

青蛤(*Cyclina sinensis*)AP-1 基因的克隆及在 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染下的表达分析*

丁 丹 潘宝平 王玉梅 侯梓园 闫春财

(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)

摘要 为了探究青蛤(*Cyclina sinensis*)转录因子(transcription factor gene, AP-1)在病原微生物侵染下的免疫防御应答过程中的潜在作用,本研究采用转录组测序筛选、设计特异性引物并成功克隆得到青蛤 AP-1 基因的 cDNA 序列(GenBank 注册号: KX840340),利用生物信息学在线软件进行了生物信息学分析,结果显示: AP-1 基因全长 1914bp,结构域全长 195bp,编码 65 个氨基酸,开放阅读框全长 825bp,编码 274 个氨基酸,存在一个保守的 bZIP 功能域;是重要的转录因子。运用实时荧光定量 PCR(qPCR)的方法分析了 Ap-1 基因在青蛤 5 个组织中表达过程变化,结果表明: Ap-1 基因在血淋巴、外套膜、肝脏、闭壳肌、腮等组织中广泛表达;在血淋巴中表达量最高,在闭壳肌中次之,然后为腮和外套膜,在肝脏中表达量最低,约为血淋巴的 1/7。另外,我们还分析了鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染青蛤血淋巴后的变化情况,结果显示: 在鳃弧菌侵染后,与对照组相比,青蛤血淋巴中的 AP-1 表达量明显升高,在 24h 时 Ap-1 基因表达量最大,与对照组差异极显著($P < 0.01$)。说明 Ap-1 基因在青蛤的免疫防御反应中具有重要作用,同时也为进一步研究 AP-1 在病原微生物侵染青蛤过程中的功能和作用机制奠定了基础。

关键词 青蛤; 转录因子(AP-1); 定量 PCR; 鳃弧菌; 免疫应答

中图分类号 Q789 **doi:** 10.11693/hyh20170700192

在我国海区地带,经济贝类中常见的当属青蛤(*Cyclina sinensis*)(王兴强等, 2006),具有适应性强,养殖产量高等经济效益(白胡木吉力图等, 2008),但随着国内青蛤养殖规模的逐年扩大,导致养殖环境恶化及种质退化严重,在我国江苏等地出现了由鳃弧菌等病原微生物引起的疾病并造成了大面积死亡现象(孙国铭等, 2004; 曹华, 2004),青蛤的集约化养殖也遭受了极大的制约。为能适应目前的养殖业要求,迫切需要研究其免疫防御系统和如何才能有效地防治病原微生物的侵染,该研究结果定能为今后青蛤的大规模养殖奠定指导作用和实践价值。

转录因子中绝大部分都含有一种重要的结构域被称为亮氨酸拉链(leucine zipper),又名碱性拉链

(bZIP),其组成包括碱性 DNA 的 N 端和亮氨酸二聚体的 C 端(Landschulz *et al*, 1988; Glover *et al*, 1995)。该拉链的非亮氨酸残基可决定蛋白之间的特异性结合(Alber, 1992)。转录因子-1(transcription factor gene, AP-1)则是其中重要的一种(Karin *et al*, 2001),Ap-1 具有进化保守的 bZIP 功能域,由亚家族单体: c-Jun 蛋白家族(Hirai *et al*, 1989; Ryder *et al*, 1989; Hartl *et al*, 1991)、c-Fos 蛋白家族(Nishina *et al*, 1990)、ATF 蛋白家族、JDP 蛋白家族(Aronheim *et al*, 1997)组成二聚体结构,其稳定性由单体的不同组成决定。研究表明 TLR、TNF 和 RIG 等信号通路的传导(Redhu *et al*, 2011; Karpus *et al*, 2012)和干扰素、白细胞介素等细胞因子能将 Ap-1 基因这种具有先天免疫反应的重要

