

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221025003

http://www.yykxjz.cn/

常松欢, 王嘉利, 许建, 张瀚元, 张天杨, 江炎亮. 鲤多拷贝基因 *MRC1* 的全基因组鉴定及表达分析. 渔业科学进展, 2024, 45(1): 85–94

CHANG S H, WANG J L, XU J, ZHANG H Y, ZHANG T Y, JIANG Y L. Genome-wide identification and expression analysis of duplicated *MRC1* gene in *Cyprinus carpio*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(1): 85–94

## 鲤多拷贝基因 *MRC1* 的全基因组鉴定及表达分析\*

常松欢<sup>1,2</sup> 王嘉利<sup>1,2</sup> 许建<sup>3</sup> 张瀚元<sup>2</sup> 张天杨<sup>2</sup> 江炎亮<sup>2①</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 农业农村部水生生物基因组学重点实验室 北京 100141; 3. 中国水产科学研究院渔业工程研究所 北京 100141)

**摘要** 甘露糖受体 C1 型基因(mannose receptor C-type 1, *MRC1*)是 C 型凝集素超家族的成员之一, 其编码的甘露糖受体是一种模式识别受体, 在先天免疫反应中发挥关键作用。*MRC1* 基因在哺乳动物免疫反应中的作用被广泛研究, 但在鱼类中的研究较少。近年来, 随着高密度集约化养殖模式的发展, 由病原微生物引发的疾病频繁暴发, 其中, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是常见的致病菌之一。本研究首次在鲤(*Cyprinus carpio*)全基因组范围鉴定 *MRC1* 基因, 共发现 11 个基因拷贝, 并进行了功能域预测、共线性分析、多序列比对和系统进化分析, 结果表明, *MRC1* 基因在物种进化过程中保守程度较高。拷贝数比较分析发现, *MRC1* 基因在不同物种中表现出不同程度的多拷贝现象, 在多数鱼类中发现 2 个拷贝, 而在鲤中发现多达 11 个拷贝。同时, 比较了各拷贝在健康鲤脑、肌肉、肝脏和脾脏组织中的表达情况, 发现在免疫相关组织脾脏中的表达量相对高于其他组织。进一步对感染嗜水气单胞菌 4、12、24 h 后在鲤脾脏中的表达进行差异比较分析, 发现不同拷贝的表达特征各有差异, 其中, HHLG13g0734 在感染嗜水气单胞菌 4 h 后表达显著上调, HHLG13g0734 在感染 24 h 后表现出极显著上调, HHLG3g0497 在整个感染过程中表达显著下调, 表明鲤 *MRC1* 基因只有部分拷贝保留了免疫相关功能及参与机体的免疫反应。本研究结果有助于进一步了解鲤 *MRC1* 基因在抵抗嗜水气单胞菌感染过程中发挥的免疫功能, 并为分子选育抗病新品系提供一定的数据基础。

**关键词** 鲤; 甘露糖受体 C1 型; 多拷贝基因; 系统进化树; 嗜水气单胞菌

**中图分类号** S964 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)01-0085-10

鲤(*Cyprinus carpio*)是欧洲和亚洲地区重要的大宗淡水养殖鱼类, 具有肉质好、耐寒性强、食物转化效率高等优良性状, 在全球 100 多个国家广泛养殖。FAO 发布报告显示, 全球鲤年产量为 418.95 万 t, 约占全球淡水水产养殖总量的 7.7% (FAO, 2020)。近年来, 随着高密度集约化养殖模式的大范围推广, 集约

化养殖对水产动物产生的环境压力导致鱼类容易感染各种疾病病原体, 包括病毒、细菌、真菌和寄生虫等, 导致各类传染病的频繁暴发, 给水产养殖业造成了巨大的经济损失(Talwar *et al.*, 2018)。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是水产养殖中最为常见的致病菌之一, 可引发多种淡水鱼类暴发细菌性败血症,

\* 农业农村部财政专项“黄河渔业资源与环境调查”(HHDC-2022-06)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD24)共同资助。常松欢, E-mail: 1670654961@qq.com

① 通信作者: 江炎亮, 副研究员, E-mail: jiangyl@cafs.ac.cn

收稿日期: 2022-10-25, 收修改稿日期: 2022-12-05

包括草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) (Yin *et al.*, 2021)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Pachanawan *et al.*, 2008)、鲤(Stratev *et al.*, 2015)等, 且流行地域广、致死率高, 严重危害水产养殖业的发展(Jones *et al.*, 1995)。

甘露糖受体 C1 型基因(mannose receptor C-type 1, *MRC1*)是 C 型凝集素超家族(C-type lectin superfamily)中甘露糖受体家族(MR family)的成员之一, 主要表达于巨噬细胞和树突状细胞的细胞膜表面(Stahl *et al.*, 1998)。其结构包含胞外区、跨膜区和胞质区, 其中胞外区由 3 个典型的结构域组成: 8~10 个串联排列的 C 型碳水化合物识别域(C-type carbohydrate recognition domain, CRD), 1 个 II 型纤连蛋白重复区(Fibronectin repeats type II, FN II)和 1 个富含半胱氨酸的胞外区(Cysteine-rich, CR) (Napper *et al.*, 2001)。*MRC1* 基因编码的甘露糖受体是一种模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 通过胞外结构域能够广泛识别并结合多种配体, 通过与配体之间的相互作用促进或抑制 TNF- $\alpha$  (Xu *et al.*, 2010)、IL-1 $\beta$ 、IL-6 (Yamamoto *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2005)等多种促炎症细胞因子的表达, 同时, 甘露糖受体参与介导吞噬细胞对病原体的吞噬, 在抗病原感染和维持内环境稳态中发挥重要作用(Kerrigan *et al.*, 2009)。由于其在先天免疫反应中发挥的关键作用, 在人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物中已有深入研究, 但在鱼类中所做的工作相对较少。目前, 在斑马鱼(*Danio rerio*) (Zheng *et al.*, 2015)、草鱼(Wang *et al.*, 2014)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (Dong *et al.*, 2016)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (Fontenla *et al.*, 2016)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (Liu *et al.*, 2014)等鱼类中已成功克隆出甘露糖受体基因。Liu 等(2014)发现, 甘露糖受体在团头鲂的主要免疫相关组织脾脏和头肾中具有明显较高的表达水平; Dong 等(2016)在对弧菌(*Vibrio*)感染大黄鱼的研究中同样发现, *MRC1* 基因在感染弧菌的大黄鱼肝脏、脾脏和肾脏中均显著上调表达, 表明甘露糖受体可能在鱼类免疫反应中发挥关键作用。Zhang 等(2005)研究促炎细胞因子的释放调控发现, 甘露糖受体对人类肺泡巨噬细胞促炎细胞因子的释放有负调节作用。另外, 有报道显示, 促炎因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的释放需要 *MRC1* 和 *TLR4* (Toll 样受体 4)的协同作用(Sulek *et al.*, 2007; Tachado *et al.*, 2007)。Wu 等(2018)在检测嗜水气单胞菌感染后团头鲂主要免疫组织中甘露糖受体基因 *MRC1*、促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和抗炎因子 AGR 的时间表达时发现, 感染细菌后 *MRC1* 在组织中出现高表

达, 促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  在前 6 h 的浓度也明显更高, 随后 TNF- $\alpha$  的表达降低, 但同时抗炎细胞因子 ARG2 表达逐渐升高并在 12 h 达到峰值。这些研究表明, *MRC1* 可能参与调控促炎因子 TNF- $\alpha$  和抗炎因子 AGR 的释放, 进而在鱼类抵抗病原感染的免疫反应中发挥作用。

本研究首次从鲤全基因组资源中鉴定出 *MRC1* 基因的 11 个拷贝, 开展基因结构预测、系统进化分析和共线性分析, 并进一步检测和比较鲤 *MRC1* 基因各拷贝在多个健康鱼组织以及感染嗜水气单胞菌后不同时间点的脾脏中的表达情况, 旨在为今后深入研究鲤 *MRC1* 基因的抗病相关功能及分子选育抗病新品系提供必要的数据库。

## 1 材料与方法

### 1.1 *MRC1* 基因序列获得和蛋白结构预测

利用本课题组已有的鲤全基因组资源并结合转录组数据(NCBI 收录号为 SRP174892、SRP072018) (Xu *et al.*, 2019), 鉴定出全部 *MRC1* 基因, 并提取出基因所在位置上下游 $\pm 2\ 000$  bp 的基因组 DNA 序列, 利用 FGESH (Salamov *et al.*, 2000)和 BLAST (Beyer *et al.*, 2007)软件, 逐一重新进行基因结构预测和注释, 并获得对应的氨基酸序列。本研究用到的其他物种包括人、小鼠、原鸡(*Gallus gallus*)、绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)、蜥蜴(*Lacerta agilis*)、非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、青鳞(*Oryzias latipes*)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、大黄鱼、河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)、尼罗罗非鱼、大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、斑马鱼等的 *MRC1* 的氨基酸序列通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>)和 Ensembl 数据库 (<http://www.ensembl.org/index.html?redirect=no>)获得。鲤 *MRC1* 蛋白的结构预测以氨基酸序列作为输入文件, 利用 TBtools 的 Batch SMART 软件完成 (Chen *et al.*, 2020)。

### 1.2 共线性分析

共线性指不同物种间同源基因按保守的顺序排列, 主要是用来描述同一染色体上基因的位置关系, 也就是指由同一祖先型分化而来的不同物种间基因的类型以及相对顺序的保守性(宋驰等, 2010; 周显臻等, 2021)。为理解不同物种基因组间 *MRC1* 基因在进化上的保守性, 通过 NCBI 和 Ensembl 数据库查询不同物种 *MRC1* 上下游基因获得共线性数据。

### 1.3 多序列比对和系统进化分析

使用 NCBI 在线多序列比对工具 COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) 对 14 个物种的 *MRC1* 氨基酸序列进行比对, 比较不同物种与鲤 *MRC1* 蛋白的一致性。使用鲤 *MRC1* 的 11 条拷贝蛋白序列与从 NCBI 和 Ensembl 数据库检索到的代表性脊椎动物的 *MRC1* 氨基酸序列进行系统发育分析, 包括人、小鼠、原鸡、绿头鸭、蜥蜴、非洲爪蟾、青鳉、三刺鱼、大黄鱼、河鲀、尼罗罗非鱼、大西洋鳕鱼、红鳍东方鲀、斑马鱼和鲤 15 个物种的 28 条氨基酸序列。利用 MEGA 11 软件 ClustalW2 程序的默认参数对氨基酸序列补齐并进行多序列比对, 使用基于 JTT 矩阵的方法计算进化距离, 位点间的速率变化采用  $\gamma$  分布构建 Neighbor-Joining (NJ) 树, 并采用 1 000 次重复抽样来评估系统发生树 (Tamura *et al.*, 2021)。

### 1.4 *MRC1* 基因在健康鲤不同组织中的表达

为探究 *MRC1* 基因各拷贝在健康鲤组织中的表达情况, 采集 40 尾黄河鲤的脑、肌肉、肝脏和脾脏组织, 使用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 提取 RNA, 并委托测序公司利用 HiSeq2000 测序平台进行 150PE 的转录组测序。原始转录组测序数据以 fastq.gz 的文件格式储存, 对测序序列进行质量控制便于后续差异基因及表达量的分析, 首先使用 Bowtie2 软件 (<https://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) 对所选的鲤参考基因组建立索引, 使用 Tophat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) 将质控后的 reads 比对到参考基因组上, 使用 Cufflinks (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) 进行基因表达值 (FPKM) 的计算

(Trapnell *et al.*, 2012), 随后提取每个样本中 *MRC1* 各拷贝的表达数据, 使用 R 软件的 ggplot2 扩展包可视化展示 (<http://cran.r-project.org/package=ggplot2>)。

### 1.5 *MRC1* 基因在鲤感染嗜水气单胞菌后不同时期脾脏中的表达分析

本课题组在前期进行了鲤感染嗜水气单胞菌的攻毒实验 (Jiang *et al.*, 2016), 具体过程如下: 将体重为 (180±25) g、体长为 (15±3) cm 的健康鲤随机分为实验组和对照组, 对实验组腹腔注射 100  $\mu$ L 浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的嗜水气单胞菌菌液, 对照组仅注射同等剂量的无菌 PBS。注射完成后开始计时, 分别在 4、12、24 h 采集脾脏组织。实验组和对照组各设 3 组重复, 每个时间点分别随机取 9 条鱼。使用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 提取 RNA, 并委托测序公司进行转录组测序。转录组数据已提交到 NCBI SRA 数据库, 收录号为 SRP072018。数据通过质量控制后进行基因表达值 (FPKM) 的计算。利用 Cuffdiff (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/announcements/cuffdiff2-paper/>) 对测序 reads 进行计数并计算各拷贝的表达量, 同时 Cuffdiff 还可以计算出不同时间点各拷贝的统计学差异, 其主要是通过 RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization, 期望最大化) 算法对转录本进行水平定量, 筛选  $|\log_2(\text{fold change})| > 1.5$  且校正后  $P < 0.05$  的拷贝进行保留。

