

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00774

斑节对虾 C1q 结合蛋白(PmC1qBP)的克隆及表达特征分析

刘先军^{1,2}, 杨丽诗², 黄建华², 周发林², 杨其彬², 江世贵²

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 南海水产研究所, 广东 广州 510300

摘要: C1q 结合蛋白(C1qBP)是补体系统中的一种重要成分, 它能与游离的补体分子 C1q 的胶原样区相互作用并启动多种细胞反应, 包括增强吞噬作用、促进吞噬细胞对微生物的杀伤、诱导趋化作用, 从而增强生物体的免疫性。本实验从构建的斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢组织 cDNA 文库中筛选并克隆了 PmC1qBP 基因。为研究 PmC1qBP 在斑节对虾中的生物学功能, 采用半定量和荧光定量的方法研究比较了 PmC1qBP 基因在雌雄个体不同组织及卵巢不同发育阶段的差异表达情况。结果表明: 雌雄个体的 PmC1qBP 基因在性腺、胃、血细胞、肠中表达量存在极显著差异($P < 0.01$)。同时, PmC1qBP 在无节幼体和蚤状幼体时表达量低, 从糠虾幼体至卵巢发育成熟过程中表达量有所增加并趋于稳定, 揭示 PmC1qBP 是斑节对虾卵巢发育过程的重要功能基因。应激实验结果表明, 经脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激 6 h 后 PmC1qBP 在肝胰腺中的表达量极显著上调, 提示 PmC1qBP 参与了斑节对虾天然免疫应答, 暗示其在斑节对虾先天性免疫调控中发挥着重要的作用。

关键词: 斑节对虾; C1q 结合蛋白; 表达谱; 发育; 天然免疫

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0774-08

补体系统是作为天然免疫中的重要而保守的体系, 为机体提供了快速和高效地清除入侵微生物的途径。补体系统除了补体的直接杀伤机制外, 在补体活化过程中释放的多种小片段分子具有广泛的生物学效应, 包括趋化中性粒细胞和淋巴细胞、调理吞噬、参与调节细胞和体液免疫应答等^[1-3]。

C1q 结合蛋白(C1q-binding proteins, C1qBP)又称 gC1qR、p32、HABP1, 在补体系统中发挥着重要的作用。C1qBP 广泛分布于细胞质和线粒体中, 能与补体分子 C1q 的胶原样区结合, 激活补体系统的经典激活途径^[4-5]。此外 C1qBP 能结合剪接因子 ASF/SF2, 调控选择性剪接^[6]; 结合蛋白激酶 C, 将底物蛋白锚定于特定细胞结构^[7]; 与高分子量蛋白 kininogen, XII 因子以及 vitronectin

相互作用, 促进前炎症因子的释放^[8]。近年研究表明, C1qBP 能与 HIV-1 病毒蛋白 Rev 和 Tat, 腺病毒衣壳蛋白 V 相互作用, 调控病毒的生活周期^[9-11]。因此, C1qBP 是一种重要的多功能蛋白, 对其表达特征和功能研究一直是研究者感兴趣的课题。

真正从分子学角度上证实海洋无脊椎动物补体成分的存在是 1996 年 Smith 等^[12]对海胆表达序列标签(EST)的研究时发现的, 海胆(*Bothriocidaris*)的免疫细胞表达 2 种类补体的 ESTs, 并且存在 1 种简单的补体系统, 即含有硫酯位点的蛋白和补体受体蛋白或调控蛋白通过补体受体介导而发挥作用。在原口动物鲎(*Ptergotus*)中也发现有类补体因子 C2/Bf 和补体 C3 受体, 并证明其带有 C3 受体的吞噬细胞以及一些类似于补体特征的体液溶

收稿日期: 2010-10-19; 修订日期: 2011-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40976101); 广东省自然科学基金资助项目(9151030002000008); 农业部 948 项目(2130106); 物种资源保护项目(2130135); 广东省海洋渔业科技推广专项(A200901 B02).

