

凡纳滨对虾 *Arf6* 基因的克隆及表达分析

崔 亮^{1,2} 殷 勤³ 陈晓汉^{2*} 彭金霞² 王志伟³ 李 奎³

(¹广西大学, 南宁 530021)

(²广西壮族自治区水产研究所, 南宁 530021)

(³中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘 要 通过电子克隆所得序列设计引物, 采用 PCR 扩增方法首次克隆得到长 695bp 的凡纳滨对虾 *Arf6* 基因序列, 其中包括 96bp 的 5' 非翻译区(Untranslated region, UTR)、71bp 的 3' 非翻译区和 528bp 的开放阅读框。编码 175 个氨基酸残基, 推算分子量约为 20kDa, 理论等电点为 8.82, 分子式为 C₈₉₆H₁₄₂₆N₂₅₂O₂₅₅S₈。氨基酸序列分析表明, *Arf6* 基因编码的氨基酸序列中具有保守的 GTP 结合区域, 总的带负电荷的残基(Asp+Glu)为 21, 总的带正电荷的残基(Arg+Lys)为 25。与其他物种的 *Arf6* 基因进行同源比对发现, 该基因的氨基酸序列具有较高的保守性, 基于氨基酸序列的聚类分析表明, 凡纳滨对虾与果蝇属种类亲缘关系最近。半定量 RT-PCR 的结果显示, 该基因在组织中广泛表达且在肝胰腺中表达量最高, 在眼柄中表达最低; 其在经桃拉综合征病毒(TSV)感染后的凡纳滨对虾肝胰腺中的表达量显著高于在无特定病原(SPF)凡纳滨对虾; 加之 ProtFun 在线预测蛋白质的功能分类, 表明 *Arf6* 基因可能是一免疫应答因子参与凡纳滨对虾免疫防御反应。

关键词 凡纳滨对虾 RT-PCR 基因克隆 *Arf6*

中图分类号 Q785, Q786 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0060-07

Molecular cloning and expression analysis of *Arf6* in *Litopenaeus vannamei*

CUI Liang^{1,2} YIN Qin³ CHEN Xiao-han^{2*}

PENG Jin-xia² WANG Zhi-wei³ LI Kui³

(¹Guangxi University, Nanning 530021)

(²Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021)

(³Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

ABSTRACT According to the sequence from the electronic cloning, a pair of primers were designed to clone the *Arf6* gene in *Litopenaeus vannamei* by PCR. A 695bp cDNA was obtained, which contained a 96bp 5' untranslated region (UTR), a 528bp open reading frame (ORF), and a 71bp 3' UTR. The encoded protein was composed of 175 amino acids, with a molecular weight of 20kDa and the calculated isoelectric point of 8.82. The molecular formula was predicted to be C₈₉₆H₁₄₂₆N₂₅₂O₂₅₅S₈. The deduced amino acid sequence showed that the protein encoded by the *Arf6* gene owned a conserved GTP-binding domain, 21 negatively charged

国家科技支撑计划项目(2008BADB9B03)、国家虾产业技术体系岗位专家(nycyt-x-46)、广西应用基础研究专项(桂科基 0836028)、广西自然科学基金(桂科自 0832009Z)和广西研究生教育创新计划资助项目(T32443)共同资助

* 通讯作者。E-mail: chnxhn@163.com

收稿日期: 2010-07-07; 接受日期: 2010-08-25

作者简介: 崔 亮(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事水生动物遗传育种研究。E-mail: clgenetics@gmail.com

residues (Asp+Glu) and 25 positively charged residues (Arg+Lys). The obtained sequence was compared with the other species through BLAST analysis, indicating that the amino acid sequence cloned in this study is highly conserved. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences revealed that *L. vannamei* is closely related to *Drosophila melanogaster*. Semi-quantitative RT-PCR results showed that the gene was expressed in most of the examined tissues, and the highest expression level was observed in the hepatopancreas, while the lowest in the eyestalk. *Arf6* gene expression level in the hepatopancreas of *L. vannamei* that was infected by the taura syndrome virus (TSV) was higher than that of the specific pathogen free *L. vannamei*. The protein functional classification results suggested that the *Arf6* plays a potential role in the pathogen host defense systems as an immune response factor.

KEY WORDS *Litopenaeus vannamei* RT-PCR Gene cloning *Arf6*

ADP 核糖基化因子(*Arf*, ADP-ribosylation factor)家族蛋白是 Ras-like 的 GTP 结合蛋白。迄今为止,在所有的真核生物中都发现它们的存在,在进化上高度保守,主要参与囊泡的形成和细胞骨架的重建,对细胞的生存起着至关重要的作用(Randazzo *et al.* 2000; Gillingham *et al.* 2007)。虽然 *Arf* 在 1982 年最初被发现的时候是作为霍乱毒素催化 Gs 蛋白 ADP 核糖基化反应的辅助因子(Weiss *et al.* 1989),但是现在大部分研究都集中在其在膜运输途径中扮演的角色。*Arf* 在多个位点调节膜的运输,早期的研究主要集中在 *Arf* 在高尔基体中的作用,近来的研究发现 *Arf* 分布在各种膜系统中,涉及内质网到高尔基体,高尔基体内的运输,以及高尔基体内的反向运输;还参与内体运输,突触小泡新生小泡的形成,以及蛋白分泌机制,并对生物体的生长、发育、繁殖和抗逆性等有重大影响(Bonifacino *et al.* 2004; Stearns *et al.* 1990)。*Arf* 蛋白可再被划分为 3 类(Kahn *et al.* 2006),第 1 类包括 *Arf1*, *Arf2* 和 *Arf3*;第 2 类包括 *Arf4* 和 *Arf5*; *Arf6* 是第 3 类中的唯一成员,主要在调节体内质膜的运输与内吞体过程中发挥作用,同时也可能影响细胞的骨架重排(D' Souza-Schorey *et al.* 2006)。对 *Arf6* 的功能来说,关键性因素是 GTP 结合状态的时期(Pasqualato *et al.* 2001),细胞内 *Arf6* 与 GTP 结合或与 GDP 结合是分别由鸟昔交换因子(GEFs)和 GTP 酶激活蛋白(GAPs)协调来实现的(Donaldson 2000)。

凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 亦称南美白对虾,为广温广盐性热带虾类,原产于美洲太平洋沿岸水域,主要分布于秘鲁北部至墨西哥湾沿岸,以厄瓜多尔沿岸分布最为集中,是世界上对虾养殖的三大品种之一。近年来不少学者对凡纳滨对虾生物学特性和养殖技术进行了研究(兰 萍等 2008;王兴强等 2006;梁萌青等 2008)。但对凡纳滨对虾分子遗传学方面的研究报道较少,尤其对凡纳滨对虾一些重要的功能基因的研究报道更少。本文主要克隆并分析了凡纳滨对虾 *Arf6* 基因及其在不同组织中的表达差异,旨在为凡纳滨对虾的分子遗传学研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

实验对虾是广西水产研究所养殖的无特定病原的凡纳滨对虾(体长 8~10 cm),于实验室暂养 7d 后(盐度 7.8,水温 25 ℃),使其适应实验室内养殖环境。采集凡纳滨对虾的心脏、肝胰腺、肌肉、胃、肠和眼柄快速置于液氮中用于提取 RNA。

1.1.2 主要试剂

TRizol Total RNA Reagent (总 RNA 提取)试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(普通离心柱型),DNA Marker 2000 购自上海天根生物公司;pMD-18T 载体连接体系购自宝生物工程有

限公司(TaKaRa,大连);DEPC、氨苄青霉素购自上海生工生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

利用 TRizol 试剂盒提取凡纳滨对虾的心脏、肝胰腺、肌肉、胃、肠和眼柄的总 RNA。操作步骤参照使用说明书。取适量的总 RNA 样品,用 DEPC 水稀释后,用紫外分光光度计测量样品的纯度。琼脂糖电泳检测 RNA 的完整程度。确认 RNA 完整无降解后,−80 °C 保存备用。

1.2.2 cDNA 的合成

按照逆转录酶 M-MLV 的操作说明将总 RNA 逆转录为 cDNA,产物作为 PCR 扩增的模板。

1.2.3 引物设计

根据果蝇的 *Drosophila melanogaster Arf6* 保守序列,电子克隆拼接凡纳滨对虾 *Arf6* 基因序列设计引物用来扩增不同的基因片段。同时设计凡纳滨对虾 β actin 引物,作为内参。引物合成由上海生工生物工程公司完成。

1.2.4 目的片段的 PCR 扩增

50 μ l PCR 反应体系中含 dNTPs 各 200 μ mol/L,引物 *Arf6*CL: 5'-ATGGTTAGAGAGGAGGAGGT-3' 和 *Arf6*CR: 5'-ACAATCCGAGGAGCCATC-3'各 10pmol, *Taq* 酶(TaKaRa 公司)1.25U,模板 2 μ l, dd H₂O 补足体积。按程序进行 PCR 扩增,具体程序如下: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 34 个循环后, 72 °C 延伸 5 min, 最后进入 4 °C 状态。PCR 产物长度预期为 695bp。

1.2.5 PCR 产物的回收、克隆和测序

1%琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物扩增结果,在紫外灯下切割目标片段,用天根公司的胶回收试剂盒进行回收纯化,参照 TaKaRa 公司 pMD-18T 克隆试剂盒说明书克隆目的片段,筛选阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司用 ABI3730 测序仪进行测序。

1.3 分析方法

采用 Primer Premier 5.0 设计引物,用 NCBI 中的 BLAST 程序进行序列同源性比对和相似性搜索,利用软件 DNASTAR 和各种在线分析程序分析测序结果中核苷酸与氨基酸序列的特性,EditSeq 用于 ORF 分析及蛋白序列的推测。根据凡纳滨对虾及其他物种 *Arf6* 的氨基酸序列,采用进化树构建软件 Mega 4.1,以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建进化树,采用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

1.4 *Arf6* 基因的组织表达分析

采用 RT-PCR 的方法,检测 *Arf6* 基因在凡纳滨对虾的不同组织与器官中的转录表达。分别提取凡纳滨对虾心脏、肝胰腺、肌肉、胃、肠和眼柄的总 RNA,并反转录合成 cDNA。引物 *Arf6*EL: 5'-CCTGATGCTTG-GCTTGGA-3'和 *Arf6*ER: 5'-ATGATGCGATGGAGTTCTTG-3'(产物大小为 273bp)对样品进行扩增,用 β -actinF: 5'-GCTAACCGCGAGAAGATGAC-3'和 β -actinR: 5'-TAGGACTTCTCCAGCGAGGA-3'作内参引物(产物大小为 380bp)。PCR 反应条件为: 94 °C 5min, 94 °C 30s, 60 °C 30s, 72 °C 30s, 进行 28 个循环;循环结束后 72 °C 延伸 5min;最后进入 4 °C 状态。

1.5 *Arf6* 基因经病毒感染后的表达分析

采用 RT-PCR 的方法,检测 *Arf6* 基因在无特定病原凡纳滨对虾(Specific pathogen free, SPF)和经桃拉综合征病毒(Taura syndrome virus, TSV)感染后凡纳滨对虾的肝胰腺中的表达分析。各做 3 组平行对照,引物 *Arf6*EL 和 *Arf6*ER 对样品进行扩增,用 β -actinF 和 β -actinR 作内参引物。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾 *Arf6* 基因的 RT-PCR 扩增

用 TRizol 试剂盒提取凡纳滨对虾肝胰腺组织总 RNA, 逆转录后用特异的 PCR 引物进行扩增, 得到 1 个约 700bp 的片段, 与预期扩增片段大小相近。将此片段在紫外灯下切取, 利用胶回收试剂盒回收以备克隆。

2.2 cDNA 的克隆与序列分析

将凝胶回收的 PCR 片段克隆于 pMD-18T 载体中, 测序发现该片段长度为 695bp, 与预期长度一致, 其中包括 96bp 的 5' 非翻译区, 71bp 的 3' 非翻译区和 528bp 开放阅读框, 共编码 175 个氨基酸, 总相对分子质量为 20 064.2, 理论等电点为 8.82。开放阅读框各碱基含量分别为 A%=26.9; C%=25.2; G%=28.0; T%=19.9。核苷酸序列和推导的氨基酸顺序见图 1。

2.3 同源性分析

通过 NCBI 的 Blast x 同源相似性搜索发现, 凡纳滨对虾 *Arf6* 基因编码的氨基酸序列与线虫 *Caenorhabditis elegans*、大西洋鲑 *Salmo salar*、爪蟾 *Xenopus tropicalis*、原鸡 *Gallus gallus*、人 *Homo sapiens* 等不同分类阶元物种的 *Arf6* 氨基酸序列比对具有很高的相似性(图 2), 显示该基因编码的蛋白质在进化中高度保守。

从构建的 NJ 进化树可见, 凡纳滨对虾 *Arf6* 与果蝇 *Drosophila melanogaster* 最为接近, 然后依次与线虫、海绵 *Suberites domuncula*、日本血吸虫 *Schistosoma japonicum*、水螅 *Hydra magnipapillata* 等无脊椎动物聚在一起。而包括人、野猪 *Sus scrofa*、小鼠 *Mus musculus*、原鸡、爪蟾、大西洋鲑 *S. salar*、斑马鱼 *Danio rerio* 等在内的脊椎动物另聚为 1 支(图 3)。

2.4 *Arf6* 基因的组织表达

半定量 RT-PCR 结果显示, *Arf6* 基因在心脏、肝胰腺、肌肉、胃、肠和眼柄中广泛表达, 但在肝胰腺中表达最高, 在眼柄中表达最低(图 4)。

2.5 桃拉病毒感染后基因表达

半定量 RT-PCR 结果显示, *Arf6* 基因在经桃拉综合征病毒(TSV)病毒感染后的凡纳滨对虾肝胰腺中的表达量显著高于在无特定病原(SPF)凡纳滨对虾中的表达量(图 5)。

3 讨论

本研究以 NCBI 电子克隆技术扩增得到了凡纳滨对虾 *Arf6* 基因的全长 cDNA 序列。经同源比对分析, 本实验所得到的基因编码的蛋白质与其他物种的 *Arf6* 相关蛋白序列具有较高的相似性, 且其蛋白质水平的相似程度远高于核苷酸序列的相似程度, 并且序列比对显示, 物种间的核苷酸突变都发生在密码子的第 3 个碱基, 进一步证实了密码子第 3 个碱基的摇摆性。*Arf6* 基因在物种间的高相似性也表明它们在进化过程中相对高的保守性。系统进化树分析结果显示, 该基因编码的蛋白序列与果蝇等低等动物较为接近, 而与哺乳动物等高等动物亲缘关系较远, 基本反映了动物的进化顺序。

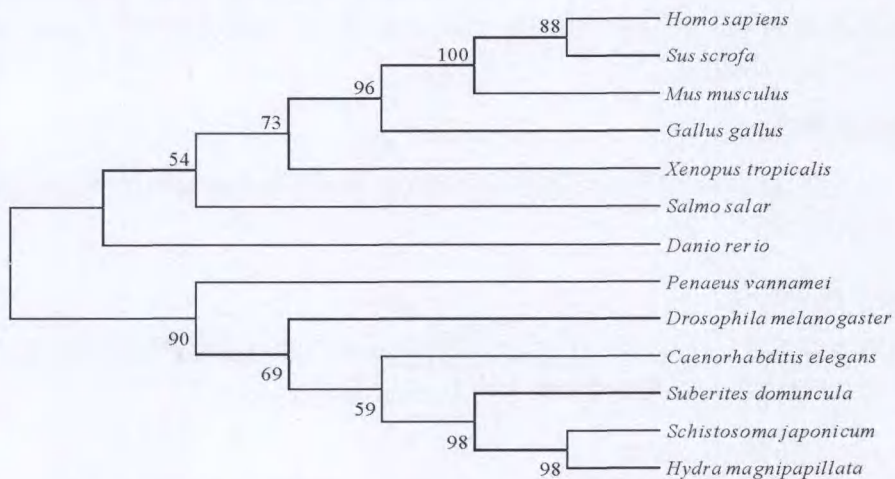
```

1      ATGGTTAGAGAGGAGGAGGTCGACCGGGATGTGTGCTGAGAGTCCGTAATTTTGGGCTT
61     TTTACCTCTCTGCTGCAGGATAAGGGCCGGGAGGATGGCCAAGCTACTGAGCAAGATC
1      M G K L L S K I
121    TTTGGAACAAGAGATCCGATCCTGATGCTTGGCTTGGACGGCGGGCAAGACCACC
9      F G N K E I R I L M L G L D A A G K T T
181    ATCCTGTACAAGCTCAAATTGGGCCATTCGGTCACTACTATCCCACAGTCGGCTTCAAT
29     I L Y K L K L G H S V T T I P T V G F N
241    GTCGAGACAGTAGCCTATAAGAACGTCAAATTCATGTTTGGGATGTGGCGGGCAGGAC
49     V E T V A Y K N V K F N V W D V G G Q D
301    AAGATCCGGCCACTGTGGAGACTACTACACGGGTACGCAGGGCCTCATCTTTGTGGTG
69     K I R P L W R H Y Y T G T Q G L I F V V
361    GACTGCGCAGACCGGGACCGCATGGACGAGCGGAGACAAGAACTCCATCGCATTAAT
89     D C A D R D R M D E A R Q E L H R I N
421    GACAGGGAGATGAGGGAAGCTATATCCTGGTGTGGCAATAAGCAGGATTTGCCCGAT
109    D R E M R D A I I L V F A N K Q D L P D
481    GCTATGAAACCTCATGAAATCCAGGAGAAAGCTAGGCCATAACAGAATCAGGGATCGCAAC
129    A M K P H E I Q E K L G L T R I R D R N
541    TGGTATGTCAGCCGTGCTGCGCAACCACAGGTGATGGCTGTACGAGGGCCITACGTGG
149    W Y V Q P C C A T T G D G L Y E G L T W
601    CTCACCAGCAACCACAAGTCATGATGCTTGGCCGGGCTCCAGCTCTTAGCTCCATAG
169    L T S N H K S
661    TCAGCTCGGCAGACAGGGATGGCTCCTCGGATTGT

```

图 1 凡纳滨对虾 *Arf6* 基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of
L. vannamei Arf6

<i>Caenorhabditis elegans</i>	. MGKFL SKIFGKKEI RILMLGLDAAGKTTILYKCLKLGG SVTTIPTVGFNV	49
<i>Penaeus vannamei</i>	. MGKLL SKIFGNKEI RILMLGLDAAGKTTILYKCLKLGH SVTTIPTVGFNV	49
<i>Salmo salar</i>	. MGKML SKIFGNKEI RILMLGLDAAGKTTILYKCLKLGG SVTTIPTVGFNV	50
<i>Xenopus tropicalis</i>	. MGKML SKIFGNKEI RILMLGLDAAGKTTILYKCLKLGG SVTTIPTVGFNV	49
<i>Gallus gallus</i>	. MGKVL SKIFGNKEI RILMLGLDAAGKTTILYKCLKLGG SVTTIPTVGFNV	49
<i>Homo sapiens</i>	. MGKVL SKIFGNKEI RILMLGLDAAGKTTILYKCLKLGG SVTTIPTVGFNV	49
Consensus	mgk lskifgnkemrilmlgl daagkttilykclklgqsvttiptvgfnv	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	ETV TYKNI KFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGTQALIFVNDADRDRVDEA	99
<i>Penaeus vannamei</i>	ETV AYKNVKFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVDCADRDRMDEA	99
<i>Salmo salar</i>	ETV TYKNI KFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVDCADRDRIDEA	100
<i>Xenopus tropicalis</i>	ETV TYKNI KFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVDCADRDRIDEA	99
<i>Gallus gallus</i>	ETV TYKNI KFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVDCADRDRIDEA	99
<i>Homo sapiens</i>	ETV TYKNI KFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVDCADRDRIDEA	99
Consensus	etvtyknvkfnvwdvvggqdkirplwrhytgtqglifvdcadrdridea	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNELHRIINDREMKEA IILV FANKQDLADAMKPHEIQ EKL GLTRIRDNRW	149
<i>Penaeus vannamei</i>	RQELHRIINDREMRDA IILV FANKQDLPDAMKPHEIQ EKL GLTRIRDNRW	149
<i>Salmo salar</i>	RQELHRIINDREMRDA IILV FANKQDLPDAMKPHEIQ EKL GLTRIRDNRW	150
<i>Xenopus tropicalis</i>	RQELHRIINDREMRDA IILV FANKQDLPDAMKPHEIQ EKL GLTRIRDNRW	149
<i>Gallus gallus</i>	RQELHRIINDREMRDA IILV FANKQDLPDAMKPHEIQ EKL GLTRIRDNRW	149
<i>Homo sapiens</i>	RQELHRIINDREMRDA IILV FANKQDLPDAMKPHEIQ EKL GLTRIRDNRW	149
Consensus	rqelhriindremrda iilv fankqdlpdamkpheiqeklgltrirdnrw	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	YVQPSCASTGDGLYEGLTWLTSNCK	174
<i>Penaeus vannamei</i>	YVQPCCATTGDGLYEGLTWLTSNHK	174
<i>Salmo salar</i>	YVQPSCATTGDGLYEGLTWLTSNYK	175
<i>Xenopus tropicalis</i>	YVQPSCATS GDGLYEGLTWLTSNYK	174
<i>Gallus gallus</i>	YVQPSCATTGDGLYEGLTWLTSNYK	174
<i>Homo sapiens</i>	YVQPSCATS GDGLYEGLTWLTSNYK	174
Consensus	yvqpsscattgdglye gltwltsnyk	

图 2 *Arf6* 基因同源蛋白的氨基酸比对Fig. 2 Alignment of *Arf6* amino acid sequences among *Litopenaeus vannamei* and other species图 3 利用 MEGA 4.1 软件构建的基于 *Arf6* 氨基酸序列的 NJ 系统树Fig. 3 NJ tree based on *Arf6* amino acid sequences using MEGA 4.1

用 ProtParam 预测 *Arf6* 编码蛋白的理化性质 (Gasteiger *et al.*, 2005), 推测该蛋白的分子式为 $C_{896}H_{1426}N_{252}O_{255}S_8$, 该蛋白中相对含量最多的氨基酸是 Leu (10.3%), 相对含量最少的氨基酸是 Cys (1.7%)。总的带负电荷的残基 (Asp+Glu) 为 21, 总的带正电荷的残基 (Arg+Lys) 为 25。用 NetPhos 2.0 预测磷酸化位点 (Blom *et al.*, 1999),

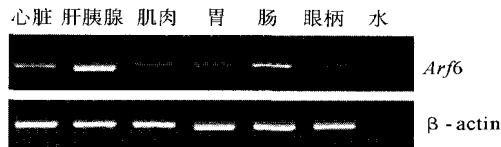
图 4 *Arf6* 基因的组织表达谱分析

Fig. 4 Tissue expression profile analysis of *L. vannamei* *Arf6* gene

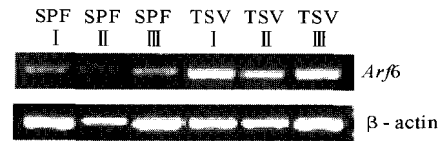
图 5 *Arf6* 基因在 SPF 及经 TSV 感染后肝胰腺中的表达分析

Fig. 5 Hepatopancreas expression analysis of *Arf6* gene in SPF and after the TSV infection

结果显示凡纳滨对虾 *Arf6* 共有 3 个可能的磷酸化位点,分别为 Tyr 54/150/163,对这些潜在磷酸化位点的进一步研究,将有助于了解生理条件下 *Arf6* 的动态修饰与作用机制。用 ProtScale 进行疏水性分析(Gasteiger *et al.* 2005),结果显示 *Arf6* 蛋白的 N 末端疏水性较强,可达到 +2.211, C 末端亲水性较强,可达到 -2.644,这说明 *Arf6* 蛋白具有两亲性的特点。InterProScan 对 *Arf6* 蛋白的分析发现(Hunter *et al.* 2009),其氨基酸序列中具有相当保守的 GTP 结合区域,证明了 *Arf6* 具有 GTP 结合蛋白的功能,推测该基因在细胞中具有重要的作用。接着用 ProtFun 2.2 Server 预测 *Arf6* 蛋白的功能分类(Blom *et al.* 1999);其免疫反应功能的可能性为 0.103,远高于其他功能。因此,推测 *Arf6* 蛋白具有免疫应答的活性,很可能参与凡纳滨对虾的免疫调控。

半定量 RT-PCR 结果显示,*Arf6* 基因在心脏、肝胰腺、肌肉、胃、肠和眼柄中广泛表达,表明凡纳滨对虾该基因在功能和进化上的保守性。但在肝胰腺中显著表达最高,而肝胰腺是对虾参与抗逆、生理防御、免疫监视等免疫过程的重要器官(刘晓云等 2003),由 *Arf6* 基因在肝胰腺中的表达差异表明,凡纳滨对虾在经 TSV 感染后表达量显著高于 SPF,进一步说明 *Arf6* 基因参与了机体对 TSV 的免疫过程,加之 ProtFun 预测的 *Arf6* 蛋白的功能分类,可初步断定本文中所研究的 *Arf6* 基因可能是一免疫应答基因,参与凡纳滨对虾免疫防御过程,但是其参与免疫的机理尚不清楚,有待进一步研究。

凡纳滨对虾是我国水产养殖主要经济品种之一,但近年来养殖大规模死亡问题一直困扰着该产业的健康发展,引起凡纳滨对虾死亡发生的原因是多方面的,可能是病原、环境和亲虾种质本身三方面共同作用的结果。因此,本实验及后续更深层的研究为探索 *Arf6* 介导的抗逆,抗病能力,以及凡纳滨对虾的遗传育种及其健康养殖奠定了基础。

参 考 文 献

- 王兴强,曹梅,马牲,董双林,阎斌伦. 2006. 盐度对凡纳滨对虾存活、生长和能量收支的影响. 海洋水产研究, 27(1): 8~13
- 兰萍,宋晓玲,张辉,成君军. 2008. 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫功能及抗病力的影响. 渔业科学进展, 31(1): 65~73
- 刘晓云,张志峰,包振民,姜明. 2003. 中国对虾组织细胞中的过氧化物酶体. 海洋科学, 27(11): 43~46
- 梁萌青,王士稳,王家林,常青. 2008. 海水养殖与低盐养殖凡纳滨对虾生长性能、酶活及 RNA/DNA 比值的差异. 海洋水产研究, 29(4): 69~73
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294(5): 1351~1362
- Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116: 153~166
- Donaldson, J. G. 2000. Filling in the GAPS in the ADP-ribosylation factor story. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3792~3794
- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. 2006. *Arf* proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 347~358
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Walker, J. M. *et al.* 2005. The proteomics protocols handbook. USA Totowa New Jersey: Humana Press, 571~607
- Gillingham, A. K., and Munro, S. 2007. The small G proteins of the *Arf* family and their regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 579~611
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K. *et al.* 2009. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*, 37: 211~215
- Kahn, R. A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R. C., Munro, S., and Schurmann, A. 2006. Nomenclature for the human *Arf* family of GTP-binding proteins, *Arf*, ARL, and SAR proteins. *Cell Biol.* 172: 645~650
- Pasqualato, S., Menetrey, J., Franco, M., and Cherfils, J. 2001. The structural GDP/GTP cycle of human *Arf6*. *EMBO Rep.* 2(3): 234~238
- Randazzo, P. A., Nie, Z., Miura, K., and Hsu, V. W. 2000. Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci. STKE*, 2000: RE1
- Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., and Kahn, R. A. 1990. ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1238~1242
- Weiss, O., Holden, J., Rulka, C., and Kahn, R. A. 1989. Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor. *Biol Chem.* 264: 21066~21072