

# 青蛤(*Cyclina sinensis*)I $\kappa$ B 基因的克隆及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达分析\*

魏 星 张海静 潘宝平

(天津师范大学生命科学学院 天津市动植物抗性重点实验室 天津 300387)

**摘要** 利用青蛤(*Cyclina sinensis*)转录组文库信息,设计引物并克隆得到了青蛤 TLRs 信号通路中的关键信号分子 I $\kappa$ B(CsI $\kappa$ B)基因的 cDNA 序列。该基因的开放阅读框为 1134bp, 编码 377 个氨基酸, 分子量为 41.79kDa, 其结构具备 I $\kappa$ B 家族基因的典型特征, 包括 C 端的 6 个锚蛋白重复序列(ankyrin repeat, ANK), N 端的 DS<sub>64</sub>GILS<sub>68</sub> 降解序列以及 C 端的酪蛋白激酶 磷酸化位点(S<sub>373</sub>DDES<sub>377</sub>)。经 BLASTX 比对及分子系统学分析证明其是 I $\kappa$ B 家族的一员。进一步利用实时荧光定量 PCR 技术检测了 CsI $\kappa$ B 基因在青蛤不同组织及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)胁迫下在特定组织中的时序性表达情况。结果表明, 该基因在样品的血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃和性腺 6 种组织中普遍表达, 其中以血淋巴中表达水平最高。在鳃弧菌刺激后 3h CsI $\kappa$ B 在青蛤血淋巴中表达量明显上调, 并于 6h 达到最大值, 说明该基因参与了青蛤非特异免疫应答反应。

**关键词** 青蛤; CsI $\kappa$ B; 鳃弧菌; TLRs 信号通路; 荧光定量 PCR

**中图分类号** Q789 **doi:** 10.11693/hyhz20150500147

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国常见的海产养殖贝类, 因其肉质鲜美, 营养丰富, 目前已成为重要的海水养殖对象之一(高晶等, 2015)。但是随着近年来国内青蛤养殖业的扩大, 加之水质污染严重, 青蛤由病原微生物引起的疾病时有发生(曹华, 2004)。其中, 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是引起海洋生物死亡的一种主要的革兰氏阴性菌, 并且对青蛤有明显毒害作用(葛端阳等, 2012)。由于青蛤缺乏特异性免疫系统, 仅仅依赖其先天性免疫系统防御入侵的病原微生物。因此, 对免疫信号通路相关分子的研究有助于更深入地了解软体动物的先天性免疫防御机制, 为贝类养殖疾病防控提供新思路。

无脊椎动物为先天性免疫防御系统, 也称为非特异性免疫(Iwanaga *et al*, 2005)。非特异性免疫系统可以通过 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)对病原相关分子模式(PAMPs)的识别, 从而激活下游信号

通路, 最终导致入侵病原体的清除(Janeway *et al*, 2004)。所有的 Toll 样受体家族成员均依赖于 TIR (Toll/IL-1R homologous region)结构域向细胞内转导其识别的信号。一类包含 TIR 结构域的接头分子如 MyD88、TIRAP、TRIF、TRAM 可募集到不同的 Toll 样受体(张炜等, 2006), TLRs 信号通路依据接头分子的不同可以分为 MyD88 依赖型信号通路和 MyD88 非依赖型信号通路(Akir *et al*, 2004)。在 TLRs 信号通路中, I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B)是一类重要的信号分子, 是核转录因子  $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)的抑制蛋白(Vallabhapurapu *et al*, 2009)。在没有受到刺激的细胞中, NF- $\kappa$ B 二聚体通过与 I $\kappa$ B 结合而以失活状态存在于细胞质中。当受到外界刺激后, I $\kappa$ B 通过磷酸化和泛素化而被蛋白酶降解, 活化的 NF- $\kappa$ B 随即转位到核内与其相关的 DNA 基序结合以诱导靶基因的转录(Baldwin, 1996)。

\*天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 12JCZDJC22800 号, 09JCZDJC19300 号, 14JCZDJC34200 号。魏星, 硕士研究生, E-mail: 13612073010@163.com

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: baopingpan@126.com

收稿日期: 2015-05-24, 收修改稿日期: 2015-06-08

IκB 家族成员存在三个特征结构域: 锚蛋白重复序列(ankyrin repeat, ANK), ANK 是哺乳动物中与 NF-κB 蛋白相互作用的重要结构域; N 端调控区, 包含两个保守的丝氨酸残基及降解序列(degradation motif); 以及 PEST 结构域(PEST motif), 富含脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、以及苏氨酸残基(Baldwin, 1996)。在哺乳动物中 IκBs 有 7 种结构类型, 其中 IκBa、IκBβ、IκBε 这 3 种 IκB 含有 N 端调控区(郭伟等, 2006)。近年来, 在一些海洋双壳类软体动物中也发现了 IκB 基因, 例如合浦珠母贝、海湾扇贝、菲律宾蛤仔、太平洋牡蛎、文蛤(Zhang *et al.*, 2009, 2011; Mu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013), 它们对病原微生物刺激的研究结果表明, IκB 基因参与这些生物的先天免疫信号转导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验青蛤

青蛤采自于天津市大港滩涂, 选取平均壳长(29.12±1.49)mm, 平均壳高(29.86±1.57)mm, 平均壳宽(19.56±0.47)mm 的个体, 暂养于通气海水中, 水温 20—23°C, 海水密度 1.020—1.040 g/cm<sup>3</sup>, 海水 pH 7.0, 投喂 5‰ 的小球藻, 一周后进行试验。

### 1.2 菌种

实验室保存的鳃弧菌用 2216E 培养基于 28°C 下培养 24h。

### 1.3 侵染实验

将培养好的鳃弧菌用无菌海水洗脱, 浓度调至 OD<sub>600</sub>=0.4 (1OD = 1 × 10<sup>8</sup> bacteria/mL)。实验随机分组, 每次设 10 个平行组。在注射前称取青蛤闭壳肌、鳃、肝脏、外套膜和性腺各 50mg, 并迅速放入装有液氮的预冷研钵中按 1 : 9 的质量体积比加入预冷生理盐水并研磨, 研磨后于 4°C, 4500 r/min 离心 15min, 取上清液备用。实验组的每只青蛤注射 50μL 鳃弧菌菌液, 空白组注射等量灭菌的生理盐水, 对照组注射等量的灭菌海水。分别于注射后 0h、3h、6h、9h、12h、24h、48h、96h 提取血淋巴, 并于 4°C 条件下, 8000 r/min 离心 10min, 收集血细胞, 加入 1mL Trizol, 置于 -80°C 超低温冰箱以备使用。

### 1.4 转录组文库的构建及筛选

Trizol 法提取健康青蛤各个组织的总 RNA, 使用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 法分离纯化总 RNA。纯化后的 mRNA 用随机引物逆转录法合成 cDNA。纯化的双链 cDNA 再经末端修复、加尾等步

骤完成整个文库制备。采用 Illumina MiSeq 二代测序仪完成转录组测序。去冗余后的数据采用 Unigene 编码蛋白框 ORF 预测分析, 并与 NR 数据库等 BLAST 比对分析, 通过 Blast2GO 软件完成 Unigene 的 GO 注释。根据 KEGG 数据库注释并进一步对 Unigene 进行 Pathway 通路的注释和预测(Pan *et al.*, 2015), 从中筛选得到青蛤 IκB (CsIκB)基因类似序列。

### 1.5 生物信息学分析

根据从转录组文库中筛选出的 CsIκB 基因类似序列设计特异性引物 CsIκB-S、CsIκB-A (表 1)进行基因克隆并测序后与 GenBank 核酸数据库进行 BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)分析; ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)预测开放阅读框(ORF); ProtParam 工具在线预测序列的分子式、分子量和等电点; ExPASy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))分析蛋白质性质; SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)查找蛋白质结构域; PEST find 用于预测 PEST 结构域(<http://www.at.embl.net.org/toolbox/pepfind/>), Proscan (<http://pbil.ibcp.fr/>)用于推断酪氨酸激酶磷酸化位点。使用 ClustalX1.83 对氨基酸序列进行比对, 根据邻接法(NJ), 使用 MEGA4.1 构建基因系统进化树, 采用 bootstrap1000 个循环检验拓扑结构的置信度。

### 1.6 Cs IκB 基因在各组织内的表达分析

参照 1.3 方法, 将青蛤肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃和性腺的上清液与青蛤注射后 0h 的血细胞分别置于 1mL TRIZOL 中提取总 RNA, 并根据 TaKaRa 公司的 PrimerScript™1st Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, β-actin 基因为内参基因进行实时荧光定量 PCR。根据 β-actin 基因和克隆得到的 CsIκB 基因序列分别设计引物为: β-actin F、β-actin R、CsIκB-F、CsIκB-R (表 1)。反应体系为 20 μL, 在 Rotor-Gene 6000 实时定量 PCR 仪上进行, 反应程序为: 95°C 30s; 94°C 5s, 60°C 30s,

表 1 本研究所用 PCR 引物序列  
Tab.1 PCR primer sequences used in this study

引物名称	引物序列 (5'—3')
Cs IκB-S	GAGCAAGTGGACTCGGGTAT
Cs IκB-A	GTCAGTGGCAAGTTCAATCAA
β-actin F	CACCACAACCTGCCGAGAG
β-actin R	CCGATAGTGATGA CCTGACC
Cs IκB-F	GAACAGCCCGAAGGTTACTC
Cs IκB-R	TCTAAACTTCCGCTTCTCAA

72°C 30s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 Cs I $\kappa$ B 基因表达量(Livak *et al.*, 2001), 并使用 SPSS 软件进行数据分析。

### 1.7 鳃弧菌刺激后 Cs I $\kappa$ B 基因在血淋巴内的时序性表达

分别利用 1.2.1 方法中鳃弧菌刺激后 0h、3h、6h、12h、24h、48h、96h 的血细胞提取总 RNA, 并反转录成 cDNA 进行实时荧光定量 PCR, 方法及引物同 1.6。反应程序为: 95°C 30s; 95°C 5s, 58°C 30s, 72°C 30s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法处理数据, 使用 SPSS 软件对同一时间点的实验组和对照组以及实验组与空白组的表达量进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 Cs I $\kappa$ B 基因的序列分析

从青蛤转录组文库筛选得到 CsI $\kappa$ B 基因类似序列, 设计引物克隆并测序, BLASTX 进行序列比对及 ORF 分析后结果显示 CsI $\kappa$ B 基因 cDNA 序列 ORF 为 1134bp, 预测编码 377 个氨基酸(图 1), 分子量为 41.79 kDa, 等电点为 4.98, 氨基酸组成中亮氨酸(Leu)含量最高, 占 10.6%。C 端存在 6 个 ANK。N 端存在 DS<sub>64</sub>GILS<sub>68</sub> 序列, 与保守的 DSGXXS 降解序列一致。利用 PEST 序列查找软件分析表明, CsI $\kappa$ B 不存在 PEST 结构域, 但是 C 端存在保守的酪蛋白激酶 磷酸化位点(S<sub>373</sub>DDES<sub>377</sub>), 通常位于 PEST 结构域。Cs I $\kappa$ B 基因在 GenBank 中的注册号为 KP067202。

### 2.2 Cs I $\kappa$ B 基因的系统进化分析

经 GenBank BLASTX 研究表明, Cs I $\kappa$ B 基因氨基酸序列与菲律宾蛤仔 I $\kappa$ B(*Ruditapes philippinarum*, ACF93446)基因的氨基酸序列同源性最高, 达到 59%, 与海蜗牛(*Aplysia californica*, XP\_005111546)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*, ADX06856)、布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*, XP\_006792655)、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*, ACF93446)和红鲍(*Haliotis rufescens*, AGZ03662)I $\kappa$ B 基因的氨基酸序列同源性为 40%、40%、41%、42%和 44%。利用无脊椎动物和脊椎动物代表性的 I $\kappa$ B 氨基酸序列构建的系统进化树显示(图 2), 无脊椎动物与脊椎动物的 I $\kappa$ B 氨基酸序列出现一个明显的进化分歧。CsI $\kappa$ B 基因与菲律宾蛤仔 I $\kappa$ B 基因聚为一支, 与其它无脊椎动物 I $\kappa$ B 基因聚类。

### 2.3 Cs I $\kappa$ B 基因在各组织间的表达

通过实时荧光定量 PCR 技术检测 CsI $\kappa$ B 基因在

青蛤不同组织中的表达情况, 结果显示, CsI $\kappa$ B 基因在所检测的血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃和性腺 6 种组织中均有表达, 并且在血淋巴中表达量最高, 其次为闭壳肌和性腺, 而在肝脏中表达量最低(图 3)。

### 2.4 Cs I $\kappa$ B 基因在鳃弧菌刺激下的表达

青蛤在鳃弧菌侵染刺激后, 在青蛤血淋巴中的 CsI $\kappa$ B 基因的时序性表达情况如图 4 所示, 实验组的表达量在刺激后 3h 迅速升高, 与对照组及空白组相比均有极显著性差异( $P < 0.01$ ); 在 6h 时表达量达到最大值, 约为对照组的 2.3 倍左右, 并且与对照组及空白组均差异极显著( $P < 0.01$ )。表达量于 6h 后开始下降, 并逐渐接近正常水平。对照组没有显著性变化。

## 3 讨论

本研究从青蛤转录组文库中筛选并进一步克隆得到了 TLRs 通路信号分子 CsI $\kappa$ B 的 cDNA 序列。分子系统学分析表明, CsI $\kappa$ B 在从无脊椎动物到脊椎动物不同物种的进化上极为保守, 青蛤、菲律宾蛤仔海湾扇贝等软体动物动物的 I $\kappa$ B 聚为一类。由此推测, 这些软体动物 I $\kappa$ B 蛋白有相似的生物学功能, 在其先天性免疫防御中起着重要作用。CsI $\kappa$ B 基因包含 6 个 ANK, 降解域以及保守的酪蛋白激酶 磷酸化位点。研究发现合浦珠母贝、海湾扇贝、菲律宾蛤仔、太平洋牡蛎(Zhang *et al.*, 2009, 2011; Mu *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013)等的 I $\kappa$ B 基因也存在 6 个 ANK, 然而文蛤的 I $\kappa$ B 基因存在 5 个 ANK (Yang *et al.*, 2011)。ANK 数量的差异可能与其相互作用的 NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白的不同有关。

根据前人对哺乳动物 I $\kappa$ B 基因的研究表明, 降解域中丝氨酸残基的磷酸化是由多种细胞外刺激介导的(Luque *et al.*, 2000)。特别是 IKK 激活 I $\kappa$ B 的降解域, 导致泛素化和蛋白酶体降解(Schmid *et al.*, 2008)。CsI $\kappa$ B 基因 N 端存在保守的降解域(DS<sub>64</sub>GILS<sub>68</sub>), 表明 CsI $\kappa$ B 可能同样是由 IKK 和 NF- $\kappa$ B 调节的。I $\kappa$ B 基因的 C 端通常存在 PEST 结构域, 会导致含有它们的细胞内蛋白的快速降解(Rogers *et al.*, 1986)。然而 CsI $\kappa$ B 基因与一些软体动物的 I $\kappa$ B 基因一样缺少 PEST 结构域, 如合浦珠母贝、海湾扇贝、太平洋牡蛎(Zhang *et al.*, 2009, 2011; Mu *et al.*, 2010)。但是 CsI $\kappa$ B 的 C 端存在酪蛋白激酶 磷酸化位点(S<sub>373</sub>DDES<sub>377</sub>), 说明也许一些 I $\kappa$ B 基因的降解不需要 PEST 结构域, 而是酪蛋白激酶 磷酸化位点起到关键作用。

```

122 ATG GATGGGAAGAAAAGCCAAAGTGACCTGTCTTTGGATAAGGACATCGTTATTGACGGG
1 M D G K K S Q S D L S L D K D I V I D G
182 GAGCCGTGCAAGGCAACGAGCAAATATCAAGATTTTCATGAGGAAAATGACACCCACCTTC
21 E P C K A T S K Y Q D F M R K M T P T F
242 TCTCCAGCGAAAAATGTTGCAGAAGGTAGGGCAAAGGAACAGCCCGAAGGTTACTCAGAG
41 S P A K N V A E G R A K E Q P E G Y S E
302 CAAGTGGACTGGGTATTCTAAGTTTGAGAAGCGGAAGTTTAGAAGTAAAAAGTTCAAAT
61 Q V D S G I L S L R S G S L E L K S S N
362 GTAGATAAAGGGACACATTTTCGTGGACAAAACACCAGTGCAGTGTTCAGATGCATACGAA
81 V D K G T H F V D K T P V Q C S D A Y E
422 AATAATCATGAAAATGATTTACAGACTAAGTTAGGAAAAGTTAGCATCGAAGATGACATT
101 N N H E N D L Q T K L G K L S I E D D I
482 GAGGATGAAGTCAATCAATGAGTTTAAAATCTTTGGATCTGGAGAGTTTGAAGTCT
121 E D E G H S S M S L K S L D L E S L N S
542 GAGCAATCTACACAAGAGTCCGAGGAAATGAAGTGGATTATATGAACAAGATGATGAT
141 E Q S T Q E S E E I E V D L Y E Q D D D
602 GGTGACACAATTTACATGTTGCCATCATAAGTCTTTTCACTGAAATAGCCAAGACATTG
161 G D T I L H V A I I S L F T E I A K T L
662 ATTGAACTGGCCACTGACGTGAAATGTCTTATCATAACAGAATTGCCTGCACCAGTCACCA
181 I E L A T D V K C L I I Q N C L H Q S P
722 TTGCACCTGGCTGTGCTTACAGGACAAGTTGATGTGGTTCGAGCACTTATTGCAAAAAGG
201 L H L A V L T G Q V D V V R A L I A K G
782 GTGGATGTTACTTAGAGATAAACAGGGGAACACCCCTTTGCATATTGCATGCCGAAA
221 V D V T L R D K Q G N T P L H I A C R K
842 GGGACCGAGATGCTGTACAGATGATTGTGCAGTCATTGGAAGTGCAGTACAAAACGT
241 G D R D A V Q M I V Q S F G N D T T K R
902 GCCAAATATTTCTCAGTGAAGAACTGTGAAGACTTACATGCCTACAGTGGCTGCTTTA
261 A K Y F S V K N C E G L T C L H V A A L
962 CACAAGGAATTTATCATTCTGGGACATTTGTTTGCTAAGGGTGCAGATGTTAACATGGGG
281 H K E F I I L G H L F A K G A D V N M G
1022 GATGCTAAAAGTGAAGAAGTCTTTTACATTGTGCTGTTGAAAGAAAAGACTTAGAACT
301 D A K S G R T L L H C A V E R K D L E T
1082 GTGTCCTGTGCTTACACTCAGACATTGATATTGACTGTAAAACATTCAAAGGTGAA
321 V S L L L T H S D I D I D C K T F K G E
1142 ACACCGCTGGTTTTAGCATACTGGAGAAATTATCAGGACATTGTTAAAAGGCTGAAGGCT
341 T P L V L A Y W R N Y Q D I V K R L K A
1202 AAGGGAGCTATTTTAGCTATGACGTTGTAGAAAATTCAGATGACGAAAGTTAA 1255
361 K G A Y F S Y D V V E N S D D E S * 377

```

图1 CsIkB 基因的 cDNA 序列的开放阅读框及推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequence of CsIkB ORF and its deduced amino acid sequence

方框且加粗部分代表起始密码子, \*代表终止密码子, 下划线代表降解域, 圆圈部分代表保守的丝氨酸残基, 灰色底纹部分代表 6 个 ANK, 方框代表酪蛋白激酶 磷酸化位点

哺乳动物 IkB 蛋白在不同组织的表达差异是由于它们对 NF- $\kappa$ B 二聚体的亲和力不同所致(Hoffmann *et al*, 2006)。也是由于 NF- $\kappa$ B 参与多种生理过程, 如免疫反应、炎症反应、细胞增殖和凋亡、细胞应激反应以及组织重建(Li *et al*, 2002)。本研究通过实时定量 PCR 技术分析了 CsIkB 基因在青蛤不同组织中的表达情况, 结果显示 CsIkB 基因在青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃和性腺 6 种组织中均有表达但表

达量不同, 表明 NF- $\kappa$ B 基因作为一种多效性的转录因子在各个组织中被屏蔽的程度不同。CsIkB 基因在血淋巴中的表达量最高, 该结果与合浦珠母贝 poI- $\kappa$ B、菲律宾蛤仔 Rp-IkB、太平洋牡蛎 IkB1 (Zhang *et al*, 2009, 2011; Lee *et al*, 2013)在血淋巴中的表达情况相似。血淋巴是软体动物免疫系统的重要组成部分, 介导了软体动物内部防御中对于入侵病原微生物的吞噬和包埋作用(Humphries *et al*, 2003)。

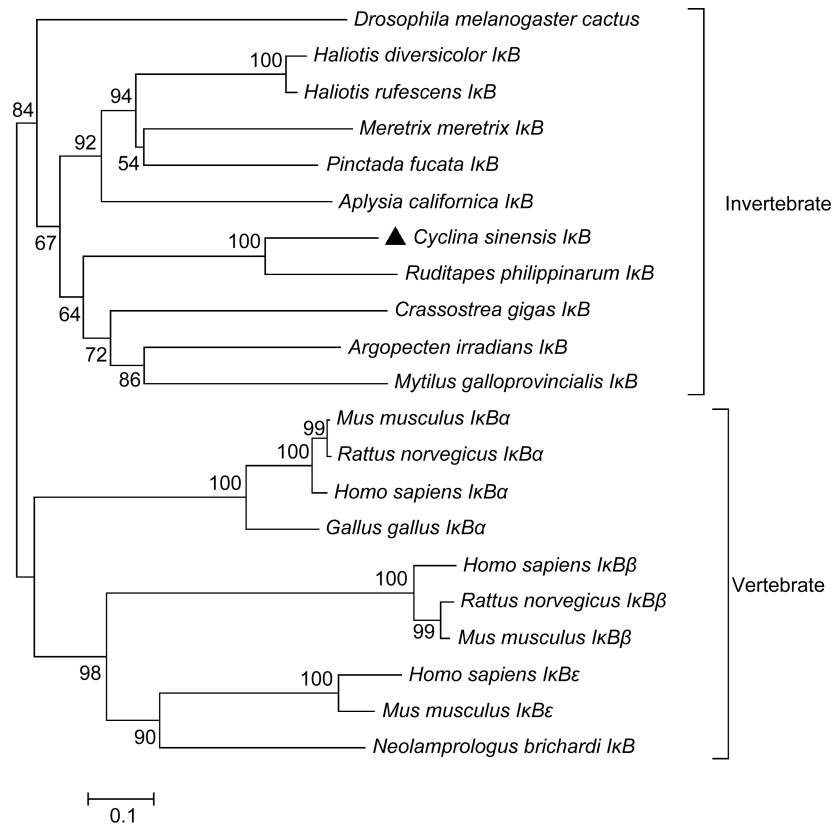


图 2 CsIkB 和其它物种的 IkB 氨基酸序列构建的系统树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequence of CsIkB and IkBs from other species

建立系统树所用的物种以及序列号为: *Drosophila melanogaster* (AAA85908); *Haliotis diversicolor* (AHM27300); *Haliotis rufescens* (AGZ03662); *Meretrix meretrix* (ADK74377); *Pinctada fucata* (ACF93446); *Aplysia californica* (XP\_005111546); *Ruditapes philippinarum* (AEB92230); *Crassostrea gigas* (ADX06856); *Argopecten irradians* (ACZ34178); *Mytilus galloprovincialis* (AH117300); *Homo sapiens* IkBa, IkBβ, IkBε (NP\_065390, AAH15528, AAC51216); *Mus musculus* IkBa, IkBβ, IkBε (AAH46754, AAH21938, AAH30923); *Rattus norvegicus* IkBa, IkBβ (Q63746, AAH85729); *Neolamprologus brichardi* (XP\_006792655); *Cyclina sinensis* (KP067202)

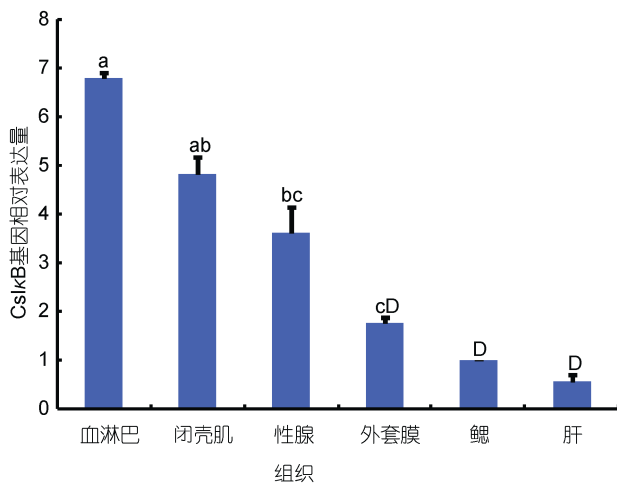


图 3 CsIkB 基因在青蛤不同组织中的表达分布

Fig.3 The distribution of CsIkB expression in different tissues of *C. sinensis*

不同小写字母代表差异显著( $P < 0.05$ ), 不同大写字母代表差异极显著( $P < 0.01$ )

为了揭示 CsIkB 基因在青蛤免疫体系中的作用机制, 本研究进一步检测了青蛤血淋巴中 CsIkB 基因在鳃弧菌刺激不同时间后的表达量, 结果表明; CsIkB 基因在刺激后 3h 上调, 6h 后其表达量开始下降, 并逐渐恢复至正常水平。与合浦珠母贝、菲律宾蛤仔、太平洋牡蛎、文蛤(Zhang *et al*, 2009, 2011; Yang *et al*, 2011; Lee *et al*, 2013)的研究结果类似, 说明 CsIkB 基因参与了青蛤的先天性免疫信号转导。CsIkB 的诱导机制可能是通过 TLRs 信号通路识别病原微生物, 从而引发下游信号级联反应(Kratsovnik *et al*, 2005)。已有研究显示, 在栉孔扇贝中存在一条原始的 MyD88 依赖型 TLRs 信号通路(Wang *et al*, 2011)。目前我们已克隆得到青蛤 TLR2 基因, 以及 MyD88 依赖型 TLRs 信号通路中最关键的接头分子 MyD88, 并证明它们参与了青蛤的先天性免疫反应(任毅鹏等, 2014; 高晶等, 2015), 本研究克隆得到 TLRs 信号通路下游

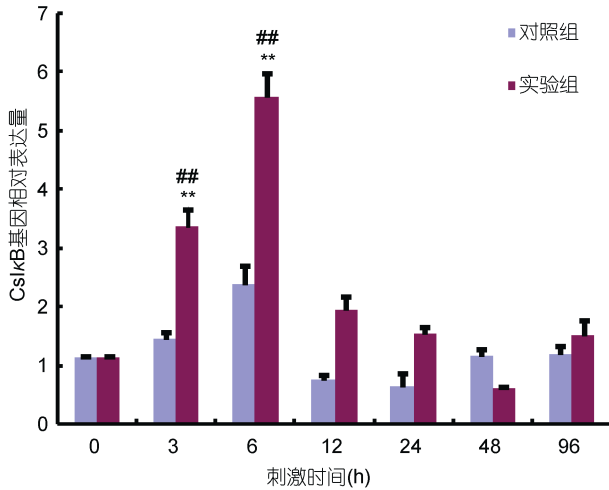


图4 鳃弧菌刺激下在青蛤血淋巴中 CskB 基因的时序性表达情况

Fig.4 The temporal expression of CskB in hemocytes after *V. anguillarum* stimulation

##代表该时间点实验组基因的表达量同组注射前(0h)相比差异极显著( $P<0.01$ ), \*\*代表相同时间点实验组与对照组基因的表达量差异极显著( $P<0.01$ )

重要的信号分子 CskB 基因的 cDNA 序列, 这些研究表明青蛤可能存在一条 TLRs 信号通路并且该通路参与了青蛤对于鳃弧菌刺激的免疫应答。

### 参 考 文 献

- 任毅鹏, 高晶, 潘宝平等, 2014. 青蛤 (*Cyclina sinensis*) TLR2 基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 45(5): 1037—1043
- 张炜, 袁金铎, 安利国, 2006. 由不同接头分子介导的 Toll 样受体信号通路. 细胞与分子免疫学杂志, 22(4): 544—546
- 高晶, 任毅鹏, 潘宝平等, 2015. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 髓样分化因子 88 基因表达的影响. 海洋与湖沼, 46(2): 440—445
- 郭伟, 王奇, 陈云波, 2006. 细胞核因子  $\kappa$ B 信号转导途径内的活化与调节机制研究进展. 实用医学杂志, 22(11): 1332—1334
- 曹华, 2004. 沿海滩涂青蛤死亡原因及对策. 中国水产, (4): 57—58
- 葛端阳, 赵婷, 潘宝平, 2012. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 的毒性及半数致死浓度研究. 海洋与湖沼, 43(6): 1192—1195
- Akir S, Takeda K, 2004. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, 4(7): 499—511
- Baldwin Jr A S, 1996. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol, 14: 649—681

- Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G, 2006. Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. Oncogene, 25(51): 6706—6716
- Humphries J E, Yoshino T P, 2003. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate immune system of vertebrates. Integr Comp Biol 43(2): 305—312
- Iwanaga S, Lee B L, 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochem Mol Biol, 38(2): 128—150
- Janeway Jr C A, Medzhitov R, 2004. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol, 20: 197—216
- Kratsovnik E, Bromberg Y, Sperling O *et al*, 2005. Oxidative stress activates transcription factor NF- $\kappa$ B-mediated protective signaling in primary rat neuronal cultures. J Mol Neurosci, 26(1): 27—32
- Lee Y, Wickamarachchi W D, Whang I *et al*, 2013. Immune response-related gene expression profile of a novel molluscan I $\kappa$ B protein member from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). Mol Biol Rep, 40(2): 1519—1527
- Li X X, Stark G R, 2002. NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathways. Exp Hematol, 30(4): 285—296
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  methods. Methods, 25(4): 402—408
- Luque I, Zong W X, Chen C L *et al*, 2000. N-terminal determinants of I $\kappa$ B necessary for the cytoplasmic regulation of c-Rel. Oncogene, 19(9): 1239—1244
- Mu C, Yu Y, Zhao J *et al*, 2010. An inhibitor kappaB homologue from bay scallop *Argopecten irradians*. Fish Shellfish Immunol, 28(4): 687—694
- Pan B P, Ren Y P, Gao J *et al*, 2015. *De novo* RNA-Seq analysis of the Venus clam, *Cyclina sinensis*, and the identification of immune-related genes. PLoS One, 10(4): e123296
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M, 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science, 234(4774): 364—368
- Schmid J A, Birbach A, 2008. I $\kappa$ B kinase (IKK /IKK2/I $\kappa$ BKB)-A key molecule in signaling to the transcription factor NF- $\kappa$ B. Cytokine Growth Factor Rev, 19(2): 157—165
- Vallabhapurapu S, Karin M, 2009. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol, 27: 693—733
- Wang M Q, Yang J L, Zhou Z *et al*, 2011. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Dev Comp Immunol, 35(4): 511—520
- Yang Q, Yang Z, Li H, 2011. Molecular characterization and expression analysis of an inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix*. Fish Shellfish Immunol, 31(3): 485—490
- Zhang D, Jiang S, Qiu L *et al*, 2009. Molecular characterization and expression analysis of the I $\kappa$ B gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. Fish Shellfish Immunol, 26(1): 84—90
- Zhang Y, He X, Yu Z, 2011. Two homologues of inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol, 30(6): 1354—1361

## CLONING OF I $\kappa$ B GENE FROM *CYCLINA SINENSIS* AND THE EXPRESSION ANALYSIS UNDER *VIBRIO ANGUILLARUM* STIMULATION

WEI Xing, ZHANG Hai-Jing, PAN Bao-Ping

(College of Life Sciences, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**Abstract** Using clam *Cyclina sinensis* transcriptome library information, we designed primers then cloned the cDNA sequence of *C. sinensis* I $\kappa$ B (CsI $\kappa$ B), a key signal molecule in the TLRs signaling pathway. The cDNA possessed an ORF of 1134 bp coding for a protein of 377 amino acids with the predicted molecular weight of 41.79 kDa. CsI $\kappa$ B protein has the typical structural features with I $\kappa$ B family members, including the C-terminal six ankyrin repeats (ankyrin repeat, ANK), N-terminal DS<sub>64</sub>GILS<sub>68</sub> degradation motif and a C-terminal casein kinase II phosphate sites (S<sub>373</sub>DDES<sub>377</sub>). BLASTX and phylogenetic analysis revealed that CsI $\kappa$ B is a member of I $\kappa$ B family. Further by using real-time PCR technique to detect the mRNA expression of CsI $\kappa$ B in various tissues and its temporal expression in specific tissue challenged with *Vibrio anguillarum*. The results showed that CsI $\kappa$ B is generally expressed in all the examined tissues with the highest expression level in hemolymph. The expression of CsI $\kappa$ B in hemolymph injected with *V. anguillarum* increased significantly at 3h and peaked at 6h, indicating that CsI $\kappa$ B involved in the non-specific immune response.

**Key words** *Cyclina sinensis*; CsI $\kappa$ B; *Vibrio anguillarum*; TLRs signaling pathway; real-time PCR