半滑舌鳎髓样分化因子的克隆和表达分析

沙珍霞[1*],王娜[1*],王启龙[1,2],徐田军[1],王磊[1],董晓丽[1],陈松林[1]

(1.中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东 青岛 266071;2.青岛农业大学 水产学院,山东 青岛 266064)

摘要:髓样分化因子(Myeloid differentiation factor 88, MyD88)是Toll/IL-lR家族成员,是TLR信号通路中的一个关键接头分子,在天然免疫系统中具有重要作用。迄今,在重要海水养殖鱼类半滑舌鳎中尚未见有关*MyD88*的研究报道。本研究克隆了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)*MyD88*基因,并对其表达模式进行了初步研究。半滑舌鳎*MyD88*基因的cDNA 全长为1 612 bp,其中包括132 bp 的5′非翻译区(UTR),590 bp的3′ UTR和编码285个氨基酸残基的858 bp的开放阅读框(ORF)。MyD88蛋白在N端具有死亡结构域(Death Domain, DD),C端具有TIR结构域(Toll/IL-1 Receptor Domain, TIR),*MyD88*基因组全长为2 923 bp,包括5 个外显子和4个内含子。系统进化树分析表明,半滑舌鳎MyD88和牙鲆聚在一起,具有最近的亲缘关系。实时定量PCR结果显示,*MyD88*基因几乎在所有组织中都有表达,在血液、脾脏、头肾、肝脏等免疫组织和精巢、卵巢生殖腺中具有较高水平的表达。利用LPS(lipopolysaccharide)、PGN(peptidoglycan)和poly I∶C作为免疫刺激源感染半滑舌鳎外周血淋巴细胞的结果显示,三者均可诱导*MyD88*基因的表达上调。鳗弧菌(*Vibrio angaillarum*)感染实验表明,注射鳗弧菌96 h后*MyD88*基因在脾脏中表达量升高了近180倍、在肝脏中的表达量升高了60多倍;在注射鳗弧菌48 h后,头肾中表达量升高了近5倍。上述实验暗示,*MyD88*基因在半滑舌鳎天然免疫防御系统中具有重要作用。[中国水产科学,2010,17(4):659-670]

关键词:半滑舌鳎;髓样分化因子MyD88;基因表达;天然免疫;鳗弧菌

中图分类号:Q959;S94 **文献标识码**:A **文章编号**:1005-8737-(2010)04-0659-12

鱼类作为低等脊椎动物,其适应性免疫系统发育还不完善,天然免疫在鱼类抵御病害侵袭中发挥了重要作用。天然免疫的重要特点是通过宿主自身存在的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)快速识别病原微生物保守的分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP),构筑机体抵抗病害侵袭的第一道防线。TOLL样受体(Toll like receptors, TLR)是迄今研究最多的模式识别受体[1]。TLR对PAMP 进行识别,引发的信号传导能导致炎症介质的释放,在天然免疫防御中起重要作用[2],是连接天然免疫和适应性免疫的桥梁[3]。其中,髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是TLR信号通路中的一个关键接头分子[4],MyD88控制着此类信号通路中信号的向下传递。

MyD88属于Toll/IL-lR家族和死亡结构域(death domain)家族成员,是一类胞浆蛋白,在N端具有死亡结构域(Death Domain, DD),C端具有TIR结构域(Toll/IL-1 Receptor Domain, TIR)。当TLRs与相应PAMP配体识别并结合后,TLRs的分子结构发生构象改变,通过其胞浆段TIR结构域与MyD88 C端的TIR结构域相互作用,再利用MyD88 N端的DD招募胞浆中也含有死亡结构域的IL-1受体相关激

收稿日期:2009-10-05;**修订日期**:2009-12-01.

基金项目:国家973计划资助项目(2010CB126303);农业部2008年度留学人员科技活动资助项目;山东省泰山学者工程专项资助;青岛市自然基金项目(07-2-3-5-jch);黄海水产研究所基本科研业务费资助项目(2008-CHB-04).

作者简介:沙珍霞(1970-),女,研究员,从事海洋鱼类生物技术研究,E-mail:shazx@ysfri.ac.cn;共同第一作者:王娜.

通讯作者:陈松林(1960-),男,研究员,博士生导师,从事海洋鱼类生物技术研究,E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

酶(IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) IRAK4和IRAK1, IRAK4和IRAK1活化TNF受体相关因子6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)。随后激活2条不同的信号传导通路,通过激活核转录因子NK-Kappa B和JNK,启动细胞因子*AP-1*等基因的表达并介导和引发炎症应答,最终启动天然免疫和获得性免疫反应[5]。

随着TLR及其信号转导通路研究的深入,多个物种如果蝇[6]、扇贝[7]、非洲爪蟾[8]、鸡[9]、鼠[10]、人[11]的*MyD88*基因被分离鉴定出来。但是在鱼类中,*MyD88*的研究还刚刚起步,目前仅有斑马鱼[12-13]、虹鳟[14]、牙鲆[15]和大黄鱼[16] *MyD88*基因克隆和表达的文献报道。

半滑舌鳎自2003年人工繁殖取得成功以来已成为中国北方目前最具发展潜力的海水养殖鱼类[17],并正在向南方推广。围绕其舌鳎繁育生物学、性别控制、全雌苗种培育等已开展了较为深入的研究[20],但是对半滑舌鳎免疫相关基因的研究刚刚起步,目前仅见*MHC*基因[21], *TLR9*基因[22]的报道。本研究拟通过分离、鉴定半滑舌鳎*MyD88* cDNA 序列和基因组序列及结构,分析其时空表达模式,研究其在海洋鱼类主要致病菌鳗弧菌作用下各免疫器官的表达规律和在不同PAMP配基刺激下外周血淋巴细胞中的表达变化,为半滑舌鳎抗病分子机理研究提供证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 半滑舌鳎取自山东莱州明波养殖公司,取健康二龄鱼4尾(雌、雄各2尾),取其血液、脑、鳃、胃、小肠、心肌、肝脏、肌肉、脾脏、头肾、后肾、精巢、卵巢等组织,立即投入液氮保存,后转入−80 ℃保存用于组织RNA 提取。另取健康鱼4尾,自尾静脉抽取血液,血液混匀后立即用于外周血淋巴细胞的分离。

