

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*

高 晶 任毅鹏 潘宝平 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)

摘要 经转录组测序后筛选并克隆得到青蛤(*Cyclina sinensis*)髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)的 cDNA 序列。在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)胁迫下,采用荧光定量 PCR 法分析了 MyD88 基因在青蛤体内的表达过程。结果显示,青蛤 MyD88 基因的开放阅读框为 1521bp,编码 506 个氨基酸,分子量约为 57.14kDa,氨基酸 N 段存在 DEATH 结构域, C 段存在 TIR 结构域(Toll/Interleukin-1 receptor domain)。MyD88 基因在青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、鳃和闭壳肌等组织中普遍表达,但在血淋巴中表达量最高,与其它组织出现显著性差异($P < 0.05$)。通过检测鳃弧菌刺激下 MyD88 基因在青蛤血淋巴中的表达值,发现 MyD88 基因在 24h 开始升高,48h 达到最大值,约为对照组的 10 倍,实验组与对照组及空白组均出现了极显著性差异($P < 0.01$);研究结果表明,该基因在软体动物的免疫应答反应中对革兰氏阴性菌有识别作用。

关键词 青蛤; 鳃弧菌; 转录组文库; MyD88; 荧光定量 PCR

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20141000290

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国习见的海产经济动物,由于其肉质细嫩鲜美,营养丰富,是我国南北沿海地区人们喜爱的鲜食贝类,目前已成为重要的海水养殖对象之一(宋欣等, 2010)。由于近年来沿海地区的水质污染较为严重,水生微生物病原体大量繁殖,青蛤养殖业受到严重制约(孙国铭等, 2004)。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是引起水产养殖动物病害的重要病原微生物之一,常给水产养殖造成巨大的损失,目前在江苏等省区已经引起青蛤的大面积病害和死亡现象(王兰萍等, 2007; 罗凯娅等, 2012)。

髓样分化因子 88(myeloid differentiation 88, MyD88)是 Toll 样模式识别受体(Toll-like receptor, TLR)跨膜信号转导引发免疫反应的重要转接分子,是信号向下游级联反应引发效应分子表达的关键靶分子。MyD88 属于 Toll/IL-1R 家族,包含 N 端死亡结构域(death domain, DD)中间区域和 C 端的 Toll 区。MyD88 在 Toll 样受体 2, 3, 4, 7, 9 信号转导通路中起着非常重要的作用

(赵兴旺等, 2011)。目前,已有多个哺乳类、禽类、鱼类等动物的 MyD88 分子相继被鉴别(朱炳林等, 2010),有关软体动物 MyD88 分子的研究比较罕见。

本研究通过建立转录组文库并从中筛选克隆得到 MyD88 基因的 cDNA 序列,进一步针对该基因的 TIR 结构域进行了结构分析和功能预测。在鳃弧菌胁迫下,利用实时荧光定量 PCR 技术检测了青蛤 MyD88 基因在不同组织的时序表达过程,讨论了该分子在贝类免疫信号传导中的重要作用,为深入揭示研究软体动物的免疫应答机制提供一定的实验数据,同时为青蛤养殖中的病害防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

活体青蛤(*Cyclina sinensis*)采自天津大港滩涂,将其暂养于人工海水中,海水密度 1.02—1.04g/cm³,水温 21—24°C,持续曝气,每天投喂 5‰的小球藻

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 12JCZDJC22800 号。高晶, E-mail: yuncangtvxq@163.com

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

收稿日期: 2014-10-11, 收修改稿日期: 2014-11-15

(*Chlorella* sp.), 一周后进行感染实验。

1.2 实验方法

1.2.1 感染实验 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)用 2216E 培养基于 28°C 下培养 24h 后, 用无菌海水重悬菌液, 将浓度调为 $OD_{600} = 0.4$ 。实验采用随机分组方法, 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, 对照组注射等量的灭菌生理盐水。注射前准确称取青蛤肝脏、外套膜、闭壳肌和鳃各 50mg, 迅速放入液氮冷冻。注射后 0h、3h、6h、12h、24h、48h、96h 时提取血淋巴。取出冷冻组织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°C、4500r/min 离心 15min, 取上清液备用。血淋巴置于 4°C 条件下, 8000r/min 离心 10 min 收集血细胞, 加入 1mL Trizol, 置于 -80°C 超低温冰箱中备用。

1.2.2 转录组文库的构建及数据筛选 Trizol 法提取活体青蛤血淋巴总 RNA, mRNA 的分离按 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 试剂盒操作手册进行。纯化后的 mRNA 加入裂解缓冲液将其打断成短片段, 采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 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。采用 Illumina MiSeq 二代测序仪, pair end 双端模式完成转录组测序。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、Uniprot/Swissprot 数据库和 Unigene ggNOG 数据库等多重 BLAST 分析比对, 通过 Blast2GO 软件完成 Unigene 的 GO 注。根据 KEGG 数据库注释信息进一步对 Unigene 进行 Pathway 通路的注释和预测, 对 Unigene 进行差异表达分析。

1.2.3 MyD88 基因序列分析 从转录组文库中筛选出青蛤 MyD88 基因类似序列, 设计特异性引物进行基因克隆, 同时与 GenBank 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量、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。

1.2.4 MyD88 基因在青蛤各组织内的表达分析 参照 1.2.1 方法, 将青蛤肝脏、外套膜、闭壳肌和鳃的匀浆上清液与青蛤注射后 0h 血细胞分别置于 1mL TRIZOL 中提取总 RNA 并反转成 cDNA, 以 cDNA 为

模板, β -actin 基因为内参基因进行实时荧光定量 PCR。RT-PCR 引物分别为: β -actin-F: 5' CACCACA ACTGCCGAGAG 3', β -actin-R: 5' CCGATAGTGATGA CCTGACC 3'; MyD88-F: 5' GACCTGTGCCACCAATA 3', MyD88-R: 5' GGGTTCCTGGG CTTTA 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^{-CT} 法计算(Livak *et al.*, 2001), 使用 SPSS 软件分析数据。

1.2.5 鳃弧菌刺激下青蛤 MyD88 基因在血淋巴中的时序性表达 参照 1.2.1 方法, 提取鳃弧菌刺激下 0h、3h、6h、12h、24h、48h、96h 时血淋巴样品, 提取总 RNA 并反转成 cDNA, 以 cDNA 为模板, β -actin 基因为内参基因进行实时荧光定量 PCR。RT-PCR 引物参照 1.2.4。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^{-CT} 法, 使用 SPSS 软件对同一时间点实验组与对照组, 实验组和空白组的表达水平进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 青蛤 MyD88 基因的结构分析

构建的转录组文库, 有 893 个基因注释到 15 个免疫相关的通路中。经随机挑取克隆并测序后, 利用 BLASTX 比对和 ORF 在线分析发现青蛤 MyD88 基因部分片段。青蛤 MyD88 基因 cDNA 开放阅读框为 1521bp, 编码 506 个氨基酸(图 1), 其理论分子量为 57.14kDa, 理论等电点 $pI=5.80$, 分子式为 $C_{2496}H_{3912}N_{698}O_{806}S_{17}$, 氨基酸组成中丝氨酸(Ser)最高, 占 14.0%。N 段存在完整的 DEATH 结构域, C 段存在完整的 TIR 结构域。青蛤 MyD88 基因在 GenBank 中的注册号为 KJ841930。

2.2 青蛤 MyD88 基因的分子系统学分析

用 MEGA4.1 软件以邻接法(NJ)构建了 MyD88 的系统树(图 2), 采用 bootstrap 1000 个循环检验拓扑结构的置信度。拓扑图显示: 青蛤 MyD88 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)聚在一个分支上; 而与鱼类如红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*)、斑马鱼(*Danio*

112 ATGGCTGACGAACAGTCAGAAGAATTGATTTATCTCTAAATACTCAGTTATCTCTCTA
 1 M A D E Q S E E F D L S S K Y S V I P L
 172 GAAGCTCTAAATGCAAGTTGCAGAAGCAAAATGCATTACATCTTAATTTAGAGGGAAC
 21 E A L N A S C R R Q I A L H L N L E G T
 232 ATGAATGAAGACAATAATAAATGATTACCGAGGCTGGCAGAAGTGGTCGGATTCAAT
 41 M N E D N I I N D Y R G L A E L V G F N
 292 TACCTAGAAATCAAAAACCTCGAGAGAAATAACAGCCCTACGGAACAGTTGTTGTCAGAC
 61 Y L E I K N F E R N N S P T E Q L L S D
 352 TGGACAACAAGGACTGATTTATCACCACCTGTAGGACCTTGTGGAAAAATTTACTGTCA
 81 W T T R T D L S P T V G T L W K N L L S
 412 CTGAAAGAGTGGACGTTCTAACTGACAGCAAGAAATATATTGAAAGAGACTGTGAAAA
 101 L E R V D V L T D S K K Y I E R D C E K
 472 TATCTTGAGATAAAAGCAAGTTTCAGACAAGCCAAATACCAGTTCAAGACAACACAGTG
 121 Y L E I K A R F Q T S Q I P V Q D N T V
 532 TCTCAGACCCCTGATCATGATGATGATGAATCATTGTTTATGGGAGTTGATGATGTTATA
 141 S Q T P D H D V D E S L F M G V D D V I
 592 CATGGAAAGCCTACAATATATGATGCTTTTGTCTGCTATAACCCAGAAGCAAGGACTTG
 161 H G K P T I Y D A F V C Y N P E G K D L
 652 GCCTTTGTCGCTCAGTTAATTCAGAAATGGAGTGGAAAAATGGTCTCAAATTTTGT
 181 A F V R Q L I Q K L E V E N G L K L F V
 712 CCATGGAGAGATGATGCTGGAGCTTCACATAACACAGTGTGGCTAAAGCTCATAGAA
 201 P W R D D L P G A S H N T V C A K L I E
 772 TACAGATGTAAGGATGATCATTATTTGTCGCCAGCTATCTGCAGAGTCTGCTGCTGT
 221 Y R C K R M I I I L S P S Y L Q S P A C
 832 GATTTTCAGACAAAGTTGCTCATGGATTGTCACCAAGTTCCCGAAAACAAGAACTTATT
 241 D F Q T K F A H G L S P G S R N K K L I
 892 CCCGTGCTGATTGAAGATTGTCATACCGGAAATAACGTCATGTGACTGCTGCAAT
 261 P V L I E D C V I P E I I R H V T C C N
 952 TACACAAAAGAAAGATTGCGGGAGTGGTCTGGTCAAGACTCATCTCATCCCTGAAAGTA
 281 Y T K K D L R E W F W S R L I S S L K V
 1012 CCCTGGATCTCTCAGAATGCAAGTACAGCAACCCAGAAGATTGAAACAGATTGAGTCTT
 301 P L D P S E C K Y S N Q K D L N R L S L
 1072 GACACATCATCTCCGTGCCTTGTGGTCAAGTTCAGGCTCTAGTTCAAGCTCA
 321 D T S S S V P C W S S S S S G S S S S S
 1132 AGCTTGATACATCTAGCTCCAATTCATCATTGGTGATTACTACTCTCAAGTTACAGG
 341 S L D T S S S N S S L V Y S Y S S S S A
 1192 TCAGACTATTCAGCTGGATGTTATCTCGCGAAATAGAGGTAACGATTACCTGCAGCCA
 361 S D Y S A G S V S R G N R G N D Y L Q P
 1252 ACATCAGCTTACCAACATATTTAGAACTGTTTCTAATTCACCACACAAGAGAAA
 381 T S A Y P T Y L E L F T S N S P P Q A R K R
 1312 TCTAATAATTATGAAGCAATAAGCAATCTCGTAGAGTAACAAATGATGCAAAATGAACAG
 401 S N N Y E R I S N L R R V T N D A N E Q
 1372 GCCTTATCTGCATCAAACATAACAGCAATGTCATCTCAGGTATATAGTAAAGCCAG
 421 A L S A S N Y T Q P I A S Q V Y S K A Q
 1432 GAACCATGAGTAGCACTTATAACAGAAGTACAGTACCTCTGCAGATAGAAGTGGG
 441 E P M S S T Y N R T Q H V T S A D R S G
 1492 CCAAGGTTGCAGACTGTATCACTCTAGCAAGATACAGTACGCTCAGAGAAATTCACCA
 461 P R V Q T V S P L A R Y S Q P Q R N S P
 1552 GCAAATAACAGGAGACCTGTGCCACCAATACCCTCTGAAGTTCAAACAAGAGATGGAA
 481 A N N R R P V P P I P S E G S N K E M E
 1612 CAAAAGGAATATTTTTCTGA 1632
 501 Q K E Y F F *

图1 青蛤 MyD88 基因 cDNA 序列的开放阅读框及功能域分析

Fig.1 The open reading frame of CsMyD88 gene and analysis on the structural domain
 方框为起始密码子, *表示终止密码子, 波浪线表示 DEATH 结构域, 下划线表示 TIR 结构域

erio)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)以及鸟类和哺乳类如原鸡(*Gallus gallus*)、人(*Homo sapiens*)、小家鼠(*Mus musculus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)进化距离较远。而海蜗牛(*Aplysia californica*)则与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)单独聚成一支。

2.3 青蛤 MyD88 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 MyD88 基因在青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃五个组织的表达情况(图 3), 结果显示 MyD88 基因在青蛤的以上五个组织中表达量存在明显差异, 其中血淋巴中表达量最高, 显著高于其它组织($P < 0.05$), 是表达量最低的肝脏的 50 倍, 外套膜表达次之。表明青蛤 MyD88 基因主要在血淋巴中表达。

2.4 在鳃弧菌刺激下青蛤 MyD88 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 MyD88 基因在血淋巴中的表达时序变化(图 4)。发现实验组在感染后 24h 表达量高于空白组; 到 48h 时出现了骤升并且达到最大值, 与对照组有极显著性差异($P < 0.01$), 约为对照组的 10 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。

3 讨论

目前有关 MyD88 分子的研究报道主要集中在鱼类、鸟类和哺乳动物中, 相对在软体动物中的研究资料比较罕见, 主要集中在栉孔扇贝(邱丽梅, 2006; 王孟强, 2010)、菲律宾蛤仔(Lee *et al*, 2011)、长牡蛎(Timothy *et al*, 2013)和紫贻贝(Mylène *et al*, 2014)等传统养殖对象中。本研究通过实时定量 PCR 分析了青蛤 MyD88 基因在不同组织中的表达情况, 结果显示在青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、鳃五个组织中均有表达, 但在血淋巴中的表达量与其它组织有显著性差异($P < 0.05$)。该结果与栉孔扇贝 CfToll-1 的组织表达情况(邱丽梅, 2006)相似。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)。鳃弧菌侵染青蛤 48h 后, MyD88 基因的相对表达量达到最大, 可能是由于鳃弧菌产生的细胞毒素入侵青蛤血细胞后, 被一些识别因子或受体蛋白所识别, 进一步激活了青蛤 Toll 通路信号

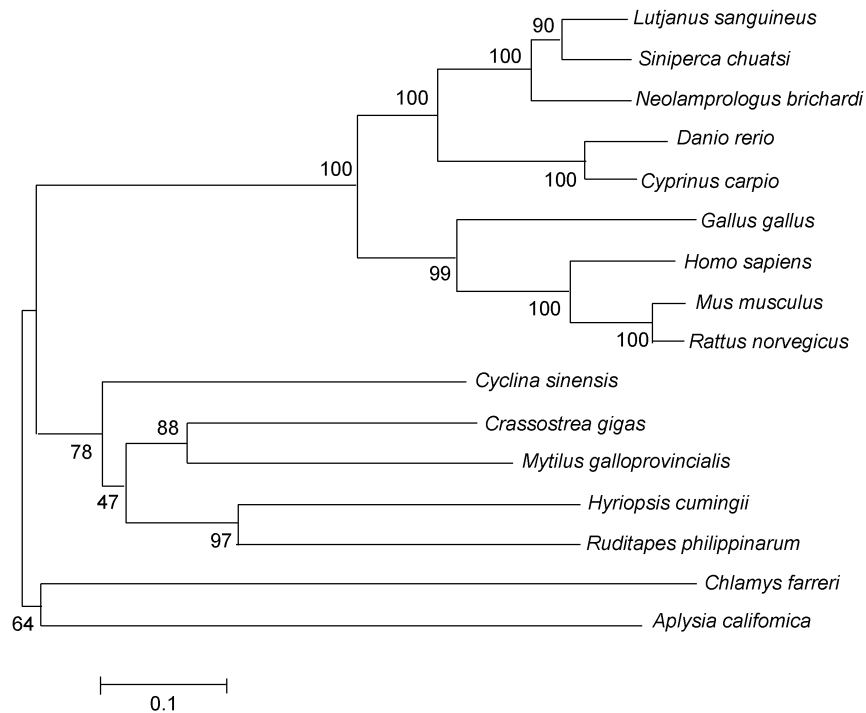


图 2 使用邻接法(NJ)构建的 16 个物种 MyD88 氨基酸序列系统树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of MyD88 of 16 species using NJ (neighbor joining) method. 建立系统树所用的物种以及序列号为: *Mus musculus* AAC53013.1; *Rattus norvegicus* NP_937763.1; *Chlamys farreri* ABB76627.1; *Lutjanus sanguineus* ADX01346.1; *Danio rerio* NP_997979.2; *Neolamprologus brichardi* XP_006795182.1; *Cyprinus carpio* ADC45019.2; *Crassostrea gigas* AFX68460.1; *Homo sapiens* AAC50954.1; *Hyriopsis cumingii* AHB62785.1; *Ruditapes philippinarum* AEF32114.1; *Aplysia californica* XP_005094456.1; *Siniperca chuatsi* ADM25313.1; *Mytilus galloprovincialis* AGG10811.1; *Gallus gallus* NP_001026133.1; *Cyclina sinensis* KJ841930

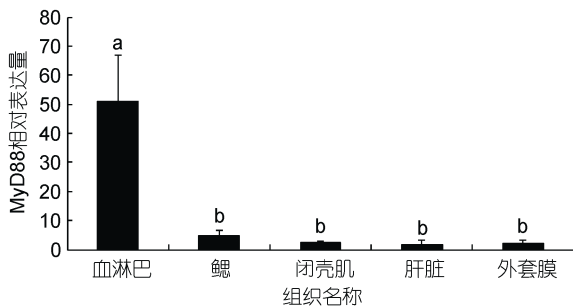


图 3 青蛤 MyD88 基因在青蛤不同组织间的表达情况

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 ($P < 0.05$)

传递, 从而引起相关因子表达量的变化, 并最终诱导产生一系列免疫反应。青蛤 MyD88 基因在鳃弧菌刺激下的表达情况与栉孔扇贝 MyD88 基因在 LPS 刺激下的实验结果类似(王孟强, 2010)。本研究结果同时发现, 鳃弧菌刺激青蛤 12h 以内 MyD88 基因的相对表达量有所下调, 其结果与 PGN 刺激下栉孔扇贝 MyD88 和 TRAF6 两种重要衔接蛋白 mRNA 的表达情况(邱丽梅, 2006)相似。该现象可能与 mRNA 处在

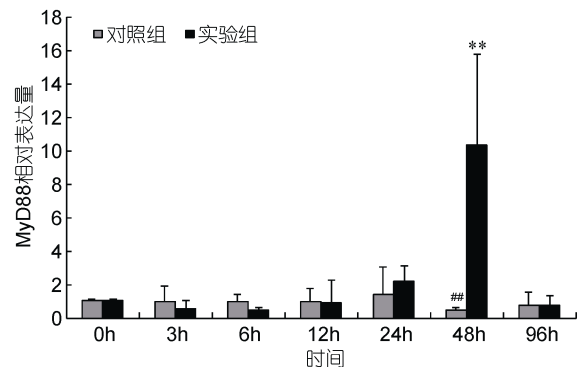


图 4 青蛤血淋巴中 MyD88 基因在鳃弧菌刺激不同时间相对表达量的变化

Fig.4 The relative expression of CsMyD88 gene in hemolymph of *C. sinensis* infected by *V. anguillarum* in different times. **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 ($P < 0.01$); ##表示该时间点实验组基因的转录表达水平与同组注射前(0h)相比差异极显著 ($P < 0.01$)

动态平衡状态有关, 当病原体入侵较短时间内, mRNA 被消耗用于合成更多的蛋白从而参与机体防御。

本研究通过构建青蛤转录组文库筛选并克隆得到 TLR 通路信号分子 MyD88 的 cDNA 序列, 利用分

子系统学分析后发现,青蛤的 MyD88 基因与长牡蛎、紫贻贝、三角帆蚌、菲律宾蛤仔亲缘关系相近,并且与长牡蛎的 MyD88 基因相似性最高,一致性达到 50%。利用 SMART 在线分析软件对青蛤 MyD88 基因进行蛋白质序列分析,发现青蛤 MyD88 氨基酸序列 N 段存在 DEATH 结构域, C 段存在 TIR 结构域。MyD88 属于 Toll/IL-1R 家族和死亡结构域家族成员, MyD88 的 TIR 结构域与 TLRs 和 IL-1Rs 的 TIR 结构域相结合,而死亡结构域可与白细胞介素 1 受体相关激酶(IL-1R-associated kinase, IRAK)的死亡结构域相互作用,募集 IRAK 到受体复合体进而介导信号向下游传导(赵兴旺等, 2011)。通过构建系统树发现青蛤的 MyD88 基因的分子进化地位与其形态分类地位基本一致,但与海蜗牛、栉孔扇贝差异明显,说明该序列在软体动物进化过程中选择压力小的区域产生了明显的变异分歧。

本研究中有关青蛤 MyD88 基因在鳃弧菌胁迫下,不同组织的时序表达过程能够初步阐明贝类 Toll 通路中 MyD88 信号因子的传递特征,为今后深入探索软体动物的免疫应答机制提供了重要的实验数据。

参 考 文 献

- 王兰萍, 耿荣庆, 刘 意等, 2007. 我国青蛤种质资源研究与利用现状. 江苏农业科学, 4: 254—255
- 王孟强, 2010. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)Toll 样受体信号通路免疫功能研究. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 74, 106—109
- 朱炳林, 李 俊, 方维焕等, 2010. 中华鳖 MyD88 部分序列克隆及其在组织中的表达差异分析. 水产学报, 34(7): 1018—1024
- 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
- 邱丽梅, 2006. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)Toll 样受体及其信号传递相关基因的克隆与表达. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 75—78, 85—86
- 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
- 罗凯娅, 刘欣欣, 葛端阳等, 2012. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)谷胱甘肽硫转移酶及其基因表达的影响. 海洋与湖沼, 43(4): 735—740
- 赵兴旺, 刘冉冉, 郑麦青等, 2011. 鸡髓样分化因子 88 的原核表达及单克隆抗体制备. 生物技术通讯, 22(6): 850—854
- Lee Youngdeuk, Whang Ilson, Umasuthan Navaneethaiyer *et al*, 2011. Characterization of a novel molluscan MyD88 family protein from manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish & Shellfish Immunology, 31: 887—893
- Myl è ne Toubiana, Umberto Rosani, Sonia Giambelluca *et al*, 2014. Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. Developmental & Comparative Immunology, 45(2): 300—312
- 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
- Timothy J Green, Caroline Montagnani, 2013. Poly I: C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). Fish & Shellfish Immunology, 35: 382—388
- 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

EFFECT OF *VIBRIO ANGUILLARUM* ON GENE EXPRESSION OF MYD88 IN *CYCLINA SINENSIS*

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

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

Abstract A gene of *Cyclina sinensis* myeloid differentiation factor 88 (CsMyD88) was cloned and analyzed with transcriptome library for studying the function in innate immune response. The expression of CsMyD88 was detected by real-time quantitative PCR. Results show that the CsMyD88 was expressed to the highest level in hemolymph significantly different from those in liver, adductor muscle, gills, and mantle ($P < 0.05$). The expression of CsMyD88 in hemolymph injected with *Vibrio anguillarum* increased in 24h and peaked in 48h, which is significantly different ($P < 0.01$) from that of the control. Therefore, *Vibrio* caused tissue injury at the first stage of infection, to which CsMyD88 responded and expressed intensively in the immune system of the clam and the MyD88 gene could recognize the Gram-negative bacterium.

Key words *Cyclina sinensis*; *Vibrio anguillarum*; transcriptome library; myeloid differentiation factor 88; real-time PCR