

# 黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*) 肿瘤坏死因子 $\alpha$ cDNA 的克隆及特征分析\*

高春萍 蔡中华<sup>1</sup> 宋林生<sup>1,2</sup> 吴龙涛<sup>2</sup> 池振明

(中国海洋大学生命学院 青岛 266003)

<sup>1</sup>(清华大学深圳研究生院 深圳 518055)

<sup>2</sup>(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 采用同源克隆的方法,从黑鲷中获得肿瘤坏死因子(TNF  $\alpha$ )全长 cDNA 序列。该序列含 1288 个核苷酸,可编码 253 个氨基酸的 TNF 前体蛋白。它是一种跨膜蛋白,无糖基化位点和信号肽结构。黑鲷 TNF  $\alpha$  与其它鱼类的 TNF  $\alpha$  的相似性很高,占据进化上独立的分支;与哺乳类 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  源于共同的祖先。基因结构分析显示,该基因含有 TNF 家族 profile 和 TNF 家族的标签序列;在参与 TNF  $\alpha$  基因二硫键形成的两个半胱氨酸和 TNF  $\alpha$  三聚体形成的位点高度保守;空间结构模拟显示,它与哺乳类 TNF  $\alpha$  的空间结构相似,都是由两个  $\beta$  折叠片组成,每个折叠片包含 5 个反向平行的  $\beta$  链。表达研究结果表明,黑鲷 TNF  $\alpha$  在检测的各个组织中均为组成型表达,表现为在刺激与非刺激鱼体中,都可以检测到黑鲷 TNF  $\alpha$  的表达,但是其表达水平在不同组织中有很大差异。黑鲷 TNF  $\alpha$  在头肾、脾脏和鳃的表达量较高,而在心脏、肝脏、血液、肾脏和大脑中表达量较低。

**关键词** 黑鲷,肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF  $\alpha$ ),克隆,特征分析

**中图分类号** Q789

肿瘤坏死因子  $\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha, TNF  $\alpha$ ) 是哺乳类免疫系统中一种重要的细胞因子。通过与其特异性受体结合,可以启动细胞程序性死亡,诱导细胞凋亡;介导细胞毒反应和基因表达调控的信号转导;诱导相关细胞因子和其它促炎因子的表达(Ibelgaufits, 2003<sup>2)</sup>)。作为一种重要的促炎因子,它可以促进巨噬细胞的趋化和吞噬,诱导呼吸代谢爆发,并刺激 B 细胞的分化,诱导抗体生产,是衔接机体特异性与非特异性免疫的重要环节,具有广泛的生物学活性(Thomson, 1998)。

由于 TNF  $\alpha$  在哺乳类机体免疫中具有重要的作用,近年来,人们一直在低等动物中寻找存在

TNF  $\alpha$  的证据,为低等动物的免疫防御提供依据。Ottaviani (1993) 和 Wittwer(1999) 分别报道了在软体动物和昆虫中存在 TNF  $\alpha$  及其它细胞因子类似活性物质。Hardie 等(1994) 和 Jang 等(1995) 分别利用人的重组 TNF  $\alpha$  和它的单克隆抗体,从细胞水平证明了鱼类存在 TNF  $\alpha$  类似功能的成分。Hirono 等(2000) 通过 EST 技术首次从牙鲆中克隆到 TNF  $\alpha$  基因,从分子水平上证明鱼类存在 TNF  $\alpha$ 。近年来,采用同源克隆和 EST 等分子生物学手段,已从虹鳟(Zou *et al.*, 2002)、金头鲷(Garcia-Castillo *et al.*, 2002)、斑马鱼(Bobe *et al.*, 2001)、鲤鱼(Saeij *et al.*, 2003)、真鲷(蔡中华等, 2003) 等多个养殖品种中克隆到 TNF  $\alpha$  基因。

\* 863 国家高技术研究发展计划资助,2001AA628118 号;国家自然科学基金项目资助,40476075 号;中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室资助。高春萍,硕士研究生, E-mail: gcp034@sina.com.cn

1) 通讯作者: 宋林生,博士,研究员,博士生导师, E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn

2) Ibelgaufits H, 2003. COPE: Horst Ibelgaufits' Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia at www.copewithcytokines.de

收稿日期: 2003-11-28, 收修改稿日期: 2004-04-29

黑鲟(*Acanthopagrus schlegelii*)是我国重要的海水养殖鱼类,随着其养殖产业的扩大,已面临病害的严重威胁。传统的化学药物治疗不仅缺乏特效性,而且由于其对环境的污染与破坏,将逐渐被改良或淘汰。因此,今后应采用分子生物学的方法,对养殖黑鲟重要的抗病因子基因进行克隆,为提高其机体抗病力、开发新型药物奠定基础。本文中采用同源克隆的方法,在养殖黑鲟中进行 TNF $\alpha$  基因的克隆,并对该基因在病原刺激下的表达规律进行探索,为研究该基因在鱼类免疫学中的作用,并进一步开发和利用该基因为生产服务提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验鱼

实验用黑鲟(*Acanthopagrus schlegelii*)均为购自青岛市南山市场的健康成鱼,体重约为 700g,于流水实验槽中控温暂养一周。暂养期间水温为(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,溶氧约为 6mg/L,每日投喂约占体重 1.5% 的商品人工配合饲料。

### 1.2 黑鲟 cDNA 的合成

用新鲜培养的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*),以围心腔注射的方式,感染经暂养的健康黑鲟,约 10<sup>8</sup> 菌/kg 鱼。24h 后,取感染鱼的头肾匀浆,以 Trizol Reagent (Invitrogen) 提取黑鲟头肾总 RNA,以 Oligo dT (Promega) 为引物,以 MMLV (Promega) 反转录酶合成 cDNA,具体操作按产品用户手册进行。

### 1.3 黑鲟 TNF $\alpha$ 同源序列的克隆

以近源物种 TNF $\alpha$  基因序列的保守区域设计的简并引物 dIF (5'-CTC TAC TTC DFC TAC HBC CAVG-3') 和 dIR (5'-CAG CTG GAA BAC TNG ACC AAG-3'), (D= G, A, T; H= A, T, C; V= A, C, G; B= G, T, C; N= A, T, G, C) 为引物,以经细菌感染的黑鲟头肾 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 10 $\times$  PCR 反应缓冲液 5 $\mu$ l, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5 $\mu$ l, 2.5mmol/L dNTP 2 $\mu$ l, 10nmol/L 引物 dIF 和 dIR 各 2 $\mu$ l, Taq 酶 1.25U, 用 HPLC 水(上海生工)将反应体系补充至 50 $\mu$ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 反应产物经纯化后,连入 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连),转化到大肠杆菌 *XL-1blue* 感受态细胞中。转化子以 dIF 和 dIR 为引物进行 PCR 筛选。选

取 3 个与预测片段大小相近的阳性克隆,经质粒纯化后,采用 ABI 377 DNA 自动测序仪测序。

### 1.4 RACE 扩增 TNF $\alpha$ 全长 cDNA

3' 末端的克隆: 以提取的黑鲟头肾总 RNA 为模板,用接头引物 Adapter dI (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT 17-3'), 在 Superscript II 反转录酶(Invitrogen) 的作用下,启动反转录合成 cDNA。以带接头的 cDNA 为模板,用接头通用引物 Universal primer (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AG-3') 与基因特异性引物 BTF1 (5'-CAG CCA GGC GTC GTT CAG AG-3') 和 BTF2 (5'-GAG GTC GGC GTG CCA GAA CA-3'), 采用半巢式 PCR(semi-nested PCR), 扩增基因的 3' 末端。PCR 反应体系与前述相同,采用 Touchdown 的 PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 10 个循环: 94 $^{\circ}$ C 45s, 66 $^{\circ}$ C 30s (每一循环温度降低 0.6 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1min; 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 45s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

5' 末端的克隆: 以 Oligo dI 为引物,用 Superscript II 反转录酶启动反转录,合成 cDNA 第一链。cDNA 模板经 PCR 纯化试剂盒(Promega, USA) 纯化,在 dCTP 存在的条件下,用末端转移酶(TdT) (Promega, USA), 在新合成的 cDNA 的 3' 末端加上 poly C 尾,具体操作按产品用户指南进行。以加尾的 dG-cDNA 为模板,用接头引物 Adapter dG (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG10-3') 和基因特异性引物 BTR1 (5'-CAG CCG CAA GCG TTA TCT CG-3') 及 BTR2 (5'-AAG TGC AAA CAC ACC GAA G-3'), 采用半巢式 PCR 扩增基因的 5' 末端,反应条件与 3' 末端扩增相似。PCR 反应扩增产物在 1% 琼脂糖上电泳,EB 染色,紫外灯下观察。

分别将 3' 和 5' 端的扩增片段连接到 pMD18-T 载体上,并转化到大肠杆菌 *XL-1blue* 感受态细胞中,获得的转化子经 PCR 筛选后进行序列测定。

### 1.5 RT-PCR 研究 TNF $\alpha$ 的转录表达

分别提取健康及经鳃弧菌感染 24h 黑鲟的血液、大脑、头肾、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、鳃等器官或组织的总 RNA,以 Oligo dI 为引物反转录合成 cDNA,方法同前。以各组织的 cDNA 为模板,用引物 Actin-F (5'-ATC GTG GGG CGC CCC AGG CAC G-3') 和 Actin-R (5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTG-3') 扩增组成型表达的  $\beta$  actin 基因部分片段为内参照,调整各样品模板浓度。在相同模板量的前提下,用 TNF $\alpha$  特异性基因引物 BTF1 和

BTRR 对样品进行扩增, 采用 RT-PCR 方法, 检测黑鲷 TNF  $\alpha$  基因经病原刺激后, 在不同组织和器官中的转录表达。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 变性 5min; 32 个循环: 94  $^{\circ}$ C 变性 45s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4  $^{\circ}$ C 保温。PCR 反应扩增产物在 1.2% 琼脂糖上电泳, EB 染色, 紫外灯下观察。

## 1.6 序列分析

扩增序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST (Altschul *et al.*, 1990) 软件进行; 多序列联配采用 CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) 程序; 以 BLAST 2 (Tatusova *et al.*, 1999) 软件进行序列拼接; 模体用 InterPro (Apweiler *et al.*, 2001) 软件查找; 信号肽查找用 SingalP (Nielsen *et al.*, 1997) 程序分析; 跨膜区用 TMpred (Hofmann *et al.*, 1993) 程序搜寻; 空间结构预测采用 Swiss-model 软件 (Schwede *et al.*, 2003), 模型查看 Swiss-PdbViewer (Guex *et al.*, 1997) 软件; 采用 CLUSTAL W 程序和 MEGA 2.1 (Kumar, 2001) 软件, 以邻位相连法 (neighbor-joining) 构建进化树。

## 2 结果

以简并引物 dTF 和 dTR 在黑鲷 cDNA 模板上进行 PCR 扩增, 获得 248bp 黑鲷 TNF  $\alpha$  (BS TNF  $\alpha$ ) 同源扩增片段, 该片段经 T-A 克隆后, 进行序列测

定。序列测定结果经 BLAST 比对, 结果表明, 该序列与部分鱼类 TNF 基因有很高的相似性。在获得的序列中设计基因特异性引物 BTF1/ BTF2 和 BTR1/ BTRR, 分别与接头引物 Universal primer 和 Adapter primer 进行 RACE PCR, 以获得该基因的全长 cDNA 序列, 基因扩增片段和引物位置如图 1 所示。获得的扩增片段经拼接后, 得到 1288bp BS TNF  $\alpha$  基因全 cDNA 编码序列 (GenBank Accession No. AY335443)。该序列包含一个 38bp 短的 5' 非编码区 (Untranslated Region UTR), 491bp 3' UTR 和 759bp 开放式读码框 (Open reading frame ORF)。在序列的 3' UTR, 有三个内毒素应答基序 (Endotoxin response motifs), 其中两个为 TTATTTAT 结构, 一个为 ATATTTAT 结构; 还有 7 个 RNA 不稳定基序 (RNA instability motif) ATTTA 结构, 但是未发现典型的 poly A 加尾信号 AATAAA (图 2), 而是被 polyA 尾上游 18 个碱基处一个 ATAAA 弱的加尾信号所取代。

BS TNF  $\alpha$  cDNA 可编码 253 个氨基酸的前体蛋白, 预测分子量约为 28kDa, 等电点约为 4.94。以 TMpred 软件分析, BS TNF  $\alpha$  氨基酸序列包含 10 个氨基酸组成的跨膜区, 位于 V<sup>35</sup>-W<sup>54</sup> (图 2)。以 InterPro 软件分析, 该序列含一个 TNF 家族 Profile, 位于 V<sup>97</sup>-L<sup>253</sup>; TNF 家族标签序列 IVIPQTGLYFVYSQASF; 以及细胞黏附分子基序 RGD; 两个

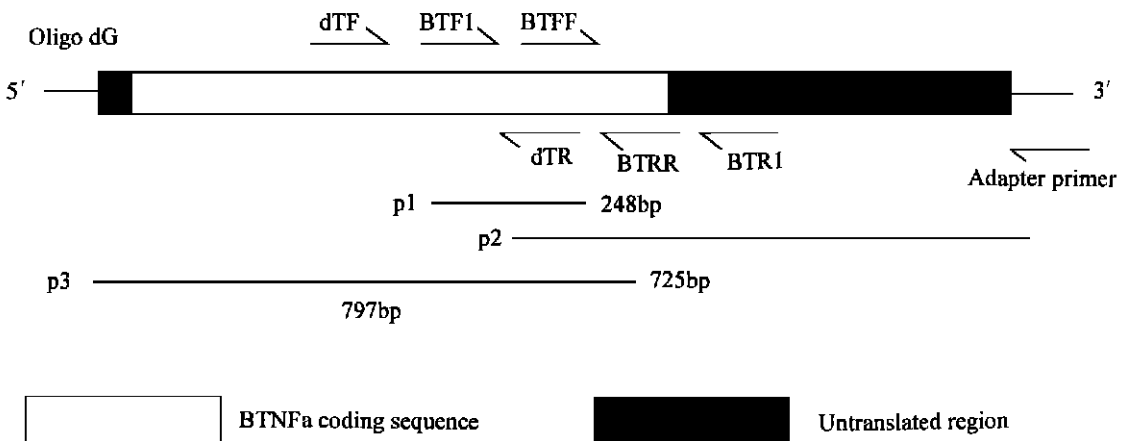


图 1 黑鲷 TNF  $\alpha$  基因克隆的示意图, 表示三段相互交叠的克隆片段拼接而成的 BS TNF  $\alpha$  全基因序列, 以及所用引物的相对位置

Fig. 1 Schematic diagram shows the overlapping of cloned TNF  $\alpha$  fragments and the positions of primers used in BS TNF  $\alpha$  cDNA cloning

```

1 AGCAGGCAGTAACGACAGAGAGCAGACTTGTGCACAGTATGGTGGCATAACAACAGCTC
M V A Y T T A P
61 CATGTGACTTGGAGATGGGTCTGAGGAGAGGACGGTAGTCTTGATAGAGAAGAAGTCAG
C D L E M G P E E R T V V L I E K K S A
121 CTACAGGGTGGATGTGGAAGGTGCCGTGGCCCTGCTCGCAGCAGCTTGTCTTCGCAG
T G W M W K V S V A L L V A A L A F A G
181 GCGTCTCGCTGTTTGGCTTGGATTGGAATGGCAAGCCAGAAATCTGATACATTTCAGGCC
V L L F A W Y W N G K P E I L I H S G Q
241 AAACAGAGGGCTAACCAAGAATGACCACACTGAGAAAAACAGATCCCCACTCCACGCTGA
T E A L T K N D H T E K T D P H S T A L R
301 GGCGCATCAGCAGAAAGCCAAGGCAGCCATCCATTAGAAGGGAGCTATGATGAAGACG
R I S S K A K A A I H L E G S Y D E D E
361 AAGGTTTGAAGACCAGGTGGAGTGAAGAATGGTCAAGGCCAGGCGTTCGCTCAGGGCCG
G L K D Q V E W K N G Q G Q A F A Q G G
421 GCTTCCGACTGGTGACAATAAGATCGTGATCCCGCAGACCGGCTCTACTTCGTCTACA
F R L V D N K I V I P Q T G L Y F V Y S
481 GCGAGGCGTTCAGAGTCTCTGACGGATGGCGACGAGGAGGGAGCAGGGAGACACC
Q A S B R V S C S D G D E E G A G R H L
541 TCACACCTCTCAGCCACACCATCTCGCGCTACTCAGAGTCCATGGGCATGATGTGTCTC
T P L S H T I S R Y S E S M G T D V S L
601 TGATGAGCGCGTGGAGTGGCGTCCAGAACCCGCTCAGGAGCAGCTACAGCGACG
M S A V R S A C Q N T A H E D S Y S D G
661 GACGGGCTGGTACACACCATCTATCTGGGCGCGTGTTCAGTGAACAGAGGGTGACA
R G W Y N T I Y L G A V F Q L N R G D R
721 GACTGGAGACGGAAACCAACAGTTGTCAGAGCTGGAGACAGACGAGGGCAAGACCTTCT
L E T E T N Q L S E L E T D E G K T F F
781 TCGGTGTGTTTGCATTTAAATGACTGTGATACTGACAGAGGACGCAAAGCCTTGCA
G V F A L *
841 CAGTGCCAAAAGTTTGGCTTTTCTGAAAGATTTTATTGAAATTTTATTATTCATCTTCA
901 TGGTGATGTAGAAATGTGAAATCTCAATGGAGATAACGCTTGGCGCTGAACAGGCGCTG
961 CTGATTTTTTAAATCCTATAAACTGTAACAGTTTGAATGTTATTTCTATTTTAGGCAC
1021 TTTTGTGACA GCTGACCTGAGATTGTAGTAGGCGAGACTCTCTCGTGAT
1081 CTGATGACGACACAGCTCTTCACTGAGAGTGCAGGTTTTCAGGATTATCTACAGAATT
1141 GTTATCATGTACCAATACAGCCTGTATGTTTATTGTTATTTTAAATTTG
1201 TGGGGTAAGGTGTTGAAAGATTTT ATGTGCACATAAACTTAATTTAAATGCAA
1261 AAAACCCAAAAGAAAAAATAAAAAA

```

图2 黑鲟TNF α 全基因序列示意图

Fig.2 Full length sequence of BS TNF α gene

方框部分显示 TNF 基因家族的标签序列; 阴影部分表示跨膜域和内毒素应答基序; 箭头指示 TNF 转换酶切点; 下划线代表 RNA 不稳定基序; 粗体字为细胞黏附序列; 星号代表基因的终止密码子

MHC 分子标签序列 KAKAAIH 和 YLGAVFQ。预测蛋白含哺乳类 TNF α 转换酶切点 (Cseh *et al*, 1989), 位于 T<sup>86</sup>/L<sup>87</sup>R<sup>88</sup>, BS TNF α 经 TNF α 转换酶消化, 可释放 166 个氨基酸的成熟肽。

以 BLAST 软件对黑鲟 TNF α 基因氨基酸序列相似性比对结果(表 1) 表明, BS TNF α 与鱼类和其它动物的 TNF 基因均有一定的相似性, 与金头鲷 TNF α 的一致性(identity) 高达 94. 8%, 与真鲷 TNF α 的一致性达 78. 6%, 与其它鱼类 TNF α 基因的相似性约为 33. 3%—60%; 与哺乳类 TNF α 和 TNF β 各有 20. 3%—26. 7% 的一致性。以 CLUSTAL W 软件进行的多序列联配结果显示(图 3), TNF 基因相似性主要集中在成熟肽区域, 尤其在参与二硫键形成的两个半胱氨酸 C<sup>156</sup>、C<sup>196</sup>, 三聚体形成活性位点 H<sup>99</sup>、W<sup>116</sup>、Y<sup>144</sup>、Y<sup>147</sup> 等位点高度保守(Van Ostade *et al*, 1991; Zhang *et al*, 1992)。空间结构模拟显示(图 4), BS TNF α 的多肽链与哺乳类一样, 由五个反向平行的 β 链, 以经典的“水母卷”(jelly-roll) 形式存在(Bodmer *et al*, 2002)。进化分析表明, 黑鲟 TNF 基因与其它鱼类

表 1 黑鲟 TNF α 氨基酸序列与已知的其它物种 TNF α 和 TNF β 基因的同源性比较

Tab.1 Homological analysis of BS TNF α amino acids sequence with other known TNF α and TNF β genes

物种	一致性	相似性	GenBank 注册号
Human TNF α	26.7	27	M10988
Mouse TNF α	26.6	27	U06950
Rat TNF α	25.8	26	X66539
Sheep TNF α	26.3	26	X55152
Horse TNF α	25.9	25	AB035735
Cow TNF α	26.3	26	AF348412
Human TNF β	20.3	27	X02911
Mouse TNF β	24.2	28	Y00137
Pig TNF β	22.3	27	X54859
Rat TNF β	23.8	27	L00981
Flounder TNF α	56.2	58	AB040448
Trout TNF α	46.1	50	AJ278085
Carp TNF α	34.9	40	AJ300801
Sea bream TNF α	94.8	95	AJ413189
Red Sea bream TNF α	78.6	80	AY314010
Brook trout TNF α	45.8	47	AF276961
Catfish TNF α	33.3	35	AJ417565

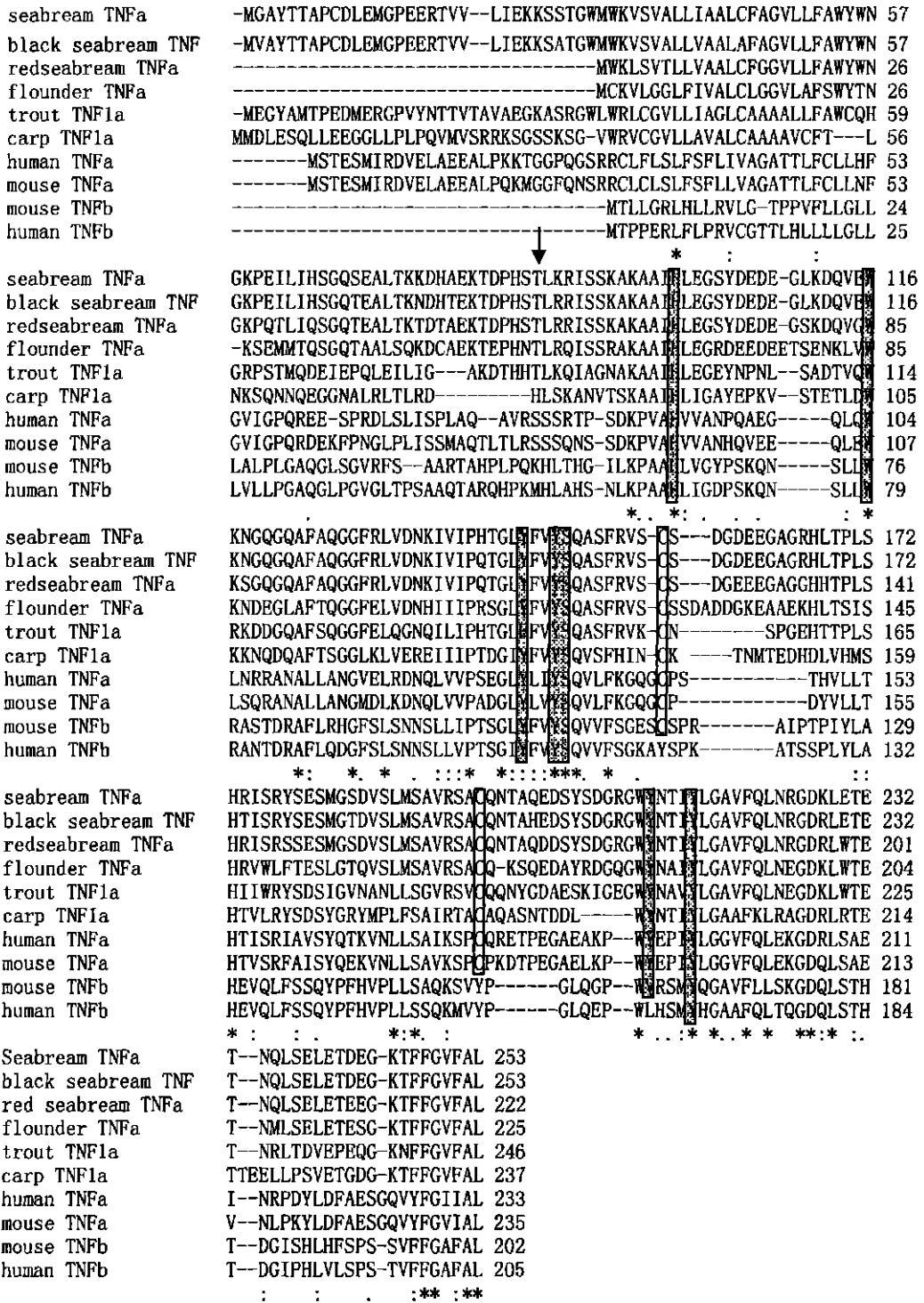


图 3 黑鲷 TNF α 与其它动物 TNF α 和 TNF β 氨基酸的多序列联配

Fig. 3 Multiple alignments of BS TNF α with other known TNF α and TNF β amino acids sequences  
星号代表同源性; 点代表相似性; 箭头表示 TNF 转换酶切割位点; 方框为参与二硫键形成的  
两个半胱氨酸, 阴影部分指示参与 TNF 三聚体形成的位点

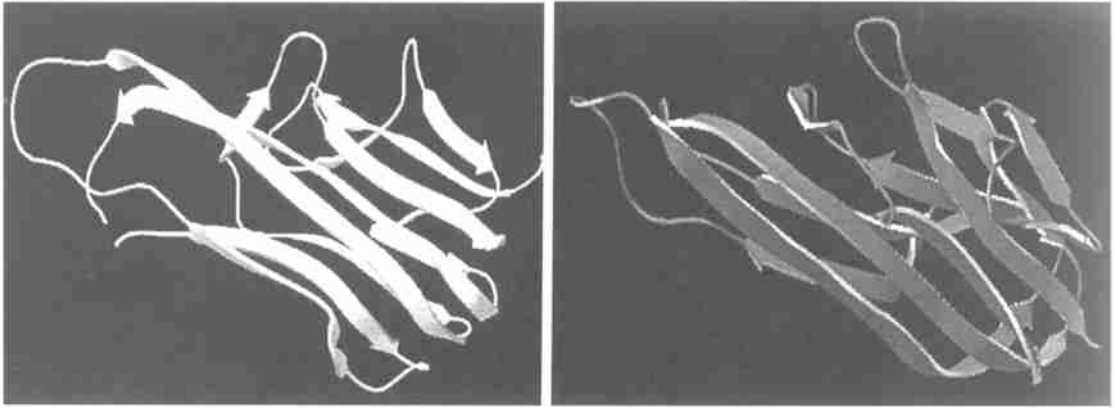


图 4 黑鲟 TNF  $\alpha$  与人 TNF  $\alpha$  空间结构比较

Fig. 4 Tertiary structure of BS TNF  $\alpha$  compared to the human TNF  $\alpha$

左图为人 TNF  $\alpha$  空间结构模型 PDB1a8e; 右图为以 Swiss-model 和 Swiss-PdbViewer 预测的黑鲟 TNF  $\alpha$  预测的空间结构模型。两者有相似的空间结构, 为一种  $\beta$  夹心结构, 每个  $\beta$  折叠由 5 个反向平行的  $\beta$  链构成

TNF  $\alpha$  占据进化上独立的分枝, 与哺乳类 TNF  $\alpha$  及 TNF  $\beta$  有相似的遗传距离, 都是由共同的祖先进化来的, 而 TNF  $\beta$  是在哺乳类与鱼类分化后才从 TNF  $\alpha$  分离的(Hirono *et al.*, 2000) (图 5)。各种鱼

类 TNF  $\alpha$  间的亲缘关系与鱼类本身的分类地位有很大关系。黑鲟与其它鲷科鱼类关系最近, 其次是鲆鲽类和鲑科鱼类, 与鲤科鱼类关系较远。

表达实验结果显示(图 6), TNF 基因在黑鲟组织中成组成型表达, 表现为在感染组和正常对照组黑鲟的头肾、脾脏、鳃、肾脏、心脏、血液和大脑等组织中都可检测到 BS TNF  $\alpha$  的转录表达, 但是 BS TNF  $\alpha$  在各个组织中的表达水平差异很大, BS TNF  $\alpha$  主要在黑鲟的头肾、脾脏和鳃上表达, 其表达量较大脑等低表达量的组织中高几倍。经病原刺激后, BS TNF  $\alpha$  的表达水平在头肾、心脏等组织中有一定升高。

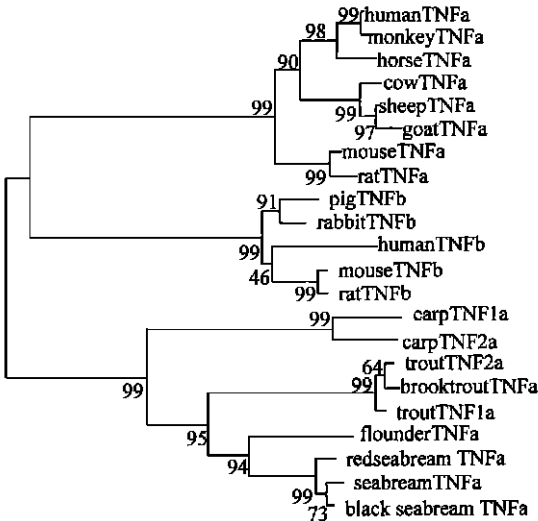


图 5 采用邻位相连法, 以 CLUSTAL W 和 MEGA 2.1 软件构建系统进化树, 表示黑鲟 TNF  $\alpha$  与其它动物 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  之间的进化关系

Fig. 5 Phylogenetic tree showed the relationship between the full-length BS TNF amino acids sequence with other known TNF  $\alpha$  and TNF  $\beta$  sequences.

The sequences are aligned by CLUSTAL W program and the phylogenetic tree is constructed by neighbour joining methods with MEGA version 2.1

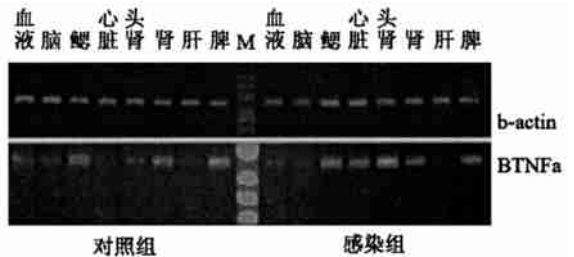


图 6 RT-PCR 技术分析黑鲟 TNF  $\alpha$  基因的组织表达和分布

Fig. 6 RT-PCR to analyze the tissues expression and distribution of BS TNF  $\alpha$

### 3 讨论

作者采用同源克隆的方法, 在经感染黑鲟的

头肾中获得了黑鲟 TNF  $\alpha$  的同源扩增片段。以 RACE 技术分别获得基因的 3' 和 5' 末端, 序列经拼接后获得 1288bp 黑鲟 TNF  $\alpha$  全长 cDNA 序列, 可编码 253 个氨基酸的前体蛋白。

氨基酸序列同源性比对结果表明, BS TNF  $\alpha$  与其它鱼类和哺乳类 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  都有一定的相似性(表 1)。与不同鱼类 TNF 基因的相似性差别很大, 其氨基酸的一致性从 33.3%—94.8% 不等; 黑鲟 TNF  $\alpha$  与不同鱼类 TNF  $\alpha$  基因相似性的差异与这些鱼类本身的分类地位非常吻合, 黑鲟与金头鲟同属, 与真鲟同科; 与牙鲆、虹鳟及鲤鱼分类地位相对较远, 表现为功能基因的结构上产生了较大的差异。BS TNF  $\alpha$  与哺乳类 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  基因各有 20.3%—26.7% 的相似性, 说明 BS TNF  $\alpha$  基因与哺乳类 TNF 有着相似的一级结构组成。进化分析表明, BS TNF  $\alpha$  与其它鱼类 TNF  $\alpha$  基因占据进化上独立的分枝, 与哺乳类 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  都具有很近的亲缘关系, 来源于共同的祖先。

InterPro 软件分析结果表明, BS TNF  $\alpha$  基因上有一个 TNF 家族的 Profile 结构域和 TNF 家族的标签序列(Signature); 二级结构分析表明, BS TNF  $\alpha$  在二硫键形成位点和形成有活性的同源三聚体结合位点上高度保守; 三级结构分析显示, BS TNF  $\alpha$  预测的空间结构模型与哺乳类 TNF 基因高度相似, 都是由两个  $\beta$  折叠片组成, 每个折叠片由五个反向平行的  $\beta$  链以“水母卷”形式组成。二级结构和空间结构的高度相似, 表明 BS TNF  $\alpha$  与哺乳类 TNF 基因有相似的功能。BS TNF  $\alpha$  序列的初级结构和高级结构分析表明, BS TNF  $\alpha$  属于 TNF 家族成员。

虽然 BS TNF  $\alpha$  与哺乳类 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  都有较高的相似性, 但是 BS TNF  $\alpha$  基因与哺乳类 TNF  $\alpha$  相似, 都有一对保守的半胱氨酸, 在参与 TNF 基因二级结构中可形成二硫键; 具有一个明确的跨膜域, 无信号肽结构和糖基化位点, 是一种跨膜蛋白; 其序列中含较为保守的 TNF  $\alpha$  转换酶切点, 经 TNF  $\alpha$  转换酶消化, 可释放成熟肽; 而哺乳类 TNF  $\beta$  基因具有信号肽结构, 缺乏跨膜域和二硫键结构, 具有糖基化位点, 是一种分泌型糖蛋白, 将信号肽切除即可释放成熟肽。因此, 从基因结构分析可以推测, BS TNF  $\alpha$  属于 TNF  $\alpha$  而不是 TNF  $\beta$ 。

RT-PCR 结果显示, BS TNF  $\alpha$  在黑鲟的组织中为组成型表达, 在感染与非感染的鱼体中, BS TNF

$\alpha$  在所有检测的组织中都有表达, 但是表达水平在各种组织中不同。这与金头鲟的组织表达结果相似(Garcia-Castillo *et al.*, 2002), 在金头鲟的所有组织中, TNF  $\alpha$  均为组成型表达; 与虹鳟(Zou *et al.*, 2002) 和牙鲆(Horono *et al.*, 2000) 的组织表达不同, 在虹鳟和牙鲆中 TNF 基因只在经诱导的组织中表达; 在真鲟中既有组成型表达, 也存在诱导型表达(蔡中华等, 2003)。

BS TNF  $\alpha$  核苷酸的 3' UTR 中有三个内毒素应答基序, 它主要参与调控内毒素的应答反应(Bodmer *et al.*, 2002); 还有多个 mRNA 不稳定基序(instability motif), 这些基序在调控 TNF  $\alpha$  的产生以及炎症的应答上有重要的作用(Han *et al.*, 1990; Hel *et al.*, 1998)。该基因推导的氨基酸序列中包含有 TNF 家族的标签序列以及两个 MHC 分子标签序列以及细胞黏附序列(cell attachment sequence)(R-G-D), 这些结构都与机体炎症反应、免疫应答有密切的关系。上述结果预示, 黑鲟 TNF  $\alpha$  基因在参与机体免疫应答中有重要的作用。

## 参 考 文 献

- 蔡中华, 宋林生, 高春萍等, 2003. 真鲟肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) cDNA 的克隆与表达. 生物化学与生物物理学报, 35(12): 1111—1116 [Cai Z H, Song L S, Gao C P *et al.*, 2003. Cloning and expression of Tumor necrosis factor alpha in red seabream. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 35(12): 1111—1116]
- Altschul S F, Gish W, Miller W *et al.*, 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215: 403—410
- Apweiler R, Attwood T K, Bairoch A *et al.*, 2001. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. Nucleic Acids Res, 29: 37—40
- Bobe J, Goetz F W, 2001. Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 129: 475—481
- Bodmer J L, Schneider P, Tschoop J, 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. TRENDS in Biochem Sci, 27(1): 19—26
- Cseh K, Beutler B, 1989. Alternative cleavage of the cathectin/Tumor necrosis factor propeptide results in a larger, inactive form of secreted protein. J Bio Chem, 264(27): 16256—16260
- Garcia-Castillo J, Pelegrin P, Mulero V *et al.*, 2002. Molecular

- cloning and expression analysis of tumor necrosis factor  $\alpha$  from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics*, 54: 200—207
- Guex N, Peitsch M C, 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 18: 2714—2723
- Han J, Brown T, Beutler B, 1990. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/ tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med*, 171(2): 465—475
- Hardie L J, Chappell L H, Secombes C J, 1994. Human tumor necrosis factor  $\alpha$  influence rainbow *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet Immunol Immunopathol*, 40: 73—84
- Hel Z, Marco S D, Radzich D, 1998. Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3'-UTR of TNF- $\alpha$  mRNA. *Nucleic Acids Research*, 26(11): 2803—2812
- Hirono I, Nam B H, Kurobe T *et al*, 2000. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA gene from Japanese flounder *Paralichthys divaceus*. *J Immunol*, 165: 4423—4427
- Hofmann K, Stoffel W, 1993. TMbase A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 374: 166
- Jang S I, Mulero V, Hardie L J *et al*, 1995. Inhibition of rainbow trout phagocyte responsiveness to human tumor necrosis factor  $\alpha$  (hTNF  $\alpha$ ) with monoclonal antibodies to the hTNF  $\alpha$  55kDa receptor. *Fish Shellfish Immunol*, 5: 61—69
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B *et al*, 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244—1245
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S *et al*, 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 10: 1—6
- Ottaviani E, Franchini A, Franceschi C, 1993. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 195(2): 984—988
- Saeij J P J, Stet R J M, Vries B J *et al*, 2003. Molecular and functional characterization of Carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? *Dev Comp Immunol*, 27: 29—41
- Schwede T, Kopp J, Guex N *et al*, 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31: 3381—3385
- Tatusova T A, Madden T L, 1999. Blast 2 sequences — a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 174: 247—250
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*, 22: 4673—4680
- Thomson A, 1998. *The Cytokine Handbook*, 3rd ed. London: Academic Press, 289—304
- Van Ostade X, Tavernier J, Prange T *et al*, 1991. Localization of the active site of human tumor necrosis factor (hTNF) by mutational analysis. *EMBO J*, 10: 827—836
- Wittwer D, Franchini A, Ottaviani E *et al*, 1999. Presence of IL-1 and TNF-like molecules in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) haemocytes and in an insect cell line *Frometigene acraea* (Lepidoptera). *Cytokine*, 11: 637—642
- Zhang X M, Weber I, Chen M J, 1992. Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor binding site and structure functional relationship. *J Bio Chem*, 267(33): 24069—24075
- Zou J, Wang T, Hirono I *et al*, 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*, 26(2): 161—172



# MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF $\alpha$ ) IN BLACK SEABREAM *ACANTHOPAGRUS SCHLEGELI*

GAO Chun-Ping, CAI Zhong-Hua<sup>\*</sup>, SONG Lin-Sheng<sup>\*\*</sup>,

WU Long-Tao<sup>\*\*\*</sup>, CHI Zhen-Ming

(College of Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

<sup>\*</sup>(Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, 518055)

<sup>\*\*</sup>(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** A partial homologue sequence of tumor necrosis factor alpha (TNF  $\alpha$ ) had been identified in black seabream by homology strategy using a pair of degenerated primers according to the conserved regions of other animal TNF  $\alpha$  genes. Subsequently the sequence was elongated by RACE PCR to get full cDNA sequence with adapter primer and gene specific primer. The cDNA of black seabream TNF  $\alpha$  (BS TNF) had 1288bp nucleotides including a short 5' UTR of 38bp, 3' UTR of 491bp and an open reading frame (ORF) of 759bp that could encode propeptide of 253 amino acids with putative MW of 28kDa and putative PI of 4.94. In 3' UTR, there were several mRNA instability motifs of ATTTA and three endotoxin responsive motifs of TTATTTAT or ATATTTAT which should be involved in TNF  $\alpha$  gene transcript regulation and endotoxin response.

The BS TNF amino acids sequence shared highest identity with seabream TNF  $\alpha$  of 94.8%, followed by red seabream TNF  $\alpha$  of 78.8% and then with other piscine TNF  $\alpha$ . The BS TNF had about 25%—26% identity with mammalian TNF  $\alpha$ , and 20%—23% identity with mammalian TNF  $\beta$  homolog. Using CLUST W software, all the piscine TNF  $\alpha$  and parts of mammalian TNF  $\alpha$  and TNF  $\beta$  amino acids were clustered, and a phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Join (NJ) algorithm. Phylogenetic analysis showed that all of the piscine TNF  $\alpha$  located in an independent clade which was different from both mammalian TNF  $\alpha$  and TNF  $\beta$ . The black seabream, seabream and red seabream that belong to the same family, were clustered together firstly, then the Japanese flounder was clustered as the first sister group. While the trout and carp were some far from it, they were located as a near branch. These results are in common with the traditional taxonomy.

The deduced peptide belongs to the membrane protein which has a transmembrane domain but lacks clearly N-glycosylation site and signal peptide. InterPro software analysis indicated that the peptide included a TNF profile and a TNF family signature. The secondary structure analysis showed that the BS TNF was similar to mammalian TNF  $\alpha$ ; they were conserved in both sites in which should form a disulphide bridge and the biological activity trimeric proteins, respectively. Tertiary analysis revealed that the BS TNF was similar to mammalian TNF  $\alpha$  which had  $\beta$ -sandwich structures containing two stacked  $\beta$ -pleated sheets each formed by five antiparallel  $\beta$  strands that adopted a classical "jelly-roll" topology. All these structural properties are common in mammalian TNF  $\alpha$ , but different to TNF  $\beta$ . The structural analysis suggested that the BS TNF should be TNF  $\alpha$ , not TNF  $\beta$ .

RT-PCR revealed that the TNF transcript was constitutively expressed in black seabream, and the BS TNF transcript could be detected in most of the detected tissue both in control and stimulated fish, but the level of the expression was different. The BS TNF  $\alpha$  was mainly expressed in head kidney, spleen and gill, whereas faint expression could be detected in blood, brain, heart, liver and kidney. This results harmonizes with the expressed TNF  $\alpha$  transcript of seabream and channel catfish, but different from that of red seabream, flounder and rainbow trout.

**Key words** Black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*), Tumor necrosis factor alpha (TNF  $\alpha$ ), Cloning, Characterization