

文章编号: 1674-5566(2024)06-1299-14

DOI: 10.12024/jsou.20240304466

半滑舌鲷 *vstm2a* 基因的响应细菌感染的表达模式和功能

林梦娇^{1,2,3}, 陈亚东^{1,2,3}, 刘洋^{2,3}, 王磊^{2,3}, 张天时^{2,3}, 史萌^{2,3,4}, 陈松林^{2,3}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237; 4. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 为了探究半滑舌鲷 *vstm2a* 基因响应细菌感染的表达特征和其蛋白功能, 采用实时荧光定量 (RT-qPCR) 检测哈维氏弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌感染半滑舌鲷后免疫组织 (鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏) 中 *vstm2a* 的相对表达特征; 构建 *vstm2a* 基因原核表达重组质粒, 获得重组蛋白, 采用牛津杯法、细菌蛋白结合实验和 siRNA 沉默等, 探究 *vstm2a* 蛋白在细菌入侵中的功能。结果显示: *vstm2a* 蛋白具有跨膜结构域和 Ig 结构域, 在细胞表面行使功能; 相关免疫组织中的 *vstm2a* 基因的表达量在哈维氏弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌感染半滑舌鲷后 6 h、48 h 和 72 h 显著升高; *vstm2a* 重组蛋白与细菌孵育后, 经过低速离心与细菌共同沉淀; 抑菌实验显示其显著抑制细菌的生长, 并且 siRNA 降低 *vstm2a* 基因后, 抑制了细胞因子 *IL-6* 和 *IL-10* 等基因的表达。证明了 *vstm2a* 蛋白响应细菌入侵, 可以识别和结合细菌, 通过抑制细菌生长和激活促炎症细胞因子, 对病原菌的感染起到免疫防御作用, 是一种重要的免疫蛋白。本研究有助于解析细菌黏附细胞或鱼体抵抗细菌入侵的机制, 为未来采用分子手段选育抗性品种提供一定的理论基础。

关键词: 半滑舌鲷; 免疫; *vstm2a*; 跨膜蛋白; 细菌结合

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 是一种暖温型底栖鱼类, 其肉质细腻、味道鲜美, 极受消费者欢迎, 市场价值很高^[1]。近年来, 随着水产养殖业的迅猛发展, 半滑舌鲷养殖产量逐步提升, 但由于养殖规模扩大和种质原因导致的细菌性感染问题也随之显现, 严重威胁着半滑舌鲷养殖业的健康发展^[2], 常见的致病性菌主要包括: 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 等, 除半滑舌鲷外, 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、和牙鲆 (*Paralichthys*

olivaceus) 等均为弧菌属细菌的易感宿主^[3-4]。

细菌入侵鱼体后, 最直接的影响便是弧菌与宿主接触^[4]。细菌感染至合适的宿主后, 必须黏附并定居在宿主的细胞或者组织上, 才能引起病原菌的内转和入侵, 进而导致如鳃出血、皮肤溃疡及炎症等病症。细菌主要通过黏附素来介导黏附, 有研究报道弧菌可以产生 3 种类型的黏附素: 与菌体细胞壁脂多糖 LPS 有关的黏附素、金属性胞外蛋白酶以及外膜蛋白^[5]。脂多糖也是病原菌的主要致病因子, 参与细菌对宿主细胞的黏附、侵袭和在细胞间扩散的过程^[6]。鞭毛蛋白可参与霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的黏附作用, 以及创伤弧菌在致病过程中的菌体远距离黏附。另

收稿日期: 2024-03-26 修回日期: 2024-05-20

基金项目: 山东省重点研发计划 (2021LZGC028); 山东省重点研发计划住鲁院士团队支持项目 (2023ZLYS02); 国家重点研发计划 (2022YFF1000303); 国家海水鱼产业技术体系半滑舌鲷岗位项目 (CARS-47-G03); 中国水产科学研究院创新团队项目 (2023TD20); 山东省泰山学者攀登计划 (2017)

作者简介: 林梦娇 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产遗传育种。E-mail: linmj000@163.com

通信作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

外,研究发现某些细菌具有致病能力的外膜蛋白(OMP),外膜蛋白本身就是细菌的黏附素(如霍乱弧菌和鳃弧菌等)^[7]。此外,有研究显示费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)的外膜蛋白有助于其黏附鲑鱼体表,该外膜蛋白由 *OmpU* 基因控制表达,该基因的缺失有效降低了细菌在宿主体内的留存量,推测 OMP 有助于病原菌黏附并在宿主内繁殖;目前在鳃弧菌、副溶血弧菌等细菌的胞外产物中检测到溶血素,其为弧菌病原中分布较广的细菌毒素,能够攻击红细胞膜导致溶血,在病原感染中发挥着重要的作用^[8];ASCHTGEN 等^[9]也从溶藻弧菌中检测出与副溶血弧菌含有相同的溶血素,认为二者致病性相似。因此,宿主细胞表面蛋白可能在细菌的入侵或者免疫反应中具有重要作用,解析宿主细胞表面蛋白在细菌入侵中的表达特征和功能有助于认识细菌与宿主体内的相互作用,对于半滑舌鳎细菌病的防控也具有重要意义。

鉴于此,已经有大量基于高通量测序的研究结果描绘了细菌入侵鱼类后宿主生物的转录特征变化,分析和构建了复杂的基因调控网络^[10]。在弧菌入侵过程中,不仅涉及宿主和病原体间大量基因的表达改变,而且许多互作蛋白在转录层面出现相互调控的现象,这一发现对于理解宿主与病原体间的相互作用具有重要价值。针对半滑舌鳎感染细菌后的转录组进行分析发现,其在鳃弧菌,哈维氏菌等病原入侵中 *vstm2a* 基因均出现了表达量变化^[11-12]。*vstm2a* 基因是 VSTM 家族成员之一,该家族最著名的 VSTM3 是一种免疫抑制受体,在抑制 T 细胞介导的肿瘤免疫反应中发挥着核心作用^[13]。研究表明,VSTM 家族成员对 T 细胞活化表现出相似的抑制活性。V-set 跨膜结构域包含物 2A (V-set transmembrane domain containing 2A, *vstm2a*) 蛋白是跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族的一员,其在结构上与 B7-like 免疫调节蛋白相似,并且拥有 IgV-like 或 IgC-like 胞外域^[14]。在人类上,VSTM2A 由 240 个氨基酸(aa)组成,包括 1 个潜在的 25-aa N 末端信号肽,2 个糖基化位点以及一个免疫球蛋白 V-set 结构域,其由前脂肪细胞表达、分泌,调节前脂肪细胞的分化和发育^[15-16]。据相关研究报道,VSTM 家族的研究都集中在其免疫功能上,如已证明 VSTM1 和

VSTM4 在巨噬细胞的激活过程中发挥着积极或消极的作用,VSTM3 作为共抑制受体,可抑制 T 细胞和 NK 细胞因子的产生,VSTM2 与脂肪生成过程中脂肪前体的生成有关^[17]。目前关于 *vstm2a* 研究主要集中在与人类相关肿瘤的方面,如结直肠癌,尚未发现在鱼类上的研究,其与病原菌的互作尚待研究。

本研究以半滑舌鳎为研究对象,采用实时荧光定量(RT-qPCR)方法检测哈维氏弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌感染半滑舌鳎后,不同时间相关免疫组织中 *vstm2a* 相对表达特征;重组表达 *vstm2a* 蛋白,确认 *vstm2a* 蛋白与病原菌是否存在互作;进行牛津杯抑菌实验,分析 *vstm2a* 蛋白的免疫作用;并通过 siRNA 沉默目的基因,以确认对下游基因的影响。分析半滑舌鳎 *vstm2a* 基因响应细菌感染的表达模式和其蛋白功能,以期为半滑舌鳎与细菌的互作研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验半滑舌鳎 7 月龄[(21.3±2.1) cm, (76.5±10.3) g]购于山东省海阳市黄海水产有限公司,活力强,无病。

1.2 质粒与菌株

实验中使用的哈维氏弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌由本实验室保存,鳃弧菌由上海海洋大学鲍宝龙教授团队惠赠,并经过 16S RNA 基因测序鉴定无误;原核表达 Rosette 感受态细胞购于博迈德生物技术有限公司,原核表达 pET-32a(+)质粒为本实验室保存。

1.3 实验方案

实验用鱼暂养于大型圆形玻璃钢水槽中(1 000 L)内,所用海水经过无菌过滤,采用循环水养殖,水温维持在 23.9 °C 左右。实验鱼在该条件下暂养 7 d,以消除鱼的应激反应。实验组分为 5 组,按照鱼体的体质量分别注射哈维氏弧菌、溶藻弧菌、鳃弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌(根据预实验确定浓度为 2×10^5 cfu/mL),感染组,以腹腔注射的方式,对照组为 1 组,注射等体积的 1×PBS,每组 50 尾鱼^[12]。

