

# 海蜇(*Rhopilema esculentum*)磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因的 cDNA、基因组克隆与表达分析\*

杨 洪<sup>1,2</sup> 朱 玲<sup>1,3①</sup> 骆晓蕊<sup>1,2</sup> 周春娅<sup>1,3</sup> 庄志猛<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;  
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究利用 RACE 和 RT-PCR 技术克隆了海蜇(*Rhopilema esculentum*)磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因 (Re-PLA<sub>2</sub>-1) 的 cDNA 及基因组序列, 并分析了其 mRNA 在海蜇不同发育阶段的表达。Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的 cDNA 全长为 824 bp, 包括了 48 bp 的 5'非编码区、504 bp 的开放阅读框及 272 bp 的 3'非翻译区。SMART 分析显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 为分泌蛋白, 包括了一个由 19 个氨基酸组成的信号肽和一个由 118 个氨基酸组成的磷脂酶 A<sub>2</sub> 结构域。多序列比对和系统进化分析显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因与来自星状海葵(*Nematostella vectensis*)、僧袍芋螺(*Conus magus*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)等磷脂酶 A<sub>2</sub> 的相似性较高, 共同聚类为 pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub> 分支, 均包含 pfam09056 家族成员酶活性所必需的 Ca<sup>2+</sup>结合位点、活性催化位点和 PLA<sub>2</sub> 结构域所必需形成二硫键的半胱氨酸。Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组全长为 2671 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成。RT-PCR 结果显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因在海蜇 4 个发育阶段均有表达, 其中, 横裂体阶段的表达量最高, 碟状体阶段最低。这些研究结果为进一步了解海蜇磷脂酶 A<sub>2</sub> 毒素的生物功能奠定了基础。

**关键词** 海蜇; 磷脂酶 A<sub>2</sub>; cDNA; 基因组; 表达分析

**中图分类号** Q346 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0123-08

水母毒素是目前已知的最毒的海洋生物毒素之一, 其毒性是海蛇(*Pelamis platurus*)毒素的 250 倍, 是河豚毒素的 450 倍(于华等, 2003)。水母毒素的研究始于 20 世纪 60 年代, 但因获取困难、稳定性差等因素导致对水母毒素的研究明显滞后于蜂毒、蛇毒、蝎毒。水母毒素成分复杂, 既含有能够溶解细胞、具有细胞毒性的多肽、酶类等, 又含有一些非蛋白类小分子物质, 具有广泛的生物学活性(Martins *et al.*, 2009)。磷脂酶 A<sub>2</sub>(Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>)是水母毒素中含量较为丰富的组分之一, 能催化甘油磷脂第 2 位脂酰键的水解生成溶血磷脂和脂肪酸, 参与磷脂的代谢(Glaser *et al.*, 1993; Nevalainen *et al.*, 2004a、b; Sher

*et al.*, 2005), 具有神经毒性、肌肉毒性、酶活性等多种生物活性。PLA<sub>2</sub> 最先发现于哺乳动物胰液中, 随后被发现广泛存在于昆虫、软体动物、蛇和海洋无脊椎动物的毒液中(Nevalainen *et al.*, 2004a、b; Razpotnik *et al.*, 2010)。根据生物来源、分子量、氨基酸序列同源性、Ca<sup>2+</sup>是否依赖性以及生理功能等特性的不同, PLA<sub>2</sub> 可以大致分为 4 类: 分泌型 PLA<sub>2</sub> (Secreted phospholipase A<sub>2</sub>; sPLA<sub>2</sub>)、胞质型 PLA<sub>2</sub> (Cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub>; cPLA<sub>2</sub>)、胞内型 PLA<sub>2</sub> (Intracellular phospholipase A<sub>2</sub>; iPLA<sub>2</sub>)和 PAF (血小板激活因子)-PLA<sub>2</sub> (Feng *et al.*, 2002)。

海蜇(*Rhopilema esculentum*)隶属于刺胞动物门、

\* 国家自然科学基金(31372507)、国家重点基础研究发展计划(973)项目(2011CB403605)和上海海洋大学研究生科研基金(A1-0209-14-0900-57)共同资助。杨 洪, E-mail: yang\_hong0317@163.com

① 通讯作者: 朱 玲, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-21, 收修改稿日期: 2016-03-02

钵水母纲、根口水母目、海蜇属,作为一种大型的可食用经济水母,在我国海洋渔业中占有重要地位。海蜇基础生物学研究深入,人工繁育、增养殖技术成熟,是研究水母毒素组成、结构和功能的理想模式生物。本研究采用转录组 454 GS FLX 测序和 RACE 技术,首次解析了海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的 cDNA 和基因组结构,分析了其 mRNA 在海蜇不同发育阶段的表达,这些研究结果将为进一步了解海蜇磷脂酶 A<sub>2</sub> 毒素的生物功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 海蜇转录组 454 GS FLX 测序与 EST 分析

