

研究报告

Research Report

河川沙塘鳢 *TLR2* 基因的克隆及表达分析

于兴达¹ 王佩佩¹ 汪亚媛¹ 贾秀琪¹ 张国松¹ 尹绍武^{1*} 陈树桥² 周国勤²

¹ 南京师范大学, 生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京, 210023; ² 南京市水产科学研究所, 南京, 210036

* 通讯作者, yinshaowu@163.com

摘要 本研究以河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)为研究对象,采用 RACE、实时荧光定量 PCR 等技术,首次对该鱼的 *TLR2* 基因进行了克隆和表达模式分析。主要研究结果如下:*TLR2* 基因的 cDNA 全长序列为 3 473 bp,包括 2 631 bp 开放阅读框(ORF)、75 bp 的 5'UTR 区和 767 bp 的 3'UTR 区,并且具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 26 bp 的 polyA 尾巴,推测该序列编码 876 个氨基酸。蛋白结构预测表明 *TLR2* 蛋白的 TIR 结构域和 LRR 基序符合 *TLR* 家族的共同特征,其蛋白分子也存在多个功能位点。系统树中河川沙塘鳢与所有鱼类聚类为独立的分支,与鲈形目亲缘关系最近。应用 RT-PCR 法检测健康河川沙塘鳢鱼体中 *TLR2* 基因的 mRNA 组织表达差异情况。结果显示,*TLR2* 基因在检测的 12 种组织中均有表达,在肝、肾、肠、血液和胃中都有较高的表达水平。人工感染嗜水气单胞菌后,对河川沙塘鳢 3 种主要免疫组织(脾、肾、肝)中进行不同时段表达量变化的检测,结果表明,*TLR2* 基因在脾中感染后 4 h 表达水平发生下降,随后的 24~48 h 又上升,48 h 时达到顶峰,72~96 h 维持在略低于 24 h 水平上。在肾中,感染后表达水平持续上升,且 24~96 h 间保持相对稳定的表达水平。在肝组织中,感染后一直呈现上升趋势,72 h 时达到顶峰,其他时段表达水平相差不大。可见 *TLR2* 在河川沙塘鳢抵御外源微生物侵染的先天免疫中发挥重要作用。

关键词 河川沙塘鳢, *TLR2*, RT-PCR, 表达分析

Clone and Expression Analysis of *TLR2* Gene from *Odontobutis potamophila*

Yu Xingda¹ Wang Peipei¹ Wang Yayuan¹ Jia Xiuqi¹ Zhang Guosong¹ Yin Shaowu^{1*} Chen Shuqiao² Zhou Guoqin²

¹ College of Life Sciences, Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology of Jiangsu Province, Nanjing Normal University, Nanjing, 210023; ² Institute of Fisheries Science of Nanjing City, Nanjing, 210036

* Corresponding author, yinshaowu@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.035.000285

Abstract With *Odontobutis potamophila* as research object, rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches and quantitative real-time PCR were used to obtain the full length of *TLR2* cDNA and to analysis the expression pattern for the first time. The main results were shown as follows: sequence analysis revealed that the full length of *TLR2* cDNA were 3 473 bp. And the putative length of open reading frame (ORF) in the gene was predicted as 2 631 bp that encoded 876 amino acids. The length of the 5' UTR of the gene was 75 bp, and the length of 3' UTR was 767 bp. Each 3' UTR in the gene possessed a poly adenylation signal sequences of AATAAAA, and a polyA tails of 26 bp which was the vertebrate typical tailing signal. *TLR2* protein of *O. potamophila* had LRR motifs and TIR domain structure. This was an important characteristic of *TLR* family. In the *TLR2* protein molecule, there also were many functional sites. Phylogenetic trees showed that *Odontobutis potamophila* was an independent branch and the gene in *O. potamophila* had closed genetic relationship with Perciformes.

基金项目:本研究由江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2013441)、“江苏省六大人才高峰”高层次人才项目(2012-NY-032)、南京师范大学科技成果转化基金项目(2013-02)和江苏省 2015 年度普通高校研究生实践创新计划项目(SJLX15_0300)共同资助

Quantitative real-time PCR was used to quantify the mRNA tissue expression differences expression of *TLR2* gene in healthy *O. potamophila*. The results showed that *TLR2* gene of 12 tissue were expressed and *TLR2* expressed highly in liver, kidney, intestine, blood and stomach. The mRNA expression levels of *TLR2* genes in liver, spleen and kidney of *O. potamophila* were quantified after *Aeromonas hydrophila* infection. The results showed that in the spleen, the expression quantities dropped at 4 hours after injection, followed by another rise at 24~48 hours and reached peak after 48 hours, 72~96 hours maintained at a level slightly lower than 24 hours. In the kidney, the expression levels of infection continue to rise, and the expression level between 24~96 hours remained relatively stable. In liver tissue, it had been showing an upward trend after infection, peaked at 72 hours, the expression levels of other times had no big difference. The results showed that *TLR2* gene played an important role in against exogenous microbial infection of innate immunity.

Keywords *Odontobutis potamophila*, *TLR2*, RT-PCR, Expression analysis

河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)为我国特有的小型淡水底栖肉食性经济鱼类(伍汉霖等, 1993), 目前对河川沙塘鳢的研究主要集中在选育种和养殖等方面(张君等, 2011; 张丽娟等, 2013; Zhu et al., 2014), 对其免疫相关基因和抗病因子的研究未见报道。因此, 开展河川沙塘鳢的免疫相关基因(因子)研究, 初步了解其免疫应答机制, 对河川沙塘鳢病害防治和开辟河川沙塘鳢抗病育种新途径具有重要意义。

机体的先天性免疫依赖有限的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)去识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 例如脂多糖 LPS (lipopolysaccharide)和病毒型核苷酸(viral nucleic acids) (Janeway and Medzhitov, 2002)。目前被鉴定的模式识别受体主要有两大类: 胞质型模式识别受体(cytosolic PRRs)和膜结合 Toll 样受体(membrane-bound toll-like receptors, TLRs) (Akira et al., 2006)。

目前已发现 13 种 TLR, TLRs 可以识别多种来自细菌、病毒、真菌甚至原生动物的 PAMPs, 诱导促炎因子和 I 型干扰素的表达从而触发免疫应答 (Medzhitov, 2001; Takeda and Akira, 2005; Kawai and Akira, 2006)。TLRs 在不同组织的表达存在差异, 研究表明, 巨噬细胞主要表达 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR6、TLR7 和 TLR9 (Muzio et al., 2000; Takeuchi et al., 2002) 尽管在不同的树突状细胞(dendritic cells, DC)亚群中有着细微的表达差别, 但 DC 几乎表达所有的 TLRs (Muzio et al., 2000)。所有 TLRs 都含有一个胞内 TIR (Toll/IL-1 receptor)结构域, TIR 结构域通过募集一个或者多个含有 TIR 结构域的连接蛋白将信号下传(Sousa, 2004)。具有 TIR 结构域的连接蛋白包括髓样分化因子(MyD88), 包含 Toll/IL-1 的接头蛋白(TIRAP)和包含 TIR 结构域的 IFN 诱导

连接蛋白(TRIF) (Medzhitov et al., 1998; Fitzgerald et al., 2001; Oshiumi et al., 2003; Sousa, 2004; O'Neill and Bowie, 2007) 其中 MyD88 介导除 TLR3 之外的所有 TLR 信号传导(韦友传等, 2011), TLRs 信号传导通路可以大体分 MyD88 依赖型信号通路和 TRIF 依赖型信号通路(又叫做 MyD88 非依赖型信号通路)。不论是 MyD88 依赖型信号通路还是 TRIF 依赖型信号通路都会激活至少三种以上重要的下游分子 NF- κ B 信号、MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 和 IRFs (Yamamoto et al., 2003; Colonna, 2007)。

从 Sangrado-vegas 等(2000)分离鉴定了 IL-1 受体(IL-1R), 即虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) IL-1R 开始, 各国学者开始了对鱼类 TLR 的研究。通过对鱼类基因组序列的挖掘, 分离和鉴定出的 TLR 家族成员有 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9、TLR13、TLR14、TLR18、TLR19、TLR20、TLR21、TLR22、TLR23。研究表明, TLR2 可能对革兰氏阳性、阴性细菌及病毒都有识别作用, 是 TLRs 家族中识别病原体相关分子模式的能力最强的分子之一。

本研究拟通过分子生物学方法, 利用 RACE 技术获得河川沙塘鳢的 *TLR2* 基因全长序列, 通过生物信息学方法对其进行分析, 并对河川沙塘鳢 *TLR2* 基因的组织分布及表达模式进行系统分析, 为进一步揭示河川沙塘鳢免疫抗感染机制奠定理论基础。

1 结果与分析

1.1 *TLR2* 基因 cDNA 全长序列特征

根据从河川沙塘鳢转录组中获得的 *TLR2* 基因部分序列, 利用 RACE 技术扩增得到 *TLR2* 基因的 5' 端上游序列和 3' 端下游序列, 通过软件拼接得到 3 473 bp (GenBank 登录号: KP973949) 的 cDNA 全

长序列,包括 2 631 bp 开放阅读框(ORF)、75 bp 的 5' UTR 区和 767 bp 的 3' UTR 区,并且具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 26 bp 的 polyA 尾巴,推测该序列编码 876 个氨基酸(图 1)。

1.2 蛋白结构和功能预测

SMART 软件分析发现,河川沙塘鳢 *TLR2* 蛋白存在符合 TLR 家族所重要特征的 LRR 基序和 TIR 结构域(图 2)。二级结构经 Predictprotein 软件进行预测,结果表明河川沙塘鳢 *TLR2* 蛋白分子在第 100、122、200、241、457、494 和 580 位有 7 个 N-糖基化位点(N-X-S/T);在第 821 位有 1 个依赖 cAMP 和 cGMP 蛋白激酶 磷酸化位点(R/K-X-X-S/T);在第 2、419、726、787、819 和 824 位有 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(S/T-X-R/K);在 102、124、153、202、291、317、322、337、413、419、478、496、678、758、790、829 和 840 位有 17 个酪蛋白激酶 磷酸化位点(S/T-X-X-D/E);在第 248、387 和 661 位有 3 个酪氨酸激酶磷酸化位点(R/K-X-XD/E-X-X-Y);在第 176、318、402、471 和 533 位有 5 个 N 酰基化位点(G-E/D/R/ K/H/ P/F/Y/W-X-XS/T/A/G/C/N-X)。二级结构预测结果还表明 *TLR2* 蛋白分子包括 α 螺旋(272 个氨基酸) 31.1%、 β 折叠(97 个氨基酸) 11.1%、 β 转角(507 个氨基酸) 57.9%。

1.3 *TLR2* 系统进化分析

为了进一步研究河川沙塘鳢 *TLR2* 推定的氨基酸序列和其他脊椎动物的进化关系,利用 BLAST 程序在线搜索与河川沙塘鳢 *TLR2* 基因同源性较高的序列,再通过 MEGA5.0 软件重复计算 1 000 次构建 N-J 系统发育树的方法构建了系统发育进化树(图 3)。系统树中哺乳类和鸟类聚为一支,河川沙塘鳢与所有鱼类聚为独立的分支,与鲈形目的其它种亲缘关系最近。

1.4 *TLR2* 基因在健康河川沙塘鳢不同组织的表达特征

应用 RT-PCR 法检测健康河川沙塘鳢鱼体中 *TLR2* 基因在不同组织中的 mRNA 表达水平。结果显示,*TLR2* 基因在检测的 12 种组织(肝、脾、肾、肠、鳃、心脏、血液、脑、性腺、肌肉、胃及鳔)中均有表达,但它们的表达量却不同。*TLR2* 在肝、肾、肠、血液和胃中都有很高的表达水平,鳃中表达程度中等,在脾、心脏、脑、性腺、肌肉和鳔中表达水平较低(图 4)。

1.5 嗜水气单胞菌感染后 *TLR2* 基因表达变化

人工感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)

后,在河川沙塘鳢 3 种主要免疫组织(脾、肾、肝)中进行不同时段表达量变化的检测,结果表明,*TLR2* 基因在脾中感染后 4 h 表达水平发生下降,随后的 24~48 h 又上升,48 h 时达到顶峰,72~96 h 维持在略低于 24 h 水平上。在肾中,感染后表达水平持续上升,且 24~96 h 间的表达水平比较一致。在肝组织中,感染后一直呈现上升趋势,72 h 时达到顶峰,且 4~96 h 表达水平相差不大(图 5)。

2 讨论

鱼类在脊椎动物中属较低等的类群,其特异性免疫进化不完善,而非特异性免疫对病原的识别范围较广,在其免疫应答过程中具有重要作用(Aoki et al., 2008)。其中 Toll 样受体(*TLR*)是免疫过程中发挥重要作用的一种跨膜蛋白受体,通过识别病原体相关分子模式启动免疫应答,在机体非特异性免疫与特异性免疫应答中都发挥着重要的作用。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)等重要经济鱼类的 Toll 样受体基因已相继被克隆测序(钱曦等, 2008; 苏建国等, 2009),其在鱼类非特异性免疫方面的功能研究也日益受到重视。目前虽有许多涉及到 Toll 样受体基因的克隆及表达模式的研究(范泽军, 2015),但本实验首次从构建的河川沙塘鳢 cDNA 文库中得到了 *TLR2* 基因的部分片段,并利用 RACE 技术获得这个基因的 cDNA 全长。

根据 *TLR2* 基因氨基酸序列构建了脊椎动物的系统进化树,所有鱼类构成进化树的一个主要分支,哺乳类和鸟类构成另外一个主要分支,最后聚类为一支,河川沙塘鳢与鲈形目的鱼类亲缘关系较近。然而河川沙塘鳢 *TLR2* 在蛋白的 N 端有保守的 TIR 结构, C 端有 LRR 序列,这符合哺乳动物 *TLR* 的普遍特征,暗示哺乳动物的 *TLR2* 与河川沙塘鳢 *TLR2* 很可能是同源物,拥有类似的生理功能。有研究指出 LRR 数目在不同的物种中有所区别,暗含功能差异(Wu et al., 2008),河川沙塘鳢具有 7 个 LRR 基序可能有助于提高其对病原的识别能力。

经 Predictprotein 软件预测河川沙塘鳢 *TLR2* 蛋白的二级结构,其酪蛋白激酶 磷酸化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、N-糖基化位点的数目都比较多,暗示其蛋白分子可能有更多的修饰变化,可能有更敏感的识别作用,有更高效率的表面递呈、捕获和识别能力。

本研究应用 RT-PCR 技术分析了 *TLR2* 基因在健康河川沙塘鳢 12 种组织的表达分布情况。分析结

```

1 cactcgctgaggagcccaacaaacaggctaaaattgtttgtgagaagacctactaccggtttaaacaagtca
76 atgtcaatcaggatgatttggacactacttctcttctcttcttgggaatcaggtcatcaccacactttaa
1 M S I R M I W T L L P F Y L F C G I R S S S P T L T
151 ccctcaacctcccagaagctccagagacagcagtagcccccctgtctgcatcatagactcgggccactttg
26 P S T S Q S P E T A V A P C L I I D S G H F A D C
226 cttggggagacaactcaacggttccgtgggagatatttctattacattagagaaaaatagacctttctaca
51 L G R Q L N R V P W E Y F P I T L E K I D L S Y N
301 aaactccaagccatctatgcccagtgacttttcccgcttaccaaaagcttctggtgaccttactgatgtaca
76 K L Q A I Y A S D F S R L P K L R G L L M Y N N
376 atttcacacattgatgatgcttccaaaaaacctttgctgggagaaactcgacattttcaataattccctt
101 I S H I D D D A F Q N N P L L E K L D I F N N S L
451 caagaaatccctactagcttaagtccactctcaaacctaaaagagctctcctcattgctcaacaactttta
126 Q E I P T T L A L M P L S N L K S L S M S N N F Y K
526 catgcaacgttagcagaagcctttgcccatttctccaactcgaagcttctgctcattaggtggcccttagt
151 H A T L A E R F A K F L Q L Q V L S L G G P L V R
601 gggcttaaaaaaggagactttgagccattaaaaaacctgagattgagcagcttttgcataaaaatttctcca
176 G L K K G D F E P I K N L R L Q R F A I K C S S N
676 ctaagttattatgaacctggagtttacaagtctcaacaaaaggagatgagttttgacatggctatagatcaa
201 L S Y Y E P G S L Q V I Q T K E M S F D M A I D I
751 cagccgagtgctgtgctgacatgctcagagactttgcaacaagaacctcactgaccttcaattccgtaacctc
226 Q P S A L L D M L R D F A N K N L T D L Q F R N L
826 tttgagttcacgtactacatgggacatgaagacatttccgtaatttaaaaaacattagtgcatacaggtcatc
251 F E F T Y Y M G H E D I F R N L K N I S A Y R L I
901 tttcacagggaaagttaataagaaatctcctgaggtatggcgtgacgaacctgaaaaagcacctacaagaa
276 F H R G K F N E N L L R M A L T N L E K A P I K R
976 ctgagactgcagtacatagactttgcccgttccctacttttgcacagtgaggacggactctagcatcacagac
301 L R L Q Y I D F A R S P T F V N S G T D S S I T D
1051 ctggaactggcaaacctggatctttgtatatacagaatccggatatttctcgttttgcactggcaatttacc
326 L E L D N L D L W Y I S N P D I L R F D W Q F T W
1126 tttacaaaatcaaaagccttgcataacagtagtacttcaactctgaccctgacgcctatgatgatgat
1351 F N K I K A L S I Q Y M Y F N S A P C D A Y D E M
1201 catcgtgtgactgtctagatattcacaacacccgctgaggagcagtagatctacaacccggcgctgtgtgac
376 H R V H L L D I S N N R L R D E Y I Y N R R C V Y
1276 aaggccaccatgcccagtttgacacacctcaacctgagcactaatgagctgactagctgaaagacttatcgtca
401 K G T M P S L H T F N L S T N E L T S L K D L S S
1351 ttaacaagacactttgacagctgacaggtgtggcgtcagcaacaacaactgggctctgtggccaagagttt
426 L T R H F D Q L Q V L D V S N N K L G S V A K S V
1426 ggctgtgtatggcaccagaacatcacttctcgtcatcacaaccagtttgttagtggcgccttcttgt
451 G C V W H Q N I T H F I A H H N Q F V S G A L L C
1501 ctgcctaccactgtggaagtcttggacctctccttttgcgaatctggatgagttaaacatgacgtactttgaga
476 L P T T V E V L D S F C N L D E L N M T Y F E K
1576 gcagataaccttaagaactctcctcaagtggaaaataaaccaagttcatcccttcaagtggaacagctccaca
501 A D N L K E L L L S G N K I K F I P S K W T S P S
1651 gtgcagttactagaataagacgggaactcctttgttataataagcaccagctccttcaacatagcccccaactg
526 V Q L L E I D G N S F G I I S T E S F Q H M P Q L
1726 tctcgtcgaagcaggaaacaacccttaccagctcaactgtgagctgacatgcttcttcaagacacagcatca
551 S R L K A G N N P Y Q C N C E L H A F V Q D T A S
1801 aaaggcaggttaacctgacagactggcattgaaactaccactgttaccaccagaccccttacttaaacctc
576 K G Q V N L T D W P L N Y H C Y H P E P L L K T L
1876 atatccaattatctcccagcaggggtggcgtgtgacatcaggtcgttataaatttgggtggccactactgca
601 I S N Y L P G R V A C D I R L V I I C V A T T A
1951 gcagttctcctcgtgttcatgttaatttgcataatcagcctaccggtgtacaccaagaccagctaccagatc
626 A V L L V F M V I C Y I F D L P W Y T K A T Y Q I
2026 atcagagccaaatacagagtgtagaaggagaaggcagctggggaagtgggaacgtacgctaccatgaccttata
651 I R A K Y R V Y K E K A A G E V G T Y A Y H A F I
2101 tcctacagcactgggagcagctgggtgagagatcagctcctgctgctggaagacagcaagaaccttac
676 S Y S H W D A D W V R D Q L P C L E D S K N P Y
2176 cgctgtgcttaccatgagggacttctgctgggaagtggatcatcgtataacatcagcaaacattgaaac
701 R L C I H E R D F M P G K W I I D N I I E N I E N
2251 agtcgcaaggctatctctcctcaccgctatttgcacacagtgagtggtgcaactacgagctgtactttggc
726 S R K A I F V L S R H F V N S E W C N Y E L Y F A
2326 cagcagagagctatgggaagacccttcagtgatgcatcctgggtggtagaggcccaatcccagctctctc
751 Q Q R A M G K T F S D V I L V V K E P I N P S S L
2401 ccaaaacagtagtcaagctcaagaagatgctgagcaccagaacatacctggagtgggccacagcaggtcagccg
776 P N K Y C K L K K M L S T K T Y L E W P Q Q V S Q
2476 caggtcttcttctgggacagctccggatgttctgggtgagaccatcgccaacacatcaagaagatcacagtga
801 Q A F F W A Q L R S V L G R P S P T T S R R Y S A
2551 aggagcaggcagctacaccgggaaactcaaccgctggatgacaccggaccggacaatgggaagcttaagtacc
827 R S R T Y T E E T Q P L D D T G P D N G K L N V A
2626 atcgtaggtgaacctggaaaataacagagaaaaatagtgacgtggccaatcagagacaactgctgtggctgga
852 I V G E P G N K I Q E N S D V A N Q R Q L P V A G
2701 aatataagatgaaataaaccttccggaatactcttatgaataggaggctggagcctattccagatgcttacagcgtg
877 N
2776 cagtagtaccatttgcagtttaattgtgggaattacagcccgaagtaggggaagaacactctgacgcccacagtggt
2851 cagcccaaggttagaccatgacattttaaagcaggggtacttgacacagccacatgcttacatcaaatc
2926 aattcaattacacaaaataatagatgcatcttcaagatgaattttcactggtcaccatttccggcctattaat
3001 ttggcccaatattataagaaaaaactttggacacatgacagtagcagcttcaactgctgtaaaatttggcagctc
3076 ccagcttaaaagggcaccataaaaggttttggagaaacagagactgacccaactgggaaactagacaagccatt
3151 tgcttacagctataatgatgtgtgacgctcaataatcacttggccactacgggaaatcagcttctgcaatt
3226 gtaaaaatcagacatgcttaattatgttgaagggtgcttctgttactttactatcccaatacagtagtta
3301 cagttagcttattaacaactgttagcacatgaagttaaatgcacacttccatttttttttttttttcttcttggact
3376 gcaattgatcttttgtgcttttggctgtgacccgaacattgtatttcttggattaaaaattatcttttactgaaa
3451 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 河川沙塘鳢 TLR2 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

注: 推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方, 为大写字母; 星号表示终止密码子; 灰色阴影部分表示结构域; 双下划线表示 poly (A)尾巴

Figure 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O. potamophila* TLR2 cDNA

Note: Translated amino acid sequence is shown under nucleotide sequence and in bold character; The stop codon was marked by an asterisk; The domains were highlighted as shadowed areas; The signal peptide was underlined; The poly (A) signal sequence was double-underlined

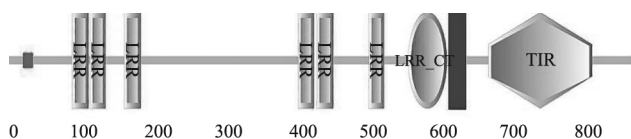


图2 *TLR2* 结构域

Figure 2 Domain structure of *TLR2*

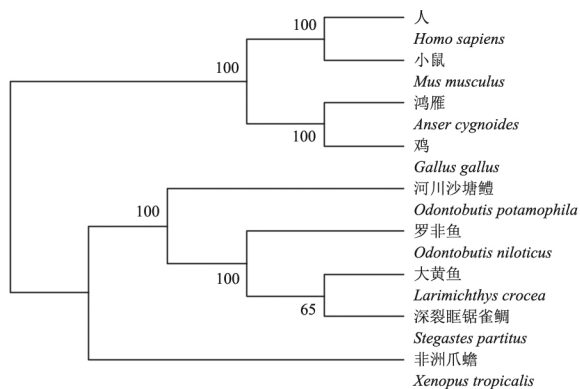


图3 河川沙塘鳢与其他物种 *TLR2* 基因的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of *TLR2* gene from *O. potamophila* and other vertebrates

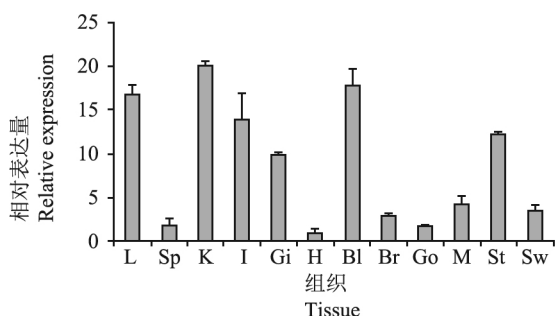


图4 *TLR2* 基因在健康河川沙塘鳢不同组织中的表达

注: 图中以 β -actin 作为内参基因, 柱状图显示为平均值 \pm 标准差(n=3); 图中 L, Sp, K, I, Gi, H, Bl, Br, Go, M, St 和 Sw 依次代表肝, 脾, 肾, 肠, 鳃, 心脏, 血液, 脑, 性腺, 肌肉, 胃及鳔

Figure 4 *TLR2* gene expressions in various tissues of healthy *O. potamophila*

Note: β -actin was used as internal reference genes, the bars graph indicated the mean \pm SE (n=3); The letter L, Sp, K, I, Gi, H, Bl, Br, Go, M, St and Sw meant liver, spleen, kidney, intestine, gill, heart, blood, brain, gonad, muscle, stomach and swim bladder respectively

果显示, 河川沙塘鳢 *TLR2* 基因在检测的 12 种组织中均有表达, 只是表达水平存在组织特异性。河川沙塘鳢 *TLR2* 基因在肝、肾、肠、血液中都具有很高的表达水平, 鳃中表达程度中等。*TLR2* 在斑马鱼(*Brachydanio rerio*)、牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)等多种鱼类的脾脏、头肾、肝脏等组织均有表达(Hirono et al., 2004; Meijer et al., 2004;

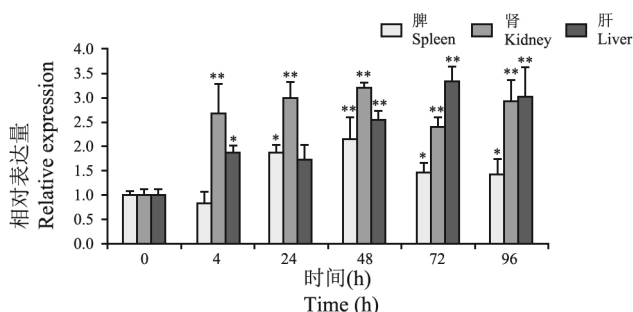


图5 *TLR2* 基因在河川沙塘鳢 3 种组织中不同时间段的表达量比较

注: 图中以 β -actin 作为内参基因, 柱状图显示为平均值 \pm 标准误(n=3); * 表示显著性差异($p < 0.05$); ** 表示极显著差异($p < 0.01$)

Figure 5 Expression comparison of *TLR2* gene in three tissues of *O. potamophila* at different time

Note: β -actin was used as internal reference genes, the bars graph indicated the mean \pm SE (n=3); * meant statistical significance ($p < 0.05$); ** meant highly significant difference ($p < 0.01$)

Baoprasertkul et al., 2007; Wei et al., 2011; Samanta et al., 2012) 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) *TLR2* 主要表达于头肾和脾(Baoprasertkul et al., 2007), 在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的表达类似于斑点叉尾鲷(Wei et al., 2011)。*TLR2* 普遍在免疫器官和组织中高水平表达, 暗示 *TLR2* 在固有免疫中发挥重要作用。

本研究采用 RT-PCR 技术研究了人工感染嗜水气单胞菌后, 河川沙塘鳢 *TLR2* 基因在 3 种主要免疫器官中的表达变化。*TLR2* 在脾中感染后 4 h 表达水平发生下降, 随后的 24~48 h 上升, 48 h 时达到顶峰, 72~96 h 维持在略低于 24 h 水平上, 这与斑点叉尾鲷感染爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)后 *TLR2* 的表达变化相一致(Baoprasertkul et al., 2007)。在肾中, 感染后表达水平持续上升, 且 24~96 h 间的表达水平比较一致。在肝组织中, 感染后一直呈现上升趋势, 72 h 时达到顶峰, 其他时段表达水平相差不大。受到海鱼分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)感染 8 周后的斑马鱼其 *TLR1* 与 *TLR2* 在 mRNA 水平上的表达量在血液和淋巴组织的表达量都显著增加(Meijer et al., 2004); 牙鲮受到 poly :C 和肽聚糖刺激后其外周血细胞中 *TLR2* 表达量显著上升(Hirono et al., 2004)。应用 LPS 和 poly :C 腹腔注射斜带石斑鱼 24 h 后, *TLR2* 在免疫器官中均呈显著上调(Wu et al., 2008)暗示斜带石斑鱼 *TLR2* 在病毒感染和细菌感染中发挥重要作用。通过以上研究可认为鱼类 *TLR2* 基因识别 PAMP 的范围可能要比哺乳类 *TLR2* 更为广泛, 可能对革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌及病毒都有识别作用。此外, *TLR2* 可以分别与 *TLR1* 或 *TLR6* 形成

异源二聚体,可识别有出三酰基脂肽和二酰基脂肽的细微差别(Takeda and Akira, 2005),还可与 CD36 和 CD14 结合,扩大了识别配体的种类(Kawai and Akira, 2010)。最近研究表明鱼类的 TLR2 与肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan-recognition protein, PGRP)结合(Chang and Nie, 2008),与哺乳类 TLR2 一样结合磷壁酸和 PGN (Ribeiro et al., 2010)。可见,鱼类的 TLR 与哺乳动物的相应 TLR 似乎在功能上有所差别,TLR 能与哪些配体结合,以及与哪些受体结合参与识别还有待进一步深入研究。

本研究通过分子生物学技术方法,首次克隆获得河川沙塘鳢的 *TLR2* 基因的 cDNA 全序列,应用生物信息学方法分析其核苷酸及氨基酸序列,并预测蛋白质的结构和功能,并对河川沙塘鳢 *TLR2* 基因的组织分布及表达模式进行系统分析,这为研究 *TLR2* 基因在河川沙塘鳢免疫体系中的进化地位及与疾病抗性的相关性,为进一步研究其生物学活性、功能和表达调控以及揭示河川沙塘鳢免疫抗感染机制奠定理论基础。

3 材料与方法

3.1 实验材料

一龄河川沙塘鳢,体重约 30 g,由南京市水产科学研究所周岗基地提供。于实验室暂养 1 周,确定健康无病后开始试验。

3.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

用高纯度总 RNA 快速抽提试剂盒(离心柱型)提取健康河川沙塘鳢脾组织总 RNA,用于 RACE-PCR。提取总 RNA 操作过程中所用枪头和离心管均为 RNase-free 的产品。提取方法参照说明书进行。提取

的 RNA 在 -80°C 保存。用分光光度计测定样品 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 比值判断 RNA 纯度。

根据 HiScript™ 1ST Strand cDNA Synthesis Kit 的说明进行反转录,反应体系总共 10 μL 。在一个 RNase-free 离心管里按如下体系加入反应液(10 μL):总 RNA (1 pg~500 ng) 1 μL , 4 \times g DNawiperMix 2 μL , RNase-free water 5 μL ,用移液器轻轻吹打混匀,瞬时离心, 42°C 反应 2 min。在第 1 步的反应管中直接加入 5 \times qRT SuperMix 2 μL ,用移液器轻轻吹打混匀,瞬时离心,按以下程序 25°C 10 min 42°C 30 min, 85°C 5 min 进行逆转录反应。cDNA 产物可在 -20°C 储存或立即用于 qPCR 反应。

3.3 *TLR2* 基因片段的获得和全长 cDNA 的克隆

根据从河川沙塘鳢转录组测序的 cDNA 文库中筛选得到 350 bp 的 *TLR2* 的 cDNA 中间 EST 序列,采用 Invitrogen 公司的 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 试剂盒获得基因的 5' 端序列。采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒获得目的基因的 3' 端序列。克隆基因所需引物已经列出(表 1)。

3.4 *TLR2* 基因的生物信息学分析

利用 BLAST 对测序结果进行同源性检索(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。使用 DNASTar 等软件统计分析序列总长,确定其开放阅读框进而预测氨基酸序列。使用 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)对预测到的氨基酸序列进行结构和功能的分析。使用 Predict protein (<https://www.predict-protein.org/>)在线预测蛋白二级结构。用 MEGA 5.0 软件重复 1 000 次构建 N-J 系统发育树。

表 1 克隆基因所用引物

Table 1 Primers used for genes cloning

引物名称	引物序列(5'-3')	应用
Primer name	Primer sequences (5'-3')	Application
<i>TLR</i> -R-GSP1	GCACTCGGCTGTTGAT	5' RACE
<i>TLR</i> -R-GSP2	AACTCATCTCCTTTGTTTGAATG	
<i>TLR</i> -R-GSP3	CATAATAACTTAGATTGGAAGAA	
AUPA	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
<i>TLR</i> -GSP3	TGCAGCGTTTTGCTATAAAAATGTTCTTCCA	3' RACE
<i>TLR</i> -NGSP3	GGAGATGAGTTTTGACATGGCTATAGATCA	
UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
3'-CDs primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	

3.5 *TLR2* 基因在健康河川沙塘鳢不同组织表达特异性分析

取 3 尾健康试验鱼的 12 种组织(肝, 血, 肾, 肠, 鳃, 心脏, 脾, 脑, 性腺, 肌肉, 胃及鳔), 提取总 RNA 后, 进行反转录获得 cDNA 第一链。依据获得的河川沙塘鳢 *TLR2* 基因 cDNA 全长序列分别设计特异性引物 *TLR2*-F/*TLR2*-R, 另外 *TLR2* 的 β -*actin* 引物为 β -*actin*F/ β -*actin*R (表 2)。分别以 12 种组织的 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 检测不同组织中 mRNA 的表达。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L :10 μ L Faststart Universal SYBR Green Master, 4 μ L (5 ng/ μ L) cDNA 模板, 2 μ L 引物(6 mmol/L), 4 μ L RNase-free water。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存。3 次重复实验以减少误差。

试验结果数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算目的基因的相对表达量, 应用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析、差异显著性检验分析。用 *t* 检验计算 *p* 值, 当 *p* < 0.05 时认为差异显著, *p* < 0.01 认为极显著差异。数值采用均值 \pm 标准差 (Means \pm SE) 表示。

3.6 *TLR2* 基因应对嗜水气单胞菌感染下的 mRNA 表达水平分析

为进一步分析河川沙塘鳢在受到病原侵袭时不同组织中 *TLR2* 基因 mRNA 表达水平的变化, 腹腔注射嗜水气单胞菌, 嗜水气单胞菌由江苏省水生疾病防控中心提供, 接种至 LB 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期, 离心机离心收集菌体, 使用 0.85% 无菌生理盐水配制成细菌悬液。经预试验后调整菌液浓度为 1.5×10^8 cfu/mL。实验组腹腔注射剂量为 0.2 mL/尾, 对照组每尾注射相同剂量的生理盐水。分别在注射后的 0 h、4 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 各随机取 3 尾河川沙塘鳢, 分别取肝、脾和肾组织提取总 RNA 后进行实时荧光定量 PCR, 方法同上。

表 2 荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primers used for quantitative real-time PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequences (5'-3')
<i>TLR2</i> -F	TGAGCATGTCAAGCAGAGCA
<i>TLR2</i> -R	CGACCTGAGATTGCAGCGTTT
β - <i>actin</i> F	TGGACTTCGAGCAGGAGATGAG
β - <i>actin</i> R	AAGGAAAGATGGCTGGAAGAGG

作者贡献

尹绍武是本项目的主要负责人, 也是实验设计的主要人员; 于兴达和汪亚媛主要负责论文写作和部分实验操作; 王佩佩负责数据处理和部分图表制作; 贾秀琪负责数据分析; 张国松、陈树桥和周国勤参与论文修改。全体作者都阅读并同意最终的版本。

致谢

本研究由江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2-013441)、“江苏省六大人才高峰”高层次人才项目(2012-NY-032)、南京师范大学科技成果转化基金项目(2013-02)和江苏省 2015 年度普通高校研究生实践创新计划项目(SJLX15_0300)共同资助。

参考文献

Akira S., Uematsu S., and Takeuchi O., 2006, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell*, 124(4): 783-801

Aoki T., Takano T., Santos M.D., Kondo H., and Hirono I., 2008, Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives, *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress, pp.263-276

Baoprasertkul P., Peatman E., Abernathy J., and Liu Z., 2007, Structural characterisation and expression analysis of toll-like receptor 2 gene from catfish, *Fish & Shellfish Immunol.*, 22(4): 418-426

Chang M.X., and Nie P., 2008, RNAi suppression of zebrafish peptidoglycan recognition protein 6 (zPGRP6) mediated differentially expressed genes involved in toll-like receptor signaling pathway and caused increased susceptibility to *Flavobacterium columnare*, *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 124(3-4): 295-301

Colonna M., 2007, TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own, *European Journal of Immunology*, 37(2): 306-309

Fan Z.J., Zou P.F., and Yao C.L., 2015, Toll-like receptors (TLR) and its signaling pathway in teleost, *Shuisheng Shengwu Xuebao (Acta Hydrobiologica Sinica)*, 39(1): 173-184 (范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾, 2015, 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展, *水生生物学报*, 39(1): 173-184)

Fitzgerald K.A., Palsson-Mcdermott E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., and O'Neill L.A., 2001, Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction, *Nature*, 413(6851): 78-83

Hirono I., Takami M., Miyata M., Miyazaki T., Han H.J., Takano

- T., Endo M., and Aoki T., 2004, Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Immunogenetics, 56(1): 38-46
- Janeway C.J., and Medzhitov R., 2002, Innate immune recognition, Annual Review of Immunology, 20(1): 197-216
- Kawai T., and Akira S., 2006, TLR signaling, Cell Death & Differentiation, 13(5): 24-32
- Kawai T., and Akira S., 2010, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors, Nature Immunology, 11(5): 373-384
- Medzhitov R., 2001, Toll-like receptors and innate immunity, Nature Reviews Immunology, 1(2): 135-45
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., and Janeway Jr C.A., 1998, MyD88 is an adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways, Molecular Cell, 2(2): 253-258
- Meijer A.H., Gabby Krens S.F., Medina Rodriguez I.A., He S., Bitter W., Ewa Snaar-Jagalska B., and Spaink H.P., 2004, Expression analysis of the toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish, Molecular Immunology, 40(11): 773-783
- Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'Amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., and Mantovani A., 2000, Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of *TLR3* in dendritic cells, Journal of Immunology, 164(11): 5998-6004
- O'Neill L.A.J., and Bowie A.G., 2007, The family of five: TIR-domain-containing adaptors in toll-like receptor signaling, Nature Reviews Immunology, 7(5): 353-364
- Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., and Seya T., 2003, TICAM-1, an adaptor molecule that participates in toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, Nature Immunology, 4(2): 161-167
- Qian X., Huang X.X., Hua X.M., Leng X.J., and Zhou H.Q., 2008, cDNA sequence analysis and tertiary structure prediction of toll-like receptor 3 gene from *Carassius auratus gibelio*, Shuichan Xuebao (Journal of Fisheries of China), 32(2): 190-199 (钱曦, 黄旭雄, 华雪铭, 冷向军, 周洪琪, 2008, 异育银鲫 Toll 样受体 3 的 cDNA 序列分析与蛋白质高级结构预测, 水产学报, 32(2): 190-199)
- Ribeiro C.M.S., Hermaen T., Taverne-Thiele A.J., Savelkoul H. F.J., and Wiegertjes G.F., 2010, Evolution of recognition of ligands from gram-positive bacteria: similarities and differences in the *TLR2*-mediated response between mammalian vertebrates and teleost fish, Journal of Immunology, 184(5): 2355-2368
- Samanta M., Swain B., Basu M., Panda P., Mohapatra G.B., Sahoo B.R., and Maiti N.K., 2012, Molecular characterization of toll-like receptor 2 (*TLR2*), analysis of its inductive expression and associated down-stream signaling molecules following ligands exposure and bacterial infection in the indian major carp, rohu (*Labeo rohita*), Fish & Shellfish Immunology, 32(3): 411-425
- Sangrador-Vegas A., Martin S.A., O'Dea P.G., and Smith T.J., 2000, Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type interleukin-1 receptor cDNA, European Journal of Biochemistry, 267(24): 7031-7037
- Sousa C.R.E., 2004, Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls, Seminars in immunology, 16(1): 27-34
- Su J.G., Zhu Z.Y., and Wang Y.P., 2009, cDNA cloning and characterization of toll-like receptor 3 in bluntnose black bream, *Megalobrama amblycephala*, Shuisheng Shengwu Xuebao (Acta Hydrobiologica Sinica), 33(5): 986-993 (苏建国, 朱作言, 汪亚平, 2009, 团头鲂 Toll 样受体 3 基因的克隆及特征研究, 水生生物学报, 33(5): 986-993)
- Takeda K., and Akira S., 2005, Toll-like receptors in innate immunity, International Immunology, 17(1): 1-14
- Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R.L., and Akira S., 2002, Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, Journal of Immunology, 169(1): 10-14
- Wei Y.C., Gao Q., Chang M.X., and Luo T.R., 2011, Cloning and expression of *MyD88* gene in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 30(3): 288-295 (韦友传, 高谦, 昌明先, 罗廷荣, 2011, 斜带石斑鱼 *MyD88* 基因的克隆与表达, 基因组学与应用生物学, 30(3): 288-295)
- Wei Y.C., Pan T.S., Chang M.X., Huang B., Xu Z., Luo T.R., and Nie P., 2011, Cloning and expression of toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, Veterinary Immunology & Immunopathology, 141(3-4): 173-182
- Wu H.L., Wu X.Q., and Xie Y.H., 1993, A revision of the genus *Odontobutis* from China with description of a new species, Shanghai Shuichan Daxue Xuebao (Journal of Shanghai Fisheries University), 2(1): 52-61 (伍汉霖, 吴小清, 解玉浩, 1993, 中国沙塘鳢属鱼类的整理和一新种的叙述, 上海水产大学学报, 2(1): 52-61)
- Wu X.Y., Xiang L.X., Huang L., Jin Y., and Shao J.Z., 2008, Characterization, expression and evolution analysis of toll-like receptor 1 gene in pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*), International Journal of Immunogenetics, 35(3): 215-225
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K., and Akira S., 2003, TRAM is specifically involved in the toll-like receptor

- 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nat. Immunol.*, 4(11): 1144-1150
- Zhang J., Shen S.D., Xu J.R., Han X.L., and Xu P., 2011, Study on embryonic development of *Odontobutis potamophila*, *Danshui Yuye* (Freshwater Fisheries), 41(3): 83-90 (张君, 沈颂东, 徐建荣, 韩晓磊, 许璞, 2011, 河川沙塘鳢胚胎发育的研究, *淡水渔业*, 41(3): 83-90)
- Zhang L.J., Zhu F., Yin S.W., Hou X.Y., and Hu Y.L., 2013, Karyotypes of *Odontobutis potamophila* (♀) × *Odontobutis yaluensis* (♂) and their hybrid progeny, *Haiyang Yuye* (Marine Fisheries), 35(2): 183-188 (张丽娟, 祝斐, 尹绍武, 侯新远, 胡亚丽, 2013, 河川沙塘鳢(♀) × 鸭绿沙塘鳢(♂) 双亲及其杂交子代的核型分析, *海洋渔业*, 35(2): 183-188)
- Zhu F., Luo J., Yin S.W., Zhang L.J., Hou X.Y., and Hu Y.L., 2014, Isolation and characterization of twenty-eight polymorphic microsatellite markers in *Odontobutis potamophila* and cross-amplification in other Gobioidae, *Conservation Genetics Resources*, 6(3): 601-604

《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的月刊科学期刊。《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学和应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶和发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表和引用文献等均实行中英文对照。

《基因组学与应用生物学》前身是原《广西农业大学学报》,创刊于1982年。《基因组学与应用生物学》(原名《广西农业生物科学》)入编了2011年版北大图书馆《中文核心期刊要目总览》核心期刊,是中国科学引文数据“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA: JYSAZ)、美国《剑桥科学文摘: 自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

《基因组学与应用生物学》(Genomics and Applied Biology) ISSN1674-568X, CN45-1369/Q, 邮发代号: 48-213; 月刊, 每月25日出版, 国内定价: ¥40.00/期, ¥480.00/年; 国际定价: \$40.00/期, \$480.00/年。

订户可到当地邮局订阅或直接通过邮局汇款至编辑部。

邮局汇款:

地址: 广西南宁市大学东路100号广西大学西校园《基因组学与应用生物学》编辑部1楼111室

邮编: 530004

收款单位: 《基因组学与应用生物学》编辑部

联系电话: 0771-3239102 0771-3232621 传真: 0771-3232621

E-mail: gab@gabcn.org 网址: www.gabcn.org