

SsClqDC 基因在毛蚶免疫防御中的作用

彭强^{1,2,3}, 王进京², 王春德², 卢霞², 刘相全³, 刘桂龙⁴, 徐鑫⁴, 许贺^{5,6}, 宁军号²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 3. 山东海洋资源与环境研究所, 山东 烟台 264006; 4. 烟台海之春水产种业有限公司, 山东 烟台 264006; 5. 江苏宝源生物科技有限公司, 江苏 连云港 222144; 6. 江苏海泰海洋科技有限公司, 江苏 连云港 222144)

摘要: 含 C1q 结构域蛋白(C1qDCs)在无脊椎动物免疫应答中发挥重要作用, 但目前有关毛蚶(*Scapharca subcrenata*)C1qDCs 免疫功能的研究鲜有报道。本研究从毛蚶中鉴定出一个含有典型 C1q 结构域的基因(命名为 *SsClqDC*), 并分析了其对主要病原感染的响应特征。*SsClqDC* 的 cDNA 全长序列为 711 bp, 编码含有 N 端信号肽和 199 个氨基酸的蛋白, 系统进化分析显示 *SsClqDC* 与双壳贝类的 C1qDCs 聚在一起。*SsClqDC* 在毛蚶卵细胞到眼点幼虫时期的表达量随发育阶段显著增加, 且该基因在成体毛蚶各组织中均有表达, 其中在肝胰腺和闭壳肌中表达水平较高。副溶血弧菌刺激可显著诱导 *SsClqDC* 基因高表达, 敲降 *SsClqDC* 基因表达后毛蚶死亡率和血细胞凋亡水平显著升高, 且导致毛蚶血细胞总数和吞噬活力显著下降。同时, 敲降 *SsClqDC* 基因的表达可显著抑制母源免疫相关基因 *Vg*、*LSZ*、*Dscam*、*TEP* 和 *SsClqDC-3* 的表达, 而 *C3*、*PAF3*、*SsClqDC-1* 和 *SsClqDC-2* 等基因的表达显著上调。本研究结果表明, *SsClqDC* 在毛蚶抗弧菌响应中发挥重要作用, 对贝类免疫学和抗病新品系的选育有重要的指导意义。

关键词: *SsClqDC*; 毛蚶(*Scapharca subcrenata*); 表达图谱; RNA 干扰; 免疫防御

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)9-0040-13

DOI: 10.11759/hyxx20230518001

补体 C1q 是补体 C1 复合蛋白的一个重要组分, 能够激活补体经典途径, 该途径是脊椎动物中连接获得性免疫和先天免疫的重要枢纽^[1,2]。含 C1q 结构域蛋白(C1q domain containing proteins, C1qDCs)是包含一个或多个球状 gC1q 结构域的蛋白超家族^[1,3], 广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中^[4,5]。在脊椎动物中, C1qDCs 不仅可以激活补体经典通路, 还可以作为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), 通过结合病原表面的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 快速启动细胞吞噬等免疫过程, 有效遏制病原微生物的侵害^[6]。例如, 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的 C1qDC 蛋白具有细菌凝集活性及脂多糖和肽聚糖结合活性^[7]。此外, 斑马鱼(*Danio rerio*)C1qDC 蛋白可以特异结合免疫球蛋白 IgG 和 IgM, 并通过激活补体经典途径抑制血清的溶血活性^[8]。

研究发现文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)C1q 蛋白可以结合哺乳类的 IgG, 但没有直接证据表明无脊椎动物中存在补体的经典激活途径^[9]。越来越多的研究表明, 无脊椎动物的 C1qDCs 参与了多种免疫应答反应, 例

如免疫识别、结合与凝集活性^[10,11], 抗菌活性^[12,13], 促吞噬作用^[14,15]和细胞迁移^[16-18]等。然而, C1qDCs 在无脊椎动物特定免疫途径中的主要作用鲜有报道, 需要进一步研究以丰富无脊椎动物的免疫机制。

本研究以毛蚶为研究对象, 利用 PCR 和 RACE 技术克隆得到 *SsClqDC* 基因的 cDNA 序列。探究了 *SsClqDC* 基因在毛蚶不同组织、早期胚胎以及弧菌刺激后的表达特征, 并利用 RNA 干扰技术敲降毛蚶 *SsClqDC* 基因的表达, 分析其在弧菌胁迫后毛蚶血

收稿日期: 2023-05-18; 修回日期: 2023-08-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31972791); 山东省农业良种工程资助项目(2020LZGC016); 山东省烟台市科技项目专项基金资助项目(2022XCZX083); 山东省现代农业产业技术体系建设项目(SDAIT-14) [Foundation: the National Natural Science Foundation of China, No. 31972791; The Earmarked Fund for Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province, No. 2020LZGC016; The Scientific and Technological Project of Yantai, Shandong Province, No. 2022XCZX083; The Earmarked Fund for Shandong Modern Agro-Industry Technology Research System, No. SDAIT-14]

作者简介: 彭强(1995—), 男, 河北保定人, 硕士, 主要从事贝类遗传育种研究, E-mail: pq16603173759@163.com; 宁军号(1988—), 男, 通信作者, 助理研究员, 主要从事贝类遗传育种研究, E-mail: jhning@yic.ac.cn

细胞吞噬和凋亡及抗弧菌感染中的功能特征。本研究为进一步阐明 *SsClqDC* 在毛蚶免疫防御中的潜在功能提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的毛蚶为合作公司的养殖群体,均为壳形完整、健康无损伤的个体。实验前随机挑选 30 只毛蚶测量数据如下:平均壳长为 22.15±1.37 mm、平均壳高为 24.17±1.08 mm、平均壳宽为 19.56±0.44 mm、平均体质量为 9.63±0.71 g。在实验室条件(pH 8.2±0.1、盐度 23±1、温度 28±0.5 °C)下暂养 7 d 进行实验,每日早晚各投喂 1 次螺旋藻饵料,投喂后 2 h 更换全部海水。实验所用的弧菌是副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)PL2 菌株,菌种由浙江省海洋水产养殖研究所清江基地实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 毛蚶总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取毛

蚶各组织总 RNA,采用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,利用 Nanodrop 2000(Thermo Scientific, 美国)检测 RNA 的纯度和浓度。然后采用 HiScript[®] III RT SuperMix 反转录试剂盒(Vazyme, 中国)将毛蚶各组织的 RNA 反转录成 cDNA, -20 °C 保存待用。

1.2.2 毛蚶 *SsClqDC* 基因 cDNA 序列克隆

以毛蚶的肝胰腺、血细胞和鳃等组织的 cDNA 为模板,根据引物 *SsClqDC*-F、*SsClqDC*-R 和 *SsClqDC*-F1, *SsClqDC*-F2(表 1)扩增 *SsClqDC* 基因的 ORF 和 cDNA 全长,利用 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒(TaKaRa, 日本)进行 PCR 实验,PCR 反应体系:2.0 μL dNTP Mix、12.5 μL 10×PCR Buffer、0.5 μL 正向引物(10 μmol/L)、1.0 μL cDNA 模板、0.2 μL Taq 聚合酶和 18.3 μL DEPC H₂O(TaKaRa, 日本)。反应程序:94 °C 预变性 3 min, 35 个循环(94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 60 s), 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳切胶纯化后,将融合质粒转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,筛选阳性克隆质粒送北京擎科生物有限公司测序。

