

中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征

孙杰^{1,2,3}, 王宝杰^{1,2}, 李晓华¹, 孙姝娟^{1,2}, 刘梅¹, 蒋克勇¹, 王雷^{1*}

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 山东省花生研究所, 山东 青岛 266100)

摘要:利用 3'和 5'RACE 技术从中国明对虾血细胞中克隆了一个酚氧化酶原基因 FCproPO, FCproPO 基因 cDNA 全长为 2 311 bp, 其中开放阅读框 2 061 bp, 编码 687 个氨基酸, 预测分子量为 78.71 ku。推测的序列与凡纳滨对虾同源率为 84%, 与日本囊对虾同源率为 71%。RT-PCR 实验结果表明, FCproPO 在血细胞中的相对表达量最高, 在心脏和精巢中几乎不表达。序列分析发现 FCproPO 含有两个保守的铜离子结合位点; 进化分析发现 FCproPO 与斑节对虾、日本囊对虾、凡纳滨对虾等海水虾的酚氧化酶原亲缘关系最近。该基因在被鳃弧菌和对虾白斑病毒(WSSV)感染后的对虾肝胰腺中的表达量显著增加, 并具有不同的时空表达趋势, 提示中国明对虾 FCproPO 基因在免疫反应中具有重要作用。

关键词:中国明对虾; 酚氧化酶原; 基因克隆; 表达

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国北方重要的海水养殖种类, 近年来, 各种病害的流行, 给对虾养殖业带来了严重损失^[1]。为降低病害发生, 减少经济损失, 国内外围绕对虾免疫机制和对虾基因组展开了大量研究并取得了一系列成果, 包括免疫基因的发现^[2-3], 以及一系列免疫相关因子的分离纯化与基因克隆和表达研究, 例如酚氧化酶^[4]、抗菌肽^[5]、溶菌酶^[6]、蛋白酶抑制剂^[7]、凝集素^[8-9]等, 对虾的免疫调控机制也开始受到人们的重视。

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)又称为酪氨酸酶(tyrosinase, EC1.14.18.1), 它是一种含铜的酶, 能够催化单酚羟化成二酚(如多巴), 并把二酚氧化成醌, 醌在非酶促条件下形成最终的反应产物黑色素^[10]。在无脊椎动物中, PO 一般以无活性的酶原形式——酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)存在, 无活性的 proPO 在丝氨酸蛋白酶作用下转变成具有活性的 PO。酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase-activated system, proPO-AS)是由 proPO、PO、丝氨酸蛋白

酶、模式识别蛋白和蛋白酶抑制剂构成的一个复杂的级联反应系统(这一过程类似于高等动物中的补体激活途径)。在节肢动物中, 酚氧化酶具有多种功能, 它不仅参与黑色素形成、角质的硬化和伤口愈合, 而且在宿主的防御反应中还作为非自身识别系统发挥作用^[11-13]。本研究通过 RACE 方法克隆了中国明对虾中酚氧化酶原基因的全长 cDNA, 将其命名为 FCproPO(GenBank 登录号:FJ594415), 它含有 3 个血蓝蛋白保守结构域和 2 个铜离子结合位点。同时对 FCproPO 与其他酚氧化酶原基因进行了相似性比对并对其进行了序列分析、结构预测以及微生物感染后表达量的变化等一系列相关研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国明对虾购自青岛南山水产品批发市场, 体长 15~16 cm, 为海捕虾。实验前在水族箱中充气暂养 10 d, 使其适应实验室内养殖环境。自对虾腹部头胸甲后以 5 号针头插入围心窦取血,

收稿日期:2009-03-05

修回日期:2009-07-28

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100311); 国家自然科学基金项目(30600458)

通讯作者:王雷, E-mail:wanglei@ms.qdio.ac.cn

按照 1:1 比例加入抗凝剂^[14],置于离心管(4 ℃ 预冷)后立即用 800 × g 离心 10 min,上清液为血清,沉淀为血细胞。分离出血细胞,用 RNA guard 保存,-70 ℃ 冰箱中保存备用。提取总 RNA 的试剂盒为 Invitrogen 公司产品。Realtime-PCR 采用上海生工(Sangon)的 Hot Start Fluorescent PCR Core Reagent Kits 试剂盒,DNA 胶回收试剂盒购于 Sangon。逆转录酶及其他主要试剂为 Promega 公司和 TaKaRa 公司产品。3',5' RACE PCR 扩增是使用 Clontech 的 Smart Race 试剂盒进行的。PCR 的扩增引物由上海生工公司合成。大肠杆菌 TOP10 菌株、鳃弧菌菌株由本实验室保存。

1.2 总 RNA 分离以及 cDNA 合成

中国明对虾血细胞总 RNA 分离利用 Trizol 试剂按试剂盒所述方法进行,总 RNA 的完整度和纯度通过凝胶电泳进行检测。RNA 的浓度根据 OD₂₆₀ 进行定量。使用 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) 去除总 RNA 中残留的基因组 DNA。cDNA 合成体系如下:在 20 μL 的反应体系中加入 1.0 μg 总 RNA,5 × MMLV 缓冲液 4.0 μL,2.5 mmol/L dNTP 4.0 μL,50 ng oligo-dT,20 units RNase 抑制剂(Promega)和 200 units MMLV 反转录酶(Promega)。轻弹管壁使其混匀,稍离心。42 ℃ 反转录 1 h,95 ℃ 5 min 灭活反转录酶。合成的 cDNA 直接作为 PCR 反应的模板,-20 ℃ 保存备用。

