

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)补体 C3 和 C4 基因的 分子特征及表达分析*

王海玲 祁鹏志 郭宝英 吴常文

(浙江海洋学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 本文测定了大黄鱼 C3(*L.c-C3*)和 C4(*L.c-C4*)基因的 cDNA 全序列。结果表明, *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 序列全长分别为 4962bp 和 5088bp, 分别编码 1653 和 1695 个氨基酸, N 端信号肽序列分别为 23 和 19 个氨基酸。推导的氨基酸序列结构分析表明大黄鱼 C3 和 C4 与已报道的补体 C3、C4 同样都具有在功能上比较重要的残基以及保守的硫酯区。分子进化分析表明, *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 分别与鳊鱼 C3、C4 的氨基酸同源性最高。实时荧光定量 PCR 结果显示, *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 在健康大黄鱼的肝脏、脾脏、肠、鳃、心脏、脑、肌肉和胃这 8 种组织中都有表达, 其中肝脏的表达量最高。在大黄鱼胚胎不同发育时期(从 2 细胞期到初生仔鱼)中, *L.c-C3* 在各个阶段没有明显的变化, 而 *L.c-C4* 的表达量有明显升高。溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)侵染的大黄鱼肝脏和脾脏中, *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 的 mRNA 表达量均明显上调。该结果表明, 大黄鱼肝组织 C3 和 C4 基因表达变化与溶藻弧菌的侵染密切相关, 揭示了 C3 和 C4 在大黄鱼抗细菌免疫反应中具有重要的作用。

关键词 大黄鱼; 大黄鱼补体 C3(*L.c-C3*); 大黄鱼补体 C4(*L.c-C4*)序列特点; 分子特征; 表达分析
中图分类号 Q785; Q516 doi: 10.11693/hyh20141000296

大黄鱼(*Larimichthys crocea*), 又称石首鱼、黄花鱼、红瓜等, 隶属于鲈形目、石首鱼科、黄鱼属, 为我国传统“四大海产”(大黄鱼、小黄鱼、带鱼、乌贼)之一。大黄鱼主要分布于南海雷州半岛以东至黄海南部西侧, 范围涵盖南海、东海和黄海南部, 结群生活于亚热带近海中下层。大黄鱼是我国沿海一种重要的海洋经济鱼类养殖品种之一, 也是我国主要的网箱养殖海水鱼类(Wan *et al.*, 2009)。近年来, 随着大黄鱼人工养殖技术的不断完善和成熟, 大黄鱼养殖也在水产养殖中产生了巨大的经济和社会效益。但是, 也出现了诸如养殖品质低、生长衰退、抗病能力弱等问题, 严重制约了大黄鱼养殖业的健康发展(Zheng *et al.*, 2006)。对大黄鱼先天免疫的研究将会对大黄鱼的疾病控制起到重要的作用。近年来, 随着分子生物学

技术的不断发展, 越来越多的大黄鱼免疫相关基因被克隆出来(Zheng *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2013)。随着许多经济鱼类基因组计划的成功完成, 对基因开展 mRNA 水平上的研究也变得越来越重要(Davidson *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2013; Venkatesh *et al.*, 2014)。目前, 本实验室即国家养殖设施与工程技术中心已经联合上海交通大学 Bio-X 研究中心对大黄鱼基因组图谱成功进行了绘制, 对大黄鱼开展基因水平上的研究已刻不容缓。

大黄鱼由于其重要的经济价值, 近年来在我国的养殖面积日益增加, 但病害问题严重, 其中溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是养殖大黄鱼弧菌病的主要病原之一。因此, 有必要对溶藻弧菌侵染后大黄鱼的免疫反应进行研究, 以期为大黄鱼的免疫学研究及健

* 国家高技术研究发展计划(863 计划), 2012AA10A403 号; 浙江省水产新品种选育重大科技专项, 2012C12907 号; 浙江省自然科学基金项目, Y14C190008 号; 海洋科学浙江省重中之重学科开放课题, 20130101 号; 大学生科技创新项目暨新苗计划, 2013R411057 号。王海玲, 硕士, E-mail: hailingwang2013@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2014-10-23, 收修改稿日期: 2014-11-28

康养殖提供一定理论依据。免疫系统是保护鱼体免受病原微生物入侵的防御系统(艾庆辉等, 2007), 也是鱼类维持正常生理功能的保障。免疫系统主要由免疫组织及器官、免疫细胞和体液免疫因子组成。鱼类是最早同时出现特异性免疫和非特异性免疫的脊椎动物。与哺乳类相比, 其特异性免疫系统不发达, 因此鱼类更多依赖非特异性免疫来抵御病害生物的入侵以及修复感染损伤的机体。而非特异性免疫主要由一些抗氧化酶如超氧化物歧化酶、磷酸酶及补体 C3、C4 参与(Lvoll *et al.*, 2006; 区又君等, 2011; Yu *et al.*, 2011)。在补体各成分中, 补体第三组分(C3)在血清中含量最高, 是补体系统的核心。C3 是哺乳动物补体系统中最重要的组成部分, 是激活和效应中心, 补体系统的三大激活途径均汇集于 C3, 然后产生相应的效应。C3 也与旁路途径的激活起始有关, 旁路途径属于自发性激活, 一种称为 C3 的“慢速运转”(tick over)机制(Müller-Eberhard, 1988)。C3 在功能上不仅依赖的阳性反馈环路的基础; 而且 C3 裂解片段及其结合蛋白复杂多样, 在免疫防御、免疫调控以及免疫病理中发挥着重要的作用(翟瑞燕等, 2010)。

补体是鱼类免疫防御系统的重要组成成分, C3 参与形成靶细胞表面攻膜复合物(MAC), 导致靶细胞溶解。C3 的存在通常可作为补体系统中旁路激活途径存在的一个依据。C3 是个包含硫酯的蛋白, 相对于补体系统中的其它组成部分而言, C3 没有非常清晰的结构区域, 但它的系统发生可以追溯到原口动物——刺胞动物、节肢动物和两侧对称动物(Fujito *et al.*, 2010; Buresova *et al.*, 2011)可以认为 C3 是补体系统进化过程中最早出现的分子。在哺乳动物中, C3 与 C4、C5 同源, 这三个分子与血清蛋白酶抑制因子 2M(α -2-macroglobulin)以及血细胞的 GPI 锚定膜蛋白 CD109 (Lin *et al.*, 2002)同属于一个家族——硫酯包含蛋白家族。目前, 已经在低等的后口动物乃至原口动物中克隆获得 C3 的 cDNA 序列, 部分有了功能上的研究结果(Clou *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005)。在按蚊和果蝇中均发现硫酯包含蛋白 TEP, 据报道, 这些分子拥有类似于脊椎动物 C3 的调理作用, 它们作为调理素参与病原菌的清除(Bou Aoun *et al.*, 2011; Povelones *et al.*, 2011)。