作者简介: 刘先军(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail:junxianliua@163.com

通信作者: 江世贵, 研究员. E-mail:jiangsg@21cn.com

胞系统^[13]。然而对于虾类补体系统的研究鲜有报道,王伟庆等用免疫消浊比浊法测定中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血清内免疫因子,发现羊抗人 C3、CRP 均能与对虾血清中某些物质发生反应,继而推断中国明对虾血清中有结构类似于 C3、CRP 等蛋白存在^[14]。海洋无脊椎动物缺乏后天获得的特异性免疫功能,不能产生免疫球蛋白,但是它们有先天性的非特异性免疫系统,能够识别和有效清除入侵的微生物和寄生虫等异物,补体系统作为一种非特异性免疫系统,在海洋动物无脊椎动物中发挥着重要的作用。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)是中国的重要海水养殖种类,然而,近年来病害成为制约斑节对虾养殖业发展的瓶颈之一。提高对虾的自身免疫力,增强其抗病能力,是解决虾病问题的重要途径。从对虾免疫系统入手,克隆和分析免疫相关的基因,研究其免疫调控机制,有助于深入了解对虾的天然免疫机制,为进一步进行抗病生物技术育种提供第一手材料。目前对虾类免疫相关基因研究的报道比较多^[15-17],但迄今为止仍未有虾类补体系统相关基因的报道。本研究从斑节对虾卵巢的 cDNA 文库中成功筛选和克隆了 PmC1qBP 基因的 cDNA 全长,利用半定量和荧光定量的方法对 PmC1qBP 基因在斑节对虾雌雄个体不同组织以及不同发育阶段的表达情况进行分析,并研究了在内毒素 LPS 作用下的表达模式,为进一步探讨 PmC1qBP 基因在斑节对虾中的发育和免疫相关功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康成熟斑节对虾(体质量 20~25 g)养殖于南海水产研究所海南基地(三亚)。在 25~35 ℃ 充气的海水中暂养 3 d 后分别取雌雄斑节对虾组织样品,包括肝胰腺、神经、性腺、肠、胃、淋巴、血细胞、鳃共 8 个组织。同时取不同发育阶段的斑节对虾性腺组织,无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体、籽虾取整虾,对体长为 5~6 cm、7~8 cm、8~10 cm、

10~12 cm 的雌虾分离卵巢。不同发育阶段的卵巢分辨及判断依据黄建华等^[18]的研究,分别取 I 期、II 期、III 期、IV 期和 V 期卵巢(对应卵原细胞期、染色质核仁期、周边核仁期、卵黄囊期、成熟期),将组织样品剪成小块并保存于 RNAlater (Ambion)保存液。

1.2 实验方法

1.2.1 斑节对虾 C1qBP 基因的克隆 对本实验室构建的斑节对虾卵巢 cDNA 文库的测序结果进行分析,将所获得的 Contigs 与 Singletons 在数据库中进行 BLASTn 和 BLASTx 分析,利用 RACE 技术获得 PmC1qBP 基因的 cDNA 全长。

1.2.2 总 RNA 抽提及 cDNA 合成 取健康斑节对虾的肝、神经、性腺、肠、胃、淋巴、血细胞、鳃共 8 个组织以及不同发育阶段的卵巢提取总 RNA,按照 RNeasy Mini kit(Qiagen)的使用说明书进行 RNA 的抽提,使用 DNase I(Qiagen)消化残留的基因组。提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳确定其完整性,经紫外分光光度计测定纯度及浓度。

每个样品各取 1 μg 总 RNA 进行逆转录,使用 Promaga 公司提供的逆转录试剂,进行逆转录合成 cDNA 的第一条链,反应体系为 1 μL Oligo(dT), 1 μg 总 RNA, 5 μL M-MLV 缓冲液, 5 μL dNTP, 0.6 μL RNA 酶抑制剂, 1 μL M-MLV Reverse Transcriptase, 7.4 μL DEPC 水,反应程序为 42℃ 60 min, 70℃ 15 min。反应结束后,用 β-actin 引物检测逆转录的 cDNA, -80℃ 保存以备后续分析使用。

1.2.3 半定量 PCR 根据斑节对虾 C1qBP 基因的全长序列设计 C1qBP 基因的上下游特异性引物 C1qBP-F1 和 C1qBP-R1(表 1),以雌雄个体不同组织(鳃、淋巴、肝胰腺、血细胞、神经、肠、卵巢、精巢和胃)cDNA 为模板进行 PCR 反应。选择 EF-1α 为内参基因,其半定量引物设计为 EF-F1 和 EF-R1(表 1)。PCR 反应体系如下:灭菌超纯水 18.3 μL, 10×ExTaq buffer 2.5 μL, dNTP 1 μL (2.5 mmol/L), C1qBP-F1 1 μL (10 μmol/L), C1qBP-R1 1 μL (10 μmol/L), ExTaq (5 U/μL) 0.2 μL 以及各 cDNA 1 μL 进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序为 94℃

