

# 团头鲂补体因子 Bf/C2 的克隆和表达分析

范君 张锋 王卫民 刘红

华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为探索团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)补体因子 Bf 和 C2(complement factor B/C2, Bf/C2)的可能功能,在转录组数据基础上,采用 RT-PCR 克隆得到 *Bf/C2A* 和 *Bf/C2B* 基因的 cDNA 序列;采用荧光实时定量 PCR 技术检测了两基因在团头鲂早期发育过程、健康成鱼及感染嗜水气单胞菌后各组织中的表达变化。结果显示,*Bf/C2A* cDNA 全长 2 520 bp,包含 5' UTR 42 bp、ORF 2 298 bp、3' UTR 180 bp,编码 765 个氨基酸。*Bf/C2B* 基因 ORF 全长 2 130 bp,编码 710 个氨基酸。两基因的氨基酸序列分别与鲤 *B/C2-A2* 及草鱼 *Bf/C2B* 相似性最高。在早期发育阶段 *Bf/C2A* 和 *Bf/C2B* 均在在出膜后 1 d 表达量最高,肠管形成期次之,其他时期的表达量相对较低;两基因在健康成鱼 10 个组织中均有表达,肝脏中表达量最高,肾脏、头肾、脾脏次之,其他组织表达量相对较低;在嗜水气单胞菌感染后,两基因在免疫相关组织如肝脏和脾脏中的表达均显著上升。上述结果表明 *Bf/C2* 在应对细菌感染的免疫过程中发挥着重要的作用。

**关键词** 团头鲂; 补体; *Bf/C2*; 克隆; 表达

**中图分类号** S 917: Q 959.46<sup>+</sup>8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0030-08

补体系统是脊椎动物先天性免疫系统重要的组成部分,包含 30 多种可溶性蛋白和膜蛋白,在机体免疫监视和抵抗微生物感染方面起着核心作用<sup>[1-2]</sup>。补体因子 B(complement factor B)与 C2(complement component 2)均为丝氨酸蛋白酶前体,是补体活化过程中 2 个关键酶,在补体替代途径中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。在鱼类中,因补体因子 B 和 C2 序列相差不多,很难区分,所以在鱼类中被命名为 Bf/C2<sup>[4]</sup>,是补体因子 B 和 C2 的统称,包含 Bf/C2A 和 Bf/C2B。Bf/C2 一般由肝脏合成,参与机体的炎症反应、细胞损伤以及组织损伤过程。由 N-末端补体调节蛋白结构域 CCP(complement control protein)、血管性血友病因子 A 结构域 vWFA(Von Willebrand factor type A)和 C-末端的丝氨酸蛋白酶结构域 Tryp\_SPc(trypsin-like serine protease) 3 个模块组成。vWFA 与 C3b 相互作用使 Bf/C2 结构重排,进而激活 Bf/C2 的 C 末端 Tryp\_SPc 的酶活性<sup>[5]</sup>。关于 *Bf/C2* 基因在哺乳动物中的研究比较全面,已有研究表明 *Bf/C2* 在人类的血管病变<sup>[6]</sup>、糖尿病<sup>[7]</sup>等发病过程中发挥着重要作用。

鱼类是低等脊椎动物,兼具固有免疫和获得性免疫功能的补体途径在免疫过程中发挥着相对哺乳动物更加重要的作用,因此,鱼类补体途径的相关研究一直是热点<sup>[8]</sup>。Bf/C2 是补体替代途径中一个重要的参与者,目前在硬骨鱼中已有研究的物种包括斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[9]</sup>、青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[10]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[11]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[12]</sup>、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)<sup>[13]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[14]</sup>等,在其他水产动物如海葵(*Nematostella vectensis*)<sup>[15]</sup>、刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)<sup>[16]</sup>、软骨鱼类如护士鲨(*Ginglymostoma cirratum*)<sup>[17]</sup>中也已有报道。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)属鲤形目、鲤科、鲂属,是我国养殖大宗淡水鱼类之一<sup>[18]</sup>,养殖过程中的主要病害是由嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染引起的细菌性败血症,会导致鱼类大量死亡<sup>[19]</sup>。有关团头鲂抗病分子生物学的研究国内已有一些<sup>[20-21]</sup>,但关于 *Bf/C2* 的研究尚未见报道。本研究以团头鲂为试验对象,在以往转录组数据基础上,克隆获得 *Bf/C2* 基因 cDNA

收稿日期: 2018-09-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2662015PY134); 现代农业产业技术体系国家大宗淡水鱼产业技术体系建设专项(CARS-46-08)

范君,硕士研究生,研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: 624937146@qq.com

