

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181129001

http://www.yykxjz.cn/

侯吉伦, 郭亚男, 付元帅, 王桂兴, 张晓彦, 孙朝徽, 司飞, 王玉芬. 牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 57-68

Hou JL, Guo YN, Fu YS, Wang GX, Zhang XY, Sun ZH, Si F, Wang YF. Cloning and expression analysis of *efhd2* and *tbc1d25* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 57-68

牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析*

侯吉伦¹ 郭亚男² 付元帅² 王桂兴¹
张晓彦¹ 孙朝徽¹ 司飞¹ 王玉芬¹①

(1. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为在分子水平解析牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)抗淋巴囊肿病的机理,本研究克隆牙鲆淋巴囊肿抗病免疫相关基因 *efhd2* 和 *tbc1d25* 的 cDNA 全序列,运用生物信息学方法对基因序列进行了详细分析;同时,采用荧光定量 PCR 分析了 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在牙鲆胚胎发育不同阶段、淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织的表达特征。结果显示, *efhd2* 基因 cDNA 全长为 5231 bp, 开放阅读框(ORF)长为 699 bp, 编码 232 个氨基酸。*tbc1d25* 基因 cDNA 全长为 3173 bp, ORF 长为 2601 bp, 编码 866 个氨基酸。定量结果显示, *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在胚胎发育的各个时期均有不同程度的表达,其中, *efhd2* 在出膜仔鱼期表达量最高,而 *tbc1d25* 在受精卵中的表达量显著高于其他时期($P<0.05$)。在所研究的淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织中, *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因均有不同程度的表达,抗病个体的血液中,这 2 个基因的表达量均显著高于患病个体($P<0.05$)。本研究结果为深入探讨 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因功能和解析牙鲆淋巴囊肿抗病机理提供了基础资料。

关键词 淋巴囊肿; 抗病机理; 血液; 胚胎发育

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0057-12

水产品是人类优质动物蛋白的重要来源。我国是世界上最大的水产动物养殖国,产量已连续多年位居世界首位。在多年的高速发展过程中,制约养殖产业健康可持续发展的不利因素逐渐显现出来,对水产养殖业的产量和效益造成严重影响。在众多传染性病害中,病毒性疾病所造成的影响尤为严重。隶属于虹彩病毒科(Iridoviridae)的淋巴囊肿病毒为重要病原之一,该病毒粒子正面观为六角形的正二十面体构造,因所依赖的宿主细胞不同,病毒粒子大小有差异,直径介于 130~350 nm 之间,由核心体、中间脂质层和

衣壳三部分组成(Paperna *et al*, 2001; Anders, 1989)。目前,淋巴囊肿病毒呈世界性分布,造成 9 目 42 科 125 种以上鱼类感染此病,其中,海水鱼占 30 科(Wolf, 1988)。病鱼在身体躯干、口等部位可见不同形状的囊肿物,虽致死率不高,但使患病鱼失去商品价值(侯吉伦等, 2017)。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为底栖冷水性鱼类,具有生长迅速、肉质鲜美、营养价值高、适宜集约化工厂养殖等特点,已成为我国北方的主要海水鱼类增养殖品种之一(司飞等, 2017)。1997 年,我国养殖的

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD0202)和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0202), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 侯吉伦, E-mail: jilunhou@126.com

① 通讯作者: 王玉芬, 高级工程师, E-mail: wangyf-8000@163.com

收稿日期: 2018-11-29, 收修改稿日期: 2018-12-24

牙鲆首次出现淋巴囊肿病,并逐渐成为危害牙鲆养殖业的重要疾病之一。针对牙鲆淋巴囊肿病,国内外学者开展了大量的研究,并取得了相应的研究进展(Fuji *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015、2018)。为了在我国选育牙鲆抗淋巴囊肿新品种以及在分子层面解析抗病机理,作者在前期利用高通量测序技术对淋巴囊肿抗病和患病牙鲆头肾组织进行了转录组分析,筛选获得了包括 *efhd2* 和 *tbc1d25* 在内的一批和抗病性紧密相关的功能基因。

EF-hand 蛋白结构域 D2(EF-hand domain-containing protein D2, EFHD2), 又称为 Swiprosin-1, 是一个高度保守的钙结合蛋白,属于 EF-hand 结构域家族,位于细胞膜脂肪微区域(Vuadens *et al.*, 2004)。EFHD2 在其 C-端有 1 个保守的卷曲螺旋结构域,为蛋白质-蛋白质相互作用所必需的;在 N-末端,则具有独特的多聚丙氨酸基序(大小为 6~9 个丙氨酸)。EFHD2 广泛表达于包括 B 细胞、CD4+/CD8+T 细胞、自然杀伤细胞和外周血单个核细胞等各类细胞,在免疫调控起到重要的调控作用(Vega, 2016)。EFHD2 可通过调节适应性和先天性免疫受体信号的关键因子 Src 激酶的活性而参与免疫细胞活化(Kroczek *et al.*, 2010);调节未成熟 B 细胞的寿命和 BCR 信号阈值;同时,作为 NF-kappa-B 信号通路的负调节因子,通过 *bcl2l1* 丰度的调节实现自发性凋亡的调控(Avramidou *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013)。

TBC1D25(TBC1 domain family member 25), 又称为 OATL1, 属于 TBC 家族,含有一段长约 200 个氨基酸的保守 TBC(Rab-GAP)结构域。TBC 结构域蛋白通过特异性识别 Rab 小 GTP 酶参与到细胞信号传导、肿瘤形成及细胞内其他的活动(Fukuda, 2011)。TBC1D25 被鉴定为一种新的 Atg8 同源结合蛋白,通过与 Atg8 同系物直接相互作用被招募至自噬体(Itoh *et al.*, 2011)。同时,作为 Rab33B(一种结合 Atg16L1 的 Rab 蛋白)的 GTP 酶激活蛋白过表达促进 GTP 酶 RAB33B 从 GTP 结合蛋白向 GDP 结合蛋白的平衡,进而调节自噬体和溶酶体之间的融合来延迟自噬体的成熟,从而实现抑制自噬的作用(Itoh *et al.*, 2017; Corona *et al.*, 2018)。

鉴于 *efhd2* 和 *tbc1d25* 在免疫调控中的重要作用,本研究首先利用 RACE 法(Rapid-amplification of cDNA ends)克隆了牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 的 cDNA 全序列,并对序列特征进行了生物信息学分析,同时,通过荧光定量 PCR 技术,研究了它们在牙鲆淋巴囊肿抗病和患病个体各组织、胚胎发育不同阶段的表达

特征,以期阐明 *efhd2* 和 *tbc1d25* 在牙鲆抗淋巴囊肿病中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆淋巴囊肿抗病和患病个体取自中国水产科学研究院北戴河中心实验站昌黎养殖基地,体重为(235.65±73.18)g,全长为(30.49±3.17)cm。选取体表无淋巴囊肿瘤状物的 3 尾抗病牙鲆和有淋巴囊肿瘤状物的 3 尾患病牙鲆(侯吉伦等, 2017),分别取全血、鳃、肝脏、头肾、肠、性腺、肌肉、心脏和脾脏等置于液氮中速冻,48 h 后置于-80℃保存备用。实验所用牙鲆不同发育时期胚胎的按照刘海金等(2008)的方法进行制备,受精卵在(16.0±0.5)℃的海水中孵化,采集受精卵(受精后 0 h,下同)、4 细胞(2 h)、32 细胞(4 h)、128 细胞(5 h)、高囊胚(6 h)、低囊胚(11 h)、原肠早期(15 h)、原肠晚期(27 h)、肌节期(32 h)、心跳期(55 h)和出膜仔鱼(62 h)样品,于液氮中速冻,48 h 后置于-80℃保存备用。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法对本研究所需各样本的总 RNA 进行提取,琼脂糖凝胶电泳检测所提取总 RNA 质量,微量紫外分光光度计(Pultton P100+)测定 RNA 浓度。经检测合格后的 RNA,用 cDNA 试剂盒(Thermo K1621)反转录获得 cDNA 模板。

1.3 基因全长序列的克隆

根据牙鲆全基因组(Shao *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017)和 GenBank 数据库中登记的牙鲆 *efhd2*(XM_020089176.1)和 *tbc1d25*(XM_020089412.1)基因序列,利用 Primer Premier 6.0 设计引物(*efhd2*-F/*efhd2*-R, *tbc1d25*-F/*tbc1d25*-R, 表 1),以头肾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,验证核心片段的准确性。PCR 反应体系:上下游引物各 0.6 μl,模板 cDNA 1 μl,PCR Mix 7.5 μl,加 ddH₂O 至 15 μl。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,为 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、回收纯化,克隆至 pMD18-T 载体,转化至 Top10 感受态细胞,取 3 个阳性克隆进行测序。

在此基础上,利用 Primer Premier 6.0 分别设计 5' 和 3' 端的接头引物和特异性引物(表 1),并采用 RACE 法,以牙鲆淋巴囊肿抗病个体头肾 RNA 为模板,进行降落 PCR 和巢式 PCR。PCR 产物经纯化、克隆、测序等步骤,获得 5' 和 3' 端序列。利用 SnapGene

4.1 软件, 对所获得的 5'和 3'RACE 序列以及中间片段进行拼接, 获得 *efhd2* 和 *tbc1d25* 的 cDNA 全长序列。

1.4 基因的生物信息学分析

氨基酸序列用 ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) 进行分析; 蛋白质结构预测使用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>); 信号肽使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行寻找; 用 TMHMM server v.2.0 分析氨基酸跨膜区(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); 采用 ClustalX2 对氨基酸序列进行多重比对。使用 MEGA10.0 软件的 Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树(Bootstrap=1000)。

1.5 荧光定量 PCR

根据牙鲈 *efhd2*、*tbc1d25* 和 β -actin(内参基因)基因序列, 分别设计目的基因和内参的引物(表 1), 并以淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织以及胚胎发育

不同时期的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 检测。定量检测采用 Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI, 美国)试剂盒在 ABI 7900 PCR 仪上开展。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析(马慧鑫等, 2018)。所有样品均设置 3 个平行, 结果以平均值 \pm 标准误差(Mean \pm SE)表示, 并利用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA) ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 牙鲈 *efhd2* 与 *tbc1d25* 基因序列分析

本研究克隆到的牙鲈 *efhd2* 基因 cDNA 全长 5231 bp, 其中, 5'非翻译区(Untranslated region, 5'UTR)长度 142 bp, 3'UTR 长度 4390 bp。ORF 长度 699 bp, 编码 232 个氨基酸, 预测分子量为 26.4 kDa, 等电点约为 5.08。牙鲈 *efhd2* 基因所编码的蛋白在第 89~117 以 125~153 位氨基酸具有 2 个典型的 EF-hand 结构域(图 1)。

表 1 牙鲈 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因序列扩增和定量 PCR 引物信息

Tab.1 Primers information for cloning and Q-PCR of *efhd2* and *tbc1d25* in *Paralichthys olivaceus*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	功能 Application
<i>efhd2</i> -F	GCCGACGGCTTCAGATAGAA	<i>efhd2</i> 中间片段验证
<i>efhd2</i> -R	GGAGCACCAAGCTTCTCCAT	
<i>tbc1d25</i> -F	GTGTCGAGATAGGAGCGGTG	<i>tbc1d25</i> 中间片段验证
<i>tbc1d25</i> -R	AGGCTTGATCTCCTCCCAT	
<i>efhd2</i> -5'RACE-F1	TGAAGCTGAGTTTGTGTCCAG	<i>efhd2</i> 基因 5'RACE
<i>efhd2</i> -5'RACE-F2	CTTCTCCATGTCCTTGATCTGC	
<i>efhd2</i> -3'RACE-F1	GCTGTTGGCAGTATTTAATGTTGAT	<i>efhd2</i> 基因 3'RACE
<i>efhd2</i> -3'RACE-F2	CTGTTGTTACACATCCCATCCTTC	
<i>tbc1d25</i> -5'RACE-F1	CAGCACCGCTCCTATCTCGACAC	<i>tbc1d25</i> 基因 5'RACE
<i>tbc1d25</i> -5'RACE-F2	GCTCTGATGAGAATGTGCTGC	
<i>tbc1d25</i> -3'RACE-F1	ACTGGTCTCTGTCTCTGATGTTGTG	<i>tbc1d25</i> 基因 3'RACE
<i>tbc1d25</i> -3'RACE-F2	GAGCAAGCCGGGTGAAAAGTATG	
<i>efhd2</i> -RTF	GTCAACTGTGAAGTGTGCTGAATAAG	<i>efhd2</i> 基因荧光定量 PCR
<i>efhd2</i> -RTR	AAAGCCAACGTGATAATGTGTTACA	
<i>tbc1d25</i> -RTF	GACTGGGACATCATAAGCCCTAAA	<i>tbc1d25</i> 基因荧光定量 PCR
<i>tbc1d25</i> -RTR	TGCCAGAGACCTCGTCTTT	
β -actin-F	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	β -actin 荧光定量 PCR
β -actin-R	GCCCATCTCTGCTCGAA	

tbc1d25 基因全长为 3173 bp, 其中, 5'UTR 长度为 108 bp, 3'UTR 长度为 464 bp。ORF 长度为 2601 bp, 编码 866 个氨基酸, 预测分子量为 96.4 kDa, 等电点约为 5.47。TBC1D25 蛋白在 199~431 位氨基酸为典型的 TBC 结构域(图 2)。

SignalP 分析未发现 EFHD2 和 TBC1D25 蛋白具有信号肽。TMHMM 分析显示, 这 2 个蛋白均无跨膜区。采用 ExPASy 网站(<http://web.expasy.org/>)的

GOR4 工具预测 EFHD2 与 TBC1D25 蛋白质的二级结构。EFHD2 蛋白的 α -螺旋(Alpha helix, Hh)包含 150 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 64.38%; 延伸链(Extended strand, Ee)包含 10 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 4.29%; 无规卷曲(Random coil, Cc)包含 73 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 31.33%。在 TBC1D25 蛋白中, α -螺旋包含 274 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 31.60%; 延伸链包含 109 个氨

```

gttgatccccgagcgcagcagaacacacgcaccgtccgcgagcagcgcacattttctcaaacaccattttaagctattagagagaccgccgtctctcgcct
ctgtagtcactgagccactcccgtgtttcgaaaATGACCACGGACGAGCTGTCGTGAAAGCTCAGCCGACGGCTTCAGATAGAAGAGGGGGCCGAGGACCTGTGGCC
M A T D E L S S K L S R R L Q I E E G A E D P V A
CTGGACCCGCCCCGACACAGAACGGCTCCAAGGAGAAGCCGAGCACCGCAACGCGGACTCGGAGCTGGGCGCCAAATGTCCCGAGAGGAGAGCTGAACGAGGGG
L D P P G H Q N G S K E K P S T A N A D S E L G A K L S R R G E L N E G
CAGGGGGAGCACTGTGAGCCAGCATGAAGGTGTTCAACCCCTACACCGAGTTCAAGGAGTTCCTCCGAAAGCAGATCAAGGACATGGAGAAGATGTTCAAATGTAT
Q G E H C Q P S M K V F N P Y T E F K E F S R K Q I K D M E K M F K M Y
GATGTGGGAAAGACAACCTACATTGACCTAATGGAGCTGAAGTTGATGATGGAGAAGCTTGGTGTCCCGACACACATTGGCTTAAAGAATATGATAAAGGAAGTG
D A G K T G D N Y I D L M E L K L M M E K L G A C A P Q T H I G L K N M I K E V
GATGAGGACCTGGACAACAACTCAGCTTCAGAGAGTTCCTGCTGATCTTTAGGAAGGAGCAGCAGGAGAGCTGTGAGAGGACGCGGCTCAGTGCACCTTGTCTGC
D E D L D N K L S F R E F L L I F R K A A A G E L S E D S G L S D L A R
CTCTTGAAATCGATGTCTCTCAGAGGGGTCAAAGGAGCCAAAGCCTTCTTTGAAAGCTAAAGTCCAGGCCATCAATGAGTCCAGCCGGTTTGAGGACAGAGTCCGC
L S E I D V S A E G V K G A K T F F E A K V Q A I N E S S R F E A E I R
CAGGAGCAGGAGGAGAAGAAGCAGGCTGATGAGCAGAAACAAAGACGAGAGGCTTCAAAGAACCTACAGTGCAGCTTCAAGTGAacccttctctcatctcagg
Q E Q E E K K K Q A D E Q K Q R R E A F K E L Q S A F K *
acctttcactctgtgctgactaacgtcaatgagtggttttgaatgccccatgtatgtcagacagtggttagtctgagtcagctcaaaatcccatatattgtttatcaa
tagtcaaatccaatggactaggtacacgttgaataatcaccactgtctatgcttatgaggttaatagatcaatgattcatctgtatatttagccttctagctcggtc
acaccttccaatacttataaaagttagtgacgtatagcaggattgtcagtagagtagtctttgctgatcctaatgaatggttctcacagtatcttctcattgggca
tagcgtctgcaatccaagaatctattttaccctaatatctactgtggctcactgtgctggcactgtggggctgctgaccagaggggctcagcaaaacaatgat
tactttccagagtagaaaaatctggctcatagagtcataaacacgtgtgacgtgtgtggcatttaacaacctcaactgttgcataaatcagcctgttctagtt
tgacagctctccctgtacctgaaacgacacacacacacactccagtagctgtgtttggacagatggctcttagatgaatcctaaactgtagttgaaa
tgactcagtgactcgttccctagtttgcataagactggtaatgacacttattgactgtcttgactacagtggttagcttgccttaactatattgattgacttta
ctcattaaagaattcactactaaatccacagtgacactttgagtcctataatcagcttgcacaattagtgccacatgtgaacaaatagctgagctctgaagtcca
gtgtcagctctgtattttgtacaatcggttgggtggttattgactagattttgtgtgtgggttggaggagtgtagttggtgatggacattcttgagcatcaagat
ttgatgaaacctgggaagtacagacagcctataatacaattatgtttctggctcctcctagttttggctattgtctcttcagcttctgattttattc
accaacttcattgtgacatcaggggatgtattgactcggagtagtgcttaattggagttcactccaaccacatgagccatcagataatttcaattcaattgtt
atctgagagtcacagtgtagataccaatattgtctcattacctttagttgtcatttctctgatcgatagttgagtggtttggacttgtgcaccacagcaaaaa
tgaaagtcaataagcgttttccgacatgaccttctgagcgtatctggagaagtgggctggactttctcctcagtttgccgtttacacatgaatgacacaacagga
gattctcactcagacaccttcttgagggtggtgcataagaggcagggtgtaatgtctggagatcacatgtttctgtttacagtacatcaactccggcatcggca
cttattcgcaaaagctccttgacatctttgtgtcttttactgtatggctctgcctttacatccttagatgtccgttttcattttacacactcactgtcagtgaa
tctgtgtggatcctctgtgtgtctcactcggctcattcagactgtctgcagactaatgtcaggggaacggccatggaagtctacacgaagtccggaggctt
tcaatcgtttgcttcacacatactctctggaaaatgtctggaggatctcaatctcctgagttgagtaaaatgtttccataactgaaaggaatttccaactttgcg
aataaggccaggcttttttctgaaaactgttctactgtatgtatgtctcacctgatgaacctggagggttaacacacaatcacatgtgccattatagcag
ttagtctagtgccacttacactgtttacattttcattgtaaaatcataactaatgtgaaatcctcgatcatcagttgaaaccagccttttccaatcagccccattc
ctgccccttactctgtgagatcctgtgtattttctgtatccaggtaaatcattttaacaaagtggcattttgacttacttgatcatttgatgtaagtgtctt
tatcaagaaattttgattaaacttgatgtaaatgttaacttcaatcaagattaaaagtcctgtctttaaacaatggtgtaactccttaagatcgtgtggaggatc
acagacagcaaccacaagataatcagataataactggtactctatagtcagattatattgttccattatttgaagataatcagggaaatgtagtgatgtttt
aacatactctcatctttcacaattaaatggcataattacacctgttggctcactagtggtgtcacattttcaaaaactccattttaagtttacagacagtgagaacaaa
tagacaaatgaacaggtcacacagatccgactcgtcatgttgttttaataattttaaaactaaacagtggtttggtttgtggctgtaactgaattagcttctgttagt
tgatgagttaatggaccagtgcaaccatacgttaatttctgtcagtagttgttattgatagcatatagattggtttaaagtgacatattgtattgaactgatcaaa
aatgttgaactactgtaattggggcttctcatgctacagcagcaaaaatgtgaatggaaataaaatgatatgacctataaaaatatttatcttttattgttaagaaag
ctgttggcagttattaatgttattctgttgttacacatcccacatcctccatcctgatgataagagtttctgctgagttcttgcagtttccacttggctgga
gagttgctatgaaagtttaggaattcaaaaataatgtacactctcatgttgttgcagtgcttccaagctcactgctggaagtcactgtgaactgtgctgaataag
acaatttcaaaagtgagctggcaggactgagtagtctctgggctgtaaacacattacacgttggcttttttaacatacaaatcagttttctctgtatggtttga
tttaatttccactctccttctgtttctgttagttgttaaggtgtactgtctgtttgttaatacaaaagagaatattgttcaatgcagcttatgtttgatttt
caataaaatgtcttgtgtataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 牙鲈 *efhd2* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *P. olivaceus efhd2*

方框内为起始密码子和终止密码子，阴影部分为 EF-hand 结构域，下划线为 PolyA 序列

Frames indicate the start codon and stop codon respectively, shadow region indicates the EF-hand domain, underline indicates the PolyA tail sequence


```

gaggaagtggagcagcgctagctccgatcctataatcgatcgccatgcactcttagaagcaaaacaagcccagaactagatcctgtc
cagcaccgggctcttgaadATGSCCGGCGAGGAGGAGAGGGGTGGTCCGTGTCAGAGTCAAGAAATGTGATGGCGTGCTCCAGTGGAG
M A G E E E R G V V R V R V K K C D G V L P V E
TTTCGGTCTTTGCTGTTGATCCTCAGATAACATCACTGGAGTCTGTCAGCACATTCTCATCAGAGCCTTTGATTTGAATGGGAAGCGG
F R S F A V D P Q I T S L E V L Q H I L I R A F D L N G K R
ACFTTTGGGATCAGTTACCTGTCCGAGATAGGAGCGGTGTCGAAATGTATCAGTCTCTGGCGTCAGACTGGATTGGATGTTGCATT
T F G I S Y L C R D R S G A E M Y Q S L A S D W D L D V A F
GTCAGTGCAGCCAAACCTACCTACAGTCAAGATGGACGTAACACCTTCAGAAGACAGTCTGTAATGGAGGACTGGGACATCATAAGC
V S A A K P Y L Q L K M D V K P S E D S P V M E D W D I I S
CCTAAAGAGCTGATTGGCTGAGCAGCTTCTGGAGAAAGGACGAGTCTCTGGCATCCGCCGCTTCTTCTCACTCAGTCTTACTG
P K D V I G S E Q L L G E R T R S L A S A A L P F T Q S L L
TCCCAGATGGGCGGACCTTGTCTAAAGTCCAGCAAGCTTTGAGTGGTCTTATGGGGAGGAGATCAAGCCTTTCAAGCCTCCTCAGT
S Q M G R T L S K V Q Q A L S W S Y G E E I K P F K P P L S
SATGGTGGATTTACAGTACTCAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAG
D G E F H S Y L N G Q G Q L T R P E E L R L R I Y H G G V E
CCTTCACTGCGCAAGGTTGTGGCGGTACCTCTGAATGTGTACCCTGATGGACTGAGTGGACAGGAAAGAATGGACTACATGAAGAGA
P S L R K V V W R Y L L N V Y P D G L S G Q E R M D Y M K R
AAGACAAGGGATGATTGACCTGAAGAGAGAGTGGACAGCCGAGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAA
K T R E Y D Q L K R E W T A R V S H E D L E F I R G N V L K
GACGCTCTGAGAACGGACCGGCTCATCCGTAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAGTGGTCAAG
D V L R T D R A H P Y Y A G S E D S P H L T A L T D L L T T
TTTGGCATCACACTCCACAGATCATACTGTAAGCATGAGCGATACGCTCCCTATACTTGCAGTAAATGGACATGAGGCGCAT
F A I T H P Q I S Y C Q G M S D I A S P I L A V M D N E A H
GCCTTCAATTTGCTTTTGTGGCATAATGAAGCGTTTGGAGGAAACTTCCGTCCAGATGGGCAACTAATGTCTATCAAATCCAGCATTTA
A F I C F C G I M K R L E G N F R P D G Q L M S I K F Q H L
AAGTCTTCTGAGTACTCGGACTGAAATTTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTT
K L L L Q Y S D P E F Y S Y L V S R G A D D L F F C Y R W L
CTTTTGGAGCTCAAGAGAGAATTTGCGTTTGTATGATGCTTTGCGGATGCTTGGAGTCACTGGAGTCCCTTCTCCGGATCCGCTGAA
L L E L K R E F A F D D A L R M L E V T W S S L P P D P P E
ACCGAAGTGGAGCTTCCGACTGCCACTGGACATGAACTGTGACCTACAAAGAAAAGACAATTGAGACTGCCCTCAGAGATGAT
T E V E L L G L P L D T D E T V T Y K E K T I E T C L R D D
AATGAACAAAAGAGAAGCAGCGGAGGAGACATATGTTGAGGCCTTCAAGAGAAGAAACAGATGCGAGCAGGAATGCCGTATAGAACAA
N E Q K E K Q R R R H M L R P S R E E T D A S R N A V I E Q
AAAGAGGCAAAATGTTGGTGTGGAACAGGAAGTGGCAGTGTGATATTAATCAAGTAAGTCTGGTAAAGGCAGATGTTGTCAG
K E R Q N V G A G T G S D G S D C D I N Q V S L V K A D C Q
GCTCCTTTTGAAGCAACAAGTTTGGAGAGTTAAATACTATACTGCCAGAAATGAAGATAGCTTTGATATGGAAGATGGTGACCAA
A P F E K Q T S F G E F K Y Y T A R N E D S F D M E D G D Q
CCACAGGTGTGGTGTTCAAAGTCCGTAAGTCAAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAG
P Q G V A N V S K S V L N I S S R Q S T V D S E E A G G A T P A E E R T
CCTCTCATAAAAACTGTGAAATTTGTTTCTCTCCAATATCATCACCTCACCTCTTCTTAGTGGCTACCTATTTGAAAAAGTGGCTCC
P L I K N C E I G F S P I S S P H L F P S G L P I W K S G S
TCTGTGTCTCCGACATTTCAATTTCCCTCCAGTGGCCAGGAGCTTCCAGACTCTCTCCAAGGTCCACATCCCCATCCCCATCC
S V S P T S V S V S P S P S P G A S P D S V P P R S T S P S P S
ACAAACAATGGAAGAGAGGCTTACCAAGCACTGTTCCAAAAATATTGACCTCTCCGCCAAGTGTCTCAGCAATACAGGAATCAACTCA
T N N G R E A L P S T V P K I L T S S A Q V L S N T G I N S
CCCACAACCCCACTGAAAACCATCTATTGCATCTCCCTCCCACCTCAGAATCGATCCCTTCTCTTCCACTATTTTGTCTTTGGG
P T T P T V K P S I A S P S H P Q N R S L L S S P I L S F G
AGAGTCCCTGTTGTCTGGCAGCAGGTATCCACCAACAATCTTCTTCCCGGAAACAATCTCCAGCACCAGCAGTAACACACC
R G P S L S G S R S S T N N L P S P G N K S P S T A A N T P
AGTCTCTGAAAGTGAACACCAGCATCAATCGTGTTCGCTCCGCTCCGCAAGAGTTCGGCAAAGGCAATCCCTCATGCTGTT
S S L K A E T T S I K S C S L P P P Q E F G K G N P F M L F
CTATGCCTGTCCATCTGCTGGAGCACCAGACCACATAATCAAGAACAGCTTGGATTACAATGAGTTAGCCATGCACCTTTGATCGGCTA
L C L S I L L E H R D H I I K N S L D Y N E L A M H F D R L
GTGCGGCCCAACCTTAGCAGGTGTGTCAGCGAGCAAGGCTTATTTGAGACTACTTGCAGAGTGAAGTGTGGGACTCAGAGGAA
V R R H N L S R V L Q R A K A L F A D Y L Q S E V W D S E E
GGAGATGAGTTAGTCCGACTCCCAACAACAATTACCGTGTGCAACATCCCTTCTTCAACCATCTCTGCCAGGCCATTTATAGC
G D E V S S D S P T T I T A V Q H S P S S T I S A R P I Y S
CCTTTAGCATCGCTCAGTCACTATTTCAAACCTCAACCTATAACCTCACAACCACCTTCCCTCCCAACAGCTCAAGTTCCCTTTCC
P L A S P Q S S F Q N S T Y N L T T T I P S P T A Q V S L S
TCTGCTTCTGATtccatcatgcaacaattgattcccatcctcagcgaagactgattgtggcctgttggaggtgtccaccttttagcc
S A S *
agccttccatgaattgggctgttaataatcttctcattctgtgtatgcttgaatgtatttatattgcttttgcagtttgatgaa
agagcttcatttctttcatgtcctctgttgttctgtatgcatgacgtttaaaccctgtgattcaggtgtcagattgtgggctgtctct
tattgttctggcaaaactcagtttagccacatggtgcatttaacctgagttgcctcttttttaaactttgtttacaacttatattat
gtccaataagccacaaaagtgtcttaactaaacactgtgttacttttagttaaaataaaagggaattccacactctgatgtatcgaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 牙鲆 *tbc1d25* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列
 Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *P. olivaceus tbc1d25*

方框内为起始密码子和终止密码子, 阴影部分为 TBC 结构域, 下划线为 PolyA 序列
 Frames indicate the start codon and stop codon respectively, shadow region indicates the TBC domain, underline indicates the PolyA tail sequence

基酸残基, 占氨基酸残基总量的 12.57%; 无规卷曲包含 484 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 55.82%。较之于 EFHD2 蛋白, TBC1D25 蛋白 α -螺旋含量比例少, 而延伸链和无规卷曲的含量比例较高。

2.2 多序列比对与系统发育树分析

将 EFHD2 蛋白分别与斑马鱼(*Danio rerio*)(NP_001313422.1)、青鳉(*Oryzias latipes*)(XP_023812778.1)、小鼠(*Mus musculus*)(NP_080270.2)和人(*Homo sapiens*)(NP_077305.2)的同源序列蛋白进行比较, 序列一致性分别为 83%、88%、73%和 72%(图 3)。利用 NJ 法对牙鲈 EFHD2 蛋白与其他 8 个物种的 EFHD2 蛋白氨

基酸序列进行系统进化树构建, 结果显示, 牙鲈 EFHD2 与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)聚为一小支, 随后与青鳉、大西洋鲑(*Salmo salar*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)和斑马鱼聚为一大支, 而小鼠、人和牛(*Bos taurus*)等哺乳动物则聚为另一支(图 4)。

TBC1D25 蛋白斑马鱼(NP_001121708.10)、青鳉(XP_011471287.2)、小鼠(NP_001159909.1)和人(NP_001335191.1)的同源序列一致性分别为 71%、74%、72%和 74%(图 5)。进化树结果表明, 牛、小鼠和人等哺乳动物聚为另一支, 6 种鱼类聚为另一支, 牙鲈在鱼类所构成的一支中, 先与半滑舌鳎聚为一支, 再与青鳉、大西洋鲑、鲫鱼和斑马鱼聚为一大支(图 6)。

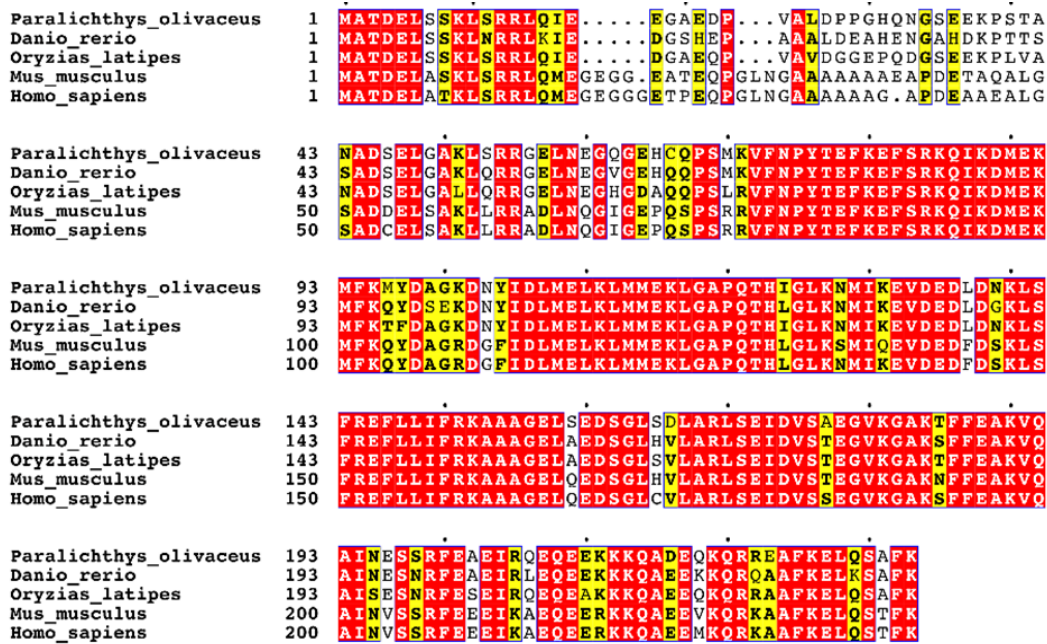


图 3 牙鲈 EFHD2 氨基酸多重序列比对结果

Fig.3 The multiple sequence alignment of the EFHD2 amino acid

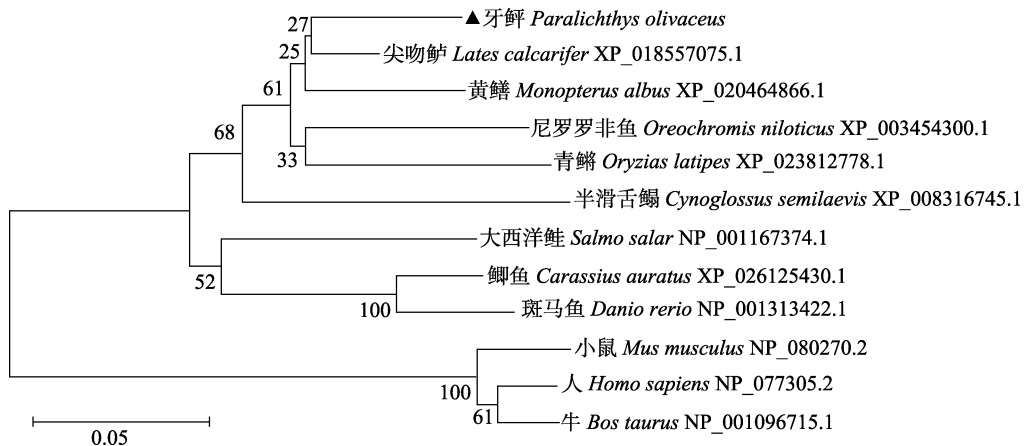


图 4 牙鲈 EFHD2 与其他物种 EFHD2 系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of *P. olivaceus* EFHD2 amino acid sequence with EFHD2 sequences of other species

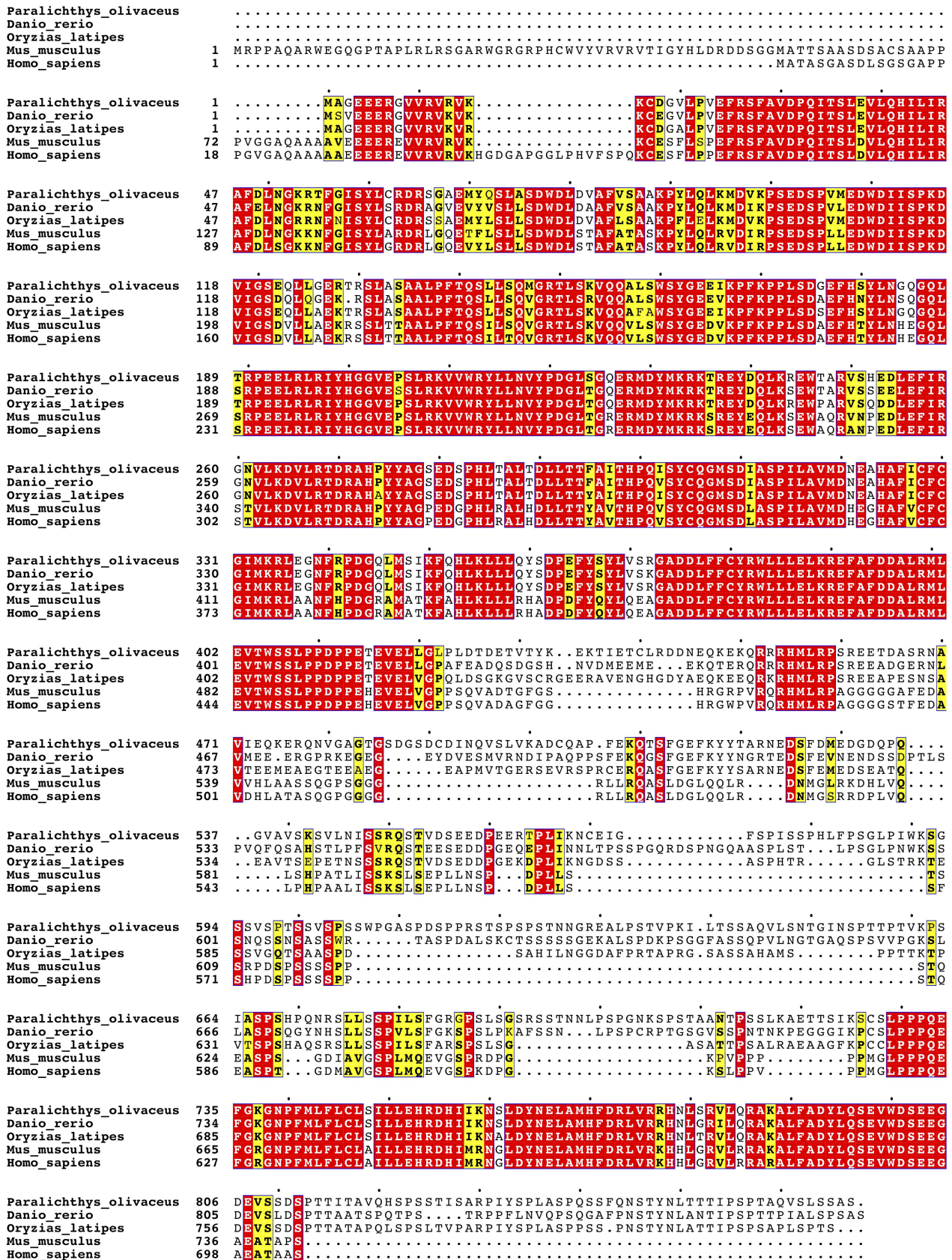


图 5 牙鲆 TBC1D25 氨基酸多重序列比对结果

Fig.5 The multiple sequence alignment of the TBC1D25 amino acid

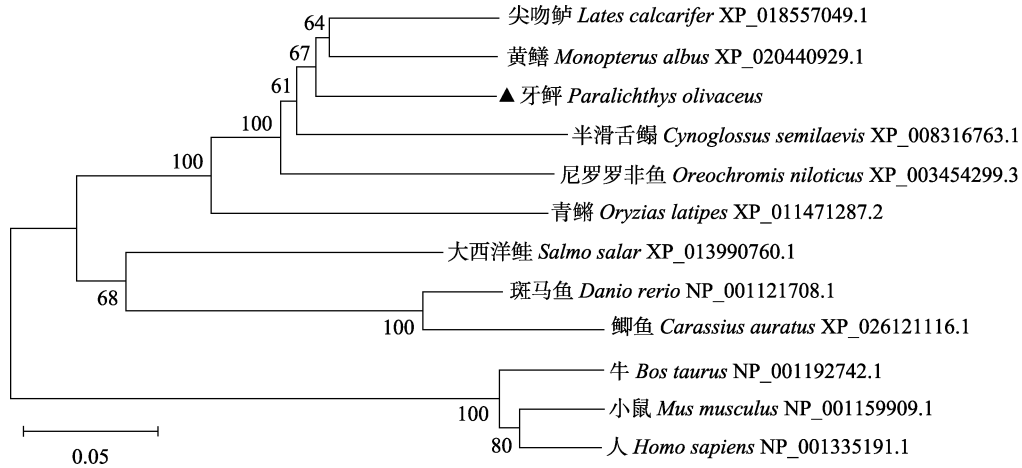


图 6 牙鲈 TBC1D25 与其他物种 TBC1D25 系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of *P. olivaceus* TBC1D25 amino acid sequence with TBC1D25 sequences of other species

2.3 牙鲈 *efhd2* 与 *tbc1d25* 基因在胚胎发育各时期的表达

以 β -actin 为内参基因，利用荧光定量 PCR 检测了牙鲈受精卵、4 细胞、32 细胞、128 细胞、高囊胚、低囊胚、原肠早期、原肠晚期、肌节期、心跳期和出膜仔鱼中 *efhd2* 与 *tbc1d25* mRNA 的表达情况，并以原肠早期为基准进行相对表达量的计算。结果显示，*efhd2* 基因在胚胎发育的各个时期均有不同程度的表达(图 7)，但在 4 细胞、低囊胚和原肠早期的表达量相对较低，与其他时期差异显著($P<0.05$)；从肌节期开始，*efhd2* 的表达量开始呈上升趋势，且在出膜仔鱼中的表达量，显著高于其他各组($P<0.05$)。

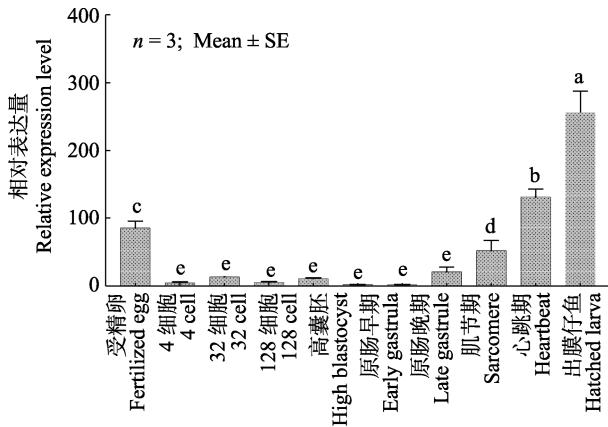


图 7 牙鲈 *efhd2* 基因在胚胎发育不同时期的相对表达
Fig.7 The relative expression level of *P. olivaceus efhd2* in different embryo development stage

误差线上方不同字母代表差异显著($P<0.05$)，下同
Different letters above the error bars indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

tbc1d25 基因在胚胎发育的各个时期也均有不同程度的表达(图 8)。其中，受精卵中的表达量显著高

于其他时期($P<0.05$)；随着发育的进行，*tbc1d25* 基因的表达量在原肠晚期降至最低($P<0.05$)；在之后的发育时期中，原肠晚期、肌节期和心跳期的表达量差异不显著($P>0.05$)；出膜仔鱼中 *tbc1d25* 的表达量又有一定的上升，显著高于除受精卵和 32 细胞之外的其他时期($P<0.05$)。

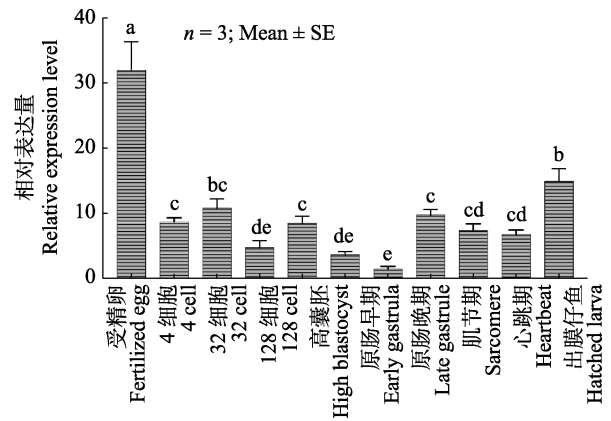


图 8 牙鲈 *tbc1d25* 基因在胚胎发育不同时期的相对表达
Fig.8 The relative expression level of *P. olivaceus tbc1d25* in different embryo development stage

2.4 牙鲈 *efhd2* 与 *tbc1d25* 基因在淋巴囊肿抗病和患病个体中的差异表达

以患病组性腺为基准进行 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因相对表达量的计算。*efhd2* 基因在所检测的淋巴囊肿抗病和患病个体的头肾、肝脏、血液、鳃、心脏、性腺、肌肉、肠和脾脏等组织中均有表达(图 9)。其中，在抗病鱼的血液、鳃、性腺、肌肉和脾脏的相对表达量要高于患病鱼，特别是在血液中，抗病鱼 *efhd2* 基因的表达量高于患病鱼，差异显著($P<0.05$)。

与 *efhd2* 基因相似，*tbc1d25* 基因在所检测的各

个组织中也均有表达(图 10)。其中,在抗病鱼的肝脏、血液、性腺的相对表达量要高于患病鱼,特别是在血液中的表达量,二者差异极显著($P<0.01$)。

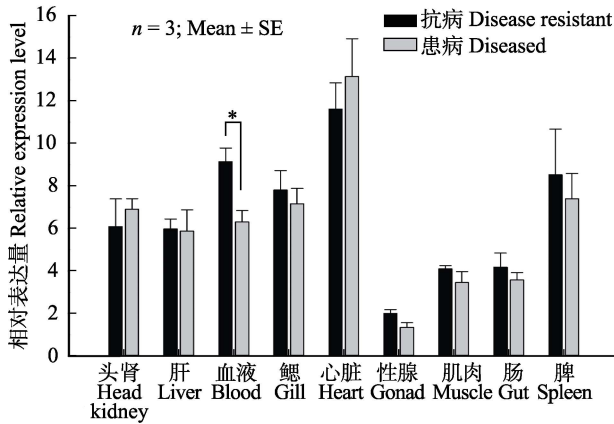


图 9 牙鲈 *efhd2* 基因在淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织的相对表达

Fig.9 The relative expression level of *P. olivaceus efhd2* in different tissues of lymphocystis disease resistant and sensitive individuals

*为差异显著($P<0.05$)

*indicates significant difference ($P<0.05$)

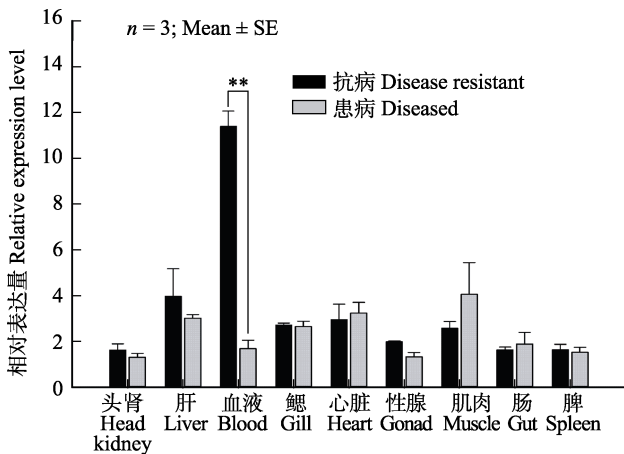


图 10 牙鲈 *tbc1d25* 基因在淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织的相对表达

Fig.10 The relative expression level of *P. olivaceus tbc1d25* in different tissues of lymphocystis disease resistant and sensitive individuals

**为差异极显著($P<0.01$)

**indicates highly significant difference ($P<0.01$)

3 讨论

本研究克隆获得了牙鲈 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的 cDNA 全序列,序列分析表明,上述 2 个基因都含有各自家族典型的结构域。同源性比较和系统进化树分

析显示,在鱼类中,2 个基因与其他鱼种具有较高的同源性,在进化上表现出一定的保守性。目前,关于 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因功能的研究,开展的较少,在鱼类上尚未见报道。

本文首次对 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在牙鲈胚胎发育不同时期的表达模式进行了研究,在胚胎发育的各个时期,2 个基因均有不同程度的表达。*efhd2* 基因在受精卵中有一定量的表达,表明其可能为母源效应基因。其表达量在经过卵裂期到原肠晚期的低水平表达后,从肌节期开始,又显著上升。*efhd2* 是高度保守的钙结合蛋白,在神经和免疫细胞的 Ca^{2+} 信号传导中起重要作用(Brachs *et al*, 2013)。在牙鲈的胚胎发育中,自原肠后期开始,神经胚开始逐渐形成,神经细胞被大量生成,*efhd2* 基因在原肠后期开始所出现的表达水平提高,可能与之有关。

在所研究的胚胎发育各时期中,*tbc1d25* 基因在受精卵的表达量最高,表明其也是母源效应基因。*tbc1d25* 所属的 TBC 基因家族是真核细胞保守的膜转运蛋白,参与膜转运的各种步骤,包括囊泡形成、沿细胞骨架的囊泡运输、运输囊泡与靶膜的锚定/对接、以及运输囊泡与靶膜的膜融合等(Pereira-Leal *et al*, 2001; Grosshans *et al*, 2006; Schwartz *et al*, 2007; Fukuda, 2008; Stenmark, 2009; Frasa, 2012)。而在胚胎发育的各阶段,都离不开膜转运的参与,因此,*tbc1d25* 在此过程中可能起到一定的作用。

本研究中,牙鲈淋巴囊肿抗病个体血液中 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的表达量都显著高于患病个体。鱼类免疫相关基因在血液中高表达的现象,在以往的研究中也有所报道。例如,在罗非鱼的 11 个组织中,血液里 *TRIM16* 和 *TRIM25* 的表达量最高(郑建美等, 2017)。血液是机体内不同器官间物质的传输介质。在牙鲈淋巴囊肿患病个体的心脏、头肾、脾脏和肠等内脏器官中均可检测到淋巴囊肿病毒颗粒(曲凌云等, 2000)。Kinne(1984)认为,鳃可能是淋巴囊肿病毒感染牙鲈的一个门户。病毒进入鳃之后,就需要通过连接各内脏器官的液体介质——血液进行传播。除了作为传输介质,血液也是重要的免疫器官,是 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等各类免疫细胞的天然携带者,可在体内免疫应答过程中执行关键的生理和生化功能。随着血液流经整个机体,会将大量的免疫细胞从一个器官转移到另一个器官,从而充当免疫系统管道的角色,在鱼类疾病防治中发挥着重要的作用(Dalmo *et al*, 1997; Castillo *et al*, 1998)。就淋巴囊肿病毒感染而言,当病毒颗粒通过血液在不同器官间传输时,可能会激活血液中相关免疫细胞的免疫反应,从而导致包括

efhd2 和 *tbc1d25* 等在内的一系列基因的高表达。但有趣的是, *efhd2* 的功能是促进细胞凋亡, 而 *tbc1d25* 的潜在作用则是抑制自噬。细胞凋亡和自噬之间存在着复杂的调控关系, 彼此之间既可相互促进(Gorski *et al.*, 2003), 也可互为拮抗(Young *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016)。就本研究而言, 淋巴囊肿病毒感染牙鲆后, 抗病个体血液中的细胞凋亡和自噬互为拮抗关系。通过较高水平的细胞凋亡, 达到对因病毒感染所损伤血液细胞的消除, 从而恢复血液组成的动态平衡, 这可能对维持病毒感染后鱼体的正常生理水平和实现鱼体的抗病功能具有重要的作用。

作为重要的免疫器官, 头肾和脾的免疫功能已被广泛研究(Yang *et al.*, 2016; 张文婷等, 2016; 郑建美等, 2017)。免疫功能基因在头肾和脾的表达量, 受多种因素所影响, 并不一定高于其他组织。在半滑舌鳎中, *TLR5S* 基因在肝脏中的表达量最高, 而在脾的表达量最低(张文婷等, 2016)。在本研究中, 淋巴囊肿抗病和患病个体头肾和脾 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的表达量差异不显著, 其可能原因为 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在淋巴囊肿病毒进入鱼体经血液向其他组织扩散的阶段起到免疫作用, 但具体原因有待于深入研究。

综上所述, 本研究报道了牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的分子特征, 分析了它们不同胚胎发育过程以及淋巴囊肿抗病和患病不同组织的表达情况特征, 为进一步研究二者的功能和牙鲆淋巴囊肿抗病机理奠定了一定的理论基础。

参 考 文 献

- Anders K. Lymphocystis disease of fishes, in viruses of lower vertebrates. Heidelberg: Springer, 1989, 141–160
- Avramidou A, Kroczeck C, Lang C, *et al.* The novel adaptor protein Swiprosin-1 enhances BCR signals and contributes to BCR-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14(11): 1936–1947
- Brachs S, Lang C, Buslei R, *et al.* Monoclonal antibodies to discriminate the ef hand containing calcium binding adaptor proteins EFhd1 and EFhd2. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2013, 32(4): 237–245
- Castillo A, Razquin B, Villena AJ, *et al.* Thymic barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(3): 157–170
- Chen Z, Jin T, Lu Y. AntimiR-30b inhibits TNF- α mediated apoptosis and attenuated cartilage degradation through enhancing autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 40(5): 883–894
- Corona AK, Jackson WT. Finding the middle ground for autophagic fusion requirements. *Trends in Cell Biology*, 2018, 28(11): 869–881
- Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bøgvold J. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20(4): 241–273
- Fan CX, Chen SL, Wang L, *et al.* Screening and identification of SSR markers associated with lymphocystis disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 577–583 [范彩霞, 陈松林, 王磊, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记的筛选与鉴定. *水产学报*, 2014, 38(4): 577–583]
- Frasa MAM, Koessmeier KT, Ahmadian MR, *et al.* Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(2): 67–73
- Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, *et al.* Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2006, 254(1): 203–210
- Fukuda M. Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(18): 2801–2813
- Fukuda M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience Reports*, 2011, 31(3): 159–168
- Gorski SM, Chittaranjan S, Pleasance ED, *et al.* A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Current Biology*, 2003, 13(4): 358–363
- Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(32): 11821–11827
- Hassan M, Selimovic D, Hannig M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World Journal of Experimental Medicine*, 2015, 5(4): 206–217
- Hou JL, Wang GX, Zhang XY, *et al.* Analysis of growth and lymphocystis disease resistance of selected breeding families of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 727–737 [侯吉伦, 王桂兴, 张晓彦, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿病家系选育及生长和抗病性能分析. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 727–737]
- Hwang SD, Fuji K, Takano T, *et al.* Linkage mapping of Toll-like receptors (TLRs) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(6): 1086–1091
- Itoh T, Fukuda M. Roles of Rab-GAPs in regulating autophagy, in autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging. Cambridge: Academy Press, 2017, 143–157
- Itoh T, Kanno E, Uemura T, *et al.* OATL1, a novel autophagosome-

- resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *Journal of Cell Biology*, 2011, 192(5): 839–853
- Kim YD, Kwon MS, Na BR, *et al.* Swiprosin-1 expression is up-regulated through protein kinase C- θ and NF- κ B pathway in T cells. *Immune Network*, 2013, 13(2): 55–62
- Kinne O. Diseases of marine animals. Volume IV, Part 1, Introduction, Pisces. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, 1984, 1–541
- Kroczek C, Lang C, Brachs S, *et al.* Swiprosin-1/EFhd2 controls B cell receptor signaling through the assembly of the B cell receptor, Syk, and phospholipase C2 in membrane rafts. *Journal of Immunology*, 2010, 184(7): 3665–3676
- Liu HJ, Wang CA, Zhu XC, *et al.* Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(3): 161–167 [刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲆单倍体, 三倍体, 雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 161–167]
- Ma HX, Wang L, Wang LQ, *et al.* The different expression patterns of the gene Arginase II in *Paralichthys olivaceus* and the correlation between its expression and *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 44–52 [马慧鑫, 王磊, 汪林庆, 等. 牙鲆精氨酸酶II基因的克隆以及免疫应答表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 44–52]
- Paperna I, Vilenkin M, Alves de Matos AP. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 48(1): 17–25
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 313(4): 889–901
- Qu LY, Sun XQ, Zhang JX. Electron ultramicroscopic observation on lymphocystis disease of the left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Qingdao Ocean University*, 2000, 30(2): 105–110 [曲凌云, 孙修勤, 张进兴. 养殖牙鲆淋巴囊肿病的电镜观察. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 105–110]
- Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, *et al.* Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 2007, 120(22): 3905–3910
- Shao CW, Bao BL, Xie ZY, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119–124
- Si F, Sun ZH, Yu SS, *et al.* Analysis of the genetic variability of the captured population of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the coastal releasing area of Qinhuangdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 18–24 [司飞, 孙朝徽, 于姗姗, 等. 秦皇岛近海增殖放流区牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 回捕群体的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 18–24]
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 513–525
- Vega IE. EFhd2, a protein linked to alzheimer's disease and other neurological disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10: 150
- Vuadens F, Rufer N, Kress A, *et al.* Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes. *Proteomics*, 2004, 4(8): 2216–2220
- Wei XL, Xu ZC, Wang GX, *et al.* pBACode: A random-barcode-based high-throughput approach for BAC paired-end sequencing and physical clone mapping. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(7): e52
- Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases. New York: Cornell University Press, 1988, 476
- Wu R, Sheng X, Tang X, *et al.* Transcriptome analysis of flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill in response to lymphocystis disease virus (LCDV) infection: Novel insights into fish defense mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 160
- Wu R, Tang X, Sheng X, *et al.* Relationship between expression of cellular receptor-27.8kDa and lymphocystis disease virus (LCDV) infection. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127940
- Yang Y, Huang YH, Yu YP, *et al.* RING domain is essential for the antiviral activity of TRIM25 from orange spotted grouper. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 304–314
- Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, *et al.* Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(18): 3888–3900
- Zeng R, Chen Y, Zhao S, *et al.* Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin *in vitro* via regulating intracellular ROS and SIRT1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2012, 33(1): 91–100
- Zhang WT, Xiang JS, Li HL, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of three *TLR5S* splicing variants in half-smooth tongue sole. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 10–20 [张文婷, 向晋松, 李海龙, 等. 半滑舌鳎 *TLR5S* 三种剪切型基因的克隆与表达分析. 中国水产科学, 2016, 23(1): 10–20]
- Zheng FR, Sun XQ, Xing MQ, *et al.* Immune response of DNA vaccine against lymphocystis disease virus and expression analysis of immune-related genes after vaccination. *Aquaculture Research*, 2010, 41(10): 1444–1451
- Zheng JM, Gao FY, Lu MX, *et al.* Cloning and expression analysis of *TRIM16* and *TRIM25* genes from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(6): 861–873 [郑建美, 高凤英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 *TRIM16* 和 *TRIM25* 基因的克隆及表达分析. 农业生物技术学报, 2017, 25(6): 861–873]

Cloning and Expression Analysis of *efhd2* and *tbc1d25* Gene in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

HOU Jilun¹, GUO Yanan², FU Yuanshuai², WANG Guixing¹,
ZHANG Xiaoyan¹, SUN Zhaohui¹, SI Fei¹, WANG Yufen¹①

(1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of the most important marine culture species in China. However, the outbreak of diseases has seriously affected the industrial culture of this particular fish. Among these diseases, the one caused by the lymphocystis disease virus has been spreading widely and has resulted in severe economic losses every year. In order to select new varieties of Japanese flounder that are resistant to lymphocystis disease in China, and to elucidate the mechanism of disease resistance at the molecular level, we used a high-throughput sequencing technique to analyze the transcriptome of kidney tissues of the Japanese flounder, and screened out a number of functional genes closely related to resistance, including *efhd2* and *tbc1d25*. In this study, we cloned the full-length cDNA sequences of *efhd2* and *tbc1d25* by using RACE (rapid-amplification of cDNA ends). The *efhd2* gene was 5231 bp in length, of which the length of the 5' untranslated region (5' UTR) was 142 bp and the length of the 3' UTR was 4390 bp. The open reading frame (ORF) was 699 bp in length, and encoded 232 amino acids with a molecular weight of 26.4 kDa and an isoelectric point of about 5.08. The full length of the *tbc1d25* gene was 3173 bp, of which the 5' UTR length was 108 bp, and the 3' UTR length was 464 bp. The ORF was 2601 bp in length and encoded 866 amino acids with a molecular weight of 96.4 kDa and an isoelectric point of about 5.47. Multiple sequence alignment revealed that the amino acid sequences of EFHD2 have 83%, 88%, 73%, and 72% homology with *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Mus musculus*, and *Homo sapiens* respectively; and those of TBC1D25 have 71%, 74%, 72% and 74% homology with these four species, respectively. The expression profiles of *efhd2* and *tbc1d25* were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Both *efhd2* and *tbc1d25* were expressed at the fertilized egg, 4-cell, 32-cell, 128-cell, high blastocyst, low blastocyst, early gastrula, late gastrula, sarcomere, heartbeat, and hatched larva stages. The expression level of *efhd2* in the 4-cell, low blastocyst and early gastrula stage was lower than that in other stages ($P < 0.05$); the expression level of *efhd2* began to increase from the sarcomere stage and reached the highest level at the hatched larva stage, and was significantly higher than that in other groups ($P < 0.05$). The expression level of the *tbc1d25* gene in the fertilized egg was significantly higher than that in other stages ($P < 0.05$); during development, the expression level of *tbc1d25* decreased to the lowest level in late gastrula ($P < 0.05$); there was no significant difference in the expression level of *tbc1d25* in late gastrula, sarcomere, and heartbeat stages ($P < 0.05$). In the lymphocystis disease-resistant and -sensitive individuals, the expression of *efhd2* and *tbc1d25* was detected in head, kidneys, liver, blood, gills, heart, gonads, muscle, intestine and spleen. The expression of *efhd2* and *tbc1d25* was significantly higher in the blood of lymphocystis disease-resistant individuals than in the lymphocystis disease-sensitive individuals. This study provides a basis for further studying the gene function of *efhd2* and *tbc1d25*, as well as the mechanism of disease resistance of the Japanese flounder to lymphocystis disease.

Key words Lymphocystis; Disease resistance mechanism; Blood; Embryonic development

① Corresponding author: WANG Yufen, E-mail: wangyf-8000@163.com