

葛 辉,林克冰,周 宸,等.10种免疫相关基因在斜带石斑鱼组织中的表达分析[J].渔业研究,2017,39(5):379–385.

10种免疫相关基因在斜带石斑鱼组织中的表达分析

葛 辉,林克冰*,周 宸,吴建绍,朱志煌,
陆 振,郑乐云,吴水清,林 琪,黄种特

(福建省水产研究所,福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室,福建 厦门 361013)

摘要:采用相对实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 技术,以 β -肌动蛋白 (β -actin) 的表达量作为内参,对健康养殖斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 不同组织 (头肾、心脏、肝脏、脾脏、鳃、肌肉、鳍、眼、肠道) 中的 10 种免疫相关基因:免疫球蛋白 (IgM)、CD4、MHCIIa、TCR β 、CD8a、MHCIa、ISP16、Mx、TNFR14、HSP90 的 mRNA 表达量进行了研究。结果显示,10 种免疫相关基因在斜带石斑鱼的 10 种组织中均有表达。其中体液免疫相关基因 [免疫球蛋白 (IgM)、CD4 和 MHCIIa] 在鳃中的表达量最高,在其他组织部位的表达量相对较少。细胞免疫相关基因 (TCR β 、CD8a 和 MHCIa) 也是在鳃中的表达量最高,在眼、肌肉、肝和肠的部位表达量相对较少。ISP16 在鳃和肝中的表达量较高,在肌肉和肠中的表达量较低。Mx 在鳃中的表达量较高,在肌肉和肠的表达量较低。TNFR14 在眼的表达量较高,在肠的表达量较低。HSP90 在鳃和肝中的表达量相对较高,在心和肌肉的表达量较低。

关键词:斜带石斑鱼;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR);免疫基因

中图分类号:S917.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-5601(2017)05-0379-07

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 属于鲷科 (Serranidae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 属广盐性鱼类。2014 年全国石斑鱼的产量为 88 130 t, 其中广东、海南和福建的产量分别为 36 138 t、24 783 t 和 24 676 t。随着石斑鱼养殖产量的急剧增加, 而养殖户缺乏科学的病害防治技术, 导致石斑鱼的病害问题日趋严重。对石斑鱼的疾病防治除了要保持良好的养殖水环境、合理的养殖密度和药物治疗外, 增强石斑鱼自身的免疫能力具有其独特的优越性。近年来, 学者们陆续开展了益生菌、拮抗蛋白等研究来提高石斑

鱼的免疫能力。因此, 开展石斑鱼的免疫学相关的基础研究具有很大的实践意义^[1-7]。

免疫 (Immunity) 是指机体对抗病原体引起疾病的能力, 免疫系统是防御和维护自身稳定的一个防卫系统。鱼类免疫系统包括免疫组织和器官、免疫细胞和体液免疫因子 3 大类。鱼类的免疫相关器官和组织主要包括胸腺、肾脏、脾脏和粘膜相关淋巴组织等^[8-9]。免疫球蛋白 (IgM)、CD4 和 MHCIIa 是体液免疫相关基因, TCR β 、CD8a 和 MHCIa 是细胞免疫相关基因, ISP16、Mx 和肿瘤坏死因子 (TNFR14) 是抗病毒通路相关蛋

收稿日期:2017-09-15

基金项目:厦门南方海洋研究中心项目 (14GZP75NE39); 产学研协同创新及科技合作项目 (3502Z20172001); 省属公益类科研院所基本科研专项 (2014R1003-11); 福建省海洋高新技术产业发展专项 (2014NO.21)。

作者简介:葛 辉 (1984-), 男, 助理研究员, 从事水产生物疾病研究。E-mail: gehuizlj@163.com

通讯作者:林克冰 (1964-), 女, 研究员, 从事海洋生物病害防治技术研究。E-mail: kebingl@sina.com

白, HSP90 是分子伴侣。免疫组织和细胞是鱼类防御系统的基础, 是鱼类抵御病原入侵的最初防线, 体液免疫因子作为免疫应答的效应分子对病原具有直接的防御作用^[10-11]。本研究应用相对定量 RT-PCR 技术对健康斜带石斑鱼的不同组织(头肾、心脏、肝脏、脾脏、鳃、肌肉、鳍、眼、肠道)中 10 种免疫相关基因[免疫球蛋白(IgM)、CD4、MHCIIa、TCR β 、CD8a、MHCIa、ISP16、Mx、TNFR14、HSP90]的 mRNA 表达水平进行研究, 希望在分子水平上为斜带石斑鱼的免疫学研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用斜带石斑鱼来源于漳州漳浦海区网箱养殖, 选择 20 尾体色正常、体质健壮、体表无损伤, 平均体重在 (80 \pm 3) g, 养殖周期相同的个体用于实验研究。采集时间为 2016 年 3 月 18 日。

1.2 试剂、耗材和仪器

无菌水; 0.9%生理盐水; 75%酒精; 无菌吸管; 解剖工具; 冻存管; qPCR 仪器, 匀浆机。

1.3 取样方法

在取样前, 将取回的斜带石斑鱼暂养在实验室, 暂养用水取自其养殖场。取样解剖前饥饿 24 h。从养殖箱中随机选取 10 尾石斑鱼, 解剖前测量体长、体重。先用无菌生理盐水冲洗实验用石斑鱼体表, 无菌条件下, 用灭菌剪刀剪开鱼体壁, 分别取出头肾、心脏、肝脏、脾脏、鳃、肌肉、鳍、眼、肠道, 置于 1.5 mL 冻存管内,

并立刻将其放入液氮中保存。

1.4 RNA 提取

将样品置于 1 mL Trizol 试剂 (Qiagen) 中, 并分别匀浆。按照 Trizol 试剂使用说明书, 从不同组织提取总 RNA, 并在 1.5% 变性琼脂糖凝胶上电泳以测试完整性。使用 Nanodrop ND-1000UV 分光光度计 (Nanodrop TM) 测定 RNA 的数量和质量 (Technologies, Wilmington, DE, USA)。

1.5 实时荧光定量核酸扩增反应 (qRT-PCR)

根据制造商的方案, 使用 QuantScript RT Kit (TIANGEN) 进行 cDNA 合成, 然后将 cDNA 储存在 -20℃ 下备用。三个重复的反应以总体积为 25 μ L 进行, 其中含有 12.5 μ L 2 \times SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (TaKaRa, Japan)、1.0 μ L cDNA 模板、0.8 μ L 10 μ mol \cdot L⁻¹ 每个正向和反向引物以及 9.9 μ L Milli-Q 水。

PCR 程序是: 95℃ 进行 5 min, 然后是 95℃ 持续 10 s、退火温度 58℃ 持续 20 s 和 72℃ 持续 30 s 的 40 个循环。在每次运行结束时, 对 PCR 产物进行熔解曲线分析 (60 ~ 95℃), 以确保单个产物被扩增。使用 cDNA 的稀释系列监测每个引物对的扩增效率。所有放大效率在 98% 和 101% 之间。用比较 Ct 法 2 ^{$\Delta\Delta$ Ct} 法计算靶基因的相对表达, 用 β -actin 标准化。采用 SPSS 20.0 对实验所得数据进行单因素方差分析和 Duncan 氏多重检验 ($P < 0.05$)。

使用 Primer Express 2.0 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 并从 Invitrogen 公司合成所有引物 (表 1)。

表 1 实验所用引物
Tab. 1 Primer sequences

基因 Gene		引物序列 Primer sequence(5'-3')
CD4	CD4 - F	TGGACTGATGGCAATGAAGTGA
	CD4 - R	GCAGCGGAGTGGATGGTTTC
CD8a	CD8a - F	GTAAAGGAAGGGCAGCGGAT
	CD8a - R	TGATGCTGAAAGATGCGATGAAT
HSP90	HSP90 - F	ACCCACTCCAACCGCATCTACAG
	HSP90 - R	AGGGGAGGAATCTCATCTGGGAC

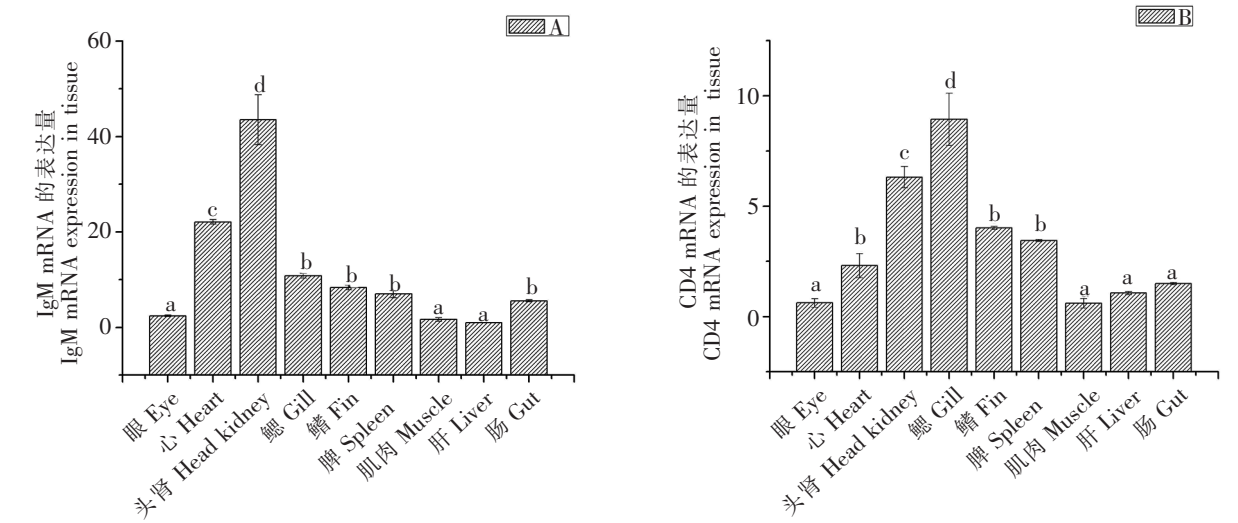
续表 1

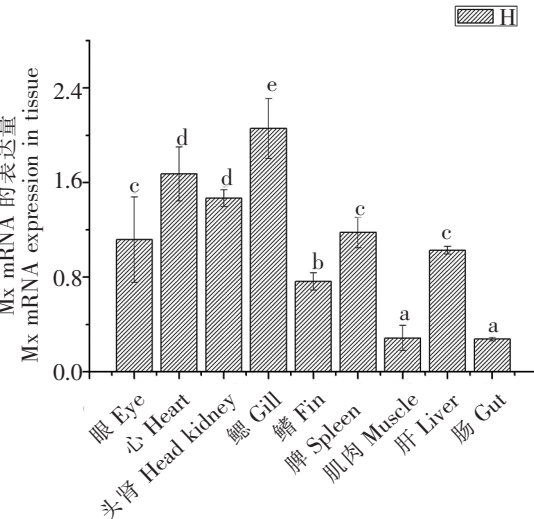
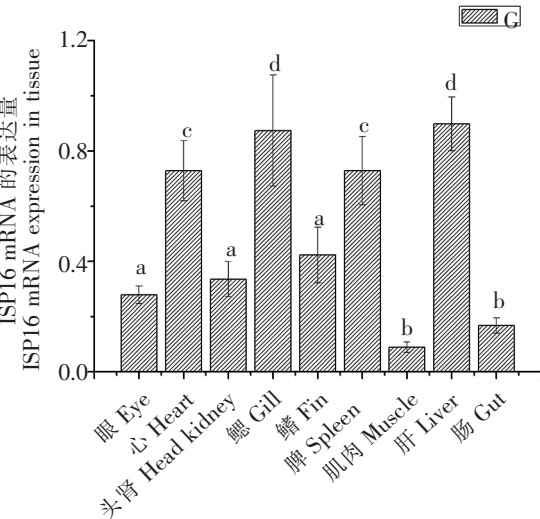
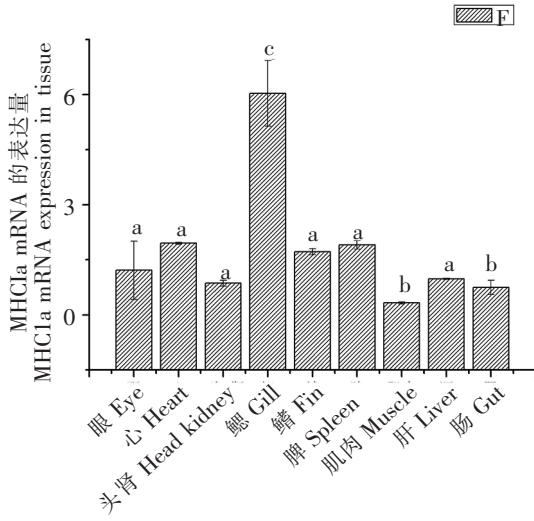
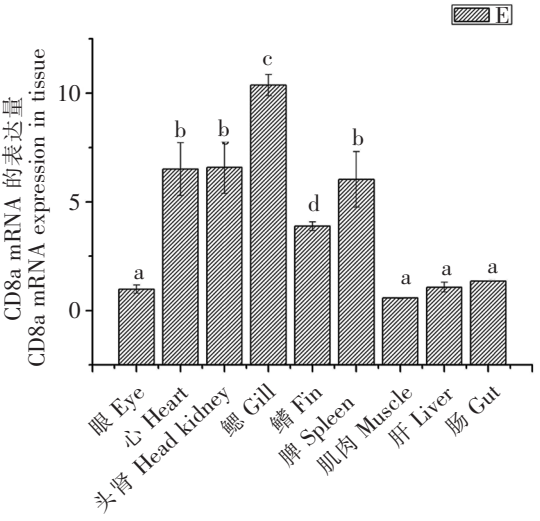
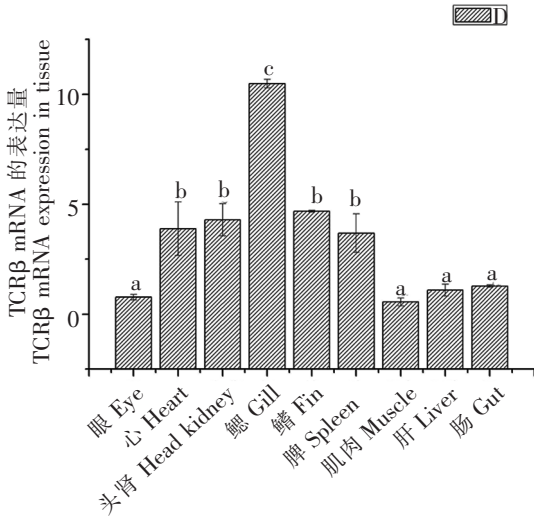
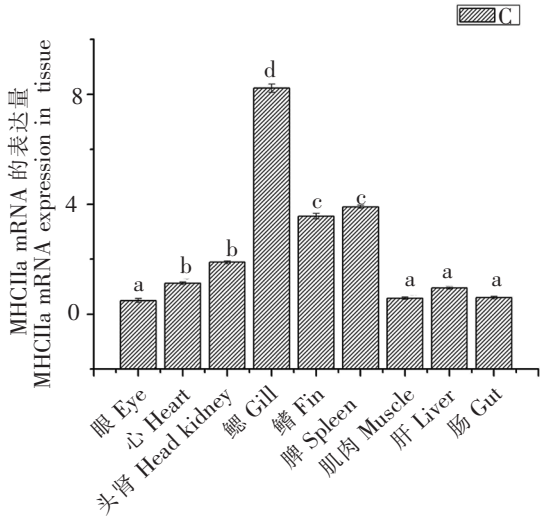
基因 Gene		引物序列
		Primer sequence(5' - 3')
IgM	IgM - F	GGAAAAGGACTGGAGTGGATTG
	IgM - R	GCTGTTGTCTGTGGAGATGGTG
β - actin	actin - F	GTCACAAACTGGGATGATATGGAG
	actin - R	TTGGCTTTAGGCTTGAGTGGGA
ISP16	ISP16 - F	CACAGTGGGCTCTCTGAAACAA
	ISP16 - R	TGAGTCTTCTGACCGTTCACAAA
MHCIIa	MHCIIa - F	TGAAGATGATGGTGGTCCTGGT
	MHCIIa - R	TCTCCTCACCATCCAGAGCGTA
MHCIa	MHCIa - F	CCTCGGCAATGACTCACTCTCT
	MHCIa - R	CAACCAACCCAACAACCACAAA
Mx	Mx - F	GTTTCATCACAAGACAAGAAACCATC
	Mx - R	CACCTCCTGTGCCATCTTCAAA
TCRβ	TCRβ - F	ACACAGTCTGGCTCCCGTTGAA
	TCRβ - R	GGGTCCCGCTCAGTGATTGG
TNFR14	TNFR14 - F	GGCTGTGCTGTCTGTAAAAGGA
	TNFR14 - R	CCGTGTGCCTGACTCTGTGTGTG

2 结果

如图 1 所示, 本文通过 qRT - PCR 技术分析 10 种体液、细胞和先天免疫相关的基因, 观察其在健康斜带石斑鱼不同组织中的免疫力。其中免疫球蛋白(IgM)、CD4 和 MHCIIa 在鳃中的表达量最高, 与其他组具有明显的统计学差异 ($P < 0.05$), 在其他组织部位的表达量相对较少。

TCR - β、CD8a 和 MHCIa 也是在鳃中的表达量最高, 在眼、肌肉、肝和肠的部位表达量相对较少。ISP16 在鳃和肝中的表达量较高, 在肌肉和肠中的表达量较低。Mx 在鳃中的表达量较高, 在肌肉和肠的表达量较低。TNFR14 在眼的表达量较高, 在肠的表达量较低。HSP90 在鳃和肝中的表达量相对较高, 在心和肌肉的表达量较低。





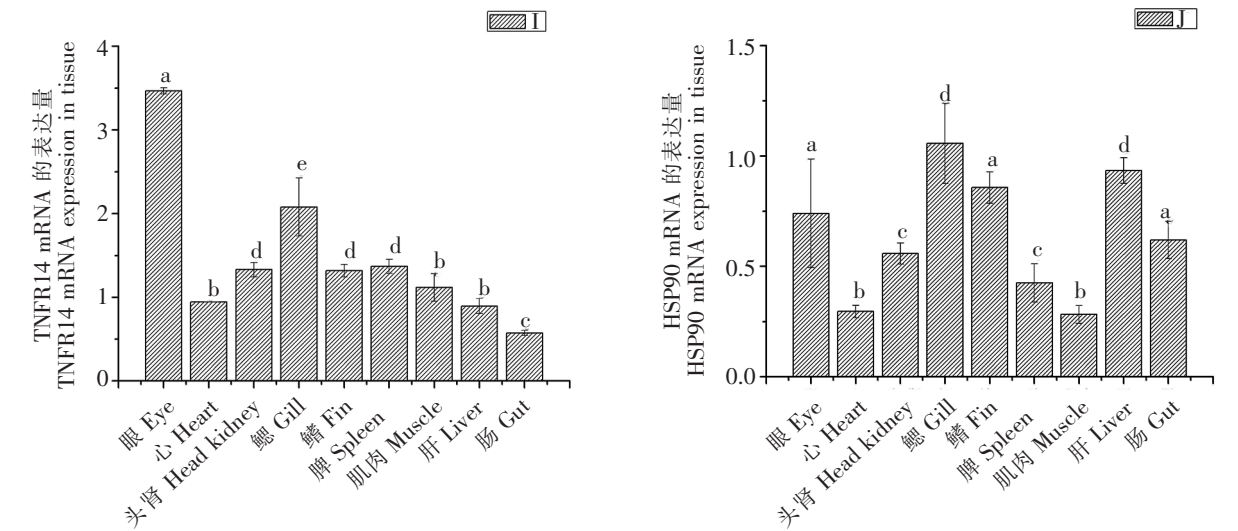


图 1 10 种免疫相关基因在斜带石斑鱼的不同组织的相对表达量

Fig.1 The quantification of 10 immune – related genes in different tissues of *Epinephelus coioides*

A: IgM mRNA; B: CD4 mRNA; C: MHCIIa mRNA; D: TCR β mRNA ; E: CD8a mRNA; F: MHCIa mRNA; G: ISPI6 mRNA ; H: Mx mRNA ; I: TNFR14 mRNA ; J: HSP90 mRNA

注：具有不同字母的值在 0.05 的显著性水平上表示显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Values with different letters represented significant difference at the significance level of 0.05 ($P < 0.05$).

3 讨论

近年来受养殖密度不断增大和水质污染的影响，斜带石斑鱼的病害明显增多。斜带石斑鱼病害的防治，除了需要良好的养殖环境和药物治疗外，还需要提高鱼体自身的免疫能力，特别对于与病毒相关的病害，更需要卓有成效的免疫防治。因此有必要进行与免疫相关的基础研究。目前对斜带石斑鱼的基础免疫学研究报道较少，所以本研究选用斜带石斑鱼为实验对象，分析了 10 种免疫相关基因的转录表达，结果发现体液免疫相关基因 [免疫球蛋白 (IgM)、CD4 和 MHCIIa] 的表达量在各组织中高低不一，在鳃中的表达量相对较高，在肌肉、肝和肠的表达量相对较低。这可能与鳃是斜带石斑鱼的呼吸器官，接触水环境较多有关，且鳃是血液丰富的部位，所以体液免疫相关基因在鳃中的表达量相对较高。CD4、MHCIIa 和某些免疫球蛋白通常用作体液免疫的标志物，IgM 是肿瘤免疫的直接指标^[12]。在本研究中，CD4、MHCIIa 和 IgM 在鳃、头肾和脾脏中均表现出大量的转录表达。当石斑鱼、鲈鱼和大西洋大比目鱼患有 β - 亚麻病

毒感染时，研究者发现 IgM 也大量表达^[13-15]。所以可根据 IgM 在石斑鱼抵抗病毒感染时会大量表达的现象来进行病害防御。鳃、头肾和脾脏是表达 IgM 的活跃组织。

与体液免疫相似，细胞免疫在宿主抗病毒反应中起到重要作用。TCR - β 是一种重要的 T 细胞标记，通常与 CD8/MHCIa 复合物配合以介导细胞毒性 T 淋巴细胞反应^[16-18]。曾有研究报道感染期间 TCR - β 、CD8a 和 MHCIa 的表达上调^[19-23]，表明这些分子可能在抗病毒免疫中起重要作用。因此，本研究观察到在鳃、头肾、脾脏和心中，TCR - β 、CD8a 和 MHCIa 的相对表达量较高，表明这几个部位可能是斜带石斑鱼抵抗病毒进行细胞免疫的主要器官。

通常，当脊椎动物遭受病毒感染时，干扰素信号通路首先被激活。在神经坏死病毒 (NNV) 感染斑马鱼的实验中，干扰素途径涉及急性 and 持续性感染^[24]。Mx 和 ISPI6 是表现出抗病毒活性的干扰素途径因子^[25-26]。在甜菜碱病毒感染几种鱼类过程中观察到 Mx 的 mRNA 表达量剧烈上调^[27]。此外，注射干扰素可以拯救感染神经坏死病毒 (NNV) 的鱼^[24]。在本研究中，ISPI6

在心、鳃、脾脏和肝脏中的相对表达量较高, Mx 在眼、心脏、头肾、鳃、脾脏和肝脏中的表达量较高, TNFR14 在眼和鳃中的表达量较高。表明当斜带石斑鱼遭受病毒感染时, 干扰素途径将会为这些组织器官提供保护。在斜带石斑鱼的应激过程中, 一些病毒会引起热休克反应, HSP90 通常参与应激诱导的细胞保护作用^[27]。在本研究中 HSP90 在多个组织中均有表达, 在眼、鳃、鳍、肝和肠的表达量相对较高。多个研究报道说明当宿主感染病毒时 HSP90 会大量表达, 表明 HSP90 在宿主体内抗病毒的重要作用^[28-29]。

参考文献:

- [1] 胡云凤. 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) IL-8 基因 cDNA 的克隆及组成型表达分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [2] 林超辉. 斜带石斑鱼的生物学特性及养殖技术 [J]. 北京水产, 2007, (5): 206-207.
- [3] 刘秀珍, 李家炳. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究 [J]. 热带海洋学报, 1994, 13 (1): 81-86.
- [4] Hansen N E. Plasma lysozyme - a measure of neutrophil turnover. An analytical review [J]. Ser Haematol, 1974, 7 (1): 1-87.
- [5] Harikrishnan R, Kim J S, Kim M C, et al. Molecular characterization, phylogeny, and expression pattern of c - type lysozyme in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31 (4): 588-594.
- [6] 林克冰, 葛辉, 林琪, 等. 斜带石斑鱼 TLR5S 基因结构及功能分析 [J]. 厦门大学学报 (自然版), 2013, 52 (1): 109-115.
- [7] 林克冰, 吴建绍, 黄兆斌, 等. 一株斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 病原菌的分离与鉴定 [J]. 福建水产, 2014, 36 (6): 419-427.
- [8] 李晓萌, 戴伟, 方珍珍, 等. 3 种非特异性免疫相关基因在点带石斑鱼组织中的 mRNA 表达分析 [J]. 天津农学院学报, 2015, (1): 1-5.
- [9] Murphy P M, Baggiolini M, Charo I F, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors [J]. Pharmacological Reviews, 2000, 52 (1): 145.
- [10] Lai Y X, Jin B L, Xu Y, et al. Immune responses of orange - spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus - like particles of betanodavirus produced in *Escherichia coli* [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2014, 157 (1-2): 87.
- [11] Liu W, Hsu C H, Chang C Y, et al. Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus - like particles [J]. Vaccine, 2006, 24 (37-39): 6282-6287.
- [12] Bowen D G, Walker C M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection [J]. Nature, 2005, 436 (7053): 946-952.
- [13] Wu M S, Chen C W, Lin C H, et al. Differential expression profiling of orange - spotted grouper larvae, *Epinephelus coioides* (Hamilton), that survived a betanodavirus outbreak [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35 (3): 215-225.
- [14] Scapigliati G, Buonocore F, Randelli E, et al. Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28 (2): 303-311.
- [15] Grove S, Johansen R, Reitan L J, et al. Quantitative investigation of antigen and immune response in nervous and lymphoid tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) challenged with nodavirus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21 (5): 525-539.
- [16] Nakanishi T, Aoyagi K, Xia C, et al. Specific cell - mediated immunity in fish [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 1999, 72 (1-2): 101-109.
- [17] Nakanishi T, Toda H, Shibasaki Y, et al. Cytotoxic T cells in teleost fish [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35 (12): 1317-1323.
- [18] Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25 (4): 326-340.
- [19] Somamoto T, Yoshiure Y, Sato A, et al. Expression profiles of TCR β and CD8 α mRNA correlate with virus - specific cell - mediated cytotoxic activity in gibel carp [J]. Virology, 2006, 348 (2): 370-377.
- [20] Utke K, Bergmann S, Lorenzen N, et al. Cell - mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22 (3): 182-96.

- [21] Boudinot P, Boubekeur S, Benmansour A. Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish [J]. *Journal of Immunology*, 2001, 167 (11): 6202 – 6209.
- [22] Landis E D, Purcell M K, Thorgaard G H, et al. Transcriptional profiling of MHC class I genes in rainbow trout infected with infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45 (6): 1646 – 1657.
- [23] Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2004, 233 (1 – 4): 1 – 14.
- [24] Lu M W, Chao Y M, Guo T C, et al. The interferon response is involved in nervous necrosis virus acute and persistent infection in zebrafish infection model [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45 (4): 1146 – 1152.
- [25] Chen Y M, Su Y L, Shie P S, et al. Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32 (7): 825 – 836.
- [26] Chin K C, Cresswell P. Viperin (cig5), an IFN – inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 (26): 15125 – 15130.
- [27] Sreedhar A S, Kalmúr E, Csermely P, et al. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance [J]. *Febs Letters*, 2004, 562 (1 – 3): 11 – 15.
- [28] Chase G, Deng T, Fodor E, et al. Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture [J]. *Virology*, 2008, 377 (2): 431 – 439.
- [29] Burch A D, Weller S K. Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Polymerase Requires the Mammalian Chaperone Hsp90 for Proper Localization to the Nucleus [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79 (16): 10740 – 10749.

mRNA expression of ten immune genes in tissues of *Epinephelus coioides*

GE Hui, LIN Keping*, ZHOU Chen, WU Jianshao, ZHU Zhihuang, LU Zhen, ZHENG Leyun, WU Shuiqing, LIN Qi, HUANG Zhongchi

(Key Laboratory of Cultivation and High – value Utilization of Marine Organisms in Fujian, Fisheries Research Institute of Fujian Province, Xiamen 361013, China)

Abstract: In this study, β – actin mRNA expression was used as the internal reference, the mRNA expression of ten immune genes [(IgM), CD4, MHCIIa, TCR β , CD8a, MHCIa, ISP16, Mx, TNFR14, HSP90] were analyzed in tissues (head kidney, heart, liver, spleen, gill, muscle, fin, eye and intestine) of *Epinephelus coioides* with quantitative Real – time PCR. The results showed that mRNA expressions of ten genes were observed in all of the above tissues. And the humoral immunity factors (IgM, CD4, MHCIa) showed a highest expression in the gill, cellular immunity factors (TCR – β , CD8a and MHCIa) also showed a higher expression in the gill and lower in the eyes, muscles, liver and intestine. The expression of ISP16 in gill and liver was higher, and lower in muscle and intestine. TNFR14 in the eye was higher and the expression level in the intestine was lower. The expression of HSP90 in the gills and liver was relatively high, while the expression of HSP90 was lower in the heart and muscle.

Key words: *Epinephelus coioides*; quantitative Real – time PCR; immune genes