1.1.2 胚胎 收集不同发育时期(受精后4 h、8 h、13 h、19 h、25 h、30 h、35 h、39 h)的半滑舌鳎胚胎各100 ~ 200枚,立即投入液氮保存,后转于−80 ℃保存用于组织RNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 已知的半滑舌鳎*MyD88*部分序列来自于半滑舌鳎cDNA文库(GenBank序列号GH229986, GH236829),参照该序列,设计了1组引物用于全长cDNA序列walking、基因组序列扩增及基因表达分析,*β-actin*基因为内参基因。本研究所用引物序列见表1,引物由北京华大基因组中心合成。

表1 本研究所用的引物及其序列
Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物 Primer name	引物序列5′−3′ Primer sequence 5′−3′	用途 Utilization
CSGSP-f1	GGACTCGGTTCCTCTGACG	扩增内含子1
CSGSP-r1	TCATCTCAGGAGTGCGGG	
CSGSP-f2	AGAAGATACCGTGAGAAGA	扩增内含子2
CSGSP-r2	TATGGCAGTAACAGATGAA	
CSqRT-f	GGACTCCAGAGAAGTTTGACG	实施定量PCR分析; 扩增内含子3和4的上游引物
CSqRT-r	TGAGGGCGAACTTGGTCT	实施定量PCR分析
CSGSP-r3	ACAGAGATTTTGCCAGACGA	扩增内含子3和4的下游引物
beta-actin-f1	TGGTGGGAATGGGTCAGA	实时定量PCR的内参引物
beta-actin-r1	ATGGCAGGAGTGTTGAAGG	

1.2.2 鳗弧菌感染实验 感染半滑舌鳎所用的病原菌为本实验室保存的鳗弧菌菌株,感染实验参照Chen 等[23]的方法。健康半滑舌鳎32尾(体质量200 ~ 300 g)平均分为2组,一组为注射鳗弧菌悬

液的实验组，另一组为注射生理盐水的对照组。鳗弧菌（*Vibrio anguillarum*）在28 ℃条件下培养至对数中期，所用培养基为2216E（蛋白胨5.0 g，酵母提取物1.0 g，$FePO_4 \cdot 4H_2O$ 0.1 g，海水1 L，pH 7.6），离心收集菌体后使用生理盐水重新悬浮至浓度9.8×10^7 CFU/mL。使用麻醉剂MS 222 将鱼麻醉，然后进行腹腔注射。实验组注射0.5 mL 鳗弧菌悬浮液，对照注射同等体积的生理盐水作为对照，未注射舌鳎作为空白对照。在注射后24 h、72 h和96 h取样，每个时间点每组分别取4尾鱼解剖，分别取肝脏、脾脏和头肾，同一组同一时间点的同种组织保存在同一冻存管中，组织保存方法同**1.1.1**所述。

1.2.3　细菌脂多糖、肽聚糖和poly I:C感染外周血淋巴细胞　从4条健康半滑舌鳎尾静脉处用肝素处理过的注射器各抽取血液1.5 mL混匀后，小心加到密度为1.072的淋巴细胞分离液中，650 g离心20 min，收集中间层的浅白色外周血淋巴细胞，然后加1×PBS溶液洗涤，200 g离心20 min，去上清液，血球计数板计数后，将2×10^5个细胞接种到24孔细胞板中，加入1 mL 含10%胎牛血清的DMEM培养基，分别加入PAMP配基细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）、肽聚糖（peptidoglycan，PGN）和病毒类似物poly I:C，终质量浓度均为1 mg/mL ，24 ℃培养至6 h、12 h、24 h收集细胞，在同一取样时间收集培养基中未添加PAMP配基的细胞作为阴性对照。立即用于RNA提取。

1.2.4　RNA提取、cDNA合成及*MyD88*基因表达的定量分析　健康鱼的13种不同组织、不同发育时期的胚胎及病原刺激后的舌鳎组织及细胞均使用Trizol试剂（Invotrigen公司）进行总RNA提取。经琼脂糖凝胶电泳及核酸定量分析仪检测总RNA的质量，使RNA在整个反应体系中达到500 ng进行反转录，使用Tiangen 公司第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA，按照操作说明进行。*MyD88*基因的定量表达分析通过ABI 7500 荧光定量PCR仪（Applied Biosystems，USA）完成，PCR反应条件按照One step SYBR primescript RT-PCR kit（Takara公司）推荐的方法：反应体系为20 μL，包含SYBR Green Real-time PCR master mixtures 10 μL，0.4 μL ROX II，上下游引物各0.4 μL（5 μmol/L），7.8 μL ddH_2O，稀释后的cDNA模板1 μl（总量为100 ng）。*β-actin*作为内参基因。每个样品设定3组重复，PCR反应条件为95 ℃ 10 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 20 s，45个循环。PCR反应结束后，使用ABI 7500 荧光定量PCR仪自带软件包进行溶解曲线分析，用SPSS 11.5分析软件进行显著性检验。

1.2.5　cDNA全长及基因组序列的获得　采用Gene walking 方法获得了半滑舌鳎*MyD88*基因全长cDNA序列。半滑舌鳎基因组DNA 参照廖小林的方法[24]从鳍条中提取。纯化后的DNA溶解于灭菌水中，保存于−20 ℃下备用。用3对特异引物（表1）扩增半滑舌鳎*MyD88*基因组序列。PCR 反应程序如下：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30个循环；72 ℃ 10 min。PCR产物经纯化后克隆到pMD18-T 载体（Takara）中，使用ABI3730测序仪进行测序。

1.2.6　序列和系统发生分析　DNA 序列和蛋白序列使用DNASTAR 5.0编辑和分析；基因结构使用NCBI Spidey Programme分析；登录NCBI 用BLAST对测序结果进行同源性检索。系统进化树使用MEGA3.0[25]构建，计算方法为Neighbou-joining，该NJ树的可靠性用自展内部分支法评定，重复1 000次。

