

DOI: 10.12264/JFSC2021-0145

## 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因家族成员的鉴定及表达分析

王菁, 李桂英, 林楷琪, 刘付柏, 李金凤, 黄宝松, 王忠良

广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088

**摘要:** 含 C1q 结构域蛋白(C1q domain containing, C1qDC)是经典补体途径的起始分子, 能够识别免疫复合物, 启动补体系统经典途径。本研究基于马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)全基因组测序数据, 结合生物信息学方法对 *ClqDC* 基因进行了鉴定, 同时对其系统进化关系、序列结构、基序组成、染色体定位和基因家族成员的表达水平进行了分析。结果显示, 从马氏珠母贝全基因组数据中共鉴定出 285 个 *ClqDC* 基因; 根据系统进化关系聚集为 5 个亚类, 不均匀分布在 14 条染色体上; 所有 C1qDC 序列均含有保守基序 1。比较转录组数据分析显示, 在溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)攻毒 4 h 后, 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因家族中有 56 个基因在血细胞中的表达水平发生了显著变化。其中, 上调表达基因 32 个, 下调表达基因 24 个。实时荧光定量 PCR 检测结果表明, 随机挑选的 8 个 *ClqDC* 基因的表达模式与转录组数据一致。本研究结果为进一步解析马氏珠母贝 *ClqDC* 基因的进化模式及其在贝类免疫应答中的调控作用提供了理论基础。

**关键词:** 马氏珠母贝; 含 C1q 结构域蛋白; 基因家族; 表达模式

**中图分类号:** S917

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2022)01-0001-12

马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)又称合浦珠母贝, 是我国生产海水养殖珍珠的主要经济贝类<sup>[1]</sup>。近年来, 病害频发导致马氏珠母贝的大量死亡<sup>[2-3]</sup>。马氏珠母贝缺乏适应性免疫系统, 其对病原体的防御完全依赖于先天免疫反应<sup>[3-5]</sup>, 补体系统作为先天免疫反应中的一个古老而关键的免疫效应系统, 具有识别、清除病原体的作用<sup>[6]</sup>。C1qDC 蛋白是经典补体途径的起始分子, 是构成 C1 复合物的重要组分; 当 C1qDC 与免疫球蛋白 IgM 或 IgG 的 Fc 段结合后, C1qDC 结构发生变化, 进而导致 C1r 和 C1s 的活化, 启动补体系统经典激活途径<sup>[7-8]</sup>。在激活补体系统的过程中, C1qDC 通过 6 个球状头部区域(globular C1q domain, gC1q)相互作用来清除细胞碎片, gC1q 可以广泛地结合自

身和异己配体, 参与宿主防御、炎症、凋亡、细胞分化等多种免疫反应<sup>[9-11]</sup>。

鉴于补体系统的防御作用, *ClqDC* 基因在多种脊椎动物和无脊椎动物中开展了广泛的研究<sup>[12]</sup>。Mei 等<sup>[13]</sup>基于斑马鱼(*Danio rerio*)基因组和 EST 数据库, 鉴定出 52 个编码 C1qDC 蛋白的基因序列。Chen 等<sup>[9]</sup>在七鳃鳗(*Eudontomyzon morii*)中分离得到 3 个 CTRPs (C1q/TNF 相关蛋白超家族成员), 并在心脏中高水平表达, 表明它们可能参与七鳃鳗心脏的免疫反应或损伤修复。Zhao 等<sup>[14]</sup>在三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)中鉴定的 4 个 *ClqDC* 基因, 在细菌感染后其表达水平均出现了不同程度的变化。Yan 等<sup>[7]</sup>研究发现非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) *ClqDC* 基因组织表达具有显著差

**收稿日期:** 2021-04-13; **修订日期:** 2021-04-17。

**基金项目:** 广东省自然科学基金面上项目(2019A1515011875); 广东省省级科技计划项目(国际科技合作领域)(2019A050510044); 国家级大学生创新创业训练计划项目(CXXL2020002, 201810566001, CXXL2018001); 广东海洋大学 2019 年“冲一流”省财政专项资金建设项目; 广东海洋大学“南海学者计划”项目(2017 年度); 广东海洋大学 2021 年度本科生创新团队项目(CXTD2021001)。

**作者简介:** 王菁(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产经济动物生物学。E-mail: a13414942597@126.com

**通信作者:** 王忠良, 副教授, 研究方向为水产经济动物功能基因与基因组学。E-mail: zhongliangwang@vip.163.com

异性,在肝脏和脾脏中的表达水平最高。Li 等<sup>[15]</sup>研究发现刀蛤(*Sinonovacula constricta*)经细菌感染后,*ClqDC* 基因在血细胞中高水平表达,并显著提高血细胞的吞噬作用。Gerdol 等<sup>[16]</sup>在地中海紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)中鉴定出 168 个 *ClqDC* 转录本;随后,利用新一代测序技术,鉴定出的 *ClqDC* 基因数量增至 232 个<sup>[17]</sup>。此外,相关研究表明地中海紫贻贝 *ClqDC* 可作为模式识别分子在病原识别过程中发挥作用<sup>[18]</sup>。

本研究从马氏珠母贝全基因组测序数据中检索鉴定了 *ClqDC* 基因家族成员,并采用生物信息学方法对其系统进化关系、基序组成、染色体定位、共线性关系进行研究,同时结合转录组数据分析了马氏珠母贝感染溶藻弧菌前后血细胞中 *ClqDC* 基因的表达情况,旨在为进一步解析马氏珠母贝中 *ClqDC* 基因的进化模式及其在贝类免疫应答中的调控作用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验使用的马氏珠母贝购自广东省湛江市雷州后洪珍珠贝养殖场。平均壳长(65±5) mm,暂养于 80 L 过滤海水中,每天投喂小球藻。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因家族成员的筛选** 从 Pfam 蛋白家族数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 *ClqDC* 基因(PF00386)的隐马尔可夫模型(HMM),并在全基因组数据库中进行检索。使用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、PFAM (<http://pfam.xfam.org/>)进一步确认筛选的候选基因的蛋白序列。

**1.2.2 系统发育树的构建和基因结构、保守基序分析** 从全基因组数据中下载 *ClqDC* 基因的蛋白序列,获得的序列通过 Clustal W 软件与默认参数进行比对;使用 Mega 7.0 软件按邻接法(NJ)构建系统发育树<sup>[19]</sup>;采用 Meme 程序识别 *ClqDC* 序列中的保守基序(motifs)。优化的参数如下:任意重复次数,最大错配 12 个,最佳基序宽度为 6~100 个氨基酸残基。

**1.2.3 染色体定位和基因复制事件分析** 根据全基因组数据注释信息确定 *ClqDC* 基因的染色体位置。使用 Map Chart 软件<sup>[20]</sup>绘制 *ClqDC* 基因的染色体位置和相对距离图;采用基因组共线性分析软件 McscanX 分析基因家族基因之间的片段重复和串联复制现象;使用  $K_a/K_s$  calculator 软件计算  $K_a/K_s$  比值。

**1.2.4 表达模式分析** 实验组通过闭壳肌注射 100  $\mu$ L 含有  $5 \times 10^7$  CFU 溶藻弧菌的 PBS 溶液,对照组注射等量的 PBS 溶液。注射 4 h 后,使用一次性注射器采集实验组和对照组的血淋巴,立即在 800 g, 4  $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min,收集血细胞,并立即提取总 RNA,构建马氏珠母贝转录组文库,保存数据于 NCBI 的 SRA 数据库(SRP041567),筛选血细胞中差异表达的 *ClqDC* 基因并计算其在溶藻弧菌攻毒前后的表达水平,使用 HemI 软件绘制热图<sup>[21]</sup>。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 验证** 采用 Trizol 法提取 PBS 对照组和溶藻弧菌刺激组的血细胞样品的总 RNA,按照 EasyScript<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书进行反转录,合成 cDNA 第一链;随机挑选出 8 个差异表达的 *ClqDC* 基因,设计引物;以  $\beta$ -actin 作为内参基因,利用实时荧光定量 PCR 验证其表达水平。PCR 程序如下: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 94  $^{\circ}$ C 5 s, 59  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 *ClqDC* 基因的相对表达水平。实时荧光定量 PCR 实验中使用的引物如表 1 所示。

## 2 结果与分析

### 2.1 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因的鉴定与系统进化分析

通过 HMM 模型和 Blast 程序检索基因组和蛋白组数据库,从马氏珠母贝全基因组中筛选并鉴定 *ClqDC* 基因。去除冗余后共鉴定到 285 个编码完整 *ClqDC* 结构域的蛋白序列。根据其染色体位置和系统进化关系进行命名(*PfClq1~PfClq285*)。为了研究 *ClqDC* 的系统发育关系,根据氨基酸序列以 NJ 法构建了系统发育树(图 1)。如图 1 所示, *ClqDC* 家族基因可以划分为 5 个进化簇,分别命名为 Cluster I、Cluster II、Cluster III、Cluster IV、Cluster V。其中,Cluster I 簇的成员数目最多(112),

表 1 实时荧光定量 PCR 实验中使用引物  
Tab. 1 Primers used in the real-time qPCR assay

基因 gene	引物 prime
<i>PfClq13</i> -F	5'-CCTGACGATAATCTCAACAGCACTC-3'
<i>PfClq13</i> -R	5'-ATTTCTTCTTTCAGCCCTGGTCC-3'
<i>PfClq17</i> -F	5'-CGGCTCACGGTTACTACTGGACT-3'
<i>PfClq17</i> -R	5'-TGCTGCTTGGCTTTCACCTCTA-3'
<i>PfClq36</i> -F	5'-GGCAATACAGAGTGTCCCGTGA-3'
<i>PfClq36</i> -R	5'-CGTAGCCTCTCCGATGTTCTC-3'
<i>PfClq45</i> -F	5'-TCCCCTCCTTTCATTAGTAAGTCCG-3'
<i>PfClq45</i> -R	5'-GGAAAAGGAGCAGAAACATCCCAAC-3'
<i>PfClq59</i> -F	5'-GGGTTTGACATTTATTTTCAGTGCTT-3'
<i>PfClq59</i> -R	5'-GTGCCACACTCAGTCTATTGCCATT-3'
<i>PfClq145</i> -F	5'-TTAGCCCCTTTATCAGGCAACA-3'
<i>PfClq145</i> -R	5'-GAGGAGGAATGGTTTTCTTCTTGG-3'
<i>PfClq157</i> -F	5'-CTGGGAGCGTTATCTGATGGTAG-3'
<i>PfClq157</i> -R	5'-GAATGTATCCTCCTGCTTGTGTC-3'
<i>PfClq220</i> -F	5'-CACGAAATGACGAAAGGGAT-3'
<i>PfClq220</i> -R	5'-GGCTACTGGTTTTGAAGCGTATGTT-3'
$\beta$ -actin-F	5'-TGGTATGGGACAGAAGGAC-3'
$\beta$ -actin-R	5'-GACAATGCCGTGCTCAAT-3'

Cluster V 簇的成员数目最少(1)。

### 2.2 基因结构及基序组成分析

使用 Meme Suite Web 服务器对 *ClqDC* 蛋白的保守基序进行鉴定, 共识别到 10 个不同的保守基序(motif), 长度从 8~41 个氨基酸不等, 依次命名为 motif 1~motif 10。根据系统发育关系, 对 CDS 和 Motif 序列进行分析(图 2)。motif 1 高度保守, 所有的 *ClqDC* 基因都含有该基序, 其次为 motif 5; 同一进化树分支表现出相似的基序组成; 例如, *PfClq102* 和 *PfClq269* 含有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 4、motif 5 (图 2)。

### 2.3 染色体定位和共线性分析

利用马氏珠母贝基因组注释信息, 分析了 *ClqDC* 基因的共线性关系。结果显示, 285 个 *ClqDC* 基因定位在 14 条不同染色体上, 其中, 9 号染色体和 11 号染色体上分别包含 29 个 *ClqDC* 基因, 而 8 号染色体上只有 3 个 *ClqDC* 基因(图 3)。

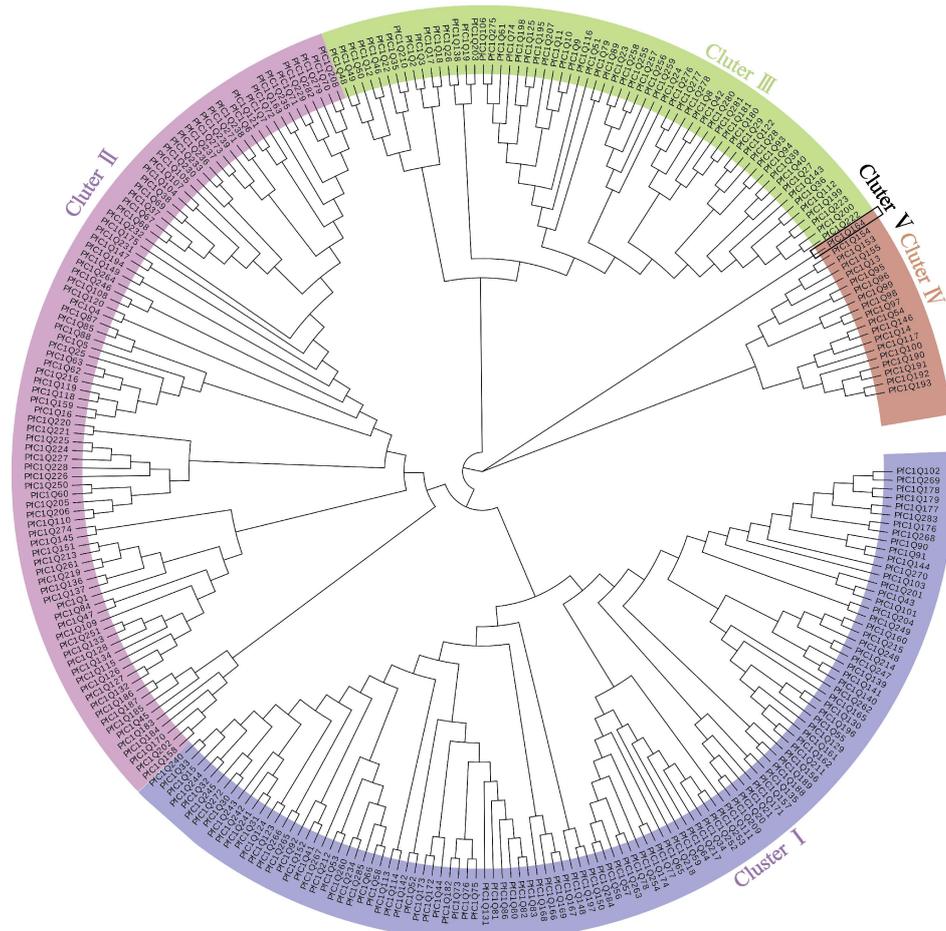
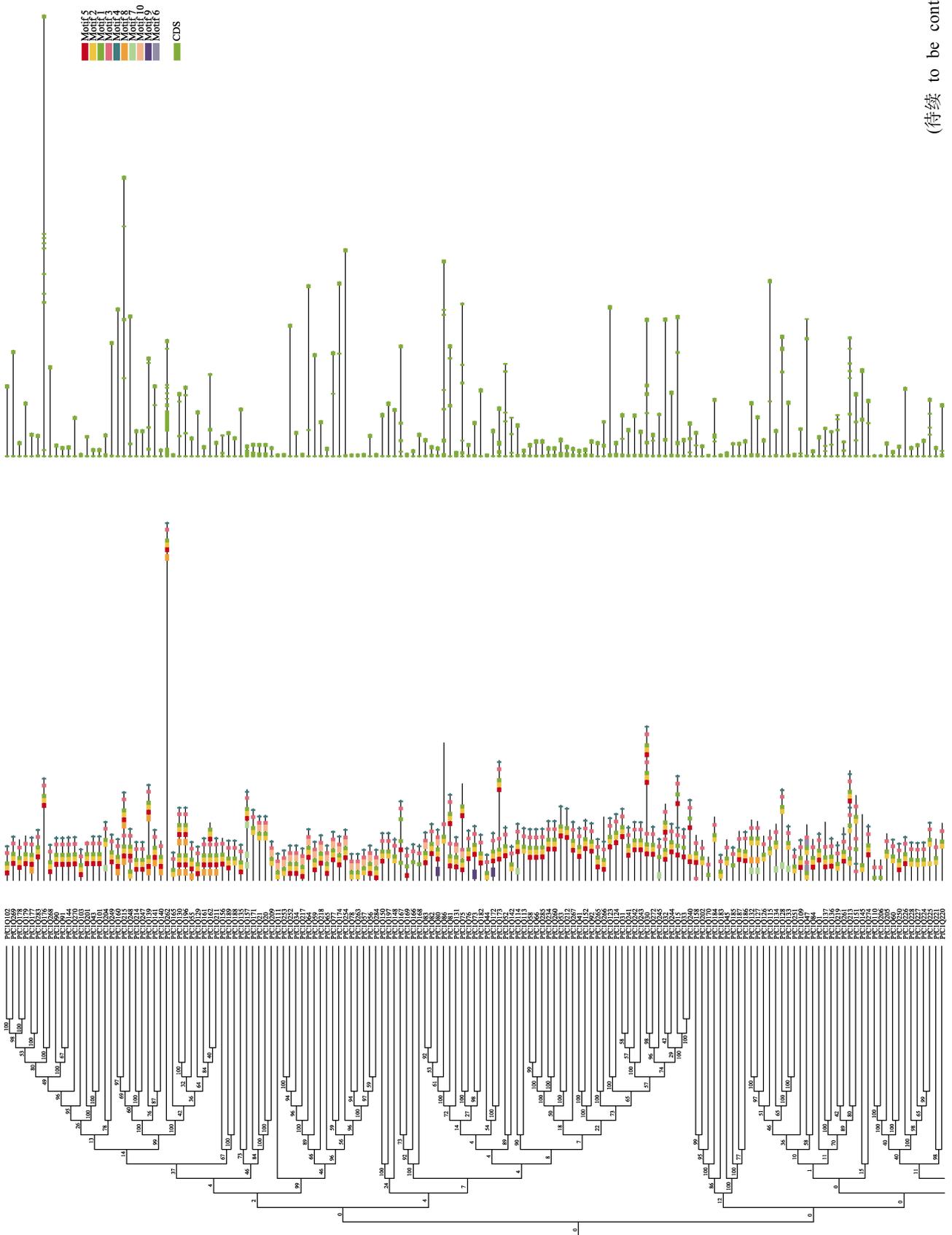


图 1 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因家族成员的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of members of the *ClqDC* gene family in *Pinctada fucata*



(待续 to be continued)

(续图 2 Fig. 2 continued)

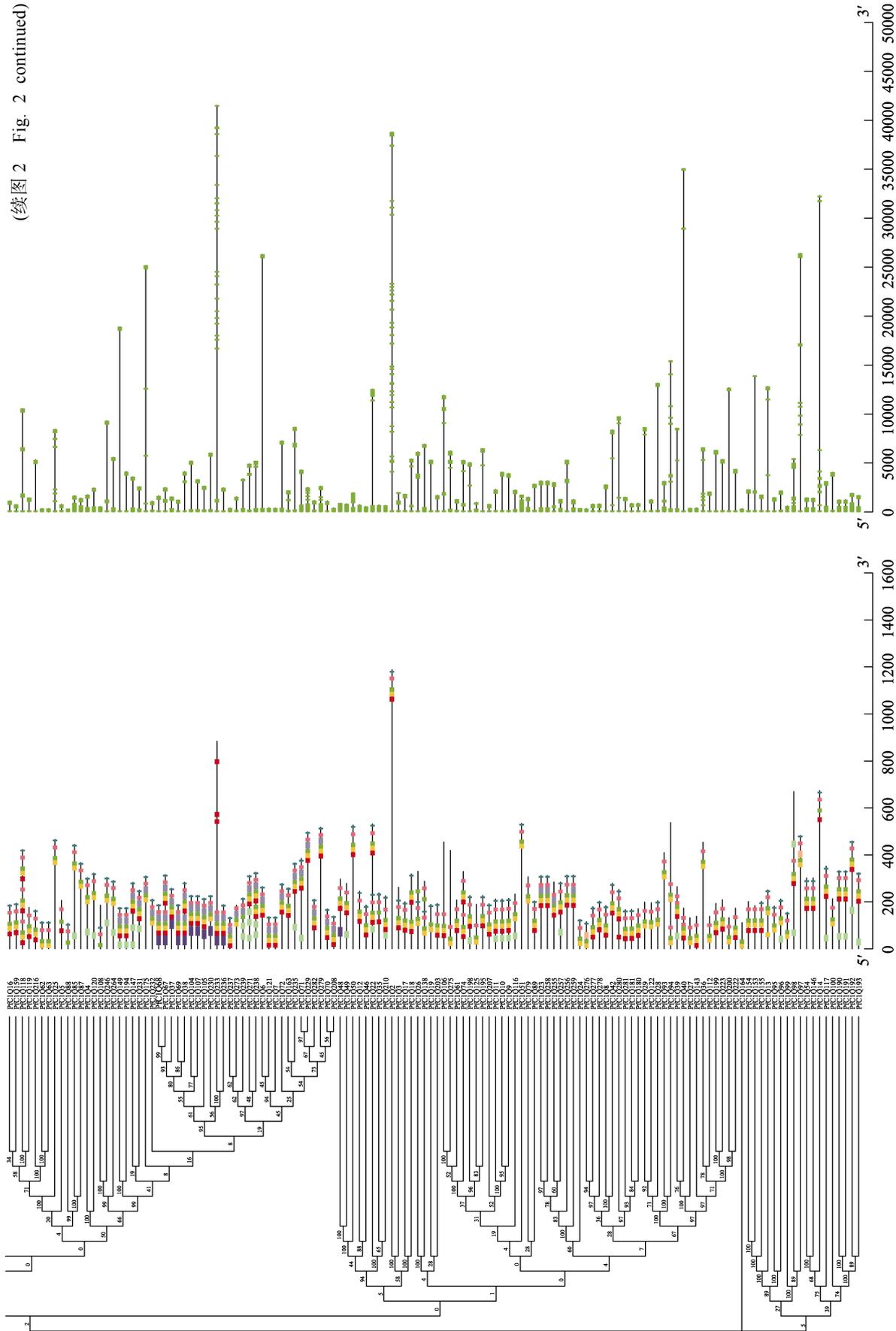
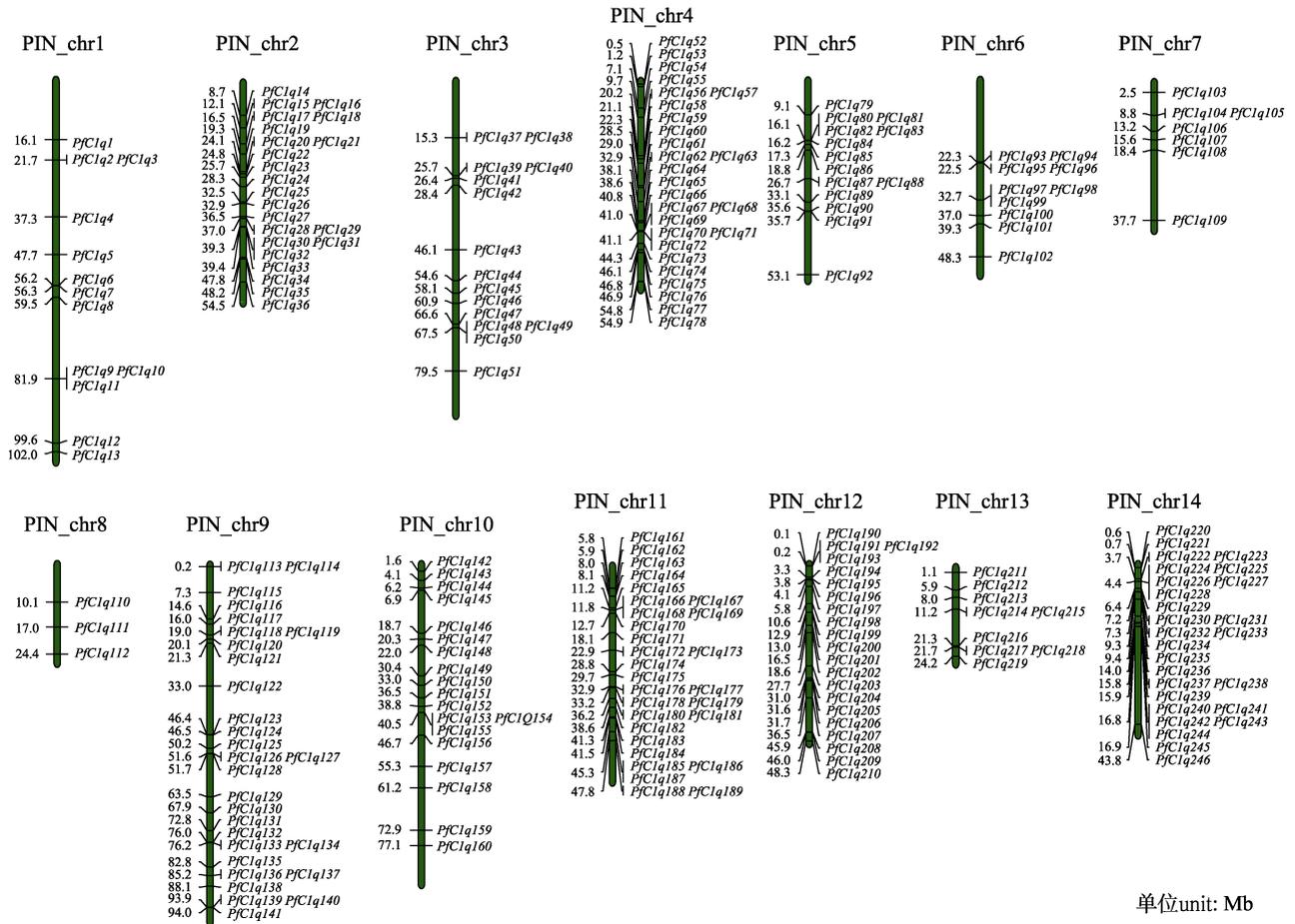


图 2 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因的基序结构分析  
Fig. 2 Motif structure analysis of *ClqDC* genes in *Pinctada fucata*

图 3 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因的染色体分布Fig. 3 Chromosome distribution of *ClqDC* genes in *Pinctada fucata*

基因复制事件分析共发现 68 对串联复制现象(表 2)。基因共线性关系分析鉴定到一对片段复制基因(*PfClq43* 和 *PfClq101*)(图 4)。此外, 大部分 *ClqDC* 基因的进化速率  $K_a/K_s$  值均小于 1, 表明大多数 *ClqDC* 基因在基因扩张过程中经历了强烈的纯化选择(表 2)。

## 2.4 基因表达模式分析

基于前期马氏珠母贝血细胞比较转录组数据分析表明, 共有 56 个 *ClqDC* 基因的表达水平在溶藻弧菌攻毒前后表现出显著差异。其中, 32 个 *ClqDC* 基因的表达量显著上升, 而 24 个 *ClqDC* 基因呈下降趋势(图 5)。为验证转录组数据的可靠性, 随机选择 8 个 *ClqDC* 基因, 并对其表达水平进行实时荧光定量 PCR 检测。结果显示, 溶藻弧菌攻毒前后其表达模式与转录组数据一致(图 6)。

## 3 讨论

### 3.1 *ClqDC* 基因家族的鉴定

补体系统是连接先天免疫和适应性免疫的枢纽, 在体液免疫中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。*ClqDC* 蛋白是软体动物先天免疫反应中的关键组分, 在无脊椎动物中主要作为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), 识别多种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 调理病原引发吞噬作用, 从而达到清除病原体的目的<sup>[22]</sup>。基于 *ClqDC* 基因家族功能的多样性及重要性, 已在多个物种中展开了广泛的研究。然而, 不同物种间 *ClqDC* 基因家族成员的数量存在很大差异。在斑马鱼基因组中鉴定到 52 个 *ClqDC* 基因<sup>[13]</sup>, 从地中海紫贻贝<sup>[17]</sup>、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)<sup>[22]</sup>和美洲牡蛎(*Crassostrea*

表 2 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因的进化速率  $K_a/K_s$   
 Tab. 2 Selection pressure of *ClqDC* gene in *Pinctada fucata*

串联重复基因 tandem duplication gene	进化速率 $K_a/K_s$	串联重复基因 tandem duplication gene	进化速率 $K_a/K_s$
<i>PfClq93&amp;PfClq94</i>	0.672018	<i>PfClq80&amp;PfClq81</i>	0.164441
<i>PfClq167&amp;PfClq168</i>	2.118770	<i>PfClq224&amp;PfClq225</i>	0.985258
<i>PfClq166&amp;PfClq167</i>	1.597370	<i>PfClq225&amp;PfClq226</i>	0.986139
<i>PfClq168&amp;PfClq169</i>	0.244935	<i>PfClq226&amp;PfClq227</i>	2.014750
<i>PfClq176&amp;PfClq177</i>	1.561960	<i>PfClq227&amp;PfClq228</i>	0.474522
<i>PfClq95&amp;PfClq96</i>	0.142122	<i>PfClq154&amp;PfClq155</i>	1.894650
<i>PfClq231&amp;PfClq232</i>	0.267266	<i>PfClq153&amp;PfClq154</i>	0.479226
<i>PfClq199&amp;PfClq200</i>	0.387736	<i>PfClq113&amp;PfClq114</i>	1.740130
<i>PfClq48&amp;PfClq49</i>	0.385330	<i>PfClq241&amp;PfClq242</i>	0.636515
<i>PfClq49&amp;PfClq50</i>	0.280602	<i>PfClq277&amp;PfClq278</i>	0.862138
<i>PfClq280&amp;PfClq281</i>	0.234080	<i>PfClq242&amp;PfClq243</i>	0.344811
<i>PfClq104&amp;PfClq105</i>	0.311568	<i>PfClq243&amp;PfClq244</i>	0.226221
<i>PfClq10&amp;PfClq11</i>	0.206378	<i>PfClq244&amp;PfClq245</i>	0.314219
<i>PfClq9&amp;PfClq10</i>	0.190300	<i>PfClq126&amp;PfClq127</i>	0.226929
<i>PfClq186&amp;PfClq187</i>	0.336715	<i>PfClq118&amp;PfClq119</i>	0.840832
<i>PfClq37&amp;PfClq38</i>	1.132260	<i>PfClq90&amp;PfClq91</i>	0.463798
<i>PfClq255&amp;PfClq256</i>	0.476308	<i>PfClq190&amp;PfClq191</i>	0.673685
<i>PfClq256&amp;PfClq257</i>	1.309110	<i>PfClq191&amp;PfClq192</i>	0.595861
<i>PfClq257&amp;PfClq258</i>	0.318349	<i>PfClq192&amp;PfClq193</i>	1.260650
<i>PfClq258&amp;PfClq259</i>	0.176466	<i>PfClq97&amp;PfClq98</i>	0.852252
<i>PfClq214&amp;PfClq215</i>	1.716730	<i>PfClq62&amp;PfClq63</i>	NA
<i>PfClq56&amp;PfClq57</i>	0.345807	<i>PfClq237&amp;PfClq238</i>	0.302464
<i>PfClq87&amp;PfClq88</i>	0.160446	<i>PfClq238&amp;PfClq239</i>	0.516463
<i>PfClq140&amp;PfClq141</i>	0.247029	<i>PfClq28&amp;PfClq29</i>	2.142760
<i>PfClq139&amp;PfClq140</i>	0.199575	<i>PfClq70&amp;PfClq71</i>	0.600112
<i>PfClq161&amp;PfClq162</i>	0.521138	<i>PfClq68&amp;PfClq69</i>	0.317917
<i>PfClq30&amp;PfClq31</i>	1.224320	<i>PfClq67&amp;PfClq68</i>	0.361095
<i>PfClq123&amp;PfClq124</i>	0.305241	<i>PfClq136&amp;PfClq137</i>	0.268440
<i>PfClq17&amp;PfClq18</i>	0.234658	<i>PfClq2&amp;PfClq3</i>	1.723610
<i>PfClq222&amp;PfClq223</i>	1.673210	<i>PfClq39&amp;PfClq40</i>	1.266460
<i>PfClq188&amp;PfClq189</i>	0.234541	<i>PfClq269&amp;PfClq270</i>	2.144230
<i>PfClq172&amp;PfClq173</i>	0.311970	<i>PfClq75&amp;PfClq76</i>	0.524691
<i>PfClq276&amp;PfClq277</i>	4.426920	<i>PfClq265&amp;PfClq266</i>	0.152615
<i>PfClq81&amp;PfClq82</i>	2.110500	<i>PfClq20&amp;PfClq21</i>	0.527602

*virginica*)<sup>[23]</sup>中分别鉴定到 232、335、476 个 *ClqDC* 基因, 本研究从马氏珠母贝全基因组数据中挖掘到 285 个 *ClqDC* 基因。双壳类动物的 *ClqDC* 转录本数目众多表明, *ClqDC* 基因家族的扩张可能仅限于双壳类动物<sup>[16]</sup>。进一步研究发现, *ClqDC* 基因的大规模扩张只发生在双壳纲的畸形亚纲和异齿亚纲, 而在原鳃亚纲和古异齿亚纲中几乎不存在<sup>[11]</sup>。

### 3.2 *ClqDC* 基因家族在进化中的保守性

基因复制是自然界普遍存在的生物现象, 包

括串联重复和片段复制。对马氏珠母贝全基因组中 *ClqDC* 基因产生的基因复制事件进行分析, 结果共发现 68 对串联复制和 1 对片段复制事件。基因复制及功能分化是基因组进化最重要的驱动力之一, 也是物种产生新功能基因的主要源泉<sup>[24]</sup>。由此推测 *ClqDC* 基因家族的扩张可能是串联复制和片段复制共同作用的结果, 而且前者可能起主导作用<sup>[25]</sup>。*ClqDC* 基因在水生无脊椎和脊椎动物中广泛存在, 并在双壳贝类, 如马氏珠母贝、长

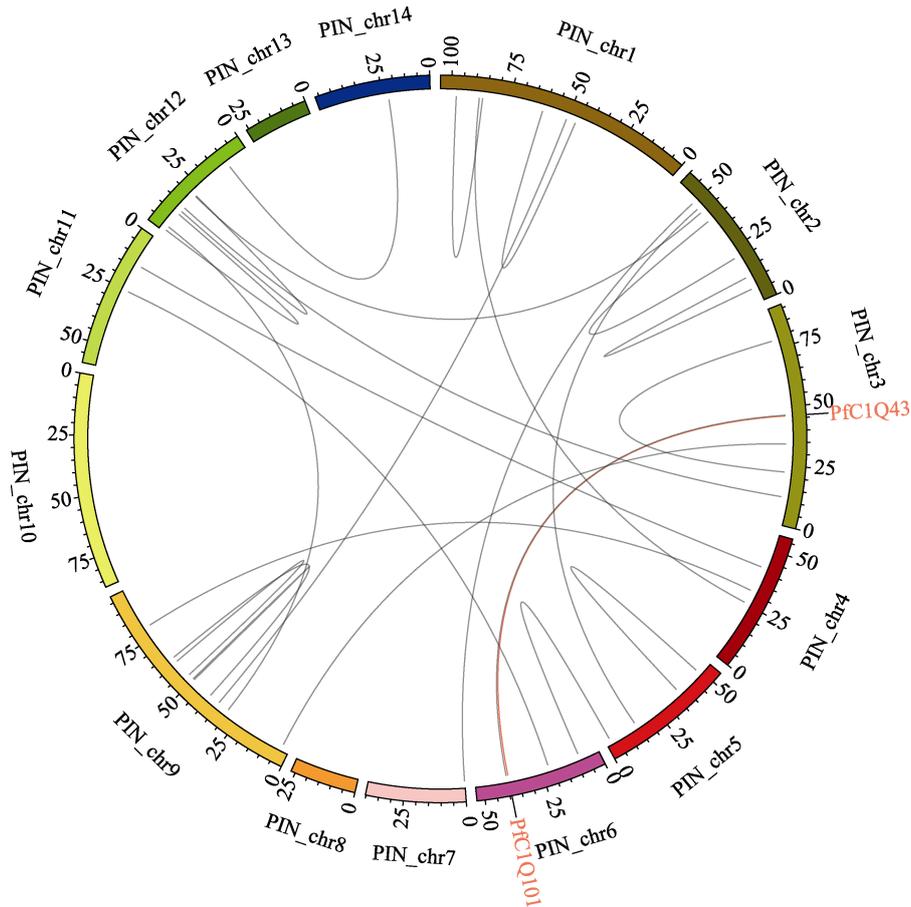


图 4 马氏珠母贝 *ClqDC* 基因片段复制

Fig. 4 Segmental duplication of *ClqDC* genes in *Pinctada fucata*

牡蛎和地中海紫贻贝中发生较大规模的基因扩张,其数量远多于鱼类和人类中的 *ClqDC* 基因数目,出现这一现象的原因可能和无脊椎动物缺乏适应性免疫,抵御外界不良环境和病原的能力较弱有关<sup>[26]</sup>。

基序是序列特异性蛋白的结合位点,与基因表达调控有关<sup>[27]</sup>。对马氏珠母贝的保守基序进行统计分析发现, Motif 1 保守性最高,在所有基因中都含有该基序,表明 Motif 1 基序可能是 *ClqDC* 结构域发挥作用的关键因子。同一进化分支成员间具有相似的保守基序组成,不同分支的成员具有不同的基序组成,这些特殊保守基序可能是不同的 *ClqDC* 基因参与不同生物学功能的主要原因。计算每个旁系同源基因对的  $K_a/K_s$ ,发现大多数  $K_a/K_s$  值小于 1,表明大多数马氏珠母贝 *ClqDC* 基因在进化过程中趋向为纯化选择来消除有害突变,与昆虫防御素等免疫基因的保守适应性进化方式一致<sup>[28]</sup>。部分 *ClqDC* 基因表现出

高度的多样性,受到选择性压力的驱动,以抵御有害的病原菌入侵。序列多态性的适应性进化侧面反映了宿主和病原体共同进化或相互作用<sup>[25]</sup>。

### 3.3 生物胁迫对 *ClqDC* 基因家族的影响

*ClqDC* 蛋白主要由一条信号肽、不同长度胶原样区(collage-like region, CLR)和 C 末端 *Clq* 球状结构域(g*Clq*)组成<sup>[29-30]</sup>。g*Clq* 结构域作为 *ClqDC* 的核心组成部分,主要功能作为 PRR 直接与细胞外膜上的受体相互作用,介导细胞吞噬和凝集<sup>[16]</sup>。相关研究表明, *ClqDC* 可通过识别并结合多种 PAMPs,激活补体经典途径,发挥清除病原体、吞噬和裂解细菌及调理炎症反应等功能<sup>[31]</sup>。近年来,越来越多的无脊椎动物分泌的 *ClqDC* 被鉴定为调理素类或具有促进吞噬功能的调理素样类。太平洋牡蛎 *ClqDC*-3 能够结合脂多糖(LPS)<sup>[32]</sup>, *ClqDC*-6 能够广泛地结合脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、甘露糖(MAN)、聚肌胞苷酸(Poly I:C)<sup>[33]</sup>。

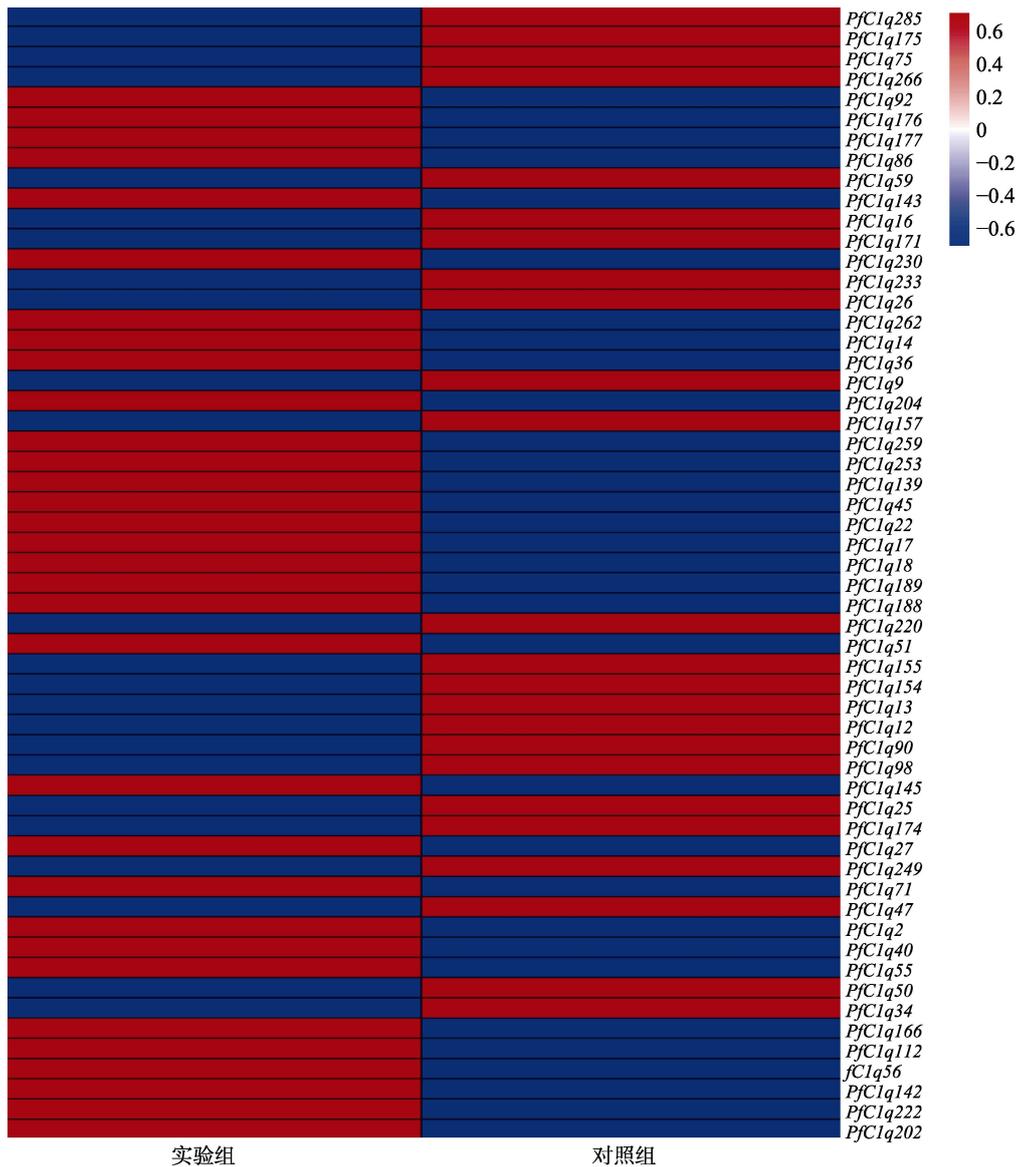


图 5 马氏珠母贝血细胞中 *ClqDC* 基因的相对表达水平  
 Fig. 5 Relative expression levels of *ClqDC* genes in the hemocyte of *Pinctada fucata*

栉孔扇贝 *ClqDC-2* 不仅可以结合上述物质, 还可以结合革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌等微生物<sup>[34]</sup>。本研究结合马氏珠母贝转录组数据, 对 *ClqDC* 基因在血细胞中的表达水平进行分析, 发现 56 个基因的表达水平在溶藻弧菌刺激前后发生了显著变化。其中, 有 32 个基因表达量上调, 24 个基因表达水平下调。采用实时荧光定量 PCR 验证转录组数据, 结果显示出与转录组数据相一致的表达模式。细菌刺激前后 *ClqDC* 基因表达水平的显著变化进一步说明这些 *ClqDC* 基因在马氏珠母贝免

疫系统中发挥重要作用。贝类的免疫防御包括以血细胞为基础的细胞和体液免疫, 能够产生各种非特异性体液因子来参与宿主的免疫防御过程<sup>[35]</sup>。*ClqDC* 具有调节各种免疫细胞反应的能力, 它不但启动机体防御病原体的第一道防线, 同时参与清除自身衰老细胞和凋亡细胞等, 在调控炎症反应等方面发挥着重要作用。地中海紫贻贝在鳃弧菌、溶壁微球菌感染后, 血细胞中 *ClqDC* 基因的表达水平迅速上升<sup>[18]</sup>。在栉孔扇贝中鉴定到的 *ClqDC-2* 在受到脂多糖刺激后表达量显著上升<sup>[36]</sup>。

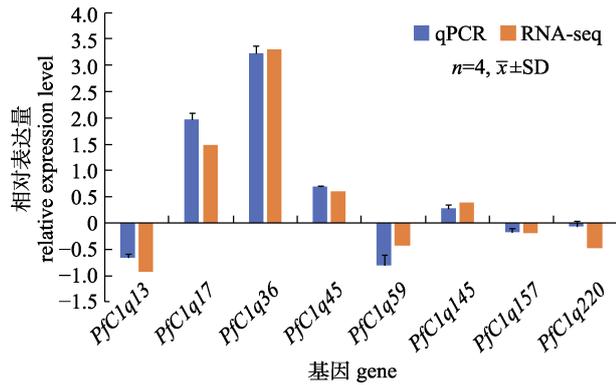


图 6 通过 qPCR 验证 *ClqDC* 基因的相对表达水平

Fig. 6 Verification of the relative expression levels of *ClqDC* genes by qPCR

马氏珠母贝血淋巴中 *ClqDC* 基因在溶藻弧菌感染后部分基因的表达量上升, 这与 TNF 等促炎性因子的特征类似<sup>[18]</sup>。总而言之, *ClqDC* 家族序列的多样性可能导致其成员在应对病原胁迫时起着不同的防御作用。

#### 4 结论

本研究基于马氏珠母贝全基因组数据, 共鉴定到 285 个 *ClqDC* 基因。*ClqDC* 序列中存在大量相似的保守基序, 串联重复和片段复制现象表明 *ClqDC* 基因是通过复制和分化进化, 从而产生的一组序列不同而具有同源性的免疫基因。溶藻弧菌攻毒后, 有 32 个 *ClqDC* 基因的表达量显著上升, 24 个基因的表达量下降, 说明这些 *ClqDC* 基因可能在马氏珠母贝的免疫应答中发挥着重要作用。本研究不仅提升了对马氏珠母贝 *ClqDC* 基因家族的系统认知, 而且为进一步理解 *ClqDC* 基因家族在贝类免疫应答中的调控作用提供了理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Wang Z L, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(4): 639-645.
- [2] Wang Z L, Wang B, Chen G, et al. Transcriptome analysis of the pearl oyster (*Pinctada fucata*) hemocytes in response to *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Gene, 2016, 575(2): 421-428.
- [3] Wu M, Liu B S, Huang G J, et al. Genotype-by-environment interactions at different growth stages of the pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 916-924. [吴曼, 刘宝锁, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝不同生长阶段的基因型与环境互作效应[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 916-924.]
- [4] He J J, Liang H Y, Zhu J P, et al. Separation, identification and gene expression analysis of PmAMP-1 from *Pinctada fucata martensii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 728-735.
- [5] Rolff J, Siva-Jothy M T. Invertebrate ecological immunology[J]. Science, 2003, 301(5632): 472-475.
- [6] Liu X J, Yang L S, Huang J H, et al. Cloning and expression profile analysis C1q-binding protein (PmC1qBP) in *Penaeus monodon*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(4): 774-781. [刘先军, 杨丽诗, 黄建华, 等. 斑节对虾 C1q 结合蛋白(PmC1qBP)的克隆及表达特征分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 774-781.]
- [7] Yan F F, Zhou E X, Liu S, et al. Complement C1q subunit molecules from *Xenopus laevis* possess conserved function in C1q-immunoglobulin interaction[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 103: 103532.
- [8] Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, et al. C1q and tumor necrosis factor superfamily: Modularity and versatility[J]. Trends in Immunology, 2004, 25(10): 551-561.
- [9] Chen L Y, Wu F F, Yuan S J, et al. Identification and characteristic of three members of the C1q/TNF-related proteins (CTRP) superfamily in *Eudontomyzon morii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 233-240.
- [10] Bally I, Ancelet S, Moriscot C, et al. Expression of recombinant human complement C1q allows identification of the C1r/C1s-binding sites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(21): 8650-8655.
- [11] Gerdol M, Venier P, Pallavicini A. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 49(1): 59-71.
- [12] Zeng Y, Xiang J S, Lu Y, et al. sghC1q, a novel C1q family member from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*): Identification, expression and analysis of antibacterial and antiviral activities[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 48(1): 151-163.
- [13] Mei J, Gui J F. Bioinformatic identification of genes encoding C1q-domain-containing proteins in zebrafish[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2008, 35(1): 17-24.

- [14] Zhao L L, Jin M, Li X C, et al. Four C1q domain-containing proteins involved in the innate immune response in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 323-331.
- [15] Li Y, Niu D H, Bai Y Q, et al. Identification of a novel C1q complement component in razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in antibacterial activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 193-201.
- [16] Gerdol M, Manfrin C, De Moro G, et al. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A widespread and diverse family of immune-related molecules[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(6): 635-643.
- [17] Gerdol M, De Moro G, Manfrin C, et al. RNA sequencing and de novo assembly of the digestive gland transcriptome in *Mytilus galloprovincialis* fed with toxinogenic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*[J]. *BMC Research Notes*, 2014, 7: 722.
- [18] Gestal C, Pallavicini A, Venier P, et al. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(9): 926-934.
- [19] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [20] Voorrips R E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs[J]. *Journal of Heredity*, 2002, 93(1): 77-78.
- [21] Deng W K, Wang Y B, Liu Z X, et al. HemI: A toolkit for illustrating heatmaps[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111988.
- [22] Takeuchi T, Koyanagi R, Gyoja F, et al. Bivalve-specific gene expansion in the pearl oyster genome: Implications of adaptation to a sessile lifestyle[J]. *Zoological Letters*, 2016, 2: 3.
- [23] Gerdol M, Greco S, Pallavicini A. Extensive tandem duplication events drive the expansion of the C1q-domain-containing gene family in bivalves[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(10): 583-596.
- [24] Liu Z L. Comparative genomics analyses of tandem duplicated genes in vertebrates[D]. Chongqing: Southwest University, 2017. [刘治隆. 脊椎动物串联复制基因的比较基因组学分析[D]. 重庆: 西南大学, 2017.]
- [25] Ota T, Sitnikova T, Nei M. Evolution of vertebrate immunoglobulin variable gene segments[M]//Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System. Heidelberg: Springer, 2000: 221-245.
- [26] Gao Y Y, Zhu L, Kong X H. Research progress on C1q domain-containing proteins in aquatic animals: A review[J]. *Fisheries Science*, 2021, 40(5): 794-800. [高园园, 朱雷, 孔祥会. 水生动物C1qDC蛋白研究进展[J]. *水产科学*, 2021, 40(5): 794-800.]
- [27] Bailey T L, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[C]// Proceedings of the International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Palo Alto: AAAI Press, 1994, 2: 28-36.
- [28] Dassanayake R S, Silva Gunawardene Y I N, Tobe S S. Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  motifs[J]. *Peptides*, 2007, 28(1): 62-75.
- [29] Lv Z, Wang L L, Jia Z H, et al. Hemolymph C1qDC promotes the phagocytosis of oyster *Crassostrea gigas* hemocytes by interacting with the membrane receptor  $\beta$ -integrin[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 98: 42-53.
- [30] Ghebrehiwet B, Hosszu K K, Valentino A, et al. The C1q family of proteins: Insights into the emerging non-traditional functions[J]. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3: 52.
- [31] Wang L L, Wang L L, Zhang H, et al. A C1q domain containing protein from scallop *Chlamys farreri* serving as pattern recognition receptor with heat-aggregated IgG binding activity[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43289.
- [32] Lv Z, Qiu L M, Wang M Q, et al. Comparative study of three C1q domain containing proteins from Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 78: 42-51.
- [33] Li H, Kong N, Sun J J, et al. A C1qDC (CgC1qDC-6) with a collagen-like domain mediates hemocyte phagocytosis and migration in oysters[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 98: 157-165.
- [34] Zhang H, Song L S, Li C H, et al. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 281-289.
- [35] Venier P, Varotto L, Rosani U, et al. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 69.
- [36] Wang L L, Wang L L, Zhang D X, et al. A novel multi-domain C1qDC protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* provides new insights into the function of invertebrate C1qDC proteins[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 52(2): 202-214.

## Identification and expression patterns of members of the *C1qDC* gene family in *Pinctada fucata*

WANG Jing, LI Guiying, LIN Kaiqi, LIUFU Bai, LI Jinfeng, HUANG Baosong, WANG Zhongliang

Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

**Abstract:** The complement system is an evolutionary and crucial component of the innate immune response, which is key to detecting and removing invading pathogens. C1q-domain-containing proteins (C1qDC), as the first sub-component of the classical pathway in the complement system, can bind immune complexes and activate the classical pathway. Although recent advances in many species have reported the characterization and functional roles of C1qDC in innate immunity, systematic knowledge of C1qDC is still lacking in *Pinctada fucata*. In this study, the phylogenetic relationship, sequence structure, motif composition, chromosome location, and expression pattern of identified *C1qDC* genes from the sequencing data of the whole genome of *P. fucata* were analyzed. The results showed that 285 *C1qDC* genes were identified and divided into five groups. *C1qDC* genes have been studied in many species, but the transcript number varies greatly among different species. In previous studies, 232, 335, and 476 *C1qDC* genes were identified in *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, and *Crassostrea virginica*, respectively. The transcript numbers are far more than that of *C1qDC* genes in fish and humans, and this is likely related to the lack of adaptive immunity of invertebrates and a weak ability of bivalves to resist adverse external environment and pathogens. The massive gene family expansion has occurred in bivalve evolution and is also common in the bivalve genomes. Structure analysis revealed that all the C1qDC proteins of *P. fucata* contained motif 1 and were randomly distributed on 14 chromosomes. Additionally, 68 pairs of tandem duplication and one pair of segmental duplication events were found. The higher synonymous substitution rate relative to the non-synonymous rate observed in *P. fucata* evoked *C1qDC* genes to evolve under purification selection. Some *C1qDC* genes showed high levels of polymorphism and were driven by selective pressure to fight off the noxious pathogens. Adaptive evolution of sequence polymorphism likely reflected the coevolution or interplay of host and pathogen. Recent research showed that C1qDC mainly functions as a pattern recognition receptor to mediate cell phagocytosis and agglutination via directly interacting with the receptor on the cell outer membrane. According to the transcriptome data, 56 *C1qDC* genes (32 upregulated and 24 downregulated) were significantly differentially expressed after the *Vibrio alginolyticus* challenge. Additionally, real-time PCR was implemented for eight randomly selected *C1qDC* genes, and agreement was confirmed between the high-throughput sequencing and real-time PCR data. The expression of the *C1qDC* genes increased in the hemocytes of *P. fucata*, which indicated that *C1qDC* might be involved in the immune response related to *V. alginolyticus* infection. These results provide a theoretical basis for further analysis of the evolutionary pattern of the *C1qDC* genes and the regulatory roles in the immune response in bivalves.

**Key words:** *Pinctada fucata*; C1qDC; gene family; expression profile

**Corresponding author:** WANG Zhongliang. E-mail: zhongliangwang@vip.163.com