

doi: 10.7541/2016.115

赤眼鳟 *Toll* 样受体3基因cDNA全长克隆及表达分析

肖调义^{1,2} 李伟¹ 王荣华¹ 刘巧林^{1,2} 彭慧珍^{1,2} 苏建明^{1,3}

(1. 湖南农业大学, 湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 长沙 410128; 2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 常德 415000; 3. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128)

摘要: 为探究赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*) *Toll*样受体3 (*Toll-like receptor 3*, *ScTLR3*)基因是否参与抗病毒免疫反应, 实验运用RACE技术, 克隆得到*ScTLR3*基因cDNA全长序列, 并进行了生物信息学分析; 通过Real-Time qPCR技术, 检测了*ScTLR3* mRNA在健康赤眼鳟10个组织中的分布以及感染草鱼呼肠孤病毒(GCRV)后肝脏、脾脏、体肾和头肾中的表达特征。结果表明: *ScTLR3*基因cDNA序列全长4043 bp, 包括5'-非编码区(UTR) 216 bp, 开放阅读框(ORF)2715 bp和3'-UTR 1112 bp; *ScTLR3*共编码904个氨基酸残基, 推导的蛋白分子量102.67 kD, 理论等电点8.76; SMART结构域预测显示, *ScTLR3*由N端的信号肽(SP)、富亮氨酸结构域(LRRs)、跨膜结构域(TM)和C端的*Toll*/白介素-1受体结构域(TIR)组成。实时荧光定量结果显示, *ScTLR3* mRNA在检测的各组织中均有表达, 肝脏中的相对表达量极显著高于其他组织($P < 0.01$); 感染GCRV后, 肝脏、脾脏、体肾和头肾组织中*ScTLR3* mRNA均上调表达, 肝脏、脾脏和体肾组织中的相对表达量在24h达到峰值, 分别为对照组的5倍、7倍和6倍。研究表明, *ScTLR3*具有TLRs家族基因的典型结构特征, 并能被GCRV诱导表达, 推测其在赤眼鳟抗GCRV入侵免疫反应中发挥了重要作用。

关键词: 赤眼鳟; *Toll*样受体3; 分子克隆; 表达特征

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2016)05-0894-08

*Toll*样受体(*Toll-like receptor*, TLRs)是一类识别病原体保守结构——病原相关分子模式(Pathogen associated molecular patterns, PAMPs)的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)^[1, 2]。自1985年在果蝇中被发现起, TLRs基因受到广大研究者的关注^[3]。鱼类中首个TLRs基因由Sangrador-Vegas等^[4]2000年从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) cDNA文库中克隆得到。TLR3同时存在于哺乳动物和鱼类, 位于细胞质核内体上, 参与双链RNA (Double-stranded RNA, dsRNA)的识别, 是抗病毒免疫反应和免疫机制进化研究的理想对象^[5, 6]。

目前, 已有多种鱼类的TLR3基因的cDNA序列、识别配体及功能被报道, 如稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)^[7]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[8]、斑马

鱼(*Danio rerio*)^[9]、鲫(*Carassius auratus*)^[10]、河豚(*Fugu rubripes*)^[11]、虹鳟(*O. mykiss*)^[12]、南亚野鲮(*Labeo rohita*)^[13]、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[14]等。研究显示, 草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)感染稀有鮡鲫^[7]或传染性造血坏死病毒(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)感染虹鳟^[12]后, 相关组织中TLR3表达量均显著上调, 且dsRNA病毒类似物poly(I:C)同样能诱导虹鳟巨噬细胞^[12]、人胚肾293细胞^[15]和大黄鱼脾脏^[16]中TLR3显著上调表达。另外, 细菌也能引起鱼类TLR3基因的表达水平变化^[16, 17]。鱼类TLR3的功能与哺乳动物相似, 在免疫反应中富亮氨酸结构域(Leucine-rich repeats, LRRs)与病毒dsRNA特异性结合并通过MyD88非依赖信号转导途径, 激活相关信

收稿日期: 2015-10-30; 修订日期: 2016-04-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31272652); 国家自然科学基金青年项目(31402289); 湖南农业大学科学基金项目(13YJ04)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31272652, 31402289); Science Foundation of Hunan Agricultural University (13YJ04)]

作者简介: 肖调义(1964—), 男, 湖南邵阳人; 教授; 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: tyx1128@163.com;

李伟(1989—), 男, 湖南常德人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: match10@qq.com

通信作者: 肖调义, E-mail: tyx1128@163.com

号因子, 诱导干扰素的产生^[18, 19]。研究表明, I 型干扰素通过促进下游干扰素刺激基因(MX1、TRIM等)表达, 从而抑制病毒的繁殖^[20, 21]。

近年来, 草鱼出血病严重影响草鱼养殖业的发展, 其病原GCRV受到广泛关注^[22]。赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)与草鱼亲缘关系较近, 同属雅罗鱼亚科, 分属赤眼鳟属和草鱼属, 其作为一种优质的淡水经济鱼类, 亦被大量研究报道^[23]。刘巧林^[24]用GCRV感染赤眼鳟和草鱼后发现, 赤眼鳟存活率较草鱼高一倍以上。为探究*ScTLR3*基因是否参与赤眼鳟抗病毒免疫反应, 本实验克隆了*ScTLR3*基因cDNA全长, 并对其进行生物信息学分析, 同时检测了*ScTLR3* mRNA在赤眼鳟各组织中分布和感染GCRV后肝脏、脾脏、体肾和头肾组织中的表达特征, 为进一步研究其结构和功能提供线索和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用赤眼鳟购自浏阳市北盛镇乌龙渔场(湖南长沙), 为2014年5月繁育个体, 实验前培育于面积333 m², 水深1 m的池塘。选取180尾6月龄的健康赤眼鳟[体长(8.45±0.74) cm, 体重(12.33±1.34) g], 于80 L/箱的恒温循环水养殖系统28℃养殖4周, 30尾/箱, 每天定时光照12h并按照体重的1%投喂粗蛋白含量为30%的膨化饲料2次。

本实验用GCRV(106毒株, 1.78×10⁷ TCID₅₀/mL)由中国水产科学院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠。

1.2 实验方法

总RNA提取和第一链cDNA合成 选取一尾健康赤眼鳟, 丁香酚(国药, 上海)麻醉处理后, 用无核酸酶匀浆管(Bertin, 法国)分别收集约80 mg肾脏和脾脏组织(预先加入5粒0.8—1.0 mm陶瓷研磨珠和600 μL裂解液, 并在冰上预冷), 立即用均质仪Precellys 24(Bertin, 法国)匀浆, 匀浆程序: 5000 r/min, 15s/次, 共2次, 间隔5s, 总RNA提取的其他步骤参考MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa, 大连)说明书。将总RNA分装成3份, 分别用于RNA浓度(纯度)检测、稳定性(完整性)检测和第一链cDNA及RACE cDNA合成。使用BioSpectrometer Basic核酸蛋白仪(Eppendorf, 德国)检测总RNA浓度(纯度), 稳定性(完整性)检测步骤: 1%琼脂糖凝胶电泳对比分析置于-70℃和37℃的总RNA样品, 28S:18S条带亮度约等于2:1且无明显变化的样品视为稳定(完整)的。使用First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, 美国)试剂盒, 以Oligo (dT)₁₈为引物、约2 μg总RNA为模板, 按照说明书进行第一链cDNA合成, 产物-20℃储存备用。

cDNA 部分序列克隆 根据GenBank中草鱼(DQ864497.1)、团头鲂(DQ986365.1)、斑马鱼(AY616582.1) *TLR3*基因cDNA序列保守区设计2对同源PCR引物F1/R1、F2/R2(表1), 克隆*ScTLR3*基因cDNA部分序列, 50 μL PCR反应体系由: 赤眼鳟脾脏和肝脏cDNA各0.5 μL、0.25 μL TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, 大连)、5 μL 10×Ex Taq缓冲液、4 μL dNTP 混合液、正反引物(10 μmol)各1 μL和37.75 μL Mili-Q等级水组成, 扩增程序: 95℃ 5min; 95℃ 30s,

表1 本研究相关引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物Primer	序列Sequence (5'-3')	应用Usage
F1 (forward)	ATTTGATGCGACTTGACC	PCR
R1 (reverse)	ATCTAGGCCATTGTAATCCA	
F2 (forward)	CATTCAGGCCACTAGTCA	
R2 (reverse)	CCACGACGAAGATACAGA	
GSP-3'-outer	<u>gattacgccaagctt</u> ATCCCTTGACTGCACCTGCGAGAGCATC	RACE
GSP-3'-inner	<u>gattacgccaagctt</u> ACCGCTCTCTGTATCTTCGTCGTGGCAT	
GSP-5'-outer	<u>gattacgccaagctt</u> AGCAAGCTTCGTTCCACCCACGGTCT	
GSP-5'-inner	<u>gattacgccaagctt</u> ATCCTTCAGCGACCCAGCATACGGTT	
<i>ScTLR3</i> -Q-F	TTTGATGCGACTTGACCTGT	RT-qPCR
<i>ScTLR3</i> -Q-R	TGCCAGTTTAGCAGATTTCA	
actin-F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG	
actin-R	GGGCACCTGAACCTCTCATT	

注: 15 bp载体同源序列用下划线标记

Note: The 15 bp vector homologous sequence was underlined

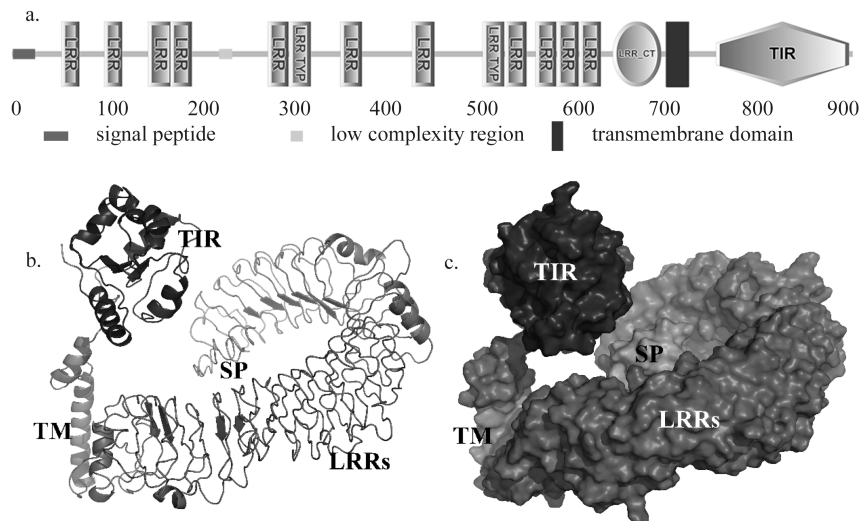


图1 软件预测的*ScTLR3*结构域和3D结构模型

Fig. 1 Predicted structural features of *ScTLR3* domains and 3D model

a. 通过SMART程序预测的*ScTLR3*结构域，包含14个LRR结构域(其中位于635—658 aa的IRR基序与IRR_CT基序重叠)、跨膜结构域(TM)和C端的Toll白介素-1受体结构域(TIR)；b, c应用I-TASSER构建的*ScTLR3*预测氨基酸序列的3D结构模型

a. Structural features of *ScTLR3* domains predicted by the simple modular architecture reach tool (SMART). The 14 leucine-rich repeats (IRRs) were located in the N-terminal region (one IR region at 635—658 aa overlap with IRR-CT). Followed by a putative transmembrane domain (TM) and a cytoplasmic toll-interleukin-1 receptor domain (TIR) at the C-terminal end; b, c. Structural features of *ScTLR3* 3D model predicted by I-TASSER

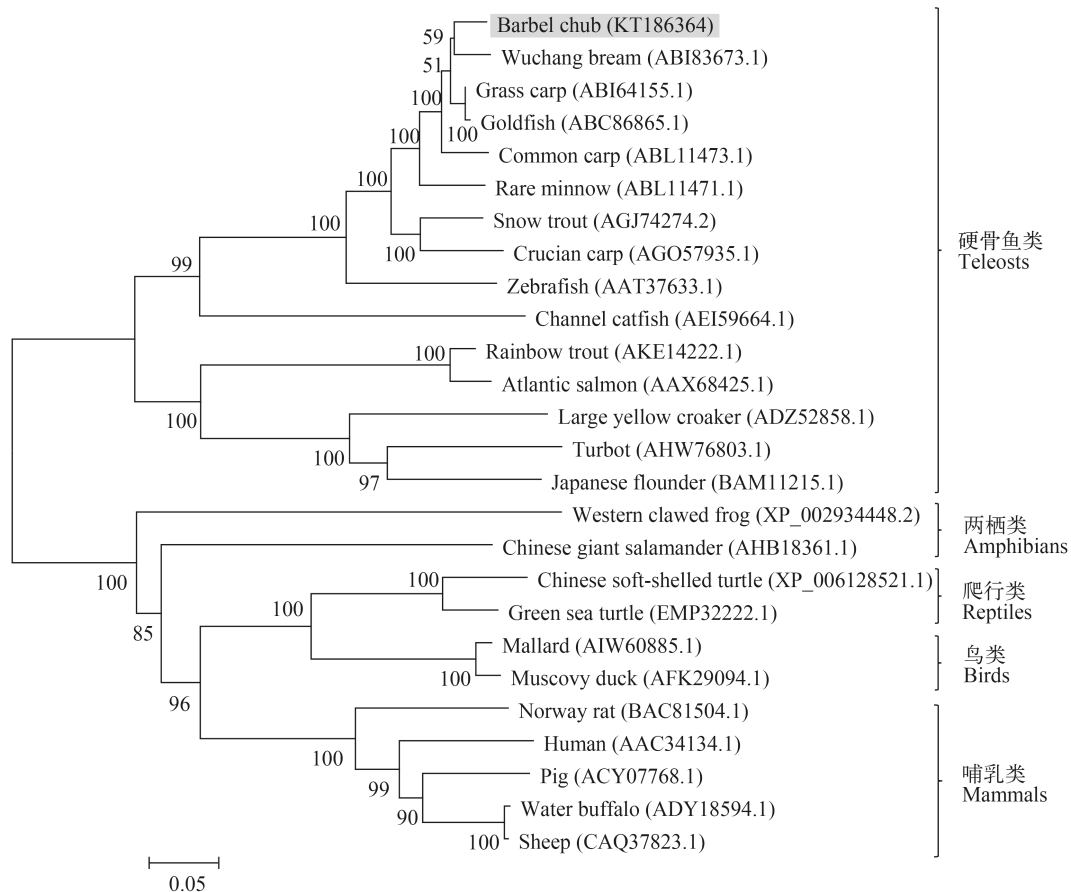


图2 应用CLUSTALW进行多序列比对并使用MEGA 6.06采用邻接法构建TLR3的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed from a CLUSTALW alignments and MEGA version 6.06 Neighbor-Joining of selected TLR3 sequences

58°C 30s, 72°C 90s, 25 cycles; 72°C 7min; 4°C 保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳纯化后采用Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, 美国)回收, 产物连接pEGM-T easy载体(Promega, 北京), 选取2个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

末端快速扩增 (RACE) 依据SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clontech, 美国)用户手册, 应用Oligo7软件以拼接的*ScTLR3*基因部分cDNA序列为模板, 设计RACE外引物GSP-5'-outer和GSP-3'-outer以及RACE内引物GSP-5'-inner和GSP-3'-inner(表1), 同时分别制备5'RACE cDNA和3'RACE cDNA。使用RACE外引物GSP-5'-outer和GSP-3'-outer分别进行5'或3'第一次PCR, 电泳检测首次PCR产物, 若无目的条带, 使用50倍稀释的首次PCR产物和相应的RACE外引物进行巢式PCR, 两次PCR的反应体系和反应程序均同用户手册。目的片段经1%琼脂糖凝胶电泳纯化后使用In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech, 美国)连接, 选取3个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 序列经SeqMan软件拼接后, 得到*ScTLR3*的cDNA全长序列。

序列分析 应用ExPASy-Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>)预测*ScTLR3*开放阅读框(ORF), 并推导其编码的氨基酸序列。对推导的氨基酸序列进行生物信息学分析: 分子量和等电点应用在线工具ExPASy-Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/)计算; 在线软件SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)被用来预测信号肽; 结构域预测使用在线软件SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>); I-TASSER (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)被用于氨基酸序列3D建模, 其数据分析和图表构建采用PyMOL 2.7软件; 使用MEGA 6.06软件, 采用邻接法(Neighbor-joining)构建TLR3系统进化树。

组织表达分析 选取3尾健康赤眼鳟, 分别提取心脏、脑、肝脏、脾脏、体肾、头肾、肌肉、肠、鳃和胸腺10个组织的总RNA, 并合成第一链cDNA。根据*ScTLR3*保守区设计特异的荧光定量引物(*ScTLR3*-Q-F/R, $E=96.64\%$), 以 β -actin作为内参基因设计引物(actin-F/R, $E=95.37\%$)(表1)。利用CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, 美国)进行实时荧光定量PCR检测, 20 μ L反应体系由10 μ L 2 \times UltraSYBR Mixture (康为世纪, 北京)、上下游引物各0.4 μ L和9.2 μ L 10倍稀释的cDNA组成。反应条件为95°C 10min; 95°C 5s, 60°C

10s, 72°C 10s, 采集荧光, 35 cycles; 溶解曲线从65°C上升至95°C, 每5s上升0.5°C, 采集荧光。每个样品进行3次重复。

病毒感染和表达特征分析 GCRV攻毒实验设实验组和对照组, 均设3个重复, 每个重复30尾。实验组腹腔注射GCRV病毒悬液200 μ L/尾, 对照组注射等量磷酸缓冲液(PBS)。在注射后的0、6h、12h、24h、48h、72h、96h和120h分别从3个实验箱随机选取一尾, 用含丁香酚自来水处理后立即取头肾、肝脏、脾脏、体肾, 提取总RNA, 并合成第一链cDNA, 对照组采用同样的方法制备cDNA模板。Real-Time qPCR方法同上。

数据处理 应用Bio-Rad CFX Manager软件, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算单个样品中*ScTLR3*的相对表达量, 并用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 显著性水平为* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2 结果

2.1 *ScTLR3* 基因的克隆和序列分析

*ScTLR3*基因全长4043 bp, GenBank No. KT186364, 其中ORF为2715 bp, 编码904个氨基酸残基, 5'-非编码区(Untranslated region, UTR) 216 bp和3'-UTR 1112 bp, 在其3'-UTR包含3个多聚腺苷酸加尾信号“aataaa”或“aacaaa”和5个mRNA不稳定信号“attta”以及典型的Poly A尾巴。预测的*ScTLR3*蛋白相对分子量为102.67kD, 理论等电点为8.76。SMART结构显示, *ScTLR3*由N-端的信号肽(SP, 1—23aa)、14个LRR基序(53—72aa, 99—118aa, 146—173aa, 170—193aa, 275—297aa, 298—321aa, 353—376aa, 430—454aa, 506—529aa, 530—553aa, 563—585aa, 586—609aa, 610—633aa, 635—658aa)、LRR_CT基序(646—698aa)、TM (704—726aa)和TIR (757—900aa)组成(图1a)。I-TASSER 3D结构模型显示, *ScTLR3*包括14个 α 螺旋、13个 β 折叠, LRRs区域为马蹄形结构(图1b/c)。