预变性 2 min; 94℃ 循环变性 30 s、55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。所获产物进行琼脂糖凝胶电泳方法分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 根据 PmC1qBP 基因的全 cDNA 长设计荧光定量 PCR 引物为 C1qBP-F2 和 C1qBP-R2(表 1), 同时选用 EF-1 α 作为内参基因, 引物为 EF-F2 和 EF-R2(表 1), 以雌雄斑节对虾的淋巴、性腺、鳃等组织的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 RT-PCR 扩增。反应体系为 20 μ L, 包含 10 μ L 的 2 \times SYBR Green Real-Time PCR Master Mix(TaKaRa), 1 μ L 模板, 0.16 μ L 引物(10 μ mol/L) 和 8.2 μ L 的双蒸水, 以蒸馏水代替模板作为阴性对照, 每个样品设置 3 个重复, 反应参数为 95℃ 预变性 10 s, 然后 95℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 最后进行融解曲线(melting curve)分析。实验数据采用相对 CT 法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)进行 C1qBP mRNA 在雌雄个体中的表达特征分析。同时以 PBS 对照组、LPS 刺激组各时间点肝胰腺 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 扩增, 引物和反应体系和反应程序同上。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。

表 1 主要相关引物及碱基序列
Tab. 1 Primers and sequences mainly used

引物名称 primer	引物序列 sequence
β -actin-F	5'-ATGGTTGTCAACTTTGCCCC-3'
β -actin-R	5'-TTGACCTCCTTGATCACACC-3'
C1qBP-F1	5'-GAACTTGGTGGTGATGTG-3'
C1qBP-R1	5'-CGTATAAAGAATGCTCGTAG-3'
EF-F1	5'-ATGGTTGTC AACTTTGCCCC-3'
EF-R1	5'-TTGACCTCCTTGATCACA CC-3'
C1qBP-F2	5'-CTCAACGTGAATCACACAGTAGACACT-3'
C1qBP-R2	5'-ACTCAAAGCTGGGACGACTCT-3'
EF-F2	5'-AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT-3'
EF-R2	5'-CGTGGTGCATCTCCACAGACT-3'

1.2.5 统计学分析 运用统计学软件 SPSS16.0 进行相对独立的单因素方差分析, 进行雌雄个体同组织间表达差异分析, 结果值以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。若 $P < 0.05$ 则认为差异显著, $P < 0.01$ 则认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

提取的斑节对虾总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0, 说明总 RNA 的完整性较好, RNA 纯度较高。琼脂糖凝胶电泳结果与 OD 值反应的结果一致, 即可见清晰的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带, 其比例达到 1:1(图 1), 表明提取的总 RNA 完整性良好, 点样孔处清晰, 说明无蛋白污染, 能够满足后续的实验要求。

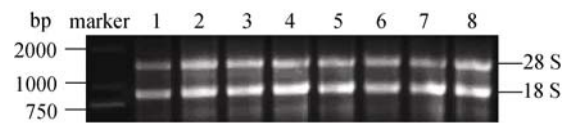


图 1 斑节对虾不同组织 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

1.肝胰腺; 2. 肠; 3.鳃; 4.淋巴; 5.神经; 6.胃; 7.精巢; 8.血细胞
Fig. 1 RNA of different tissues in *Penaeus monodon*
1.hepatopancreas; 2.intestine; 3.chill; 4.lymph; 5.nerve;
6.stomach; 7.testeis; 8.hemocytcs

2.2 PmC1qBP 基因在雌雄个体中的组织表达谱

2.2.1 PmC1qBP 基因在雌雄个体不同组织中的半定量分析 将斑节对虾的卵巢的 cDNA 文库中的 Contig391 进行 RACE, 获得了 PmC1qBP 的 cDNA 全长, cDNA 全长 1 285 bp, ORF 为 633 bp 编码 210 个氨基酸, 将其命名为 PmC1qBP。

为了解 PmC1qBP 基因在雌雄个体不同组织中的表达情况, 实验选取了斑节对虾雌雄个体淋巴、肝胰腺、肠、血细胞、鳃、性腺、胃、神经几种组织进行半定量表达分析。由于 PCR 反应必须落在线性增长期内, 故实验首先进行了 C1qBP 基因和内参 EF-1 α 基因的循环数梯度摸索。在设定的 20、23、26、30、32、35 共 6 个循环数梯度中, C1qBP 基因在 23 到 35 个循环时的表达量呈现梯度上升的趋势, 表明 PCR 扩增处于指数增长期。实验选取 30 个循环为 C1qBP 基因的最佳 PCR 循环数, 内参 EF-1 α 基因最佳 PCR 循环数为 26。

从半定量结果可见 PmC1qBP 基因在雌雄斑节对虾中均有表达, 但存在表达量上的差异(图 2、图 3)。在雄性个体的淋巴中表达量最高, 在血细胞中较高, 但肠中几乎未检测到 PmC1qBP 的

