

文章编号: 1674-5566(2016)01-0018-07

红笛鲷 *LITAF* 基因的克隆与表达分析

郑琦¹, 蔡佳^{1,2,3}, 汤菊芬^{1,2,3}, 鲁义善^{1,2,3}, 吴灶和^{2,3}, 简纪常^{1,2,3}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东湛江 524088; 3. 广东省水产经济动物病害控制重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 通过同源克隆和 RACE PCR 技术从红笛鲷脾脏中鉴定得到了脂多糖诱导的肿瘤坏死因子(LITAF)基因, 命名为 *Ls-LITAF*。该基因 cDNA 全长 815 bp, 开放阅读框为 447 bp, 编码 148 个氨基酸, 理论分子量为 15.7 ku。序列分析显示 *Ls-LITAF* 蛋白具有保守的 LITAF 结构域, 其中包含一个 CXXC 基序与一个 (H)_xCxxC 基序。*Ls-LITAF* 蛋白与其他鱼类 LITAF 蛋白相似度较高, 在系统进化树中也与其他鱼类该蛋白聚为一支。*Ls-LITAF* 基因在健康鱼体多种组织均有表达, 其中鳃、脾脏、皮肤与头肾的表达量较高; 且哈氏弧菌刺激鱼体后, *Ls-LITAF* 在脾脏和头肾中的表达量显著上调。以上研究结果为进一步了解 *Ls-LITAF* 在红笛鲷免疫反应中的作用提供了参考。

关键词: 红笛鲷; *LITAF* 基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 (Lipopolysaccharide Induced TNF- α Factor, LITAF) 是一类重要的炎症调控因子, 能调控 TNF- α , interferon- γ , interleukin (IL)-1 α , IL-10 等多种细胞因子的表达^[1-4], LITAF 与 STAT6B 形成的复合物能从细胞质转移到细胞核内与炎症因子的启动子序列结合, 进而影响细胞因子的转录^[2,4]; LITAF 还能通过 AKt、ERK1/2 以及 RSK 调节 LPS 刺激促炎症因子及抗炎因子的平衡, 保护机体免受 LPS 诱导产生炎症反应的毒害作用^[5]。除了炎症调控, B 细胞中 LITAF 可能具有促进 B 细胞成熟的功能^[6]。此外, LITAF 的表达还与白血病细胞以及肿瘤细胞的形成、凋亡与分化密切相关^[7-10]。

目前, LITAF 的同源物已经在哺乳动物^[2,11-12]、鸟类^[13]、软体动物^[14]、甲壳动物^[15]和鱼类^[16-19]等多种生物中相继被鉴定, 其中鱼类 LITAF 的表达能被细菌^[16]、病毒^[17-18]或者病原

相关分子模式 (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP)^[18-19]诱导, 表明鱼类 LITAF 在宿主抵御病原侵染的免疫反应中发挥着一定的作用, 但迄今未见红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) LITAF 的研究报道。红笛鲷是我国南部沿海的重要海水养殖鱼类, 近年来弧菌病的爆发对红笛鲷的养殖造成了极大的损失。本文拟克隆红笛鲷 *LITAF* 基因 cDNA 全长, 分析该基因在健康鱼体中各组织的表达情况及其在哈氏弧菌感染后的表达模式, 为了解红笛鲷抗菌免疫反应的分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 健康红笛鲷各组织 cDNA 合成

实验用红笛鲷 (约 500 g/尾) 购于湛江市某水产市场, 体表无明显炎症、溃烂及鳞片脱落, 鱼活动正常, 解剖后内脏无异常, 暂养于水温 (28 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 的循环水养殖系统中, 养殖用海水已经过滤

收稿日期: 2015-04-20 修回日期: 2015-06-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31402335, 41406172); 广东省科技厅国际合作项目 (2012B050600029); 广东高校国际合作创新平台项目 (2013gjh0008); 广东海洋大学创新强校工程 (GDOU2013050231)

作者简介: 郑琦 (1993—), 男, 研究方向为水产动物病害防治。E-mail: Max_Chaos@163.com

通信作者: 蔡佳, E-mail: matrix924@foxmail.com

及消毒。暂养 7 d 后摘取 5 尾鱼的皮肤、心脏、肌肉、脑、头肾、鳃、胃、肠、肾、脾、肝脏用于组织表达分布检测。采用 Trizol (Invitrogen) 法分别提取总 RNA 后通过 M-MLV 将总 RNA 反转成 cDNA 一链用于后续试验。另取脾的总 RNA, 利用 Clontech 公司的 SMARTer RACE 试剂盒合成用于 3' 与 5' RACE 扩增的 cDNA 模板。

1.2 溶藻弧菌人工感染

哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 由本实验室保存。取保存的菌株复苏后按照体积比 1:50 加到含有 60 mL TSB (2% NaCl) 培养基中, 28 °C 振荡 (200 r/min) 培养至对数生长期后收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液。根据预实验调整菌液浓度为 2.0×10^8 cfu/mL。将健康红笛鲷分为两组, 实验组采用腹腔注射法进行人工感染 (0.2 mL 菌液/尾), 对照组注射相同体积的无菌生理盐水, 于注射后的 6、12、18、24、48 及 72 h 分别从两组鱼摘取 5 尾鱼的脾脏和头肾进行后续分析, RNA 提取及 cDNA 合成方法同 1.1。

1.3 红笛鲷 *LITAF* 基因 cDNA 全长的扩增

1.3.1 红笛鲷 *LITAF* 基因引物的设计

首先根据已报道的大西洋鲑 (*Salmo salar*, BT056544)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, JX162559) 与裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*, BT083097) *LITAF* 基因的保守区域设计简并引物 LsLITAF-DF 与 LsLITAF-DR (表 1), 从脾脏

cDNA 一链中扩增红笛鲷 *CTL* 基因的保守序列, 然后测序得到的序列设计 Ls-*LITAF* cDNA 全长的 RACE 引物。

1.3.2 红笛鲷 *LITAF* 基因片段的扩增

利用引物 LsLITAF-DF 与 LsLITAF-DR, 通过降落 PCR 扩增 Ls-*LITAF* 基因的片段。PCR 反应条件如下: 98 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s 5 个循环; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s 5 个循环; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s 25 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 反应产物切胶回收后与 PMD-18T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态, 阳性克隆送至上海生工测序。

1.3.3 红笛鲷 *LITAF* 基因 3' 与 5' 端扩增

利用 LsLITAF3'-F1、LsLITAF5'-R1 分别与试剂盒自带的 UPM Mix 引物进行 3' 与 5' RACE PCR 的第一轮扩增。反应条件为: 98 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 72 °C 2 min 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 2 min 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min 25 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。取第一轮 PCR 产物稀释 10 倍作为第二轮的模板, 用 LsLITAF3'-F2、LsLITAF5'-R2 分别与试剂盒引物 NUP 进行第二轮 PCR, 反应条件为: 98 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。余下步骤同 1.2.2。

表 1 实验中所用引物序列

Tab.1 Primers used in experiments

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 application
LsLITAF-DF	ACM DTGTGTCY CACTGCCAGCAG	保守片段扩增
LsLITAF-DR	TCAMATHCGHTTGTAKAHGTAGATGA	
LsLITAF3'F1	ACCATATTTGGGTGTTTTCTTTGCTGT	3'RACE-PCR
LsLITAF3'F2	CGTTCTGCATTCATTCCTGTCAAGA	
TLsLITAF5'R1	TGGCAGGATGGACAGCGATGCTCT	5'RACE-PCR
LsLITAF5'R2	CAGCAAAGAAAACACCCAAATATGGT	
RT- LsLITAF-F	TACCCTGGACCACCTGTGAACATG	
RT- LsLITAF-R	GCTGGCAGTGGGACACACAGTTTG	荧光定量 PCR
RT-Actin-F	GCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGA	
RT-Actin-R	CGCCTGAGTGTATGAGAAATG	

1.4 红笛鲷 *LITAF* 基因的序列分析

上述测序结果采用 DNAMAN5.2 软件进行拼接, 获得的 cDNA 序列通过 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行比对分析;

通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线分析结构域; 用 Genetyx 7 软件预测开放阅读框 (ORF) 的确定以及氨基酸序列; 信号肽预测用 SingalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)

SignalP/) 程序; 利用 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点; 应用 Clustal X2.0 及 MEGA 5 软件分别进行序列的多重比对与系统进化树构建。

