

凡纳滨对虾 G 蛋白 G₁ 亚基的克隆、表达与鉴定

金利华¹ 骆晶晶² 林圣彩¹ 叶志云^{1*}

(¹ 厦门大学生命科学学院, 福建 361005)

(² 加拿大阿尔伯特卡尔加里大学医药中心生物化学与分子生物学系)

摘要 根据 G 蛋白 G₁ 亚基的保守序列设计简并引物, 通过简并 PCR 和 RACE 技术, 克隆到凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) G₁ 基因的全长 cDNA 序列。利用 Blast、DNAstar 和 Genedoc 软件分析, 发现该 G₁ 编码的蛋白序列与其他物种已知的 G₁ 序列具有相当高的保守性, 将它命名为 pvG₁。免疫共沉淀分析发现 pvG₁ 能在体外适当条件下与对虾 G_s 或 G_q 相互结合。Western blotting 分析发现, pvG₁ 在对虾身体各部位都有广泛分布, 尤其在脑神经、眼和眼柄有大量表达。说明了 G₁ 在对虾的神经系统和光信号传导等生命过程中的重要性。

关键词 G 蛋白 凡纳滨对虾 克隆

中图分类号 Q344 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2006)03-0007-07

Cloning and characterization of G protein beta 1 subunit in shrimp *Litopenaeus vannamei*

JIN Li-hua¹ LUO Jing-jing² LIN Sheng-cai¹ YE Zhi-yun^{1*}

(¹ School of Life Sciences, Xiamen University, Fujian 361005)

(² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, the University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada)

ABSTRACT The β -subunits of the heterotrimeric GTP-binding proteins are important regulators of G-protein α subunits as well as a series of signal transduction receptors and effectors. In this study, a novel G protein β 1 subunit was isolated from shrimp *Litopenaeus vannamei*, and was termed pvG₁. Sequence analysis showed that the pvG₁ protein contained all the well-conserved domains and motifs that were critical sites for interaction with receptors and other binding effectors. Co-immunoprecipitation assay demonstrated that pvG₁ could interact with G_s and G_q of shrimp in vitro in appropriate conditions. Tissue distribution analysis demonstrated that pvG₁ was widely expressed in shrimp tissues, with highest levels in brain and eye plus eyestalk, providing evidence that signal transductions in nerve system and photoreception using G₁ protein is conserved in invertebrate crustaceans.

KEY WORDS G-protein *Litopenaeus vannamei* Cloning

国家 863 计划项目 (2002AA629060) 资助

*通讯作者。E-mail: yzy1893@xmu.edu.cn, Tel & Fax: (0592) 2182993

收稿日期: 2005-06-07; 接受日期: 2006-03-03

作者简介: 金利华 (1975-), 女, 博士, 讲师, 主要从事生物医学工程研究。Tel: (0592) 2188687, 13515963921

G 蛋白信号传导途径包括无数的外界配体刺激-受体-G 蛋白-第二信使的信号传导过程,引起一系列生理效应的发生。在这个过程中,除了 G 蛋白 亚基调节胞内包括腺苷酸环化酶(Adenylyl cyclases, AC)、磷脂酶 C(Phospholipase C, PLC)等酶的活性外, $\beta\gamma$ 复合体也起着重要的作用。 $\beta\gamma$ 复合体作为一个功能单位,通过调节 PLC、光感受器 cGMP 磷酸二酯酶、离子通道等途径来调节兴奋、神经递质信号传导、脱敏作用、细胞生长、分化和感觉信号传导等众多的信号转导过程(Hamm 1998)。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又称白肢虾(Whiteleg shrimp) 或者白对虾(White shrimp), 是世界上公认的少数优良养殖品种之一, 也是世界养殖产量最高的三大虾种之一。该品种原产于美洲太平洋沿岸水域, 1988 年由中国科学院海洋研究所张伟权研究员将凡纳滨对虾引入我国后, 国内科学工作者已经就它的生活习性、育苗、养殖、抗病等各方面做了大量研究, 但是从分子生物学的角度去研究凡纳滨对虾的生长、发育等调控机制的研究还很少见。已经在包括美国龙虾 *Homarus americanus* 的很多物种中发现 G 蛋白在嗅觉和视觉信号途径中起着极其重要的作用(Schandar *et al.* 1998, Xu *et al.* 1999, Dolph *et al.* 1994)。而气味、光线、食物等因素在对虾等低等生物的生活习性等多方面都是很重要的因素。本文主要寻找并克隆凡纳滨对虾 G 蛋白信号途径中的功能基因 G 蛋白 亚基, 并对其功能进行初步的分析鉴定, 旨在为对虾的生长、发育、抗病及养殖等生理调控奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

体长 8 cm 左右的凡纳滨对虾购自厦门大学白城菜市场。利用 RNeasy mini kit 试剂盒(美国 Qiagen 公司)提取对虾脑神经的总 RNA, 操作过程见试剂盒说明书。总 RNA 经 1% 琼脂糖胶电泳, 溴化乙啶染色鉴定质量, OD_{260nm} 测定 RNA 浓度。

1.2 第一链 cDNA 的合成

2 μ g 的总 RNA 为模板, 用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(美国 Clontech 公司)合成第一链 cDNA。

1.3 简并 PCR

根据其他物种已知 G 蛋白 1-5 亚基的氨基酸序列的保守区域设计 1 对简并引物, 前向引物 G F 序列为 5'-TGGGT(AGCT)ATG(AG)C(AC)TGTGCITA-3', 反向引物 G R 序列为 5'-AACTTG(AG)(ACT)I(GC)(AT)(AG)GCA TCACA-3'。引物由上海生工生物工程服务有限公司(上海生工)合成。25 μ l 简并 PCR 反应体系如下: 上述第一链 cDNA 1.5 μ l, 10 μ mol/L 的两向简并引物各 2 μ l, 10 mmol/L 的 dNTP 0.6 μ l, Taq DNA 聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司) 1.25 U, 10 \times 缓冲液 2.5 μ l, 超纯水 16.2 μ l。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 42 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。PCR 产物经琼脂糖胶电泳, 回收目的片段 DNA 并克隆到 pBluescript SK(-) 载体, 由上海生工测序。

1.4 5' 端 RACE 和 3' 端 RACE

上述克隆测序结果通过 NCBI 网站的 Blastx 软件比对, 确定为目的基因 G 蛋白 亚基后, 根据测序得到的序列结果, 设计两条特异引物, 分别进行 5' 端 RACE 和 3' 端 RACE 反应。快速扩增 cDNA 末端反应(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行。其中, 进行 5' 端 RACE 反应的特异性引物 G 5' 为 5'-CCTGATGTGAA TGTGTTCA TGTTCG-3', 进行 3' 端 RACE 反应的特异性引物 G 3' 序列为 5'-GTCACACTGGTTACCTAA GTTGCTGT-3'。为了保证 PCR 的准确性, 作者采用美国 Stratagene 公司的高保真 pfu DNA 聚合酶进行 RACE 扩增反应。扩增产物经琼脂糖胶电泳, 回收目的片段, 克隆到 pBluescript SK(-) 载体并测序。

1.5 表达载体的构建

根据 RACE 获得对虾 G 蛋白 β 亚基的全长 cDNA 序列,按照其编码区域设计从起始密码子到终止密码子的两端引物,前向引物 G₁F 带有 *Nde* 酶切位点,引物序列为 5'-atcatATGAA TGA TTTGGATA GTTT-3',反向引物 G₁R 接上 *Xba* 酶切位点,引物序列为 5'-attctagaTTA GTTCCA GA TCTTGA G-3'。以上述 cDNA 为模板, *pfu* DNA 聚合酶扩增该全长编码序列,PCR 产物经 *Nde* / *Xba* 酶切,连接到 pCMV5 带 Flag 标记的载体上。克隆送往上海生工测序。

带有 HA 标记的对虾 G 蛋白 pvG_s和 pvG_q的表达载体 pCMV5- HA-pvG_s和 pCMV5- HA-pvG_q为本实验室以类似的方法构建。

1.6 细胞培养

哺乳动物细胞 HEK 293 在含有 10% 小牛血清(杭州四季青公司)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)中培养,在 37℃ 和 5.0% 的 CO₂ 条件下培养。

1.7 免疫共沉淀分析和 Western blotting 分析

取适当浓度的 HEK 293 细胞铺于 60 mm 细胞培养板,24 h 后,用阳离子聚合物聚醚酰亚胺(Polyethylenimine, PEI)(美国 Poly science 公司)将 pCMV5-Flag-pvG₁ 分别与 pCMV5 空载体、pCMV5- HA-pvG_s 和 pCMV5- HA-pvG_q 各 2 μ g,共转染到细胞中。36 h 后收细胞,按照 Sternweis 等(1984)的方法提取细胞膜蛋白。将膜蛋白重悬于缓冲液(Hepes 30 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, DTT 0.1 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, GDP 0.1 mmol/L, Lubrol-PX 0.1%)中(Xu *et al.* 1998),取 800 μ l 浓度为 4 mg/ml 的膜蛋白,冰上放置 30 min,然后离心 20 min 后去掉不溶物,在上清溶液中加入单克隆抗体 anti- HA(美国 Santa cruz 公司)1 μ g,5 μ l protein A/G 琼脂糖珠(美国 Santa cruz 公司),于 4℃ 混和器上缓慢旋转过夜后,1 000 r/min 4 离心收集沉淀产物,同上缓冲液洗 3 次,然后 SDS-PAGE 电泳,Western blotting 分析,操作过程参考文献(Luo *et al.* 2003)。

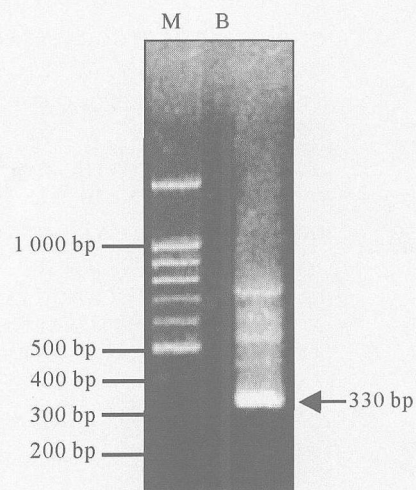
1.8 膜蛋白的提取

按 Sternweis 等(1984)方法分别提取体长 8 cm 左右对虾的触角、额角、腮、尾部肌肉、步行足、游泳足、尾扇、脑神经、心脏、肝胰脏、胃、肠、眼和眼柄中的膜蛋白。分别取这些膜蛋白 8 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳以及 Western blotting 分析。其中用来检测目的蛋白的特异性一抗为抗 G 蛋白 β 亚基的抗体(德国 Calbiochem 公司),制作该抗体的抗原为 G 中间 127-139 氨基酸序列的合成多肽,能识别 35 kda 和 36 kda 的 G 蛋白 β 亚基。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾 G 蛋白 β 亚基全长 cDNA 的克隆

以对虾脑 cDNA 为模板,简并 PCR 扩增结果如图 1。其中左箭头指向的约 330 bp 的 DNA 条带为目的片段。将该 DNA 从琼脂糖胶回收,克隆并测序,将序列通过 NCBI 网站 Blastx 软件比对分析,发现该片段序列与其他物种已知的 G 蛋白 β 亚基有很高的同源性。作者初步确定其为对虾的 G 蛋白 β 亚基基因。然后根据该片段序列,设计进行 5' 端和 3' 端 RACE 反应



Lane M, 100 bp DNA Marker; Lane B, PCR product amplified from Brain cDNA

图 1 对虾 G 基因的简并 PCR 产物电泳
Fig. 1 Degenerate PCR product of G gene from the brain cDNA of *L. vannamei*

的特异性引物。RACE 扩增反应得到的序列片段克隆测序结果得到该目的基因的全长 cDNA 序列 1 272 bp。再根据 Blastx、DNAstar、Genedoc 软件对该 cDNA 序列进行分析,发现只有从第 27 位起始密码子翻译的氨基酸序列为正确阅读框,5'端 26 bp 的序列为 5'端非编码序列(5'-UTR),3'端 223 bp 为 3'-UTR,开放阅读框 27 bp ~ 1 049 bp 的 cDNA 序列为编码区,编码成含 340 个氨基酸的蛋白(图 2)。

```

ATTTTTAGTTTTGTAATTTTTAGAAATGAATGATTGGATAGTTTACGACAAGAAGCAG 60
                                M N D L D S L R Q E A
AAAGACTAAAGAACACAATACGAGATGCTCGCAAAAATGCCTTGACACGACCTTGGTCC 120
E R L K N T I R D A R K N A L D T T L V
AAGCCACATCCGGCATGGACCTATTGGCCGAATTCAGATGCGAACCAGGAGAACGCTTA 180
Q A T S G M D P I G R I Q M R T R R T L
GAGGACACTTAGCCAAAATATATGCCATGCACTGGGGTTCGGACTCTAGGAATTTGGTAT 240
R G H L A K I Y A M H W G S D S R N L V
CAGCATCTCAAGACGGCAAGCTCATAGTATGGGACAGTTACACTACAAACAAGGTGCATG 300
S A S Q D G K L I V W D S Y T T N K V H
CCATCCCCCTTCGGTCCAGCTGGGTTCATGACCTGTGCCTATGCTCCCTCGGGCAGTTACG 360
A I P L R S S W V M T C A Y A P S G S Y
TTGCCTGIGGTGGCCTTGATAACATCTGTCTATATACAACCTAAAGACAAGAGAAGGCA 420
V A C G G L D N I C S I Y N L K T R E G
ATGTGAGAGTGAGTAGGGAGTTGCCTGGTCACACTGGTTACCTAAGTTGCTGTCGGTTCC 480
N V R V S R E L P G H T G Y L S C C R F
TAGACGACAACCAATAGTCACAAGCTCGGGAGACATGACCTGTGCCCTCTGGGATATAG 540
L D D N Q I V T S S G D M T C A L W D I
AGACGGGTCAGCAGTGCACGCAATTCACAGGCCATACAGGGGATGTGATGTCCCTGTCCC 600
E T G Q Q C T Q F T G H T G D V M S L S
TGTCACCGAACATGAACACATTCACATCAGGTGCCTGTGATGCGTCTGCTAAGCTATGGG 660
L S P N M N T F T S G A C D A S A K L W
ACATTCGTGATGGGATGTGCCGCCAGACCTTCCCAGGACACGAATCTGACATTAATGCAG 720
D I R D G M C R Q T F P G H E S D I N A
TTACATCTTCCCCAATGGGCATGCATTTGCCACGGGATCAGATGATGCCACATGCCGCC 780
V T F F P N G H A F A T G S D D A T C R
TATTTGACATTCGTGCAGACCAGGAGCTTGCCATGTACTCTCATGACAACATTATTTGTG 840
L F D I R A D Q E L A M Y S H D N I I C
GCATCACCTCAGTGGCATTGAGCAAGTCTGGCAGACTCCTGCTGGCTGGTTACGATGACT 900
G I T S V A F S K S G R L L L A G Y D D
TTAATTGTAACGTTTGGGACTCCATGAGGACAGAAAGAGCTGGTGTCTGGCGGGCCATG 960
F N C N V W D S M R T E R A G V L A G H
ACAACCGCTCAGTTGCCCTGGGTGTTACAGAAGATGGCATGGCAGTGGCCACAGGCTCAT 1020
D N R V S C L G V T E D G M A V A T G S
GGGATAGCTTCCCTCAAGATCTGGAACCTAAGCTTGTTCATGCCACCACCACTCCAGTATCAA 1080
W D S F L K I W N
CATCAGTATCTTCCAAGGAACCAAAATCCCTCCACCGTCCCTGGGACTTGACACTGTT 1140
ATATGAGGGATTTTCAATTGATTCCGACTCCGGTTGTAGCTTATGAAGTCTCGTTTGTG 1200
AATTTGTCATGTAAGTAACTATCTGACTTGTC AATAAAGCTATTTGTCTTTACAAAAA 1260
AAAAAAAAAAAAA 1272

