

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19081

大弹涂鱼 *TLR* 基因分子进化研究及其在鳃弧菌胁迫后的表达分析

周建波¹, 孟繁星², 黎明², 王日昕², 石戈¹

1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘要: 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)是一种生活在潮间带的淤泥滩和红树林等两栖环境中的鱼类, 其免疫系统面临比水生生活更大的选择压力。Toll 样受体基因(简称 *TLR*)是重要的先天免疫成员, 一直是鱼类分子免疫学的研究热点之一。为了探究大弹涂鱼 *TLR* 基因是否因为其独特的生活环境而产生适应性进化以及其 *TLR* 基因在受到细菌攻击后的免疫应答模式, 本研究从大弹涂鱼皮肤转录组中获得了 *TLR5*, *TLR8* 和 *TLR9* 完整序列以及 *TLR3* 和 *TLR7* 部分序列, 采用分子生物信息学对大弹涂鱼 *TLR5*, *TLR8* 和 *TLR9* 基因序列以及氨基酸序列进行了分析, 并根据所构建的系统发育树对 5 个 *TLR* 基因进行了分子进化分析, 采用荧光定量 PCR 方法对大弹涂鱼 5 个 *TLR* 基因的组织表达分布和鳃弧菌攻击后 5 个 *TLR* 基因的免疫应答模式开展了研究。结果显示, *TLR5* 基因全长 3071 bp, 包括长度为 2646 bp 的编码区, 共编码 882 个氨基酸; *TLR8* 基因全长 3175 bp, 包括长度为 3033 bp 的编码区, 共编码 1011 个氨基酸; *TLR9* 基因全长 3398 bp, 编码区长度为 3093 bp, 共编码 1031 个氨基酸。大弹涂鱼 3 个 *TLR* 基因与其他物种的 *TLR* 基因结构相似, 具有高度保守性。位点模型结果表明, 鱼类 *TLR3*, *TLR5* 和 *TLR8* 是高度保守的, 而 *TLR7* 和 *TLR9* 在长期进化过程中产生了适应性进化; 而进化枝-位点模型结果表明, 为了适应更加复杂多变的两栖环境, 大弹涂鱼 *TLR9* 基因可能产生了适应性进化。大弹涂鱼 5 个 *TLR* 基因在 8 个健康组织(肠, 眼, 肾, 肝, 脑, 肌肉, 脾和皮肤)中均有表达, 在肝脏和脾脏中的表达量较高。在受到鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)攻击后的免疫表达模式表明了大弹涂鱼 5 个 *TLR* 基因在应对细菌入侵时起到了重要作用。

关键词: 大弹涂鱼; Toll 样受体基因; 序列分析; 分子进化分析; 鳃弧菌; 基因表达

中图分类号: S92

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)06-1049-15

水生环境中存在着各种各样的微生物, 使得鱼类总是受到病原体的威胁。据统计, 海洋中寄生虫, 真菌和细菌的数量可以达到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL^[1-2], 病毒数量可达 $3 \times 10^6 \sim 10^8$ CFU/mL^[3-4]。先天免疫系统是保护鱼类免受水生环境中病原微生物侵害的第一道屏障^[5-6]。在复杂的演变过程中, 鱼类也建立了较为完善的免疫防御系统。鱼类在进化的过程中产生了许多新基因, 研究发现鱼类的免疫防御反应与其他脊椎动物的基因显著不同^[7-9]。由于先天免疫对细菌入侵的快速反应和对细菌的广泛识别, 其正在吸引越来越多的关注和研究^[10-11]。例如, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)C6 基因在对抗

细菌入侵时起到重要作用^[12], 并且在高密度养殖胁迫下也发挥了重要作用^[13]。

Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)基因主要存在于细胞膜上, 是病原体相关分子模式(PAMPs)重要的识别受体。鱼类 *TLR* 家族包括 6 个亚家族, 共有 27 个 *TLR* 基因, 并且还有更多的 *TLR* 基因正被逐渐发现, 远远超过哺乳动物(13 个 *TLR* 基因)^[14]。TLR 分子是一种重要的模式识别受体(PRR), 可识别并结合肽聚糖、脂蛋白、脂多糖、单链 RNA 和鞭毛蛋白等 PAMPs, 进而启动细胞内信号^[15-16]。研究表明, *TLR* 基因家族分子在进化上是保守的^[17-18], 然而, 鱼是较低等的脊椎动物,

收稿日期: 2019-04-02; 修订日期: 2019-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31472279).

作者简介: 周建波(1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫基因的克隆及分子进化研究. E-mail: 852508538@qq.com

通信作者: 石戈, 硕士生导师, 教授, 研究方向为海洋生物化学与分子生物学. E-mail: sg2610105@126.com

它们的 *TLR* 基因家族介导的分子识别和激活过程与哺乳动物有一定的差异^[19]。在本研究中,我们研究了大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)的 5 个 *TLR* 基因(*TLR3*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR8* 和 *TLR9*),这 5 个基因均可识别革兰氏阴性菌^[19]。鱼类 *TLR3* 分子在先天免疫中起着至关重要的作用,可以识别革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和 Poly I: C^[20-21],根据目前的报道,*TLR3* 基因在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[22]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[23]和大黄鱼^[24]等鱼中的肝脏、脾脏和头肾中均有表达。鱼类 *TLR5* 分为膜结合型 *TLR5(TLR5M)* 和分泌型 *TLR5(TLR5S)* 两种,*TLR5M* 在条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)^[25]、花盖红点鲑(*Salvelinus malma*)^[26]和斑马鱼^[27]等鱼中均有表达;*TLR5S* 是鱼类独有的,仅在鳊鱼(*Miichthys miui*)等少数鱼类中发现^[28]。鱼类 *TLR7*, *TLR8* 和 *TLR9* 属于 *TLR7* 亚家族,研究发现它们能够识别革兰氏阳性细菌^[29],革兰氏阴性细菌^[30]和病毒^[31]。PolyI: C 感染大黄鱼后,其头肾和脾脏中 *TLR7* 和 *TLR8* 的表达量增加应对病原体的入侵^[32]。另外对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)9 个 *TLR* 基因的研究表明 *TLR* 基因在应对嗜水气单胞菌感染中起到了重要的作用^[33]。

大弹涂鱼隶属于虾虎鱼目(Gobiiformes),虾虎鱼科(Gobiidae),大弹涂鱼属(*Boleophthalmus*)^[34],是一种生活在河口潮间带的淤泥滩和红树林等两栖环境中的鱼类。大弹涂鱼具有较高的营养价值,含有 8 种人体必需氨基酸^[35]。大弹涂鱼生活在充满着种类和数目众多致病微生物的两栖环境中,但它们很少感染严重的细菌性疾病,表明大弹涂鱼免疫系统受到的生存选择压力十分强大^[36]。由于其特殊的生存环境,使其成为研究鱼类进化较为合适的动物模型,You 等^[37]用它来研究了鱼的进化历程。鉴于 *TLR* 基因在外部细菌入侵中的重要作用,本研究筛选了 5 个能够识别鳃弧菌的 *TLR* 基因^[19],利用这 5 个 *TLR* 基因探讨大弹涂鱼 *TLR* 基因是否因为两栖环境影响产生适应性进化,并且研究了它们在受到鳃弧菌感染后的免疫应答模式,以期对鱼类先天免疫和 *TLR* 基因家族进化史的研究做出一定贡献。

1 材料与方法

1.1 *TLR5*、*TLR8* 和 *TLR9* 序列分析

从实验室大弹涂鱼皮肤转录组中筛选到 *TLR5*、*TLR8* 和 *TLR9* 基因的完整序列^[38],利用 DNAMAN 将 3 个 *TLR* 基因翻译成氨基酸序列;根据所翻译的氨基酸序列在 Simple Modular Architecture Reach Tool (SMART)(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测 *TLR5*、*TLR8* 和 *TLR9* 氨基酸序列结构域;利用 EXPASY(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 *TLR3* 的分子量以及理论 pI 值;通过 MatGAT2.01^[39]分析 3 个 *TLR* 基因与其他物种氨基酸的相似性和一致性,本文所有其他物种的氨基酸序列在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)中检索获取,利用 MEGA 5.1^[40]进行序列比对以及构建氨基酸 NJ 系统发育树。