1 材料与方法

1.1 材料

一龄大黄鱼 5 尾, 取自福建沙埕港, 体重约 700g/

尾, 活体运输到实验室, 取脑、肌肉、肝脏、脾脏、心脏、鳃、肠和胃这 8 个组织迅速投入液氮中保护 RNA 并转移至 -80°C 冰箱中保存备用。提取上述 8 个组织的总 RNA 并反转录成 cDNA, 用于大黄鱼补体 C3(*L.c-C3*)和补体 C4(*L.c-C4*)基因的克隆扩增及组织表达谱检测。

不同胚胎发育阶段的大黄鱼, 采自福建省福鼎市沙埕养殖基地, 是在大黄鱼卵受精后每 1h、3h、7h、12h、17h、24h 后采样, 分别对应大黄鱼胚胎发育的 2 细胞期、多细胞期、原肠初期、眼泡出现期、尾芽期、初孵仔鱼, 并用光学显微镜进行确认。

一龄大黄鱼(500—700 g/尾)共 36 尾, 健康无伤病, 于循环水族箱中暂养一周以上。饲养期间投喂新鲜小杂鱼。分为对照组和诱导组两组, 每组 18 尾。诱导组于腹腔内注射溶藻弧菌 $200\ \mu\text{L}$ (PBS 重悬, 细胞数约为 1.0×10^7 个), 对照组注射 PBS $200\ \mu\text{L}$ 。分别于注射后 0h、6h、12h、24h、48h 和 72h 采样, 每组每次随机挑取 3 尾, 解剖取肝脏和脾脏两个组织, 于液氮中速冻后保存于 -80°C 超低温冰箱, 用于诱导后不同时间点的表达变化分析。

1.2 *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 基因克隆及全长 cDNA 的获得
大黄鱼基因组草图已经由浙江海洋学院国家海洋设施养殖工程技术研究中心联合上海交通大学 Bio-X 研究中心联合绘制完成(Wu *et al.*, 2014), 利用该基因组数据, 作者已得到 *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 基因的全长。

总 RNA 提取采用 TRIZOL(美国 Invitrogen 公司)试剂, 提取方法参照说明书。琼脂糖电泳检测提取效果(图 1), 然后用 DNase I 酶于 37°C 消化 30 min 以去除残留的 DNA。用 Poly(T)18 和 Power Script Transcriptase (Clontech)将消化后的总 RNA 反转录成 cDNA。

1.3 序列分析

采用 ORF finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Marker 肠 胃 肌肉 鳃 肝脏 脾脏 心脏 脑

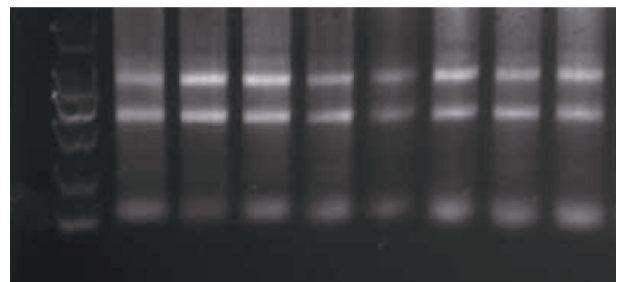


图 1 琼脂糖电泳检测 RNA 提取效果

Fig.1 RNA examination by agarose gel electrophoresis

gorf)对 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因 cDNA 全长序列进行开发阅读框(ORF)预测。采用 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.gembl-heidelberg.de/>)和 SignalP 4.0 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分别进行结构域分析和信号肽分析。利用 CLUSTALW X2 软件进行氨基酸序列的多重比对。采用 MEGA 4.0 软件比较不同序列之间的相似度并构建系统发育树, 树形分支置信度通过开展 1000 次自举重复得到。

1.4 荧光定量检测大黄鱼 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因 mRNA 的表达特征分析

分别取 3 条健康大黄鱼(脑、肌肉、肝脏、脾脏、心脏、鳃、肠和胃)共 8 种不同组织检测 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因 mRNA 的组织差异性表达、取不同胚胎发育阶段(2 细胞期、多细胞期、原肠初期、眼泡出现期、尾芽期和初孵仔鱼)共 6 个时期的大黄鱼受精卵检测不同发育阶段中 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因 mRNA 的差异性表达、取溶藻弧菌侵染的大黄鱼(每一取样时间点的实验组和对照组鱼各 3 尾)肝脏和脾脏组织, 分别抽提以上各组织的总 RNA。总 RNA 提取、DNase I 处理和第一链 cDNA 合成等方法详见文献(黄左安等, 2011)。根据 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因的 cDNA 序列分别设计一对跨内含子的扩增引物, 选取 β -actin 作为内参基因。各引物序列详见表 1。

表 1 用于实时定量荧光 PCR 的引物序列
Tab.1 Primers used for RT-PCR

引物	引物序列(5'—3')	用途
<i>L.c</i> -C3rpF	CACCTGTGTGAAAAATTCTACCATCC	用于 <i>L.c</i> -C3 RT-PCR
<i>L.c</i> -C3rpR	CCCTGAGGACCCACATCATAA	
<i>L.c</i> -C4rpF	AGACAACCTGCAGATAACGCCT	用于 <i>L.c</i> -C4RT-PCR
<i>L.c</i> -C4rpR	ATCCACAGCCAGTAAAGCCACT	
-actin-F	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	用于内参基因 RT-PCR
-actin-R	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	

荧光定量检测试剂采用 SYBR 定量检测试剂盒 (Takara 公司), 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)采用 25 μ L 反应体系, 含 SYBR Premix ExTaq (2 \times)缓冲液 12.5 μ L, 正向和反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 0.5 μ L, 灭菌水 10 μ L。扩增反应在 Applied Biosystems 7500P 荧光定量 PCR 仪上进行, 94 $^{\circ}$ C 变性 180s 后, 按以下程序进行 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s。为确保特异性扩增, PCR 结束后对扩增产物进行熔解曲线分析, 流程为 94 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 95 $^{\circ}$ C 30s,