1.4 样品采集

动物实验操作遵循中国水产科学研究院黄

海水产研究所伦理委员会的要求进行。对照组和实验组每个时间点随机选择 5 尾鱼,将开始注射的时间点记为 0 h,分别在注射后的 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 等 6 个时间点,采用 MS-222 麻醉鱼体后,解剖取皮肤、鳃、肝脏、脾脏、肠道和头肾组织采用液氮速冻,之后立即转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,以备后续提取总 RNA^[12]。

1.5 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

采用 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,货号:Y1217]提取组织 RNA,提取后的 RNA 采用 Pulltton 微量核酸浓度仪测定 RNA 的浓度以及质量,采用 1% 琼脂糖浓度电泳检测 RNA 的完整度,高质量的 RNA 使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) (南京诺唯赞生物科技有限公司,货号:R312)反转录合成为 cDNA。

1.6 *vstm2a* 基因序列分析

使用在线软件 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 Smart (<http://smart>

embl-heidelberg.de/) 预测半滑舌鳎 *vstm2a* 蛋白的保守结构域、信号肽、蛋白质分子量(MW)和理论等电点(pI)。

1.7 实时荧光定量检测基因表达

根据测序验证的 *vstm2a* 基因序列,利用 NCBI 网站设计特异性引物,用于定量研究,引物由青岛擎科生物技术有限公司合成(表 1)。扩增体系参照天根荧光定量试剂盒(天根,货号:FP205): 10 μL TIANGEN Super Real PreMix Plus (SYBR Green), cDNA 1 μL , 基因特异性引物各 1 μL , 7 μL 无酶水,每个样品设 3 个重复。荧光定量反应采用 ABI 7 500 Fast 设备进行,反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 两步法(95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环);反应结束后绘制熔解曲线以确保扩增的特异性和准确性。采用 β -actin 作为内参基因,各基因的相对表达量利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算,以 $P < 0.05$ 为差异显著,字母相同代表组间不存在显著性差异。

表 1 本研究中所使用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	目的 Purpose
<i>vstm2a</i> -F	ACGGTGTCTCTCTAAACTGGAA	ORF verification
<i>vstm2a</i> -R	TTATAACAAGGCATCCCACAGCA	ORF verification
<i>vstm2a</i> -q-F	CTGCCCTCGAATATGACGGT	RT-qPCR
<i>vstm2a</i> -q-R	CAATGGGTTCGGCGGTTTTT	RT-qPCR
<i>vstm2a</i> -p-F	GGTGCTCGAGTGGCGCCGCAACGGTGTCTCTCTAAACTGGAA	Connection plasmid
<i>vstm2a</i> -p-R	TTATAACAAGGCATCCCACAGCAGCATATCAGCCATGGCCTTG	Connection plasmid
β -actin-F	TTCAGCCTTCCTTCCTT	RT-qPCR
β -actin-R	TACCTCCAGACAGCACAG	RT-qPCR
<i>IL-6</i> -F	CGTCTCCATTTTGGGGCTTG	RT-qPCR
<i>IL-6</i> -R	TGTTTCAGACCTTCGGCCAAAC	RT-qPCR
<i>MyD88</i> -F	TTCAGACCAAGTTCGCCCTC	RT-qPCR
<i>MyD88</i> -R	TTGCCAGACGATCCCAGAAC	RT-qPCR
<i>IL-10</i> -F	CGATTTGTGGAGGGTTTCCC	RT-qPCR
<i>IL-10</i> -R	CAGCACTTCGCTGAGGTAGAA	RT-qPCR

1.8 *vstm2a* 基因的克隆

使用 TOYOBO 的 KOD 扩增酶进行半滑舌鳎 *vstm2a* 完整编码区的扩增,模版为半滑舌鳎肝脏、肾脏和肠道组织混合 RNA 反转后的 cDNA,反应总体积为 50 μL : cDNA 模板 1 μL , *vstm2a*-F 1 μL , *vstm2a*-R 1 μL , KOD 25 μL , ddH₂O 22 μL 。PCR 扩增程序:98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。使用 NCBI 网站中的 Primer BLAST, 根据半滑舌鳎的 *vstm2a* mRNA (XM_008307389.3) 序列,进行引

物设计,序列见表 1。PCR 产物进行凝胶电泳检测,将条带大小与目的片段一致片段使用胶回收试剂盒(DC301, 诺唯赞)进行回收纯化,纯化回收后送至青岛擎科生物技术有限公司测序。

1.9 *vstm2a*-pET-32a(+) 重组质粒的构建

将 pET-32a(+) 质粒采用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切,反应程序为 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。反应体系为 10 μL : *Hind* III 1 μL , *Bam* H I 1 μL , CutSmart 2 μL , pET-32a(+) 1 μL ,

ddH₂O 5 μL。酶切时间为 1 h, 终止反应后, 采用凝胶电泳确认, 并进行切胶纯化回收酶切产物。

以 *vstm2a* 的编码区为模板, 增加酶切位点的克隆引物进行扩增, 引物为表 1: *vstm2a*-p-F 和 *vstm2a*-p-R。PCR 产物采用凝胶电泳检测, 确认后, 与线性化质粒进行连接反应体系为 20 μL: 线性化载体 pET-32a(+) 1 μL, *vstm2a* 编码区 2 μL, 5×CE II Buffer 4 μL, Exnase II 3 μL 和 ddH₂O 10 μL。连接后, 采用热激发转化至 Rosatte 感受态细胞, 经过抗性平板涂布培养 12~18 h 后, 挑取单菌落, 液体扩培后, 采用引物 M13F 和 M13R 进行阳性结果检测, PCR 产物经凝胶电泳检测, 阳性克隆送至送青岛擎科生物技术有限公司测序。

1.10 *vstm2a* 重组蛋白表达、纯化与 Western-blot 分析

将构建成功的含有重组质粒的菌种进行活化, 液体扩大培养。当其生长到培养基 OD 值为 0.4~0.6 时, 加入终浓度为 1 mol/L 的 IPTG, 分别在 16 和 25 °C 诱导 12~16 h, 离心收集菌泥后加入适量的非变性裂解液 (P2226, 上海碧云天生物技术有限公司), 裂解后产物进行 SDS-PAGE 电泳检测, 根据目的条带有无判断是否诱导成功。在最佳的诱导温度后, 扩大培养, 进行 *vstm2a* 重组蛋白大量诱导表达, 使用超声波破碎仪进行菌体破碎后离心, 分别收集沉淀和上清, 采用镍亲和层析法进行蛋白纯化, 透析后, 将重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法转移到 NC 膜上, 进行 Western-blot 实验, 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后清洗, 使用一抗 (AH367-1, 上海碧云天生物技术有限公司) 室温孵育 2 h 后, 用 1×TBST 清洗 5 min, 共 3 次; 二抗 (A0216, 上海碧云天生物技术有限公司) 室温孵育 2 h 结束后, 使用 ECL 显色液 (P0018S, 上海碧云天生物技术有限公司), A 液和 B 液等比例混合, 显色曝光, 观察结果。纯化的重组蛋白超滤后在 -20 °C 冰箱保存。

1.11 细菌蛋白互作实验

将表 2 中 4 种细菌分别用 10 mL 的培养基过夜培养至对数期, 在 4 °C 6 000 r/min 的条件下离心 5 min, 用 1×PBS 多次洗涤菌体, 直至培养基完全清除, 用 1×PBS 对菌体进行重悬直至其 OD₆₀₀ 值为 0.1。分别将 900 μL 的重悬细菌和 100 μL (蛋白浓度为 500 ng/μL) 的重组蛋白共孵育 40 min 后, 对照组添加的蛋白为蛋白标准品 (BSA)。孵育完成后以 4 °C 3 000 r/min 进

行离心 30 min, 采用 PBS 洗涤、离心, 重复 3 次收集菌体, 将菌体进行超声破碎, 吸取 30 μL 破碎液进行 Western blot 检测, 检测方法参照 1.10 节。

