

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *c-Jun* 基因的克隆及免疫应答分析*

于孟君^{1,2} 孙璐明^{1,2} 陈亚东^{2,3} 陈学杰² 杨 光²
刘 洋¹ 仇雪梅¹ 沙珍霞^{2,3}①

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛大学生命科学学院 青岛 266071)

摘要 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)AP-1 家族转录因子 *c-Jun* 基因(Jun proto-oncogene)及其在免疫应答中的作用尚无报道。本研究根据半滑舌鳎转录组数据库中预测的 *c-Jun* 序列, 通过 RACE 技术和 PCR 扩增方法获得了半滑舌鳎 *c-Jun* 基因 cDNA 全长 2093 bp, CDS 区域共 981 bp, 编码 326 个氨基酸, 5' UTR 区域 377 bp, 3' UTR 区域 735 bp。SMART 分析显示, C-JUN 蛋白具有 2 个结构域: AP-1 家族典型结构域 Jun, 以及高度保守的亮氨酸拉链结构域(BRLZ)。经蛋白多序列同源比对、系统进化树分析, 发现半滑舌鳎 *c-Jun* 与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) *c-Jun* 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析显示, *c-Jun* 基因在半滑舌鳎不同组织中普遍表达, 在卵巢中表达量最高。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)人工感染半滑舌鳎后, *c-Jun* 基因在肝脏、脾脏、头肾、小肠、鳃、血液中表达量都出现不同程度上调, 其中, 鳃中变化最明显: 感染 12 h 后表达量达到 0 h 时的 13.20 倍。使用 LPS、PGN、PolyI:C 和 WGP 病原模拟物刺激半滑舌鳎外周血淋巴细胞, 结果显示, WGP 诱导 *c-Jun* 基因上调表达, 而 LPS 与 PolyI:C 均下调基因表达。以上实验结果表明, *c-Jun* 基因在半滑舌鳎的免疫防御中发挥重要作用。

关键词 半滑舌鳎; 转录因子 *c-Jun* 基因克隆; 表达分析; 病原感染; 免疫应答

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0031-09

原癌基因 *c-Jun* 是促分裂原活化蛋白激酶 AP-1 (Activator protein 1)复合物家族的一个重要转录因子。AP-1 复合物包括 *Jun*(Jun proto-oncogene)(*c-jun*、*jun-B* 和 *jun-D*)、*Fos*(*c-Fos*、*Fos-B*、*Fra-1* 和 *Fra-2*) 及 *Atf* (Activating transcription factor)因子(Eferl *et al.*, 2003)。在细胞的催化区域, *c-Jun* 和 *c-Fos* 通过亮氨酸拉链结构(BRLZ, Leucine zipper structure domain)相互结合, 再通过 *Atf* 蛋白嵌合, 形成异质二聚体, 并绑定 AP-1 启动子结合位点, 调节神经元中下游基

因的转录(Angel *et al.*, 1988; Bohmann *et al.*, 1987)。JUN 蛋白以及 FOS 蛋白组成 DNA 结合蛋白, 根据不同的生物体信号指挥转录调节基因的表达, 它主要参与体内免疫应答, 调节细胞增殖分化、肿瘤生长、细胞死亡(Blau *et al.*, 2012; Karin *et al.*, 2001; Shaulian, 2010; Vesely *et al.*, 2009)。 *c-Jun* 基因以及其家族转录因子广泛参与到 B 细胞受体信号通路、T 细胞受体信号通路、MASP 信号通路以及 JNK 信号通路等诸多的信号通路中, 并在各个通路中发挥着重要的信号传

* 国家自然科学基金(31172439)和国家 863 高技术计划(2012AA10A401-4)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31172439), and the National High Technology Development Program of China (863) (2012AA10A401-4)]. 于孟君, E-mail: ymj31362009@163.com

① 通讯作者: 沙珍霞, 研究员, E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-01-25, 收修改稿日期: 2016-02-29

导作用,因此,对 *c-Jun* 以及相关转录因子的研究必将对信号通路的探索提供重要线索(Novoszel, 2013)。

c-Jun 的研究始于 20 世纪 80 年代中后期,研究表明其在哺乳动物、鸟类的生长发育、免疫应答中起着重要作用(Alladi *et al*, 2005; Santos *et al*, 2012)。目前, *c-Jun* 家族基因的克隆以及功能已在一些鱼类中进行了研究,包括鲫鱼(*Carassius auratus*) (Fujikawa *et al*, 2006)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*) (李园园等, 2013)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (Wei *et al*, 2015)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Matsuoka *et al*, 1998)等,但在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)中却未有相关报道。半滑舌鲷是我国重要的海水养殖鱼类,养殖规模日益扩大,而养殖病害问题一直是影响产业可持续发展的瓶颈。因此,探讨半滑舌鲷抗病分子机制将会对半滑舌鲷的病害防治提供重要理论基础,本研究将重点解析 *c-Jun* 基因鉴定、表达模式及免疫应答表达分析,以期探明半滑舌鲷免疫机制的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼以及病原

实验用半滑舌鲷购于日照东鑫现代渔业技术研究所,为 1.5 龄鱼,平均体长为 30 cm。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)由本实验室自行保存。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国);总 RNA 提取试剂盒(天根);Trans-T1(全式金);PrimeScript™ RT reagent 试剂盒(Perfect Real-time) (TaKaRa);5'-Full RACE 试剂盒(TaKaRa);3'-Full RACE 试剂盒(TaKaRa, 大连)等。

