

团头鲂 Toll 样受体 3 基因的克隆及特征研究

苏建国^{1, 2} 朱作言² 汪亚平²

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

cloning and characterization of toll-like receptor 3 in bluntnose black bream, megalobrama amblycephala

SU Jian-Guo^{1, 2}, ZHU Zuo-Yan² and WANG Ya-Ping²

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 团头鲂; Toll 样受体 3; 基因克隆; 特征分析

Key words: *Megalobrama amblycephala* (bluntnose black bream); Toll-like receptor 3 (TLR3); Gene cloning; Characterization

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)05-0986-08

由草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus, GCRV) 引起的草鱼出血病, 是对草鱼危害最大的传染性疾病之一。GCRV 是双链 RNA 病毒, 属呼肠孤病毒科 (Reoviridae), 水生呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*), G 亚型^[1]。GCRV 主要引起草鱼、青鱼等在鱼种阶段发生出血病。高密度集约化养殖更增加了疾病暴发的频率, 严重地影响了经济效应。团头鲂、鲫鱼、鲤鱼等能抗 GCRV 感染^[2]。模式鱼斑马鱼对 GCRV 也不易感, 而模式鱼稀有鲫却极易感^[3]。同样都是鲤科鱼类, 有些对 GCRV 易感, 有些不易感, 其原因可能来自机体本身免疫机制上的差异。

TLRs (Toll-like Receptors) 家族是一类模式识别受体 (Pattern Recognition Receptor, PRR), 它们特异性识别病原体的某些保守成分 (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs), 在先天性免疫启动及获得性免疫承继中发挥重要作用。其中成员 TLR3 (Toll-like Receptor 3) 被认为是 RNA 病毒感染的指示分子^[4], 因为 TLR3 识别 dsRNA (Double strand RNA)^[5], 而 dsRNA 是所有 RNA 病毒复制的中间环节^[5-7]。公认的 dsRNA 结合位点位于 TLR3 的 N 端马蹄形结构的无糖基化的一面^[8]。TLR3 识别 dsRNA 后, 诱导一系列促炎细胞因子和趋化因子, 以便有效对抗病毒感染^[9, 10]。

IFN- β 是由 TLR3 诱导产生的最主要的细胞因子^[11]。IFN 并不进入宿主细胞直接杀病毒, 它首先与靶细胞表面的特异性受体结合, 使细胞内酶激活, 然后触发一系列细胞反应, 使宿主细胞产生一组抗病毒蛋白, 如蛋白激酶 R (Protein kinase R)、Mx 蛋白、2', 5' 寡腺苷酸合成酶依赖的 RNase L (2', 5'-Oligoadenylate Synthetase, OAS) /RNase L 等^[12]。

TLR3 基因序列已在多种无脊椎动物和脊椎动物中被报道。到目前为止 (2008 年 7 月), 在鱼类中已在鲫鱼、稀有鲫、斑马鱼、斑点叉尾鲂、蓝叉尾鲂、虹鳟、红鳍东方鲀、牙鲆中被报道, 其中鲫鱼、稀有鲫、斑马鱼为鲤科鱼类。在本研究中, 我们以与草鱼食性相似的团头鲂为研究对象, 通过同源克隆和 RACE 技术获得了其 TLR3 基因的 mRNA 全长。把团头鲂 TLR3 与已报道的鲤科鱼类 TLR3 序列进行比对, 期望能在 GCRV 的识别受体上能发现一些可能的启示, 为进一步深入研究对 GCRV 的抗病机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 RNA 的提取 实验室活体解剖市场购买的团头鲂, 取出 50—100 mg 组织 (包括肝胰脏、中肠、头肾、心脏、肌肉、脾脏和鳃) 立即放入 TRIzol[®] LS (Invitrogen) 匀浆, 总 RNA 按说明书提取。通过琼脂糖凝胶电泳溴乙锭染色检测 RNA 的完

收稿日期: 2008-07-18; 修订日期: 2009-01-13

基金项目: 中国博士后科学基金 (20070410298); 西北农林科技大学“青年学术骨干支持计划” (01140309); 国家自然科学基金 (30740009 和 30871917)

作者简介: 苏建国 (1972—), 男, 汉族, 陕西人; 博士; 主要研究方向为水生生物分子免疫学。E-mail: su.jianguo@gmail.com

通讯作者: 汪亚平, E-mail: wangyp@ihb.ac.cn

整性。通过分光光度计测定 RNA 的浓度,并根据 A_{260}/A_{280} 判断 RNA 的纯度。将高质量的总 RNA 保存与 -80 备用。

1.2 团头鲂 TLR3部分序列的克隆 根据 GenBank 中已报道的鱼类 TLR3 的 cDNA 序列设计兼并引物。第一轮 PCR 的正向引物为 STF1,反向引物为 STR4;嵌套式 PCR 的正向引物为 STF2,反向引物为 STR3 (表 1)。用六碱基随机引物和 SuperScriptTM III 反转录酶进行反转录。PCR 反应在 ABI 9700 Thermal Cycler Instrument 上进行。在 25 μ L 的反应体系中,1 μ L cDNA,2.5 μ L 的 10 $\times$ 缓冲液,2.5 μ L Mg²⁺

(25mmol/L),1 μ L dNTPs (10mmol/L),1 μ L Taq 酶 (1 U/ μ L),每条引物各 1 μ L (10 μ mol/L),15 μ L 无核酶的水。PCR 反应程序为:94 变性 5min,接着 35 个循环 (94 30s,60 30s,72 1min),72 延伸 5min,最后 20 。PCR 产物用 Axygen 胶回收试剂盒 (Axygen) 进行纯化,连接到 pMD-18 T 载体 (TaKaRa)。连接产物转染 Top10 感受态细胞 (Invitrogen)。PCR 筛选获得的阳性克隆选 3 个用 ABI 3730 DNA 测序仪 (Applied Biosystems) 进行测序。获得的序列用 BLASTX 进行比对,该序列与已知鱼类的 TLR3 同源。

表 1 本研究所用的主要引物

Tab. 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	扩增长度及说明 Amplicon length (nt) and primer information
TLR3		
STF1 (forward)	CTCAGYAA YAA YAA YATYGMAACAT	Smear
STR4 (reverse)	TTCAGWA GAA YYGRATYCTCCA	Gene cloning (first round PCR)
STF2 (forward)	TKCAGCACAA YAA YTIDGC	357
STR3 (forward)	A YAGRA TGCTCTCRCA SGTGCA	Gene cloning (Nested PCR)
STF83a (forward)	ACTTGA TGCTTTGCGTGGCTTCTC	3' RACE
STR8a (reverse)	CAGCTGATTCAA GAGATTACCACGG	5' RACE
STR9 (reverse)	GAGAA GCCACGCAAA GCA TCAAGT	
STFa (forward)	CTGAACGTGGGAAA TTAGATCGTCAC	2824
STRb (reverse)	GGACCTGGCACAAAA TAAACATTA TAGG	Confirming sequence
STFc (forward)	TCTGCTAAACTGGGCACAC	141
STRd (reverse)	AGATGAGAGTATCA GAACCC	RT-PCR
β -actin		
F86 (forward)	GATGATGAAA TTGCCGCACTG	135
R87 (reverse)	ACCAACCATGACACCTGATGT	RT-PCR
Universal adaptor primer		
UM	Long: CTAA TACGACTCACTA TAGGGCAAGCA GTGGTA TCAACGCAGAGT	RACE
	Short: CTAA TACGACTCACTA TAGGGC	
NUP	AAGCATGGTA TCAACGCAGAGT	
5'RACE adaptor		
Oligo dG	AAGCATGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG	5' RACE
3'RACE primer		
3' CDS	AAGCATGGTA TCAACGCAGAGTAC (T) ₃₀ VN	3' RACE

Note: Y = C/T; M = A/C; K = G/T; D = A/T/G; R = A/G; S = G/C; W = A/T; V = A/G/C; N = A/G/C/T

1.3 快速扩增 cDNA 末端 (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) 根据上述已获得的团头鲂 TLR3 部分序列设计引物,用 BD SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (BD Biosciences Clontech) 进行 RACE。在 3' RACE 中,用基因特异性引物 STF83a 和接头引物 UPM 进行扩增 (表 1)。在 5' RACE

中,第一轮 PCR 用基因特异性引物 STR8a 和接头引物 UPM,嵌套 PCR 用基因特异性引物 STR9 和接头引物 NUP (表 1)。对获得的 PCR 产物进行纯化、连接、转化、筛选及测序。全长 cDNA 序列用 5' 非翻译区引物 STFa 和 3' 非翻译区 STRb (表 1) 进行验证。

1 GAGCTGAACGTGGGAAATTAGATCGTCACAATTCAATTTGACTTTGAAAAAGCTTGAA
1 M E L M K L I L L P L F Y T C F
61 GAAAGGAAAATACATGGAAGTATGAACTCATACTGTTGCCCTGTTCTACACTTGCTT
17 H A H C A D S A Y P H K S T C T I E N A
121 CCATGCCCCTGTGCAGACTCTGCATATCCACACAAGTCAACATGTACGATTGAAATGC
37 K A D C S H M N L D V V P T N L P R N I
181 CAAAGCAGACTGTAGTCATATGAATCTGGATGTAGTTCCAACGAACCTACCCAGAAATAT
57 T T L D V S H N R L K N L S S L H L Y S
241 CACCACATTGGATGTGTCTCACAATAGACTAAAAATCTGTCTTCCTTGCATTTGTACTC
77 N L V N V D A S Y N S L T A I E K D L C
301 AAATCTGGTGAATGTAGATGCCAGCTACAACCTCTTAAGTCCATAGAAAAGGATCTCTG
97 L S L P H L Q I L N L Q H N E V Y L M S
361 TCTTTCTCTTCCACACCTGCAAATCTTAATCTGCAACACAATGAAGTGTATTTGATGAG
117 E K V L K N C F H L K R L D L S V N R L
421 CGAGAAAGTCCTGAAAACTGTTTTCATTTGAAGCGACTTGACCTGTCTGTCAATAGGCT
137 K L Q G E P F S V L K N L T W L D V S R
481 GAAGCTACAAGGGGAGCCTTTCTCTGTTCTAAAGAATTTGACATGGTTGGATGTATCTCG
157 N K L K S A K L G T Q P Q L F N L V T L
541 AAACAACTGAAATCTGCTAAACTGGGCACACAACCTCAGCTGCCAAATCTGGTGACCCT
177 I L S G N E I S V L Q K N D F S F L S N
601 TATTCTTTCTGGAATGAAATTTCTGTACTGCAAAGAATGACTTCTCATTCTCAGTAA
197 S S A F R V L I L S S L S L K K I E N G
661 TTCCTCTGCATTTGGGTTCTGATACTCTCATCTCTGTCTCTTAAGAAGATCGAGAATGG
217 C F R A I A R L S D L V L D W S K L S T
721 CTGTTTCCGGCTATTGCTAGACTATCTGACTTGGTTCTGGATTGGAGCAAGCTCAGCAC
237 Q F T T D L C E E L A S T A V R N L S L
781 TCAGTTTACCACTGATCTTTGTGAAGAACTTGCTAGCACAGCCGTGCGAAACCTTTCCCT
257 K N T L Q V T L S N M T F K G L D K T N
841 TAAGAACTCTCCAGGTGACACTCTCAAACATGACTTTTAAAGGTCTAGACAAGACTAA
277 I T V L D L S Y N T M S K I V D G A F Q
901 CATCACAGTGCTTGACCTCAGCTACAACACAATGTCCAAGATTGTTGATGGTGCCTTTCA
297 W F P R L E F L S L E H N S L R H L T K
961 GTGGTTTCCCGACTGGAATTTTATCCCTGGAGCATAACTCCCTTAGACACCTAACTAA
317 D T F S G L G N L R Q L N L Q K A L I K
1021 GGACACCTTCAGTGGACTGGGAAACCTGAGGCAGCTTAACCTGCAGAAAGCACTGATTAA
337 S H T S S L P I I E D F S F H H L V Q L
1081 GAGCCATACATCATCATTACCAATTATTGAAGACTTCTCATTTCCACATTTAGTCCAAC
357 E H L C M A D T A F R E I T E H I F S G
1141 GGAGCATCTTTGTATGGCAGATACTGCATTCCGAGAGATAACGGAGCACATCTTCTCTGG
377 L L H L K T L D L S W S S T G L K T V T
1201 ACTTCTGCACCTGAAGACACTGGATTTAAGCTGGAGCAGCACAGGGTTGAAGACAGTCAC
397 N K T F A S L Q E S P L L E T L N L S A
1261 AAACAAAACCTTTGCTTCTCTGCAAGAATCCCCACTCCTTGAGACTCTTAATCTTTCAGC
417 M G I N K L G P G A F S S L G N L T T L
1321 TATGGGTATAACAAGTTGGGGCCTGGTGCCTTCTCAAGTTGGGCAACCTCACTACACT
437 L L G R N F I N Q Q L K G D E F E G L T
1381 CCTACTTGCCGAACTTCATTAATCAGCAGTTGAAAGGGGATGAGTTGAGGGCCTAAC
457 S I K E I D M S I N Q Q S I S L T N T S
1441 TAGCATTAAGAGATTGACATGTCTATAAACCAGCAAAGTATTTCCCTTACAAATACGTC
477 F I H V P T L R T L K L G R A L K G T L
1501 ATTCATCCACGTCCCTACGTTGAGGACTCTAAAGCTAGGTCGTGCCCTAAAGGGACCT
497 D I E P S P F R P L V N L T V L D L S N
1561 AGATATTGAACCATCTCCATTCAAGCCACTAGTCAACCTCACAGTTCTAGATCTCAGTAA
517 N N I A N I N A G M L R G L Y H L K V L

```

1621 TAACAATATTGCAAACATAAATGCTGGCATGCTGAGAGGGCTGTATCATCTGAAAGTGCT
537 K M Q H N N L A R L W K T A N P G G P V
1681 GAAATGCAGCACAACACTTGGCAAGGTTGTGAAGACAGCCAACCCTGGTGGTCCAGT
557 F F L K D A T K L S V L D L D Y N G L D
1741 GTTTTCTCTCAAGGATGCCACAAACTGTCTGTTCTGGATCTGGATTACAATGGCCTAGA
577 E I P L D A L R G F S E L H E L S L R G
1801 TGAGATTCCACTTGATGCTTTGCGTGGCTTCTCTGAGTTACATGAGCTAAGTCTCCGTGG
597 N L L N Q L H A S V F D D L Q S L K Y L
1861 TAATCTCTTGAATCAGCTGCATGCCTCTGTTTTTGTATGACCTACAGTCTTTAAAGTATTT
617 H L Q K N L I T S V Q R A T F G V P L S
1921 GCATCTTCAGAAGAACCTTATAACATCCGTCCAACGTGCCACATTTGGTGTGCCATTGTC
637 N L T E L D M D R N P F D C T C E S I L
1981 CAACCTGACAGAACTTGACATGGACCGCAACCCCTTTGACTGCACCTGCGAGAGCATCCT
657 W F S E W L N S T N T S V P G F P K S Y
2041 GTGGTTCTCCGAGTGGCTTAACCTCCACCAATACAAGTGTTCCTGGATTTCTCTAAAAGTTA
677 I C N T P N A Y F N R S V M Y F D P L S
2101 CATCTGCAATACCCGAATGCCTACTTTAACCCTCCGTCATGTACTTTGACCCATTGTC
697 C K D M T P F K A L Y I L T S T A V L M
2161 CTGCAAGGATATGACACCTTTTAAGGCACTGTACATTTTGACTAGCACAGCTGTTTTAAT
717 L L F T A F L V H F Q G W R I Q F F W N
2221 GTTGTATTTTACAGCTTTTCTGGTGCCTTCCAGGGATGGAGAATCCAGTTCCTCTGGAA
737 I I V N R M L G S L K D E S V T E G R Y
2281 CATAATAGTAAACCGTATGCTGGGTCGCTGAAGGATGAAAGTGTACTGAAGGTAGATA
757 V Y D A Y I I H T A K D R P W V E R S L
2341 TGTGTATGATGCTTATATCATTACACTGCTAAGGACAGACCATGGGTGGAACGAAGCTT
777 L P L E D E K F N F F L E D R D A I R G
2401 GCTCCCCCTAGAGGATGAAAAATTTAATTTTTTCCTTGAAGACAGAGATGCAATACCTGG
797 F S Q L N T I I E N M G Q S R K I I F V
2461 CTTTTCTCACTTAACACCATTTATGAAAACATGGGACAATCCAGGAAGATAATTTTTGT
817 I T E M L L K D P W C R Q F K A H H A L
2521 TATCACAGAAATGCTTTTAAAGGATCCATGGTGTAGGCAATTCAAAGCACATCATGCACT
837 H Q V M E N N R D S L I L I F L Q D V T
2581 TCACCAGGTAATGGAGACAATCGTGACTCCCTGATTCTGATTTTTTGTGAAGATGTAAC
857 D Y N L N R S L Y L R R G M L K P R C V
2641 TGATTACAATTTGAACCGCTCTCTGTATCTTCGCCGTGGCATGTTGAAACCTCGCTGTGT
877 L Y W P L H K E R I P A F H E K L R S A
2701 TCTCTACTGGCCTTTACACAAGGAACGTATCCAGCTTTTCATGAGAACTCCGCTCAGC
897 L A S T N K V N *
2761 ATTAGCCTCTACCAACAAAGTTAATTAGAAATGATTTTTCTCTATAATGTTTATTTGTGC
2821 CAGGTCCCTCAATATTTGTACTACAGTCCTTACTTGGATTCTCTGTTCCATCACTTTAACA
2881 TTTCTTAACAC ATTTA CAGTTTAAAGAATTTTCAGGTGAGATAAGGTTGAGCACTGGTT
2941 CCTTTCAAATCCTGCAGACCATGCCACCTACCAGAAGTTGCATCCAATGGCTTTGCAAGG
3001 AAGTACCAAATGTGACCTGACAAATGTTAAATGGATAA ATTTACTGTGCTCACAAAAA
3061 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 团头鲂 *TLR3* cDNA 及推导的氨基酸序列Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Megalobrama amblycephala* *TLR3* cDNA

起始密码子前的“终止密码子”用下划线标出;起始密码子加边框;终止密码子用星号(*)标出;AU富含基序加粗表示;信号肽用阴影标出(在蛋白序列上的位置为:1—23);LRR结构域用下划线标出(在蛋白序列上的位置分别为:53—72, 99—122, 146—173, 170—193, 275—297, 298—321, 353—376, 430—452, 506—529, 530—553, 563—585, 586—609, 610—631, 635—658);跨膜区用双下划线标出(在蛋白序列上的位置为:705—727);TR结构域用波浪线标出(在蛋白序列上的位置为:757—900);斜体部分表示亮氨酸拉链结构(在蛋白序列上的位置为:45—66);着重号表示 BB loop(在蛋白序列上的位置为:790—796)

The “stop codon” in front of start codon is marked by dot underline. The start codon is boxed and the stop codon is indicated with an asterisk. AU-rich elements are shown in bold. The signal peptide is shaded (1—23aa). The LRR domains are underlined (53—72aa, 99—122aa, 146—173aa, 170—193aa, 275—297aa, 298—321aa, 353—376aa, 430—452aa, 506—529aa, 530—553aa, 563—585aa, 586—609aa, 610—631aa, 635—658aa). The transmembrane domain is marked by double underline (705—727aa). The TR domain is indicated by wavy underline (757—900aa). The leucine zipper pattern is italic (45—66aa). The BB loop is marked by emphasis symbol (790—796aa)

1.4 序列分析 序列同源性比对用 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。氨基酸序列分析用 Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/>)。蛋白结构域预测用 Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)^[13]。内部结构域特征用 PROSITE database (<http://us.expasy.org/tools/scansite>)^[14]进行扫描。多序列比对用 ClustaW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 及 sequence manipulation suite (<http://www.bioinformatics.org/sms/>) programs。分子进化分析用 MEGA 4.0版本^[15]。

1.5 不同组织中的表达 以 β -actin 为内参照,用半定量 RT-PCR 检测 *MaTLR3* 在不同组织中的表达。 β -actin 的正向引物为 F86,反向引物为 R87,PCR 循环数为 25 圈;*MaTLR3* 的正向引物为 STFc,反向引物为 STFd (表 1),PCR 循环数为 29 圈。PCR 产物在含溴乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.6 GenBank 序列注册号 团头鲂 *TLR3* 全长 mRNA 在 GenBank 中的注册号为 DQ986365,翻译的蛋白的序列号为 AB B3673。

2 结果

2.1 团头鲂 *TLR3* 基因的克隆及序列分析

通过兼并引物扩增获得了团头鲂 *TLR3* 的第一个片段为 357 bp, BLASTX 分析表明与斑马鱼 *TLR3* (序列号: NP_001013287) 的同源性最高 (E 值 = $1e-53$)。3 RACE 获得了 1275 bp 的序列,与第一个片段有 232 bp 完全重叠,包含 30 个 A 的 poly(A) 尾巴,得到了 3 端的全长。5 RACE 获得了 1833 bp 的序列,与第一个片段有 148 bp 完全重叠,在上游出现了“终止密码”,且起始密码与其他鱼类 *TLR3* 也一致,认为获得了 5 端全长。将这些序列拼接后获得了 3085 bp 的序列,设计引物扩增、测序后验证了该序列的正确性,获得了团头鲂 *TLR3* 的 mRNA 全长。序列分析表明团头鲂 *TLR3* 全长 mRNA 序列由 3085 bp 组成,包括 73 bp 的 5 非翻译区,编码区,267 bp 的 3 非翻译区及 30 bp 的 poly(A) 尾巴 (图 1)。编码序列从第 74 个核苷酸开始到第 2788 个核苷酸终止,编码 904 个氨基酸的蛋白。

2.2 氨基酸分析及分子进化关系

由 904 个氨基酸组成的团头鲂 *TLR3* 分子量约为 102846 道尔顿,等电点约为 8.53。BLASTP 分析该序列与鲫鱼的 *TLR3* 同源性最高 (E 值 = 0.0)。团头鲂 *TLR3* 属 I 型跨膜蛋白,具有 23 个氨基酸组成的信号肽,成熟的蛋白有 3 个区域组成,14 个富含亮氨酸重复结构域 (Leucine-rich Repeats, LRRs) 组成的膜外区、1 个跨膜结构域 (Transmembrane Domain) 跨膜区、1 个 TR (Toll - interleukin 1 - resistance) 膜内区 (图 1)。选择人、所有已报道序列的鱼类、海胆的 *TLR3* 序列构建分子系统进化树 (图 2)。在系统树中,团头鲂的 *TLR3* 首先与鲫鱼的 *TLR3* 聚在一起,这与上述 BLASTP 的结果一致。鲤科鱼类的 *TLR3* 聚在一起。为了减少由于进化引起的序列变化,我们选择鲤科鱼类的 *TLR3* 序列进行多序列比对 (图 3),以期分析获得可能的与抗 GCRV 相关的位点。

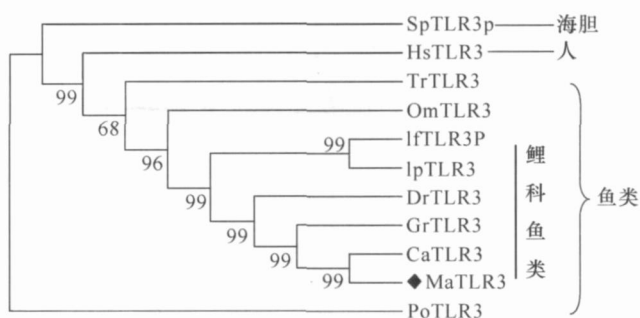


图 2 鱼类、人及海胆 *TLR3* 蛋白序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationships of *TLR3* in fish, human and sea urchin

由 ClustaW2 和 MEGA4.0 软件构建;线长表示遗传距离;黑色方块 () 标出团头鲂 *TLR3*;序列名最后带 p 的表示部分序列;MaTLR3、CaTLR3、GrTLR3、DrTLR3、IpTLR3、IfTLR3、OmTLR3、TrTLR3、HsTLR3、SpTLR3、PoTLR3 所代表的物种及序列号分别为:团头鲂 AB B3673、鲫鱼 ABC86865、稀有鲫 ABL11471、斑马鱼 AAT37633、斑点叉尾鲂 ABD93872、蓝叉尾鲂 ABH10661、虹鳟 AAX68425、红鳍东方鲂 AAW69373、人 NP_003256、海胆 XP_001199902、牙鲆 BAD01045

Phylogenetic tree was obtained from a ClustaW2 alignment and MEGA4.0 Neighbor-Joining of 11 sequences. The bar indicated the distance. The black square () marks *Megalobrama amblycephala* *TLR3*. The last p behind sequence name indicates partial sequence. The species and accession numbers of MaTLR3, CaTLR3, GrTLR3, DrTLR3, IpTLR3, IfTLR3, OmTLR3, TrTLR3, HsTLR3, SpTLR3, PoTLR3 are as follows: *Megalobrama amblycephala* AB B3673, *Carassius auratus* ABC86865, *Gobiocypris rarus* ABL11471, *Danio rerio* AAT37633, *Ictalurus punctatus* ABD93872, *Ictalurus furcatus* ABH10661, *Oncorhynchus mykiss* AAX68425, *Takifugu rubripes* AAW69373, *Homo sapiens* NP_003256, *Strongylocentrotus purpuratus* XP_001199902, *Paralichthys olivaceus* BAD01045

2.3 团头鲂 *TLR3* 在不同组织中的表达

TLR3 在被检测的肝胰脏、中肠、头肾、心脏、肌肉、脾脏和鳃组织中都有表达,以肝胰脏中表达最高,心脏和肌肉中的表达最低 (图 4)。

3 讨论

草鱼对 GCRV 敏感,然而其识别受体 *TLR3* 基因序列尚未见报道。本研究以与草鱼食性相似,但对 GCRV 不敏感的团头鲂为研究对象,克隆了其 *TLR3* 基因序列,并对其结构特征进行了分析。

团头鲂 *TLR3* 基因 5 非翻译区有一个“终止密码子”,说明 CDS 的 5 端是完整的。在 3 非翻译区含有 2 个与 mRNA 不稳定有关的 AU 富含基序,这种情况尤其发生在那些与炎症反应和免疫调节有关的基因中^[16]。翻译的蛋白序列中,在 N 端具有一个亮氨酸拉链结构,该结构负责寡聚体的形成,并且是抗病活性所需要的^[17]。在 C 端具有与信号传导密切相关的 BB loop 结构^[18]。

团头鲂 *TLR3* 序列与鲫鱼 *TLR3* 序列遗传距离最近,在鲫鱼囊胚细胞上的研究表明,*TLR3* 参与了 GCRV 的识别,激

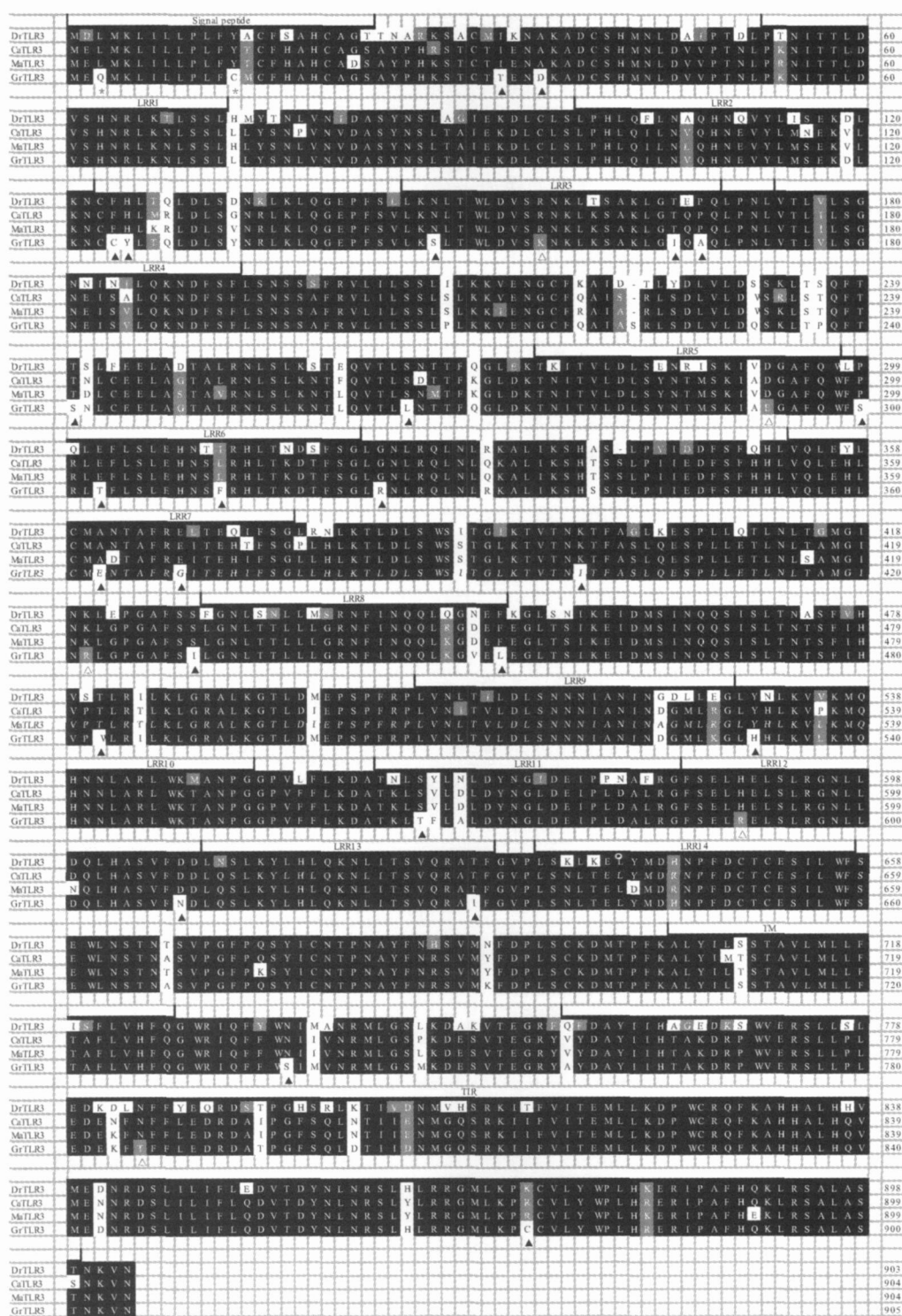


图 3 鲤科鱼类 TLR3 的多序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of the Cyprinidae TLR3

蛋白序列由 cDNA 序列推导而来;黑色残基表示相同;深灰色残基表示相似;超过 70% 相同或相似才标注颜色;右边的数字表示氨基酸在相应蛋白中的位置;信号肽及结构基序用上划线及对应的名称表示;在信号肽部分的差异残基用星号 (*) 表示;成熟肽差异残基用实心三角表示 (▲);相似残基用空心三角表示 (△);序列名称及登录号与图 2 相同

Amino acid sequences are deduced from cDNA. Residues highlighted in black are identical and those in dark gray are similar. Percentage of sequences must agree for identity or similarity coloring to be added 70%. The right numbers represent the amino acid position in the corresponding species. Signal peptide and motifs were top-lined with their names. The various amino acids in signal peptide were indicated with asterisks (*). The different amino acids in mature peptide were marked with solid triangles (▲). The similar amino acids in mature peptide were shown with hollow triangles (△).

The accession numbers of aligned sequences were as Fig. 2

活了下游的干扰素途径^[19];与稀有鲟鲤TLR3序列的遗传距离也较近,稀有鲟鲤TLR3不仅被GCRV诱导而激活,而且通过构型改变的方式激活下游的抗病毒效应分子Mx^[20];其次与斑马鱼TLR3序列聚类在一起(图2),斑马鱼TLR3在鳃中表达量较高^[21]。团头鲂TLR3的表达在肝脏中较高,这一点与斑点叉尾鲴及虹鳟的表达模式类似^[22,23]。鲤科鱼类的TLR3同源性较高,首先聚类在一起。这其中只有稀有鲟鲤对GCRV敏感,而别的3种鱼都不敏感。它们序列上的氨基酸的不同,可能影响到它们的抗病性。我们把这些序列放在一起进行了比对(图3)。如果团头鲂、斑马鱼、鲫鱼的序列一致,而稀有鲟鲤的序列不同,这些不同的位点是否与抗GCRV相关还需要进一步的研究。共有27个这样的位点,其中2个位于信号肽区域,在成熟蛋白中被切掉,应该影响不大。剩余的25个位点中,其中有14个位于结构域或活性位点上。14个位点中,有4个即在结构域中,又在活性位点上,在稀有鲟鲤上它们分别是:S¹⁴⁹、F³¹²、I⁴³⁰及T⁵⁶⁷。S¹⁴⁹位于LRR3中,又在N糖基化位点上^[24];F³¹²位于LRR6中,又在蛋白激酶C磷酸化位点上^[25];I⁴³⁰位于LRR8位点上,又在豆蔻酰化位点上^[26];T⁵⁶⁷位于酪蛋白激酶磷酸化位点上^[27]。另一个值得注意的是BB loop结构,虽然我们没有找到有规律的差异,然而,这一结构的变化将严重影响其功能^[18]。当然,这种分析需要进一步试验验证。如果将来有了更多的易感或不易感的鲤科鱼类的TLR3序列,如:草鱼、鲤鱼等,这种分析比对将更趋于完善。为我们进一步研究分析抗病与这些位点的多态性奠定基础。

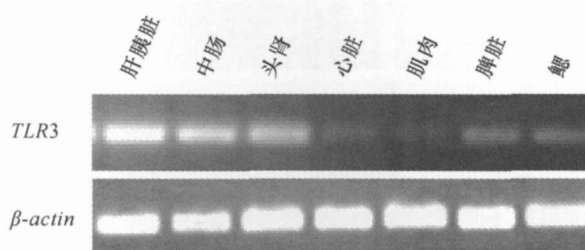


图4 团头鲂不同组织中TLR3的表达

Fig. 4 *MaTLR3* mRNA expression profile in different tissues

参考文献:

- [1] Fang Q, Zhu Z Y. Advances in aquareovirus research [J]. *Virologica Sinica*, 2003, **18**(1): 82—86 [方勤,朱作言. 水生呼肠孤病毒研究进展. 中国病毒学, 2003, **18**(1): 82—86]
- [2] Ding Q Q, Yu L F, Ke L H, *et al*. Study on infecting other fishes with grass carp hemorrhage virus [J]. *Virologica Sinica*, 1991, **6**(4): 371—373 [丁清泉,余兰芬,柯丽华,等. 草鱼出血病病毒对其他鱼的感染性研究. 中国病毒学, 1991, **6**(4): 371—373]
- [3] Wang T H, Liu P L, Chen H X, *et al*. Preliminary study on the susceptibility of *Gobiocypris rarus* to hemorrhagic virus of grass carp (GCHV) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1994, **18**(2): 144—149 [王铁辉,刘沛霖,陈宏溪,等. 稀有鲟鲤对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究. 水生生物学报, 1994, **18**(2): 144—149]
- [4] Scumpia P O, Kelly K M, Reeves W H, *et al*. Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes [J]. *Glia*, 2005, **52**: 153—162
- [5] 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**: 732—738
- [6] Sen G C, Sarkar S N. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, **16**: 1—14
- [7] Wang T H, Town T, Alexopoulou L, *et al*. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis [J]. *Nat Med*, 2004, **10**: 1366—1373
- [8] Choe J, Kelker M S, Wilson I A. Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain [J]. *Science*, 2005, **309**: 581—585
- [9] Loving C L, Brockmeier S L, Ma W, *et al*. Innate cytokine responses in porcine macrophage populations: evidence for differential recognition of double-stranded RNA [J]. *J Immunol*, 2006, **177**: 8432—8439
- [10] Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3 [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, **21**: 13—25
- [11] Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, *et al*. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA mediated signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**: 1364—1369
- [12] Choudhary S, Gao J, Leaman D W, *et al*. Interferon action against human parainfluenza virus type 3: involvement of a novel antiviral pathway in the inhibition of transcription [J]. *J Virol*, 2001, **75**: 4823—4831
- [13] Letunic I, Copley R R, Pils B, *et al*. SMART 5: domains in the context of genomes and networks [J]. *Nucl Acids Res*, 2006, **34**: D257—D260
- [14] Hub N, Bairoch A, Bulliard V, *et al*. The 20 years of PROSITE [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**: D245—D249
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al*. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**: 1596—1599
- [16] Kracht M, Saklatvala J. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation [J]. *Cytokine*, 2002, **20**: 91—106
- [17] Ponten A, Sick C, Weeber M, *et al*. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxyl-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity [J]. *J Virol*, 1997, **71**: 2591—2599
- [18] Toshchakov V Y, Fenton M J, Vogel S N. Cutting Edge: Differential Inhibition of TLR Signaling Pathways by Cell-Permeable Peptides Representing BB Loops of TLRs [J]. *J Immunol*, 2007, **178**: 2655—2660

- [19] Zhang Y B, Jiang J, Chen Y D, *et al* The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells [J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, **31**: 232—243
- [20] Su J, Zhu Z, Wang Y, *et al* Toll-like receptor 3 regulates Mx expression in rare minnow *Gobiocypris rarus* after viral infection [J]. *Immunogenetics*, 2008, **60**: 195—205
- [21] Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Mol Immunol*, 2005, **42**: 1057—1071
- [22] Bilodeau A L, Waldbieser G C. Activation of TLR3 and TLR5 in channel catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, **29**: 713—721
- [23] Rodriguez M F, Wiens G D, Purcell M K, *et al* Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunogenetics*, 2005, **57**: 510—519
- [24] Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering [J]. *Protein Eng*, 1990, **3**: 433—442
- [25] Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, *et al* Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3'5' monophosphate-dependent protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 12492—12499
- [26] Grand R J A. Acylation of viral and eukaryotic proteins [J]. *Biochem J*, 1989, **258**: 625—638
- [27] Pinna L A. Casein kinase 2: an eminence grise in cellular regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1054**: 267—284