

大黄鱼 *TLR25* 的分子结构及表达特征分析

李永健, 姚翠鸾

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 克隆了大黄鱼 *TLR25* (*LcTLR25*) 基因的 cDNA 序列, 采用荧光定量 PCR 检测了 *LcTLR25* 基因在大黄鱼不同组织中的表达, 以及免疫诱导后的表达变化。结果显示: *LcTLR25* cDNA 序列长度为 2868 bp, 包含 1605 bp 的开放阅读框, 编码 534 个氨基酸; 预测蛋白质由 5 个 LRR 结构域、1 个跨膜区和 1 个 TIR 结构域组成, 主要定位于细胞膜; 系统进化树分析表明, *LcTLR25* 与其他硬骨鱼的 *TLR25* 基因聚为一支, 与尼罗罗非鱼的 *TLR25* 序列同源性最高; 定量 PCR 分析显示, *LcTLR25* 在大黄鱼肠组织中表达量最高, 但是在鳃、肝、胃及皮肤组织中未检测到其表达; LPS 刺激后, 大黄鱼 LCK 细胞系中 *LcTLR25* 基因表达量显著增加, 在刺激后 6 h 达到最高值 ($P < 0.05$), 随后逐渐恢复至对照组水平; 而 *LcTLR25* 在 Poly I:C 刺激后 6 h 显著下降 ($P < 0.05$), 随后逐渐恢复至对照水平。提示 *LcTLR25* 可能参与 LPS 诱导的免疫反应。

[关键词] 大黄鱼; *TLR25* 基因; 克隆; 转录表达; 免疫刺激

[中图分类号] S 917.4

Molecular Structure and Expression Characterizations of *TLR25* in Large Yellow Croaker, *Larimichthys crocea*

LI Yongjian, YAO Cuiluan

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In the present study, the cDNA sequence of a *TLR25* from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) was cloned and the expression of *LcTLR25* transcripts in different tissues was detected by qPCR as well as in LCK cells stimulated with LPS or Poly I:C. Our results showed that a 2868 bp fragment represented *LcTLR25* was obtained by homologous cloning, containing a 1605 bp open reading frame (ORF) and encoding 534 amino acids. The predicted *LcTLR25* protein included five LRR domains, a transmembrane region and a TIR domain, which belonged to the conservative TLR family. Phylogenetic tree analysis showed that *LcTLR25* was clustered to the teleost TLR1 subfamily and *TLR25* clade, and shared the highest sequence identity with *TLR25* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The qPCR analysis revealed that *LcTLR25* expressed most in intestine, but it was not detected in gill, liver, stomach and skin. After LPS challenge, the expression levels of *LcTLR25* in LCK cell increased significantly ($P < 0.05$), reaching the peak value of 3 times as much as the control at 6 h post-stimulation. However, it decreased significantly after Poly I:C stimulation ($P < 0.05$), with the lowest value appearing at 6 h post-challenge. These results suggested that *LcTLR25* might be induced largely by LPS challenge.

Keywords: large yellow croaker; *TLR25* gene; gene cloning; expression analysis; immune stimulation

[收稿日期] 2022-05-18

[基金项目] 福建省重大专项 (2020NZ08003)

[作者简介] 李永健 (1996—), 男, 硕士生, 从事鱼类分子免疫学研究。通信作者: 姚翠鸾 (1971—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事水生生物免疫研究。E-mail: clyao@jmu.edu.cn

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 主要分布于我国东南沿海,是我国海水网箱养殖量最大的经济鱼类。然而,病害频发已经成为制约大黄鱼养殖业健康发展的主要瓶颈之一^[1-2]。

Toll样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类重要的先天性模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs),通过识别包括来自细菌、真菌及病毒等病原体中的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖 (peptidoglycan, PGN)、鞭毛蛋白 (flagellin)、多聚核苷酸 (Poly I:C, CpG-DNA) 等共有的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMPs),激活宿主下游免疫信号传导通路及炎症反应^[3]。典型 TLR 家族成员的蛋白质结构包括胞外富含亮氨酸 (leucine rich repeats, LRR) 的结构域 (主要识别不同病原的 PAMPs)、一个跨膜区 (transmembrane region, TM), 以及一个胞内的 Toll/白细胞介素-1 受体 (Toll/IL-1 Receptor, TIR) 结构域。TLRs 激活后可招募胞内的接头蛋白及信号分子,通过 MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) 依赖或 MyD88 非依赖途径,向下游进行免疫信号传递^[4]。

迄今为止,已经在人类体内发现了 10 种不同的 TLR,在小鼠中发现了 13 种^[5]。根据其结构特点、进化关系及它们识别的 PAMPs 配体,将 TLR 分为 TLR1、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 和 TLR11 等 6 个亚家族^[6]。其中 TLR1、TLR4、TLR5 亚家族成员主要分布在细胞膜上,主要识别细菌、真菌产生的脂肽、脂多糖、肽聚糖等 PAMPs^[7-9]。TLR3、TLR7、TLR11 亚家族成员主要存在于内体膜上^[10],通过识别病毒、细菌等病原体的双链及单链 RNA 或 CpG DNA 激活免疫^[11]。目前,已经发现鱼类存在 20 余种 TLRs,虽然其多样性远远多于哺乳动物,但是对其序列及结构分析表明,它们也分属于哺乳动物的 6 个 TLR 亚家族^[12]。

TLR1 亚家族主要识别细菌细胞壁中的肽聚糖和脂肽,在抗细菌免疫中发挥重要作用。哺乳动物 TLR1 亚家族的主要成员包括 TLR1、TLR2、TLR6 和 TLR10^[13]。但是,鱼类 TLR1 亚家族包括 TLR1、TLR2、TLR14、TLR18、TLR25^[14] 和 TLR28^[15],提示来自鱼类的 TLR 可能与哺乳动物存在较大差异。

TLR25 是近年来在鱼类中发现的 TLR1 亚家族的新成员,目前,已经在达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*)^[16]、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*)^[17]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[18] 中得到鉴定。研究表明,这些鱼类的 TLR25 均具有典型 TLR 分子的三个保守结构域。在免疫反应中,达氏鲟的 *TLR25* 可以被 LPS、Poly I:C 刺激所诱导^[16];齐口裂腹鱼的 *TLR25* 主要存在于细胞质,可能参与识别 LPS 与 Poly I:C^[18];而脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、脂磷壁酸质 (Lipoteichoic acid, LTA) 和酵母聚糖能够显著诱导尼罗罗非鱼 *TLR25* 的表达上调^[17]。在尼罗罗非鱼中发现两种类型的 *TLR25*,其中截短的 *TLR25* 可以诱导多种促炎细胞因子和 I 型干扰素 (IFN-I) 的表达^[18],提示不同鱼类的 *TLR25* 可能存在较大差异,它们在鱼类的免疫反应中可能发挥重要作用。但是,作为一种重要的经济鱼类,大黄鱼 *TLR25* 的序列尚未得到鉴定,它在大黄鱼免疫反应中的功能,也尚未见报道。

本研究拟克隆一个大黄鱼 *TLR25* 的 cDNA,对其进行结构分析,构建系统进化树,并在此基础上,研究其在大黄鱼不同组织及免疫刺激后在大黄鱼肾细胞 (LCK) 中的时空表达特征,为深入了解大黄鱼 *TLR25* 在免疫反应中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼、细胞系及免疫刺激

大黄鱼 (体重 (300 ± 25.6) g,体长 (24 ± 3) cm) 购自福建宁德,取样前驯养 1 周。取 4 尾大黄鱼,解剖取出肌肉、脾脏、胃、肠、血液、头肾、鳃、肝脏、肾脏、皮肤、心脏和大脑等 12 种组织或器官 ($n = 4$),迅速置于液氮中冻存,并保存于 -80°C 超低温冰箱中,用于总 RNA 提取。

大黄鱼 LCK 细胞系为本实验室保存。采用含有 10% (质量分数) 胎牛血清及 1% (质量分数) 双抗的 MEM 培养基,在 28°C 下培养,待细胞长满培养瓶后,用胰酶将其消化并传代至 6 孔板,细胞量约

为 2×10^6 ind/孔，待细胞贴壁程度达到 80 % 以上后，分别用溶于 PBS 的 LPS（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）与 Poly I：C（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）进行刺激，刺激后 6、12、24、48 h 分别取样。对照组细胞内加入等体积 PBS（0.01 mol/L，pH = 6.8）。每个样本设置 3 次独立生物学重复及 3 个平行重复（ $n = 3$ ）。取样前先使用灭菌 PBS 洗涤细胞 1 ~ 2 次，洗涤后于冰上加入 RNA 裂解液裂解，吹匀后吸出，用于 RNA 提取。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的大黄鱼 12 种组织及收集的 LCK 细胞中提取总 RNA，具体操作参照厂家说明书（Eastep $\text{\textcircled{C}}$ Super Total RNA，Promega）。

分别以上述总 RNA 为模板，采用反转录试剂盒（HiScript $\text{\textcircled{C}}$ II 1st Strand cDNA，诺唯赞）制备 cDNA 模板，每个反应使用 1 μg 总 RNA，所制备的 cDNA 用于后续的 *LcTLR25* cDNA 的克隆与荧光定量 PCR（qPCR）分析。

1.3 *LcTLR25* 基因的克隆

根据 GenBank 数据库中预测的 *TLR25*（XM_010729650.3）序列信息，设计大黄鱼 *TLR25* 特异性引物 *LcTLR25-F*、*LcTLR25-R*（见表 1）。以健康大黄鱼各个组织混合的 cDNA 为模板扩增 *LcTLR25* 编码区序列。PCR 体系为：ddH₂O 12.2 μL 、5 \times PCR buffer 4 μL 、dNTP mix 1.6 μL 、*LcTLR25-F* 0.5 μL 、*LcTLR25-R* 0.5 μL 、各组织混合的 cDNA 模板 1 μL 、高保真 Taq 酶 0.2 μL 。PCR 反应程序为：变性 98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min；98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s（55 个循环）；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物条带。

