

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15363

半滑舌鳎 *RasGRP3* 基因的克隆和免疫应答分析

陈学杰^{1,2}, 陈亚东^{1,3}, 于孟君^{1,4}, 孙璐明^{1,4}, 杨光^{1,2}, 沙珍霞^{1,3}

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200;
4. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: *RasGRP3* (Ras Guanyl nucleotide Releasing Protein 3)是一种鸟苷酸交换蛋白, 差异表达的 *RasGRP3* 蛋白在疾病发生和固有免疫中发挥着重要作用。为了探究半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *RasGRP3* 基因组成、组织表达及免疫应答特征, 根据本实验室半滑舌鳎转录组数据获得的部分 *RasGRP3* 序列, 采用 RACE (Rapid-Amplification of cDNA Ends)技术, 克隆了 *RasGRP3* 基因的全长, 将测序结果进行氨基酸序列比对和同源性分析: 半滑舌鳎 *RasGRP3* 基因全长 2756 bp, ORF (Open Reading Frame)长度为 2244 bp, 编码 747 个氨基酸; 推导的半滑舌鳎 *RasGRP3* 氨基酸序列与其他鱼类的 *RasGRP3* 氨基酸序列相似性较高, 是同源基因。采用 qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) 方法对 *RasGRP3* 基因在健康半滑舌鳎 13 种组织、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后不同时间点的 6 种免疫组织及 LPS、PGN、WGP 和 poly I:C 4 种病原模拟物处理的半滑舌鳎外周血淋巴细胞不同时间点中的表达特征进行分析: *RasGRP3* 基因在健康半滑舌鳎 13 种组织中均有表达, 其中在性腺中表达量最高, 其次是肝、脑和脾, 在血液中表达量最低; *RasGRP3* 基因在鳃弧菌感染后半滑舌鳎 6 种免疫组织中都表现出不同的表达趋势, 其中肝和鳃中上调趋势明显, 6 h 比 0 h 上调表达倍数分别为 3 倍和 30 倍, 在肠、脾、头肾和血液中 6 h 都出现了下调表达; *RasGRP3* 在 4 种病原模拟物处理的半滑舌鳎外周血淋巴细胞中整体上调表达, 在 PGN 和 poly I:C 这 2 种病原模拟物刺激后表达趋势出现明显上调, 在 PGN 刺激后 24 h 比 0 h 上调表达倍数为 13 倍, 在 poly I:C 刺激后 6 h 比 0 h 上调表达 8 倍。结果表明, *RasGRP3* 基因参与了半滑舌鳎的免疫应答过程, 可能在免疫调控中发挥着重要的作用。

关键词: 半滑舌鳎; *RasGRP3*; 基因克隆; 病原感染; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0813-10

RasGRP3 是鸟嘌呤核苷酸交换因子(Guanine nucleotide Exchange Factors, GEFs)中的一员, 其作用是促进小 GTP 酶(如 Ras 和 Rap)由非活性形式转变为活性形式^[1]。目前在哺乳类动物中 *RasGRP* 家族含有 4 个成员: *RasGRP1*、*RasGRP2*、*RasGRP3* 和 *RasGRP4*; 而在斑马鱼中仅有 3 个: *RasGRP1*、*RasGRP2*、*RasGRP3*。它们在淋巴细胞以及神经细胞中均有较高的表达, 并在这些细胞中显示了重要的功能^[2]。研究发现, 在 *RasGRP* 家族成员中,

RasGRP1 和 *RasGRP4* 能活化 Ras; *RasGRP2* 能活化 Rap; 而 *RasGRP3* 既能活化 Ras 又能活化 Rap^[3]。*RasGRP3* 活化 Ras 后引起下游信号通路的活化, 其中最具有特征的是 Raf-Mek-Erk 酶级联通路, 蛋白激酶 Erk 能磷酸化许多底物, 导致细胞的增殖、分化和存活。此外, Ras 家族成员还被认为在固有免疫应答过程中扮演着重要的调控角色^[4-5]。

当细胞受到外界刺激时, *RasGRP* 家族成员迅速被活化并在细胞信号通路中发挥重要的调节作

收稿日期: 2015-09-16; 修订日期: 2015-12-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31572644); 国家 863 计划项目(2012AA10A401-4); 鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-03).

作者简介: 陈学杰(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫基因功能的研究. E-mail: chenxuejie1234@126.com

通信作者: 沙珍霞, 研究员. E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

用^[6-7]。*RasGRP3*通过激活 MAPK (mitogen-activated protein kinases)和 NF- κ B (nuclear factor κ B)信号通路,从而介导天然免疫细胞产生合适强度的免疫应答^[8-9]。在 B 细胞中,BCR (B Cell Receptor)信号通路主要通过 *RasGRP3* 来活化 ERK^[10],在巨噬细胞中 *RasGRP3* 通过 PLC (Phospholipase C)和 DAG (Diacylglycerol)到达细胞表面从而在吞噬功能中发挥作用^[11]。此外,*RasGRP3* 还在血管内皮细胞^[12]、内分泌细胞^[13-14]中具有重要作用。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是中国重要的海水经济养殖鱼类^[15],广泛分布于中国的黄海、渤海、东海等海域,具有生长快、食性温和、营养级别低、出肉率高、口感鲜美、市场价值高等特点,但它的产量受到各种细菌和病毒等病原的严重威胁,而鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是其病害发生的主要病原体之一,可以导致半滑舌鲷发生弧菌病。有关半滑舌鲷免疫机制的研究和有效的病害防控手段还有待于深入^[16]。因此开展半滑舌鲷免疫基因的功能研究,阐明其分子作用机制,将为实现健康养殖提供理论基础。

RasGRP3 在鱼类中鲜有报道,鉴于 *RasGRP3* 在固有免疫中的作用^[17],本研究旨在发现半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因序列组成、组织表达特征,特别是在响应不同病原刺激后的基因表达变化,为揭示 *RasGRP3* 基因与半滑舌鲷免疫的相关性提供科学理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

半滑舌鲷购自日照东鑫现代渔业技术研究所,鱼龄 1.5 龄左右,体长(30.5±2.5) cm,体重(220±6.4) g。感染前在实验室水族箱中暂养 7 d,每天更换新鲜除菌海水。

1.2 样品处理和采集

1.2.1 健康组织的收集 随机选取 3 条健康半滑舌鲷进行组织的收集,每条鱼分别采集肝、肠、脾、头肾、后肾、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉、胃、心脏和卵巢 13 种组织,所有采集的组织立即投入液氮中冷冻,然后转移至-80℃保存,以备 RNA 提取。

