

## 马氏珠母贝 *TLR6* 基因的克隆、序列分析与表达

吴羽媛<sup>1,2</sup>, 郭志颖<sup>1</sup>, 梁海鹰<sup>1,2\*</sup>, 林丽旋<sup>1</sup>, 郝瑞娟<sup>1,2</sup>, 焦钰<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 为了探究 *TLR6* (Toll like receptor 6) 在马氏珠母贝免疫反应中的作用, 实验采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得了马氏珠母贝 *TLR6* 基因 (*Pm-TLR6*) cDNA 全长序列, 并且运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测了 *Pm-TLR6* 在马氏珠母贝各组织中的表达情况、哈维氏弧菌刺激后和植核移植后血淋巴中的表达模式。结果显示: *Pm-TLR6* cDNA 全长 2295 bp, 其中 5' 非编码区 (UTR) 长 94 bp, 3' UTR 长 89 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 2112 bp, 编码 703 个氨基酸; 多序列比对结果表明物种间 *TLR6* 具有较高的保守性; *Pm-TLR6* 具有跨膜域、富含亮氨酸的重复序列 (LRRs) 和 TIR 域, 符合 TLRs 家族特征。qRT-PCR 数据分析表明, *Pm-TLR6* 在马氏珠母贝肝胰脏、血细胞、鳃、性腺、闭壳肌、外套膜中均有表达, 其中肝胰脏中表达量最高; 哈维氏弧菌刺激后, *Pm-TLR6* 在 2 h 表达上调, 约为对照组 (0 h) 的 9 倍, 随后的 6 h 恢复至正常水平, 直至 16 h 表达水平开始回升并于 24 h 达到最大表达量, 是对照组的 29.4 倍, 具有显著性差异; 植核移植实验结果显示 *Pm-TLR6* 在植核后 5 和 10 d 表达水平没有显著性变化, 15 和 20 d 表达量出现上升趋势, 但差异不显著, 最后于 30 d 达到最大值, 约为空白对照组 (0 d) 的 5 倍, 具有显著性差异。研究表明, *Pm-TLR6* 可能在马氏珠母贝免疫防御反应中担任着重要的角色。

**关键词:** 马氏珠母贝; *TLR6*; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** Q 785; S 968.3

**文献标志码:** A

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 属于模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 家族的一员, 通过特异性的识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 并经 MyD88 依赖性的信号转导途径或 MyD88 非依赖的信号转导途径启动先天性免疫反应, 激发适应性免疫<sup>[1-3]</sup>, 是机体防御病原微生物的第一道屏障<sup>[4]</sup>。TLR 家族根据基因结构和氨基酸序列, 可分为 6 个亚家族: TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9 和 TLR11 亚家族, 其中 TLR2 亚家族包括 TLR1、TLR2、TLR6 和 TLR10; TLR9 亚家族包括 TLR7~TLR9; TLR11 亚家族是最新在小鼠 (*Mus musculus*) 基因组中发现的

TLR11~TLR13<sup>[5]</sup>。迄今, 在哺乳动物中至少已发现了 13 个 TLRs (TLR1~TLR13), TLR18~TLR20、TLR23~TLR26 只在鱼类发现<sup>[5]</sup>, 而在马氏珠母贝中, 目前已确定了 TLR2<sup>[6]</sup>、TLR3<sup>[4]</sup> 和 TLR4<sup>[7]</sup>。不同的 TLRs 识别各自特异 PAMPs, 激活不同的免疫途径, 抵抗微生物感染<sup>[8]</sup>。TLR13 可以识别一段细菌 23S rRNA 序列<sup>[9]</sup>; TLR9 识别病毒和细菌的非甲基化鸟嘌呤二核苷酸<sup>[10]</sup>; TLR6 能够与 TLR2 形成二聚体复合物来共同识别革兰氏阴性菌成分、肽聚糖、支原体脂蛋白、酵母多糖等, 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[11-12]</sup>。一系列研究表明 TLR6 在机体抵抗微生物的感染过程中担任着重要的角色。马链球菌马亚种 (*Streptococcus equi*) 感

收稿日期: 2016-11-24 修回日期: 2017-03-28

资助项目: 国家自然科学基金 (31472306); 广东省科技计划项目 (2012A031100010); 广东省海港建设与渔业产业发展专项 (A201608B15); 国家级大学生创新创业训练项目 (201410566005); 广东海洋大学大学生创新创业训练项目 (CXXL2014012)

通信作者: 梁海鹰, E-mail: zjlianghy@126.com

染小鼠巨噬细胞后, TLR1、TLR2和TLR6表达上调, 并促进细胞分泌白细胞介素2(IL-2)和白细胞介素12(IL-12)<sup>[13]</sup>; 基因敲除小鼠实验结果显示白细胞中TLR2和TLR6能够识别呼吸道合胞病毒激活机体天然免疫系统的信号, 促进白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein 1, CCL1)及单核细胞趋化蛋白5(CCL5)分泌<sup>[14]</sup>; 日本血吸虫感染小鼠肝脏后, 小鼠肝组织中的TLR6蛋白表达增加, 暗示了肝组织中的TLR6参与了日本血吸虫感染小鼠血吸虫病发生过程<sup>[15]</sup>。

马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)是我国重要的海水珍珠贝, 在美容、装饰、养生、医药等领域具有很大的价值。近年来, 我国沿海水质的污染等问题导致马氏珠母贝各种病害频繁发生, 严重阻碍了养殖业的发展<sup>[16]</sup>。同时马氏珠母贝通过植核移植技术生产珍珠, 植核过程中带入大量的病原体引起受体贝的强烈免疫应答而导致吐核甚至死亡<sup>[17]</sup>。鉴于TLR6在机体防御病原微生物中的作用, 本实验通过RACE技术获得*Pm-TLR6* cDNA全长序列并进行了序列分析, 同时利用qRT-PCR技术分析其在马氏珠母贝各组织的表达情况以及哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和植核移植刺激后不同时间点血淋巴中的表达模式, 初步研究了TLR6在马氏珠母贝中的免疫学功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及菌种

实验所用贝为马氏珠母贝(2龄贝), 取自于广东省湛江市徐闻养殖场。取外套膜、闭壳肌、肝胰脏、性腺、鳃和血淋巴作为本次实验样品, 所取血淋巴经4℃, 1500 r/min, 离心15 min弃上清后加入1 mL Trizol试剂; 所取样品均于液氮中速冻后放于-80℃冰箱保存备用。实验克隆载体为*pEASY*<sup>®</sup>-Blunt Simple Cloning Kit, 所用的感受态细胞为*Trans1-T1 Phage Resistant*, 均购自全式金公司。刺激实验所用哈维氏弧菌由本实验室保存。

### 1.2 实验试剂

DEPC、Amp购自Sangon Biotech; RACE试剂盒购自Clontech公司; Primer star、Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH)、DNA Marker等购

自TaKaRa公司; SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix购自Thermo Fisher Scientific公司; Trizol购自Thermo Fisher公司。