```

图 2 pvG₁ 的全长 cDNA 序列和相应编码的蛋白氨基酸序列

Fig. 2 The full length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of pvG₁

氨基酸序列比对表明,该氨基酸序列与其他物种已知的 G 蛋白 G₁ 亚基具有相当高的同源性(图 3),从与脊椎动物兔(*Rattus norvegicus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和人类(*Homo sapiens*)高达 86% 的同源性,到与无脊椎动物果蝇(*Drosophila melanogaster*)具有 88% 的同源性,与线虫(*Caenorhabditis elegans*)有 90% 的同源性,尤其与美国龙虾(*H. americanus*),存在高达 98% 的序列同源性。所以作者将这个从凡纳滨对虾中克隆到的新基因表达产物命名为 pvG₁ (Gprotein beta 1 subunit of *L. vannamei*), Genbank 收录编号为

A Y626793 ,相应编码的氨基酸序列收录号为 AAU12180。

从图 3 中可以看出 ,pvG_i 的序列与其他物种 G_i 序列具有极高的保守性。哺乳动物 G_i 亚基中的重要功能区域 ,在 pvG_i 中都完全保守的存在 ,如与腺苷酸环化酶相互结合的两个区域 TTN KV HA IPLRSSWVMT-CAY (氨基酸残基 86-105) 和 ACGGLDNICSIYNL KTREGNV (氨基酸残基 115-135) (Chen *et al.* 1997) ;与钙调蛋白结合的 24 氨基酸残基区域 V GRIQMR TRRTL RGH LA KIYAMHW (氨基酸残基 40-63) (Liu *et al.* 1997) ;还有哺乳动物 G_i 亚基用来调节激活 PLC 以及 MAPK/ ERK 和 JNK/ SAPK 信号途径的 C 末端 14 个氨基酸序列(327-340) 等等(Zhang *et al.* 1996; Yamauchi *et al.* 1997)。

