

斑点叉尾鮰血浆铜蓝蛋白的全长 cDNA 克隆及表达特征分析

孟艳青¹ 党广成¹ 刘 洋^{1*} 王启龙² 沙珍霞²

(¹大连海洋大学水产与生命学院, 116023)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 本研究克隆了斑点叉尾鮰中血浆铜蓝蛋白基因全长 cDNA 序列, 其中 5' 非翻译区 (5'-UTR) 25 bp、3' 非翻译区 (3'-UTR) 860 bp、开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 3 225 bp, 编码一条含有 1 074 个氨基酸的多肽链。与其他真核生物血浆铜蓝蛋白成员进行同源性比较, 表现出较高的保守性。本研究利用荧光实时定量 PCR 技术分析了斑点叉尾鮰血浆铜蓝蛋白基因在正常组织和被不同病菌感染后的肝脏、肠、头肾及脾脏中的表达。结果发现, 正常组织中血浆铜蓝蛋白基因在正常肝脏中表达最强烈。4 种病原 (迟钝爱德华氏菌、海豚链球菌、嗜水气单胞菌和斑点叉尾鮰呼肠孤病毒) 引起的血浆铜蓝蛋白基因的应答在不同组织中都有差异。血浆铜蓝蛋白基因对海豚链球菌的应答最为显著, 而对呼肠孤病毒的应答最不明显。而且不难发现, 感染 4 种病原菌后, 血浆铜蓝蛋白基因在头肾中的表达都出现明显的上调。

关键词 斑点叉尾鮰 血浆铜蓝蛋白 感染 差异表达

中图分类号 S971.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0052-10

Cloning and expression analysis of ceruloplasmin cDNA in channel catfish *Ictalurus punctatus*

MENG Yan-qing¹ DANG Guang-cheng¹ LIU Yang^{1*}

WANG Qi-long² SHA Zhen-xia²

(¹ College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, 116023)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Ceruloplasmin is a ferroxidase combining more than 95% copper atoms in plasma that plays roles in copper transport and regulates iron homeostasis. In this study, a full-length cDNA of ceruloplasmin was cloned from channel catfish *Ictalurus punctatus*. The cDNA of ceruloplasmin has a length of 4 110 bp, composed of a 25 bp 5' UTR, an 860 bp 3' UTR and a 3 225 bp ORF, encoding a polypeptide of 1,074 amino acids. Alignments showed that catfish ceruloplasmin was conserved among others. Quantitative real-time PCR was conducted to detect

国家自然科学基金资助项目(30871941)资助

* 通讯作者。E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-03-04; 接受日期: 2012-05-15

作者简介: 孟艳青(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产生化与分子生物学研究。E-mail: tegong19871222@163.com, Tel: (0411)84763589

expression profiles of ceruloplasmin in normal tissues and four tissues (liver, headkidney, intestine and spleen) after infection by different pathogens: *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophila*, and channel catfish Hemorrhage Reovirus (CCRV). The expression profile in liver was the highest in normal tissues. *S. iniae* induced the expression of ceruloplasmin to the highest extent, and CCRV virus to the lowest extent. These results provide a basis for further research aimed at exploring the precise immune-related molecular mechanism of ceruloplasmin in channel catfish.

KEY WORDS *Ictalurus punctatus* Ceruloplasmin Infection
Differential expression

血浆铜蓝蛋白(Ceruloplasmin)又称血蓝蛋白、铁氧化酶,是一种含铜的 α_2 -球蛋白,主要分布于动物的血液中,是血浆中的重要蛋白质之一,结合了血浆中95%以上的铜,主要在肝脏中合成(Hellman *et al.* 2002)。不少的研究者从该蛋白的结构、生化特性、生物合成、在体内的分布、代谢及生理功能等诸多方面展开了大量研究,尤其以该蛋白与人类部分疾病之间的联系研究报道较多。因此,长期以来一直受到了人们的格外关注。血浆铜蓝蛋白作为一个急性期有关蛋白,在许多病理条件下可以升高,如1型和2型糖尿病(Nowak *et al.* 2010; Memisogullari *et al.* 2004)、严重不稳定型心绞痛等心血管疾病(Ziakas *et al.* 2009; Shukla *et al.* 2006)、风湿性关节炎(Taysi *et al.* 2002)、重型海洋性贫血患者中血浆铜蓝蛋白的浓度和它的铁氧化酶活性都有显著升高(Awadallah *et al.* 2011)。而在某些病理情况下CP却下降,特别是一种Wilson's病中血浆铜蓝蛋白往往很低(Dhawan *et al.* 2005; Taly *et al.* 2007)。

鱼类中的血浆铜蓝蛋白的水平常常被作为某些疾病治疗前的早期侦查工具,而这些疾病主要是由病原菌引起的。比如对虹鳟注射左旋咪唑(Ispir *et al.* 2005)和磺胺甲基嘧啶(Yonar *et al.* 2010)等抑菌抗生素后,血浆铜蓝蛋白基因的水平都有所升高,而且Yada等(2004)发现催乳素和生长激素都可以引起虹鳟中血浆铜蓝蛋白量的升高。Dautremepuits等(2004)分别对健康和被绦虫感染的鲤鱼进行壳聚糖处理,也发现类似的现象。被嗜水气单胞菌感染的南亚野鲮(印度鲤鱼的一种)的血浆铜蓝蛋白水平是呈显著正相关的(Sahoo *et al.* 2008)。该基因在冰鱼中也有所报道,而且该基因的表达被作为缺血红素类鱼的抑制 Fe^{2+} 的补偿机制(Scudiero *et al.* 2007)。Liu等(2011)从斑点叉尾鲷中得到血浆铜蓝蛋白基因,确定了该基因的基因组结构、在正常组织中的表达以及感染爱德华氏菌后肝脏中该基因的表达。

斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* 亦称沟鲶(Channel catfish),属于鲶形目 Siluriformes、鲶科 Ictaluridae 鱼类(向建国等 2004)。20世纪80年代我国引进了斑点叉尾鲷,因其有较好的市场前景,目前已成为我国重要的水产养殖经济鱼类之一,但随着养殖规模的扩大以及养殖密度的不断增加,大规模爆发疫病的风险也相应增加。斑点叉尾鲷病毒病(Channel catfish virus disease, CCVD)是斑点叉尾鲷幼鱼的主要传染性病毒病,CCVD对幼鱼感染力非常强,并且发病速度快,7d内死亡率可达90%(张林等 2007)。据报道,国内外斑点叉尾鲷养殖主要细菌性病害是鲷爱德华氏菌引起的肠败血症(ESC),美国斑点叉尾鲷养殖由细菌性病害造成的损失每年都超过10%(Wagner *et al.* 2002)。另外,在我国广西连续几年爆发海豚链球菌病,该病波及面广,传染性强,死亡率30%~100%(余晓丽等 2008)。由嗜水气单胞菌引起的腹水病和烂尾病也是造成斑点叉尾鲷批量死亡的常见疾病(虞鹏程等 2006)。

本研究以斑点叉尾鲷为研究对象,克隆出了血浆铜蓝蛋白 cDNA 全长并且分析了其结构,同时与其他真核生物血浆铜蓝蛋白成员进行同源性比较,另外利用荧光定量 PCR 技术研究了血浆铜蓝蛋白在斑点叉尾鲷正常组织中的表达情况。迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda*、海豚链球菌 *Streptococcus iniae*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(Channel Catfish Hemorrhage Reovirus, CCRV)是水产生物的强致病菌,因此本研究还做了血浆铜蓝蛋白基因对这4种病原菌的应答情况的探索,以便为利用分子生物学技术提高养殖鱼类抗病力的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康斑点叉尾鲷于2010年6月取自江苏泰兴斑点叉尾鲷国家原良种场,鱼龄为3个月,平均体重10.5 g,平均体长12.1 cm,保持水温在27℃,气泵充气,于中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业可持续发展重点实验室暂养7d无异常后使用。总共120条斑点叉尾鲷分成5组进行处理:1)迟钝爱德华氏菌 *E. tarda* 注射组;2)海豚链球菌 *S. iniae* 注射组;3)嗜水气单胞菌 *A. hydrophila*;4)斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(CCRV)注射组;5)对照组:注射PBS溶液。

1.2 病原菌的分离与培养

实验用病原微生物嗜水气单胞菌和斑点叉尾鲷呼肠孤病毒是从斑点叉尾鲷中分离获得,迟钝爱德华氏菌从大菱鲆中分离获得,海豚链球菌从罗非鱼中分离获得。挑取迟钝爱德华氏菌单克隆、海豚链球菌单克隆和嗜水气单胞菌单克隆,分别在BHI、THB和TWA培养基中28℃过夜培养。培养后离心收集菌体,使用PBS溶液(pH 7.4)重悬细菌,预实验确定注射病原微生物的半致死剂量(LD₅₀),最终配成终浓度2.06×10⁵ CFU/ml(迟钝爱德华氏菌)、2.84×10⁴ CFU/ml(海豚链球菌)、5.13×10³ CFU/ml(嗜水气单胞菌)。斑点叉尾鲷呼肠孤病毒在斑点叉尾鲷肾细胞系中繁殖,在加入盘尼西林、链霉素和5% DFBS的DMEM培养基中28℃培养(曾令兵等 2009),根据其半致死剂量用磷酸盐缓冲液来配成终浓度为1.5×10⁷ CFU/ml的斑点叉尾鲷呼肠孤病毒。

1.3 感染取样

从未注射的鱼($n=4$)中取肝脏、脾脏、头肾、后肾、肠、鳃、肌肉、皮肤、胃、脑、血液和心脏,冻于液氮10 min,然后放置于-80℃保存待用。分别对每组进行腹腔注射不同的病原微生物及PBS各100 μl,然后从120条活鱼(每组24条)中分别取迟钝爱德华氏菌、海豚链球菌、嗜水气单胞菌、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒感染后及注射PBS后0h、12 h、24 h、2 d、3 d、7 d的实验鱼头肾、肠、肝脏和脾脏(每个时间点4条),然后-80℃保存用于RNA提取。注射和取样前均用浓度为100 mg/L的MS 222溶液浸泡斑点叉尾鲷个体使其麻醉。

1.4 克隆策略和引物设计

利用已获得的两个ESTs(Wang *et al.* 2010)进行BLAST搜索,两个片段间存在一个缺口,3'端完整,带PolyA,5'端可能完整。因此设计一对特异引物(CPF和CPR)扩增斑点叉尾鲷血浆铜蓝蛋白基因中间未知片段,然后设计两条特异引物(CP-5和CP-5n)采用5'-RACE和巢式PCR进而获得基因的5'端,最终通过序列拼接获得全长cDNA。

还设计一对特异引物(qCPF和qCPR)用来进行该基因的表达分析。根据斑点叉尾鲷β-actin的基因序列设计引物ActbF和ActbR。

以上引物均在表1中列出。

表1 用于克隆和实时定量PCR的引物

Table 1 Primers for cloning and quantitative real-time PCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
CPF	5'-AGTGGGTGGTGCCTAAGA-3'
CPR	5'-AGGGAATACGCTGATGGT-3'
CP-5	5'-CACTCGGGTCAAGCAGTTCGTGTCATCT-3'
CP-5n	5'-TTGAAGGTAAGTCCGTG-3'
UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT-GGTATCAACGCAGAGT-3'
	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
qCPF	5'-CGGAGCTGGTATTTAGACGAGAA-3'
qCPR	5'-GTCACCTTTGCACATAGTCAGGC-3'
18S rRNA-f	5'-GGCAAGGATTGACAGATTGATAGC-3'
18S rRNA-r	5'-GCCCTCTAAGAAGTTGGACGC-3'

1.5 RNA 的提取和 RACE

总 RNA 从斑点叉尾鲷组织中使用 TRIzol 试剂(Qiagen)提取。通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计来检测 RNA 的质量。提取脾脏 RNA,反转录后进行血浆铜蓝蛋白基因 cDNA 全长的克隆,提取未经注射的 12 个正常组织与经细菌和病毒感染过的组织 RNA,反转录后做荧光定量分析。以提取的总 RNA 为模板,利用 PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa)合成 cDNA 的第一条链,具体操作按照试剂盒说明书进行。5'-RACE 使用的是 Smart RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)。降落 PCR 的程序如下:94℃ 2min;94℃ 5s,72℃ 3min,5 个循环;94℃ 5s,70℃ 30s,72℃ 3min,10 个循环;94℃ 5s,68℃ 30s,72℃ 3min,25 个循环;72℃ 10min。目的基因片段最后通过巢式 PCR 获得。扩增得到的片段使用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行分离纯化,然后克隆到 pMD19-T 载体(TaKaRa)上,在大肠杆菌(DH5 α)中扩增,然后进行测序。

1.6 序列分析

使用软件 DNASTAR 5.0 分析克隆得到的 cDNA 序列和推导出的蛋白序列。其他物种的血浆铜蓝蛋白从 GenBank 数据库中下载(表 2)。利用 SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对血浆铜蓝蛋白基因所推导的氨基酸序列进行信号肽预测。利用 ClustalX 1.8 比对分析蛋白质序列同源性。使用 NCBI 的保守结构域数据库(CDD: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进行氨基酸序列保守结构域搜索。

表 2 序列比对所用的血浆铜蓝蛋白 GenBank 注册号
Table 2 Accession numbers of Ceruloplasmin for alignments

物种名称 Species	注册号 Accession number
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_000087
牛 <i>Bos taurus</i>	XP_592003
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_031778
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NP_036664
家鸡 <i>Gallus gallus</i>	XP_001235149
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_571877
眼斑雪冰鱼 <i>Chionodraco rastrorpinosus</i>	CAL92184
尼罗罗非鱼斑点叉尾鲷 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003458996
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	GU936972

1.7 荧光实时定量 PCR

提取总 RNA,并用无 RNase 的 DNase I 处理,以去除残留的痕量 DNA 污染。使用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa)将 500ng RNA 反转录成 10 μ l 体系 cDNA,并用 Easy dilution 稀释 10 倍做实时定量模板。利用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)进行实时荧光定量 PCR 反应。20 μ l 体系:2 \times SYBR Green Real time PCR Master (TaKaRa),5 μ mol/L 特异性引物(qCPF 和 qCPR),2 μ l cDNA 模板。实时定量 PCR 的反应程序如下:95℃ 预变性 5min,95℃ 15s,60℃ 34s,共进行 40 个循环,每个延伸步骤后进行荧光信号检测。反应结束后的分解步骤(95℃ 15s,60℃ 1min,95℃ 15s,60℃ 15s)用于绘制溶解曲线,对目的片段是否进行特异性扩增进行评估。采用 β -actin 基因作为实时定量 PCR 的内参基因,荧光定量反应中每个样本均设置 3 个平行。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量,使用 SPSS 13.0 统计软件中的单因素方差(One-way ANOVA)分析各组数据的差异显著与否, $P < 0.05$ 认为是差异显著, $P < 0.01$ 认为是差异极显著。

2 结果

2.1 斑点叉尾鲷血浆铜蓝蛋白基因 cDNA 的克隆和序列分析

通过 PCR 技术获得中间未知片段,并利用 RACE-PCR 技术验证 5' 端的完整性,最终通过序列拼接得到血浆铜蓝蛋白的全长 cDNA 序列,该序列已提交到 GenBank 数据库(Accession number:JF914943)。

```

gacatccaaatcacagaggagcaacATGGGGAGGTTGCACTGGAACCTGATGGGATT 59
11
MGRRLHWNLIGI
149
TGTCGTGTGTGGAAGTGTGCTCTGCAATAAGAGAATATTCATAGGTATTAAGGAGATTGAGTGGGATTACGCCACTTCGGGAAGA
1239
L C V G T V S C A I R E Y F I G I K E I E W D Y A P T T G K
41
ACCTGATCAAACAAAACACTAGATGAGATGAACATGCAAGACATTTTGAAAATGGTACCTTAGGATTGGGGTGTGTATAAGA
71
N T I A R F R I G
329
AGGCAGTGTACTCCAGTACAGGCACCTTACCTTCAAGCAGGACATAGGTAAGCCAAATGCTGGGCTTTGTCGGGPTATCATCAGTC
101
K A V Y L Q Y T L D L T F G Q E I G K P K W L G I F V G C I L S
419
CTGAAGGAGTACAGCTGGTTCGATTTAAAGAACATGGCCCTTCGCAAACTCCATTTCATCCCATGGAAATGACACTAACAATAAT
131
A F E D D T T V V H L K N W A S R K Y S I H P H G M W N V N K
509
CCAGTGAAGGGGATGGTACCTTGATATGACAGGTACGGAGGAGACCTCGATGATGCTGGGCTCGGGGAGATGTAATCACTATTTGT
161
S E G E S F E R M H A T N G P V F G R S A D P D E S M C M C
599
GAAAGCTGTACTGCTCACCCTGCTGCTGAAGATGACAGCACTGCTGACCCGAGTACCCACTCTCGGTACGTTGCCAAAAGATA
191
W K N S S H A P A E D D T N C T I R V Y H S V N A P K D I
689
CTGCCACAGACTACATGGCCCTTATATCTGTAAAAAGGTACTCTGGACATACATGGTGAACAACTCAAGCCACTACCTATACACCC
221
T A S G L T G P P F I C K K G T L D I H G D K S S D Y L Y T
779
TCATGTTCACTGTTCTGATGAAAACCTCAGTTGGTACCTGGATGACAACATCAAGAAATCTGCAAAAACCCGACAAAGTCGACAAGG
251
L M F T V S D E N L D N I L K Y C K T P T K V D K
869
ATGATGGAGCTTTCAGGAGGCAATAAAATGCWCGCTATTAACGGTTATGTCTTTGAAAATCTGCCAGACCTTGAGCATGTGCATGGGCA
281
D D E D P Q E S Y T M H A T N G P V F G R S A D P D E S M C M C
959
AAAACATCAATGGTACCTGTTGGGATGGCAACGAAGTGGACATCCACTCGCTTCTCCATGGTCAGATCTTAAAGAACAGCAGC
311
K N I Q W Y L G I G N E I H S A F P H G Q I L K N K Q
1049
ACCGCACAGACCCATTAGCTCTTCCAGCTACGTTTGTACATGTAAGAAATGGAGCCGACAAACCTGGACAGTGGCTTATGAGCTGCC
341
H R T D T I S L F P A T F V S V E M E A D K P G G W L L S C
1139
AGGTTAATGATACCTGGAGGGGGCATGGAGCCATTTTGGAGATCAAGAGATGTTTCCGGCTGTCATAGCCGACACCTTTGGTG
371
A A F N D H I F A G M Q A F F E I K R C F P A V H K P R P T G K
1229
AAGTCGACAGTACTACATGCTGCTGAGGAGGTTATCTGGGACTATGACCTACACAGTCAACCAATACACTGGCATTAAGCTACAGG
401
P V R Q M G L F A D E A T A A C C G T A C C G T A C C A T G C C A T G G A A T A C A A G A A T T G G T A T G G A A T A C A G A G T
431
D D S M A G I F P N N R N D R I I G G K Y K K V R Y V E Y T D
1409
GGACCTTTACCAAGCCAAAGAGAACACCTGGAAGGACACCTGGGCACTCTGGGTCCAATCATCAGGGCAGAGGAGGGACACCA
461
C T F T K P K P E E E H L G I L G P T I R A E E E D T
1499
TTAAGTCGCTTTTAAAGACTTGAAGCCGACTTACAGCATGACGCTCATGGATACAGTACAATGTTGAAATGGACGGCAGCACTTT
491
K E F E S F E R M H A T N G P V F G R S A D P D E S M C M C
1589
ACCACAACGTTCTAGAGAATCATACACTGGCAAAAGCTTAGGGAACCTCAAGAAAGAGCAAGAAATGTTGAACCTCTCTGCTGGCT
521
M H N V L E E E S T A Q K L R E I R K E A R A T V E P L P A K
1679
CCGTCCGCCAGGCACAACCTATAATATGAGTGGGTTGCTTGAAGATGGAGTCCAACTAAAACCGATCTGACTGTATCACTACT
551
S V R P G T T P Y N K V K N G G P T K N D P D C T I
1769
TGACTACTCTGGCTGGACCCATCCCAAGTACCAACTCTGGCCGTTGGACCTCTCTAAATCTGTAACCAAAAACCCCTCAAGAGG
581
Y Y S A V D P Q E S Y T M H A T N G P V F G R S A D P D E S M C M C
1859
GCAACGAAAAAARWRAAARAATTCACCTGCTTACTACGGCTTTGATGAGAACCCGAGCTGGTATTAGACAGACCAATTAAGA
611
K Q L D E T D T F T K P D R S A D P D E S M C M C
1949
GATTCACAACACAACCTAAGTCTGGAAGAAGATGATGAAGATTTTCAGTTGTCTAATAAAATGCAATCAATGATGATGATG
641
R P T Q P K S Y K K D D E D F Q L S N K M H S I N G Y M Y
2039
GAAATCTCCAGGCTGACTATGTCGAAGGTCGACAGGTTTCTGGCATCTTTCCGGTTTGGGATCAGAGGGGGACATTCAGGACTTT
671
N L Q G L T M C K G D K V S W H L S G L G S E G D I H T L
2129
ACTTCCATGGCAACGTTCTCTACAGAGAACAGGAGACACCATCAGCGTATCCCTCATGCTCACATGACDGTCAATCGGAGC
701
Y F H G R T R R D T I S V T I M E
731
CAGCAGCATGGGCAATTTGAGTGTACATGTATAAGTGTGATGATAACCACCGAGTGTAGAGTGAACACTACAGCTGCAGAGTGT
701
P D S R F D E R A T N G P V F G R S A D P D E S M C M C
2219
GTATCTTAGCAGGCTCAGAGATCTGCTCAACAGAAAGAAATATACATGCTGCTGTAGAGTGGACTGGGATATTTCCAGCC
761
S I F S R Q S E I M L Q Q K K Y Y I A A V E V D W D Y S P S
2309
GCACCTGGGAGGAAAAATTTTCACTGGCCTTAAAGATAGCCACAGTAAACATTTCTTAATAAAGGAGGCAATTTATGGTCCAAT
791
R T W E E K M F H G L K D S P G N T P L N K G G K F I G S K
2489
ACAAGAAGTCTTACAGAGATACACTGATGACACCTTACTAAGCCAAAGGACAGGCTCTGCTGATCTGGAACTTAGAAATTTGG
821
Y K K D E L F T K P D R S A D P D E S M C M C
2579
CTCCTAATTCATGAAATGAGGAGAAAGTAAAGGTGTTTCAAGACTTAGCCAGAGGGCATCTCGATCATGATGATGAG
851
G P I I H G N V G E K V K V K N L A C K R P Y S H A H G
2669
TAAAGCAGAAAGTCTCAAGTCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAAC
881
V K T E S P Q V T P T P Q P G Q T Q T Y T W Y I P K S A G A P T
2759
CTGAACAAGGAAATGATGTTGGAGCTTACTATCAACTATAGACGTTAACAAGGATTTGTCAGTGGACTGTGGACCCGATGATA
911
S E Q E E C S V G A Y S T I D V N K D L Y I G P L
2849
TCTGTGAGAGAGTCTCTGAGGAGCTTTGGGCTAAAGAGAGATTTAGGAGTTTGCATTTGCTGTTGATGAGGATAAGT
941
L C K E L F T K P D R S A D P D E S M C M C
2939
CCTGCTATCTGGAGCAACATAAAACATATGCTGAAAATCTCCCAAAAATTTAGCAGGATGAGACTTTTGAAGTAAACAAA
971
S W Y L E D N I E K N P K N L E D E E F I E S N K
3029
TGCATGATAAATGGCCGCTTTCGGCAACCTTACGGCTCAATATGAATGCGGACATAAGCTGATTTGGTACCTCTCGGATGG
1001
M H G I N G L V F G N L H G I N M N V G D K V W Y V M
3119
GAAATGAAATAGACCTACACAGGACATTCATGAGTCCACAGCTTTGAGTACAAGACAAGTGGGCTCCATCCGGATGATGTTGCACT
1031
G N P E D H I A C H T S E F Y K T S G C H R N D P D C T I
3209
TAACCCGGCAGTTCACAGACTCAAAAAGCCCGCTGATACCCGGCAGCTGGCTCTGACAGCCGCTGTCGGCCGACCGTCTG
1061
L C K E L F T K P D R S A D P D E S M C M C
3299
CTGGCAGGACCAATACACAGTGAAGAAGCCAAATAGCTgagctgaagaactcaacacatcattttctgacccaataccta
1074
S G M E T Y T V T V K E R K *
3389
ctgtaccataaatttcatacattatgaataactttatggcaattgtacaagaagttttaataatcggcacacatacataa
3479
aataacagataagtttaaaaagtccaataatttatgtgctataagaacgaaacacagatgtaataacatacaaggctactacttgc
3569
ctcttctgaggaactcagtaataacttaaacctggatcatagatataataaagttaataaaccacacacacacacacacac
3659
taaacatgggttctcagtgtagcagtaacaattacactgttgcctcctgctgagctccatgatgtaaatgtgaatgataatcag
3749
ccttaagatggaggagctgttttaaacctcaaatgtgctatggatacaatctcaaaaacctcaatttctatttagtgg
3839
acaaatttagtgcggatggccaataatgaattttagatacaatttaaaagttaactgttatgacctgaagaatcaggtagcc
3929
atcgcagaacaaattgacttttttttaaaaccttttaacatgatcttcagtttgcctgtatttccgaatgtataatcggccacac
4019
aaaatttttcaactgctcaaaaagaacacacacatgactagcttaacataaacactgagtgatctgttatcgtataatcgaatcaaac
4109
tgaataaataaataaaaaaattanaaactgaaatgattactacaaaaaataaataaataaataaataaataaataaataaataa
4110
a

```

注:终止密码子用*标出。下划线标出 mRNA 不稳定相关 ATTTA 序列、加尾信号(AATAAA)和信号肽断裂位点。阴影标出血浆铜蓝蛋白的 4 个 COX2 结构域

Note: Stop codon was marked with *; ATTTA sequence, AATAAA and signal peptide cleavage sites were underlined. Four COX2 domains were shaded

图 1 斑点叉尾鲟血浆铜蓝蛋白基因的全长 cDNA 序列及所推导的氨基酸序列

Fig. 1 Full-length cDNA and deduced amino acid sequences of Ceruloplasmin from channel catfish

斑点叉尾鲟血浆铜蓝蛋白 cDNA 全长 4 110 bp,其中 5'非翻译区(5'-UTR) 25 bp,3'非翻译区(3'-UTR) 860 bp,开放阅读框(Open reading frame,ORF) 3 225 bp,编码了一条含有 1 074 个氨基酸的多肽链。在 poly(A)前存在加尾信号(AATAAA),此外还发现有多处与 mRNA 不稳定相关的序列 ATTTA(图 1)。通过 SignalP 3.0 Server 程序寻找信号肽,预测信号肽断裂位点位于成熟肽的第 20 和第 21 个氨基酸残基之间(图 1)。通过保守结构域的搜索发现了 4 个 COX2 结构域(图 1)。利用 ClustalX 1.8 软件将推测出的斑点叉尾鲟血浆铜蓝蛋白与其他真核生物血浆铜蓝蛋白成员进行同源比较,结果表现出较高的保守性(图 2)。

2.2 斑点叉尾鲟血浆铜蓝蛋白基因在各个组织中的表达分析

为了研究血浆铜蓝蛋白基因在正常斑点叉尾鲟体内的表达特征,本研究获取了 12 种正常斑点叉尾鲟组织

(肝脏、脾脏、头肾、肾、肠、鳃、肌肉、皮肤、胃、脑、血液及心脏),并提取了总 RNA,然后利用实时荧光定量 PCR 技术进行表达分析。结果显示,该基因主要在肝脏中表达,其他组织中表达量极低(图 3)。

Table with multiple columns showing amino acid sequences for various species (e.g., 小尾, 褐家鼠, 牛, etc.) and their corresponding positions. The sequences are aligned to show similarities and differences, with asterisks (*) indicating identical residues and colons (:) or dots (.) indicating high or low homologies. Gaps are marked with #.

注:各物种的铜蓝蛋白基因序列从 NCBI 下载,注册号见表 2。完全相同的序列用“*”表示,同源性较高的序列用“:”表示,相似性不高的用“.”表示,缺口用“-”表示。本研究克隆的斑点叉尾鮰血浆铜蓝蛋白用“#”标出,已经报道的斑点叉尾鮰血浆铜蓝蛋白用“\$”标出。

Note: All sequences were retrieved from NCBI, and their accessions were shown in Table 2. The residues identical in all sequences were shown with asterisks (*), whereas those with strong homologies and weak similarities were marked by colons (:), and dots (.), respectively. Gaps were introduced by (-) during the alignment process. Our ceruloplasmin sequences was marked with #; the ceruloplasmin reported formerly was marked with \$.

图 2 斑点叉尾鮰与其他物种的铜蓝蛋白序列比对

Fig. 2 Alignments of ceruloplasmin from channel catfish and other species

2.3 感染细菌和病毒后4种组织中血浆铜蓝蛋白基因的表达分析

为了了解斑点叉尾鲟血浆铜蓝蛋白基因对细菌和病毒的应答情况,本研究利用实时定量PCR技术对分别感染海豚链球菌、迟钝爱德华氏菌、嗜水气单胞菌和斑点叉尾鲟呼肠孤病毒后的斑点叉尾鲟4种组织(头肾、肠、肝脏和脾脏)的血浆铜蓝蛋白mRNA进行了测定。

感染迟钝爱德华氏菌后,血浆铜蓝蛋白基因在选取的4种免疫组织中都有不同程度的诱导表达(图4A)。在肠和头肾中血浆铜蓝蛋白基因在感染后12h有显著的升高,在肠中表达量提高 29.1 ± 0.09 倍,在头肾中表达量提高 19.7 ± 0.36 倍,随后,表达量下降。但是,在肠中,感染后72h血浆铜蓝蛋白的表达量又显著升高,达到了 27.96 ± 0.44 倍。在肝脏和脾脏中,血浆铜蓝蛋白表达量略有升高,感染后24h肝脏中表达量升至最高(3.96 ± 0.26 倍),感染后第7天脾脏中表达量升至最高(4.25 ± 0.08 倍)。由此可见,4种组织对迟钝爱德华氏菌都有相应的应答,但是迟钝爱德华氏菌对头肾和肠中的血浆铜蓝蛋白基因的诱导作用比较强,而对肝脏和脾脏的诱导作用较弱。

感染海豚链球菌后,血浆铜蓝蛋白基因显著的表达是在感染12h的头肾中(321.58 ± 0.01 倍),在感染后24h也有较高的表达量(46.64 ± 0.02 倍)(图4B)。在其他组织中血浆铜蓝蛋白基因表达只有微弱升高。脾脏和肠中该基因最高表达量则出现在72h(5.93 ± 0.18 倍、 10.56 ± 0.13 倍),在肝脏中感染后24h表达量最高(4.69 ± 0.14 倍)。显而易见,头肾中的血浆铜蓝蛋白基因对海豚链球菌的应答最为强烈。

在感染嗜水气单胞菌后,头肾中的血浆铜蓝蛋白应答最强烈(图4C),感染后12h表达量升高(13.51 ± 0.18 倍),然后逐渐下降至开始水平,然而,在感染后第7天,血浆铜蓝蛋白基因表达量又急剧升高(143.12 ± 0.11 倍)。而在其他组织中,血浆铜蓝蛋白基因的表达量则缓慢下降,但下降幅度不大。

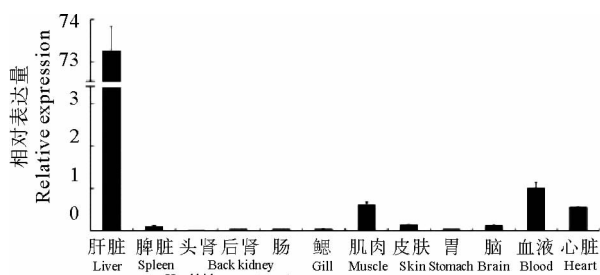
与迟钝爱德华氏菌、海豚链球菌和嗜水气单胞菌相比,斑点叉尾鲟呼肠孤病毒对血浆铜蓝蛋白基因的影响最不显著(图4D)。在头肾和肝脏中血浆铜蓝蛋白基因表达有微弱的升高,头肾中最高表达量出现在感染后12h(4.21 ± 0.10 倍),肝脏中最高表达量出现在感染后72h(2.97 ± 0.29 倍)。而在脾脏和肠中血浆铜蓝蛋白基因表达随着感染时间的增加而下降。

实验结果说明血浆铜蓝蛋白基因对不同的病原呈现出不同的表达模式,此外该基因的表达也存在组织特异性。

3 讨论

3.1 序列分析

为了从分子水平上阐明斑点叉尾鲟病害发生及病害抵抗的机制,选择了与免疫及抗病相关的水浆铜蓝蛋白基因进行研究,获得了斑点叉尾鲟血浆铜蓝蛋白基因的全长cDNA序列,这与之前Liu等(2011)报道的斑点叉尾鲟的基因组序列一致,它们的氨基酸序列仅有3个位点的氨基酸残基不同。与其他真核生物血浆铜蓝蛋白成员进行同源性比较,也表现出较高的保守性。通过保守结构域的搜索,斑点叉尾鲟含有4个COX2结构域,结果与斑马鱼、冰鱼、罗非鱼和家鸡一致,但是COX2结构域的数目却比更高等的哺乳动物少1个。这种差异也许是分子进化的表现。



注:铜蓝蛋白基因在血液中的表达量作为参照,设为1,柱状图表示均值±标准差(N=3)

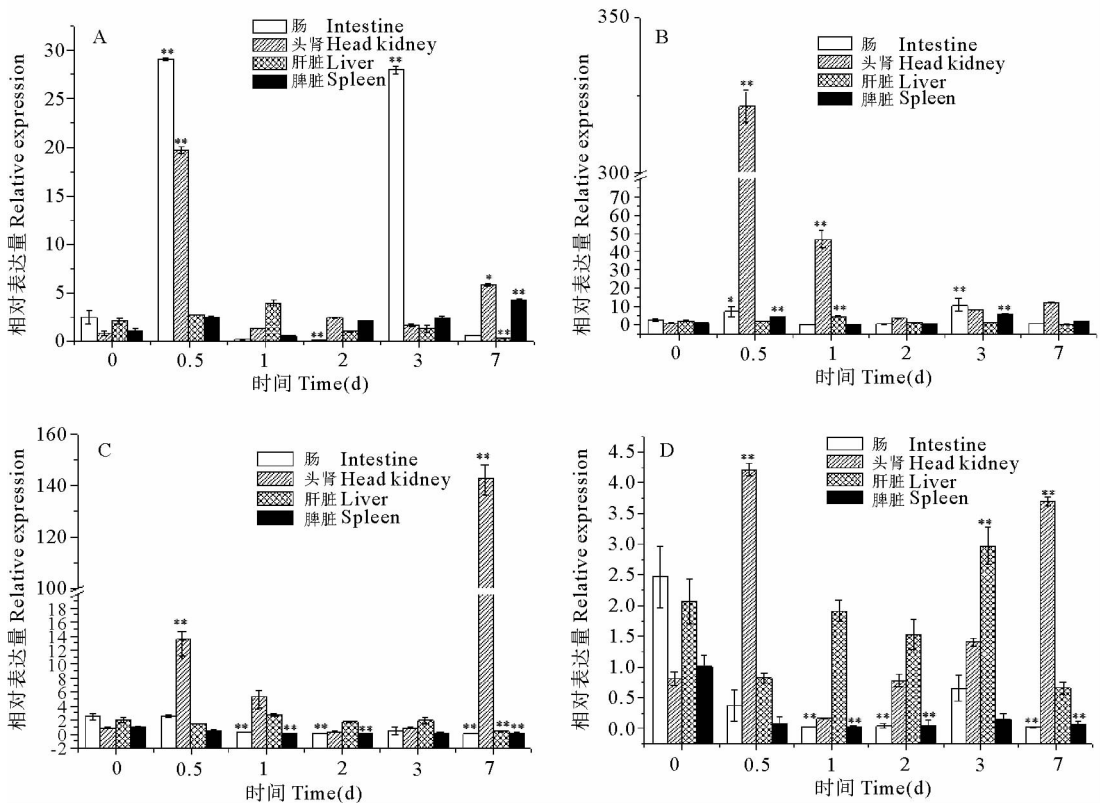
Note: Expression level in blood was chosen as the

cardinal, set as 1. Data are shown as means ± SE (N=3)

图3 血浆铜蓝蛋白基因在斑点叉尾鲟正常组织中的表达
Fig. 3 Expression of ceruloplasmin in various normal tissues of channel catfish

3.2 表达特征分析

传统的半定量 RT-PCR 法检测血浆铜蓝蛋白基因表达在人、鼠等方面均有报道。Pan 等(1996)用 RT-PCR 法调查了血浆铜蓝蛋白基因在人各种免疫细胞中的表达情况,发现在人的淋巴细胞、CD4、CD8T 细胞中均有血浆铜蓝蛋白基因的表达,用半定量 RT-PCR 法进一步研究得知人免疫细胞中血浆铜蓝蛋白 mRNA 量仅为入肝细胞中的 20%。Pan 等(1998)对小鼠免疫组织脾、胸腺及骨髓与肝细胞中血浆铜蓝蛋白基因的表达情况进行了调查,结果发现胸腺中仅有可检出血浆铜蓝蛋白基因,在脾脏中血浆铜蓝蛋白 mRNA 的丰度仅为肝中的 3%。与哺乳动物相比,常见鱼类的血浆铜蓝蛋白相关报道较少。本研究使用实时荧光定量 PCR 法对斑点叉尾鲷 12 种组织中血浆铜蓝蛋白基因的表达量进行了研究,结果表明,血浆铜蓝蛋白基因在斑点叉尾鲷肝脏组织中表达量最高,其他组织中只有极少表达。Liu 等(2011)对斑点叉尾鲷 11 种组织做了血浆铜蓝蛋白基因的表达量研究,发现其主要的表达也是在肝脏中,脾脏里只有有限的表达,其他组织中该基因的表达量极少,也与以上哺乳动物的研究相似。可以推断肝脏也是鱼类血浆铜蓝蛋白生物合成的主要场所。



注: A: 迟钝爱德华氏菌注射组; B: 海豚链球菌注射组; C: 嗜水气单胞菌注射组; D: 斑点叉尾鲷呼肠孤病毒注射组。使用 18S rRNA mRNA 的表达作为实时定量 PCR 的内参, 每个实验有 3 个平行。柱状图表示均值 ± 标准差 (n=3)。在检测每个时间点的基因表达量时, 把各个组织感染 0h 的血浆铜蓝蛋白的表达量作为参照, 设为 1。图中显示的各时间点数据是注射病原组相对于该时间点注射 PBS 组的表达量。显著性用 * 表示, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

Note: Expression levels of groups treated with *E. tarda* (A), *S. iniae* (B), *A. hydrophila* (C) and CCRV (D), respectively. Expression of 18S rRNA was as an endogenous control for quantitative real-time PCR. Each experiment was performed at least in triplicate. Data are shown as Mean ± SE (n=3). At each of the examined time points, the ceruloplasmin mRNA level of 0 h time point challenge in each tissue was chosen as the cardinal, set as 1. The ordinate expression profiles are shown with the expression levels in pathogen-treated groups compared with PBS-treated group. Significances among three pathogens at each period are indicated with asterisks, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 4 感染不同病原后斑点叉尾鲷血浆铜蓝蛋白表达分析

Fig. 4 Expression of the channel catfish ceruloplasmin responding to different pathogens

血浆铜蓝蛋白是一种急性期反应蛋白,它在天然免疫反应中起着重要的作用,在许多病理状况下表达量可以升高。Tureck等(2001)发现血浆铜蓝蛋白是人发生肝病时的主要急性期反应蛋白。Peatman等(2007)对斑点叉尾鲷肝脏中的急性期反应蛋白进行了基因芯片分析,发现迟钝爱德华氏菌能够上调肝脏中的血浆铜蓝蛋白 mRNA。本研究利用更多的病原物,包括迟钝爱德华氏菌、海豚链球菌、嗜水气单胞菌和斑点叉尾鲷呼肠孤病毒,检测了不同组织中血浆铜蓝蛋白对这些病原物的应答。在肝脏中,血浆铜蓝蛋白对迟钝爱德华氏菌、海豚链球菌和嗜水气单胞菌有较低水平的应答,比 Peatman 等(2007)报道的数值低。实际上,正常肝脏中血浆铜蓝蛋白的表达丰度已经很高,可以推测肝脏是血浆铜蓝蛋白发挥功能的重要组织。

感染迟钝爱德华氏菌后,头肾和肠中血浆铜蓝蛋白基因在感染后 12h 有显著的升高,而且在肠中感染后 72h 血浆铜蓝蛋白的表达量又显著升高,而肝脏和脾脏中该血浆铜蓝蛋白表达量只略有升高,可见同一病原菌对不同免疫组织血浆铜蓝蛋白基因的诱导作用是不同的。感染海豚链球菌和嗜水气单胞菌后,血浆铜蓝蛋白基因显著的表达分别是在感染 12h 和 7d 的头肾中,其他组织中表达不明显,可见同一组织的水浆铜蓝蛋白基因对两种病原呈现出不同的表达模式。感染斑点叉尾鲷呼肠孤病毒后,头肾和肝脏中血浆铜蓝蛋白基因表达分别在 12h 和 72h 有微弱的升高,而在脾脏和肠中血浆铜蓝蛋白基因表达随着感染时间的增加而下降,说明斑点叉尾鲷呼肠孤病毒对血浆铜蓝蛋白基因的诱导作用不显著或起抑制作用。通过实验结果不难发现,头肾中血浆铜蓝蛋白对 4 种病原的应答最强烈,尤其是海豚链球菌,其次是嗜水气单胞菌。在海豚链球菌感染个体中,头肾的血浆铜蓝蛋白的表达量在 12h 急剧升高,表达水平超过了正常的肝脏组织;而在嗜水气单胞菌感染的个体中,感染后第 7 天表达量也超过了正常的肝脏组织。实验结果暗示了头肾可能是在病原侵染过程中除肝脏之外的另一个合成血浆铜蓝蛋白的重要器官。可以看出,头肾作为鱼类重要的免疫器官,在针对病原物的刺激的急性期反应过程中起到了重要的作用,也暗示了头肾对病原菌比较敏感,进而表现出急性期反应的特性。肠道败血症主要是肠道感染后发生的急性败血病,该病是由鲷爱德华氏菌引起的,其与迟钝爱德华氏菌均属于爱德华氏菌属,迟钝爱德华氏菌可引起肠道的急性反应,本研究数据显示感染迟钝爱德华氏菌后 12h 和 72h 肠内血浆铜蓝蛋白基因表达量相对较高,这与急性白血病引起的肠道急性反应相吻合。肠中的该基因对其他病原菌的应答反应不明显。因此可以说明肠道对由爱德华氏菌引起的疾病有较好的应急反应。肝脏和脾脏中血浆铜蓝蛋白基因对 4 种病原菌的感染作用不明显。由此可见这两种组织对由 4 种病原菌引起的疾病的应急作用不明显。

本研究在一定程度上揭示了血浆铜蓝蛋白基因的免疫抗病相关功能,为进一步研究血浆铜蓝蛋白基因的免疫相关分子机制提供了基础。

参 考 文 献

- 向建国,周进,金宏. 2004. 斑点叉尾鲷的生物学与生理生化特性研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 30(4):355-358
- 余晓丽,陈明,李超,李莉萍,雷爱莹,钟穆妮,梁万文. 2008. 斑点叉尾鲷暴发性海豚链球菌病的研究. 广西水产科技, 23(3):185-191
- 张林,孟彦,罗晓松,曾令兵. 2007. 斑点叉尾鲷主要疾病及其防治概述. 淡水渔业, 37(1):76-79
- 曾令兵,徐进,李艳秋,王瑶,肖艺,范玉顶,周勇. 2009. 斑点叉尾鲷出血病病原呼肠孤病毒的分离与鉴定. 病毒学报, 6:460-466
- 虞鹏程,熊国勇,简少卿. 2006. 斑点叉尾鲷常见病害及防治技术. 中国水产, 4:56-57
- Awadallah SM, Nimer NA, Atoumb MF, Saleh SA. 2011. Association of haptoglobin phenotypes with ceruloplasmin ferroxidase activity in β -thalassemia major. Clin Chim Acta 412(11-12): 975-979
- Dautremepuits C, Betoulle S, Paris-Palacios S, Vernet G. 2004. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp(*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). Aquat Toxicol 68(4): 325-338
- Dhawan A, Taylor RM, Cheeseman P and 3 others. 2005. Wilson's disease in children: 37-year experience and revised King's score for liver transplantation. Liver Transplant 11(4): 441-448
- Hellman NE, Gitlin JD. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. Annu Rev Nutr 22: 439-458
- Ispir U, Dorucu M. 2005. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turk J Vet Anim Sci 29: 1169-1176
- Liu H, Peatman E, Wang W and 7 others. 2011. Molecular responses of ceruloplasmin to *Edwardsiella ictaluri* infection and iron overload in

- channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Shellfish Immunol* 30(3): 992-997
- Memisogullari R, Bakan E. 2004. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat* 18(4):193-197
- Nowak M, Wielkoszynski T, Marek B and 7 others. 2010. Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med* 10(3):185-192
- Pan Y, Katula K, Failla ML. 1996. Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1307(2):233-238
- Pan Y, Failla ML. 1998. Differential up-regulation of ceruloplasmin gene expression in rat immune tissues during experimental inflammation. *Nutr Res* 18(2):273-282
- Peatman E, Baoprasertkul P, Terhune J and 8 others. 2007. Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. *Dev Comp Immunol* 31(11):1183-1196
- Sahoo PK, Mahapatra KD, Saha JN. 2008. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol* 25(1-2): 163-169
- Scudiero R, Trinchella F, Riggio M, Parisi E. 2007. Structure and expression of genes involved in transport and storage of iron in red-blooded and hemoglobin-less antarctic notothenioids. *Gene* 397(1-2):1-11
- Shukla N, Maher J, Masters J and 2 others. 2006. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor. *Atherosclerosis* 187(2): 238-250
- Taly AB, Meenakshi-Sundaram S, Sinha S and 2 others. 2007. Wilson disease description of 282 patients evaluated over 3 decades. *Medicine* 82(2):112-121
- Taysi S, Polat F, Gul M. 2002. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 21(5):200-204
- Tureck L, Kupcova V, Uhlikova ME. 2001. Ceruloplasmin in sera of patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* 32: 159
- Wagner BA, Wise DJ, Khoo LH, Terhune JS. 2002. The epidemiology of bacterial diseases in food-size Channel Catfish. *J Aquat Anim Health* 14(4): 263-272
- Wang S, Peatman E, Abernathy J and 38 others. 2010. Catfish Genome Consortium. Assembly of 500,000 inter-specific catfish expressed sequence tags and large scale gene-associated marker development for whole genome association studies. *Genome Biol* 11(1):R8
- Yada T, Muto K, Azuma T, Ikuta K. 2004. Effects of prolactin and growth hormone on plasma levels of lysozyme and ceruloplasmin in rainbow trout. *Comp Biochem Phys C* 139(1-3): 57-63
- Yonar ME, Saglam N, Ispir U. 2010. Effect of sulfamerazine on plasma ceruloplasmin levels in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Turkish Journal of Science & Technology* 5(2): 79-84
- Ziakas A, Gavriliadis S, Souliou E and 10 others. 2009. Ceruloplasmin is a better predictor of the long-term prognosis compared with fibrinogen, CRP, and IL-6 in patients with severe unstable angina. *Angiology* 60(1):50-59