

中国花鲈 *IgM* 重链 (*IgMH*) 和 *MHC II β* 基因的克隆及表达分析



雷丽娜^{1,2}, 高 谦^{1,2*}, 王 伟^{1,2}, 孙兆盛^{1,2}, 罗 璋³, 刘其根^{1,2}

1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 3. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384

摘要:

【目的】进一步了解中国花鲈适应性免疫机制在病害防治中的作用。

【方法】本研究通过荧光定量 PCR (RT-PCR) 和快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 技术克隆获得了免疫球蛋白 M 重链 (*IgMH*) 和主要组织相容性复合体 *MHC II β* 基因的全长; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测其在中国花鲈各组织的分布情况以及 LPS、Poly (I:C) 刺激及迟缓爱德华氏菌人工感染后其对应 mRNA 水平的表达变化情况; 实验构建了 *IgMH*-pET21d、*IgMCH₁₋₂*-pET21d 和 *MHC II β*-pET21d 原核重组表达质粒, 进行重组蛋白表达, 并通过分子筛层析技术纯化中国花鲈 *IgMH*、*IgMCH₁₋₂* 和 *MHC II β* 重组蛋白, 进而制备了抗中国花鲈 *IgMH* 的多克隆抗体。

【结果】中国花鲈 *IgMH* 和 *MHC II β* 的 cDNA 全长分别为 1 977 bp 和 1 242 bp; 二者在鳃、脾脏和头肾等免疫相关组织中对应 mRNA 表达量较高; LPS、Poly (I:C) 刺激及迟缓爱德华氏菌人工感染中国花鲈导致鳃、脾脏和头肾中这两个基因的表达水平发生显著变化, 表明 *IgMH* 和 *MHC II β* 均参与了花鲈的抗感染免疫反应; 此外, 抗中国花鲈 *IgM* 的多克隆抗体能与花鲈全血清发生强烈反应, 与鳊全血清弱反应, 与大口黑鲈和草鱼血清不发生反应, 推测其反应强度反映了物种间亲缘关系的远近。

【结论】本研究首次克隆了中国花鲈的 *IgMH* 和 *MHC II β* 基因全长, 表达了 *IgMH* 和 *MHC II β* 原核重组蛋白, 制备了抗中国花鲈 *IgM* 的多克隆抗体, 揭示了 *IgMH* 和 *MHC II β* 参与花鲈的抗感染免疫应答, 为深入研究中国花鲈的免疫调控机制和疾病防控策略奠定了基础。

关键词: 中国花鲈; *IgMH*; *MHC II β*; 表达调控; 蛋白纯化

第一作者: 雷丽娜, 从事鱼类免疫学与病害防控研究, E-mail :

leilina1206@163.com



通信作者: 高谦, 从事鱼类免疫学与病害防控研究, E-mail : qgao@shou.edu.cn

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900605)

收稿日期: 2023-02-12

修回日期: 2023-07-18

文章编号:

1000-0615(2025)06-069403-18

中图分类号: Q 785; S 942.5

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

鱼体受到病原感染时先天免疫系统率先发挥作用, 同时会激活鱼类特异性免疫应答。在鱼类特异性体液免疫反应中起关键作用的是免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)^[1]。硬骨鱼类的 Ig 包括 IgM、IgD、IgZ/IgT 及 IgM-IgZ 嵌合体等类型^[2-3], 其中 IgM 是大部分硬骨鱼血清中主要的免疫球蛋白^[4]。IgM 可衔接先天和适应性免疫系统^[2], 具有激



活补体、凝集抗原和调理细胞毒作用等多种功能^[5-6]。硬骨鱼类 IgM 以两种形式存在: 分泌型的四聚体和作为 B 细胞表面受体 (BCR) 的膜结合型单体^[7]。IgM 重链 (IgM heavy chain, IgMH) 的结构包含可变区 (variable region, V 区) 和恒定区 (constant region, C 区), 可变区又分为骨架区 (framework region, FR) 和互补决定区 (complementarity determining region, CDR) 两部分, 其中在骨架区中有与免疫球蛋白进行结构折叠相关的保守区域^[7-8]。迄今已报道的鱼类 IgMH 基因包括鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[9]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[10]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[8]、日本花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[11]、欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[12] 和大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)^[13] 等鲈形目 (Perciformes) 鱼类, 斑马鱼 (*Danio rerio*)^[14]、鲤 (*Cyprinus carpio*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[15] 等鲤科 (Cypriniformes) 鱼类, 以及虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[16]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[17] 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 等。值得注意的是, 刘悦等^[11]报道了“*L. japonicus*”(文中中文学名“日本花鲈”) IgMH 序列, 但 *L. japonicus* 被认为是中国花鲈 (*L. maculatus*) 的同物异名^[18], *Lateolabrax* 隶属鲈形目鲈科 (Serraninae)。研究收集所有已报道的鲈形目鱼类 IgMH 序列, 并对其恒定区进行多序列比对和序列一致性分析, 发现刘悦等^[11]报道的“*L. japonicus*”隶属太阳鱼科 (Centrarchidae), 而非隶属花鲈所在的鲈科, 推测其为大口黑鲈的一个地方群体。由此可见, 中国花鲈 IgMH 基因有待鉴定。

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex class, MHC) 是另外一类关键的适应性免疫分子, 具有丰富的多态性, 在诱导和调节适应性免疫反应方面起重要作用^[19]。脊椎动物中存在 3 类 MHC 分子, 其中 MHC II 类分子是由 α 和 β 两个亚基组成的异源二聚体, 主要分布在巨噬细胞、B 细胞和内皮细胞等表面, 起到抗原呈递作用。鱼类 MHC II 类分子的基因克隆鉴定及其多态性研究主要涉及斑马鱼、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、牙鲆^[20] 和西伯利亚鲟 (*Acipenser baeri*)^[21] 以及尼罗罗非鱼^[22]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[23]、鳊 (*Miichthys*

miuiy)^[24]、真鲷 (*Pagrosomus major*) 和欧洲舌齿鲈^[25] 等鱼类。

中国花鲈分布于中国、朝鲜和日本沿海及河口水域, 属广盐性鱼类, 在其人工繁殖等苗种繁育技术突破之后, 中国花鲈海水网箱、滩涂池塘和淡水池塘养殖等模式全面发展, 工厂化和深远海养殖也在兴起^[26-27]。随着养殖规模扩大, 中国花鲈病害愈加频发, 造成巨大的经济损失^[28]。解析中国花鲈适应性免疫相关基因的表达调控机制, 发展中国花鲈病害的免疫防控技术已成为当务之急。因此, 本研究首次克隆鉴定了中国花鲈 IgMH 和 MHCII β 基因; 检测了细菌人工感染以及细菌和病毒类似物刺激后, 中国花鲈 IgMH 和 MHCII β 基因在 mRNA 水平的表达情况; 进一步原核表达并纯化了中国花鲈 IgMH 和 MHCII β 的重组蛋白, 制备了抗中国花鲈 IgM 的多克隆抗体, 拟为深入探究中国花鲈抗菌和抗病毒免疫应答机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验所用中国花鲈购买自杭州萧山萧湘水产养殖场, 平均体长 (20 ± 5) cm, 体重 (200 ± 50) g, 实验鱼暂养 1 周 [水温: (24 ± 1) °C] 后选择健康鱼进行后续实验。本研究获得了上海海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (DW-2019-012), 实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学伦理规范, 并按照上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 cDNA 全长序列克隆

随机选取 3 尾鱼进行解剖。取鳃、肠道、肝脏、脾脏、头肾等组织, 通过 TRIzol (Invitrogen, 美国) 法提取各组织总 RNA, 并使用 Nanodrop 2000c 超微量分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 测定 RNA 样品浓度和质量。以组织总 RNA 为模板, 使用 SMART RACE cDNA amplification kit (TaKaRa, 日本) 根据其使用说明制备用于 cDNA 末端快速扩增 (RACE-PCR) 的 cDNA 模板。

利用 Local Blast 软件分析中国花鲈基因组数据库并得到 IgMH 和 MHCII β 的部分 cDNA 序列, 设计中间片段引物 IgM-F/IgM-R

与 MHC II β -F/MHC II β -R(表 1) 进行 PCR 扩增, 引物合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成。PCR 产物依次进行琼脂糖凝胶电泳、胶回收、连接、转化和菌液阳检等, 然后将阳性菌液送苏州金唯智生物科技有限公司测序。根据中间片段测序结果设计 3'-和 5'-RACE 引物 (表 1), 使用已制备的 RACE-PCR cDNA 模板, 采用降落 PCR 和巢式 PCR 扩增各基因 cDNA 序列的 5'-末端和 3'-末端 (RACE-PCR 中使用的 APG、AP、UPM 和 NUP 为通用引物^[29])。最后根据测序结果进行全长序列拼接。

在 2 个基因的 5'-非编码区 (5'-UTR) 和 3'-

表 1 实验用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

序号 no.	名称 name	序列(5'-3') sequence (5'-3')
1	IgM-F	CAGAAGAGCTCACATCAGTTC
2	IgM-R	GCCTTGACGTTTCAGGGATG
3	IgM-5'R1	CAGTCAAAGAATAACCAGAGACC CG
4	IgM-5'R2	ATACTGTTACACAGGATCCAGCT GC
5	IgM-3'F1	CAGTTGTCACTCAGCCTCAAGCA
6	IgM-3'F2	CAGGTCTATCGGGTCCAGAAC
7	IgM-CF	CAGAAGAGCTCACATCAGTTC
8	IgM-CR	GTGTCGCTGTGTCTTTTGCTG
9	IgM-qF	AAAGGCACAGTGGAGGACAG
10	IgM-qR	GTCTTGGCTTGTGTGATGATG
11	MHC II β -F	ATGGCTTCATCCTTTCTCAG
12	MHC II β -R	AGCCTGAGAGAACCTCTGAT
13	MHC II β -5'R1	CTCCGTACTCCGTGAATCCAA
14	MHC II β -5'R2	GTCGTTCACTCAGTGGAGTTA
15	MHC II β -3'F1	GATGTTACAGACCCTCCAAGTGG
16	MHC II β -3'F2	CCAGGTCTGGAGAGAAGATCTC
17	MHC II β -CF	CAGTGTTGTCAAGTGAACC
18	MHC II β -CR	CTCTGATACTCTGCTGGTCT
19	MHC II β -qF	ACCTCTGATGTCACCTCCAC
20	MHC II β -qR	ATCGCCATCGGAGCCTCAGG
21	LM-ef1a-F	ATCTCTGGATGGCACGGAGA
22	LM-ef1a-R	ATGCTAGCGGAACCACTG
23	UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
24	UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
25	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
26	APG	CCAGACTCGTGGCTGATGCAGGG GGGGGGGGGGGG
27	AP	CCAGACTCGTGGCTGATGCA

非编码 (3'-UTR) 区分别设计引物 IgM-CF/IgM-CR 和 MHC II β -CF/MHC II β -CR, 使用高保真酶分别扩增 *IgMH* 和 *MHCII β* 基因编码序列, 与上述拼接的全长序列进行比较, 验证拼接结果准确性。

1.3 生物信息学分析

基于 *IgMH* 和 *MHC II β* 基因的 cDNA 全长, 使用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列预测, 并在 NCBI 数据库中通过 BLAST 进行鱼类同源基因验证 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。使用 BioEdit 从基因组序列预测转录本, Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 网页查找其他物种基因结构。SMART (<http://SMART.embl-heidelberg.de/>) 预测 IgMH 和 MHCII β 氨基酸序列的结构域, ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 预测信号肽、跨膜区、N-糖基化位点、分子质量和等电点 (pI)。使用 MEGA 5.1 Beta4 软件进行氨基酸多序列比对, GeneDoc 2.7 软件阴影处理比对结果。使用 MEGA5.0 软件包, 采用邻接法 (Neighbour Joining, NJ) 构建分子系统进化树, 经过 10 000 次自举检验得到进化树各分支的支持值。

1.4 组织表达模板制备

随机选取 6 尾健康的中国花鲈, 用间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (MS-222) 麻醉, 尾静脉取血后解剖鱼体, 分别取鳃、肠道、肝脏、脾脏、头肾、皮肤、肌肉 (白肌) 和脑组织样品, 提取总 RNA。按照 Hifair™ II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 试剂盒说明书反转录, 制备实时荧光定量 PCR 的 cDNA 模板。

1.5 细菌人工感染及中国花鲈腹腔注射 LPS、Poly (I:C) 的体内刺激实验

中国花鲈人工感染所用的迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 菌株由本实验室保种。菌种活化后, 28 °C 扩大培养, 通过平板菌落计数法测定菌液浓度, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤并梯度稀释菌液。

通过预实验, 本研究确定细菌脂多糖 (LPS) 注射剂量为 800 μ g /尾 (4 μ g/g), 聚肌胞苷酸 [Poly (I:C)] 为 1 mg /尾 (5 μ g/g), 迟缓爱德华氏菌剂量为 4 $\times$ 10⁷ CFU/尾, 对照组注射相同体

积的 PBS。每组 30 尾实验鱼, 共注射 120 尾。注射后 6、12、24、48 和 72 h 组织取样。每个时间点每组取 5 尾实验鱼, 取鳃、肠道、肝脏、脾脏、脑、皮肤、肌肉和头肾 8 种组织, TRIzol 法提取总 RNA。RNA 样品置于 -80°C 冻存, 用于中国花鲈刺激实验的基因表达定量。

1.6 RT-qPCR 分析

利用 Primer premier 5.0 设计 *IgMH* 和 *MHC II* β 基因的特异性 RT-qPCR 引物 (*IgM*-qF/*IgM*-qR 和 *MHC II* β -qF/*MHC II* β -qR) 及内参基因转录延伸因子 (*EF-1 α*) 的 RT-qPCR 引物 (表 1)。用已验证的 RT-qPCR 引物, 制作内参基因和目标基因的标准曲线, 用于基因表达水平的定量分析。然后使用 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 将上述样品进行 RT-qPCR。反应体系 10 μL : cDNA 模板 3 μL , 正反向引物各 0.2 μL , qPCR SYBR Green Master Mix 5 μL , ddH₂O 1.6 μL 。参照 qPCR SYBR Green Master Mix 使用说明书设置反应程序: 95°C 预变性 2 min; 98°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 再延伸 7 min。使用 Graphpad Prism 8.0 (Graphpad, 美国) 制作柱状图。

1.7 原核表达载体构建和重组蛋白诱导表达与纯化

根据中国花鲈 *IgMH* 和 *MHC II* β 基因完整 CDS 区序列, 去除信号肽区域序列, 分别针对 *IgMH* CDS 区、*IgMHC*₁₋₂ 区 (*IgMHC*₁₋₂ 代表 *IgMH* 的前两个恒定区 C1 和 C2) 和 *MHC II* β CDS 区对应序列设计 5'端带有 *Nco* I 酶切位点及 CA 保护碱基且 3'端带有 *Bam* H I 酶切位点的引物, 通过 PCR、双酶切等手段将其连接至 pET21d 载体上。经测序验证后, 将重组质粒分别转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (C₄₃)、BL21 (DE₃) 及 Rosetta 表达菌株, 挑选阳性单克隆菌落, 分别接种到含 100 mg/mL 氨苄青霉素的液体培养基, 摇床培养 (37°C , 170 r/min) 至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8。将一部分菌液加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导, 另外一部分作为对照, 培养 6 h。实验组和对照组分别取出 1 mL 菌液, $8\,000\times g$ 离心 5 min, 弃上清液, 使用 PBS 缓冲液重悬, 加入 5 $\times$ 的上样缓冲溶液, 100°C 金

属浴 10 min 后, 10% SDS-PAGE 蛋白电泳。

根据 SDS-PAGE 结果扩大诱导培养体积, $8\,000\times g$ 离心 5 min 收集菌体, 超高压破碎, 提取包涵体, 稀释法复性包涵体形式的重组蛋白。将复性蛋白进行浓缩、置换后, 使用分子筛层析柱在 AKTA 仪器 (GEHEAL THCare) 上纯化蛋白, SDS-PAGE 检测纯化蛋白。采用 BCA 法测定纯化蛋白的浓度, -20°C 冻存。

1.8 多克隆抗体制备及蛋白质印迹 (Western blot) 检测

使用驯养 2 周的新西兰白兔 (*Oryctolagus cuniculus*) (体重约 2.5 kg) 用于多克隆抗体制备。免疫注射常温溶解冻存的纯化蛋白, 首次免疫采用完全佐剂, 佐剂和抗原 1:1 (体积比) 充分混匀, 所注射抗原的蛋白浓度为 1 mg/mL, 每只兔子注射 0.5 mL。首次免疫后分别在第 14、21 和 35 天进行二次免疫、三次免疫和四次免疫 (二次至四次免疫采用不完全佐剂, 抗原浓度减半, 注射量不变)。三次免疫后第 7 天进行兔耳动脉采血检测血清抗体效价。四次免疫后第 7 天采集 40 mL 全血制备抗血清。利用 ELISA 和 Western blot 技术检测所制备的血清样品。

将健康中国花鲈、鳊、大口黑鲈和草鱼以及人工感染爱德华氏菌 12 h 的中国花鲈全血清分别进行 50 倍稀释, 稀释后的全血清样品及纯化的目的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE); 采用半干法转膜; 使用纯化的多抗作为一抗, 一抗蛋白以 1:1 000 稀释后进行 Western blot; 利用 Odysee[®] CLx 成像系统成像。

2 结果

2.1 中国花鲈 *IgMH* 和 *MHC II* β cDNA 全长克隆与序列特征

本研究通过克隆鉴定获得了中国花鲈 *IgMH* 和 *MHC II* β 的 cDNA 全长序列, 并上传 NCBI 数据库 (*IgMH* 登录号: QWX94362.1, *MHC II* β 登录号: AXY87851.1)。其中, 中国花鲈 *IgMH* cDNA 全长 1 977 bp, 包括 49 bp 的 5'-UTR 和 155 bp 的 3'-UTR, 开放阅读框 (ORF) 预测编码 590 个氨基酸, 预测的蛋白相对分子质量 (Mw) 和理论等电点 (pI) 分别为 63.82 ku 和 6.51。IgMH 氨基酸序列包括信号肽、1 个 V 区、

4个C区及C-末端序列,且C区含有4个糖基化位点NGT、NAS、NKT和NAT(图1-a)。氨基酸多序列比对发现,中国花鲈 *IgMH* 同大多数鲈形目鱼类具有相同结构组成,V区均含有4个FR区(FR1-4)和3个CDR区(CDR1-3)(图2-a);C区有9个保守的半胱氨酸位点和8个保守的色氨酸位点,形成4个二硫键盐桥(图2-b)。对 *IgMH* 的C区进行基因结构分析发现,中国花鲈 *IgMH* 基因C区部分包含4个外显子和3个内含子,与人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼的一致(图3-a)。

中国花鲈 *MHC II β* 的 cDNA 全长序列为 1 242 bp, 3'-和 5'-UTR 长度分别为 463 和 29 bp, 750 bp 的 ORF 编码 249 个氨基酸, 氨基酸序列由先导肽(信号肽的一种)LP、胞外结构域、TM/CY 跨膜区和胞质区组成, 蛋白质结构域预测显示该蛋白质包括 *MHC II β* 结构域和 *IGc1* 结构域(图1-b)。氨基酸多序列比对显示, 中国花鲈 *MHC II β* 与其他硬骨鱼类具有高度的相似性和结构特点: 具有4个保守的半胱氨酸位点, 分别位于 *β domain* 和 *Ig domain* 中, 各自形成一个键内二硫键(图2-c)。基因结构预测分析发现, 中国花鲈 *MHC II β* 含6个外显子和5个内含子, 与鳊和小鼠的 *MHC II β* 基因结构一致, 但不同于人和斑马鱼的基因结构(图3-b)。

2.2 中国花鲈 *IgMH* 和 *MHC II β* 的系统发育树

通过 Novopro (https://www.novopro.cn/tools/ident_sim.html) 对中国花鲈 *IgMH* 氨基酸进行序列分析。结果显示, 中国花鲈 *IgMH* 恒定区与同科中的鳊 *IgMH* 恒定区一致性为 60.8%, 相似性为 75.6%(表2)。*MHC II β* 与黄金鲈(*Perca flavescens*) (XP_028420408.1) 的氨基酸一致性高达 81.53%。应用 MEGA 5.0 软件采用邻近法所构建的硬骨鱼类免疫球蛋白重链系统发育树显示, 中国花鲈 *IgMH* 与其他硬骨鱼 *IgMH* 聚为一支, 并与鲈形目鲈科中的斜带石斑鱼和鳊聚为一分支, 自举支持率为 74%(图4)。*MHC II β* 的系统发育树显示, 中国花鲈 *MHC II β* 首先与斜带石斑鱼聚为一支, 自举支持率为 96%, 再与大黄鱼、鳊、赤点石斑鱼(*E. akaara*)聚为一簇, 自举支持率为 84%(图5)。

2.3 组织表达结果

RT-qPCR 结果显示, *IgMH* 和 *MHC II β* 基

因在健康中国花鲈的肝脏、脾脏、头肾、肠道、鳃、脑、皮肤和肌肉(白肌)这8种组织中均有表达(图6)。其中 *IgMH* 的 mRNA 的表达水平在脾脏中最高, 在头肾和鳃中表达量较高, 在脑、肠道、皮肤和肝脏中表达量较低(图6-a)。*MHC II β* 的 mRNA 在鳃中表达量最高, 在脾脏和头肾中表达量较高, 在脑、肌肉、肝脏、肠道和皮肤中表达量较低(图6-b)。

2.4 LPS、Poly (I:C) 刺激及细菌人工感染后的 *IgMH* 和 *MHC II β* mRNA 表达结果

相较于对照组, LPS 刺激组中国花鲈的鳃组织 *IgMH* 的 mRNA 表达水平呈现先下调后上调的趋势, 在第6小时显著下调, 在12~48 h 上调, 第72小时极显著上调; 在头肾组织中, 第6小时上调, 第12和24小时与对照组无显著差异, 第48小时显著下调, 第72 h 恢复到正常水平; 在脾脏中, 第24小时出现显著上调, 第48小时与对照组表达水平相近, 在刺激后第72小时又呈显著上调(图7-a)。中国花鲈 *MHC II β* 的 mRNA 表达水平在鳃组织中仅在第12小时显著下调, 在其他时间点无明显变化; 在头肾组织中, 第6小时出现极显著上调, 第12和24小时与对照组无显著差异, 在第48小时显著下调, 第72小时则恢复到正常水平; 在脾脏组织中, 刺激后第6小时无显著变化, 第24和48小时显著下调, 第72小时其表达量升高, 但与对照组差异不显著(图7-b)。

在迟缓爱德华氏菌人工感染组中, 中国花鲈鳃、头肾和脾脏中 *IgMH* 的 mRNA 水平在第6~24小时整体高于对照组水平, 呈现显著或极显著上调; 在48 h 时, 头肾和脾脏中表达量恢复正常水平, 而鳃组织中表达量仍显著上调(图8-a)。在鳃、脾脏和头肾中 *MHC II β* 的 mRNA 表达量总体上呈先上调后下调的趋势; 在鳃中, 第6小时显著上调, 第12和24小时与对照组无明显差异, 至第48小时表达水平下调; 在头肾中, 6~24 h 显著上调, 第48小时恢复至正常水平; 在脾脏中, 第6和12小时显著上调, 第24小时恢复至正常水平, 在第48小时其表达量低于对照组, 但差异不显著(图8-b)。此外, 在迟缓爱德华氏菌感染48 h 后, 发现感染组中的中国花鲈出现死亡, 鳍条基部出血, 解剖后发现其肝脏发白, 脾脏和肾脏肿大。

Poly (I:C) 刺激组中, 中国花鲈鳃组织中

(a)

(图 1 Fig. 1)

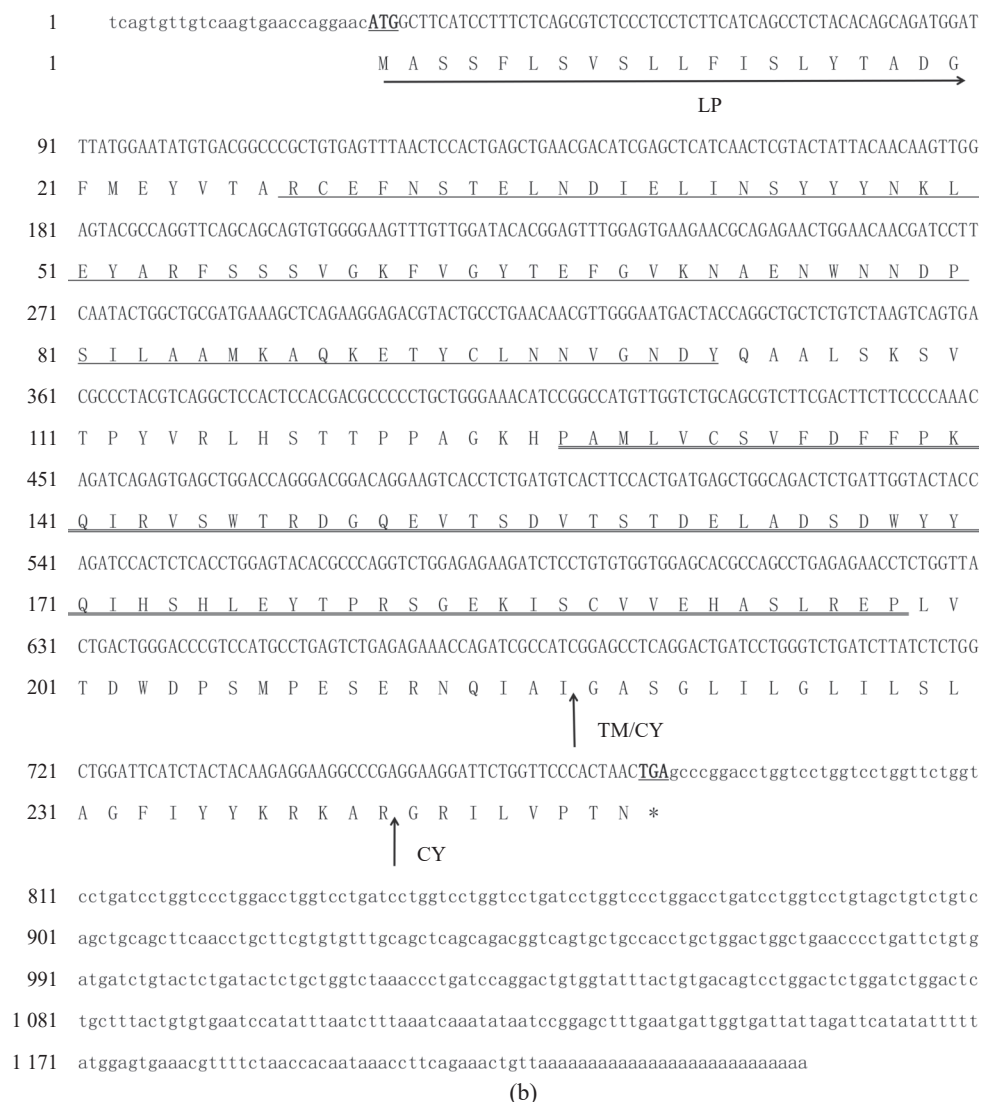


图1 中国花鲈的 *IgMH* (a)、*MHCII β* (b) cDNA 序列和推测出的氨基酸序列

(a) 起始密码子 (ATG) 及终止密码子 (TAG) 用下划线标出, 4 个糖基化位点用方框标出。黄色区域为可变区, 蓝色、绿色、灰色和粉色区域分别为 4 个恒定区。双下划线为 C-端序列。(b) LP 为信号肽; TM 为跨膜结构域; CY 为胞质结构域; 单下划线为 N 端 *MHCII β* 结构域序列; 双下划线标注为 *Ig* 结构域序列。“↑”为 TM/CY 与 CY 结构域的分界线。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *IgMH* (a) and *MHCII β* (b) in *L. maculatus*

(a) translation start (ATG) and stop codon (TAG) are designated with underline. Four putative N-glycosylation sites are highlighted in blank boxes. The yellow area is the variable area, and the blue, green, gray and pink areas are four constant areas respectively. Double underscores are C-terminal sequences. (b) LP, leader peptide; TM, transmembrane region; CY, cytoplasmic domain; the N-terminal *MHCII β* domain is marked with a single underline. The *Ig* domain sequences is marked with a double underline. “↑” the boundary between TM/CY region and CY domain.

IgMH 的 mRNA 表达量上调, 在第 12 和 24 小时显著上调, 上调水平逐渐降低, 第 48 小时恢复到正常水平; 头肾组织中的表达量在第 6 小时显著上调, 12~48 h 其表达水平与对照组相近, 第 72 小时的表达量略高于对照组, 但差异不显著; 在脾脏中, 6~24 h 均显著上调, 在第 48 小时恢复到正常水平, 72 h 再次显著上调 (图 9-a)。*MHCII β* 的 mRNA 表达水平在鳃、脾脏和头肾

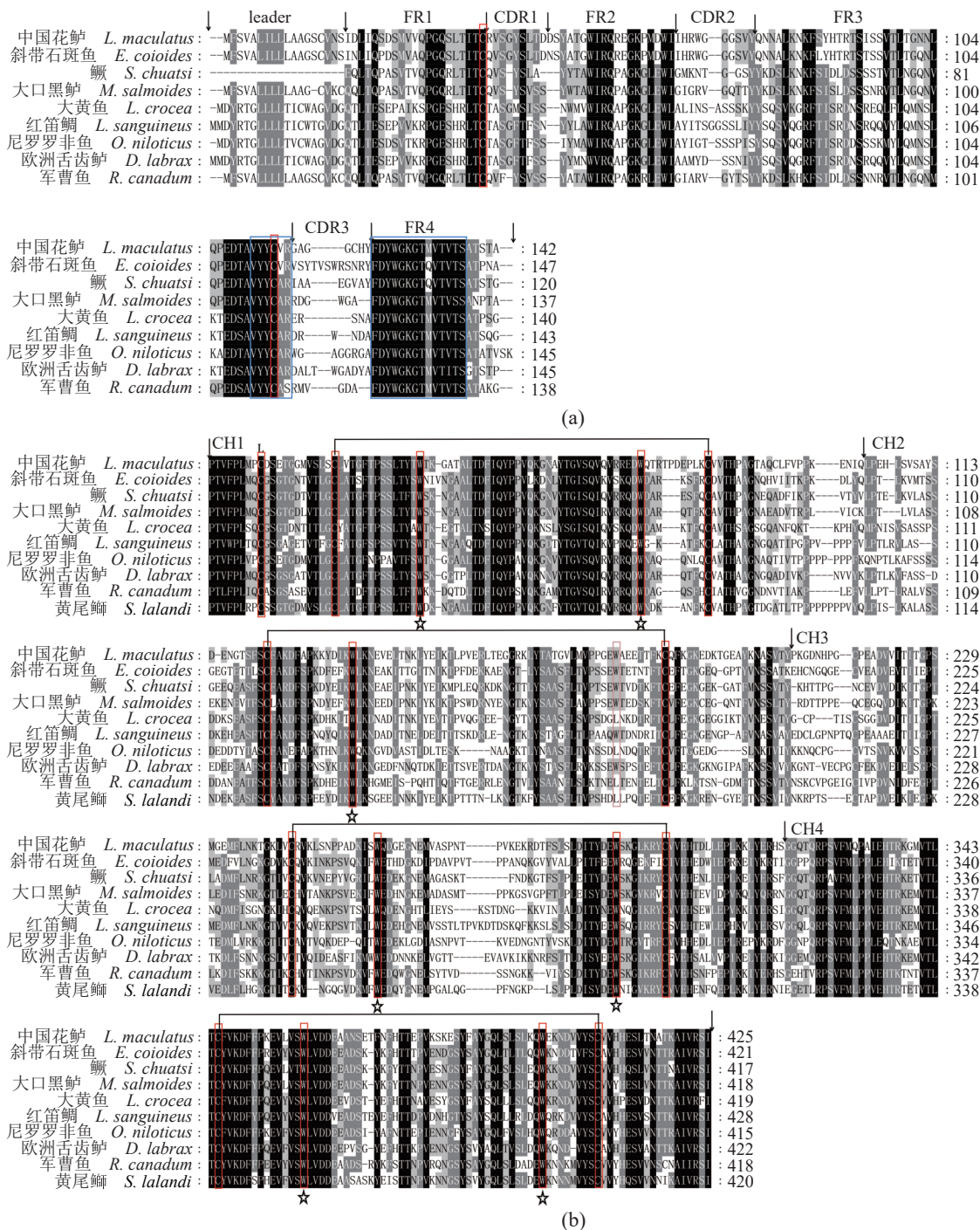
中总体呈现先上调后下调再上调的趋势; 在鳃组织中, 第 6 和 12 小时显著上调, 48 h 显著下调, 在第 72 小时恢复至正常水平; 在头肾中, 第 6 小时出现极显著上调, 第 12 和 24 小时与对照组表达相近, 第 48 小时略有下调, 第 72 小时再一次显著上调; 在脾脏中, 6~24 h 有轻微上调, 但无显著差异, 第 48 小时呈现显著下调, 在第 72 小时则极显著上调 (图 9-b)。

2.5 原核表达并纯化的重组蛋白及中国花鲂 IgMH 多克隆抗体

通过对重组质粒 IgMH-pET21d 和 IgMCH₁₋₂-pET21d 分别进行大量诱导, 待包涵体提取之后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分别有相对分子质量约为 63.8 ku 和 24.1 ku 的包涵体形式的蛋白表达, 包涵体经过复性后通过凝胶层析色谱柱

纯化, 收集紫外吸收峰值下边的蛋白液, SDS-PAGE 凝胶电泳均显示单一的蛋白条带(图 10-a)。将获得的单管纯度较高的 IgMH-pET21d 蛋白浓缩后用于多克隆抗体的制备。对 MHC II β -pET21d 重组质粒采用同样的诱导和纯化方式获得了与预测蛋白分子量相近的 MHC II β 的重组蛋白(图 10-b)。

所制备的中国花鲂 IgMH 抗体能与原核表



(图 2 Fig. 2)

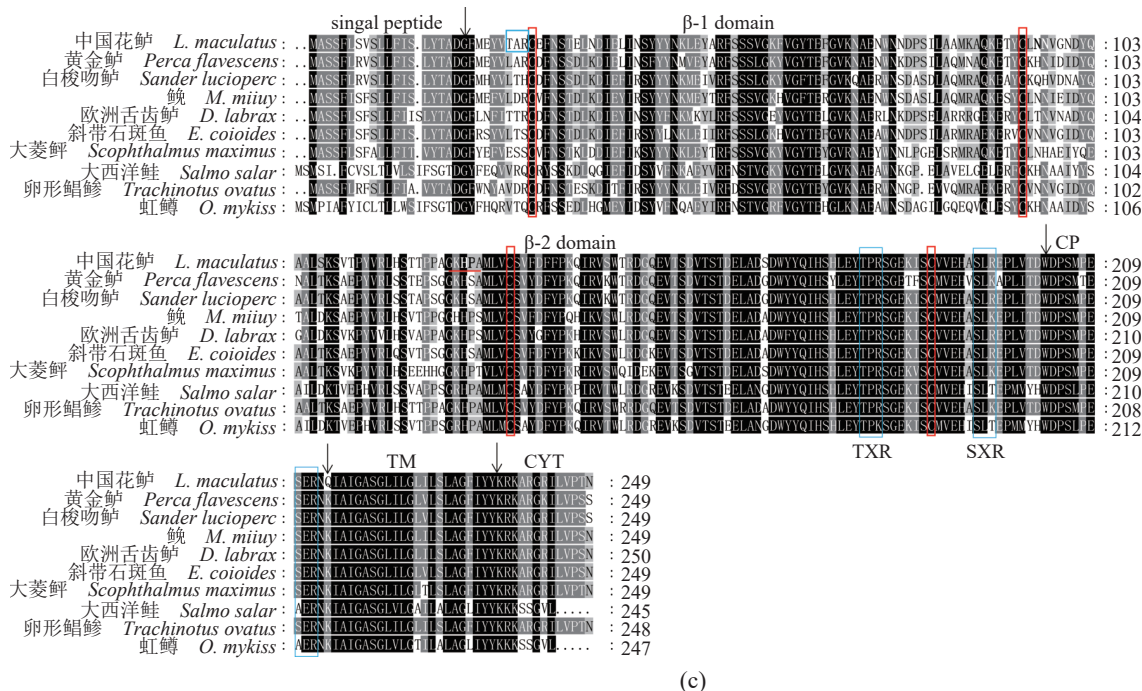


图2 中国花鲈 IgMH 可变区 (a)、恒定区 (b) 和 MHC II β 与其他鱼类多序列比对

(a) Leader 为预测前导链, FR1~4 为 4 个骨架区、CDR1~3 为 3 个互补决定区, 不同区域由“↓”分开, 保守位点的半胱氨酸 (C) 用红色方框标出, FR3 中保守的 DX3YYC 基序和 FR4 中保守 FDYWGKGT-VTV-S 基序用蓝色方框标出。(b) CH1~4 为 4 个恒定区, 由“↓”分开; 保守的色氨酸 (W) 和半胱氨酸 (C) 用红色方框标出, 形成链内二硫键的 2 个半胱氨酸用黑线连在一起; 不同鱼类共有的色氨酸位点用“☆”标示, 键间二硫键用“L”标示。(c) signal peptide 为信号肽、 β -1/ β -2 domain 为 β -1/ β -2 结构域、CP 为连接肽、TM 为跨膜区、CYT 为胞内区, 为序列上方显示了预测的信号肽、 β -1 结构域、 β -2 结构域、连接肽、跨膜区和胞内区, 不同区域由“↓”分开; 预测的蛋白激酶 C 磷酸化位点用蓝色方框标出, TXR 和 SXR 为鱼类中保守的蛋白激酶 C 磷酸化位点; 保守位点的半胱氨酸 (C) 用红色方框标出, N-乙酰化位点用横线标出。物种名称及序列号: (a) 中国花鲈 QWX94362.1, 斜带石斑鱼 AAX78206.1, 鳊 AAQ14862.1, 大口黑鲈 QLF98876.1, 大黄花鱼 ACM24795.1, 红笛鲷 ADX01345.1, 尼罗罗非鱼 AAL99934.1, 欧洲舌齿鲈 ARC77253.1, 军曹鱼 AFN02400.1, 黄尾鲷 AUT13231.1。(c) 中国花鲈 AXY87851.1, 黄金鲈 XP_028420408.1, 白吻鲈 XP_031172151.1, 鳊 AGJ70356.1, 欧洲舌齿鲈 CAJ34344.1, 斜带石斑鱼 ADZ99156.1, 大菱鲈 AWO97408.1, 大西洋鲑 CAA49726.1, 卵形鲳鲹 APD68825.1, 虹鳟 CBX11172.1。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of IgMH variable region (a), constant region (b) and MHC II β between *L. maculatus* and other fish species

(a) Leader: predicted leader, FR1-4: four framework regions, CDR1-3: three complementarity determining regions; different regions are separated by "↓"; conserved cysteine (C) sites are marked with red boxes, and the conserved DX3YYC motif in FR3 and FDYWGKGT-VTV-S motif in FR4 are indicated with blue boxes. (b) CH1-4 denote four constant regions, separated by "↓"; cysteine (C) and tryptophan (W) at conserved sites are marked with red boxes, and the two cysteines that form a disulfide bond in the chain are connected together with a black line; conserved tryptophan sites shared by different fish species are marked with "☆", and the inter-bond disulfide bond is marked with "L". (c) regions corresponding to the putative signal peptide, β -1 domain, β -2 domain, connecting peptide (CP), transmembrane region (TM) and cytoplasmic tail (CYT) are shown above the sequences, and separated by "↓"; predicted protein kinase C phosphorylation sites are marked with blue boxes, and TXR and SXR represent conserved protein kinase C phosphorylation sites in fish; conserved cysteine (C) sites are marked with red boxes, and the N-acetylation site is marked with a horizontal line. Species and GenBank accession numbers: (a) (b) *L. maculatus* QWX94362.1, *E. coioides* AAX78206.1, *S. chuatsi* AAQ14862.1, *M. salmoides* QLF98876.1, *L. crocea* ACM24795.1, *Lutjanus sanguineus* ADX01345.1, *O. niloticus* AAL99934.1, *D. labrax* ARC77253.1, *Rachycentron canadum* AFN02400.1, *Seriola lalandi* AUT13231.1. (c) *L. maculatus* AXY87851.1, *Perca flavescens* XP_028420408.1, *Sander lucioperca* XP_031172151.1, *M. miui* AGJ70356.1, *D. labrax* CAJ34344.1, *E. coioides* ADZ99156.1, *Scophthalmus maximus* AWO97408.1, *Salmo salar* CAA49726.1, *Trachinotus ovatus* APD68825.1, *O. mykiss* CBX11172.1.

达的 IgMH 蛋白单体和 IgMHC₁₋₂ 蛋白多聚体反应, 也能与中国花鲈全血清中相对分子质量在 55~95 ku 的蛋白条带发生强烈反应, 与同属鲷科的鳊的全血清发生弱反应, 但与大口黑鲈和

草鱼的全血清没有交叉反应 (图 11)。

3 讨论

当鱼体受病原侵袭时, 其适应性 (获得性)

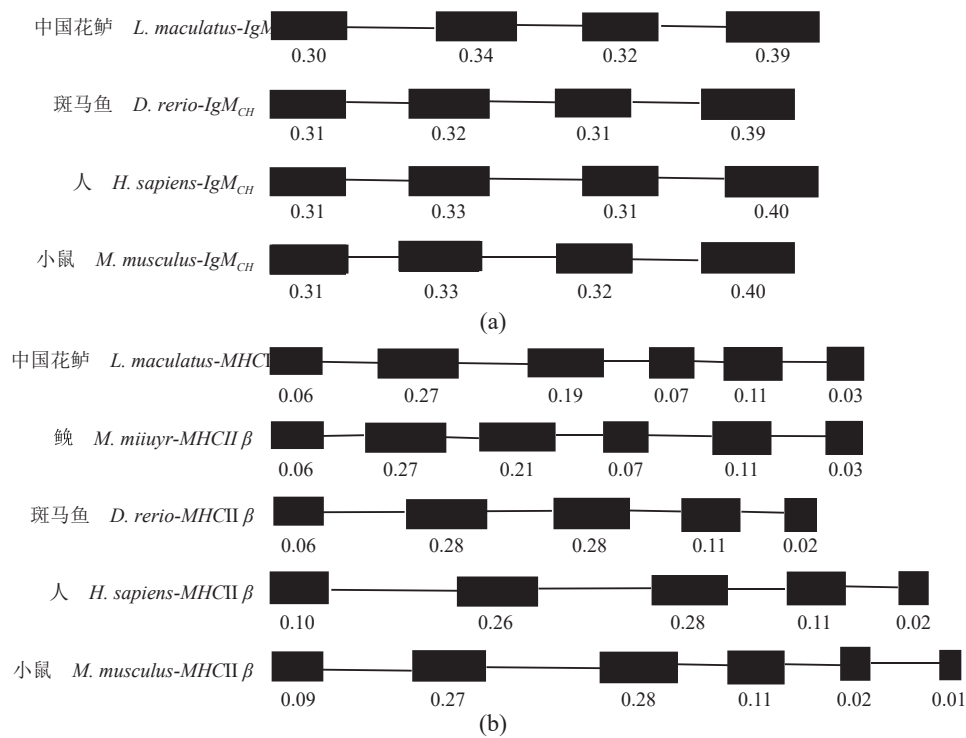


图3 中国花鲈 IgMH 恒定区和 MHCII β 与其他物种基因结构比较

黑色框代表基因组中外显子内的编码区, 横线代表内含子, 数字代表碱基的数量(kb)。(a) 中国花鲈 QWX94362.1, 斑马鱼 AAH91644.1, 人 CAA47714.1, 小鼠 AAB59651.1。(b) 中国花鲈 AXY87851.1, 鳊 AGJ70356.1, 人 AAD00819.1, 小鼠 NP_034512.2。

Fig. 3 Comparison of IgMH and MHCII β gene structure in *L. maculatus* and other species

The black boxes represent coding regions within the exon in the genome, the horizontal lines represent introns, and the numbers represent the number of bases (kb). (a) *L. maculatus* QWX94362.1, *D. rerio* AAH91644.1, *H. sapiens* CAA47714.1, *M. musculus* AAB59651.1. (b) *L. maculatus* AXY87851.1, *M. miiuyr* AGJ70356.1, *H. sapiens* AAD00819.1, *M. musculus* NP_034512.2.

表2 IgMH 恒定区氨基酸一致性和相似性

Tab. 2 Amino acid identities and similarity of IgMH constant region %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		66.7	75.6	73.2	67.1	68.5	67.5	71.1	65.4	69.3
2	48.1		75.8	74.8	68.7	68.6	67.4	69.5	67.7	67.4
3	60.8	60.9		86.4	75.2	73.8	70.4	77.0	73.9	76.0
4	57.5	59.3	74.5		72.2	72.9	68.8	76.5	74.6	74.3
5	49.9	52.7	59.7	55.2		70.0	65.0	72.4	65.6	66.4
6	52.7	52.3	58.0	58.0	53.3		67.0	77.7	67.3	69.4
7	47.5	50.2	52.2	50.1	43.1	46.9		69.3	73.2	70.2
8	54.2	54.2	61.4	62.0	53.5	60.5	47.6		70.1	73.7
9	48.0	50.7	56.5	55.6	48.1	49.5	49.8	53.1		74.9
10	53.0	50.9	61.4	59.1	50.1	53.6	50.7	53.1	59.1	

注: 下三角表示一致性; 上三角表示相似性。1. 中国花鲈 QWX94362.1; 2. 斜带石斑鱼 AAX78206.1; 3. 鳊 AAQ14862.1; 4. 大口黑鲈 QLF98876.1; 5. 大黄鱼 ACM24795.1; 6. 红笛鲷ADX01345.1; 7. 尼罗罗非鱼 AAL99934.1; 8. 欧洲舌齿鲈 ARC77253.1; 9. 军曹鱼 AFN02400.1; 10. 黄尾鲷AUT13231.1。

Notes: Lower triangle indicate uniformity; upper triang indicate similarity. 1. *L. maculatus* QWX94362.1; 2. *E. coioides* AAX78206.1; 3. *S. chuatsi* AAQ14862.1; 4. *M. salmoides* QLF98876.1; 5. *L. crocea* ACM24795.1; 6. *L. sanguineus* ADX01345.1; 7. *O. niloticus* AAL99934.1; 8. *D. labrax* ARC77253.1; 9. *R. canadum* AFN02400.1; 10. *S. lalandi* AUT13231.1.

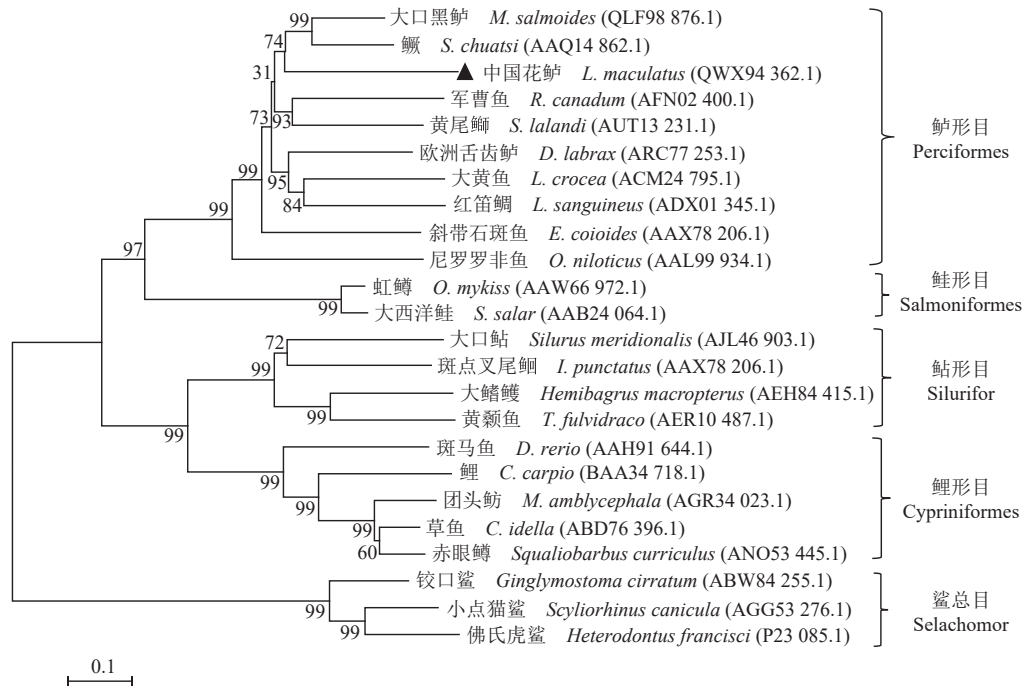
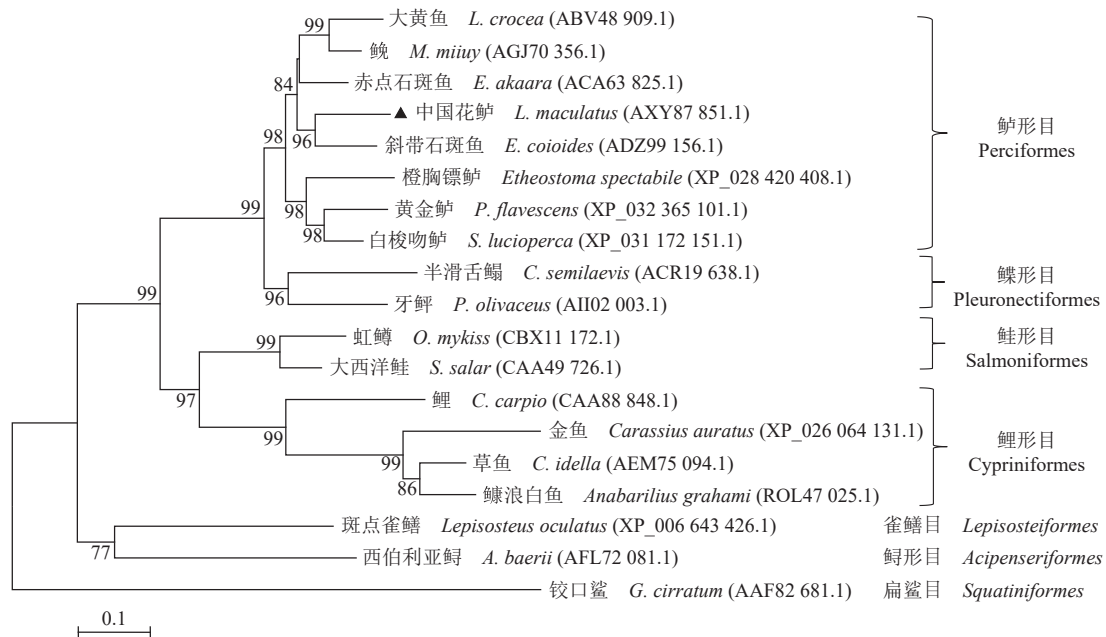


图 4 IgMH 氨基酸序列系统发育树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree of IgMH amino acid sequence

图 5 MHCII β 氨基酸序列系统发育树Fig. 5 NJ phylogenetic tree of MHCII β amino acid sequence

免疫系统, 无论是细胞免疫还是体液免疫, 在防御和清除病原微生物方面都发挥着重要的作用^[7]。参与特异性细胞免疫的功能细胞主要是 T 淋巴细胞, T 细胞表面的抗原接受器可以辨识抗原呈递细胞上 MHC II 分子呈递的抗原片段^[30]; 参与特异性体液免疫的主要是 B 淋巴细

胞, 其在抗原刺激下转化为浆细胞, 进而合成免疫球蛋白, 能与靶抗原结合的免疫球蛋白即为抗体^[31-32]。携带有抗原肽-MHC II 类分子复合物的抗原呈递细胞通过与辅助性 T 细胞表面的 CD4 细胞标记结合, 也可协助 B 细胞产生抗体^[33]。IgM 是鱼类 B 细胞产生的最主要的抗体,

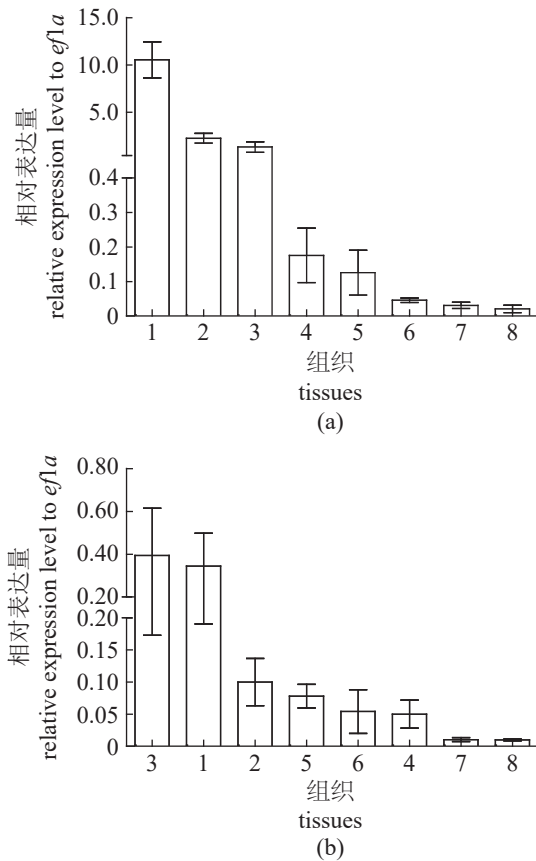


图6 *IgMH* (a) 和 *MHCII β* (b) 组织表达分析

IgMH 和 *MHCII β* 的相对表达量以内参基因 *EF-1α* 表达水平为标准。数据显示为平均值±标准误 ($n=4$), 下同。1. 脾脏, 2. 头肾, 3. 鳃, 4. 肌肉, 5. 脑, 6. 肠道, 7. 皮肤, 8. 肝脏。

Fig. 6 Tissue expression analysis of *IgMH* (a) and *MHCII β* (b)

The relative expression levels of *IgMH* and *MHCII β* were expressed as arbitrary units that were normalised against the expression levels of *EF-1α*. Data are shown as mean±SE ($n=4$), the same below. 1. spleen, 2. head kidney, 3. gill, 4. muscle, 5. brain, 6. intestine, 7. skin, 8. liver.

本研究所克隆的中国花鲈 *IgMH* 在 FR3 骨架区所含的 DX3YYC 以及 FR3 中存在的 V 家族的保守区域 FDYWGKGT-VTV-S 是免疫球蛋白的结构折叠所必需的^[8], 虽 FR2 骨架区包含的疏水氨基酸残基 GKGLEW 在中国花鲈的 *IgMH* 中也有发现, 但 GLE 被 PMD 所代替 (图 2-a)。通过对 *IgMH* 恒定区氨基酸的一致性和相似性比较 (表 2), 验证了中国花鲈与鳊的亲缘关系, 同时也表明了 *IgMH* 恒定区在鲈形目鱼中一致性约为 60%。比较结果显示, “*L. japonicus*”^[11] 与鲈科鱼类鳊^[9] 和斜带石斑鱼^[10] 的序列一致性分别为 73.6% 和 59.9%, 而与隶属太阳鱼科的大口黑鲈^[13] 的序列一致性高达 94.5%, 由此说明

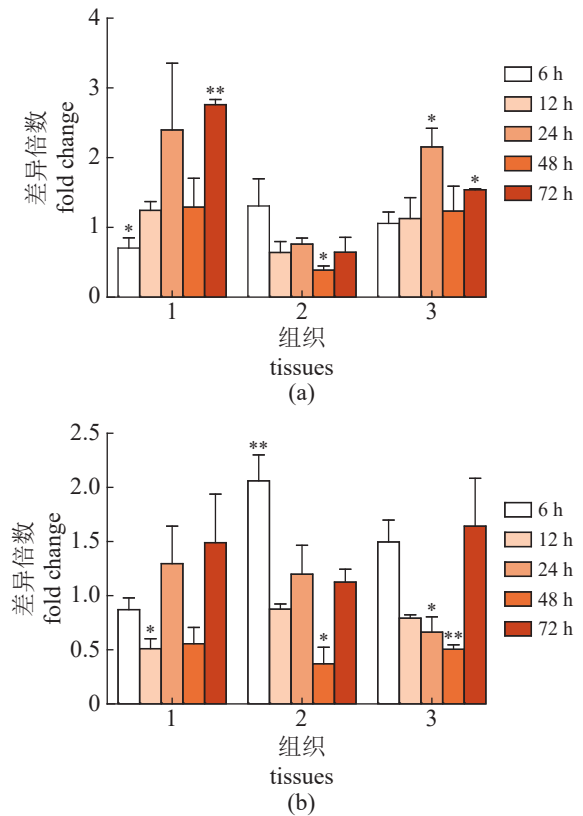


图7 LPS 刺激后中国花鲈组织中 *IgMH* (a) 和 *MHCII β* (b) mRNA 表达分析

IgMH 和 *MHCII β* mRNA 表达水平是相对于 *EF-1α* 水平表示, 在 PBS (对照) 和 LPS 刺激 6~72 h 的表达结果。1. 鳃, 2. 头肾, 3. 脾脏。“*”表示差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$); 下同。

Fig. 7 Analysis of *IgMH* (a) and *MHCII β* (b) mRNA expression after LPS stimulation in *L. maculatus*

IgMH and *MHCII β* mRNA levels expressed as a ratio relative to *EF-1α* levels after stimulating with PBS (control) and LPS for 6 h to 72 h. 1. spleen, 2. head kidney, 3. gill. “*” indicate significant difference ($P < 0.05$); “**” indicate extremely significant difference ($P < 0.01$), the same below.

了刘悦等^[11]报道的“*L. japonicus*”并非隶属鲈科的中国花鲈, 而应该隶属太阳鱼科, 推测其为大口黑鲈的一地方群体。此外, 通过比对发现, 本研究克隆得到的 *MHCII β* 氨基酸数目在鲈形目鱼类中比较保守, 均为 249 个氨基酸; 在结构上同其他鱼类一致, 均具有 *MHCII β* 结构域 ($\beta 1$ domain 和 $\beta 2$ domain) 以及 IGc1 结构域; 在通过对中国花鲈 *MHCII β* 与其他鱼类进行多序列比对分析发现, 在中国花鲈中存在保守的 N-乙酰化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点, 这些结构特点同样在尼罗罗非鱼^[34] 和大黄鱼等鱼类中有所发现 (图 2-b)。所克隆的 *IgMH* 和 *MHCII β*

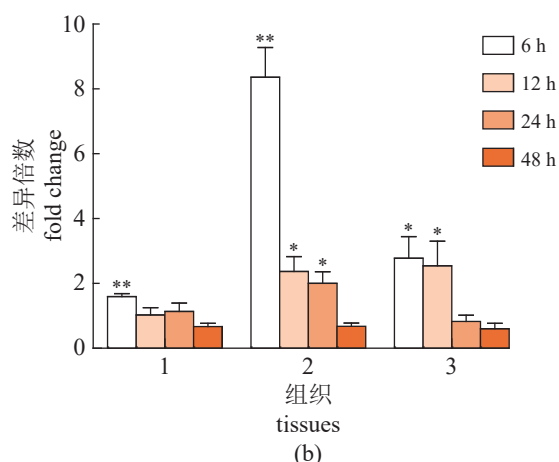
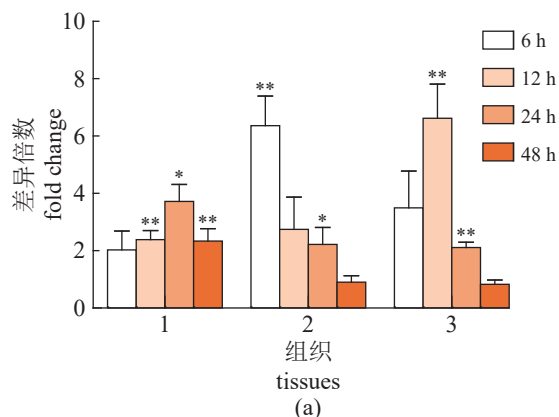


图8 迟缓爱德华氏菌刺激后中国花鲈组织中 *IgMH* (a) 和 *MHC II β* (b) mRNA 表达分析

在 PBS(对照) 和迟缓爱德华氏菌刺激后 6~48 h 的表达结果。

Fig. 8 Analysis of *IgMH* (a) and *MHC II β* (b) mRNA expression after *E. tarda* stimulation in *L. maculatus*

Expression analysis after stimulating with PBS (control) and with *E. tarda* for 6 to 48 h.

氨基酸序列在系统树中的进化地位与鱼类系统发育关系吻合, 为后续的功能研究奠定了基础。

草鱼 *IgM* 在头肾、中肾、脾脏中表达量较高^[35], 斑马鱼 *IgM* 在胸腺、脾脏、肾脏中表达量较高^[2], 尼罗罗非鱼在头肾、肠道及脾脏中表达量较高^[8], 黄颡鱼 *IgM* mRNA 在头肾、中肾、脾脏和鳃中表达较高^[17], 本研究中国花鲈 *IgMH* 的 mRNA 在脾脏、头肾和鳃中表达量较高。说明鱼类的脾脏、头肾、鳃等鱼体重要的淋巴器官是 *IgM* mRNA 高表达的组织器官。据报道, 大黄鱼 *MHC II β* mRNA 高表达于肾脏、脾脏和鳃组织^[36], 欧洲舌齿鲈中的 *MHC II β* 在鳃、肠道和胸腺组织中高表达^[25], 鲢中脾脏、

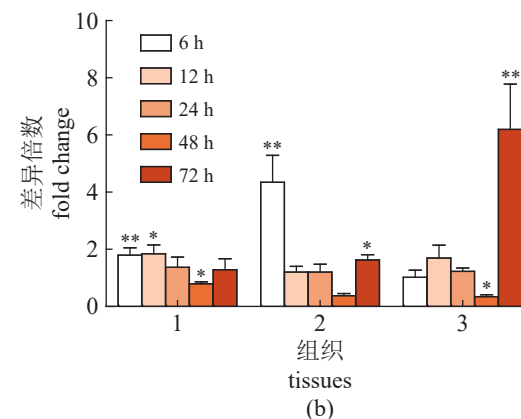
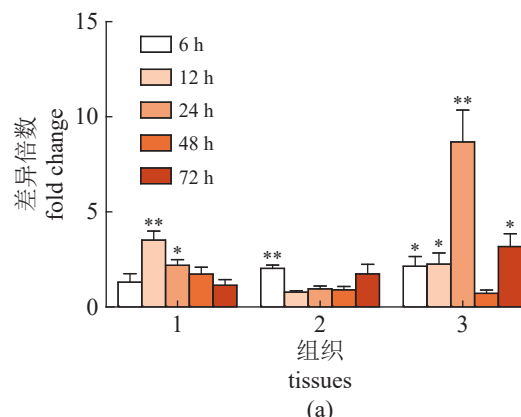


图9 Poly (I:C) 刺激后中国花鲈组织中 *IgMH* (a) 和 *MHC II β* (b) mRNA 表达分析

在 PBS(对照) 和 Poly (I:C) 刺激后 6~72 h 的表达结果。

Fig. 9 Analysis of *IgMH* (a) and *MHC II β* (b) mRNA expression after Poly (I:C) stimulation in *L. maculatus*

Expression analysis after stimulating with PBS (control) and with Poly (I:C) for 6 h to 72 h.

肝脏、肠道和肌肉组织中 *MHC II β* mRNA 表达水平也较高^[23]; 本研究发现, 中国花鲈 *MHC II β* mRNA 主要在鳃、脾脏和头肾中高水平表达, 虽然 *MHC II β* 基因在不同鱼体内的器官或组织中表达水平有所差异, 但鳃和肠道等是共同的较高表达的组织器官, 这可能与它们是最易接近病原体的部位有关。上述结果表明, 鱼类 *IgM* 和 *MHC II* 基因在不同鱼体内存在组织特异性, 但大多数在肾脏和脾脏等免疫器官中表达程度较高^[37], 推测各项研究中其表达模式差异可能是与鱼体生长发育期和取样组织器官的选择差异相关。

细菌脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性杆菌细胞壁的主要组分之一, 细菌入侵时, LPS 可作为重要的抗原分子被机体的抗原递呈细胞 (APC)

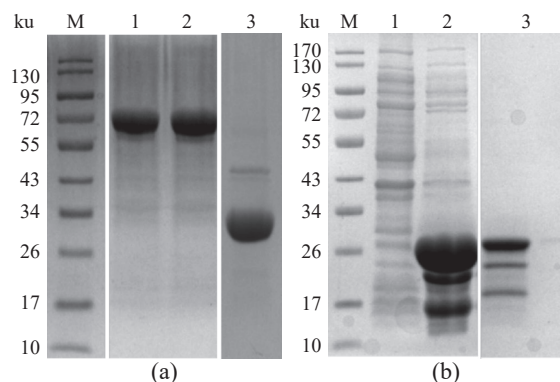


图 10 IgMH (a) 和 MHC II β (b) 重组蛋白 SDS-PAGE

M. 蛋白 marker; (a) 1~2. IgMH 蛋白, 3. IgMHC₁₋₂ 蛋白, (b) 1. MHC II β 菌液破碎后上清液, 2. MHC II β 菌液破碎后包涵体, 3. MHC II β 蛋白。

Fig. 10 SDS-PAGE of recombinant protein expression
IgMH (a) and MHC II β (b)

M. protein marker; (a) 1-2. IgMH protein, 3. IgMHC₁₋₂ protein, (b) 1. supernatant of broken MHC II β bacterial solution, 2. inclusion bodies after MHC II β bacterial solution was broken, 3. purified MHC II β protein.

捕获, 进而引起免疫反应^[38]。中国花鲈在受到 LPS 刺激后, *IgMH* mRNA 的表达量在鳃和脾脏中产生了较为显著的变化, 在 24 和 72 h 均显著上调, 这同斑马鱼^[39] *IgM* 在 LPS 刺激后 24 h 内表达水平变化的结果相一致, 而头肾中 *IgM* mRNA 在此时间段的表达量变化不大, 在 48 h 呈现显著下调, 其下调原因有待进一步研究。中国花鲈 *MHC II β* mRNA 的表达量在鳃、头肾和脾脏中的表达水平存在差异, 在鳃和脾脏中均出现了显著下调, 头肾中 *MHC II β* mRNA 的

表达量虽然早期显著性上调, 但在 48 h 出现下调之后恢复增加, 这一结果与西伯利亚鲟细菌感染后体内 *MHC II β* mRNA 的表达量变化趋势一致^[21]。

与尼罗罗非鱼人工感染嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 后的表达状况^[34] 类似, 人工感染迟缓爱德华氏菌后 6~24 h, 中国花鲈头肾和脾脏 *IgMH* 的 mRNA 表达显著上调, 且上调幅度高于 LPS 刺激, 上调倍数约为后者 2 倍; 中国花鲈 *MHC II β* 在头肾和脾脏中 mRNA 表达水平变化与 *IgMH* mRNA 相似, 在前期出现显著上调, 在 48 h 趋于正常水平或下调, 在鳃中感染早期出现显著上调后逐渐趋于正常水平, 表明 *MHC II β* 对于中国花鲈抵御迟缓爱德华氏菌感染起重要的作用。在细菌感染后 *MHC II β* 与 *IgMH* 的基因表达量同步显著上调可能与触发鱼体异己成分识别机制进而激发特异性免疫反应相关^[40]。

Poly (I:C) (聚肌苷酸胞苷酸) 是一种人工合成的病毒双链 RNA(dsRNA) 类似物, 其调节机体免疫功能与单核吞噬细胞的活性有关^[41]。Poly (I:C) 刺激后, 中国花鲈 *IgMH* mRNA 的表达量在鳃和脾脏中的变化比较大, 在头肾中变化不明显, 并且在鳃和脾脏中虽然总体上调, 但是随时间变化的趋势并不一致。*MHC II β* 基因在鳃、脾脏和头肾中差异表达, 鳃和头肾中在刺激早期出现显著上调, 这与大黄鱼在 Poly (I:C) 刺激下, 肠和肾脏中的 *MHC II - α* 和 β 类

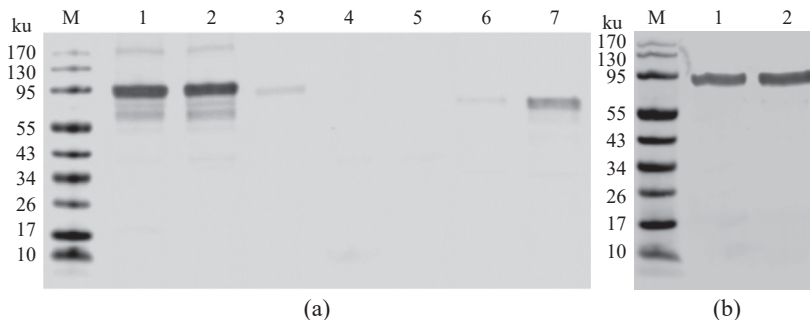


图 11 多克隆抗体的免疫印迹分析

(a) *IgMH* 多克隆抗体特异性检测。(b) 迟缓爱德华氏菌感染前后中国花鲈血清 *IgMH* 含量检测, M. 蛋白 marker; 1. 中国花鲈正常血清, 2. 感染爱德华氏菌 12 h 后的中国花鲈血清, 3. 鳊全血清, 4. 大口黑鲈全血清, 5. 草鱼全血清, 6~7. 纯化后的 *IgMH* 蛋白 (25.5 μ g/mL, 53.125 μ g/mL)。

Fig. 11 Western blot analysis of polyclonal antibody

(a) specificity detection of the polyclonal antibody against *L. maculatus* *IgMH*; (b) detection of *IgMH* content in serum of *L. maculatus* before and after *E. tarda* infection. M. protein marker; 1. *L. maculatus* whole serum, 2. serum from *L. maculatus* 12 h after infection with *E. tarda*, 3. *S. chuatsi* whole serum, 4. *M. salmoides* whole serum, 5. *C. idella* whole serum, 6-7. purified recombinant *IgMH* protein (25.5 μ g/mL, 53.125 μ g/mL).

mRNA 的表达早期出现上调结果一致^[36]。而在脾脏中则是在受到刺激后先出现显著下调再出现显著上调, 与大黄鱼脾脏中早期出现上调的结果不同, 但在虹鳟急性病毒感染期间, *MHCII β* 基因表达水平显著下调^[42], 说明不同鱼类组织对于对免疫反应的调节作用可能存在差异。最近的研究表明, 鱼类中的 Poly (I:C) 可以诱导 *IFN-γ* 基因表达^[43]。此外, 通过相关实验已确定 MHC- II 反式激活蛋白 (CIITA) 的表达受 *IFN-γ* 调节^[44]。因此实验推测, 鳃和头肾中 *MHC II β* 基因表达的明显上调可能是 Poly (I:C) 诱导产生 *IFN-γ* 的结果。

通过原核表达载体构建及分子筛层析等技术纯化获得中国花鲈 IgMH、IgMCH₁₋₂ 和 MHC II β 的重组蛋白, 其中 IgM-pET21d 重组蛋白的分子量大小与刘悦等^[11] 获得的日本花鲈 IgMH 重组蛋白的结果相近。免疫印迹结果显示, 制备获得的 anti-IgMH 多克隆抗体能够与中国花鲈 IgMH 重组蛋白以及全血清发生特异性结合, 并能与鳃全血清发生交叉反应, 但与大口黑鲈和草鱼的全血清不发生结合, 这从蛋白水平上证明了中国花鲈与鳃的亲缘关系较近。根据氨基酸序列推测获得的 IgMH 原核重组蛋白相对分子质量约为 63.8 ku, 而免疫印迹结果显示, 血清中 IgM 重链的分子质量大小明显高于重组蛋白, 该分子量大小与张福森等^[45] 分离纯化鲈血清得到的 IgM 重链分子质量大小为 72 ku 相近。分析其原因可能由于中国花鲈 B 淋巴细胞中的重链分子在天然状态下可发生强烈的糖基化作用 (其结构上具有 4 个糖基化位点), 而通过原核表达系统纯化出来的蛋白不具备糖基化修饰所造成^[46]。

本研究通过对中国花鲈 *IgMH* 和 *MHC II β* 基因克隆与生物信息学分析, 丰富了对于中国花鲈适应性免疫相关基因的研究, 同时也从进化的角度确定了中国花鲈与石斑鱼和鳃等鲷科鱼类的亲缘关系。通过感染和刺激实验, 发现中国花鲈头肾脏、脾脏和鳃组织中 *IgMH* 和 *MHC II β* 在 mRNA 水平上显著上调, 说明在感染病原微生物后, 这些器官均产生了不同程度的免疫反应, 激发了适应性免疫系统调控, 为后续应对中国花鲈的细菌或病毒感染实验制定策略提供了新思路。中国花鲈 anti-IgM 抗体的

制备, 为探究中国花鲈 B 细胞特性和免疫学功能以及病原诊断等奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 张小萍, 梁筱燕, 张庆璞, 等. 尼罗罗非鱼血清免疫球蛋白单克隆抗体制备及鉴定 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29(8): 663-667.
Zhang X P, Liang X Y, Zhang Q H, *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies against serum immunoglobulin from *Oreochromis niloticus* [J]. Immunological Journal, 2013, 29(8): 663-667 (in Chinese).
- [2] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, *et al.* The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z [J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(3): 295-302.
- [3] Savan R, Aman A, Nakao M, *et al.* Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(6): 458-463.
- [4] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2: 201-221.
- [5] Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses [J]. *Molecular Immunology*, 2000, 37(18): 1141-1149.
- [6] Arnold J N, Dwek R A, Rudd P M, *et al.* Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease [J]. *Immunology Letters*, 2006, 106(2): 103-110.
- [7] 叶剑敏, 王玉红, 丁明媚, 等. 硬骨鱼 IgM 结构和功能及其体液免疫应答 [J]. 华南师范大学学报 (自然科学版), 2015, 47(5): 1-8.
Ye J M, Wang Y H, Ding M M, *et al.* Teleost IgM structure, function and humoral immune response [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2015, 47(5): 1-8 (in Chinese).
- [8] 张武凤, 张小萍, 王亚凤, 等. 尼罗罗非鱼 IgM 重链基因的克隆及其抗血清的制备 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(1): 67-70.
Zhang W F, Zhang X P, Wang Y F, *et al.* cDNA cloning and antiserum preparation of IgM in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) [J]. Immunological Journal, 2015, 31(1): 67-70 (in Chinese).
- [9] Zhang Y A, Nie P, Wang Y P, *et al.* cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14(5): 477-480.
- [10] Cheng C A, John J A C, Wu M S, *et al.* Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain [J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2006, 109(3-4): 255-265.

