

郇卫华,田 罗,黄廷华,等. 凡纳滨对虾钙网蛋白 cDNA 序列的克隆及组织表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):36-40,47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.009

凡纳滨对虾钙网蛋白 cDNA 序列的克隆及组织表达分析

郇卫华^{1,2}, 田 罗³, 黄廷华¹, 姚 敏¹, 许巧情^{1,2}

(1. 长江大学动物科学学院水产系, 湖北荆州 434025; 2. 汕头大学广东省海洋生物技术重点实验室, 广东汕头 515063;

3. 荆州职业技术学院, 湖北荆州 434023)

摘要:利用 RACE 技术,克隆了凡纳滨对虾钙网蛋白(calreticulin, CRT)基因(GenBank 登录号:JQ682618)。该基因(*LvCRT*)cDNA 全长 1 866 bp,含有 1 个长达 1 221 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码的成熟肽由 406 个氨基酸组成,5'UTR(5'非编码区)长度为 222 bp,3'UTR 长度为 423 bp,3'端加尾信号 AATAAA 位于 poly(A)尾巴上游 27 bp 处。预测其理论分子量是 15.3 ku,等电点 pI 为 4.90。具有 1 个保守的钙网蛋白家族标签(KHEQNIDCGGGYLKVF),1 个信号肽(MKTWVFLALFGVVLVES)和保守的 HDEL 内质网回收标签。经 NCBI BLASTX 比对表明,*LvCRT* 基因与中国明对虾和斑节对虾的 *LvCRT* 具有高度的相似性和一致性。系统进化分析表明,*LvCRT* 在亲缘关系上更接近昆虫的钙网蛋白基因。荧光定量 PCR 结果显示 CRT 在肌肉组织中表达量最低,在肠中的表达量最高。对凡纳滨对虾 CRT 基因全长 cDNA 序列克隆和表达的研究为更进一步了解 CRT 多肽在凡纳滨对虾中的重要功能奠定了基础。

关键词:凡纳滨对虾;钙网蛋白;基因克隆;表达

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0036-05

钙网蛋白(calreticulin, CRT)最初是由 Ostwald 等在兔肌肉细胞的糙面内质网中被发现的^[1]。近年来研究表明, CRT 不仅存在于内质网腔中,在细胞表面和胞外基质中都有表达^[2-3]。Luan 等研究表明, CRT 在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肝胰腺、鳃、肌肉、肠、淋巴器官、血细胞和卵巢中均有表达,其中卵巢的表达量最高^[4]。成熟的钙网蛋白包括 3 个不同的功能结构域:N-功能域负责结构底物蛋白,P-功能域和 C-功能域可以结合钙离子并使这种结合更加稳定^[5-8]。目前为止,已公布的甲壳动物的钙网蛋白序列包括中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (DQ323054)、斑节对虾 *Penaeus monodon* (HQ259085) 和克氏原螯虾 *Pacifastacus leniusculus* (HQ596362)。

作为内质网分子伴侣蛋白,钙网蛋白除了在细胞功能中扮演重要的作用,如内质网钙离子平衡和分子伴侣功能^[8-9]外,还参与了包括生长、繁殖、蜕皮、免疫功能、细胞凋亡和氧化及胁迫响应的多种生物学过程^[2,6,10-13]。本研究根据长期低盐诱导消减 cDNA 文库中差异表达基因的同源序列和 RACE 方法,克隆了凡纳滨对虾 CRT(*LvCRT*)基因,并利用荧光定量 PCR 技术对其组织特异性表达进行了分析,以期对凡纳滨对虾胁迫生理相关基因的克隆研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验用虾购自广东海兴农生物科技有限公司,于广东海洋大学东海岛实验基地水泥池暂养 1 周,取健康凡纳滨对虾,经灭菌 DEPC 水清洗后,先将其冰浴麻醉,冰浴条件下分离血细胞、肌肉、肝胰腺、肠道和鳃共 5 种组织,迅速装入 1.5 mL eppendorf 离心管(RNase free),并立即投入液氮速冻,后转移至 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取

取凡纳滨对虾血细胞、肌肉、肝胰腺、肠道和鳃共 5 种组织,按照联合基因的 Unizol Reagent(GENERay biotechnology, China)的操作步骤,研磨、裂解组织后提取总 RNA,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和紫外可见分光光度计对提取的组织总 RNA 进行定性和定量检测。

1.3 *LvCRT* cDNA 全长克隆

1.3.1 *LvCRT* cDNA 片段的获得 根据构建的消减 cDNA 文库得到的 *LvCRT* 的 EST 序列(146 bp)和中国明对虾 CRT 保守序列,重新应用软件 Primer Premier 5.0 设计正反向引物(*LvCRT*F1/*LvCRT*R1)克隆中间片段,本试验中所有引物皆由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1)。PCR 反应体系为 20 μL,反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 60 s,57 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,用 PCR 产物凝胶回收试剂盒(OMEGA, USA)回收扩增片段,回收后与 Easy Digestion T-vector(pED-T)(SinoBio, Shanghai)载体连接,并转入感受态细胞 DH5α 中。挑取阳性克隆菌落送往深圳华大基因公司测序,将所得 *LvCRT* 基因 cDNA 中间序列于 NCBI 中进行 BLASTX 同源性分析。

收稿日期:2015-07-12

基金项目:广东省海洋生物技术重点实验室开放基金(编号:GPKLMB201403);长江大学博士启动经费(编号:8012000101122)。

作者简介:郇卫华(1977—),女,湖北襄阳人,博士,讲师,主要从事水产分子营养学研究。E-mail: gwh105@126.com。

通信作者:许巧情,博士,教授,主要从事水产分子生物学研究。E-mail: 35507883@qq.com。

1.3.2 *LvCRT* cDNA 3'端和 5'端的获得 根据 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 和 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends (Invitrogen, USA) 试剂盒操作步骤,分别扩增 *LvCRT* 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列,整个过程所需的引物序列见表 1。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,接下来的 DNA 回收、连接转化、测序和同源性比对等步骤均同“1.3.1”节。

1.3.3 序列分析 采用 BioEdit 软件将中间序列、3'端序列

和 5'端序列拼接得到 *LvCRT* 基因全长 cDNA 序列。设计正反引物(*LvCRTF*/*LvCRTR*)对该基因进行 ORF 开放阅读框克隆以确保全长的正确性。此过程采用 Ex *Taq* DNA 聚合酶,PCR 反应条件:95 ℃ 4 min;95 ℃ 40 s,57 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。冰箱 4 ℃ 保存。接下来的 DNA 回收、测序和同源性比对等步骤均同“1.3.1”节,所用引物序列见表 1。

表 1 *LvCRT* 基因克隆和转录表达分析所用引物列表

引物	序列(5'→3')	长度 (bp)	作用
<i>LvCRTF</i> 1	ATYTYGGGHCCNGGHACMAAGAA	23	中间片段
<i>LvCRTR</i> 1	TCKCCRTCCATYTCRTCRTCCCA	23	中间片段
GSP-1	TCACCAGACTGAGCTT	16	5'-RACE
GSP-2	CAATGAGGGTGTACAGATGAGA	22	5'-RACE
GSP-3	GTCCTTACAACGGATTTCTTTTC	22	5'-RACE
3' <i>LvCRT</i> -1	CAAGAAGATCAAGGACCCAGAAGCCAAG	28	3'-RACE
3' <i>LvCRT</i> -2	TTGGGACCAACCTGAACACGTTCTCGAT	28	3'-RACE
<i>LvCRTF</i>	CCATGAAGACCTGGGTTTTTC	21	全长验证
<i>LvCRTR</i>	CTTTACAGTTCGTCATGTTCCA	22	全长验证
<i>LvCRTF</i> '	ACAACCTCCTCATCTCCAAT	20	荧光定量
<i>LvCRTR</i> '	CGTCATCATCCTCATCCTT	19	荧光定量
β -actinF'	AATCGTTCGTGACATCAAGGAG	22	内参基因
β -actinR'	TTGTAGGTGCTCTCGTGGATG	21	内参基因

1.3.4 *LvCRT* cDNA 全长生物学信息分析 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLASTX 进行蛋白序列同源性检索^[14];通过 <http://expasy.pku.edu.cn> 网站上的 ExPASy 软件对该 cDNA 全长进行序列开放阅读框搜索、蛋白质分子量、等电点和氨基酸序列的推断等;通过 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 网站上 SignalP3.0 软件预测该基因的信号肽^[15];通过 Clustal W 1.8 软件进行氨基酸多重序列分析^[16],再结合 MEGA 4.0 软件用邻接法构建 NJ 系统树 (Neighbour-Joining tree)^[17]。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 分析 根据已克隆 *LvCRT* 基因和 β -actin 内参基因,使用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量表达的特异性正反向引物 *LvCRTF*'/*LvCRTR*'和 β -actinF'/ β -actinR' (表 1)。使用 Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI, LTU) 试剂盒合成 cDNA 第一链。具体如下:在冰浴后 PCR 管中加入 1 μ g 总 RNA 和 1 μ L Oligo-dT(15) (0.5 μ g/ μ L),然后再加入 DEPC 水配制成 10 μ L 体系,将反应管置于 PCR 仪中,70 ℃ 预变性 5 min,迅速置于冰上。变性反应结束后再加入 4 μ L 5 \times First-strand 缓冲液、2.0 μ L 0.1 mol/L DTT、1.0 μ L RiboLock™ Ribonuclease inhibitor 和 2.0 μ L dNTP mix (10 mmol/L) 后将 PCR 管置于 PCR 仪中,37 ℃ 孵育 5 min,再加入 1 μ L Superscript II (200 U/ μ L),将 PCR 管置于 PCR 仪中进行反应,42 ℃ 孵育 50 min,70 ℃ 变性 10 min,4 ℃ 保存。实时荧光定量 PCR 使用 SYBR μ Premix Ex *Taq*™ (TaKaRa, Japan) 试剂盒在 ABI 7500 Real Time Thermal Cycler 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystem 美国应用生物系统) 中进行,定量数据分析采用相对定量中的 2- $\Delta\Delta$ Ct 法 (Livak 和 Schmittgen, 2001)^[22];使用 SPSS 13.0 软件进行显著性分析;用 Turkey 法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 *LvCRT* 全长 cDNA 序列的克隆及分析

以凡纳滨对虾肝胰腺 cDNA 为模板,采用分段克隆方法和 3'RACE、5'RACE 法对 *CRT* 基因全长 cDNA 序列进行克隆,得到全部中间序列 (397 bp) (图 1) 和 3'末端 (990 bp)、5'末端 (742 bp) (图 2),采用 BioEdit 软件去除重叠序列以及接头序列后得到 1 866 bp 的 cDNA 全长序列,将获得的凡纳滨对虾 *LvCRT* cDNA 全长序列提交 NCBI, GenBank 登录号为 JQ682618。经 <http://au.expasy.org/tools/dna.html> 在线软件分析显示,该基因具有 1 个长达 1 221 bp 完整的开放阅读框,1 个起始密码子 (ATG) 和 1 个终止密码子 (TAA),开放阅读框编码具有 406 个氨基酸的钙网蛋白。基因 5'端非编码区 (5'-UTR) 长 222 bp,3'端非编码区 (3'-UTR) 长 423 bp。3'端的加尾信号 AATAAA 位于 poly(A) 尾巴上游 27 bp 处。开放阅读框进一步验证结果表明 cDNA 全长序列的正确性 (图 2)。经 http://web.expasy.org/compute_pi/ 在线分析,该蛋白分子量为 15.3 ku,等电点 pI 为 4.90。

2.2 *LvCRT* cDNA 特征的分析

用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 网上 SignalP 3.0 软件在线预测该基因信号肽,结果显示,该基因具有 1 个疏水信号肽 (MKTWVFLALFGVVLVES),该信号肽位于氨基酸 N 端 (图 3)。使用在线 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> 软件预测该基因蛋白磷酸化位点,预测结果显示该蛋白共有 22 个磷酸化位点,其中 5 个为 Ser 磷酸化位点,其氨基酸位点分别为 27、76、83、124、191;11 个为 Thr 磷酸化位点,其氨基酸位点分别为 50、66、77、94、139、179、222、229、246、298、344;6 个为 Tyr 磷酸化位点,其氨基酸位点分别为

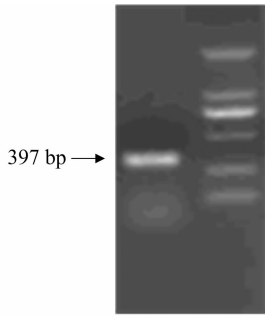


图1 凡纳滨对虾肝胰腺 *LvCRT* 片段扩增结果

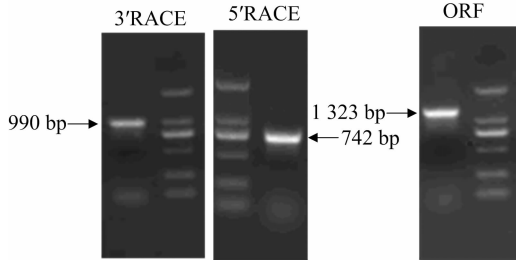


图2 凡纳滨对虾肝胰腺 5' RACE、3' RACE和 ORF 扩增结果

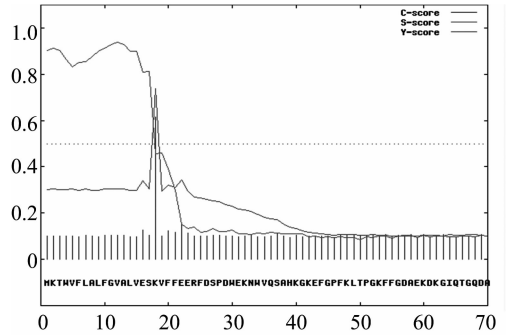


图3 CRT 信号肽预测结果

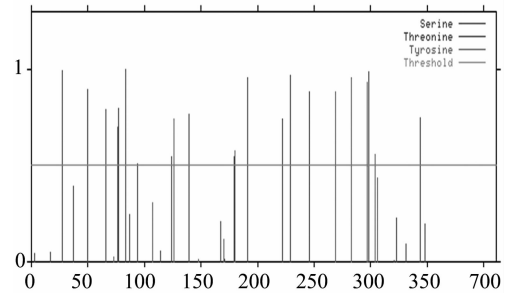


图4 CRT 磷酸化位点预测结果

126、180、269、283、297 和 304(图 4)。

通过 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 蛋白质保守区的结果显示,推测 *LvCRT* 中第 19~330 个氨基酸残基构成了 1 个由 311 个氨基酸组成的保守区,该保守区属于钙网蛋白家族。该基因还具有 1 个保守的钙网蛋白家族标签 (KHEQNIDCGGYLKVF),该标签位于第 95~111 个氨基酸残基之间。除此之外,还发现该基

因具有 1 个钙网蛋白家族的重复序列 IxDExxKPE(/D)DWD 和 1 个保守的 HDEL 内质网回收标签,这个内质网回收标签位于氨基酸序列的 C 末端(图 5)。

2.3 *LvCRT* 基因序列比对与系统发育分析

使用 ClustalW 1.83 和 MEGA 4.0 软件,选取中国明对虾 (ABC50166)、斑节对虾 (ADO00927)、克氏原螯虾 (AEC₅₀)

```
133 CCG GCC CGT TGA TCC TAA CGG GTT CTT CTG TTA CTC CCA GAG TGA AGG TGG GGA CTT GCT CGA GTG
199 ACA GTC AAG AGC GAA GAC GGA ACCATG AAG ACC TGG GTT TTT CTT GCC CTG TTT GGG GTT GTC CTA
265 GTG GAA TCT AAA GTA TTT TTC GAA GAA AGG TTC GAC AGC CCT GAT TGG GAG AAA AAT TGG GTT CAG
331 TCT GCA CAC AAG GGA AAG GAG TTT GGA CCC TTC AAA TTG ACA CCC GGC AAA TTC TTC GGC GAT GCT
397 GAG AAA GAC AAG GGA ATC CAG ACT GGA CAG GAT GCC CGC TTT TAT GTT TCA ACA AAG TTT GAG
463 CCC TTC AGC AAT AAG GAT TCT CCA CTT GTC ATT CAG TTC ACT GTA AAA CAT GAG CAG AAC ATT GAC
529 TGT GGT GGA GGA TAT CTC AAG GTC TTT GAT TGC TTT TTA GAC CAG AAA GAC ATG CAC GGA GAG TCT
595 CCA TAC CTC ATT ATG TTT GGT CCT GAT ATC TGT GGC CCA GGC ACC AAG AAG GTT CAT GTA ATT TTC
661 AAC TAT AAG GGT GAG AAC CAT CTG ATC AAG AAA GAA ATC CGT TGT AAG GAC GAT GTA TTT TCT CAT
727 CTG TAC ACC CTC ATT GTC AAT CCT GAC AAC ACA TAC GAA GTC CTT ATC GAC AAT GAG AAA GCT CAG
793 TCT GGT GAA CTC GAG GAG GAC TGG GAT TTC CTT CCA CCC AAG AAG ATC AAG GAC CCA GAA GCC AAG
859 AAG CCC GAC GAT TGG GAT GAC CGC CCC ACC ATT GCT GAT CCT GAT GAT ACT AAG CCT GAA GAT TGG
925 GAC CAA CCT GAA CAC GTT CCT GAT CCT GAT GCC ACC AAA CCT GAG GAC TGG GAT GAT GAA ATG GAT
991 GGC GAG TGG GAA CCA CCC ATG ATT GAC AAC CCC GAC TAC AAG GGT GAA TGG AAG CCC AAG CAG ATT
1057 GAT AAC CCT GAT TAC AAG GGC CCA TGG ATT CAC CCT GAA ATT GAC AAC CCA GAA TAC ACA CCT GAC
1123 CCA GAG ATT TAC AAG TAT GAT GAA GTC TGT GCT CTT GGT TTG GAT CTG TGG CAG GTG AAA TCT GGT
1189 ACT ATC TTT GAC AAC TTC CTC ATC TCC AAT GAT CCT GAA GAA GCC CGC AAG ATT GGT GAA GAG ACT
1255 TGG GGT GCT ACT AAA GAA GCA GCT AAG AAG ATG AAG GAT GAA CAG GAT GAA GAG GAG CGA AAG AGA
1321 GCA GAG GAA GAA GCA AAG GCA GCT GCT GAT GCT GAA AAG GAT GAG GAT GAT GAC GAT GAA GAT GAT
1387 CTT GGT GAT GAA GAC GAA GAT GAT CTT GAT AAT GAA CTG GAA CAT GAC GAA CTG TAA AGT TAA ATT
1453 TAT TTT TAT TAA GGC AGT TAT TAT TTA AAT AGC CTG TTG TAC TAT TTA AAC ATC AAA AAG TAC AAT
1519 TAA CTG AAC CTT TTG GTT GTA CAT TCT TGT AAA TAC CAA GGG CTT CAG TTA ATT CTA GTC ATG GAA
1585 TCT TTT GTT GTG GTA AAT TGA AAT CCA AGC ATT CCA GTA GCT GAA GCT GAT TGG AGG TTC CTT GAC
1651 AAG AAA ATC ACC TGT ATA GGT GGT ATT CAT AGA ACA TCA CTC ATT ACT CAT CCC CAT CAT CAT
1717 GTA TGC TGC ACA GTC CTG TAT GTT TGT ACG AGA CAA AAG TGT GTC AGT ACT GAT GTC AAT TTA AAC
1783 CTG ATT CAG TAG CGC TGA TTG CAC AAT GTG TGT CTG AGT TGA ACG ATT TCC AAT AAA CAC AAT CGG
1849 AAA AAA AAA AAA AAA AAA
```

图5 *LvCRT* 基因的核苷酸序列和推导氨基酸序列

079), 意蜂 *Apis mellifera* (XP_392689), 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (AAL68781), 家蚕 *Bombyx mori* (BAC57964), 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (CAA45791), 斑马鱼 *Danio rerio* (NP_956007), 小鼠 *Mus musculus* (AAH03453), 人 *Homo sapiens* (NP_004334), 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (NP_176030), 烟草 *Nicotiana tabacum* (CAA59694), 非洲爪蟾 *Xenopus laevis* (CAA47866) 13 个物种的 CRT 氨基酸序列与凡纳滨对虾的 CRT 氨基酸序列进行比对。分析显示, 凡纳滨对虾全序列与

斑节对虾 (ADQ28317)、中国明对虾 (ABC50166)、克氏原螯虾 (AEC₅₀079) 和黑腹果蝇 (AAF54416) 分别具有 99%、99%、94% 和 81% 的序列相似度, 99%、97%、89% 和 69% 的序列一致性 (图 6)。系统发育分析显示, 构建的分子进化树可以将 CRT 基因聚类分为植物、脊椎动物和无脊椎动物 3 个分支, *LvCRT* 位于无脊椎动物 CRT 的一支, 与昆虫的 CRT 聚类在一起 (图 7)。

<i>L. vannamei</i>	..MKTWVFLALFGLVVLVESKVFEEBREDSPLEWKNWVQSAHKGKEFGPFK	48
<i>P. monodon</i>	..MKTWVFLALFGLVALVESKVFEEBREDSPLEWKNWVQSAHKGKEFGPFK	48
<i>F. chinensis</i>	..MKTWVFLALFGLVALVESKVFEEBREDSPLEWKNWVQSAHKGKEFGPFK	48
<i>P. leniusculus</i>	..MKIFLFAAILGASLVESKVFEEBREDSPLEWKNWVQSAHKGKEFGPFK	48
<i>D. melanodaster</i>	MMWCKTVIVLLATVGFISAEVYLKENEDNENWEDTWIYSKHGKEFGKFFV	50
<i>L. vannamei</i>	LTFGKFFFCDAEKDKGIQTGQDARFYGLSTKKEFFFSNKDSPLVIOFTVKHE	98
<i>P. monodon</i>	LTAGKFYFGDAEKDKGIQTGQDARFYGLSTKKEFFFSNKDSPLVIOFTVKHE	98
<i>F. chinensis</i>	LTAGKFYFGDAEKDKGIQTGQDARFYGLSSKKEFFFSNKDSPLVIOFTVKHE	98
<i>P. leniusculus</i>	LTFGKFFYFGDAEKDKGIQTSQDARFYGLSTKFTFFSNKDTPLVVQFSIKHE	98
<i>D. melanodaster</i>	LTFGTFYNDAAEADKGIQTSQDARFYAASRKEDGFSNEDKPLVVQFSVKHE	100
<i>L. vannamei</i>	QNIDCGGGYLKVFDCSLDQDMHGESPYLIMFGPDICGPGTKKVHVIFNY	148
<i>P. monodon</i>	QNIDCGGGYLKVFDCSLDQDMHGESPYLIMFGPDICGPGTKKVHVIFNY	148
<i>F. chinensis</i>	QNIDCGGGYLKVFDCSLDQDMHGESPYLIMFGPDICGPGTKKVHVIFNY	148
<i>P. leniusculus</i>	QNIDCGGGYLKVFDCSLDQDMHGESPYLIMFGPDICGPGTKKVHVIFNY	148
<i>D. melanodaster</i>	QNIDCGGGYVKLFDCSLDQDMHGESPYLIMFGPDICGPGTKKVHVIFESY	150
<i>L. vannamei</i>	KGENHLIKKEIRCKDDVFSLYTLIVNPDNTYEVLIDNEKACSGELEEDW	198
<i>P. monodon</i>	KGENHLIKKEIRCKDDVFSLYTLIVNPDNTYEVLIDNEKACSGELEEDW	198
<i>F. chinensis</i>	KGENHLIKKEIRCKDDVFSLYTLIVNPDNTYEVLIDNEKACSGELEEDW	198
<i>P. leniusculus</i>	NGKNHLIKKEVRCKDDVFSLYTLIVKPDNTYEVLIDNEKACSGELEEDW	198
<i>D. melanodaster</i>	KGNHLISKDIRCKDDVYTHFYTLIVRPNNTYEVLIDNEKVESGNLEEDW	200
<i>L. vannamei</i>	DLFLPKKIKDPEAKKPDWDDRETIADPELDTKPEDWDQPEHVPDPDATKP	248
<i>P. monodon</i>	DLFLPKKIKDPEAKKPDWDDRETIADPELDTKPEDWDQPEHVPDPDATKP	248
<i>F. chinensis</i>	DLFLPKKIKDPEAKKPDWDDRETIADPELDTKPEDWDQPEHVPDPDATKP	248
<i>P. leniusculus</i>	DLFLPKKIKDPEAKKPDWDDRETIADPELDTKPEDWDQPEHVPDPDATKP	248
<i>D. melanodaster</i>	DLFLPKKIKDPEAKKPDWDDRETIADPELDTKPEDWDQPEHVPDPDATKP	250
<i>L. vannamei</i>	EDWDDDEMDGEWEPPMIDNPDYKGEWKPKQIDNPDYKGPWIHPIDNPEYT	298
<i>P. monodon</i>	EDWDDDEMDGEWEPPMIDNPDYKGEWKPKQIDNPDYKGPWIHPIDNPEYT	298
<i>F. chinensis</i>	EDWDDDEMDGEWEPPMIDNPDYKGEWKPKQIDNPDYKGPWIHPIDNPEYT	298
<i>P. leniusculus</i>	EDWDDDEMDGEWEPPMIDNPDYKGEWKPKQIDNPDYKGPWIHPIDNPEYT	298
<i>D. melanodaster</i>	EDWDDDEMDGEWEPPMIDNPDYKGEWKPKQIDNPDYKGPWIHPIDNPEYT	300
<i>L. vannamei</i>	PDPEIYKYDEVCAIGLDLWQVKSSTIFDNFLISNDPEEARKIGEEETWGAT	348
<i>P. monodon</i>	PDPEIYKYDEVCAIGLDLWQVKSSTIFDNFLISNDPEEARKIGEEETWGAT	348
<i>F. chinensis</i>	PDPEIYKYDEVCAIGLDLWQVKSSTIFDNFLISNDPEEARKIGEEETWGAT	348
<i>P. leniusculus</i>	PDPEIYKYDEVCAIGLDLWQVKSSTIFDNFLISNDPEEARKIGEEETWGAT	348
<i>D. melanodaster</i>	PDDKIYLRKEICTIGFDLWQVKSSTIFDNFLITDDVFLAAKAAAEVKNTO	350
<i>L. vannamei</i>	KEAAKKMKDEQDEEERKRAEEEAATAAEK..DEDDEDDDLGDEDEDD	396
<i>P. monodon</i>	KDAKKMKDEQDEEERKRAEEEAATAAEK..DEDDEDDDLGDEDEDD	396
<i>F. chinensis</i>	KDAKKMKDEQDEEERKRAEEEAATAAEK..DEDDEDDDLGDEDEDD	396
<i>P. leniusculus</i>	KDAKKMKDEQDEEERKRAEEEAATAAEK..E..DDDDDELDDEDDDD	394
<i>D. melanodaster</i>	AGE..KKMKEAQDEVQRKKDEEAKKASDKDEDE..DDDDDEKDDDESKOD	397
<i>L. vannamei</i>	LDNELEHDE	405
<i>P. monodon</i>	LDNDLEHDE	405
<i>F. chinensis</i>	LDNDLEHDE	405
<i>P. leniusculus</i>	LENERDHDE	403
<i>D. melanodaster</i>	KDQSEHDEL	406

图6 不同物种的钙网蛋白氨基酸序列比较

2.4 *LvCRT* 基因在组织中的表达分布

荧光定量 PCR 分析结果显示, *LvCRT* 基因在凡纳滨对虾所检测的组织包括肌肉、鳃、肠、肝胰腺和血细胞中均有表达 (图 8), 由高到低依次为: 肠道 > 鳃 > 血细胞 > 肝胰腺 > 肌肉, 肠道中表达量最高, 显著高于其他各组织; 血细胞和肝胰腺间的 *LvCRT* 表达量无显著性差异, 但二者均显著高于肌肉而低于鳃; 肌肉表达量最低, 显著低于其他各组织。

3 讨论与结论

目前, 钙网蛋白的研究多集中在模式生物上, 甲壳动物中钙网蛋白的研究相当少。迄今为止, 已公布的对虾类钙网蛋白序列仅包括中国明对虾 (DQ323054)、斑节对虾 (HQ259085) 和克氏原螯虾。

本研究以先前建立的盐度胁迫诱导凡纳滨对虾消减 cDNA

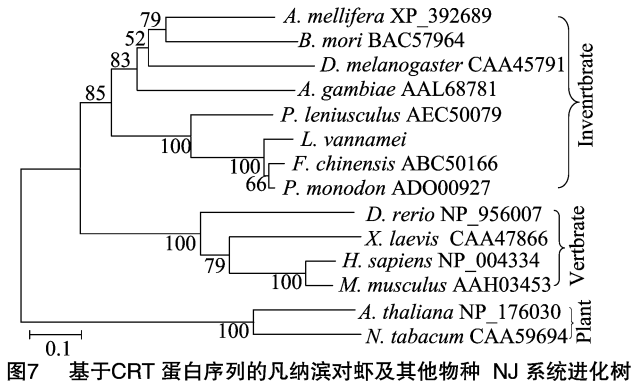


图7 基于 CRT 蛋白序列的凡纳滨对虾及其他物种 NJ 系统进化树

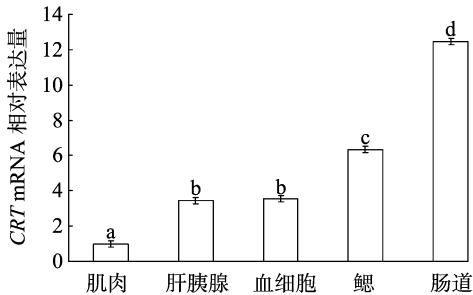


图8 qRT-PCR 方法检测 CRT 基因在凡纳滨对虾不同组织内的表达

文库为 PCR 模板^[18]，成功克隆到凡纳滨对虾的钙网蛋白 *LvCRT* 基因的 cDNA 全长序列，并对其进行了氨基酸的预测和同源序列的比对分析。*LvCRT* 基因与斑节对虾 (ADQ28317)、中国明对虾 (ABC50166) 和克氏原螯虾 (AEC₅₀079) 具有 99%、99% 和 94% 的序列相似度，99%、97% 和 89% 的序列一致性。*LvCRT* 基因推导的氨基酸序列具有 1 个 311 个氨基酸组成的高度保守区和 1 个高度保守的钙网蛋白家族标签 (KHEQNIDCGGGYLKVF)，这与栾伟报道的中国明对虾 FcCRT 钙网蛋白分子结构^[5]极为相似，即与底物结合的相关的 N-和 P-2 个功能域都非常保守，据此推测，*LvCRT* 可能与之前报道的钙网蛋白具有相似的分子伴侣功能。系统发育分析显示，*LvCRT* 位于无脊椎动物 CRT 的一支，在亲缘上接近于昆虫的 CRT。

以往的研究表明，钙网蛋白作为重要的内质网分子伴侣蛋白，在病原感染、发育以及环境胁迫等情况下都对细胞起到重要的保护作用。钙网蛋白最初被鉴定为一种内质网的钙离子结合蛋白，之后其作为分子伴侣蛋白在内质网行使的众多功能得到一一阐明^[2,5,8]。近期的研究结果又证明钙网蛋白在免疫中扮演重要的作用，如吞噬、补体途径、细胞粘连甚至自体免疫等过程。Johnson 等研究表明，若缺乏 CRT，小鼠胚胎的死亡率会增高、细胞黏附活性会降低、细胞对凋亡的敏感度增加、心肌的非正常发育会增加、非折叠蛋白的积累和错误折叠会增加等^[2]。在哺乳动物中，CRT 在炎症反应和病原感染过程中起重要的作用^[5,19-20]。昆虫中的 CRT 不仅参与早期的包裹作用，且很可能参与了昆虫的免疫过程^[11]。Wang 等在感染 WSSV 的中国明对虾中，利用基因芯片技术发现 CRT 基因在感染 6 h 和濒临死亡的对虾体内会显著上调表达^[21]。Duan 等在感染鳃弧菌和 WSSV 的脊尾白虾中发现，血细胞和

肝胰腺在感染第 1 个 6 h 后 CRT 转录水平表达量的上调表明其与免疫防御有关联^[13]。栾伟发现在热休克、重金属胁迫和感染 WSSV 的中国明对虾中，CRT 转录表达会有明显变化，且不同重金属处理有不同的 CRT 转录表达模式^[5]。Visudtipholle 等研究表明，斑节对虾仔虾血细胞的 CRT 基因在热休克胁迫 3 h 后会显著上调表达，可以作为斑节对虾对热应激的分子生物标记^[6]。结合本研究中盐度胁迫的消减文库中 CRT 基因的发现，表明 *LvCRT* 与环境胁迫之间存在一定关联，未来可以作为一种环境胁迫或者种质改良的分子标记。

参考文献:

- [1] Ostwald T J, MacLennan D H. Isolation of a high affinity calcium - binding protein from sarcoplasmic reticulum[J]. Journal of Biological Chemistry, 1974, 249(3): 974 - 979.
- [2] Johnson S, Michalak M, Opas M, et al. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space[J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11(3): 122 - 129.
- [3] Ghiran I, Klickstein L B, Nicholson - Weller A. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(23): 21024 - 21031.
- [4] Luana W, Li F, Wang B, et al. Molecular characteristics and expression analysis of calreticulin in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2007, 147(3): 482 - 491.
- [5] 栾伟. 中国明对虾重要分子伴侣蛋白基因的克隆及表达研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.
- [6] Visudtipholle V, Wathanasurorot A, Klinbunga S, et al. Molecular characterization of calreticulin: a biomarker for temperature stress responses of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2010, 308(Suppl 1): S100 - S108.
- [7] Liu H, Peatman E, Wang W, et al. Molecular responses of calreticulin genes to Iron overload and bacterial challenge in Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35(3): 267 - 272.
- [8] Wang L, Fang Q, Zhu J, et al. Molecular cloning and functional study of calreticulin from a lepidopteran pest, *Pieris rapae* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 38(1): 55 - 65.
- [9] Fan W, Hu Y, Li C, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of calreticulin from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Tsinghua Science and Technology, 2008, 4(13): 466 - 473.
- [10] Ihara Y, Kageyama K, Kondo T. Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 329(4): 1343 - 1349.
- [11] Zhang G, Schmidt O, Asgari S. A calreticulin - like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2006, 30(9): 756 - 764.
- [12] Cha W H, Kim Y, Lee D W. Calreticulin in *Cotesia plutellae* suppresses immune response of *Plutella xylostella* (L.) [J]. Journal of Asia - Pacific Entomology, 2015, 18(1): 27 - 31.
- [13] Duan Y, Liu P, Li J, et al. Molecular responses of calreticulin gene to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 164 - 171.

序列 650 bp, 编码 209 个氨基酸, 具有 FGF 家族典型的结构。推测的氨基酸序列与藏羚羊的同源性最近, 这符合物种的进化规律。同时利用生物信息学分析了藏山羊的磷酸化位点、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位、二级和三级结构以及蛋白相互作用等。结果发现, 藏山羊 FGF21 没有跨膜结构, 具有信号肽结构, 含有 13 个磷酸化位点, 并主要发生在丝氨酸残基上(8 个), 推测其翻译后修饰主要是通过此来进行的。二级结构预测发现在藏山羊 FGF21 氨基酸序列主要有 33 个 α -螺旋、48 个 β -折叠、19 个 β -转角和 109 个无规则卷曲结构, 并且三级结构预测也证明了二级结构的预测^[17], 有利于进一步阐明藏山羊 FGF21 的功能。

本研究发现经过蛋白质相互作用分析预测与藏山羊 FGF21 相互作用的蛋白可能是 FGFR1、IGF1R、FGFR2、INSR、FGFR、PPAR α 、CSF1R、CYP7A1、FGFR3 和 FGFR4 等。

有研究指出 *FGF21* 的启动子上有 PPAR α 结合位点, 具有上调 *FGF21* 表达的功能, 禁食和饲喂可以通过 PPAR α 促进 *FGF21* 在肝脏中的大量表达^[6], 本试验的预测结果与之一致。但关于 *FGF21* 在藏山羊中的具体的作用机制需要试验来进一步证明。

参考文献:

- [1] 于浩泳, 贾伟平. 成纤维细胞生长因子 21 与糖脂代谢的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(42): 3019–3021.
- [2] 侯玉婷, 李晋南, 任桂萍, 等. 人 *FGF-21* 基因的克隆、表达及其调节脂肪细胞糖代谢的活性[J]. 遗传, 2010, 32(6): 583–587.
- [3] Berti L, Irmeler M, Zdichavsky M, et al. Fibroblast growth factor 21 is elevated in metabolically unhealthy obesity and affects lipid deposition, adipogenesis, and adipokine secretion of human abdominal subcutaneous adipocytes[J]. Molecular Metabolism, 2015, 4(7): 519–527.
- [4] Slusher A L, Whitehurst M, Zoeller R F, et al. Attenuated fibroblast growth factor 21 response to acute aerobic exercise in obese individuals[J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 2015, 25(9): 839–845.
- [5] Grunwald T, De Luca F. Role of fibroblast growth factor 21 (*FGF21*) in the regulation of statural growth[J]. Current Pediatric Reviews, 2015, 11(2): 98–105.
- [6] Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21[J]. Cell Metabolism, 2007, 5(6): 415–425.
- [7] Badman M K, Koester A, Flier J S, et al. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis[J]. Endocrinology, 2009, 150(11): 4931–4940.
- [8] Coskun T H, Schneider M. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice[J]. Endocrinology, 2008, 149(12): 6018–6027.
- [9] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21[J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774–781.
- [10] 朱蓓, 蒋艺兰. 肥胖者血清成纤维细胞生长因子 21 的水平及其临床意义[J]. 同济大学学报: 医学版, 2014, 35(4): 97–100.
- [11] 谈旭霞. 藏山羊产业发展现状及持续发展的可行性[J]. 畜牧兽医学志, 2010, 29(3): 56–58.
- [12] Kharitonov A, Shiyanova T L, Koester A, et al. *FGF-21* as a novel metabolic regulator[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(6): 1627–1635.
- [13] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21[J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774–781.
- [14] Badman M K, Pissios P, Kennedy A R, et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states[J]. Cell Metabolism, 2007, 5(6): 426–437.
- [15] Varady J, Ringseis R, Eder K. Dietary moderately oxidized oil induces expression of fibroblast growth factor 21 in the liver of pigs[J]. Lipids in Health and Disease, 2012, 11: 34.
- [16] Yu J, Zhao L, Wang A, et al. Growth hormone stimulates transcription of the fibroblast growth factor 21 gene in the liver through the signal transducer and activator of transcription 5[J]. Endocrinology, 2012, 153(2): 750–758.
- [17] 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 158–230.
- [18] Gao W H, Tan B P, Mai K S, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to long-term low salinity stress[J]. Aquaculture, 2012, 364/365: 186–191.
- [19] Wang W A, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(6): 842–846.
- [20] Ghebrehiwet B, Peerschke E I. cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection[J]. Molecular Immunology, 2004, 41(2/3): 173–183.
- [21] Wang F I, Chen J C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 671–681.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.

(上接第 40 页)

- [14] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [15] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4): 783–795.
- [16] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [17] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[M]. Tempe, Arizona, USA: Arizona State University, 2001.
- [18] Gao W H, Tan B P, Mai K S, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus van-*