表 1 本研究中所用的引物

Tab.1 Primer sequences used in this study

引物	序列(5'-3')	用途	退火温度(°C)
<i>SsClqDC</i> -F	TGTCAGAGACAGAAACACTCTTACC	PCR	57.5
<i>SsClqDC</i> -R	CTACTGTATCCACAGAATGTGTCCA	PCR	58.7
<i>SsClqDC</i> -F1	TGGCAACGGATTGAATACAACGGAC	3'RACE	68.9
<i>SsClqDC</i> -F2	GATCACGCGTATGCTCAGATCCACA	3'RACE	68.1
<i>SsClqDC</i> -S1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCG ACAAGGTAGTAATGTATTT	RNAi	75.9
<i>SsClqDC</i> -S2	AAATACATTACTACCTTGTCGCCCTATAG TGAGTCGTATTAGTGATC	RNAi	75.9
<i>SsClqDC</i> -A1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGATA CATTACTACCTTGTCGTT	RNAi	74.9
<i>SsClqDC</i> -A2	AACGACAAGGTAGTAATGTATCCCTATAG TGAGTCGTATTAGTGATC	RNAi	74.9
<i>18S</i> -RTF	CTTTCAAATGCTGCCCTATCAACT	qPCR	61.3
<i>18S</i> -RTR	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCCT	qPCR	61.6
<i>SsClqDC</i> -RTF	TACTGATGAGAGTGGAAAGGGAAAG	qPCR	61.2
<i>SsClqDC</i> -RTR	CTGTATCCACAGAATGTGTCCATTG	qPCR	61.2
<i>LSZ</i> -RTF	CTGGGAAACGACACCTGATGTAAA	qPCR	58.3
<i>LSZ</i> -RTR	CACATTCACATTGTACCGGAGGAT	qPCR	58.1
<i>TEP</i> -RTF	TACACATTTGGAAAGCCCGTCAA	qPCR	57.8
<i>TEP</i> -RTR	AGCTTTGTTTCTCAGCCACATCA	qPCR	59.4
<i>Dscam</i> -RTF	TGTGTATCAGGGGTAACAGTGGT	qPCR	58.6

续表

引物	序列(5'-3')	用途	退火温度(°C)
<i>Dscam</i> -RTR	ATCATACCCTGCATGTTCTGCTG	qPCR	61.7
<i>Vg</i> -RTF	CGTTCGCTTGATGATGACTGCCTT	qPCR	63.0
<i>Vg</i> -RTR	TGGTAAGTAGCCGTTTCGTCTCTC	qPCR	61.6
<i>PAF3</i> -RTF	GCGGATCTGTGCAGGTTTAA	qPCR	58.7
<i>PAF3</i> -RTR	CTAGTGAAAGATGCCACGCC	qPCR	58.2
<i>C3</i> -RTF	AGTGATAGGAATGGCAGAAAGTGA	qPCR	58.3
<i>C3</i> -RTR	TCTACAGTGACCGTGGATTGG	qPCR	58.1
<i>SsClqDC-1</i> -RTF	ATGACTAAAGGGTCACCATCAAATG	qPCR	58.6
<i>SsClqDC-1</i> -RTR	AGACACCACTGAAATACGAAACTCC	qPCR	58.3
<i>SsClqDC-2</i> -RTF	ATGATACTTGAGTGGCTTCTTGGGA	qPCR	58.3
<i>SsClqDC-2</i> -RTR	TAGTTTGGTGCTTGAAAATGGGTG	qPCR	57.4
<i>SsClqDC-3</i> -RTF	CGGTGGAAGTGTCAGCCTGGT	qPCR	60.7
<i>SsClqDC-3</i> -RTR	ACCACTGAAAAATGAGTCTCCGCCA	qPCR	61.8

1.2.3 生物信息学分析

在 NCBI 数据库中 BLAST 模块(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行 *SsClqDC* 核苷酸和氨基酸序列分析; 利用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)在线预测 *SsClqDC* 基因的开放阅读框和氨基酸序列; 使用 ExPASy(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行 *SsClqDC* 理论等电点与相对分子量的预测; 使用 DNAMAN 8.0 软件对不同物种的 ClqDC 蛋白进行多序列比对; 利用 MEGA-X 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)对包括毛蚶在内的 15 个 ClqDC 氨基酸序列构建系统进化树, bootstrap 值设为 1 000。

1.2.4 不同组织、胚胎发育时期和弧菌刺激后 *SsClqDC* 基因表达情况

解剖雌、雄毛蚶各 5 只, 分别取血细胞、性腺、闭壳肌、斧足、外套膜、肝胰腺和鳃组织等样品, 其中毛蚶血细胞取样具体操作如下: 先用移液枪吸取 500 μL 的抗凝剂(336 mmol/L NaCl, 27 mmol/L 柠檬酸钠, 115 mmol/L 葡萄糖, 9 mmol/L EDTA- Na_2 , pH 7.0)加至无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中, 再用注射器或移液枪从毛蚶体内吸取 500 μL 的血液, 注入提前加入抗凝剂的 EP 管中轻轻吹打均匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min 收集血细胞, 用 PBS 洗两遍, 重悬于 1 mmol/L 的 Trizol 中。诱导毛蚶产卵后分别取卵细胞、卵裂期(2 细胞到 8 细胞阶段)、囊胚期、原肠期、D 型幼虫和眼点幼虫等不同发育时期样品, 每个发育时期取 5 个平行样品。此外, 将 120 只健康无损的毛蚶随机分成 2 组, 实验组向海水加入副溶血弧菌

溶液至终浓度为 3×10^7 CFU/mL, 对照组毛蚶在常规充气的海水中饲养。在弧菌攻毒 0、3、6、12、24 和 48 h, 随机取 5 只毛蚶解剖取血细胞。上述所有样品均在液氮中速冻后置于 -80°C 冰箱保存、待用。

依据毛蚶 *SsClqDC* 基因 cDNA 序列设计荧光定量引物(表 1), 利用 qRT-PCR 技术检测 *SsClqDC* 基因在毛蚶不同组织、胚胎和幼虫发育时期及弧菌刺激后的表达模式, 实验设置 4 个不同样本重复, 内参基因为 18S rRNA。利用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(Vazyme, 中国)进行 qRT-PCR 实验, 反应体系: $2 \times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL 、 ddH_2O 3.6 μL 、cDNA 模板 1 μL 、正、反向引物各 0.2 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 40 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 35 s)。反应在 ABI QuantStudioTM 5 Real-Time PCR Instrument(Thermo Scientific, 美国)仪器中进行, 利用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 *SsClqDC* 基因的相对表达水平^[19]。

1.2.5 RNA 干扰分析

根据 *SsClqDC* 基因的 ORF 序列设计其小干扰 RNA 序列为 *SsClqDC*-siRNA(5'-CGACAAGGUAGUA AUGUAU-3'), 将该序列随机打乱顺序获得 *SsClqDC*-random-siRNA(5'-AGACUAAUGGAUACUAUGG-3') 序列, 利用 T7 启动子体外转录试剂盒(Tiandz, 天恩泽, 中国)并按其说明书进行小 RNA 合成与纯化。

将 120 只健康无损的毛蚶随机分为实验组和对照组, 每组各 60 只, 利用微量注射器分别注射 6 μL 的 *SsClqDC*-siRNAs 和 *SsClqDC*-random-siRNAs 至毛蚶的体腔中。在注射后的 0、12、24、48 和 72 h, 两组分别随机取 5 只毛蚶解剖取血细胞样品, 液氮冻存后转

入-80℃冰箱保存。经 RNA 提取和反转录成 cDNA 后, 通过 qRT-PCR 检测实验组和对照组毛蚶 *SsClqDC* 基因的表达量, 分析 *SsClqDC*-siRNA 的干扰效率。

1.2.6 敲降毛蚶 *SsClqDC* 基因后母源性免疫基因的表达分析

敲降 *SsClqDC* 基因的表达后, 通过 qRT-PCR 技术检测母源免疫相关基因的表达情况, 这些基因包括卵黄蛋白原(vitellogenin, *Vg*)、细胞黏附分子免疫球蛋白(down syndrome cell adhesion molecule, *Dscam*)、补体 C3 分子(complement, *C3*)、硫酯蛋白(thioester-containing protein, *TEP*)、溶菌酶(lysozyme, *LSZ*)、酚氧化酶原激活因子 3(phenoloxidase-activating factor 3, *PAF3*)以及同源基因 *SsClqDC-1*、*SsClqDC-2* 和 *SsClqDC-3*。用于检测母源性免疫基因表达的特异性引物见表 1, 18S rRNA 作为内参基因。

