

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)Toll 样受体 2 (TLR2)基因克隆及免疫功能*

覃川杰¹ 龚全² 文正勇¹ 袁登越¹ 王均¹ 贺扬¹ 邵婷¹

(1. 内江师范学院生命科学学院 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室 内江 641112;

2. 四川省农业科学院水产研究所 成都 611731)

摘要 为探究 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)及下游免疫分子对瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)机体的保护作用,本研究采用 RT-PCR 及 RACE 法获得瓦氏黄颡鱼 TLR2 全长 cDNA (2611bp), 编码 789 个氨基酸残基, 含有 10 个富含亮氨酸的重复序列(Leucine Rich Repeat, LRR)和 Toll/IL-1R (Toll/IL-1 Receptor Domain, TIR)同源区结构域, 属 I 型跨膜受体。序列同源性比对发现, 瓦氏黄颡鱼 TLR2 cDNA 与斑点叉尾鲷、鲤及虹鳟的同源性分别为 78%、62%及 49%。系统进化树分析表明, 瓦氏黄颡鱼 TLR2 与斑点叉尾鲷聚为一支。qRT-PCR 分析表明, TLR2 mRNA 在检测的组织中均有表达, 且在头肾和脾脏中表达水平显著高于其他组织($P<0.05$)。嗜水气单胞菌感染能显著上调瓦氏黄颡鱼肝脏、头肾及脾脏中 TLR2 mRNA 表达($P<0.05$), 分别在 24h、48h 及 12h 达到最大值。头肾中的 TLR 2 信号通路下游的髓样分化因子、半胱氨酸蛋白酶 8、核转录因子 kappa B、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β mRNA 均显著上升($P<0.05$), 分别在 24h、12h、48h、48h 和 48h 达到最大值。结果表明, 嗜水气单胞菌感染激活了 TLR2 信号通路, 通过上调表达, 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 等。本研究表明, TLR2 在瓦氏黄颡鱼抵御嗜水气单胞菌侵染的过程中发挥了重要的免疫作用。

关键词 瓦氏黄颡鱼; Toll 样受体 2; cDNA; 免疫功能

中图分类号 Q789

doi: 10.11693/hyhz20170700193

鱼类获得性免疫组成与结构较为简单, 获得性免疫应答的发生相对滞后, 应答效能较低。因此, 先天性免疫在抵御病原微生物入侵过程中发挥了重要作用 (Zhu *et al.*, 2013)。模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原体细胞表面的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 后, 激活机体的先天性免疫和获得性免疫, 以清除入侵的病原 (Kawai *et al.*, 2009)。除 TOLL 样受体 (Toll like receptors, TLRs), 模式识别受体家族还包括 RIG-I 样受体 (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RLRs) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs) (Lee *et al.*, 2007)。Toll

样受体是天然免疫系统中的重要成分之一, TLR 识别病原中的 PAMP 后, 通过级联反应, 激活下游的免疫细胞因子, 调节靶基因的表达, 发挥非特异性的免疫作用, 也能够促进机体发挥特异性免疫反应, 从而清除病原体 (Akira *et al.*, 2006)。目前, 在哺乳动物中, 至少有 13 种 TLRs 已被克隆分离, 而硬骨鱼类中已鉴定获得了至少 17 种不同的 TLRs (Akira, 2004; Roach *et al.*, 2005)。在鱼类中, LR3-5 及 TLR7 等亚家族相关分子的基因序列、mRNA 表达及蛋白功能的研究较为深入, 而鱼类 TLR2 的基因结构、mRNA 表达分析仅见斑马鱼、牙鲈、斑点叉尾鲷及大黄鱼等少数几种鱼类中 (Meijer *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2011; Baoprasertkul *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2015)。TLR2 一般包含 6—10 个

* 国家自然科学基金项目, 31402305 号; 四川省科技厅应用基础项目, 2017JY0161 号; 四川省“十三五”育种攻关项目, 2016NYZ0024 号; 四川省教育厅项目, 2014ZA0249 号。覃川杰, 博士, 副教授, E-mail: qinchuanjie@126.com

收稿日期: 2017-07-21, 收修改稿日期: 2017-08-26

LRR 结构域, TIR 结构域的氨基酸数在 145—160。斑马鱼、牙鲆、斑点叉尾鲷等鱼类中的病菌浸染实验表明, TLR2 分子可能细菌及病毒都有识别作用, 包括革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌, 发挥了重要的非特异性免疫作用。

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)隶属于鲇形目、鲿科、黄颡鱼属, 其肉质细嫩、味道鲜美, 且生长较快, 深受养殖户和消费者青睐, 已成为一种重要的名优经济养殖鱼类。近年来, 随着养殖规模的扩大、养殖密度的提高、种质资源退化及养殖水体恶化等, 在苗种培育和养成阶段, 嗜水气单胞菌和迟钝爱德华氏菌等导致瓦氏黄颡鱼、黄颡鱼等暴发性发生“红头病”、“腐皮病”及“腹水病”等, 造成了大量经济损失(梁正生等, 2012; 李强等, 2014)。目前对于瓦氏黄颡鱼的抗细菌感染的分子机制及免疫机制的研究较少。嗜水气单胞菌能显著促进瓦氏黄颡鱼肝脏、脾脏和肾脏补体 C8 α 、C8 β mRNA 表达等(Qin *et al.*, 2017a)。作为一种重要的识别病原分子, TLR2 参与瓦氏黄颡鱼先天性免疫, 抵御病原侵染机制还有待深入研究。因此, 本实验克隆瓦氏黄颡鱼 TLR2 cDNA, 为深入了解 TLR2 在鱼类炎症反应中的分子免疫机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)平均体重为 15.49 ± 2.18 g, 驯养 30 天后。实验期间, 水温(25 ± 2) °C, pH=7.27 $\pm$ 0.4, 溶氧充足。选择健康的瓦氏黄颡鱼 240 尾随机分为对照组和实验组, 每组三个平行, 每个平行 40 尾。在腹腔处为对照组每尾鱼注射 100 μ L 的生理盐水, 采用相同方式为实验组每尾鱼注射 100 μ L 的嗜水气单胞菌菌液(0.85 ± 10^9 CFU/mL), 分别在 0h、6h、12h、24h、48h 和 96h 随机从对照组和实验组取 9 尾瓦氏黄颡鱼(3 尾/每个平行), 丁香酚麻醉后解剖, 分别取肝脏、脾脏和头肾, 无菌水清洗后置入液氮, 后保存于-80°C。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

按照 RNAiso Plus (TaKaRa)试剂操作步骤提取瓦氏黄颡鱼肝脏的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板, 采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒合成 cDNA。

1.3 TLR2 基因 cDNA 克隆

从瓦氏黄颡鱼肝脏转录组 (BioProject ID:

PRJNA362523)挑取 TLR2 Unigens (Qin *et al.*, 2017b), 设计和合成基因特异性引物 TLR2-S 和 TLR2-A(表 1)。以肝脏总 RNA 为模板, 按照 5'-RACE System (Clontech)试剂操作步骤合成 cDNA 后, 以引物为 TLR2-A 和 UPM 扩增 TLR2 5'端。以肝脏总 RNA 为模板, 采用 SMART ScribeTM Reverse Transcriptase (Clontech)和引物 3'-CDS primer A 合成 cDNA 后, 以引物为 TLR2-S 和 UPM 扩增 TLR2 3'端。扩增产物由上海生工生物技术有限公司纯化、克隆及测序。

1.4 TLR2 基因序列与氨基酸序列的同源性分析

分别采用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)、ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>)进行同源比较分析瓦氏黄颡鱼 cDNA 和推导瓦氏黄颡鱼 cDNA 氨基酸序列。采用 Motif Scan 和 Expasy (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>, <http://prosite.expasy.org/>)分析瓦氏黄颡鱼 TLR2 蛋白的序列特征。采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)进行三级结构的预测, 以邻接法(Neighbour-joining, NJ)构建系统进化树, 用自展法(Bootstrap)进行 1000 次重复检验。

1.5 TLR2 基因组织表达分析

随机选取 9 尾健康的瓦氏黄颡鱼, 冰上麻醉后, 分别取机体的 9 个组织(鳃、脑、心脏、肝脏、脾脏、头肾、肠道、皮肤及肌肉), 分别采用 RNAiso Plus (TaKaRa)试剂盒、Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)提取总 RNA 和合成 cDNA。采用 Roche Light Cycler Nano (USA)进行荧光定量 PCR。PCR: 稀释的 cDNA 模板 1 μ L、Fast Start Essential DNA Green Master 10 μ L、10 μ mol/L 引物 Q-TLR2a 和 Q-TLR2s 各 2 μ L(表 1)、水 5 μ L, 总体积 20 μ L。反应条件均为: 95°C 预变性 5min; 95°C 变性 10s、65°C 退火 5s、72°C 延伸 10s, 共 45 个循环。以肝脏 mRNA 表达为对照, 以瓦氏黄颡鱼 β -actin 为内参基因(表 1) (Zheng *et al.*, 2010), 采用 Livak 和 chmittgen 建立的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组织 TLR 2 mRNA 的表达水平(Livak *et al.*, 2001)。目的基因相对表达量用平均值 $\pm$ 标准差表示。嗜水气单胞菌感染瓦氏黄颡鱼后, 肝脏、脾脏和头肾中基因 TLR 2 mRNA 表达分析方法同上。头肾中 TLR 2 信号通路下游的髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88), 半胱氨酸蛋白酶 8 (Caspase 8, CASP8), 核转录因子 kappa B (NF- κ B), 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF α), 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)

mRNA 表达分析方法同上, 引物见表 1。

1.6 数据统计及分析

采用平均值±标准差(mean ± S.D.)表示 TLR2

mRNA 相对表达量, 采用 SPSS18.0 统计分析软件 t-检验分析不同组织和不同基因的相对表达水平, 当 $P<0.05$ 时差异显著。

表 1 本研究所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'—3')
Adapter Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA(T)30VN
Universal Primer Mix	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
TLR2-A	GTCCCTTAGAGTAATCAAGT GGTCG
TLR2-S	GTGGCAGAAAGCGAAGTGGA
TLR2-Qa	TTCGCTTTCTGCCACCAACC
TLR2-Qs	GGAGTCACGCTCATTCTAAAAGTATTG
β-actin-Qs	CACTGTGCCCATCTACGAG
β-actin-Qa	CCATCTCCTGCTCGAAGTC
Myd88-Qa	GGTGTAAAGAGGATGGTGGTTGTC
Myd88-Qs	TGTGGAGGGTCTGGTGTAGTCA
IL-1β-Qa	CTCCATGAAGATAGTGAAGAGGTCC
IL-1β-Qs	CAAAGGAATCCGTATCCAGGTCA
TNFα-Qa	CCTCAGGGAGTGCTTGATTTCCT
TNFα-Qs	TCAGGTTTGTGGATGTGGACG
NF-κB-Qa	CCTCGCTACCGAACAGGACA
NF-κB-Qs	TGTAGAGGCGTAGAGCCGTCAT
CASP8-Qa	CAGCAAACAAAAGCACGAAGG
CASP8-Qs	GAAGGTTCCGTTAAACAGGTCTG

2 结果

2.1 TLR2 cDNA 克隆和序列分析

从瓦氏黄颡鱼肝脏转录组挑取 TLR2 Unigenes, 设计基因特异性引物, 采用 RACE 技术克隆获得 TLR2 基因 5'和 3'端, 拼接后获得 TLR2 cDNA 序列, 全长 2611bp, 包含 2370bp 的开放阅读框, 138bp 5'-非编码区和 106bp 3'-非编码区。开放阅读框编码的 789 个氨基酸(图 1), 其中包括 20 个氨基酸组成的信号肽。序列比对分析表明, 瓦氏黄颡鱼 TLR2 氨基酸与斑点叉尾鲷、草鱼、虹鳟、鲢、狗的同源性分别为 78%、62%、64%、40%、43%(表 2)。

Motif Scan 和 Expasy 分析得出, 瓦氏黄颡鱼 TLR2

氨基酸序列含有一个跨膜结构域(590—612)、一个 TOLL/IL 受体结构域(643—788)、9 个富含亮氨酸的重复序列(51—72, 73—96, 98—120, 121—144, 359—384, 388—413, 414—437, 478—500, 535— 588)、一个 LRRCT 结构域(图 1, 图 2)。此外, 瓦氏黄颡鱼 TLR2 的 TIR 结构域还含有保守的 Box1、Box2 和 Box3 基序, 分别是 YDAFVSY、LCLHKRDFLPG、FW。由此可推断, 克隆得到的 cDNA 为瓦氏黄颡鱼 TLR2 基因, 将该 cDNA 序列提交 GenBank, 登录号为 KY982542。用 MEGA6.1 软件以邻接法(NJ)构建了 TLR2 的系统树(表 2), 采用 bootstrap 1000 个循环检验拓扑结构的置信度。结果表明瓦氏黄颡鱼 TLR2 与斑点叉尾鲷的进化距离最近, 与青蛤的亲缘关系最远(图 3)。

表 2 物种名称、序列号及相似性
Tab.2 Accession number, scientific name and identity of the members of TLR2 amino sequences

基因	物种	登录号	相似性(%)
TLR2	瓦氏黄颡鱼 <i>Pelteobagrus vachellii</i>	KY982542	
TLR2	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	AEI59663.1	77
TLR2	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	BAU98381.1	61
TLR2	南亚黑鲩 <i>Labeo rohita</i>	ADQ74644.1	58

1-38 tgcctccaagcttcattctgctggtatgaagcagcaagattttcttcctgtgatgcgaatttgtagttgtagttgtctgagctccacagcagaactaagacatccaaacacacagcagtggtgataatgaag

1 ATGAAGGCACTCACTGTCCATATTATCTGTTTGTAGCTGTCTGGAGCTGTGATCTCGACATCGAGAGACAAACTGTGAGGATGCGATGAAGATCTCTTCTGCGAGCTGTCTGCAAAAGACTTTCCACCACATACCCATAGTCCCAACC
1 M K A S L S I F I C F S L S W T R T R T S E R P N C D G C D E D L F C D C S A K T F H H I P I V P T

151 GAGTCTCTTCCCTTGAGCTGTCTTCAATAGAGATGAGTGCATTTATCAGAGAGATCTTACTGCATACAGAGCTGAGAACTTTAAAGCTGCAAGAACAAACATCAGCATGATCCACCAAGAGCGTTTGTATGCCAGCACAACATG
51 D V L S L D V S Y N E I E S I Y Q E D L T A Y T E L R L T L K L Q N N K L S M I H Q E A F D S Q H K L

301 GAGGAGCTTGATCTGTCTCAATGAATGAACAGTGAACAACTTATTCAGTGTGGTTTCTCATCTCGGCTCTCTGAAACATCTGAAACATCTGGGAAACCAATATACCACTTTGGGATCTGATGCCCTTTTCCATTTCTTAAAAATCTGCT
101 E E L D L S Y N E L E N I Y S V W F S H L R S L K H L N I L G N Q Y T T L G S D A L F P P L K N P A

451 CTGAAAAGCTCCAGTTCGGTAACAGCTTCATCAGGACGTGAACAGAGATGTGTGCTAATATGACAGCTGGATGAGCTGACTTTTGTGGTGTCTAACTAGATCATATGAGAACGGAAATTTCCAGATGGCTCAACCCATCAGG
151 L K K L Q F G N T F I K D V K Q N V L R N I A Q L D E L T F V G A N L R S Y E N G S F Q M A Q P I R

601 GTAGTTACATCAGCCTACAGGGTGTGTTTTCAGGAGATCCGGCTCTAGTATCAAGATCTCTCGAGATGTTCTCAACCTGAGACCTCCCTGATTATAGAGACACTTCTAGTGAAGACAAATGAACCCATACAAAGCTTTAAAGAGATC
201 V V T L S L Q G L F Q E N P A L V S K I L R D V S H P E T S L I I R D T S L K T N E P I Q T F K E I

751 CGTCAGGGTTGATCAGAAAGCTTTCTTTCAAAAGCTCAGCACAACATGACAGGGAGTCAAGCTCAATTTAAAGATTTGGATGGCTCTCGGCTGTCTTACATCGGTTTAGAGGATATTACCTTATCGGTAGGGGTGTGGTGGCAGAA
251 R Q G C T R R L S F Q N C S T T D E G V T L I L K V L D G S P V S Y I G L E D I Y L I G R G W W Q K

901 GCGAAGTGGACACTTAGAAAACCTACACACCATATTATTGCGCAACATAGAAATCAGGGGTCTCATCAGATTTAGCAGCATGTTACAGTATAGTGTCTGTTGAGACATCTACCAAGATATCCGTCATCACTGCATGTTTGTG
301 A K W T H L E N L H T I F M R N I E I Q G F I R S S M L Q L V L D K L T K I S V I N C T T V F G

1051 ATTCCGTCATCACCACCTATTCTTCAGCAGCTGCGAGTACTTGGACTTTGAGCCAAAATCTCCTATCGGATATCACCATGCAAGAACCTTATGCAATGGTAAATGCAATATGACACATCTGAACATGCTCAATGCTCAGTCACAACTCA
351 I P C I T T Y F L R H V E Y L D L S Q N L S D I T M Q E T L C N G K C N M H N L N M L N V S H N S

1201 CTGAAATCTCTCCAGCTCATGCGCAGCTGTCTGCGATCTCCAAAAGCTCAGCGGCTCGAGTGTGATCACAAGCACTTTTAAAAATGCCACAGGTTTGGATTTGGCCCAAGTCTCAGGTTCTGATATCTCTCTGCTATTAACCT
401 L K S L Q L I A S L V S H L Q K L T A L D V S H N D F L K M P Q V C D W P T S L R F L N L S A T K L

1351 CATAAGCTTACTCGTGCATACCTCTGAGCCTGACTGCTGTGGATTGAGCCAGCACTACCTCAGCGGTTCCACCTCCATCTTCCCAACTTATGAGGCTCTGGCTAACGAGAACAGGTTTATTTCCTACCAGAAAGTGAGCATGTT
451 H K L T P C I P L S L T A L D L S Q N Y L T A F H L H L P K L M E L W L T G N R F I S L P E G G Q F

1501 CCCAGCCTCAGATGCTGTTCAATCAAGAAACACATTGAACATGTTTAAACAAAAGGAGCTGATGAGCATTCAGCTGCTCCAGTCTTGGAAAGCTGTCAGAACATTTTGTGTCAGCTGTGAGTTGTAGATGCTTTTAAAGGTCAC
501 P S L Q M L F I Q R N T L N M F N K S D L M A F Q S L Q F L E A G Q N N F V C S C E F V E F F K G H

1651 GTGACCACTTGATTACTCTAAGGAGCGGACATCAGCATAGTGTGTGACTCTCCGCCCTGTTGAGAGATCTGACCATGATTAAGCTCAGCTCATGCTGTTTAAAGTGCATGATCTTGTGGTATCTGTGTCTGCTCTGTGACT
551 V D H L I T L R D G H H S Y V C D S P P S L R D L T I D N A Q L S V F K C H M I L S V S V V C S V T

1801 GTGTGCTGCTGATGCGCGCGGTAATGCGCTGTCAAGCTTCAAGCTCTTTGTATCTACAGATGACCGTGGCATGTTGAGGCGAAGGTAAACCGGCTGTATGACGCGCGGCGTAGTCTACGTCAGATGCTTTGTATCATAG
601 V V V L I A A V I A C Y K L H V F W Y L Q M T V A W L K A K G K P A V C S A G A S L R Y D A F V S Y

1951 AGTCAGCAGTATGAGTGGTGGTGAAGAAATCTGTGCGCAGGTTAGAAAGCTCTGATCTCTCGGTTGCTCTGTGCTGCAAGAGAGACTTCTCTCCAGCGCTGATGCTGCTGCAACATCATGAGTCCATTGAAGATGAGTAC
651 S Q H D A E W V E I L V P E L S D P P V A L C L H K R D F L P G R W I V D N I E S I E S S Y

2101 CGCATCTCTTGTCTGTCAGAGAACTTTGTGACGAGCGAGTGGTGGCGCTACGAGCTGACTTTTTCATCATTTCCGATCATGAGCAGAACACAGCATCGGCCATCTGATCTGCTGAGCGGATCGCCAAAGAGAGCATTTCTTAAG
701 R T L F V L S E N F V T S E W C R Y E L N F S H F R I M D E N N D S A I L I L L E P I A K E T I P K

2251 GGTGTTTGCAGAACTCGGCAAAATTAATGAATCCAGGAGCTGACTGAGTGGCTCAGGACGAAGAAAGGCGAGGAGAACTTTGGCACAACCTCGAGCTGTACTAAGAGAGAGGAGTACGagacacacacaccttttatccataatgaag
751 R F C K L R K I M N S R T Y L E W P Q D E E R R G E F W H N L R A V L K R E D *

2401 ttctgacacacttcagctgacatcgtctgctgggaaatctgactaataaagtatttttaactttccaaaaaaaaa

图 1 瓦氏黄颡鱼 TLR2 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

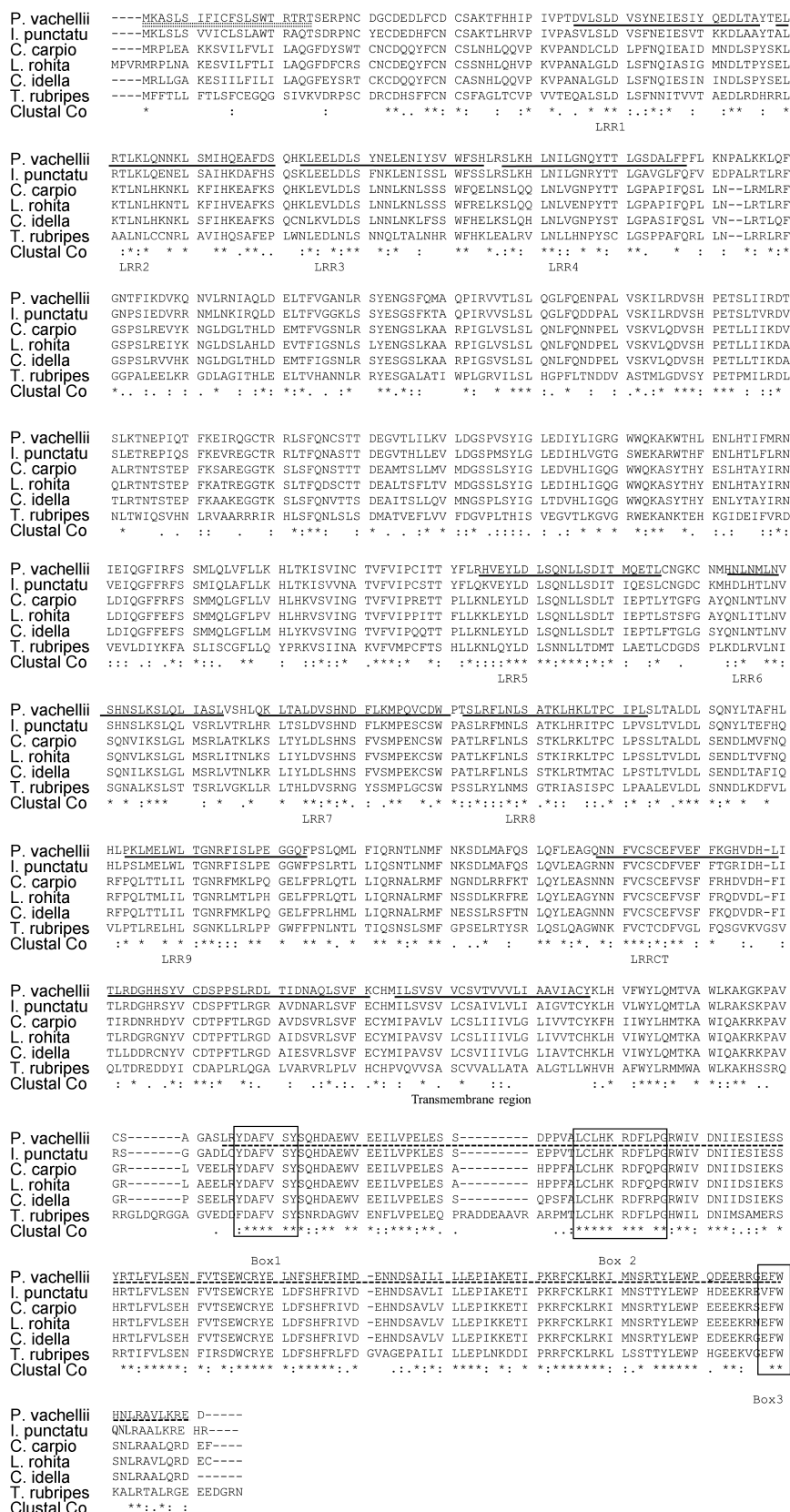


图2 瓦氏黄颡鱼与其他动物的TLR2氨基酸的多序列比对结果

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of TLR2 from *P. vachellii* and other species

注: 虚线、双虚线、下划线及方框分别表示 TIR、信号肽、LRR 及 Box 基序

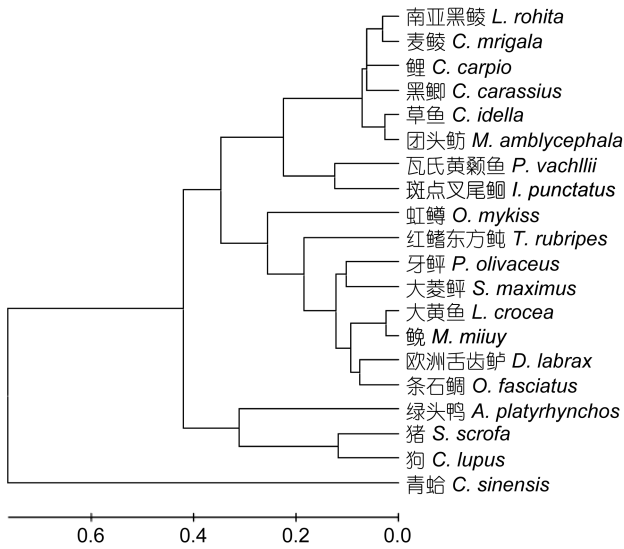


图 3 根据 TLR2 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of TLR2 amino acid sequences from different species

2.2 TLR2 基因的组织表达分析

荧光定量 PCR 检测结果显示, TLR2 mRNA 在健康瓦氏黄颡鱼的鳃、肝脏、脾脏、头肾、肠道、肌肉、皮肤、脑、心脏组织均有表达; TLR2 mRNA 在瓦氏黄颡鱼脾脏中的含量最高, 其次是头肾, 两者显著高于肝脏、鳃和肾脏等组织($P<0.05$), 在肠道中表达量最低(图 4)。

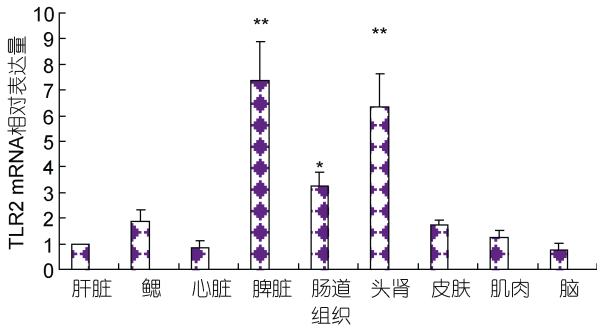


图 4 TLR2 在瓦氏黄颡鱼不同组织的表达

Fig.4 The expression level of TLR2 in tissues of *P. vachellii*
注: 与肝脏组织相比, *代表 $P<0.05$; **代表 $P<0.01$; 下同

2.3 嗜水气单胞菌感染后 TLR2 表达变化

嗜水气单胞菌感染后, 瓦氏黄颡鱼肝脏、脾脏和头肾中 TLR2 mRNA 表达水平分别在 6—48h、6—96h、6—96h 内显著增加($P<0.05$), 且呈现先上升后下降趋势(图 5a, b, c), 分别在 24h、24h 及 12h 达到最大值。

2.4 嗜水气单胞菌感染后 TLR2 下游基因表达变化

嗜水气单胞菌感染后, 头肾中 TLR 2 信号通路下

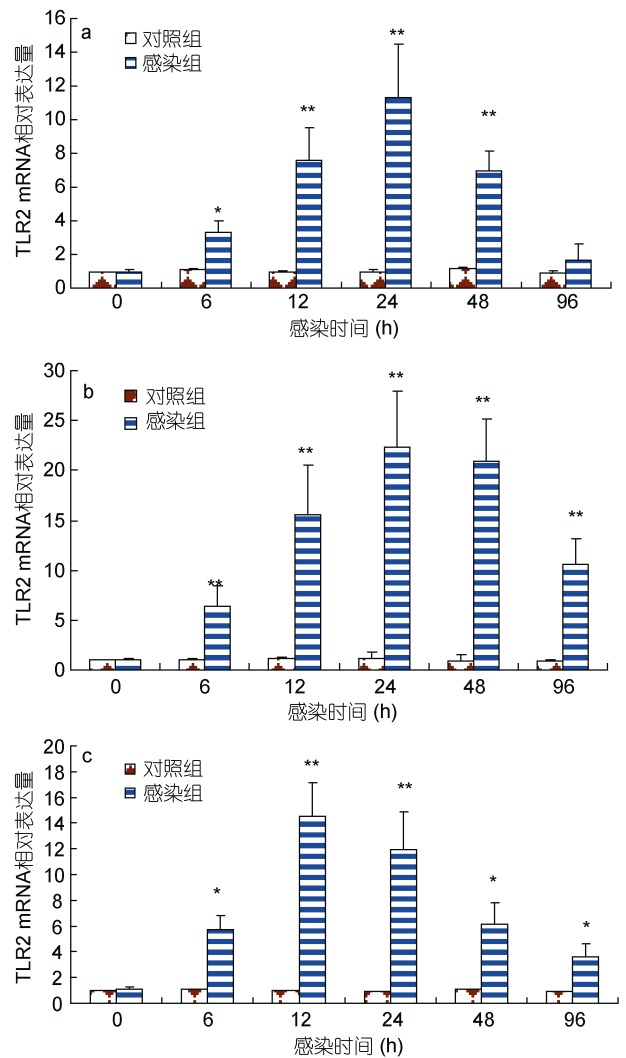


图 5 嗜水气单胞菌感染后, TLR2 mRNA 在肝脏(a)、脾脏(b)和头肾(c)内表达分析

Fig.5 The expression level of TLR2 in tissues after *Aeromonas hydrophila* challenge

游的髓样分化因子(MyD88)、半胱氨酸蛋白酶 8 (CASP 8)、核转录因子 kappa B (NF- κ B) mRNA 在 6—96h 内均显著上升($P<0.05$), 且分别在 24h、12h、48h, 达到最大值。肿瘤坏死因子(TNF α), 白细胞介素 1 β (IL-1 β) mRNA 在 6—192h 内均显著上升($P<0.05$), 均在 48h 达到最大值(图 6)。

3 讨论

TLR 属于模式识别受体家族, 是非特异性免疫系统中特异的 I-型跨膜受体, 能识别病原体细胞表面的病原相关分子模式(PAMPs), 从而激活机体的免疫防御等(Takeuchi *et al.*, 2010)。TLR2 氨基酸结构域在点带石斑鱼、银鲈、斑点叉尾鲷、大黄鱼、野鲮中较

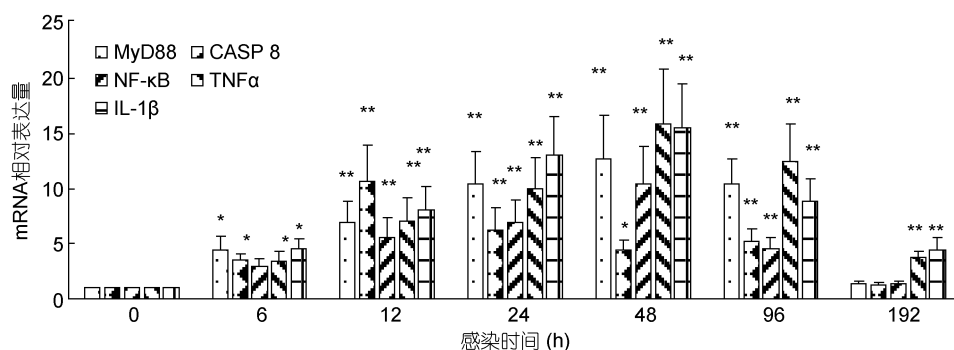


图6 嗜水气单胞菌感染后, TLR2 下游基因在头肾内表达分析

Fig.6 The expression level of downstream genes of TLR2 in head kidney after *A. hydrophila* challenge

为保守, 均含有富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)、有 Toll/IL-1 受体(Toll/IL-1 receptor domain, TIR)结构域及跨膜结构域等(Wei *et al.*, 2011; Samanta *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016)。在瓦氏黄颡鱼 TLR2 基因胞外区含有 8 个富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRRs), 不同于点带石斑鱼、斑点叉尾鲷、大黄鱼, 分别含有 9、8、10 个 LRR (Baoprasertkul *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2015), 而大菱鲆和南亚黑鲷 LRR 数量高达 19 个、21 个(Samanta *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016), 这可能与识别 PAMPs 的多少有关(Wei *et al.*, 2011; Samanta *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016)。与其他物种的 TLR2 相同, 瓦氏黄颡鱼 TLR2 分子胞内区含有 Toll/IL-1 受体结构域, 由 200 多个氨基酸残基组成(Barton *et al.*, 2006)。TIR 结构域位于 Toll 受体的 C 端, 位于胞内, 含有 3 个保守基序, 且不同动物的 TIR 结构域序列高度保守(Xu *et al.*, 2000)。Box 1 的典型氨基酸序列为“F/YDAF-SY”, 位于 TIR 结构域的 N 端约 4—10 位氨基酸残基处。Box 2 的典型氨基酸序列为“LCL-RD-PG”, 位于 TIR 结构域的 N 端约 45—55 位氨基酸残基处, 该区域包含 1 个被称为“BB loop”的精氨酸绝对保守 motif, 其氨基酸序列为“PG”。Box 3 的典型氨基酸序列为“Fw”, 位于 TIR 结构域约 160 位氨基酸残基处(Xu *et al.*, 2000)。瓦氏黄颡鱼 TLR2 的 TIR 结构域保守的 Box1、Box2 和 Box3 分别是 YDAFVSYS、LCLHKRDFLP、FW。多重序列比对分析表明, LRR、TIR 结构域及 3 个 Box 基序在哺乳动物及鱼类中高度保守。