1.2 构建系统发育树和分子进化分析

利用 MrBayes^[41]构建系统发育树,然后通过 PAML^[42]软件包进行分子进化分析,探索鱼类 *TLR* 基因的进化过程。PAML 有三大分析模型,分别为:位点模型,进化枝模型和进化枝-位点模型。非同义核苷酸取代率(dN)与同义核苷酸(dS)的取代率之比(dN/dS,称为 ω 值)是判断的标准。如果 $\omega > 1$,则认为该基因处于正选择状态;如果 $\omega < 1$,则认为该基因处于负选择状态;如果 $\omega = 1$,该基因被认为处于中性进化状态^[42]。首先,位点模型包括三对子模型,即 M0 和 M3, M1a 和 M2a, M7 和 M8。第一对(M0-M3)用于检测位点(密码子)之间是否存在进化异质性,另外两对(M1a-M2a 和 M7-M8)用于检测 *TLR* 基因中的正选择位点。然后使用贝叶斯(BEB)方法估计每个位点的后验概率(PP)值与相应的 ω 值,只有 PP>0.95 的位点被认为具有显著性。其次,进化枝-位点模型用于检测某些进化枝中是否存在正选择位点。进化枝-位点模型包含一对嵌套模型,即进化枝-位点模型及其相对应的零假设模型。

1.3 细菌感染实验与取样

大弹涂鱼捕捉自浙江三门沿岸滩涂,在实验室中暂养两周。随机挑选健康且体表无损伤的实验鱼 180 尾,置于 6 个 65 L 的缸中,每缸 30 尾。

经过查阅文献^[43]并进行预实验确定注射的鳃弧菌浓度为 1×10^7 CFU/mL。注射实验包括两个组: 对照组和鳃弧菌感染组, 两组分别腹腔注射 200 μ L 的 0.9%生理盐水和浓度为 1×10^7 CFU/mL 的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的菌液。在实验后 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h, 从每缸随机挑选 3 条鱼, 用 MS-222 麻醉并在冰上处死, 解剖获得肝脏与脾脏, 另外, 在暂养缸中选取健康大弹涂鱼, 取肝、脾、肾、肠、脑、皮肤和肌肉组织。所取样品液氮冷冻, 并保存于 -80°C 直至 RNA 提取完成。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成

将冷冻样品用匀浆器(IKA, GER)匀浆, 然后使用 RNAiso Reagent 试剂盒(Takara, 日本)按照说明书提取总 RNA 并溶解在 DEPC 处理过的水中。随后使用 NanoDrop 2000 分光光度计(NanoDrop Technologies, USA)测量所提取的 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度来确定分离的 RNA 的浓度, 并且使用 1%琼脂糖凝胶电泳来检查其完整性。使用具有 gDNA Eraser (Transgen, 中国)的 PrimeScript^{RT} 试剂盒, 按照制造商的说明, 以 1 μ g 总 RNA 作为模板合成单链 cDNA。所有反应

均一式两份进行, 然后将所合成的 cDNA 放在 -20°C 中保存。

1.5 实时荧光定量 PCR

从实验室大弹涂鱼皮肤转录组^[38]中筛选得到 *TLR5*、*TLR8* 和 *TLR9* 基因的完整序列, 以及 *TLR3*(编码区 2445 bp)和 *TLR7*(编码区 1992 bp)的部分序列, 与公共数据库所获得的 *TLR3*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR8* 和 *TLR9* 基因进行比对, 重合部分完全一致。利用所筛选的 5 个 TLR 基因设计验证引物并进行扩增, 产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 经过比对之后发现与获得序列完全一致, 根据验证后的序列设计荧光定量 PCR 引物, 本研究中使用的引物由 Primer Premier 6^[44]设计(表 1)。利用 TaqTM DNA 聚合酶(Transgen, 中国)在荧光定量 PCR 仪(Eppendorf, 德国)进行实时荧光定量 PCR(qPCR)反应(20 μ L)。实时荧光定量 PCR 反应体系: 10 μ L GoTaqTMqPCR Master 预混液, 0.4 μ L 的 cDNA, 0.4 μ L 上游引物, 0.4 μ L 下游引物, 和 8.8 μ L 的 ddH₂O。荧光定量 PCR 程序如下: 95°C 5 min, 95°C 20 s, 60°C 25 s, 72°C 25 s。用 *β -actin* 基因作为参考基因, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法^[44]计算基因的相对表达。

表 1 本实验所用的引物
Tab.1 PCR primers used in the study

引物名称 primer name	正向引物(5'-3') forward primer	反向引物(3'-5') reverse primer	用途 usage
<i>TLR3</i> -1	GATTCTGAAGACTGGTGACT	ATGACAATGGTGCTGCTTAAG	验证 verification
<i>TLR3</i> -2	ACGCCACTATCCTACTTCAAC	CCAGAGCAATAAGCAGGTTC	验证 verification
<i>TLR5</i> -1	CCTGTCTTGCCATCCTACAC	CACCTAACTGCTCCAATCTA	验证 verification
<i>TLR5</i> -2	CAGATACCACAGAACAATAGC	CAGATAGCGTCACGGATGTTG	验证 verification
<i>TLR7</i> -1	GTTCCACAGCCTTGGATAA	ACTGTGCCAGATGTGCTGTC	验证 verification
<i>TLR7</i> -2	CTGCGTCTCCATAGCAACTC	CTAACCTCTCCAGCGATTACAC	验证 verification
<i>TLR8</i> -1	TGCTCCGTATTCTTGTTTC	ATTGTGGCTGATGATTAGGTG	验证 verification
<i>TLR8</i> -2	TGCGCATTACTTTGAAGCAG	ATATGGGTCTGTGGCGTCAT	验证 verification
<i>TLR9</i> -1	ACCATGCTTTCCTTGTCAG	GCAAACAGCATTCTCCATCC	验证 verification
<i>TLR9</i> -2	AATTATTTCCAGCCCCATTC	CAGAACAGACCTCCTGCACA	验证 verification
<i>TLR3</i>	GCCACATGAGCCTCAGTGAGATTC	TGATGGTCGATCCGCACTAGCC	qRT-PCR
<i>TLR5</i>	GCGGTGCCTGTCTTGCCATC	ACTGTGCCAGGTCCTGTAGTGAG	qRT-PCR
<i>TLR7</i>	GGCAACAGCAGCGAGGTGAC	GGTTGGTGGTCTCTTGTTGGTATG	qRT-PCR
<i>TLR8</i>	ACAGCTCTCTGCACTCACCT	CCTGGAAACCAATCCCGCTC	qRT-PCR
<i>TLR9</i>	CAGAACAGACCTCCTGCACAGTC	GTACTAGTGCTGCTGGACGACATG	qRT-PCR
<i>β-actin</i>	GAGCGTGGCTACTCTTTCA	GGAGGCAGCAGTGTTTCAT	qRT-PCR

1.6 统计分析

使用 SPSS Statistics 19 软件进行 qPCR 数据分析。所有数据均表示为平均值±标准差。进行方差分析(ANOVA), 然后进行多重比较, 以比较各处理之间的显著差异。利用独立样本 *T* 检验分析每个时间点对照组和鳃弧菌感染组之间的相对表达量的差异, 通过单因素方差分析法分析对照组或者鳃弧菌感染组内所有时间点之间的差异。

