

南方农业学报
Journal of Southern Agriculture
ISSN 2095-1191, CN 45-1381/S

《南方农业学报》网络首发论文

题目：湘云鲫2号肠道干细胞标志物LGR6分子特征及其多克隆抗体制备
作者：胡聂文，唐仪阳，冯孟哲，周泽军
收稿日期：2022-09-14
网络首发日期：2023-03-14
引用格式：胡聂文，唐仪阳，冯孟哲，周泽军. 湘云鲫2号肠道干细胞标志物LGR6分子特征及其多克隆抗体制备[J/OL]. 南方农业学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1381.S.20230313.0944.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

收稿日期：2022-09-14

基金项目：国家自然科学基金项目(32102847)；湖南师范大学 2022 年大学生创新创业训练计划项目(2022129)；湖南师范大学学位与研究生教育改革研究项目(21JG13)

通讯作者：周泽军(1986-)，<https://orcid.org/0000-0002-2901-5041>，博士，主要从事鱼类免疫学研究工作，E-mail：
zhouzejun@hunnu.edu.cn

第一作者：胡聂文(2002-)，<https://orcid.org/0000-0001-9832-1360>，研究方向为鱼类肠道干细胞，E-mail：2858447288@qq.com

湘云鲫 2 号肠道干细胞标志物 LGR6 分子特征 及其多克隆抗体制备

胡聂文，唐仪阳，冯孟哲，周泽军*

(省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室/湖南师范大学生命科学学院，湖南长沙 410081)

摘要：【目的】克隆湘云鲫 2 号肠道干细胞标志物 LGR6，分析其分子特征并制备多克隆抗体，为后续研究 LGR6 的功能及揭示其在维持鱼类肠道黏膜稳态中的分子机制提供重要工具。【方法】利用 PCR 克隆湘云鲫 2 号 LGR6 的 ORF 序列(3nLGR6)，通过 InterProScan、TMHMM Server 2.0、SignalP 5.0、SWISS-MODEL、MEGA 11 及 STRING 等在线软件进行生物信息学分析，并利用原核表达系统制备和纯化 3nLGR6 重组蛋白，将其免疫小鼠以制备多克隆抗体；使用制备的多克隆抗体，通过免疫组织化学法分析 3nLGR6 在湘云鲫 2 号肠组织中的分布。【结果】3nLGR6 的 ORF 全长 2874 bp，编码 957 个氨基酸残基。TMHMM 2.0 预测该蛋白有 7 次跨膜结构域；同源性比对和进化分析表明 3nLGR6 与其他硬骨鱼的同源性较高，且具有较近的亲缘关系。此外，使用原核表达系统表达和纯化了 3nLGR6 部分蛋白，并制备其多克隆抗体。免疫组化结果显示，该抗体可特异性识别湘云鲫 2 号肠道内源性 3nLGR6。【结论】3nLGR6 编码蛋白的结构和功能相对保守。利用制备的 3nLGR6 抗体可特异性识别湘云鲫 2 号肠组织 LGR6，为后续深入研究 3nLGR6 的功能提供了重要数据。

关键词：三倍体鱼；干细胞；LGR6；原核表达；多克隆抗体

Molecular characterization and polyclonal antibody preparation of intestinal stem cell marker LGR6 in Xiangyun Crucian Carp 2

HU Nie-wen, TANG Yi-yang, FENG Meng-zhe, ZHOU Ze-jun*

(State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish/College of Life Sciences, Hunan Normal University,
Changsha, Hunan 410081, China)

Abstract: 【Objective】 In this study, the intestinal stem cell marker LGR6 of "Xiangyun Crucian Carp 2" was cloned, and we analyzed the molecular characteristics of LGR6 and prepared its polyclonal antibody, which provided an important tool for the subsequent research on the molecular mechanism of LGR6 in maintaining the homeostasis of fish intestinal mucosa. 【Method】 PCR was used to clone the ORF sequence (3nLGR6) of Xiangyun crucian carp 2, and bioinformatics analysis was conducted by InterProScan, TMHMM Server 2.0, SignalP 5.0, SWISS-MODEL, MEGA 11 and STRING. The 3nLGR6 recombinant protein was prepared and purified by the prokaryotic expression system and immunized mice to prepare polyclonal antibody. After that, this prepared polyclonal antibody was used to analyze the distribution of 3nLGR6 in the intestinal tissues of "Xiangyun Crucian Carp 2" by immunohistochemistry. 【Result】 The ORF of 3nLGR6 is 2874 bp in length and encodes 957 amino acids. TMHMM 2.0 predicts that the protein has seven transmembrane domains. Homology alignment and evolution analysis showed that 3nLGR6 had higher

homology and a closer relationship with other teleost fish. In addition, we expressed and purified the 3nLGR6 protein using a prokaryotic expression system, and prepared mouse anti-3nLGR6 polyclonal antibodies. Immunohistochemistry result showed that the antibody could specifically recognize the intestinal endogenous 3nLGR6 of Xiangyun crucian carp 2. **【Conclusion】**The structure and function of 3nLGR6 are relatively conserved. The 3nLGR6 antibody can specifically recognize the LGR6 in intestinal tissue of Xiangyun crucian carp 2, which provides important data for further study of the function of 3nLGR6.

Key words: triploid fish; stem cells; LGR6; prokaryotic expression; polyclonal antibody

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (32102847); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Hunan Normal University (2022129); Degree & Postgraduate Education Reform Project of Hunan Normal University (21JG13)

0 引言

【研究意义】湘云鲫 2 号是一种新型的异源三倍体鱼, 是以湘江野鲤为原始父本($2n=100$)、红鲫为原始母本($2n=100$), 利用远缘杂交, 经多代培育形成雌雄两性可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤群体($4n=200$), 然后以雌性改良二倍体红鲫为母本、雄性改良四倍体鲫鲤为父本杂交获得的异源三倍体($3n=150$)(刘少军等, 2010)。湘云鲫 2 号的生长速度快、抗逆抗病能力强, 为人们提供了优质的肉质食品, 具有较高的经济价值(梁向阳等, 2011)。肠道不仅是鱼类的消化吸收器官, 还是其最大的免疫器官(米海峰等, 2015)。肠道病变通常会引起鱼体肝胰脏等器官的损伤和功能障碍, 进而影响鱼体健康, 即肠道健康对于鱼类十分重要(Gehart et al., 2019)。肠道环境是生物体最为恶劣的环境之一, 肠上皮细胞处于强酸性、高酶量的环境中, 对其稳态也提出了更加苛刻的要求(Barker, 2014; Date and Sato, 2015)。肠道干细胞实时分裂分化确保肠道表面上皮细胞的实时更新, 以维持其营养和+膜屏障功能(Marshman et al., 2002)。富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 LGR6 是鱼类肠道干细胞标志物之一, 但关于 LGR6 是否参与调控湘云鲫 2 号肠黏膜稳态的研究尚未见报道。因此, 克隆湘云鲫 2 号 LGR6, 探析其基因序列特征, 并进行原核表达和多克隆抗体制备, 可为揭示 LGR6 在湘云鲫 2 号肠黏膜屏障中的作用机制打下重要基础。**【前人研究进展】**G 蛋白偶联受体超家族(GPCRs), 是真核生物中最为丰富的膜受体群之一(Bockaert and Pin, 1999; Fredriksson et al., 2003), 其对激素、神经递质、离子、光子、气味等刺激做出反应, 调节细胞内各种信号级联反应(Hilger et al., 2018)。富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体(LGR)是 GPCRs 的一个亚家族, 其特征是存在 1 个 7 次跨膜结构域及一系列亮氨酸重复序列的胞外结构域(Barker et al., 2010)。依据系统发育分析, LGR 可以分为 A、B、C 三种亚型: A 型包括: LGR1、LGR2、LGR3; B 型包括: LGR4、LGR5、LGR6; C 型包括: LGR7、LGR8(Barker et al., 2007)。Barker 等(2007)采用体内谱系追踪等方法, 发现小鼠中表达 LGR5 的肠道细胞是多能、自增殖的成体干细胞。Snippert 等(2010)也用类似的方法证明 LGR6 是小鼠皮脂腺和皮肤更新的成体干细胞群的标志物。有趣的是, 在硬骨鱼类青鳉肠道的研究中没有发现 LGR5 的直系同源物, 只鉴定和克隆出 LGR6 基因, 且表达 LGR6 的干细胞群承担着在哺乳动物中 LGR5 和 LGR6 所承担的功能(Deguchi et al., 2012)。同时 Hirose 等(2011)也没有在斑马鱼中发现 LGR5 的同源物。此外, 在斑马鱼中研究发现, Wnt/ β -catenin 信号通路可调控 LGR6 的表达, 并与胚胎早期发育密切相关(沈婉瑶, 2019)。但是, 关于鱼类肠道干细胞标志物 LGR6 的基础生物学研究匮乏, 也尚未有商业化鱼类肠道干细胞抗体的报道。**【本研究切入点】**目前, 关于三倍体鱼湘云鲫 2 号的外形、育性和遗传特征、营养成分和抗逆能力分析等方面已有系统研究(黎玲等, 2013; 许文婷等, 2018; Liu et al., 2018; Ren et al., 2018; Xiao et al., 2019), 而其抗病机制的相关研究仍处于初步的探索阶段(陈剑兴等, 2015)。此外, 关于青鳉、斑马鱼等鱼类的肠道干细胞标志物也已有初步研究(Hirose et al., 2011; Deguchi et al., 2012), 但仍然缺少相关的鱼类肠道干细胞抗体。**【拟解决的关键问题】**拟克隆湘云鲫 2 号肠道干细胞标志物 LGR6(3nLGR6),

并进行蛋白体外重组表达及多克隆抗体制备, 以期从肠道干细胞角度探索湘云鲫 2 号的抗病机制提供重要工具。

1 材料与方法

1.1 试验材料

湘云鲫 2 号 cDNA 由省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室反转获得, 并保存在-80 °C 冰箱。大肠杆菌 Trans5 α 和 BL21 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; pMD-18T 载体、Ex *Taq* DNA 聚合酶和内切酶购自大连 TaKaRa 公司; 引物委托北京擎科生物科技有限公司合成; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、蛋白 Marker 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 3nLGR6 基因克隆

根据 GenBank 已公布的金鱼 *LGR6* 基因序列(XM_026199275.1)设计 1 对引物: 上游引物为: 5'-ATGTTG GTGGTGTACTGAT-3', 下游引物为: 5'-AGAATGAGTTGAGAGATGCG-3'。以湘云鲫 2 号肝 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 20.0 μ L: cDNA 模板 2.0 μ L, 10 \times Ex *Taq* Buffer 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 上、下游引物各 1.0 μ L, Ex *Taq* 酶 0.2 μ L, ddH₂O 11.8 μ L。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 120 s, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 3.0 μ L PCR 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行切胶、回收并纯化, 将 PCR 纯化产物送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.3 3nLGR6 生物信息学分析

使用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性比对分析; 运用 InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)预测蛋白结构功能域, 以 TMHMM Server 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)预测蛋白跨膜结构域, 使用 ExPASy Proteomics Server(<http://ca.expasy.org>)推导氨基酸序列、确定开放阅读框(ORF)、分子量计算值(Mw)和理论等电点(pI)预测等; 采用 SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)预测蛋白信号肽; 利用 PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form2.html>)预测亚细胞定位, 使用 SoftBerry-Psit(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=proloc>)进行氨基酸序列的功能位点分布预测, 分别使用 UCL-CS Bioinformatics(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>)和 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测蛋白二、三级结构。使用 Blast 进行多重序列比对, 并以 MEGA 11.0 中的邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育进化树。通过 Bgee(<https://bgee.org/>)数据库进行蛋白组织表达分析, 并基于 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)进行 PPI 网络互作分析和 GO 和 KEGG 富集分析。

1.4 3nLGR6 原核表达、纯化和多克隆抗体制备

以湘云鲫 2 号肝脏 cDNA 为模板, 使用引物 5'-GGATCCGTGCTGGAGCTGTCACACAAT-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点)与 5'-CTCGAGCCGTACCACCCAAGTGTCAA-3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点)PCR 扩增 3nLGR6 的 ORF 部分序列(第 350 位~第 557 位氨基酸)。PCR 反应体系 20.0 μ L: cDNA 模板 2.0 μ L, 10 \times Ex *Taq* Buffer 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 上、下游引物各 1.0 μ L, Ex *Taq* 酶 0.2 μ L, ddH₂O 11.8 μ L。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 60 s, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。将 PCR 产物回收连接 T 载体, 测序验证正确后利用 *Bam*H I 和 *Xho* I 内切酶切 T 载体, 回收目的片段, 连接至 pET-32a(+)质粒。经过转化连接, 挑取阳性克隆, 测序验证质粒构建成功(命名为 pET32-3nLGR6)。

构建成功的重组质粒 pET32-3nLGR6 转入大肠杆菌 BL21, 之后将含有 pET32-3nLGR6 的 BL21 菌株(50 μ g/mL Kan)置于摇床 37 °C, 二次活化至 OD₆₀₀ \approx 0.5, 加入 IPTG 母液(终浓度 4 mmol/L), 18 °C 下 110 r/min 低温低速诱导 8 h。用离心管离心收集菌液, 弃上清液, 使用 5 mL 的裂解液重悬菌体。设超声破碎

仪程序为：7 W，工作 3 s/次，间隔 10 s，总工作时间 5 min，振幅 40%，破碎细胞。超声后，4 °C离心分离上清液和沉淀。将沉淀用 8 mol/L 尿素的 Buffer B(pH 8)重悬裂解，将裂解液加入平衡好的镍柱[生工生物工程(上海)股份有限公司]中。依次使用 pH 为 6.3、5.9 和 4.5 的 Buffer B 洗脱柱子，收集洗脱液，PBS 透析过夜，SDS-PAGE 检验纯化效果。选择 8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠用于制备抗血清。按照上述方法纯化重组蛋白后，与弗氏完全佐剂(Sigma)等体积混合至乳化，腹腔皮下多点注射。21 d 后，重组蛋白与弗氏不完全佐剂(Sigma)等体积混合至乳化，腹腔皮下多点注射；7 d 后眼球取血于无菌离心管中，4 °C静置过夜后，取上层清液，分装 20 μL/管，-80 °C保存。

1.5 3nLGR6 在湘云鲫 2 号肠组织中的分布

湘云鲫 2 号后肠组织石蜡切片由省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室保存提供。将制作好的石蜡切片二甲苯过夜脱蜡，梯度复水。将切片架泡在柠檬酸盐缓冲液中，100 °C下抗原修复 6 min。用 5% 羊血 37 °C封闭 30 min 后，加上述制备的抗血清(1:500)，4 °C孵育过夜。之后加 Cy3 标记的羊抗小鼠二抗(上海生工，1:1000)，湿盒避光 37 °C孵育 1 h；PBS-T 清洗 3 次，避光加 DAPI[生工生物工程(上海)股份有限公司]，滴抗荧光猝灭封片剂，荧光显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 3nLGR6 基因克隆

克隆得到的 3nLGR6 基因 ORF 序列全长 2874 bp，编码 957 个氨基酸残基(图 1-A)。经 InterProScan 和 TMHMM 2.0 预测分析发现，其 N 端有 1 个亮氨酸重复序列结构域，C 端有 1 个 7 次跨膜结构域的 GPCR(G 蛋白偶联受体)的结构域(图 1-B)。

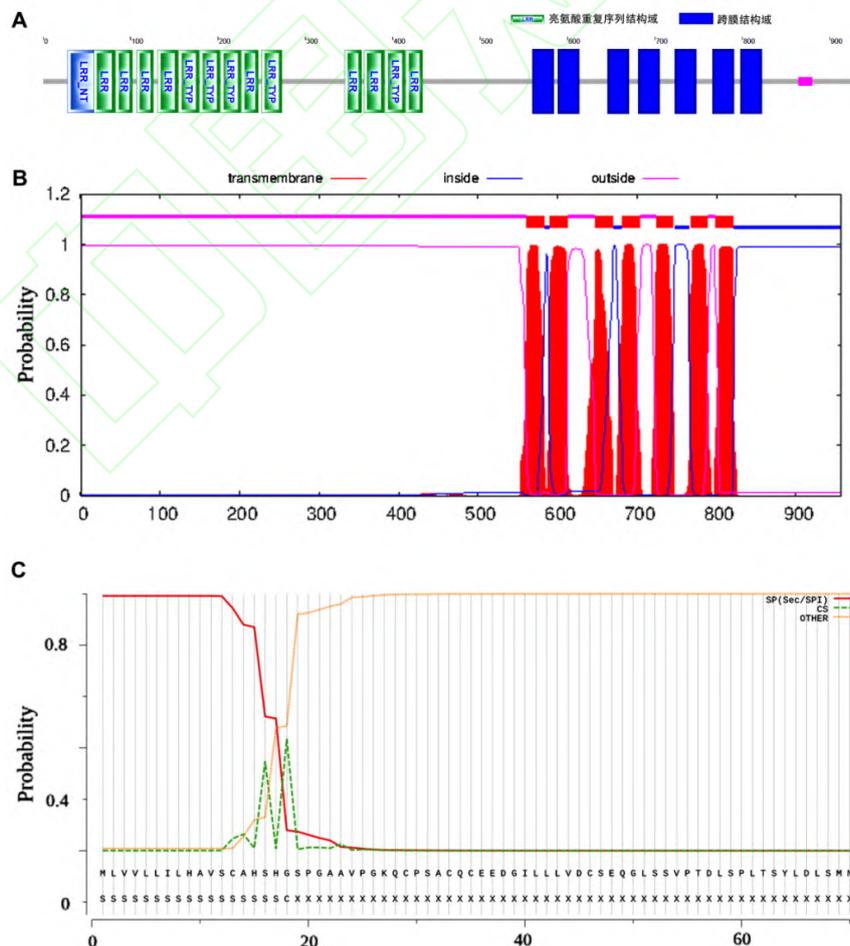


图 1 3nLGR6 蛋白结构域预测结果

Fig.1 Prediction of 3nLGR6 structure

A: 结构域预测结果; B: 跨膜结构域结果; C: 信号肽预测结果

A: Domain prediction result; B: Transmembrane domain result; C: Signal peptide prediction result

2.2 3nLGR6 蛋白质的理化性质预测结果

在真核生物中, 信号肽通常指导蛋白质进入内质网腔, 随后在信号肽酶的作用下被切割。利用 SignalP 5.0 对 3nLGR6 进行 N 端信号肽结构的预测, 结果发现其在 ^{18}Gly 和 ^{19}Ser 间存在常规分泌通路 Sec 信号肽, 能被 I 型信号肽酶 SPase I 裂解(图 1-C)。ExPASy 预测结果显示, 3nLGR6 的原子总数为 14862, 分子结构式为 $\text{C}_{4736}\text{H}_{7456}\text{N}_{1240}\text{O}_{1382}\text{S}_{48}$, 理论分子量约 105.4 kD, 理论等电点(pI)为 5.44。分子脂肪系数为 106.18, 总平均亲水性为 0.184, 不稳定系数为 49.64, 高于阈值 40, 表明该蛋白为不稳定疏水性蛋白。该蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数为 83320(mol/cm), 依据此值通过吸光度可测定 3nLGR6 蛋白浓度。酸性氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 90 个, 碱性氨基酸(Arg+Lys)总数为 58 个, N 末端起始氨基酸是甲硫氨酸(Met)。在酵母和大肠杆菌中表达的半衰期分别大于 20 和 10 h, 理论上能在大肠杆菌中进行原核表达。利用 PSORT II Prediction 进行亚细胞定位预测, 结果显示: 3nLGR6 位于细胞膜上可能性最大, 为 56.5%, 其次为内质网, 可能性为 17.4%, 而位于细胞内的可能性均为 4.3%, 故推测 3nLGR6 蛋白存在于细胞膜上, 与前人的研究结果(Fredriksson et al., 2003)一致。利用 SoftBerry-Psite 预测发现该氨基酸序列含有 3 个 N-糖基化位点, 18 个磷酸化位点(8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 9 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点), 10 个 N-豆蔻酰化位点和 16 个微体 C-末端靶信号位点等。

2.3 3nLGR6 蛋白质的高级结构预测结果

利用 UCL-CS Bioinformatics 预测蛋白二级结构, 结果显示, 3nLGR6 序列中绝大多数氨基酸都参与组成螺旋结构, 极少数氨基酸参与组成折叠结构(图 2-A), 与 GPCR 的 7 次跨膜 α 螺旋特点相吻合(Barker et al., 2007, 2010; Hilger et al., 2018)。将 LGR6 序列提交至 SWISS-MODEL, 自动搜索同源蛋白作模板, 得到 LGR6 三级结构模型(图 2-B)。LGR6 序列与 SWISS-MODEL 数据库目标蛋白 4bsr.1.B 序列同源性(Sequence identity)为 61.85%, 高于 40%表明该同源建模可用于预测该蛋白三维结构, 且预测模型可信度高。GMQE 值为 0.42, GMQE 值在 0~1 之间, 较接近于 1, 建模质量较好; QMEAN 值区间为-4~0, 本模型 QMEAN 值为 0.72, 接近于 0, 序列匹配度好。同时从三级结构预测结果也能看出其多次跨膜的结构特点, 与 GPCR 的特点相符(Barker et al., 2007, 2010; Hilger et al., 2018)。

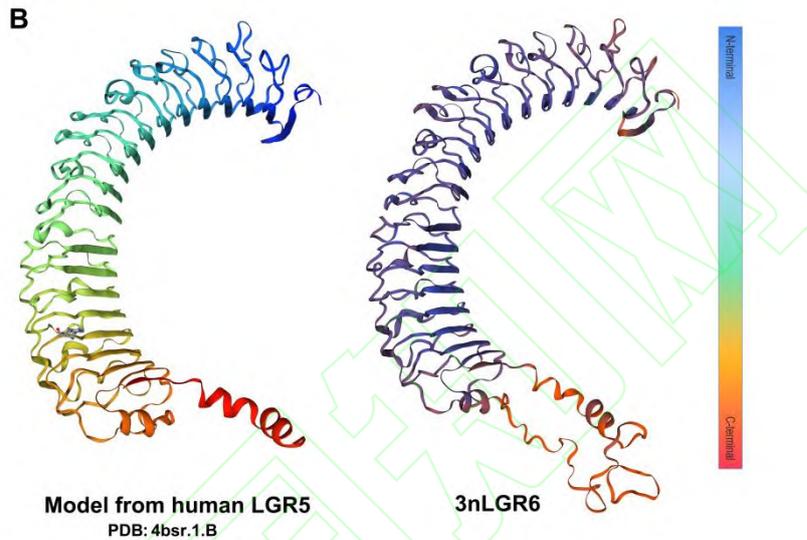
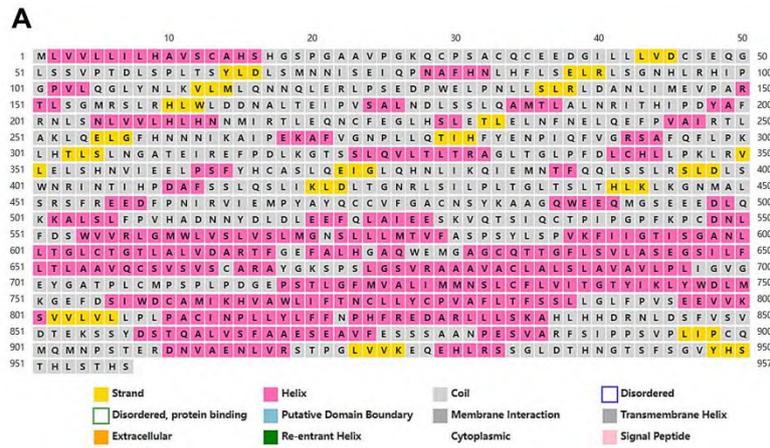


图 2 3nLGR6 的高级结构预测结果

Fig.2 Advanced structural prediction of 3nLGR6

A: 二级结构预测; B: 三级结构预测

A: Prediction of secondary structure B: Prediction of tertiary structure

2.4 3nLGR6 的同源性比对和进化分析结果

BLAST 同源比对分析发现, 湘云鲫鱼 2 号 LGR6 与其他物种的 LGR6 高度同源(图 3)。其中, 与二倍体斑马鱼(鲤形目, 鲤科)的相似性为 92.28%, 与人类和小鼠的相似性分别为 64.45%和 63.52%。利用 MEGA11 的 Neighbor-joining 法(NJ), 将 3nLGR6 氨基酸序列与其他物种构建系统进化树(Bootstrap=1000), 结果显示 3nLGR6 蛋白明显与其他硬骨鱼为同一亚族(图 4), 表明具有较近的亲缘关系。

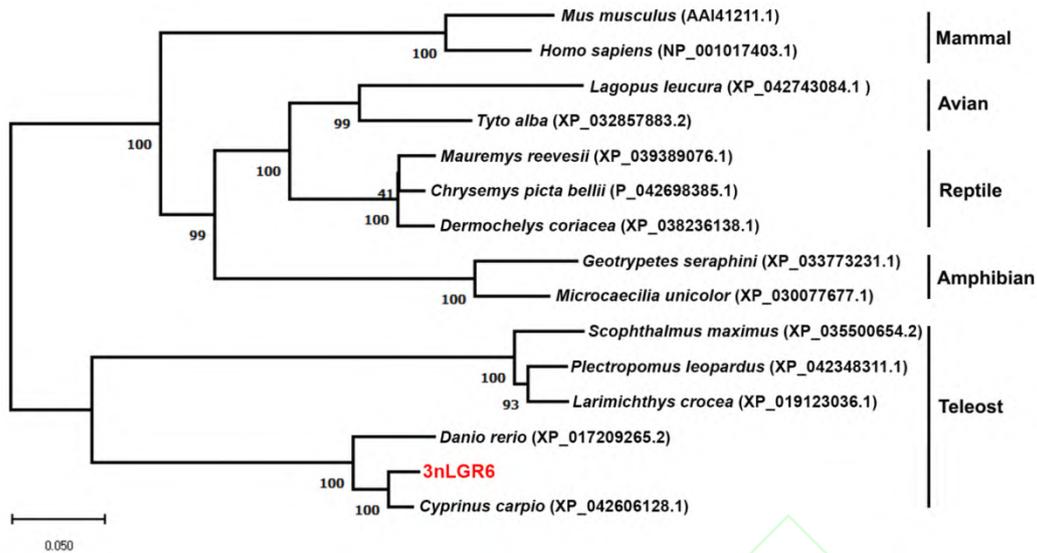


图 4 基于 NJ 法构建的 3nLGR6 氨基酸序列与其他物种的系统发育进化树
Fig.4 Phylogenetic tree of 3nLGR6 and other species based on NJ method

2.5 鱼类 LGR6 的组织表达预测结果

利用 Bgee 数据库搜索青鳉 LGR6 的组织表达情况，搜索发现 LGR6 在青鳉的各组织均有表达，且在咽鳃中的表达最高(表 1)。该结果为初步了解 LGR6 在硬骨鱼组织中的表达提供了重要参考数据。

表 1 青鳉 LGR6 的组织表达情况

Table 1 Tissue expression of LGR6 in *Oryzias latipes*

登录编号	Anat. entity ID	组织 Tissue	排名得分 Rank score	表达得分 Expression score	数据来源 Source
UBERON:0000206		咽鳃	1.22e-4	62.71	RNA-Seq
UBERON:0000922		胚胎	2.95e-4	44.81	RNA-Seq
UBERON:0002385		肌肉	0.011	44.81	RNA-Seq
UBERON:0004734		原肠胚	4.40e-4	41.54	RNA-Seq
UBERON:0000948		心脏	0.024	38.21	RNA-Seq
UBERON:0000473		精巢	0.032	37.05	RNA-Seq
UBERON:0000080		中肾	0.039	31.89	RNA-Seq
UBERON:0001474		骨骼	0.051	18.51	RNA-Seq
UBERON:0000160		小肠	0.375	24.41	RNA-Seq
UBERON:0000307		囊胚	0.624	24.87	RNA-Seq

2.6 鱼类 LGR6 的网络图预测结果

利用 STRING 数据库，搜索到斑马鱼 LGR6 的可能网络互作图(图 5-A)。结果发现与 LGR6 作用密切的基因有：*LGR4*、*RNF43*、*RSPO2*、*CTNNB1*、*APC*、*CTNNA1*。GO 和 KEGG 富集分析结果表明：*Lgr4*、*RNF43*、*RSPO2*、*APC* 基因主要涉及 Wnt 信号通路；*CTNNB1*、*CTNNA1* 基因主要涉及 Adherens junction 信号通路(图 5-B 和图 5-C)。

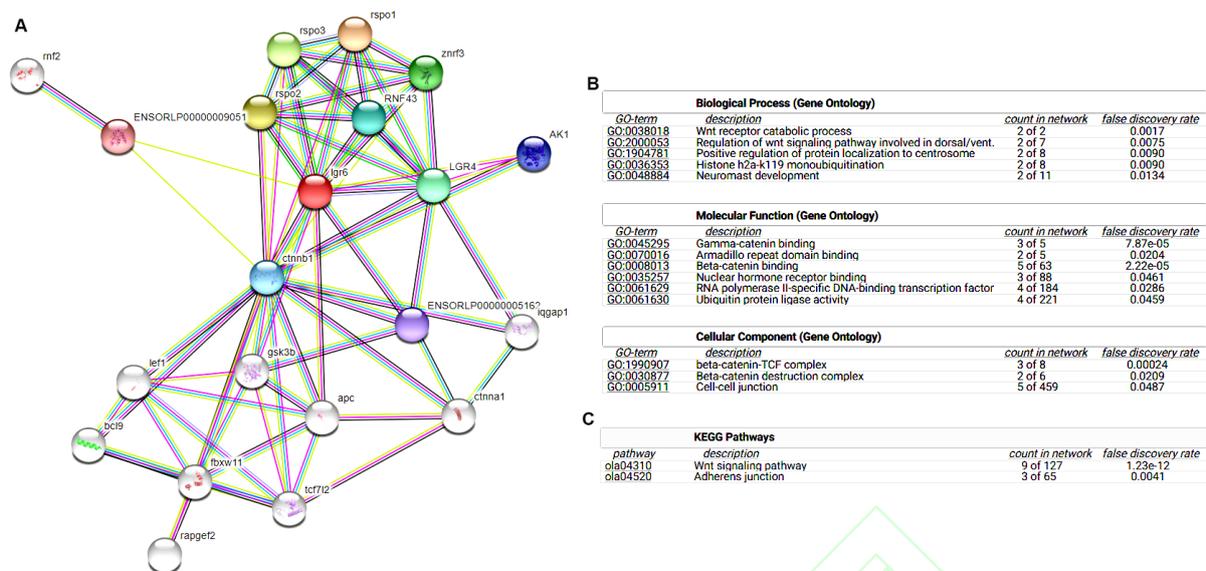


图5 斑马鱼 LGR6 的网络图互作图

Fig.5 The network of zebrafish LGR6

A: 斑马鱼 LGR6 的网络互作图预测结果; B: GO 富集分析结果; C: KEGG 富集分析结果

A: Prediction of LGR6 network from zebrafish; B: GO enrichment results; C: KEGG enrichment result

2.7 3nLGR6 原核表达和纯化结果

将 pET32-3nLGR6 转化入大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导, 可成功表达出约 47 kD 的目的蛋白(图 6-A)。利用 Ni-NTA 柱, 依次经不同梯度 pH(6.3、5.5 和 4.5)的尿素洗涤液洗脱后, 成功纯化出 3nLGR6 重组蛋白, 且大部分杂蛋白已去除(图 6-B)。

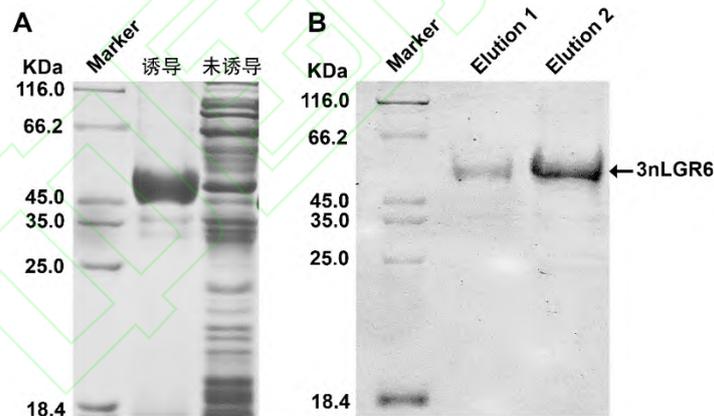


图6 3nLGR6 的诱导表达和纯化结果

Fig.6 Protein expression and purification results of 3nLGR6

A: 3nLGR6 诱导表达; B: 3nLGR6 纯化

A: Induction expression of 3nLGR6 B: Purification of 3nLGR6

2.8 3nLGR6 在湘云鲫 2 号肠组织中的分布

将纯化得到的重组蛋白免疫小鼠, 制备小鼠抗 3nLGR6 多克隆抗体。利用制备的多克隆抗体, 运用免疫组化检测 3nLGR6 在湘云鲫 2 号肠组织中的分布情况。结果表明, 3nLgr6 阳性产物主要定位于肠隐窝下层细胞的细胞质中, 每个肠隐窝平均可观察到 2 个阳性细胞, 且与细胞核无重叠(图 7); 但在肠绒毛上皮细胞等位置均未观察到阳性产物, 使用阴性抗体也未检测到阳性信号(图 7)。说明该多克隆抗体可特异性识别湘云鲫 2 号肠组织中的 3nLGR6。

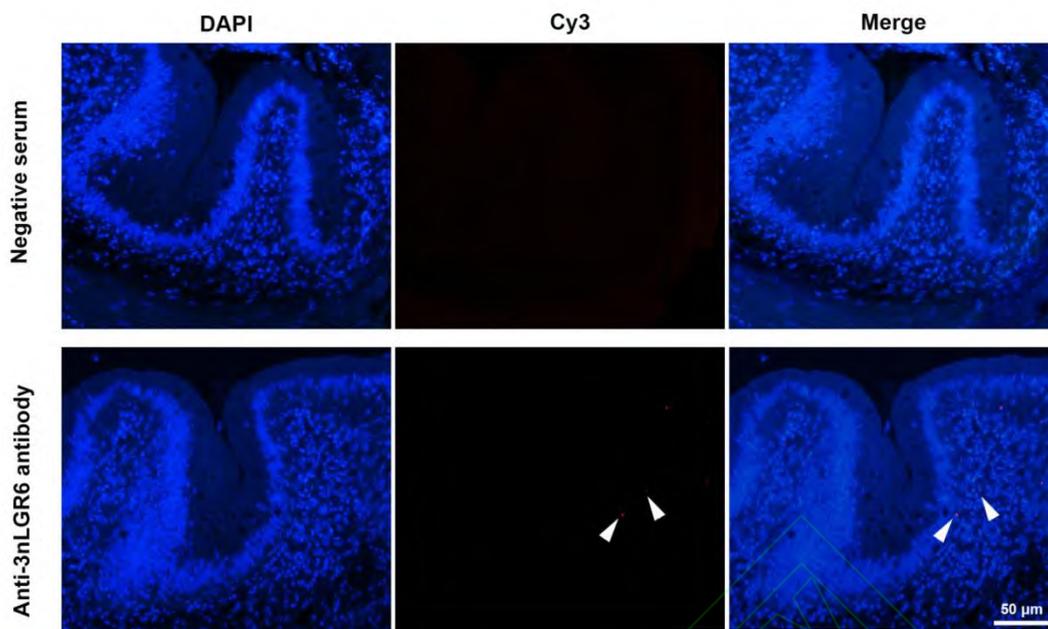


图 7 湘云鲫 2 号肠道 3nLGR6 免疫组化分析结果

Fig.7 Immunohistochemical analysis of intestinal 3nLGR6 in Xiangyun crucian carp 2

一抗为小鼠抗 3nLGR6 多克隆抗体，二抗为 Cy3 标记羊抗小鼠二抗。DAPI 标记细胞核

Paraffin sections of intestinal from Xiangyun Crucian Carp 2 were renatured, and primary antibody mouse anti-3nLGR6 polyclonal antibodies was added, secondary antibody was Cy3 labeled sheep anti-mouse. DAPI labeled nucleus

3 讨论

动物肠道兼有营养吸收和物理、生物屏障的功能，肠病变通常会引起各种疾病(Gehart et al., 2019)。在哺乳动物肠道中，由于机械磨损及生物损伤，每天约有 3 亿个死于肠道表面上皮的细胞，因此在维持肠道稳态及生物体健康方面，肠道成体干细胞发挥了重要作用(Date et al., 2019)。本研究从维持肠道屏障与稳态的干细胞角度出发，PCR 克隆得到湘云鲫 2 号 *3nLGR6* 基因 ORF 序列，并进行 3nLGR6 原核表达与纯化。湘云鲫 2 号 *3nLGR6* 基因 ORF 全长 2874 bp，编码 957 个氨基酸残基；3nLGR6 蛋白的理论分子量约为 105.4 kD，理论等电点为 5.44，在蛋白 N 端有 1 个亮氨酸重复序列结构域，C 端有 1 个 7 次跨膜结构域的 GPCR(G 蛋白偶联受体)的结构域，其在 ¹⁸Gly 和 ¹⁹Ser 间存在信号肽切割位点，为 Sec 信号肽，被 SPase I 裂解。

参考鱼类中已有 LGR6 研究的青鳉(Deguchi et al., 2012)，在 Bgee 数据库中搜索发现 LGR6 在青鳉的各组织中均有表达，且在咽鳃中的表达最高。由于青鳉 LGR6 序列与 3nLGR6 的相似性约 64.67%，后续仍然需要采取实验去探究三倍体鱼遗传背景下 LGR6 的组织表达情况。在 LGR6 的网络互作分析中，由于 3nLGR6 与斑马鱼 LGR6 的相似性约 92.28%，参考了 LGR6 的网络互作情况。结果表明，3nLGR6 与 *Rspd*、*ctnnb1*、*Lgr4* 等基因相互作用密切，且对斑马鱼 LGR6 基因进行 GO 和 KEGG 富集分析发现，这些互做基因主要涉及 Wnt 信号通路和 Adherens junction 信号通路。

为了研究 3nLGR6 在三倍体硬骨鱼中的肠道黏膜稳态作用，本研究使用原核表达载体 pET-32a(+)表达 3nLGR6 部分蛋白。在不影响 3nLGR6 的蛋白活性和免疫原性基础上，设计引物扩增 3nLGR6 的胞外段序列，并将其连接至原核表达载体 pET-32a(+)上。大肠杆菌因具有易于培养、繁殖快、表达量高、易纯化、成本低等优点，故大肠杆菌原核表达系统是研究高效表达的首选体系，其中大肠杆菌 BL21(DE3)是应用最广的表达宿主菌(Feng et al., 2022)。本研究将 pET32-3nLGR6 转化入大肠杆菌 BL21(DE3)，经 IPTG 诱导，并最终成功表达出 3nLGR6 融合蛋白。诱导表达的 3nLGR6 融合蛋白稳定，分子量与预期相符，表明原核

表达质粒 pET-32a(+)适合该蛋白的表达,且大肠杆菌 BL21 选用及其诱导表达是正确的。但是,通过该方法诱导表达的融合蛋白主要以包涵体的形式存在,后续需通过摸索、优化不同复性体系以期获得具有蛋白活性的 3nLGR6 重组蛋白。在融合蛋白纯化方面,因为 pET-32a(+)的 C 端携带有 His 标签,为后期蛋白的纯化提供了便利。因此,本研究选用镍柱并利用不同 pH 的尿素溶液纯化 3nLGR6 重组蛋白。结果表明,当依次使用 pH 为 6.3、5.5 和 4.5 的尿素洗涤液后,大部分杂蛋白已经去除,可获得纯度较高的融合蛋白,且损伤较少,故确定该梯度是包涵体尿素洗涤液的最佳 pH 梯度。

在模式动物研究中,目前已有众多商业化肠道干细胞抗体,但鱼类作为非模式动物,其商业化抗体非常匮乏。已有大量研究表明,利用小鼠并配合佐剂的使用可制备效果优良的鱼类多克隆抗体。张李敏等(2022)利用小鼠成功制备出小鼠抗花鲮鱼抗缪勒氏管激素多克隆抗体。本研究将纯化的 3nLGR6 重组蛋白和佐剂混合,皮下多点多次注射 BALB/c 雌性小鼠,制备了小鼠抗 3nLGR6 多克隆抗体。免疫组化结果显示该抗体可以特异性识别湘云鲫 2 号肠道内源性 3nLGR6,为后续深入研究 LGR6 在硬骨鱼组织中的表达情况、LGR6 在其肠道黏膜稳态中发挥的作用及相关机制提供了重要研究工具。

4 结论

三倍体鱼湘云鲫 2 号 3nLGR6 与其他物种的 LGR6 具有较高同源性,且与其他硬骨鱼具有较近亲缘关系,利用原核表达系统能成功获得 3nLGR6 部分蛋白,并制备其多克隆抗体。该结论为后续深入研究 3nLGR6 的功能奠定了重要基础。

参考文献:

- 陈剑兴, 吴萍, 丁磊, 吕传生, 罗凯坤, 王国清, 毛觉生. 2015. 湘云鲫 2 号抗病能力初步研究[J]. 当代水产, 40(12): 78-79.
- [Chen J X, Wu P, Ding L, Lv C S, Luo K K, Wang G Q, Mao J S. 2015. A preliminary study on the disease resistance of Xiangyun crucian carp 2[J]. Contemporary Fisheries, 40(12): 78-79.]
- 刘少军, 王静, 罗凯坤, 周工健, 陶敏, 张纯, 刘筠. 2010. 淡水养殖新品种——湘云鲫 2 号[J]. 当代水产, 35(1): 62-63. [Liu S J, Wang J, Luo K K, Zhou G J, Tao M, Zhang C, Liu Y. 2010. A new breed of freshwater aquaculture-Xiangyun crucian carp 2[J]. Contemporary Fisheries, 35(1): 62-63.]
- 梁向阳, 刘少军, 王静, 肖军, 胡婕, 段巍, 陈松, 陶敏, 张纯, 罗凯坤, 刘筠. 2011. 湘云鲫 2 号肌肉营养成分和氨基酸组成分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 34(1):71-74. [Liang X Y, Liu S J, Wang J, Xiao J, Hu J, Duan W, Chen S, Tao M, Zhang C, Luo K K, Liu Y. 2011. Muscle nutrition and amino acid composition analysis of Xiangyun crucian carp 2[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 34(1):71-74.]
- 黎玲, 钟泽州, 曾鸣, 刘少军, 周毅, 肖军, 王军, 刘筠. 2013. 不同倍性鱼肌间骨的比较分析[J]. 中国科学:生命科学, 43(3):189-200. [Li L, Zhong Z Z, Zeng M, Liu S J, Zhou Y, Xiao J, Wang J, Liu Y. 2013. Comparative analysis of intermuscular bone in different ploidy fish[J]. Science China Life Sciences, 56.] doi: 10.1007/s11427-013-4465-5.
- 米海峰, 孙瑞健, 张璐, 李宝圣, 王武刚, 吴业阳, 王用黎. 2015. 鱼类肠道健康研究进展[J]. 中国饲料, (15):19-22. [Mi H H, Sun R J, Zhang L, Li B S, Wang W G, Wu Y Y, Wang Y L. 2015. Review on the intestinal health of fish[J]. China Feed, (15):19-22.] doi:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20151505.
- 沈婉瑶. 2019. Wnt/ β -catenin 信号通路对斑马鱼胚胎早期神经发育的调控作用[D]. 武汉大学. [Shen W Y. 2019. Regulatory effects of Wnt/ β -catenin signaling pathway on the early neurodevelopment of zebrafish embryos[D]. Wuhan University.] doi:10.27379/d.cnki.gwhdu.2019.000234.
- 许文婷, 周蓉, 胡鑫江, 肖亚梅, 彭亮跃. 2018. 三倍体湘云鲫 2 号线粒体 DNA 含量与其不育的相关性研究[J]. 生命科学研究, 22(1):55-60+66. [Xu W T, Zhou R, Hu X J, Xiao Y M, Peng L Y. 2018. Mitochondrial dna content affects the fertilizability of the improved triploid crucian carp[J]. Life Science Research, 22(1):55-60+66.] doi:10.16605/j.cnki.1007-7847.2018.01.009.
- 张李敏, 郭琦, 王向斌, 黄茜, 李学军, 周传江, 赵道全, 张建新, 刘慧芬. 2022. 花鲮抗缪勒氏管激素基因克隆、抗体制备及其对外源雌激素的响应[J/OL]. 南方农业学报, 1-13. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1381.S.20220919.1831.004.html> [Zhang L M, Guo Q, Wang X B, Huang Q, Li X J, Zhou C J, Zhao D Q, Zhang J X, Liu H F. 2022. Molecular cloning of

- anti-Müllerian hormone gene, polyclonal antibody preparation and response to exogenous estrogen in spotted steed, *Hemibarbus maculatus*. 1-13. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1381.S.20220919.1831.004.html>.]
- Barker N, van Es J H, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters P J, Clevers H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*[J]. *Nature*, 449(7165):1003-1007. doi: 10.1038/nature06196.
- Barker N. 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1):19-33. doi: 10.1038/nrm3721.
- Barker, N, Clevers, H. 2010. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells[J]. *Gastroenterology*, 138:1681-1696. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.002.
- Bockaert J, Pin J P. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success[J]. *EMBO Journal*, 18(7):1723-1729. doi: 10.1093/emboj/18.7.1723.
- Date S, Sato T. 2015. Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31:269-289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125218.
- Deguchi T, Kawasaki T, Ohnishi H, Yuba S, Takahashi T. 2012. Identification and developmental expression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6 (*lgr6*) in the medaka fish, *Oryzias latipes*[J]. *Development Genes and Evolution*, 222(4):217-227. doi: 10.1007/s00427-012-0403-y.
- Feng C, Liu X, Hu N, Tang Y, Feng M, Zhou Z. 2022. *Aeromonas hydrophila* Ssp1: A secretory serine protease that disrupts tight junction integrity and is essential for host infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 127:530-541. doi: 10.1016/j.fsi.2022.06.068.
- Fredriksson R, Lagerström M C, Lundin L G, Schiöth H B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints[J]. *Molecular Pharmacology*, 63(6):1256-1272. doi: 10.1124/mol.63.6.1256.
- Gehart H, Clevers H. 2019. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells[J]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(1):19-34. doi: 10.1038/s41575-018-0081-y.
- Hilger D, Masureel M, Kobilka B K. 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1): 4-12. doi: 10.1038/s41594-017-0011-7.
- Hirose K, Shimoda N, Kikuchi Y. 2011. Expression patterns of *lgr4* and *lgr6* during zebrafish development[J]. *Gene Expression Patterns*, 11(7):378-383. doi: 10.1016/j.gep.2011.04.002.
- Liu W, Wen Y, Wang M, Gui S, Li X, Fan Y, Yan X, Lin Y, Sun Y, Liu J, Peng L, Liu S, Li DW, Xiao Y. 2018. Enhanced resistance of triploid crucian carp to cadmium-induced oxidative and endoplasmic reticulum stresses[J]. *Current Molecular Medicine*, 18(6):400-408. doi: 10.2174/156652401866618113105018.
- Marshman E, Booth C, Potten C S. 2002. The intestinal epithelial stem cell[J]. *Bioessays*, 24(1):91-98. doi: 10.1002/bies.10028.
- Ren L, Gao X, Yang C, Tan H, Cui J, Wang S, Li W, Zhang C, Tao M, Qin Q, Liu S. 2018. Comparison of diploid and triploid *Carassius auratus* provides insights into adaptation to environmental change[J]. *Science China Life Sciences*, 61(11):1407-1419. doi: 10.1007/s11427-017-9358-7.
- Snippert H J, Haegebarth A, Kasper M, Jaks V, van Es J H, Barker N, van de Wetering M, van den Born M, Begthel H, Vries R G, Stange D E, Toftgård R, Clevers H. 2010. *Lgr6* marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin[J]. *Science*, 327:1385-1389. doi: 10.1126/science.1184733.
- Xiao J, Fu Y, Wu H, Chen X, Liu S, Feng H. 2019. MAVS of triploid hybrid of red crucian carp and allotetraploid possesses the improved antiviral activity compared with the counterparts of its parents[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 89:18-26. doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.044.