

DOI: 10.12264/JFSC2022-0195

青鲫 sIgZ 重链基因的克隆及对嗜水气单胞菌的免疫响应

夏虎¹, 杨品红¹, 张运生¹, 陈中元¹, 刘良国¹, 罗玉双¹, 肖丕清², 方秀¹,
孟诗雅¹, 路典敬³

1. 湖南文理学院生命与环境科学学院; 水生动物重要疫病分子免疫技术湖南省重点实验室, 微生物技术创新团队; 常德市农业生物大分子研究中心, 湖南 常德 415000;
2. 湖南湘云生物科技有限公司, 湖南 常德 415000;
3. 湖南省常德市安乡县农业农村局, 湖南 常德 415600

摘要: 免疫球蛋白是鱼类适应性免疫中主要的效应因子之一, 研究鱼类免疫球蛋白对鱼类疾病的免疫防控尤为重要。本研究利用 PCR 与 RACE 技术克隆获得青鲫(*Carassius auratus indigentia*)分泌型免疫球蛋白 Z (secretory immunoglobulin Z, sIgZ)重链基因 cDNA 全长序列 (基因序列登录号: MZ274344.1), 青鲫 sIgZ 重链基因 cDNA 序列全长 2083 bp, 其开放阅读框长 1668 bp, 编码一条由 556 个氨基酸组成的肽链, 相对分子质量为 61.59 kD, 理论等电点为 7.03。青鲫 sIgZ 重链基因结构由 1 个可变区(VH), 4 个恒定区(CH1-CH4)以及 1 个分泌型的尾部(secretory tail, Sec tail)构成。在 GenBank 中进行同源序列检索, 青鲫 sIgZ 氨基酸序列与其他鱼类 IgZ 的相似性依次为团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (63.17%)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) (60.82%)、鲤(*Cyprinus carpio carpio*) (52.98%)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (37.06%)和金头鲷(*Sparus aurata*) (35.01%)。利用 MEGA 5.1 软件进行多重序列比对分析, 采用邻接法构建遗传系统进化树, 发现青鲫 sIgZ 基因与同属鲤科(Cyprinidae)鱼类的 IgZ 聚为一支, 青鲫 sIgZ 与团头鲂的 sIgZ 亲缘关系最近。通过 qPCR 检测青鲫不同组织中 sIgZ 基因的表达, 发现青鲫头肾中 sIgZ 基因的表达量最高, 中肾、脾和肝脏次之。利用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对青鲫进行浸泡感染, sIgZ 在头肾、脾脏、中肾、肝、肠、鳃和皮肤中的表达水平在感染的 28 d 内先升高后降低, sIgZ 的相对表达量在黏膜免疫组织(肠和皮肤)中达到峰值的时间要早于系统免疫组织(头肾和脾脏), 肠和皮肤中 sIgZ 在峰值时的相对表达量显著高于头肾中 sIgZ 在峰值时的相对表达量, 实验结果显示, 青鲫 sIgZ 在肠和皮肤黏膜免疫组织中可能发挥重要的免疫功能。

关键词: 免疫球蛋白 Z; 黏膜免疫; 青鲫; 嗜水气单胞菌

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)10–1449–12

免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)是鱼类适应性免疫中体液免疫应答主要的效应分子之一, 在保护宿主免受病原体感染方面发挥着重要作用^[1-2]。免疫球蛋白由两条轻链(light chain, L)和两条重链(heavy chain, H)组成, 具有分泌型和膜结合型两种形式。膜结合型免疫球蛋白(membrane-bound

immunoglobulin, mIg)是 B 细胞膜表面的抗原受体, 在中和抗原过程中发挥重要作用, 分泌型免疫球蛋白(secretory immunoglobulin, sIg)主要存在于体液与血清中, 介导体液免疫应答。哺乳动物中存在 5 种免疫球蛋白, 分别为: IgG、IgE、IgA、IgD 和 IgM^[3]。鸟类具有 3 种免疫球蛋白(IgM、IgY

收稿日期: 2022-05-18; **修订日期:** 2022-06-24.

基金项目: 湖南省科技厅自然科学基金项目(2022JJ30033); 国家自然科学基金项目(32172965; 31972835).

作者简介: 夏虎(1986–), 副教授, 博士, 研究方向: 鱼类抗病育种与免疫学. E-mail: 867242290@qq.com

通信作者: 杨品红, 教授, 研究方向: 水产养殖. E-mail: yph588@163.com;

张运生, 副教授, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: yskaoyan@163.com

和 IgA)^[3-4]。长期以来在硬骨鱼类中认为仅有 IgM 和 IgD 两种类型的免疫球蛋白,然而 2005 年,在斑马鱼与虹鳟中分别发现了一种新的免疫球蛋白,被命名为 IgZ 或 IgT(IgZ/IgT)^[5-6]。随后,在其他硬骨鱼类中相继发现了 IgZ/IgT 基因,如草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)、河鲢(*Tetraodon lineatus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)及南亚野鲮(*Labeo rohita*)等^[7-11]。IgZ 重链恒定区(constant segment, C)基因位于 IgM 恒定区基因的上游,且 IgZ 重链基因具有特定的多变区(diversity segment, D)和连接区(joining segment, J),其高变区(variable segment, V)基因位于两个邻近的 D-J-C 簇的上游, V 基因与 IgZ 的 DJC 或者 IgM 的 DJC 基因组合形成 IgZ 或 IgM^[11]。大多数硬骨鱼类 IgZ 基因编码 4 个恒定区外显子和 2 个跨膜结构域外显子^[12]。然而,棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)和南极鱼 IgZ 包含 3 个恒定区,河鲢 IgZ 由 2 个恒定区组成^[10,13-15]。不同鱼类 IgZ/IgT 基因结构虽然不同,但是遗传系统进化树分析显示,这些 IgZ/IgT 基因聚为一支,有着相似的进化起源,被认为是同一种免疫球蛋白^[7]。

IgZ 是硬骨鱼类特有的一种免疫球蛋白,与哺乳动物 IgA 的作用类似,主要在黏膜免疫组织发挥免疫功能。IgT/IgZ 蛋白结构与功能的研究在虹鳟和斑马鱼中有过报道^[16-17]。到目前为止,在虹鳟中发现存在 3 种 IgT 亚型(IgT1、IgT2 和 IgT3),这 3 种 IgT 亚型包含 4 个恒定区结构域,在血清中均可检测到^[17-18]。IgT1 和 IgT3 同时具有膜结合型和分泌型,然而 IgT2 仅具有分泌型^[5]。虹鳟 IgT 在血清中以单体形式表达(约 180 kD),而在黏液中主要以非共价键链接形成多聚体(4~5 个单体),同时在黏液中还存在少量 IgT 单体^[19-20]。虹鳟黏液中 IgT 的浓度低于 IgM 的浓度,然而,黏液中 IgT/IgM 的比例高于血清中 IgT/IgM 的比例^[20]。小瓜虫感染虹鳟,病原特异性 IgT 滴度在黏膜组织的黏液中显著升高,然而 IgM 在血清中占绝对优势,血清中也可以检测到病原特异性 IgT 滴度,

