

异育银鲫 PTX3 基因的克隆与表达分析

李 森¹ 何 川² 胡瑞雪¹ 顾泽茂¹

1. 华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070;

2. 北京市水产技术推广站, 北京 100021

摘要 为研究 Pentraxin 3 (PTX3) 在鱼类中的作用, 克隆得到异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) PTX3 基因, 并对其序列结构特征和表达模式进行分析。异育银鲫 PTX3 序列由 3 个外显子和 2 个内含子构成, 编码 453 个氨基酸。异育银鲫 PTX3 蛋白的前 22 aa 为信号肽, 241~453 aa 为 PTX 结构域; 在 PTX 结构域有一个非典型的 Pentraxin 信号。同源进化分析发现, 异育银鲫 PTX3 与其他鱼类聚为一支, 且与斑马鱼最为相似 (79%); 两栖类和哺乳类各自聚为一支。实时荧光定量 PCR 结果显示, PTX3 在异育银鲫的心脏、肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃、脑、肌肉、肠、血液、性腺等 11 个组织中都有表达。在嗜水气单胞菌攻毒后, 肝脏、脾脏、头肾、肠和血液中 PTX3 mRNA 水平都显著上调。在感染后 3 h, 脾脏中 PTX3 mRNA 水平即出现显著上调; 感染后 6 h, 血液中 PTX3 mRNA 水平即达到了峰值。这些结果表明, PTX3 作为急相反应蛋白在鱼类受到病原侵袭中发挥免疫保护作用。

关键词 异育银鲫; PTX3; 克隆; 氨基酸序列; 表达模式; 急相蛋白; 免疫

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0099-07

天然免疫系统是宿主防御外源性病原侵袭的第一条防线。相比其他脊椎动物, 鱼类的后天免疫系统尚处于进化的低级阶段^[1], 因此, 在鱼类免疫防御中, 天然免疫系统显得尤为重要。正五聚蛋白 (pentraxins, PTX) 正是鱼类天然免疫中重要的组成部分, 该家族是由一些含有 PTX 结构域 (pentraxin domain) 的急相蛋白 (acute phase proteins, APPs) 构成的蛋白超家族^[2]。根据正五聚蛋白的基本结构, 正五聚蛋白又可分为 2 个亚族: 短链 PTX 家族和长链 PTX 家族。短链 PTX 家族以 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 为代表。在鱼类中, CRP 作为急相反应蛋白参与鱼类的天然体液免疫, 也被用来作为免疫检测指标。长链 PTX 家族以 Pentraxin 3 (PTX3) 为代表。在哺乳动物中, PTX3 可参与多种免疫相关活动, 并可由多种细胞分泌产生。在高强度肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 感染的小鼠中, PTX3 可以抑制中性粒细胞浸润, 并显著提高 TNF- α 表达水平^[3]。Bonavita 等^[4] 发现 PTX3 能够通过 C1q 和 H 因子相互作用, 激活和调节补体级联反应, 进而发挥抗肿瘤的作用。

PTX3 的结构与 CRP 十分相似, 仅在氨基端多了一段与 PTX 结构域相连的无关区域^[5]。在鱼类中, 对 CRP 免疫作用的相关研究早已开展^[6-8], 而关于 PTX3 的研究目前尚未见报道。笔者克隆得到异育银鲫 PTX3 基因 cDNA 序列和 DNA 序列, 并利用荧光定量 PCR 分析了 PTX3 在健康异育银鲫和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 刺激下各个器官和组织中的表达变化, 以为鱼类免疫相关研究提供理论基础和新的方向。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验用异育银鲫 (体质量 100~150 g) 购自湖北阳逻某渔场, 实验室暂养 2 周后用于试验。攻毒用嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 为笔者所在实验室保存的菌株。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

快速分离异育银鲫头肾组织, 加入适量 Trizol (TaKaRa), 参照试剂盒说明提取总 RNA。使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit With gDNA Eraser

收稿日期: 2015-05-30

基金项目: 现代农业产业技术体系北京市观赏鱼创新项目 (pxm2012-036237-000139); 湖北省重大科技创新计划项目 (2013ABA009)

