

# 奥利亚罗非鱼髓样分化因子 (MyD88) 的克隆及其在组织中的表达

邹芝英 王倩 杨弘\* 李大宇 祝璟琳 肖炜

中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081

**摘要:** 髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 是 TLR (toll-like receptor) 信号通路的关键接头蛋白, 在先天性免疫中具有重要作用。通过 RACE-RCR 技术克隆了奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) MyD88 基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: JN032017)。序列分析表明, 奥利亚罗非鱼 MyD88 基因全长为 1 611 bp, 其中包括 155 bp 的 5' 非编码区, 589 bp 的 3' 非编码区和 867 bp 的编码区, 编码 288 个氨基酸残基。MyD88 蛋白 N 端具有死亡结构域, C 端具有 TIR 结构域。同源性分析表明, 奥利亚罗非鱼 MyD88 氨基酸序列与鳊鱼 (*Siniperca chuats*) 相似性最高, 为 85.8%, 与其他鱼类相似性为 70% ~ 82%, 与哺乳动物相似性为 63% ~ 66%; 系统进化树分析表明, 奥利亚罗非鱼 MyD88 与同属鲈形目的鳊鱼、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 聚在一起。采用实时定量 PCR 方法检测 MyD88 在奥利亚罗非鱼各组织中的表达情况。结果显示, MyD88 在所有被测组织中都有表达, 其中表达量最高的是卵巢, 其次在小肠、脾、肝、肾、鳃和血液中有较高的表达量, 肌肉、精巢组织中表达量最低。本研究可为进一步探讨 MyD88 在奥利亚罗非鱼 TLR 信号通路中的作用奠定一定的基础。

**关键词:** 奥利亚罗非鱼; 实时定量 PCR; MyD88; 基因表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2013) 06-894-11

## Cloning and Expression of A Myeloid Differentiation Factor 88 Gene in *Tilapia Oreochromis aureus*

ZOU Zhi-Ying WANG Qian YANG Hong\* LI Da-Yu ZHU Jing-Lin XIAO Wei

Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

**Abstract:** As an important adaptor protein in the intracellular signaling of Toll-like receptor superfamily, myeloid differentiation factor 88 (MyD88) plays a crucial role in the innate immune response. The full cDNA sequence of MyD88 (GenBank Accession number: JN032017) has been isolated by RACE-PCR method in *Tilapia* (*Oreochromis aureus*). The MyD88 gene is 1 611 bp, including a 155 bp 5'-terminal untranslated region (UTR), a 589 bp 3'-UTR and an 867 bp open reading frame (ORF), which encodes a polypeptide of 288 amino acids. The MyD88 protein contains the typical TLR and IL-1R-related (TIR) domain and death domain (DD). Homology analysis revealed that the predicted amino acid sequence of *Oreochromis aureus* MyD88 shared the highest identity 85.8% to *Siniperca chuats*, 70% - 82% to other fishes, and 63% - 66% to

**基金项目** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (No. 2011JBFA04), 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (No. CARS-49), 现代农业人才支撑计划经费, 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金项目 (No. 2012A0508);

\* 通讯作者, E-mail: yangh@ffrc.cn;

**第一作者介绍** 邹芝英, 女, 硕士; 研究方向: 水产动物遗传育种和生物技术; E-mail: zouzy@ffrc.cn.

收稿日期: 2013-01-20, 修回日期: 2013-05-21

mammals. The phylogenetic tree based on MyD88 proteins from 15 species showed that *O. aureus* shared the closest relationship with *Siniperca chuatsi* and *Larimichthys crocea*, all pertaining to Perciformes. Expression of MyD88 was determined by real-time RT-PCR (qRT-PCR) in different tissues. The results revealed that MyD88 transcripts were expressed in all tested tissues, being strongly expressed in the ovary, moderately expressed in intestine, spleen, liver, kidney, gill and blood, and weakly expressed in muscle and testis. This study will lay a foundation for further exploring the role of MyD88 in the TLR signaling in *Tilapia*.

**Key words:** *Oreochromis aureus*; Real-time PCR; MyD88; Gene expression

作为低等脊椎动物,鱼类获得性免疫系统发育还不完善,先天性免疫系统在机体免疫中起着重要的作用。先天性免疫通过宿主自身存在的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)快速识别病原微生物保守的分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs),通过信号转导级联反应引起效应分子的表达。Toll样受体(Toll like receptors, TLRs)作为生物体内重要的 PRRs,是先天性免疫系统的重要组成部分,同时也是连接先天性免疫与获得性免疫的桥梁。TLRs 识别 PAMPs 后,其本身结构发生二聚化,并通过两种不同的途径向下游传导:MyD88 依赖性传导和 MyD88 非依赖性传导途径(Akira et al. 2003, 王德成等 2008)。前者产生核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)和促炎症反应相关因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)等(Janeway et al. 2002)。后者引起干扰素 3(interferon 3, IRF3)介导的第 I 型干扰素(type I interferons, IFN)和干扰素诱导基因的表达(Kawai et al. 2001)。

髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是 TLR 信号转导通路中关键的接头蛋白,是信号向下游传导的关键靶分子。1990 年,Load 用 IL-6 刺激小鼠(*Mus musculus*)髓样白血病细胞系细胞 M1 分化为巨噬细胞时,发现了髓样分化家族的新成员 MyD88,当时认为它是一种髓样分化标记蛋白(Lord et al. 1990)。MyD88 蛋白含有 3 个功能区域:N 端的死亡结构域(death domain)、中间区域(intermediate domain)和 C 端的 TIR 结构域(Toll/IL-1 receptor domain)。一般地,MyD88

的死亡结构域大约有 90 个氨基酸,TIR 结构域含有 135 ~ 160 个氨基酸(Ohnishi et al. 2009)。MyD88 通过 TIR 结构域与 IL-1R/TLRs 相结合,而死亡结构域募集含有死亡结构域的白色介素 1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinases, IRAKs),导致 IRAK 自身磷酸化,然后与肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF-receptor-associated factor 6, TRAF6)相互作用,激活 I $\kappa$ B 激酶复合物,最终导致核因子 NF- $\kappa$ B 的活化并导致相关基因发生转录,从而引起死亡及凋亡相关信号的传导和促炎症反应的表达(Muzio et al. 1997, Wesche et al. 1997, 赵文华等 2007)。近年来 MyD88 基因已经从多个物种中分离鉴定出来,包括人(*Homo sapiens*) (Bonnert et al. 1997)、小鼠(Lord et al. 1990)、鸡(*Gallus gallus*) (Wheaton et al. 2007)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (Prothmann et al. 2000)、果蝇(*Drosophila melanogaster*) (Tauszig-Delamasure et al. 2002)、扇贝(*Chlamys farreri*) (Qiu et al. 2007)等。在鱼类中,已有文献报道在斑马鱼(*Danio rerio*) (Jault et al. 2004)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Kongchum et al. 2011)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Rebl et al. 2009)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (Yao et al. 2009)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Takano et al. 2006)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Skjaeveland et al. 2009)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Yu et al. 2009)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*) (Whang et al. 2011)中分离出 MyD88 基因,并证实其在免疫反应中的重要作用。

罗非鱼(*Tilapia*),俗称非洲鲫鱼,属鲈形目(Perciformes) 丽鱼科(Cichlidae),以其“生

长快、食性杂和适应性强”等优势成为国际上养殖最广泛的品种之一,是第三大国际贸易水产品。中国罗非鱼产量占全球罗非鱼总产量的一半,其出口量高居世界第一位(杨弘 2010)。然而近年来,由于高密度养殖,种群退化,加上养殖水质、环境及气候恶化,病害频繁发生且日趋严重。特别是自 2009 年以来,我国罗非鱼的主产区广东、海南、广西和福建等地大规模爆发链球菌病,给整个罗非鱼产业带来了巨大的损失(祝璟琳等 2010)。因此提高罗非鱼的抗病能力,加快优良品种的培育,对于整个罗非鱼产业的发展显得尤为重要。但目前对于罗非鱼免疫相关因子及其在免疫信号通路中的作用研究还处于起步阶段,有关罗非鱼 TLR 信号通路相关因子的研究至今未见报道。本研究利用 RACE-PCR 技术分离 奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) *MyD88* 基因 cDNA 全长序列,并通过实时荧光定量分析 *MyD88* 在奥利亚罗非鱼各组织的表达情况,为深入研究罗非鱼 TLR 信号通路及先天性免疫系统的分子机制奠定基础,为进行罗非鱼抗病品种的选育提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验鱼** 实验鱼奥利亚罗非鱼由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心国家罗非鱼产业技术体系研发中心保种。取健康 2 龄鱼 12 尾(♀, ♂),分别取其血液、脑、肾、肝、脾、心、精巢、卵巢、小肠、鳃、肌肉、皮肤 12 种组织样品,立即投入液氮中冷冻,后转入 -80℃ 冰箱保存,用于组织 RNA 的提取。

**1.1.2 实验试剂与仪器** 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂 Reverse Transcriptase M-MLV、oligo(dT) Primer、RNase Inhibitor,3'-Full RACE Core Set Ver 2.0, 5'-Full RACE Kit,DNA 胶回收试剂盒,小剂量抽提质粒试剂盒,pMD19-T 载体,*EcoR* I 和 *Pst* I 内切酶等购自大连宝生物工程有限公司(TakaRa);荧光定量试剂 SYBR Green PCR

Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保种。其他试剂均为国产分析纯。

荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司生产的 7900HT Fast Real-time PCR 仪,紫外分光光度计为 UNICO 公司的 UV-3802 紫外分光光度计,凝胶成像系统为 Syngene 公司的 G:BOX。

**1.1.3 引物** 参考 GenBank 中其他已知物种的 *MyD88* cDNA 序列以及罗非鱼 *MyD88* 基因相关的 EST 序列(GenBank 登录号分别为:GR679416.1、GR677755.1、GR667828.1、GR657529.1、GR660908.1、GR600336.1),用 MEGA4 分析保守性。在保守区内用软件 primer premier 5.0 设计引物 *mydF1*、*mydR1*(表 1)。根据获得的奥利亚罗非鱼 *MyD88* 基因编码区序列设计 3'RACE 引物 *mydF2*、*mydF3*,5'RACE 引物 *mydF4*、*mydF5* 和一对荧光定量 PCR 引物 RT-*mydF*、RT-*mydR*(表 1)。根据奥利亚罗非鱼  $\beta$ -*actin* 序列(GenBank 登录号:EU784813)设计一对荧光定量 PCR 引物 RT-*actinF*、RT-*actinR*(表 1)。引物由基康生物技术有限公司合成并纯化。

表 1 引物及序列

Table 1 Primers and their sequences

引物 Primers	序列 5'→3' Primer sequences 5'→3'	用途 Utilization
<i>mydF1</i>	GCTAAACATGAGCGTGAGGA	编码区序列
<i>mydR1</i>	ACAGTTATGGCAGCGACAGA	扩增
<i>mydF2</i>	TCCAGTGATCTACAAGCCGATGAC	3'RACE
<i>mydF3</i>	CGCTTCTCACCAATTGTGACTAC	
<i>mydF4</i>	ACATCCTCATCTATCACTGCTCCG	5'RACE
<i>mydF5</i>	TACCGTGTGCTTGGGGTTACAGATA	
RT- <i>mydF</i>	GCCGACTCGCAAGTTGACTT	<i>MyD88</i> 的
RT- <i>mydR</i>	GCTTTTCTCCTCAGCTCATGT	定量 PCR
RT- <i>actinF</i>	CCCAGATCATGTTCCAGACCTT	内参基因的
RT- <i>actinR</i>	CAGCCTGGATGCAACCT	定量 PCR

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 合成** 分别取健康鱼体 12 种组织 50 mg 用液氮充分研磨,按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂方法提取总 RNA。以 Oligo(dT) Primer 为反转录引物,使用

Reverse Transcriptase M-MLV 进行反转录, 反应体系为: 总 RNA 1  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), oligo (dT) Primer 1  $\mu\text{l}$ , 5  $\times$  M-MLV Buffer 2  $\mu\text{l}$ , dNTPs (10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{l}$ , RNase Inhibitor 0.25  $\mu\text{l}$ , RTase M-MLV (RNaseH-) 1  $\mu\text{l}$ , 加不含 Rnase 的无菌水至总体积为 10  $\mu\text{l}$ 。反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$  1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$  15 min 后冰上冷却。反转录所得 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.2 MyD88 部分序列的分离** PCR 的反应体系为: 奥利亚罗非鱼肝 cDNA 1  $\mu\text{l}$ , mydF1、mydR1 (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 4  $\mu\text{l}$ , 10  $\times$  Ex PCR Buffer (含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{l}$ , dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{l}$ , Ex Taq (5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 50  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。目的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 按 DNA 胶回收试剂盒操作说明回收目的片段。将目的 DNA 片段与 pMD19-T 载体连接, 转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含 Amp<sup>+</sup> 的 LB 琼脂平板中, 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。挑选单菌落进行扩大培养, 经质粒抽提并使用 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切检测后, 菌液送上海生工生物工程有限公司测序。

**1.2.3 3' RACE 和 5' RACE** 按照 3'-Full RACE Kit 试剂盒操作要求, 采用特异性引物 mydF2、mydF3 扩增。用 5'-Full RACE Kit, 使用特异引物 mydF4、mydF5 进行 5' RACE 反应。最后所获得的目的条带, 胶回收连接后转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆测序。

**1.2.4 序列分析** 利用 biowire 软件对所获得的奥利亚罗非鱼的 MyD88 cDNA 序列进行片段拼接和序列分析, cDNA 序列和氨基酸序列用 DNAMAN 软件进行编辑, 利用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对氨基酸序列进行分析, 用 ClustalX2、Mega4 软件进行多序列比较和聚类分析。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析** 任取一份组织 cDNA 进行 5 倍系列稀释, 选取 5 个稀释度制作标准曲线, 每次实验设一个不加 cDNA 的阴性对照。反应体系: 2  $\times$  SYBR Green PCR

Master Mix 10  $\mu\text{l}$ , 引物 (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 1  $\mu\text{l}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{l}$ 。每组待测样品设置 3 个重复。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  40 s)。使用 ABI7900 HT Fast real-time PCR 仪自带软件建立标准曲线。在 PCR 扩增后进行熔解曲线分析以确定得到的产物是否为单一产物。应用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  分析方法对数据进行分析。具体实验方法参考文献 (王倩等 2012)。

## 2 结果

**2.1 奥利亚罗非鱼 MyD88 基因的分离** 取奥利亚罗非鱼肝总 RNA, 以引物 mydF1、mydR1 进行 RT-PCR 反应, 得到一条 750 bp 左右的条带。克隆后测序得到一条长 821 bp 的片段。经 BLAST 分析, 证实是奥利亚罗非鱼 MyD88 基因的部分序列。根据得到的序列设计 3' RACE 和 5' RACE 引物, 最终获得 MyD88 基因的 3'UTR 和 5'UTR。奥利亚罗非鱼 MyD88 基因全长为 1 611 bp, 由 867 bp 的开放阅读框、155 bp 5'UTR、589 bp 3'UTR 组成, 共编码 288 个氨基酸。3'UTR 含有两个多聚核苷酸加尾信号 (AATAAA) (图 1)。奥利亚罗非鱼 MyD88 全长 cDNA 序列已提交 GenBank, 序列号为 JN032017。

用 SMART 软件预测奥利亚罗非鱼 MyD88 氨基酸序列。N 端具有死亡结构域, 包含 92 个氨基酸 (氨基酸区域: 12 ~ 103), C 端具有 TIR 结构域, 包含 137 个氨基酸 (氨基酸区域: 152 ~ 288)。TIR 结构域包含三个高度保守的区域: box 1 (FDAFICYCQ)、box 2 (LCVFDRDVLPGSC) 和 box 3 (FWTRL) (图 2)。

**2.2 奥利亚罗非鱼 MyD88 基因的同源性分析及系统进化树构建** 将奥利亚罗非鱼 MyD88 基因分别与人、小鼠、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾等 14 个物种的 MyD88 基因的编码区序列和蛋白质序列进行比对分析。分析结果显示, 奥利亚罗非鱼与鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 相似性最高 (核苷酸 84.7%, 氨基酸 85.8%), 与无脊椎动物栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (核苷酸 9.2%, 氨

基酸 31.8%)、果蝇(核苷酸 3.3%,氨基酸 21.9%)的序列相似性最低;与鱼类核苷酸相似性为 69%~85%,氨基酸相似性为 70%~86%,与哺乳动物核苷酸和氨基酸相似性约为 63%~66%(表 2)。

使用 Clustal X2 与 MEGA 4.0 软件,对奥利

亚罗非鱼和上述 14 个物种的 MyD88 蛋白质序列采用 Neighbor-joining 法 Bootstrap 重复 1 000 次的计算方法构建系统进化树。进化分析表明,鱼类 MyD88 聚为一支,与无脊椎动物距离较远;奥利亚罗非鱼和鳊鱼、大黄鱼聚在一起,它们都属于鲈形目,具有较近的亲缘关系(图 3)。

```

gaaagcaaagacttcaacttctcagtcaggtatggttgctgtagacttccgaggcaacacagcatttca 70
aatcacgtctatcgttataatggttagcttcttacttataacttacaanaaacccggttaacttaacc 140
gaaacttttggaacATGGCTTGCGCCGACTCGCAAGTTGACTTGGAGAAGATTCCTCTCGTTGCCCTAA 210
      M A C A D S Q V D L E K I P L V A L 18
ACATGAGCGTGAGGAAAAGCTGGGACTTTATCTGAACCCCAAGCACACGGTAGCCGACTGGATGGC 280
N M S V R K K L G L Y L N P K H T V A A A D W M A 42
GCTCGCAGAGGCCATGGCTTCAACTGGAAATAAAGAAGTACGAAGTGCCTGCAAAACCCAACTGC 350
  L A E A M G F N Y L E I K N Y E V P K N P T C 65
ACGGTCTGGAGGACTGGCAGGCTCGGACCACAGACAGTCAGTGGGAAGTGTGTGTAATGCTCTCGG 420
  T V L E D W Q A R T T D T S V G K L L S M L S 88
AGCTGGACAGAGAAGACATCGTGGAGGACTGCGACCACTGATAGATGAGGATGTCGGGAAGTACTGTG 490
E L D R E D I V E D L R P L I D E D V R K Y C A 112
GAATCTTAAAAAGAAAGCTGAACCCCCCTCAGGTTCTGAGGTCGACAGCTGTGTCCCTCGACCCCT 560
  N L K K K A E P P L Q V P E V D S C V P R T P 135
GAGAGTCTGGGATCACTGTGGATGATGACCTGAAGGGTTCCTGAGATGTTGATGCCTCATCTGCT 630
  E R S G I T V D D D P E G V P E M F D A F I C 158
ACTGCAGAGGCACTTTGCGTTCGCCAGAAATGATCCGTGAGCTGGAGCAGACGGACTACAAGCTGAA 700
Y C Q S D F A F V H E M I R E L E Q T D Y K L K 182
ACTGTGTGTTCGACAGAGATGTCCTCCCGGGCTCTGCGTGTGGACCATCACTAGTGAACATCGAG 770
  L C V F D R D V L P G S C V W T I T S E L I E 205
AAGAGGTGTAACCGGATGGTGGTGGTATTCTGATGAATATCTCGACAGGATGCCTGTGACTTTCAGA 840
  K R C K R M V V V I S D E Y L D S D A C D F Q 228
CCAAGTTGCTCTCAGCCTTTGCTGGAGCTCGAAGTAAACGCCTGATTCACAGTATACAAGCCGAT 910
T K F A L S L C P G A R S K R L I P V I Y K P M 252
GACAAAGCCCTTCCCAGCATTTTACGTTCTCACCATTGTGACTACACCCGGCTTGCACGACGGCG 980
  T K P F P S I L R F L T I C D Y T R P C T Q A 275
TGGTTCTGGACTCGACTTGCCAAAGCTGTGCTGCCATAAactgtagcagcgggttaatcatatttc 1050
  W F W T R L A K A L S L P * 288
aaagtgccttttgttattccattaaaagattatggttgacagtgccaaatgcagcactggaggaatct 1120
catgattacactgtatgtatataatcttactgcttcaactgcacttcccttggagacgacacagattcct 1190
gcacactgcattatgaaagtgagaccgcagtagtatccaacccagcaaaagtctcagtgataatc 1260
attatcatattatgagatttccattctgacaggggtttgtgtggacctatgttattatgtgtgt 1330
tgcattgaggagaagggtacattctttgtcacttcccttatgagcaactgttcatgaaattgaagc 1400
ttaaaggaagaactgtttgtgacctgatacttcaagaattcagttctactgacagctgacacctgcc 1470
ttctgtgcagcaattctgttactgtggatctctacttttgagttgtttttaaagtctcttttta 1540
gaccaataaaataatgttttttaaataaagttaacgtggtgattatcaaaaaaaaaa 1610
a 1611

```

图 1 奥利亚罗非鱼 MyD88 基因及蛋白质序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Oreochromis aureus* MyD88

翻译起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用粗体标出,推导的氨基酸序列位于编码区下方,5'UTR 和 3'UTR 用小写字母列出,死亡结构域和 TIR 结构域用灰色阴影标出,保守区域(box 1~3)用斜黑体标出,加尾信号(AATAAA)用下划线标出。

The translation start codon (ATG) and termination codon (TAG) are in bold letters, the deduced amino acid sequence is shown below the ORF region, the 5'UTR and 3'UTR are listed in lowercase letters. The death domain and TIR domain are in dark gray underlay, in which conserved sequences (box 1~3) are denoted by bold italicized letters. The polyadenylation signals (AATAAA) are underlined.



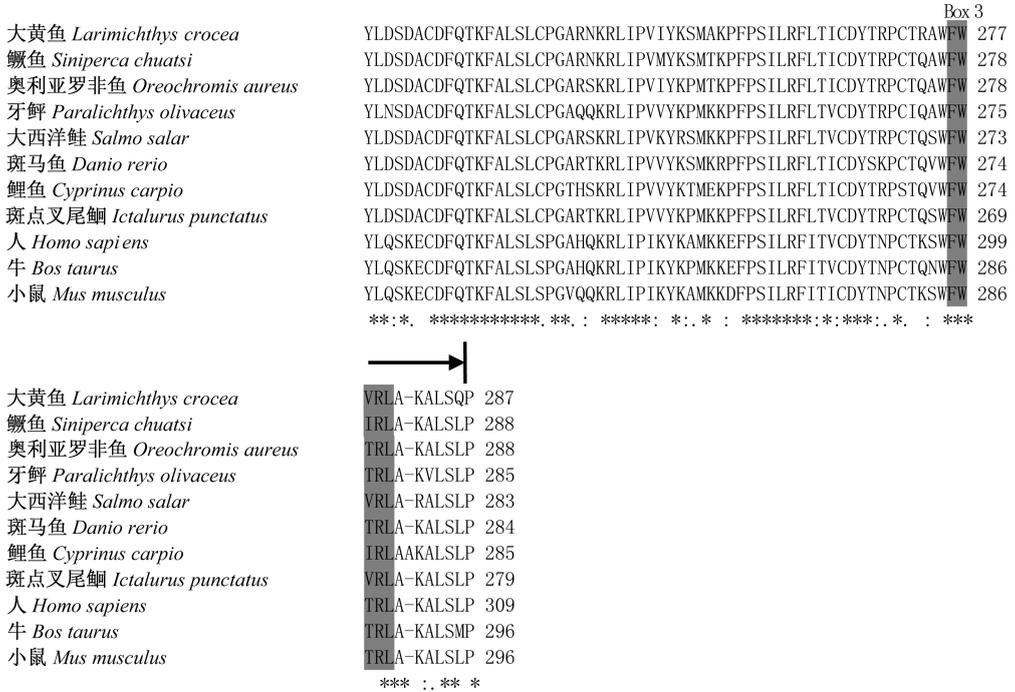


图 2 奥利亚罗非鱼和其他物种的 MyD88 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of MyD88 amino acid sequences from *Oreochromis aureus* and those of other species

星号表示相同的氨基酸残基,横线表示空位;箭头标出死亡结构域和 TIR 结构域;box 1 ~ 3 以灰色阴影标出。

Identical amino acid residues are indicated by dots; Dashes indicate gaps that are introduced for optimal alignment. Death domain and TIR domain are indicated by arrows. The three conserved regions (box 1 - 3) are in dark gray underline.

表 2 奥利亚罗非鱼和其他 14 个物种的 MyD88 核苷酸和氨基酸序列相似度

Table 2 Pair wise similarities of selected MyD88 nucleotide and amino acid sequences

物种 Species	GenBank 序列号 Accession No.	核苷酸序列相似度 Nucleotide identity (%)	氨基酸相似度 Amino acid identity (%)
鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	HQ014593	84.7	85.8
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	EU978950	81.7	81.9
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NM_001136545	72.5	77.0
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AB241074	79.4	76.6
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	NM_001200278	71.3	75.3
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_212814	69.0	70.2
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	HQ380208	69.0	70.6
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AF294272	62.1	64.3
鸡 <i>Gallus gallu</i>	EF011109	63.7	62.1
牛 <i>Bos taurus</i>	NM_001014382	63.7	64.2
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_010851	63.4	65.2
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_002468	63.9	64.9
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	DQ249918	9.2	31.8
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NM_136635.2	3.3	21.9

2.3 实时荧光定量 PCR 的标准曲线和溶解曲线分析 对各组织的 cDNA 进行 5 倍系列稀释,选取 5 个稀释度进行实时荧光定量 PCR 反

应。结果以循环阈值 (threshold cycle, Ct) 为纵坐标,以稀释倍数值为横坐标,获得相对定量标准曲线。MyD88 和  $\beta$ -actin 基因标准曲线的相

关系数分别为 0.998 和 0.995, 扩增效率分别为 100% 和 96.7%。可见各基因 real-time PCR 在稀释度范围内有很好的线性关系。

*MyD88* 和  $\beta$ -*actin* 的溶解曲线分别在 78.5°C、77.5°C 处形成单一的特异峰, 溶解温度均一, 且峰位于 5°C 范围内, 无特异性荧光, 表明无引物二聚体及非特异性产物产生、扩增产物特异性高。

**2.4 *MyD88* 基因组织差异表达分析** 采用 real-time PCR 对 *MyD88* 基因在奥利亚罗非鱼不同组织的表达进行了分析。结果显示 (图 4), *MyD88* 基因在健康罗非鱼所有被测组织中均有表达。其中表达量最高的是卵巢, 其次, 在小肠、脾、肝、肾、鳃、血液中有较高的表达量, 在肌肉、精巢中 *MyD88* 的表达量是最低的。

### 3 讨论

本文首次克隆了奥利亚罗非鱼 *MyD88* 全

长 cDNA 序列。首先利用生物信息学方法得到了奥利亚罗非鱼的部分编码区序列, 然后应用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术克隆了奥利亚罗非鱼完整 cDNA 序列, 全长为 1 611 bp, 其中开放阅读框大小为 867 bp, 共编码 288 个氨基酸序列, 与鳊鱼的 *MyD88* 氨基酸数目相同。

将奥利亚罗非鱼 *MyD88* 蛋白序列与其他物种相应序列进行同源性比对, 结果表明奥利亚罗非鱼 *MyD88* 与鱼类相似性很高, 高于哺乳类、鸟类、两栖类和软体类。其中, 与鳊鱼的同源性最高, 达 85.8%。通过 NJ 法构建系统进化树分析表明, 鱼类的 *MyD88* 单独聚成一支。罗非鱼首先与同属鲈形目的鳊鱼、大黄鱼聚在一起, 再与其他鱼类聚成一支。本结果与其系统进化关系是一致的。

通过 SMART 软件预测以及与其他物种的同源序列对比分析显示, *MyD88* 的蛋白结构在鱼类甚至整个进化过程中非常保守。首先, 罗

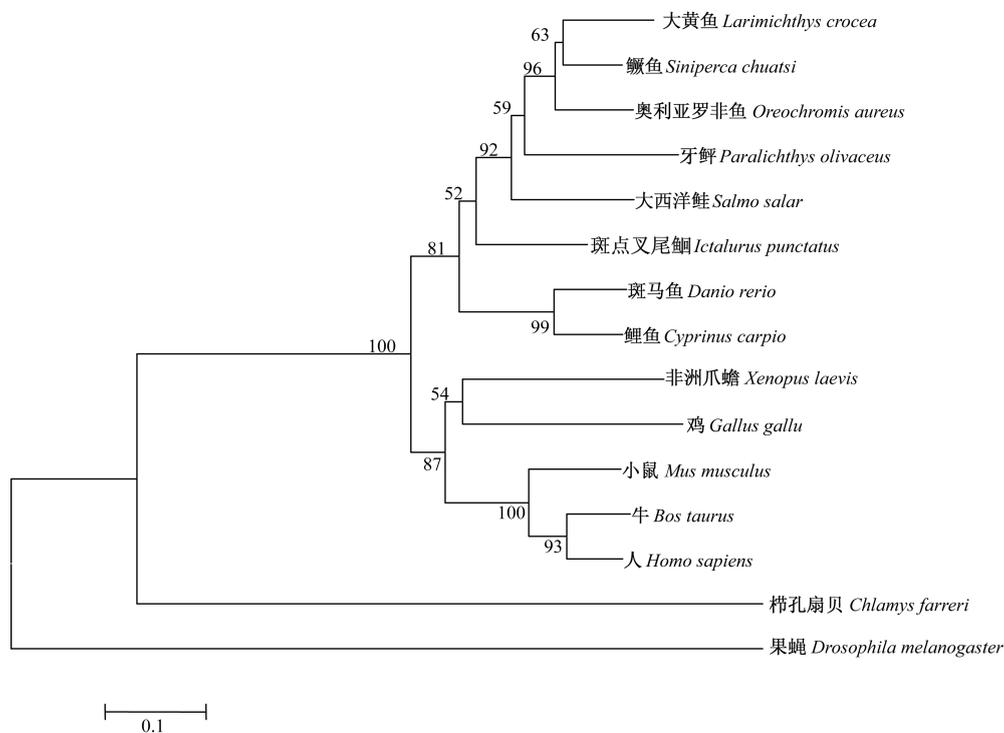


图 3 基于奥利亚罗非鱼和其他已知物种 *MyD88* 蛋白序列的 NJ 系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *MyD88* proteins from *Oreochromis aureus* and other species

标尺 (0.1) 代表遗传距离, 节点的数据代表置信度。

The scale bar (0.1) refers to phylogenetic distance. Numbers at tree nodes refer to bootstrap values.

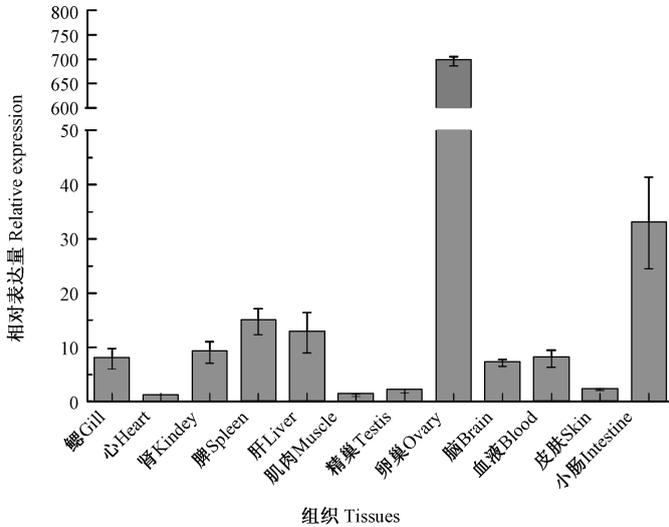


图4 奥利亚罗非鱼 MyD88 mRNA 在不同组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of MyD88 mRNA in *Oreochromis aureus* tissues

非鱼 MyD88 蛋白 N 末端同样也含有死亡结构域,长度为 92 个氨基酸。至今,已发现有 300 多个包含死亡结构域的蛋白,这些蛋白的死亡结构域大多位于 C 末端 (Feinstein et al. 1995)。MyD88 的死亡结构域位于 N 末端,最初认为死亡结构域参与介导信号传导最终引起细胞凋亡,现认为它是 MyD88 与下游 IRAK 家族成员相互作用的基序 (Whang et al. 2011)。其次,罗非鱼 MyD88 蛋白 C 末端含有 TIR 结构域,长度为 137 个氨基酸,并且 TIR 结构域比死亡结构域更为保守。TIR 结构域也同样含有 3 个高度保守的区域 (box 1、box 2、box 3),与其他鱼类以及哺乳动物 (人、小鼠、牛) 仅有 1~2 个氨基酸的差异 (图 2)。Slack 等 (2000) 通过对 IR-1 的 TIR 结构域分析提出,box 1 和 box 2 结合信号传导中的相关蛋白,而 box 3 通过和细胞骨架分子相互作用指导定位受体,因此这 3 个区域在信号传导通路中发挥重要功能。

早期的研究认为 MyD88 仅在小鼠髓样组织中表达 (Lord et al. 1990),但随后研究证实 MyD88 可在哺乳动物的非髓样组织中表达,但不同组织表达水平存在一定差异 (Bonnert et al. 1997)。这可能是由于 MyD88 不仅与多个 TLRs、IL-1 受体和 IL-18 受体信号转导有关,而

且也与 IFN- $\gamma$  受体信号传导有关 (Sun et al. 2006)。表达 MyD88 基因的细胞主要为单核细胞系、胸腺细胞系、T 细胞系、B 细胞系、Th1 细胞系和 Th2 细胞系等免疫细胞 (Qiu et al. 2007),因此 MyD88 基因在免疫相关组织的表达量较高。本实验中,MyD88 在健康奥利亚罗非鱼被测组织中均有表达,其中表达量最高的是卵巢,其次在小肠、脾、肝、肾、鳃和血液中有较高的表达量,在肌肉、精巢组织中 MyD88 的表达量较低。MyD88 在奥利亚罗非鱼肝、脾、肾等免疫器官中高丰度表达,在肌肉组织中表达较低,与报道的牙鲆 (Takano et al. 2006)、大黄鱼 (Yao et al. 2009)、条石鲷 (Whang et al. 2011) 等鱼类中的表达情况相似。在奥利亚罗非鱼的卵巢组织中 MyD88 的表达量大大超过其他组织,猜测可能与实验鱼处于繁殖期有关,此时卵巢里含有大量成熟卵细胞。实验检测处于非繁殖期的奥利亚罗非鱼卵巢,表达量要低很多 (未发表数据)。与本实验结果相似,半滑舌鳎未受精卵里的 MyD88 表达量高于受精卵发育各个时期 (Yu et al. 2009),因此卵巢 MyD88 表达量可能与鱼体发育成熟度及发育时期相关。推测这一现象与母源性免疫相关。这种母源性 MyD88 mRNA 同样在斑马鱼 (van

der Sar et al. 2006)、非洲爪蟾(Qiu et al. 2006)中发现。这种免疫相关的母源性 mRNA 可能与保护卵细胞和受精后的胚胎发育有关。沙珍霞等(2010)在半滑舌鳎的精巢中发现 *MyD88* 有较高表达, 认为与该基因在小鼠睾丸、附睾中表达结果相似, 推测这种高水平表达与雄性生殖过程中所发挥的先天免疫作用有关。但本实验检测奥利亚罗非鱼精巢 *MyD88* 表达量并不高, 有关奥利亚罗非鱼精巢中 *MyD88* 发挥的免疫作用还有待进一步验证。

综上所述, 奥利亚罗非鱼 *MyD88* cDNA 序列和氨基酸序列与其他鱼类及哺乳动物高度同源, 在各免疫相关组织中的表达模式类似, 预示罗非鱼 *MyD88* 与其他鱼类及哺乳动物功能相近, 是罗非鱼重要的先天免疫因子, 在机体免疫起关键作用。

## 参 考 文 献

- Akira S, Yamamoto M, Takeda K. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochemical Society Transactions*, 31(3): 637–642.
- Bonnert T P, Garka K E, Parnet P, et al. 1997. The cloning and characterization of human MyD88; a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Letters*, 402(1): 81–84.
- Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, et al. 1995. The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends of Biochemical Sciences*, 20(9): 342–344.
- Janeway Jr C A, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197–216.
- Jault C, Pichon L, Chluba J. 2004. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular Immunology*, 40(11): 759–771.
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of Immunology*, 167(10): 5887–5894.
- Kongchum P, Hallerman E M, Hulata G, et al. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of TLR9, MyD88 and TRAF6 genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1): 361–371.
- Lord K A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D A. 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding *MyD88*, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5(7): 1095–1097.
- Muzio M, Ni J, Feng P, et al. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 278(5343): 1612–1615.
- Ohnishi H, Tochihob H, Katoa Z, et al. 2009. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25): 10260–10265.
- Prothmann C, Armstrong N J, Rupp R A. 2000. The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for *Xenopus* axis formation. *Mechanisms of Development*, 97(1/2): 85–92.
- Qiu L M, Song L S, Yu Y D, et al. 2007. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(3): 614–623.
- Rebl A, Goldammer T, Fischer U, et al. 2009. Characterization of two key molecules of teleost innate immunity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): MyD88 and SAA. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 131(1/2): 122–126.
- Skjaeveland I, Iliiev D B, Strandskog G, et al. 2009. Identification and characterization of TLR8 and MyD88 homologs in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental and Comparative Immunology*, 33(9): 1011–1017.
- Slack J L, Schooley K, Bonnert T P, et al. 2000. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(7): 4670–4678.
- Sun D, Ding A. 2006. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nature Immunology*, 7(4): 375–381.
- Takano T, Kondo H, Hirono I, et al. 2006. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(9): 807–816.
- Tauszig-Delamasure S, Bilak H, Capovilla M, et al. 2002. Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nature Immunology*, 3(1): 91–97.
- van der Sar A M, Stockhammer O W, van der Laan C, et al. 2006. MyD88 innate immune function in a zebrafish embryo infection model. *Infection and Immunity*, 74(4): 2436–2441.
- Wesche H, Henzel W J, Shillinglaw W, et al. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6): 837–847.

- Wang I, Lee Y, Kim H, et al. 2011. Characterization and expression analysis of the myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*) in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Molecular Biology Reports*, 38(6): 3911–3920.
- Wheaton S, Lambourne M D, Sarson A J, et al. 2007. Molecular cloning and expression analysis of chicken *MyD88* and *TRIF* genes. *DNA Sequence*, 18(6): 480–486.
- Yao C L, Kong P, Wang Z Y, et al. 2009. Molecular cloning and expression of *MyD88* in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(2): 249–255.
- Yu Y, Zhong Q W, Zhang Q Q, et al. 2009. Full-length sequence and expression analysis of a myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*) in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Immunogenetics*, 36(3): 173–182.
- 沙珍霞, 王娜, 王启龙, 等. 2010. 半滑舌鲷髓样分化因子的克隆和表达分析. *中国水产科学*, 17(4): 659–667.
- 王德成, 余敏, 余锐萍, 等. 2008. Toll 样受体研究进展. *动物医学进展*, 29(2): 56–60.
- 王倩, 邹芝英, 李大宇等. 2012. 尼罗罗非鱼 *MyD88* 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立. *中国农学通报*, 28(5): 92–97.
- 杨弘. 2010. 我国罗非鱼产业现状及产业技术体系建设. *中国水产*, (9): 6–10.
- 赵文华, 夏雪山. 2007. Toll 样受体研究进展. *动物医学进展*, (10): 85–87.
- 祝璟琳, 杨弘, 邹芝英, 等. 2010. 海南养殖罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验. *海洋与湖沼*, 41(4): 590–596.

## 《动物学杂志》第十一届编辑委员会

名誉主编: 马 勇

主 编: 宋延龄

副 主 编: 赵 勇 彭景榭 孙悦华 梁 冰(常务)

编 委: (以姓氏笔画为序)

丁长青 马 勇 马志军 马建章 王德华 计 翔 石树群 孙青原 孙悦华  
 刘迺发 许木启 李 明 李保国 李枢强 李新正 张正旺 张春光 张明海  
 张树义 张海燕 宋延龄 宋林生 宋昭彬 杨增明 宛新荣 郑光美 赵 勇  
 费 梁 钟文勤 桂建芳 夏国良 徐存拴 徐宏发 徐延恭 梁 冰 彭贤锦  
 彭景榭 蒋志刚 戴家银 魏辅文

责任编辑: 顾亦农 梁 冰