2.2 不同物种TLR3的进化分析

结果显示, 整个系统发育树分为两支: 硬骨鱼类聚为一支, 两栖类和其他参与分析的陆生动物聚为一支; 硬骨鱼类中, 淡水硬骨鱼类和海水硬骨鱼类各为一支, 其中赤眼鳟和武昌鱼聚为一支。进一步分析不同物种TLR3 TIR 结构域氨基酸序列, *ScTLR3*与草鱼(ABI64155.1)和鲤(ABC86865.1)相似度高达97%, 其次是团头鲂(ABI83673.1) 96% (图2)。

2.3 *ScTLR3*的组织表达及GCRV诱导表达分析

采用Real-Time qPCR方法检测*ScTLR3* mRNA在健康赤眼鳟不同组织的相对表达量及GCRV攻

毒后的表达量变化,结果表明: *ScTLR3* mRNA在所检测的10个组织中均有表达,由低到高依次为:胸腺<鳃<体肾<脑<肠<脾脏<肌肉<头肾<心脏<肝脏,且肝脏中的相对表达量极显著高于其他9个组织 ($P<0.01$) (图3)。与对照组相比,感染GCRV后肝脏、脾脏、肾脏和头肾组织中*ScTLR3* mRNA均上调表达,其中,肝脏和脾脏中相对表达量除0和120h外均极显著高于对照组 ($P<0.01$),头肾中相对表达量除0外均极显著高于对照组 ($P<0.01$)。感染GCRV后*ScTLR3* mRNA在被检测的四种组织中表达特征相似,均出现两个表达峰,同时又具有一定差异性,肝脏和脾脏组织中第一个表达峰出现在24h,第二个表达峰出现在96h但低于前一个,肾脏组织中第一个表达峰出现在24h,但第二个表达峰并不明显,头肾组织中两个表达峰出现较肝脏和脾脏早,分别出现在12h和72h且表达量相近(图4)。

3 讨论

在免疫反应中,机体对病原的识别、呈递与免疫反应的强度、速度直接相关,TLR3主要参与识

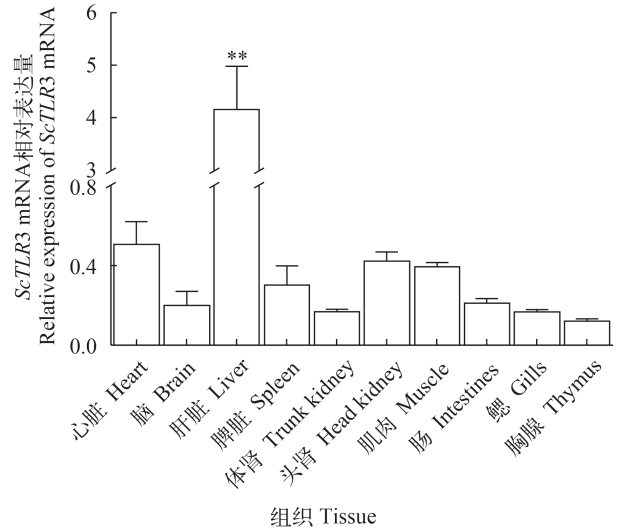


图3 健康赤眼鲮心脏、脑、肝脏、脾脏、体肾、头肾、肌肉、肠、鳃和胸腺组织中*ScTLR3*相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *ScTLR3* in different tissues of barbel chub, include heart, brain, liver, spleen, trunk kidney, head kidney, muscle, intestines, gills and thymus

“**”表示显著性差异 ($P<0.01$). $N=3$, 误差线表示标准误差

The symbol of “**” meang extremely significant differences ($P<0.01$). $N=3$, Error bar show the standard error

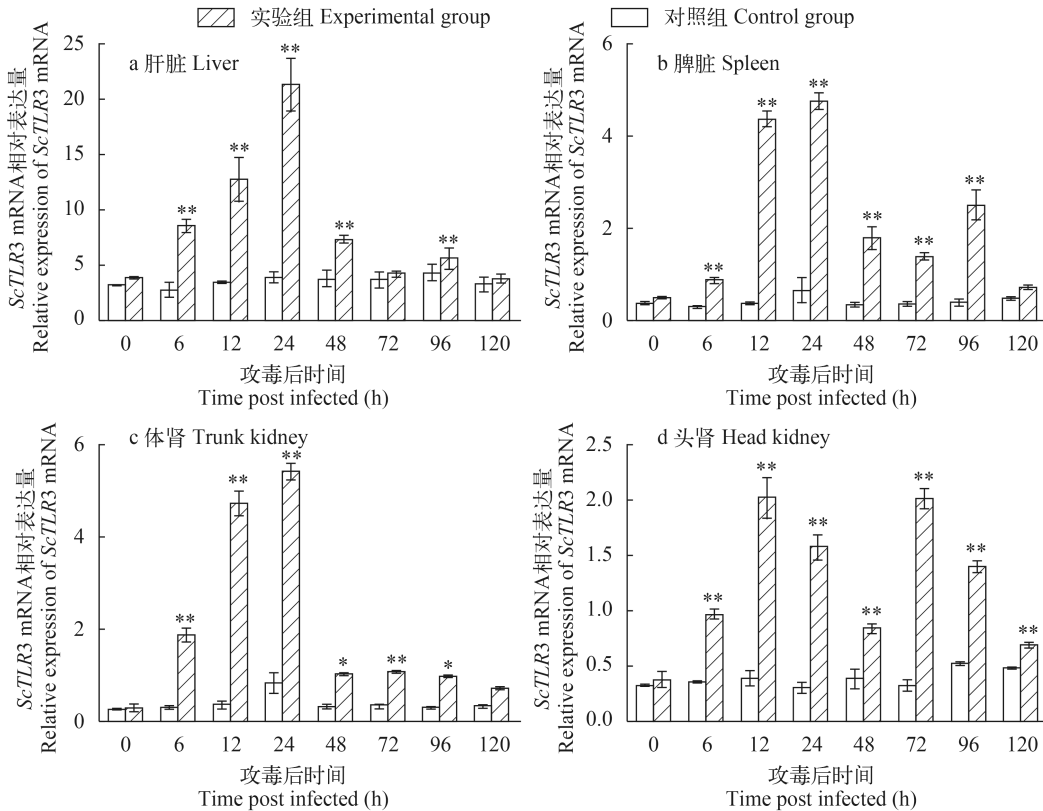


图4 感染GCRV后*ScTLR3*基因的时空表达特征

Fig. 4 Expression pattern of *ScTLR3* after infected by GCRV

相对于对照组 (PBS组), 具有显著性差异 ($P<0.05$) 和极显著性差异 ($P<0.01$) 分别用* or **标出. $N=3$, 误差线表示标准误差

Reference the expression of control the significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) were indicted with “*” and “**” $N=3$. Error bar show the standard error

别胞内病毒dsRNA, 并以其特有的MyD88非依赖途径激活下游免疫因子, 诱导I型干扰素(α -IFN和 β -IFN)表达和分泌, 达到抑制病毒复制的目的^[25-27]。基于前期赤眼鲮GCRV攻毒实验中赤眼鲮死亡率显著低于草鱼的结果和TLR3在哺乳动物免疫反应中的重要作用以及其在各物种间的保守性, 我们希望探究TLR3是否在赤眼鲮抗病毒免疫反应中也发挥了作用。

3.1 *ScTLR3* cDNA序列及结构特征分析

本实验运用RACE方法获得了*ScTLR3*基因cDNA全长序列4043 bp, 预测其开放阅读框(ORF) 2715 bp, *ScTLR3*基因3'-UTR 1112 bp, 较草鱼(DQ864497.1)、团头鲂(DQ986365.1)、斑马鱼(NM_001013269.3)等长400—600 bp, 已有研究表明, 3'-UTR的长度和序列构成与mRNA的稳定性、转录调控和蛋白定位均有一定的影响^[28-30]。不稳定的mRNA 3'-UTR通常含有AU富含基序(AU-rich elements, AREs), 如免疫调节和炎症反应相关基因IL-1、IL-2、IL-4、TNF和IFN等, ARE结构中最典型的基序为ATTTA^[31-33]。在本实验中, *ScTLR3*基因mRNA 3'-UTR包含5个ATTTA序列, 而草鱼(DQ864497.1)包含4个、人(NM_003265.2)包含3个、团头鲂(DQ986365.1)包含2个、斑马鱼(NM_001013269.3)一个也没有。结果表明, *ScTLR3*基因的稳定性不及草鱼、人、团头鲂和斑马鱼。氨基酸序列对比分析发现, *ScTLR3*是一个保守型很高的基因, *ScTLR3*与草鱼TLR3相似度高达96%, 与其他鲤科鱼类(团头鲂、斑马鱼、稀有鮎鲫、鲫等)相似度也达到了82%以上, 这提示*ScTLR3*很可能是赤眼鲮体内一种重要的基础分子。结构域分析发现, *ScTLR3*主要由胞外的LRRs结构域、TM结构域和胞内的TIR结构域组成, 具有TLRs的典型结构。3D模型显示*ScTLR3*基因LRRs结构域为典型的马蹄形结构, 有资料证明, 该结构能与dsRNA形成稳定的二聚体, 有利于dsRNA的识别^[34, 35]。

3.2 *ScTLR3*表达特征

不同物种TLR3 mRNA在健康个体组织中的表达情况有所差异。Su等^[7]定量检测未经GCRV攻毒的稀有鮎鲫, 发现TLR3在鳃、心脏、肠、体肾、肝脏、肌肉和脾脏中均有表达, 在肝脏、肌肉和体肾中表达量较高。Yang等^[36]定量检测健康鲤鳃、心脏、肠、体肾、肝脏、肌肉和脾脏中TLR3的表达量, 发现鲤肌肉和心脏中TLR3表达量较低, 而在肠、体肾和肝脏中表达量较高。在本实验中, *ScTLR3* mRNA在被检测的10个组织中均有表达, 在肝脏中的表达量极显著的高于其他9个组织, 这

可能与组织的功能差异有关。

大量诱导表达实验表明, 鱼类TLR3基因能被dsRNA病毒、dsRNA类似物poly(I:C)或DNA病毒诱导表达^[37]。Su等^[8]用GCRV感染草鱼后发现, 草鱼脾脏中TLR3的表达量在1—7d均上调表达, 1—2d上升到对照组的3倍以上, 除第4天略微下降外, 至第7天(实验结束)一直上升。Huang等^[16]定量检测注射poly(I:C)的大黄鱼, 发现其脾脏组织TLR3表达量在注射后6h显著上升, 之后逐步下降, 至48h下降到初始水平; 而肝脏中在24h前上升较为缓慢, 至48h迅速上升, 达到最大值。Hu等^[14]发现感染大菱鲆虹彩病毒(Turbot reddish body irido-virus, TRBIV)后, 大菱鲆肝脏和肌肉中TLR3表达量在1d迅速上升, 然后缓慢下降至第5天达到初始水平。在本实验中, 赤眼鲮在感染GCRV后赤眼鲮肝脏、脾脏和体肾中的TLR3 mRNA的表达特征相似, 整体表现为先上升后下降, 然后小幅上升, 最后回归初始水平, 在24h出现表达量峰值。这一结果与Phelan等^[9]用SHRV感染斑马鱼成鱼后TLR3的表达情况相似, 与Su等^[8, 38]用GCRV感染稀有鮎鲫后鳃中TLR3表达特征以及GCRV感染草鱼后脾脏中TLR3表达特征不同。另外, 赤眼鲮在感染GCRV后, 头肾中的TLR3 mRNA表达量在12h迅速上升, 在72h迅速达到第二表达峰值, 这一结果较草鱼和稀有鮎鲫TLR3表达变化更加快速, 但是否与赤眼鲮对GCRV抗性有关需要进一步研究证明。

4 结论

*ScTLR3*主要由富亮氨酸结构域(LRRs)、跨膜结构域(TM)和Toll/白介素-1受体结构域(TIR)组成, 具有TLRs的典型结构特征, 在健康赤眼鲮肝脏中特异性表达; GCRV攻毒后, *ScTLR3* mRNA在赤眼鲮肝脏、脾脏、体肾和头肾中的表达水平显著升高, 这些结果提示TLR3在赤眼鲮抵抗GCRV入侵反应中发挥了重要作用。

参考文献:

- [1] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, **124**(4): 783—801
- [2] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. *Annual Review of Immunology*, 2003, **21**(1): 335—376
- [3] Anderson K V, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: genetic studies on the role of the *Toll* gene product [J]. *Cell*, 1985, **42**(3): 779—789
- [4] Sangrador-Vegas A, Martin S A M, O'Dea P G, et al. Cloning and characterization of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) TLR3 gene [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, **28**(12): 783—791

- rhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**(24): 7031—7037
- [5] Roach J C, Glusman G, Rowen L, *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors [J]. *PNAS*, 2005, **102**(27): 9577—9582
- [6] Wu B, Peisley A, Richards C, *et al.* Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5 [J]. *Cell*, 2012, **152**(1—2): 276—289
- [7] 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**(3—4): 195—205
- [8] Su J, Jang S, Yang C, *et al.* Genomic organization and expression analysis of Toll-like receptor 3 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(3): 433—439
- [9] Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Molecular Immunology*, 2005, **42**(9): 1057—1071
- [10] Zhang Y B, Jiang J, Chen Y R, *et al.* The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, **31**(3): 232—243
- [11] 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
- [12] 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**(7): 510—519
- [13] Samanta M, Basu M, Swain B, *et al.* Molecular cloning and characterization of toll-like receptor 3, and inductive expression analysis of type I IFN, Mx and pro-inflammatory cytokines in the Indian carp, rohu (*Labeo rohita*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, **40**(1): 225—235
- [14] Hu G B, Li X P, Liu D H, *et al.* A toll-like receptor 3 homologue that is up-regulated by poly I:C and DNA virus in turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, **86**(2): 431—447
- [15] 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
- [16] Huang X, Wang Z, Yao C. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **31**(1): 98—106
- [17] Bilodeau A L, Waldbieser G C. Activation of TLR3 and TLR5 in channel catfish exposed to virulent [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, **29**(8): 713—721
- [18] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **20**(2): 137—151
- [19] Magnadóttir B. Immunological control of fish diseases [J]. *Marine Biotechnology*, 2010, **12**(4): 361—379
- [20] Stetson D B, Medzhitov R. Type I interferons in host defense [J]. *Immunity*, 2006, **25**(3): 373—381
- [21] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, *et al.* Type I interferons in infectious disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, **15**(2): 87—103
- [22] Chen L, Li Q, Su J, *et al.* Trunk kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) mediates immune responses against GCRV and viral/bacterial PAMPs *in vivo* and *in vitro* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **34**(3): 909—919
- [23] Liu Q L, Xiao T Y, Liu M, *et al.* Research progress of biology in *Squaliobarbus curriculus* [J]. *Fisheries Science*, 2012, **31**(11): 687—691 [刘巧林, 肖调义, 刘敏, 等. 赤眼鲮生物学研究进展. 水产科学, 2012, **31**(11): 687—691]
- [24] Liu Q L. Studies on genetic characteristics and grass carp reovirus resistance of F₁ hybrids between grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*) [D]. Changsha: Hunan Agricultural University. 2013 [刘巧林. 草鱼与赤眼鲮杂交F₁遗传特征及对草鱼呼肠孤病毒抗性的研究. 长沙: 湖南农业大学. 2013]
- [25] Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses [J]. *Biochemical Journal*, 2014, **458**(2): 195—201
- [26] Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, *et al.* Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA [J]. *Nature Communications*, 2013, **4**(5): 1833
- [27] 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**(18): 732—738
- [28] Moor C H D, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3'UTR in development and differentiation [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005, **16**(1): 49—58
- [29] Mazumder B, Seshadri V, Fox P L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, **28**(2): 91—98
- [30] Zhang Y, Sturgis E M, Sun Y, *et al.* A functional variant at miRNA-122 binding site in IL-1 α 3'UTR predicts risk and HPV-positive tumours of oropharyngeal cancer [J]. *European Journal of Cancer*, 2015, **51**(11): 1415—1423
- [31] Qian X, Huang X X, Leng X J, *et al.* cDNA sequence analysis and tertiary structure prediction of Toll-like re-

- ceptor 3 gene from *Carassius auratus gibelio* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, **32**(2):190—199 [钱曦, 黄旭雄, 华雪铭, 等. 异育银鲫 Toll 样受体 3 的 cDNA 序列分析与蛋白质高级结构预测. 水产学报, 2008, **32**(2): 190—199]
- [32] Kracht M, Saklatvala J. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation [J]. *Cytokine*, 2002, **20**(3): 91—106
- [33] Luchin A I, Nadella M V P, Thudi N K, *et al.* AU-rich elements in the 3'-UTR regulate the stability of the 141 amino acid isoform of parathyroid hormone-related protein mRNA [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, **364**(1—2): 105—112
- [34] Liu L, Botos I, Wang Y, *et al.* Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA [J]. *Science*, 2008, **320**(5874): 379—381
- [35] Jungwoo C, Kelker M S, Wilson I A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain [J]. *Science*, 2005, **309**(5734): 581—585
- [36] Yang C, Su J. Molecular identification and expression analysis of Toll-like receptor 3 in common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, **76**(8): 1926—1939
- [37] 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. 水生生物学报, 2015, **39**(1): 173—184]
- [38] Su J G, Zhu Z Y, Wang Y P. Up-regulating expressions of Toll-like receptors 3 and Mx genes in gills by grass carp reovirus in rare minnow, *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 728—734 [苏建国, 朱作言, 汪亚平. 草鱼呼肠孤病毒上调稀有鮡鲫鳃中 TLR3 和 Mx 基因的表达. 水生生物学报, 2008, **32**(5): 728—734]

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF TOLL-LIKE RECEPTOR 3 GENE IN BARBEL CHUB *SQUALIOBARBUS CURRICULUS*

XIAO Tiao-Yi^{1,2}, LI Wei¹, WANG Rong-Hua¹, LIU Qiao-Lin^{1,2}, PENG Hui-Zhen^{1,2} and SU Jian-Ming^{1,3}

(1. Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde 415000, China; 3. College of Animal Veterinary and Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To investigate whether the toll-like receptor 3 (*ScTLR3*) gene involve in antiviral immune response, TLR3 full-length cDNA in barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*) was cloned and characterized with RACE technique and grass carp reovirus (GCRV) infection was used. The method of real-time qPCR was used to examine the expression of *ScTLR* mRNA in 10 different tissues and the relative expression in liver, spleen, trunk kidney and, head kidney after infection at different times. The results showed that the full-length cDNA of *ScTLR3* was 4043 bp including a 216 bp 5'-terminal untranslated region (UTR), an 1112 bp 3'-terminal untranslated region (UTR) and a 2715 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 904 amino acid residues. The putative isoelectric point (pI) and molecular weight (Mw) of *ScTLR3* were 8.76 and 102.67 kD, respectively. The *ScTLR* motifs were consisted of N-terminal signal peptide (SP), 14 leucine-rich repeats (LRRs), transmembrane domain (TM), and the Toll/IL-1 Receptors domain (TIR) in C-terminal. *ScTLR3* mRNA was expressed in all tested tissues, and its expression in liver was extremely significant higher than other tested tissues in health barbell chub ($P < 0.01$). GCRV infection induced the *ScTLR* expression in liver, spleen, trunk kidney, and head kidney. Compared with the control group, the *ScTLR* mRNA expression levels in liver, spleen and trunk kidney tissues of barbel chub was induced 5-, 7-, and 6- fold at 24h post infection, respectively. These results suggest that *ScTLR3* may play an important role in the immune response of barbel chub against GCRV infection.

Key words: *Squaliobarbus curriculus*; Toll-like Receptor 3; Molecular cloning; Expression characterizations