

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00385

斜带石斑鱼 *TLR3* 基因的克隆及其在刺激隐核虫感染时的表达分析

乔 玮 李言伟 李安兴

(中山大学生命科学学院, 水产品安全教育部重点实验室/生物防治国家重点实验室, 广州 520275)

摘要: *TLR3*(Toll like receptor 3)是 Toll 样受体家族的重要成员, 通过识别病原相关分子模式, 诱导宿主天然免疫应答。研究从斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)中克隆得到 *TLR3* cDNA 序列, 全长为 2937 bp, 包括 107 bp 的 5'非编码区、100 bp 的 3'非编码区和编码 909 个氨基酸的 2730 bp 的开放阅读框。*TLR3* 全长氨基酸序列包含 1 个信号肽、18 个富含亮氨酸的重复序列(Leucine-rich Repeat LRR)、1 个跨膜结构域和 1 个胞内 TIR 结构域(IL-R1 homologous region)。同源比对显示, 斜带石斑鱼 *TLR3* 与其他已报道硬骨鱼类的 *TLR3* 具有较高的同源性(52%—67%)。组织表达分析显示, *TLR3* 在健康斜带石斑鱼的组织中具有较广的表达分布, 其中在前脑、体肾和脾脏中表达量较高。刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)感染斜带石斑鱼后: 在皮肤中 *TLR3* 的表达量呈现先降低后升高的趋势, 从感染后第 7 天开始上调, 并在第 10 天达到高峰; 而在脾脏中, *TLR3* 的表达量在感染 6h 时就显著上调并达到峰值。结果表明斜带石斑鱼 *TLR3* 在抗刺激隐核虫的免疫应答过程中可能发挥重要作用。

关键词: 斜带石斑鱼; 刺激隐核虫; *TLR3*; 克隆; 表达分析

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0385-08

鱼类是较低等的脊椎动物, 其获得性免疫系统尚未完善, 因此其先天性免疫系统在宿主免疫防御过程中就显得尤为重要^[1]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类重要的模式识别受体(Pathogen recognize receptors PRRs), 通过识别保守的病原相关分子模式(Pathogen associated molecular patterns, PAMPs)启动先天性免疫应答^[2, 3]。*TLR3* 是目前研究较为广泛的一类受体, 哺乳类动物 LR3 能识别 dsRNA, 并通过不依赖于 MyD88 的信号途径诱导干扰素及干扰素相关基因的表达, 参与抗病毒过程^[4]。另外, *TLR3* 还可以激活 DC 细胞的成熟, 调节获得性免疫^[3, 5]。随着研究的深入, 鱼类 *TLR3* 也成为研究的重点。目前, 已从斑马鱼(*Danio rerio*)^[6]、河豚(*Takifugu rubripes*)^[7]、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)^[8]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、稀有鮰(*Gobiocypris rarus*)^[10]、鲫鱼(*Carassius auratus*)^[11]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[12]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[13]等鱼中克隆出 *TLR3* 基因序列, 并对其基因特征、识别的配体及功能进行研究。Rodriguez, et al. 研究显示 Poly (I:C) 能诱导虹鳟巨噬细胞中 *TLR3* 表达量的上升^[9]; Su, et al. 研究表明草鱼在感染 GCRV 病毒后脾脏和皮肤中的 *TLR3* 转录水平升高^[13, 14]。最近的研究发现河豚 *TLR3* 与哺乳动物 *TLR3* 相同也能识别 Poly (I:C)^[15]。另外, 在鱼类中由细菌引起的 *TLR3* mRNA 水平的变化也有报道。Bilodeau, et al. 和 Phelan, et al. 的研究显示, 革兰氏阴性菌能诱导斑点叉尾鮰和斑马鱼 *TLR3* 的表达^[8, 16]。然而在 Rodriguez, et al. 和 Baoprasertkul, et al. 的研究中却发现, 当虹鳟和长鳍叉尾鮰被革兰氏阴性菌感染后, 头肾中 *TLR3* 的 mRNA 水平下降, 推测这与鱼的易感性和抗病性有关^[9, 17]。前期的研究表明 *TLR3* 参与由病毒和细菌所引起的鱼类免疫应答, 但对其是否参与鱼类抗寄生虫的免疫应答尚未见报道。

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans* Brown 1951)

收稿日期: 2011-04-10; 修订日期: 2012-01-07

基金项目: 国家自然科学基金(30871934)资助

作者简介: 乔玮(1986—), 女, 山西洪洞人; 硕士研究生; 主要从事鱼类病害防控方面的研究。E-mail: yvluwin@126.com

通讯作者: 李安兴, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

是一种体表寄生的原生纤毛虫，可以感染几乎所有海水鱼类，引起“海水白点病”^[18, 19]。随着集约化养殖程度的提高和养殖环境的恶化，我国南方地区刺激隐核虫病连年暴发。从 2003 年到 2009 年广东地区多处暴发该病，引起极大的危害和损失。所以寻找识别刺激隐核虫病原相关分子模式的受体，并研究其在宿主免疫应答过程中的变化规律，对于开展“白点病”防治工作有一定的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验鱼 斜带石斑鱼购自广东省大亚湾水产实验中心，体重为(109.36 ± 18.82) g，体长为(19.36 ± 1.04) cm。实验前，进行镜检和阻抗试验，确定试验鱼无刺激隐核虫及其他体表寄生虫感染。

刺激隐核虫 采自广东省大亚湾海域，以卵形鲳鲹为宿主进行实验室传代^[20]。

菌株和质粒 大肠杆菌 DH5α 和 pMD18-T Vector 购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上已有的鱼类 TLR3 基因序列(表 1)，通过同源比对在保守区设计简并引物，再利用同源扩增所得到的目的基因片段设计特异性引物(表 2)

1.3 试验方法

TLR3 cDNA 的克隆 取斜带石斑鱼的脾脏，用 Trizol Reagent(Invitrogen) 提总 RNA，DNase I 处理残留 DNA 后，用 ReverTra Ace -α- reverse transcriptase (TOYOBO) 合成一链 cDNA。以此 cDNA 为

模板，TLR3F1 和 TLR3R1 为引物，扩增 TLR3 片段。PCR 的反应条件为：95℃ 5min; 95℃ 1min, 55℃ 45s, 72℃ 90s, 35 个循环；72℃ 5min，由此得到 TLR3 部分基因片段。然后采用 RACE 技术扩增 TLR3 的 5' 端和 3' 端，具体参照 BD SMART™ RACE cDNA Amplification 操作手册进行，逆转录用到的引物(表 1)。采用巢式 PCR 扩增 5' 端，一轮和二轮 PCR 引物分别为 RTLR3R1/UPM 和 RTLR3R2/NUP。采用半巢式 PCR 扩增 3' 端，以引物 RTLR3F1 与 UPM 进行第一轮扩增，稀释 50 倍后的产物作为模板，用 RTLR3F1 与 NUP 进行第二轮扩增。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测，回收目的产物，TA 克隆后挑取阳性克隆测序，测序工作由上海 Invitrogen 公司完成。

表 1 引物设计所用物种的 TLR3 的核苷酸序列登录号
Tab. 1 GenBank accession numbers of TLR3 sequence used for designing primers

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank Accession NO.
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	DQ291158
稀有𬶋鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	DQ 885908
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_001013269
斑点叉尾鮰 Channel catfish	AY741552
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AY883999

TLR3 序列分析 使用 NCBI 中 BLAST 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 CLUSTAL 2.0 进行同源序列的分析；通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 和 TagIdent tool(<http://expasy.org/tools/tagident.html>) 确定开放阅读框、非编码区，并预测所推测蛋白的分子质量和等电点。用

表 2 在本研究中所用到的引物序列

Tab. 2 Primers used in this experiment

引物名称 Primer	核酸序列(5'→3') Nucleotide sequence
TLR3F1	ATHGAHAGCTTYTCNTTYCA
TLR3R1	CTCCADCCCTGGAAAGYGCAC
RTLR3R1	AGGTTTGGGAGGTGACGGAATGG
RTLR3R2	TCAGGACCCTCAAACCTGGCACAT
RTLR3F1	TCTCCATTCCGTACCTCCAAACC
RQTLR3F1	TGGATAGTAACAATCTGGATG
RQTLR3R1	TGATGGGGTGGTTGTAGTAAG
β- actinF	TGCTGTCCCTGTATGCCCT
β- actinR	CCTTGATGTCACGCACGAT
BD SMART II™ A oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCAGGG
3'-RACE CDS Primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN

SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 分析序列的保守结构域、功能基序和 N 糖基化位点。采用 ClustalX 1.83 和 MEGA 4 软件对不同鱼类、原鸡、家鼠及人的 TLR3 全序列和 TIR 结构域进行氨基酸序列分析，并构建系统进化树。

TLR3 在健康石斑鱼组织中的表达分析 在取样前进行阻动试验，具体如下：取石斑鱼血清 100 μL 加入 96 孔板中，然后每孔加入 100 μL 含 200 个幼虫的海水，轻轻地混匀，室温下孵育 1h。1h 后观察是否有幼虫阻动和凝集现象。将未发生阻动和凝集现象的视为未感染刺激隐核虫的健康石斑鱼。

分别取 3 尾健康斜带石斑鱼的血液、肌肉、皮肤、腮、前脑、中脑、后脑、下丘脑、脑垂体、头肾、体肾、肝脏、脾脏、胸腺、心脏和脂肪共 16 个组织，依照上述方法提取 RNA，并反转录为 cDNA。将此 cDNA 做为 Semi-PCR 的模板，检测 TLR3 在组织中的分布情况。TLR3 基因的引物是 RQTLR3F1/RQTLR3R1(表 2)，扩增条件是：95℃ 2min; 95℃ 15s, 59℃ 15s, 72℃ 20s, 29 个循环；72℃ 5min。参照基因为 β -actin，其引物是 β -actinF/ β -actinR (表 2)，扩增条件：95℃ 2min; 95℃ 15s, 55℃ 15s, 72℃ 20s, 28 个循环；72℃ 5min。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

刺激隐核虫感染诱导的 TLR3 表达分析 实验分两组：实验组和对照组，每组 80 尾鱼。实验组：用孵化 3h 内的刺激隐核虫幼虫感染健康斜带石斑鱼，感染剂量为 30000 幼虫/尾鱼。由于刺激隐核虫的生活周期是 7d，其滋养体在感染 3d 后脱落，并在池底形成包囊，3d 后孵化出幼虫。为了避免因自然形成幼虫所引起的重复感染，感染 3d 后将实验组鱼移于新池中。在初次感染 7d 后，以同样方法和剂量重复感染一次。对照组除不添加刺激隐核虫幼虫感染外，所有处理与感染组相同。在首次感染 6h、1d、2d、3d、5d、7d、10d 和 14d 时，对两组鱼(每个时间点每组取 6 尾鱼)取样。用丁香酚麻醉，每尾鱼分别取皮肤和脾脏组织，用上述方法提取 RNA 并反转录。利用 LightCycler 480 荧光定量仪(Roche Sweden) 进行实时荧光定量 PCR 反应。具体操作按照 SYBR green real time PCR master mix (QPK-201) kit (TOYOBO) 试剂盒说明书进行，PCR 条件：95℃ 2min; 95℃ 15s, 59℃ 15s, 72℃ 20s, 40 个循环，每

个延伸步骤后进行荧光信号检测，用于检验产物的特异性。利用 $Fold = 2^{-\Delta\Delta CT}$ [20] 计算基因的相对表达量，然后用实验组/对照组得到实验组相对于对照组的表达量，采用 SPSS 13.0 统计软件的 Duncan's 检验法分析各组数据差异的显著性。

2 结果

2.1 斜带石斑鱼 TLR3 cDNA 的克隆及序列分析

TLR3 cDNA 序列(GeneBank NO. HQ857748)全长 2937 bp，包括 107 bp 的 5' 的非编码区、100 bp 的 3' 非编码区和一个 2730 bp 的开放阅读框架。整个阅读框架编码 909 个氨基酸的蛋白，包括 1 个信号肽、18 个 LRR 结构域、1 个跨膜结构域和 1 个 TIR 结构域(图 1A)。推测 TLR3 蛋白的分子量为 102.68 kD，等电点为 8.27。同源比对显示斜带石斑鱼 TLR3 与红鳍东方鲀(相似度 67%)、虹鳟(相似度 60%)、鲫鱼(相似度 54%)的 TLR3 同源性较高。

TLR3 全序列进化分析显示鱼类 TLR3 单独聚为一支，远离鸡、家鼠和人的 TLR3。斜带石斑鱼 TLR3 与红鳍东方鲀的 TLR3 进化关系最近，其次是虹鳟。各种鲤科鱼类 TLR3 进化距离较近。结果能客观的反映出各个物种的 TLR3 的分子进化地位，并与生物学分类相一致(图 2)。通过进一步分析不同物种 TLR3 的 TIR 结构域的氨基酸序列、同源性及进化关系，发现斜带石斑鱼 TLR3 与红鳍东方鲀(相似度 72%)、虹鳟(相似度 67%)、鲫鱼(相似度 57%)等的相似度高于通过 TLR3 整个序列比对的结果，并且其与高等脊椎动物和斑马鱼的 TLR3 的 TIR 结构域一样，有三个保守区域：Box 1、Box 2 和 Box 3(图 1B)，说明 TIR 结构域在整个 TLR3 中比较保守。

2.2 健康斜带石斑鱼 TLR3 在组织中的表达分析

半定量的结果显示：TLR3 在健康斜带石斑鱼的血液、肌肉、皮肤、腮、前脑、中脑、后脑、下丘脑、脾脏、头肾和体肾等 16 个组织中都能检测到表达(图 3)，其中在前脑、体肾和脾脏的表达量较高，而在血液、肌肉、皮肤、后脑和肝脏中痕量表达。

2.3 刺激隐核虫感染斜带石斑鱼诱导 TLR3 的表达分析

为了探究 TLR3 是否参与刺激隐核虫感染引起的斜带石斑鱼免疫应答，我们用 real-time PCR 检测了刺激隐核虫感染后斜带石斑鱼皮肤和脾脏中 TLR3 表达量的变化，以不感染刺激隐核虫的斜带石

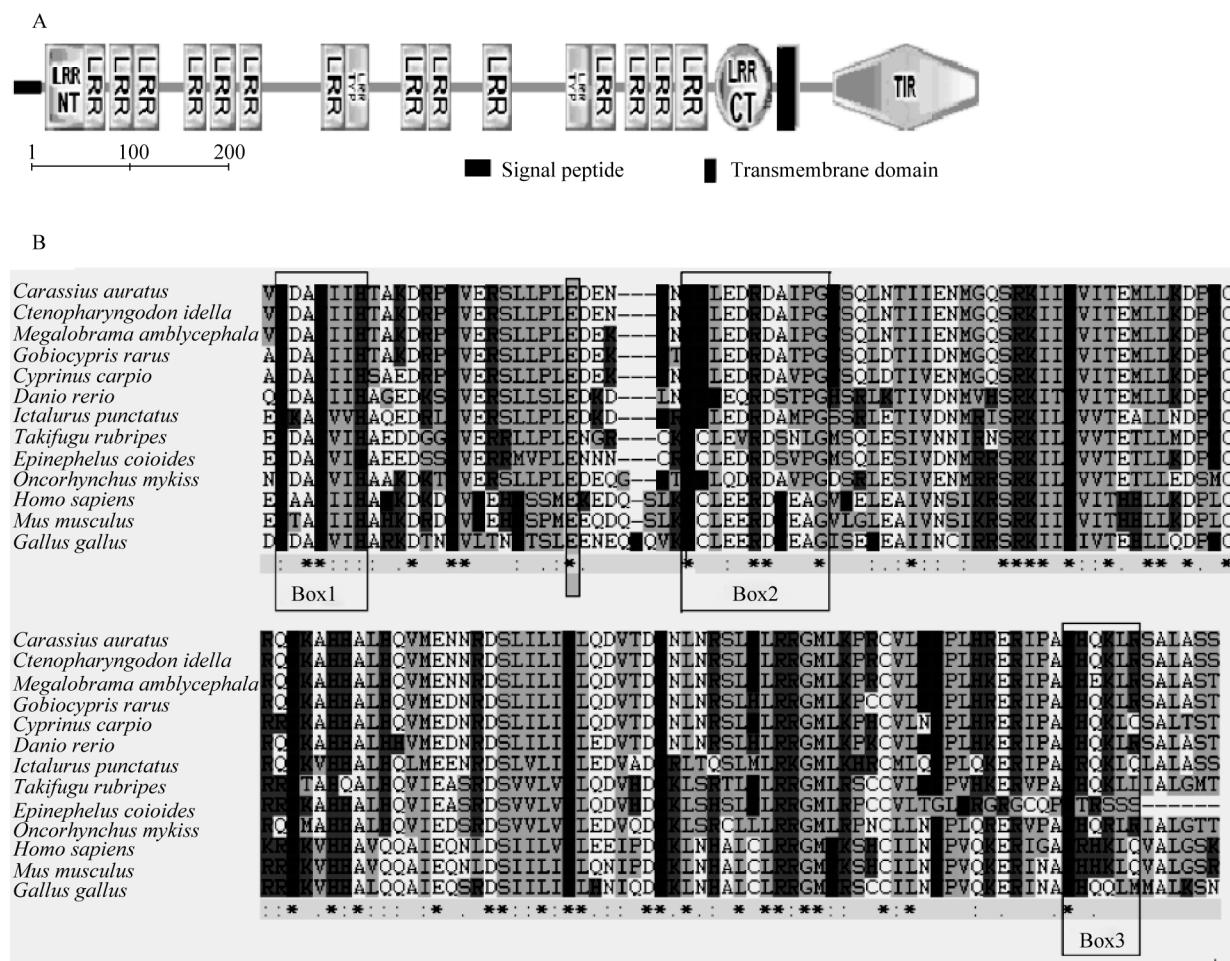


图 1 TLR3 结构域示意图(A)和不同物种 TLR3 的 TIR 结构域同源比对(黑色线框标示了 3 个保守的基序)(B)

Fig. 1 Schematic representation of TLR3 domains predicted by SMART programs. LRR: Leucine-rich Repeat; TIR: IL-1R1 homologous region (A); Multiple alignment of TLR3-TIR domains from different species (B). TIR domains of TLR3 protein sequences were determined by SMART program and aligned by Clustal 1.8. Three conserved box (box1 box2 box3) were framed

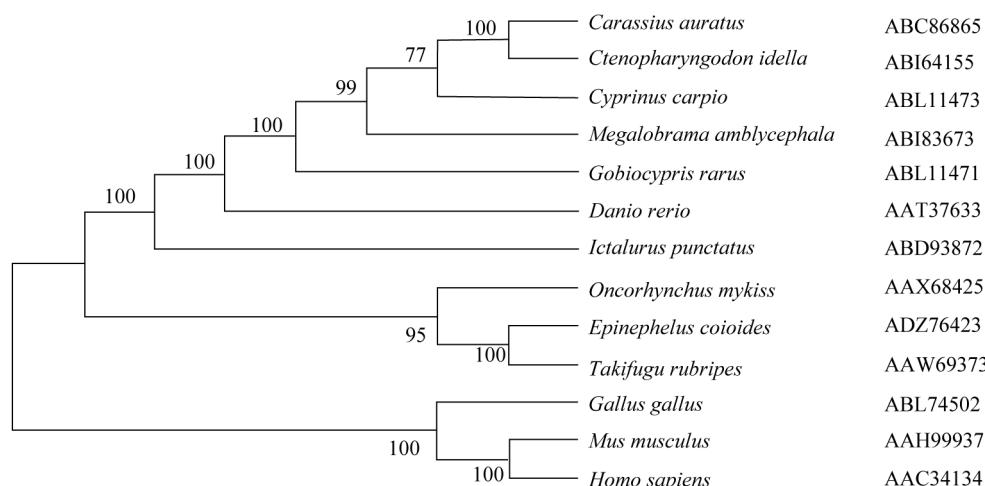


图 2 斜带石斑鱼与其他鱼及原鸡、家鼠和人的 TLR3 进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of TLR3 from different species

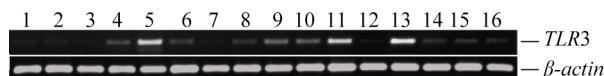


图 3 TLR3 在健康斜带石斑鱼的不同组织中的表达分析

Fig. 3 Constitutive expression of TLR3 in healthy *E. coioides* issues was determined by RT-PCR

1. 血液, 2. 肌肉, 3. 皮肤, 4. 腭, 5. 前脑, 6. 中脑, 7. 后脑, 8. 下丘脑, 9. 脑垂体, 10. 头肾, 11. 体肾, 12. 肝脏, 13. 脾脏, 14. 胸腺, 15. 心脏, 16. 脂肪

Lane 1. blood; lane 2. muscle; lane 3. skin; lane 4. gill; lane 5. forebrain; lane 6. midbrain; lane 7. hindbrain; lane 8. hypothalamus; lane 9. pituitary gland; lane 10. head kidney; lane 11. tank kidney; lane 12. liver; lane 13. spleen; lane 14. thymus; lane 15. heart; lane 16. lipod

斑鱼为空白对照。结果(图 4)所示: 在皮肤中, 刺激隐核虫感染后的 5d 内 TLR3 的表达量降低, 但在初次感染 7d 后, 表达量开始升高, 并在第 10 天时显著性上升达到峰值($P<0.05$); 而在脾脏中, 感染 6h 后, 相对于对照组, 实验组鱼的 TLR3 表达量显著上升(4.2 倍), 但在感染后的 1—2d 表达量显著下降($P<0.05$), 而在虫体脱落期 3—5d 时表达量上升。在 7d 后进行再次免疫时, 其表达量又降低。由结果可以看出不同的部位 TLR3 对刺激隐核虫感染的应答是不同的。

3 讨论

TLR3 位于细胞器膜上, 是一种重要的病毒识别受体, 通过 LRR 结构域识别病原分子后, TIR 结构域与相应的接头蛋白结合, 激活下游信号途径。实验结果显示, 与人和斑马鱼的 TLR3 一样, 斜带石斑鱼 TLR3 的 LRR 结构域也含有多个 LRR 基序(18 个), 且两端具有 LRR-NT 和 LRR-CT 帽子结构,

这种帽子结构有利于包埋暴露的疏水性氨基酸残基, 使得胞外结构更为稳定^[21, 22]。另外斜带石斑鱼 TLR3 的 LRR 结构域中有 6 个半胱氨酸, 其中有两个半胱氨酸(Cys-30 和 Cys-41)位于 LRR-NT 中, 可能与人类 TLR3 LRR-NT 中的 Cys-28 和 Cys-38 的作用相同, 可通过形成二硫键而利于 LRR-NT Loop 结构的形成^[22]。同时, 斜带石斑鱼 TLR3 中 LRR 结构域具有 15 个糖基化位点, 其中有 5 个糖基化的位点较为保守, 同样存在于人类 TLR3 中^[22]。TLR3 识别 dsRNA 后, 发生二聚化, 由胞内 TIR 结构域的 BB loop 结构与接头蛋白 TRIF 相互作用而实现信号的转导和级联放大^[23, 24]。TLR3 的 TIR 结构域非常保守, 存在三个保守区域: Box 1、Box 2 和 Box 3。Box 1 含有(F/Y)DA 保守基序, 其中的 D 是形成疏水核心 β 折叠的一个重要氨基酸残基; Box 2 包括形成 BB loop 保守结构域的氨基酸残基 Arg、Asp 和 Gly, Arg、Asp 与外周 α 螺旋的 Glu 以离子键相连, 对 BB loop 结构的维持起了重要的作用。Box 3 含有 FH 的保守性氨基酸^[24]。

斜带石斑鱼 TLR3 在检测的 16 个组织中都有表达, 但不同组织表达量存在差异, 这与对稀有鮈、草鱼和长鳍叉尾鮰的研究结果一致^[10, 13, 25], 可能是由于不同组织所具有的免疫防御功能的不同, 因而在组织分布上存在差异。由于皮肤是刺激隐核虫感染的主要器官, 也是鱼类免疫防御的第一道屏障, 因此我们选用皮肤作为检测对象, 并以鱼类重要的免疫器官脾脏作为对照, 研究刺激隐核虫感染后斜带石斑鱼 TLR3 表达量的变化。结果显示刺激隐核虫感染初期(6—5d), 皮肤中 TLR3 的表达受抑制,

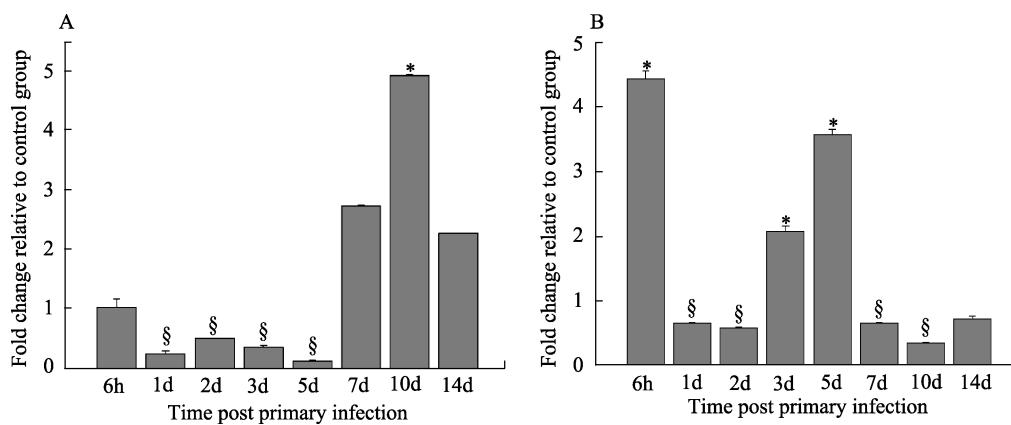


图 4 刺激隐核虫感染斜带石斑鱼后, TLR3 基因在皮肤(A)、脾脏(B)的表达分析(\$: 显著下降 *: 显著上升)

Fig. 4 TLR3 expression in *E. coioides* skin (A) and spleen (B) infected by *C. irritans* were detected by Real-time PCR at various time points after challenge

这与虹鳟和长鳍叉尾鮰被革兰氏阴性菌感染后, 头肾 TLR3 的 mRNA 水平下降的研究结果一致^[9, 25], 但在第 7 天 TLR3 的表达量出现上调。这可能是由于刺激隐核虫是胞外寄生虫, 在感染初期宿主通过下调 TLR3 来诱导 Th2 细胞应答, 从而引起体液免疫和炎症反应抵抗刺激隐核虫的侵染, 但在感染后期(7—10d)宿主通过上调 TLR3 来避免因过度的炎症反应而使宿主受损^[26, 27]。与皮肤中不同, 在虫体感染 6h 时, 脾脏中 TLR3 的表达量显著升高, 这可能是在感染早期需要大量 TLR3 表达用于激活巨噬细胞和诱导 DC 细胞成熟的结果^[28]。综上所述, 刺激隐核虫感染会引起斜带石斑鱼 TLR3 mRNA 水平的变化, 但在不同组织、不同时间表达情况有所差异。推测在刺激隐核虫感染斜带石斑鱼的过程中, TLR3 起免疫调节的作用, 但对于其在 mRNA 水平产生变化的机理还有待进一步证明。近来随着免疫医学的发展, 很多研究都利用 TLR3 具有引起先天性免疫和调节获得性免疫的功能, 将 TLR3 信号通路的激动剂应用到疾病的治疗当中。例如 Ribes, et al. 研究发现 ploy (I:C) 能增强小神经胶质细胞吞噬细菌的活性, 提高中枢神经系统抵抗细菌感染的能力^[29]。Breckpot, et al. 用 HIV-1 lentiviral 作为载体可以通过 TLR3 信号途径激活 DC 细胞, 调节 CD8⁺ T 细胞^[30]。因此, 研究刺激隐核虫应答阳性受体 TLR3 对于揭示鱼类抗寄生虫免疫应答机制和开发新型抗寄生虫鱼药都有重要理论指导作用。

参考文献:

- [1] Magnadottir B. Innate immunity of fish (overview) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **20**(2): 137—151
- [2] Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition [J]. *Trends in Microbiology*, 2000, **8**(10): 452—456
- [3] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nature Immunology*, 2001, **2**(8): 675—680
- [4] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 [J]. *Nature*, 2001, **413**(6857): 732—738
- [5] Schnare M, Barton G M, Holt A C, et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses [J]. *Nature Immunology*, 2001, **2**(10): 947—950
- [6] Meijer A H, Gabby Krens S F, Medina Rodriguez I A, et al. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. *Molecular Immunology*, 2004, **40**(11): 773—783
- [7] Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, et al. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome [J]. *Immunogenetics*, 2003, **54**(11): 791—800
- [8] Bilodeau A L, Waldbieser G C. Activation of TLR3 and TLR5 in channel exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, **29**(8): 713—721
- [9] Rodriguez M F, Wiens G D, Purcell M K, et al. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunogenetics*, 2005, **57**(7): 510—519
- [10] Su J G, Zhu Z Y, Wang Y P, et al. Toll-like receptor 3 regulates Mx expression in rare minnow *Gobiocypris rarus* after viral infection [J]. *Immunogenetics*, 2008, **60**(3-4): 195—205
- [11] Zhang Y B, Jiang J, Chen Y D, et al. The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, **31**(3): 232—243
- [12] Yang C, Su J. Molecular identification and expression analysis of Toll-like receptor 3 in common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, **76**(8): 1926—1939
- [13] Su J G, Jang S H, Yang C R, et al. Genomic organization and expression analysis of Toll-like receptor 3 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(3): 433—439
- [14] Su J G, Zhu Z Y, Wang Y P. Up-regulating expressions of Toll-like receptor 3 and Mx gene in gills by *Grass carp reovirus* in rare minnow, *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 728—733 [苏建国, 朱作言, 汪亚平. 草鱼呼肠孤病毒上调稀有𬶋鲫腮中 TLR3 和 Mx 基因的表达. 水生生物学报, 2008, 32(5): 728—733]
- [15] Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T, et al. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses [J]. *The Journal of Immunology*, 2008, **181**(5): 3474—3485
- [16] Phelan P E, Mellon M T. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Molecular Immunology*, 2005, **42**(9): 1057—1071
- [17] Baoprasertkul P, Peatman E, Somridhivej B, et al. Toll-like receptor 3 and TICAM genes in catfish: species-specific expression profiles following infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Immunogenetics*, 2006, **58**(10): 817—830
- [18] Colorni A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of ‘white spot disease’ in marine fish: an update [J]. *Aquarium Science and Conservation*, 1997, **1**: 217—238
- [19] Wang F H, Xie M Q, Li A X. A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **29**(1): 32—41
- [20] Dan X M, Li A X, Lin X L, et al. A standardized method to

- propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Aquaculture*, 2006, **258**: 127—133
- [21] Gay N J, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, **76**: 141—165
- [22] Bell J K, Botos I, Hall P R, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain [J]. *Proceedings of National Academy Science of USA*, 2005, **102**(31): 10976—10980
- [23] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway [J]. *Science*, 2003, **301**(5633): 640—643
- [24] O'Neill L A, Bowie A G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, **7**(5): 353—364
- [25] Baoprasertkul P, Peatman E, Somridhivej B, et al. Toll-like receptor 3 and TICAM genes in catfish: species-specific expression profiles following infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Immunogenetics*, 2006, **58**(10): 817—830
- [26] Joshi A D, Schaller M A, Lukacs N W, et al. TLR3 modulates immunopathology during a *Schistosoma mansoni* egg-driven Th2 response in the lung [J]. *European Journal of Immunology*, 2008, **38**(12): 3436—3449
- [27] Vanhoutte F, Breuilh L, Fontaine J, et al. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology [J]. *Microbes and Infection*, 2007, **9**(14—15): 1606—1613
- [28] Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J H, et al. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells [J]. *Journal of Immunology*, 2001, **166**(1): 249—255
- [29] Ribes S, Adam N, Ebert S, et al. The viral TLR3 agonist poly (I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of *Escherichia coli* by microglial cells [J]. *Neuroscience Letters*, 2010, **482**(1): 17—20
- [30] Breckpot K, Escors D, Arce F, et al. HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7 [J]. *Journal of Virology*, 2010, **84**(11): 5627—5636

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A TLR3 FROM *EPINEPHELUS COIOIDES* INFECTED WITH *CRYPTOCARYON IRRITANS*

QIAO Wei, LI Yan-Wei and LI An-Xing

(Key Laboratory for Aquatic Products Safety of Ministry of Education / State Key Laboratory of Bio-control, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Toll-like receptor (TLR), one family of I type trans-membrane protein, is a kind of well-studied pattern recognition receptors (PRRs) recognizing pathogen-association molecular patterns (PAMPs). Mammalian TLR3 is best-known for its recognition of pathogen dsRNA and triggering various innate immune responses against virus infection. In contrast to mammalian TLR3, piscine TLR3 can detect not only virus but also bacterial PAMPs. However, whether piscine TLR3 also involved in host anti-parasite immunity is still poorly understood. In the present study, we first cloned an *Epinephelus cooides* TLR3 (*EcTLR3*) cDNA sequence by homology cloning and RACE technique. The full length of *EcTLR3* was 2937 bp including a 5'-terminal untranslated region (UTR) of 107 bp, a 3'-terminal untranslated region (UTR) of 100 bp and an open reading frame (ORF) of 2730 bp encoding a polypeptide of 909 amino acid residues. The putative isoelectric point (pI) and molecular weight (Mw) of *EcTLR3* was 8.27 and 102.68 kD, respectively. The TLR family motifs, such as leucine-rich repeat (LRR) domains and Toll/ interleukin-1 receptor (TIR) domain were also conserved in *EcTLR3*, with 18 LRR domains and one TIR domain which were connected by one trans-membrane domain. The multiple sequence alignment demonstrated that the full length *EcTLR3* amino acid sequence shared high percentage of identities with other teleost (52%—67%), and a somewhat higher sequence identity with the TIR domains (from 55% to 72%), showing that the TIR domain was more highly conserved than that of other domains during TLR3 evolution. To better understand the evolutionary relationship of *EcTLR3*, a phylogenetic tree was constructed using reported TLR3 protein sequence. The tree indicated that *EcTLR3* was branched into the same cluster as that of other teleost TLR3, and showed a highly correlated evolutionary relationship with pufferfish TLR3. To determine the tissues expression pattern of *EcTLR3*, we examined *EcTLR3* expression in healthy grouper by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the *EcTLR3* was broadly expressed in all tested tissues, while the expression levels differed noticeably among the tissues, with strong expression in the spleen, trunk kidney and prosencephalon, which imply that *EcTLR3* may play an important role in host innate immune response. To identify whether *EcTLR3* involved in host anti- *Cryptocaryon irritans* immune responses, we detected the expression change of *EcTLR3* in the skin and spleen at different time points (6h, 1d, 2d, 3d, 5d, 7d, 10d and 14d) post parasite infection by real-time quantitative PCR. The result showed that in the skin, the expression level of *EcTLR3* was significantly down-regulated at the early time points (from day 1 to 5), while was up-regulated from day 7 and reached the peak at day 10 post the primary infection. However, in the spleen, the expression level of *EcTLR3* was immediately up-regulated and reached the peak at 6h post the parasite infection. The significant up-regulation of *TLR3* expression was also observed at day 3 and 5 in the spleen post the primary infection. This result suggested that *EcTLR3* may also play an important role in the host defense against *C. irritans* infection.

Key words: *Epinephelus cooides*; *Cryptocaryon irritans*; TLR3; Clone; Expression analysis