



草鱼 C5a、C5aR 和 F II 多克隆抗体的制备与表达特性

苏杭, 肖调义*, 许宝红*, 刘巧林, 吕丽刚, 刘益

(湖南农业大学, 湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128)

摘要: 为研究草鱼补体蛋白 5a (complement component 5a, C5a)、补体蛋白 5a 受体 (C5a receptor, C5aR) 和凝血因子 II (blood coagulation factor II, F II) 在感染草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 时的蛋白表达和相互作用, 针对草鱼 C5a 和 F II 蛋白构建了原核表达体系、针对草鱼 C5aR 蛋白构建 C5aR-KLH 偶联物, 纯化蛋白, 免疫日本大耳白兔制备 3 种蛋白的多克隆抗体。用蛋白质印迹 (Western blot)、免疫共沉淀 (Co-IP) 和拉下 (pull down) 实验检测 3 种蛋白表达与互作关系, Western blot 结果显示, C5a 和 C5aR 在健康草鱼的肝脏、脾脏、肾脏、头肾、肠、鳃和肌肉中均有蛋白表达, F II 在肝脏、脾脏和肠中表达, 而在肾脏、头肾、鳃和肌肉中不表达; 在感染 GCRV 的草鱼肝脏组织中 C5a、C5aR 和 F II 蛋白均随病程进展呈现上升趋势。Co-IP 结果显示, 在 GCRV 处理后, C5a、C5aR 和 F II 蛋白具有相互作用关系。pull down 结果显示, C5a pull down 共鉴定得到 C3、RIG-I 等 28 种候选蛋白, C5aR pull down 共鉴定得到转醛醇酶、巨球蛋白等 24 种候选蛋白。该研究为深入探讨 C5a、C5aR 和 F II 互作调控关系以及进一步探索补体和凝血级联系统中 3 个关联蛋白响应 GCRV 感染的作用机制奠定了基础。

关键词: 草鱼; C5a; C5aR; F II; 多克隆抗体; 草鱼呼肠孤病毒 (GCRV); 表达特性

中图分类号: S 941

文献标志码: A

先天性免疫是鱼体对抗外界刺激的“第一道防线”, 补体系统与凝血系统在鱼体抗病毒过程中发挥重要作用^[1-3]。补体系统在机体感染早期大量激活^[4], 补体 5 (complement component 5, C5) 被大量激活为补体活性分子 C5a^[5-6]。C5a 是一种强过敏毒素, 同时可增强机体的免疫应答。C5a 可直接作用于肥大细胞, 引起血管扩张及局部水肿^[7-8]。大量的 C5a 可以诱导中性粒细胞产生趋化作用^[9]。高浓度的 C5a 可以促进溶酶体酶释放^[10], 加快氧化代谢进程, 刺激中性粒细胞黏附, 增强其产生超氧化物的能力^[11]。C5a 释放后会与其受体 (C5a receptor, C5aR) 结合, 通过激活 T、B 细胞和中性粒细胞等释放细胞因子, 从而诱导 IL-1、IL-8

及 TNF- α 等炎症因子的大量表达^[12], 在机体炎症中发挥关键作用^[13-14]。凝血系统是机体凝血的主要作用机制, 在病毒感染期间被激活, 参与机体的免疫反应^[15]。凝血因子 II 是凝血系统中的重要因子, 又称凝血酶原, 主要在肝脏中产生^[16]。当机体受到病毒刺激, F II 被凝血酶原酶复合物激活为细胞表面的凝血酶^[17], 凝血酶将纤维蛋白原转化为纤维蛋白, 并激活凝血因子 V、VII、VIII 和 X III, 从而维持血液稳态、引起炎症和促进伤口愈合^[18-19]。

研究表明, 在高等哺乳动物全身性的炎症反应中, 补体系统与凝血系统之间存在诸多相互作用^[20-22]。在传统观点中, C5 的活化必须经由补体

收稿日期: 2021-11-19 修回日期: 2022-02-06

资助项目: 国家自然科学基金 (U20A2063); 湖南省自然科学基金青年项目 (2019JJ50265)

第一作者: 苏杭 (照片), 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: suhang913@stu.hunau.edu.cn

通信作者: 肖调义, 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: tiaoyixiao@hunau.edu.cn;

许宝红, 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: 195463778@qq.com



的三大途径(经典途径、凝集素途径、旁路途径)才能产生 C5a^[1],但在补体系统与凝血系统的作用下,凝血酶能够有效地裂解 C5 形成 C5a^[23-24],从而加速补体系统的激活。且在凝血酶激活纤溶抑制物的存在下,C5a 的趋化作用减弱,诱导的中性粒细胞迁移减少^[25]。这两种级联系统之间的作用并非是单向,即 C5a 的存在能够诱导嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等细胞上组织因子(tissue factor, TF)的表达和活性,触发固有的凝血途径^[26]。C5 的活化也能够导致 F II 裂解为凝血酶^[27],在使用凝血酶抑制剂的人类血液模型中,C5a 诱导的单核细胞被激活从而使 F II 裂解^[28]。与哺乳动物相比,鱼类关于 C5a、C5aR 和 F II 的研究大多集中在独立的分子克隆、结构分析与组织分布等方面。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)中均克隆得到了 C5 和 C5aR^[29-32]。虹鳟通过重组 C5a 蛋白证明,硬骨鱼类 C5a 对外周血和头肾白细胞有较强的趋化作用,并能诱导细胞内的呼吸爆发^[33]。对草鱼 C5a 的前期研究发现,草鱼感染出血病后,C5 mRNA 与 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 等炎症因子都相似的表达规律^[29]。草鱼和条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)也克隆得到了 F II^[19, 34]。

基于以上研究进展可知,鱼类具有与哺乳动物类似的 C5a、C5aR 和 F II 蛋白并参与鱼类的炎症反应,但是否具有与哺乳动物相类似的 C5a、C5aR 和 F II 相互作用尚未可知。为明晰三者草鱼感染草鱼呼肠孤病毒(GCRV)时的蛋白表达和相互作用,研究利用原核表达和构建血蓝蛋白(KLH)偶联物 2 种方式免疫日本大耳白兔(*Oryctolagus cuniculus*),成功制备草鱼 C5a、C5aR 和 F II 多克隆抗体并依靠蛋白质印迹(Western blot)、免疫共沉淀(Co-IP)和拉下(pull-down)实验,初步证明了草鱼 C5a、C5aR 和 F II 之间有相互作用关系,为深入研究草鱼补体和凝血级联系统中 3 个关联蛋白的相互作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验采用湖南省浏阳市乌龙渔场所提供的健康草鱼,鱼体长为(10.0 \pm 1.5)cm;SPF(specific pathogen-free)级日本大耳白兔购自 ABclonal 公司;草鱼肾

