



大黄鱼 C 型凝集素受体 Clec4e 的分子鉴定及凝集特性

张鑫洛¹, 王永阳², 吴子良¹, 黄小红^{1,2},
陈新华¹, 张伟妮^{1,2*}

(1. 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建省海洋生物技术重点实验室, 福建 福州 350002;
2. 福建农林大学, 中西兽医结合与动物保健福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 为了揭示硬骨鱼 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptor, CTLR) 的生物学功能, 实验以从大黄鱼转录组数据库中筛选出的一个 CTLR 基因—C 型凝集素结构域家族 4 成员 E 基因 (*Clec4e*) 为研究对象, 研究其分子特征、表达分布和凝集特性。结果显示, *LcClec4e* cDNA 全长 1 546 bp, 开放阅读框 (ORF) 771 bp, 编码 254 个氨基酸。*LcClec4e* 的 N 端有一个跨膜区, 无信号肽, C 端含有一个糖识别结构域 (CRD), 其中含有糖结合位点 EPN 和 WFD 以及 6 个可形成二硫键的保守半胱氨酸。系统发育分析表明, *LcClec4e* 与多种鲈形目鱼类 *Clec4e* 具有较近的亲缘关系。荧光定量 PCR 结果显示, *LcClec4e* 在所检测的 10 种组织中呈组成型分布, 且在肝脏中表达量最高; *LcClec4e* 在来源于大黄鱼头肾组织的原代巨噬细胞、淋巴细胞和粒细胞中均有表达, 且在巨噬细胞中表达量最高; 经灭活溶藻弧菌刺激后, *LcClec4e* 在 3 种免疫细胞中的表达均极显著上调。原核表达的重组 *LcClec4e* 胞外段 (recombinant *LcClec4e*-extracellular domain, r*LcClec4e*-ex) 具有 Ca^{2+} 依赖性的凝集活性, 可凝集小鼠、家兔的红细胞, 以及嗜水气单胞菌、变形假单胞菌、溶藻弧菌和坎氏弧菌等 4 种水产常见的革兰氏阴性菌。*D*-葡萄糖、*D*-果糖、*D*-甘露糖、*D*-麦芽糖、 α -乳糖和脂多糖均可抑制 r*LcClec4e*-ex 对大黄鱼重要病原菌变形假单胞菌的凝集作用, 说明 *LcClec4e* 可能与变形假单胞菌表面的糖类物质结合。上述结果提示, *LcClec4e* 可能作为一种模式识别受体, 通过结合病原菌表面的糖类病原体相关分子模式来识别病原, 参与大黄鱼抗细菌感染的免疫防御。

关键词: 大黄鱼; C 型凝集素受体 (CTLR); *Clec4e*; 红细胞凝集; 细菌凝集

中图分类号: S 942

文献标志码: A

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 俗称黄花鱼, 属鲈形目 (Perciforms) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄鱼属 (*Larimichthys*), 主要分布在黄海南部、东海南部及南海北部海域。据《2021 年中国渔业统计年鉴》, 2020 年我国大黄鱼产量达 25.4 万 t, 占海水鱼类养殖总产量的 14.51%, 稳居养殖海水鱼类之首^[1]。然而, 大黄鱼也是病害极其多发的鱼类,

长期遭受溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)^[2]、变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*)^[3]、刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*)^[4] 和虹彩病毒 (*Iridovirus*)^[5] 等病原的感染, 遭受了重大的经济损失。因此, 探究大黄鱼抗病原感染的分子机制, 制定有效的免疫防治方案, 是其产业可持续发展的重要策略。鱼类作为低等脊椎动物, 具有发达的先天性

收稿日期: 2022-01-24 修回日期: 2022-04-22

资助项目: 国家自然科学基金 (31802333)

第一作者: 张鑫洛 (照片), 从事水产动物病害及免疫学研究, E-mail: xinluozhang@qq.com

通信作者: 张伟妮, 从事水产动物病害与免疫学研究, E-mail: zhangweini@fafu.edu.cn



免疫和相对完善的获得性免疫。当外界病原体入侵时, 先天免疫作为第一道防线发挥着重要作用^[6-8]。而先天性免疫的激活依赖于模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 如 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)、NOD 样受体 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs)、RIG-I 样受体 (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RLRs) 以及凝集素受体等, 它们识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 如脂多糖、肽聚糖、鞭毛蛋白、核酸等, 从而激活免疫系统来清除病原或维持内环境的稳态^[9]。凝集素受体是一种以非共价可逆地结合碳水化合物的非酶蛋白或糖蛋白, 最早在植物提取物中发现, 具有血凝活性, 现已证实广泛存在于各种生物体中^[10]。动物凝集素受体通常被分为五大类: C 型 (Ca²⁺依赖型)、S 型 (又称半乳糖凝集素)、I 型、P 型以及正五聚体蛋白^[11]。其中, C 型凝集素受体 (C-type lectin receptor, CTLR) 是最早发现的动物凝集素之一, 也是凝集素家族中种类和数量最多的一个家族, 主要通过识别和结合病原微生物表面的脂多糖、肽聚糖、甘露糖及葡聚糖等糖类结构的 PAMPs 激活宿主先天性免疫^[6]。部分 CTLR 含有跨膜结构域, 作为膜受体发挥作用, 部分 CTLR 也可作为分泌蛋白发挥作用。在功能上, CTLR 被证实可参与多种免疫过程, 包括病原体识别^[12]、细胞黏附^[13]、吞噬^[14]、抗原递呈细胞与 T 细胞的相互作用^[15]、T 淋巴细胞的活化与调控^[16-17]等, 甘露糖结合凝集素还具有激活补体的功能^[13]。

目前, 已经在硬骨鱼中鉴定出大量的 CTLR, 并证实其参与了宿主抗细菌感染的防御。如香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) CTLR—PaCD209L 能够结合革兰氏阳性和阴性菌, 用抗体阻断 PaCD209L 后, 单核/巨噬细胞的吞噬作用和杀菌活性显著降低^[18]; 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的 CTLR (CsCD94) 与细菌孵育后降低了该菌的体外存活率^[19]; 许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) SsLec1 具有抑制细菌感染的作用^[20]; 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染后草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 甘露糖受体 gcMR 在肝脏、脾脏、头肾和肠道中的表达均显著上调^[21]。在大黄鱼中已被鉴定的 CTLR 有 LcNTC 和 LcDC-SIGN, 前者是一种具有广谱细菌凝集活性的分泌型 CTLR, 在肝脏、脾脏和头肾中的表达量经副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 刺激后均显著升高^[22]; 后者为膜型 CTLR, 具有红细胞凝

集活性和对半乳糖的偏好性, 对 2 种食源性致病菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 具有凝集作用^[23]。在大黄鱼基因组数据库中已注释的 CTLR 家族成员达 20 多种^[24], 因而有必要对大黄鱼 CTLR 的分子特征及功能进行深入研究。

我们前期从溶藻弧菌感染的大黄鱼头肾组织转录组^[25]及头肾巨噬细胞转录组中, 均发现一个 CTLR 基因—C 型凝集素结构域家族 4 成员 E 基因 (C-type lectin domain family 4 member E gene, *Clec4e*) 的表达显著上调。*Clec4e* 又称巨噬细胞诱导的 C 型凝集素 (the macrophage-inducible C-type lectin, Mincl), 主要分布在单核/巨噬细胞表面^[26-27]。哺乳类 *Clec4e* 已被证实能够识别细菌、真菌等病原^[28-30], 而在鱼类中鲜见报道。为此, 本实验以大黄鱼 *Clec4e* 为研究对象, 分析其分子特征, 探究其在不同组织与免疫细胞中的表达分布、细菌感染后表达模式的变化, 及其凝集活性和糖结合特异性, 实验结果为进一步揭示硬骨鱼 CTLR 在先天免疫中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用大黄鱼购自宁德市富发水产有限公司, 体长 (15±3) cm, 体重 (50±10) g; 小鼠 (*Mus musculus*)、新西兰白兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 购自闽侯县吴氏实验动物贸易有限公司; 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、嗜水气单胞菌、变形假单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和坎氏弧菌 (*V. campbellii*) 均为实验室保藏水产病原菌。本研究获得了福建农林大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守福建农林大学实验动物伦理规范, 并按照福建农林大学实验动物管理和使用伦理委员会制定的规章制度执行。

Pfu DNA 聚合酶、Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞、Trans BL21(DE3) 化学感受态细胞、pEASY[®]-Basic Seamless Cloning and ASSEMBLY Kit 同源重组试剂盒均购自北京全式金生物技术股份有限公司; 表达载体 pET-32a 购自德国默克集团; RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自上海普洛麦格生物产品有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司; DNA Marker、Protein Marker 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公

司; 实时荧光定量 PCR 试剂 2×SYBR Green Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 琼脂糖亲和层析介质 (Ni) 购自 GE 公司; 限制性内切酶及其缓冲液购自 ThermoFisher 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷、重组凝血酶购自北京索莱宝科技有限公司; 培养基 BHI、TSB、2216E 均购自青岛海博生物技术有限公司。

1.2 引物

本实验所用基因 *LcClec4e* (登录号: ON241310.1) 和 *Lcβ-actin* (登录号: XP_027140724.1) 的引物均由福州博尚生物技术公司合成, 具体信息见表 1。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primers information

引物名称 primers name	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')
<i>LcClec4e</i> -F	ACCAAAGCCTTTAGGGACCAG
<i>LcClec4e</i> -R	ACATACACGGCATTAGCATC
q <i>LcClec4e</i> -F	CTACAACCTGAAGGAACAGG
q <i>LcClec4e</i> -R	CCATCCATCGGGACACT
<i>LcClec4e</i> -ex-F	<u>CTGATATCGGATCCGAATTC</u> IGTCCCGATGGATGGATTTCATG
<i>LcClec4e</i> -ex-R	<u>TCGAGTGC</u> GGCCGCAAGCTTITACTGGCAGATCCGTTTATAA
q <i>Lcβ-actin</i> -F	GACCTGACAGACTACCTCATG
q <i>Lcβ-actin</i> -R	AGTTGAAGGTGGTCTCGTGGA

注: 与表达载体重叠序列用下划线标注, *Eco*R I 酶切位点 (GAATTC) 和 *Hind* III 酶切位点 (AAGCTT) 用矩形标注。
Notes: Overlapping sequences with expression vectors are underlined, *Eco*R I restriction site (GAATTC) and *Hind* III enzyme restriction site (AAGCTT) are boxed.

1.3 *LcClec4e* 基因克隆及生物信息学分析

前期通过对溶藻弧菌感染的大黄鱼头肾组织及头肾巨噬细胞转录组分析发现 *Clec4e* 基因表达上调, 因此, 基于大黄鱼基因组数据库中 *Clec4e* 基因序列设计了一对特异性引物 *LcClec4e*-F/R (表 1)。以大黄鱼头肾总 RNA 反转录得到的第一链 cDNA 为模板, 以 *LcClec4e*-F/R 为引物, 使用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, PCR 体系参考 Pfu DNA 聚合酶说明书。PCR 程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物回收后与 Blunt simple 克隆载体连接后, 转化 T-1 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行测序。

通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列同源性比对; 利用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)

预测蛋白质的分子量 (MW) 和等电点 (pI), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质的保守结构域; 利用 TMHMMServer v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜区; 利用 DNAMAN 8.0 进行氨基酸多重序列比对; 利用 MEGA 7.0 中的最大似然法构建系统发育树。构建系统发育树所用物种氨基酸序列的 GenBank 登录号见表 2。

表 2 大黄鱼与其他鱼类 *Clec4e* 氨基酸序列

Tab. 2 The amino acid sequences of *L. crocea* and other fish *Clec4e*

物种 species	登录号 accession no.
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	ON241310.1
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	KAG8009952.1
橙胸镖鲈 <i>Etheostoma spectabile</i>	XP_032374706.1
黄鲈 <i>Perca flavescens</i>	XP_028436842.1
河鲈 <i>P. fluviatilis</i>	XP_039661036.1
豹纹鳃棘鲈 <i>Plectropomus leopardus</i>	XP_042345345.1
白梭吻鲈 <i>Sander lucioperca</i>	XP_031155548.1
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	XP_018527930.1
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	XP_033496180.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	XP_014055857.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036803905.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	XP_021327539.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	XP_042628288.1
草鱼 <i>C. idella</i>	ACS16044.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	XP_040550438.1
小鼠 <i>M. musculus</i>	EDK99716.1
牛 <i>Bos taurus</i>	XP_015326781.1
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_055173.1

1.4 *LcClec4e* 在大黄鱼组织与免疫细胞中的表达分析

取健康的大黄鱼 3 尾, 丁香酚麻醉后, 使用真空采血管 (抗凝) 进行尾静脉采血, 剖取各组织 (头肾、脾脏、鳃、肝脏、头肾、肠、胃、肌肉、皮肤、脑和心脏), 大黄鱼原代头肾巨噬细胞 (primary head kidney macrophages, PKM)、原代头肾淋巴细胞 (primary head kidney lymphocytes, PKL) 和原代头肾粒细胞 (primary head kidney granulocytes, PKG) 的分离参照本课题组之前的方法^[31]。组织和细胞 RNA 提取方法均按照试剂盒 Promega LS1040 操作说明进行, 反转录反应参照

Eastep® RT Master Mix 操作说明进行。以反转录产物为模板, *qLcClec4e-F/R* 为引物, *qLcβ-actin* 为内参进行实时荧光定量 PCR, 反应体系: 9.8 μL cDNA(1 : 100, 体积比), 0.1 μL *qLcClec4e-F/qLcβ-actin-F*, 0.1 μL *qLcClec4e-R/qLcβ-actin-R*, 10 μL 2×qPCR SYBR Green Master Mix, 总体积 20 μL。实时荧光定量 PCR 程序: 95 °C 15 min; 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 32 s, 40 个循环。每个样品 3 个重复。

将分离后的 PKM、PKL 和 PKG 分别培养在 6 孔细胞培养板中, 每孔细胞数为 2×10^6 个, 28 °C 培养 5 h 后, 使用终浓度为 1×10^7 CFU/mL 的灭活溶藻弧菌刺激, 分别在 1、2、4、8 和 16 h 收集细胞, 实时荧光定量 PCR 检测 *LcClec4e* 基因表达水平的变化。

采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[32] 计算 *LcClec4e* 的相对表达量, 并用 SPSS17.0 进行统计学分析。

1.5 构建 *LcClec4e* 胞外域 (*LcClec4e-ex*) 的原核表达载体

LcClec4e-ex 基因克隆 以 *LcClec4e* ORF 的克隆载体为模板、*LcClec4e-ex-F/R* 为引物, 扩增 *LcClec4e-ex*, PCR 体系见 Pfu DNA 聚合酶说明书, PCR 程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

原核表达载体的线性化 使用 *EcoR I* 与 *Hind III* 限制性内切酶对质粒 pET-32a 进行双酶切线性化操作。酶切体系: 1 μL *EcoR I*, 1 μL *Hind III*, 5 μL 10×Fast Digest Buffer, 质粒 5 μg, 无核酸酶水补齐 50 μL。酶切反应条件: 37 °C 2 h。酶切完毕后使用胶回收试剂盒进行 DNA 纯化, 操作步骤见 OMEGA D2500-02 说明书。

LcClec4e-ex 连接线性化 pET-32a 连接反应体系: 5 μL 2×Basic Assembly Mix, 4 μL 线性化 pET-32a, 1 μL *LcClec4e-ex*, 总体积 10 μL; 程序: 50 °C 15 min。将连接产物加入 50 μL 刚解冻的 T-1 感受态细胞, 轻柔混匀, 置于冰上 30 min。42 °C 热休克 45 s, 立即置于冰上 2 min。加入 250 μL LB 培养基, 37 °C 200 r/min 培养 1 h, 取 200 μL 菌液均匀涂抹在氨苄抗性的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养。挑取单菌落使用通用引物进行菌落 PCR, 将阳性单克隆测序。

1.6 *LcClec4e-ex* 的重组表达与纯化

重组 *LcClec4e-ex*(*rLcClec4e-ex*) 的表达

将测序正确的 *LcClec4e-ex* 原核表达载体转化至 Trans BL21(DE3) 感受态细胞。挑取长势良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性单菌落接种至 LB/Amp^r 液体培养基, 200 r/min 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6。加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 诱导剂, 200 r/min 16 °C 过夜诱导。离心收集诱导表达的菌体, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬洗涤 2 次, 高压破碎, 4 °C 12 000×g 离心 10 min, 将上清和沉淀分别进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测。

rLcClec4e-ex 的纯化 向菌体破碎后的上清中加入适量体积的琼脂糖亲和层析介质 (Ni), 4 °C 轻摇 20 min 使 Ni 介质充分结合目的蛋白。将上清蛋白与 Ni 介质转移至层析柱中并使液体流尽。向 Ni 柱中加入杂蛋白洗涤缓冲液 (Tris 20 mmol/L, NaCl 0.2 mol/L, 咪唑 100 mmol/L, pH 7.4), 考马斯亮蓝 G250 检测流出液, 直至考马斯亮蓝 G250 几乎不变蓝, 则说明杂蛋白已被完全洗涤。向 Ni 柱中加入目的蛋白洗脱缓冲液 (Tris 20 mmol/L, NaCl 0.2 mol/L, 咪唑 300 mmol/L, pH 7.4), 用考马斯亮蓝 G250 检测流出液, 直至考马斯亮蓝 G250 几乎不变蓝, 则说明目的蛋白已被完全洗脱。SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度。根据说明书用 BCA 法测定蛋白浓度 (BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司)。

rLcClec4e-ex 融合标签的切除 将纯化的目的蛋白透析至酶切缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0)。根据蛋白浓度加入适量的重组凝血酶 37 °C 酶切 2 h。将蛋白溶液与 Ni 介质轻摇孵育 20 min, 收集流出液。

1.7 凝集实验

参照已有文献^[22] 的方法。使用抗凝采血管取小鼠、新西兰白兔和大黄鱼血液, 2 000×g 离心 15 min 去除上层血浆, 用 10 倍红细胞体积的 TBS(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 重悬, 2 000×g 离心 5 min, 弃上清液加入适量 TBS 配制成 2%(体积百分比) 红细胞悬液。

将无乳链球菌接入 BHI 培养基 37 °C 振荡培养; 嗜水气单胞菌用 LB 培养基, 变形假单胞菌用 TSB 培养基, 溶藻弧菌、副溶血弧菌和坎氏弧菌用 2216E 培养基, 28 °C 振荡培养。待菌液 OD₆₀₀ 达到约 0.6, 6 000×g 离心 5 min, 收集菌体, TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 重悬菌体, 将浓度调

整为 2.0×10^8 CFU/mL。

红细胞凝集实验在 V 型 96 孔血凝板中进行, 细菌凝集实验在 96 孔细胞培养板进行。将 rLcClec4e-ex (1.2 mg/mL) 梯度稀释, 每孔加入 50 μ L, 再向每孔加入 50 μ L 血细胞/细菌并充分混匀, 室温放置 40 min。对溶解在 TBS-Ca (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, pH 7.4) 中的 rLcClec4e-ex 蛋白进行同样的处理以检测 rLcClec4e-ex 的凝集活性是否为 Ca²⁺ 依赖性。同时用同浓度的 rTrxA 标签蛋白做为阴性对照。镜检观察血细胞/细菌凝集效果, 记录最小凝集浓度。实验重复 3 次。

1.8 糖抑制实验

为检测 rLcClec4e-ex 的糖类特异性结合能力, 以变形假单胞菌为实验菌, 选取 D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、D-麦芽糖、D-半乳糖、D-海藻糖、 α -乳糖、蔗糖和脂多糖等 9 种糖类, 进行糖抑制实验。在 96 孔板加入 25 μ L 梯度稀释的上述糖类, 再加入 25 μ L rLcClec4e-ex (浓度为对变形假单胞菌的最小凝集浓度) 混合物于室温孵育 30 min 后, 加入 50 μ L 的变形假单胞菌悬液 (2.0×10^8 CFU/mL), 轻轻吹打混匀, 室温孵育 1 h。镜检每种糖类是否对凝集具有抑制作用, 并记录最小抑制浓度。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 LcClec4e 的序列分析

LcClec4e 的 cDNA 全长为 1 546 bp, 包含一个 309 bp 的 5'-非翻译区 (untranslated region, UTR), 一个 771 bp 的开放阅读框 (ORF), 一个 466 bp 的 3'-UTR。LcClec4e ORF 编码 254 个氨基酸残基的蛋白质, 预测的分子量和理论等电点分别为 24.3 ku 和 4.99。推断的 LcClec4e 蛋白包含一个跨膜区域 (transmembrane region, 47-69 位氨基酸) 和一个糖识别结构域 (carbohydrate recognition domain, CRD, 117~249 位氨基酸)(图 1)。以 LcClec4e 氨基酸序列在现有数据库中进行 BLASTP 比对, 结果显示, LcClec4e 与黄姑鱼等鲈形目鱼类 Clec4e 序列的一致性较高, 约为 81.89%~92.58%。多序列比对结果显示, 各序列间具有较高的相似性, LcClec4e 具有 CTLR 典型序列 WIGL, 6 个高度保守的半胱氨酸残基, 碳水化合物识别基序 EPN 和 WFD 以及 2 个 Ca²⁺ 结合位点 (图 2)。系统

进化分析显示, 鱼类 Clec4e 聚成一簇, 远离鸟类和哺乳类组成的分支, 其中 LcClec4e 与黄姑鱼 Clec4e 的亲缘关系最近 (图 3)。

2.2 LcClec4e 在大黄鱼不同的组织和免疫细胞中的表达特征

LcClec4e 在所检测的 10 种组织中均有表达, 其中在肝脏中表达最高、在肠中表达最少 (图 4-a)。同时, LcClec4e 在所检测的 3 种原代免疫细胞中也均有表达, 在原代头肾巨噬细胞 (PKM) 中表达最高, 其次是原代头肾淋巴细胞 (PKL), 在原代头肾粒细胞 (PKG) 中表达最低 (图 4-b)。经灭活溶藻弧菌刺激后, LcClec4e 在 3 种免疫细胞中的表达都显著上调, 在 PKG 与 PKM 中的相对表达量在 4 和 8 h 达到最高, 随后均出现下调趋势, 而在 PKL 中则是持续表达上调 (图 5)。

2.3 LcClec4e-ex 的原核表达

PCR 扩增出胞外段 LcClec4e-ex, 回收目的片段, 得到约 400 bp 的片段, 与预期大小一致。重组质粒 pET-32a-rLcClec4e-ex 诱导表达和纯化的结果显示, 融合蛋白的大小为 28 ku (含分子量为 11.8 ku 的 TrxA 标签蛋白), 符合蛋白预期大小 (28.6 ku)(图 6)。表达菌株经诱导后超声破碎, SDS-PAGE 分别检测上清液与沉淀, 发现 rLcClec4e-ex 大量存在上清液中, 少量存在沉淀中。大量诱导表达取破碎的菌液上清液进行 Ni 柱亲和层析纯化后, 将纯化的 rLcClec4e-ex 的融合标签切除, 再次 Ni 柱亲和层析纯化后, SDS-PAGE 检测几乎无杂带。

2.4 rLcClec4e-ex 的凝集活性

纯化的 rLcClec4e-ex 在 TBS-Ca 中能凝集小鼠和新西兰白兔的红细胞, 对大黄鱼红细胞无凝集作用 (图版 I); 细菌凝集实验显示, rLcClec4e-ex 能凝集嗜水气单胞菌、变形假单胞菌、溶藻弧菌和坎氏弧菌, 对副溶血弧菌和无乳链球菌无凝集作用 (图版 II); 在没有 Ca²⁺ 的情况下, rLcClec4e-ex 对各种红细胞和细菌均无凝集作用, 可见其对红细胞和细菌的凝集作用为 Ca²⁺ 依赖型。同时, 在 rTrxA 处理的对照中没有观察到凝集现象。rLcClec4e-ex 对红细胞和细菌的最小凝集浓度见表 3。

2.5 rLcClec4e-ex 的糖类结合特异性

糖抑实验结果显示, D-葡萄糖、D-果糖、D-

```

1   aaaatgaagaagaacctcccagtttgagttttgagtttctggtttttcagagacaaa
61  aaattcttttagttgtaggtacgggatagtttaactacatagtgcttctctgagcacattt
121 gttatagaactgcagccgttttgtaagcagggcgacgtgcctcgataaatcaaccagcag
181 ggacaaatttaatttcaaggagaaaatattgctgcttgagagaggagataccaagccttt
241 agggaccagagagggtgcggtggagagagagacaaagtgagaaagtgtgttaacaaggac
301 atcacagccATGGAGGAGAGAGAAAACCTACACCAGCCTACAGGAGCTCACGGACCAGTCT
1       M E E R E N Y T S L Q E L T D Q S
361 ACAACTGAAGGGAACAGGCCATTCTGGAACACAGCAACGGCTCCCAGGGACTGAAGCGG
18   T T E G N R P I L E H S N G S Q G L K R
421 GGTGTTGAGTGTGTTGAGGAGTCAGACTGTCTCTCTGATGGTTATTGGCTTTTGGCTCC
38   G V E C L R S Q T V L L M V I G F L A S
481 ATCTGCGCCAACATCGTACTGACTGTGCTCTTGATTGGCAAGCCGGTGCCAGGTGCAGCT
58   I C A N I V L T V L L I G K P V P G A A
541 GTAGACTCTTCACCTCTGGGTTTGAATAACCTCAATGCGCAGACGTTACATCCAGCTA
78   V D S S P L G L K L T S M R R R Y I Q L
601 TGCGAGGACTACACCGCCCTGGGACAGGACTGTTCAAAGACAGTTAAGCAGTGCAGGGAG
98   C E D Y T A L G Q D C S K T V K Q C R E
661 TGTCCCGATGGATGGATTATGTCGGAGATCAGTGTACAGCTTCAGCGGGGACAAGCAG
118  C P D G W I H V G D Q C Y S F S G D K Q
721 GACTGGCTGAAGAGCAGAGACAGCTGTGAAGAGATGGGCAGCCATCTTGCCATCTGCAC
138  D W L K S R D S C E E M G S H L A I L H
781 ACTATGGAGCGCATGACGCTCTGGAAAAGAAGCCAAGAAAATGGAGGATTGATTAC
158  T M E A H D A L E K E A K K I G G F D Y
841 CACTTCTGGATTGGCCTGTCTGACATAGAGACGGAAGGAGATTGGAGATGGGTGGACAAC
178  H F W I G L S D I E T E G D W R W V D N
901 ACAACATTGCAACATAAATATTGGGATCAGTGGAGCTCAGAGCCAAATAACCACAGTCA
198  T T L Q H K Y W D Q W S S E P N N H Q S
961 GGAGGCGAACCGGAGAAGACTGTGCCGTCTTAGACAGCCACGCAAAGACATGGTTTGAT
218  G G E H G E D C A V L D S H A K T W F D
1 021 GTTCTTGTGAACACATTTATAAACGGATCTGCCAGATGGACACCATCCAGCTCAACTGA
238  V P C E H I Y K R I C Q M D T I Q L N *
1 081 taactacacaggtgaaagtctggaaactacacagggttatgacagaaaacataacat
1 141 ggtaaaatgtttgggattacagaaaagtaattcttgtgacatacaacatgacagaggag
1 201 atattgatgctaaatgccgtgtatgtgttgatttatcgcttattggaagaaataggaagt
1 261 actaatacaagtctgtgatggacagccatcgagaagtatgtacgtttcataaatctaaa
1 321 agggaaaaaacaacaaaagatgcattgtagtattgcactgatatacaagtttttgtgtg
1 381 tccaattatgattcattttttcatttacttgattatttttttcttattgcaatgccatga
1 441 atgctgtgactgtgtccgagaagtttgggcataaataattgtaactgtgtagactcacaac
1 501 ttaaaactgagctgcaataattcagaaaatgtattagtaaaattta

```

图 1 *LcClec4e* 序列分析

跨膜区域和糖识别结构域分别蓝色和粉红色突出显示；方框表示跨膜区；下划线表示糖识别结构域。

Fig. 1 Sequence analysis of *LcClec4e*

Transmembrane region and carbohydrate recognition domain are shown in blue and pink, respectively; transmembrane region is shown with square frame; carbohydrate recognition domain is shown with underline.

甘露糖、D-麦芽糖、α-乳糖和脂多糖预处理均可抑制 *rLcClec4e-ex* 对变形假单胞菌的凝集作用；而蔗糖、D-半乳糖和 D-海藻糖不能抑制 *rLcClec4e-ex* 对该菌的凝集活性。各种糖的最小抑制浓度见表 4。

3 讨论

C 型凝集素受体 (CTLR) 作为模式识别受体 (PRR)，通过识别并结合病原体表面糖类结构的病

原相关分子模式 (PAMPs)，在先天性免疫中发挥着重要的作用。本研究从大黄鱼中克隆并鉴定了 *LcClec4e*，并检测了其在不同的组织与免疫细胞中的表达谱和凝集特性。结果显示，*LcClec4e* 是一个具有跨膜结构的受体，无信号肽，属于 CTLR 家族中 II 型亚家族的成员^[33]。多序列比对的结果表明，*LcClec4e* 的氨基酸序列与许多鱼类 *Clec4e* 具有较高的同源性，都具有 CTLR 标志性保守基序 WIGL，在其 C 端有一个典型的碳水化

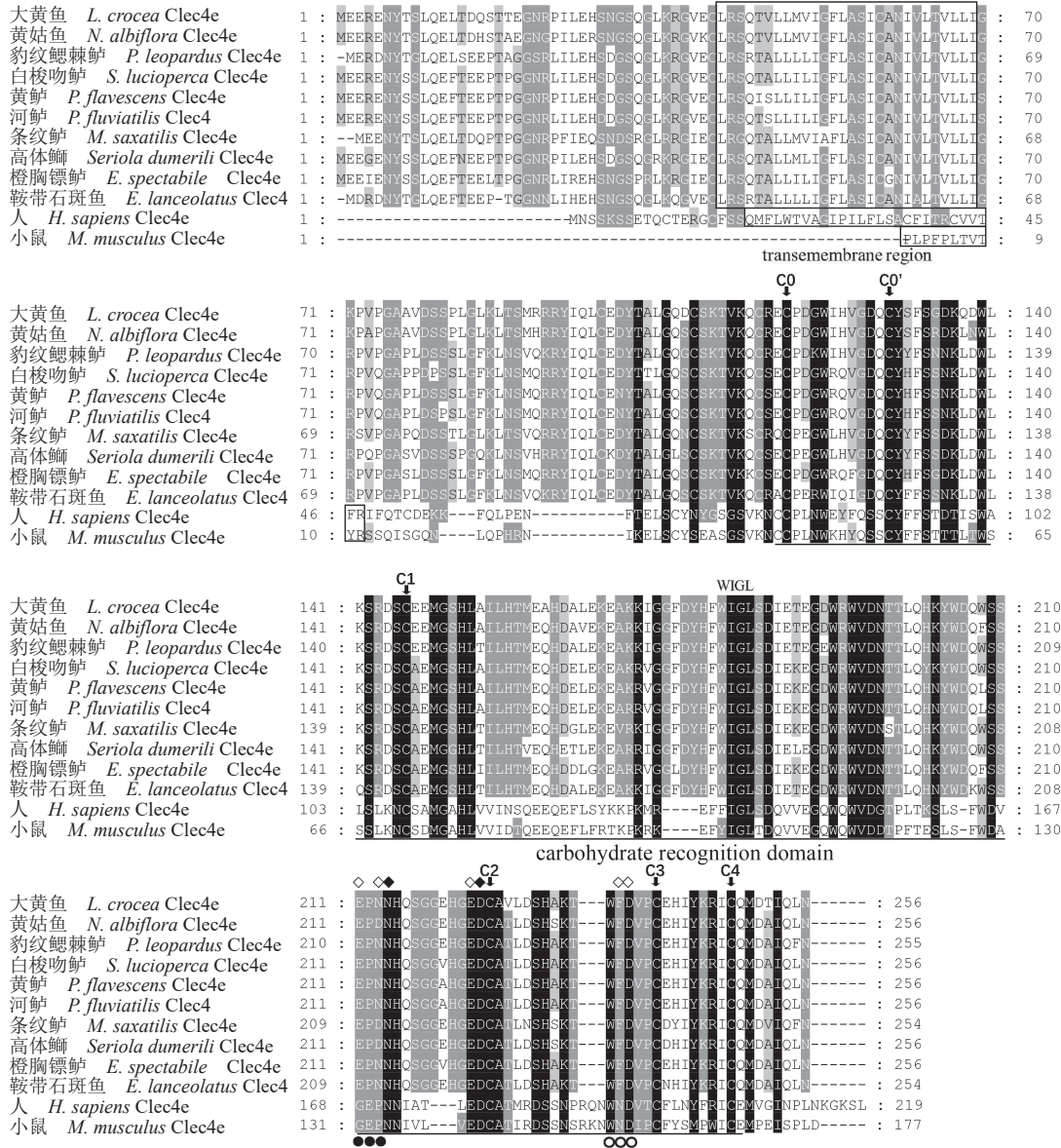


图 2 Clec4e 氨基酸序列的多重比对

6 个高度保守的半胱氨酸残基用箭头表示 (C0, C0', C1-C4); WIGL 为 CTLR 高度保守基序; 碳水化合物识别基序 EPN 和 WFD 在下面分别用实心圆和空心圆表示; Ca²⁺ 结合位点 1 用实心菱形标记; Ca²⁺ 结合位点 2 用空心菱形标记。

Fig. 2 Multiple alignments of amino acid sequences of Clec4e

The six highly conserved cysteine residues are indicated by arrows (C0, C0', C1-C4); WIGL is a highly conserved motif for CTLR; EPN motif and WFD motif are indicated with solid and hollow cycles below, respectively; Ca²⁺ binding site 1 is marked with solid diamond; Ca²⁺ binding site 2 is marked with hollow diamond.

合物结合域 (CRD), 该 CRD 不仅包含 4 个保守的半胱氨酸残基 (C1-C4), 并且在该 CRD 序列的 N 端出现了 2 个额外的半胱氨酸残基 (C0 和 C0'), 说明 *LcClec4e* 的 CRD 属于“长型”(long-form)^[33], 它们是维持和稳定 CRD 的重要基础^[34]。同其他鱼类的 CTLR 一样, *LcClec4e* CRD 包含了结合 Ca²⁺ 所必需的残基与典型的糖结合基序 EPN 以及 WFD, 表明 *LcClec4e* 具有碳水化合物亲和性^[35]。值得注

意的是, WND 是哺乳动物 CTLR 结合碳水化合物的一个极其重要的基序^[34], 鱼类 *Clec4e* 通常表现为一个类似的基序 WFD, 而无脊椎动物 CTLR 中, WND 基序又可突变为 FRD^[36] 或 WSD^[37]。可见, CTLR 的保守基序可能由于进化差异在不同物种间产生突变。系统进化分析显示, *LcClec4e* 与其他鱼类 *Clec4e* 处于同一分支中, 表明本研究克隆得到的 *LcClec4e* 确实为 *Clec4e* 的同源基因, 且

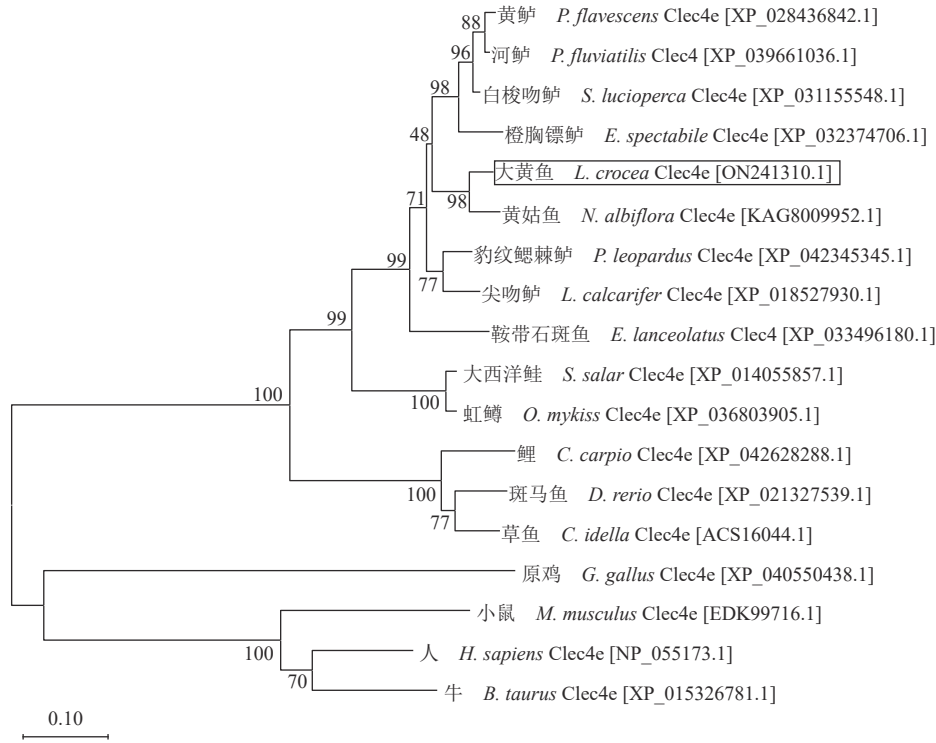


图 3 最大似然法构建的 Clc4e 系统发育树

标尺 (0.1) 代表遗传距离; 节点处的数字是用 bootstrapping 算法进行 1 000 次重复计算出的自展值 (%)。

Fig. 3 Maximum likelihood phylogenetic tree constructed based on Clc4e amino acid sequences

The scale bar (0.1) represents the genetic distance; Numbers beside the internal branches indicate bootstrap values based on 1 000 replications.

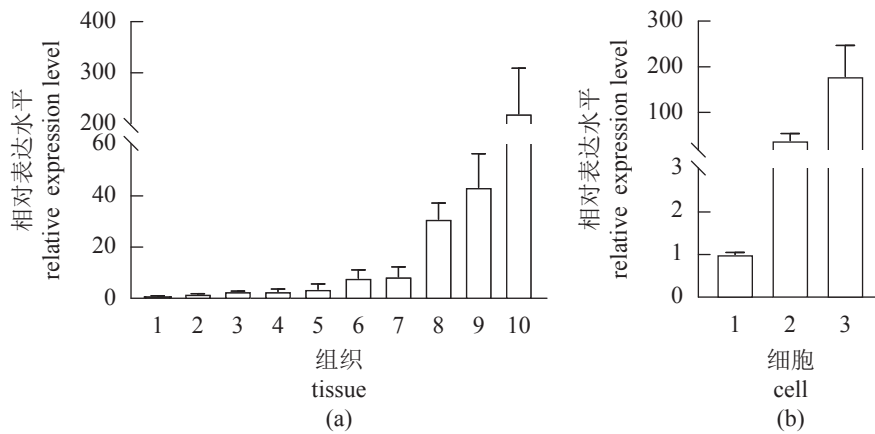


图 4 LcClc4e 在大黄鱼组织 (a) 和免疫细胞 (b) 中的表达谱

(a) 1. 肠, 2. 脑, 3. 胃, 4. 脾脏, 5. 鳃, 6. 头肾, 7. 心脏, 8. 肌肉, 9. 皮肤, 10. 肝脏, (n=3); (b) 1. 原代头肾粒细胞, 2. 原代头肾淋巴细胞, 3. 原代头肾巨噬细胞 (n=3)。

Fig. 4 Expression profiles of LcClc4e in tissues and immune cells

(a) 1. intestine, 2. brain, 3. stomach, 4. spleen, 5. gills, 6. head kidney, 7. heart, 8. muscle, 9. skin, 10. liver (n=3); (b) 1. primary head kidney granulocytes, 2. primary head kidney lymphocytes, 3. primary head kidney macrophages (n=3)。

LcClc4e 与同为石首鱼科的黄姑鱼 Clc4e 的序列一致性最高, 为 92.58 %。以上结果表明 LcClc4e 具有结构的保守性, 提示其功能也具有保守性。

LcClc4e 在大黄鱼所检测的 10 种组织中均有

表达, 呈组成型分布, 且在肝脏中表达量最高。在已报道的鱼类 CTLR 中, 有的在脾脏或鳃中表达量最高, 如虹鳟^[38]、大西洋鲑^[39]、鲤^[21] CTLR 和大黄鱼 LcN^[22], 也有的主要在肝脏中表达, 如

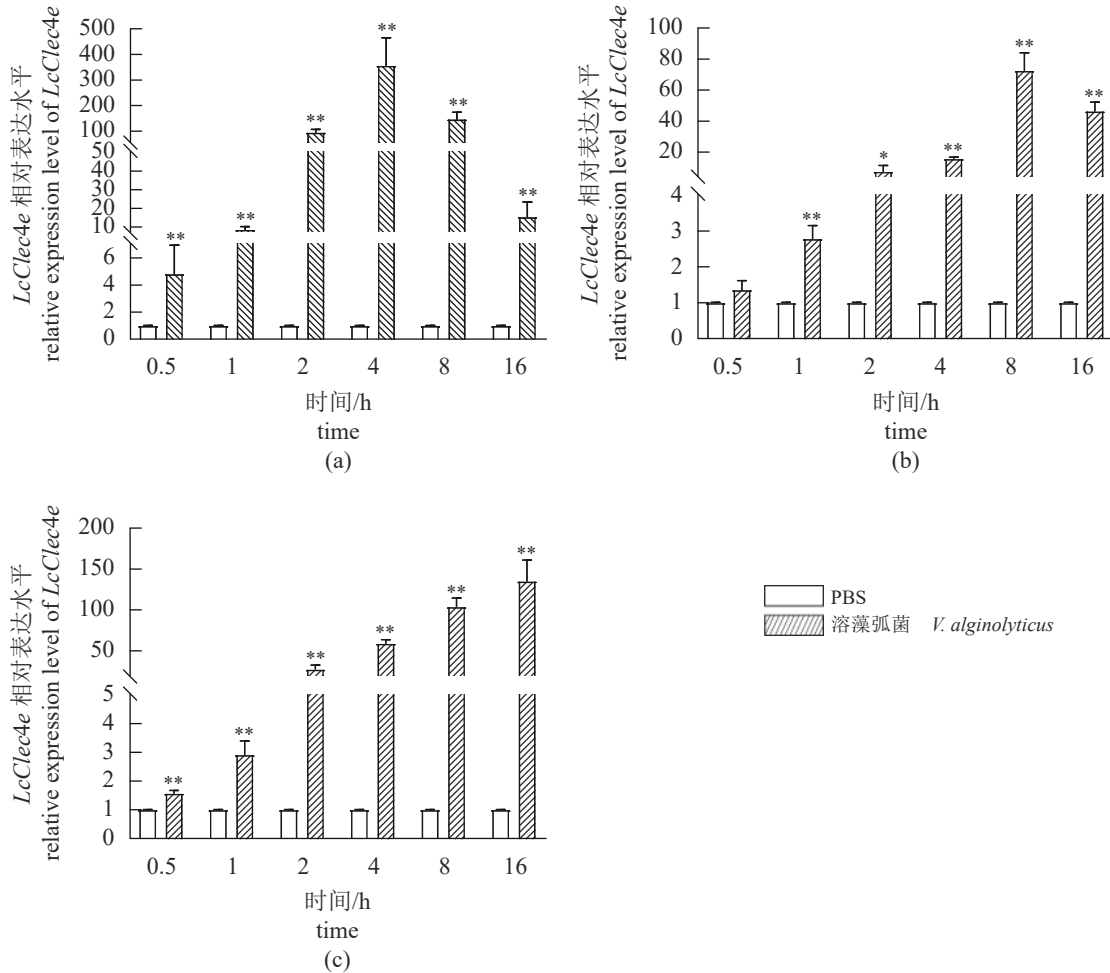


图5 灭活溶藻弧菌刺激后免疫细胞中 *LcClec4e* 的表达水平变化

(a) 原代头肾粒细胞, (b) 原代头肾巨噬细胞, (c) 原代头肾淋巴细胞; $n=3$, “*” $P < 0.05$, “**” $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Expression changes of *LcClec4e* in immune cells after stimulation with inactivated *V. alginolyticus*

(a) primary head kidney granulocytes, (b) primary head kidney macrophages, (c) primary head kidney lymphocytes; $n=3$, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

点带石斑鱼 (*E. coioides*)^[40]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[41] 和大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[42] 的 CTLR。除此之外, 斑马鱼 *CTLR4* 在卵巢中表达量最高^[43], 半滑舌鳎 *CsCTL1* 在肾脏中表达量最高^[44], 香鱼 *PaCTL* 在脑中表达量最高^[18]。上述结果表明 CTLR 在不同鱼类中的表达谱存在明显差异, 可能是由于鱼种差异或生存环境不同所导致的。此外, *LcClec4e* 基因在大黄鱼原代头肾巨噬细胞 (PKM)、原代头肾粒细胞 (PKG) 和原代淋巴细胞 (PKL) 均有表达, 用灭活溶藻弧菌处理后, *LcClec4e* 在 3 种免疫细胞中的表达量都极显著上调, 提示 *LcClec4e* 参与了大黄鱼抗细菌感染的免疫应答过程。

少数 CTLR 的凝集作用为非 Ca^{2+} 依赖型^[45-47], 本实验发现, 大黄鱼 *Clec4e* 的胞外段 (r*LcClec4e*-

ex) 对红细胞和细菌的凝集均为 Ca^{2+} 依赖型, 这与多数 CTLR 是相同的^[48]。在本研究中, r*LcClec4e*-ex 能够凝集小鼠和兔的红细胞, 却无法凝集大黄鱼红细胞, 这与大黄鱼膜型 *LcDC-SIGN* 的红细胞凝集特性相同^[49], 说明高等与低等脊椎动物红细胞表面糖类分子之间存在差异。而大黄鱼分泌型 *LcNTC*^[22] 对人、兔和大黄鱼红细胞均具有凝集活性, 可见 CTLR 的凝集活性也与蛋白本身结构和特性有关。细菌凝集实验进一步证明 r*LcClec4e*-ex 对嗜水气单胞菌、变形假单胞菌、溶藻弧菌和坎氏弧菌均具有凝集作用, 而对副溶血弧菌和无乳链球菌没有凝集效果, 表明其可能主要在抵御革兰氏阴性菌入侵的免疫防御中发挥作用。CTLR 对红细胞和细菌的凝集基于其与细胞表面特定碳水化合物化合物的结合。本研究中糖抑制实验结果显示,

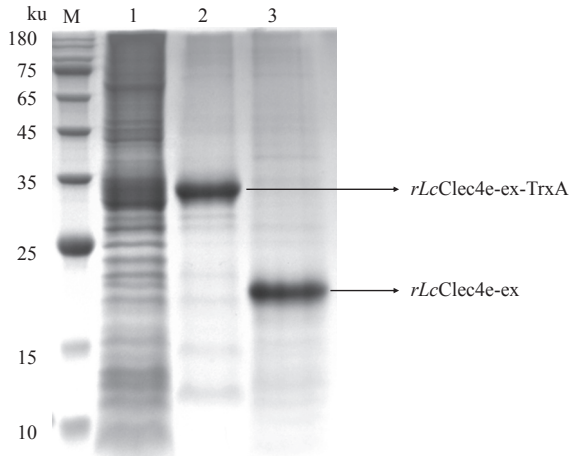


图 6 rLcClec4e-ex 的表达与纯化

M. 蛋白 marker; 1. 上清液中的总蛋白; 2. 纯化后的蛋白; 3. 酶切后的蛋白。

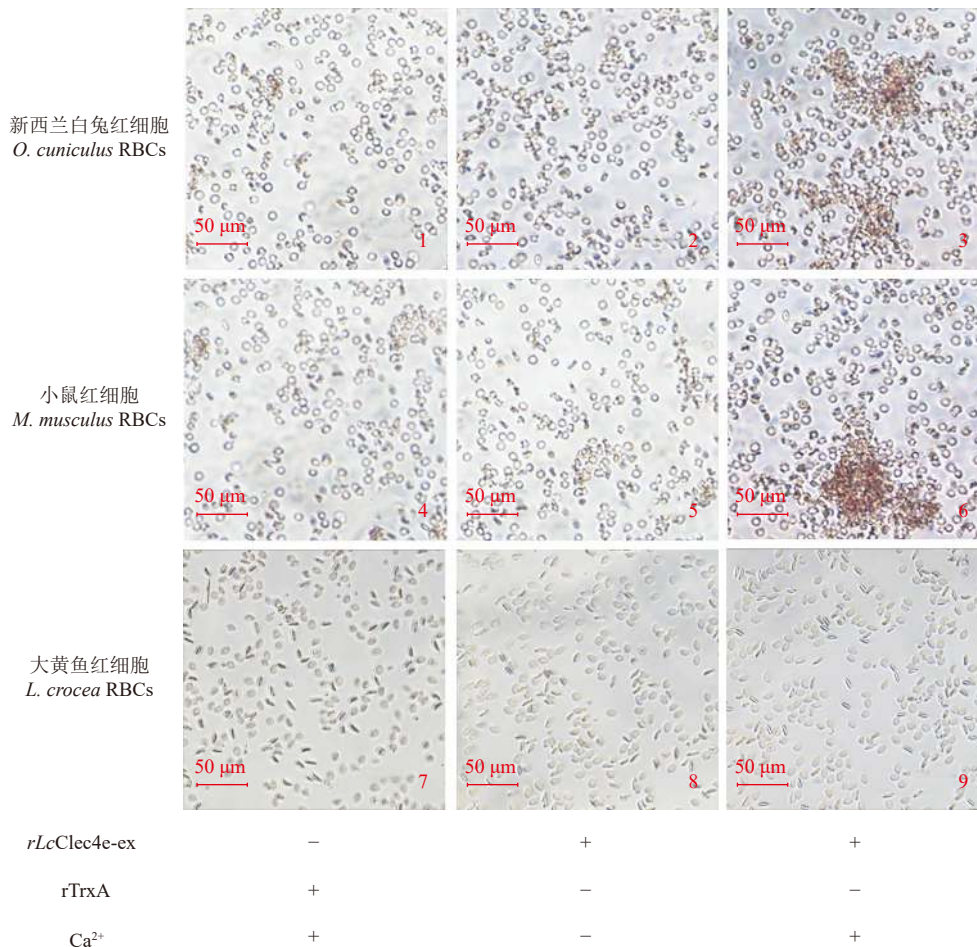
Fig. 6 Expression and purification of rLcClec4e-ex protein

M. protein marker; 1. total protein in the supernatant; 2. the purified protein; 3. protein after enzyme digestion.

rLcClec4e-ex 对多种糖类均具有广泛的结合力, 包括 D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、D-麦芽糖、α-乳糖和脂多糖, 表明 LcClec4e 可能是这些糖类物质的受体。尖吻鲈 Clec4e 已被认为是脂多糖的受体之一, 脂多糖通过与其结合, 诱导 TNF-α 和 IL-6 的表达^[50]。与纳氏海鲢鱼 (*Thalassophryne nattereri*) 的 Nattectin^[45] 不同的是, 虽然 LcClec4e 也具有典型的糖特异性结合基序 EPN, 但 rLcClec4e-ex 不能结合 D-半乳糖, 这可能与缺乏半乳糖特异性结合基序 QPD 有关。

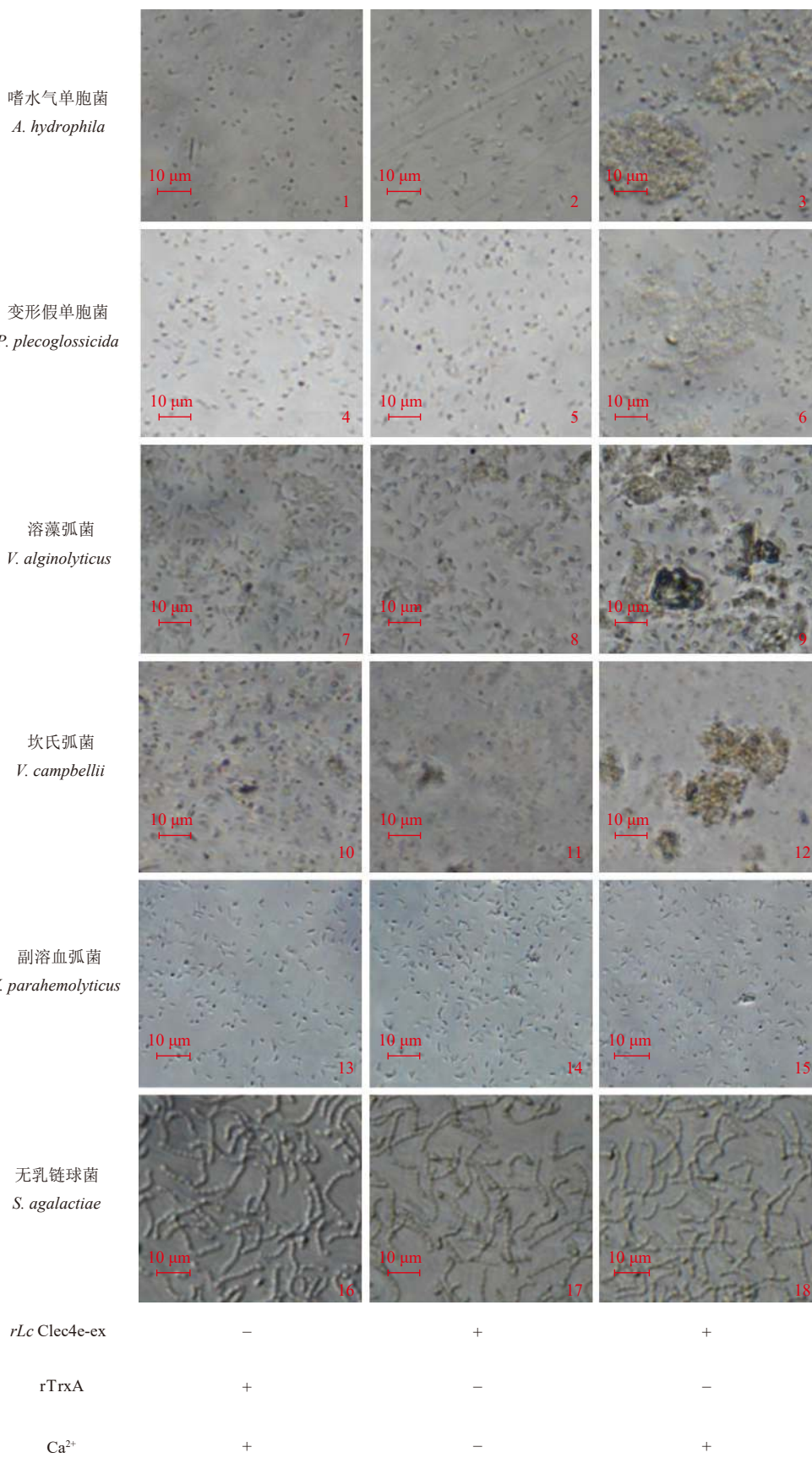
4 结论

本研究从大黄鱼中鉴定了一种新的 C 型凝集素受体 Clec4e, 其组成型表达在检测的大黄鱼各组织和免疫细胞中, 灭活溶藻弧菌可极显著上调 LcClec4e 在免疫细胞中的表达水平; 重组 LcClec4e 对红细胞和革兰氏阴性水产病原菌均表现出凝集



图版 I rLcClec4e-ex 对红细胞的凝集

Plate I Hemagglutination of rLcClec4e-ex



图版 II *rLcClec4e-ex* 对细菌的凝集

Plate II Agglutination of *rLcClec4e-ex* against bacteria

表3 rLcClec4e-ex 对红细胞/细菌的最小凝集浓度

Tab. 3 The minimal agglutinating concentration of rLcClec4e-ex against RBCs/bacteria

细胞/细菌 RBCs/bacteria	最小凝集浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) minimal agglutinating concentration
新西兰白兔红细胞 <i>O. cuniculus</i> RBCs	1.25
小鼠红细胞 <i>M. musculus</i> RBCs	2.5
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	15
变形假单胞菌 <i>P. plecoglossicida</i>	30
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	30
坎氏弧菌 <i>V. campbellii</i>	30

表4 糖类对 rLcClec4e-ex 凝集变形假单胞菌的最小抑制浓度

Tab. 4 Minimal inhibition concentration of sugar on the agglutination of rLcClec4e-ex toward *P. plecoglossicida*

糖类 sugar	最小抑制浓度 minimal inhibition concentration
D-葡萄糖 <i>D</i> -glucose	50.0 mmol/L
D-果糖 <i>D</i> -fructose	12.5 mmol/L
D-甘露糖 <i>D</i> -mannose	100.0 mmol/L
D-麦芽糖 <i>D</i> -maltose	100.0 mmol/L
α -乳糖 α -lactose	100.0 mmol/L
脂多糖 lipopolysaccharide	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
蔗糖 sucrose	NI ^a
D-半乳糖 <i>D</i> -galactose	NI ^a
D-海藻糖 <i>D</i> -trehalose	NI ^a

注: NI^a表示浓度达到200 mmol/L时仍未发生抑制。
Note: NI^a represented no inhibition at 200 mmol/L.

活性, 且为 Ca^{2+} 依赖型。此外, 还证实重组 LcClec4e 对细菌的凝集基于其与各种碳水化合物的结合。本实验结果提示, LcClec4e 可能作为一种 PRR 通过与菌体表面的糖类 PAMPs 结合来识别病原菌, 并参与大黄鱼抗细菌感染的免疫应答。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 22, 26.
Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural
- [2] Chen Q, Yan Q, Wang K J, et al. Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2008, 80(3): 181-188.
- [3] Li C W, Wang S L, Ren Q L, et al. An outbreak of visceral white nodules disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida* at a water temperature of 12 °C in cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(11): 1353-1361.
- [4] Zuo R T, Ai Q H, Mai K S, et al. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(2): 249-258.
- [5] Chen X H, Lin K B, Wang X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(10): 615-619.
- [6] Aoki T, Takano T, Hikima J I. DNA vaccine-mediated innate immune response triggered by PRRs in teleosts[J]. Fisheries Science, 2015, 81(2): 205-217.
- [7] Chaves-Pozo E, Muñoz P, López-Muñoz A, et al. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*[J]. Cell and Tissue Research, 2005, 320(1): 61-68.
- [8] Uribe C, Folch H, Enriquez R, et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review[J]. Veterinarni Medicina, 2011, 56(10): 486-503.
- [9] Netea M G, Joosten L A B, Latz E, et al. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease[J]. Science, 2016, 352(6284): aaf1098.
- [10] Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules[J]. Glycobiology, 2004, 14(11): 53R-62R.
- [11] Gabius H J. Animal lectins[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 243(3): 543-576.
- [12] Cambi A, Koopman M, Figdor C G. How C-type lectins detect pathogens[J]. Cellular Microbiology, 2005, 7(4):

- 481-488.
- [13] Švajger U, Anderluh M, Jeras M, *et al.* C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity[J]. *Cellular Signalling*, 2010, 22(10): 1397-1405.
- [14] Kim J H, Matin A, Shin H J, *et al.* Functional roles of mannose-binding protein in the adhesion, cytotoxicity and phagocytosis of *Acanthamoeba castellanii*[J]. *Experimental Parasitology*, 2012, 132(2): 287-292.
- [15] Geijtenbeek T B H, Gringhuis S I. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(7): 465-479.
- [16] Zizzari I G, Martufi P, Battisti F, *et al.* The macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) modulates regulatory T cell functions[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132617.
- [17] Drummond R A, Brown G D. Signalling C-type lectins in antimicrobial immunity[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(7): e1003417.
- [18] Yang G J, Lu X J, Chen Q, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of a novel C-type lectin receptor-like gene from a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 603-610.
- [19] Li X P, Hu Y H. CD94 of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* binds a wide arrange of bacteria and possesses antibacterial activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 641-649.
- [20] Liu Y, Li N Q, Zhao X P, *et al.* A C-type lectin that inhibits bacterial infection and facilitates viral invasion in black rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 309-317.
- [21] 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.
- [22] Lv C H, Zhang D L, Wang Z Y. A novel C-type lectin, Nattectin-like protein, with a wide range of bacterial agglutination activity in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 50: 231-241.
- [23] Ao J Q, Ding Y, Chen Y Y, *et al.* Molecular characterization and biological effects of a C-type lectin-like receptor in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 29631-29642.
- [24] Mu Y N, Huo J Y, Guan Y Y, *et al.* An improved genome assembly for *Larimichthys crocea* reveals hepcidin gene expansion with diversified regulation and function[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 195.
- [25] 程安怡, 王永阳, 翁华松, 等. 转录组分析揭示溶藻弧菌感染早期大黄鱼的免疫应答特征 [J]. *水生生物学报*: 2022, 46(12): 1845-1854.
- Cheng A Y, Wang Y Y, Weng H S, *et al.* Transcriptome analysis revealed the immune response of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in early stage of *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*: 2022, 46(12): 1845-1854.
- [26] Matsumoto M, Tanaka T, Kaisho T, *et al.* A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages[J]. *Journal of immunology*, 1999, 163(9): 5039-5048.
- [27] Richardson M B, Williams S J. MCL and mincle: C-type lectin receptors that sense damaged self and pathogen-associated molecular patterns[J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 288.
- [28] Pahari S, Negi S, Aqdas M, *et al.* Induction of autophagy through CLEC4E in combination with TLR4: an innovative strategy to restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1021-1043.
- [29] Bowker N, Salie M, Schurz H, *et al.* Polymorphisms in the pattern recognition receptor Mincle gene (*CLEC4E*) and association with tuberculosis[J]. *Lung*, 2016, 194(5): 763-767.
- [30] Miyake Y, Yamasaki S. Immune recognition of pathogen-derived glycolipids through mincle[M]/Hsieh S L. *Lectin in host defense against microbial infections*. Singapore: Springer, 2020: 31-56.
- [31] 程安怡, 赵金鹏, 黄小红, 等. 脂多糖对大黄鱼原代头肾巨噬细胞的激活作用[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2021, 50(6): 805-811.
- Cheng A Y, Zhao J P, Huang X H, *et al.* The activation of lipopolysaccharide in primary head kidney macrophages of large yellow croaker[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2021, 50(6): 805-811 (in Chinese).
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene

- expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [33] Day A J. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily[J]. *Biochemical Society Transactions*, 1994, 22(1): 83-88.
- [34] Zelensky A N, Gready J E. The C-type lectin-like domain superfamily[J]. *The FEBS Journal*, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [35] Dambuzza I M, Brown G D. C-type lectins in immunity: recent developments[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2015, 32: 21-27.
- [36] Ma T H T, Benzie J A H, He J G, *et al.* PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 99(3): 332-341.
- [37] Kong P F, Wang L L, Zhang H, *et al.* A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 836-844.
- [38] Fujiki K, Bayne C J, Shin D H, *et al.* Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) C-type lectin and pentraxin by use of suppression subtractive hybridisation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(3): 275-279.
- [39] Ma L M, Wang W J, Liu C H, *et al.* Selection of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in black rockfish (*Sebastes schlegelii*)[J]. *Marine Genomics*, 2013, 11: 67-73.
- [40] Zhang M, Sun L. The tissue factor pathway inhibitor 1 of *Sciaenops ocellatus* possesses antimicrobial activity and is involved in the immune response against bacterial infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(3): 247-252.
- [41] 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.
- [42] Kondo H, Tzeh A G Y, Hirono I, *et al.* Identification of a novel C-type lectin gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(5): 1089-1094.
- [43] Lin A F, Xiang L X, Wang Q L, *et al.* The DC-SIGN of zebrafish: insights into the existence of a CD209 homologue in a lower vertebrate and its involvement in adaptive immunity[J]. *Journal of Immunology*, 2009, 183(11): 7398-7410.
- [44] Zhou Z J, Sun L. CsCTL1, a teleost C-type lectin that promotes antibacterial and antiviral immune defense in a manner that depends on the conserved EPN motif[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 50(2): 69-77.
- [45] Lopes-Ferreira M, Magalhães G S, Fernandez J H, *et al.* Structural and biological characterization of nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*[J]. *Biochimie*, 2011, 93(6): 971-980.
- [46] Mistry A C, Honda S, Hirose S. Structure, properties and enhanced expression of galactose-binding C-type lectins in mucous cells of gills from freshwater Japanese eels (*Anguilla japonica*)[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 360(1): 107-115.
- [47] Tsutsui S, Iwamoto K, Nakamura O, *et al.* Yeast-binding C-type lectin with opsonic activity from conger eel (*Conger myriaster*) skin mucus[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(5): 691-702.
- [48] Sharon N, Lis H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins[M]//Wu A M. The molecular immunology of complex carbohydrates. New York: Springer, 2001: 1-16.
- [49] 陈园园. 大黄鱼三种凝集素的克隆表达、进化分析和功能研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
Chen Y Y. Identification and molecular characterization of three kinds of lectin in large yellow croaker[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010.
- [50] Zoccola E, Kellie S, Barnes A C. Immune transcriptome reveals the mincle C-type lectin receptor acts as a partial replacement for TLR4 in lipopolysaccharide-mediated inflammatory response in barramundi (*Lates calcarifer*) [J]. *Molecular Immunology*, 2017, 83: 33-45.

Molecular identification and agglutination characteristics of C-type lectin receptor Clec4e in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

ZHANG Xinluo¹, WANG Yongyang², WU Ziliang¹, HUANG Xiaohong^{1,2},
CHEN Xinhua¹, ZHANG Weini^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Fujian Province,
Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in
Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: C-type lectin receptor (CTLR) is a kind of pattern recognition receptors that can specifically bind to carbohydrates pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and plays an important role in innate immunity. In order to elucidate the biological function of CTLR in teleost fish, a CTLR gene-*Clec4e* (C-type lectin domain family 4 member E gene, *Clec4e*), which was screened from the transcriptome database of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), was taken as the object of the present study, and its molecular features, expression distribution and agglutination characteristics were studied. The results showed that the full-length cDNA of *LcClec4e* was 1 546 bp, with an open reading frame (ORF) of 771 bp, encoding 254 amino acids. The N-terminus of *LcClec4e* had a transmembrane region without a signal peptide, and the C-terminus had a carbohydrate recognition domain (CRD), which contained carbohydrate-binding sites EPN and WFD and 6 conserved cysteines what could form disulfide bonds. Phylogenetic analysis showed that *LcClec4e* was closely related to CTLRs of a variety of fishes of the order Perciformes. The results of real-time quantitative PCR showed that *LcClec4e* was constitutively distributed in the 10 tissues tested, and the expression level was the highest in the liver; *LcClec4e* was expressed in primary macrophages, lymphocytes and granulocytes from the head kidney tissues of *L. crocea*, and the expression level was the highest in macrophages; the expression levels of *LcClec4e* in these 3 kinds of immune cells were significantly upregulated after stimulation by inactivated *Vibrio alginolyticus*. The extracellular segment of *LcClec4e* (*rLcClec4e*-extracellular domain, *rLcClec4e*-ex) expressed in *Escherichia coli* BL21 had Ca²⁺-dependent agglutination activity and could agglutinate mouse, rabbit erythrocytes and 4 Gram-negative bacteria common in aquaculture, such as *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*. D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-maltose, α -lactose, and lipopolysaccharide all had inhibitory effects on the agglutination of *rLcClec4e*-ex toward *P. plecoglossicida*, suggesting that *LcClec4e* could bind to carbohydrates of *P. plecoglossicida*. The results above indicated that *LcClec4e* might be an PPR which could recognize bacteria by binding to carbohydrates PAMPs, thus involved in the immune defense of *L. crocea* against bacterial infection.

Key words: *Larimichthys crocea*; C-type lectin receptor (CTLR); Clec4e; hemagglutination; bacterial agglutination

Corresponding author: ZHANG Weini. E-mail: zhangweini@fafu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31802333)