

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00050

斑节对虾 *Relish* 基因的克隆及免疫刺激对其 mRNA 表达水平的影响

刘文静^{1,2}, 杨丽诗¹, 李晓兰^{1,3}, 邱丽华¹, 苏天凤¹, 杨其彬¹, 江世贵¹

1. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
3. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州, 510642

摘要: *relish* 是 Rel/NF- κ B 家族的重要成员之一。本研究在构建的斑节对虾(*Penaeus monodon*)肝胰腺转录组文库中克隆得到 *PmRelish* 基因, 其全长 5 112 bp, 包括 3 561 bp 的 ORF, 推测编码 1 个含 1 186 个氨基酸的蛋白。*PmRelish* 的蛋白具有 Rel/NF- κ B 蛋白家族的典型结构特征, 包括 N 端的 RHD 结构域, 核定位信号, C 端的 6 个锚蛋白重复序列以及死亡结构域, 表明该蛋白是 NF- κ B1 亚型。该基因在所检测组织中呈组成型表达, 并在血细胞表达量最高。使用定量 PCR 检测 *PmRelish* 基因在不同免疫刺激条件下在肝胰腺中的 mRNA 表达情况, 结果显示, 肝胰腺 *PmRelish* 基因是诱导型表达, 并被创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和白斑综合征病毒(WSSV)调控表达, 其中被创伤弧菌上调表达最显著。进一步证明了病毒核酸类似物 Poly(I:C)、R484 可激活 *PmRelish* 的表达。上述研究结果说明 *Relish* 是斑节对虾的重要免疫因子, 可能通过直接或间接作用参与对细菌和病毒的免疫反应。

关键词: 斑节对虾; *relish* 基因; 细菌; WSSV; poly(I:C); R484; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0050-11

核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是一种重要的核转录因子, 它广泛存在于各种细胞中, 能与多种细胞基因启动子或增强子序列 κ B 位点发生特异性结合, 进而参与调控这些基因的转录和表达。在机体的先天性免疫应答、炎症反应、细胞增殖和分化、细胞凋亡等重要的病理和生理过程中发挥着重要的作用^[1-3]。

NF- κ B 是由 Rel 蛋白家族成员以同源或异源二聚体形式组成的一组转录因子, 该家族成员均在 N 端含有保守的 300 个氨基酸残基左右的 Rel 同源结构域(Rel-homology domain, RHD), RHD 的 C 端有 1 段大约 4~5 个氨基酸残基组成的短序列, 被称为核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。NF- κ B 在细胞质中与其抑制蛋白 I- κ B 结合,

以无活性的状态存在, 当信号传导通路被刺激物激活后, I- κ B 蛋白降解, NF- κ B 在 NLS 的引导下转入细胞核, 并与其激活的特定基因的启动子或增强子区相结合, 启动基因的转录。Rel/NF- κ B 是大部分信号转导的中枢, 了解其调控表达机制具有重要科学意义。

目前, 在哺乳动物中发现存在的 Rel/NF- κ B 成员有 RelA(P65)、c-Rel、RelB、P105(NF- κ B1)和 P100(NF- κ B2)等 5 种。黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中已报道的 Rel/NF- κ B 家族蛋白有 Dorsal、Dif 和 Relish 等 3 种^[1]。其中 Dorsal 和 Dif 属于 NF- κ B2 亚型, 主要参与 Toll 信号通路并被革兰氏阳性菌和真菌激活表达^[4-5]。Relish 属于 NF- κ B1 亚型, 主要参与 Imd 信号通路并被革兰氏

收稿日期: 2012-03-14; 修订日期: 2012-07-03。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31202019, 31101903); 国家虾产业体系项目(CARS-47); 国家 863 计划项目(2012AA10A409-02); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2012TS16)。

作者简介: 刘文静(1986-), 硕士研究生, 研究方向为海洋生物分子生物学。E-mail: l6h6q6@163.com

通信作者: 江世贵(1964-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事遗传育种与种质资源方面的研究工作。E-mail: jiangsg@21cn.com

阴性菌激活表达^[6]。Rel/NF-κB 家族蛋白激活的最终效应是控制不同类型抗菌肽基因的表达。目前, 在牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[7]、鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*)^[8]、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[9]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[10]、桑蚕(*Bombyx mori*)^[11]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[12]等重要养殖无脊椎动物中也发现了 Rel/NF-κB 家族成员, 但斑节对虾(*Penaeus monodon*)中尚未见报道。

养殖水环境富含各种微生物, 许多致病性细菌或病毒通过水体传播并引起虾病爆发。常见的对虾病原有弧菌、白斑综合征病毒(WSSV)等, 可引起养殖对虾大量死亡, 造成巨大的经济损失。因此, 深入了解由细菌、病毒等免疫刺激引发的天然免疫反应, 克隆和分析免疫相关的基因, 研究其免疫调控机制, 特别是信号中枢 Rel/NF-κB 家族的转录、表达和激活模式, 有助于探讨对虾免疫反应机制, 有针对性地开发抗病药物, 提高虾体免疫力。本研究克隆了斑节对虾 Rel/NF-κB 家族成员 *PmRelish* 的 cDNA 序列, 并分析其在斑节对虾不同组织中的表达以及在不同微生物及不同微生物成分刺激下的表达情况, 为更加深入系统了解对虾的先天性免疫机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康的斑节对虾(体质量 20 ~ 30 g)养殖于南海水产研究所热带水产研究开发中心(三亚, 陵

水), 在 25 ~ 30℃ 充气的循环海水池中暂养 3 d。取其组织样品, 包括脑、眼柄、鳃、心、肝胰腺、肠、胃、神经、血细胞、肌肉共 10 个组织, 剪碎后保存于 RNAlater (Ambion), 并带回广州实验室分析。

1.2 免疫刺激实验

用于免疫刺激实验的斑节对虾在循环海水中暂养。随机挑选 175 尾 3~5 g 虾分成 7 组, 每组 25 尾。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)分别用平板培养后, 用适量 PBS 调至 OD≈2.0 后高压灭活。白斑综合征病毒悬液制备方法参考文献[13]。注射微生物的实验组分别注射 50 μL 灭活的金黄色葡萄球菌、创伤弧菌、白斑综合征病毒悬液, 细菌终浓度为 2×10⁶ 细胞/尾, 病毒最终稀释度为 5×10⁻⁴, 于第二腹节肌肉向心注射。注射免疫刺激剂的实验组分别用 dsRNA 类似物 poly(I:C)及 ssRNA 类似物 R484(InvivoGen)接种, 注射终浓度为 600 μg/mL。阴性对照注射 PBS (NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 4.3 mmol/L, KH₂PO₄ 1.4 mmol/L) 50 μL, 注射后 3、6、9、12、24、48 h 取每组 3 尾斑节对虾肝胰腺进行基因表达量分析。

1.3 斑节对虾 *PmRelish* 基因的 cDNA 克隆及鉴定

在本实验室构建的斑节对虾肝胰腺转录组文库中分析获得 1 条 4 816 bp 的 EST 序列(EST no.Contig283), BLAST 分析显示其与凡纳滨对虾的 *Relish* 基因具有高度同源性(identity=97%)。使用 F1 和 R1 引物(表 1)对该片段进行验证。

表 1 实验中所用引物序列
Tab. 1 Oligonucleotide primers used in the experiment

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	目的 purpose
F1	GCAAAGAGGGACACGAAAGA	获取中间片段 primers used to obtain the initial fragment
R1	TGCCAAGAAATAGCTGGGAA	
PmRelish-R2	TGGGGTTCACAGATTGGGAAGT	5'RACE PCR
PmRelish-F2	CACTCTGTAGCGGAATCGGAA	3'RACE PCR
PmRelish-F4	ATGAGAATGATCGGGAGGTA	SYBR 荧光定量 PCR
PmRelish-R4	TGTCAGGCATGAATGTGAAGT	SYBR Green real time PCR
PmEF- F	AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT	SYBR 荧光定量 PCR
PmEF-R	CGTGGTGCATCTCCACAGACT	SYBR Green real time PCR

按照刘先军等^[14]的方法提取健康斑节对虾肝胰腺 RNA 并制备 RACE 模板, 利用表 1 引物进行 3' 及 5'RACE 获取 *PmRelish* 基因全长。所获产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳并用试剂盒回收(TaKaRa), 经克隆鉴定后送至上海英骏生物技术有限公司进行双向测序。测序仪器为美国 ABI 公司 3730 全自动序列分析仪。

1.4 斑节对虾 *PmRelish* 基因的序列分析

使用 DNASTAR 对 Pm-Relish 的氨基酸序列进行预测, 蛋白结构域分析用 NCBI 结构分析工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 SMART 4.0 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 程序; 扩增序列同源性比对和相似性搜索用 NCBI 网站上的 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行; 用 Clustalx 1.81 软件进行多序列比对; 用 GenDoc 软件进行核苷酸比对结果编辑; 采用 Clustalx1.81 软件和 PHILIP 软件, 以邻位相连法(Neighbor-joining, NJ) 构建进化树。

1.5 RNA 的提取和 cDNA 的合成

从成虾的不同组织及经过刺激后的不同时间段斑节对虾的肝胰腺中提取总 RNA。RNA 提取方法参见 Trizol 说明书(Invitrogen)。提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳确定其完整度, 用 NanoDrop 2000/2000c 分光光度计测定其浓度和纯度。

每个样品取 1 μ gRNA 进行逆转录。使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript[®] RT 逆转录试剂盒进行。总 RNA 经 42℃ 孵育 2 min 去除基因组 DNA, 随即 37℃ 孵育 15 min 进行第一链 cDNA 合成。

1.6 实时荧光定量 PCR

将不同组织样品及免疫刺激样品 cDNA 稀释 1 倍作为模板, 采用 SYBR Green 染料法, 在 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析。依照 TaKaRa SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行 PCR 反应。反应体系为 20 μ L, 包含 10 μ L 的 2 $\times$ SYBR Green Real-time PCR Master Mix, 1 μ L 稀释的模板, 各 0.4 μ L 正、反引物(10 μ mol/L)及 8.2 μ L 的双蒸水。每个时间点设置 3 个重复。反应参数为 95℃ 预变性 10 s; 然后 95℃ 变性 15 s, 55℃ 退火

30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。使用引物 PmRelish-F3 和 PmRelish-R3 扩增目标基因(表 1), PmEF-F 和 PmEF-R 扩增 *EF-1 α* 基因作为内参(表 1), 实验数据采用相对 CT 法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)分析 *PmRelish* 基因在各样品中的相对表达量。

