

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190309001

http://www.yykxjz.cn/

王杉, 徐文腾, 李明, 王洁, 王磊, 翟介明, 陈松林. 斑石鲷 *TGF-β1* 基因克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 78–87

Wang S, Xu WT, Li M, Wang J, Wang L, Zhai JM, Chen SL. Molecular cloning and expression pattern analysis of *TGF-β1* in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 78–87

斑石鲷 *TGF-β1* 基因克隆和表达分析*

王杉^{1,2} 徐文腾¹ 李明^{1,2} 王洁^{1,2} 王磊¹ 翟介明³ 陈松林^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 3. 莱州市明波水产有限公司 烟台 261400)

摘要 虹彩病毒是造成斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)工厂化养殖中大规模死亡的主要病原,其感染力极强,感染后的斑石鲷死亡率高,严重影响了斑石鲷养殖产业发展。转化生长因子 *TGF-β1* 是一种重要的免疫调节因子,在病毒免疫应答中发挥重要作用。为研究 *TGF-β1* 在斑石鲷被虹彩病毒感染过程中发挥的作用,运用 RACE 和实时荧光定量 qRT-PCR 技术对 *TGF-β1* 进行了基因克隆,并对其在不同组织、不同时间点相对表达量的差异分析。结果显示,斑石鲷 *TGF-β1* 基因 cDNA 序列全长为 3157 bp, 5'非编码区长 712 bp, 3'非编码区长 1278 bp, 开放性阅读框长 1167 bp, 编码 388 个氨基酸,基因组包含 6 个外显子和 5 个内含子。同源分析发现, *TGF-β1* 和鱼类相似度较高,与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的同源性最高,为 76.67%。*TGF-β1* 在斑石鲷健康组织(肝脏、脾脏、肾脏、头肾、心脏、鳃、胃、肠和皮肤)中均有表达,在头肾、肠、肝脏和皮肤组织中表达量较高,而在脾脏和肾脏组织表达量较低。为进一步研究 *TGF-β1* 在病毒感染过程中相对表达量的变化,对健康斑石鲷注射虹彩病毒进行刺激,随后比较了 *TGF-β1* 在脾脏、肝脏、肾脏、头肾 4 个不同组织、不同时间点的相对表达量的差异,在头肾、脾脏和肝脏中,病毒刺激后 *TGF-β1* 的表达量均出现升高,但在脾脏和肝脏中,峰值出现在刺激后第 4 天,而在头肾中峰值出现在感染后的第 10 天。在肾脏中,病毒刺激后的 *TGF-β1* 的表达呈现下降趋势,0 d 表达量最高,4、7 d 依次降低,7 d 降至最低,10 d 有所恢复。以上研究表明, *TGF-β1* 可能响应了虹彩病毒对机体的刺激,可能在病毒免疫应答中发挥作用。而病毒感染后不同组织中 *TGF-β1* 相对表达量的差异,则值得进一步研究。

关键词 斑石鲷; 虹彩病毒; *TGF-β1*

中图分类号 S942.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0078-10

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)属于鲈形目、石鲷科、石鲷属,主要分布在太平洋东北部,朝鲜、日本、中国等地沿海地区。因其营养丰富、经济价值高,成

为一种新兴的工厂化养殖鱼类。但在斑石鲷大规模养殖过程中病害频发,严重影响斑石鲷的产业发展。因此,研究病毒感染与免疫的分子机制,对于斑石鲷病

* 国家重点研发计划项目蓝色粮仓科技创新专项(2018YFD0900301-2)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0900301-2), and Taishan Scholar Climbing Project Fund of Shandong, China.] 王杉, E-mail: 787832529@qq.com

① 通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-09, 收修改稿日期: 2019-04-16

害防控具有重要意义。

通过对某养殖场患病或死亡斑石鲷的PCR检测,可以扩增出明亮的虹彩病毒特有的条带。因此,认为这些斑石鲷携带虹彩病毒,并推测虹彩病毒可能与斑石鲷的死亡有关。虹彩病毒科包括5个属:细胞肿大病毒属、蛙病毒属、淋巴肿大病毒属、虹彩病毒属和绿虹彩病毒属等。其中,感染鱼类的主要是细胞肿大病毒属中的真鲷虹彩病毒(RSIV)和脾肾坏死病毒(ISKNV),它们可以感染多种海洋鱼类,感染后死亡率极高(Nakajima *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001)。虹彩病毒是一种大型二十面体病毒,具有线性双链DNA基因组(Goorha *et al.*, 1984)。在一些亚洲国家,细胞肿大病毒导致多种海洋物种在高水温下死亡(Inoue *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1994; Chua *et al.*, 1994; Matsuo *et al.*, 1996; Miyata *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 1998)。在韩国,1998年首次在南部沿海地区发现条石鲷虹彩病毒感染(Jung *et al.*, 2000)。疾病的最初症状是进食量减少,嗜睡,身体颜色异常,鳃有淤点,以及脾脏、鳃和消化道的病变。在疾病的末期,患病鱼在笼子边缘无规律游动(Inoue *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 2000; Gibson-Kueh *et al.*, 2003; He *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 1997)。受虹彩病毒感染的鱼的特征是脾脏增大,脾脏、鳃、肾、心脏和肝脏中存在嗜碱性细胞增大的现象,并导致肾和脾造血组织坏死(Nakajima *et al.*, 1998; Oshima *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2000)。虹彩病毒对斑石鲷养殖业危害巨大,因此,亟需从分子机制角度对斑石鲷虹彩病毒病进行防治。

TGF-β是调节复杂免疫反应的主要分子开关,在免疫过程中起促进和抑制的双重调节作用。转化生长因子β超家族(TGF-βs)属于多功能生长因子的超家族,主要包括5个成员(TGF-β1~5)(Roberts *et al.*, 1990; Kehrl *et al.*, 1986)。体内绝大部分组织和细胞都能产生TGF-β及其受体(Le *et al.*, 2005),在成纤维细胞、巨噬细胞和血小板中表达量较高(Takehara, 2000; Thompson *et al.*, 1989),其广泛参与体内各种生理生化功能的调节,包括哺乳动物胚胎发育,两栖动物、昆虫的骨骼发育,伤口愈合、免疫以及成人的炎症反应,调节细胞增殖、分化和生长(Senturk *et al.*, 2010),并能调节包括干扰素γ和肿瘤坏死因子α在内的其他生长因子的表达和激活,其中,*TGF-β1*含量最高且功能最为广泛。

目前,*TGF-β1*在鱼类中的研究主要集中在基因克隆和对免疫细胞调节方面,先后在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Daniels *et al.*, 1999)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Kohli *et al.*, 2003)、海鲷(*Sparus aurata*)(Tafalla *et al.*, 2003)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(Yang *et al.*,

2008)中克隆得到*TGF-β1*;在鱼类免疫细胞中的研究表明,通过用LPS刺激草鱼体外培养的单核巨噬细胞,发现*TGF-β1*抑制了炎症细胞因子如肿瘤坏死因子(tnfa)、白细胞介素(il1b)、肌苷(inos)和白细胞介素(il8)mRNA水平的表达(Wei *et al.*, 2015)。金鱼(*Carassius auratus* L.)*TGF-β1*抑制TNF-α激活的巨噬细胞中的一氧化氮的生成(Haddad *et al.*, 2008),从而抑制巨噬细胞的活化。草鱼*TGF-β1*显著降低草鱼头部肾白细胞(hkls)的活性(Yang *et al.*, 2012)。这些研究表明,*TGF-β1*主要通过抑制促炎症因子的表达来发挥抗炎作用,因为过度炎症可能导致组织损伤和广泛的慢性疾病,在哺乳动物中造成如关节炎、炎症性肠病和哮喘等(Foster *et al.*, 2009)。*TGF-β1*已被证明能够抑制toll样受体下游的炎症信号,在炎症的消退中起关键作用(Han *et al.*, 2005; Serhan *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2010)。然而,*TGF-β1*在某些研究中呈现出截然相反的作用,如草鱼体内*TGF-β1*下调LPS/PHA刺激造成的外周血淋巴细胞增殖,而*TGF-β1*在同一细胞中的刺激作用则出现与之相反的情况(Yang *et al.*, 2010)。*TGF-β1*在哺乳动物的免疫应答中同样发挥双重作用。如在癌细胞发展初期起到抑制作用,而在癌细胞的侵袭和扩散过程中起促进作用。这些研究不仅可以将*TGF-β1*看作是硬骨鱼类的免疫调节因子,还表明*TGF-β1*在脊椎动物进化过程中保持基本相近的免疫功能。然而,有关鱼类*TGF-β1*参与炎症调节的机制仍然缺乏研究。实际上,到底是什么机制介导其对免疫应答的抑制作用,仍然没有详细的阐释。

本文主要研究了*TGF-β1*基因在斑石鲷健康组织中的相对表达量以及斑石鲷感染虹彩病毒后该基因在4种不同免疫组织中相对表达量的差异,希望能为进一步深入了解*TGF-β1*基因在斑石鲷免疫调节中起的作用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

正常组织:健康、体重为(300±10)g的斑石鲷由莱州明波水产有限公司提供,实验前,在水箱中暂养3d(24℃~26℃)。麻醉后,取3条鱼进行解剖,取肝脏、脾脏、肾脏、头肾、心脏、鳃、胃、肠和皮肤组织,立即放入液氮保存,随后将样品转移到-80℃保存,用于后续的RNA提取。

斑石鲷虹彩病毒感染及样品采集:健康、体重为(150±10)g的斑石鲷,由莱州明波水产有限公司提供,

实验前暂养 3 d (24°C~26°C)。麻醉后,腹腔注射斑石鲷虹彩病毒液(由华南农业大学秦启伟教授提供),每尾 100 μl (10^9 拷贝数)。虹彩病毒感染后,在 0、4、7、10 d 时间点取样,每个时间点取 3 条鱼,每条鱼取肝脏、脾脏、肾脏和头肾 4 个组织。取完的组织立即放入液氮中,随后放入 -80°C 冰箱中冷冻保存,以待后续 DNA 和 RNA 提取。

1.2 RNA 提取和 cDNA 的合成

本实验使用 Trizol 法对样品的 RNA 进行提取,包括所有健康组织和所有感染后的样品。用琼脂糖凝胶电泳对提取的 RNA 进行检测,使用 Gene Quant Pro RNA/DNA 分光光度计测定提取的 RNA 的浓度。将鉴定合格的 RNA,使用 cDNA 反转录试剂盒(TaKaRa)反转录合成 cDNA,再用琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 的质量。使用 RACE 试剂盒(TaKaRa),按照说明合成 RACE-Ready-cDNA,作为扩增 5' 和 3' 非翻译区(Untranslated Region, UTR)的模板。

1.3 TGF- β 1 基因全长 cDNA 与基因组序列的克隆

1.3.1 中间片段的验证 根据斑石鲷转录组测序结果,获得 TGF- β 1 基因的部分 cDNA 序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物(TGF- β 1-F/TGF- β 1-R)(表 1),分别将

9 个不同组织(肝脏、脾脏、肾脏、头肾、心脏、鳃、胃、肠和皮肤)的 cDNA 模板进行混合,使用混合模板进行 PCR 扩增。总体系为 15 μl : Mix (TaKaRa) 7.5 μl , TGF- β 1-F 1 μl , TGF- β 1-R 1 μl , ddH₂O 4.5 μl , 模板 cDNA 1 μl 。反应程序: 95°C 预变性 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 60 s, 共 40 个循环; 72°C 7 min; 4°C 保存。

将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物与目的片段大小一致,将目的片段切下,使用胶回收试剂盒(诺唯赞,南京)对目的片段进行回收纯化,将回收产物连接到 pEASY-T1 载体(全式金,北京),转化到 Trans-T1 感受态细胞(全式金,北京)中,加入无抗 LB 液体培养基,振荡培养 1 h,涂板,37°C 过夜培养(12~16 h),挑取 6 个克隆送到北京睿博兴科生物技术有限公司(青岛区)测序。

1.3.2 5' 和 3' RACE 克隆 根据已经验证正确的部分 cDNA 序列,分别在序列两端设计 5' (TGF- β 1-5'-GSP/TGF- β 1-5'-NGSP) 和 3' (TGF- β 1-3'-GSP/TGF- β 1-3'-NGSP) RACE 引物(表 1)。使用巢氏 PCR 扩增 5'/3'UTR。第一轮反应体系为 10 μl ,使用 TaKaRa LA TaqTM Hot Start Version 试剂盒,按照使用说明书的比例加样混合,进行 Touchdown PCR 程序反应。将

表 1 本实验所用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
TGF- β 1-F	CCGAATTCATGAAGCTGGCATTCTTGATGCTC	验证内部片段
TGF- β 1-R	CGGAGCTCGCTACACTTGCAGGACTTCACAAT	Verifying the internal fragment
TGF- β 1-5'-GSP	TAATCCCCACACTTTCTCGTATCACC	5'和 3'端克隆 Cloning the 5' and 3' ends
TGF- β 1-5'-NGSP	CTTGTTGAGCACCTTGGCGAAG	
TGF- β 1-3'-GSP	CTCTGGGACCGTGGGTGCTAGGG	
TGF- β 1-3'-NGSP	GGAAGTGGATACATAAGCCGACG	
TGF- β 1-qRT-F	GCCAGACGAGCGTTGATAGTG	Real-time PCR
TGF- β 1-qRT-R	TTTTTTGCGTGAGGTGAGGTG	
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	内参 Internal reference
β -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTG	
TGF- β 1-GM-F1	GAGGGAGGATTTGCTAAGAACC	验证基因片段
TGF- β 1-GM-R1	GAAAGTAACGCACAGCATCAGAC	Verifying the genomic fragment
TGF- β 1-GM-F2	CTGGTCTGATGCTGTGCGTTAC	
TGF- β 1-GM-R2	GGAAGCGAGGTAGCGGGC	
TGF- β 1-GM-F3	GGAAAATAGGGAATGAATGGTG	
TGF- β 1-GM-R3	CAAAAGTGTCTTCCATCGTG	
TGF- β 1-GM-F4	CTGGTCTGATGCTGTGCGTTAC	
TGF- β 1-GM-R4	CCAGTATTGCCATCTGTGTCATTG	
TGF- β 1-GM-F5	AAGCAACGGGGTTCGGACAGTATG	
TGF- β 1-GM-R5	CGGGAAGCGAGGTAGCGGGC	

第一轮 PCR 反应的产物稀释 20 倍作为模板, 随后进行第二轮普通 PCR 扩增反应。反应体系为 50 μl, 同上按照比例加样混合后进行第二轮普通 PCR 反应。将得到的 PCR 产物根据 1.3.1 中间片段验证的方法进行测序(Wang *et al*, 2019)。

1.3.3 基因组序列的克隆 提取 3 条斑石鲷的脾脏组织的 DNA, 以此为模板, 验证 *TGF-β1* 的基因组。方法与 1.3.1 中间片段的验证类似, 引物(TGF-β1-GM-F1/TGF-β1-GM-R1, TGF-β1-GM-F2/TGF-β1-GM-R2, TGF-β1-GM-F3/TGF-β1-GM-R3, TGF-β1-GM-F4/TGF-β1-GM-R4 和 TGF-β1-GM-F5/TGF-β1-GM-R5)退火温度改设为 55°C, 延伸时间设为 5 min。

1.4 生物学分析及系统发育树的构建

使用 NCBI 对克隆得到的 *TGF-β1* 基因的全长 cDNA 序列进行分析, 预测其开放阅读框(ORF)和氨基酸序列, 并推导出其蛋白的分子量和等电点(图 1)。使用网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对翻译的氨基酸序列进行分析, 包括信号肽, 氨基酸序列跨膜结构域。

在 NCBI 中搜索 *TGF-β1* 基因放入同源氨基酸序

列并预测其功能结构域。使用 DNAMAN 软件对 *TGF-β1* 进行氨基酸多重比对, 通过 MEGA 7.0 软件完成其生物系统进化树构建。

1.5 *TGF-β1* 基因的相对表达量检测

通过使用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测健康的斑石鲷不同组织中 *TGF-β1* 基因的相对表达量; 经虹彩病毒感染刺激后 4 个不同时间点、4 个不同组织(肝、肾、脾和头肾)的相对表达量的变化。根据得到的 ORF 序列设计实时荧光定量 PCR 引物(TGF-β1-qRT-F/TGF-β1-qRT-R, 表 1), 再以 *β-actin* 基因(*β-actin*-F/*β-actin*-R, 表 1)作为内参基因, 每个样品设置 3 个生物学重复, 按照 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 说明书介绍的方法进行 *TGF-β1* 基因的定量分析。根据测得的 *Ct* 值(*Ct* 取 3 个平行样品的平均值), 利用 2^{-ΔΔ*Ct*} 法计算 *TGF-β1* 基因相对表达量, 实验得到的数据均采用 SPSS 软件进行方差分析, 设定 *P*<0.05 为差异显著。使用 Origin Pro 8 软件将定量结果作图(Wang *et al*, 2018)。



图 1 斑石鲷 *TGF-β1* cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O. punctatus TGF-β1*

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方, 用大写字母表示。方框所示为起始密码子(ATG)、星号(*)所示为终止密码子(TGA); 下划线(—)所示为 *TGF-β* 家族结构域; 蓝色下划线(—)所示为终止信号; 黄色下划线(—)所示为 polyA 结构

The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence and expressed in capital letters. The starting codon (ATG), asterisk (*) and termination codon (TGA) are shown in the box, the underline (—) is shown in the *TGF-beta* family domain, the blue underline (—) is shown in the termination signal, and the Yellow underline (—) is shown in the polyA structure

2 结果与分析

2.1 斑石鲷 TGF-β1 基因序列特征

斑石鲷 TGF-β1 基因的 cDNA 全长为 3157 bp, 开放阅读框长 1167 bp, 编码 388 个氨基酸, 5' 非编码区长 712 bp, 3' 非编码区长 1278 bp, 相对分子质量为 44.32 kDa, 预测等电点为 8.178。对 TGF-β1 基因的氨基酸序列进行分析, 发现该基因没有信号肽, 也没有跨膜区, 含有 1 个 TGF-β 前导肽, 为第 19~260 个氨基酸; 含有 1 个 TGF-β 结构域, 为第 291~388 个氨基酸, 长 98 个氨基酸。

2.2 系统进化树分析和氨基酸多序列比对

将斑石鲷的 TGF-β1 基因对应的氨基酸序列通过 NCBI 的 Protein Blast 比对, 从 NCBI 上下载其他物种 TGF-β1 基因的氨基酸序列, 鸟纲 2 种: 鸡(Gallus gallus) (XP_025000221.1)、大山雀(Parus major) (XP_015471764.1); 哺乳纲 2 种: 人(Homo sapiens) (NP_000651.3)、小鼠(Mus musculus) (NP_035707.1); 爬行纲 2 种: 多疣壁虎(Gekko japonicus) (XP_015282748.1)、原矛头蝮(Protobothrops mucrosquamatus) (XP_015680068.1); 两栖纲 1 种: 热带爪蟾(Xenopus tropicalis) (XP_002939433.1); 鱼纲 9 种:

青鳉(Oryzias latipes) (XP_004075270.1)、墨西哥丽脂鲤(Astyanax mexicanus) (XP_022531678.1)、斑点雀鲷(Lepisosteus oculatus) (XP_015196176.1)、虹鳟(O. mykiss) (XP_021447007.1)、白斑狗鱼(Esox lucius) (XP_010868815.1)、半滑舌鳎(Cynoglossus semilaevis) (XP_008307032.1)、欧洲鲤鱼(Cyprinus carpio) (XP_018927916.1)、斑马拟丽鱼(Maylandia zebra) (XP_004569626.1), 共计 16 种。多重氨基酸序列比对结果显示, 斑石鲷和其他鱼类物种 TGF-β1 氨基酸序列相对保守, 其中, 特有的 TGF-β 结构域更为保守(图 2)。系统进化树显示, 鱼纲聚为一大支, 青鳉(鲱形目青鳉科)、斑石鲷(鲈形目石鲷科)、半滑舌鳎(鲈形目舌鳎科)、斑马拟丽鱼(鲈形目慈鲷科)聚为一支; 欧洲鲤鱼(鲤形目鲤科)、虹鳟(鲑形目鲑科)、白斑狗鱼(狗鱼目狗鱼科)、墨西哥丽脂鲤(脂鲤目脂鲤科)聚为一支。鸟纲的鸡(鸡形目雉科)和大山雀(雀形目山雀科)聚为一支; 哺乳纲的小鼠(鼠目啮齿科)和人(灵长目人科)聚为一支; 爬行纲的多疣壁虎(有鳞目壁虎科)、原矛头蝮(有鳞目蝮科)聚为一支; 两栖纲的热带爪蟾(无尾目负子蟾科)单独聚为一支(图 3)。经基因组分析发现, 斑石鲷与半滑舌鳎的基因组都包含 6 个外显子和 5 个内含子, 白斑狗鱼和人则含有 7 个外显子和 6 个内含子(图 4)。

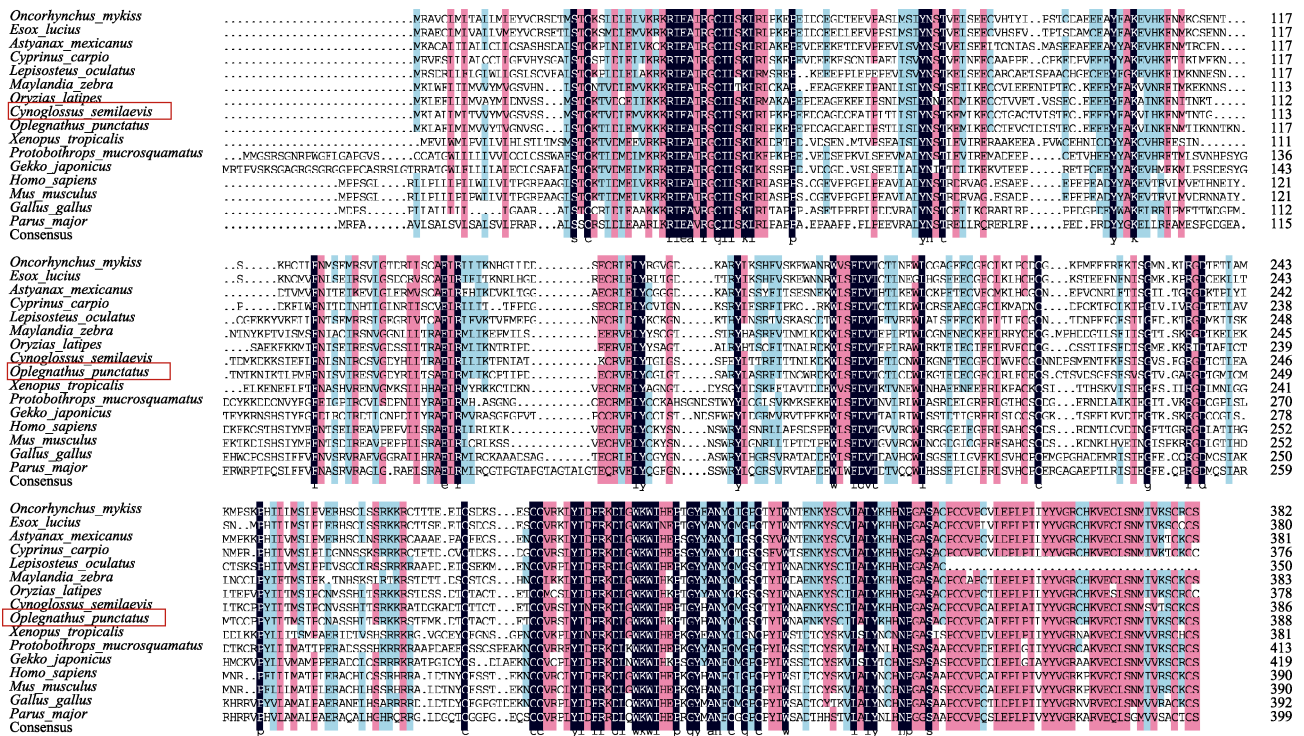


图 2 斑石鲷与其他物种 TGF-β1 氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple alignment of the deduced amino acids of TGF-β1 among *O. punctatus* and other different species

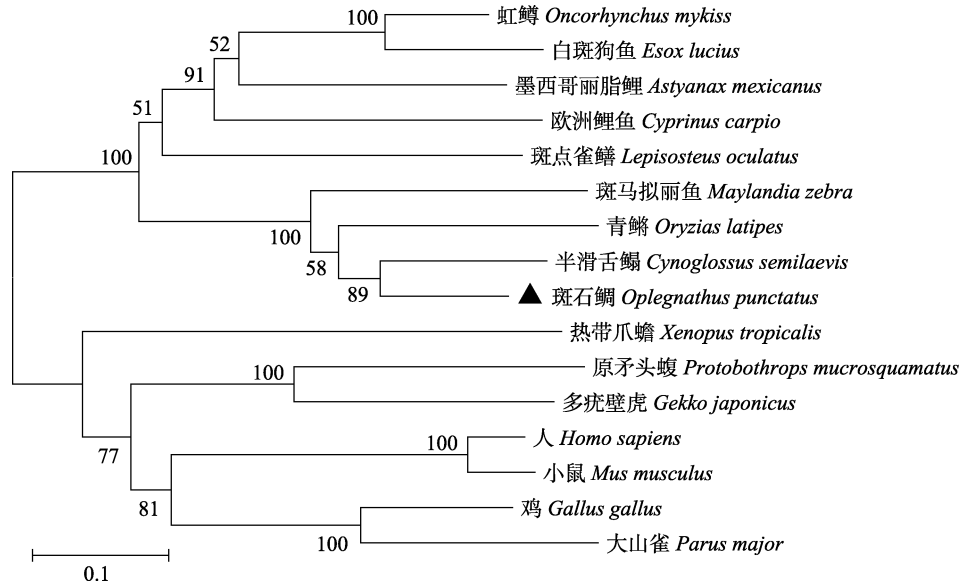


图 3 斑石鲷 *TGF-β1* 与其他物种 *TGF-β1* 系统进化分析
Fig.3 Phylogenetic analysis of *TGF-β1* among *O. punctatus* and other different species

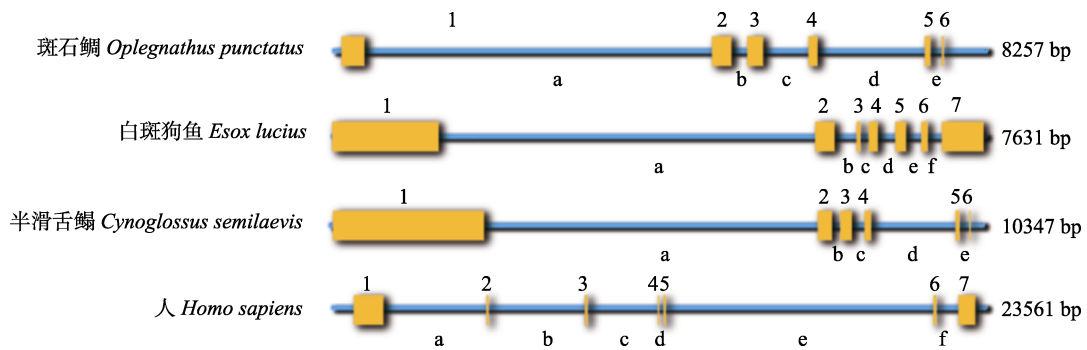


图 4 斑石鲷、白斑狗鱼、半滑舌鲷和人的 *TGF-β1* 基因结构
Fig.4 Structure of *TGF-β1* gene in *O. punctatus*, *E. Lucius*, *C. semilaevis* and *H. sapiens*

黄色方框代表外显子，直线代表内含子。■ exon ■ intron

The yellow box represents the exon and the straight line represents the intron

斑石鲷(*O. punctatus*): 1: 332 bp; 2: 291 bp; 3: 239 bp; 4: 155 bp; 5: 116 bp; 6: 50 bp;

a: 4411 bp; b: 164 bp; c: 541 bp; d: 1332 bp; e: 113 bp.

白斑狗鱼(*E. lucius*): 1: 1295 bp; 2: 270 bp; 3: 80 bp; 4: 147 bp; 5: 154 bp; 6: 115 bp; 7: 532 bp;

a: 4295 bp; b: 198 bp; c: 107 bp; d: 159 bp; e: 153 bp; f: 131 bp.

半滑舌鲷(*C. semilaevis*): 1: 2492 bp; 2: 279 bp; 3: 242 bp; 4: 150 bp; 5: 115 bp; 6: 60bp;

a: 5351 bp; b: 79 bp; c: 154 bp; d: 1326 bp; e: 102 bp.

人(*H. sapiens*): 1: 553 bp; 2: 162 bp; 3: 121 bp; 4: 80 bp; 5: 160 bp; 6: 173 bp; 7: 304 bp;

a: 4234 bp; b: 3429 bp; c: 2497 bp; d: 128 bp; e: 9590 bp; f: 903 bp.

2.3 斑石鲷 *TGF-β1* 基因的相对表达量

2.3.1 *TGF-β1* 基因在正常斑石鲷各组织中的相对表达量 qRT-PCR 健康组织的表达结果显示, *TGF-β1* 基因在斑石鲷各个组织中均有表达, 其中, 在肝脏、头肾、肠、皮肤、鳃中表达量较高, 头肾最高; 在脾脏、肾脏、胃、脑中表达量较低, 脾脏最低(图 5)。

2.3.2 斑石鲷虹彩病毒感染后 *TGF-β1* 基因的相对表达量的变化 在肝脏中呈现出先升高后降低的趋势, 在 4 d 时表达量最高, 约是 0 d 的 2.7 倍; 在头肾中呈现波动的趋势, 0~4 d 升高, 第 4 天是 0 d 的 1.94 倍, 4~7 d 降低, 7~10 d 再度升高, 10 d 时表达量最高, 是 0 d 的 2.5 倍; 脾脏与头肾的趋势类似, 不过在 4 d 时表达量最高, 是 0 d 的 3.1 倍; 在肾脏中呈现先下降后升高的趋势, 0~7 d 下降, 7~10 d

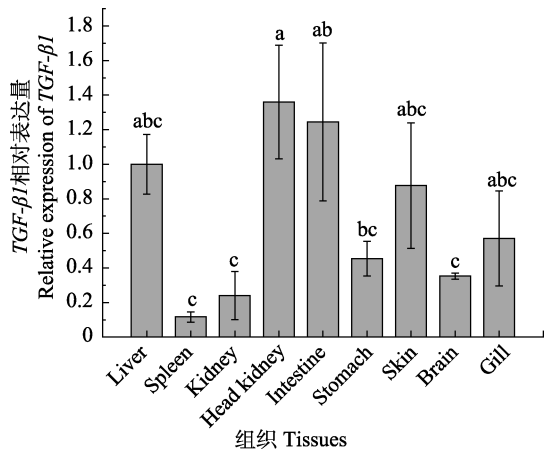


图5 *TGF-β1* 基因在健康斑石鲷组织中的相对表达量
Fig.5 The relative expression of *TGF-β1* gene in normal tissues of *O. punctatus*

a、b 和 c 表示在 SPSS 19.0 软件中的 Duncan 分组。同一字母表示无显著差异 ($P>0.05$), 不同字母表示显著差异 ($P<0.05$)。下同

The letters of 'a, b and c' indicated the Duncan grouping in SPSS 19.0 software. The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$), the different letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same applies below

升高, 其中, 7 d 时表达量最低, 是 0 d 的 0.38 倍 (图 6)。

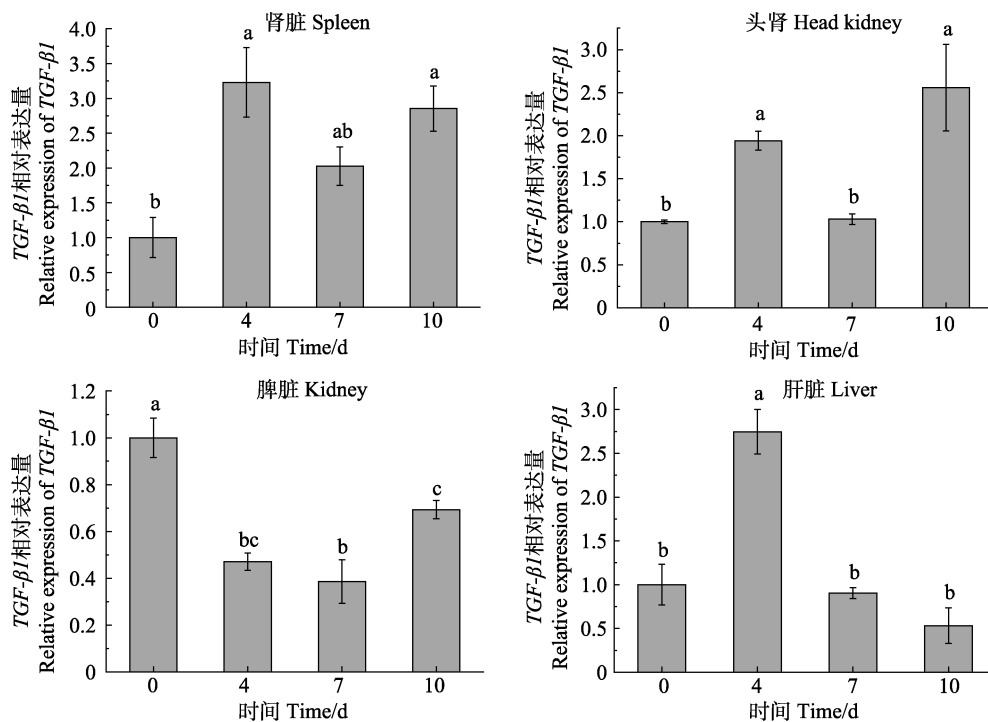


图6 斑石鲷感染斑石鲷虹彩病毒 4 种组织(肝脏、肾脏、头肾和脾脏)中 *TGF-β1* 基因的相对表达量
Fig.6 Relative expression of *TGF-β1* gene in four tissues (liver, spleen, kidney, and head kidney) of *O. punctatus* at different time points after SKIV infection

3 讨论

本研究通过 PCR 和 RACE 技术克隆得到了斑石鲷 *TGF-β1* 基因的 cDNA 全长序列, 研究了斑石鲷在健康组织和响应虹彩病毒刺激后 *TGF-β1* 相对表达量的变化。对 *TGF-β1* 基因的多重氨基酸序列比对结果分析, 发现参与比对的不同物种 *TGF-β1* 蛋白结构比较相似, 都包含 1 个前导肽(第 19~260 氨基酸)和 1 个 *TGF-β* 结构域(第 291~388 氨基酸)。但相对而言, 不同鱼类之间 *TGF-β* 序列更为相似, 而在不同纲之间差异较大, 例如, 斑石鲷与人类 *TGF-β1* 氨基酸序列相似度为 47.34%, 与半滑舌鳎相似度为 76.67%。*TGF-β* 蛋白起初是以未激活的形式从细胞中分泌出来的, 称为休眠 *TGF-β* 或小休眠复合体。对克隆得到的 *TGF-β1* 基因的氨基酸序列分析证明其包含 1 个前导肽。*TGF-β* 家族有 9 个半胱氨酸, 这 9 个半胱氨酸中的 8 个会每 2 个为 1 组形成半胱氨酸结(Cysteine knot), 这个结构是整个 *TGF-β* 超家族所共有的特征, 第 9 个半胱氨酸会通过共价的二硫键与另外一个次单元的半胱氨酸形成二聚体。其他的 *TGF-β* 结构主要以非共价的疏水性相互作用力(Hydrophobic interactions)形成其二级结构。第 5 个与第 6 个半胱氨酸之间含有最多的氨基酸变异区域, 而这段区域是使

TGF-β 分子暴露在外, 使不同的 *TGF-β* 与不同受体分子相互识别并相互结合的区域(Daopin *et al*, 1992)。

鱼类免疫主要以先天性免疫为主。大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)抗体的产生需要 4~6 周时间, 并且依赖温度, 然而病原体的侵袭在短短几天内就可以造成鱼体死亡, 因此, 鱼类抗病原体的免疫应答中, 先天性免疫在感染初期发挥主要作用, 由肾脏、脾脏及粘膜相关淋巴组织(存在于鳃、消化道等富含粘膜层的组织中)执行(Ellis, 2001); 另外, 在许多物种的肝脏移植研究中发现, 肝脏也具有免疫调节功能(Qian *et al*, 1997)。对斑石鲷健康组织相对表达量分析发现, *TGF-β1* 基因在斑石鲷各个组织中均有表达, 并且具有组织特异性, 其中, 头肾表达量最高, 这与罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)健康组织中的情况一致(Zhan *et al*, 2015), 在肝脏、肠、皮肤和鳃中表达量较高, 可能是由于 *TGF-β1* 主要分布在细胞分化旺盛或与外界有直接接触并且含有大量淋巴组织的外周免疫器官之中, 这些组织含有大量的未被激活的 *TGF-β1*, 作为免疫应答的启动因子储存。*TGF-β1* 在斑石鲷头肾、脾脏和肝脏中相对表达量的变化则有可能与 *TGF-β1* 在免疫过程中发挥的双重调节作用有关。其中, 病毒感染后的第 4 天斑石鲷开始发病, 头肾、脾脏、肝脏中的上调可能代表 *TGF-β1* 是促进免疫应答的, 一些研究表明, *TGF-β* 可以在感染部位招募单核细胞和中性粒细胞, 触发促炎性细胞因子表达(如 *TNF-α*、*IL-γ* 等), 激活白细胞促进其对感染细胞的吞噬和抗原的呈递, 放大炎症反应(Li *et al*, 2006; McGeachy *et al*, 2007; Wan *et al*, 2007), 这可以帮助机体对抗病毒的侵袭; 随后表达下降(第 7 天), 但在第 10 天, 脾脏和头肾再度上调可能是与其抑制或终止免疫应答有关, 有研究证明, *TGF-β* 可以直接下调其他促炎性细胞因子的表达, 参与炎症的消退(Roberts *et al*, 1993), 可以避免机体过度炎症反应引起的损伤, *TGF-β* 的双重调节机制可能依赖于作用部位的体液环境, 受调控细胞类型和自身浓度梯度影响。无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)感染罗非鱼的实验中, 头肾 *TGF-β1* 也表现出在 0~4 d 升高, 随后下降的趋势, 但其在 10 d 时并未再度升高, 与本研究肝脏情况一致, VHSV (Viral haemorrhagic septicemia virus)感染虹鳟的实验中, *TGF-β1* 在头肾组织中也呈现先升高后下降的趋势, 非致病性病毒株感染组在第 3 天达到峰值, 致病性病毒株感染组在第 5 天达到峰值(Maehr *et al*, 2013)。至于病毒感染后肾脏中 *TGF-β1* 表达一直呈下调趋势, 这种变化则十分

有趣。由于虹彩病毒主要感染部位是脾脏和肾脏, 这可能是由于在感染后主要是头肾而非整个肾脏发挥主要免疫作用而造成的。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染半滑舌鲷的实验中, 感染后的 72 h 内, 半滑舌鲷肝脏、脾脏和肾脏中 *TGF-β1* 呈现先上升后下降的表达趋势, 不同组织达到峰值的时间并不相同, 肝脏 48 h、脾脏 24 h、肾脏 12 h (李雪等, 2016), 而本研究中 *TGF-β1* 表达量在第 4 天时出现显著升高(肝脏、脾脏和肾脏), 随后回落, 这可能是由于感染初期病毒处于潜伏期, 机体免疫应答处于持续增强阶段, 到第 4 天时达到较高水平, 随后, 随着机体免疫功能的自我调节, *TGF-β1* 的表达水平逐渐回落。本研究发现, *TGF-β1* 可能参与了斑石鲷对虹彩病毒的免疫应答, 并在其中发挥一定作用, 希望能为深入研究 *TGF-β1* 基因在斑石鲷免疫应答过程中发挥的作用提供借鉴。

4 结论

斑石鲷 *TGF-β1* 基因 cDNA 序列与半滑舌鲷 *TGF-β1* 基因序列最相似。健康斑石鲷中, *TGF-β1* 基因主要在头肾、肝和肠中表达; 虹彩病毒感染后, *TGF-β1* 基因表达量显著上调, 揭示了 *TGF-β1* 可能与斑石鲷抗虹彩病毒免疫应答有关。

参 考 文 献

- Chou HY, Hsu CC, Peng TY. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathology*, 1998, 33: 201-206
- Chua FHC, Ng ML, Ng KL, *et al*. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease' affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *Journal of Fish Diseases*, 1994, 17: 417-427
- Daniels GD, Secombes CJ. Genomic organization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* *TGF-beta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23(2): 139-147
- Daopin S, Piez K, Ogawa Y, *et al*. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: An unusual fold for the superfamily. *Science*, 1992, 257(5068): 369-373
- Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 827-839
- Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*, 2009, 130(1): 7-15
- Gibson-Kueh S, Netto P, Ngho-Lim GH, *et al*. The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 129(2-3): 111-119
- Goorhai R, Dixit P. A temperature-sensitive (TS) mutant of frog

- virus 3 (FV3) is defective in second-stage DNA replication. *Virology*, 1984, 136(1): 186–195
- Haddad G, Hanington PC, Wilson EC, *et al.* Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(6): 654–663
- Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nature Immunology*, 2005, 6(12): 1198–1205
- He JG, Wang SP, Zeng K, *et al.* Systemic disease caused by an iridovirus like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 23(3): 219–222
- Inoue K, Yamano K, Maeno Y, *et al.* Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 1992, 27: 19–27
- Jung SJ, Oh MJ. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(3): 223–226
- Kehrl JH. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine*, 1986, 163(5): 1037–1050
- Kohli G, Hu S, Clelland E, *et al.* Cloning of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-beta 1 in oocyte maturation. *Endocrinology*, 2003, 144(5): 1931–1941
- Le Y, Yu X, Ruan L, *et al.* The immunopharmacological properties of transforming growth factor beta. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(13–14): 1771–1782
- Li MO, Wan YY, Shomyseh S, *et al.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 2006, (24): 99–146
- Li X, Chen SL, Yang CG, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of transforming growth factor TGF- β 1 and TGF- β 3 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) following stimulation with *Vibrio harveyi*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(6): 889–898 [李雪, 陈松林, 杨长庚, 等. 半滑舌鲷转化生长因子 TGF- β 1 和 TGF- β 3 基因的克隆及受哈维氏弧菌感染后表达分析. *农业生物技术学报*, 2016, 24(6): 889–898]
- Machr T, Costa MM, Vecino JL, *et al.* Transforming growth factor- β 1b: A second TGF- β 1 paralogue in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that has a lower constitutive expression but is more responsive to immune stimulation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 420–432
- Matsuo S, Inouye K, Nakajima K. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathology*, 1996, 31(4): 233–234
- McCartney-Francis NL, Frazier-Jessen M, Wahl SM. TGF-beta: A balancing act. *International Reviews of Immunology*, 1998, 16(5–6): 553–580
- McGeachy MJ, Cua DJ. T cells doing it for themselves: TGF-beta regulation of Th1 and Th17 cells. *Immunity*, 2007, 26(5): 547–549
- Miyata M, Matsuno K, Jung SJ, *et al.* Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20(2): 127–134
- Nakajima K, Sorimachi M. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 1994, 29(1): 29–33
- Nakajima K, Inouye K, Sorimachi M. Viral diseases in cultured marine fish in Japan. *Fish Pathology*, 1998, 33(4): 181–188
- Oshima S, Hata JI, Hirasawa N, *et al.* Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, 32(2): 87–90
- Qian S, Thai NL, Lu L, *et al.* Liver transplant tolerance: mechanistic insights from animal models, with particular reference to the mouse. *Transplant Reviews*, 1997, 11(3): 151–164
- Qin QW, Shi C, Gin KY, *et al.* Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp. *Journal of Virological Methods*, 2002, 106(1): 89–96
- Roberts AB, Rosa F, Roche NS, *et al.* Isolation and characterization of TGF-beta 2 and TGF-beta 5 from medium conditioned by *Xenopus* XTC cells. *Growth Factors*, 1990, 2(2–3): 135–147
- Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors*, 1993, 8(1): 1–9
- Senturk S, Mumcuoglu M, Gursoy-Yuzugullu O, *et al.* Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology*, 2010, 52(3): 966–974
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nature Immunology*, 2005, 6(12): 1191–1197
- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, *et al.* Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor β 1. *Fish and Shellfish Immunology*, 2003, 14(5): 405–421
- Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 2000, 24(Supplement 1): S70–S77
- Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, *et al.* Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *Journal of Cell Biology*, 1989, 108(2): 661–669
- Wan YY, Flavell RA. ‘Yin-Yang’ functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological Reviews*, 2007, 220(1): 199–213
- Wang RQ, Wang N, Wang RK, *et al.* The identification of tyrp1a and tyrp1b in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the regulation study of tyrp1a and mmu-miR-143-5p_R+2. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 49–58 [王若青, 王娜, 王仁凯, 等. 牙鲆 tyrp1a 和 tyrp1b 的鉴定及 tyrp1a 与 mmu-miR-143-5p_R+2 的调控关系. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 49–58]
- Wang SY, Wang L, Chen ZF, *et al.* Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene in the half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*).

- Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鲷多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 51–57]
- Wei H, Yin LC, Feng SY, *et al.* Dual-parallel inhibition of IL-10 and TGF-β1 controls LPS-induced inflammatory response via NF-κB signaling in grass carp monocytes/macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 445–452
- Yang M, Wang Y, Wang X, *et al.* Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Foxp1a/1b/2: Evidence for their involvement in the activation of peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(2): 289–295
- Yang M, Wang X, Chen D, *et al.* TGF-β1 exerts opposing effects on grass carp leukocytes: Implication in teleost immunity, receptor signaling and potential self-regulatory mechanisms. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35011
- Yang M, Zhou H. Grass carp transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1): Molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes. *Molecular Immunology*, 2008, 45(6): 1792–1798
- Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *Journal of Biochemistry*, 2010, 147(6): 781–792
- Zhan XL, Ma TY, Wu JY, *et al.* Cloning and primary immunological study of TGF-β1 and its receptors TβR I/TβR II in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 134–140

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Expression Pattern Analysis of *TGF-β1* in Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)

WANG Shan^{1,2}, XU Wenteng¹, LI Ming^{1,2}, WANG Jie^{1,2}, WANG Lei¹, ZHAI Jieming³, CHEN Songlin^{1①}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261400)

Abstract Iridovirus has a wide infection spectrum in aquatic animals, which is harmful to aquaculture. In spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*), iridovirus is the major factor causing large-scale mortality. Iridovirus infection results in high mortality rate and thus limits the development of the spotted knifejaw industry. As an important immunoregulatory factor, *TGF-β1* plays a vital role in viral immune response. In order to study its role in the process of iridovirus infection, we have cloned this gene and studied its spatiotemporal expression patterns. The total length of *TGF-β1* gene is 3157 bp, including 5'-untranslated region (UTR) of 712 bp, 3'-UTR of 1278 bp. The open reading frame length is 1167 bp that encodes 388 amino acids, including 6 exons and 5 introns. Homologous alignment showed that the amino acid sequence of *TGF-β1* in spotted knifejaw had a close identity to *Cynoglossus semilaevis*, of about 76.67%. *TGF-β1* is widely distributed in tissues, and high expressed in the head kidney, intestine, liver, skin, but shows a relatively low expression in the spleen and kidney. To further illustrate the expression patterns of *TGF-β1* during viral infection, we have analyzed the expression patterns of *TGF-β1* in the spleen, liver, kidney, and head kidney at different time points after iridovirus infection. In head kidney, spleen and liver, the expression of *TGF-β1* was increased post infection. The peak level in the spleen and liver appeared 4 days post infection (dpi), and in the head kidney the peak appeared at 10 dpi. In the kidney, viral infection seemed to downregulate *TGF-β1* expression. The highest expression was observed at day 0, then decreased at 4 dpi and reach the lowest level at 7 dpi. At 10 dpi, the expression had recovered but still lower than level of day 0. These results suggest that *TGF-β1* could respond to iridovirus infection and may play an important role in the process of viral immunity. However, the different expression pattern of *TGF-β1* in different tissues after viral infection requires further study.

Key words *Oplegnathus punctatus*; Iridovirus; *TGF-β1*

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn