

欧洲鳗鲡 *MyD88* 基因的克隆及其免疫功能分析

姚志刚, 冯建军*, 王艺磊, 郭松林, 林 鹏, 张子平, 张在鹏

(集美大学水产学院, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心,
农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

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,在先天性免疫中发挥重要作用。实验首次克隆了欧洲鳗鲡 *MyD88* 基因 cDNA 全长序列,命名为 *AaMyD88*,其全长为 1 539 bp,开放阅读框为 846 bp,编码 282 个氨基酸。该蛋白三维丝带空间结构图与人类的 MyD88 十分相似,具有 MyD88 家族典型的死亡结构域和 TIR(toll-like/IL-1 receptor)结构域,其中 TIR 结构域中含有 3 个序列高度保守的 box1、box2 和 box3。同源性分析显示,欧洲鳗鲡 MyD88 氨基酸序列与斑点叉尾鲷相似性最高,为 76.3%,与其他鱼类相似性为 67.5%~73.2%,与哺乳动物相似性较低,为 61.6%~62.6%。欧洲鳗鲡 MyD88 在系统进化树中与其他鱼类 MyD88 聚为一支,哺乳类以及两栖类 MyD88 分别聚为一支。实时荧光定量 PCR 检测发现,*AaMyD88* 基因在欧洲鳗鲡各组织器官中均有表达,其中在肝脏中的表达量最高,心脏、肠、脾脏以及肾脏中也有较高的表达,而肌肉和鳃中的表达水平较低;欧洲鳗鲡经山羊 IgG 肌肉注射后,肾脏 *AaMyD88* 基因在第 7 天表达量有显著性提高,14 d 后恢复至正常水平,而脾脏 *AaMyD88* 基因表达水平从第 7~21 天持续显著上调,于第 7 天达到峰值,其表达量为肾脏的 1.7 倍;欧洲鳗鲡鳍细胞系经 poly I:C 处理后,*AaMyD88* 基因表达水平在 3 h 显著降低,6~48 h 均有显著升高,于 12 h 达到峰值。LPS 处理后的欧洲鳗鲡鳍细胞系 *AaMyD88* 基因表达水平在 3 h 显著降低,6 和 12 h 显著升高,于 12 h 达到峰值,24 h 后恢复至正常水平。poly I:C 处理组 *MyD88* 基因表达水平在 12~48 h 均显著高于 LPS 处理组。研究表明,MyD88 在欧洲鳗鲡抵御外源微生物的免疫应答反应中发挥重要作用。

关键词: 欧洲鳗鲡;髓样分化因子;基因克隆;荧光定量;免疫功能

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

鱼类虽为低等脊椎动物,但与哺乳动物一样,也存在天然和适应性免疫应答两种类型。其中,天然性免疫作为抵御病原生物侵害的第一道防线发挥着重要作用,同时能够促进和引导后续适应性免疫应答^[1]。鱼体通过免疫细胞中的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)对病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)进行识别,以激发天然免疫应答^[2]。Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)是迄

今研究最为透彻的重要模式识别受体,能够选择性识别来自细菌、病毒、真菌以及原生动物不同的 PAMPs^[3],通过接头蛋白分子将胞外刺激信号传递至细胞内,诱导促炎症反应相关因子的产生,上调协同刺激因子的表达,迅速激活天然免疫,为激活机体适应性免疫应答、形成免疫记忆提供必要条件^[4]。

髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是 TLRs 信号转导通路中的一个关键

收稿日期:2014-09-22 修回日期:2014-12-11

资助项目:国家自然科学基金(31272685);福建省海洋与渔业厅项目(201212140006);福建省教育厅项目(JA11150);集美大学创新团队基金(2010A001);集美大学科研基金(C60819)

通信作者:冯建军, E-mail: fengjj@jmu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

转接蛋白,在信号下游传导中起重要作用^[5]。MyD88 蛋白结构主要由 N 端死亡结构域、中间区域以及 C 端的 TIR (toll-like/IL-1 receptor) 结构域 3 部分组成^[6]。TLRs 识别并结合相应的 PAMPs 后,TLRs 分子构象发生改变,通过其细胞质部分的 TIR 结构与 MyD88 C 端的 TIR 结构域相互作用,将 MyD88 募集到受体上,MyD88 则通过其 N 端的死亡结构域与同样含有死亡结构域的 IL-1 受体相关激酶 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK) IRAK4、IRAK1 以及 IRAK2 相互作用并激活 IRAKs。活化后 IRAKs 与 TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) 结合引发信号传导级联反应,导致两条信号通路的关键激酶 IKK (inhibitory NF- κ B kinase) 复合体 (包括 IKK α 、IKK β 、IKK γ) 以及促分裂素原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 家族中的 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 p38 被激活,进而引发相应的细胞核转录因子 NF- κ B 和 AP-1 活化并转移到细胞核内诱导白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和 I 型干扰素 (type I interferons, IFN) 等细胞因子表达,介导炎症反应^[3,6]。

1990 年, Lord 等^[7] 在小鼠细胞中首次克隆获得髓样分化基因家族中的新成员 MyD88 基因。随着 TLRs 及其信号转导通路研究的深入,已有多个物种的 MyD88 基因被克隆分析,包括人^[8]、鸡 (Gallus gallus)^[9]、非洲爪蟾 (Xenopus laevis)^[10]、果蝇 (Drosophila melanogaster)^[11] 以及中国明对虾 (Fenneropenaeus chinensis)^[12] 等。近年来,有关 MyD88 基因的研究在斑马鱼 (Danio rerio)^[13]、牙鲆 (Paralichthys olivaceus)^[14]、虹鳟 (Oncorhynchus mykiss)^[15]、条石鲷 (Oplegnathus fasciatus)^[16] 和斜带石斑鱼 (Epinephelus coioides)^[17] 以及大黄鱼 (Larimichthys crocea)^[18] 等中也有报道。通过 MyD88 蛋白序列比对发现,鱼类与哺乳动物相比均有保守的死亡结构域和 TIR 结构域序列,显示该基因在功能和系统发育方面的保守性。当鱼体受到病原菌^[14,18]、病毒^[19] 以及 LPS、PGN、poly I:C 等不同 PAMPs^[14,16] 刺激后,MyD88 基因的表达水平显著上调,表明 MyD88 在鱼体免疫应答中扮演重要角色。然而经 CpGs 和 poly I:C 免疫刺激后的大西洋鲑

(Salmo salar)^[20] 以及海鱼分枝杆菌 (Mycobacterium marinum) 感染后的斑马鱼^[21] MyD88 基因表达水平均无显著变化,提示鱼体在针对不同外源物刺激时,其 MyD88 基因表达调控机制有所不同,具有种属特异性。

鳗鲡 (Anguilla) 是亚洲各国广泛养殖的重要温水性鱼类,也是我国水产养殖品种单项出口创汇最多的品种之一^[22],但近年来由于大规模、高密度养殖带来了鳗鲡病害的频繁发生与流行,造成巨大的经济损失^[23]。目前,有关鳗鲡 TLRs 信号通路相关因子的研究还较薄弱,鳗鲡 MyD88 基因的研究尚未见报道。本实验首次克隆了欧洲鳗鲡 (Anguilla anguilla) MyD88 基因 (命名为 AaMyD88) 全长 cDNA,利用荧光定量 PCR 技术检测了该基因在欧洲鳗鲡各组织器官表达情况以及山羊 IgG 肌肉注射后欧洲鳗鲡肾脏和脾脏 MyD88 基因水平的表达变化,同时通过病原体相关分子模式 LPS 和 poly I:C 刺激欧洲鳗鲡鳍细胞系,对 AaMyD88 基因参与细胞免疫应答反应进行了研究,以期为深入了解欧洲鳗鲡 MyD88 的基因结构、功能以及在 TLRs 信号转导通路的作用机制奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

欧洲鳗鲡体质量约 200 g,由厦门同安养鳗场提供。取 5 尾欧洲鳗鲡进行解剖,取各组织器官,并立即放入液氮冻存,随后取出置于 -80 °C 超低温冰箱保存;另取 25 尾欧洲鳗鲡驯养一周,温度约 28 °C,溶氧充足,日换水约 1/3。背部肌肉注射与 0.5 mL 完全弗氏佐剂混合均匀的 0.5 mg 山羊 IgG,分别在免疫后 0、7、14、21、28 和 35 d 随机取 5 尾欧洲鳗鲡,收集脾脏和肾脏,迅速用液氮冷冻后移至 -80 °C 保存。欧洲鳗鲡鳍细胞系 (EECFS) 由本课题组构建和保存。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用 Trizol (Invitrogen) 总 RNA 提取方法,参照产品说明书进行。用分光光度计测定总 RNA 在 OD_{260 nm} 的值,以计算浓度,并测定 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 的比值检测 RNA 的纯度。取 1.5 μ L 总 RNA 样品用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 的质量。

取 3 μ g 肾脏 RNA 与 1 μ L oligo (dT) (10

$\mu\text{mol/L}$)、 $1\ \mu\text{L}$ 的 5'/3'CDS Primer($10\ \mu\text{mol/L}$) ($10\ \mu\text{mol/L}$), $1\ \mu\text{L}$ MMLV 逆转录酶 ($200\ \text{U}/\mu\text{L}$, 购自 Promega 公司)。混匀后置 PCR 仪中: $37\ ^\circ\text{C}$ $90\ \text{min}$, $70\ ^\circ\text{C}$ $15\ \text{min}$ (逆转录所用引物: UPM、NUP、5' CDS primer、3' CDS primer 以及 SMART II 见表 1)。

表 1 实验中用到的引物及其序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used in the experiments

引物类别 primer function	引物名称 primer name	引物序列(5' → 3') primer sequence
简并引物 degenerate primers	MyD88-F	GGAGTYCAGGCTGAAGATGC
	MyD88-R	GTCCAGTCTGAGGGGAAGCC
3'-RACE 特异引物 specific primer for 3'-RACE	MyD88-3-inner	CCCTTAATGTCCTGTCCCCCTCGAA
5'-RACE 特异引物 specific primer for 5'-RACE	MyD88-5-inner	GTAGTAATCTCCTGCATCTTCAGCC
RACE 通用引物 universal primers for RACE	UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
	UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
	5'CDS primer *	(T)25VN
	3'CDS primer *	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN
	SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
头至趾引物 head to toe PCR primers	MyD88-ORF5	ATGATGATGTCAAACATTTTACTGCTGGTG
	MyD88-ORF3	CTACTCGGTGCAGTCGGCTTCCG
荧光定量引物 qRT-PCR primers	5'real-MyD88	GGAGCAGCACTTTGACCCTC
	3'real-MyD88	TCGGTGCAGTCGGCTTTC
	5'- β -actin	AATCCACGAGACCACCTTCAA
	3'- β -actin	GTTGGCGTACAGGTCCTTACG

* N = A, C, G, 或 T; V = A, G, 或 C

AaMyD88 基因片段的获得和全长 cDNA 的克隆 使用简并引物 MyD88-F 和 MyD88-R (表 1), 以上述 cDNA 为模板, 扩增 *AaMyD88* 基因片段。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T (TaKaRa) 载体连接, 转化到 JM109 感受态细胞, 于含有 Amp 的 LB 平板上培养 $14\ \text{h}$, 挑取单克隆菌落, 接种于含 Amp 的 LB 培养基中, $37\ ^\circ\text{C}$ 过夜培养, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序。该序列经 BLAST 比对后, 确定是 *AaMyD88* 基因。利用 Primer 5.0 所设计的 RACE 引物(表 1) 扩增其基因的全长 cDNA 序列, 并用 head to toe PCR 验证其开放阅读框(open reading frame, ORF) 的正确性(表 1)。

AaMyD88 基因的生物信息学分析 利用 NCBI 数据库中 VecScreen、Blast、ORF Finder 等软件分析测序结果, 比对是否为目的基因并将其

拼接成目的基因的全长 cDNA 序列。使用 ExPASy (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测基因的等电点及分子量, SingalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SingalP>) 寻找基因可能存在的信号肽序列, 使用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点, 使用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点, 采用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构域, 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三级结构的预测, 利用 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>) 软件进行序列的多重比对, 利用 MEGA 4.0 软件中邻位相接法构建系统进化树。

AaMyD88 基因在不同组织的表达分析

以 oligo(dT) 为引物,按 Promega 逆转录酶说明书逆转录合成的 cDNA。选择 β -actin 做为内参基因(引物 5'- β -actin 和 3'- β -actin 见表 1),荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 的反应体系为 20 μ L:10 μ L SYBR Green Realtime PCR Master Mix(购自 TOYOBO 公司),10 μ mol/L 的 5'-real-MyD88 和 3'-real-MyD88 引物(表 1)各 0.5 μ L,9 μ L cDNA 第一条链,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环(95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min)。检测基因的溶解曲线和扩增曲线,对产物割胶测序,以验证是否为基因特异产物。每个组织的欧洲鳗鲡分析 5 个样品,并根据仪器分析得出各个样品的 RQ 值即 $2^{-\Delta\Delta C_T}$,基因表达水平由 RQ 平均值 $\pm$ 标准误差的平均值(mean $\pm$ SE)来表示,SPSS 软件对数据进行样本 *t*-检验分析,显著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

山羊 IgG 注射欧洲鳗鲡后 AaMyD88 基因表达分析 为检测经山羊 IgG 免疫注射后的欧洲鳗鲡脾脏和肾脏 AaMyD88 基因表达变化,采用 Trizol 试剂抽提免疫后 0、7、14、21、28 和 35 d 欧洲鳗鲡脾脏和肾脏总 RNA,按 Promega 逆转录酶说明书逆转录合成的 cDNA,进行 qRT-PCR 检测分析,方法同上。

LPS、poly I:C 处理欧洲鳗鲡鳍细胞系后 AaMyD88 基因表达分析 欧洲鳗鲡鳍细胞系用 DMEM 培养基培养,培养基中含 16.7% 胎牛血清 FBS、5% β -巯基乙醇、50 μ g/mL N-乙酰葡萄糖胺、50 μ g/mL 羧甲基纤维素钠、10 μ g/L Murine FGF-basic、5 μ g/L Human EGF、1 μ g/L Human HGF、100 IU/mL 青霉素以及 100 μ g/mL 赤霉素,置于 27 $^{\circ}$ C 恒温培养,细胞长满整瓶后用 0.25% 胰酶消化转入六孔板中,待细胞长满孔板更换新鲜培养基,同时分别加入终浓度为 50 μ g/mL poly I:C 以及 30 μ g/mL LPS 溶液处理细胞,分别在 0、3、6、12、24 和 48 h 取样,每个时相设 4 个重复。细胞样品经 PBS 溶液冲洗 2 次后采用 Trizol (Invitrogen) 总 RNA 方法提取。以 oligo(dT) 为引物,按 Promega 逆转录酶说明书逆转录合成 cDNA,选择 β -actin 做为内参基因(引物 5'- β -actin 和 3'- β -actin 见表 1),选择引物 5'-real-MyD88 和 3'-real-MyD88 (表 1) 特异性扩增 AaMyD88 基因片段,qRT-PCR 的方法与数据分析同上。

2 结果

2.1 AaMyD88 基因全长克隆及序列分析

AaMyD88 的 cDNA 全长 1 539 bp (GenBank 登录号:KJ726741),包括 409 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR)、284 bp 的 3'UTR 和 846 bp 的 ORF, Poly A 上游 6 bp 处为 Poly A 终止信号 AATAAA。该基因编码 282 个氨基酸,预测蛋白质分子量为 32.43 ku,等电点为 5.47,含有 2 个糖基化位点(图 1)。SMART 预测欧洲鳗鲡 MyD88 的结构域,结果显示第 22~98 位置的氨基酸为死亡结构域,第 146~282 位置的氨基酸为 TIR 结构域(图 1),死亡结构域和 TIR 结构域是 MyD88 蛋白家族所共有的特征结构域。在 TIR 结构域中包含 3 个高度保守的区域:Box1 (FDAFICYCQ)、Box2 (LCVFDRDVLPGTC) 和 Box3 (FWGRL)(图 1)。

2.2 欧洲鳗鲡 MyD88 空间结构模拟

采用 SWISS-MODEL 软件的同源建模方法,将欧洲鳗鲡 MyD88 蛋白序列与软件搜索得到的模板(PDB code:2js7A)(solution NMR structure of human myeloid differentiation primary response)人工进行联配,以 AaMyD88 基因推导的氨基酸构建其三维结构,欧洲鳗鲡 MyD88 由 12 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠片组成,其蛋白序列三维丝带结构图与人类的 MyD88 三维丝带结构图十分相似(图 2)。

2.3 欧洲鳗鲡 MyD88 与其他物种 MyD88 的多重比对及系统进化树分析

将推导的欧洲鳗鲡 MyD88 氨基酸序列与其他物种的 MyD88 蛋白进行多序列比对以及蛋白功能域分析,发现欧洲鳗鲡 MyD88 和其他鱼类、哺乳类和两栖类一样,都具有典型的死亡结构域和 TIR 结构域,其中 TIR 结构域中的 box1、box2、box3 序列高度保守(图 3)。欧洲鳗鲡与斑点叉尾鲡 MyD88 蛋白氨基酸序列相似性最高,达 76.3%,与虹鳟等其他鱼类也有较高的相似度,为 67.5%~73.2%,与非洲爪蟾氨基酸相似性为 63%,而与哺乳动物鼠、牛以及人类相似性较低,分别为 62.6%、62.3% 以及 61.6%(表 2)。NJ 系统发育树表明,欧洲鳗鲡 MyD88 与其他鱼类 MyD88 聚为一支,哺乳类 MyD88 聚为一支,两栖类单独成为一支,系鱼类和哺乳类 MyD88 之间的过渡(图 4)。

```
1 GGGACTAAGGAAATCACTTCAACCGGACAGACGCATAGGCTACGTGATTTCCATAAAACAGAATAGCACGCATGAGATCCGTACTACCACGCTCTAATTC 100
101 CGAATTTTCATTGAATGTTTTATTATTCGGTTAGGGCTCGATCTGCAAGAATGAAACCGCCAGTTAAAAATTTGGTCTGAATCTTTTAGACGGAGA 200
201 ACTGGTAACCAAACTTCGATAATACTCTTCAAATTAGTTTTTCCTGAGTTTTACAACAACTGAAGCAGGAATTGCATTATTACCTAGTAAATGACCGT 300
301 CAATCAAACCTAAAAATAACTTTAGGGACTATATTTATATTGTGAATTTAAAAACCCCTTTTAAATTTCCGCGCAGAATTTGTACCTCTGTCTACG 400
401 CATGAGAATatggtgacagttcaagcatagattatcagtatcccggtgatagctttaaatcagtttgaggaaagagcttgacttcacttaaadc 500
1 M A D S S S I D Y S S I P L I A L N F S L R K E L G L H L N P 31
501 cgaggaataactgttgctgcagactggactacactggctgaaatgatgggtttcagttatatgtgaaataaaaactacgaaaaatacgaacccaactgc 600
32 R N T V A A D W T T L A E M M G F S Y I E I K N Y E K Y D N P T A 64
601 aaagattttagaagactggcagtcacgatgtcccaagccacagtgggaagttggtgcccatgcttgaagaagcggagagaaaggatattgtgaccgag 700
65 K I L E D W Q S R C P K A T V G K L V P M L E E A E R K D I V T E 97
701 ctgacctccttgattgaaagaactgcattgcataatttgaagcgaagaggagtcaccagttcaggtacctgaagtagacagctggacacctgataaga 800
98 L A S L I E K N C I A Y L K R K E E S P V Q V P E V D S W T P D K N 131
801 atggcataacaacgaaagacgatccgatgggcaacatgccgaaatgtttgatgccttcactctgctactgccagagtgcattgagtttgtccatgagat 900
132 G I T T K D D P M G N M P E M F D A F I C Y C Q S D I E F V H E M 164
901 gatccgacagctggagcagacggctctacaggttaaactgtgtgtgttcacagggatgttctccgggcacttgtgtttggactgtcaccagtgaaactc 1000
165 I R Q L E Q T V Y R L K L C V F D R D V L P G T C V W T V T S E L 197
1001 atcgaatgaggtgtaagagaatggttgacagtgatttcgatgaataaccttgacagtgaaagcagcagcttcaaaccaagtttgctctcagcctctgtc 1100
198 I E M R C K R M V A V I S D E Y L D S E A C D F Q T K F A L S L C P 231
1101 caggagcgaagaaagacgtctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc 1200
232 G A Q K K R L I P V L Y K P M K K P F P S I L R F L T V C D Y T R 264
1201 gccctgcaccagctcttggttctggggcagactggctagagctctgtctctcccgTGATGGCCTACTCTCAAATCACCACGTTGTGTGTGCTTTTCGGAA 1300
265 P C T Q S W F W G R L A R A L S L P * 282
1301 GTAGCGTTGCTTGTATTTGGGTGTGTGGTAGTTGGAGGGAAGTTCAAGGCCGACAGCCTGTGCGCATTCTTATTTTCCAGCTCTTCTGCGACATAGAC 1400
1401 CCACGCTGAAGACTTCATGCAAAATTCATGTTTGCTCAGTGATTTTTTTTTTTGTGAATAAGAGGCCTCATGAACATTGAGTTTTGAAATATAAATAA 1500
1501 AAGACTGAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1539
```

图 1 欧洲鳗鲡 *AaMyD88* 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

大写字母分别代表 5'和 3'非编码区序列,小写字母代表编码区序列;上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)、终止信号(AATAAA)用加粗标示;死亡结构域和 TIR 结构域用灰色底纹标示;TIR 结构域中保守区域(box 1-3)用斜黑体标出,糖基化位点用双下划线标示;磷酸化位点用单下划线标示

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *AaMyD88* gene from *A. anguilla*

Capital letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region separately. Lowercase letters represent the coding sequence, with nucleotide sequence above and coded amino sequence below. The initiation codon(ATG), the stop codon(TGA) and the polyadenylation are characterized in bold. The death domain and TIR domain are shaded. Underlay. The conserved sequences(box 1-3) in the TIR domain are denoted by bold italicized letters. The putative N-glycosylation sites are underlined and the putative phosphorylation sites are double underlined

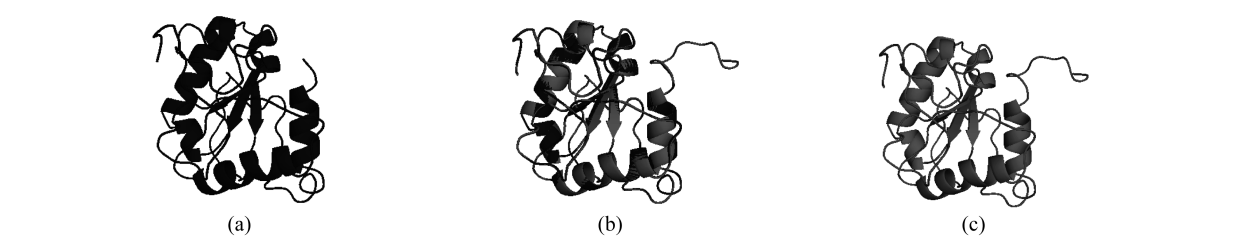


图 2 欧洲鳗鲡 *MyD88* 与人类 *MyD88* 空间结构的比较

(a) 欧洲鳗鲡 *MyD88* 空间结构模拟; (b) 欧洲鳗鲡与人类 *MyD88* 叠合空间结构模拟; (c) 人 *MyD88* 空间结构模拟

Fig. 2 *MyD88* three-dimensional structure comparison between *A. anguilla* and human

(a) The predicted three-dimensional structure of *AaMyD88*. (b) The predicted three-dimensional structure of *AaMyD88* overlapped with human *MyD88*. (c) The three-dimensional structure of a human *MyD88*

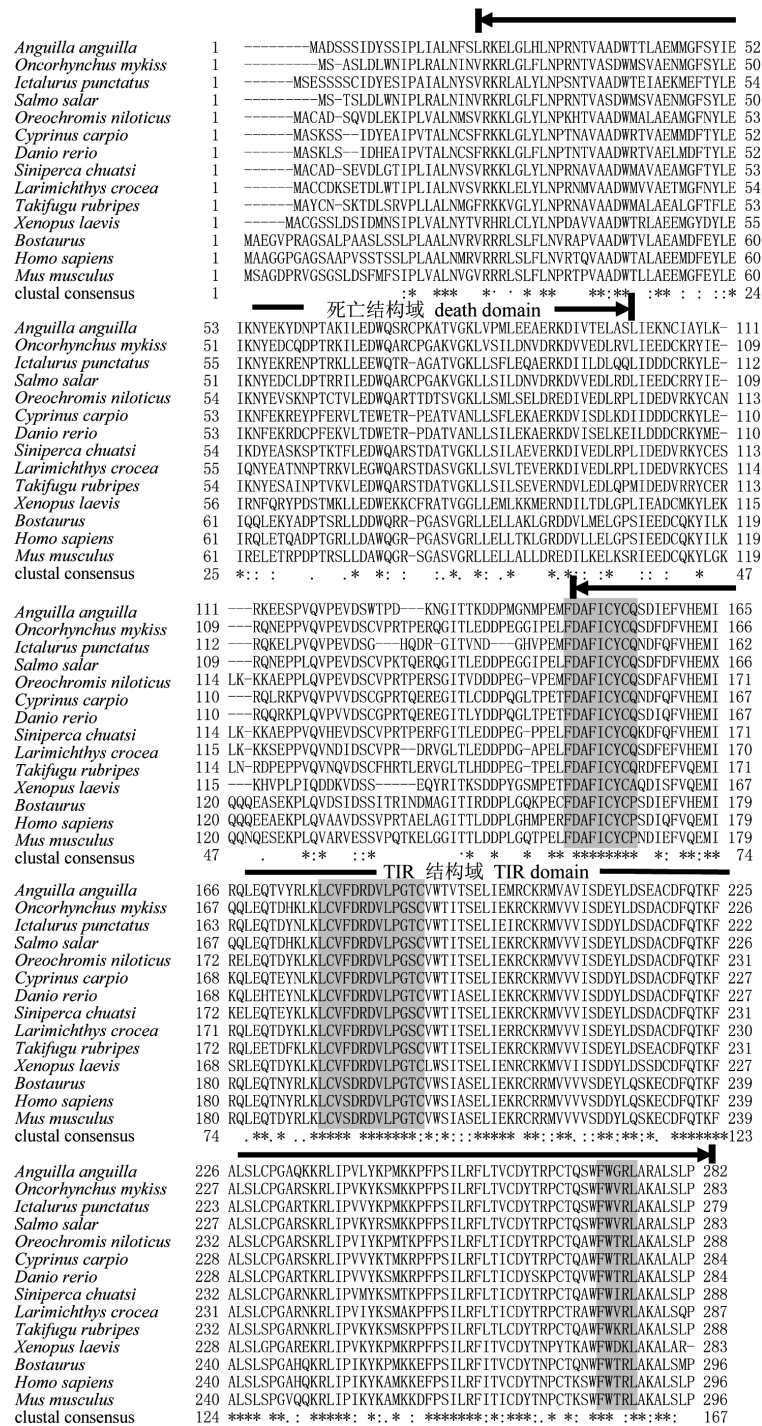


图3 欧洲鳗鲡 MyD88 和其他物种 MyD88 氨基酸序列的多重比较

用于比较的氨基酸序列分别为欧洲鳗鲡 KJ726741, 虹鳟 CDG03206.1, 斑点叉尾鲷 NP 001187207.1, 大西洋鲑 NP 001130017.1, 尼罗罗非鱼 AHN82524.1, 鲤 ADC45019.2, 斑马鱼 Q5XJ85.2, 鳊 ADM25313.1, 大黄鱼 ACL14361.1, 红鳍东方鲀 NP 001106666.1, 非洲爪蟾 NP 001081001, 牛 NP 001014404.1, 人 Q99836.1, 小鼠 AAH05591.1。空位经手工优化以“-”表示; 相同氨基酸残基以“*”表示; 不同的氨基酸序号用数字表示; 箭头标出死亡结构域和 TIR 结构域; box 1-3 以灰色阴影标出

Fig. 3 Multiple alignment of the MyD88 amino acid sequence between *A. anguilla* and other species

Multiple alignment of the amino acid sequences of MyD88 from *A. anguilla* (GenBank accession n. KJ726741), *Oncorhynchus mykiss* (GenBank accession n. CDG03206.1), *Ictalurus punctatus* (GenBank accession n. NP 001187207.1), *S. salar* (GenBank accession n. NP 001130017.1), *Oreochromis niloticus* (GenBank accession n. AHN82524.1), *Cyprinus carpio* (GenBank accession n. ADC45019.2), *Takifugu rubripes* (GenBank accession n. Q5XJ85.2), *Siniperca chuatsi* (GenBank accession n. ADM25313.1), *Larimichthys crocea* (GenBank accession n. ACL14361.1), *Takifugu rubripes* (GenBank accession n. NP 001106666.1), *Xenopus laevis* (GenBank accession n. NP 001081001), *Bos taurus* (GenBank accession n. NP 001014404.1), *Homo sapiens* (GenBank accession n. Q99836.1), *Mus musculus* (GenBank accession n. AAH05591.1). Gap positions were manually optimized and are indicated by hyphens. Amino acid residues found identical in all of the compared sequences are indicated by *. Different amino acid residues positions are indicated by numbers. Death domain and TIR domain are indicated by arrows. The three conserved regions (box 1-3) are in dark gray underline

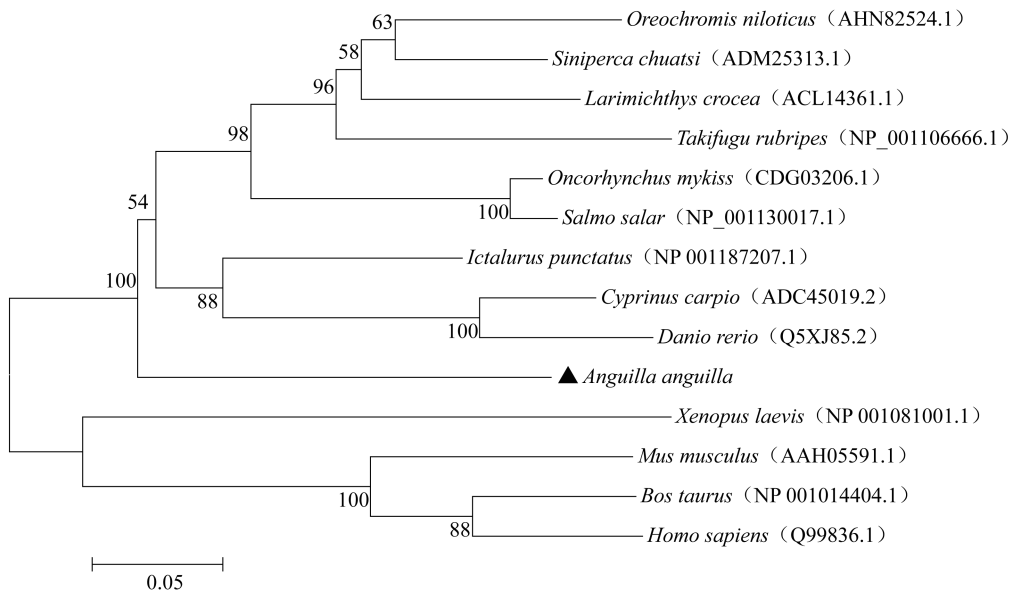


图 4 欧洲鳗鲡 *MyD88* 和其他物种 *MyD88* 恒定区氨基酸序列系统发育树(*AaMyD88* 用▲标出)

Fig. 4 Phylogenetic tree of the *MyD88* constant region amino acid sequences between *A. anguilla* and other species(The solid triangle marks the *A. anguilla* *MyD88*)

Oreochromis niloticus:尼罗罗非鱼; *Siniperca chuatsi*:鳊; *Larimichthys crocea*:大黄鱼; *Takifugu rubripes*:红鳍东方鲀; *Oncorhynchus mykiss*:虹鳟; *Salmo salar*:大西洋鲑; *Ictalurus punctatus*:斑点叉尾鲷; *Cyprinus carpio*:鲤; *Danio rerio*:斑马鱼; *Anguilla anguilla*:欧洲鳗鲡; *Xenopus laevis*:非洲爪蟾; *Mus musculus*:小鼠; *Bos taurus*:牛; *Homo sapiens*:人

表 2 欧洲鳗鲡和其他 13 个物种的 *MyD88* 蛋白相似度

Tab.2 Pairwise similarities of selected *MyD88* proteins

物种名 species	GenBank 登录号 accession no.	氨基酸 一致性/% amino acid identity
1. 欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	KJ726741	100
2. 斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	NP 001187207.1	76.3
3. 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	CDG03206.1	73.2
4. 大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NP 001130017.1	71.8
5. 尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	AHN82524.1	71.8
6. 鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	ADM25313.1	71.1
7. 大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ACL14361.1	69.8
8. 鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	ADC45019.2	69.4
9. 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	Q5XJ85.2	68.7
10. 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	NP 001106666.1	67.5
11. 非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NP_001081001	63.0
12. 小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAH05591.1	62.6
13. 牛 <i>Bos taurus</i>	NP 001014404.1	62.3
14. 人 <i>Homo sapiens</i>	Q99836.1	61.6

2.4 *AaMyD88* 基因在欧洲鳗鲡不同组织的表达

AaMyD88 在欧洲鳗鲡各组织器官中均有表达, 其中在肝脏中的表达量最高, 显著高于其他组织 ($P < 0.01$); 心脏、肠、脾脏以及肾脏中也有较高的表达水平; 而肌肉和鳃中的表达水平较低(图 5)。

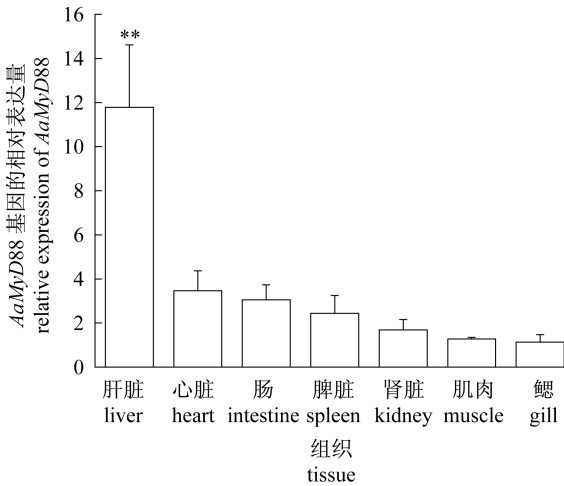


图 5 *AaMyD88* 基因在欧洲鳗鲡各组织器官中的表达

** 表示与其他组织中的表达水平存在极显著性差异 ($P < 0.01$)

Fig. 5 Distribution pattern of *AaMyD88* in the different tissues of *A. anguilla*

The extremely significant differences of the tissue compared with other tissues are indicated by “ ** ” ($P < 0.01$)

2.5 山羊 IgG 注射对欧洲鳗鲡脾脏和肾脏 *AaMyD88* 基因表达的影响

欧洲鳗鲡经山羊 IgG 肌肉注射后, 脾脏

<http://www.scxuebao.cn>

AaMyD88 基因表达水平从第 7~21 天持续显著上调 ($P < 0.05$), 第 28 天后恢复至正常水平 (图 6), 而肾脏 *AaMyD88* 基因仅在第 7 天表达量有显著性提高 ($P < 0.05$), 第 14 天后则恢复至正常水平 (图 7)。脾脏和肾脏 *AaMyD88* 基因表达水平均在第 7 天达到峰值, 其中脾脏 *AaMyD88* 基因表达量为肾脏的 1.7 倍 (图 6, 图 7)。

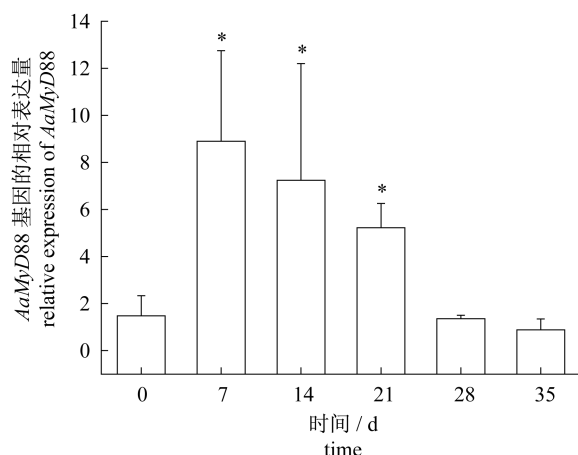


图 6 注射山羊 IgG 对欧洲鳗鲡脾脏 *AaMyD88* 基因表达的影响

“*”表示与 0 d 相比较 *AaMyD88* 基因表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 6 The effect of goat IgG on *AaMyD88* gene expression in the spleen of *A. anguilla*

“*” indicated the significant difference of *AaMyD88* gene expression compared with 0 day ($P < 0.05$)

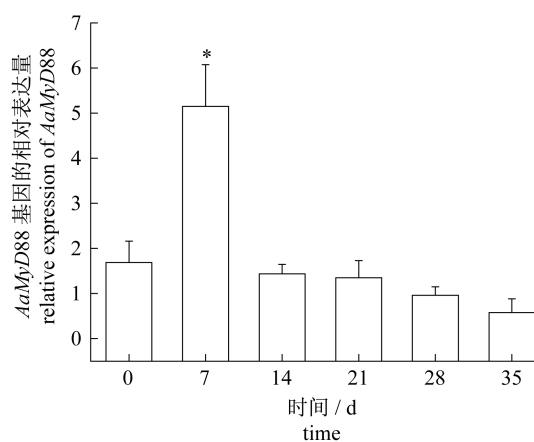


图 7 山羊 IgG 注射对欧洲鳗鲡肾脏 *AaMyD88* 基因表达的影响

“*”表示与 0 d 相比较 *AaMyD88* 基因表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 7 The effect of goat IgG on *AaMyD88* gene expression in the kidney of *A. anguilla*

“*” indicated the significant difference of *AaMyD88* gene expression compared with 0 day ($P < 0.05$)

2.6 poly I:C、LPS 处理对欧洲鳗鲡细胞系 *AaMyD88* 基因表达的影响

poly I:C 处理后, 欧洲鳗鲡细胞系 *AaMyD88* 基因表达水平在 3 h 显著降低 ($P < 0.05$), 从 6 h 开始至 48 h 均有显著升高 ($P < 0.05$), 在 12 h 达到峰值。LPS 处理后, 欧洲鳗鲡细胞系 *AaMyD88* 基因表达水平在 3 h 显著降低 ($P < 0.05$), 6 和 12 h 显著升高 ($P < 0.05$), 并在 12 h 达到峰值, 24 和 48 h 恢复至正常水平。poly I:C 处理组的 *AaMyD88* 基因表达水平在 12~48 h 均显著高于 LPS 处理组 ($P < 0.05$) (图 8)。

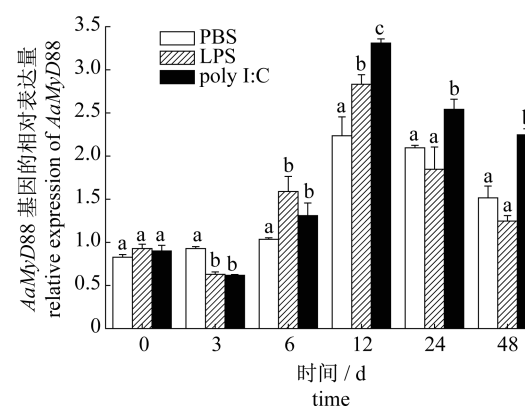


图 8 poly I:C、LPS 对欧洲鳗鲡细胞系 *AaMyD88* 基因表达的影响

含有相同字母表示各时相的处理组之间 *AaMyD88* 基因表达水平不存在显著性差异 ($P > 0.05$)

Fig. 8 The effect of poly I:C and LPS on *AaMyD88* gene expression of *A. anguilla* fin cell line

Stages with the same letter indicate no significant difference of *AaMyD88* gene expression level between the different treatment groups

3 讨论

本实验获得了欧洲鳗鲡 *AaMyD88* cDNA 全长, GenBank 登录号为 KJ726741, 其编码的氨基酸序列与斑点叉尾鲷、虹鳟、大西洋鲑、尼罗罗非鱼等 *MyD88* 氨基酸序列相似性较高 (76.3% ~ 71.8%), 具有 *MyD88* 蛋白家族典型的死亡结构域和 TIR 结构域。TIR 结构域内存在 3 个高度保守区域 Box1、Box2 和 Box3, 分别含有 9、13 以及 5 个氨基酸残基。其中 Box1 序列与其他 9 种鱼类完全一致, 与人类相比仅有 1 个氨基酸不同, 而

Box2 和 Box3 与其他鱼类和人类相比也仅有 1 个氨基酸的差别。欧洲鳗鲡 *MyD88* 空间结构模拟图也显示其蛋白三维丝带结构图与人类的 *MyD88* 三维丝带结构图十分相似。已有的研究表明,Box1 和 Box2 能够结合信号传导中的相关蛋白,在信号传导中发挥关键作用^[24],Box3 可以通过和细胞骨架分子相互作用引导定位受体^[25],参与信号传导。以上分析表明,欧洲鳗鲡 *MyD88* 具备了 *MyD88* 蛋白家族的基本特征,反映 *MyD88* 在进化过程中相对保守,预示着其免疫调节方面的功能与哺乳动物具有相似性。NJ 系统发育树显示欧洲鳗鲡 *MyD88* 与其他鱼类 *MyD88* 聚为一支,提示鱼类 *MyD88* 起源于共同的祖先基因。另外,哺乳类 *MyD88* 聚为一支,而两栖类单独构成一支,为鱼类和哺乳类 *MyD88* 的过渡。

AaMyD88 基因在欧洲鳗鲡各组织均有表达,这种组成型基因表达模式也存在于斜带石斑鱼^[26]、大黄鱼^[18]、大西洋鲑^[19]、牙鲆^[14]以及条石鲷^[16]等鱼类中。当受到外源微生物侵染时,鱼体中不同的组织都可以通过 *MyD88* 依赖信号传导途径进行先天性免疫应答,发挥其在机体免疫监视和免疫防御的重要作用。欧洲鳗鲡 *AaMyD88* 基因在肝脏中的表达量最高,与斜带石斑鱼 *MyD88*^[17]的研究结果一致。但在大黄鱼^[18]中,其脾脏 *MyD88* 基因有高丰度的表达,而条石鲷^[16]和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[27] *MyD88* 基因表达量则是在血液中最高。以上结果提示,*MyD88* 基因与这些组织器官中的免疫应答过程密切相关,同时也表明 *MyD88* 基因的表达在不同物种的差异性。

山羊 IgG 免疫注射欧洲鳗鲡后,其脾脏和肾脏 *AaMyD88* 基因表达量均有显著上调,第 7 天达到峰值,且脾脏的表达水平明显高于肾脏,该结果与 Skjaeveland 等^[19]用 SAV3 (Salmon alphavirus sub-type3)刺激大西洋鲑后 *MyD88* 基因表达变化相一致。其他相关研究结果也表明,鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*)感染半滑舌鳎 4 d 后其脾脏 *MyD88* 基因表达量成倍增加^[27],而副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)免疫大黄鱼第 1 天表达量就有明显提高,第 2 天达到峰值^[18]。Takano 等^[14]检测到爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)感染牙鲆 3 d 后的,其脾脏和肾脏中 *MyD88* 阳性细胞明显增多。由此可见,脾脏是 *MyD88* 基因重要

的靶器官,在天然免疫应答反应中起关键作用。这很可能与脾脏含有大量淋巴细胞、巨嗜细胞以及树突状细胞等有关,但由于刺激物、种属等因素的差异,引起 *MyD88* 基因水平的变化时间有所不同。

同其他脊椎动物一样,鱼类主要通过细胞表面的模式识别受体 PRR 特异地识别病原相关分子模式 PAMPs,如 LPS、poly I:C、脂蛋白 (lipoprotein)以及病原微生物遗传物质核酸等,激活先天性免疫应答,引起细胞因子的释放,上调并刺激分子表达,促进炎症反应发生,其中 LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁的重要组分,poly I:C 则是 RNA 病毒的类似物^[28]。

欧洲鳗鲡鳍细胞系经 LPS 刺激后 6 ~ 12 h, *AaMyD88* 基因表达量明显上调,牙鲆^[14]和半滑舌鳎^[27]外周血淋巴细胞经 LPS 处理后分别在 6 和 24 h *MyD88* 基因表达水平显著升高,表明 LPS 能够激发欧洲鳗鲡 *MyD88* 信号通路进行天然免疫应答反应。Whang 等^[16]也发现,用 LPS 和爱德华氏菌免疫条石鲷后其 *MyD88* 基因表达水平在血液、脾脏以及头肾中均有显著提高。人和小鼠的研究表明,LPS 主要通过 TLR4 对其进行识别,进而招募 *MyD88* 分子激活机体的炎症反应^[29]。鱼类 TLR4 目前仅在斑马鱼中有所报道^[13,21],进一步的研究发现,斑马鱼 TLR4 融合蛋白并不能对 LPS 进行识别,提示斑马鱼 TLR4 可能识别其他未知的 PAMPs^[30]。虽然 Takano 等^[14]认为,LPS 处理后牙鲆外周血淋巴细胞 *MyD88* 基因表达量升高与 TLR4 的识别激活有关,并且朱炳林等^[31]检测到 LPS 可以激活中华鳖 (*Trionyx sinensis*)心脏成纤维样细胞中 TLR4 的 *MyD88* 依赖信号转导途径,但是在红鳍东方鲀中的研究表明,TLR23 可能参与对 LPS 的识别^[32],Iliev 等^[33]则认为鱼类淋巴细胞对 LPS 的识别主要通过 Beta-2 integrins,而不是 TLR4。可见,LPS 能够明显上调欧洲鳗鲡 *MyD88* 的基因表达,但有关 LPS 的识别受体及其信号传导调控 *MyD88* 基因表达的机制还不清楚,尚待对欧洲鳗鲡 TLRs 系列分子进行深入研究。

poly I:C 处理欧洲鳗鲡鳍细胞系 6 h 后,其 *MyD88* 基因持续上调,这与草鱼体肾细胞 *MyD88* 基因水平变化相吻合^[34]。Takano 等^[14]也观察到牙鲆外周血淋巴细胞 *MyD88* 基因表达量经 poly

I:C 刺激后显著提高,与本研究结果一致,表明 poly I:C 能够激发欧洲鳗鲡细胞系依赖 MyD88 信号通路的抗病毒免疫反应。目前,鱼类主要通过 TLR3 和 TLR22 对 poly I:C 以及双链 RNA 病毒进行识别,虽然 MyD88 是多种 TLRs 的接头蛋白,在 TLRs 信号转导通路中起着重要作用,但研究证明 MyD88 不是 TLR3 和 TLR22 的接头蛋白^[2]。欧洲鳗鲡机体显然存在其他受体对 poly I:C 和双链 RNA 病毒进行识别,再通过依赖 MyD88 分子的未知信号通路进行天然免疫防御。最近,Ruscanu 等^[35]检测到人类树突细胞经 RNA 病毒感染后,MyD88 基因水平显著提高,认为树突细胞中存在依赖 MyD88 但不同于 TLR3 的其他 RNA 病毒识别受体。以上研究结果提示,在高等和低等的脊椎动物中其针对不同病原相关分子模式的信号通路具有复杂性。

此外,LPS 和 poly I:C 处理后 3 h 的欧洲鳗鲡细胞 MyD88 基因表达水平均有显著下调,扇贝 (*Chlamys farreri*) 血细胞经 LPS 刺激后 MyD88 基因表达量也明显降低^[36],在副溶血弧菌感染的大黄鱼肝脏中也有类似的结果^[18]。虽然 poly I:C 直接引起 MyD88 基因水平下调的研究报道很少,但有研究表明,作为 MyD88 信号通路的下游效应分子肿瘤坏死因子 TNF- α ,在野田村病毒 (*Nodavirus*) 感染后的舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 头肾中基因表达水平显著降低^[37],而最近的研究发现日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 免疫注射 poly I:C 后,其血细胞 TNF- α 基因表达量显著下调^[38],推测欧洲鳗鲡机体存在针对 LPS 和 poly I:C 两种刺激物的 MyD88 信号通路负调控机制,有待进一步研究证实。

本实验从欧洲鳗鲡克隆得到 AaMyD88 的 cDNA 全长,实时荧光定量 PCR 结果显示,经山羊 IgG 免疫注射的欧洲鳗鲡脾脏和肾脏以及 poly I:C 和 LPS 刺激的欧洲鳗鲡细胞系 AaMyD88 基因水平均有明显的提高,表明该基因在欧洲鳗鲡抵御外界病原微生物方面发挥重要作用,为欧洲鳗鲡免疫防御分子机制的研究提供了参考资料。

参考文献:

- [1] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(2): 137 - 151.
- [2] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35 (12): 1263 - 1272.
- [3] Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors [J]. Trends in Molecular Medicine, 2007, 13(11): 460 - 469.
- [4] Schnare M, Barton G M, Holt A C, et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses [J]. Nature Immunology, 2001, 2(10): 947 - 950.
- [5] Casanova J L, Abel L, Quintana M L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: Natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics [J]. Annual Review of Immunology, 2011, 29: 447 - 491.
- [6] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors [J]. Nature Immunology, 2010, 11 (5): 373 - 384.
- [7] Lord K, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6 [J]. Oncogene, 1990, 5(7): 1095 - 1097.
- [8] Bonnert T P, Garka K E, Parnet P, et al. The cloning and characterization of human MyD88: A member of an IL-1 receptor related family [J]. FEBS Letters, 1997, 402(1): 81 - 84.
- [9] Wheaton S, Lambourne M D, Sarson A J, et al. Molecular cloning and expression analysis of chicken MyD88 and TRIF genes: Full length research article [J]. Mitochondrial DNA, 2007, 18(6): 480 - 486.
- [10] Prothmann C, Armstrong N J, Rupp R A. The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for (*Xenopus axis*) formation [J]. Mechanisms of Development, 2000, 97(1): 85 - 92.
- [11] Tauszig-Delamasure S, Bilak H, Capovilla M, et al. Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections [J]. Nature Immunology, 2002, 3(1): 91 - 97.
- [12] Wen R, Li F, Sun Z, et al. Shrimp MyD88 responsive to bacteria and white spot syndrome virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 574 - 581.
- [13] Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio* [J]. Molecular Immunology, 2004, 40(11): 759 - 771.

- [14] Takano T, Kondo H, Hirono I, *et al.* Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30 (9): 807 – 816.
- [15] Rebl A, Goldammer T, Fischer U, *et al.* Characterization of two key molecules of teleost innate immunity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): MyD88 and SAA [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 131: 122 – 126.
- [16] Whang I, Lee Y, Kim H, *et al.* Characterization and expression analysis of the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in rock bream *Oplegnathus fasciatus* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38 (6): 3911 – 3920.
- [17] Wei Y C, Gao Q, Chang M X, *et al.* Cloning and expression of MyD88 gene in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2011(3): 288 – 295. [韦友传, 高谦, 昌明先, 等. 斜带石斑鱼 MyD88 基因的克隆与表达. 基因组学与应用生物学, 2011(3): 288 – 295.]
- [18] Yao C L, Kong P, Wang Z Y, *et al.* Molecular cloning and expression of MyD88 in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 249 – 255.
- [19] Skjæveland I, Iliev D B, Strandskog G, *et al.* Identification and characterization of TLR8 and MyD88 homologs in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(9): 1011 – 1017.
- [20] Strandskog G, Skjæveland I, Ellingsen T, *et al.* Double-stranded RNA-and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: Comparison and synergies [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (36): 4704 – 4715.
- [21] Meijer A H, Gabby Krens S, Medina Rodriguez I A, *et al.* Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(11): 773 – 783.
- [22] Lee W C, Chen Y H, Lee Y C, *et al.* The competitiveness of the eel aquaculture in Taiwan, Japan, and China [J]. *Aquaculture*, 2003, 221 (1): 115 – 124.
- [23] Guo S L. The research situation of eels bacterial disease [J]. *Scientific Fish Farming*, 2011(7): 48 – 49. [郭松林. 鳗鲡细菌性疾病的研究概况. 科学养鱼, 2011(7): 48 – 49.]
- [24] Watters T M, Kenny E F, O' Neill L A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2007, 85(6): 411 – 419.
- [25] Slack J L, Schooley K, Bonnert T P, *et al.* Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(7): 4670 – 4678.
- [26] Li Y W, Luo X C, Dan X M, *et al.* Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR2, MyD88 and IL-1 β involved in anti-Cryptocaryon irritans response [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30 (6): 1230 – 1240.
- [27] Sha Z X, Wang N, Wang Q L, *et al.* Cloning, characterization and expression of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) gene in half smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 659 – 670. [沙珍霞, 王娜, 王启龙, 等. 半滑舌鳎髓样分化因子的克隆和表达分析. 中国水产科学, 2010, 17(4): 659 – 670.]
- [28] Ao J Q, Chen X H. Research progress on pattern-recognition receptors in fish [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012(9): 1049 – 1054. [敖敬群, 陈新华. 鱼类模式识别受体的研究进展. 生命科学, 2012(9): 1049 – 1054.]
- [29] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4 (7): 499 – 511.
- [30] Sepulcre M P, Alcaraz-Perez F, Lopez-Munoz A, *et al.* Evolution of Lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: Fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappa B activation [J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182 (4): 1836 – 1845.
- [31] Zhu B L, Li J, Fang W H, *et al.* Cloning of MyD88 partial cDNA sequence of Chinese soft shelled turtle (*Trionyx sinensis*) and its expression in different tissues [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34 (7): 1018 – 1024. [朱炳林, 李俊, 方维焕, 等. 中华鳖 MyD88 部分序列克隆及其在组织中的表达差异分析. 水产学报, 2010, 34(7): 1018 – 1024.]
- [32] Roach J C, Glusman G, Rowen L, *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America, 2005, 102 (27) : 9577 – 9582.
- [33] Iliev D B, Roach J C, Mackenzie S, *et al.* Endotoxin recognition: In fish or not in fish? [J]. FEBS Letters, 2005, 579 (29) : 6519 – 6528.
- [34] 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.
- [35] Ruscanu S, Pascale F, Bourge M, *et al.* The double-stranded RNA bluetongue virus induces type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via a MyD88-dependent TLR7/8-independent signaling pathway [J]. Journal of Virology, 2012, 86 (10) : 5817 – 5828.
- [36] Qiu L, Song L, Yu Y, *et al.* Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23 (3) : 614 – 623.
- [37] Poisa-Beiro L, Dios S, Ahmed H, *et al.* Nodavirus infection of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) induces up-regulation of galectin-1 expression with potential anti-inflammatory activity [J]. Journal of Immunology, 2009, 183 (10) : 6600 – 6611.
- [38] Feng J, Guan R, Guo S, *et al.* Molecular cloning of Japanese eel *Anguilla japonica* TNF- α and characterization of its expression in response to LPS, poly I:C and *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32 (5) : 1046 – 1059.

Molecular cloning and immune function analysis of *MyD88* gene in *Anguilla anguilla*

YAO Zhigang, FENG Jianjun*, WANG Yilei, GUO Songlin,

LIN Peng, ZHANG Ziping, ZHANG Zaipeng

(Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education;

Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture;

Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is a universal and crucial adaptor protein of signal transduction activity elicited by TLR (toll-like receptor) superfamily and plays an essential role in the innate immunity response. In this study, a *MyD88* gene, *AaMyD88*, was cloned for the first time from *Anguilla anguilla*. Its full-length cDNA sequence is 1 539 bp, with an 846 bp open reading frame encoding a protein of 282 aa. The predicted three-dimensional structure of *AaMyD88* can be merged well with the crystal structure of the human MyD88 and has the typical death domain and TIR (toll-like/IL-1 receptor) domain of the MyD88 family. In the TIR domain, three conserved boxes, named box 1, box 2 and box 3, are found. According to the comparison with known MyD88 amino acid sequences, the putative protein of *AaMyD88* showed the highest identities with *Ictalurus punctatus* (76.3%), and other bony fishes (67.5% – 73.2%), but low identities (61.6% – 62.6%) with mammalian. All the sequences were clustered into three main branches in which all MyD88 of fish clustered together, while the MyD88 of mammals and amphibians formed two separate clusters. qRT-PCR revealed the expression of *AaMyD88* could be detected in all adult tissues examined. The highest expression level was observed in the liver, followed by the heart, intestine, and spleen, and the lowest expression level was found in muscle and gills. After injection with goat IgG, the *AaMyD88* expression level was obviously up-regulated in the kidney at 7 d and returned to the normal level after 14 d. The obvious up-regulation of the *AaMyD88* expression level was observed in the spleen from 7 d to 21 d, peaking at 7 d with a value 1.7 times higher than that of the kidney. After stimulation with poly I:C, *AaMyD88* transcripts in fin cell line were down-regulated significantly at 3 h, increased strongly from 6 h to 48 h, and peaked at 12 h. After treatment with LPS, the expression level of *AaMyD88* in fin cell line was sharply down-regulated at 3 h and began to significantly increase at 6 h and peaked at 12 h. As the time progressed past this time point, the expression level rapidly decreased to the control levels at 24 h post-treatment. Compared with the group of LPS treatment, the expression level of *AaMyD88* in the poly I:C group was observed continuously higher from 12 h to 48 h. Our results suggested that *AaMyD88* might play important roles during the immune response of *Anguilla anguilla* against the different pathogen microbes.

Key words: *Anguilla anguilla*; myeloid differentiation factor 88 (MyD88); gene cloning; real-time PCR; immune function

Corresponding author: FENG Jianjun. E-mail: fengjj@jmu.edu.cn