1.7 统计学分析

运用统计学软件 SPSS16.0 进行相对独立的单因素方差分析, 不同刺激物同一时间点的表达差异分析以及同一刺激物的时序表达分析。结果值以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。 $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *PmRelish* 基因的 cDNA 序列特征

在斑节对虾肝胰腺转录组文库中分析获得 1 条 4 816 bp 的 EST 序列(EST no. Contig283), BLAST 分析显示其与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的 *Relish* 基因具有高度同源性(相似性为 97%)。

使用 F1 和 R1 引物(表 1)对肝胰腺 cDNA 文库 4 816 bp 的 EST 序列进行验证, 其结果显示为 *Relish* 家族成员。使用特异性引物进行 5' 和 3'RACE, 经拼接获得 *PmRelish* 基因 (GenBank 登录号: JQ728539)。*PmRelish* 基因全长 5 112 bp, 包括 3 561 bp 的 ORF 片段, 100 bp 的 5'UTR 和 1 451 bp 的 3'UTR (表 1), 3'UTR 有 2 个加尾信号 AATAAA。预测 *PmRelish* 蛋白包含 1 186 个氨基酸, 分子量为 132.3 kD, 理论等电点为 5.19。BLAST 同源性分析及 SMART 分析显示, *PmRelish* 氨基酸序列包含 1 个保守的 N 端 Rel 同源结构域(Rel homolog domain, RHD)(43–352 aa), 1 个核定位信号 LKRRR (356–360 aa), 1 个 C 端 I κ B 样结构域(6 个 ankyrin 重复)(783–994 aa)以及 1 个 C 端的死亡结构域(death domain, DD)(1 114–1 184 aa)(图 1)。其中 RHD 结构域包含 2 个保守型结构, 即 RHD1 结构域(43–244aa)和 Ig-样 plexin 转录因子结构域 (IPT 结构域, 或称 RHD2)(250–352aa)。*Relish* 标签序列 FRYKSE 位于 56–61 aa, 推测的激酶断裂位点(L-E-V-A-D)位于 665–669 aa。

[illegible]

图1 斑节对虾 *Relish* 基因的 cDNA 序列和推断的氨基酸序列

起始密码子和终止密码子用斜黑体表示, RHD1 结构域用灰色标记, RHD2(IPT)结构域用方框标示, 6 个 ankyrin 重复用下划线标示, DD 结构域用虚线标示, 核定位信号用粗体标示, 加尾信号用波浪线标示。

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of *PmRelish* gene

Start and stop codons of the open reading frame are italic in bold; the RHD1 domain is in grey; the RHD2 (IPT) domain is boxed; six ankyrin repeats are underlined; the DD domain is indicated with dotted lines, the NLS is in bold, and the ANKs are boxed; the putative polyadenylation signal(AATAAA) in 3'UTR is indicated with wavy line.

```

3521 ccttggttagctggggaaccatctccagcttcaactctcctccacctgataacatgaagctgtgagcttagagaagcttcgagagtgc
    _P_C_L_A_G_E_P_S_P_A_S_T_L_L_H_P_D_N_M_K_S_V_S_L_E_K_L_R_E_C
3611 ctacagttcttggcctcaaggatgtgtcgtgtgctggaccaggcataa gaagtgagagaacattgacctgaatgtgcataatcataa
    _L_T_V_L_G_L_K_E_C_V_A_V_L_D_Q_A_*
3701 gcacagaaatattgtgtttattgagttcttactgttagattttcattcttatcatgtacaaacttgaacttttatatgggttcacaga
3791 ttgggaagtcctatgtcagttttattgatttcacctttttttattttttattttttcttgccttaaaaaatcacctagatgtacatg
3881 ttgcttttgcaaaaaaagctgcaacactgcttgattgtatttcaaaggagggtgaattgtacaagtatatagttttgagattgtttta
3971 tgaaaaaataataggttagtaaaatcaccttttagttgttttcagaactaaggcaattagctaagggttaaagatggaagctagtt
4061 attgtgtgagcagtaaatagtagattttttatgtataacttggtagtcagatgttttatatgcaactaaactggcatcataggtattaaa
4151 aagatgacttacatgttatgttgcataataggttttaatttagcttttataaaagtgttatgtatctttacaaaaattttattttttta
4241 acctttttacctttatttaataatgataccatagataattaaaaatcatttagtactagtgtatataatgaaatttattagtagatagacaagat
4331 ggtctgtgttaattaatcttgcataataaaaggagaaatataatagtagtataatgtttggcagatactagagaatttgagaaatgattt
4421 gccaaaaatatttaccagggtcatttttaccgtcattccttatggtaaggatagatacagttattgttcactgtaagtggtcagtgctt
4511 tcacattgcttcatgtctgtgttatgtatgtatgaatgaataaggatgagtagtggtgtatgctaatacctggaataatccttgtaa
4601 ggatgaagttaattgtctggaagaaataatattgtgagacattgcttttagatgttacaataatgtagaataaaatttgattatccatat
4691 gtaaatgttaattgaattgtgataatttttgaatttattagaaataaaatctcttccctataattttctaaagtgattgtatagactgctg
4781 atagcaggttaggttagatttttagagctcagaagtaagaacttattaggaccatcacgtaactgtacattcccagctattttctggcaca
4871 gtggaactgaccacttcaagtagatttaagaagaatgtgcttagcacaagaacaacctacataatgtatggactaagatattcctt
4961 ttaaatatgttggttaggcataaatctcaacaattttgaatctcgtcattccttggaaccaacaggtaactttacatgtagcttttata
5051 agccatttgaaaattgtagtgtgtcacaataatgatttcacttttatctaaaaaataaaaaa

