

草鱼 *TLR9* 基因全长 cDNA 的克隆及特征分析

杨春荣, 苏建国*, 彭丽敏, 董捷

(西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用同源克隆及快速扩增 cDNA 末端技术, 从草鱼鳃组织中克隆了 Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, *TLR9*) 基因的 cDNA 全长。序列分析表明, 草鱼 *TLR9* cDNA 全长 3 468 bp, 编码 1 058 个氨基酸, 其中包括 18 个氨基酸组成的信号肽、16 个富含亮氨酸重复结构域 (leucine rich repeat, *LRR*)、1 个跨膜区和 1 个 TIR 结构域 (Toll/IL-1 receptor)。该蛋白的分子量为 121 921 u, 等电点为 8.80。氨基酸序列的同源性分析显示, 草鱼 *TLR9* 与鲤 *TLR9* 的同源性最高 (85%), 依次为斑马鱼 (82%)、大西洋鲑 (55%)、虹鳟 (55%)。在系统发生树上, 草鱼 *TLR9* 首先与鲤科的鲤和斑马鱼聚类。通过半定量 RT-PCR 检测可知, 草鱼 *TLR9* 在被检测的 15 个组织中都有表达, 其中在鳃中的表达最高, 其次为血、头肾等。这些结果为进一步深入研究 *TLR9* 的功能及开发草鱼免疫增强剂奠定基础。

关键词: 草鱼; Toll 样受体 9 (*TLR9*); 鳃; 表达特征

中图分类号: Q 786; S 917

文献标识码: A

先天性免疫系统是宿主抵御病原微生物入侵的第一道防线。它通过胚系编码的模式识别受体 (pattern recognition receptors, *PRRs*) 来识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, *PAMPs*), 从而诱导一系列的免疫应答 (包括先天性免疫和获得性免疫)。Toll 样受体 (Toll-like receptors, *TLRs*)、RIG-I 样受体 (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, *RLRs*) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, *NLRs*) 构成了三大 *PRR* 家族, 各自识别不同而又重叠的 *PAMPs*^[1]。迄今已有 10 种人类和 13 种小鼠的 *TLRs* 被报道^[2], 其不同成员能够分别识别病毒、细菌、真菌、原生动物的 *PAMPs*^[3]。*TLR9* 位于细胞膜或内体膜上, 是先天性免疫系统中识别细菌和病毒非甲基化胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤基序 (CpG-DNA) 的模式识别受体^[4-6], 人工合成的寡脱氧核糖核酸 (CpG oligodeoxynucleotides, CpG-ODN) 也是它的配体^[7]。用 CpG-DNA 激活

TLR9 信号通路可能是多种疾病新的预防与治疗策略^[8]。体内外试验结果表明, CpG-ODN 在硬骨鱼类中也具有很好的免疫增强效果, 其作用原理是通过 *TLR9* 识别 CpG-ODN, 从而激发一系列的免疫反应^[9-11]。免疫增强剂能非常有效地控制鱼类疾病的发生, 在鱼类养殖中是非常有用的, 但不是对所有疾病都有效^[12]。

TLR9 基因序列已在无脊椎动物^[13] 及多种脊椎动物中被报道。截止 2010 年 12 月, 鱼类 *TLR9* 在鲤、斑马鱼、大西洋鲑、虹鳟、斜带石斑鱼、黄鲷、真鲷、牙鲆、黑鲷、黄鳍鲷、金头鲷、大黄鱼、半滑舌鳎、南极鱼、独角雪冰鱼、红鳍东方鲀中已被报道, 其中鲤和斑马鱼为鲤科鱼类。

本研究以病害损失比较严重的草鱼为研究对象, 通过同源克隆和 RACE 技术获得 *TLR9* 基因的 cDNA 全长, 分析其结构特征, 并进行聚类分析, 研究其在 15 个不同组织中的表达规律, 为进一步深入研究其功能及开发草鱼的免疫增强剂奠定基础。

收稿日期: 2010-12-27 修回日期: 2011-03-10

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30871917); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-08-0466)

通讯作者: 苏建国, E-mail: su.jianguo@gmail.com

1 材料与方法

1.1 RNA 的提取

活体解剖市场购买的草鱼,取出 50 ~ 100 mg 组织(包括血、脑、眼睛、前肠、中肠、后肠、鳃、头肾、中肾、心脏、肝胰脏、肌肉、皮肤和脾脏)立即放入 TRIZOL(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 的完整性。通过分光光度计测定 RNA 的浓度,并根据 OD_{260}/OD_{280} 判断 RNA 的纯度。将高质量的总 RNA 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 草鱼 TLR9 部分序列的克隆

根据 GenBank 中已报道的鱼类 TLR9 的 cDNA 序列设计兼并引物。正向引物为 TF340,反向引物为 NR13b(表 1)。用六碱基随机引物和 MMLV 反转录酶(Promega)进行反转录。PCR 反应体系为 1 μL cDNA, 2.5 μL 的 10 \times 缓冲液, 2.5 μL Mg^{2+} (25 mmol/L), 1 μL dNTPs (10 mmol/L), 1 μL *Taq* 酶(1 U/ μL), 每条引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 15 μL 无核酶的水。PCR 反应

程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 最后 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。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 进行比对分析,该序列与已知鱼类的 TLR9 同源。

1.3 快速扩增 cDNA 末端

根据上述已获得的草鱼 TLR9 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 NF102 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 TR356 和接头引物 UPM,嵌套 PCR 用基因特异性引物 TR357 和接头引物 NUP。对获得的 PCR 产物进行纯化、连接、转化、筛选、测序及拼接。

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	扩增长度及说明 amplicon length(nt) and primer information
TLR9		
TF340(forward)	GGASACATAAATGTGGACTG	2 510 gene
TR13b(reverse)	CABASRTCCCAGCCRTAGAG	cloning
NF102(forward)	AGCAACCATCATTCCCCTCCTGA	3'RACE
TR356(reverse)	TACACAGTTCCACATCAAGCTGAGA	5'RACE
TR357(reverse)	CTGAGATGCTTGAGATTGGGTAAA	
NF238(forward)	TCTGCTAAACTGGGCACAC	98 RT-PCR
NR239(reverse)	AGATGAGAGTATCAGAACCC	
18S rRNA		
18F99(forward)	ATTTCGCACACGGAGAGG	90 RT-PCR
18R100(reverse)	CATGGGTTTAGGATACGCTC	
universal adaptor primer	long: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
UPM	short: CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
5'-RACE adaptor		
OligodG	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG	5'RACE
3'-RACE primer		
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN	3'RACE

B = C/T/G; R = A/G; S = G/C; V = A/G/C; N = A/G/C/T.

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/>)^[14]。内部结构域特征用 PROSITE database (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite>)^[15] 进行扫描。分子进化分析用 MEGA 4.0 软件^[16]。

1.5 不同组织中的表达

以 18S rRNA 为内参照,用半定量 RT-PCR 检测草鱼 *TLR9* 在不同组织中的表达。18S rRNA 的正向引物为 18F99,反向引物为 18R100,PCR 循环数为 22 圈;*TLR9* 的正向引物为 NF238,反向引物为 NR239(表 1),PCR 循环数为 32 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

草鱼 *TLR9* 全长 mRNA 在 GenBank 中的注册号为 FJ969850, 翻译的蛋白的序列号为 ADB96920。

2 结果

2.1 草鱼 *TLR9* 基因的克隆及序列分析

通过兼并引物扩增获得了草鱼 *TLR9* 的第一个片段为 2 510 bp, BLASTX 分析表明,与鲤 *TLR9* (序列号: ADC45018) 的同源性最高 (84%)。3' RACE 获得了 776 bp 的序列,与第一个片段有 48 bp 完全重叠,包含 poly(A) 尾巴,得到了 3' 端的全

长。5' RACE 获得了 382 bp 的序列,与第一个片段有 152 bp 完全重叠,在上游出现了多个“终止密码”,认为获得了 5' 端全长。将这些序列拼接后获得了 3 468 bp 的序列,获得了草鱼 *TLR9* 的 cDNA 全长。序列分析表明草鱼 *TLR9* 全长 mRNA 序列包括 128 bp 的 5' 非翻译区,编码区,163 bp 的 3' 非翻译区及 poly(A) 尾巴(图 1)。编码序列从第 129 个核苷酸开始到第 3 305 个核苷酸终止,编码 1 058 个氨基酸的蛋白。

2.2 氨基酸分析及分子进化关系

由 1 058 个氨基酸组成的草鱼 *TLR9* 分子量为 121 921 u,等电点约为 8.80。BLASTP 分析表明,该序列与鲤的 *TLR9* 同源性最高 (85%),依次为斑马鱼 (82%)、大西洋鲑 (55%)、虹鳟 (55%)。草鱼 *TLR9* 属 I 型跨膜蛋白,具有 18 个氨基酸组成的信号肽,成熟的蛋白由 3 个区域组成,16 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 TIR (Toll-interleukin 1-resistance) 膜内区(图 1)。选择人及所有已报道的鱼类 *TLR9* 序列构建分子系统进化树(图 2)。在系统树中,草鱼的 *TLR9* 首先与鲤的 *TLR9* 聚在一起,这与上述 BLASTP 的结果一致。鲤科鱼类的 *TLR9* 聚在一起。

2.3 草鱼 *TLR9* 在不同组织中的表达

TLR9 在被检测的血、脑、眼睛、前肠、中肠、后肠、鳃、鳃、头肾、中肾、心脏、肝胰脏、肌肉、皮肤和脾脏组织中都有表达,以鳃中表达最高,其次为血和头肾(图 3)。

```

1 ATGAAAAGGTGAACACTGTTAATATTATTACTTAGACCCAGCATTGTTGGTTACTTTGCTTCTCTGGTGAATGT
1 M F G H V Y L I
76 AAAAGATACACAGTGTGTGGAACGTAAAGATTTGGATTGCAAACCTTCGGACATGTTTGGACACGTGTATCTGA
9 L I L N Q F H L F A T K H P E F Y P C E S R T S K
151 TTCATCACTGAATCAGTTTCATCTTTTGGCTACTAAGCATCCTGAATTCATCCATGTGAAAGTCGCACCTCCA
34 D G H I N I D C Q H R R L S K I P K F I S L S V V
226 AGGATGGACACATAAATATCGACTGCCAGCAGACAGCTCTCTAAAATCCCCAAGTTCATATCCCTATCTGTTG
59 S L N L N Q N H T H Y I K G D A E S D L P N L K H
301 TATCACTCAACCTAAATCAAACCATATACACTACATTAAGGTGATGCATTTTCTGATTTACCCAATCTCAAGC
84 L S L M W N C V P D P L K E Q R W P S C N L N V D
376 ATCTCAGCTTGATGTGGAACGTGTACCAGATCCTCTTAAGGAGCAGAGATGGCCTTCATGCAACCTGAATGTTG
109 P E A F V G L K N L T S L Q L A G N S L K T I P P
451 ATCCAGAAGCATTGTCGGACTTAAAAACCTAACTCCCTCCAGTTAGCAGGAATAGCCTGAAGACCATTCCTC
134 L P K Q L L V L G L E F N N I F H I V K P L G T P
526 CTCTACCAAAGCAGCTTTTAGTCTTGGGACTGGAATTTAACAAATATTTTCATATTGTCAAACCACTCGGTACAC

```

159 L L K Q L L L N K N C F Y A N P C Y R P Y F I D P
 601 CGCTACTAAAACAACACTACTGCTAAACAAGAATTGTTCTACGCCAACCCATGTTATCGGCCTTACTTTATCGACC
 184 R V F Q E L P E L L N L T L S Y N N V T N V P L H
 676 CACGTGTGTTCAAGAACTTCCTGAGCTTTTGAACCTTACCCTTAGTTACAACAATGTGACCAATGTCCCTTAC
 209 L P P S L E S L D L G E N K I T G I T K E S F A N
 751 ACCTTCCACCTTACTAGAAAGTCTAGACTTGGGAGAGAACAAGATCACAGGTATTACTAAAGAGTCTTTTGCGA
 234 L T R L R H L N L G W N C Q R C D H A S E P C F P
 826 ATCTTACAGTCTGCGACACCTTAACCTGGGGTGAATGCGCAAAGATGCGATCATGCTTCTGAACCTGTTTCC
 259 C P N N Q S L R L H Q D A F L D Q R D S L I S L S
 901 CATGCCAAAACAACCAATCTCTGCGTCTGCATCAGGATGCATTTTGGATCAGAGAGACTCTCTAATTAGTCTAA
 284 L R G N S L R T L P Q Y L F M H L H N L K E L D L
 976 GTTACGAGGCAACTCTCTTGTACTTCCCTCAGTATCTTTTATGCACCTGCACAATCTCAAAGAGCTAGATC
 309 S D N F L A Y T I Q N G T F Y E E L Q N V V S L S
 1051 TATCTGACAACTTTTGTAGCTTACCCATACAAAATGGCACCTTTTATGAAGAGCTCCAGAATGTCGTGCCCTCA
 334 L L Y N Y E P L K S F P E L I L S P A I E K M T A
 1126 GTCTGCTTACAACATGAACCCCTGAAGTCTTTCCTGAATTGATTCTGTCCCTGCCATAGAGAAGATGACGG
 359 L R E L Y L S G F F F K E L S N H S L A P L I K L
 1201 CTCTAAGAGAGTTGTACTGAGCGGATTTTCTTCAAAGAAGTGTGGAACACAGCCTCGCACCTCTGATCAAAC
 384 P R L E S L E L R M N F I C F I S I D S I S Q L R
 1276 TGCCAAGACTTGAGTCCCTAGAGCTACGCATGAACCTCATCTGCTTATTAGCATTGATTCTATTAGCCAGCTGA
 409 T L K R V G L S Q N M L A F S P C Y S T C N S E A
 1351 GGACATTAAGAGGGTGGGTCTTTCCAAAACATGCTTGTCTTTCAGTCCATGCTATTCAACCTGCAATTCTGAAG
 434 I L Q Y Q T L E K R H D Y E Q M H E V P A P N S K
 1426 CCATACTGCAATACCAACCCCTGAAAAACGTCATGACTATGAACAAATGCATGAAGTCCCTGCTCCAAACTCAA
 459 L N N M Q S S E E D Y C P F Y Y S M W H F K K Q I
 1501 AGCTGAACAATATGCAGAGCTCTGAAGAAGATTACTGTCGTTTTATTATTCTATGTGGCATTTCAAAAGCAGA
 484 C S K S L F F D L S Q N S I P W L N A S T F R G M
 1576 TCTGCTCTAAAAGCCTGTTTTTGGACCTGTCTCAAACAGCATCCCATGGCTGAATGCAAGTACTTTTAGAGGCA
 509 E N V V C I D L S Y N Y I S Q S L N G R Q F S H L
 1576 TCTGCTCTAAAAGCCTGTTTTTGGACCTGTCTCAAACAGCATCCCATGGCTGAATGCAAGTACTTTTAGAGGCA
 509 E N V V C I D L S Y N Y I S Q S L N G R Q F S H L
 1651 TGAAAACGTGGTGTGCATAGATCTATCTACAACACTACATCAGTCAATCTTTAAATGGCCGGCAGTTCACATC
 534 S K L A F L N M A H N R I D L Y S E K A F H E V S
 1726 TAAGCAAACCTAGCTTTTCTTAATATGGCGCACAACCGCATTGACCTGTAATCTGAAAAGGCCTTCCATGAGGTTA
 559 G T L K A L D L S N N E F H F V M K G M G H R F T
 1801 GTGGAACCCCTGAAAGCTCTTGACCTCAGCAACAACGAATTCACCTTTGTAATGAAGGGTATGGGACATCGCTTCA
 584 F L S H L T S L K V L S L A N N H I G L R I S N T
 1876 CATTCTTTCACACTTGACGTCTCTTAAAGTACTGAGTCTAGCAACAATCACATGGTCTTTCGAATCTCTAACA
 609 L N S T S L K Y L A F S G N R L D I M W D S R R N
 1951 CTCTTAATAGTACTTCTGAAATATCTTGCCTTCTGGAATCGCTTGGACATAATGTGGGACTCTAGGCGTA
 634 Q Y I H F F Q G L T N L T H L D I S E N Q L K S F
 2026 ACCAATACATACATTTCTTTCAGGGTCTTACTAACCTTACACACTTAGACATTTCTGAAAACCAGCTCAAATCGT
 659 P P E V I V N L P P S L Q V L R V D S N M L S Y F
 2101 TTCCCCAGAGGTAATAGTAAACTTGCCCTCAAGCCTCCAGGTGCTCAGAGTCGACTCCAACATGTTGAGTTATT
 684 P W A N I S V L R Q L C Y L N L S S N M L L F L P
 2176 TCCCCTGGGCCAACATCTCAGTCTCAGACAGCTCTGCTACCTGAACCTTAGTTCAAACATGCTTTTATTTTAC
 709 N I H F E L H L V S L D L S H N R L V T I P K A F
 2251 CTAATATCCATTTTGAGCTCCACCTCGTAAGCCTGGACTTAAGTCACAATCGACTAGTTACAATCCCAAAGGCTT
 734 L S Q A V H L K N L M L N H N Q L K I L D V Q A L

```

2326 TCCTTAGTCAGGCAGTACACCTTAAAAACCTAATGCCTTAACCAACAGCTGAAGATCCTTGATGTACAAGCTC
759 P L L F H K G H T F C P A G Q N K N R S S C K L V
2401 TTCCCTTGTTATCCATAAAGGTCATACCTTTCTGTCCAGCTGGGCAGAATAAAAAATAGGTCCTCCTGCAAACTTG
784 L H S N P F I C S C V I S G F A K F L R E T E L D
2476 TGCTGCATTCGAATCCTTTTATTTGCAGTTGCGTTATCTCGGGGTTTGTCTAAATTTCTCAGAGAACTGAATTGG
809 I P H L T T Q V H C A Y P E S L S G V N V L S I D
2551 ATATCCCACATCTCACCACACAGGTTCACTGTGCTTACCAGAGTCATTGTCTGGTGTGAACGTTCTCTCGATTG
834 L R S C Q E I F G G F A L L C T L L L T L A A T I
2626 ACCTTCGCTCATGCCAGGAGATATTTGGGGGATTCGCTTTACTCTGTACTTTATTTGTTGACATTGGCAGCAACCA
859 I P L L K H L Y G W D L W Y C I Q I L W T G H R G
2701 TCATTCCTCCTGAAGCATCTCTACGGTTGGACCTGTGGTATTCATCCAGATCCTGTGGACTGGACACAGAG
884 H T P A N G N M T D D Q Y D A F V V E D T S N K A
2776 GACACACTCCAGCTAATGGTAACATGACCGATGACAGTATGATGCATTTTGTGGTCTTTGATACAAGTAACAAGG
909 V R D W I Y K E M I V R L E N R G R W R F R L C L
2851 CAGTCAGAGATTGGATCTACAAGAAATGATTGTGAGATTGGAGAACAGGGGAGATGGCGCTTTCGACTTTGTC
934 F E R D W L P G V S C I E N I H K A V Y S S R K T
2926 TAGAGGAACGTGACTGGTTGCCTGGAGTATCGTGCATAGAGAATCTCCACAAGGCAGTTTACAGCAGCAGAAAGA
959 V E V L T S P S G Y S Q S S G V V R Q A F L L V Q
3001 CGGTGTTTCGATTGACTAGCCCTAGTGGCTATTCTCAATCAAGTGGGGTGGTCCGACAAGCCTTCTCTCGGTTTC
984 Q R L L D E K V D V A V L V L L D F L E P K E K Y
3076 AGCAGCGGCTTCTTGATGAGAAAGTGGATGTTGCAGTCTTGTTTTGCTAGACTTCTTATCCCAAGTCAAAT
1009 L Q M R K R L C K K S V L S W P K N P R V Q P L E
3151 ACCTTCAGATGAGGAAACGGCTCTGCAAAAAGTCAGTCTTATCCTGGCCCAAGAACCCACGAGTGCAGCCGCTCT
1034 W N N I R V A L V S D N V K A Y N K N V T E S F F
3226 TCTGGAATAACTTGCCTGTCGCTCTTGTCTCCGACAATGTCAAAGCCTACAACAAAAATGTCACAGAGAGCTTCT
1059 *
3301 TCTACAAGGCTAAAAATGTAATGAGGATATGTTTTATGAAGTCTATGTTTTGTTTTTCACATTTTTGCCAAGT
3376 GGGTTGTGGCTAAACAGAATGTAATTTTTCTAACACATTTTAAATGGTGAATAAAAAAATGATTTTTGATCTCT
3451 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 草鱼 *TLR9* cDNA 及推导的氨基酸序列

起始密码前的“终止密码子”用下划线标出。起始密码子加边框。终止密码用星号(*)标出。多聚腺苷酸加尾信号加粗表示。信号肽用阴影标出(在蛋白序列上的位置为1-18)。LRR结构域用下划线标出(在蛋白序列上的位置分别为54-75、115-134、189-209、210-229、276-295、300-328、356-379、383-403、533-559、588-619、642-665、667-686、691-714、715-732、737-757、787-838)。跨膜区用双下划线标出(在蛋白序列上的位置为840-862)。TIR结构域用波浪线标出(在蛋白序列上的位置为895-1044)。斜体部分表示对CpG结合及基因调控具有重要作用两个CXXC(在蛋白序列上的位置为246-259)。着重号表示与CpG-DNA相互作用所必须的两个氨基酸(D⁵⁴⁷和Y⁵⁴⁹)。配体接头TIR的3个保守盒子加方框(在蛋白序列上的位置分别为896-903、931-941和1033-1037)。

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *C. idella* *TLR9* cDNA

The “stop codons” in front of start codon are marked by dot underline. The start codon is boxed and the stop codon is indicated with an asterisk. Polyadenylation signal is shown in bold. The signal peptide is shaded(1-18aa). The LRR domains are underlined(54-75aa, 115-134aa, 189-209aa, 210-229aa, 276-295aa, 300-328aa, 356-379aa, 383-403aa, 533-559aa, 588-619aa, 642-665aa, 667-686aa, 691-714aa, 715-732aa, 737-757aa, 787-838aa). The transmembrane domain is marked by double underline(840-862aa). The TIR domain is indicated by wavy underline(895-1044aa). The two CXXC motifs important for CpG binding and gene regulation are shown in italic(246-259aa). The two essential amino acids for interacting with CpG-DNA are indicated by emphasis symbol(D⁵⁴⁷ and Y⁵⁴⁹). The TIR domain boxes for ligand adaptor are boxed(896-903aa, 931-941aa and 1033-1037aa).

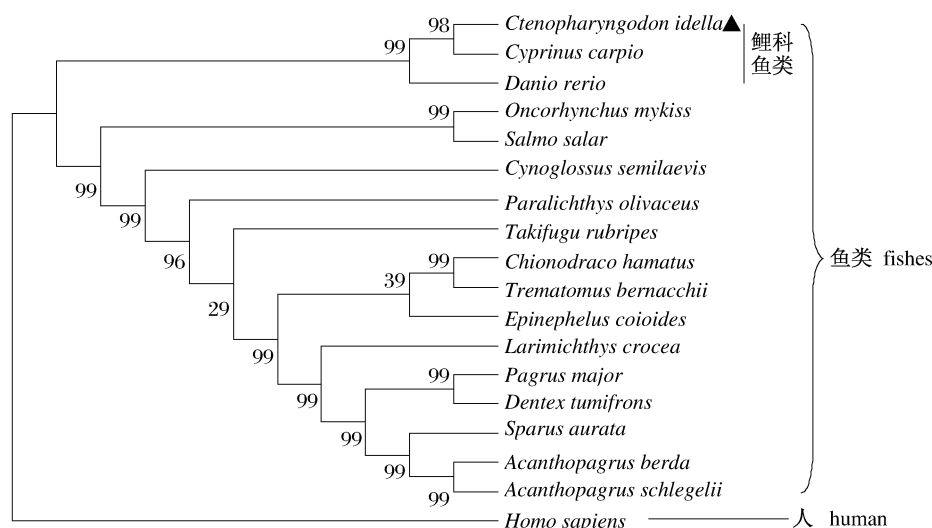


图2 鱼类及人 TLR9 蛋白序列的系统进化树

由 ClustalW2 和 MEGA4.0 软件构建。线长表示遗传距离。黑色三角(▲)标出草鱼 TLR9。*Ctenopharyngodon idella*: 草鱼 (ADB96920); *Cyprinus carpio*: 鲤 (ADC45018); *Danio rerio*: 斑马鱼 (NP_001124066); *Salmo salar*: 大西洋鲑 (NP_001117125); *Oncorhynchus mykiss*: 虹鳟 (NP_001123463); *Epinephelus coioides*: 斜带石斑鱼 (ACV04893); *Dentex tumifrons*: 黄鲷 (ABY79218); *Pagrus major*: 真鲷 (ABY79217); *Acanthopagrus schlegelii*: 黑鲷 (ABY79216); *Paralichthys olivaceus*: 牙鲆 (BAE80691); *Acanthopagrus berda*: 黄鳍鲷 (ABY79215); *Sparus aurata*: 金头鲷 (AAW81697); *Larimichthys crocea*: 大黄鱼 (ACF60624); *Cynoglossus semilaevis*: 半滑舌鲷 (ACL68661); *Trematomus bernacchii*: 南极鱼 (ACT64130); *Chionodraco hamatus*: 独角雪冰鱼 (ACT64129); *Takifugu rubripes*: 红鳍东方鲀 (AAW69377); *Homo sapiens*: 人 (ABW37074)。

Fig. 2 Phylogenetic relationships of TLR9 in fishes and human

Phylogenetic tree was obtained from a ClustalW2 alignment and MEGA4.0 Neighbor-Joining of 11 sequences. The bar indicated the distance. The solid triangle(▲)marks *Ctenopharyngodon idella* TLR9.

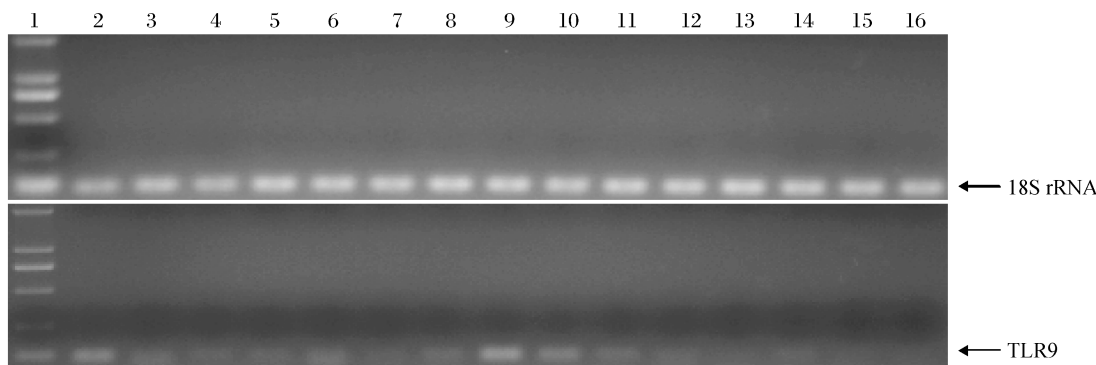


图3 草鱼不同组织中 TLR9 的表达

1. Marker, 2. 血, 3. 脑, 4. 眼睛, 5. 前肠, 6. 中肠, 7. 后肠, 8. 鳔, 9. 鳃, 10. 头肾, 11. 中肾, 12. 心脏, 13. 肝胰脏, 14. 肌肉, 15. 皮肤, 16. 脾脏。

Fig. 3 CiTLR9 mRNA expression profile in different tissues

1. Marker, 2. blood, 3. brain, 4. eye, 5. foregut, 6. midgut, 7. hindgut, 8. gas bladder, 9. gill, 10. head kidney, 11. trunk kidney, 12. heart, 13. hepatopancreas, 14. muscle, 15. skin, 16. spleen.

3 讨论

草鱼 TLR9 基因 5' 非翻译区有 4 个“终止密码子”, 说明 CDS 的 5' 端是完整的。在 3' 非翻译

区含有多聚腺苷酸加尾信号及 poly(A) 尾巴, 说明 3' 端是完整的。翻译的蛋白序列进行 BLASTP 及多序列比对分析, 与其它物种的 TLR9 同源, 而且还含有 CpG 结合及基因调控具有重要作用的

两个 CXXC 模体(在蛋白序列上的位置为 246 – 259),也含有与 CpG-DNA 相互作用所必须的两个氨基酸(在蛋白序列上的位置为 D⁵⁴⁷ 和 Y⁵⁴⁹)及配体接头 TIR 的 3 个保守盒子(在蛋白序列上的位置分别为 896 – 903、931 – 941 和 1033 – 1037)(图 1)^[17-18]。草鱼 *TLR9* 序列与鲤的遗传距离最近(图 2)。鲤科鱼类聚类在一起,与其它鱼类距离较远。这些结构的相似性说明功能的相似性。

通过半定量 RT-PCR 检测,草鱼 *TLR9* 在被检测的 15 个组织中都有表达,其中鳃中的表达最高,其次为血和头肾。鳃作为鱼类的呼吸器官,直接与水环境中大量微生物接触,其先天性免疫防御反应对鱼类抵抗各种病原入侵具有重要作用。鳃小片由上下两层细胞构成,在鳃小片中有微血管,这里的表皮很薄,当血液流过这里时就完成了气体交换。这里也是病原比较容易入侵的区域。鳃中先天性免疫相关的基因高表达有利于鱼类抵御病原入侵。与草鱼 *TLR9* 同源性最高的鲤 *TLR9*,在被检测的 7 个组织中,肾脏的表达最高,其次是鳃^[17]。斑马鱼 *TLR9* 在被检测的 10 个组织中,血的表达最高(鳃没有被检测)^[19]。真鲷 *TLR9* 在被检测的 9 个组织中广泛表达(除了皮肤),血的表达最高,其次是鳃^[10]。牙鲆 *TLR9* 在被检测的 11 个组织中广泛表达,在鳃、肠、脾脏和肾脏中都有较高的表达^[20]。虹鳟 *TLR9* 在被检测的 4 个组织中广泛表达,鳃的表达最低,脾脏表达最高^[18]。这种组成性表达模式差异的生物学意义有待进一步研究。

草鱼对多种病原敏感,研究开发免疫增强剂势在必行。体外研究表明,应用广泛的免疫增强剂 CpG-ODN 对草鱼也具有免疫调节作用^[21]。本研究克隆了草鱼 *TLR9* 基因序列,并对其结构特征及表达规律进行了分析,为进一步深入研究鱼类 *TLR9* 基因的作用机理、草鱼免疫增强剂的开发及作用机制奠定基础。

参考文献:

- [1] KAWAI T, AKIRA S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(4) : 317 – 337.
- [2] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7) : 499 – 511.
- [3] FINBERG R W, WANG J P, KURT-JONES E A. Toll like receptors and viruses [J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(1) : 35 – 43.
- [4] BAUER S, KIRSCHNING C J, HACKER H, *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (16) : 9237 – 9242.
- [5] LATZ E, VISINTIN A, ESPEVIK T, *et al.* Mechanisms of TLR9 activation [J]. *J Endotoxin Res*, 2004, 10(6) : 406 – 412.
- [6] HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. *Nature*, 2000, 408(6813) : 740 – 745.
- [7] AN H, YU Y, ZHANG M, *et al.* Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells [J]. *Immunol*, 2002, 106(1) : 38 – 45.
- [8] 杨海伟,魏继福,何韶衡. 肥大细胞 Toll 样受体的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(9) : 933 – 934.
- [9] TASSAKKA A, SAKAI M. Current research on the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides in fish [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1 – 4) : 25 – 36.
- [10] CUESTA A, ESTEBAN M A, MESEGUER J. The expression profile of TLR9 mRNA and CpG ODNs immunostimulatory actions in the teleost gilthead seabream points to a major role of lymphocytes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(13) : 2091 – 2104.
- [11] CARRINGTON A C, SECOMBES C J. A review of CpGs and their relevance to aquaculture [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 112 (3 – 4) : 87 – 101.
- [12] 黄洪敏,邵健忠,项黎新. 鱼类免疫增强剂的研究现状与进展 [J]. *水产学报*, 2005, 29(4) : 552 – 559.
- [13] FERRANDON D, IMLER J L, HETRU C, *et al.* The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(11) : 862 – 874.
- [14] LETUNIC I, COPLEY R R, PILS B, *et al.* SMART 5: domains in the context of genomes and networks [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (suppl. 1) : D257 – D260.
- [15] HULO N, BAIROCH A, BULLIARD V, *et al.* The 20 years of PROSITE [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(suppl. 1) : D245 – D249.

- [16] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24 (8): 1596 – 1599.
- [17] KONGCHUM P, HALLERMAN E M, HULATA G, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of TLR9, MyD88 and TRAF6 genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2010, 30(1): 361 – 371.
- [18] ORTEGA-VILLAIZAN M, CHICO V, FALCO A, *et al.* The rainbow trout TLR9 gene and its role in the immune responses elicited by a plasmid encoding the glycoprotein G of the viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(8–9): 1710 – 1717.
- [19] 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.
- [20] TAKANO T, KONDO H, HIRONO I, *et al.* Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44 (8): 1845 – 1853.
- [21] MENG Z, SHAO J, XIANG L. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(4): 313 – 321.

Cloning and characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Toll-like receptor 9

YANG Chun-rong, SU Jian-guo^{*}, PENG Li-min, DONG Jie

(Northwest A & F University, Shanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of Toll-like receptor 9 (CiTLR9) gene was identified from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) gill by homologous cloning and rapid amplification cDNA ends (RACE). The CiTLR9 cDNA was 3 468 bp, encoding 1 058 amino acid (aa) residues, including signal peptide, 16 leucine rich repeat (LRR) motifs, one transmembrane zone and one Toll/IL-1 receptor (TIR) domain. The molecular weight of the deduced protein is 121 921 u, and the isoelectric point is 8.80. The amino acid sequence of CiTLR9 possessed 85%, 82%, 55%, and 55% identity with the TLR9s of *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss* respectively. CiTLR9 protein firstly clustered with TLR9s in Cyprinidae species, *Cyprinus carpio* and *Danio rerio* in the phylogenetic analysis. CiTLR9 mRNA was detected in all the tested 15 tissues (blood, brain, eye, foregut, midgut, hindgut, gas bladder, gill, head kidney, trunk kidney, heart, hepatopancreas, muscle, skin, spleen) by semi-quantitative real-time RT-PCR, highly in gill, blood and head kidney. The results serve further studies on functions of TLR9 and exploitation of immunostimulators in grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; Toll-like receptor 9 (TLR9); gill; characterization

Corresponding author: SU Jian-guo. E-mail: su.jianguo@gmail