2 结果与分析

2.1 *TLR5*, *TLR8* 和 *TLR9* 序列分析

大弹涂鱼 *TLR5* 基因全长 3071 bp, 包括长度为 2646 bp 的编码区, 235 bp 的 5'-非编码区和 190 bp 的 3'-非编码区, 共编码 882 个氨基酸, 其分子量为 100.2 kD, 理论 pI 为 5.33。大弹涂鱼 *TLR5* 包括一个低复杂度区域, 10 个 LRR 结构域, 2 个 LRR_TYP 结构域, 一个 LRR_CT 结构域, 一个跨膜结构域和一个 TIR 结构域(图 1)。大弹涂鱼 *TLR8* 基因全长 3175 bp, 包括长度为 3033 bp 的编码区, 80 bp 的 5'-非编码区和 62 bp 的 3'-非编码区, 共编码 1011 个氨基酸, 其分子量为 117.2 kD, 理论 pI 值为 6.91。其 *TLR8* 包括 12 个 LRR 结构域, 一个 LRR_TYP 结构域, 一个 LRR_CT 结构域, 一个跨膜结构域和一个 TIR 结构域(图 1)。大弹涂鱼 *TLR9* 基因全长 3398 bp, 包括长度为 3093 bp 的编码区, 64 bp 的 5'-非编码区和 241 bp 的 3'-非编码区, 共编码 1031 个氨基酸, 其分子量和理论 pI 值分别为 118.2 kD 和 7.50。大弹涂鱼 *TLR9* 包括 13 个 LRR 结构域, 2 个 LRR_TYP 结构域, 一个 LRR_CT 结构域, 一个跨膜结构域和一个 TIR 结构域(图 1)。大弹涂鱼 *TLR5* 氨基酸序列与革首南极鱼的相似性和一致性最高, 其 *TLR8* 氨基酸序列与鲢鱼、金鲳鱼的相似性和一致性较高, 而 *TLR9* 氨基酸序列与大黄鱼、鲢鱼的相似性和一致性较高(表 2)。NJ 树结果表明鱼类的 3 个 TLR 先各聚为一枝, 再与哺乳动物聚在一起, 3 个大弹涂鱼 TLR 都位于鱼类 TLR 分枝上, 并且与鲈形目鱼类进化距离最近(图 2)。

2.2 系统发育树

为了探索 5 个 *TLR* 基因的系统发育关系, 从

公共数据库中获取大弹涂鱼 *TLR3* 基因(XM_020931412.1)和 *TLR7* 基因(XM_020939129.1)与已获取的 *TLR5*、*TLR8*、*TLR9* 一起构建系统发育树, 另外从公共数据库中获取 59 个 *TLR* 基因, 包括 32 个鱼类 *TLR* 基因和 27 个非鱼类 *TLR* 基因, 其中三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)*TLR3* 和日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)*TLR3* 作为外群, 利用贝叶斯方法将 5 个大弹涂鱼 *TLR* 基因与 59 个 *TLR* 基因一起构建系统发育树。*TLR3*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR8* 和 *TLR9* 基因与它们的直系同源基因分别聚在一起, 形成 5 个大组, 即 5 个 *TLR* 基因组, 每个 *TLR* 基因组中鱼类 *TLR* 基因先聚在一起, 然后再与非鱼类的 *TLR* 基因聚在一起。根据进化树可知 *TLR7* 组首先与 *TLR8* 组聚在一起, 然后分别与 *TLR9* 组和 *TLR5* 组聚在一起, 最后与 *TLR3* 组聚在一起(图 3)。

2.3 分子进化分析

利用 5 个大弹涂鱼 *TLR* 基因与其他物种相应的 *TLR* 基因分别构建进化树, 在 PAML 中利用位点模型分析。结果表明, 在鱼类 *TLR3*, *TLR5* 和 *TLR8* 基因中没有发现进化位点; 在鱼类 *TLR7* 基因中检测到两个正选择位点(647Q, 691S); 在鱼类 *TLR9* 基因中检测到一个正选择位点(516A)(表 3)。

此外, 利用进化枝-位点模型来研究大弹涂鱼的 5 个 *TLR* 基因, 结果显示, 大弹涂鱼 *TLR3* 和 *TLR8* 基因没有发现正选择的位点; 而鱼类 *TLR5* 的共同祖先枝上存在两个进化位点(109D, 267K), 在非鱼类的祖先枝上存在一个位点(260S); 在 *TLR7* 的非鱼类祖先枝上也检测到了一个位点(15W); 最后, 在大弹涂鱼的 *TLR9* 中发现了 3 个正选择位点(76P, 596A 和 603E), 并且在鱼类 *TLR9* 的祖先枝中也检测到三个进化位点(107S, 293S, 471S)(表 4)。

2.4 健康组织中 5 种 *TLR* 基因的表达量

取健康大弹涂鱼的肠、眼、肾、肝脏、脑、肌肉、脾脏和皮肤进行定量检测, 结果表明, 5 个 *TLR* 基因在所有检测的健康组织中均有表达。5 个 *TLR* 基因在肝脏和脾脏中都具有较高的表达水平, 特别是 *TLR3*, *TLR5* 和 *TLR7*。另外, 皮肤中

表 2 大弹涂鱼 3 个 TLR 氨基酸与其他物种相应的 TLR 氨基酸序列相似性和一致性
Tab. 2 Similarities and identities of 3 TLR amino acid sequences between *Boleophthalmus pectinirostris* and other species

基因 gene	物种 species	拉丁名 scientific name	相似性/% similarity	一致性/% identity
TLR5	大弹涂鱼	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	—	—
	大西洋鲑	<i>Salmo salar</i>	69.2	49.2
	花羔红点鲑	<i>Salvelinus malma</i>	69.5	49.4
	鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	63.5	41.0
	鲫	<i>Carassius auratus</i>	63.2	42.5
	大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	71.2	54.2
	革首南极鱼	<i>Notothenia coriiceps</i>	73.9	55.3
	智人	<i>Homo sapiens</i>	61.1	40.3
	倭黑猩猩	<i>Pan paniscus</i>	61.2	40.4
	大弹涂鱼	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	—	—
TLR8	大西洋鲑	<i>Salmo salar</i>	69.9	51.4
	北极红点鲑	<i>Salvelinus alpinus</i>	70.1	51.4
	鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	67.9	47.3
	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	52.0	32.7
	金鲷鱼	<i>Trachinotus ovatus</i>	72.9	58.8
	鳊	<i>Miichthys miiuy</i>	73.3	57.7
	智人	<i>Homo sapiens</i>	58.9	40.5
	倭黑猩猩	<i>Pan paniscus</i>	60.0	41.1
	大弹涂鱼	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	—	—
	大西洋鲑	<i>Salmo salar</i>	69.2	49.2
TLR9	花羔红点鲑	<i>Salvelinus malma</i>	69.5	49.4
	鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	63.5	41.0
	鲫	<i>Carassius auratus</i>	63.2	42.5
	大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	71.2	54.2
	革首南极鱼	<i>Notothenia coriiceps</i>	73.9	55.3
	智人	<i>Homo sapiens</i>	61.1	40.3
	倭黑猩猩	<i>Pan paniscus</i>	61.2	36.4

TLR9 的表达量, 肠中 TLR8 的表达量都相对较高(图 4)。

2.5 5 个 TLR 基因在感染细菌后的免疫应答模式

根据组织差异表达结果可知 5 个 TLR 基因在肝脏和脾脏的表达量相对较高, 所以检测了 5 个 TLR 基因在感染细菌后肝脏和脾脏中的免疫应答模式。在肝脏中, 5 个 TLR 基因在对照组中均无显著性差异($P>0.05$); 当鳃弧菌感染后, TLR3 表达量在 36 h 显著增加并达到最高峰, 一直到 72 h 都显著高于对照组。其他四个 TLR 基因, 都在 6 h 的表达量显著增加, 但是 TLR5 一直到 24 h 都维持在一个较高水平, 随后降至正常水平; TLR7 分别在 6 h 和 24 h 显著高于对照组; TLR8 和 TLR9 都在 12 小时后下降, 但是 TLR8 降至正常水平, 而 TLR9 显著降低至正常水平以下(图 5)。在脾脏中, 5 个 TLR 基因在对照组中的表达水平也没有显

著变化($P>0.05$); 在感染组, TLR5 在 6 h 和 12 h 显著上升, 然后在 24 h 后降低, 在 36 h 后再次增加并维持在高水平; TLR3 与 TLR5 表达趋势相似, 但是波动的幅度小得多。TLR7 在 24 h 时显著上升, 到 36 h 时到达顶峰, 随后略有下降。TLR8 和 TLR9 仅在 36 h 显著升高, 并且迅速降低至较低水平(图 6)。

3 讨论

3.1 TLR5, TLR8 和 TLR9 序列分析

研究表明, 大部分 TLR 基因结构包含 3 个部分: LRR 结构域, 跨膜结构域和 TIR 结构域^[46-47]。LRR 结构域的数量决定了 TLR 基因的特异性^[48], LRR 结构域是识别病原体组分的关键结构^[49]。TIR 具有高度保守性, 它的作用是激活下游信号通路^[50], 产生的信号随后进行一系列反应产生炎症因子^[51-53], 进而消灭入侵的病原体。本研究从

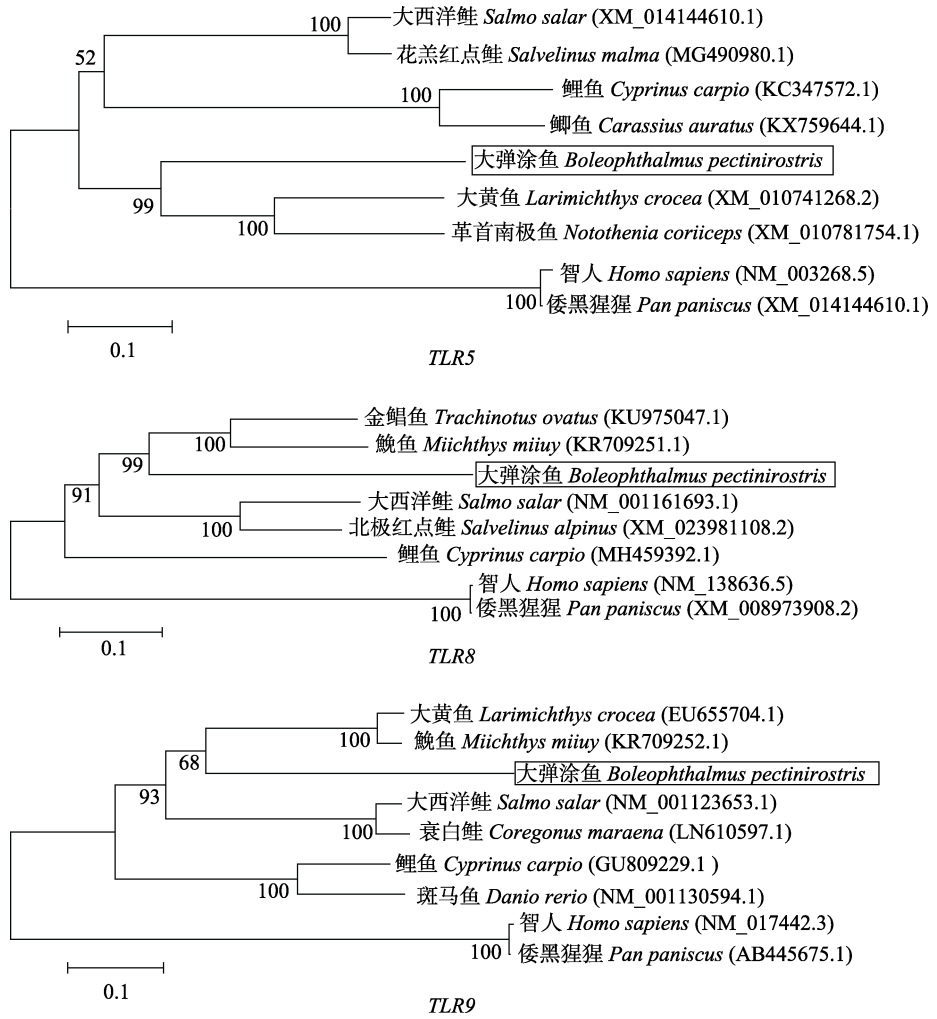


图 2 基于 TLR5, TLR8 和 TLR9 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of TLR5, TLR8 and TLR9 amino acid sequences

大弹涂鱼皮肤组织转录组中获得了大弹涂鱼 *TLR5*, *TLR8* 和 *TLR9* 基因的 cDNA 序列, 并进行序列验证。大弹涂鱼 3 个 *TLR* 基因具有不同数量的 LRR 结构域, 而 LRR_CT、跨膜区和 TIR 结构域数量相同, 其结构也与黄颡鱼等鱼类中的 *TLR5*、*TLR8* 和 *TLR9* 相似^[33]。氨基酸序列比对以及 NJ 系统发生树表明大弹涂鱼 3 个 *TLR* 基因与其他物种相应的氨基酸序列具有较高的相似性, 因此可以推测, 大弹涂鱼 3 个 *TLR* 基因是相对保守的, 这与 *TLR* 基因具有高度保守性的报道一致^[19]。

3.2 5 个 *TLR* 基因的系统发育树

鱼类存在同哺乳动物相对应的同源基因^[54], 在本研究中, 利用大弹涂鱼的 5 个 *TLR* 基因与其他脊椎动物的 *TLR3*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR8* 和 *TLR9*

基因构建系统发育树, 结果表明 *TLR7*、*TLR8* 和 *TLR9* 的直系同源基因先聚在一起, 然后分别与 *TLR5* 组和 *TLR3* 组聚合在一起, 该结果与脊椎动物 *TLR* 基因的进化分析一致^[14]。根据进化树可知, *TLR3* 是第一个与祖先枝分离的直系同源组, 它能够识别革兰氏阴性菌也可以识别相对较短的双链 RNA^[55]和 Poly I: C^[56]。接着 *TLR5* 组与其他组分开, *TLR5* 分子可识别细菌鞭毛, 细菌鞭毛由细菌鞭毛蛋白构成, 它是高度保守的, 几乎在所有移动的细菌中都存在^[57]。研究发现 *TLR5* 分子位于细胞表面^[19], 因此, *TLR5* 基因可能受到更多环境选择压力。最后, *TLR7* 亚家族与系统发育树分离, *TLR7* 亚家族基因主要识别革兰氏阳性及阴性菌, 位于细胞内环境中^[19], 因此, 由于细胞膜的

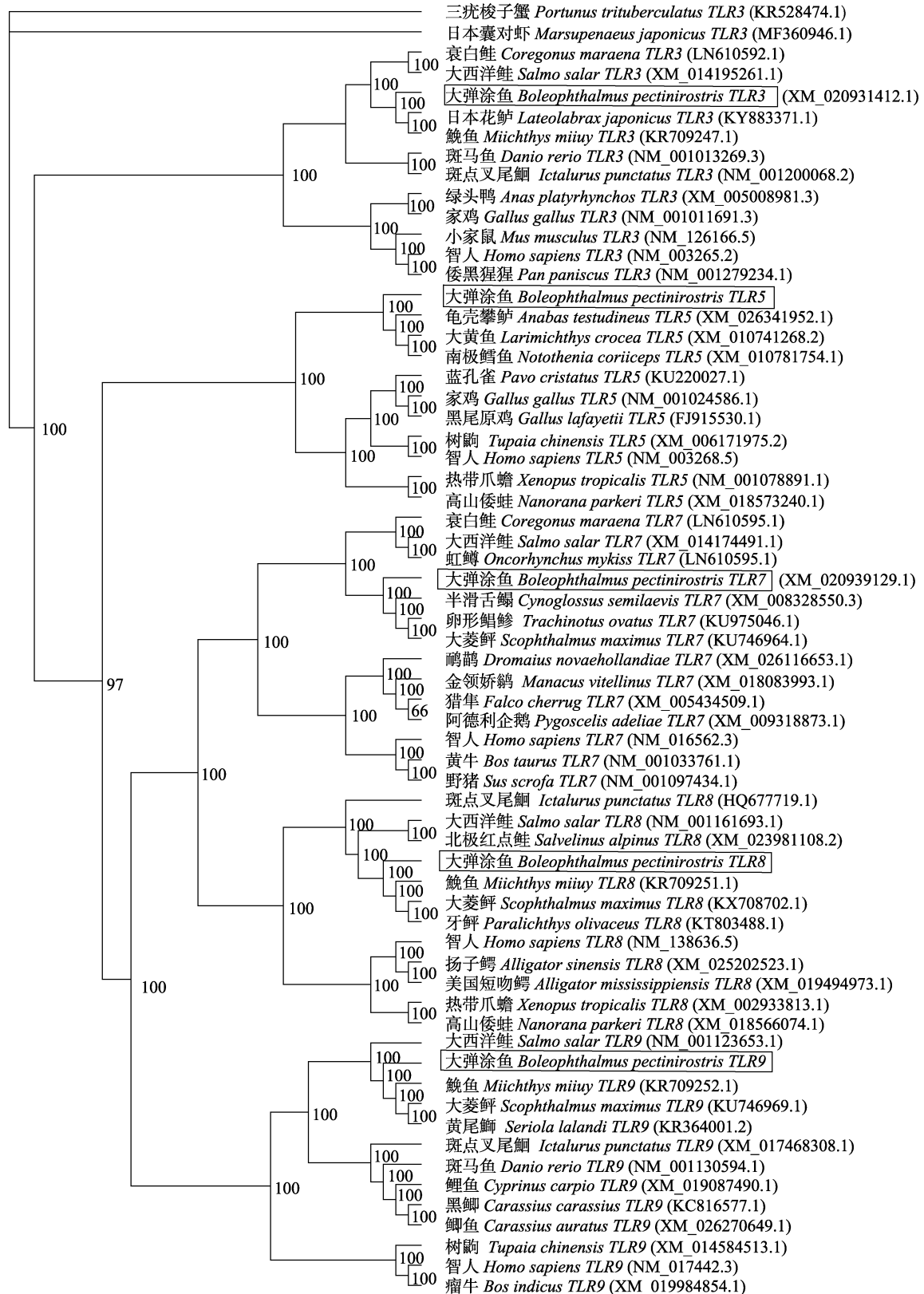


图 3 5 个脊椎动物 TLR 基因(TLR3, TLR5, TLR7, TLR8 和 TLR9)的系统发育树
 后验概率显示在线后。

Fig. 3 The reconstructed Bayesian phylogeny of 5 vertebrate TLR genes (TLR3, TLR5, TLR7, TLR8 and TLR9)
 The posterior probabilities were shown after the lines, respectively.

表 3 5 个 *TLR* 基因的位点模型结果
Tab. 3 The results of site models on the five *TLR* genes

模型 model	参数数目 np	−lnL	模型配对 model comparison	LRT	<i>P</i>	正选择位点 positive sites
<i>TLR3</i>						
M0	31	28528				
M1a	32	28003				
M2a	34	28003	M2a, M1a	0.0	1.0	未通过 not allowed
M3	35	27712	M3, M0	1633.430	0.0	无 none
M7	32	27709				
M8	34	27708	M8, M7	0.810	0.52	未通过 not allowed
<i>TLR5</i>						
M0	25	24439				
M1a	26	23981				
M2a	28	23981	M2a, M1a	0.0	1.0	未通过 not allowed
M3	29	23786	M3, M0	1304.901	0.0	无 none
M7	26	23788				
M8	28	23787	M8, M7	1.627	0.32	未通过 not allowed
<i>TLR7</i>						
M0	27	25865				
M1a	28	25295				
M2a	30	25295	M2a, M1a	0.0	1.0	未通过 not allowed
M3	31	25088	M3, M0	1553.093	0.0	无 none
M7	28	25086				
M8	30	25077	M8, M7	17.663	8.7E−5	647Q 691S
<i>TLR8</i>						
M0	23	28718				
M1a	24	27865				
M2a	26	27865	M2a, M1a	0.0	1.0	未通过 not allowed
M3	27	27678	M3, M0	2091.908	0.0	无 none
M7	24	27672				
M8	26	27671	M8, M7	1.639	0.32	未通过 not allowed
<i>TLR9</i>						
M0	33	25252				
M1a	34	25706				
M2a	36	25706	M2a, M1a	0.0	1.0	未通过 not allowed
M3	37	24455	M3, M0	1593.950	0.0	无 none
M7	34	24446				
M8	36	24437	M8, M7	18.219	6.6E−5	516A

保护作用, *TLR7* 亚家族受到的环境压力比 *TLR5* 亚家族小。

3.3 分子进化分析

位点模型结果发现, 在鱼类的 *TLR3*、*TLR5* 和 *TLR8* 中没有检测到进化位点, 这与之之前对鱼类 *TLR3* 和 *TLR5* 的结果一致^[26]。从这一现象可以看出, 在长期演化过程中, 环境变化并没有对大弹涂鱼的 *TLR3*、*TLR5* 和 *TLR8* 产生正选择压力。然而, 在 *TLR7* 中发现了两个进化位点(647Q,

691S), 在 *TLR9* 中发现了一个(516A)。647Q 位于 LRR(621~653)结构域中, 该结构域直接参与病原体的识别^[58], 因此该区域可能需要进化选择以获得更大的变异性, 进而适应不同的配体分子^[10]。鱼类生存环境的复杂性导致了 691S 氨基酸位点的产生, 该位点位于 *TLR7* 分子的 LRRcap (643~660)结构域, 516A 位于 *TLR9* 分子的 LyrTR (469~561)结构域, 这两个结构域的功能还不清楚, 需要进一步的研究来说明它们在鱼类中的详细功

表 4 5 个 *TLR* 基因的进化枝-位点模型结果
Tab. 4 The results branch-site models on the five *TLR* genes

模型 model	参数数目 np	-lnL	模型配对 model comparison	LRT	<i>P</i>	正选择位点 positive site
<i>TLR3</i>						
1. 零-大弹涂鱼 Null- <i>B. pectinirostris</i>	34	28002	1, 2	2.40	0.061	无 none
2. 备-大弹涂鱼 <i>B. pectinirostris</i>	33	28003				
3. 零-鱼类 Null-fish	34	27997	3, 4	6.73	0.0047	无 none
4. 备-鱼类 Fish	33	28001				
5. 零-非鱼类 Null-not fish	34	28003	5, 6	1.36	0.12	未通过 not allowed
6. 备-非鱼类 Not fish	33	28004				
<i>TLR5</i>						
1. 零-大弹涂鱼 Null- <i>B. pectinirostris</i>	28	23978	1, 2	2.56	0.055	无 none
2. 备-大弹涂鱼 <i>B. pectinirostris</i>	27	23979				
3. 零-鱼类 Null-fish	28	23981	3, 4	4.01	0.023	109D 267K
4. 备-鱼类 Fish	27	23979				
5. 零-非鱼类 Null-not fish	28	23975	5, 6	9.25	0.0012	260S
6. 备-非鱼类 Not fish	27	23979				
<i>TLR7</i>						
1. 零-大弹涂鱼 Null- <i>B. pectinirostris</i>	30	25289	1, 2	5.52	0.0091	无 none
2. 备-大弹涂鱼 <i>B. pectinirostris</i>	29	25292				
3. 零-鱼类 Null-fish	30	25289	3, 4	10.57	5.75E-4	15W
4. 备-鱼类 Fish	29	25294				
5. 零-非鱼类 Null-not fish	30	23981	5, 6	2628.36	0.0	无 none
6. 备-非鱼类 Not fish	29	25295				
<i>TLR8</i>						
1. 零-大弹涂鱼 Null- <i>B. pectinirostris</i>	26	27859	1, 2	7.38	0.0033	无 none
2. 备-大弹涂鱼 <i>B. pectinirostris</i>	25	27863				
3. 零-鱼类 Null-fish	26	27865	3, 4	1.75	0.93	无 none
4. 备-鱼类 Fish	25	27864				
5. 零-非鱼类 Null-not fish	26	27865	5, 6	1.8E-5	0.50	无 none
6. 备-非鱼类 Not fish	25	27865				
<i>TLR9</i>						
1. 零-大弹涂鱼 Null- <i>B. pectinirostris</i>	36	24678	1, 2	16.12	3.0E-5	76P 596A 603E
2. 备-大弹涂鱼 <i>B. pectinirostris</i>	35	24686				
3. 零-鱼类 Null-fish	36	24686	3, 4	11.89	2.82E-4	107S 293S 471S
4. 备-鱼类 Fish	35	24692				
5. 零-非鱼类 Null-not fish	36	24706	5, 6	0.0	1.0	未通过 not allowed
6. 备-非鱼类 Not fish	35	24706				

能。总的来说, 鱼类 *TLR7* 和 *TLR9* 基因为了适应复杂多变的环境已经产生了一定的适应性进化。

使用进化枝-位点模型检测, 我们发现 *TLR5* 在鱼类分枝中有两个进化位点(109D 和 267K), 在非鱼类分枝中有一个进化位点(260S), 这表明 *TLR5* 基因经历了两次正选择。第一次正选择发生在鱼类的共同祖先枝上, 这可能是与鱼类进化早期需要适应更加复杂多变的环境有关; 第二次正选择发生在鱼类之外的脊椎动物祖先枝上, 这

可能是由于从水生环境向陆生环境转变过程中的环境压力造成的。在鱼类 *TLR7* 祖先枝上发现了一个进化位点(15W), 说明 *TLR7* 在鱼类早期进化中经历了一次正选择, 这可能与鱼类向复杂多变的水生环境适应辐射有关。最后, 在鱼类 *TLR9* 分支中发现了 3 个进化位点(76P, 596A 和 603E), 在大弹涂鱼 *TLR9* 分枝中检测到了 3 个进化位点(107S, 293S 和 471S), 根据该结果可以推测大弹涂鱼 *TLR9* 可能经历了两次正选择。第一次正选

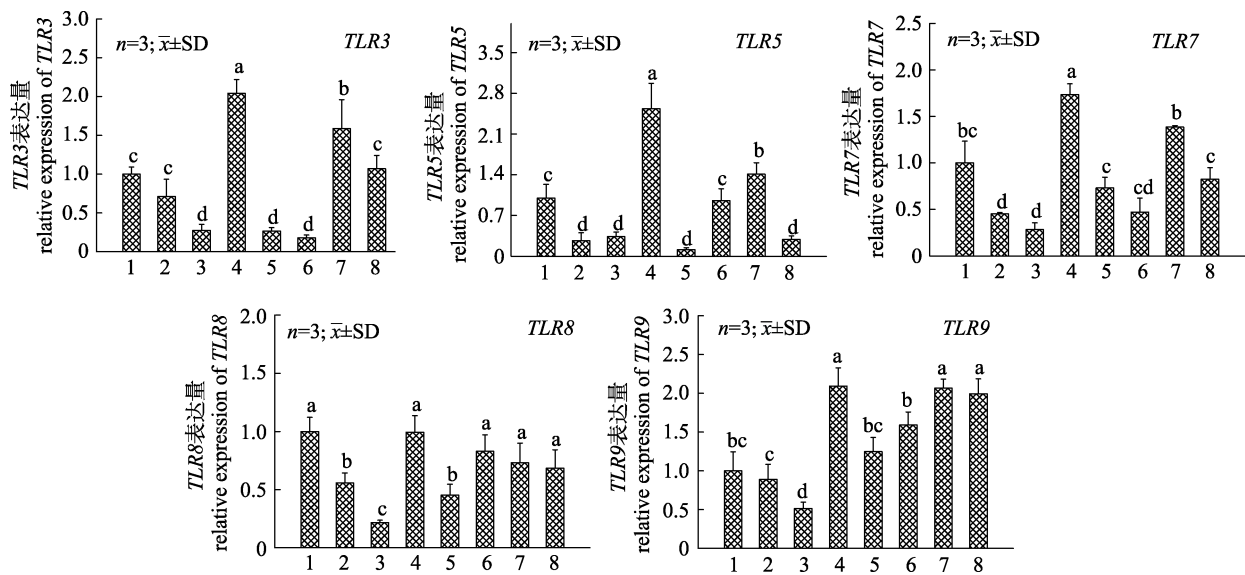


图 4 大弹涂鱼的 8 个组织(肠, 眼, 肾, 肝, 脑, 肌肉, 脾和皮肤)中 5 个 *TLR* 基因的表达水平
1. 肠道; 2. 眼; 3. 肾脏; 4. 肝脏; 5. 脑; 6. 肌肉; 7. 脾脏; 8. 皮肤
Fig. 4 The relative expression levels of 5 *TLR* genes in the 8 tissues
(intestinal, eye, kidney, liver, brain, muscle, spleen and skin) of *Boleophthalmus pectinirostris*
1. intestinal; 2. eye; 3. kidney; 4. liver; 5. brain; 6. muscle; 7. spleen; 8. skin

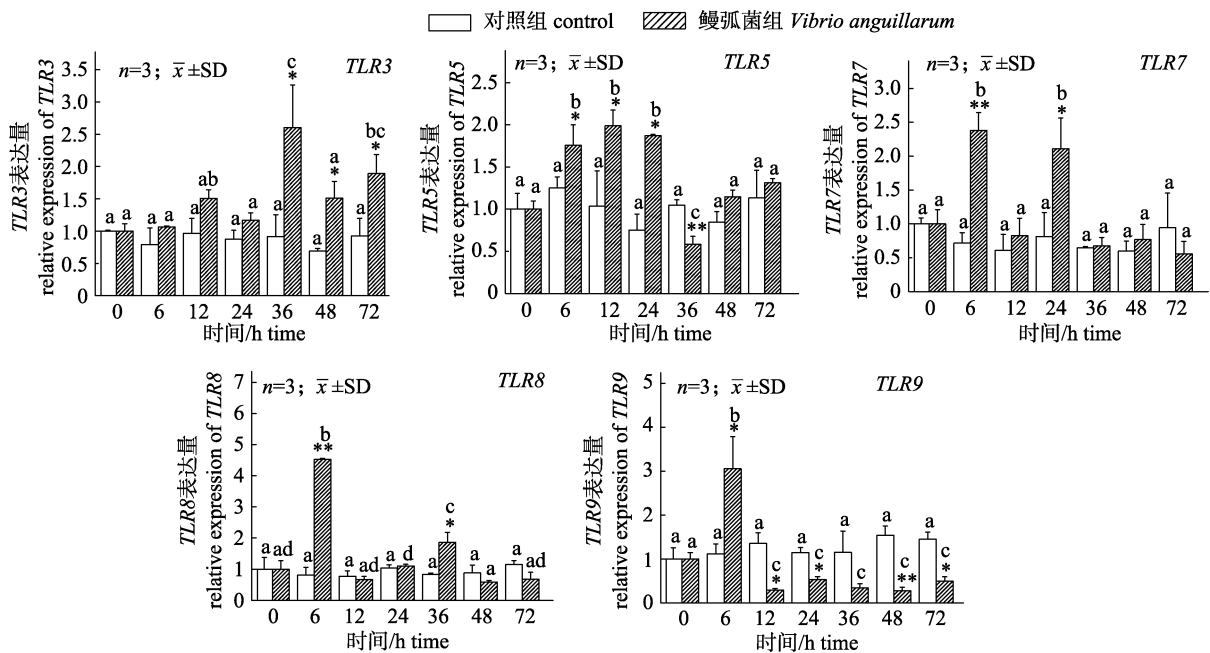


图 5 鳃弧菌感染后肝脏中 5 个 *TLR* 基因的表达水平
*代表对照组和实验组之间的显著性差异($P < 0.05$), **代表极显著差异($P < 0.01$). 不同时间点之间的差异用小写字母表示
Fig. 5 The relative expression levels of 5 *TLR* genes in liver after *Vibrio anguillarum* injection
* represented the significant difference ($P < 0.05$) between the control group and experimental group; ** represented the extremely significant difference ($P < 0.01$). The differences among different time points were shown by lowercase letters

择可能发生在鱼类的早期进化史, 而第二次可能是由于大弹涂鱼为了适应更复杂多变的两栖环境而产生了适应性进化^[37]。总而言之, 脊椎动物祖先, 鱼类祖先和大弹涂鱼都经历了正选择, 其中, 鱼类祖先经历了最强烈的正选择, 这可能与鱼类复杂的生存环境和进化史有关, 此外, 大弹涂鱼

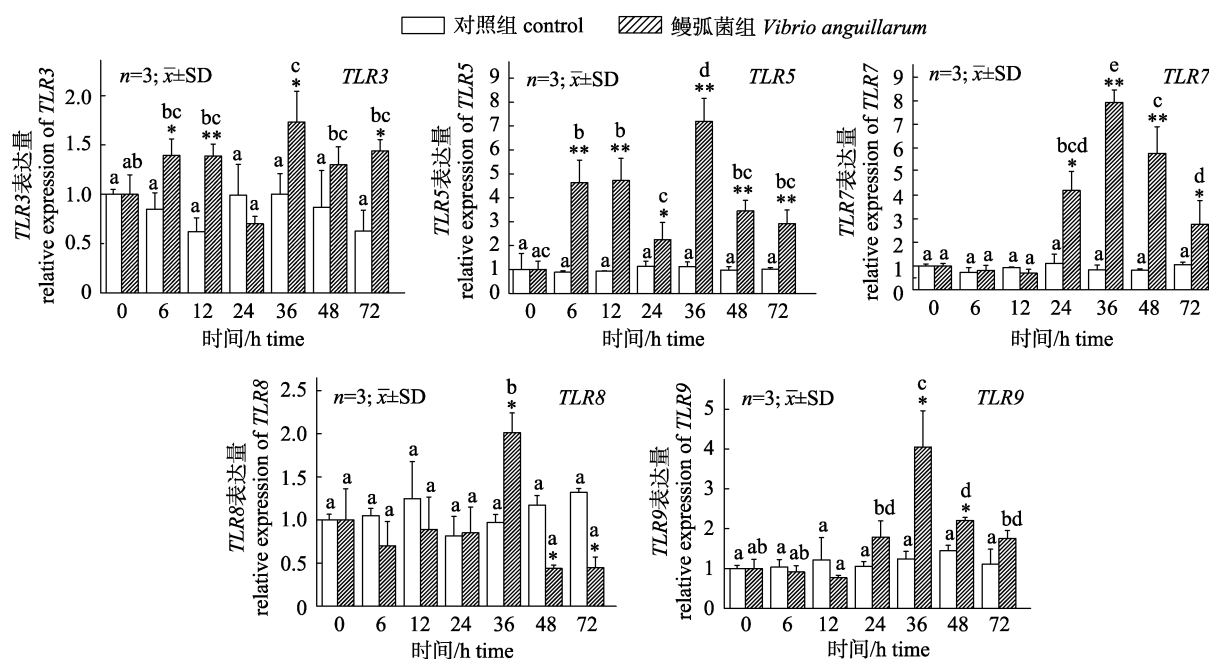


图 6 鳗弧菌感染后脾脏中 5 个 TLR 基因的表达水平

*代表对照组和实验组之间的显著性差异($P < 0.05$), **代表极显著差异($P < 0.01$)。不同时间点之间的差异用小写字母表示

Fig. 6 The relative expression levels of 5 TLR genes in spleen after *Vibrio anguillarum* injection

* represented the significant difference ($P < 0.05$) between the control group and experimental group, ** represented the extremely significant difference ($P < 0.01$). The differences among different time points were shown by lowercase letters

为了适应复杂多变的两栖环境,其 *TLR9* 基因可能产生了适应性进化,为大弹涂鱼的进化研究提供了一定的证据支持。

3.4 鳗弧菌攻击后 5 个 TLR 基因的免疫应答模式

鳗弧菌是一种能够引起致命性出血性败血症的革兰氏阴性细菌,由于其高发病率和高死亡率而导致了水产养殖的严重损失^[59]。根据组织差异结果,本研究检测了 5 个大弹涂鱼肝脏和脾脏中 TLR 基因在受到鳗弧菌攻击后的免疫表达模式。鳗弧菌攻击后,大弹涂鱼肝脏和脾脏 5 个 TLR 基因(*TLR3*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR8* 和 *TLR9*)的定量结果表明,肝脏中的总体表达趋势是先上升后下降。脾脏中 *TLR5*, *TLR7*, *TLR8* 和 *TLR9* 的表达趋势与肝脏相似,均先增加后减少,这些结果与黄颡鱼 TLR 基因在嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染后的表达趋势相似^[33]。此外,脾脏中 *TLR3* 基因在对照组和感染组的表达趋势与哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染的鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)相似^[60],都在 6 h 和 12 h 迅速升高,然后在 24 h 后降低,在 36 h 后再次升高并维持在高水平。总

体而言,在应对病原体入侵时,肝脏中 5 个 TLR 基因反应更快,但是反应的激烈程度不如脾脏中的高。鳗弧菌感染后,肝脏和脾脏中 *TLR5* 和 *TLR7* 表达量都维持在一个的较高水平,其中在脾脏中持续的时间更长,另外,肝脏和脾脏中 *TLR5* 基因在细菌攻击后反应最快,这可能是与它识别细菌鞭毛有关^[61]。总而言之,这些结果表明大弹涂鱼的 5 个 TLR 基因在应对细菌入侵时起到了重要作用,并且 *TLR5* 和 *TLR7* 可能在早期应对鳗弧菌攻击中发挥更大作用。

4 结论

本次实验筛选获得了大弹涂鱼的 *TLR5*, *TLR8* 和 *TLR9* 基因,并对其进行了分子生物信息学分析,结果表明 3 个 TLR 基因在结构上是相对保守的。根据位点模型结果可知 5 个 TLR 基因的进化分析结果表明 *TLR3*, *TLR5* 和 *TLR8* 是高度保守的,而 *TLR7* 和 *TLR9* 在长期进化过程中产生了适应性进化。进化枝-位点模型结果表明,大弹涂鱼为了适应更加复杂多变的两栖环境其 *TLR9* 基因可能

产生了适应性进化, 为大弹涂鱼的进化提供了一定的证据支持。在大弹涂鱼正常健康组织中, 肝脏和脾脏中 5 个 *TLR* 基因的表达水平相对较高。在鳃弧菌感染后, 大弹涂鱼肝脏和脾脏中 5 个 *TLR* 基因的表达趋势表明 *TLR* 基因在应对外部病原体入侵时起到了重要作用。

致谢: 由衷感谢廖智老师所提供的大弹涂鱼皮肤转录组数据, 感谢李健、杨立国、刘桓君和谢雨欣同学在养殖实验所提供的帮助。

参考文献:

- [1] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [2] Azam F, Fenchel T, Field J G, et al. The ecological role of water-column microbes in the sea[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1983, 10(3): 257-263.
- [3] Suttle C A. Viruses in the sea[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 356-361.
- [4] Wilhelm S W, Suttle C A. Viruses and nutrient cycles in the sea[J]. *BioScience*, 1999, 49(10): 781-788.
- [5] Wang M Q, Yang J L, Zhou Z, et al. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(4): 511-520.
- [6] Zhao B S, Zhao L, Liao H, et al. Mapping toll-like receptor signaling pathway genes of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) with fish[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2015, 14(6): 1075-1081.
- [7] Aoki T, Takano T, Santos M D, et al. Molecular innate immunity in teleost fish: Review and future perspectives[C]// *Proceedings of the 5th World Fisheries Congress on Fisheries for Global Welfare and Environment*, Tokyo: TERRAPUB, 2008: 263-276.
- [8] Volff J N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish[J]. *Heredity*, 2005, 94(3): 280-294.
- [9] Stein C, Caccamo M, Laird G, et al. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish[J]. *Genome Biology*, 2007, 8(11): R251.
- [10] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [11] Lai R F, Liu H, Jakovlić I, et al. Molecular cloning and expression of toll-like receptor 4 (tlr4) in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 59: 63-76.
- [12] Liu X H, Jiao C L, Ma Y, et al. A live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine induces efficient immunoprotection in tiger puffer (*Takifugu rubripes*)[J]. *Vaccine*, 2018, 36(11): 1460-1466.
- [13] Sun P, Bao P B, Tang B J. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high stocking density stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68: 332-340.
- [14] Roach J C, Glusman G, Rowen L, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(27): 9577-9582.
- [15] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(7): 499-511.
- [16] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 388(4): 621-625.
- [17] Kimbrell D A, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(4): 256-267.
- [18] Bricknell I, Dalmo R. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19(5): 457-472.
- [19] Fan Z J, Zou P F, Yao C L. Toll-like receptors (*TLR*) and its signaling pathway in teleost[J]. *Acta Hydrobiologica sinica*, 2015, 39(1): 173-184. [范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾. 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 173-184.]
- [20] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3[J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [21] Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(1): 13-25.
- [22] Bilodeau A, Waldbieser G. Activation of *TLR3* and *TLR5* in channel catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, 29(8): 713-721.
- [23] Meijer A H, Gabby Krens S F, Medina Rodriguez I A, et al. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(11): 773-783.
- [24] Huang X N, Wang Z Y, Yao C L. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(1): 98-106.
- [25] Umasuthan N, Bathige S D N K, Thulasitha W S, et al. Identification of a gene encoding a membrane-anchored toll-like receptor 5 (*TLR5M*) in *Oplegnathus fasciatus* that responds to flagellin challenge and activates NF- κ B[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 276-290.
- [26] Meng F X, Zhang Y Y, Zhou J B, et al. Do the toll-like receptors and complement systems play equally important roles in freshwater adapted Dolly Varden char (*Salvelinus malma*)?[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 581-598.
- [27] Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(11): 759-771.
- [28] Huo R X, Zhao X Y, Han J J, et al. Genomic organization,

- evolution and functional characterization of soluble toll-like receptor 5 (*TLR5S*) in miuiy croaker (*Miichthys miuiy*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 80: 109-114.
- [29] Skjæveland I, Iliev D B, Zou J, et al. A *TLR9* homolog that is up-regulated by *IFN-γ* in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(6): 603-607.
- [30] Müller T, Hamm S, Bauer S. *TLR9*-mediated recognition of DNA[M]//Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Heidelberg: Springer, 2008, 183: 51-70.
- [31] Lee P T, Zou J, Holland J W, et al. Identification and characterization of *TLR7*, *TLR8a2*, *TLR8b1* and *TLR8b2* genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(2): 295-305.
- [32] Qian T L, Wang K R, Mu Y N, et al. Molecular characterization and expression analysis of *TLR7* and *TLR8* homologues in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(3): 671-679.
- [33] Zhang X T, Zhang G R, Shi Z C, et al. Expression analysis of nine Toll-like receptors in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) responding to *Aeromonas hydrophila* challenge [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 63: 384-393.
- [34] Han Y L, Sheng Z, Liu G D, et al. Cloning, characterization and cadmium inducibility of metallothionein in the testes of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 119: 1-8.
- [35] Wang J, Su Y Q. Biochemical composition and energetics of three mudskippers[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 1994, 33(1): 96-99. [王军, 苏永全. 三种弹涂鱼的生化组成及能值分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, 33(1): 96-99.]
- [36] Guan F, Li C H, Nie L, et al. Piscidin 1 of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: Molecular characterization and functional analysis[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018, 49(2): 422-431. [管峰, 李长红, 聂力, 等. 大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) piscidin 1 的分子特征及功能分析[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(2): 422-431.]
- [37] You X X, Bian C, Zan Q J, et al. Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5594.
- [38] Zhang Y X, Shi G, Wang R X, et al. Transcriptome of *Boleophthalmus pectinirostris* skin and analysis of antimicrobial peptide related unigenes[J]. Life Science Research, 2018, 22(1): 26-35. [张毓霞, 王戈, 王日昕, 等. 大弹涂鱼皮肤转录组测序及抗菌肽基因分析[J]. 生命科学研究, 2018, 22(1): 26-35.]
- [39] Campanella J J, Bitincka L, Smalley J. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences[J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4: 29.
- [40] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [41] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. Bioinformatics, 2001, 17(8): 754-755.
- [42] Yang Z H. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Bioinformatics, 1997, 13(5): 555-556.
- [43] Wang L P, Jiang L H, Wu C W, et al. Molecular characterization and expression analysis of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) interleukin-12A, 16 and 34 after poly I: C and *Vibrio anguillarum* challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 74: 84-93.
- [44] Singh V K, Mangalam A K, Dwivedi S, et al. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence[J]. BioTechniques, 1998, 24(2): 318-319.
- [45] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [46] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 805-820.
- [47] Zhu L Y, Nie L, Zhu G, et al. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 39(1-2): 39-62.
- [48] Zhang J, Kong X H, Zhou C J, et al. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 380-388.
- [49] Bell J K, Botos I, Hall P R, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(31): 10976-10980.
- [50] Bell J K, Mullen G E D, Leifer C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. Trends in Immunology, 2003, 24(10): 528-533.
- [51] Broz P, Monack D M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens[J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(8): 551-565.
- [52] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2001, 1(2): 135-145.
- [53] Vidya M K, Kumar V G, Sejian V, et al. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals[J]. International Reviews of Immunology, 2018, 37(1): 20-36.
- [54] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [55] Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T, et al. Teleost *TLR22* recognizes RNA duplex to induce *IFN* and protect cells from birnaviruses[J]. The Journal of Immunology, 2008, 181(5): 3474-3485.
- [56] Baghel M S, Singh B, Dhuriya Y K, et al. Postnatal exposure to poly (I: C) impairs learning and memory through changes in synaptic plasticity gene expression in developing rat brain[J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2018, 155: 379-389.
- [57] Pietretti D, Wiegertjes G F. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies[J]. De-

- velopmental & Comparative Immunology, 2014, 43(2): 205-222.
- [58] Pei Y Y, Huang R, Li Y M, et al. Conservative and evolution of *TLR4*'s gene structure and function in fish and mammalian[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(3): 590-597. [裴永艳, 黄容, 李勇明, 等. 鱼类和哺乳类 *TLR4* 基因结构和功能的保守与进化[J]. 水生生物学报, 2015, 39(3): 590-597.]
- [59] Frans I, Michiels C W, Bossier P, et al. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(9): 643-661.
- [60] Wang P F, Zhao C, Wang C Y, et al. *TLR3* gene in Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*): Molecular cloning, characterization and expression analysis after bacterial infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 347-354.
- [61] Reyes-Becerril M, Alamillo E, Rosales-Mendoza S, et al. Molecular characterization and expression analyses of toll like receptor-5 induced by *Vibrio parahaemolyticus* antigens in Pacific red snapper[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 68: 180-189.

Molecular evolution analysis of 5 *TLR* genes in the great blue-spotted mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) and the immune response patterns after *Vibrio anguillarum* infection

ZHOU Jianbo¹, MENG Fanxing², LI Ming², WANG Rixin², SHI Ge¹

1. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Toll-like receptor (*TLR*) genes that can recognize various pathogens are important innate immune members; thus, they are a hot spot in fish molecular immunology studies. The great blue-spotted mudskippers (*Boleophthalmus pectinirostris*) inhabit an amphibious environment that has numerous pathogenic microorganisms. Based on this situation, it can be speculated that the *TLR* genes of *B. pectinirostris* might encounter strong selection pressure. In the present study, the complete sequence of *TLR5*, *TLR8*, and *TLR9* and the partial sequences of *TLR3* and *TLR7* were obtained from the skin transcriptome of *B. pectinirostris*. *TLR5*, *TLR8*, and *TLR9* nucleotide and amino acid sequences of *B. pectinirostris* were analyzed using molecular bioinformatics. The molecular evolution analysis of the 5 *TLR* genes was conducted based on the phylogenetic tree. The tissue expression patterns of the 5 *TLR* genes and their immune response patterns under *Vibrio anguillarum* challenge were explored using real-time quantitative PCR. The results showed that the *TLR5* gene was 3071 bp and included a coding region that was 2646 bp, which encoded 882 amino acids. The *TLR8* gene was 3175 bp, and it had a 3033 bp coding region, which encoded 1011 amino acids, and the *TLR9* gene was 3398 bp and had a 3093 bp coding region, which encoded 1031 amino acids. The *TLR5*, *TLR8*, and *TLR9* molecule structures were similar to those of other species, showing high conservation. The site model detected two sites (647Q, 691S) under positive selection pressure from fish *TLR7* genes, and one such site (516A) from fish *TLR9* genes. Although there were no positive sites in the other 3 *TLR* genes. From the results of the site model, it can be speculated that *TLR3*, *TLR5*, and *TLR8* of fish were highly conserved, whereas *TLR7* and *TLR9* had some adaptive changes during long-term evolution. Furthermore, the branch-site model detected 3 positive sites (76P, 596A, and 603E) from the branch of *B. pectinirostris*. The results of the branch-site model showed that owing to the transition from the aquatic environment to the amphibious environment, the *TLR9* gene of *B. pectinirostris* underwent adaptive evolution. The results of expression patterns in healthy tissues showed that 5 *TLR* genes were widely expressed in the tissues examined (intestine, eye, kidney, liver, brain, muscle, spleen, and skin), especially in the liver and spleen. Under *V. anguillarum* challenge, the expression trends of the 5 *TLR* genes in the liver and spleen increased at first and then decreased, suggesting that the *TLR* genes of *B. pectinirostris* play an important role in coping with bacterial invasion.

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; toll-like receptors; sequence analysis; molecular evolution; *Vibrio anguillarum*; gene expression

Corresponding author: SHI Ge. E-mail: sg2610105@126.com