

菲律宾蛤仔脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 α *VpLITAF* 基因克隆及其对微生物侵染的应答研究*

张林宝¹ 孙伟¹ 宁璇璇² 蔡文贵¹ 张喆¹ 陈海刚¹ 马胜伟¹ 贾晓平¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广东省渔业生态环境重点实验室 广州 510300; 2. 国家海洋局烟台海洋环境监测中心站 烟台 264003)

提要 脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 α (LITAF)是一种重要的转录因子,在调节 LPS 诱导炎症因子 TNF- α 的表达过程中发挥重要作用。采用表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)结合 cDNA 末端快速克隆技术(rapid amplification of cDNA Ends, RACE),获得了菲律宾蛤仔 *LITAF* 基因 cDNA 全长(*VpLITAF*),并利用实时荧光定量 PCR 技术研究 *VpLITAF* 的组织分布以及鳃弧菌、藤黄微球菌刺激下的时序表达特征。*VpLITAF* 基因序列包含 393bp 的开放阅读框,编码 130 个氨基酸,预测分子量为 14.39kD,理论等电点 7.47。序列分析表明,*VpLITAF* 具有高度保守的 LITAF 结构域,与其它贝类 LITAF 具有高度同源性,并在系统进化树中与海洋软体动物 LITAF 聚为一簇。*VpLITAF* 基因主要表达于蛤仔肝胰腺,肌肉中的表达量则相对较低。鳃弧菌和藤黄微球菌刺激在某些时段可显著诱导 *VpLITAF* 基因的表达水平,最高可达对照组表达量的 3.5 倍,且鳃弧菌对 *VpLITAF* 基因表达的诱导作用明显强于藤黄微球菌。以上结果表明,*VpLITAF* 在菲律宾蛤仔的固有免疫反应中发挥着重要作用。

关键词 菲律宾蛤仔;脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 α ;微生物侵染;基因表达

中图分类号 S968.3 **doi:** 10.11693/hyhz20130400020

细胞因子(Cytokine)是多种细胞分泌的能调节细胞生长分化、调节免疫功能、参与炎症反应和创伤愈合的小分子多肽,它们是细胞和体液免疫反应不可缺少的介质(Kuby, 1997)。无脊椎动物中关于细胞因子样物质的研究主要集中在白介素和肿瘤坏死因子 TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)上。TNF- α 作为前炎性细胞因子介导炎症反应和免疫调节反应(Bazzoni *et al*, 1996),能直接导致肿瘤细胞死亡并参与机体内炎症和免疫应答调节(García-Castillo *et al*, 2002)。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的肿瘤坏死因子 α LITAF(LPS-induced TNF a factor)是 TNF- α 重要的转录因子,在调节 LPS 诱导 TNF- α 的表达过程中起着非常重要的作用(Tang *et al*, 2003)。LITAF 在脊椎动

物和无脊椎动物中均被分离出来(Bolcato-Bellemin *et al*, 2004; Hong *et al*, 2006; Yu *et al*, 2007; Park *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2009),并证实其可以特异结合人 TNF- α 启动子上位于-515 到-511 位的 CTCCC 序列(Tang *et al*, 2003),在受到 LPS 刺激后与 STAT6B 蛋白形成复合体进入细胞核调控 TNF- α 的表达(Tang *et al*, 2005)。

迄今为止,在扇贝、牡蛎等贝类中相继报道了 LITAF 的基因克隆与功能研究(Yu *et al*, 2007; Park *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2009; 赫崇波等, 2012; Li *et al*, 2012; Yang *et al*, 2012; Yu *et al*, 2012)。然而,有关菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*) LITAF 基因的功能研究则未见报道。菲律宾蛤仔作为我国海水养殖业的

*中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目,2012TS28 号(中国水产科学研究院南海水产研究所),2012A0203 号,2013A0301 号(中国水产科学研究院);海南省社会发展科技专项资金项目,XH201312 号。张林宝, E-mail: zhanglinbao1984@163.com

通讯作者: 贾晓平, 研究员, E-mail: jxp60@tom.com

收稿日期: 2013-04-29, 收修稿日期: 2013-06-26

重要经济贝类,年产量高达180万吨,是沿海居民最常食用的海产品之一(Zhang *et al*, 2006)。但是,近年来频发的病害问题严重制约了蛤仔养殖业的健康发展,因此开展菲律宾蛤仔抗病及免疫相关基因的研究是非常重要和十分紧迫的。本研究在已构建的cDNA文库和大规模EST (expressed sequence tags, 表达序列标签)分析的基础上,采用RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, cDNA末端快速扩增技术)等方法克隆菲律宾蛤仔*LITAF*基因序列,用生物信息学方法对基因和推测的蛋白进行结构分析和功能预测,同时通过实时荧光定量PCR技术分析该基因在蛤仔不同组织以及受到不同微生物刺激后的表达情况。研究旨在深入了解菲律宾蛤仔的免疫抗病机制,为其遗传改良和抗病品系选育工作提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验样品及处理

实验所用菲律宾蛤仔购自广州市黄沙水产市场,选取壳长为3—4cm个体进行实验。正式实验开始前,在过滤海水中驯养一周,每日定时投喂小球藻,水温控制在20—22°C。微生物侵染实验中,设置对照组和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)刺激组。鳃弧菌作为本研究中革兰氏阴性菌的代表,广泛存在于养殖环境,是海水鱼、虾、贝类的常见细菌性病原(Egidius, 1987)。藤黄微球菌是一种典型的革兰氏阳性菌,属条件致病菌,目前有文献报道其在水体以及水生生物体内都有分布(Spanggaard *et al*, 2001; 彭彬等, 2011)。对照组不做任何处理,随机取6只蛤仔,采集闭壳肌、外套膜、肝胰腺、鳃和血淋巴细胞五种组织。侵染组菲律宾蛤仔分别浸泡于含有 1×10^7 CFU/mL 鳃弧菌和藤黄微球菌的海水中,于6、12、24、48 h 每组随机采集6只蛤仔血淋巴样品。血淋巴样品于4°C, 3000r/min离心5 min收集血淋巴细胞,加入1mL Trizol (Invitrogen公司)后置于超低温冰箱,其余组织放入预先装有1mL Trizol的离心管中充分研磨,在4°C, 5000r/min离心5min,取上清置于超低温冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 菲律宾蛤仔*LITAF*基因的克隆 采用Trizol提取菲律宾蛤仔各组织以及鳃弧菌和藤黄微球菌侵染后的血淋巴细胞总RNA,用Dnase I (Promega公司)消化残留DNA,然后用M-MLV (Promega公司)反转录合成第一链cDNA。根据本实验室已构建的菲律宾

蛤仔cDNA文库获得*LITAF* EST序列,并分别设计3'和5' Race特异性引物(表1),以反转录的cDNA为模板,按Race试剂盒(Clontech公司)说明步骤分别扩增该基因的3'和5'端。PCR产物经纯化后连接到pMD18-T载体上(TaKaRa公司),转化大肠杆菌TOP10F感受态,PCR检测阳性克隆后测序。

表1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
VpLITAF-F1	ATTCTATGAGACTGGCACGC	3'RACE
VpLITAF-F2	TTGGATGCTGGATTGGTTGC	
VpLITAF-R1	ATCCAGCATCCAACAATAGC	5' RACE
VpLITAF-R2	AGTATAAGCGGGCTGGGTCA	
VpLITAF-QF	CAAGTGCCAATTCTGTCCAGGCT	实时荧光
VpLITAF-QR	AGCAACCAATCCAGCATCCAAC	定量 PCR
Actin-QF	CTCCCTTGAGAAGAGCTACGA	内参基因
Actin-QR	GATACCAGCAGATTCCATACCC	

1.2.2 菲律宾蛤仔*VpLITAF*基因生物信息学分析 序列同源性比对和相似性搜索利用NCBI在线软件BLAST进行分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),多序列比对采用CLUSTAL W多重比对程序(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>);信号肽查找用SignalP 3.0 Server软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);同时运用MEGA 5.0软件包(Tamura *et al*, 2011)的Neighbor-joining法构建进化树(Saitou *et al*, 1987)。

1.2.3 菲律宾蛤仔*VpLITAF*基因表达分析 采用PCR Sybrgreen Master Mix (TaKaRa)试剂盒,使用ABI公司7500Fast型荧光定量PCR仪分析*VpLITAF*基因的组织分布特征以及在鳃弧菌和藤黄微球菌感染下的时序表达规律。根据扩增获得的*VpLITAF*基因序列,设计荧光定量引物VpLITAF-QF和VpLITAF-QR,以 β -actin为内参照(引物信息见表1),采用相对定量方法检测*VpLITAF*基因的表达特征。PCR反应条件:第一步:50°C 2min,第二步:95°C 10min,第三步:95°C 15s,60°C 1min,共40个循环,反应完成后进行熔解曲线分析:95°C 15s,60°C 20s,然后缓慢升温至95°C,连续记录荧光信号的变化,将温度的变化与荧光信号的变化求负倒数后对温度作图,可得到产物的 T_m 值。实验过程中,每个反应均设3个重复,并在反应结束后进行熔解曲线分析确保产物的特异性。数据处理首先用 β -actin作为内标基因对*VpLITAF*基因表达量进行标准化,计算 Δ CT值。组织分布研究将闭壳肌

组织的样品作为参照因子(calibrator), 其倍数变化为 1, 对于其它组织样本, 目标基因表达差异相对于参照因子基因表达的倍数为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。菌刺激样品 *VpLITAF* 基因相对表达水平用微生物处理组的表达量与海水对照组表达量的比值来计算(Zhang *et al*, 2011)。所得数据采用 SPSS 13.0 软件包进行 *t*-test 统计分析。

2 结果

2.1 菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因序列分析

通过 5' 和 3' RACE 方法获得菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因 cDNA 序列(GenBank 注册号 HQ174259), 如图 1 所示。该 cDNA 序列长为 725 bp, 含有 393 bp 的开放阅读框序列(Open Reading Frame, ORF), 编码 130 个氨基酸残基, 该多肽的理论分子量为 14.39 kDa, 等电点为 7.47。 *VpLITAF* cDNA 序列 5' 非编码区(5'-UTR)为 23 bp, 3' 非编码区(3'-UTR)为 309 bp, 包含一个加尾信号(AATAAA)和典型的 polyA 尾巴。利用 SignalP 软件分析发现 *VpLITAF* 不具有信号肽序列。

2.2 *VpLITAF* 同源性分析与进化分析

经 BLASTP 比对发现 *VpLITAF* 基因编码的蛋白与文蛤(*Meretrix meretrix*)和竹蛏(*Solen grandis*) LITAF 蛋白同源性最高, 分别为 96% 和 84%, 与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、

中华圆田螺(*Cipangopaludina chinensis*)和鲍(*Haliotis discus discus*)等贝类 LITAF 也有 55%—67% 的一致性。利用 SMART 软件(<http://cn.expasy.org>)分析发现, *VpLITAF* 蛋白 C 端含有一个保守的 LITAF 结构域和两个保守的 CXXC 基序。多序列比对发现在该保守结构域内含有 8 个保守的半胱氨酸残基(图 1, 图 2), 推测这些保守的半胱氨酸残基可能在维持蛋白的高级结构中发挥着重要作用。采用 Neighbor-joining 方法构建系统进化树, 发现 LITAF 蛋白首先分为脊椎动物和无脊椎动物两大类, 菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 与海洋软体动物 LITAF 聚类在一起, 然后再与鱼类、鸟类及哺乳动物的 LITAF 蛋白聚在一起, 这与生物进化的远近关系基本一致(图 3)。

2.3 *VpLITAF* 基因在菲律宾蛤仔组织中的分布特征

以 β -actin 为对照, 利用实时荧光定量 PCR 检测 *VpLITAF* mRNA 在菲律宾蛤仔鳃、肝胰腺、外套膜、血淋巴细胞和闭壳肌 5 种正常组织中的表达情况(图 4); 结果显示, *VpLITAF* mRNA 在 5 种组织中均可见不同丰度的表达。 *VpLITAF* 在肌肉中的表达量最低, 血淋巴细胞、外套膜和鳃中 *VpLITAF* 的表达量相对较高, 分别是闭壳肌组织中表达量的 19.89、29.56 和 82.28 倍。 *VpLITAF* 基因在菲律宾蛤仔肝胰腺中的表达量最高, 为闭壳肌组织中表达量的 315.90 倍。

```

1           M S A P P P Y P G P D S K
1   tttggttaaattaaggagaaatATGCTGCACCTCCACCTTATCCAGGACCTGATAGCA
14    G P P P P N A A Y P Q Q Q P A Q Y N T P
61   AGGGACCACCACCACAAATGCAGCTTATCCACAGCAGCAACCTGCCAGTATAACACC
34    Y G Q P Q N T S T V V V T Q P A Y T V V
121  CATATGGGACGCCGAGAACACCAGCACCGTGGTTGTGACCCAGCCGCTTATACTGTAG
54    Q H F R E S P V R I K C Q F C Q A D V V
181  TGCAGCATTCGGGAGTCACCAGTGCATCAAGTGCCAATTCGTGAGCTGATGTGG
74    T S T F Y E T G T L T W V A C F V I A I
241  TAACCTCCACATTCTATGAGACTGGCAGCTCACCTGGGTGGCATGCTTCGTCATTGCTA
94    V G C W I G C C L I P F C M D A C K D V
301  TTGTTGGATGCTGGATTGGTTGCTGCTTATTCCATTCTGTATGGATGCCTGCAAGGACG
114   V H Q C P N C H Q Q C G R Y N R M *
361  TCGTACATCAGTGTCCAACTGTACCAGCAGTGTGGCCGTTACAACCGCATGTAacata
421  cagcgcgcacacatggcagaatgcttctacaaatccatgcaaagtttcagtatcacacac
481  aaacgtgatgcagtgtgtacaaatataatattcactatcagacttattatcaaatgct
541  tttaaataaaataaaagaatgtgtacagtaaaatgcatgtgatacaaaaaaaaaaaaaa
601  aaaaaaaaaaaaaaaaaatcttacttgacagccccaagatcacttattgttattaactta
661  caggacatatttttcatatattaatcttaactgtgatcataagataaaaaaaaaaaaaaa
721  aaaaa

```

图 1 菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of *VpLITAF*

注: 核苷酸序列在下, 推导的氨基酸序列在上, 数字表示相应的位置; LITAF 结构域用灰色阴影标出, 黑色阴影标记的为 8 个保守的半胱氨酸残基; 5' RACE 引物用双下划线标记, 加尾信号用单下划线标记, 星号表示翻译终止

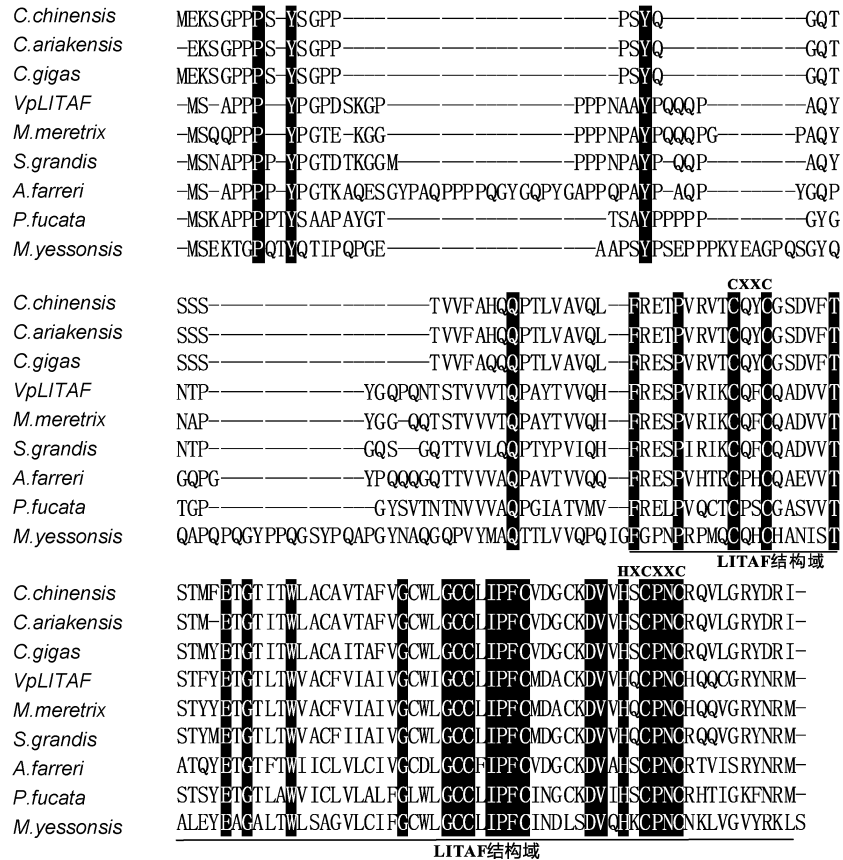


图 2 VpLITAF 与其它物种 LITAF 氨基酸序列的多序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of VpLITAF with LITAFs from other organisms

注: 保守区以黑色阴影标记, LITAF 结构域以下划线标记。比对的序列包括: *C. chinensis* (AEX08893); *C. ariakensis* (ACA96822); *C. gigas* (ABO70331); *M. meretrix* (ADA77533); *S. grandis* (AEW43450); *A. farreri* (ABI79459); *P. fucata* (ACN70008); *M. yessoensis* (AEO14650)

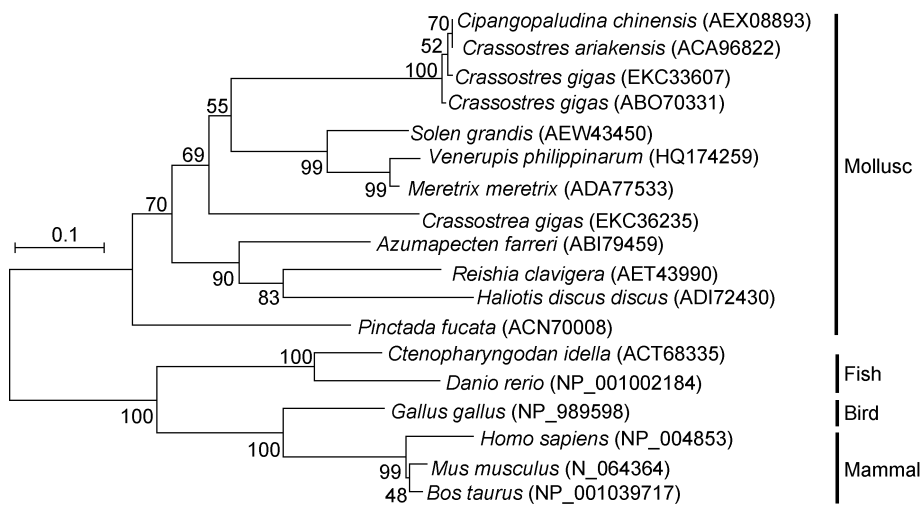


图 3 不同物种 LITAF 进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of LITAF sequences from different organisms

注: 进化树用 MEGA4.0 构建, Bootstrap 值为 1000, 每个分支数值表示 bootstrapping 分析中所占百分比, 菲律宾蛤仔 VpLITAF 用粗体表示

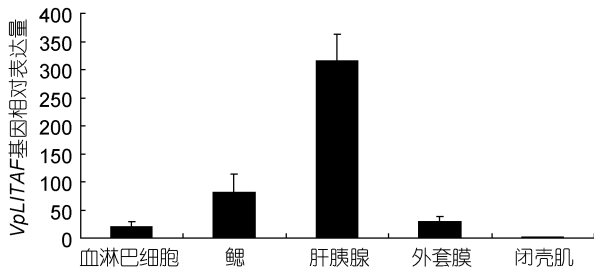


图 4 *VpLITAF* 在菲律宾蛤仔各组织中的相对表达情况
Fig.4 Distribution of *VpLITAF* mRNA in different tissues of *V. philippinarum*

2.4 菌刺激后菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因的时序表达特征

利用荧光定量 PCR 方法, 分析菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因 mRNA 在鳃弧菌和藤黄微球菌刺激后的时序表达情况(图 5)。其中, 对照组样品 *VpLITAF* 表达量在所检测的时间范围内未出现明显变化。鳃弧菌感染组菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因表达量不断变化, 12h 和 48h 的表达量有着显著增加, 分别为对照组的 2.1 倍和 3.5 倍。藤黄微球菌感染 24h 以内, *VpLITAF* 基因 mRNA 表达量有所升高, 但与对照组表达水平并无显著差异。随着感染时间的延长, *VpLITAF* 基因表达水平在 48h 被鳃弧菌显著诱导, 表达量为对照组的 1.9 倍。

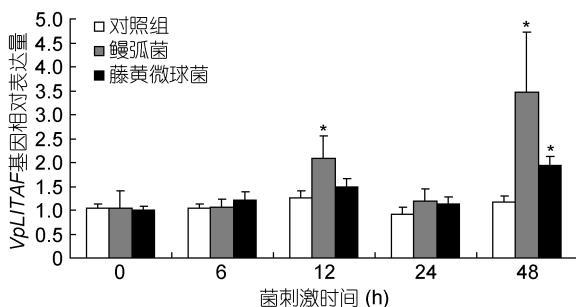


图 5 菌刺激后菲律宾蛤仔血淋巴细胞中 *VpLITAF* 的时序表达特征
Fig.5 Temporal expression of *VpLITAF* in haemocytes of *V. philippinarum* after bacterial infection

3 讨论

LITAF 是一种重要的转录因子, 在调节 LPS 诱导炎症因子 TNF- α 的表达过程中起着非常重要的作用。迄今为止, 在扇贝、牡蛎、文蛤和中华圆田螺等贝类中相继报道了 *LITAF* 基因(Yu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012)。然而有关菲律宾蛤仔 *LITAF* 基因的相关研究则未见报道。本研究首次克隆了蛤仔的

LITAF 基因 cDNA 序列, 并对其免疫调节作用进行了初步研究。

比对分析发现, *VpLITAF* 氨基酸序列与其它贝类 *LITAF* 具有较高的相似性(Yu *et al.*, 2007, 2012; Li *et al.*, 2012), 都具有高度保守的 *LITAF* 结构域。*LITAF* 结构域由 N 端的 CXXC 区、25 个氨基酸长的疏水区和 C 端的(H)XCXXC 区组成, N 端和 C 端的 CXXC 基序结合在一起, 形成紧密结合的 Zn^{2+} 结构(Ponting *et al.*, 2001), 介导 *LITAF* 与 DNA 之间的结合启动相关基因转录(Yu *et al.*, 2012)。系统进化分析发现, *VpLITAF* 首先与贝类 *LITAF* 聚为一簇, 然后与各类脊椎动物 *LITAF* 聚在一起, 这与物种进化的发生顺序基本一致。综上所述, 同源比对、结构域和进化分析均表明菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 为 *LITAF* 家族一员。

研究表明 *LITAF* 基因主要表达于脊椎动物外周血细胞、淋巴结和脾等淋巴组织中, 在非淋巴器官中也有不同程度的表达(Bolcato-Bellemin *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006)。本研究中 *VpLITAF* 在菲律宾蛤仔所检测组织中均有表达, 其中肝胰腺的表达量最高(图 4), 这与 *LITAF* 基因在中华圆田螺和太平洋牡蛎中的组织分布情况类似(Yang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012)。牡蛎全基因组研究揭示许多免疫相关基因高度表达于消化腺中(Zhang *et al.*, 2012), 这表明消化系统与血淋巴细胞一样是软体动物对抗、清除病原体的重要一线防御器官(江静波, 1982; Park *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), 因此推测菲律宾蛤仔肝胰腺中高表达的 *VpLITAF* 在机体免疫反应中发挥着重要作用。然而, 栉孔扇贝和文蛤 *LITAF* 的组织分布情况则有所不同, 二者的最高表达量分别发生在性腺和鳃组织中(Yu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012), 表明 *LITAF* 基因组织分布特征随物种的不同而不同。

虽然本研究中 *VpLITAF* 在蛤仔血淋巴细胞中的表达量相较于其它组织来说偏低, 然而血淋巴细胞在贝类固有免疫系统中发挥着重要的作用(王信超等, 2012; 刘世良等, 2003), 经常作为研究免疫相关基因的组织材料(Zhang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012), 因此本研究选取血淋巴细胞研究 *VpLITAF* 基因表达与微生物感染的相关性。研究结果表明鳃弧菌和藤黄微球菌侵染在某些时段均可显著诱导 *VpLITAF* 基因的表达水平(图 5), 类似的结论在太平洋牡蛎、虾夷扇贝、文蛤和珍珠贝中也有发现(Park *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; 赫崇波等, 2012; Li *et al.*, 2012), 表明 *LITAF* 参与了机体的免疫调节过程。鳃弧菌和藤黄微球菌侵

染 24 h, *VpLITAF* 基因表达水平与 12 h 相比有所回落, 这可能是因为随着微生物侵染时间的延长, 蛤仔血淋巴系统中产生 *VpLITAF* 的血细胞数量减少或转移至微生物增殖的其它组织中, 如外套膜、消化腺和鳃等。微生物感染下, 类似的诱导-降低-再诱导的表达模式在贝类其它免疫相关基因的表达分析中也有发现, 如盘鲍(*Haliotis discus discus*)抗菌肽(De Zoysa *et al*, 2010)和菲律宾蛤仔谷胱甘肽过氧化物酶(Zhang *et al*, 2011)。另外, 本研究中鳃弧菌对 *VpLITAF* 基因表达的诱导作用明显强于藤黄微球菌。鳃弧菌是一种革兰氏阴性菌, 其细胞外膜的主要结构成分为 LPS, 目前已有诸多研究表明 LPS 可显著诱导 *LITAF* 的转录水平(Bolcato-Bellemin *et al*, 2004; Hong *et al*, 2006; Yu *et al*, 2007, 2012)。藤黄微球菌是一种革兰氏阳性菌, 其细胞壁主要结构成分为肽聚糖(peptidoglycan, PGN), 研究表明 PGN 对栉孔扇贝 *LITAF* 基因表达无显著诱导作用(Yu *et al*, 2007)。因此, 不难理解菲律宾蛤仔 *VpLITAF* 基因表达对鳃弧菌感染更为敏感。藤黄微球菌侵染蛤仔 48 h 后, *VpLITAF* 基因被显著诱导的原因需进一步深入研究。总之, *VpLITAF* 基因克隆与表达分析表明 *VpLITAF* 参与了菲律宾蛤仔的先天性免疫反应, 这为进一步研究蛤仔分子水平的免疫防御机制研究提供了新的基础资料。

参 考 文 献

- 王信超, 孙敬敬, 范美华等, 2012. 厚壳贻贝血细胞的蛋白质组学分析. 南方水产科学, 8(2): 7—14
- 刘世良, 麦康森, 2003. 贝类免疫系统和机理的研究进展. 海洋学报, 25(2): 95—105
- 江静波, 1982. 无脊椎动物学. 北京: 高等教育出版社
- 彭 彬, 杨光友, 陈晓利等, 2011. 黄鳍藤黄微球菌的分离鉴定及药敏实验. 上海海洋大学学报, 20(3): 405—411
- 赫崇波, 朱 宝, 刘卫东等, 2012. 虾夷扇贝脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 *LITAF* 基因的克隆及表达分析. 遗传, 34(6): 736—741
- Bazzoni F, Beutler B, 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*, 334(26): 1717—1725
- Bolcato-Bellemin A L, Mattei M G, Fenton M *et al*, 2004. Molecular cloning and characterization of mouse *LITAF* cDNA: role in the regulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression. *J Endotoxin Res*, 10(1): 15—23
- De Zoysa M D, Whang I, Lee Y *et al*, 2010. Defensin from disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*, 28(2): 261—266
- Egidius E, 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology, a review. *Aquaculture*, 67: 15—28
- García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V *et al*, 2002. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor α from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics*, 54(3): 200—207
- Hong Y H, Lillehoj H S, Lee S H *et al*, 2006. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*). *Dev Comp Immunol*, 30(10): 919—929
- Kuby J, 1997. Immune effect mechanisms, *Immunology*, 3rd. W. H. Freeman and Company Press
- Li H J, Yang Q, Gao X G *et al*, 2012. Identification and expression of a putative LPS-induced TNF- α factor from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix*. *Mol Biol Rep*, 39(2): 865—871
- Park E M, Kim Y O, Nam B H *et al*, 2008. Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 24(1): 11—17
- Ponting C P, Mott R, Bork P *et al*, 2001. Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome Res*, 11(12): 1996—2008
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol*, 4(4): 406—425
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen E B *et al*, 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ Microbiol*, 3(12): 755—765
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28(10): 2731—2739
- Tang X R, Fenton M J, Amar S, 2003. Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF- α promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(7): 4096—4101
- Tang X R, Marciano D L, Leeman S E *et al*, 2005. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF alpha factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(14): 5132—5137
- Yang S, Li P, Mi Z, 2012. LPS-induced TNF α factor (*LITAF*) in the snail *Cipangopaludina chinensis*: gene cloning and its apoptotic effect on NCI-H446 cells. *Fish Shellfish Immunol*, 32(2): 268—272
- Yu F, Zhang Y, Yu Z, 2012. Characteristics and expression patterns of the lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*) gene family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 33(4): 899—908
- Yu Y D, Qiu L M, Song L S *et al*, 2007. Molecular cloning and

- characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol*, 23(2): 419—429
- Zhang D C, Jiang J J, Jiang S G *et al*, 2009. Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF- α factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol*, 27(3): 391—396
- Zhang G F, Yan X W, 2006. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. *Aquaculture*, 258(1—4): 452—461
- Zhang G, Fang X, Guo X *et al*, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490: 49—54
- Zhang L, Liu X, Chen L *et al*, 2011. Transcriptional regulation of selenium-dependent glutathione peroxidase from *Venerupis philippinarum* in response to pathogen and contaminants challenge. *Fish Shellfish Immunol*, 31(6): 831—837

MOLECULAR CLONING OF LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA FACTOR FROM *VENERUPIS PHILIPPINARUM* (*VpLITAF*), AND ITS TRANSCRIPTIONAL RESPONSE FOLLOWING BACTERIAL CHALLENGE

ZHANG Lin-Bao¹, SUN Wei², NING Xuan-Xuan², CAI Wen-Gui¹, ZHANG Zhe¹,
CHEN Hai-Gang¹, MA Sheng-Wei¹, JIA Xiao-Ping¹

(1. Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Lab. of Fishery Ecology Environment, Guangdong Province, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Yantai Oceanic Environmental Monitoring Central Station, State Oceanic Administration, Yantai 264003, China)

Abstract Lipopolysaccharide (LPS)-induced tumor necrosis factor alpha factor (LITAF) is a novel transcription factor responsible for LPS-induced transcription of tumor necrosis factor- α , and it plays an important role in innate immunity system. We identified a full-length cDNA encoding a LITAF from *Venerupis philippinarum* (designated as *VpLITAF*) with expressed sequence tag (EST) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches, and investigated its temporal expression patterns post *Vibrio anguillarum* and *Micrococcus luteus* challenges. The full-length *VpLITAF* cDNA contains an open reading frame (ORF) of 393 bp encoding a polypeptide of 130 amino acids with a predicted molecular weight of 14.39 kDa, and theoretical isoelectric point of 7.49. *VpLITAF* possessed a conserved LITAF domain at C-terminal and shared high sequence similarity with the LITAFs from other marine mollusks, indicating that *VpLITAF* should be a member of the LITAF family. *VpLITAF* mRNA was found expressed most abundantly in hepatopancreas but least in adductor muscles. Bacterial challenging could significantly up-regulate the mRNA expression of *VpLITAF* at different time intervals, in which the highest expression level was 3.5-fold of the control. Moreover, *V. anguillarum* displayed stronger induction of *VpLITAF* expression than that of *M. luteus*. All these results suggested that *VpLITAF* was a potent factor in the regulation of genes that are involved in innate defence mechanism.

Key words *Venerupis philippinarum*; Lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor alpha factor (*LITAF*); bacterial challenge; gene expression