

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

刘凤艳¹, 刘逸尘^{1*}, 张亦陈¹, 耿绪云², 孙金生^{1,2*}

(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. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

摘要: 为了探讨凡纳滨对虾细胞因子信号转导负调控因子(SOCS)在病毒引发的免疫应答过程中的潜在作用,本实验根据前期的转录组和表达谱结果提示信息,首次克隆了凡纳滨对虾的SOCS基因(*Lv-SOCS*, GenBank注册号:KJ000426),利用在线软件进行了生物信息学分析,运用半定量的方法进行了组织表达分析,并利用实时荧光定量PCR(qPCR)技术分析了该基因在白斑杆状病毒(WSSV)侵染过程中的表达变化特征。结果显示,*Lv-SOCS*的ORF区1 191 bp,编码397个氨基酸,预测分析显示该基因编码的蛋白质含有1个SH2结构域和1个SOCS-box结构域,组织表达分析表明该基因主要在凡纳滨对虾血细胞、肠道和肝胰腺中表达。在WSSV感染后中晚期(6~48 hpi),*Lv-SOCS*可以被显著诱导,在血细胞中呈明显上调表达趋势,表明该基因在一定程度上参与了凡纳滨对虾体内由WSSV引发的先天免疫应答过程,上述结果为进一步研究*Lv-SOCS*基因在对虾应答病毒侵染过程中的功能和作用机制奠定了基础。

关键词: 凡纳滨对虾; SOCS; 序列分析; 基因表达; 先天免疫应答

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾,其生长速度快、群体增长均匀、壳薄、肉厚,是世界范围内的重要养殖虾种,然而近年来养殖环境的恶化以及对虾病害的大规模暴发给我国对虾养殖业带来巨大损失,养殖效益大幅度下降,深入开展对虾抗病毒免疫应答研究是解决病害问题的关键。细胞因子信号转导负调控因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)是细胞信号转导途径JAK/STAT通路中最重要的信号抑制因子^[1-2],而JAK/STAT通路是许多细胞因子信号由胞膜向核内传递的重要途径^[3],它广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及胚胎发育和机体免疫调节等重要生物学过程,是近年来的研究热点。SOCS通过抑制细胞因子信号转导来调节机体对细胞因子的过度刺激^[1],在机体免疫、生长、发育等方面发挥着关键作用^[4-7]。SOCS最早于1997

年由3个实验室用不同的方法同时发现^[8-10],到目前为止,SOCS家族一共有8个成员(SOCS1~SOCS7和CIS)^[11-12],这8个成员结构相似,即中间为1个SH2结构域,羧基端为一段保守序列,约40个氨基酸大小的SOCS框,而氨基端为不同长度的可变区^[12-16]。SOCS1和SOCS3的N末端结构域称之为KIR,它能够抑制JAK活化下游分子^[17];SOCS2和CIS包含一个N端延伸的SH2亚结构域(N-terminal extended SH2 subdomain, N-ESS)结构域,用于连接SH2结构域和SOCS-box^[18]。SOCS家族所有成员均利用它们的SH2结构域来结合磷酸化的酪氨酸残基,如SOCS2和CIS通过SH2与STAT竞争结合细胞膜表面细胞因子受体上的酪氨酸磷酸化位点而发挥负调控作用^[19]。根据先前的系统进化分析发现:SOCS家族分为2个亚家族,分别为类型I(SOCS4-SOCS7)和

收稿日期:2014-03-07 修回日期:2014-06-11

资助项目:国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA092205;2012AA10A401);国家“九七三”重点基础研究发展计划(2012CB114405);国家科技支撑计划(2011BAD13B04;2011BAD13B07)

通信作者:刘逸尘, E-mail:liuychn@outlook.com;孙金生, E-mail:jinshsun@163.com

类型II(SOCS1-SOCS3和CIS),类型II中的SOCS基因成员可能来源于类型I^[20-21]。目前,关于SOCS的研究及其应用在人、鼠等脊椎动物中已经有较多报道^[22-23],而在甲壳动物中的研究甚少,目前仅在日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[24]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[21]等甲壳动物中有相关研究。前期实验的转录组和表达谱结果^[25]提示,白斑杆状病毒(WSSV)感染后的凡纳滨对虾SOCS基因表达有显著改变,表明其所在的JAK/STAT信号通路可能参与对虾应答病毒感染的过程。研究拟在克隆凡纳滨对虾的SOCS基因的基础上,进行序列与结构特征分析,并对其组织分布和应答WSSV感染的表达模式进行分析,以期为后续深入探讨SOCS基因在凡纳滨对虾抗病毒免疫应答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

实验动物、菌株、质粒 凡纳滨对虾(体长12~14 cm)购于天津市汉沽区对虾养殖场,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TOP-10F'为本实验室保存;克隆载体pMD-19T购自TaKaRa公司。

实验试剂 TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen); PrimeScript Reverse Transcriptase、DL 2000 DNA Marker、SYBR premix ExTaqTM II和SYBR premix Perfect Real Time(购自TaKaRa公司);其他试剂均为国产或进口分析纯产品。

实验仪器 梯度PCR仪(Bio-Rad);核酸蛋白检测仪(Bio-Rad);恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);台式冷冻离心机(Eppendorf);超净工作台等。

1.2 总RNA的提取及第一链cDNA的合成

获取健康凡纳滨对虾的血淋巴、鳃、心脏、肠道、神经、肝胰腺,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℃保存备用。以血细胞及各组织总RNA为模板,以poly(T)(5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTAC(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-SOCS基因ORF区的克隆

根据前期转录组测序结果^[25],设计序列特异性引物LvSO-F(5'-GCACCACACGACCCT-3')和

LvSO-R(5'-CCTCAAGCAGCCGTC-3'),以对虾血细胞cDNA为模板、以LvSO-F及LvSO-R为引物,进行PCR扩增,将获得的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 Lv-SOCS基因的生物信息学分析

利用在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)对测序验证正确的Lv-SOCS基因序列进行翻译,并对推导的SOCS蛋白质序列进行分子量及等电点的预测;通过Blast P工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对Lv-SOCS进行同源比对分析;采用ClustalX和MEGA 5.0软件对其进行多序列比对和聚类分析,系统树采用Neighbour-Joining方法构建。

1.5 Lv-SOCS基因的组织分布分析

获取健康凡纳滨对虾的血淋巴、鳃、心脏、肠道、神经、肝胰腺共6种组织的总RNA,并通过反转录合成cDNA,以β-actin-qF(5'-GAAGTAGC-CGCCCTGGTTG-3')和β-actin-qR(5'-CGGTTA-GCCTTGGGGTTGAGGGGAG-3')为内参基因的扩增引物,反应条件:95℃预变性5 min,1个循环;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,26个循环;72℃总延伸10 min。将调整好的各组织的模板cDNA量来扩增目的基因。以SOCS-qF(5'-CTTGTCCGTATGCGTTTAGAT-3')和SOCS-qR(5'-TTGCCGTTTCCCCTGTGA-3')为目的基因的扩增引物,反应条件:95℃预变性5 min,1个循环;94℃变性1 min,54℃退火1 min,72℃延伸1 min,26个循环;72℃总延伸10 min。PCR产物均在1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。利用半定量的方法检测Lv-SOCS基因的组织分布情况。

1.6 Lv-SOCS基因在血细胞中应答WSSV感染的表达变化特征分析

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,按照如下步骤提取病毒,取感染WSSV的凡纳滨对虾的鳃加入TNE buffer,冰浴匀浆;将匀浆液以3 500×g,4℃离心5 min,取上清液后,30 000×g,4℃离心30 min;弃去上清液,沉淀用10 mL TN buffer悬浮,3 500×g,4℃离心5 min;取上清液,30 000×g,4℃离心20 min;沉淀加10 mL TN buffer,30 000×g,4℃离心20 min;沉淀用1 mL的TN buffer重悬备用。

选用健康的凡纳滨对虾,设置2个组别,分别为对照组和实验组,每组3个平行,每个平行5尾

虾。对照组注射用于稀释病毒的 Tris-NaCl (TN) 缓冲液,每尾注射 10 μL;实验组注射病毒悬液,每尾注射 10 μL (浓度为 10⁸/mL)。利用注射 WSSV 后 0、1、3、6、12、24、48 和 72 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, 简称 TPI) 作为内参基因,引物为 TPI-qF (5'-GGTCACGTGTTGTCTTG-GCTTATGAACC-3') 和 TPI-qR (5'-CTGAACAA-AGTCTGGCTTGAGAGCTGC-3'), Lv-SOCS 特异引物为 SOCS-qF (5'-TGCGGCAAGTTCAGG-TTAG-3') 和 SOCS-qR (5'-CGTCTTTCCTTCGT-GGTCG-3'), 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 进行融解曲线分析。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^{-ΔΔC_t}法计算,采用 t 检验分析显著性差异。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 Lv-SOCS 基因的序列分析

本研究获得了凡纳滨对虾 SOCS 基因的 cDNA 序列(图 1),其完整 ORF 区间长为 1 191 bp,编码的多肽序列含 397 aa,5'-UTR 区长度为 517 bp,3'-UTR 区尚不完整,其克隆工作正在进行中,经序列比对发现,测序结果与已有转录组结果一致。预测的分子量为 42.30 kDa,等电点为 8.62。利用在线软件 (<http://www.expasy.org/tools>) SMART 分析显示:Lv-SOCS 编码的蛋白质含有 1 个 SH2²⁴⁶⁻³³⁵ 结构域和 1 个 SOCS-box³⁵⁹⁻³⁹³ 结构域,但不具有信号肽结构。

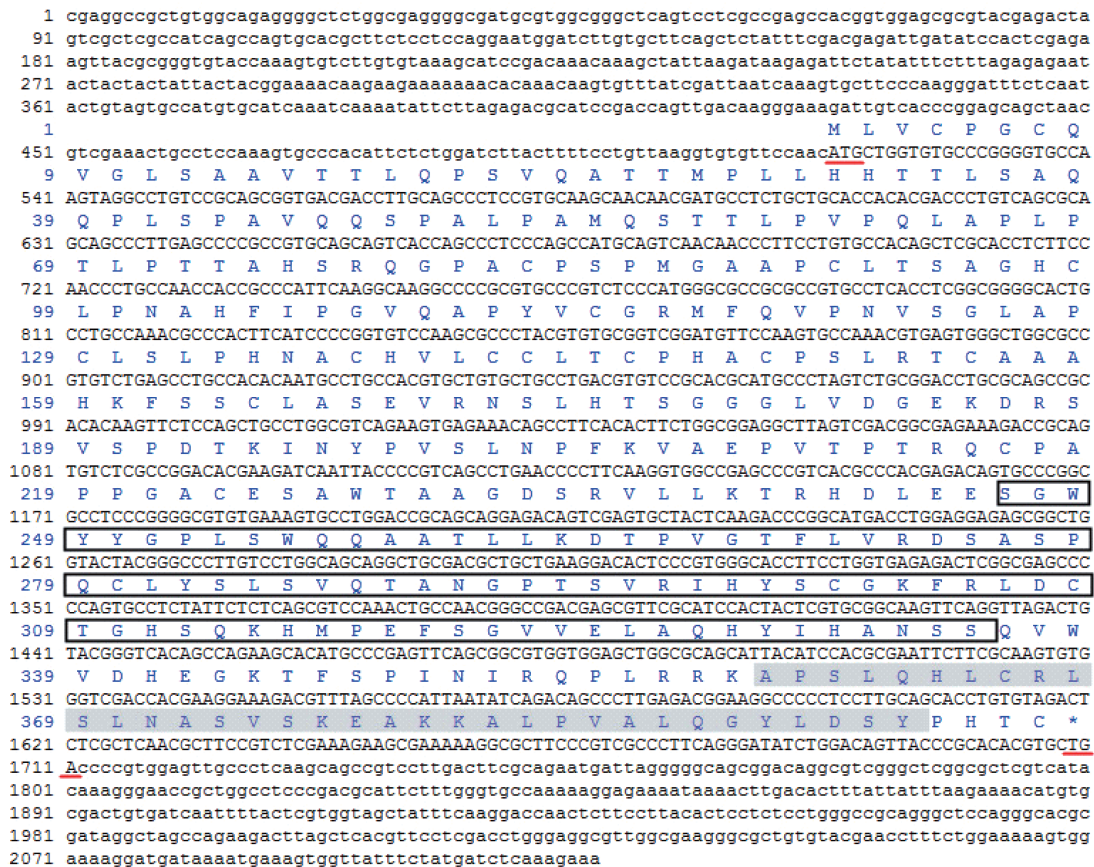


图 1 凡纳滨对虾 Lv-SOCS 基因的核酸序列及其氨基酸序列

黑框部分为 SH2 结构域,阴影部分为 SOCS-box 结构域,ATG 和 TGA 分别为起始密码子和终止密码子

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Lv-SOCS

SH2 domain was shown in black box and SOCS-box was shown in the shadow, ATG is the start codon, the TGA is the stop codon

2.2 *Lv-SOCS* 的多重序列比对分析

基于 Blast P (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的比对结果,将 *Lv-SOCS* 推导的氨基酸序列与其他物种的 SOCS 序列进行多序列比对,结果显示:*Lv-SOCS* 与日本囊对虾 SOCS 相似性最高(94%),其次为中华绒螯蟹的 SOCS(56%),与人(*Homo sapiens*)、牛(*Bos taurus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)

等的 SOCS 相似性均在 35% 左右。它们在 SH2 结构域、SOCS-box 结构域上有很多一致序列(图 2),如在 SH2 结构域中,所有参与比对的物种都存在一个磷酸化酪氨酸位点(pY 位点),显示这些序列具有较强的保守性。将 *Lv-SOCS* 与 SOCS 家族其他成员的蛋白序列构建系统发生树(图 3),结果显示:这些序列聚为 2 组,分别为

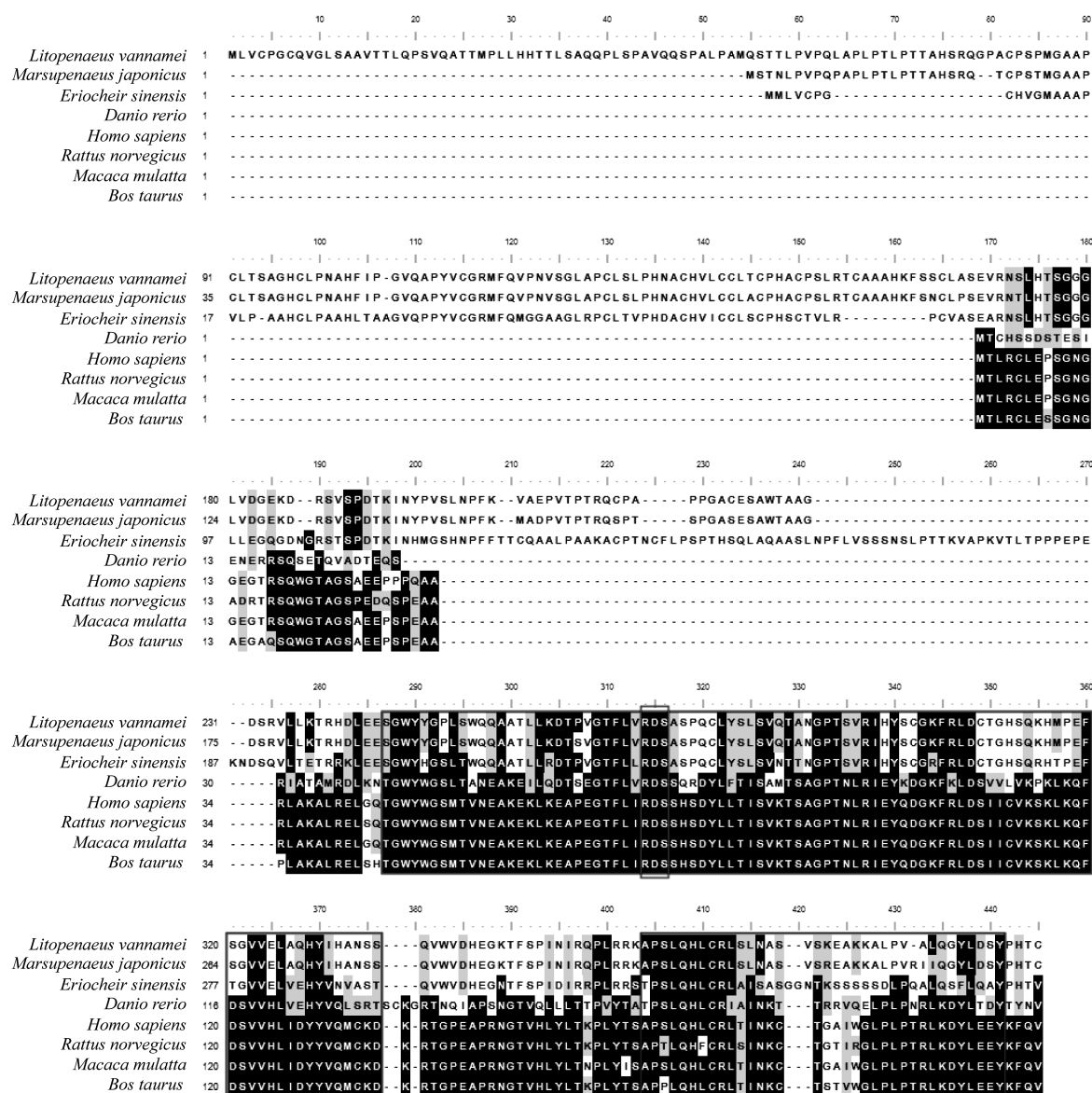


图 2 *Lv-SOCS* 基因推断的氨基酸序列与其他物种 SOCS 蛋白的多序列比对

红框部分为 SH2 结构域,蓝框部分为 SOCS-box 结构域,绿框部分为 pY 位点。其他物种 SOCS 蛋白及其 GenBank 注册号分别为,日本囊对虾 SOCS(BAI70368.1);中华绒螯蟹 SOCS(ACU42699.1);斑马鱼 SOCS(NP_001108022.1);人 SOCS(BAG70132.1);褐家鼠 SOCS(NP_478115.1);猕猴 SOCS(NP_001181691.1);牛 SOCS(AAI14663.1)

Fig. 2 Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequence of *Lv-SOCS* compared with others SOCSs. SH2 domain was shown in red box, SOCS-box was shown in blue box and pY position was shown in green box. GenBank accession number: *Marsupenaeus japonicus* SOCS(BAI70368.1), *Eriocheir sinensis* SOCS(ACU42699.1), *Danio rerio* SOCS(NP_001108022.1), *Homo sapiens* SOCS(BAG70132.1), *Rattus norvegicus* SOCS(NP_478115.1), *Macaca mulatta* SOCS(NP_001181691.1), *Bos Taurus* SOCS(AAI14663.1)

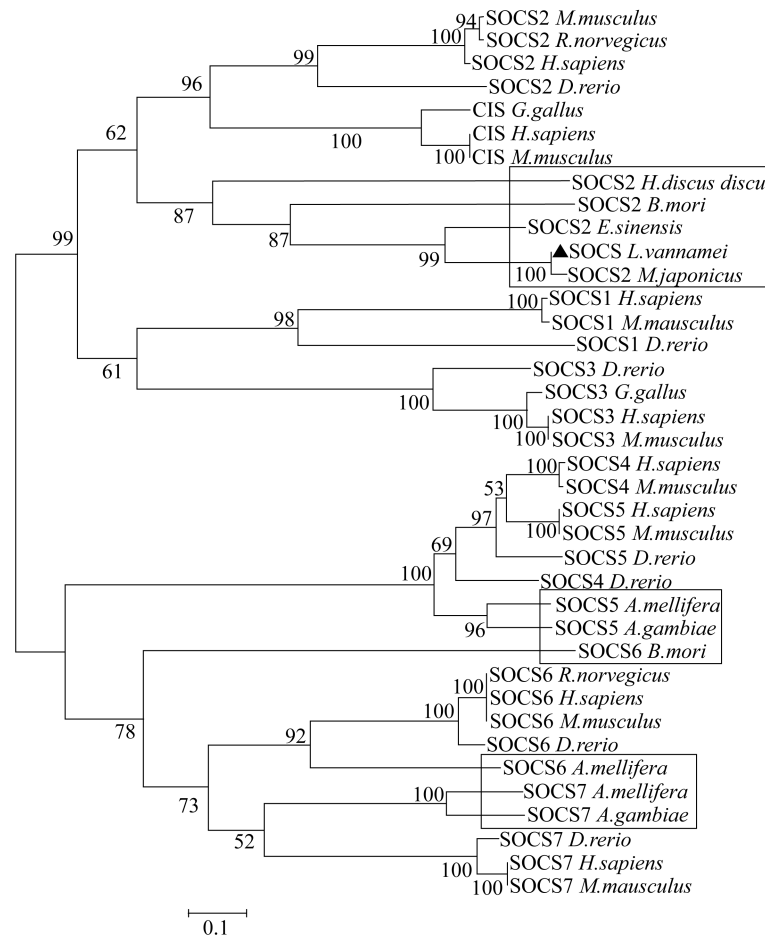


图3 *Lv-SOCS* 与其他物种 *SOCS* 的进化发生分析

方框部分表示无脊椎动物的 *SOCS* 基因。其他物种 *SOCS* 蛋白及其 GenBank 注册号:人 *CIS* (AAH64354.1); 原鸡 *CIS* (NP_989957.1); 小家鼠 *CIS* (NP_034025.1); 人 *SOCS1* (NP_003736.1); 斑马鱼 *SOCS1* (NP_001003467.1); 小家鼠 *SOCS1* (NP_001258532.1); 人 *SOCS2* (BAG70132.1); 斑马鱼 *SOCS2* (NP_001108022.1); 小家鼠 *SOCS2* (AAB62402.1); 中华绒螯蟹 *SOCS2* (ACU42699.1); 日本囊对虾 *SOCS2* (BAI70368.1); 盘鲍 *SOCS2* (ACH72048.1); 家蚕 *SOCS2* (NP_001243921.1); 褐家鼠 *SOCS2* (NP_478115.1); 人 *SOCS3* (CAG46495.1); 斑马鱼 *SOCS3* (NP_956244.1); 小家鼠 *SOCS3* (NP_031733.1); 原鸡 *SOCS3* (NP_989931.1); 人 *SOCS4* (NP_955453.1); 斑马鱼 *SOCS4* (NP_001104695.1); 小家鼠 *SOCS4* (NP_543119.2); 人 *SOCS5* (AAH32862.1); 斑马鱼 *SOCS5* (ABM68036.1); 小家鼠 *SOCS5* (NP_062628.2); 意蜂 *SOCS5* (ABV01936.1); 冈比亚按蚊 *SOCS5* (ABV01933.1); 人 *SOCS6* (NP_004223.2); 斑马鱼 *SOCS6* (ABM68037.1); 小家鼠 *SOCS6* (AAH94443.1); 褐家鼠 *SOCS6* (NP_001258078.1); 意蜂 *SOCS6* (XP_003693165.1); 冈比亚按蚊 *SOCS6* (ADO51636.1); 人 *SOCS7* (AAI28608.1); 斑马鱼 *SOCS7* (AAI58200.1); 小家鼠 *SOCS7* (NP_619598.1); 意蜂 *SOCS7* (ABV01937.1); 冈比亚按蚊 *SOCS7* (ABV01935.1)

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the *Lv-SOCS* with other *SOCS*s

The *SOCS* of invertebrate was shown in box. GenBank accession number: *Homo sapiens* *CIS* (AAH64354.1), *Gallus gallus* *CIS* (NP_989957.1), *Mus musculus* *CIS* (NP_034025.1), *Homo sapiens* *SOCS1* (NP_003736.1), *Danio rerio* *SOCS1* (NP_001003467.1), *Mus musculus* *SOCS1* (NP_001258532.1), *Homo sapiens* *SOCS2* (BAG70132.1), *Danio rerio* *SOCS2* (NP_001108022.1), *Mus musculus* *SOCS2* (AAB62402.1), *Eriocheir sinensis* *SOCS2* (ACU42699.1), *Marsupenaeus japonicus* *SOCS2* (BAI70368.1), *Haliotis discus discus* *SOCS2* (ACH72048.1), *Bombyx mori* *SOCS2* (NP_001243921.1), *Rattus norvegicus* *SOCS2* (NP_478115.1), *Homo sapiens* *SOCS3* (CAG46495.1), *Danio rerio* *SOCS3* (NP_956244.1), *Mus musculus* *SOCS3* (NP_031733.1), *Gallus gallus* *SOCS3* (NP_989931.1), *Homo sapiens* *SOCS4* (NP_955453.1), *Danio rerio* *SOCS4* (NP_001104695.1), *Mus musculus* *SOCS4* (NP_543119.2), *Homo sapiens* *SOCS5* (AAH32862.1), *Danio rerio* *SOCS5* (ABM68036.1), *Mus musculus* *SOCS5* (NP_062628.2), *Apis mellifera* *SOCS5* (ABV01936.1), *Anopheles gambiae* *SOCS5* (ABV01933.1), *Homo sapiens* *SOCS6* (NP_004223.2), *Danio rerio* *SOCS6* (ABM68037.1), *Mus musculus* *SOCS6* (AAH94443.1), *Rattus norvegicus* *SOCS6* (NP_001258078.1), *Apis mellifera* *SOCS6* (XP_003693165.1), *Anopheles gambiae* *SOCS6* (ADO51636.1), *Homo sapiens* *SOCS7* (AAI28608.1), *Danio rerio* *SOCS7* (AAI58200.1), *Mus musculus* *SOCS7* (NP_619598.1), *Apis mellifera* *SOCS7* (ABV01937.1), *Anopheles gambiae* *SOCS7* (ABV01935.1)

类型 I (SOCS4-SOCS7) 亚家族和类型 II (SOCS1-SOCS3 和 CIS) 亚家族。其中, 类型 I 包括脊椎动物的 SOCS4-SOCS7 以及无脊椎动物的 SOCS5-SOCS7; Lv-SOCS 分布在了类型 II 分支上, 与日本沼虾的 SOCS 聚在一个分支上, 其次为中华绒螯蟹的 SOCS。

2.3 Lv-SOCS 基因的组织分布分析

利用半定量的方法分析了 Lv-SOCS 在不同组织中的表达特征 (图 4-a), 并对实验结果进行了灰度分析 (图 4-b), 结果显示该基因在血细胞、肠道和肝胰腺中高度表达, 在神经组织中也有一定量的表达, 鳃中表达量很低, 而在心脏中几乎无表达。

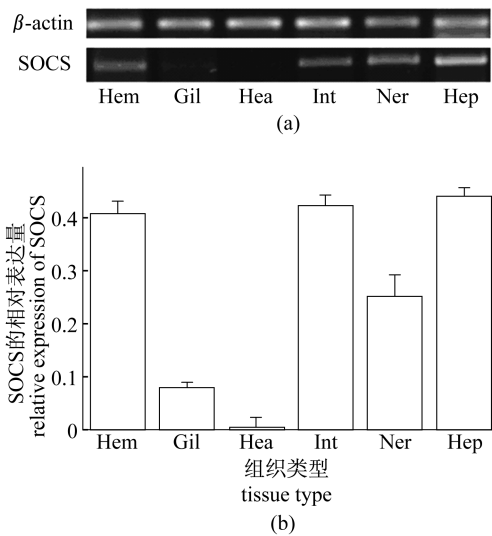


图 4 Lv-SOCS 基因组织表达分析

(a) Lv-SOCS 基因组织表达的凝胶电泳检测; (b) Lv-SOCS 基因组织表达的凝胶灰度分析。从左至右各组织分别为血细胞、鳃、心脏、肠道、神经和肝胰腺

Fig. 4 Tissue expression of Lv-SOCS in *Litopenaeus vannamei*

(a) gel electrophoresis of Lv-SOCS gene expression in tissue; (b) expression of *L. vannamei* SOCS gene by gray scale analysis. From left to right: hemocytes, gill, heart, intestine, nerve and hepatopancreas

2.4 Lv-SOCS 基因应答 WSSV 感染的表达变化分析

利用 Real-time PCR 的方法分析了凡纳滨对虾血细胞中 Lv-SOCS 在 WSSV 感染后不同时间的表达变化 (图 5)。结果显示, 病毒感染可以显著诱导 Lv-SOCS 基因的表达, Lv-SOCS 的表达量在感染的中晚期 (6、12、24 和 48 hpi) 呈显著上升趋势, 与空白组 (0 hpi) 相比有显著差异 ($P <$

0.05); 在感染后第 48 h (48 hpi) 的表达量达到高峰 ($P < 0.01$), 约为该基因对照组表达量的 23 倍, 感染后 72 h (72 hpi) 该基因表达量迅速下降, 基本恢复至对照组水平。

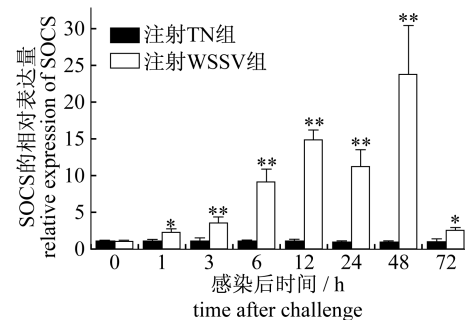


图 5 WSSV 感染后凡纳滨对虾血细胞中 Lv-SOCS 基因的表达模式

* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 5 Expression profile of Lv-SOCS after WSSV challenge in hemocytes of *L. vannamei*

* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** represent extremely significant difference ($P < 0.01$)

3 讨论

SOCSs 是近年来相继发现的一系列能够抑制 JAK/STAT 通路的蛋白质, 不仅参与机体的生长、发育, 在机体的天然免疫与获得性免疫中也起到重要作用^[1]。本研究从凡纳滨对虾的血细胞中克隆得到 SOCS 基因 (Lv-SOCS, GenBank 注册号: KJ000426), SMART 分析预测其蛋白结构中不包含信号肽结构, 和大多数 SOCS 一样, Lv-SOCS 亦为胞浆蛋白, 不存在跨膜移位活动。虽然 SOCS 家族成员的氨基酸长度不尽相同, 但组成 SOCS 蛋白的基本结构和其发挥功能的结构域和氨基酸序列是保守的, 即均存在其中的 SH2 结构域和 SOCS-box 结构域。SH2 区和 SOCS-box 存在于 SOCS 家族所有成员中, 是进化上最保守也是功能最重要的区域, 其中 SOCS-box 高度保守, 被认为是保持生物学功能的关键结构域。在 SH2 结构域中, 所有参与比对的物种都存在一个磷酸化酪氨酸位点 (pY 位点) (图 2), 该位点是特异性识别酪氨酸磷酸化的结构基础^[21], 预测能与其他信号蛋白的磷酸化酪氨酸残基结合^[9,26]。在已有的研究中发现, SH2 结构域与 STAT 相似, 可以竞争结合细胞因子受体胞质区的磷酸化 Tyr 位点, 通过阻止转录因子 STAT 的活化而阻止

STAT 募集到细胞因子受体,进而抑制了 JAK/STAT 通路^[27-29]。在 *Lv-SOCS* 的 SH2 结构域中,pY 位点为 Arg²⁷³,Asp²⁷⁴ 和 Ser²⁷⁵,比对显示与其他物种的 SOCS 具有同一类 pY 位点,提示可能具有相似的作用机制。碳端的 SOCS-box 结构域包含 34 个氨基酸(Ala³⁵⁹ ~ Tyr³⁹³),其核心序列与 JAKs 家族中具有调节激酶活性的酪氨酸酸化位点相似,这个位点在 JAK 家族中,非磷酸化状态时发挥着假底物作用^[30];SOCS-box 还可介导含有 SOCS 盒的蛋白质与一种复合物延伸蛋白 BC(由延伸蛋白 B 和 C 组成)之间的结合,之后可能与一种名为 cullin-2 的 E3 泛素连接酶结合,然后通过泛素化途径降解与其结合的蛋白质^[31]。

系统发生分析结果显示:SOCS 家族成员分为 2 大支(图 3),第 1 支包括 *Lv-SOCS*,盘鲍、家蚕、中华绒螯蟹、日本囊对虾的 SOCS2,以及脊椎动物的 CIS、SOCS1-SOCS3,即类型 II 亚家族;第 2 支包括脊椎动物的 SOCS4-SOCS7 以及无脊椎动物的 SOCS5-SOCS7,这提示各物种的 SOCS4-SOCS7 可能起源于共同的祖先。本实验中,*Lv-SOCS* 归属于类型 II 亚家族,这与中华绒螯蟹^[21] SOCS2 基因和日本囊对虾^[24] SOCS 的研究结果一致。进化分析结果同时也表明,SOCS 是按亚家族类型分支的,与物种没有直接关系,进一步证实了 SOCS 在进化上是一种很古老的基因^[32]。

组织表达分析显示,*Lv-SOCS* 具有一定的组织表达特异性,该基因在血细胞、肠道和肝胰腺中高度表达(图 4),在中华绒螯蟹^[21] 和日本囊对虾^[24] 体内的实验也得到了一致的结果,这些组织在对虾的免疫防御过程中分别发挥着重要功能,与 *Lv-SOCS* 基因发挥免疫功能有一定的关系。在 WSSV 感染的极早期,血细胞内的 *Lv-SOCS* 表达量变化并不显著,从第 6 h 开始显著升高,并在感染后第 48 h 达到高峰。SOCS 是 JAK/STAT 通路中的一个负调控因子,并不是直接与病原相结合的模式识别受体,因此其应答病毒感染的反应可能会相对滞后一些。在感染中晚期的每个时间点中,*Lv-SOCS* 的表达量均显著高于对照组中该基因的表达量(图 5),表明该基因可能在病毒感染后持续发挥作用,推断病毒感染可以显著诱导 *Lv-SOCS* 基因的表达。目前,还未见关于 SOCS 应答 WSSV 感染的表达特征报道,在对中华绒螯蟹^[21] SOCS 的研究中,中华绒螯蟹在被鳃

利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)或藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)刺激后,其体内的 SOCS 也呈现出表达量增加的现象,而在对日本囊对虾^[24]的研究中,PG 或 poly I:C 的刺激也可以显著诱导 SOCS 的表达,由此可以看出,不同的病原刺激机体,机体内的 SOCS 均被上调,以上实验结果说明 SOCS 在甲壳动物机体先天免疫中可能发挥着重要作用。本研究系统分析了 *Lv-SOCS* 基因的结构特点、组织表达特征以及病毒侵染以后该基因的表达量变化模式,研究结果为深入探讨 SOCS 蛋白在调控对虾 JAK-STAT 信号通路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] Zhou Y H, Rong G H, Yang Z X. The research progress of SOCS and its immunological function [J]. *Modern Immunology*, 2007, 27(6): 516 - 521. [周运恒, 荣光华, 杨再兴. SOCS 及其免疫学作用研究进展. *现代免疫学*, 2007, 27(6): 516 - 521.]
- [2] Naka T, Fujimoto M, Kishimoto T. Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor [J]. *Trends In Biochemical Sciences*, 1999, 24(10): 394 - 398.
- [3] Li Q G. The research progress of JAK-STAT mediated by cytokine receptor [J]. *Section of Immunology Foreign Medical Sciences*, 2000, 23(1): 26 - 29. [李清刚. 细胞因子受体介导的信号传递 JAK-STAT 研究新进展. *国外医学(免疫学分册)*, 2000, 23(1): 26 - 29.]
- [4] Tian Z G. The specific inhibitor of JAK/STAT signaling pathways—The discovery and significance of SOCS system [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2000, 16(8): 454 - 456. [田志刚. JAK/STAT 信号传导通路特异抑制物—SOCS 系统的发现及意义. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(8): 454 - 456.]
- [5] Croker B A, Kiu H, Nicholson S E. SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 2008, 19(4): 414 - 422.
- [6] Dalpke A, Heeg K, Bartz H, et al. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins [J]. *Immunobiology*, 2008, 213(3-4): 225 - 235.
- [7] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins,

- cytokine signaling and immune regulation[J]. Nature Reviews Immunology, 2007, 7(6): 454 - 465.
- [8] Starr R, Willson T A, Viney EM, *et al.* A family of cytokine inducible inhibitors of signaling [J]. Nature, 1997, 387(6636): 917 - 921.
- [9] Endo T A, Masuhara M, Yokouchi M, *et al.* A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases[J]. Nature, 1997, 387(6636): 921 - 924.
- [10] Naka T, Narazaki M, Hirata M, *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor [J]. Nature, 1997, 387(6636): 924 - 929.
- [11] Dalpke A, Heeg K, Bartz A, *et al.* Regulation of innate immunity by suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins [J]. Immunobiology, 2008, 213(3 - 4): 225 - 235.
- [12] Yoshimura A, Nishinakamura H, Takaki H. SOCS genes: critical regulators of cytokine signaling and immune responses[J]. International Congress Series, 2005, 1285(11): 121 - 129.
- [13] Rico-Bautista E, Flores-Morales A, Fernandez-Perez L. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2006, 17(6): 431 - 439.
- [14] Alexander W S. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2(6): 410 - 416.
- [15] Wormald S, Hilton D J. Inhibitors of cytokine signal transduction [J]. The Journal of Biochemistry, 2004, 279(2): 821 - 824.
- [16] Alexander W S, Hilton D J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response [J]. Annual Review of Immunology, 2004, 22: 503 - 529.
- [17] Wang T, Secombes C J. Rainbow trout suppressor of cytokine signaling (SOCS) -1, 2 and 3: molecular identification, expression and modulation [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2008, 45(5): 1449 - 1457.
- [18] Bullock A N, Debreczeni J E, Edwards A M, *et al.* Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2006, 103(20): 7637 - 7642.
- [19] Fu Z C, Cai J M, Han L. Cytokine signal transduction negative regulation protein family and signal transduction [J]. Molecular Biomedicine, 2003, 9(12): 705 - 707. [傅志超, 蔡建明, 韩玲. 细胞因子信号转导负调控蛋白家族与信号转导. 分子生物医学, 2003, 9(12): 705 - 707.]
- [20] Jin H J, Shao J Z, Xiang L X, *et al.* Global identification and comparative analysis of SOCS genes in fish: insights into the molecular evolution of SOCS family [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2008, 45(5): 1258 - 1268.
- [21] Zhang Y, Zhao J, Zhang H, *et al.* The involvement of suppressors of cytokine signaling 2 (SOCS2) in immune defense responses of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(1): 42 - 48.
- [22] Cao J, Ouyang Y. The expression of SOCS3 in cancer of the liver tissue [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(8): 1499 - 1501. [曹军, 欧阳艳. 肝癌组织中 SOCS-3 mRNA 的表达. 现代生物医学进展, 2009, 9(8): 1499 - 1501.]
- [23] Ueki K, Kondo T, Tseng Y H, *et al.* Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2004, 101(28): 10422 - 10427.
- [24] Okugawa S, Mekata T, Inada M, *et al.* The SOCS and STAT from JAK/STAT signaling pathway of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Molecular cloning, characterization and expression analysis [J]. Molecular and Cellular Probes, 2013, 27(1): 6 - 14.
- [25] Xue S, Liu Y, Zhang Y, *et al.* Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection [J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e76718.
- [26] Zhu L. SOCS: negative feedback suppressor of cytokine signaling [J]. Section of Immunology Foreign Medical Sciences, 2008, 26(1): 1 - 4. [朱蕾. SOCS: 细胞因子信号传导的负反馈抑制因子. 国外医学(免疫学分册), 2008, 26(1): 1 - 4.]
- [27] Li M L. The negative feedback regulation of cytokine signal transduction inhibition of protein in the JAK/STAT signal pathway [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2009, 22(3): 329 - 334. [李敏利. 细胞因子信号转导抑制蛋白在 JAK/STAT 信号通路中的负反馈调节作用. 医学研究生学报, 2009, 22(3): 329 - 334.]
- [28] Krebs D L, Hilton D J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling [J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 378 - 387.

- [29] Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and spread family proteins[J]. Keio Journal of Medicine, 2009, 58(2): 73-83.
- [30] Du X P, Xue C Y. Signal transduction negative regulatory factor family [J]. Section of Molecular Biology Foreign Medical Sciences, 2001, 23(1): 34-36. [杜喜平, 薛承岩. 信号传导的负性调节因子家族 SOCS. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(1): 34-36.]
- [31] Hou S X, Zheng Z, Chen X, et al. The JAK/STAT pathway in model organism: emerging roles in cell movement [J]. Developmental Cell, 2002, 3(6): 765-778.
- [32] Zeidler M P, Bach E A, Perrimon N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway [J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2598-2606.

Molecular cloning and characteristics of suppressors of cytokine signaling gene (*Lv-SOCS*) from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

LIU Fengyan¹, LIU Yichen^{1*}, ZHANG Yichen¹, GENG Xuyun², SUN Jinsheng^{1,2*}

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

2. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Tianjin 300221, China)

Abstract: Suppressors of cytokine signaling (SOCS) is an important inhibitor of JAK/STAT signaling pathway, which plays an important role in immunity, growth and development. The results of our previous transcriptome showed that the expression profile of *Lv-SOCS* fluctuated significantly in response to WSSV infection. It is suggested that *Lv-SOCS* might be involved in innate immunity in *L. vannamei* in response to WSSV infection. In this research, the full length cDNA of *SOCS* gene (*Lv-SOCS*, GenBank accession number: KJ000426) was cloned from hemocytes of *L. vannamei*. *Lv-SOCS* has a 1 191 bp ORF encoding 397 aa with a predicted molecular weight of 42.30 ku and calculated isoelectric point of 8.62. The SMART online software analysis shows that *Lv-SOCS* has two functional domains (SH2 domain and SOCS-box). According to the multiple sequence alignment, *Lv-SOCS* shows the highest similarity with *Marsupenaeus japonicus* SOCS which is in a same branch of phylogenetic tree with *Lv-SOCS*. Semi-quantitative RT-PCR revealed that *Lv-SOCS* was mainly expressed in hemocytes, intestine and hepatopancreas. The expression of *Lv-SOCS* could be up-regulated significantly after WSSV infection. The above results give important clues for further study on the function and regulation mechanism of *Lv-SOCS* in anti-WSSV immune response.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; SOCS; sequence analysis; gene expression; innate immune response

Corresponding author: LIU Yichen, E-mail: liuychn@outlook.com;

SUN Jinsheng. E-mail: jinshsun@163.com