

斑马鱼 *BLT1-like* 基因的克隆和表达分析

唐宇飞¹, 刘晓红^{1,2}, 常馨月¹, 吴海珍^{1*}, 张元兴^{1,2}

(1. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237;

2. 上海海洋动物疫苗工程技术研究中心, 上海 201424)

摘要: 为了研究白三烯 B₄ 受体在斑马鱼发育和免疫中的功能, 本实验利用 RACE 技术克隆得到了斑马鱼白三烯 B₄ 受体样 (*BLT1-like*) 基因 *BLT1-like1* 和 *BLT1-like2* 的全长 cDNA 序列, 其分别编码 339 和 356 个氨基酸。序列和结构分析发现, 其编码的 2 个蛋白均属于 G 蛋白偶联受体家族视紫红质蛋白亚族, 并具有典型的 G 蛋白偶联受体的特征, 与人的 *BLT1* 同源度达 31% 以上。进一步将 2 个基因与绿色荧光蛋白融合表达, 发现其具有较好的细胞膜定位功能; Western 印迹检测也证实, 重组表达细胞的全细胞蛋白可与人源 *BLT1* 的多克隆抗体发生特异性相互作用。此外, 荧光定量 PCR 分析结果显示, 在斑马鱼幼鱼发育过程中, *BLT1-like1* 在胚胎发育 12 h 显著上调, mRNA 表达量上升至 1 h 时的 18 倍, 而 *BLT1-like2* 在胚胎发育 24 h 发生显著上调, 表达量上升至 1 h 时的 34 倍; 斑马鱼成鱼中的 2 个基因在心脏和肝脏中表达量相对较高, 而肠道、皮肤和眼睛中表达量相对较低。说明斑马鱼体内可能存在多个 *BLT1* 基因, 实验结果为鱼类 *BLT1* 基因的克隆和功能鉴定提供基础。

关键词: 斑马鱼; *BLT1*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

白三烯 B₄ 是一种来源于膜磷脂的脂类炎症介导因子, 主要由中性粒细胞、巨噬细胞和树突细胞产生和释放^[1], 存在于所有脊椎动物中, 但在非脊椎动物中尚未发现^[2]。白三烯 B₄ 与多种炎症疾病密切相关, 包括类风湿性关节炎^[3]、哮喘^[4]、关节炎^[5]、牛皮癣^[6]以及动脉粥样硬化^[7]等。在机体的抗感染过程中, 白三烯 B₄ 能够活化并招募淋巴细胞至感染部位发挥重要免疫功能, 且能促使淋巴细胞脱颗粒^[8-10]。对白三烯 B₄ 及其受体相互作用的研究有助于对疾病发生和机体免疫机理的阐释。

目前白三烯 B₄ 受体已在人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 中得到鉴定, 其中 *BLT1* 为白三烯 B₄ 高亲和力受体, 主要表达于中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、树突细胞以及效应 T 细胞等白细胞表面, 参与活化及介导白细胞向炎症部位的迁移^[11-15]; *BLT2* 为白三烯 B₄ 低亲

和力受体, 在机体内表达分布广, 并在脾脏中的表达量最高, 其具体功能还有待进一步研究^[16]。这 2 个受体都属于 G 蛋白偶联受体中的视紫红质蛋白亚族, 具有 7 次跨膜结构, 在胞外的 2 个环中具有 2 个保守的半胱氨酸残基, 且胞外氨基端序列中存在 1 个保守的糖基化位点^[16-18]。这 2 个受体基因在人和小鼠的基因组中成簇分布, 具有相同的转录方向, 且 2 个受体具有较高相似度, 在人和小鼠中分别为 45.2% 和 44.6%。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为生命科学研究中重要的模式动物, 已被广泛用于发育生物学、遗传学、肿瘤学、药理学、毒理及环境等方面的研究^[19]。随着斑马鱼全基因组序列的公布, 斑马鱼基因通过与人类及其他哺乳动物已知功能基因的比对, 很多功能得到初步确认。但由于不同物种之间基因的多样性、差异性以及基因剪接方式的不同, 相当一部分斑马鱼基因的功能尚不明确。

收稿日期: 2015-06-11 修回日期: 2015-09-01

资助项目: 国家自然科学基金 (31372550); 国家鲜鲟类产业技术体系 (CARS-50-G07)

通信作者: 吴海珍, E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

已有学者研究并克隆了斑马鱼 *BLT1-like* 基因 *zBLT1* 和 *BLT2-like* 基因 *zBLT2a*、*zBLT2b*^[20]。序列分析发现 *zBLT1* 具有与人 *BLT1* 相似的特征结构。进一步功能研究发现,表达 *zBLT1* 的 CHO 细胞在白三烯 B₄ 的刺激下,胞内钙离子浓度会升高,且 cAMP 的产生会被抑制,这与人 *BLT1* 的功能具有相似的特性。表达 *zBLT2a* 和 *zBLT2b* 的 CHO 细胞在白三烯 B₄ 和 12-HHT (12-hydroxyheptadecatrienoic acid) 的诱导下,胞内钙离子浓度也会升高,且 cAMP 的产生也会被抑制,这与人 *BLT2* 的功能具有类似的特性。然而,在人和小鼠中只存在 1 个 *BLT2* 基因,而在斑马鱼中却鉴定出 2 个 *BLT2-like* 基因,说明斑马鱼白三烯受体具有一定的多样性。并且,在 NCBI 数据库中发现仍有 6 条预测的斑马鱼 *BLT1-like* 基因。因此,斑马鱼的 *BLT1* 基因是否也具有多样性,有待进一步的验证。

本实验室之前的研究中,斑马鱼经鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 减毒活疫苗 MVAV6203 浸泡免疫 28 d 后,基于基因芯片的脾脏组织基因表达差异分析发现,预测的 *BLT1-like* 基因 (GenBank 登录号:XM_002662721) 与对照组相比表达上调 9.19 倍^[21],说明其在疫苗的免疫过程中可能发挥着重要作用,之后 Okuno 等^[20]证实其编码的蛋白就是 *BLT1* 受体。本研究进一步对 NCBI 数据库中预测的斑马鱼 *BLT1* 基因进行了克隆,并得到 2 条与人 *BLT1* 具有较高相似度的序列。此外,考察了其所编码蛋白在胞内的定位情况及其与人 *BLT1* 抗体的相互作用,并对这 2 条序列在斑马鱼胚胎发育不同时期及各组织的表达情况进行了分析。

1 材料与amp;方法

1.1 实验用鱼

交配所用亲鱼来自上海中国科学院神经所,品系为 AB 系,体长 3~4 cm,体质量 0.5~0.7 g。成鱼组织分布表达实验所用斑马鱼由上海嘉定鱼场提供,体质量为 0.15~0.25 g,5~7 月龄。斑马鱼在实验室条件饲养,水温 24 ℃,每天喂食 2 次,每日 12 h 黑暗 12 h 光照交替进行,实验之前均驯养 2 个星期以上。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、

RNAStore 样本保存液、DNA 胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; Premix *Taq*™ Hot Start Version 酶、逆转录试剂盒、限制性内切酶 *Xho*I 和 *Eco*RI、pMD19-T 克隆载体购自宝生物(大连)公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 购自 Roche 公司; 人源 *BLT1* 多克隆抗体购自 Sigma-Aldrich 公司; RNase-free 的枪头和离心管购自 Axygen 公司; PCR 仪购自宁波东胜仪器科技有限公司; 封片液、NanoDrop 2000 spectrophotometer 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; Tanon-5500 全自动数码凝胶图像分析系统购自天能公司; Leica TCS SP5 激光扫描共聚焦显微镜购自 Leica 公司; ABI 7500 Real-Time Detection System 购自 Applied Biosystems 公司。

1.3 总 RNA 的提取以及 cDNA 的合成

总 RNA 采用 TRIzol 法进行提取。胚胎发育实验中,取 15 枚鱼卵为一组,设 3 个平行组;成鱼组织分布表达实验中,将 10 条斑马鱼分为一组,分别设 3 个平行组。提取的 RNA 先用 DNaseI 消化后再根据逆转录试剂盒说明书上的操作逆转录合成 cDNA。

1.4 3' RACE 和 5' RACE 实验

以肝脏的 RNA 作为模板,按照 RACE 试剂盒中的操作方法逆转录合成 cDNA。根据 NCBI 网站上预测的 2 条 *BLT1-like* 基因 (GenBank 登录号分别为 XM_001341420.4 和 XM_005169008.1) 设计 RACE 引物(表 1),引物设计软件为 Primer premier 6.0。实验过程中采用热启动的 *Taq* 酶,并使用巢式 PCR 对 2 个 *BLT1-like* 基因的 3' 端和 5' 端进行 PCR,以减少非特异性扩增。克隆得到 3' 端和 5' 端序列后,再次设计引物克隆其全长 cDNA 序列并测序。

1.5 *BLT1-like* 基因序列的分析及系统进化树的构建

克隆得到的 cDNA 序列和相应的氨基酸序列用 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行比对分析;用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 对相应蛋白序列的特定结构进行分析;跨膜结构使用 TMpred Server (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 进

表 1 实验中所用的引物
Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primers	序列 (5'→3') sequences (5'→3')	用途 usage
BLT1-GSP-F	GGTGACACTGACGCAGAGCAGGATGG	3' RACE
BLT1-NGSP-F	GGAGCACTGCTGCCTGTGTGATCCTG	3' nested RACE
BLT1-GSP-R	TGTTCCCTAAGTCTTGAAAACAGCTTCACTATCCCT	5' RACE
BLT1-NGSP-R	GGGCCAGCGAGTAGATCCACAGCGGTAAGGTGA	5' nested RACE
BLT2-GSP-F	GGGAATACGAGTCTGACACCCAGGAGGCTGT	3' RACE
BLT2-NGSP-F	GCGTGGTGGTGATGTTTGTCTGTGCTGGAT	3' nested RACE
BLT2-GSP-R	ATCCAGCACAGAGCAAACATCACCACCACGC	5' RACE
BLT2-NGSP-R	CCCGTTTCTCGAAGTGAGCTGCGGAAGGTTC	5' nested RACE
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5' and 3' RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	nested PCR
BLT1-1-pE-F	CCGCTCGAGATGAACAGTTCTCTCTATCTGGT	plasmid construction
BLT1-1-pE-R	GGAATTCGCTGTTCATCAACAGGACTTTCCA	plasmid construction
BLT1-2-pE-F	CCGCTCGAGATGAACGCTACGGCGAATCTTC	plasmid construction
BLT1-2-pE-R	GGAATTCGCTGTGAGTACTGACGCATGAT	plasmid construction
BLT1-1-pc-F	GGAATTCGCCACCATGAACGCTACGGCGAATCTTC	plasmid construction
BLT1-1-pc-R	GGAATTCGCCACCATGAACAGTTCTCTCTATCTGGT	plasmid construction
BLT1-2-pc-F	GGAATTCGCCACCATGAACGCTACGGCGAATCTTC	plasmid construction
BLT1-2-pc-R	CCGCTCGAGTACTGTTCATCAACAGGACTTT	plasmid construction
BLT1-1-FC-F	AGTCAGAGCTGTGATTCTCTG	cDNA cloning
BLT1-1-FC-R	TCATTTAAACAACATTAATTATAAC	cDNA cloning
BLT1-2-FC-F	AAGGAAACATGAACGCTAC	cDNA cloning
BLT1-2-FC-R	GAGGAGACACAAGCAAATG	cDNA cloning
BLT1-1-Q-F	AGCAGCGTCTTCATCATC	RT-qPCR
BLT1-1-Q-R	GCCATCATCCTCATCATCTAA	RT-qPCR
BLT1-2-Q-F	TCATCACATAGGCAACATTCT	RT-qPCR
BLT1-2-Q-R	GCACATAGAGCACTGGATT	RT-qPCR
β -actin-F	ATGGATGAGGAAATCGCTGCC	control, RT-qPCR
β -actin-R	CTCCCTGATGTCTGGGTCTGTC	control, RT-qPCR

行在线预测;不同序列之间的一致性和相似性用软件 MatGAT 2.01^[22] 进行计算;糖基化位点用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 进行在线预测;进化树构建使用 MEGA6.06 软件,以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建进化树,1 000 次自举 (Bootstrap) 分析计算各节点支持率。序列比对和进化树构建时所选物种及序列的 GenBank 登录号如表 2 所示。

1.6 BLT1-like 受体的细胞亚定位

使用 pEGFP-N1 表达质粒,将克隆到的 2 个 *BLT1-like* 基因的开放阅读框 (不包括终止密码子) 通过 *Xho* I 和 *Eco*R I 2 个酶切位点接入 pEGFP-N1 质粒与绿色荧光蛋白融合表达。转染时,将消化好的 CHO 细胞接种到已放置细胞爬片的 96 孔板中,24 h 后用 LipofectamineTM 2000 Reagent (Invitrogen) 转染上述 2 种重组质粒,并转

表 2 序列比对及进化树构建所用物种及相应序列
GenBank 登录号

Tab. 2 Species and GenBank accession number used in sequence alignment and phylogenetic tree construction

物种 species	GenBank 登录号 GenBank accession no.
亚马逊花鳉 <i>Poecilia formosa</i>	XP_007559106
牛 <i>Bos taurus</i>	Q3T181
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP_004067323
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NP_001134220
人 <i>H. sapiens</i>	NP_858043
小鼠 <i>M. musculus</i>	NP_032545
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	NP_001295904
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XP_010737765
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	AHZ41231
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003454831

染 pEGFP-N1 质粒作为对照;4 h 后更换培养液;在转染 18 h 后,用 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次并用

4%的多聚甲醛固定 15 min;之后将附着细胞的爬片倒扣于载玻片并用封片液固定,室温干燥过夜,然后用激光共聚焦显微镜对其定位情况进行观察。

1.7 Western 印迹检测 BLT1-like 受体与抗体的相互作用

将得到的 2 个 *BLT1-like* 基因的开放阅读框通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 2 个酶切位点克隆到 pcDNA3.1(+) 表达质粒并用 Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) 转染 CHO 细胞。培养一段时间后,用胰酶消化转染 *BLT1-like* 基因的 CHO 细胞(约 1×10^6 个)并离心收集,倒掉上清液并用 200 μ L 细胞裂解液 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, TritonX-10 0.5%, pH = 7.4) 进行裂解。之后往细胞裂解液中加入 50 μ L loading buffer 进行 SDS-PAGE 和 western 印迹实验,观察其与人源 BLT1 多克隆抗体的相互作用。

1.8 RT-qPCR

根据克隆得到的 BLT1-like cDNA 序列设计荧光定量 PCR 特异引物 BLT1-like1-F/R、BLT1-like2-F/R 以及内参 β -actin-F/R(表 1),实验前进行标准曲线的绘制以确定引物的有效性和模板的浓度范围。选用 ABI 7500 Real-Time Detection System,使用 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 进行检测。PCR 扩增时采用 20 μ L 体系,SYBR Green 10 μ L,上下游引物各 1 μ L,模板 1 μ L, RNase-free H_2O 7 μ L。PCR 反应条件为初始 95 $^{\circ}C$ 变性 10 min;之后 95 $^{\circ}C$ 变性 15 s,60 $^{\circ}C$ 退火/延伸 60 s,循环 40 次;最后进行溶解曲线的测定。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆和序列分析

通过 RACE 技术,成功克隆得到了 *BLT1-like1* (GenBank 登录号:KT004422) 和 *BLT1-like2* (GenBank 登录号:KT004423) 2 个基因的全长 cDNA,其分别为 1 431 和 1 223 bp,其开放阅读框编码产物分别为 339 和 356 个氨基酸。通过与基因组的比对发现,这 2 个基因在斑马鱼基因组上位置相邻,并且都不含内含子。其编码的蛋白具有典型的 G 蛋白偶联受体的特征:7 次跨膜结构、数个跨膜结构中都含有保守的脯氨酸残基、胞外的环中具有 2 个保守的半胱氨酸残基以及胞外氨基端存在糖基化位点等(图 1,2),且在其羧基端

存在数个丝氨酸和苏氨酸残基,推测其可能与胞内的信号转导有关。

2.2 蛋白序列比对和进化树分析

序列间的一致性和相似性如表 3 所示,这 2 个受体间的氨基酸序列一致性高达 51.9%,且与亚马逊花鲈、青鲈以及大西洋鲑预测的 BLT1 氨基酸序列具有较高的一致性,并具有较近的亲缘关系(图 3)。此外,二者与人源 BLT1 的氨基酸序列一致性为 32% 左右,相似性约为 55%。

2.3 BLT1-like 受体在细胞中的亚定位分析

将 BLT1-like1 和 BLT1-like2 的羧基端融合表达增强的绿色荧光蛋白,从而可以在荧光场下间接观察这 2 个蛋白表达后的定位情况。对照细胞整个胞质均可见绿色荧光,而 BLT1-like1 和 BLT1-like2 融合表达的细胞,细胞边缘存在显著绿色荧光,而胞质中荧光较弱,说明这 2 个受体能定位在细胞膜上(图 4)。

2.4 BLT1-like 受体与抗体的相互作用

通过将 BLT1-like 蛋白在 CHO 细胞中进行表达,然后对细胞全蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting,考察了 BLT1-like 蛋白与人源 BLT1 多克隆抗体之间的相互作用(图 5)。表达 BLT1-like1 和 BLT1-like2 的 CHO 细胞全蛋白与人源 BLT1 多克隆抗体具有明显的特异性相互作用,而对照组和蛋白 Marker 与相应抗体没有可见的相互作用。

2.5 BLT1-like 基因在胚胎发育过程中的表达分析

在斑马鱼胚胎发育早期,基因 *BLT1-like1* 与 *BLT1-like2* 的表达呈现一定程度的相似性,表现为急剧上调后迅速下调。基因 *BLT1-like1* 的表达在 12 h 发生显著上调,表达量上升至 1 h 的 18 倍左右,之后便迅速下降,但表达量依旧维持在 1 h 的 5 倍以上(图 6);而 *BLT1-like2* 在前 12 h 的表达变化不显著,在 24 h 表达量发生显著变化,约上升至 1 h 的 34 倍,并在 48 h 进一步上调表达,之后便急剧下降,降至发育 1 h 的表达水平。

2.6 BLT1-like 基因在成鱼组织中的表达分布

2 个基因在肠道、皮肤和眼睛中的相对表达量均较低,而在肝脏和心脏中的表达量则较高(图 7)。同时 *BLT1-like1* 基因在鳃中具有最高的表达量,约为肠中的 9 倍,而 *BLT1-like2* 基因在肝脏的表达量最高,约为肠中的 5 倍。

```

1  AGT CAG AGC TGT GAT TCT CTG AAA CTG GAC AAC ATG AAC AGT TCC TCT CTA TCT GGT GAG ACT GAC GCA GAG CAG GAT GGT TGG TCG ACT 90
1  M N S S S L S G E T D A E Q D G W S T 19
91  ACA GGG AGC ACT GCT GCC TGT GTG ATC CTG GCT GTG TGT TTT CTA GTG GGC ACC CCG GGG AAC CTG CTG GTG TGG ACC ATC CTG AAG 180
20  T G S T A A C V I L A V C F L V G T P G N L L V V W T I L K 49
181 CAT GTA AAA CAG CGT TCA CAC ACG GTG CTG CTC ATC CTT CAT CTG TCC ATT GCA GAC CTT CTG GTG CTG ATC ACC CTG CCG CTG TGG ATC 270
50  H V K Q R S H T V L L I L H L S I A D L L V L I T L P L W I 79
271 TAC CTG CTG GCC CGG TCC TGG GTG TTC GGA AAG GCT GCC TGT AAA GCC ATG GTC TAC ATC ATC TAT TCC TGC ATG TAC AGC AGC GTC TTC 360
80  Y S L A R S W V F G K A A C K A M V Y I I Y S C M Y S S V F 109
361 ATC ATC ACC ATC ATG AGT GTG GAG CGA TTC CTG GCT ATC AGG TAC CCA TTC AAG ATG CTG TCC TGG AAA AAT GAG ACG GCC ATG TTC AGA 450
110 I I T I M S V E R F L A I R Y P F K M L S W K N E T A M F R 139
451 CTA CTG CTA GTG ACC TGG ATC CTG TCA TTA CTT TTG GGG AGT CCA GTC ATC CTG ACC CAG TCT TTA GAT GAT GAG GAT GAT GGC ACA GGA 540
140 L L L V T W I L S L L L G S P V I L T Q S L D D E D D G T G 169
541 CAC TGC CTG CAC CGG GTC TAC AAC TCC TTG TCT TTT GAA GTC TTT TGT ATG TGT TTG GAG ACT CTT CTT GGC TTT GTC ATT CCA TTT TTT 630
170 H C L H R V Y N S L S F E Y F C M C L E T L L G F V I P F F 199
631 ACA CTT GGC ATC TGT TAC TGC CAA GTT GCC GGA CAG CTG CGC ATG GAG GTC GGC AAG AAG AAA TCC GTT TTC CTC ATT GGT GGA 720
200 T L A I C Y C Q V A A Q L R K V R F R A K K K S V F L I G G 229
721 GTG GTC GTG GCC TTC ATT TTG TGT TGG CTA CCT CAT CAT GTC CTT AAT GTA ATA AGT CTG GTG GAT ATT CTA AGA GGA GAA TCA GAA GAA 810
230 V V V A F I L C W L P H H V L N V I S L V D I L R G E S E E 259
811 GCA TCT GCT ATA TCA GAT AGC GCT ATC TTC ATT TTT GGA TCT CTT GCT TTT ATA AGT AGC TCA GTC AAC CCT GTG TTG TAC GCT TTT GCT 900
260 A S A I S D S A I F I F G S L A F I S S S V N P V L Y A V C F 289
901 TCC AGA ACC TTC CAT GGA AGT CTG AAG AAG GCA GGG ATA GTG AAG CTG TTT CAA GAC TTG GGA ACA CAA ACA CTT CAA ATG AAA GAA GAG 990
290 S R T F H G S L K K A G I V K L F Q D L G T Q T L Q M K E E 319
991 GCC TTG CAG GGT GGT GGA CCG CAG GAT GGA AAT AAC CTG GAA AGT CCT GTT GAT GAA CAG TAG TTA GAA GTT TGG ATA TAT TTG AAA TTG 1080
320 A L Q G G G P Q D G N N L E S P V D E Q * 339
1081 TCA AAT TTT TCA GAT TAC ATA TAT TTG GTT TTC TTT TTA GGT AAA TAA TTG TTT GTT CGA AAT GGT CAA AAT GGC TTG CAT CTT AAA TGG 1170
1171 CTA AAG CTA GTC AGA TGC CAT TAT ATC ATG ATT TAG TTT TTT GTA ATC GAC AAT GTT GAA GTG TTA TAT TTT ACA CCT TTG TGC ATG TTC 1260
1261 TTT AAC TGC CAC AAT ATA TGT TAT AAT TAA TGT TGT TTA AAT GAC AGG ATG TTT TGT TTT TTT ATA GTT AAA GGA TTT TAG ATG TCA AAT 1350
1351 ATT ATT TCA AAT CTT TGT GAT CAG TTT TGT TCA TTT ACA TGA TTT TAT GAA AGT TGT TTA AAT GCC ATA TTA AAT CTG TAT 1431

```

图 1 *BLT1-like1* 的全长 cDNA 序列和相应的氨基酸序列

* 表示终止密码子; polyA 加尾信号用黑体和下划线标识; 跨膜结构用下划线标识, 分别标注为 TM1 ~ 7; 糖基化位点用黑体加阴影标识, 下同

Fig. 1 Full-length cDNA sequence and corresponding amino acids sequence of *BLT1-like1*

Asterisk indicates the stop codon; polyA tail signal is bold and underlined; trans-membrane domains are underlined and designated as TM1-7; N-linked glycosylation sites are shaded and bold, the same below

```

1  AA GGA AAC ATG AAC GCT ACG GCG AAT CTT CAG GGA GAC GAG GAG ACC GAG CTG GGC TTG GTG GGG GCC TGT GTG ATC CTG GCC GTG TGT TTT 92
1  M N A T A N L Q G D E E T E L G L V G A C V I L L A V C F 28
93  ATG GTG GGC ACA CCA GGA AAC CTG CTA GTG GTC TGG ACC ATC CTG AAG CAT GTA AAA CAG CGT TCA CAC ACG GTG CTG CTC ATC CTC CAT 182
29  M V G T P G N L L V V W T I L K H V K Q R S H T V L L I L H 58
183 CTG GCC GCC GCT GAC CTT ATG GTG CTG ATC ACC CTG CCG CTG TGG ATC TAC TCG CTG GCC CGG TCC TGG GTG TTC GGA AAG GCT GCC TGT 272
59  L A A A D L M V L I T L P L W I Y S L A R S W V F G K A A C 88
273 AAA GCC ATG GTC TAC ATC ATC TAT TCC TAC ATG TAC AGC AGC GTC TTC ATC ATT ACC GTC ATG AGT GTG GAG CCA TTC CTG GCC GTC AGG 362
89  K A M V Y I I Y S Y M Y S S V F I I T V M S V E R F L A V R 118
363 TAC CCA TTC ATC TCC ACC TGG AGA AGA AAA GTA CTA AAC AAG GTG CTT CTG ATA ATA TGG ATT GTT TCA TTT CTG CTG AGC ATT 452
119 Y P F I S I T W R R K Q V L N K V L L I I W I V S F L L S I 148
453 CCC ATT ATC TTA ACT CAC AAT CTG GGG GAT GTT AAT GGA CAC GAT CAA TGC ATT TTC AGG GAA TAC GAG TCT GAC ACC CAG GAG GCT GTT 542
149 P I I L T H N L G D V N G H D Q C I F R E Y E S D T Q E A V 178
543 TTG CTT ATT TTA GAA ACT CTT ATA GGT TTC ATC GTC CCC TTT TTA ACT TTG CTG GTC TGT IAT GGC TGC CTC TGT AGT CGC ATA GTG CAG 632
179 L L I L E T L I G F I V P F L T L L V C Y G C L F S R I A V R 208
633 ATG AAC TTC AAG TCC AAG CCA GGA AAT TCC ACA GTT TTG ATC TGC AGC GTG GTG ATG TTT GCT CTG TGC TGG ATC CCT CAT CAC ATA GGC 722
209 M N F K S K R K S T V L I C S V V V M F A L C W I P H H I G 238
723 AAC ATT CTT TCT CTC ATT TCA CTG GCA ATC AAG CAA TCA AAC CCA GAC CTG GCG CAA AGT TTG GAA GAC ATT TGT GCC ACA ATG GGC ATT 812
238 N I L S L I S L A I K Q S N P D L A Q S L E D I C A T M G I 268
813 ATA GCA GGA GCC CTG GTA TTT GTT AGC AGC TCT GTC AAT CCA GTG CTC TAT GTG CTC GCT GCA CGA ACC TTC CGC AGC TCA CTT CGA GAA 902
268 I A G A L V F V S S S V N P V L Y V L A A R T F R S S L R E 298
903 ACG GGG ATA CAG AAG CTG TTC CAG CAT CTG TCC AGT GCT GTG TCA GGA GAA GGG AAT AAG GAG TTA TCA TTT GTG TCC AAA AGA CAA AGT 992
298 T G I Q K L F Q H L S S A V S G E G N K E L S F V S K R Q S 328
993 TCA CAC ACC ACC ACC AAC TCA CAG TGT CTC ACA GAC TCA AAA AGT CAA GAC GTG GCA GTG GAA TCA TGC GTC AGT ACT GCA GAC TGA CCC 1082
328 S H T T T N S Q C L T D S K S Q D V A V E S C V S T A D * 356
1083 TAT CAG GTG TTT CAC ACC CAG GAC TGA ACA ATA TTA GGC ATT TAA CTA TTG TTT CTC AAG CAG GAG TGC ATG AAG CTT TTA AAT GTA GGA 1172
1173 GTT GTA TTC AAA TGC ACA CGT TTA AAT CAA GTA AAA CAT TTG CTT GTG TCT 1223

```

图 2 *BLT1-like2* 的全长 cDNA 序列和相应的氨基酸序列

Fig. 2 Full-length cDNA sequence and corresponding amino acids sequence of *BLT1-like2*

表 3 BLT1-like 蛋白与其他序列间的一致性(右上)和相似性(左下)

Tab.3 Identities (top right) and similarities (down left) between BLT1-like and sequences selected

基因来源 gene source	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. BLT1-like1		51.9	41.5	31.7	30.6	33.3	32.4	31.7	31.1	47.0	47.1	30.2
2. BLT1-like2	70.2		56.1	33.3	30.3	32.6	31.8	30.1	32.0	61.6	62.1	31.2
3. 亚马逊花鲈 <i>P. formosa</i>	62.3	72.9		28.2	28.4	28.3	30.0	30.4	28.5	66.2	60.4	28.7
4. 牛 <i>B. taurus</i>	59.3	55.9	50.9		39.7	72.3	78.5	40.6	39.8	28.2	30.3	40.7
5. 斑马鱼 <i>D. rerio</i>	52.6	53.4	50.4	56.8		38.2	39.5	57.2	57.6	29.3	32.1	56.4
6. 小鼠 <i>M. musculus</i>	59.0	54.8	49.9	82.9	58.9		76.8	40.1	40.3	30.0	30.1	41.1
7. 人 <i>H. sapiens</i>	56.0	54.5	50.6	85.5	58.4	84.4		40.3	42.1	30.1	32.1	40.7
8. 大黄鱼 <i>L. crocea</i>	53.0	52.7	55.0	60.0	75.3	59.7	60.0		77.2	29.5	29.8	74.7
9. 尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	54.8	55.9	53.7	58.9	76.3	61.8	61.6	85.2		30.3	31.3	72.4
10. 青鳉 <i>O. latipes</i>	68.4	79.8	78.6	53.2	51.3	52.9	53.7	53.5	55.4		67.0	29.4
11. 大西洋鲑 <i>S. salar</i>	67.3	79.5	74.9	53.7	50.5	54.8	55.4	50.9	54.3	83.4		30.4
12. 大菱鲆 <i>S. maximus</i>	55.6	55.1	54.0	61.3	72.9	61.3	62.1	83.9	84.7	54.3	53.8	

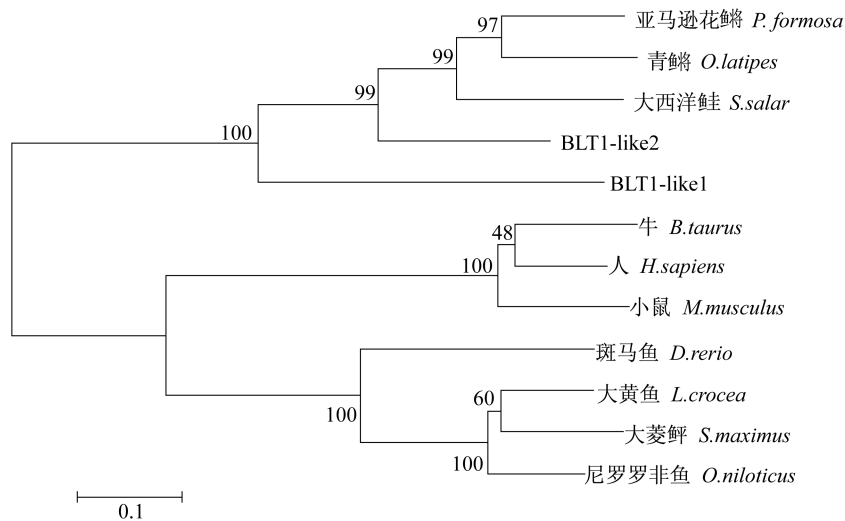


图 3 斑马鱼与其他物种的 BLT1 进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of BLT1 from zebrafish and other species

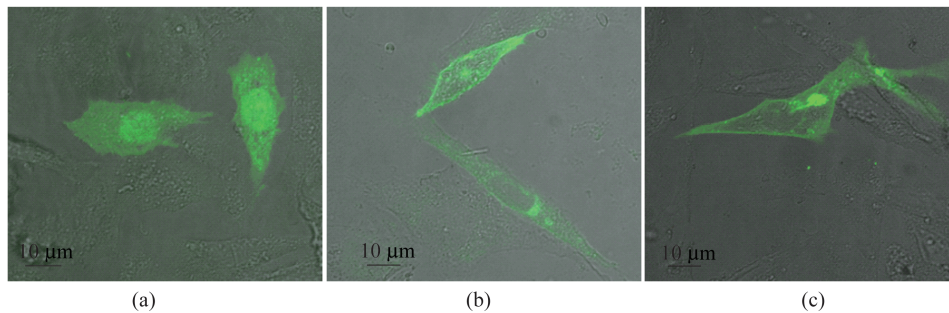


图 4 BLT1-like1 和 BLT1-like2 的亚细胞定位

(a) 对照组, 转染空载 pEGFP-N1 质粒的 CHO 细胞; (b) 转染重组 pEGFP-N1-BLT1-like1 质粒的 CHO 细胞; (c) 转染重组 pEGFP-N1-BLT1-like2 质粒的 CHO 细胞

Fig.4 Subcellular localization of BLT1 and BLT2

(a) control group, CHO cells transfected with plasmid pEGFP-N1; (b) CHO cells transfected with recombinant plasmid pEGFP-N1-BLT1-like1; (c) CHO cells transfected with recombinant plasmid pEGFP-N1-BLT1-like2

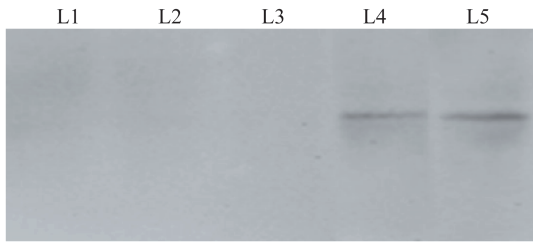


图 5 *BLT1-like1* 和 *BLT1-like2* 与人 *BLT1* 抗体的相互作用

L1: 蛋白 marker; L2: CHO 细胞; L3: 转质粒 pcDNA3.1 (+) 的 CHO 细胞; L4: 转重组质粒 pcDNA3.1 (+)-*BLT1-like1* 的 CHO 细胞; L5: 转重组质粒 pcDNA3.1 (+)-*BLT1-like2* 的 CHO 细胞

Fig. 5 The interaction of *BLT1-like1* and *BLT1-like2* with human *BLT1* antibodies

L1: protein marker; L2: CHO cells; L3: CHO cells transfected with plasmid pcDNA3.1 (+); L4: CHO cells transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1 (+)-*BLT1-like1*; L5: CHO cells transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1 (+)-*BLT1-like1*

3 讨论

本研究采用 SMART RACE 克隆技术获得了 *BLT1-like1* 和 *BLT1-like2* 2 个 *BLT1-like* 基因的全长 cDNA 序列,其编码的蛋白均具有典型的 G 蛋白偶联受体的特征,并且和人 *BLT1* 一样属于 G 蛋白偶联受体中的视紫红质蛋白亚族。细胞的亚定位实验表明这 2 个受体都具有较好的膜定位功能。这与 *BLT1* 作为细胞膜受体,接收胞外信号的特点相一致。并且这 2 个受体都可以与人 *BLT1* 抗体发生特异性相互作用,说明它们的某些结构域具有一定的相似性。以上发现都进一步说明这 2 个 *BLT1-like* 受体与人 *BLT1* 具有一定程度的相似性。

在胚胎发育过程中,2 个 *BLT1-like* 基因的表达量在发育的 3 d 内都发生了显著的变化,均呈现先急剧上调后迅速下调的趋势,表明其在斑马鱼胚胎早期的发育过程中可能具有相当重要的功

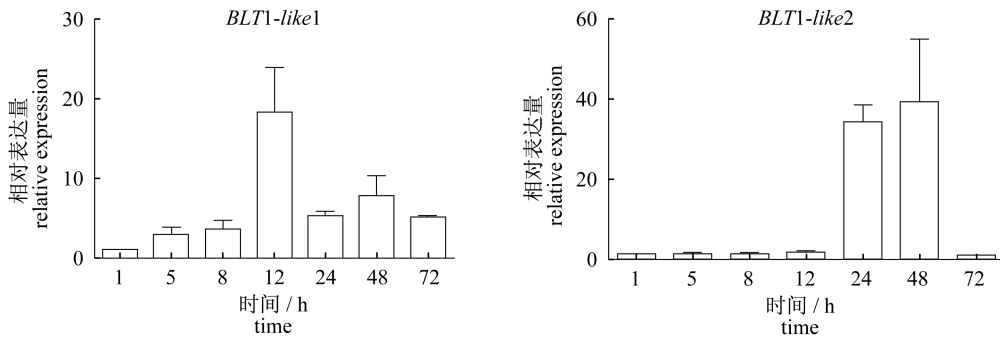


图 6 *BLT1-like1* 和 *BLT1-like2* 在胚胎发育过程中相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *BLT1-like1* and *BLT1-like2* during embryo development

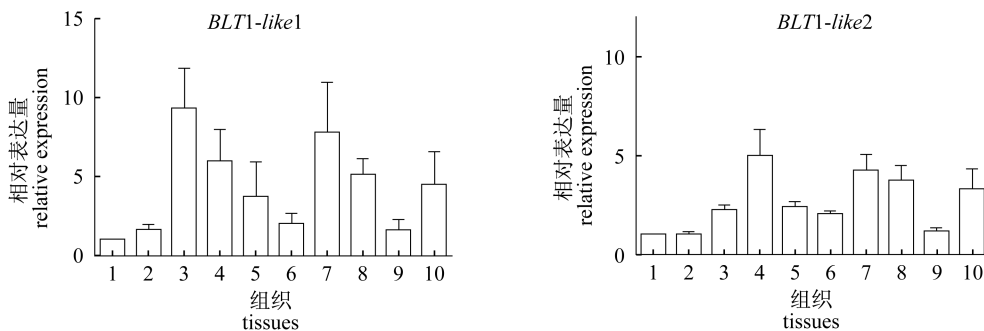


图 7 *BLT1-like* 基因的组织表达分布

1. 肠道; 2. 皮肤; 3. 鳃; 4. 肝; 5. 脾; 6. 肾; 7. 心; 8. 肌肉; 9. 眼睛; 10. 脑

Fig. 7 Tissue distributions of *BLT1-like* genes

1. intestine; 2. skin; 3. skill; 4. liver; 5. spleen; 6. kidney; 7. heart; 8. muscle; 9. eye; 10. brain

能。与此结果相似的是, Okuno 等^[20] 通过干扰 zBLT1 的表达以及阻断白三烯 B₄ 的生物合成证明了此基因在斑马鱼原肠胚发育期中的重要作用。以上结果说明这 2 个 BLT1-like 受体可能与 zBLT1 一样在斑马鱼胚胎发育中起着重要作用。然而, 人体中 BLT1 的主要功能在于趋化淋巴细胞至感染部位, 并且 BLT1 缺失的小鼠并不存在胚胎发育的问题^[23], 因此其在胚胎发育中的作用可能是鱼类所特有的, 这也是 BLT1 在感染和免疫之外被发现的新功能。

组织表达结果显示 *BLT1-like1* 和 *BLT1-like2* 基因在肠道、皮肤和眼睛中的相对表达量较低, 而在肝脏和心脏的表达量较高。*BLT1-like1* 基因在鳃中的表达量最高, 并在心脏中具有较高表达量, 而鳃和心脏都是富含血细胞的器官, 从而间接地说明 *BLT1-like1* 基因在血液细胞中具有较高的表达量。与此相一致的是, 人类的 *BLT1* 在外周血细胞中也具有较高的表达量^[9]。与 *BLT1-like1* 基因不同, *BLT1-like2* 基因在肝脏和心脏中具有较高的表达量, 而在鳃中的表达量相对较低。在鳃中表达量的显著差异说明二者可能存在某些差异性的功能, 虽然二者在基因组上的位置相邻以及编码的蛋白具有较高的一致性 (51.9%)。上述结果表明, *BLT1-like1* 和 *BLT1-like2* 虽然同为 BLT1-like 受体, 但在功能上可能存在一定程度的差异。

本研究成功克隆到了 2 个 *BLT1-like* 基因, 其位于同一基因簇上, 且编码的 2 个蛋白之间具有较高的相似度。这 2 个基因编码的 2 个蛋白具有与人 BLT1 受体相似的特征, 并在斑马鱼胚胎发育过程中可能起着重要的作用。该结果进一步说明斑马鱼的 *BLT1* 基因可能与其 *BLT2* 基因一样存在多样性, 并为其他鱼类的 *BLT1* 基因的克隆和鉴定提供借鉴。

参考文献:

- [1] Peters G M, Henderson J W R. Leukotrienes [J]. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357 (18) : 1841 - 1854.
- [2] Morgan E L, Maskrey B H, Rowley A F. At what stage in metazoan evolution did leukotriene generation first appear? —key insights from cartilaginous fish [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29 (1) : 53 - 59.
- [3] Griffiths R J, Pettipher E R, Koch K, *et al.* Leukotriene B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92 (2) : 517 - 521.
- [4] Turner C R, Breslow R, Conklyn M J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* effects of leukotriene B₄ antagonism in a primate model of asthma [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97 (2) : 381 - 387.
- [5] Cole A, Pilkington B, McLaughlan J, *et al.* Mucosal factors inducing neutrophil movement in ulcerative colitis: the role of interleukin 8 and leukotriene B₄ [J]. *Gut*, 1996, 39 (2) : 248 - 254.
- [6] Iversen L, Kragballe K, Ziboh V. Significance of leukotriene-A4 hydrolase in the pathogenesis of psoriasis [J]. *Skin Pharmacology and Physiology*, 1997, 10 (4) : 169 - 177.
- [7] Jala V R, Haribabu B. Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators [J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25 (6) : 315 - 322.
- [8] Samuelsson B, Dahlen S E, Lindgren J A, *et al.* Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects [J]. *Science*, 1987, 237 (4819) : 1171 - 1176.
- [9] Yokomizo T, Izumi T, Chang K, *et al.* A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis [J]. *Nature*, 1997, 387 (6633) : 620 - 624.
- [10] Chen X S, Shelter J R, Johnson E N, *et al.* Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene [J]. *Nature*, 1994, 372 (6502) : 179 - 182.
- [11] Prete A D, Shao W H, Mitola S, *et al.* Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B₄ receptors: a role for LTB₄ in up-regulation of CCR7 expression and function [J]. *Blood*, 2007, 109 (2) : 626 - 631.
- [12] Miyahara N, Takeda K, Miyahara S, *et al.* Leukotriene B₄ receptor-1 is essential for allergen-mediated recruitment of CD8⁺ T cells and airway hyperresponsiveness [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 174 (8) : 4979 - 4984.
- [13] Tager A M, Bromley S K, Medoff B D, *et al.* Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment [J]. *Nature Immunology*, 2003, 174 (8) : 982 - 990.
- [14] Subbarao K, Jala V R, Mathis S, *et al.* Role of leukotriene B₄ receptors in the development of

- atherosclerosis; potential mechanisms [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004,24(2):369-375.
- [15] Shao W H, Prete A D, Bock C B, *et al.* Targeted disruption of leukotriene B₄ receptors BLT1 and BLT2: acritical role for BLT1 in collagen-induced arthritis in mice [J]. *The Journal of Immunology*, 2006,176(10):6254-6261.
- [16] Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, *et al.* A Second leukotriene B₄ receptor, BIT2 anew therapeutic target in inflammation and immunological disorders [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192(3):421-432.
- [17] Murphy P M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors [J]. *Annual Review of Immunology*, 1994,12(1):593-633.
- [18] Tryselius Y, Nilsson N E, Kotarsky K, *et al.* Cloning and characterization of cDNA encoding a novel human leukotriene B₄ receptor [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 274(4):377-382.
- [19] Sun Z H, Jia S J, Meng A M. Zebrafish: swimming in life sciences [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2006,18(5):431-436. [孙智慧,贾顺姬,孟安明. 斑马鱼:在生命科学中畅游. *生命科学*, 2006,18(5):431-436.]
- [20] Okuno T, Ishitani T, Yokomizo T. Biochemical characterization of three BLT receptors in zebrafish [J]. *PloS One*, 2015,10(3):e0117888.
- [21] Zhang H, Fei C, Wu H Z, *et al.* Transcriptome profiling reveals Th17-like immune responses induced in zebrafish bath-vaccinated with a live attenuated *Vibrio anguillarum* [J]. *PloS One*, 2013,8(9):e73871.
- [22] Campanella J J, Bitincka L, Smalley J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003,4(1):29.
- [23] Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, *et al.* Absence of leukotriene B₄ receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th2-type immune responses [J]. *The Journal of Immunology*, 2005,175(7):4217-4225.

Cloning and expression analysis of *BLT1-like* genes from zebrafish (*Danio rerio*)

TANG Yufei¹, LIU Xiaohong^{1,2}, CHANG Xinyue¹, WU Haizhen^{1*}, ZHANG Yuanxing^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Biomanufacturing Technology, Shanghai 201424, China)

Abstract: In order to research the functions of BLT1 in the development and vaccination process of zebrafish, two leukotriene B₄ receptor 1-like (BLT1-like) genes, *BLT1-like1* and *BLT1-like2*, from zebrafish were cloned, which encoded 339 and 356 amino acids, respectively. Through sequence and structure analysis, it was found that both of the two proteins belong to rhodopsin subfamily of G protein coupled receptors (GPCR), with typical features of GPCR and have a moderate identity of above 31% with human BLT1. Additionally, when fused with enhanced green fluorescent protein (EGFP) and expressed in CHO cells, a good membrane-bound property was found. And Western blotting experiment verified their specific interactions with human BLT1 polyclonal antibodies. Besides, the results of RT-qPCR showed that during the embryo development of zebrafish, the expression of *BLT1-like1* was up-regulated significantly at 12 h, which was 18 times higher than that of 1 h. While the expression level of *BLT1-like2* changed sharply at 24 h, which was 34 times higher than that of 1 h. In addition, both of the two genes had a relatively high expression level in the heart and liver, while with a relatively low expression level in the intestine, skin and eye. Conclusively, our study indicates that there might exist more than one *BLT1* gene in zebrafish and this will be helpful to clone and characterize *BLT1* genes from other fishes.

Key words: zebrafish; BLT1; gene cloning; gene expression

Corresponding author: WU Haizhen. E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Funds of China (31372550); Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-50-G07)