1.12 *vstm2a* 重组蛋白的体外抑菌活性检测

使用牛津杯法对半滑舌鳎 *vstm2a* 重组蛋白进行体外抑菌活性的检测, 利用鳗弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌检测该重组蛋白的活性, 具体菌种及培养条件见表 2。取 200 μL 表 2 中所列菌液加到 30 mL 相应的液体培养基中, 在合适的培养条件下, 160 r/min 恒温培养 8 h 后离心, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。测量菌液的 OD 值, 待其 OD 值为 1 时, 用 PBS 进行梯度稀释至 10²~10³ cfu/mL, 取 200 μL 涂布至相应的固体培养基上, 室温静置 30 min 吸收菌液, 用无菌镊子将灭菌后的牛津杯置其上, 轻压固定后, 分别加入 100 μL 的重组蛋白, 等量的 1×PBS 和氨苄抗生素 (Amp⁺) 作为阴性、阳性对照。加样完成后, 置于相应细菌最适温度的恒温培养箱中过夜, 观察细菌生长情况和抑菌圈的大小。

表 2 实验菌株的培养条件
Tab. 2 Culture conditions of experimental bacteria

菌种 Bacteria	培养基 Medium	培养温度 Cultural temperature/°C
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	TSB	28
鳗弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	TSB	28
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	TSB	28
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	LB	28

1.13 *vstm2a* 基因的 siRNA 干扰

使用 *vstm2a* 基因的 siRNA 序列见表 3, siRNA 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司青岛分公司合成, siRNA 干扰使用锐博 riboFECT™ CP Transfection Kit (广州锐博生物技术有限公司, 货号: W0728) 转染, 主要步骤如下: 转染前 24 h 将培养瓶底 90%~95% 的半滑舌鳎肝脏细胞转移到 12 孔板, 按照试剂盒说明书配置转染试剂, 加入相应的 12 孔板中, “8 字法” 充分混匀, 室温孵育 10 min。每个位点设置 3 个平行组, 以转染 Cy3-siRNA 的孔为对照组转染 24 h 后观察转染效果, 48 h 后利用 TRIzol 收集转染后的细胞, 并提取 RNA 及 cDNA 合成。采用 qPCR 检测对于下游靶基因的下调情况, 定量引物见表 1。

表 3 *vstm2a* 基因的 siRNA 序列
Tab. 3 siRNA sequence of *vstm2a* gene

序号 No.	siRNA 名称 Name of siRNA	siRNA 序列 Sequence of siRNA
1	<i>vstm2a</i> -siRNA1	CCUCGAAUAUGACGG UUAATT
2	<i>vstm2a</i> -siRNA2	GGGCUAACUACGGAG AGAUTT
3	<i>vstm2a</i> -siRNA3	GCUGUGGGAUGCCUU GUUATT

2 结果

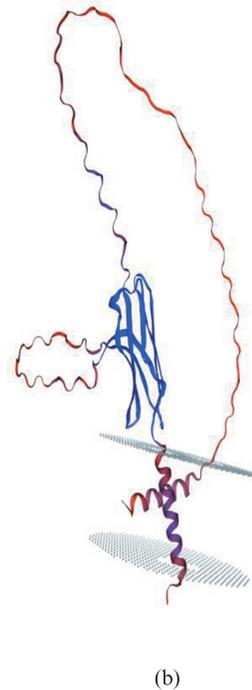
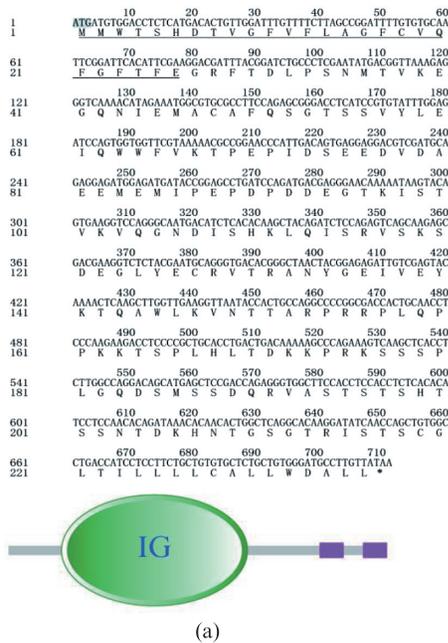
2.1 *vstm2a* 基因克隆及序列分析

以半滑舌鲷正常的组织肝脏、肾脏和肠道混合 cDNA 作为模板,成功地克隆了 *vstm2a* 基因。序列分析表明半滑舌鲷 *vstm2a* 的编码区长度为 711 bp,共编码 236 个氨基酸,预测其分子量大小为 26.3 ku,等电点 (pI) 为 5.29,在 1~26 aa 存在一个跨膜信号肽(图 1a)。另外,对如图 1b 所示该基

因的三维结构,表明其蛋白存在跨膜结构,跨膜螺旋中预测约 30 个氨基酸(aa),其中不规则折叠(50.8%)在二级结构中最多,其次是 α 螺旋(49.2%)。

2.2 细菌感染后半滑舌鲷 *vstm2a* 的表达模式

为研究 *vstm2a* 在半滑舌鲷抗菌免疫应答过程中的表达特征,检测了哈维氏弧菌、鳗弧菌和溶藻弧菌分别感染半滑舌鲷后 5 种免疫相关组织(鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏)中 *vstm2a* 的转录水平变化。如图 2 所示,半滑舌鲷感染哈维氏弧菌后, *vstm2a* 在鳃中的表达水平在 48 h 达到峰值,约为对照组 0 h 的 500 倍(图 2a);肝脏和肠道的表达模式相似,均在感染后 48h 达到峰值(图 2b、2d);在脾脏中的 *vstm2a* 转录水平在第 6 小时开始出现显著性上调,在 48 h 达到峰值,为对照组 0 h 的 50 倍(图 2c);肾脏中的转录水平同样在感染后 48 h 达到峰值(图 2e)。



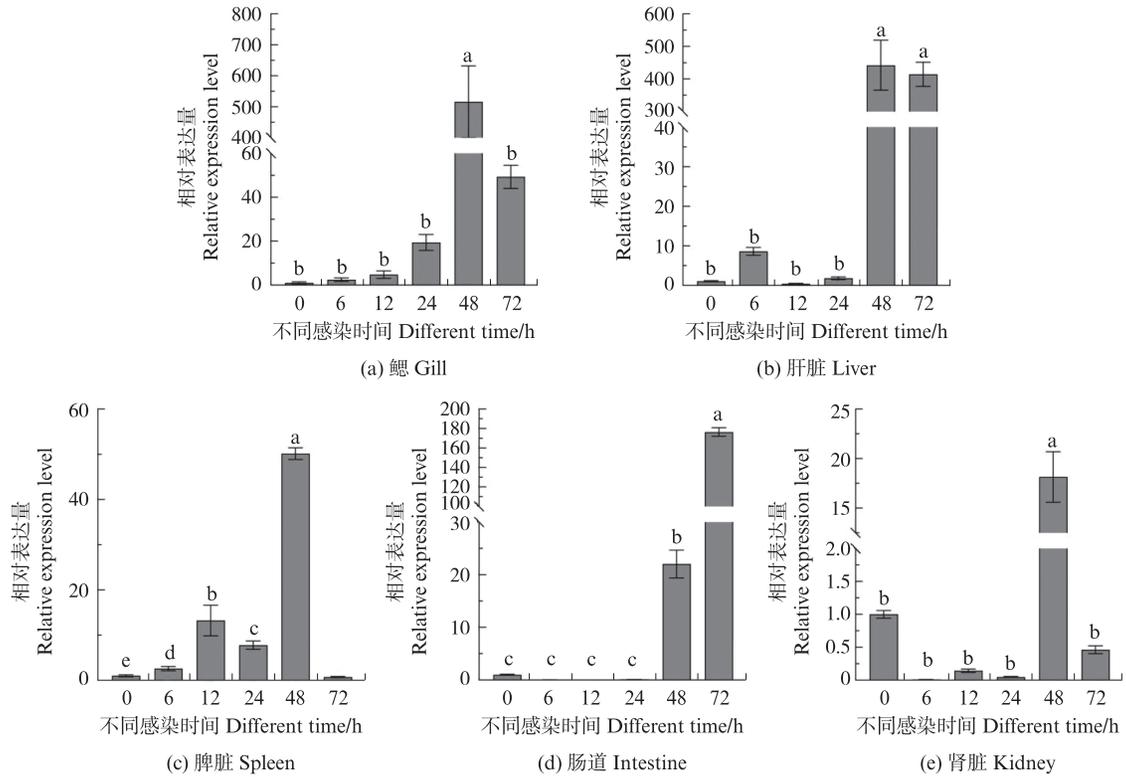
阴影为起始密码子,星号为终止密码子,下划线为信号肽,数字表示分别为核苷酸和氨基酸数目。
Shadow is the start codon, asterisk is the stop codon, underline is the signal peptide, the number is the number of nucleotides and amino acids.