通信作者: 刘红,博士,教授,研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

序列并进行生物信息学分析,同时通过荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)技术研究 *Bf/C2* 在早期发育阶段、健康成鱼及嗜水气单胞菌感染后的表达情况,初步探讨 *Bf/C2* 在团头鲂免疫过程中的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用团头鲂均采自湖北百容水产良种有限公司,试验鱼运回华中农业大学水产学院实验室暂养,待其适应环境后进行试验。人工授精后在受精卵、桑葚胚期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、体节出现期、肌肉效应期、心脏出现期、心跳期、出膜期、眼色素出现期、鳃形成期、肠管形成期以及出膜后 1、3、7 和 10 d 时取胚胎或仔鱼样品各 3 份保存。另取 6 尾 2<sup>+</sup> 龄健康团头鲂,采集肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、心、脑、肌肉、血液和头肾等 10 个组织并保存。用  $1.0 \times 10^6$  cfu/mL 的嗜水气单胞菌 0.1 mL(对照

组注射等量生理盐水)对试验鱼(平均体质量 25 g)进行腹腔注射感染,注射后 0 h、4 h、12 h、24 h、3 d 和 5 d 时采集鱼的肝脏、脾脏、肾脏、肠和头肾组织,每个时间点对照组和试验组分别采集 3 个重复,每个重复取 7 尾鱼的组织混合。所有样品用液氮冷冻后,置于 -80 °C 冰箱保存待用。

### 1.2 样品总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

将样品在液氮中研磨成粉末,按照 Trizol 试剂盒说明书提取各样品的总 RNA,取 1.0 μg 总 RNA 按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒的说明进行反转录,得到 cDNA 后进行后续 RT-PCR 或 qRT-PCR 实验,反应分为两步进行,首先进行基因组 DNA 的消除反应,再进行反转录反应。

### 1.3 引物设计

根据团头鲂转录组序列中 *Bf/C2A* 和 *Bf/C2B* 基因的 unigene 序列,使用 Primer premier 5.0 设计 PCR 测序验证和 qRT-PCR 基因表达的引物,送至武汉擎科公司合成(表 1)。

表 1 *Bf/C2* 基因验证及表达所用引物

Table 1 Primers used for *Bf/C2* gene verification and expression

引物名称 Name of primer	引物序列(5'→3') Sequence of primer	产物大小/bp Size of product	引物用途 Purpose of primer
<i>Bf/C2A</i> -ORF-2F	TTTTGGAGAATGGAGAGGTGAC	1 597	序列验证
<i>Bf/C2A</i> -ORF-2R	CGTGGTACATCAGTAGCGGG		Sequence verification
<i>Bf/C2A</i> -ORF-3F	CCTCAGTCCATTTGCTTTCAGTG	566	序列验证
<i>Bf/C2A</i> -ORF-3R	ACTGCTACCAGGGGGAACG		Sequence verification
<i>Bf/C2A</i> -ORF-4F	CAATGTTGCTCGTCCTCCAC	1 047	序列验证
<i>Bf/C2A</i> -ORF-4R	CCTGCCTGCCATTGGGTAG		Sequence verification
<i>Bf/C2B</i> -ORF-21F	AGATTATGAGGAACCACAGAAGAAC	2 214	序列验证
<i>Bf/C2B</i> -ORF-21R	TCAGCACTATGCTAAGGACGAAAT		Sequence verification
<i>Bf</i> -RT-PCR-1F	AAGGCTATTCAGATGGGAGTTT	230	荧光定量
<i>Bf</i> -RT-PCR-1R	ATGACACGAGTAGGTGGTTGTG		qRT-PCR
<i>Bf/C2B</i> -RT-PCR-1F	CGTATTGGAGACAGAGTGCG	267	荧光定量
<i>Bf/C2B</i> -RT-PCR-1R	GAAGACATTCAGCCGACCT		qRT-PCR
18S rRNA-F	CGGAGGTTCTGAAGACGATCA		内参基因
18S rRNA-R	GGGTCGGCATCGTTTACG		Reference gene

### 1.4 PCR 扩增和荧光实时定量 PCR

PCR 扩增体系为 10 μL:10×*Taq* PCR Buffer 1.0 μL, DNTP 0.4 μL, *Taq* DNA Polymerase 0.2 μL, 模板(cDNA)0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.1 μL, 上下游引物各 0.4 μL。反应条件为:94 °C 预变性 2 min, 35 个循环(94 °C 变性 30 s, 50~60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 循环结束后 72 °C 延伸 10 min。产物电泳检测和回收,用于后续连接转化、阳性克隆筛选和测序。

qRT-PCR 以 18S-*rRNA* 为内参基因,反应体系 20 μL: SYBR mix 10.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.4 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 上下游引物各 0.8 μL。在罗氏(Roche)LightCycler® 480 荧光定量 PCR 仪程序下进行,反应条件:95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 退火 20 s(退火温度随引物不同而定), 72 °C 20 s, 40 个循环。基因表达量采用相对定量法计算,公式为:  $F = 2^{-[CT_{处理组目的基因} - CT_{处理组内参基因}] - [CT_{目的基因对照组} - CT_{内参基因对照组}]}$ 。

用 SPSS Statistics 17.0 软件对目的基因的相对

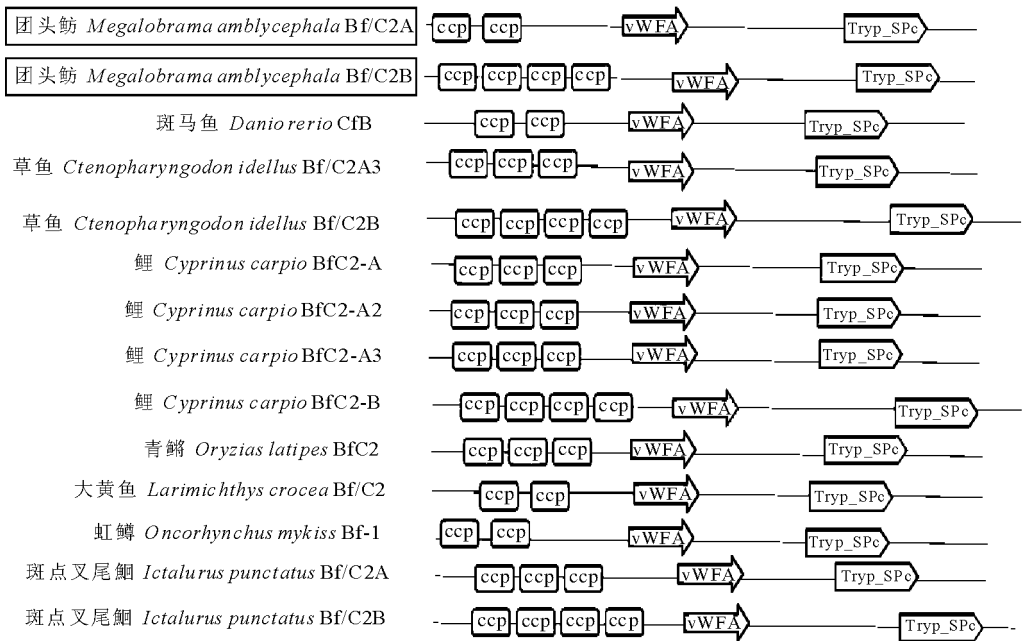
表达量进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并用 Duncan's 进行多重比较,数值均采用平均值±标准误(mean±SE)表示,根据分析结果在 Graphpad Prism 6.01 中做出相对表达量柱状图。当  $P < 0.05$  时,认为差异显著;当  $P < 0.01$  时,认为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 团头鲂 *Bf/C2A*、*Bf/C2B* 基因序列分析

通过 RT-PCR 方法验证得到团头鲂 *Bf/C2A* 基因 cDNA 全长 2 520 bp,包含 5' UTR 42 bp、ORF 2 298 bp、3' UTR 180 bp,编码 765 个氨基酸;*Bf/C2B* 基因 ORF 共 2 131 bp,编码 710 个氨基

酸。进行 Blastp 分析发现团头鲂 *Bf/C2A* 与鲤 *Bf/C2-A2* 相似性最高,为 76%,与鲤 *Bf/C2A*、斑马鱼 *Bf/C2*、鲤 *Bf/C2-A3*、草鱼 *Bf/C2A3* 的相似性分别为 74%、70%、62%和 62%。*Bf/C2B* 与草鱼、鲤、斑马鱼 *Bf/C2B* 的相似性分别为 95%、84%和 79%。利用 NCBI 在线软件 CDD 对团头鲂及其他鱼类 *Bf/C2* 氨基酸序列进行结构域预测,发现鱼类 *Bf/C2* 由 3 个结构域组成,包括补体调节蛋白结构域 CCP、血管性血友病因子 A 结构域 vWFA 以及胰蛋白酶结构域 Tryp\_SPC,不同在于补体调节蛋白结构域 CCP 的个数。团头鲂 *Bf/C2A*、*Bf/C2B* 分别包含 2 个和 4 个补体调节蛋白结构域 CCP(图 1)。



方框中为团头鲂 *Bf/C2* *Bf/C2* of *M. amblycephala* are highlighted by square frame.

图 1 不同鱼类 *Bf/C2* 的结构域

Fig.1 The domains of *Bf/C2* in different fish species

用 MEGA 6.0 构建系统进化树(图 2),发现鱼类 *Bf/C2* 聚为 2 支,团头鲂 *Bf/C2A* 与鱼类 *Bf/C2A* 聚在一支,团头鲂 *Bf/C2B* 与鱼类 *Bf/C2B* 聚在另外一支,而两栖类及哺乳类 B 分别聚为一支,在鱼类 2 支的中间。

### 2.2 团头鲂 *Bf/C2* 基因表达分析

从图 3 可以看出,在早期发育过程中团头鲂 *Bf/C2A* 与 *Bf/C2B* 基因 mRNA 的表达变化趋势一致,均在出膜后 1 d 达到最高,肠管形成期次之,

此外 *Bf/C2A* 在出膜期表达量也相对较高,两基因在其他发育期表达量相对都较低。

在健康团头鲂成鱼的肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、心脏、脑、肌肉、血液和头肾等 10 个组织中 2 个 *Bf/C2* 基因均广泛表达,且表达趋势相似,表达量最高的都是肝脏,其次是肾脏、头肾和脾脏。在其他组织中,*Bf/C2A* 表达从高到低依次为:肠>血液>心脏>肌肉>鳃>脑;而 *Bf/C2B* 表达从高到低依次为:肌肉>脑>心脏>血液>肠>鳃(图 4)。

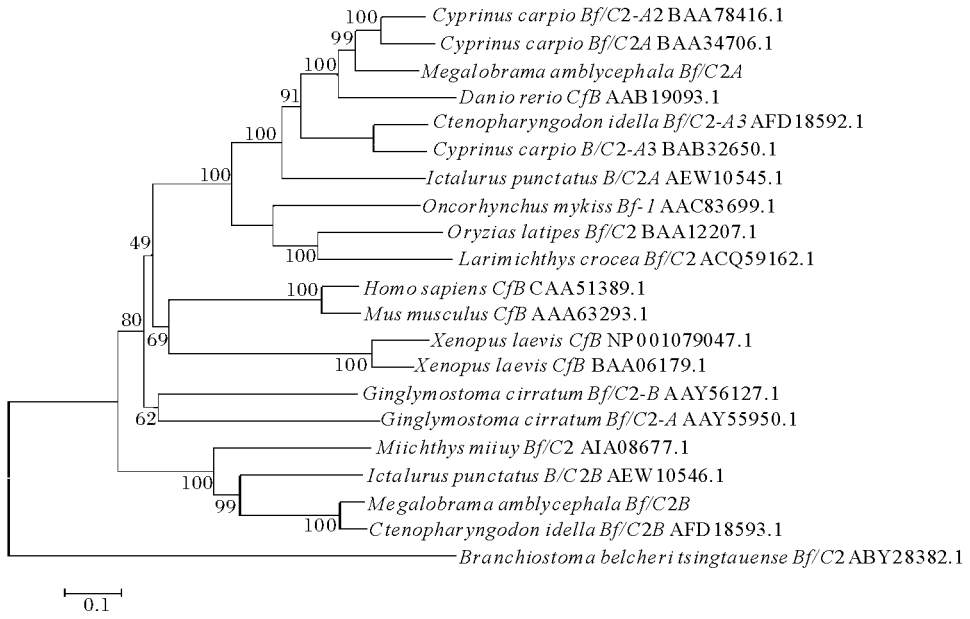
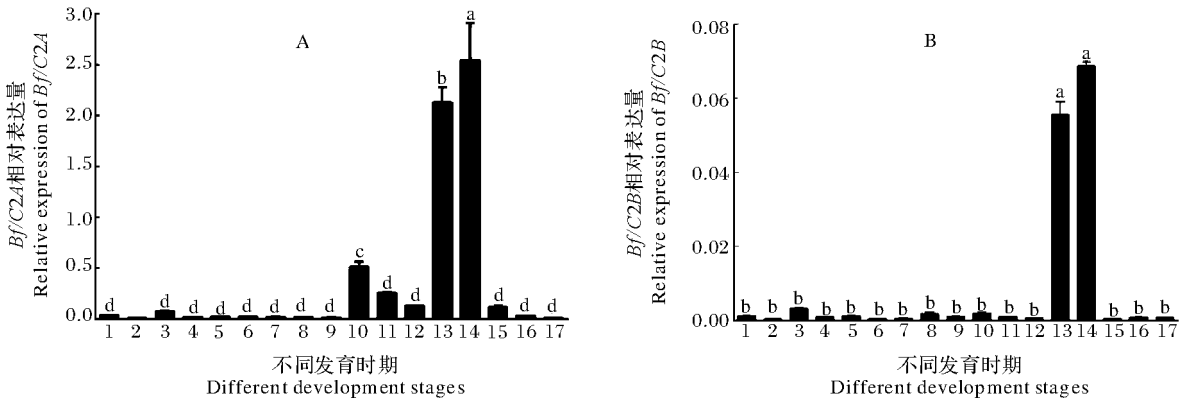


图 2 不同物种 *Bf/C2A*、*Bf/C2B* 基因编码氨基酸序列的系统进化树  
 Fig.2 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by the *Bf/C2A* and *Bf/C2B* genes in different species



1:受精卵; 2:桑葚胚期; 3:囊胚期; 4:原肠胚期; 5:神经胚期; 6:体节出现期; 7:肌肉效应期; 8:心脏出现期; 9:心跳期; 10:出膜期; 11:眼球色素出现期; 12:鳃形成期; 13:肠管形成期; 14:出膜后 1 d; 15:出膜后 3 d; 16:出膜后 7 d; 17:出膜后 10 d; 字母不同表示差异显著,  $P < 0.05$ 。1: Fertilized egg; 2: Morula stage; 3: Blastula stage; 4: Gastrula stage; 5: Neural plant stage; 6: Body segment appearance stage; 7: Muscle functioning stage; 8: Heart appearance stage; 9: Heart beat stage; 10: Hatching; 11: Eyeball pigment stage; 12: Air bladder formation stage; 13: Intestine formation stage; 14: 1 dpf; 15: 3 dpf; 16: 7 dpf; 17: 10 dpf; different letters mean significant differences,  $P < 0.05$ .

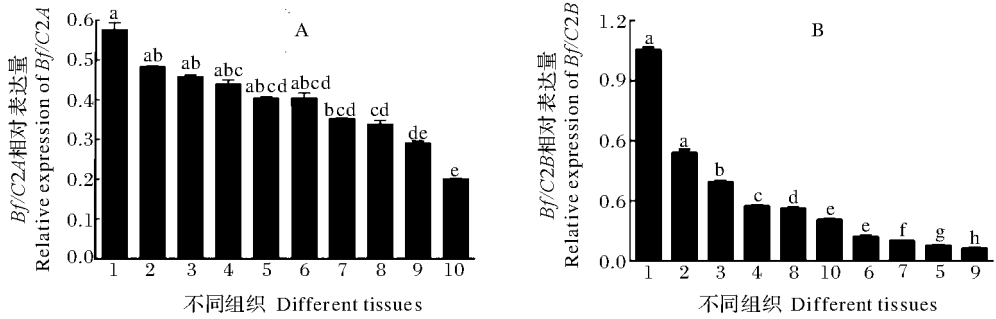
图 3 团头鲂发育早期 *Bf/C2A* (A) 和 *Bf/C2B* (B) 基因的相对表达量

Fig.3 The relative expression of the *Bf/C2A* (A) and *Bf/C2B* (B) mRNA in different embryonic and larval stages

感染嗜水气单胞菌后, *Bf/C2* 在肝脏、脾脏、肾脏、肠及头肾表达都发生了显著变化(图 5)。

在肝脏中, *Bf/C2A* 在注射感染 24 h 开始大幅上升为对照组的 4.96 倍, 3 d 上升为对照组的 13.6

倍, 5 d 时上升到最大值, 为对照组的 27.1 倍 ( $P < 0.05$ )。 *Bf/C2B* 在感染 4 h 表达量低于对照组, 24 h 开始大幅上升为对照组 30.4 倍, 3 d 达到最高峰(为对照组 46.0 倍), 之后下降, 5 d 时仅为对照



1: 肝脏; 2: 肾脏; 3: 头肾; 4: 脾脏; 5: 肠; 6: 血液; 7: 心脏; 8: 肌肉; 9: 鳃; 10: 脑。字母不同表示差异显著,  $P < 0.05$ 。1: Liver; 2: Kidney; 3: Head kidney; 4: Spleen; 5: Intestine; 6: Blood; 7: Heart; 8: Muscle; 9: Gill; 10: Brain. Different letters mean significant differences,  $P < 0.05$ .

图 4 健康团头鲂成鱼不同组织 *Bf/C2A* (A) 和 *Bf/C2B* (B) 基因的相对表达量

Fig. 4 The relative expression of the *Bf/C2A* (A) and *Bf/C2B* (B) genes in different tissues of adult blunt snout bream

组的 9.1 倍 ( $P < 0.05$ )。

在脾脏中, 两基因表达量均在注射后 4 h 时最高, 分别为对照组的 177.4 和 25.7 倍 ( $P < 0.05$ )。

在肾脏中, *Bf/C2A* 表达量在 12 h 达到最高, 为对照组的 3.6 倍; 3 d 时为对照组的 1.3 倍; 与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。 *Bf/C2B* 的表达量在 3 d 时达到最高, 为对照组的 13.5 倍 ( $P < 0.05$ ); 12 h 时为对照组的 8.8 倍; 24 h 时表达受到抑制, 仅为对照组的 1% ( $P < 0.05$ )。

在肠中, *Bf/C2A* 表达量在 5 d 前呈平稳趋势, 5 d 时表达量达到最大, 为对照组的 9.7 倍 ( $P < 0.05$ )。 *Bf/C2B* 在 24 h 前表达很低, 仅为对照组的 20% 和 40%; 24 h 时表达量达到最大, 为对照组的 5.2 倍 ( $P < 0.05$ ); 在 3 d 时表达受到抑制, 仅为对照组的 2% ( $P < 0.05$ ); 在 5 d 时基因表达量再次上升, 为对照组的 2.9 倍。

*Bf/C2A* 在头肾中的表达量从 12 h 开始呈显著性增长, 3 d 和 5 d 时分别是对照组的 4.8 倍和 8.0 倍 ( $P < 0.05$ )。 *Bf/C2B* 在头肾中的 4 h 表达量为对照组的 1.3 倍; 随后在 12 h 表达受到抑制, 大幅下降到对照组的 1%; 24 h 显著增长为对照组的 1.3 倍; 随后 3 d 表达量受到抑制, 到 5 d 时逐渐恢复到正常水平。

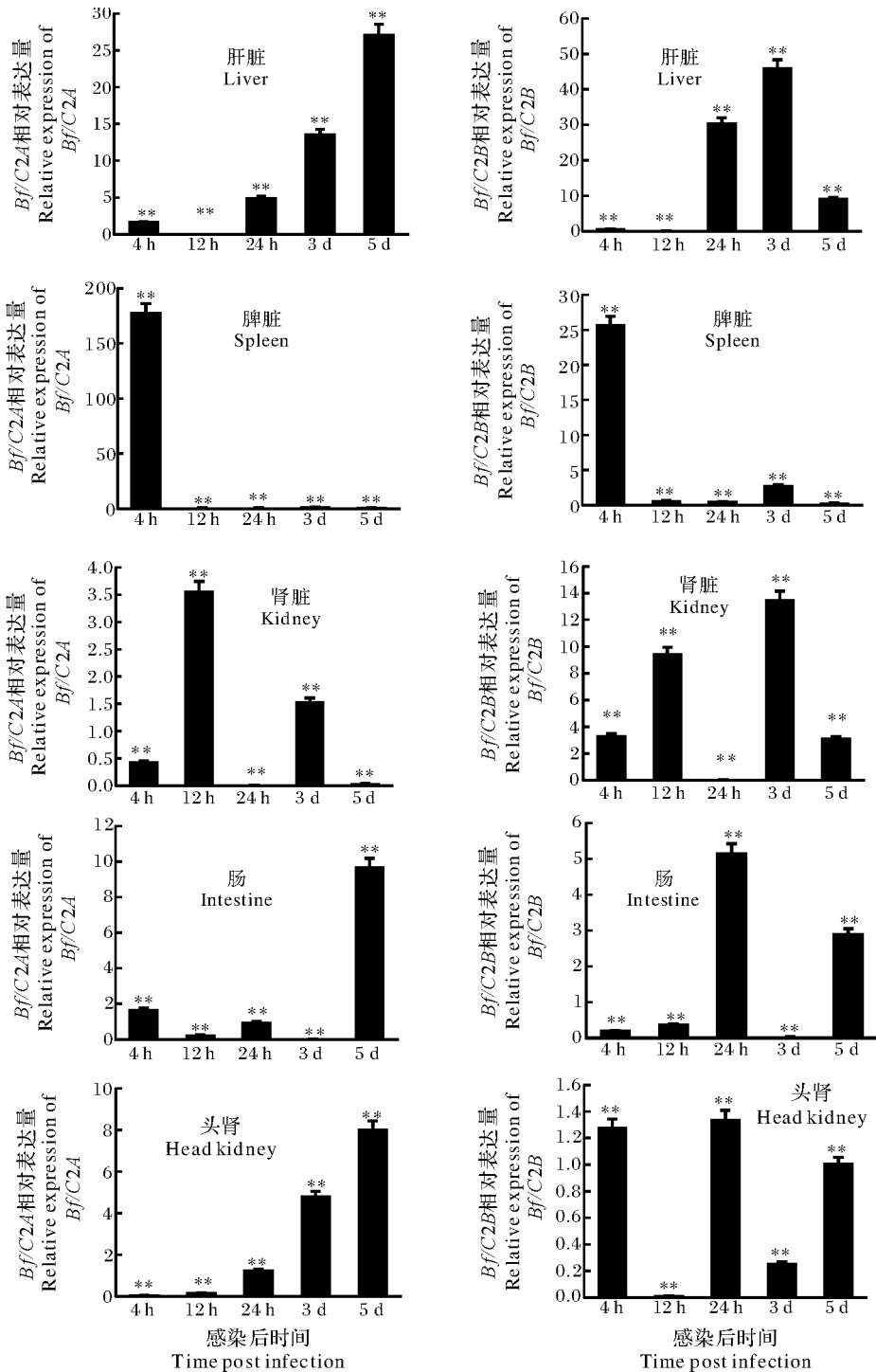
### 3 讨论

补体因子 B 与 C2 是丝氨酸蛋白酶前体, 同时也是补体活化过程中 2 个关键性的酶。在比较高等的脊椎动物中 C2 参与经典途径和凝集素途径, 而

*Bf* 参与替代途径<sup>[22]</sup>。在鱼类中 *Bf* 与 C2 统称为 (*Bf/C2*), 在鲤科鱼类中主要由 *Bf/C2A* 和 *Bf/C2B* 组成。目前, 已在鲤<sup>[12,23]</sup>、草鱼<sup>[14]</sup>、斑点叉尾鲷<sup>[13]</sup>、护士鲈<sup>[17]</sup> 以及大黄鱼<sup>[24]</sup> 等鱼类中对补体 *Bf/C2* 基因进行了初步研究。经 CDD 软件预测, 团头鲂 *Bf/C2* 包含三大结构域: 2 或 4 个重复的补体调节蛋白结构域 CCP、1 个血管性血友病因子 A 结构域 vWFA 以及 1 个胰蛋白酶结构域 Tryp\_SPc。这与其他鱼类相同, 例如鲤的 3 个 *Bf/C2A* (*Bf/C2A*, *Bf/C2-A2*, *Bf/C2-A3*) 和 *Bf/C2B*<sup>[4]</sup> 以及草鱼的 *Bf/C2A3* 和 *Bf/C2B*<sup>[9]</sup> 均含相同的 3 个结构域, 仅是补体调节蛋白结构域 CCP 的数目 2~4 个不等, 这也说明了 *Bf/C2* 在进化过程中的保守性。

团头鲂 *Bf/C2* 基因在不同胚胎发育期的相对表达结果显示, 两基因均在出膜后 1 d 表达量最高, 在肠管形成期表达量也相对较高, *Bf/C2A* 在出膜期表达量也较高, 在其他时期表达量都较低。而同时观察发现, 在出膜前的发育过程中, 囊胚期的表达量最高。有研究表明, 囊胚期是细胞分裂的过程<sup>[25]</sup>, 在该时期细胞数量呈“J”型增长, 所以推测在该时期 *Bf/C2A* 基因的表达量较高与之有关; 但不排除该基因在受精卵分裂过程亦发挥一定的作用<sup>[9]</sup>。出膜后 1 d 表达量最高, 很有可能是该时期胚胎脱掉卵膜, 变成仔鱼进入到水体中, 缺少膜的保护, 同时鱼体抵抗力差, 同时经过一段时间的环境暴露, 很可能受到水体中病原体入侵<sup>[18]</sup>, 此时先天性免疫发挥作用导致表达量上升, 这也说明 *Bf/C2* 基因在先天性免疫中起很关键作用。肠管形成期表





差异显著( $P < 0.05$ )和差异极显著( $P < 0.01$ )分别用“\*”和“\*\*”表示。Statistically significant regulation in genes expression ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ) are denoted with ‘\*’ and ‘\*\*’, respectively.

图 5 团头鲂感染嗜水气单胞菌后 *Bf/C2* 基因在肝脏、脾脏、肾脏、肠和头肾中的相对表达量  
 Fig.5 Relative expression of the *Bf/C2* transcript in the liver, spleen, kidney, intestine and head kidney after infection with *A. hydrophila* in blunt snout bream

达量也相对较高,说明在胚胎发育期,相对于肌肉、鳃、眼等组织,肠能够在肝脏、脾脏、肾脏、头肾等免疫器官不存在时发挥一定免疫作用。团头鲂 *Bf/C2* 基因的表达在发育早期的总的趋势是,出膜后表

达量远高于出膜前表达量。

在健康团头鲂成鱼各组织中,免疫相关组织如肝脏、肾脏和脾脏中 *Bf/C2* 基因的表达量相对较高,其中在肝脏中表达量最高,这与在草鱼<sup>[14]</sup>、大黄鱼<sup>[24]</sup>中的研究结果一致,说明 *Bf/C2* 基因产物主要在肝脏中合成,与其他补体成分类似;同时说明团头鲂 *Bf/C2* 在免疫过程中可能发挥着重要作用。同时发现团头鲂 *Bf/C2* 在其他非免疫组织中也有较高的表达,说明团头鲂 *Bf/C2* 与炎症反应也有密切的关系<sup>[26]</sup>。

在感染嗜水气单胞菌之后,团头鲂 *Bf/C2* 在不同组织、不同时间的表达分析显示肝脏、脾脏、肾脏、肠及头肾中的表达量有显著升高的过程,但是达到峰值的时间各不相同,可能是因为各个组织在参与免疫的过程中顺序不一样。同样在不同物种中,此基因表达达到峰值的时间也略有不同,如草鱼肝脏、脾脏、肾脏、肠及头肾 *Bf/C2A* 的表达量均在感染后 4 h 上升到最高<sup>[9]</sup>。而斑点叉尾鲷肝脏 *Bf/C2A* 的表达量在感染后 2 d 上升到最大,但脾脏和肾脏中变化趋势不明显<sup>[13]</sup>。在大黄鱼中,肝脏、脾脏和肾脏在被细菌感染后均有不同程度变化,其中肝脏中在 5 d 时表达量达到最高<sup>[24]</sup>。

综合以上试验结果,团头鲂基因组中有 2 个 *Bf/C2* 基因,两基因表达模式相似,出膜后表达量远高于出膜前表达量,成鱼在免疫器官肝脏中表达量都最高,意味着两者有类似的功能。团头鲂在嗜水气单胞菌感染后,其 *Bf/C2* 在肝脏、脾脏、肾脏、肠及头肾等免疫器官中的表达量有显著升高的过程,表明团头鲂 *Bf/C2* 在应对细菌感染的免疫过程中发挥着重要的作用。本研究结果丰富了对鱼类补体系统的认识,可为今后具体的功能研究和抗病育种工作提供一定的科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] MORGAN B P, MARCHBANK K J, LONGHI M P, et al. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive response[J]. *Immunology letters*, 2005, 97: 171-179.
- [2] SARMA J V, WARD P A. The complement system[J]. *Cell tissue research*, 2011, 343: 227-235.
- [3] SCHREIBER R D, PANGBURN M K, LESAVRE P H, et al. Initiation of the alternative pathway of complement: recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1978, 75: 3948-3952.
- [4] ISHIKAWA N, NONAKA M, WETSELRA, et al. Murine complement C2 and factor B genomic and cDNA cloning reveals different mechanisms for multiple transcripts of C2 and B[J]. *Journal of biological chemistry*, 1990, 265: 19040-19046.
- [5] BHATTACHARYA A A, LUPHER M L, STAUNTON D E, et al. Crystal structure of the A domain from complement factor B reveals an integrin-like open conformation [J]. *Structure*, 2004, 12: 371-378.
- [6] OSTERGAARD J R, BRUUN P G, LAMML U. HLA antigens and complement types in patients with intracranial saccular aneurysms[J]. *Tissue antigens*, 1986, 28(3): 176-181.
- [7] BEN M S, GHANEM N, KNEISSIT, et al. Immunogenetic markers (BF, C2, C4, 21-OH, TNF alpha, TCR beta, Ig) and insulin-dependent diabetes in the Tunisian population: serological and molecular study[J]. *Annales de biologie clinique*, 1991, 49(7): 389-396.
- [8] SUNYER J O, LAMBRIS J D. *Encyclopedia of life sciences* [M]. [S. l.: s.n.], 1999.
- [9] SEEGER A, MAYER W E, KLEIN J. A complement factor B-like cDNA clone from the zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Molecular immunology*, 1996, 33(6): 511-520.
- [10] KURODA N, SASAKI M, NONAKA M, et al. Molecular cloning and linkage analysis of the Japanese medaka fish complement *Bf/C2* gene [J]. *Immunogenetics*, 1996, 44(6): 459-467.
- [11] SUNYER J O, ZARKADIS I, SARRIAS M R, et al. Cloning, structure, and function of two rainbow trout Bf molecules[J]. *Molecular immunology*, 1998, 161(8): 4106-4114.
- [12] NAKAO M, FUSHITANI Y, FUJIKI K, et al. Two diverged complement factor B/C2-like cDNA sequences from a teleost, the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Journal of immunology*, 1998, 161(9): 4811-4818.
- [13] ZHOU Z C, LIU H, LIU S K, et al. Alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): molecular characterization, mapping and expression analysis of factors Bf/C2 and Df [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2012, 32: 186-195.
- [14] SHEN Y B, ZHANG J B, XU X Y, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the complement *Bf/C2* gene in grass carp [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2012, 32: 789-795.
- [15] KIMURA A, SAKAGUCHI E, NONAKA M. Multi-component complement system of Cnidaria 3, Bf and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis* [J]. *Immunobiology*, 2009, 214(3): 165-178.
- [16] ZHONG L, ZHANG F, CHANG Y. Gene cloning and function analysis of complement B factor-2 of *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2012, 33: 504-513.
- [17] SHIN D H, WEBB B, NAKAO M, et al. Molecular cloning, structural analysis and expression of complement component

- Bf/C2* genes in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum* [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2007, 31 (11): 1168-1182.
- [18] 王卫民.团头鲂养殖产业现状[J].科学养鱼,2009(4):44-45.
- [19] 蔡丽娟,许宝青,林启存.水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J].水产科学,2011,30(1):42-45.
- [20] 周凤娟.团头鲂 NLR3-like 基因的克隆、表达及其 SNP 的开发和鉴定[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [21] 柴欣,胡晓坤,马徐发,等.团头鲂 *MHC II $\alpha$*  基因的 SNP 位点开发、鉴定及与抗病性状关联分析[J].华中农业大学学报,2017, 36(4):76-82.
- [22] VOLANAKIS J E, YAMAUCHI Y, ISHII Y. Structure, polymorphism and regulation of expression of the *C2* gene[M]// CRUSE J N, LEWIS J R. *Complement today*. Basel: Karger, 1993.
- [23] GONZALEZ S F, BUCHMANN K, NIELSEN M E. Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2007, 31: 576-586.
- [24] WEI W, WU H Z, XU H Y, et al. Cloning and molecular characterization of two complement *Bf/C2* genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2009, 27: 285-295.
- [25] 万成炎,林永泰,黄道明.鲂胚后发育[J].湖泊科学,1999(11): 357-362.
- [26] LAUFER J, KATZ Y, PASSWELL J H. Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation [J]. *Molecular immunology*, 2001, 38: 221-229.

## Cloning and expression of complement factor B and C2 (*Bf/C2*) gene in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

FAN Jun ZHANG Feng WANG Weimin LIU Hong

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China

**Abstract** To explore the possible function of the complement factor B and C2 (*Bf/C2*) gene in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*), the cDNA sequences were cloned with RT-PCR and the expression of the *Bf/C2* mRNA in healthy fish tissues and after *Aeromonas hydrophila* infection during early development was investigated with quantitative real-time PCR. The results showed that the sequence length of *Bf/C2A* cDNA was 2 520 bp containing a 42 bp 5' UTR, a 2 298 bp ORF and a 180 bp 3' UTR, encoding 765 amino acid. The *Bf/C2B* cDNA had an 2 131 bp ORF, encoding 710 amino acid. The mRNA of both *Bf/C2A* and *Bf/C2B* were highly expressed at 1 dpf, followed by the intestinal formation stage during early development. The highest expression of both *Bf/C2A* and *Bf/C2B* in healthy adults appeared in the liver, followed by the kidney, head kidney and spleen. The expression of *Bf/C2A* and *Bf/C2B* exhibited a significant change after infection of *A. hydrophila* in the immunity-related tissues including the liver and kidney, indicating that *Bf/C2* plays important role in the immune response against bacterial infection.

**Keywords** *Megalobrama amblycephala*; complement; *Bf/C2* gene; cloning; expression

(责任编辑:边书京)