1.2.2 鳃弧菌感染组和 PBS 对照组组织收集 鳃弧菌由本实验室保存,在磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中重新悬浮至浓度为 2.864×10⁸ 菌落形成单位(CFU/mL)。鳃弧菌感染参照 Sha 等^[18]实验方法略作修改,实验组用 3.18×10⁵ CFU/g 鱼体(半致死剂量)的鳃弧菌对半滑舌鲷进行腹腔注射,对照组参照实验组注射与体重相应剂量的 1×PBS 溶液。在 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 共 6 个时间点,收集鳃弧菌感染组和 PBS 对照组不同时间点肝、肠、脾、头肾、鳃和血液 6 种组织,每个时间点取 3 条鱼。所有采集的组织立即投入液氮中冷冻,然后转移至-80℃保存,以备 RNA 提取。

1.2.3 4 种病原模拟物处理的半滑舌鲷外周血淋巴细胞样品收集 半滑舌鲷外周血淋巴细胞由本实验室分离获得(未发表资料),将分离的淋巴细胞在 6 孔细胞培养板中进行培养,分别用终浓度为 50 ng/mL 的脂多糖(LPS)、100 μg/mL 的肽聚糖(PGN)、50 ng/mL 的葡聚糖(WGP)、50 μg/mL 的聚肌胞苷酸^[19](polyI:C)感染淋巴细胞,每个实验设置 3 个重复。感染 30 min 后去除包含感染源的培养基,用 1 mL PBS 溶液反复冲洗淋巴细胞,吸到 1.5 mL 离心管中离心,去上清,加入新鲜的培养基,吹打细胞使其分散,然后铺板用新鲜的培养基继续培养细胞。用 PBS 同时处理半滑舌鲷淋巴细胞作为对照组。分别收集感染后 0 h(感染开始时)、2 h、6 h、12 h 和 24 h 五个时间点的淋巴细胞,每个时间点取 3 个重复,低温离心后去除离心管中上清液,加入 1 mL 的裂解液(RZ),然后转移至-80℃保存,以备 RNA 提取。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 模板的制备

RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)的说明书进行操作。cDNA 第一条链的合成按照反转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司,大连)说明书进行。最终得到的 cDNA 在-20℃保存待用。

1.4 半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因克隆和序列分析

1.4.1 半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因的克隆和测序 根据本实验室已发表的半滑舌鲷转录组数据^[20]中

的 *RasGRP3* 基因序列信息, 设计引物 RasGRP3-F 和 RasGRP3-R(表 1)进行 PCR 反应, 克隆得到了 *RasGRP3* 基因的部分 cDNA 序列。将 PCR 产物使用胶回收试剂盒(宝生物工程有限公司, 大连)回收 DNA 片段, 取 4 μ L 产物在 25 $^{\circ}$ C 与 1 μ L T1(全式金生物技术有限公司, 北京)载体连接 20 min, 转化到 Top10 感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床 1 h, 取 200 μ L 均匀涂在含有 Amp⁺抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单克隆于含 Amp⁺的液体 LB 中在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇菌 4~6 h, 进行菌液 PCR 检测, PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 含有阳性克隆的菌液测序在苏州金唯智生物技术有限公司完成。根据验证的序列设计特异性引物 RasGRP3-5'-R/N 和 RasGRP3-3'-R/N(表 1)分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE, RACE 反应按照试剂盒说明书(宝生物工程有限公司, 大连)进行操作。本研究所有引物均用 Primer Premier 5.0 软件设计。

1.4.2 半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因序列分析 将测序得到的结果去除载体序列后, 拼接获得 *RasGRP3* 的基因全序列, 然后将基因序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行同源性比对, 应用 ORF finder^[21]、DNASTAR (<http://www.dnastar.com/>)、Clustalx1.83 (<http://www.genome.jp/tools/clustalx/>)和 DNAMAN (<http://www.lynnon.com/>)等生物软件进行半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因开放阅读框的查找及氨基酸组成和同源性分析。

1.5 半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因实时定量分析

根据测序得到的半滑舌鲷 *RasGRP3* 的序列设计 qRT-PCR 引物为 qRasGRP3-F、qRasGRP3-R(表 1), 扩增长度为 189 bp, 以半滑舌鲷 18S rRNA 基因为内参, 设计引物为 18S-F、18S-R(表 1)。用 SYBR Green 荧光定量试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)按照说明书在 ABI PRISM 7500Fast 实时定量扩增仪上进行 qRT-PCR 反应。

表 1 半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因克隆和表达分析所用引物

Tab. 1 Primers used for expression analysis and cloning of *RasGRP3* in *C. semilaevis*

引物 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 application
RasGRP3-F	AGTCCTGACATGACATCGTAC	克隆中间片段
RasGRP3-R	ACCAGACGCCTTCATTTTATTTG	克隆中间片段
RasGRP3-5'-R	AACAATTGATGTATGTGTA	克隆 5'末端
RasGRP3-5'-N	TCCGGAATTTCCGACCACTC	克隆 5'末端
RasGRP3-3'-R	GGGCACTCAGTCCATCACCCCTGA	克隆 3'末端
RasGRP3-3'-N	CAATCCAAGGCTCCAGAAACTCA	克隆 3'末端
qRasGRP3-F	TTGGGAAAAGGCAGCGACAC	定量引物
qRasGRP3-R	TTGGTAGTCGTCTCCGTTGC	定量引物
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	定量内参引物
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	定量内参引物

1.6 统计学分析

qRT-PCR 检测结果使用 SPSS19.0 统计软件进行分析。实时定量数据用 3 组重复平均值 \pm 标准误 ($\bar{x}\pm$ SE)表示, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。采用单因素方差分析法中的 Duncan 法对多组样本均数进行两两比较分析, $P<0.05$ 时, 认为存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *RasGRP3* 基因序列、结构域及同源比对

2.1.1 *RasGRP3* 基因序列及结构域分析 将测序得到的半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因序列, 在 NCBI 官

网上进行比对, 能够比对到半滑舌鲷基因数据库中(XM_008322457.1)。通过基因序列验证和末端扩增获得的 *RasGRP3* 基因全长为 2756 bp, 用 ORF finder 软件发现其 ORF 长度为 2244 bp, 5'-UTR (untranslation region)长度为 41 bp, 3'-UTR 长度为 471 bp。DNASTAR 软件显示半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因 ORF 编码 747 个氨基酸(图 1), 将其氨基酸序列在 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)中分析发现其含有 1 个 RasGEFN 结构域(45~68), 1 个 RasGEF 结构域(191~428), 2 个 EFh 结构域(468~496, 497~528)和 1 个 C1 结构域(538~587)(图 2)。

```

gccgtgaacggtgatgagagtgctgacacctgtagctcctgac
ATGACATCGTACCACAGAGGGAACCGGAGTGATATACACATACATCAATTGTTCTTCCAAAGTCCGAAGAAAATCCTGAGTGGTCCGAAA 41
M T S Y H R G N A S D I H I H Q L F F Q S P K K I L S G P K 131
TTCCGGATTACCGCTTTTGGCTTTTGTGGCCCTAAAACCTATGGGATCGTCCACTTTGGGAAAGGCAGCGACACTTGATGCTCTCTTACAT 30
F R I T R F G F C G P K T M G S S T L G K A A T L D A L L H 221
GAATGCGTTGAGGCTTTCCGAAGACAATGGGAAAACCTCAGGACAACCACTTCCCGCAGCCTCCTGCTGATGCACCGCTGGTATGTACC 60
E C V E A F E D N G K L Q D N H L P R S L L L M H R W Y V T 311
TCTGCAGAGCTGGCAGGAAAACCTACTAATGATGTATCGCAACTGCAACCGAGAGCAGCTACCAAAGGACCAGACTGAAGATTTGTTATTTA 401
S A E L A G K L L M M Y R N C N G D D Y Q R T R L K I C Y L 120
ATGAGGTAAGTGGATTGTCAGTTCCTCGCAGAGTTCAACCTTGACCTTGGTCTGATTAGGATTACAGAAGAGTTTAGAGGCGTTGCGGCT 491
M R Y W I V T F P A E F N L D L G L I R I T E E F R G V A A 150
CATCTCGGACGAGGAGCATTTCAAACTCATGACATCTCCACCATTCCCTTACGATTGGATGCGGAAGCTGACCCAGAGAAAAG 581
H L G S E E H F K L I D I S T I P S Y D W M R K L T Q R K K 180
CAGACTAAGAAAGCAAGCTCGCTGTTGACCACTGAAAGCCCATCGAGCTGGCGAACCCTCACCTTTTGGAGTTCAAGTCC 671
Q T K K G K A C S L L F D H L K P I E L A E H L T F L E F K S 210
ATCCGGAGGATATCGTTACCGATTACCGCAGTACGTGATCCACAGTTGCCTGGTGTGACAATCCAACCTCGGAGCGGTCATCCGACTC 761
I R I S F T D Y R S Y V I H S C L V D N P T L E R S I A L 240
TTCAATGGAGTTTCGCAATGGTCCAGCTTATGGTACTGACCAAGCTAAAGCCCTCAAAACCGTGGGAGGTCATACCAAGTACATCAAC 851
F N G V S Q W V Q L M V L S K L T P Q T R A E V I T K Y I N 270
GTGGCTCAGGAAGTCTGCACCTCCAGAAGTCAACACGCTCATGGCGTGGTGGGAGGACTGAGTACAGCTCCATATCCCGACTTAAG 941
V A Q E L L H L Q N F N T L M A L V G G L S H S S I S R L K 300
GAGACTCACTCTATGCGCTCCGGAGGTCATGAAGGTGGGAGGAGATGACAGAGTTGGTGTCTCCAGCAACAACACTACTCCTGTTAC 1031
E T H S Y L A P E V M K V W R E M T E L V S S S N Y S C Y 330
CGTAAGGCGTTCAGTGAAGTCCAGGCTTAAAGATACCCATCTGGGCGTGCACCTCAAGGACCTGATTGCAGTGCAGTGGTCTTCCT 1121
R K A F S E C Q G F K I P I L G V H L K D L I A V H V V F P 360
GACTGGGTGGACCAATAATAAAGTCAACCTGGTGAAGATGAATCAGTCTACGTGACGTTTTCGGAGCTGATGCTCTGCAGAGTGCA 1221
D W V D N K V N L V M N L V Y V T F S E L M S L Q S A 390
GCCGCGCAGGTTGAGCCGACATGGACCTGATCTACCTGCTGACGCTTTCTTTAGATCTTACTACAGAGGACGAGATTTACGAGCTG 1301
A A Q V E P D M D L I Y L L T L S L D L Y Y T E D E I Y E L 420
TCGTTGCTCAGGAGCCTCGTAACTCAAATCACTGCTTGCCTCGCCCAACGACTCCCAACAAGCCTATGGCTCCCTGGACTGGCCCTCC 1391
S L L R E P R N S K S L L A S P T T P N K P M A P L D W A S 450
GGCGTCACCACAAAACAGCCGACAGTGGTCAACAACACATCAGAAAAGTGGTGGATTCTGTGTTACGAAATACGACTACGATCAC 1481
G V T T K P T V V N K H I R K V V D S V F R N Y D Y D H 480
GACGGTTATTTCTCAAGAGGACTTTGAGAGCATCGCTGCTAACTTTCCTTTCCTGGATTCTTCTGTGTTTGGACAAGGATCAAGAC 1571
D G Y I S Q E D F E S I A A N F P F L D S F C V L D K Q D 510
GGACTGATCAGAAAGGATGAATGATGGCTATTTTCTCGCGCTAACCCAGTGCAGTGAATAATGGGACCAGGATTCATCCACAATTC 5401661
G L I S K D E M M A Y F L R A N P V Q C K M G P G F I H N F 1751
CAGGAGATGACTTACCTGAAGCCACTTTTGTGAACATTTGCTGGATTTTTGGGGAATTATCAAAACAGGCTACAAGTCAAAAGAC 570
Q E M T Y L K P T F C E H C A G F L W G I I K Q G Y K C K D 1841
TGTGGCGTTAACTGCCACAACAAATGTCGAGAGCTGTTGGTTCCTGGCTGTAGGAAGCTTCTGGCTCGGTTCTGTGGCCAGCCGAC 600
C G V N C H K Q C R E L L V L A C R K L L R S G S V G S A S 1931
CCTGCCAGACTGTCCACAGTTCACTGCCAGCCCAACACTGCCACCTGTAAGATGAGGACGAGGTTCAAGTTCOCGTGTGTC 630
P A R L S H S S L P S S P T L P T C K D E D E V F K F P C V 2021
TCTGCAGCCAGTGCACCTCAGGCACTCAGTCCATCACCTGATGACTGGTTCAGCTCAGAGGATCTCAGTGCCTCTGCAGAGGGCCACC 660
S A A S A T Q G T Q S I T L M T G S A Q R I S V R L Q R A T 2111
ACGAGTCAGGCCAGCAGACCGAGCCCTTTGGCCAGGACACAGCTGGGCTCCTCACACAGTGGCCCTCACACTTCCCCAAAATGAAA 690
T S Q A T Q T E P L W P G H S W G S H S G P H T F P K M K 2201
TATAGGACTCACAGGAGTCTTCTAAAAACAAGTGTGGCTACGCGGGATGCGCTGAATGGCAAGCAACACCAGGCGGTGACATCACGA 720
Y R T T H R R S S K N K G V A T R D A L N G K Q H Q A V T S R 2291
TGTAGTCTGGAGTCTCAAGAAAAGTTGATGCTCACAAGAGCTCGTGCAGAACGGGTTACGCCAGACATGAGAACAGCTGA-attgtc 747
C S G L S Q E K F D V S Q E L V Q N G V T P R H E N S * 2381
gacggtccaatccaaggtccaagaactcacaagctccaggaaaccaggatggttctcctctctggggcaggcctgagctgacctgaggttc 2471
cccttcagtgacctgaagtcactgtctgtctgtagccctcagaacagacagacagagctgcatgagaagactaccgtatggggcacggt 2561
atcgccacctgctgtgaatcaatgaggatttacagccttctgctgggatccctcaggatgtagtacctctggaatgaaatgaaataaaca 2651
cttttaaaaaaagtctctgaggtgtgttaaacaggaaacgggtgacagcaaaattgtttactaaatgcaaatgtctgacctggactcaaga 2741
gaagacattaacatactgacataatatttaactgaatgtattacaataaataatgaaggcgtctggtgagagctaaaaaaaaaaaaaaaa 2756
aaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 半滑舌鲷 *RasGRP3* 基因 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

方框标出的分别为起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)和加尾信号。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *RasGRP3* in *C. semilaievis*

The block marks were initiation codon (ATG), termination codon (TGA) and the tailing signal, respectively.

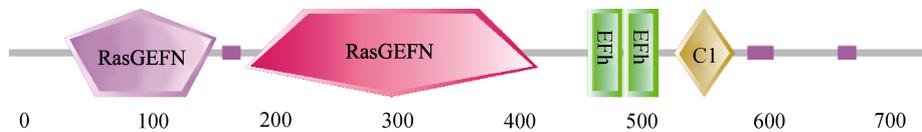


图 2 预测的半滑舌鲷 *RasGRP3* 蛋白结构域

Fig. 2 Protein domain prediction of *RasGRP3* in *C. semilaievis*

2.1.2 *RasGRP3* 同源比对 半滑舌鲷 *RasGRP3* 氨基酸序列在 NCBI 中进行同源比对后, 发现与其

同源性较高的 6 种鱼分别是: 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 86%、斑马宫丽鱼(*Maylandia*

zebra) 84%、红丽鱼(*Pundamilia nyererei*) 84%、亚马逊花鲈(*Poecilia formosa*) 83%、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) 82%和斑马鱼(*Danio rerio*) 80%。将上述物种的 *RasGRP3* 氨基酸序列通过 Clustalx1.83 和

DNAMAN 进行序列比对(图 3), 表明半滑舌鲷 *RasGRP3* 的 4 个结构域中, C1 结构域和 EFh 结构域为 2 个高保守的调节亚基, *RasGEFN* 结构域和 *RasGEF* 结构域为相对保守的催化亚基。

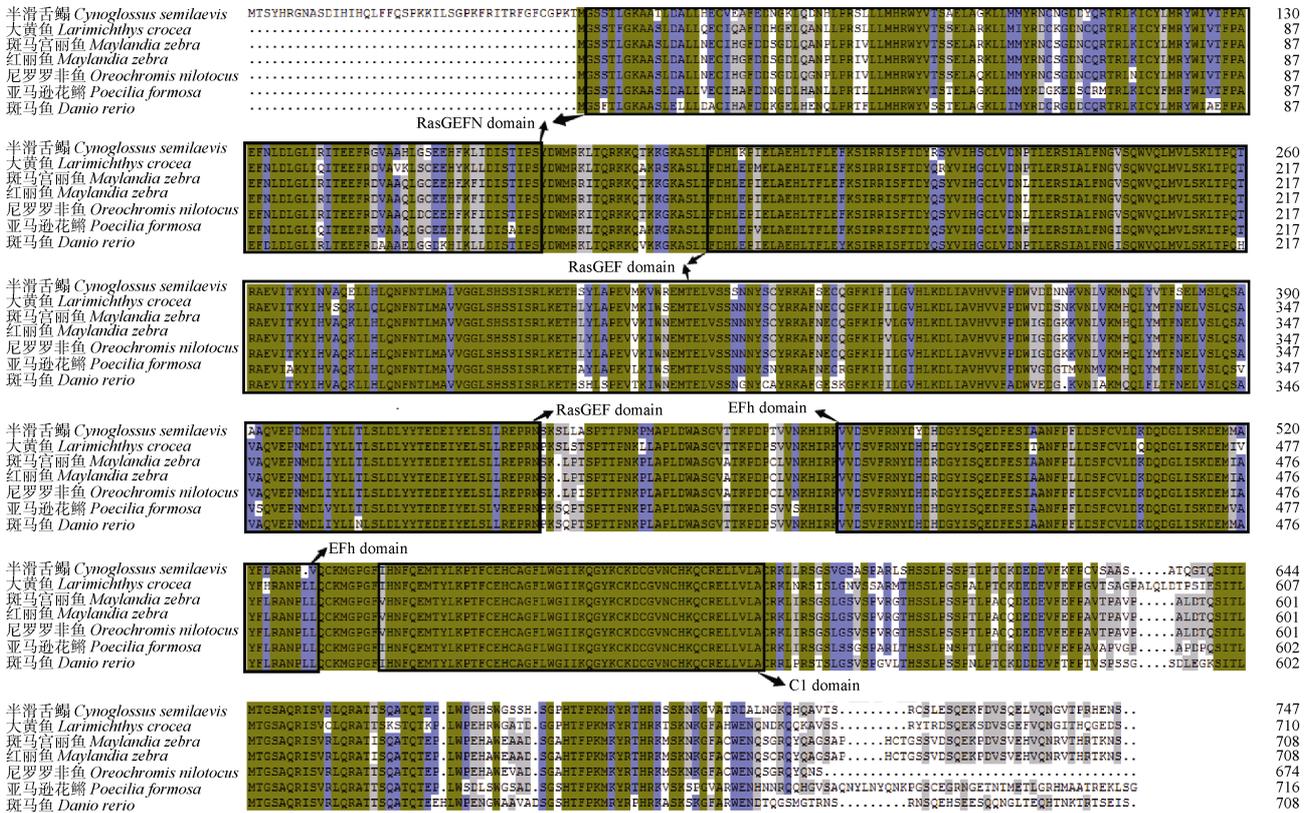


图 3 半滑舌鲷 *RasGRP3* 氨基酸序列与其他 6 种鱼类 *RasGRP3* 氨基酸序列比对

100%完全相同的氨基酸背景颜色为浅绿色; 75%~100%相同的氨基酸背景颜色为浅紫色; 25%~75%相同的氨基酸背景颜色为浅灰色; 25%以下为白色。

Fig. 3 Alignment of *RasGRP3* amino acid sequences of *C. semilaevis* and other six species fish. The background colour is light green for 100% identical amino acids; the background colour is light purple for 75%–100% identical amino acids; the background colour is light grey for 25%–75% identical amino acids; the background colour is white for less than 25% identical amino acids.

