

凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

赵永贞, 陈秀荔, 谢达祥, 王大鹏, 彭敏,
杨春玲, 杨彦豪, 韦嫔媛, 陈晓汉*

(广西水产研究所, 广西水产动物遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 克隆了凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因全长 cDNA 并进行了序列分析。该基因由 1 042 bp 的碱基组成, 开放阅读框长 411 bp, 编码由 136 个氨基酸组成的蛋白, 基因两翼分别存在 113 bp(5'端)和 518 bp(3'段)的非翻译区。聚类分析表明, 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白氨基酸序列与斑节对虾脂肪酸结合蛋白紧密聚为一支, 之后聚类顺序依次为刀额新对虾、意大利蜜蜂、斑马鱼、大西洋鲑、鸡、猪和人。通过半定量 RT-PCR 对该基因在不同组织的表达分析表明, 该基因在抗 IHHNV 对虾肠、胃、肝胰腺和肌肉组织中表达较高, 在心肌中表达较低, 在眼柄中不表达。比较该基因在抗 IHHNV 对虾和 IHHNV 易感对虾心、肝胰腺、肠、胃、眼柄和肌肉组织表达发现, 该基因在两种对虾心、肠、胃和肌肉组织中的表达无明显差异, 但在肝胰腺中抗 IHHNV 对虾的表达量明显高于 IHHNV 易感对虾的表达量, 说明该基因参与抗性对虾抑制 IHHNV 感染的免疫过程。

关键词: 凡纳滨对虾; 脂肪酸结合蛋白; 基因克隆; 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

脂肪酸结合蛋白(fatty-acid-binding protein, FABPs)属于胞内脂质结合蛋白超家族成员, 是一类低分子量的胞浆蛋白质, 其分子中氨基酸数量介于 126 ~ 137 个, 分子量在 15 ku 左右。FABPs 广泛存在于脊椎和无脊椎动物的组织细胞内, 其可以特异性地结合细胞内疏水配基和游离氨基酸, 负责胞内脂肪酸的转运和吸收, 参与脂肪酸的代谢, 调节基因的表达和细胞的生长^[1]。FABPs 在人巨噬细胞、单核细胞等免疫细胞中不同程度的表达, 表明其还可能参与机体的免疫过程^[2-3]。大量的研究表明, FABPs 基因存在于肌内脂肪含量相关的多态性位点^[4]。肌内脂肪含量是衡量肉质品质的一个重要指标, 因此在畜牧生产中已将 FABPs 作为控制肌肉品质的重要候选基因。

迄今, 人们对 FABPs 已有近 40 年广泛深入的研究, 但其成果主要集中于对脊椎动物的研究^[5]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世

界养殖产量最高的三大虾种之一, 已成为我国海水养殖的支柱产业。FABPs 通过调节胞内脂肪酸转运和吸收, 在调节细胞生长、免疫和控制肌内脂肪沉积等方面具有重要的作用。因此, 开展凡纳滨对虾 FABP 的基因功能研究, 对于揭示对虾生长、抗病和肌肉发育机理等方面具有重要的研究价值。然而, 目前尚无凡纳滨对虾 FABP 基因序列的报道。本研究克隆了凡纳滨对虾 FABPs 基因的全长 cDNA 序列, 并对其结构特征进行了分析, 研究其在抗对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus, IHHNV)对虾和易感对虾不同组织的表达模式, 为进一步研究 FABP 影响对虾生长、抗病和肉质品质等方面的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

特异性病原(specific pathogen free, SPF)和

收稿日期:2010-06-11 修回日期:2010-07-18

资助项目:国家科技支撑计划项目(2007BAD29B01, 2006BAD01A13, 2008BADB9B03);桂科基(0836028)

通讯作者:陈晓汉, E-mail:chenxhan@yahoo.com.cn

抗 IHHNV 凡纳滨对虾由广西水产研究所国家级凡纳滨对虾遗传育种中心提供;总 RNA 抽提试剂盒(SV Total RNA Isolation System)、RT-PCR 试剂盒(ImProm-II™ Reverse Transcription System)、pGEM-Teasy 载体、氨苄青霉素、X-gal、IPTG 购自 Promega 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物有限公司;SMART™ RACE cDNA Amplification Kit、Advantage® cDNA PCR Kit & Polymerase Mix、LA TaqDNA 聚合酶以及 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司,其它试剂均为国产分析纯;大肠杆菌 Top10 由本室保存。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