1.2.7 敲降 *SsClqDC* 基因的毛蚶弧菌刺激后血细胞凋亡、吞噬活性、血细胞总数和存活率的变化

将 120 只健康无损的毛蚶随机分为 2 组, 分别注射 *SsClqDC*-siRNA 和 *SsClqDC*-random-siRNA 后 12 h, 分

别向两组毛蚶养殖水体加入终浓度为 3×10^7 CFU/mL 的副溶血弧菌, 弧菌攻毒后的 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取样, 每个时间点实验组和对照组各随机解剖 5 只毛蚶取血淋巴样品。用预装 500 μ L 抗凝剂的无菌注射器收集 500 μ L 血淋巴, 并用 300 目筛绢过滤。4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 5 min 后倒去上清液, 重悬于 1 mL 的 PBS 缓冲液, 相同条件再次离心倒掉上清液, 重悬于 1 mL 的 PBS 缓冲液中, 用制备好的血细胞工作液检测血细胞凋亡、吞噬活性、血细胞总数。

利用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(碧云天, 中国)检测血细胞凋亡水平, 操作如下: 取 200 μ L 血细胞工作液避光条件下加入 195 μ L 的 FITC 结合液、5 μ L FITC 和 10 μ L 碘化丙染色液(PI), 轻轻混匀, 25 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min 后用流式细胞仪(CytoFLEX, 美国)检测细胞凋亡率。设置仅添加 FITC 或 PI 的单一染料对照组和不添加染料的阴性对照组, 来确定散射图十字门的位置(图 1)。毛蚶血细胞的凋亡率用 FITC 阳性和 PI 阴性细胞的数量占细胞总数的百分比来表示^[20]。

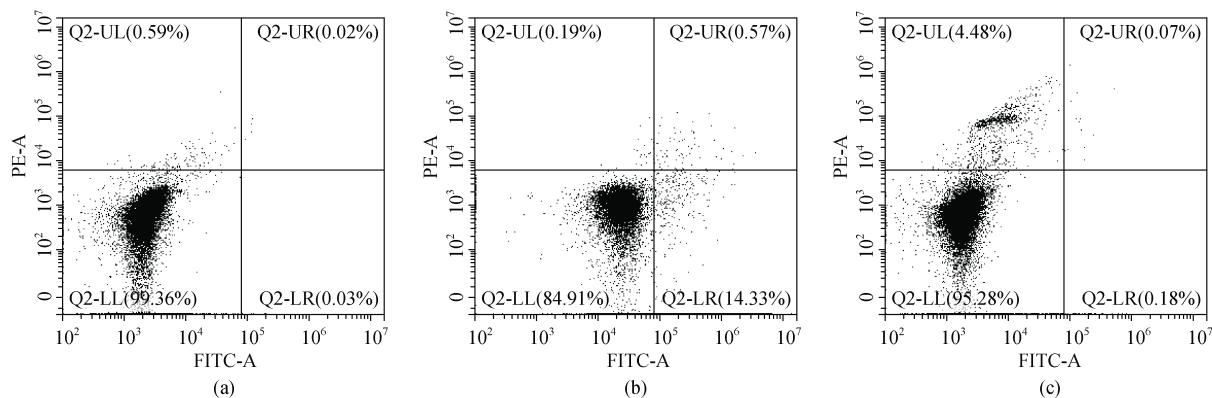


图 1 细胞凋亡散点图中十字门的位置

Fig. 1 The position of the cross gate in the scatter plot of apoptosis

注: 未添加染料的阴性对照组(a)和仅添加 FITC(b)或 PI(c)的单一染料对照组, 来确定散点图十字门的位置

血细胞吞噬率检测方法参考文献[21]并进行相应调整: 将 200 mL 血细胞工作液与 20 μ L 3.0%荧光微球(YG 1.0 μ m, Polysciences, 美国)混匀, 在 25 $^{\circ}$ C 黑暗环境中孵育 1 h。后用 10 μ L 37%福尔马林溶液(上海吉至生化科技有限公司)固定, 并在 1 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min, 重悬于 200 mL PBS 缓冲液中并通过流式细胞仪(FL-1 通道)检测, 血细胞的吞噬率用吞噬微球的血细胞数目占血细胞总数的百分比表示(图 2)。

使用 SYBR Green I 荧光染料(Biosharp, 中国)对血细胞染色, SYBR Green I 可以通过和细胞核中

的 DNA 结合, 产生绿色荧光。取 180 μ L 血细胞工作液, 加入 20 μ L 10 \times 的 SYBR Green I 染料, 25 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, 孵育完成后用移液枪吸取 50 μ L 反应液, 利用流式细胞仪(FL-1 通道)检测绿色荧光的细胞并进行计数。

180 只健康的毛蚶被随机分成 *SsClqDC*-siRNA 和 *SsClqDC*-random-siRNA 注射后加弧菌组以及 *SsClqDC*-siRNA 注射后加 PBS 3 组, 每组设置 3 个平行, 每个平行 20 只毛蚶。在 siRNA 注射后 12 h, *SsClqDC*-siRNA 和 *SsClqDC*-random-siRNA 注射组

的毛蚶在 28℃ 的含有副溶血弧菌(3×10^7 CFU/ mL)的海水中养殖。SsC1qDC-siRNA 注射组中加入等量的 PBS 缓冲液(Solarbio, 中国)作为空白对照。每 12 h 统计 3 组毛蚶的存活个数。

1.2.8 数据分析

实验数据结果采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较不同数据组间的差异, 其中 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 毛蚶 SsC1qDC 基因的克隆和序列特点

利用 PCR 和 RACE 克隆技术得到毛蚶 SsC1qDC 基因(基因序列号: OQ264768)的 cDNA 全长序列为 711 bp(图 3), 其中 5'-UTR 21 bp, 3'-UTR 80 bp, ORF 600 bp, 共编码 199 个氨基酸。SsC1qDC 的 C1q 结构域为第 66~199 个氨基酸, 预测相对分子量 22.64 kDa, 理论等电点为 8.60。

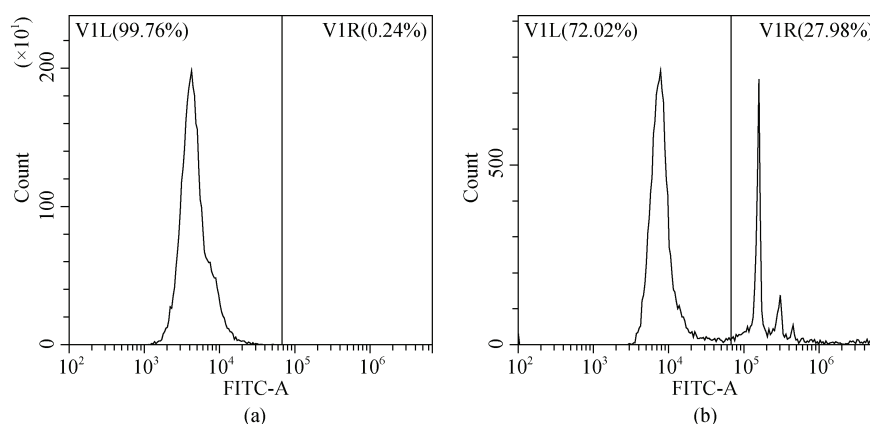


图 2 通过流式细胞术检测得到的毛蚶血细胞吞噬率的 FITC 直方图

Fig. 2 FITC histogram plot yielded by flow cytometric analysis of phagocytosis rate in Scapharca subcrenata

a. 不加微球的阴性对照; b. 加微球的实验组

```

1  TGTCAGAGACAGAAACACTCTTACCAAACCAATGTCACACGACAAATGTTCTTTGGTTGT
1  M C T R Q M F F G C
62  ATTTACAGCCTTGTAATGTTATTAGATGGTATTGACGGGGCTTTGGAATCTCCAAAACCA
11  I Y S L V M L L D G I D G A L E S P K P
122 TTTGAACACCATACTGATTGCGCCAGATACTTAGTGAAGGAAATGATTCATCTTTTGGCT
31  F E H H T D C A R Y L V K E M I H L F A
182 GATGAGAAGATTAGCAACGAAATACAACAAGTTGTCAATAAAATGAAAATACAACAAAA
51  D E K I S N E I Q Q V V N K M K I Q Q K
242 GAAAATAGAGTTGCTTCTCAGCAAATTTAGCAAGTGAAGCTACATATTCAAATAACAA
71  E N R V A F S A N L A S E A T Y S N K Q
302 ATACTGAAATTTACAAAGGTAATAACAAACATTGGCAACGGATTGAATACAACGGACGGA
91  I L K F T K V I T N I G N G L N T T D G
362 GTTTTTATTGTCCTGTACCAGGAGTGTATTCCTTCTTTCTTAATATCCAGTCAAACACA
111 V F Y C P V P G V Y S F F L N I Q S N T
422 GATCACGCGTATGCTCAGATCCACAAAACGACAAGGTAGTAATGTATGTTACTGAT
131 D H A Y A Q I H K N D K V V M Y V F T D
482 GAGAGTGGAAAGGGAAAGTGGAAATCTGGATCTAACGAGGTGATTCTTCAGCTGAAGAGA
151 E S G K G K W K S G S N E V I L Q L K R
542 GGAGACACAGTCTCCATCAAATCACATTTATCTGTTAGGTATCACCCATGGCCAGTCAT
171 G D T V S I K S H L S V R Y H P M A S H
602 TTCAATGGACACATTCTGTGGATACAGTAGTTTAAACATTGATTTATGTCAATGTTATA
191 F N G H I L W I Q *
662 AATAAAGAATTCAAACCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 3 毛蚶 SsC1qDC 核苷酸及预测的氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide and deduced amino acid sequences of SsC1qDC

注: 起始密码子(ATG)、信号肽、C1q 结构域和终止密码子(TAG)分别用绿色、红色和黄色以及灰色阴影标出

2.2 序列比对与系统进化关系

将毛蚶 *SsClqDC* 保守的 C1q 结构域序列与其他物种的 C1q 结构域序列对比, 结果如图 4 所示, 毛蚶 *SsClqDC* 与双壳类 *SsClqDCs* 的同源性高于脊椎动物。毛蚶 *SsClqDC* 与美洲牡蛎(*Crassostrea virginica* 41.23%)*CvClqDC*、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria* 39.47%)*MmClqDC* 的相似性较高, 与人(*Homo sapiens*)和家鼠(*Mus musculus*)*SsClqDCs* 的相似性较低,

低, 分别是 28.83%、26.61%。

利用 15 个不同动物门的 C1qDCs 结构域序列构建 NJ 进化树, 系统进化树如图 5 所示, 进化树的拓扑结构明显分无脊椎动物和脊椎动物 2 大分支。毛蚶 *SsClqDC* 与紫贻贝(*Mytilus edulis*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)*C1qDCs* 聚为一支, 然后与其他贝类的 C1qDCs 形成无脊椎动物分支; 来自哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物和鱼类的 C1qDCs 聚为脊椎动物分支。

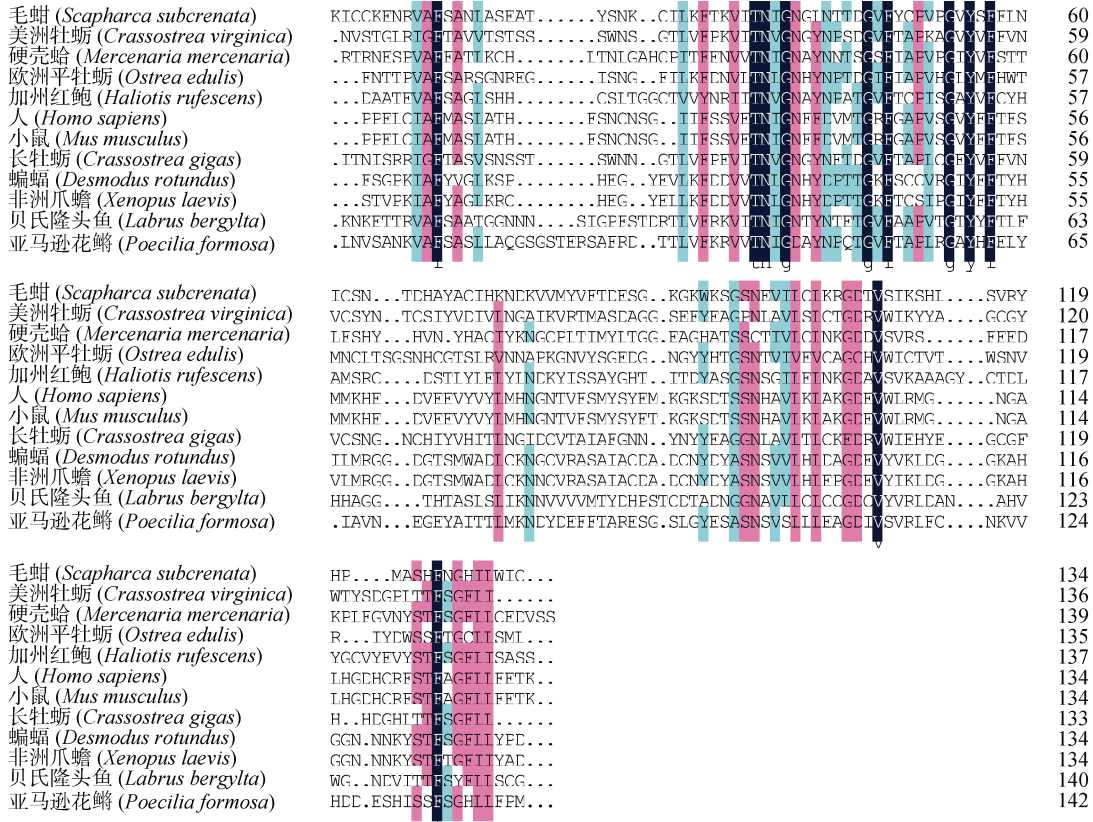


图 4 C1qDCs 蛋白质的多序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of C1qDC proteins

注: C1qDCs 的物种和登录号如下: 人(NP_852100.3); 小鼠(NP_112150.1); 长牡蛎(XP_034333860.1); 美洲牡蛎(XP_022291269.1); 红鲍(XP_046377716.2); 欧洲平牡蛎(CAG2203397.1); 亚马逊花鲈(XP_007577129.1); 非洲爪蟾(XP_018122782.1); 硬壳蛤(XP_045158489.1); 贝氏隆头鱼(XP_020504487.1)

2.3 毛蚶 *SsClqDC* 基因在不同组织和胚胎时期的表达特征

如图 6a 所示, *SsClqDC* 基因在毛蚶所有检测组织中均有表达, 在肝胰腺、闭壳肌和鳃中表达水平较高, *SsClqDC* 在雄性毛蚶性腺、斧足、外套膜和鳃中的表达量显著高于雌性毛蚶, 而在肝胰腺中的表达量呈相反趋势(图 6a 所示)。*SsClqDC* 基因在胚胎发育阶段的表达模式如图 6b 所示, 与卵细胞期相比,

SsClqDC 的表达从卵裂期到眼点幼虫阶段均显著上调($P < 0.05$)。

2.4 毛蚶 *SsClqDC* 基因在副溶血弧菌刺激后的表达模式

副溶血弧菌刺激后, 毛蚶血细胞中 *SsClqDC* 基因的表达量如图 7 所示, 与对照组相比, *SsClqDC* 的表达量在 3、6、24 和 48 h 显著升高($P < 0.01$), 呈现先升高再下降而后再升高的变化趋势, 并在 6 h 达到

最大值(约为对照组的 4.0 倍)。随后 *SsClqDC* 的表达水平显著下降, 在 24 h 达到表达量最低, 显著低于

对照组的表达量($P < 0.01$)。在 48 h, *SsClqDC* 的表达量再次显著上调($P < 0.01$)。

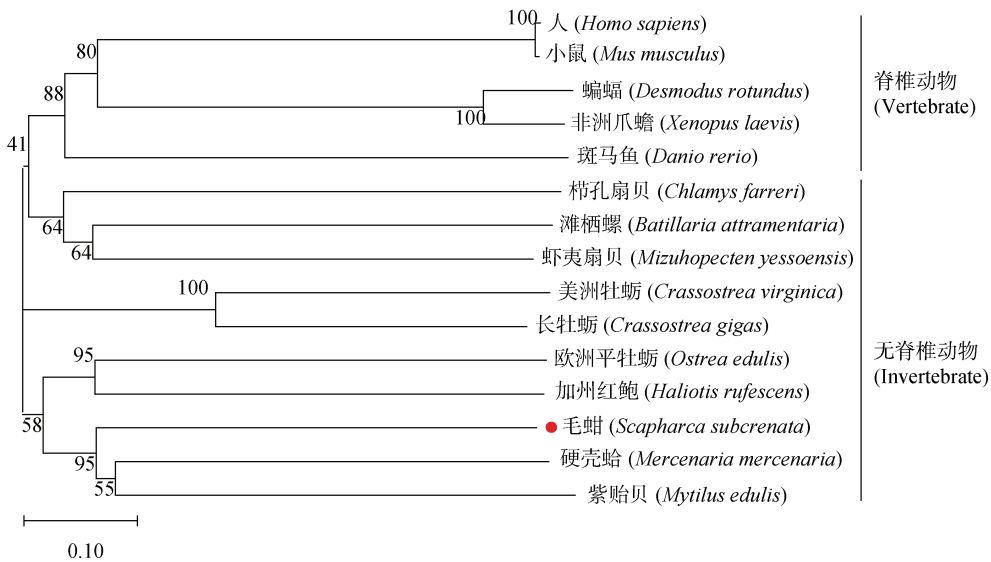


图 5 不同物种 ClqDCs 蛋白的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of ClqDCs proteins from different species

注: 利用 MEGA-X 软件, 采用邻接法构建系统进化树, 重复 1000 次。ClqDCs 的物种和登录号如下: 人(NP_852100.3); 小鼠(NP_112150.1); 蝙蝠(XP_0244_25520.1); 非洲爪蟾(XP_018122782.1); 斑马鱼(XP_009296972.1); 虾夷扇贝(XP_021374682.1); 滩栖螺(KAG5686619.1); 太平洋牡蛎(XP_034333860.1); 长牡蛎(XP_022291269.1); 红鲍(XP_046377716.2); 欧洲平牡蛎(CAG2203397.1); 紫贻贝(CAG2203397.1); 硬壳蛤(XP_045158489.1)

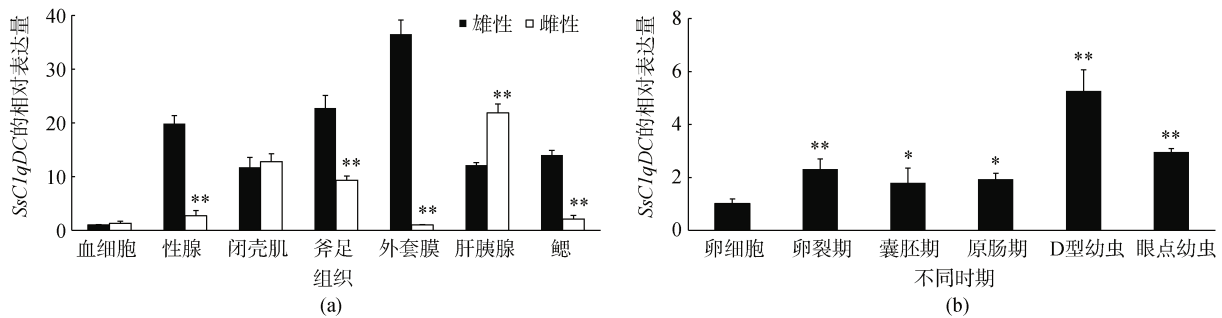


图 6 *SsClqDC* 在不同组织(a)和胚胎时期(b)的表达模式(平均值±标准差, $n=3$)

Fig. 6 Expression profiles of *SsClqDC* in different tissues (a) and at early development stages (b) (Mean±SD, $n=3$)

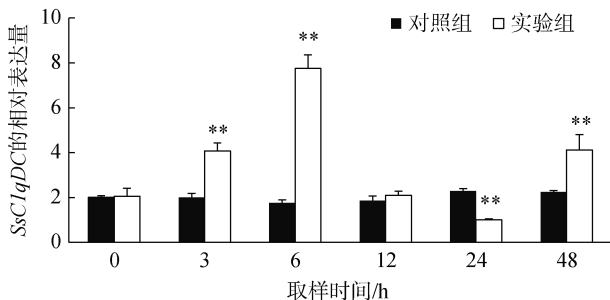


图 7 弧菌刺激后 *SsClqDC* 的表达情况(平均值±标准差, $n=3$)

Fig. 7 The expression profile of *SsClqDC* in ark shell hemocytes challenged with *V. parahaemolyticus* (Mean±SD, $n=3$)

2.5 毛蚶 *SsClqDC* 基因 siRNA 的干扰效率

合成的 *SsClqDC*-siRNA 的干扰效率见图 8。与注射随机打乱序列的 siRNA 对照组相比, 毛蚶注射 *SsClqDC*-siRNA 后 12 和 24 h 血细胞中 *SsClqDC* 基因干扰效果显著($P < 0.01$), 干扰效率分别为 64.9% 和 59.9%。因此, 选择注射 *SsClqDC*-siRNA 后 12 h 的血细胞用于后续实验分析。

2.6 敲降 *SsClqDC* 基因后免疫相关基因的表达情况

敲降 *SsClqDC* 基因的表达后, 母源性免疫基因

Vg、*LSZ*、*Dscam*、*TEP*、*SsClqDC-1* 的表达显著下调($P<0.01$), 而 *C3*、*PAF3*、*SsClqDC-2* 和 *SsClqDC-3* 的表达显著上调($P<0.01$), 其中 *C3* 和 *PAF3* 基因的表达量约是对照组的两倍(图 9)。

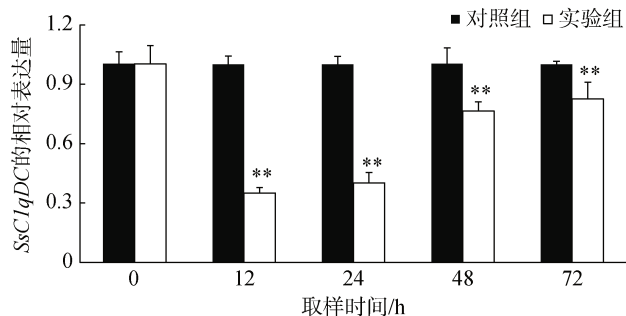


图 8 注射 siRNA 对 *SsClqDC* 基因的干扰效率(平均值±标准差, $n=3$)

Fig. 8 The silencing efficiency of siRNA on transcription level of *SsClqDC* (Mean±SD, $n=3$)

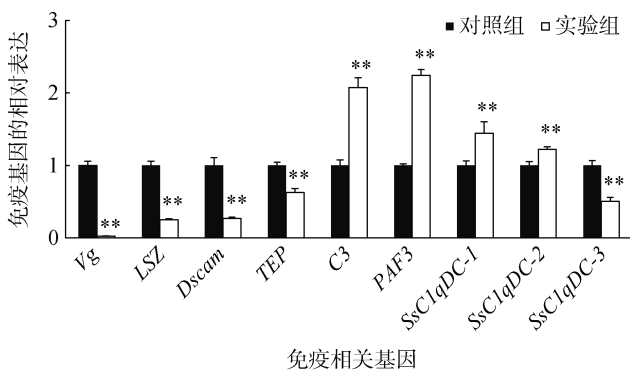


图 9 敲降 *SsClqDC* 后免疫相关基因的表达情况(平均值±标准差, $n=3$)

Fig. 9 Expression analyses of immune-related genes in the *SsClqDC*-silenced ark shell mediated by siRNA (Mean±SD, $n=3$)

2.7 敲降 *SsClqDC* 基因表达对弧菌刺激后毛蚶的血细胞凋亡、吞噬活性、血细胞总数及存活率的影响

如图 10a 所示, 敲降 *SsClqDC* 基因的表达, 副溶血弧菌刺激后实验组毛蚶血细胞的凋亡率在 6 h 显著高于对照组($P<0.05$), 并维持较高的凋亡水平到 72 h; 实验组毛蚶血细胞的吞噬率在 12 和 24 h 显著低于对照组($P<0.05$), 与弧菌刺激前相比, 48 和 72 h 的实验组和对照组毛蚶血细胞吞噬活力均明显下降(图 10b); 实验组毛蚶血细胞总数在 3 h 后显著低于对照组, 与弧菌刺激前相比, 6 h 后实验组和对照组毛蚶血细胞

总数均明显下降(图 10c); 副溶血弧菌胁迫后实验组的毛蚶的死亡率在 24 h 显著高于对照组, 且其死亡率在 36 h 超过 60%, 在 84 h 全部死亡, 而对照组毛蚶在 36 h 死亡率不到 20%, 在 84 h 仍有超过 20% 的毛蚶存活(图 10d)。

3 讨论

越来越多的研究发现双壳贝类 *ClqDC* 基因具有多种免疫功能, 在对不同病原的免疫防御反应中起重要作用^[7, 9, 11, 14, 22]。本研究从毛蚶中克隆获得一个新的 *ClqDC* 基因(命名为 *SsClqDC*), 多序列比对显示该基因编码的蛋白不保守, 这与水生动物中 *ClqDC* 蛋白序列高度可变性的研究结果一致^[14, 23]。系统进化分析显示 *SsClqDC* 与紫贻贝、硬壳蛤的 *ClqDC* 蛋白聚为一支, 然后与其他软体动物 *ClqDC* 聚成一大支, 表明 *SsClqDC* 是软体动物 *ClqDC* 家族中的新成员。

SsClqDC 基因在毛蚶所有检测的组织中均有表达, 尤其在肝胰腺和鳃等免疫组织中明显高表达, 提示该基因在毛蚶先天免疫中的潜在作用。已有的研究表明, *ClqDC* 基因在双壳贝类不同组织中普遍表达^[23-26], 通常在血细胞中高表达, 然而本研究发现 *SsClqDC* 在毛蚶血细胞中表达量较低, 表明 *ClqDC* 基因在不同物种组织中存在表达差异。毛蚶 *SsClqDC* 蛋白序列存在信号肽, 推测 *SsClqDC* 是一种分泌型蛋白, 可通过开放式循环系统转运至机体的不同组织, 以发挥其免疫功能^[17]。有研究发现成体三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的母源性免疫基因在卵巢中的表达通常显著高于精巢^[27, 28]。本研究中, *SsClqDC* 仅在雌性毛蚶肝胰腺中的表达水平显著高于雄性毛蚶中的表达, 但在雄性鳃、性腺、足和外套膜等组织中的表达显著高于雌性, 这一结果表明 *SsClqDC* 可能不是母源性免疫基因。因为母源的 mRNAs 通常在早期胚胎发育中因为消耗而显著下调表达, 待合子基因组激活后通过转录而显著增加其表达量^[29-31], *SsClqDC-1* 从受精卵到 D 形幼虫阶段的显著上调表达也暗示 *SsClqDC-1* 不是母源基因。

副溶血弧菌刺激后, 毛蚶 *SsClqDC* 的表达量在短时间内显著升高, 并且在 6 h 达到最高值, 提示 *SsClqDC* 是一种可诱导的快速免疫效应分子, 这与马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)感染溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)后的表达模式一致^[32]。通常在清除入侵的病原或外来刺激物

时, C1qDCs 的 mRNA 水平往往呈现先升高后降低的趋势^[23, 31-34]。在本研究中, 副溶血弧菌刺激后毛蚶 *SsClqDC* 基因表达呈先升高后降低而后再升高的变化趋势, *SsClqDC* 基因在 6 h 后表达降低, 可能是负反馈调节机制、抑制因子的产生以及清除被激活的细胞等调控作用造成 *SsClqDC* 基因表达下降^[35, 36]。由于刺激仍

然存在, 免疫细胞可能会形成免疫记忆^[37], 以便更好地应对未来的刺激, 造成 48 h 后 *SsClqDC* 基因表达的再次升高, 暗示该基因在毛蚶血液系统中起到免疫功能调节的作用。此外, 敲降 *SsClqDC* 的表达, 毛蚶在副溶血弧菌刺激后的死亡率显著高于对照组, 这一结果支持上述 *SsClqDC* 参与毛蚶抗弧菌反应的观点。

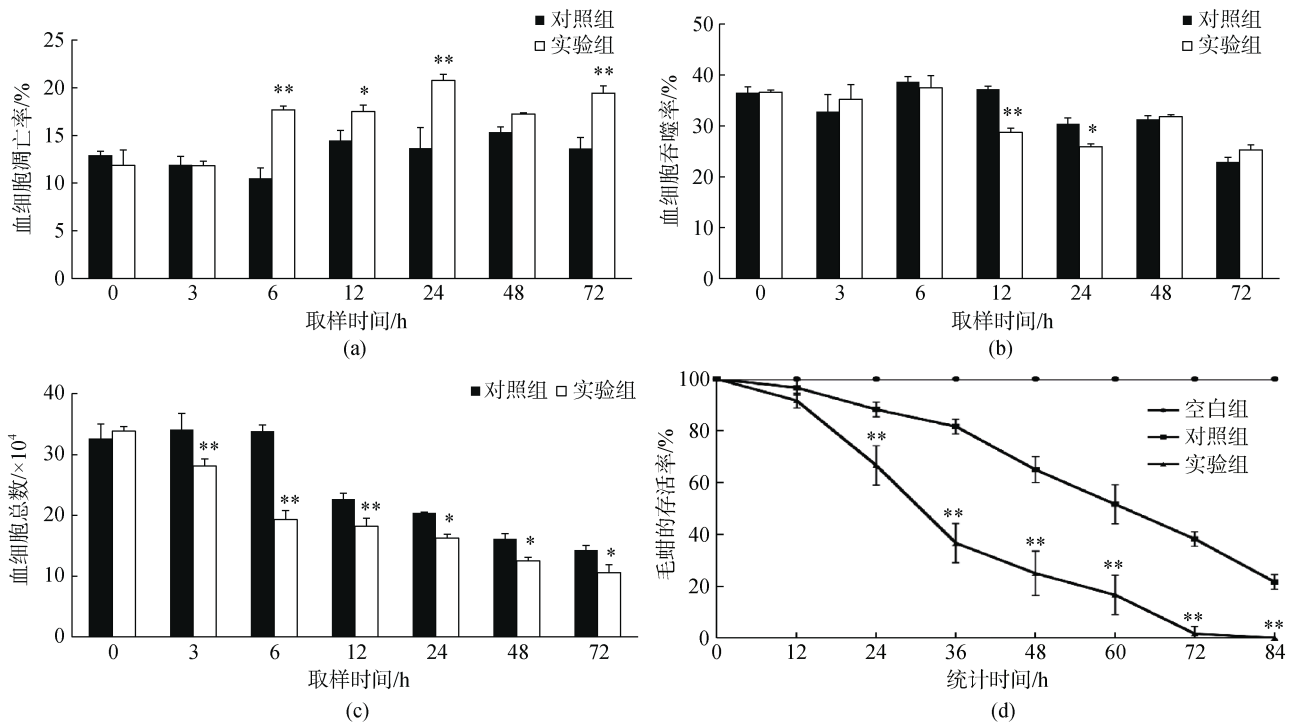


图 10 敲降 *SsClqDC* 基因表达对弧菌刺激后毛蚶的血细胞凋亡率(a)、吞噬率(b)、血细胞总数(c)和毛蚶存活率(d)的影响 (平均值±标准差, $n=3$)

Fig. 10 Changes in apoptosis (a), phagocytosis (b), total hemocyte number (c) and survival rates (d) of *SsClqDC*-knockdowned ark shells after *V. parahaemolyticus* challenge (Mean±SD, $n=3$)

在脊椎动物中, 补体经典途径由补体 C1q 与抗原复合物的相互作用激活并触发 C3 的蛋白水解, 进而清除入侵的病原^[3, 11]。本研究中, 敲降 *SsClqDC* 基因可以影响补体 C3 样基因(如 *C3* 和 *TEP*)的表达, 这与脊椎动物中补体经典途径的激活的调控过程类似, 提示补体的经典激活途径是动物由低等向高等进化过程中逐渐完善而来的。通常双壳类动物缺乏免疫球蛋白, 因此缺少经典的补体途径, 但栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)的 CfC1qDC 蛋白具有与免疫球蛋白 IgG 的结合活性^[14], 推测无脊椎动物 C1qDC 蛋白可能通过凝集素激活途径激活补体系统^[38]。

本研究中, 注射 *SsClqDC*-siRNA 后 12 h 对 *SsClqDC* 基因的干扰效果最佳, 12 h 后干扰效果下降, 可能与 *SsClqDC*-siRNA 在毛蚶体内的浓度降低有关,

这是因为 *SsClqDC*-siRNA 的生物稳定性较差, 可能被毛蚶体内的核酸酶分解^[39]。此外, 由于细胞更新和分裂, 注射的 *SsClqDC*-siRNA 会逐渐稀释, 从而降低对 *SsClqDC* 基因的干扰效率^[40]。因此注射 *SsClqDC*-siRNA 后的干扰效果只能在一定时间内观察到, 随后干扰效果会逐渐降低。 *Vg*、*LSZ*、*Dscam*、*TEP* 和 *C3* 是典型的母源性免疫基因, 在水生动物的早期发育和入侵病原快速清除中发挥重要作用^[17, 28, 41, 42]。本研究中, 除补体 *C3* 外, 敲降 *SsClqDC* 基因表达后, 上述免疫基因的表达均显著下调, 表明 *SsClqDC* 基因可能参与调控毛蚶基础免疫。这与在三疣梭子蟹中的研究结果相一致, 当敲降 *gClqR* 基因表达后, 补体 *C3* 样基因(*alpha-2-macroglobulin* 和 *TEP*)的表达显著上调^[29]。

吞噬作用作为免疫细胞的第一道防线,具有识别、吞噬和清除外源异物或自身凋亡细胞的作用^[43]。先前的研究表明, C1qDCs 可以作为调理素促进后生动物的吞噬作用^[12, 32, 44]。本研究中, 敲降毛蚶 *SsC1qDC* 基因的表达后, 副溶血弧菌刺激后血细胞的吞噬率显著下降, 提示 *SsC1qDC* 可能参与调节毛蚶血细胞的吞噬作用。这与马氏珠母贝中敲降 *Pf-ghC1q* 基因表达能明显降低血细胞吞噬作用的结果一致^[23]。同时, 已有文献报道双壳类的 C1qDC 蛋白可参与病原的识别, 从而直接增强其血细胞的吞噬作用^[12, 17, 22]。

在软体动物的免疫反应中, 细胞凋亡通过应激信号或吞噬作用清除受损、衰老和受感染的细胞, 并引发凋亡细胞死亡^[45]。本研究中, 敲降 *SsC1qDC* 基因表达可显著提升毛蚶血细胞的凋亡水平, 从而导致血细胞总数和吞噬活力的显著降低。此外, 当外界胁迫超过动物的耐受极限后, 随着胁迫的持续, 胁迫损伤变得不可修复, 最终导致动物死亡^[46]。本研究发现, 敲降 *SsC1qDC* 表达, 副溶血弧菌刺激后毛蚶的死亡率显著高于对照组, 表明 *SsC1qDC* 在毛蚶抗弧菌感染中具有关键作用。

在三疣梭子蟹中的研究中发现, PtgC1qR 可在蛋白和转录水平上抑制其酚氧化酶原激活系统^[29]。在本研究中, 敲降 *SsC1qDC* 基因显著增强了 *PAF3* 的表达, 提示 *SsC1qDC* 基因可能通过酚氧化酶原激活系统参与毛蚶的体液免疫。有关毛蚶 *SsC1qDCs* 与下游调控基因及效应分子之间的调控关系有待于进一步研究。

4 结论

综上, 本研究克隆获得了毛蚶 *SsC1qDC* 基因的 cDNA 全长序列, 并分析了该基因在响应主要病原感染后的功能特征。*SsC1qDC* 的表达量从毛蚶卵细胞到眼点幼虫期随发育阶段显著增加, 该基因在成体毛蚶各组织广泛表达且可被副溶血弧菌诱导高表达。敲降 *SsC1qDC* 基因表达后, 母源免疫相关基因的表达受到显著影响。此外, 与对照组相比, 副溶血弧菌攻毒后 *SsC1qDC* 基因干扰实验组的毛蚶死亡率和血细胞凋亡水平显著升高, 因此导致其血细胞总数和吞噬活力显著降低。结果表明, *SsC1qDC* 基因可能参与了毛蚶抗弧菌感染免疫防御反应。

参考文献:

[1] KISHORE U, REID K B M. C1q: structure, function, and receptors[J]. Immunopharmacology, 2000, 49(1/2):

159-170.
 [2] GABORIAUD C, THIELENS N M, GREGORY L A, et al. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle[J]. Trends in Immunology, 2004, 25(7): 368-373.
 [3] GHAI R, WATERS P, ROUMENINA L T, et al. C1q and its growing family[J]. Immunobiology, 2007, 212(4-5): 253-266.
 [4] CARLAND T M, GERWICK L. The C1q domain containing proteins: Where do they come from and what do they do? [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(8): 785-790.
 [5] KISHORE U, GHAI R, GREENHOUGH T J, et al. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q[J]. Immunology Letters, 2004, 95(2): 113-128.
 [6] ADZIGBLI L, HAO R, JIAO Y, et al. Immune response of pearl oysters to stress and diseases[J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(2): 513-523.
 [7] ZHU L, GAO Y Y, YUAN G L, et al. 2021. Identification and immune functional analysis of a novel C1q domain-containing protein in Yellow River Carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Aquaculture, 534: 736313.
 [8] HU Y L, PAN X M, XIANG L X, et al. Characterization of C1q in teleosts: insight into the molecular and functional evolution of C1q family and classical pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(37): 28777-28786.
 [9] GAO Z, LI M Y, MA J, et al. An *amphioxus* gC1q protein binds human IgG and initiates the classical pathway: implications for a C1q-mediated complement system in the basal chordate[J]. European Journal of Immunology, 2014, 44(12): 3680-3695.
 [10] MATSUSHITA M, MATSUSHITA A, ENDO Y, et al. Origin of the classical complement pathway: lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(27): 10127-10131.
 [11] WANG L L, WANG L L, ZHANG H, et al. A C1q domain containing protein from scallop *Chlamys farreri* serving as pattern recognition receptor with heat-aggregated IgG binding activity[J]. PLoS One, 2012, 7 (8): e43289.
 [12] LV Z, WANG L L, JIA Z H, et al. Hemolymph C1qDC promotes the phagocytosis of oyster *Crassostrea gigas* hemocytes by interacting with the membrane receptor β -integrin[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 98: 42-53.
 [13] LIANG X R, XIONG X W, CAO Y F, et al. Globular C1q domain-containing protein from *Pinctada fucata martensii* participates in the immune defense process[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 123: 521-527.
 [14] BOHLSON S S, RASER D A, TENNER A J. Complement

- proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(1-3): 33-43.
- [15] JIANG S, LI H, ZHANG D X, et al. A C1q domain containing protein from *Crassostrea gigas* serves as pattern recognition receptor and opsonin with high binding affinity to LPS[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 583-591.
- [16] TAHTOUH M, CROP F, VIZIOLI J, et al. Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46: 523-531.
- [17] LI D, WAN Z, LI X J, et al. Alternatively spliced down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) controls innate immunity in crab[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(44): 16440-16450.
- [18] MORISS K M, ADEN D P, KNOELES B B, et al. Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2[J]. *The Journal of clinical investigation*, 1982, 70(4): 906-913.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] SCHUTTE B, NUYDENS R, GEERTS H, et al. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1998, 86(1): 63-69.
- [21] DELAPORTE M, SOUDANT P, MOAL J, et al. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species-*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(17): 3053-3064.
- [22] JIANG S, LI H, ZHANG D, et al. A C1q domain containing protein from *Crassostrea gigas* serves as pattern recognition receptor and opsonin with high binding affinity to LPS[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 583-591.
- [23] WANG J, THAIMUANGPHOL W, CHEN Z, et al. A C1q domain-containing protein in *Pinctada fucata* contributes to the innate immune response and elimination of the pathogen[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 131: 582-589.
- [24] GERDOL M, MANFRIN C, DE MORO G, et al. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a widespread and diverse family of immune-related molecules[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(6): 635-643.
- [25] GERDOL M, GRECO S, PALLAVICINI A. Extensive tandem duplication events drive the expansion of the C1q-domain-containing gene family in bivalves[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(10): 583.
- [26] GERDOL M, VENIER P, PALLAVICINI A. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in bivalvia[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(1): 59-71.
- [27] NING J H, LIU Y, GAO F T, et al. 2019. Characterization and functional analysis of a novel gC1qR in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 970-978.
- [28] NING J H, LIU Y, CUI Z X. Identification and functional analysis of a thioester-containing protein from *Portunus trituberculatus* reveals its involvement in the prophenoloxidase system, phagocytosis and AMP synthesis[J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 9-21.
- [29] 宁军号. 三疣梭子蟹补体样分子结构及免疫功能研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2019. NING Junhao. Study on complement-like molecular structure and immune function of *Portunus trituberculatus*[D]. Qingdao: Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, 2019.
- [30] TADROS W, LIPSHITZ H D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts[J]. *Development*, 2009, 136: 3033-3042.
- [31] WALSER C B, LIPSHITZ H D. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition[J]. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2011, 21(4): 431-443.
- [32] WANG Z L, WANG B, CHEN G et al. An alpha-2 macroglobulin in the pearl oyster *Pinctada fucata*: characterization and function in hemocyte phagocytosis of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 585-594.
- [33] ZHU L, GAO Y, YUAN G et al. Identification and immune functional Analysis of an novel C1q domain-containing protein in Yellow River carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736313.
- [34] DU X, WANG G H, YUE B, et al. A novel C1q domain containing protein in black rockfish (*Sebastes schlegelii*) serves as a pattern recognition receptor with immunoregulatory properties and possesses binding activity to heat-aggregated IgG[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 73-81.
- [35] PERRIMON N, MCMAHON A P. Negative feedback mechanisms and their roles during pattern formation[J]. *Cell*, 1999, 97(1): 13-16.
- [36] SANCHEZ-MARTIN A, SANCHON-SANCHEZ P, ROMERO M R, et al. Impact of tumor suppressor genes inactivation on the multidrug resistance phenotype of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 165: 115209.
- [37] WERONIKA R, PAULINA N, BEATA T, et al. Immunological memory cells[J]. *Central-European Journal of*

- Immunology, 2018, 43(2): 194-203.
- [38] ENDO Y, TAKAHASHI M, FUJITA T. Lectin complement system and pattern recognition[J]. Immunobiology, 2006, 211(4): 283-293.
- [39] LIEBERMAN J, SONG E, LEE S, et al. Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference[J]. Trends in Molecular Medicine, 2003, 9(9): 397-403.
- [40] CASTANOTTO D, ROSSI J J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics[J]. Nature, 2009, 457(7228): 426-433.
- [41] MATSUMOTO T, YAMANO K, KITAMURA M, et al. Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2008, 149(3): 293-298.
- [42] WANG Z P, ZHANG S C, TONG Z, et al. Maternal transfer and protective role of the alternative complement components in zebrafish *Danio rerio*[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4498.
- [43] STUART L M, EZEKOWITZ R A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(2): 131-141.
- [44] NEPOMUCENO R R, HENSCHEN-EDMAN A H, BURGESS W H, et al. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qRP, the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in *vitro*[J]. Immunity, 1997, 6(2): 119-129.
- [45] TERAHARA K, TAKAHASHI K G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs[J]. Current Pharmaceutical Design, 2008, 14(2): 131-137.
- [46] YANG C Y, GAO Q, LIU C, et al. The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against acute heat stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 68: 132-143.

A novel C1q domain-containing gene (*SsC1qDC*) from *Scapharca subcrenata* participates in the immune defense against pathogen infection

PENG Qiang^{1, 2, 3}, WANG Jin-jing², WANG Chun-de², LU Xia², LIU Xiang-quan³, LIU Gui-long⁴, XU Xin⁴, XU He^{5, 6}, NING Jun-hao²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 3. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 4. Yantai Spring-Sea AquaSeed Co., Ltd., Yantai 264006, China; 5. Jiangsu Baoyuan Biotechnology Co., Ltd., Lianyungang 222144, China; 6. Jiangsu Haitai MariTech Co., Ltd., Lianyungang 222144, China)

Received: May 18, 2023

Key words: *SsC1qDC*; *Scapharca subcrenata*; expression profiles; RNA interference; immune defense

Abstract: The C1q domain-containing proteins (C1qDCs) have been demonstrated to play crucial roles in the immune responses of invertebrates, with very few reports in the ark shells. In the present study, a C1qDC gene with a typical C1q domain (designated as *SsC1qDC*) was identified from the ark shell *Scapharca subcrenata* and its possible immune responses against pathogen infection was also characterized. The full-length cDNA sequence of *SsC1qDC* was 711 bp, encoding a peptide of 199 amino acids with an N-terminal signal peptide. *SsC1qDC* was clustered with the C1qDCs from bivalves in the phylogenetic tree. *SsC1qDC* was widely expressed in the tissues, with the high expression level in hepatopancreas and adductor muscles. The expression of *SsC1qDC* was increased significantly from eggs to eye-point larvae stage and induced remarkably by *Vibrio parahaemolyticus* infection. Moreover, compared to the controls, knockdown of *SsC1qDC* resulted in a remarkable increase of mortality and apoptotic levels of ark shells after *V. parahaemolyticus* challenge, and thus a significant reduction of total number and phagocytosis of hemocytes. Meanwhile, knockdown of *SsC1qDC* could significantly inhibit the expression of maternally derived immune-related genes (*Vg*, *LSZ*, *Dscam*, *TEP* and *SsC1qDC-3*), while the expression of *C3*, *PAF3*, *SsC1qDC-1* and *SsC1qDC-2* was up-regulated remarkably. Taken together, these results suggested that *SsC1qDC* performs crucial roles in immune defense against pathogen infection in ark shells, which is of great guiding significance to the immunology of shellfish and the breeding of new disease-resistant strains.

(本文编辑: 谭雪静)