



凡纳滨对虾JAK和STAT基因在苏云金芽孢杆菌 侵染过程中的表达变化分析

李丹蕾¹, 郝少彦¹, 张亦陈¹, 耿绪云², 刘逸尘^{1*}, 孙金生^{1*}

(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. 天津市水产研究所, 天津 300221)

摘要: 为了分析凡纳滨对虾JAK (*Lv-JAK*)和STAT (*Lv-STAT*)基因应答病原菌侵染的表达变化特征, 本实验利用半定量PCR技术分析了*Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因的组织表达特征, 并利用实时荧光定量PCR技术分析了其在苏云金芽孢杆菌侵染过程中的表达变化特征。结果显示, *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因在凡纳滨对虾的9种组织中有不同程度的表达, 均在鳃、肠道和心脏中表达量较高。苏云金芽孢杆菌感染后, 在鳃组织中, *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因的相对表达量在感染的中晚期(24~72 h)显著上调表达; 在肠道组织中, *Lv-JAK*基因的相对表达量在感染后的6和24 h显著上调, *Lv-STAT*基因的相对表达量在感染后的24和72 h显著上调。综上表明, JAK和STAT基因在一定程度上参与了凡纳滨对虾体内由苏云金芽孢杆菌引发的天然免疫应答过程, 探讨凡纳滨对虾JAK和STAT基因应答苏云金芽孢杆菌感染的表达变化特征, 有助于研究对虾JAK/STAT通路在应答病原菌侵染过程中的功能和作用机制。

关键词: 凡纳滨对虾; JAK/STAT; 基因表达; 细菌感染; 天然免疫应答

中图分类号: Q 785; S 941.42

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界范围内重要的水产养殖种类。目前对虾病害频发, 对虾养殖产业受损严重, 因此对其免疫防御机制的研究就显得十分必要。天然免疫系统在获得性免疫系统特异应答之前发挥作用^[1], 能够区分病原体 and 自身, 从而成功地保护生物体免受感染^[2]。对虾属于无脊椎动物, 不具备获得性免疫系统, 只能依靠天然免疫系统来抵御和杀死入侵的病原^[3-7]。JAK/STAT通路作为天然免疫的重要组成部分, 在免疫应答中发挥了至关重要的作用。在哺乳动物中, JAK/STAT信号通路的核心成分包含细胞因子和跨膜受体, 4种

JAK激酶成员和7种STAT蛋白^[8-11]。JAK/STAT信号通路可被多种配体激活, 如细胞因子、生化介质和病原等。这些配体结合到相应的酪氨酸激酶相关受体, 通过将受体二聚化来激活JAK, 然后由活化的JAK磷酸化STAT上的特异性酪氨酸残基, 从而形成二聚体, 通过这种方式穿过核膜并与DNA靶序列特异性结合, 以此来启动细胞因子应答基因转录^[12-13]。有研究表明, WSSV感染能够调控对虾体内JAK^[14]和STAT^[15-17]的转录水平, 提示对虾体内可能存在JAK/STAT通路, 但其在细菌感染过程中的免疫应答特征鲜有报道。

收稿日期: 2019-09-19 修回日期: 2019-10-28

资助项目: 国家自然科学基金(31472299); 天津市应用基础与前沿技术研究计划(15JCZDJC33800); 天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金(TJAE2015005); 天津市高等学校创新团队建设规划(TD13-5076); 天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目; 天津市水产产业技术体系创新团队(ITFRS2017007)

通信作者: 刘逸尘, E-mail: skylyc@tjnu.edu.cn; 孙金生, E-mail: skysjs@tjnu.edu.cn

急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是一种危害养殖虾类的细菌性疾病,经济受影响严重,目前,我国主要海水养殖虾类地区均有流行。患病对虾主要表现为肝胰腺萎缩且颜色变浅、空肠空胃、甲壳变软、失去活力等症状,死亡率高达100%。从患病对虾中分离出的致病菌63%为副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),同时还有31.8%为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),用分离出来的苏云金芽孢杆菌对健康对虾进行人工感染,对虾死亡率为62%,死亡对虾表现出典型的肝胰腺坏死症状^[18]。本实验室前期转录组分析结果显示,几种主要致病菌的感染可以引发JAK/STAT途径中关键因子表达的显著改变。本研究在分析Lv-JAK和Lv-STAT基因组织表达分布的基础上,探究了其应答苏云金芽孢杆菌侵染的表达变化特征,研究结果有助于探讨对虾JAK/STAT信号通路在抗菌免疫应答过程中的作用及调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与仪器

实验动物 凡纳滨对虾(体长9~13 cm)来自天津水产研究所,于实验室循环养殖系统中(27 °C,盐度3‰~4‰,充氧)暂养3~4 d,使其适应实验室内养殖环境。

实验试剂 TRIzol (Invitrogen), GoScript™ Reverse Transcription System和GoTaq® Green Master Mix (Promega), AceQ® qPCR-SYBR® Green Master Mix (Vazyme),其他试剂均为国产或进口分析纯产品。

实验仪器 Veriti™ PCR仪(Applied Biosystems), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher), Smart spec™ Plus分光光度计(Bio-Rad),台式冷冻离心机(Eppendorf),微量移液器(Eppendorf), LightCycler® 480 System (Roche), Gel Doc™ XR+成像系统(Bio-Rad)等。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

解剖分离健康凡纳滨对虾的血、肝胰腺、鳃、肠道、胃、心脏、神经、游泳足和肌肉等共9种组织,利用TRIzol提取各组织的总RNA。经1%MOPs琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪(NanoDrop 2000)进行定性和定量检测, -80 °C保存备用。根据GoScript™ Reverse Transcription

System说明书,以2 μg各组织总RNA为反转录模板,用接头引物AOLP和BDA合成cDNA,利用管家基因β-actin及引物(Actin-F和Actin-R)检测cDNA质量(表1)。

表1 实验所用引物序列

Tab. 1 Information of primer sequences used in the present study

引物名称 primers name	引物序列(5'-3') sequences (5'-3')
AOLP	5'-GGCCACGCGTCTAGTAC(T)16(A/C/G)-3'
BDA	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAAGTACGCGGG-3'
Actin-F	5'-GAAGTACCGCCCTGGTTG-3'
Actin-R	5'-CGGTTAGCCTTGGGGTTGAGGGAG-3'
JAK-BF	5'-ACTCTATCCGACGGCACCCTACTA-3'
JAK-BR	5'-ACCACCCATAATACCCTCTC-3'
STAT-BF	5'-CTGTCTTTGCCAGTTGTAGTCA-3'
STAT-BR	5'-CTCTCCAAGGGGTGTGTAGTA-3'
TPI-qF	5'-GGTCACGTGTGTCTTGGCTTATGAACC-3'
TPI-qR	5'-CTGAACAAAGTCTGGCTTGAGAGCTGC-3'
JAK-qF	5'-CCCAGCAACCAACAAAGGA-3'
JAK-qR	5'-CTCAGCCCCACGAGTAAACA-3'
STAT-qF	5'-CCAGATAATCCAAGCCATACTC-3'
STAT-qR	5'-GTGAAACACCTCTCTAACAT-3'

1.3 Lv-JAK和Lv-STAT基因组织表达分析

以各组织cDNA为模板,利用半定量PCR的方法分析各组织中Lv-JAK和Lv-STAT基因的表达情况。以管家基因β-actin为内参基因,以Actin-F和Actin-R为扩增引物,PCR扩增条件:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,26个循环。用β-actin表达量相对一致的各组织cDNA模板量来扩增Lv-JAK基因和Lv-STAT基因片段。参考NCBI数据库中Lv-JAK基因的序列信息(GenBank注册号:KP310054.1)和本实验室已克隆的STAT基因(GenBank注册号:KC779541.1)的序列信息设计序列特异性半定量引物。Lv-JAK和Lv-STAT基因半定量特异性引物为JAK-BF/JAK-BR和STAT-BF/STAT-BR,PCR扩增条件:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸30 s/1 min,26个循环。PCR产物均在1%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,进而计算

*Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因在不同组织中的相对表达量。

1.4 *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因应答苏云金芽孢杆菌侵染的表达变化分析

实验所用苏云金芽孢杆菌购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。将苏云金芽孢杆菌在LB培养基中于37 °C、220 r/min过夜培养, 次日将过夜培养的菌液再次培养至OD₆₀₀为0.6~0.8, 离心后弃去培养基, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)将细菌重悬, 调整浓度至10⁷ CFU/mL, 并保存于4 °C待用。

选用健康的凡纳滨对虾设置为实验组、对照组和空白组, 实验组每尾对虾注射10 μL苏云金芽孢杆菌悬液(10⁷ CFU/mL), 对照组每尾对虾注射10 μL灭菌PBS缓冲液, 空白组对虾无任何注射。取空白组对虾鳃和肠道组织, 并在注射后的7个时间点(6、12、24、36、48、60和72 h)分别取对照组和实验组对虾鳃和肠道组织, 每组3个平行, 每个平行取7尾虾, 提取其总RNA并反转录为cDNA作为实时荧光定量PCR (qPCR) 反应的模板, 用磷酸丙糖异构酶基因(triosephosphate isomerase, *TPI*)作为内参基因, 引物为*TPI-qF*和*TPI-qR*, *Lv-JAK*基因定量特异性引物为*JAK-qF*和*JAK-qR*; *Lv-STAT*基因定量特异性引物为*STAT-*

*qF*和*STAT-qR*; qPCR反应程序: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 40个循环; 最后经1个循环95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s进行熔解曲线分析。对照组和实验组每个时间点的cDNA样品设置2组qPCR, 一组为内参基因, 另一组为目的基因, 每组反应设置3个平行。使用2^{-ΔΔC_t}法计算*Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因相对表达量并利用统计学分析其显著性差异情况。

2 结果

2.1 *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因的组织表达分析

以半定量PCR方法分析*Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因在不同组织中的表达情况, 利用BandScan软件对电泳条带进行灰度分析。结果显示, *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因在凡纳滨对虾的9种组织中有不同程度的表达, 其中在鳃、肠道和心脏中表达量较高, *Lv-JAK*基因在神经和肝胰腺组织中表达量较低, *Lv-STAT*基因在肝胰腺和胃组织中表达量较低(图1)。

2.2 *Lv-JAK*基因应答苏云金芽孢杆菌感染的表达变化特征分析

人工感染苏云金芽孢杆菌后, 分析凡纳滨

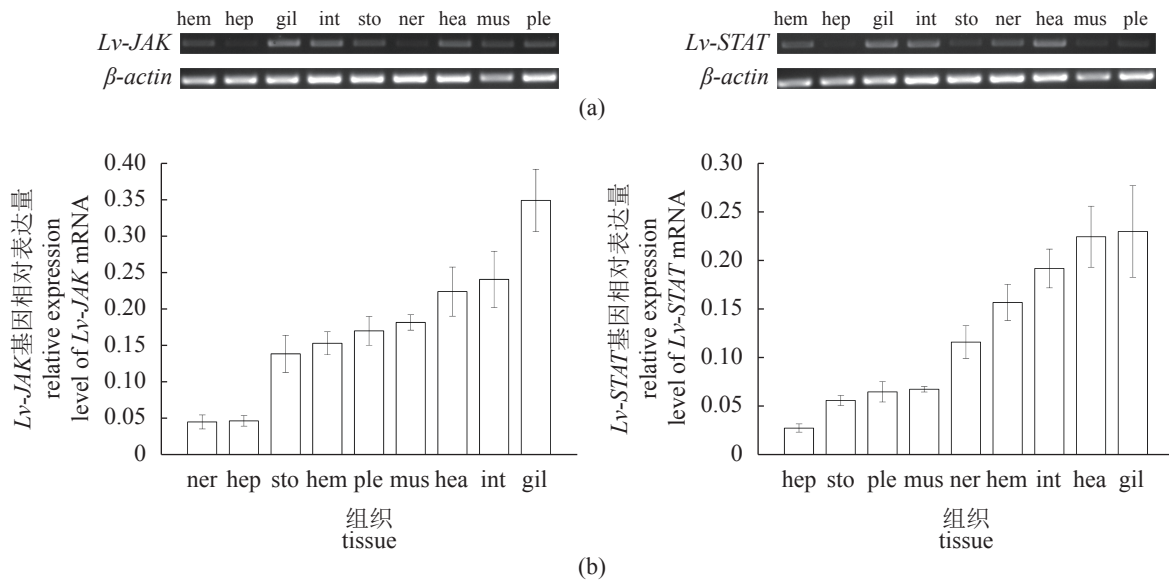


图1 凡纳滨对虾*Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因组织表达特征

(a) *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因组织表达的凝胶电泳分析, (b) *Lv-JAK*和*Lv-STAT*基因在不同组织中的相对表达量分析; hem. 血细胞, hep. 肝胰腺, gil. 鳃, int. 肠道, sto. 胃, ner. 神经, hea. 心脏, mus. 肌肉, ple. 游泳足

Fig. 1 Relative tissue expression of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* gene in *L. vannamei*

(a) tissue expression of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* gene by gel electrophoresis, (b) relative expression level of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* gene in different tissues; hem. hemocytes, hep. hepatopancreas, gil. gill; int. intestine, sto. stomach, ner. nerve, hea. heart, mus. muscle, ple. pleopod

对虾鳃和肠道中 $Lv-JAK$ 基因在感染后不同时间点的表达变化特征。结果显示,与对照组相比,鳃组织中 $Lv-JAK$ 基因在感染的中晚期(24~72 h)显著上调表达($P<0.05$),感染后48 h的相对表达量达到最高,之后在感染的60和72 h的相对表达量虽略有下降,但与对照组相比,仍有显著上升

($P<0.05$)(图2-a);肠道组织中, $Lv-JAK$ 基因在感染的早中期(6和24 h)显著上调表达($P<0.05$),在感染后6 h的相对表达量最高,感染中后期(48~72 h)的相对表达量呈下调模式,基本恢复至对照组水平(图2-b)。

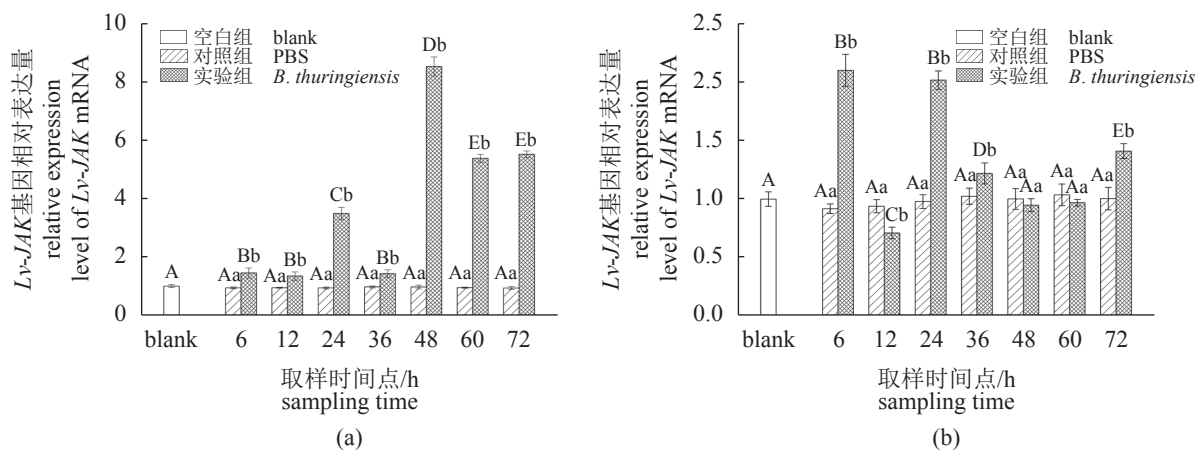


图2 苏云金芽孢杆菌感染后凡纳滨对虾鳃(a)和肠道(b)中 $Lv-JAK$ 基因的表达变化特征

组间显著性差异用不同大写字母表示,组内显著性差异用不同小写字母表示;下同

Fig. 2 Relative expression level of $Lv-JAK$ gene after *B. thuringiensis* infection in gill (a) and intestine (b) of *L. vannamei*

Significant differences between groups were expressed in different capital letters, and significant differences within groups were expressed in different lower-case letters; the same below

2.3 $Lv-STAT$ 基因应答苏云金芽孢杆菌感染的表达变化特征分析

人工感染苏云金芽孢杆菌后,分析凡纳滨对虾鳃和肠道中 $Lv-STAT$ 基因在感染后不同时间点的表达变化特征。结果显示,与对照组相比,感染苏云金芽孢杆菌后的24~72 h,鳃组织中 $Lv-STAT$ 基因的相对表达量均呈显著上调表达模式,感染后48 h的相对表达量达到最大值,之后在感染的60和72 h的相对表达量虽略有下降,但仍显著高于对照组($P<0.05$)(图3-a);感染苏云金芽孢杆菌后的6~72 h,肠道组织中 $Lv-STAT$ 基因的相对表达量亦呈显著上调表达模式,感染后24 h相对表达量达到首个峰值,之后略有下降,在72 h的相对表达量达到最大值(图3-b)。

3 讨论

研究显示JAK/STAT信号通路除了广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及胚胎发育外,还在天然免疫应答方面起到重要作用^[19-23]。长期以来,对JAK/STAT通路的研究主要集中在高等生

物和模式生物中,该通路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。Song等^[14]从凡纳滨对虾中克隆获得 JAK 的cDNA全长序列,该基因含有1个FERM结构域,1个SH2结构域和2个酪氨酸激酶催化结构域,还包含 JAK 特征性同源结构域JH1~JH7。张铃等^[24]从凡纳滨对虾中克隆获得 $STAT$ 的cDNA全长序列,该基因含有N-末端结构域、螺旋结构域、DNA结合域和SH2结构域,其结构特征显示了 $STAT$ 基因在进化上的保守性。目前,围绕甲壳动物JAK/STAT通路开展的研究工作多数集中在对抗对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)^[25-27]和对通路中的受体^[28]及靶基因^[29]的研究,该通路应答病原菌侵染的研究尚鲜有报道。

利用半定量PCR技术分析了该基因在对虾的血细胞、肝胰腺、鳃、肠道、胃、神经、心脏、肌肉和游泳足共9种组织中的分布情况。结果显示, $Lv-JAK$ 和 $Lv-STAT$ 基因均存在于上述9种组织中,这种组成型分布特征可能有助于JAK/

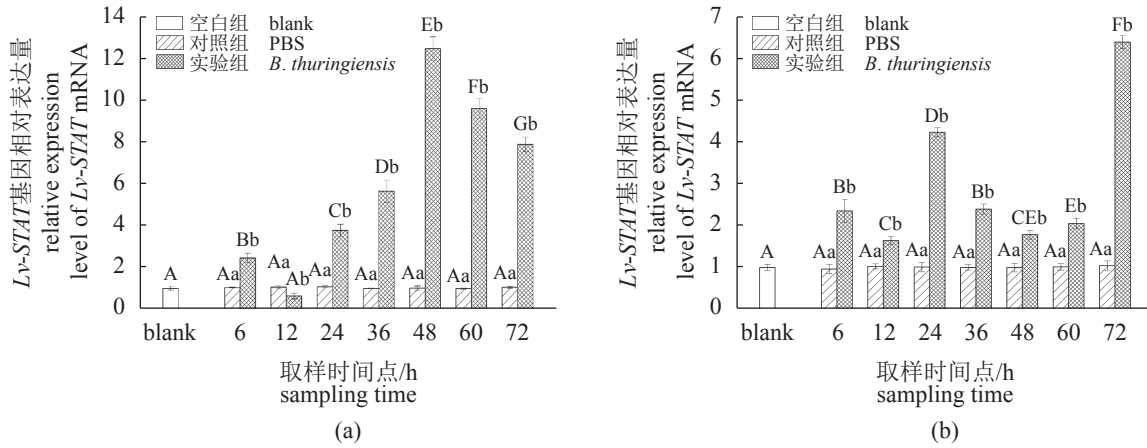


图3 苏云金芽孢杆菌感染后凡纳滨对虾鳃(a)和肠道(b)中Lv-STAT基因的表达变化特征

Fig. 3 Relative expression level of Lv-STAT gene after B. thuringiensis infection in gill (a) and intestine (b) of L. vannamei

STAT通路对病原体入侵做出快速反应。Lv-JAK和Lv-STAT基因都在鳃和肠道中表达量较高,在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[30]和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[31]中也报道了相似的结果。鳃和肠道是对虾的首要免疫防御屏障,鳃是对虾的主要滤过器官,作为病原微生物的过滤器,其发挥着不可或缺的免疫功能;肠道菌群被作为疾病、污染及病原菌侵染程度的指示剂,所以肠道不仅是重要的消化器官,同时也是一个重要的免疫器官。基因在不同组织中分布的差异也许代表着一些组织功能上的差异,组织表达分布特点也间接表明了其在机体免疫调控过程中的作用特征。

近年来,对虾急性肝胰腺坏死症频频暴发,有研究表明,苏云金芽孢杆菌与对虾肝胰腺坏死症暴发密切相关^[18],但其机理尚不明确。苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌,也是微生物源低毒杀虫剂,其在芽孢形成过程中产生的伴胞晶体被称为δ-内毒素,或杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)。δ-内毒素即伴胞晶体毒素,通常分为Cry蛋白和Cyt蛋白两大类^[32]。其中Cyt被称为细胞外溶解性晶体蛋白(cytolytic protein),该蛋白具有显著溶血和溶细胞特性,对无脊椎动物和脊椎动物有溶解细胞的毒杀作用^[33-37]。研究人员对Cyt蛋白的杀虫机理持两种观点,一种观点认为毒素蛋白被昆虫进食后,经过肠道降解为活性蛋白,结合并插入到上皮细胞膜,进入肠道腔,多个蛋白分子寡聚,导致细胞肿胀破碎;另一种观点认为,Cyt蛋白

聚集在膜表面引起脂质组装的大量非特异性破损从而破坏细胞膜,使得胞内分子泄露^[38]。如今细菌感染引发的对虾病害越来越严重,苏云金芽孢杆菌侵染凡纳滨对虾后,是否有类似的作用机制、引发了怎样的宿主应答过程,凡纳滨对虾JAK/STAT通路能否参与苏云金芽孢杆菌引发的免疫应答以及如何调控,值得深入探讨。

因此,本研究选取了苏云金芽孢杆菌对凡纳滨对虾进行人工感染实验,分析在鳃和肠道中高表达的Lv-JAK和Lv-STAT基因是否参与机体应答病原菌侵染的过程。研究表明,鳃中Lv-JAK和Lv-STAT在感染的中晚期(24~72 h)均显著上调表达($P<0.05$),且都是感染后48 h的相对表达量达到峰值,肠道中Lv-JAK和Lv-STAT均在感染后的6、24和72 h显著上调表达($P<0.05$),前者在感染后6 h的相对表达量最高,后者在感染后72 h表达量达到峰值。苏云金芽孢杆菌侵染凡纳滨对虾后, Lv-JAK基因在2种组织里的表达变化模式呈现不同特征, Lv-STAT基因在2种组织里的表达变化模式都呈上调趋势,表明苏云金芽孢杆菌(G+)可以在一定程度上诱导Lv-JAK和Lv-STAT基因转录水平的提高,进而参与到作用于病原的防御应答过程。Lv-JAK基因在两种组织里不同的表达模式表明其不同组织参与应答苏云金芽孢杆菌侵染的作用模式可能有所不同,而Lv-STAT基因在两种组织中应答苏云金芽孢杆菌感染的作用模式可能较为类似。有研究表明,用同为革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌侵染凡纳滨对虾、拟穴青蟹和中华绒螯蟹,凡纳滨对

虾肝胰腺中*Lv-JAK*基因早期相对表达量显著降低,晚期显著升高;拟穴青蟹鳃中*Sp-JAK*基因和中华绒螯蟹血细胞中*Es-JAK*基因的相对表达量在感染早期变化不大,中晚期显著上调;中华绒螯蟹血细胞中*Es-STAT*基因的相对表达量在晚期上调,与我们的研究结果类似。经副溶血弧菌(G-)刺激后,拟穴青蟹鳃中*Sp-JAK*基因和中华绒螯蟹血细胞中*Es-STAT*基因相对表达量的上调比被G+侵染后更为明显和迅速^[14,30-31]。

虽然目前的研究认为对虾肝胰腺坏死症主要是由于能够表达毒力蛋白PirAB的弧菌属(以副溶血弧菌为主)所引起^[39-40],但从患病对虾中分离出的致病菌有三分之一为苏云金芽孢杆菌,的确是一个值得关注的现象,它的内毒素蛋白是否与副溶血弧菌的毒力蛋白PirAB有着类似或差别的功能?它如何与副溶血弧菌协同作用共同导致对虾肝胰腺坏死症的发生?苏云金芽孢杆菌(G+)和副溶血弧菌(G-)细胞壁的结构组成和免疫识别时宿主模式识别受体的差异是否导致了不同的分子免疫反应?宿主对其感染的应答经由哪些信号途径进行调控?这些问题的深入研究正在本实验室进行。目前,甲壳动物JAK/STAT通路特征及功能研究相对较少,病原菌刺激后,该通路关键基因的应答特征和功能研究更是寥寥无几,因此,本实验为深入探讨JAK和STAT基因在对虾天然免疫应答过程中的作用机制提供了有价值的参考,研究结果将有助于了解对虾肝胰腺坏死症的暴发机理及对虾的应答调控过程。

参考文献:

- [1] Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway Jr C A, *et al.* Phylogenetic perspectives in innate immunity[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1313-1318.
- [2] Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways[J]. *Immunological Reviews*, 2000, 173(1): 89-97.
- [3] Kurtz J, Armitage S A O. Alternative adaptive immunity in invertebrates[J]. *Trends in Immunology*, 2006, 27(11): 493-496.
- [4] Flajnik M F, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?[J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(12): 640-644.
- [5] Janeway Jr C A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1989, 54(9): 1-13.
- [6] Fearon D T, Locksley R M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response[J]. *Science*, 1996, 272(5258): 50-54.
- [7] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 971-974.
- [8] Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(11): 900-911.
- [9] Li W X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling[J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, 18(11): 545-551.
- [10] Ahmed C M, Noon-Song E N, Kempainen K, *et al.* Type I IFN receptor controls activated TYK2 in the nucleus: implications for EAE therapy[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2013, 254(1-2): 101-109.
- [11] Schindler C, Strehlow I. Cytokines and STAT signaling[J]. *Advances in Pharmacology*, 1999, 47: 113-174.
- [12] Kiu H, Nicholson S E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways[J]. *Growth Factors*, 2012, 30(2): 88-106.
- [13] Stark G R, Darnell Jr J E. The JAK-STAT pathway at twenty[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 503-514.
- [14] Song X, Zhang Z J, Wang S, *et al.* A Janus Kinase in the JAK/STAT signaling pathway from *Litopenaeus vannamei* is involved in antiviral immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 662-673.
- [15] Chen W Y, Ho K C, Leu J H, *et al.* WSSV infection activates STAT in shrimp[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(10): 1142-1150.
- [16] Sun C, Shao H L, Zhang X W, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of signal transducer and activator of transcription (STAT) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(8): 5313-5319.
- [17] Wen R, Li F H, Li S H, *et al.* Function of shrimp STAT during WSSV infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(2): 354-360.
- [18] 黄志坚, 陈勇贵, 翁少萍, 等. 多种细菌与凡纳滨对虾肝胰腺坏死症(HPNS)暴发有关[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2016, 55(1): 1-11.

- Huang Z J, Chen Y G, Weng S P, *et al.* Multiple bacteria species were involved in hepatopancreas necrosis syndrome (HPNS) of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2016, 55(1): 1-11(in Chinese).
- [19] Ihle J N. The Stat family in cytokine signaling[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(2): 211-217.
- [20] Perrimon N, Mahowald A P. I (1) hopscotch, a larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in *Drosophila*[J]. *Developmental Biology*, 1986, 118(1): 28-41.
- [21] Hou X S, Melnick M B, Perrimon N. *marelle* acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs[J]. *Cell*, 1996, 84(3): 411-419.
- [22] Yan R, Luo H, Darnell Jr J E, *et al.* A JAK-STAT pathway regulates wing vein formation in *Drosophila*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(12): 5842-5847.
- [23] Yan R Q, Small S, Desplan C, *et al.* Identification of a *Stat* gene that functions in *Drosophila* development[J]. *Cell*, 1996, 84(3): 421-430.
- [24] 张铃, 刘逸尘, 张亦陈, 等. 凡纳滨对虾信号转导及转录激活因子(*Lv-STAT*)基因的克隆及表达特征分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(8): 1140-1146.
- Zhang L, Liu Y C, Zhang Y C, *et al.* Molecular cloning and expression pattern analysis of signal transducer and activator of transcription (*Lv-STAT*) from the *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1140-1146(in Chinese).
- [25] Wang S, Song X, Zhang Z J, *et al.* Shrimp with knockdown of *LvSOCS2*, a negative feedback loop regulator of JAK/STAT pathway in *Litopenaeus vannamei*, exhibit enhanced resistance against WSSV[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 65: 289-298.
- [26] Chen Y H, Jia X T, Huang X D, *et al.* Two *Litopenaeus vannamei* HMGB proteins interact with transcription factors *LvSTAT* and *LvDorsal* to activate the promoter of white spot syndrome virus immediate-early gene *ie1*[J]. *Molecular Immunology*, 2011, 48(5): 793-799.
- [27] Yao D F, Ruan L W, Lu H S, *et al.* Shrimp STAT was hijacked by white spot syndrome virus immediate-early protein IE1 involved in modulation of viral genes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 59: 268-275.
- [28] Yan M T, Li C Z, Su Z Q, *et al.* Identification of a JAK/STAT pathway receptor domeless from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 26-32.
- [29] Yang L W, Luo M T, He J H, *et al.* A JAK-STAT pathway target gene encoding a single WAP domain (SWD)-containing protein from *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 555-563.
- [30] Deng H W, Xu X P, Hu L, *et al.* A janus kinase from *Scylla paramamosain* activates JAK/STAT signaling pathway to restrain mud crab reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 275-287.
- [31] Ruan Z C, Wan Z C, Yang L, *et al.* JAK/STAT signalling regulates antimicrobial activities in *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 491-501.
- [32] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775-806.
- [33] Waalwijk C, Dulleman A M, Van Workum M E S, *et al.* Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(22): 8207-8217.
- [34] Promdonkoy B, Ellar D J. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Biochemical Journal*, 2000, 350(1): 275-282.
- [35] Akiba T, Abe Y, Kitada S, *et al.* Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 386(1): 121-133.
- [36] Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2415-2422.
- [37] Knowles B H, Blatt M R, Tester M, *et al.* A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers[J]. *FEBS Letters*, 1989, 244(2): 259-262.
- [38] 齐东来, 李一丹, 高继国. 苏云金杆菌溶细胞毒素及相关基因研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2005, 36(1): 104-108.

- Qi D L, Li Y D, Gao J G. Progress of cytolytic toxin and related genes from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2005, 36(1): 104-108(in Chinese).
- [39] Lee C T, Chen I T, Yang Y T, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798-10803.
- [40] Dong X, Bi D X, Wang H L, *et al.* *pirAB^{vp}*-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1859.

Expression profile analysis of *JAK* and *STAT* genes in *Litopenaeus vannamei* after *Bacillus thuringiensis* challenge

LI Danlei¹, HAO Shaoyan¹, ZHANG Yichen¹, GENG Xuyun², LIU Yichen^{1*}, SUN Jinsheng^{1*}

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

2. Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin 300221, China)

Abstract: In order to understand the expression profile of *JAK* (*Lv-JAK*) and *STAT* (*Lv-STAT*) genes in *Litopenaeus vannamei* during the infection of pathogenic bacteria, relative expressions of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* genes were analyzed in this study. Relative expression profile of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* in different tissues and during the infection of *Bacillus thuringiensis* were analyzed by semi-quantitative PCR and quantitative real-time PCR, respectively. The results showed that transcript of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* was mainly detected in gill, intestine and heart. The relative expressions of *Lv-JAK* and *Lv-STAT* were significantly up-regulated in gill tissues at the middle and late stages of *B. thuringiensis* infection (24~72 h). In intestine, the relative expression of *Lv-JAK* was significantly up-regulated at 6 and 24 h, while that of *Lv-STAT* was significantly up-regulated at 24 and 72 h. These studies indicated that *JAK* and *STAT* participated in the innate immune response induced by *B. thuringiensis* in *L. vannamei*. Understanding the expression profile of *JAK* and *STAT* in response to *B. thuringiensis* infection will be helpful to study the function and regulatory mechanism of shrimp *JAK/STAT* signaling pathway in response to bacterial infection.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *JAK/STAT*; gene expression; bacterial infection; innate immune response

Corresponding authors: LIU Yichen. E-mail: skylyc@tjnu.edu.cn; SUN Jinsheng. E-mail: skysjs@tjnu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472299); Natural Science Foundation of Tianjin (15JCZDJC33800); Open Research Funding of Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture (TJAE2015005); Program for Innovative Research Team in University of Tianjin (TD13-5076); Tianjin Development Program for Innovation and Entrepreneurship; Innovation Team of Tianjin Fisheries Research System (ITFRS2017007)