

牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)TLR21 基因在迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染后的表达特征*

张 洁¹ 郑津辉¹ 李庆亚¹ 耿绪云² 孙金生^{1,2}
潘宝平¹ 孙世南¹ 高 虹¹

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

2. 天津市水产养殖病害防治中心 天津 300221)

摘要 应用荧光定量 PCR 技术, 检测了 TLR21 基因在牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)感染迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)后, 在 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、6 d 后, 在心脏、肝脏、脾脏、头肾、鳃、小肠、肌肉和血的时空表达特征, 并探讨了它们与牙鲈先天免疫反应的关系。结果表明, 大多组织在感染病原 6 h 后 TLR21 基因表达明显上调, 尤其是头肾和小肠。头肾 6 h 的表达量达到了对照组的 59.3 倍, 小肠 6 h 的表达量为对照组的 38.6 倍。迟缓爱德华氏菌感染引起牙鲈体内各组织中 TLR21 的上调表达和变化, 为研究牙鲈对迟缓爱德华氏菌的防御机制提供了理论依据。

关键词 TLR21 基因; 牙鲈; 迟缓爱德华氏菌; 表达; 实时荧光 PCR

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20150800211

牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)是不可或缺的海水鱼种之一, 也是鲈亚目中有关免疫研究较为集中的鱼种。近些年, 由于人们对水产鱼类的需求远远大于水产品捕捞业的产量, 导致了人工养殖业尤其是集约化养殖的蓬勃发展。集约化养殖有空间小, 养殖密度大, 充分利用资源等优势, 可以不断产生的巨大的经济效益, 但也使养殖业面临着疾病传播速度快, 养殖鱼短时间大量死亡的问题(王卫卫等, 2010)。在导致养殖业遭受重创的疾病中, 以迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)引起的腹水病最为严重。牙鲈感染了 *E. tarda* 后, 出现的症状有鱼腹部凸起, 肝脏、肾脏肿大, 有的鱼甚至出现肝脏局部坏死和出血, 体色逐渐变暗变黑(崔青曼等, 2008)。养殖厂饲养的牙鲈中因腹水病死亡的数量占到 1/2 以上(袁春营等, 2006), 导致了牙鲈产量的下降, 给牙鲈养殖业带来了巨大损失。现今治疗鱼病的方法主要是依靠传统的抗生素, 而大量使用抗生素会导致过剩药物残留于

鱼体内, 随着食物网的物质和能量的传递, 有害物质不易排出体外, 在体内造成富集现象, 危害人类健康; 而长久使用抗生素会产生药物耐受性以及环境污染等问题, 最终会对人类生活的土壤和水环境造成恶劣影响。通过研究牙鲈免疫相关基因的功能及其调控过程, 为硬骨鱼的免疫与治疗提供理论的补充与相关实验验证, 为解决养殖鱼类的病害问题提供新的解决可能性。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)在免疫中起着辨别和传递信息的作用(王德成等, 2008; 范泽军等, 2015)。依据 TLR 识别不同 PAMP 及其结构特点, 鱼类中的 TLR 可归为 6 个亚家族, TLR21 属于 TLR11 亚家族, TLR11 亚家族是哺乳类所没有的, 目前尚不清楚其对特定病原的识别机制, 需要进一步研究。TLR11 亚家族包括 TLR20、TLR21、TLR22、TLR23。TLR21 基因被发现存在于鸡、两栖动物、鱼类中, 不存在于哺乳动物类中, 鸡 TLR21 是一种核苷酸受体,

* 天津市自然科学基金重点项目资助, 14JCZDJC34200 号; 天津市教育科学十二五规划课题, BE4142 号。张洁, 硕士研究生, E-mail: zhangjie2032@126.com

通讯作者: 高虹, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: skygh@mail.tjnu.edu.cn

收稿日期: 2015-08-10, 收修改稿日期: 2015-08-31

能对 DNA 进行识别和响应(Keestra *et al.*, 2010)。目前, 在海七鳃鳗、斜带石斑鱼、斑马鱼、牙鲈、草鱼和条石鲷等硬骨鱼类中有针对 TLR21 基因的相应研究(Kasamatsu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; 路颀, 2013; Priyathilaka *et al.*, 2014)。本课题组前期克隆了牙鲈 TLR21 的全长 cDNA, 相关研究表明, 在人工培育的头肾细胞中 MyD88 抑制剂可以抑制由 CpG ODN 或 poly I: C 诱发的 TLR21 基因的表达上调(Gao *et al.*, 2013)。TLR21 基因广泛表达在健康牙鲈体内, 尤其头肾和鳃中, 本文通过观察 *E. tarda* 感染牙鲈后, 观察不同时间点 TLR21 在牙鲈体内 mRNA 水平的定量表达特征和变化情况, 对牙鲈疾病的治疗预防等方面提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

健康牙鲈, 体重范围为 90—110 g, 体长 10.5—12 cm, 购于天津市鑫永丰水产养殖场。在有供氧和过滤装置的水循环鱼缸内养殖牙鲈进行试验, 在充氧一周的自来水与盐卤按比例配制而成的水环境中养殖 7 d [盐度为 17—18, 水温为(20±2) °C], 以消除环境胁迫对牙鲈的影响(吴恋等, 2013), 避免强光直射, 鱼缸上方要遮光, 模拟牙鲈底栖的生存条件。每日投放人工配合饲料一次。

E. tarda 由天津水产养殖病害防治中心提供。

1.2 序列获得和引物设计

对本课题组前期实验成果 TLR21 全长序列运用 Primer Premier 5.0 软件设计出实时定量荧光 PCR 引物, 进行相对定量表达分析。以牙鲈 β -actin 基因作为内参基因。各引物序列详见表 1。

表 1 牙鲈 TLR21 基因和 β -actin 基因实时定量表达引物及序列

Tab.1 Sequences of the primers of TLR21 and β -actin used for qPCR analysis

引物名称	序列(5'—3')
TLR21-F	TAAACTTTGCCTACATCACA
TLR21-R	AACACGAGCAGAAGAACAT
β -actin F	AGGTTCCGTTGTCCCG
β -actin R	TGGTTCCTCCAGATAGCAC

1.3 迟缓爱德华氏菌的培养

将 *E. tarda* 在无菌环境中接种于 pH 为 7 的 Luriai-Bertani 培养基中, 恒温培养, 6000g 离心 2 min

收集菌体, 用无菌 PBS 缓冲液(NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g, KH₂PO₄ 0.24g)洗涤一遍, 再次离心后重置于无菌 PBS 缓冲液中, 调整浓度为 10⁷ CFU/mL 浓度。

1.4 迟缓爱德华氏菌的感染

将 48 尾鱼分成两组, 第一组 24 尾鱼, 注射 *E. tarda*, 注射剂量为 100 μ L, 1×10⁷ CFU/mL。相应的, 另一组 24 尾鱼, 每尾注射 PBS 100 μ L。在感染后 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、6 d, 随机取各组鱼 3 尾解剖, 将各组织储存于冻存管中。除血组织外其余组织均立刻投入液氮中, 放置于-80°C 冰箱中保存。血组织置于冰中, 待后续操作。以上步骤都在无菌条件下操作。

1.5 RNA 的提取

取出在液氮中保存的除血以外的其它各组织, 进行如下操作: 将 50—100 mg 组织立即放入玻璃匀浆器中, 加 1 mL Trizol, 研磨彻底, 4°C、12000 r/min, 离心 10 min。取上部液体, 加 200 μ L 氯仿, 离心 15 min。取上部液体, 加异丙醇颠倒混合, 放置于冰中, 静置 10 min, 4°C、12000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加 1 mL 75%乙醇洗涤。4°C、7500 r/min 离心 5 min, 只保留沉淀倒置空干 5 min, 加入 20 μ L 无 RNA 的无酶水溶解。取血组织 200 μ L, 4°C、9000 r/min 离心 5 min。弃上清, 将沉淀转入匀浆器中, 加 1 mL Trizol, 置于冰中彻底研磨。其后操作步骤同上述操作。对提取的 RNA 进行电泳检测。将提取的 RNA 保存于-80°C 超低温冰箱中备用。

1.6 cDNA 第一链的合成

使用 Sangon Biotech®公司的 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒, 以 Random Primer p(dN)6 为反转录引物, 合成 cDNA 第一链。步骤如下: RNA 2 μ g, 随机六合引物(0.2 μ g/ μ L) 1 μ L, RNase free ddH₂O 定容至 12 μ L, 轻轻混匀后离心 3—5 s, 反应混合物在 65°C 温浴 5 min 后, 冰浴 30 s, 然后离心 3—5 s。试管冰浴, 加入如下组分: 5×Reaction Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (20 U/ μ L) 1 μ L, dNTP Mix (10 mmol/l) 2 μ L, M-MuLV RT(200 U/ μ L) 1 μ L。混匀后离心 3—5 s。25°C 保温 10 min; 42°C 保温 60 min; 70°C 保温 10 min 后迅速放到冰上冷却。扩增体系总体积为 20 μ L。

1.7 TLR21 基因表达定量分析

以反转组织的 cDNA 为模板, 通过 ABI 7500 荧光 PCR 仪收集组织的 TLR21 基因表达水平的数据, 按照 Promega®公司的 GoTaq®qPCR Master Mix 推荐

的方法配制 qPCR 反应体系: 反应体系为 24 μL , GoTaq[®] qPCR Master Mix 2 \times 10 μL , Nuclease-Free Water 9.2 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 4 μL 稀释后的 cDNA 模版。qRT-PCR 的步骤按照 Promega[®] 公司 GoTaq[®] qPCR Master Mix 推荐的二步法进行操作, 退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。同一反应重复三遍, 并判断 qPCR 反应特异性。相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法。用 Origin 8 软件作图。

2 结果

TLR21 广泛表达在健康牙鲆体内, 尤其是在脾和鳃中。刺激 *E. tarda* 后, 最早出现 TLR21 表达高峰是在头肾组织中(1 h, 13.5 倍, $P<0.05$), TLR21 表达量最高是在脾组织中(6 h, 59.3 倍, $P<0.05$), 其次是在肠组织中(6 h, 15.1 倍, $P<0.05$)。刺激 6 h 后, TLR21 的表达水平达到各组织的高峰, 高峰过后 TLR21 表达量回落到 0 h 参照量之下。在刺激后 3 d、6 d 各组织中 TLR21 的表达量趋于稳定, 与对照组表达量相持平。在刺激 *E. tarda* 后各组织中随着时间的变化 TLR21 表达量各有变化(具体趋势见图 1—图 8)。

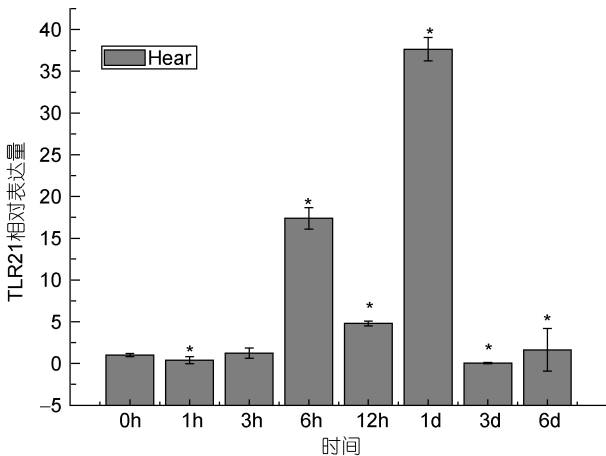


图 1 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在心脏中的表达量变化
Fig.1 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in heart after infection by *E. tarda*

E. tarda 刺激后 TLR21 在牙鲆各组织中的表达量变化结果见图 9。TLR21 基因在受 *E. tarda* 刺激后, 在牙鲆心脏中 12 h 达到最高值, 其它组织在 6 h 时至最高峰, 脾脏、小肠、心脏、头肾在注射 *E. tarda* 后 TLR21 表达变化趋势明显(图 9)。

图 9 中 0 h 组织的表达量只是作为参照量 1, 便于表明随着时间推移各组织中 TLR21 表达量的倍比关系。针对 0 h 时间点 TLR21 的表达量对比见图 10。

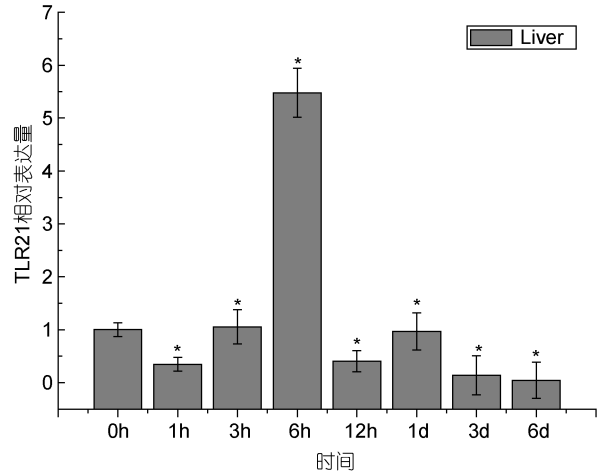


图 2 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在肝脏中的表达量变化
Fig.2 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in liver after infection by *E. tarda*

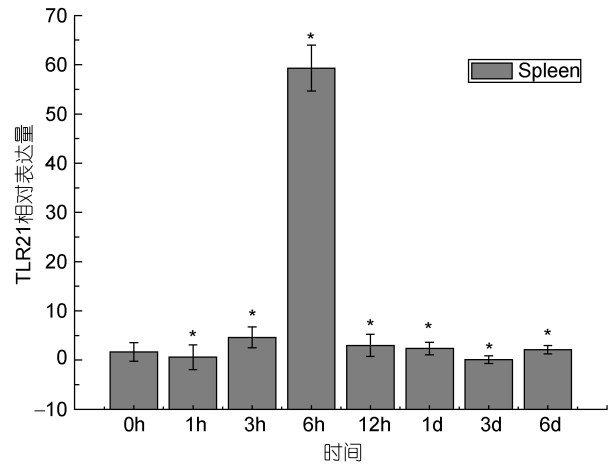


图 3 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在脾脏中的表达量变化
Fig.3 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in spleen after infection by *E. tarda*

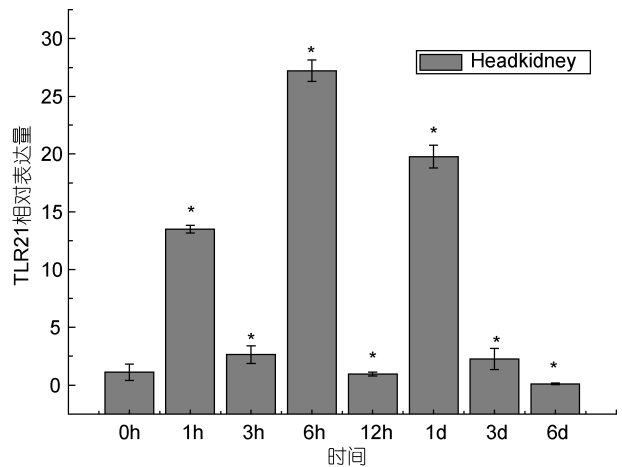


图 4 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在头肾中的表达量变化
Fig.4 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in head kidney after infection by *E. tarda*

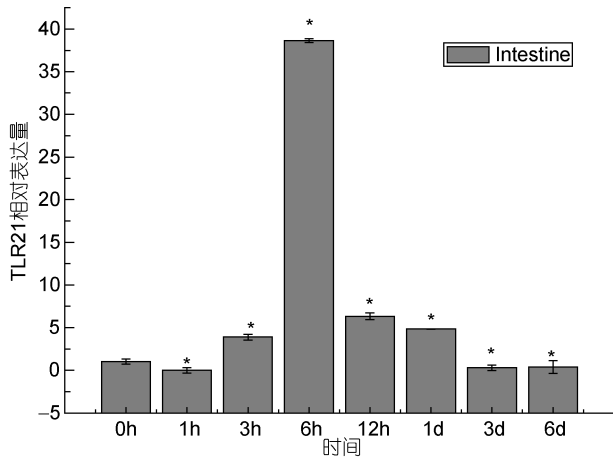


图5 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在小肠中的表达量变化
Fig.5 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in intestine after infection by *E. tarda*

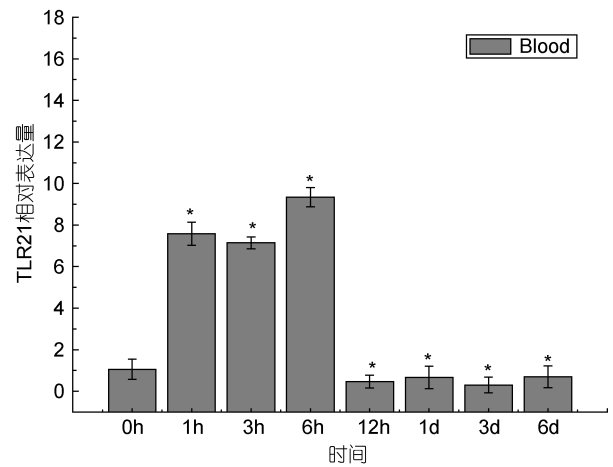


图8 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在血中的表达量变化
Fig.8 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in blood after infection by *E. tarda*

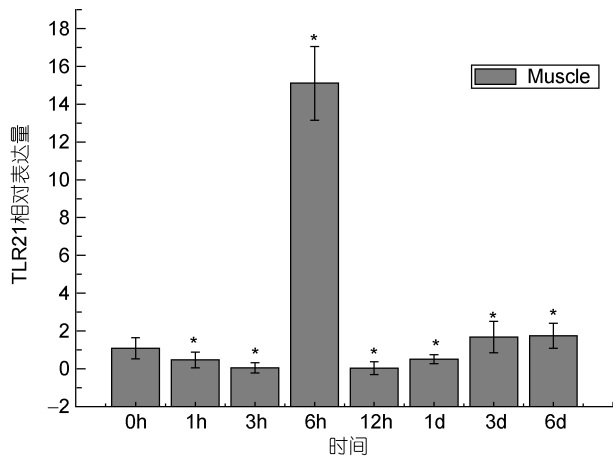


图6 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在肌肉中的表达量变化
Fig.6 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in muscle after infection by *E. tarda*

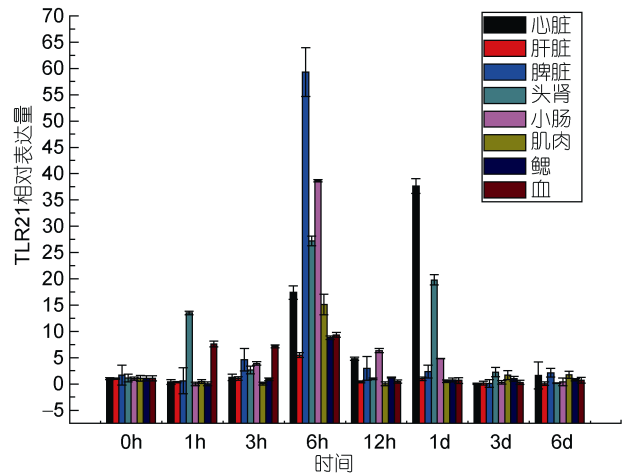


图9 受 *E. tarda* 刺激后 TLR21 在牙鲈各组织中的表达量变化
Fig.9 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in various tissue after infection by *E. tarda* in different time duration

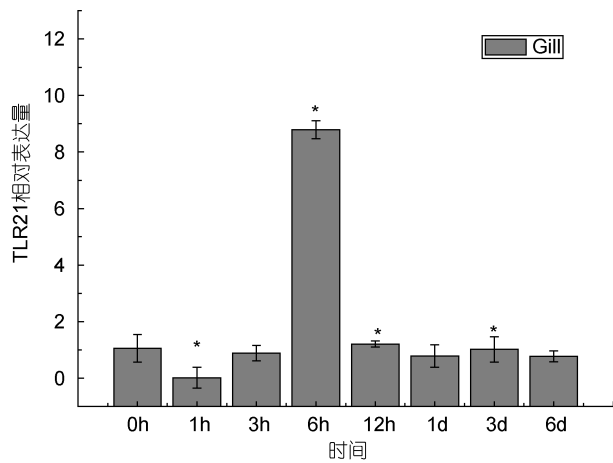


图7 TLR21 在受 *E. tarda* 刺激后在鳃中的表达量变化
Fig.7 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in gill after infection by *E. tarda*

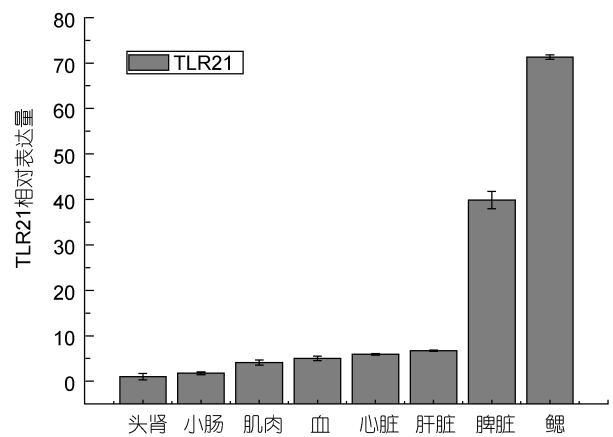


图10 TLR21 在牙鲈健康组织中的相对表达量
Fig.10 The relative expression of *P. olivaceus* TLR21 in various tissue

在0 h, TLR21较高的表达在鳃、脾中, 在头肾中最少。TLR21广泛的分布在牙鲮体内。

3 讨论

目前, 已经克隆出和鉴定出了很多与牙鲮免疫相关的基因, 测定了这些基因在牙鲮不同组织中的表达情况, 并对健康牙鲮进行病原感染的刺激试验, 研究这些免疫相关基因的表达变化模式并了解其在牙鲮先天免疫中的作用。TLR21是重要的免疫相关基因, 在牙鲮体内是否响应 *E. tarda* 的病原刺激及表达变化情况, 目前没有相关研究报告。本研究就牙鲮体内各组织是否都进行 TLR21 的表达及腹腔注射 *E. tarda* 后各组织 TLR21 表达量变化等问题进行试验, 目的是为了获取刺激 *E. tarda* 后 TLR21 基因的表达变化模式。

TLR21广泛存在于鱼体内, 如河豚(Oshiumi *et al.*, 2003)、鲶鱼(Baoprasertkul *et al.*, 2007)和石斑鱼(Li *et al.*, 2012)组织中, 当鲶鱼通过腹腔注射感染 *E. tarda* 后, TLR21 的转录水平在感染后 6 h 有明显增长(Baoprasertkul *et al.*, 2007), 在本试验中也呈现出刺激病原体后 6 h 达到表达高峰的趋势。鲶鱼中检测出 TLR21 主要分布在脾、小肠、胃、肝、中肾、卵巢、脑和鳃中(Baoprasertkul *et al.*, 2007), 较少表达在头肾和皮肤中, TLR21 不存在于肌肉中。石斑鱼 TLR21 较高的表达在中肾、头肾、脾、心脏、鳃、肝和胸腺中, 较少表达在皮肤和后脑, TLR21 不存在于肌肉中(Li *et al.*, 2012)。斑马鱼 TLR21 较高表达在脾、鳃、头肾, 较少表达在肝、内脏和皮肤(Sundaram *et al.*, 2012)。这些结果都表明 TLR21 广泛的分布于硬骨鱼多种健康的组织中, TLR21 表达量较高的组织集中在脾、鳃。TLR21 基因在不同部位中表达量不同, 也许是鱼种差异造成的结果。

头肾在刺激 *E. Tarda* 1 h 后, 其表达量比其它组织中的表达量较早达到了第一个小高峰, 可以看出头肾在刺激 *E. tarda* 后, 免疫响应较迅捷。头肾在解剖形态上显示为深红色, 紧贴脊椎, 富含淋巴细胞和吞噬细胞等与免疫相关的细胞, 是免疫细胞的发源地(李敏等, 2012), 在免疫反应方面具有特殊作用, 在致病性病原体入侵后, 头肾参与机体免疫过程, 尤其是参与早期免疫过程。

鱼类生存在富含多种微生物(包括致病微生物)的水中, 鱼类黏膜系统作为鱼类与外界水环境直接接触的界限, 是第一道屏障(王俊相, 2010)。本试验通

过腹腔注射 *E. tarda* 的方式对机体进行刺激, 肠道直接浸浴在病菌环境中, 刺激后 6 h 肠内 TLR21 基因的表达量为对照组的 15.1 倍, 在被试组织中仅次于脾组织。有研究表明, 包含肠黏膜在内的鱼类黏膜系统可能相对于包含传统免疫器官如头肾、脾等的系统免疫系统在免疫过程中具有一定的独立性(唐海蓉, 2006)。也有研究表明, 鱼类血清中的免疫物质与黏膜系统中的免疫物质不同, 而血清中的免疫物质是由系统免疫系统产生而转运到血清中的, 因此从另一个角度证明了黏膜系统在免疫过程中具有一定的自主性(巩华, 2006)。本实验中 TLR21 基因在肠中的表达量较高, 也许就是因为肠黏膜在免疫中有一定的自主性, 且较早的直接接触病原微生物, 与小肠直接参与抗病原体感染有关系。

在刺激 *E. Tarda* 6 h 后, TLR21 表达量达到高峰后迅速降低, 推测是一种免疫系统的自我保护与自我调整。TLR21 激活的免疫应答反应可以很强烈, 对于病原体入侵导致的机体发炎感染等情况有很强的打击作用, 如果这种强烈的免疫反应保持的时间过长, 则有可能对机体带来负面影响造成负担, 如产生内毒素休克(王海坤等, 2006)。因此在过强的免疫反应发生后, 机体进行自我保护与自我调整, 会降低 TLR21 在组织中的表达量。

作为一种低等的脊椎动物, 鱼类有更丰富的 TLRs, 这些 TLRs 被证实可以识别同样的 PAMP, 如河豚鱼 TLR3、TLR22 能辨别双链核糖核酸(Matsuo *et al.*, 2008), 虹鳟鱼 TLR5 和 TLR5s 能辨别细菌的鞭毛蛋白(Tsujita *et al.*, 2004), 在青蛙和硬骨鱼中能检测到 TLR21, 也能检测到 TLR9 (Oshiumi *et al.*, 2003; Meijer *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 2009)。鸡 TLR21 基因功能与哺乳类 TLR9 基因相似, 可作为 CpG ODN 的识别受体(Keestra *et al.*, 2010), 牙鲮 TLR21 的功能是否也是如此, 有待于今后进一步证实。

参 考 文 献

- 王卫卫, 吴谔琦, 孙修勤等, 2010. 硬骨鱼免疫系统的组成与免疫应答机制研究进展. 海洋科学进展, 28(2): 257—265
- 王俊相, 李玉萍, 孔令富等, 2010. 鱼类免疫系统的研究进展. 四川畜牧兽医, 37(7): 29—31
- 王海坤, 韩代书, 2006. Toll 样受体(TLRs)的信号转导与免疫调节. 生物化学与生物物理进展, 33(9): 820—827
- 王德成, 余敏, 余锐萍等, 2008. Toll 样受体研究进展. 动物医学进展, 29(2): 56—60
- 巩华, 吴淑勤, 潘厚军, 2006. 硬骨鱼类黏膜免疫机理研究

- 概况. 动物医学进展, 27(6): 24—28
- 李 敏, 李 琪, 王启龙等, 2012. 斑点叉尾鲷 TLR5 和 TLR5s 基因在不同病原诱导下的表达特征. 渔业科学进展, 33(5): 30—38
- 吴 恋, 孙金生, 耿绪云等, 2013. 牙鲈 Toll 样受体 1 基因全长 cDNA 的克隆及特征分析. 安徽农业科学, 40(26): 12754—12760
- 范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾, 2015. 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展. 水生生物学报, 39(1): 173—184
- 袁春营, 宫春光, 陈福杰等, 2006. 牙鲈腹水病药物筛选及防治措施探讨. 水利渔业, 2(3): 102—103
- 唐海蓉, 陈仕均, 王选年, 2006. 鱼类免疫组织的研究进展. 现代畜牧兽医, (9): 52—54
- 崔青曼, 袁春营, 张青田等, 2008. 牙鲈腹水病病原及免疫学防治效果初步研究. 水利渔业, 28(2): 98—99
- 路 飏, 王启龙, 李 敏等, 2013. 斑点叉尾鲷 TLR20 和 TLR21 基因在不同细菌和病毒感染后的表达特征. 渔业科学进展, 34(6): 44—51
- Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E *et al*, 2007. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. Fish&Shellfish Immunology, 23(6): 1218—1230
- Gao H, Wu L, Sun J S *et al*, 2013. Molecular characterization and expression analysis of Toll-like receptor 21 cDNA from *Paralichthys olivaceus*. Fish & Shellfish Immunology, 35(4): 1138—1145
- Ishii A, Kawasaki M, Matsumoto M *et al*, 2009. Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* Toll-like receptors. Immunogenetics, 59(4): 281—293
- Keestra A M, de Zoete M R, Bouwman L I *et al*, 2010. Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. The Journal of Immunology, 185(1): 460—467
- Kasamatsu J, Oshiumi H, Matsumoto M *et al*, 2010. Phylogenetic and expression analysis of lamprey toll-like receptors. Developmental & Comparative Immunology, 34(8): 855—865
- Li Y W, Luo X C, Dan X M *et al*, 2012. Molecular cloning of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR21 and expression analysis post *Cryptocaryon irritans* infection. Fish & Shellfish Immunology, 32(3): 476—481
- Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T *et al*, 2008. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. The Journal of Immunology, 181(5): 3474—3485
- Meijer A H, Gabby Krens S F, Medina Rodriguez I A *et al*, 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. Molecular Immunology, 40(11): 773—783
- Oshiumi H, Tsujita T, Shida K *et al*, 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. Immunogenetics, 54(11): 791—780
- Priyathilaka T T, Elvitigala D A S, Whang I *et al*, 2014. Molecular characterization and transcriptional analysis of non-mammalian type Toll like receptor (TLR21) from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). Gene, 553(2): 105—116
- Sundaram A Y M, Consuegra S, Kiron V *et al*, 2012. Positive selection pressure within teleost toll-like receptors *tlr21* and *tlr22* subfamilies and their response to temperature stress and microbial components in zebrafish. Molecular Biology Reports, 39(9): 8965—8975
- Tsujita T, Tsukada H, Nakao M *et al*, 2004. Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). The Journal of Biological Chemistry, 279: 48588—48597
- Wang W J, Shen Y B, Pandit N P *et al*, 2013. Molecular cloning, characterization and immunological response analysis of Toll-like receptor 21 (TLR21) gene in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Developmental & Comparative Immunology, 40(3—4): 227—231
- Yeh D W, Liu Y L, Lo Y C *et al*, 2013. Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 110(51): 20711—20716

EXPRESSION OF TLR21 GENE IN *PARALICHTHYS OLIVACEUS* CHALLENGED BY *EDWARDSIELLA TARDA*

ZHANG Jie¹, ZHENG Jin-Hui¹, LI Qing-Ya¹, GENG Xu-Yun², SUN Jin-Sheng^{1,2},
PAN Bao-Ping¹, SUN Shi-Nan¹, GAO Hong¹

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;
2. Tianjin Aquaculture Disease Prevention & Treatment Center, Tianjin 300221, China)

Abstract Expression patterns of *Paralichthys olivaceus* TLR21 gene in the heart, liver, spleen, head kidney, grill, intestine, muscle, and blood were characterized in quantitative real-time PCR at 0h, 1h, 3h, 6h, 12h, 1d, 3d and 6d after infection by *Edwardsiella tarda*. The results show that *E. tarda* induced TLR21 that regulates the relative expression levels in *P. olivaceus* tissues, and the expression changes were tissue specific. The expression was up-regulated in all the tissues and increased by 59.3-fold and 38.6-fold in spleen and intestine respectively in 6 h after challenge. Therefore, TLR21 gene in *P. olivaceus* is vital for the physiological function of the fish. This finding offers a theoretical reference for understanding the mechanism of disease defense in the fish, with which more effective vaccines and immune therapies may be developed.

Key words TLR21; *Paralichthys olivaceus*; *Edwardsiella tarda*; expression; real-time PCR