

斜带石斑鱼 *TLR5S* 基因结构及功能分析

林克冰, 葛 辉, 林 琪, 吴建绍, 何丽斌, 方琼珊, 周 宸*

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361013)

摘要: Toll 样受体 5(Toll-like receptor 5, TLR5)属于先天免疫系统中的一种模式识别受体(PRR),可分为可溶型和跨膜型 2 种. 它可以识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP),从而启动信号转导. 本研究从 NCBI 数据库中得到斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)可溶型 *TLR5* (*ECTLR5S*)cDNA 全长序列(Genbank 登录号: GQ396667). 其 cDNA 序列全长 2 439 bp,包括 69 bp 的 5'UTR,435 bp 的 3'UTR 和 1 935 bp 的开放阅读框,共编码 644 个氨基酸,预测编码蛋白质分子质量为 72.28 ku,等电点为 6.37. 将 *ECTLR5S* 基因氨基酸序列与其他脊椎动物的 *TLR5S* 基因氨基酸序列进行比对,结果显示出很高的相似性,其中与牙鲆相似度可达 69%. Real time PCR 检测结果显示 *ECTLR5S* 基因在斜带石斑鱼不同器官中均有表达,其中在肝脏中的表达量最高,其次是脾脏、血淋巴、肾脏等. Real time PCR 检测 *ECTLR5S* 基因在哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染 3,6,12,24,48 h 后的肝脏中表达情况,结果显示 *ECTLR5S* 基因在 3,6,12,24 h 时表达量显著上调($p < 0.05$),而在 48 h 下降至初始水平. 这些结果说明 *ECTLR5S* 基因可能参与斜带石斑鱼抗弧菌感染的免疫反应中,并且肝脏是其发挥作用的重要器官.

关键词: 斜带石斑鱼; *TLR5S*; 哈维氏弧菌; Real time PCR

中图分类号: S 965

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2013)01-0109-07

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)家族是一种重要的免疫识别受体,广泛存在脊椎动物、无脊椎动物和植物中的高度保守蛋白,主要参与先天免疫系统,启动细胞信号传递,同时它也是连接先天免疫和后天免疫的桥梁^[1-2]. 1997 年 Medzhdidov 等^[3]发现了人体中与果蝇 Toll 蛋白同源的跨膜蛋白,并报道了它在免疫反应中的作用. 随后一系列的 TLR 受体在各种物种中相继发现,目前为止在哺乳动物中至少有 13 种 TLRs 被发现,而鱼类中约有 17 种^[4]. TLRs 属于 I 型跨膜受体,由 3 部分组成,分别为胞膜外区、胞浆区及连接前两区的跨膜区. 胞膜外区由十几个至几十个串联的富集亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)组成^[5],并含有 3 个胞外段辅助蛋白,有利于增强蛋白质间的相互粘附,认为可参与对病原相关分子模式(PAMP)的识别. 胞浆区具有一个高度保守的蛋白相互作用区 Toll-IL-1 受体结构域(Toll-IL-1 receptor domain, TIR)与 IL-1R(interleukin 1 receptor, IL-1R)家族成员胞浆区高度同源,在 TLRs 信号传导中具有重要作用^[6-7].

TLR5 是 TLRs 家族成员之一,可识别外来入侵

机体的病原微生物,通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖型信号传导通路活化核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B),从而刺激炎症细胞因子的产生,促进炎症靶基因的表达^[8-9]. *TLR5* 的主要配体是鞭毛蛋白,鞭毛蛋白是细菌鞭毛内主要的致病因子,具有强致炎作用,能介导机体炎症反应及器官损伤^[10-11]. 目前在硬骨鱼中发现存在 2 种类型的 *TLR5*,分别是可溶型的 *TLR5* (soluble form of *TLR5*, *TLR5S*)和跨膜型的 *TLR5* (Membrane form of *TLR5*, *TLR5M*),其中 *TLR5S* 是硬骨鱼特有的. 第 1 个在鱼类中发现的 *TLR5* 是红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)的可溶型 *TLR5*,没有跨膜区和 TIR 结构域^[12],虽然已经在哺乳类中发现了可溶型的 *TLR4*^[13]和 *TLR2*^[14],但是至今为止还没有在哺乳动物中发现 *TLR5S*. 除红鳍东方鲀外,在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中也有 *TLR5S* 基因的报道^[15-18]. 最近研究表明, *TLR5S* 是在 *TLR5M* 激活 NF- κ B 信号通路后,与一些急性蛋白共同被表达出来, *TLR5S* 能以正反馈的形式扩大 *TLR5M* 在细胞内的反应^[18].

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)属于鲷科(Serranidae),石斑鱼属(*Epinephelus*),英文名为 orange-spotted grouper,属广盐性鱼类,作为我国南方

收稿日期: 2012-05-14

基金项目: 福建省种业创新与产业化工程项目(闽种石斑 004 号)

* 通信作者: ccdfj@fjscs.ac.cn

名贵的经济养殖鱼类,由于其肉质鲜美、营养丰富、体色艳丽,市场价格高且稳定,近几年成为台湾、广东、福建、海南 4 省的重要养殖鱼类。随着养殖规模的扩大,养殖业者普遍缺乏科学的养殖技术和病害防控技术,在苗种培育和养成阶段,常有爆发性死亡现象发生。细菌病是危害石斑鱼健康养殖的常见病,特别是弧菌属(*Vibrio*)种类,常造成养殖石斑鱼的大量死亡,给水产养殖业造成重大的经济损失。2011 年福建养殖石斑鱼发生严重的表皮溃烂症,损失严重,我们经过分离、人工感染、鉴定其病原之一就是哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)。目前对于斜带石斑鱼的抗细菌感染的分子机制及其免疫机制的研究较少^[19-24]。作为重要的先天免疫相关基因之一,TLR5 在斜带石斑鱼受到病菌感染后的反应中所起作用的相关研究还尚未见报道。因此,本实验开展对斜带石斑鱼可溶型 TLR5 (*ECTLR5S*) 基因结构与功能的研究,并检测其表达量在外界病原菌感染前后的变化,为了解 TLR5 在鱼类炎症反应中的分子免疫学机制及提高人工养殖斜带石斑鱼的天然免疫力和抗病力提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本实验所采用的斜带石斑鱼来自于福建省诏安县大华水产有限公司。挑选活泼健康的个体[全长(16±5) cm,体质量(70±15) g]在水池中暂养一周,确定石斑鱼个体无特殊情况出现。每实验组 5 尾,其中攻毒组鱼采用腹腔注射哈维氏弧菌。培养 18~24 h 的菌,制成 1.8×10^8 mL⁻¹ 的生理盐水悬液,注射剂量为 2.5 μL/g;对照组鱼注射等量生理盐水,然后在 0,3,6,12,24,48 h 时将其脾脏、肝脏、头肾、肠、胃、脑、鳃、血、肌肉、心脏取出 30~50 mg,放入 2.0 mL 装有 RNAlater 的离心管中保存。

1.2 引物设计

斜带石斑鱼 cDNA 序列,采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计定量 Real time PCR 引物,所有引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。各引物及其序列如表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取及消除 DNA 污染

取出 30~50 mg 在 4 °C 保存于 RNAlater 中斜带石斑鱼样品组织,置于装有 1 mL 动物 RNAout(购自

北京天恩泽基因科技有限公司)提取液的离心管中,用

表 1 *ECTLR5S* 基因定量引物序列

Tab. 1 <i>ECTLR5S</i> gene quantitative primer sequence		
基因	正向引物	反向引物
<i>TLR5S</i>	5'-TGTTTCCCAAAA-CAACGTGA-3'	5'-CATGACCCAGAA-CACCAATG-3'
<i>βactin</i>	5'-TACGAGCTGCCT-GACGGACA-3'	5'-GGCTGTGATCTC-CTTCTGCA-3'

匀浆器研磨至无颗粒状残留物,静置于冰盒 10 min,使细胞充分裂解。直接加入预冷的 200 μL CHCl₃,颠倒混匀稍许,12 000 g 低温离心 10 min,取上清液移至新的 1.5 mL 管中,加入等体积的异丙醇,低温下放置 20 min,再经 12 000 g 低温离心 10 min。弃上清,留下离心管中白色沉淀物,加入 700 μL 的 70%~75% (体积分数)乙醇洗去沉淀中的异丙醇,12 000 g 低温离心 5 min,重复洗涤 2 次。然后清除管中残留乙醇后,加 10~30 μL 无 RNA 酶灭菌的双蒸水溶解 RNA 沉淀。取 2 μL RNA 电泳,检测其质量及是否收到 DNA 和蛋白质污染。最后测 OD 值。

1.3.2 合成 Real time PCR cDNA 第一条链

在 0.5 mL 的 PCR 管中加入如下的反应体系:1) 加入 3 μg 经过 DNase 处理过的总 RNA,1 μL 的随机引物(10 mmol/L),再加入无 RNA 酶的灭菌双蒸水至 14 μL,轻轻混匀后,72 °C,10 min,然后冰上放置 5 min,破坏其 RNA 二级结构。随后加入以下体系:4 μL 5 × First-strand Buffer, 1 μL dNTP Mix (10 mmol/L),1 μL MMLV 逆转录酶(200 U/μL),混合均匀。37 °C 下反应 90 min,热盖 70 °C 加热 15 min。将产物置于 -20 °C 保存备用。

1.3.3 目的基因的生物学分析

运用 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性比对;使用 Compute pI/Mw tool(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)预测等电点和分子质量;利用 NetNGlyc1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)查找糖基化位点;NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)查找磷酸化位点;采用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)寻找信号肽;ScanProsite(<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>)预测二硫键位置;TMHMM 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测蛋白跨膜结构域;InterProScan software (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>)

ProScan/) 预测蛋白质功能结构域;用 MEGA4.0 软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树;使用 BioEdit 软件进行多重比较。

1.3.4 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 反应体系中以 cDNA 第一条链为模板,斜带石斑鱼 β -actin (GenBank: AY510710) 作为看家基因,用 β -actin 引物与目的基因引物在 96 孔板内进行定量 PCR 扩增。经过预实验对引物和模板浓度进行一系列优化后,将总反应体积定位为 20 μ L, 每个体系反应包括:10 μ L SYBR Green Real time PCR Master Mix, 10 μ mol/L 正、反引物各 0.5, 9 μ L cDNA 模板。每个时相做 5 个样品,每个样品做 3 个重复样。

PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。并对每个基因的溶解曲线进行分析。

1.3.5 数据处理

根据仪器自动给出每个样品的 RQ (relative quantification) 值,记录下 RQ 值,基因表达水平用 RQ 平均值 \pm 标准误差来表示,并用 SPSS 统计软件对数据进行非配对样本 *t*-检验分析,以 $p < 0.05$ 为显著水平。

2 结 果

2.1 *ECTLR5S* 基因 cDNA 序列及蛋白质结构分析

ECTLR5S 基因是从基因库中筛选出来的。在 *ECTLR5S* 基因的 5' 和 3' 非编码区分别设计一个正向和一个反向引物,通过 head to toe PCR 扩增获得 *ECTLR5S* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF) 序列,并通过序列测定确定了该序列的准确性。该基因全长序列 2 439 bp (图 1), ORF 检索该 cDNA 序列,其编码区 1 935 bp 共编码 644 个氨基酸,5' 非编码区(5' UTR) 和 3' 非编码区(3' UTR) 435 bp, 末端具有 polyA 尾。*ECTLR5S* 预测编码蛋白质分子质量为 72.28 ku, 等电点为 6.37。用 SignalP4.0 程序预测,结果显示开始 21 个氨基酸为信号肽,说明它是分泌蛋白。SMART 软件分析该蛋白, *ECTLR5S* 包含 9 个 LRR 结构域及 3 个 LRR 典型亚结构域(图 2), 并且没有 TIR 结构域,说明该基因为可溶性 Toll 样受体。

2.2 *ECTLR5S* 的同源性和系统进化分析

经过 BLAST 生物学分析, *ECTLR5S* 与 NCBI 数据库中的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、香鱼 (*Plecoglossus altivelis altivelis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 等物种的 *TLR5S* 基因的核苷酸序列的相似性为 74%~79%。该氨基酸序列与 NCBI 上已有物种的 *TLR5* 氨基酸序列进行同源性比较分析,一致性最高为 69%。由此可知 *ECTLR5S* 蛋白高度保守。

使用 MEGA 5.0 软件分析,对氨基酸序列以 NJ 法做系统进化树,置信度检验 1 000 次。结果显示: *ECTLR5S* 与其他硬骨鱼类聚为一支,高等哺乳类聚为一支,两栖类和昆虫分别单独为一支(图 3)。

电泳结果表明 RNA 纯度尚可,基本没有 DNA 和蛋白的污染。说明提取的总 RNA 质量较好,可以进行后续实验。

2.3 *ECTLR5S* 基因表达特征

电泳结果表明 RNA 纯度尚可,基本没有 DNA 和蛋白的污染。说明提取的总 RNA 质量较好,可以进行后续实验。

2.3.1 *ECTLR5S* 基因在各种组织中的表达

利用 Real time PCR 技术,以看家基因 β -actin 作为内参照,检测 10 种组织中 *ECTLR5S* 基因的表达情况(图 4)。从结果中可以看出 *ECTLR5S* 基因在斜带石斑鱼 10 个组织中均有表达,但是在肝脏中表达量最高,其次为脾脏、血、肾脏,而在肌肉中表达量最低。

2.3.2 *ECTLR5S* 基因在弧菌感染后肝脏中的表达

斜带石斑鱼经过弧菌感染 0, 3, 6, 12, 48 h 后,对实验组和对照组斜带石斑鱼的肝脏提取总 RNA,再反转录为 cDNA 后作为模板。

Real time PCR 结果显示(图 5),在肝脏中,弧菌感染 3, 6, 12, 48 h 后 *ECTLR5S* 基因在转录水平的表达量显著高于对照组 ($p < 0.05$),且在 3 h 时表达量达到最高,6 h 后表达量开始下调。

3 讨 论

鱼类 TLRs 受体家族的种类和哺乳动物相似,但是也存在差异,如 *TLR5S* 是鱼类所特有。鱼类的 *TLR5S* 首次发现是在红鳍东方鲀中^[12],随后在虹鳟、大西洋鲑和牙鲆中陆续被发现。本实验所研究 *ECTLR5S* 的全长 cDNA 序列为 2 439 bp,由 SMART 软件分析可知, *TLR5S* 只含有 LRRs 结构域,缺乏跨膜区和胞浆区结构域,即不具有 TIR 结构域。这是 *TLR5S* 和 *TLR5M* 的明显不同,这表明 *ECTLR5S* 与其他鱼类的 *TLR5S* 相同,是一种可以从细胞内分泌出来的可溶性细胞因子受体。使用 EMBL 软件分析, *ECTLR5S* 的 LRRC 区(LRRCT)具有 2 个半胱氨酸

```

1 GCAGAACAGAGCTCTGATCTGGAGTGTGTTGACTTCATATCATTGAGGGTTCCCTGGTGAGCAAGatgtggactct 80
1
1 gggcttcagggtggctgtcatctgtgttttctacaggtgccagggtgtttcccatcatgctctcatgtgaactctgtag 160
5 G L Q V A V I C V F L Q V P G C F P S C L I V N S V A 31
161 ccaactgtgctacaagaacctcgcctcagttcctccctccctccctcacatcaccacctgtacctggaggggaaccgc 240
32 N C A Y K N L R S V P P L P P H I T H L Y L E G N R 57
241 atcagtgagatcaactccaactcctgtcggcctgaaggagctgcaggagctggaccttggagggcagttgtgctct 320
58 I S E I N S N S L S G L K E L Q E L D L G G Q F V R L 84
321 catgatcagaacaatgccttcaggagacaagacacctgaggagctgggtgctcggtggcaactccacctcagctgg 400
85 M I R N N A F R E Q R H L R R L V L G G N V H L Q L E 111
401 agccgcaggttttggggactgtccagtttcagaatctctacttatatacactgttcctccaacagctctatactggag 480
112 P Q A F V G L S S L Q N L Y L Y H C S L Q Q S I L E 137
481 gggactacctggagccactcacctcttagagactcttgacctctttgtaacaagataaagagactccagcttcaat 560
138 E D Y L E P L T S L E T L D L F G N K I K R L Q P S M 164
561 gttcttgcacaacatgactaatttgaaatctgaaatctcaaactgaatgaaatgacaaaaatgtgagctgtagctgg 640
165 F F A N M T N L K I L N L K L N E I D K I C E S D L V 191
641 taggttttcagggaagcactttgaggttctgaatttagactctgtttgcttaagacctgttaaaaaacgcgaatgg 720
192 G F Q G K H F E V L N L D S V C L K T M F K K R E V 217
721 cagaatgtggaaatcctttcaggggatgtcctttcagacaactcagctgtccaacaacgggtaagcgtgagtaaatc 800
218 Q K C G N P F R G M S F Q T L D L S N N G L S V S K S 244
801 gaacagttgtccacagcattagggggaccaagatttccaatctcaactgtcactgggactcatgggtaagatttt 880
245 K Q L S T A I R G T K I S N L K L S L G L M G K G F S 271
881 cattcaatatttaccctgatccagacagcagatgttgaaagcctgaatgacagttcagctccacactctggactctct 960
272 F N I Y P D P D S S M F E S L N D S S V H T L D L S 297
961 aaaaacagatatttgactccaaggggggtttcagtgactaaaagaagtgcattgatgtttcccaaaaacaa 1040
298 K N K I F A L Q E G V F S A L K E V A I I D V S Q N N 324
1041 cgtgaatcagatacacagaatgcctttgaaggccttcaggacatttacaatgcctcaactgtcacacaacctgtgg 1120
325 V N Q I H R N A F E G L Q G H L Q M L N L S H N L L G 351
1121 gggaaatcattctgacacttttgcctctctgacaaacctgcaggtgtggactgtcttacaatcacatgggtttctg 1200
352 E I H S D T F A S L T N L Q V L D L S Y N H I G V L 377
1201 ggtcactgactcatttagtgaacttccaatataaagtattaaactaacaggaaactctctcgagacattggcttccc 1280
378 G H D S F S E L P K L K V L N L T G N S L R D I G F P 404
1281 tgcttacttccgagtttagattacctctgttgagtgacaataaactgatagactcgcggggagaaatcatcataggt 1360
405 A L L P S L D Y L L L S D N K L I D S P G R S I H R F 431
1361 ttgctgggatatttgcacttggacattcgggataacagattaacaacctggggggtgttataaccttggactctg 1440
432 A G D I L H L D I R D N R L T N L G G V Y T L V T L 457
1441 ctggaccgcttcagcatctctcttatggaggaaaccaatcaagtgggcaactcggcagagaagtcaggttcattga 1520
458 L D R L Q H L S Y G G N P I K W C N L G R E V R F I D 484
1521 ttogaataatgtcacacctggatctcagcgcagctcctgcagctgtctggctcagtggaatgtctggactctgt 1600
485 S N N V T T L D L H G S S L Q S V W S Q W T C L D L F 511
1601 ttgacaatttcggacatgtgattactctgaacttgagccacaacgcgctgcagctcttctcctaggggcattttcaagggt 1680
512 D N F G H V I T L N L S H N A L Q S L P R G I F K G 537
1681 ctcacctcagttgtggagatggacctctcaacaccttgacttctcagcctgatgtattgcccacaaagtctcaa 1760
538 L T S V V E M D L S S N S L T Y L Q P D V L P K S L K 564
1761 agtactcgaccttccaacacctcagacctcctcagcctgatgcttttcgctctcagctccttgacctgaaca 1840
565 V L D L S N N F I A S P D P D A F R S L S S L D L N M 591
1841 tgaaccgatttcactgtgatgcaaacctgaaggttttctgaattgggtaaccaaacaccacctgacactcctgacct 1920
592 N R F H C D A N L K S F L N W V T N T T V T L L T P 617
1921 gtcaaggagctcaaatgtgaatttccatctgattctataatgttcctctgttacgattctctgatgacatcacagca 2000
618 V K E L K C E F P S D F Y N V P L L R F S D D I T Q Q 644
2001 gtaaAGTAGCAACTAAAAGCCAACACATAACGGATAATGTACAGCGAGTGGCCATTATTGAGAAATAAACCTGCAGAGG 2080
2081 GGTCTGAATCACCATTCTGTACATAATCCCACTTGTACATGGCCAACATAAAGTCAATAAATTTGACACAAAATTT 2160
2161 GAATGCAAGCTTTTACTGATATGAAAATGATCTTATTGCTTCTGCTGGCGTCTATGATCAGAAGTCTGATGCAACG 2240
2241 GTCTGTTTTTCATCAGATGGTCTGCTCTTCAAGAATATGTATGTCTTTCAATGTGACGCCTGTAAAATCATGTGGAA 2320
2321 TGAACACATATTGACTTGTGTAATATCTGTATGATCTGAATTTGTAATAAGAGCCAGATAATGATAATCTCAGAAAAAGT 2400
2401 TAAAGTTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2439

```

矩形框为信号肽；下划线为 LRR 结构域；粗下划线为 LRR 典型亚结构域。

图 1 ECTLR5S 基因 cDNA 全长和推导的氨基酸序列
Fig. 1 ECTLR5S gene cDNA full-length and deduces the sequence of amino acids



图 2 ECTLR5S 保守区结构域模式图
Fig. 2 ECTLR5S conservative district structure of patterning domain

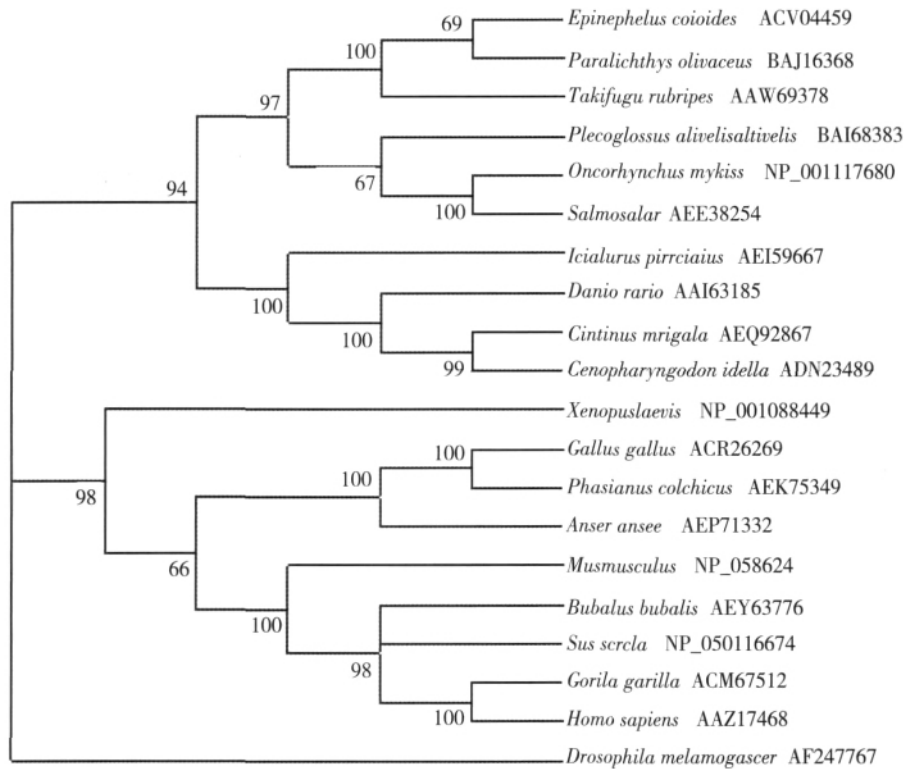
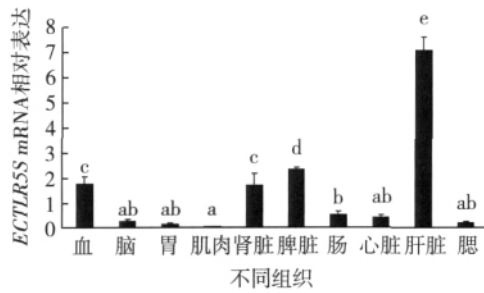


图 3 TLR5S 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

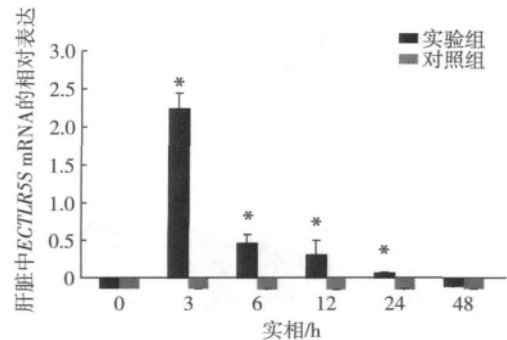
Fig. 3 TLR5S amino acid sequences NJ system evolutionary tree



不同组织中的 a,b,c,d,e 表示差异显著性 ($p < 0.05$).

图 4 *ECTLR5S* 基因的组织表达

Fig. 4 *ECTLR5S* gene expression in different tissues



不同实相中的 * 表示差异显著性 ($p < 0.05$).

图 5 *ECTLR5S* 基因在肝脏中的表达

Fig. 5 *ECTLR5S* gene expression in the liver

残基,和牙鲆的 *TLR5S* 的 LRRCT 中半胱氨酸残基数相同^[15],而鲶鱼中含有 4 个半胱氨酸残基^[16,25].

ECTLR5S 与其他物种极高的相似性和在进化过程中的保守性可能暗示其功能的重要性. Real time PCR 检测 *ECTLR5S* 基因在不同组织中的表达情况,结果显示 *ECTLR5S* 基因在所有组织中均有表达,其中在肝脏中的表达量最高,其次是脾脏、血和肾脏,而其他组织的表达量较低.这可能主要是因为自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)和自然杀伤 T 细胞(natural killer T cell,NKT)等天然免疫细胞选择性富集

于肝脏,在抗原呈递作用下介导免疫耐受或炎症发生^[26-27].其他鱼类中 *TLR5S* 基因同样在所有组织中都有表达,其中虹鳟中 *TLR5S* 基因也是在肝脏中的表达量最高^[18],但是在牙鲆中 *TLR5S* 基因在头肾中表达量最高^[15],红鳍东方鲀 *TLR5S* 基因在消化系统中表达量最高^[12].由于 Real time PCR 结果表明斜带石斑鱼 *TLR5S* 基因在肝脏中显著表达 ($p < 0.05$),因此本实验研究了斜带石斑鱼经哈维氏弧菌感染刺激后其在肝脏转录水平的表达变化.在哺乳动物研究中,

TLR5 所识别的唯一配体是鞭毛蛋白^[28]. 当 TLR5 与配体蛋白结合后, 通过 MyD88 依赖途径和白介素 1 受体相关激酶受体相关激酶 6 (Interleukin-1 receptor associated kinases, IRAKs) 家族相互作用募集肿瘤坏死因子受体相关激酶 6 (TNF receptor-associated factor 6, TARF6) 而激活 NF- κ B, 再进一步诱导细胞因子及前炎症因子的产生. 哈维氏弧菌感染后 3, 6, 12, 24 h, *ECTLR5S* 基因在肝脏中表达量显著升高 ($p < 0.05$), 而在 48 h 回落至正常水平. 在哈维氏弧菌感染刺激早期, 机体为了清除入侵病原, 诱导 *ECTLR5S* 基因的表达, 参与机体免疫应答. 随时间推移, 机体中的病原逐渐被清除, *ECTLR5S* 基因表达随之下降. 这可能揭示了 *ECTLR5S* 在斜带石斑鱼抵抗哈维氏弧菌的过程中发挥重要的作用, 而且肝脏是其发挥作用的重要场所.

参考文献:

- [1] 何玉林, 刘小双, 叶狄. Toll 样受体的结构及免疫功能探究[J]. 中国健康月刊: 学术版, 2011, 30(7): 2-4.
- [2] 弓莉, 顾为望, 蔡建平. 脊椎动物 Toll 样受体的比较生物学[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(6): 507-511.
- [3] Janeway C A Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. Science's STKE, 2002, 20: 197.
- [4] Rebl A, Goldammer T, Seyfert H M. Toll-like receptor signaling in bony fish[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2010, 134(3/4): 139-150.
- [5] 嵇武, 李宁. Toll 样受体与临床疾病关系的研究进展[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(16): 3709-3711.
- [6] 王鸿鹄. 斜带石斑鱼 IL-8 及其受体基因的克隆、表达 [D]. 广州: 广东海洋大学, 2010.
- [7] 谢艳萍, 王建春. Toll 样受体与信号转导[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2003, 23(4): 198-200.
- [8] 苏踊跃, 罗向东. Toll 样受体与天然免疫[J]. 生命的化学, 2002, 22(5): 407-410.
- [9] 韦友传, 高谦, 昌明先, 等. 斜带石斑鱼 MyD88 基因的克隆与表达[J]. Genomics, 2011, 30(3): 288-295.
- [10] Liaudet L, Murthy K G K, Mabley J G, et al. Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* serovar Muenchen flagellin and serovar enteritidis lipopolysaccharide [J]. Infection and Immunity, 2002, 70(1): 192-198.
- [11] Liaudet L, Szabo C, Evgenov O V, et al. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis [J]. Shock, 2003, 19(2): 131.
- [12] 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.
- [13] Iwami K, Matsuguchi T, Masuda A, et al. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling [J]. The Journal of Immunology, 2000, 165(2): 6682-6686.
- [14] LeBouder E, Rey-Nores J E, Rushmere N K, et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR) 2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk [J]. The Journal of Immunology, 2003, 171(12): 6680-6689.
- [15] 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 Immunology, 2010, 29(4): 630-638.
- [16] Peterson B C, Bosworth B G, Bilodeau A L. Differential gene expression of IGF-I, IGF-II, and toll-like receptors 3 and 5 during embryogenesis in hybrid (channel \times blue) and channel catfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2005, 141(1): 42-47.
- [17] 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]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 109(1/2): 183-187.
- [18] 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]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(47): 48588-48597.
- [19] 胡云凤. 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) IL-8 基因 cDNA 的克隆及组成型表达分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [20] 林超辉. 斜带石斑鱼的生物学特性及养殖技术 [J]. 水产科技情报, 2007, 34(5): 206-207.
- [21] 刘秀珍, 李家炳. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究 [J]. 热带海洋, 1994, 13(1): 81-86.
- [22] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原 [J]. 水产学报, 2004, 28(3): 297-302.
- [23] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.
- [24] 朱传华, 何建国, 黄志坚. 网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病病原菌分离、鉴定及致病性研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 39(S1): 278-282.
- [25] Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E, et al. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S,

- TLR20, TLR21[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(6):1218-1230.
- [26] 王丙云, 毛鑫智. 肝脏的免疫功能[J]. *国外医学:免疫学分册*, 1999, 22(3):158-161.
- [27] 陈宁, 刘雯雯, 朱樑. TLR 与肝脏疾病[J]. *肝脏*, 2011, 16(2):162-163.
- [28] 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.

Characterization and Analysis of *TLR5S* Gene from *Epinephelus coioides*

LIN Ke-bing, GE Hui, LIN Qi, WU Jian-shao, HE Li-bin, FANG Qiong-shan, ZHOU Chen*
(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

Abstract: TLR5 (Toll-like receptor 5) is an evolutionarily conserved component of the innate immune system that responds to specific pathogen-associated molecular patterns (PAMP) during infections. By now, two types of TLR5 were found in fish, one was membrane form and the other one was soluble form. In this report, the *Epinephelus coioides* soluble TLR5 (*ECTLR5S*) cDNA sequence was screened from the NCBI database (GenBank number: GQ396667). The full-length cDNA of *ECTLR5S* was of 2 439 bp, including a 5'-terminal untranslated region (UTR) of 69 bp, a 3'-terminal UTR of 435 bp and an open reading frame (ORF) of 1 935 bp encoding a polypeptide of 644 amino acid residues. The molecular mass of the deduced protein was approximately 72.28 ku with an estimated pI of 6.37, and showed highest identity (69%) to *Paralichthys olivaceus*. Quantitative Real time PCR analysis revealed a broad expression of *ECTLR5S* in most tissues, with the predominant expression in the liver. The expression of *ECTLR5S* after injection with *Vibrio harveyi* was tested in liver. The results indicated that *ECTLR5S* could be induced in liver by injection with *Vibrio harveyi*. *ECTLR5S* expression was significantly upregulated at 3, 6, 12 and 24 h ($p < 0.05$). Our results suggested that *ECTLR5S* might play an important role in fish's defense against bacterial infection, and liver might be the vital organs of the actions.

Key words: *Epinephelus coioides*; TLR5S; *Vibrio harveyi*; Real time PCR