据任毅鹏等(2014)报道, 青蛤 TLR2 基因在血淋巴中的表达量最高, 显著高于肝脏、鳃、外套膜、闭壳肌、性腺等组织。大黄鱼血液中 TLR2 mRNA 表达水平高于脾脏、头肾, 且在胃中的表达量最低(Wei

et al., 2011)。瓦氏黄颡鱼 TLR2 mRNA 在头肾及脾脏中表达水平显著高于鳃、肌肉、皮肤、肠道等组织。在大菱鲆中, TLR2 mRNA 主要在头肾、脾脏等免疫组织中表达, 显著高于脑、鳃、性腺等非免疫器官(Zhang *et al.*, 2016)。上述研究表达, 瓦氏黄颡鱼、大黄鱼及牙鲆等鱼类类似于哺乳动物, TLR2 主要表达在富含免疫细胞的组织中, 如脾脏和头肾。哺乳动物的 TLR2 主要表达于巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞、T 淋巴细胞等免疫细胞表面, 是连接天然免疫与获得性免疫的桥梁(罗兵等, 2011)。

在哺乳动物中, Toll 样受体存在于细胞膜上, 识别病原的脂多糖、肽聚糖、双链 RNA、鞭毛蛋白等 PAMP 后, 通过髓样分化因子, 激活下游的核转录因子(NF-κB)、干扰素等调控分子, 诱导肿瘤坏死因子、白细胞介素、干扰素等刺激细胞大量生成, 以杀灭和清除入侵的病原; 此外, Toll 样受体信号通路在连接先天性免疫与获得性免疫反应中起着重要的桥梁作用(Palti, 2011)。在鱼类中, 嗜水气单胞菌能显著诱导瓦氏黄颡鱼头肾、脾脏及肝组织中 TLR2 mRNA 的表达。海鱼分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)和爱德华氏菌(*E. ictulari*)能显著诱导斑马鱼、斑点叉尾鲷血液、头肾和脾脏组织中的 TLR2 mRNA 表达(Meijer *et al.*, 2004; Baoprasertkul *et al.*, 2007)。肽聚糖和 poly I:C 刺激后, 大菱鲆外周血细胞中 TLR2 基因 mRNA 表达显著增强(Zhang *et al.*, 2016)。白介素-1(IL-1)受体相关激酶家族(interleukin-1 receptor-associated kinases, IRAKs)是白介素-1 受体家族(IL-1, IL-18 和 IL-33 受体)和 TOLL 样受体(TLRs)信号通路中的重要信号分子, 能激活 TLRs 信号通路的下游免疫相关分子(Janssens *et al.*, 2003)。IRAKs 能与髓样分化因子(MyD88)的死亡结构域形成一个 Myddosome 复合体

后, 与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6)结合, 从而激活 NF- κ B 介导的系列信号通路(Li *et al*, 2002; Lin *et al*, 2010)。嗜水气单胞菌感染瓦氏黄颡鱼后, 头肾中的 TLR2 信号通路下游的髓样分化因子(MyD88)、半胱氨酸蛋白酶 8 (CASP 8)、核转录因子 kappa B (NF- κ B), 肿瘤坏死因子 α (TNF α), 白细胞介素 1 β (IL-1 β) mRNA 表达水平显著上调, 表明嗜水气单胞菌感染激活了瓦氏黄颡鱼头肾 TLR 2 下游的免疫分子, 如白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子, 从而促使组织应答感染和促炎症反应。据 Samanta 等(2012)报道, 酵母聚糖、肽聚糖、脂磷壁酸和迟钝爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)等均能诱导野鲮 TLR2 mRNA 上调表达, 且能显著上调 TLR 通路下游的免疫细胞因子白细胞介素-8、髓样分化因子及核转录因子 kappa B (NF- κ B) mRNA 表达。上述研究表明, 瓦氏黄颡鱼 TLR2 及下游的 MyD88、CASP 8、NF- κ B、TNF α 和 IL-1 β 在抵抗细菌感染过程中发挥了重要作用。

4 结论

本实验探究了 Toll 样受体 2(TLR2)及下游免疫分子对瓦氏黄颡鱼机体的保护作用, 序列同源性比对发现瓦氏黄颡鱼 TLR2 cDNA 与斑点叉尾鲷、鲤及虹鳉的同源性分别为 78%、62%及 49%。系统进化树分析结果表明瓦氏黄颡鱼 TLR2 与斑点叉尾鲷聚为一支。qRT-PCR 分析表明 TLR2 mRNA 在被检测的组织中均有表达, 且在头肾和脾脏中表达水平显著高于其它组织($P < 0.05$)。嗜水气单胞菌感染激活了 TLR2 信号通路, 通过上调表达肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 等。TLR2 在瓦氏黄颡鱼抵御嗜水气单胞菌感染的过程中起到了重要的免疫作用。