1.3 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 片段的克隆

从 GenBank 获得了凡纳滨对虾酚氧化酶原基因(EU373096.1),斑节对虾酚氧化酶原基因(AF099741.1,AF521948.1)序列,并根据此序列设计一对简并引物 Prosl 和 Proal,引物由上海生工公司合成。以中国明对虾血细胞 cDNA 为模板,以 Prosl 和 Proal 为引物,进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25 μL,扩增条件:94 ℃ 变性 2 min,1 个循环;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,1 个循环;4 ℃ 保存。PCR 产物均用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小,0.5% EB 染色,凝胶成像仪观察。扩增的 PCR 产物使用上海生工公司生产的 PCR 产物回收试剂盒进行纯化,并克隆到 pMD18-T 载体(大连宝生物公司),重组质粒转化到大肠杆菌 TOP10 菌株,产生的阳性克隆经 PCR

验证后测序。

1.4 cDNA 5'和 3'末端的扩增

对测序结果进行网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)比对,以上实验得到的酚氧化酶原部分序列与其它物种的酚氧化酶原同源,根据此测得序列再设计正向(ProRace3-1, ProRace3-2)、反向(ProRace5-1, ProRace5-2)共 4 条引物用于 RACE 扩增其 cDNA 全长序列。3',5' RACE PCR 扩增是使用 Clontech 的 Smart Race 试剂盒进行的,PCR 产物的分离纯化测序等方法如上所述。

1.5 生物信息学分析

cDNA 序列使用 NCBI BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行比对分析,使用 Translate 软件进行 cDNA-蛋白翻译(<http://au.expasy.org/tools/dna.html>),对推导出的蛋白序列使用 Protparam 软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白理化特性预测,Smart 软件预测功能域,采用 Clustal W 软件进行多序列比对分析。不同来源的酚氧化酶原基因利用 Clustal W 创建一个多序列的比对结果,系统发生和进化的分析在比对的基础上用 MEGA 3.0 软件^[15]完成,系统树采用 Neighbor-joining 方法构建^[16]。

1.6 Realtime-PCR 相对定量分析中国明对虾酚氧化酶原 mRNA 的组织分布特征

根据测序所得的中国明对虾酚氧化酶原的 cDNA 序列设计了一对引物 Proreal1s 和 Proreal1a 用于 Realtime-PCR 检测。提取健康的中国明对虾不同组织(包括血细胞、心脏、鳃、肝胰脏、肠、表皮和精巢)的 RNA,按照前述反转录的方法分别合成 cDNA 进行实时荧光定量 PCR,取不同组织 cDNA 各 1 μL, β -actin 基因作为内标,利用前面的 PCR 反应条件,以 40 个循环扩增目的基因和内标基因片段,来检测不同对虾组织中酚氧化酶原 mRNA 的表达情况。采用上海生工的 Hot Start Fluorescent PCR Core Reagent Kits 试剂盒进行。反应体系 25 μL:SYBR(R) Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μL,ddH₂O 10.5 μL,稀释的 cDNA 1 μL。反应条件:94 ℃ 变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,40 个循环;4 ℃ 保存,PCR 产物送测序以确保其为预期的目的基因片段。每个组织的样品设 3 次重复。

用 Line-Gene K 软件分析处理 PCR 结果(采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法),数据用 Spss 10.0 软件统计处理。

1.7 Realtime-PCR 相对定量分析对虾白斑病毒刺激后中国明对虾酚氧化酶原 mRNA 的表达变化

选取暂养的健康对虾若干尾进行 WSSV 感染实验,实验前随机挑选 5 尾,提取基因组 DNA 用 PCR 检测证实没有 WSSV 感染。用 WSSV 粗提液从对虾最后腹节进行注射,每只虾注射 20 μL 。对照组中,每只虾注射等体积 PBS 缓冲液 (pH 7.4),无任何注射的对虾作为空白组(0 h)。注射后 3、6、12、24、48 h 分别取虾 4 尾,取对虾的肝胰腺,切成小块,用于总 RNA 提取。分别提取刺激后不同时间段中国明对虾肝胰腺总 RNA,按照前述反转录的方法分别合成 cDNA。取不同刺激时间段的稀释后的 cDNA 各 1 μL , β -actin 基因作为内标,利用前面所述的 PCR 反应条件,以 40 个循环扩增目的基因和内标基因片段,来检测不同刺激时间段中酚氧化酶原 mRNA 的表达情况。

反应体系、反应条件及数据处理及分析同上所述。

1.8 Realtime-PCR 相对定量分析鳗弧菌刺激后中国明对虾酚氧化酶原 mRNA 的表达变化

选取暂养的健康对虾若干尾进行鳗弧菌感染实验,实验用鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 于实验前一天活化菌种,在 LB 培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,使用前用无菌生理盐水洗下。将鳗弧菌煮沸灭活后配成 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的菌悬液备用。实验时用菌悬液从对虾最后腹节进行注射,每只虾注射 20 μL 。对照组中,每只虾注射等体积 PBS 缓冲液 (pH 7.4),无任何注射的对虾作为空白组(0 h)。注射后 3、6、12、24、48 h 分别取虾 4 尾,取对虾的肝胰腺,切成小块,用于总 RNA 提取。提取刺激后不同时间段中国明对虾肝胰腺总 RNA,反转录合成 cDNA。取不同刺激时间段的稀释后的 cDNA 各 1 μL , β -actin 基因作为内标,利用前面所述的 PCR 反应条件和反应体系,来检测不同刺激时间段中酚氧化酶原 mRNA 的表达情况。数据处理及分析方法如上所述。

表 1 实验中主要相关引物

Tab.1 Primers used in the experiments

引物名称 primers	引物序列 primer sequences
基因特异性引物 gene-specific primers	
Prosl (forward)	5'-CCTCGGIGTTTGTGATGG-3'
Proal (reverse)	5'-ATTTC AACGGCGGTCTG-3'
ProRace3-1	5'-GCAGGTGAACAACAGCGGTAAAGGGAT-3'
ProRace3-2	5'-GGGGACGAGGCAGGACGATACCAA-3'
ProRace5-1	5'-CTGCCITTTATCCCTTTACCGCTGTTG-3'
ProRace5-2	5'-TGGTAATTGAAGGGCTCGTGGTC-3'
Proreall s (forward)	5'-GTGACCCAACGA ACTACC-3'
Proreall a (reverse)	5'-CACAGAAA ACTGACCCCA-3'
β -actin 引物 β -actin primers	
AF (forward)	5'-TATGCCCTCCCTCACGCTAT-3'
AR (reverse)	5'-GCCAGACTCGTCGTATTCT-3'

2 结果

2.1 中国明对虾酚氧化酶原全长 cDNA 特征及蛋白结构预测

从中国明对虾血细胞提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳(图 1)可见 28S、18S、两个条带,说明降解不严重,可以满足后续实验的要求。利用同源序列设计的引物 Prosl 和 Proal 进行 PCR 扩增得到一 500 bp 的 cDNA 片段,将其克隆到 T 载体并

转化大肠杆菌 Top-10F,挑取阳性克隆检测后测序。将测序结果做网上搜索比对 (Blastx),显示与已登录的凡纳滨对虾酚氧化酶原基因 (EU373096.1),斑节对虾酚氧化酶原基因 (AF099741.1, AF521948.1) 具有一定的同源性。再根据测得的片段序列设计 RACE 用引物 ProRace3-1, ProRace3-2, ProRace5-1 和 ProRace5-2 分别进行 3'-RACE 和 5'-RACE。过 3' RACE 得到一条 1185 bp 的 cDNA 片段,其中包含终止密码子

(TAA),多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA)和 polyA 尾。通过 5'RACE 得到一条 1 047 bp 的片段。在 5'端上游区域 GCCGCTCAGCATGC 序列中包含一个可能的翻译起始位点(ATG),它在一定程度上符合 Kozak 规则中共有序列的特征(图 2)。3'和 5'RACE 扩增获得的 cDNA 序列拼接获得了中国明对虾酚氧化酶原基因全长,命名为 FCproPO(GenBank 登录号:FJ594415),软件分析表明完整的 cDNA 包含一个 2 061 bp 的开放阅读框(ORF),编码 687 个氨基酸;3'UTR 为 19 bp,5'UTR(非编码区)为 228 bp,其中包括一个终止密码子和 polyA 尾(图 3)。从氨基酸序列分析得知,中国明对虾酚氧化酶原的理论等电点(pI)为 6.30,计算分子量为 78.71 ku。在成熟肽中,亮氨酸所占比例最高(8.89%),其次为天冬氨酸(7.73%)和精氨酸(7.43%)。

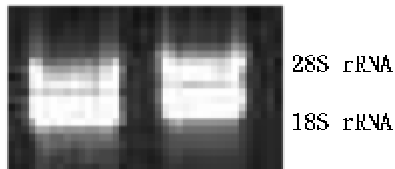


图 1 中国明对虾血细胞总 RNA 电泳图谱
Fig.1 The pattern of total RNA of haemocytes from *Fenneropenaeus chinensis*

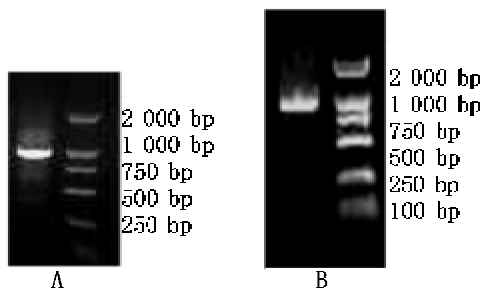


图 2 中国明对虾酚氧化酶原基因 3'和 5'RACE 结果电泳图谱
A:3'RACE 结果电泳图谱;B:5'RACE 结果电泳图谱
Fig.2 The pattern of the cloned prophenoloxidase gene fragments by 3' and 5' RACE from *Fenneropenaeus chinensis*
A: Electrophoresis of 3'RACE products, B: Electrophoresis of 5'RACE products.

SMART(simple modular architecture research tool)分析推断的氨基酸显示 FCproPO 是酚氧化酶原家族中的一个成员。该蛋白含有 3 个串联的血蓝蛋白结构域 hemocyanin-N 结构域(残基 75 位~135 位),hemocyanin-M(残基 144 位~418

位)结构域和 hemocyanin-C 结构域(残基 424 位~681 位)(图 4),该结构域被认为是酚氧化酶原的功能结构域。蛋白分析软件发现,在 FCproPO 的 3 个血蓝蛋白结构域中共有 2 个铜离子结合位点(图 3),铜离子结合位点 A(CuA)位于保守区域 I、II 中,铜离子结合位点 B(CuB)位于保守区域 III 中。这些 FCproPO 铜离子结合位点中保守的组氨酸在蛋白中的位置分别为 212, 216, 238, 372, 376, 和 412,在图 3 中用星号标出。通过与其他甲壳动物酚氧化酶原基因比对得到的 5 个保守区域用下划线在图 3 中标出。

2.2 FCproPO 基因同源序列分析

BlastP 程序网上比对发现 FCproPO 蛋白序列与其它物种的酚氧化酶原具有一定的相似性。它与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (ABY81277.1)酚氧化酶原有 84% 的相似性,与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) (ABO73223.1)酚氧化酶原有 71% 的相似性,与斑节对虾(*Penaeus monodon*) (AAM77689.1)有 67% 的相似性。通过网上搜索其同源序列,利用 ClustalW 对中国明对虾 FCproPO 和其它酚氧化酶原蛋白的保守的血蓝蛋白结构域之间的进行多序列比对。FCproPO 的 Hmocyanin-M 和 Hmocyanin-C 分别与凡纳滨对虾酚氧化酶原的 Hmocyanin-M 和 Hmocyanin-C 有 59% 和 74% 的相似性,与斑节对虾(*Penaeus monodon*)的酚氧化酶原有 57% 和 66% 的相似性,与龙虾(*Homarus americanus*)的酚氧化酶原(Q6DN47)有 55% 和 54% 的相似性,与短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*)的酚氧化酶原(Q8MUI3)有 58% 和 66% 的相似性。

实验比对了 31 个不同的酚氧化酶原序列并计算了它们的氨基酸相似性,我们利用 MEGA 软件对这些序列进行了分子系统学分析,在构建了系统发生树的基础上研究了中国明对虾 FCproPO 和其它酚氧化酶原之间的进化关系(图 5)。结果显示不同物种来源的酚氧化酶原之间是保守的并且在一定程度上是相关的。从系统进化树上可以看到 ProPO 被分为两个分支。中国明对虾 FCproPO 与凡纳滨对虾,斑节对虾,日本囊对虾,龙虾(AAT73697.1),淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*) (CAA58471.1),克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) (ABR12412.1),锯缘青蟹

(*Scylla serrata*) (ABD90511.1) 等甲壳动物的酚氧化酶原分为一个亚群。意大利蜂 (*Apis mellifera*) (NP_001011627.1), 疟蚊 (*Anopheles gambiae*) (AAC27383.1), 家蝇 (*Musca*

domestica) (AAR84669.1), 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) (ABU98653.1), 埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) (XP_001663691.1) 等昆虫纲动物的酚氧化酶原属于另外一个亚群。

```

ttgaaacgaggtcgcgcgccatggataagagtcagaagaacctgagttaacctgttcgagttg
      M D K S Q X N L M Y L F E L
ccttacgactccatcagcctccctcgcagcggggggaaggtecacttcgatgtcgaaast
P Y D S I S L P R S G G K V I F D V E N
gatgtctcgcggccccgggtgggtcgcacagagccttgsegggcgggtatccccgtggaaacg
D V S R P P V V A T R L G G G I P V E T
algccagtgcccgatcgcgggagglcccttacaasaacctgggcacccgccaccaccgtg
M P V P D R G D V P L Q N L G T A T C V
cccccttgctcgcctctctcctctctcctcaagacgcctcgtcaggccgccaaaggacctc
P L G S P F S F F I K T H R Q A A K D L
tggcagcttctcaatgaaaacgagagaaccgcggaggccctccatgcaangtggcagcggcggcgtg
C D V P M K T K N A E D L L Q V A A R V
catggccatgtgaaagagaagcctgtaacatctacgccctctctctctcctcctcctcagaag
I G H V N E T L Y I Y A L S F V I L R K
aaagacccttcgtaacagccgtctcgcggagcataatcgaagtgtttcccggaatcttacc
X E L R N S R L P S I I E V F P G K F I
cttcaagaanaactaatggaaagcacaattggaaatcaaccgatccgcccttaatgagttct
L Q E X L Y E A C L E I N R S D P N E S
acgcccaatttggtggagcaccgactcgaatttgccgggacacagctgaagcctgagcac
T P I V V E H G I E F A G T Q L K P E H
cgccctgacctacggagggaggactataggcatcaaccgcccaaccacggcactggccaccctc
R L S Y W R E D Y G I N A H E W H W H L
      I * *
gltctaccctatcgatattggatgltcaaccaagaccgggaaggagaactglttctactacatg
V Y P I D Y D V N Q D E K G E L F Y Y M
caccagcagatgatcgcaggtaagacatggagcgcctctgcctgggtctcccgaggggtg
I Q Q M I A R Y C W E E L C I G L P R V
* II
cagaagctcgagaactggcgagctcctatcgatgaccggatacttctcaaaagctcaccgtg
Q K L E N W R A P I D D G Y F S K L C V
aataactcaggagagctttgggggaccgaggcaggacgataccaaaatgcaccactttcag
N N S G R A W G T R Q D D T K M H E F Q
cgaaatgacttcgggtctcgaacttcaccgaggtcaccgacctggagatctggcggtcccg
R N D F G L D F T E V T D L E I W R S R
alccctcgalgtatccaccaggatctcaatgacagtcagtcagggggaacagaglgatctc
I L D A I E Q G F M I D S Q G E R V C L
agcgatgacgtcacttcccgcaagegaggeatcgatatactcggcgatgtgttgagtc
S D D V T S R Q A R H E Y P R R C V G V
gattcaaatattagcgtaaattcccgttattacggtgacctccacacatgggtcattgtc
D S N I S V X S R Y Y G D L E N M G H V
      * *
cttctagcttctcgcgatgacctgacttcgcccaataggaggaatggctgctcatgggtl
L L A P S E D P D F A H K E E M A V X G

```

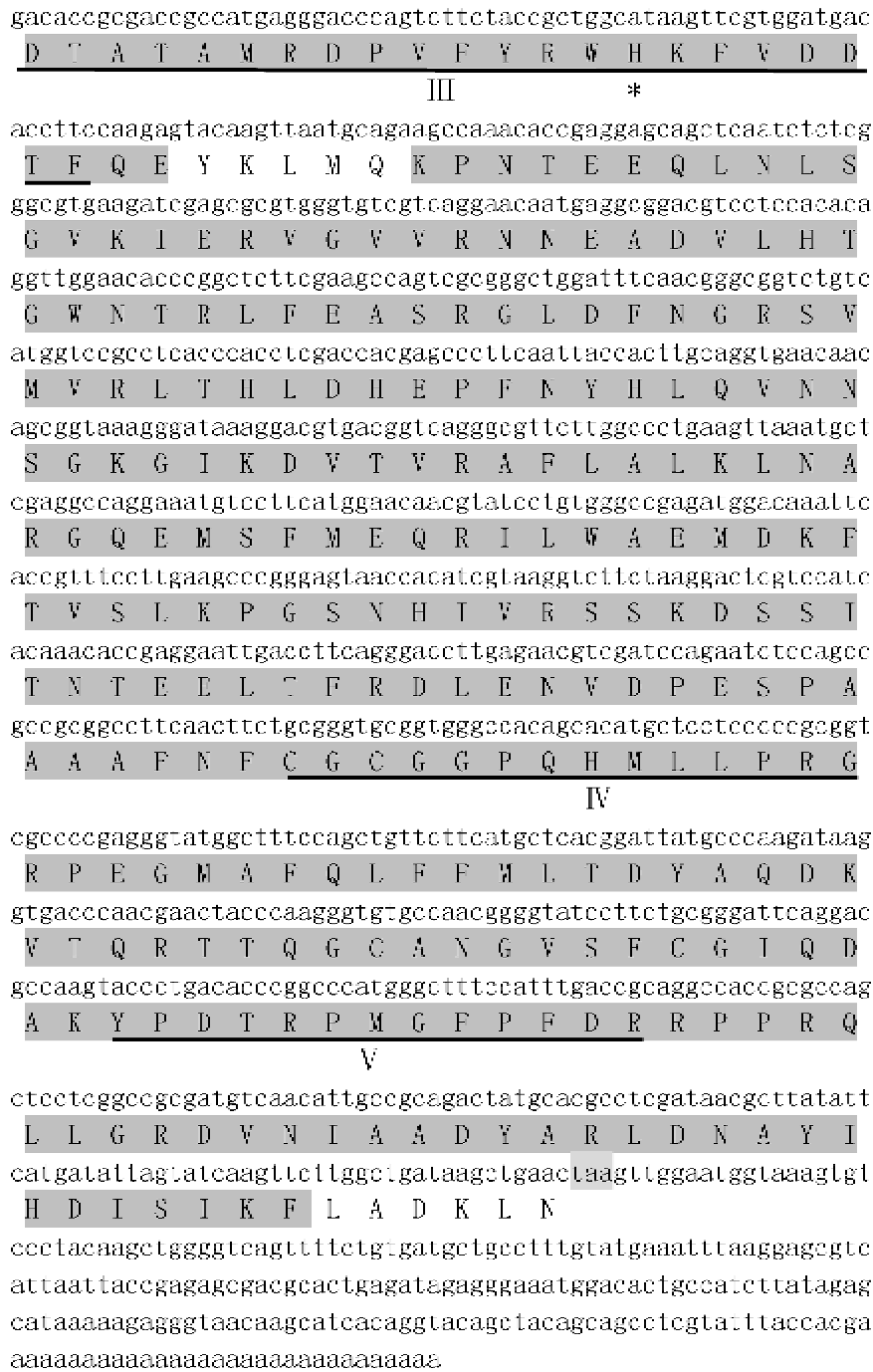


图3 中国明对虾中酚氧化酶原完整的核苷酸和推断的氨基酸序列

阴影中标示的分别为相应的起始密码子(ATG),终止密码子(TAA)。阴影中显示的为3个血蓝蛋白结构域,十足目动物酚氧化酶原的5部分保守序列用下划线标出,6个铜离子结合位点的组氨酸残基用星号标记。

Fig. 3 The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of proPO from *F. chinensis*

The letter in the shadow indicates the start codon (ATG), the stop codon (TAA). The three hemocyanin domains are shown in the shadow. Regions I - V are conserved domains among these arthropod proPOs. The six histidine residues within the copper-binding sites are indicated by asterisks

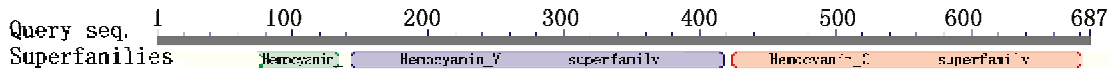


图4 中国明对虾酚氧化酶原中的3个串联血蓝蛋白结构域位置

Fig. 4 Distribution of three tandem hemocyanin domains of proPO from *F. chinensis*

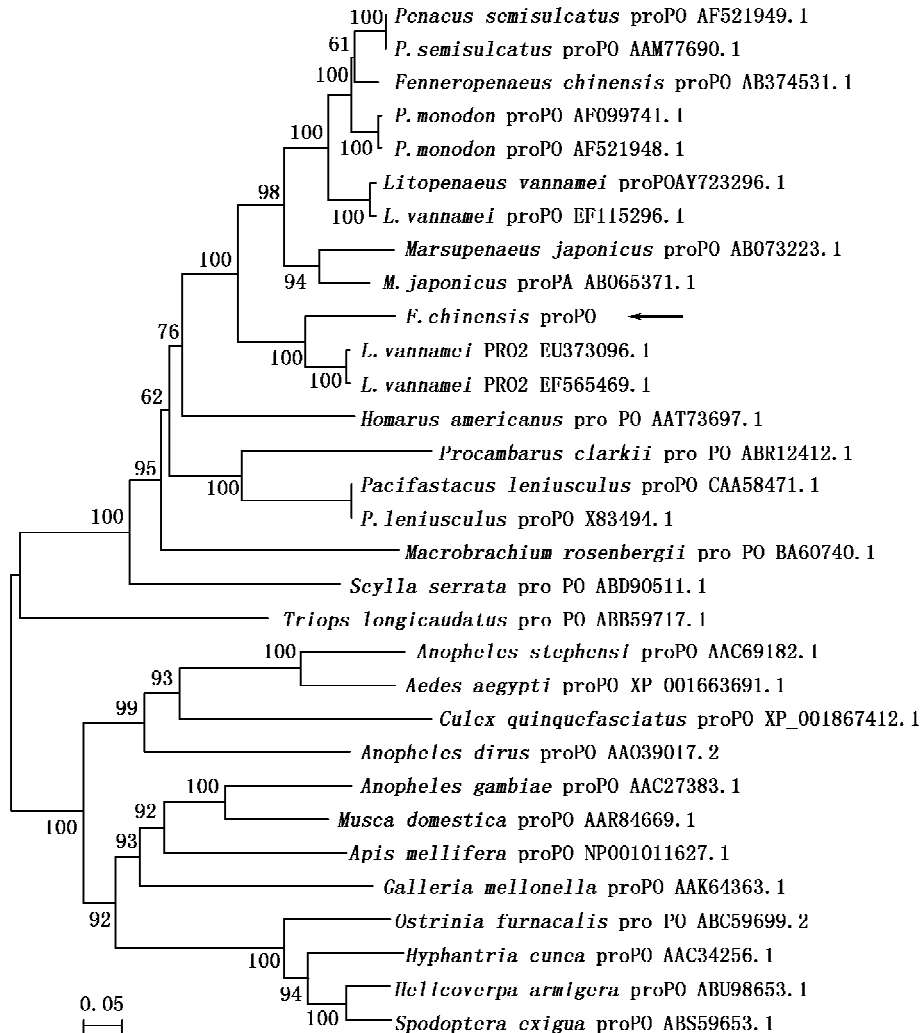


图5 利用 NJ 法绘制的 31 种甲壳动物和昆虫的酚氧化酶原基因进化树

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree of proPO amino acid sequences from 31 different species of Crustacea and Insecta.

2.3 中国明对虾酚氧化酶原 mRNA 的组织分布

利用 Realtime-PCR 相对定量方法分析了对虾酚氧化酶原 FCproPO mRNA 在不同组织中的表达,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理 PCR 结果,基因的表达特征图谱如图 6 所示。从图 6 中可以看到 FCproPO 基因在血细胞和肝胰腺中转录水平最高;在肠、表皮和鳃中有较弱表达,仅有微弱的 PCR 产物出现;而在心脏和精巢中几乎无表达。

2.4 微生物刺激后中国明对虾酚氧化酶原 FCproPO 基因的表达变化

鳃弧菌或 WSSV 刺激后中国明对虾酚氧化酶原 FCproPO 基因的表达特征图谱相类似(图 7,图 8)。FCproPO 表达量在感染后前 3 h 变化不大,在 6 h 达到峰值($P < 0.01$),接着在 6 h 以后基因的表达呈明显的下调,48 h 与空白对照表达量差别不大。尽管从图上看在 12 h 的表达量略高于

24 h,但它们之间并无显著性差异($P > 0.05$)。

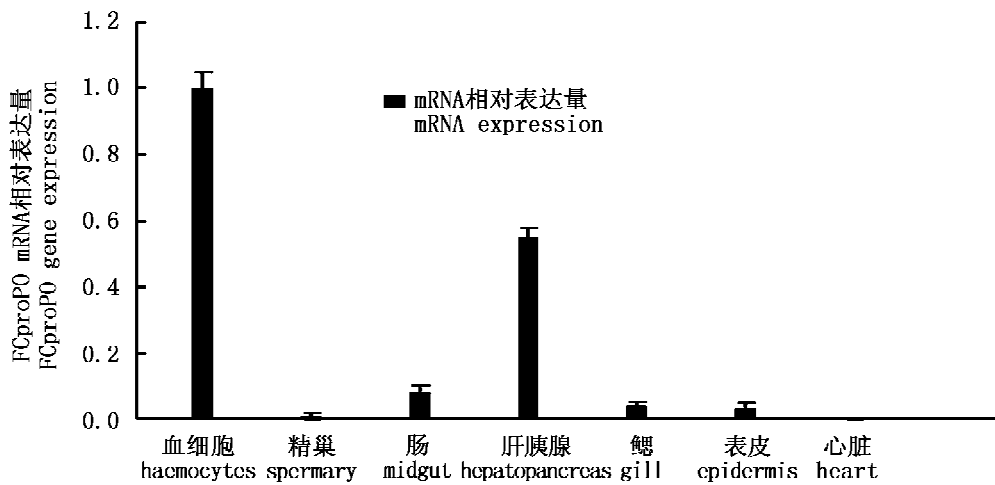


图 6 中国明对虾酚氧化酶原 FCproPO 在不同组织的表达情况

Fig. 6 Realtime-PCR analysis of FCproPO gene expression from different tissues of *F. chinensis*

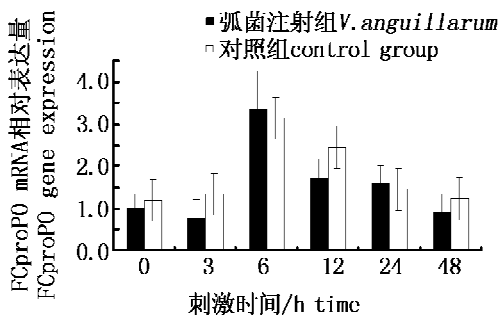


图 7 中国明对虾酚氧化酶原 FCproPO mRNA 应答鳃弧菌感染的时程表达分析

Fig. 7 Time-course expression analysis of FCproPO mRNA in *F. chinensis* haemocytes in response to the stimulation by *Vibrio anguillarum*

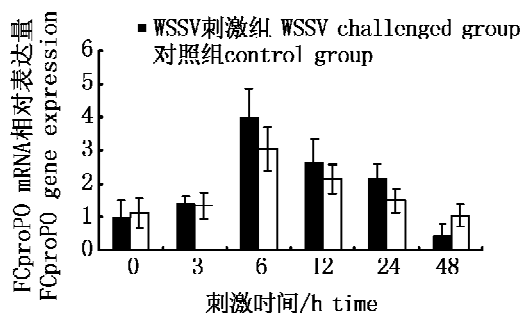


图 8 中国明对虾酚氧化酶原 FCproPO mRNA 应答 WSSV 病毒粗提液感染的时程表达分析

Fig. 8 Time-course expression analysis of FCproPO mRNA in *F. chinensis* haemocytes in response to WSSV challenge

3 讨论

酚氧化酶(酪氨酸酶)是一种含铜的酶,在自然界中广泛分布于动物、植物和微生物中,是黑色素形成的关键酶。在无脊椎动物中,该酶还参与一些免疫防御反应,如伤口愈合、病原或寄生虫侵入时的黑化等^[17]。由于酚氧化酶的这些重要作用,引起了越来越多的研究者的兴趣。他们用不同的研究手段从不同的物种中对其进行了深入的研究。在无脊椎动物中,许多酚氧化酶原基因全长已经得到克隆,其结构和表达特征正在被深入研究。在甲壳动物中已经有来自 15 种生物的 17 种酚氧化酶原基因被克隆。本研究利用同源序列进行克隆得到了中国明对虾的酚氧化酶原 FCproPO 的基因全序列。FCproPO 的 cDNA 包含一个 2 061 bp 的开放阅读框(ORF),编码 687 个氨基酸;BlastP 程序网上比对发现 FCproPO 蛋白序列与的凡纳滨对虾,日本囊对虾以及斑节对虾酚氧化酶原序列具有很高的相似性。

酚氧化酶原序列最显著的特征是两个被称为 CuA 和 CuB 的铜结合位点,该活性位点含有一对铜离子,每个铜离子都与 3 个保守的组氨酸残基结合^[18]。这对铜离子是酚氧化酶与分子氧和它的酚类底物相互作用的部位。将中国对虾 FCproPO 的 cDNA 片段推导的氨基酸序列与其他动物的酚氧化酶原序列进行比较发现 FCproPO 中含有两个公认的铜结合位点(图 3),铜离子结

合位点 A(CuA)位于保守区域 I、II 中,铜离子结合位点 B(CuB)位于保守区域 III 中。FCproPO 的结构中还发现 3 个保守的血蓝蛋白结构域,依次为 Hemocyanin-N, HemoCyanin-M 和 Hemoeynin-C,这再次证明甲壳动物和昆虫的 ProPO 都是血蓝蛋白家族的基因(图 4)。血蓝蛋白基因家族包括血蓝蛋白, cryptocyanin, ProPO 和 hexamerins,这四种蛋白在不同程度上都参加了节肢动物的蜕皮和氧化结合这两个重要功能^[19]。中国明对虾 FCproPO 和其它酚氧化酶原蛋白的保守的血蓝蛋白结构域之间具有较高的相似性,但 FCproPO 中的这 3 个血蓝蛋白保守结构域之间保守性并不强。另外,本研究发现 FCproPO 在进化上与斑节对虾、日本对虾、凡纳滨对虾等海水虾的酚氧化酶原亲缘关系最近,其次与淡水螯虾,克氏原螯虾等一些淡水虾的酚氧化酶原基因相关联;与棉铃虫,埃及斑蚊等昆虫纲动物的酚氧化酶原在分子进化上距离较远。

FCproPO 的表达具有组织特异性, Realtime-PCR 的结果显示 FCproPO mRNA 表达量在血细胞中最高,其次是肝胰腺,在肠、鳃和表皮中仅有少量表达。同样,在凡纳滨对虾^[20]和斑节对虾^[21]中克隆到的 4 种酚氧化酶原基因表达量最高的组织也是血细胞,说明对虾中酚氧化酶原的组织分布特点是与它的功能密切相关的。为了研究中国明对虾中酚氧化酶原和血蓝蛋白在免疫应答中的作用,本研究设计了细菌和病毒的攻毒实验,结果表明酚氧化酶原 FCproPO 在鳃弧菌和 WSSV 刺激后 mRNA 的表达量变化基本是一致的,在刺激后的 6 h mRNA 表达达到最大值,此时的表达量比空白组增加了 3~5 倍,并且有显著性差异,FCproPO 的高水平转录可能用来合成并补充那些参与与免疫应答而活化的酚氧化酶原蛋白。刺激后 6 h 到 48 h FCproPO 基因的转录是下降的,可能意味着这个阶段动物处在感染后的恢复期。类似的基因表达情况在鳃弧菌刺激后的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[22]中也有出现,但是在 WSSV 刺激后的斑节对虾中有所不同,其酚氧化酶原基因的表达在病毒感染后下调,12 h 最低,24 h 和 48 h 有所恢复^[21]。通过 FCproPO 的表达模式推测:中国明对虾的 FCproPO 作为一种重要的免疫因子,在清除病原的防御反应中,可能起着重要的作用。

目前在中国明对虾中共克隆到了两个酚氧化酶原的基因序列,与我们的 FCproPO 类似,另一个酚氧化酶原序列 ProPO(AB374531.1)也含有 3 个血蓝蛋白保守结构域,理论等电点 PI 为 5.86,分子量为 78.22 ku。ProPO 也含有有高度保守的 6 个组氨酸位点。两种酚氧化酶原的氨基酸序列仅有 29% 的相似性。推测两个酚氧化酶原基因在中国明对虾体内行使的功能可能有所不同。同样人们在凡纳滨对虾中也克隆到了两种不同的酚氧化酶原基因 LvproPO-1 和 LvproPO-2,二者序列有 72% 的相似性。两个基因都主要在血细胞中表达,在其他组织中表达量略有不同,二者的主要区别是 LvproPO-2 的表达量在对虾白斑病毒 WSSV 刺激后发生明显改变,提示 LvproPO-2 的功能可能还与抵御病毒入侵相关^[20]。在斑节对虾中也存在两个酚氧化酶原基因 PmproPO1(AF099741)和 PmproPO2(FJ025814),二者序列有 67% 的相似性。两个基因都主要在血细胞中表达,采用 RNA 干扰技术(RNAi)发现这两个基因在抵御弧菌入侵时都发挥作用^[21]。这种现象在所报道的昆虫酚氧化酶原基因中也是存在的,例如在烟草天蛾(*Manduca sexta*)中存在两种酚氧化酶原基因^[23-24],在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中存在 3 种酚氧化酶原基因^[25-26],在埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)中存在九种到十种的酚氧化酶原基因^[27]。现在关于为什么有些甲壳动物体内存在多种酚氧化酶原以及每种酚氧化酶原基因的具体功能的研究还不是很深入,可能有些酚氧化酶原基因在它们发育的不同阶段表达不同的功能,或者在它们生长的某个时期具有独立的或者协同的功能。

参考文献:

- [1] 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制[M]. 北京:海洋出版社,2001:104-133.
- [2] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25:565-577.
- [3] Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, et al. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by

- EST approach [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13(1):69–83.
- [4] Soderhall K, Cerenius L, Johansson M W. The prophenoloxidase activating system in invertebrates [M]//Soderhall K, Twanaga S, Vasta G R. *New Directions in Invertebrate Immunology*, Fair Haver: SOS Publications, 1996:229–253.
- [5] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:28398–28406.
- [6] Millar D A, Ratcliffe N A. *Invertebrates* Turner R J (editor). *Immunology, a comparative approach* [M]. England: John Wiley & Sons Ltd. 1994:29–68.
- [7] Jimenez-Vega F, Vargas-Albores F, Soderhall K. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(2):101–108.
- [8] Sun J, Wang L, Wang B L, *et al.* Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(2):292–299.
- [9] Sun J, Wang L, Wang B L, *et al.* Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25:290–297.
- [10] Lerh K. Protein and active-site structure of tyrosinase [M]//Bagnam J (ed). *Advances in Pigment cell research*, New York: Alan RLiss, 1988:85–98.
- [11] 王雷, 李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展 [J]. *海洋科学*, 1992, 16(3):18–19.
- [12] Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors [J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21(5):385–395.
- [13] Kanost M R. Serine proteinase inhibitors arthropod immunity [J]. *Dev Comp Immunol*, 1999, 23:291–301.
- [14] 蒋琼, 王雷, 罗日祥. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选 [J]. *水产科学*, 2001, 25(4):359–362.
- [15] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17:1244–1245.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4:406–425.
- [17] Ashida M, Yamazaki H. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation [M]//*Molting and metamorphosis*. Ohnishi E, Ishizaki H (eds). Berlin: Springer-Verlag, 1990:239–265.
- [18] Jackman M P, Hajnal A, Lerch K. Albino mutants of streptomyces glaucescens tyrosinase [J]. *Biochem J* 1991, 274:707–712.
- [19] Dong B, Liu F S, Xiang J H, *et al.* Expression profile of penaeidins from *F. chinensis* in response to vibrio and WSSV infection by realtime PCR [J]. *Acta Oceanol Sin*, 2005, 24(2):131–140.
- [20] Ai H S, Huang Y C, Li S D, *et al.* Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2008, 25:28–39.
- [21] Piti A, Walaiporn C, Anchalee T. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33:247–256.
- [22] Gai Y, Zhao J, Song L, Li C, *et al.* A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(2):156–167.
- [23] Hall M, Scott T, Sugumaran M, *et al.* Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:7764–7768.
- [24] Jiang H, Kanost M R. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta* [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:1082–1087.
- [25] Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, *et al.* Nucleotide sequence of the cDNA encoding prophenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:7769–73.
- [26] Asada N, Yokoyama G, Kawamoto N, *et al.* Prophenol oxidase A3 in *Drosophila melanogaster*: activation and the PCR based cDNA sequence [J]. *Biochem Genet* 2003, 41:151–63.
- [27] Waterhouse R M, Kriventseva E V, Meister S, *et al.* Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes [J]. *Science*, 2007, 316:1738–43.

The full length cDNA cloning and expression profile of prophenoloxidase of *Fenneropenaeus chinensis*

SUN Jie^{1,2,3}, WANG Bao-jie¹, LI Xiao-hua¹, SUN Shu-juan^{1,2},
LIU Mei¹, JIANG Ke-yong¹, WANG Lei^{1*}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China)

Abstract: Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is one of the most economically valuable and widely cultured species in China. During the last decade its development has been seriously affected on a regular basis by the outbreak of viral and bacterial diseases. To analyze the immune defense mechanisms of shrimp *F. chinensis*, a prophenoloxidase gene (FCproPO) was cloned from haemocytes of Chinese shrimp by Rapid Amplification Complementary DNA Ends (RACE) method. The full length cDNA of FCproPO consisted of 2 311 bp with a 2 061 bp Open Reading Frame (ORF), which encoded 687 amino acids, and the predicted molecular mass was 78.71 ku. It showed 84% and 71% homology with those of *Litopenaeus vannamei* and *Marsupenaeus japonicus*. The Realtime-PCR results showed that the expression level of FCproPO in haemocytes was highest among seven studied tissues. Sequence analysis showed FCproPO contained two conserved copper-binding sites. Phylogenetic analysis revealed that FCproPO and prophenoloxidase from *L. vannamei*, *M. japonicus* and *P. monodon* were in the same phylogenetic branches. Realtime-PCR analysis showed that the expression of FCproPO was up-regulated distinctly in the hepatopancreas of shrimp when they were challenged by *Vibrio anguillarum* and white spot syndrome virus (WSSV). FCproPO showed different expression profiles in the hepatopancreas during *V. anguillarum* or WSSV virus infection. The result implied that FCproPO might play an important role in the shrimp immune system.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; prophenoloxidase; gene cloning; expression analysis

Corresponding author: WANG Lei. E-mail: wanglei@ms.gdio.ac.cn