脏细胞系(CIK)、人肾上皮细胞系(293T)、GCRV 病毒株 109 和 JX0901 由本实验室保存。

草鱼 cDNA 的制备主要参照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction (TaKaRa, 中国)试剂盒和 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, 美国)逆转录试剂盒说明书。质粒 DNA 小量试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购买于 Axygen 公司;PCR 反应体系、DNA marker、感受态细胞 DH5 α 购买于天根生化科技(北京)有限公司;载体 pET-28a-SUMO 购买于武汉爱博泰克生物科技有限公司;BamH I 酶、Hind III 酶、T4 DNA ligase 购买于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。蛋白纯化试剂盒、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 序列分析与表达质粒构建

从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库中检索到草鱼 C5 (GenBank No. MK256357.1)、C5aR (GenBank No. AZZ09366) 和 F II (GenBank No. KF937688) 蛋白序列,利用 DNA star 软件根据抗原指数、亲水性结构、柔韧性及表面概率结构 4 个参数及特异性、合成难易程度等方面综合分析序列的特点,避开信号肽区域,确定制备多克隆抗体的抗原区域。草鱼 C5aR 的多克隆抗体选取 2-20aa 合成多肽 EGDYLDYGPFD-SNESYSC, 疏基偶联到 KLH 上形成 C5aR-KLH 偶联物作为抗原。草鱼 C5a 多克隆抗体选取 C5 序列 677-747 aa、F II 多克隆抗体选取 29-266 aa 作为抗原区域,根据对应的 cDNA 序列设计引物(表 1)设计并交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。设置扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火温度 58 °C 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 7 min, 得到 C5a 与 F II 蛋白编码基因 PCR 扩增产物。反应结束后,利用 BamH I 和 Hind III 酶对 PCR 目的产物和载体进行酶切,酶切产物用 DNA 产物回收试剂盒。将酶切后的目的产物与载体 pET-28a-SUMO 振荡混匀,短暂离心后放置于 16 °C 的摇床内连接过夜。连接体系:载体 DNA (20 ng/ μ L) 1.0 μ L, 目的片段 (15 ng/ μ L) 5.0 μ L, 10 \times T4 Ligase Buffer 2.0 μ L, T4 Ligase (5 U/ μ L) 1.0 μ L, ddH₂O 2.0 μ L。连接产物加入 50 μ L 的感受态细胞,摇匀后于冰上放置 30 min,随后在 42 °C 水浴中热激 60 s,而后迅速在冰上冷却 5 min。将菌液摇匀涂于含卡那霉素的

固体培养基上,置培养皿于 37 °C 培养基中过夜。每个平板选择 3 个单细胞菌落,分别装在有 2 mL LB 培养基的试管中扩大培养,300 × g 摇床培养

过夜,进行 PCR 鉴定并选择一个阳性克隆菌液(200 μL)送至武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

表 1 C5a 和 F II 引物

Tab. 1 Primers for C5a and F II

引物名称 primers	引物序列(5'→3') primer sequences	扩增片段 amplified fragment
pET-28a-SUMO-C5a-F	TCACCTGACCTGGGGCAAAG	C5 2 029-2 241 bp
pET-28a-SUMO-C5a-R	TGAATTTGCTATAAAGCTCCGT	
pET-28a-SUMO-FII-F	GAACAGATTGGTGGATCCAATAATAAGGAAGCCTCT	FII 85-798 bp
pET-28a-SUMO-FII-R	TGCGGCCGAAGCTTTCCTCCACAATTCTGC	

1.3 抗原蛋白表达与纯化

分别取鉴定正确的 pET-28a-SUMO-C5a 和 pET-28a-SUMO-F II 1 mL 阳性克隆菌液加入 1 μL (1 : 1 000, 体积比) IPTG 中进行诱导表达,2 h 后 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加入 100 μL 的 1 × 磷酸盐缓冲溶液(PBS)悬浮,再加入 50 μL 的 3 × SDS,95 °C 加热 30 min 后聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),进行小规模表达测试。根据检测结果,将小量表达的菌液加入 LB 培养基中,恒温 37 °C 摇床培养 4 h,当 OD 值到达 0.5~0.6 时加入 IPTG (300 μL) 诱导 4 h,收集细菌,超声后离心得到上清液与沉淀。用尿素溶解,吹匀沉淀,进行二次破菌离心得到上清液和包涵体。将上清液和包涵体稀释后进行 SDS-PAGE 电泳确定蛋白表达位置。C5aR 蛋白 N 端多肽由美国 CME 公司的 Liberty 全自动多肽合成仪合成,采用 Fmoc 方法,从 C 端向 N 端合成。将合成完成的多肽溶解于尿素-PBS 缓冲溶液中,疏基偶联到 KLH 上,形成 C5aR-KLH 偶联物。以上重组蛋白经谷胱甘肽琼脂糖亲和层析结合过夜后洗脱进行纯化,SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 草鱼 3 种蛋白的多克隆抗体制备

将得到的蛋白作为抗原用 1 × PBS 稀释到 1 mg/mL,采用皮下多点注射到日本大耳白兔体内。第 1 次免疫,使用完全弗氏佐剂与抗原等量混合,每只注射 0.6 mg。第 2、3、4、5 次免疫,使用不完全弗氏佐剂与抗原等量混合,每只注射 0.3 mg,注射间隔为 2 周。免疫 66 d 后,对日本大耳白兔尾静脉进行采血,分离得到抗血清,将抗血清用蛋白抗原进行抗原亲和纯化,得到抗体,对得到的 C5a、C5aR、F II 抗体进行 1 : 1 000 稀释,利用 CIK 细胞蛋白和 293T 细胞蛋白进行 Western blot 特异性检测。

1.5 Western blot 表达检测

GCRV109 毒株,经腹腔注射注入鱼体(0.1 mL/尾),在攻毒后 0 d、潜伏期、感染期、暴发期、恢复期、痊愈期^[29] 取样,对照组注射同等量的 PBS,每个时间点取 3 尾鱼作为重复。将制备完成的草鱼 C5a、C5aR、F II 多克隆抗体以 1 : 1 000 稀释作为一抗,收集草鱼健康组织肝脏、脾脏、肾脏、头肾、肠、鳃、肌肉以及患草鱼出血病各时期草鱼肝脏组织总蛋白,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后转膜封闭,4 °C 过夜,PBST 清洗,孵育二抗,避光显色,凝胶图像分析。

1.6 3 个蛋白的胞内互作

将 CIK 细胞消化后铺至细胞瓶内,待细胞铺满细胞瓶底约 80%,加入稀释好的 GCRV 病毒(JX-0901),倒置显微镜下观察细胞出现明显细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)时,使用 IP 细胞裂解液(中)提取总蛋白;将 C5a、C5aR、F II 多克隆抗体各 5 μg 分别加入 4 管含有 200 μL CIK 总蛋白的 EP 管中,4 °C 旋转孵育过夜,每 EP 管加入 20 μL protein A+G agarose,室温旋转孵育 2 h 后将混合物 4 °C,3 000 × g 离心 3 min,分离上清 I,每管用 1 mL IP 细胞裂解液洗 3 次,收集最后一次上清 II 和沉淀,加入 5 × SDS 上样缓冲液,置于 PCR 仪中 99.9 °C 变性 10 min;SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后用制备的抗体作为一抗孵育(1 : 1 000, 体积比),以山羊抗兔 IgG (1 : 2 000, 体积比)为二抗,以检测 C5a、C5aR 和 F II 3 个蛋白之间是否在胞内有相互作用。

1.7 3 个蛋白的质谱分析

对 C5a、C5aR 和 F II 抗体孵育过的 protein A+G agarose 以及收集的上清 I 和上清 II 进行 SDS-PAGE

凝胶电泳直至溴酚蓝到达凝胶底部,用考马斯亮蓝快速染液染色 15 min,蒸馏水洗 3~5 次,每次 30 min,将对应的条带送至上海欧易生物医学科技有限公司进行质谱检测,分析与其相互作用的蛋白。

2 结果

2.1 获得 3 个蛋白抗原

以重组质粒 pET-28a-SUMO-C5a、pET-28a-SUMO-F II 为模板,扩增草鱼 C5a、F II 蛋白的编码基因,扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,条带大小约 213 和 714 bp (图 1),与预期大小一致,测序结果与预计序列相符合,说明已经成功克隆到 pET-28a-SUMO 载体 (20 ku) 上。将含有 pET-28a-SUMO-C5a 和 pET-28a-SUMO-F II 质粒的大肠杆菌分别进行 IPTG 诱导,SDS-PAGE 结果显示,pET-28a-SUMO-C5a 和 pET-28a-SUMO-F II 的蛋白分子量大小分别约为 27 和 50 ku,且二者均表达在包涵体中 (图 2)。对纯化的蛋白进行 Western blot,结果显示,可以检测到 pET-28a-SUMO-C5a 和 pET-28a-SUMO-F II 蛋白的特异性条带 (图 3),且纯度较高,可以用于免疫动物。

用 C5aR 多肽偶联的抗原获得化学合成的 C5aR 多肽经纯化后纯度为 98%,交联 KLH 可用于免疫动物。

2.2 抗体制备检测结果

Western blot 检测结果显示,C5a、C5aR、F II 多克隆抗体能在 CIK 细胞蛋白的 8、42 和 50 ku

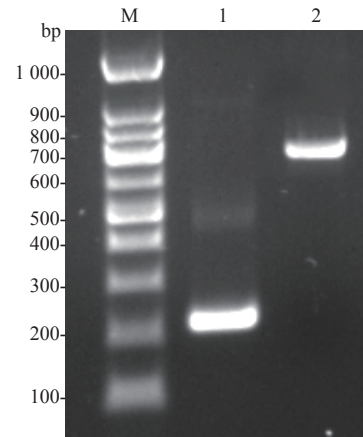


图 1 C5a 与 F II 蛋白编码基因 PCR 扩增产物电泳图
M. DNA 分子量标准; 1. C5a PCR 扩增产物; 2. F II PCR 扩增产物

Fig. 1 Electrophoretic map of PCR amplification products of C5a and F II protein coding gene

M. DNA marker; 1. PCR product of C5a; 2. PCR product of F II

处分别检测到相对单一的对应该条带,而在 293T 细胞蛋白中无抗原抗体结合 (图 4)。结果表明,实验制备的草鱼 C5a、C5aR、F II 多克隆抗体且具有较好的灵敏性。

2.3 Western blot 表达检测结果

结果显示,健康草鱼 7 个组织中,草鱼 C5a 和 C5aR 均有表达 (图 5-a, c),其中 C5aR 蛋白主要在肝脏中表达,且与其他 6 个组织存在显著差异 ($P < 0.05$)。草鱼 F II 在肝脏、脾脏和肠中表达,而在肾脏、头肾、鳃和肌肉中不表达 (图 5-e)。GCRV 感染后,不同时期肝脏中 C5a、C5aR 和

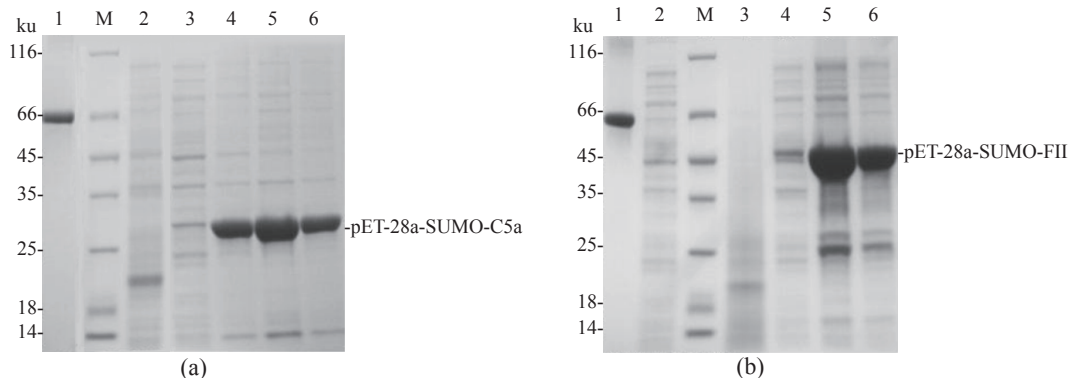


图 2 C5a(a) 和 F II (b) 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定

M. 蛋白分子量标准; 1. 0.4 mg/mL BSA; 2. 上清 I; 3. pET-28a-SUMO 空载诱导表达; 4. 上清 II (2 mol/L 尿素溶解包涵体); 5. 包涵体 2 倍稀释 (8 mol/L 尿素溶解包涵体); 6. 包涵体 5 倍稀释 (8 mol/L 尿素溶解包涵体)

Fig. 2 SDS-PAGE identification of recombinant C5a protein(a) and F II protein(b)

M. protein marker; 1. 0.4 mg/mL BSA; 2. supernatant I; 3. induced pET-28a-SUMO no-load expression; 4. supernatant II (inclusion body in 2 mol/L urea soluble); 5. inclusion body in 2-fold dilution (inclusion body in 8 mol/L urea soluble); 6. inclusion body in 5-fold dilution (inclusion body in 8 mol/L urea soluble)