1.3 实验方法

1.3.1 鳃弧菌感染实验 实验鱼暂养于 60 cm×30 cm×40 cm 塑料箱中,20–22℃水温条件下暂养 7 d 以消除环境胁迫。鳃弧菌感染实验参照 Sha 等(2012)略作修改,实验组按照 3.18×10^5 CFU/g (半数致死量, LD₅₀)的剂量进行腹腔注射,对照组注射等体积 1×PBS 溶液。分别在注射后 0、6、12、24、48、72 h 共 6 个时间点取样,每个时间点 3 个样本,分别取肝、小肠、脾、头肾、鳃、血液 6 种组织;另外,随机选 3 条健康鱼,分别收集肝、脾、头肾、后肾、小肠、胃、血液、鳃、皮肤、肌肉、心脏、脑、卵巢 13 个组

织,所有组织迅速投入液氮中,随后将其转移至–80℃冰箱中保存,用于总 RNA 提取。

1.3.2 细胞感染实验 脂多糖 Lipopolysaccharide (LPS, 革兰氏阴性菌模拟物)、肽聚糖 Peptidoglycan (PGN, 革兰氏阳性菌模拟物)、聚肌胞 Poly muscle cell (PolyI:C, 病毒模拟物)和葡聚糖 Dextran(WGP, 真菌模拟物)分别稀释到 50 ng/ml、100 μg/ml、50 μg/ml、50 μg/ml,感染 6 孔板中接种的半滑舌鲷外周血淋巴细胞, PBS 组为对照组,每组 3 个平行。感染后 0.5 h 收集细胞悬液,1000 r/min、5 min 离心去培养基,使用 PBS 洗涤半滑舌鲷外周血淋巴细胞数次,加入新培养基进行培养。分别在 0、2、6、12、24 h 共 5 个时间点取样。低温离心去上清,各加 1 ml TRIzol 试剂收集细胞,–80℃冰箱超低温保存,待提取 RNA。

1.3.3 总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 液氮条件下研磨收集的组织,先加入 500 μl 的裂解液 RZ 裂解并研磨充分,最后再加入 500 μl 裂解液充分裂解,具体步骤参照总 RNA 提取试剂盒(天根)提取操作说明,得到的 RNA 在 1%琼脂糖上进行电泳检测,并用紫外分光光度计检测所提取的 RNA 浓度及质量。取 1 μl 的 RNA,按照 TaKaRa 反转录试剂盒(TaKaRa)说明书,首先去除基因组 DNA,再进行反转,反转产物稀释到相应倍数作为 qRT-PCR 模板。

1.3.4 *c-Jun* 基因的克隆 根据本实验室转录组测序获得的 *c-Jun* 基因 cDNA 序列(Zhang *et al*, 2015),运用 Primer 5.0 软件设计 CDS 扩增引物 *c-Jun*-F、*c-Jun*-R(表 1),以半滑舌鲷混合组织 cDNA 为模板,扩增目的基因;设计 5'-RACE 扩增引物 RACE-F1、RACE-R1 和 3'-RACE 扩增引物 RACE-F2、RACE-R2 (表 1),按照 TaKaRa RACE 扩增试剂盒说明书对 5'-UTR 和 3'-UTR 进行扩增。PCR 产物用 1%琼脂糖检测,进行切胶回收,连接 T 载体,转化到感受态细胞中,并孵育、涂板,培养过夜后挑取单克隆,菌液 PCR 检测选取阳性单克隆后送苏州金唯智生物有限公司测序。

1.3.5 C-JUN 蛋白的生物信息学分析 运用 NCBI 的 Protein Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析半滑舌鲷 C-JUN 和其他同源蛋白的相似性,SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构域 ClustalW(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)以及 MEGA 5.0 (<http://megasoftware.net/>)进行序列比对,采用 Neighbour-Joining 方法构建系统进化树。

1.3.6 *c-Jun* 基因组织表达分析 运用实时荧光定量 PCR 技术检测 *c-Jun* 基因在各个组织中的表达情

况。以半滑舌鳎 18S rRNA 作为内参, 采取三步法进行 PCR 扩增: 95℃ 预变性 15 min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 20 s, 最后 72℃ 延伸 30 s, 同时采集荧光信号, 共 40 个循环, 程序自动加入熔解曲线分析, 分析结束后采用 ABI-7500Fast 自有软件 SDS v2.0.6 对扩增曲线、熔解曲线分析, 相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 7500 software v2.0.6 处理结果后导出相对定量数据, 用 SPSS 19.0 对数据进行单因素分析, 利用 Origin 9.0 制作相对定量表达柱状图。18S rRNA 扩增引物和组织特异性检测引物序列见表 1。

2 结果

2.1 *c-Jun* 基因 cDNA 序列扩增

以半滑舌鳎混合组织为模板, 扩增得到 *c-Jun* 基因 cDNA 全长为 2093 bp, CDS 区域共含有 981 个碱基, 编码 326 个氨基酸, 其 5' UTR 为 377 bp, 3' UTR 为 735 bp。预测编码蛋白质的分子量约为 35.9 kDa, 等电点为 8.24。通过在线蛋白质结构与预测软件 Smart 分析得 *c-Jun* 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(BRLZ)结构域(图 1)。

表 1 实验所用引物

Tab.1 Primers and their sequences used in this study

| 引物 Primers | 碱基序列 Base sequence(5'-3') | 用途 Application |
|------------|------------------------------|---------------------|
| C-JUN-F | CAGCGGCAGCAGATAAGG | 扩增 C-JUN ORF 上游引物 |
| C-JUN-R | CACAGAAACTTTAGCGGGTC | 扩增 C-JUN ORF 下游引物 |
| CS-18S-F | GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC | 内参上游引物 |
| CS-18S-R | AGTGGGGTTCAGCGGGGTTAC | 内参上游引物 |
| C-JUN-RT-F | TACGGATACAGCGACGCCA | <i>c-Jun</i> 定量上游引物 |
| C-JUN-RT-R | CCGTTGCTGGACTGGATG | <i>c-Jun</i> 定量下游引物 |
| Race-F1 | TGCGTTGCCGCCTATCTCTCT | 扩增序列 5'UTR 区域 |
| Race-R1 | CTAATACGACTCACTATAGGGC | 扩增序列 5'UTR 区域 |
| Race-F2 | GAGGCTGGAGGATAAAGTGAAGAACCTC | 扩增序列 3'UTR 区域 |
| Race-R2 | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | 扩增序列 3'UTR 区域 |

```

gattgctgcacgttactccgctcagccaatacacatccaggcagatgtaggagaggaacagcggacgctctgtgctgttctctgac
cagcggcagcagataag 17
tggaaaacttttctctaaagactttgtgactcaaaagcgtcacaaactctgggaagcagcagcctcgccacctgacagacgtaagtct
107
gattcctgtgtcaacaccattgctgacagagtttggaaagtgttttagtagaaaagcttttggaaaccaatattttctctcatctta
197
taaaagaggaagaagacaagtgacaaaaagttgctttctcaaaaacaagacacttaagtgtctttttattttggaaagtttctctct
287
ATGATGCCAAGATGGAAGACTACTTTCTATGAAGACTCACTCAACGCTTTCTCCAGCAGCAAAAACACCGGCTACGGATACAGCGACGCC
377
M Y A K M E T T F Y E D S L N A F S Q H E N T G Y G Y S D A
467
AAAGCTCTGAAACACAACATGACGCTGAACCTGTCCGATCCGTCGGAACTTTGAAACCTCATCTGCGGGCCAAGGCGAGCGACATCCTT
557
K A L K H N M T L N L S D P S G T L K P H L R A K A S D I L
60
ACATCCCCGACGTGGGCTTACTGAAGTTGGCTTCTCCTGAGCTGGAGCGGCTTATCATCCAGTCCAGCAACGGACTCACCAACAAG
647
T S P D V G I L K I A S P E I E R I I I Q S S N G I I T T T
90
CCGACACCCAGCCAGTTCGTGTCTAGAAACGTCACGGATGAGCAGGAGGGCTTCGCTGAGGGGTTTGTCCGAGCTCTGGCCGAGCTC
737
P T P T Q F V C P R N V T D E Q E G F A E G F V R A L A L
120
CACCACGACACATGCGCGCCAGCCTAATGTCAAGTGTCACTCCGCGCCGAGACCCTGTCAACAGTGCCTGCGCCTATCTCCTCT
827
H H Q H M P A Q P N V S V T S A P Q T T V N S A I P P I S S
150
GTCGCGGGAGCCACTGTTTACAACAACAACGGCGCTCTCGCTCCGATTCACCTGTTTATGAGGATCTTAACGCCCTCAACACAGCAAA
917
V A G A T V Y N N N G A L R S D S P V Y E D L N A F N T A N
180
ACCACAGCCTCGGCTCAAAATACACCACCTCAGCCCAACTATGTCCTCACCGCTGCGCCACAACCTACCCATCTACGGTCAGCCCTCC
1007
T T A S A Q N Y T T S A P T M S F T A A P Q L P I Y G Q P S
210
TCTGCCAGCATCCGGGCTCACCCGCTCAAAGAGGAGCCCAAACTGTGCCGAAATGCGGGGGAGACCCACACTCTCCCGGATT
1097
S A Q H P R L T T L K E E P Q T V P E H P G E T P P L S P I
240
GACATGGAAGCCAGAGCCATCAAGCGGAGAGAAAGAGGATGCGTAACCGTATCCGCGCGTCTAAGTCCGCAAAAGGAGCTGGAG
1187
D M E S [ Q E R I K A E R K R M R N R I A A S K C R K R K L E
270
AGAATTCGAGGCTGGAGGATAAAGTGAAGAACCTCAAGTCCAGAACTCGGAACCTGCGTCCACCGCAACATGCTACGTAGGAGGTTG
1277
R I S R L E D K V K N L K S Q N S E L A S T A N M L R E Q V
300
GCACAACCTAAGCAGAAAGTGATGAACCAACGTCACAGCGGTTGCCAGTCAATGTTGACCCAGCAGCTCCAGACTTTCTGAGAGGcaga
1367
[A Q L K Q K V M N ] H V N S G C Q L M L T Q Q L Q T F *
326
agcagcggaggagagagagtagcagactgtggtgaaatgaaacggactcttctgtgaaaggtggtcagctgctgctccagaatcgtg
1457
aggsgaattgagatgatcgccgcccgaaggttggaccgcgtaaaagtttctgtgtgacgagcagccagccagcggcgtccgcaaa
1574
aaagcctgggacagctctacagtgccatgaaccagagggcagcgaatgacagatggcttttctgttttctgtctgtcttca
1637
cagaactggactggactgaccttttctgtattacaccagctctgcacggacctctcatgagctacccaaatgagaatattcagattaa
1727
acgatgtgaaaacctgagatagccacaacggcctgacaacatggcggttggccatttcttggggtggaagttgtaaccaagcgg
1817
cctgactttgactttcagtagcaagtagcttttctttttattgtgagaaaatagttggaagcatcaagatttactgtttttcta
1907
acgtaattgggtttcactcattgttatatgtacataagatcaactttgagtagtacttatgtttaccatttgaacaactgtgaagatttt
1997
ttatgttgtagtattctgagcactcagaactaattattatataaaaatataaagcatataaaaccccccccccccccccccccc
2087
aaaaaa 2093

```

图 1 半滑舌鳎 *c-Jun* 基因 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *C. semilaevis c-Jun*

图中下划线所标出的 5-236 号氨基酸为 JUN 结构域, 用方框圈出的 245-309 号氨基酸为亮氨酸拉链结构域(BRLZ) The JUN domain from No.5 to No.236 amino acid residues is marked by an underline, the leucine zipper structure domain (BRLZ) from No.245 to No.309 amino acid residues is marked by a box

2.2 氨基酸多序列比对及系统进化树分析

利用 Protein blast 对在 NCBI 数据库中下载的其他物种: 斑马鱼(Danio rerio, NP_956281.1)、大黄鱼(Larimichthys crocea, XP_010738075.1)、非洲爪蟾(Xenopus laevis, NP_001084266.1)、红鳍东方鲀(Takifugu rubripes, XP_003974079.1)、虹鳟(Oncorhynchus mykiss, NP_001117883.1)、孔雀鱼(Poecilia reticulata, XP_008405560.1)、罗非鱼(Oreochromis niloticus, XP_005478994.1)、青鳉(Oryzias latipes, XP_004068223.1)、原鸡(Gallus gallus, NP_001026460.1)、人(Homo sapiens, NP_002219.1)、小鼠(Mus

musculus, NP_034721.1)的 C-JUN 蛋白同源序列进行氨基酸序列比对(图 2)。结果显示, 半滑舌鲷 C-JUN 蛋白序列与其他物种相似度很高, 与大黄鱼 C-JUN 序列相似高达 94%, 与其他几种常见硬骨鱼类相似度在 90%左右, 亮氨酸拉链结构域氨基酸序列在不同的物种之间均呈现出高度的相似性。系统进化树分析显示(图 3), 鱼类的 c-Jun 聚为一支, 其中, 半滑舌鲷首先与虹鳟聚为一支; 红鳍东方鲀首先与青鳉聚为一支, 然后又与大黄鱼、罗非鱼聚为一支。鱼类与两栖类、鸟类和哺乳类的 c-Jun 分别聚类在两大不同的分支上, 显示鱼类的亲缘关系更为接近。

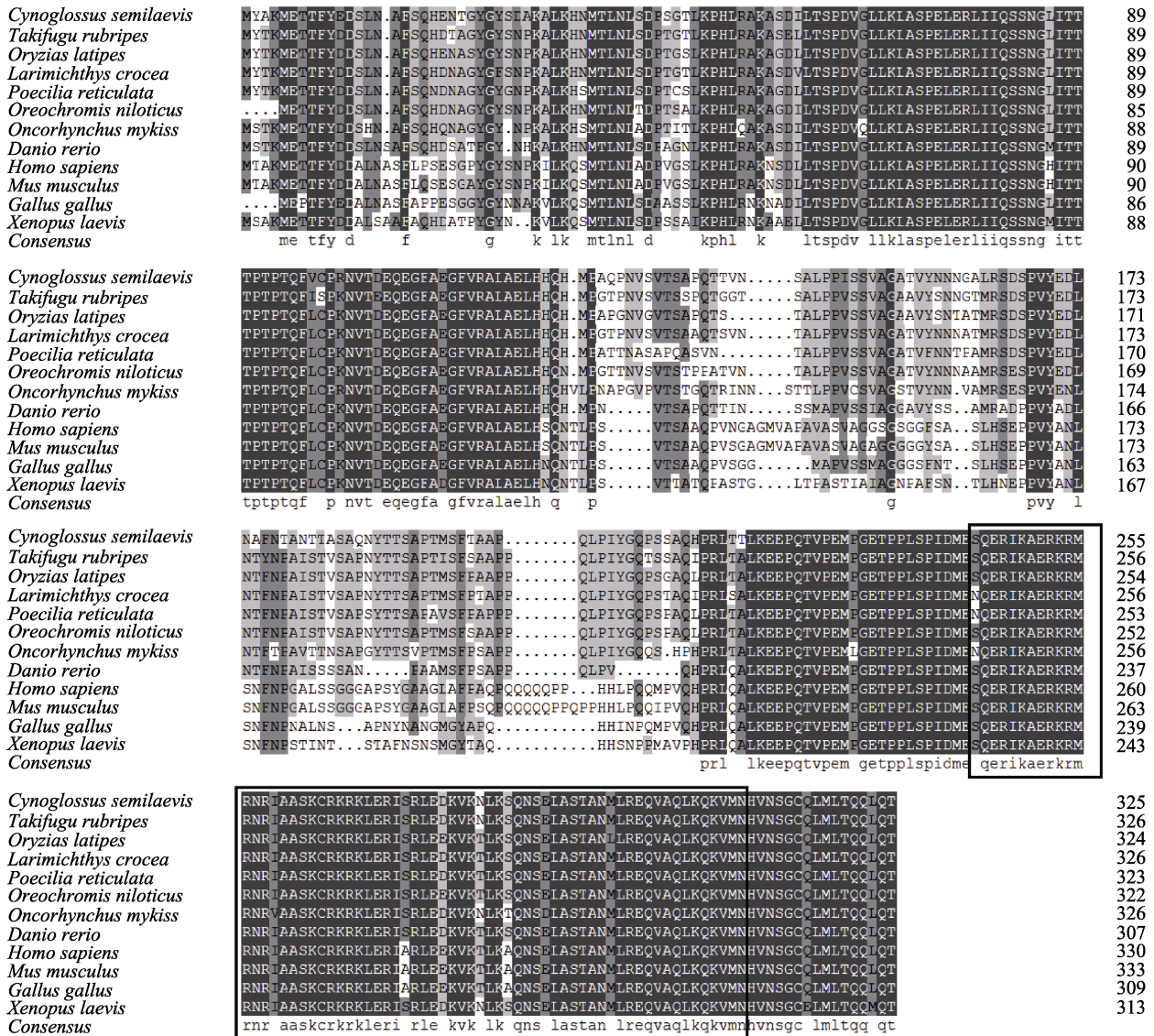


图 2 半滑舌鲷 C-JUN 蛋白质多重序列比对结果

Fig.2 The multiple sequence alignment of the C-JUN protein

用黑色线框标注的是亮氨酸拉链结构域(BRLZ)

Leucine zipper structure domain (BRLZ) is marked by a black box

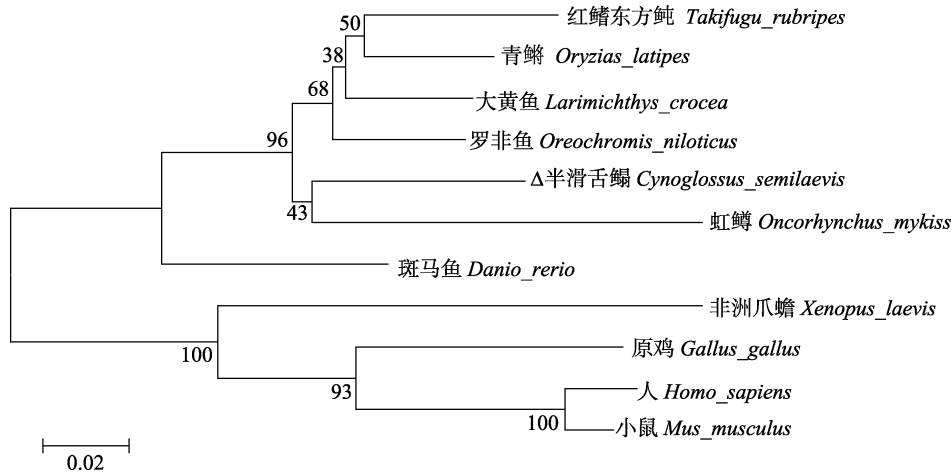


图 3 半滑舌鲷 *c-Jun* 与其他物种 *c-Jun* 系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *C. semilaevis* *c-Jun* sequence with other *c-Jun* sequences in fish, amphibians, birds and mammals

2.3 *c-Jun* 基因在健康鱼中的实时荧光定量分析

c-Jun 基因在健康半滑舌鲷 13 种组织: 肝脏、小肠、脾脏、头肾、后肾、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉、胃、心脏、卵巢中均有不同程度的表达(图 4)。其中, 卵巢中的表达量最高, 后肾中的表达最低, 卵巢中的

表达量是后肾中的 14.43 倍; 其次在皮肤中的表达较高, 另外在脑、鳃、肝、脾、小肠组织中也都有较高的表达。

2.4 鳃弧菌感染半滑舌鲷后 *c-Jun* 基因在不同组织、不同时间点的表达分析

鳃弧菌感染半滑舌鲷后, *c-Jun* 基因在主要免疫组织的表达如图 5 所示。*c-Jun* 的表达量在 6 种组织(肝脏、脾脏、鳃、血液、头肾、小肠)均呈现上升趋势, 达到峰值后开始降低到正常量。鳃和血液中变化趋势最为明显, 设定 0 h 表达量为标准, 表达量为 1, 在鳃中 12 h 的表达量达到 0 h 的 13.20 倍($P < 0.01$), 之后在 24 h 迅速下降到 0 h 的 2.10 倍($P < 0.05$), 开始回归正常水平; 血液中的表达变化趋势与鳃中相似, 也在 12 h 达到最高峰, 是 0 h 表达水平的 5.79 倍($P < 0.01$), 之后也开始下降; 其他免疫相关的组织中也呈现不同程度的上升趋势, 其中, 肝脏中表达峰值为 0 h 的 4.32 倍($P < 0.01$), 小肠组织中的变化是在 6 h 时上升到最高, 为 0 h 的 4.75 倍($P < 0.01$); *c-Jun* 基因在脾和头肾表达峰值均出现在 24 h, 头肾中 24 h 表达量是 0 h 的 4.62 倍($P < 0.01$); 脾脏中 24 h 时的表达量为 0 h 的 3.41 倍($P < 0.01$)。

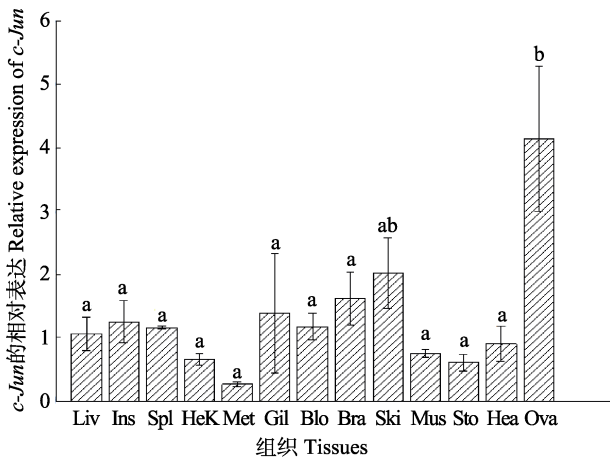


图 4 半滑舌鲷 *c-Jun* 基因在不同组织中的表达分布

Fig.4 *c-Jun* gene of *C. semilaevis* expression profile in different tissues

Liv: 肝脏; Ins: 小肠; Spl: 脾脏; HeK: 头肾; Met: 后肾; Gil: 鳃; Blo: 血液; Bra: 脑; Ski: 皮肤; Mus: 肌肉; Sto: 胃; Hea: 心脏; Ova: 卵巢。图中“a, b”为 SPSS 软件中 Duncan 算法计算出的子集分组, 有相同字母表示差异不显著($P > 0.05$), 无相同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Liv: Liver; Ins: Intestine; Spl: Spleen; HeK: Head-kidney; Met: Metanephros; Gil: Gill; Blo: Blood; Bra: Brain; Ski: Skin; Mus: Muscle; Sto: Stomach; Hea: Heart; Ova: Ovary. The letters “a, b” were subsets by Duncan algorithm. The same letters indicated no significant difference ($P > 0.05$), the different letters indicated significant difference ($P < 0.05$)

2.5 *c-Jun* 在外周血淋巴细胞中的表达分析

c-Jun 基因在不同病原模拟物处理后的外周血淋巴细胞中表现出不同的表达趋势(图 6)。其中, LPS 处理后的细胞中 *c-Jun* 表达量呈现下降趋势, 2 h 后表达量即下降到了 0 h 时的 33.26%, 并一直保持在低的表达状态; PGN 处理组没有明显的变化; PolyI:C 处理后表达量也下降; WGP 组处理之后, *c-Jun* 基因

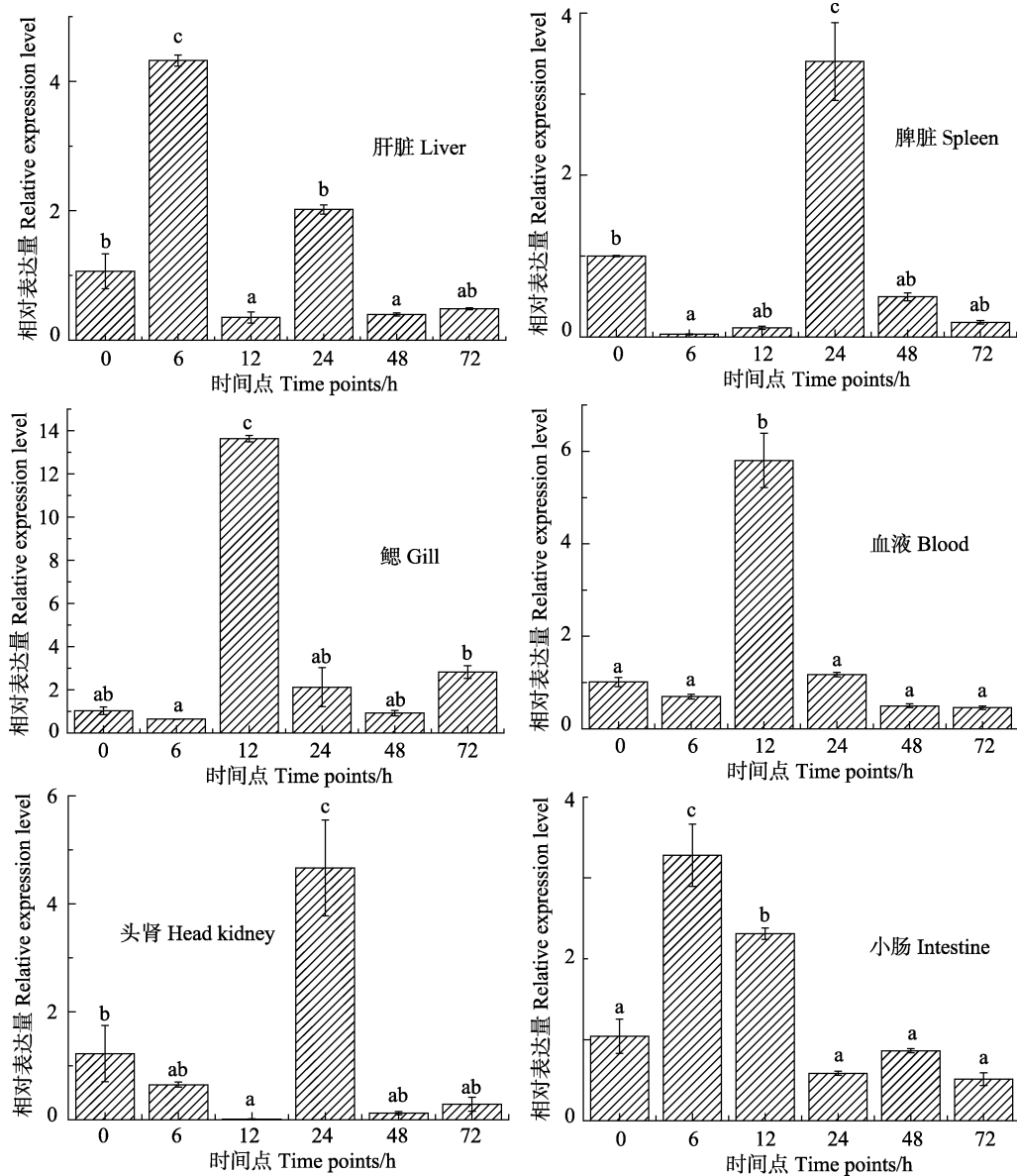


图 5 鳃弧菌感染后半滑舌鲷 *c-Jun* 在免疫组织中表达变化

Fig. 5 The expression of *C. semilaevis c-Jun* gene in immunologic tissues after *V. anguillarum* infection

图中“a, b, c”为 SPSS 软件中 Duncan 算法计算出的子集分组，下同
The letters “a, b, c” were subsets by Duncan algorithm, the same as below

表达量有所升高，在 6 h 相对表达量达到峰值，为 0 h 时的 2.49 倍，之后在 12 h、24 h 时呈现下降趋势。

3 讨论

本研究结果显示，半滑舌鲷 C-JUN 蛋白中具有典型的亮氨酸拉链结构域，而且通过蛋白质多重序列比对得知，不同物种之间 C-JUN 的亮氨酸拉链结构域具有高度的保守性，由此可以推测，半滑舌鲷的 C-JUN 可能通过亮氨酸拉链结构域结合特异目标蛋白，从而在不同的信号通路中发挥信号传递、调控的

功能(Angel *et al.*, 1988)。

c-Jun 基因在健康半滑舌鲷不同的组织中呈现组成型表达，谭俊等(2012)¹⁾在文昌鱼(*Branchiostoma japonicum*)的研究已经证明了 *AP-1* 家族基因与卵巢发育、机体免疫密切相关；本研究中，半滑舌鲷 *c-Jun* 基因在卵巢中表达量最高，由此可以推测，半滑舌鲷 *c-Jun* 基因在卵巢发育或母源免疫中或许发挥重要的作用。

经鳃弧菌感染后 *c-Jun* 基因在半滑舌鲷各免疫组织都呈现出不同程度的上调趋势，推测 *c-Jun* 转录因子参与了革兰氏阴性菌引起的机体免疫信号传导。结

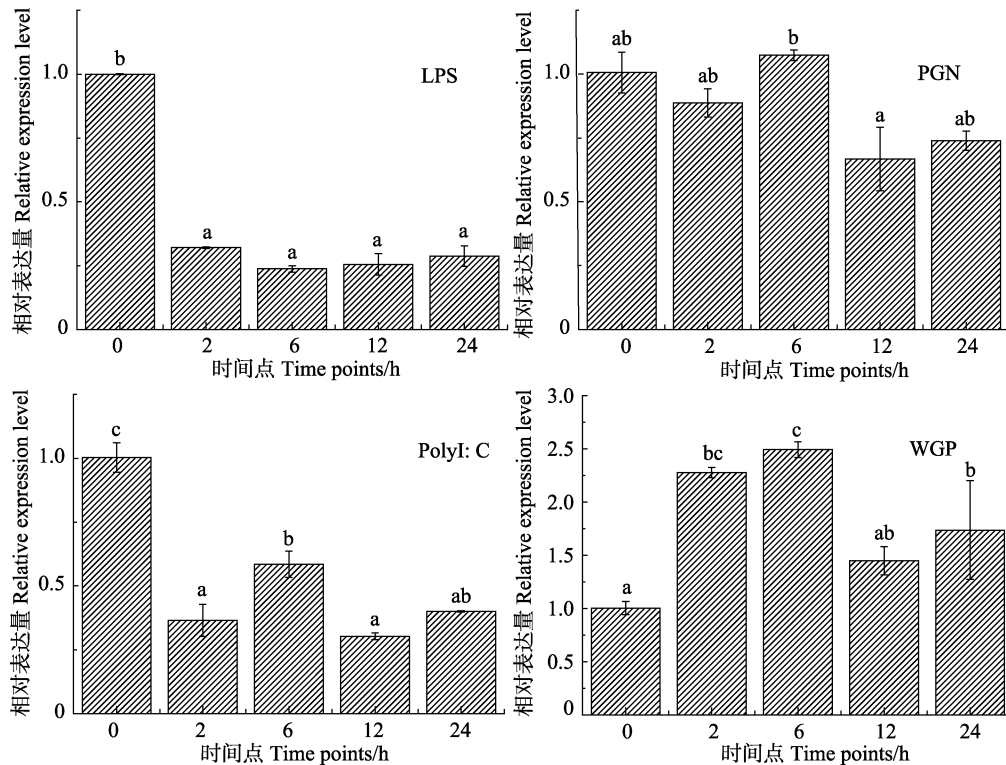


图 6 病原模拟物处理后半滑舌鳎 *c-Jun* 基因在外周血淋巴细胞中的表达分布
Fig.6 The expression of *C. semilaevis c-Jun* gene in lymphocyte after stimulation with LPS, PGN, Poly I: C and WGP respectively

合之前学者对 *AP-1* 家族基因参与免疫反应机制的研究(Ameyar *et al*, 2003; 吴冰等, 2014), 推测在半滑舌鳎 B 细胞受体激活的通路中, 机体经过外源细菌刺激后, 会迅速发生信号传递作用于通路下游因子, 而受通路信号刺激之后, *c-Jun* 基因与 *c-Fos* 基因会迅速而短暂地被诱导表达(Tischmeyer *et al*, 1999), 由于二者都具有亮氨酸拉链结构, 因此可以在 *Atf* 基因的嵌合作用下形成二聚体, 然后再与 DNA 序列特异性的结合(Uimari *et al*, 1997)作用在 B 细胞膜受体上激活 B 细胞通路, 从而使 B 细胞尽快参与到体液免疫, 发挥免疫应答作用。

LPS、PolyI:C、WGP 分别是革兰氏阴性菌、病毒、真菌真菌模拟物, 经不同病原模拟物处理后, 在淋巴细胞的表达只有 WGP 组出现明显上调趋势, LPS、PolyI:C 组经处理后呈现不同程度的下调趋势, 而 PGN 组没有明显的变化。由此可以推测, *c-Jun* 在介导信号通路的过程中, 对病原的识别具有广谱性, 但由于体外单独的培养环境很难达到体内的状态, 使其缺乏了一些激活该通路的介导因子, 因此, 不会产

生像体内一样在短的时间内出现显著变化, 但该实验同时也可以从细胞层面上确定 *c-Jun* 基因在免疫过程中发挥着积极作用。

综上, 本研究报告了半滑舌鳎 *c-Jun* 基因的克隆和鉴定, 分别从个体及细胞两个水平对半滑舌鳎的 *c-Jun* 基因的表达分析进行了研究, 研究结果显示, 该基因参加了半滑舌鳎的免疫应答, 为今后更深入研究半滑舌鳎的免疫应答机理提供了详实的数据, 奠定了理论基础。

参 考 文 献

- Alladi PA, Roy T, Singh N, *et al*. Developmentally regulated expression of c-Fos and c-Jun in the brainstem auditory nuclei of *Gallus domesticus* is modified by prenatal auditory enrichment. *Journal of Neurobiology*, 2005, 62(1): 92–105
- Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman J. A role for AP-1 in apoptosis: The case for and against. *Biochimie*, 2003, 85(8): 747–752
- Angel P, Allegretto EA, Okino ST, *et al*. Oncogene *jun* encodes a sequence-specific *trans*-activator similar to AP-1. *Nature*, 1988, 332(6160): 166–171

1) Tan J. Molecular cloning and expression of transcription factor *AP-1* in amphioxus *Branchiostoma japonicum*. Master's Thesis of 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. 上海海洋大学硕士学位论文, 2012]

- Blau L, Knirsh R, Bendror I, *et al.* Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(42): 2875–2884
- Bohmann D, Bos TJ, Admon A, *et al.* Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 1987, 238(4832): 1386–1392
- Eferl R, Wagner EF. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(11): 859–868
- Fujikawa Y, Kozono K, Esaka M, *et al.* Molecular cloning and effect of *c-fos* mRNA on pharmacological stimuli in the goldfish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(2): 253–259
- Karin M, Shaulian E. AP-1: Linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life*, 2001, 52(1–2): 17–24
- Li YY, Ma JG, Li XY. Cloning and sequence analysis of immediately early genes (*c-fos* & *c-jun*) in *Hypophthal-michthys molitrix*. *Journal of Hydroecology*, 2013, 34(6): 63–69 [李园园, 马军国, 李效宇. 鲢即刻早期基因 *c-fos* 和 *c-jun* 的克隆及其序列分析. *水生态学杂志*, 2013, 34(6): 63–69]
- Matsuoka I, Fuyuki K, Shoji T, *et al.* Identification of *c-fos* related genes and their induction by neural activation in rainbow trout brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1998, 1395(2): 220–227
- Novoszel P. The role of the AP-1 proteins c-Jun and JunB in the development and function of plasmacytoid dendritic cells. *Uniwien*, 2013
- Santos FR, Diamond-Stanic MK, Prasannarong M, *et al.* Contribution of the serine kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) to oxidant-induced insulin resistance in isolated rat skeletal muscle. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2012, 118(5): 231–236
- Sha ZX, Wang QL, Liu Y, *et al.* Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 914–921
- Shaulian E. AP-1—the Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise. *Cellular Signalling*, 2010, 22(6): 894–899
- Tischmeyer W, Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1999, 55(4): 564–574
- Uimari A, Strommer J. Myb26: A MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant Journal*, 1997, 12(6): 1273–1284
- Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, *et al.* Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2009, 682(1): 7–12
- Wei S, Huang Y, Huang X, *et al.* Characterization of c-Jun from orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 230–240
- Wu B, Liu YC, Zhang YC, *et al.* Cloning and expression profile analysis of *AP-1* gene from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 9–14 [吴冰, 刘逸尘, 张亦陈, 等. 凡纳滨对虾 *AP-1* 基因的克隆和表达特征分析. *水产学报*, 2014, 38(9): 9–14]
- Zhang X, Wang S, Chen S, *et al.* Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in immunity in *Cynoglossus semilaevis* during *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 209–218

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression of the *c-Jun* Gene in Immune Response to Pathogen Challenge in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

YU Mengjun^{1,2}, SUN Luming^{1,2}, CHEN Yadong^{2,3}, CHEN Xuejie², YANG Guang²,
LIU Yang¹, QIU Xuemei¹, SHA Zhenxia^{2,3}①

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

3. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071)

Abstract The transcription factor *c-Jun* (jun proto-oncogene) of AP-1 family and its role in immune response is unknown in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) so far. Based on *c-Jun* genetic partial cDNA sequence of half-smooth tongue sole, the complete cDNA sequence is obtained by RACE and PCR application. The cDNA of *c-Jun* is 2093 bp in length, including a 377 bp 5'-terminal untranslated region (UTR), a 735 bp 3'-terminal UTR and a 981 bp open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 326 amino acids. The deduced amino acid sequence of *c-Jun* possesses a Jun domain which is a typical structure domain in AP-1 family and a high conservative leucine zipper structure domain (BRLZ). The protein sequence alignment and phylogenetic tree analysis suggested that the half-smooth tongue sole *c-Jun* gene is closely related to that of the rainbow trout's (*Oncorhynchus mykiss*). Tissue expression analysis by quantitative real-time reverse transcription PCR showed that the *c-Jun* mRNA was constitutively expressed in all examined tissues with the predominant expression in the ovary. After infection with *Vibrio anguillarum*, the half-smooth tongue sole *c-Jun* transcript levels exhibited distinct time-dependent response patterns in the liver, spleen, head kidney, intestine, gill and blood. Among the tested tissues, changes in gill is the most obvious, and it reached the peak level 13.20-fold at 12 h post-infection. After challenge with different pathogenic (LPS, PGN, PolyI:C, WGP) in lymphocyte, the *c-Jun* gene in the WGP group showed up-regulation, while in the LPS group and PolyI:C group it showed down-regulation, while, there was no significant change in the PGN group. The results suggested that the *c-Jun* gene plays a vital role in the immune response in half-smooth tongue sole and might play an important role in half-smooth tongue sole host defense against the bacteria infection.

Key words Half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*; Transcription factor *c-Jun* gene cloning; Expression analysis; Pathogen challenge; Immune response

① Corresponding author: SHA Zhenxia, E-mail: shazx@ysfri.ac.cn