图 1 半滑舌鲷 *vstm2a* 的序列分析及三维结构

Fig. 1 Sequence analysis and three-dimensional structure of *vstm2a* in *Cynoglossus semilaevis*

如图 3 所示,鳗弧菌感染半滑舌鲷后,在鳃中 *vstm2a* 的转录水平在 6 h 达到峰值,为对照组的 14 倍(图 3a);肝脏中的 *vstm2a* 的转录水平与在脾

脏的表达模式相似,在 48 h 表达量达到峰值,分别为对照组的 2.5、3.5 倍(图 3b、3c);肾脏中表达水平无明显差异(图 3e)。



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$).
 Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图2 哈维氏弧菌感染半滑舌鲷后 *vstm2a* 基因在鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏中不同时间点的表达水平
 Fig. 2 Expression levels of *vstm2a* gene in gill, liver, spleen, intestine and kidney of *Cynoglossus semilaevis* at different time points after infection with *Vibrio harveyi*

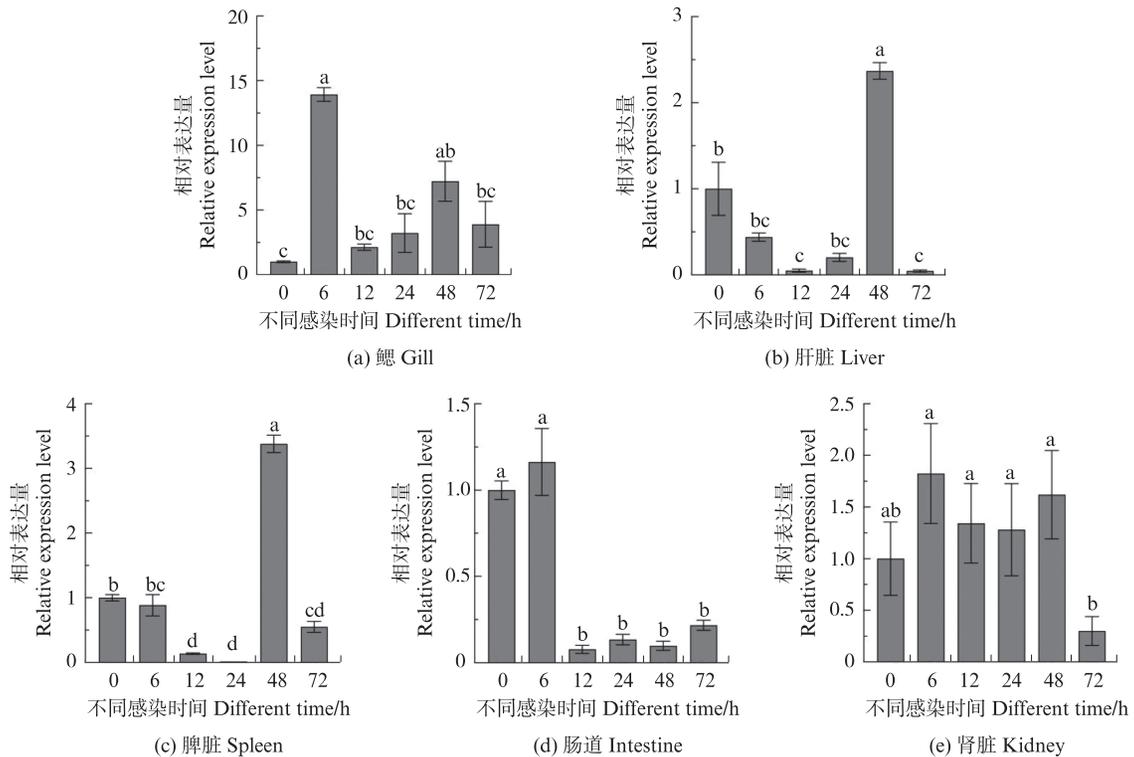


图3 鳃弧菌感染半滑舌鲷后 *vstm2a* 基因在鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏中不同时间点的表达水平
 Fig. 3 Expression levels of *vstm2a* gene in gill, liver, spleen, intestine and kidney of *Cynoglossus semilaevis* at different time points after infection with *Vibrio anguillarum*

溶藻弧菌感染半滑舌鳎后,在鳃中 *vstm2a* 的转录水平在 6 h 达到峰值,约为对照组的 60 倍(图 4a);在肝脏中, *vstm2a* 的转录水平呈先降低后升高再降低的表达模式,且在 48 h 达到峰值,约为 0 h 的 2.5 倍(图 4b);在脾脏中, *vstm2a* 在 72 h 达到

峰值,为 0 h 的 15 倍(图 4c);在肠道中 *vstm2a* 的转录水平呈先降低后升高的表达模式,在 72 h 时达到峰值(图 4d);在肾脏中 *vstm2a* 的转录水平同样在 72 h 达到峰值,约为 0 h 的 7 倍(图 4e)。

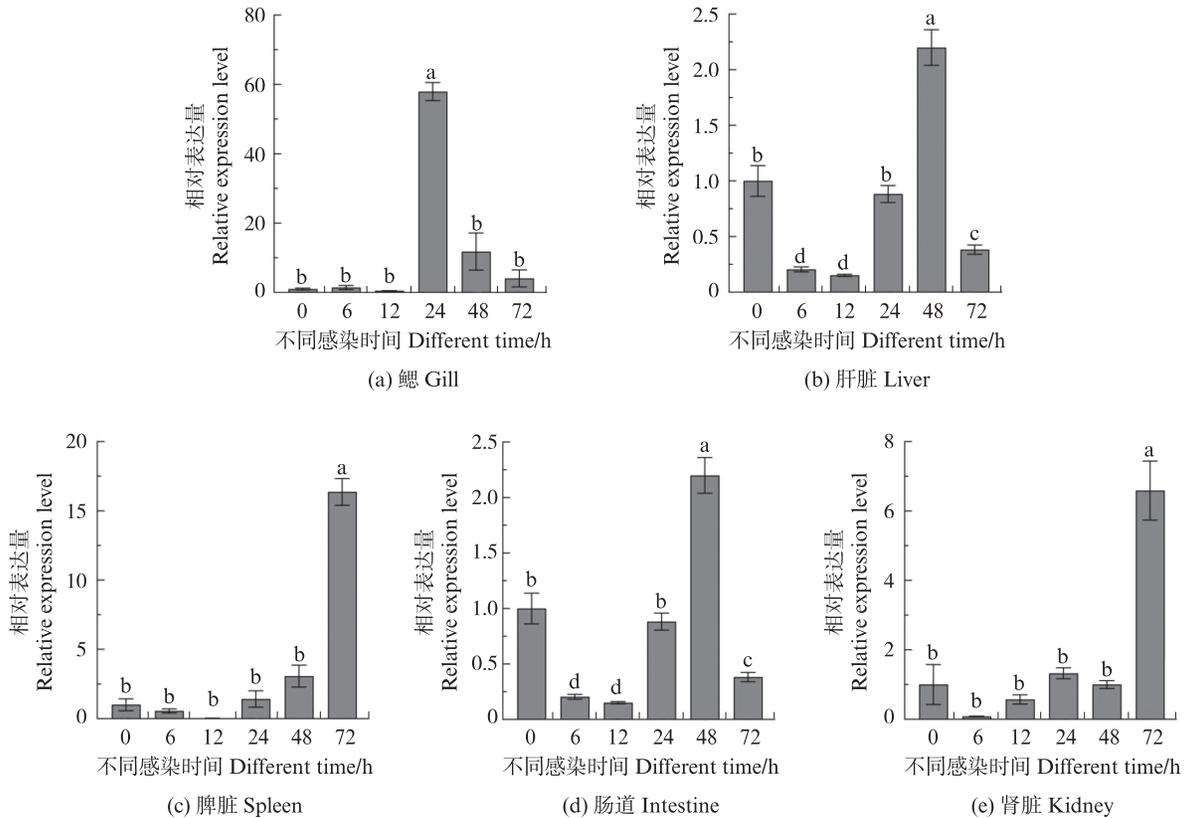


图 4 溶藻弧菌感染半滑舌鳎后 *vstm2a* 基因在鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏中不同时间点的表达水平
 Fig. 4 Expression levels of *vstm2a* gene in gill, liver, spleen, intestine and kidney of *Cynoglossus semilaevis* at different time points after infection with *Vibrio alginolyticus*

迟缓爱德华氏菌感染半滑舌鳎后,在鳃中 *vstm2a* 的转录水平在 48 h 达到峰值约为对照组的 75 倍(图 5a);在肝脏中, *vstm2a* 的转录水平呈先升高后降低再升高的表达模式,且在 6 h 达到峰值,约为 0 h 的 1.4 倍(图 5b);在脾脏中, *vstm2a* 在 48 h 达到峰值,为 0 h 的 6 倍(图 5c);在肠道中 *vstm2a* 的转录水平呈先降低后升高的表达模式,在 72 h 时达到峰值(图 5d);在肾脏中 *vstm2a* 的转录水平在 48 h 达到峰值,约为 0 h 的 7 倍(图 5e)。

无乳链球菌感染半滑舌鳎后, *vstm2a* 在鳃和肝脏中具有相似的表达模式,均在 24 h 达到峰值;在脾脏、肠道和肾脏中, *vstm2a* 只在 0~12 h 的表达模式均为先上升后降低,并在 6 h 达到峰值;不同的是, *vstm2a* 在脾脏中(24~72 h)呈先升高后降低再升高的表达模式(图 6c),在肠道中呈先降

低后升高的表达模式(图 6d),在肾脏中则为先升高后降低的表达模式(图 6e)。

2.3 *vstm2a* 重组蛋白原核表达及纯化

以 *vstm2a* 完整编码区序列为参考设计的特异性引物进行 PCR 扩增,得到 711 bp 的条带,扩增结果与预测一致。将双酶切后的 pET-32a(+) 与 *vstm2a* 进行连接,测序结果显示重组质粒构建成功。

本实验中的 *vstm2a* 重组蛋白的大小预测为 26.3 ku,经过 LPS 诱导表达发现 *vstm2a* 重组蛋白主要在上清中表达,采用 HIS 标签纯化和蛋白复性后,SDS-PAGE 电泳检测结果与预测的分子量一致。对纯化后的半滑舌鳎 *vstm2a* 重组蛋白进行组氨酸标签抗体的 Western Blot 验证,在 26 ku 的位置同样出现了单一条带,表明 *vstm2a* 重组蛋白表达成功。

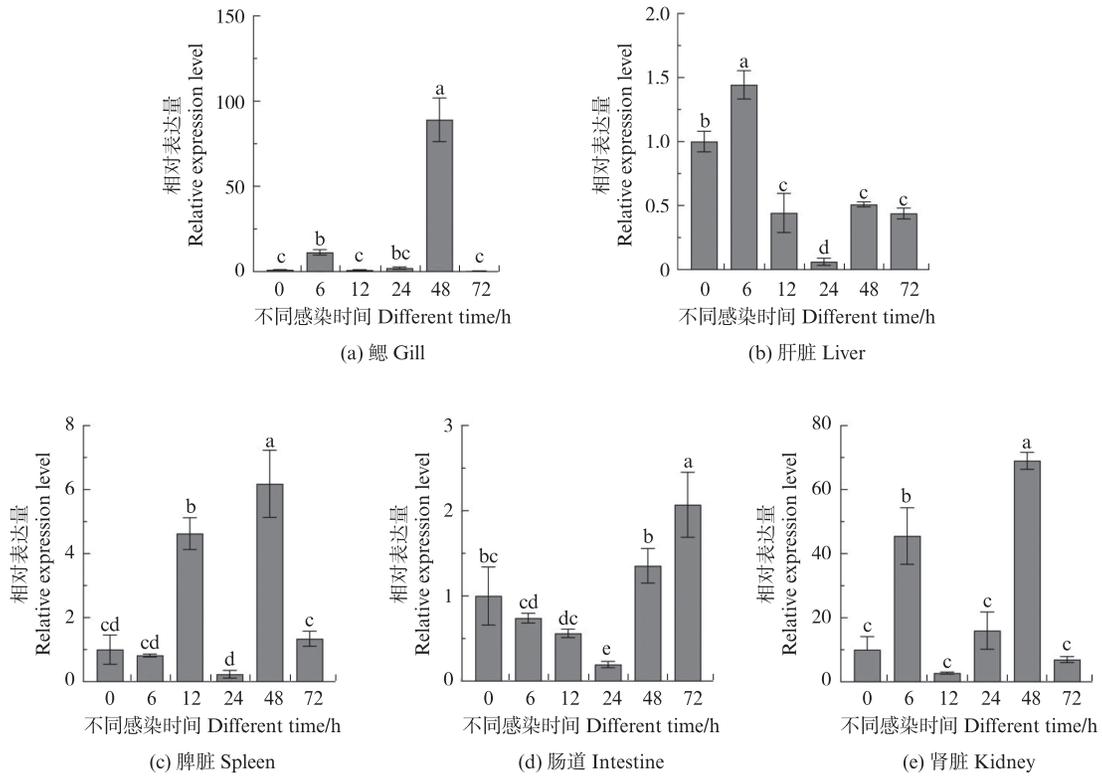


图5 迟缓爱德华氏菌感染半滑舌鲷后 *vstm2a* 基因在鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏中不同时间点的表达水平
 Fig. 5 Expression level of *vstm2a* gene in gill, liver, spleen, intestine and kidney of *Cynoglossus semilaevis* at different time points after infection with *Edwardsiella tarda*

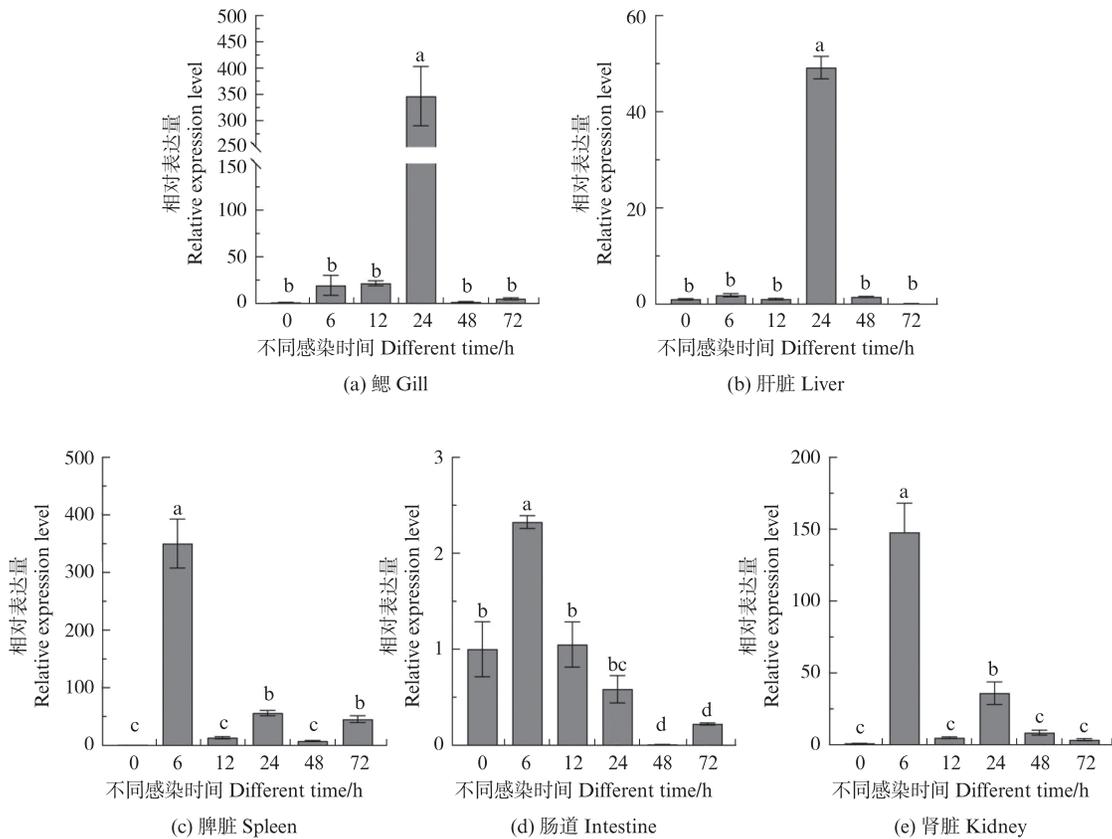


图6 无乳链球菌感染半滑舌鲷后 *vstm2a* 基因在鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏中不同时间点的表达水平
 Fig. 6 Expression level of *vstm2a* gene in gill, liver, spleen, intestine and kidney of *Cynoglossus semilaevis* at different time points after *Streptococcus agalactiae* infection

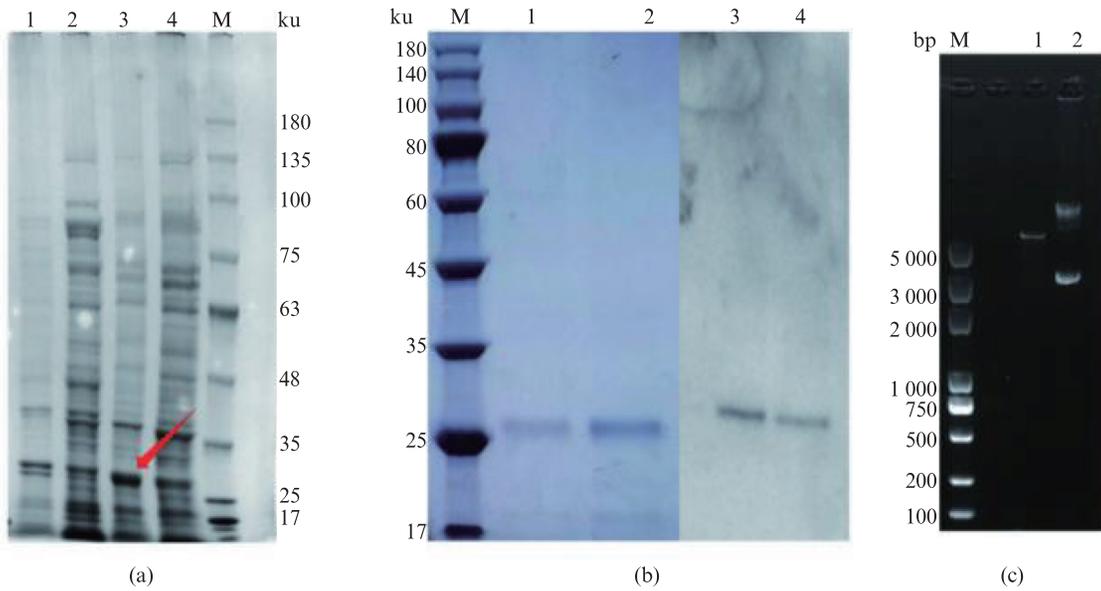
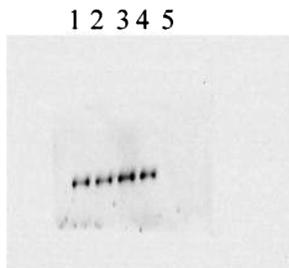


图7 *vstm2a* 重组蛋白诱导、纯化及 Western Blot 结果
 Fig. 7 *vstm2a* recombinant protein induction, purification and Western Blot results

2.4 细菌与蛋白互作实验

为了确认 *vstm2a* 重组蛋白是否可以直接与细菌相互作用,进行了 *vstm2a* 重组蛋白与细菌的结合实验。蛋白与细菌共同孵育后,经过低温离心,确保细菌可以沉淀,而蛋白无法单独离心。如图 8 所示,在 Western Blot 实验结果中发现,重组蛋白与 4 种细菌结合实验均出现了明显的目的条带,且其与 *vstm2a* 重组蛋白大小一致(约 23.6 ku),而在阴性对照组 BSA 结合的细菌泳道中无检测条带,表明了蛋白随着细菌被离心下来,证明了蛋白可以结合在细菌表面。



1-4. 鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌;5. BSA 对照。
 1-4. *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus agalactiae*; 5. BSA control.

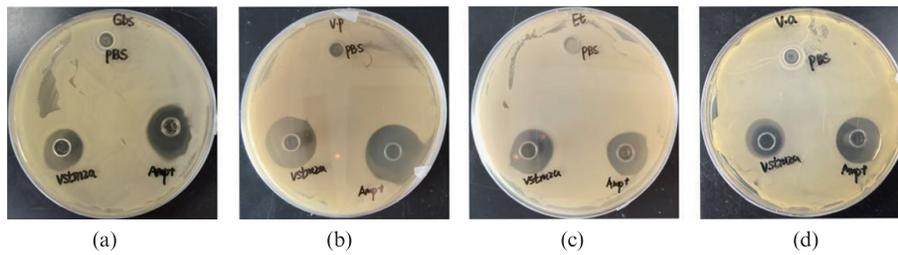
图8 体外 *vstm2a* 重组蛋白与细菌的结合实验
 Fig. 8 Binding experiments of *vstm2a* recombinant protein with bacteria *in vitro*

2.5 *vstm2a* 重组蛋白体外抑菌活性

本实验采用牛津杯法对 *vstm2a* 重组蛋白的体外抑菌活性进行检测,抑菌圈方法结果显示如图 9, *vstm2a* 重组蛋白对无乳链球菌(图 9a)、鳃弧菌(图 9b)、迟缓爱德华氏菌(图 9c)以及溶藻弧菌(图 9d)均有抑菌活性。其中同浓度下, *vstm2a* 蛋白对鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌抑菌圈大小与阳性对照大小接近,而对无乳链球菌的抑制效果小于阳性对照。结果表明, *vstm2a* 重组蛋白可以在体外有效抑制细菌生长。

2.6 siRNA 干扰试验及对下游基因的影响

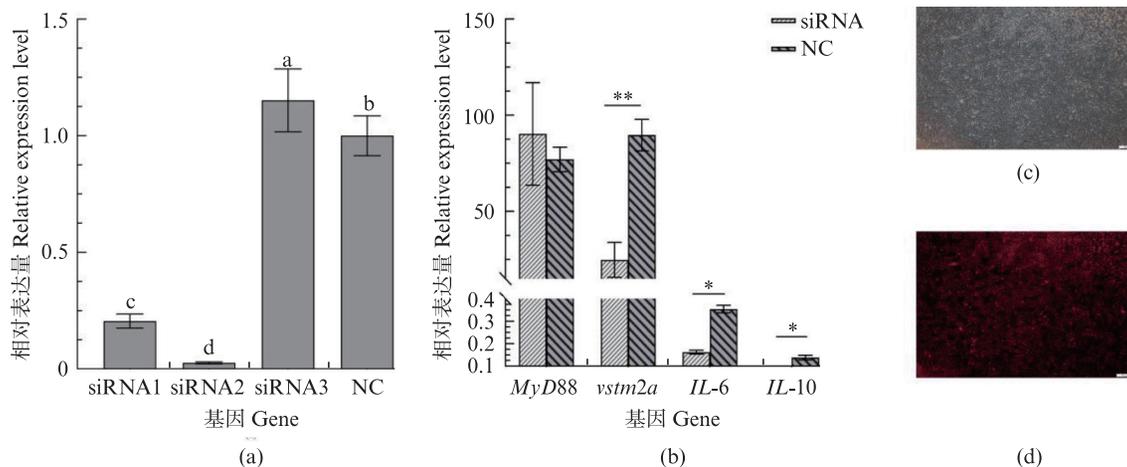
根据 *vstm2a* 基因设计了 3 个 siRNA 位点,成功对 siRNA 进行肝脏细胞转染,转染效率 >90%。进行基因沉默后收集细胞,提取 RNA,反转录后,经过 qPCR 检验后,发现 *vstm2a* 3 个位点中的 2 位点 siRNA 是半滑舌鳎 *vstm2a* 基因的高效靶点,沉默效率在 90% 以上(图 10a)。通过对半滑舌鳎肝脏细胞中 *vstm2a* 基因进行 siRNA 干扰(图 10b),发现 *vstm2a* 基因表达下降后,显著下调了 *IL-6* 和 *IL-10* 表达水平,但对 *MyD88* 基因表达无显著影响,推测 *vstm2a* 蛋白对免疫系统的细胞因子的表达具有一定调控作用。



氨苄青霉素作为阳性对照(50 ng/mL), 1×PBS作为阴性对照; (a)无乳链球菌; (b)鳃弧菌; (c)迟缓爱德华氏菌; (d)溶藻弧菌。Ampicillin (50 ng/mL) were used as positive control, and 1×PBS was used as negative control; (a) *Streptococcus agalactiae*; (b) *Vibrio anguillarum*; (c) *Edwardsiella tarda*; (d) *Vibrio alginolyticus*.

图9 vstm2a重组蛋白的体外抑菌活性

Fig. 9 Extracellular antimicrobial activity of recombinant vstm2a



(a) 3个siRNA位点与阴性对照的比较; (b) *vstm2a*-siRNA 2转染后 *MyD88*、*IL-6*、*IL-10*的相对表达量; (c) Cy3-siRNA转染半滑舌鲷肝细胞24 h后荧光观察; (d) Cy3-siRNA转染视野红色荧光观察, 100×下拍照观察(标尺为100 μm); **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$ 。
(a) Comparison of three siRNA sites with negative control; (b) The relative expression of *MyD88*, *IL-6* and *IL-10* after transfection of *vstm2a*-siRNA 2; (c) Fluorescence observation of Cy3-siRNA transfected *Cynoglossus semilaevis* liver cells after 24 h; (d) Cy3-siRNA transfection was observed by red fluorescence in the field of vision, photographs were taken under 100× for observation (Scale bars was 100 μm); **represents $P < 0.01$, *represents $P < 0.05$.