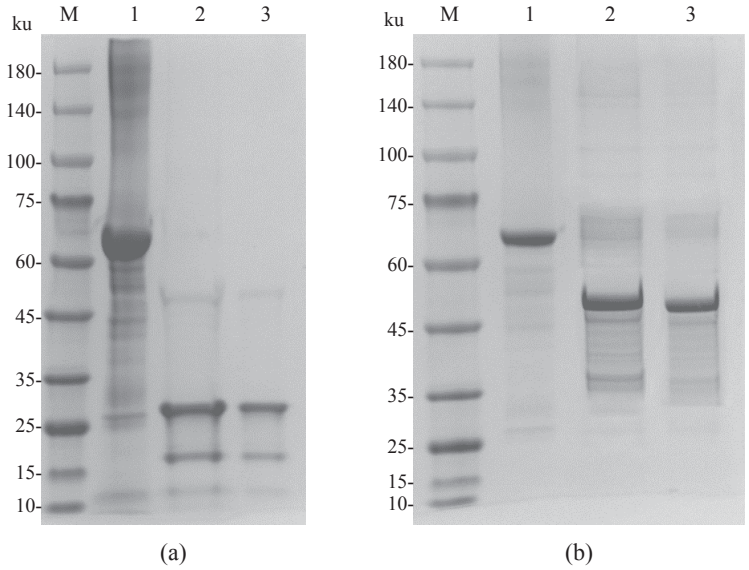


图 3 C5a(a) 和 F II (b) 重组蛋白表达的 Western blot 鉴定

M. 蛋白分子量标准; 1. 0.4 mg/mL BSA; 2. pET-28a-SUMO-C5a 和 pET-28a-SUMO-F II 2 倍稀释; 3. pET-28a-SUMO-C5a 和 pET-28a-SUMO-F II 5 倍稀释

Fig. 3 Western blot identification of recombinant C5a(a) and F II protein(b)

M. protein marker; 1. 0.4 mg/mL BSA; 2. pET-28a-SUMO-C5a and pET-28a-SUMO-F II diluted in 2 folds; 3. pET-28a-SUMO-C5a and pET-28a-SUMO-F II diluted in 5 folds

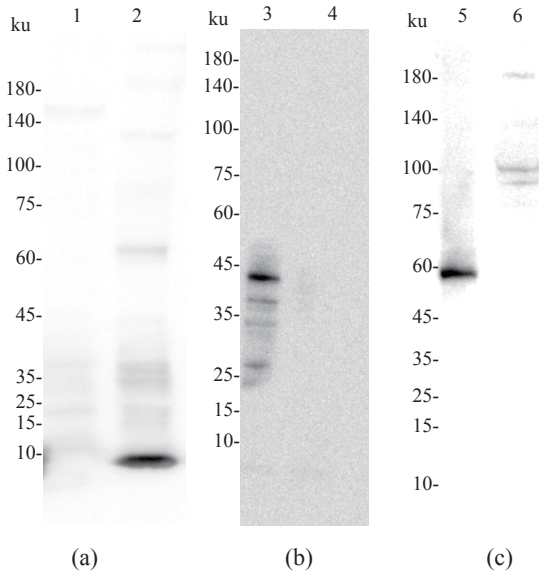


图 4 C5a(a)、C5aR(b) 和 F II (c) 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

1、4、6. C5a、C5aR、F II 多克隆抗体检测 293T 细胞蛋白; 2、3、5. C5a、C5aR、F II 多克隆抗体检测 CIK 细胞蛋白

Fig. 4 Western blot identification of C5a(a), C5aR(b) and F II (c) polyclonal antibodies

1,4,6. detection of 293T cell protein by C5a, C5aR, F II polyclonal antibodies; 2,3,5. detection of CIK cell protein by C5a, C5aR, F II polyclonal antibodies

F II 的蛋白相对表达量均随病程进展呈现上升趋势 (图 5-b、d、f)。痊愈期的 C5a、C5aR 和 F II 的蛋白相对表达量分别为第 0 天时的 3.949 倍、5.580 倍和 3.749 倍。以上结果验证了制备的多克隆抗体可以用于常规 Western blot 检测草鱼机体内源表达的 C5a、C5aR 和 F II 蛋白。

2.4 3 个蛋白的胞内互作结果

采用 Co-IP 验证草鱼 C5a、C5aR、F II 蛋白之间存在相互作用。结果显示, 攻毒后的 CIK 细胞中 C5a、C5aR、F II 蛋白能够通过孵育吸附在 protein A+G agarose 上, 并被 Western blot 实验检测到 (图 6)。结果表明, GCRV 刺激后, C5a、C5aR、F II 蛋白之间存在相互作用。

2.5 3 个蛋白的质谱分析结果

SDS-PAGE 凝胶电泳后, C5a 和 C5aR pull down 沉淀泳道可见明显目的条带 (图 7), 将蛋白条带切下, 经质谱分析后, 排除 Co-IP 互作蛋白, C5a pull down 共鉴定到 28 种候选蛋白, C5aR pull down 共鉴定到 24 种候选蛋白 (表 2, 表 3)。利用 UniPort 数据库对鉴定到的肽段进行功能注释, 结果表明, C5a 与 C5aR 互作的候选蛋白吻合度较高, 共有 17 种相同的候选蛋白, 大部分为补体活化反

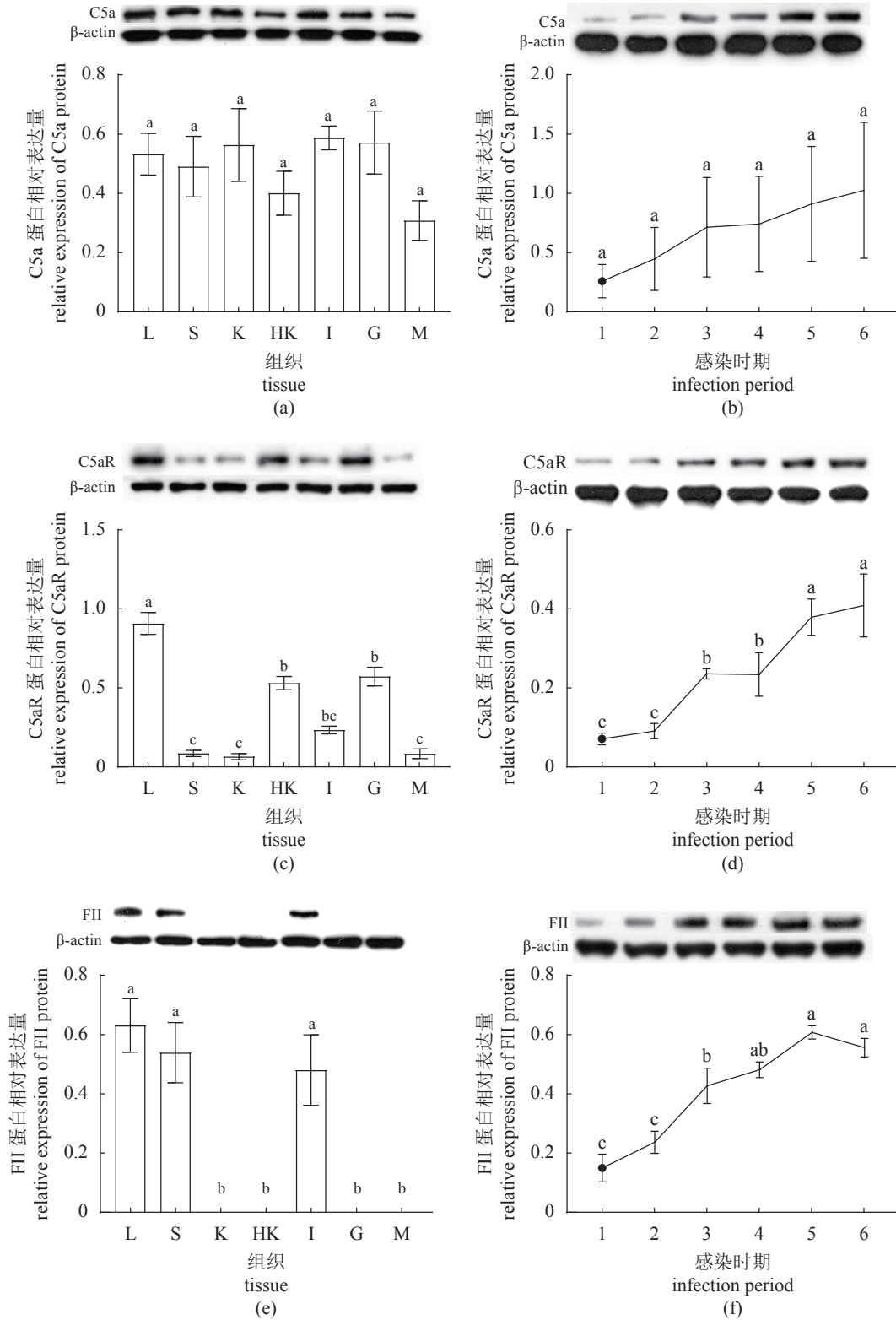


图 5 C5a、C5aR、FII 在健康组织和感病组织中的蛋白表达

L. 肝脏, S. 脾脏, K. 肾脏, HK. 头肾, I. 肠, G. 鳃, M. 肌肉; 1. 0 d, 2. 潜伏期, 3. 感染期, 4. 暴发期, 5. 恢复期, 6. 痊愈期; 图例中小写字母 a、b、c. 表示显著性差异 ($P < 0.05$); 误差棒表示标准误差 ($n=3$)

Fig. 5 Protein expression of C5a, C5aR and FII in healthy and diseased tissues

L. liver, S. spleen, K. kidney, HK. head kidney, I. intestine, G. gill, M. muscle; 1. 0 d, 2. incubation period, 3. infection period, 4. outbreak period, 5. recovery period, 6. healing period; the different low-case letters indicate extremely significant differences ($P < 0.05$); error bar shows the standard error ($n=3$)

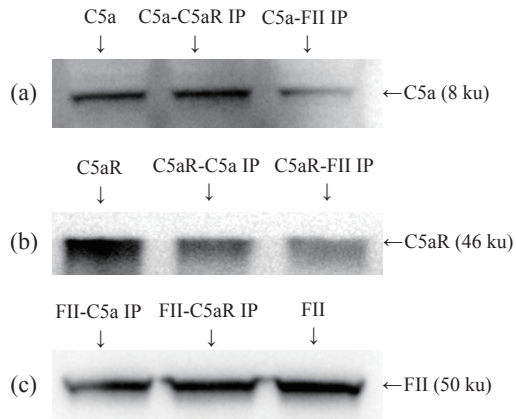


图 6 以 C5a、C5aR、F II 多克隆抗体为诱饵蛋白, 免疫共沉淀后, Western blot 检测 C5a、C5aR、F II 的表达

Fig. 6 Expression of C5a, C5aR and F II detected by Western blot after co-immunoprecipitation, using polyclonal antibodies against C5a, C5aR and F II as bait proteins

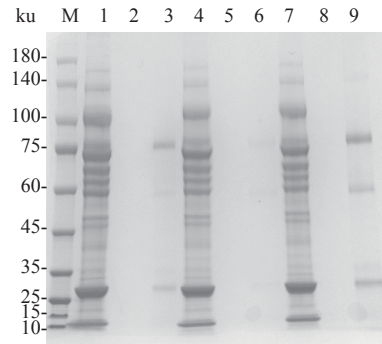


图 7 pull down 实验 SDS-PAGE 结果

M. 蛋白分子量标准; 1. C5a pull down 上清 I; 2. C5a pull down 上清 II; 3. C5a pull down 沉淀; 4. F II pull down 上清 I; 5. F II pull down 上清 II; 6. F II pull down 沉淀; 7. C5aR pull down 上清 I; 8. C5aR pull down 上清 II; 9. C5aR pull down 沉淀

Fig. 7 SDS-PAGE result of pull down experiment

M. protein marker; 1. C5a pull down supernatant I; 2. C5a pull down supernatant II; 3. C5a pull down precipitation; 4. F II pull down supernatant I; 5. F II pull down supernatant II; 6. F II pull down precipitation; 7. C5aR pull down supernatant I; 8. C5aR pull down supernatant II; 9. C5aR pull down precipitation

表 2 草鱼 C5a 相互作用候选蛋白鉴定结果

Tab. 2 Identification of interactive candidate proteins with C5a of *C. idella*

蛋白 proteins	登录号 accession no.	描述 description	蛋白分子量/ku protein molecular weight	覆盖率/% coverage	肽段数/个 peptides
转铁蛋白	B3VQI2	serotransferrin	73.515	45.994	29
肌动蛋白	P83751	actin, cytoplasmic 1	41.726	49.067	11
巨球蛋白	Q6TAS2	alpha-2-macroglobulin	134.221	6.942	9
14 ku 载脂蛋白	Q6SXX7	14 ku apolipoprotein	15.271	31.387	4
角蛋白样蛋白	C1KH73	keratin-like protein	42.477	10.000	5
C4a	A0A3T0QI28	C4a anaphylatoxin	190.530	4.071	7
C3	Q6UAQ6	complement C3	187.997	4.532	7
α珠蛋白	Q8JH84	alpha globin	15.456	22.378	3
抗胰蛋白酶	B2MUP2	serpina1 protein	49.303	12.217	5
内凝集素	Q4U122	intelectin	35.241	12.264	4
H因子	A0A3Q9U4I2	putative complement factor H	97.829	5.760	4
半乳糖结合凝集素	A0A0A1CEZ3	galactose-binding lectin	26.527	13.546	3
补体C1qc	H9CTG0	complement C1q subcomponent subunit C	26.146	13.525	3
GAPDH	K9J9Z6	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	28.172	7.925	2
温适应相关65 ku蛋白	E1U3C1	warm temperature acclimation-related 65 ku protein	16.609	18.919	2
β珠蛋白	Q8JH87	beta globin	16.215	14.966	2
EF-1a	F8QMS8	Elongation factor 1-alpha	45.594	4.535	2
补体C1qa	A0A3Q9U3J6	complement C1q subcomponent subunit a	25.790	11.429	2
活化肽片段1	W8FYF8	activation peptide fragment 1	59.699	1.527	1
MASPI	A0A3Q9VGY8	putative mannan-binding lectin serine peptidase 1	94.453	0.945	1
C3	A0A3T0QHS2	complement Component 3	198.603	0.571	1
补体C1qb	R9UMA6	complement C1q subcomponent subunit b	25.671	6.584	1
Histone H2A	A0A068L824	Histone H2A	12.968	7.438	1
IGF1R-b	B5A5T2	receptor protein-tyrosine kinase	27.207	10.833	1
TLR22a	A0A6C0PI17	Toll-like receptor 22a	109.672	1.992	1
中间轻酶解肌球蛋白	A6NA52	intermediate light meromyosin	64.906	2.309	1
hsp60	E7D7N6	60 ku chaperonin	61.221	1.217	1
RIG-I	F8QPI3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	108.603	0.634	1