2　结果与分析

2.1　半滑舌鳎*MyD88*基因的克隆和序列分析

对本实验室构建的半滑舌鳎全长cDNA文库中EST序列进行BLAST分析，发现了2条EST序列（1条EST序列来自精巢cDNA文库，长度为416 bp，克隆号为csgspa0_0009_C03.ab1，GenBank序列号为GH236829；另1条EST序列来自混合免疫器官cDNA 文库，长度为515 bp，克隆号为csgmma0_0014_A02.ab1，GenBank序列号为GH229986）与牙鲆等已知物种的*MyD88*基因具有同源性。经Cluster分析和拼接，获得了1段长度为566 bp的半滑舌鳎*MyD88*基因部分序列，经BLAST

分析比对，该序列已经包含5′ UTR和起始密码子，于是对其中的一个EST克隆csgmma0_0014_A02.ab1采用基因步移（gene walking）方法进行测序，直至获得至polyA 的3′端未知序列。半滑舌鳎*MyD88*基因cDNA全长为1 612 bp，包括132 bp的5′ UTR，858 bp的开放阅读框以及590 bp的3′ UTR。通过对基因组DNA扩增获得了长度为2 923 bp的半滑舌鳎*MyD88*基因组序列。该基因包含5个外显子和4个内含子，在每个内含子的5′和3′端都分别有典型的内含子剪切特征GT（5′）和AG（3′），如图1所示。

图1 半滑舌鳎*MyD88*基因及蛋白序列

翻译起始密码子（ATG）、终止密码子（ TAA）和加尾信号（AATAAA）用粗体标出；外显子用大写字母标出，推导的氨基酸序列位于外显子下方；5′ UTR、内含子和3′ UTR用小写字母列出，表征内含子剪切特征的5′ gt和3′ ag以下划线标出.

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of half smooth tongue sole *MyD88*

The translation start codon（ATG）, termination codon（ TAG）, polyadenylation signal（AATAAA）are bold; exons are shown by capital, and amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The introns are listed with lowercase letters. The 5′（gt）and 3′（ag）ends of each intron are underlined.

半滑舌鳎*MyD88*的基因组结构与人类、斑马鱼和牙鲆等物种*MyD88*相同，其中，这4个物种的外显子5都为155 bp；另外，半滑舌鳎的*MyD88*外显子2和斑马鱼的外显子2长度也是相同的，半滑舌鳎*MyD88*基因和牙鲆外显子仅外显子3和外显子4存在2个碱基的差别，其他的3个外显子长度在这2种鱼上是完全相同的（图2），从基因结构可以看出，*MyD88*基因是较为保守的。半滑舌鳎*MyD88*全长cDNA序列和基因组序列已提交GenBank，序列号分别为FJ527610 和FJ527611。

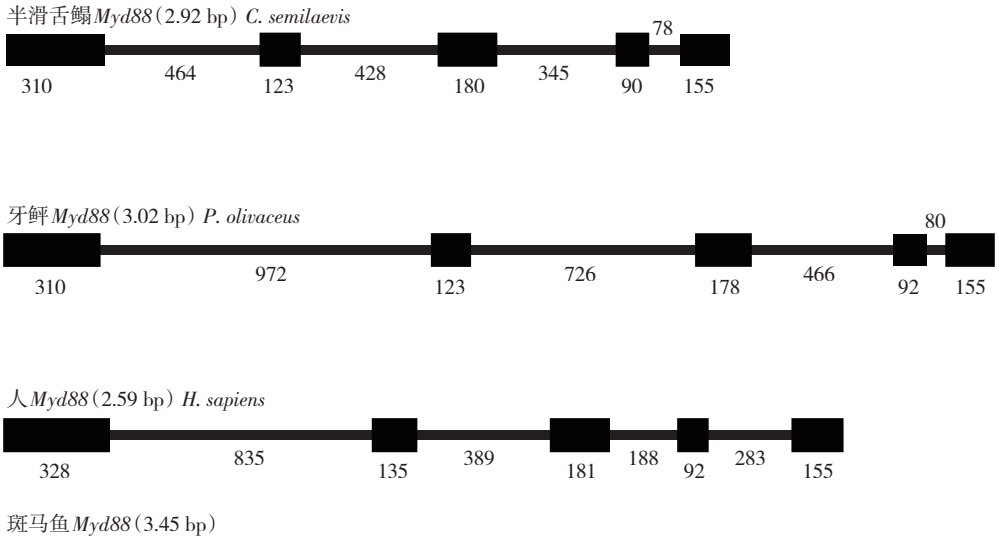

图2　半滑舌鳎、牙鲆、人、斑马鱼*Myd88*基因结构图
黑色矩形框代表外显子，数字代表碱基对数（bp）.

Fig. 2　Comparison of *MyD88* gene structures of half smooth tongue sole, Japanese flounder, human and zebrafish. Boxes indicate exons, and numbers indicate the length (bp) of exons and introns.

2.2　*MyD88*氨基酸序列比对及及系统发生分析

经Dnastar软件分析后，推测出半滑舌鳎*MyD88*氨基酸组成包括285aa，运用Mega3.0软件将其与牙鲆（*Paralichthys olivaceus*）、河 鲀（*Takifugu rubripes*）、大黄鱼（*Larimichthys crocea*）、大西洋鲑（*Salmo salar*）、虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）、斑马鱼（*Danio rerio*）、斑点叉尾鮰（*Ictalurus punctatus*）、牛（*Bos Taurus*）、小鼠（*Mus musculus*）和人（*Homo sapiens*）10个物种的*MyD88* 氨基酸序列进行比对，其同源序列相似度分别为74.7 %、71.6 %、71.6 %、69.8 %、68.1%、65.6%、66.7%、63.9%、60.0%和63.9%（表2）。SMART在 线软件分析显示，半滑舌鳎*MyD88* N-末端具有典型的死亡结构域DD，该结构域具有92个氨基酸（氨基酸区域：12-103），C-末端具有TIR结构域，该结构域包含147个氨基酸（氨基酸区域：149-285），氨基酸序列比对分析表明，半滑舌鳎TIR结构域与其他物种都具有高度的同源性，TIR结构域中包括3个高度保守的mortif区域，分别命名为box1、box2和box3、box1包含FDAFICYCQ氨基酸残基，box2包含LCVFDRDVLPCSC氨基酸残基，box3包含FWDRL氨基酸残基（图3）。通过MEGA3.0的Neighbor-joining法分析，重复1 000次的计算方法构建了系统进化树，分子进化分析，鱼类*MyD88*与哺乳动物*MyD88*分属于系统树的2个分枝，在鱼类中，半滑舌鳎和牙鲆聚在一起，具有最近的亲缘关系（图4）。

2.3　*MyD88*基因的表达分析

2.3.1　*MyD88*基因在不同组织内的表达　采用Real time PCR对*MyD88* 基因在半滑舌鳎不同组织的表达进行了分析。结果显示，半滑舌鳎*MyD88*基因几乎在所有的组织中都有表达（图5）。其中，表达量

表2 半滑舌鳎和其他10个物种的MyD88蛋白相似度
Tab. 2 Pairwise similarities of selected MyD88 proteins

Sole 半滑舌鳎	Flounder 牙鲆	Pufferfish 河鲀	Croaker 大黄鱼	Salmon 大西洋鲑	Trout 虹鳟	Zebrafish 斑马鱼	Catfish 斑点叉尾鮰	Cattle 牛	Mouse 小鼠	Human 人	
	74.7	71.6	71.6	69.8	68.1	65.6	66.7	63.9	60	63.9	Sole 半滑舌鳎
		69.3	71.4	69.3	67.8	63.9	68.2	61.1	57.5	56.6	Flounder 牙鲆
			76.3	66.8	67.6	61.2	66.9	52	55.9	56.5	Pufferfish 河鲀
				70	71.3	62.1	71.8	60.3	57.5	55.1	Croaker 大黄鱼
					89.3	67.7	71.1	60.8	56.4	55.2	Salmon 大西洋鲑
						64.5	69.5	59.3	56.9	55.7	Trout 虹鳟
							71.8	58.6	53.3	53.6	Zebrafish 斑马鱼
								60.7	62.3	60.3	Catfish 斑点叉尾鮰
									67	76.5	Cattle 牛
										78.8	Mouse 小鼠
											Human 人

最高的组织分别是血液；其次是在肝脏、脾脏、头肾、鳃、精巢、卵巢中有较高的表达量，但在肌肉组织中*MyD88*的表达量是最低的，另外，在脑组织和皮肤中的表达量也较低。

2.3.2 *MyD88*基因在不同发育时期胚胎中的表达 Real time PCR结果显示*MyD88*基因在半滑舌鳎不同胚胎发育时期的表达量存在较大差别。在胚胎发育早期表达量维持在较高的水平，其中，在胚胎发育4 h基因表达量最高，8 h的胚胎该基因表达量就降低了3倍多，在胚胎发育至19 h，*MyD88*基因的表达量就降低到较低的水平，并在胚胎发育的25 h、30 h、35 h和39 h都保持在较低的表达水平。结果如图6所示。

2.3.3 *MyD88*基因在病原刺激后免疫组织内的表达 腹腔注射鳗弧菌悬浮液后，半滑舌鳎*MyD88*的mRNA在肝脏、脾脏和头肾等免疫组织的表达量发生了波动性的变化。Real time PCR结果如图7所示，在注射了鳗弧菌实验鱼脾脏组织内，*MyD88*基因的表达呈现急剧上升趋势，在注射后24 h，*MyD88*基因的表达量变化不大，但在注射后48 h，基因的表达量剧增至83.55倍，而在注射后96 h，基因的表达量增加了178倍，暗示脾脏是半滑舌鳎*MyD88*基因的主要效应器官。*MyD88*基因的表达量变化在实验鱼和对照鱼的肝脏组织内呈现了与脾脏组织相同的趋势，注射后24 h，*MyD88*基因表达量提高了2倍，而在注射后48 h，基因表达量升高了14倍，在注射后96 h，基因的表达量则提高了62倍多。*MyD88*基因在头肾中的表达量呈现波动趋势，在注射后24 h有较小幅度的提高，在注射后48 h 表达量提高了近5倍，但在注射后96 h，*MyD88*基因的表达量呈现下降趋势，实验组仅比对照组增加1倍多。

2.3.4 *MyD88*基因在外周血淋巴细胞中的表达 为检测*MyD88*基因在病原刺激后的免疫应答反应，本研究利用病原体细胞表面的保守分子标志PAMP如LPS（革兰氏阴性菌特有）、PGN（革兰氏阳性菌特有）和病毒类似物poly I:C作为免疫刺激源感染半滑舌鳎外周血淋巴细胞结果显示，LPS、PGN、Poly I:C均可诱导*MyD88*基因的表达上扬，其中，LPS刺激24 h后*MyD88*的表达上调最为明显（图8）。

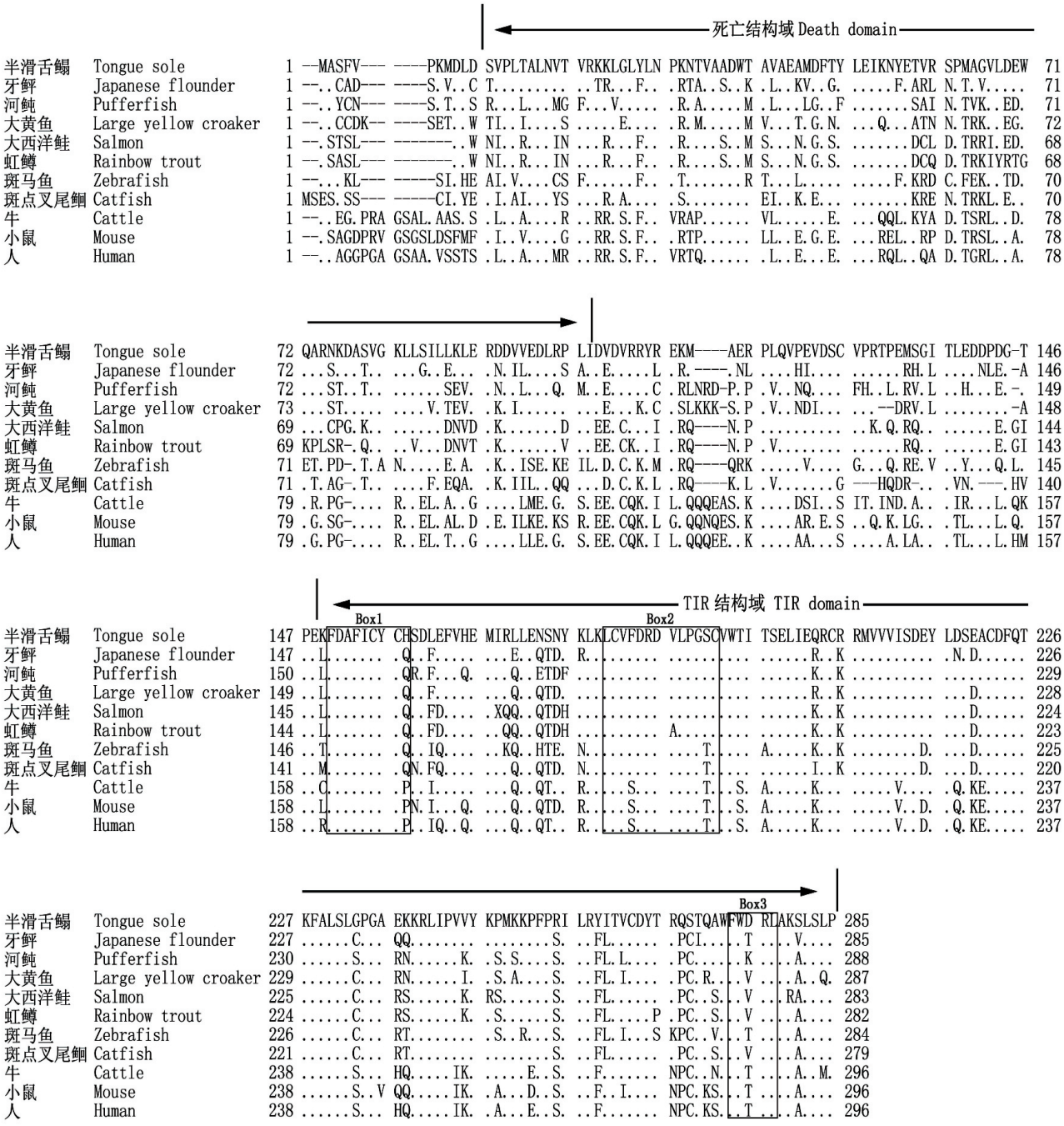

图3　半滑舌鳎和其他已知物种的MyD88氨基酸序列比对

圆点表示相同的氨基酸残基，横线表示空位；箭头标出DD结构域和TIR结构域；Box1-3以方框示出.

Fig. 3　Alignment of amino acid sequence of MyD88 proteins

Identical amino acid residues are indicated by dots ; Dashes indicate gaps that are introduced for optimal alignment . Death domain and TIR domain are indicated by arrows. The three important regions (Box1-3) in TIR domains are flamed.

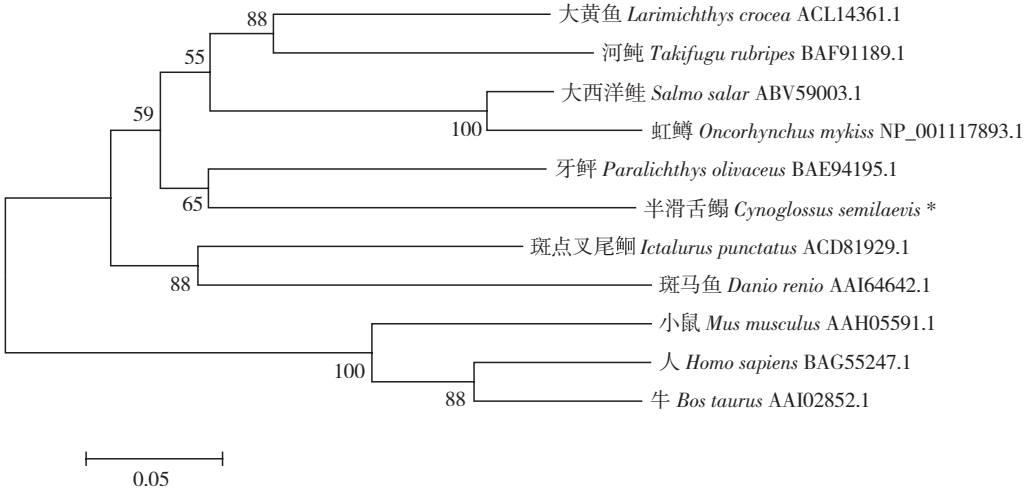

图4 基于半滑舌鳎和其他已知脊椎动物MyD88蛋白序列的NJ系统发生树
节点处数值为自展置信值,自展重复1 000次; 星号标出半滑舌鳎*MyD88*.

Fig.4 Phylogenetic analysis of half smooth tongue sole MyD88 protein with related vertebrate MyD88 proteins
The phylogenetic tree was drawn from ClustalW generated multiple sequence alignment of amino acid sequences using the neighbor-joining method within the MEGA 3.0 package. Data were analyzed using Poisson correction and gaps were removed by complete deletion. The topological stability of the neighbor joining trees was evaluated by 10,000bootstrapping replications, and the bootstrapping percentage values are indicated by numbers at the nodes. Half smooth tongue sole *MyD88* is marked with asterisk.

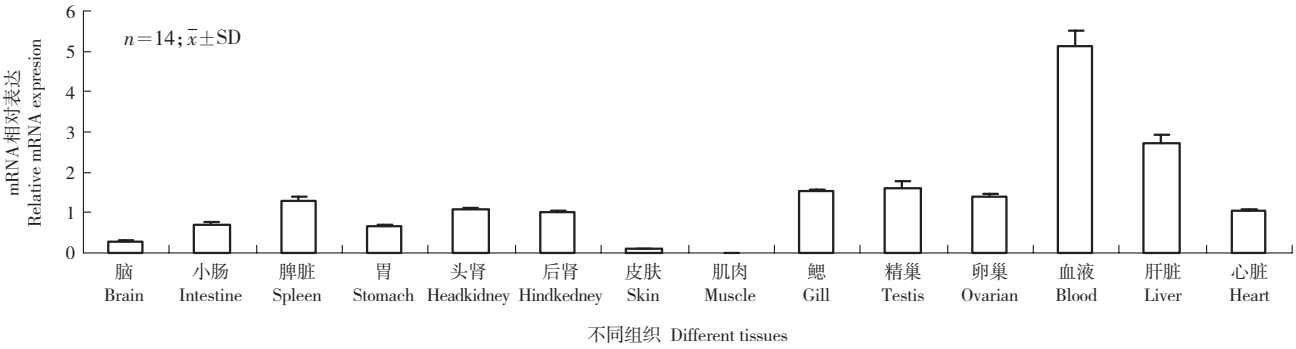

图5 实时定量PCR方法分析*MyD88*基因在健康半滑舌鳎不同组织内的表达
组织名称自左向右分别为: 脑、小肠、脾、胃、头肾、后肾、皮肤、肌肉、鳃、精巢、卵巢、血液、肝和心.

Fig. 5 Quantitative RT-PCR analysis of *MyD88* expression in various healthy tissues of half smooth tongue sole including brain, intestine spleen, stomach, head kidney, trunk kidney, skin, gill, testis, ovarian, blood, liver and heart.

3 讨论

MyD88是一类重要的细胞质接头蛋白,通过介导TLR受体以及IL-1和IL-18受体信号传导通路,在先天免疫和获得性免疫中具有重要作用[26]。TLR信号传导途径包括MyD88依赖型信号传导通路和MyD88非依赖型途径,其中, MyD88依赖的信号传导途径是TLR信号传导的共同途径[5],除了TLR3,现在已知功能的TLR受体都具有MyD88依赖性信号传导通路[27]。推测的半滑舌鳎MyD88 开放阅读框(ORF)编码一个含有285 个氨基酸残基的多肽蛋白,与牙鲆MyD88的氨基酸数目相同[15]。对其蛋白功能区域预测分析及与牙鲆、大黄鱼、河鲀、人、牛等MyD88氨基酸序列的同源比对发现,半滑舌鳎MyD88蛋白在N末端同样具有DD结构域,长度为92个氨基酸残基, C末端具有TIR结构域,长度为147

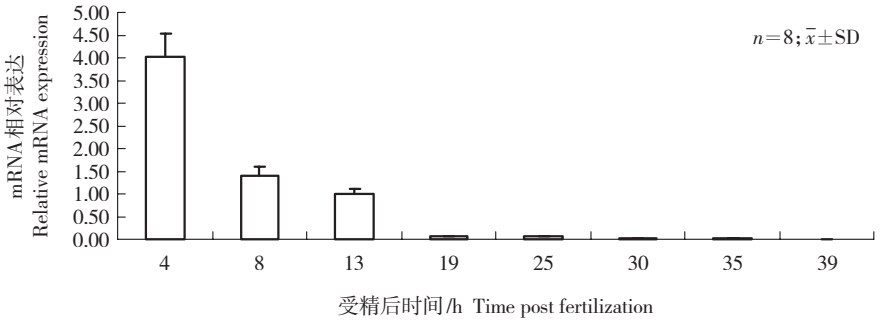

图6　实时定量PCR方法分析*MyD88*基因在不同发育时期胚胎中的表达

Fig. 6　Quantitative RT-PCR analysis of *MyD88* expression in embryos at different stages

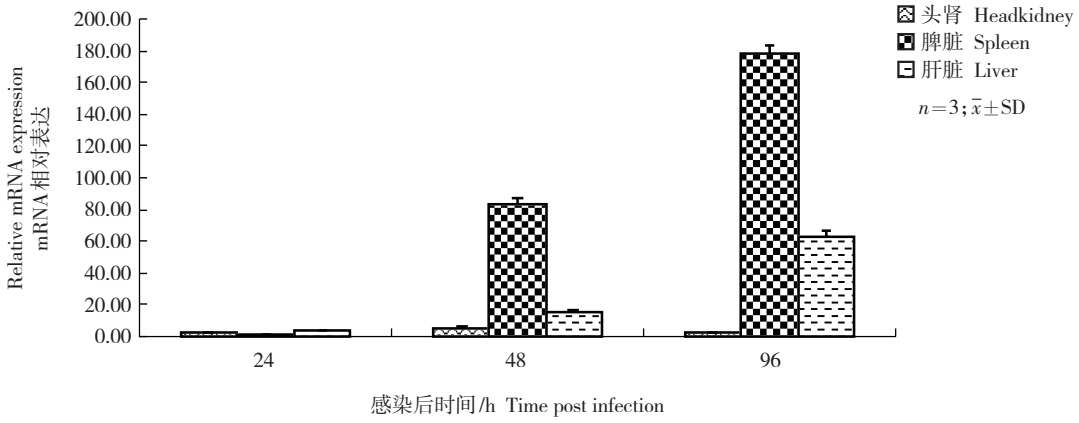

图7　*MyD88*基因在人工感染鳗弧菌的半滑舌鳎头肾、肝脏和脾脏中的实时定量表达

Fig. 7　Quantitative RT-PCR analysis of half smooth tongue sole *MyD88* gene expression in head kidney, liver and spleen after challenged with *Vibrio anguillarum*

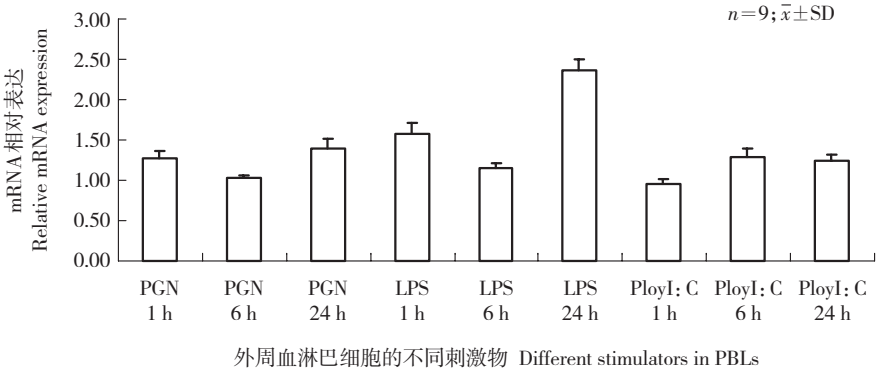

图8　半滑舌鳎*MyD88*基因在经脂多糖、肽聚糖及poly I:C刺激后的外周血淋巴细胞中的表达

Fig. 8　Expression of half smooth tongue sole *MyD88* transcripts by quantitative RT-PCR in PBLs stimulated with lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN) and poly I:C at 1, 6, 24 h after stimulation

个氨基酸残基。哺乳动物MyD88的DD大约有90个氨基酸残基，TIR结构域大约为150个氨基酸残基[26]，半滑舌鳎MyD88的功能结构域在长度上和哺乳动物极为接近。

另外，半滑舌鳎MyD88的TIR区域与其他物种高度保守，特别是3个高度保守的motif区域（box1–3）。其中，box1包含FDAFICYCH氨基酸残基，与其他10个包括鱼类、哺乳类和人类在内的物种的box1 只有2个氨基酸的差别；box2包含LCVFDRDVLPGSC氨基酸残基，其氨基酸序列则与所比对的鱼类几乎完全一致；box3包含FWDRL氨基酸残基，其保守性相对较差。已有的报道证明box2的R、D、G氨基酸残基组成了TIR结构域的BB Loop环，在TIR–TIR相互作用和信号传导特异性方面具有极其重要的作用，而基因突变及基因缺失（gene deletion）研究则表明box1和box2是MyD88信号传导所必需的[28]。半滑舌鳎的MyD88氨基酸序列中box1和box2的保守性预示着其功能与哺乳动物具有相似性。

半滑舌鳎*MyD88*基因几乎在所有组织中都有表达，其中在血液、肝脏、脾脏、头肾、精巢和卵巢中有较高的表达，在脑和皮肤中的表达水平较低，在肌肉中表达水平最低。*MyD88*在不同组织中的广谱性表达已经在小鼠[30]、牙鲆[15]、大黄鱼[16]物种中得到证实。*MyD88*基因在血液和免疫器官脾脏、头肾及肝脏中的高丰度表达，可能与该基因参与机体的免疫反应密切相关。*MyD88*在精巢中也有高水平的表达，与该基因在小鼠的睾丸、附睾中表达结果[31]极为相似，这种高水平表达可能与*MyD88*及其TLR受体在雄性生殖过程中所发挥的先天免疫作用有关。*MyD88*在胚胎发育早期表达水平较高，随着发育的进行，*MyD88*的表达水平降到较低的水平，这个结果与斑马鱼*MyD88*基因在胚胎发育早期有较高的表达[13]的结果相似，可能与受精卵中母性免疫物质存在较多有关。

利用鳗弧菌感染半滑舌鳎，感染后至96 h，*MyD88*基因在脾脏、头肾和肝脏中的表达发生了强烈的变化，其中，在脾脏呈现上扬表达，在感染后96 h，基因表达增强了170多倍，这个结果与大黄鱼在人工感染细菌后的结果一致，说明脾脏是鱼类重要的免疫器官，也是*MyD88*基因重要的靶器官。大黄鱼人工感染细菌后，*MyD88*基因在肝脏的表达量呈下调表达，与本研究结果不同，可能与不同的物种的鱼在应对不同病原刺激产生不同的免疫应答有关。

在对半滑舌鳎外周血淋巴细胞PBLs使用不同的PAMP配基进行刺激后，*MyD88*基因均有上调表达，其中LPS刺激24 h后*MyD88*的表达上调最为明显。这个结果与在这3种配基刺激牙鲆的PBLs后*MyD88*基因都为明显上扬表达不同，这可能与本实验在舌鳎PBLs细胞培养基没有添加细胞有丝分裂原CoA和PMA导致细胞增殖速度过慢有关。

本研究结果表明，MyD88是半滑舌鳎重要的先天免疫因子，对病原的侵染具有快速的应答反应，但是对MyD88参与抗病的机制尚需进一步的研究。

参考文献：

[1] Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition [J]. Trends Microbiol, 2000, 8: 452–456.

[2] Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. Nature, 2000, 406 (6797): 782–787.

[3] 赵文华，夏雪山. Toll 样受体研究进展[J]. 动物医学进展，2007, 28 (10): 85–87.

[4] Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling [J]. Nature, 2004, 430 (6996): 257–263.

[5] Kawai T, Akira S. TLR signaling pathways [J]. Seminar in Immunology, 2004, (16): 3–9.

[6] Tauszig-Delamasure S, Bilak H, Capovilla M, et al. Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections [J]. Nat Immunol, 2001, 3: 91–97.

[7] Qiu L, Song L, Yu Y, et al. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 614–623.

[8] Prothmann C, Armstrong N J, Rupp R A. The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for Xenopus axis formation [J]. Mech Dev, 2000, 97 (1–2): 85–92.

[9] Wheaton S, Lambourne M D, Sarson A J, et al. Molecular cloning and expression analysis of chicken MyD88 and TRIF genes [J]. DNA

Seq，2007，18：480–486.

[10] Hardiman G，Jenkins N A，Copeland N G，et al. Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88 [J]. Genomics，1997，45：332–339.

[11] Bonnert T P，Garka K E，Parnet P，et al. The cloning and characterization of human MyD88：a member of an IL-1 receptor related family [J]. FEBS Lett，1997，402：81–84.

[12] Stockhammer O W，Zakrzewska A，Hegedûs Z，et al. Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to Salmonella infection [J]. J Immunol，2009，182（9）：5641–5653.

[13] van der Sar A M，Stockhammer O W，van der Laan C，et al. MyD88 innate immune function in a zebrafish embryo infection model [J]. Infect Immun，2006，74（4）：2436–2441.

[14] Rebl A，Goldammer T，Fischer U，et al. Characterization of two key molecules of teleost innate immunity from rainbow trout（*Oncorhynchus mykiss*）：MyD88 and SAA [J]. Vet Immunol Immunopathol，2009，131（1–2）：122–126.

[15] Takano T，Kondo H，Hirono I，et al. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88（MyD88）cDNA and gene in Japanese flounder，*Paralichthys olivaceus* [J]. Dev Comp Immunol，2006，30（9）：807–816.

[16] Yao CL，Kong P，Wang Z Y，et al. Molecular cloning and expression of MyD88 in large yellow croaker，*Pseudosciaena crocea* [J]. Fish Shellfish Immunol，2009，26（2）：249–255.

[17] Zhuang Z M，Wu D，Zhang S C，et al. G-banding patterns of the chromosomes of tonguefish *Cynoglossus semilaevis* Gunther，1873 [J]. J Appl Ichthyol，2006，22：437–440.

[18] Liao X，Ma H Y，Xu G B，et al. Construction of a genetic linkage map and mapping of a female-specific DNA marker in half-smooth tongue sole（*Cynoglossus semilaevis*）[J]. Mar Biotechnol（NY），2009，11（6）：699–709.

[19] Chen S L，Tian Y S，Yang J F，et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole（*Cynoglossus semilaevis*）[J]. Mar Biotechnol（NY），2009，11（2）：243–251.

[20] Chen S L，Li J，Deng S P，et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole（*Cynoglossus semilaevis*）[J]. Mar Biotechnol（NY），2007，9（2）：273–280.

[21] Xu T J，Chen S L，Ji X S，et al. Molecular cloning，genomic structure，polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of half-smooth tongue sole（*Cynoglossus semilaevis*）[J]. Fish Shellfish Immunol，2009，27（2）：192–201.

[22] Yu Y，Zhong Q，Li C，et al. Isolation and characterization of Toll-like receptor 9 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. Fish Shellfish Immunol，2009，26（3）：492–499.

[23] Chen S L，Li W，Meng L，et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot（*Scophthalmus maximus*）[J]. Fish Shellfish Immunol，2007，22：172–181.

[24] Liao X，Wang D，Yu X，et al. Characterization of novel microsatellite loci in rare minnow（*Gobiocypris rarus*）and amplification in closely related species in Gobioninae [J]. Conserv Genet，2007，8：1003–1007.

[25] Kumar S，Tamura K，Nei M. MEGA3.0：integrated software for molecular evolutionary [J]. Brief Bioinform，2004，5：150–163.

[26] Ohnishi H，Tochio H，Kato Z，et al. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling [J]. Nature，2009，106（25）：10260–10265.

[27] Bonizzi G，Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity [J]. Trends Immunol，2004，25（6）：280–288

[28] Xu Y，Tao X，Shen B，et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains [J]. Nature，2000，408：111–115.

[29] Poltorak A，He X，Smirnova I，et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice：Mutations in *Tlr4* gene [J]. Science，1998，282：2085–2088.

[30] Hardiman G，Jenkisns N A，Copeland N G，et al. Genetic structure and chromosomal mapping of *MyD88* [J]. Genomics，1997，45：332–339.

[31] Palladino M A，Johnson T A，Gupta R，et al. Members of the toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive Tract [J]. Biol Reprod，2007，76：958–964.

Cloning, characterization and expression of a myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*) gene in half smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*

SHA Zhenxia[1*], WANG Na[1*], WANG Qilong[1,2], XU Tianjun[1], WANG Lei[1], DONG Xiaoli[1], CHEN Songlin[1]

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory For Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China; 2. Aquaculture College, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266064, China)

Abstract: As an important adaptor protein in the intracellular signaling of interleukin-1 receptor/toll-like receptor (IL-1R/TLR) superfamily, myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*) plays a crucial role in the innate immune response. So far, no report about *MyD88* in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), one of the most promising and commercially important species for marine fish culture in China, is available. In this paper, the cloning, characterization and expression pattern of *MyD88* in half smooth tongue sole was described. The full length *MyD88* cDNA of half smooth tongue sole is 1 612 bp including a 132 bp 5′ untranslated region (UTR), a 590 bp 3′ UTR and a 858 bp open reading frame (ORF) encoding 285 amino acids. *MyD88* contains a typical death domain at the N-terminal and a conservative Toll/IL-1R (TIR) domain at the C-terminal. The length of genomic DNA of *MyD88* in this species is 2 923 bp with 5 exons and 4 introns. The phylogenetic tree based on 11 species MyD88 proteins showed that half smooth tongue sole MyD88 shared the closetest relationship with Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). The next quantitative real-time reverse transcription PCR analysis revealed *MyD88* gene was expressed in all tested tissues with higher expression in immune tissues and reproduction tissues including blood, liver, spleen, kidney, testis and ovary. Then, the stimulation with LPS (lipopolysaccharide), GPN (peptidoglycan) and poly I:C showed that these stimulators could induce up-regulation of *MyD88* expression in PBL of half smooth tongue sole. Finally, the pathogen infection experiment with Gram negative bacteria *Vibrio anguillarum*, indicated that *MyD88* expression was significantly increased in the spleen by nealy 180 times and in the liver by more than 60 times after 96 th hour and in the headkidney with near 5 times at 48 th hour after challenge, respectively. These results suggest that MyD88 play an important role in the innate immune system in half smooth tongue sole. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 659–670]

Key words: half smooth tongue sole; myeloid differentiation factor 88; expression, innate immunity; *Vibrio anguillarum*

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

*** First author equally**