

文章编号: 1674-5566(2013)04-0488-08

牙鲆纤维蛋白原相关蛋白(*FREPI*)基因的克隆和表达分析

陈文君, 鲍宝龙

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 利用 RACE-PCR 技术获得了牙鲆 *FREPI* (fibrinogen-related protein) 基因 1 131 bp cDNA 全长序列, 其中开放阅读框 786 bp, 所编码的蛋白 C 端含有纤维蛋白样结构域标签 (WWYSRCGSAGLNG)。RNA 整体原位杂交检测发现只在孵化后 2 d 和 5 d (2 dph, 5 dph) 仔鱼的肠道中有 *FREPI* 基因表达, 而在 9 dph 和 13 dph 仔鱼胸鳍、肠道、鳃和皮肤中均有表达。荧光定量 PCR 检测显示该基因主要在成鱼的肠、鳃、皮肤和鳍条上表达, 而脾脏、心脏、肾脏、肝脏和肌肉表达量很低或没有表达。鳍条和皮肤较其他组织均有极显著差异 ($P < 0.01$), 鳃和肠相比其他组织具有显著差异 ($P < 0.05$)。由于该基因主要在鳍条、皮肤、肠和鳃中表达, 提示 *FREPI* 基因可能和牙鲆先天性免疫相关。

研究亮点: FREP 在鱼类免疫方面的报道很少, 本研究所克隆的牙鲆 *FREPI*, 不管是牙鲆仔鱼还是成鱼, 其仅在与外界直接接触的皮肤、鳃、肠道等组织中表达, 提示其与牙鲆的先天免疫相关。
关键词: 牙鲆; 纤维蛋白原相关蛋白基因; RACE-PCR; 荧光定量
中图分类号: S 917
文献标志码: A

纤维蛋白原样蛋白 (FREP) 是一类 C 端含有纤维蛋白原样结构域 (FLD)、N 端结构域有差异的糖蛋白^[1]。FREP 中 FLD 是一个高度保守的结构域并且广泛存在于各种动物中^[2-4]。FREP 家族包括纤维蛋白原 (FB)、血管生成素 (ANGPT/ANGPTL)、微丝相关蛋白 4 (MFAP4)、纤维胶凝蛋白 (FCN)、腱糖蛋白 (Tn-C)、外源凝聚素 (tachylectins)、纤维介素 (fibroleukin)^[5]。除 ANGPT/ANGPTL 外, 这类蛋白主要与免疫作用相关, 如纤维胶凝蛋白是哺乳类、两栖类、鸟类及无脊椎动物中重要的免疫分子^[6-8], 鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 外源凝聚素能对各种细菌及来自人体的红细胞识别并粘合^[9]。近几年在无脊椎动物方面的研究表明 FREP 在免疫反应方面具有重要的作用^[10-12]。但 FREP 在鱼类免疫方面的报道较少, 仅见于大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、松江鲈鱼 (*Trachidermus fasciatus*) 和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 等^[13-15]。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是我国大规模养

殖的名贵海产鱼类。高密度集约化养殖技术的推广和应用, 增加了病原微生物感染和疾病暴发的隐患, 给养殖生产带来了巨大的危害。近年来有关牙鲆免疫基因方面的研究主要集中在组织相容性复合体 (MHC)^[16]、铁调素 (hepcidin)^[17]、趋化因子 (CCL19)、核苷二磷酸激酶 (NDPK)、激活的蛋白激酶 C 的受体 (RACK1)、核心蛋白聚糖 (decorin)、半胱氨酸蛋白酶 (cystein proteinase)^[18] 等。而 FREP 与牙鲆免疫相关的研究却鲜有报道, 仅李塑等^[19] 克隆 *fibrinogen β* 基因, 并检测到鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后在肝脏和肾脏中表达量显著提高。本研究克隆得到 *FREPI* 基因丰富了牙鲆免疫基因方面的基础研究, 更为日后实际生产中牙鲆疾病免疫提供了理论参考和指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆鱼苗购自青岛忠海水产有限公司, 4%

收稿日期: 2012-12-20 修回日期: 2013-01-27

基金项目: 国家自然科学基金 (30771668)

作者简介: 陈文君 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: chenwenjun1014@126.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

PFA 固定后换成甲醇保存于 4 °C 以备原位杂交用。牙鲆成鱼购自上海铜川路水产批发市场。分离成鱼心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肠道、肌肉、鳍条、皮肤和鳃置于液氮中速冻后转移至 -80 °C 低温保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -80 °C 保存的样本于液氮中研磨,参照 TRIzol (Invitrogen) 说明书抽提 RNA,用 DNase I 去除基因组 DNA 污染,所得的 RNA 保存于 -20 °C。利用 Promega 反转录系统,以总 RNA 为模板,oligo(dT) 为引物于 94 °C 反应 5 min、冰浴 5 min 后 42 °C 反应 1 h 反转录合成 cDNA。3'/5' RACE-cDNA 合成参照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (TAKARA)。

1.2.2 *FREPI* 基因全长扩增

牙鲆 *FREPI* EST (GenBank 登录号:GW882549) 序列来自本实验室早期构建的 cDNA 文库^[20]。参照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 实验操作,主要步骤如下:以 3'-RACE-Ready cDNA 为模板,pFREPI-3': 5'-GTTTCAGAGCGCAGCGGAG GAGAGG-3' 为上游引物,通用引物 UPM 为下游引物: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT-3', 5'-CTAATACGAC TCACTATAGGGC-3' 扩增 3' 末端序列,以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板,通用引物 UPM 为上游引物,pFREPI-5': 5'-AGCGAAGCGGTGGCCC CGTTGTGCTCT-3' 为下游引物扩增 5' 末端序列。PCR 反应程序:94 °C 30 s,72 °C 3 min,5 个循环; 94 °C 30 s,70 °C 30 s,72 °C 3 min,5 个循环;94 °C 30 s,68 °C 30 s,72 °C 3 min,25 个循环。RACE 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,用 AXYGEN 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 RACE 产物。所得产物连接至 pGEM-T 载体后转化到大肠杆菌感受态细胞 Top 10,阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序。牙鲆 *FREPI* 基因全长获得后,设计一对引物(F:AATGAAGAG TCTGGTTCCATTTGTTG; R:CTCTCACACAGACTT GATCATCATTC)验证牙鲆 *FREPI* 基因读码框序列。

1.2.3 生物信息学分析

测序获得 3' 和 5' 末端序列用 ContigExpress 软件拼接,得到 *FREPI* 全长序列,通过 NCBI ORF

Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 推导其相应氨基酸序列。在 NCBI 中比对 *FREPI* 同源性,利用 ExPASy ProtParam (http://web.expasy.org/prot_param/) 在线软件分析 *FREPI* 氨基酸组成、分子量和等电点,使用 ExPASy PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 分析蛋白质的结构域、功能位点,使用 BioEdit 软件分析 FLD 结构域的同源性。

1.2.4 *FREPI* 基因探针制备

根据已知牙鲆 *FREPI* 基因 cDNA 全长序列设计引物 pFREPI-F: 5'-TCCGTTTGTGTCGAGT TTG-3' 和 pFREPI-R: 5'-GTCGTGTGTCAGGTTTC C-3' 克隆 *FREPI* 基因探针序列 365 bp (35 ~ 399)。胶回收产物连接至 pGEM-T 载体,转化至大肠杆菌感受态细胞 Top 10,经测序验证后大量扩增抽提质粒。分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I 线性化质粒,以线性化的质粒为模板分别用 *SP6* 和 *T7* RNA 聚合酶体外合成含地高辛标记的 *FREPI* 基因正义和反义 RNA 探针。RNA 探针用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测并保存于 -20 °C。

1.2.5 RNA 整体原位杂交

RNA 整体原位杂交步骤主要参考文献[21] 进行。甲醇保存的仔鱼经过梯度复水至 PBST (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween20)。用 100 mmol/L 的甘氨酸处理 30 min, PBST 洗脱后,样品置于 3% H₂O₂ 的中强光照去色素, PBST 漂洗 2 次。经盐酸处理后用 PBST 漂洗 2 次,蛋白酶 K 消化,用 4% PFA 于 4 °C 固定,以保持仔鱼的完整性。将仔鱼放置在预杂交液中 55 °C 温浴 4 h 后 55 °C 杂交液中过夜。杂交完毕后用 50% 甲酰胺和 50% 5 × SSC 清洗 20 min。然后梯度至 0.2 × SSC,用 0.5 × PBST 洗两次。仔鱼在 37 °C 抗体稀释液中震荡 1 h,再用 1:2 000 ~ 1:5 000 的地高辛抗体 4 °C 过夜后 PBST 漂洗若干次, TSM1 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L MgCl₂), TSM2 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl₂) 各漂洗两次,用 FAST RED 暗室中显色 (2 ~ 3 h)。显色完毕后,在 0.5 × PBST 中过夜,4 °C 下 4% PFA 中保存。

1.2.6 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 分析所用仪器为 CFX-96 (Bio-Rad)。根据 *FREPI* 基因和牙鲆 β -actin 序列设计特异性引物 FREP1-F: 5'-AGGTGACTGTGAGATGC-3', FREP1-R: 5'-TCTTGGTCTTGTGCTTGG-3', β actinF: 5'-GGAAATCGTGCCTGACATTAAG-3', β actinR: 5'-CCTCTGGACAACGGAACCTCT-3' 用于荧光定量 PCR, 引物设计参照文献[20], 牙鲆 β -actin 作为内参基因。PCR 反应体系 20 μ L: 包括 1 μ L 模板 cDNA, 各 0.5 μ L 的上下游引物, 10 μ L IQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 用无菌水补足至 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 最后 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 5 s 溶解曲线分析扩增特异性, 数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法和 SPSS 13.0^[22]。

2 结果

2.1 牙鲆 *FREPI* 基因 cDNA 全长序列和同源性分析

采用 RACE 技术获得 1 131 bp 牙鲆 *FREPI* 基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: KC121372), 包括 93 bp 的 5'UTR, 786 bp ORF 编码 261 个氨基酸, 252 bp 3'UTR。读码框测序证实为牙鲆 *FREPI* 基因。编码蛋白的分子量为 29.09 ku, 等电点为 9.59。氨基酸序列中包含一段信号肽序列 (1~21) 和 C 端纤维蛋白原样结构域 (29~261), C 端纤维蛋白原样结构域标签为 (WWYSRCGSAGLNG, 211~223)、4 个半胱氨酸残基组成两个二硫键 (34~64, 203~216)。牙鲆 *FREPI* 第 43 位和 98 位 (N43, N98) 天冬氨酸残基为糖基化修饰位点 (图 1)。牙鲆 *FREPI* 基因和松江鲈鱼 *FREPI* 基因相似性为 68%, 而与其

他含 FLD 结构域的蛋白相似性较低处于 36%~47% 之间。同源性比对发现不同基因 FLD 结构域有多个氨基酸位点完全一致, 包括形成二硫键的 4 个半胱氨酸残基 (图 2)。

2.2 牙鲆 *FREPI* 基因组织表达

FREPI 基因在成鱼牙鲆心、肝、脾、肾、肠、肌肉、鳃、皮肤和鳍条均有表达, 但组织间表达差异较大。表达量从高到低依次为鳍条、皮肤、鳃、肠道、肌肉、肾、心、肝、脾。以肌肉为对照发现鳍条和皮肤较其他组织均有极显著差异 ($P < 0.01$), 鳃和肠相比其他组织具有显著差异 ($P < 0.05$), 但鳃和肠之间并没有显著差异 (图 3)。

2.3 牙鲆早期发育中 *FREPI* 空间表达

FREPI 基因只在 2 dph、5 dph 牙鲆仔鱼的肠道表达 (图版 -1, 2, 3, 4, 5) 而其他组织无表达。但到了 9 dph、13 dph, *FREPI* 基因表达明显增强且表达范围也增大。除在肠道 (图版 -6, 7, 8, 9, 12, 13) 检测到有表达外, 在胸鳍 (图版 -8, 11)、皮肤 (图版 -8, 9, 10, 15) 和鳃 (图版 -6, 8, 9, 14) 中均检测到有表达。

3 讨论

本研究从牙鲆中克隆到 *FREPI* 基因, 并获得了该基因 cDNA 全长序列, 具有完整的读码框, C 端含有 FLD 标签 (WWYSRCGSAGLNG, 211~223)。牙鲆 *FREPI* 氨基酸序列与松江鲈鱼 *FREPI* 的相似性为 68%, 而与其他含 FLD 结构域基因的相似性较低, 因此本研究获得的该基因命名为 *FREPI*。同源性比对发现不同物种不同基因的 FLD 结构域具有较高的保守性, 且形成两个二硫键的 4 个半胱氨酸残基位点相同, 推测二硫键的形成可能对蛋白的结构和功能具有重要作用。

```

1   tacatggggagtt tagtctgaggggaataagggactgc gtttggtgtggagttt gacc aga
16  gatacaagcttca tataacacacgc aggt caaa
94  ATGAAGAGTCTGG TTCCATTT GTTGACTCATCTTGG TGTT TCTCTTGAGCCA AACAGAA
    M K S L V P F V G L I L V F L L S Q T E
154 ACCA AACGGGGTACGGCAGTT TCCTCTCAAGGAAAAG ACTGCACACAGA TTAAAGCT CTC
    T K R G T A V S S Q G K D C T Q I K A L
214 TCTC AAA TGCAT CCAGTGGG GTTT ACGT AATCCAGC CTCA TGGAGTCA AGGCCCA TTT
    S P N A S S G V Y V I Q P H G V K A P F
274 AAGGTGTACTGTGAGAT GCGG GCAGATGGAGGC TGGA TGGT GTTT CAGAGGCG CAGCGGA
    K V Y C E M R A D G G W M V F Q R R S G
334 GGAGAGGT TTCCT TTCA CAGGAAGT GGGC TGCA TATAAAAA TGGC TTTGAAA CCTGACA
    G E V S F H R K V A A Y K N G F G N L T
394 CAGACCA CTGGCTCGG TCTGAAGA AGGT TTTC ATTG TGAC CAAG CACA AGAC CAAGAAG
    H D H W L G L K K V F I V T K H K T K K
454 TGGACCAT GAGGG TGGA TTTA TCAG ACCA CAACGGGG CCAC CGCCTTCG CTGAGTAC AAA
    W T M R V D L S D H N G A T A F A E Y K
514 AACT TCAA ACTGA GAAA TGGG AAGG AACA TTTC AAC TGCA TGTCGGGA AATA CACAGGA
    N F K L R N G K E H F K L H V G K Y T G
574 AACG CAGG TGATG CCAT CCGT GGTG CCAA CGGAGAAG TTGA CCAG AACG GCTA CGGCTTC
    N A G D A I R G A N G E V D Q N G Y G F
634 AGCA CTAT TGACCGTGA CAACGATG GCTG CTCG CCCT GCAT CTTT GGTG ACAT TGCT CAA
    S T I D R D N D G C S P C I F G D I A Q
694 AGAGAATG TACCT TCACAGAGGGCG GAGG CTGG TGGT ACAG TAGA TGTG GTTC TGCCGGG
    R E C T F T E G G G W W Y S R C G S A G
754 CTGAATGGTGATT GGCA TCCT ACCG GTGA TCAC ATTG GCTG GGGG TCCG GCCT CCAC TGG
    L N G D W H P T G D H I G W G S G L H W
814 AGAA CCTG GAAAT TTCA CGGG GTGC ATTCTCTC AAGACCAG CAGA ATGA TGAT CAAG TCT
    R T W K F H G V H S L K T S R M M I K S
874 GTGTGA
    V *
880 gaggaggc cgcac atgt ttaacttc aggc tggat ttt gttgcagc acagctat tttagta
940 cccgagtgtctct gctt ttaaggtt aactgtgt tact ttgt tattgttt tcagtgaaactg
1 000 agaaatgt gtttagtc gatat gtaaggag caagtgcatttc tgtc attatgaa tcat cta
1 060 tgtgcaaacatag tcat taaaggct tgtgggtaataa tcac aaaaaaa aaaaaaaa
1 120 aaaaaaa agta

```

图1 牙鲆 *FREPI* 基因 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Paralichthys olivaceus FREPI*

小写字母代表3'、5'端非翻译区,大写字母为编码区,上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列,信号肽用深灰底色标出,C端纤维蛋白原样结构域用浅灰底色标出,*表示终止密码子,黑色三角形表示糖基化位点(N⁴³,N⁹⁸)多聚腺苷酸加尾信号(ataaaa),形成2个二硫键的4个半胱氨酸残基(C³⁴,C⁶⁴,C²⁰³,C²¹⁶)用黑色方框标示,C端纤维蛋白原样结构域标签用黑色下划线标出。

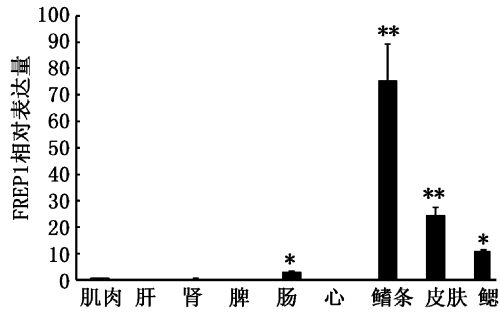
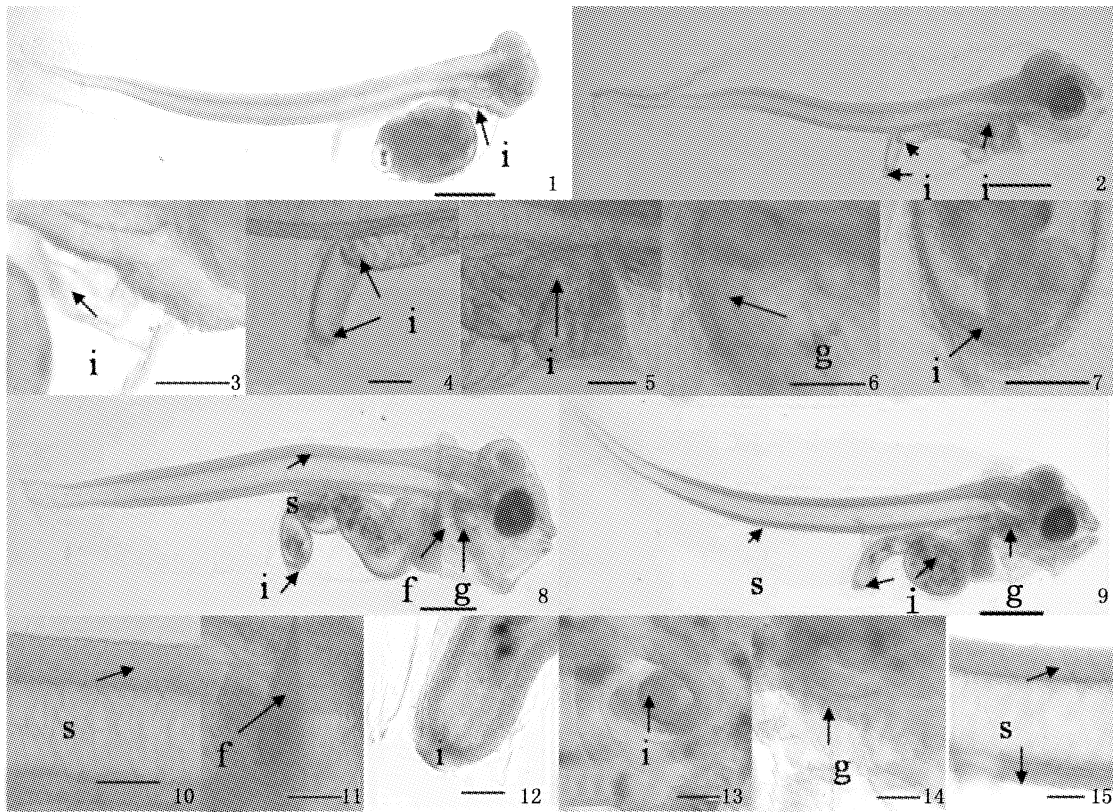


图3 FREPI 在牙鲆不同组织间的表达水平比较
Fig.3 Expression levels of FREPI

in different tissues of *Paralichthys olivaceus*

单星号(*)表示有显著差异($P < 0.05$),双星号(**)表示极显著差异($P < 0.01$)。

FREP 是一类 C 端含有 FLD 结构的糖蛋白, 现有研究表明 FREP 包含 MFAP4、FCN、FB、ANGPT/L 等多种蛋白^[1,5]。除 ANGPT/L 外, 其余 FREP 基因都与免疫反应相关。鱼类免疫系统包括先天性免疫和获得性免疫, 先天性免疫组织主要包括皮肤、鳃和消化道^[23]。有关从皮肤、鳃和消化道中分离获得和先天免疫相关分子报道很多, 如王辉等^[24]从牙鲆皮肤和鳃中提取了抗菌肽; LUMSDEN 等^[25]采用注射免疫虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*), 在免疫鱼鳃表面检测到相应抗原的抗体; DEZFULI 等^[26]对褐鳟 (*Salmo trutta*) 肠道感染绦虫, 发现多种与免疫相关的分子



图版 不同发育时期牙鲆仔鱼 FREPI 基因的表达分布

Plate Expressional pattern of FREPI during development of larvae *Paralichthys olivaceus*

1. 2 dph 仔鱼; 2. 5 dph 仔鱼; 3. 2 dph 仔鱼肠道放大观; 4,5. 5 dph 仔鱼肠道放大观; 6. 9 dph 仔鱼鳃; 7. 9 dph 仔鱼肠道; 8. 9 dph 仔鱼; 9. 13 dph 仔鱼; 10. 9 dph 仔鱼皮肤; 11. 9 dph 仔鱼胸鳍; 12,13. 13 dph 仔鱼肠道; 14. 13 dph 仔鱼鳃; 15. 13 dph 仔鱼皮肤。i. 肠道; f. 胸鳍; g. 鳃; s. 皮肤; 1,2,8,9 标尺为 500 μm ; 其余标尺均为 100 μm 。

在肠道中表达升高。荧光定量检测发现 FREPI 基因主要在牙鲆成鱼鳍条、皮肤、鳃和肠道中表达而脾脏、肾脏和肝脏等组织表达量极低, 这与 TfFREPI 基因在松江鲈鱼组织中表达模式是吻合的^[15], 推测 FREPI 基因可能与牙鲆成鱼鳍条、

皮肤、鳃和肠道先天性免疫相关。RNA 整体原位杂交检测发现 FREPI 基因只在牙鲆仔鱼(2 dph, 5 dph, 9 dph, 13 dph) 鳍条、鳃、肠道和皮肤中表达; 其中 2 dph、5 dph 仔鱼只在肠道表达, 而 9 dph、13 dph 仔鱼的表达区域扩大至鳍条、皮肤和

鳃。最近有研究报道称大多数鱼类在其仔鱼阶段特异性免疫器官尚未发育完全,先天性免疫在仔鱼抵御病菌的过程中发挥重要的作用^[27-29], *FREPI* 基因在牙鲆仔鱼的特异性表达给本文研究者重要启示:该基因可能参与了牙鲆仔鱼肠道、鳃、皮肤和鳍条的形成及其免疫反应。综合分析 *FREPI* 基因在牙鲆仔鱼和成鱼中的表达模式,本研究认为 *FREPI* 基因可能参与牙鲆鳍条、皮肤、鳃和肠道形成及其先天性免疫,但对于这一推测还需要进一步的研究和验证。

参考文献:

- [1] ROMERO A, DIOS S, POISA-BEIRO L, et al. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 35(3): 334-344.
- [2] FUJITA T, MATSUSHITA M, ENDO Y. The lectin-complement pathway and its role in innate immunity and evolution [J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 85-202.
- [3] ZHANG H, WANG L, SONG L, et al. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(1): 56-64.
- [4] WANG X, ROCHELEAU T A, FUCHS J F, et al. A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(2): 73-82.
- [5] THOMSEN T, SCHLOSSER A, HOLMSKOV U, et al. Ficolins and FIBCD1: soluble and membrane bound pattern recognition molecules with acetyl group selectivity [J]. *Molecular Immunology*, 2010, 48(4): 369-381.
- [6] GARRED P, HONORE C, MA Y J, et al. The genetics of ficolins [J]. *Journal of Innate Immunity*, 2010, 2(1): 3-16.
- [7] KAKINUMA Y, ENDO Y, TAKAHASHI M, et al. Molecular cloning and characterization of novel ficolins from *Xenopus laevis* [J]. *Immunogenetics*, 2003, 55(1): 29-37.
- [8] KENJO A, TAKAHASHI M, MATSUSHITA M, et al. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 19959-19965.
- [9] GOKUDAN S, MUTA T, TSUDA R, et al. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(18): 10086-10091.
- [10] MIDDHA S, WANG X. Evolution and potential function of fibrinogen-like domains across twelve *Drosophila* species [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 260.
- [11] ROMERO A, DIOS S, POISA-BEIRO L, et al. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(3): 334-344.
- [12] HANINGTON P C, ZHANG S M. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation [J]. *Journal of Innate Immunity*, 2011, 3(1): 17-27.
- [13] XIE F J, ZHANG Z P, LIN P, et al. Identification of immune responsible fibrinogen beta chain in the liver of large yellow croaker using a modified annealing control primer system [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 202-209.
- [14] NIU D, PEATMAN E, LIU H, et al. Microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) genes in catfish play a novel role in innate immune responses [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(5): 568-579.
- [15] CHAI Y, YU S, ZHU Q. The molecular cloning and characteristics of a fibrinogen-related protein (TfFREPI) gene from roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(3): 614-618.
- [16] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 MHC class II B 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的分析 [J]. *水产学报*, 2006, 30(5): 633-639.
- [17] 李伟, 陈松林, 张玉喜. 牙鲆抗菌肽 hepcidin 基因的克隆及表达分析 [J]. *高技术通讯*, 2007(1): 78-82.
- [18] 杜昌升. 牙鲆抗病毒及免疫相关基因的克隆鉴定及表达分析 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2005.
- [19] 李塑, 齐洁, 王志刚, 等. 牙鲆 *fibrinogen β* 基因的克隆及表达分析 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(6): 89-94.
- [20] XIE C, XU S, YANG L, et al. mRNA/microRNA profile at the metamorphic stage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2011: 1-12.
- [21] BAO B L, YANG G M, LIU Z J, et al. Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1725(1): 64-70.
- [22] 谢彩霞, 邢巨斌, 鲍宝龙. 牙鲆 *epigen* 基因的克隆以及在变态过程中的表达 [J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(5): 577-582.
- [23] MAGNADOTTIR B. Immunological control of fish diseases [J]. *Mar Biotechnol*, 2010, 12(4): 361-379.
- [24] 王辉, 安利国, 杨桂文. 牙鲆不同组织抗菌肽的提取及部

- 分性质检测[J]. 水产科学,2007,26(2):87-90.
- [25] LUMSDEN J S, OSTLAND V E, MACPHEE DD, et al. Production of gill-associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenges[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1995, 5(2): 151-165.
- [26] DEZFULI B S, ARRIGHI S, DOMENEGHINI C, et al. Immunohistochemical detection of neuromodulators in the intestine of *Salmo trutta* L. naturally infected with *Cyathocephalus truncatus* Pallas (Cestoda) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(4): 265-273.
- [27] 钱云霞,王国良,邵健忠. 鱼类的非特异性免疫调节[J]. 宁波大学学报,2000,13(1):95-99.
- [28] 徐晓津,翁朝红,王军,等. 大黄鱼早期发育过程中免疫器官的发生[J]. 海洋学报,2007,29(3):105-113.
- [29] 佟雪红,徐世宏,刘清华,等. 大菱鲆早期发育过程中免疫器官的发生[J]. 海洋科学,2011,35(6):62-67.

Cloning and expression analysis of a fibrinogen-related protein(*FREPI*) gene from Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*)

CHEN Wen-jun, BAO Bao-long

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Full-length cDNA *FREPI* (fibrinogen-related protein) was cloned from larval *Paralichthys olivaceus* by the way of RACE-PCR, and 1 131 bp-length *FREPI* cDNA with a 786 bp open reading frame encoded a putative protein containing a fibrinogen C-terminal domain signature (WWYSRCCSAGLNG). The whole amount *in situ* hybridization showed that *FREPI* was only expressed in intestine of 2 dph and 5 dph (days post-hatching) larvae, but expressed in fin, skin, gill and intestine of 9 dph and 13 dph larvae. qRT-PCR reveals that *FREPI* was expressed mainly in fin, skin, gill and intestine of adult fish, but was expressed very lowly in liver, heart, kidney, spleen and muscle. If muscle expression was a control sample, compared with the other tissues the expression of *FREPI* in fin and skin were highest ($P < 0.01$). But compared with gill and intestine, the expression of *FREPI* in heart, kidney, spleen, liver and muscle is much lower ($P < 0.05$). Since it was mainly expressed in skin, gill and intestine, which was associated with innate immunity system, *FREPI* may be an important member of innate immune system of *P. olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; FREP; RACE-PCR; qRT-PCR