参 考 文 献

- 任毅鹏, 高晶, 潘宝平等, 2014. 青蛤 (*Cyclina sinensis*)TLR2 基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 45(5): 1037—1043
- 李强, 黄华, 张昱昱等, 2014. 鲷爱德华菌单克隆抗体的制备及其在黄颡鱼“红头病”研究中的应用. 大连海洋大学学报, 29(4): 323—328
- 罗兵, 李涛, 徐元宏, 2011. TOLL 样受体的信号转导及抗感染免疫研究进展. 免疫学杂志, 27(2): 165-169
- 梁正生, 黄钧, 施金谷等, 2012. 黄颡鱼腹水病病原菌的分离鉴定及药敏试验. 南方农业学报, 43(9): 1400—1404
- Akira S, Takeda K, 2004. Toll-like receptor signaling. Nature Reviews Immunology, 4(7): 499—511
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124(4): 783—801
- Baoprasertkul P, Peatman E, Abernathy J *et al*, 2007. Structural characterisation and expression analysis of toll-like receptor 2 gene from catfish. Fish & Shellfish Immunology, 22(4): 418—426
- Barton G M, Kagan J C, Medzhitov R, 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. Nature Immunology, 7(1): 49—56
- Fan Z J, Jia Q J, Yao C L, 2015. Characterization and expression analysis of Toll-like receptor 2 gene in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Fish & Shellfish Immunology, 44(1): 129—137
- Gao Q X, Xiao Y P, Zhang C J *et al*, 2016. Molecular characterization and expression analysis of toll-like receptor 2 in response to bacteria in silvery pomfret intestinal epithelial cells. Fish & Shellfish Immunology, 58: 1—9
- Janssens S, Beyaert R, 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. Molecular Cell, 11(2): 293—302
- Kawai T, Akira S, 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. International Immunology, 21(4): 317—337
- Lee M S, Kim Y J, 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annual Review of Biochemistry, 76: 447—480
- Li S, Strelow A, Fontana J *et al*, 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(8): 5567—5572
- Lin S C, Lo Y C, Wu H, 2010. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. Nature, 465(7300): 885—890
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Q real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Methods, 25(4): 402—408
- Meijer A H, Krens S F G, Rodriguez I A M *et al*, 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebra fish. Molecular Immunology, 40(11): 773—783
- Palti Y, 2011. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. Developmental & Comparative Immunology, 35(12): 1263—1272
- Qin C J, Shao T, Zhao D X *et al*, 2017a. Effect of ammonia-N and pathogen challenge on complement component 8 α and 8 β expression in the darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachellii*. Fish & Shellfish Immunology, 62: 107—115
- Qin C J, Gong Q, Wen Z Y *et al*, 2017b. Comparative analysis of the liver transcriptome of *Pelteobagrus vachellii* with an alternative feeding time. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 22: 131—138
- Roach J C, Glusman G, Rowen L *et al*, 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(27): 9577—9582
- Samanta M, Swain B, Basu M *et al*, 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
- Takeuchi O, Akira S, 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6): 805—820
- Wei Y C, Pan T S, Chang M X *et al*, 2011. Cloning and expression of Toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141(3—4): 173—182
- Xu Y W, Tao X, Shen B H *et al*, 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408(6808): 111—115
- Zhang H Y, Hu G H, Liu Q M *et al*, 2016. Cloning and expression study of a Toll-like receptor 2 (*tlr2*) gene from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 59: 137—148
- Zheng K K, Zhu X M, Han D *et al*, 2010. Effects of dietary lipid levels on growth, survival and lipid metabolism during early ontogeny of *Pelteobagrus vachellii* larvae. *Aquaculture*, 299(1—4): 121—127
- Zhu L Y, Nie L, Zhu G *et al*, 2013. Advances in research of fish immune relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1—2): 39—62

CLONING AND EXPRESSION OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 OF *PELTEOBAGRUS VACHELLII*

QIN Chuan-Jie¹, GONG Quan², WEN Zheng-Yong¹, YUAN Deng-Yue¹, WANG Jun¹,
HE Yang¹, SHAO Ting¹

(1. Key Laboratory of Sichuan Province for Fishes Conservation and Utilization in the Upper Reaches of the Yangtze River, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China; 2. Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 611731, China)

Abstract Toll-like receptors (TLRs) play essential roles in innate immunity, and TLR2 is crucial to the host defense of pathogenic microbes. In this study, a 2611bp full-length cDNA sequence of TLR2 gene from *Pelteobagrus vachellii* was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The translated protein was composed of 789 amino acids. The putative domains included one transmembrane domain, nine leucine-rich repeats (LRRs), and one Toll/IL-1 receptor homology domain (TIR) in TLR2 of *P. vachellii*. Sequence comparison indicated that the TLR2 deduced from amino acid sequence of *P. vachellii* had an overall identity of 78%, 62% and 49% to that of *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*, respectively. Alignment of deduced amino acid sequence to other species showed that the overall structure of TLR2 was evolutionarily conserved. Phylogenetic analysis revealed that the *P. vachellii* TLR2 was closely related to the TLR2 in other fish. Quantitative PCR analysis showed that TLR2 was expressed in the detected tissues, with the highest level in head kidney. After *Aeromonas hydrophila* challenge, the TLR2 mRNA levels increased significantly ($P < 0.05$) to the maximum, attained at 24h in the liver, 48h in the head kidney, and 12h in the spleen. Moreover, myeloid differentiation factor 88 (MyD88) (the downstream genes of TLR2), Caspase 8, and NF- κ B showed significant up-regulation in 6—96h, to the maximum levels at 24h, 12h, and 48h, respectively. Tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-1 β (IL-1 β) showed significantly up-regulation in 6—192h, to the maximum levels both at 48h. The present study indicated that TLR2 could exhibit important immune responses to virus infection.

Key words *Pelteobagrus vachellii*; toll-like receptor 2; cDNA; immunity