

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15469

半滑舌鳎 *CD40* 基因克隆及其免疫功能分析

位战飞^{1,2}, 郭华^{1,2}, 李海龙¹, 郑卫卫^{1,2}, 王文文¹, 戴欢¹, 朱颖¹, 刘洋¹,
董忠典¹, 陈松林^{1,3}

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋与渔业资源重点实验室, 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 266237

摘要: 本研究通过 RACE 技术在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中克隆得到 1 个 *CD40* 同源基因。该基因 cDNA 全长为 2098 bp, 开放阅读框为 1011 bp, 可编码由 336 个氨基酸组成的蛋白质。推导得到的 *CD40* 氨基酸序列包含 1 个信号肽、1 个跨膜结构区、2 个 N-糖基化位点以及含 4 个富含半胱氨酸的保守结构区。不同物种氨基酸序列同源分析结果显示, 该基因与哺乳类、两栖类以及硬骨鱼类相似性为 28%–47%, 其中与硬骨鱼类相似性较高。系统进化分析结果显示, 半滑舌鳎 *CD40* 与其他硬骨鱼类 *CD40* 聚类为一支, 哺乳类与两栖类 *CD40* 聚类为另一支。荧光定量 PCR 结果显示, *CD40* 在健康半滑舌鳎不同组织中均有表达, 其中在鳃、肝和脾等组织中表达量较高, 在肠、肌肉和皮肤中表达量较低, 在脑和肾中微量表达。经哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染刺激后, 与 PBS 处理的对照组相比, 该基因 mRNA 在半滑舌鳎 3 个主要免疫组织(肝、脾和肾)中表达量均呈显著性升高, 在肝中 12 h 到达峰值, 在脾和肾中 6 h 达到峰值。上述结果表明 *CD40* 基因参与了半滑舌鳎抵抗哈维氏弧菌的免疫应答反应。

关键词: 半滑舌鳎; *CD40* 基因; 克隆; 荧光定量; 哈维氏弧菌

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2016)05–1063–10

肿瘤坏死因子受体超家族^[1](tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRSF)为细胞因子受体家族, 主要参与细胞凋亡、炎症反应以及信号转导等^[2]。*CD40*(TNFR superfamily member 5)是 TNFRSF 中的一员^[3], 属于 I 型跨膜糖蛋白, 在动物机体免疫应答过程中发挥着重要作用。自 Stamenkovic 等^[4]首次人类(*Homo sapiens*)中分离出 *CD40* 基因后, 对该基因表达模式以及免疫功能的探究主要集中于哺乳类动物。在人类中, *CD40* 在免疫细胞和非免疫细胞中广泛表达, 在 B 细胞表面可作为信号受体分子参与 B 细胞的激活以及周期进程的调控^[5–6], 在树突细胞中可影响 T 细胞的启动及其介导的免疫应答反应^[7–9]。在小鼠

中, 树突细胞 *CD40* 的不同表达量可对 T 细胞分化产生影响, 表达量较低时可诱导调节性 T 细胞的产生, 较高时则会诱导效应 T 细胞的产生^[10]。*CD40* 与其特异性配体 *CD40L* 结合形成共刺激途径是 *CD40* 在机体免疫应答反应中执行生物学效应的前提^[11–12]。研究发现, 人类 *CD40L* 基因的突变将会诱发免疫缺陷疾病的发生^[13–14], 小鼠 *CD40-CD40L* 共刺激途径中任意基因的敲除都会对 T 细胞依赖性体液免疫应答反应产生严重影响^[15–16]。此外, *CD40-CD40L* 共刺激途径也与 B 细胞的增殖与分化以及效应细胞因子的分泌有关^[17–19]。

相对于哺乳动物广泛深入的研究, *CD40* 基因仅在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[20]、斑马鱼(*Danio*

收稿日期: 2015-12-18; 修订日期: 2016-02-20.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31530078); 山东省泰山学者攀登计划专项资助项目.

作者简介: 位战飞(1989–), 男, 硕士, 主要从事海水鱼免疫基因功能与 DNA 甲基化研究. E-mail: zhanfeiwei@126.com

通信作者: 陈松林, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事水产生物技术研究. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

erio)^[21]以及大西洋鲑(*Salmo salar*)^[22]等鱼类中有报道。Park 等^[20]在牙鲆中发现,在不同外源刺激下,外周血细胞 *CD40* 表达均呈显著增加,证明 *CD40* 基因参与宿主免疫反应。Gong 等^[21]在斑马鱼中证明了 *CD40-CD40L* 共刺激途径在鱼类中的存在,以及该共刺激途径与机体特异性免疫有关。Lagos 等^[22]研究发现,在大西洋鲑中 *CD40-CD40L* 共刺激途径可影响抗原呈递细胞的成熟。Shao 等^[23]通过高密度 SNP 图谱构建与 QTL 定位,在牙鲆中成功筛选到 12 个抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染免疫相关基因,其中 *CD40* 作为主要组织相容性复合体(MHC class II)的辅助分子直接参与抗鳃弧菌感染免疫应答过程。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鲷科(Cynoglossidae)、舌鲷属(*Cynoglossus*),主要分布在中国沿海地区,具有生长快、肉质鲜美等特点,已成为具有极高经济价值的名贵鱼类^[24]。随着半滑舌鲷养殖规模的不断扩大,其所面临的细菌病害威胁也越来越严重。其中,哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是主要的致病菌之一,能够引发半滑舌鲷皮肤溃疡性疾病,对半滑舌鲷养殖业造成巨大的经济损失^[25]。因此,为了半滑舌鲷养殖业的健康发展,对其机制尤其是分子免疫机制的研究迫在眉睫。此外,对半滑舌鲷免疫相关基因及其免疫机制的研究,也为高抗病品系的筛选和种质的改良提供了理论基础。目前 *CD40* 基因在少数鱼类中已有研究,然而,在半滑舌鲷中该基因的完整性未得到验证,有关其在病菌刺激下的免疫应答机制尚未见报道。本研究从半滑舌鲷中成功克隆得到 1 个 *CD40* 同源基因,采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术检测了该基因在半滑舌鲷不同组织中的表达模式,分析了哈维氏弧菌刺激下 *CD40* 基因在 3 个主要免疫组织中的表达规律。并结合该基因序列及进化特征,初步揭示了半滑舌鲷 *CD40* 基因的序列特征以及哈维氏弧菌刺激下的表达特征,为进一步探究该基因在半滑舌鲷免疫应答中的作用机制提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

