

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00994

鲢补体 C7 基因的克隆、表达和序列分析

蒋菁菁^{1,2}, 李英文¹, 陈大庆², 刘绍平², 段辛斌², 李小芳²,
范振华², 汪登强²

1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331;

2. 农业部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 补体系统经活化形成末端补体复合物, C7 是将此复合物与目的细胞的细胞膜结合的重要分子。本研究从已有的 cDNA 文库中克隆鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)补体 C7 的 cDNA, 其全长 2 625 bp, 编码 821 个氨基酸。同源性分析表明, 鲢补体 C7 与草鲤鱼的氨基酸序列相同率最高(为 93%)。与已报道的硬骨鱼类补体 C7 相同, 鲢补体 C7 具有一些保守的结构, 如 TSP1、LDLRa、MACPF、EGF、TSP1、CCP。对 12 尾鲢补体 C7 进行遗传多样性分析发现有 6 个突变位点, 其中 5 个是同义突变, 另外一个是非同义突变, 确定 6 个等位基因。在鲢正常组织和嗜水气单胞菌感染的免疫器官组织中, 对 C7 基因进行了 RT-PCR 表达分析, 结果显示, 正常状态下, 鲢补体 C7 基因只在脾中表达, 在感染嗜水气单胞菌 12 h 后, 鲢 C7 基因在脑、鳃、心、肾、肝、肠、脾 7 种组织中迅速表达, 随着病原的清除, 补体 C7 基因表达量也逐渐降低直至停止表达, 说明补体 C7 是一个与抗嗜水气单胞菌感染相关的基因。

关键词: 鲢; C7; 遗传多样性; 克隆; 表达

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-0994-07

补体系统是动物一个古老的防御机制, 有很多重要功能, 如促进吞噬和溶解靶细胞, 能有效抵抗入侵者。补体系统由 30 多种蛋白分子所组成, 是迄今所知机体中最复杂的一个限制性蛋白水解系统^[1]。补体的活化经过经典途径、旁路途径或凝集途径, 形成末端补体复合物^[2]。当几种补体蛋白 C6、C7、C8、C9 和 C5b 结合于末端补体复合物活化表面, 就会形成脂溶性微孔结构, 即膜攻击复合物 (Membrane Attack Complex, MAC), MAC 引起细胞渗透性溶解。在 MAC 形成过程中, C5b 和 C6 相互作用形成 C5b-6 二聚体, 后与 C7 结合形成 C5b-7 三聚体, 并产生一个短暂的高亲和性脂结合位点, 它使得这个复合物插入靶细胞的细胞膜中, 再结合上 C8、C9, 形成最终的跨膜复合物^[3]。

C7 使中间体 C5b-7 能结合到靶细胞膜上, 从而使 MAC 在亲水-疏水两性中转变^[4], 是补体系统末端级联反应的重要因子。C7 分子结构包括 a 型低密度脂蛋白受体(LDLRa)、表皮生长因子前体(EGF)、I 型凝血敏感蛋白(TSP-1)、膜攻击复合物-穿孔素(MACPF)和补体控制蛋白(CCP)等结构功能域^[5], 活化过程中并无分子的裂解, 而是作为整体参与结合。C7 最早是在人血清中被发现, 硬骨鱼类 C7 序列最早见于日本比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)(Gene Bank AB020964), 之后虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)的 C7 也被已克隆和分析, 其他鱼类的 C7 还未见报道。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是中国重要的淡水养殖种类之一, 具有很高的淡水养殖量及

收稿日期: 2011-11-21; 修订日期: 2011-12-25.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(200903048-01).

作者简介: 蒋菁菁(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类分子生物学. E-mail: yaqingjingjing@163.com

通信作者: 汪登强(1973-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 鱼类遗传多样性及保护. Tel: 13697302706; E-mail: wdq@yfi.ac.cn

渔业产量^[6-7], 在中国水产养殖业中占有举足轻重的地位。但是, 鲢在养殖过程病害频发, 尤以败血症为甚, 病原体主要是嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*), 由它引起的疾病一般病势较猛, 多为恶性传染病, 死亡率很高^[8-9]。为了研究鲢对细菌性病原的防御机制, 我们构建了患败血症鲢 cDNA 文库。本研究从 cDNA 文库中筛选出鲢的补体 C7 基因, 分析它在群体中的多样性和在不同组织中的表达以及鱼体受到病原入侵后的反应, 有助了解鲢抗病机理、也为鲢抗病育种的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2010 年 10 月在湖南省鱼类原种场取鲢 12 尾(体质量 80~150 g), 取肝和脾组织, 按 0.1 g 组织取 1 mL Trizol 溶液(大连宝生物工程有限公司)混合, 并在匀浆器中快速匀浆后于-20℃保存备用。

为了检测 C7 的组织表达特征, 2010 年 11 月在湖北省荆州市窑湾渔场取 18 尾健康状况良好的鲢(体质量 50~90 g), 其中 15 尾腹腔注射嗜水气单胞菌溶液, 注射量为 10⁴/g, 其余 3 尾注射 0.015 mol/L 磷酸缓冲液作为对照组。在注射感染 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 时各取 3 尾鲢, 对照组于 12 h 时采样, 将每尾鱼的肝、脾、肾、肠、鳃、脑、心 7 种组织取出, 立即加入 Trizol 溶液, 匀浆后于-20℃保存备用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

根据 Invitrogen 公司的 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书, 从保存于-20℃的各种匀浆组织中

提取总 RNA, 琼脂糖电泳检测提取效果(图 1), 然后用 DNase I 酶于 37℃消化 30 min 以去除残留的 DNA。用 Poly(T)₁₈ 和 PowerScript Transcriptase (Clontech)将消化后的总 RNA 反转录成 cDNA。

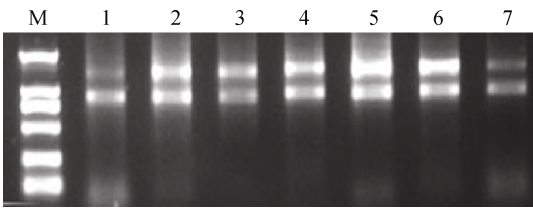


图 1 电泳检测提取的鲢总 RNA
M: 250 bp 分子量标准; 1: 脑; 2: 鳃; 3: 心脏; 4: 肾;
5: 肝; 6: 肠; 7: 脾

Fig.1 Gel electrophoresis analysis the total RNA of *Hypophthalmichthys molitrix*
M:250 bp marker; 1: brain; 2: gill; 3: heart; 4: kidney;
5: liver; 6: intestine; 7: spleen

1.3 cDNA 文库的筛选

根据其他鱼类补体 C7 的保守序列, 设计简并的特异引物 C7-F 和 C7-R(表 1), 按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)说明书从鲢 cDNA 文库^[10]中筛选 C7 cDNA 序列, 并测序。

1.4 鲢群体补体 C7 的扩增及测序

根据从文库筛选 C7 cDNA 序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计两对鲢 C7 特异引物: C7-F1 和 C7-R1 以及 C7-F2 和 C7-R2(表 1)。这两对引物包含一个约 180 bp 的重叠区以便拼接, 两对引物扩增长度约占编码区的 93%。12 尾鲢取自湖南省鱼类原种场, 取脾组织, 提取总 RNA, 并反转录成 cDNA 作模板。扩增体系为 50 μL, 包括 10×PCR Buffer 5 μL、10 mmol/L dNTP 0.5 μL、10 μmol/L 引物各 2 μL、cDNA 模板适量并补充灭菌双蒸水

表 1 鲢补体 C7 扩增引物所用引物
Tab.1 Primer used to amplify the *Hypophthalmichthys molitrix* C7 gene

引物 primer	核苷酸序列(5'-3') nucleotide sequence(5'-3')	作用 function
C7-F	GARSTAGCYCAGTCCAGAAC	从文库中筛选 C7 cDNA 序列
C7-R	CACATKSCACYTCCTTGACCA	clone C7 cDNA sequence from cDNA library
C7-F1	CAGCATCCACAGCATTAAGA	扩增鲢 C7 编码区-19 位至 1 473 位基因
C7-R1	TCTTCCTGTGAGGTCAGAG	amplificate the coding region of -19 to 1 473
C7-F2	AGTGGCACTATAGTGTGT	扩增鲢 C7 编码区 1 290 位至第 2 296 位基因
C7-R2	GCAGACCAACAGCTCCAG	amplificate the coding region of 1290 to 1 473
β-actinF	CCCCATCGAGCACGGTATG	扩增内参基因
β-actinR	ATGGCGGGGTGTTGAAGGTC	amplificate the β-actin gene

至 50 μ L。扩增反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。扩增结束后取 2 μ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

用 Gel Extraction Kit(OMEGA)对目的片段进行纯化回收, 回收产物与 pMD-18T 载体(大连宝生物工程有限公司)连接, 转化于大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。用 PCR 方法检测阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序, 每个样品测 7~10 个克隆。

1.5 补体 C7 的组织表达

设计鲢 C7 基因特异引物对感染嗜水气单胞菌的样本及对照组样本各种组织 cDNA 进行 RT-PCR 半定量表达检测, 以 β -actin 作内参(表 1)。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 23 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.6 序列分析

用 Lasergene 软件包对序列进行校正和拼接。在线软件 Motif Scan(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)以及 ScanProsite(<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)分析补体 C7 的功能结构区。用 MEGA 4.0 软件, 将鲢(GenBank JN806258)补体 C7 与 GenBank 上下载的一些脊椎动物补体 C7 的氨基酸序列进行多重比较, 包括草鲤 C7(*Ctenopharyngodon idella*, Ctld C7, JN655169), 斑马鱼 C7-1(*Danio rerio*, Dare C7-1, BC100054), 罗非鱼 C7-like(*Oreochromis niloticus*, Orni C7-like, XM003440208), 虹鳟 C7-1(*Oncorhynchus mykiss*, OnmyC7-1, NM001124618), 褐牙鲈 C7(*Paralichthys*

olivaceus, PaolC7, AB020964), 大西洋鲑 C7(*Salmo salar*, SasaC7, NM001139773), 鸡 C7(*Gallus gallus*, GaqaC7, HQ878377), 家鼠 C7(*Mus musculus*, MumuC7, NM001243837), 非洲爪蟾 C7(*Xenopus laevis*, XelaC7, NM001091647), 安乐蜥蜴 C7(*Anolis carolinensis*, AncaC7, XR118683)及人 C7(Human C7, J03507), 并用邻位相连法(Neighbor-joining)构建分子发育树。

2 结果与分析

从鲢 cDNA 文库中筛选得到一个阳性克隆, 经测序并作 BLAST 检索后确定为补体 C7。该克隆为 2625bp, 含完整编码区, 其编码区长 2 466 bp, 编码 821 个氨基酸。此外, 鲢补体 C7 cDNA 5' 非编码区有 19 bp, 3' 非编码区有 140 bp, 在 poly(A)前 4 bp 存在一个 mRNA 的加尾信号(AATAAA)。DNASTAR 软件分析鲢 C7 等电点为 6.99, 分子量为 92 299.60 D。在第 1~19 个氨基酸为信号肽。对蛋白质分子结构分析显示, 鲢 C7 存在 2 个 TSP1(分别位于 23~76 和 483~532 位点)、一个 LDLRA(80~115)、一个 MACPF(117~439)、2 个 EGF(458~469, 696~711)和 2 个 CCP(552~611, 612~673), 位点 599~602 为唯一糖基化位点, 鲢 C7 分子功能结构区见图 2。

将鲢补体 C7 基因氨基酸序列与其他硬骨鱼以及人类的 C7 序列比对后(图 3)表明, 补体 C7 存在多个保守位点。在氨基酸序列上, 鲢补体 C7 与草鱼和鲤鱼 C7 的相似率最高为 93%, 其次是斑马鱼 C7-1 similar 相似率为 82%, 与其他硬骨鱼类罗非鱼 C7-like 为 54%, 虹鳟 C7-1 为 54%, 褐牙鲈

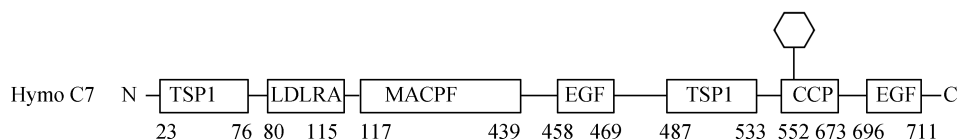


图 2 鲢 C7 分子组织结构图

TSP1: 型凝血敏感蛋白; LDLRA: a 型低密度脂蛋白受体; MACPF: 膜攻击复合体-穿孔素; EGF: 表皮生长因子前体; CCP: 补体控制蛋白。

Fig.2 Structural organization of the *Hypophthalmichthys molitrix* C7

TSP1: a thrombospondin type I domain; LDLRA: low-density lipoprotein receptor class A; MACPF: the membrane attack complex/perforin segment; EGF: epidermal growth factor precursor; CCP: complement control protein

53%, 大西洋鲑 48%, 而与鸡、安乐蜥、非洲爪蟾、人的相似率最低, 分别为 44%、43%、44%、29%。系统发育分析显示鲢补体 C7 与草鲤鱼最先形成一簇, 亲缘关系最近(图 4)。

对 12 尾鲢个体 C7 基因序列分析显示, 除了

一个个体分离得到 2 种序列(等位基因)外, 其余个体均只得到单一序列。将所有这些序列比对后发现, 共有 6 个变异位点, 确定 6 个等位基因, 变异位点见图 5。所有的碱基变异都为转换突变, 即 T/C 或 A/G 替换, 其中 601 的突变发生在密码子

Hymo C7	---MCP-AVL LVLVTFLLPYI WCEQPVNCRW GPYGDWSECD GCTKTQVRLR HVETFPQFGG STCTGEAIQK QSCFPKKSCP LQTGCGNRRF	86
Dare similar C7-1	---...QSS IF.L.....L.....V. Q.....KS...D...A.L.....A.E....	87
Onmy C7-1	---MISLTVIS NL ILL SSV C.D.A...Q...S.E...N...D.EQ.T...NVYA...QA.S.N.S.T...P.V.T.R...IE...E...	88
Paol C7	---MKLSLAVCS SL LIL SPV C.Q.S...E...S.EA.T...VYA...AA.S...T.T...P.V.Q.R...E...D...	89
Human C7	MKVISLFLV GFIGE.QSFS SASS...Q DF.AP...N...T.R S.AVYG.Y...QP.V.N.FET...E.TRG...TEE...E...	90
Hymo C7	CTSGQCINPS LLCNGDHDC DG-LDEQRCS GSGT-IVNC KKPSPNSDLT GRGFDVLTGE LRAGVINTRS FGGQCRKIFS GDHRDFYRLP	174
Dare similar C7-1	V.....T...DK Q.....E.....V.....E....	173
Onmy C7-1	..IL...VSL...V...Q...E.GT..RH.D ADNSHY..DL D.T...H...K.Y...K F.S...L...V...KT....	178
Paol C7	SRT.....F..N...RG.P QDDQQFS.DL D.T...A.F...Y...K.....Q.....Q.....KVY....	178
Human C7	..F....SK...V....S..D EDSA..D..E D.ERRPS.DI D....IE...N.YNE...Q F.NR...K.....V...GK....S	180
Hymo C7	QSLRLYSFQV RVENDFSDEY YDSSWSYMRH E-----E ERKTIIRG---GHDKHTFHN KLKQDKTYHL LIIKNEVEVA QFQNAPEYL	252
Dare similar C7-1	..N.....S.....T.D.....D-----K Q.RI...---.....Q.....R.....	250
Onmy C7-1	..I...T...V.....TE.A..E.....K I-----Q DNALW-----..RR...T E.NK...SHR.....Q...L...TV.Q.V	254
Paol C7	..V...N.E K.D.EDT..S..E.....TQ I-----Q ANALF-----..RR...K D.TEN.ASR I.L.K..L...S.Q.	254
Human C7	GNV.S.T...KIN...NY.F..N.T...VK TSTEHTSSSR K.SFF.SSSS SSRSYSHT EIHKG.S.Q...VVE.T...I..N..F.	270
Hymo C7	PLSEGFWDKL LALPSTYDPS AYRFFIHYG THYMEEGSLG GQYRALLELD ANYMMMSRT DIDFHQCITR VKRRFLYKKK TTKCVKLMKT	342
Dare similar C7-1	D....S...I..E...L...R.....ET.....	340
Onmy C7-1	T.A....A SS..T..SYP...SLL.T...LS..A...Q...F. NEALK.T.T. TEYQR.V.K K...R..V K.T.E..VDS	344
Paol C7	..S.RDGHNVN...I.VNVF...DPSF.GA..V...K.ET GEI.DN..S...D..NI.DQ...H...Q...R...E.T.E..	344
Human C7	Q.A.P...E SH...L..Y...RL.DQ...LQS...E..V.FVV SEKLKQNDEN SVEKK.KSS -GWHFVV.FS SHG.KE.ENA	359
Hymo C7	IESFSENKNQ KMPVKTDIIG GHTAYIAGLS LLDLENPNND KQMYSKWAGS VKEFPKVIKH KLRLPYELVK EVPCAGLKKL HLKRALEYL	432
Dare similar C7-1	..N...R.H...I.....NS.....T.....Q.....H...A...V.....	430
Onmy C7-1	LKTSK.YN.N..L.I..NV...DPSF...V...EA G...D..R...D..Q..NT.....Q...R...T.E..	434
Paol C7	..S.RDGHNVN...I.VNVF...DPSF.GA..V...K.ET GEI.DN..S...D..NI.DQ...H...Q...R...E.T.E..	434
Human C7	LKAA.GTQ.N VLRGEPP.R..GAGF.S...Y.E.D..AG..RR..A..E..TNL.Q...Q...T.....SV...Y..W...E..	449
Hymo C7	EEQSPCHCSP CQNGMAVLT EGVCTCVCRP GTSGNACQNG HVLGEQPGVI EGRWSCWSAW SSCSRGQKSR TRSCNNPAPR NGRNCIGET	522
Dare similar C7-1	R.....S.....G.....H.....T.....K.....	520
Onmy C7-1	A.EH...R..H...QPL...GTE.K...P..ES. T.I...H.S...S..G...QSKM...S.T.T...R..LH.V.LP	524
Paol C7	S.EH...R...QPL.S GS..R.....P..P..T. A.I...L..H.G...S..G...G.RM...S.R.QH.T.LR	524
Human C7	D.FD...R...G.L.TVE GTH.L.H.K Y.F.A..EQ VLV.N.A.GV D.G...S..P.VQ.K.T S.E...P.S G...S.V...	539
Hymo C7	IERKNCEPD FEHLKMMEPQ CFDPITLTPVK TCKTPPPLTN GFVLDPKDIY PVGRKIEYTC TDGHDHIGNP VAECTENLTW KMSPECKKT	612
Dare similar C7-1	...RS..E...IL..H.....A.....T...K...I...Y.R...F....S...RI...S	610
Onmy C7-1	T.HTS..ES LQ.....GLSISTP. A.RA..A.R...S.R.V..L..S...S..IE..YIT.ET...D.NS TRG.L...SA	614
Paol C7	A.Q.P...Q IQY.QT...SLSV..P..GP..N.R...IQN.R.F..V..NTV.FS...E..YLS.DA..TR...Q..TPRTTV..SA	614
Human C7	T.STQ...EE L...RL..H...PLS.V TE.FPS..A.KD...Q.EGPMF...KNV...NE.YSL...R.G.D.R LVGE.H.Q.I	629
Hymo C7	ACDPPAVLSN VIATPSKQAY LIGESVTLSC PSGMQKEG-E AEIMCRGLS WYSPETVRC NPVEAVPTQQ S-LFCKPWEK QAKGQCVCKM	700
Dare similar C7-1	E..A...R...VV..L..S..R..D.....D...G..R.....D.KS...P...L...PGT.....	698
Onmy C7-1	T..V.SLEND TG..W.VI. Q..D..Y...V..MR..-M...V.SSS.Q...S...DSI...RE.PKG..PP LG.N...L..T PG.S...L	703
Paol C7	T.GI.QLGAE..M...T.A..Q..DG.S...A.SLLD.EV S.VI.SPS.Q...S...AGA...KAAPTA.PPP..G.K...T AG.NK...	704
Human C7	..VL.VLMDG IQSH.Q.PF TV..K..V..SG..SL..-P SAFL.GSS.K..S.EMKNA..VQK.N..LT AVPK.QR...LQNSR...	717
Hymo C7	PYECKASLHV CAS-VRPGRV NRMSICQLGA FQCLGQTFSL LQDSACSWEPE TKFTSCQDCH QWETCDG-F KCECIDPDDC SDDSAHLCVS	787
Dare similar C7-1	..F...T...T...T...V...L...T...S...D.K.E...P...V...	785
Onmy C7-1	..Q.QP..QL..T-LHT..T SKLGM...L...RS.K VK..D.D.SD QGL...EEC F-----T..VQLCVLPD	775
Paol C7	..FQ.S...LL..R-LGS-AP KLL.T...L...RS..TS.AD.Q...G-AF..ESV R-----E..PT...P...	775
Human C7	GP..D...QDE.SK.I LPLTV.KMHV LH.Q.RNYT TGRDS.TL.A SAEKA.GA.P L.GK..AESS..V.REASE EEEGFST..E	807
Hymo C7	LKGAPQMFS ECEAGAWRCQ EKEITVLSIG DCQT---	821
Dare similar C7-1	..M...E..M...R.G..MN..R..A..S---	819
Onmy C7-1	---SAVAVTM...V..R...GEQFD.V..K.A.SAL---	809
Paol C7	---S.VVTMT...V..R..G GELMN.IG.D.A.PE---	808
Human C7	V-N.KE.TM...L..R GQS.S.T..R P.AAETQ	843

图 3 补体 C7 氨基酸序列的多重比较

“.”表示与 Hymo C7 序列一致; “—”表示间隔; Hymo C7: 鲢 C7; Dare similar C7-1: 斑马鱼类似 C7-1; Onmy C7-1: 虹鳟 C7-1; Paol C7: 牙鲈 C7; Human C7: 人 C7。

Fig.3 Amino acid sequences Alignment of *Hypophthalmichthys molitrix* C7

Amino acids identical to *Hypophthalmichthys molitrix* C7 are shown with dots“.”; Gaps are shown with dashes“—”; HymoC7: *Hypophthalmichthys molitrix*C7; Dare similarC7-1; Onmy C7-1: *Oncorhynchus mykiss* C7-1; Paol C7: *Paralichthys olivaceus* C7.

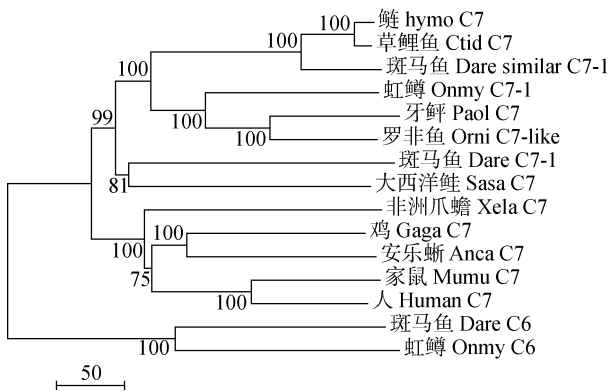


图 4 通过邻近相连法构建的补体 C7 的系统发育树
Fig. 4 The phylogenetic tree of C7 was constructed by neighbor-joining method

	2	6	1	1	1	2	
	2	0	0	1	3	1	
	8	1	0	0	8	9	
			5	4	6	9	P
H_1	T	T	G	T	A	G	5
H_2	T	T	A	T	G	G	2
H_3	T	T	A	T	G	A	1
H_4	T	C	G	C	A	G	1
H_5	T	T	G	T	A	A	3
H_6	C	T	G	C	A	G	1

图 5 鲢补体 C7 基因变异位点
P 表示序列数目

Fig.5 Mutation sites of *Hypophthalmichthys molitrix* C7 gene
P shows the number of sequence

第一位上, 导致非同义突变, 造成由酪氨酸(Y)突变为组氨酸(H), 其他的碱基突变都是发生在密码子第三位上, 都是无义突变。等位基因 H_1 出现频率最高, 为 5 次, 其次是 H_5 和 H_2, 分别为 3 和 2 次, 其余 3 个等位基因都是一次。

鲢 C7 组织表达情况见图 6, 对照组只有脾有少量表达, 其他组织没有表达。感染组注射嗜水气单胞菌 12 h 后, 在每个组织都有表达, 尤其在肾、肝、肠、脾中有高表达量; 注射 24 h 后, 在鳃、心、肝、肠、脾中有表达, 其中肝和肠中大量表达; 注射 36 h 后, 肾和肝中有表达, 肝中表达量较大; 注射 48 h 和 60 h 后, 各组织中几乎都没有表达。

3 讨论

研究表明, 补体 C7 与 C6、C8 α 、C8 β 和 C9 形成末端补体复合物(TCCs), 它们都属于同一个基

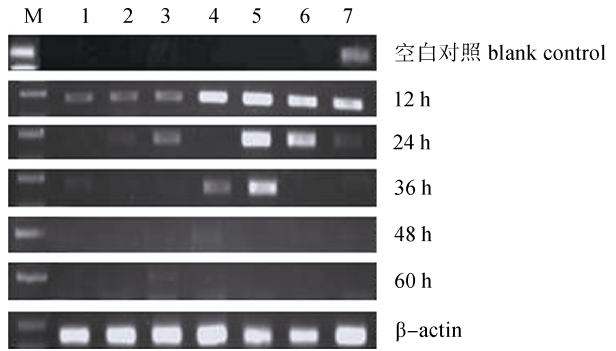


图 6 RT-PCR 检测鲢补体 C7 的组织特异表达

M: 250 bp 分子量标准; 1: 脑; 2: 鳃; 3: 心; 4: 肾;
5: 肝; 6: 肠; 7: 脾

Fig.6 RT-PCR analysis of *Hypophthalmichthys molitrix* C7 expression in various tissues
M: 250 bp marker; 1: brain; 2:gill; 3:heart; 4:kidney; 5:liver; 6:intestine; 7:spleen

因家族, 可能由同一个原始基因通过一系列复制形成^[11]。鱼类补体系统的研究始于 20 世纪 80 年代^[12], 但有关鱼类补体 C7 的报道还比较少。最早得到 C7 序列的硬骨鱼类是日本比目鱼, 于 1998 年投到 GenBank 上, 2005 年 Zarkadis 等从虹鳟中分离获得了 C7-1(编码 808 个氨基酸)和 C7-2(编码 845 个氨基酸) 2 个基因亚型, 并显示了虹鳟 C7 发生了基因复制^[13]。硬骨鱼类和哺乳动物中的可溶性补体成分拥有一些共同的保守的结构单元, 如 TSP1, LDLa, EGF, MACPF^[14-15]。虹鳟 C7-1 基因结构中含有两个 TSP1 和两个 CCP, 及 LDLRa, MACPF、EGF、FIMAC 各一个^[13], 虹鳟 C7-2 除了含有虹鳟 C7-1 所含有的结构单元外, 还多含有一个 FIMAC, 而这第二个 FIMAC 可能和增强 C7-2 与 C5b-6 复合物之间的相互作用有关^[4]。本研究分离得到鲢补体 C7 同样包有这些保守结构(图 2), 说明鲢补体 C7 具有对外源细胞的攻击功能。

对不同人群补体 C7 研究显示, 人类补体 C7 在蛋白质水平和 DNA 水平上均存在多态性^[16-17], 并且 C7 的多态性与某些疾病相关^[18]。目前, 斑马鱼和虹鳟也分别发现 2 个不同 C7 亚型, 但鱼类群体中 C7 的多态性上还未见报道。本研究对鲢群体 C7 编码区的多态性分析中发现, 12 尾鱼中确定了 6 个单倍型, 尽管主要是非同义突变, 但也说

明鲢 C7 在 DNA 水平上也是具有多态性的。虹鳊和哺乳动物 C7 在基因组中都是仅有单一拷贝^[13], 因此, 尽管还未确定, 但推测鲢 C7 在基因组也可能是单一拷贝。我们在一尾鱼中鉴定到 2 个等位基因, 提示鲢两条同源染色体上 C7 基因均具有表达活性。

组织 RT-PCR 显示正常状态下, 鲢补体 C7 基因只在脾组织中有表达, 这与虹鳊和哺乳动物的表达特征不相同: 虹鳊 C7 基因在脑、心、肠和肝中有表达, 而脾和肾不表达, 哺乳动物脾和肾一般都表达 C7 基因^[13]。这说明尽管执行相同的功能, 不同种类 C7 基因组织模式并不一致。补体 C7 是补体膜攻击复合体的重要组成成分, 在抵御外源细菌或真菌的入侵中起着重要作用。感染嗜水气单胞菌 12 h 后, 鲢的脑、鳃、心、肾、肝、肠、脾 7 种组织中均表达补体 C7 基因, 说明鲢补体 C7 对嗜水气单胞菌具有快速响应作用, 大量表达 C7 以抵御嗜水气单胞菌的攻击。随着时间的推移, 病菌逐渐被消除, 鲢补体 C7 基因表达量也随之下降, 乃至停止表达, 表现在感染 24 h 后脑和肾组织中基本停止表达, 而鳃、心、肝、肠、脾 5 种组织表达量也有所降低, 感染 36 h 后 C7 主要在肝中还有表达(图 6)。由此推测, 鲢补体 C7 在对抗嗜水气单胞菌的感染中具有重要作用, 但其对嗜水气单胞菌的作用途径还有待深入研究。

致谢:

实验过程中, 得到巴家文老师的指导, 以及阴双雨、金菊、程小凤同学的大力协助, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] Kato Y, Nakao M, Mutsum J, et al. The complement component C5 of the common carp (*Cyprinus*): cDNA cloning of two distinct isotypes that differ in a functional site[J]. Immunogenetics, 2003, 54: 807–815.
- [2] Muller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement[J]. Annu Rev Immunol, 1986, 4: 503–528.
- [3] Würzner R. Modulation of complement membrane attack by local C7 synthesis[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 121: 8–10.
- [4] DisScipio RG. Formation and structure of the C5b-7 complex of the lytic pathway of complement[J]. J Bio Chem, 1992, 267: 17087–17094.
- [5] Hobart MJ, Fernie BA, DisScipio RG. Structure of the human C7 gene and comparison with the C6, C8a, C8b and C9 genes[J]. J Immunol, 1995, 154: 5188–5194.
- [6] 张四明, 汪登强, 邓怀, 等. 长江中游系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. 生生物学报, 2002, 26: 142–146.
- [7] 吴力钊, 王祖熊. 长江中游避鱼天然种群的生化遗传结构及变异[J]. 水生生物学报, 1997, 21(2): 157–162.
- [8] 熊国根, 张元柱, 邹小玲, 等. 鲢出血病原菌的研究[J]. 江西水产科学, 1994(1): 14–17.
- [9] 余晓丽, 秦春香, 陈明, 等. 鲢鱼嗜水气单胞菌 P-CR 检测办法的建立[J]. 广西农业科学, 2008, 39(5): 681–684.
- [10] 汪登强, 罗晓松, 陈大庆. 败血症鲢脾肾 cDNA 文库构建及 MHC class I 的克隆与分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1–8.
- [11] DisScipio RG, Chakravarti DN, Muller-Eberhard HJ, et al. The structure of human complement C7 and C5b-7 complex[J]. J Biol Chem, 1988, 263: 549–560.
- [12] Dodds A W, Petry F. The phylogeny and evolution of the complement system, in “Immunology and Medicine”, London[J]. Kluwer Academic Publishers, 1993: 39.
- [13] Zarkadis IK, Duraj S, Chondrou M. Molecular cloning of the seventh component of complement in rainbow trout[J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29(2): 95–102.
- [14] Podack ER, Olsen KJ, Lowery DM, et al. Structure and function of perforin[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1988, 140: 11–17.
- [15] Katagiri T, Hirano I, Aoki T. Molecular analysis of complement component C8 beta and C9 cDNAs of Japanese flounder[J]. *Paralichthys olivaceus*[J]. Immunogenetics, 1999, 50: 43–48.
- [16] Nishimukai H, Nishimura K, Orimoto C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human complement C6 and C7 genes[J]. Leg Med (Tokyo), 2003, Mar, 5 Suppl 1: S198–200.
- [17] Fernie BA, Würzner R, Unsworth DJ, et al. DNA polymorphisms of the complement C6 and C7 genes[J]. Ann Hum Genet, 1995, 59: 163–81.
- [18] James R. Cerhan, Anne J. Novak, Zachary S. Fredericksen, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in association with germline variation in complement genes[J]. Br J Haematol, 2009, 145(5): 614–23.

Molecular cloning and genetic diversity analysis of the seventh component of the complement in *Hypophthalmichthys molitrix*

JIANG Jingjing^{1,2}, LI Yingwen¹, CHEN Daqing², LIU Shaoping², DUAN Xinbing², LI Xiaofang²,
FAN Zhenhua², WANG Dengqiang²

1. Department of Life Science, Chong Qing Normal University, Chong Qing 401331, China;

2. Fishery Resource and Environment Key Field Station of Upper-middle Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: Complement activation via the classical, the mannan binding lectin or the alternative pathway leads to the formation of the terminal complement complex (TCC). C7 plays an important role in the terminal complement cascade, since C7 incorporation into the TCC allows its hydrophilic-amphiphilic transition, which subsequently leads to the direct binding of the complex to target cell membranes. To date, C7 has been cloned only from the *Paralichthys olivaceus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*, *Paralichthys olivaceus* and *Salmo salar* teleost species. In this article, the full-length *Hypophthalmichthys molitrix* C7 cDNA was isolated from the existing cDNA library, which was 2 625 bp and encoded 821 amino acids. The deduced amino acid sequence of *H. molitrix* C7 showed the highest sequence identity (82%) with those of *D. rerio* similar C7-1. *H. molitrix* C7, similar to C7 reported for other teleost species, displayed many conserved structural motifs, such as TSP1, LDLRa, MACPF, EGF, TSP1 and CCP. This may indicate that *H. molitrix* C7 has the ability to attack the exogenous bacteria. Within the genetic diversity analysis for the seventh component of the complement of the 12 *H. molitrix*, we found six mutation sites, five of which were synonymous mutations, another was a non-synonymous mutation, and identified six alleles. RT-PCR was conducted to detect the expression of the C7 gene in various tissues of healthy *H. molitrix* and immunity tissues of turbot infected with *Aeromonas hydrophila*. RT-PCR results showed that the C7 gene was only expressed in the spleen of uninfected *H. molitrix*, but the expression of the target gene in the brain, gill, heart, kidney, liver, intestine and spleen increased after 12h of challenge with *Aeromonas hydrophila*. With the removal of pathogens, the expression gradually reduced until a complete disappearance. This result indicated that C7 may be an *A. hydrophila*-resistance associated gene.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; C7; genetic diversity; clone; expression

Corresponding author: WANG Dengqiang. E-mail: wdq@yfi.ac.cn

欢迎订阅 2013 年《农产品质量与安全》

主管 中华人民共和国农业部 主办 中国农业科学院

支持单位 农业部农产品质量安全监管局

协办单位 农业部农产品质量安全中心 中国绿色食品发展中心

承办单位 中国农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所

主要栏目: 本刊特稿、本刊专稿、政策法规、质量安全监管、无公害农产品、绿色食品、有机农产品、农产品地理标志、农业标准化、检验检测、学科建设与发展、研究与探讨、安全生产技术、地方经验交流、海外博览、农业标准公告、市场信息与动态等。

读者对象: 与农产品质量安全、农业质量标准和检验检测有关的各级行政管理、科研教学、检验监测、技术推广、生产企业等部门的相关人员。

本刊为双月刊, 逢双月 10 日出版。大 16 开本, 彩色四封, 80 页。全国各地邮局(所)均可订阅, 也可直接到本刊编辑部办理订阅手续。邮发代号: 82-223。每册定价: 10.00 元, 全年共 60.00 元。

通信地址: 北京市中关村南大街 12 号中国农科院质标所《农产品质量与安全》编辑部, 邮政编码: 100081。

联系电话/传真: 010-82106522, 82106521 E-mail: aqs@caas.net.cn

欢迎各界朋友订阅、赐稿和刊登广告