1.5 实时荧光定量 PCR

根据红笛鲷 *LITAF* 基因的编码区序列设计荧光定量 PCR 引物 RT-LsLITAF-F 和 RT-LsLITAF-R(表 1), β -actin 为内参基因, 引物为 RT-Actin-F 和 RT-Actin-R(表 1)。荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L 2 \times SYBR Green qPCR SuperMix (Roche), 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 μ L 模板和 8.5 μ L 双蒸水, 每个样品设 3 个重复, PCR 反应参数: 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s 后, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。红笛鲷 *LITAF* 基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算, 通过 SPSS 11.0 软件对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 红笛鲷 *LITAF* 基因的 cDNA 克隆及序列分析

红笛鲷 *LITAF* 基因 cDNA 全长 815 bp, 命名为 Ls-LITAF (GenBank 登录号: KM275269), 5' 非翻译区 (5' UTR) 85 bp, 3' 非翻译区 (3' UTR) 283 bp, 其中包含一个加尾信号 AATAAA 和 poly(A) 尾; 开放阅读框 447 bp, 可编码 148 个氨基酸, 分子量大约为 15.7 ku。SMART 网站分析显示, 红笛鲷 *LITAF* 蛋白具有保守的 *LITAF* 功能结构域。经 SignalP 4.0 和 NetNGlyc 1.0 分析, 红笛鲷 *LITAF* 氨基酸序列中不含信号肽和糖基化位点 (图 1), 已报道的小鼠 (NP_064364)、人类 (NP_004853); 鸡 (NP_989598)、大西洋鲑 (ACM08416)、虹鳟 (NP_001158593)、裸盖鱼 (ACQ58825) *LITAF* 蛋白序列也具有相同的特征。

```

ACATGGGCAG
GACAAGGCAGCTCCAGGAAAAAGGGTGTAACTCCCCCTTTTGTGATGGAAAGTCACAATAAAGATTCTGAAG
ATGGA AAAAGGATACCCACCACAGGAGTCAGCTCCACCGTACCCTGGACCACCTGTGAACATATGGGGTCTCAG
M E K G Y P P Q E S A P P Y P G P P V N Y G G P Q
CCAGGGATGTACCCACAGCCAGGGATGTACCCACAGCCGGGCATGTCTGCAGGACCTCCACCTGCTGGATACCAA
P G M Y P Q P G M Y P Q P G M S A G P P P A G Y Q
GGAGGTGCTCCTTTTCTGCAGCCCCGGGTGCACCTGCCACAACAGTGACTCACGTGGTAGTAACACCTGCGCTG
G G A P F P A A P G A P A T T V T H V V V T P A L
CATGACGTGCGAGGACAACTGTGTGTCCTCCACTGCCAGCAGACAGTGATGACCCAGACAGACACAGCAGGC
H D V A G Q T V C P H C Q Q T V M T Q T E H T A G
CTGATGACCTGGGCCATCTGTGCTGGCCTACCATATTTGGGTGTTTCTTTGCTGTTGCATCCCGTTCTGCATT
L M T W A I C A G L T I F G C F L C C C I P F C I
GATTCCTGTCAAGATGTAGAGCATCGCTGTCCATCCTGCCACAAAGTCATCTACATATACAAGCGAATGTGAAAG
D S C Q D V E H R C P S C H K V I Y I Y K R M *
TATCCTGACTGTGGGTGGGAGAAGATCTGCTGCTGAGCCTGATCAGATCCTTATGTGCTGCAAGATCTTTT
GATATTGATCAAGTAATATAAAATGCACCTATTCTGCTGCTGACTCACTGAGTGGCTATCTGTGACCCCTTCC
TGCTATAATGAACCTCAATAATATATAGATATATATACAATGAGGCATTACACTGTGGGACTTATATTCG
TATTCATCGGTGAACATTTGTAATTCATATAAACCAATAAACATGTGTGCTGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 红笛鲷 *LITAF* 基因核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotid and deduced amino acid sequences of *L. sanguineus* *LITAF*

poly(A) 加尾信号 (AATAAA) 与 poly(A) 分别用下划线及加粗字体标出。LITAF 结构域用阴影表示。

The polyadenylation signal sequences (AATAAA) and poly(A) were underlined and shown in bold, respectively. Gray indicated the *LITAF* domain.

2.2 同源性比较和进化分析

红笛鲷 *LITAF* 氨基酸序列与其他物种该蛋白序列比对结果显示: 与斜带石斑鱼 *LITAF* 蛋白 (*E. coioides*, JX162559) 的相似度最高为 74%, 与人类 *LITAF* 蛋白的相似度最低 (*H. sapiens*, NP_004853) 仅有 37%。Ls-LITAF 蛋白还具有 8 个保

守的半胱氨酸, 功能结构域包含一个 CXXC 基序与一个 (H)_xC_{xx}C 基序 (图 2)。系统进化聚类分析表明, 鱼类 *LITAF* 与两栖类、鸟类、哺乳类 *LITAF* 蛋白亲缘关系较远, 红笛鲷 *LITAF* 蛋白与鱼类 *LITAF* 聚在一起, 与裸盖鱼和石斑鱼的亲缘关系较为接近 (图 3)。

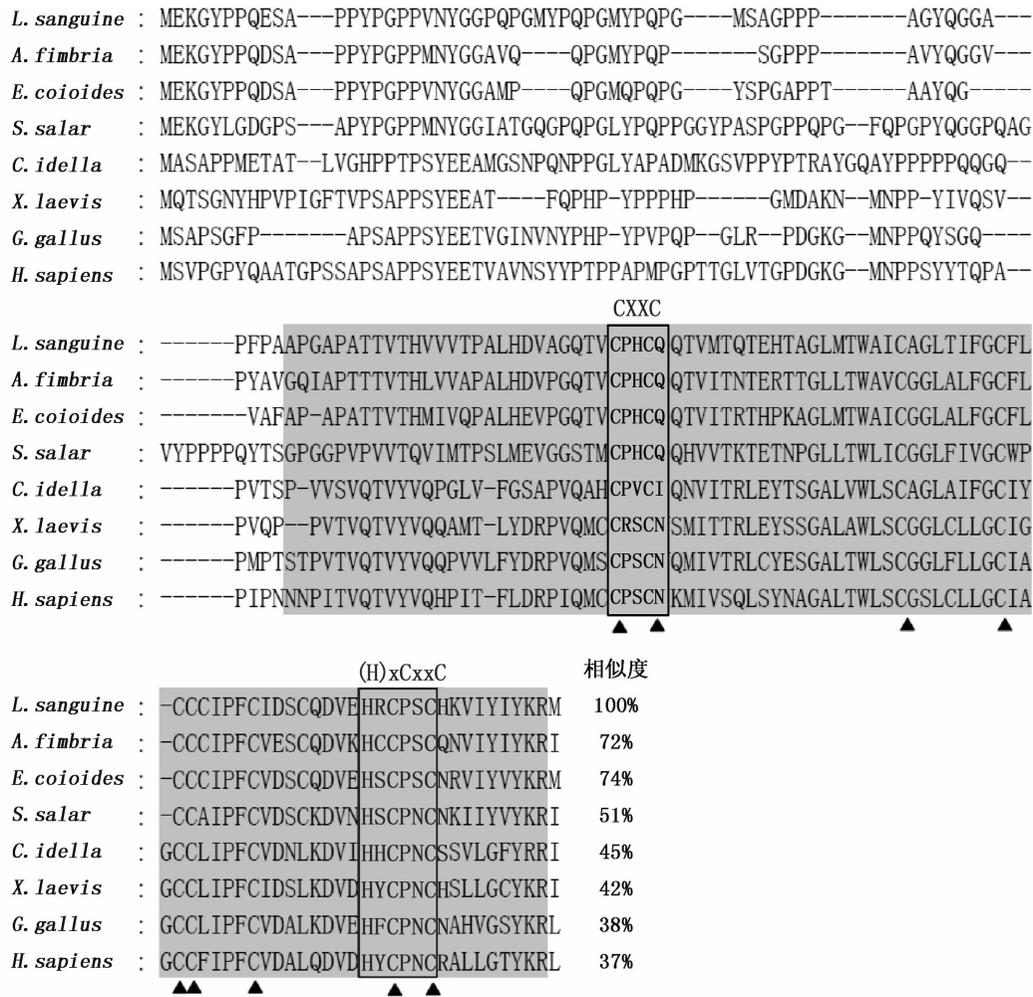


图 2 红笛鲷 *LITAF* 的氨基端序列与其他物种 *LITAF* 的氨基酸多序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of the predicted amino acid sequences of *L. sanguineus* *LITAF* with other *LITAF* amino acid sequences

LITAF 结构域用阴影表示;功能基序 CXXC 与 (H)xCxxC 用方框表示;八个保守的半胱氨酸用箭头表示。所有蛋白序列登录号见图 3。

The *LITAF* domains were shaded. The eight conserved cysteine residues were presented with arrows. The CXXC and (H)xCxxC motifs were indicated by black boxes. The accession numbers of the proteins used in this study are listed in Fig. 3.

2.3 红笛鲷 *LITAF* 基因的组织表达分析

以 β -actin 作为参照,采用实时荧光定量 PCR 技术对红笛鲷 *LITAF* 基因在健康鱼体中各组织的表达情况进行检测。如图 4 所示, *Ls-LITAF* 在所有检测的组织中均有表达,其中在鳃的表达量最高,其次是脾脏、皮肤和头肾,肝脏中的表达量最低。

2.4 哈氏弧菌感染后红笛鲷 *LITAF* 的表达变化

通过荧光定量 PCR 检测弧菌感染后对照组和实验组红笛鲷脾脏与头肾中 *LITAF* 基因的表达差异。结果表明,脾脏和头肾中 *Ls-LITAF* 在弧菌感染后 6 h 显著上调 ($P < 0.05$),感染 18 h 后 *Ls-LITAF* 在脾脏和头肾中的转录水平达到最高值(分别为对照组的 10.7 倍与 6.9 倍,见图 5)。

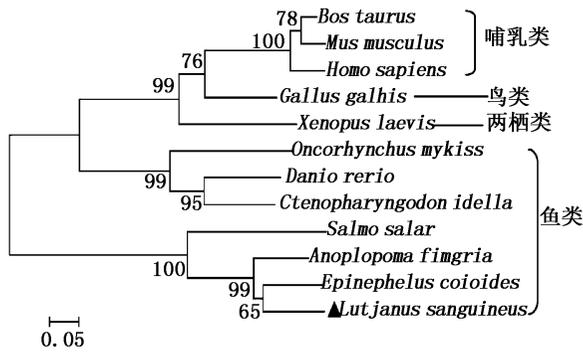


图3 红笛鲷 *LITAF* 与其他物种 *LITAF* 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *L. sanguineus* *LITAF* and *LITAF* from other species

Lutjanus sanguineus: 红笛鲷 (KM275269); *Mus musculus*: 小鼠 (NP_064364); *Bos taurus*: 牛 (NP_001039717); *Homo sapiens*: 人类 (NP_004853); *Gallus gallus*: 鸡 (NP_989598); *Xenopus laevis*: 爪蟾 (NP_001089805); *Ctenopharyngodon idella*: 草鱼 (FJ542044); *Epinephelus coioides*: 斜带石斑鱼 (AFP89359); *Danio rerio*: 斑马鱼 (NP_001002184); *Salmo salar*: 大西洋鲑 (ACM08416); *Oncorhynchus mykiss*: 虹鳟 (NP_001158593); *Anoplopoma fimbria*: 裸盖鱼 (ACQ58825)。

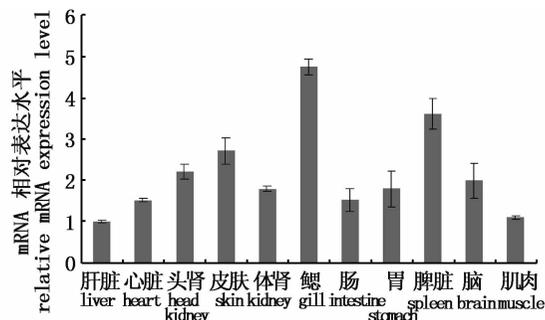


图4 红笛鲷 *LITAF* 在不同组织中的表达情况

Fig. 4 The expression of *L. sanguineus* *LITAF* in different tissues

3 讨论

本文通过同源克隆和 RACE PCR 获得了红笛鲷 *LITAF* 基因,其 cDNA 全长为 832 bp,开放阅读框为 447 bp,编码 148 个氨基酸。红笛鲷 *LITAF* 蛋白的 C 端具有 *LITAF* 家族高度保守的 *LITAF* 功能结构域,包含 CXXC 基序、(H)xCxxC 基序与 8 个保守的半胱氨酸,其他已报道的鱼类 *LITAF*、人类 *LITAF* 与鸡 *LITAF* 也含有这类基序,其中 8 个半胱氨酸可能对于蛋白高级结构的维持十分重要,而 CXXC 基序、(H)xCxxC 基序结合形成的结构能紧密结合 Zn^{2+} ,该类结构能介导 *LITAF* 与 STAT6B 形成功能复合物并转移到细胞

核内,从而发挥生物学功能^[2]。高度保守的功能域特征表明红笛鲷 *LITAF* 蛋白具有与其他 *LITAF* 蛋白相同或者相似的生物学功能。

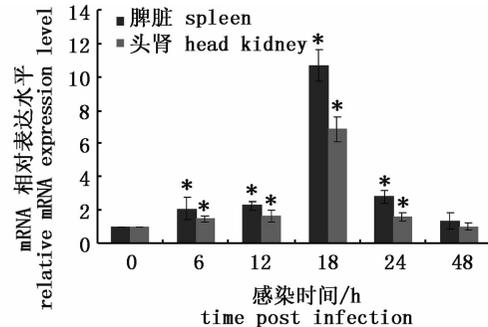


图5 哈氏弧菌感染后红笛鲷脾脏和头肾中 *LITAF* 基因的表达变化

Fig. 5 The expression changes of *LITAF* in spleen and head kidney of *L. sanguineus* post *V. harveyi* infection

* 表示对照组与实验组表达差异显著 ($P < 0.05$)。

* indicated there was significant differences between control group and experimental group ($P < 0.05$).

红笛鲷 *LITAF* 在健康鱼体中的不同组织中均有表达,这与人类、小鼠、鸟类以及其他鱼类 *LITAF* 的报道一致^[11-13,16-19]。红笛鲷 *LITAF* 在鳃、脾脏、皮肤与头肾的表达量较高,已报道的鱼类 *LITAF* 如条石鲷^[16]、斜带石斑鱼^[17]、牙鲆^[19]也有相似的组织分布情况。鳃和皮肤是鱼类抵御水体中病原侵染的重要屏障,包含淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞等免疫细胞;鱼类头肾、脾、肾则是鱼类免疫细胞如淋巴细胞、巨噬细胞产生、成熟并发挥免疫学功能的主要场所^[20]。因此,红笛鲷 *LITAF* 在上述组织的高表达表明该基因可能在多种免疫细胞中均有表达,且在抵御病原侵染的免疫反应过程中发挥着重要的作用。

本文应用哈氏弧菌感染红笛鲷后,*LITAF* 基因在头肾和脾脏中的表达量在感染后 6 h 均显著上调,随后在 18 h 达到峰值,与其他鱼类 *LITAF* 的研究结果不同,牙鲆 *LITAF* 在爱德华氏菌感染后,在头肾及脾脏中的表达量分别于 2 h 和 8 h 达到峰值^[19];而 HWANG 等用海豚链球菌感染条石鲷 5 d 后,脾脏中 *LITAF* 才达到峰值^[16],上述结果表明鱼类 *LITAF* 参与了宿主的抗菌免疫,而表达时序的差异可能是感染菌株、鱼种类与体质的不同等因素造成的结果。CAI 等^[17]的研究发现石斑鱼 *LITAF* 过表达能上调细胞中 $TNF\alpha$ 的表

达,暗示鱼类 *LITAF* 可能通过调节细胞因子的表达进而参与鱼体抵御病原侵染的免疫反应,因此下一步可采用体外转染、RNA 干扰、酵母双杂交等技术解析红笛鲷 *LITAF* 对细胞因子的调控作用及其分子机理,为更好地了解红笛鲷抗菌免疫提供新的思路。

参考文献:

- [1] TANG X R, FENTON M J, AMAR S. Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF- α promoter[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 4096-4101.
- [2] TANG X R, MARCIANO D L, LEEMAN S E, et al. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF- α factor, and STAT6 (B) with effects on multiple cytokines[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(14): 5132-5137.
- [3] PANG T, WANG J, BENICKY J, et al. Minocycline ameliorates LPS-induced inflammation in human monocytes by novel mechanisms including LOX-1, Nur77 and *LITAF* inhibition[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2012, 1820(4): 503-510.
- [4] TANG X R, YANG Y, AMAR S. Novel regulation of CCL2 gene expression by murine *LITAF* and STAT6B[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25083.
- [5] SRINIVASAN S, LEEMAN S E, AMAR S. Beneficial dysregulation of the time course of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha factor-deficient mice[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2010, 17(5): 699-704.
- [6] BERTOLO C, ROA S, SAGARDOY A, et al. *LITAF*, a BCL6 target gene, regulates autophagy in mature B-cell lymphomas[J]. British Journal of Haematology, 2013, 162(5): 621-630.
- [7] LIU J, XING H, CHEN Y, et al. PIG7, transactivated by AML1, promotes apoptosis and differentiation of leukemia cells with *AML1-ETO* fusion gene[J]. Leukemia, 2012, 26(1): 117-126.
- [8] ZHOU J, YANG Z, TSUJI T, et al. *LITAF* and TNFSF15, two downstream targets of AMPK, exert inhibitory effects on tumor growth[J]. Oncogene, 2011, 30(16): 1892-1900.
- [9] KOKKINAKIS D M, BRICKNER A G, KIRKWOOD J M, et al. Mitotic arrest, apoptosis, and sensitization to chemotherapy of melanomas by methionine deprivation stress[J]. Molecular Cancer Research, 2006, 4(8): 575-589.
- [10] ABBA M C, DRAKE J A, HAWKINS K A, et al. Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression[J]. Breast Cancer Research, 2004, 6(5): R499-R513.
- [11] MYOKAI F, TAKASHIBA S, LEBOR R, et al. A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor α gene expression: Molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(8): 4518-4523.
- [12] BOLCATO-BELLEMIN A L, MATTEI M G, FENTON M, et al. Molecular cloning and characterization of mouse *LITAF* cDNA: Role in the regulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression[J]. Journal of Endotoxin Research, 2004, 10(1): 15-23.
- [13] HONG Y H, LILLEHOJ H S, LEE S H, et al. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2006, 30(10): 919-929.
- [14] YANG S B, LI P F, MI Z X. LPS-induced TNF α factor (*LITAF*) in the snail *Cipangopaludina chinensis*: Gene cloning and its apoptotic effect on NCI-H446 cells[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 32(2): 268-272.
- [15] WANG P H, WAN D H, PANG L R, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily gene, TNF receptor superfamily gene and lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*) gene from *Litopenaeus vannamei* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 36(1): 39-50.
- [16] HWANG S D, SHIM S H, KWON M G, et al. Molecular cloning and expression analysis of two lipopolysaccharide-induced TNF- α factors (*LITAFs*) from rock bream, *Oplegnathus fasciatus* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 36(2): 467-474.
- [17] CAI J, HUANG Y H, WEI S N, et al. Characterization of LPS-induced TNF α factor (*LITAF*) from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1858-1866.
- [18] WANG H, SHEN X B, XU D, et al. Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Evidence for its involvement in antiviral innate immunity[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 538-545.
- [19] LI S, LI X J, GEN X Y, et al. Identification and characterization of lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2014, 157(3/4): 182-189.
- [20] 姚一彬, 刘臻, 鲁双庆, 等. 鱼类免疫因子作用机制及其应用[J]. 湖南饲料, 2011(3): 32-35.
- YAO Y B, LIU Z, LU S Q, et al. The mechanism and application of immune factor in fish[J]. Hunan Feed, 2011(3): 32-35.

Molecular cloning and expression analysis of *LITAF* in *Lutjanus sanguineus*

ZHENG Qi¹, CAI Jia^{1,2,3}, TANG Jufen^{1,2,3}, LU Yishan^{1,2,3}, WU Zaohe^{2,3}, JIAN Jichang^{1,2,3}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 3. Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524088, Guangdong, China)

Abstract: The lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*) gene was identified from humphead snapper (*Lutjanus sanguineus*) spleen using homologous cloning and RACE PCR, designated as *Ls-LITAF*. The full length cDNA of *Ls-LITAF* was 815 bp, contained an ORF of 447 bp encoding a polypeptide of 148 amino acids with predicted molecular mass of 15.7 ku. Sequence alignment showed that *Ls-LITAF* possessed a typical *LITAF* domain with a CXXC and (H)xCxxC motif, shared high similarities with other fish *LITAF* proteins. Phylogenetic analysis indicated that *Ls-LITAF* clustered closely with known fish *LITAF*s. *Ls-LITAF* was distributed in all analyzed tissues with higher expressions in gill, spleen, skin and head kidney. After *Vibrio harveyi* infection, the expression levels of *Ls-LITAF* were up-regulated significantly in spleen and head kidney. These results provided a reference to further investigate the roles of *Ls-LITAF* in immune response of *Lutjanus sanguineus*.

Key words: *Lutjanus sanguineus*; *LITAF*; cloning; expression analysis