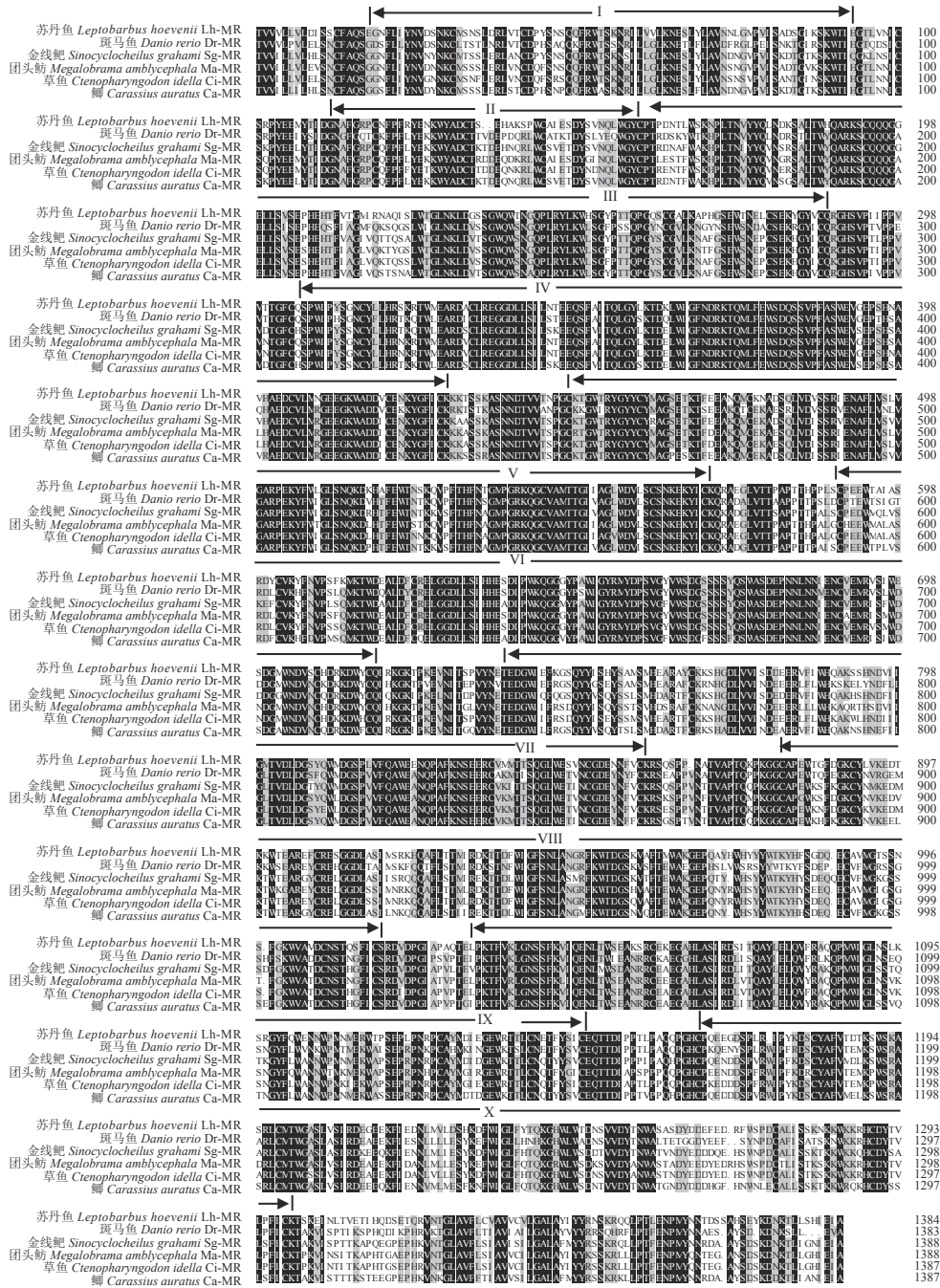


图3 苏丹鱼与其他鱼类MR的氨基酸序列比对

黑色阴影部分表示MRs的保守一致序列，小黑点表示缺失的氨基酸，罗马数字I. RICIN结构域，II. FN2结构域，III. CLECT1结构域，IV. CLECT2结构域，V. CLECT3结构域，VI. CLECT4结构域，VII. CLECT5结构域，VIII. CLECT6结构域，IX. CLECT7结构域，X. CLECT8结构域；物种的GenBank ID：苏丹鱼 Lh-MR；斑马鱼 Dr-MR(NP_001297773.1)；金线鲃 Sg-MR(XP_016095338.1)；团头鲂 Ma-MR(AGN52245.1)；草鱼 Ci-MR(AIE15913.1)；鲫 Ca-MR(ALS87701.1)

Fig. 3 Amino acid sequence comparison of MR between *L. hoevenii* and other fish species

The black shaded portion indicates a conserved consensus sequence of MRs, the small black dot indicates missing amino acid, the Roman numeral I represents the RICIN domain, II. FN2 domain, III. CLECT1 domain, IV. CLECT2 domain, V. CLECT3 domain, VI. CLECT4 domain, VII. CLECT5 domain, VIII. CLECT6 domain, IX. CLECT7 domain, X. CLECT8 domain; GenBank ID of the species are as follows: *Leptobarbus hoevenii* Lh-MR; *Danio rerio* Dr-MR(NP_001297773.1); *Sinocyclocheilus grahamsi* Sg-MR(XP_016095338.1); *Megalobrama amblycephala* Ma-MR(AGN52245.1); *Ctenopharyngodon idella* Ci-MR(AIE15913.1); *Carassius auratus* Ca-MR(ALS87701.1)

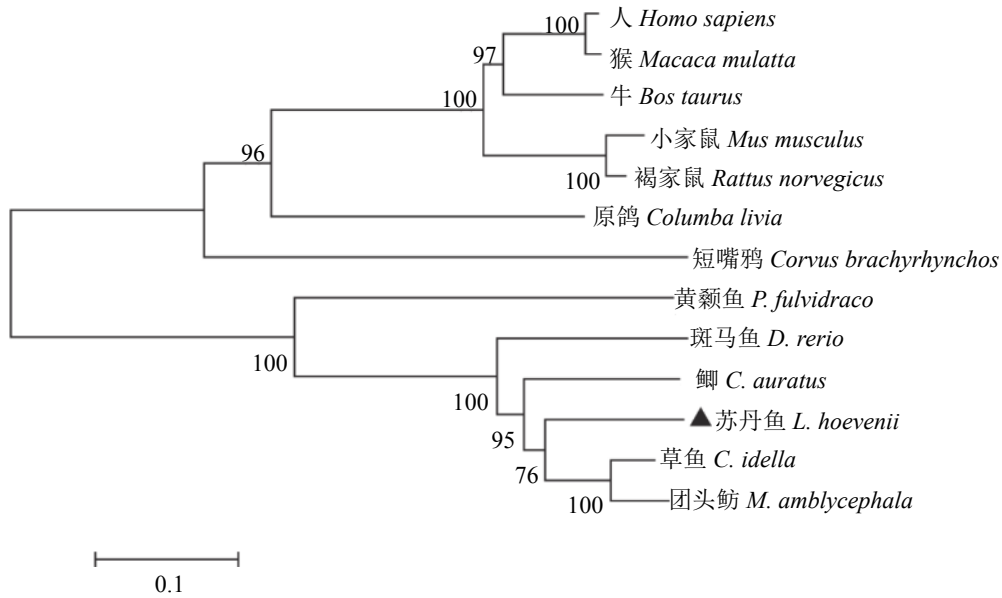


图 4 不同物种LhMR分子进化树

用MEGA 6.0软件中的Neighbor-Joining构建, 节点处数值为自展置信值, 自展重复1 000次; 黑色三角形标记为苏丹鱼MR基因; 各物种MR名称及GenBank登录号: 苏丹鱼 Lh-MR; 人 Hs-MR(AAA60389.1); 猕猴 Mm-MR(NP 001180854.1); 牛 Bt-MR(XP 003586820.2); 小家鼠 Mm-MR(NP 032651.2); 褐家鼠 Rn-MR(NP 001099593.2); 原鸽 Cl-MR(XP 005507998.1); 短嘴鸦 Cb-MR(XP 008628192.1); 黄颡鱼 Tf-MR(AOE43613.1); 斑马鱼 Dr-MR(NP 001297773.1); 鲫 Ca-MR(ALS87701.1); 草鱼 Ci-MR(AIE15913.1); 团头鲂 Ma-MR(AGN52245.1)

Fig. 4 Molecular phylogenetic tree of MR from different animal species

The tree was constructed using the neighbor-joining method within the MEGA 6.0 program, the value at the node is the self-expanding value, and the self-expansion is repeated 1 000 times; the black triangle is labeled as the *L. hoevenii* MR gene; GenBank ID of other species are as follows: *L. hoevenii* Lh-MR; *Homo sapiens* Hs-MR(AAA60389.1); *Macaca mulatta* Mm-MR(NP 001180854.1); *Bos taurus* Bt-MR(XP 003586820.2); *Mus musculus* Mm-MR(NP 032651.2); *Rattus norvegicus* Rn-MR(NP 001099593.2); *Columba livia* Cl-MR(XP 005507998.1); *Corvus brachyrhynchos* Cb-MR(XP 008628192.1); *Tachysurus fulvidraco* Tf-MR(AOE43613.1); *Danio rerio* Dr-MR(NP 001297773.1); *Carassius auratus* Ca-MR(ALS87701.1); *Ctenopharyngodon idella* Ci-MR(AIE15913.1); *Megalobrama amblycephala* Ma-MR(AGN52245.1)

丹鱼不同器官LhMR的基因表达情况。结果显示, LhMR在脾脏、肠道、体肾和鳃中都有不同

程度的表达上调: 鳃的表达量在3~24 h持续上升并达到峰值, 在48 h时有所下降(图6-a); 其中体

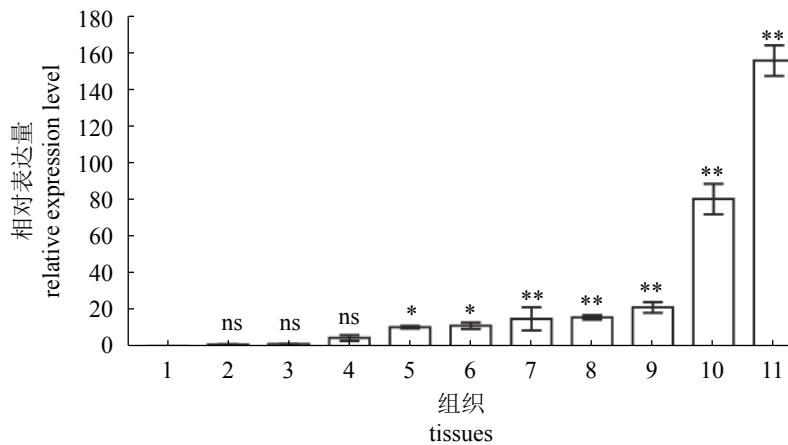


图 5 LhMR基因在健康苏丹鱼不同组织内的mRNA表达

*. 有显著差异(P<0.05); **. 有极显著差异(P<0.01); ns. 没有显著差异; 1.皮肤, 2.肌肉, 3.鳃, 4.肝脏, 5.后肠, 6.前肠, 7.中肠, 8.脑, 9.心脏, 10.体肾, 11.脾脏; 下同

Fig. 5 mRNA expression of LhMR in different tissues of healthy *L. hoevenii*

*. significant difference, P<0.05; **. extreme significant difference, P < 0.01; ns. no significant difference; 1. skin, 2. muscle, 3. gills, 4. liver, 5. hind-intestinal, 6. fore-intestinal, 7. mid-intestinal, 8. brain, 9. heart, 10. trunk kidney, 11. spleen; the same below

肾*LhMR*基因表达量从注射后3~48 h都持续上升(图6-b); 肠道中的MR表达量在3和12 h显著上升并在12 h达到峰值, 随后在24和48 h又逐渐降低, 呈现单峰型(图6-c); 在脾脏中, MR在3 h和

12 h表达量逐渐升高, 12 h达到峰值, 在24 h时显著下降到最低值, 随后在48 h又达到第二个峰值(图6-d)。以上结果表明*LhMR*参与了细菌感染免疫反应。

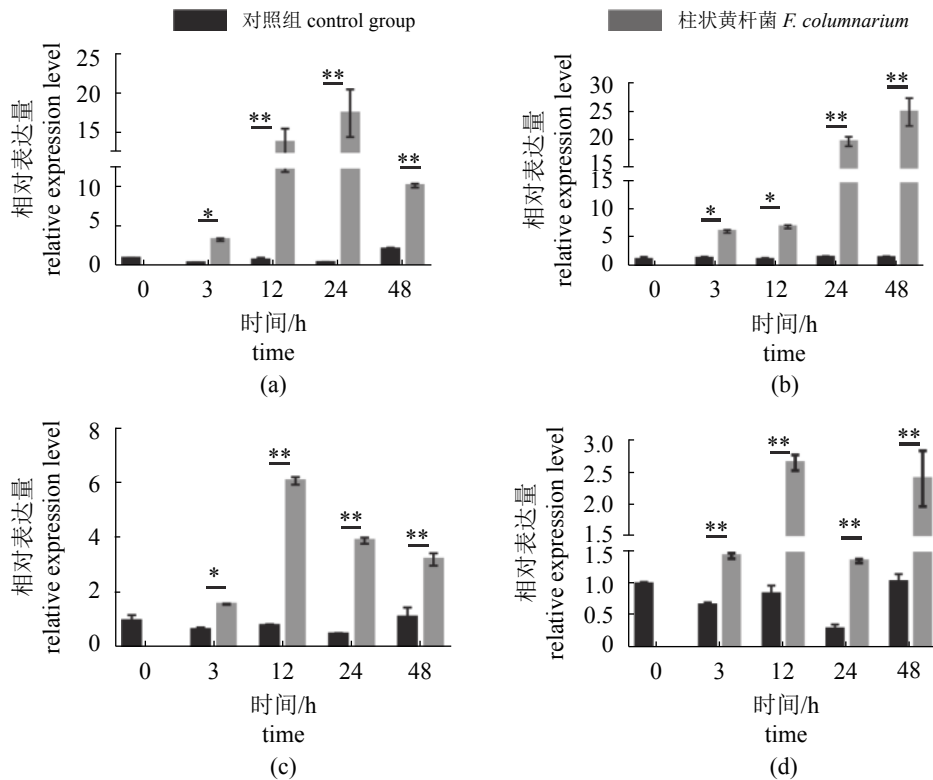


图6 柱状黄杆菌感染苏丹鱼后甘露糖受体mRNA在不同组织中的基因表达量

(a) 鳃, (b) 体肾, (c) 肠, (d) 脾脏

Fig. 6 Relative expression of *LhMR* mRNA in different tissues of *L. hoevenii* infected with *F. columnarium*

(a) gills, (b) trunk kidney, (c) intestine, (d) spleen

2.5 苏丹鱼感染柱状黄杆菌的组织病理切片分析

在人工感染的发病苏丹鱼中, 感染菌液浓度为 7.68×10^7 CFU/mL组的苏丹鱼被感染的时程较长, 并有存活, 因此用于组织器官病理切片制作, 在显微镜下观察并拍照记录各组织病变情况, 在感染12 h时的肝细胞中出现蜂窝状小空泡, 其细胞核发生病变, 表现为核染色质移到核膜的边缘; 感染24 h时发生病变的范围扩大, 可观察到肝细胞内的小空泡连成大空泡, 细胞核悬浮在肝细胞的中央; 48 h时细胞周界不清晰, 细胞核肿大, 并出现部分肝细胞的核浓缩、破裂、溶解消失(图7-a)。体肾在感染12 h时表现为肾小管水肿; 24 h时其上皮细胞与基底膜完全分离, 形成一空腔, 细胞排列不规则; 在48 h时肾小管有大量的血细胞浸润, 病变严重的肾

<http://www.sxuebao.cn>

小管的上皮细胞发生变性, 甚至坏死(图7-b)。肠道在感染12 h时表现为肠黏膜上皮细胞坏死脱落; 24 h时黏膜下层固缩, 固有层脱离, 肠壁变薄; 48 h后肠道组织大量弥散坏死(图7-c)。在感染12 h时鳃小片发生炎性水肿, 一部分单层扁平细胞肿大变性, 毛细血管扩张、充血及渗出, 肿大变性的上皮细胞肥大和变圆; 24 h时几乎全部的呼吸上皮细胞都肿大变性, 毛细血管进一步充血、渗出, 使原来紧密附着于毛细血管的呼吸上皮细胞全部或部分分离, 红细胞也被被动地渗出, 造成局部出血; 48 h时鳃小片肿胀、混乱、坏死脱落, 鳃丝末端缺损, 边缘腐烂, 周围常黏附坏死脱落的细胞。(图7-d)。

2.6 柱状黄杆菌感染后LhMR蛋白水平的表达变化

通过免疫组织化学进一步检测柱状黄杆菌

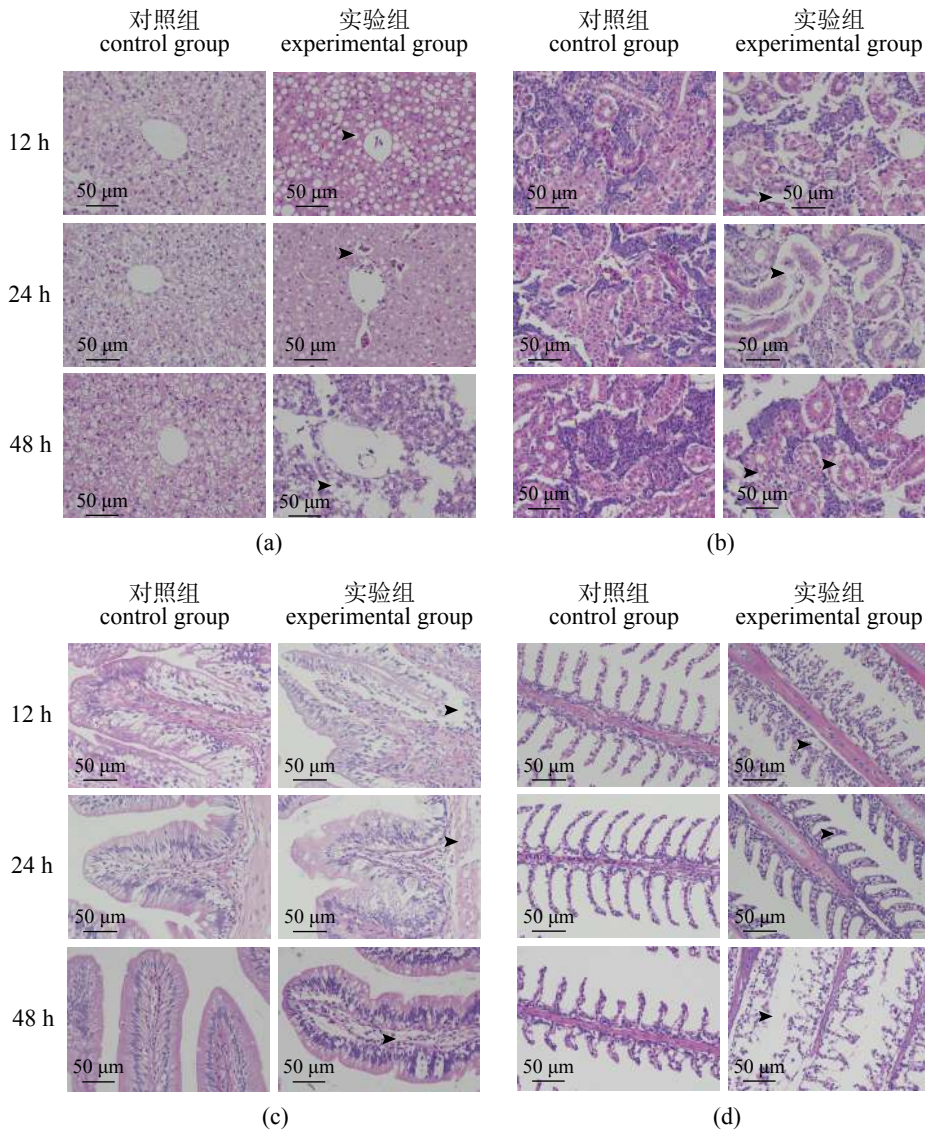


图 7 苏丹鱼感染柱状黄杆菌的组织病理切片

(a) 肝, (b) 体肾, (c) 肠, (d) 鳃; 箭头所指的地方为发生病变的部位

Fig. 7 Histopathological changes of tissues from *L. hoevenii* infected with *F. columnarium*

(a) liver, (b) trunk kidney, (c) intestine, (d) gills; the arrow points indicate histopathological sites

感染苏丹鱼期间蛋白质水平的LhMR表达。结果显示, 在柱状黄杆菌感染后, 脾脏、体肾及鳃中的LhMR蛋白表达水平显著提高(图8)。

3 讨论

关于MR结构与功能的关系, 在哺乳动物中已得到阐明, MR可通过其胞外复杂的结构域特异性结合内源和外源的多种配体, 所以在病原识别、内环境稳定及肿瘤发生等过程中具有重要的作用。同时, 其具有清除内源性蛋白、内化甘露糖基化抗原的功能, 所以MR在增强抗原

递呈和介导吞噬方面起重要作用^[18-19]。因此, MR可能主要是作为一种模式识别受体, 在病原识别的免疫反应中起重要作用。本团队前期的研究表明, 甘露糖、壳寡糖和壳聚糖都在不同程度上通过鱼类巨噬细胞激活呼吸爆发和一氧化氮途径, 从而提高鱼类的免疫力^[20-22]。

本实验成功克隆并测定了苏丹鱼甘露糖受体(LhMR)全基因。进化树分析发现LhMR与鲤形目中的草鱼同源性最高, 其次是团头鲂、鲫和斑马鱼。在进化树的聚类分支中, LhMR与草鱼、鲤(*Cyprinus carpio*)、团头鲂等鲤科鱼类聚为一支, 哺乳类、鸟类和爬行类单独聚为一支,

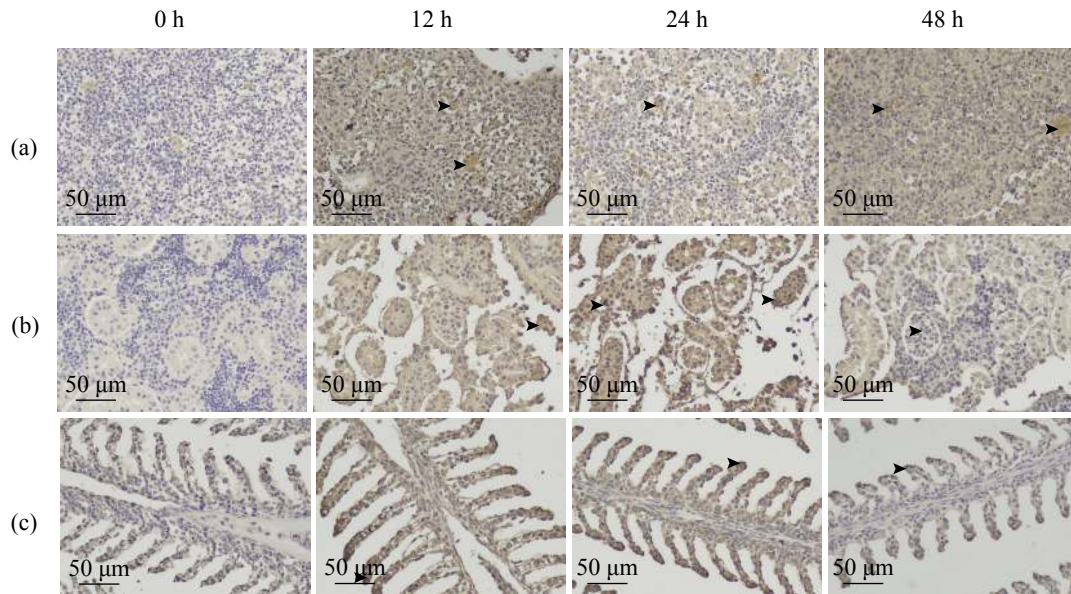


图8 柱状黄杆菌感染苏丹鱼后各组织免疫组化检测

(a) 脾脏, (b) 体肾, (c) 鳃; 以0 h时的脾脏、体肾和鳃为对照; 检测12、24和48 h不同感染时间点的免疫组化; 箭头所指为检测到不同程度的阳性信号

Fig. 8 Immunohistochemical assay of various tissues from *L. hoevenii* infected with *F. columnarium*

(a) spleen, (b) trunk kidney, (c) gills; 0 h of the tissues were used as control; immunohistochemical assay was performed at different time points of 12, 24 and 48 h, the arrow points indicate positive signals

此结果从分子水平证明了它们同属于鲤科鱼类的进化关系。

鱼类MR广泛表达于多种器官, 尤其是在肾脏和脾脏中, 并且在细菌免疫应答过程中发挥重要作用。本研究结果表明, 苏丹鱼MR基因在皮肤、肌肉、鳃、肝脏、后肠、前肠、中肠、脑、心脏、体肾和脾脏中均有表达, 在脾脏和肾脏中的表达明显高于其他组织, 此结果与团头鲂对MR基因表达的结果一致^[23], 也与脾脏和肾脏属于主要免疫器官有关。经柱状黄杆菌感染后, *LhMR* mRNA在脾脏、肾脏、肠道和鳃组织中的时序表达在一定的时间点均出现了显著性上调。此结果和免疫组化检测柱状黄杆菌感染苏丹鱼MR在蛋白质水平表达的结果一致。本研究表明*LhMR*在柱状黄杆菌的免疫应答中扮演重要角色, 可为防控苏丹鱼柱形病提供参考。

何昕和秦真东为共同第一作者。

参考文献:

- [1] Wileman T E, Lennartz M R, Stahl P D. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(8): 2501-2505.
- <http://www.scxuebao.cn>

- [2] Paveley R A, Aynsley S A, Turner J D, *et al.* The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production[J]. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(13-14): 1335-1345.
- [3] Zhang X S, Brondyk W, Lydon J T, *et al.* Biotherapeutic target or sink: analysis of the macrophage mannose receptor tissue distribution in murine models of lysosomal storage diseases[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, 34(3): 795-809.
- [4] 张典, 梅其炳. 甘露糖受体在宿主免疫应答中的作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(2): 233-235.
- Zhang D, Mei Q B. Role of mannose receptors in host immune response[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2011, 27(2): 233-235(in Chinese).
- [5] East L, Isacke C M. The mannose receptor family[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2002, 1572(2-3): 364-386.
- [6] Miller J L, de Wet B J M, Martinez-Pomares L, *et al.* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(2): e17.
- [7] Dan J M, Kelly R M, Lee C K, *et al.* Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6): 2362-2367.
- [8] Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, *et al.* Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(44): 41613-41623.
- [9] Chakraborty P, Ghosh D, Basu M K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes[J]. *The Journal of Parasitology*, 2001, 87(5): 1023-1027.
- [10] Wang L, Liu L C, Zhou Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(1): 54-58.
- [11] Liu X L, Tang X C, Wang L, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(7): 4601-4611.
- [12] Zheng F F, Asim M, Lan J F, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 10997-11012.
- [13] 刘小玲, 王虹, 樊启学, 等. 黄颡鱼甘露糖受体基因的克隆和功能分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(7): 1036-1043.
- Liu X L, Wang H, Fan Q X, *et al.* Cloning and functional analysis of mannose receptor from Chinese yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1036-1043(in Chinese).
- [14] 王俊丽, 秦超彬, 卢荣华, 等. 淇河鲫甘露糖受体基因克隆及嗜水气单胞菌感染对其基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 18-28.
- Wang J L, Qin C B, Lu R H, *et al.* Molecular cloning of mannose receptor in *Carassius auratus* var. *qihe* and effects of *Aeromonas hydrophila* infection on its gene expression[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 18-28(in Chinese).
- [15] Wagner B A, Wise D J, Khoo L H, *et al.* The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(4): 263-272.
- [16] Hawke J P, Thune R L. Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1992, 4(2): 109-113.
- [17] 李洁, 王虹, 周洋, 等. 团头鲂Toll样受体II基因的克隆与表达分析[J]. *淡水渔业*, 2017, 47(1): 22-29.
- Li J, Wang H, Zhou Y, *et al.* Cloning and expression of Toll-like receptor 2 in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(1): 22-29(in Chinese).
- [18] Sørensen K K, Tollersrud O K, Evjen G, *et al.* Mannose-receptor-mediated clearance of lysosomal α -mannosidase in scavenger endothelium of cod endocardium[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, 129(2-3): 615-630.
- [19] Allavena P, Chieppa M, Bianchi G, *et al.* Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages[J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2010, 2010: 547179.
- [20] Liu L C, Zhou Y, Zhao X H, *et al.* Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 47(1): 17-24.
- [21] Zhao X H, Liu L C, Hegazy A M, *et al.* Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca^{2+} -dependent manner[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 357-363.
- [22] 郝明君, 刘立春, 张涓, 等. 3种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 72-77.
- Xi M J, Liu L C, Zhang J, *et al.* Effect of three chitosan on respiratory burst activity of head-kidney phagocytes in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(3): 72-77(in Chinese).
- [23] Wu C S, Zhao X H, Babu V S, *et al.* Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama*

amblycephala) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas*

hydrophila[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 52-59.

Cloning, expression and immune features of Sultan fish (*Leptobarbus hoevenii*) mannose receptor

HE Xin¹, QIN Zhendong¹, ZHANG Kai¹, LIANG Rishen¹, YANG Sen¹,
WU Jianbiao², ZHAO Lijuan^{1*}, LIN Li^{1*}

(1. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. Biaoji Fishery Company, Nanhai District, Foshan 528200, China)

Abstract: In order to understand the structural characteristics of MR and its role in anti-infective immune responses in *Leptobarbus hoevenii*, we cloned and sequenced the MR of *L. hoevenii*. Subsequently, real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay was used to measure the expression of the MR in the tissues of *L. hoevenii* with or without *F. columnare* infection. The results showed that the MR of *L. hoevenii* (LhMR) open reading frame was 4 296 bp, encoding 1 431 amino acids (aa). The amino acid sequence and molecular structure of LhMR are highly similar to the MRs from other animals, i.e., containing an extracellular ricin-like β -type clover domain (RICIN), a fibronectin type II domain (FNII) and eight tandem C Lectin-like domains (CLECTs), a transmembrane region and a short intracellular region. The mRNA of *LhMR* was widely expressed in 11 tested tissues, including spleen, kidney, heart, brain, skin, muscle, gills, liver, post intestine, fore intestine and mid intestine, with the highest expression level in the spleen. The mRNA expression of *LhMR* was significantly increased in the spleen, intestine, kidney and gills of *L. hoevenii* infected by *F. columnare* measured by qRT-PCR. Furthermore, the protein expression of LhMR was also increased in the spleen, kidney and gill of *L. hoevenii* infected by *F. columnare* revealed by immunochimistry assay. By Hematoxylin eosin staining, there were various pathological changes observed in the body kidney, intestine, liver and gills. In the body kidney, there were blood cells infiltrated in the renal tubules with necrosis in epithelial cells. The wall of intestine became thinner with diffused necrosis. Numerous vacuoles were observed in the liver cells. Gill lamella showed swollen, disordered, necrosis and detached. The results revealed that LhMR plays an important role in the immune responses of *L. hoevenii* infected by *F. columnare* and this will provide some reference for prevention and therapy strategies against columnaris disease.

Key words: *Leptobarbus hoevenii*; *Flavobacterium columnare*; mannose receptor; cloning; gene expression

Corresponding authors: ZHAO Lijuan. E-mail: 406856929@qq.com; LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: China-ASEAN Maritime Cooperation Fund; National Natural Science Foundation of China (31872606, 31572657, U1701233); Funds from the Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); Department of Education of Guangdong Province (KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604)