```

(续图 1)

2.2 PmRelish 氨基酸多重比对

由于 RHD 结构域是 Relish 的关键功能结构域, 因此采用 ClustalX 1.81、ClusterW 等软件对 14 个物种, 17 种不同来源的 Relish 家族成员的 RHD 区进行比对。同源性分析结果显示, 斑节对虾 PmRelish 与凡纳滨对虾 LvRelish 及短小亚型 LvRelish-S 的 RHD 结构域序列完全一致(100%), 同时与中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) FcRelish(98.1%)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) EsRelish(85.2%) 的 RHD 区也高度相似。但 PmRelish 的 RHD 结构域与节肢动物包括果蝇、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、白蚁 (*Nasutitermes graveolus*) 等的相似度较低, 在 39.2%~59.3% 之间, 但与软体动物相似度最低, 与合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) PfRelish、光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) BgRelish 的相似度分别为 38% 和 33.6%。

此外, 氨基酸多重比对结果表明, Relish 家族 RHD 结构域保守程度较高, 在 RHD1 结构域和 RHD2 结构域中均有高度保守的区域(图 2), 例如 RHD1 中含有 FRFRY*SEM 保守区域, RHD2(IPT) 结构域中存在 F***DVHHQYAI 保守序列。

2.3 PmRelish 氨基酸的进化树分析

采用邻位相连法构建了基于氨基酸全长序列的系统进化树(图 3), Bootstrap 显示不同物种的 Relish 被聚合成几支, 包括昆虫、甲壳动物、软体动物等。斑节对虾 Relish 与凡纳滨对虾聚成一支,

并依次与中华绒毛蟹、凡纳滨对虾短小亚型、中国明对虾相近, 聚成甲壳动物分支。该分支与来源于双翅目昆虫的分支最为相近, 包括埃及伊蚊、刺舌蝇 (*Glossina morsitans morsitans*)、果蝇、家蚕 (*Bombyx mori*)、棉铃实夜蛾 (*Helicoverpa armigera*) 等的 Relish 蛋白。上述两支聚为节肢动物的分支, 与软体动物分支(包括合浦珠母贝、光滑双脐螺)相近。有趣的是, 膜翅目昆虫白蚁及蜜蜂均单独形成独立分支, 这可能与它们的 Relish 蛋白特殊的氨基酸序列有关。

2.4 Relish 基因的组织表达谱

从健康斑节对虾的各个组织中抽提 RNA, 分析 PmRelish 的表达特征, 通过使用 real-time PCR 分析基因的相对表达水平, 将相对表达量与内参基因进行比较。Relish 基因为组成型表达, 在检测的 10 种组织中均有表达(图 4)。其中血细胞的表达量最高; 在脑、鳃、心、肠、神经、眼柄中的表达量居中; 在肝胰腺、胃、肌肉中的表达量较低。

2.5 Pmrelish 基因在不同微生物刺激下的表达模式

由于肝胰腺是对虾的重要免疫器官, 在研究 Pmrelish 是否参与抗微生物的免疫反应时, 选取肝胰腺作为靶器官进行检测。结果如图 5 所示, 肝胰腺 Pmrelish 基因可被诱导表达, 并且 PBS 组在注射后 3~24 h 有显著变化, 但在 48 h 回落到正常水平, 可能由于针头刺激导致发生了免疫应激反应。与 PBS 组相比较, WSSV 组在注射后 3 h

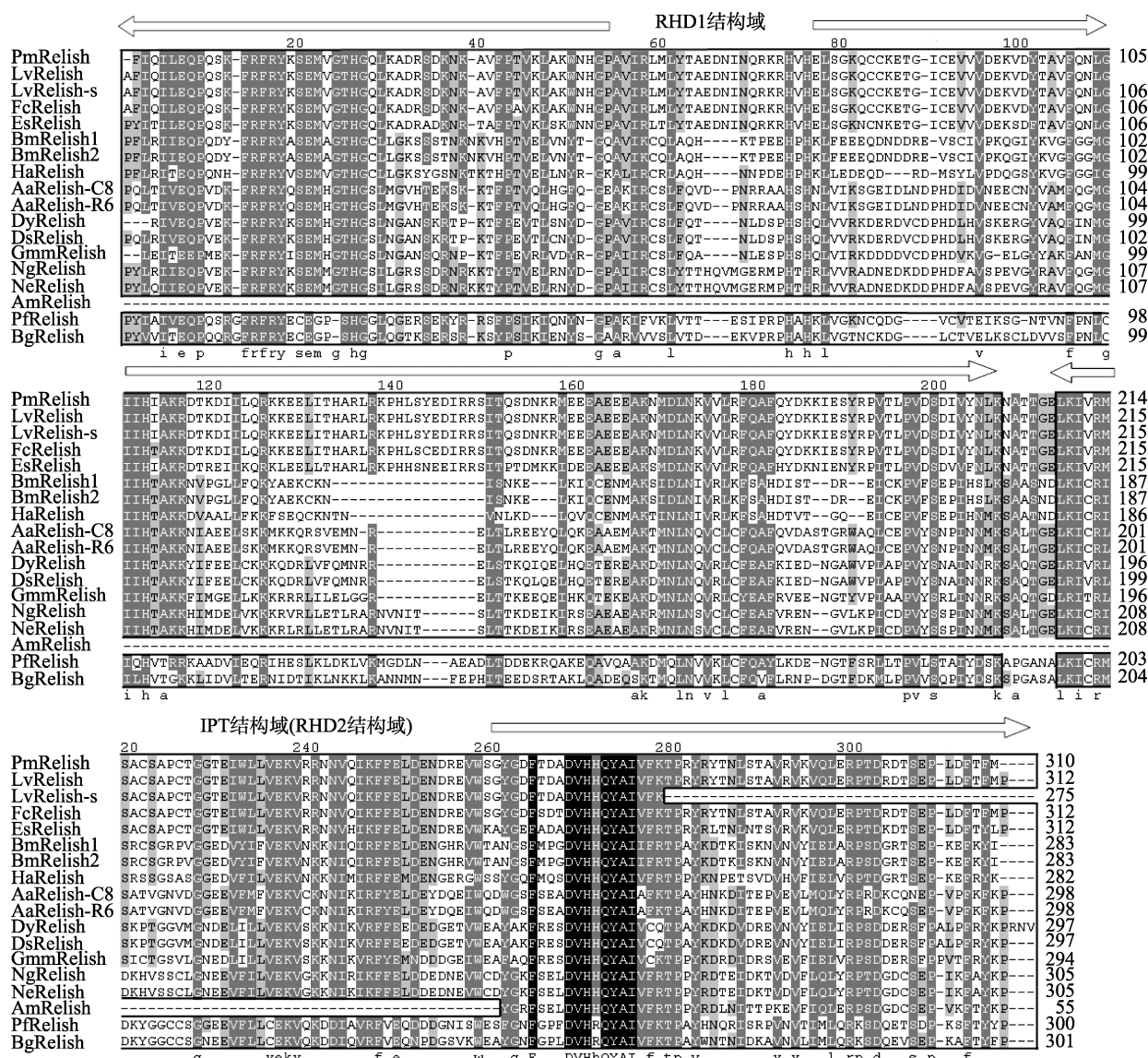


图 2 Relish 家族成员的多重比对

序列中 100%保守残基用黑色突出显示, 80%保守性残基用灰底白字显示, 60%保守性残基用灰底黑字显示. 序列下方显示 Relish 家族的保守残基. Pm: 斑节对虾; Lv: 凡纳滨对虾; Fc: 中国明对虾; Es: 中华绒毛蟹; Bm: 家蚕; Ha: 棉铃实夜蛾; Aa: 埃及伊蚊; Dy: 果蝇; Ds: 拟果蝇; Gmm: 刺舌蝇; Ng: 白蚁; Ne: 澳桉象白蚁; Am: 蜜蜂; Pf: 合浦珠母贝; Bg: 光滑双脐螺.

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of Relish family members

The sequences with 100% identity were shaded with black, while those with 80% and 60% identity were showed as grey bottom with write words and grey bottom with black words, respectively. The amino acid below the alignment represents the conserved residues of relish family. Pm: *Penaeus monodon*; Lv: *Litopenaeus vannamei*; Fc: *Fenneropenaeus chinensis*; Es: *Eriocheir sinensis*; Bm: *Bombyx mori*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Aa: *Aedes aegypti*; Dy: *Drosophila yakuba*; Ds: *Drosophila simulans*; Gmm: *Glossina morsitans morsitans*; Ng: *Nasutitermes graveolus*; Ne: *Nasutitermes exitiosus*; Am: *Apis mellifera*; Pf: *Pinctada fucata*; Bg: *Biomphalaria glabrata*.

Pmrelish 表达量开始下调, 6 h 时下调到最低值, 9 h 后表达量逐渐上升, 但仍显著低于 PBS 组的表达水平, 直到 48 h 较 PBS 显著上调 4.4 倍. 创伤弧菌注射后表达变化呈波浪式, 即在 6 h、12 h 和 48 h 达到表达高峰, 其中 6 h 和 48 h 的表达量高于

PBS 组 1.1 倍和 4 倍, 其余时间点与 PBS 相比表达显著被抑制. 金黄色葡萄球菌注射 0~6 h 被抑制, 9 h 时显著上调 ($P < 0.05$) 约 1.9 倍, 24 h 时上调至与 PBS 相似水平, 48 h 虽有回落, 却显著高于 PBS 4.9 倍.

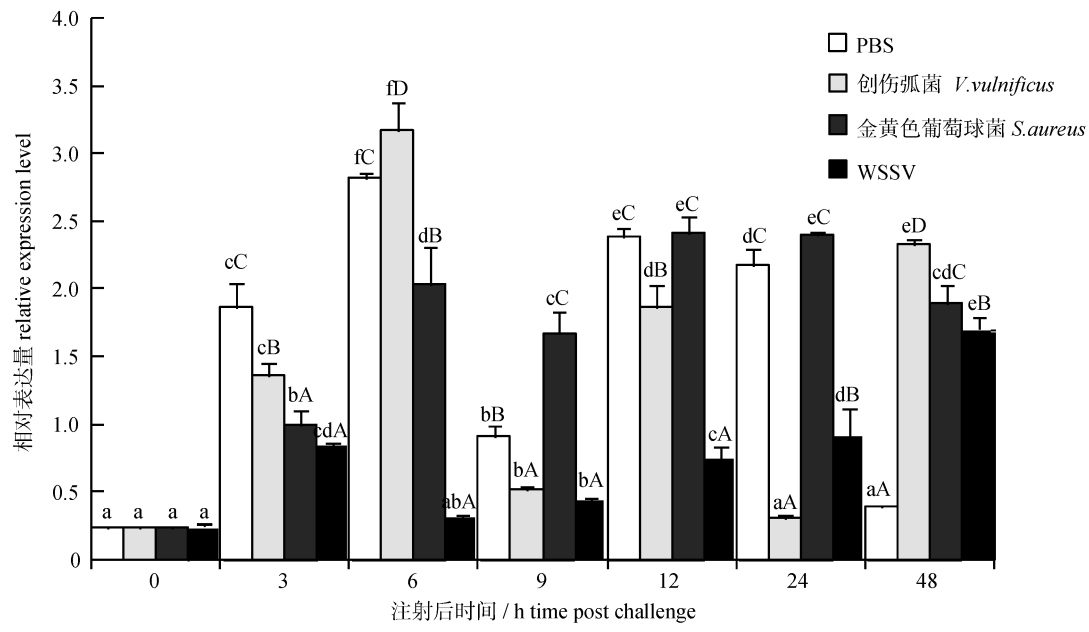


图 5 斑节对虾肝胰腺 *PmRelish* 基因在创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和 WSSV 刺激下的表达特征分析

不同小写字母表示同一刺激物不同时间点差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示不同刺激物同一时间点差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Expression profile of the *PmRelish* gene in hepatopancreas of *Penaeus monodon* after challenge with *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus* and WSSV

The lowercase letters represents significant difference at different time points after challenged with the same stimulus ($P<0.05$). The uppercase letters indicated significant difference at the same time points after challenged with different stimulus ($P<0.05$).

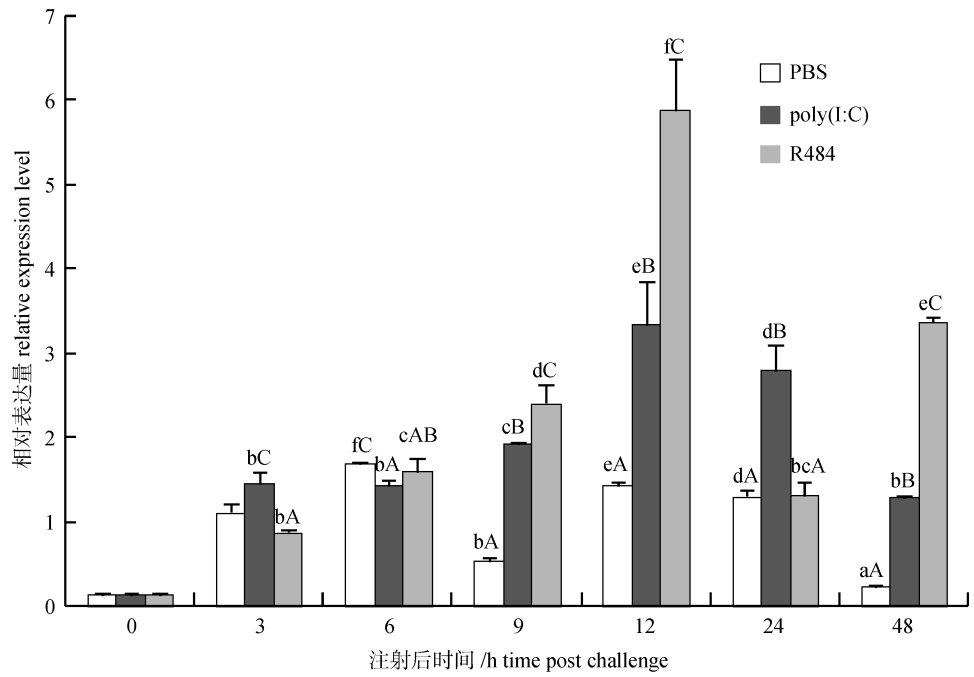


图 6 斑节对虾肝胰腺 *PmRelish* 基因在 dsRNA 类似物 poly(I:C)及 ssRNA 类似物 R484 刺激下的表达特征

不同小写字母表示同一刺激物不同时间点差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示不同刺激物同一时间点差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Expression profile of the *PmRelish* gene in hepatopancreas of *penaeus monodon* after challenge with microbial component including dsRNA analog poly(I:C) and ssRNA analog R484

The lowercase letters represents significant difference at different time points after challenged with the same stimulus ($P<0.05$). The uppercase letters indicated significant difference at the same time points after challenged with different stimulus ($P<0.05$).

说明 *relish* 进化起源于几百万年以前,并保留了其作为 NF- κ B 信号分子的功能^[15]。进化树显示,斑节对虾 *Relish* 在进化上与甲壳动物最为相近,其次为昆虫和软体动物。但相对而言,中国明对虾的 *relish* 与 *Pmrelish* 相似性较低且进化距离远,这可能是由于对虾体内还存在多种亚型的 *Relish* 基因或其类似物。例如,在凡纳滨对虾^[13]、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)^[16]、独角仙(*Allomyrina dichotoma*)^[18]中曾报道存在不同的 *relish* 亚型。

组织表达结果表明 *PmRelish* 为组成型表达,但不同组织间具有差异表达。血细胞中表达水平明显高于其他组织,这和中华绒螯蟹^[11]及中国明对虾^[18]相似。血细胞是对虾免疫系统中最重要组织,当虾体受到病原菌侵染时,血细胞可直接将其吞噬或采用凝血的方式包围病原菌,同时释放抗菌肽,因此血细胞中高表达的 *PmRelish* 可能参与了体液免疫反应。同时,*PmRelish* 在脑、心、肠、神经、眼柄中的表达量居中,在肝胰腺、胃、肌肉中的表达量较低。凡纳滨对虾该基因主要在鳃组织中表达,在肝胰腺、表皮、心脏、血细胞、肠、胃、脑中的表达量相对较低^[13]。

为研究 *PmRelish* 对微生物的响应规律,本研究用革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌以及病毒 3 种类型微生物对斑节对虾进行免疫刺激。肝胰腺 *PmRelish* 在感染创伤弧菌后转录水平有所变化,其先抑后扬的波浪式表达模式与中国明对虾头胸甲 *FcRelish* 在鳃弧菌感染后的表达相似,说明 *PmRelish* 可能参与了革兰氏阴性菌的免疫反应。在模式生物果蝇中,革兰氏阴性菌主要被 Imd 通路识别,通过 NF- κ B/rel 家族成员 *Relish* 将刺激信号传递到细胞内,并激活抗菌肽基因表达^[19-20]。在中国明对虾中,利用基因敲除技术发现, *FcRelish* 基因被沉默后抑制抗菌肽 *Penaeidin 5* 基因转录^[18],此外,在凡纳滨对虾中,利用启动子报告系统发现 *LvRelish* 可结合 *Penaeidin2*、*Penaeidin4* 基因的 κ B 位点并激活其表达^[13]。斑节对虾 *PmRelish* 基因的存在说明其体内也可能存在 Imd 通路,并通过激活 *Penaeidin* 等抗菌肽基因表达抵御革兰氏阴性菌感染。

Relish 也可能参与了对虾对革兰氏阳性菌的免疫防御反应。斑节对虾肝胰腺 *PmRelish* 在受金黄色葡萄球菌刺激后 0~6 h 时被抑制,随后上调表达,而中国明对虾 *Relish* 被藤黄微球菌刺激后表达发生变化^[18]。这与蚕 *Relish1* 和 *Relish2* 均可被大肠杆菌诱导,但不能被金黄色葡萄球菌诱导^[21]。在果蝇中,革兰氏阳性菌主要被 Toll 通路识别并激活宿主天然免疫系统。最新研究发现,果蝇 Toll 通路和 IMD 通路的激活具有协同作用,Toll 通路的激活可能会增加 *Relish* 基因的表达水平,以实现机体对细菌更有效的免疫反应^[22-23]。因此推测,由于金黄色葡萄球菌对斑节对虾 Toll 通路的激活,导致 IMD 通路分子活跃表达,促进了 *PmRelish* 的上调表达。

肝胰腺 *PmRelish* 在 WSSV 感染后 24 h 均被显著抑制,直到 48 h 才显著上调。这可能是病毒逃逸宿主天然免疫系统的策略。在侵染机体初期,强烈抑制 *Relish* 的转录和表达,降低免疫基因的转录水平,以利于大量复制和感染。到感染晚期,又利用宿主 NF- κ B 基因的激活促进病毒包装基因的表达,加速病毒包装。蜚丝病毒(*Microplitis demolitor* bracovirus, MdBV)能编码类 I- κ B 蛋白抑制结合 *Relish* 蛋白,从而抑制 drosomycin、cecropin 等抗菌肽表达^[24]。由此推断,*PmRelish* 参与了 WSSV 免疫防御反应。

为进一步探索病毒成分对 *PmRelish* 基因表达模式的影响,分别利用 dsRNA 和 ssRNA 类似物进行刺激表达。结果表明,病毒核苷类似物能比全病毒更快更显著地诱导 *PmRelish* 的表达,并且两种核苷酸对 *PmRelish* 基因的诱导程度不同,poly(I C)较 R484 更能刺激 *Relish* 的上调表达。Poly(I C)在哺乳动物中被作为干扰素的诱生剂,被 Toll 样受体 3 识别并激活 NF- κ B 活性,诱导干扰素、抗炎症因子产生^[25-26]。咪唑喹啉类药物 R-848 则作为 TLR7/8 的促进剂(agonist),激活 NF- κ B 活性^[27-28]。本实验结果揭示,对虾中可能存在识别 poly(I:C)、R484 等病毒核苷酸的模式识别受体,并直接或间接通过 *Relish* 基因建立信号

传递途径。

综上所述, 斑节对虾 *Relish* 基因在抵御微生物侵染等天然免疫反应中发挥着重要的作用, 尤其是其与病毒核酸成分的相互关系, 值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 225–260.
- [2] Dixit V, Mak T W. NF- κ B signaling: Many roads lead to Madrid [J]. *Cell*, 2002, 111: 615–619.
- [3] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling [J]. *Cell*, 2008, 132: 344–362.
- [4] Manfrulli P, Reichhart J M, Steward R, et al. A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF [J]. *EMBO J*, 1999, 18: 3380–3391.
- [5] Meng X, Khanuja B S, Ip Y T. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor [J]. *Genes Dev*, 1999, 13: 792–797.
- [6] Rutschmann S, Jung A C, Zhou R, et al. Role of *Drosophila* IKK in a toll-independent antibacterial immune response [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1: 342–347.
- [7] Montagnani C, Kappler C, Reichhart J M, et al. Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *FEBS Lett*, 2004, 561: 75–82.
- [8] Jiang Y S, Wu X Z. Characterization of a Rel/NF- κ B homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor subtexa* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31: 121–131.
- [9] Wu X, Xiong X H, Xie L P, et al. Pf-Rel, a Rel/Nuclear factor- κ B homolog identified from the pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007, 39(7): 533–539.
- [10] Li F, Wang L, Zhang H, et al. Molecular cloning and expression of a Relish gene in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Int J Immunogenet*, 2010, 37(6): 499–508.
- [11] Tanaka H, Matsuki H, Furukawa S, et al. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1769: 559–568.
- [12] Huang X D, Yin Z X, Liao J X, et al. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2009, 27(2): 230–238.
- [13] 孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2006, 3(26): 17–20.
- [14] 刘先军, 杨丽诗, 黄建华, 等. 斑节对虾 C1q 结合蛋白 (PmC1qBP) 的克隆及表达特征分析 [J]. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 774–781.
- [15] Fan Z H, Wang X W, Lu J, et al. Elucidating the function of an ancient NF- κ B p100 homologue, CrRelish, in anti-bacterial defense [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(2): 664–670.
- [16] Shin S W, Kokoza V, Ahmed A, et al. Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF- κ B transcription factor Relish from the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 9978–9983.
- [17] Sagisaka A, Tanaka H, Furukawa S, et al. Characterization of a homologue of the Rel/NF- κ B transcription factor from a beetle, *Allomyrina dichotoma* [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2004, 1678: 85–93.
- [18] Li F, Yan H, Wang D, et al. Identification of a novel relish homolog in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and its function in regulating the transcription of antimicrobial peptides [J]. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(10): 1093–1101.
- [19] Ganesan S, Aggarwal K, Paquette N, et al. NF- κ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster* [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 349: 25–60.
- [20] Matova N, Anderson K V. Rel/NF- κ B double mutants reveal that cellular immunity is central to *Drosophila* host defense [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(44): 16424–16429.
- [21] Tanaka H, Yamamoto M, Moriyama Y, et al. A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1730(1): 10–21.
- [22] De Gregorio E, Spellman P T, Tzou P, et al. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila* [J]. *EMBO J*, 2002, 21(11): 2568–2579.
- [23] Choe K M, Werner T, Stöven S, et al. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila* [J]. *Science*, 2002, 296(5566): 359–362.
- [24] Thoetkiattikul H, Beck M H, Strand M R. Inhibitor κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(32): 11426–11431.
- [25] Botos I, Liu L, Wang Y, et al. The toll-like receptor 3: dsRNA signaling complex [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789(9–10): 667–674.
- [26] Amarante M K, Watanabe M. A toll-like receptor 3: involvement with exogenous and endogenous RNA [J]. *Int Rev*

- Immunol, 2010, 29(6): 557–73.
- [27] Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity [J]. Immunol Rev, 2007, 220: 214–224.
- [28] Nian H, Geng W Q, Cui H L, et al. R-848 triggers the expression of TLR7/8 and suppresses HIV replication in monocytes [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 5.

Cloning and mRNA expression analysis of *Relish* gene in *Penaeus monodon* following immune stimulation

LIU Wenjing^{1,2}, YANG Lishi¹, LI Xiaolan^{1,3}, QIU Lihua¹, SU Tianfeng¹, YANG Qibin¹, JIANG Shigui¹

1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, P.R. China, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Relish is an important member of the Rel/NF- κ B family. We cloned a *Relish* homologue, *Pmrelish*, from the hepatopancreas transcriptome library of *Penaeus monodon*. The full-length cDNA of *Pmrelish* was 5 112 bp with an open reading frame of 3 561 bp that encodes 1 186 amino acids. PmRelish protein exhibits the typical architecture of Rel/NF- κ B family members, including a conserved N-terminal Rel homology domain (RHD), a nucleus localization signal, six C-terminal ankyrin repeats, and a death domain, suggesting that it belongs to the class I NF- κ B. *PmRelish* mRNA was constitutively expressed in all detected tissues, with the highest expression in the hemocytes. Using real time PCR, we analyzed the mRNA expression profile of *PmRelish* following challenge with a variety of stimuli. The results show that *PmRelish* was induced in the hepatopancreas. PmRelish was regulated by *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus*, and WSSV, and significantly up-regulated by *Vibrio vulnificus*. In addition, we confirmed that viral nucleic acid analogue poly(I:C) and R484 activate the expression of *PmRelish*. In conclusion, our results suggest the *Relish* gene plays an important role in the immunity of tiger shrimp, and is directly or indirectly involved in the immune response against bacteria and viruses.

Key words: *Penaeus monodon*; *Relish*; bacteria; WSSV; poly(I:C); R484; expression

Corresponding author: JIANG Shigui. E-mail: jiangsg@21cn.com