

中华鳖 *MyD88* 部分序列克隆及其在组织中的表达差异分析

朱炳林¹, 李俊², 方维焕¹, 李肖梁^{1*}

(1. 浙江大学动物科学学院, 浙江省动物预防医学重点实验室, 浙江 杭州 310029;

2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400716)

摘要: *MyD88* (Myeloid differentiation factor 88, *MyD88*) 是多数 TLRs (Toll like receptor, TLRs) 信号转导过程中的关键接头分子。研究根据 *MyD88* (Myeloid differentiation factor 88, *MyD88*) TIR 结构域 (Toll-like/IL-1 receptor domain) 保守区设计简并引物, 通过 PCR 扩增, 成功地从中华鳖脾脏 cDNA 中扩增出 351 bp 的目标序列。测序后经结构域和序列比较分析, 扩增片段为中华鳖的 *MyD88* TIR 结构域。该序列与大黄鱼、鸡等脊椎动物的 *MyD88* 的 TIR 结构域序列同源性和相似性分别为 72.9% ~ 86% 和 77.6% ~ 83.6%。以热灭活嗜水气单胞菌刺激中华鳖后, 经荧光定量 PCR 检测, 在 48 h 内, 肝、脾和肾组织中 *MyD88* mRNA 相对表达量均出现不同程度的增加, 尤以脾脏中的增幅最为明显, 为对照组的 6.89 倍; 中华鳖心脏成纤维样细胞经 20 ng LPS 刺激后 1 ~ 8 h, *MyD88* 表达量有所提高, 24 h 的表达量最高。该研究结果将为开展中华鳖天然免疫奠定良好基础。

关键词: 中华鳖; 髓样分化因子 88; TIR 结构域; 组织表达; 嗜水气单胞菌; 脂多糖

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

天然免疫应答是脊椎动物抗感染免疫的第一道防线, 机体依赖免疫细胞中模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 对病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 的识别激发机体的天然免疫反应^[1]。Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 作为一类 PRRs 在对相应的 PAMPs 识别后, 使得 TLRs 的 TIR 结构域构象改变, 并与胞浆内的含有 TIR 结构域的接头蛋白分子结合, 通过信号转导级联效应而引起效应分子的表达^[2]。

MyD88 是 TLRs 的关键接头分子, 机体的 *MyD88* 依赖性信号传导途径是 TLRs 信号传导通路之一。*MyD88* 分子由 C 端 TIR (Toll-like/IL-1 receptor) 结构域、中间区和 N 端死亡结构域 (Death domain, DD) 3 个功能区域组成^[3]。当机体受到刺激后, TLRs 胞浆中 TIR 结构域与 *MyD88* TIR 结构域相互作用形成 TIR-*MyD88* 复合体, 复合体利用 *MyD88*N 端的 DD 招募 IRAKs (IL-1 receptor

associated kinase, IRAK), 主要是 IRAK4、IRAK2 和 IRAK1, IRAKs 相继被磷酸化并从 *MyD88* 上解离, 并导致 TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 激活, TRAF6 通过 N 端 RING 结构域与 Ubc13 (Ubiquitin-conjugating enzyme 13) 和 Uev1A (Ubiquitylating factors ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1) 形成复合体后激活 TAK1 (Transforming growth factor- β -activated protein kinase 1, TAK1), TAK1 随后激活下游的 IKK (I κ B kinase) 和 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 通路, 从而激活转录因子 NF- κ B 和 AP-1, 引起炎性介质的释放^[4-6]。鉴于 *MyD88* 在天然免疫中的重要性, 已有多个哺乳动物、禽类、鱼类等动物的 *MyD88* 分子相继被鉴别^[7-9]。然而, 种类繁多、生物进化中占有重要地位的爬行纲动物至今为止尚无 *MyD88* 分子被鉴别。中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 作为古老的次生水生爬行动物, 不仅在生命科学研究中具有十分重要的地位, 而且具有较高的食用及药用

收稿日期: 2010-04-08 修回日期: 2010-05-06

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2009BADB9B09-5); 杭州市重大专项资助项目 (20082332Y03)

通讯作者: 李肖梁, Tel: 0571-86971193, E-mail: xlli@zju.edu.cn

价值,已成为我国的主要特种水产养殖品种之一^[10]。

研究通过中华鳖 *MyD88* 克隆、分析,并以热灭活嗜水气单胞菌刺激中华鳖,观察 *MyD88* mRNA 在中不同组织的表达差异,以及 LPS 作为刺激剂与心脏成纤维样细胞中 *MyD88* mRNA 表达的量效关系。该研究将有助于了解中华鳖天然免疫免疫应答机制及其规律。

1 材料与方 法

1.1 *MyD88* 部分序列克隆

引物设计和 cDNA 合成 比较 GenBank 中不同物种的 *MyD88* 基因序列,利用 DNASTar 软件设计一对简并引物 (*MyD88*-dF, *MyD88*-dR) (表 1),用 RNA 抽提试剂盒 (Tiagen) 提取经 LPS (Sigma, L2630, *E. coli* 0111;B4) 刺激 24 h 中华鳖的脾脏的总 RNA 1 μ g,用随机引物和 SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) 进行反转录合成 cDNA。

PCR 反应体系和条件 PCR 反应体系为: cDNA 模板 3 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, 10 mmol/L dNTP Mixture 1 μ L, 2 \times GC Buffer I 25 μ L, TAKARA LA *Taq*[®] 1 μ L, 去离子水补至 50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将目的片段用 DNA 胶回收试剂盒 (Axygen) 回收后用于克隆和测序。

1.2 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测 *MyD88* 表达

荧光定量 PCR 引物设计 根据 Genbank 上 β -*actin* 基因序列 (Accession No. EU727174.1) 和已克隆测序的中华鳖 *MyD88* 基因序列,用 Primer Express[®] software version 2.0 (Applied Biosystems, USA) 软件设计 2 对引物 (β -*actin*-F, β -*actin*-R 和 *MyD88*-F, *MyD88*-R) (表 1) 并用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行特异性分析验证。

荧光定量 PCR 方法的建立 按 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 试剂盒说明加入 2 \times Core buffer 10 μ L 和终浓度为 0.2 μ mol/L 的引物以及 2 μ L 合成的 cDNA,置于 iQ[™] 5 Multicolor 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 上进行检测。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min 后,95 $^{\circ}$ C 10 s, 61 $^{\circ}$ C 10 s,

72 $^{\circ}$ C 15 s 反应 40 个循环,72 $^{\circ}$ C 实时检测荧光信号。65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 每隔 6 s 检测融解曲线,共 71 个循环。同时设定不加 cDNA 的阴性对照。

表 1 RCR 和荧光定量 PCR 引物

Tab.1 Primers for PCR and real-time PCR in this study

引物 primers information	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')
<i>MyD88</i> -dF	GTTTGTSCABGAGATGATC
<i>MyD88</i> -dR	GCVAGNCKDDYCCARAACCA
β - <i>actin</i> -F	AACTGGGATGACATGGAGAAGA
β - <i>actin</i> -R	AACATGATCTGGGTCATCTT
<i>MyD88</i> -F	CGAGAGCTGGAGCAAACGGAGTTCAAG
<i>MyD88</i> -R	GCTGGCTAGTGATGGACCACACGCA

1.3 不同刺激物对 *MyD88* 表达的影响

热灭活嗜水气单胞菌对中华鳖的刺激 将 24 只体重为 450 ~ 500 g 健康中华鳖 (购自浙江中德农业集团有限公司) 随机分成 2 组,每组 12 只。试验 0 d,对照组每只注射 0.5 mL PBS (Gibico), 试验组注射经 90 $^{\circ}$ C 灭活 30 min^[11] 的 10⁸ CFU/mL 嗜水气单胞菌 (AS 1.927, 购自中国典型微生物保藏中心) 0.5 mL。每只中华鳖单独饲养于水温在 (30 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 50 cm \times 50 cm \times 40 cm 的水族箱中,试验期间不喂食。

注射后第 1、2、4 和 8 d,对照组和试验组分别处死 3 只中华鳖,收集肾脏、脾脏、肝脏和小肠组织,按照 RNA 抽提试剂盒提取不同组织总 RNA,然后利用 Nano Drop 1000 (Invitrogen) 测定总 RNA 的浓度,一定量的总 RNA 用随机引物和 Rever TraAce 反转录酶 (TOYOBO) 反转录为 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

不同浓度 LPS 刺激中华鳖心脏成纤维样细胞 将中华鳖心脏成纤维样细胞 (CSSTH1, 购自中科院典型培养物保藏委员会昆明细胞库) 接种于 6 孔板中,每孔接种细胞浓度为 4 \times 10⁵ 个细胞,用完全培养基 [70% DMEM (Gibico) + 20% FBS (Gibico) + 10% H₂O] 培养于 28.0 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞培养箱中,当细胞生长至 85% 融合度时,倾去细胞培养液,用 PBS (Gibico) 洗涤 2 次后,加入分别含 0、10 ng/mL 和 100 ng/mL LPS (Sigma, L4391, *E. coli* 0111;B4) 培养基 (90% DMEM + 10% H₂O) 2 mL,培养于 28.0 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞培养箱中。每个浓度 3 个重复。培养 1、2、4、8 和 24 h 后,收获细胞, RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA,并进行反转录,合成的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 数据处理和统计分析

mRNA 相对表达量根据 Livak 等^[12]建立的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,即各个实验组相对于对照组 *MyD88* mRNA 表达量经 β -actin 校正, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算结果,计算公式为: $Ct = \text{试验组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内标基因}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内标基因}})$ 。

2 结果

2.1 中华鳖 *MyD88* 部分序列克隆及其同源性和相似性分析

PCR 扩增出 351 bp 长度的核苷酸序列及推导的氨基酸序列见图 1,蛋白质序列经 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析,该蛋白质具有 TIR 结构域(图 2),E 值为 5.00×10^{-5} 。通

过 DNASTar 5.0 软件中的 Clustal W MegAlign 分析,获得的中华鳖序列与鸡(*Gallus gallus*) (NM 001030962.1),非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (NM 001016837.2),人(*Homo sapiens*) (NM 002468.4),大鼠(*Rattus norvegicus*) (NM 198130.1),猪(*Sus scrofa*) (AB 292176.1),牛(*Bos taurus*) (BC 102851.1),斑马鱼(*Danio rerio*) (NM 212814.2) 和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (EU 978950.1) *MyD88* TIR 结构域一致性和相似性分析表明(表 2),与鸡、非洲爪蟾、人类、大鼠、猪、牛、斑马鱼和大黄鱼的核苷酸序列一致性分别为 86%、76%、76%、75.4%、75.4%、74.9%、75.7% 和 72.9%;氨基酸序列相似性分别为 83.6%、81.0%、82.8%、81%、83.6%、80.2%、76.7% 和 77.6% (图 3)。

```

TTTGTGCAGGAGATGATCCGAGAGCTGGAGCAAACGGAGTTCAAGCTGAAGCTGTGTGTG 60
F V Q E M I R E L E Q T E F K L K L C V
TTTGATCGGGATGTCCTGCCAGGGTCATGCGTGTGGTCCATCACTAGCCAGCTCATAGAG 120
F D R D V L P G S C V W S I T S Q L I E
AAACGCTGTAGGAAGATGGTGGTTGTTATTTTCAGATGATTATCTGGAAAGCAATGCATGT 180
K R C R K M V V V I S D D Y L E S N A C
GATTTCCAGACCAATTTGCTCTTAGCCTTTCCCGAGGTGCTCGCCAGAAACGGCTGATT 240
D F Q T K F A L S L S P G A R Q K R L I
CCGGTCAAGTACGAAACCATGAAGAATGCATTTCCAAGCATTGAGGTTTCATTACAGTC 300
P V K Y E T M K N A F P S I L R F I T V
TGCGACTACACTAATCCCTGCACCAAAAATGGTTTTGGACCAGCCTCGC
C D Y T N P C T K K W F W T S L A

```

图 1 中华鳖 *MyD88* cDNA 部分序列及其推导的氨基酸序列(方框为 TIR 结构域保守基序)

Fig. 1 Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *MyD88* cDNA of Chinese soft-shelled turtles (Box indicates the conservative motif in TIR domain)



图 2 预测结构域示意图

结果来自网站 <http://smart.embl-heidelberg.de>。

Fig. 2. Domain within the query sequence of residues

by the website of <http://smart.embl-heidelberg.de>.

2.2 热灭活嗜水气单胞菌对中华鳖组织中 *MyD88* 表达差异的影响

经热灭活嗜水气单胞菌刺激后,中华鳖 *MyD88* mRNA 在不同时间不同组织(肝、脾、肾和小肠)中的相对表达水平见图 4。刺激 24 h 后,脾脏和肝脏中 *MyD88* 转录水平即出现明显增高,为对照组的 3.14 和 3.19 倍;48 h 后,肾脏中的

表 2 *MyD88* TIR 结构域核苷酸序列(上三角)和推导氨基酸(下三角)差异百分率

Tab. 2 Percentage divergence of nucleotide (above diagonal) and deduced amino acid sequence (below diagonal) of *MyD88* TIR domain

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
		86	76	76	75.4	75.4	74.9	75.7	72.9	1 中华鳖 <i>Trionyx sinens</i>
83.6			72.6	75.4	74	74.9	74.3	75.7	74.3	2 鸡 <i>Gallus gallus</i>
81	77.6			73.4	73.1	72.9	72.9	74.9	72.9	3 非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>
82.8	78.4	78.4			87.7	93.4	91.1	72	72.6	4 人 <i>Homo sapiens</i>
81	77.6	77.6	95.7			87.4	86.3	72	72	5 大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>
83.6	79.3	79.3	98.3	94			92.6	75.1	75.4	6 猪 <i>Sus scrofa</i>
80.2	75.9	76.7	95.7	91.4	94.8			74.9	75.4	7 牛 <i>Bos taurus</i>
76.7	73.3	75.9	77.6	77.6	79.3	78.4			79.1	8 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
77.6	74.1	77.6	75.9	76.7	77.6	77.6	85.3			9 大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>

MyD88 相对表达量迅速上升,为对照组 5.06 倍,脾脏中的表达量持续上升为对照组的 6.89 倍,而肝脏的表达量呈现下降趋势,仅为对照组的 1.45

倍;此后肝、脾和肾的表达量均呈现明显的下降。试验期间小肠中 *MyD88* mRNA 相对表达量变化不明显。

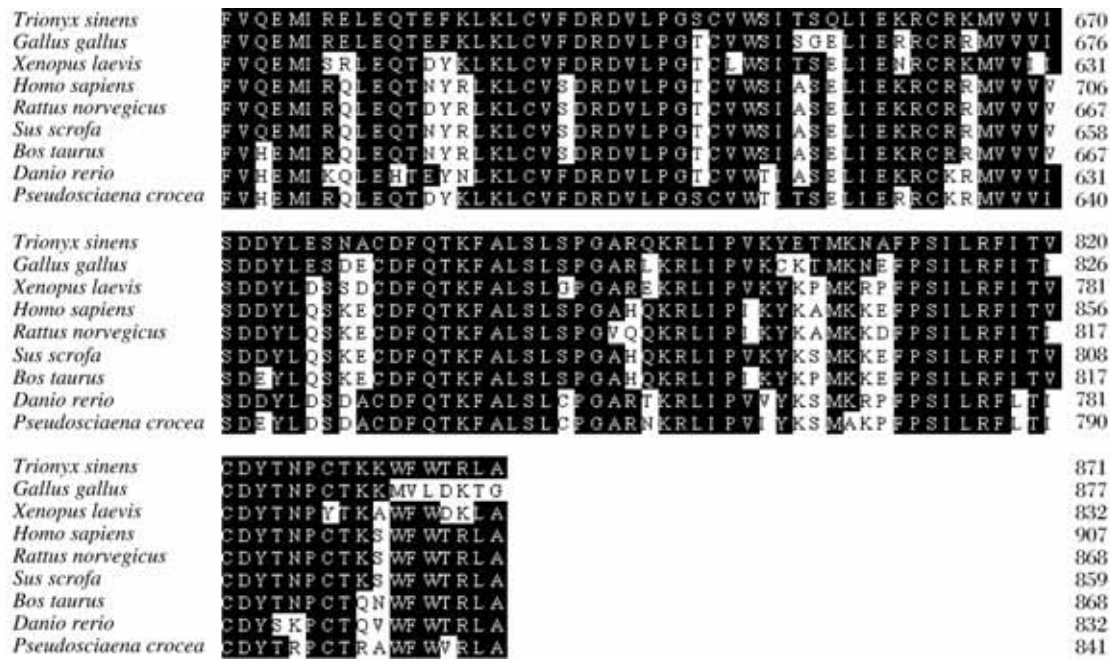


图3 脊椎动物 *MyD88* TIR 结构域同源性比较

黑框表示与中华鳖一致的序列

Fig. 3 Multiple alignment of *MyD88* TIR domain amino acid sequences of different vertebrate species

Shade with solid black residues that match *Trionyx sinensis* exactly

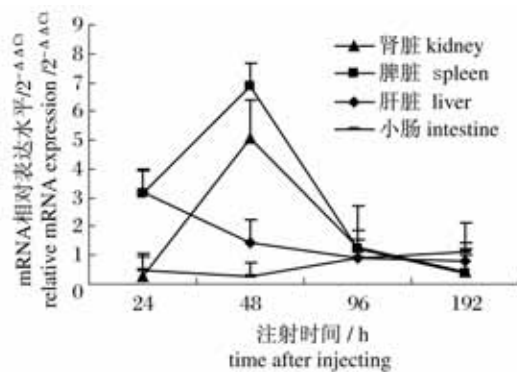


图4 热灭活嗜水气单胞菌对中华鳖组织 *MyD88* mRNA 表达的影响 ($n=3, \bar{X} \pm \text{SEM}$)

Fig. 4 Relative expression levels of *MyD88* mRNA in different tissue of Chinese soft-shelled turtles against heat-inactivated *Aeromonas hydrophila*, as determined by real-time PCR

2.3 LPS 对中华鳖心脏成纤维样细胞 *MyD88* 表达的影响

图5 显示 LPS 对中华鳖心脏成纤维样细胞 *MyD88* mRNA 表达的剂量效应和时间效应关系,

中华鳖心脏成纤维样细胞经 20 ng LPS 刺激 24 h 后, *MyD88* 表达量是 1、2、4 和 8 h 的 4.52、8.49、19.4 和 12.54 倍, 也比 200 ng LPS 刺激 4 h 时高 345.34%。

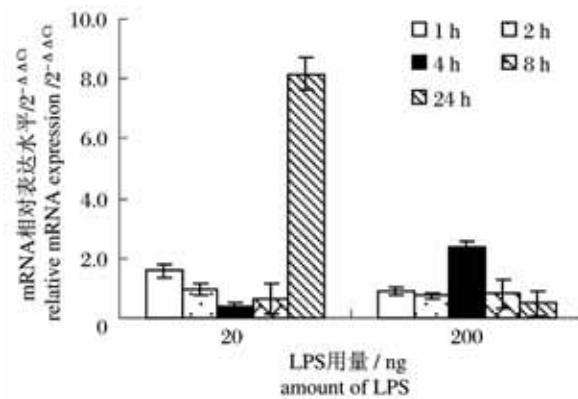


图5 LPS 对中华鳖心脏成纤维样细胞 *MyD88* mRNA

表达的剂量效应和时间效应关系 ($n=3, \bar{X} \pm \text{SM}$)

Fig. 5 Time- and dose-response of LPS to stimulate *MyD88* mRNA expression in heart fibroblast cell of the soft-shell turtle, as determined by real-time PCR

3 讨论

通过 *MyD88* 基因敲除的小鼠模型研究模型表明,除了 TLR3,大部分 TLRs 信号转导均与 *MyD88* 有关^[3]。目前,多个哺乳动物、鱼类、鸟类和无脊椎动物的 *MyD88* 分子已被鉴别,但是有关爬行动物的 *MyD88* 分子却鲜见报道。本研究克隆的中华鳖 *MyD88* 部分 cDNA 序列经 BLAST 和 SMART 分析,为 *MyD88* 分子的 TIR 结构域,经 Clustal W MegAlign 比较,与鸡的序列具有较高的一致性(86%)和相似性(83.6%)。Matsuda 等^[13]通过比较细胞遗传学图谱分析,鸡与中华鳖的 6 个大染色体几乎一致,具有很高的保守性,两种动物具有共同的起源于 210MYA 的双孔亚纲的初龙下纲祖先,并在其进化过程中被很好的保留了下来,这与本文的序列同源性分析结果基本一致。结构分析显示,获得的序列中存在 RDVLPG 和 FW 基序。研究表明,这两个基序是哺乳动物 TIR 结构域中保守基序,尤其是 RDVLPG 基序中的 Lys 和 Arg 残基形成 BB-loop 区,这对于 TIR-TIR 互作有着重要的作用^[14]。上述结果显示,获得的序列为中华鳖 *MyD88* 部分 cDNA 序列,可能存在与其他动物相似的功能。

早期的研究认为,*MyD88* 仅在骨髓组织中表达^[15],但随后研究证实,*MyD88* 可在哺乳动物的非骨髓组织中表达,但不同组织表达水平存在一定的差异^[7,16],而且与日龄也有一定的关系^[17]。这可能是因为 *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- γ 受体信号有关^[18]。本研究将严重危害水产养殖的嗜水气单胞菌热灭活后作为刺激剂刺激中华鳖,观察 *MyD88* 在肝、脾、肾和小肠的转录水平。刺激后 24 h,中华鳖脾脏和肝脏中 *MyD88* 的转录水平明显上升;脾脏和肾脏组织中 *MyD88* 的表达量在刺激后 48 h 到达峰值,分别比 24 h 时提高了 2.19 和 19.72 倍。Yao 等^[19]用灭活的 *Vibrio parah-aemolyticus* 刺激大黄鱼后,脾脏中的 *MyD88* 的表达量在 48 h 达到峰值的结果基本一致。同样,Skjaeveland 等^[20]用 SAV3 (Salmon alphavirus sub-type 3) 刺激大西洋鲑鱼发现,脾脏中 *MyD88* 得到了较好表达,但在第 7 天时的表达量最高。脾脏作为机体最大的免疫器官,含有大量参与机体天然免疫的免疫细胞,如淋巴细胞、巨

嗜细胞和树突状细胞,因此,当外源微生物机体侵入机体后,这些细胞迅速的被激活并引发相应的免疫反应,但由于刺激剂的不同和物种的差异等因素,免疫细胞激发天然免疫反应的时间和持续性上可能也存在的差异。

LPS 为 G⁻ 细菌细胞壁的主要成分,由“O”-抗原(O-antigen)、多糖和脂质 A(Lipid A)三部分构成,其中的 Lipid A 是激发天然免疫反应的主要成分。当 LPS 被 LBP (LPS binding protein, LBP) 识别、结合、转运后,与 CD14、TLR4 和 MD-2 (Myeloid differentiation protein-2, MD-2) 形成 LPS 复合物后招募 *MyD88* 分子激活机体的炎症反应^[21]。研究表明,不同物种对 LPS 的敏感程度不仅一致,人类、猫、豚鼠和兔子等高等脊椎动物对 LPS 非常敏感,而鱼和蛙等低等脊椎动物表现出一定的耐受性^[22]。LPS 作为刺激剂,在培养细胞中应用浓度一般为 1 ~ 1 000 ng/mL^[21],本试验表明,20 ng LPS 刺激中华鳖心脏成纤维样细胞 24 h 后,可较好的激活 TLR4 的 *MyD88* 依赖信号转导途径。

研究首次克隆了中华鳖 *MyD88* 分子的部分序列,并以此为基础,检测了其在不同条件下的表达差异。结果为进一步开展 *MyD88* 基因表达、结构功能分析以及中华鳖免疫机制等相关研究提供了基础资料。

参考文献:

- [1] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373 - 384.
- [2] Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll-like receptors in innate immunity [J]. *Int Immunol*, 2005, 17(1): 1 - 14.
- [3] Luke A J, O' Neill, Andrew G B. The family of five: TIR-domain containing adaptors in Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 353 - 364.
- [4] Sarah L D, Luke A J, O' Neill. Toll-like receptors: From the discovery of NF- κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(9): 1102 - 1113.
- [5] Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(11): 460 - 469.
- [6] Wertz I E, Dixit V M. Ubiquitin-mediated regulation

- of TNFR1 signaling [J]. Cytokine Growth Factor Rev,2008,19(3-4):313-324.
- [7] 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 Lett, 1997, 402(1):81-84.
- [8] Tomokazu T, Hidehiro K, Ikuo H, *et al.* Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(9):807-816.
- [9] Qiu Y, Shen Y, Li X, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel isoform of chicken myeloid differentiation factor 88 (MyD88) [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32 (12): 1522-1530.
- [10] Li X L, Zhang C L, Fang W H, *et al.* White-spot disease of Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*) caused by *Paecilomyces lilacinus* [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(7):578-581.
- [11] Azad I S, Shankar K M, Mohan C V, *et al.* Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody [J]. Dis Aquat Organ, 2000, 43(2):103-108.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [13] Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, *et al.* Highly conserved linkage homology between birds and turtles: bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other [J]. Chromosome Res, 2005, 13(6):601-615.
- [14] Hidenori O, Hidehito T, Zenichiro K, *et al.* Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling [J]. PNAS, 2009, 106: 10260-10265.
- [15] Lord K A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6 [J]. Oncogene, 1990, 5(7):1095-107.
- [16] Hardiman G, Jenkins N A, Copeland N G, *et al.* Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88 [J]. Genomics, 1998, 45(2):332-339.
- [17] Tohno M, Shimazu T, Aso H, *et al.* Molecular Cloning and Functional Characterization of Porcine MyD88 Essential for TLR Signaling [J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(5):369-376.
- [18] Sun D, Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA [J]. Nat Immunol, 2006, 7(4):375-381.
- [19] 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 Immunol, 2009, 26(2):249-255.
- [20] Skjaeveland I, Iliev DB, Strandskog G, *et al.* Identification and characterization of TLR8 and MyD88 homologs in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33 (9): 1011-1017.
- [21] Swain P, Nayak S K, Nanda P K, *et al.* Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2008, 25(3):191-201.
- [22] Subhra K, Biswas, Eduardo Lopez-Collazo. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance [J]. Trends in Immunol, 2009, 30 (10): 475-487.

Cloning of *MyD88* partial cDNA sequence of Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) and its expression in different tissues

ZHU Bing-lin¹, LI Jun², FANG Wei-huan¹, LI Xiao-liang^{1*}

(1. Zhejiang Province Key Lab of Preventive Veterinary Medicine, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which is considered as a pivot adaptor molecule for signal transduction of all toll-like receptors (TLRs) except TLR3, possesses important function. In this study, degenerate primer pairs were designed from the conserved regions of the Toll-like/IL-1 receptor (TIR) domain of myeloid differentiation factor 88 (MyD88). A 351-bp length target sequence was amplified by PCR successfully from the spleen cDNA of Chinese soft-shelled turtle (CSST), and is found as the TIR domain of CSST MyD88 as shown by sequence alignment and domain search. Its identity is 72.9% – 86% and 77.6% – 83.6% respectively at the nucleotide and amino acid levels as compared with the MyD88 TIR domains of other vertebrates (e. g. yellow croaker [*Pseudosciaena crocea*], chicken). Real-time PCR revealed that mRNA expression of CSST MyD88 in the liver, spleen and kidney increased to varying extent within 48 hours after intramuscular stimulation of CSST by heat-inactivated *Aeromonas hydrophila*. In particular, MyD88 expression in the spleen was 6.89 fold higher than that from unstimulated control. When the heart fibroblast cell line of CSST was stimulated by 20 ng LPS, as stimulator, MyD88 expression increased slightly from hour 1 to 8, but significantly at hour 24. This study has laid good foundation for further study on innate immunity of CTTS.

Key words: *Trionyx sinensis* (Chinese soft-shelled turtle); myeloid differentiation factor 88 (MyD88); toll-like/IL-1 receptor (TIR) domain; tissue expression; *Aeromonas hydrophila*; lipopolysaccharides (LPS)

Corresponding author: LI Xiao-liang. E-mail: xlli@zju.edu.cn