图10 vstm2a siRNA对炎症因子基因表达水平的影响分析

Fig. 10 Analysis of the effect of *vstm2a* siRNA on the expression level of inflammatory factor genes

3 讨论

本研究发现在哈维氏弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌分别感染半滑舌鲷后,其相关免疫组织中(鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏)均有表达,具有广泛性。在哈维氏弧菌组中,主要集中在48 h(鳃、肝脏、脾脏、肠道和肾脏)、72 h(肝脏和肠道)显著性表达;在鳃弧菌组中, *vstm2a* 相较于对照组0 h,主要在6 h(鳃)和48 h(鳃、肝脏、脾脏)显著性表达;在溶藻弧菌组,则是24 h(鳃)、48 h(肝脏、肠道)和72 h(脾脏和肾脏)显著性表达;在迟缓爱德华氏菌组中, *vstm2a* 基因主要集中在6 h(肝脏)、48 h(鳃、脾脏和肾脏)和72 h(肠道)显著性表达;在无乳链球菌组中, *vstm2a* 主要集中在6 h(鳃和肝脏)和24 h

(脾脏、肠道和肾脏)显著性表达。尽管各组织的 *vstm2a* 的表达峰值时间点不尽相同,但为 *vstm2a* 参与半滑舌鲷免疫应答提供了证据。鳃直接与水体接触,是鱼体抵御病原菌入侵的第一道防线^[18-19],同时参与先天免疫和适应性免疫;同时在鱼类免疫中,肝脏、脾脏和肾脏等也是重要的免疫器官^[20]。脾脏是产生鱼类红细胞和重力细胞的主要组织,黑色素巨噬细胞可以迅速增加用以保护细胞免受病原菌攻击时的损伤^[21]。肠道和肾脏则是鱼类重要的淋巴组织,含有丰富的淋巴细胞和粒细胞,在病原菌侵入时能够激活相应的免疫机制用以抵御入侵^[22]。在其他的组织中 *vstm2a* 出现了波动,并在不同的时间点出现峰值,可能是由于不同病原菌侵入或组织反应的时间引起的。半滑舌鲷 *vstm2a* 基因在病原菌入侵中

存在表达变化证明其参与免疫反应。

结构域分析发现 *vstm2a* 是一种跨膜蛋白。*vstm2a* 含有 Ig 结构域, Ig 结构域是一种由免疫球蛋白分子中的不同区域组成的结构域。这种结构域一般包含 7 个螺旋和 2 个连接片段^[23]。在一些重要的水生动物中也存在一些含有 Ig 结构域分子与病原菌感染有关, 如日本囊对虾的 *MjplgR* 基因在 WSSV 入侵时, 其表达水平发生明显上调, *MjplgR* 敲降后能够显著抑制病毒对宿主的入侵, 对虾的成活率也有显著提高^[24]。在抵御细菌感染过程中, 虹鳟血清总 IgM 浓度和细菌特异性 IgM 结合量均显著性升高, 且头肾中 IgM⁺B 细胞的增值非常显著^[25]。有研究发现鱼类口腔黏膜受到细菌感染后, IgT 在整个适应性免疫应答过程中发挥着重要的作用^[26]。斑马鱼的 SIGR 含有 2 个 Ig 结构域, 通过结合凝集细菌发挥细菌识别功能, 并可以通过参与 NF- κ B 信号通路来调控下游抗菌肽发挥抗菌功能^[27]。免疫球蛋白 (Ig) 是免疫系统中重要的识别和结合细菌的蛋白质之一, 通过高度特异的抗原位点与细菌表面相互作用, 从而形成稳定的抗原-抗体复合物^[28]。Ig 能够识别多种细菌的表面抗原, 如脂多糖等。当抗体与细菌结合后, 触发免疫反应, 如促进吞噬作用、激活补体系统等, 从而识别和标记细菌^[29]。本研究的细菌的结合试验结果显示: *vstm2a* 重组蛋白能够结合细菌, 推测 *vstm2a* 重组蛋白的抗微生物活性可能是通过与细菌细胞结合后发挥抑菌作用, 而这种与细菌结合的能力可能与该蛋白的 IgV 结构域有关。但是具体的分子机制还不清楚, 还需要进一步研究。

跨膜蛋白在免疫系统中扮演着关键的角色, 它们能够识别细菌并相互作用, 从而触发免疫应答, 一些主要的跨膜蛋白以及它们识别细菌后引发的免疫机制: TLRs 是一类跨膜受体, 能够识别细菌的特定分子模式 (例如细菌脂多糖、细菌 DNA 等), 从而激活免疫反应^[30]。TLRs 与细菌分子模式结合后, 会激活信号传导途径, 进而引发炎症反应和抗菌免疫。钙调神经蛋白是一类在宿主细胞中调节钙离子通道的跨膜蛋白, 它们在细菌感染时能够与细菌蛋白相互作用, 调节细胞内钙离子浓度, 从而影响细胞对细菌的清除^[31]。这些跨膜蛋白通过与细菌的不同分子结合或调控, 参与了免疫系统对抗细菌感染的过程^[32]。它

们的识别机制涉及特定的结合位点和信号传导途径, 这些机制对于理解免疫应答和抗菌治疗具有重要意义。本研究发现 *vstm2a* 与细菌结合, 可能是宿主黏附细菌的重要蛋白。进一步实验表明, *vstm2a* 对鳃弧菌、溶藻弧菌、迟缓爱德华氏菌和无乳链球菌均有一定的抑菌效果, *vstm2a* 通过识别和结合细菌, 可能导致细菌无法有效接触营养物质, 最终无法繁殖。

vstm2a 作为细胞膜蛋白, 参与了细菌识别和结合, 并且抑制细菌生长, 证明了其可能是重要的免疫蛋白。*vstm2a* 在病原体入侵机体时, 能够迅速参与免疫应答, 在此过程中有大量的细胞类型和介质参与机体的炎症反应。本研究结果中的 *IL-6* 和 *IL-10* 基因表达均受到了 *vstm2a* 蛋白的调控。细胞因子是机体进行免疫调节不可或缺的成分, 它们可以激活炎症信号和吞噬细胞从而抵抗病原菌的入侵^[33]。白细胞介素 10 (IL-10) 是在促炎反应后产生的, 在多种炎症性疾病的发展中起到重要作用。之前的研究发现, IL-10 几乎在先天性和适应性免疫系统中所有类型的细胞中都有表达, 例如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、T 细胞和 B 细胞^[34]。IL-10 具有多效性调节功能, 它可以抑制促炎反应并抑制炎症从而避免因过度炎症反应引起的组织破坏。近些年来, *IL-10* 在多种硬骨鱼中被报道, 包括斑石鲷 (*Oplegnathus punctatus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和虹鳟等^[35]。IL-10 也能够干扰 MAPK 信号通路的激活电位。有研究发现 cAMP 依赖性和 PI3K-mTOR 信号传导途径促进 *vstm2a* 的表达, 此外 *vstm2a* 与 MAPK 信号通路关系密切^[36]。IL-6 是免疫系统的一类小分子蛋白质, 它们由免疫细胞 (如 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞等) 和某些其他类型的细胞在特定刺激下分泌, 起着调节免疫和炎症反应的作用^[37]。IL-6 可以促进 B 细胞的生长和成熟, 进而分化为浆细胞产生抗体, 对抗病原体^[38]; 它还能够激活其他免疫细胞和促进炎症细胞向炎症部位的迁移; 在一些细胞系中, IL-6 可作为生长因子, 影响细胞的增殖和分化^[38-39]。*vstm2a* 被沉默后, 炎症细胞因子在肝细胞中表达下降说明 *vstm2a* 基因在识别病原后, 激活下游免疫基因的表达, 进而影响宿主免疫系统的激活和反应。

本研究证明了半滑舌鳎的跨膜蛋白 *vstm2a*

参与了细菌入侵的免疫反应,其蛋白可以直接结合细菌,通过抑制细菌生长和激活下游促炎症细胞因子,对病原菌的感染起到免疫防御作用,是一种重要的免疫蛋白。本研究有助于解析细菌黏附细胞或鱼体抵抗细菌入侵的机制,为未来采用分子手段选育抗性品种提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] SONG W T, LI Y Z, ZHAO Y W, et al. Construction of a high-density microsatellite genetic linkage map and mapping of sexual and growth-related traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52097.
- [2] MA H, CHEN Y D, YU M J, et al. Immune role of the complement component 6 gene and its associated novel miRNA, miR-727, in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 123: 104156.
- [3] OKUDA J, ARIKAWA Y, TAKEUCHI Y, et al. Intracellular replication of *Edwardsiella tarda* in murine macrophage is dependent on the type III secretion system and induces an up-regulation of anti-apoptotic NF- κ B target genes protecting the macrophage from staurosporine-induced apoptosis [J]. Microbial Pathogenesis, 2006, 41(6): 226-240.
- [4] LAGIER J C, EDOUARD S, PAGNIER I, et al. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(1): 208-236.
- [5] 权太淑,李薇,杨喜玲. 自腹泻患者中分离溶藻性弧菌及其病原性的探讨 [J]. 中国公共卫生, 1985, 4(5): 15-18.
QUAN T S, LI W, YANG X L. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from diarrhea patients and its pathogenicity [J]. Chinese Journal of Public Health, 1985, 4(5): 15-18.
- [6] 潘晓艺,沈锦玉,尹文林,等. 水生动物的弧菌病及其致病机理 [J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 272-277.
PAN X Y, SHEN J Y, YIN W L, et al. *Vibriosis* and their mechanisms in aquatic animals [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2006, 21(3): 272-277.
- [7] ASCHTGEN M S, LYNCH J B, KOCH E, et al. Rotation of *Vibrio fischeri* flagella produces outer membrane vesicles that induce host development [J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(16): 2156-2165.
- [8] 赵香汝,杨汉春. 细菌外膜蛋白的研究现状 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(12): 41-42.
ZHAO X R, YANG H C. Research status of bacterial outer membrane proteins [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1997, 23(12): 41-42.
- [9] ASCHTGEN M S, WETZEL K, GOLDMAN W, et al. *Vibrio fischeri*-derived outer membrane vesicles trigger host development [J]. Cellular Microbiology, 2016, 18(4): 488-499.
- [10] 潘旻. RNA高通量测序技术以及鱿鱼-费氏弧菌共生机制的研究 [D]. 南京: 东南大学, 2016.
PAN M. RNA high-throughput sequencing technology and the study of squid-*V. fischeri* symbiosis mechanism [D]. Nanjing: Southeast University, 2016.
- [11] QI L J, CHEN Y D, SHI K P, et al. Combining of transcriptomic and proteomic data to mine immune-related genes and proteins in the liver of *Cynoglossus semilaevis* challenged with *Vibrio anguillarum* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2021, 39: 100864.
- [12] WEI M, XU W T, LI K M, et al. Cloning, characterization and functional analysis of *dctn5* in immune response of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 77: 392-401.
- [13] MARTIN A, BECKER S I. A relational account of visual short-term memory (VSTM) [J]. Cortex, 2021, 144: 151-167.
- [14] DONG Y J, ZHANG Y Q, KANG W, et al. VSTM2A suppresses colorectal cancer and antagonizes Wnt signaling receptor LRP6 [J]. Theranostics, 2019, 9(22): 6517-6531.
- [15] WANG L, YILMAZ O, VEENEMAN B A, et al. Gene of the month: VSTM2A [J]. Journal of Clinical Pathology, 2024, 77(2): 73-76.
- [16] SECCO B, CAMIRÉ É, BRIÈRE M A, et al. Amplification of adipogenic commitment by VSTM2A [J]. Cell Reports, 2017, 18(1): 93-106.
- [17] AL DOW M, SILVEIRA M A D, POLIQUIN A, et al. Control of adipogenic commitment by a STAT3-VSTM2A axis [J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2021, 320(2): E259-E269.
- [18] MENG X L, TIAN X, LIU M, et al. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(2): 287-293.
- [19] PENNACCHI Y, LEEF M J, CROSBIE P B B, et al. Evidence of immune and inflammatory processes in the gills of AGD-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(2): 563-570.
- [20] WANG H, CHAN Y L, LI T L, et al. Reduction of splenic immunosuppressive cells and enhancement of anti-tumor immunity by synergy of fish oil and selenium yeast [J].

- PLoS One, 2013, 8(1): e52912.
- [21] INOUE S, NAM B H, HIRONO I, et al. A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1997, 6(4): 376-380.
- [22] CAI Y, WANG S F, GUO W L, et al. Transcriptome analysis provides insights into the immune responsive pathways and genes in the head kidney of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) fed with *Spatholobus suberectus*, *Phellodendron amurense*, or *Eclipta prostrata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 100-111.
- [23] WANG L S, ZHANG Y P, CHEN Y B, et al. *VSTM2A* overexpression is a sensitive and specific biomarker for mucinous tubular and spindle cell carcinoma (MTSCC) of the kidney [J]. *American Journal of Surgical Pathology*, 2018, 42(12): 1571-1584.
- [24] 牛国娟. 两种含Ig结构域蛋白以及STAT激活抑制蛋白在日本囊对虾先天免疫中的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- NIU G J. Function study of two Ig-containing proteins and protein inhibitor of activated STAT in innate immunity of *Marsupenaeus japonicus* [D]. Jinan: Shandong University, 2019.
- [25] YU Y Y, KONG W G, YIN Y X, et al. Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection [J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(11): e1007251.
- [26] 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.
- [27] 薄功文. 斑马鱼中新型多聚免疫球蛋白受体SIGR的免疫功能研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2023.
- BU G W. Study on the immune function of novel polyimmunoglobulin receptor SIGR in zebrafish [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2023.
- [28] VIDARSSON G, DEKKERS G, RISPENS T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions [J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 520.
- [29] MALBEC O, DAËRON M. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation [J]. *Immunological Reviews*, 2007, 217(1): 206-221.
- [30] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [31] ANTHONY R M, NIMMERJAHN F, ASHLINE D J, et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc [J]. *Science*, 2008, 320(5874): 373-376.
- [32] BROWN G D, GORDON S. Immune recognition of fungal β -glucans [J]. *Cellular Microbiology*, 2005, 7(4): 471-479.
- [33] WEN C, GAN N, ZENG T T, et al. Regulation of Il-10 gene expression by Il-6 via Stat3 in grass carp head kidney leucocytes [J]. *Gene*, 2020, 741: 144579.
- [34] MOORE K W, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor [J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1): 683-765.
- [35] HAZLETT L D, JIANG X Y, MCCLELLAN S A. IL-10 function, regulation, and in bacterial keratitis [J]. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2014, 30(5): 373-380.
- [36] LIU H Q, LI W X, AN Y W, et al. Integrated analysis of the genomic and transcriptional profile of gliomas with isocitrate dehydrogenase-1 and tumor protein 53 mutations [J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2022, 36: 3946320221139262.
- [37] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, et al. A panoramic review of IL-6: structure, pathophysiological roles and inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2020, 28(5): 115327.
- [38] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 2014, 6(10): a016295.
- [39] SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy [J]. *Journal of Hepatology*, 2016, 64(6): 1403-1415.

The expression pattern and function of *vstm2a* gene in response to bacterial infection in *Cynoglossus semilaevis*

LIN Mengjiao^{1,2,3}, CHEN Yadong^{1,2,3}, LIU Yang^{2,3}, WANG Lei^{2,3}, ZHANG Tianshi^{2,3}, SHI Meng^{2,3,4}, CHEN Songlin^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. State Key laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, Shandong, China; 4. College of Marine Life Sciences, China Ocean University, Qingdao 266071, Shandong, China)

Abstract: In order to explore the expression characteristics and protein function of *vstm2a* gene in response to bacterial infection in *Cynoglossus semilaevis*, in this study, the relative expression characteristics of *vstm2a* in immune tissues (gill, liver, spleen, intestine and kidney) of *Cynoglossus semilaevis* after infection with *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus agalactiae* were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The prokaryotic expression recombinant plasmid of *vstm2a* gene was constructed and the recombinant protein was obtained. The Oxford cup method, bacterial protein binding experiment and siRNA silencing were used to explore the function of *vstm2a* protein in bacterial invasion. The results showed that the *vstm2a* protein had a transmembrane domain and an Ig domain, which functions on the cell surface; The expression of *vstm2a* gene in related immune tissues was significantly increased at 6 h, 48 h and 72 h after infection with *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus agalactiae*. After incubation with bacteria, the *vstm2a* recombinant protein was co-precipitated with bacteria by low-speed centrifugation. Bacteriostatic experiments showed that it significantly inhibited the growth of bacteria, and after siRNA reducing the *vstm2a* gene, it inhibited the expression of cytokines *IL-6* and *IL-10*. This study demonstrates that *vstm2a* protein can respond to bacterial invasion, recognize and bind bacteria, and play an immune defense role against pathogen infection by inhibiting bacterial growth and activating pro-inflammatory cytokines. It is an important immune protein. This study is helpful to analyze the mechanism of bacterial adhesion to cells or fish resistance to bacterial invasion, and provides a theoretical basis for the future selection of resistant varieties by molecular means.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; immunization; *vstm2a*; transmembrane protein; bacterial binding