## 2 结果

### 2.1 鲤 *MRC1* 基因的鉴定和蛋白结构预测

通过搜索基因组数据并重新注释, 在鲤全基因组范围共鉴定出 11 条 *MRC1* 基因序列, 其中, 在鲤 3、

表 1 鲤 *MRC1* 基因各拷贝具体信息  
Tab.1 Detailed information of *MRC1* gene in *Cyprinus carpio*

基因 ID Gene ID	染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End	外显子数 Exon number	内含子数 Intron number
HHLG3g0497	LG3	14 222 255	14 233 285	31	30
HHLG4g0565	LG4	15 417 583	15 430 007	30	29
HHLG7g0562	LG7	17 794 425	17 818 103	6	5
HHLG8g0657	LG8	25 248 854	25 254 564	4	3
HHLG13g0210	LG13	8 394 106	8 398 449	30	29
HHLG13g0734	LG13	27 112 504	27 174 011	13	12
HHLG13g1096	LG13	35 877 554	35 889 293	14	13
HHLG14g0062	LG14	1 887 458	1 905 784	10	9
HHLG31g0289	LG31	10 775 952	10 796 726	10	9
HHLG42g0001	LG42	10 891	30 765	50	49
HHLG42g0228	LG42	5 715 282	5 720 812	12	11

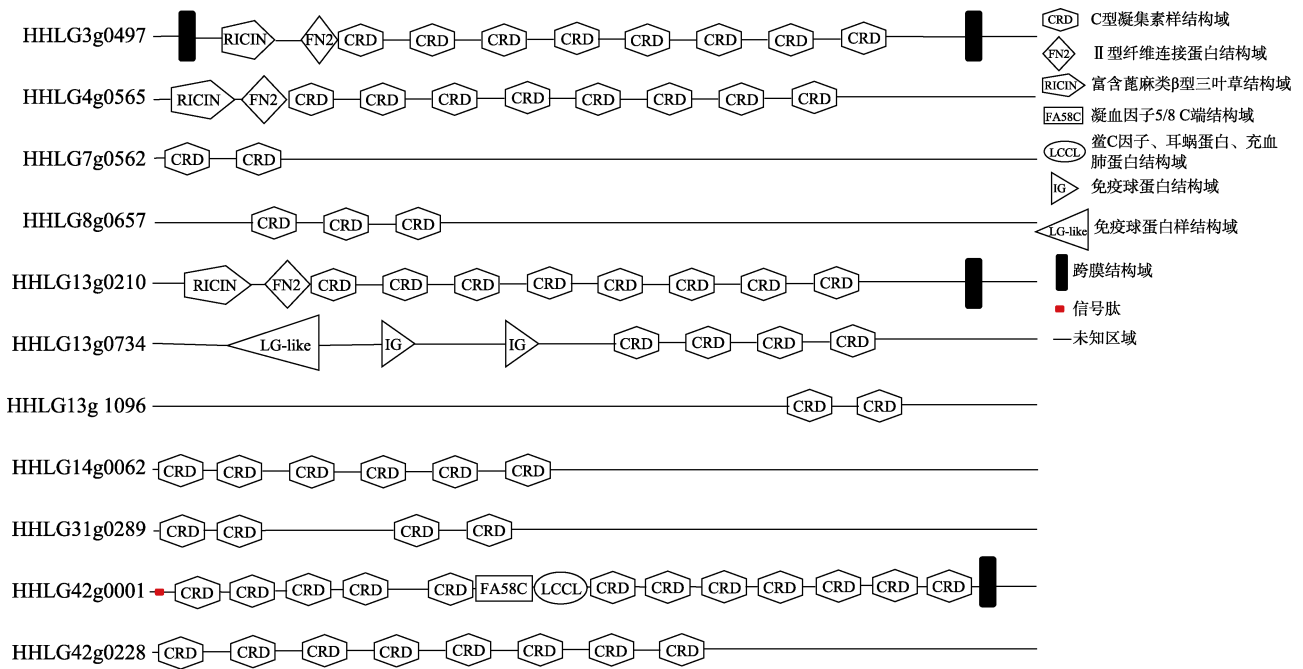


图 1 鲤 *MRC1* 基因不同拷贝蛋白结构域分析  
Fig.1 Protein domain prediction of *MRC1* in *C. carpio*

4、7、8、14、31 号染色体上各找到 1 条序列，42 号染色体上找到 2 条，13 号染色体上找到 3 条。鲤 *MRC1* 基因各拷贝的信息详见表 1。进而对 *MRC1* 基因 11 个拷贝的蛋白结构域进行了预测，结果如图 1 所示，其中，HHLG3g0497、HHLG4g0565 和 HHLG13g0210 的蛋白结构高度相似，包含甘露糖受体蛋白的关键结构域，即 8 个串联排列的 CRD 结构域和 1 个 FN2 结构域，该结果与大黄鱼 *MRC1* 结构域预测相一致；HHLG42g0001 的预测结构包含 1 个信号肽、12 个 CRD 结构域、1 个 FA58C 结构域和 1 个 LCCL 结构域；而其他各拷贝预测到 2~8 个数目不等的 CRD 结构域。

## 2.2 *MRC1* 基因拷贝数比较和共线性分析

*MRC1* 基因在鲤基因组中存在多拷贝现象，与人、小鼠、原鸡、绿头鸭、蜥蜴、非洲爪蟾、青鳉、红鳍东方鲀、斑马鱼等 15 个代表性物种的 *MRC1* 基因拷贝数进行比较，发现在不同物种中 *MRC1* 基因出现了不同程度的多拷贝现象。如表 2 所示，*MRC1* 基因在大部分的物种中为单拷贝，在硬骨鱼中的三刺鱼、大西洋鲑鱼和斑马鱼中存在 2 个拷贝，而在鲤中则存在多达 11 个拷贝。

为了更好地理解不同物种 *MRC1* 基因的同源性以及在基因组上的保守性，对人、小鼠、原鸡、爪蟾、蜥蜴、红鳍东方鲀、斑马鱼和鲤 8 个物种的 *MRC1* 基因进行共线性分析(图 2)。由于鲤染色体和斑马鱼

染色体呈现典型的 2 : 1 同源共线性关系，优先选择对应斑马鱼 2 号染色体 *MRC1-b* 基因所在染色体的鲤 3、4 号染色体上结构完整且氨基酸序列较长的 HHLG3g0497 和 HHLG4g0565 这 2 个拷贝来分析。从分析结果可以看出，*MRC1* 基因在进化上具有相对较高的保守性。与 *MRC1* 基因关联性最强的是钙离子

表 2 鲤和其他物种 *MRC1* 基因拷贝数比较分析

Tab.2 Copy number of *MRC1* gene of *C. carpio* and other species

物种名 Species	拷贝数 Copy No.
人 <i>Homo sapiens</i>	1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	1
绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	1
蜥蜴 <i>Lacerta agilis</i>	1
爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	1
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	2
河鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	1
大西洋鲑鱼 <i>Gadus morhua</i>	2
腔棘鱼 <i>Latimeria chalumnae</i>	1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	1
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	2
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	11

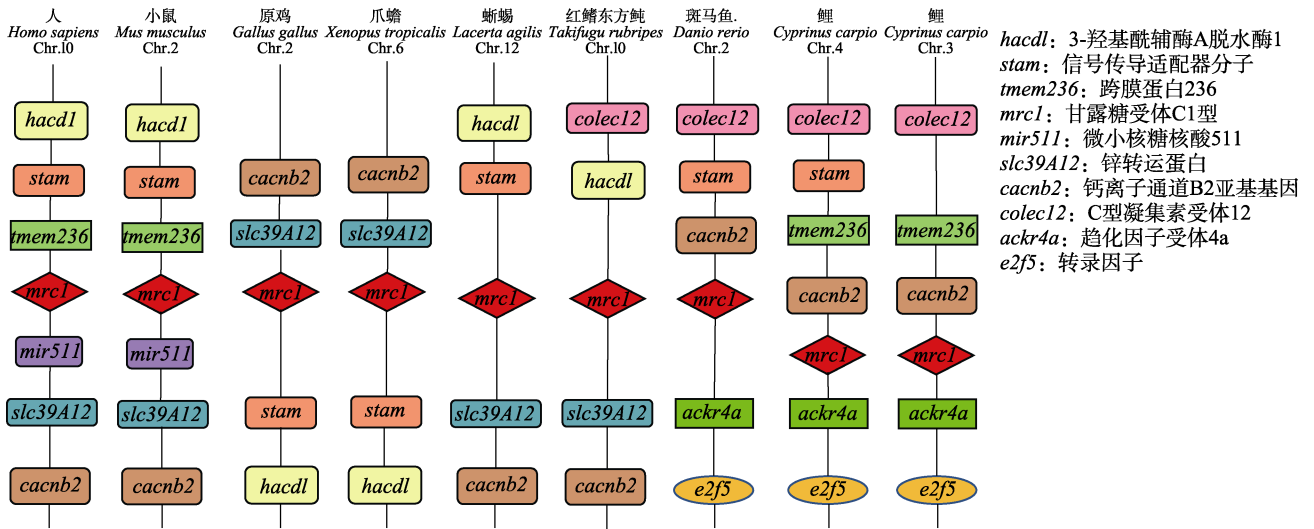


图 2 *MRC1* 基因共线性分析  
Fig.2 Synteny of genes neighboring *MRC1*

通道 B2 亚基基因(*cacnb2*), 存在于人、小鼠、原鸡、爪蟾、蜥蜴、红鳍东方鲀、斑马鱼和鲤 8 个物种中, 并且 *cacnb2* 基因在鲤和斑马鱼基因组上处于一致的位置, 都位于 *MRC1* 基因上游。而在其他物种中 *cacnb2* 基因位于 *MRC1* 基因下游, 这可能是在进化过程中基因出现了易位。C 型凝集素受体 12 基因(*colec12*)、*cacnb2*、非典型趋化因子受体 4a 基因(*ackr4a*)、转录因子 f5 基因(*e2f5*)均存在于鲤和斑马鱼 *MRC1* 基因上下游。另外, 位于鲤 4 号染色体上的 *MRC1* 上下游的基因分布和斑马鱼上基因分布高度相似。

### 2.3 *MRC1* 蛋白序列比对和系统进化分析

从 NCBI 和 Ensembl 数据库检索到的几种代表性物种的 *MRC1* 氨基酸序列进行多序列比对和系统发育分析, 包括人、小鼠、原鸡、绿头鸭、蜥蜴、非洲爪蟾、青鳉、三刺鱼的 *MRC1a*, 大黄鱼、河鲀、尼罗罗非鱼、大西洋鲱鱼的 *MRC1a*, 红鳍东方鲀、斑马鱼的 *MRC1a*, 及鲤鱼的 HHLG3g0497, 总计 15 个物种的 28 条蛋白序列。多序列比对结果显示(图 3),

15 个物种的 *MRC1* 氨基酸长度大体一致, 其中, 与鲤 *MRC1* 蛋白一致性最高的是斑马鱼(81.98%), 一致性最低的是蜥蜴(47.58%)。

系统进化分析一定程度上反映 *MRC1* 基因在整个物种进化过程中的差异, 利用 MEGA 11.0 软件构建系统进化树。如图 4 所示, 进化树包括哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和鱼类 5 个分支, 各分支依次聚集在一起。其次鸟类中的鸡和绿头鸭、哺乳类中的人和小鼠亲缘关系最近聚在一起。硬骨鱼类中, 鲤 3、4 号染色体上结构完整的 HHLG3g0497、HHLG4g0565 两个拷贝与大西洋鲱鱼的 *MRC1b* 拷贝、斑马鱼的 *MRC1b* 拷贝、三刺鱼的 *MRC1b* 拷贝聚集为一个亚分支。鲤 HHLG13g0210 拷贝与斑马鱼的 *MRC1a* 拷贝聚为一支, 同时和其他硬骨鱼类聚成一个亚分支。

### 2.4 *MRC1* 在健康黄河鲤肝脏、脾脏、肌肉和脑组织中的表达

*MRC1* 在健康黄河鲤脑和肌肉组织中各拷贝表达情况高度相似, 表达较高的分别是 HHLG3g0497、

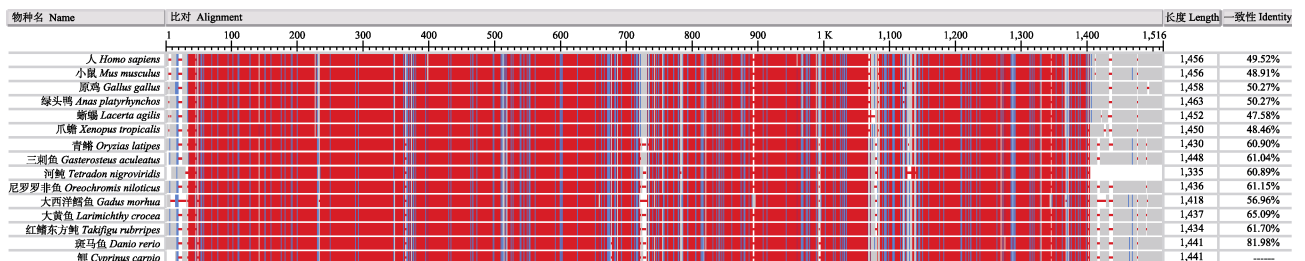


图 3 鲤 *MRC1* 蛋白与其他物种的序列比对  
Fig.3 Alignment of *MRC1* among *C. carpio* and other species

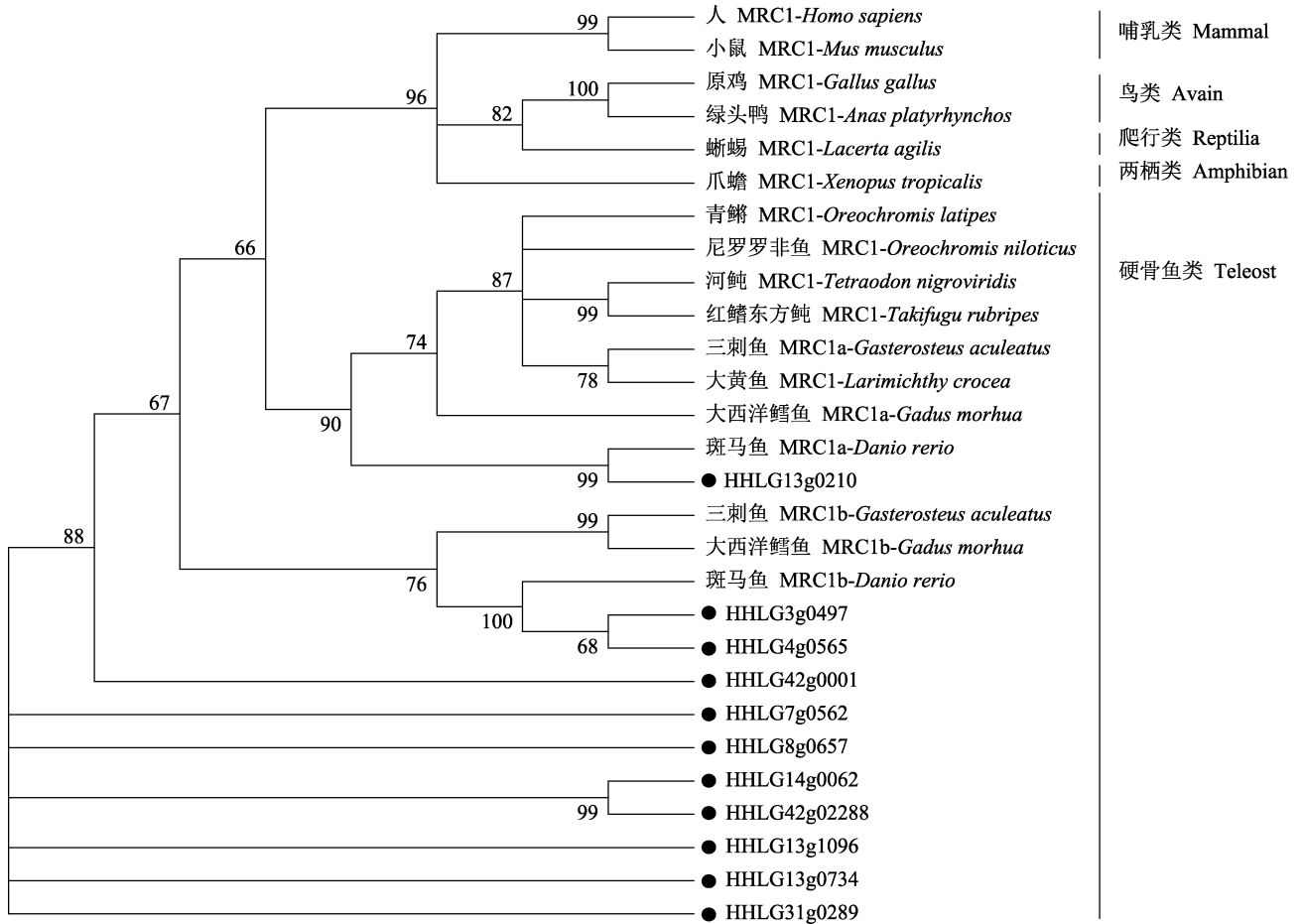


图4 MRC1蛋白的系统进化树  
Fig.4 Phylogenetic tree of MRC1 proteins

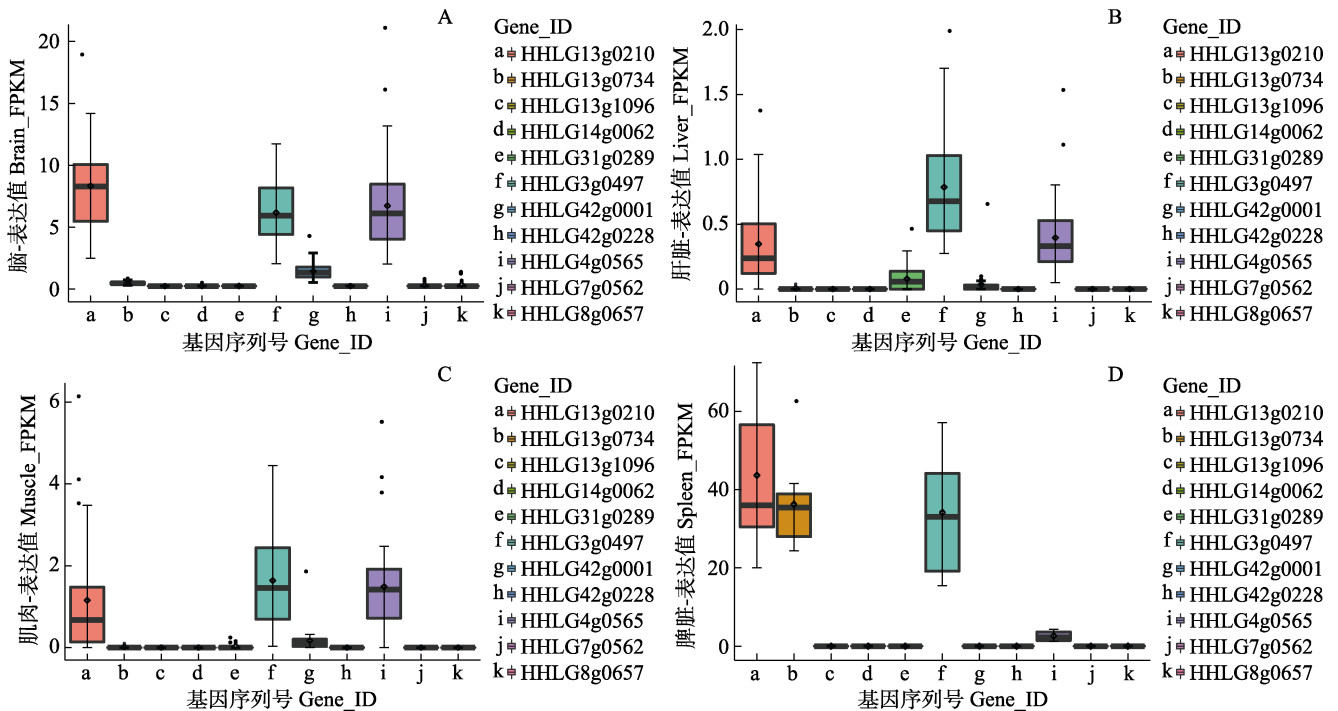


图5 MRC1基因在健康鲤脑(A)、肝脏(B)、肌肉(C)和脾脏(D)组织中的表达  
Fig.5 Expression of MRC1 genes in healthy *C. carpio* brain (A), liver (B), muscle (C) and spleen (D)

HHLG4g0565、HHLG13g0210 和 HHLG42g0001, 其他 7 个拷贝在健康鲤脑和肌肉组织中表达量非常低或者不表达。在肝脏组织中, 表达量较高的拷贝分别为 HHLG3g0497、HHLG4g0565、HHLG13g0210 和 HHLG31g0289。在脾脏组织中, HHLG3g0497、HHLG4g0565、HHLG13g0210 和 HHLG13g0734 拷贝的表达量较高(图 5)。总体来说, *MRC1* 基因在健康黄河鲤脾脏中的表达量相对高于在其他 3 种组织中的表达量。

## 2.5 *MRC1* 在鲤感染嗜水气单胞菌后不同时期脾脏中的差异表达分析

通过使用 Cuffdiff 计算转录本的表达量, 同时计算出 *MRC1* 基因各拷贝在感染嗜水气单胞菌 4、12、24 h 后的表达差异, 筛选出显著差异表达的拷贝。结果发现(图 6), HHLG13g0734 在感染细菌 4 h 后显著上调( $P < 0.05$ ), 感染 24 h 后表现出极显著的上调( $P < 0.001$ ); 而 HHLG3g0497 在感染细菌 4、12、24 h 后表现出极显著的下调( $P < 0.001$ )。

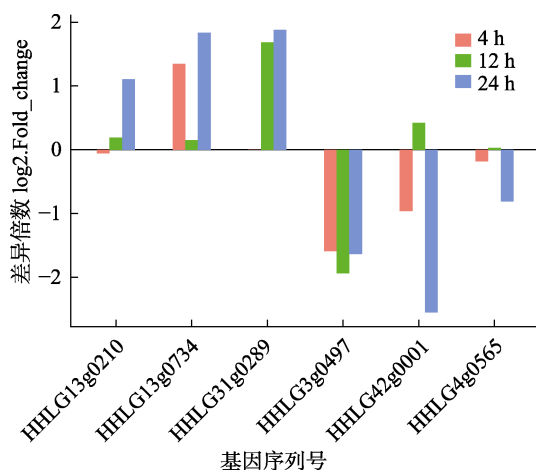


图 6 感染嗜水气单胞菌 4、12、24 h 后不同拷贝的表达分析  
Fig.6 Expression analysis of *MRC1* genes at 4 h, 12 h and 24 h after *Aeromonas hydrophila* infection

## 3 讨论

嗜水气单胞菌是一种常见的革兰氏阴性菌, 也是典型的人-畜-鱼共患病病原菌, 可以侵染人类、爬行动物和鱼类, 引起多种水产动物的败血症(Boulanger *et al.*, 1977; Pasquale *et al.*, 1994)和人类的腹泻(Davis *et al.*, 1978)。甘露糖受体(MR)是一种 C 型凝集素, 也是一种模式识别受体, 能够识别各种病原体的表面多糖, 在先天免疫和获得性免疫中都发挥重要作用(Gazi *et al.*, 2009)。Sallusto 等(1995)证明人类外周血

单核细胞会发展成树突状细胞向 T 细胞提供可溶性抗原, 在确定抗原捕获机制时发现 MR 在低密度配体情况下连续向细胞输送大量配体, 表明 MR 的特异性和对炎症刺激的反应能力提高了免疫过程中抗原呈递的能力。同时有研究表明, 人类甘露糖受体 C1 型(*hMRC1*)可以增强 HIV-1 与巨噬细胞的结合并有助于抑制 HIV-1 病毒的释放(Nguyen *et al.*, 2003; Sukegawa *et al.*, 2018)。目前, 在鱼类中克隆了模式物种和几种经济物种的 *MRC1* 基因全长, 但对其抗病机制以及在抗炎症过程中的作用研究较少。为了深入探究鲤 *MRC1* 基因的结构和功能特点及其在感染嗜水气单胞菌过程中的表达情况, 本研究从鲤基因组中鉴定得到 11 个 *MRC1* 基因拷贝, 并分析了序列结构、系统进化及其在进化过程中的保守程度, 同时还探究了各拷贝在健康鲤各组织以及受嗜水气单胞菌感染后不同阶段的表达情况。

不同物种 *MRC1* 的多拷贝现象和共线性结果体现了硬骨鱼类和其他物种之间的进化差异。基因多拷贝是基因和基因组复制的结果。在物种进化过程中, 基因和基因组复制被认为对物种多样性起着重要作用。脊椎动物早期进化经历了两轮全基因组复制, 为多样性提供了原材料(Zhang, 2003)。比较基因组研究发现, 硬骨鱼的辐鳍鱼纲发生了第 3 次基因组复制即鱼类特异性基因组重复(Meyer *et al.*, 2005)。鲤是一种异源四倍体硬骨鱼类, 除经历了硬骨鱼类共有的第 3 轮全基因组复制事件外, 还经历了特有的第 4 轮全基因组复制事件。最新的研究表明, 鲤第 4 轮全基因组复制事件大约发生在 820 万年前, 全基因组复制直接导致基因拷贝的增加(Xu *et al.*, 2019)。本研究发现, *MRC1* 基因在多种硬骨鱼包括其他鲤科鱼类中出现多拷贝现象, 支持硬骨鱼类较四足动物多经历了一轮基因组加倍的观点。其中, 鲤 *MRC1* 基因在全基因组范围多达 11 个拷贝, 与异源四倍体鲤鱼经历了特有的第 4 轮全基因组复制事件的观点相一致。共线性分析结果发现, 位于鲤 4 号染色体的 *MRC1* 基因 HHLG4g0565 上下游的基因分布与斑马鱼几乎一致, *colec12*、*cacnb2*、*ackr4a* 和 *e2f5* 均存在于鲤和斑马鱼 *MRC1* 基因上下游, 距离鲤 *MRC1* 基因上游最近的是 *cacnb2* 和 *tmem236*, *cacnb2* 也是人、小鼠、蜥蜴、红鳍东方鲀、斑马鱼共有的基因, 表明基因在基因组复制过程中可能会出现一定程度的差异保留和丢失(Brunet *et al.*, 2006)。与 *MRC1* 基因关联较强的基因中, *ackr4a* 同样具有免疫相关功能, 参与鱼类抵御细菌感染的先天免疫反应, 能有效抑制下游炎症因子

(IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ )的表达(陈亚, 2022), 而另一基因 *colec12* 也参与宿主对病原体的防御反应(Suzuki *et al.*, 1997)以及细菌感染后宿主的免疫识别和免疫清除(Feng *et al.*, 2016), 表明 *MRC1* 基因所在区域可能形成了一定的基因功能区, 参与机体的免疫反应。

鲤 *MRC1* 基因各个拷贝在相同组织中的表达各有差异, 表明各拷贝可能具有不同的功能。其中, HHLG3g0497、HHLG4g0565、HHLG13g0210 等拷贝在不同组织中均高表达, 推测这几个基因可能广泛存在于鲤各组织中, 参与维持机体内环境稳态。此外, 各基因拷贝在脾脏中的表达量相对高于其他组织。脾脏是鱼类主要的免疫器官之一, 由此推测, 鲤 *MRC1* 基因极有可能参与机体的免疫反应。在其他鱼类中也得到相似结果, 比如团头鲂 *MRC1* 在主要免疫相关组织脾脏和头肾中的表达明显高于其他组织(Liu *et al.*, 2014), 感染嗜水气单胞菌后, *MRC1* 在脾脏中显著上调(Wu *et al.*, 2018)。*MRC1* 基因在感染了弧菌的大黄鱼脾脏中同样显著上调表达(Dong *et al.*, 2016)。本研究进一步检测了鲤 *MRC1* 基因各拷贝在感染嗜水气单胞菌后不同时期的脾脏中的表达, 并进行了差异比较分析。结果发现, 不同的拷贝表现不同的表达特征, 比如 HHLG3g0497 在感染细菌 4、12、24 h 持续表现出极显著下调, 而 HHLG13g0734 在感染细菌 4 h 后显著上调, 12 h 时表达差异不明显, 24 h 时再次表现出极显著上调。这个结果暗示 HHLG3g0497 和 HHLG13g0734 两个基因拷贝可能参与了鲤抵抗嗜水气单胞菌感染的免疫反应。我们推测, 这可能是由于在进化过程中 *MRC1* 经全基因组复制产生的各个基因拷贝出现了亚功能化或去功能化(Guo *et al.*, 2011), 其中只有部分拷贝保留了免疫相关功能。

本研究初步揭示了鲤 *MRC1* 的多拷贝现象, 为更深入地了解 *MRC1* 基因在鲤感染嗜水气单胞菌后的免疫反应中的作用提供了分子基础, 为嗜水气单胞菌引起的鱼类疾病防控策略的制定提供了基础理论参考。但由于对各拷贝在细菌感染过程中具体引起了哪些抗炎症因子的变化并不清楚, 因此, 后续需要进一步探究感染过程中各拷贝和抗炎症因子(如 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等)的时空表达及相互作用。

## 参 考 文 献

- BEYER D, THOMAS A H, RANJIT J, *et al.* The software model checker Blast. International Journal on Software Tools for Technology Transfer, 2007, 9(5/6): 505–525
- BOULANGER Y, LALLIER R, COUSINEAU G. Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. Canadian Journal of Microbiology, 1977, 23(9): 1161–1164
- BRUNET F G, HUGUES R C, PARIS M, *et al.* Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(9): 1808–1816
- CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194–1202
- CHEN Y. Regulation mechanisms of the *Miichthys miiuy* *eIF3k* and *ackr4a*-mediated autophagy in NF- $\kappa$ B signaling. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2022 [陈亚. 鲢鱼 *eIF3k* 和 *ackr4a* 介导的自噬在调控 NF- $\kappa$ B 信号通路中的机制研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2022]
- DAVIS W A, KANE J G, GARAGUSI V F, *et al.* Human *Aeromonas* infections: A review of the literature and a case report of endocarditis. Medicine, 1978, 57(3): 267–277
- DONG X L, LI J J, HE J Y, *et al.* Anti-infective mannose receptor immune mechanism in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Fish and Shellfish Immunology, 2016, 54: 257–265
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in Action, 2020
- FENG S S, JIANG Y L, ZHANG S H, *et al.* Genome wide identification of scavenger receptors class A in common carp (*Cyprinus carpio*) and their expression following *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 54: 60–67
- FONTENLA F, NOIA M, LEIRO J M, *et al.* The turbot macrophage mannose receptor: Phylogenetic analysis, functional characterization and changes in gene expression during vaccination and infection with *Philasterides dicentrarchi*. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 53: 121–122
- GAZI U, MARTINEZ-POMARES L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. Immunobiology, 2009, 214(7): 554–561
- GUO B C, WAGNER A, HE S. Duplicated gene evolution following whole-genome duplication in teleost fish. Gene Duplication, 2011, 27–36
- JIANG Y L, FENG S S, ZHANG S H, *et al.* Transcriptome signatures in common carp spleen in response to *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 57: 41–48
- JONES B L, WILCOX M H. *Aeromonas* infections and their treatment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1995, 35(4): 453–461
- KERRIGAN A M, BROWN G D. C-type lectins and phagocytosis. Immunobiology, 2009, 214(7): 562–575
- LIU X L, TANG X C, WANG L, *et al.* Molecular cloning and



- expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(7): 4601–4611
- MEYER A, VAN DE PEER Y. From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 2005, 27(9): 937–945
- NAPPER C E, DYSON M H, TAYLOR M E. An extended conformation of the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(18): 14759–14766
- NGUYEN D G, HILDRETH J E K. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *European Journal of Immunology*, 2003, 33(2): 483–493
- PACHANAWAN A, PHUMKHACHORN P, RATTANACHAI-KUNSOPON P. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 419–424
- PASQUALE V, BALODA S B, DUMONTET S, *et al.* An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(5): 1678–1680
- SALAMOV A A, SOLOVYEV V V. Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Research*, 2000, 10(4): 516–522
- SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C, *et al.* Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 1995, 182(2): 389–400
- SONG C, WANG Y. Microsynteny analysis of tomato and peach genome. *Hereditas*, 2010, 32(9): 966–973 [宋弛, 王瑛. 番茄和桃基因组的微同线性研究. *遗传*, 2010, 32(9): 966–973]
- STAHL P D, EZEKOWITZ R A B. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 50–55
- STRATEV D, DASKALOV H, VASHIN I. Characterisation and determination of antimicrobial resistance of beta-haemolytic *Aeromonas* spp isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Revue De Medecine Veterinaire*, 2015, 166(1/2): 54–61
- SUKEGAWA S, MIYAGI E, BOUAMR F, *et al.* Mannose receptor 1 restricts HIV particle release from infected macrophages. *Cell Reports*, 2018, 22(3): 786–795
- SULEK J, WAGENAAR R A, SHIREMAN J, *et al.* Increased expression of the collagen internalization receptor uPARAP/Endo180 in the stroma of head and neck cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2007, 55(4): 347–353
- SUZUKI H, KURIHARA Y, TAKEYA M, *et al.* A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 1997, 386(6622): 292–296
- TACHADO S D, ZHANG J M, ZHU J P, *et al.* Pneumocystis-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 81(1): 205–211
- TALWAR C, NAGAR S, LAL R, *et al.* Fish gut microbiome: Current approaches and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 2018, 58(4): 397–414
- TAMURA K, STECHER J, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022–3027
- TRAPNELL C, POBERTS A, GOFF L, *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 2012, 7(3): 562–578
- WANG L, LIU L C, ZHOU Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Developmental Comparative Immunology*, 2014, 43(1): 54–58
- WU C S, ZHAO X H, BABU V S, *et al.* Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 52–59
- XU P, XU J, LIU G J, *et al.* The allotetraploid origin and asymmetrical genome evolution of the common carp *Cyprinus carpio*. *Nature Communications*, 2019, 10: 4625
- XU X L, XIE Q M, SHEN Y H, *et al.* Involvement of mannose receptor in the preventive effects of mannose in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 641(2/3): 229–237
- YAMAMOTO Y, KLEIN T W, FRIEDMAN H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infection and Immunity*, 1997, 65(3): 1077–1082
- YIN L C, XU W T, LIU X L, *et al.* Autophagy promotes innate defense against *Aeromonas hydrophila* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) monocytes or macrophages. *Aquaculture*, 2021, 535: 736391
- ZHANG J M, TACHADO S D, PATEL N, *et al.* Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release *in vitro*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005, 78(3): 665–674
- ZHANG J Z. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18(6): 292–298
- ZHENG F F, ASIM M, LAN J F, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebrafish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*.

International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(5): 10997–11012  
 ZHOU X Z, YAO S H, LI J W, *et al.* Analyses of gene duplication and synteny in *Melampsora larici-populina*

(Pucciniales, Basidiomycota). *Mycosystema*, 2021, 40(3): 580–591 [周显臻, 姚诗幻, 李嘉雯. 落叶松–杨栅锈菌基因复制事件及共线性分析. *菌物学报*, 2021, 40(3): 580–591]

(编辑 冯小花)

## Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Duplicated *MRC1* Gene in *Cyprinus carpio*

CHANG Songhuan<sup>1,2</sup>, WANG Jiali<sup>1,2</sup>, XU Jian<sup>3</sup>, ZHANG Hanyuan<sup>2</sup>, ZHANG Tianyang<sup>2</sup>, JIANG Yanliang<sup>2①</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 3. Fisheries Engineering Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

**Abstract** Mannose receptor C-type 1 (*MRC1*) is a member of the C-type lectin superfamily that encodes the mannose receptor. This pattern recognition receptor plays a key role in the innate immune response. The role of the *MRC1* gene in the immune response of mammals has been extensively investigated but less so in fish. The emergence of high-density intensive culture in recent years has increased the frequency with which diseases caused by pathogenic microorganisms have occurred. *Aeromonas hydrophila* is one of the most prevalent pathogenic bacteria. In this study, 11 copies of the *MRC1* gene were identified in *Cyprinus carpio* for the first time. Domain prediction, collinearity analysis, multiple sequence alignment, and phylogenetic analysis were conducted. The results showed that the *MRC1* gene has been highly conserved during evolution. We found that the *MRC1* gene exhibited varying degrees of the multicopy phenomenon in different species, ranging from 2 copies in most fish to 11 copies in *C. carpio*. Simultaneously, the expression level of each copy in the brain, muscle, liver, and spleen tissues of healthy carp was examined and compared. It was discovered that immune-related tissue expression was relatively higher in the spleen than that in other tissues. Further comparative analysis of expression in the spleen at 4 h, 12 h, and 24 h after infection with *A. hydrophila* revealed that the expression characteristics of different copies were distinct, with the expression of HHLG13g0734 being significantly up-regulated after 4 h of infection, HHLG13g0734 being significantly up-regulated after 24 h of infection, and HHLG3g0497 being significantly down-regulated throughout the infection. It indicated that only a portion of the *MRC1* gene of *C. carpio* retained immune-related functions and participated in the immune response. Our findings contribute to a better understanding of the immune function of the *MRC1* gene during the process of defending against *A. hydrophila* infection and serve as a fundamental data reference for the molecular-assisted breeding of new disease-resistant strains.

**Key words** *Cyprinus carpio*; Mannose receptor C type 1; Duplicated gene; Phylogenetic tree; *Aeromonas hydrophila*

① Corresponding author: JIANG Yanliang, E-mail: jiangyl@cafs.ac.cn