海蜇转录组的构建、454 GS FLX 测序与分析见周春娅等(2013)。利用生物信息学方法检索海蜇转录组文库,寻找与已知 PLA<sub>2</sub> 基因同源的 EST 序列。

### 1.2 Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA 全长的克隆

生物信息学分析发现,海蜇 EST<sub>(isotig15581)</sub>与僧帽芋螺(*Conus magus*)的 PLA<sub>2</sub> 基因具有高度的相似性。根据 EST<sub>(isotig15581)</sub>序列,设计特异性引物 Re-PLA<sub>2</sub>-1 F1 和 Re-PLA<sub>2</sub>-1 R1 扩增海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA 全长(表 1)。3'-RACE 使用 pBluescript SK(+/-)载体上的通用引物 T7 与 Re-PLA<sub>2</sub>-1 F1, 5'-RACE 使用载体通用引物 T3 与 Re-PLA<sub>2</sub>-1 R1。PCR 反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 33 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳检测后胶回收、连接、转化,

获得的阳性重组子经菌落 PCR 验证后送上海鼎安生物科技有限公司测序。

### 1.3 海蜇基因组 DNA 的提取及 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的基因组克隆

海蜇于 2015 年 8 月采自青岛沙子口。液氮保存返回实验室后,采用酚-氯仿法提取基因组 DNA: 取约 100 mg 海蜇伞径进行液氮研磨,然后加入 400 μl 的 DNA 提取液[其中, Tris-HCl (pH 为 8.0) 100 mmol/L, EDTA (pH 为 8.0) 100 mmol/L, 1% SDS 50 μl, 20 mg/ml 蛋白酶 K 8 μl],充分混匀, 55℃ 水浴 40 min。待裂解完全后,加入等体积的酚-氯仿试剂,静置 10 min, 12000 r/min 离心 15 min, 去除上清液。再加入 0.6 体积的异丙醇静置 7 min, 12000 r/min 离心 10 min, 除去上清液。然后加入 400 μl 预冷无水乙醇,沉淀 DNA 约 30 min 后,用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,自然干燥后,加入 20 μl 超纯水溶解。提取的 DNA 经 1.5%琼脂糖电泳进行检测。

根据 Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA 全长设计 5 对特异性引物进行基因组序列扩增(表 1)。

### 1.4 Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA 在不同发育阶段的表达

利用 Trizol 法分别提取海蜇 4 个不同发育阶段: 螅状体(Scyphistoma)、横裂体(Strobila)、碟状体(Ephyra)、水母体(Medusa)的总 RNA,然后反转录分别合成 cDNA,反应体系及反应条件按说明书要求操作(Invitrogen, 美国)。

表 1 引物序列

Tab.1 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 Name of primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Application
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F1	CAAGATGCAGACATACAAGGGAG	3' Race/genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R1	TCTAGTCCAGCCATAGCGATT	5' Race Race/genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F2	TAGGGTGTTCATTGGTGGTGT	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R2	TCTGTTGTTGTATCTGTCCGGTGC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F3	TATGTGGAAATCGCTATGGCT	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R3	TCTCCACGAATAAAAAGGCCAT	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F4	CTATTTGGAACGGCATAACGG	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R4	CTTTGCACCATTCTGGAGAGC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F5	AGTTACTTTGTTTCAAGCTCTCC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R5	GCTATATTTCTGTCGTCTTCTGTTC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F	ACTAACTCAAACCTACGAAAGCGAC	RT-PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R	ACGCACGGTTTGATAGTAGGC	RT-PCR
β-Actin F	AACTGGGACGATATGGAGAAGA	β-Actin PCR
β-Actin R	CGACCAGAGGCGTACAATGAG	β-Actin PCR
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	3' Race-PCR
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	5' Race-PCR

### 1.5 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的生物信息学分析

采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测 Re-PLA<sub>2</sub>-1 在螅状体、横裂体、碟状体和水母体的表达, 相关引物见表 1。RT-PCR 反应在 ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems) 上进行。PCR 反应体系和流程参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒操作说明(TaKaRa)。样品和内参分别设 3 个重复。反应结束后, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法和 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析和统计。

用 EditSeq 和 DNASTar 软件对 DNA 序列和推测的氨基酸序列进行生物信息学分析; 用 Bioedit 软件对所获得的测序结果序列进行全长拼接; ORF Finder 在线程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测开放阅读框, 并获得编码的氨基酸序列; 用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 及 SignalP 4.1 信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件对海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 进行蛋白结构域分析及信号肽预测; 用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与其他物种 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列的多序列比对。根据多序列比对结果, 用 Mega 4.1 采用邻接法 (Neighbor-joining) 构建 PLA<sub>2</sub> 的系统进化树 (Tamura *et al.*, 2007)。

