



香港牡蛎淋巴因子基因 *tal* 的克隆与功能

黄亚楠¹, 周银银², 张跃环², 喻子牛², 李军^{2*}, 潘英^{1*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530004;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东广州 510301)

摘要: 为了研究淋巴因子基因 (T-cell acute lymphocytic leukemia, *tal*) 在香港牡蛎中的免疫功能, 实验采用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 克隆了香港牡蛎 *tal* 的 cDNA 全长序列, 命名为 *Chtal*, 该基因全长 812 bp, 其中 5' 非编码区 17 bp, 3' 非编码区 135 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 660 bp, 编码 219 个氨基酸, 相对分子质量 25.11 ku, 理论等电点 5.80。多序列比对和系统进化树结果显示, *Chtal* 与长牡蛎、美洲牡蛎和海蜗牛 *tal* 同源性较高, 证明了该基因是软体动物 *tal* 家族的一个成员。荧光定量 PCR 结果显示, *Chtal* 在香港牡蛎血淋巴细胞中表达量最高, 其次是心脏、鳃和消化腺。在溶藻弧菌和溶血性葡萄球菌刺激后, *Chtal* 表达量显著上调, 分别在 24 和 12 h 达到最高水平, 随着时间的增加该基因的表达量逐渐下降。亚细胞定位结果显示, *Chtal* 在细胞核中表达。活体注射重组 TAL 蛋白能够显著提高淋巴细胞的数量, 通过 Edu 增殖实验进一步证实了 *tal* 具有促进香港牡蛎血淋巴细胞再生的功能。本研究初步揭示了香港牡蛎 *tal* 参与了淋巴细胞再生, 为深入研究该基因在牡蛎抗病中的功能提供了依据。

关键词: 香港牡蛎; *tal*; 基因克隆; 亚细胞定位; 原核表达; Edu 增殖测定

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

淋巴因子基因 (T-cell acute lymphocytic leukemia, *tal*) 是 T 细胞急性淋巴细胞白血病患者发生遗传病变的关键基因^[1-3], 通过染色体易位, 出现不适当的重排的等位基因表达, 从而诱使白血病的发生^[4], 在近 25% 的 T 细胞急性淋巴细胞白血病患者中发现 *tal* 的改变^[1-3, 5-11]。*tal1* 编码至少 2 种磷蛋白, 即全长基因产物 pp42Tal1 (氨基酸残基 1~331) 和截短的多肽 pp22Tal1 (残基 176~331)。二者都包含基本的螺旋—环—螺旋 (bHLH) 基序^[12]。*tal1* 的 bHLH 结构域与 *lyl1* 和 *tal2* bHLH 结构域最为相关, *lyl1* 和 *tal2* 是不同的

基因, 它们是在 T 细胞白血病中被染色体易位改变的新基因, 编码一种带有螺旋—环—螺旋 DNA 结合基序的蛋白质, 它们也被 *tal* 中的染色体重排激活^[13-14]。因此, *tal1*、*tal2* 和 *lyl1* 构成了与人类 T 细胞白血病有关的 bHLH 蛋白的离散亚组^[14]。bHLH 结构域是 bHLH 转录因子的 DNA 结合区, bHLH 转录因子的结构域包含约 60 个氨基酸, bHLH 基序促进蛋白质异二聚体和同二聚体的形成, 而富含碱性氨基酸的相邻区域介导序列特异性 DNA 结合。bHLH 转录因子分为两大类: A 类蛋白和 B 类蛋白^[15], E12 和 E47 是 *E2A* 基因产

收稿日期: 2020-03-30 修回日期: 2020-05-28

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901400); 国家贝类产业体系建设专项 (CARS-49); 广州市珠江科技新星专项 (201806010003)

第一作者: 黄亚楠 (照片), 从事水产动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1828680977@qq.com

通信作者: 李军, E-mail: jun.li@scsio.ac.cn; 潘英, E-mail: yingpan@gxu.edu.cn



物,属于A类蛋白, *tal*的bHLH结构域和A类bHLH蛋白二聚化是bHLH蛋白质识别DNA所必需的^[16],产生的异二聚体(*tal1/E12*和*tal1/E47*)与启动子区E-box序列具有高亲和力。

目前关于*tal*的研究主要集中于人(*Homo Sapiens*)^[1,3,5,11,17]和小鼠(*Mus musculus*)^[18-20]等哺乳动物中,在无脊椎动物中研究较少,特别是海洋贝类,很多仅停留于序列的报道,如长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[21]和海胆^[22],深入的功能探讨和应用尚未开展。香港牡蛎(*C. hongkongensis*)是华南沿海海水养殖支柱产业之一,主要分布在我国华南沿海河口地带,具有较高的营养价值与经济价值^[23]。近年来随着养殖规模的不断扩大,养殖环境的破坏以及病害的频发,香港牡蛎出现了大规模死亡,严重制约了香港牡蛎养殖业的健康可持续发展。因此,开展香港牡蛎免疫防疫研究,对其养殖业的健康持续发展具有重要的意义。本实验首次克隆了香港牡蛎*tal*基因(*Chtal*),初步探讨了其在免疫防御及淋巴细胞增殖中的作用,这些结果为研究贝类免疫的细胞学机理奠定了基础,为贝类的病害防治和抗病育种提供了重要的理论与实践依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2019年6月,从中国科学院南海海洋研究所广东湛江实验基地取壳高为(10±0.2)cm的香港牡蛎若干,暂养于沙滤海水中,水温25~29℃,盐度20~26,连续充气,每天投喂单胞藻2次。

1.2 细菌感染

实验分为2组,一组是溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)实验组,一组是溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)实验组,每个实验组以100 μL/100 g剂量,浓度为1×10⁸ CFU/mL的溶藻弧菌和溶血性葡萄球菌分别对香港牡蛎闭壳肌进行注射,对照组注射相同体积的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS),每个实验条件下取20只香港牡蛎用于病原菌注射;随机取5只香港牡蛎,分别于3、6、12、24、48和72 h取血淋巴细胞,保存于液氮中备用。

1.3 RNA提取与cDNA的合成

选取5只健康香港牡蛎,取外套膜、性腺、

闭壳肌、消化腺、鳃、心脏和血淋巴细胞7个组织;选取细菌感染后香港牡蛎5只,取不同时间点的血淋巴细胞。利用Trizol法提取总RNA,采用1%的琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop 2000分光光度计检测其含量和质量,并保存于-80℃冰箱。用Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒进行反转录,实际操作根据试剂盒说明书进行。

1.4 *Chtal*基因克隆与生物信息学分析

根据已有的转录组数据,通过生物信息学方法筛选到*tal*部分序列^[24],利用Premier 5.0软件设计特异性引物(表1),全长扩增采用SMART RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa)试剂盒,通过巢式PCR进行5'和3'末端的扩增,第1轮PCR反应条件:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 30个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。以第1轮PCR产物为模板,进行第2轮PCR反应,反应条件为94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 30个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段,然后将产物与pMD-19T载体连接,并转化至DH5α中,氨苄抗性平板筛选阳性克隆并进行菌液PCR鉴定,送天一辉远生物科技有限公司测序。利用NCBI数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)的BLASTP工具进行同源序列分析,利用ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的分子量和等电点,利用NCBI数据库中的ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行开放阅读框确定及序列翻译,利用MEGA 7.0软件中的Neighbor-Joining (NJ)构建系统进化树。

1.5 *Chtal*在不同组织中的表达分布

利用实时荧光定量方法(qPCR)检测*Chtal*在健康香港牡蛎不同组织中的表达,包括外套膜、性腺、闭壳肌、消化腺、鳃、心脏和血淋巴细胞,以及香港牡蛎受到细菌感染后*Chtal*在血淋巴细胞中的表达,每种组织取3个个体。采用SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa)染料,EF1α做为内参基因,使用LightCycler 480II荧光定量PCR仪进行定量分析,PCR反应程序:50℃

表 1 本实验所用的引物和序列

Tab. 1 Primers and sequences used in this study

引物 primer	序列(5'—3') sequence	用途 usage
<i>Chtal</i> R1	GACTATTGGTAAACATTCTTTTGTGACG	5' RACE of <i>Chtal</i>
<i>Chtal</i> R2	TACAATATGATGTTCTGGACGGTAAAA	
<i>Chtal</i> F1	TTTGCGGAGCTTCGTAAACTTGTACCG	3' RACE of <i>Chtal</i>
<i>Chtal</i> F2	ATTAGACTTTTGGAGAACGTTTTAGA	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	first PCR for 5' and 3' RACE
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	nested PCR for 5' and 3' RACE
<i>Chtal</i> F3	AGCTGGATCCATGTGCGACGGAGTATAGAAG	vector for <i>Chtal</i> -pET28a
<i>Chtal</i> R3	ACGTCTGCAGTTACGCTGAATGCAGACTTT	
<i>Chtal</i> F4	ACTGCTCGAGATGTGCGACGGAGTATAGAAG	vector for <i>Chtal</i> -GFP
<i>Chtal</i> R4	CTGAGGATCCCGCGCTGAATGCAGACTTTCAT	
<i>Chtal</i> F5	GACGACAGCGACGATAATGT	Real-time-PCR of <i>Chtal</i>
<i>Chtal</i> R5	CCTGGGTAGAACTTGACCGT	
EF1 α -F	GCTCCACCCAACATCACCAGT	Real-time-PCR of EF1 α
EF1 α -R	ACGGATTCCTTTACGGACACG	

2 min, 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线程序: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s。

1.6 *Chtal* 表达产物的亚细胞定位

使用本实验室保存的绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-N1, 设计引物 *Chtal*-GFP(表 1), 包含 *Bam*H I 和 *Eco*R I 2 个酶切位点, PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 扩增产物, 利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 PCR 扩增产物和 pEGFP-N1 载体, 37 °C 酶切 3 h, 再利用琼脂糖凝胶电泳回收酶切产物, T4 连接酶连接, 转化 DH5 α , 挑阳性克隆送公司测序, 测序正确的用于提取质粒。将培养至对数期的 HEK-293T 细胞接种于 6 孔细胞培养板进行培养, 待细胞融合度达到约 80% 进行转染, 以 pEGFP 空载体为对照组, pEGFP-*tal* 为实验组, 采用脂质体转染法进行转染, 转染 12 h 后换液, 48 h 后用 DAPI 进行细胞核染色, Olymapus 显微镜进行荧光拍照。

1.7 *Chtal* 原核表达与纯化

选择 *Bam*H I 和 *Xho* I 这 2 个酶切位点, 设计原核表达引物 *Chtal*-pET28a (表 1); PCR 扩增

出 *Chtal* ORF; PCR 产物和 pET-28a 载体分别使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 内切酶进行双酶切, 利用琼脂糖凝胶电泳纯化酶切产物; 将纯化后的酶切 PCR 产物和 pET-28a 载体连接; 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 送公司测序鉴定, 将测序正确的重组质粒 pET28a-TAL 转入到 BL21 (DE3) 细胞中, 经 IPTG 诱导后用 1×PBS 重悬菌体, 利用超声波破碎仪破碎菌体后, 使用镍柱亲和层析法对蛋白进行纯化, 分别取未诱导的蛋白、IPTG 诱导蛋白和纯化后的重组蛋白进行蛋白质聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE)。

1.8 香港牡蛎血淋巴细胞计数与 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷增殖测定

分别将 100 μ L (100 mg/mL) TAL 重组蛋白和血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 注射到香港牡蛎闭壳肌中, 其中 BSA 作为对照组; 12 h 后每个组随机取 5 只香港牡蛎。分别取血淋巴细胞放于血细胞计数板上进行计数; 6 孔板中的每个孔接种 1×10^6 个血淋巴细胞, 在每孔中加入 10 μ mol 的 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu), 室温避光孵育 2 h, PBS 清

洗细胞2次,每次3 min,加入1 mL 4%的多聚甲醛室温孵育10 min, PBS清洗细胞2次,每次3 min,加入1 mL含0.5% TritonX-100的PBS室温孵育10 min,然后PBS清洗细胞2次,加入500 μ L Click-iT™反应液室温避光孵育30 min,弃Click-iT™反应液,用含有3% BSA的PBS清洗细胞,加入500 μ L稀释的DAPI试剂,室温避光孵育10 min,然后弃染色液,用PBS清洗3次,荧光显微镜下镜检拍照。

1.9 数据分析

数据用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示,利用SPSS 18.0软件采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)对数据进行统计学检验, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

2.1 *Chtal* cDNA 序列的克隆与分析

Chtal cDNA序列全长为812 bp,包含5'非编码区17 bp,3'非编码区135 bp,ORF为660 bp,编码了219个氨基酸,其相对分子量为25.115 ku,理论等电点为5.80。多序列比对结果显示,*Chtal*的氨基酸序列与太平洋牡蛎(AAK72692.1)的一致性最高,为98.17%,与斑马鱼(*Danio rerio*)(XP_009300346.1)的一致性为72.31%,与人(NP_001277335.1)和小鼠(NP_035657.1)的一致性分别为68.12%和67.65%(图1)。利用10个物种的TAL氨基酸序列构建系统进化树,香港牡蛎与长牡蛎、美洲牡蛎(*C. virginica*)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)聚为一支,再与果蝇(*Drosophila yakuba*)、斑马鱼、海蜗牛(*Aplysia californica*)聚为一支,人和小鼠单独聚为一支(图2)。

2.2 *Chtal* 组织分布和细菌感染下的表达模式

qPCR结果显示,*Chtal*在外套膜、性腺、闭壳肌、消化腺、鳃、心脏和血淋巴细胞中均有表达,在血淋巴细胞中表达量最高,其次是心脏、鳃和消化腺,在外套膜中表达量最低(图3)。在溶藻弧菌感染12 h后,*Chtal*表达水平显著升高,24 h达到最高,为对照组的15.43倍($P < 0.01$),随着时间的增加,*Chtal*表达量逐渐下降。在溶血性葡萄球菌感染6 h后,*Chtal*开始显著上调,在12 h达到最高,为对照组的16.64倍($P < 0.01$),随着时间的增加,*Chtal*的表达量逐渐下

降(图4)。

2.3 *Chtal* 表达产物的亚细胞定位

经双酶切后,构建表达绿色荧光蛋白和目的基因融合蛋白的重组质粒,将重组质粒转染293T细胞,结果显示,pEGFP-*tal*在细胞核中表达,对照组pEGFP-NI在细胞核和细胞质中表达(图版I)。

2.4 *Chtal* 原核表达与纯化

构建原核表达载体,将重组质粒pET28a-*tal*转入到BL21(DE3)细胞中,经IPTG诱导,镍柱亲和层析法对蛋白进行纯化,取未诱导蛋白,IPTG诱导蛋白,纯化后重组蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳。结果显示,IPTG诱导蛋白和纯化后重组蛋白相对分子质量为25 ku(图5),与理论蛋白相对分子质量相近。

2.5 香港牡蛎血淋巴细胞计数与Edu增殖测定

将TAL重组蛋白注射到香港牡蛎闭壳肌,通过血细胞计数板计数,结果显示,实验组香港牡蛎的血淋巴细胞数目高于对照组,与对照组差异显著($P < 0.05$)(图6)。Edu增殖测定结果显示,实验组具有明显的细胞增殖现象,血淋巴细胞的增殖率为对照组的2.35倍($P < 0.05$),TAL重组蛋白具有促进香港牡蛎血淋巴细胞增殖的功能(图版II)。

3 讨论

TAL是哺乳动物造血发育的最早标志之一,TAL最初发现于T细胞急性淋巴细胞白血病患者,是通过反复的染色体易位参与鉴定的^[18],在成年小鼠的造血组织中检测到TAL1蛋白^[20],小鼠SCL同系物、SCL和TAL参与造血过程^[25-26]。有研究表明^[27],在敲除了*tal1*基因后,小鼠在9.5 d左右死亡,同时发现缺失*tal1*基因的小鼠,其造血组织受到了不可恢复的影响,在脊椎动物中,*tal1/SCL*表达的激活对于造血功能和造血干细胞的形成至关重要。考虑到*tal1/SCL*在脊椎动物中的功能,长牡蛎的*tal*可能是研究牡蛎造血的有前途的工具^[21]。本实验多序列对比中,香港牡蛎*tal*的氨基酸序列与长牡蛎的一致性最高,与人和小鼠*tal*的一致性较低,可以看出香港牡蛎*tal*与其他物种*tal*具有序列的保守性,均具

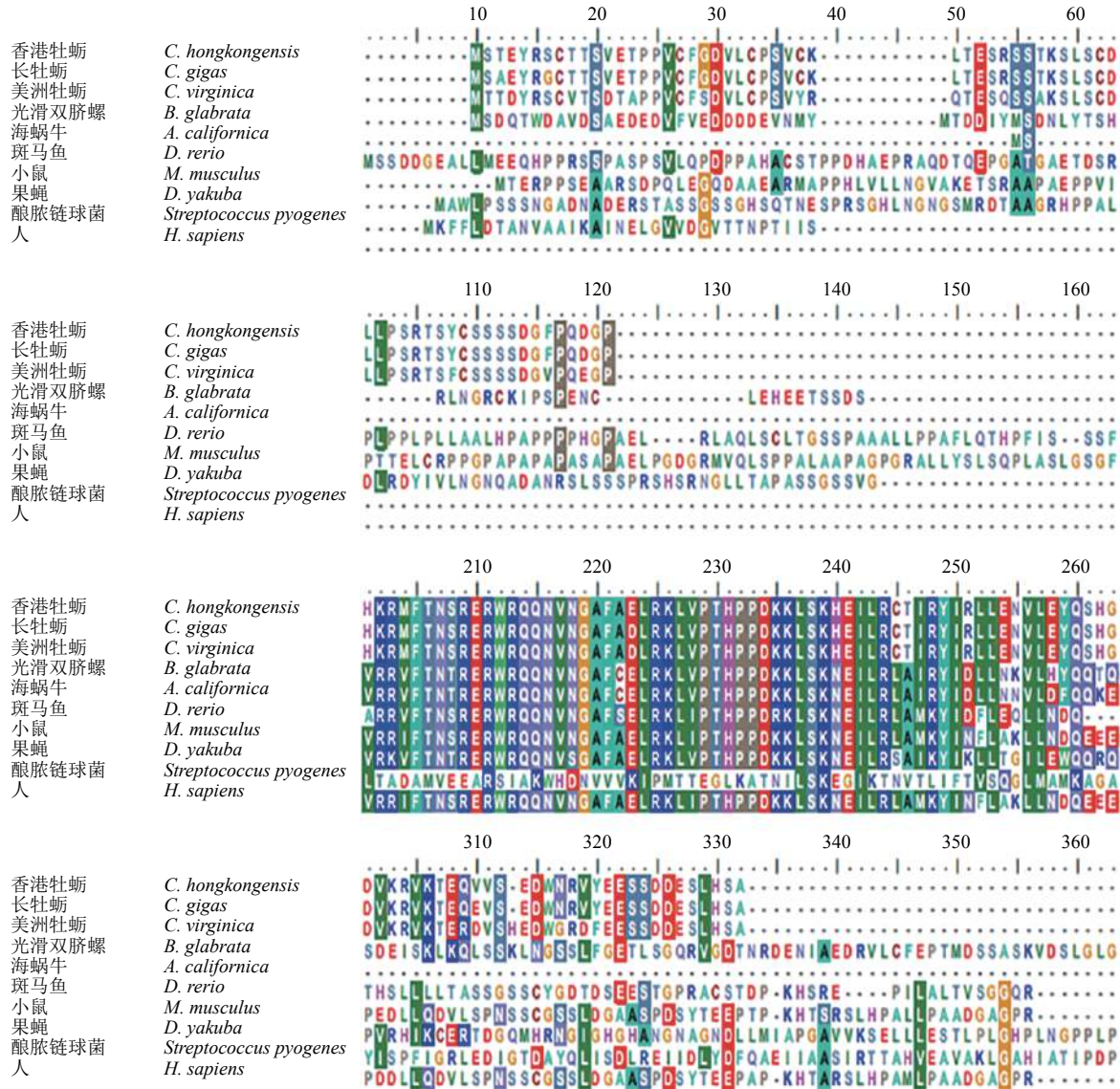


图 1 *Chtal* 和其他物种该氨基酸序列的多序列对比结果

物种及其 *tal* 编码的氨基酸序列的 GenBank 序列号: 长牡蛎 (AAK72692.1); 美洲牡蛎 (XP_022312823.1); 光滑双脐螺 (XP_013070458.1); 海蜗牛 (XP_005089768.1); 斑马鱼 (AAC41264.1); 小鼠 (AAA86937.1); 果蝇 (EDW92429.2); 酿脓链球菌 (ANC25916.1); 人 (AAB19683.1)

Fig. 1 Comparison of *tal* amino acid sequence in *C. hongkongensis* with amino acid sequences of other species

GenBank sequence number of species and their *tal* amino acid sequence: *C. gigas* (AAK72692.1); *C. virginica* (XP_022312823.1); *B. glabrata* (XP_013070458.1); *A. californica* (XP_005089768.1); *D. rerio* (AAC41264.1); *M. musculus* (AAA86937.1); *D. yakuba* (EDW92429.2); *Streptococcus pyogenes* (ANC25916.1); *H. sapiens* (AAB19683.1)

有 bHLH 结构域。系统进化树显示香港牡蛎 *tal* 与软体动物聚为一支, 这说明这些基因可能起源于共同的祖先。实验结果表明, 香港牡蛎 *tal* 可能具有类似于其他软体动物 *tal* 的功能。

为了探讨 *tal* 在香港牡蛎中的生理功能, 实验运用 qPCR 技术对其在不同组织中的表达模式和细菌感染下表达水平的变化进行了研究。在健康的香港牡蛎体内, *tal* 广泛表达于香港牡蛎各个组织, 在血淋巴细胞中的表达量最高, 这

与长牡蛎的研究结果相似。Barreau-Roumiguier 等^[21] 研究结果显示长牡蛎 *tal* 探针与从血细胞中提取的 RNA 强杂交, 从心脏提取的 RNA 也出现微弱的杂交信号, 暗示其可能与免疫相关。溶藻弧菌、溶血性葡萄球菌是水生生物的致病菌, 是导致海洋软体动物死亡的一个重要因素。香港牡蛎血淋巴细胞在宿主防御系统中起着中心作用^[28]。在外界病原进入体内时, 很快被血细胞吞噬, 血细胞的吞噬作用是贝类最主要的防御手

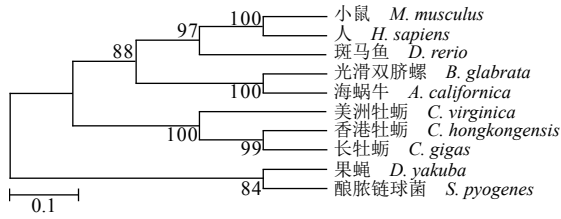


图 2 香港牡蛎和其他物种的 TAL 氨基酸系统进化树
GenBank 序列号：长牡蛎 (AAK72692.1)；美洲牡蛎 (XP_022312823.1)；光滑双脐螺 (XP_013070458.1)；海蜗牛 (XP_005089768.1)；斑马鱼 (AAC41264.1)；小鼠 (AAA86937.1)；果蝇 (EDW92429.2)；酿脓链球菌 (ANC25916.1)；人 (AAB19683.1)

Fig. 2 Phylogenetic tree of TAL amino acids in *C. hongkongensis* and other species

GenBank sequence number: *C. gigas* (AAK72692.1); *C. virginica* (XP_022312823.1); *B. glabrata* (XP_013070458.1); *A. californica* (XP_005089768.1); *D. rerio* (AAC41264.1); *M. musculus* (AAA86937.1); *D. yakuba* (EDW92429.2); *S. pyogenes* (ANC25916.1); *H. sapiens* (AAB19683.1)

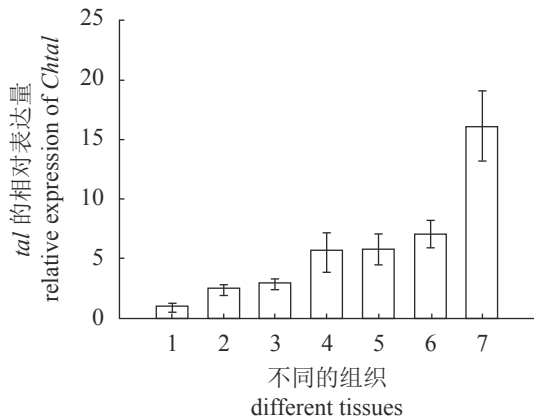


图 3 tal 基因在香港牡蛎不同组织内的表达水平
1. 外套膜, 2. 性腺, 3. 闭壳肌, 4. 消化腺, 5. 鳃, 6. 心脏, 7. 血淋巴细胞

Fig. 3 Expression levels of tal gene in different tissues of *C. hongkongensis*

1. mantle, 2. gonad, 3. adductor muscle, 4. digestive gland, 5. gill, 6. heart, 7. hemocytes

段^[29]。因此，实验对溶藻弧菌和溶血性葡萄球菌刺激后 tal 在香港牡蛎血淋巴细胞中的表达情况进行了检测。在牡蛎受到溶藻弧菌和溶血性葡萄球菌感染后，Chtal 的表达水平均显著上调，表明其可以作为免疫因子在香港牡蛎防御病原体入侵以及消灭病原体过程中发挥至关重要的作用。长牡蛎 tal 的表达不受盐蛋白胨水 (saline peptone water, SPW) 或细菌感染的影响，可能与研究方法有关，mRNA 的差异显示方法 (mRNA

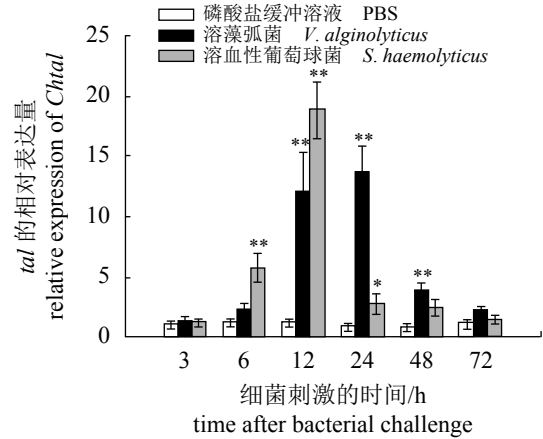
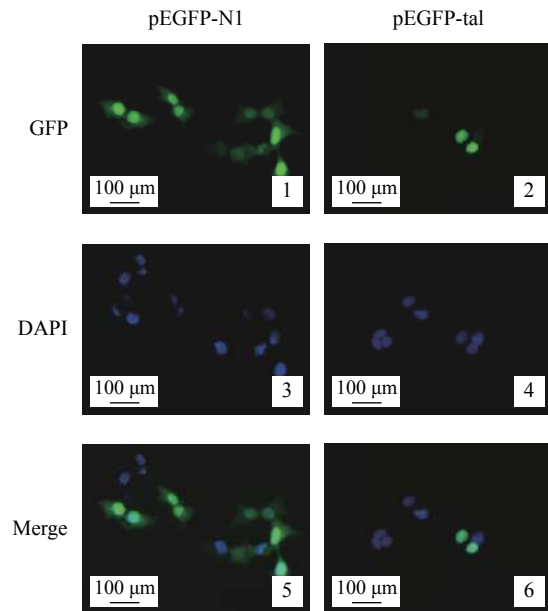


图 4 细菌刺激后香港牡蛎血淋巴细胞中 tal 的表达量变化

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 下同

Fig. 4 Changes of tal gene expression in lymphocyte of *C. hongkongensis* after bacterial stimulus

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; the same below



图版 I Chtal 的亚细胞定位

Plate I Subcellular localization of Chtal

differential display approach, DD-RT-PCR) 假阳性克隆的发生率较高，通过这种方法得到的基因经常在细胞中组成型表达。

亚细胞定位结果显示，Chtal 主要在细胞核中表达，表明 Chtal 在血淋巴细胞的细胞核中发挥作用，tal 可能作为直接转录因子，与细胞核中的 DNA 结合，发挥免疫功能。有研究表明，tal 与 DNA 序列的 E-box 具有较高的亲和力，bHLH

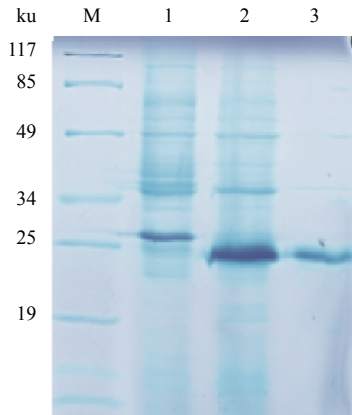


图 5 原核表达和纯化的结果

M. 蛋白分子质量; 1. 未诱导蛋白; 2. IPTG 诱导蛋白; 3. 纯化后的 ChTAL-His 重组蛋白

Fig. 5 Results of prokaryotic expression and purification

M. protein marker; 1. uninduced protein; 2. IPTG induced protein; 3. purified Chtal-His recombinant protein

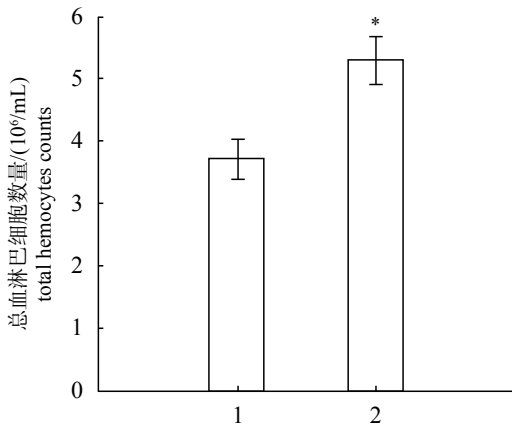


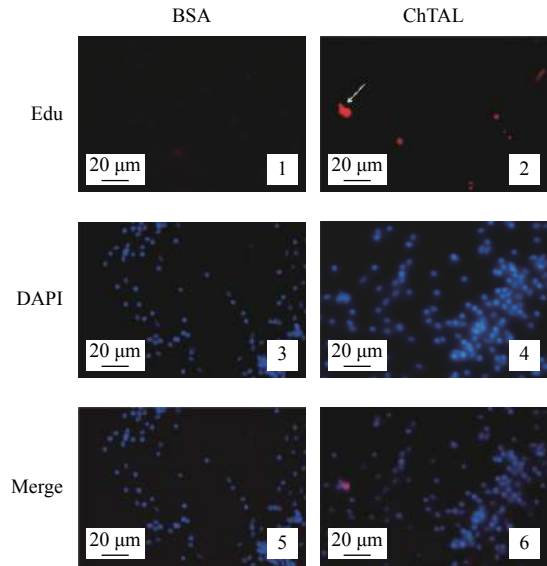
图 6 香港牡蛎血淋巴细胞计数

1. 对照组; 2. 实验组

Fig. 6 Lymphocyte count in *C. hongkongensis*

1. control group; 2. experimental group

结构域可以介导 E12 或 E47(A 类) 与 *tal* (B 类) 之间的异源二聚体形成, 形成对免疫球蛋白增强子位点高亲和力的蛋白, *tal1* 异二聚体优先结合由共有序列 AACAGATGGT 表示的 E-box 元件。*tal1* 异二聚体可能识别下游靶基因的子序列, 并可能调节其表达, 起到转录调节因子的作用^[16]。另外, 在蛋白质水平上, 重组蛋白 TAL 注射到香港牡蛎闭壳肌后, 香港牡蛎血淋巴细胞增多, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。Edu 增殖测定结果显示, 实验组比对照组的血淋巴细胞多, 重组蛋



图版 II 香港牡蛎血淋巴细胞 Edu 增殖测定

Plate II Determination of lymphocyte Edu proliferation in *C. hongkongensis*

白 TAL 具有促进血淋巴细胞再生的功能, 血细胞计数的结果与 Edu 的结果一致。*tal* 与造血功能之间的联系在小鼠^[27, 30] 和人^[31] 等哺乳动物中也有过相关的报道。在小鼠中, *tal1* 基因产物参与造血调节的转录因子和胚胎血管的生成, 在成年小鼠胚胎中的胚层、卵黄囊和造血组织中检测到 TAL1 蛋白^[20], 小鼠 *scl* 同系物、*scl* 和 *tal* 参与造血过程^[25-26]。有研究表明, 缺失 *tal1* 基因的小鼠, 造血组织受到严重的影响^[27]。对非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的研究表明^[32], 基础螺旋—环—螺旋基因 *scl* 的破坏导致早期造血阻滞, 并导致所有造血系的缺陷, 证明了 *scl* 在胚胎发生早期的腹中胚层中表达, *scl* 参与胚胎中胚层造血。宋小瑞^[33] 通过 ds-RNA 干扰实验, 发现对长牡蛎 *scl* mRNA 表达的干扰会引起血淋巴细胞特异性基因和造血相关转录因子的显著下调, *scl* 可能参与长牡蛎的造血作用, 这与本实验通过原核表达, Edu 增殖测定方法直接得出的 *tal* 促进血淋巴细胞再生的研究结果相一致。

4 结论

本研究克隆了香港牡蛎 *tal*, 多序列比对和系统进化树分析结果表明, *tal* 与软体动物的 *tal* 高度同源。溶藻弧菌和溶血性葡萄球菌感染后, 血淋巴细胞中 *tal* 表达量显著上调, 揭示 *tal* 可能

参与了牡蛎抵抗病原微生物的先天免疫反应。通过原核表达、Edu增殖测定结果显示, *tal* 具有促进血淋巴细胞再生的功能。这些结果为香港牡蛎免疫防御以及抗病育种研究提供了参考。

参考文献 (References):

- [1] Aplan P D, Lombardi D P, Ginsberg A M, *et al.* Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity[J]. *Science*, 1990, 250(4986): 1426-1429.
- [2] Chen Q, Cheng J T, Tasi L H, *et al.* The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein[J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(2): 415-424.
- [3] Finger L R, Kagan J, Christopher G, *et al.* Involvement of the *TCL5* gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(13): 5039-5043.
- [4] Hsu H L, Wadman I, Tsan J T, *et al.* Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(13): 5947-5951.
- [5] Brown L, Cheng J T, Cheng Q, *et al.* Site-specific recombination of the *tal-1* gene is a common occurrence in human T cell leukemia[J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(10): 3343-3351.
- [6] Bernard O, Lecoite N, Jonveaux P, *et al.* Two site-specific deletions and t (1; 14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the *tal-1* gene[J]. *Oncogene*, 1991, 6(8): 1477-1488.
- [7] Bernard O, Guglielmi P, Jonveaux P, *et al.* Two distinct mechanisms for the *SCL* gene activation in the t (1; 14) translocation of T-cell leukemias[J]. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1990, 1(3): 194-208.
- [8] Begley C G, Aplan P D, Denning S M, *et al.* The gene *SCL* is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(24): 10128-10132.
- [9] Bash R O, Crist W M, Shuster J J, *et al.* Clinical features and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the *TAL1* locus: a pediatric oncology group study[J]. *Blood*, 1993, 81(8): 2110-2117.
- [10] Baer R. TAL1, TAL2 and LYL1: a family of basic helix-loop-helix proteins implicated in T cell acute leukaemia[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 1993, 4(6): 341-347.
- [11] Mouthon M A, Bernard O, Mitjavila M T, *et al.* Expression of *tal-1* and GATA-binding proteins during human hematopoiesis[J]. *Blood*, 1993, 81(3): 647-655.
- [12] Cheng J T, Hsu H L, Hwang L Y, *et al.* Products of the *TAL1* oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residues[J]. *Oncogene*, 1993, 8(3): 677-683.
- [13] Mellentin J D, Smith S D, Cleary M L. *lyl-1*, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif[J]. *Cell*, 1989, 58(1): 77-83.
- [14] Xia Y, Brown C, Yang Y C, *et al.* *TAL2*, a helix-loop-helix gene activated by the (7; 9)(q34; q32) translocation in human T-cell leukemia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(24): 11416-11420.
- [15] Murre C, McCaw P S, Vaessin H, *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence[J]. *Cell*, 1989, 58(3): 537-544.
- [16] Murre C, McCaw P S, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins[J]. *Cell*, 1989, 56(5): 777-783.
- [17] Begley C G, Aplan P D, Davey M P, *et al.* Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ -chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(6): 2031-2035.
- [18] Porcher C, Swat W, Rockwell K, *et al.* The T cell leukemia oncoprotein *SCL/tal-1* is essential for development of all hematopoietic lineages[J]. *Cell*, 1996, 86(1): 47-57.
- [19] Kallianpur A R, Jordan J E, Brandt S J. The *SCL/TAL-1*

- gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis[J]. *Blood*, 1994, 83(5): 1200-1208.
- [20] Robertson S M, Kennedy M, Shannon J M. A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1[J]. *Development*, 2000, 127(11): 2447-2459.
- [21] Barreau-Roumiguere C, Montagnani C, Escoubas J M. Characterization of a *Tal/SCL*-like transcription factor in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(9): 793-800.
- [22] Solek C M, Oliveri P, Loza-Coll M, *et al.* An ancient role for Gata-1/2/3 and Scl transcription factor homologs in the development of immunocytes[J]. *Developmental Biology*, 2013, 382(1): 280-292.
- [23] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2019[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook-2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019 (in Chinese).
- [24] Tong Y, Zhang Y, Huang J M, *et al.* Transcriptomics analysis of *Crassostrea hongkongensis* for the discovery of reproduction-related genes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134280.
- [25] Capron C, Lécluse Y, Kaushik A L, *et al.* The *SCL* relative *LYL-1* is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation[J]. *Blood*, 2006, 107(12): 4678-4686.
- [26] Gekas C, Rhodes K E, Gereige L M, *et al.* Mef2C is a lineage-restricted target of Scl/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis[J]. *Blood*, 2009, 113(15): 3461-3471.
- [27] Shivdasani R A, Mayer E L, Orkin S H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL[J]. *Nature*, 1995, 373(6513): 432-434.
- [28] Wootton E C, Dyrzynda E A, Ratcliffe N A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(3): 195-210.
- [29] 刘世良, 麦康森. 贝类免疫系统和机理的研究进展[J]. *海洋学报*, 2003, 25(2): 95-105.
- Liu S L, Mai K S. The progress of studies on molluscs Immunological system and mechanism-a review[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(2): 95-105(in Chinese).
- [30] Robb L, Lyons I, Li R, *et al.* Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(15): 7075-7079.
- [31] Visvader J E, Fujiwara Y, Orkin S H. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(4): 473-479.
- [32] Mead P E, Kelley C M, Hahn P S, *et al.* SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos[J]. *Development*, 1998, 125(14): 2611-2620.
- [33] 宋小瑞. 长牡蛎免疫系统的发生和发育机制的初步研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2016.
- Song X R. Study on the ontogenesis and development mechanism of immune system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2016 (in Chinese).

Cloning and functions of the lymphogenic *tal* gene of *Crassostrea hongkongensis*

HUANG Yanan¹, ZHOU Yinyin², ZHANG Yuehuan², YU Ziniu², LI Jun^{2*}, PAN Ying^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Key Laboratory of Tropical Marine Biological Resources and Ecology,

South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: *Crassostrea hongkongensis* is one of the pillar industries of mariculture in the coastal areas of South China. In recent years, with the continuous expansion of the scale of cultivation, the destruction of the breeding environment and the frequent occurrence of diseases, the large-scale death of *C. hongkongensis* has occurred, which seriously restricts the healthy and sustainable development of *C. hongkongensis*. Therefore, it is very important and urgent to carry out immune research for the healthy and sustainable development of *C. hongkongensis*. In this study, the immune function of T-cell acute lymphocytic leukemia (*tal*) in *C. hongkongensis* was studied, RACE technique was used to clone the full-length cDNA sequence of the (T-cell acute lymphocytic leukemia) *tal* gene of *C. hongkongensis*, named *Chtal*. The open reading frame (ORF) is 660 bp, encoding 219 amino acids, with the relative molecular weight of 25.11 ku. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree results showed that the *Chtal* gene had high homology with *C. gigas*, *C. virginica* and *Aplysia californica*, which proves that it is a member of the *tal* family of mollusks. Fluorescence quantitative PCR results showed that *Chtal* was the most highly expressed in haemolytic lymphocytes of oyster in *C. hongkongensis*, followed by heart, gill and digestive gland, suggesting its function in lymphogenesis. After the stimulation of *Vibrio alginolyticus* and *Staphylococcus haemolyticus*, the expression levels of *Chtal* were significantly up-regulated, reaching the highest levels at 24 and 12 h, respectively, and the expression of the gene gradually decreased with time. The results of subcellular localization showed that *Chtal* was expressed in the nucleus. *In vivo* injection of recombinant *tal* can significantly increase the number of hemocytes. Edu proliferation assay further confirmed that *Chtal* could promote the regeneration of hemocytes in *C. hongkongensis*. In summary, this study revealed that *Chtal* was involved in hemocytes regeneration, providing a basis for further research on the function of this gene in immune response of oysters.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; *tal*; gene cloning; subcellular localization; prokaryotic expression; Edu proliferation assay

Corresponding authors: LI Jun. E-mail: jun.li@scsio.ac.cn;

PAN Ying. E-mail: yingpan@gxu.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program (2018YFD0901400); China Agricultural Shellfish Industry Technology System Project (CARS-49); Program of the Pearl River Young Talents of Science and Technology in Guangzhou of China (201806010003)