表 3 草鱼 C5aR 相互作用候选蛋白鉴定结果

Tab. 3 Identification of interactive candidate proteins with C5aR of *C. idella*

蛋白 proteins	登录号 accession no.	描述 description	蛋白分子量/ku protein molecular weight	覆盖率/% coverage	肽段数/个 peptides
C4a	A0A3T0QI28	C4a anaphylatoxin	190.530	7.788	13
角蛋白样蛋白	C1KH73	keratin-like protein	42.477	12.432	7
肌动蛋白	P83751	actin	41.726	10.400	2
巨球蛋白	A8VZJ0	alpha-1-microglobulin	38.818	10.632	3
补体C1qc	H9CTG0	complement C1q subcomponent subunit c	26.146	18.852	4
补体C1qa	A0A3Q9U3J6	putative complement C1q subcomponent subunit a	25.790	17.143	4
α 珠蛋白	Q8JH84	alpha globin	15.456	20.979	3
H因子	A0A3Q9U4I2	putative complement factor H	97.829	3.802	4
C3	A0A3S5HYM4	putative complement component C3	171.972	1.100	2
EF-1a	F8QMS8	Elongation factor 1-alpha	45.594	6.921	3
C3	Q6UAQ6	complement C3	187.997	1.371	3
活化肽片段1	W8FYF8	activation peptide fragment 1	59.699	5.344	3
抗胰蛋白酶	B2MUP2	serpina1 protein	49.303	3.394	2
补体C1qb	R9UMA6	complement C1q subcomponent subunit b	25.671	6.584	1
半乳糖结合凝集素	A0A0A1CEZ3	galactose-binding lectin	26.527	7.171	2
14 ku载脂蛋白	Q6SXN7	14 ku apolipoprotein	15.271	17.518	2
GAPDH	K9J9Z6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	28.172	5.283	1
14-3-3蛋白 β/α	A0A499PT42	14-3-3 protein beta/alpha	27.616	3.279	1
转铁蛋白	B3VQI2	serotransferrin	73.515	1.335	1
转醛醇酶	Q8AY87	transaldolase	20.865	3.243	1
C3	A0A3T0QHS2	putative complement component C3	198.603	0.571	1
巨球蛋白	Q6TAS2	alpha-2-macroglobulin	134.221	0.909	1
组蛋白	A0A068L824	histone H2A	12.968	7.438	1
趋化因子32a	A0A345D744	chemokine ligand 32a	22.061	19.898	1

应的蛋白，例如补体 C4a、补体 C1qc、补体 C3 等，此外，还包括具有催化、结合生命大分子、参与能量产生与转换的蛋白。

3 讨论

草鱼出血病作为一种病毒性疾病，对草鱼养殖业的发展影响巨大，感染草鱼后病鱼主要症状为头部、口腔、鳃盖、鳍条、肌肉、肠壁等部位充血，肝胰脏、胆囊、肾脏等部位有出血点或血丝^[35-36]。同时草鱼出血病可诱发 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 等炎症因子的大量表达，产生炎症反应^[37]。作为天然免疫中的组成成员，补体系统和凝血系统势必参与了鱼体应对 GCRV 的过程。现有研究也证实，补体系统和凝血系统在鱼体感染草鱼出血病前后变化最为显著，C5、C5aR 和 F II 的 mRNA 变化均与鱼体感染 GCRV 过程有关联性^[29]。

实验根据草鱼 C5a、C5aR 和 F II 不同的蛋白结构特性，C5a 和 F II 多克隆抗体采取原核表达的方式成功制备 pET-28a-SUMO 抗原蛋白，该方法是目前最为稳定、应用最为广泛的表达系统^[38]。C5aR 为 7 次跨膜蛋白^[39]，采用原核表达难度极大，则选用多肽偶联的方式制备抗原蛋白，选取表达的多肽段为蛋白 N 端且位于 outside 区，暴露性较好，特异性、免疫原性和亲水性均较好，适合作为抗原^[40-41]。免疫日本大耳白兔后对血清进行纯化透析，获得纯度较高的兔抗 C5a、C5aR 和 F II 蛋白多克隆抗体。

C5a 的生物学功能依赖于结合 C5aR 实现，C5aR 在机体组织中广泛表达，因此 C5a 在各组织中均能发挥生物学功能^[39]。因而在草鱼健康组织中，C5a 和 C5aR 蛋白在 7 个组织中均有表达，C5aR 在健康肝脏中表达最高，头肾、鳃次之，

但 C5a 的表达没有显著差异, 说明此时在健康鱼体内 C5a 与 C5aR 没有大量结合的趋势, 表达平缓。在 GCRV 处理后, C5a 和 C5aR 均在潜伏期至感染期这一阶段增长最为明显, 说明这一阶段处于鱼体感染病毒早期, 补体系统激活 C5 大量转化为 C5a, 鱼体也随之生成更多的配体 C5aR, 且 C5a 与 C5aR 蛋白含量一直保持增长的趋势, 这说明鱼体中的补体系统被过度激活, 无法回到正常水平, 而补体的过度激活会对机体造成难以恢复的损伤^[7]。由此可见患病鱼体内 C5a 和 C5aR 的表达规律均与哺乳动物中补体的表达特性相似^[4]。与 C5a 和 C5aR 不同的是, F II 并未广泛表达, 仅见肝脏、脾脏和肠中有表达, 推测这可能是因为其他健康鱼体组织中凝血系统尚未被激活。感染 GCRV 后 F II 同样是在潜伏期至感染期这一阶段增长最为明显, 这也佐证了鱼类凝血系统与哺乳动物凝血系统具有一致性^[3], 均是在病毒感染早期即被大量激活。此外, 实验亦发现肝脏中 F II 经 GCRV 感染后的恢复期至痊愈期阶段表达量呈现下降的趋势, 说明鱼体可能在愈合过程中不再出血从而凝血反应逐步减少。

在 GCRV 感染的基础上, 实验通过 Co-IP 证实草鱼中 C5a 与 C5aR 能够相互作用。当 C5 活化为 C5a 后, C5a 随之与其受体 C5aR 的结合, 二者结合通过两个结合位点, 第一结合位点为 C5a 的 N 末端与 C5aR 细胞外 N 端, 第二结合位点为 C5a 的 C 末端和 C5aR 的跨膜区域^[42], 所以二者的结合为直接结合。实验通过 Co-IP 检测发现草鱼中 C5a 和 F II 存在互作关系, 这一结果与哺乳动物中的研究相吻合。C5a 与 F II 之间的互作调控关系在哺乳动物中已被证实^[27, 43], F II 被激活为凝血酶后, 凝血酶具有与 C5 转化酶相类似的作用促进 C5 裂解为 C5a, C5a 结合 C5aR 激活嗜碱性粒细胞释放炎症介质在免疫调节中发挥关键作用^[44], 激活的 C5a 又会作用于单核细胞促进 F II 的生成, 从而加速机体的凝血反应, 致使机体炎症反应加强^[27]。故 GCRV 感染 CIK 后, C5a 和 F II 的互作反应有可能与哺乳动物类似, 相互调控的同时加速炎症进程。尚未有文献证实 C5aR 与 F II 之间存在直接结合的相互作用关系, 但在 Co-IP 检测中能相互检测得到, 这可能与使用的样品为攻毒后的蛋白样有关, 在 GCRV 处理后, C5a 和 C5aR 蛋白大量结合, 则导致 C5a 与 C5aR 以复合物的形式出现, 故推测 F II 能够与这一复合物发生间

接结合, 从而在 Co-IP 实验中 F II 能与 C5aR 结合。

通过 pull down 得到 C5a、C5aR 与 F II 不仅能互作, C5a 还可能与 28 种候选蛋白发生互作, C5aR 可能与 24 种候选蛋白发生互作。候选蛋白中, 大多为补体系统内的蛋白, 当 GCRV 感染鱼体后, 整个补体系统被激活从而促使 C5a 与 C5aR 结合, C3a 等补体蛋白的存在也促进 C5a 与 F II 蛋白结合。C5a 候选互作蛋白中的 α 珠蛋白和 β 珠蛋白为触珠蛋白 (haptoglobin, Hp) 的 2 个部分, Hp 是一种抗氧化剂, 具有抗菌活性, 并在组织保护和预防氧化损伤中发挥作用, 是许多疾病的潜在生物标志物^[45], C5a 与其互作可能是感染 GCRV 过程中机体缓解 C5a 的过度激活采取的手段之一。与 Hp 功能截然不同的 C5aR 候选互作蛋白中醛缩酶 (transaldolase, GSM2) 的高表达可能与局部组织的恶化相关, 它的存在往往引起活性氧的大量产生^[46], 与 C5aR 互作有可能发生协同作用, 引起细胞呼吸爆发。此外, 实验还发现 C5a、C5aR 的潜在互作蛋白中还存在 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR)、RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) 等先天免疫分子, 由此推测草鱼应对 GCRV 感染时, C5a 与 C5aR 表现出与哺乳动物类似的特性, 能够诱发各类免疫分子参与到机体的炎症反应中^[47], 但仍需进一步验证。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Nakao M, Yano T. Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166(1): 27-38.
- [2] Blanco-Abad V, Noia M, Valle A, et al. The fish coagulation system could help to prevent infection by the ciliate parasite *Philasterides dicentrarchi*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 460.
- [3] Choi G, Schultz M J, Levi M, et al. The relationship between inflammation and the coagulation system[J]. *Swiss Medical Weekly*, 2006, 136(9-10): 139-144.
- [4] Favoreel H W, Van De Walle G R, Nauwynck H J, et al. Virus complement evasion strategies[J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84(1): 1-15.
- [5] Gralinski L E, Morrison T E, Menachery V D, et al. Complement activation contributes to severe acute res-

- piratory syndrome coronavirus pathogenesis[J]. *mBio*, 2018, 9(5): e01753-18.
- [6] Bajic G, Degen S E, Thiel S, *et al.* Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases[J]. *The EMBO Journal*, 2015, 34(22): 2735-2757.
- [7] 查晚生. 补体活化产物 C5a 在三氯乙烯致敏小鼠肾脏损伤过程中的作用研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- Zha W S. Complement activation product C5a involved in renal injury induced by trichloroethylene sensitized in BALB/c mice[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2014 (in Chinese).
- [8] Colley C S, Popovic B, Sridharan S, *et al.* Structure and characterization of a high affinity C5a monoclonal antibody that blocks binding to C5aR1 and C5aR2 receptors[J]. *mAbs*, 2018, 10(1): 104-117.
- [9] Schreiber A, Xiao H, Jennette J C, *et al.* C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20(2): 289-298.
- [10] Goldstein I M, Weissmann G. Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes[J]. *Journal of Immunology*, 1974, 113(5): 1583-1588.
- [11] Wu N, LaPatra S E, Li J, *et al.* Complement C5a acts as molecular adjuvant in fish by enhancing antibody response to soluble antigen[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 616-623.
- [12] Cavaillon J M, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N. Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages[J]. *European Journal of Immunology*, 1990, 20(2): 253-257.
- [13] Riedemann N C, Guo R F, Sarma V J, *et al.* Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 168(4): 1919-1925.
- [14] Chakraborty S, Winkelmann V E, Braumüller S, *et al.* Role of the C5a-C5a receptor axis in the inflammatory responses of the lungs after experimental polytrauma and hemorrhagic shock[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 2158.
- [15] Antoniuk S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection[J]. *Blood*, 2014, 123(17): 2605-2613.
- [16] Anderson G F, Barnhart M I. Prothrombin synthesis in the dog[J]. *American Journal of Physiology*, 1964, 206(5): 929-938.
- [17] Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog J W, *et al.* The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(1): 274-283.
- [18] Sheehan J, Templer M, Gregory M, *et al.* Demonstration of the extrinsic coagulation pathway in teleostei: identification of zebrafish coagulation factor VII[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(15): 8768-8773.
- [19] Choi K M, Jeong J M, Bae J S, *et al.* Coagulation factor II from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): first report on the molecular biological function and expression analysis in the teleost[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 145-153.
- [20] Krem M M, Di Cera E. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(2): 67-74.
- [21] Amara U, Rittirsch D, Flierl M, *et al.* Interaction between the coagulation and complement system[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 632: 71-79.
- [22] Rittirsch D, Flierl M A, Ward P A. Harmful molecular mechanisms in sepsis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(10): 776-787.
- [23] Amara U, Flierl M A, Rittirsch D, *et al.* Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(9): 5628-5636.
- [24] Huber-Lang M, Sarma J V, Zetoune F S, *et al.* Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway[J]. *Nature Medicine*, 2006, 12(6): 682-687.
- [25] Tawara S, Sakai T, Matsuzaki O. Anti-inflammatory and anti-fibrinolytic effects of thrombomodulin alfa through carboxypeptidase B2 in the presence of thrombin[J]. *Thrombosis Research*, 2016, 147: 72-79.
- [26] Markiewski M M, Nilsson B, Ekdahl K N, *et al.* Complement and coagulation: strangers or partners in crime?[J]. *Trends in Immunology*, 2007, 28(4): 184-192.
- [27] Ehrnström B, Kojen J F, Giambelluca M, *et al.* TLR8 and complement C5 induce cytokine release and throm-