李 森, 硕士研究生, 研究方向: 水生动物医学. E-mail: wols2009@163.com

通信作者: 顾泽茂, 博士, 教授. 研究方向: 水生动物医学. E-mail: guzema@mail.hzau.edu.cn

(TaKaRa)反转录试剂盒以提取的异育银鲫总 RNA 为模板,合成 cDNA 第一链。

1.3 异育银鲫 PTX3 基因 cDNA 序列及内含子序列的克隆

根据实验室获得的金鱼 PTX3 序列 cDNA 全长设计引物 PTX3-F/R(表 1),扩增异育银鲫 PTX3 cDNA 全长。用凝胶回收试剂盒(康为世纪)回收目的条带,并用加 A 尾试剂盒(TaKaRa)加 A 尾后,与 pMD19-T(TaKaRa)连接,转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中,挑选阳性克隆,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据得到的 PTX3 基因 cDNA 序列及 GenBank 中鲤基因组数据,预测异育银鲫 PTX3 基因包含有 2 个内含子,设计引物 Intr1-F/R,Intr2-F/R(表 1)。提取异育银鲫头肾组织总 DNA 为模板,对 2 个内含子序列进行扩增。扩增产物切胶回收后送公司测序。组织总 DNA 提取方法参照试剂盒说明(康为世纪),胶回收及克隆方法同上。

1.4 生物信息学分析

使用 Vector NTI 软件对测序得到的序列进行拼接和分析,整理得到异育银鲫 PTX3 基因 cDNA 全长序列及内含子序列。用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)预测 PTX3 基因开放阅读框(ORF)的大小以及氨基酸的序列;利用 ExPasy 在线软件 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算预测蛋白的理论分子质量和等电点;利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对蛋白结构进行预测;pBLAST 检索同源蛋白质;ClustalX 软件对预测的氨基酸序列进行比对;根据比对结果利用 MEGA6.06 软件采用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.5 异育银鲫 PTX3 基因的组织表达分布

选取 3 尾健康异育银鲫,对心脏、肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃、肌肉、肠、脑、性腺、血液等 11 个组织取样,提取总 RNA 并反转录。以各组织 cDNA 为模板,用 PTX3 基因特异引物 QPTX3-F/R(表 1)在 Roche Light Cycler[®] 480 上进行荧光定量 PCR 检测,以 β -actin 为内参。反应体系:cDNA 模板 1 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,SYBR[®] Premix Ex Taq II (TaKaRa) 10 μ L,补去离子水至 20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共 40 个循环。扩增结束后,0.1 $^{\circ}$ C/s 的速度进行溶解曲线分析。对读取的目的基因和内

参基因的 Ct 值,利用 Ct 法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)计算 PTX3 基因 mRNA 在不同组织中的相对表达量,最后用 SPSS17.0 软件对得到的定量数据进行单因素方差分析。

表 1 试验所用引物及其序列

Table 1 The sequences of primers used in this study	
引物 Primer	引物序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')
PTX3-F	GCAGTTCACCAAACAAGCAGGAG
PTX3-R	GTGGCTAAGCAGGTTCT
Intr1-F	GCCAACCGATTGCTC
Intr1-R	CTCGGACACGGTCTAG
Intr2-F	ATCTGCGGTTGAGAACTCG
Intr2-R	CATTGGTCTGAAAGGGTG
QPTX3-F	AACGGCATTGGTCTGAAAGG
QPTX3-R	GCTTCCATCAGGCTGTGACA
β -actin-F	CTGGGATGATATGGAGAAGA
β -actin-R	CCAGTAGTACGACCTGAAGC

1.6 异育银鲫 PTX3 基因病理条件下的表达变化

用 0.01 mol/L PBS 洗脱在 LB 固体培养基上划线培养的嗜水气单胞菌菌落,并稀释至 1×10^7 cfu/mL。选取大小规格一致,体表健康的异育银鲫 100 尾,平均分成 2 组。试验组按照 1×10^7 cfu/kg 腹腔注射稀释好的菌液,对照组注射相同体积的 0.01 mol/L PBS。在注射后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取样,每个时间点每组各取 3 尾鱼解剖,分别取肝脏、脾脏、头肾、肠和血液 5 个组织,提取 RNA 并反转录,调整各组织 cDNA 浓度用于荧光定量 PCR。具体试验步骤同上“材料与方法 1.5”。

2 结果与分析

2.1 异育银鲫 PTX3 基因序列和预测的氨基酸序列分析

克隆得到异育银鲫 PTX3 基因 cDNA 全长 1 560 bp(GenBank 登录号 KR816340),包括 5' 非编码区(untranslated region, UTR)118 bp,3' UTR 80 bp,开放阅读框(ORF)1 362 bp,编码 453 aa。预测蛋白的分子质量为 49 861.3 u,等电点(PI)为 5.10。克隆得到异育银鲫 PTX3 基因 2 个内含子序列,长度分别为 970 bp 和 1 513 bp。对得到的 PTX3 基因的 cDNA 序列和内含子序列进行拼接,共得到 PTX3 基因 DNA 序列全长 4 043 bp。2 个内含子序列均符合“GT-AG”的剪切规则^[9](图 1)。

SMART 在线软件对异育银鲫 PTX3 蛋白结构预测,结果如图 2 所示,同人类相似,鲫 PTX3 蛋白

也由信号肽(1~22 aa)、氨基端区域(23~240 aa)和 PTX 功能结构域(241~453 aa)组成;在 PTX 结构域含有 1 个非典型的 Pentraxin 信号 (HICA-

VWSS)。但与人类不同的是, 鲫 *PTX3* 蛋白的 Pentraxin 信号 (Pentraxin signal) 并不完全符合 HxCxS/TW_xS(x 表示任意氨基酸)这一规律^[10]。

```

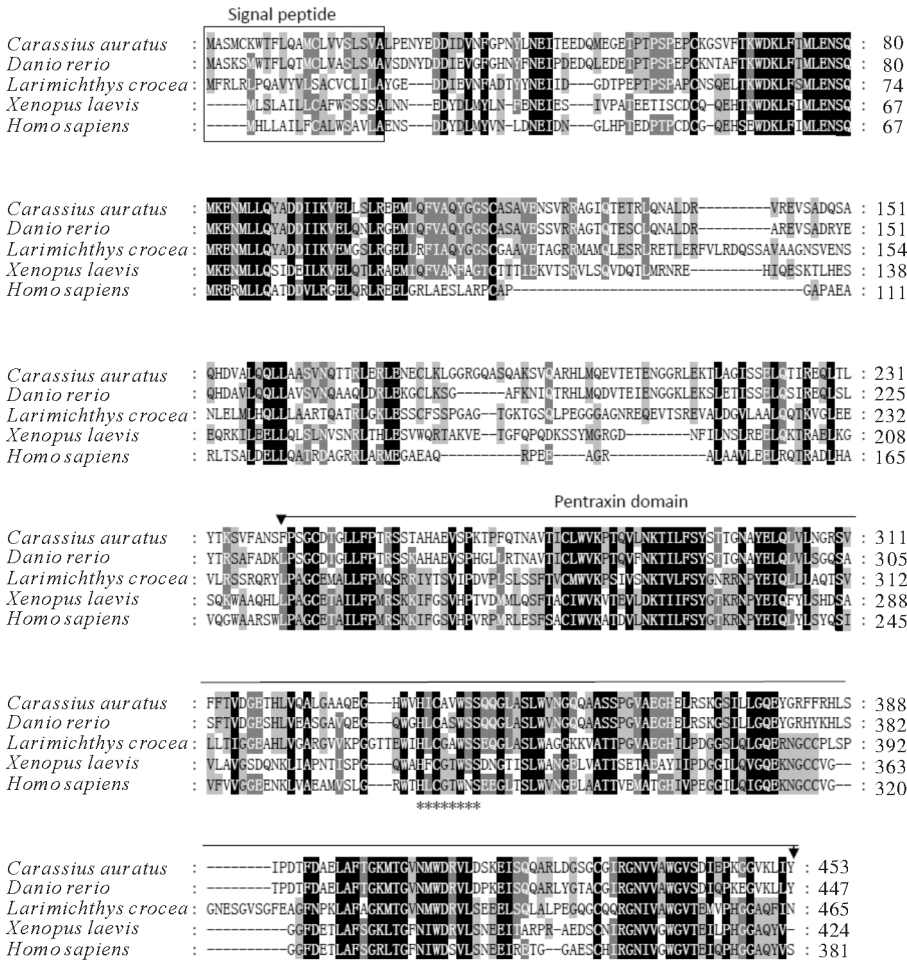
1   gcgattcaccacaaacagcaggagcccagcccaaccggttgcagcatcacaaggagaccaccagagaaaaagagacaattttatacaaaactga
100  gccttgttactactcaaacATTGCCACGATGTGCAAGTGGACATTCCTCCAGGCCATGTGTCTGGTGTTCATTGTCGGTGCCATTACCTGAGAATTA
1   M A S M C K W T F L Q A M C L V V S L S V A L P E N Y
199  TGAGGATGATATCGATGTGAACCTTGGACCCAATTATTGAACGAGATAACTGAGGAGGCCAGATGGAAAGTgagtaataataaaaaataaaaaa
28   E D D I D V N F G P N Y L N E I T E E D Q M E G
298  agtaataaatattacgttgtgatcagattgttagctgtgagttacgcagacatgcaagtgatgacagacaataataactatcagcatgtgtgtaaaa
397  atgtcttccagagaggtgttacattagcaagggaagaaagaaatacaaacatgtaactcactgggatcatgtgcataaacatttgtgaatgcag
496  gaatattttgtccgtattttggaagtgaacagaatttaagtccatgacataaacatttgtttgtgaagaggtataactatgattgtgtctcgtc
595  ttggagtatactgaatgccctctgacaacaggggaaaaaaatagaagaaaaagaaatagaatgaagcagataataaaaaaaactgatctgcttttt
694  attaaccatttttgattaaagaaaaaaacctaacaataaacacacatttaccatttttaggtttaatttaaatcaaaagagatgatcattat
793  ttaaaattgagtatctacttataagtgaataatttttacttttttttaatttacttataacgacctagatctagatattgtcagggtgttc
892  aaaaattttaactcatgtaagaacacagatttgcattctcgttttctggatcatccattgtgcaaaaaactgaaaaaagattattccttggttgag
991  ttaaatcaaacattttttttctgacagtttccagatttaacagatttaatacactcaaaaactgactgcaactttttatatagttcac
1 090  agagtccataagacctgacacactctccgctgctaacacttcaagctcaatggtgtcactttaaagcatataaaaaaacatgctcatcaactcatg
1 189  ttctctctttctacactcctctccgcttcttcccttgatttctctctcagGGGAGACCCACACCTTCCCCTGAACCCGCAAAGGCTCAGTCTTCA
52   E T P T P S P K G S V F
1 288  CTAAGTGGGATAAGCTCTTTACAATGCTGGAAAAATCCCAAATGAAAGAGAACATGCTCCTGCAGTATGCCGATGATATCATCAAGGTGGAGCTGCTGA
67   T K W D K L F T M L E N S Q M K E N M L L Q Y A D D I I K V E L L
1 387  GTCTGAGAGAAGATGTACAGTTTGTGGCAGACGACGCTGGCTTGTGCTTCTCGGTTGAGAAGCTCGGTTCAAGGGCTGGGATCAAAACAGAGA
100  S L R E E M L R L E V A Q Y G G S C A S A V E N S Q A K S R A G I Q T E
1 486  CGCGTCTGCAGACGCGCTAGACCGCGTCCGAGAAGTCTCAGCTGATCAATCCGCACAACTGATGTAGCCCTGCAGCAGCTACTGGCTGCTAGCGTAA
133  T R L Q N A L D R V R E V S A D Q S A Q H D V A L Q Q L L A A S V
1 585  ACCAGACTACAGCGTGGAGCGACTGGAAACGAATGCTTGAATTTGGGGGAAGAGGTGAGGCTCCCAAGCCAAGAGCGTCCAGGCCCGACATCTCA
166  N Q T T R L R L E R L E N E C L K L G G R G Q A S Q A K S R A G I Q R H L
1 684  TGCAAGAAGTGACAGACAGAGAATGGAGGTAGGCTGGAGAAGACTTTAGCAGGCATCTCCAGTACGCTGCAAAACCTCCGGGAACAGCTGACCCCTT
199  M Q E V T E T E N G G R L E K T L A G I S S E L Q T I R E Q L T L
1 783  ACACAAATCAGTCTTTGCAAAACGCTTTCCATCAGTgagacatacaagttatagaaaaacaaatgagtaaatattataccacattattgagagagag
232  Y T K S V F A N S F P S G
1 882  ctcaagaggatgtaaaatcaaaatgggtatactggaattcaaacctggattcaaacctcagagtttttaactatgtaaaagaaatggcacagataataga
1 981  ccaactgcataatagaaaagttaaaatgcacatgtagatttatgccataggaccacaacaaaacatacaattctcgcacaaattccgcttgcaggttttt
2 080  atatgagttattctctgaggtcaattttgtagagagactaaaagagactgccaaagtgatgtctggtttgggtgctgtacattttgagccgtaaaactt
2 179  aagatlaatgcaaacacatgataaaaatcaaatcaactcactagcccaactgagctgacacacagcagctgcaactcatacagcactctgagcagacacatcacc
2 278  ccaagttaggaggttgataacctcaaaatctgataaatgtttaaccacctcaagatattccccaaagctcctactgagttgcatcacttgcagtaagc
2 377  cggatattgttagtcagcttaagctaaaaatgatttcaactcgtgaatgccatgccctctcgcattaaatagctttgtgagaggtagagtaaatgaaa
2 476  gacagagggaggtataatttaaacagctatgcaagggcgaccacccaagcatccagggggaaacagaacagatgacatggttttagaaaatgact
2 575  tagctttttctccattctcccacagcagaacaaactcctggacaggttcaaatgactaaatgtaactgtaactgtagcagcagagagccactgctcgtatag
2 674  caaagcaatcaacatgagagagagaatgtaccaatcccattaaacagccctetacaactctttcagttttacaagccttccactgtaattaaagttt
2 773  ctctcgttgaaggtcgcctcaatggttatgccggccaactcgcacaaaactcaccatccatataatttaagtgtctcatgcaactatgaactataa
2 872  aagacaactccacagggcgcaacttgttgattatacctgatcatttagcagtgataaatactaaaagcaaaagaaaaagaagtcctctgtatctttg
2 971  acgctttttgggaggtctcagcagcaacaaactcctggacaggttcaaatgactaaatgtaactgtaactgtagcagcagagagccactgctcgtatag
3 070  gatgcactgaggattacatcgcacaaactttttattatttacactctgtgttgagccctcctcaaaagattttgtgaagatagacagatcaaaatca
3 169  taagccttcagtgatcaaatgggttgagttggttagtggttctcccgctgaataaataagggtaaacagcagcacaacatacagttgtgttctctcta
3 268  acagggataatcaaaagttgtttacactctcccttactctctcaattctctctcttcccttccagGCTGTGACACTGGGCTGCTTCCCCACAGCTTCA
245  C D T G L L F P T R S
3 367  TCTACAGCACATGTGAAGTCTCACCAAGACACCCCTTTCAGACAAATGCCGTTACCATTTGCCCTGTGGGTAACCCACTCAGGTACTCAACAGACC
256  S T A H A E V S P K T P F Q T N A V T I C L W V K P T Q V L N K T
3 466  ATCCTCTTCTCGTACAGTACTGCAATGCCATCGAAGCTCCAATTGGTGTGAATGGACGGAGTGTCTTCTTTACCGTGTGATGGTAAACCAATTG
289  I L F S Y S T T G N A Y E L Q L V L N G R S V F T T V D G E T H L
3 565  GTGCAAGCTTTAGGGCAGCTCAAGAGGTCATGGGTGCACATTTGTGCAGTCTGGAGCTCACACAGGGCTTGGCTTCACTGTGGGTAATGGTCAA
322  V Q A A G C A A Q E G H W V H I C A V W S S Q Q G L A S L W V N G Q
3 664  CAAGCTCAAGCTCTCCCGAGTGGCCGAAGTCTAGAGTACGCAGCAAGGAAGCATACTATTGGGGCAAGAGTATGGACCTTTCTCAGGCATCTT
355  Q A A S S P G V A E G H E L R S K G S I L L Q G E Y G R F R H L
3 763  AGTATCCAGACACATTTGATGCGGAACCTGGCCITCACAGGAAGATGACTGGAGTGAACATGTGGGACCGCGTITTTGGATTCAAAGAGATATCTCAG
388  S I P D T F D A E L A F T G K M T G V N M W D R V L D S K E I S Q
3 862  CAAGCGCGCTGGATGGGGTGTGGTATCCGTTGATGGTGGATGGGCTTTCTGACATGAGCCAAAGGGGGTGTCAAGCTAATATAC
421  Q A R L D G S G C G I R G N V A W G V S D I E P K G G V K L I Y
3 961  TAAAtttctctatcttcttaaccactgagccctgtatacaaatcagotctacaagcacatattaagaacctgcttagccac
454  *

```

起始密码子用方框标出;外显子序列用大写字母表示,下面显示氨基酸序列;内含子/外显子连接处的 gt/ag 用黑体表示;信号肽用下划线标出。Initiation codon is surrounded by box;exon sequences are indicated in upper case letters and the deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence.The gt/ag intron/exon boundaries are highlighted in boldface.The putative signal peptide is underlined.

图 1 异育银鲫 *PTX3* 基因全长

Fig.1 The full nucleotide sequence of *PTX3* in *Carassius auratus*



PTX3 的保守一致性序列达到 100%用黑色标示,80%用深灰色标示,60%用浅灰色标示。“-”表示此位置缺少氨基酸。Pentraxin 信号用“*”标注。The conserved percent of PTX3 100% is black,80% is dark gray,60% is light gray.The absent amino acids in the alignment are indicated by dashes.Pentraxin signal is marked by asterisk.

图 2 异育银鲫与其他物种 PTX3 氨基酸序列同源性比较

Fig.2 Comparison of the deduced amino acid sequence of PTX3 from *Carassius auratus* with that from other species

2.2 PTX3 氨基酸序列比对及同源进化分析

将异育银鲫 PTX3 的氨基酸序列在 NCBI 数据库中检索,发现与斑马鱼(CAM56444)的相似性最高(79%);与大黄鱼(KKF12920)的一致性为 46%,与非洲爪蟾(NP001091159)为 36%,与人类(CAA45158)为 37%。由于 PTX3 基因尚未在鱼类中报道,比对到的其他鱼类 PTX3 的氨基酸序列多为根据 mRNA 序列预测得到(斑马鱼和大黄鱼的 PTX3 氨基酸序列为直接提交或基因组分析得到)。在这些预测的 PTX3 氨基酸序列中,异育银鲫 PTX3 氨基酸序列与墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*)(XP007232157)同源性最高,一致性为 57%。基于 PTX3 氨基酸序列构建的系统进化树结果如图 3 所示:异育银鲫与斑马鱼(*Danio rerio*)聚为一支,落入鱼类形成的支内;两栖类聚为一支;哺乳动物聚

为一支。

2.3 组织分布及其病理条件下的表达变化

以管家基因 β -actin 为内参基因,选取心脏、肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃、脑、肌肉、肠、性腺、血液等 11 个组织检测 PTX3 在健康异育银鲫各组织的表达情况。如图 4 所示:PTX3 在健康异育银鲫的肌肉和脑中表达量最高,且其表达量显著高于其他组织($P < 0.05$);在鱼体主要免疫器官肝脏、脾脏、头肾、肠中表达量均较低。

在嗜水气单胞菌感染后,异育银鲫肝脏、脾脏、头肾、肠和血液中 PTX3 mRNA 水平均显著上调,且在不同时间点达到峰值(图 5)。感染后 3 h,脾脏中 PTX3 mRNA 水平即出现显著上调($P < 0.05$);感染后 6 h,血液中 PTX3 mRNA 水平即达到了峰值,为对照组的 4.8 倍。

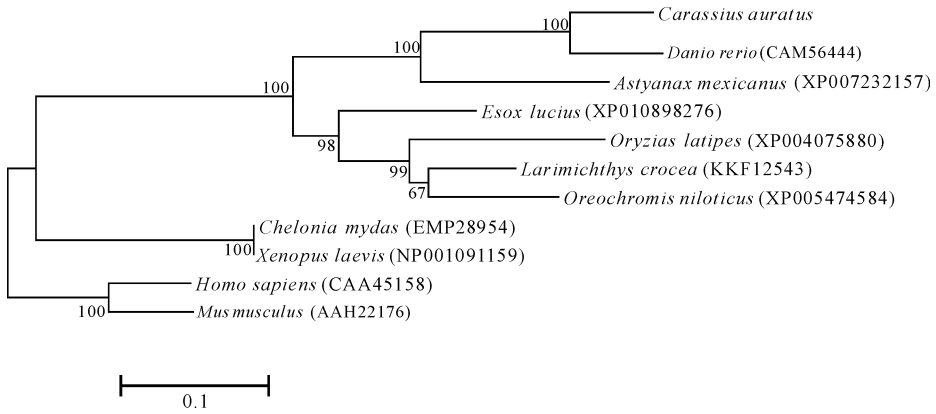


图 3 MEGA 6.0 软件邻接法构建 *PTX3* 分子进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *PTX3* constructed using MEGA 6.0 with neighbor-joining method

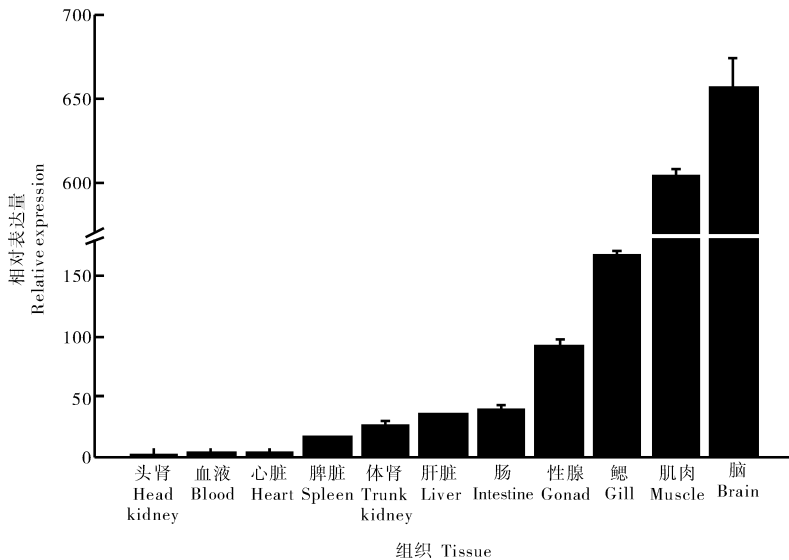


图 4 *PTX3* 基因在健康异育银鲫不同组织内的表达

Fig.4 Tissue distribution of *PTX3* mRNA in *Carassius auratus*

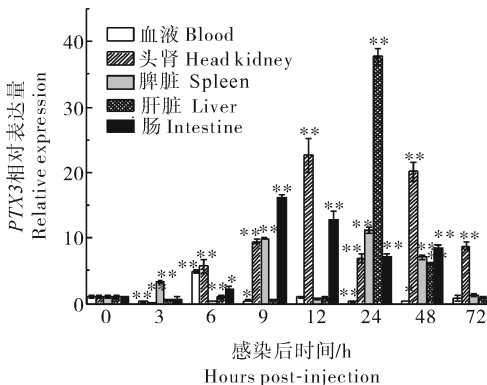


图 5 嗜水气单胞菌感染后对 *PTX3* 表达分析

Fig.5 Expression analysis of *PTX3* after *A. hydrophila* infection

3 讨论

PTX3 作为急相反应蛋白在哺乳动物天然免疫中发挥着重要作用^[9],但在鱼类中尚未见相关报道。本研究首次从异育银鲫中扩增得到了 *PTX3* 基因 cDNA 和 DNA 序列。异育银鲫 *PTX3* 的基因结构和蛋白结构组成同人类相似^[10]:均由 3 个外显子和 2 个相间的内含子构成;前 2 个外显子编码信号肽 (1~22 aa) 和氨基端 (23~240 aa),第 3 个外显子编码 *PTX* 结构域 (241~453 aa);在 *PTX* 结构域含有 1 个非典型的 Pentraxin 信号 (HICAVWSS)。系统进化分析显示,从异育银鲫获得的序列与所有已知的及预测的鱼类 *PTX3* 聚在一起 (支持率 100%),

且与斑马鱼亲缘关系最近(相似度为 79%)。以上分析表明,本研究克隆得到的 *PTX3* 基因属于异育银鲫 *PTX3* 基因。

实时荧光定量结果表明,*PTX3* 在异育银鲫的心脏、肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃、脑、肌肉、肠、性腺、血液等 11 个器官和组织中均有表达,在脑和肌肉中的表达量最高,而在免疫相关组织中的表达量均较低。对 *PTX3* 在人体的组织分布统计(<http://biogps.org/#goto=genereport&id=5806>)分析发现,在人类平滑肌中 *PTX3* 的表达量最高。异育银鲫 *PTX3* 的组织分布与人的也基本相符。但是,*PTX3* 在异育银鲫的脑组织中表达量也很高,而在人类中,仅胎儿阶段脑组织的 *PTX3* 表达量相对其他组织较高(约为其他组织的 2~7 倍),这种差异可能与异育银鲫的进化程度较低有关。用嗜水气单胞菌攻毒后 3 h,脾脏中 *PTX3* mRNA 水平就已出现显著上升($P < 0.05$),攻毒后 6 h,血液中 *PTX3* mRNA 水平达到峰值,其他免疫组织也在不同时间相继达到峰值。这说明,异育银鲫 *PTX3* 同哺乳动物 *PTX3* 一样也参与机体免疫活动,属于急相反应蛋白^[11-12]。对鱼类 CRP 的表达模式研究结果显示:CRP 在鱼类中组成性表达,通常在鱼类的肝脏中 CRP 表达最高,其他组织较低;在免疫发生时,各免疫器官和组织中表达水平迅速显著上升^[1,13]。*PTX3* 与 CRP 在鱼类中表达模式的异同性表明两者在功能上的异同性。

鲫与人类的 *PTX3* 在基因结构、组织分布及病理条件下的表达变化上的相似性,表明了 *PTX3* 在 2 个物种的功能上具有极大的相似性和保守性。在人类中 *PTX3* 可以通过与补体、补体受体、Fc γ 受体结合,促进病原体的吞噬^[3];也可以调控补体级联效应的发生和细胞免疫因子的表达上调,而达到免疫防御的目的^[14-15]。但是在鱼类中,对于 *PTX3* 具体是通过什么方式和途径参与鱼类免疫作用还有待进一步的研究。对鱼类短链 *PTX* 家族成员 CRP 的研究发现,在钙离子存在时,CRP 能够使多种真菌、寄生虫及细菌的糖基以及磷脂酶分子产生沉淀从而降低病原体的毒力^[13]。这也许可以为研究 *PTX3* 在鱼类免疫中作用的方式提供参考。

本研究从基因序列、组织分布和病理条件下表达变化 3 个方面,对异育银鲫 *PTX3* 进行了研究,证明了其在基因结构和蛋白结构上具有保守性,且在鱼类中作为急相反应蛋白参与免疫活动,为进一步

研究 *PTX3* 在鱼类生命活动中的作用提供了依据和参考。

参 考 文 献

- [1] FALCO A, CARTWRIGHT J R, WIEGERTJES G F, et al. Molecular characterization and expression analysis of two new C-reactive protein genes from common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 37(1): 127-138.
- [2] CRISCI E, FRAILE L, VALENTINO S, et al. Immune characterization of long pentraxin 3 in pigs infected with influenza virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(1): 185-192.
- [3] SOARES A C, SOUZA D G, PINHO V, et al. Dual function of the long pentraxin *PTX3* in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice [J]. *Microbes and Infection*, 2006, 8(5): 1321-1329.
- [4] BONAVIDA E, GENTILE S, RUBINO M, et al. *PTX3* is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer [J]. *Cell*, 2015, 160(4): 700-714.
- [5] DAIGO K, MANTOVANI A, BOTTAZZI B. The yin-yang of long pentraxin *PTX3* in inflammation and immunity [J]. *Immunology Letters*, 2014, 161(1): 38-43.
- [6] KODAMA H, YAMADA F, MURAI T, et al. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1989, 13(2): 123-132.
- [7] PEATMAN E, BAOPRASERTKUL P, TERHUNE J, et al. Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(11): 1183-1196.
- [8] MOUNT S M. A catalogue of splice junction sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 1982, 10(2): 459-472.
- [9] GARLANDA C, BOTTAZZI B, BASTONE A, et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility [J]. *Annual Review of Immunology*, 2005, 23: 337-366.
- [10] BREVIARIO F, D'ANIELLO E M, GOLAY J, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells: cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(31): 22190-22197.
- [11] CRISCI E, FRAILE L, VALENTINO S, et al. Immune characterization of long pentraxin 3 in pigs infected with influenza virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(1): 185-192.
- [12] LANNERGÅRD A, ROSENSTRÖM F, NORMANN E, et al. Serum pentraxin 3 concentrations in neonates [J]. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2014, 119(1): 62.
- [13] 唐春华, 杨丹, 左振华, 等. 草鱼 CRP 基因全长 cDNA 的克隆及

- 其表达分析[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2009,35(6):673-678.
- [14] MOALLI F,JAILLON S,INFORZATO A,et al.Pathogen recognition by the long pentraxin *PTX3*[J].BioMed Research International,2011(11):1-15.
- [15] BOTTAZZI B,SANTINI L,SAVINO S,et al.Recognition of *Neisseria meningitidis* by the long pentraxin *PTX3* and its role as an endogenous adjuvant[J].PloS One,2015,10(3):1-17.

Molecular characterization and expression analysis of Pentraxin gene from *Carassius auratus*

LI Sen¹ HE Chuan² HU Ruixue¹ GU Zemao¹

1.College of Fisheries,Huazhong Agricultural University/

Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province,Wuhan 430070,China;

2.Beijing Fisheries Technology Extension Station,Beijing 100021,China

Abstract We cloned the DNA and cDNA sequence of the Pentraxin 3 gene (*PTX3*) from *Carassius auratus*, and examined its expression patterns in various tissues and after *Aeromonas hydrophila* infection. Bioinformatics analysis showed that the *C. auratus PTX3* gene consists of three exons and two introns, encoding 453 amino acids with the signal peptide (1-22 aa) and a pentraxin domain (241-453 aa). Sequences analysis revealed that the *C. auratus PTX3* amino acids sequence is closest to that of zebrafish (79%). Phylogenetic analysis showed that *C. auratus* fall in the fish clade. Real-time quantitative PCR results showed that the *C. auratus PTX3* is constitutively expressed in the heart, liver, spleen, head kidney, kidney, gills, brain, muscle, intestine, blood, and gonads. The mRNA levels of *PTX3* in the liver, spleen, head-kidney, intestine and blood increased significantly after *A. hydrophila* infection. At 3 h post-infection, the *PTX3* mRNA levels in spleen were significantly increased ($P < 0.05$) and at 6 h post-infection, the *PTX3* mRNA levels in the blood reached a peak. These results indicated that *PTX3* is an acute phase protein which can protect fish against infections.

Keywords *Carassius auratus*; *PTX3*; gene cloning; amino acid sequence; expression pattern; acute phase protein; immune

(责任编辑:边书京)