表达(图 2)。而在雌性个体的卵巢中表达量最高, 淋巴和肝胰腺中也有较高的表达, 但神经和胃的 PmC1qBP 表达量较低(图 3)。

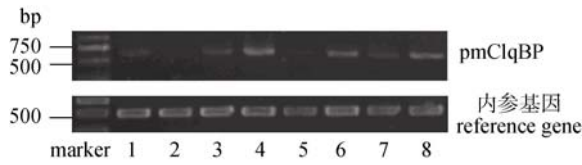


图 2 PmC1qBP 在雄性斑节对虾组织中的半定量分析
1.肝胰腺; 2.肠; 3.鳃; 4.淋巴; 5.神经; 6.胃; 7.精巢; 8.血细胞

Fig. 2 Semi-quantitative analysis of PmC1qBP in male tiger shrimp tissue
1. hepatopancreas; 2.intestine; 3.gill; 4.lymph; 5.nerve; 6.stomach; 7. testeis; 8. hemocytes

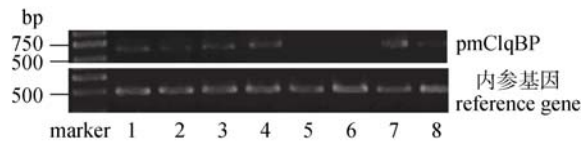


图 3 PmC1qBP 在雌性斑节对虾组织中的半定量分析
1.肝胰腺; 2.肠; 3.鳃; 4.淋巴; 5.神经; 6.胃; 7.卵巢; 8.血细胞

Fig. 3 Semi-quantitative analysis of PmC1qBP in female tiger shrimp tissue
1.hepatopancreas; 2.intestine; 3.gill; 4. lymph; 5.nerve; 6.stomach; 7.ovary; 8. hemocytes

2.2.2 PmC1qBP 在雌雄个体不同组织中的定量分析 为进一步验证 PmC1qBP 在雌雄个体中的表达谱, 利用荧光定量 PCR 方法对上述 8 种组织

的表达情况进行验证。采用 EF-1 作为内参基因。定量结果如图 4 所示, 所检测的 8 种组织中, 肠、胃、性腺、血细胞在雌雄斑节对虾中分别存在着显著差异。雄虾中淋巴表达量最高, 而雌虾中卵巢表达量最高。雄虾胃和血细胞的 PmC1qBP 的表达量分别是雌虾的 1.97 和 1.53 倍, 但雌虾卵巢和肠中的表达量却分别是雄虾精巢的 1.81 和 2.32 倍, 而在肝胰腺、神经、鳃中不存在显著性差异(图 4), 这与半定量电泳结果一致。

2.3 PmC1qBP 的发育表达谱

为了解 PmC1qBP 基因在不同发育阶段的表达特征, 实验采集了不同发育阶段, 以及不同时期卵巢样品进行半定量检测。结果表明, PmC1qBP 基因在无节幼体和蚤状幼体时几乎检测不到表达(图 5)。发育到糠虾幼体时, PmC1qBP 有微弱表达, 随着发育阶段的推进, 表达量逐渐上升(图 5)。7~8cm 体长的斑节对虾已在卵巢中检测到较高表达的 PmC1qBP, 直至从 I 期卵巢发育到 V 期卵巢, 表达量仍趋于稳定(图 5)。

2.4 PmC1qBP 对 LPS 应激表达谱

LPS 是革兰氏阴性菌的主要成分, 实验利用 LPS 作为免疫刺激物, 对 PmC1qBP 在处理 0~24 h 的斑节对虾血细胞中的表达情况进行分析。结果如图 6 所示, PmC1qBP 基因 LPS 刺激 3 h 时, 刺

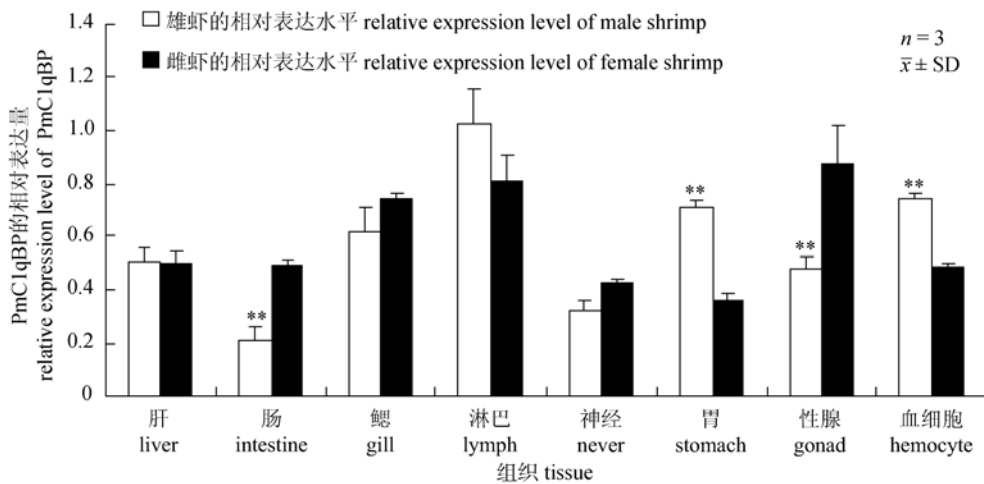


图 4 PmC1qBP 在雌雄个体在不同组织中 C1qBP 的定量分析

“*”表示雌虾和雄虾在此组织中表达差异显著($P < 0.05$); “**”表示差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 4 Quantitative analysis of PmC1qBP in different tissue of male and female tiger shrimp
“*” represents $P < 0.05$; “**” represents $P < 0.01$.

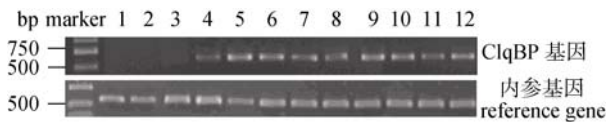


图 5 PmClqBP 在斑节对虾卵巢不同发育阶段的半定量分析

1. 无节幼体; 2. 蚤状幼体; 3. 糠虾幼体; 4. 籽虾; 5. 卵巢(体长 7~8 cm); 6. 卵巢(体长 8~10 cm); 7. 卵巢(体长 10~12 cm); 8. I 期卵巢; 9. II 期卵巢; 10. III 期卵巢; 11. IV 期卵巢; 12. V 期卵巢

Fig. 5 Semi-quantitative analysis of PmClqBP in different development stages

1. nauplii; 2. zoea larvae; 3. mysis larvae; 4. seed shrimp; 5. ovary (7-8 cm body length); 6. ovary (8-10 cm body length); 7. ovary (10-12 cm body length); 8. ovary stage I; 9. ovary stage II; 10. ovary stage III; 11. ovary stage IV; 12. ovary stage V

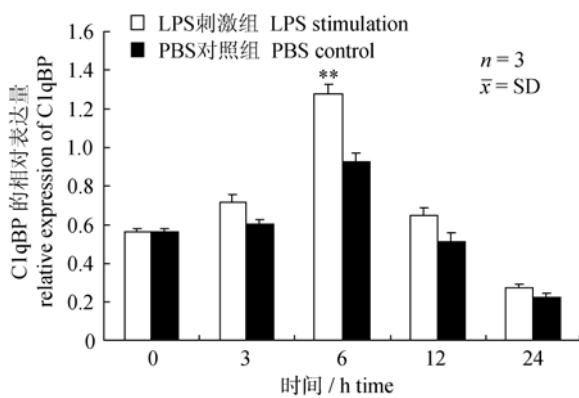


图 6 血细胞 PmClqBP 在 LPS 刺激下的表达特征分析
“**”表示 $P < 0.01$.

Fig. 6 Expression profile of the PmClqBP in hemocyte after LPS stimulation
“**” represents $P < 0.01$.

激组和对照组相比表达量没有显著性变化, 在刺激后的 6 h, 表达量上调, 刺激组是对照组的 1.38 倍, 表达差异为极显著($P < 0.01$), 此时 PmClqBP 的表达量达到最高值。刺激后 12 h, 表达量开始回落。

3 讨论

ClqBP 作为补体系统中的一种重要成分, 在生物体先天性免疫中发挥着重要的作用。目前关于 ClqBP 蛋白的结构与功能的信息主要来自人和小鼠等生物, 在海洋无脊椎生物中的研究少, 斑节对虾的补体系统的研究更是鲜有报道。本研究对 PmClqBP 基因在雌雄个体的组织表达情况、

不同发育阶段表达情况以及内毒素刺激作用下的表达情况进行了探索, 发现 PmClqBP 在免疫组织和卵巢中具有高表达, 并受 LPS 的调控表达。

目前对高等脊椎动物 ClqBP 研究较多, ClqBP 作为一种跨膜高度糖基化的糖蛋白已经被克隆^[19-20], ClqBP 在人类、小鼠中显示出高度同源性(67%~87%)^[21-25]。Dean 等^[26]研究发现, ClqBP 主要存在于人的内皮细胞、小鼠的肺和肠组织。斑节对虾的组织表达分析表明, PmClqBP 在具有内皮细胞来源的肝胰腺、肠、淋巴、胃中均有表达, 在血细胞中表达量也较高。肝胰腺、肠、胃、淋巴是斑节对虾重要的免疫器官, 血细胞则是对虾天然免疫系统的首要防线, 发挥识别、吞噬、黑化、细胞毒性和细胞间信息传递等多种免疫功能^[27]。PmClqBP 在这些器官的高表达提示其可能参与了天然免疫反应。

值得关注的是, PmClqBP 在雌雄个体间的表达量存在着组织的差异, 在雌性个体中卵巢中的表达量最高, 而在雄性斑节对虾中则是淋巴组织表达量最高, 雄虾胃和血细胞中的 PmClqBP 的表达量分别是雌虾的 1.97 倍和 1.53 倍, 而雌虾卵巢和肠中的表达量却分别是雄虾精巢和肠的 1.81 和 2.32 倍。雌雄个体组织的差异表达可能与其参与的不同生命活动有关。近年来, 越来越多研究支持免疫基因在卵巢中具有高表达的现象。Qiu 等^[28]通过 qRT-PCR 方法检测免疫基因 PmPrx 在不同组织中的表达情况, 发现 PmPrx 在卵巢中表达量最高。Chen 等^[29]应用 Northern blot 的分析方法研究三疣梭子蟹免疫相关基因 proPO 组织表达情况, proPO 在卵巢、肝胰腺、血细胞中有很高的表达量。Zhou 等^[30]研究发现, 斑节对虾的免疫相关基因 QM 在卵巢、肌肉、胃、脑、心脏组织中都有表达, 但在卵巢中的表达量最高。

为研究在性腺中高表达的 PmClqBP 基因是否参与了斑节对虾的发育过程, 本研究对不同发育时期的卵巢的 PmClqBP 基因进行了半定量表达分析。结果表明, PmClqBP 基因在无节幼体和蚤状幼体时几乎检测不到表达。发育到糠虾幼体时, PmClqBP 有微弱表达, 随着发育阶段的推进,

表达量逐渐上升。说明随着免疫系统的发育成熟, PmC1qBP 开始表达并逐渐上升到高水平。根据黄建华等^[19]对卵巢发育阶段时期的划分, 本研究选取了前 5 个阶段进行分析, 在卵巢发育逐渐成熟过程中, PmC1qBP 的表达维持在相对稳定的水平。Kilvik 等^[31]研究发现, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)补体分子 C3-1、C3-3、C3-4、C4、C5、C7、B 因子和 D 因子在未受精卵阶段都有转录。受精后到孵出阶段, 补体转录水平稳定增加。Huttenhuis^[32]也在鲤(*Cyprinus carpio*)未受精卵中检测到母源 C3 mRNA 和 C3 蛋白。因此, 卵巢高表达的补体相关因子可能在受精卵的防御机制中发挥重要作用。

为高阐述 PmC1qBP 是否参与了斑节对虾免疫反应, 本研究进行了 LPS 刺激条件下其表达特征分析。LPS 是革兰氏阴性菌的细胞壁组分, 被认为是真核生物先天性免疫的一种重要的刺激物^[33-34]。对虾致病菌如弧菌、假单胞菌、气单胞菌等均是革兰氏阴性菌, 是对虾养殖过程中的主要病害之一^[35]。

实验采用 LPS 作为刺激物, 具有一定代表性。LPS 能刺激人和小鼠的巨噬细胞、单核细胞和中性粒细胞, 通过活化转录因子引起一些细胞因子和可溶性的调控物的释放^[36-37]。在昆虫和甲壳动物中, LPS 能结合到相应的识别蛋白后, 激活酚氧化酶原激活系统、凝集级联反应以及抗菌肽基因的表达^[38]。斑节对虾受 LPS 刺激后, 血细胞的 PmC1qBP mRNA 迅速表达上调, 在刺激 6 h 后达到表达高峰, 随着注射时间推移, 表达量逐渐回落, 说明 PmC1qBP 是 LPS 诱发的免疫反应中的急性期蛋白。这与在人类补体 C3 在机体受炎症刺激后浓度显著上升相类似。在补体替代途径中, 人类补体系统可被细菌的脂多糖、多糖、肽聚糖或真菌的酵母聚糖等成分特异性激活, 在 P、B 和 D 因子级联互动下, 最终形成细胞杀伤性膜攻击复合物, 清除细胞异己分子, PmC1qBP 可能参与这一免疫应答过程。Somboonwivat K 等用差异显示 PCR 和双向电泳技术研究了弧菌感染后斑节对虾免疫相关因子差异表达情况, 结果发现血

蓝蛋白、酚氧化酶、丝氨酸蛋白酶、抗 LPS 因子、热激蛋白 90、 α -巨球蛋白等免疫因子显著上调, 但未报道发现补体相关因子^[39-40]。因此, 补体因子及补体系统在斑节对虾天然免疫中的作用及机制仍有待研究。本研究结果为 PmC1qBP 在斑节对虾发育及免疫方面的功能研究提供了理论依据。

目前本实验室正在开展 PmC1qBP 活性方面的研究, 以期通过借助细胞生物学的手段来研究 PmC1qBP 在免疫应答中的作用机理, 这将对甲壳类动物免疫机理方面研究提供更有价值的信息, 相关结果将另外报道。

参考文献:

- [1] Yan W, Sheng N, Seto M, et al. Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart [J]. *Biol Chem*, 1999, 274(21): 14926-14935.
- [2] Yamaoka K, Masuda K, Ogawa H, et al. Cloning and characterization of the cDNA for human airway trypsin-like protease [J]. *Biol Chem*, 1998, 273(19): 11895-11901.
- [3] John E, Michael M. The Human Complement System in Health and Disease [J]. *Ann Rheum Dis*, 1998, 57: 581.
- [4] Wing M G, Seilly D J, Nicholas R S. Comparison of C1q-receptors on rat microglia and peritoneal macrophages [J]. *Neuroimmunol*, 1999, 94: 74-81.
- [5] Ghebrehiwet B, Peerschke E I. cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41(2-3): 173-183.
- [6] Amet L E, Lauri S E, Hienola A, et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 18: 1014-1024.
- [7] Robles-Flores M, Rendon-Huerta E, Gonzalez-Aguilar H, et al. P32 (gC1qBP) is a general protein kinase C (PKC)-binding protein; interaction and cellular localization of P32-PKC complexes in ray hepatocytes [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(7): 5247-5255.
- [8] Ghebrehiwet B, CebadaMora C, Tantral L, et al. gC1qR/p33 serves as a molecular bridge between the complement and contact activation systems and is an important catalyst in inflammation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 586: 95-105.
- [9] Matthews D A, Russell W C. Adenovirus core protein V interacts with p32--a protein which is associated with both

- the mitochondria and the nucleus [J]. *Gen Virol*, 1998, 79 (pt 7): 1677–1685.
- [10] Milbradt J, Auerochs S, Marschall M, et al. Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C [J]. *Gen Virol*, 2007, 88(pt 10): 2642–2650.
- [11] Berro R, Kehn K, Adair R, et al. Acetylated Tat regulates human immunodeficiency virus type 1 splicing through its interaction with the splicing regulator p32 [J]. *Virology*, 2006, 80(7): 3189–3204.
- [12] Smith L C, Chang L, Britten R J, et al. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes [J]. *Immunol*, 1996, 156: 593–602.
- [13] Zhu Y, Thangamani S, Ho B, et al. The ancient origin of the complement system [J]. *EMBO J*, 2005, 24: 382–394.
- [14] 王伟庆, 李爱杰, 兰霞, 等. 用免疫消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子 [J]. *水产学报*, 1998, 22(2): 171–174.
- [15] Yang L S, Yin Z X, Liao J X, et al. A Toll receptor in shrimp [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44: 1999–2008.
- [16] Zhao Z Y, Yin Z X, Xu X P, et al. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity [J]. *Virology*, 2009, 83(1): 347–356.
- [17] Huang X D, Yin Z X, Liao J X, et al. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(2): 230–238.
- [18] 黄建华. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察 [J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(3): 47–52.
- [19] Nepomuceno R R, Ruiz S, Park M. C1qBP is a heavily O-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity [J]. *Immunology*, 1999, 162(6): 3583–3589.
- [20] Nepomuceno R R, Henschen-Edman A H, Burgess W H, et al. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qBP, the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro [J]. *Immunity*, 1997, 6(2): 119–1129.
- [21] Kim T S, Park M, Nepomuceno R R, et al. Characterization of the murine homolog of C1qR(P): Identical cellular expression pattern, chromosomal location, and functional activity of the human and murine C1qR(P) [J]. *Mol Immunol*, 2000, 37(7): 377–389.
- [22] Petrenko O, Beavis A, Klaine M, et al. The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4 [J]. *Immunity*, 1999, 10(6): 691–700.
- [23] Norsworthy P J, Taylor P R, Walport M J. Cloning of the mouse homolog of the 126-kDa human C1q/MBL/SP-A receptor, C1qBPp [J]. *Mammalian Genome*, 1999, 10: 789–793.
- [24] Dean Y D, McGreal E P, Akatsu H. Molecular and cellular properties of the rat AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor with structural homology to thrombomodulin [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(44): 34382–34392.
- [25] Vaage J T, Dissen E, Szpirer C, et al. Characterization and molecular cloning of rat C1Rp, a receptor on NK cells [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(12): 3355–3362.
- [26] Dean Y D, McGreal E P, Akatsu H, et al. Molecular and cellular properties of the rat AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor with structural homology to thrombomodulin [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(44): 34382–34392.
- [27] Mats W, Pia K, Kallaya S, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, 2000, 191 (1–3): 45–52.
- [28] Qiu L, Ma Z, Jiang S, et al. Molecular cloning and mRNA expression of peroxiredoxin gene in black tiger shrimp [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(6): 2821–2827.
- [29] Chen P, Li J, Liu P, et al. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase gene in swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(1): 106–112.
- [30] Zhou F L, Qiu L H, Jiang S G, et al. Molecular analysis of the QM gene from *Penaeus monodon* and its expression on the different ovarian stages of development [J]. *Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11033-010-0312-y.
- [31] Kilvik T, Løvoll M, Boshra H, et al. Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunogenetics*, 2006, 58(2–3): 168–179.
- [32] Huttenhuis H B, Grou C P, Taverne-Thiele AJ, et al. Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(4): 586–596.
- [33] Ulevitch R J, Tobias P S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin [J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 437–457.
- [34] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral

- regulatory gene cassette spatzle/Toll, dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults [J]. *Cell*, 1996, 86: 973–983
- [35] 陶保华, 胡超群, 吴蔚. 斑节对虾弧菌病的病原生物学研究 [J]. *热带海洋学报*, 2001, 20(2): 80–86.
- [36] Ostos M A, Recalde D, Zakin M M, et al. Implication of natural killer T cells in atherosclerosis development during a LPS induced chronic inflammation [J]. *FEBS Lett*, 2002, 519(1–3): 23–29.
- [37] Nakagomi A, Freedman S B, Geczy C L. Interferon-gamma and lipopolysaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by C-reactive protein: relationship with age, sex, and hormone, replacement treatment [J]. *Circulation* 2000, 101(15): 1785–1791.
- [38] Hofmann J A, Reichart J M, Hetru C. Innate immunity in higher insects [J]. *Immunology*, 1996, 8: 8–13.
- [39] Somboonwiwat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, et al. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Biochem Mol Biol*, 39(1): 26–36.
- [40] Somboonwiwat K, Chaikerasitak V, Wang H C, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection [J]. *Proteome Sci*, 2010, 8: 39.

Cloning and expression profile analysis C1q-binding protein (PmC1qBP) in *Penaeus monodon*

LIU Xianjun^{1,2}, YANG Lishi², HUANG Jianhua², ZHOU Falin², YANG Qibin², JIANG Shigui²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

Abstract: C1q-binding protein (C1qBP) is an important component of the complement system, which interacts with collagen-like region of C1q and invokes many cell responses, involved in enhancing phagocytosis, promoting macrophage of microbial, inducing chemotaxis, and further enhancing the organism's immunity. In recent years, higher frequencies of disease epidemics have been reported. It is necessary to further research the innate immune mechanisms of *Penaeus monodon*. Now we have successfully constructed cDNA library of ovarian tissue in *Penaeus monodon*, and identified PmC1qBP gene. To study the biological functions of PmC1qBP in shrimp, we compared the expression level of PmC1qBP in different tissues of female and male *Penaeus monodon* and development stages of ovary with semi-quantitative and real-time quantitative PCR. The results show that the expression level of PmC1qBP has significant differences between male and female *Penaeus monodon* in gonads, hemocytes, intestine and stomach ($P < 0.01$). At the same time, the expression level of PmC1qBP is very low in nauplii and zoea larvae stage, which increases from mysis larvae stage and stabilizes during the maturation stages of ovary. The results reveal that PmC1qBP is an important functional gene during the ovary development of *Penaeus monodon*. The immune challenge experiment indicated that PmC1qBP is up-regulated in hepatopancreas after treated with LPS for 6 h. The result suggested that the PmC1qBP was involved in the innate immune response of *Penaeus monodon* and might play an important function in immune regulation.

Key words: *Penaeus monodon*; C1qBP; expression; development; innate immunity

Corresponding author: JIANG Shigui. E-mail: jiangsg@21cn.com