

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15073

半滑舌鲷 *TLR5S* 三种剪切型基因的克隆与表达分析

张文婷^{1,2,3}, 向晋松^{2,3,4}, 李海龙^{2,3}, 张宁^{2,3}, 董忠典^{2,3}, 高峰涛^{2,3}, 陈松林^{2,3}

1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源重点实验室, 山东 青岛 266071;
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 266071;
4. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: Toll 样受体 5 (Toll-like receptor 5, TLR5) 是 TLRs 家族成员之一, 可分为跨膜型 TLR5M 和鱼类特有的可溶型 TLR5S, 它们可以识别致病菌表面的鞭毛蛋白并协同作用激活免疫反应。为了研究半滑舌鲷受到病原感染后 TLR5S 参与免疫反应的作用, 本研究使用 RACE 技术获得了半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) TLR5S 全长 cDNA 序列。TLR5S cDNA 有 3 种剪切型: *Cs.TLR5S* x1, *Cs.TLR5S* x2 和 *Cs.TLR5S* x3。这 3 种剪切型的相同区域为 308 bp 5'非编码区(5'UTR) 和 1701 bp 开放阅读框(ORF), 不同的 3'UTR 分别为 138 bp、364 bp 和 637 bp。*Cs.TLR5S* 共编码 567 个氨基酸, 预测编码蛋白质分子量为 64.03 kD, 等电点为 8.49。氨基酸多重序列比对结果显示, *Cs.TLR5S* 氨基酸序列与其他脊椎动物 TLR5S 氨基酸序列具有较高的相似性, 其中与牙鲆相似度高达 61%, 表明 *Cs.TLR5S* 在进化上的具有一定的保守性。Real-time PCR 结果表明该基因在半滑舌鲷的不同组织均有表达, 其中在肝的表达量最高, 在脾的表达量最低。此外, 检测 *Cs.TLR5S* 3'端的不同剪切型在肝、脾、头肾、小肠中的表达, 结果显示 *Cs.TLR5S* x3 只在肝中高表达, 而 *Cs.TLR5S* x1 则在肝和小肠中都有中等程度表达。鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染半滑舌鲷实验表明, 注射菌液 6 h 后, *Cs.TLR5S* 基因在肾、小肠、肝和脾 4 个组织中的表达量都有显著上升; 注射鳃弧菌 48 h 后, 以上 4 种组织中表达量均呈现降低的变化。上述实验结果说明, *Cs.TLR5S* 基因可能参与了半滑舌鲷抗弧菌感染的免疫反应。

关键词: 半滑舌鲷; *TLR5S*; 鳃弧菌; 基因克隆; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0010-11

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类位于细胞膜上的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 的识别受体, 能够直接识别或通过抗原呈递细胞 (antigen-presenting cell, APC) 识别外源病原微生物中的脂多糖 (LPS)、肽聚糖、双链 RNA、鞭毛蛋白 (flagellin) 等 PAMP^[1-2]。TLRs 在进化中相当保守, 属于 I 型跨膜糖蛋白, 典型结构由胞外结构域、跨膜区和胞内结构域 3 部分构成^[3]。胞外区由串联的富含亮氨酸的重复序列 (leucine-rich repeats, LRRs) 构成, 参与相关 PAMP 的识别和结合^[4], 胞内结构

域由与哺乳类白介素-1 受体同源的 TIR (toll/interleukin-1 receptor) 功能域组成, 负责与接头蛋白分子相互作用^[5], 随后通过髓样分化因子 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) 依赖和非依赖性信号途径引起信号级联反应, 最终激发机体产生固有免疫应答^[6-8]。TLR5 属于 Toll 样受体家族中的一员, 能够识别致病菌表面的鞭毛蛋白^[9]。有研究表明, 鞭毛蛋白是细菌鞭毛的主要致病因子, 具有促发炎症反应及器官损伤的功能^[10], TLR5 识别鞭毛蛋白后, 通过 MyD88 依赖信号途径激活核因子 κ B (nuclear factor κ B,

收稿日期: 2015-02-12; 修订日期: 2015-04-21.

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.

作者简介: 张文婷 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类生物技术. E-mail: wen0zi1988@126.com

通信作者: 陈松林, 研究员, 博导, 从事鱼类生物技术研究. Tel: 0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

NF- κ B), 从而刺激炎症因子产生, 介导的免疫反应和炎症反应^[11]。目前在哺乳动物中仅获得 1 种 TLR5^[12], 而在鱼类中存在 2 种 TLR5: 一种是与哺乳动物同源的“跨膜型”, 即 TLR5M (toll-like 5 membrane form); 另一种是鱼类特有的可溶型 TLR5S (toll-like 5 soluble form), TLR5S 在结构上不包含跨膜区和胞内 TIR 结构域^[13]。继 Tsujita 等^[14]在 2004 年首次报道了虹鳟 (*Onchorhynchus mikiss*) 体内存在两种类型的 TLR5 基因后, 又在红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)^[15]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[16]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[17-18]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[19]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[20] 等多种硬骨鱼类中陆续克隆得到 TLR5S 基因。Moon 等^[21]对大菱鲆 TLR5S 的启动子活性分析表明, TLR5S 含有 2 个 AP-1 结合位点、2 个 C/EBP 结合位点以及一个 NF- κ B 结合位点, 且 NF- κ B 亚基 p65 与鞭毛蛋白分别作为转录因子和配合基, 相互配合能最大程度地诱导 TLR5S 的转录。Tsujita 等^[14]发现虹鳟 TLR5M 和 TLR5S 都能识别细菌鞭毛蛋白, 且 TLR5S 能与鞭毛蛋白特异性结合; 此外, TLR5M 可与诱导表达的 TLR5S 协调作用, 实现通路信号的放大。

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 是中国特有的一种近海温水性底栖鱼类, 具有生长速度快、肉味鲜美、经济价值高等特点^[22]。近年来, 由于养殖环境恶化而引起的半滑舌鲷病害时有发生, 给半滑舌鲷养殖产业造成了巨大经济损失。目前, 半滑舌鲷主要免疫基因的研究包括干扰素调节因子基因 (interferon regulatory factors, IRFs)^[23-24]、主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)^[25-27]、*MyD88*^[28]、*TLR9*^[29] 和抗菌肽^[30] 等, 尚未见到有关半滑舌鲷 TLR5S 的报道。本研究对 *Cs.TLR5S* 基因进行了克隆, 检测 *Cs.TLR5S* 基因在正常组织及鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后不同组织中的表达水平, 为研究 TLR5S 在鱼类中的分子免疫机制及提高半滑舌鲷人工养殖效益奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

61 条半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*), 体重 (200±20) g, 购于山东省海阳市黄海水产有限公司。实验室暂养 7 d。取 3 条健康半滑舌鲷, 解剖并分别取其头肾、肝、脾、小肠、皮肤、肌肉、鳃、血液及脑共计 9 种组织, 立即将样品投入液氮中速冻后, 在 -80℃ 超低温冰箱中保存, 用于检测基因在不同组织中的表达。病原感染所用鳃弧菌菌株由本实验室分离保存, 感染实验参照 Chen 等^[31]的方法。根据本研究室已确定的鳃弧菌半致死浓度^[32], 通过 10 尾实验鱼进行预实验确定半致死量 (median lethal dose, LD₅₀), 人工感染注射浓度为 2×10⁷ CFU/mL。将剩余 48 尾实验鱼平均分成 2 组, 实验组腹腔注射菌液 0.1 mL/100 g, 对照组注射等体积的 PBS。在注射后第 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 7 d 分别取 3 条鱼, 解剖后取头肾、小肠、肝和脾, 组织保存方法如上所述。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

分别取半滑舌鲷 9 种健康组织及病原刺激后的 4 种组织各 50~100 mg 立即置于无 RNAase 的研钵中, 加入少量液氮充分研磨, 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 进行总 RNA 的提取。提取的总 RNA 用 DNase I (Invitrogen) 进一步消化, 以去除 RNA 中残存的 DNA。检测浓度和纯度后, 用逆转录试剂盒 (TaKaRa) 合成 cDNA。

1.3 *Cs.TLR5S* cDNA 全序列的克隆

根据实验室已获得的 *Cs.TLR5S* 开放阅读框 (ORF) 序列 (Cse_R013586), 利用 Primer Premier 5.0 设计 RACE 引物 (表 1)。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 操作手册, 以肝 RNA 为模板分别合成 3' RACE 和 5' RACE 反应模板, 采用降落 PCR 和巢式 PCR 分别获得 3' 和 5' 端片段。通用引物 UPM (Long: Short=1: 4) 和 NUP 分别用于降落 PCR 和巢式 PCR。降落 PCR 反应程序为: 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s,

表 1 实验所用的引物序列
Tab. 1 Primers and their sequences used in this study.

| 引物名称 primer | 引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3') | 用途 utilization |
|------------------|---|------------------------|
| TLR5S-F | ATGGCCTTTGTTGCTCAAA | 简并引物 degenerate primer |
| TLR5S-R | AACAGGAATGAACGTTTTCTTCC | 简并引物 degenerate primer |
| TLR5S.3-F1 | ACAACCTTCATAGCCTCTCCAGACCCC | 5' or 3' RACE |
| TLR5S.3-F2 | GCTCAATCAGACTCACGTACACC | 5' or 3' RACE |
| TLR5S.5-R1 | AAGGTGTTGAAATGCTTCCCCCG | 5' or 3' RACE |
| TLR5S.5-R2 | ATTGATTCGTTGAGAGAACAGTG | 5' or 3' RACE |
| NUP_S | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | 5' or 3' RACE |
| UPM_S | CTAATACGACTCACTATAGGGC | 5' or 3' RACE |
| UPM_L | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | 5' or 3' RACE |
| TLR5S.q-F | CCAGCGTCTCTCCCCAGTTTACAT | Real-time PCR |
| TLR5S.q-R | GTCACCTCTGTTGTCACCTGATGTCCA | Real-time PCR |
| TLR5S-S1-F | AAACATCAGGCAAATACTT | Real-time PCR |
| TLR5S-S1-R | TCAAGATAAAGAGGGAGTT | Real-time PCR |
| TLR5S-S2-F | CAAACGCTGGAAGAAAACG | Real-time PCR |
| TLR5S-S2-R | ATGCTCCAATGTTTTGTATG | Real-time PCR |
| TLR5S-S3-F | ATAACAGCAGGGGGCAGCA | Real-time PCR |
| TLR5S-S3-R | TGATGAAATCGTAATGGTA | Real-time PCR |
| β -Actin-s | CCAACAGGGAAAAGATGACC | Real-time PCR |
| β -Actin-a | TTCTCCTTGATGTCACGCAC | Real-time PCR |

注: F 和 R 分别表示正向和反向引物.

Note: F represents forward primer; and R represents reverse primer.

67°C 30 s, 72°C 3 min, 28 个循环; 72°C 7 min。巢式 PCR 反应程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经纯化后克隆到 pMD18-T 载体中, 每个片段选 10 个阳性克隆送华大基因测序, 测序结果用 DNASTar 软件拼接分析。

1.4 荧光定量 RT-PCR

根据已获得的 *Cs.TLR5S* 全长 cDNA 设计定量特异性引物 TLR5S.q-F/TLR5S.q-R, 采用该引物检测 *Cs.TLR5S* 基因在健康和感染后半滑舌鳎不同组织的表达水平。TLR5S-S1-F/TLR5S-S1-R、TLR5S-S2-F/TLR5S-S2-R 和 TLR5S-S3-F/TLR5S-S3-R 分别用于检测不同剪切型 *Cs.TLR5S* x1、*Cs.TLR5S* x2 和 *Cs.TLR5S* x3 mRNA 的表达(表 1), 以 β -actin-a/s(表 1)为内参, 采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa), 在实时荧光定量 ABI 7500 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)进行扩增。PCR 扩增体系为: SYBR Premix Ex Taq(2 \times)10 μ L,

ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, 共 20 μ L。PCR 扩增程序为: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。所有样品均设置 3 个平行。根据测得的 C_t 值运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析相对表达量。所有结果均以平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm SE$)来表示, 并利用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 认为差异显著。

1.5 序列分析及系统进化树的构建

用 ExPASy(<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>)分析氨基酸序列; 蛋白质结构预测使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>); 用 TMHMM server, v.2.0 分析氨基酸跨膜结构域(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); 氨基酸序列多重比对采用 ClustalW 2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)完成。使用 MEGA5.0 构建 NJ 系统进化树。信号肽区域使用 SignalP4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测。

2 结果与分析

2.1 *Cs.TLR5S* 全长 cDNA 的克隆和系统进化分析

利用 DNASTar 软件去除载体序列并将其进行拼接, 得到 *Cs.TLR5S* 3 种剪切型完整的 cDNA 序列 *Cs.TLR5S* x1、*Cs.TLR5S* x2 和 *Cs.TLR5S* x3(GenBank 注册号: KP714714、KP714715、KP714716)。*Cs.TLR5S* cDNA 序列包括 1068 bp 的开放阅读框, 308 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR), 3' UTR 分别为 138 bp (*Cs.TLR5S* x1), 364 bp(*Cs.TLR5S* x2)和 637 bp (*Cs.TLR5S* x3)。预测 *Cs.TLR5S* 共编码 567 个氨基酸的蛋白质, 大

小为 64.03 kD, 等电点为 8.49, 含有 16.6%的亮氨酸。SMART 分析 *Cs.TLR5S* 含有 11 LRRs 结构域, 其中从 N 端起第 5 个为 LRR 典型亚型结构域 [Leucine-rich repeats, typical (most populated) subfamily, LRR-TYP], 第 11 个为 C 末端 LRR 结构域 (Leucine rich repeat C-terminal domain, LRR-CT)(图 1)。

与其他物种已报道的氨基酸序列进行同源性比较(图 2), 结果显示, 半滑舌鲷 *Cs.TLR5S* 氨基酸序列与牙鲆、斜带石斑鱼、红鳍东方鲀、虹鳟、大西洋鲑和斑点叉尾鲷的 *TLR5S* 氨基酸序列的同源性分别达到 61%、60%、58%、47%、

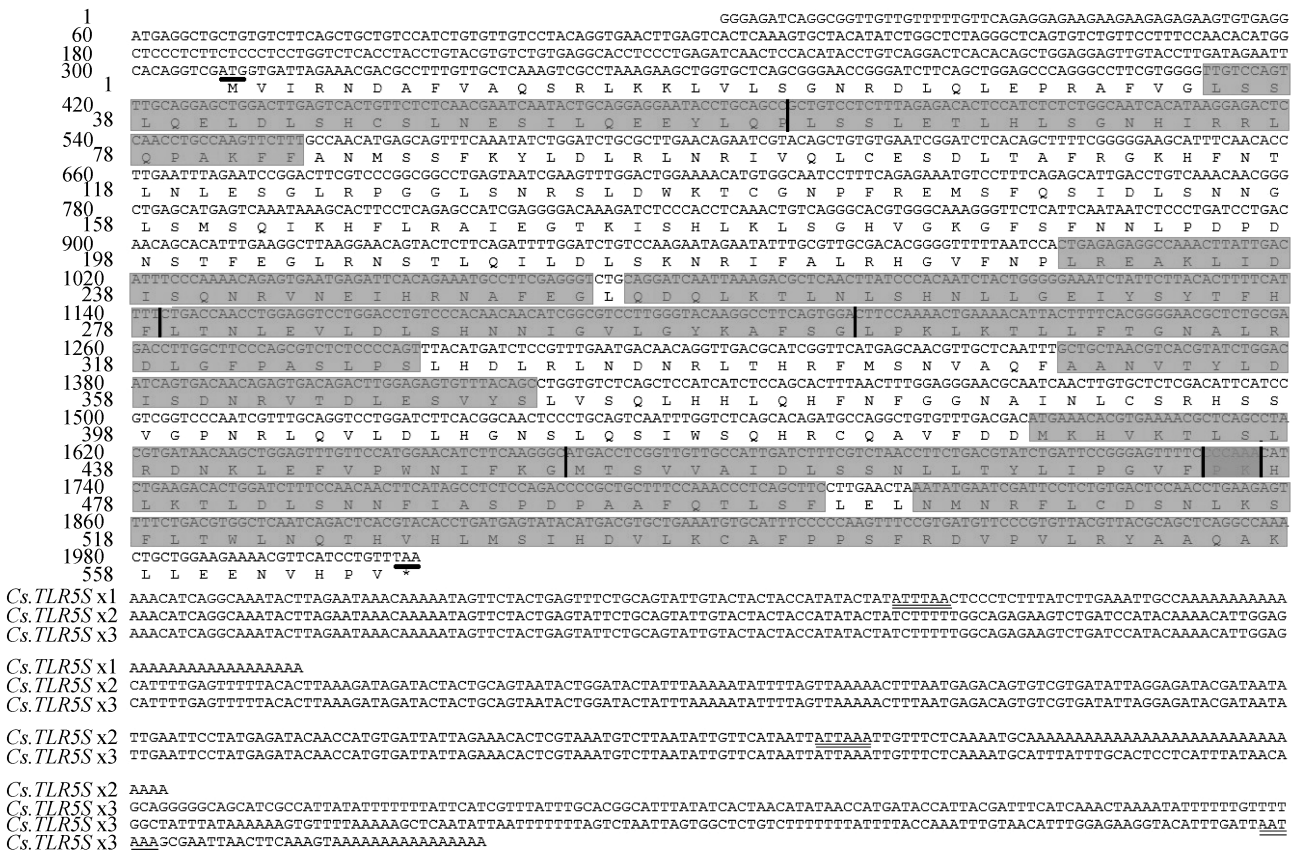


图 1 *Cs.TLR5S* 基因的 cDNA 序列和预测的氨基酸序列

加粗单划线分别表示启动子 ATG 和终止子 TAA, 双划线表示 PolyA 加尾信号, 11 个 LRR 结构域用阴影标出(在蛋白序列上的位置依次为 35-60aa, 61-82aa, 230-253aa, 257-278aa, 279-302aa, 303-327aa, 350-371aa, 429-452aa, 453-476aa, 475-501aa, 507-557aa)。

Fig.1 Full-length cDNA of *Cynoglossus semilaevis TLR5S* with the predicated amino acid sequence

The initiation codon(ATG) and the termination codon(TAA) are bold underlined(≡). The termination signals (AATAAA) in the 3'-untranslated region(UTR) are double underlined(≡≡). The LRR domain are marked by shadow (35-60aa, 61-82aa, 230-253aa, 257-278aa, 279-302aa,303-327aa, 350-371aa, 429-452aa, 453-476aa, 475-501aa, 507-557aa).

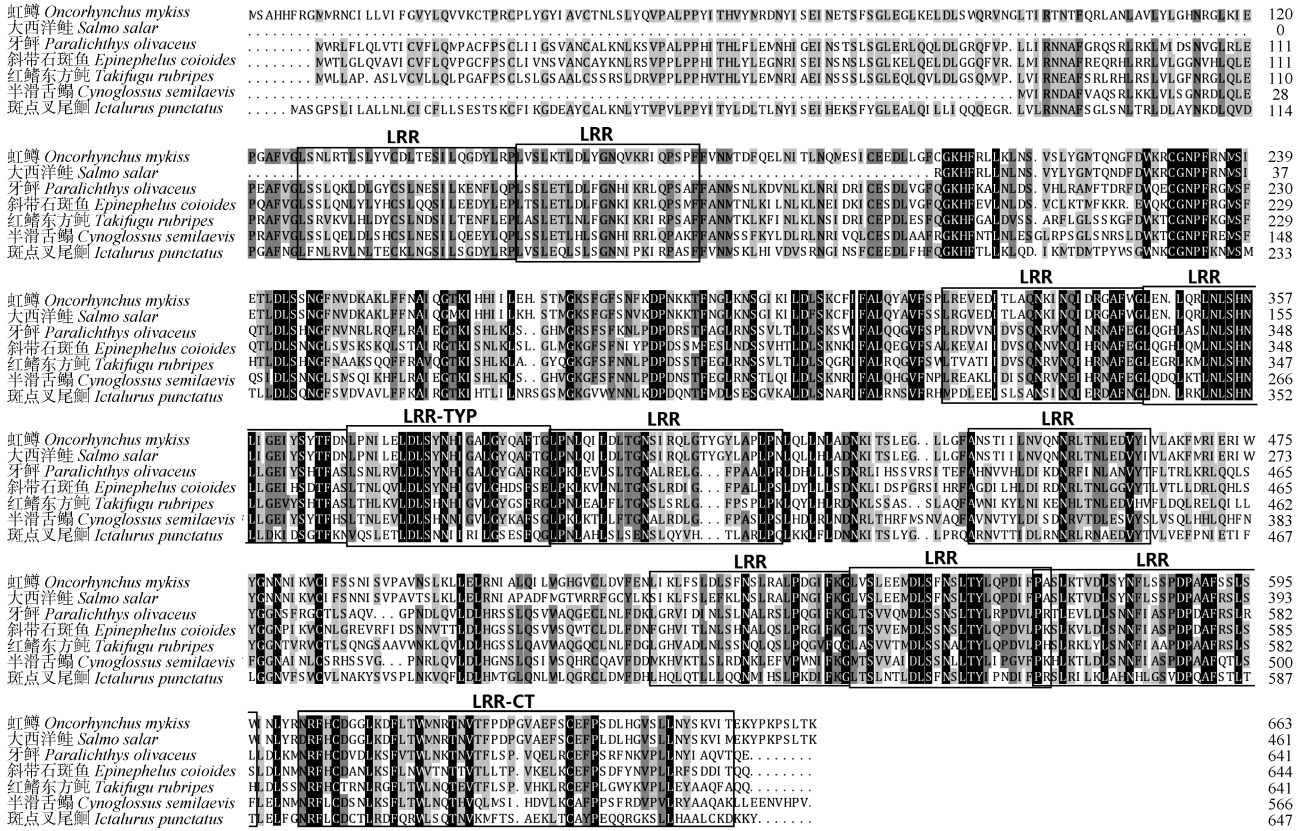


图 2 不同物种 TLR5S 氨基酸序列多重比对分析

阴影区显示同源性的氨基酸，其中黑色区代表氨基酸同源性为 100%，深灰色区代表氨基酸的同源性为 75% 以上，浅灰色区代表氨基酸的同源性为 50%~75%。牙鲆: BAJ16368, 斜带石斑鱼: ACV04459, 红鳍东方鲀: AAW69378, 虹鳟: ND_001117680, 大西洋鲑: AEE38254, 斑点叉尾鲟: NP001187158.1. 方框表示 TLR5S 蛋白的保守结构域特征序列。

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence among different species' TLR5S

Shaded regions indicate residues sharing homology, black region is 100% homologous sequence, gray region is higher than 75%, light gray region is 50%~75%. Boxes indicate the sequence of conserved domain of TLR5S protein. *Paralichthys olivaceus*: BAJ16368, *Epinephelus coioides*: ACV04459, *Takifugu rubripes*: AAW69378, *Oncorhynchus mykiss*: ND_001117680, *Salmo salar*: AEE38254, *Ictalurus punctatus*: NP001187158.1.

45%和44%。使用 MEGA 5.0 分析, 对氨基酸序列构建 NJ 系统进化树, 结果显示 Cs.TLR5S 首先与红鳍东方鲀聚为一枝, 之后依次与牙鲆和斜带石斑鱼等聚类(图 3)。

2.2 Cs.TLR5 基因的表达分析

采用 RT-PCR 对 Cs.TLR5S 基因在半滑舌鲷不同组织的表达进行了分析。结果显示, 半滑舌鲷 Cs.TLR5S 基因几乎在所有的组织中都有表达(图 4)。其中, 表达量最高的组织是肝, 其次为血、皮肤和鳃, 在脾和小肠中表达量较低。肝中 Cs.TLR5S 的表达量约为血的 12 倍(P<0.05)。

2.3 Cs.TLR5S 基因不同剪切型的组织表达

在健康半滑舌鲷的肝、脾、头肾、肠中均检

测到 Cs.TLR5S 3'端不同剪切型 Cs.TLR5S x1 和 Cs.TLR5S x3 的表达(图 5), 结果显示, Cs.TLR5S x1 在肝和小肠都有中等程度表达; Cs.TLR5S x3 只在肝高表达。

2.4 感染鳃弧菌后 Cs.TLR5S 基因的定量表达分析

在鳃弧菌感染后, Cs.TLR5S 基因在半滑舌鲷头肾、小肠、肝、脾中的表达水平呈现出先上升后下降的趋势(图 6)。与对照组相比, 肾和肝感染 6 h 后 Cs.TLR5S 基因表达量分别达到峰值, 升幅为 17.5 和 15 倍(P<0.05), 随后逐步回落。在小肠、脾中的表达呈现出波动状态, 但始终高于对照组的 38 倍(P<0.05), 12 h 回落至 4.2 倍, 感染

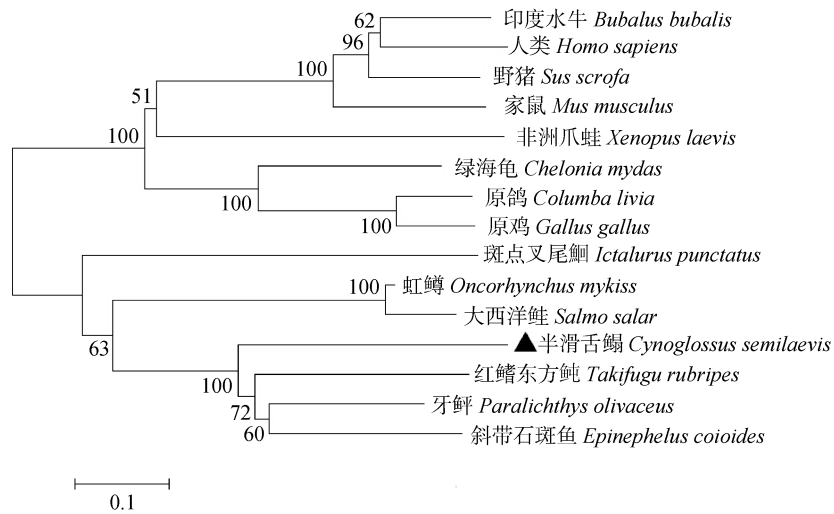


图 3 基于 *TLR5S* 氨基酸序列绘制的系统树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the homologous of the *TLR5S* amino acid sequences

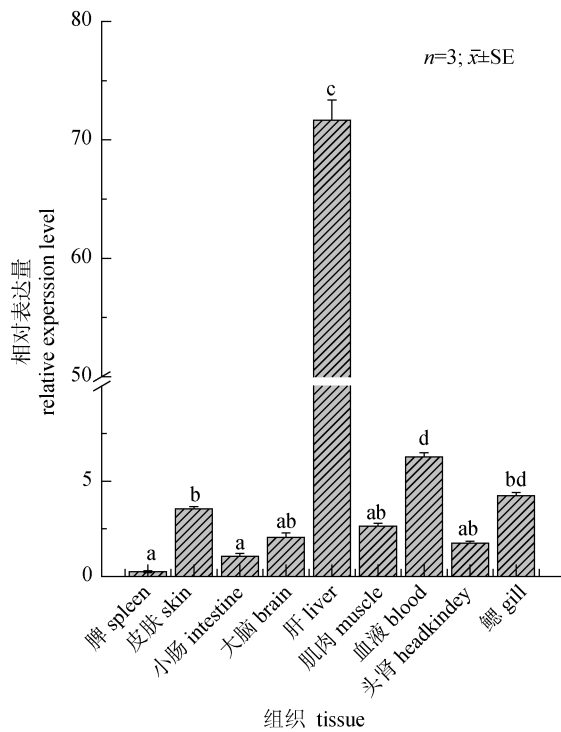


图 4 *Cs.TLR5S* 基因在半滑舌鳎组织中的表达

Fig. 4 Real-time PCR analysis of *TLR5S* expression in different tissues of *Cynoglossus semilaevis*

24 h 又上升至 16 倍, 48 h 起下降至原来的表达量。脾在感染后 6 h 表达量增至 22 倍 ($P < 0.05$), 12 h 迅速下调至 5 倍, 感染 24 h 表达达到峰值, 升幅 28 倍 ($P < 0.05$), 至 48 h 后又降为初始的表达量。

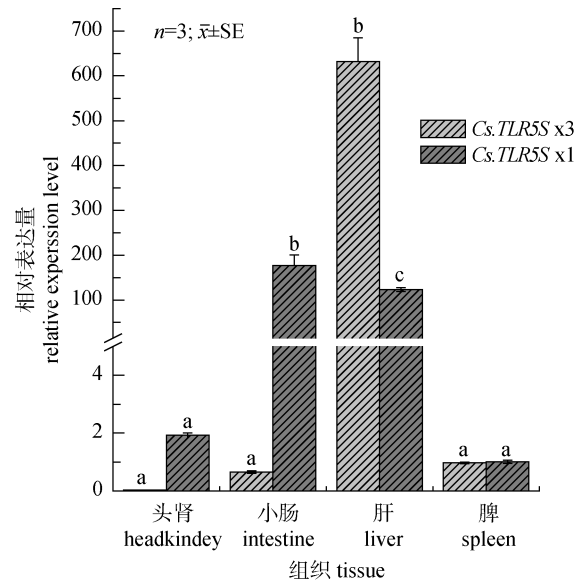


图 5 *Cs.TLR5S* x1 和 *Cs.TLR5S* x3 在健康半滑舌鳎主要免疫器官中的表达

Fig. 5 Real-time PCR analysis of *Cs.TLR5S* x1 and *Cs.TLR5S* x3 expression in immune tissues of *Cynoglossus semilaevis*

3 讨论

TLRs 家族基因在进化中高度保守, 绝大部分的哺乳动物 *TLRs* 都能在鱼类中找到同源 *TLRs*, 目前已经在 31 种鱼类中发现了 16 种 *TLRs*, 其中有 8 种是鱼类特有的^[33]。鱼类生活环境的复杂多样导致 *TLRs* 家族分子在进化过程中呈现出多态性, 主要表现在两个方面: 不同基因编码所产生

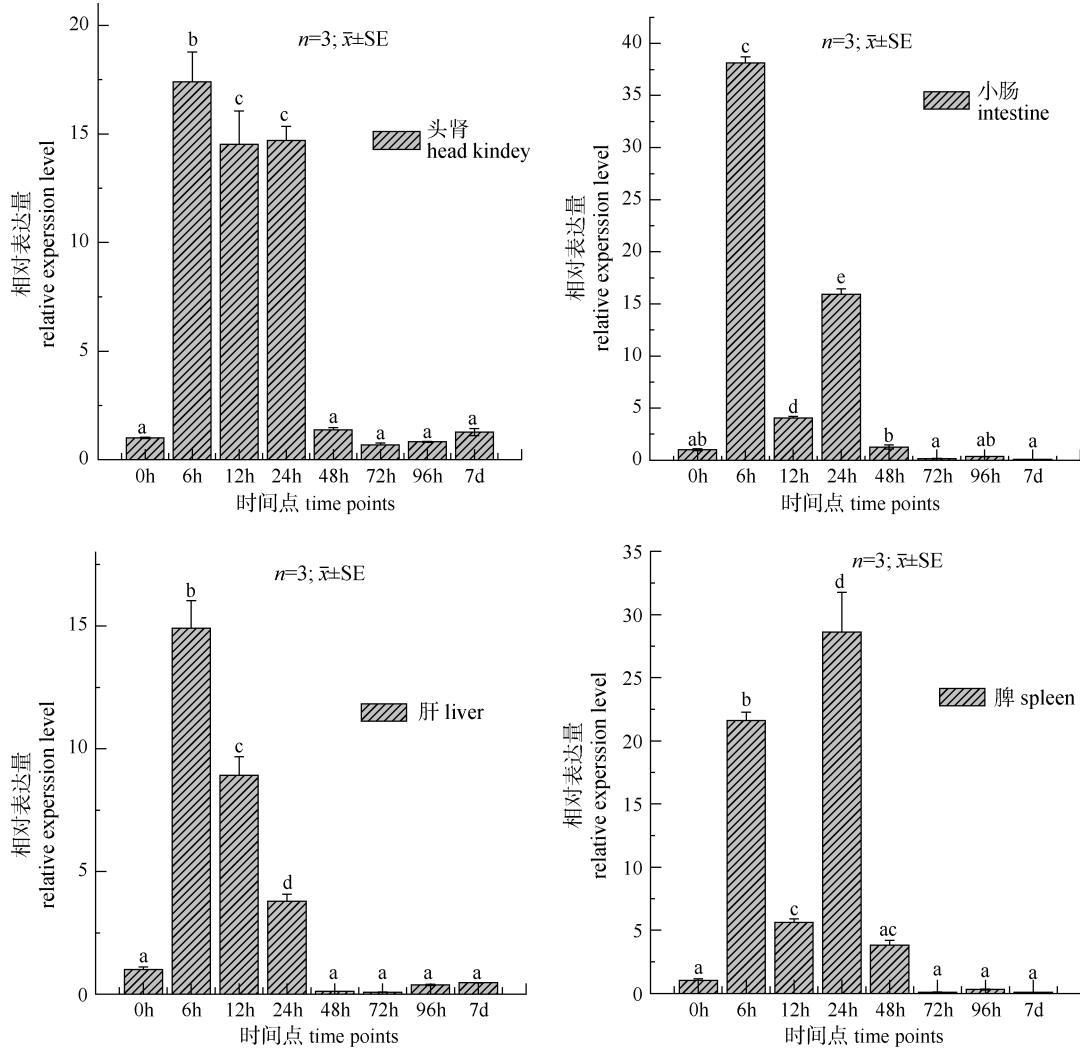


图 6 *Cs.TLR5S* 基因在感染鳃弧菌后各组织中的表达量

Fig. 6 Real-time PCR analysis of *TLR5S* expression in different tissues of *Cynoglossus semilaevis* after challenging with *Vibrio anguillarum*

的亚型和同一个基因的不同剪切型^[34]。与哺乳动物相比,鱼类的TLRs具有更高的多态性,鱼类的TLR5M和TLR5S也属于不同基因编码的TLR5,TLR5M具有TLR家族典型结构,而TLR5S在结构上不包含跨膜区和胞内TIR结构域^[35];Sullivan等^[36]报道了斑马鱼(*Danio rerio*)TLR4a与TLR4b是由不同基因编码的,在序列、所在染色体的位置以及LRR结构域数量上都存在差别,但两者都可参与机体MyD88依赖信号途径的负反馈调节^[37]。目前,在多种鱼类中发现了TLRs具有可变剪切,转录时通过不同的剪切方式使其结构发生改变。例如,已有研究报道斑马鱼存在TLR4a和TLR4b^[38-39]、TLR7a和TLR7b^[38-39]、TLR8.1和TLR8.2^[39]的剪切

亚型;对大西洋鲑^[40]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[41]以及大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[42]的研究表明TLR9有TLR9A、TLR9B两种剪切亚型。从进化角度分析,TLR基因多态性说明鱼类的固有免疫系统更加复杂,且TLR基因可能正处在动态进化的阶段^[43]。

本研究首次克隆了半滑舌鲷TLR5S基因,获得了*Cs.TLR5S*基因全长cDNA序列,发现3'UTR有3种剪切型,*Cs.TLR5S* x1, *Cs.TLR5S* x2和*Cs.TLR5S* x3,长度分别为138 bp、364 bp和637 bp。有研究报道这种可变剪切型PolyA加尾APA(alternative cleavage and polyadenylation)广泛存在于mRNA的3'末端,而APA在编码序列或

3'UTRs 生成不同的亚型使转录更复杂, 可能起到调节、稳定、定位和提高靶基因转录效率的作用^[44]。作者推测 *Cs.TLR5S* 作为免疫相关基因, 不同剪切型的存在及表达量的不同可能与其定位和调节作用有关。此外, 本研究首次检测了 *Cs.TLR5S* 基因 3'端的 2 种不同剪切型在肝、脾、头肾、小肠中的表达, 结果表明 *Cs.TLR5S* x3 只在肝中高表达, 而 *Cs.TLR5S* x2 则在肝和肠中都有中等程度表达。不同剪切型的 TLRs 在鱼类组织分布有所差异, 如斑马鱼的 *TLR4a* 和 *TLR4b* 表达差异极显著, 不同于 *TLR4a* 的广泛表达, *TLR4b* 只在皮肤和心脏表达^[38]; Yao 等^[42]对大黄鱼 *TLR9* 不同剪切型 *TLR9A* 和 *TLR9B* mRNA 在各组织表达的研究表明, *TLR9A* 广泛表达于皮肤、肝、脑、血、心脏, 而 *TLR9B* 在脾和肾有极高表达。上述结果说明这种可变剪切可能与鱼类的 TLRs 功能更为广泛有关, 但其功能和信号传递机制还需深入研究。

TLR5S 作为一种鱼类特有的细菌鞭毛蛋白识别受体, 可与 *TLR5M* 协同作用激活生物体免疫应答反应^[14]。Hwang 等^[20]报道牙鲆的 *TLR5S* 在头肾中表达量最高, 在脑、心脏和小肠表达水平次之, 在眼和胃中表达量最低; 斑点叉尾鲷的 *TLR5S* 在头肾、脾、皮肤、肝等组织中的表达量较高^[18]; Oshiumi 等^[15]对红鳍东方鲀的研究发现, *TLR5S* 在肠、胃等消化器官中表达量较高。与已报道的结果类似, 本研究中 *Cs.TLR5S* 在所检测的多种组织(脾、皮肤、小肠、脑、肝、肌肉、头肾、血液和鳃)中均有表达, 且肝中的表达量最高。这与鱼类肝有发达的血液循环系统, 使其成为处理消化产物、防御外源有害物质的第一道屏障有关^[45-46]。鳃弧菌是一种比较常见的革兰氏阴性弧菌, 通过鞭毛和外膜蛋白黏附并定居在宿主的组织上, 通过释放内毒素致病^[47], 可以感染半滑舌鲷^[48]、牙鲆^[49]、大黄鱼^[50]等海水养殖鱼类。人工感染鳃弧菌后, *Cs.TLR5S* 基因在半滑舌鲷头肾、小肠、肝、脾中的表达水平总体呈现出先上升后下降的趋势。在感染 6 h 后, 头肾和肝中 *Cs.TLR5S* 基因的表达量出现最大值, 之后随着时间推移逐渐降低。Tsujita 等^[13]研究发现, 鳃弧菌可诱导虹鳟肝

癌细胞系(RTH-149)中 *TLR5S* 表达, 且其表达量随时间推移出现先升高后降低的变化。不同于肾和肝的是, *Cs.TLR5S* 的表达量在小肠和脾中呈现波动表达的趋势, 在 6 h 和 24 h 有较高水平的表达, 之后趋于平稳。这与斑点叉尾鲷人工感染链球菌后小肠和脾中 *TLR5S* 基因的表达量变化一致^[13], 这种在应激状态下免疫相关基因表达量上升的现象表明, 小肠和脾中产生了持久的免疫应答。

本研究克隆了 *Cs.TLR5S* 基因全长 cDNA 序列, 并对其结构特征和表达模式进行了分析, 通过人工感染实验进一步研究了 *Cs.TLR5S* 基因在半滑舌鲷感染鳃弧菌后的表达变化, 为今后进一步研究 *Cs.TLR5S* 基因参与半滑舌鲷抗病原菌感染的作用和机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21(1): 335-376.
- [2] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(4): 621-625.
- [3] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition ARTICLE[J]. *Int Immunol*, 2009, 21(4): 317-337.
- [4] Bell J K, Mullen G E D, Leifer C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(10): 528-533.
- [5] Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*[J]. *Mol Immunol*, 2004, 40(11): 759-771.
- [6] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways[J]. *Semin Immunol*, 2004, 16(1): 3-9.
- [7] Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses[J]. *J Endotoxin Res*, 2000, 6(5): 383-387.
- [8] Kawai T, Akira S. TLR signaling[J]. *Semin Immunol*, 2007, 19(1): 24-32.
- [9] Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5[J]. *Nature*, 2001, 410(6832): 1099-1103.
- [10] He Y, Xu T, Fossheim L E, et al. FliC, a flagellin protein, is essential for the growth and virulence of fish pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45070.
- [11] Mizel S B, Honko A N, Moors M A, et al. Induction of

- macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes[J]. *J Immunol*, 2003, 170(12): 6217–6223.
- [12] Means T K, Hayashi F, Smith K D, et al. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170(10): 5165–5175.
- [13] Tsujita T, Ishii A, Tsukada H, et al. Fish soluble Toll-like receptor (TLR) 5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin[J]. *Vaccine*, 2006, 24(12): 2193–2199.
- [14] Tsujita T, Tsukada H, Nakao M, et al. Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*)[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48588–48597.
- [15] Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, et al. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome[J]. *Immunogenetics*, 2003, 54(11): 791–800.
- [16] Tsoi S, Park K C, Kay H H, et al. Identification of a transcript encoding a soluble form of toll-like receptor 5 (TLR5) in Atlantic salmon during *Aeromonas salmonicida* infection[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1): 183–187.
- [17] Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E, et al. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(6): 1218–1230.
- [18] Li M, Li Q, Wang Q L, et al. Gene expression of TLR5 and TLR5S in channel catfish *Ictalurus punctatus* induced by different pathogens[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 30–38.[李敏, 李琪, 王启龙, 等. 斑点叉尾鲴 TLR5 和 TLR5S 基因在不同病原诱导下的表达特征[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 30–38.]
- [19] Lin K B, Ge H, Lin Q, et al. Characterization and analysis of *TLR5S* gene from *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2013, 52(1): 109–115.[林克冰, 葛辉, 林琪, 等. 斜带石斑鱼 TLR5S 基因结构及功能分析[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2013, 52(1): 109–115.]
- [20] Hwang S D, Asahi T, Kondo H, et al. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(4): 630–638.
- [21] Moon J Y, Nam B H, Kong H J, et al. Maximal transcriptional activation of piscine soluble Toll-like receptor 5 by the NF- κ B subunit p65 and flagellin[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(6): 881–886.
- [22] Liu X Z, Zhuang Z M, Ma A J, et al. Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 20(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, 20(5): 7–14.]
- [23] Lu Y, Wang Q, Liu Y, et al. Gene cloning and expression analysis of IRF1 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Mol Biol Reports*, 2014, 41(6): 4093–4101.
- [24] Zhang J, Li Y, Hu Y. Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 44(1): 272–282.
- [25] Du M, Chen S, Liu Y, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 8 families of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *BMC Genet*, 2011, 12(1): 78.
- [26] Xu T, Chen S, Ji X, et al. Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(2): 192–201.
- [27] Xu T, Chen S. Molecular cloning, genomic structure and expression analysis of major histocompatibility complex class α gene of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2011, 37(1): 85–90.
- [28] Yu Y, Zhong Q W, Zhang Q Q, et al. Full-length sequence and expression analysis of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Int J Immunogenet*, 2009, 36(3): 173–182.
- [29] Yu Y, Zhong Q, Li C, et al. Isolation and characterization of Toll-like receptor 9 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 492–499.
- [30] Wang Y, Liu X, Ma L, et al. Identification and characterization of a hepcidin from half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(2): 213–219.
- [31] Chen S L, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(3): 172–181.
- [32] Sha Z X, Wang Q L, Liu Y. Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(5): 914–921.
- [33] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function[J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35(12): 1263–1272.

- [34] 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.]
- [35] Gewirtz A T, Navas T A, Lyons S, et al. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression[J]. *J Immunol*, 2001, 167(4): 1882–1885.
- [36] Sullivan C, Charette J, Catchen J, et al. The gene history of zebrafish *tlr4a* and *tlr4b* is predictive of their divergent functions[J]. *J Immunol*, 2009, 183(9): 5896–5908.
- [37] Sepulcre M P, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, et al. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 1836–1845.
- [38] 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]. *Mol Immunol*, 2004, 40(11): 773–783.
- [39] Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*[J]. *Mol Immunol*, 2004, 40(11): 759–771.
- [40] 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]. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(6): 603–607.
- [41] Franch R, Cardazzo B, Antonello J, et al. Full-length sequence and expression analysis of Toll-like receptor 9 in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Gene*, 2006, 378: 42–51.
- [42] Yao C L, Kong P, Wang Z Y, et al. Cloning and expression analysis of two alternative splicing toll-like receptor 9 isoforms A and B in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(5): 648–656.
- [43] Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome[J]. *Dev Biol*, 2006, 300(1): 349–365.
- [44] Elkon R, Ugalde A P, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(7): 496–506.
- [45] Su J Q, Chu X L, Liu W Q, et al. The cause and treatment of fish liver disease[J]. *Shandong Fisheries*, 2009, (12): 29–31.[苏建青, 褚秀玲, 刘文强, 等. 鱼类肝病的发生原因及诊治[J]. *齐鲁渔业*, 2009, (12): 29–31.]
- [46] Jin S, Zhang D Z, Chen Y X. Toll-like receptor and liver diseases[J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2005, 44(1): 68–69.[金生, 张大志, 陈压西. Toll 样受体与肝脏疾病[J]. *中华内科杂志*, 2005, 44(1): 68–69.]
- [47] Egidius E. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review[J]. *Aquaculture*, 1987, 67(1): 15–28.
- [48] Sha Z X, Wang N, Wang Q L, et al. Cloning, characterization and expression of a myeloid differentiation factor 88(*MyD88*) gene in half smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 659–670. [沙珍霞, 王娜, 王启龙, 等. 半滑舌鲷髓样分化因子的克隆和表达分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 659–670.]
- [49] Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y, et al. Classification for one pathogenic *Vibrio anguillarum* strain isolated from skin-ulcer flounder[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(3): 263–269. [莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定[J]. *微生物学报*, 2002, 42(3): 263–269.]
- [50] Li Q L, Chen Q. Identification of bacterial pathogen and treatment after infection of *Pseudosclaena crocar* in marine cage culture[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, 7(5): 489–493.[李清禄, 陈强. 海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(5): 489–493.]

Molecular cloning, characterization, and expression of three *TLR5S* splicing variants in half-smooth tongue sole

ZHANG Wenting^{1, 2, 3}, XIANG Jinsong^{2, 3, 4}, LI Hailong^{2, 3}, ZHANG Ning^{2, 3}, DONG Zhongdian^{2, 3}, GAO Fengtao^{2, 3}, CHEN Songlin^{2, 3}

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China;
2. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fishery, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China;
4. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Toll-like receptor (TLR) 5 plays a vital role in bacterial flagellin recognition and immune response alerts in vertebrates. In the present study, the synergistic role of the TLR5 membrane form and the TLR5 soluble form (TLR5S) are reported in a bony fish. The full-length *TLR5S* cDNA was cloned using homologous cloning and rapid amplification of cDNA ends techniques to study the regulatory role of TLR5S in the innate immune response of half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, (designated *Cs.TLR5S*). Three alternative splicing variants (*Cs.TLR5S* x1, *Cs.TLR5S* x2, and *Cs.TLR5S* x3) of the *Cs.TLR5S* cDNA sequence were found in *C. semilaevis*. The full-length *Cs.TLR5S* cDNA included a 308 bp 5'-untranslated region (UTR), a 1701 bp open reading frame, and 138 bp, 364 bp, and 637 bp 3'-UTRs, respectively. The cDNA encoded a polypeptide of 567 amino acids, with a molecular mass of 64.03 kD and an isoelectric point of 8.49. Multiple sequence alignment revealed that the *Cs.TLR5S* proteins are well conserved with a typical modular architecture and identical active sites throughout vertebrates, and shared the highest identity with *Paralichthys olivaceus TLR5S* (61%), suggesting a conserved function for *TLR5S*. A phylogenetic analysis indicated that *Cs.TLR5S* and homologous *TLR5S* sequences from teleosts were clustered into a clade, and *Cs.TLR5S* was separated from another clade with amphibians, mammals, and other vertebrates. A tissue expression profile analysis using the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) showed that *Cs.TLR5S* mRNA was constitutively expressed in all tested tissues, with predominant expression in liver and the lowest expression in spleen. Alternative splicing of the 3'-UTR using qRT-PCR showed that *Cs.TLR5S* x3 was only expressed in liver, whereas *Cs.TLR5S* x1 was expressed in liver and intestine. In addition, *Cs.TLR5S* was expressed at different levels in liver, spleen, intestine, and head kidney after a *Vibrio anguillarum* challenge. These results suggest that expression of the *C. semilaevis Cs.TLR5S* variants are differentially regulated in different tissues and play important roles in the immune response against bacterial pathogens.

Keywords: *Cynoglossus semilaevis*; *TLR5S*; *Vibrio anguillarum*; gene cloning; expression

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