

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) F₀-ATP 合酶 b 链全长 cDNA 的克隆及组织分布*

何晓东^{1,2} 刘庆慧^{1,3} 关广阔^{1,2} 李倩^{1,2} 李晨¹ 黄健^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 上海 201306;

3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 采用 RACE 方法克隆得到了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的 F₀-ATP 合酶 b 链基因的全长 cDNA 序列。生物信息学分析显示,该基因开放阅读框 744 bp,编码 248 个氨基酸,分子量为 28.2 kDa。Blast 比对结果显示,克隆得到的 cDNA 序列所编码的氨基酸序列与海虱(*Caligus clemensi*) F₀-ATP 合酶 β 亚基的同源性为 50%,与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) F₀-ATP 合酶 β 亚基的同源性为 60%。免疫组化实验及流式细胞分析表明, F₀-ATP 合酶 b 链广泛分布于对虾鳃组织中,并且在对虾血细胞表面有分布。

关键词 凡纳滨对虾; F₀-ATP 合酶 b 链; 克隆; 分布

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0087-07

对虾养殖在水产养殖业中具有重要的商业价值,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是广泛养殖的一个品种(张许光等, 2013)。对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)感染养殖对虾后, 3-10 d 对虾死亡率达到 100% (黄健等, 1995; Lightner, 1996; Wang *et al*, 1998), 并且该病毒可以感染其他甲壳类动物, 给养殖业带来了重大的经济损失。

ATP 合酶(ATP synthase)又称 F₀F₁-ATP 酶, 是一种位于线粒体内膜上、并在生物体的氧化还原反应中发挥关键作用的一种酶(张吉斌等, 2010)。ATP 合酶主要由 F₁ 和 F₀ 两个亚基组成, 其中 F₁ 伸在膜外, 具有水溶性, 而 F₀ 则嵌在膜内(杨福愉, 2005)。ATP 合酶在对虾的生命活动中发挥重要作用, 在不适的环境中, 该酶的活动会明显加强。Martinez-Cruz 等(2012)研究表明, 在溶氧较低的水体中, 对虾体内的 ATP 合酶会加速水解 ATP 以维持其自身的各种生理活动。Wang 等(2007)研究表明, WSSV 感染对虾后

ATP 合酶表达量明显上升。F₁-ATP 合酶的 β 亚基中的 BP53 蛋白参与 WSSV 感染(Liang *et al*, 2010), F₁-ATP 合酶作用于 WSSV 膜蛋白 VP37 (Zhan *et al*, 2013)。而 F₀-ATP 合酶 b 链与 WSSV 膜蛋白 VP292 有作用, WSSV 感染影响 F₀-ATP 合酶 b 链转录表达(Li *et al*, 2013)。目前 F₀-ATP 合酶 b 链全长基因序列尚未被克隆。

本研究采用 RACE 方法, 克隆得到 F₀-ATP 合酶 b 链 cDNA 序列的全长, 利用生物学分析方法对得到的序列进行分析, 并利用免疫组化实验和流式细胞分析其在对虾鳃和血细胞的分布情况, 为深入研究该基因在 WSSV 感染中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用凡纳滨对虾于 2013 年 7 月购自山东青

* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、国家自然科学基金(30871942)、山东省“泰山学者”建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。何晓东, E-mail: hxdong2012@126.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-17, 收修改稿日期: 2014-06-20

岛宝荣水产科技发展有限公司, 体长 10 cm, 实验室暂养 7 d 后使用。

1.2 凡纳滨对虾 F_0 -ATP 合酶 b 链全长 cDNA 的克隆

1.2.1 凡纳滨对虾肌肉总 RNA 的提取 取对虾的肌肉组织, 用 TaKaRa RNAiso Plus 试剂进行肌肉总 RNA 的提取。1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 180 V 电压下电泳 10 min 以观察 RNA 的提取效果。

1.2.2 F_0 -ATP 合酶 b 链的 3' RACE 根据 GenBank 公布的 F_0 -ATP 合酶 b 链的部分序列 (GenBank: EU246975.1) 设计并合成特异性引物。以提取的 RNA 为模板, 使用 TaKaRa 3' RACE 扩增试剂盒合成 cDNA。以 3' RACE 外引物和 GSP1 进行第 1 轮 PCR。PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。然后以第 1 轮 PCR 产物为模板进行第 2 轮 PCR, 使用引物为 3' RACE 内引物和 GSP2。PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 2 min, 30 个循环, 然后 72℃ 10 min。将扩增产物进行回收, 经 TA 克隆后进行测序, 得到 F_0 -ATP 合酶 b 链的 3' 端序列。

1.2.3 F_0 -ATP 合酶 b 链的 5' RACE 以提取的 RNA 为模板, 使用 TaKaRa 5' RACE 扩增试剂盒对总 RNA 进行 CIAP、TAP 处理, 并与 5' RACE 接头引物连接后, 反转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板进行后续的 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 使用的引物为 GSP4 和 5' RACE 外引物, PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 然后 72℃ 10 min。以上述的 PCR 产物为模板进行第 2 轮 PCR, 使用的引物为 GSP3 和 5' RACE 内引物, PCR 反应条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 然后 72℃ 10 min。将 PCR 扩增产物回收后测序, 得到 F_0 -ATP 合酶 b 链的 5' 端序列。

1.2.4 全长 F_0 -ATP 合酶 b 链序列的拼接 将得到的 F_0 -ATP 合酶 b 链的 5' 端序列和 F_0 -ATP 合酶 b 链的 3' 端序列使用 Accelrys Gene 软件进行拼接, 得到 F_0 -ATP 合酶 b 链序列的全长。

1.2.5 F_0 -ATP 合酶 b 链序列的验证 根据拼接得到的 cDNA 序列的全长设计一对引物 (表 1, Fs、Fa), 以提取的总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 7 min。1%琼脂糖凝胶进行电泳, 将 PCR 产物进行回收, 经 TA 克隆后测序, 验证 F_0 -ATP 合酶 b 链基因的全长序列。

1.3 F_0 -ATP 合酶及其编码的氨基酸序列的生物信息学分析

使用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

表 1 实验中所用引物

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
GSP1	GCTTACAGAGAAAGGCTGGCAA
GSP2	AACTCGCATTGAGCAGAAGCAC
GSP3	CTGAATGAACAGTTGCCAGCCTTT
GSP4	GTGCTTCTGCTCAATGCGAGTTTT
Fs	ATCTTGCCCTTCAGTGCCGTAAG
Fa	TTTAAGTTTTAAACTGACATCTGTC

和在线二级结构分析软件 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopm.html) 分析 F_0 -ATP 合酶全长 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列, 利用三级结构预测软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测该蛋白的空间结构, 利用 ClustalX 1.83 和 MEGA 4.02 建立系统进化树。

1.4 F_0 -ATP 合酶 b 链在鳃组织的分布

取凡纳滨对虾的鳃组织并浸入 10 倍体积的 Davidson's AFA 固定液中, 固定 24 h, 然后转移至 70%乙醇中。经梯度酒精脱水和二甲苯透明, 用石蜡包埋机进行包埋, 石蜡切片机切片, 切片脱蜡去水后, 3% H_2O_2 处理 10 min 阻断内源性过氧化物酶, 用蒸馏水冲洗。在微波炉里加热抗原修复液 (0.01 mol/L, pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲溶液) 至沸腾, 反复 1-2 次加热后, 室温冷却 10-20 min, 经 PBS 冲洗后晾干。与 F_0 -ATP 合酶兔抗 (1:10000) 作用 2 h 后, PBS 洗涤 3 次, 再经 FITC 标记羊抗兔 IgG (1:200) 作用 1 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次, DAPI 染核 3 min, 在激光共聚焦显微镜下观察, 同时以未经免疫的兔抗血清作对照。

1.5 流式细胞分析

从凡纳滨对虾围心腔中抽取血淋巴, 800 g 离心 5 min, PBS 悬浮血细胞, 加入 F_0 -ATP 合酶 b 链兔抗血清 50 μ l (1:5000) (Li *et al.*, 2013), 室温条件下轻微振荡孵育 1 h。800 g 离心 5 min, 用 200 μ l PBS 重悬, 加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 50 μ l (1:200), 室温条件下轻微振荡孵育 1 h, 用流式细胞仪 (CyFlow Space, 德国) 检测。以未经免疫的兔抗血清作空白对照。

2 实验结果

2.1 RACE 扩增 F_0 -ATP 合酶 b 链基因全长

3' RACE 扩增获得 500 bp 的片段 (图 1-A), 根据 TA 克隆测序的序列, 设计 5' RACE 特异引物, 扩增出约 700 bp 的特异片段 (图 1-B), 经 TA 克隆并测序, 获得 1129 bp 全长序列。以拼接得到的 cDNA 序列的

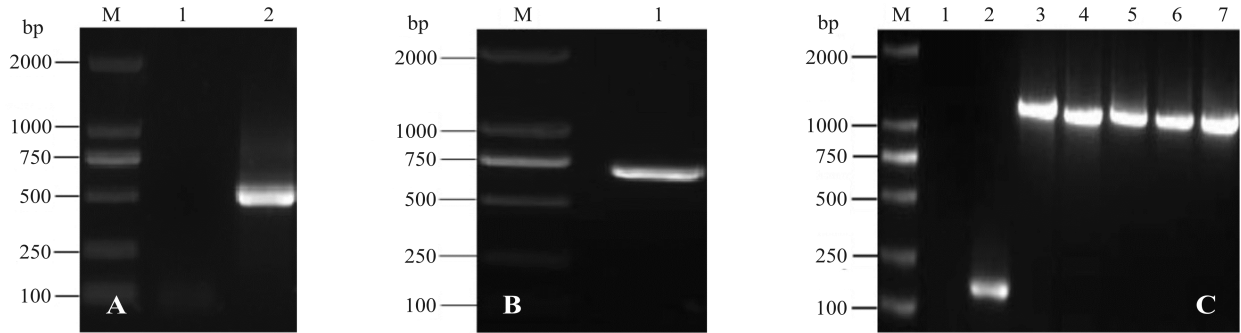


图 1 F₀-ATP 合酶 b 链基因 3' RACE、5' RACE 及全长序列扩增

Fig.1 PCR amplification results of 3'-RACE, 5'-RACE and full length of F₀-ATP synthase b-chain

A: 3' RACE. M. DNA marker DL2000; 1. 空白对照 Blank control; 2. 目的片段 F₀-ATP synthase

B: 5' RACE. M. DNA marker DL2000; 1. 目的片段 F₀-ATP synthase

C: Full length. M. DNA marker DL2000; 1. 对照 Control; 3-7. F₀-ATP 合酶目的片段 F₀-ATP synthase b-chain

全长设计引物进行 RT-PCR 扩增得到 1100 bp 的扩增片段(图 1-C), TA 克隆测序验证得到了 F₀-ATP 合酶 b 链基因的全长。

2.2 生物信息学分析

克隆得到的 F₀-ATP synthase 合酶 b 链 cDNA 全长 1129 bp, 共编码 248 个氨基酸(图 2), 其第 1-28

1	ATC	TTG	CCT	TCA	GTG	CCG	TAA	GAT	CCG	CCG	GAC	AGT	GACGACG	ATG	CTC	49	
														M	L		
50	TCC	CGA	CTT	GCC	CTC	CGC	TCC	GTG	CAG	GAA	GCC	AGA	CCT	TTT	CTG	GTG	97
	S	R	L	A	L	R	S	V	Q	E	A	R	P	F	L	V	
98	GCT	GTG	CGG	CCA	ACA	AGC	ACC	ACT	GCC	GTT	AAC	AAG	GCT	ACA	GAG	CGC	135
	A	V	R	P	T	S	T	T	A	V	N	K	A	T	E	R	
136	GAT	GAG	GTA	AAC	TTC	CCC	CGC	CGT	GCC	AGG	CCT	GTT	GAA	CCT	GGC	AAG	183
	D	E	V	N	F	P	R	R	A	R	P	V	E	P	G	K	
184	AGT	GCG	ATG	GGC	TTC	CTG	CCA	GAG	GAG	TGG	TTC	CAG	TTC	TTC	TAC	TCA	231
	V	R	M	G	F	L	P	E	E	W	F	Q	F	F	Y	S	
232	AAG	ACT	GGT	GTC	ACT	GGT	CCT	TAC	ATG	TTT	GGA	GTG	GGT	CTT	ACC	ACC	279
	G	K	T	V	T	G	P	Y	M	F	G	V	G	L	T	T	
280	TTC	CTC	TGC	TCC	AAG	GAG	ATC	TAT	GTC	ATG	GAG	CAC	GAG	TTT	TAC	ACT	327
	F	L	C	S	K	E	I	Y	V	M	E	H	E	F	Y	T	
328	GGT	TTG	TCC	ATC	TTT	GTC	ATG	GCT	GTT	TAT	GCC	ATC	AAG	AAG	TTG	GGC	375
	G	L	S	I	F	V	M	A	V	Y	A	I	K	K	L	G	
376	CCT	GGT	ATT	GCC	AAC	TAC	TTG	GAC	AAG	GAG	ATT	GAG	GAT	ATT	GAG	GGC	423
	P	G	I	A	N	Y	L	D	K	E	I	E	D	I	E	G	
424	AGC	TGG	GTG	AAG	TAT	CGC	CAA	GAG	AGT	GTC	GAG	GGT	CTT	AAG	CAG	GCT	471
	S	W	V	K	Y	R	Q	E	S	V	E	G	L	K	Q	A	
472	GTC	GAA	GAT	GAG	AAG	AAG	GCC	CAG	TGG	GAA	GCT	GAA	GGC	CAG	AAA	ATA	519
	V	E	D	E	K	K	A	Q	W	E	A	E	G	Q	A	I	
520	CTC	TTC	GAT	GCC	AAG	CGA	GAA	AAT	GTT	GCA	CTC	CAG	CTT	GAA	GCT	GCT	567
	L	F	D	A	K	R	E	N	V	A	L	Q	L	E	A	A	
568	TAC	AGA	GAA	AGG	CTG	GCA	ACT	GTT	CAT	TCA	GAG	GTT	AAG	AAA	AGG	TTG	615
	Y	R	E	R	L	A	T	V	H	S	E	V	K	K	R	L	
616	GAC	TAC	CAG	CTG	GAG	ACT	GCC	AAC	GTC	AAA	ACT	CGC	ATT	GAG	CAG	AAG	663
	D	Y	Q	L	E	T	A	N	V	K	T	R	I	E	Q	K	
664	CAC	ATG	GTG	AAC	TGG	ATT	GTA	AAC	AAC	GTT	AAA	GCC	TCC	ATC	ACT	CCT	711
	H	M	V	N	W	I	V	N	N	V	K	A	S	I	T	P	
712	GCT	CAG	GAG	GCT	GCT	GCT	CTG	AAG	CAG	TGC	TTT	GCT	GAC	CTC	AAG	GGT	759
	A	Q	E	A	A	A	L	K	Q	C	F	A	D	L	K	G	
780	CTT	GCT	CCC	CAG	TCT	GCC	TAA	ACA	AGA	ATT	ATT	TTT	CTA	TTT	TGA	GAT	807
	L	A	P	Q	S	A	*										
808	TTT	TTT	TTG	TCC	AGT	CAG	ATC	ATA	TTT	AGC	TGT	TTA	TTT	GTA	TAG	AAA	855
856	AGT	AYA	TTC	CAT	AAC	CTT	TTG	GGC	AGT	AGG	ACT	TAT	TGG	GTT	CAA	GAT	903
904	GAC	ATC	AGC	ATY	GTG	GTT	GTG	GTT	CAT	AGT	GGA	TAT	GAT	GAG	CTT	CTC	951
952	ATT	CCA	TTG	TCA	TTA	ATG	TAG	TTT	ACT	TGA	TGC	TCC	ACA	ACA	AAC	CAA	999
1000	TAA	TGA	ATA	ACT	ACC	AGT	GAC	AAA	ACC	AAG	TGT	ACT	ATG	TAC	AAT	TTT	1047
1048	CTT	ATT	AAR	ATT	TAT	GTA	CAG	AGG	ATA	TGT	AAA	TAA	ATG	ACA	GAT	GTC	1095
1096	AGT	TTA	AAA	CTT	AAA	AAA	AAA	AAA									1129

图 2 凡纳滨对虾 F₀-ATP 合酶 b 链核酸及氨基酸序列

Fig.2 The cDNA sequence and amino acid sequence of F₀-ATP synthase b-chain

图中灰色背景为起始密码子, 星号为终止子, 下划线部分为信号肽区域

The initiation codon is highlighted in gray, termination codon is indicated by asterisk, and the underline annotation is signal peptide

位氨基酸为信号肽, 所推导的成熟肽预测分子量为 28.2 kDa, 理论等电点(pI)为 8.614。二级结构分析显示, F_0 -ATP 合酶 b 链包含大量的 α 螺旋(占 58.47%),

无规则卷曲占 22.18%, 而 β 折叠只有 7.26%, 少量的 β 折叠(图 3)。利用蛋白结构预测软件得到其空间结构, 如图 4 所示。

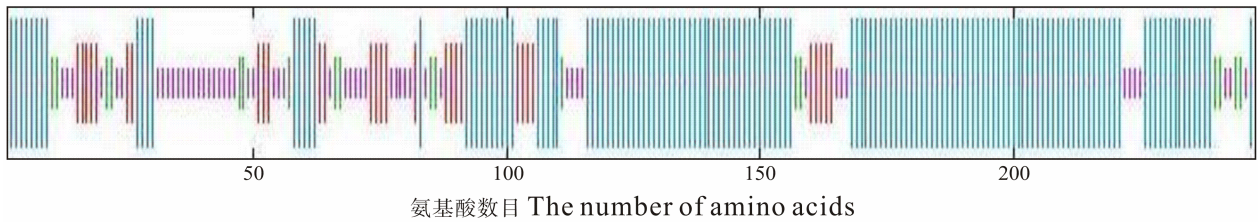


图 3 F_0 -ATP 合酶 b 链二级结构分析

Fig.3 Secondary structure analysis of F_0 -ATP synthase b-chain

蓝色代表 α 螺旋, 绿色代表 β 折叠, 红色代表延伸链, 紫色代表无规则卷曲

Alpha helix is indicated by blue, beta turn is indicated by green, extended strand is indicated by red, random coil is indicated by purple

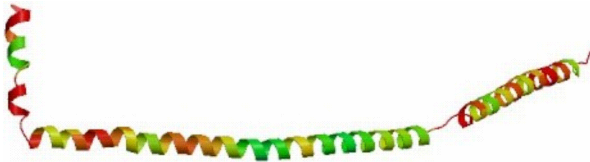


图 4 F_0 -ATP 合酶 b 链空间结构预测

Fig.4 Space structure prediction of F_0 -ATP synthase b-chain

用 NCBI BLAST 进行程序比对的结果显示, 实验克隆得到的 cDNA 序列所编码的氨基酸序列与海虱(*Caligus clemensi*) F_0 -ATP 合酶 β 亚基的同源性为 50%, 与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) F_0 -ATP 合酶 β 亚基的同源性为 60%。

基于凡纳滨对虾 F_0 -ATP 合酶 b 链基因编码的氨

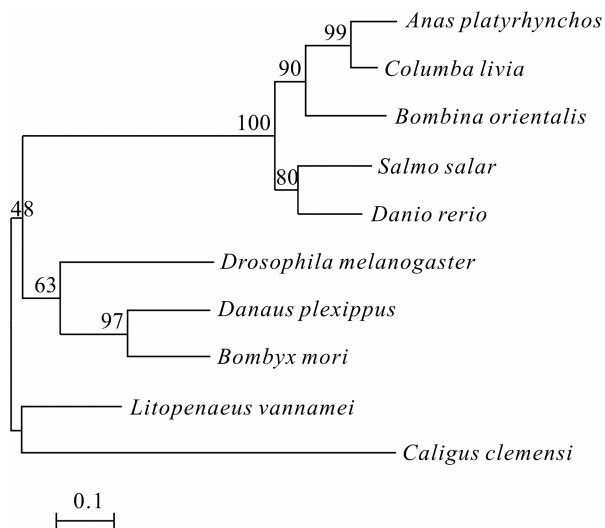


图 5 凡纳滨对虾 F_0 -ATP 合酶 b 链基因与其他物种同源基因的进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of nucleotide sequences among *L. vannamei* F_0 -ATP synthase b-chain and its homologous genes from different species

基酸序列, 利用 MEGA 4.02 软件对其与其他物种同源物的序列进行了分子系统学分析, 表明凡纳滨对虾 F_0 -ATP 合酶 b 链与海虱聚为一类(图 5)。

2.3 免疫组化实验

以 F_0 -ATP 合酶 b 链抗体检测 F_0 -ATP 合酶 b 链在鳃组织的分布, 可见鳃组织中大量绿色荧光信号包围在蓝色荧光的细胞核周围(图 6), 表明 F_0 -ATP 合酶 b 链广泛存在于凡纳滨对虾鳃中, 而未免疫的兔血清对照, 仅见微弱的绿色荧光信号(图 6)。

2.4 流式细胞分析

试验组和对照组分别计数 50000 个细胞, FL1 通道检测为荧光值大小(图 7)。通过设门(RN1)可以看出, 对照组荧光强度在门内的细胞数为 1368 个, 占总数的比例为 2.74%, 而实验组荧光强度在门内的细胞数为 6149 个, 占总数的比例为 12.30%。实验组发射荧光的细胞数明显高于对照组, 说明血细胞表面有 F_0 -ATP 合酶的分布。 F_0 -ATP 合酶通过与其抗体相结合, 进而与带荧光染料的二抗结合, 从而使细胞发射荧光。

3 讨论

本研究从凡纳滨对虾中克隆得到了 F_0 -ATP 合酶的 cDNA 序列的全长, 为 1129 bp。

Wang 等(2007)研究了对虾在感染 WSSV 病毒后其体内各种蛋白表达量的变化, 发现 ATP 合酶 β 亚基蛋白的表达量明显上升。对虾在感染其他病毒时, 其体内的 ATP 合酶 β 亚基蛋白含量也会上升。Bourchookarn 等(2008)研究发现, 对虾在感染对虾黄头病毒(Yellow head virus, YHV)后, 其体内的 ATP 合酶 β 亚基蛋白表达量与对照组相比明显上升。Martinez-Cruz 等(2012)

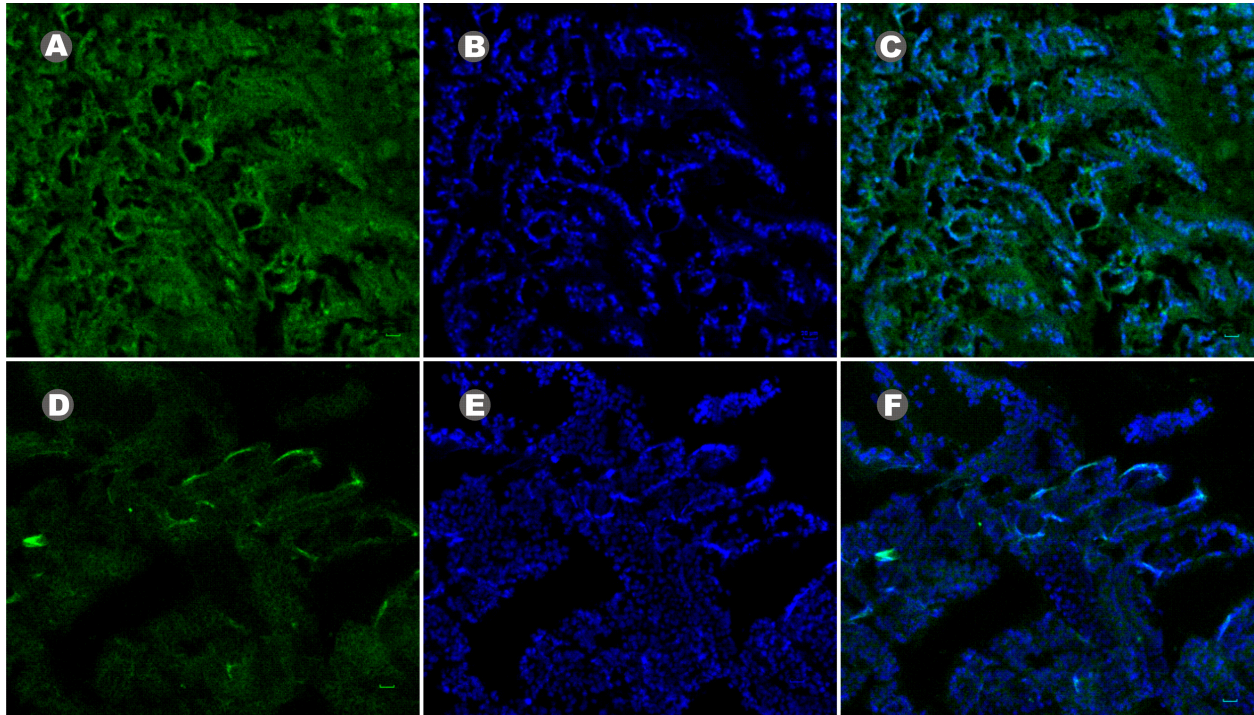


图 6 F_0 -ATPase b 链在凡纳滨对虾鳃组织中的定位

Fig.6 F_0 -ATPase b-chain distribution in gill of *L. vannamei*

A: 一抗为 F_0 -ATP 合酶兔抗; B: DAPI 核染; C: 合并 A 和 B; D: 一抗为兔抗血清对照; E: DAPI 核染; F: 合并 D 和 F
A: F_0 -ATPase synthase b-chain; B: DAPI; C: Merged A and B; D: Pre-immune serum; E: DAPI; F: Merged D and F

研究指出, 凡纳滨对虾在经过 10 h 的低氧处理后, 其体内的 ATP 含量并未发生明显变化, 而 ATP 合酶的活动与之前相比却提升了 70%。本研究免疫组化的实验结果表明, F_0 -ATP 合酶在凡纳滨对虾的鳃中有大量分布, 在对照组中, 由于组织的非特异性显色, 在显微镜下观察也有微弱的荧光现象。鳃作为对虾呼吸和病毒入侵感染的重要器官, 推测 F_0 -ATP 合酶在对虾遭到病毒感染时发挥了重要作用。

He 等(2005)分析比较了感染 WSSV 病毒后存活的对虾与普通对虾体内物质之间的差异, 发现了一种类似干扰素的物质, 并推测是该种物质增强了对虾的抵抗病毒的能力。干扰素是一种在细胞受到某些病毒感染后分泌的具有抗病毒功能的宿主特异性糖蛋白, 该种物质只在脊椎动物中发现, 在低等物种如甲壳动物中并没有发现。Rosa 等(2008)的更深入的研究发现, 在存活对虾中发现的类似干扰素的物质是属于 F_0 -ATP 合酶 β 亚基上的一个蛋白。Li 等(2013)采用 RT-PCR 方法, 分析 F_0 -ATP 合酶转录水平的分布, 表明 F_0 -ATP 合酶在凡纳滨对虾各组织中均有分布, 中和试验表明 F_0 -ATP 合酶参与 WSSV 的感染过程。本实验中, 利用流式细胞检测到 F_0 -ATP 合酶在凡纳滨对虾血细胞表面的分布, 在阴性对照中也检测到部分的荧光细

胞, 分析可能是由组织的自发荧光现象引起。Mangiullo 等(2008)的研究表明, F_0F_1 -ATP 合酶在血细胞膜表面有分布并执行受体功能, 但凡纳滨对虾 F_0 -ATP 合酶在 WSSV 感染中是否行使受体的功能尚需进一步的试验。

参 考 文 献

- 杨福愉. ATP 合酶: 一个最小的蛋白质分子转动马达. 医学分子生物学杂志, 2005, 2(4): 243-249
- 张吉斌, 刘月平, 方美英. 线粒体 ATP 合酶基因组成及生化机制研究进展. 中国畜牧杂志, 2010(7): 64-68
- 张许光, 赵培, 王国成, 等. 不同放苗密度凡纳滨对虾生物絮团养殖的环境和产出效应. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 111-119
- 黄健, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1-10
- Bourchookarn A, Havanapan PO, Thongboonkerd V, et al. Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 2008, 1784(3): 504-511
- He N, Qin Q, Xu X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive

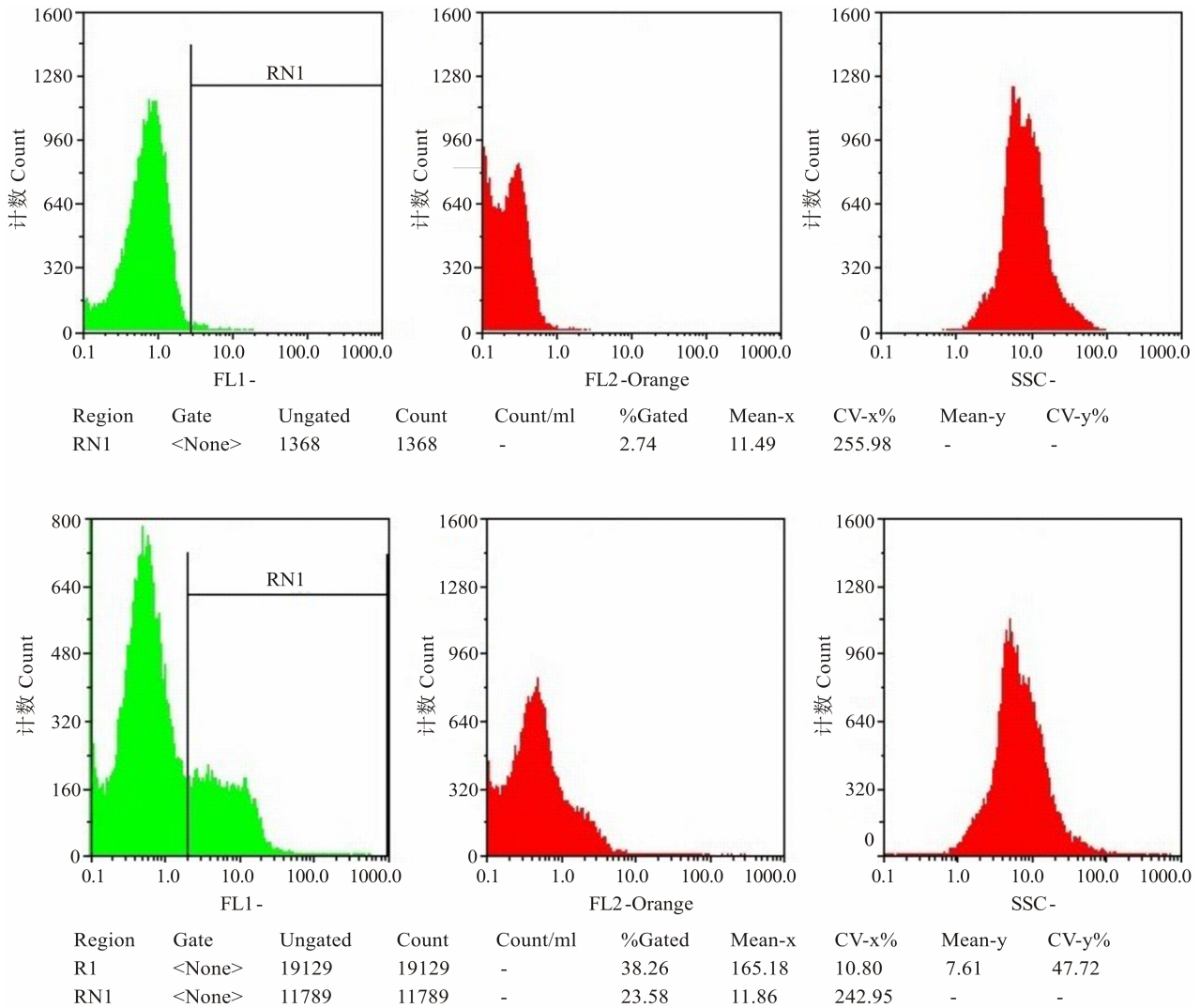


图7 流式细胞分析

Fig.7 Flow cytometry analysis

上图：一抗为兔抗血清对照，下图：一抗为 F₀-ATP 合酶抗体

Upper: Pre-immune serum, Under: Anti-F₀-ATPase b-chain synthase antibody

hybridization and differential hybridization. *Antiviral Res.*, 2005, 66(1): 39–45

Li Q, Liu QH, Huang J. F₀ ATP synthase b-chain of *Litopenaeus vannamei* involved in White Spot Syndrome Virus infection. *Virus Genes*, 2013, 47(1): 42–48

Liang Y, Cheng JJ, Yang B, *et al.* The role of F₁ ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Virol*, 2010(7): 144–152

Lightner DV. Epizootiology distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 1996, 15(2): 579–601

Mangiullo R, Gnoni A, Leone A, *et al.* Structural and functional characterization of F₀F₁-ATP synthase on the extracellular surface of rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*

(BBA)-Bioenergetics, 2008, 1777(10): 1326–1335

Martinez-Cruz O, Calderon de la Barca AM, Uribe-Carvajal S, *et al.* The function of mitochondrial F₀F₁ ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol*, 2012, 162(4): 107–112

Rosa RD, Barracco MA. Shrimp interferon is rather a portion of the mitochondrial F₀-ATP synthase than a true α -interferon. *Mol Immunol*, 2008, 45(12): 3490–3493

Wang HC, Wang HC, Leu JH, *et al.* Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(7): 672–686

Wang YC, Lo CF, Chang PS, *et al.* Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*, 1998, 164: 221–231

Zhan WB, Wang XL, Chi YY, *et al.* The VP37-binding protein F1ATP synthase b subunit involved in WSSV infection in

shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunol*, 2013, 34(1), 228–235

(编辑 冯小花)

cDNA Cloning and Study on Tissue Distribution of F₀-ATP Synthase b-chain of *Litopenaeus vannamei*

HE Xiaodong^{1,2}, LIU Qinghui^{1,3}①, GUAN Guangkuo^{1,2}, LI Qian^{1,2}, LI Chen¹, HUANG Jie^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is a major fatal pathogen to shrimp. It is known that the b-chain of F₀-ATP synthase plays a key role in the synthesis of ATP in all living organisms. Evidence from our previous research indicated that the b-chain of F₀-ATP synthase of *Litopenaeus vannamei* was involved in WSSV infection. However the full-length sequence of the b-chain of F₀-ATP synthase in *L. vannamei* has not been available yet. In this study we cloned the full cDNA using reverse transcription PCR (RT-PCR) and the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. Bioinformatics analysis was performed to predict the amino acid sequence and the secondary and space structure of the b-chain of F₀-ATP synthase. We also mapped the homology and phylogenetic tree using ClustalX 1.83 and MEGA 4.02. Immuno-histochemical and flow cytometry analysis were carried out to detect the tissue distribution of the b-chain of F₀-ATP synthase in *L. vannamei*. The results showed that the 1129 bp full length cDNA was successfully cloned. Bioinformatics analysis indicated that the full length cDNA had an open reading frame (ORF) of 744 bp that encoded 248 amino acids, and that the predicted molecular weight of the mature peptide was 28.2 kDa. The homology analysis of the b-chain of F₀-ATP synthase between species demonstrated that there was a higher similarity between *L. vannamei* and *Caligus clemensi* (50%), and *Drosophila melanogaster* (60%). Immuno-histochemical results showed that the b-chain of F₀-ATP synthase was widely distributed in the gill of *L. vannamei*. Flow cytometry analysis indicated that the b-chain of F₀-ATP synthase was distributed on the surface of hemocytes as well as in the cytoplasm of *L. vannamei*. These results suggested that the b-chain of F₀-ATP synthase could be located on the surface as well as in the cytoplasm of hemocytes when mediating the WSSV infection in *L. vannamei*. Our study shed lights on the further understanding of the role of the b-chain of F₀-ATP synthase in WSSV infection.

Key words *Litopenaeus vannamei*; F₀-ATP synthase b-chain; Clone; Distribution

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn