

郜卫华, 田 罗, 黄廷华, 等. 凡纳滨对虾儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶 cDNA 序列克隆及组织表达分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 26 - 30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.007

凡纳滨对虾儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶 cDNA 序列克隆及组织表达分析

郜卫华^{1,2}, 田 罗³, 黄廷华¹, 姚 敏¹, 许巧倩^{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 (rapid amplification of cDNA ends) 技术, 克隆了凡纳滨对虾儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶 (catechol - O - methyltransferase, COMT) 基因 cDNA 序列。该基因 (*LvCOMT*) cDNA 全长 910 bp (GenBank 登录号 JQ345478), 含有 666 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 221 个氨基酸, 理论分子量 74.9 ku, 等电点 4.98。经软件分析, 该成熟肽有 12 个磷酸化的氨基酸位点, 不具信号肽, 推测凡纳滨对虾 *COMT* 基因可能是依赖 12 个可能的氨基酸发生可逆的磷酸化反应来进行调控作用。*LvCOMT* 基因与斑节对虾、中国明对虾的氧位 - 甲基转移酶具有高度相似性, 系统进化分析表明, *LvCOMT* 在亲缘关系上更接近于哺乳动物的儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶。应用 RQ - PCR 分析 *COMT* 在凡纳滨对虾中的组织特异性分布, 结果显示 *COMT* 在肝胰腺组织中表达量最高, 在鳃中的表达量最低。

关键词: 凡纳滨对虾; 儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶; 基因克隆; 表达

中图分类号: S917; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302 (2016) 02 - 0026 - 05

氧位 - 甲基转移酶 (O - methyltransferase, OMT) 是一种转甲基酶, 在真菌^[1]、细菌^[2]、植物^[3]等多种生物中普遍存在。根据甲基受体分子不同, 氧位 - 甲基转移酶的种类也有所不同。在动物中研究最多的 2 种氧位 - 甲基转移酶是法呢酸 - 氧位 - 甲基转移酶 (farnesoic acid - O - methyltransferase, FAMeT)、儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶 (catechol - O - methyltransferase, COMT)。COMT 是 1958 年首先在人体中发现的一种重要代谢酶, 广泛存在于机体各种组织中, 如脑、肝、肾、肺等, 其主要功能是代谢具有毒性或生物活性的儿茶酚胺类物质及降解外界系统的多巴胺^[4]。迄今为止, 已公布甲壳动物的法呢酸 - 氧位 - 甲基转移酶序列包括斑节对虾 (*Penaeus monodon*) (AY823409)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (AY823408)、刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) (AF333042)、断沟龙虾 (*Penulirus interruptus*) (AF249871)、日本长额对虾 (*Pandalopsis japonica*) (HQ399440)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) (HQ587049)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) (GQ861517)、黄道蟹 (*Cancer pagurus*)^[5]; 而甲壳动物儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶的序列仅在中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) (DQ091255) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*) (JN572540) 中发现。据报道, 水产动物的 OMTs 基因参与病原和细菌感染后的免疫反应^[6-7], 其中 *COMT* 在动物中是否

参与免疫反应尚未见报道。本研究以凡纳滨对虾为材料, 通过 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术克隆获得凡纳滨对虾 *COMT* 基因全长, 并对其进行生物信息学分析, 进一步利用荧光定量 PCR 技术对该基因的组织特异性分布进行分析, 以期为该基因免疫作用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试动物

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, 经灭菌焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水清洗后, 先将其冰浴麻醉, 冰浴条件下分离肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏等 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 °C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取

取凡纳滨对虾肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏等 5 种组织, 按照联合基因的 Unizol Reagent (GENEray biotechnology, China) 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、定量检测。

1.3 *LvCOMT* cDNA 全长克隆

1.3.1 *LvCOMT* cDNA 片段的获得 根据中国明对虾 *COMT* 保守序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计正、反向引物 (*LvCOMT*F1/R1) 克隆中间片段, 本研究中所有引物 (表 1) 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 用 PCR 产物凝胶回收试剂盒 (OMEGA, 美国) 回收扩增片段, 回收后与 Easy

收稿日期: 2015 - 03 - 06

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

作者简介: 郜卫华 (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: gwh@126.com。

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

Digestion T - vector(pED - T) (SinoBio, 上海市) 载体连接, 并转入感受态细胞 DH5 α 中。挑取阳性克隆菌落送往深圳华大基因公司测序, 将所得 *LvCOMT* 基因 cDNA 中间序列于 NCBI 中进行 blastx 同源性分析。

1.3.2 *LvCOMT* cDNA 3'端和 5'端的获得 根据 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国) 和 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends (Invitrogen, 美国) 试剂盒操作步骤, 分别扩增 *LvCOMT* 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列, 整个过程所需引物序列见表 1。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 后续的 DNA 回收、连接转化、测序、同源

性比对等步骤同“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、5'端序列拼接得到 *LvCOMT* 基因全长 cDNA 序列。设计正、反向引物(LvCOMTF/LvCOMTR), 对该基因进行 ORF 开放阅读框克隆以确保全长的正确性。该过程采用 Ex Taq DNA 聚合酶, PCR 反应条件: 95 ℃ 变性 4 min; 95 ℃ 变性 40 s, 57 ℃ 退火 1 min; 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 4 ℃ 冰箱保存。后续的 DNA 回收、测序、同源性比对等步骤同“1.3.1”节, 所用引物序列见表 1。

表 1 *LvCOMT* 基因克隆和转录表达分析所用引物

引物	引物序列 (5'→3')	长度 (bp)	作用
LvCOMTF1	TAGAVATYGGDGTDTWCACAGG	22	中间片段
LvCOMTR1	CCCYTTGCTDGCRTCRATGAA	21	中间片段
GSP - 1	CGATGTGCAGACGGAT	16	5' - RACE
GSP - 2	GGATTCTCCCAAGACGGCTT	21	5' - RACE
GSP - 3	AACGGCTTGCTATGTTGGTA	21	5' - RACE
3'LvCOMT - 1	CGCCCTGGACATCAGTGAGGAGTATACC	28	3' - RACE
3'LvCOMT - 2	CCAACATAGGCAAGCCGTTCTGGGAGGA	28	3' - RACE
LvCOMTF	GAAGATGCTCTTCTATGAAGAGT	22	全长验证
LvCOMTR	CTCATTTTTTGAAACAGAGCGA	22	全长验证
LvCOMTF'	TCGGTGGTCTTGAGTTCTT	19	荧光定量
LvCOMTR'	GGATCGGCGTCGTAATAAC	19	荧光定量
β - actinF'	AATCGTTCTGTGACATCAAGGAG	22	内参基因
β - actinR'	TTGTAGGTGCTCTCGTGGATG	21	内参基因

1.3.4 *LvCOMT* 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^[8]; 通过“<http://expasy.pku.edu.cn>”网站上 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、氨基酸序列的推断等; 通过“<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>”网站上 SignalP 3.0 软件预测该基因的信号肽^[9]; 通过 Clustal W1.8 软件进行氨基酸多重序列分析, 再结合 MEGA 4.0 软件用邻接法构建 NJ 系统树 (neighbour - joining tree)^[10]。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 分析 根据已克隆的 *LvCOMT* 基因和 β - actin 内参基因设计荧光定量表达的特异性正、反向引物 *LvCOMTF'*/*LvCOMTR'* 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 1 链。具体步骤如下: 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, 配制成为 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 μ L 0.1 mol/L DTT、1 μ L RiboLock™ Ribonuclease inhibitor、2 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® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本) 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^[11]; 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 *LvCOMT* 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 *COMT* 基因全长 cDNA 序列进行克隆, 得到全部中间序列 (247 bp) 和 3'末端 (560 bp)、5'末端 (447 bp) (图 1), 采用 BioEdit 软件去除重叠序列以及接头序列后得到 910 bp 的 cDNA 全长序列, 将获得的凡纳滨对虾 *LvCOMT* cDNA 全长序列提交 NCBI, GenBank 登录号为 JQ345478。经在线软件 (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) 分析显示, 该基因具有 1 个起始密码子 (ATG)、1 个终止密码子 (TGA)、1 个长达 666 bp 的完整开放阅读框, 此 ORF 编码 221 个氨基酸。该基因 5' - UTR 即 5'端非编码区长 99 bp, 3' - UTR 长 145 bp。3'非编码区存在 1 个 mRNA 不稳定基序 (ATTTA), 未发现典型的 poly (A) + 加尾信号 AATA - AA (图 2)。经网络在线 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析, 该蛋白分子量为 74.9 ku, 等电点为 4.98。

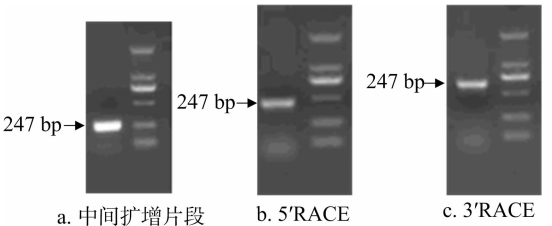


图1 凡纳滨对虾肝胰腺 5' RACE、3' RACE 扩增结果

```
1  TCG CCG ATA CCT CGG TGG TCT TGA GTT CTT TGA AAG AAC ATG TCA CAA GCG TCT
55  GGG ATT AGA GGG GGT GCT GTC CAC ACA GGA ACT AGA TCC CTG AAG ATG TCT TCT
    M S S
109 ATG AAG AGT TAT TAC GAC GCC GAT CCT TTG GTG CAG TAT TGT GTA AAG AAT TCA
    M K [S] [Y] Y N A D P L V Q Y C V K N [S]
163 TTG AGA TTA ACC GAC GTG CAA AAA CGC CTG AAC GAC GTC ACT CTG CAG CAC AGT
    L R L T D V Q K R L N D V T L Q H S
217 AGG GCC GCG ATG TTG GGA GCT CCC GAG GTT CTG CAG CTC AAC TCC AAC ATA ATG
    R A A M L G A P E V L Q L N S N I M
271 CAG GCG ATC GGG GCC AAG AAA GTG CTA GAC ATC GGG GTG TTC ACC GGC GCC AGT
    Q A I G A R K V L D I G V F T G A S
325 TCC CTC TCC GCC GCC TTG GCT CTG CCT CCT GAG GGG AAG GTC CAC GCC CTG GAC
    [S] L S A A L A L P P E G K V H A L D
378 ATC AGT GAG GAG TAT ACC AAC ATA GGC AAG CCG TTC TGG GAG GAA TCC GGC GTC
    I S E E [Y] T N I G K P F W E E S G V
433 GCG GAC AAG ATC CGT CTG CAC ATC GCT CCG GCT GCC GAG ACG CTG CAG AAG TTC
    A D K I R L H I A P A A E [T] L Q K F
487 GTC GAG GCG GGA GAA GCC GGC ACC TTC GAC TAC GCC TTC ATC GAC GCC GAC AAG
    V D G G E A G T F D [Y] A F I D A D K
541 ACC AAC TAC GAT CGA TAC TAC GAA CTG TGC CTC ACC CTG CTG CGT CCT GGA GGA
    [T] [S] [Y] D R [Y] Y E L C L T L L R P G G
595 GTC ATC GCC TTC GAC AAC ACG CTC TGG GAT GGG GCT GTG ATC GAC CCC GCT GAC
    V I A F D N T L L D G A V V D P S K
649 CAG ACT CCG GAC ACG GTG GCT CTC AGG AAG CTC AAC GAA AAG CTG AAG GAC GAC
    D [T] P N T V A I R K L N E K L K D D
703 CAG AGA ATC AAC ATC TCC TTC CTC AAG ATT GGC GAT GGC TTG TCG LTC TGT TTC
    Q R I N L S F L K I G D G L S C C F
757 AAA AAA TGA GIT TCG TTT TTT TCA TAT GCT AGG CAC AGA ACT TCC CAA ATA GIT
    K K *
811 ATT AAG ATT GTT TAG GAG AAT GTC GAA ACC TTA GTC ATA ATT AGA AAA TGT GAC
865 CAA GAA TTT ATA TAA AAA AGG TTA TAA AAG CCA AAA AAA AAA AAA A
```

小写字母为核苷酸序列；起始密码子以加粗黑色框表示；终止密码子以星号表示；12 个氨基酸磷酸位点用黑框表示；不稳定信号（ATTTA）用下划线表示

图2 *LvCOMT* 的核酸序列及推导的氨基酸序列

2.2 *LvCOMT* cDNA 特征的分析

用“<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>”网站上的 SignalP 3.0 软件在线预测该基因是否具有信号肽,发现开放阅读框编码的成熟蛋白没有信号肽(图 3)。用“<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>”网站上的蛋白磷酸化位点预测该基因的磷酸化位点,得分超过 0.5 即为潜在的磷酸化位点^[12],结果发现该蛋白共有 12 个磷酸化位点,其中 4 个为 Ser 磷酸化位点,其氨基酸位点分别为 6、21、76、149;3 个为 Thr 磷酸化位点,其氨基酸位点分别为 125、148、185;5 个为 Tyr 磷酸化位点,其氨基酸位点分别为 7、98、140、150、153(图 4)。

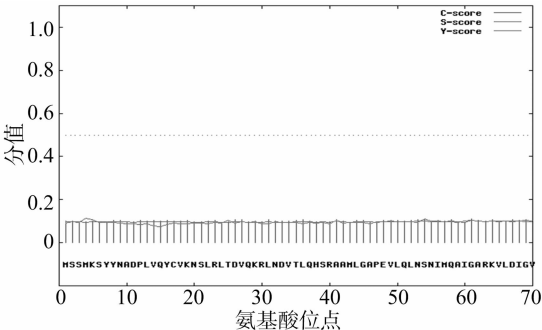


图3 *LvCOMT* 信号肽预测结果

NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 蛋白质保守区结果显示,该基因有 1 个由 204 个氨基酸组成的保守区,该保守区位于第 18 ~ 221 个氨基酸残基之间,该保守区属于甲基转移酶-3 家族。除了 COMT,甲基转移酶-3 家族成员还包括咖啡酰辅酶 A - 氧位 - 甲基转移酶 (caffeoyl - CoA O - methyltransferase, CCoAOMT) 和细菌氧位 - 甲基转移酶 (O - methyltransferase, OMT)。

2.3 *LvCOMT* 基因序列比对与系统发育分析

将 *LvCOMT* 氨基酸序列与斑节对虾、中国明对虾、舌齿鲈

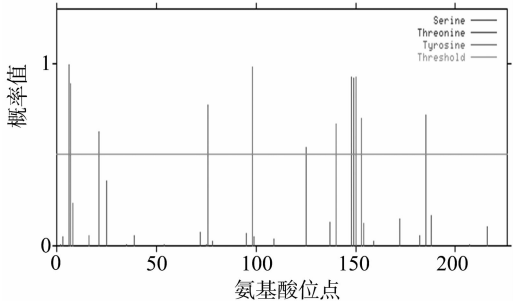


图4 *LvCOMT* 磷酸化位点预测结果

(*Dicentrarchus labrax*)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、三文鱼 (*Salmo salar*)、虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 OMT 氨基酸序列比较,其一致性为 47% ~ 88%,相似性为 68% ~ 95%,与斑节对虾、中国明对虾 OMT 的一致性很高,分别为 88%、87%,相似性分别为 95%、94%,即本研究克隆的 *LvCOMT* 基因和中国明对虾、斑节对虾的 OMT 具有较高的同源性。使用 ClustalW1.83 软件对凡纳滨对虾、斑节对虾、中国明对虾、舌齿鲈、罗非鱼、三文鱼、虹鳟鱼、斑马鱼的 COMT 氨基酸序列进行氨基酸水平的多重比较(图 5)。

用中国明对虾 (AAZ66373) OMT、斑节对虾 (AEP84098) OMT、斑节对虾 (AAX24112) FAMeT、凡纳滨对虾 (AAX24111) FAMeT、刀额新对虾 (AAK28535) FAMeT、拟穴青蟹 (AEE26196) FAMeT、中华绒螯蟹 (ACX30003) FAMeT、斑马鱼 (NP_001077312) COMT、小鼠 (*Mus musculus*) (NP_001104533) COMT、人 (*Homo sapiens*) (NP_001128634) COMT、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (AAF04440) COMT、烟草 (*Nicotiana tabacum*) (CAA52462) COMT 进行系统发育分析,结果显示凡纳滨对虾 COMT 基因属于 COMTs 的新成员,是一种儿茶酚 - 氧位 - 甲基转移酶(图 6)。

<i>D. rerio</i>	TAVSFYLRRPNKQNLDFPPQLVEKKSFTSQFQSSSLGFCRLSLASDIKMLC	50
<i>L. vannamei</i>	0
<i>F. chinensis</i>	0
<i>P. momodon</i>	0
<i>D. labrax</i>MSFRSVSREAFVGSITLGVV	20
<i>O. niloticus</i>MSFRIVSKEGLVGSITLGVV	20
<i>S. salar</i>MSFHSVSREALIGSATLGVV	20
<i>O. mykiss</i>	0
<i>D. rerio</i>	TFSLILALTGLCRSALIS.KSHEGDD..PILOYVVNNSUREHPVLTKRL	97
<i>L. vannamei</i>MSSMKSYYNADPIVOYCVKNLSRLTDVOKRND	33
<i>F. chinensis</i>MSSLKSYDNTDPIVOYCVNLSRLTDVOKRND	33
<i>P. momodon</i>MSSLKSYRNADPIVOYCVNLSRLTDVOKRND	33
<i>D. labrax</i>	FVAGYFFGKKKSPMTSIT.KSHCE.KDNPIMOYVLNFSMREHPVLKSKRL	68
<i>O. niloticus</i>	FVAGYFIGKKKSSIMSIS.KSHLGKDNPILOYVVNFSMREHPVLKSKRL	69
<i>S. salar</i>	FVAGYYIGKRRSTFSMDIFKSHSGAKDNPIMOYVLNFSUREHPALKKRL	70
<i>O. mykiss</i>	...MTSGKRRSTFSMDILKSHSGAKDNPIMOYVLNFSMREHPALKKRL	47
<i>D. rerio</i>	RTMEDARNVIMVASEQAQIMANLAKITFANKTIEIGLYTGYNALSIAIVV	147
<i>L. vannamei</i>	VTLOHSRAAMLCAGEVLIQNSNIMQAIGARKVLDIGVETGASSLSAATAL	83
<i>F. chinensis</i>	ATLQHRRAAMLCAGEVLIQNSNIMQAIGARKVLDIGVETGASSLSAATAL	83
<i>P. momodon</i>	VTLOHRRASMLCAGEVLIQNSNIMQAIGARKVLDIGVETGASSLSAATAL	83
<i>D. labrax</i>	RTMEDSNINIMVACEQSOFMANLARIKAKKALEIGVYTGYNLTNMATAL	118
<i>O. niloticus</i>	RTMEDSWNGIMVASESOLANLAKLIKAKKALEIGVYTGYNLTNMATAL	119
<i>S. salar</i>	RTMDDSWNFIMVAAEQSOLMANLARIKAKKALEIGVYTGYNLTLSIAIVL	120
<i>O. mykiss</i>	RTMDDSWNFIMVAAEQSOLMANLARIKTKKALEIGVYTGYNLTLSIAIVL	97
<i>D. rerio</i>	PENGRVACITINDYVKIGKPFAPAGVENKIDIRLKPAVETLDELLSAG	197
<i>L. vannamei</i>	PPECKVHALISEEYTNIGKPEWEEAGVADKIRLHAPAAETLQKFVDGG	133
<i>F. chinensis</i>	PPNGKVYALISEEFTNIGKPYWEEAGVSNKISLHAPAAETLQKFIDAG	133
<i>P. momodon</i>	PPDCKVYALISEEFANIGKPEWEEAGVINKISLHAPAAETLQKFIDGG	133
<i>D. labrax</i>	DDGVLVACITISEDYTNIGKPEWKEAGVECKIDLRICPALKTLDDLLSAG	168
<i>O. niloticus</i>	DEDCVVIACITISEEYTNIGKPEWKEAGVEKKIDLRICPALKTLDDLLSSG	169
<i>S. salar</i>	DDGCKMVACITKDEYTNIGKPEWKEAGVACKIDLRICPALKTLDDLLANG	170
<i>O. mykiss</i>	DDGCKMVACITKDEYTNIGKPEWKEAGVEHKIDLRICPALKTLDDLLANG	147
<i>D. rerio</i>	EAGMYDFVFIDADKKIYETYYEKSLOLVRKGGIATDNLVWGCVVNEAE	247
<i>L. vannamei</i>	EAGTFDYAFIDADKTSYDRYYELCLILRFGGVTAEDNILLGAVVDPSK	183
<i>F. chinensis</i>	EASTFDYAFIDADKESYDRYYELCLILRFGGVTAEDNILLGAVVIDTD	183
<i>P. momodon</i>	EAGTFDYAFIDADKGIYETYYELCLILRSGGVTAEDNILLGVIDTD	183
<i>D. labrax</i>	CAETFDYAFIDADKVN YDRYYEKSLOLVRKGGIATDNLVWGCKVWNESP	218
<i>O. niloticus</i>	CAETFDYAFIDADKVN YDRYYEKSLOLVRKGGIATDNLVWGCKVWNESP	219
<i>S. salar</i>	EAGTFDFVFIDADKAYDNYYEKSLOLVRKGGIATDNLVWSGKVWNAAA	220
<i>O. mykiss</i>	EAGTFDFVFIDADKAYDNYYEKSLOLVRKGGIATDNLVWSGKVWNAAA	197
<i>D. rerio</i>	IDLSSCAIDKLNKKLHKDRITDLSMTVGDGLTLATK	284
<i>L. vannamei</i>	DTNPVIAIRKLNKKLKDDORINISFTKIGDGLSLCFK	220
<i>F. chinensis</i>	QKPGTIAIRKLNKKLKDDORINISFTKIGDGLSLCFK	220
<i>P. momodon</i>	QTPTVIAIRKLNKKLRDORINISFTKIGDGLSLCFK	220
<i>D. labrax</i>	DDIDTVAIDKLNKKLHRDTRVSLSMITVGDGLTLATK	255
<i>O. niloticus</i>	DDADTVAIDKLNKKLVRDTRINLSMTVGDGVTLATK	256
<i>S. salar</i>	DDIDTCAIDKLNKKLYRDRINISMTVGDGVTLATK	257
<i>O. mykiss</i>	DDIDTCAIDKLNKKLYRDRINISMTVGDGVTLATK	234

斑节对虾 *P. monodon* OMT(AEP84098); 中国明对虾 *F. chinensis* OMT(AAZ66373); 舌齿鲈 *D. labrax* COMT(CBN81506); 罗非鱼 *O. niloticus* COMT(XP_003441864); 三文鱼 *S. salar* COMT(ACI67838); 虹鳟鱼 *O. mykiss* COMT(ACO07843); 斑马鱼 *D. rerio* COMT(CAX14524)

图5 不同物种的氧位—甲基转移酶氨基酸序列比较

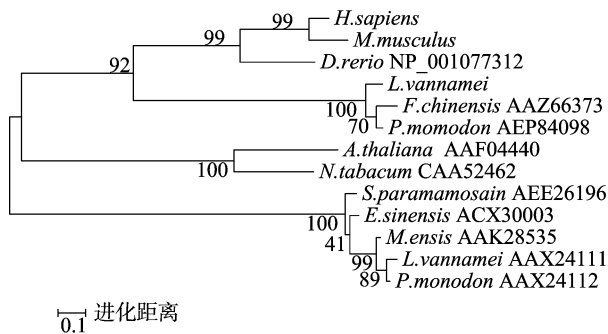


图6 系统发育树分析

2.4 *LvCOMT* 基因在组织中的表达分布

荧光定量 PCR 分析显示, *LvCOMT* 基因在凡纳滨对虾的鳃、肝胰腺、胃肠道、心脏中均有表达(图 7), 其表达量由高到

低为肝胰腺 > 肠道 > 胃 > 心脏 > 鳃。肝胰腺中表达量最高, 显著高于其他各组织; 鳃、心脏中的 *LvCOMT* 表达量最低。

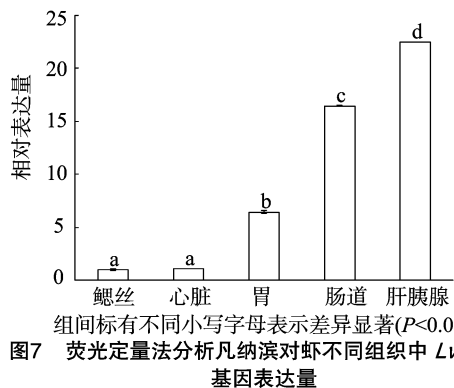


图7 荧光定量法分析凡纳滨对虾不同组织中 *LvCOMT* 基因表达量

3 结论与讨论

OMT 可以催化许多不同功能和调控作用的大分子、小分子的甲基化反应,其不仅在植物、动物的生长、发育、繁殖方面具有调控作用^[13-14],而且还参与植物防御与环境因子的相互作用^[15]。OMT 转甲基反应的化学机制都相同,差别在于甲基受体分子不同,对动物研究较多的 2 种 OMT 分别是 FAMeT、COMT。研究表明,COMT 在代谢动物大脑中的儿茶酚胺类(如去甲肾上腺素、多巴胺等)方面起重要作用^[16]。在 Mg^{2+} 存在时,COMT 可催化 S 腺苷蛋氨酸的 1 个甲基转移到含儿茶酚结构的底物分子上,从而形成甲基化产物^[17]。本研究通过 RACE 技术克隆了凡纳滨对虾儿茶酚-氧位-甲基转移酶基因(GenBank 登录号 JQ345478);该基因全长 910 bp,含有 1 个长达 666 bp 的开放阅读框,编码的成熟肽由 221 个氨基酸组成;该基因理论分子量为 74 872.60 u,等电点为 4.98。

COMT 研究始于人体中儿茶酚-氧位-甲基转移酶的发现^[14],继而陆续开展了其他物种的 COMT 相关生物学功能研究。本研究中,经“<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>”网站上蛋白质保守区分析,结果显示该基因有 1 个由 204 个氨基酸组成的保守区,该保守区属于甲基转移酶-3 家族。氨基酸多重比对显示,LvCOMT 氨基酸序列与斑节对虾、中国明对虾、舌齿鲈、罗非鱼、三文鱼、虹鳟鱼、斑马鱼的 OMT 氨基酸序列的一致性为 47%~88%,相似性为 68%~95%,与斑节对虾、中国明对虾的 OMT 一致性很高,分别为 88%、87%,相似性分别为 95%、94%,与甲壳动物十足目动物的 FAMeTs 序列一致性很低,即本研究克隆的 LvCOMT 基因和中国明对虾、斑节对虾的 OMT 具有较高同源性。系统发育分析显示,凡纳滨对虾 COMT 与哺乳动物的 COMTs 属于同支,属同种儿茶酚-氧位-甲基转移酶。

在线磷酸化位点和信号肽预测结果表明,凡纳滨对虾 COMT 有 12 个氨基酸磷酸化位点,没有信号肽,说明凡纳滨对虾 COMT 基因可能是依赖 12 个可能的氨基酸发生可逆的磷酸化反应来进行调控作用,这与中国明对虾调控方式一致^[7]。

近年研究表明,水产动物的 OMT 基因在病原和细菌感染中发挥重要作用。Tsoi 等用 SSH 技术对大马哈鱼免疫相关研究时发现,OMT 基因在诱导后高度上调表达^[6]。李殿香研究表明,中国明对虾 OMT 基因在细菌诱导后的上调表达可能是参与了对抗细菌入侵的免疫防御反应^[7]。笔者以往研究发现,COMT 基因是在环境胁迫中发现的差异表达基因,其与盐度变化之间存在某种联系,具体机制还须要进一步研究^[18]。

参考文献:

- [1] Averbeck N B, Jensen O N, Mann M, et al. Identification and characterization of PaMTH1, a putative *O*-methyltransferase accumulating during senescence of *Podospira anserina* cultures [J]. Current Genetics, 2000, 37(3): 200-208.
- [2] Pospiech A, Bietenhader J, Schupp T. Two multifunctional peptide synthetases and an *O*-methyltransferase are involved in the biosyn-

- thesis of the DNA-binding antibiotic and antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus* [J]. Microbiology, 1996, 142(4): 741-746.
- [3] Ibrahim R K, Bruneau A, Bantignies B. Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(1): 1-10.
- [4] Axelrod J, Tomchick R [J]. Enzymatic *O*-methylation of epinephrine and other catechols [J]. J Biol Chem, 1958, 233(3): 702-705.
- [5] Ruddell C J, Wainwright G, Geffen A, et al. Cloning, characterization, and developmental expression of a putative farnesoic acid *O*-methyl transferase in the female edible crab cancer pagurus [J]. Biology Bulletin, 2003, 205(3): 308-318.
- [6] Tsoi S C, Ewart K V, Penny S, et al. Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization [J]. Marine Biotechnology, 2005, 6(3): 199-214.
- [7] 李殿香. 中国对虾氧位-甲基转移酶基因克隆, 表达分析与功能研究 [D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1244-1245.
- [11] 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.
- [12] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5): 1351-1362.
- [13] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism [J]. Annu Rev plant physiol plant Mol Biol, 1989, 40(40): 347-369.
- [14] Bosrt D W, Laufer H, Landau M, et al. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development [J]. Insect Biochem, 1987, 17(7): 1123-1127.
- [15] Chiron H, Drouet A, Claudot A C, et al. Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional *O*-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44(6): 733-745.
- [16] Filipenko M L, Beilina A G, Alekseenko O V, et al. Changes in catechol-*O*-methyltransferase gene expression associated with agonistic behavior in male mice [J]. Doklady Biological Sciences, 2001, 377(1/2/3/4/5/6): 125-128.
- [17] Guldberg H C, Marsden C A. Catechol-*O*-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role [J]. Pharmacological Reviews, 1975, 27(2): 135-206.
- [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.