## 2 结果与分析

### 2.1 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的全长 cDNA 分析

将 3'-RACE 和 5'-RACE 获得的序列与 EST<sub>(isotig15581)</sub> 序列进行拼接, 获得海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的 cDNA 全长序列。Re-PLA<sub>2</sub>-1 的 cDNA 全长序列为 824 bp, 包括 48 bp 的 5'非编码区(5'UTR)、504 bp 的开放阅读框(ORF)以及 272 bp 的 3'非翻译区(3'UTR), 其中, 3'UTR 包括一个多腺苷酸 Poly(A)尾和一个多腺苷酸化加尾信号 AATAAA (图 1)。Re-PLA<sub>2</sub>-1 为分泌蛋白, 信号肽由 19 个氨基酸组成, 酶切后的成熟肽预测的分子量和理论等电点分别为 18.93 kDa 和 7.79。

### 2.2 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的相似性和系统进化分析

BLAST 分析发现, 预测的海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与僧帽芋螺的 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列相似性为 41%, 与刺胞动物门星状海葵 (*Nematostella vectensis*) 的 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列 Nv10-Nv12 的相似性在 32%–34% 之间。多序列比对发现, Ca<sup>2+</sup> 结合位点和组氨酸-天冬氨酸催化位点在所有 PLA<sub>2</sub> pfam09056 成员推测的保守结构域严格保守 (图 2)。

```

1 CAATGCCTAATGTGCATCTGTTGTGGTCAATTCTGAG|GTTGTCACAATGCAAGTTCTG
1
1 M Q V L
61 GTTCTCTCTTTTCCATCTCTCTGAACTTCATATTAAGTTGGATGCCCTTCGGATACA
5 V L L F S I S L N F I L T C G C P S D T
121 TTGACCAACGGTTGCAGTGTACCAATCAATAGCACATCGTTTCCATACAAGGTCTTCTTC
25 L T N G C S V P I N S T S F P Y K V F F
181 CATCCAGCTTGCCAGAGACATGATGTTTGTCTATTCTTGC|GGTCAAATGCATAGCTGGTCA
45 H P A C Q R H D V C Y S C G Q M H S W S
241 AGAGCAAATGTGATTCTGGATTTTAAACGACATGATAGGCATATGTAGGACAACAAAC
65 R A N C D S G F L N D M I G I C R T T N
301 TCAAACCTACGAAAGCGACGCCATATTGAAGACTACATGCCGCTGCTTCGACACAAGCTG
85 S N L R K R R H I E D Y M P L L R H K L
361 AAACGTAGTATACGAGCCACCGGCTGACGATCTGGTCTATGATTGTGGGGTACAGTG
105 K R S I R A T E P D D L V Y A L W G T V
421 TGTGAATGGGCCGG|GAGCCTACTATCAAAACCGTGCCTTTGTTGGAAACAAACACTAT
125 C E W A A G A Y Y Q T V R L F G T K H Y
481 GAGCAGCTTTCACCTGCCCATATGCATTCCAAATGTGCTATAGACAATGGTACCCCA
145 D D V S P A H I C I H Q C A I D N G T P
541 AACATCAGCTGAAGCTCAATGTATTATCACAACTAGAAGATAAAATAGCCACGCAA
165 N I S *
601 TTAAGTGAGCTCGATCTTGGTGACATTAGTGAAGAGCAGACCAAGAGGCTGAAGAGTTT
661 TTCAGCCAGAAAGCAAAGATTGGTGAG|AATAAA|GATGAGGATTTGAGACAATGAAGAT
721 TTAGGGGCTGGCAATGGAGGAAGGTGGGCAAAAGTCAGGCATAAGCCTTCAAAAATTA
781 TAATGGCCAGAAAAAAGAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因全长 cDNA 及推测的氨基酸序列  
Fig.1 Full-length Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA of *R. esculentum* and the deduced amino acid sequence

注: 下划实线表示信号肽; 终止密码子用\*标出; 方框表示多聚腺苷酸加尾信号; 3 个内含子插入位点用 Y 标出  
Note: The putative signal peptide was underlined. The asterisk (\*) indicated the stop codon and the classical polyadenylation signal was enclosed in a box. The arrow (Y) marked the insertion site of three introns

选择来自不同物种的 pfam09056 家族的 PLA<sub>2</sub> 结构域, 应用 MEGA 4.1 程序, 采用邻接法构建系统进化树见图 3。从图 3 可以看出, Re-PLA<sub>2</sub>-1 与僧帽芋螺、星状海葵、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 毒素 PLA<sub>2</sub> 聚为 GIX PLA<sub>2</sub> 一支, 与 GX III、GX II PLA<sub>2</sub> 共聚为 pfam-collection, 而其他家族共聚为 cd-collection。

### 2.3 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组结构分析

利用 5 对特异性引物扩增获得了 5 段首尾重叠的 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组片段, 将这些片段拼接获得了全长为 2671 bp 的 RePLA<sub>2</sub> 基因组序列。利用 NCBI 上 Splign 内含子在线分析工具将 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的 cDNA 与基因组序列进行比对分析。结果显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组包含 4 个外显子和 3 个内含子 (表 2、图 4)。4 个外显子大小在 39–388 bp 之间, 3 个内含子大小分别为 1003 bp、616 bp、494 bp。内含子的 A+T 含量在 62.15%–

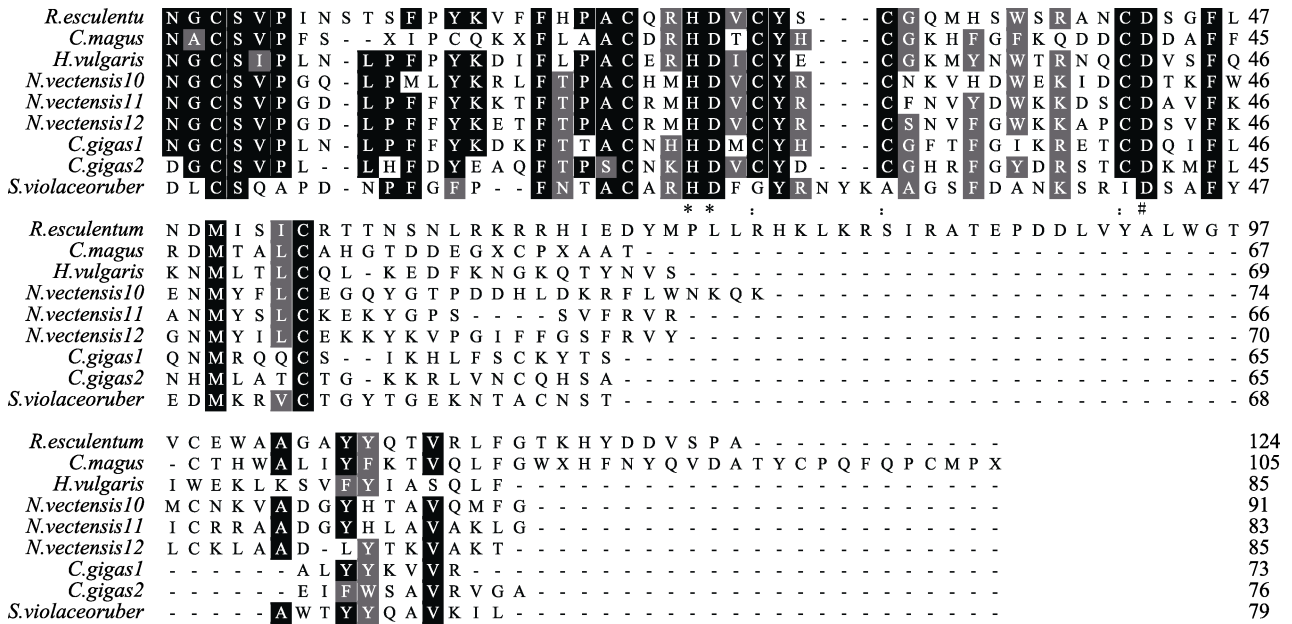


图 2 海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与其他 pfam09056 家族 PLA<sub>2</sub>S 结构域氨基酸多序列比对  
 Fig.2 Multiple sequence alignment between *R. esculentum* Re-PLA<sub>2</sub>-1 and PLA<sub>2</sub>S from other species

注: 黑色表示相同氨基酸, 灰色表示相似氨基酸; \*和#分别表示 PLA<sub>2</sub> 结构域的 Ca<sup>2+</sup>结合位点和组氨酸-天冬氨酸催化位点  
 Note: The black shadowing showed identical amino acids and the gray shadowing indicated similar amino acids. The asterisk (\*) and pound sign (#) indicatd a calcium-binding site and the His-Asp catalytic active sites of a PLA<sub>2</sub> domain respectively

67.60%之间, 而外显子的 A+T 含量在 53.46%–61.08% 之间, 明显高于外显子。预测的 PLA<sub>2</sub> 结构域活性中心“组氨酸-天冬氨酸”(HD)二聚体和 Ca<sup>2+</sup>结合位点天冬氨酸(D)被第 2 个内含子分隔在第 2、3 外显子中。所有内含子-外显子边界均符合“AT-CG”剪切规则, 按照内含子分型原则, 内含子类型分别属于 0 型和 1 型(表 2)。

### 2.4 Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA 的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术分析了 Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA 在海蜇不同发育阶段的表达见图 5。从图 5 可以看出, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因在海蜇的螅状体、横裂体、碟状体和稚水母 4 个发育阶段均有表达, 但存在着明显的表达差异。其中, 横裂体阶段表达量最高, 碟状体阶段表达量最低, 横裂体、螅状体和水母体阶段的表达分别为碟状体阶段表达的 12.2、7.6 和 5.5 倍。

### 3 讨论

分泌型磷脂酶(sPLA<sub>2</sub>S)是一类分子量小(14–17 kDa)、由二硫键连接的分泌蛋白, 其催化活性依赖于微摩尔的 Ca<sup>2+</sup>存在。根据分子结构的差异, sPLA<sub>2</sub>S 可以分成 15 个组(Groups, G)和许多亚组(Sub-Groups) (Six *et al.*, 2000)。近年来, Nevalainen 等(2012)、Punta 等(2011)根据保守结构域将 sPLA<sub>2</sub>S 分成 cd-collection 和 pfam-

collection 两大类群。sPLA<sub>2</sub>S 家族在进化上出现较早, 从低等微生物到高等脊椎动物均有发现, 尽管氨基酸序列差异较大, 但 Ca<sup>2+</sup>结合环、催化活性位点在不同家族 sPLA<sub>2</sub>S 都严格保守, 这说明 sPLA<sub>2</sub>S 在不同生物的生命过程中都起关键作用(Nevalainen *et al.*, 2012)。

海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 具有 sPLA<sub>2</sub>S 的典型特征: 磷脂酶 Pfam09056 家族严格保守的 Ca<sup>2+</sup>结合位点和催化活性中心“HD”二聚体(图 3)。多序列比对和系统进化分析结果都表明, Re-PLA<sub>2</sub>-1 不但与僧袍芋螺 PLA<sub>2</sub> 具有较高的相似性(41%), 而且与僧袍芋螺、长牡蛎、水螅等聚类于 GIX 一簇, 说明 Re-PLA<sub>2</sub>-1 也是 pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub> 家族成员之一。目前, 在僧袍芋螺中发现的磷脂酶 A<sub>2</sub> 是唯一确定的 pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub>S 的成员, 但其三维结构还未见报道(McIntosh *et al.*, 1995; Nevalainen *et al.*, 2013)。因此, GIX 家族磷脂酶 Ca<sup>2+</sup>结合及催化活性中心结构域均基于已知三维结构的紫红链霉菌(*Streptomyces violaceoruber*) pfam09056 GIV PLA<sub>2</sub>S 进行预测(Sugiyama *et al.*, 2002)。紫红链霉菌 PLA<sub>2</sub>S N 端天冬氨酸(Asp)和亮氨酸(Leu)共同参与 Ca<sup>2+</sup>的结合, 而刺胞动物 PLA<sub>2</sub>S 则衍变为天冬酰胺(Asn)和甘氨酸(Gly), 这一变化的具体生物学意义目前还不清楚(Nevalainen *et al.*, 2012)。Re-PLA<sub>2</sub>-1 含有 11 个半胱氨酸(Cys), 能形成 5 对二硫键。在以“HD”二聚体为核心的催化位点具有 GIX

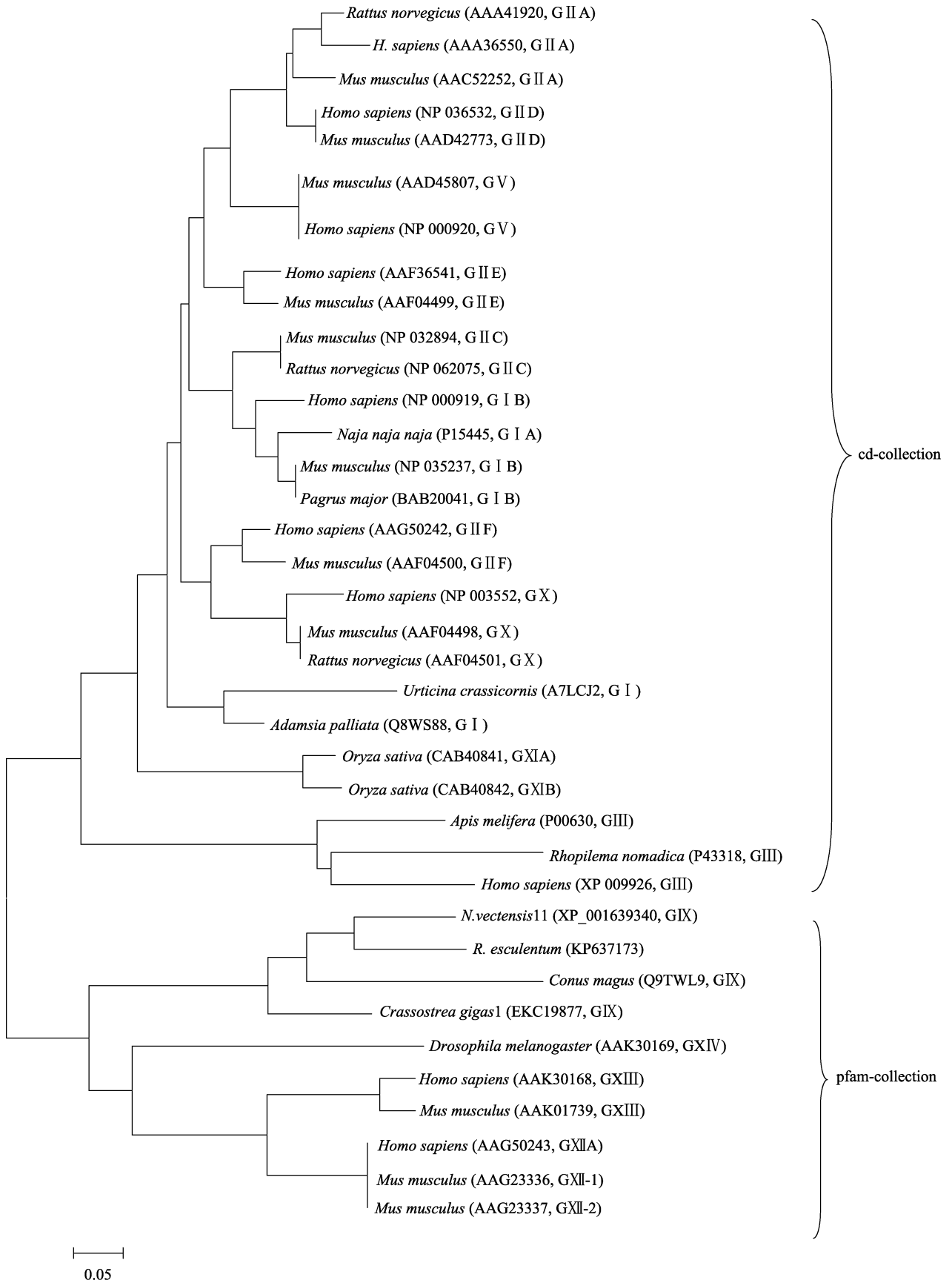


图 3 基于邻接法的 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列的系统进化树  
 Fig.3 Phylogenetic tree of PLA<sub>2</sub> based on neighbor-joining method



表 2 Re-PLA<sub>2</sub>-1 内含子/外显子长度、剪切位点及内含子类型  
Tab.2 Intron/exon lengths, splice junctions, and intron types of Re-PLA<sub>2</sub>-1

外显子 Exon	外显子长度 Length of exon (bp)	剪切位点 Splice junction		内含子长度 Length of intron (bp)	内含子类型 Type of intron
		3'	5'		
1	-39	-	GAGgtaagt	1003	-
2	180	ttgaagGTT	TGCgtacgt	616	0
3	217	ttttagGGT	CGGgtaggt	494	1
4	388	tttcagGAG	-	-	-

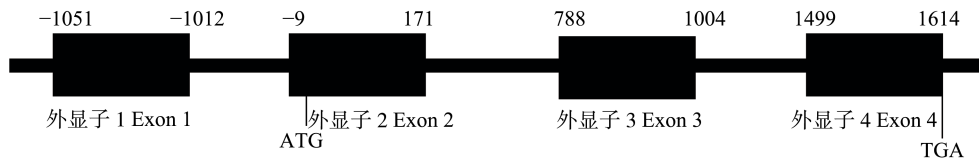


图 4 海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组结构分布  
Fig.4 Genomic organization of *R. esculentum* Re-PLA<sub>2</sub>-1

注: 黑色方块代表外显子, 黑色粗线代表内含子; 数字代表外显子和内含子的位置和大小(bp)

Note: The black block showed exon and the black thick line indicatd intron. The number marked the site and size of of the exon and intron

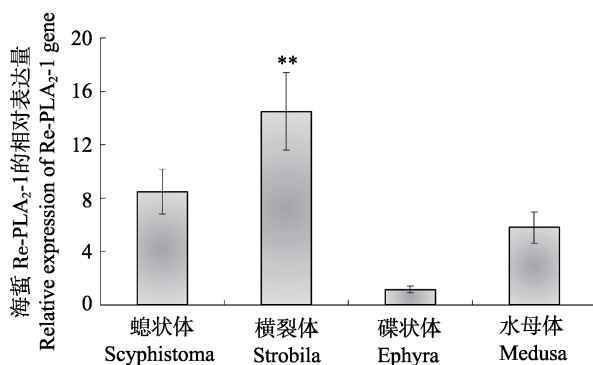


图 5 Re-PLA<sub>2</sub>-1 在海蜇不同发育阶段的表达  
Fig.5 The expression of Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA in different developmental stages of *R. esculentum*

\*\* 为差异极显著

\*\* were considered to be extremely significant differences

PLA<sub>2</sub> pfam09056 家族成员保守氨基酸序列 (Ala/Ser-Cys-X-X-His-Asp-X-Cys-Tyr-X-Cys) 的特征, 其中, Ca<sup>2+</sup>结合结构域缺失, Ca<sup>2+</sup>的结合可能也是由 N 端的 Asn 和 Gly 共同介导完成的 (Nevalainen *et al.*, 2012)

sPLA<sub>2</sub> 在动物中广泛存在, 但不同种类的 sPLA<sub>2</sub> 基因组结构差异明显。人的 G II A 磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因组中均含 5 个外显子 4 个内含子 (Seilhamer *et al.*, 1989), 而 G I B 磷脂酶的基因组中却含有 4 个外显子和 3 个内含子 (Jeyaseelan *et al.*, 2000)。同时, 同一家族的 sPLA<sub>2</sub> 在不同物种中其基因组结构也不相同。蜜蜂 (*Apis mellifera*) 和蝎子 (*Anuroctonus phaiodactylus*) 的

G III 磷脂酶的基因组均含有 4 个外显子, 人的则有 7 个外显子, 而果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 G III 磷脂酶 A<sub>2</sub> 具有 2-6 个不等的外显子个数 (Valdez-Cruz *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2009)。海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与 G I B 磷脂酶基因组结构相似, 均具有 4 个外显子和 3 个内含子, 说明海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 可能具有某些与 G I 磷脂酶相似的基因组进化方式 (Jeyaseelan *et al.*, 2000)。

PLA<sub>2</sub>s 种类繁多, 其表达模式和分布随着发育过程发生改变。小鼠 (*Muroidea* sp.) 的 G I B、G II A、G II D、G II E、G II F、G V 和 G X sPLA<sub>2</sub>s 在其胃肠道中均有表达, 但在其他组织中分布不同 (Eerola *et al.*, 2006)。意大利蜂毒 PLA<sub>2</sub> 的表达随其日龄和季节发生变化, 如其羽化早期毒囊内表达量很低, 羽化后的 8-10 d 表达量急剧增加, 并在随后的成年期保持不变 (Owen *et al.*, 1990)。本研究发现, Re-PLA<sub>2</sub>-1 在海蜇生活史各时期均有表达, 其中, 横裂体阶段表达量最高, 碟状体表达量最低, 2 个阶段的表达量相差高达 12 倍。不同发育阶段 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的表达差异可能与海蜇在不同发育阶段的摄食方式有关。研究表明, 海蜇不同发育阶段具有不同的摄食方式, 蟪状体依靠触手捕获食物, 碟状体依靠缘瓣捕获食物, 而水母体则依靠口腕和肩板表面上的吸口完成 (刘春洋等, 2011)。而利用免疫组化的方法定位地中海水母磷脂酶毒素的分泌部位发现, 其磷脂酶毒素是由刺丝囊分泌的 (Sher *et al.*, 2005), 而刺丝囊素作为水母的捕食和防御的重要武器, 在其生活史的不同发育阶段均具有重要作

用。因此,海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 尽管在不同发育阶段的表达模式不同,但均在海蜇捕食、防御和食物消化中具有重要作用。

### 参 考 文 献

- 于华华,刘希光,刘松,等.水母毒素的研究现状.海洋科学,2003,27(11):27-29
- 刘春洋,王彬,李轶平,等.海蜇不同生长阶段的摄食方式和摄食习性.水产科学,2011,30(8):491-494
- 周春娅,朱玲,潘滢,等.海蜇(*Rhopilema esculentum*)Wnt5 基因: cDNA 克隆、基因组结构与表达.海洋与湖沼,2013,44(4):1115-1122
- Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, et al. Analysis of expression of secreted phospholipases A<sub>2</sub> in mouse tissues at protein and mRNA levels. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761(7): 745-756
- Feng L, Manabe K, Shope JC, et al. A real-time fluorogenic phospholipase A<sub>2</sub> assay for biochemical and cellular activity measurements. Chem Biol, 2002, 9(7): 795-803
- Glaser KB, Mobilio D, Chang JY, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Regulation and inhibition. Trends Pharmacol Sci, 1993, 14(3): 92-98
- Jeyaseelan K, Armugam A, Donghui M, et al. Structure and phylogeny of the venom group I phospholipase A<sub>2</sub> gene. Mol Biol Evol, 2000, 17(7): 1010-1021
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- Martins RD, Alves RS, Martins AMC, et al. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A<sub>2</sub> from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. Toxicon, 2009, 54(4): 413-420
- McIntosh JM, Ghomashchi F, Gelb MH, et al. Conodipine-M, a novel phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. J Biol Chem, 1995, 270(8): 3518-3526
- Nevalainen TJ, Cardoso JCR. Conservation of group XII phospholipase A<sub>2</sub> from bacteria to human. Comp Biochem Phys D: Genomics Proteomics, 2012, 7(4): 340-350
- Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> in cnidaria. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2004a, 139(4): 731-735
- Nevalainen TJ, Quinn RJ, Hooper JNA. Phospholipase A<sub>2</sub> in porifera. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2004b, 137(3): 413-420
- Nevalainen TJ, Morgado I, Cardoso JCR. Identification of novel phospholipase A<sub>2</sub> group IX members in metazoans. Biochimie, 2013, 95(8): 1534-1543
- Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. Toxicon, 1990, 28(7): 813-20
- Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res, 2011, 40(D1): 290-301
- Razpotnik A, Krizaj I, Sribar J, et al. A new phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis* - its primary structure and phylogenetic classification. FEBS J, 2010, 277(12): 2641-2653
- Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P, et al. Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. J Biol Chem, 1989, 264(10): 5335-5338
- Sher D, Knebel A, Bsor T, et al. Toxic polypeptides of the hydra—a bioinformatic approach to cnidarian allomones. Toxicon, 2005, 45(7): 865-879
- Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Classification and characterization. Biochim Biophys Acta, 2000, 1488(1-2): 1-19
- Sugiyama M, Ohtani K, Izuhara M, et al. A novel prokaryotic phospholipase A<sub>2</sub>: Characterization, gene cloning, and solution structure. J Biol Chem, 2002, 277(22): 20051-20058
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599
- Valdez-Cruz NA, Segovia L, Corona M, et al. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. Gene, 2007, 396(1): 149-158
- Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 2002, 3(7): 1-11
- Xin Y, Choo YM, Hu ZG, et al. Molecular cloning and characterization of a venom phospholipase A<sub>2</sub> from the bumblebee *Bombus ignitus*. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2009, 154(2): 195-202

## cDNA, Genome Cloning, and mRNA Expression of Phospholipase A<sub>2</sub> Gene from the *Rhopilema Esculentum*

YANG Hong<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>1,3</sup>①, LUO Xiaorui<sup>1,2</sup>, ZHOU Chunya<sup>1,3</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>1,3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** The cDNA and gene of phospholipase A<sub>2</sub> (Re-PLA<sub>2</sub>-1) of *Rhopilema esculentum* were cloned using RACE, and the mRNA expression was monitored at different developmental stages with quantitative real-time PCR analysis. The full-length cDNA of Re-PLA<sub>2</sub>-1 was 824 bp, containing a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 48 bp, an open reading frame (ORF) of 504 bp, and a 3'-untranslated region (3'-UTR) of 272 bp. SMART analysis showed that Re-PLA<sub>2</sub>-1 was a secreted protein, including a putative signal peptide consisting of 19 amino acid residues and a domain of phospholipase A<sub>2</sub>. The deduced amino acid sequence of Re-PLA<sub>2</sub>-1 was highly similar to those of PLA<sub>2</sub>s from *Conus magus*, *Nematostella vectensis*, *Crassostrea gigas* and so on, and they could form a cluster of pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub> revealed by the multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. They shared the essential features of pfam09056 PLA<sub>2</sub>s family, including a calcium-binding site, the catalytic active sites, and a PLA<sub>2</sub> domain, which perfectly corresponds to the conserved disulfide-bonded cysteine residues involved in the formation of the internal disulfide. The size of Re-PLA<sub>2</sub>-1 gene was 2671 bp that included four exons and three introns. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression of Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA occurred in all four developmental stages. The expression was the highest in strobila and the lowest in ephyra. These results contributed to further understanding the biological function of PLA<sub>2</sub> in *R. esculentum*.

**Key words** *Rhopilema esculentum*; Phospholipases A<sub>2</sub>; cDNA; Genome; Expression analysis

① Corresponding author: ZHU Ling, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn