

青蛤(*Cyclina sinensis*) TRAF6 基因克隆 及其在 Poly I:C 胁迫下的免疫应答*

高玮玮¹ 潘宝平² 闫春财²

(1. 天津市河西区职工大学 天津 300203; 2. 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 对青蛤(*Cyclina sinensis*)转录组文库筛选并克隆得到青蛤 TRAF6(CsTRAF6)基因的 cDNA 序列, 其开放阅读框为 2337bp, 编码 778 个氨基酸, 分子量为 86.59kDa。CsTRAF6 蛋白包含 RING 型锌指结构, 两个 TRAF 型锌指结构, coiled-coil 结构域以及 MATH 结构域。经生物信息学及分子系统学分析表明 CsTRAF6 属于 TRAF6 家族的一员。利用实时荧光定量 PCR 方法检测了 CsTRAF6 基因在青蛤各个组织以及在 Poly I:C 侵染下在血淋巴中的时序性表达情况。结果表明, CsTRAF6 基因在青蛤血淋巴、闭壳肌、鳃、性腺、外套膜和肝脏中普遍表达, 其中在血淋巴中的表达水平最高。在 Poly I:C 刺激后的 3h, 青蛤血淋巴中 CsTRAF6 的表达量迅速升高, 在 6h 达到最大值, 说明青蛤的 CsTRAF6 基因参与了病毒类似物侵染下的免疫应答反应。

关键词 青蛤; CsTRAF6; Poly I:C; 荧光定量 PCR

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20160600125

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国近海重要的经济软体动物。近年来, 海水贝类养殖业中各种病害的爆发严重制约着行业的健康发展。因此, 开展软体动物先天性免疫识别路径方面的研究尤为重要, 能够为其免疫学理论及病害防治措施提供有价值的实验数据。

软体动物具有非特异性的先天免疫系统, 其 Toll 样受体(TLRs), 是一类很重要的模式识别受体, 能够识别细菌、真菌、原生动物以及病毒等病原体的侵染(Akira *et al.*, 2006)。有研究表明, TLR3 可以识别双链 RNA(dsRNA)的类似物, 聚肌苷-脱氧胞苷酸(Poly I:C)(Yamamoto *et al.*, 2003), TLR3 缺陷型的小鼠还对巨细胞病毒呈易感性(Tabeta *et al.*, 2004)。肿瘤坏死因子受体相关因子(Tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAFs)是衔接 Toll 样/白细胞介素 1 受体(Toll/IL-1 receptor, TIR)超家族以及肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor)超家族的重要分子。目前在哺乳动物中已经发现的 TRAFs 家族成员有 7 个

(TRAF1-7)。Ishida 等(1996)通过酵母双杂交对于 CD40 信号传导作用的研究时, 发现了能与 CD40 作用的 TRAF6。其分子包括 C 端的指环型锌指结构, 两个 TRAF 型锌指结构, N 端的 coiled-coil 结构域以及 MATH(Mepirin and TRAF homology)结构域。TRAF6 是衔接 Toll 样/白细胞介素 1 受体(Toll/IL-1 receptor, TIR)超家族以及肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor)超家族的重要分子, 在动物机体的脑、心脏、肝、骨骼肌、肾脏、脾脏等组织中均能表达。

1 材料与方法

1.1 材料

青蛤样品采于天津大港海域, 选取成体、形态无显著差异的个体[平均壳长(29.14±1.23)mm, 平均壳宽(19.12±0.57)mm, 平均壳高(29.52±1.47)mm]。实验前在通气海水中暂养, 海水密度 1.02—1.04g/cm³, 水温 21—24℃, pH 7.0, 投喂 5‰小球藻, 一周后进行实验。

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点与青年项目资助, 12JCZDJC22800 号, 14JCZDJC34200 号, 14JCQNJC14600 号; 天津市高等学校科技发展基金资助项目, 20090608 号; 天津师范大学引进人才基金资助项目, 5RL104 号。高玮玮, 讲师, E-mail: 53339400@qq.com.cn

通讯作者: 闫春财, E-mail: skyyc@mail.tjnu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-15, 收修改稿日期: 2016-06-30

1.2 方法

1.2.1 青蛤转录组文库的构建及数据筛选 采用 Trizol 法提取活体青蛤各组织总 RNA, 采用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 方法进行分离纯化。采用 Illumina MiSeq 二代测序仪完成转录组测序。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 TRAF6(Cs TRAF6)基因的类似序列。

1.2.2 侵染实验 实验所用 Poly I:C 浓度为 1 μ g/g。利用随机分组方法选取对照组和实验组, 每组设置 10 个平行试验。在实验组青蛤的闭壳肌内注射 50 μ L Poly I:C 悬液, 对照组注射等量灭菌海水。注射前准确称取青蛤闭壳肌、鳃、性腺、外套膜和肝脏各 50mg, 迅速放入液氮中, 在预冷匀浆器中按质量体积比 1 : 9 加入预冷生理盐水进行匀浆, 4 $^{\circ}$ C, 4500r/min 离心 15min, 取上清备用。分别于注射后 0h、3h、6h、9h、12h、24h、48h 提取血淋巴, 4 $^{\circ}$ C, 8000r/min 离心 10min, 收集血细胞, 加入 1mL Trizol, 于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱冷冻备用。

1.2.3 生物信息学分析 利用筛选得到的青蛤 CsTRAF6 基因类似序列设计引物 Cs TRAF6-S、CsTRAF6-A(表 1)并克隆, 测序后与 GenBank 核酸数据库进行 BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)比对分析; ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)预测开放阅读框(ORF); 利用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)在线分析蛋白质性质; 使用 ProtParam 分析预测蛋白质的理论分子量以及等电点; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)查找蛋白质结构域; 使用 ClustalX1.83 对氨基酸序列进行比对, 并根据邻接法(NJ), 使用 MEGA4.1 构建基因的物种进化树, 采用 bootstrap1000 个循环检验拓扑结构的置信度。

1.2.4 CsTRAF6 基因在各组织内的表达分析 参考(魏星等, 2015)方法, 将青蛤闭壳肌、鳃、性腺、外套膜和肝脏的上清液与注射 0h 的血细胞分别置于 1mL TRIZOL 中用于提取总 RNA, 根据 TaKaRa 公司的 PrimerScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 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 CsTRAF6 基因序列分别设计引物: β -actin-F, β -actin-R, CsTRAF6-F, CsTRAF6-R(表 1)。反应在 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行, 扩增体系 20 μ L, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s, 94 $^{\circ}$ C 变性 5s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 40 个循环。数据的处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法

(Livak *et al.*, 2001), 数据分析利用 SPSS 软件进行。

表 1 实验中用到的 PCR 引物
Tab.1 PCR primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'—3')
Cs TRAF6-S	CAGAACAGTGC GGGTAGT
Cs TRAF6-A	ACAGCCCTTTGTATGATTGG
β -actin-F	CACCACAAC TGCCGAGAG
β -actin-R	CCGATAGTGATGA CCTGACC
Cs TRAF6-F	AGGGAGTCAGAGTCACGGT
Cs TRAF6-R	ACAGCCCTTTGTATGATTGG

1.2.5 Poly I:C 侵染后青蛤血淋巴 CsTRAF6 基因的时序性表达 分别在注射后 0h、3h、6h、12h、24h、48h 提取青蛤血淋巴细胞总 RNA, 方法及引物同 1.2.4。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 40 个循环。数据的处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, 使用 SPSS 软件对相同时间点实验组及对照组, 实验组及空白组的表达量进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 CsTRAF6 基因的序列分析

青蛤 CsTRAF6 基因的 ORF 为 2337bp, 能够编码出含有 778 个氨基酸的多肽。该多肽的估计分子量为 86.59kDa, 估计等电点为 6.16。通过 SMART 在线分析表明 CsTRAF6 编码的氨基酸包含 RING 型锌指结构(183—221aa), 两个 TRAF 型锌指结构(266—320aa, 320—377aa), coiled-coil 结构域(592—624aa)以及 MATH 结构域(629—756aa)(图 1)。CsTRAF6 基因在 GenBank 中的注册号为 KP067203。

2.2 CsTRAF6 基因的系统进化分析

利用 BLASTP 比对表明, 青蛤 CsTRAF6 基因的氨基酸与栉孔扇贝 TRAF6 基因的同源性最高, 达到 60%。与霸王花青螺 *Lottia gigantea* TRAF6 (XP_009051677.1)、虾夷扇贝 TRAF6 基因氨基酸序列同源性分别为 56%和 48%。利用 16 个物种的 TRAF6 基因(图 2)构建的系统树表明, 不同物种的 TRAF6 基因各自聚成一支, 其中哺乳动物与软体动物的 TRAF6 基因明显的聚在两个分支上, 青蛤 CsTRAF6 基因与其它软体动物的 TRAF6 基因聚在一支。果蝇、对虾的 TRAF6 基因分别独立聚成一支。刺参与文昌鱼的 TRAF6 基因聚在一个分支上。由此可见, 青蛤 CsTRAF6 基因分子生物学特性与软体动物在分类学上的进化地位的一致性。

499 ATG GATAACAATACATGTCGTGAAGGCTCTTTTCCTTATCTACCTCAAATACGGGTCAA
 1 M D N N T C R E G S F P Y L P P N T G Q
 559 AATGTCACAAGTCTGGAAGCTCAGGTTACTGTCAACTGCTAGTTCCAGCCACCATAGT
 21 N V T S P G S S G Y L S T A S S S H H S
 619 GTTCAAGCCTCAAACCTCTCCCTTCTGGAGTGGTATCGAGGGTCAGGCACCAGGTTC
 41 V Q A S N S S P F W S G I E G Q A P G F
 679 ACAAGATTTCAACCAGCTAGTGGCGGTGCATCTTCTCTCAGTGCAAACAATTTTCTGCCA
 61 T R F Q P A S G G A S S L S A N N F L P
 739 CATAGAAGCAGTGCACCTGTAGAGACTGGTCTTTTATATTTACAGATAGTTTGCCTATG
 81 H R S S A P V E T G L L Y F T D S L P M
 799 GCATCAAATCTTCTTGGCCAGGTAATGGCCAACCAGGCGGTGCTACTTCATTAGCAACA
 101 A S N S S W P G N G Q P G G A T S L A T
 859 AACACAGGGCGTGGTCAGCGCAACTACTGGACAATTTCTGCAACAACGGCAGGTAAT
 121 N T G A W S A P T T G Q F P A T T A G N
 919 CGTGACAGTGAAGTAGCAGCAGCAGCGGCAGTCAGAACAGTGCGGGTAGTGATTATTCA
 141 R D S G S S S S S G S Q N S A G S D Y S
 979 TACATTTTGACAATGAAGAAGGCTGGGATCTTGTGTTGTACCACATCGCTCGGAAAAA
 161 Y I F D N E E G W D L V F V P H R S E K
 1039 TTTGACTGTCCAATATGTCTGCTAGTCCTCCGAGAGCCCATGCAGACAGAGTGTGGGCAT
 181 F D C P I C L L V L R E P M Q T E C G H
 1099 CGTTTTGTAGGGCGTGTATACTGAAATGGCTCAGGGAGTCAGAGTCACGGTGTCCCGTA
 201 R F C R A C I L K W L R E S E S R C P V
 1159 GATAACCAGCCCCTAGAAGAGCGGCAGTTATTTCCAGATAATTTTGCCAAAAGAGAAATC
 221 D N Q P L E E R Q L F P D N F A K R E I
 1219 CTTGTTTTAAATGTAAATGTCCAATCATAAAAGGGCTGTGATCAAATTGTTGTACTG
 241 L V L N V K C P N H T K G C D Q I V V L
 1279 AAGCATTTACAGACTCATTTAGAAAATTGTATATTTTCATTAACCTCATGTCCTAATGAA
 261 K H L Q T H L E N C I F S L T P C P N E
 1339 TGTACAAGTGTTTAATGCGTGGTTCGGTGTGTCAGAACATCTTCAGAACCAAGTGTCCAAAA
 281 C T S V L M R G R L S E H L Q N Q C P K
 1399 AGAATAATCAGGTGTCCCTGTGTCATCTGAATTTGTTGCTGAGAAAAAGCAGGACCAC
 301 R I I R C S L C Q S E F V A E K K Q D H
 1459 CAGTTAGACTGTCCAGAGGCTATCATTAACTGCCCATCTGTGAACTGCAACTTAAAAGG
 321 Q L D C P E A I I N C P S C E L Q L K R
 1519 CAACTGCTGACACAACATCTGAATACAGAGTGTGAAGAAGGCTTTGACAAGATGTCAGTAC
 341 Q L L T Q H L N T E C K K A L T R C Q Y
 1579 CAGCTGCTTGGATGTCCTTACGAGGGAGAAAGGCAGAGTCTGGAGGATCATGAAAAATTCT
 361 Q L L G C P Y E G E R Q S L E D H E N S
 1639 CAGCTCGCCTATCACATGGGACTGATTAATCTGAGTATCATACGATTATTCACGCTGTTG
 381 Q L A Y H M G L I N L S I I R L F T L L
 1699 GGAATCAATCCGCGTAACCTGCAGTCGGCCACCGTCTTCTCGCTAAACTACCAGCCT
 401 G I N P R N L Q S A H R P S S L N Y Q P
 1759 ACTGAAGGATCAGCAAGTTCAGGGCCGCAAGTTATCCATCATACTTTGTAATCCAAAA

```

421 T E G S A S S G A A S Y P S Y F V N P K
1819 GAAAGTATGAATTTATTGCAGCACCTTTTCAATCACTGAATCTAACACCAAGTGATTTA
441 E S M N L L Q H L F Q S L N L T P S D L
1879 AATAATGTTGCTGTTAGTGGTGTAATGTTACACAAAGTTCAACTAGAATAGGAAGTAGT
461 N N V A V S G V N V T Q S S T R I G S S
1939 GTTGAAAGTTTACAGTCGAGTGGTATGAATGTCTTACATACCAGTCCAGGAAGTGTCTTCT
481 V E S L Q S S G M N V L H T S P G S V S
1999 ATAGCAACAGCACAAAACATGCATATACCAGTCAGTCAGGCACAGGAGAGTAGACAAATT
501 I A T A Q N M H I P V S Q A Q E S R Q I
2059 ACTGAGGAGGAACAACAGAATGATAGTGAACGAGTAAGTTCAAACCTGTTGAGGTATCAG
521 T E E E Q Q N D S E R V S S N L L R Y Q
2119 ACGTTGAGTTACACGTCTGAACCTTCGAATAGGCAGGATAATGAAGTGCCTATGATGTCT
541 T L S Y T S E P S N R Q D N E V P M M S
2179 GTTAGTGAATCAACTGCACACAATGAAATGCCAGAACGATATCCAGGACGAAAGTTTA
561 V S E N Q L H T M K C Q N D I Q D E S L
2239 GCGAGACATGATCAACAGTTACTAGATTTGGCACATCAGAAAGACTTGCATGAGAGAGTT
581 A R H D Q Q L L D L A H Q K D L H E R V
2299 ATTCGGGACTTGAAAATGAAAGTTGAAAGTTAGAAAATACAATTCAGGATATGGAAGGT
601 I R D L K M K V R S L E N T I Q D M E G
2359 AGATGTGGTAATGGAGTATATGTTTGGAGAATCAAGAATTATTTAAAACCTAGAAGAGAA
621 R C G N G V Y V W R I K N Y L K L R R E
2419 GCTGAAAAAGGGGAGGTTACAGCAATACATAGCTCGTCATTTTATTCTAGTTATTACGGT
641 A E K G E V T A I H S S S F Y S S Y Y G
2479 TATAAACTGTGTATAAGGGTTAATCTGAATGGAGTTGATGCTGCGAAGGGCACGCATCTT
661 Y K L C I R V N L N G V D A A K G T H L
2539 TCATTATTATTTCATTCATGCAGGGGAGAATATGATGATTATTGGAGTGGCCATTAGT
681 S L F I H F M Q G E Y D D L L E W P F S
2599 GGAAGGATTGTCTCACAAATTATTGATCAAAATCCTATTTGTGAAATGCGCAACAATATT
701 G R I V L T I I D Q N P I C E M R N N I
2659 TCGGAAACGCTCATGTCAAAGCCTAACTTGGCAGCATTCCAACGCCTGTAGTACTAGG
721 S E T L M S K P N L A A F Q R P V S T R
2719 AATCACAAGGTTTTGGATACATGGAGTTTTTACCACTAACGTTATAGATGGGTCAACC
741 N H K G F G Y M E F L P L N V I D G S T
2779 TTTGTTAGGAATGACACTTTGATAATTAAGCGACTGTAATCCATCCAATATGTAA
761 F V R N D T L I I K A T V I P S N M *

```

图 1 青蛤 TRAF6 的开放阅读框及结构域

Fig.1 The open reading frame and the structural domain of CsTRAF6

注: 方框表示起始密码子, *为终止密码子, 阴影部分分别表示 RING 型锌指结构(183—221aa), TRAF 型锌指结构(266—320aa, 320—377aa), coiled-coil 结构域(592—624aa)以及 MATH 结构域(629—756aa)

2.3 CsTRAF6 基因在组织间的表达分析

以青蛤 β -actin 基因作为内参对照, 运用 Real-time PCR 方法检测青蛤 CsTRAF6 在血淋巴、闭壳肌、鳃、

性腺、外套膜和肝脏中的表达量(图 3)。结果显示, CsTRAF6 在青蛤的六种组织中均能够表达, 而在血淋巴中的表达水平最高, 在闭壳肌中的表达水平次之,

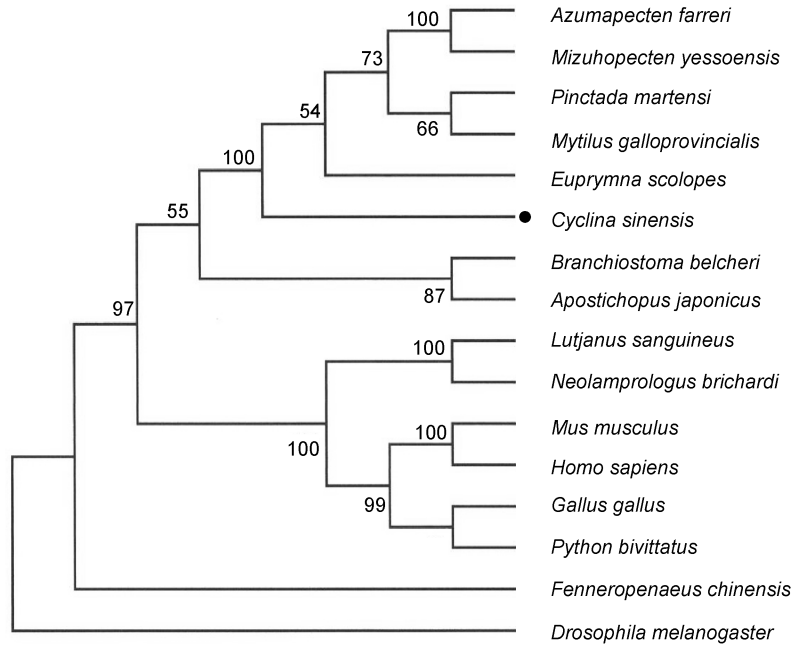


图 2 利用邻接法(NJ)建立的 16 个物种的 TRAF6 基因氨基酸序列系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of TRAF6 from 16 species constructed using the Neighbor Joining method
 注: *Mus musculus* TRAF6 (BAA12705.1); *Python bivittatus* TRAF6 (XP_007435082.1); *Azumapecten farreri* TRAF6 (ABC73694.1); *Lutjanus sanguineus* TRAF6 (AIC37510.1); *Apostichopus japonicus* TRAF6 (AHA83604.1); *Neolamprologus brichardi* TRAF6 (XP_006793845.1); *Fenneropenaeus chinensis* TRAF6 (AFU51810.1); *Homo sapiens* TRAF6 (NP_665802.1); *Branchiostoma belcheri* TRAF6 (ABN04154.1); *Mizuhopecten yessoensis* TRAF6 (AFU52971.1); *Pinctada martensi* TRAF6 (AHC94802.1); *Mytilus galloprovincialis* TRAF6 (AHI17288.1); *Gallus gallus* TRAF6 (XP_421089.2); *Cyclina sinensis* TRAF6 (KP067203); *Euprymna scolopes* TRAF6 (AAY27978.1); *Drosophila melanogaster* TRAF6 (AAD47895.1)

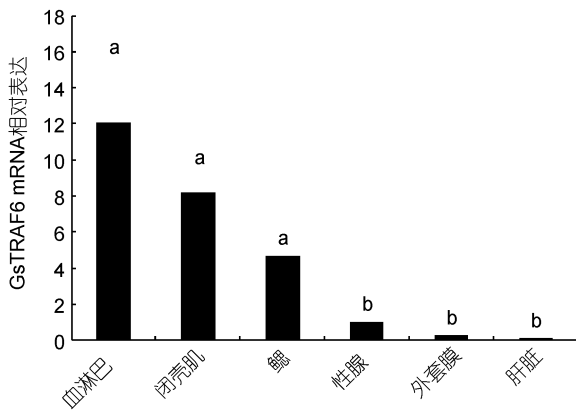


图 3 CsTRAF6 基因的组织分布表达
 Fig.3 Tissues distribution of CsTRAF6
 注: 柱上不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

在肝脏的表达量最低。

2.4 CsTRAF6 基因在 Poly I:C 刺激下的表达分析

青蛤在 Poly I:C 侵染后, 不同时间点的血淋巴中 CsTRAF6 基因相对于 β -actin 基因的表达变化如图 4 所示。结果显示, 实验组的表达量在侵染后的 3h 时迅速升高; 表达量在 6h 时达到最大值, 与对照组相

比差异显著($P < 0.05$), 约为对照组的 3.8 倍, 并且显著高于空白组($P < 0.05$)。6h 后其表达量开始下降, 逐渐恢复至正常水平。

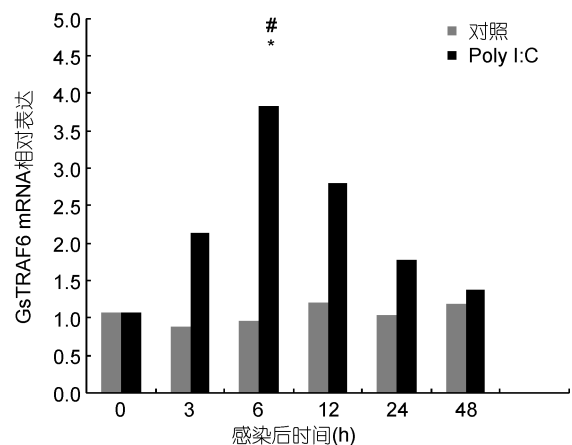


图 4 Poly I:C 感染后青蛤 CsTRAF6 基因的相对表达量
 Fig.4 Relative expression of CsTRAF6 in *C. sinensis* after infection with Poly I:C
 注: *表示在同一时间点下, 实验组与对照组 TRAF6 的相对表达量具有显著差异($P < 0.05$); #表示在这一时间点下, 对照组 TRAF6 的相对表达量同组注射前(0h)相比差异显著($P < 0.05$)

3 讨论

通过青蛤转录组文库筛选得到的青蛤 CsTRAF6 基因的类似序列, 经克隆及二次测序后, 通过 BLAST 核苷酸数据库进行比对获得了青蛤 CsTRAF6 的 cDNA 序列, 其 ORF 为 2337bp, 能够编码 778 个氨基酸的蛋白质。预测的 CsTRAF6 蛋白估计分子量为 86.59kDa, 估计等电点为 6.16。通过 SMART 在线分析 CsTRAF6 基因编码的氨基酸序列包含 RING 型锌指结构(183—221aa), 两个 TRAF 型锌指结构(266—320aa, 320—377aa), coiled-coil 结构域(592—624aa)以及 MATH 结构域(629—756aa)。这些结构域在青蛤中是保守的, 表明它们具有与哺乳动物 TRAF6s 基因类似的功能。相关研究表明, N 端 RING 型锌指结构与 TRAF 型锌指结构用于激活 IKK (Grech *et al*, 2000), coiled-coil 结构域的作用是自动泛素化从而激活下游 NF- κ B 信号通路(Yang *et al*, 2004)。此外, MATH 结构域能够与通路上游信号分子 IRAK 相互作用(Arch *et al*, 1998)。

通过 BLASTP 比对表明青蛤 CsTRAF6 的氨基酸与栉孔扇贝 TRAF6 的同源性最高, 达 60%。与霸王花青螺、虾夷扇贝 TRAF6 氨基酸序列同源性为 56% 和 48%。通过 MEGA 构建的系统树表明, 不同物种的 TRAF6 基因各自聚成一支, 青蛤 CsTRAF6 基因与其它软体动物的 CsTRAF6 基因聚在一支, 脊椎动物的 TRAF6 基因聚在其它分支上。黑腹果蝇的 TRAF6 基因氨基酸序列单独在一个分支上。结果表明, 青蛤 CsTRAF6 基因与软体动物 TRAF6 基因进化距离较近, 相反与昆虫以及脊椎动物的 TRAF6 基因的进化距离较远, 因此, CsTRAF6 基因可能是 TRAF6 家族的一个新成员。

本研究中利用 Real-time PCR 方法检测其在各个组织中的表达情况。结果显示, 青蛤 CsTRAF6 基因在所有的组织中普遍表达, 表明其参与多种生物学过程。青蛤像其它双壳类软体动物一样, 有一个开放的循环系统, 其体内的血液渗透压和温度会随着环境而波动。这个开放的血液循环体系对于无脊椎动物的免疫防御有关键的作用(Bigas *et al*, 2006)。它们可以充当吞噬细胞以及参与体液因子的分泌。CsTRAF6 基因在血淋巴中的表达量最高, 这与虾夷扇贝 TRAF6 的表达情况相似(He *et al*, 2013), 这表明 CsTRAF6 可能在抵御病原物质感染时发挥着重要作用。然而这与栉孔扇贝 TRAF6(CfTRAF6)基因在组织

中的表达情况不同, 其 CfTRAF6 主要在性腺中表达, 表明 CfTRAF6 基因在扇贝的发育过程中起着重要作用。上述结果表明 CsTRAF6 在青蛤体内主要起到免疫作用, 亦说明不同种类软体动物的 TRAF6 基因在组织中的表达模式及调节功能有明显差别。

前人相关研究认为, 低等动物血液可以直接吞噬和破坏微生物(Sun *et al*, 2001), 而软体动物的先天免疫系统主要依靠血淋巴的循环运转(Pipe *et al*, 1997; Wootton *et al*, 2003)。在脊椎动物中, TLR3 是通过识别双链 RNA 以及合成类似物如 Poly I:C, 随后引发 MyD88 非依赖性途径, 从而引起干扰素的分泌(Alexopoulou *et al*, 2001)。TRAF6 是 Toll 样受体信号通路中重要的信号转导分子, 本研究中的 CsTRAF6 基因在 Poly I:C 的刺激下, 其表达量在侵染后的 3h 便迅速升高, 说明 CsTRAF6 基因参与了对于 Poly I:C 刺激的免疫应答反应, 并且青蛤内存在于 TLR3 所介导的信号通路, 有关该通路在青蛤体内所发挥的免疫功能还需进一步探索。

参 考 文 献

- 魏 星, 张海静, 潘宝平, 2015. 青蛤(*Cyclina sinensis*)I κ B 基因的克隆及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达分析. 海洋与湖沼, 46(4): 793—799
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783—801
- Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R *et al*, 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857): 732—738
- Arch R H, Gedrich R W, Thompson C B, 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev*, 12: 2821—2830
- Bigas M, Durfort M, Poquet M, 2006. Cytological response of hemocytes in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, experimentally exposed to mercury. *Biomaterials*, 19(6): 659—673
- Grech A, Quinn R, Srinivasan D *et al*, 2000. Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Mol Immunol*, 37(12—13): 721—734
- He C B, Wang Y, Liu W D *et al*, 2013. Cloning, promoter analysis and expression of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) in Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*). *Mol Biol Rep*, 40(8): 4769—4779
- Ishida T, Mizushima S I, Azuma S, *et al*, 1996. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol*

- Chem, 271(46): 28745—28748
- 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: 402—408
- 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): e0123296
- 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(3): 537—545
- Sun H S, Li G Y, 2001. Humoral factors of bivalves participating in immunity defence. *Marine Sciences*, 25(4): 34—36
- Tabeta K, Georgel P, Janssen E *et al*, 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(10): 3516—3521
- 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(3): 195—210
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H *et al*, 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633): 640—643
- Yang K, Zhu J M, Sun S G *et al*, 2004. The coiled-coil domain of TRAF6 is essential for its auto-ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(1): 432—439

CLONING OF CSTRAF6 GENE FROM *CYCLINA SINENSIS* AND IMMUNE RESPONSE UNDER POLY I:C STIMULATION

GAO Wei-Wei¹, PAN Bao-Ping², YAN Chun-Cai²

(1. Hexi District of Tianjin Community College For Staff, Tianjin 300203, China; 2. College of Life Science, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract The immune system of shellfish is non-specific and prevention against pathogens depends on hemolymph. The immune system can recognize the invading pathogenic microorganisms by Toll like receptors (TLRs), and then trigger the downstream signal transduction pathways. The tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (necrosis factor receptor-associated factor tumor 6, TRAF6) gene plays an important role in the TLRs signaling pathway. We screened the cDNA sequence of TRAF6 (CsTRAF6) gene and cloned it from transcriptome library of clam *Cyclina sinensis*. The cDNA possessed an ORF of 2337bp encoding a protein of 778 amino acids; the predicted molecular weight was 86.59kDa and theoretical isoelectric point 6.16. The CsTRAF6 protein contains a RING-type zinc finger structure, two TRAF-type zinc finger structures, a coiled-coil domain, and a MATH domain. BLAST (the basic local alignment search tool) comparison and phylogenetic analysis show that CsTRAF6 is a member of the TRAF6 family. In addition, we detected the CsTRAF6 gene and their sequential expression in all tissues by real-time PCR after Poly I:C infection. We found that the CsTRAF6 gene was generally expressed in hemolymph, adductor muscle, gill, gonad, mantle and liver, of which in hemolymph was the highest. The expression of CsTRAF6 in hemolymph injected with Poly I:C increased significantly in 3h and peaked at 6h, indicating that the gene was involved in the immune response against Poly I:C infection in *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*; CsTRAF6; Poly I:C; real-time PCR