

文章编号: 1000-0615(2018)04-0476-09

DOI: 10.11964/jfc.20170510848

香鱼白细胞介素17C基因克隆及鳃利斯顿氏菌 侵染后的时空表达

李明云*, 苗亮, 郭晓飞, 聂力, 侯红红, 陈炯

(宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了解香鱼白细胞介素17(interleukin 17, IL-17)的序列特征、系统发育及其与鳃利斯顿氏菌侵染的相关性, 实验采用RACE-PCR方法扩增出香鱼IL-17C基因cDNA序列, 并通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测了鳃利斯顿氏菌侵染后香鱼各组织中IL-17C基因的表达变化。结果显示, 香鱼IL-17C基因cDNA序列全长1 087 bp, 含534 bp的开放阅读框, 在3'端非编码区存在7个mRNA不稳定信号(ATTTA)。预测该基因编码177个氨基酸, N端19个氨基酸为信号肽序列, 成熟蛋白中含有8个半胱氨酸残基。系统进化树分析显示不同物种的相同IL-17亚型聚为一支, 香鱼IL-17C与其他脊椎动物IL-17C聚为一支; 同源比对结果显示香鱼IL-17C与虹鳟的IL-17C1和IL-17C2亲缘关系最近, 相似性分别为40.72%和33.51%。qRT-PCR检测显示IL-17C基因在健康香鱼的心、肝、脾、头肾、鳃、脑、肌肉和肠等组织中均有表达, 鳃和头肾中表达量较高。经鳃利斯顿氏菌侵染后, 香鱼肝脏中IL-17C基因表达变化最大, 菌侵染8 h时的表达量为对照组的9.17倍; 其次为脾, 菌侵染4 h时的表达量为对照组的6.69倍。研究表明, 香鱼IL-17C基因的表达与病原菌侵染密切相关, 可能在免疫功能中具有重要作用。

关键词: 香鱼; 白细胞介素17C基因; 基因克隆; 鳃利斯顿氏菌; 时空表达

中图分类号: Q 785; S 941.42

文献标志码: A

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)是近年来养殖规模和知名度扩大较快的一种洄游性名贵经济鱼类, 养殖形式主要为高密度工厂化^[1], 一旦发病传染快、损失大, 但使用抗生素易产生细菌耐药性以及药物残留等问题, 因此以预防为主的病害防治策略是香鱼工厂化高密度健康养殖和食品安全的可靠保障。研究香鱼的自身免疫能力和抗病性状具有重要的理论和生产意义。

白细胞介素17(interleukin 17, IL-17)是一种T细胞来源细胞因子, 在机体自身免疫性疾病和过敏性疾病中具有重要协调作用, 最早由Rouvier等^[2]获得自小鼠淋巴细胞cDNA文库(当时被命名为CTLA-8)。研究发现IL-17基因具有不同的亚

型, 根据其结构的相似性, 将IL-17基因家族分为6大成员(IL-17A~F), 同时具备5个相应的配体结构^[3]。序列分析显示, 该基因在家族内相对保守, 其中IL-17A和IL-17B位于同一染色体上, 具有55%的氨基酸序列同源性, 共用同一个配体。IL-17基因家族成员的C-末端均含有构成二硫键的保守半胱氨酸; 3'UTR含有多个不稳定基序(ATTTA)^[4]。IL-17是一种促炎性细胞因子, 主要来源于激活的CD4+ T淋巴细胞、肥大细胞和嗜中性粒细胞等, 在机体自身免疫性疾病和过敏性疾病中具有重要作用^[5]。对人和鼠的IL-17研究表明, IL-17参与免疫应答和炎症反应^[6-7]。IL-17可广泛刺激细胞的活性, 如刺激破骨细胞增殖、

收稿日期: 2017-05-26 修回日期: 2017-07-29

资助项目: 国家自然科学基金(41406154); 宁波市自然科学基金(2015A610271); 浙江省教育厅(理)科研计划(Y201430860); 浙江省“水产”重中之重学科开放基金(xkzsc1514)

通信作者: 李明云, E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

粒细胞生成和T细胞增殖反应等^[7-9]。

鉴于IL-17在机体自身免疫疾病和过敏性疾病中具有重要作用, 研究者在有关鱼类中也进行了IL-17基因的研究。在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)体内已鉴定出7种IL-17基因, 在脑、肾和鳃中均有表达, 当用脂多糖进行刺激时, 能够明显上调IL-17基因表达水平^[10]。研究显示IL-17A/F₁、IL-17A/F₂和IL-17D在黏膜免疫相关组织中表达水平很高, 如鳃、表皮和小肠等^[11]。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体内, LPS和IL-1 β 能够调控体内2种IL-17基因的表达, 当病原菌入侵时, 体内的IL-17A/F₂表达量增加, 在促炎症反应和先天性免疫应答中起到重要作用^[5]。在大西洋鲑(*Salmo salar*)^[12]和七鳃鳗(*Lethenteron japonicum*)^[13]体内发现有IL-17D基因同源物, 并且经LPS刺激后七鳃鳗皮肤细胞中IL-17基因表达显著上调。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中鉴定出的IL-17A/F₁是一种促炎因子, 在嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染1 d后表达显著上调, 感染3 d后恢复至正常水平^[14]。鲢(*Miichthys miui*)体内已鉴定出6个IL-17基因家族成员, polyIC刺激12 h后IL-17N被显著诱导, 在刺激36 h后IL-17A/F₁、IL-17A/F₂被显著诱导^[15]。大黄鱼(*Larimichthys crocea*)体内已发现了3个IL-17A/F基因成员: IL-17A/F₁、IL-17A/F₂、IL-17A/F₃, 嗜水气单胞菌感染后, 在头肾、鳃中这3个IL-17A/F基因成员均被诱导表达, 至6 h诱导表达达到高峰, 其中IL-17A/F₂为最高, 至12 h下降至基本正常, 并稳定至48 h实验结束^[16]。但迄今未见有香鱼IL-17基因方面研究报道。

本研究对香鱼IL-17C基因的cDNA序列进行了克隆和分析, 并通过qRT-PCR分析了其在正常组织和鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)感染后组织中的表达情况, 研究结果可进一步充实硬骨鱼中IL-17基因的结构和免疫机制的资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用香鱼为新品种“浙闽1号”(平均体长15.22 cm, 平均体质量32.47 g), 于2016年4月购自浙江宁海崑溪清泉香鱼养殖专业合作社。实验鱼运至实验室暂养后, 用灭菌剪分别取香鱼的8种组织(心、肝、脾、脑、肠、肌肉、鳃、头

肾)分装于1.5 mL离心管, 迅速置于液氮中, 于-80 °C保存备用。鳃利斯顿氏菌为本实验室培养保存, 以108 cfu/mL浓度对香鱼进行腹腔注射0.2 mL, 对照组注射等量的无菌PBS, 菌感染组和对照组均设置3组重复, 在4、8、12和24 h后分别取其肠、脑、脾、肝和头肾组织分装于1.5 mL离心管, 液氮快速冷冻后于-80 °C保存备用。用Trizol法提取各组织总RNA。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由本实验室保存; 氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、LB培养基、琼脂糖、核酸染料、无水乙醇均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; RNA提取试剂Trizol、DEPC-H₂O、3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase Kit、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™、pMD19-T载体购自宝生物工程(大连)有限公司; BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit购自Clontech公司; 薄型琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; Taq premix-Dye(2 \times)购自上海博彩生物科技有限公司。

1.2 香鱼IL-17C基因cDNA克隆及序列分析

根据从本实验室香鱼性腺转录组测序中获得的IL-17C基因部分序列, 利用Primer Premier 5.0设计克隆IL-17C基因cDNA的3'-RACE特异性引物IL-17C-3-Outer和IL-17C-3-Inner以及5'-RACE特异性引物IL-17C-5-Outer和IL-17C-5-Inner(表1)。

将上述提取的组织总RNA按3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase Kit和BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit说明书分别进行3'-RACE和5'-RACE操作并测序。对测序结果拼接后获得IL-17C基因cDNA序列。应用BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行序列同源性比对和相似性分析; 开放阅读框(ORF)的确定以及氨基酸序列的翻译采用Edit-Seq软件进行; 采用SignalP 4.1软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列; 采用NetNGlyc软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测N糖基化位点; 采用ClustalW程序(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)进行多重序列比对; 采用Compute pI/Mw软件(http://web.expasy.org/compute_pi)预测等电点。使用MEGA 4软件以邻位相连法(Neighbor-joining method)构建系统进化树。

表 1 cDNA克隆所用引物信息

Tab. 1 The information of primers used for cDNA cloning

| 引物 primer | 序列(5'-3') sequence(5'-3') | 退火温度/°C annealing temperature |
|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>IL-17C-3-Outer</i> | 5'-GTTCTCTGGGTGATACGGGCTC-3' | 62 |
| <i>IL-17C-3-Inner</i> | 5'-CCAATTGCGTGCACCTGTGT-3' | 62 |
| <i>IL-17C-5-Outer</i> | 5'-CAAGGCTGCGTAGTCCTGTCT-3' | 62 |
| <i>IL-17C-5-Inner</i> | 5'-TTGAATATCCTTTGTAAGTTGGCAT-3' | 62 |
| <i>IL-17C-YG-F</i> | 5'-TGGATGCCAACTTACAAAGG-3' | 58 |
| <i>IL-17C-YG-R</i> | 5'-CAGGGGGAGATGGACCGATT-3' | |
| <i>β-actin-F</i> | 5'-TCGTGCGTGACATCAAGGAG-3' | 58 |
| <i>β-actin-R</i> | 5'-CGCACTTCATGATGCTGTTG-3' | |

1.3 RT-PCR检测

根据获得的香鱼*IL-17C*基因cDNA序列,用Primer Premier 5.0软件设计1对引物*IL-17C-YG-F*和*IL-17C-YG-R*进行qRT-PCR检测,并根据GenBank中香鱼*β-actin*基因序列设计1对引物*β-actin-F*和*β-actin-R*作为内参(表1)。提取各组织总RNA,用PrimeScript™ RT reagent Kit进行反转录获得一链cDNA。用Eppendorf实时荧光定量PCR仪进行qRT-PCR扩增检测,每组样品重复3次。扩增反应程序为95 °C预变性3 min; 95 °C变性15 s、58 °C退火30 s,共40个循环; 95 °C 15 s、60 °C 1 min, 95 °C 15 s。qRT-PCR实验数据分析参照Livak等^[17]提出的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)实时荧光定量结果,以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 香鱼*IL-17C*基因cDNA序列及分析

由香鱼性腺转录组中获得的*IL-17C*基因部分序列长度为534 bp,经3'-RACE扩增后,用DNA-MAN软件进行序列拼接得到*IL-17C*基因cDNA序列全长1 087 bp,在3'端非编码区存在7个mRNA不稳定信号ATTA;含有1个534 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF),其中A碱基140个(26.22%),G碱基128个(23.97%),T碱基130个(24.34%),C碱基136个(25.47%);编码177个氨基酸残基的多肽,N端具有19个氨基酸(MQVL-LALVVILNLTILKA)为信号肽序列,成熟蛋白裂解位点位于Ala19与His20之间;预测蛋白分子

量为19.54 ku,理论等电点为9.08,属于IL-17超家族;成熟蛋白中含有6个丝氨酸(Ser62、80、83、85、128、140)、4个苏氨酸(Thr96、120、154、174)、4个酪氨酸(Tyr79、98、122、156)和8个半胱氨酸残基,在Asn12和Asn81处存在2个潜在的N-糖基化位点(可能性分别为0.781 8和0.634 3)(图1)。

2.2 香鱼*IL-17C*基因与其他物种序列比对及系统发育分析

氨基酸序列比对(图2)和系统进化树(图3)分析显示,不同物种的相同IL-17亚型同源基因聚为一支;香鱼*IL-17C*与虹鳟*IL-17C1*和*IL-17C2*在进化上最近,与其他鱼类和哺乳动物的IL-17C聚为一大支。不同物种的IL-17C序列同源性比较显示:香鱼*IL-17C*与虹鳟*IL-17C1*和*IL-17C2*的同源性最高,分别为40.72%和33.51%,而与红鳍东方鲀*IL-17C2*、青鳉(*Oryzias latipes*)*IL-17C*、鳊*IL-17C*、红鳍东方鲀*IL-17C1*的同源性分别为27.12%、26.37%、25.79%和23.66%。

2.3 鳊利斯顿氏菌胁迫后的时空表达

qRT-PCR检测显示健康香鱼各组织中均有*IL-17C*基因mRNA表达,其中头肾中表达量最高,其次是鳃、脑、肝和肠,在心、脾和肌肉中表达量相对较低(图4)。

鳊利斯顿氏菌感染后4、8、12和24 h分别取香鱼肠、脑、脾、肝和头肾组织检测*IL-17C*的表达变化,结果显示,感染后各组织中*IL-17C*的表达较对照组均有显著性上调($P < 0.05$),其中以肝脏中表达量变化最大,在感染8 h时,*IL-17C*的表

| | | |
|-------|---|-------|
| 1 | GAAAACCTCGTTTACAA | 16 |
| 17 | GAGGAAGAACTCTATATTGGGATTCCTGGTGCAGCGGATTTCCACAAAAGTAAACT | 76 |
| 77 | ATACACGGCTTTGCTATAAATAGGGGTCACACTACTATGGAATATCGCAAGTGAAGACA | 136 |
| 137 | CTGGTCTTAAACACAGAGAGGAATTTATCATCCCAACACATTTAAACTACAAAATAAACA | 196 |
| 197 | ATGCAGGTTCTTCTTGCCTCGTGAATCCTCAACCTGACGCTGATTTTAAAGCTCAC | 256 |
| 1 | M Q V L L A L V V I L N L T L I L K A H | 20 |
| 257 | GTGCCCGTGTGCTTTCCTGCGGAGGAGCTGGATGCCAATTACAAAGGATATTCAAGCGT | 316 |
| 21 | V P V C F P A E E L D A N L Q R I F K R | 40 |
| 317 | CAAATTAGAAAAGGACTAATTGCAAATATAAACGACGAGACAGGACTACGCAGCCTTGCC | 376 |
| 41 | Q I R K G L I A N I N D E T G L R S L A | 60 |
| 377 | AAGTCCAAGACAACCCGACGTGTCCCATTGCACTCTACGCCACTTCGCCGGCGTATAGC | 436 |
| 61 | K S K T T R T C P I A L Y A T S P A Y S | 80 |
| 437 | AATCGGTCCATCTCCCCTGGACTTTAAGTTTGGATGTGGATGAGACCCGCTACCCGCCG | 496 |
| 81 | N R S I S P W T L S L D V D E T R Y P P | 100 |
| 497 | AAGATTGCTGCTCAATGCCTGTGCAAGGGCTGTATCATCAACGGGGCCGAAAATACG | 556 |
| 101 | K I A V A Q C L C K G C I I N G A E N T | 120 |
| 557 | GGATACGTTTCGGTACCTGTTTCCCAAAGTAAAGATGGTGTAAAGAAGATACCCTGTTCT | 616 |
| 121 | G Y V S V P V S Q S K M V L K K I P C S | 140 |
| 617 | CTGGGTGATACGGGCTCGCGGATGGGATACCGTCTTGAACAGAATATATTGACGTCCA | 676 |
| 141 | L G D T G S R M G Y R L E T E Y I D V P | 160 |
| 677 | ATTGCGTGACCTGTGTGGTTCCGCACATTAGACATATGACTAGACCGAAATAATTCCTC | 736 |
| 161 | I A C T C V V P H I R H M T R P K * | 177 |
| 737 | TCGTAGAGGATATGTAAGAACTAAATGTAGTGACAAGTTTCACATTATGTTGTGTTGT | 796 |
| 797 | TATAAATGCACCTAAAGTT <u>ATTTA</u> CTTTTAAATAACACTAAACATGCTTATGCGTAAT | 856 |
| 857 | AAGCA <u>ATTTA</u> AAAAACCGGACACT <u>ATTTA</u> TGT <u>ATTTA</u> ATGTTAAGAATTTGTATAAGT | 916 |
| 917 | <u>ATTTA</u> TAGGAGGATGTTTTAAT <u>ATTTA</u> TTTACTATTTTATTCTTCTACTATTTGTTC | 976 |
| 977 | CTT <u>ATTTA</u> ATTGGTAATAATGTGATAAAATCGTTTTTTCTCAACCATGACCACAGTTTA | 1 036 |
| 1 037 | AGATATTTCAATGTGAAAAGTGCTGCTAAAAATCGCTAATAAAAAAAAAA | 1 087 |

图1 香鱼*IL-17C*基因cDNA序列及其编码的氨基酸序列

方框内表示预测信号肽; 潜在的N糖基化位点用灰色底纹标出; RNA不稳定序列(ATTTA)用双下划线标出

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *P. altivelis IL-17C* cDNA

A signal peptide is boxed; two nitrogen potential glycosylation sites are shades of gray; the sequences of seven instability motifs (ATTTA) are double underlined

达量是对照组的9.17倍。其次是脾, 在感染4 h时, *IL-17C*表达量是对照组的6.69倍。在小肠中的表达呈现先上升后下降的趋势, 其中4 h达到峰值; 脑中的表达则呈现上升趋势, 在24 h达到最大值; 头肾中的表达呈现平缓趋势, 在4 h达到峰值, 之后的时间段内并无显著性差异(图5)。

3 讨论

在本研究中, 克隆出香鱼*IL-17C*基因cDNA序列含有完整的ORF。在人类和已知的鱼类*IL-17*基因mRNA中, 3'UTR均含有多个mRNA不稳定基序(ATTTA)。序列分析显示, 香

鱼*IL-17C*基因的3'UTR也含有7个mRNA不稳定基序(ATTTA), 这符合*IL-17*家族基因的特征。与其他物种相比, *IL-17*基因中不稳定基序较多, 该基序是否参与mRNA的降解或还有其他方面的功能有待研究。同时, 在其他促炎性因子(如TNF α)中也发现含有多个mRNA不稳定基序(ATTTA)^[18], 这些典型的促炎性因子特征表明香鱼*IL-17C*基因可能在机体的炎症反应过程中有重要作用。

系统进化树中香鱼与小鼠及人的*IL-17C*的亲缘关系高于斑马鱼*IL-17C*和红鳍东方鲀*IL-17C2*, 说明鱼类和哺乳类*IL-17C*基因可能起源于相同的

| | | | |
|---|--|-------------|-----------------|
| | | C1 | |
| 香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i> IL-17C | -----MQVLLALVVILN-LTLILKAHVP-VCFPAEELDANLQR----- | | IFKR 40 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> IL-17C | -----MWSPLFFGLLFFWLS-ESKVEGKHLCFKDCDHGFSKAH----- | | 37 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C1 | -----MKQFLTFVLLVLSACTGESNRCYDEHELSEAAANR----- | | 34 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C2 | -----MTISLGSLLLFGERPLCAGGS-QCVSEDEANQRLER----- | | 35 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C1 | ---MPGLFKIMQTLTLLGLFIDKLTASEAHKHKGCFSABELEDGALK----- | | ILRR 49 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C2 | ---MPGLFKIMQTLTLLGLVIA---TSEAHKYKGCFSSTEKLEHRALK----- | | ILHR 45 |
| 鳊 <i>Miichthys miui</i> IL-17C | -----MDLKQILIFGLLIASVWTDKMYRCYGEHELDDVAER----- | | 36 |
| 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> IL-17C | -----MRLNQILIGTVCLVALCACK--KCVSVDDLKKEEK----- | | 34 |
| 小鼠 <i>Mus musculus</i> IL-17C | MSLL----LLGWLPTGMTHQDPPSWGKPRSHRTLRCYSAEELSHGQAPPHLLTRSARWEQ | | 56 |
| 人 <i>Homo sapiens</i> IL-17C | MTLLPGLLFTLWHTCLAHHDPSLRGHPHSHGTPH CYSAEELPLGQAPPHLLARGAKWGQ | | 60 |
| | * * * * * | * * * * * | |
| | | C2 | |
| 香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i> IL-17C | QIRKGLIANINDETGLRSLAKSKTTRTPIALYA--TSPAYSN---- | | RSISPWTLSDV 93 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> IL-17C | ---QKLLRSLISPRHPVQVPHHPAGSCEDFVRTASDDLKHRSLSPWRTSISLVFFRTVE | | 94 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C1 | ---KLRSHY---PQPAEPSPAAAADSSYTCPLELYLQKDLPPHLSG---RTVP----- | | 78 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C2 | ---FHKNRPTPTFTDHTQTCCEKVRQLFEDVAPQLKGEHMRQ---RSVSPWRYRIDH | | 85 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C1 | ---NRYLKDGHIDETQYHKLG---TKKTCPAVLHS--QSVDYNN---RSVSPWRYIDS | | 97 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C2 | ---NRYQTDVHIDETQYHKLG---MKKTCPTVLR--QSVDYNN---RSVSPWRYIDS | | 93 |
| 鳊 <i>Miichthys miui</i> IL-17C | ---KLRTHYRLLPADTLPSQASDTPAVCPVELFQQAT--PDHISG---RSVSPWRYILKT | | 89 |
| 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> IL-17C | ---AMRKHG---IGIWQHSISSPSSDATGCPVDLYQND--SKDEK---RSVSPWKYTEVT | | 84 |
| 小鼠 <i>Mus musculus</i> IL-17C | ALPVALVASLEATGHRHQHEGPLAGTQCPVLRPEEVLEADTHE---- | | RSISPWRYIDT 111 |
| 人 <i>Homo sapiens</i> IL-17C | ALPVALVSSLEAASHRGRHERPSATTQCPVLRPEEVLEADTHQ---- | | RSISPWRVDT 115 |
| | * * * * * | * * * * * | |
| | | C3 C4 C5 C6 | |
| 香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i> IL-17C | DETRYPPIAQAQCLCKGCIIN-----GAENTGY--VSPVVSQSKMVLKPKPCSLG | | 142 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> IL-17C | NPDMPYSKYEEAQCLEDGCIIN-----GELNRSYN--SVPVFKTHVFLKHKPCPSD | | 143 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C1 | LGDSFPSSYTEAQCLCSGCIILVPS--PQNQVLLTETHDYNVPIKQNRVFLRKELCADG | | 136 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C2 | NINRSPADIAMAECLEKGCILEQ-----KETHDYNVSVTTHIKVLYKNPCPDD | | 134 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C1 | KEGRFPEKIVVAECLCTGCIIVKGH---GHHGAEYEDYGYNSVPPVQSMVLMKTECTTD | | 154 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C2 | VEGRFPEKIVVAECLCEGLI IKGP---GHHGAQHAY--NSVPIEQTMVLMKTVCLNN | | 148 |
| 鳊 <i>Miichthys miui</i> IL-17C | LKDFPSTYTEAQCLCSGCIILIQDNSVPDKRPLPVESYDYNVPIKQSKVFLKRELCSDG | | 149 |
| 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> IL-17C | REGYFPPSYMEAQCLCKGCIILKEGN-----NVIESHNFNSKPLVSRMFLRRVLCGG | | 137 |
| 小鼠 <i>Mus musculus</i> IL-17C | DENRYPKQLAVAECLEKGCINAK-----TGRETAALN--SVQLQLSLVLRQPQPSRD | | 162 |
| 人 <i>Homo sapiens</i> IL-17C | DEDRYPKQLAFAECLEKGCIDAR-----TGRETAALN--SVRLQLSLVLRQRQPSRD | | 166 |
| | * * * * * | * * * * * | |
| | | C7 C8 | |
| 香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i> IL-17C | DTGSRM--GYRLETEYIDVPIACTCVVPHIRHMTRPK----- | | 177 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> IL-17C | PD-----KYSFTFEHVQVPVACTCAVPKQ----- | | 167 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C1 | -----KKHHLKPVTIQVAVGCTCVRPKTTS----- | | 161 |
| 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> IL-17C2 | PG-----KYLKHEFYFKVSVGCI CVEPKRSS----- | | 160 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C1 | PG-----KYSFSSHYIKVPIACTCVKARTY----- | | 179 |
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> IL-17C2 | PE-----KYSLSHFVKVPIACTCVRSRI----- | | 172 |
| 鳊 <i>Miichthys miui</i> IL-17C | -----KKYSLKPVTLNVAVGCTCARVKTSSS----- | | 175 |
| 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> IL-17C | NINGTA--KTYKLERVQLDVAVGCI CVRTRS----- | | 165 |
| 小鼠 <i>Mus musculus</i> IL-17C | GTADPTPGSFAFHTEFIRVPVGGTCVLRSTQ----- | | 194 |
| 人 <i>Homo sapiens</i> IL-17C | GSGLPPTGAFAFHTEF IHVPVGGTCVLRPSV----- | | 197 |
| | * * * * * | * * * * * | |

图 2 香鱼IL-17C与其他脊椎动物IL-17氨基酸序列比对

相同氨基酸用“*”标出，相似氨基酸用“·”标出，8个半胱氨酸用灰色背景标出

Fig. 2 Multiple alignment of *P. altivelis* IL-17C with other homologues IL-17 in representative vertebrates

Identical “*” and similar “·” amino acid residues are indicated, eight cysteine residues are indicated in vertical gray

祖先基因，但是由于进化程度的不同，基因在各物种中的变化不同。目前关于各物种中是否都存在IL-17C1和IL-17C2两种亚型以及两种亚型在进化上呈现什么规律的研究较少，更细致的分化与进化关系还有待于进一步研究。与其他物种IL-17C氨基酸序列的多重序列比对显示，香鱼IL-17C蛋白含有8个保守的半胱氨酸残基，其中有4个构成二硫键，符合IL-17蛋白家族的典型特征。在虹鳟^[5]和红鳍东方鲀^[10]中均发现含有2种

IL-17C基因，但在香鱼中是否也存在2种IL-17C基因尚有待研究。

Wang等^[5]发现健康虹鳟的鳃、皮肤和小肠中IL-17表达量最高，这些组织都是病原菌最易入侵的部位，提示IL-17在机体抵御病原菌入侵中起到重要作用，同时在脑中也检测到IL-17的高表达，表明IL-17在神经系统调节中也可能起到一定作用；在注射鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)后，虹鳟IL-17的表达量显著上调，尤其在脑

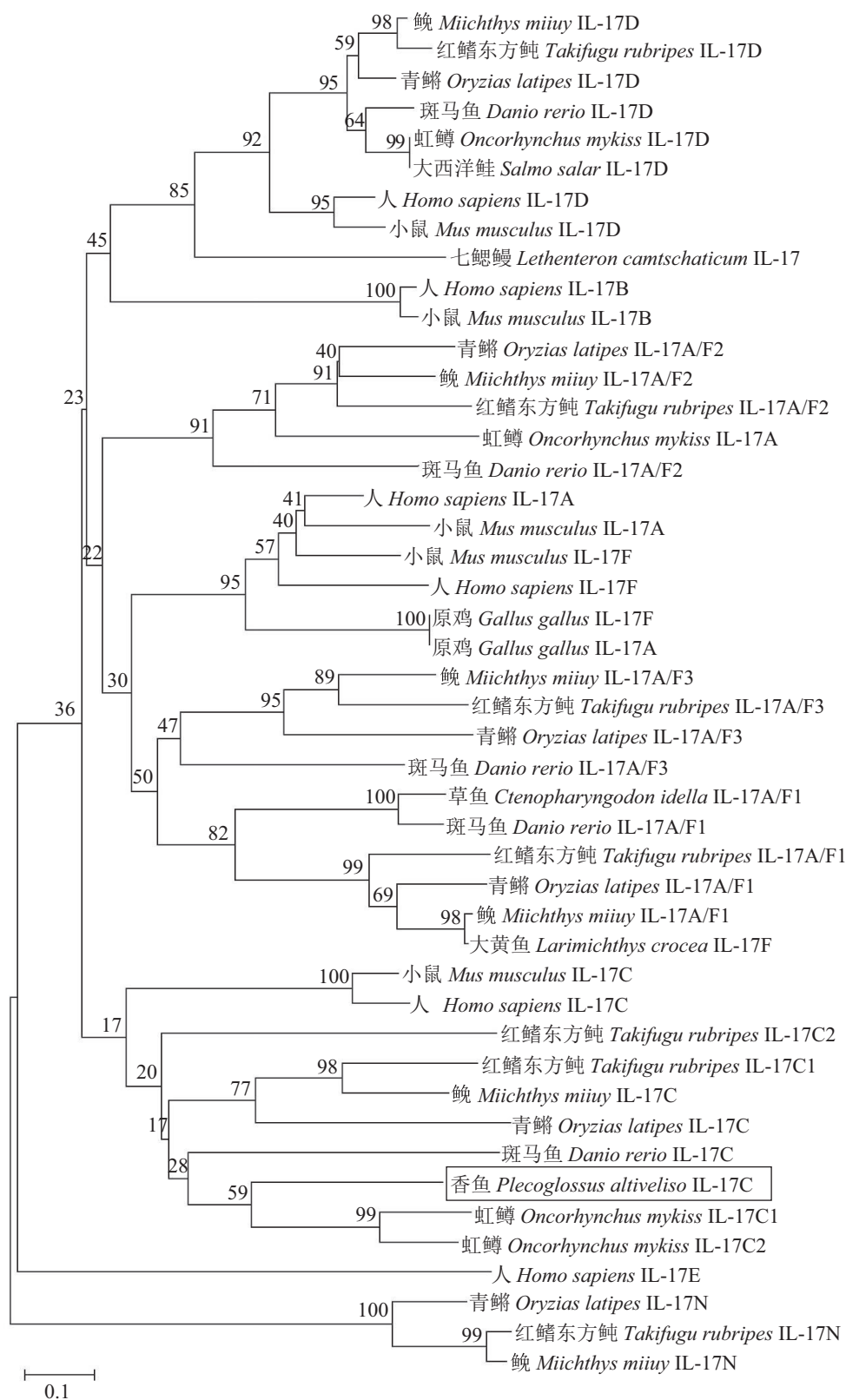


图3 基于NJ法构建的IL-17系统进化树

Fig. 3 A phylogenetic tree analysis of IL-17 gene constructed with the Neighbor-joining method

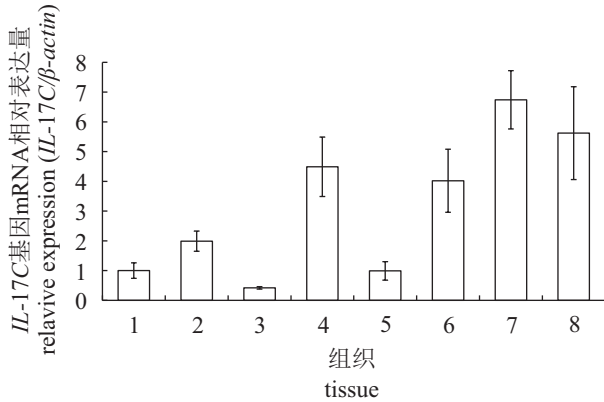


图4 IL-17C基因mRNA在香鱼各组织中的表达

1. 心; 2. 肠; 3. 肌肉; 4. 脑; 5. 脾; 6. 肝; 7. 头肾; 8. 鳃。图中数据表示为平均值±标准差(n=3)

Fig. 4 The expression of IL-17C mRNA in healthy *P. altivelis*

1. heart; 2. intestine; 3. muscle; 4. brain; 5. spleen; 6. liver; 7. head kidney; 8. gill. Data were shown as mean±SD (n=3)

中的表达变化最大, 提示IL-17可能在免疫系统和内分泌系统的联系中起到一定的作用。在红鳍东方鲀中, IL-17主要在脑、鳃、头肾和皮肤中表达, 注射LPS后头肾中IL-17表达显著上调, 表明IL-17可能参与机体的炎症反应^[10]。健康香鱼IL-17C在头肾中表达量最高, 提示一般情况下主要由头肾抵御病菌攻击和进行免疫调节; 而在鳃利斯顿氏菌侵染后, 其他各组织中IL-17C的表达均上调, 表明菌侵染刺激了各组织的免疫调节, 共同应对鳃利斯顿氏菌的攻击, 尤其是肝脏。香鱼体内IL-17C的表达变化与其他鱼类中的相关研究结果具有相似性, 都是免疫相关组织中的表达变化最大, 并且脑中表达也有所上调, 显示IL-17C在香鱼机体抵御病原菌侵染的过程中参与了免疫调节, 同时也可能与神经调节有关。研究结果可为进一步探讨香鱼IL-17C在炎症反应中的调节机制提供参考。

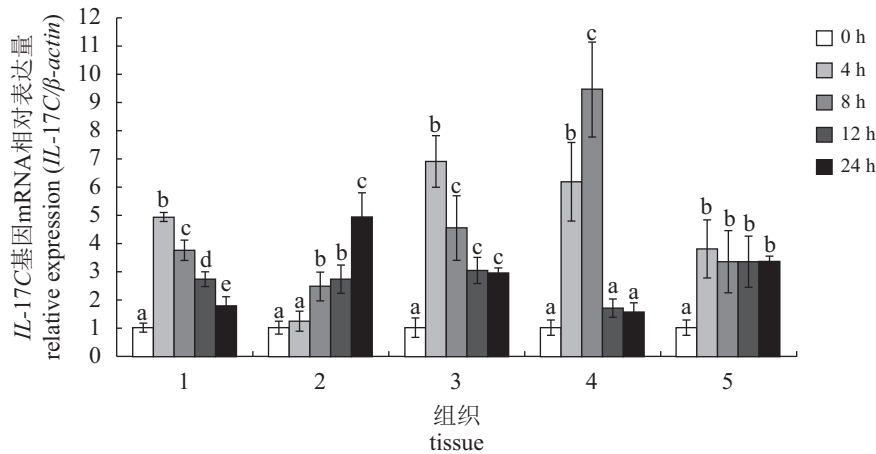


图5 鳃利斯顿氏菌侵染后香鱼组织中IL-17C基因的表达情况

1. 肠; 2. 脑; 3. 脾; 4. 肝; 5. 头肾。图中数据表示为平均值±标准差(n=3), 同一组织中不同时间点的表达量之间不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)

Fig. 5 Expression pattern of IL-17C gene in *P. altivelis* after *L. anguillarum* infection

1. intestine; 2. brain; 3. spleen; 4. liver; 5. head kidney. Data were shown as mean±SD (n=3), different letters among different time-points in the same tissue indicate significant difference (P<0.05)

参考文献:

[1] 李明月, 苗亮, 陈炯. 快长、少畸形香鱼新品种“浙闽1号”的选育[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(9): 1392-1397.

Li M Y, Miao L, Chen J. Breeding of a new variety of ayu (*Plecoglossus altivelis*) named "Zhemin No.1" with fast growth and few abnormality characters[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(9): 1392-1397(in

Chinese).

[2] Rouvier E, Luciani M F, Mattéi M G, et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene[J]. The Journal of Immunology, 1993, 150(12): 5445-5456.

[3] Song X Y, Qian Y C. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory

- diseases[J]. Cellular Signalling, 2013, 25(12): 2335-2347.
- [4] Moseley T A, Haudenschild D R, Rose L, *et al.* Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2003, 14(2): 155-174.
- [5] Wang T H, Martin S A M, Secombes C J. Two interleukin-17C-like genes exist in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* that are differentially expressed and modulated[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(5): 491-500.
- [6] Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation[J]. Cell, 1986, 46(5): 659-667.
- [7] Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, *et al.* cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2000, 20(10): 879-883.
- [8] Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines[J]. Journal of Experimental Medicine, 1996, 183(6): 2593-2603.
- [9] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1999, 103(9): 1345-1352.
- [10] Korenaga H, Kono T, Sakai M. Isolation of seven IL-17 family genes from the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5-6): 809-818.
- [11] 杜林勇. 硬骨鱼IL-17家族成员的分子和功能鉴定及合成机制的研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2014.
- Du L Y. Molecular identification, functional characterization and synthesis mechanism of IL-17 family members in teleost[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2014 (in Chinese).
- [12] Kumari J, Larsen A N, Bogwald J, *et al.* Interleukin-17D in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular characterization, 3D modelling and promoter analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(5): 647-659.
- [13] Tsutsui S, Nakamura O, Watanabe T. Lamprey (*Lethenteron japonicum*) IL-17 upregulated by LPS-stimulation in the skin cells[J]. Immunogenetics, 2007, 59(11): 873-882.
- [14] Du L Y, Feng S Y, Yin L C, *et al.* Identification and functional characterization of grass carp *IL-17A/F₁*: an evaluation of the immunoregulatory role of teleost *IL-17A/F₁*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 51(1): 202-211.
- [15] Yang Q, Sun Y N, Su X R, *et al.* Characterization of six IL-17 family genes in miiuy croaker and evolution analysis of vertebrate IL-17 family[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 243-251.
- [16] Ding Y, Ao J Q, Ai C X, *et al.* Molecular and functional identification of three interleukin-17A/F (IL-17A/F) homologues in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 55: 221-232.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] Alber G, Kamradt T. Regulation of protective and pathogenic Th17 responses[J]. Current Immunology Reviews, 2007, 3(1): 3-16.

Cloning of *IL-17C* gene from *Plecoglossus altivelis* and the expression pattern analysis after *Listonella anguillarum* infection

LI Mingyun*, MIAO Liang, GUO Xiaofei, NIE Li, HOU Honghong, CHEN Jiong

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To understand the sequence features and phylogeny of interleukin 17 (IL-17) in sweet fish (*Plecoglossus altivelis*), and its correlation to *Listonella anguillarum* infection, the cDNA sequence of *IL-17C* was cloned from *P. altivelis* by RACE-PCR, and the expression changes of different tissues were detected after *L. anguillarum* infection by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The full length of *P. altivelis IL-17C* cDNA was 1 087 bp including a 534 bp ORF and seven 3'UTR instability motifs (ATTTA), and it encoded 177 amino acids with eight conservation cysteine (Cys) and a 19 amino acids N-terminal signal peptide. Phylogenetic tree analysis showed that the same IL-17 subtype homologue from different species gathered together, and the *P. altivelis IL-17C* was clustered in one group with other vertebrate IL-17C. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *P. altivelis IL-17C* has higher similarity to *Oncorhynchus mykiss IL-17C1* (40.72%) and *O. mykiss IL-17C2* (34.04%). In healthy *P. altivelis*, *IL-17C* mRNA expression was detected in heart, liver, spleen, head kidney, gill, brain, muscle and intestine, high expression was shown in gill and head kidney. After *L. anguillarum* infection, the expression of *IL-17C* increased 9.17 folds in liver at 8 hpi (hours post infection) and 6.69 folds in spleen at 4 hpi compared to the control group. *IL-17C* gene is closely related to the pathogenic bacteria infection of *P. altivelis*, and it may play an important role in inflammatory immune response.

Key words: *Plecoglossus altivelis*; interleukin 17C (*IL-17C*); gene cloning; *Listonella anguillarum*; expression pattern

Corresponding author: LI Mingyun. E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41406154); Natural Science Foundation of Ningbo (2015A610271); Research Project (Science) of Department of Education of Zhejiang Province (Y201430860); Open Fund of Priority Subjects (Aquaculture) of Zhejiang Province (xkzsc1514)