- [11] 刘悦, 张其中, 崔淼. 鲈鱼 IgM 重链基因 cDNA 的克隆及其原核表达 [J]. 生态科学, 2013, 32(2): 218-223.
- Liu Y, Zhang Q Z, Cui M. Full-length cDNA cloning and prokaryotic expression of immunoglobulin M heavy chain in Weever (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Ecological Science, 2013, 32(2): 218-223 (in Chinese).
- [12] Buonocore F, Stocchi V, Nunez-Ortiz N, et al. Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus infection [J]. BMC Molecular Biology, 2017, 18(1): 8.
- [13] Yang S, Chen W Q, He F F, et al. Comparison of the roles of IgM in systemic and mucosal immunity via tissue distribution analysis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Aquaculture, 2020, 527: 735488.
- [14] Danilova N, Hohman V S, Kim E H, et al. Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish [J]. Immunogenetics, 2000, 52(1-2): 81-91.
- [15] 丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼血清 IgM 蛋白的纯化及抗血清的制备 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 164-169.
- Ding W D, Cao L P, Cao Z M. Purification of serum IgM from grass carp (*Ctenopharyngodon delta*) and preparation of rabbit sera anti-IgM ding [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 164-169.
- [16] Hansen J, Leong J A, Kaattari S. Complete nucleotide sequence of a rainbow trout cDNA encoding a membrane-bound form of immunoglobulin heavy chain [J]. Molecular Immunology, 1994, 31(6): 499-501.
- [17] Xu J, Zhang X T, Luo Y Z, et al. IgM and IgD heavy chains of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): molecular cloning, characterization and expression analysis in response to bacterial infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 84: 233-243.
- [18] 温海深, 李昀, 张美昭, 等. 中国花鲈——家喻户晓的中国海鲈 [J]. 中国水产, 2020(8): 110-111.
- Wen H S, Li Y, Zhang M Z, et al. Spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) -- the well-known Chinese sea bass [J]. China Fisheries, 2020(8): 110-111 (in Chinese).
- [19] Roche P A, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation [J]. Nature Reviews Immunology, 2015, 15(4): 203-216.
- [20] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 MHC class II B 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的分析 [J]. 水产学报, 2006, 30(5): 633-639.
- Zhang Y X, Chen S L. Major histocompatibility complex class II B allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(5): 633-639 (in Chinese).
- [21] 田照辉, 徐绍刚, 胡红霞, 等. 西伯利亚鲟 MHC II β 基因克隆、组织分布及细菌感染后的表达变化 [J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 56-62.
- Tian Z H, Xu S G, Hu H X, et al. Molecular cloning and expression of major histocompatibility complex class II β gene in tissues of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(1): 56-62 (in Chinese).
- [22] Pang J C, Gao F Y, Lu M X, et al. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: genomic structure, molecular polymorphism and expression patterns [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 486-496.
- [23] Liu J, Sun Y Y, Xu T J. Identification of 48 full-length MHC-DAB functional alleles in miyu croaker and evidence for positive selection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 544-550.
- [24] Xu T J, Liu J, Sun Y Y, et al. Characterization of 40 full-length MHC class IIA functional alleles in miyu croaker: polymorphism and positive selection [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 55: 138-143.
- [25] Buonocore F, Randelli E, Casani D, et al. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II β chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(4): 853-866.
- [26] 张美昭, 高天翔, 阮树会, 等. 中国花鲈鲈鱼人工培育与催产技术研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 195-200.
- Zhang M Z, Gao T X, Ruan S H, et al. Study on artificial cultivation and spawning inducement technique of *Lateolabrax japonicus* [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(2): 195-200 (in Chinese).
- [27] 张春丹, 李祥云. 中国花鲈繁殖生物学及繁育技术研究进展 [J]. 宁波大学学报(理工版), 2005, 18(3): 400-403.
- Zhang C D, Li M Y. Advance of study on reproductive biology and breeding technology of *Lateolabrax japonicus* [J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2005, 18(3): 400-403 (in Chinese).
- [28] 吕孙建, 刘天强, 阳涛, 等. 海鲈迟缓爱德华氏菌病诊断实例 [J]. 科学养鱼, 2015(12): 64.
- Lv S J, Liu T Q, Yang T, et al. Diagnosis of delayed Edward's disease in sea bass [J]. Scientific Fish Farming, 2015(12): 64 (in Chinese).
- [29] Li X, Yuan S Y, Sun Z S, et al. Gene identification and functional analysis of peptidoglycan recognition protein from the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) [J]. Fish & Shellfish

- Immunology, 2020, 106: 1014-1024.
- [30] Kelly A, Powis S H, Kerr L A, *et al.* Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex[J]. *Nature*, 1992, 355(6361): 641-644.
- [31] Scott-Browne J P, Crawford F, Young M H, *et al.* Evolutionarily conserved features contribute to $\alpha\beta$ T cell receptor specificity[J]. *Immunity*, 2011, 35(4): 526-535.
- [32] Reddy S T. The patterns of T-cell target recognition[J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 36-38.
- [33] 韩柳. 鲈鱼 *CD4*、*GF- β 1* 基因的克隆与表达分析 [D]. 宁波: 宁波大学, 2013.
- Han L. Molecular cloning and tissue distribution of *CD4* and *TGF- β 1* from *Lateolabrax japonicus*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013 (in Chinese).
- [34] 周芬娜. 尼罗罗非鱼 MHC 基因的克隆、表达及多态性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- Zhou F N. Molecular cloning, expression and polymorphism analysis of MHC gene of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [35] 王欣欣, 孙宝剑, 昌鸣先, 等. 草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达 [J]. 水产学报, 2008, 32(1): 13-20.
- Wang X X, Sun B J, Chang M X, *et al.* The sequence and expression of the immunoglobulin M heavy chain cDNA of *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(1): 13-20 (in Chinese).
- [36] Yu S H, Ao J Q, Chen X H. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II α and β genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(3): 1295-1307.
- [37] 庞纪彩, 高风英, 卢迈新, 等. 鱼类 MHC II 类基因及其研究进展 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(3): 141-145.
- Pang J C, Gao F Y, Lu M X, *et al.* Progress of major histocompatibility complex (MHC) II gene and relevant gene research in fish[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(3): 141-145 (in Chinese).
- [38] 王霞, 王廷璞, 袁毅君, 等. 红茂草异紫堇碱对 LPS 诱导小鼠 RAW 264.7 细胞炎症因子的影响 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(4): 178-180, 183.
- Wang X, Wang T P, Yuan Y J, *et al.* Effects of isocorydine alkaloid in *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) Fedde (DLF) on inflammatory factors in RAW264.7 cells stimulated by LPS[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(4): 178-180, 183 (in Chinese).
- [39] 王志平, 胡庆玲, 郝转. 细菌脂多糖处理对斑马鱼免疫球蛋白亚型表达水平的影响 [J]. 水产科学, 2016, 35(6): 731-734.
- Wang Z P, Hu Q L, Hao Z. Effect of lipopolysaccharide treatment on expression of Ig isotypes in zebrafish[J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(6): 731-734 (in Chinese).
- [40] Rothbard J B, Geftter M L. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins[J]. *Annual Review of Immunology*, 1991, 9(1): 527-565.
- [41] 王晓杜, 沈阳, 马志永. 细胞自噬与机体免疫机制及抗微生物感染的关系 [J]. 生命的化学, 2010, 30(6): 877-879.
- Wang X D, Shen Y, Ma Z Y. Autophagy was association with immunity and anti-microbial infection of host cells[J]. *Chemistry of Life*, 2010, 30(6): 877-879 (in Chinese).
- [42] Hansen J D, La Patra S. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection[J]. *Immunogenetics*, 2002, 54(9): 654-661.
- [43] Zou J, Carrington A, Collet B, *et al.* Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish[J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(4): 2484-2494.
- [44] Th  le C, Kiderlen A F. Sources of interferon-gamma (IFN- γ) in early immune response to *Listeria monocytogenes*[J]. *Immunobiology*, 2005, 210(9): 673-683.
- [45] 张福淼, 杨桂文, 李国田, 等. 鲈血清免疫球蛋白分离纯化及部分特性分析 [J]. 动物学杂志, 2004, 39(5): 9-12.
- Zhang F M, Yang G W, Li G T, *et al.* Isolation, purification and partial characterization of serum immunoglobulin in sea bass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2004, 39(5): 9-12 (in Chinese).
- [46] 冯建军, 关瑞章, 林鹏, 等. 欧洲鳗鲡免疫球蛋白 M 重链基因的原核表达与不同组织中表达变化的定量分析 [J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 719-725.
- Feng J J, Guan R Z, Lin P, *et al.* The prokaryotic expression and quantitative analysis of immunoglobulin heavy chain gene expression change in different tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2009, 28(6): 719-725 (in Chinese).

Molecular cloning and expression analysis of *IgMH* and *MHC II β* genes in the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)

LEI Lina^{1,2}, GAO Qian^{1,2*}, WANG Wei^{1,2}, SUN Zhaosheng^{1,2}, LUO Zhang³, LIU Qigen^{1,2}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Tianjin Key Lab of Aqua-ecology and Aquaculture, College of Fisheries,

Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

Abstract: To gain a deeper comprehension of the adaptive immune mechanism involved in disease prevention and control of *Lateolabrax maculatus*, this study employed RT-PCR and RACE techniques to clone the immunoglobulin M heavy chain (*IgMH*) and Major histocompatibility complex β (*MHC II β*). Additionally, real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was utilized to examine the expression distribution in different tissues of spotted sea bass, along with the alterations in mRNA levels following LPS, Poly (I: C) stimulation, and *Edwardsia tarda* infection. Finally, the expression of recombinant proteins *IgMH*, *IgMCH₁₋₂*, and *MHC II β* was achieved by constructing prokaryotic recombinant expression plasmids *IgMH*-pET21d, *IgMCH₁₋₂*-pET21d, and *MHC II β* -PET21d. The proteins were obtained through molecular sieve chromatography, and anti *IgMH* Polyclonal antibodies of *L. maculatus* were successfully prepared. The results indicated that the full length cDNA of *IgMH* and *MHC II β* in *L. maculatus* were 1 977 bp and 1 242 bp, respectively. The genes *IgMH* and *MHC II β* exhibit high expression in immune-related tissues, including gills, spleen, and head kidney. LPS and Poly (I:C) stimulation and delayed *Edwardsiella* artificially infected *L. maculatus* led to significant changes in the expression levels of these two genes in gill, spleen and head and kidney, indicating that both *IgMH* and *MHC II β* participated in the anti-infection immune response of *L. maculatus*. Additionally, immunoblotting analysis demonstrated that anti-*IgM* Polyclonal antibodies display strong reactivity with the entire serum of *L. maculatus*, weak reactivity with *Siniperca chuatsi*, and no reactivity with *Micropterus salmoides* and *Ctenopharyngodon delta*. It is speculated that the reaction intensity reflects the genetic relationship between species. In summary, this study successfully accomplished the cloning of the complete sequences of *IgMH* and *MHC II β* genes, followed by the expression of recombinant *IgMH* and *MHC II β* proteins. Additionally, the production of Anti-*IgM* polyclonal antibody was achieved. The findings of this study provided evidence supporting the involvement of *IgMH* and *MHC II β* in the immune response of *L. maculatus*. Furthermore, these results established a solid groundwork for future investigations on immune regulation and disease prevention and control strategies for *L. maculatus*.

Key words: *Lateolabrax maculatus*; *IgMH*; *MHC II β* ; expression regulation; protein purification

Corresponding author: GAO Qian. E-mail: qgao@shou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900605)