每一个样品技术重复 3 次。采用 β -actin 基因对各个样本 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因表达水平进行校正, 每个样本的检测均重复 3 次, 并测量其 Ct 值。采用相对标准曲线法 2^{-Ct} (Livak *et al*, 2001)分析相对定量结果, 实验结果表示为平均值 \pm 标准误, 显著性水平采用 SPSS18.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因 cDNA 序列分析

L.c-C3 基因 cDNA 序列全长 4962 个核苷酸 (nucleotides, nt) (GenBank 登录号: KJ544508), 编码一个由 1653 个氨基酸组成的前体蛋白。前体蛋白 N 端 23 个氨基酸为信号肽序列。利用 SMART 数据库对结构域开展检测分析显示, 大黄鱼 C3 蛋白由一个信号肽部分和 8 个结构域组成(图 2B 所示), 详细信息见表 2。将 *L.c*-C3 基因氨基酸序列与其它硬骨鱼以及人类的 C3 序列比对后(图 1)表明, 补体 C3 存在多个保守位点, 其中包括一个 β - 折叠位点(RXXR 结构, 660—663aa, 如图 2A), 一个 ANATO 结构域(由 CC.....C.....C.....CC 构成, 686—722aa, 如图 2C)和一个极保守的硫酸酯区(GCGEQ, 1005—1009aa, 图 2C), *L.c*-C3 与鳊鱼(*Miichthys miui*)C3 的同源性最高(序列相似度为 82%), 而与其它硬骨鱼类如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、金头鲷(*Sparus aurata*)和花狼鱼(*Anarhichas minor*)的序列相似度分别为 73%、73%和 72%而与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的相似度为 43%, 与尤金袋鼠(*Macropus eugenii*)的为 42%, 与人(*Homo sapiens*)的则为 41%。系统发育分析显示大黄鱼补体 C3 与鳊鱼最先发生聚类, 表明亲缘关系最近, 鱼类 C3 和哺乳动物 C3 分别形成两个不同的枝系, 在鱼类 C3 中大黄鱼与鳊鱼 C3 首先聚类, 然后再与其它鱼类的 C3 发生聚类(图 3)。

L.c-C4 基因 cDNA 序列全长 5088 个核苷酸(已经提交到 GenBank), 编码一个由 1695 个氨基酸组成的前体蛋白。前体蛋白 N 端 19 个氨基酸为信号肽序列。大黄鱼 C4 蛋白同样也是由一个信号肽部分和 8 个结构域组成(如图 4A 所示)。就结构域组成来看, *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因具有相同的结构域, 只是在序列中的位置不同, 详细信息见表 3。

将 *L.c*-C4 基因氨基酸序列与其它硬骨鱼以及人类的 C4 序列比对后表明, *L.c*-C4 同样与鳊鱼(*Miichthys miui*)

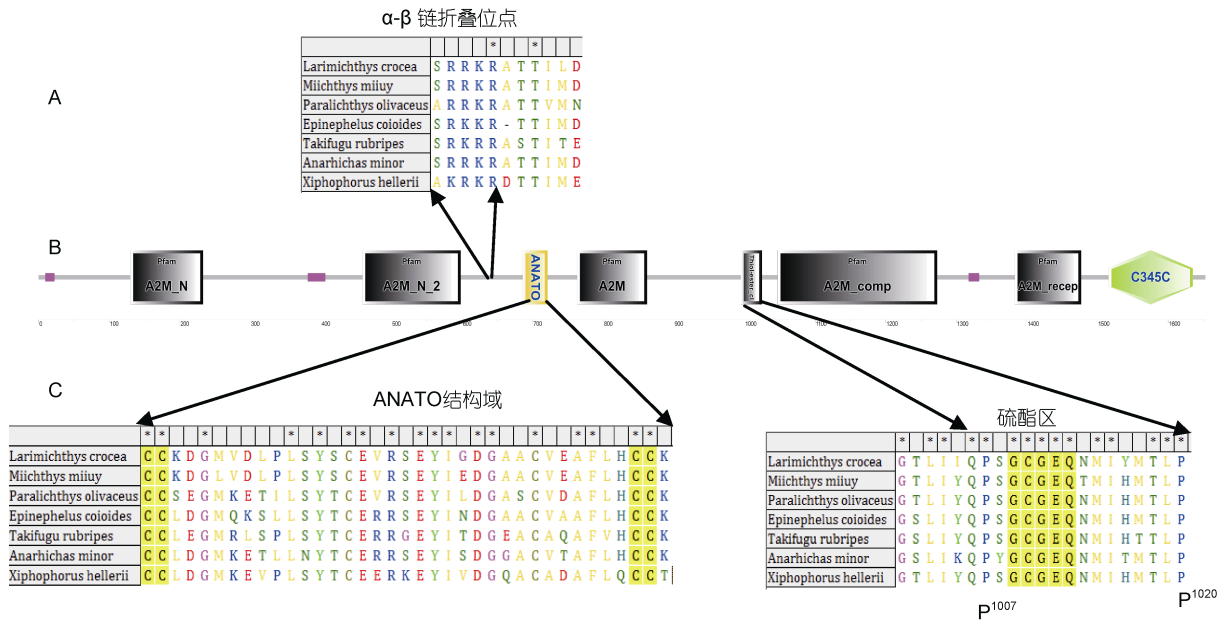


图 2 A. *L.c-C3* 多重序列比较 - 链折叠位点部分; B. 大黄鱼补体 C3 分子结构域分析图; C. *L.c-C3* 多重序列比较 ANATO 结构域和硫酯区

Fig.2 A. - folding sites of *L.c-C3* of multiple sequence; B. Molecular structural domain of *L.c-C3*; C. ANATO structural domain and thioester domain of *L.c-C3* of multiple sequence

表 2 SMART 数据库预测的大黄鱼 C3 结构域
Tab.2 Prediction to the structural domain of *L.c-C3* by SMART database

结构域名称	起始	结束	E 值
信号肽	1	23	
A2M_N	130	233	1e-15
A2M_N_2	459	598	8.4e-24
A2M	686	721	8.56e-10
ANATO	763	862	5.1e-29
Thiol-ester_cl	995	1025	9.3e-12
A2M_comp	1047	1273	3.4e-52
A2M_recep	1383	1477	3.4e-30
C345C	1516	1635	4.72e-46

C4 具有最高的同源性(序列相似度为 92%), 而与其它硬骨鱼类如雀鲷(*Stegaste spartitus*)、尼罗口孵非鲫(*Oreochromis niloticus*) 和 红 鳍 东 方 鲃 (*Takifugu rubripes*)的序列相似度分别为 65%、63%和 62%。系统发育分析显示大黄鱼补体 C4 也首先与鲉鱼发生聚类, 表明亲缘关系最近, 鱼类 C4 和哺乳动物 C4 同样分别形成两个不同的枝系, 在鱼类中, 大黄鱼 C4 与鲉鱼 C4 首先聚类, 然后再与其它鱼类 C4 发生聚类, 如图 5。

2.2 *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 基因表达特性

L.c-C3 mRNA 的组织表达特异性荧光定量检测

结果如图 6 所示, 在图 6 中可以看到 *L.c-C3* 在大黄鱼脾脏、心脏、肌肉、鳃、胃、肠、脑、肝脏这 8 种组织中均有表达, 其中在肝脏中的表达量特别高, 而在其它 7 种组织中都只有微量表达, 在这些微量表达的组织中, 脾脏和肠中的表达量相对高一些。

L.c-C4 mRNA 的组织表达特异性荧光定量检测结果如图 6 所示, 如图 6 所示, 肝脏和肌肉中 *L.c-C4* mRNA 的表达量明显高于其它组织, 说明 *L.c-C4* mRNA 主要在肝脏和肌肉中表达, 其次是在胃、脾脏和鳃中表达。

L.c-C3 mRNA 在胚胎时期各个阶段的表达特征如图 7 所示。由图 7 可知, *L.c-C3* 在胚胎时期的表达量并无明显变化, 而在每个时期都有一定的表达, 在其它鱼中也存在这种现象, 对鳕鱼(*Gadus morhua*) (Lange et al, 2004)、牙鲆(*Paralichthy solivaceu*) (Lange et al, 2006)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Lvoll et al, 2007)的研究表明 C3 在多种器官和幼鱼发育的不同时期均有表达。经过用 SSPS 软件进行的数据统计分析显示也是如此, 在组织表达差异中, 用单因素方差分析检测得出大黄鱼肝脏中 C3 的表达量是其它组织的成百上千倍($P < 0.01$), 其它各种组织中都有表达, 但无明显差异, 在大黄鱼胚胎发育的不同时期中, *L.c-C3* 的表达量并无明显差异, 单因素方差分析检测得 $P > 0.05$, 说明各个阶段的表达差异并不明显。

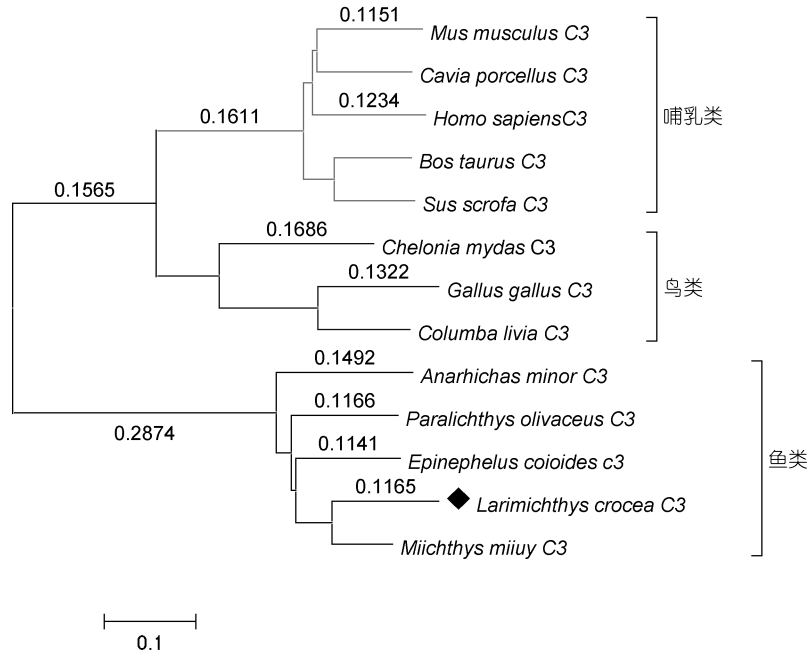


图3 通过邻近相连法构建的补体 C3 的系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree of C3 constructed by Neighbor-Joining method

构建系统发育树的各物种 C3 登录号如下: *Larimichthys crocea* C3 (大黄鱼: KJ544508); *Gallus gallus* C3 (原鸡: NP_990736.1); *Homo sapiens* C3 (人: NP_000055.2); *Miichthys miiuy* C3 (鲢鱼: JQ033711.1); *Anarhichas minor* C3 (花狼鱼: CAC29154.1); *Mus musculus* C3 (小鼠: NP_033908.2); *Epinephelus coioides* C3 (点带石斑鱼: HQ259061.1); *Bos taurus* (家牛: NP_001035559.2); *Paralichthys olivaceus* (牙鲆: BAA88901.1); *Sus scrofa* (野猪: NP_999174.1); *Cavia porcellus* (豚鼠: NP_001166374.1); *Columba livia* (原鸽: EMC77851.1)

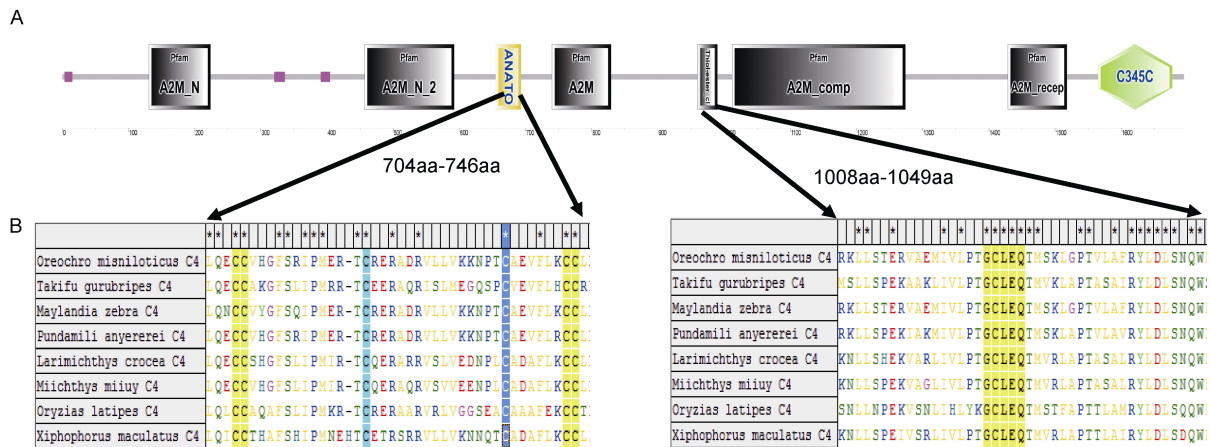


图4 A. 经 SMART 分析, *L.c*-C4 共包含的 8 个结构域; B. *L.c*-C4 多序列比对后其中 ANATO 结构域部分以及硫酯区部分的结果

Fig.4 A. Eight domains in *L.c*-C4 by SMART analysis; B. ANATO structural domain thioester domain of *L.c*-C4 of multiple sequence

L.c-C4 mRNA 在胚胎时期各个阶段的表达特征如图 7 所示, 在图中可以清楚地看到 *L.c*-C4 mRNA 的表达量在眼泡出现期、尾芽期、初孵仔鱼三个阶段中的表达量明显高于前三个阶段。这说明在大黄鱼胚胎发育的早期 *L.c*-C4 表达量不高, 但是随着胚胎发育, 在眼泡出现期表达量明显提高。

2.3 被溶藻弧菌侵染后 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因表达变化

大黄鱼被溶藻弧菌侵染后 *L.c*-C3 mRNA 在肝脏、

脾脏中的表达变化如图 8A 所示, 在图 8 中可以看到大黄鱼在被溶藻弧菌侵染后 6h 和 48h 的时候肝脏中 *L.c*-C3 的表达量明显提高, 而在脾脏中则是在被侵染后的 12h 和 24h 的时候明显提高。在肝脏中 *L.c*-C3 的表达量水平在健康的大黄鱼中表达量较其它组织要高很多, 但是在溶藻弧菌感染实验中, 对照组中 *L.c*-C3 的表达量相对于感染后的 *L.c*-C3 的表达量, 要低的多。肝脏中 *L.c*-C3 在被溶藻弧菌侵染后表达量

表 3 SMART 数据库预测的大黄鱼 C4 结构域
Tab.3 Prediction of the structural domain of *L.c*-C4 by SMART database

结构域名称	起始	终止	E 值
信号肽	1	19	
A2M_N	131	224	8.8e-18
A2M_N_2	457	592	8.1e-23
A2M	655	693	0.00000752
A2M	740	829	2.2e-31
Thiol-ester_cl	960	990	1.7e-11
A2M_comp	1012	1274	3.2e-70
A2M_recep	1429	1518	5.3e-28
C345C	1565	1677	4.77e-33

是明显上升的, 这说明肝脏是合成补体 C3 的主要器官, 也是遇到外界细菌侵染后发生免疫反应的效应器。但是在 6h 和 48h 时主要在肝脏中表达, 而在 12h 和 24h 时主要在脾脏中表达, 这可能是多种原因综合作用造成的。

大黄鱼被侵染溶藻弧菌后 *L.c*-C4 mRNA 在肝脏、脾脏中的表达变化如图 8B 所示, 可以看出, *L.c*-C4 mRNA 在肝脏中的变化并不明显, 只有在被溶藻弧菌侵染后 48h 时, 较其它时间段的表达量升高明显。而在脾脏中在被侵染后的 6h 以后的各个时间段 *L.c*-C4 mRNA 的表达量都有明显的升高, 造成这个

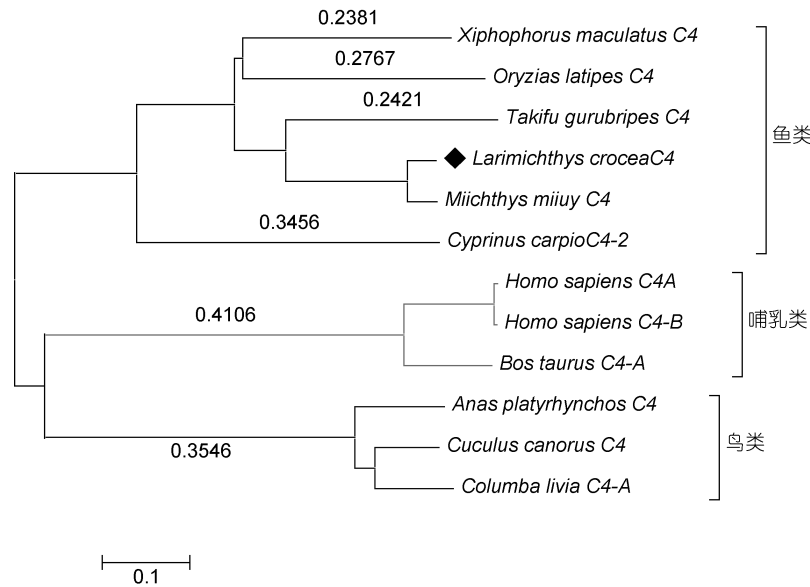


图 5 通过邻近相连法构建的补体 C4 的系统发育树

Fig.5 The phylogenetic tree of C4 was constructed by Neighbor-Joining method

构建系统发育树的各种登录号如下: *Miichthys miuiy* C4 (鲮鱼: AIA08678.1); *Takifugu rubripes* C4 (红鳍东方鲀: CAD45003.1); *Oryzias latipes* (青鳉: NP_001098167.1); *Xiphophorus maculatus* C4 (花斑剑尾鱼: XP_005805153.1); *Cyprinus carpio* C4-2 (鲤鱼: BAB03285.1); *Homo sapiens* C4A (人: AAB59537.1); *Homo sapiens* C4-B (人: NP_001229752.1); *Cuculus canorus* C4 (大杜鹃: KFO81918.1); *Anas platyrhynchos* C4 (绿头鸭: EOB02130.1); *Columba livia* C4-A (原鸽: XP_005501920.1); *Bos taurus* C4-A (家牛: XP_003584658.1)

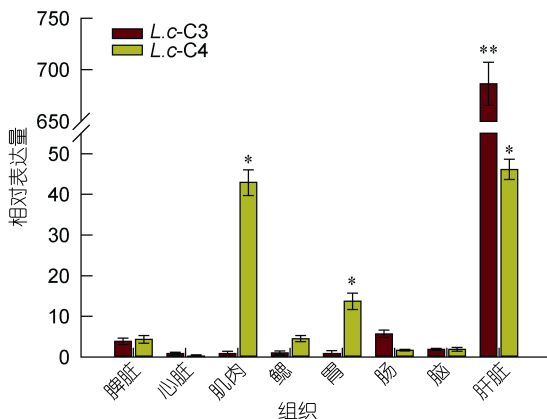


图 6 *L.c*-C3 mRNA, *L.c*-C4 mRNA 在各组织中表达特征
Fig.6 Expression of *L.c*-C3 and *L.c*-C4 mRNA in different tissues
柱形图柱子上面注**表示 $P < 0.01$; *表示 $P < 0.05$

结果的原因可能是由于 *L.c*-C4 在健康大黄鱼的脾脏中表达量比较少, 一旦受到外界细菌的刺激, 表达量就会明显升高。

3 讨论

3.1 大黄鱼补体成分 C3 和 C4 的全长 cDNA 序列分析

本文利用大黄鱼基因组数据库, 获得了大黄鱼补体成分 C3 和 C4 的全长 cDNA 序列。序列分析表明, 大黄鱼 C3 和 C4 具有已知 C3、C4 特征性结构, C3 和 C4 存在翻译后的 N-糖基化修饰, 这与已报道的哺乳动物 C3、C4 结果一致。与哺乳动物相比, 鱼类补体系统的研究较晚, 直到进入 20 世纪 80 年代以后才

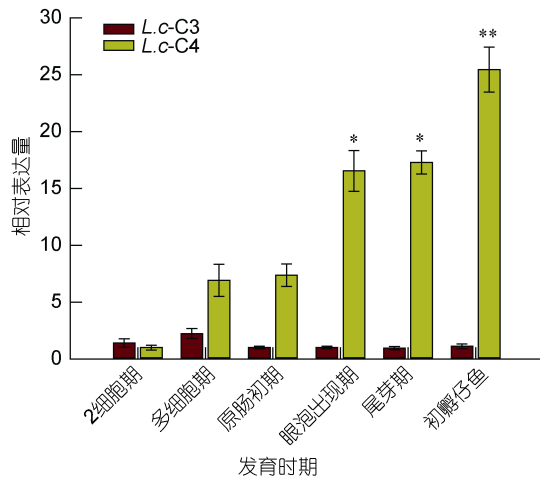


图7 *L.c-C3* mRNA, *L.c-C4* mRNA 在大黄鱼胚胎时期各阶段的表达特征

Fig.7 Expression characteristics of *L.c-C3* and *L.c-C4* mRNA in different phases of embryonic period

柱形图柱子上面注**表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$

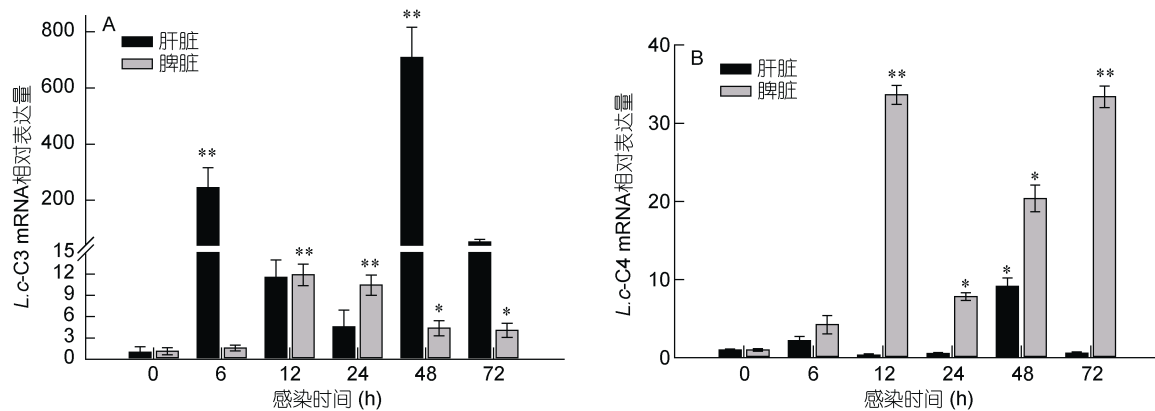


图8 A. 被溶藻弧菌感染后 *L.c-C3* mRNA 在肝脏和脾脏中的变化; B. 被溶藻弧菌感染后 *L.c-C4* mRNA 在肝脏和脾脏中的变化

Fig.8 Effects of *L.c-C3* mRNA in liver and spleen infected by *V. alginolyticus*; B. Effects of *L.c-C4* mRNA in liver and spleen infected by *V. alginolyticus*

柱形图柱子上面注**表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$

氨酸可被不同的残基所取代, 例如鲤 C3-S 基因型中的丝氨酸、虹鳟 C3-4 基因型中的苏氨酸、鲤 C3-Q1 和 C3-Q2 基因型中谷氨酰胺相应地取代了催化性组氨酸。研究表明, 高等动物和低等动物不仅在氨基酸序列方面存在差异, 而且在 C3 受体特异性、C3 对热的敏感性以及 C3 的溶血活性方面也不同(Alsenz *et al*, 1992; Zarkadis *et al*, 2001)。但有关大黄鱼 C3 的功能尚有待进一步研究。

系统进化树分析表明, 鱼类 C3 和 C4 与哺乳类 C3 和 C4 都分别形成各自的枝系, 大黄鱼 C3 和 C4 与鳊鱼的 C3 和 C4 最相似, 这与两者的在分类关系上亲缘关系最近的特点相一致。

开始(Dodds *et al*, 1993)。由于 C3 在补体活化途径中的关键作用, 自从从人血清中分离得到第一个 C3 分子后(Müller-Eberhard *et al*, 1960), 有关硬骨鱼类和其它物种 C3 结构和功能的研究报道日益增多。本文利用大黄鱼基因组数据库, 获得了大黄鱼补体成分 C3 和 C4 的全长 cDNA 序列。序列分析表明, 大黄鱼 C3 和 C4 与哺乳动物的 C3、C4 存在明显的相同和差异性。在结构上, 大黄鱼 C3 和哺乳动物 C3 一样, C3 转化酶的剪切位点都是 Arg-Ser; 都存在两条肽链(链和链), 并且链上都存在硫酯部位; 与硫酯催化反应相关的残基都是组氨酸。在人 C3 中, Pro¹⁰⁰⁷ 和 Pro¹⁰²⁰ 在形成稳定的硫酯键时是必不可少, Glu¹¹²⁸ 在决定硫酯结合的特异性方面起着重要的作用(Zarkadis *et al*, 2001), 在大黄鱼 C3 中也是如此。在所有脊椎动物的 C3 中, 处于催化部位、在功能上比较重要的残基主要是组氨酸, 但在某些同种异型中催化性组

3.2 *L.c-C3* 和 *L.c-C4* 基因表达特性分析

组织表达特征研究揭示, 健康大黄鱼 C3 和 C4 基因 mRNA 在肝中表达量都很高, C4 在肌肉中也有一定量表达, 但在肠、鳃、心脏、脑中只有少量表达。补体是鱼类抵抗微生物感染的重要成分, 激活后具有机体靶细胞溶解和调理作用, 而 C3、C4 是补体系统的主要成分。实验结果表明大黄鱼的肝脏中的补体 C3、补体 C4 的含量最高, 其它的组织中也能检测出补体 C3、C4, 这与在鳕鱼(*Gadus morhua* L)幼鱼(Lange *et al*, 2004)、庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus* L)幼鱼(Lange *et al*, 2006)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Lvoll *et al*, 2007)的结论相似, 说明肝脏是补体分泌

主要部位。而多斑狼鱼(*Anarhichas minor* Olafsen)的补体 C3 仅在肝脏中表达(Ellingsen *et al*, 2005), 这可能与鱼种品种和生长环境有关。

胚胎发育过程中不同发育阶段的补体 C3 和 C4 表达特征的研究表明, 在其过程中补体 C3 的表达量没有变化, 说明其在胚胎发育过程中很可能没有发挥作用, 而补体 C4 在胚胎发育的后期阶段表达量明显提高, 这可能与即将要孵化面临外界的刺激有关。

3.3 经溶藻弧菌感染后的大黄鱼 *L.c*-C3 和 *L.c*-C4 基因表达特性分析

本文研究表明, 经溶藻弧菌侵染后, 肝组织中 C3 基因 mRNA 显著增加, 6h 时达到峰值, 在 12h 和 24h 时, C3 基因的 mRNA 在脾中的表达量显著增加, 到 48h 时肝脏和脾脏中的 C3 表达量仍显著高于对照组, 在对照组的肝组织中, 在大黄鱼体内补体 C3 的表达微量; 而在感染有溶藻弧菌的大黄鱼肝组织中, 检测到 *L.c*-C3 大量表达。这说明受到病原体的侵袭, 肝脏大量合成补体 C3。在硬骨鱼类中, 已有研究表明, 补体除了具有溶菌、中和外毒素(Sakai, 1984a, b)、溶解寄生虫(Bower, 1988)等直接的抗微生物作用外, 还显示出对吞噬细胞吞噬活性的促进作用, 即所谓调理作用。Buchmann(1998)发现补体 C3 可通过旁路途径杀死体内的寄生虫; Harris 等(1998)曾报道虹鳟血清或黏液中的补体对体内的寄生虫具有杀伤作用; Matsuyama 等(1992)证实鲤补体的调理作用是由于 C3 的作用而引起的。溶藻弧菌对鱼、虾、贝等都有较强的致病性, 溶藻弧菌的感染可引起大黄鱼产生鱼体发白, 体表点状发红, 下颌、眼球、腹部、以及各鳍基发红, 鳍条散列, 肝脏、肾脏、脾脏充血肿大。本研究利用 RT-PCR 技术显示感染溶藻弧菌的大黄鱼肝组织中存在补体 C3 的表达明显上调, 因此推测 *L.c*-C3 在抗溶藻弧菌的感染中具有一定的作用, 但其对溶藻弧菌的作用途径有待深入研究。

受溶藻弧菌侵染后, 肝组织中 C4 基因的 mRNA 的表达量也有所增加, 但在脾脏中在 12h 以后都显著高于对照组, 揭示肝组织大量合成 C3, 脾脏中可以大量合成 C4。组织 RT-PCR 显示正常状态下, 大黄鱼补体 C4 基因只在在肝和肌肉组织中表达量比较高, 这与哺乳动物的表达特征相同。在哺乳动物中, C3 与 C4、C5 同源, 这三个分子与血清蛋白酶抑制因子 2M(-2-macroglobulin)以及血细胞的 GPI 锚定膜蛋白 CD109 (Lin *et al*, 2002)同属于一个家族——硫酸酯包含蛋白家族。感染溶藻弧菌 12h 后, 大黄鱼的

脾中补体 C4 基因表达明显提高, 说明大黄鱼补体 C4 对溶藻弧菌具有快速响应作用, 大量表达 C4 以抵御溶藻弧菌的攻击。随着时间的推移, 大黄鱼补体 C4 基因表达量也随之上升, 表现在感染 72h 后, 肝组织中基本停止表达有所降低, 而脾中表达量仍然很高(图 8B)。由此推测, 大黄鱼补体 C4 在对抗溶藻弧菌的感染中具有重要作用, 但其对溶藻弧菌的作用途径还有待深入研究。

综上所述, 本文首次报道了大黄鱼补体成分 C3 和 C4 基因的 cDNA 全序列, 并利用 RT-PCR 技术对其组织表达特异性, 不同发育阶段的表达变化, 以及感染溶藻弧菌的大黄鱼的肝脏和脾脏中的表达量变化与过程进行了相关研究, 为鱼类抗细菌免疫的深入研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 区又君, 罗 奇, 李加儿, 2011. 卵形鲳鲹碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的分布及其低温保存. 南方水产科学, 7(2): 49—54
- 艾庆辉, 麦康森, 2007. 鱼类营养免疫研究进展. 水生生物学报, 31(3): 425—430
- 黄左安, 陈 炯, 陆新江等, 2011. 香鱼凝血因子 X 基因表达与鳃利斯顿氏菌感染的相关性. 动物学研究, 32(5): 492—498
- 翟瑞燕, 王长法, 仲跻峰等, 2010. 补体 C3 基因多态性与相关疾病研究进展. 家畜生态学报, 31(6): 92—96
- Alsensz J, Avila D, Huemer Hartwig P *et al*, 1992. Phylogeny of the third component of complement, C3: Analysis of the conservation of human CR1, CR2, H, and B binding sites, concanavalin A binding sites, and thiolester bond in the C3 from different species. *Dev Comp Immunol*, 16: 63
- Bou Aoun R, Hetru C, Troxler L *et al*, 2011. Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. *J Innate Immun*, 3(1): 52—64
- Bower S M, 1988. Acquired and innate resistance to the haemo flagellate *Cryptobia salmositica* in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Dev Comp Immunol*, 12: 749
- Buchmann K, 1998. Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes, Monogenea). *Dis Aquat Org*, 32: 195
- Buresova V, Hajdusek O, Franta Z *et al*, 2011. Function algenomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun*, 3(6): 623—630
- Clow L A, Raftos D A, Gross P S *et al*, 2004. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *J Exp Biol*, 207(Pt 12): 2147—2155
- Davidson W S, Koop B F, Jones S J *et al*, 2010. Sequencing the genome of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genome Biol*, 11: 403
- Dodds A W, Day A J 1993. The phylogeny and evolution of the complement system. *Immunology and Medicine Volume*, 20: 39—88

- Ellingsen T, Strand C, Monsen E *et al*, 2005. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Fish & Shellfish Immunology*, 18(5): 351—358
- Fujito N T, Sugimoto S, Nonaka M, 2010. Evolution of thioester containing proteins revealed by cloning and characterization of their genes from a cnidarian sea anemone, *Haliplanella lineate*. *Dev Comp Immunol*, 34(7): 775—784
- Harris P D, Soleng A, Bakke T A, 1998. Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. *Parasitology*, 117: 137
- Lange S, Bambr S, Dodds A W *et al*, 2004. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)—an immuno histochemical study. *Fish & Shellfish Immunology*, 16: 359—367
- Lange S, Slavko H B, Alister W D *et al*, 2006. Complement component C3 transcription in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 285—294
- Lin M, Sutherland D R, Horsfall W *et al*, 2002. Cell surface antigen CD109 is a novel member of the 2 macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood*, 99(5): 1683—1691
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Lvoll M, Kilvik T, Boshra H *et al*, 2006. Maternal transfer of complement components C3-1, C3-2, C3-3, C3-4, C4, C5, C7 Bf and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*, 58: 168—179
- Lvoll M, Roy A Dalmo, Jarl Bgwald, 2007. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 64: 721—731
- Matsuyama H, Yano T, Yamakawa T *et al*, 1992. Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish Shellfish Immunol*, 2: 69
- Müller-Eberhard H J, Nilsson U, Aronsson T, 1960. Isolation and characterisation of two B1-glycoproteins of human serum. *J Exp Med*, 111: 201—215
- Müller-Eberhard H J, 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*, 57: 321—347
- Povelones M, Upton L M, Sala K A *et al*, 2011. Structure function analysis of the *Anopheles gambiae* LRIM1/APL1C complex and its interaction with complement C3-like protein TEP1. *PLoS Pathog*, 7(4): e1002023. doi:10.1371/journal.ppat.1002023
- Qian T L, Wang K R, Mu Y N *et al*, 2013. Molecular characterization and expression analysis of TLR 7 and TLR 8 homologs in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish Shellfish Immunol*, 36: 671—679
- Sakai D K, 1984a. Osponization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudates cells isolated from salmonid fishes. *J Fish Dis*, 7: 29—38
- Sakai D K, 1984b. The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and the correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products. *J Fish Dis*, 7: 329
- Smith J J, Kuraku S, Holt C *et al*, 2013. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat Genet*, 45: 415—421
- Venkatesh B, Lee A P, Ravi V *et al*, 2014. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature*, 505: 174—179
- Wan X, Chen X H, 2009. Molecular cloning and expression analysis of a CXC chemokine gene from large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Vet Immunol Immunopathol*, 127(15): 6—61
- Wu C W, Zhang D, Kan M Y *et al*, 2014. The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity. *Nature Communication*, DOI:10.1038/ncomms6227
- Yu Z N, He X C, Fu D K, 2011. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 533—539
- Zarkadis I K, Mastellos D, Lambris J D, 2001. Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev Comp Immunol*, 25: 745—762
- Zheng W B, Liu G Z, Ao J Q *et al*, 2006. Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with poly (I: C). *Fish Shellfish Immunol*, 21: 414—430
- Zhu Y, Thangamani S, Ho B *et al*, 2005. The ancient origin of the complement system. *EMBO J*, 24(2): 382—394

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EXPRESSION OF COMPLEMENT COMPONENT C3 AND C4 IN LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

WANG Hai-Ling, QI Peng-Zhi, GUO Bao-Ying, WU Chang-Wen

(National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract We reported the primary sequence of *Larimichthys crocea* complement component C3 (*L.c-C3*) and C4 (*L.c-C4*) cDNA. The *L.c-C3* open reading frame (ORF) is 4962 bp encoding 1653 amino acids (aa) with a putative signal peptide of 23 amino acid residues. *L.c-C4* open reading frame (ORF) is 5088bp encoding 1695 aa with a putative signal peptide of 19 amino acid residues. The deduced amino acid sequence shows that the *L.c-C3* and *L.c-C4* has conserved residues and domains known to be critical for C3 and C4 functions. Phylogenetic analyses of *L.c-C3* and *L.c-C4* showed that *L. crocea* was most closely related to *Miichthys miiuy*. The mRNA expressions of *L.c-C3* and *L.c-C4* were detectable at different tissues. *L.c-C3* and *L.c-C4* were expressed in a wide range of adult tissues, with the highest expression levels in the liver. During the different development stages from fertilized egg to newborn larvae of the large yellow croaker the highest expression levels of *L.c-C3* gene was not found, but *L.c-C4* was significantly up-regulated. Bacterial challenge experiments showed that the levels of *L.c-C3* and *L.c-C4* mRNAs expression were up-regulated in the liver and spleen of adult large yellow croaker. The results show that *L.c-C3* and *L.c-C4* mRNAs expression in the large yellow croaker were influenced by bacterial stress. The *L.c-C3* and *L.c-C4* mRNAs expressions in the large yellow croaker were influenced by bacterial stress and they may play an important role in immunity mechanisms. This study will deepen our understanding on the functions of *L.c-C3* and *L.c-C4* mRNAs and the molecular mechanism of innate immunity in teleosts.

Key words large yellow croaker *Larimichthys crocea*; *L. crocea* complement component C3 (*L.c-C3*); *L. crocea* complement component C4 (*L.c-C4*); molecular characterization; expression analysis