

中国明对虾血蓝蛋白基因cDNA的克隆与序列分析¹

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

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071, 2. 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 利用 3'和 5'RACE 技术从中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 肝胰腺中克隆了一个血蓝蛋白基因 FCHc, FCHc 基因 cDNA 全长为 2161bp, 其中开放阅读 2034bp, 编码 678 个氨基酸, 预测分子量为 77.59kDa。FCHc 序列与凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 血蓝蛋白同源性为 82%, 与日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicas* 同源性为 85%。Realtime-PCR 实验结果表明, FCHc 在肝胰腺中的相对表达量最高, 在心脏和表皮中几乎不表达。该基因在鳃弧菌和对虾白斑综合征病毒 (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 FCHc 基因在免疫反应中具有重要作用。

关键词: 中国明对虾, 血蓝蛋白, 基因克隆, 序列分析

cDNA cloning and sequence analysis of hemocyanin in

Fenneropenaeus chinensis

SUN Jie^{1,2} WANG Bao-jie¹ SUN Shu-juan^{1,2} LI Xiao-hua¹ JIANG Shan^{1,2}
LIU Mei¹ JIANG Ke-yong¹ Wang Lei¹

(¹ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

ABSTRACT A hemocyanin gene (FCHc) was cloned from hepatopancreas of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by Rapid Amplification Complementary DNA Ends (RACE) method. The full length cDNA of FCHc consists of 2,161bp with a 2,034 bp Open Reading Frame (ORF), which encoded 678 amino acids, and the predicted molecular mass was 77.59kDa. It showed 82% and 85% homology with those of *Litopenaeus vannamei* and *Marsupenaeus japonicas*. The real-time PCR results showed that the expression level of FCHc in hepatopancreas was the highest among seven studied tissues. Real-time PCR analysis showed that the expression of FCHc was up-regulated distinctly in the hepatopancreas of shrimp when they were challenged by *Vibrio anguillarum* and white spot syndrome virus (WSSV). FCHc showed different expression profiles in the hepatopancreas during *V. anguillarum* or WSSV virus infection. The results implied that FCHc might play an important role in the shrimp immune system.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis* Hemocyanin Gene cloning Sequence analysis

分类号: Q178.53

中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 是我国主要的海水养殖虾类之一。近十年来, 由于病毒病及细菌病的影响, 中国明对虾的育苗和养殖生产受到了严重威胁 (相建海, 2001)。目前, 虾类水产养殖业的发展及其养殖能力所面临的最大危险是日益严重的生态环境和病害问题 (樊廷俊, 2002; Moriarty, 1998; 许华等, 2008)。九十年代以来, 全球性虾类病害给虾类养殖业造成了巨大的经济损失, 因为使用抗生素等药物有安全性及抗药性等方面的考虑, 因此研究甲壳动物的免疫机制, 有效提高虾类本身的抗病能力, 是解决问题的根本之道, 从而引起了人们对虾类自身免疫防御系统的关注。无脊椎动物缺乏真正的抗体, 没有免疫记忆, 因此主要依靠先天性免疫过程来抵抗寄生虫和病毒的侵袭, 其免疫反应主要依赖非特异性免疫机制 (Philippe, 1999; Takahashi et al. 1995)。因此, 开展对虾免疫相关基因的研究, 阐明对虾的免疫机制, 制

1 本研究受自然科学基金青年基金项目 (30600458) 和国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2006AA100311) 资助

作者简介: 孙杰 (1981 -), 女, 山东潍坊人, 博士, 主要从事对虾营养及免疫研究, E-mail: sj605@sina.com; Tel: 13589311019

王雷, 通讯作者, E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn.

定有效的对虾疾病防治策略, 培育抗病的对虾新品种, 具有重要的意义。

血蓝蛋白(hemocyanin)是位于节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白,脱氧状态为无色, 结合氧状态为蓝色。一般认为, 血蓝蛋白的主要生物学功能与机体内的输氧有关, 它与血红蛋白(hemoglobins)和蚯蚓血红蛋白(hemerythreins)并称为动物界 3 种呼吸蛋白(李晓燕等, 1994; Bumester, 2002)。近年来研究表明, 血蓝蛋白不仅具有输氧功能, 而且还与能量的贮存、渗透压的维持、蜕皮过程的调节、表皮的固化以及黑色素的合成有关。特别引起学术界重视的是, 血蓝蛋白及其降解片段还具有酚氧化物酶活性、抗病毒和抗菌等多种免疫学功能, 被认为是一种具有多种非特异性免疫活性的多功能蛋白(Destoumieux et al. 2001; Jaenicke, 1999; Paul et al. 1998; Zhang et al. 2004; 罗展等, 2007)。

目前, 许多甲壳类血蓝蛋白的 cDNA 序列已被克隆并测序, 如斑节对虾(*Penaeus monodon*), 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)等。本研究通过 RACE 方法克隆了中国明对虾中血蓝蛋白基因的全长 cDNA, 将其命名为 FChc (GenBank 登录号: FJ594414), 它含有三个血蓝蛋白保守结构域和两个铜离子结合位点。同时对 FChc 与其他血蓝蛋白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 15-16cm, 为海捕虾。实验前在水族箱中充气暂养 10 天, 使其适应实验室内养殖环境。取对虾的肝胰腺, 切成小块, 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 公司的 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、鳗弧菌菌株由本实验室保存。

1.2 总RNA分离以及cDNA合成

中国明对虾肝胰腺总 RNA 分离利用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)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 μ L 的反应体系中加入 1.0 μ g 总 RNA, 5 \times MMLV 缓冲液 4.0 μ L, 2.5mM dNTP4.0 μ L, 50ng 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 1h, 95℃ 5min 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 中国明对虾血蓝蛋白基因cDNA片段的克隆

从 GenBank 获得了凡纳滨对虾血蓝蛋白基因 (CAA57880.1), 斑节对虾血蓝蛋白基因 (AAL27460.1) 和日本对虾血蓝蛋白原基因 (ABR14693.1), 并根据此序列设计一对简并引物 Xues1 和 Xuea1, 引物由上海生工公司合成。以中国明对虾肝胰腺 cDNA 为模板, 以 Xues1 和 Xuea1 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25 μ L, 扩增条件: 94℃ 变性 2 min, 1 个循环; 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s, 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, 稳压 100V, 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, 以上实验得到的血蓝蛋白部分序列与其它物种的血蓝蛋白同源, 根据此测得序列再设计正向 (XueRace3-1, XueRace3-2)、反向 (XueRace5-1, XueRace5-2) 共四条引物用于 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,SignalP程序分析信号肽,采用Clustal W软件进行多序列比对分析。不同来源的血蓝蛋白基因利用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(Kumar et al. 2001)完成,系统树采用neighbor-joining方法构建(Saitou et al. 1987)。

1.6 Real Time-PCR相对定量分析中国明对虾血蓝蛋白mRNA的组织分布特征

根据测序所得的中国明对虾血蓝蛋白的cDNA序列设计了一对引物Xuereal1s, Xuereal1a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、肝胰腺、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 μ l, 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血蓝蛋白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 μ l: SYBR(R)Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μ l, ddH₂O 10.5 μ l, 稀释的cDNA 1 μ l。反应条件:94 变性4 min;94 变性30 s, 58 退火30 s, 72 延伸45s, 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。每个组织的样品设三次重复。用Line-Gen K 软件分析处理PCR结果(采用 2^{-Ct} 法),数据用Spss10.0软件统计处理(任伟成等, 2007)。

1.7 Realtime-PCR相对定量分析对虾白斑综合征病毒WSSV刺激后中国明对虾血蓝蛋白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 μ l。对照组中,每只虾注射等体积PBS缓冲液(pH7.4),无任何注射的对虾作为空白组(0h)。注射后3h、6h、12h、24h、48h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 μ l, 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血蓝蛋白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相对定量分析鳃弧菌刺激后中国明对虾血蓝蛋白mRNA的表达变化

选取暂养的健康对虾若干尾进行鳃弧菌感染实验,实验用鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)于实验前一天活化菌种,在LB培养基上28 培养24h,使用前用无菌生理盐水洗下。将鳃弧菌煮沸灭活后配成 1×10^7 cells.ml⁻¹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 μ l。对照组中,每只虾注射等体积PBS缓冲液(pH7.4),无任何注射的对虾作为空白组(0h)。注射后3h、6h、12h、24h、48h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 μ l, 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血蓝蛋白mRNA的表达情况。数据处理及分析方法如上所述。

表1 实验中用到的引物及其序列
Table 1 Primers used in the experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
基因特异性引物 Gene specific primer	
Xues1 (Forward)	5' CCTCGGTGTTTGTGATGG 3'
Xuea1 (Reverse)	5' ATTTCAACGGGCGGTCTG 3'
XueRace3-1	5' GTCAGTTCCCCTCTCGTCCAGATAATG 3'
XueRace3-2	5' AGGATGTGGATGGTGTGCTCG 3'

XueRace5-1	5'	ATGCGAGCAACACCATCCACATCCT	3'
Xuereall1s(Forward)	5'	CCCAACCTAAAAGGAAAAG	3'
Xuereall1a (Reverse)	5'	ATGAGAACATCGAAGAGCA	3'
β-actin 引物			
AF (Forward)	5'	TATGCCCTCCCTCACGCTAT	3'
AR (Reverse)	5'	GCCAGACTCGTCGTATTCCT	3'

2 结果与分析

2.1 中国明对虾血蓝蛋白全长cDNA特征及蛋白结构预测

各引物组合扩增获得的 cDNA 序列拼接获得了中国明对虾血蓝蛋白基因全长，命名为 FCHc (GenBank 登录号: FJ594414)，软件分析表明完整的 cDNA 包含一个 2034bp 的开放阅读框 (ORF)，编码 678 个氨基酸；3'UTR 为 9bp，5'UTR (非编码区) 为 115bp，其中包括一个终止密码子，多聚腺苷酸加尾信号 (Polyadenylation Signal Site) (AATAAA) 和 polyA 尾。从氨基酸序列分析得知，成熟肽是由前体分子加工得到的，SignalP V1.1 World Wide Web Server 分析此多肽 N 端含有 15 个氨基酸的信号肽序列，位于 663 个氨基酸组成的成熟肽之前，从氨基酸序列分析得知，中国明对虾血蓝蛋白的理论等电点 (pI) 为 5.37，计算分子量为 77.59 kDa。在成熟肽中，天冬氨酸所占比例最高 (8.11%)，其次为谷氨酸 (7.82%) 和亮氨酸 (7.52%)。

```

accacaacatgaaggtcctcgtagtgcctttgtcgcgact
      M K V L V V L A F V A T
gcggctccccggccgaacctcggattccaggcggacgctgcagatgtgtcagatgccag
A A A R P N L G F Q A D A A D V S D A Q
aagcagcatgatatcaacttctgctgcacaagatctacggagaaatccgtgatcccaac
K Q H D I N F L L H K I Y G E I R D P N
ctaaaggaaaagctgattcctttgaccgcggaggctgattatcccattacagtgcagct
L K G K A D S F D P E A D L S H Y S D S
ggtgagcggtagacataaactcataagagatctcaaggatcacagactcctcgaacagaac
G E A V H K L I R D L K D H R L L E Q N
cactggttctctcctcagcccaagacagcgtcatgaagcacttatgctcttcgatgtt
H W F S L L S P R Q R H E A L M L F D V
ctcattcgtgcaaggattgggatacattgtcagcaatgcagcctacttccgtcagcgt
L I R C K D W D T F V S N A A Y F R Q R
atgaacgagggagagttgtctacgccttgtatgttcagtcacactctcctctggct
M N E G E F V Y A L Y V A V I H S P L A
gaacacgttgacttctcactctatgaggtcgtcctcatctctcactaacagtgaa
E H V V L P P L Y E V A P H L F T N S E
gacattgaagcagcttatcgtgccaagcagacacagaccctggtaaattccagctctcc
D I E A A Y R A K Q T Q T P G K F Q S S
tttactggaacaagaagaacctgaacaaagagtagcctatttcggagaggacattgga
F T G T K K N P E Q R V A Y F G E D I G
atgaacactcaccacgttacatggcatatggaattcccattctggtggcaagatgaatac
M N T H H* V T W H* M E F P F W W Q D E Y
agtcacatctggatcgcaaggagagagcttcttctgggtacatcatcttgcctt
S H H L D R K G E S F F W V H H* H L A V
cgcttgatgctgaacgtctctccaattattggatcccgtcgacgaacttactgggag
R F D A E R L S N Y L D P V D E L H W E

```

aagccatcgtaacagggtttgctccccacaccacttacaagtatggaggtcagttccc
K P I V Q G F A P H T T Y K Y G G Q F P
tctcgccagataatgtaaacttcgaggatgtggatgggtgctcgaattcgagatctg
S R P D N V N F E D V D G V A R I R D L
ctcattgtgagagccgaattcgtgatgctattgccacgggtatattattgacaacaa
L I V E S R I R D A I A H G Y I I D K Q
ggcaatcgcallgacatcatgaatgagcgtggcattgacattctggagacatcattgaa
G N R I D I M N E R G I D I L G D I I E
tctcaatgtatagtcctaagtccagctactatggggctttgcataaactgctcatatt
S S M Y S P N V Q Y Y G A L H* N T A H* I
gtactcggctgacaggccgatccacatggaaaatagctctaccacctgggtactagaa
V L G R Q A D P H G K Y A L P P G V L E
catttgaaactgccacacgtgatcccagtttctcaggctacacaaatataatggataat
H F E T A T R D P S F F R L H* K Y M D N
atctcaaagaacataaggattctctccccataactcaaaggaagaattaacttcaca
I F K E H K D S L P P Y S K E E L T F T
gggtgtaattgtgaaaatctatccggtgatgggaattagagaccttcttgaggactat
G V N V E N L S V D G E L E T F F E D Y
gagtacagtcttataatgctgttgacgacactgaagaaatgcggatgtagaaatctct
E Y S L I N A V D D T E E I A D V E I S
acgtacgttctcgtctcaaccacaaagatttcgatacaacattgaagttacaaacaat
T Y V P R L N H K D F A Y N I E V T N N
aacggcaaggaagttctaacaacagtcgcatttcgctggcctcaccgtgacaacaat
N G K E V L T T V R I F A W P H R D N N
ggattgataactttcgacgagggtcgttgggaatgctattgaactagacaagtttgg
G I E Y T F D E G R W N A I E L D K F W
gttaagttgctcccggctcaaaccacattgtccgtaagtcacagaatcagcagtaact
V K L S P G S N H I V R K S S E S A V T
gttctgatgtaccaagtttcgatactcttcaagaaggccgaagctgcctgggtggc
V P D V P S F D T L F K K A E A A L G G
ggggatgccggacttacagaattcgagagtgcgactggcattcctaaccgttctcctc
G D A G L T E F E S A T G I P N R F L L
cccaagggtaacgaacagggtctggagttcgatcttgcgtagctgtgacggatggtgaa
P K G N E Q G L E F D L V V A V T D G E
gctgacgcagctgtagaggactacacgataaactgacttcatccactacggttccat
A D A A V E G L H D N T D F I H Y G S H
ggcaaataccctgataatgcccacatggctaccctggatcgtaaagtccagatgac
G K Y P D N R P H G Y P L D R K V P D D
cgcgtgttgaagtccttcccacttcaagcacattcaagtaaaggtcttcaatcacgg
R V F E V L P N F K H I Q V K V F N H G
gaacatatccatcaccatgaaactaatagaaatcgataagacttgaacaaataccatgt
E H I H H H - ttatttatcttcttaaaggatgcggtttcaataaagtagatttcattcaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaa

图 1 中国明对虾中血蓝蛋白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 (TGA) 和多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA)。单下划线标出的为信号肽序列，阴影中显示的为三个血蓝蛋白结构域，六个铜离子结合位点的组氨酸残基用星号标记。

Fig.1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of hemocyanin in *F. chinensis*

The letter in the shadow indicates the start codon (ATG), the stop codon (TAA) and the polyadenylation signal sequence (AATAAA). The putative sequence of signal peptide is underlined with single line. The three hemocyanin domains are shown in the shadow. The six histidine residues within the copper-binding sites are indicated by asterisks.

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) 分析推断的氨基酸显示 FCHc 是血蓝蛋白家族中的一个成员。从氨基酸序列分析得知, 该蛋白含有三个串联的血蓝蛋白结构域 hemocyanin-N 结构域 (残基 29 位 ~ 157 位), hemocyanin-M (残基 159 位 ~ 426 位) 结构域和 hemocyanin-C 结构域 (残基 432 位 ~ 680 位) (图 2)。血蓝蛋白的主要生物学功能与机体内的输氧有关, 其氧结合位点处都含有一对铜离子, 脱氧时表现为 Cu () 状态, 氧化后变成 Cu () 状态 (Bumester 2002 ; Van Holde *et al.* 2001)。FCHc 结构域中共有 2 个铜离子结合位点 (见图 1), 这些 FCHc 铜离子结合位点中保守的组氨酸在蛋白中的位置分别为 : 217 , 221 , 248 , 377 , 381 , 和 407 , 在图 1 中用星号标出。

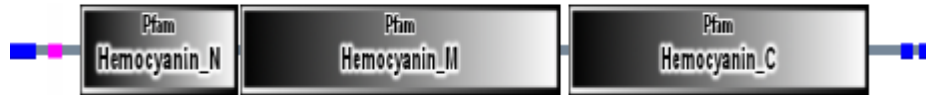


图2 中国明对虾血蓝蛋白中的三个串联血蓝蛋白结构域位置示意图

Fig.2 Distribution of three tandem hemocyanin domain of hemocyanin in *F. chinensis*

2.2 FCHc基因同源序列分析

BlastP程序网上比对发现FCHc蛋白序列与其它物种的血蓝蛋白具有一定的相似性。它与日本囊对虾 (*M. japonicus*) (ABR14693.1) 血蓝蛋白L亚基有85%的相似性, 与凡纳滨对虾 (*L. vannamei*) (CAB85965.1) 血蓝蛋白有82%的相似性, 与加州刺龙虾 (*Panulirus interruptus*) 血蓝蛋白c亚基 (AAB22190.1) 有67%的相似性。FCHc的Hemocyanin-N和Hemocyanin-M分别与凡纳滨对虾 (*L. vannamei*) 酚氧化酶原的Hemocyanin-N和Hemocyanin-M有59%和74%的相似性, 与青蟹 (*Callinectes sapidus*) 的血蓝蛋白 (Q9NGL5) 有63%和74%的相似性, 与美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 的血蓝蛋白 (Q9NFR6) 有57%和72%的相似性。

本文中比对了21个不同的血蓝蛋白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FCHc和其它血蓝蛋白之间的进化关系 (见图3)。结果显示不同物种来源的血蓝蛋白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血蓝蛋白在甲壳动物中被分为两个分支。中国明对虾FCHc与日本囊对虾 (*M. japonicus*) , 凡纳滨对虾 (*L. vannamei*) , 斑节对虾 (*P. monodon*) , 青蟹 (*Callinectes sapidus*) (AAF64305.1) 珍宝蟹 (*Cancer magister*) (AAW57892.1) 加州刺龙虾 (*Panulirus interruptus*) (AAB22190.1) , 梭子蟹 (*Portunus pelagicus*) (ABM74407.1) 等动物的血蓝蛋白分为一个亚群。斯氏鲸虱 (*Cyamus scammoni*) (ABB59715.1) , 挪威龙虾 (*Nephrops norvegicus*) (AAF04149.1) , 钩虾 (*Gammarus roeseli*) (CAI78901.1) , 淡水螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*) (AAO47336.1) , 龙虾 (*Palinurus vulgaris*) (CAC69244.1) 等动物的血蓝蛋白属于另外一个亚群。我们发现FCHc在进化上与日本囊对虾、斑节对虾、凡纳滨对虾等海水虾的血蓝蛋白亲缘关系最近, 其次与珍宝蟹, 青蟹等一些蟹类的血蓝蛋白基因相关联; 与斯氏鲸虱, 挪威龙虾, 钩虾等生物的血蓝蛋白在分子进化上距离较远。

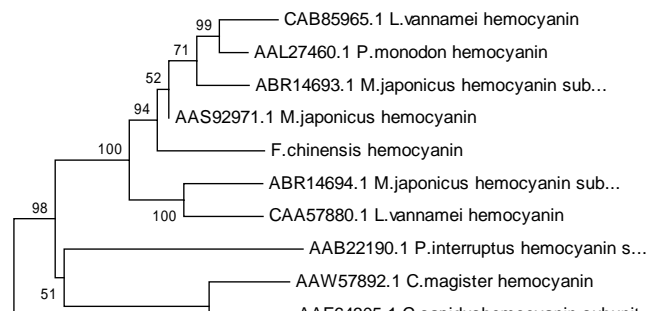


图3、利用NJ法绘制的21种甲壳动物和昆虫的血蓝蛋白进化树。

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of hemocyanin amino acid sequences from 21 different species of Crustacea and Insecta

2.3 中国明对虾血蓝蛋白mRNA的组织分布特征

利用Real-time PCR相对定量方法分析了血蓝蛋白FCHc mRNA在不同组织中的表达，采用 2^{-Ct} 法处理PCR结果，基因的表达特征图谱如图4所示。从图4中可以看到FCHc基因的表达具有组织特异性，在肝胰腺中转录水平最高，因此推断中国明对虾中血蓝蛋白主要的合成部位是在肝胰腺中。FCHc mRNA在血细胞、肠、精巢和鳃中也有表达，而在心脏和表皮中有较弱表达。

2.4 微生物刺激后中国明对虾血蓝蛋白FCHc基因的表达变化

鳃弧菌或WSSV刺激后中国明对虾血蓝蛋白FCHc基因的表达特征图谱相类似(图5,图6)。FCHc表达量在感染后6h达到峰值($P < 0.01$)，此时的表达量比空白组增加了6-10倍，并且有显著性差异，FCHc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血蓝蛋白。接着在6h以后基因的表达呈明显的下调，48h与空白对照表达量差别不大，可能意味着这个阶段动物处在感染后的恢复期。尽管从图上看在12h的表达量略高于24h，但它们之间并无显著性差异($P > 0.05$)。

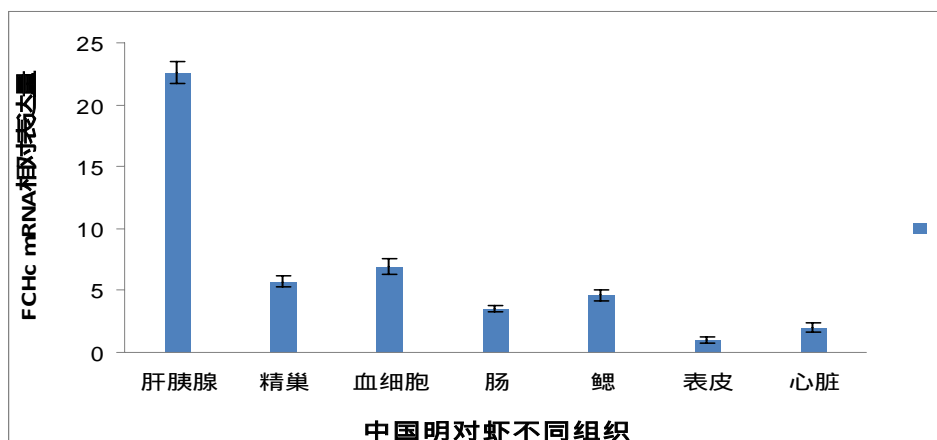


图4、中国明对虾血蓝蛋白FCHc在不同组织的表达情况

Fig.4. Real-time PCR analysis of FCHc gene expression from different tissues of *F. chinensis*

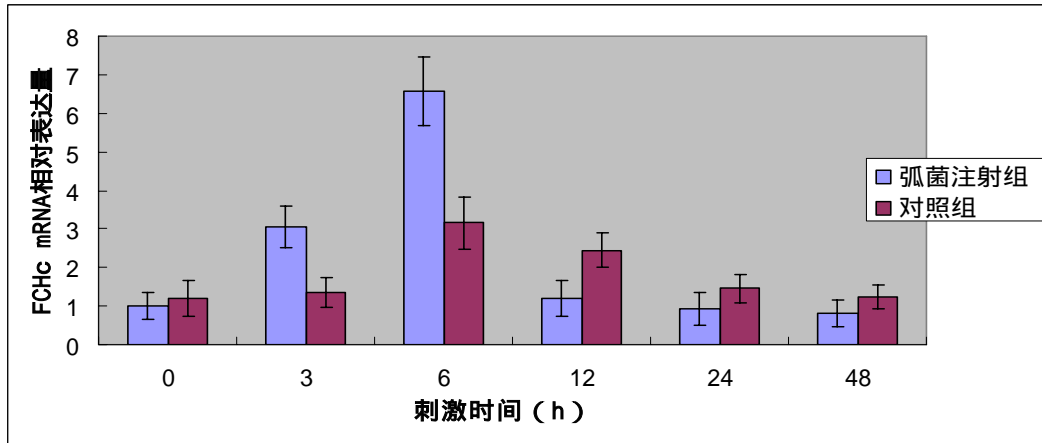


图5、中国明对虾血蓝蛋白FCHc mRNA应答鳃弧菌感染的时程表达分析

Fig.5. Time-course expression analysis of FCHC mRNA in *F. chinensis* haemocytes in response to the stimulation by *Vibrio anguillarum*

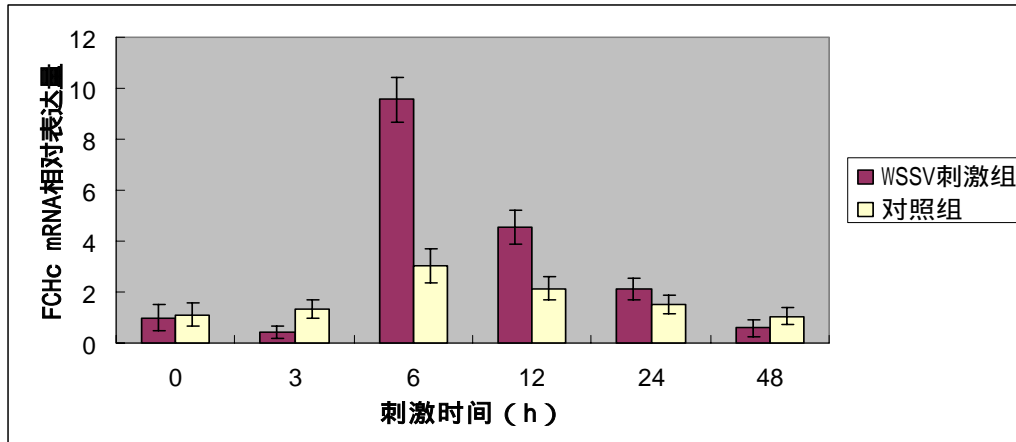


图6、中国明对虾血蓝蛋白FCHc mRNA应答WSSV病毒粗提液感染的时程表达分析

Fig.6. Time-course expression analysis of FCHc mRNA in *F. chinensis* haemocytes in response to WSSV challenge

3、讨论

血蓝蛋白是节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白，脱氧状态为无色，结合氧状态为蓝色，分子质量一般为 50 kDa ~ 75 KDa，本文中我们首次从中国明对虾肝胰腺中克隆到了血蓝蛋白基因cDNA全长，将其命名为FCHc（GenBank注册号：FJ594414），预测分子量为 77.59KDa，与已分离的凡纳滨对虾的血蓝蛋白亚基分子量类似（章跃陵等，2005；章跃陵等，2005）。典型的甲壳动物血蓝蛋白每个亚基折叠为三个结构域，其中第一、三结构域分别为亚基蛋白的N、C端，第二结构域含血蓝蛋白的活性部位，活性部位结合有两个铜离子CuA和CuB，每个铜离子分别与蛋白质链上三个组氨酸的咪唑氮原子配位，这两个铜离子是血蓝蛋白结合一个O₂分子所必需的（Jaenicke *et al.* 2004），SMART（Simple Modular Architecture Research Tool）

分析推断的氨基酸显示FCHc含有三个串联的血蓝蛋白结构域 hemocyanin-N结构域(残基 29位~157位), hemocyanin-M(残基 159位~426位)结构域和hemocyanin-C结构域(残基 432位~680位)(图2)。其中FCHc的第二个结构域hemocyanin-M结构域中共有2个铜离子结合位点(见图1),这些铜离子结合位点中保守的组氨酸在蛋白中的位置分别为:217,221,248,377,381,和407(图1)。FCHc的三个血蓝蛋白结构域与日本囊对虾、凡纳滨对虾及青蟹的血蓝蛋白结构域都有很高的相似性。同时在进化上FCHc与日本囊对虾、斑节对虾、凡纳滨对虾等海水虾的血蓝蛋白亲缘关系最近,其次与珍宝蟹,青蟹等一些蟹类的血蓝蛋白相关联。相关研究认为节肢动物血蓝蛋白主要的合成部位是在肝胰腺中。从日本囊对虾中克隆的血蓝蛋白两个亚基PjHcL和PjHcY在肝胰腺中表达量都较高(Lei KY et al., 2008)。在本研究中,Real-time PCR的结果显示中国明对虾与其它节肢动物类似,其血蓝蛋白FCHc mRNA也是在肝胰腺中表达量最高。

血蓝蛋白的免疫防御功能是近年来无脊椎动物免疫学领域的最新发现,Zhang等首次证明血蓝蛋白具有非特异性抗病毒作用(Zhang et al. 2006)。应用亲和层析从斑节对虾(*P. monodon*)血清中分离出2种能与白斑杆状病毒(White spot syndrome virus, WSSV)和虹彩病毒(Singapore grouper irido virus, SGIV)结合的多肽,分子质量分别为73 kDa和75 kDa,经质谱分析鉴定为血蓝蛋白。Lei KY等报道,血蓝蛋白的两个分子质量73 kDa和75 kDa的亚基,只有75 kDa的PiHcL亚基具有抗病毒功能,PjHcY亚基不具有抗病毒功能(Lei et al. 2008)。在本实验中,WSSV刺激后中国明对虾血蓝蛋白FCHc基因的表达特征具有不同的时空表达趋势,在病毒刺激6h后mRNA的相对表达量到达高峰,之后下降,提示中国明对虾FCHc基因在抵抗病毒入侵时也发挥了重要作用。

章跃陵等以凡纳滨对虾为研究对象,将其血清分别与溶藻酸弧菌,哈维氏弧菌,嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌等4种病原菌孵育,采用亲和蛋白质组学和Western-blotting等分子生物学方法纯化、鉴定和确证其中可与病原菌直接结合的蛋白为血蓝蛋白,提示血蓝蛋白全蛋白可能具有抗菌活性(章跃陵等,2008)。2001年,Destoumieux等从凡纳滨对虾血浆中得到分子质量为2.7 kDa和从细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中得到分子质量为7.9 kDa、8.3 kDa的广谱抗真菌活性的小分子阴离子抗菌肽,通过分析发现,95%~100%氨基酸序列与各自血蓝蛋白c-末端氨基酸序列相同,由此断定分离所得抗真菌活性多肽源自血蓝蛋白(Destoumieux et al. 1999)。上述研究表明,对虾血蓝蛋白本身或部分降解产生的抗菌肽,在对虾的免疫防御体系中具有重要作用。在本实验中,鳃弧菌刺激后中国明对虾血蓝蛋白FCHc基因的不同时空表达趋势也从一个侧面表明了中国明对虾FCHc在免疫防御系统中可能存在抗病毒和抗菌双重作用。

参考文献:

- 任伟成,王崇明,李赞. 荧光实时定量PCR技术及其在水产养殖研究中的应用[J].海洋水产研究,2007,28(6):97-104.
- 许华,黄健,杨官品. 对虾白斑综合征病毒蛋白质组的研究进展[J].海洋水产研究,2008,29:118-126.
- 李晓燕,孙宏建,路军. 血蓝蛋白模型化合物的合成和载氧性能[J]. 山东大学学报(自然科学版),1994,29(2):96-99.
- 罗展,黄健,周丽. 抗白斑综合征病毒(WSSV)感染途径研究进展[J]. 海洋水产研究,2007,28(5):116-123.
- 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.
- 章跃陵,刘光明,王三英,胡忠,邹湘辉. 南美白对虾血蓝蛋白与抗人IgG相互作用的研究[J]. 汕头大学学报(自然科学版),2005,20(2):32-36.
- 章跃陵,卓奕明,朱永飞,王三英,黄通旺. 凡纳滨对虾人工感染细菌后肝胰脏中主要变化蛋白的研究[J]. 水产科学,2005,24(6):19-23.
- 章跃陵,林智建,李祖江,严芳,李远友,叶向群. 凡纳滨对虾血清中直接与病原菌相结合

的主要蛋白的鉴定[J]. 水产学报 2008, 32 : 105-111。

樊廷俊.对虾非特异性免疫与对虾疾病监控的研究进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 26-31.

Bumester T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins[J]. J.Comp.Physio., 2002, 172:95-107.

Destoumieux D, Saulnier D, Garnier J, et al. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 47070—47077.

Jaenicke E, Foll R, Decker H. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone[J]. J.Biol.Chem., 1999,274:34 267-34 271.

Jaenicke E, Decker H. Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase [J]. Micron, 2004, 35: 89-90.

Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B., Nei M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software[J]. Bioinformatics. 2001, 17:1244-1245.

Lei K, Li F, Zhang M, et al. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense[J]. Dev Comp Immunol, 2008, 2(4): 11-17.

Moriarty DJW. Control of luminous *Vibrio* species in Penaeid aquaculture Ponds Aqua[J], 1998, 164(1/4): 351-358.

Paul R, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates [J]. Zoology, 1998, 100:319-327.

Philippe Roch. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates[J]. Aquaculture, 1999, 172: 125-145.

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol 1987, 4: 406-425.

Takahashi Y, Itami T, Kondo M. Immundefense system of Crustacean[J]. Fish Pathol 1995, 30(2):141-150.

Van Holde K, Miller K. Hemocyanins and invertebrate evolution[J]. J.Biol.Chem., 2001, 276: 15563-15566.

Zhang XB, Huang CH, Qin QW. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*[J]. Antivir.Res., 2004, 61:93-99.

Zhang Y L, Wang S Y, Xu A L, et al. Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like prore in *Litopenaeus vannariae* and study on its agglutination characterization[J]. JProteo me Res, 2006, 5(4): 815-821.