但其水平低于黏膜免疫组织^[18-21]。IgT 缺失的鱼对黏膜寄生虫(小瓜虫)非常敏感,且 IgM 或 IgD 没有代偿性反应^[22]。IgT 在调控硬骨鱼类肠道微生物群的平衡中起着关键作用, IgT 短暂耗尽,鱼类肠黏膜免疫组织的微生物群严重失衡^[22]。斑马鱼中报道了两个 IgZ 亚型,其中 IgZ 存在于血清和鳃/皮肤黏液中,而 IgZ2 只存在于黏液中^[16]。鱼类 IgZ/IgT 对病原体感染的免疫应答可能并不局限于黏膜免疫组织^[23]。然而至今,在青鲫(*Carassius auratus indigenticus* subsp. nov.)中还没有关于 IgZ 基因的报道。

青鲫因其味道鲜美、肉质细嫩、营养丰富等特点而深受消费者喜爱。近些年随着青鲫养殖业的迅猛发展,在高密度集约化养殖模式大面积推广的同时,各种鱼病也频繁发生。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染导致的细菌性败血症是青鲫最常见的传染性疾病之一,其发病时间短和死亡率高,已成为青鲫养殖产业绿色发展的重要制约因素。青鲫感染嗜水气单胞菌后, IgZ 基因在免疫器官中的免疫应答尚不清楚。因此,本研究克隆获得青鲫 IgZ 基因 cDNA 全长并进行序列分析,与其他的物种进行同源性序列比对,构建遗传系统进化树;通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测青鲫 IgZ 基因在不同组织的表达;利用嗜水气单胞菌对青鲫进行浸泡感染,研究 IgZ 基因在免疫相关组织表达的变化规律,以期为青鲫的病害防控及抗感染机制的研究提供基础实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

青鲫(50 g±2 g)取自湖南文理学院安乡县尚军水产良种繁育场。在采样前,实验鱼暂养在实验室循环养殖系统两周,养殖过程中 24 h 充氧曝气,保持水中足够的溶氧,溶氧量为(6.5±0.2) mg/L,水温(26±2) °C,并投喂适量的成鱼浮性料。健康的实验用鱼经 MS-222 麻醉后先用注射器抽取血液,然后分别剖取头肾、脾脏、体肾、肝脏、鳃、肌肉、肠、皮肤、心脏等组织各 100 mg,在液氮中速冻后,保存于-80 °C 冰箱。

1.2 嗜水气单胞菌感染以及样品采集

取 300 尾青鲫分别暂养在两个容积约 6000 L 的循环水水族箱中, 水温约 26 ℃, 投喂青鲫成鱼浮性料, 每天 8:30 和 17:30 投喂 1 次, 达到饱食状态, 实验过程保持充足氧气。从湖南文理学院微生物实验室获得嗜水气单胞菌菌种, 挑取单克隆菌株并接种到 Luriabroth (LB) 液体培养基中, 28 ℃ 震荡培养过夜, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后, 用无菌 PBS 溶液稀释, 平板活菌计数法测定稀释后的菌液浓度, 并将菌液浓度稀释至 1.0×10^9 CFU/mL 备用。实验组设置 3 个重复组, 每组 30 尾青鲫同时浸泡在浓度为 1.0×10^9 CFU/mL 嗜水气单胞菌的养殖箱中, 浸泡 30 min 后, 将实验组的青鲫转入曝气的养殖桶。选取没有经过感染, 正常健康的青鲫作为对照组, 分别在 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 和 28 d 取样。每次取样, 分别从对照组和实验组取 5 尾鱼。每尾鱼经 MS-222 麻醉后立即取头肾、体肾、脾、肝脏、鳃、肠和皮肤组织各 100 mg, 并立即置于液氮中速冻, 然后保存于-80 ℃ 冰箱。

1.3 总 RNA 提取和反转录

采用 Simgen 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取青鲫头肾总 RNA, 利用核酸浓度测定仪检测

RNA 的浓度和纯度(OD_{260}/OD_{280})。电泳检测 RNA 的完整性, 选取条带清晰完整性好的 RNA 为模板, 利用 Simgen 反转录试剂盒进行反转录, 所得 cDNA 保存于-20 ℃ 备用。

1.4 sIgZ 基因全长 cDNA 序列的扩增

利用 Premier 5.0 软件, 根据 NCBI 中已知鲤科鱼类 IgZ 基因 cDNA 序列, 设计引物(sIgZ-F, sIgZ-R)。sIgZ 基因中间序列的扩增以青鲫头肾 cDNA 为模板, PCR 反应条件: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s, 54 ℃, 30 s, 72 ℃, 1 min, 循环 30 次; 72 ℃, 10 min, 4 ℃ 终止。将 PCR 产物回收纯化, 经链接、转化以及菌液 PCR 鉴定后, 送湖南擎科测序。

根据测序获得的青鲫 sIgZ 基因中间序列设计 5'和 3' RACE 引物, 以青鲫头肾总 RNA 为模板, 根据 RACE 试剂盒(TaKaRa, 日本)的操作说明, 扩增青鲫 sIgZ 两端序列。扩增条件为: 94 ℃, 5 min; 94, 30 s, 72 ℃, 3 min, 循环 5 次; 94 ℃, 30 s, 70 ℃, 30 s, 72 ℃, 3 min, 循环 5 次; 94 ℃, 30 s, 68 ℃, 30 s, 72 ℃, 3 min, 循环 25 次; 72 ℃ 延伸 8 min, 4 ℃ 终止。PCR 产物经回收纯化后与 lineraried pRACE 载体连接, 转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 株, 经选择培养基筛选及菌液 PCR 鉴定, 然后送湖南擎科测序(表 1)。将已获得的

表 1 青鲫 sIgZ 基因扩增引物
Tab. 1 Primers used to amplify the *Carassius auratus indigentiaus* subsp. nov. sIgZ gene

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')
中间片段引物 primers for partial cDNA fragments	
sIgZ-F	GGTGACAAATGTGATAGA
sIgZ-R	CATCACCGAGTTTAGGGC
RACE 引物 primers for RACE	
3' GSP	GATTACGCCAAGCTTTTAATAAAGGAGGTGAACAGAATCC
5' GSP	GATTACGCCAAGCTTCTGAGCCATTCTTCTCACTT
long primer	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
ORF 引物 primers for ORF	
sIgZ-OF	AACCATGATCTCTTCATC
sIgZ-OR	TAGTTCGGGAACGCTTGC
qPCR 引物 primers for real time PCR	
Z-qF	CTGATTCTGCTGGGTATG
Z-qR	TTCGCACTTGATGGTTT
ACTB-F	CACTTCCCTTGCTCCTTCCAC
ACTB-R	GAAGGGCCAGACTCATCGTACT

cDNA 片段进行拼接, 并进行序列分析与比对, 获得青鲫 sIgZ 基因全长 cDNA 序列, 设计青鲫 sIgZ 基因 ORF 引物对 sIgZ 基因序列进一步进行验证。

1.5 序列分析

利用 DNASTar 软件拼接获得青鲫 sIgZ 基因全长 cDNA 序列, 使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线软件 open reading frame finder 预测青鲫 sIgZ 基因氨基酸序列并寻找 ORF, 用 Blastn 工具在 GenBank 中检索 IgZ 基因同源序列。使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 对 IgZ 氨基酸结构域进行标注。多序列比对由软件 Clustal X 1.83 完成, 用软件 MEGA 5.1 构建遗传系统进化树(NJ 法, 1000 次)。

1.6 qPCR 检测青鲫 sIgZ 基因的表达

取青鲫各组织, 利用 Simgen 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 用除基因组反转录试剂盒(TaKaRa, 日本), 根据操作说明, 反转录得到 cDNA 模板。根据青鲫 sIgZ 基因 cDNA 序列设计 qPCR 引物(Z-qF 和 Z-qR), β -actin 基因为内参基因, 利用 qPCR 试剂盒(TaKaRa, 日本)检测青鲫不同组织中 sIgZ 基因的表达, qPCR 扩增条件为 95 °C, 5 min; 95 °C, 20 s, 56 °C, 20 s, 72 °C, 20 s,

循环 40 次; 72 °C, 8 min, 利用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算青鲫不同组织以及浸泡感染后不同时间点 sIgZ 基因的相对表达量。

1.7 数据分析

实验结果均采用平均值 $\pm$ 标准误进行表示。利用 SPSS 统计软件单因素方差分析 sIgZ 基因在青鲫不同组织以及感染后不同时间点的表达差异, 显著性水平均为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 青鲫 sIgZ 基因中间保守区 cDNA 序列的克隆

通过 PCR 扩增, 获得青鲫 IgZ 基因中间序列 514 bp (图 1)。在 NCBI 中通过 Blast 检索与同源性序列比对, 确定为青鲫 sIgZ 基因的部分序列。

2.2 RACE 技术扩增青鲫 sIgZ 基因两端序列

通过 RACE 与 PCR 技术获得青鲫 sIgZ 基因 5' 端 965 bp 及 3' 端 742 bp 的序列(图 1), 其中与保守区域有部分重叠, 通过 DNASTar 软件拼接获得青鲫 sIgZ 基因全长 cDNA 序列。根据拼接获得的青鲫 sIgZ 基因全长 cDNA 序列, 设计 sIgZ 基因 ORF 的特异性引物, 对 sIgZ 基因全长 cDNA 序列进一步进行验证, 获得 1671 bp 的片段, 经测序与序列比对, 该序列为青鲫 sIgZ 基因序列(图 1)。

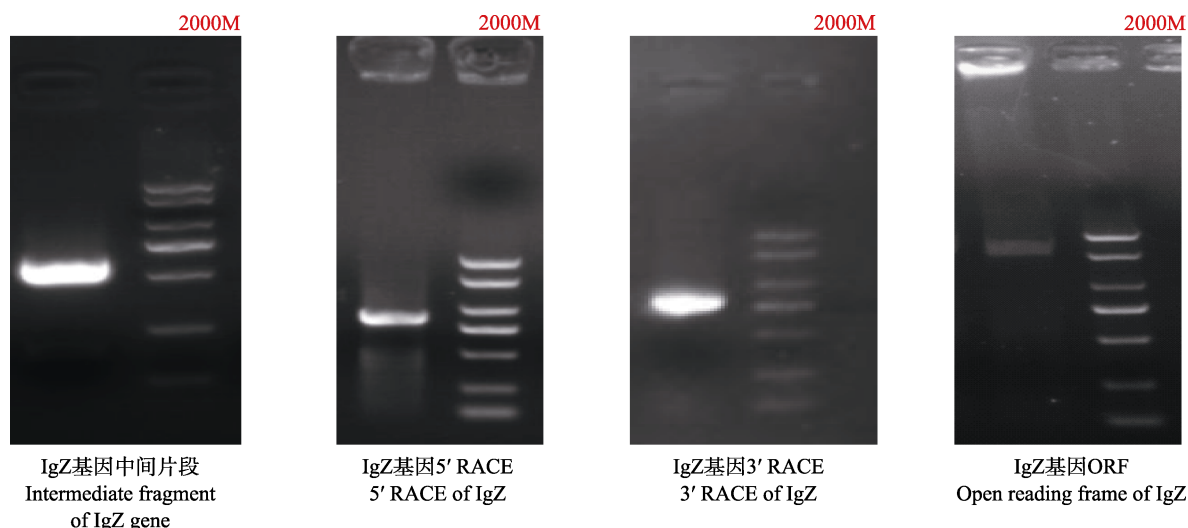


图 1 青鲫 sIgZ 基因全长 cDNA 序列的克隆

Fig. 1 Cloning of complete cDNA sequence of sIgZ gene in *Carassius auratus indigentia* subsp. nov.

2.3 青鲫 sIgZ 基因全长 cDNA 序列

青鲫免疫球蛋白 sIgZ 基因 cDNA 序列全长 2083 bp (GenBank 登录号: MZ274344.1), 5'非编

码区(UTR)长 17 bp, 3'非编码区长 395 bp, 其中包含一个终止密码子、多聚腺苷酸加尾信号和多聚 A 尾, 其开放阅读框长 1688 bp, 编码 556 个氨基

酸, 其 PI=7.03, 理论分子量为 61.59 kD (图 2)。

2.4 青鲫 sIgZ 多重序列比对分析

对青鲫 sIgZ 氨基酸序列进行分析, 青鲫 sIgZ 基因结构由 1 个可变区(VH), 4 个恒定区(CH1-CH4)以及 1 个分泌型的尾部(Sec tail)构成(图 2)。将青鲫 sIgZ 与团头鲂 IgZ、草鱼 IgZ 和虹鳟 IgT

进行氨基酸序列比对分析,发现在可变区和四个恒定区中分别存在两个保守的半胱氨酸(Cysteine, Cys),在 CH1 区与分泌型的尾部还存在 1 个额外的保守 Cys(图 3)。青鲫 IgZ 在 CH2 区存在两个氮糖基化位点,CH4 区与分泌型的尾部(Sec tail)分别存在 1 个氮糖基化位点(图 2)。

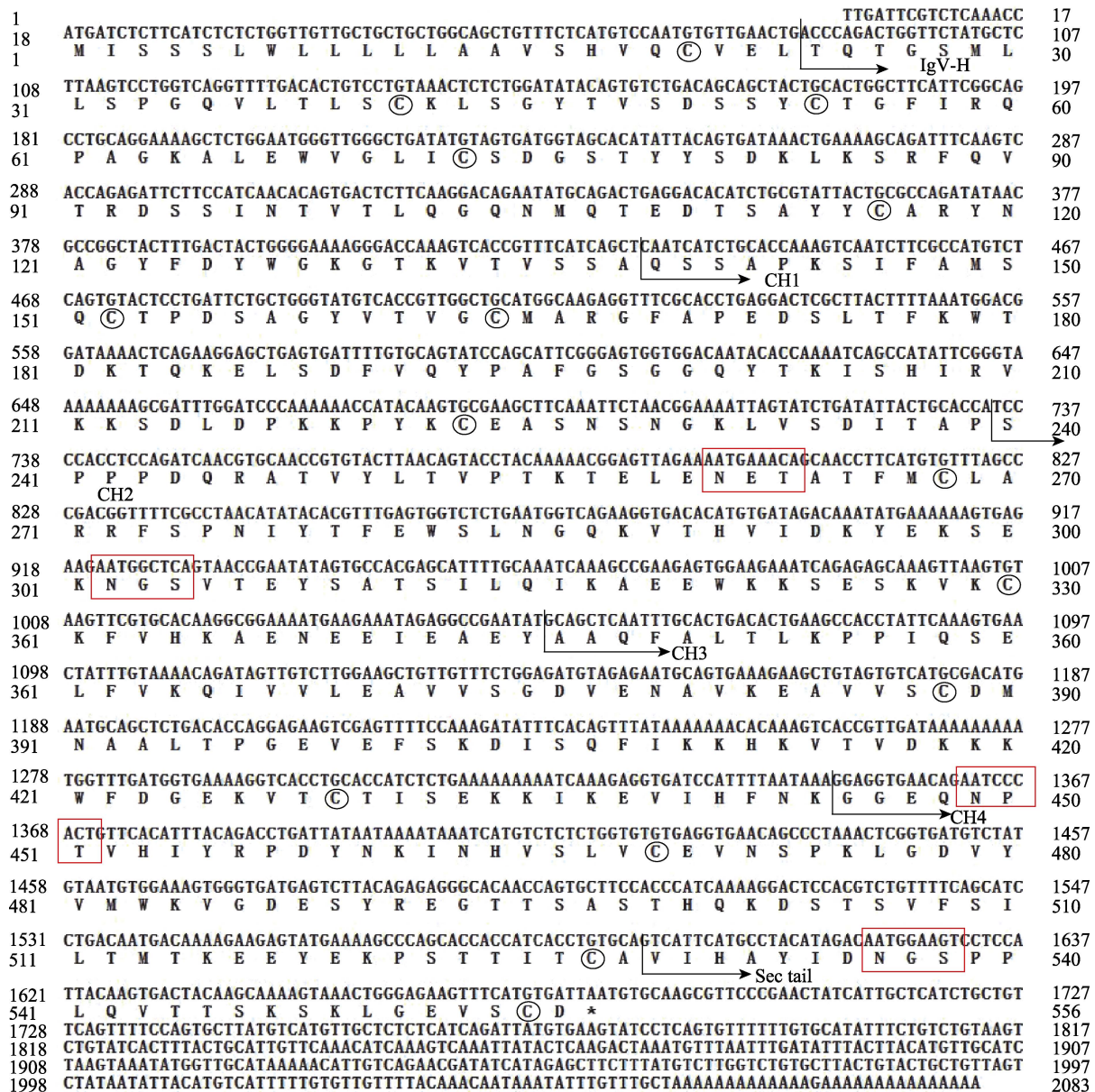


图2 青鲫 sIgZ 基因 cDNA 全长序列及推断的氨基酸序列(GenBank 登录号: MZ274344.1)

半胱氨酸以黑色的圆圈表示, 氮糖基化位点以红色的方框表示,

多聚腺苷酸加尾信号序列用黑色的下划线表示.

Fig. 2 The complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *slgZ* gene in *Carassius auratus indigenticus* subsp. Nov. (GenBank Accession No.: MZ274344.1)

Cysteine is represented by black circles, nitrogen glycosylation sites are represented by red boxes, and polyadenylate plus tail signal sequences are underlined in black.

2.5 青鲫 sIgZ 基因同源性分析

将预测的青鲫 sIgZ 氨基酸序列在 GenBank 中进行 Blast 同源性序列检索, 与其他鱼类 IgZ 进行比对分析, 其相似性依次为, 团头鲂(63.17%)、草鱼(60.82%)、鲤(52.98%)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (37.06%)和金头鲷(*Sparus aurata*)(35.01%) (表 2)。

表 2 青鲫 sIgZ 氨基酸序列与其鱼类 IgZ 的相似性
Tab. 2 Similarity between IgZ amino acid sequences of *Carassius auratus indigentia* subsp. nov. and other species

物种 species	相似度/% similarity value	基因序列登录号 GenBank accession number
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	63.17	AGR34024.1
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	60.82	ACV21056.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	52.98	QHW04710.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	37.06	AAW66979.1
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	35.01	ASK39430.1

2.6 青鲫 sIgZ 基因遗传系统进化树

将预测的青鲫 sIgZ 氨基酸序列与其他物种 IgZ 进行多重序列比对分析, 通过邻接法构建遗传系统进化树。青鲫 sIgZ 基因与同属鲤科鱼类的 IgZ 聚为一支, 青鲫 sIgZ 与团头鲂的 IgZ 亲源关系最近(图 4)。

2.7 青鲫不同组织 sIgZ 基因的表达及比较分析

青鲫 sIgZ 基因在脑中的表达量最低, 与脑中 sIgZ 基因的表达量比较, sIgZ 基因的相对表达量在头肾最高(58.75 倍, $P<0.01$), 在中肾(35.54 倍)、脾脏(28.71 倍)和肝脏(24.53 倍)中的相对表达量次之, 在肠(11.54 倍)、鳃(9.86 倍)、皮肤(6.56 倍)和性腺(3.34 倍)中的相对表达量较低(图 5)。

2.8 青鲫 sIgZ 基因对嗜水气单胞菌的免疫响应

利用嗜水气单胞菌对青鲫进行浸泡感染, 不

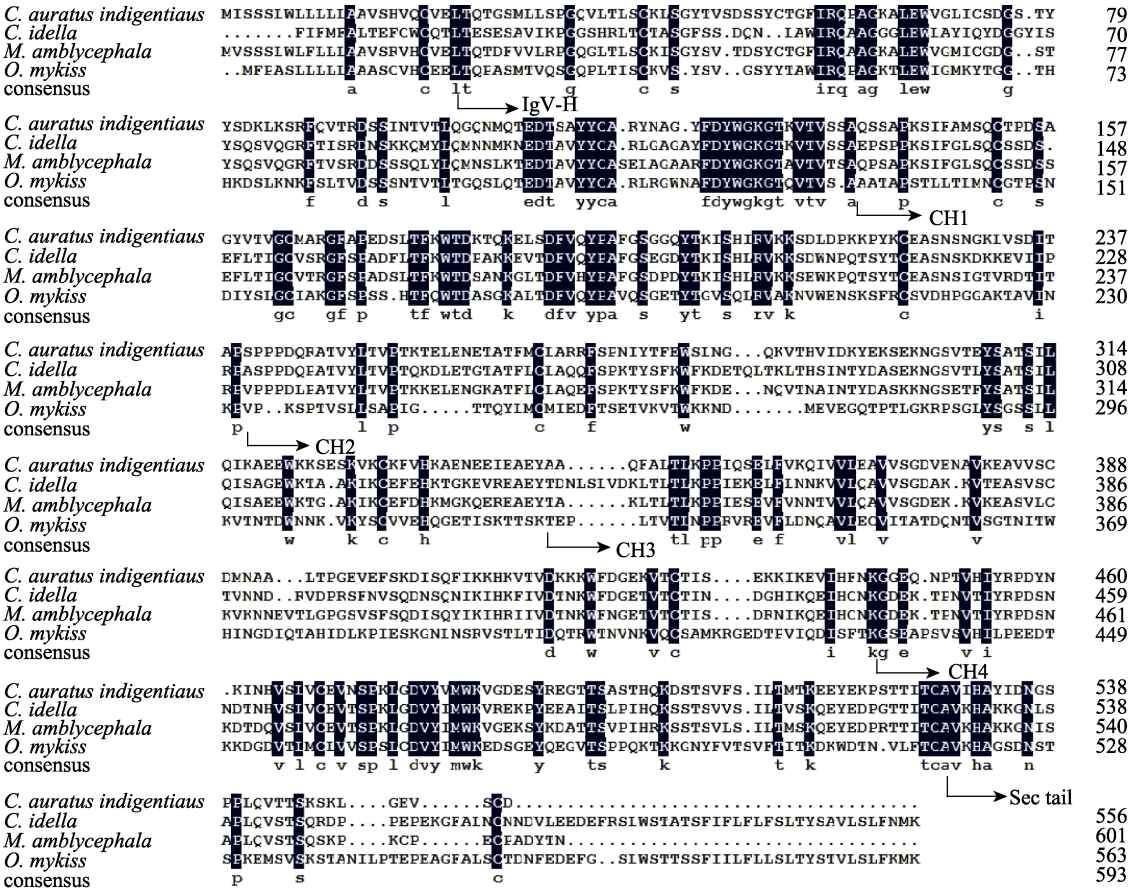


图 3 青鲫 sIgZ 氨基酸序列与其他鱼类 IgZ 的多重序列比对分析
蓝色部分为保守的相同氨基酸。
Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of sIgZ amino acid sequences of *Carassius auratus indigentia* subsp. nov. and other fishes
The same amino acids are conserved in blue.

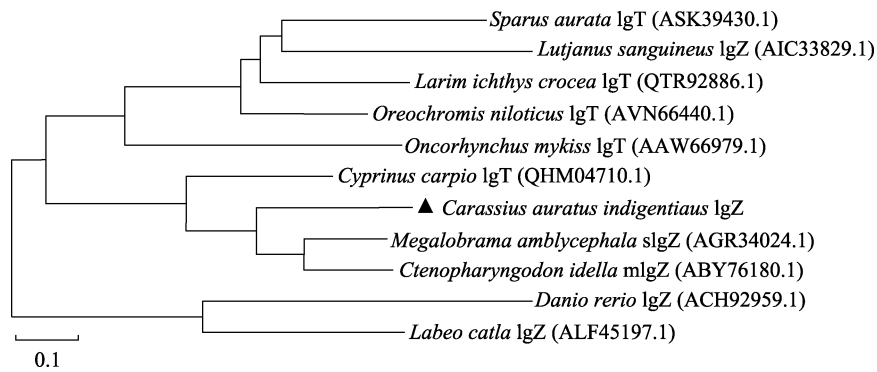


图 4 基于 IgZ 氨基酸序列构建不同鱼类的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic trees of different fishes based on IgZ amino acid sequences

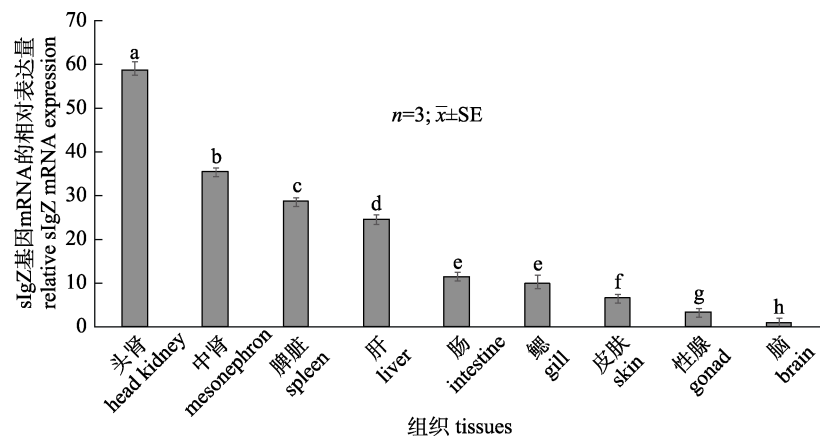


图 5 青鲫不同组织 sIgZ 基因的 mRNA 水平

不同的字母表示不同的组织之间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 5 The level of sIgZ mRNA in various tissues of *Carassius auratus indigentiaus* subsp. nov. Various letters above pillars indicated statistical significance ($P<0.05$).

同组织中 sIgZ 基因表达水平在感染的 28 d 先升高后降低(图 6)。皮肤和肠中 sIgZ 基因的表达水平在感染 3d 达到峰值, 鳃、脾和头肾在感染 5 d 达到最大值, 肝脏在感染 7 d 达到峰值, 中肾在感染 14 d 达到最大值。黏膜免疫组织(皮肤和肠) sIgZ 基因的表达水平达到峰值的时间(3 d)要早于头肾与脾脏(5 d), 同时达到峰值时的相对表达倍数也高于头肾。

头肾 sIgZ 基因的相对表达量在感染 1 d 显著升高(5.28 倍, $P<0.01$), 在感染 5 d 达到最大值(5.70 倍, $P<0.01$), 然后逐渐降低, 在感染 28 d 降至 1.78 倍。中肾 sIgZ 基因的相对表达量在感染 1 d 显著升高(1.66 倍, $P<0.01$), 在 14 d 达到峰值(3.81 倍, $P<0.01$), 在感染 21 d 后逐渐降低。肝脏 sIgZ 基因的相对表达量在感染 7 d 达到峰值(13.45 倍, $P<0.01$), 然后逐渐降低, 在 28 d 降至 3.21 倍

($P<0.01$)。脾脏 sIgZ 基因的相对表达量在感染 5 d 达到最大值, 是对照组的 13.36 倍($P<0.01$), 在感染 28 d 降至 1.72 倍, 但仍显著高于对照组。肠 sIgZ 基因的相对表达量在感染 3 d 达到峰值, 是对照组的 11.24 倍($P<0.01$), 在感染 5 d 后逐渐降低, 在 28 d 降至 1.60 倍($P<0.01$)。鳃 sIgZ 基因的相对表达量在感染 5d 达到最大值(5.82 倍, $P<0.01$), 在感染 7 d 后逐渐降低, 在 28 d 降至 1.16 倍。皮肤 sIgZ 基因的相对表达量在感染 3 d 达到峰值(8.56 倍, $P<0.01$), 在感染 5 d 后逐渐降低, 在 28 d 降至 1.89 倍($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 IgZ 基因的结构特征

硬骨鱼类免疫球蛋白重链(immunoglobulin heavy chain, IgH)基因座排列方式为 Vn-Dn-Jn-

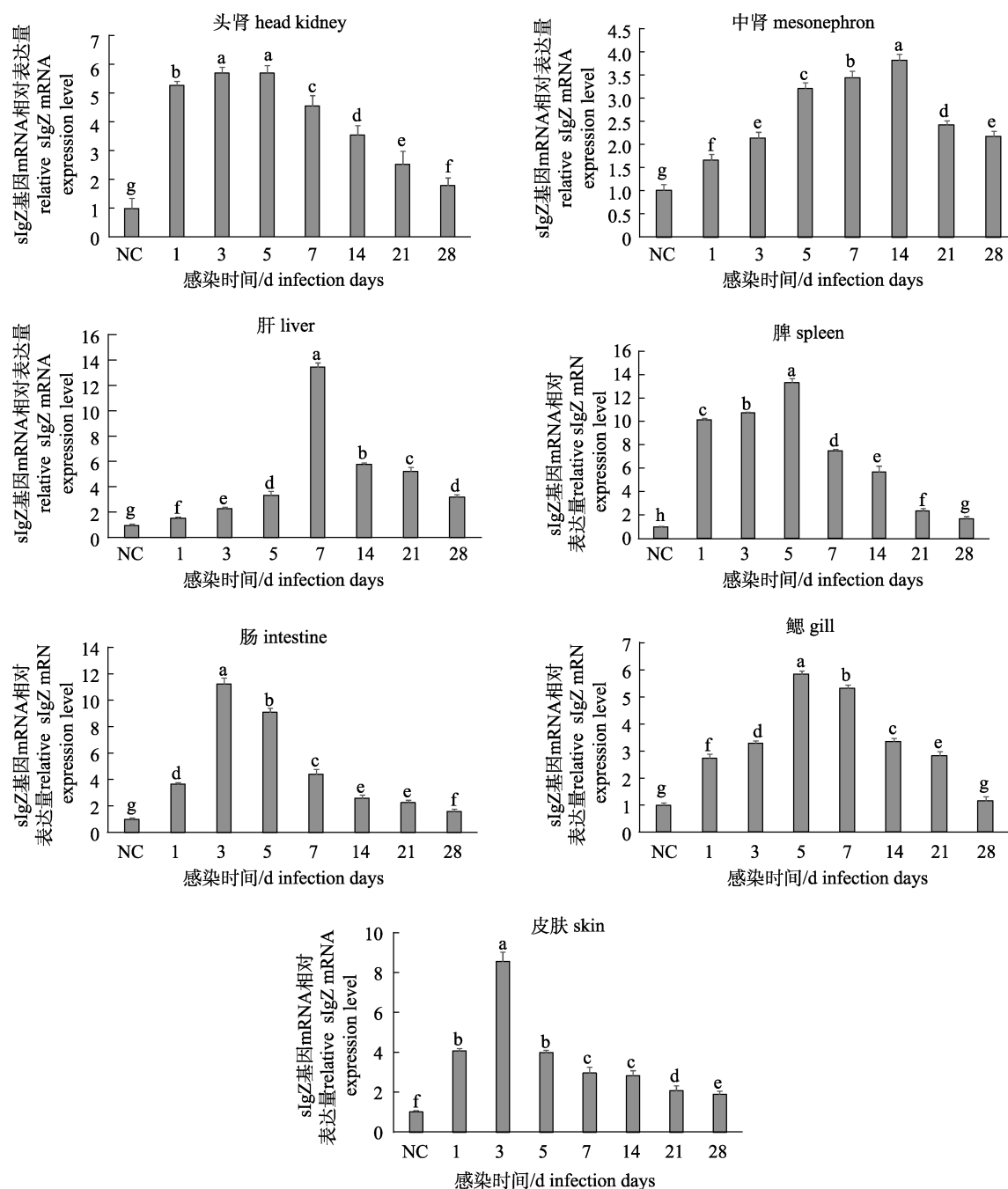


图 6 浸泡感染嗜水气单胞菌后青鲫不同组织中 sIgZ 基因的表达变化规律

NC 表示没有感染的对照组. $n = 3$; $\bar{x} \pm SE$.

Fig. 6 The changes of slgZ gene expression in various tissues of *Carassius auratus indigenticus* subsp.

Nov. after infection *Aeromonas hydrophila* by immersion

NC is a control group without infection. $n = 3$; $\bar{x} \pm SE$.

IGHZ-Dn-Jn-IGHM-IGHD^[5-6,10]。虽然 IgH 基因座排列方式比较保守, 但不同鱼类 IgZ 基因结构不同。团头鲂 sIgZ 基因编码四个恒定区, 棘鱼、香鱼和南极鱼 IgZ 包含 3 个恒定区, 河豚 IgZ 由 2 个恒定区组成^[4,10,13-15]。本研究首次在青鲫中克隆

获得 sIgZ 基因全长 cDNA 序列, 青鲫 sIgZ 基因由一个可变区(VH), 4 个恒定区(CH1-CH4)及分泌型的尾部(Sec tail)组成, 其基因结构为: VH-CH1-CH2-CH3-CH4-Sec tail, 不同鱼类 IgZ 基因结构不同可能导致功能上的差异。

哺乳动物多聚体 IgM 和 IgA 的分泌型尾部存在一段 $PX_3NXS/TL/VX_3E/DX_4CY$ 序列, 其中氮糖基化位点和倒数第二个半胱氨酸用于铰链区的聚合和多聚体的形成^[24-25]。团头鲂 sIgZ 的分泌型尾部具有一个氮糖基化位点和两个 Cys^[4]。青鲫 sIgZ 中发现存在 4 氮糖基化位点, 分别位于 261 位(NET)、302 位(NGS)、448 位(NPT)和 535 位(NGS), 分别位于 CH2、CH4 和分泌型尾部结构域。免疫球蛋白分子中的氮糖基化位点可能在稳定 Ig 的分子结构, 激活补体及识别受体过程中发挥重要作用。

斜带石斑鱼 sIgZ 每个恒定区都存在两个保守的 Cys 和色氨酸(Tryptophan, Try)^[11]。Cys 和 Try 相似, 在蛋白质形成三级结构及维持高级结构的稳定过程中扮演重要的角色^[26]。硬骨鱼类免疫球蛋白中保守的 Cys 用于形成链间与链内二硫键, 在虹鳟与斑马鱼 IgZ/IgT 中有过相关的报道^[16-17]。团头鲂 sIgZ 和 sIgM 在可变区及每个恒定区分别存在两个保守的 Cys, 用来形成链内二硫键^[4, 27]。青鲫 sIgZ 的结构与团头鲂 sIgZ 类似, 在可变区(V)、CH1、CH2、CH3 和 CH4 都存在 2 个保守的 Cys, 推测可能用于形成链内二硫键。然而, 青鲫 sIgZ 可变区第 54 位及第 73 位存在两个额外的 Cys, 这两个 Cys 可能与轻链中的 Cys 形成重链与轻链之间(H-L)的二硫键, CH1 区第 153 位及分泌型的尾部(Sec tail)第 555 位分别存在一个额外保守的 Cys, 可能介导重链与重链之间(H-H)二硫键的形成。

3.2 IgZ 基因的组织表达

头肾是硬骨鱼类的初级淋巴器官, 其形态结构与功能类似于哺乳动物的骨髓, 是产生抗体和免疫细胞的主要器官^[27]。脾脏是硬骨鱼类最大的次级淋巴器官, 具有产生淋巴细胞、储血和调节血量的功能。性成熟斑马鱼 IgZ1 主要在胸腺和头肾中表达, 而 IgZ2 在斑马鱼的初级淋巴器官和次级淋巴器官中都有表达^[28]。IgZ 基因在河豚和鳊脾脏、头肾和鳃中表达量较高^[9-10]。性成熟与性未熟团头鲂 sIgZ、sIgM 和 mIgD 主要在头肾、体肾和脾脏中表达^[4, 27, 29]。青鲫 sIgZ 表达水平在头肾中最高, 其次是体肾和脾脏, 表明头肾与脾脏

是鱼类产生 IgZ 的主要免疫器官, 然而, IgZ 在头肾中的作用机制还有待进一步研究。

口腔、鼻腔、皮肤、鳃和肠是鱼类的黏膜免疫器官, 已有研究报道硬骨鱼类 IgZ 与哺乳动物 IgA 的功能相似, 主要在黏膜免疫组织中发挥免疫作用^[18-22]。不同鱼类 IgZ 基因在不同组织的表达规律不同。鲤 IgZ2 在肠中的表达量高于 IgM 的表达量, 河豚 IgZ 在鳃上皮细胞有大量的表达, 性成熟与性未熟团头鲂 sIgZ 在肠和鳃中有较高的表达量^[4, 10, 30]。青鲫 sIgZ 主要在头肾、体肾和脾脏中表达, 然而, 在黏膜免疫组织肠、鳃和皮肤中也检测到了 sIgZ 基因的表达。青鲫 sIgZ 在不同组织蛋白水平的表达规律是否与 mRNA 水平检测结果一致, 还需进一步的研究。

3.3 IgZ 基因的免疫应答

鱼类 IgZ 对细菌、细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、病毒及寄生虫刺激, 都能产生免疫应答。对团头鲂进行腹腔注射感染嗜水气单胞菌, 体肾和脾脏中 sIgZ 基因 mRNA 在感染第 7 天达到最大值, 肝脏、鳃和肠中 sIgZ 基因 mRNA 在感染第 14 天达到峰值^[4]。鲈鱼感染诺达病毒, 鳃和脾脏中 IgZ 的表达显著增加^[31]。南亚野鲮感染鱼虱 12 h, IgZ 在头肾、皮肤和黏液中均表达上调^[32]。斑马鱼被 LPS 刺激后 12 h, IgZ-2 在大多数免疫组织中表达显著上调, 而 IgZ 仅在肾脏中被诱导表达^[28]。利用嗜水气单胞菌对青鲫进行浸泡感染, sIgZ 基因 mRNA 在头肾、体肾、肝脏、脾脏、肠、鳃和皮肤中的表达呈现出先升高后降低的趋势。不同的鱼类、不同的病原感染及感染方式不同, 可能导致 IgZ 在各免疫组织的免疫应答规律不同。

鱼类被病原感染后, IgZ 在系统免疫组织与黏膜免疫组织都能产生免疫响应。青鲫皮肤和肠黏膜免疫组织 sIgZ 基因的表达水平在感染嗜水气单胞菌 1 d 开始显著升高, 在感染 3 d 达到峰值, 头肾、脾脏和鳃中 sIgZ 基因在感染 5 d 达到最高水平, 肝脏与中肾 sIgZ 基因的表达水平分别在感染 7 d 和 14 d 达到最高水平, 表明特异性免疫应答激活是一个复杂的过程, 且在这个过程中免疫球蛋白可能起到识别抗原的作用。牙鲆经腹腔注射和浸泡接种迟缓爱德华氏菌, 在黏膜免疫组织与

系统免疫组织中 IgZ mRNA 水平均显著上调^[33]。鲤鱼接种鳃弧菌疫苗, 头肾中 IgZ:IgM 的比例显著降低, 而在肠黏膜免疫组织中则显著升高^[30]。鳊鱼接种灭活柱状黄杆菌, 单次注射组与加强注射组, IgZ 在不同时间点头肾、血、鳃中表达量均上调^[9]。青鲫感染嗜水气单胞菌后, 黏膜免疫组织(皮肤和肠) sIgZ 基因的表达水平达到峰值的时间要早于头肾与脾脏, 同时达到峰值时的相对表达倍数也高于头肾与脾脏, 推测青鲫 sIgZ 可能在皮肤和肠黏膜免疫组织中发挥重要的作用。然而, 目前由于缺乏青鲫 IgZ 抗体, 不同的病原感染及感染方式不同, IgZ 在蛋白水平的表达变化与功能还有待进一步的比较研究。

参考文献:

- [1] Fu Y W, Yao Z J, He M H, et al. Expression analysis and tissue localization of IgZ in the grouper *Epinephelus coioides* after *Vibrio alginolyticus* infection and vaccination[J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(10): 1647-1655.
- [2] Aoki T, Hikima J I, Hwang S D, et al. Innate immunity of finfish: Primordial conservation and function of viral RNA sensors in teleosts[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1689-1702.
- [3] Xia H, Liu L G, Yang P H, et al. Secretory immunoglobulin M (sIgM) heavy chain gene in *Siniperca kneri* Garman: Molecular characterization and expression analysis in response to *Aeromonas hydrophila* challenge[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(6): 2828-2839.
- [4] Xia H, Liu W J, Wu K, et al. sIgZ exhibited maternal transmission in embryonic development and played a prominent role in mucosal immune response of *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 107-117.
- [5] 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.
- [6] Hansen J D, Landis E D, Phillips R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(19): 6919-6924.
- [7] Dash P, Sahoo P K. Ontogeny, tissue distribution and expression analysis of IgZ in rohu, *Labeo rohita* in response to various stimuli[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015, 166(3-4): 70-78.
- [8] Xiao F S, Wang Y P, Yan W, et al. Ig heavy chain genes and their locus in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(4): 594-599.
- [9] Tian J Y, Sun B J, Luo Y P, et al. Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation[J]. Aquaculture, 2009, 288(1-2): 14-21.
- [10] Savan R, Aman A, Sato K, et al. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from Fugu[J]. European Journal of Immunology, 2005, 35(11): 3320-3331.
- [11] Huang B, Chen S N, Xu Z, et al. Molecular characterization of IgM, IgZ and IgD heavy chain genes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1000-1010. [黄贝, 陈善楠, 徐镇, 等. 斜带石斑鱼 IgM、IgZ 和 IgD 重链基因的克隆[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1000-1010.]
- [12] Salinas I, Fernández-Montero Á, Ding Y, et al. Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 121: 104079.
- [13] Gambón-Deza F, Sánchez-Espinel C, Magadán-Mompó S. Presence of an unique IgT on the IGH locus in three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) and the very recent generation of a repertoire of VH genes[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(2): 114-122.
- [14] Giacomelli S, Buonocore F, Albanese F, et al. New insights into evolution of IgT genes coming from Antarctic teleosts[J]. Marine Genomics, 2015, 24: 55-68.
- [15] Kato G, Takano T, Sakai T, et al. Cloning and expression analyses of a unique IgT in ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. Fisheries Science, 2015, 81(1): 29-36.
- [16] Ji J F, Hu C B, Shao T, et al. Differential immune responses of immunoglobulin Z subclass members in antibacterial immunity in a zebrafish model[J]. Immunology, 2021, 162(1): 105-120.
- [17] Parra D, Korytář T, Takizawa F, et al. B cells and their role in the teleost gut[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 64: 150-166.
- [18] Zhang Y A, Salinas I, Li J, et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity[J]. Nature Immunology, 2010, 11(9): 827-835.
- [19] Xu Z, Takizawa F, Parra D, et al. Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10728.
- [20] Kong W G, Yu Y Y, Dong S, et al. Pharyngeal immunity in early vertebrates provides functional and evolutionary insight into mucosal homeostasis[J]. Journal of Immunology (Balti-

- more, Md: 1950), 2019, 203(11): 3054-3067.
- [21] Yu Y Y, Kong W G, Xu H Y, et al. Convergent evolution of mucosal immune responses at the buccal cavity of teleost fish[J]. *iScience*, 2019, 19: 821-835.
- [22] Xu Z, Takizawa F, Casadei E, et al. Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution[J]. *Science Immunology*, 2020, 5(44): eaay3254.
- [23] Rombout J H W M, Yang G W, Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 634-643.
- [24] O'Connor S E, Imperiali B. Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation[J]. *Chemistry & Biology*, 1996, 3(10): 803-812.
- [25] Yoo E M, Coloma M J, Trinh K R, et al. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(47): 33771-33777.
- [26] Williams A F, Barclay A N. The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition[J]. *Annual Review of Immunology*, 1988, 6: 381-405.
- [27] Xia H, Wu K, Liu W J, et al. Molecular cloning and expression analysis of immunoglobulin M heavy chain gene of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 129-135.
- [28] Hu Y L, Xiang L X, Shao J Z. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: Implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates[J]. *Molecular Immunology*, 2010, 47(4): 738-746.
- [29] Xia H, Wu K, Liu W J, et al. Spatio-temporal expression of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) mIgD and its immune response to *Aeromonas hydrophila*[J]. *Central-European Journal of Immunology*, 2015, 40(2): 132-141.
- [30] Ryo S, Wijdeven R H M, Tyagi A, et al. Common carp have two subclasses of bonyfish specific antibody IgZ showing differential expression in response to infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(11): 1183-1190.
- [31] 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.
- [32] Kar B, Mohapatra A, Mohanty J, et al. Transcriptional changes in three immunoglobulin isotypes of rohu, *Labeo rohita* in response to *Argulus siamensis* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 28-33.
- [33] Du Y, Tang X Q, Zhan W B, et al. Immunoglobulin tau heavy chain (IgT) in flounder, *Paralichthys olivaceus*: Molecular cloning, characterization, and expression analyses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1571.

Secretory immunoglobulin Z heavy chain gene in *Carassius auratus indigentiaus*: Molecular cloning and immune response to *Aeromonas hydrophila* challenge

XIA Hu¹, YANG Pinhong¹, ZHANG Yunsheng¹, CHEN Zhongyuan¹, LIU Liangguo¹, LUO Yushuang¹,
XIAO Piqing², FANG Xiu¹, MENG Shiya¹, LU Dianjing³

1. Hunan Provincial Key Laboratory for Molecular Immunity Technology of Aquatic Animal Diseases; Microbial Technology Innovation Team, Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule; College of Life and Environment Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China;
2. Hunan Xiangyun Biology Science and Technology Co. Ltd., Changde 415000, China;
3. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Anxiang County, Changde 415600, China

Abstract: Immunoglobulin is one of the major effector factors in the adaptive immunity of fish. Thus, the study of immunoglobulin is crucial for the prevention and control of disease in fish. In this study, the complete cDNA sequence of secretory immunoglobulin Z heavy chain gene (GenBank accession no. MZ274344.1) of *Carassius auratus indigentiaus* was cloned by PCR and RACE. The complete cDNA sequence of *C. auratus indigentiaus* sIgZ heavy chain gene was 2083 bp, and its open reading frame (ORF) was 1668 bp, which encoded a peptide chain composed of 556 amino acids, with a relative molecular weight of 61.59 kD and theoretical isoelectric point of 7.03. The sIgZ heavy chain gene structure of *C. auratus indigentiaus* is composed of one variable region (V), four constant regions (CH1-CH4), and one secretory tail (Sec tail). According to the homologous sequence retrieval in GenBank, the similarity of sIgZ amino acid sequence between *C. auratus indigentiaus* and other fish was as follows: *Megalobrama amblycephala* (63.17%), *Ctenopharyngodon idellus* (60.82%), *Cyprinus carpio* (52.98%), *Oncorhynchus mykiss* (37.06%), and *Sparus aurata* (60.82%). Constructing a phylogenetic tree using the neighbor-joining method in MEGA 5.1, sIgZ of *C. auratus indigentiaus* was found to cluster into one branch with the IgZ of *Cypriniformes*, wherein the genetic evolution relationship between *C. auratus indigentiaus* and *M. amblycephala* was the closest. qPCR analysis revealed that *C. auratus indigentiaus* sIgZ gene expression was highest in the head kidney, followed by mesonephron, intestine, spleen, and gonad. After artificial infection with *Aeromonas hydrophila*, the *C. auratus indigentiaus* sIgZ mRNA levels first increased and then decreased in different tissues within 28 d. The relative expression levels of sIgZ in mucosal immune tissues (intestine and skin) peaked earlier than that in systemic immune tissue (head kidney and spleen), wherein the relative expression of sIgZ in the intestine and skin at peak was significantly higher than that in the head kidney. These results showed that sIgZ of *C. auratus indigentiaus* may play an important immune function in mucosal immune tissue (e.g., intestine and skin).

Key words: IgZ; mucosal immunity; *Carassius auratus indigentiaus*; *Aeromonas hydrophila*

Corresponding author: YANG Pinhong. E-mail: yph588@163.com