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 12JCZDJC22800 号, 09JCZDJC19300 号; 天津市科学技术普及项目, 17KPXMSF00040 号; 天津师范大学基金项目, 043135205-GC54 号, 043135202-XK1706 号。丁 丹, E-mail: 783830149@qq.com

通讯作者: 闫春财, 博士, 副教授, E-mail: skyycc@tjnu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-21, 收修改稿日期: 2017-08-23

因子激活(Wehkamp *et al.*, 2004; Saadane *et al.*, 2011)。细胞内的 AP-1 基因是信号传导的第三信使, 它的活性可经 MAPK 信号转导通路的磷酸化调控。Ap-1 对病原微生物侵染会做出免疫应答, 可通过与 Ap-1 结构域中 N 端的 DNA 区域结合或调控其转录和翻译, 从而参与生物体内的免疫系统防御、细胞增殖、分化、编程性死亡等过程(Tan, 2012; 任毅鹏等, 2014; 魏星等, 2015)。

如今, 在脊椎动物类中关于转录因子 Ap-1 的报道时常能见到, 有报道显示哺乳动物的 Ap-1 能与基序为 [TGA/C(G)TCA] 的特异性 DNA 形成二聚体(Vesely *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2014), 这种复合体在调节炎症和控制不同类型组织或细胞的表达时均能发挥作用(Adcock, 1997; Jochum, 2001; Karin, 2001)。但在海洋无脊椎动物中这样的报道却不多, 只有在鲍 (*Haliotis discus*) 和菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 中有, 在青蛤中关于 AP-1 基因的报道至今尚未发现。在研究脊椎动物 Ap-1 时, 发现该基因影响相关基因在免疫应答中表达, 同时还参与传导多条信号通路。鳃弧菌是制约青蛤养殖业发展的主要病原微生物, 所以开展青蛤 AP-1 基因的研究不但能够初步揭示软体动物先天免疫应答的作用机制, 还能为后续研究软体动物如何更好地防治病害起到指导作用(吴冰等, 2014)。

研究以生物免疫学方法为主, 从构建的转录组文库中筛选、克隆 Ap-1 基因 cDNA 序列并用在线生物学软件预测了其结构域、开放阅读框的结构和功能等。检测在鳃弧菌侵染下 Ap-1 基因在青蛤体内不同组织的时序表达过程, 进一步深入研究青蛤血淋巴中 Ap-1 基因在不同时间点的表达量变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验动物来自于天津大港滩涂, 将青蛤放入密度 $1.02\text{--}1.04\text{g/cm}^3$ 、水温 $21\text{--}24^\circ\text{C}$ 的海水中, 用 0.005g/mL 的小球藻饲养一周左右。然后筛选大小适中、外壳完好的个体, 平均壳宽(19.12 ± 0.57)mm, 平均壳长(29.14 ± 1.23)mm, 平均壳高(29.52 ± 1.47)mm, 进行实验。

1.1.2 材料处理 用培养基将实验室低温保种的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)在 28°C 下培养 24h 后, 用离心机离心, 重复 3 次无菌海水重悬, 将 OD_{600} 调至 0.4。依据随机分组原则, 每只青蛤分别取 50mg 的血

淋巴、外套膜、闭壳肌、腮、肝脏等组织, 加入 $600\mu\text{L}$ Trizol 研磨后再加 $400\mu\text{L}$ Trizol 使其充分裂解。对照组每只注射 $50\mu\text{L}$ 灭菌海水, 实验组青蛤注射 $50\mu\text{L}$ 鳃弧菌, 在 0、3、6、12、24、48、96h 时间点抽取青蛤血淋巴, 3000r/min , 4°C , 离心 10min; 加入 1mL Trizol 在冰中裂解 5min。然后将材料放置在 -80°C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 青蛤 Ap-1 基因的筛选 取健康青蛤各组织, 将其置于放有液氮容器中进行充分研磨, 然后使用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 法, 加入 1mL Trizol 分离纯化总 RNA。纯化好的 mRNA 用随机引物逆转录法合成 cDNA。将得到的双链 cDNA 需经末端修饰、加尾、加测序接头、纯化、PCR 技术扩增等制备过程。采用第二代测序仪完成青蛤转录组测序。得到的序列用 Unigene 编码蛋白框 ORF 测序分析、经 BLAST 分析、克隆检测、基因功能 Go 注释和代谢途径分析, 最后从中筛选得到青蛤 Ap-1 基因序列。

1.2.2 青蛤 Ap-1 基因的克隆与序列分析 将筛选出的 Ap-1 基因全长序列, 通过 Primer5.0 软件设计符合要求的引物并进行基因克隆; 用 BioEdit 软件将克隆的序列与 GenBank 核酸数据库序列进行比对; SMART 软件可预测该基因的结构域; 使用 Open Reading Frame 在线预测基因开放阅读框(ORF); 用 ProtParam 在线分析其分子量, 等电点, 分子式等; 用 Clustal W 对氨基酸序列进行多重比对和同源性分析; Ap-1 信号肽用 SignalP3.0 查找; 用 MEGA6 以邻接法(NJ)构建分子系统数。

1.2.3 检测 Ap-1 基因在青蛤 5 个组织中的表达变化 将提好的青蛤血淋巴、外套膜、肝脏、腮和闭壳肌等组织的 RNA 进行逆转录, 合成 cDNA 并以此作为模板, 放入 -20°C 备用。选用稳定性强的内参基因 RT- β -actin-F, RT- β -actin-R; 特异性引物用 RT-Ap-1-F, RT-Ap-1-R (表 1), 在 Rotor-Gene6000 实时定量 PCR 仪上进行反应。扩增体系为 $20\mu\text{L}$, 程序为: 95°C 预变性 30s, 95°C 变性 3s, 60°C 延伸 15s, 40 个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算(Livak *et al.*, 2001), 以 RQ 平均值 \pm 标准差作为基因的表达水平。然后依据 SPSS 软件进行 t 检验分析显著性差异。

1.2.4 青蛤 Ap-1 基因在鳃弧菌侵染后血淋巴的时序性表达 分别提取经鳃弧菌侵染后 0、3、6、12、24、48、96h 时间点的青蛤血淋巴总 RNA, 通过逆转录合成 cDNA。内参基因用 RT- β -actin-F、RT- β -actin-R,

表 1 实验中用到的 PCR 引物
Tab.1 The PCR primers used in this study

引物	序列(5'—3')
RT-β-actin-F	CACCACAACCTGCCGAGAG
RT-β-actin-R	CCGATAGTGATGACCTGACC
RT-Ap-1-F	GGAGCAGTATTGGTCAGATT
RT-Ap-1-R	TCGTGTTAGCAGTGCCTAGA

特异性引物用 RT-Ap-1-F、RT-Ap-1-R, 反应体系、反应程序, 参照 1.2.3。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, 然后依据 SPSS 软件分析。

2 结果

2.1 青蛤 Ap-1 基因的结构分析

青蛤转录组中筛选出的 Ap-1 基因, 其基因全长 1914bp, 结构域 195bp, 编码 65 个氨基酸, 开放阅读框为 825bp, 从 419bp 到 1243bp, 共编码 274 个氨基酸(图 1), 存在一个相对保守的 BRLZ 结构域。在 GenBank 的注册号为 KX840340。其理论分子量为 30.07kDa, 理论等电点 $pI=8.81$, 分子式为 $C_{1298}H_{2132}N_{372}O_{417}S_{14}$ 。氨基酸组成中亮氨酸(Leu)最高, 占 8.8%,

```

419 atggagacaccatgtataatgatgacggcgatagggaaaataacagcttcggaagt
1 M E T T M Y N D D G A D R E N N S F G S
479 aaactgaacagtatgaagcgttcaatgacactggactttaatcagaaatggatttcc
21 K L N S M K R S M T L D F N S G N G I S
539 agtgcataaagcaaaaattcagacagcctgttacagtcaccgattgaaatgttg
41 S A K K Q K I Q T A L L Q S P D L N M L
599 aagttagctcaccagaactgagaaaatgattcaggcaaatggcatggtgaccaca
61 K L A S P E L E K M I I Q A N G M V T T
659 acaccaacactactcagatactatttccaaaattgtaacagatgaacaagaagcttac
81 T P T P T Q I L F P K F V T D E Q E A Y
719 gccacggggttgtgctgactgacagcctcattcaaaaccaggagaaaatttgaa
101A Q G F V A A L A E L H S K P G E N F E
779 aatcaggaaacattgttagttcaacaacaatgatgcttgaaaaacattttaccaca
121N S G N I V S S T T N D A L K N I F T T
839 acaacatcactgccaggtgtatagtcctaccaatcgttaccgtcaaaatcgttctg
141T T S L P G G I V P T N S L P S K S L L
899 aatccgggtcataccattagtcagtgaaagaaccacaactgttccatgtgga
161N P G S Y P L V S V K E E P Q T V P C G
959 attaatccccaccacctaccaataaatggtggatcaggaagtcacaaactggaa
181 I N S P P P S P I N M A D Q E V I K L E
1019cgaagaagagcaagaacagcgtcgcagcaagaatgtcgaacaagaactcgaagg
201R K R A R N R V A A R K C R T R K L E R
1079attgccctctcagcagcaaaagtctgacctgaaaggacaaaataatgacttagccact
221I A R L E D K V A D L K G Q N N D L A T
1139cagcctacaaacttagacagcgaagtgtgaaattaaaacaaccattattgaacacgtg
241Q A T K L R D E V C K L K Q T I I E H V
1199aatagtgctgcaataatgatgctcagaatcaacttctga
261N S G C Q I M M A Q N I N F -

```

图 1 青蛤 Ap-1 基因 cDNA 序列的开放阅读框和结构域分析

Fig.1 The open reading frame of Ap-1 gene and the structure domain

注: 起始密码子用波浪线, 终止密码子用虚线, BRLZ 结构域用双线

2.2 青蛤 Ap-1 基因的分子系统学分析

采用 MEGA6.0 软件以邻接法(NJ)构建了 Ap-1 的系统树(图 2), 用 bootstrap 1000 个循环检验拓扑结构的置信度。其结果显示: 青蛤 Ap-1 与盘鲍(*Haliotis discus*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)聚在一个分支上, 表明它们之间进化距离最近, 而黑线仓鼠(*Cricetulus griseus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)等在另一个分支上, 说明与其进距离较远。

2.3 青蛤 Ap-1 基因在不同组织间的表达

以实时荧光定量 PCR 方法研究 Ap-1 基因在青蛤组织: 外套膜、闭壳肌、血淋巴、肝脏及腮的表达量变化情况, 用稳定性强的 β-actin 基因作为青蛤 5 个组织中表达量的对照组, 以 AP-1 基因做实验组。实验结果表明: 在青蛤的 5 个组织中 Ap-1 基因均有一定程度的表达且存在差异(图 3), 其中表达量最高是在血淋巴中, 显著高于其他组织($P<0.05$), 闭壳肌表达

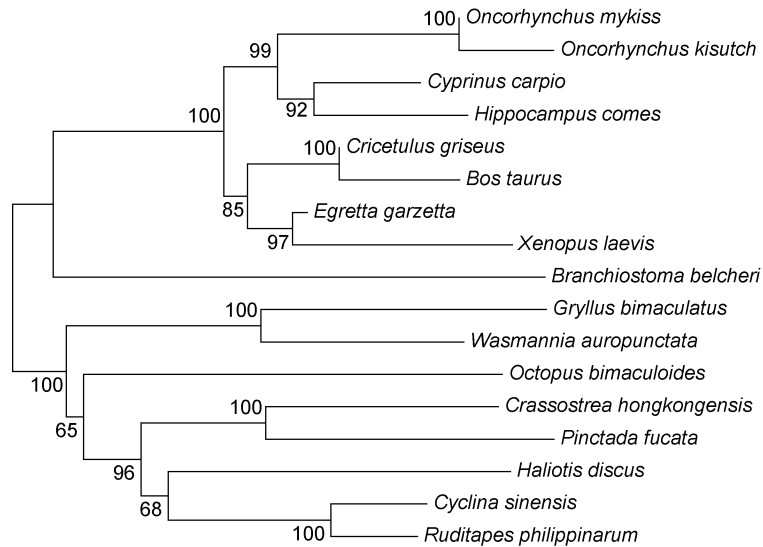


图 2 使用邻接法(NJ)构建的 17 个物种 Ap-1 氨基酸序列系统树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed with amino acid sequences of Ap-1 of 17 species using neighbor-joining method
注: 建立系统树所用的物种以及序列号为: *Ruditapes philippinarum* ADZ48236.1; *Crassostrea hongkongensis* AHF51977.1; *Haliotis discus discus* ADQ43242.1; *Octopus bimaculoides* XP_014768778.1; *Pinctada fucata* AKP06506.1; *Oncorhynchus mykiss* CDQ60233.1; *Gryllus bimaculatus* BAX36489.1; *Cricetus griseus* XP_007608298.1; *Wasmannia auropunctata* XP_011694334.1; *Egretta garzetta* XP_009634534.1; *Oncorhynchus kisutch* XP_020354835.1; *Bos taurus* NP_001071295.1; *Cyprinus carpio* XP_018981694.1; *Hippocampus comes* XP_019752857.1; *Xenopus laevis* NP_001079363.1; *Branchiostoma belcheri*; XP_019631421.1; *Cyclina sinensis* KX840340

量次之, 后面依次为腮、外套膜, 而肝脏中的表达量最低, 约占血淋巴的 1/7。表明 Ap-1 基因在青蛤中主要通过血淋巴表达出来。

2.4 鳃弧菌感染青蛤 Ap-1 基因时在血淋巴中的时序性表达

用鳃弧菌感染青蛤以后, 利用荧光定量 PCR 分析了青蛤 Ap-1 基因在血淋巴中不同时间点的表达情况变化(图 4)。结果发现, 与对照组相比, 实验组在感染后 24h 骤升并达到最大值, 且与对照组存在极显著性差异($P < 0.01$), 约为对照组的 1.5 倍左右; 与各时间点的实验组相比, 感染 24h 的表达量最大, 有极显著性差异($P < 0.01$)。48h 后其表达量开始下降。

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。通过青蛤转录组文库获得了 Ap-1 基因的 cDNA 序列。青蛤 Ap-1 基因在结构上, 具有其蛋白家族典型的 Jun 功能域的 N 端和保守亮氨酸拉链结构域(BRLZ)的 C 端, 能和 DNA 结合形成二聚体(Glover, 1995), 青蛤 Ap-1 基因与大多数转录因子一样, 都在进化上相对保守。经蛋白多序列同源比对、系统进化树分析, 发现其与菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和盘鲍(*Haliotis discus*)亲缘关系最近。由此可以推测, 青蛤 Ap-1 可能通过亮氨酸拉链

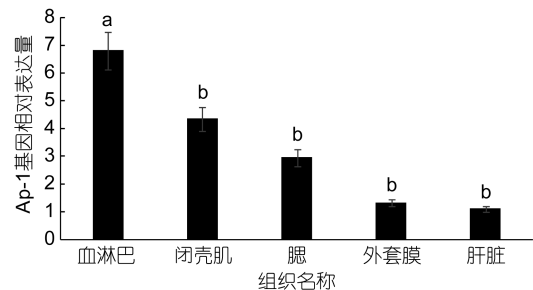


图 3 青蛤 Ap-1 基因在青蛤不同组织间的表达情况

Fig.3 The expression of *C. sinensis* in organs revealed by real time PCR

注: 柱上不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

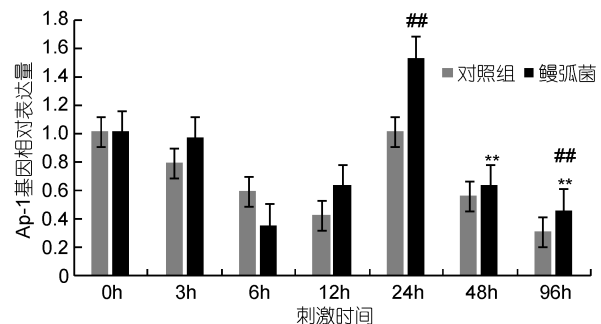


图 4 青蛤血淋巴 Ap-1 基因在鳃弧菌感染下不同时间相对表达的情况

Fig.4 The relative expression of *Cs* Ap-1 gene in hemolymph of *C. sinensis* infected by *V. anguillarum* in different periods

注: **表示相同时间点实验组与对照组基因的转录表达水平差异极显著($P < 0.01$); ##表示该时间点对照组基因的转录表达水平与同组注射前(0h)相比差异极显著($P < 0.01$)

结构域结合特异目标蛋白,从而在 Toll 样受体和 NF- κ B、MAPK 等信号传导通路中发挥传递、调控等功能(Tan, 2012)。

通过荧光定量 PCR 技术分析, Ap-1 基因在青蛤血淋巴、外套膜、闭壳肌、肝脏、鳃等组织中广泛表达。说明青蛤 Ap-1 和杂色鲍、凡纳滨对虾和菲律宾蛤仔是相同的(De Zoysa, 2010; 吴冰等, 2014; Wu *et al.*, 2015)。Ap-1 在不同细胞或组织中的表达具有特异性,并可调节其转录特异性基因,这种特异性符合家族成员在组织表达中的特点。青蛤 Ap-1 基因在血淋巴中表达量最高,这同样与上述三种生物相同。青蛤的先天非特异性免疫主要通过血淋巴循环,血淋巴中含有大量吞噬细胞,可破坏微生物的同时产生和释放抗菌物质,在病原微生物侵染过程中发挥防御作用。当外界病原刺激青蛤时能直接接触刺激的组织是鳃,其表达量也比较高。这与凡纳滨对虾和菲律宾蛤仔类似,说明 Ap-1 不仅在影响免疫应答过程,可能也同时参与细胞的编程性死亡(Ameryar *et al.*, 2008)。青蛤 Ap-1 在肝脏中表达量最低,这与凡纳滨对虾类似。青蛤 Ap-1 内参基因和凡纳滨对虾、菲律宾蛤仔和杂色鲍均一样都是用稳定性强的 β -actin。而盘鲍选用核糖体蛋白 L17(EF03427)作为组织表达的内参基因,就造成青蛤 Ap-1 与盘鲍的血淋巴、外套膜等组织表达情况不同(De Zoysa, 2010)。

研究表明:当病原微生物侵染无脊椎动物,如菲律宾蛤仔、杂色鲍和凡纳滨对虾时,其血淋巴的表达量都呈现出显著性变化。本实验用鳃弧菌侵染青蛤,检测出其血淋巴中 Ap-1 基因的表达量在 0、3、6、12、24、48、96h 呈现出不同的变化情况。当鳃弧菌刚开始侵染青蛤的 0—12h 过程中,与对照组相比, AP-1 基因几乎没变化或呈下降趋势。无脊椎动物的许多免疫信号通路传导和相关免疫基因的表达调控都与 Ap-1 基因有关。Ap-1 这个下游效应基因在免疫信号传导过程中会被 MAPK 信号通路控制其活性(Ye *et al.*, 2014)。青蛤 IRAK-4 是 Toll 样信号通路的上游接头分子,在被鳃弧菌感染 3h 表达量达到最大值。而作为 MAPK 下游的 Ap-1 效应基因,只能在鳃弧菌侵染一段时间后才能被激活,像其他免疫防御基因一样参与免疫防御过程。综上分析表明:在被鳃弧菌侵染的早期免疫应答过程, AP-1 基因并不参与免疫防御过程。可能因为在免疫防御的早期阶段,参与病原微生物识别和信号传导的主要是 Toll 受体和其通路上游的因子(Ge, 2011)。转录因子 Ap-1 不能在鳃弧菌侵染的

早期就像模式识别受体那样结合病毒并发挥作用。在感染后 24h 时, AP-1 基因表达量明显高于对照组,且与实验组相比也达到最大值,说明 Ap-1 最大程度上参与了防御鳃弧菌的免疫应答过程。推测此时青蛤的非特异性免疫防线被激活,大量血细胞得到复制并能产生许多吞噬细胞,从而抵御鳃弧菌的侵染。说明转录因子 Ap-1 参与了革兰氏阴性菌引起的机体免疫信号传导。在被鳃弧菌侵染 48—96h, AP-1 基因的表达量与 24h 相比有所下降,但仍高于对照组($P < 0.01$)。

4 结论

本实验利用青蛤转录组文库对 Ap-1 基因进行筛选、克隆、鉴定和生物学分析,可知青蛤 Ap-1 基因含有其蛋白家族典型的保守的 bZIP 功能域。对 Ap-1 基因在青蛤鳃、血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌等不同组织及病原微生物侵染下的血淋巴的表达特征进行了分析,结果显示青蛤的血淋巴是其非特异性免疫过程的重要防线。作为下游效应基因的转录因子 Ap-1,在青蛤的免疫防御应答过程和重要的信号传导通路中发挥了重要作用。本实验对青蛤 Ap-1 基因的生物免疫学研究结果有望为今后深入了解无脊椎动物提供有价值的信息。

参 考 文 献

- 王兴强,曹梅,阎斌伦等,2006. 青蛤的生物学及其繁殖. 水产科学, 25(6): 313—316
- 白胡木吉力图,高悦勉,姚红伟,2008. 青蛤北方 3 个群体遗传多样性分析. 水产科学, 27(9): 487—489
- 任毅鹏,高晶,潘宝平等,2014. 青蛤 (*Cyclina sinensis*)TLR2 基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 45(5): 1037—1043
- 孙国铭,万夕和,刘培庭等,2004. 通州海区滩涂青蛤死亡原因的初步分析. 水产养殖, 25(2): 26—27
- 吴冰,刘逸尘,张亦陈等,2014. 凡纳滨对虾 Ap-1 基因的克隆和表达特征分析. 水产学报, 38(9): 1294—1301
- 曹华,2004. 沿海滩涂青蛤死亡原因初探及对策. 科学养鱼, (4): 47—48
- 魏星,张海静,潘宝平,2015. 青蛤 (*Cyclina sinensis*)IKB 基因的克隆及其在鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 刺激下的表达分析. 海洋与湖沼, 46(4): 793—799
- Adcock I M, 1997. Transcription factors as activators of gene transcription: Ap-1 and NF- κ B. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 52(2): 178—186
- Alber T, 1992. Structure of the leucine zipper. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2(2): 205—210
- Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman J B, 2008. A role for Ap-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie*, 5(8): 747—752
- Aronheim A, Zandi E, Hennemann H *et al.*, 1997. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting

- protein-protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6): 3094—3102
- De Zoysa M, Nikapitiya C, Lee Y *et al*, 2010. First molluscan transcription factor activator protein-1 (AP-1) member from disk abalone and its expression profiling against immune challenge and tissue injury. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6): 1028—1036
- Ge H, Wang G D, Zhang L L *et al*, 2011. Molecular cloning and expression of interleukin-1 receptor associated kinase 4, an important mediator of Toll-like receptor signal pathway, from small abalone *Haliotis diversicolor*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(4—5): 1138—1146
- Glover J N M, Harrison S C, 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 373(6511): 257—261
- Hartl M, Hutchins J T, Vogt P K, 1991. The chicken junD gene and its product. *Oncogene*, 6(9): 1623—1631
- Hirai S I, Ryseck R P, Mechta F *et al*, 1989. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *The EMBO Journal*, 8(5): 1433—1439
- Jochum W, Passequé E, Wagner E F, 2001. Ap-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 20(19): 2401—2414
- Karin M, Shaulian E, 2001. AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life*, 52(1—2): 17—24
- Karpus O N, Heutinck K M, Wijnker P J M *et al*, 2012. Triggering of the dsRNA sensors TLR3, MDA5 and RIG-I induces CD55 expression in synovial fibroblasts. *PLoS One*, 7(5): e35606
- Landschulz W H, Johnson P F, McKnight S L, 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240(4860): 1759—1764
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods. *Methods*, 25(4): 402—408
- Nishina H, Sato H, Suzuki T *et al*, 1990. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9): 3619—3623
- Redhu N S, Saleh A, Halauko A J *et al*, 2011. Essential role of NF- κ B and Ap-1 transcription factors in TNF- α induced TSLP expression in human air way smooth muscle cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 44(3): 479—485
- Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuerno E *et al*, 1989. Jun-D: a third member of the jun gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5): 1500—1503
- Saadane A, Eastman J, Berger M *et al*, 2011. Parthenolide inhibits ERK and Ap-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells. *Journal of Inflammation (London, England)*, 8: 26
- Tan J, 2012. Cloning and Expression of Japanese amphioxus AP-1 transcription factor gene. Shanghai Ocean University
- Vesely P W, Staber P B, Hoefler G *et al*, 2009. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1): 7—12
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K *et al*, 2004. NF- κ B and Ap-1 mediated induction of human betadefensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and Immunology*, 72(10): 5750—5758
- Wu L N, Zhang L, Zhao J M *et al*, 2015. Cloning and expression of a transcription factor activator protein-1 (Ap-1) member identified from Manila clam *Venerupis philippinarum*. *Gene*, 557(1): 106—111
- Ye N, Ding Y, Wild C *et al*, 2014. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(16): 6930—6948

CLONING AND EXPRESSION OF AP-1 GENE FROM *CYCLINA SINENSIS* INFECTION BY *VIBRIO ANGUILLARUM*

DING Dan, PAN Bao-Ping, WANG Yu-Mei, HOU Zi-Yuan, YAN Chun-Cai
(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract To understand the roles of transcription factor AP-1 in immune response triggered by pathogenic microbes, we used clam *Cyclina sinensis* transcriptome library information and designed primers to clone the cDNA sequence of *C. sinensis* transcription factor gene AP-1 (GenBank Accession Number: KX840340). Online bio-information software analysis shows that the full length of the AP-1 is 1914bp, with a 195bp domain encoding 65 amino acids and an 825bp ORF encoding 274 amino acids. Tissue expression analysis by fluorescent quantitative PCR (qPCR) revealed that the AP-1 gene was expressed in haemolymph, mantle, liver, adductor muscle, and gill, and the expression level of AP-1 was the highest in haemolymph and lowest in liver. The sequence and expression of *Vibrio vulnificus* infecting hemolymph were also analyzed. After stimulated by *V. anguillarum*, the expression level increased and reached peak point in 24h, showing significant difference from that of the control ($P < 0.01$). Therefore, the Ap-1 gene plays an important immune role in *C. sinensis*. Meanwhile, for study basis function and mechanism of AP-1 gene was response of *V. anguillarum* infecting in *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*; transcription factor gene (AP-1); quantitative PCR; *Vibrio vulnificus*; immune response