

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15082

半滑舌鳎 *TRAF6* 基因和 *TAK1* 基因的克隆及表达分析

陈燕, 樊琳, 刘田田, 刘跃中, 李赞, 张全启

中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003

摘要: 本研究通过同源克隆和 RACE 技术获得了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)和转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)的 cDNA 全长, 并分析了其不同组织和早期胚胎发育时期的表达情况。结果表明, *TRAF6* cDNA 全长 1956 bp, 开放阅读框(ORF)为 1731 bp, 编码 576 个氨基酸。二级结构预测显示 TRAF6 具有保守的蛋白结构域: N 端的 RING 结构, 两个锌指结构以及 C 端的环-环(coiled-coil) α 螺旋结构和高度保守的 MATH 同源结构。*TAK1* cDNA 全长 2519 bp, ORF 为 1731 bp, 编码 576 个氨基酸。TAK1 的蛋白结构域包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活结构域和 C 端的环-环(coiled-coil) α 螺旋结构域。系统进化树分析表明, 半滑舌鳎 TRAF6 和 TAK1 分别与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)TRAF6 和 TAK1 聚为一支, 亲缘关系最近。荧光定量 PCR 结果显示, *TRAF6* 和 *TAK1* 在所检测的 8 种组织中都有表达, *TRAF6* 在鳃中的表达最高, 肠中也有较高的表达; *TAK1* 在心脏中的表达量最高, 其次是肾。*TRAF6* 和 *TAK1* 在鳃、肾等免疫器官中的高表达, 与其在 Toll 样受体信号通路中的重要作用是一致的。对 *TRAF6* 和 *TAK1* 在早期胚胎发育时期的表达情况进行检测, 结果显示, 在未受精卵中可检测到 *TRAF6* 和 *TAK1*, 提示了这两种免疫分子的母源性 mRNA 遗传的可能性。免疫分子母源性 mRNA 可能参与发育过程, 也可能参与构建免疫体系, 以保护胚胎或仔鱼免受病原体的侵袭。

关键词: 半滑舌鳎; *TRAF6*; *TAK1*; 克隆; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0867-10

Toll 样受体(TLRs)可参与识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 激活细胞内的信号转导途径, 诱导促炎细胞因子的分泌和共刺激分子的表达, 启动固有免疫应答和特异性免疫应答反应^[1-4]。肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)和转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)是 Toll 样受体信号通路中重要的接头蛋白, 可激活下游信号通路, 启动固有免疫应答反应和特异性免疫应答反应^[5-7]。研究发现 TRAF6 不仅介导信号的传导, 还具有重要的生物

学功能, 在胸腺上皮细胞的分化、骨代谢、先天性免疫反应和胚胎正常发育中都发挥着重要的作用^[8-10]。TAK1 是 MAPKKK 蛋白家族成员, 可被多种细胞因子激活, 是炎症反应和细胞应激信号传导通路中重要的调节蛋白^[11-13]。TAK1 可通过活化 JNK、p38 和 NF- κ B 信号通路来参与调节细胞的分化、存活和炎症反应。

目前 *TRAF6* 基因和 *TAK1* 基因已在多种物种中被克隆出来, 已报道 *TRAF6* 基因鱼类有斑马鱼(*Danio rerio*)^[14]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[4]、麦瑞加拉鲮(*Cirrhinus mrigala*)^[15]、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[16]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[17]等。

收稿日期: 2015-03-02; 修订日期: 2015-04-17.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A402).

作者简介: 陈燕(1988-), 女, 硕士, 研究方向为海洋生物遗传学. E-mail: gtpeng@163.com

通信作者: 张全启, 教授. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

TAK1 基因在人(*Homo sapiens*)^[18]、中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)^[19]、草鱼^[17]等物种都有报道。尽管 TRAF6 和 TAK1 的氨基酸序列在不同物种中的相似性很高,但表达模式却不尽相同。因此,从更多的鱼类中克隆 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因并研究其表达模式,有助于了解 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因在鱼类中的功能及其在脊椎动物中的进化过程。

近年来,随着养殖业的快速发展,水生病害问题已引起人们的高度关注,养殖场中鱼类大规模的死亡及其造成的重大经济损失使高密度集约化人工养殖面临严峻挑战^[20]。目前有关半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)免疫机制的研究正处于起步阶段,还未找到有效的手段来预防疾病的发生和控制疾病(如鳃弧菌病、爱德华氏综合病、出血白血病等)的传染。现代分子生物学技术的发展为人们了解鱼类抗病机理提供了可能^[21-24],但要找到新的预防措施和治疗方法还需做深入的研究。本研究克隆了半滑舌鲷 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的 cDNA 全长,并分析了其在不同组织和不同发育时期的表达模式,为研究这两个基因在 Toll 样受体信号通路中的作用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康半滑舌鲷取自山东海阳市黄海水产公司。选取 3 条体重约为 250 g 的半滑舌鲷,于循环海水中暂养 1 d,断椎处死,取心脏、脾、肠、肝、肾、肌肉、脑、鳃 8 种组织,液氮冷冻后置于-80℃中保存待用。半滑舌鲷受精卵于(17±1)℃过滤海水中孵化,解剖镜下观察胚胎发育时期。100 目筛绢收集 13 个时期的胚胎样品,放入盛有 1 mL RNAlater 的冻存管中,4℃过夜后转入-80℃中保存待用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取半滑舌鲷不同组织和胚胎发育各时期的 RNA,电泳检测 RNA 的完整性。按照 M-MLV 反转录试剂盒(TOYOBO, Japan)说明书合成 cDNA 第一条链。

1.3 *TRAF6* 基因和 *TAK1* 基因的克隆

根据 GenBank 中已提交的鱼类 *TRAF6* 和 *TAK1* cDNA 序列的保守区设计兼并引物(*TRAF6*-F/*TRAF6*-R; *TAK1*-F/*TAK1*-R)(表 1),扩增 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的核心片段。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,与 PMD18-T (TaKaRa, Japan)载体连接,转入 trans5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆进行测序。BLAST 比对分析后获得 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的核心片段。

根据得到的核心片段设计 RACE 特异性引物(表 1),利用巢式 PCR 扩增 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的 5'和 3'末端。电泳检测目的片段后,连接到载体,转化 trans5α 感受态细胞,筛选阳性克隆送测序。BLAST 分析测序结果,Seqman 软件拼接得到的序列,最终获得半滑舌鲷 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因全序列。

1.4 序列比对和系统进化分析

利用 EditSeq 软件预测 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的开放阅读框(ORF)及可能编码的氨基酸序列。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 InterPro Scan 在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tool/InterProScan>)预测和分析蛋白结构域。在 NCBI 数据库中搜寻其他物种的 *TRAF6* 和 *TAK1* 的氨基酸序列(表 2),利用 MEGA5.0 软件,以 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

根据 *TRAF6* 和 *TAK1* 的 cDNA 序列设计定量引物(表 1),以 18S rRNA 为内参基因(此基因经预实验证明是稳定的),对半滑舌鲷不同组织和胚胎发育各时期进行荧光定量 PCR 检测。Trizol 法提取半滑舌鲷不同组织和早期胚胎发育时期的总 RNA,利用 M-MLV 反转录试剂盒(TOYOBO, Japan)合成 cDNA 第一条链。采用 Roche Light Cycler480 定量 PCR 仪(Roche, Switzerland)测定不同组织和不同发育时期 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的相对表达量,实验中每个样品做 3 次重复,且设置阴性空白对照。反应条件为:95℃, 2 min; 95℃, 15 s, 60℃, 45 s, 40 个循环;循环结束后绘制熔解曲线,以确保产物的特异性。

表 1 本研究中用到的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	用途 application
TRAF6-F1	TTGGAGGAGGACAGCTATGAW	核心扩增 core amplification
TRAF6-R1	TGGGYGTRGTRCCGTTG	核心扩增 core amplification
TRAF6. 3-F1	GCCTCAGCCTCAATGGTA	3'RACE 扩增 3'RACE amplification
TRAF6. 3-F2	CACGATTGGTGAAGCAGGAC	3'RACE 扩增 3'RACE amplification
TRAF6. 5-R1	CAGCAAAGTGTACAGCAAAGAAT	5'RACE 扩增 5'RACE amplification
TRAF6. 5-R2	TTACAGGCTATGGGTGCTTTGG	5'RACE 扩增 5'RACE amplification
TRAF6. q-F1	TGCGTTTACATCTTCAGGCTCC	RT-PCR
TRAF6. q-R1	AATCCTTTAGGGTTGCGTTGC	RT-PCR
TAK1-F1	GACCTCAAACCAACCAATC	核心扩增 core amplification
TAK1-R1	TCTGCTGRTCTTCTTCGTC	核心扩增 core amplification
TAK1. 3-F1	CTGAAGTGGACCAAGACGAGAAG	3'RACE 扩增 3'RACE amplification
TAK1. 3-F2	ACCAACGGCTCGGACAACT	3'RACE 扩增 3'RACE amplification
TAK1. 5-R1	TTAGACCAACAGCGAGTCATCAA	5'RACE 扩增 5'RACE amplification
TAK1. 5-R2	TGCCAGTGTAGTCCAGGTATGAAC	5'RACE 扩增 5'RACE amplification
TAK1.q-F1	AACCCTGTCTGTCTTGTAAATGG	RT-PCR
TAK1.q-R1	GGCATGGGAAGCAGTGAATA	RT-PCR
18S-F1	GGTAACGGGGAATCAGGGT	RT-PCR
18S-R1	TGCCTTCCTTGATGTGGT	RT-PCR

表 2 用于构建进化树的 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因 NCBI 登录号
Tab. 2 GenBank accession numbers of *TRAF6* and *TAK1* gene used for phylogenetic trees

中文名 Chinese name	拉丁名 Latin name	NCBI 检索号 GenBank access no	基因符号 gene symbol
牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	KM655804	<i>TRAF6</i>
罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450846.1	<i>TRAF6</i>
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	AAT37634.1	<i>TRAF6</i>
中华鳖	<i>Pelodiscus sinensis</i>	XP_006124531.1	<i>TRAF6</i>
安氏蜂鸟	<i>Calypte anna</i>	KFO96151.1	<i>TRAF6</i>
大杜鹃	<i>Cuculus canorus</i>	XP_009555865.1	<i>TRAF6</i>
西部锦龟	<i>Chrysemys picta bellii</i>	XP_005304573.1	<i>TRAF6</i>
牛	<i>Bos taurus</i>	XP_005890975.1	<i>TRAF6</i>
人类	<i>Homo sapiens</i>	AAH31052.1	<i>TRAF6</i>
褐家鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001101224.1	<i>TRAF6</i>
罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003456059.1	<i>TAK1</i>
牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	KM655803	<i>TAK1</i>
墨西哥脂鲤	<i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007254980.1	<i>TAK1</i>
斑点雀鲷	<i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_006626219.1	<i>TAK1</i>
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_001018586.1	<i>TAK1</i>
白喉雀	<i>Zonotrichia albicollis</i>	XP_005484022.1	<i>TAK1</i>
非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001084359.1	<i>TAK1</i>
牛	<i>Bos taurus</i>	NP_001075064.1	<i>TAK1</i>
人类	<i>Homo sapiens</i>	AAV38460.1	<i>TAK1</i>

1.6 统计学分析

实验采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的相对表达量, 所得数据均用平均值 $\pm$ 标准误差($\bar{x}\pm SE$)表示。利用 SPSS 17.0 软件, 进行单因素方差分析。 $P<0.05$ 时, 认为存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷 *TRAF6* 基因和 *TAK1* 基因的克隆及序列分析

运用同源克隆和 RACE 技术得到了半滑舌鲷

TRAF6 和 *TAK1* 基因的 cDNA 全长。*TRAF6* 基因(图 1)全长 1956 bp, 包括 72 bp 的 5'非编码区(5'-UTR), 153 bp 的 3'非编码区(3'-UTR)和 1731 bp 的开放阅读框(ORF)。利用 EditSeq 软件预测该基因可编码 576 个氨基酸, 分子量为 64.7 kD, 等电点为 6.10。SMART 和 InterPro Scan 在线分软件预测分析了半滑舌鲷 TRAF6 的蛋白结构域, 其二级结构包括 N 端的 RING 结构, 两个锌指结构以及 C 端 TRAF 同源结构域, 与之前报道的其他物种的 TRAF6 蛋白结构一致^[14-17]。其 C 端同源结构

```

1  acatgggggggtgacgttttggggaatataaaaaacaggaattcagaagaacgcaaaattctacaaggtccATGGTAATGATGGCTAGC
1  M V M M A S
91  TTTGAAAGCAAAAGAGAAGTCTGGAAGAAGACAGTGTGTAAGGAGCTGTGGTGGAGAGCTGTCCAATTGTGCTTTGGCAATGCTGGAA
7  F E S K K R S L E E D S V E G A V G G E L S N C A L A L M E
181 CAAGAGCGAGAATCCCTTCTCAGCCCATCTGAAGGCTCTGTAACCTTACTAAGCAGCACCTCTAGTAGTCTTCAGACACCCGCCCTCTC
37  Q E R E S L L S P S E G S V T L L S S T S S S L Q T P A P L
271 CAGGGCTATGATGTAGAGTTTGACCCACCCCTAGAGAGTAAATATGAGTGCCCATCTGCCTCATGGCTTTGAGGAATGACGATTCAAACT
67  Q G Y D V E F D P P L E S K Y E C P I C L M A L R N A V Q T
361 CCATGTGGTCATCGCTTTTGCAAGAACTGCATAGAGAAGTCCATTCTGTGATACAGGACAAAGATGCCAGTGGACAATGTAATCTTGTC
97  P C G H R F C K N C I E K S I R D T G Q R C P V D N V I L S
451 GAAGATCAGCTGTTCCAGATAACTTTGCTAAAAGGGAGATTCTTCGCTGACAGTTTGTGTGCCAACTCTGGATGTGTGAAAAATG
127  E D Q L F P D N F A K R E I L S L T V C C P N S G C V E K M
541 GAGCTAAGCAGATTGGAGAATCATCTGATGGTGTGTGAATTGCGCACAGCCTCTTGCCCAAGTCCAGCAGCTGTCTCAGGAAGAGCAGA
157  E L R H L E N H L M V C E F A T A S C P Q C Q Q S V R K S R
631 CTAGAAGAACACAACTGTAGAGTGTCTAGAAGACAGTTTCATGTCCAGACTGTGTAGCATGTTTGTGTTATGAGGAGAAAGAGCTT
187  L E E H T T V E C A R R P V S C P D C V A C F V Y E E K E L
721 CATGAGCAGTGTCCCTTTGCCAATGTAAAGTGTCAATACTGTGGGATGGAGTCTATCAGAGATCAGATGGAAATCTCACTGTGTATACA
217  H E Q Q C P F A N V K C Q Y C G M E L I R D Q M E S H C D T
811 GATTGCCCAAGACCCATAGCCTGTAACCTTAGCACTTTGGATGTAAAGAACAGATGCAGCGTCATAACTTGGCTCAGCACATGCAG
247  D C P K A P I A C N F S T F G C K E Q M Q R H N L A Q H M Q
901 GAGTTACACAGATGCATATGTGTACATGGCAGAGTTCCTGCGTGGCCTCAGCCTCAATGGTACCACATCTAAATCTCTGAGACACAT
277  E F T Q M H M W Y M A E F L R G L S L N G T T S K S L R A H
991 GGACCTGCTGCTTCTGTGATGACCAAGAAGCTGCAGCAACAGAACGTAACCTCCAGCGGGGCCGAAGACCTGTAGGGGTAACGGCAGC
307  G P A A S C D D Q E A A A T E R N S S G A R R P V G C N G S
1081 AGCAACTGTGCTCCTTCTCAGCCAGTGAAGGAATGCAGCAGCTCAGAGAGATGGATGCAGGATGGTGAAGCAGGACCAAAATTCGT
337  S N C A P S Q P S E G M Q Q L R E M D A R L V K Q D H Q I R
1171 GAGCTAACTATTATAAAGAAACACAGGCTGGTCAATTAGCAGAGCTTAGCGAAGGGTGGTGGTGTCTAGAAGAACTGTTAAGGAGCTG
367  G L T I Y K E T Q A G Q L A E I R R R V V V L E E T V K E L
1261 GAGGCCAGCAGTGTGCTGTTATTTATCTGGCGTCTTAAAGGTTTTCTGCTCTCCTGCGGAACCAAGAAGCAGGACTGCCCTGGTA
397  E A Q Q C R G L E L W R L K G F S A L L R N Q E A G L P V V
1351 GAGCAGCCCGAGGCTTACACAGGCTGTCCAGGCTATAAGCTGTGCTTACATCTTCAGGCTCCCAACGCCCTTCGCTGCTCC
427  E H S R G F Y T C P G Y K L C L R L H L Q A P N A L R C K R
1441 AACTTCATTTCCCTCTTTGTTACACAATGCAAGGATCTTTGACGGGCAGTTAACTTGGCCTTTTCAAGGCACCATCAGGCTTGCATC
457  N E L S L F V H T M Q G S E D G Q L T W P F Q G T T R L A I
1531 CTAGACAGGACCTGAGGTCAGCATCAGATGGAGGTGATGGAAACCAACCCGATCTGCAAGCGTTTCAAGGCCCTCCATGCAACGC
487  L D D G P F E G Q H H M F V M F T K P D D Q A F Q K P S M Q R
1621 AACCTAAAGGATTTGGCTATGTTACCTTTATGCACCTACAGCAGTAAGTCAGAAAACCTTTGTCAAAGACGACCCCTCCTGATCCGC
517  N P K G F G Y V T F M H L Q D L S Q K T F V K D G D T L L I R
1711 TGTGACGTTACGCGCGGTTTGACAGCATGCCTATCGCAGGCACCTGTGGTCCAGGCAAGAGGCTCGAAGCCTCATTTCAAAAGAC
547  C D V T P R F D S M P H R E A P V V Q A R G L E A S F S K D
1801 TAAgtcaaacatgaatagataattattacactgacagaaatgtaactcacatatatacaatgttctttactgctgttactttttattag
577  *
1891 tagacaacaaatgatgatttgagattttgtatagtcgagcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 *TRAF6* cDNA 序列及预测的氨基酸序列

起始密码子用加粗表示, “*”表示终止密码子, RING 结构域用方框表示, 锌指结构用灰色阴影表示, 环-环 α 螺旋结构用下划线表示, MATH 结构域用波浪线表示。

Fig. 1 Nucleotide and putative amino acid sequences of *TRAF6* cDNA

The start codon (ATG) is in bold font and the stop codon (TAA) is indicated by an asterisk. The RING domain (83–121 aa) and two zinc fingers (142–190 aa and 217–274 aa) were boxed and shaded, respectively. The coiled-coil region (366–394 aa) and the MATH domain (404–532 aa) were marked by the single underline and wavy underline, respectively.

TRAF6 聚为一大支, 半滑舌鲷 TRAF6 与其他鱼类 TRAF6 单独聚为一支。牙鲆 TRAF6 和半滑舌鲷 TRAF6 的亲缘关系最近。

BLASTP 分析结果显示, 半滑舌鲷 *TAK1* 编码的氨基酸序列与大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、点带石斑鱼和红笛鲷的相似性高达 95%, 与牙鲆、罗非鱼、斑马宫丽鱼 (*Maylandia zebra*) 的相似性为 94%, 这说明 *TAK1* 基因的保守性很高。利用 MEGA 5.0 构建的系统进化树(图 3B)显示, 所有的硬骨鱼类聚为一大支, 鸟类、哺乳类和两栖类聚为另一支。在这些物种中, 牙鲆 *TAK1* 与半滑舌鲷 *TAK1* 的亲缘关系最近。

2.3 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的组织表达分析

以 18S rRNA 为内参基因, 对半滑舌鲷成体组织进行实时定量 PCR 结果显示(图 4), *TRAF6* 基因在所检测的 8 种组织中都有表达, 但其表达量存在明显差异, 在鳃中表达量最高, 其次是肠和脑, 在肌肉和肝中的表达量较低。

实时荧光定量 PCR 结果显示(图 4), *TAK1* 基因在心脏的表达量最高, 在肾、肝和脑也有较高的表达, 而肌肉中的表达量最低。

2.4 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因的早期胚胎发育表达分析

对半滑舌鲷早期胚胎发育时期 *TRAF6* 基因的表达情况进行检测(图 5)。结果显示, *TRAF6* 基因

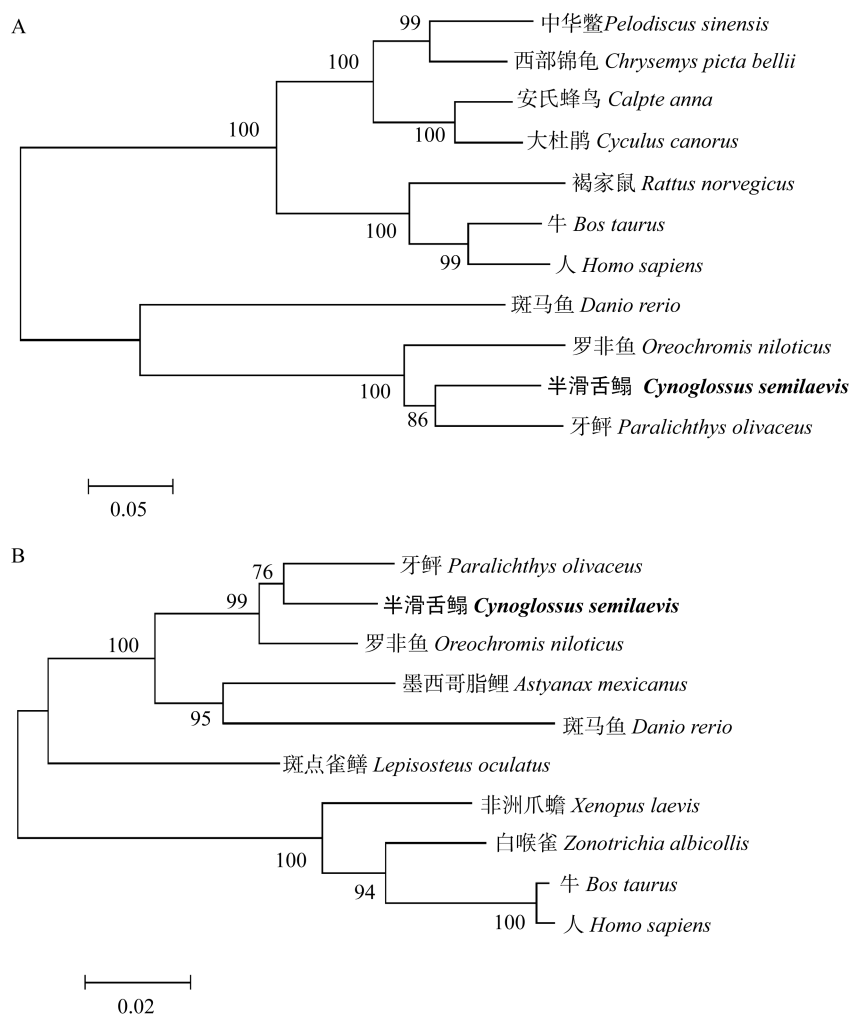


图 3 TRAF6 (A)和 TAK1 (B)系统进化树

本研究得到的半滑舌鲷 TRAF6 和 TAK1 用加粗表示。

Fig. 3 Phylogenetic trees of TRAF6 (A) and TAK1 (B)
TRAF6 and TAK1 of *Cynoglossus semilaevis* in this study were in bold font.

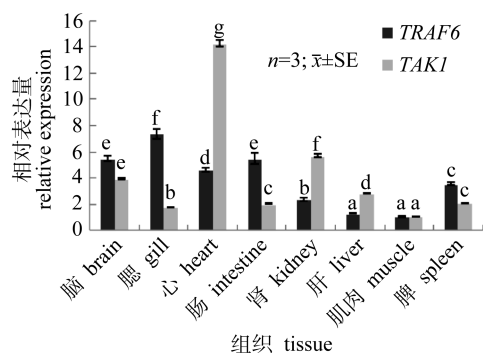


图 4 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因在半滑舌鳎不同组织中的相对表达

柱状图上方不同字母表示不同组织间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 The relative expression levels of *TRAF6* and *TAK1* genes in different tissues of *Cynoglossus semilaevis*. Different letters donate significant differences between tissues ($P < 0.05$).

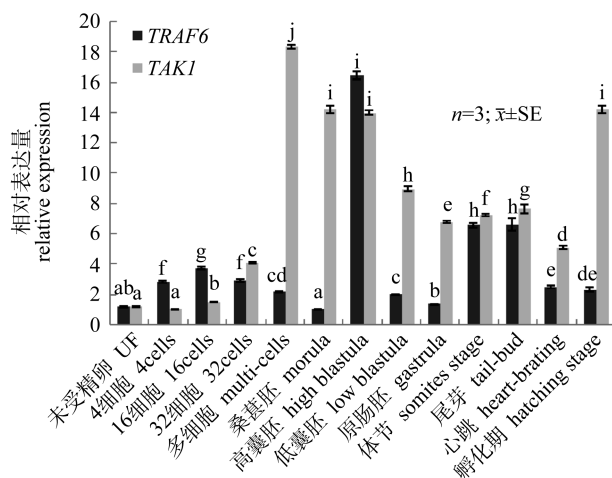


图 5 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因在半滑舌鳎早期胚胎发育时期的相对表达

柱状图上方不同字母表示不同发育期间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 The relative expression levels of *TRAF6* and *TAK1* genes at different developmental stages of *Cynoglossus semilaevis*.

Different letters donate significant differences between different developmental stages ($P < 0.05$).

在所检测的 13 个时期都有表达, 包括未受精卵, 提示了 *TRAF6* 基因的母源性遗传的可能性。受精之后, *TRAF6* 的表达逐渐升高且一直持续到 16 细胞期, 随后其表达量逐渐降低, 到桑椹胚时表达量降到最低。之后 *TRAF6* 的表达急剧升高, 到高囊胚时达到最高, 随后其表达量呈现先减后增的趋势, 过了尾芽时期表达量开始下降且一直持续

到孵化期(最后一个取样点)。

实时荧光定量 PCR(图 5)结果显示, *TAK1* 基因在所检测的 13 个时期也都有表达, 包括未受精卵, 提示了母源性 mRNA 的存在。受精之后, 表达量开始升高, 到多细胞时期达到最高。随后其表达量开始下降, 一直持续到原肠胚期。胚胎发育后期, *TAK1* 基因的表达略微升高直至尾芽期, 之后心跳期表达量有明显下降。孵化期时表达量较心跳期有明显升高。

3 讨论

TRAF6 和 *TAK1* 是 Toll 样受体信号通路中重要的接头蛋白, 可激活下游信号通路, 在先天性免疫反应中发挥着重要作用。本研究克隆得到的 *TRAF6* 基因全长 1956 bp, 编码 576 个氨基酸。经 SMART 和 InterPro Scan 分析, *TRAF6* 蛋白含有保守的蛋白结构域, 他们分别为: N 端的 RING 结构、2 个锌指结构、1 个环-环(coiled-coil) α 螺旋结构以及高度保守的 MATH 同源结构。研究表明, RING 结构和锌指结构对于下游信号通路(NF- κ B 或 JNK)的激活具有至关重要的作用^[25]。MATH 同源结构可介导 TRAF 分子之间形成二聚体或多聚体, 与含有 TRAF 结构域的蛋白结合^[17]。环-环(coiled-coil) α 螺旋结构相对变异较大, 主要是由于其含有疏水性的氨基酸残基, 并且以周期性排列, 故形成 α 螺旋结构, TRAF 分子通过此结构可形成三聚体^[26]。SMART 和 InterPro Scan 分析半滑舌鳎 *TAK1* 含有典型的 *TAK1* 结构域: C 端的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活结构域和 N 端的环-环(coiled-coil) α 螺旋结构。蛋白激酶激活结构域可结合转化生长因子活化蛋白激酶 1 结合蛋白(TAB1), 这对于 *TAK1* 的激活是必须的^[27]。环-环(coiled-coil) α 螺旋结构可与 TAB2 相互作用, 使 *TAK1* 与其他蛋白分子形成聚合物^[28-29]。这些保守的蛋白结构域揭示了 *TRAF6* 和 *TAK1* 在不同物种间行使的功能可能是一样的。

本研究通过实时荧光定量 PCR 技术探究了 *TRAF6* 基因在不同组织中的表达情况, 发现 *TRAF6* 基因广泛表达于各组织中, 但是表达量组

织间差异很大,在鳃中表达量最高,其次是肠和脑,在肌肉中的表达量最低。这可能与 *TRAF6* 基因在不同组织中的生物学功能不同有关。先前的研究已证明, *TRAF6* 不仅介导信号的传导,还具有重要的生物学功能,在胸腺上皮细胞的分化、骨代谢、先天性免疫反应、树突状细胞的成熟和胚胎正常发育中都发挥着重要作用^[9-10]。 *TRAF6* 基因广泛表达于各组织中,这种情况与其他硬骨鱼类是一致的。但是不同物种 *TRAF6* 基因的表达模式存在差异。斑马鱼中, *TRAF6* 基因主要在鳃中表达^[14],鲤肝的表达量最高^[4],麦瑞加拉鲮肾的表达量最高^[15],而点带石斑鱼^[16]和草鱼^[17]几种免疫相关组织中 *TRAF6* 基因的表达量都较高。由此可见,不同物种 *TRAF6* 基因的表达模式虽不尽相同,但总体上 *TRAF6* 在鳃、肾、肝和脾等主要的免疫器官中都有较高的表达。肾、脾是鱼类免疫细胞生成的主要场所,也是产生免疫应答的主要部位^[30], *TRAF6* 基因在这些免疫组织中的高表达暗示了 *TRAF6* 作为一种重要的信号接头蛋白,在免疫反应中可能发挥着重要作用。对 *TAK1* 进行的组织表达分析显示, *TAK1* 基因在所检测的 8 种组织中都有表达,但表达量存在显著差异,其在心脏中的表达量最高,在肾中也有较高的表达量。 *TAK1* 的这种泛表达在人类^[18]、中华蜜蜂^[19]、草鱼^[17]等物种中也有报道。 *TAK1* 在鱼类中的表达模式首次报道于草鱼中,其在脾中的表达最高。在其他鱼类中还未见报道。 *TAK1* 基因已被证明在免疫及发育过程中发挥着重要作用。在哺乳动物细胞中, *TAK1* 基因对于细胞应对各种刺激是至关重要的。它是信号转导通路中重要的调节分子,可激活转录因子 AP-1 和 NF- κ B。细胞接收来自微生物病原体或细胞因子的刺激后,激活 TAK1,进而激活核因子 κ B 激酶抑制因子(IKK)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),最终导致 NF- κ B 和 AP-1 的活化。 *TAK1* 在不同组织中的表达不同,可能与其在不同组织中的功能不同有关^[31]。

本研究检测了 *TRAF6* 和 *TAK1* 基因在早期胚胎发育时期的表达情况。结果显示,在未受精卵中可检测到 *TRAF6* 和 *TAK1* 的存在,这表明了母

源性 mRNA 遗传的可能性。母源性 mRNA 的存在暗示了这两个基因所在的 Toll 样受体信号通路可能在胚胎早期发育过程中发挥免疫防御功能。免疫分子母源性 mRNA 的存在在其他硬骨鱼中也有报道。例如,母源性 *TLR9*、*IRAK4* mRNA 在半滑舌鳎未受精卵和早期胚胎发育各时期都被检测到^[32-33],斑马鱼中可检测到母源性的 *MyD88* mRNA^[34], *Ig* mRNA 就在鲈(*Dicentrarchus labrax*)卵中有报道^[35],母源性 *C3* mRNA 在鲤未受精卵和早期胚胎发育各时期都有检测到^[36]。免疫分子母源性 mRNA 可能参与发育过程,也可能参与构建免疫体系,以保护胚胎或仔鱼免受病原体的侵袭^[36]。

本研究通过同源克隆和 RACE 技术克隆得到了半滑舌鳎 *TRAF6* 和 *TAK1* 的基因全长,并且分析了这两个基因的序列特征及在不同组织和早期胚胎发育时期的表达情况,为进一步研究这两个基因在免疫反应中的作用机理提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Liew F Y, Xu D, Brint E K, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(6): 446-458.
- [2] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 179-190.
- [3] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2): 135-145.
- [4] Kongchum P, Hallerman E M, Hulata G, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *TLR9*, *MyD88* and *TRAF6* genes in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(1): 361-371.
- [5] Mao R F, Fan Y H, Mou Y G, et al. TAK1 lysine 158 is required for TGF- β -induced TRAF6-mediated Smad-independent IKK/NF- κ B and JNK/AP-1 activation[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(1): 222-227.
- [6] Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, et al. The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway[J]. *Nature*, 1999, 398(6724): 252-256.
- [7] Lu Y, Li C, Zhang P, et al. Two adaptor molecules of *MyD88* and *TRAF6* in *Apostichopus japonicus* toll signaling cascade: Molecular cloning and expression analysis[J]. *Dev Comp Immunol*, 2013, 41(4): 498-504.
- [8] Wooten M W, Geetha T, Seibenhener M L, et al. The p62

- scaffold regulates nerve growth factor-induced NF- κ B activation by influencing TRAF6 polyubiquitination[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35625–35629.
- [9] Lomaga M A, Yeh W C, Sarosi I, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling[J]. Gene Dev, 1999, 13(8): 1015–1024.
- [10] Ha H, Han D, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling[M]//Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc, 2009: 1–19.
- [11] Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, et al. Functional interactions of transforming growth factor β -activated kinase 1 with I κ B kinases to stimulate NF- κ B activation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(15): 10641–10648.
- [12] Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, et al. The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(10): 1199–1207.
- [13] Yamashita M, Fatyol K, Jin C Y, et al. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β [J]. Mol Cell, 2008, 31(6): 918–924.
- [14] Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Mol Immunol, 2005, 42(9): 1057–1071.
- [15] Basu M, Swain B, Maiti N K, et al. Inductive expression of toll-like receptor 5 (TLR5) and associated downstream signaling molecules following ligand exposure and bacterial infection in the Indian major carp, mrigal (*Cirrhinus mrigala*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(1): 121–131.
- [16] Wei J G, Guo M L, Gao P, et al. Isolation and characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) from grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 39(1): 61–68.
- [17] Zhao F, Li Y W, Pan H J, et al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TRAF6 and TAK1: Molecular cloning and expression analysis after *Ichthyophthirius multifiliis* infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(6): 1514–1523.
- [18] Kondo M, Osada H, Uchida K, et al. Molecular clone of human TAK1 and its mutational analysis in human lung cancer[J]. Int J Cancer, 1998, 75(4): 559–563.
- [19] Meng F, Kang M J, Liu L, et al. Characterization of the TAK1 gene in *Apis cerana cerana* (AccTAK1) and its involvement in the regulation of tissue-specific development[J]. BMB Rep, 2011, 44(3): 187–192.
- [20] Nho S W, Hikima J, Cha I S, et al. Complete genome sequence and immunoproteomic analyses of the bacterial fish pathogen *Streptococcus parauberis*[J]. J Bacteriol, 2011, 193(13): 3356–3366.
- [21] Avunje S, Kim W S, Park C S, et al. Toll-like receptors and interferon associated immune factors in viral haemorrhagic septicaemia virus-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 31(3): 407–414.
- [22] Tanekhy M, Matsuda S, Itano T, et al. Expression of cytokine genes in head kidney and spleen cells of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Nocardia seriolae*[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 134(3–4): 178–183.
- [23] Hwang S D, Ohtani M, Hikima J, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 3 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Dev Com Immunol, 2012, 37(1): 87–96.
- [24] Hwang S D, Kondo H, Hirono I, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 14 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 425–429.
- [25] Grech A, Quinn R, Srinivasan D, et al. Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: Implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants[J]. Mol Immunol, 2000, 37(12–13): 721–734.
- [26] Yang K, Zhu J M, Sun S G, et al. The coiled-coil domain of TRAF6 is essential for its auto-ubiquitination[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1): 432–439.
- [27] Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, et al. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1[J]. FEBS Lett, 2000, 474(2): 141–145.
- [28] Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, et al. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β signal transduction[J]. Science, 1996, 272(5265): 1179–1182.
- [29] Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway[J]. Mol Cell, 2000, 5(4): 649–658.
- [30] Wang W W, Wu S Q, Sun X Q, et al. Progress in research for components of the immune system and mechanism of the immune response in teleost[J]. Advances in Marine Science, 2010, 28(2): 257–265. [王卫卫, 吴谡琦, 孙修勤, 等. 硬骨鱼免疫系统的组成与免疫应答机制研究进展[J]. 海洋科学进展, 2010, 28(2): 257–265.]
- [31] Chen Z J, Bhoj V, Seth R B. Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection?[J]. Cell Death Differ, 2006, 13: 687–692.
- [32] Yu Y, Zhong Q W, Li C M, et al. Isolation and characteriza-

- tion of Toll-like receptor 9 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3): 492–499.
- [33] Yu Y, Zhong Q W, Li C M, et al. Identification and characterization of IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(4): 609–615.
- [34] 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.
- [35] Picchietti S, Taddei A R, Scapigliati G, et al. Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*[J]. Cell Tissue Res, 2004, 315(2): 259–270.
- [36] Huttenhuis H B T, Grou C P O, Taverne-Thiele A J, et al. Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(4): 586–596.

Molecular cloning and expression analysis of *TRAF6* and *TAK1* in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

CHEN Yan, FAN Lin, LIU Tiantian, LIU Yuezhong, LI Zan, ZHANG Quanqi

College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) and transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) are important adaptor molecules in Toll-like receptor (TLR) signaling pathways. To better understand the biological role of these two genes in immune response, we cloned *TRAF6* and *TAK1* cDNA sequences from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) using homologous cloning methods and rapid amplification of cDNA ends. We also detected the expression patterns of these two genes in different tissues at different developmental stages. The full-length cDNA sequence of *TRAF6* was 1956 bp, including a 1731 bp open reading frame (ORF) that encoded a putative 576 amino acid protein. TRAF6 contained one RING domain, two zinc fingers, one coiled-coil region, and one MATH domain; this structure is highly similar to that of TRAF6 in other species. The conserved motifs of TRAF6 likely indicate that its functions are similar to those of other mammal TRAF6s. The full-length *TAK1* cDNA sequence was 2519 bp, including a 1731 bp ORF that encoded a putative 576 amino acid protein. TAK1 contains a conserved serine/threonine protein kinase catalytic domain and a coiled-coil region. The highly conserved domains indicate that all TAK1s have a similar function. Phylogenetic trees showed that both TRAF6 and TAK1 in *C. semilaevis* were evolutionarily closest to those in *Paralichthys olivaceus*. In addition, the expression patterns of these two genes were examined in different tissues and developmental stages. *TRAF6* was expressed in all tested tissues, and the highest expression was in the gills followed by the intestines. *TAK1* was highly expressed in the heart and kidney. The high levels of *TRAF6* and *TAK1* in the gills and kidneys were consistent with the essential role of the two genes in the TLR/Toll-like receptor signaling pathway, which is pivotal in both innate and adaptive immune responses. *TRAF6* and *TAK1* were expressed throughout developmental stages, including unfertilized eggs, indicating maternal inheritance of *TRAF6* and *TAK1*. The expression of maternal mRNA throughout development demonstrates the potential role of *TRAF6* and *TAK1* in early immune defense and developmental regulation of *C. semilaevis*. These results indicate that TRAF6 and TAK1 may play crucial roles in immune responses and might be involved in half-smooth tongue sole development. This study provides a theoretical basis for understanding the roles of these two genes in *C. semilaevis* immune response.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *TRAF6*; *TAK1*; cloning; expression

Corresponding author: ZHANG Quanqi. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn