

凡纳滨对虾 AP-1 基因的克隆和表达特征分析

吴 冰¹, 刘逸尘^{1*}, 张亦陈¹, 耿绪云², 孙金生^{1,2*}

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

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心,天津 300221)

摘要: 为了探讨凡纳滨对虾转录因子 AP-1 在病毒引发的免疫应答过程中的潜在作用,实验根据前期的转录组和表达谱结果提示信息,首次克隆了凡纳滨对虾 AP-1 基因(LvAP-1, GenBank 注册号:KF999956),利用在线软件进行了生物信息学分析,运用半定量的方法进行了组织表达分析,并利用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术分析了该基因在白斑杆状病毒(WSSV)侵染过程中的表达变化特征。结果显示,AP-1 基因 ORF 区全长 882 bp,编码 293 个氨基酸。预测分析显示该基因编码的蛋白质含有 1 个 Jun 结构域和 1 个高度保守的亮氨酸拉链结构域(bZIP),其中 Jun 结构域在非脊椎动物中保守性不高。组织表达分析表明,该基因在凡纳滨对虾各组织中广泛表达,其中在血细胞中表达量最高。在 WSSV 感染早期(0.5 hpi),该基因表达没有显著改变,感染后 5 h(5 hpi),AP-1 基因开始显著上调表达,在人工感染后 24 h,该基因的表达量达到最高($P < 0.01$)。研究表明,该基因在一定程度上参与了凡纳滨对虾体内由 WSSV 引发的先天免疫应答过程,为进一步研究 LvAP-1 在对虾应答病毒侵染过程中的功能和作用机制奠定了基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 转录因子激活蛋白(AP-1); 序列分析; 表达谱分析; 免疫应答

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

转录因子是一种调节蛋白,结合特定 DNA 序列的启动子下游区域或者在转录和翻译后水平结合靶基因来调节基因的表达^[1-2]。AP-1 参与众多的生物反应,是重要的转录因子^[3],它主要参与体内免疫系统的调控、细胞增殖、分化和凋亡等重要生物反应^[4-8]。然而到目前为止,AP-1 基因的研究主要集中在脊椎动物等高等生物上,近几年已在软体动物鲍鱼(*Haliotis discus discus*)^[9]和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)中分别克隆出 AP-1 基因,而甲壳动物 AP-1 基因的相关研究还未见报道。基于对脊椎动物 AP-1 的研究,可知 AP-1 基因参与多条信号传导通路,尤其调控着大量免疫应答相关基因的表达,所以对甲壳动物 AP-1 基因开展研究可以对其先天免疫应答作用机制的探讨

提供一定参考^[10]。AP-1 转录因子是由原癌基因 *jun* 和 *fos* 以及活性转录因子亚基基因 *atf* 分别编码的 Jun(c-Jun, JunB, JunD)、Fos(c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB)和 Atf 蛋白嵌合而成的二聚体复合物^[6],包括同源或者异源 Jun-Jun、Jun-Fos 或者 Jun-Atf^[7-11]。这种复合物能够结合到具有高度亲和性的启动子和增强子区域,从而调控基因表达^[12]。AP-1 基因编码的蛋白具有高度保守的亮氨酸拉链结构域(bZIP)和 1 个碱性氨基酸区^[1],在亮氨酸拉链附近富含带正电荷的赖氨酸和精氨酸,介导 AP-1 与靶基因启动子上的反式激活因子应答元件(TRE)相连接^[5]。实验前期的转录组和表达谱结果^[13]提示:白斑杆状病毒(WSSV)感染对虾后,AP-1 基因表达量有显著变化,表明其可能参与对虾应答病毒侵

收稿日期:2014-02-15 修回日期:2014-06-17

资助项目:国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA092205;2012AA10A401);国家“九七三”重点基础研究发展计划(2012CB114405);国家科技支撑计划(2011BAD13B04;2011BAD13B07)

通信作者:刘逸尘,E-mail:liuychn@outlook.com;孙金生,E-mail:jinsun@163.com

染的过程。本研究以凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血细胞为模板,首次克隆出 AP-1 基因,在此基础上对其进行序列和生物信息学分析以及组织表达特征分析和 WSSV 刺激时该基因的表达情况,为研究该基因在凡纳滨对虾先天免疫过程中应答病毒感染的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 凡纳滨对虾(体长 10 ~ 12 cm) 购于天津市汉沽区对虾养殖基地。

实验主要试剂及菌株 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(购自 Invitrogen); PrimeScript Reverse Transcriptase 和克隆载体 PMD-19T(购自 TaKaRa); *E. coli* Top-10F' (本实验室保存); 其他试剂均为国产或进口分析纯产品。

实验仪器 PCR 仪 (Bio-Rad); 冷冻离心机 (Eppendorf); NANODrop2000 (Thermo); 摇床; 恒温培养箱; 超净工作台等。

1.2 总 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

分别取 8 尾健康凡纳滨对虾的血液,经离心后得到血细胞,参照 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒说明书的方法提取血细胞总 RNA。提取后的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行定性检测以及使用 NANODrop2000 对其进行定量检测, -80 °C 保存备用。以 2 μ L 凡纳滨对虾血细胞 RNA 为反转录模板, AOLP (5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTAC (T)₁₆ (A/C/G)-3') 为反转录引物, 根据 PrimeScript Reverse Transcriptase 说明书合成第一链 cDNA。

1.3 AP-1 基因的克隆

根据前期本实验室转录组测序结果^[13], 设计该序列特异性引物 F (5'-TCCGCTAGTGACTCATCGT-3') 和 R (5'-GGCATCCACATACTCC-3'), 以凡纳滨对虾血细胞 cDNA 为模板, 利用 PCR 方法进行扩增, 并在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 获得目的条带, 进行割胶回收, 与克隆载体 PMD-19T 16 °C 过夜连接, 转化到感受态内, 并挑取阳性克隆进行测序验证。

1.4 AP-1 基因的生物信息学分析

利用在线软件 (<http://www.expasy.org/>)

tools) 将测序结果翻译成蛋白质序列, 并对其进行分子量及等电点的预测。在 NCBI 的 Protein Blast 数据库中搜寻具有较高同源性的 AP-1 蛋白质序列, 利用 Clustal-X 和 MEGA 5.0 软件进行多序列比对和聚类分析, 系统发生树采用 Neighbour-Joining 方法构建。

1.5 AP-1 基因的组织表达分析

取正常未染病对虾的心、肝胰腺、鳃、血细胞、肌肉、肠和神经 7 种组织, 进行 RNA 提取和反转录成 cDNA, 利用半定量的方法检测各组织中该基因的表达情况。以 β -actin f (5'-GAAGTAG-CCGCCCTGGTTG-3') 和 β -actin r (5'-CGGTT-AGCCTTGGGGTTGAGGGGAG-3') 为内参基因的扩增引物, 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 26 个循环, 72 °C 总延伸 10 min。将调整好的各组织的模板 cDNA 量来扩增目的基因。以 AP-1f (5'-GCCCCATCCACCAACACCA-3') 和 AP-1r (5'-CGTCTGCGGCTCCTCCTT-3') 为目的基因的扩增引物, 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 26 个循环, 72 °C 总延伸 10 min。PCR 产物均在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。并利用 BandScan 软件分析电泳条带灰度, 从直观上反映该基因在不同组织中的相对表达量。

1.6 AP-1 基因应答 WSSV 感染的表达分析

该实验分为对照组和实验组。实验组每尾虾注射 WSSV 病毒 10⁶ 拷贝数的 WSSV 悬液, 而对照组注射等体积的 TN 缓冲液, 注射后分别于 0、0.5、5、12、24、36、48 及 72 hpi (hours past infection) 取血细胞, 提取血细胞总 RNA 并经反转录获得 cDNA, 将得到的 cDNA 作为 Real-time PCR 的模板, 以磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, TPI) 作为内参, 引物为 TPI-qF (5'-GGTCACGTGTTGTCTTGGCTTATGAACC-3') 和 TPI-qR (5'-CTGAACAAAGTCTGGCTTGAGAGCTGC-3')。Real-time PCR 的反应体系为 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环; 最后经 55 °C 升温到 95 °C, 每个循环上升 0.5 °C 进行融解曲线分析。所获得的数据经统计分析后使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算, 并采用 *t* 检验分析目的基因 AP-1 显著性差异。

2 结果

2.1 AP-1 基因的序列分析

以凡纳滨对虾血细胞 cDNA 为模板,克隆到凡纳滨对虾 AP-1 基因 ORF 区为 882 bp, 编码 293

个氨基酸,预测其分子量为 32.7 kDa,等电点为 7.80。通过 SMART 在线分析发现,AP-1 编码的蛋白质含有 Jun 结构域和 1 个高度保守的亮氨酸拉链结构域(bZIP)(图 1)。

```

1 gcagacagcagaggctgaacgtgtgtcgtgcttatatgtgatgagatataagactgtgcctcatagtgtgagtcogtccgctagtactca
1 M E A T M Y E D G S Y N N
91 tcgtgaaccaccacgtgccaagaagtttgtttgtgtaagactagttatggaggcaaccatgtaccaggacgggtcgtaaccaac
14 Y S K E S V N Q M K R K L T L D F T R P S K K Q R P G G N F
181 TACTCTAAGGAAAGTGTAAACCAGATGAAACGCAAATGACGCTGGATTTCACCAGACCGTCCAAGAAACAGCGACCAGGAGGCAATTC
44 N P L L T S P D L N Q L K L A S P E L E R L I M Q Q G S T I
271 AACCCACTTCTAACTTCCCGGACCTCAACCAGCTGAAGTTCCTCCAGTTCGCGAGTGGAGAGACTGATTATGCAGCAGGGGAGCACCATC
74 L N S N T V T T P S Q F F P S K T A T V E E E E F A K G F
361 CTCAACAGCAACACGGTGACGACGCCCTCCAGTTCCTTCCCGCAGCAAAACCGCCACCGTCGAGGAGGAAGAAATCGCCAAAGGATTT
104 E D T L E Q L H H Q D A I S T S G S G T V V V T S V A P S V
451 GAGGACACTTTGGAACAGCTGCACCACCAGGATGCCATCTCCACCAGCGGTAGCGGCACGGTCGTCGACCAGCGTGGCCCTTCAGTG
134 S S A P L Q Y T Q L D V P I H Q H H A H H P H Q Q V P V T
541 TCTTCGGCGCCCTTCAGTATACCCAGCTGGATGTGCCATCCACCAACACCACCACCGCCACCCCCATCAGCAGGTTCTGTGACA
164 S G A A V S L S V S E S Q H H V A A H L G L L P P A H I K E
631 TCGGGCGCGCGTATCGCTATCGGTGAGCGAGTCCCAGCACCAATGTGGCGGCGCATCGGGCCTGTGCCACTGCGCACATCAAGGAG
194 E P Q T V P S V S G S P P L S P I D M E C Q E R I K L E R K
721 GAGCCGACAGCGTGCCAGCGTGAGTGGCTCGCTCCGCTATCGCCATCGATATGGAGTGCAGGAGCGGATCAAGTTGGAGCGCAAG
224 R I R N R I A A S K C R R R K L E R I S R L E E K V K T L K
811 CGGCTGCGGAATCGAATCGCGCGTCCAAGTCCCGCGTCCGAAAGTGGAGCGCATCAGCCGCTCGGAGGAGAAGGTGAAAACGCTCAAG
254 G E N M E L Q A V V N K L Q V C S L K Q E V M E H V N S
901 GCGGAGAACATGGAGCTGCAGGCGGTGGTCAACAAGCTCCGCGACCAGGTGTCTCGCTCAAGCAGGAGGTGATGGACACGTCAACTCA
284 G C Q I P F V T H Q *
991 GGGTGCCAGATCCCTTCGTAACGCACCAGTGAcgtgacgacgaagcaccgtaacgtgcccagatcaccacagaccgccccccccccaca
1081 gccagccagaccgccccccgacgcccccaatggaccocctctgctggccccgctgtttgtggtgcccgtgtgagcagctagcgcctga
1171 cctccctacagcaacctgtaggaggccccgacggcagcagttgtacacggagttgtatgtggatgcccagacctggtttctgtgagagg
1261 cagccagggggggcgaatcccggtgagggcggaatattgttaccggggctggggagcagaaccactataccgggctgttctgtatc
1351 aagtgagcgcgtgactcggccgccatagtgcgctcgcgccccaccgccccaccgccccgacgccccgacgccccgccccgccccg
1441 atgtgatagtcccgtgtatgcaaaaaatgtgctaaaatcttccatttttattcttactactgcagtgctttaccagacagcaattt
1531 ttctatggaacaccagtcattggcccagcctcactttgttggttcacagatctattgctgtttctatttctttatgcagtttgatgatc
1621 aaggtcagtcagtgatacccttctaatgtcatgtcaagaatttctgaccttgtgtgtaactaagtattaccgtgatatgaaagtg

```

图 1 凡纳滨对虾 AP-1 基因的核酸序列及其氨基酸序列

下划线部分为亮氨酸拉链结构域(bZIP),阴影部分为 Jun 结构域

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AP-1

The basic leucine zipper (bZIP) domain is underlined, the shaded amino acids indicate the predicted Jun domain

2.2 AP-1 基因的多重序列比对及系统发生树构建

将 AP-1 序列 NCBI 数据库中进行 Blast-P 比对,结果发现,该蛋白与其他物种 AP-1 蛋白大致有 40%~48% 的相似度,其中与肩突硬蜱 (*Ixodes Scapularis*) 相似性最高,达到 48%,与斑马鱼 (*Danio rerio*) AP-1 的相似性达到 45%,与小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 也分别有 42% 和 43% 的相似性。多序列比对分析结果显示,脊椎动物的 AP-1 蛋白有较高的相似度,高达 90% 以上。而无脊椎动物 AP-1 蛋白保守性相对较低,只有约 45% 的相似性(图 2)。将上述有关序列及其他物种 AP-1 蛋白序列构建系统发生树,分析它们之间的进化关系,结果

表明上述序列共聚为 3 组,分别是脊椎动物,软体动物和节肢动物(图 3)。凡纳滨对虾 AP-1 与节肢动物切叶蚁 (*Acromyrmex echinator*) 聚到一个分支上。

2.3 AP-1 基因的组织表达分析

利用半定量的方法分析了 AP-1 在不同组织中的表达情况(图 4-a)。结果显示,该基因在凡纳滨对虾的心、肝、鳃、血细胞、肌肉、肠和神经中均有不同程度表达,尤其在血细胞中表达量最高,而在心脏中表达量最低。利用 BandScan 软件对电泳条带进行灰度分析(图 4-b),结果与肉眼观察结果一致。血细胞中该基因的表达量为内参 β -actin 的 3.11 倍,而心组织相对含量较少,仅为内参的 0.58 倍。

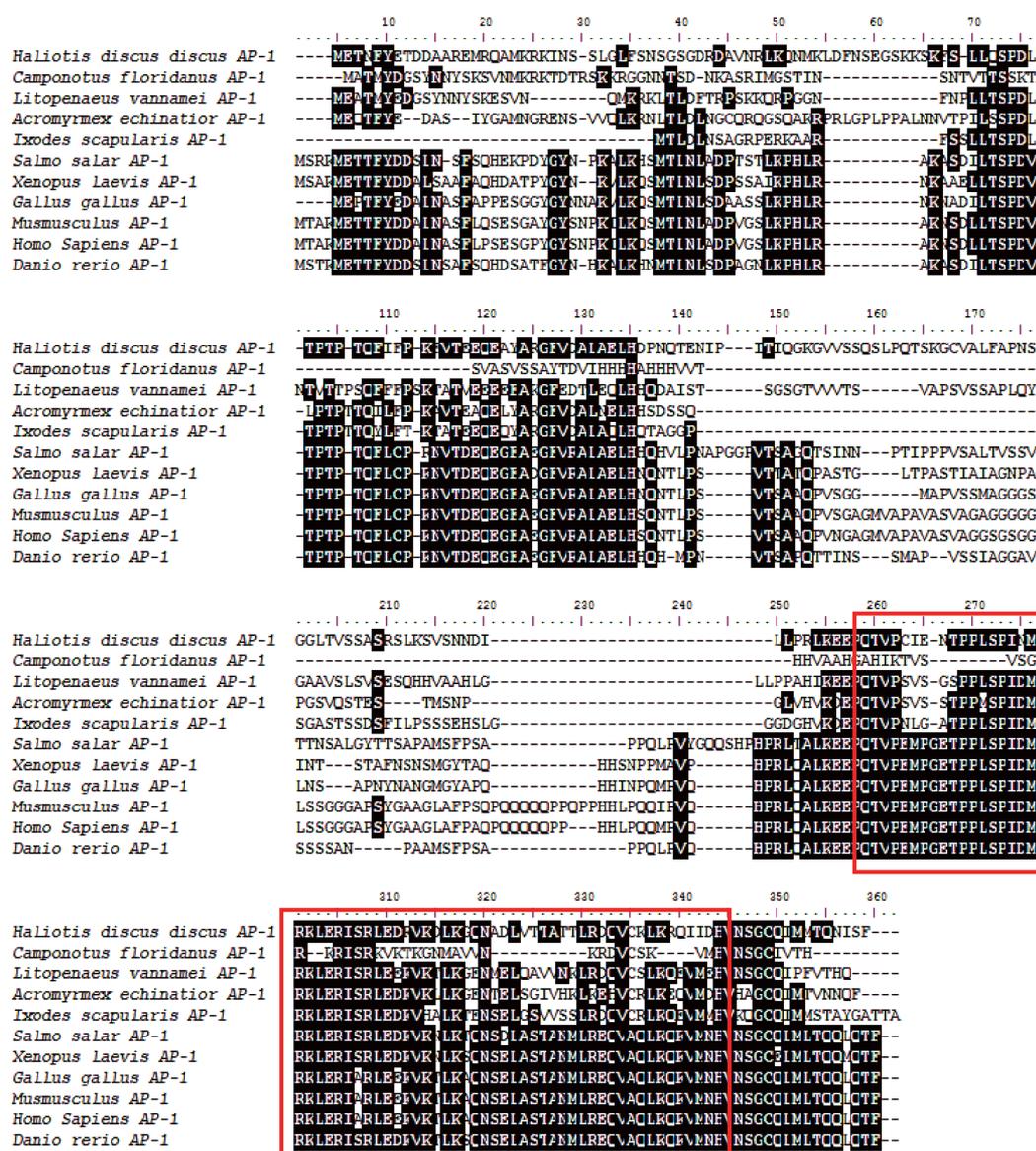


图 2 凡纳滨对虾 AP-1 与其他物种 AP-1 蛋白的多序列比对结果

红色矩形内为保守的亮氨酸拉链(bZIP)结构域;其他物种 AP-1 蛋白及其 GenBank 注册号分别为,鲍鱼 AP-1 (ADQ43242);佛罗里达弓背蚁 AP-1 (EFN66194.1);切叶蚁 AP-1 (EGI68820.1);肩突硬蜱 AP-1 (XP_002404571);大西洋鲑 AP-1 (ACN11435);非洲爪蟾 AP-1 (NP_001084266);原鸡 AP-1 (NP_001026460);小鼠 AP-1 (NP_034721);人 AP-1 (NP_002219);斑马鱼 AP-1 (NP_956281)

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of AP-1 with other species

The sequences of amino acids in the red rectangle are the conserved leucine zipper domain (bZIP); GenBank accession number; *Haliotis discus discus* AP-1 (ADQ43242); *Camponotus floridanus* AP-1 (EFN66194.1); *Acromyrmex echinatio* AP-1 (EGI68820.1); *Ixodes scapularis* AP-1 (XP_002404571); *Salmo salar* AP-1 (ACN11435); *Xenopus laevis* AP-1 (NP_001084266); *Gallus gallus* AP-1 (NP_001026460); *Mus musculus* AP-1 (NP_034721); *Homo sapiens* AP-1 (NP_002219); *Danio rerio* AP-1 (NP_956281)

2.4 AP-1 基因应答 WSSV 感染的表达分析

经 RT-PCR 方法分析了虾血细胞中 AP-1 基因在 WSSV 病毒感染后的不同时间的表达

变化特征(图 5)。结果显示:在注射 WSSV 病毒初期(0.5 h)时没有显著变化,直到注射后 5 h 时,AP-1 基因开始显著上调表达,在 12 h 时

AP-1 基因表达量有所下降,但也是对照组的 1.52 倍,具有显著差异 ($P < 0.05$)。直到注射 WSSV 病毒后 24 h 时,*AP-1* 基因的相对表达量达到最高,是对照组的 2 倍多,具有极显著的差异 ($P < 0.01$)。而后的 48 和 72 h *AP-1* 基因的表达量略有下降,但与对照组相比,仍有显著变化 ($P < 0.05$)。所以 WSSV 病毒感染可以显著诱导 *AP-1* 基因的上调表达,参与机体的免疫反应。

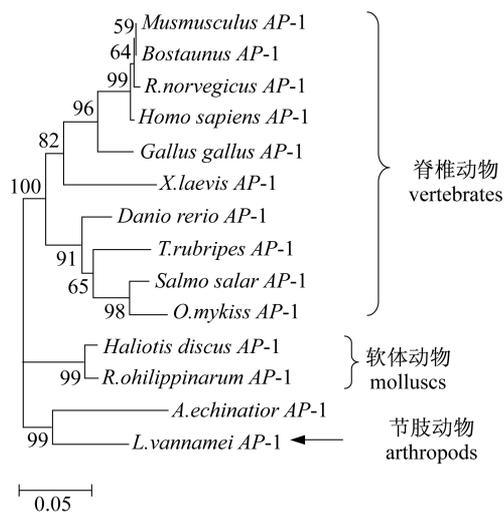


图 3 凡纳滨对虾 *AP-1* 与其他物种 *AP-1* 之间的进化分析

凡纳滨对虾 *AP-1* 用箭头标出。其他物种 *AP-1* 蛋白及其 GenBank 注册号分别为,小鼠 *AP-1* (NP_034721); 牛 *AP-1* (NP_001071295); 褐家鼠 *AP-1* (NP_068607); 人 *AP-1* (NP_002219); 原鸡 *AP-1* (NP_001026460); 非洲爪蟾 *AP-1* (NP_001084266); 斑马鱼 *AP-1* (NP_956281); 红鳍东方鲀 *AP-1* (CAD56856); 大西洋鲑 *AP-1* (ACN11435); 虹鳟 *AP-1* (NP_001117883); 鲍鱼 *AP-1* (ADQ43242); 菲律宾蛤仔 *AP-1* (ADZ48236); 切叶蚁 *AP-1* (EGI68820.1)

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *L. vannamei AP-1* with other species

L. vannamei AP-1 was marked with the arrow. GenBank accession number: *Mus musculus AP-1* (NP_034721), *Bostaurus AP-1* (NP_001071295), *Rattus norvegicus AP-1* (NP_068607), *Homo sapiens AP-1* (NP_002219), *Gallus gallus AP-1* (NP_001026460), *Xenopus laevis AP-1* (NP_001084266), *Danio rerio AP-1* (NP_956281), *Takifugu rubripes AP-1* (CAD56856), *Salmo salar AP-1* (ACN11435), *Oncorhynchus mykiss AP-1* (NP_001117883), *Haliotis discus discus AP-1* (ADQ43242), *Ruditapes philippinarum AP-1* (ADZ48236), *Acromyrmex echinator AP-1* (EGI68820.1)

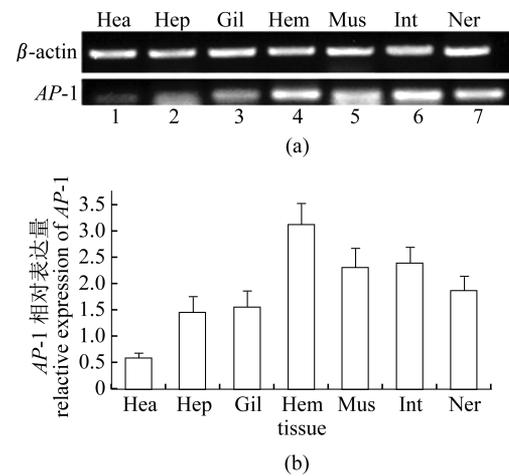


图 4 凡纳滨对虾 *AP-1* 基因组织表达特征

(a) *AP-1* 基因组织表达的凝胶电泳检测; (b) *AP-1* 基因组织表达的凝胶灰度分析。1. 心; 2. 肝; 3. 鳃; 4. 血; 5. 肌肉; 6. 肠; 7. 神经

Fig. 4 Tissue expression of *AP-1*

(a) gel electrophoresis of *AP-1* gene expression in tissue; (b) expression of *L. vannamei AP-1* gene by gray scale analysis. 1. heart; 2. hepatopancreas; 3. gill; 4. hemocytes; 5. muscle; 6. intestine; 7. nerve

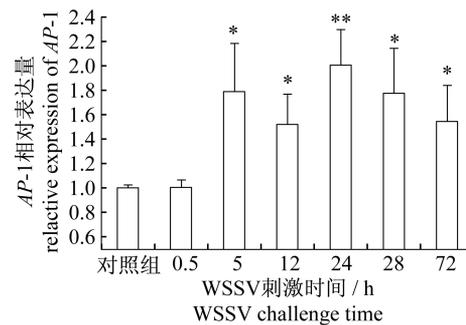


图 5 RT-PCR 方法检测 WSSV 感染后不同时间点凡纳滨对虾血细胞 *AP-1* 的相对表达量

* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 5 RT-PCR analysis temporal expression of *AP-1* after WSSV challenge in hemocytes

* indicate significant difference ($P < 0.05$), ** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$)

3 讨论

转录因子 *AP-1* 参与众多的生物反应,是重要的转录因子^[14],长期以来,对转录因子 *AP-1* 基因的研究主要集中在脊椎动物等高等生物上,对甲壳动物 *AP-1* 基因的研究还未见报道,但该基因的重要性受到了越来越多的关注,在低等动物中对其的研究也陆续开展起来。2012 年首次在进化

地位处于脊椎动物与无脊椎动物之间的文昌鱼 (*Branchiostoma japonicum*) 上进行研究,证明了 AP-1 基因参与卵巢的发育,与文昌鱼的生长发育密切相关,且清楚地发现 AP-1 基因在脊椎动物和无脊椎动物之间具有进化的差异性^[4]。在免疫方面,AP-1 基因参与 Toll 样受体和 NF- κ B 等免疫通路^[15],De Zoysa 等^[9]对鲍鱼进行病原刺激,刺激后 AP-1 基因表达有显著变化,与本实验室前期转录组结果中凡纳滨对虾 AP-1 基因应答 WSSV 感染的表达变化模式相吻合,表明其可能通过调控下游效应基因表达来参与对虾应答病毒感染过程。

本研究以凡纳滨对虾血细胞为模板,首次克隆出 AP-1 基因。AP-1 蛋白常以二聚体的形式存在,而 AP-1 蛋白之间及其他蛋白的相互作用也是 AP-1 发挥生物学作用所必需的^[16-17]。SMART 在线软件预测该蛋白 N 端具有与 DNA 结合负责转录激活的 Jun 结构域,C 端具有负责形成二聚体的较保守的亮氨酸拉链 (bZIP) 结构域^[18],是典型的 DNA 结合域,与转录因子的功能相一致,并显示了其进化的保守性。在亮氨酸拉链附近也发现富含赖氨酸和精氨酸等带正电荷的氨基酸^[5] (图 1),Jun 结构域通过这些碱性氨基酸构成的疏水区相互作用形成稳定的二聚体结构^[3],结合 DNA 序列特异的识别位点 5'-TGAG/CTCA-3' (又称作 TRE)^[19],这些结构特征均与曾报道过的 AP-1 蛋白结构相一致,通过该位点结合 DNA 进而发挥其生物学调控作用^[20-21]。AP-1 蛋白也可通过磷酸化来调控转录激活能力,据报道人的 AP-1 基因具有几个磷酸化位点:S63/S73/T91/T93 具有磷酸化增强转录激活能力,T231/S243 具有磷酸化抑制 DNA 结合能力^[22],而这些关键位点在凡纳滨对虾中也有发现,分别是 S49/S59/T78/T80 和 T197/S208,推测其也有磷酸化修饰蛋白的功能,可以增强和抑制转录活性。凡纳滨对虾 AP-1 蛋白序列与其他物种同源性并不高,但其中脊椎动物 AP-1 之间的同源性较高(图 2),高达 90% 以上,表明了脊椎动物 AP-1 基因进化的保守性,而包括凡纳滨对虾 AP-1 蛋白在内的无脊椎动物 AP-1 蛋白 C 端的亮氨酸拉链 (bZIP) 结构域相对比较保守。在进化树分析中,AP-1 被分为 3 组,分别是脊椎动物、软体动物和节肢动物(图 3),而脊椎动物也明显分为哺乳动物和鱼类,凡

纳滨对虾 AP-1 蛋白与切叶蚁聚到一个分支上,同属节肢动物门,但与脊椎动物亲缘关系较远。

组织表达分析结果显示,AP-1 基因在凡纳滨对虾各组织中均呈组成型表达,不具有组织特异性,其中在血细胞中表达量较高,而血细胞在对虾的免疫防御过程中具有重要的作用,这与 AP-1 基因在免疫调控中的功能具有一定的相关性。该基因在肌肉和神经等组织中表达量也较高,可能参与对虾的生长^[4]和细胞凋亡^[14]等重要反应。

对虾血细胞中 AP-1 基因在 WSSV 病毒感染后不同时间点呈现了不同的表达特征(图 5)。从实验结果可以推断,在 WSSV 感染早期 (< 5 hpi),AP-1 基因的表达几乎没有变化,表明该基因几乎没有参与对病毒感染的应答,AP-1 是一个转录因子,而非结合病毒的模式识别受体,因此可能不在病毒感染的早期阶段发挥作用;在感染后 5 h 时,AP-1 基因表达的显著上调表明其开始参与应答病毒感染反应,到了感染后 24 h,该基因的表达量达到峰值,此时其在最大程度上参与了抗病毒应答过程,可能此时血细胞已完成大量复制,或激发起自身的免疫防御系统;在对虾感染 WSSV 48 ~ 72 h 期间,AP-1 基因的表达量略有下降,但与对照组相比,仍有显著上调变化 ($P < 0.05$)。表明 AP-1 基因可能通过在病毒感染的中晚期发挥作用而参与机体抵抗病毒入侵的免疫反应。基于脊椎动物 AP-1 的研究基础,可知 AP-1 基因参与多条信号传导通路,尤其调控着大量免疫相关基因的表达。本研究为深入探讨 AP-1 基因在凡纳滨对虾先天免疫应答过程中的作用机制奠定了理论基础,后续该基因调控对虾抗病毒免疫应答的精确功能研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Baeuerle P A. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1072 (1): 63 - 80.
- [2] Jackson S P. Regulating transcription factor activity by phosphorylation [J]. *Trends in Cell Biology*, 1992, 2(4): 104 - 108.
- [3] He Q N. Research progress on the transcription factor AP-1 [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Pediatrics*. 1999, 26(3): 152 - 155. [何庆南. 转录因子 AP-1 的研究进展. 国外医学儿科学分册, 1999, 26(3): 152 - 155.]

- [4] Tan J. Cloning and Expression of Japanese amphioxus AP-1 transcription factor gene [D]. Shanghai:Shanghai Ocean University, 2012. [谭俊. 日本文昌鱼转录因子 AP-1 基因的克隆和表达. 上海:上海海洋大学, 2012.]
- [5] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1072 (2 - 3): 129 - 157.
- [6] Karin M, Shaulian E. AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death [J]. *IUBMB Life*, 2001, 52 (1 - 2): 17 - 24.
- [7] Vesely P W, Staber P B, Hoefler G, *et al.* Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins [J]. *Mutation Research*, 2009, 682 (1): 7 - 12.
- [8] Shaulian E. AP-1 the Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise [J]. *Cellular Signalling*, 2010, 22 (6): 894 - 899.
- [9] De Zoysa M, Nikapitiya C, Lee Y, *et al.* First molluscan transcription factor activator protein-1 (AP-1) member from disk abalone and its expression profiling against immune challenge and tissue injury [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29 (6): 1028 - 1036.
- [10] Foletta V C, Segal D H, Cohen D R. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1 [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1998, 63 (2): 139 - 152.
- [11] Halazonetis T D, Georgopoulos K, Greenberg M E, *et al.* c-Jun dimerizes itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities [J]. *Cell*, 1988, 55 (5): 917 - 924.
- [12] Curran T, Robert F J B. Fos and Jun: AP-1 connection [J]. *Cell*, 1988, 55 (3): 395 - 397.
- [13] Xue S, Liu Y, Zhang Y, *et al.* Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e76718.
- [14] Ameryar M, Wisniewska M, Weitzman J B. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against [J]. *Biochimie*, 2003, 85 (8): 747 - 752.
- [15] Fan H, Peck O M, Tempel G E, *et al.* Toll-like receptor 4 coupled GI protein signaling pathways regulate extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and AP-1 activation independent of NF- κ B activation [J]. *SHOCK*, 2004, 22 (1): 57 - 62.
- [16] Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1 [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (19): 2476 - 2489.
- [17] Zhou C C, Liu Z H, Qi J. Advances in research on the relationship between AP-1 and tumor [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 14 (1): 1 - 5. [周长春, 刘芝华, 齐军. AP-1 和肿瘤的关系研究进展. 世界华人消化杂志, 2006, 14 (1): 1 - 5.]
- [18] Cottage A J, Edwards Y J, Elgar G. AP-1 genes in Fugu indicate a divergent transcriptional control to that of mammals [J]. *Mammalian Genome*, 2003, 14 (8): 514 - 525.
- [19] Angel P, Imagawa M, Chiu R, *et al.* Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor [J]. *Cell*, 1987, 49 (6): 729 - 739.
- [20] Sun Y, Oberley L W. Redox regulation of transcriptional activators [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 21 (3): 335 - 348.
- [21] Zhang L Q. C-Jun leucine zipper binding protein (Jlip) studies on the regulation of AP-1 and ATM [D]. Beijing: PLA Military Academy of Medical Sciences, 2003. [张令强. C-Jun 亮氨酸拉链结合蛋白 (Jlip) 对 AP-1 和 ATM 的调控研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2003.]
- [22] Zhang L Q, He F C. C-Jun/activator protein-1 activity regulation Progress [J]. *Biochemistry and Biophysics*, 2002, 29 (6): 872 - 876. [张令强, 贺福初. C-Jun/激活蛋白-1 活性调节研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (6): 872 - 876.]

Cloning and expression profile analysis of AP-1 gene from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

WU Bing¹, LIU Yichen^{1*}, ZHANG Yichen¹, GEN Xuyun², SUN Jinsheng^{1,2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance/College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Tianjin 300221, China)

Abstract: The purpose is to study *Litopenaeus vannamei* transcription factor AP-1 potential role in the immune response triggered by the virus. Our previous transcriptome results showed that the expression profile of AP-1 fluctuated significantly in response to WSSV infection. In this research, a novel AP-1 gene (GenBank Accession Number: KF999956) was cloned from Pacific white shrimp (*L. vannamei*). The full length cDNA of AP-1 has an 882bp ORF encoding 293 amino acids. The predicted molecular weight and calculated isoelectric point of AP-1 was 32.7 KDa and 7.80. The online software (SMART) analysis results showed that two predicted domains including the Jun protein domain and a highly conserved basic leucine zipper (bZIP) which existed in the deduced protein of AP-1. Multiple alignment analysis shows that AP-1 shared 48%, 42% and 43% amino acid identities with *Ixodes Scapularis*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*, respectively. Tissue expression analysis by Semi-quantitative RT-PCR revealed that expression of AP-1 gene is constitutive in all selected tissues and shows highest expression in hemocytes. The transcript of AP-1 is induced in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection. At the early stage of WSSV infection (0.5 hpi), AP-1 did not change significantly. Then the expression of AP-1 gene began to increase after 5 hpi. At 24 hpi, the gene expression increased significantly and reached the highest level ($P < 0.01$). From this result, it could be deduced that AP-1 gene took part in shrimp innate immune response caused by WSSV.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; AP-1; sequence analysis; expression profile analysis; immune response

Corresponding author: LIU Yichen. E-mail: liuychn@outlook.com;

SUN Jinsheng. E-mail: jinshsun@163.com