

文章编号: 1000-0615(2019)02-0523-09

DOI: 10.11964/jfc.20171010995

大头鳕 *TNFSF6* 基因的结构分析及其在发育早期和病毒暴发时的表达水平

刘瑞婷¹, 蒋洁兰¹, 毛明光^{1,2*}, 姜志强¹, 布尔特¹,
矫志伟¹, 陈明康¹, 孙谦¹

(1. 大连海洋大学, 农业农村部北方海水增养殖重点实验室,

辽宁省北方鱼类应用生物学与增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 为揭示大头鳕 *TNFSF6* 基因的基本结构与功能及其在大头鳕发育和神经坏死病毒 (Pacific cod nervous necrosis virus, PCNNV) 暴发时的响应机制, 本研究通过基因克隆获得 *TNFSF6* cDNA 开放阅读框序列, 并对序列进行生物信息学分析, 运用相对荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法对 *TNFSF6* 在不同组织、孵化后不同日龄仔鱼和 PCNNV 感染前后仔稚鱼中的表达水平进行检测。结果显示, 大头鳕 *TNFSF6* cDNA 长 1 388 bp, 5'UTR 占 315 bp, 3'UTR 占 500 bp, ORF 全长 573 bp, 编码 190 个氨基酸。qRT-PCR 结果显示, *TNFSF6* 在各组织均有表达, 但在脾脏和鳃组织中的表达量较高; 大头鳕孵化后 15、20、37 和 40 d *TNFSF6* 基因的转录水平分别是其在 5 d 转录水平的 0.28、0.15、0.12 和 0.13 倍。在 24 d 和 46 d PCNNV 暴发时, 病鱼 *TNFSF6* 基因的转录水平高于对照组; 在 77 d PCNNV 暴发时, 病鱼 *TNFSF6* 转录水平则显著低于对照组。研究表明, *TNFSF6* 基因在大头鳕发育早期和仔鱼暴发 PCNNV 时发挥了重要的作用。

关键词: 大头鳕; 肿瘤坏死因子; *TNFSF6*; 发育; 神经坏死病毒

中图分类号: S 941.99

文献标志码: A

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF), 最初由 Carswell 等^[1]发现, 因该蛋白能引起肿瘤组织出血性坏死, 因而被称为肿瘤坏死因子。在人类中, 已有 19 种肿瘤坏死因子超家族 (TNF superfamily, TNFSF) 成员和 29 种肿瘤坏死因子受体超家族 (TNF receptor superfamily, TNFRSF) 成员被确认, 鱼类中有超过 14 种 TNFSF 成员被确认^[2]。在无脊椎动物中, 第一个 *TNFSF* 和 *TNFSFR* 在 2002 年分别被 Igaki 等^[3] 和 Kanda 等^[4] 从黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 体内分离出来。TNFSF 成员具有促进细胞生长、分化或死亡的功能, 并在淋巴器官的形成、免疫细胞的激活以及维持机体自身稳态方面发挥重要作用。TNFSF 成员

可与同源受体结合形成相关的信号复合物, 激活多种信号通路, 如 NF- κ B、JNK、MAPKs 等, 引起细胞凋亡^[5-6]。TNFSF 是重要的炎症因子, 具有诱导靶细胞增殖和凋亡的能力, 在免疫系统发育和免疫反应中也发挥着重要的作用。参与细胞增殖的 TNFSF 成员主要有 TNFSF5 (CD40L)、TNFSF4 (OX40L) 和 TNFSF7 (CD70), 参与细胞凋亡的 TNFSF 成员主要有 TNFSF6 (FasL)、TNFSF10 (TRAIL) 和 TNFSF12 (TWEAK)^[7]。

肿瘤坏死因子超家族成员 6 (tumor necrosis factor superfamily 6, TNFSF6) 别名 CD178、CD95L、FasL, 是一个 40 ku 的 II 型跨膜蛋白, 是 TNF 超家族成员之一^[8]。目前, 在水产动物研究中, 有关

收稿日期: 2017-10-10 修回日期: 2018-02-06

资助项目: 国家自然科学基金 (31302202); 中国博士后基金 (2016M602391); 中国水产科学研究院基本科研和农业部海洋渔业可持续发展重点实验室开放课题 (2017HY-XKQ01-08); 辽宁省教育厅专项 (QL201702, LR2016009)

通信作者: 毛明光, E-mail: mmg@dlou.edu.cn

*TNFSF6*基因的研究鲜有报道。2003年,对金头鲷(*Sparus aurata*)的*FasL-like*基因的研究发现其不含跨膜结构^[9]。2014年, Ma等^[10]对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)*FasL*基因的研究发现其mRNA与蛋白质的表达不同步, 3'UTR含有AUUUA重复序列。除此之外, 有关*TNF*的研究主要集中在*TNF- α* 上, 2000年, Bobe等^[11]从斑马鱼(*Danio rerio*)卵巢克隆获得一种*TNFR*基因, Northern blots结果显示在斑马鱼卵巢中表达量较高。2016年, 研究者从草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中克隆获得一种肿瘤坏死因子受体相关因子作用蛋白(tumor necrosis factor receptor-associated factor-interacting protein, *TRIP*), 亚细胞定位及双杂交分析显示, *TRIP*定位于细胞核, 可与肿瘤坏死因子受体相关因子1(tumor necrosis factor receptor-associated factor 1, *TRAF1*)和*TRAF2*相互作用^[12]。除此之外, 还有许多水产动物的*TNF*基因得到克隆, 如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[13-14]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[15]、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[16]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[17]等。

大头鲷(*Gadus macrocephalus*)隶属于鲑形目(Gadiformes)、鲑科(Gadidae)、鲑属(*Gadus*), 属冷水性底层鱼类^[18]。目前, 我国农业农村部北方海水增养殖重点实验室研究人员虽然有过成功进行大头鲷的人工繁育和周年饲养的先例, 但育苗早期会出现仔、稚鱼上浮于水面、急促螺旋状游动等症状, 死亡率达90%以上, 经显微镜观察及分子生物学诊断, 确诊为鱼类病毒性神经坏死病(viral nervous necrosis, *VNN*)^[19], 因此该病毒的防治成为人工繁育的主要瓶颈。当病毒入侵细胞时, 受感染的细胞会启动先天性免疫来抑制病毒复制和增殖^[20]。为揭示大头鲷神经坏死病毒(Pacific cod nervous necrosis virus, *PCNNV*)暴发后引起大头鲷免疫系统的响应机制, 本研究将以肿瘤坏死因子为切入点进行深入研究, 在差异转录组数据的基础上克隆获得大头鲷*TNFSF6*开放阅读框cDNA序列, 分析其结构特点, 并运用qRT-PCR方法对*TNFSF6*基因在不同组织、不同发育日龄仔鱼和*PCNNV*暴发前后的mRNA表达水平进行检测。研究结果将为病毒入侵时大头鲷仔、稚鱼的免疫调节机制提供理论依据, 为早日突破大头鲷人工繁育瓶颈提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

野生大头鲷成鱼于2015年旅顺附近海域捕获, 于农业农村部北方海水增养殖重点实验室进行人工授精、孵化和培育。将同一批次的受精卵置于1 m³的方形缸内进行流水培育, 于孵化后5、15、20、37和40 d取表观健康的仔、稚鱼各4~6尾; *PCNNV*暴发的时间为孵化后24、37、46、69和77 d, 在暴发时间点分别取样。对3尾成鱼进行解剖, 分别取鱼脑、鳃、肠、头肾、胸腺及脾脏等组织。以上所取样品置于1.5 mL离心管中, 液氮速冻, 并转移至-80 °C冰箱保存。

1.2 总RNA的提取与cDNA的合成

参照Tripure(Roche)试剂使用说明书进行总RNA提取, 用微量分光光度计测定总RNA的浓度, 并用1%(*W/V*)琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。总RNA经DNaseI处理后按照反转录试剂盒(TaKaRa)说明书合成cDNA。

1.3 *TNFSF6*基因扩增及序列测定

根据本实验室大头鲷转录组信息中已获得的*TNFSF6*部分序列, 利用Primer Premier 5.0设计一对特异性引物F1(5'-TAAAAGGGCTTAGTGATGTG-3')和R1(5'-AGCGAACTGAGAACA TAACTG-3')。以大头鲷脾脏组织的cDNA第一链为模板进行PCR, 扩增获得*TNFSF6*基因部分片段。PCR反应程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s; 58 °C退火30 s; 72 °C延伸1 min, 共35个循环; 72 °C终延伸10 min; 4 °C终止反应。PCR产物经1%(*W/V*)琼脂糖凝胶电泳检测后用胶回收试剂盒回收目的片段。将胶回收产物与pMD18-T载体连接, 连接产物转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 基因序列生物信息学分析

运用DNAMAN软件对序列进行分析得到氨基酸序列; 用生物信息学网站NCBI的在线功能BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)工具和DNAMAN软件对序列进行同源性比对和相似性分析; 运用ExPASy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)工具预测多肽分子量; 运用ExPASy protscale(<http://web.expasy.org/protscale/>)进行亲水

性分析;运用ExPASy TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行跨膜区预测;利用SignalP 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)程序对*TNFSF6*基因编码的氨基酸序列进行N端信号肽结构预测;用ExPASy prosite(<http://prosite.expasy.org/>)工具对*TNFSF6*进行结构域预测;利用Ras Tap软件构建大头鳕*TNFSF6*基因表达蛋白三维模型;使用MEGA 7.0,邻位相连法构建进化树,所用物种*TNFSF6*序列均从GenBank下载。

1.5 qRT-PCR检测*TNFSF6*基因表达

根据所获得*TNFSF6*基因序列信息设计特异性引物F2(5'-ATCCATAGCACCTCGTCG-3'),R2(5'-CCTCATCAGCTCCACCCT-3');以 β -actin作为内参基因F3(5'-CCCAAAGCCAA CAGGGAG-3'),R3(5'-GAGGCGTACAGGGA CAGC-3')。qRT-PCR反应体系为20 μ L,反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s;60 $^{\circ}$ C延伸15 min,共40个循环,样品和内参分别设3个重复。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因相对表达量^[21],基因的表达量用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)来表示,用SPSS 17.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 *TNFSF6*克隆结果与序列分析

大头鳕*TNFSF6*基因cDNA(GenBank登录号:MH190217)序列长1 388 bp,包含315 bp的5' UTR、500 bp的3' UTR和573 bp的ORF,编码190个氨基酸,预测蛋白分子量约为21.7 ku,结构域预测结果显示48~190位氨基酸残基之间含有一个TNF家族共有的同源结构域(TNF homeodomains, THD)(图1)。

2.2 *TNFSF6*氨基酸序列比对及系统发育树分析

利用BLAST工具,将大头鳕*TNFSF6*氨基酸序列和NCBI数据库中其他物种*TNFSF6*的氨基酸序列进行同源性分析,结果显示,其与大西洋鳕(*G. morhua*)*TNFSF6*的相似性高达97.0%,与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripe*)的*TNFSF6*相似性为59.0%,与原鸡(*Gallus gallus*)的*TNFSF6*相似性最低,为19.8%(表1)。运用DNAMAN工具进行氨基酸多序列比对,结果显示,*TNFSF6*含有一个TNF

家族特征序列“LQVNETGLYFVYSR”,C端含有两个高度保守的序列“VNVS”和“FFGLYLI”(图2)。利用包括大头鳕在内的10个物种的*TNFSF6*氨基酸序列构建进化树,结果显示,鱼类聚为一个支,其他物种聚为一个支。鱼类分支中海水鱼和淡水鱼分别聚为一个支,其中大头鳕与大西洋鳕在海水鱼的分支中单独聚为一个支(图3)。根据获得的大头鳕*TNFSF6*蛋白质氨基酸序列,以人FasL突变体(5L19)的晶体结构为模型^[22]构建*TNFSF6*蛋白质三维模型(图4),结果显示,*TNFSF6*单体主要由10个 β -折叠构成。

2.3 *TNFSF6*基因组织差异表达分析

qRT-PCR检测不同组织中*TNFSF6*基因的表达量,结果显示,*TNFSF6*基因在不同组织中均有表达,脾脏组织中表达量高于其他组织,其次是鳃,脑中的表达量最低,肠、头肾、胸腺、鳃、脾脏的表达量分别是脑中表达量的2.0、7.8、16.1、43.8、56.8倍(图5)。

2.4 发育早期*TNFSF6*的差异表达分析

qRT-PCR检测大头鳕仔鱼不同发育时期*TNFSF6*的表达量,结果显示,*TNFSF6*在大头鳕整个发育阶段中均有表达,但随着发育天数的增加,表达量逐渐降低,但40 d时表达量有微弱上升(图6)。在*TNFSF6*基因不同发育时期的表达中,15、20、37和40 d的表达量分别是5 d表达量的0.28、0.15、0.12和0.13倍。

2.5 PCNNV病毒暴发时*TNFSF6*的差异表达分析

qRT-PCR检测大头鳕仔、稚鱼感染PCNNV后*TNFSF6*的表达量,结果显示,在24、37、46、69 d病鱼*TNFSF6*基因的相对表达量分别与对照组相比,均无显著差异,77 d时,病鱼的*TNFSF6*基因的相对表达量显著低于对照组($P < 0.05$)(图7)。

3 讨论

本研究首次从大头鳕中克隆获得了*TNFSF6*基因的开放阅读框,序列分析表明该基因ORF全长573 bp,编码190个氨基酸,其蛋白分子量约为21.69 ku。大头鳕*TNFSF6*基因所编码的蛋白不含跨膜结构,且分子量较小,与Cuesta等^[9]发现的胞浆型蛋白相似,Cuesta等运用流式细胞术检测经透化处理的白细胞,发现分子量为19 ku的金头鲷FasL胞浆型蛋白,故推测本研究获得的


```

1                                                                                               GTA
4  AGTAGCTTCTGATTGCAATGGTTTATAAGACAAATTATAAGCTAAGTCAAATCAAATGTATAGTATCAAATGTGCATT
82  AAAACCTGTACATCATGTTTCGTCAAACTCAAAATATATTCAGAATGATAAAATGGAAGATCCTGTTTTCATTGAATT
160 AAGAAATTTGTAACATAAATAAAGAAAGATTTGATTGTACAGTGCATTTTCTAAGGTTATTCATAAGTGCAATTTGT
238 TGAATTAGTTACATTTGTCATGTATTGTCATGTCTATCTATAATAGGAATGTTTATTTTCGAACTAAAAGGGCTTAGTG
316 ATGTGTTATGGATATAAATCTTTATTTTCATCCGACAGACTGATAGGATGCATGACTCAGACACAAACATTCTCACA
1  M C Y G Y N S L F F I R Q T D R M H D S D T N I L T
394 CCTGAAAAGCAAGTTGGGCTTGA AAAACCAGTGTGGAGAAAGTTAAGGAGGAAGTAAGACCTGCAGCACATGCATA
27  P E K Q V G L E K P V L E K V K E E V R P A A H V I
472 GGGCGTATCCATAGCACCTCGTCGCAAAGACCCACCTTCTGTGGGAGCCAAGACGGGCCGCGCATTACAGAGGGA
53  G R I H S T S S P K T H L L W E P K T G R A F T E G
550 GGAGTCGTCTATCAGGATGGAGCTCTCCTGGTCAATCACACAGGACTCCACCATGTCTATTCAGGGTGGAGCTGATG
79  G V V Y Q D G A L L V N H T G L H H V Y S R V E L M
628 AGGCCGTGCTCCCCGACACACCCTTTGTTACAGTGTGTTTGTGAGGCGAGCCGGGCGTGCCGACCCACTGATGCTG
105 R P C S P T I I F V I S V F V R R A G R A D P L M L
706 ATGGTGGCAACAGAAAAGATGCGTGCAATGACAAGACAAAGGACAGCGTGTGGACCTCAGACAGCTACCTGGCGGCC
131 M V G N R K D A C N D K T K D S V W T S D S Y L A A
784 GCACTGCATCTTCAGAAGCAGGACAGAGTGTGTTGTAACGTCTCCACCCAGGGACCTGAGCCACAATCATTACGCC
157 A L H L Q K Q D R V F V N V S H P R D L S H N H Y A
862 AACTTCTTTGGTCTCTACAAAATCTAGCATGGAATGACTTTGACAATACATGCGTAAATTATTTTCATTATTTTCATTC
183 N F F G L Y K I *
940 AATAAAGGGTTTTTCAGCCAGAAAACATATTTATATAAATTTTCTCATAATTTAGCTGATTTTACAACCTGTAGAAAATTTT
1 018 CAGTTATGTTCTCAGTTTCGCTCTTAGGTTCTACTTCTCCCTCATGATTTTGTCTACCCGTTTGAGAGCTTAGGCA
1 096 TCATGGTATTAGACTGATTCTGGCATTATCTAATCACTGGAGCCCTCTGAAGCAAAGTAGAAAAAGGAATTGATATATT
1 147 GGACAAGACCGCATTTAGAAAAGTGTAAAGTGACAGCTGTGGCAATTGTGAAGCTCATAGATAAATAATTGTTAATAAC
1 252 AAATGACAGCTTTTGTGATACTGCATAAAACACTAAAGTAGTGAATTATGATTTATTTTGTGATCTCTAATATTTA
1 330 TTTCTGCTGTGGGCTTGTGACCTTGTCAAGACAATGTTAATAAAATGTTGAATTGTAC

```

图 1 TNFSF6核苷酸序列及推测的氨基酸序列

下划线部分为起始密码子和终止密码子；*为终止密码子；“□”代表TNF家族特征序列；阴影部分为TNFSF6的THD结构域

Fig. 1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of TNFSF6

Initiation codon and termination codon are underlined; the “*” stands for the termination codon; “□” stands for the signature sequence of TNF family; dashed area stands for the THD domain of TNFSF6

表 1 TNFSF6氨基酸序列物种间的比对分析

Tab. 1 Comparison of TNFSF6 amino acid sequences among species

物种 species	序列号 accession no.	相似性/% similarity
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	AEO92032.1	97.0
红鳍东方鲀 <i>T. rubripe</i>	XP 0116130.39.1	59.0
黄鳍 <i>Monopterus albus</i>	XP 020443152.1	55.0
东北虎 <i>Panthera tigris altaica</i>	XP 007084079.1	36.0
人 <i>Homo sapiens</i>	KJT60329.1	34.0
鲸鲨 <i>Rhincodon typus</i>	XP 020385912.1	32.0
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NM 001137578.1	24.0
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	NP 001036166.1	22.7
原鸡 <i>G. gallus</i>	NP 001026730.1	19.8

TNFSF6基因所编码的蛋白为胞浆型蛋白。根据所获得基因序列推导出的氨基酸序列用DNAMAN软件进行多序列比对结果显示，大头鳕TNFSF6基因所编码的蛋白含有一个TNF家族的特征序列“LQVNETGLYFVYSR”，且大头鳕TNFSF6基因编码的蛋白C端含有一个TNF家族的同源结构域(THD)。以上结果表明，所获得基因cDNA为大头鳕TNFSF6基因cDNA序列。系统发育进化树分析显示，大头鳕与大西洋鳕聚为一支，表明大西洋鳕与大头鳕TNFSF6基因的进化相关性最高。

胸腺、肾脏、脾脏是鱼类最主要的免疫器官，鳃和消化道作为黏膜淋巴组织的成员，对

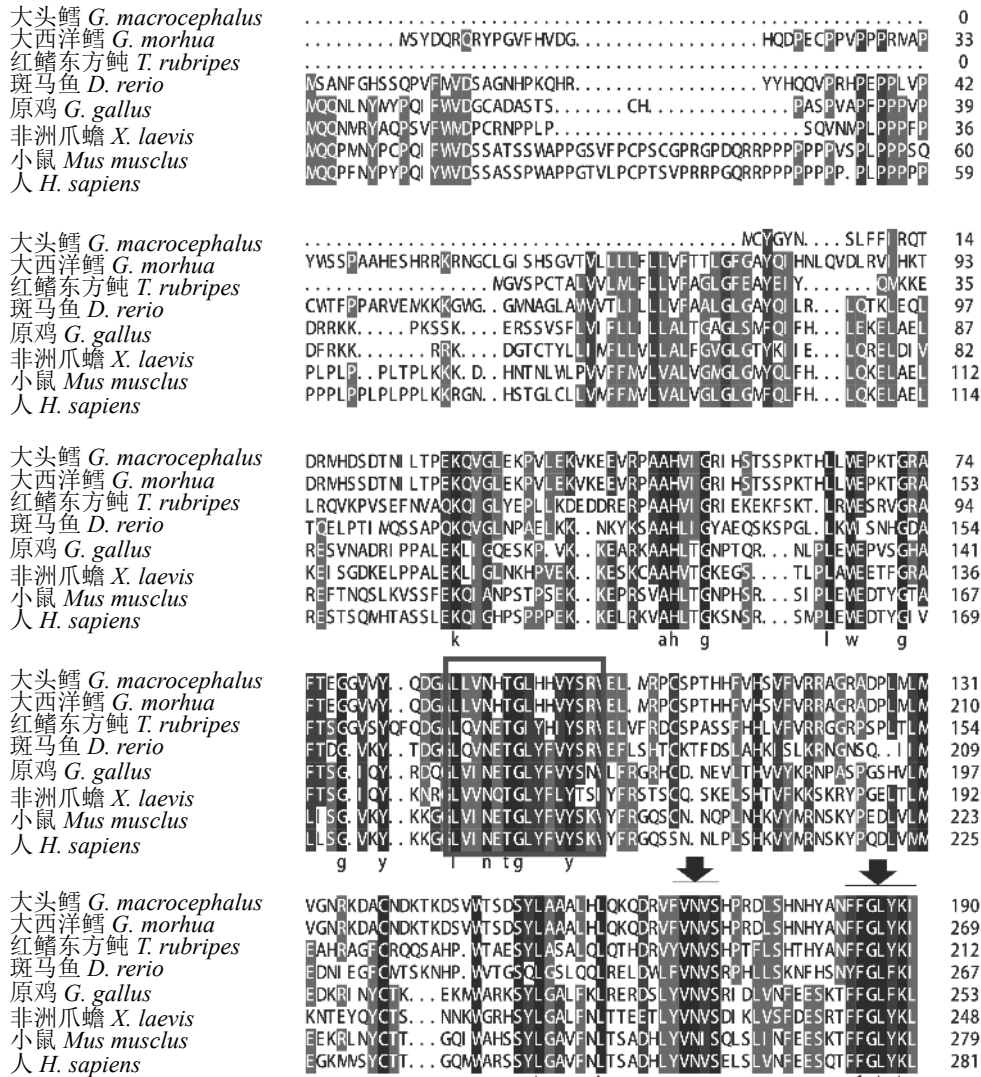


图 2 大头鳕 *TNFSF6* 与其他物种氨基酸序列对比

黑色阴影表示氨基酸序列同源性为100%；灰色阴影从深到浅分别表示氨基酸序列同源性≥75%、≥50%；“↓”代表高度保守序列；“□”代表TNF家族特征序列

Fig. 2 Multiple alignments of amino acid sequences of *TNFSF6* among *G. macrocephalus* and other species

The black shadow showed sequence homology of amino acid is 100%; black shallow from deep color to faint color indicated sequence homology of amino acid is more than 75%, 50%; “↓” stands for a highly conserved sequence; “□” stands for the signature sequence of TNF family

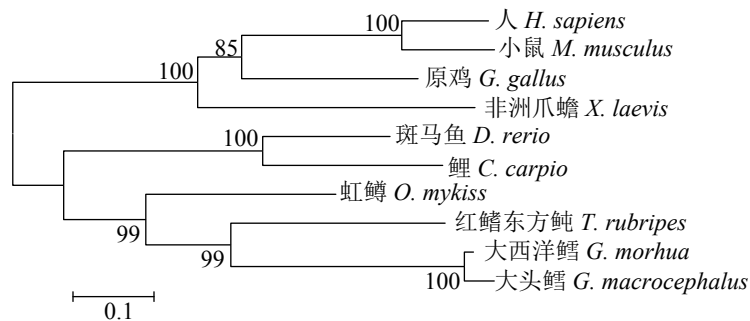


图 3 *TNFSF6* 氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from multiple alignments of *TNFSF6* amino acid sequences

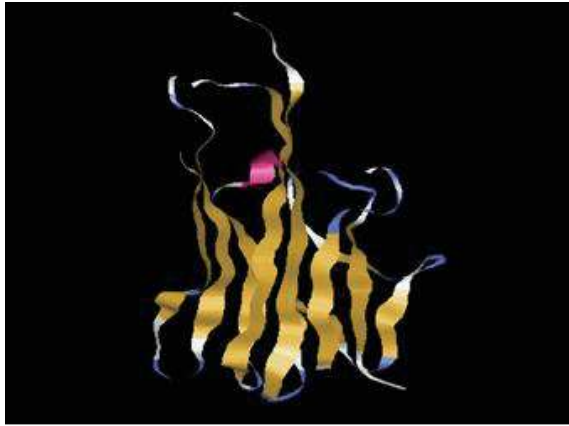


图4 TNFSF6蛋白三维结构预测

红色为 α 螺旋；蓝色为 β -转角；黄色为 β -折叠

Fig. 4 Prediction of three dimensional structure of TNFSF6

Red stands for α -helix; blue stands for β -turn; yellow is β -sheet

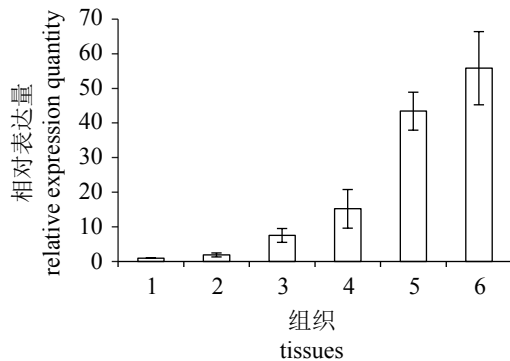


图5 qRT-PCR检测TNFSF6基因在成鱼组织中的表达

1. 脑, 2. 肠, 3. 头肾, 4. 胸腺, 5. 鳃, 6. 脾脏

Fig. 5 qRT-PCR analysis of TNFSF6 transcripts in adult fish tissues

1. brain, 2. intestine, 3. head kidney, 4. thymus, 5. gill, 6. spleen

鱼体免疫同样具有重要作用^[23]。脑是中枢神经系统的最高级部位，也是PCNNV感染的主要部位。因此本研究主要检测以上组织中TNFSF6的表达水平。相对qRT-PCR结果显示，TNFSF6基因在大头鳕成鱼的脾脏、鳃、胸腺、头肾中表达量较高，反映了TNF在鱼类免疫系统中的重要作用。文献显示，TNF的表达与鱼体抵抗病原感染密切相关，主要表现为经病原感染后，鱼体头肾、脾脏组织或细胞中的TNF表达量明显上调。草鱼脾脏组织经草鱼呼肠弧病毒(grass carp reovirus)感染后，TNF- α 表达量在48~72 h明显上调，120 h恢复到最初的表达量^[24]；香鱼(*Plecoglossus altivelis altivelis*)经鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)

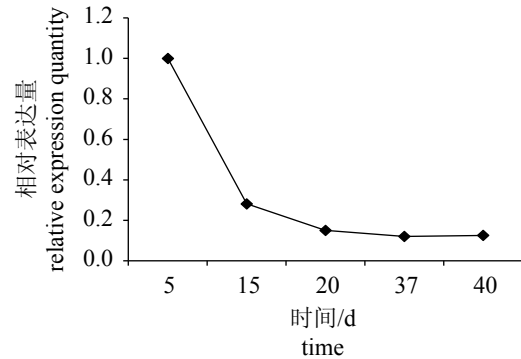


图6 qRT-PCR检测TNFSF6基因在不同日龄的表达变化

Fig. 6 qRT-PCR analysis of TNFSF6 transcripts at different age

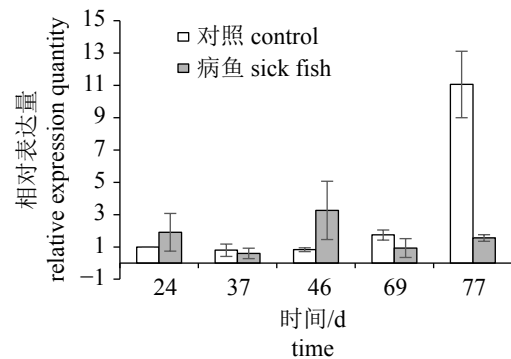


图7 qRT-PCR检测TNFSF6基因在PCNNV感染前后的表达变化

Fig. 7 qRT-PCR analysis of TNFSF6 transcripts upon PCNNV infection

感染后，头肾、脾脏中TNF- α 表达量在4 h后显著上调，8 h后脾脏中TNF- α 的表达量与对照组有明显差异，头肾在感染12 h后TNF- α 表达量达到峰值^[25]。TNFSF6在肠组织中的表达量较低，这可能是由于大头鳕属于深海鱼类，且多生活在冷水中，其生活环境中病原微生物较少^[18]。TNFSF6基因在脑中也有微量的表达，推测本实验用鱼可能携带有大头鳕神经坏死病毒^[19]。

根据相对qRT-PCR分析，TNFSF6基因在大头鳕整个发育时期都有表达，表达量逐渐降低，37 d时表达量最低，但在40 d时有微弱上升，PCNNV暴发前后不同日龄仔稚鱼TNFSF6的表达量中，对照组69 d和77 d的表达量有明显的升高。有研究表明，亲鱼所产生的抗体蛋白会传递给子代，且对子代免疫产生影响^[26]，大头鳕仔鱼在40 d时可摄食少量卤虫，自身非特异性免

疫能力增强,因此,*TNFSF6*表达量在发育前期较高且逐渐降低,可能与母源免疫有关,而发育后期表达量升高则可能与自身非特异性免疫能力增强有关。大头鳕仔鱼发病前后不同日龄中的全鱼相对qRT-PCR分析显示,病鱼与对照组*TNFSF6*基因表达水平无明显差异。本实验室前期研究发现,大头鳕*rag1*和*Igμ*在孵化后60 d左右开始表达,预示着T/B细胞开始分化成熟,该时期也正是仔、稚鱼免疫力薄弱期,易受病毒感染^[19],同时,T/B细胞与*TNF*之间存在着密切的关系^[11],本研究结果显示,69 d和77 d的对照组比较时,*TNFSF6*基因在77 d出现显著上调,这可能是在该时期T/B细胞分化时,*TNFSF6*基因也在特异性免疫系统发育过程中发挥了重要的调节作用。在77 d中,病鱼的*TNFSF6*基因显著低于对照组,这可能是由于病毒暴发时病毒粒子制约了宿主特异性免疫系统的正常发育,当病毒暴发时,病毒的拷贝数可达到 10^7 左右^[19]。总之,大头鳕发育早期*TNFSF6*基因的表达和病毒的复制之间存在着必然的联系,但这种关联机制尚不清楚,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Carswell E A, Old L J, Kassel R L, *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, 72(9): 3666-3670.
- [2] Wiens G D, Glenney G W. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1324-1335.
- [3] Igaki T, Kanda H, Yamamoto-Goto Y, *et al.* Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(12): 3009-3018.
- [4] Kanda H, Igaki T, Kanuka H, *et al.* Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(32): 28372-28375.
- [5] Li H X, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation[J]. *Cytokine*, 2008, 41(1): 1-8.
- [6] Wagner E F, Nebreda Á R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(8): 537-549.
- [7] Aggarwal B B, Gupta S C, Kim J H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey[J]. *Blood*, 2012, 119(3): 651-665.
- [8] Lettau M, Paulsen M, Kabelitz D, *et al.* Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15(17): 1684-1696.
- [9] Cuesta A, Esteban M Á, Meseguer J. Identification of a FasL-like molecule in leucocytes of the teleost fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(1): 21-27.
- [10] Ma T Y, Wu J Y, Gao X K, *et al.* Molecular cloning, functional identification and expressional analyses of FasL in Tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 448-460.
- [11] Bobe J, Goetz F W. Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2-3): 475-481.
- [12] Lu R H, Chang Z G, Sun J, *et al.* Molecular cloning, expression and functional characterization of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)-interacting protein (TRIP) in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 406-412.
- [13] Laing K J, Wang T H, Zou J, *et al.* Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(5): 1315-1322.
- [14] Hong S, Li R G, Xu Q Q, *et al.* Two types of TNF- α exist in teleost fish: Phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 191(12): 5959-5972.
- [15] Novoa B, Ordas M C, Costa M M, *et al.* Turbot TNF α gene: Molecular characterization and biological activity of the recombinant protein[J]. *Molecular Immunology*, 2006, 44(4): 389-400.
- [16] Xiao J, Zhou Z C, Chen C, *et al.* Tumor necrosis factor- α gene from mandarin fish, *Siniperca chuatsi*: Molecular cloning, cytotoxicity analysis and expression

- profile[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(14): 3615-3622.
- [17] Savan R, Sakai M. Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio* L.): Genomic and expression analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(1): 87-94.
- [18] 李艳秋. 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)早期发育阶段的生物学研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2013.
- Li Y Q. Study on biology of *Gadus macrocephalus* Tilesius during early developmental stage[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2013(in Chinese).
- [19] Mao M G, Wen S H, Perálvarez-Marín A, *et al.* Evidence for and characterization of nervous necrosis virus infection in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*)[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(9): 2237-2248.
- [20] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2015, 58(2): 156-169.
- Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 156-169.
- [21] 余舜武, 刘鸿艳, 罗利军. 利用不同实时定量PCR方法分析相对基因表达差异[J]. *作物学报*, 2007, 33(7): 1214-1218.
- Yu S W, Liu H Y, Luo L J. Analysis of relative gene expression using different real-time quantitative PCR[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(7): 1214-1218(in Chinese).
- [22] Liu W F, Ramagopal U, Cheng H Y, *et al.* Crystal structure of the complex of human FasL and its decoy receptor DcR3[J]. *Structure*, 2016, 24(11): 2016-2023.
- [23] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(6): 648-654.
- Zhang Y A, Sun B J, Nie P. Immune tissues and cells of fish: A review[J]. *Acta HydroBiologica Sinica*, 2000, 24(6): 648-654(in Chinese).
- [24] Wang H, Shen X B, Xu D, *et al.* Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Evidence for its involvement in antiviral innate immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 538-545.
- [25] 杨智景, 李长红, 张浩, 等. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*)肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因的分子克隆、鉴定及免疫相关性表达[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(6): 1380-1389.
- Yang Z J, Li C H, Zhang H, *et al.* Molecular cloning, characterisation and immune-related expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) gene in Ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(6): 1380-1389(in Chinese).
- [26] 丁福红, 雷霖霖, 韩明明, 等. 母源免疫对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)子代抗体IgM水平的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(5): 1301-1305.
- Ding F H, Lei J L, Han M M, *et al.* Effect of maternal immunity on the antibody IgM level in turbot *Scophthalmus maximus* offspring[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(5): 1301-1305(in Chinese).

Structural analysis of *TNFSF6* gene and its expression profiles in early development stages and virus outbreak in *Gadus macrocephalus*

LIU Ruiting¹, JIANG Jielan¹, MAO Mingguang^{1,2*}, JIANG Zhiqiang¹, BU Erte¹,
JIAO Zhiwei¹, CHEN Mingkang¹, SUN Qian¹

(1. Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China's Liaoning Province Sea,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish

Applied Biology and Aquaculture in North China, Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: In order to understand the structure and expression profiles of *TNFSF6* gene in *Gadus macrocephalus*, the full-length cDNA of *TNFSF6* was cloned and analyzed using the bioinformatics tools, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to examine the *TNFSF6* mRNA expression levels in various tissues of adult *G. macrocephalus*, at different development stages of larvae, and during PCNNV outbreak. The results showed that *TNFSF6* cDNA contains a 5'UTR of 315 bp, a 3'UTR of 500 bp, and an ORF of 573 bp encoding a protein of 190 amino acids. The results revealed that *TNFSF6* was expressed in various tissues and it was higher in the spleen and gill. QRT-PCR indicated that the transcript level of *TNFSF6* on 15, 20, 37, and 40 d post hatching was 0.28, 0.15, 0.12, 0.13 times of that on 5 d respectively. Compared to the control, the transcript level of *TNFSF6* decreased significantly during virus outbreak on 77 d, however, there was an upward trend of *TNFSF6* expression on 24 and 46 d respectively. The results indicated that *TNFSF6* plays an important role in the early development stages and in responding to PCNNV outbreak.

Key words: *Gadus macrocephalus*; tumor necrosis factor; *TNFSF6*; development; viral nervous necrosis

Corresponding author: MAO Mingguang. E-mail: mmg@dlou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31302202); China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2016M602391); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research & Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, P. R. China CAFS (2017HY-XKQ01-08); Research Project of Liaoning Education Department (QL201702, LR2016009)