

Cloning and Expression Analysis of LRCH2-Like Gene in *Strongylocentrotus intermedius*

Huidong Zou, Li Bai, Shengmei Liu, Yadong Chen, Shuhong Zhou, Xuemei Qiu, Yang Liu*

Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning
Email: liuy78@foxmail.com

Received: Apr. 25th, 2018; accepted: May 16th, 2018; published: May 23rd, 2018

Abstract

One cDNA of LRCH2-like named SiLRCH2-like was cloned from sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* through Smart RACE technology. The full-length cDNA sequence of SiLRCH2-like is 2446 bp, with 1644 bp in coding region, 609 bp in 3'-UTR, 193 bp in 5'-UTR, encoding 548 amino acids. Predicted protein molecular weight is 59.9 KDa, and its theoretical isoelectric point is 4.07. SiLRCH2-like is an acidic protein that contains a Na-Ca-ex-superfamily domain and 7 leucine-rich repeats (LRRs). SiLRCH2-like was assessed in all tested tissues using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression level in female gonad was significantly higher than the others, secondly in gut with tube feet, and lower in coelomocytes with peristomial membrane, but the expression is few in male gonad. Expression distribution in coelomocytes after challenge with *Vibrio fortis*, LPS, PGN, WGP and polyI:C were also detected qRT-PCR. The expression level of SiLRCH2-like in coelomocytes was strongly up-regulated after challenge with PGN, reaching the highest point at 12 h; the expression level of SiLRCH2-like was weakly down-regulated after challenge with WGP, and showed no significant difference after challenge with others. The findings showed that SiLRCH2-like gene participated in the NOD-like receptor signaling pathway and played an important role in innate immune system of sea urchin.

Keywords

Strongylocentrotus intermedius, LRCH2-Like, RACE, qRT-PCR

虾夷马粪海胆LRCH2-Like基因的克隆与表达特征分析

邹惠冬, 白莉, 刘圣美, 陈亚东, 周淑红, 仇雪梅, 刘洋*

*通讯作者。

文章引用: 邹惠冬, 白莉, 刘圣美, 陈亚东, 周淑红, 仇雪梅, 刘洋. 虾夷马粪海胆 LRCH2-Like 基因的克隆与表达特征分析[J]. 海洋科学前沿, 2018, 5(2): 18-28. DOI: [10.12677/ams.2018.52003](https://doi.org/10.12677/ams.2018.52003)

大连海洋大学, 农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连
Email: liuy78@foxmail.com

收稿日期: 2018年4月25日; 录用日期: 2018年5月16日; 发布日期: 2018年5月23日

摘要

本实验采用cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆获得了一条虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)LRCH2-like基因的全长cDNA序列。SiLRCH2-like基因全长为2446 bp, 其中编码区为1644 bp, 3'-UTR为609 bp, 5'-UTR为193 bp, 编码548个氨基酸, 预测的蛋白分子量为59.9 KDa, 理论等电点为4.07, 为酸性蛋白, 有1个Na-Ca-ex-superfamily结构域和7个LRR结构域。我们采用实时定量PCR技术分析SiLRCH2-like基因在各组织中的表达情况。他在所有检测的组织中均有表达, 在雌性性腺中表达量最高, 其次是肠道、管足, 体腔细胞和围口膜中表达量较少, 在雄性性腺中几乎检测不到表达。我们也检测了该基因在强壮弧菌(*Vibrio fortis*)、脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、葡聚糖(WGP)、聚肌胞苷酸(polyI:C)五种病原刺激后的体腔细胞中的表达情况。SiLRCH2-like基因在PGN处理后在12 h出现了表达高峰, 在WGP处理后出现了表达下调, 而其他病原处理后表达上调不明显。研究结果表明, SiLRCH2-like基因参与了虾夷马粪海胆的NLR信号通路, 它在海胆的天然免疫系统中发挥了重要的作用。

关键词

虾夷马粪海胆, LRCH2-Like, RACE, 实时定量PCR

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)又称中间球海胆, 原产于日本北海道及以北沿海, 在俄罗斯远东地区的萨哈林岛等地也有分布。大连海洋大学于1989年将其从日本引进到中国, 现已成为中国北方沿海特别是辽东和山东半岛重要的养殖种类, 其养殖规模也越来越大, 随着海胆养殖业的发展, 其也面临着多种病害的威胁, 因此研究其免疫相关基因的表达模式就显得尤为重要, 也能为虾夷马粪海胆的免疫学基础研究提供参考依据。目前虾夷马粪海胆的NLR基因家族[1], TLR基因家族[2]等均有其与免疫相关的研究结果, 通过这些免疫相关的研究已经对虾夷马粪海胆的免疫应答有了初步的了解, 但并不完善。通过对高通量测序得到的虾夷马粪海胆转录组数据的分析[3], 发现了一个与免疫反应相关的基因LRCH2-like基因, 该基因可能与NLR信号通路有关, 参与NLR信号通路中的一条途径的免疫反应。本研究通过对虾夷马粪海胆转录组数据的分析, 筛选出LRCH2-like基因的部分片断, 采用cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆得到了一条虾夷马粪海胆LRCH2-like基因的全长cDNA序列, 通过实时定量的方法研究了LRCH2-like基因在虾夷马粪海胆的不同组织中的表达情况, 使用5种病原对虾夷马粪海胆的体腔细胞进行刺激, 对不同时间点的体腔细胞进行实时定量PCR检测LRCH2-like基因的表达量变化。