分别采取体重近 5 g 的 SPF 和抗 IHHNV 活体凡纳滨对虾的肝胰腺、肠道、心脏、肌肉、胃和眼柄等组织并迅速置于液氮中冷冻保存备用。按照 SV Total RNA Isolation System 操作说明提取总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证总 RNA 的完整性,使用 DNase 去除 RNA 中残存的 DNA,经 Smartspe plus 核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度后,按照 ImProm-II™ Reverse Transcription System 操作说明合成 cDNA 第一链用于基因中间序列扩增和半定量 RT-PCR 检测。利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第一链,用作基因 3'和 5'端序列快速扩增的模板。

1.3 脂肪酸结合蛋白基因 cDNA 片段的克隆及测序

参考 GenBank 公布的斑节对虾(*Penaeus monodon*) FABP 基因全长 CDS 序列(DQ459988),应用 Primer5 软件设计一对引物 FABP1 和 FABP2,由北京三博远志生物技术有限公司合成,用于扩增凡纳滨对虾 FABP 的基因片段。其引物的序列为 FABP1: 5'-ATGAAGGCTCTGGG-TGTTG-3', FABP2: 5'-CCGTAGTCCCAGTCAT-ATCC-3'。采用 50 μL PCR 反应体系进行脂肪酸结合蛋白基因 cDNA 片段的扩增,在 PCR 反应管中分别加入:cDNA 1 μL,10 μmol/L 的上、下游引物各 1 μL,2 × GC Buffer 25 μL,2.5 mmol/L 的 dNTPs 8 μL,5 U/μL 的 La TaqDNA 聚合酶 0.5 μL,灭菌超纯水加至 50 μL,置于 PCR 仪中进行扩增。PCR 扩增程序为 94 °C 3 min,(94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1.5 min) × 35 cycles,72 °C 3 min。取 PCR 扩增产物 2 μL 在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果后,按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒

操作说明纯化回收 PCR 特异性扩增产物,并连接至 pGEM-Teasy 载体,重组质粒转化至大肠杆菌 Top10,阳性克隆经菌液 PCR 初步鉴定后由北京三博远志生物技术有限公司测序。

1.4 脂肪酸结合蛋白基因 5'和 3'端 cDNA 片段的克隆及测序

以获得的脂肪酸结合蛋白基因片段为模板设计用于 5'和 3'端 RACE 所需的引物 FABP-5' RACE 和 FABP-3' RACE,其引物序列分别为

FABP-5' RACE: 5' GCAGACAACGTCATCA-ACCTTGCACTC3';

FABP-3' RACE: 5' GACGGCGATACCTACA-CAATGAAGACG3'。

以 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第一链为模板,分别用 FABP-5' RACE 和 FABP-3' RACE 引物与 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物配对,并完全按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 FABP 基因 5'端和 3'端基因序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与 1.3 所述相同。

1.5 序列的拼接与生物信息学分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。将所得序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框(ORF)的预测与氨基酸序列的翻译。对推导出的蛋白序列通过 Protparam 软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白理化特性预测,使用 Interpro Scan 软件(<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>)进行蛋白质功能结构域分析,通过 Motif Scan 程序(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)分析蛋白质功能位点,使用 DNAMAN 软件进行不同物种 FABP 氨基酸序列比对和进化树制作。

1.6 半定量 RT-PCR

以已获得的基因序列为模板,利用 Primer5 软件设计一对引物 FABP3 和 FABP4 对感染 IHHNV 和抗性对虾肝胰腺、肠道等组织中 FABP 基因的表达进行检测,参照已公布凡纳滨对虾 β -actin 基因序列设计一对引物 actin1 和 actin2 进行扩增作为 FABP 基因半定量检测的内参,所需引

物序列分别为 FABP3: 5'-GGCAGGA-GCGTCAGTTGT-3', FABP4: 5'-GTCGCAGCG-TTACCCATC-3'; Actin1: 5'-CGAGAAATCGTT-CGTGAC-3', Actin2: 5'-GATGGAGTTGTAGGT-GGTCT-3'。半定量 RT-PCR 的扩增体系包括 cDNA 1 μ L, 10 μ mol/L 的上、下游引物各 1 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4 μ L, 5 U/ μ L 的 La *Taq*DNA 聚合酶 0.25 μ L, 灭菌超纯水加至 25 μ L。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min, (94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s) \times 25 cycles, 72 $^{\circ}$ C 3 min。取 PCR 扩增产物 5 μ L 用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因全长 cDNA 序列的克隆与序列分析

以通过 ImProm-IITM Reverse Transcription System 试剂盒合成的 cDNA 为模板, 利用引物 FABP1 和 FABP2 扩增获得了一条长约 616 bp 的特异性条带, 与预期大小相同(图 1)。

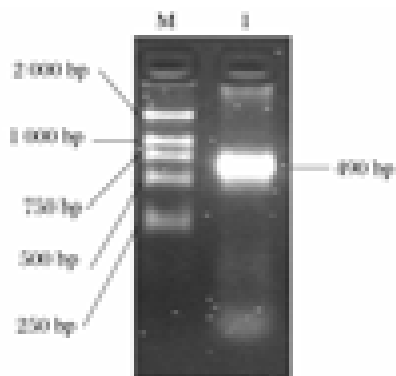


图 1 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因 cDNA 片段的扩增结果

M:DL2000 分子量标准; 1:FABP 基因的 cDNA 片段。

Fig. 1 The amplification result of *L. vannamei* FABP gene cDNA sequence

M:DL2000 ladder; 1: cDNA fragment of *L. vannamei* FABP gene.

以 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 为模板, 用 FABP-5'RACE 和 FABP-3'RACE 引物分别与 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物配对, 分别获得了一条长约 490 bp 和 790 bp 的特异性条带(图 2 和图 3)。

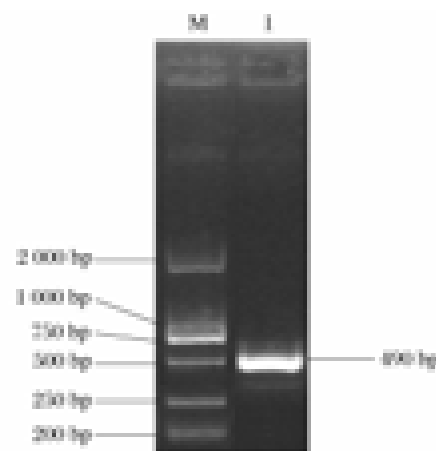


图 2 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因 5'RACE 扩增结果
M:DL2000 分子量标准; 1:FABP 基因的 cDNA 片段。

Fig. 2 5'RACE result of *L. vannamei* FABP gene
M:DL2000 ladder; 1: cDNA fragment of *L. vannamei* FABP gene.

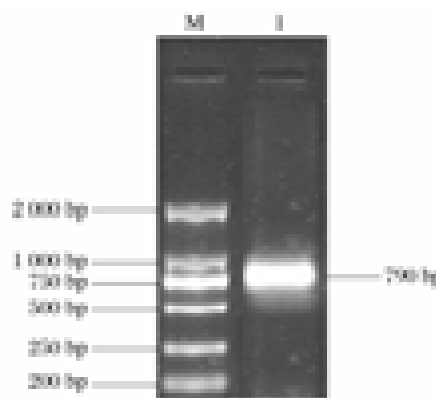


图 3 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因 3'RACE 扩增结果
M:DL2000 分子量标准; 1:FABP 基因的 cDNA 片段。

Fig. 3 3'RACE result of *L. vannamei* FABP gene
M:DL2000 ladder; 1: cDNA fragment of *L. vannamei* FABP gene.

将所得片段克隆测序并去除冗余序列后, 利用 DNASTar 中的 SeqMan 程序进行电子拼接, 获得一条长 1 042 bp 的序列, 将该序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对, 发现在 GenBank 数据库中没有凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因全长 cDNA 序列, 且只有 2 条序列与提交序列同源达到 80% 以上, 一条为斑节对虾脂肪酸结合蛋白基因(DQ459988), 与之同源性达到 94%, 另一条序列为刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*) 视黄醇结合蛋白基因(AF458289.1), 与之同源性达到 82%。根据 Kozak 规则和 NCBI 在线开放阅读框搜寻软件对该基因进一步分析, 显示该基因的开放阅读

框长度为 411 bp,其两翼分别存在 113 bp(5'端)和 518 bp(3'段)的非翻译区,在该基因的 PolyA 尾巴前 13 个碱基处存在一个可能的加尾信号序

列 ATTAAG。对开放阅读框中碱基组成分析发现,G、C 碱基的含量(47.93%)低于 A、T(52.07%)碱基的含量。

```

1 CTCACGAGG CAAAGCTGG TGGCAACA CCGAGCGG CAGGAGCGT CAGTTGTGA
55 ATCAACCGC CAAGCAGTT CACTACAGG TCTTGCGCA CCGAGCAA CCCCAGTG
100 AAAATGACC AAGATTGAA GGAAAGTTC AAGATGGAG AGCTCCGAG AACTTTGAC
    M A K I E G K F K M E S S E N F D
150 GAGTTCATG AAGGCTCTG GGTGTTGGC TTGGTGATG CGCAAGATG GGTAAACGCT
    E F M K A L G Y G L Y M E K M G N A
217 GCGACCCC ACCGTGAG ATCAACAA GACGGGAGT ACCTACACA ATGAAGA CG
    A T P T V E I T K D G D T Y T M E T
271 ACCAACCCT TTCAAGA CC ACAGAG ATC AAGTTCAAG TTGGGGGA G GAATTTGAA
    T T T F K T T E I E F K L G E E F E
325 GAGAACCAC GCTGATGGC CGGTTGTA AAGTCAACC ATTACTTTG GATGGCAAT
    E T T A D G R V V K S T I T L D G N
379 AAGCTAGT CACAAACAA GTTGGAGAC AAGGAGAA G AAAGAGAA G GATTCTGAG
    K L V H E Q Y G D K E K K E K D S E
433 CTTCTCGA GAATTCACC GACGACAAG ATGCTAATG GAGTGCAG GTTGATGAC
    L L R E F T D D K M L M E C E V D D
487 GTTGTCTGC AAGCGAGT TACTCTCGT TTAGAATAA ATCCAGCAA GTTATCTGC
    V V C K R V Y S E L E *
541 ACCCAAGTA TGGAAAGTG GTTACTTTA AATCTTAA G GAOCACACT ATAATTGAA
595 GATAAA ATT ATAATTTCT ATGTCAAAA TAAATTGAA TTGTAAA CT TTCCAAA G
649 ATAGG TTT GCAATTTT T ACATTCATC GTAAGCAGA TGTAGCATT TTATGGAAA
703 GGCTGGTTC CCTAAGGAA GTAAACACA TTATCCTAT TCACATCCC ATTTGGTTF
757 GCTCAAACT GTCTTGAG GCTTCATTA TTCTTCACT GTTCTCTTC AAATTTGAA
811 GAAAAA ATT CAGTTGATG TGTTFGTG GTTATGCTC TAAOCAAAG AAGGA AAAA
865 ACCCTAAGT ACAGTTTAT GGTAMAG T TACCAG AT TTTTTTTC ATTEAAA CA
919 AGTTTACTT GGATGAATG GCAAATGC AAGTGAGA G ATTAACATT TATATCTCT
973 TAGTCATT TGTAAACTT TATATATTA AATTGAAAC AAATTCAAA AAAAAAAA A
1027 AAAAAA AAAAAAAA

```

图4 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因和推导出的氨基酸序列

起始密码子(ATG)用方框表示,终止密码子(TAA)用下划线表示。

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino-acid sequence of *L. vannamei* FABP

Start codon ATG are framed and stop codon TAA are underlined.

2.2 编码蛋白组成和结构分析

利用 DNASTar 中的 Edisequce 程序将该基因编码序列翻译为相应的氨基酸序列,发现该基因编码一个由 136 个氨基酸残基组成的蛋白质,其分子量为 15.493 ku,等电点为 5.583。该蛋白包含 25 个碱性氨基酸(K,R)、27 个酸性氨基酸(D,E)、36 个疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,V)和 29 个极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y)。通过 Interpro Scan 软件对该蛋白进行结构域分析发现,该蛋白第 4~26、63~79 和 114~134 氨基酸残基间具有脂肪酸结合蛋白结构域特征,通过 Motif Scan 在线程序分析的结果显示整个氨基酸序列特征也与脂肪酸结合蛋白家族氨基酸序列特

征相符合,且在 73~76、133~136 氨基酸间存在可能的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(CK2-PHOSPHO_SITE),在 50~52、56~58 氨基酸间存在可能的蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC-PHOSPHO_SITE)。

2.3 编码蛋白序列比对以及进化树构建

通过 NCBI Blast 软件对该基因编码的氨基酸序列进行在线搜索,该序列与斑节对虾 FABP 氨基酸序列(ABE77154.1)的同源性最高为 98%,其次与刀额新对虾视黄醇结合蛋白氨基酸序列的同源性(AAL68638.1)为 88%,与意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)(NP_001011630.1)、大西洋鲑(*Salmo salar*)FABP 氨基酸序列(NP_001135371.1)以及斑

马鱼 (*Danio rerio*) (NP_999972.1)、鸡 (*Gallus gallus*) (NP_990639.1)、猪 (*Sus scrofa*) (NP_001020400.1) 和人 (*Homo sapiens*) FABP 7 氨基酸序列 (NP_001437.1) 的同源性依次为 57%、50%、

49%、51%、50%、50%。进化树分析表明,该序列与斑节对虾脂肪酸结合蛋白紧密聚为一支,之后聚类顺序依次为刀额新对虾、意大利蜜蜂、斑马鱼、大西洋鲑、鸡、猪和人(图 5)。

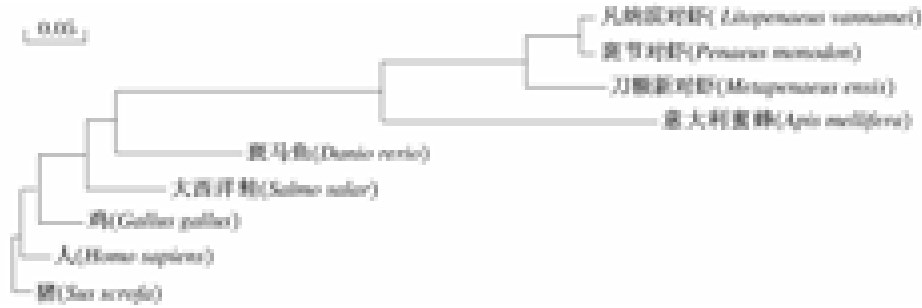


图 5 基于 FABP 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Homology phylogenetic tree based on amino acid sequence of FABP genes from some animals

利用 DNAMAN 软件对该基因编码的氨基酸序列与斑节对虾、意大利蜜蜂、大西洋鲑 FABP 氨基酸序列以及斑马鱼、鸡、猪和人 FABP 7 个氨基酸序列进行比对,发现所有比对蛋白在 13~26 和

57~82 间的氨基酸序列高度保守,其序列特征分别为 SXNFDXXMKXLGXG、FKXTEIXFXLGEEXEXTDXRXXKS,其间的部分序列甚至在所有比对物种间完全一致(图 6)。

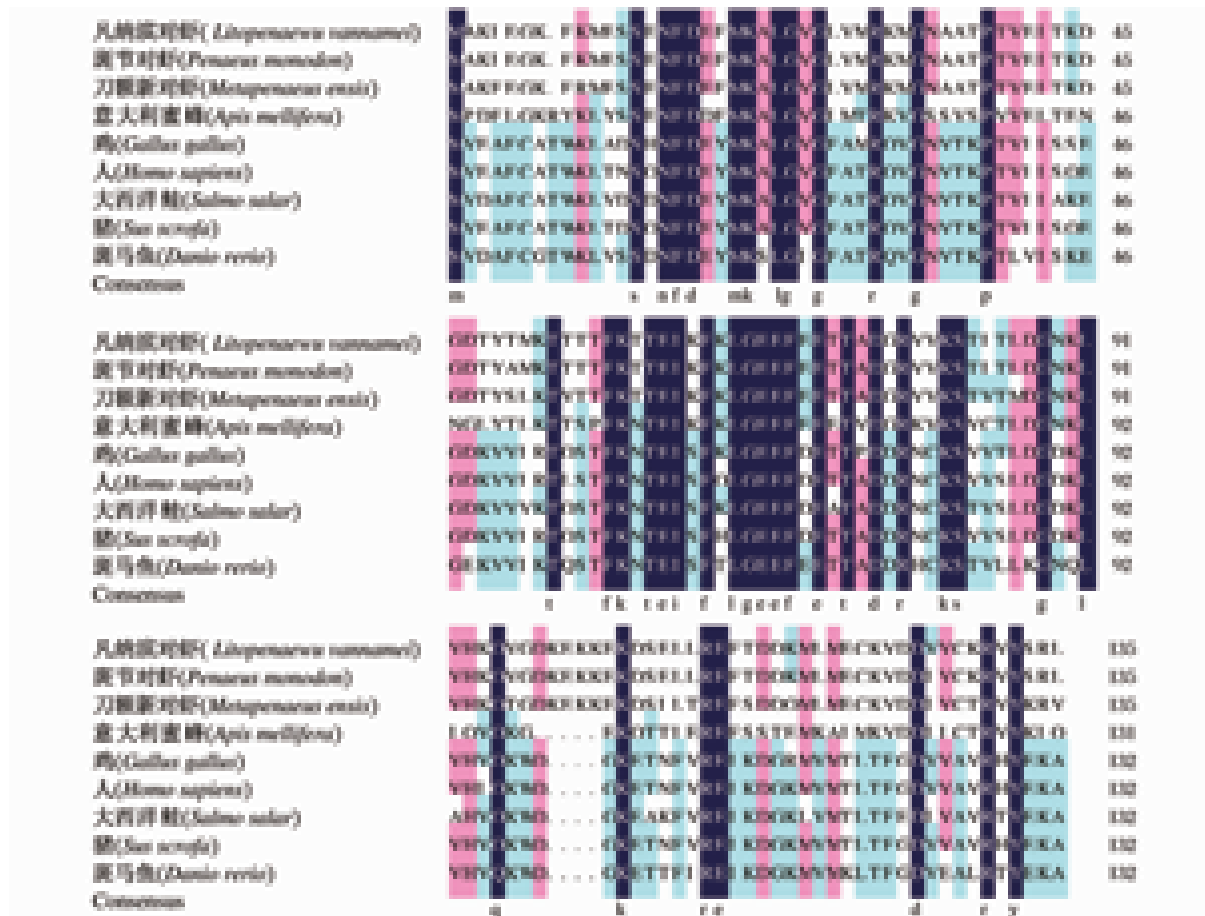


图 6 凡纳滨对虾 FABP 氨基酸序列与 8 种生物 FABP 氨基酸序列比对

Fig. 6 Amino-acid sequence alignment of *L. vannamei* FABP with different animals FABPs

2.4 凡纳滨对虾 FABP 基因的表达特征

通过半定量 RT-PCR 对该基因在未感染病毒对虾不同组织的表达分析表明,该基因在肠、胃、肝胰腺和肌肉组织中表达较高,在心肌中表达降低,在眼柄中不表达。进一步比较该基因在抗 IHHNV 对虾和 IHHNV 易感对虾心、肝胰腺、肠、胃、眼柄和肌肉组织中的表达发现,该基因在两种样品对虾心、肠、胃和肌肉等组织中的表达无明显差异,但在肝胰腺中,抗 IHHNV 对虾的表达量明显高于 IHHNV 易感对虾的表达量;在抗 IHHNV 对虾眼柄中无表达,在 IHHNV 易感对虾眼柄中微弱表达(图 7)。

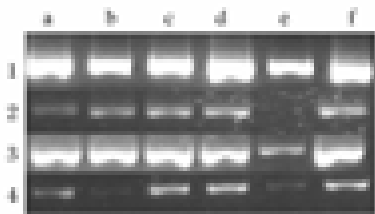


图 7 脂肪酸结合蛋白基因在 IHHNV 易感和抗性凡纳滨对虾不同组织的半定量检测

1: β -actin 基因在 IHHNV 抗性对虾不同组织半定量检测结果; 2: 脂肪酸结合蛋白基因在 IHHNV 抗性对虾不同组织半定量检测结果; 3: β -actin 基因在感染 IHHNV 对虾不同组织半定量检测结果; 4: 脂肪酸结合蛋白基因在感染 IHHNV 对虾不同组织半定量检测结果。

a: 心脏; b: 肝胰腺; c: 肠道; d: 胃; e: 眼柄; f: 肌肉。

Fig. 7 Semi-quantitative PCR analysis of FABP gene in different tissues of IHHNV-infected and IHHNV-resistant *L. vannamei*

1; Semi-quantitative PCR analysis of β -actin gene in different tissues of IHHNV-resistant *L. vannamei*; 2; Semi-quantitative PCR analysis of FABP gene in different tissues of IHHNV-resistant *L. vannamei*; 3; Semi-quantitative PCR analysis of β -actin gene in different tissues of IHHNV-infected *L. vannamei*; 4; Semi-quantitative PCR analysis of FABP gene in different tissues of IHHNV-infected *L. vannamei*.

a; heart; b; hepatopancreas; c; intestinal; d; gastric; e; eyestalk; f; muscle.

3 讨论

Ockner 等^[6]分离出了第一个 FABPs 基因,近 40 年世界各地的学者对脊椎动物 FABPs 的基因序列、结构、基因功能、蛋白三维结构以及进化关系等方面开展了广泛而深入的研究,而对无脊椎动物 FABPs 的研究则相对滞后。自第一个无脊椎动物

FABP——沙漠蝗虫 (*desert locust, S. gregaria*) 的 FABP 克隆以来,迄今已鉴定出 30 多个无脊椎动物的 FABP^[7]。本研究从凡纳滨对虾肝胰腺组织克隆获得一段 1 042 bp 的序列,该序列与 GenBank 数据库仅有的 2 条虾类 FABP 类基因——斑节对虾脂肪酸结合蛋白基因 (DQ459988) 和刀额新对虾视黄醇结合蛋白基因 (AF458289. 1) 具有较高的同源性,但与斑节对虾脂肪酸结合蛋白基因的同源性更高,达 94%,与刀额新对虾视黄醇结合蛋白基因的同源性为 82%。该基因开放阅读框长 411 bp,编码的蛋白质在第 4~26、63~79 和 114~134 氨基酸残基间具有明显的脂肪酸结合蛋白结构域特征。氨基酸序列比对发现,该基因编码的蛋白质与斑节对虾脂肪酸结合蛋白氨基酸序列的同源性高达 98%,同样具有比视黄醇结合蛋白更长的第二 a-螺旋三维结构^[8]。由此确定本研究获得的序列为凡纳滨对虾 FABP 基因序列。

FABPs 是细胞内脂肪酸结合蛋白多基因家族成员,广泛存在于脊椎和无脊椎动物组织细胞内,在脊椎动物和无脊椎动物分化前由一个共同的基因分化而来^[5]。本研究将克隆所得基因的氨基酸序列与斑节对虾、意大利蜜蜂、大西洋鲑、斑马鱼、鸡、猪和人的 FABP 进行比对和进化树分析,该序列与斑节对虾脂肪酸结合蛋白紧密聚为一支,之后聚类顺序依次为刀额新对虾、意大利蜜蜂、斑马鱼、大西洋鲑、鸡、猪和人,表明该蛋白从节肢动物到冷血脊椎动物到哺乳动物的进化过程,符合动物进化从低等到高等的进化规律。

吸收和转运疏水性基团是所有活细胞最基本的生命活动。通过特异性结合长链脂肪酸和其他疏水性配基,从而参与细胞内脂肪酸转运、吸收和代谢则是 FABPs 最基本的生物学功能。脊椎动物 FABPs 在包括肝、胰、肌肉和免疫细胞等多种组织细胞中表达,行使不同的功能^[8]。本研究检测了凡纳滨对虾不同组织中 FABPs 的表达,该基因肠、肝胰腺中的表达量较高,在眼柄中不表达,与斑节对虾相应组织中的表达结果相一致^[7],而相反的结果是该基因在凡纳滨对虾肌肉组织中表达较高,而在斑节对虾肌肉组织中不表达。在牛、猪、和鸡等高等动物,不同基因型的 FABPs 以及不同的表达水平与肌肉组织中脂肪的沉积显著相关^[9-12],FABPs 在凡纳滨对虾肌肉组织中也高效表达,但该基因上单核苷酸突变或表达水平的差异是否与肌肉组织

中的脂肪沉积有关还需要进一步的研究。

IHHNV 是危害对虾养殖经济效益的主要病毒之一,通过抑制对虾表皮细胞的正常生长导致对虾罹患慢性矮小残缺综合症 (runt-deformity syndrome, RDS),其通过垂直和水平传播方式把病毒传给下一代和其他种群^[13]。研究凡纳滨对虾对 IHHNV 的抗病机理具有重要的经济意义,但目前人们对 IHHNV 感染机理方面的研究甚少。FABPs 在具有免疫活性的脊椎动物免疫细胞中表达较高^[2-3],Zeng 等^[14]通过抑制性消减杂交技术 (suppression subtractive hybridisation, SSH) 研究克氏螯虾 (*Procambarus clarkii*) 感染白斑病毒前后血淋巴中的基因表达差异,发现对虾感染 IHHNV 后血淋巴组织中 FABPs 的表达上调,Zhao 等^[15]应用 SSH 技术研究白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 易感和抗性凡纳滨对虾肝胰腺中差异基因的表达时发现, FABP 基因在抗性对虾的肝胰腺中的表达上调,这些研究结果暗示 FABPs 可能具有免疫方面的功能。本研究以广西国家级凡纳滨对虾遗传育种中心提供的易感和抗性凡纳滨对虾为材料,比较了不同类型对虾不同组织中 FABPs 的表达情况,结果该基因在两种对虾肌肉中的表达无明显差异,说明该基因没有参与 IHHNV 感染或抑制感染对虾肌上皮细胞生长的过程。然而, FABPs 在抗 IHHNV 对虾肝胰腺中的表达量明显高于在易感对虾中的表达量,由此推断该基因参与抗性对虾抑制 IHHNV 的感染过程,但具体功能需要更深入的研究。

参考文献:

- [1] Zimmerman A W, Veerkamp J H. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(7): 1096 - 1116.
- [2] Makowski L, Boord J B, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis [J]. Nat Med, 2001, 7: 699 - 705.
- [3] Schachtrup C, Scholzen T E, Grau V, et al. L-FABP is exclusively expressed in alveolar macrophages within the myeloid lineage: evidence for a PPAR alpha-independent expression [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 2042 - 2053.
- [4] 徐海霞, 房兴堂, 陈宏, 等. 脂肪酸结合蛋白及其主要家族基因的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2008, 40 (1): 94 - 97.
- [5] Haunerland N H, Spener F. Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations [J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(4): 328 - 349.
- [6] Ockner R K, Manning J A, Poppenhausen R B, et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues [J]. Science, 1972, 177: 56.
- [7] Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins [J]. Comp Biochem Physiol, 2006, 142(3-4): 262 - 274.
- [8] Söderhäll I, Tangprasittipap A, Liu H P, et al. Characterization of a hemocyte intracellular fatty acid-binding protein from crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. The FEBS Journal, 2006, 273(13): 2902 - 2912.
- [9] Brandsteyer A M, Sauerwein H, Veerkamp J H, et al. Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle [J]. Livestock Production Science, 2002, 75(2): 199 - 208.
- [10] Gerbens F. Association of heart and adipocyte fatty acid binding protein gene with intramuscularly fat content in pigs [J]. J Anim Sci, 2001, 79(2): 347 - 354.
- [11] 叶满红, 曹红鹤, 文杰, 等. 北京油鸡和矮脚鸡心脏型、脂肪型脂肪酸结合蛋白基因多态性的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(5): 422 - 426.
- [12] 王启贵, 李宁, 邓学梅, 等. 鸡细胞外脂肪酸结合蛋白基因单核苷酸多态性与腹脂性状的相关研究 [J]. 中国科学(C辑), 2001, 31(3): 266 - 270.
- [13] Lighmer D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures of diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996: 304.
- [14] Zeng Y, Lu C P. Identification of differentially expressed genes in haemocytes of the crayfish (*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus by suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2009, 26(4): 646 - 650.
- [15] Zhao Z Y, Yin Z X, Weng S P, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2007, 22 (5): 520 - 534.

Cloning and analysis of full length cDNA of intracellular fatty-acid-binding protein in *Litopenaeus vannamei*

ZHAO Yong-zhen, CHEN Xiu-li, XIE Da-xiang, WANG Da-peng, PENG Min, YANG Chun-ling, YANG Yan-hao, WEI Pin-yuan, CHEN Xiao-han*

(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Health Cultivation of Guangxi, Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Abstract: Full-length cDNA sequence of fatty acid-binding protein was isolated from hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*. The full-length cDNA sequence of fatty acid-binding protein is 1 042 bp, which contains a 113 bp 5'-UTR (untranslated region), 518 bp 3'-UTR (untranslated region), and 411 bp open reading frame (ORF) that encodes 136 amino acid residues. There are typical fatty acid-binding protein domains between 4–26 and 63–79 amino acids residues of *Litopenaeus vannamei* FABP (LvFABP), and these sequences highly conserve in *L. vannamei*, *Metapenaeus ensis*, Italian bee, zebra fish, Atlantic salmon, chicken, swine, human. The phylogenetic analysis based on amino acid sequence shows that LvFABP has the highest similarity (98%) with black tiger shrimp FABP, and has 88%, 57%, 50%, 49%, 51%, 50%, 50% identity with cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP) of *Metapenaeus ensis*, FABP of Italian bee, zebra fish, Atlantic salmon, chicken, swine, human, respectively. The expression of the gene in different tissues was analyzed by semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR), the result shows that the expression of the gene was higher in intestinal, gastric, hepatopancreas, muscle tissues, and the expression was decreased in myocardium, and undetectable in eyestalk of normal shrimp tissue. Comparing the expression of the gene in myocardium, hepatopancreas, intestinal, gastric, eyestalk, muscle of IHHNV-resistant shrimp to IHHNV-infected shrimp, there was no obvious difference in myocardium, intestinal, gastric and muscle tissues between two kinds of shrimps, but the expression of FABP in hepatopancreas of IHHNV-resistant shrimp is higher than IHHNV-infected shrimp, which showed FABP involves in the immune process inhibiting shrimp from being infected by IHHNV.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; fatty acid-binding protein; gene cloning; infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus

Corresponding author: CHEN Xiao-han. E-mail: chenxhan@yahoo.com.cn