- bin activation in human whole blood challenged with Gram-positive bacteria[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 107(4): 673-683.
- [28] Skjeflo E W, Christiansen D, Fure H, *et al.* *Staphylococcus aureus*-induced complement activation promotes tissue factor-mediated coagulation[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2018, 16(5): 905-918.
- [29] 吕丽刚. 草鱼 C5/C5a/C5aR 信号通路及部分相关因子的初步验证 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- Lv L G. Preliminary verification of C5/C5a/C5aR signaling pathway and some related factors in grass carp[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [30] Franchini S, Zarkadis I K, Sfyroera G, *et al.* Cloning and purification of the rainbow trout fifth component of complement (C5)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(5-6): 419-430.
- [31] Kato Y, Nakao M, Mutsuro J, *et al.* The complement component C5 of the common carp (*Cyprinus carpio*): cDNA cloning of two distinct isotypes that differ in a functional site[J]. *Immunogenetics*, 2003, 54(11): 807-815.
- [32] Natarajan N, Abbas Y, Bryant D M, *et al.* Complement receptor C5aR1 plays an evolutionarily conserved role in successful cardiac regeneration[J]. *Circulation*, 2018, 137(20): 2152-2165.
- [33] Boshra H, Peters R, Li J, *et al.* Production of recombinant C5a from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role in leucocyte chemotaxis and respiratory burst[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(3): 293-303.
- [34] Xu B H, Chen K J, Yao Y B, *et al.* Cloning, characterization and expression analysis of coagulation factor II gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 13764-13778.
- [35] 郑德崇, 黄琪琰, 蔡完其, 等. 草鱼出血病的组织病理研究[J]. *水产学报*, 1986, 10(2): 151-159.
- Zheng D C, Huang Q Y, Cai W Q, *et al.* Histopathological studies on the hemorrhage disease of grass carp[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, 10(2): 151-159 (in Chinese).
- [36] 杨玲, 苏建国. 草鱼呼肠孤病毒II型自然发病与人工注射感染草鱼的病理症状和病毒分布研究[J]. *水产学报*, 2022, 46(2): 250-260.
- Yang L, Su J G. Studies on pathological symptoms and virus distribution in natural and artificial injection infection *Ctenopharyngodon idella* with grass carp reovirus type II[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(2): 250-260 (in Chinese).
- [37] 许宝红. 感病草鱼脾脏的比较转录组分析 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- Xu B H. Transcriptome analysis of grass carp infected GCHV[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [38] 刘丽琴, 陈婷婷, 李少伟, 等. 大肠杆菌表达系统在基因工程疫苗研发中的应用与策略优化[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(21): 2434-2442.
- Liu L Q, Chen T T, Li S W, *et al.* Escherichia coli expression system applied in the development of recombinant human vaccines and its potential improvement[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2020, 29(21): 2434-2442 (in Chinese).
- [39] 张泽英. C5aR 介导 LPS 诱导的肾脓毒症以及肾 I/R 损伤机制的研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2016.
- Zhang Z Y. Study on the mechanism of C5a receptor mediated lipopolysaccharide inducing renal sepsis and renal ischemia/reperfusion (I/R) injury[D]. Wuhan: Hubei University, 2016 (in Chinese).
- [40] 吕凤林, 朱锡华. 人C5aR(CD88)序列结构分析及其B细胞表位预测[J]. *免疫学杂志*, 1998(3): 153-156.
- Lv F L, Zhu X H. An alysis of characteristics and prediction of B-cell epitopes for the human C5a receptor[J]. *Immunological Journal*, 1998(3): 153-156 (in Chinese).
- [41] 赵杰, 高美须, 潘家荣, 等. Pen a 1表位抗原多克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3191-3198.
- Zhao J, Gao M X, Pan J R, *et al.* Preparation and identification of polyclonal antibody of one Pen a1 epitope peptide[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(15): 3191-3198 (in Chinese).
- [42] 齐洁. C5a受体的作用位点及信号传导[J]. *国外医学分子生物学分册*, 1997, 19(5): 196-201.
- Qi J. Action sites and signal transduction of C5a receptor[J]. *Foreign Medical Molecular Biology Fascicles*, 1997, 19(5): 196-201 (in Chinese).
- [43] Mans B J. Chemical equilibrium at the tick-host feeding interface: a critical examination of biological relevance in hematophagous behavior[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 530.
- [44] Yanase Y, Matsuo Y, Takahagi S, *et al.* Coagulation factors induce human skin mast cell and basophil

- degranulation via activation of complement 5 and the C5a receptor[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2021, 147(3): 1101-1104.
- [45] Naryzhny S, Ronzhina N, Zorina E, *et al.* Evaluation of haptoglobin and its proteoforms as glioblastoma markers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6533.
- [46] Zheng M, Zhu C Y, Yang T T, *et al.* GSM2, a transaldolase, contributes to reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 104(1-2): 39-53.
- [47] Zaal A, Dieker M, Oudenampsen M, *et al.* Anaphylatoxin C5a regulates 6-sulfo-LacNAc dendritic cell function in human through crosstalk with toll-like receptor-induced CREB signaling[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 818.

Preparation and expression characteristics of polyclonal antibodies against C5a, C5aR and F II in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

SU Hang, XIAO Tiaoyi*, XU Baohong*, LIU Qiaolin, LÜ Ligang, LIU Yi
(Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization,
Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Complement and coagulation cascade are important components of innate immunity, in which complement protein 5a (complement component 5a, C5a), complement protein 5a receptor (C5a receptor, C5aR) and coagulation factor II (blood coagulation factor II, FII) play a key role in dealing with virus infection. In order to study their protein expression and interaction in *Ctenopharyngodon idella* infected with grass carp reovirus (GCRV), the prokaryotic expression system of C5a and FII protein was constructed, the C5aR-KLH conjugate against C5aR protein was constructed, and the protein was purified. Japanese big-eared rabbits were immunized to prepare polyclonal antibodies against the three kinds of proteins. The expression and interaction of the three proteins were detected by western blot, Co-immunoprecipitation (Co-IP) and pulldown test. Western blot results showed that C5a and C5aR proteins were expressed in liver, spleen, kidney, head kidney, intestine, gill and muscle of *C. idella*. FII protein was expressed in liver, spleen and intestine, but not in kidney, head kidney, gill and muscle. Expression of C5a, C5aR and FII proteins in liver tissues of *C. idella* infected with GCRV showed an upward trend with the progression of the disease. Co-IP results showed that C5a, C5aR and FII proteins interacted with each other after GCRV treatment. Pull down results showed that 28 candidate proteins such as C3 and RIG-I were identified by C5a pull down, and 24 candidate proteins such as transaldolase and macroglobulin were identified by C5aR pull down. This study provides a basis for further exploring the interaction and regulation of C5a, C5aR and FII, and for further exploring the mechanism of the three associated proteins in the complement and coagulation cascade system responding to GCRV infection.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; C5a; C5aR; F II; polyclonal antibody; grass carp reovirus (GCRV); expression characteristics

Corresponding authors: XU Baohong. E-mail: 195463778@qq.com;
XIAO Tiaoyi. E-mail: tiaoyixiao@hunau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U20A2063); Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ50265)