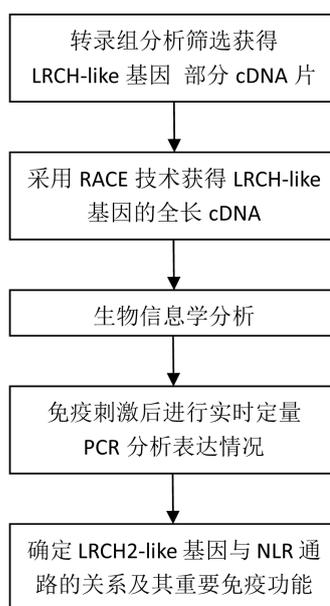
LRCH2样蛋白是LRCH(leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein)蛋白亚家族的一员, 该蛋白亚家族隶属于LRR蛋白超家族。LRR蛋白至少可以分为7个不同的亚家族, 如核糖核酸酶抑制剂(RI)样的亚家族, 包括核糖核酸酶抑制剂(RI)和GTP酶活化蛋白malp; SDS22样亚家族, 包

括 Rab 脂酯转移酶(geranylgeranyltransferase), internalin B, 动力轻链蛋白 1(dynein light chain 1); 含半胱氨酸的 LRR 亚家族, 包括 Skp2, SLRP, NLRR, LRRC4; 细菌 LRR, 包括 YopM, lpa4, lpa7; 植物特异性 LRR; TpLRR; 典型的 LRR 蛋白[4]。LRR 蛋白中富亮氨酸重复序列的数目可以从血小板糖蛋白中的 1 个, 到植物疾病抑制蛋白 Cf-2 中的 38 个。真核 LRR 蛋白的富亮氨酸重复基序一般为 20~29 个, LRR 最常见的长度一般为 23~24 个含保守亮氨酸的氨基酸残基。LRR 蛋白广泛存在于病毒、酵母和哺乳动物的各个组织中[5], 越来越多含 LRR 的蛋白已被发现[6] [7] [8] [9], 其表达定位十分广泛, 可以定位在细胞浆、细胞核、细胞质基质、血清和细胞膜的膜内区和膜外区。LRR 蛋白在不同生物体中的分布促使其具有不同的细胞定位和功能。根据 LRR 蛋白细胞定位的特点可以将其分为两类, 一类为细胞内 LRR 蛋白, 另一类为细胞外或跨膜 LRR 蛋白。细胞内的 LRR 蛋白, 如人的 flightlessUL37, 果蝇 flightlessLRR47, 秀丽线虫 sur-8, 鼠 rsp1, 酵母腺苷酸环化酶等, 这些细胞内 LRR 蛋白的共同特点是其序列具有高度相似性, 可以与 Ras-like GTP 酶相互作用, 调控 Ras-like GTP 酶的活性[10]。细胞外或跨膜的 LRR 蛋白的功能主要是作为细胞粘附分子或受体参与神经系统的生长、发育及重塑[11]。这类 LRR 蛋白的 LRR 重复序列的两端通常由富含半胱氨酸的 N 端和 C 端 LRR 包裹。这两端的 LRR 具有高度保守性。含有 LRR 的蛋白参与多个生物学过程, 如信号转导, 细胞粘附, 细胞凋亡, 细胞重塑, 细胞周期的调控, 细胞支架, 酶的抑制, DNA 修补, RNA 的加工和转录等。

LRCH 蛋白是一类新发现的在进化上相对保守的 LRR 蛋白亚家族, 该蛋白含有 LRR (leucine-rich repeats)重复结构和一个 CH (calponin homology domain)结构域, 具有细胞骨架蛋白的特性, LRR 重复结构提供了一个蛋白与蛋白之间相互作用的结构骨架[12], 而 CH 结构域通常被看作是一个肌动蛋白结合结构[13]。尽管 LRR 重复结构和 CH 结构域在真核生物中是普遍存在的, 但是这两个结构域的组合同时出现在一个蛋白中仅限于动物物种。LRCH 蛋白首次在果蝇中发现, 人类与果蝇的 dLRCH 表现出高度相关性的蛋白只有 4 种(hLRCH1-4), 说明它们共有一个进化起源, 根据它们保守的氨基酸序列表明它们是细胞骨架的支架因子[14]。

2. 材料与方法

2.1. 研究流程



2.2. 海胆的饲喂和组织获取

试验用 2 龄虾夷马粪海胆取自大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室,海胆饲养于 16℃~25℃ 的海水中,每日投喂新鲜的海带。抽取体腔细胞前一日停止投喂。

选取 8 枚健康的海胆(雌、雄各 4 枚),分别用注射器抽取虾夷马粪海胆的体腔液,在 4℃ 下离心 10 min,转速为 5000 r/min,离心后丢弃上清,收集沉淀的体腔细胞,接着解剖海胆个体,获得围口膜、肠、管足、卵巢和精巢,并将这些组织放置于液氮中冻存,最后转移至-80℃ 冰箱中保存。

2.3. 海胆个体的免疫诱导

虾夷马粪海胆体腔细胞是主要的免疫组织,我们选取四种病原物(脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、葡聚糖(WGP)和聚肌胞苷酸(polyI:C))和一种致病菌(强壮弧菌(*Vibrio fortis*))对健康的海胆个体进行免疫刺激,来检测目标基因对免疫刺激的应答情况。强壮弧菌是虾夷马粪海胆的一种致病菌,属于革兰氏阴性菌,可以用来诱导虾夷马粪海胆的免疫反应[15]。脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁中的一种成分,也是细菌内毒素的主要成分,具有抗原性,是一种内源性免疫增强剂[16]。肽聚糖是细菌(主要是革兰氏阳性菌)等原核生物细胞壁内的一类大分子聚合物,在革兰氏阳性菌中肽聚糖含量高达 30%~95%,在革兰氏阴性菌中也有 5-20%的含量,是一种重要的水产动物免疫增强剂[17]。葡聚糖是存在于酵母细胞壁中一种具有增强免疫力活性的多糖,可刺激机体免疫反应[16]。聚肌胞苷酸是一种合成型的双链 RNA 类似物,一种病毒感染相关的分子模式,是用来模拟 RNA 病毒的免疫抑制剂。

采用直接体腔注射的方法对虾夷马粪海胆个体进行免疫刺激,同时体腔注射磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照组。强壮弧菌使用半致死量注射 50 只海胆,防止由于死亡导致数量不足。其余 4 种病原物的注射量为 LPS: 2 mg/ml、PGN: 200 μg/ml、WGP: 600 μg/ml,每组注射 20 只,PBS 注射 20 只。体腔细胞在注射后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 五个时间点进行抽取,按前面的方法处理后保存于-80℃ 冰箱中备用。

2.4. RNA 的制备及 cDNA 合成

按照 RNAprep Pure Tissue Kit 总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)方法提取虾夷马粪海胆各组织总 RNA,用凝胶电泳检测 RNA 的质量,核酸蛋白检测仪检测 RNA 浓度。为了减少个体差异及性别对试验结果的影响,各组织均使用 4 枚海胆的 RNA 等量混合后用于反转录,其中精巢、卵巢各使用 4 枚雄性或雌性海胆,其余组织均使用 2 枚雄性海胆和 2 枚雌性海胆。制备好的 RNA 样品保存于-80℃ 冰箱中备用。

使用 cDNA 第一链合成试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)合成 cDNA 第一条链。反转录产物于-20℃ 冰箱保存用于实时定量 PCR 检测。按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech 公司)说明进行反转录,合成 cDNA 第一条链,反转录产物于-20℃ 冰箱保存用于 RACE 克隆。

2.5. 引物设计

根据虾夷马粪海胆转录组数据[3]中筛选到的 LRCH2-like 基因部分片段设计引物,应用 Primer 5.0 软件分别设计扩增 LRCH2-like 基因全长 3'和 5'的 RACE 引物和用于实时定量的引物,内参基因选取 18S rRNA,内参基因的引物根据 GenBank 中虾夷马粪海胆的 18S rRNA(D14365)序列设计。所有引物由上海生工生物有限公司合成(表 1)。

2.6. LRCH2-like 基因 cDNA 全长的克隆及回收测序

使用 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech 公司)进行 RACE 克隆虾夷马粪海胆

Table 1. Primers used in this experiment**表 1.** 本实验使用的引物

引物名称	引物序列	用途
LRCH2-3	CAGGTGAGGTGGCCCCATGCGGTTC	3'RACE 引物
LRCH2-5	CAAGCTCCGAAGGTTGGCCATGTCC	5'RACE 引物
rLRCH2-s	GCTTACTTCACTGCCAAGGGATA	实时定量引物
rLRCH2-a	CTGGTTTCCATTACCACCAA	实时定量引物
r18S_S	GCGTTTAGCCAGGCGAGAT	内参
r18S_A	GGAGGAGGTTACGCGGATTA	内参

LRCH2-like 基因全长 cDNA 的克隆。以合成的 cDNA 第一链为模板, 分别用 LRCH2-5 和 LRCH2-3 与试剂盒提供的 UPM 引物配对进行 PCR 扩增。使用降落 PCR 进行扩增: 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 sec, 72°C 3 min 共 5 个循环; 94°C 30 sec, 70°C 30 sec, 72°C 3 min 共 5 个循环; 94°C 30 sec, 65°C 30 sec, 72°C 3 min 共 25 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

按照 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)方法对目的片段进行胶回收, 使用全式金公司的 p-easy-T1 载体, 进行 TA 克隆, 使用 M13 通用引物进行菌液 PCR 扩增, 鉴定重组子。取 5 μ l 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 确认包含重组子的克隆, 将得到的阳性克隆菌株送至上海英俊有限公司进行测序, 使用通用引物进行测序。

2.7. 利用生物信息学方法进行序列拼接及分析

将测序结果进行序列拼接, 完成全长拼接后, 首先使用 NCBI 的 blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线工具进行比对, 确认为目的序列后, 用 NCBI 上的 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行保守结构域分析, 寻找信号肽和跨膜结构域, 使用 clustalw 与其他物种相似序列进行相似性比对, 并根据比对结果用 MEGA5.0 软件构建进化树。

2.8. 使用实时定量 PCR 进行表达特征分析

采用实时荧光定量 PCR 法检测 LRCH2-like 基因在健康虾夷马粪海胆体腔细胞、围口膜、肠道、管足、卵巢和精巢中的表达情况, 同时也检测它在免疫刺激之后的虾夷马粪海胆体腔细胞中的表达情况。

选取虾夷马粪海胆的 18S rRNA 为内参基因, 在 life technology 的 7500 实时定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR, 按照试剂盒 SYBR Premix EX Taq II Kit(takara 公司)使用说明进行实时定量 PCR 扩增反应。PCR 反应体系(20 μ l): SYBR Realtime PCR Master Mix 10 μ l, 上下游引物 (10 μ M) 各 0.8 μ l, ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ l, cDNA 模板 2 μ l, RNase free H₂O 6 μ l。PCR 反应条件: 95°C 30 sec 预变性; 95°C 5 sec, 60°C 34 sec, 40 个循环; 在检测引物特异性及制备标准曲线时需加上溶解曲线的过程: 95°C 15 sec, 60°C 1 min, 95°C 15 sec, 60°C 25 sec。每个样本重复检测三次。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测 LRCH2-like 基因的表达情况。

3. 结果与分析

3.1. LRCH2-Like 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

通过条件优化, 虾夷马粪海胆 LRCH2-like 基因的 RACE 克隆获得了较好的结果, 条带单一, 符合预期片段大小, 将选取的单克隆送去测序, 测序结果去除载体后进行分析, 获得 LRCH2-like 基因的 3'RACE

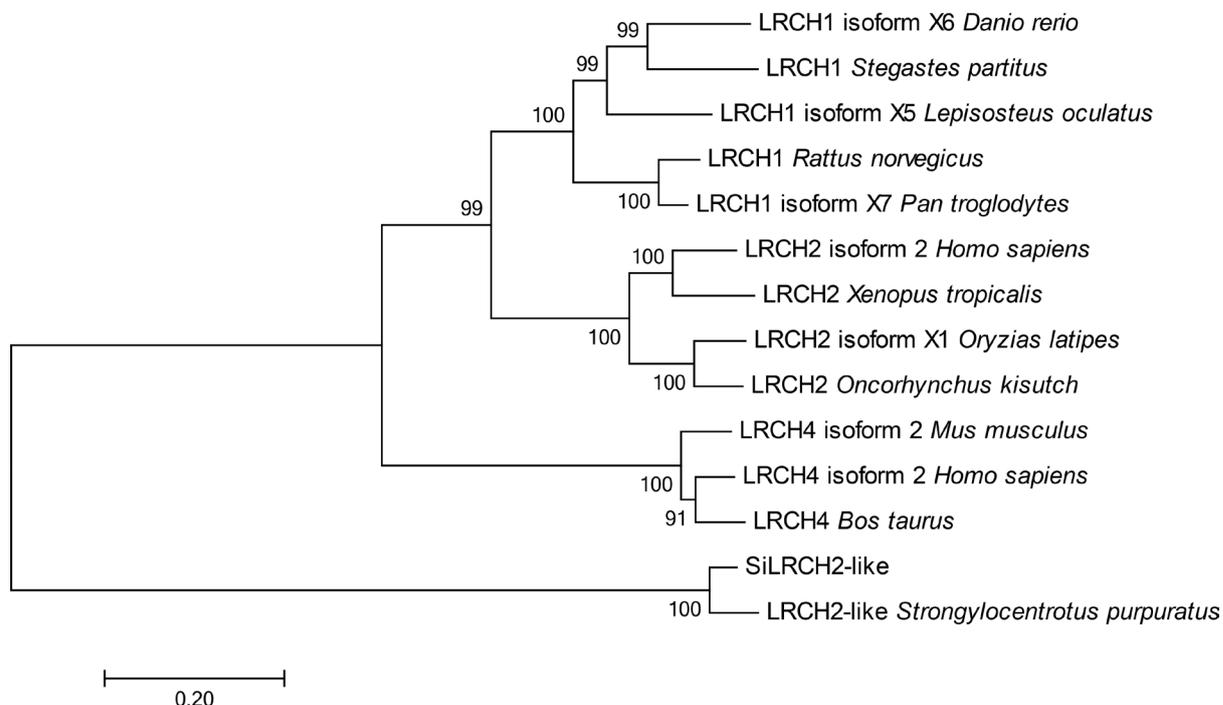


Figure 2. Phylogenetic analysis of LRCH homologous proteins (The scale represents the genetic distance, and numbers at branch nodes represented the confidence level of 1000 bootstrap replications)

图 2. 基于氨基酸序列的 LRCH 同源蛋白系统进化树(标尺表示遗传距离, 分支处数字代表自展置信值, 重复 1000 次)

邻接法构建系统进化树, 设定 Bootstrap 值为 500。如图 2 所示, 所有的脊椎动物的 LRCH 同源蛋白聚为一支, 这些物种有斑马鱼(*Danio rerio*)、深裂眶锯雀鲷(*Stegastes partitus*)、斑点雀鲷(*Lepisosteus oculatus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、牛(*Bos taurus*), 而虾夷马粪海胆 SiLRCH2-like 与紫海胆(*S. purpuratus*)的 LRCH 2-like 单独形成最外缘的一簇。结合物种的分类地位, 可以推测, 海胆的 LRCH2-like 基因很有可能和脊椎动物的 LRCH 同源蛋白源于共同祖先。

3.3. SiLRCH2-like 基因在虾夷马粪海胆不同组织的表达情况

采用相对定量的方法对未经处理的虾夷马粪海胆各个组织进行表达量的检测, 使用 18S rRNA 作为内参基因, 检测结果如图 3 所示, SiLRCH-2like 基因 mRNA 在所有检测的组织中均进行转录, 但是在不同的组织中表达量有差异。SiLRCH2-like 基因在卵巢中表达量最高, 其次是肠道、管足, 体腔细胞和围口膜中表达量较少, 在精巢中表达相对来说很低。

3.4. 免疫刺激后 SiLRCH2-like 基因的表达特征

本实验使用四种病原物 LPS、PGN、PolyI:C、WGP 以及病原菌强壮弧菌(*V. fortis*)对虾夷马粪海胆的体腔进行刺激后, 检测 SiLRCH2-like 基因在实验选取的病原体刺激后的 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h 的表达量变化(图 4)。

经过 LPS 处理后(图 4(a)), SiLRCH2-like 基因在 24 h 出现了一个表达高峰, 表达量增加了 0.5 倍, 但未出现显著性差异变化, 说明 SiLRCH2-like 基因对 LPS 刺激并无明显应答。经 PGN 处理后(图 4(b)) SiLRCH2-like 基因在 12 h 达到表达高峰, 显著性上调, 在 24 h 表达量趋近于 0, 随后又呈现上升趋势, SiLRCH2-like 基因对 PGN 的刺激表现出强烈的应答。Poly I: C 处理后(如图 4(c)), SiLRCH2-like 基因表达量变化不大, 与 0 h 相比, 其他 5 个时间表达量都在下降, 在 72 h 表达量最低, 说明 Poly I:C 抑制

SiLRCH2-like 基因的表达使其表达量下降, 呈现下调趋势。WGP 处理后(图 4(d)), SiLRCH2-like 基因表达量持续降低, 在 48 h 表达量达到最低, 呈现表达下调的趋势, 说明 WGP 同样抑制 SiLRCH2-like 基因的表达使其表达下调。经过强壮弧菌处理后(图 4(e)), SiLRCH2-like 基因在 12 h 表达量达到最大, 其余时间表达量都在下降, SiLRCH2-like 基因表达量整体无明显变化, 说明 SiLRCH2-like 基因对强壮弧菌的免疫应答不明显。由此可见, SiLRCH2-like 基因对 LPS 和强壮弧菌的刺激并未产生明显表达反应, 说明 LPS 和强壮弧菌对 SiLRCH2-like 基因有一定的免疫刺激, 但并不剧烈; 对 PolyI:C 和 WGP 的刺激出现表达下调, 说明 PolyI:C 和 WGP 对 SiLRCH2-like 没有免疫刺激, 甚至抑制 SiLRCH2-like 基因的表达; PGN 通常是 NLR 受体识别的分子模式, SiLRCH2-like 对 PGN 的刺激产生的表达反应最剧烈, 由此可以推测 SiLRCH2-like 基因可能参与 NLR 信号通路的免疫反应。

4. 讨论

在使用 RACE 技术得到 SiLRCH2-like 基因的全长 cDNA 后, 通过序列比对发现, SiLRCH2-like 基因的 LRR 结构非常保守, 属于 LRR-RI 超家族, 该家族的 LRR 通常由 20~29 个氨基酸残基组成, 存在于多种蛋白中, 参与蛋白与蛋白之间的相互作用, 有许多不同的功能和细胞定位。LRR 重复对应的结构单位是由一个 β 片层和一个 α 螺旋组成, β 片层是一保守的 LxxLxLxxN/CxL 序列[18], 这段序列包含 12 个片层与 11 个全重复相一致, 与之前在该超家族观察到的范围一致, 作为 RanGTPase 激活蛋白发挥作用, LRR 也可作为富亮氨酸重复受体激酶发挥作用, 还可作为 LRR 蛋白参与包括信号转导、细胞凋亡、细胞重塑、固有免疫反应、细胞支架, 激素受体的相互作用或者酶的抑制等多个生物学过程。由于 LRR 是 NLR 家族蛋白识别病原体的主要区域, 因此可以表明 SiLRCH2-like 基因参与 NLR 信号通路的免疫反应, 但是 SiLRCH2-like 基因的 LRR 重复域较短, 可能与 SiLRCH2-like 基因识别的病原体种类有关。

从 SiLRCH2-like 基因在虾夷马粪海胆组织中的表达量结果中可以发现, SiLRCH2-like 在卵巢中的表达量最高, 而在精巢中表达量很低。这可能是因为为有性繁殖动物具有性别二态性的特点, 性别二态性的形成与不同基因的表达有关[19] [20], 雌性性腺作为海胆繁殖的重要器官, 在进行取样时处于发育成熟期, 而 SiLRCH2-like 基因在细胞生长发育、分化和凋亡等方面发挥重要作用, 因此 SiLRCH2-like 基因在雌性性腺中的表达量最高, 这也可能与保护卵子存在一定关系。

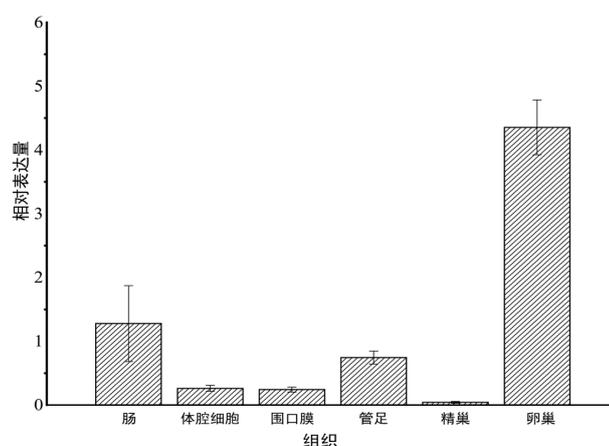


Figure 3. Expression profiles of SiLRCH2-like gene in various tissues from normal sea urchin. The longitudinal axis values represent relative expressions and the transverse axis is different tissues

图 3. SiLRCH2-like 基因在健康虾夷马粪海胆不同组织中的表达情况。纵轴数值表示相对表达量, 横轴为不同组织

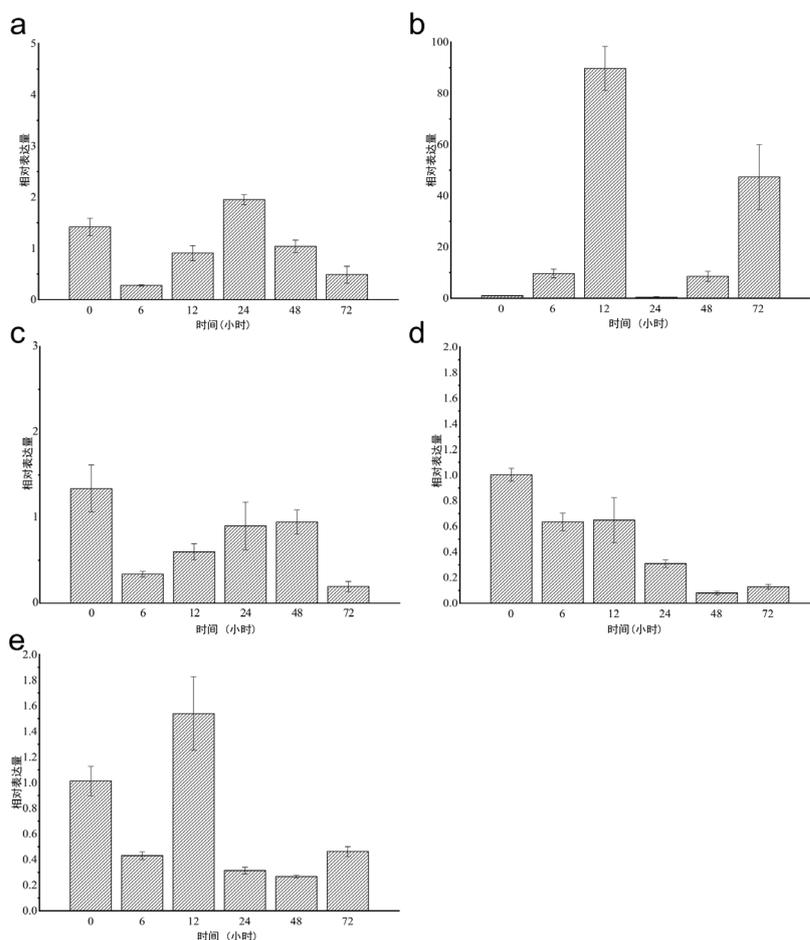


Figure 4. Expression profiles of SiLRCH2-like gene in sea urchin coelomocytes after immune stimulation: The expression of SiLRCH2-like was stimulated by LPS, PGN, Poly I:C, WGP and *Vibrio fortis*. The longitudinal axis values represent relative expressions, the transverse axis are different periods after immune stimulation
图 4. 免疫刺激后 SiLRCH2-like 基因在体腔细胞中的表达特征(a)-(e): SiLRCH2-like 分别在 LPS、PGN、Poly I:C、WGP 及强壮弧菌刺激下的表达情况。纵轴数值表示相对表达量, 横轴为免疫刺激后不同时间点

图 4 中, 我们可以发现 PGN 刺激的体腔细胞表达量显著上升, 在 12 h 达到表达高峰, 呈表达上调。PGN 是细菌等原核生物细胞壁特有的成分, 在天然免疫中, PGN 是一种重要的病原体相关分子模式, 是免疫系统的激活剂, 宿主可以通过模式识别受体识别 PGN 结构, 对入侵的细菌作出相应的免疫应答, 通过不同的信号转导途径释放免疫调控物质, 发挥免疫功能[21]。研究证明 NOD 蛋白可以识别细菌 PGN, 而 NOD1 作为胞质受体识别革兰氏阴性菌的 PGN, NOD2 作为胞浆受体识别革兰氏阳性菌的 PGN[22] [23], 由 NOD2 的 LRR 结构域介导 PGN 直接与 NOD2 相互作用[24]。SiLRCH2-like 基因对 PGN 的刺激反应剧烈, 而 PGN 是 NLR 信号通路中参与 NOD2 反应途径的反应物, 说明 SiLRCH2-like 基因可能参与了 NOD2 介导的 NLR 信号通路。LPS 作为一种内源性免疫增强剂, 主要作用于巨噬细胞和嗜中性白细胞, 对许多动物的免疫系统都有深远的影响, 它能刺激许多真核生物包括鱼类等的非特异性免疫, 提高机体的免疫力[25], 经过 LPS 处理的体腔细胞表达量在 24 h 达到高峰, 在其余的时间并没有显著变化, 上述实验结果表明, 虽然 LPS 对 SiLRCH2-like 基因有一定的刺激, 可以作为免疫刺激物激发 SiLRCH2-like 基因的表达, 但对 SiLRCH 2-like 基因的刺激作用微弱, 这可能与 LPS 内毒素的核心结构类脂 A 的高度保守有

关[26]。WGP 通常存在于真菌的细胞壁中, 应用于水产动物的 WGP 大多为酵母葡聚糖, 即 β -葡聚糖。WGP 可以选择性地作用于吞噬细胞、自然杀伤细胞和颗粒细胞的特异性受体并激活这些细胞, 通过吞噬作用来吸收、破坏和清除侵入体内的病原微生物, 同时还能产生细胞因子来增强鱼类对细菌病原体的抵抗力[16] [27]。WGP 可以使 SiLRCH2-like 基因表达下调, 表明 SiLRCH-like 基因对 WGP 没有免疫应答, 也进一步暗示了 SiLRCH2-like 基因不参与真菌引发的免疫反应。Poly I:C 作为一种模拟 RNA 病毒的免疫抑制剂刺激体腔细胞, 抑制 SiLRCH2-like 基因的表达, 可以推测 SiLRCH2-like 基因不参与 RNA 病毒引发的免疫反应。强壮弧菌是虾夷马粪海胆条件性致病菌, 实验证明强壮弧菌对虾夷马粪海胆的半致死浓度是 10^5 cfu/ml [15] [28], 用半致死浓度刺激体腔细胞, 其表达量在 12 h 达到最高, 表达量整体差异不大, 可以推测 SiLRCH2-like 基因不是直接参与强壮弧菌引发的免疫反应。

5. 结论

本实验获得了虾夷马粪海胆 LRCH2-like 基因的全长 cDNA, 并对其在不同组织以及不同病原刺激后的表达情况进行了分析, 并推测虾夷马粪海胆的 LRCH2-like 基因是一个免疫相关基因, 参与了 NLR 信号通路。本实验为后续有关 SiLRCH2-like 基因作用机制研究奠定了基础。

基金项目

国家自然科学基金“海胆天然免疫分子 NLR 家族的免疫应答机制研究”(31101923)辽宁省自然科学基金“海胆抗菌肽的基因克隆、表达特征分析及原核表达”(2015020761)。

参考文献

- [1] 陈亚东, 刘晓飞, 常亚青, 等. 虾夷马粪海胆 NLR 家族基因片段的克隆及表达特征分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(4): 336-341.
- [2] 王轶南, 于卓, 刘洋, 等. 虾夷马粪海胆 TLR 基因 cDNA 克隆及表达分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(4): 329-335.
- [3] Chen, Y., Chang, Y., Wang, X., *et al.* (2015) *De Novo* Assembly and Analysis of Tissue-Specific Transcriptomes Revealed the Tissue-Specific Genes and Profile of Immunity from *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish & Shellfish Immunology*, **46**, 723-736. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.013>
- [4] 武明花, 李桂源. 蛋白质识别基序——富亮氨酸重复序列的结构与功能[J]. 临床与病理杂志, 2006, 26(1): 35-38.
- [5] Groves, M.R. and Barford, D. (1999) Topological Characteristics of Helical Repeat Protein. *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 383-389. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80052-9](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80052-9)
- [6] Aruga, J. and Mikoshiba, K. (2003) Identification and Characterization of Slitrk, a Novel Neuronal Transmembrane protein Family Controlling Neurite Outgrowth. *Molecular & Cellular Neuroscience*, **24**, 117-129. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00129-5](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00129-5)
- [7] Wang, W., Yang, Y., Li, L., *et al.* (2003) Synleurin, a Novel Leucine-Rich Repeat Protein That Increases the Intensity of Pleiotropic Cytokine Responses. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **305**, 981-988. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00876-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00876-3)
- [8] Harton, J.A., O'Connor Jr., W., Conti, B.J., *et al.* (2002) Leucine-Rich Repeats of the Class II Transactivator Control Its Rate of Nuclear Accumulation. *Human Immunology*, **63**, 588-601. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(02\)00400-7](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(02)00400-7)
- [9] Laurén, J., Airaksinen, M.S., Saarma, M., *et al.* (2003) A Novel Gene Family Encoding Leucine-Rich Repeat Transmembrane Proteins Differentially Expressed in the Nervous System. *Genomics*, **81**, 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00030-2)
- [10] Li, W., Han, M. and Guan, K.L. (2000) The Leucine-Rich Repeat Protein SUR-8 Enhances MAP Kinase Activation and Forms a Complex with Ras and Raf. *Genes & Development*, **14**, 895-900.
- [11] Kuja-Panula, J., Kiiltomaki, M., Yamashiro, T., *et al.* (2003) AM IGO, a Transmembrane Protein Plicated in Axon Tract Development, Defines a Novel Protein Family with Leucine-Rich Repeats. *Journal of Cell Biology*, **160**, 963-973.
- [12] Hindle, K.L., Bella, J. and Lovell, S.C. (2009) Quantitative Analysis and Prediction of Curvature in Leucine-Rich Re-

- peat Proteins. *Proteins-Structure Function & Bioinformatics*, **77**, 342-358. <https://doi.org/10.1002/prot.22440>
- [13] Gimona, M. and Mital, R. (1998) The Single CH Domain of Calponin Is Neither Sufficient nor Necessary for F-Actin Binding. *Journal of Cell Science*, **111**, 1813-1821.
- [14] Foussard, H., Ferrer, P., Valenti, P., *et al.* (2010) LRCH Proteins: A Novel Family of Cytoskeletal Regulators. *PLoS One*, **5**, e12257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012257>
- [15] Wang, Y., Feng, N., Li, Q., *et al.* (2013) Isolation and Characterization of Bacteria Associated with a Syndrome Disease of Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*, in North China. *Aquaculture Research*, **44**, 691-700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03073.x>
- [16] 龚全, 陈孝煊, 许国焕. 活性多糖及其在水产养殖中的应用[J]. 水生态学杂志, 2007, 27(2): 92-94.
- [17] 刘芳, 杨跃寰. 细菌细胞壁肽聚糖的研究[J]. 四川理工学院学报(自科版), 2011, 24(6): 628-631.
- [18] Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001) The Leucine-Rich Repeat as a Protein Recognition Motif. *Current Opinion in Structural Biology*, **11**, 725-732. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00266-4)
- [19] 丁君, 孙巍, 常亚青. 虾夷马粪海胆性腺 cDNA 文库构建及部分 EST 序列分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 222-229.
- [20] 尚晓莉, 曲宪成. 鱼类性别决定和性别分化机制研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010, 2010(4): 245-248.
- [21] 江蕾, 张朝晖, 王圆. 肽聚糖在天然免疫中的作用研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(13): 54-56.
- [22] 郑媛, 安丽, 仇杰, 等. NOD1 和 NOD2 介导的信号通路研究进展[J]. 中国医药科学, 2015, 5(23): 49-52.
- [23] 沈雪莹, 方传雷, 刘志华. NOD 蛋白与免疫应答[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(6): 801-810.
- [24] Grimes, C.L., Ariyananda, L.D.Z., Melnyk, J.E., *et al.* (2012) The Innate Immune Protein Nod2 Binds Directly to MDP, a Bacterial Cell Wall Fragment. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 13535-13537. <https://doi.org/10.1021/ja303883c>
- [25] 李盈锋, 齐鑫, 邵庆均. 脂多糖对鱼类免疫功能影响及其在水产饲料中应用展望[J]. 饲料工业, 2012, 33(10): 35-37.
- [26] 张悦, 宋晓玲, 黄健. 微生物多糖结构与免疫活性的关系[J]. 动物医学进展, 2005, 26(8): 10-12.
- [27] 温周瑞, 刘慧集, 周敏, 等. 微生物多糖对水产动物免疫作用研究进展[J]. 水生态学杂志, 2004, 24(4): 1-3.
- [28] Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., *et al.* (2005) Pathogenicity of Vibrios to Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology*, **7**, 1488-1495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00847.x>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2376-4260, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ams@hanspub.org