

青蛤(*Cyclina sinensis*)TLR2 基因的克隆与表达分析*

任毅鹏 高 晶 潘宝平 高 虹 闫春财

(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)

提要 利用转录组文库分析得到青蛤(*Cyclina sinensis*)的 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2) 基因序列, 采用荧光定量 PCR 法分析该基因的表达过程。结果显示, 青蛤 TLR2 基因的 cDNA 开放阅读框为 2082bp, 编码 693 个氨基酸, 具典型的 LRRs、单次跨膜区和 TIR 结构域。该基因在血淋巴中的表达量最高, 与肝脏、鳃、外套膜、闭壳肌和性腺有显著性差异($P < 0.05$)。在鳃弧菌和 Poly I:C 刺激下, 青蛤血淋巴中 TLR2 基因 3h 开始升高, 48h 达到最大值, 与对照组和空白组有极显著性差异($P < 0.01$); 藤黄微球菌刺激下, 血淋巴中 CsTLR2 基因 3h 开始升高, 48h 亦达到最大值, 实验组与对照组有显著性差异($P < 0.05$)。

关键词 青蛤; 转录组文库; Toll 样受体 2; 荧光定量 PCR

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20140600183

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国重要的海产经济贝类, 广泛分布于我国南北沿海滩涂及河口的泥砂质区域。近年来, 随着我国海产贝类养殖产业的高速发展及养殖环境的恶化, 青蛤的增养殖业受到了病害的严重困扰, 相继出现了大面积死亡事件(孙国铭等, 2004; 曹华, 2004)。因此, 亟待探索青蛤的免疫信号传导通路及免疫抗病害机理。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)早在(Nusslein-Volhard *et al*, 1980)研究果蝇胚胎发育时发现的一种蛋白, 属于天然免疫过程中参与识别病原体相关的分子模式(PRRs), 是一种重要的模式识别受体(PAMPs)(Medzhitov *et al*, 2002; Janeway *et al*, 2002)。它可以识别多种仅表达在病原微生物上的高度保守结构序列, 其中包括细菌细胞壁成分, 鞭毛蛋白等。TLRs 是一类跨膜蛋白, 胞外有参与病原体识别的一些富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)。胞内存在一段保守序列, 该序列被称为 TIR 结构域(Toll/Interleukin-1 homologous region)(Xu *et al*, 2000; Yamamoto *et al*, 2005), 这段区域是高度保守的, 与果蝇(*Drosophila melanogaster*)同源, 可以激活已经被转染的细胞中的

菌肽启动子(Tauszig *et al*, 2000), 并与髓样分化因子 88(Myd88)相互作用, 参与细胞内的信号传递。

目前, 大部分的脊椎动物中 TLRs 已经被克隆, 并阐释了其在先天免疫和获得性免疫中的重要作用(Pasare *et al*, 2004)。其中, 在海洋无脊椎动物中鲜有报道, 如中华鲎(*Tachypleus tridentatus*)(Inamori *et al*, 2004)、夏威夷短尾鱿鱼(*Euprymna scolopes*)(Goodson *et al*, 2005)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等 Toll 基因的序列全长已被克隆, 从现有的文献来看, 青蛤(*Cyclina sinensis*)的 Toll 基因的相关序列目前还没有报道。本实验的结果为探索青蛤抗病害机理和免疫反应机制提供重要的实验数据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

青蛤(*Cyclina sinensis*)样品采于天津大港滩涂, 暂养于通气海水中, 海水密度 1.02—1.04g/cm³, 水温 21—24°C, 投喂 5‰小球藻, 选择没有损伤, 形态上无显著差异的成体[平均壳宽(19.12 ± 0.57)mm, 平均壳长(29.14 ± 1.23)mm, 平均壳高(29.52 ± 1.47)mm],

*天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 12JCZDJC22800 号, 09JCZDJC19300 号。任毅鹏, 硕士研究生, E-mail: renyipeng2011@163.com

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: p.baoping@gmail.com

收稿日期: 2013-12-26, 收修改稿日期: 2014-03-12

一周后开始实验。

将实验室保存的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)菌种用 2216E 培养基于 28°C 下培养 24h, 用无菌海水重悬菌液, 将浓度调为 $OD_{600} = 0.4$ 。采用随机分组方法, 每次试验均设 10 个平行组。实验组青蛤注射 50 μ L/只的鳃弧菌菌液和藤黄微球菌菌液, 对照组注射等量的灭菌生理盐水。注射前提取血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃和性腺, 准确称取组织质量 50mg; 注射后 3h、6h、9h、12h、24h、48h、96h 时提取血淋巴。以上组织迅速放入液氮冷冻备用。

1.2 方法

1.2.1 青蛤转录组文库的构建 利用 TRIZOL 法, 提取青蛤各个组织的总 RNA, 采用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 方法进行分离纯化。采用第二代 MiSeq 测序仪, pair end 双端模式完成青蛤转录组测序, 利用 *De novo* RNA-seq analysis 技术综合分析, 对相关基因进行功能注释和代谢途径的分析。

1.2.2 生物信息学分析 将获得的青蛤基因类似序列的全长 cDNA 序列与 GenBank 中的核酸数据库作 BLASTX 分析, 使用开放阅读框(open reading frame, ORF)在线分析, ProtParam 工具在线预测序列的分子式、分子量和等电点, SignalP 3.0 和 SMART 查找信号肽及结构域, Clustal W 对氨基酸序列进行多重比对和同源性分析, 利用 MEGA4.1 以邻接法(NJ)构建分子系统树。

1.2.3 青蛤 TLR2 基因在各组织内的表达分析 利用 TRIZOL 法提取血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌和鳃的总 RNA, 反转成 cDNA 在 -20°C 保存备用。以 β -actin 基因为内参基因, 实时定量引物分别为 β -actin-F: 5' CACCACAACCTGCCGAGAG 3', β -actin-R: 5' CCGATAGTGATGACCTGACC 3'; TLR2-F: 5' ACGG GATAATTTACTTGGGA 3', TLR2-R: 5' GCGAGACTT TGTAGTGGGT 3; 反应在 Rotor-Gene 6000 实时定量 PCR 仪上进行, 扩增体系为 20 μ L, 反应程序为: 95°C 预变性 30s, 94°C 变性 5s, 60°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 40 个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算(Livak *et al.*, 2001), 使用 SPSS 软件分析数据。

1.2.4 鳃弧菌刺激后青蛤 TLR2 基因在血淋巴内的时序性表达 参照 1.2.3 的方法提取鳃弧菌感染后各时间点血淋巴总 RNA, 并反转成 cDNA。以 β -actin 基因为内参基因, 引物参照 1.2.3。反应程序为: 95°C 预变性 30s, 95°C 变性 5s, 58°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s,

40 个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak *et al.*, 2001), 使用 SPSS 软件对同一时间点实验与对照组, 实验组和空白组的表达水平进行单因素方差分析。

1.2.5 藤黄微球菌刺激后青蛤 TLR2 基因在血淋巴内的时序性表达 利用 TRIZOL 法提取藤黄微球菌感染后各时间点血淋巴总 RNA, 并反转成 cDNA。荧光定量 PCR 引物、反应体系、程序、数据分析和处理同 1.2.4。

1.2.6 Poly I:C 刺激下青蛤 TLR2 基因在血淋巴内的时序性表达 利用 TRIZOL 法提取藤黄微球菌感染后各时间点血淋巴总 RNA, 并反转成 cDNA。荧光定量 PCR 引物、反应体系、程序、数据分析和处理同 1.2.4。

2 结果

2.1 青蛤 TLR2 基因的结构

用转录组所建的库中, 有 893 个基因注释到 15 个免疫相关的通路中。利用 BLASTX 在线比对后分析发现 Toll 样受体家族基因类似序列。该序列与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)Toll 样受体家族 TLR2 基因相似性最高, 一致性达到 68%。将该序列命名为青蛤 TLR2, 在 GenBank 的注册号为 KJ841929。

青蛤 TLR2 基因 cDNA 开放阅读框为 2082bp, 编码 693 个氨基酸(图 1), 其理论分子量为 80.40kDa, 理论等电点 $pI=7.35$, 分子式为 $C_{3641}H_{5649}N_{959}O_{1026}S_{35}$, 氨基酸序列 1—28 位为信号肽序列。氨基酸组成中亮氨酸(Gly)最高, 占 12.8%。利用 SMART 软件预测的青蛤的 TLR 基因, 结果表明其有六个亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats) (103—131, 158—180, 202—225, 231—254, 255—278, 385—407), 还有一个 LRRCT (LRR-C-terminal)结构域(445—499), 单次跨膜区为 503—525, 末端的 TIR 区(Toll/IL-1R homologous region)为 554—693。

2.2 青蛤 TLR 基因的系统学分析

用 MEGA4.1 软件以邻接法(NJ)构建了 TLRs 的系统树, 如图 2, 采用 bootstrap 1000 个循环检验拓扑结构的置信度。结果表明青蛤 TLR2 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的进化距离最近, 称为最近的一支。

2.3 青蛤 TLR2 基因在不同组织间的表达

以 β -actin 在各组织中的表达量为内参对照, 利用实时荧光定量 PCR 分析了青蛤 TLR2 基因在青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃和性腺等六个组织的表达情况, 结果显示青蛤 TLR2 基因在青蛤的以

上六个组织中普遍性表达(图 3), 但表达量存在明显差异, 其中血淋巴中表达含量最高, 显著高于其它组

织($P<0.05$), 是表达量最低的肝脏的 8 倍, 外套膜表达次之。表明青蛤 TLR2 基因主要在血淋巴中表达。

```

1atgagtttcaaagatacagctagaataagattttctccaacacctggtattttctgtgggc
  1 M S F K D T A R I R F L Q H L V F L V G
  6ltttatgagggttattcaatcaacccttattgtcacacacctggaaccgttgctaatttt
 21 F M R V I Q S T P Y C H T P G T V A N F
12lagccacaaaacttgacgtatattccacatctgtcaggctacatcgaatgtcttatattt
41 S H Q N L T Y I P H L S G Y I E C L I F
18laaaggaaacttctgttaaataacgcaggagacattcagaaatataagccatcccagag
61 K G N F L L N V T Q E T F R N I S H P E
24lagaattttaagtctggatttgggtttaataacatcgtttcaattgataccaatgettta
81 R I L S L D L G F N N I V S I D T N A L
30lcaaatgtttggggagttgaagtatctataccttcaggcaacgcaataccatctcacgat
101 Q M F G E L K Y L Y L S G N A I P S H D
36lctgaaacaccttcttgggaatattttctacaaactatcatctgcatacgtcaaattaaac
121 L K H L L G N I S T N Y H L H T L K L N
42lgagatgggtgaacaaacatttctagcggatacattttccttaatggagggtaccgatta
141 E M G E Q T F L A D T F S L M E G T R L
48laaggaactgtatttggaaataacaacatcaggcacatatctgcaggtttcctcgcggtc
161 K E L Y L E Y N N I R H I S A G F L A V
54lttcaagaatttgaatgttagtactttccacaaccttgtggcgagtgcgaattttctct
181 F K N L K M L V L S H N L V A S A N F P
60laaaatgcacaagttgtataaacttgatatgagcgataataaacttgaatcaaattccaaat
201 K M H K L Y K L D M S D N N L N Q I P N
66lttctgtatgagtgacaataacagtagcctgttgccaaaactgagagacataatatttaaac
221 F C M S D N N S S L L P K L R D I Y L N
72lgacaacaaaattgtcgaaataaggaaaagagatctttcggtgtttgggtagcttacatgaa
241 D N K I V E I R K E I F R C L G S L H E
78lctagagatacggcaaaatttcatttcggtttttctgatgacatgctgatgaataccctt
261 L E I R Q N F I S V F P D D M L M N T P
84lcaactatggtcttttaaatgcagaaaaaattcaggacaccatgcgcaatcgaaccatata
281 Q L W S L N A E K N S G H H A R I E P Y
90lgcatttagatctaaatctctgggcgttcttaaaattggttctaatggagggggtaaaacg
301 A F R S K S L G V L K I G S N G G G K T
96lgccttcacatcagtgacagaaacgtttaaatatttaccaaaattaatagcacttgaggtt
321 A F T S V T E T F K Y L P K L I A L E V
102lagttacttcaatatgtttgacatgcccgcgcagtcgataaacactctttttctccttta
341 S Y F N M F D M P A Q S I N T L F S P L
108ltcaaacttaaagtatctcatgtgtctataattgtcagatacagatgatccaaaactgttt
361 S N L K Y L M C Y N C Q I R D D P K L F
114lctaagcaataaactcactgaatagaataaagctcgacagaaattatattgaaaatatt
381 L S N K S Q L N R I K L D R N Y I E N I

```

```

120lagcaatgacacgtttaaatccaatcctctattgaaaacattatcaataaacatgaacaag
401 S N D T F K S N P L L K T L S I N M N K
126lataggacatctgaaagcatctgagatttcagtcgattttcttaacagcttggactctcta
421 I G H L K A S E I S V D F L N S L D S L
132lgatctctcgcacaacccgttcatatgcgattgtgacctcgaatggtttataacctgggtg
441 D L S H N P F I C D C D L E W F I T W L
138laaatcaacaaagacggccaaagttgaatattaccctcaaaattatgtctgtgcatatcca
461 K S T K T A K V E Y Y P Q N Y V C A Y P
144lgcgaatatggcaggaacgaaactaactgatgtgcattacacatatcgtgaatgcatcca
481 A N M A G T K L T D V H Y T Y R E C H P
150lttcactgtttgggagtggtgggcattgtcggcgaccgattgctgttgtgttagcgatc
501 F T V W E W V G I V G G P I A V V L A I
156lgtatccttctgtattataccgtaaaaggtgggtcaattaaacattacatatacttgatgaga
521 V S F V L Y R K R W S I K H Y I Y L M R
162laagaggcgaactacatattggtggatggtgaaaactttctctatgatgcctttgttget
541 K R R N Y I L V D G E N F L Y D A F V A
168ltacaaccaagaggattctgactgggtccgggaacacctgcttctgtcctggaagatgaa
561 Y N Q E D S D W V R E H L L P V L E D E
174lcatcagttaaaactatgtatacacgagagagatttcagagcaggaattttaatcaacgat
581 H Q L K L C I H E R D F R A G I L I N D
180laacattgttacttgtattgaacaaagtaagaaaattataattatcctgtcaaacgaattt
601 N I V T C I E Q S K K I I I I L S N E F
186lgccaaaagtggatggtgcattgctcgagcttctgttgcgcattccaagcacatcgaagat
621 A K S G W C M F E L R V A H S K H I E D
192lgagatggaacttgttgttattctgttggagaggataaatggcaggaatatgaataactcg
641 E M E L V V I L L E R I N G R N M N N S
198latgaaaactcttttggaaacgaccacttatattgaatggacagaagaccagcatggtcag
661 M K T L L E T T T Y I E W T E D Q H G Q
204lcttctcttctggaaccagcttaaggettcaatgaataaataa2083
681 L L F W N Q L K A S M N K *

```

图 1 青蛤 TLR2 基因 cDNA 序列的开放阅读框及功能域分析

Fig.1 The open reading frame of CsTLR2 gene and analysis on the structural domain

方框为起始密码子, *表示终止密码子, 点式下划线部分为信号肽, 双线表示 LRR 结构域, 波浪线表示 LRRCT 结构域, 灰色底纹部分为跨膜区, 下划线表示 TIR 结构域

2.4 在鳃弧菌刺激下青蛤 TLR2 基因在血淋巴中的时序性表达

在鳃弧菌侵染青蛤后, 以 β -actin 为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 分析了青蛤 TLR2 基因在血淋巴组织中的表达时序变化(图 4)。发现实验组在感染后 3h 开始升高; 直到 48h 的时候达到了最大值, 并与对照组有极显著性差异($P < 0.01$), 约为对照组的 6.8 倍左右; 且与空白组有极显著性差异($P < 0.01$)。96h 后其表达量开始下降, 恢复并接近至正常水平。

2.5 在藤黄微球菌刺激下青蛤 TLR2 基因在血淋巴中的时序性表达

在藤黄微球菌侵染青蛤后, 以 β -actin 为内参基

因, 利用实时荧光定量 PCR 分析了青蛤 TLR2 基因在血淋巴组织中的表达时序变化(图 5)。发现实验组在感染后 3h 开始升高; 直到 48h 的时候达到了最大值, 并与对照组有显著性差异($P < 0.05$), 约为对照组的 8.5 倍左右。在刺激 96h 后其表达量开始下降, 恢复并接近至正常水平。

2.6 在 Poly I:C 刺激下青蛤 TLR2 基因在血淋巴中的时序性表达

在 Poly I:C 侵染青蛤后, 以 β -actin 为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 分析了青蛤 TLR2 基因在血淋巴组织中的表达时序变化(图 6)。发现实验组在感染后 3h 开始逐渐升高; 直到 48h 的时候达到了最大

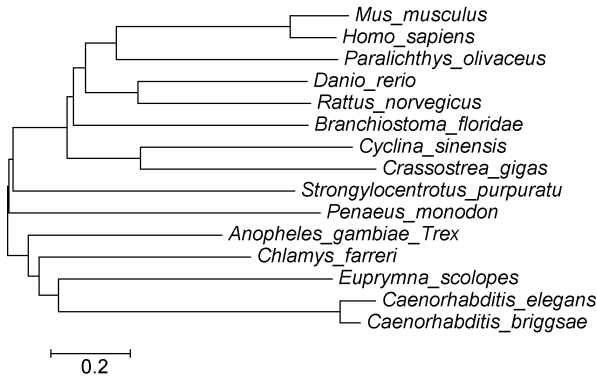


图 2 使用邻接法(NJ)构建的 15 个物种 TLRs 氨基酸序列系统树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of TLRs of 15 species using neighbor-joining method 建立系统树所用的物种以及序列号为: *Euprymna scolopes* AAY27971; *Strongylocentrotus purpuratus* XP_784955; *Chlamys farreri* ABC73693.1; *Anopheles gambiae* AAL37904; *Paralichthys olivaceus* BAD01045; *Branchiostoma floridae* AAM18891; *Crassostrea gigas* KC700618.1; *Homo sapiens* AAC34133; *Rattus norvegicus* NP_062051; *Mus musculus* NP_036035; *Danio rerio* AAQ90475; *Caenorhabditis elegans* AF348166; *Caenorhabditis briggsae* CAE74340; *Penaeus monodon* ADK55066.1

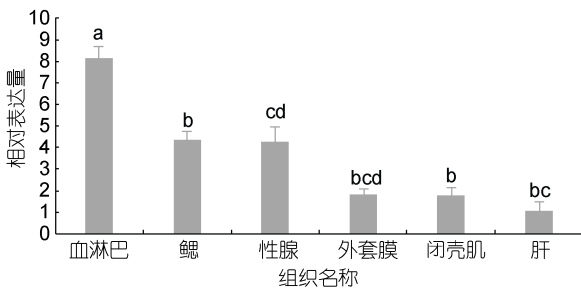


图 3 青蛤 TLR2 基因在青蛤不同组织间的表达情况
Fig.3 Expression characterization of *C. sinensis* in organs revealed by real time PCR
柱上不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

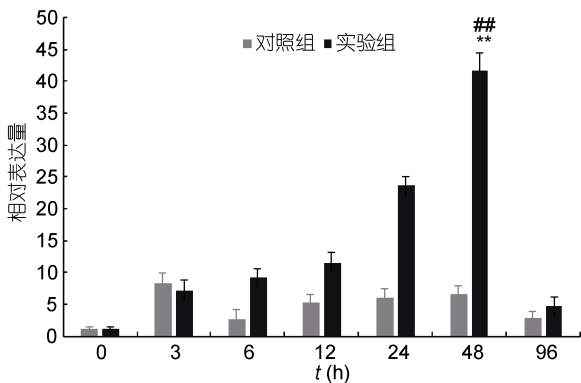


图 4 青蛤血淋巴 TLR2 基因在鳃弧菌刺激不同时间相对表达量的变化

Fig.4 The relative expression of CsTLR2 gene in hemolymph of *C. sinensis* infected by *V. anguillarum* in different periods
**表示相同时间点实验组与对照组基因的转录表达水平差异极显著($P < 0.01$); ##表示该时间点对照组基因的转录表达水平与同组注射前(0h)相比差异极显著($P < 0.01$)

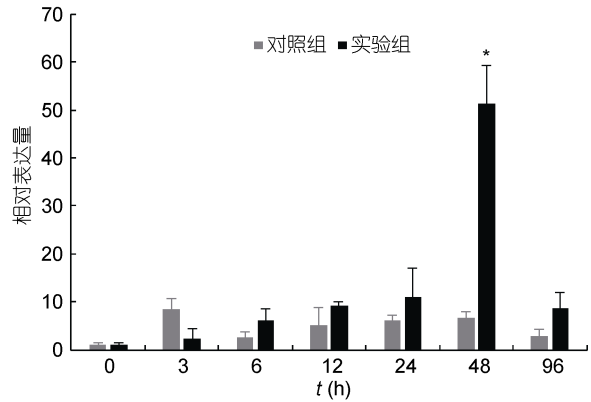


图 5 青蛤血淋巴 TLR2 基因在藤黄微球菌刺激不同时间相对表达量的变化

Fig.5 The relative expression of CsTLR2 gene in hemolymph of *C. sinensis* infected by *M. luteus* in different periods
*表示相同时间点实验组与对照组基因的转录表达水平差异显著($P < 0.05$)

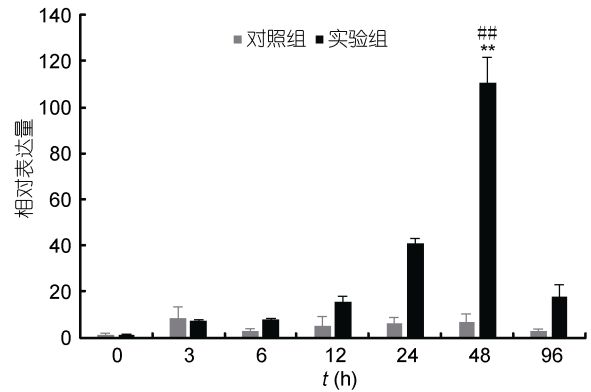


图 6 青蛤血淋巴 TLR2 基因在 Poly I:C 刺激不同时间相对表达量的变化

Fig.6 The relative expression of CsTLR2 gene in hemolymph of *C. sinensis* infected by Poly I:C in different periods
**表示相同时间点实验组与对照组基因的转录表达水平差异极显著($P < 0.01$); ##表示该时间点对照组基因的转录表达水平与同组注射前(0h)相比差异极显著($P < 0.01$)

值, 并与对照组有极显著性差异($P < 0.01$), 约为对照组的 18.3 倍左右, 且与空白组有极显著性差异($P < 0.01$)。在刺激 96h 后其表达量开始下降, 恢复并接近至正常水平。

3 讨论

本研究通过转录组建库, 得到了青蛤 TLR2 基因的 cDNA 序列, 通过比对发现该基因与许多水生生物的 TLR2 基因亲缘关系相近, 例如长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)等。在已经报道的长牡蛎(Gueguen *et al*, 2003)、太平洋长牡蛎(De Lorgeril *et al*, 2011)、虾夷扇贝(Hou *et al*, 2011)、地中

海贻贝(Venier *et al.*, 2011)和夏威夷短尾鱿鱼(Goodson *et al.*, 2005)中都发现了 TLR2 基因片段, 这有利于了解软体动物非特异性免疫应答中模式识别受体的作用机制。蛋白序列经 SMART 结构预测与分析, 发现其胞外段存在 6 个 LRR 结构域, LRR 结构域参与病原识别、信号传递、细胞粘连和细胞发育等(Buchanan *et al.*, 1996; Kajava, 1998; Bell *et al.*, 2003)。还发现了 6 个 N-糖基化位点, 均位于 Toll 样受体胞外区。几乎所有的 Toll 样受体都具有胞外 N-糖基化位点, 其能影响受体表面的特性、结合和模式识别等有关, 例如 TLR2 和 TLR4 都有相应结构以便发挥功能(Ohnishi *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2004)。此外在胞外的 TIR 区域是 TLRs 与其下游蛋白激酶相互作用的关键部位, 与髓样分化因子 88(Myd88)相互作用, 参与细胞内的信号传递。它们之间构成一种网络, 对于识别病毒、真菌、细菌等“非己”物质, 启动并激活先天免疫系统等方面有着重要的作用(Akira *et al.*, 2001; Goldstein *et al.*, 2004)。

本实验结果显示, 青蛤 TLR2 基因的在各组织中的表达量基本表现为血淋巴>鳃>性腺>外套膜>闭壳肌>肝脏。而且在血淋巴中的表达量与其它组织有显著性的差异($P<0.05$)。血淋巴可以直接吞噬和破坏微生物, 在抗感染中发挥作用。还可以产生和释放抗菌性物质, 最后血淋巴还在炎症中的包囊形成和损伤修复中发挥作用(孙虎山等, 2001; 刘志鸿等, 2003)。青蛤的先天性免疫主要依赖于血淋巴的循环, 其在软体动物的内部防御中起到至关重要的作用(Pipe *et al.*, 1997; Wootton *et al.*, 2003)。青蛤 TLR2 基因的相对表达量在血淋巴中最高, 也再一次证明了其参与青蛤的先天性免疫反应。

无脊椎动物中存在识别和结合细菌、真菌和病毒细胞成分的蛋白因子, 这些蛋白因子可以识别并结合微生物的脂多糖、葡萄糖等并且激发一系列的免疫反应。革兰氏阴性菌表面的脂多糖结构被称为内毒素, 是激发机体天然免疫的重要分子(Biswas *et al.*, 1999; Iwanaga, 2002); 革兰氏阳性菌表面细胞壁的主要成分肽聚糖, 其是真核生物先天性免疫系统识别的靶标(Doyle *et al.*, 1994); Poly I:C 中文名称为聚肌胞苷酸、聚肌苷酸-聚胞苷酸, 为双链 RNA(dsRNA)的类似物, 可以激活青蛤的非特异性免疫, 本实验用鳃弧菌作为阴性菌的代表, 藤黄微球菌作为阳性菌的代表, 用 Poly I:C 模拟病毒的双链来刺激青蛤。在等量的三种外源刺激物刺激青蛤 3h 后, TLR2 基因在血淋

巴中的表达量均呈现上调的趋势, 直到 48h 表达量达到最大值。在鳃弧菌和 Poly I:C 的刺激下, 48h 的相对表达量与对照组和空白组均有极显著性差异($P<0.01$), 在藤黄微球菌的刺激下, 48h 的相对表达量也与对照组有显著性差异($P<0.05$), 该结果与青蛤其它免疫相关因子如溶菌酶(潘宝平等, 2010)、磷酸酶(宋欣等, 2010)的研究结果基本一致。实验结果说明在外界刺激下青蛤 TLR2 基因的转录水平随之升高, 其参与了青蛤的免疫应答反应, 对于革兰氏阳性菌、阴性菌和病毒均有识别作用。在鳃弧菌和 Poly I:C 刺激下, 青蛤 TLR2 基因的表达量与对照组和实验组均有显著性差异($P<0.01$), 说明该基因与革兰氏阳性菌相比对于病毒和革兰氏阴性菌有更强的识别作用。本研究结果可为进一步深入研究贝类 TLR2 基因的作用机理奠定基础, 并为贝类养殖中的病害防治提供技术支撑。

参 考 文 献

- 刘志鸿, 牟海津, 王清印, 2003. 软体动物免疫相关酶研究进展. 海洋水产研究, 24: 86—90
- 孙虎山, 李光友, 2001. 双壳贝类参与免疫防御的体液因子. 海洋科学, 25: 34—36
- 孙国铭, 万夕和, 刘培庭等, 2004. 通州海区滩涂青蛤死亡原因的初步分析. 水产养殖, 25(2): 26—27
- 宋 欣, 张丽岩, 高玮玮等, 2010. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 41(2): 254—258
- 曹 华, 2004. 沿海滩涂青蛤死亡原因初探及对策. 科学养鱼, (4): 47—48
- 潘宝平, 宋 欣, 罗凯娅等, 2010. 青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达. 海洋与湖沼, 41(6): 901—906
- Akira S, Takeda K, Kaisho T, 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol, 2: 675—680
- Bell J K, Mullen G E, Leifer C A *et al.*, 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. Trends Immunol, 24: 528—533
- Biswas C, Mandal C, 1999. The role of amoebocytes in endotoxin-mediated coagulation in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. Scand J Immunol, 49: 131—138
- Buchanan S G, Gay N J, 1996. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. Prog Biophys Mol Biol, 65: 1—44
- De Lorgeril J, Zenagui R, Rosa R D *et al.*, 2011. Whole transcriptome profiling of successful immune response to vibrio infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. PLoS ONE, 6(8): 23142
- Doyle R J, Marquis R E, 1994. Flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. Trends Microbiol, 2: 57—60

- Goldstein D R, 2004. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. *Curr Opin Immunol*, 16: 538—544
- Goodson M S, Kojadinovic M, Troll J V *et al*, 2005. Identifying components of the NF-kappaB pathway in the beneficial *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* light organ symbiosis. *Appl Environ Microbiol*, 71: 6934—6946
- Gueguen Y, Cadoret J, Flament D *et al*, 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303: 139—145
- Hou R, Bao Z M, Wang S *et al*, 2011. Transcriptome sequencing and *De novo* analysis for yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. *PLoS ONE*, 6(6): 21560
- Inamori K, Ariki S, Kawabata S, 2004. A Toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol Rev*, 198: 106—115
- Iwanaga S, 2002. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol*, 14: 87—95
- Janeway Jr C A, Medzhitov R, 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20: 197—216
- Kajava A V, 1998. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol*, 277: 519—527
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} methods. *Methods*, 25: 402—408
- Medzhitov R, Janeway Jr C A, 2002. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science*, 296: 298—300
- Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K *et al*, 1980. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*, 283: 474—476
- Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, 2003. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10: 405—410
- Pasare C, Medzhitov R, 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*, 6: 1382—1387
- Pipe R K, Farley S R, Coles J A, 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res*, 289: 537—545
- Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann J A *et al*, 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 10520—10525
- Venier P, Varotto L, Rosani U *et al*, 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*, 12: 69
- Weber A N, Morse M A, Gay N J, 2004. Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *J Biol Chem*, 279: 34589—34594
- Wootton E C, Dyrinda E A, Ratcliffe N A, 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol*, 15: 195—210
- Xu Y, Tao X, Shen B *et al*, 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408: 111—115
- Yamamoto M, Akirz S, 2005. TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways. *Adv Exp Med Biol*, 560: 1—9

EXPRESSION AND CLONING OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 GENE FROM *CYCLINA SINENSIS*

REN Yi-Peng, GAO Jing, PAN Bao-Ping, GAO Hong, YAN Chun-Cai

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

Abstract The gene CsTLR2 (*Cyclina sinensis* toll-like receptor 2) were cloned and analyzed with transcriptome library. The expression of CsTLR2 was detected in real-time quantitative PCR. Results show that the open reading frame of CsTLR2 consisted of 2082bp, encoding 693 amino acids with the typical leucine-rich repeats, a single transmembrane area, and toll/interleukin-1 homologous region. Gene CsTLR2 was expressed in the highest level in hemolymph significantly different from those in liver, adductor muscle, gills, mantle, and gonad ($P < 0.05$). The expression of TLR2 in *C. sinensis* hemolymph injected with *Vibrio anguillarum* and Poly I:C increased in 3h and reached the highest level in 48h, which is very significantly different ($P < 0.01$) from those of the control group and the blank group. The expression of TLR2 in *C. sinensis* hemolymph injected with *Micrococcus luteus* increased in 3h and reached the highest level in 48h and it was significantly different ($P < 0.05$) from that of control group.

Key words *Cyclina sinensis*; transcriptome library; Toll-like receptor 2; real-time PCR