### 1.3 实验方法

总RNA提取及第一链cDNA的合成 运用Trizol法提取马氏珠母贝各组织的总RNA, 采用1%琼脂糖凝胶电泳和Nano Drop ND1000紫外分光光度计分别对其进行完整性和纯度分析。中间片段用cDNA模板的制备参照Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH)说明书操作。5'和3'RACE模板的合成按照SMARTer<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification kit的说明书进行。

RACE技术扩增*Pm-TLR6*全长 以马氏珠母贝植核移植血细胞转录组文库为基础, 获得注释为*TLR6*的unigene序列, 并设计特异性引物(表1)。采用巢式PCR扩增法进行*Pm-TLR6* cDNA全长扩增, PCR扩增反应体系为10  $\mu$ L: cDNA模板 0.4  $\mu$ L, 5'或3'末端outer引物(10  $\mu$ mol/L)为0.4  $\mu$ L, UPM引物(10  $\mu$ mol/L)为0.4  $\mu$ L, 灭菌的ddH<sub>2</sub>O 3.8  $\mu$ L, Primer star mix 5  $\mu$ L。PCR反应程序: 95℃预变性5 min; 98℃变性15 s, 65~70℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃保温10 min; 4℃保存。第二轮巢式PCR扩增引物为相应的inner和NUP, 模板为第一轮PCR扩增产物, 退火温度根据不同引物的理论T<sub>m</sub>值调整。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的基因片段导入到*pEASY*<sup>®</sup>-Blunt Simple Cloning Kit载体中, 最后转化到*Trans1-T1 Phage Resistant*感受态细胞中, 挑取阳性单克隆菌落进行菌落PCR检测, 目的菌送广州生工测序。

生物信息学分析 使用DNAMAN软件对测序序列和已知的unigene序列进行比对拼接, 得到*Pm-TLR6* cDNA全长序列。使用NCBI数据库的ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)软件预测该基因的ORF并推导其氨基酸序列。使用ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线分析该氨基酸序列的理化性质; 使用ExPASy-ProtScale (<http://web.expasy.org/prot-scale/>)预测其疏水性; 采用Softberry(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=psite&group=programs&subgroup=proloc>)网站对其进行功能位点预测; 采用SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测其信号肽; 使用SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1))

表 1 *Pm-TLR6* 基因克隆及 qRT-PCR 所用的引物序列Tab. 1 Primer sequences used in the cloning and qRT-PCR of *Pm-TLR6*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
TLR6-5'-outer	AATTTTGCAGACCGACAAATACGTCGT	5'-RACE
TLR6-5'-inner	TCGGGTAGGGCATTACGGAGAACAG	5'-RACE
TLR6-3'-outer	TCAAAACGAGGCTATCAACGCATACCG	3'-RACE
TLR6-3'-inner	GAGATTTCTACCTGGCGATCTCATTGC	3'-RACE
TLR6-F	TTTCTGTCGCTGAGATTGTTG	Middle fragment validation 中间片段验证
TLR6-R	GCGTTGATAGCCTCGTTTTGA	Middle fragment validation 中间片段验证
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTACGAC	Colony PCR detection 菌落PCR检测
M13-R	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	Colony PCR detection 菌落PCR检测
TLR6-qPCR-F	GAGGCTATCAACGCATACCG	qRT-PCR 荧光定量PCR
TLR6-qPCR-R	ATGACCCAAGGTCTATCTGCTG	qRT-PCR 荧光定量PCR
GAPDH-F	GCAGATGGTGCCGAGTATGT	Reference genes 内参基因
GAPDH-R	CGTTGATTATCTTGCGAGTG	Reference genes 内参基因

预测结构域。通过DNAMA软件进行多序列比对; 使用Mega 6软件(Neighbor-Joining法)构建生物系统进化树。

***Pm-TLR6* 组织表达分析** qRT-PCR所用组织为马氏珠母贝的外套膜、血淋巴、鳃、肝胰脏、闭壳肌和性腺, 参照Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH)说明书操作获得cDNA模板。qRT-PCR反应体系(10 $\mu$ L): cDNA模板0.5  $\mu$ L, SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix 5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各0.4  $\mu$ L, 灭菌的ddH<sub>2</sub>O 3.7  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C预变性2 min; 95  $^{\circ}$ C变性15 s, 60  $^{\circ}$ C退火1 min, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 40个循环, 添加1个熔解曲线, 以*GAPDH*为内参基因, 每个组织进行3次重复。

**哈维氏弧菌刺激后*Pm-TLR6*在血淋巴中的表达模式** 取实验室保存的菌株复苏。按照体积比1:40加到200 mL TSB培养基中, 28  $^{\circ}$ C, 200 r/min振荡培养至对数生长期后收集菌体, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤并配制细菌悬液。将140只暂养一周的健康马氏珠母贝随机分为两组: 实验组、对照组, 每组各70只贝。采用闭壳肌注射的方法, 向实验组各个个体中注射哈维氏弧菌进行诱导, 每只注射100  $\mu$ L (浓度为1 $\times$ 10<sup>7</sup> 个/mL), 对照组注射100  $\mu$ L PBS。在注射后的0、2、6、8、12、16、24 h从各组中随机选取10只马氏珠母贝, 从闭壳肌中抽取血淋巴, 经4  $^{\circ}$ C, 1500 r/min, 离心15 min收集血细

胞, 提取RNA后反转录为cDNA进行qRT-PCR, 每个样品进行3次重复。

**植核移植刺激后*Pm-TLR6*在血淋巴中的表达模式** 实验于广东省湛江市徐闻马氏珠母贝养殖场通过植核送片手术对200只马氏珠母贝进行植核移植实验。用注射器分别随机抽取植核后0、5、10、15、20、30 d各10只贝的血淋巴, 经4  $^{\circ}$ C, 1500 r/min, 离心15 min后收集血细胞, 提取RNA, 反转录为cDNA后, 进行qRT-PCR, 每个样品进行3次重复。

**数据处理** 相对表达量采用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算。运用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 并用Duncan氏法多重比较对均值进行差异显著性检验, 显著性水平 $\alpha$ 设为0.05。

## 2 结果

### 2.1 *Pm-TLR6* 基因克隆及其序列分析

采用RACE技术得到*Pm-TLR6*的cDNA全长为2295 bp, 其中5'UTR为94 bp, 3'UTR为89 bp, 包含31 bp的polyA尾巴(图1), ORF为2112 bp, 编码703个氨基酸。预测其分子量约为81.43 ku, 等电点为8.47。

### 2.2 *PmTLR6* 氨基酸序列理化性质分析

通过SignalP 4.1在线预测其信号肽, 结果表

TCTAATACGACTCACTATAGGTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCTAATACGACTCACTATAGGGTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG 90  
TCTAATGTTGAACGAGAAGGCCGATGTCGTGGTAAATTCATGAGGATCAACTTGATATTTCTGTCGCTGAGATTGTTGAAGCAACGAT 180  
M L N E K A H V R G K F M R I N L I F L S L R F V E A T I 29  
ATTTGTAAGGCCGAAGGATGTGGACCTTGCAAATGTATAGAGGAATCTTATGTTGACTGCAGAAAATCGTTCAATGATGCTATACCAAC 270  
F V R A E G C G P C K C I E E S Y V D C R N R S M M S I P T 59  
ACTTCTACAACGACTAAAGCTGTTGATTTCAGTTTAAATTTGTTTTCAGCGTTGAGTTCCTCTTCTTTTAAATATACACAGTTACA 360  
L P T T T K A V D F S F N L F S A L S S S F L F N I S Q L Q 89  
ACTGACGAATATCAGTTTCAGACATGTGGAGTACGTTACATATCGTCTGACGCTTTACATCCTTCTGGAGTAGAAAATCTAGATAT 450  
L T N I S F R H C G V R Y I S S D A F T S F L S V E I L D I 119  
AAGTGAGAACAGCATTAGTTTCACATACTGATGGAGGCCAAAAAGGACTAGCAAATCAAGATTGACGGATTCAATATATCCAGCCT 540  
S E N S I Q F H I L M E A T K G L A N S R L T D F N I S S L 149  
GTTCTCCGTAATGCCATACCGATGGATTCTTTACGACCTCAATTCACGCCCTTGCAAACATTCGATTGTAACAATGGATTAAC 630  
F S V N A L P D G F F Q H L N S T P L S N I S I R N N G L T 179  
AAGTCTTAGAAACAGCATTGTTGCGGTCTGCAAAATTTAACTTCTGACTTAAAGTAAAGATAGACACGACCTGAACTT 720  
S L R N D V F V G L Q N L T F L D L S L N K I D S N D L N L 209  
AAGCGGATTACAGAACTACAATTTCTAACTTGCAATGAATGAACCTCAAGAGGTTCCGAAAATTTGTGACAATGAAGAATTTTCACT 810  
S G F T E L Q I L N L T M N E L K R F P K F C D N E E F S L 239  
TGTACCGAATTTACATACTTTGTTATTAGGAATGAATCAATTAAGTACTGACAGTACTCCCTATGACATGGGACATTGTTGCCAACTT 900  
V P N L H T L L L G M N S I T D T Y S L Y D M G H C L P N L 269  
GAAAGTCTCAATTTAACTACAATCCCATCAGAGTGGTTTCAGGAACTTTTCCACAATAAAAGACTTGAAAATCTTAGCCTTGC 990  
K V L N L T Y N P I R V V S G N S F S T I K D L E I L S L A 299  
GAATCTATTGCGTACGAGTGGAGTTGAAGTAACTGCTTCAACGCTCAAGTCTCAAGATATACATATCGAAAATTTTAAAGAAA 1080  
N L F A Y E V E F E V T A F N A S S L K I L H I G N I L R K 329  
ATGGCCAGAAAAGATAAATTCATCGGAATTTCCATATATTGCAAGAACTTGGAAAGAACTCGATCTTACCTTGTTCAGTGACGACTT 1170  
W P E T I N S S R I F L Y C K N L E E L D L T L F K L T Y F 359  
TAAAAGGAGGACTTACGCTAATGTTGAAGCCACTTCGAAAGCTAAAACGACTGATTTTGAAGTCTTCAAGTTTACATGAAGTCCCC 1260  
K R E D F S L M L K P L R K L K R L I L D S S S L H E V P P 389  
TGTCGAAACCTACCAGACTTAGAAGTCTTATTTTGAAGAAAATTTACATACGGCATGTAAGTAAAGAAATTTTCGAAAATAACTAA 1350  
V G N L P D L E V L I L R K N Y I R H V S K E D F R N N T K 419  
ACTGAAGCGGCTTCTATCAGTATAAATCATATAAGCGTGTACCAGAAAATCATTCCAACCTTCTTGTAGAAAATATTGAACAAAT 1440  
L K R L S I S I N H I S V F T E N S F P T F L L E N I E Q I 449  
AGACTTAGCGTCAATCCATACTTGCACCTGTGAAATAGAATGGTTTCTGGTTGGATGAAAAGACATAAAGAAAAGTGCAAAAGCTT 1530  
D L A F N P Y S C T C E I E W F L G W M K R H K E K L Q S F 479  
CCCTAAATCTATGAGTGTGATCCACAGGATCGGAAGAAAACGCCGCTATTAACATAATCCTGATAAATGAATGTCATCCTAT 1620  
P K F Y E C D S P R Y R K K T P L I N Y N P D N N E C H P I 509  
CAGCCAAATAGTATGCAATAGTATTGGAGTGGTCTCTGAGCGTTGGTCACTTCTGGATTATTATCAGGAGGATCGATGGGA 1710  
S Q Y V V M A I V F G V V S V A L V I L G F I I R R Y R W D 539  
TATCAAATATTACATTTATCTTGAAGATCAAAAACGAGGCTATCAACGCATACCGGAACAAGATGGCTACCTCTATGACGCGTTCGTTGC 1800  
I K Y Y I Y L A R S K R G Y Q R I P E Q D G Y L Y D A F V A 569  
ATACAATGCAGCAGATAGACCTTGGGTCAATGCCAACTAGTTGGTGATCTAGAGAAAAACCAATAACAATATGCCTACATGAACG 1890  
Y N A A D R P W V M S Q L V G D L E K K H Q Y K L C L H E R 599  
AGATTTCTACCTGGCGATCTCATTGCAGATCAAATACCAGAAGGTCAAGGCTAGTAGAAGATTCACTTGGTTATATCCAACAAT 1980  
D F L P G D L I A D Q I T E K V K A S R R F I L V I S N N F 629  
TGCCAAAAGCAGATGGTGTGAGTTGAGATCTTTGAGCGCAGAATCGCCTATTGGATGACGGTGCAGAATTTATAATTCCTATCTGTT 2070  
A K S R W C Q F E I F V A Q N R L L D D G A E F I I P I L L 659  
AGAGGATATAAAAGCAAGCAGATGCAACATATCTAAAATTCCTTTGAATTCGCTAATTTCTTGGAGTGGGCAACTAATATTGCTGG 2160  
E D I K A K H M S T Y L K F L L N S L T F L E W A T N I A G 689  
TAAAGAATTGTTCTCAATAAATCTGAACAAGCTATGAAAAATTAATTTGTTTCTCATTATAGCTCCATGTTTGAATTAAGATA 2250  
K E L F F N K L E Q A M K K \* 703  
AAGTTAATAATATCaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2295

图1 Pm-TLR6序列分析及编码的氨基酸序列

方框: 起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA); 波浪线: 信号肽序列; 双划线: LRR-NT和LRR-CT域; 单划线: 跨膜域; 浅阴影部分: 4个LRR域; 深阴影部分: TIR域; 小写字母: Ploy A尾

Fig. 1 Sequence analysis of Pm-TLR6

Box: initiation codon (ATG)and termination codon (TAA); Wavy lines: the signal peptide; Amino acids with double-line: LRR-NT and LRR-CT domain; Single line: the transmembrane domain; Light shades: four LRR domains; Deep shades of gray: TIR domain; Lowercase letters: ploy A

明该氨基酸序列的N-末端在第1~27位存在信号肽, 在第27~28位为切割位点(图2)。同时SMART软件分析结果显示, *Pm-TLR6*氨基酸序列在第35~66位为1个N端亮氨酸富集区(leucine-rich repeat N-terminal, LRR-NT), 分别在第189~212、266~289、371~392、393~416位含有亮氨酸重复序列(leucine rich repeats, LRRs), 第454~507位是1个C端亮氨酸富集区(leucine-rich repeat C-terminal, LRR-CT), 在第511~533位含有1个跨膜结构域, C端Toll/IL-1R同源结构域(TIR)在第563~703位氨基酸(图1、图3)。疏水性分析得知 *Pm-TLR6*氨基酸序列总平均亲水性系数为-0.042, 预测该蛋白属于亲水性蛋白, 且在第490位达到最高亲水性, 亲水指数为-2.744, 在第525位氨基酸达到最高疏水性, 疏水指数为3.322(图4)。

采用Softberry网站对其进行功能位点预测, 结果显示该氨基酸序列拥有12个糖基化位点、2个cAMP和cGMP蛋白激酶磷酸化位点、12个蛋

白激酶C磷酸化位点、9个酪蛋白激酶II磷酸化位点、4个酪氨酸激酶磷酸化位点、1个磷酸泛酰巯基乙胺附着位点、3个肉豆蔻酰化位点。

### 2.3 *Pm-TLR6*的同源分析及物种进化分析

运用NCBI在线Blastx比对, 结果示 *Pm-TLR6*氨基酸序列与长牡蛎 *TLR6* 的相似性最高, 为33%(E-value=2e-83)。将 *Pm-TLR6* 的氨基酸序列与底鳃(*F. heteroclitus*, JAQ80186.1)、人类(*H. sapiens*, BAA78631.1)、长牡蛎(*C. gigas*, EKC38225.1)和小鼠(*M. musculus*, BAA78632.1)的 *TLR6* 氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明物种间 *TLR6* 有较好的相似度(图5)。运用MEGA 6软件以马氏珠母贝的氨基酸序列和其他物种氨基酸序列构建系统进化树(表2; 图6), 结果显示 *TLR1*、*TLR6*、*TLR2* 为 *TLR2* 亚家族, 聚为一大支, 其中马氏珠母贝和长牡蛎 *TLR6* 聚为一簇; *TLR9* 亚家族聚在一支; *TLR11* 亚家族聚为一支, 结果

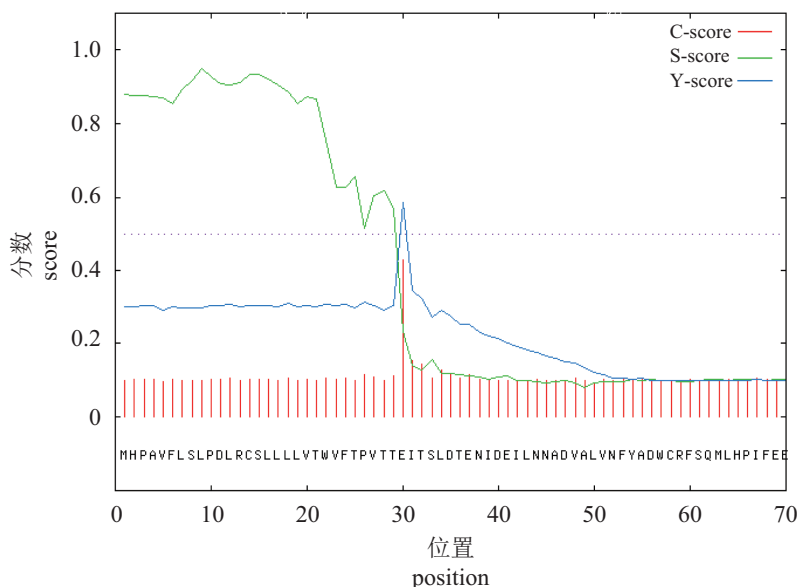


图2 *Pm-TLR6*信号肽预测

Fig. 2 Prediction of signal peptide of *Pm-TLR6*

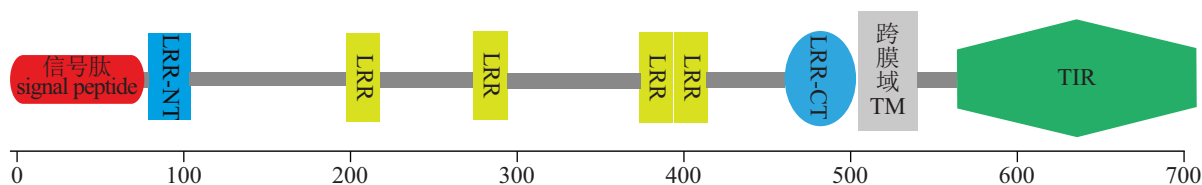


图3 *Pm-TLR6*结构域模式图

Fig. 3 The pattern diagrams of *Pm-TLR6* structural domain

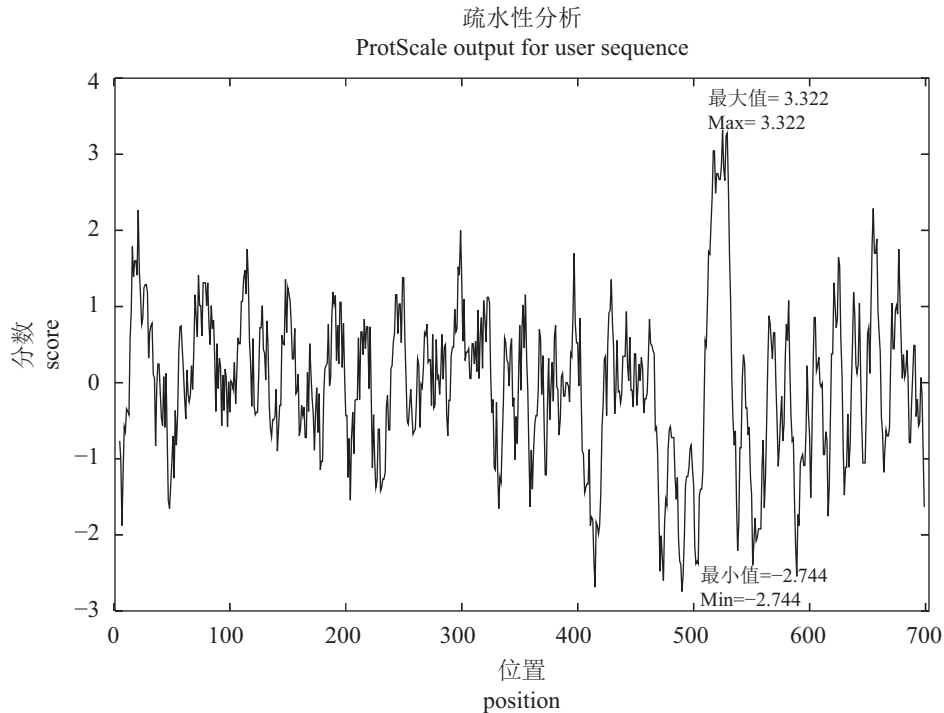


图4 *Pm-TLR6*疏水性预测

Fig. 4 Prediction of hydrophobicity of *Pm-TLR6*

与传统分类吻合。

#### 2.4 *Pm-TLR6*的组织差异表达分析

实验运用qRT-PCR技术检测*Pm-TLR6*基因在马氏珠母贝外套膜、肝胰脏、性腺、闭壳肌、鳃、血细胞中的表达情况,结果显示*Pm-TLR6*基因在各实验组织中均有表达。其中肝胰脏中表达量最高( $P < 0.05$ )(图7)。

#### 2.5 哈维氏弧菌刺激下*Pm-TLR6*在血淋巴中的时序表达

马氏珠母贝受哈维氏弧菌刺激后,取0、2、6、8、12、16、24 h血淋巴,应用qRT-PCR技术检测马氏珠母贝血淋巴中*Pm-TLR6*的表达水平,结果显示血淋巴中*Pm-TLR6*在2 h表达上调,约为对照组(0 h)的9倍,随后的6 h恢复至正常水平,直至16 h表达水平开始回升并于24 h达到最大表达量,是对照组的29.4倍,具有显著性差异( $P < 0.05$ )(图8)。

#### 2.6 植核移植刺激后*Pm-TLR6*在血淋巴中的表达情况

取植核移植后0、5、10、15、20、30 d的血淋巴,运用qRT-PCR检测*Pm-TLR6*在马氏珠母贝

植核后不同时间点的表达情况。结果表明,在植核后5和10 d *Pm-TLR6*基因表达水平没有显著性变化( $P > 0.05$ ),15和20 d表达量出现上升趋势,但差异不显著,最后于30 d达到最大值,约为空白对照组(0 d)的5倍,具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

TLR是一种进化上高度保守的I型跨膜蛋白,由胞外区、胞内区和跨膜区3部分组成,其中胞外区是富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeat, LRR)的病原结合结构域,负责识别并结合病原微生物特异的PAMPs;胞内区为TIR (Toll/IL-1 receptor domain)结构域,招募胞浆中MyD88和其他接头蛋白分子并起到起始信号转导作用;跨膜结构域负责TLRs的亚细胞定位<sup>[9, 18-19]</sup>。软件分析结果显示*Pm-TLR6*氨基酸序列具有LRRs、TIR域、跨膜域和信号肽,符合典型的TLR家族特征。TLR6多序列比对结果显示,物种间有较好的保守性,尤其是TIR结构域,暗示其在功能上的保守性。

研究某基因功能的基本手段之一是了解该基因在不同组织器官中的表达模式<sup>[20]</sup>。本实验采用qRT-PCR技术检测了*Pm-TLR6*在马氏珠母贝不

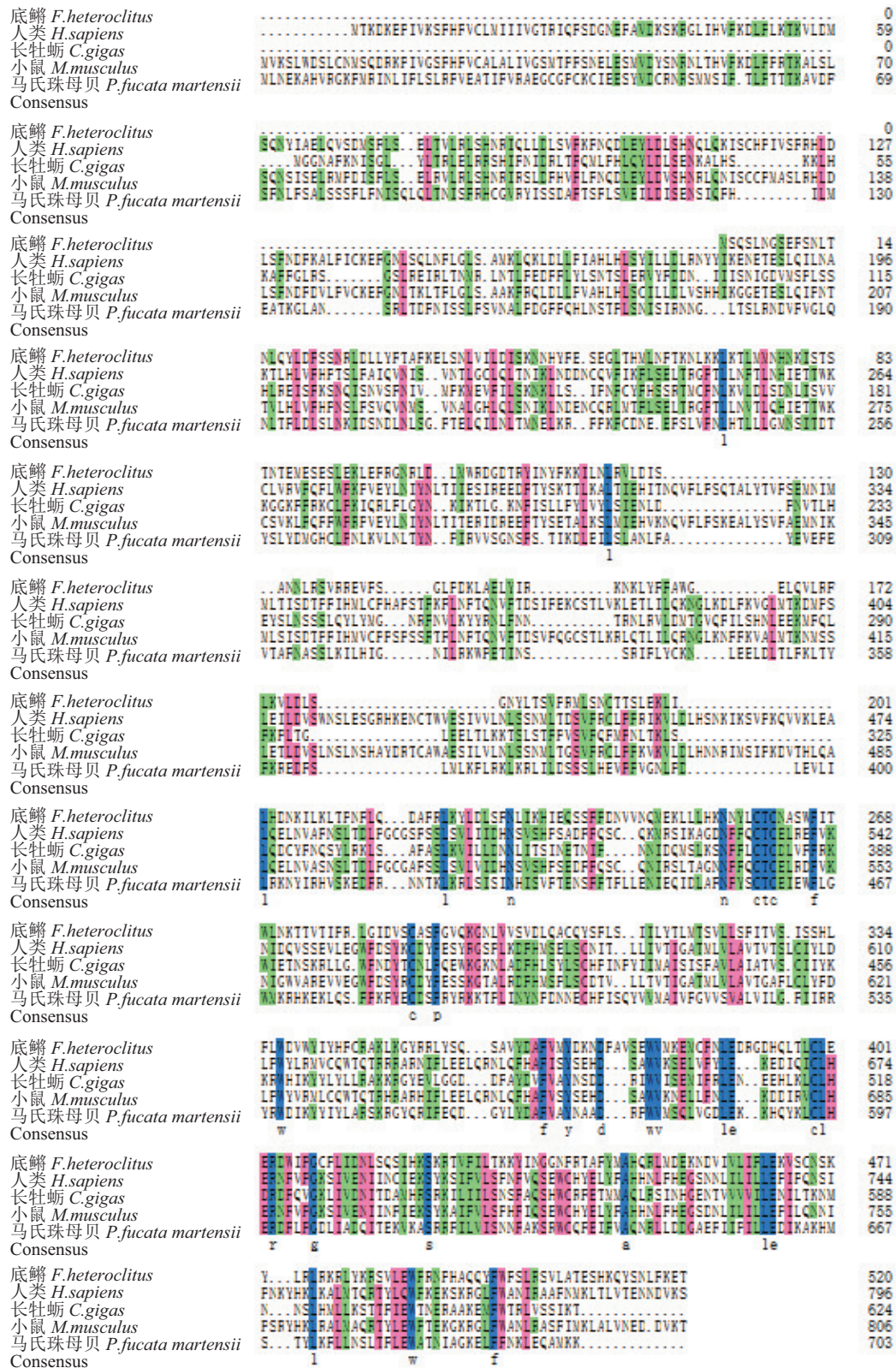


图 5 TLR6 蛋白质序列多序列比对

小写字母, 蓝色: 一致氨基酸; 红色: 相似度大于 75% 的氨基酸; 绿色: 相似度大于 50% 的氨基酸

Fig. 5 Multi-alignment of TLR6 amino acid sequence

Lowercase letters, blue: the coincident amino acids; red: the similarity is more than 75%; green: the similarity is more than 50%

表 2 用于TLRs蛋白质聚类分析的氨基酸序列

**Tab. 2 Amino acid sequence of TLRs protein Cluster-analysis**

物种 species	TLRs	GenBank登录号 accession number
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	TLR6	EKC38225.1
人类 <i>Homo sapiens</i>	TLR6	BAA78631.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	TLR6	NP_001124065.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	TLR6	NP_001075178.3
牛 <i>Bos taurus</i>	TLR6	CAF06197.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR1	AAG37302.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR2	AAF04277.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR3	AAH99937.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR4	AAF04278.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR5	AAI25248.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR6	BAA78632.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR7	AAI32386.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR8	AAK62677.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR9	AAK29625.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR11	NP_991388.2
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR12	EDL30230.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	TLR13	EDL14060.1

同组织中的表达情况，结果显示*Pm-TLR6*在肝胰脏中的表达量显著高于其他组织，而在血细胞中表达量最低。牦牛*TLR6*基因在脾脏表达量最高，在肌肉中表达量最低<sup>[21]</sup>，兔*TLR6*在肺中的表达量最高，而在脾脏和下丘脑中表达量最低<sup>[22]</sup>。这是因为物种的不同，组织器官功能性的差异，使得TLR6具有特异性的表达模式<sup>[22]</sup>。软体动物的肝胰脏是代谢和消化吸收的重要器官，而且其富含淋巴液，亦是机体进行免疫反应的重要器官<sup>[23]</sup>。*Pm-TLR6*在肝胰脏中高表达，暗示其可能在免疫防御反应中发挥重要的作用。

哈维氏弧菌属于革兰氏阴性细菌，广泛存在于海洋环境中，是危害水产养殖业发展的重要病原菌之一，其在免疫防治研究中具有重要意义<sup>[24]</sup>。有报道指出哈维氏弧菌使海水网箱养殖高体鲷(*Seriola dumerili*)和花鲈幼鱼(*Lateolabrax japonicas*)感染发病，引起大量死亡<sup>[25-26]</sup>。革兰氏阴性短杆菌(*Brevibacterum*)和双球菌(*Diplococcus*)是马氏珠母贝主要的细菌病原菌<sup>[27]</sup>。每年7—8月份是养殖贝类微生物病害流行暴发的时期，其中哈维氏弧菌是主要病原菌之一<sup>[28]</sup>。鉴于TLR6在机体抵抗微生物感染过程的作用，本研究通过qRT-PCR技术检测了马氏珠母贝在哈维氏弧菌刺激条件下血淋巴中*Pm-TLR6*的时序表达，

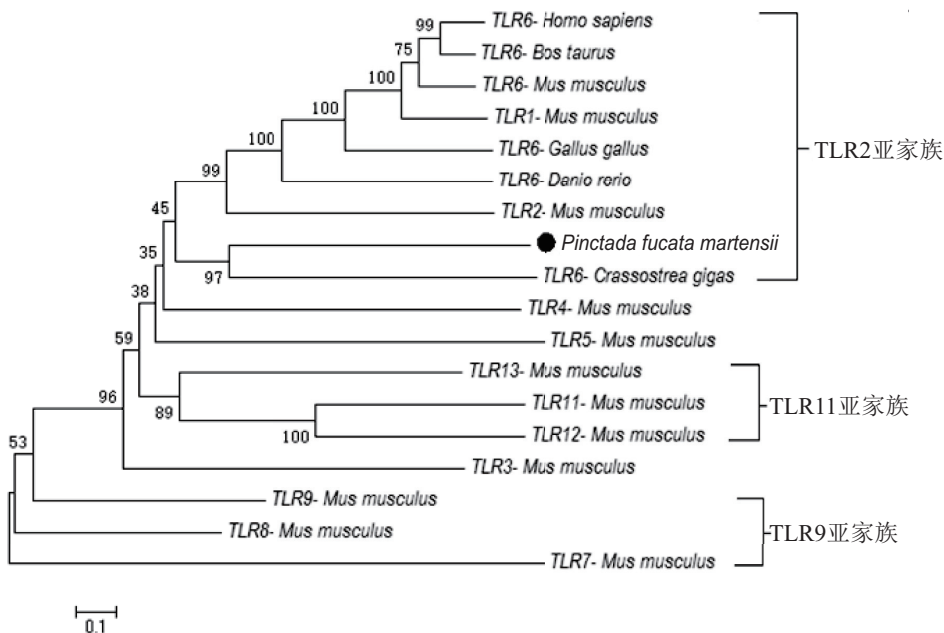


图 6 TLR6氨基酸序列聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of TLR6 protein sequence



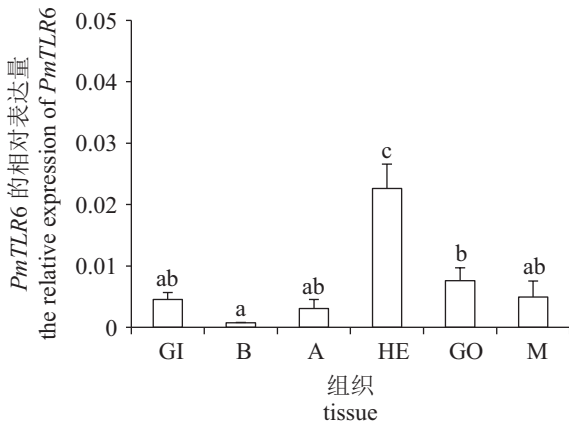


图 7 *Pm-TLR6* 在马氏珠母贝不同组织的分布

GI. 鳃; B. 血细胞; A. 闭壳肌; HE. 肝胰脏; GO. 性腺; M. 外套膜; 相同字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ ); 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同

Fig. 7 Expression distribution of *Pm-TLR6* of *P. fucata martensii* in different tissues

GI. gill; B. hemocytes; A. adductor muscle; HE. hepatopancreas; GO. gonads; M. mantle; The same letters mean no significant differences at the  $P > 0.05$  level; Different letters mean significant differences at the  $P < 0.05$  level, the same below

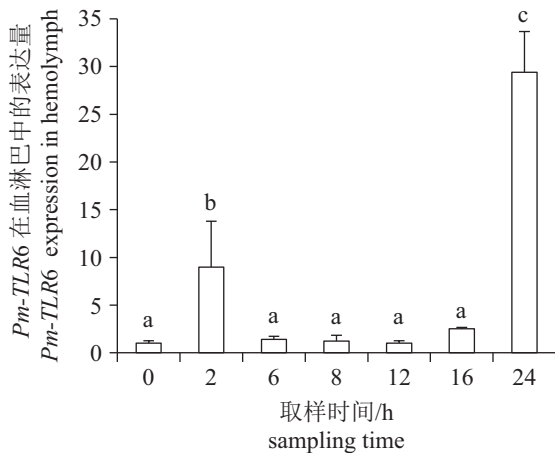


图 8 哈氏弧菌刺激后 *Pm-TLR6* 在马氏珠母贝血淋巴中的时序表达

Fig. 8 Sequential expression of *Pm-TLR6* in the hemolymph of *P. fucata martensii* after *V. harveyi* stimulation

并对其在贝体的免疫反应进行评估。结果显示血淋巴中 *Pm-TLR6* 在 2 h 表达上调, 随后的 6 h 恢复至正常水平, 直至 16 h 表达水平开始回升并于 24 h 达到最大表达量, 是对照组的 29.4 倍。 *S. equi* 感染小鼠巨噬细胞后, *TLR6* 表达量在感染后的 6 和 12 h 较对照组均无显著差异, 在感染后 24 h 时 *TLR6* 表达量极显著升高, 下游细胞因子

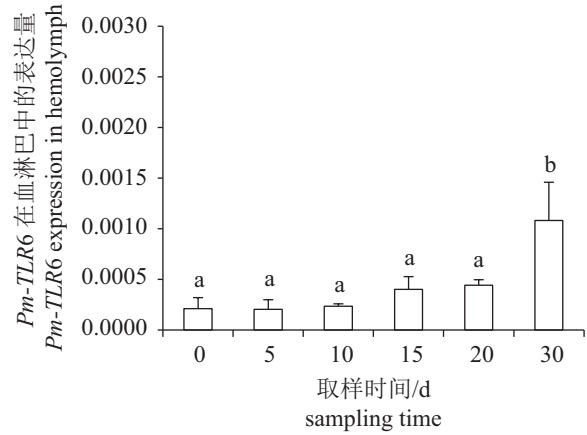


图 9 植核后马氏珠母贝血淋巴中 *Pm-TLR6* 的表达情况

Fig. 9 Expression levels of *Pm-TLR6* in hemolymph of *P. fucata martensii* after nucleus insertion surgery

IL-2、IL-12 的表达量也显著上升 ( $P < 0.01$ )<sup>[13]</sup>。 *Pm-TLR6* 在哈维式弧菌感染后 2 h 表达上调, 其原因可能是机体识别病原体致使 *TLR6* 表达量升高, 同时也促进相关免疫因子的分泌来抵抗哈维式弧菌感染, 直至 24 h 后, 随着感染程度的加深, *TLR6* 的表达量再一次出现显著上调, 这一点与 *S. equi* 感染小鼠巨噬细胞结果相似<sup>[13]</sup>。本研究结合前人研究成果表明, 马氏珠母贝 *TLR6* 能识别革兰氏阴性菌成分, 介导激活信号通路, 并促进机体释放炎症细胞因子参与免疫反应<sup>[11]</sup>。

有核珍珠的植核移植手术后会引起贝体产生免疫排斥反应, 并伴随着炎症反应和死亡<sup>[17]</sup>。因此, 研究免疫相关基因在马氏珠母贝植核后不同时间点的表达情况, 对于其移植免疫反应机制具有重要的意义。植核移植实验结果表明, *Pm-TLR6* 在植核后前 20 d 的表达量较对照组无显著性变化, 但在 20 d 后表达量显著上调, 并于 30 d 达到最大值。出现这一结果的原因可能是植核移植后的前 20 d 内, 受体贝主要进行创伤的修复和伤口的愈合, 微生物感染比较弱, 或者是其它的免疫因子起到主要的免疫作用, 而 *Pm-TLR6* 可能在植核移植 20 d 后发挥重要的免疫作用。有研究证明 *TLRs* 对马氏珠母贝植核移植后相关的排斥反应和感染等方面有着重要的影响<sup>[29-30]</sup>。马氏珠母贝植核移植后的 0~10 d 表达量一直处于低水平, 可能是移植体或手术过程中带入的微生物引起了贝体的移植排斥免疫反应, 但是目前本实验属于初步实验, *TLR6* 基因是否与马氏珠母贝移植排斥免疫反应有关还需

要更深入的研究。

总之,本研究首次从马氏珠母贝中克隆出 *TLR6* 基因的cDNA全长序列,分析其生物学功能,并进行了组织特异性表达分析、哈维氏弧菌刺激和植核移植刺激后血淋巴中的表达模式分析。研究结果表明 *TLR6* 基因在马氏珠母贝的免疫防御反应中承担着重要的角色。本研究为贝类免疫防御系统的研究提供了基础资料。

#### 参考文献:

- [1] 曾爽,何小兵,陈国华,等. Toll样受体介导的信号转导通路及其调控分子的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2011(4): 433-440.  
Zeng S, He X B, Chen G H, *et al.* Advances in Toll-like receptors-mediated signaling pathways and their regulation molecules[J]. Chinese Veterinary Science, 2011(4): 433-440(in Chinese).
- [2] 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.
- [3] 马思慧,杨欢,吴天成,等. Toll样受体信号传导通路的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8): 160-164.  
Ma S H, Yang H, Wu T C, *et al.* Research progress on toll like receptors mediated signaling transduction pathway[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(8): 160-164(in Chinese).
- [4] 汪欢. 马氏珠母贝皮连蛋白基因和Toll样受体3基因的克隆与功能研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.  
Wang H. Cloning and functional research of dermatopontin and Toll-like receptor 3 of pearl oyster, *Pinctada martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [5] Wang Y J, Bi X Y, Chu Q, *et al.* Discovery of Toll-like receptor 13 exists in the teleost fish: Miiuy croaker (*Perciformes, Sciaenidae*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 61: 25-33.
- [6] 师尚丽,杜晓东,焦钰,等. 马氏珠母贝 *TLR2* 基因cDNA的分子特征及组织表达分析[J]. 中国农学通报, 2014, 30(20): 35-41.  
Shi S L, Du X D, Jiao Y, *et al.* Molecular characterization and tissue expression analysis of *PmTLR2* gene from *Pinctada martensii*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(20): 35-41(in Chinese).
- [7] 王志新. 马氏珠母贝热休克蛋白与Toll样受体基因的克隆与表达研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.  
Wang Z X. Cloning and express characters of *HSP60* gene from *Pinctada martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [8] Heine H, Lien E. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response[J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2003, 91(1): 1-12.
- [9] Li X D, Chen Z J. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13[J]. Elife, 2012, 1(1): e00102-e00102.
- [10] Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling[J]. Folia Biologica, 2005, 51(6): 188-197.
- [11] Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. A dipalmitoylated lipoprotein from mycoplasma pneumoniae activates NF-kappa B through TLR1, TLR2, and TLR6[J]. Journal of Immunology, 2005, 175(7): 4641-4646.
- [12] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways[J]. Seminars in Immunology, 2004, 16(1): 3-9.
- [13] 杜润慈,刘建华,史茜,等. TLRs介导的信号通路在马链球菌感染RAW264.7细胞中的作用[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(5): 1270-1276.  
Du R C, Liu J H, Shi Q, *et al.* Effect of TLRs mediated signal pathway on *Streptococcus equi* infection in RAW264.7 cells[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(5): 1270-1276(in Chinese).
- [14] Murawski M R, Bowen G N, Cerny A M, *et al.* Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-Like receptor 2[J]. Journal of Virology, 2009, 83(3): 1492-1500.
- [15] 汤娟娟,季小芳,朱郁炯,等. 日本血吸虫感染小鼠肝脏Toll样受体2和6的表达变化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(2): 101-105.  
Tang J J, Ji X F, Zhu X M, *et al.* Expression of Toll-like receptors 2 and 6 in mice liver during *Schistosoma japonicum* infection[J]. Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases, 2014, 32(2): 101-105(in Chinese).
- [16] 张英霞,邹瑗徽,满初日嘎,等. 马氏珠母贝鳃组织抗菌活性的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 465-468.  
Zhang Y X, Zou A H, Manchu R G, *et al.* An-timicrobial activity in gills of shellfish *Pinctada martensii*, Shuichan Kexue[J]. Fisheries Science, 2010, 29(8): 465-468(in Chinese).

- [17] 周畅, 谢莉萍, 张荣庆. 插核手术对合浦珠母贝免疫水平的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(5): 419-423.  
Zhou C, Xie L P, Zhang R Q. Effect of pearl-nucleus-inserting operation on immune level in *Pinctada fucata*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(5): 419-423(in Chinese).
- [18] Akira S. Toll receptor families: Structure and function[J]. Seminars in Immunology, 2004, 16(1): 1-2.
- [19] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 805-820.
- [20] Cui M, Zhang Q Z, Yao Z J, *et al.* Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(6): 1060-1065.
- [21] 林宝山, 兰道亮, 黄偲, 等. 牦牛TLR6基因的克隆、序列分析及其表达分布研究[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(7): 91-97.  
Lin B S, Lan D L, Huang S, *et al.* Cloning, sequence analysis of TLR6 gene of yak and expression and distribution in tissues[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(7): 91-97(in Chinese).
- [22] 陈晨. 兔各器官中TLRs表达谱以及脂多糖对母兔子宫中生殖激素受体表达的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.  
Chen C. The expression profiles of Toll-like receptors in various organs of female rabbit and the effects of Lipopolysaccharide on the expression level of reproductive hormone receptors in uterus of female rabbits[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2005 (in Chinese).
- [23] 谭莘, 杨建明, 官阳, 等. 空心莲子草对钉螺肝肠超微结构影响[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(7): 825-826.  
Tan P, Yang J M, Guan Y, *et al.* Effect of alternanthera philoxeroides on ultrastructure of liver and intestine of *Oncomelania hupensis*[J]. Chinese Journal of Public Health, 2007, 23(7): 825-826(in Chinese).
- [24] 孙鲲. 哈氏弧菌种特异性分子标记的发现及其在哈氏弧菌快速诊断和免疫防治中的应用[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2009.  
Sun K. Identification and application of a novel genetic marker of *Vibrio harveyi*[D]. Qingdao: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Marine Research Institute), 2009 (in Chinese).
- [25] 吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鲈弧菌病理学研究[J]. 水产学报, 1999, 23(2): 206-209.  
Wu H B, Pan J P. Pathological studies on the vibriosis of marine cage cultured *Seriola dumerili*[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(2): 206-209(in Chinese).
- [26] 王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55.  
Wang B K, Yu J H, Li J, *et al.* Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 52-55 (in Chinese).
- [27] 陈皓文. 珠母贝的病害[J]. 水产养殖, 2005, 26(1): 34-37.  
Chen H W. Diseases, enemies and disasters of maricultured pearl oysters[J]. Journal of Aquaculture, 2005, 26(1): 34-37 (in Chinese).
- [28] 韩风杰. 山东省贝类弧菌流行病学调查及副溶血弧菌快速检测方法的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.  
Han F J. The investigation of shellfish vibrio disease epidemiology in Shandong province and establishment of a rapid detection method about vibrio parahaemolyticus[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [29] 魏巴金, 周琳. Toll样受体家族基因多态性与移植后相关疾病研究进展[J]. 中华移植杂志: 电子版, 2016, 10(2): 92-96.  
Wei B J, Zhou L. Progress on the association between polymorphisms of Toll-like receptors and correlated disease after transplantation[J]. Chinese Organ Transplantation Journal (Electronic Edition), 2016, 10(2): 92-96(in Chinese).
- [30] Zhao X X, Wang Q H, Jiao Y, *et al.* Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(6): 730-739.

## Cloning, sequence analysis and expression studies on *PmTLR6* gene from *Pinctada fucata martensii*

WU Yuyuan<sup>1,2</sup>, GUO Zhiying<sup>1</sup>, LIANG Haiying<sup>1,2\*</sup>, LIN Lixuan<sup>1</sup>, HAO Ruijuan<sup>1,2</sup>, JIAO Yu<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Pearl Breeding and Processing Engineering Technology Research Center of Guangdong Province, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** TLR6 (Toll like receptor 6) is a kind of pattern recognition receptors and plays an important role in resisting microorganism infection. To study the function of TLR6 in the immune response of *P. fucata martensii*, in this study, a full length of *Pm-TLR6* was obtained using rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology from *P. fucata martensii*. The expression patterns of *Pm-TLR6* in all tissues and its sequential expression in the hemolymph after *Vibrio harveyi* stimulation and nucleus insertion operation were further detected by Quantitative Real-Time PCR technology. Results showed that the total length of *Pm-TLR6* cDNA was 2295 bp, including a 5' UTR of 94 bp, a 3' UTR of 89 bp and an open reading frame (ORF) of 2112 bp which encodes 703 amino acids. Multiple sequence alignment indicated that TLR6 was highly conservative among species. The protein encoded by *Pm-TLR6* has a transmembrane domain, several leucine rich repeats(LRRs) and a TIR domain, conforming to the characteristics of TLRs family. qRT-PCR data revealed that *Pm-TLR6* was expressed in all tested tissues, including hepatopancreas, hemocytes, gill, gonads, adductor muscle and mantle, with the highest expression in hepatopancreas ( $P<0.05$ ). After *Vibrio harveyi* injection, the expression level of *Pm-TLR6* increased at 2 h (9 fold vs. control), then dropped to normal levels at 6 h and began to increase at 16 h, with the highest level of expression appearing at 24 h (29.4 fold vs. control,  $p<0.05$ ). The result of nucleus insertion surgery showed that *Pm-TLR6* expression level was not significantly changed at 5 d and 10 d, and began to increase at 15 d and 20 d ( $P>0.05$ ). Its expression reached the maximum level at 30 d with significant difference (5 fold vs. control,  $p<0.05$ ). These results indicated that *Pm-TLR6* may play an important role in the immune defense reaction of *P. fucata martensii*.

**Key words:** *Pinctada fucata martensii*; TLR6; gene cloning; expression analysis

**Corresponding author:** LIANG Haiying. E-mail: zjlianghy@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31472306); Science and Technology Plan Projects of Guangdong Province, China (2012A031100010); Harbor Construction and Development of Special Fisheries Industry of Guangdong Province, China (A201608B15); National College Students' Innovation Entrepreneurship Training Program (201410566005); College Students' Innovation Entrepreneurship Training Projects of Guangdong Ocean University (CXXL2014012)