

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180305001

http://www.yyxxjz.cn/

王双艳, 王磊, 陈张帆, 崔忠凯, 周茜, 陈松林. 半滑舌鳎多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 51-57

Wang SY, Wang L, Chen ZF, Cui ZK, Zhou Q, Chen SL. Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 51-57

半滑舌鳎多聚免疫球蛋白受体(pIgR) 基因的克隆和表达分析*

王双艳^{1,2} 王磊¹ 陈张帆¹ 崔忠凯¹ 周茜¹ 陈松林^{1①}

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究根据半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)基因组数据库中预测的多聚免疫球蛋白受体(Polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)序列, 通过PCR和RACE技术获得了半滑舌鳎pIgR基因cDNA, 全长为1419 bp, 开放阅读框(ORF)为1020 bp, 编码339个氨基酸, 5'UTR区域为109 bp, 3'UTR区域为290 bp。保守结构域分析显示, 半滑舌鳎pIgR蛋白包含1个信号肽, 2个免疫球蛋白功能域(Ig-like domain, ILD)和1个跨膜结构域。经蛋白序列同源比对和系统进化树分析, 发现半滑舌鳎pIgR与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)的pIgR亲缘关系最近。实时荧光定量PCR分析显示, pIgR基因在健康半滑舌鳎的不同组织中均有表达, 在鳃中表达较高, 在肌肉中表达最低。经哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)病原感染刺激后, pIgR基因在半滑舌鳎的5个组织(肝脏、脾脏、肾脏、肠和鳃)中均呈先上升后下降的趋势, 其中, 在脾脏和鳃中48 h达到最高值, 在肝脏、肾脏和肠中72 h达到峰值。与内脏组织不同的是, pIgR基因在皮肤中呈一直上升的趋势。上述结果表明, pIgR基因在半滑舌鳎抵御哈维氏弧菌的免疫应答中发挥重要作用。

关键词 半滑舌鳎; 多聚免疫球蛋白受体基因; 病原感染; 免疫应答

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0051-07

多聚免疫球蛋白受体 pIgR (Polymeric immunoglobulin receptor)是I型跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族的一员, 在动物黏膜相关淋巴组织中结合并介导分泌型抗体跨过上皮细胞进行转运, 经酶切后以复合物的形式分泌到黏膜表面, 抑制病原微生物的粘附和入侵, 在先天性免疫与获得性免疫中均具有重要

作用(Phalipon *et al.*, 2003; Kaetzel, 2005)。哺乳动物的pIgR蛋白包含5个免疫球蛋白功能域(Ig-like domains, ILD), 可以与二聚体IgA或者四聚体IgM结合, 两栖动物和鸟类的pIgR蛋白包含4个ILD, 分别与哺乳动物的第1、3、4和5个ILD同源(Piskurich *et al.*, 1995; Wieland *et al.*, 2004)。

* 国家自然科学基金项目(31530078)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山卓越人才培养项目(2017ASTCP-OS15)、现代农业产业技术体系(CARS-47-G03)和山东省泰山学者攀登计划专项共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31530078), Aoshan Excellent Talent Training Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-OS15), China Agricultural Research System (CARS-47-G03), and Taishan Scholar Climbing Project, Shandong, China]. 王双艳, E-mail: 190303624@qq.com

① 通讯作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-05, 收修改稿日期: 2018-03-30

目前,在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(Hamuro *et al*, 2007)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Rombout *et al*, 2008)、草鱼(*Ctenopharyodon idellus*)(张毅, 2016)、牙鲮(*Paralichthy solivaceus*)(Xu *et al*, 2013)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Feng *et al*, 2009)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Zhang *et al*, 2010)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(丁冰洁等, 2013)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(Wang *et al*, 2017)等硬骨鱼类中均克隆得到了 *pIgR* 基因。结构分析表明,硬骨鱼 *pIgR* 蛋白仅有 2 个 ILD, 分别与哺乳动物的 ILD1 和 ILD5 同源。因此,研究鱼类 *pIgR* 对于了解生物进化过程具有重要意义。鱼类 *pIgR* 也具有和哺乳动物 *pIgR* 类似的转运功能,显示了生物进化的严谨性和保守性。最新的研究发现,在硬骨鱼中存在一种新型的免疫球蛋白 IgT。对虹鳟的研究发现, *pIgR* 仅能与肠道 IgT 结合,而不能与血液 IgT 结合(Zhang *et al*, 2010),提示硬骨鱼 *pIgR* 的功能仍有很多未知之谜。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水经济养殖鱼类,由于其肉质鲜美滑嫩、营养价值高、生长快速等特点而深受人们喜爱。随着养殖数量的增多,病害的威胁也日趋严重,尤其是细菌引起的溃烂症、肠炎症最为严重,给养殖业带来了巨大的经济损失。同时,半滑舌鳎是一种底栖鱼类,腹部摩擦底面,特别容易受到损伤,在水环境中黏膜包被的皮肤、鳃、肠等是病原侵袭的主要部位,黏膜不仅仅是物理屏障,其局部黏膜的免疫应答对病原体的抵御更加重要。因此,对半滑舌鳎抗病分子机制的研究将会对其病害防治提供重要的理论基础。目前关于 *pIgR* 基因在半滑舌鳎的克隆及功能研究尚未见报道。

本研究对半滑舌鳎的 *pIgR* 基因进行全长 cDNA 克隆并初步分析其结构特征,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术(邢贺飞等, 2016)检测了该基因在半滑舌鳎不同组织中的表达模式和在哈维氏弧菌

(*Vibrio harveyi*)的刺激下不同组织的表达特征,从而为探究 *pIgR* 在半滑舌鳎的免疫应答中的作用机制、开发抗病相关分子标记提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

1.1.1 正常组织 本实验中所用的半滑舌鳎取自山东省海阳市黄海水产公司,18 月龄健康的半滑舌鳎体重为(104.9±4.6) g,全长为(25.8±1.3) cm,体宽为(6.8±0.2) cm。麻醉后,解剖分离肝、脾、肾、头肾、鳃、肠、肌肉、心脏、皮肤等组织,将组织样品迅速放入 RNA 保存液中,置于-20℃冰箱保存。

1.1.2 哈维氏弧菌感染及样品采集 根据半滑舌鳎的感染实验(Wei *et al*, 2017),将 10 月龄健康的半滑舌鳎经腹腔注射哈维氏弧菌感染,在感染后的 12、24、48、72 和 96 h 共 5 个时间点,并以感染前 0 h 作为对照,分别取 3 条半滑舌鳎。将活鱼麻醉后迅速取肝、脾、肠、肾、鳃和皮肤等 6 个免疫组织,放入 RNA 保存液中,置于-20℃冰箱中保存。

1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用 Trizol 法进行半滑舌鳎总 RNA 的提取,用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,并使用 Gene Quant Pro RNA/DNA 分光光度计测定 RNA 浓度。RNA 鉴定合格后,用 cDNA 反转试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。使用 TaKaRa RACE 试剂盒,根据其说明书合成 RACE-Ready-cDNA。

1.3 *pIgR* 基因全长 cDNA 的克隆

1.3.1 中间片段的验证 首先根据半滑舌鳎全基因组测序结果(Chen *et al*, 2014),获得 *pIgR* 基因的部分 cDNA 序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计引

表 1 本研究所用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>pIgR</i> -F	TGGCATTACCAACATCAAGG	验证中间片段
<i>pIgR</i> -R	TCTTGTTTGCGTATTTTCCAC	Verifying the internal fragment
<i>pIgR</i> -5'-GSP	TGATGGCGACTGAAGTGTCTCGTAGAT	
<i>pIgR</i> -5'-NGSP	CACTGTAGAGACATTCAGCCGT	克隆 5'和 3'末端
<i>pIgR</i> -3'-GSP	CGGTGGCAGCGCGTCTGTAC	Cloning the 5' and 3' ends
<i>pIgR</i> -3'-NGSP	CCTGGAACAGTTACGGTCACA	
<i>pIgR</i> -qRT-F	GAGAGATACAGAGACAGCGTGAAGA	定量 PCR
<i>pIgR</i> -qRT-R	GCGACTGAAGTGTCTCGTAGA	Real-time PCR
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	
β -actin -R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	

物(*pIgR-F/pIgR-R*)(表 1), 分别以肠、肾和鳃为模板进行体系为 15 μ l 的普通 PCR 扩增。体系为: Mix 为 7.5 μ l, *pIgR-F* 为 0.6 μ l, *pIgR-R* 为 0.6 μ l, ddH₂O 为 5.3 μ l, 模板 cDNA 为 1 μ l。程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 为 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 利用胶回收试剂盒(康为世纪)对所需的片段进行收集、纯化, 连接到 pEASY-T1 载体, 转化 Top10 感受态细胞, 涂板后经 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 挑取 3 个阳性克隆送到北京睿博兴科生物技术有限公司(青岛区)测序。

1.3.2 5'和 3' RACE 克隆 根据验证得到的部分 cDNA 序列设计 5'和 3'端的 RACE 引物(*pIgR-5'-GSP/pIgR-5'-NGSP* 和 *pIgR-3'-GSP/pIgR-3'-NGSP*)。第一轮反应体系 10 μ l, 根据 TaKaRa *TaqTM Hot Start Version* 说明书介绍的体系比例加样混合, 进行 Touch down PCR 程序反应。

将第一轮 PCR 反应产物稀释 50 倍后作为第二轮普通 PCR 扩增反应的模板。反应体系为 50 μ l, 同上按比例加样混合后, 进行第二轮普通 PCR 反应。将得到的 PCR 产物根据中间片段验证的方法处理并测序。

1.4 生物学分析及进化树构建

使用生物学软件 DNASTAR 对克隆得到的 *pIgR* 全

长 cDNA 序列进行分析, 预测其开放阅读框(ORF)以及氨基酸序列, 并推导出蛋白的分子量和等电点; 使用 SignalP4.1 对翻译的氨基酸序列进行信号肽分析, 利用 TMpred 预测氨基酸序列跨膜结构域。*pIgR* 基因同源氨基酸序列的搜索在 NCBI 数据库中通过 Blast 完成并预测功能结构域, 通过 MEGA 7.0 软件完成生物系统进化树构建和氨基酸多序列比对。

1.5 pIgR 基因的表达模式检测

通过使用 qRT-PCR 检测健康的半滑舌鳎不同组织中 *pIgR* 基因的表达量; 经哈维氏弧菌感染刺激后 6 个不同时间点的肝、肾、脾、肠、鳃和皮肤的表达模式。根据得到的 ORF 序列设计实时荧光定量引物(*pIgR-qRT-F/pIgR-qRT-R*), 再以 β -actin 基因(β -actin-F/ β -actin-R)(表 1)作为内参基因, 根据 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex *TaqTM* 说明书的方法进行 *pIgR* 基因的定量分析。根据测得的 *Ct* 值, 利用 2^{- $\Delta\Delta Ct$} 法计算 *pIgR* 基因相对表达量, 实验得到的数据均采用 SPSS 软件进行方差分析, 设定 *P*<0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鳎 pIgR 基因序列特征

半滑舌鳎 *pIgR* 基因的 cDNA 全长为 1419 bp, 其中, ORF 为 1020 bp, 编码 339 个氨基酸, 5' UTR 为

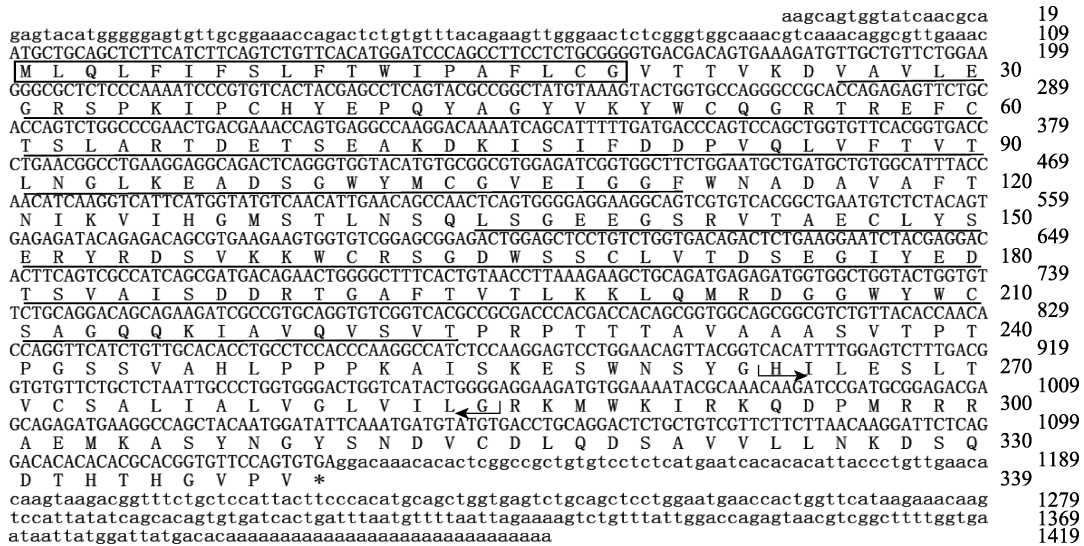


图 1 半滑舌鳎 *pIgR* 基因 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列
Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *C. semilaepis pIgR*

方框表示信号肽序列为 1~19 号氨基酸, 下划线表示 26~111 号和 135~224 号氨基酸的 2 个 ILD 功能结构域, 箭头区域表示跨膜结构域
The box indicates amino acid residues 1~19 in the signal peptide sequence, two ILD functional domains in amino acids 26~111 and 135~224 are underlined, the arrowhead indicates the transmembrane domain

109 bp, 3' UTR 为 290 bp, 相对分子质量为 37472.76 D, 理论等电点为 6.870。蛋白结构预测结果显示, 在 1~19 aa 之间存在 1 个信号肽序列, 之后为胞外区、跨膜区和胞内区, 分别由 263、22 和 54 个氨基酸组成。胞外区包括 2 个 ILD 功能结构域分别在 26~111 aa 和 135~224 aa 位置(图 1)。

2.2 系统进化树分析及氨基酸多序列比对

将半滑舌鳎 pIgR 的氨基酸序列通过蛋白序列比对在 NCBI 数据库中下载的其他物种: 大菱鲂(*S. maximus*, AGN54539.1)、牙鲆(*P. olivaceus*, ADK91435.1)、红鳍东方鲀(*T. rubripes*, NP_001266944.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, XP_010733629.2)、青鳉

(*Oryzias latipes*, XP_004079170.1)、虹鳟(*O. mykiss*, ADB81776.1)、鲤鱼(*C. carpio*, ADB97624.1)、草鱼(*C. idellus*, ALX37964.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_001289179.1)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, ABK62772.1)、原鸡(*Gallus gallus*, NP_001038109.1)、鼠(*Mus musculus*, NP_035212.2)、人(*Homo sapiens*, NP_002635.2)的 pIgR 蛋白序列进行分析。多序列氨基酸比对结果显示, 半滑舌鳎 pIgR 与其他硬骨鱼类都只含有 2 个 ILD 区, 分别对应哺乳类的 ILD1 和 ILD5, 哺乳类及鸟类在 ILD1 中存在 3 个互补决定区 (Complementary determining region, CDR), 而硬骨鱼类则没有相似序列(图 2)。系统进化树显示鱼类的 pIgR 聚为一支, 其中, 半滑舌鳎与大菱鲂和牙鲆聚

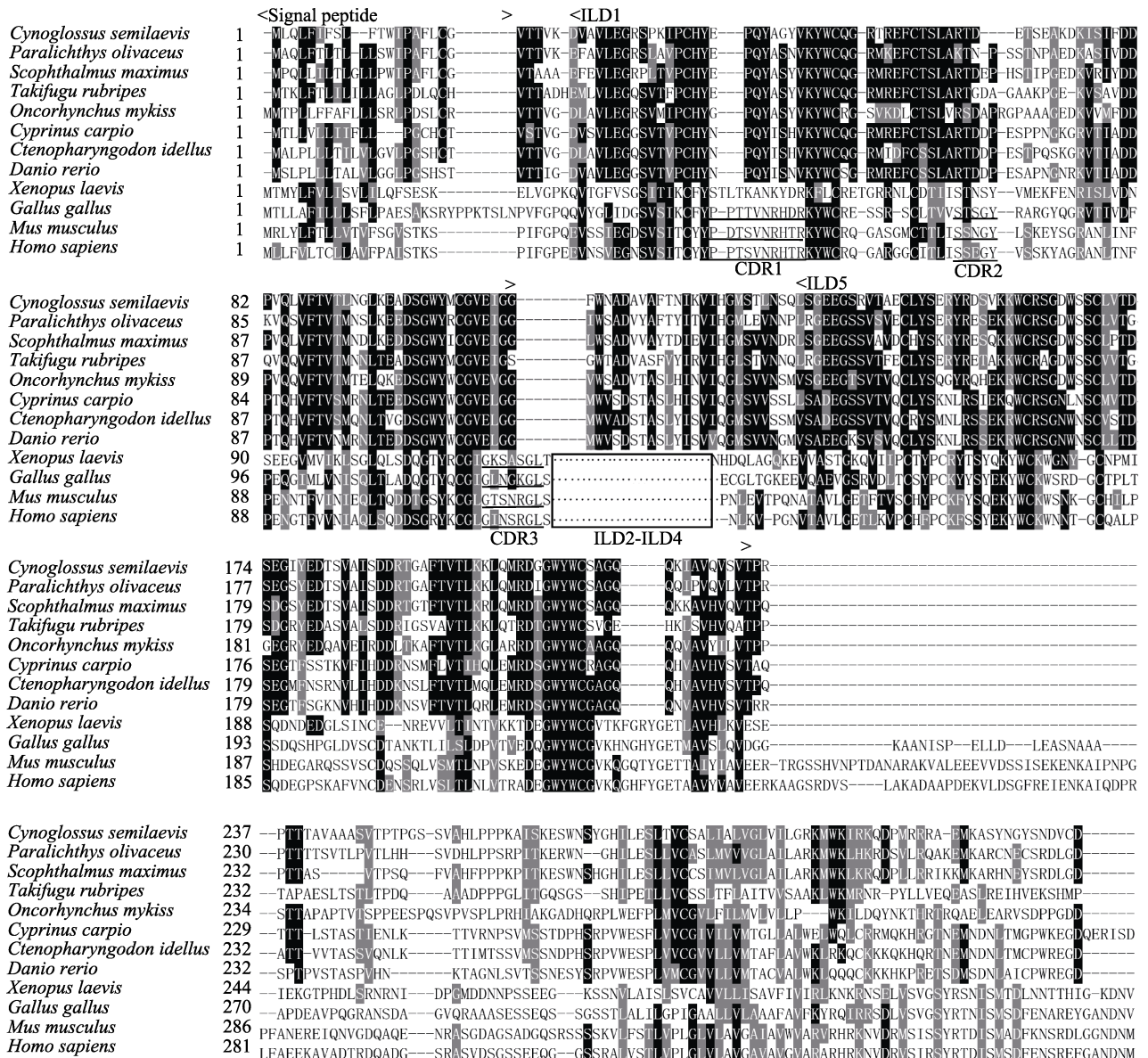


图 2 半滑舌鳎 pIgR 氨基酸多重序列比对结果

Fig.2 The multiple sequence alignment of the pIgR amino acid

为一个分支, 3 种淡水鱼(鲤鱼、草鱼和斑马鱼)聚为一个分支; 两栖类、鸟类和哺乳类聚为另一支(图 3)。

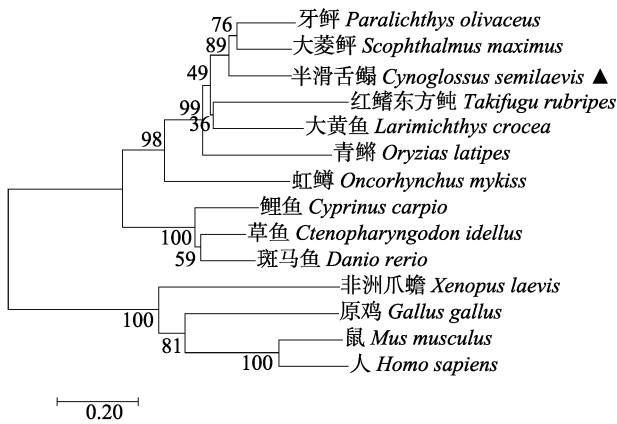


图 3 半滑舌鳎 pIgR 与其他物种 pIgR 系统进化分析
Fig.3 Phylogenetic analysis of *C. semilaevis* pIgR sequence with other pIgR sequences in fish, amphibians, birds, and mammals

2.3 半滑舌鳎 pIgR 基因的表达模式

2.3.1 pIgR 基因在各组织中的表达 健康组织表达结果显示, pIgR 基因在半滑舌鳎各个组织中均有表达, 在鳃中表达量最高, 其次是心脏、脾脏和皮肤, 在肝脏、头肾和肠中表达量较低, 在肌肉中的表达量最低(图 4)。

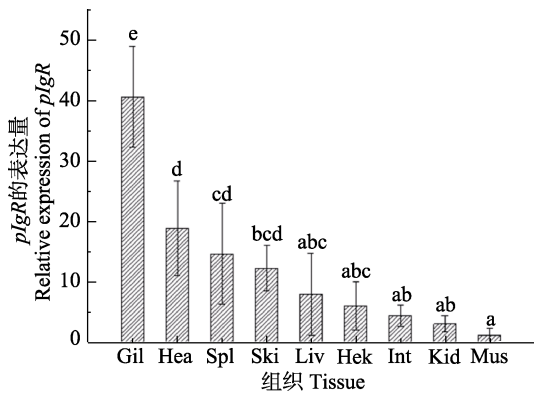


图 4 半滑舌鳎 pIgR 基因在不同组织的表达分布
Fig.4 pIgR gene of *C. semilaevis* expression profile in different tissues

图中“a, b, c, d, e”为 SPSS 软件中 Duncan 算法计算出的子集分组, 下同

Gil: 鳃; Hea: 心脏; Spl: 脾脏; Ski: 皮肤; Liv: 肝脏; Hek: 头肾; Int: 肠; Kid: 肾脏; Mus: 肌肉

The letters “a, b, c, d, e” were subsets by Duncan algorithm, the same as below

Gil: Gill; Hea: Heart; Spl: Spleen; Ski: Skin; Liv: Liver; Hek: Head Kidney; Int: Intestine; Kid: Kidney; Mus: Muscle

2.3.2 哈维氏弧菌感染后 pIgR 基因的表达量的变化

经哈维氏弧菌感染后, 半滑舌鳎内脏和鳃组织中 pIgR 基因的表达模式发生变化。各组织中 pIgR 基因的相对表达量均呈现先增加后减少的趋势, 其中, 鳃和脾脏在 48 h 时出现峰值; 肾脏、肝脏和肠在 72 h 时出现峰值; 皮肤在 96 h 内一直处于上升趋势(图 5)。

3 讨论

本研究通过 PCR 及 RACE 方法成功获得半滑舌鳎 pIgR 基因 cDNA 全长序列, 丰富了对半滑舌鳎免疫相关基因的认识。与硬骨鱼类 pIgR 基因的氨基酸序列进行同源比对分析, 表明 8 种硬骨鱼类都只含有 2 个 ILD, 分别与哺乳动物的 ILD1 和 ILD5 同源。哺乳动物 pIgR 与免疫球蛋白的结合实验证明 ILD1 是受体结合的必要结构(Kaetzel *et al*, 2005)。虽然已有研究证明, 硬骨鱼 pIgR 能够结合 IgM 和 IgT (Feng *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010), 但结合及转运的机制还需要进一步研究。另外, 研究证明, 斑马鱼存在多种 pIgR-like 基因, 在鲤鱼肠道中也发现一种具有 IgM 结合活性的 pIgR-like 蛋白(Kortum *et al*, 2014), 在半滑舌鳎中的研究有待继续开展。

组织表达模式分析发现, pIgR 基因在半滑舌鳎各个组织中均有表达, 其中, 在鳃中表达最高, 在心脏、脾脏和皮肤中表达稍高, 在肌肉中表达最低, 说明 pIgR 特异地在黏膜免疫相关组织中表达。心脏组织样品采集时充盈了血液, 因此 pIgR 表达量较高。本研究结果与牙鲆(Xu *et al*, 2013)、大菱鲆(丁冰洁等, 2013)、斜带石斑鱼(Feng *et al*, 2009)和红鳍东方鲀(Hamuro *et al*, 2007)等基本一致。已有研究证明, 硬骨鱼类 pIgR 基因对细菌和寄生虫的感染均有快速的响应模式。灭活鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)浸泡刺激后, 大菱鲆免疫组织中 pIgR 的相对表达量在 72 h 内均呈现先上升后下降的趋势, 且黏膜相关淋巴组织中的峰值出现最早(丁冰洁等, 2013)。白点虫感染泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的脾脏、肾脏、皮肤和鳃中 pIgR 的表达量均有显著升高(Yu *et al*, 2018)。本研究对哈维氏弧菌感染不同时间, 半滑舌鳎免疫相关组织中 pIgR 基因的表达变化规律进行了检测。在鳃和 4 种内脏组织中 pIgR 基因均呈现先增加后减少的趋势, 其中, 鳃和脾脏 pIgR 的表达量在 48 h 时出现峰值; 肾脏、肝脏和肠中 pIgR 的表达量在 72 h 时出现峰值。然而, 在皮肤中的 pIgR 的表达量在 96 h 内持续上升, 证明皮肤一直处于应答状态, 这可能是因为腹腔注射的哈维氏弧菌经血液循环及组织扩散到

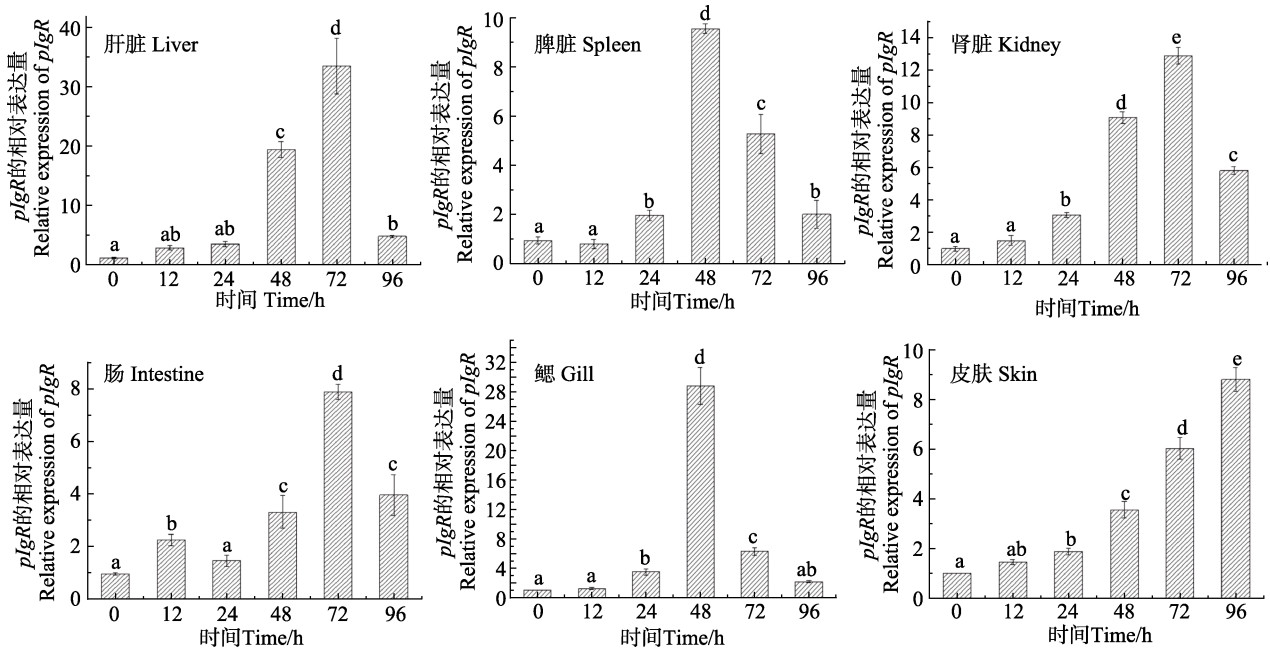


图5 哈维氏弧菌感染后半滑舌鲷 *pIgR* 在免疫组织中表达变化

Fig.5 The expression of *C. semilaevis pIgR* in immunologic tissues after *V. harveyi* infection

皮肤, 导致皮肤溃烂。因此, 皮肤中大量表达 *pIgR*, 发挥持久的免疫防御作用, 提示 *pIgR* 在黏膜免疫防御中发挥重要作用。

综上所述, 本研究对半滑舌鲷 *pIgR* 基因进行了 cDNA 全长克隆、进化分析及表达模式的研究, 尤其是对 *pIgR* 在黏膜免疫防御中的作用进行了深入分析, 为进一步研究 *pIgR* 在免疫应答中的作用机制提供了理论基础。

参 考 文 献

- Chen S, Zhang G, Shao C, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- Ding BJ, Sheng XZ, Tang XC, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the *pIgR* gene in *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 178(4): 792–801 [丁冰洁, 绳秀珍, 唐小千, 等. 大菱鲆多聚免疫球蛋白受体基因的克隆及表达分析. *中国水产科学*, 2013, 178(4): 792–801]
- Feng LN, Lu DQ, Bei JX, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(3): 282–289
- Hamuro K, Suetake H, Saha NR, *et al.* A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *Journal of Immunology*, 2007, 178(9): 5682–5689
- Kaetzl CS. The polymeric immunoglobulin receptor: Bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological Reviews*, 2005, 206(1): 83–99
- Kortum AN, Rodriguez-Nunez I, Yang J, *et al.* Differential expression and ligand binding indicate alternative functions for zebrafish polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) and a family of *pIgR*-like (PIGRL) proteins. *Immunogenetics*, 2014, 66(4): 267–279
- Phalipon A, Corthésy B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: Well beyond transport of immunoglobulins. *Trends in Immunology*, 2003, 24(2): 55–58
- Piskurich JF, Blanchard MH, Youngman KR, *et al.* Molecular cloning of the mouse polymeric Ig receptor: Functional regions of the molecule are conserved among five mammalian species. *Journal of Immunology*, 1995, 154(4): 1735
- Rombout JH, Sijpe VDT, Yang G, *et al.* Expression of the polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 620–628
- Wang L, Zhang J, Kong X, *et al.* Molecular characterization of polymeric immunoglobulin receptor and expression response to *Aeromonas hydrophila* challenge in *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 372–380
- Wei M, Xu WT, Li HL, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of a novel r-spondin member (*rspo21*) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 72: 436–442
- Wieland WH, Orzáez D, Lammers A, *et al.* A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochemical Journal*, 2004, 380(3): 669–676
- Xing HF, Gao FT, Zhang YZ, *et al.* Molecular cloning, expression and SNP Screening of natural resistance-

- associated macrophage protein (*Nramp*) gene cDNA from half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(4): 116–127 [邢贺飞, 高峰涛, 张永珍, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因克隆与表达分析及 SNP 筛选. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 116–127]
- Xu G, Zhan W, Ding B, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of polymeric immunoglobulin receptor in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 653–660
- Yu Y, Liu Y, Li H, *et al.* Polymeric immunoglobulin receptor in dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*): Molecular characterization and expression analysis in response to bacterial and parasitic challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 175–184
- Zhang Y. Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Gene cloning, expression analysis and binding activity with IgM. Doctoral Dissertation of Henan Normal University, 2016 [张毅. 草鱼 pIgR 基因克隆表达及与 IgM 结合活性的研究. 河南师范大学博士研究生学位论文, 2016]
- Zhang YA, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 827

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of the Polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) Gene in the Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WANG Shuangyan^{1,2}, WANG Lei¹, CHEN Zhangfan¹,
CUI Zhongkai¹, ZHOU Qian¹, CHEN Songlin^{1①}

(1. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In this study, the full-length cDNA sequence of the polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) gene of the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) was obtained on the basis of its predicted sequence. The cDNA sequence was 1419 bp and included an open reading frame (1020 bp, encoding 339 amino acids), a 5'-UTR region (109 bp), and a 3'-UTR region (290 bp). Conserved domain analysis revealed that the pIgR protein of the half-smooth tongue sole contained one signal peptide, two immunoglobulin-like domains, and one transmembrane domain. According to the protein sequence homology alignment and phylogenetic tree analysis, the *pIgR* sequence of the half-smooth tongue sole had high similarity with the turbot (*Scophthalmus maximus*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) pIgR sequences. Real-time PCR analysis of *pIgR* expression in different tissues of healthy half-smooth tongue sole showed that the highest expression was in the gill and the lowest expression in muscles. After pathogen challenge with *Vibrio harveyi*, *pIgR* expression initially increased and then decreased in five tissues (liver, spleen, kidney, intestine, and gill) of the half-smooth tongue sole, with the peak time point being at 48 h in the spleen and gill, and 72 h in the liver, kidney, and intestine. Unlike in the internal organs, *pIgR* expression in the skin was continually upregulated. These results indicate that *pIgR* is involved in the immune response of the half-smooth tongue sole toward bacterial pathogens, and this finding may contribute to the discovery of an antibacterial gene marker.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene; Pathogen challenge; Immune response

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn