



赤点石斑鱼 Toll 样受体 (TLRs) 基因家族的鉴定、进化与表达

陈桂森^{1,2}, 曹贞洁¹, 要欣平¹, 魏曹莹¹, 孙云^{1,2*}, 周永灿^{1,2*}

(1. 海南大学, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228;

2. 海南大学, 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南海口 570228)

摘要: 为研究赤点石斑鱼 Toll 样受体 (TLRs) 的进化、分布及表达模式, 本实验基于已公开的赤点石斑鱼基因组和转录组数据, 利用 Blast、系统进化与共线性等生物信息学方法, 分析赤点石斑鱼 TLRs 基因家族的系统进化、染色体分布及在各组织中的表达模式。结果显示, 在赤点石斑鱼中共鉴定出 17 个 *TLR* 基因, 这些基因分属于 5 个亚家族 (*TLR1*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR7* 和 *TLR11*), 分别分布在 24 条染色体中的 11 条染色体上; 17 个 *TLR* 基因在赤点石斑鱼不同组织中具有不同的表达模式, 然而, 位于相同染色体上的 *TLR* 基因的不同拷贝则存在相似的表达模式。其中 *EaTLR18-1* 与 *EaTLR18-2* 均位于 9 号染色体上, 二者的表达模式高度相似, 均在心脏中高表达; 同位于 20 号染色体上的 *EaTLR2-1a* 与 *EaTLR2-1b* 的表达模式也高度相似, 均在脑中高表达; *EaTLR5M* 与 *EaTLR5S* 同位于 14 号染色体上, 二者不仅具有高度相似的 LRR 结构域, 且在不同组织中的表达水平也高度相似; 而位于 18 号染色体的 *EaTLR7* 与 *EaTLR8* 和位于 4 号染色体的 *EaTLR2-2* 与 *EaTLR3*, 其表达模式却存在明显差异。研究结果可为鱼类 Toll 样受体系统进化分析提供参考数据, 也为进一步研究赤点石斑鱼 Toll 样受体基因的功能奠定基础。

关键词: 赤点石斑鱼; Toll 样受体; 系统进化分析; 表达分析

中图分类号: S 942

文献标志码: A

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类保守的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 其主要通过识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 启动先天免疫应答并帮助机体清除病原微生物^[1-2]。

TLRs 家族基因最早发现于果蝇 (*Drosophila* spp.), 研究显示, 其在建立果蝇胚胎背腹极性和调控抗真菌反应中发挥重要作用^[3-4]。随后, 在哺乳动物中陆续鉴定出 Toll 基因的同系物, 即 Toll 样受体基因。典型的 TLRs 属跨膜蛋白, 包含细胞外区域的 N 端富亮氨酸重复序列 (N-terminus with leucine-rich repeat region, LRR), 一个跨膜结

构域 (transmembrane domain) 和细胞内区域的 Toll/IL-1 受体结构域 (Toll/IL-1 receptor domain, TIR)^[5]。截至目前, 脊椎动物中已鉴定出 27 个 TLRs 家族成员。根据其系统进化树的拓扑结构, Roach 等^[6]将其分为 6 个亚家族: *TLR1*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7* 与 *TLR11* 亚家族。已有研究表明, 不同物种间 TLRs 家族成员存在差异。例如, 在人 (*Homo sapiens*) 中鉴定出 *TLR1-10* 共 10 个 TLRs 家族成员, 在小鼠 (*Mus musculus*) 中鉴定出 *TLR1-9* 与 *TLR11-13* 共 12 个 TLRs 家族成员。而在鱼类中, 至少存在 16 个 TLRs 家族成员, 且其家族成员组成不同于哺乳动物。例如, 哺乳动

收稿日期: 2022-01-03 修回日期: 2022-03-10

资助项目: 海南省重点研发基金 (ZDYF2021XDNY298); 海南省自然科学基金 (320QN212)

第一作者: 陈桂森 (照片), 从事水产动物病害免疫防控研究, E-mail: thecgs001@foxmail.com

通信作者: 孙云, 从事水产动物病害免疫防控研究, E-mail: syshui207@126.com;

周永灿, 从事水产动物病害免疫防控研究, E-mail: zychnu@163.com



物中的 *TLR11* 与 *TLR12* 在鱼类中尚未见报道^[7]; *TLR4* 在哺乳动物中普遍存在, 而硬骨鱼中目前仅在斑马鱼 (*Danio rerio*)^[8]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9] 和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[10] 中发现; 在斑点叉尾鲷^[10]、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)^[11]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[12] 等硬骨鱼中发现了一种鱼类特有的 TIR 结构域缺失的 *TLR* 基因——*TLR5S*; *TLR21* 与 *TLR22* 仅在鱼类和两栖类中有过报道^[7, 9-11, 13-17]; *TLR16* 和 *TLR24* 分别在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[18] 和日本七鳃鳗 (*Lampetra japonica*)^[19] 中被发现。鉴于 *TLRs* 成员组成存在显著的物种差异性, 因此该家族基因的鉴定、分类对进化研究具有重要的意义。

赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 俗称红斑, 属于鲈形目 (Perciformes) 鲷科 (Serranidae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 是一种名贵海洋经济鱼类, 由于营养价值高, 市场需求潜力大, 该物种已在中国和东南亚等国家广泛养殖^[20]。目前, 赤点石斑鱼 *TLRs* 家族的成员组成及免疫功能尚未阐明, 鉴于 *TLRs* 在先天免疫识别中的重要作用, 有必要加深对赤点石斑鱼 *TLRs* 家族成员的研究。本研究利用生物信息学的方法, 对赤点石斑鱼 *TLRs* 家族成员进行了全基因组鉴定, 并进一步对其进化关系、染色体定位、基因结构与蛋白结构域, 以及在各组织中的表达模式进行了研究。研究结果将为鱼类 Toll 样受体系统进化分析提供参考数据, 也为开展赤点石斑鱼 *TLRs* 家族的功能研究奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 赤点石斑鱼 *TLR* 基因的鉴定

赤点石斑鱼基因组及基因集数据从 figshare 数据库 (<https://figshare.com/>) 中下载。从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 或 Ensemble (<http://www.ensembl.org>) 中获得人、小鼠、斑马鱼、红鳍东方鲀、斜带石斑鱼 (*E. coioides*)、鞍带石斑鱼 (*E. lanceolatus*) 和花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) *TLRs* 的氨基酸序列。使用 genblastG 软件将同源 *TLRs* 序列与赤点石斑鱼基因组进行比对从中预测赤点石斑鱼 *TLRs* 基因结构, *E-value* 设置为 1×10^{-10} ^[21]; 同时使用 TBLASTP 程序识别赤点石斑鱼基因集潜在的 *TLRs*, *E-value* 设置为 1×10^{-5} ^[22]。将筛选出的候选 *TLRs* 与 NR 数据库进行比对, 手动去除冗余序列, 保留注释为 *TLRs* 的序列^[23]。通过 Prot-

Param 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 计算 *TLRs* 的蛋白分子量与等电点, 并利用 ProtComp 9.0 在线软件 (<http://www.softberry.com>) 预测 *TLRs* 的亚细胞定位^[24]。

1.2 赤点石斑鱼 *TLR* 基因的系统进化分析

使用 ClustalW2 软件比对筛选的赤点石斑鱼 *TLRs* 与上述 7 个物种的同源 *TLRs* 氨基酸序列; 使用 MEGA-CC10^[25] 软件构建系统进化树, 其中, MEGA-CC10 程序采用最大似然法, 最优模型为 WAG 模型, 使用 JTT 模型评估 NJ 和 BioNJ 算法生成的距离矩阵, 自动获得启发式搜索的初始树, 使用离散的 Gamma 分布模拟位点间进化速率的差异, 移除覆盖度少于 95% 的位点, Bootstrap 设为 1 000; 最后使用 iTOL (<http://itol.embl.de/>) 在线工具^[26] 对系统进化树进行修饰。

1.3 赤点石斑鱼 *TLR* 基因的染色体定位与共线性分析

根据赤点石斑鱼基因组中的基因结构信息, 确定 *TLR* 基因的染色体分布情况。以鞍带石斑鱼基因组 (NCBI 登录号: GCF_005281545.1) 作为对照基因组, 使用 MCSanX 在线软件 (<http://github.com/tanghaibao/jcvi>) 对赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼基因组进行共线性分析, 参数使用默认值, 并用 R 包 cricize 对共线性结果进行可视化。

1.4 赤点石斑鱼 *TLR* 的基因组结构及蛋白结构域分析

根据赤点石斑鱼基因组中的基因结构信息, 获得 *TLR* 基因的外显子-内含子结构信息, 使用 GSDS2.0 在线软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu>) 进行可视化。采用 SMART 在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 并结合 HMMER、Pfam、SignalP 数据库对赤点石斑鱼 *TLR* 蛋白的结构域进行识别与鉴定, 使用 IBS 软件 (Illustrator for Biological Sequences) 对预测的结构域进行可视化。

1.5 赤点石斑鱼 *TLR* 基因的组织表达分析

从 NCBI 的 SRA 数据库中下载赤点石斑鱼转录组测序的原始数据 (raw reads) (SRR8132758-SRR8132770), 该转录组样本来源于厦门的 4 龄健康赤点石斑鱼组织样品, 使用 HiSeq X Ten 测序仪获得 raw reads。通过 trimmomatic^[27] 软件过滤掉 raw reads 中的低质量数据与接头序列, 获得有效数据 (clean reads)。使用 HISAT2^[28] 将 clean reads

比对到赤点石斑鱼基因组上。采用 StringTie 软件^[29]统计比对到每一个基因的读长数 (read counts)。根据公式^[30] 计算 TPM 值, 为消除测序深度与基因长度的影响, 使用自己编写的 Python 脚本将 read counts 进行标准化 (https://github.com/theegs/readcounts2FPKM_and_TPM)。热图由 R 包 heatmap 生成。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

健康的赤点石斑鱼 [体长 (8.8 ± 2.2) cm] 由福建省水产研究所赠予, 提取肝脏、脾脏组织的总 RNA, 并反转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。使用 Primer premier 6 软件设计赤点石斑鱼 TLRs 各成员的特异性引物 (表 1)。qRT-PCR 检测参考 Yang 等^[31] 的方法, 以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量。使用 R 包 ggplot2 可视化实验结果。

2 结果

2.1 赤点石斑鱼 TLR 基因的鉴定与理化性质

本研究中共鉴定出 17 个赤点石斑鱼的 TLR 基因, 根据赤点石斑鱼 TLR 基因与 7 种已知脊椎动物 TLR 基因的进化关系及赤点石斑鱼与鞍带石

斑鱼 TLR 基因的共线性关系将这 17 个基因命名为 *EaTLR1-1*、*EaTLR1-2*、*EaTLR2-1a*、*EaTLR2-1b*、*EaTLR2-2*、*EaTLR3*、*EaTLR5S*、*EaTLR5M*、*EaTLR7*、*EaTLR8*、*EaTLR9*、*EaTLR13-1*、*EaTLR13-2*、*EaTLR18-1*、*EaTLR18-2*、*EaTLR21*、*EaTLR22* (表 2)。

赤点石斑鱼 TLR 基因编码蛋白的理化性质如表 2 所示, 相对分子质量为 58.08~135.98 ku, 理论等电点为 5.64~8.94。亚细胞定位预测结果显示, 除了 *EaTLR18-1* 蛋白定位于胞质、*EaTLR21* 蛋白定位于膜泡、*EaTLR5S* 与 *EaTLR22* 蛋白定位于膜结合线粒体外, 其余的赤点石斑鱼 TLRs 蛋白均定位于质膜。

2.2 赤点石斑鱼 TLR 基因系统进化分析

系统进化分析表明, 赤点石斑鱼 TLR 基因分为 5 个亚家族 (图 1), 其中 TLR1 亚家族包括 *EaTLR1-1*、*EaTLR1-2*、*EaTLR2-1a*、*EaTLR2-1b*、*EaTLR2-2*、*EaTLR18-1* 和 *EaTLR18-2*, TLR3 亚家族仅包含 *EaTLR3*, TLR5 亚家族包含 *EaTLR5M* 和 *EaTLR5S*, TLR7 亚家族包含 *EaTLR7*、*EaTLR8* 和 *EaTLR9*, TLR11 亚家族包含 *EaTLR13-1*、*EaTLR13-2*、*EaTLR21* 和 *EaTLR22*。系统进化树的拓扑

表 1 赤点石斑鱼 17 个 TLR 基因的 qRT-PCR 引物

Tab. 1 Specific primers for qRT-PCR expression analysis of 17 TLR genes identified in *E. akaara*

引物名 primer names	正向引物 (5'-3') primer F (5'-3')	反向引物 (5'-3') primer R (5'-3')
<i>EaTLR1-1</i>	TGCAGCTACCCGGACAATGTTC	GCGATGGCAAGCGGTCACAA
<i>EaTLR1-2</i>	ACCATTGCCGTCGTGTCCCTA	GCCTTGAGGTGACGCACAGTT
<i>EaTLR2-1a</i>	CGTCCAGACCTCCAGTCGTACA	GCCTCCGTTGATGGCTGATTGG
<i>EaTLR2-1b</i>	TCCGACAACCTGCTGACTGACA	GGCTCACTGCGGACAGAGACTT
<i>EaTLR2-2</i>	TGGAGGCTGGTGCGAACACA	GGCACTCAAACACCGACAACCT
<i>EaTLR3</i>	ACCTCAGCCTGCTTGTCATGGA	GCCAGTGGAGTGTGTCACGTAT
<i>EaTLR5M</i>	TGCGAGTGCTGGATCTTCATGA	TGTGGGAGAGCCGCAAGTGA
<i>EaTLR5S</i>	TGGACCGCCTTCAGCATCTCT	GCCGTGAAGATCCAGGGTTGTG
<i>EaTLR7</i>	AGACGGACATGCTGCTTCTGC	TTGGTCGTGTTGAGCCACTTGA
<i>EaTLR8</i>	CGGCGAACCAGAAGGACAAAGT	GGACGTAGGAGGCATCCAGTA
<i>EaTLR9</i>	AGCGTTCCTCGTCTGTTCCTTC	TAGCCCTTGTGTCCTGCCAAA
<i>EaTLR13-1</i>	TAGCCCAGGTCAACCTCTCTGC	AGGGTTACCAGTCAGGTCCAGG
<i>EaTLR13-2</i>	CCACATCGGGAACAGCATCGT	TGGCAGGCAGAGCATCAAGGT
<i>EaTLR18-1</i>	CCCTACCACTGCACTTGTGAGC	TTCCCGCCGCTTCTCCTTGT
<i>EaTLR18-2</i>	ATCACTCGGCTTGTCGCTCAC	AGCTGGTCCAGGTTGCAGTAGG
<i>EaTLR21</i>	GCTGCACCTGCAAGAACCATT	GGTTGTCATGCGGGCATAACAT
<i>EaTLR22</i>	CTGCGATAACGCCTGGTTCCTC	GGACCGGATGTCGAGCTTCAAC
β -actin	CCCTCTCCAGCCTTCTCTCTCT	ACCTCCAGACAGCAGGTGTT

表 2 赤点石斑鱼 17 个 TLR 基因的理化特征

Tab. 2 Characteristics of 17 TLR genes identified in *E. akaara*

登录号 GenBank ID	基因名 gene names	染色体 chromosome	mRNA长度/bp mRNA length	CDS长度/bp CDS length	氨基酸数/个 number of amino acids	分子量/ku MW	等电点 pI	亚细胞定位 subcellular location
OM023889	<i>EaTLR1-1</i>	Chr08	2 411	2 412	803	90.34	6.04	质膜
OM023890	<i>EaTLR1-2</i>	Chr23	3 880	2 484	827	93.29	6.34	质膜
OM023891	<i>EaTLR2-1a</i>	Chr20	9 129	2 244	747	84.64	5.64	质膜
OM023892	<i>EaTLR2-1b</i>	Chr20	12 242	2 415	804	90.74	5.89	质膜
OM023893	<i>EaTLR2-2</i>	Chr04	2 393	2 394	797	90.82	5.92	质膜
OM023894	<i>EaTLR3</i>	Chr04	3 149	2 733	910	102.73	8.47	质膜
OM023895	<i>EaTLR5M</i>	Chr14	9 647	2 661	886	100.90	6.51	质膜
OM023896	<i>EaTLR5S</i>	Chr14	3 786	1 935	644	72.64	6.7	膜结合线粒体
OM023897	<i>EaTLR7</i>	Chr18	3 486	3 171	1 056	121.58	8.33	质膜
OM023898	<i>EaTLR8</i>	Chr18	13 945	3 579	1 192	135.98	6.61	质膜
OM023899	<i>EaTLR9</i>	Chr03	3 576	3 183	1 060	121.47	7.04	质膜
OM023900	<i>EaTLR13-1</i>	Chr16	7 483	2 037	678	78.67	5.75	质膜
OM023901	<i>EaTLR13-2</i>	Chr22	4 866	2 748	915	102.70	8.72	质膜
OM023902	<i>EaTLR18-1</i>	Chr09	4 899	1 860	619	71.16	6.35	胞质
OM023903	<i>EaTLR18-2</i>	Chr09	2 184	1 530	509	58.08	8.25	质膜
OM023904	<i>EaTLR21</i>	Chr09	2 939	2 940	979	113.44	8.65	膜泡
OM023905	<i>EaTLR22</i>	Chr21	5 397	2 928	975	111.85	8.94	膜结合线粒体

结构显示, 赤点石斑鱼的 TLR 各基因均首先与鞍带石斑鱼和斜带石斑鱼 TLR 基因聚为一支, 其次与同属鲷形目的花鲈 TLR 基因聚为一支, 然后再与其他鱼类 TLR 基因聚为一支, 最后与哺乳动物 (人与小鼠) TLR 基因聚为一支, 且每个分支节点均具有较高的 Bootstrap 值, 表明本实验系统进化分析结果的可信度较高。另外, 本实验系统进化分析结果支持赤点石斑鱼 TLR 基因的注释。

2.3 赤点石斑鱼 TLR 基因的染色体定位与共线性分析

为进一步确定赤点石斑鱼 TLR 基因的分类, 本研究对赤点石斑鱼基因组与鞍带石斑鱼基因组同时进行了染色体定位与共线性分析。染色体定位与共线性结果显示, 本次分析共获得 19 207 个同源基因对, 109 个共线性区域, 其中赤点石斑鱼的 17 个 TLR 基因分别分布在 24 条染色体的 11 条染色体上, 鞍带石斑鱼的 15 个 TLR 基因同样分别分布在 24 条染色体的 11 条染色体上 (图 2)。对赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼 TLR2-1 和 TLR18-1 基因进行局部共线性分析, 结果显示, 赤点石斑鱼的 *EaTLR2-1a* 与 *EaTLR2-1b* 与鞍带石斑鱼的 *EITLR2-1* 为对应关系; 赤点石斑鱼 *EaTLR18-1* 与鞍带石斑

鱼的 *EITLR18-1* 为对应关系; 然而, *EaTLR18-2* 为赤点石斑鱼所特有, 在鞍带石斑鱼基因组中并未发现 (图 3)。除此之外, 其余 TLR 基因在赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼之间均显示极高的共线性关系 (图 2)。

2.4 赤点石斑鱼 TLR 的基因结构及对应蛋白结构域分析

基因结构分析显示, 赤点石斑鱼 TLR 基因的外显子数从 1 到 13 不等, 不同 TLR 基因外显子分布不均 (图 4)。*EaTLR1-1* 和 *EaTLR1-2* 分别含有 1 个和 2 个外显子, *EaTLR2-1a* 和 *EaTLR2-1b* 分别含有 11 个和 13 个外显子, *EaTLR13-1* 和 *EaTLR13-2* 分别含有 3 个和 6 个外显子, *EaTLR18-1* 和 *EaTLR18-2* 分别含有 6 个和 2 个外显子, 表明赤点石斑鱼 TLR 基因的不同拷贝在外显子数目上存在差异。

对赤点石斑鱼 TLRs 的蛋白结构域分析结果显示, 除 *EaTLR5S* 不含有 TIR 结构域, *EaTLR1-1*、*EaTLR2-1b*、*EaTLR5S*、*EaTLR13-2* 和 *EaTLR18-1* 不含有跨膜区外, 其他 TLRs 蛋白序列均含有 TIR 结构域、LRR 结构域和跨膜区 (图 5)。此外, 不同的 TLR 蛋白包含有不同的 LRR 结构域种类, 如 *EaTLR2-1b*、*EaTLR18* 和 *EaTLR21* 不包含 LRR_

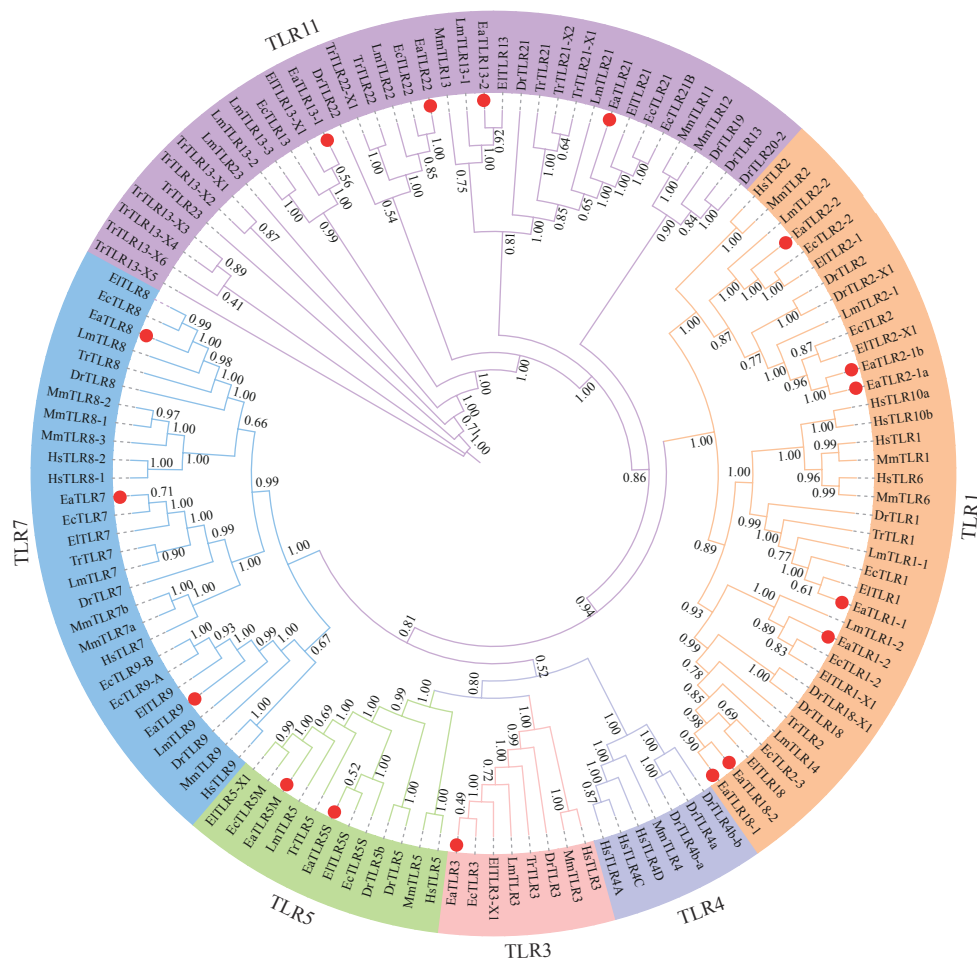


图1 *TLR* 基因家族成员的系统进化树

TLR 基因家族基因包含 TLR1、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 和 TLR11 等 6 个亚家族；不同颜色代表不同 *TLR* 基因亚家族，红色的圆点表明赤点石斑鱼 *TLR* 基因在系统进化树上的位置

Fig. 1 Phylogenetic tree of the *TLR* gene family

The *TLR* gene family are divided into six subfamilies, including TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 and TLR11; the genes of different subfamilies are represented by different colors, the red dots indicate the locations of the *TLR* genes of *E. akaara* on the phylogenetic tree

CT 结构域 (leucine rich repeat C-terminal domain); EaTLR2-2、EaTLR3、EaTLR5S 和 EaTLR7 含有 LRR_NT 结构域 (leucine rich repeat C-terminal domain), 其他 TLR 均无此结构域等。

2.5 赤点石斑鱼 *TLR* 基因的组织表达分布

对赤点石斑鱼 8 个组织 (心脏、脑、鳃、性腺、肌肉、肝脏、肾脏和脾脏) 的 13 个样品中的 *TLR* 基因表达量进行聚类分析, 结果显示, 2 个雌性性腺样品与 1 个中性性腺样品聚为 1 支; 2 个雌性脑样品、1 个中性脑样品和 1 个雄性脑样品聚为 1 支 (图 6, 图 7)。在不同性别的脑与性腺样品中, *TLR* 基因的表达模式基本相同, 表明 *TLR* 基因 mRNA 水平的表达模式可能与性别无关。

各组织中赤点石斑鱼 *TLR* 基因的相对表达量

如图 6 所示, 肝脏中, *EaTLR5S* 表达量最高, *EaTLR3* 次之, 其余低表达; 性腺中, *EaTLR8* 表达量最高; 肌肉中, *EaTLR3* 最高, 其次是 *EaTLR8*; 脑组织中, *EaTLR8* 表达量最高, 其次是 *EaTLR3*; 脾脏中, 表达较高的 *TLR* 基因依次是 *EaTLR8*、*EaTLR22*、*EaTLR21*、*EaTLR2-2*、*EaTLR3* 和 *EaTLR13-2*; 肾脏中除 *EaTLR13-2* 不表达外, 其余均表达, 其中 *EaTLR8* 表达量最高, 其次是 *EaTLR5M* 和 *EaTLR21*; 在鳃中, *EaTLR8* 表达量最高, 其次是 *EaTLR21*、*EaTLR22*; 在心脏中, *EaTLR21* 表达最高, 其次是 *EaTLR8* 和 *EaTLR3*。

赤点石斑鱼 *TLR* 基因家族成员在 8 个组织中均有不同的表达模式 (图 7), 如 *EaTLR18-1* 和 *EaTLR18-2* 主要在心脏中表达; *EaTLR1-2*、*EaTLR2-2* 和 *EaTLR13-2* 主要在脾脏中表达; *EaTLR5M*

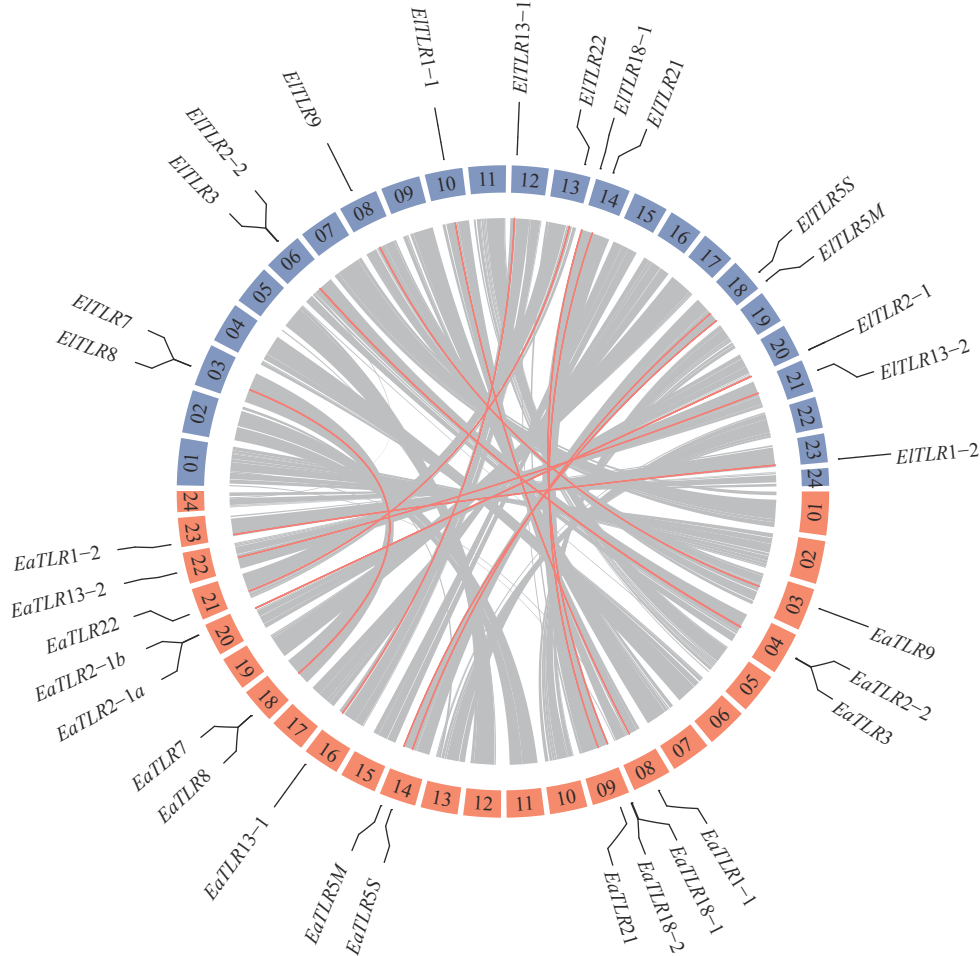


图 2 赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼 TLR 基因的染色体定位和共线性关系

橙色方框. 赤点石斑鱼染色体; 蓝色方框. 鞍带石斑鱼染色体; 灰色线条. 赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼基因之间的共线关系; 红色线条. 赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼 TLR 基因之间的共线关系

Fig. 2 Chromosomal localization and synteny of TLR genes in *E. akaara* and *E. lanceolatus*

Orange box represents red-spotted grouper chromosome; blue box represents giant grouper chromosome; gray line represents the synteny relationship between *E. akaara* and *E. lanceolatus* genes; red line represents the synteny relationship between *E. akaara* and *E. lanceolatus* the TLR genes

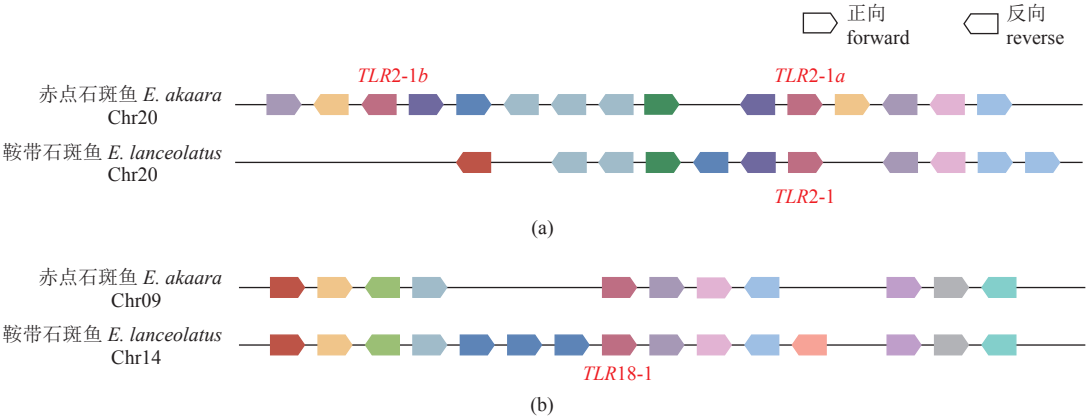


图 3 赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼 TLR2-1 (a) 和 TLR18-1 (b) 基因的共线性分析

不同颜色代表不同基因

Fig. 3 Synteny analysis of TLR2-1 (a) and TLR18-1 (b) genes in *E. akaara* and *E. lanceolatus*

Different colors represent different genes

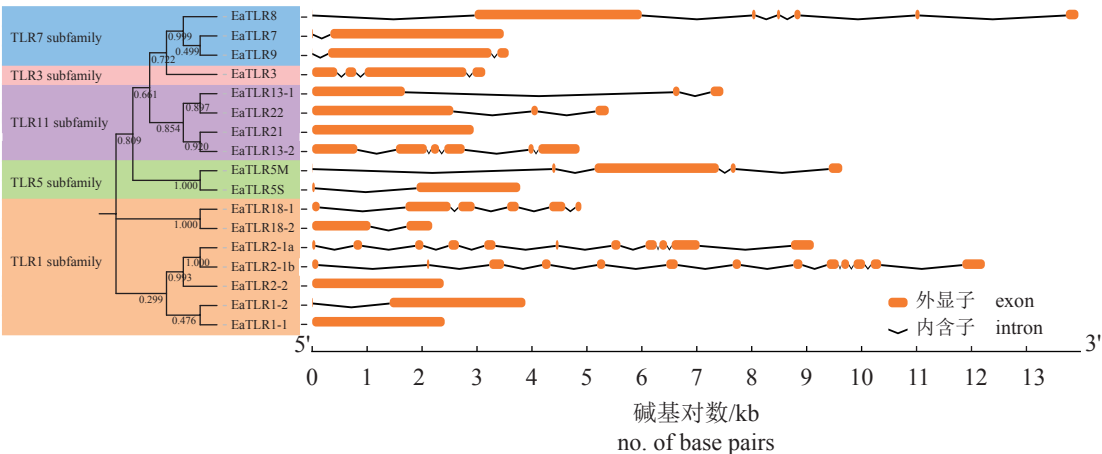


图 4 赤点石斑鱼 *TLR* 基因结构分析

赤点石斑鱼 *TLR* 基因的系统进化树由 MEGA-CC10 软件生成, 采用最大似然法, Bootstrap 值为 1 000, 5 个亚家族用不同的颜色表示

Fig. 4 Exon-intron patterns of *TLR* genes in *E. akaara*

Phylogenetic tree of *TLR* genes in *E. akaara* was generated by MEGA-CC10 software using maximum likelihood method with bootstrap value of 1 000 and 5 subfamilies represented by different colors

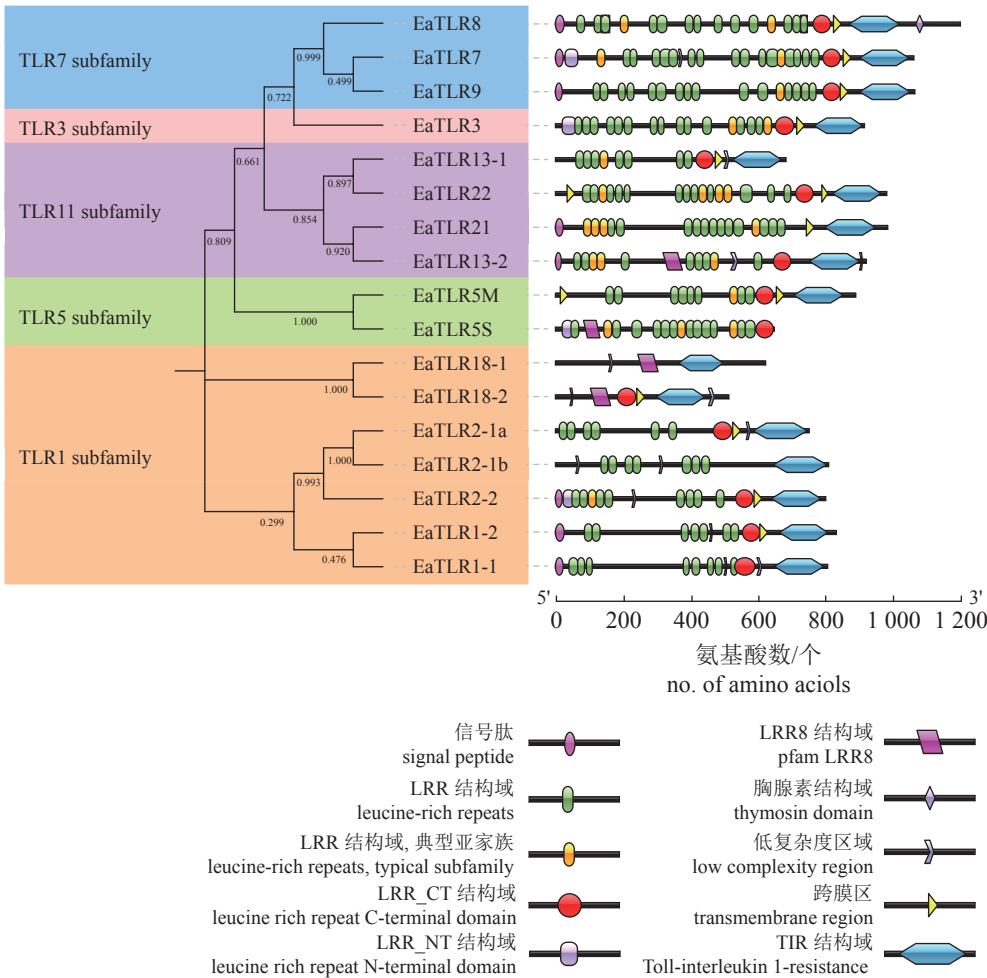


图 5 赤点石斑鱼 *TLR* 的蛋白结构域

Fig. 5 Domain architecture of *TLR* in *E. akaara*

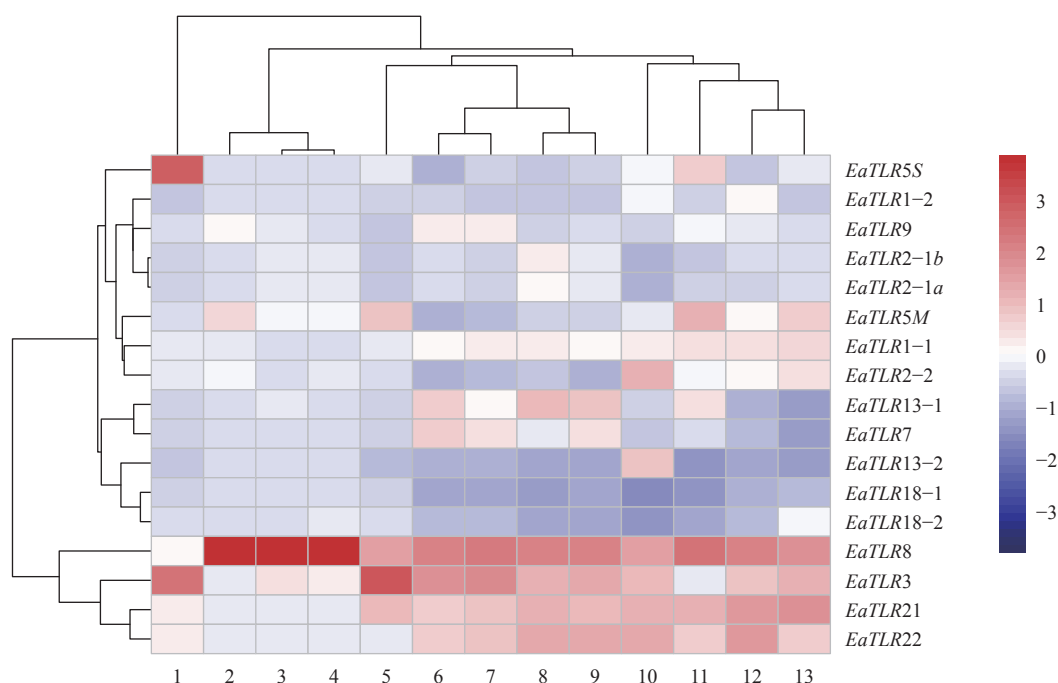


图 6 各组织中赤点石斑鱼 TLR 基因的相对表达量

1. 雌性肝脏, 2. 雌性性腺, 3. 雌性性腺, 4. 中性性腺, 5. 雌性肌肉, 6. 雌性脑, 7. 中性脑, 8. 雌性脑, 9. 雄性脑, 10. 雌性脾脏, 11. 雌性肾脏, 12. 雌性鳃, 13. 雌性心脏; 红色表示高表达, 蓝色表示低表达; 颜色从红到蓝, 表示 $\lg(\text{TPM}+1)$ 从大到小, 按列归一化数据

Fig. 6 The relative expression of TLR different genes in tissues of *E. akaara*

1. female liver, 2. female gonad, 3. female gonad, 4. intersex gonad, 5. female muscle, 6. female brain, 7. intersex brain, 8. female brain, 9. male brain, 10. female spleen, 11. female kidney, 12. female gill, 13. female heart; red indicates high expression, blue indicates low expression; colors ranging from red to blue, indicate $\lg(\text{TPM}+1)$ from large to small, normalize data by column

主要在肾脏、脾脏、鳃和心脏中有较高表达, 其他组织表达偏低; *EaTLR5S* 主要肾脏、肝脏与脾脏中高表达, 其他组织低表达; *EaTLR8* 除了在肌肉和肝脏中低表达, 其余组织均有较高表达; *EaTLR2-1a*、*EaTLR2-1b*、*EaTLR13-1*、*EaTLR7*、*EaTLR3*、*EaTLR9*、*EaTLR22*、*EaTLR1-1* 和 *EaTLR21* 主要在脑、脾脏、肾脏和鳃中有较高的表达。此外, 结合染色体定位的分析 (图 5), 发现位于同一染色体的 *EaTLR18-1* 和 *EaTLR18-2* 在 8 个组织中表达模式基本一致, 均在心脏中高表达; 位于同一染色体的 *EaTLR2-1a* 和 *EaTLR2-1b* 在 8 个组织中表达模式也高度相似, 均在脑中有较高表达; 此外, 位于 14 号染色体的且 LRR 结构域有较高相似性的 *EaTLR5M* 和 *EaTLR5S* 在不同组织中的表达水平也有着较高的相似性。然而, 分别位于同一染色体的 *EaTLR7* 与 *EaTLR8* 和 *EaTLR2-2* 与 *EaTLR3*, 表达模式却存在明显差异。

2.6 qRT-PCR 验证

为了验证转录组数据结果的可靠性, 采用 qRT-PCR 检测了赤点石斑鱼脾脏与肝脏中 17 个

TLR 基因的表达情况。结果显示, qRT-PCR 分析得出的 TLR 基因转录水平表达分布趋势与 RNA-seq 结果一致 (图 8), 表明本研究获得的转录组数据结果可信。

3 讨论

目前 TLRs 已经在斑马鱼^[8]、鲤^[9]、花鲈^[13]、斑点叉尾鲷^[32]、非洲爪蟾^[18]、红鳍东方鲀和人^[11]等多个物种中广泛报道, 为了探究赤点石斑鱼 TLRs 的分布与进化规律, 以及在各组织中的表达特征, 本研究基于基因组与转录组数据, 结合生物信息学分析方法对赤点石斑鱼 TLRs 进行了系统的鉴定、进化及表达模式的分析。

本实验根据系统进化与共线性分析的结果, 共鉴定出 5 个亚家族的 17 个赤点石斑鱼 TLRs 成员 (TLR1: *EaTLR1-1*、*EaTLR1-2*、*EaTLR2-1a*、*EaTLR2-1b*、*EaTLR2-2*、*EaTLR18-1* 和 *EaTLR18-2*; TLR3: *EaTLR3*; TLR5: *EaTLR5S* 和 *EaTLR5M*; TLR7: *EaTLR7*、*EaTLR8* 和 *EaTLR9*; TLR11: *EaTLR13-1*、*EaTLR13-2*、*EaTLR21* 和 *EaTLR22*)。

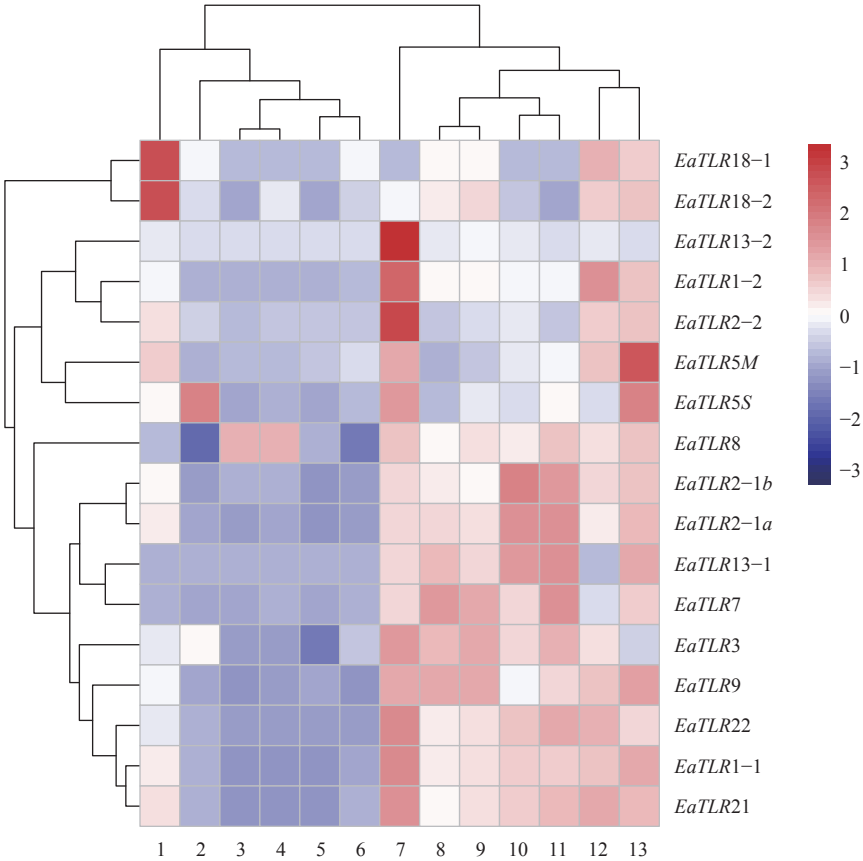


图 7 基于 RNA-seq 的赤点石斑鱼 TLR 基因在不同组织中的表达谱

1. 雌性心脏, 2. 雌性肝脏, 3. 雌性性腺, 4. 中性性腺, 5. 雌性性腺, 6. 雌性肌肉, 7. 雌性脾脏, 8. 雌性脑, 9. 中性脑, 10. 雌性脑, 11. 雄性脑, 12. 雌性鳃, 13. 雌性肾脏; 红色表示高表达, 蓝色表示低表达; 颜色从红到蓝, 表示 lg (TPM+1) 从大到小, 按行归一化数据

Fig. 7 Expression profiles based on the RNA-seq of TLR genes in different tissue of *E. akaara*

1. female heart, 2. female liver, 3. female gonad, 4. intersex gonad, 5. female gonad, 6. female muscle, 7. female spleen, 8. female brain, 9. intersex brain, 10. female brain, 11. male brain, 12. female gill, 13. female kidney; red indicates high expression, blue indicates low expression; colors ranging from red to blue, indicate lg(TPM+1) from large to small, normalize data by row

已有研究表明, TLRs 可分为 6 个亚家族 (TLR1、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 和 TLR11), 本研究结果显示, 在赤点石斑鱼中缺失 TLR4 亚家族, 这与花鲈^[13]、红鳍东方鲀^[11]的结果一致。目前 TLR4 亚家族仅包含 TLR4, 且仅在硬骨鱼中的斑马鱼^[8]、鲤^[9]和斑点叉尾鲷^[10, 32]中发现, 赤点石斑鱼与其他石斑鱼 (如鞍带石斑鱼、斜带石斑鱼) 一样, 均未发现 TLR4 的存在, 推测该基因可能在石斑鱼属中缺失, 具体原因有待进一步分析。同时, 在哺乳动物中普遍存在的 TLR6 和 TLR10 基因, 在赤点石斑鱼中并未发现, 且在斑马鱼^[8]、花鲈^[13]与红鳍东方鲀^[11]等硬骨鱼类中也未发现 TLR6 和 TLR10 基因, 推测可能由于哺乳动物 TLR6 和 TLR10 的进化起源较晚, 因此目前尚未在鱼类中鉴定到这 2 个基因。相反, 在鱼类中常见的 TLR18 基因 (有时也称为 TLR14) 在哺乳动物中

尚未见报道。根据进化树的拓扑结构分析, 推断哺乳动物的 TLR6 和 TLR10 基因与硬骨鱼类的 TLR18 基因是独立进化的 2 个分支, 它们的共同祖先可能是 TLR1 基因, 也有研究推测 TLR18 基因可能是 TLR6 的同源替代物或其祖先受体^[33]。此外, 本实验在赤点石斑鱼中同样发现了 TLR5 亚家族中的 2 个 TLR 基因, 即可溶性的 TLR5S 与膜结合型的 TLR5M, 其中 TLR5M 主要识别鞭毛蛋白, 而 TLR5S 则为硬骨鱼类所特有, 这可能是特异性免疫不足的鱼类为了应对复杂水域环境的一种策略。系统进化分析表明, 石斑鱼 TLR5S 与其他鱼类 TLR5M 之间的亲缘关系较哺乳动物 TLR5M 更近, 这与 Oshiumi 等^[11]在红鳍东方鲀中的发现一致, 推测 TLR5S 是在硬骨鱼与哺乳动物分化之后才出现的, 但也不排除 TLR5S 在哺乳动物进化过程中存在丢失的可能。

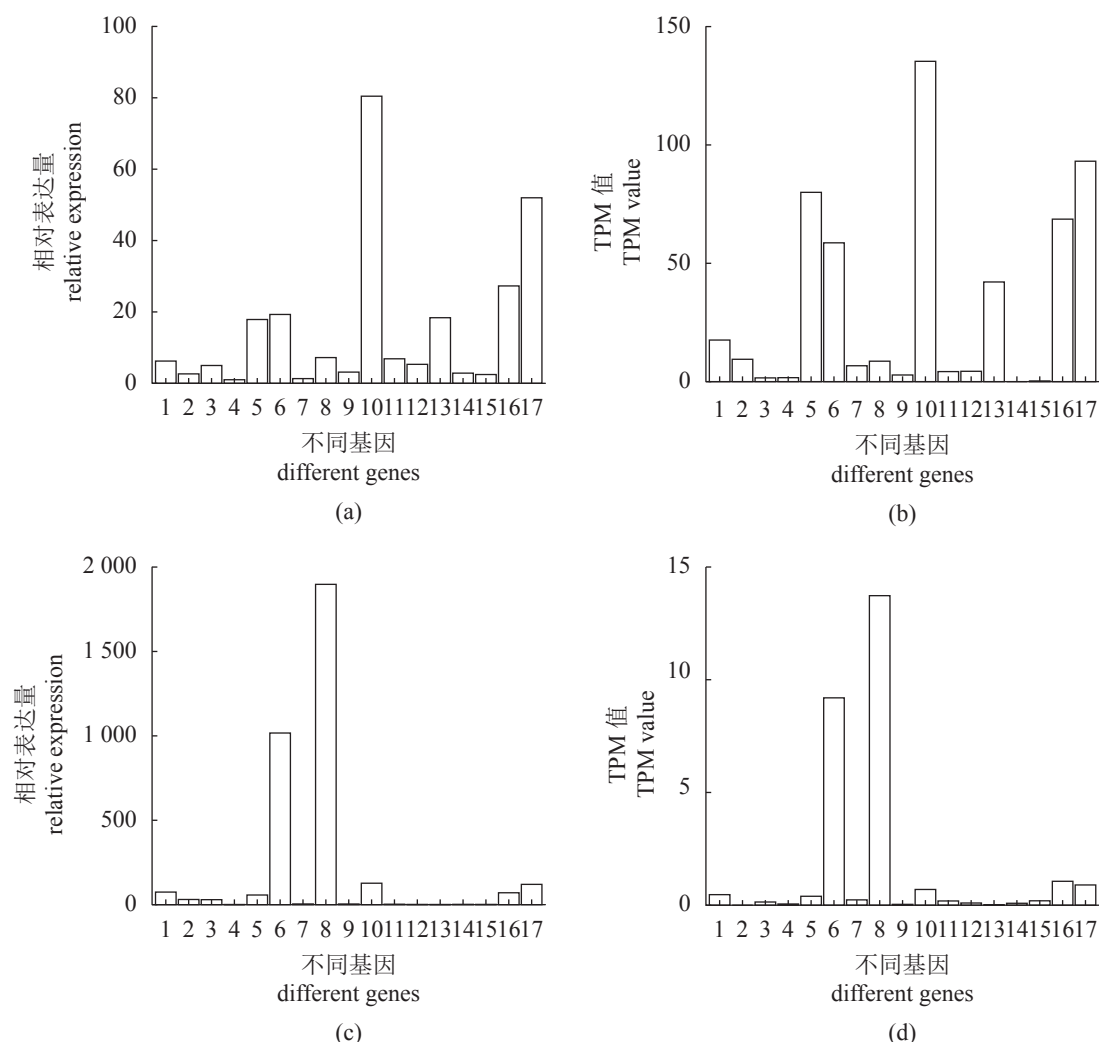


图 8 赤点石斑鱼 *TLR* 基因在脾脏 (a)(b) 与肝脏 (c)(d) 组织中的相对表达量

Fig. 8 *TLR* genes relative expression in spleen (a)(b) and liver (c)(d) of *E. akaara*

(a)(c). qRT-PCR, (b)(d). RNA-seq; 1. *EaTLR1-1*, 2. *EaTLR1-2*, 3. *EaTLR2-1a*, 4. *EaTLR2-1b*, 5. *EaTLR2-2*, 6. *EaTLR3*, 7. *EaTLR5M*, 8. *EaTLR5S*, 9. *EaTLR7*, 10. *EaTLR8*, 11. *EaTLR9*, 12. *EaTLR13-1*, 13. *EaTLR13-2*, 14. *EaTLR18-1*, 15. *EaTLR18-2*, 16. *EaTLR21*, 17. *EaTLR22*

染色体定位与共线性分析不仅能为 TLRs 的分类提供更多的证据, 而且对于研究 TLRs 的进化过程也具有重要意义。因此, 本研究对赤点石斑鱼与石斑鱼属中组装较为完整的鞍带石斑鱼基因组进行了共线性分析及 TLRs 的染色体定位分析。结果发现, 在赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼中, *TLR2-2* 与 *TLR3*、*TLR5S* 与 *TLR5M*、*TLR7* 与 *TLR8*、*TLR18* 与 *TLR21* 分别位于同一染色体的相近位置, 该结果与花鲈 TLRs 染色体定位的结果一致^[13], 这一现象佐证了 TLRs 复制事件可能不是随机产生的, 而是受到了某种或多种因子选择的结果。本研究从赤点石斑鱼基因组中鉴定出 *TLR2-1* 基因的 2 个拷贝, 分别命名为 *EaTLR2-1a* 与 *EaTLR2-1b*, 这 2 个基因位于同一染色体上, 是赤点石斑

鱼 TLRs 中含有外显子与内含子数目最多的基因, 其中 *EaTLR2-1a* 含有 13 个外显子和 12 个内含子, *EaTLR2-1b* 含有 11 个外显子和 10 个内含子。类似的, 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[34]、花鲈^[13] 和红鳍东方鲀^[11] 的 *TLR2-1* 同样是外显子与内含子数目最多的基因。此外, 在赤点石斑鱼基因组中还发现 *TLR18* 基因也存在 2 个拷贝, 分别命名为 *EaTLR18-1* 与 *EaTLR18-2*, 它们均位于 9 号染色体上, 蛋白结构域分析结果表明, *EaTLR18-1* 不含有跨膜结构域, 这与其亚细胞定位预测其定位于细胞质相一致; 而 *EaTLR18-2* 含有一个跨膜结构域, 其亚细胞定位预测结果显示定位于细胞膜上。值得注意的是, 赤点石斑鱼的 *EaTLR18-1* 和 *EaTLR18-2* 与鞍带石斑鱼的 *EITLR18-1* 的蛋白结

构域存在较大差异；赤点石斑鱼与鞍带石斑鱼基因组的共线性分析结果表明 *EaTLR18-1* 具有较好的保守性，而 *EaTLR18-2* 与鞍带石斑鱼不共线。

基因在不同组织中的表达模式分析可为一些未知功能基因的功能预测提供基础参考。在本次研究中，17 个 TLRs 在不同组织中具有不同的表达模式，但一些 TLR 基因在不同物种中也有相似的表达模式。在本研究中 *EaTLR3* 在肝脏中高表达，Phelan 等^[35] 在斑马鱼的肝脏细胞中也发现 *TLR3* 有着较高表达；本研究中 *EaTLR5S* 主要在肾脏、肝脏与脾脏中高表达，其他组织低表达，林克冰等^[36] 发现斜带石斑鱼的 *TLR5S* 在所有健康组织中均有表达，肝脏表达最高，其次是脾脏、肾脏等，且在哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染下，斜带石斑鱼的 *TLR5S* 在肝脏中表达量显著上调，推测斜带石斑鱼的 *TLR5S* 可能参与弧菌的免疫反应，并且肝脏是其发挥作用的重要器官；本研究中 *EaTLR5M* 主要在肾脏、脾脏、鳃和心脏中有较高表达，其他组织表达偏低，Tsujita 等^[37] 研究发现虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *TLR5S* 的 mRNA 表达主要局限于肝脏，而 *TLR5M* 在所有被检测的组织中都有表达。此外，还发现位于 20 号染色体的 *EaTLR2-1a* 与 *EaTLR2-1b* 表达模式高度相似；同样的，位于 9 号染色体的 *EaTLR18-1* 与 *EaTLR18-2* 及位于 14 号染色体 *EaTLR5M* 与 *EaTLR5S* 均具有高度相似的表达模式。相反，位于 18 号染色体的 *EaTLR7* 与 *EaTLR8* 和位于 4 号染色体的 *EaTLR2-2* 与 *EaTLR3* 表达模式却存在明显差异，提示位于相同染色体上的 TLR 基因可能存在相似或不同的表达模式。

综上所述，本实验系统鉴定了赤点石斑鱼 Toll 样受体基因家族成员，并分析了其分类情况、进化特点及组织表达模式，可为未来研究鱼类 Toll 样受体系统进化提供有用的参考数据，也为进一步研究赤点石斑鱼 Toll 样受体基因的功能奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 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.
- [2] 袁文玲, 吕钊, 刘益, 等. 赤眼鳟与草鱼 *TLR19* 结构及功能差异初探[J]. 水产学报, 2020, 44(12): 1948-1959.
- [3] Yuan W L, Lü Z, Liu Y, *et al.* Preliminary analysis of the structural and functional differences between *Squaliobarbus curriculus* and *Ctenopharyngodon idella* *TLR19*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(12): 1948-1959 (in Chinese).
- [4] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The Dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults[J]. *Cell*, 1996, 86(6): 973-983.
- [5] Hashimoto C, Hudson K L, Anderson K V. The *toll* gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein[J]. *Cell*, 1988, 52(2): 269-279.
- [6] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [7] Roach J C, Glusman G, Rowen L, *et al.* The evolution of vertebrate toll-like receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(27): 9577-9582.
- [8] 李言伟. 石斑鱼 TLRs 功能及刺激隐核虫感染后免疫相关基因表达分析 [D]. 广州: 中山大学, 2012.
- [9] Li Y W. Research on TLRs and immune-related genes expression profile of grouper infected with *Cryptocaryon irritans*[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2012 (in Chinese).
- [10] Novoa B, Bowman T V, Zon L, *et al.* LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 326-331.
- [11] Gong Y W, Feng S S, Li S Q, *et al.* Genome-wide characterization of toll-like receptor gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) and their involvement in host immune response to *Aeromonas Hydrophila* infection[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2017, 24: 89-98.
- [12] Quiniou S M A, Waldbieser G C. Mapping of the toll-like receptor family in channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Animal Genetics*, 2011, 42(5): 567-568.
- [13] Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, *et al.* Prediction of the prototype of the human toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu Rubripes*, genome[J]. *Immunogenetics*, 2003, 54(11): 791-800.
- [14] Tsoi S, Park K C, Kay H H, *et al.* Identification of a tran-

- script encoding a soluble form of toll-like receptor 5 (TLR5) in Atlantic salmon during *Aeromonas salmonicida* infection[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 109(1-2): 183-187.
- [13] Fan H Y, Wang L Y, Wen H S, *et al.* Genome-wide identification and characterization of toll-like receptor genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their involvement in the host immune response to *Vibrio harveyi* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 782-791.
- [14] Lee P T, Zou J, Holland J W, *et al.* Identification and characterisation of TLR18-21 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 549-559.
- [15] 徐腾. 卵形鲳鲹 TLR21、TLR22 及相关基因的克隆与表达分析 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- Xu T. Molecular cloning and expression analysis of TLR21, TLR22 and their related genes from golden pompano(*Trachinotus ovatus*)[D]. Nanning: Guangxi University, 2019 (in Chinese).
- [16] 詹凡玢. 团头鲂 TLRs 及 IRFs 基因的克隆、表达及其功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- Zhan F B. Cloning expression and functional characterization of toll-like receptors and interferon regulatory factors in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [17] 丁旭. 斜带石斑鱼 Toll 样受体 22 基因的 cDNA 克隆、表达模式分析及其信号通路的初步探讨 [D]. 海口: 海南大学, 2012.
- Ding X. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) toll-like receptor 22: molecular characterization, expression pattern and pertinent signaling pathways[D]. Haikou: Hainan University, 2012 (in Chinese).
- [18] Ishii A, Kawasaki M, Matsumoto M, *et al.* Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* toll-like receptors[J]. *Immunogenetics*, 2007, 59(4): 281-293.
- [19] Liao Z W, Su J G. Progresses on three pattern recognition receptor families (TLRs, RLRs and NLRs) in teleost[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 122: 104131.
- [20] Yang Y X, Han T, Xiao J, *et al.* Transcriptome analysis reveals carbohydrate-mediated liver immune responses in *Epinephelus akaara*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 639.
- [21] She R, Chu J S C, Uyar B, *et al.* GenBlastG: using BLAST searches to build homologous gene models[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(15): 2141-2143.
- [22] Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403-410.
- [23] 刘宁, 黄欣, 刘寒, 等. 团头鲂 *Hox* 基因家族的鉴定、进化与表达分析[J]. *水产学报*, 2021, 45(2): 161-169.
- Liu N, Huang X, Liu H, *et al.* Identification, evolution and expression pattern of *Hox* gene family in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 161-169 (in Chinese).
- [24] 宋珊珊, 丁洪昌, 严兴洪. 条斑紫菜单孢子形成相关基因 (*PyMFG*) 的特性及其表达差异[J]. *水产学报*, 2020, 44(4): 1-12.
- Song S S, Ding H C, Yan X H. Characteristics of formation related genes (*PyMFG*) of monospores and analysis of differential expression in *Pyropia yezoensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 1-12 (in Chinese).
- [25] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [26] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) V5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [27] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [28] Pertea M, Kim D, Pertea G M, *et al.* Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and ballgown[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(9): 1650-1667.
- [29] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295.
- [30] Robinson M D, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(3): R25.
- [31] Yang X, Wu Y, Zhang P, *et al.* CC chemokine 1 protein

- from *Cromileptes altivelis* (CaCC1) promotes antimicrobial immune defense[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 123: 102-112.
- [32] Zhang J R, Liu S K, Rajendran K V, *et al.* Pathogen recognition receptors in channel catfish: III phylogeny and expression analysis of toll-like receptors[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 185-194.
- [33] Hwang S D, Kondo H, Hirono I, *et al.* Molecular cloning and characterization of toll-like receptor 14 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 425-429.
- [34] Hwang S D, Asahi T, Kondo H, *et al.* Molecular cloning and expression study on toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(4): 630-638.
- [35] Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length *TLR3*, *IRAK-4*, and *TRAF6* in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(9): 1057-1071.
- [36] 林克冰, 葛辉, 林琪, 等. 斜带石斑鱼 $TLR5S$ 基因结构及功能分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2013, 52(1): 109-115.
- Lin K H, Ge H, Lin Q, *et al.* Characterization and analysis of *TLR5S* gene from *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2013, 52(1): 109-115 (in Chinese).
- [37] Tsujita T, Tsukada H, Nakao M, *et al.* Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(47): 48588-48597.

Identification, evolution and expression pattern of Toll-like receptor gene family in *Epinephelus akaara*

CHEN Guisen^{1,2}, CAO Zhenjie¹, YAO Xinping¹, WEI Caoying¹, SUN Yun^{1,2*}, ZHOU Yongcan^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Tropical Hydrobiology and Biotechnology, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Toll-like receptor gene family is a class of conserved pattern recognition receptors, which plays an essential role in innate immunity providing efficient defense against invading microbial pathogens. *Epinephelus akaara* is one of the most important commercial marine fishes, and the main aquaculture industry in China is distributed along the coast of Fujian. The species is also considered a good model for studying immunity. Although TLRs have been extensively characterized in both invertebrates and vertebrates, a comprehensive analysis of TLRs in *E. akaara* is lacking. This research aims to study the systematic evolution, chromosome distribution, and expression regulation patterns of the Toll-like receptor genes in different tissues of *E. akaara*, based on the published genome and transcriptomic data of *E. akaara*, this study analyzed the phylogenesis, chromosome distribution, and expression regulation patterns of Toll-like receptor gene family in *E. akaara* tissues using bioinformatics methods including BLAST, phylogeny and synteny. The results showed that a total of 17 TLR genes were identified in *E. akaara*, which were divided into 5 subfamilies (TLR1, TLR3, TLR5, TLR7 and TLR11) and distributed on 11 of the 24 chromosomes. The 17 TLRs showed different expression patterns in different tissues. *EaTLR1-2*, *EaTLR2-2*, and *EaTLR13-2* were mainly highly expressed in the spleen. *EaTLR5M* was highly expressed in the kidney, spleen, gills, and heart, but lowly expressed in other tissues. *EaTLR5S* was highly expressed in the kidney, liver, and spleen, but with low expression in other tissues. *EaTLR18-1* and *EaTLR18-2* were mainly expressed in the heart. *EaTLR8* was highly expressed in all tissues except muscle and liver. *EaTLR1-1*, *EaTLR2-1a*, *EaTLR2-1b*, *EaTLR3*, *EaTLR7*, *EaTLR9*, *EaTLR13-1*, *EaTLR21*, and *EaTLR22* were mainly highly expressed in the brain, spleen, kidney, and gill. In addition, *EaTLR18-1* and *EaTLR18-2* were both located on chromosome 9 with highly similar expression patterns. *EaTLR2-1a* and *EaTLR2-1b* were located on chromosome 20 and their expression patterns were also highly similar. In addition, *EaTLR5M* and *EaTLR5S*, which had high LRR domain similarity, were located on chromosome 14, and had high similarity in expression levels in different tissues. On the contrary, *EaTLR7* and *EaTLR8*, which were located on chromosome 18, and *EaTLR2-2* and *EaTLR3*, which were located on chromosome 4, had different expression patterns. These suggested that copies of TLR genes in the same chromosome may have similar expression patterns or functions. This work provided reference data for studying the evolution of the Toll-like receptor system in fish, and laid a foundation for further research on the function of Toll-like receptor genes in *E. akaara*.

Key words: *Epinephelus akaara*; Toll-like receptors; phylogenetic analysis; expression analysis

Corresponding authors: SUN Yun. E-mail: syshui207@126.com;

ZHOU Yongcan. E-mail: zychnu@163.com

Funding projects: Key Research and Development Program Fund Project of Hainan Province (ZDYF2021XDNY298); Natural Science Foundation of Hainan Province (320QN212)