研究论文

草鱼 ClqC 基因的克隆及表达分析

陈玥¹, 李家乐^{1,2}, 沈玉帮¹

1. 上海海洋大学 水产动物种质资源挖掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要:为了研究 *ClqC* 基因在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)免疫过程中所起的作用,利用 RT-PCR 和 RACE 方法克 隆获得了 *ClqC* 基因 cDNA 全长序列,经序列分析表明,所克隆的 *ClqC* cDNA 全长为 916 bp,包括开放阅读框 (open reading frame, ORF)735 bp,5'端非编码区(untranslated region, UTR)89 bp 和 3'端非编码区(UTR)92 bp。735 bp 的 ORF 共编码 244 个氨基酸,相对分子量为 26 162.5 U。同源性分析表明,草鱼与斑马鱼(*Danio rerio*)的相似度最高,达到 71%。经草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)诱导后,草鱼 *ClqC* 基因在鳃、皮肤、肌肉、肝、中肾、心脏、头肾等组织中的 mRNA 表达水平均显著上调。在草鱼胚胎发育的各个阶段都能检测到 *ClqC* mRNA 的 表达,说明该基因可能在草鱼胚胎和鱼苗的免疫反应和早期发育中起重要作用。本研究将为今后在草鱼免疫功能方面深入研究 *ClqC* 基因提供基础资料。

关键词: 草鱼; *C1qC* 基因; 克隆; 表达; 草鱼呼肠孤病毒 中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2013)01-0025-10

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是中国乃至世 界最重要的淡水养殖鱼类之一^[1]。但草鱼养殖病 害频发,草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)所导致的草鱼病毒性出血病给养殖产业带 来了很大损失^[2-3]。迄今为止,由于药物和疫苗种 类有限,导致应用传统方法预防这种传染病十分 困难。而通过选育抗病力强的草鱼新品种,再结 合已有的预防和治疗方式来增强草鱼抵抗疾病传 染的能力,不失为防治该病的一条有效途径。

补体系统作为先天性免疫中的一类重要和保 守的体系,为机体提供了快速和高效清除入侵微 生物的途径^[4]。补体的激活方式有3种,分别是经 典激活途径、替代激活途径和凝集素激活途径。 其中,补体的经典激活途径是通过C1分子诱导 的,而C1分子是由1分子的C1q和2分子的C1r 及 2 分子的 C1s 通过 Ca²⁺连接而成的大分子复合物。其中, C1q 是补体经典途径的目标识别蛋白, 是一种具有多种功能的蛋白质,参与天然免疫和 适应性免疫,它在补体经典激活途径中起着重要 作用。研究将含有 C1q 结构域的蛋白统称为含 C1q 结构域蛋白(C1q-domain-containing protein, C1qDC protein)。近年来,许多含 C1q 结构域蛋白 被陆续发现,组成了一个新的 C1q 蛋白家族^[5]。 人类的 C1q 由 18 个多肽(6A, 6B, 6C)组成,分别 构成 A 链、B 链和 C 链。C1q 可以通过它的三聚 体 gC1q 功能域广泛地结合自我和非我的配体, 进而激活经典途径^[6]。

Clq 作为补体经典途径中的启动分子,一直 是补体系统的研究热点。目前的研究显示,Clq 所 参与的补体经典途径可能由补体的凝集素途径演

收稿日期: 2012-04-15; 修订日期: 2012-06-16.

通信作者: 李家乐(1963-), 教授, 主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究. Tel: 86-21-61900401; E-mail: jlli2009@126.com

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-46-04);国家科技支撑计划项目(2012BAD26B02);上海市重点学科 建设项目(Y1101).

作者简介: 陈玥(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种. Tel: 86-21-61900438; E-mail: doveyy88@ 163.com

变而来,而作为启动分子的 C1q 则有可能是在免疫球蛋白出现前从某类凝集素进化而来的^[7-10]。 在对一些哺乳动物的 C1q 分子的功能研究中发现, C1q 分子球形结构域中的 A、B、C 链各自具有独 立的功能^[11],类似的情况也在鲤(*Cyprinus carpio*) 中得到印证^[12]。在硬骨鱼类中,已克隆获得了一 些和哺乳动物 *C1qC* 同源的序列^[13],但是它的结 构和功能尚未被研究,因此,硬骨鱼类 C1q 分子 的表达和功能,其在补体经典途径中的作用,在 进化上是否保守,以及 C1q 家族的进化,都有待 深入地研究。

本研究采用 RT-PCR 和 RACE 法克隆获得了 草鱼 *ClqC* 基因 cDNA 全长序列,并对其进行序 列分析和蛋白质结构预测,利用实时荧光定量 PCR 技术探讨其感染 GCRV 后的时空表达,以期 进一步探究该基因在草鱼免疫应答中的作用,并 为抗病草鱼选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用草鱼取自吴江市国家级四大家鱼原 种场。2 龄草鱼体质量平均为 200 g,健康无伤病, 在实验室水族箱中暂养 7 d,饲养水温恒定为 (27±1)℃。分为对照组和诱导组,每组 20 尾。诱 导组于腹腔内注射草鱼呼肠孤病毒(GCRV)200 μL(GCRV-JX01 株,1×10⁷ TCID50/mL),对照组注 射 PBS 200 μL。分别于注射后 4 h、1 d、3 d 和 7 d 采样,每次 5 尾,解剖取血、鳃、鳍、皮肤、肌肉、 肝、脾、中肾、肠、心脏、头肾、脑等 12 个组织。

草鱼胚胎和鱼苗包括未受精的卵、受精后 0 h、16 细胞期、桑葚期、原肠期、眼基出现期、 尾鳍出现期、肌肉效应期、心跳期、孵化期及孵 化后 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、7 d、10 d、15 d 等不同发育阶段。采样时水温为(21±1)℃。

上述所有样品用液氮保存,带回实验室放在 -80℃超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 总 **RNA** 的提取 采用 Trizol(Takara, 大连) 试剂提取不同组织样本总 RNA, 提取方法参照说

明书。采用 Nanodrop 2000C 分光光度计和 1%琼 脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度和完整性。

1.2.2 ClqC 基因全长 cDNA 的扩增 使用 PrimerScript cDNA 第一链合成试剂盒(Takara, 大 连), 以肝总 RNA 为模板, 采用 adapter-T 合成 cDNA 第一链, 合成方法参照试剂盒说明书。根据 斑马鱼等物种的 ClqC 基因 cDNA 保守区设计引 物 F1、R1, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应试剂采用 Ex Taq 酶(Takara, 大连), 扩增体系 包括 Takara Ex Taq(5U/µL) 0.125 µL; 10×Ex Taq Buffer(Mg²⁺ plus) 2.5 µL; dNTP mixture(各 2.5 mmol/L) 2 µL; 上下游引物各 0.5 µL(20 µmol/L); cDNA 模板 2 μL 以及双蒸水 17.375 μL。反应条 件为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延 伸 10 min。扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳分 离检测,用胶回收试剂盒(天根,北京)回收,纯化 后的产物与 pGEM-T(Promega, 美国)载体连接构 建重组质粒, 热转化感受态 DH5α 大肠杆菌后涂 布于含氨苄的选择性培养基, 再经蓝白斑筛选获 得阳性克隆, 测序得到草鱼 ClqC 基因 cDNA 部分 序列。测序反应由北京华大基因上海分公司完成。

根据已获得的 ClqC 基因片段用 Primer Premier 5.0 软件并结合 BLAST 程序设计 5'和 3'RACE 基因特异性引物,引物由上海生工生物 技术服务有限公司合成(表 1)。3'末端扩增使用 3'Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒(Takara,大 连)。5'末端扩增使用 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage[®] 2 PCR Enzyme System 试剂盒(Clontech,美国)。RACE 扩增得到 的目的片段经克隆测序后,采用 BLAST 比对确 定为 ClqC 基因 cDNA 序列,再将这两段序列与 中间序列进行拼接,即为草鱼 ClqC 基因 cDNA 的全长序列。

1.2.3 序列分析 将获得的草鱼 *ClqC* 基因的全长 cDNA 序列应用 ORF Finder 程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)预测开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)。用 Protparam、Sigal P 4.0 server^[14]、TMHMM 及 ProtScale 等软件,分

10	abit finners used to ampiny of grass carp converting in length and real-time	KCK		
引物 primer	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 application		
M13 primer M4	GTTTTCCCAGTCACGAC	3'RACE		
C3race	CCTGGCACTTATTATTTTGT			
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'RACE(通用引物)		
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC			
C5race	GCTCGGGAGGCAATCTTGTACCACG	5'RACE		
F1	GGAAGGCAAGGAATGAAGGG	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -		
R1	CAAATAGAGAGACAGTCCACCAGAG	中间力权扩填		
C1qC-F	CTCTGCCTCCATCTGGTCTCTAC	共火 会員		
C1qC-R	ATCTCCTGTCTCCCCTTCATCC	火兀止里		
actin-F	CCTTCTTGGGTATGGAATCTTG	共业 中島 () 、		
actin-R	AGAGTATTTACGCTCAGGTGGG	灾兀正重(β -actin)		

表1 草鱼 ClqC cDNA 全长扩增及表达所用引物 Primers used to amplify of grass carp cDNA full length and real-time BCB Tab 1

别预测氨基酸序列的物理参数及信号肽、分析氨 基酸跨膜结构及氨基酸序列的疏水区。采用 Clustalw1.8^[15]和 BioEdit 软件对核苷酸序列及编 码氨基酸序列进行序列多重比对。蛋白质的二级 结构用 Jpred3 (http://www.compbio.dundee.ac.uk/ www-ipred/index. html)进行预测、三级结构通过 ESyPred3D (http://www.fundp.ac.be/sciences/ biologie/urbm/bioinfo/esypred/)进行分析^[16]。采用 Mega5.0 软件对包括草鱼在内的 13 个 ClqC 氨基 酸序列构建 NJ 树、并采用 1000 次自展分析分枝 支持率。

1.2.4 实时荧光定量分析 根据草鱼 ClqC 基因 保守序列设计引物 ClqC-F、ClqC-R, 并采用 β-actin 作为内参基因^[17](表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR premix Ex TaqTM II 试剂盒(Takara, 大 连)在 Bio-Rad CFX-96(Bio-Rad, 美国)实时荧光 定量 PCR 仪上进行。采用 25 µL 反应体系、包括 Premix Ex TaqTM(2×)12.5 µL、上下游引物(10 mol/L)各 1 µL、ddH₂O 8.5 µL 及模板 cDNA2 µL。 每个样品进行3次重复。反应程序为:95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 40个循环, 延伸 阶段收集信号,从 65℃到 95℃,每个循环增加 0.5℃, 持续 5 s 获得解链温度, 采集熔解曲线荧 光信号。相关系数、解链温度等系列参数通过荧 光定量 PCR 仪自带的计算软件 CFX Manager[™] Software 得到后导出至 Microsoft Excel 表格以供

后续分析。目的基因与内参基因的相对表达量采 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[18], 采用 SigmaPlot12.0 软件绘图。 使用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 ClqC 基因 cDNA 序列特征分析

草鱼 ClqC 的 cDNA(GenBank 登录号: JQ 358795)全长为 916 bp, 包括 735 bp 的开放阅读框, 89 bp 的 5'端非翻译区(URT), 92 bp 的 3'端非翻译 区(UTR)。3′UTR 区含有典型的多聚核苷酸加尾信 号序列 AATAAA 和 Poly(A)尾巴。多聚核苷酸加 尾信号在前体 mRNA 3'端翻译后的剪切中发挥作 用^[19],由此可知该 cDNA 具有编码该蛋白的完整 编码区。

2.2 ClqC 基因编码氨基酸序列特征分析

草鱼 ClqC 基因 ORF 区共编码 244 个氨基酸, N 端含有 23 个氨基酸的信号肽序列、成熟肽位于 24-244 氨基酸之间, 共 221 个氨基酸, 预测该蛋 白的分子式为 C1155H1795N329O347S10, 计算的理论 等电点为 8.75, 相对分子量为 26 162.5 U。不稳定 系数为 27.48, 属于稳定蛋白。使用 Bioedit 软件 对成熟肽的氨基酸组成进行分析表明、其中带负 电荷的氨基酸残基(Asp和Glu)有23个,带正电荷 的氨基酸残基(Arg 和 Lys)有 27 个。此外, 甘氨酸 (Gly)含量最高,为14.93%,色氨酸(Trp)含量最少, 为 0.45%。

第1期

犬狼 野马 褐家鼠

家鼠

人猕猴

原鸡

草鱼

犬狼

野马鼠

原鸡 草鱼

斑马鱼

犬野褐家人猕 原 親 马家鼠 猴 親

原鸡 草鱼 斑马鱼 大西洋鲑

犬野褐家人 一般 马家鼠 一般

猕猴 原鸡 草鱼

斑马鱼

犬狼 野马 褐家鼠

家人猕猴

;原鸡 草<u>鱼</u> 斑马鱼

大西洋鲑

大西洋鲑

斑马鱼

大西洋鲑

结构域预测结果发现,第26-107位氨基酸残 基反复出现 Gly-X-Y 三联体形式排列, 其中 Y 通 常为羟脯氨酸或羟赖氨酸残、是典型的胶原序列、 第 108-244 氨基酸残基为 gC1q 结构域。用 Clustal W 软件, 对 ClqC 的氨基酸进行多序列比对发现, 鱼类 ClqC 蛋白和其他物种相似性较高(图 1)。其 中,有4个半胱氨酸残基在不同的物种中保守。

Mus musculus (EDL29927) Homo sapiens (NP_758957.2) Macaca mulatta (XP_001102196)

Gallus gallus (XP_417653) Ctenopharyngodon idella (JQ358795)

Danio rerio (ACN62223 大西洋鲑 Salmo salar (ACN11312)

Canis lupus (XP_544508) Equus caballus (XP_001504308) Rattus norvegicus (NP 001008524)

2.3 草鱼 ClqC 蛋白结构预测

Jpred3 软件对草鱼 ClqC 基因编码蛋白质的 二级结构预测结果表明,在 6-12, 134-140, 152-156, 160-169 等 10 个氨基酸残基处存在 β 折叠。

以 Boggon T. (http://www.pdb.org/pdb/explore/ explore.do?structureId=1C3H)报道的家鼠(Mus musculus)ACRP-30 三级结构(PDB id: 1c3h)为模

				V		
Canis lupus (XP_544508) Equus caballus (XP_001504308) Rattus norvegicus (NP_001008524) Mus musculus (EDL29927) Homo sapiens (NP_758957.2) Macaca mulatta (XP_001102196) Gallus gallus (XP_417653) Ctenopharyngodon idella (JQ358795) Danio rerio (ACN62223) Salmo salar (ACN11312)	MDTGPSSWPH MDVGSSSRLP MVVGTSCQPQ MVVGPSCQPQ MDVGPSSLPH MCQSSRDQLH MFGGH MFGGH MFGGC	LGENILLE-I LGEHULLE-I HGIYULLE-I GGECILLE-I LGEKULLE-I LGEKULLE-I LGEKULLE-R IFGTULAGS LIEVSULSAS IAMGANUSLA	LALPLGGQAS LALPLGGQAS LALPLRSQAN LALPLRSQAN LLLPLRSQAN LESAVTSDPP LCHUVSTDT LCLCLASADT LP-DLVTMET	TOCYGIPGMP TDCYGIPGMP ACCYGIPGMP TCCYGIPGMP TCCYGIPGMP TCCYGIPGMP HSCYGAPGIP CSAGAMPGIP CPACAMPGIP CTSAGTPGLH	GUPGAPGKDG GMPGTPGKDG GMPGTPGKDG GMPGAPGKDG GUPGAPGKDG GMPGVPGRDG GMPGVPGRDG GIPGEPGRDG GPGEPGRDG GPGEPGRDG GPGLPGRDG	HDGLPGPKGE HDGLQGPKGE HDGLQGPKGE HDGLQGPKGE MDGLPGPKGE RDGLKGAKGE RHGMKGETGD RQGMKCEKGD RDGETGEKGV
Canis lupus (XP_544508) Equus caballus (XP_001504308) Rattus norvegicus (NP_001008524) Mus musculus (EDL29927) Homo sapiens (NP_758957.2) Macaca mulatta (XP_001102196) Gallus gallus (XP_417653) Ctenopharyngodon idella (JQ358795) Danio rerio (ACN62223) Salmo salar (ACN11312)	PGIPAIPGTR PGIPAMPGTQ PGIPAMPGTQ PGIPAMPGTQ PGIPAIPGTR PGIPAIPGTR PGIPAIPTMQ PGIPIKPYET LGIPIKPGDT SGWLSCPGQK	GPKGQKGEPG GPKGQKGEPG GPKGQKGEPG GPKGQKGEPG GPKGQKGEPG GPKGMKGEPG GPKGMKGEPG VKKGERGAFG AEEGQKGEPG	TPGWPGKNGP TPGHPGKNGP MPGHRGKNGP UPGHPGKNGP SPGLKGKWGP LKGMPGKRGL LKGPPGKRGP WKGAVGKPGR	MGTPGIPGVP MGTSGMACLP MGTSGSPGDP RGTSGLPGDP MGPPGMPGVP MGPPGMPGVP FGPAGPEGDP FGPAGPEGDP FGPGPGRGPP SGVRGDKGSP	GPVGPPGEPG GLVGPRGEPG GPRGPPGEPG GPRGPPGEPG GPMGIPGEPG GPMGIPGEPG GVMGAAGQKG GPQGQPGDPG GPQGQPGDPG GPPGEPGEAG GPBCARGEPG	EECRYKQKHQ EECRYKQKHQ EECRYKQKHQ EECRYKQKHQ EECRYKQKHQ LPGSLKRMHQ NLENSKSHLQ LVDVSGSQLQ ESGSAGPLLQ
Canis lupus (XP 544508) Equus caballus (XP 001504308) Rattus norvegicus (NP 001008524) Mus musculus (EDL29927) Homo sapiens (NP 758957.2) Macaca mulatta (XP 001102196) Gallus gallus (XP 417653) Ctenopharyngodon idella (JQ358795) Danio rerio (ACN62223) Salmo salar (ACN11312)	SVFTVTRQTA SVFTVTRQTD SVFTVTRQTA SVFTVTRQTF SVFTVTRQTH SAFSVTRQTH SAFSVSRCTR SAFSVSRCTR SAFSVSRCTR	OYPLANNL VK OYPAANSL VK OYPAANSL VK OYPAANSL VK OYPAPNSL IR OPPAPNSL IR EHPMKNITP VV LPPEPNIVIR IPPDANKVIR SPPEKASP IR	FNTVITNPQG FNSAITNPQG FNSAITNPQG FNSVVTNPQG FNSVVTNPQG FNAVITNPQG FNNIITNTNN FTNIITNPDS FSKVITNPQG FTTVITDVNK	DYDTSTGKFT HYDTSTGKFT DYNTNTGKFT HYNPSTGKFT DYDTSTGKFT DYDTSTGKFT DYSTTGKFT HFKTDESKFW HFSTDESKFW DYNTETGRFR	CKVPGLYYFV CRVPGLYYFV CRVPGLYYFV CRVPGLYYFV CKVPGLYYFV CKVPGLYYFV CKTPGTYYFV CKTPGTYYFV CRTPGTYYFV CRVPGTYYFV	YHTSLTSN-L HHTSQTAN-L HHTSQTAN-L YTSHTAN-L YHASHTAN-L YHASHTAN-L YHSSMERN-L HHASSKEKSL LHASSHEKSL YHASSEER-L
Canis lupus (XP 544508) Equus caballus (XP 001504308) Rattus norvegicus (NP 001008524) Mus musculus (EDL29927) Homo sapiens (NP 758957.2) Macaca mulatta (XP 001102196) Gallus gallus (XP 417653) Ctenopharyngodon idella (JQ358795) Danio rerio (ACN62223) Salmo salar (ACN11312)	CWHLYRSGTR CVQLLNNAK CVQLLNNAK CVHLNLNLAR CVHLYRSGVK CVHLYRGGVK CVHLYQDKVK CVHLWHDDKK CVHLWHDDKN CVHLVHDDKN CLVFKLDGTS	WT TFCDHMSN WTSFCDHMSN WASFCDHMSN WASFCDHMFN WTFCGHTSK WTFCGHTSK KASFCDHKTN WANFCDHIQR LVSFCDHTQR LSSFCDLTYG	SK9VSSGG SK9VSSGG SK9VSSGG SK9VSSGG TN9VNSGG AN9VNSGG N19VNSGG SS9-QVSSGG G S9-QVSSGG G TKRQVSSGG	VLLRLQMGEQ VLLQLQVGEE ALLRLQRGDE VLLRLQRGDE VLLRLQVGEE VLLRLQVGEE VLLRLQVGEE VLLHLEAGNQ LAVYLNENBK LAVYLNENBK LATYLKKDQE	WELAVNDYNG WWLAVNDYNG WWLAVNDYNG WWLSVNDYNG WWLAVNDYNG WWLEWNDYNG WWLUGSYNG WWLMGSYNG WWLMTNALNG WWLETNDYNG	MVGTEG-SDS MVGTEG-SDS MVGTEG-SDS MVGTEG-SDS MVGTQG-SDS MVGTGE-SDS LYAEGNKGDS MYATADRADS MTGKPE-GNS
	n in the second s					

VFSGFLLFPD
VFSGFLLFPD
FSGFLLFPD
VF SGFL THAH
VF SGFL IIHAH
LFSGFLLNPH

图 1 不同脊椎动物 ClqC 氨基酸序列的比对分析

使用 ClustalW 进行比对. 黑色三角表示 4 个保守的半胱氨酸残基.

Fig. 1 Multiple sequence alignment of C1qC from different previously known vertebrates Analysis was performed by Clustal W. Black triangulars show the four conserved cysteine residues. 板,通过 ESyPred3D 预测获得了草鱼 ClqC 蛋白 的三级结构。三级结构预测结果发现其具有十股 的 jelly-roll 折叠结构,与斑马鱼的 ClqC 三级结 构相似^[12](图 2)。该结果与 Jpred3 软件对草鱼 ClqC 基因编码蛋白的二级结构预测结果一致。

2.4 草鱼 C1qC 氨基酸序列同源性及分子进化分析

将本实验所得 C1qC 氨基酸序列经 Blast 比对 发现,与斑马鱼 C1qC 的相似度最高,为 71%;与 已发现的人(*Homo sapiens*)、大西洋鲑(*Salmo salar*) 和舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)的相似度分别为 48%、47%和 42%。用 ClustalW 软件将本实验所 得的氨基酸序列与其他物种的 C1qC 氨基酸序列 进行多重序列比对, 再结合 Mega 5.0 软件将比对 结果以邻接法(NJ法)构建系统树(图 3), 并用重复 1 000 次的自展检验计算各分支的置信值。结果显 示, 本实验中草鱼 ClqC 与斑马鱼的进化关系最近, 最先聚为一枝, 再与大西洋鲑和舌齿鲈形成的小 枝聚在一起, 最后与其他哺乳动物聚成一大枝。 2.5 不同组织的表达分析

分析 *ClqC* 在不同组织中的表达差异水平, 如图 4 所示,在所采集的 12 个组织中都检测到 *ClqC* 基因的表达,在脾、中肾、头肾组织中发现 表达水平较高。

为分析草鱼呼肠孤病毒诱导草鱼后 ClqC 在



图 2 ESyPred3D 预测的草鱼 C1qC 蛋白(a)、模板(b)、斑马鱼 C1qC 蛋白(c)、人 C1qC 蛋白(d)三级结构 Fig. 2 C1qC in *Ctenopharyngodon idella*(a), template(b), C1qC in *Danio rerio*(c), and C1qC in *Homo sapiens*(d) protein tertiary structure predicted by ESyPred3D



Fig. 3 Phylogenetic tree of gcC1qC and their homologues using NJ method The GenBank accession numbers of the sequences are in brackets.

体内的转录反应, 使用荧光定量 PCR 方法对诱导 后4个时间点的血、鳃、鳍、皮肤、肌肉、中肾、 肝、脾、肠、心脏、头肾、脑组织表达谱进行检 测和分析。由图 5 可见, 经草鱼呼肠孤病毒诱导 后, ClqC的表达量在鳍、皮肤、肌肉、肝、肠、 心脏中都显著上调(P<0.05),其中,脾的表达量 最高。值得注意的是,在诱导后1d, 鳃、鳍、皮 肤、肝、中肾、肠、心脏等 7 个组织的表达出现 上调;在诱导后3d,除肌肉和脑表达上调以外所 有组织 ClqC 表达量迅速回调; 在诱导后第 7 天, ClqC 基因只在血和肌肉 2 个组织中的表达上调。 2.6 不同发育时期的表达分析

该基因在未受精的卵细胞中即具有较高转录 水平,随后转录数量开始下降,于心跳期达到最 低点, 再逐渐回升(图 6)。在孵化后 6 d 该基因的 表达量上升到一个高峰,但随后又下降到新的低 点, 再逐渐回升, 孵化后 15 d 表达量最高(P< 0.05)。总体来说, 草鱼胚胎发育期及鱼苗期 ClqC 具有较高水平的 mRNA 转录。

600

500

400

300

200

100

0

relative expression level

相对表达量



图 5 草鱼 ClqC 基因的诱导表达谱 "*"和"**"分别表示相对表达量显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)高于对照样本.

组织 tissue

Fig. 5 Quantitative expression profile of C1qC gene after induction with grass carp reovirus Asterisks and double asterisk indicate that the relative expressions are significantly higher than those of the corresponding control samples at 0.05 or 0.01 levels respectively.

縣伯事

^創8汕]

' blood€

3 讨论

本研究采用 RACE 法从草鱼中克隆获得 *ClqC*基因 cDNA 全长序列,为916 bp,开放阅读 框 735 bp,共编码 244 个氨基酸。序列分析及同 源性分析表明,该基因与其他动物有较高的相似 度,特别是与斑马鱼的相似性达到 70%以上,说 明该基因具较强的保守性,也表明该基因在脊椎 动物免疫应答中起着重要且不可替代的作用。对 结构域的预测也显示该基因的结构域与其他已知 的 *Clq* 结构域有较高的相似性,且具有许多保守 的结构特征。在序列中有 4 个在不同物种中都保 守存在的半胱氨酸残基,这 4 个半胱氨酸分别和 链间及链内的二硫键结合有关^[20-21],因此推测, 草鱼 ClqC 和人 ClqC 的晶体结构类似。在分子 结构上,草鱼 ClqC 的 Clq 结构域与其他物种一 样,都和肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)的 C 端 THD 结构域有相似之处,他们都存 在1个由 β -三明治亚单位组成的堆成三聚体,每1 个亚单位都有1个十股的 jelly-roll 折叠结构。该 β 核心的拓扑结构与疏水性都具有很高的保守性^[22]。 分子进化分析表明, *ClqC* 基因与斑马鱼、舌齿鲈、 大西洋鲑的亲缘关系较近,与人、小鼠等哺乳动 物的亲缘关系也不远,这表明从低等脊椎动物到 高等脊椎动物动物间,该基因结构在进化中高度 保守^[22]。草鱼 *ClqC* 基因中所含的这样高度保守 的 Clq 结构域暗示了其具有 Clq 分子作为模式识 别受体(Pattern Recognition Receptor, PRR)识别某 些配体的性质。

荧光定量 PCR 结果显示, 草鱼 *ClqC* 基因的 表达不仅局限于某种特定组织或某一特定时期,



图 6 草鱼 C1qC 基因不同发育时期的表达分析 "*"表示相对表达量显著高于对照样本(P<0.05).

Fig. 6 Quantitative expression profile of ClqC during different development stages

Asterisks indicate that the relative expressions are significantly higher than those of the corresponding control samples (P<0.05).

它们在各个组织中都能检测到,与文献[12]报道 一致。在各组织中,表达量最高的 3 个组织依次 为脾、中肾、头肾。与哺乳动物不同的是,鱼类 的先天免疫是免疫中最基本的防御机制^[23],鱼类 缺少骨髓和淋巴结,肾是其主要的淋巴样器官, 用来执行相似的功能^[24]。另外,鱼类的脾含有大 量的淋巴细胞、巨噬细胞和多种粒细胞,可以执 行免疫功能^[25]。而本研究发现,草鱼 *ClqC* 主要 在这些免疫相关组织中高表达,表明草鱼 *ClqC* 基因与草鱼免疫系统具有相关性。

以 β-actin 为内参, 经草鱼呼肠孤病毒进行诱 导后, ClqC 的表达量在血、鳃、脾、中肾、头肾 组织中都出现显著上调。草鱼 ClqC 基因在诱导 后表达迅速上调、说明该基因可能参与病原入侵 后的早期免疫反应,进而在急性的炎症反应和长 期免疫保护中发挥重要作用^[26]。皮肤和肌肉是鱼 类免疫系统的防御屏障^[35], 笔者在实验中发现, 诱导后 ClaC 在皮肤和肠的表达上调、说明草鱼 呼肠孤病毒感染可引起鱼体中广泛的组织损伤。 此外、鳍条、鳃、肠道等组织中 ClaC 基因表达量 在诱导后都显著上升、而这些组织正是草鱼病毒 性出血病发生病变的主要部位^[27],这表明该基因 可能参与草鱼全身性宿主防御反应、并在炎症调 节、适应性免疫和维持机体平衡等方面起着重要 作用, 而这也印证了 ClqC 结构域中所含的信号 传导分子的功能^[28]。根据 Clq 结构域可以结合多 种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)的功能^[5,29-32], 推测在受 到病原刺激时, 草鱼 ClqC mRNA 能在不同组织 中得到转录,新合成的蛋白通过其自身的 Clq 结构 域识别多种病原微生物、从而参加免疫应答反应。

在草鱼胚胎发育的各个阶段也能够检测到 *ClqC* 的表达, 暗示着草鱼补体在受精卵中就已 经存在, 这与文献报道的一致^[33]。低等脊椎动物 中囊胚期开始进行合子基因的表达^[34], 而在本研 究中发现 *ClqC* 在囊胚期之前就已检测到表达, 由此表明 *ClqC* 是母系遗传。笔者在早期的未受 精卵细胞中就检测到了较高的草鱼 *ClqC* 转录本 水平, 随后其转录水平逐渐降低, 直至于心跳期 达到低谷。因此草鱼早期胚胎中的 *ClqC* 转录本 应当是来自于母体并随着胚胎发育逐渐降解,直 至胚胎自身基因开始表达后其转录本才逐渐回 升。*ClqC* 转录水平于孵化后 6 d 达到一个高峰, 这一时期正值鱼苗刚失去卵膜保护,直接与外界 微生物接触^[35]。这些结果表明,*ClqC* 基因可能在 草鱼胚胎的免疫反应和早期发育中起重要作用。

本研究对草鱼 *ClqC* 基因的 cDNA 序列进行 了克隆和分析, 对其 mRNA 在草鱼呼肠孤病毒诱 导后的表达规律进行了检测, 为进一步探讨 Clq 分子的进化机制提供了新的依据。此外, 还发现 GCRV 能使草鱼 *ClqC* mRNA 表达上调, 表明该 基因可能参与了对病毒感染的防御反应, 这为今 后开展草鱼的抗病选择育种提供了一定的理论依 据。下一步尚需从蛋白水平研究 *ClqC* 基因的表 达及功能。

参考文献:

- Li S, Lu Q, Zhou B. Evaluation on the potential capacity of the swan oxbow for the conservation of the major Chinese carp[J]. Aquaculture, 1995, 137: 46–47.
- [2] Su J, Jang S, Yang C, et al. Genomic organization and expression analysis of Toll-like receptor 3 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(3): 433–439.
- [3] Attoui H, Fang Q, Jaafar F M, et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of Golden shiner reovirus, Grass carp reovirus, Striped bass reovirus and golden ide reovirus (genus Aquareovirus, family Reoviridae) [J]. J Gen Virol, 2002, 83(8): 1941–1951.
- [4] Muller-Eberhard H J, Nilsson U, Aronsson T. Isolation and characterization of two beta1-glycoproteins of human serum[J]. J Exp Med, 1960, 111: 201–215.
- [5] Kishore U, Ghai R, Greenhough T J, et al. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q[J]. Immunol Lett, 2004, 95(2): 113–128.
- [6] Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, et al. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility[J]. Trend Immunol, 2004, 25(10): 551–561.
- [7] Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway-its role in innate immunity and evolution[J]. Im-

munol Rev, 2004, 198(1): 185-202.

- [8] Mei J, Gui J. Bioinformatic identification of genes encoding C1q-domain-containing proteins in zebrafish[J]. J Genet Genom, 2008, 35(1): 17–24.
- [9] Dodds A W, Matsushita M. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway[J]. Immunobiology, 2007, 212(4-5): 233–43.
- [10] 孔鹏飞. 海湾扇贝补体样成分 AiC1qDC-1 基因克隆及其 功能的研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
- [11] Kishore U, Gupta S, Perdikoulis M, et al. Modular organization of the carboxy-terminal, globular and head region of human C1qA, B, C chains[J]. J Immunol, 2003, 171: 812– 820.
- [12] Hu Y, Pan X, Xiang L, et al. Characterization of C1q in Teleosts[J]. J Biol Chem, 2010, 285(37): 28777–28786.
- [13] Kocabas A M, Li P, Cao D, et al. Expression profile of the channel catfish spleen: analysis of genes involved in immune functions[J]. Mar Biotechnol, 2002, 4: 526–536.
- [14] Petersen T N, Brunak S, von Heijine G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nat Methods, 2011,8: 785–786.
- [15] Jeanmougin F, Thompson J, Gouy M, et al. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. Trend Biochem Sci, 1998, 23(10): 403–405.
- [16] Lambert C, Leonard N, de Bolle X, et al. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures[J]. Bioinformatics, 2002, 18(9): 1250–1256.
- [17] Xu Z Y, Nie P, Chang M X, et al. Cloning, characterization and expression analysis of SIMP (source of immunodominant MHC-associated peptides) in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(6): 701–714.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-△△CT} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [19] Proudfoot N J, Brownlee G G. 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA[J]. Nature, 1976, 263(5574): 211–214.
- [20] Reid K B, Porter R R. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement[J]. Biochem J, 1976, 155(1): 19–23.
- [21] Kishore U, Reid K B. Modular organization of proteins containing C1q-like globular domain[J]. Immunopharmacology, 1999, 24: 15–21.
- [22] 胡瑜兰. 硬骨鱼类补体关键因子 Clq 及免疫球蛋白分子

克隆、进化和功能的初步研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.

- [23] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria[J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 827–839.
- [24] Liu Y, Chen S L, Meng L, et al. Cloning, characterization and expression analysis of a novel CXC chemokine from turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(4): 711–720.
- [25] Press C McL, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 9(4): 309-318.
- [26] Bohlson S S, Fraser D A, Tenner A J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term immune function[J]. Mol Immunol, 2007, 44(1-3): 33–43.
- [27] 肖雪. 草鱼呼肠孤病毒人工感染草鱼的条件筛选和病理 学研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [28] Kishore U, Reid K B. C1q: structure, function, and receptors[J]. Immunopharmacology, 2000, 49: 159–170.
- [29] Alberti S, Marques G, HernandezAlles S, et al. Interaction between complement subcomponent C1q and the Klebsiella pneumoniae porin OmpK36[J]. Infect Immun, 1996, 64(11): 4719–4725.
- [30] Thielens N M, Tacnet-Delorme P, Arlaud G J. Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses[J]. Immunobiology, 2002, 205(4-5): 563–574.
- [31] Rimoldi M T, Tenner A J, Bobak D A, et al. Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by Trypanosoma-cruzi trypomastigotes[J]. J Clin Invest, 1989, 84(6): 1982–1989.
- [32] Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, et al. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties[J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46974–46982.
- [33] Wang Z, Zhang S, Wang G, et al. Complement activity in the egg cytosol of zebrafish *Danio rerio*: Evidence for the defense role of maternal complement conponents[J]. PLoS ONE, 2008, 3(1): e1463.
- [34] Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos[J]. Reprod Biol, 2008, 8(1): 23–42.
- [35] Liu F, Li J L, Yue G H, et al. Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 133: 133–143.

Cloning and expression of *C1qC* gene in grass carp (*Ctenopharyn-godon idella*)

CHEN Yue¹, LI Jiale^{1, 2}, SHEN Yubang¹

- 1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;
- 2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We evaluated the immune function of C1qC in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). The full-length C1qC cDNA was successfully cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length C1qC cDNA was 916 bp, consisting of a 735 bp open reading frame (ORF) encoding 244 amino acids, a 89 bp 5'untranslated region (5' UTR), and a 92 bp 3' untranslated region (3' UTR). The molecular weight of this mature peptide was estimated to be 26 162.5U. Multiple alignment analysis revealed that grass carp C1qC shares the highest identity with zebrafish C1qC (71%). We constructed a phylogenetic tree using the neighbor-Joining (NJ) method. Grass carp were grouped most closely with zebrafish (*Danio rerio*). The expression of grass carp C1qC was significantly up-regulated in most tissues following challenge with grass carp reovirus (GCRV). The expression of C1qC plays an important role in early embryonic development and in the response to GCRV-related diseases in grass carp. Our result provide a basis for further evaluation of the role of grass carp C1qC in immune function.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *C1qC* gene; expression; grass carp reovirus **Corresponding author:** LI Jiale. Tel: 86-21-61900401; E-mail: jlli2009@126.com