

文章编号: 1000-0615(2019)04-0763-08

DOI: 10.11964/jfc.20180811386

凡纳滨对虾含溴结构域蛋白基因cDNA序列的 克隆和表达特征

邹柅峰¹, 李丹蕾¹, 张亦陈¹, 刘逸尘^{1*}, 耿绪云², 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: 含溴结构域蛋白(bromodomain/BRD-containing protein, BCP)是一种高度保守的蛋白, 属于含溴结构域和额外终端域(bromodomain and extraterminal, BET)蛋白超家族成员。该蛋白在有丝分裂过程中通过募集不同的染色体修饰蛋白, 达到了广泛调控基因复制及转录的作用, 其表达水平的变化常与肿瘤及炎症的发生相关联。本研究根据实验室前期转录组结果提示信息, 首次获得了凡纳滨对虾2 229 bp的BCP基因cDNA序列(*Lv-BRD*, GenBank注册号: MH638256), 利用在线软件进行了生物信息学分析, 利用实时荧光定量PCR(qPCR)技术分析了该基因的组织表达特征和其在对虾白斑综合征病毒(WSSV)、苏云金芽孢杆菌以及副溶血性弧菌感染过程中的表达变化特征。结果显示,*Lv-BRD*编码的蛋白质有一个保守的可以参与细胞周期调控过程的溴结构域(bromodomain, BRD); 组织表达分析表明该基因主要在凡纳滨对虾血细胞、肝胰腺和鳃组织中表达; 在WSSV和病原菌感染后早期(0.5~12 hours past infection, hpi), *Lv-BRD*的表达可以被显著诱导, 在血细胞中呈明显上调的表达趋势, 表明该基因在一定程度上参与了对虾体内由病原引发的天然免疫应答反应。上述研究结果为进一步研究*Lv-BRD*基因在对虾抗病毒免疫及干扰素调控过程中的功能和作用机制奠定了基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 含溴结构域蛋白; 基因表达; 病原感染; 天然免疫应答

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又名南美白对虾, 因其具有肉质鲜美、产率高、生长速率快, 且广温广盐的特性, 是世界范围内重要的对虾养殖品种, 但近年来对虾病害大规模暴发给其养殖业造成了严重的经济损失。因此深入研究对虾免疫防御机制和重要免疫应答因子的作用, 并探讨将其应用于对虾的养殖实践显得尤为重要。含溴结构域蛋白(bromodomain/BRD-containing protein, BCP)是一种保守蛋白, 属于含溴结构域和额外终端域(bromodomain and extraterminal domain, BET)蛋白超家族成员。溴结

构域bromodomain/BRD是BCP分子的标志性结构域, 也是目前公认的可以与乙酰化赖氨酸结合的结构域, 其结构具有高度的保守性^[1]。作为BET家族重要成员的BCP蛋白, 在有丝分裂过程中通过募集不同的染色体修饰蛋白, 发挥着广泛调控基因复制及转录的作用。含BRD结构域蛋白在哺乳动物中的研究已经较为深入, 相关报道表明其在肿瘤研究中发挥重要作用^[2-5]; 且其表达水平的变化常常与肿瘤及炎症的发生相关联。因此, 是人类的脑胶质瘤、鼻咽癌肿瘤以及甲状腺癌的重要研究对象^[6-8]。BCP可以与人

收稿日期: 2018-08-01 修回日期: 2018-10-22

资助项目: 国家自然科学基金(31472299); 天津市自然科学基金(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

通信作者: 刘逸尘, E-mail: skylyc@tjnu.edu.cn

干扰素调控因子2互作,在控制细胞周期方面也有一定的作用^[9]。BCP参与小鼠的细胞生长分化及凋亡过程,其在细胞凋亡初始环节发挥作用,在肥胖小鼠的肝脏中,BCP参与ERS信号调控通路^[10];在果蝇的精子形成过程中,BET家族成员可以通过调控减数分裂而发挥重要作用^[11];也有学者发现,BCP参与AMPK自噬通路中,参与果蝇的溶菌和细胞自噬过程^[12]。到目前为止,甲壳动物含BRD结构域蛋白的研究尚无报道。本实验室前期转录组研究结果发现,病原感染后的凡纳滨对虾*Lv-BRD*基因表达有显著改变,表明其可能参与对虾应答病原感染的过程。本研究在获得凡纳滨对虾*BRD*基因cDNA序列的基础上,进行了序列与结构特征分析,并对其组织分布和应答病原感染的表达模式进行了分析,以期为后续深入探讨*BRD*基因在对虾免疫调控方面的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与仪器

实验材料 凡纳滨对虾(体长12~14 cm)购于天津汉沽对虾养殖基地,实验前在水族箱循环系统中充气暂养3 d,以适应实验室内的养殖环境;宿主菌株大肠杆菌DH5 α 为本实验室保存;克隆载体pMD-19T购自TaKaRa公司。

主要试剂 总RNA提取试剂TRIzol(Invitrogen), PrimeScript Reverse Transcriptase、DL 2000 DNA Marker、SYBR premix ExTaq TM II 和 SYBR premix Perfect Real Time(TaKaRa公司),其他试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

获取健康对虾的血淋巴、鳃、心脏、胃、肝胰腺、肠道、神经、足、肌肉共9种器官或组织,参照TRIzol说明书的方法提取血细胞及各组织的总RNA,经琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪进行定性和定量检测,-80 °C保存备用。以血细胞及各组织/器官总RNA为模板,以Oligo(dT)₁₆引物[AOLP: 5'-GGCCACGCGTCTGACT-AGTAC(T)₁₆(A/C/G)-3']为反转录引物,参照PrimeScript Reverse Transcriptase说明书,合成第一链cDNA。

1.3 *Lv-BRD*的cDNA序列的扩增

根据前期转录组测序结果,设计序列特异

性引物*Lv-BRD-F* (5'-TCCTCCATCATCTCCC-A-3')和*Lv-BRD-R* (5'-GACGCTCCTTCTGT-TCC-3'),以对虾血细胞cDNA为模板、以*Lv-BRD-F*及*Lv-BRD-R*为引物,进行PCR扩增,将获得的目的基因片段进行回收、纯化,并与克隆载体pMD-19T连接,挑取检测正确的阳性克隆进行测序验证。

1.4 生物信息学分析

利用在线分析网站(<http://web.expasy.org>)对测序验证正确的*Lv-BRD*的cDNA序列进行翻译,并对该基因推导的蛋白质序列进行分子量等电点的预测、结构域分析等;通过Blast P工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对不同物种来源的含BRD结构域蛋白进行同源比对分析;采用Clustal X和MEGA 5.0软件对其进行多序列比对。

1.5 凡纳滨对虾*Lv-BRD*基因组织/器官表达分析

利用“总RNA提取和cDNA合成”中获取的健康对虾9种组织/器官的cDNA为模板,以Actin-qF (5'-GAAGTACCGCCCTGGTTG-3')和Actin-qR (5'-CGGTTAGCCTTGGGGTTGAGGGAG-3')为内参基因的扩增引物,实时定量PCR反应程序: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进行熔解曲线分析。Real-time PCR反应在Bio-Rad公司iQ2 PCR仪上进行,所用染料为SYBR Green,每个时间点的cDNA样品做2组PCR,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。所获得的数据经统计分析后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。统计学分析利用SPSS软件(版本24.0)进行Duncan和Turkey的多重比对检验, $P < 0.05$ 认为具有显著性差异, $P < 0.01$ 认为具有极显著差异。

1.6 实时荧光定量PCR分析病原刺激后*Lv-BRD*表达模式

以天津市水生动物疫病预防控制中心检疫室提供的感染WSSV的病虾为材料,参照刘凤艳等^[13]的方法提取病毒。实验用副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)由天津市水产研究所提供,苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。将副溶血性弧菌和苏云金芽孢杆菌在LB培养基中分别于28和37 °C过夜培养复苏,次日将过夜

培养的菌体继续培养至 OD_{600} 为0.6~0.8, 菌液离心后弃去培养基, 用无菌PBS重悬菌体, 保存于4 °C。

选用健康的凡纳滨对虾, 设置WSSV感染组、副溶血性弧菌感染组、苏云金芽孢杆菌感染组、TN(Tris-NaCl)对照组和PBS对照组共5个组别, 每组3个平行, 每个平行7尾虾。WSSV感染组每尾对虾注射病毒悬液10 μ L(1×10^5 个/ μ L), 其对照组每尾对虾注射用于稀释病毒的TN缓冲液10 μ L; 副溶血性弧菌和苏云金芽孢杆菌实验组每尾对虾注射菌体悬液10 μ L(1×10^4 CFU/ μ L); 其对照组每尾对虾注射灭菌PBS缓冲液10 μ L。利用注射WSSV和病原菌后0、0.5、5、12、24和48 hpi(hours past infection)的凡纳滨对虾血细胞cDNA作为Real-time PCR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 (5'-GGTCACGTGTTGTCTTGGCTTATGAACC-3')和TPI-qR (5'-CTGAACAAAGTCTGGCTTGAGAGCTGC-3'), *Lv-BRD*特异性引物为*Lv-BRD*-qF (5'-GAA-GGAGAAGCCTGTGAGTT-3')和*Lv-BRD*-qR (5'-TCTTGGTGC GGGAATG-3'), 实时荧光定量PCR反应程序: 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进行熔解曲线分析。qPCR反应在Bio-Rad公司iQ2 PCR仪上进行, 所用染料为SYBR Green, 每个时间点的cDNA样品平行进行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。所获得的数据经统计分析后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。为了验证病毒感染的有效性, 于注射TN缓冲液和病毒悬液后的第3天, 从对照组与实验组分别随机选取3尾对虾进行病毒检测, 结果显示对照组WSSV的检测为阴性, 而实验组WSSV的检测为强阳性。

2 结果

2.1 序列及生物信息学分析

本研究获得了凡纳滨对虾含溴结构域蛋白cDNA(*Lv-BRD*)序列共2 229 bp, 经序列比对发现, 获得的*Lv-BRD*序列与已有转录组测序结果一致。利用在线分析软件SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析, 显示该基因编码的蛋白序列

中含有一个典型的溴结构域, 推断它可以与乙酰化赖氨酸结合, 并可能在参与转录激活的多组分复合物的组装或激活过程中发挥作用。果蝇中的DM8结构域也存在于*Lv-BRD*的蛋白序列中, 但该结构域的功能尚未见报道。

基于Blast P (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的比对结果, 将*Lv-BRD*推导的氨基酸序列与其他物种的含BRD结构域蛋白序列进行多序列比对。结果显示, *Lv-BRD*与昆虫的BCP蛋白相似度较高, 与人体虱(*Pediculus humanus corporis*)BCP的相似度达54%, 与集蜂(*Dufourea novaeangliae*)BCP的相似度达到53%, 与人(*Homo sapiens*)的BCP的相似度为44%, 它们都具有标志性的溴结构域, 但不同物种之间的氨基酸序列具有显著的差异性(图1)。

2.2 组织/器官表达分析

利用qPCR的方法分析了*Lv-BRD*在不同组织中的表达特征(图2), 结果显示该基因在血细胞、肝胰腺和鳃中高表达, 在足、心、肠道和神经中也有一定量的表达, 在肌肉组织中表达量较低。

2.3 *Lv-BRD*基因应答WSSV感染的表达变化分析

利用qPCR方法分析了凡纳滨对虾血细胞中*Lv-BRD*基因在感染WSSV后不同时间的表达变化(图3)。结果显示, WSSV感染后早期(0.5 hpi), *Lv-BRD*基因极显著上调表达($P < 0.01$); 在感染后5 h(5 hpi), 目的基因表达量达到峰值, 且与对照组有极显著差异($P < 0.01$); 随着感染时间的延长, 基因表达量迅速下降, 到感染后48 h(48 hpi), *Lv-BRD*基因的相对表达量降至与对照组齐平, 且无显著差异($P > 0.05$)。

2.4 *Lv-BRD*基因应答细菌感染的表达变化分析

利用qPCR方法分析了感染苏云金芽孢杆菌和副溶血性弧菌后不同时间, 凡纳滨对虾血细胞中*Lv-BRD*基因表达量的变化(图4)。苏云金芽孢杆菌感染组中, 在感染的早期(0.5 hpi), 该病原可导致目的基因的应激性上调表达($P < 0.01$); 随后表达量在5 hpi达到最高值($P < 0.01$); 在副溶血性弧菌刺激组, 实验组中目的基因的表达量约为对照组的4倍(5 hpi); 随着感染时间的延长, 苏云金芽孢杆菌刺激组中*Lv-BRD*基因迅速下降,

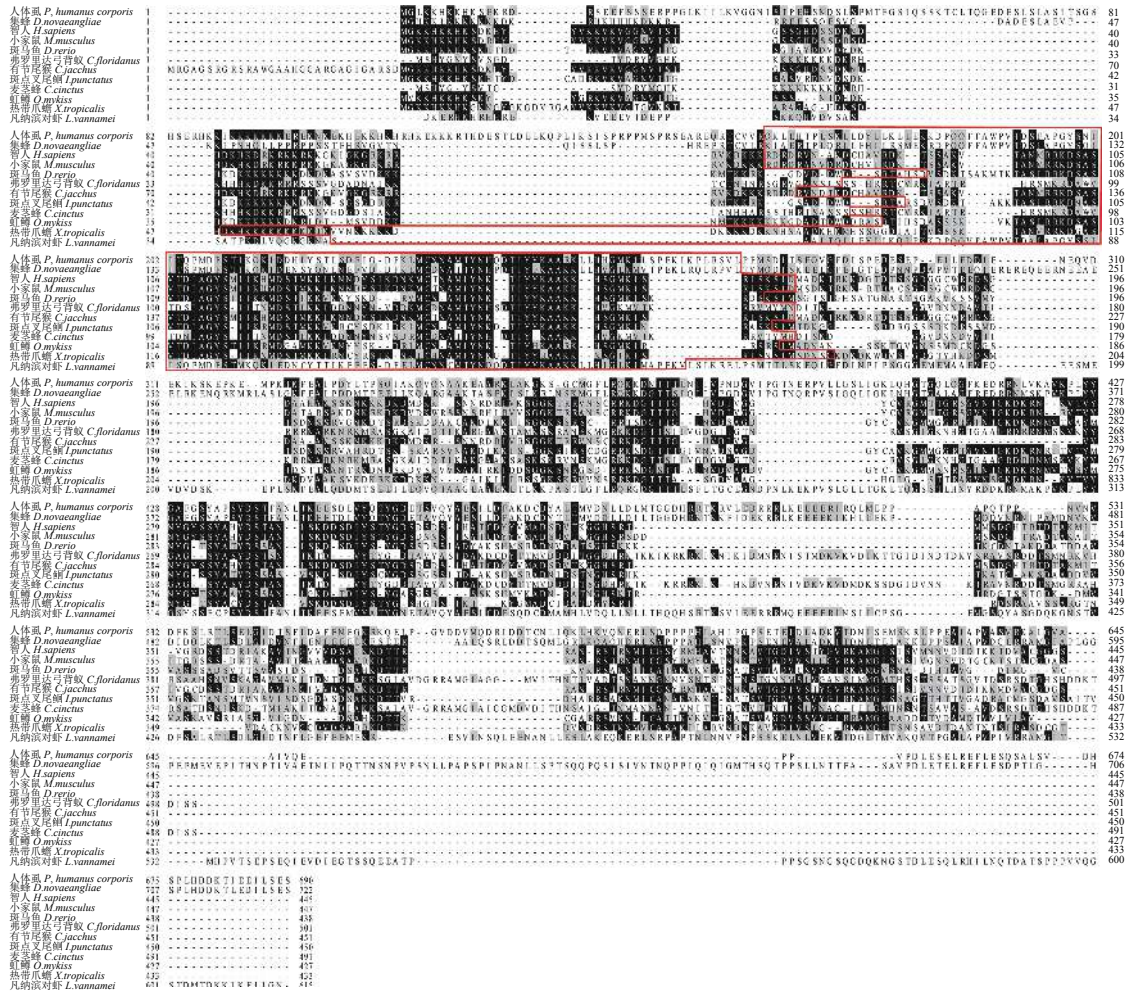


图1 凡纳滨对虾含溴结构域蛋白与其他物种该蛋白的比对分析

红色方框内为溴结构域。GenBank注册号：人体虱(XP_002427310.1)，集蜂(XM_015584428.1)，智人(NP_037395.2)，小鼠(NP_036177.1)，斑马鱼(NP_998531.2)，佛罗里达弓背蚁(XP_011260222.1)，有节尾猴(XP_008984098.1)，斑点叉尾鲟(XP_017313969.1)，麦茎蜂(XP_015585020.1)，虹鳟(XP_021442237.1)，热带爪蟾(NP_001008008.1)

Fig. 1 The predicted protein of bromine domain of *L. vannamei* compared with other bromine domains in different species

The bromine domains are shown in red boxes. *Pediculus humanus corporis* (XP_002427310.1), *Dufourea novaeangliae* (XM_015584428.1), *Homo sapiens* (NP_037395.2), *Mus musculus* (NP_036177.1), *Danio rerio* (NP_998531.2), *Camponotus floridanus* (XP_011260222.1), *Callithrix jacchus* (XP_008984098.1), *Ictalurus punctatus* (XP_017313969.1), *Cephus cinctus* (XP_015585020.1), *Oncorhynchus mykiss* (XP_021442237.1), *Xenopus tropicalis* (NP_001008008.1)

在24 hpi时实验组目的基因表达量已恢复至对照组水平；副溶血性弧菌刺激组中Lv-BRD基因表达量则呈现缓慢下调趋势，至实验最后取样点(48 hpi)时，目的基因表达量与对照组相比仍具有显著差异(P<0.05)。

3 讨论

机体免疫系统分为天然免疫(innate immunity)和获得性免疫(acquired immunity)两大类[14-16]。脊椎动物具备获得性免疫，然而作为无脊椎动物

的甲壳动物不具备特定的获得性免疫系统，所以在感染病原后可引起多种体液和细胞反应，以达到快速控制病原体的目的，其天然免疫应答体系在抗病原刺激过程中发挥了巨大的作用[17-19]。近年来，学者们就对虾免疫应答及调控机制做出多种探索，如环境胁迫因素对对虾抗病毒免疫的影响[20-22]、病原的侵染特征及与宿主的互作分析[23-25]、对虾的多种免疫调控途径或效应物研究[26-28]等。这些研究从不同角度探讨了对虾免疫调控机制，丰富了甲壳动物的天然免疫学研究

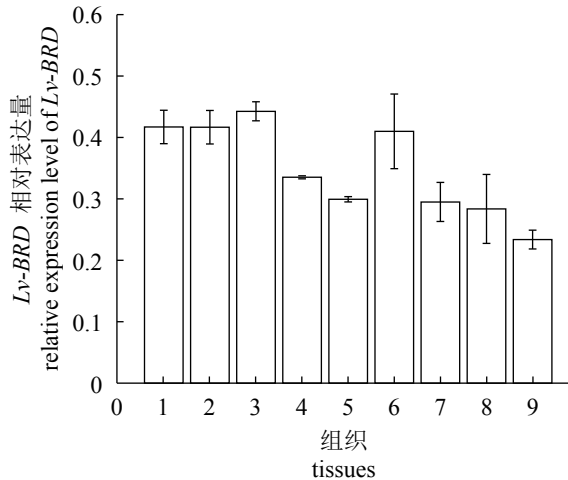


图2 *Lv-BRD*的组织/器官表达分析

1. 血细胞; 2. 肝胰腺; 3. 鳃; 4. 步足; 5. 胃; 6. 心; 7. 神经; 8. 肠道; 9. 肌肉

Fig. 2 Tissues/organs expression of *Lv-BRD* in *L. vannamei*

1. hemocytes; 2. hepatopancreas; 3. gill; 4. paraeipod; 5. stomach; 6. heart; 7. nerve; 8. intestine; 9. muscle

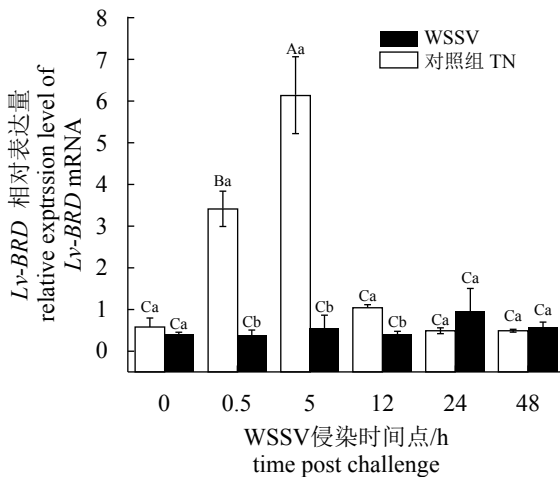


图3 WSSV侵染后不同时间对虾血细胞中*Lv-BRD*的表达变化模式

组间差异用不同大写字母表示, 组内差异用不同小写字母表示, 下同

Fig. 3 Expression profile of *Lv-BRD* after WSSV challenge in hemocytes of *L. vannamei*

The differences between groups were showed in capital letters, while the differences within groups were showed in lowercase letters, the same below

内容。本研究基于实验室前期转录组数据的提示, 选取了具有明显抗病原特性的调控因子*Lv-BRD*基因进行克隆及应答病原刺激的分析, 以期对对虾天然免疫研究和病害防治提供新思路。

本研究获得了凡纳滨对虾含溴结构域蛋白的cDNA序列(*Lv-BRD*), 并对其进行了生物信息学分析。*Lv-BRD*分子中溴结构域由104个氨基酸组成, 它可能作为一种细胞内的信号调节因子发挥功能, 生物信息学分析显示该蛋白可能具有溴结构域蛋白特有的与乙酰化赖氨酸结合的功能。蛋白质预测结果分析提示其具有潜在的NLS区, 因此推断该蛋白可能参与入核调控过程, 虽然不同物种间存在着一定的差异性, 但NLS区的氨基酸序列具有一定的保守性。此外, 还发现了在果蝇中特有的BM8结构域也存在于该序列中, 推断该蛋白所发挥的功能与昆虫等节肢动物可能有类似之处。

利用荧光定量PCR分析了该基因在对虾的血淋巴、鳃、心脏、胃、肝胰腺、肠道、神经、足、肌肉共9种组织/器官中的相对表达量。结果显示, *BRD*基因在血细胞中的表达量最高, 在肝胰腺和鳃中表达量次之, 在其他组织中也有一定的表达。众所周知, 血细胞是机体免疫调控的重要阵地, 在高等脊椎动物中, 血细胞来源于骨髓的造血多能干细胞, 具有免疫活性, 是机体特异性免疫的关键一环。在对虾中, 血细胞同样在免疫应答过程中发挥着重要作用, 它们不能进行有丝分裂, 其更新补充是由造血组织来完成的, 血细胞随着血淋巴循环分布到对虾机体各处, 发挥着吞噬、结节、包裹、产生多种效应物等细胞和体液免疫防御功能。肝胰腺作为对虾重要的免疫器官, 具有造血功能, 由于肝胰腺中含有多种抗逆酶类和离子转移酶等, 因此也具有解毒能力, 它在对虾抵御病毒和细菌侵染过程中起到了至关重要的作用。*Lv-BRD*基因在血细胞和肝胰腺中的高表达, 也间接表明该基因具有与免疫调控相关的功能。

WSSV一直是感染率和致死率最高的对虾易感病毒, 而近年来, 由对虾感染苏云金芽孢杆菌和副溶血性弧菌引发的肝胰腺坏死症也频频发生^[29], 因此, 本研究选取了WSSV、副溶血性弧菌和苏云金芽孢杆菌对凡纳滨对虾进行人工感染实验, 分析*Lv-BRD*是否参与机体应答病原侵染的过程。研究表明, WSSV可以在极早期诱导*Lv-BRD*显著上调表达, 表明目的基因在WSSV入侵的早期就参与了机体应答病毒侵染的免疫反应, 随着感染时间的延长, *Lv-BRD*则进一步通过上调表达实现对靶基因的调控, 从而促进机体防御病毒。从结果中可以看出, 在病毒感

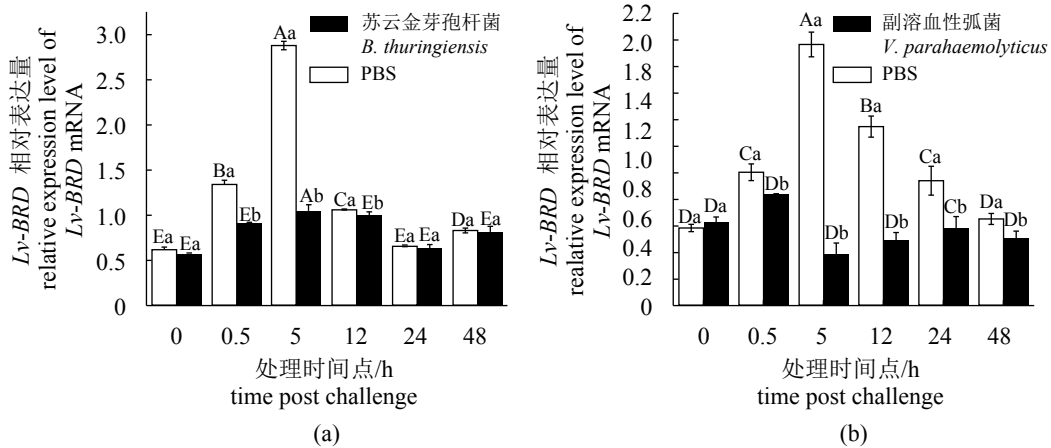


图4 苏云金芽孢杆菌(a)和副溶血性弧菌(b)侵染后不同时间凡纳滨对虾血细胞中*Lv-BRD*的表达变化模式

Fig. 4 Expression profile of *Lv-BRD* after *B. thuringiensis* (a) and *V. parahaemolyticus* (b) challenge in hemocytes of *L. vannamei*

染的中后期, *Lv-BRD*参与机体应答反应的程度明显下降, 它可能主要在感染早期病毒入侵的过程中发挥功能。苏云金芽孢杆菌侵染对虾早期可以诱导*Lv-BRD*表达量的显著上调, 其表达量变化趋势与WSSV侵染过程类似, 表明该基因在苏云金芽孢杆菌侵染早期就参与到了应答病原的免疫调控过程中, 在病原侵染中期表达量持续上调, 随着感染时间延长, 其表达量恢复至正常水平。可以看出, *Lv-BRD*应对苏云金芽孢杆菌的侵染主要在早期、中期参与免疫过程。然而, 副溶血性弧菌侵染过程有所不同, 病原侵染对虾早期可诱导*Lv-BRD*的上调表达, 且该基因随着侵染时间延长, 其表达量上调更为显著。表明该基因在副溶血性弧菌侵染早期就参与到免疫过程中, 随侵染时间延长, *Lv-BRD*基因表达量有所下降, 但直至刺激后48 h, 其表达量较对照组仍有显著性差异, 表明*Lv-BRD*在副溶血性弧菌刺激的免疫应答反应中、晚期也发挥了较大作用。不同病原刺激对*Lv-BRD*基因表达的影响效应及其应答模式有所不同, 病毒刺激后*Lv-BRD*表达量变化较细菌刺激更为显著。

截至目前, BRD相关报道主要集中在人的癌症研究领域, 研究者通过酵母双杂交的方法获得了能够与BRD互作的几种典型蛋白质^[30-32], 如IL-7、 β -I κ B、KIAA1375蛋白以及IRF2等, BRD与IRF的互作提示它可能参与了干扰素调控途径。本研究系统分析了*Lv-BRD*的cDNA序列特点、组织/器官表达特征以及病原侵染后该基因的表达变化模式, 研究结果为后续深入探讨BRD蛋白在

调控对虾干扰素途径以及参与抗病毒免疫应答过程中的作用机制提供了参考。

参考文献:

- [1] Huang D P, Lo K W, Choi P H K, *et al.* Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1991, 54(1): 91-99.
- [2] Park S W, Herrema H, Salazar M, *et al.* BRD7 regulates XBP1s' activity and glucose homeostasis through its interaction with the regulatory subunits of PI3K[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 20(1): 73-84.
- [3] Zhou M, Xu X J, Zhou H D, *et al.* BRD2 is one of BRD7-interacting proteins and its over-expression could initiate apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2006, 292(1-2): 205-212.
- [4] Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, *et al.* Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells[J]. *Diabetes*, 2001, 50(6): 1472-1481.
- [5] Tang Y J, Gholamin S, Schubert S, *et al.* Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(7): 732-740.
- [6] Lovén J, Hoke H A, Lin C Y, Lau A, *et al.* Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers[J]. *Cell*, 2013, 153(2): 320-334.
- [7] Jian S, Wang Y F, Zeng L, *et al.* Disrupting the inter-

- ction of BRD4 with diacetylated twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(2): 210-225.
- [8] Zhou J, Ma J, Zhang B C, *et al.* BRD7, a novel bromodomain gene, inhibits G1-S progression by transcriptionally regulating some important molecules involved in ras/MEK/ERK and Rb/E2F pathways[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2004, 200(1): 89-98.
- [9] Staal A, Enserink J M, Stein J L, *et al.* Molecular characterization of celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription factor interferon regulatory factor 2[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 185(2): 269-279.
- [10] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(3): 184-190.
- [11] Kimura S, Loppin B. Two bromodomain proteins functionally interact to recapitulate an essential BRDT-like function in *Drosophila* spermatocytes[J]. *Open Biology*, 2015, 5(2): 140145.
- [12] Sakamaki J I, Wilkinson S, Hahn M, *et al.* Bromodomain protein BRD4 is a transcriptional repressor of autophagy and lysosomal function[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(4): 517-532.e9.
- [13] 刘凤艳, 刘逸尘, 张亦陈, 等. 凡纳滨对虾细胞因子信号转导负调控因子基因(*Lv-SOCS*)的克隆及特征分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(10): 1687-1695.
Liu F Y, Liu Y C, Zhang Y C, *et al.* Molecular cloning and characteristics of suppressors of cytokine signaling gene (*Lv-SOCS*) from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(10): 1687-1695(in Chinese).
- [14] Ward A E, Rosenthal B M. Evolutionary responses of innate immunity to adaptive immunity[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 21: 492-496.
- [15] Lal N K, Nagalakshmi U, Hurlburt N K, *et al.* The receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(4): 485-497.e5.
- [16] O'Dwyer D N, Gurczynski S J, Moore B B. Pulmonary immunity and extracellular matrix interactions[J]. *Matrix Biology*, 2018, 73: 122-134.
- [17] Boonrawd S, Supungul P, Tassanakajon A, *et al.* Antimicrobial activity of a serine proteinase inhibitor SPIPm5 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 147-155.
- [18] Qin Z D, Babu V S, Wan Q Y, *et al.* Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged by *Vibrio parahaemolyticus* reveals unique immune-related genes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 164-174.
- [19] Kong J R, Wei W, Liang Q J, *et al.* Identifying the function of LvPI3K during the pathogenic infection of *Litopenaeus vannamei* by *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 355-367.
- [20] Wang L, Wang X R, Liu J, *et al.* Rab from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its regulation upon environmental stress[J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(7-8): 1765-1774.
- [21] Cardoso-Mohedano J G, Páez-Osuna F, Amezcua-Martínez F, *et al.* Combined environmental stress from shrimp farm and dredging releases in a subtropical coastal lagoon (SE Gulf of California)[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 104(1-2): 83-91.
- [22] Wang L, Wang W N, Liu Y, *et al.* Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(6): 6427-6438.
- [23] Li X C, Du Z Q, Lan J F, *et al.* A novel pathogen-binding gC1qR homolog, FcgC1qR, in the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 400-407.
- [24] 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.
- [25] Xu D D, Liu W F, Alvarez A, *et al.* Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 47(2): 287-297.
- [26] Zuo H L, Yuan J, Yang L W, *et al.* Identification of the thioredoxin-related protein of 14 kDa (TRP14) from *Litopenaeus vannamei* and its role in immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 514-520.
- [27] Sun J J, Xu S, He Z H, *et al.* Activation of toll pathway is different between kuruma shrimp and *Drosophila*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1151.
- [28] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate

- immune responses in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 973-980.
- [29] 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)爆发有关[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).
- [30] Hu M C T, Wang Y P, Qiu W R, *et al.* Hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1) stress response signaling pathway activates I κ B kinases (IKK- α/β) and IKK- β is a developmentally regulated protein kinase[J]. *Oncogene*, 1999, 18(40): 5514-5524.
- [31] Kzhyshkowska J, Rusch A, Wolf H, *et al.* Regulation of transcription by the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain-containing protein BRD7[J]. *The Biochemical Journal*, 2003, 371: 385-393.
- [32] Kim S, Lee J, Park J, *et al.* BP75, bromodomain-containing M_r 75,000 protein, binds dishevelled-1 and enhances Wnt signaling by inactivating glycogen synthase kinase-3 β [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(16): 4792-4795.

Isolation and characterization of a bromodomain-containing protein cDNA sequence from *Litopenaeus vannamei* and its expression analysis

ZOU Ruifeng¹, LI Danlei¹, ZHANG Yichen¹, LIU Yichen^{1*}, GENG Xuyun², SUN Jinsheng¹

(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: Bromodomain-containing protein (BCP) is a highly conservative protein, which belongs to the bromodomain and extraterminal (BET) protein superfamily. BCP can regulate gene replication and transcription by recruiting different chromosome modifying proteins, and the change of its expression is often associated with the occurrence of tumor and inflammation. Based on the transcriptomic analysis, a cDNA sequence of BCP gene (*Lv-BRD*), 2 229 bp in length, was isolated from the hemocytes of *Litopenaeus vannamei* in this study. The sequence has been deposited in GenBank with accession number of MH638256. Using online tools, the sequence was characterized. The deduced protein sequence of *Lv-BRD* has a conservative bromine domain, indicating that it may be involved in the regulation of cell cycle. Tissue/organ expression was analyzed by qPCR and the result showed that *Lv-BRD* was mainly expressed in hemocytes, hepatopancreas and gills of shrimp. Expression of *Lv-BRD* in hemocytes increased significantly in the early stage (0.5–12 hours past infection, hpi) challenge by white spot syndrome virus (WSSV), *B. thuringiensis* and *V. parahemolyticus*, suggesting that *Lv-BRD* is involved in the innate immune response to pathogens in shrimp. These results provided a basis for further studies on the function and mechanism of *Lv-BRD* in antiviral immunity and interferon regulation of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; bromodomain-containing protein; gene expression; pathogenic infection; innate immune response

Corresponding author: LIU Yichen. E-mail: skylyc@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 Team