使用胶回收试剂盒（Gel Extraction Kit，OMEGA）对 PCR 产物进行胶回收。回收产物用于连接至 pMD19-T 线性载体（Promega），连接体系为：纯化后 PCR 产物 4.5 μL 、Solution I 5 μL 、PMD-19-T 线性载体 0.5 μL 。连接条件为 16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 12 h。连接后载体经转化 Top10 感受态细胞后，挑单克隆培养及菌液 PCR 检测，检测出的阳性菌液送至厦门铂瑞测序公司测序。

表 1 实验中所用引物
Tab.1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence	用途 Application
<i>LcTLR25-F</i>	GCCTCAAATCTTCCCAATG	基因克隆 Gene clone
<i>Lc TLR25-R</i>	CTTCCTGATGATGAAACAATA	
<i>qTLR25-F</i>	AACCGCTTCAGCAGCCTTT	定量分析 qPCR
<i>qTLR25-R</i>	AGAACACGCCTTATCCAAT	
<i>qβ-actin-F</i>	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	
<i>qβ-actin-R</i>	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	

1.4 序列及结构分析

使用 NCBI 网站中 BLAST 工具（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）进行同源比对、相似性分析及氨基酸序列预测；氨基酸序列的多重比对使用 Clustomega（<http://www.clustal.org/omega/>）进行；分子量、等电点等使用 EXPASY（<https://web.expasy.org/protparam/>）预测；保守的结构域及其功能在 SMART 网站（<http://smart.embl-heidelberg.de>）进行分析；亚细胞定位在 BUSCA（<http://busca.biocomp.unibo.it/>）网站进行在线分析。

1.5 进化树的构建

在 NCBI 数据库中选择来自其他物种 TLR1 亚家族成员 TLR1、TLR2、TLR18、TLR14、TLR25 的氨基酸序列及部分其他 TLR 家族成员的氨基酸序列。使用 MEGA X 软件（<https://www.megasoftware.net/>）对相关基因序列进行邻位相接法（NJ method）构建系统进化树，用 Bootstrap 法评估 1000 次。

1.6 定量 PCR 检测 *LcTLR25* 转录水平的表达变化

采用 qPCR 检测 *LcTLR25* 在肌肉、脾脏、胃、肠、血液、头肾、鳃、肝脏、肾脏、皮肤、心脏和大脑等组织中的转录表达水平, 以及 LPS 或 Poly I:C 刺激后 *LcTLR25* 在 LCK 细胞系中的表达变化。用 *LcTLR25* 的特异性引物 qTLR25-F 和 qTLR25-R, 并以 β -actin 为内参, 扩增目的基因。qPCR 反应体系为: $2 \times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix $10 \mu\text{L}$, 正反向特异性引物各 $0.4 \mu\text{L}$, 模板 $2 \mu\text{L}$, ddH₂O 补齐 $20 \mu\text{L}$ 。qRT-PCR 程序反应程序为: 95°C 3 min ; 95°C 10 s , 60°C 10 s (40 个循环); 60°C 1 min , 95°C 15 s 。实验方法参照诺唯赞 ChamQ™ Universal SYBR © qPCR Master Mix 说明书。目的基因表达的相对定量参照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法确定^[19]。

1.7 数据分析

使用软件 GraphPad Prism 8 对数据进行样本差异显著性分析 (Student's t test), 并做图。差异显著性水平为 $P < 0.05$, 差异极显著性水平为 $P < 0.01$ 。


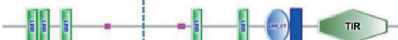






2 结果与分析

2.1 *LcTLR25* 基因的 cDNA 序列

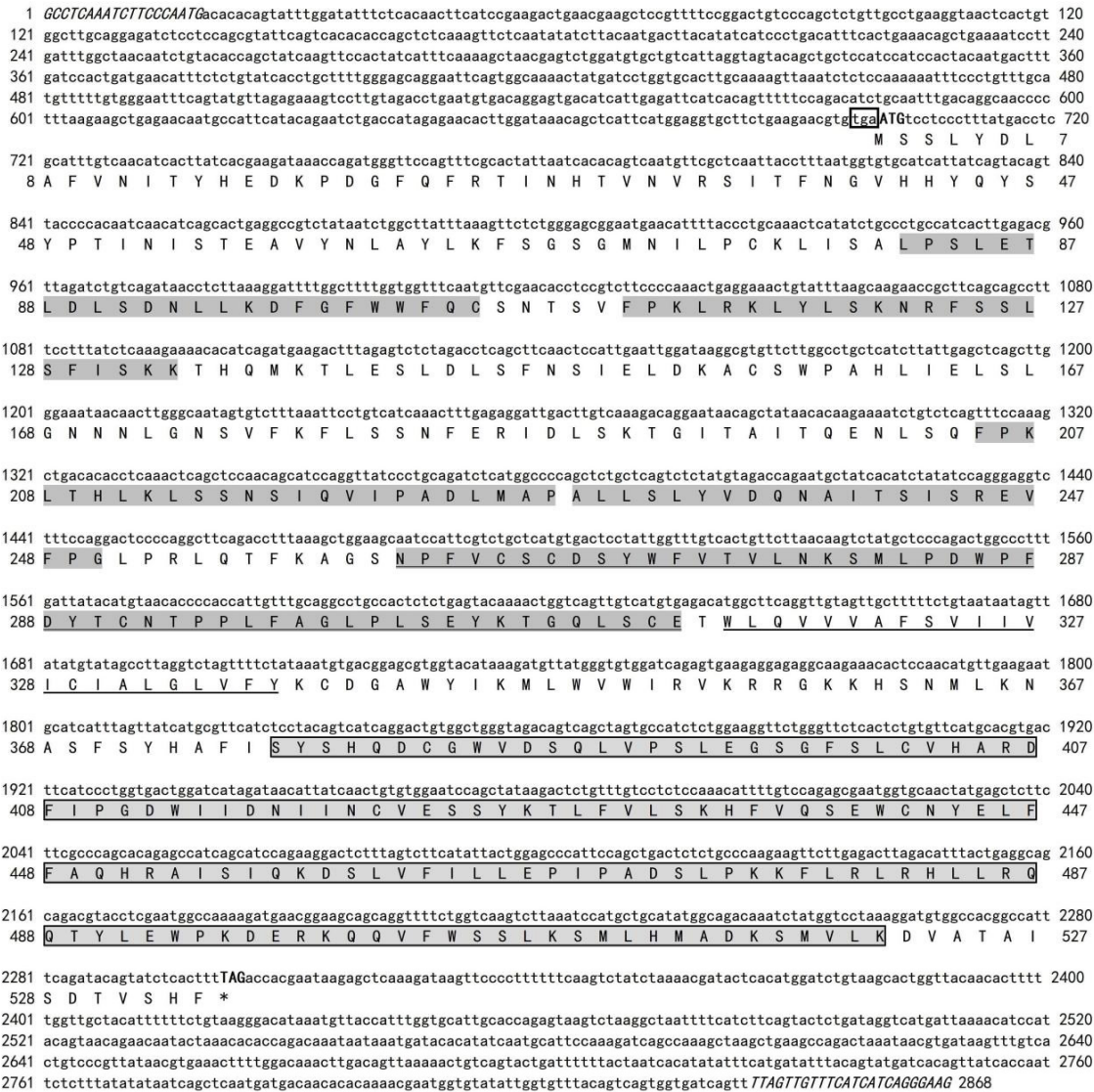
利用基因特异性引物 *LcTLR25*-F 和 *LcTLR25*-R 扩增后获得约 2868 bp 特异性单一条带, 测序后对序列进行 BLASTX 分析。结果显示该序列与尼罗罗非鱼的 *TLR25* 同源性最高 (80.43%), 与其他鱼类 *TLR25* 同源性约 $64.09\% \sim 67.66\%$, 推测本研究所获得的为 大黄鱼 *TLR25* 基因序列。

通过 SMART 在线分析推测大黄鱼及其他硬骨鱼 *TLR25* 的保守功能域, 结果见表 2。预测的 *LcTLR25* 蛋白质包括 5 个胞外的 LRR, 分别位于 $82\text{—}105 \text{ aa}$ 、 $111\text{—}133 \text{ aa}$ 、 $205\text{—}228 \text{ aa}$ 、 $229\text{—}250 \text{ aa}$ 、 $262\text{—}313 \text{ aa}$ (LRR CT); 一个跨膜区, 位于 $315\text{—}337 \text{ aa}$; 一个典型的胞内 TIR 同源域, 位于 $371\text{—}521 \text{ aa}$ (见图 1, 表 2)。与其他鱼类的 *TLR25* 相比, 大黄鱼 LRR 数量较少, 其 *TLR25* 氨基酸起始序列对应其他硬骨鱼 *TLR25* 序列约 $278\text{—}291 \text{ aa}$ 处 (表 2 中虚线表示)。

表 2 与不同硬骨鱼 *TLR25* 结构域的比较
Tab.2 Comparison of the predicted conserved domains of *TLR25* from different teleost

物种 Species	基因 Gene	预测蛋白结构 Predicted protein structure	氨基酸 长度 Amino acid length	氨基酸序 列一致性 Amino acid identity	碱基序列 相似性 Nucleic acid sequence similarity
大黄鱼 <i>Larimichthys corceae</i>	<i>LcTLR25</i>		564 aa		
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	<i>CiTLR25</i>		815 aa	63.83%	63.83% (XM_005460356.4)
斑点叉尾鱼鲇 <i>Ictalurus punctatus</i>	<i>IpTLR25</i>		828 aa	67.37%	67.66% (HQ677726.1)
达氏鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	<i>AdTLR25</i>		852aa	63.48%	67.42% ^[15]
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	<i>OnTLR25</i>		827 aa	77.02%	80.43% ^[17]
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>CcTLR25-1</i>		817 aa	64.02%	64.90% (LC150778.1)
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>CcTLR25-2</i>		817 aa	64.58%	65.53% (LC150779.1)
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	<i>SpTLR25</i>		817 aa	64.20%	65.09% (MG839713.1)

序列分析表明，该序列包含 699 bp 的 5’ 非翻译区（UTR）、564 bp 的 3’ UTR、1605 bp 的完整开放读码框（ORF），起始密码子为“ATG”，终止密码子为“TAG”，编码 534 个氨基酸（见图 1）。Expsasy 预测其分子质量为 61.09 kD，理论等电点（pI）为 8.35；亚细胞定位预测 *LcTLR25* 定位于细胞膜。



注：ATG 为起始密码子，TAG 为终止密码子；首尾大写斜体部分表示序列克隆所用引物位置；灰色底纹部分氨基酸序列分别表示 5 个 LRR，其中前 4 个灰色底纹部分表示 LRR（82—105 aa、111—133 aa、205—228 aa 及 229—250 aa），灰色底纹加下划线为 LRR_ CT（262—313 aa）；下划线部分表示跨膜结构域（315—337 aa）；方框及灰色底纹序列为 TIR 结构域（371—521 aa）。

Notes: The start codon（ATG）and the stop codon（TAG）are capitalized, capital italic section indicate the position of primers used for sequence cloning, the amino acid sequence in gray shadows indicate the LRRs（82—105 aa, 111—133 aa, 205—228 aa, 229—250 aa and 262—313 aa）and the underlined sequence is emphasized as LRR_CT, transmembrane domain（315—337 aa）is underlined, sequence in gray box is the TIR domain（371—521 aa）.

图 1 大黄鱼 *TLR25* 基因的编码区

Fig. 1 The cDNA sequences and deduced amino acid sequences of *LcTLR25*

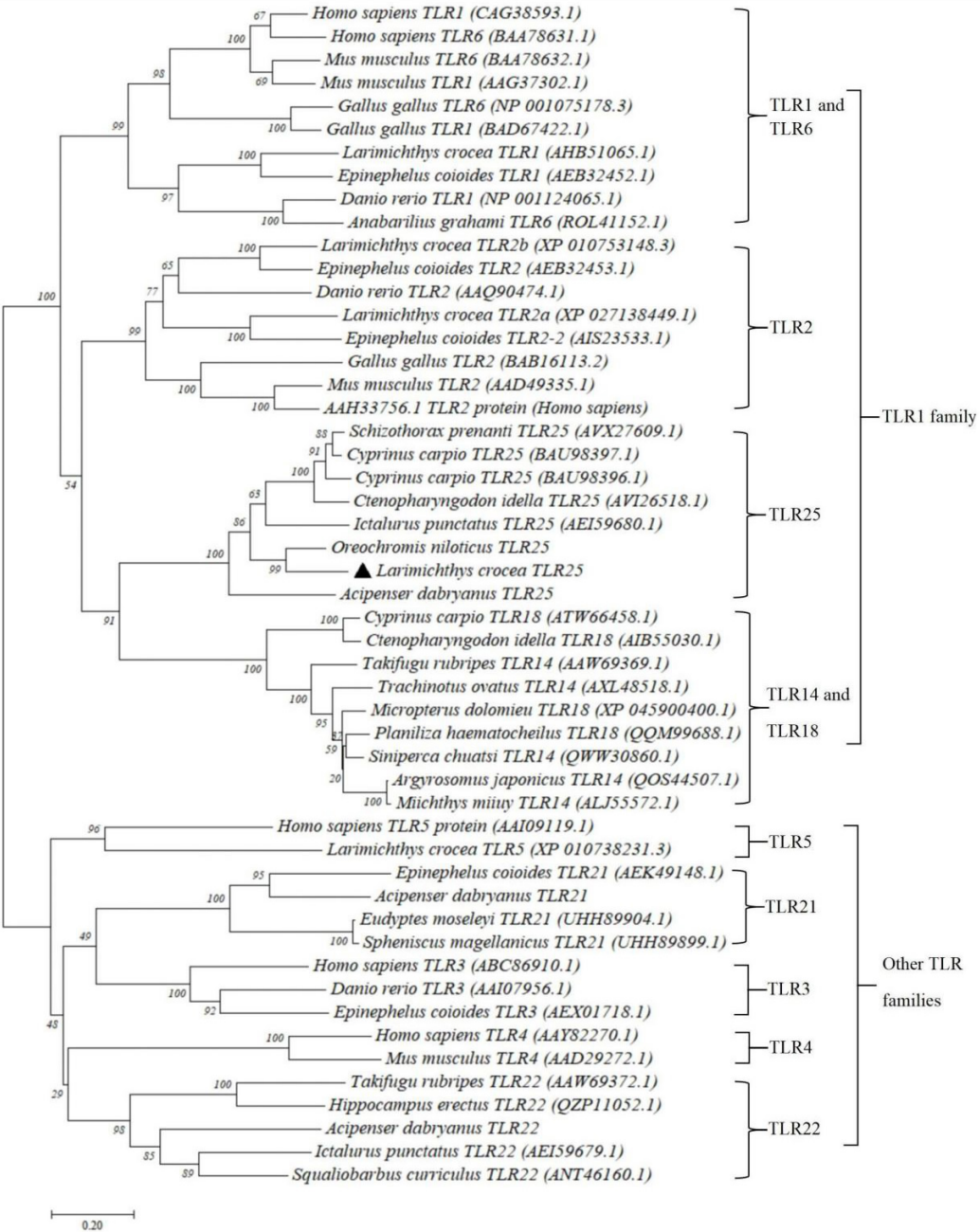
2.2 序列一致性分析

使用 NCBI-blast 分析了大黄鱼 *TLR25* 氨基酸序列与大黄鱼 *TLRs* 或其他物种 *TLRs* 的氨基酸序列一致性。结果显示：大黄鱼 *TLR25* 与大黄鱼其他 *TLR* 家族成员具有较低氨基酸序列一致性（24.06 % ~ 35.84 %），与人的 *TLR6* 序列一致性为 34.95 %；在硬骨鱼中，*LcTLR25* 与尼罗罗非鱼 *TLR25* 序列一致

性最高 (77.02%), 与斑点叉尾鲷 *TLR25*、齐口裂腹鱼 *TLR25*、鲤鱼 *TLR25*-1、鲤鱼 *TLR25*-2 及达氏鲟 *TLR25* 的序列一致性分别为 67.37%、64.20%、64.02%、64.58% 及 63.48%。

2.3 进化树分析

系统进化树结果表明 (见图 2), 从大黄鱼中扩增得到的 *LcTLR25* 与来自其他鱼类的 *TLR25* 聚为一支, 其中与同样来自鲈形目 (Perciformes) 的尼罗罗非鱼的 *TLR25* 显示出较近的亲缘关系; *TLR1* 亚家族的其他成员分别聚类到其相应的分支; 而其他 *TLRs* 亚家族成员也分别聚类到其相应的分支。



注: 达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) *TLR21*、*TLR22* 和 *TLR25* 引自文献 [16], 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *TLR25* 引自文献 [18])。Notes: The *TLR21*, *TLR22*, and *TLR25* sequence of Dabry's Sturgeon was from reference [16], and the *TLR25* sequence of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was from reference [18]).

图2 大黄鱼 *TLR25* 基因的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree produced using the neighbor-joining algorithm

2.4 大黄鱼 *TLR25* 的组织表达谱

通过 qPCR 方法在大黄鱼 12 个组织（脑、鳃、心脏、头肾、肾脏、胃、肠、肝脏、脾脏、皮、肌肉、血液）中检测了 *LcTLR25* 基因的转录表达水平。结果表明，*LcTLR25* 在肠、肌肉、心脏、血液、脑、脾脏、肾脏及头肾中均有表达。其中：在肠组织中的表达量最高；其次为肌肉、心脏、血液、脑、脾脏、肾脏及头肾；而在胃、肝脏、鳃及皮肤中未检测到其表达（CT 值 >35）（结果见图 3）。

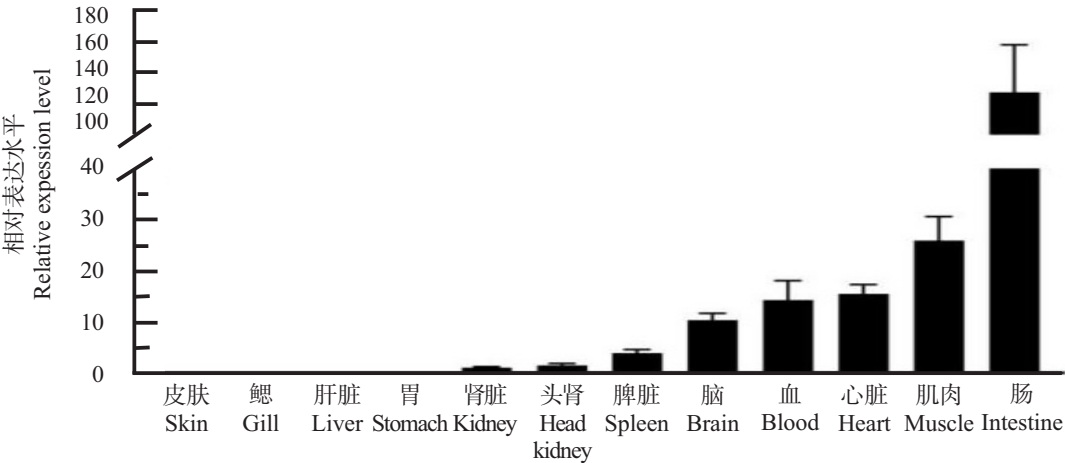


图3 大黄鱼*TLR25*基因的组织表达
Fig.3 The constitutive expression of *TLR25* in different tissues

2.5 大黄鱼 *TLR25* 的刺激表达谱

LCK 细胞经 LPS、Poly I:C 刺激后，qPCR 检测结果表明：*LcTLR25* 基因表达水平在 LPS 刺激后 6 h 时极显著上调（ $P < 0.01$ ）并达到最大值，约为对照组表达水平的 3.1 倍；随后逐渐下降，但是在刺激后 12 h 时 *LcTLR25* 表达水平仍然显著高于对照组（ $P < 0.01$ ），约为对照组的 2.3 倍；但刺激后 24 h 及 48 h 时恢复至对照组水平。

在 Poly I:C 刺激后 6 h 时，*LcTLR25* 表达水平显著下调（ $P < 0.05$ ），大约为对照组的 70 %；随后逐渐增加，在刺激后 24 h 时显著高于对照组（ $P < 0.05$ ），约为对照组的 1.5 倍；但是在刺激后 48 h 时，恢复至对照组水平。

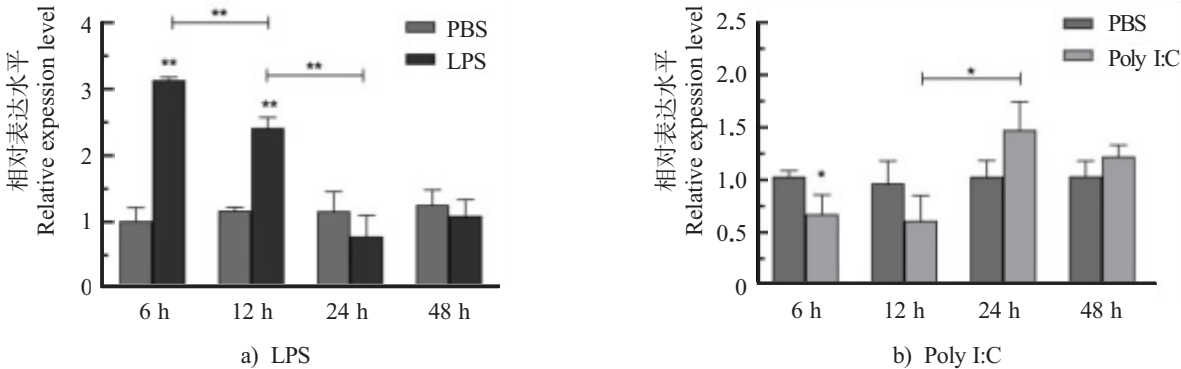


图4 LPS及Poly I:C刺激LCK细胞后不同时间对大黄鱼*TLR25*基因mRNA表达水平的影响
Fig.4 Quantitative RT-PCR analysis of *TLR25* gene expression in LCK cells after LPS and Poly I:C stimulation

3 讨论

本研究克隆到 2868 bp 的大黄鱼 *TLR25* 基因 cDNA 序列,其开放阅读框 1605 bp,编码 534 个氨基酸。BLASTN 及多重比对结果显示大黄鱼 *TLR25* 碱基序列与尼罗罗非鱼 *TLR25* 具有最高的序列同源性。氨基酸序列分析及蛋白跨膜区预测显示 *LcTLR25* 具有 5 个典型的亮氨酸重复 LRRs,1 个跨膜结构域,并具有 1 个典型的 TIR 结构域(见图 1),提示其属于典型的 TLR 家族。大黄鱼 *TLR25* 与鱼类 *TLR25* 分子氨基酸序列一致性约 64%~77%。来自尼罗罗非鱼、达氏鲟、草鱼等的 *TLR25* 大多包含 815~852 个氨基酸,具有 6~9 个 LRR 结构域(见表 2)。

LcTLR25 包含较短的 ORF,仅编码 534 个氨基酸,与其他鱼类 *TLR25* 相比,*LcTLR25* 缺少了 N 端 2~3 个 LRR 结构域(见表 2)。这是由于本实验克隆到的 *LcTLR25* cDNA 在 697—699 bp 处由大多数鱼类 *TLR25* 中的“TGG”突变为“TGA”,造成翻译终止,下一个密码子 700—702 bp 处的“AAA”变为“ATG”,造成了翻译起始位点后移,因此导致大黄鱼的 *TLR25* 编码区较短。在鱼类的进化过程中,由于基因组倍增及演化,导致了其基因型的多样性。目前,已经发现鱼类的许多功能基因存在不同基因型或者多种剪接体^[21]。与其他物种相比,这种较短的 *LcTLR25* 基因可能是选择及进化的结果^[22-23],这也可能导致了鱼类 TLR 比哺乳动物更为丰富多样。进化分析表明,*LcTLR25* 与其他鱼类的 *TLR25* 聚为一支,并与其他成员一起聚为硬骨鱼的 TLR1 家族(见图 2),说明本研究获得的序列可能为鱼类保守的 *TLR25*,也分属于 TLR1 亚家族。

组织表达分析显示,大黄鱼 *TLR25* 在肠组织中表达量最高,其次是肌肉和脑(见图 3)。齐口裂腹鱼 *TLR25* 在脑中表达量最高^[16],鲤鱼 *TLR25* 在肌肉中表达量最高^[24],与本研究结果相似。但是尼罗罗非鱼 *TLR25* 在脾脏组织中表达量较高^[17],说明不同鱼类 *TLR25* 的组织表达水平可能存在差异,也有可能和鱼的生理状态有关。推测大黄鱼 *TLR25* 基因可能在肠道内具有重要功能。

大黄鱼肾脏细胞中的 *LcTLR25* 能够被 LPS 显著诱导(见图 4)。Qi 等^[16]研究发现,尼罗罗非鱼 *TLR25* 的转录表达水平可以被 LPS、LTA 和酵母聚糖显著诱导^[17];另外达氏鲟、齐口裂腹鱼的 *TLR25* 也表现出相似的研究结果^[16-17]。TLR1 亚家族主要识别来自细菌的 PAMPs^[25],LPS 作为一种内毒素,能够诱导多种 TLR 及其下游关键因子的表达增加^[26],提示 *LcTLR25* 可能参与 LPS 诱导的免疫反应。经 Poly I:C 刺激后,*LcTLR25* 在刺激早期表达下调;然而在达氏鲟、齐口裂腹鱼及尼罗罗非鱼中,Poly I:C 刺激均可诱导 *TLR25* 的表达上调^[16-18]。这有可能与 *LcTLR25* 包含较少的 LRR 有关,也有可能是由于不同类型的细胞导致,详细机制还有待于深入研究。

综上所述;本实验克隆获得的大黄鱼 *TLR25* 基因,包含典型的 TLRs 家族结构域,为硬骨鱼类特有的 TLR1 家族成员;*LcTLR25* 在大黄鱼肠组织中表达量最高;LPS 可显著诱导 *LcTLR25* 表达上调,但是 Poly I:C 不能诱导其表达上调,提示 *LcTLR25* 可能更多参与 LPS 诱导的免疫反应。

[参 考 文 献]

- [1] 郑天伦,王国良,金珊,等. 养殖大黄鱼溃疡病的病原菌及其防治药物研究[J]. 南方水产,2006(1):5-10.
- [2] 郑尧兰. 大黄鱼网箱养成阶段主要病害诊治[J]. 中国水产,2008(7):69-71.
- [3] MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Nature Reviews Immunology,2001,1(2):135-135.
- [4] JENKINS K A,MANSELL A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling[J]. Cytokine,2010,49(3):237-244.
- [5] REUVEN E M,FINK A,SHAI Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions:lessons from the TLR family[J]. Biochimica et Biophysica Acta,2014,1838(6):1586-1593.
- [6] LIAO Z,SU J. Progresses on three pattern recognition receptor families (TLRs,RLRs and NLRs) in teleost[J]. Developmental and Comparative Immunology,2021,122:104131.
- [7] MI S J,KIM S E,JIN Y H,et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide[J]. Cell,2007,130(6):1071-1082.
- [8] SHI H,KOKOEVA M V,INOUE K,et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance[J]. Journal

- of Clinical Investigation,2006,116(11):3015-3025.
- [9] MIAO E A, ANDERSEN-NISSEN E, WARREN S E, et al. TLR5 and Ipaf; dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2007, 29(3):275-288.
- [10] BLASIUS A L, BELITLER B. Intracellular Toll-like receptors[J]. *Immunity*, 2010, 32(3):305-315.
- [11] BARTON G M, KAGAN J C. A cell biological view of Toll-like receptor function; regulation through compartmentalization[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(8):535-542.
- [12] 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[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1):12.
- [13] LI N, JACQUELINE S, REN L, et al. Molecular evolution of the vertebrate TLR1 gene family-a complex history of gene duplication, gene conversion, positive selection and co-evolution[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11(1):149-149.
- [14] ZHANG J, KONG X, ZHOU C, et al. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish; ligand specificity and signal pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2):380-388.
- [15] WANG Y J, JIN R, et al. Identification and characteristic analysis of TLR28; a novel member of the TLR1 family in teleost[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 62:102-107.
- [16] QI Z, WANG S, ZHU X, et al. Molecular characterization of three Toll-like receptors (TLR21, TLR22, and TLR25) from a primitive ray-finned fish Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82:200-211.
- [17] LI Y, WU J, LI D, et al. Teleost-specific TLR25 identified from *Schizothorax prenanti* may recognize bacterial/viral components and activate NF- κ B and type I IFNs signaling pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82:361-370.
- [18] LEE P T, HO T H, NGUYEN B T, et al. Expression profile, subcellular localization and signaling pathway analysis of fish-specific TLR25 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104:141-154.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [20] BOTOS I, SEGAL D, DAVIES D. The structural biology of Toll-like receptors[J]. *Structure*, 2011, 19(4):447-459.
- [21] KAISER M, AOKI T, TAKANO T, et al. Molecular innate immunity in teleost fish; review and future perspectives[C]//Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress. Yokohama: World Council of Fisheries Societies, 2008, 263-276.
- [22] YANG Z, NIELSEN R, GOLDMAN N, et al. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites[J]. *Genetics*, 2000, 155(1):431-449.
- [23] WERLING D, JANN O C, OFFORF V, et al. Variation matters; TLR structure and species-specific pathogen recognition[J]. *Trends in Immunology*, 2009, 30(3):124-130.
- [24] GONG Y, FENG S, LI S, et al. Genome-wide characterization of Toll-like receptor gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) and their involvement in host immune response to *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology D: Genomics & Proteomics*, 2017, 24:89-98.
- [25] PIETRETTI D, WIEGERTJES G F. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish; indications from infection studies[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 43(2):205-22.
- [26] KANG J Y, LEE J O. Structural biology of the Toll-like receptor family[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80(1):917-941.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)