2.2 *RasGRP3* 基因的表达分析

2.2.1 *RasGRP3* 基因在半滑舌鲷健康组织中的表达

RasGRP3 基因在健康半滑舌鲷的肝、小肠、脾、头肾、后肾、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉、胃、心脏和卵巢 13 种组织中均有表达(图 4), 相对表达的峰值出现在卵巢组织(109.06), 其次是肝(62.19)、脑(44.64)、脾(43.68); 在头肾、后肾、皮肤和心脏中表达相对较高, 在血液(1.00)和肌肉(6.56)中的表达量相对较低。

2.2.2 半滑舌鲷感染鳃弧菌后 *RasGRP3* 基因在免疫组织中的表达

鳃弧菌感染半滑舌鲷后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h, *RasGRP3* 基因在不同时间点 6 种免疫组织(肝、肠、脾、头肾、鳃和血液)中呈现出不同的表达特征(图 5)。结果表明, 在肝中 *RasGRP3* 的表达趋势是先升高后降低, 其表达峰值出现在鳃弧菌感染后的 6 h, 为 0 h 表达量的 3.1 倍, 在后面的 4 个时间点都低于 0 h 的表达量; 在肠中的表达是在 6 h 出现最低值, 12 h 达到峰

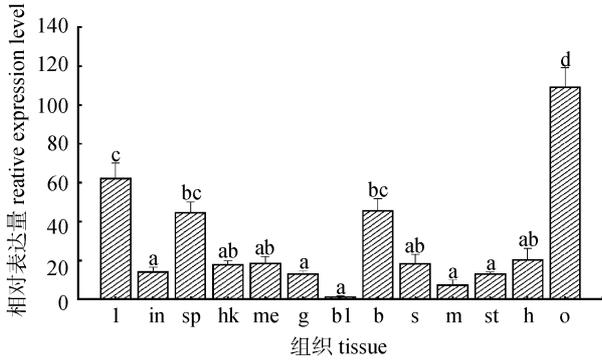


图 4 *RasGRP3* 基因在半滑舌鲷健康组织中的相对表达量字母 a, b, c, d 代表 SPSS 多重分析的不同分组, 有相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 无相同字母表示差异显著 ($P<0.05$). b, 脑; bl, 血液; g, 鳃; h, 心脏; hk, 头肾; in, 肠; l, 肝; m, 肌肉; me, 后肾; o, 卵巢; s, 皮肤; sp, 脾; st, 胃.

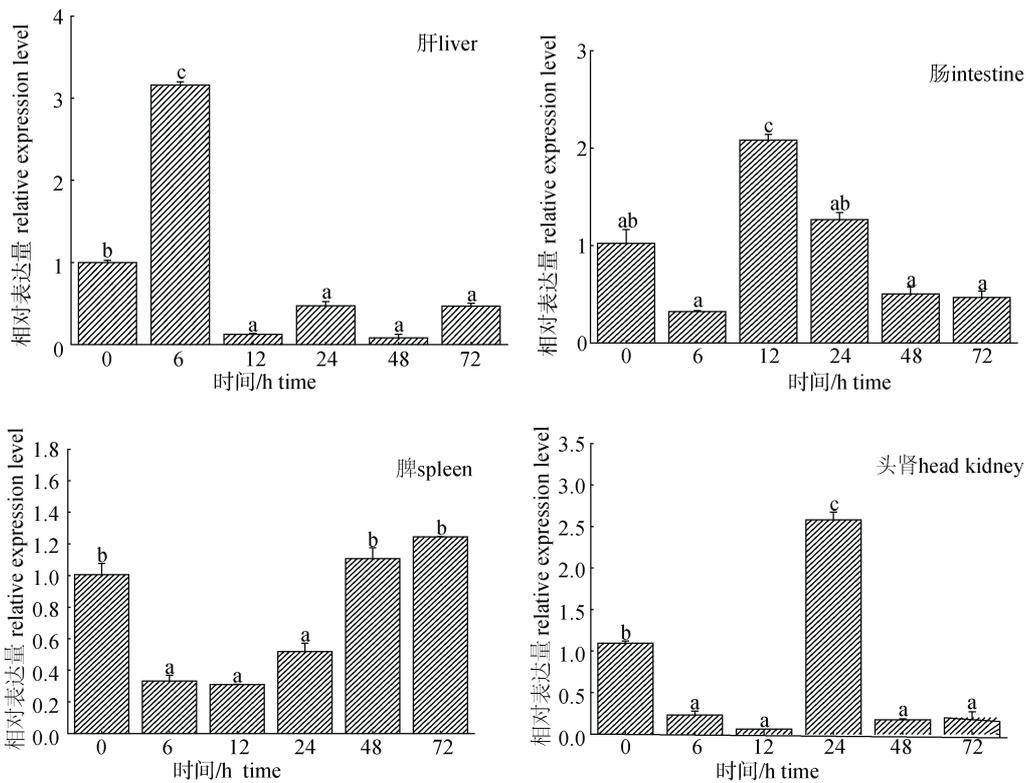
Fig. 4 Relative expression level of *RasGRP3* in normal tissues of *C. semilaevis*

The letters of a, b, c and d indicates the Duncan grouping in SPSS. The same letters indicate insignificant difference ($P>0.05$); the different letters indicate significant difference ($P<0.05$). b, brain; bl, blood; g, gill; h, heart; hk, head kidney; in, intestine; l, liver; m, muscle; me, metanephros; o, ovary; s, skin; sp, spleen; st, stomach.

值, 为 0 h 表达量的 2 倍, 48 h 后回到正常表达水平, 其总的表达趋势也是先升高再降低; 在脾中

的表达趋势是先降低再升高, 在 12 h 出现最低值, 到 72 h 达到表达的最高峰值; 在头肾中 12 h 出现表达的最低值, 在 24 h 到达表达的峰值为 0 h 表达量的 2.5 倍, 在 48 h、72 h 都低于 0 h 的表达量, 其总的表达趋势是先下降后上升; 在鳃中 6 h 时表达量迅速上升达到表达的峰值, 是 0 h 表达量的近 30 倍, 在 12 h 后开始回到正常表达水平, 其总的表达趋势为先上升后降低; 在血液中表达的最低值出现在 6 h, 在 12 h 略有上升, 在 24 h、48 h 回归到正常表达水平, 72 h 达到表达的峰值为 0 h 的 1.7 倍, 其表达的趋势为先下降后上升。总的来说, 鳃弧菌感染后 *RasGRP3* 在 6 种组织中都出现了上调表达的趋势, 只是峰值出现的时间点不同, 在肝、肠、头肾和鳃中上调趋势明显。

2.2.3 *RasGRP3* 基因在病原模拟物刺激后的半滑舌鲷外周血淋巴细胞中的表达 4 种病原模拟物 LPS、PGN、WGP 和 poly I:C 刺激半滑舌鲷外周血淋巴细胞后, *RasGRP3* 基因在 0 h、2 h、6 h、12 h 和 24 h 5 个时间点的表达结果如图 6 所示。



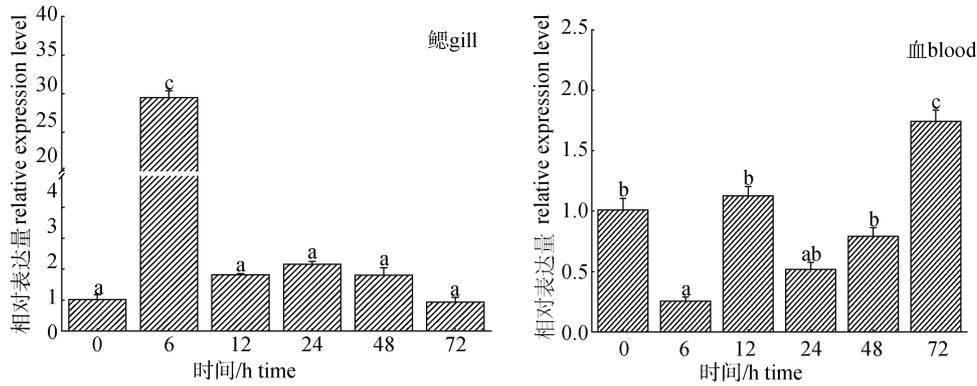


图 5 *RasGRP3* 基因在鳃弧菌感染半滑舌鳎后不同时间点 6 种组织中的相对表达量
 每个时间点的 *RasGRP3* 的表达量为感染组除以 PBS 组的相对表达量. 字母 a, b, c 代表 SPSS 多重分析的不同分组.
 有相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 无相同字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 5 Relative expression levels of *RasGRP3* gene in six tissues at different time points after *C. semilaevis* infected with *Vibrio anguillarum*

The expression levels of *RasGRP3* at each point were presented relative expression levels which infected group divided by the PBS group. The letters of a, b and c indicated the Duncan grouping in SPSS.

The same letters indicate insignificant difference ($P>0.05$); the different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

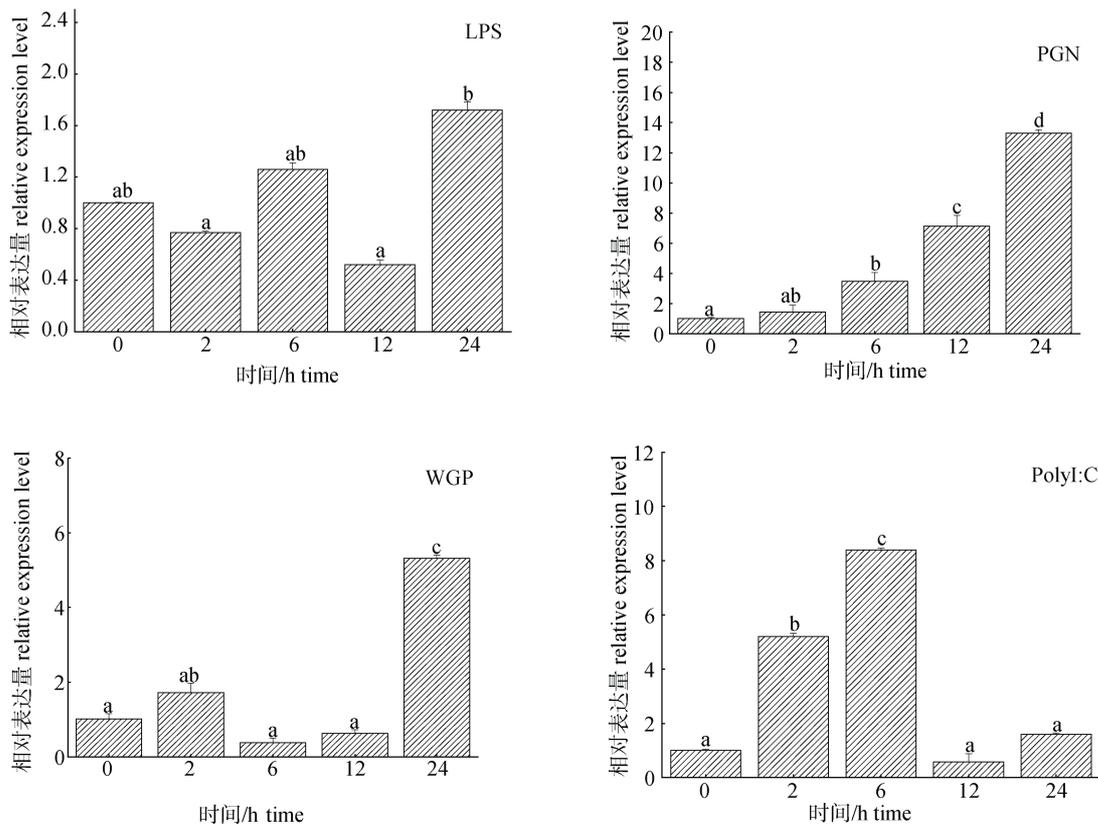


图 6 半滑舌鳎淋巴细胞中 *RasGRP3* 基因在 LPS, PGN, WGP 和 polyI:C 刺激下的相对表达量

字母 a, b, c, d 代表 SPSS 多重分析的不同分组. 有相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 无相同字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 6 The relative expression of *RasGRP3* gene in *C. semilaevis* lymphocyte respond to the challenge of LPS, PGN, WGP and poly I:C
 The letters of a, b, c and d indicated the Duncan grouping in SPSS. The same letters indicate insignificant difference ($P>0.05$); the different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

LPS 对 *RasGRP3* 基因的诱导表达趋势是: 先下降后上升, 在感染后 2 h、6 h 的表达量与 0 h 相差不大, 在 12 h 有所降低, 到 24 h 达到表达的最高峰值为 0 h 的 1.7 倍。PGN 的诱导表达趋势跟其他 3 种病原模拟物稍有不同: 从 0 h 到 24 h 一直处于上升状态, 到 24 h 达到表达的最高峰值, 是 0 h 表达量的 13 倍。WGP 的诱导表达趋势为: 2 h 开始上升后, 6 h 和 12 h 下降, 在 6 h 出现表达最低值, 到 24 h 后迅速上升为 0 h 表达量的 5 倍, 并达到最高峰值。Poly I:C 的诱导表达趋势为: 先升高后降低, 6 h 达到表达的最高峰值, 为 0 h 表达量的 8 倍, 之后 12 h 下降到最低, 到 24 h 恢复到跟 0 h 相当的表达量。总的来说, *RasGRP3* 基因在 PGN, WGP 和 poly I:C 这 3 种病原模拟物诱导下表达趋势出现明显的上调, 其中 LPS, PGN 和 WGP 3 种病原模拟物感染后都在 24 h 达到表达的最高峰值。

3 讨论

RasGRP3 首次发现是在大规模的 cDNA 序列项目中, 使用 *RasGRP3* 的抗体检测, 发现在许多 B 细胞系中具有较高的表达。Szamalek 等^[22]的研究表明, *RasGRP3* 在 T 细胞的产生和成熟、B 细胞的活化、血小板的聚集和肥大细胞活性的调节中发挥着重要的作用。Goudarzi 等^[23]把小鼠 *RasGRP3* 基因进行敲除, 发现小鼠体内的免疫球蛋白数量减少, 同时其所调节的 Ras-Erk 信号通路级联反应减弱。Huang 等^[2]发现 *RasGRP1* 在斑马鱼的淋巴系统发育过程中发挥着重要作用, 敲低 *RasGRP1* 的表达会损伤斑马鱼的淋巴系统发育。然而 *RasGRP3* 基因在鱼类免疫应答中的作用尚没有文章报道。

Buday 等^[24]发现, 当 BCR 受到特异性刺激活化后, 可以激活 PKC (protein kinase C) 同时使第二信使 DAG 增加, 与 *RasGRP3* 中的 C1 区域结合, 使 *RasGRP3* 活化, 其活化后作用于 Ras 蛋白, 能使无活性的 RasGDP 变为有活性的 RasGTP, 进一步活化 Ras-ERK 信号通路, 影响细胞分化、增生、凋亡及细胞间信号传递。据此推测正是由于 C1

结构域的这种高度保守性使得 *RasGRP3* 基因在 BCR 激活和 Ras-ERK 信号通路活化中发挥着重要的桥梁作用。本研究得到的半滑舌鳎 *RasGRP3* 基因序列全长为 2756 bp, 编码 747 个氨基酸。同源分析表明, 半滑舌鳎 *RasGRP3* 含有 2 个高度保守的调节亚基: C1 结构域和 EFh 结构域, 特别是 C1 结构域, 与其他 6 种鱼类的同源比对中仅第一个氨基酸存在差异。由此可推测, 半滑舌鳎 *RasGRP3* 基因也具有类似的功能。

RasGRP3 广泛表达于各组织中, 但在不同组织中存在较大差异, 这可能与 *RasGRP3* 基因在不同组织中的生物学功能不同有关, Ozaki 等^[14]研究表明 *RasGRP3* 在不同的组织中参与不同的信号通路。在卵巢中表达水平最高, 说明它可能与半滑舌鳎发育和母源免疫相关。其次是在肝、脾和脑中表达量较高, 肝和脾是鱼类重要的免疫器官, 在取样的过程中可以发现鳃弧菌注射组的肝和脾的颜色比 PBS 对照组要深一些, 同时脾也是鱼类淋巴细胞的主要聚集器官之一, Suzuki 等^[25]发现 *RasGRP3* 基因在淋巴细胞中高表达。

从 4 种病原模拟物处理的半滑舌鳎淋巴细胞的时空表达可以看出, *RasGRP3* 基因整体表现出上调表达的趋势, 只是出现峰值的时间点不同, 出现这种情况的原因可能是淋巴细胞对不同病原的敏感程度不一样, 出现免疫应答的时间就会出现一定的差异。LPS、PGN、WGP 和 polyI:C 分别是革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌和病毒的模拟物, 从图 7 可以看出 poly I:C 刺激淋巴细胞后, *RasGRP3* 的表达量在 6 h 时就达到了表达的峰值, 说明淋巴细胞对病毒敏感性强, 使其细胞内的免疫基因在短时间内出现应答反应。在 LPS、PGN 和 WGP 3 种病原模拟物刺激后, *RasGRP3* 都是在 24 h 出现了表达峰值。在 LPS 处理组其各个时间点的表达量差异不是很显著, 24 h 的峰值仅为 0 h 的 1.7 倍, 可能是此病原没有达到淋巴细胞产生免疫应答所需要的阈值。其中 PGN 处理组是逐渐升高的趋势, 说明 *RasGRP3* 基因表达激活存在时序性。

本研究克隆获得了半滑舌鳎 *RasGRP3* 基因序

列全长, 并对其氨基酸序列进行了同源性和结构域的预测, 对 *RasGRP3* 基因在半滑舌鳎 13 种健康组织、鳃弧菌感染后不同时间点的 6 种免疫组织和 4 种病原模拟物处理的不同时间点的半滑舌鳎淋巴细胞进行了表达特征分析, 为深入研究 *RasGRP3* 基因在鱼类免疫中所发挥的作用提供了分子生物学基础和理论依据。

参考文献:

- [1] Limnander A, Depeille P, Freedman T S, et al. STIM1, PKC- δ and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(5): 425–433.
- [2] Huang H, Jin T, Wang L, et al. The RAS guanyl nucleotide-releasing protein RasGRP1 is involved in lymphatic development in zebrafish[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4): 2355–2364.
- [3] Liu X, Zhan Z, Li D, et al. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(5): 416–424.
- [4] Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth[J]. *Nature*, 2010, 464(7287): 431–435.
- [5] Stone J C. Regulation and function of the RasGRP family of Ras activators in blood cells[J]. *Gen Can*, 2011, 2(3): 320–334.
- [6] Reynolds L F, de Bettignies C, Norton T, et al. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and *RasGRP1*[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18239–18246.
- [7] Caloca M J, Zugaza J L, Matallanas D, et al. Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor *Ras GRP1*[J]. *EMBO J*, 2003, 22(13): 3326–3336.
- [8] Martínez-López N, García-Rodríguez J L, Varela-Rey M, et al. Hepatoma cells from mice deficient in glycine N-methyltransferase have increased RAS signaling and activation of liver kinase B1[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3): 787–798. e13.
- [9] Yang D, Tao J, Li L, et al. RasGRP3, a Ras activator, contributes to signaling and the tumorigenic phenotype in human melanoma[J]. *Oncogene*, 2011, 30(45): 4590–4600.
- [10] Oh-hora M, Johmura S, Hashimoto A, et al. Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C- γ 2 to Ras in B cell receptor signaling[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(12): 1841–1851.
- [11] Botelho R J, Harrison R E, Stone J C, et al. Localized diacylglycerol-dependent stimulation of Ras and Rap1 during phagocytosis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(42): 28522–28532.
- [12] Randhawa P K, Rylova S, Heinz J Y, et al. The Ras activator *RasGRP3* mediates diabetes-induced embryonic defects and affects endothelial cell migration[J]. *Circ Res*, 2011, 108(10): 1199–1208.
- [13] Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, et al. CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25488–25493.
- [14] Ozaki N, Miura Y, Yamada T, et al. *RasGRP3* mediates phorbol ester-induced, protein kinase C-independent exocytosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(2): 765–771.
- [15] Huang J Q, Chen S L, Shao C W, et al. Molecular cloning, construction of the expression vector and detection of transcription activity of *vasa* regulatory regions in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(1): 1–8. [黄进强, 陈松林, 邵长伟, 等. 半滑舌鳎 *vasa* 调控区的克隆, 表达载体构建及其驱动活性检测[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(1): 1–8.]
- [16] Chen Y, Fan L, Liu T T, et al. Molecular cloning and expression analysis of TRAF6 and TAK1 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015(5): 867–876. [陈燕, 樊琳, 刘田田, 等. 半滑舌鳎 TRAF6 基因和 TAK1 基因的克隆及表达分析[J]. *中国水产科学*, 2015(5): 867–876.]
- [17] Bhatnagar R, Dabholkar J, Saranath D. Genome-wide disease association study in chewing tobacco associated oral cancers[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(9): 831–835.
- [18] Sha Z X, Wang Q L, Liu Y, et al. Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(5): 914–921.
- [19] Yan H, Chen Y, Zhou S, et al. Expression profile analysis of miR-221 and miR-222 in different tissues and head kidney cells of *Cynoglossus semilaevis*, following pathogen infection[J]. *Mar Biotechnol*, 2016, 18(1): 37–48.
- [20] Zhang X, Wang S L, Chen S L, et al. Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in immunity in *Cynoglossus semilaevis* during *Vibrio anguillarum* infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 43(1): 209–218.
- [21] Rombel I T, Sykes K F, Rayner S, et al. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification[J]. *Gene*, 2002, 282(1–2): 33–41.
- [22] Szmałek M, Baer-Dubowska W. RasGRP proteins—Ras-activating factors[J]. *Postepy Biochemii*, 2007, 53(2): 112–120.

- [23] Goudarzi A, Gokgoz N, Gill M, et al. Protein kinase C epsilon and genetic networks in osteosarcoma metastasis[J]. *Cancers*, 2013, 5(2): 372–403.
- [24] Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation[J]. *Biochim Biophys Acta—Rev Canc*, 2008, 1786(2): 178–187.
- [25] Suzuki K, Takahashi S, Haramoto Y, et al. *XRASGRP2* is essential for blood vessel formation during *Xenopus* development[J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(4): 609.

Cloning and immune response analysis of the *RasGRP3* gene in *Cynoglossus semilaevis*

CHEN Xuejie^{1,2}, CHEN Yadong^{1,3}, YU Mengjun^{1,4}, SUN Luming^{1,4}, YANG Guang^{1,2}, SHA Zhenxia^{1,3}

1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China;
4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: The Ras guanyl nucleotide-releasing protein-3(*RasGRP3*) is a guanyl nucleotide exchange protein that plays important roles in the occurrence of various diseases when differentially expressed. To explore the genetic composition, tissue expression, and immune response characteristics of *Cynoglossus semilaevis*, the full-length *RasGRP3*cDNA was cloned using rapid-amplification of cDNA ends technology based on the partial *RasGRP3* sequence obtained from our laboratory *C. semilaevis* transcriptome data. Amino acid sequence alignment and homology analyses were performed based on the sequencing results. The full-length *RasGRP3*cDNA was 2756 bp, contained a 2244-bp-long open reading frame, and encoded a protein of 747 amino acids. The amino acid sequence of *C. semilaevis RasGRP3* was highly homologous with those of other fish species. We applied quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis to study the expression patterns of the *RasGRP3* gene in 13 healthy tissues and six *Vibrio anguillarum*-infected tissues at different time points. We also infected lymphocytes of *C. semilaevis* with lipopolysaccharide, peptidoglycan (PGN), whole glucan particles, and polyinosinic: polycytidylic acid (poly I:C). The qRT-PCR results showed that *RasGRP3* was expressed in all 13 healthy tissues of *C. semilaevis*. The expression level was highest in ovary, followed by liver, brain, and spleen, but low in blood. *RasGRP3* tended to be differentially expressed in the six *V. anguillarum*-infected tissues. *RasGRP3* expression was up regulated 3- and 30-fold in liver and gill, respectively, at 6h compared with that at 0h. *RasGRP3* expression was downregulated in intestine, spleen, headkidney, and blood 6h after infection with *V. anguillarum*. The lymphocyte infection experiment indicated that *RasGRP3* expression was upregulated after PGN and poly(I:C) stimulation. PGN up regulated expression 13-fold after 24 h compared with that at 0 h, and poly I:C up regulated expression eight-fold after 6 h compared with that at 0 h. These results indicate that the *RasGRP3* gene is involved in the *C. semilaevis* immune response and may play an important role in immune regulation.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *RasGRP3*; gene cloning; pathogenic infection; gene expression

Corresponding author: SHA Zhenxia. E-mail: shazx@ysfri.ac.cn