本实验中用到的半滑舌鲷(1.5 龄)购自山东省黄海水产有限公司,体重(145.01±60.02) g,体长(27.68±5.53) cm。为消除环境影响,于实验室环境下暂养 7 d,暂养条件为:水温(21±2)℃,正常充氧,每日早晚投喂饵料 1 次,每日换水 1 次,换水量为原有水量的 1/3。

1.2 哈维氏弧菌培养与感染

哈维氏弧菌处理前,随机选取 3 条半滑舌鲷,分别取肝、脾、肾、心脏、皮肤、肌肉、肠、鳃及脑 9 个组织,于-80℃保存,用于 *CD40* 基因在各组织中的表达模式分析。

哈维氏弧菌来源于本实验室已有菌种。感染实验前,将菌种接种到培养基中,28℃培养 18 h。8000 r/min 离心 15 min 使菌体沉淀,用 PBS 重悬菌体沉淀,使其最终滴度为 6.0×10^5 CFU/mL。以腹腔注射哈维氏弧菌的方法刺激半滑舌鲷,剂量为 30 μL/g,同时取 3 条半滑舌鲷注射 PBS 作为对照组。分别在感染后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 7 个时间点取样,取其肝、脾和肾 3 个主要免疫组织,液氮中速冻后转入-80℃保存,用于 *CD40* 基因在哈维氏弧菌处理后不同时间的表达规律分析。

1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

利用 TRIZOL(Invitrogen)法提取半滑舌鲷各组织中的总 RNA,使用琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 质量,同时使用 NanoVueTM Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)检测 RNA 浓度与其他参数。按照 PrimeScript^{RT} reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连)使用说明合成 cDNA,按照 SmartTM RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa, 大连)使用说明合成 RACE-Ready- cDNA。

1.4 *CD40* 基因的克隆

根据 Chen 等^[26]发表的半滑舌鲷全基因组测序结果,获得 *CD40* 基因部分 cDNA 序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(*CD40-A/CD40-S*,表 1),以肝、脾和肾混合 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,并送金唯智生物公司测序,成功验证了

表 1 本研究所用到的引物及其序列
Tab. 1 Names and sequences of the primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	目的 purpose
CD40-A	GAAGCCCAAACTCCAGTCAA	verifying the internal fragment 验证中间片段
CD40-S	CCAGGTTTCTACCCAGGACA	
CD40-5'R	ACATTCGTGTCATTGCTCGCAG	cloning the 5' and 3' ends 克隆 5'和 3'末端
CD40-3'R	AAGGTGTGTAAGTCTGTTGACGGG	
CD40-5'N	CGGGACATCTTTGGCACA	
CD40-3'N	TAGATTGAAGCGGAGCACG	
CD40-qRT-A	ATTCGTGTCATTGCTCGC	real-time PCR 定量 PCR
CD40-qRT-S	ACTGTGTGCCAAAGATGTCCC	
β -actin-A	GCATCACACCTTCTACAACGA	
β -actin-S	ACCAGAGGCATACAGGGACA	

CD40 的部分 cDNA 序列。根据验证得到的部分 cDNA 序列, 设计两对 RACE 引物(CD40-5' R/5' N 和 CD40-3' R/3' N, 表 1), 其中 CD40-5' R 和 CD40-3' R 引物以合成的 RACE-Ready-cDNA 为模板用于 RACE 第一轮 Touchdown PCR 反应。反应体系为 15 μ L: 10 $\times$ LA Taq Buffer 1.5 μ L; dNTP (2.5 mmol/L) 1.2 μ L; UPM 1.6 μ L; Gsp (CD40-5' R 和 CD40-3' R) 0.3 μ L; LA Taq DNA 聚合酶(TaKaRa) 0.2 μ L; RACE-Ready-cDNA 1 μ L; ddH₂O 9.2 μ L。Touchdown PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 10 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 复性 30 s (每一个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min; 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 67 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。将第一轮 PCR 反应产物经 50 倍稀释后作为第二轮 NEST PCR 反应的模板, 以 CD40-5' N 和 CD40-3' N 为引物。反应体系为: 10 $\times$ Buffer 5 μ L; dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L; NUP 与 NGsp (CD40-5'N 和 CD40-3'N) 1.5 μ L; Taq DNA 聚合酶(TaKaRa) 0.5 μ L; Touchdown PCR 产物稀释 50 倍 2 μ L; 并用 ddH₂O 将反应体系补充至 50 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。NEST PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后分离得到目的片段, 按照说明书使用 TianGen 胶回收试剂盒回收, 连接到 pMD-18T 载体, 转染 Top10 感受态细胞, 涂板后经 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 挑取 3 个阳性克隆送生物公司测序。

1.5 生物学分析及进化树构建

应用生物学软件 DNASTar 5.0 对得到的的序

列进行拼接, 预测开放阅读框(ORF)以及氨基酸序列, 推导蛋白的分子量和等电点。应用 SingalP 4.0 对蛋白质信号肽进行分析。应用 Soft Berry-Psite 对氨基酸序列进行功能位点预测。应用 TMpred 预测氨基酸序列跨膜结构域。应用 InterProScan SequenceSearch 预测氨基酸序列保守结构区。*CD40* 基因同源氨基酸序列的搜索在 NCBI 数据库中通过 Blastp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)完成。应用 Clustal W 软件对 *CD40* 基因进行同源序列分析。通过 Mega 6.0 软件以邻位相连接法(Neighbor-Joining, NJ)完成生物系统进化树构建。

1.6 *CD40* 基因表达模式检测

应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测半滑舌鲷不同组织中 *CD40* 基因转录表达模式, 以及经哈维氏弧菌感染刺激后 7 个不同时间点肝、脾、肾 3 个免疫组织中 *CD40* 基因的表达规律。以 β -actin (β -actinA/ β -actinS, 表 1)基因为内参, 根据验证得到的 ORF 序列设计实时荧光定量引物(CD40-qRT-A 和 CD40-qRT-S, 表 1), 按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa, 大连)试剂盒说明书, 使用 ABI 7500 Fast Real-time (Applied Biosystems, USA)仪器完成 *CD40* 基因的定量分析。

本实验得到的数据均表示为平均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x}\pm SE$), 采用 SPSS.17.0 软件进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较, 当 $P<0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷 *CD40* 基因序列特征

半滑舌鲷 *CD40* 基因 cDNA 序列全长为 2098 bp,

其中开放阅读框为 1011 bp, 5'非编码区(UTR)和 3'非编码区分别为 44 bp 和 1043 bp。该基因 ORF 可编码一个由 336 个氨基酸残基组成的蛋白质, 相对分子质量为 37.27 kD, 理论等电点为 5.355。在 3' UTR 区发现了 2 个不稳定信号(ATTTA), 并且在 poly A 上游 28 bp 处发现了一个脊椎动物中常见的终止信号(AATAAA)(图 1)。该基因序列已经提交至 NCBI, 基因注册号: KU291170。

信号肽预测结果显示, 该基因存在 1 个信号肽序列, 位于 1~33 氨基酸之间。功能位点预测结果显示, 该氨基酸序列存在 2 个 N-糖基化位点(分别位于 146~149 aa 和 164~167 aa), 3 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点(分别位于 109~112 aa, 185~188 aa 和 229~232 aa), 4 个蛋白

激酶 C 磷酸化位点(分别位于 12~14 aa, 134~136 aa, 296~298 aa 和 306~308 aa)和 2 个 CAAX box (分别位于 115~118 aa 和 126~129 aa)。跨膜预测结果显示, 该氨基酸序列 202~224 aa 存在跨膜结构域(图 1)。保守结构区预测结果显示, 该氨基酸序列具有 4 个富含半胱氨酸的结构区(cysteine-rich domains, CRDs)。

氨基酸序列同源比对结果显示(图 2), 半滑舌鲷 CD40 氨基酸序列与其他硬骨鱼类、哺乳类和两栖类相似性为 28%~47%, 其中与硬骨鱼类氨基酸序列相似性较高, 与点带石斑同源为 47%, 与牙鲆同源为 45%, 与大黄鱼同源为 44%。系统进化树结果显示(图 3), 半滑舌鲷 CD40 先与牙鲆 CD40 聚类为一支, 之后与其他硬骨鱼类 CD40

```

1  acatgggtcccataccgcctctgtgtcttcgacataaagcagtATGTGCTGAACTCGACCAAGTTCACCTGCTGACGATGAGGATGA
   M L L K L D Q V H L L T M R M K
91  AGATACTAGTGGCGTGGTGTGTGCGGATTTCGCGTGTGACTGCTGCTCAGTTCAGCTGCGACCCACTGACTCAGTACCAGAGGTCGG
   I L V A L V C A D F A L M T A A Q F S C D P L T Q Y Q R S G
181 GACAATGTTGTCAAATGTGCAAGTCCAGGTACACACATGTTATCTCAAGCCCTGTTTGAACCTCGGTGCTCTGAATGTGGGAAAGTG
   Q C C Q M C S P G T H M L S Q S P C F E P R C S E C G E S E
271 AATATCAAGATAAATACAACTGATTCAAATGTCAACAACAGCCATACTGTGACGCCAATAGAACTTCCAGGTTTCTACCCAGGACA
   Y Q D K Y N T D S K C Q Q P Y C D A N R N F Q V S T Q D N
361 ATAAGAAGAAGAAATCAGCTGCATGTGTTGCTCGGCTTCCACTGCTCGGTGAAATCTGTTCAATCTGTGTACCGCACACAACCTGCA
   K K K K I S C M C L L G F H C S G E I C S I C V P H T T C K
451 AACCGAGAGGGCGCTGTTGCCATAGGGAACACACCATGACACTGTGTGCCAAGATGTCGCGAGGGCTCATTCTCCTCAATGACT
   P G E G A V A I G N H T H D T V C Q R C P E G S F S S N D S
541 CCTGGGAAAGTGTTCACCAACACACTGAATGTGGGAGTGGATGAACCTTGGCGGAAAGGAACGGCGATATCTGACAACTGCTGCG
   W E S V C T K H T E C G S G Y E L W R K G T A I S D N V C E
631 AGCGAATGACAGCAATGTATATCGGCTGTGTATAGGATTTCTTGTCTGTCAGTTAATAGTGGCTGCATGCTGTACACAGTTCATG
   R M T R M Y I G L L I G F L V L V S L I V A A C L Y T V H V
721 TAAACGGAAGAAAAAGAGTTTGACATTGCTGGAGAAAATGGGCATCTGGCCATCAACAACAGGCATATCTATACCCAGTGGATGACC
   K R K K S F D I A G E N G H L A I N N R H I Y T P V D D P
811 CTGAAATGAGCAACCACTTTTGTAAACAAATCTCAAAAGAAGAGTGTGGTACGAGAACGCTGAGGAAAATGTCGACGAAGGATCGC
   E N E Q P L F V T Q I S K E E C G T R T P E E N V D E G S L
901 TAGAAGAGGGCTCAGACAGCGGTGTTTATCTCAGAAGGGGAACCTTTTAAACAGGAGACTGGTAAACAGGAAATCCTCTCCCTGCCGG
   E E G S D S G V Y T Q K G N F L K Q E T G K Q E I L S L P E
991 AGGAGTCACAGACATCAACGGTATGCTGGTGAAGGTCCACAAGATTTCGTTAATCAGATGGGATGAaaggaaccactgtgtcacatatga
   E S Q T S T V V G E G P Q D S F N Q M G *
1081 cgtcattgcccattgttctctgatctaaacctgtatatatttctttatctctgtgtgtagcatgttagcatgtcagtcgtgtgttgcgttt
1171 ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
1261 atgaattgctacattttgtagtgcagtgcttccctctgtttatagttgtatgtatgtatctgttggaaggtcatacaatacagtaaaccttgg
1351 actctttgggataacagaaggttccataaatcattcggaatatttttagctggcatcaaatcttctctattttgactctgcctgttttt
1441 catctggagaatttgactactaaacttagttgaacaaagtacgaaagtacccgtaaacaggagagagtactaaagtactcagaatagaat
1531 aaaatagcaaaacaaacacacattatggcaaaactagcattatgtccaaaattacttcaaaattacaaaaaacctcgaacagaat
1621 gtataataaataatcttaattgtaaaaaatgaaaatatggattttattcaatatggaaatgtaggatttccaagttaattttaaaattat
1711 gactttaaagattttacctcgatagttgtgtaccataaacatgttagttctctcaaatgaggttacattatggatctcttaattgaatcaac
1801 tatgttttaataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataata
1891 cacggtcaaaagcctcatcaaaaagctgttttacctaactgttaattgtatgtgtatcacacgtagcactctgtatatttttgcgttt
1981 tgactggagtttgggcttcatttttaactttgtgtcaacattgtgtaaagaaaaaaataaatgtatcagttgaattgtacatggaaaaa
2071 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 半滑舌鲷 CD40 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

小写字母代表 5'和 3'端非编码区; 大写字母代表编码区序列。上面为核苷酸序列, 下面对应为氨基酸序列; 起始密码子 ATG、终止密码子 TGA、终止信号 AATAAA 均加粗表示; 2 个不稳定基序 ATTTA 用方框表示; 信号肽用灰色阴影表示; 跨膜结构域用下划线标出; 2 个 N-糖基化位点用双下划线标出。

Fig. 1 The CD40 cDNA sequence and deduced amino acids in *Cynoglossus semilaevis*. Lowercase letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region. Capital letters represent the coding sequence. The nucleotide sequence is above and the coded amino sequence is below. The initiation codon ATG, the stop codon TGA and the polyadenylation (AATAAA) are characterized in bold. The boxed sequences represent two instability motifs (ATTTA). The signal peptide is shaded. The trans-membrane domain is underlined. Two N-glycosylation sites are double underlined.

半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i> CD40	MLLKLDQVHLLTMRMKILVALVCADFALMTAAQFSDPLTQVQRS..GCGCGGCGCTHMLL..QSEGF..EERFCH..GGESENYQKYNTUSGQQQEPFOANR	97
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> CD40	MLLFMVVVMCTEVTVKTWAGS..CDPLTQVNEEA..GCGCGGCGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	85
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i> CD40	MFGTLFSKMHLLVLIITMIMLDSLVTMTAAPPAQCDPLTQVVKD..DVCGKMGCGCTHMLL..QSLAPDF..GCHGDNENYQDYTABSHCHRCQPOBNK	95
红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i> CD40	MLLRSTKQKFTNMVRLWQPTVWALMVMTAAQPCDPLTQVEMD..GFCGCGGCGGFSMS..LSTGW..DQCCH..GGEYQDYQKYTKQPCERRPQOSNL	96
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> CD40	MSDTHLLQLFVIFSTCIAPAAAPQPCDPLTQVQLD..GECGCGGCGGFSMTS..LGSCL..ECCCH..GGEYQDYQKYTKQPCERRPQOSNL	87
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> CD40	MNFALAILITVALVVDADLDCDPLTQVFEQG..GECGCGGCGGQKMSLSLSS..EHCCH..GRENENYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	84
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> CD40	MLGCFKTKRIEMVTLIF..MLAVFPVVFYSDPETOYENH..GECGCGGCGGTRMSSDHSQGF..DHCCH..GGEYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	90
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> CD40A	MRGVAKILGCFITTRIEMVLLLCILSVLTVVYSDPETOYMKN..VCGCGGCGGCTHMLLSSHSGCL..DHCCH..GGEYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	97
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i> CD40	MEVVTFFV..MISIVPVVYSDPETOYENK..NIOCKGCGGCTHMLLSSHSGCL..EHCCH..GGEYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	81
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> CD40	MTVILRVCLLVTLICLVSLGKKEKHHYTNQSGKCGCGGCGGTRMMK..DDND..DRCCH..GEVGEYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	82
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i> CD40	MLPLPQLCALWGCILLTAVHLGCQVITSDKQYLQ..GECGCGGCGGTRMSSDHSQGF..DHCCH..GGEYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	87
人类 <i>Homo sapiens</i> CD40	MVRLPQLQVWGCILLTAVHPEPTATREKQYLIN..SCGCGGCGGQKLV..DCTEFTETED..GGESEFLDTWNRETHCHQKQPCDQNK	87
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> CD40	MRFLLLFLLLLLSCSHKGVALTKNTEILRD..GCGGCGGCGGKVSQ..ECDAQIDTV..DRCCH..GGEYQDYQKYTKENTCKLQPCDQNK	84
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i> CD40	LFQVSTQDNKKKKSGL..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSEGF..EERFCH..GGESENYQKYNTUSGQQQEPFOANR	195
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> CD40	NLRVTKPESKTKQSP..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	183
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i> CD40	NFKAVLDKNNKGLSAG..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSLAPDF..GCHGDNENYQDYTABSHCHRCQPOBNK	193
红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i> CD40	NFETPVHD..KKKRTIC..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	193
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> CD40	NFQQPVDH..VTIRTN..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	183
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> CD40	NFKEAVDMKTTVKHVC..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	182
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> CD40	NFEGSTNRSKTSLSC..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	188
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> CD40A	NFEHSTNRNTTISLSC..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	195
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i> CD40	NFQVIANRNTIRIE..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	179
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> CD40	NFLPQMNNSKTSRNE..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	179
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i> CD40	GLQVKKEGTAVSDTV..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	186
人类 <i>Homo sapiens</i> CD40	GLRVQKGTSETDTT..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	186
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> CD40	GKKEVTKGTAEINVE..GCHGCGGCGGCTHMLL..QSTGT..DQCCH..GNREYQDQRYTRACQKQCPHOBNK	182
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i> CD40	ERMTRMYIGLL.....IGFLVLVLSLIVAACLYTVHVKR..KKKSFDIAGENGH..LAIN.NRHIYTPVDD..PENE...QPLFVTQISKEECGTRTPE	278
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> CD40	VEPPRHGGGLIACVV..AVGSLAVGCMVCLCKGETKQRA..KDYLESCHGKEN..LQREPSLVLETTLDE..TENH...ELLEPT...EEEMKIE	268
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i> CD40	VPAIRSHVGLIASLSTVVVFAVLAIAWFLCKGKRDTQGNLKACVESOWGDKKE..FLREANVLINPPTNE..IEEES...IMP..ELQSSQEEAGARTPE	286
红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i> CD40	VGTQRTHVVVLAVVIFLIVGLLVSIVWQCRGDQHDARQGVKSCVSCMGSSHE..PLRGDTLITPTDQNVDEES...SCPEHQSQEEGFTIRTE	288
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> CD40	VGNLRQYTAIVCVIT..VFLLVCCAVIYLLVVSRRGPRKRLKNCIELCVGKQOE..PPKEANPLVTINQDT..YDEP...MLP..ERQASQEE...PRTPE	271
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> CD40	AKNRDHVIAIALAVFG...VLCAMVAVVVLCSIESLSPES...FTPIRQETRT..PVETEDIGITENGCVVQEHG...NAVLS...RQESQMDTTT	267
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> CD40	VSPVTFESG.....NIKVMSESTPRKERNFVWSV..KRATADGRAEEGNAGPEEGRE...QLQPIIPGEGSSTPYF..	216
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> CD40A	VPVNSYGTIITIVMA..FLAAVVLGIVLFFKFGQGEACKKANESCDMIANLKRGT..KRATADGRAEEGNAGPEEGRE...QLQPIIPGEGSSTPYF..	287
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i> CD40	EQAPISSGVIVGAVIA..VILPI..LVLFPIWYKGRGLGDAFHKAMGCMVCLRSNCLPGQPEHKEGRKKEVEFKQLBQNE...ALIQVGEIQPHCPQPTFV	274
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> CD40	VGTDRRTAVIV.....VVCVLLLLIAAALVGLCFKFKGKSLPLFLQKQTFMEIRPDDVTVIAVQQQPEEDEE...NAPVSPITLS.....	256
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i> CD40	GFQPR..MRALLVI P...VVMVLLITIFVFLVLYIKKVVKPKDNEVLPEARGQDPVEIEDYEG...HNIAAPVQETLHGQCP.....	261
人类 <i>Homo sapiens</i> CD40	GFQDR..LRALVVI P...IIFGLLFAILLVLVFIKKVAKPT.....VAQEDGKESRISVQERVTGSMALKPLV.....	223
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> CD40	RMKQQRSHIWIIVLS...LIFVVLITMALCFVSKKYGI FORKKEQGFQEPVKLRPIEDNDPEADPMEDCYSLPDTTAQGLP.....	263
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i> CD40	ENVDEGSLEEG..SDSGVYTKGNFLKQETKQOEILSLPEESQTSVTVGEGPQDSFNQM	335
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> CD40	KTR.....TKG.....RSWMLFVSTVMDSV.....	290
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i> CD40	ENDEHSGQEV..LVDLALTENGNYVTQENKSTVLSRQESQOTQTLTESSSCHYDHNM..	341
红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i> CD40	EIEDP.....TDVGSTDRGNFVTQETGKTAVLSRQESQPHTYGD.....	327
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> CD40	EVDIYELQDDISITTEVHFTENGKFMQDKG.....SDNEL.....	307
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> CD40	EHST.....LFSSSSEKSSCERINSL.....	289
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> CD40	SWPGQIPPEEVEAKDMSENGQLVQEEGKSDHVSVDKQSVFYE.....	216
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> CD40A	EDDVNDQSAESYTVAQDMTENGHVVAQEEGKAHHTSVCDQSMSVVISL.....	331
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i> CD40	NMTENGNFVQEHGKDAIIPCHESTSNITYQ.....	322
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> CD40	VAQEDGKESRISVQERVTGSMALKPLV.....	286
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i> CD40	VAQEDGKESRISVQERVTGSMALKPLV.....	289
人类 <i>Homo sapiens</i> CD40	VAQEDGKESRISVQERVTGSMALKPLV.....	223
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> CD40	VAQEDGKESRISVQERVTGSMALKPLV.....	277

图 2 半滑舌鲷 CD40 与其他物种 CD40 氨基酸序列多重比较

GenBank 序列号分别为: 半滑舌鲷(KU291170), 牙鲆(BAC87848.1), 裸盖鱼(ACQ58926.1), 红笛鲷(AGM16418.1), 红鳍东方鲀(ACL80205.1), 青鳉(ACL80204.1), 大西洋鲑(ACI69421.1), 虹鳟(ADE40849.1), 白斑狗鱼(ACO13407.1), 斑马鱼(ACL77796.1), 褐家鼠(NP599187.1), 人类(AAO43990.1), 热带爪蟾(NP001138688.1)。方框内显示 CD40 4 个保守的富含半胱氨酸的结构区。

Fig. 2 Multiple alignment of CD40 amino acid sequence between *Cynoglossus semilaevis* and other species
GenBank accession number: *Cynoglossus semilaevis* (KU291170), *Paralichthys olivaceus* (BAC87848.1), *Anoplopoma fimbria* (ACQ58926.1), *Lutjanus sanguineus* (AGM16418.1), *Takifugu rubripes* (ACL80205.1), *Oryzias latipes* (ACL80204.1), *Salmo salar* (ACI69421.1), *Oncorhynchus mykiss* (ADE40849.1), *Esox lucius* (ACO13407.1), *Danio rerio* (ACL77796.1), *Rattus norvegicus* (NP599187.1), *Homo sapiens* (AAO43990.1) and *Xenopus tropicalis* (NP001138688.1). The boxed sequences are four cysteine-rich domains.

在生物进化上聚类为一支, 最后与哺乳类与两栖类 CD40 聚类为一支。

2.2 半滑舌鲷 *CD40* 基因表达模式

qRT-PCR 组织表达结果显示, *CD40* 基因在半滑舌鲷各组织中均有表达, 在鳃中表达量最高, 在肝、脾和心脏中表达量次之, 在肠、肌肉和皮肤中表达量较低, 在脑和肾中微量表达(图 4)。与对照组相比, 哈维氏弧菌刺激后半滑舌鲷肝、脾和肾 3 个主要免疫组织中 *CD40* 基因的表达均显

著增加。其在肝中表达量于 12 h 达到峰值, 为对照组的 4.3 倍($P<0.05$); 在脾与肾中的表达量于 6 h 达到峰值, 分别为对照组的 4.7 倍和 5.4 倍($P<0.05$)。同时, 3 个组织中在刺激后 48 h 表达量均有一定程度的上调, 后恢复至最低水平(图 5)。

3 讨论

本研究通过 RACE 方法克隆获得了 1 个半滑舌鲷 *CD40* 基因, GenBank 登录号为: KU291170。

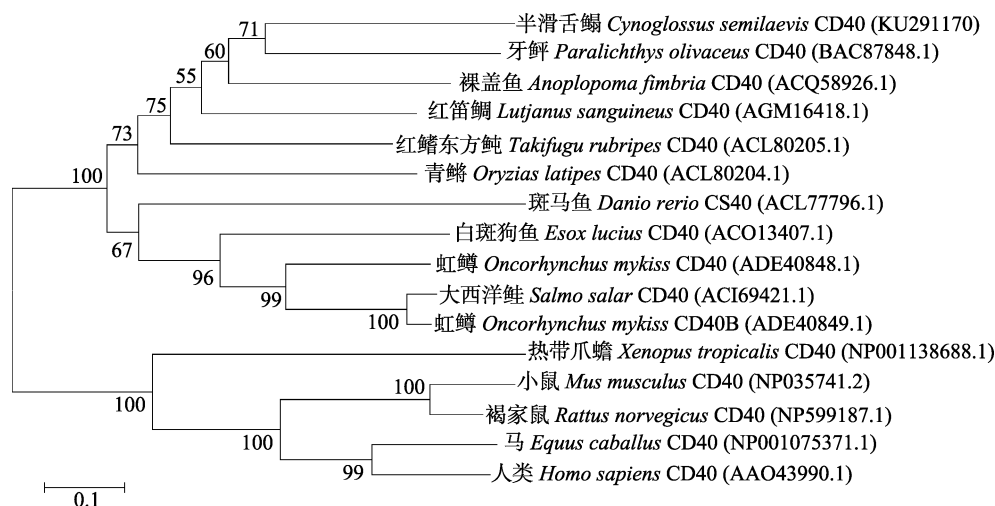
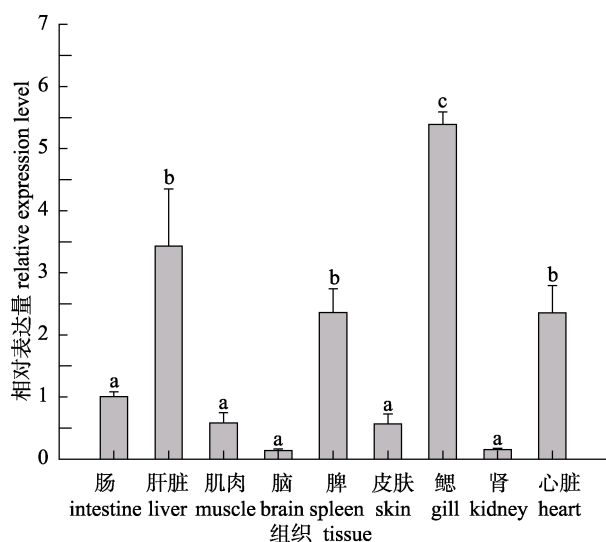


图 3 半滑舌鲷与其他物种 CD40 进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Cynoglossus semilaevis* CD40 with other reported CD40s图 4 *CD40* 在健康半滑舌鲷各组织中的表达量不同字母表示不同组织间差异显著($P < 0.05$).Fig. 4 Expression levels of *CD40* in various tissues of healthy *Cynoglossus semilaevis*Different letters denotes significant difference between different tissues ($P < 0.05$).

氨基酸比对结果显示, 半滑舌鲷 *CD40* 编码的氨基酸序列与硬骨鱼类氨基酸序列同源性较高。推导得到的氨基酸序列具有肿瘤坏死因子受体家族共同结构区, 包含 1 个信号肽序列, 1 个跨膜结构区和 4 个富含半胱氨酸的保守结构区。以上结果表明该基因编码蛋白具有 *CD40* 蛋白基本特征, 该基因属于硬骨鱼类 *CD40* 同源基因。

本研究发现, 半滑舌鲷 *CD40* 基因 3'-UTR 富含 AU 元件(AU-rich element), 具有 1 个脊椎动物

中常见的终止信号(AATAAA)和 2 个 mRNA 不稳定基序(ATTTA)。已有研究表明, 在真核生物中, mRNA 3'-UTR 内的 AU 富含区可通过影响 mRNA 的稳定性来调控基因的表达水平, 从而影响基因在信号通路中的作用^[27]。这暗示着半滑舌鲷 *CD40* cDNA 3'-UTR 区 2 个不稳定信号的存在对 *CD40* 基因的表达和翻译有着重要作用。

CD40 具有 2 种形式: 膜型 *CD40* (membrane-anchored *CD40*, m*CD40*)和可溶性 *CD40* (soluble *CD40*, s*CD40*)。s*CD40* 能够与 *CD40L* 结合, 抑制 m*CD40* 与 *CD40L* 的特异性结合, 进而抑制活化 B 细胞的增殖与免疫蛋白的分泌^[28-29]。同时, 研究发现, 硬骨鱼类 *CD40* 均为 m*CD40*, 尚未发现 s*CD40*^[20-22]。与其他硬骨鱼类 *CD40* 氨基酸序列结构相似, 半滑舌鲷 *CD40* 氨基酸序列 N 端具有 1 个信号肽, C 端具有 1 个跨膜结构区以及 2 个 N-糖基化位点。这些结果说明半滑舌鲷 *CD40* 为 m*CD40*, 且为 I 型跨膜糖蛋白, 并预示着半滑舌鲷 *CD40* 基因在功能上与其他硬骨鱼类相似, 参与了半滑舌鲷的免疫应答。

与其他物种氨基酸序列比对结果显示, 半滑舌鲷 *CD40* 与硬骨鱼类有较高的同源性, 其中细胞外氨基酸序列的同源性高于细胞内氨基酸序列, 并且在细胞外氨基酸序列上发现 4 个保守性较高的富含半胱氨酸结构区。在牙鲆中的研究发现, 这 4 个保守的半胱氨酸富含区与 *CD40L* 结合有关,

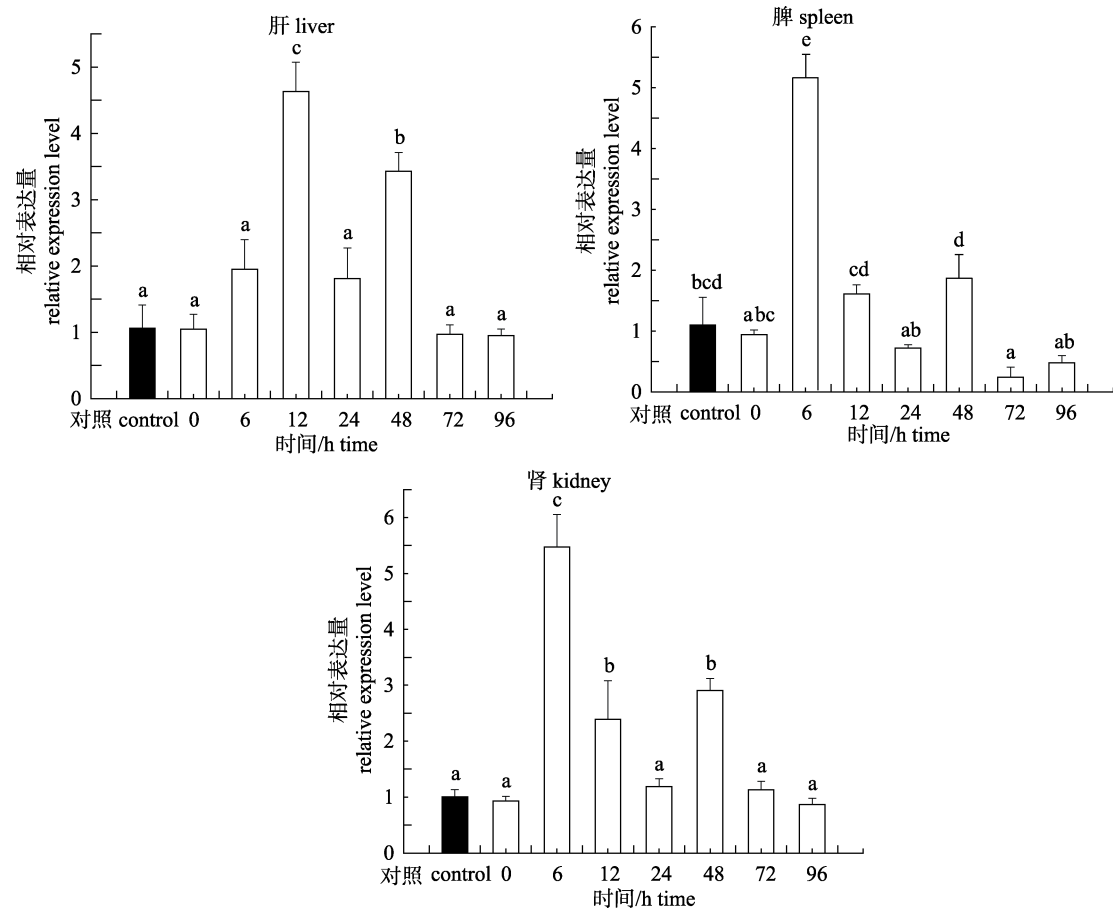


图 5 哈维氏弧菌刺激后 *CD40* 在半滑舌鲷肝、脾和肾中不同时间点的表达量
不同字母表示不同时间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 5 The expression profiles of *CD40* in liver, spleen, and kidney of *Cynoglossus semilaevis* after stimulation by *Vibrio harveyi* for different times
Different letters denotes significant difference between time points ($P < 0.05$).

CD40-CD40L 相互作用在抵抗病原菌入侵过程中发挥着重要的作用^[20]。这暗示着半滑舌鲷 *CD40* 可参与抵抗病原菌入侵的免疫应答反应。

对半滑舌鲷各组织 qRT-PCR 结果显示, *CD40* 基因在不同组织中均有表达, 为组成型表达模式, 且在免疫组织中表达量较高, 与牙鲆^[20]、斑马鱼^[21]以及大西洋鲑^[22]中 *CD40* 表达模式相同。本研究发现, 在半滑舌鲷各组织中, *CD40* 在鳃、肝、脾和心脏中表达量较高, 这一结果与其他硬骨鱼类中研究结果并不一致。在牙鲆^[20]各组织中, 该基因在脾、肾、肠和鳃中表达量较高; 在斑马鱼^[21]各组织中, 该基因在脾、肾、肝、肠、鳃和皮肤中表达量较高; 在大西洋鲑^[22]各组织中, 该基因在脾、肾和鳃中表达量较高。以上结果分析表明, 半滑舌鲷 *CD40* 基因在免疫组织中的高表达与机

体免疫应答有关, 并且 *CD40* 基因在不同硬骨鱼类各组织中表达量存在差异。同时, 鳃作为黏膜淋巴组织, 是鱼体与环境之间的天然屏障, 可以抵抗病原体入侵^[30]。半滑舌鲷 *CD40* 在鳃中的高表达也表明该基因在抵抗病原体的感染方面发挥着重要的作用。

对半滑舌鲷腹腔注射哈维氏弧菌后, 进一步 qRT-PCR 结果表明, 在 3 个主要的免疫组织中 (肝、脾和脾), *CD40* 基因在哈维氏弧菌刺激后短时间内均有上调表达, 且随时间延长, 逐渐恢复到原先水平。半滑舌鲷 *CD40* 在 3 个免疫组织中短期内上调表达趋势与牙鲆^[20]外周血细胞与大西洋鲑^[22]头肾白细胞在不同刺激下的表达趋势相同, 与斑马鱼^[21]经血蓝蛋白(KLH)和脂多糖(LPS)分别处理后 *CD40* 表达趋势不同。在牙鲆^[20]中研究发

现, 其外周血细胞经刀豆素(Con A)和佛波酯(PMA)分别处理后, CD40 表达量在 1 h 时达到峰值, 经 LPS 处理后, 1~6 h 内 CD40 表达量快速上调, 并在 6 h 达到峰值。在大西洋鲑^[22]中研究发现, 头肾白细胞经 LPS、聚肌胞苷酸(Poly I:C)等刺激下, CD40 表达量在 12 h 达到峰值。在斑马鱼^[21]中研究发现, 经 KLH 刺激后, CD40 在第 6 天呈显著性上调; 而经 LPS 刺激后, 第 3 天呈显著性上调。以上分析结果说明半滑舌鲷 CD40 作为一种急性反应蛋白参与了宿主免疫以及炎症反应, 同时在不同鱼中针对不同的外源刺激物, CD40 表达调控机制存在差异。此外, 本研究发现, 对于哈维氏弧菌处理后半滑舌鲷 CD40 在 3 个免疫组织中 48 h 时再一次上调, 可能与 CD40-CD40L 共刺激途径有关, 但是这种免疫机制尚不清楚, 需进一步探究。

本研究通过对半滑舌鲷 CD40 基因的克隆、遗传特征分析、氨基酸同源分析以及表达模式分析的探究, 初步表明 CD40 参与了半滑舌鲷免疫应答过程, 为进一步探究 CD40 在半滑舌鲷免疫应答过程中的作用和筛选高抗病品种提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. Cell, 2001, 104(4): 487–501.
- [2] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games[J]. Immunology, 2005, 115(1): 1–20.
- [3] Smith C A, Farrah T, Goodwin R G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death[J]. Cell, 1994, 76(6): 959–962.
- [4] Stamenkovic I, Clark E A, Seed B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas[J]. EMBO J, 1989, 8(5): 1403.
- [5] Clark E A, Ledbetter J A. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(12): 4494–4498.
- [6] Kooten C V, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9(3): 330–337.
- [7] Kooten C V, Banchereau J. CD40-CD40 ligand[J]. J Leukoc Biol, 2000, 67(1): 2–17.
- [8] Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand)[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(7): 687–693.
- [9] Ridge J P, Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell[J]. Nature, 1998, 393(6684): 474–478.
- [10] Martin S, Agarwal R, Murugaiyan G, et al. CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection[J]. J Immunol, 2010, 185(1): 551–559.
- [11] Akira Y A, Sayegh M H. The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation[J]. Transplantation, 2002, 73(1): S36–S39.
- [12] Du Z L. The role of CD40-CD40L costimulatory pathway in the humoral and cellular immunity[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2012, 28(12): 1341–1343. [杜振兰. CD40-CD40L 共刺激途径在体液免疫和细胞免疫中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(12): 1341–1343.]
- [13] Allen R C, Armitage R G, Conley M E, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome[J]. Science, 1993, 259(5097): 990–993.
- [14] Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, et al. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2170–2173.
- [15] Kawabe T, Naka T, Tanaka T, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation[J]. Immunity, 1994, 1(3): 167–178.
- [16] Xu J, Foy T M, Laman J D, et al. Mice deficient for the CD40 ligand[J]. Immunity, 1994, 1(5): 423–431.
- [17] Grewal I S, Flavell R A. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation[J]. Immunol Rev, 1996, 153(1): 85–106.
- [18] Schönbeck U, Mach F, Bonnefoy J Y, et al. Ligation of CD40 activates interleukin 1 β -converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1 β [J]. J Biol Chem, 1997, 272(31): 19569–19574.
- [19] Sempowski G D, Chess P R, Moretti A J, et al. CD40 mediated activation of gingival and periodontal ligament fibroblasts[J]. J Periodontol, 1997, 68(3): 284–292.
- [20] Park C I, Hirono I, Hwang J Y, et al. Characterization and

- expression of a CD40 homolog gene in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Immunogenetics, 2005, 57(9): 682–689.
- [21] Gong Y F, Xiang L X, Shao J Z. CD40154-CD40 interactions are essential for thymus-dependent antibody production in zebrafish: insights into the origin of costimulatory pathway in helper T cell-regulated adaptive immunity in early vertebrates[J]. J Immunol, 2009, 182(12): 7749–7762.
- [22] Lagos L X, Iliev D B, Helland R, et al. CD40L-a costimulatory molecule involved in the maturation of antigen presenting cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 38(3): 416–430.
- [23] Shao C W, Niu Y C, Rastas P, et al. Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): applications to QTL mapping of *Vibrio anguillarum* disease resistance and comparative genomic analysis[J]. DNA Res, 2015, 22(2): 161–170.
- [24] Liu X Z, Zhuang Z M, Ma A J, et al. Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Gunther[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(5): 7–14. [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 7–14.]
- [25] Chen Z Q, Yao Z X, Lin M, et al. Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 764–771. [陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病原研究[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 764–771.]
- [26] Chen S L, Zhang G J, Shao C W. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. Nat Genet, 2014, 46(3): 253–260.
- [27] Hel Z, Marco S D, Radzioch D. Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3-UTR of TNF- α mRNA[J]. Nucl Acids Res, 1998, 26(11): 2803–2812.
- [28] Kooten C V, Gaillard C, Galizzi J P, et al. B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(4): 787–792.
- [29] Fanslow W C, Anderson D M, Grabstein K H, et al. Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells[J]. J Immunol, 1992, 149(2): 655–660.
- [30] Koppang E O, Fischer U, Moore L, et al. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue[J]. J Anat, 2010, 217(6): 728–739.

Cloning and immunologic function analysis of *CD40* from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WEI Zhanfei^{1,2}, GUO Hua^{1,2}, LI Hailong¹, ZHENG Weiwei^{1,2}, WANG Wenwen¹, DAI Huan¹, ZHU Ying¹, LIU Yang¹, DONG Zhongdian¹, CHEN Songlin^{1,3}

1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China

Abstract: *Cynoglossus semilaevis*, which is distributed along the coast of China, is one of the most economically important marine aquaculture species. With the expansion of *C. semilaevis* breeding, diseases caused by bacteria and viral pathogens have become more widespread and serious. The disease caused by the bacterial pathogen *Vibrio harveyi* has become an obstacle in the development of half-smooth tongue sole aquaculture. Therefore, it is important to understand the defense mechanisms of the host, *C. semilaevis*, against this pathogen. The CD40 protein, which is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily 5, is an important receptor molecule that plays a key role in the host's immune system and participates in several immune signaling pathways. In this study, using the whole-genome sequence of half-smooth tongue sole, we obtained one *CD40* homolog using the rapid amplification of cDNA ends technique. The full-length cDNA was 2098 bp long and included an open reading frame (ORF) of 1011 bp, a 5'-untranslated region (UTR) of 44 bp, and a 3'-UTR of 1043 bp. The ORF of *CD40* encoded a 336-amino acid protein with a predicted molecular weight of 37.27 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.355. The 3'-UTR included two instability motifs (ATTTA) and one polyadenylation signal (ATTAAA) located 28 bp upstream of the polyA tail signal (AATAAA). The putative amino acid sequence contained one signal peptide, one trans-membrane region, two N-glycosylation sites, and four conserved cysteine-rich domains. The deduced amino acid sequence of *C. semilaevis CD40* shared 28%–47% identity with the CD40s from other teleost fish, mammals, and amphibians, with higher similarity to CD40s of bony fish. The phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences demonstrated that the *C. semilaevis CD40* clustered in one branch with other teleost fish. Real-time quantitative PCR analyses detected *C. semilaevis CD40* transcripts in a wide range of tissues in healthy adult fish. There were higher transcript levels of *C. semilaevis CD40* in the liver, spleen, and kidney after challenge with *V. harveyi*. After challenge with the pathogen, the peak transcript levels of *CD40* were at 12 h in the liver, and at 6 h in the spleen and the kidney, before a second peak in transcript levels at 48 h in the three tissues. These results indicate that *CD40* is involved in the immune response of *C. semilaevis* to the bacterial pathogen *V. harveyi*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *CD40* gene; gene clone; real-time quantitative PCR; *Vibrio harveyi*

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