shrimp	: MNDLDSLRQEAERLKNITIRDARKNALDITLVQATSGMDFVIGRIQMRTRRTL RGH LAKIYA :	60
lobster	: mndldslrqeaerlknitirdarknaldtllvqatagmfpigriqmrtrrtlrghlakiya :	60
fly	: mnldslrqeaeslknairdarkaactdsgllgaatslepigriqmrtrrtlrghlakiya :	60
<i>C.elegans</i>	: mseldqlrqeaedlksqirearksandtllatvasnlepigriqmrtrrtlrghlakiya :	60
frog	: mseldqlrqeaedlknqirdarkacadaatlaqitaniqsvgrigmrtrrtlrghlakiya :	60
mouse	: mseldqlrqeaedlknqirdarkacadaatlsqitnnidvgrigmrtrrtlrghlakiya :	60
human	: mseldqlrqeaedlknqirdarkacadaatlsqitnnidvgrigmrtrrtlrghlakiya :	60
shrimp	: MHWGDSRNLVVSASQDGKLIYWDSYTTNKVHAIPLRSSWVMT CAYAPSGSYVACGGLDNI :	120
lobster	: mhwgdsrnlvsasqdgkliywdsyttknkhaiplrswvmtcayapsgsyvaccgldni :	120
fly	: mhwgdsrnlvsasqdgkliywdsyttknkhaiplrswvmtcayapsgsyvaccgldni :	120
<i>C.elegans</i>	: mhwdsrnlvsasqdgkliywdsyttknkhaiplrswvmtcayapsgsyvaccgldni :	120
frog	: mhwgtdsrllvsasqdgkliywdsyttknkhaiplrswvmtcayapsgsyvaccgldni :	120
mouse	: mhwgtdsrllvsasqdgkliywdsyttknkhaiplrswvmtcayapsgsyvaccgldni :	120
human	: mhwgtdsrllvsasqdgkliywdsyttknkhaiplrswvmtcayapsgsyvaccgldni :	120
shrimp	: CSILYNLKTREGNVRVSRRELPGHTGYLSCCRFLDDNQIIVTSSGDMTCALWDIETGGQCTQF :	180
lobster	: csiylslktregnvrvsrelpghtgylsccrflddnqivtssgdmccalwdietggqctqf :	180
fly	: csiylnlktregnvrvsrelpghgylsccrflddnqivtssgdmccglwdietgglwtsf :	180
<i>C.elegans</i>	: csiylslktregnvrvsrelpghtgylsccrflddnqivtssgdmccalwdietggqctaf :	180
frog	: csiylnlktregnvrvsrelpghtgylsccrflddnqivtssgdmccalwdietggqcttf :	180
mouse	: csiylnlktregnvrvsrelpghtgylsccrflddnqivtssgdmccalwdietggqcttf :	180
human	: csiylnlktregnvrvsrelpghtgylsccrflddnqivtssgdmccalwdietggqcttf :	180
shrimp	: TGHTGDVMSLSLSLSPNMNTEFTSGACDASAKLWDIIRDGMCRQTFEGHESDINAVTFFPNQHA :	240
lobster	: tghtgdvmslslsispmnrtftsgacdasaklwdiirdgmcrcqtfgghesdinavtffpngha :	240
fly	: lghtgdvmslsislapgckttfvsagacdasaklwdiregvekqtfegghesdinavtffpnqga :	240
<i>C.elegans</i>	: tghtgdvmslsislpdfrftfvsagacdasaklwdiirdgmcckqtfegghesdinavtffpnqna :	240
frog	: tghtgdvmslsislapdrcfvsagacdasaklwdvregmcrqtfegghesdinavtffpnqna :	240
mouse	: tghtgdvmslsislapdtrlfvvsagacdasaklwdvregmcrqtfegghesdinavtffpnqna :	240
human	: tghtgdvmslsislapdtrlfvvsagacdasaklwdvregmcrqtfegghesdinavtffpnqna :	240
shrimp	: FATGSDDATCRFLFDLRADQELAMYSHDNIICGITSVAFSKSGRLLLAGYDDFNCNVWDSM :	300
lobster	: fatgsddatcrflfdlradqelamyshdniicgitsvafsksgklllagyddfnncnvwdsml :	300
fly	: fatgsddatcrflfdlradqelamyshdniicgitsvafsksgklllagyddfnncnvwdm :	300
<i>C.elegans</i>	: fatgsddatcrflfdlradqelamyshdniicgitsvafsksgklllagyddfnncnvwdsml :	300
frog	: fatgsddatcrflfdlradqelamyshdniicgitsvafsksgklllagyddfnncnvwdtl :	300
mouse	: fatgsddatcrflfdlradqelmtvshdniicgitsvafsksgklllagyddfnncnvwdal :	300
human	: fatgsddatcrflfdlradqelmtvshdniicgitsvafsksgklllagyddfnncnvwdal :	300
shrimp	: RTERAGVLAGHDNRVSCLGVTEDGMVAATGSWDSFLKIWN :	340
lobster	: rteragvlaghdnrvsclgvtedgmavatsgwsdfkllwn :	340
fly	: kaersgllaghdnrvsclgvtengmavatsgwsdfllrvwn :	340
<i>C.elegans</i>	: rqreragvlaghdnrvsclgvtedgmavatsgwsdfkllwn :	340
frog	: kadragvlaghdnrvsclgvtddgmavatsgwsdfkllwn :	340
mouse	: kadragvlaghdnrvsclgvtddgmavatsgwsdfkllwn :	340
human	: kadragvlaghdnrvsclgvtddgmavatsgwsdfkllwn :	340

黑色表示保守氨基酸残基。Shrimp, *L. vannamei*; Lobster, *H. americanus*; Fly, *D. melanogaster*; *C. elegans*, *C. elegans*; Frog, *X. laevis*; Mouse, *Mus musculus*; Human, *H. sapiens*. Genbank 序列号分别为 AAU12180、AAC02998、P26308、AA K55963、CAA60532、NP-032168 和 AA H04186

The black represents conserved residues. Shrimp, *L. vannamei*; Lobster, *H. americanus*; Fly, *D. melanogaster*; *C. elegans*, *C. elegans*; Frog, *X. laevis*; Mouse, *Mus musculus*; Human, *H. sapiens*. Genbank accession numbers are AAU12180, AAC02998, P26308, AA K55963, CAA60532, NP-032168 and AA H04186 respectively

图 3 pvG_i 亚基氨基酸全序列与其他物种 G_i 亚基氨基酸全序列比对分析

Fig. 3 Comparison of the predicted amino-acid sequence of pvG_i with G_i from other species

2.2 pvG₁基本功能的保守性

由于 G 蛋白信号途径在进化史上的高度保守性,使我们能用哺乳动物细胞来研究对虾 G 蛋白的功能。在低浓度的 Mg^{2+} 和高浓度的 GDP 存在的情况下,G 蛋白 3 种亚基(、/)容易以三聚体的形式存在(Xu *et al.* 1998)。所以作者在 pvG₁ 与 pvG_s、pvG_q 的体外免疫共沉淀分析中,提供了这些适合 G 蛋白三聚体存在的条件。实验结果表明,在适当条件下 pvG₁ 在体外完全能够与凡纳滨对虾的 G_s 或 G_q 亚基共沉淀(图 4)。

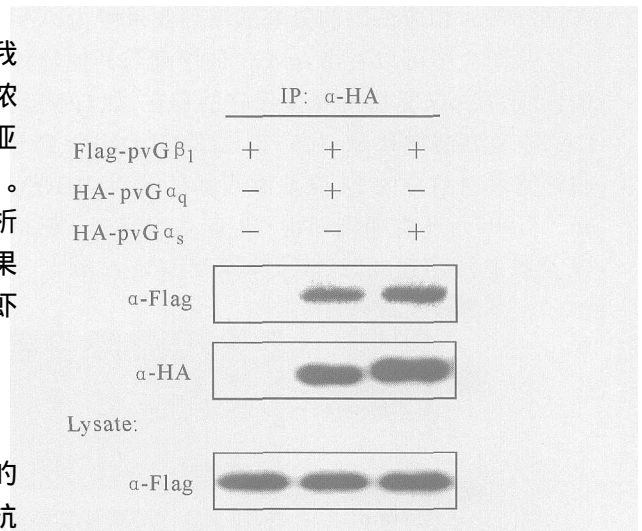
2.3 pvG₁在凡纳滨对虾中的分布

pvG₁ 与哺乳动物 G 在氨基酸残基 127-139 序列的完全一致,使得我们能够用商业化的抗 G 蛋白 亚基的抗体来检测 pvG₁ 在凡纳滨对虾中的分布。通过对体长 8 cm 左右的凡纳滨对虾各部位膜蛋白的 Western blotting 分析,作者发现在脑神经、眼和眼柄中有大量 pvG₁ 的存在,游泳足和肠内也有适量分布,在触角、额角、腮、步行足、尾扇、心脏、肝胰脏和胃中都存在相对较少的分布,而在尾部肌肉中几乎检测不到 pvG₁ 的存在(图 5)。虽然该检测抗体能识别 35 kDa 和 36 kDa 的 G 蛋白 亚基,但是在 Western blotting 检测中只显示了 1 条带,鉴于 G 蛋白 亚基极高的序列同源性,作者推测凡纳滨对虾中可能只存在 1 种 G 蛋白 亚基。

3 讨论

通过保守序列设计简并引物,进行简并 PCR,再根据简并 PCR 所得序列设计特异引物进行 5' 端和 3' 端 RACE,从而获得全长 cDNA 序列,该技术路线对克隆具有高度序列保守性的新基因都是行之有效的。本实验根据所得序列的序列分析和基因表达蛋白产物的基本功能的鉴定,结果都表明作者克隆到的基因为凡纳滨对虾的 G 蛋白 亚基基因,表达蛋白产物 pvG₁。进一步证明了 G 蛋白在进化史上的高度保守性。

pvG₁ 以及 pvG_q 和 pvG_s (Data not shown) 在凡纳滨对虾身体各部位的广泛分布,说明了 G 蛋白信号途径在对虾生命活动中的重要性。G 复合体除了能与 G 亚基结合并将 G 亚基锚定在细胞膜上,使之能接受受体传递的信息以外,G 亚基还能直接与离子通道、效应分子偶联。在果蝇中就有发现体内 G 蛋白 亚基与 G 蛋白偶联受体结合,参与光信号转导过程(Dolph *et al.* 1994)。已有检测到不同的 G 亚基在低等脊椎动物 *Sparus aurata* (Funkenstein *et al.* 1997) 的视杆和视锥细胞中分布,还有在美国龙虾的脑、触角、眼和眼柄中有 G 的大量分布(Xu *et al.*



上面的带型为免疫共沉淀图谱,中间的带型为免疫沉淀图谱,下面带型为总的细胞裂解液中 Flag-pvG₁ 的表达图谱

The top panel was the co-immunoprecipitated pattern, the middle panel was the immunoprecipitated pattern, and the bottom panel was the expression pattern of Flag-pvG₁ from total cell lysates

图 4 Flag-pvG₁ 和 HA-pvG_q、HA-pvG_s 的免疫共沉淀及 Western blotting 分析
Fig. 4 Western blotting analysis of co-immunoprecipitation between Flag-pvG₁ and HA-pvG_q or HA-pvG_s

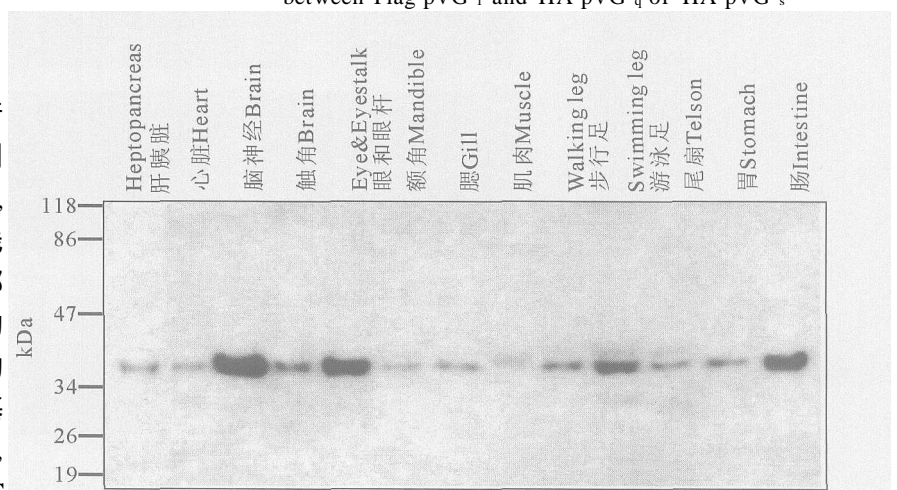


图 5 pvG₁ 在对虾中的分布

Fig. 5 Western blotting analysis of pvG₁ distribution in shrimp

1998),在蜥蜴的视网膜中也克隆到 G 蛋白 β 亚基(Ryan *et al.* 2001)。最近研究表明,在硬骨鱼的光/暗适应反应过程中有 G / 复合体的参与(Kobayashi *et al.* 2004)。作者在对虾脑神经和眼、眼柄中检测到 β G 的大量分布,与上述众多实验结果说明,G 在凡纳滨对虾视觉信号的传导中可能起着重要作用。

越来越多的研究表明,G / 复合体在无脊椎动物的嗅觉信号传递中也有着必不可少的地位。除哺乳动物以外,在鲶鱼和甲壳类龙虾的嗅觉受体神经细胞中都有检测到 G / 复合体的分布(Bruch *et al.* 1997, Xu *et al.* 1998)。在美国龙虾中还发现 G 蛋白 β 亚基与 G 蛋白受体激酶结合,参与嗅觉信号转导过程(Xu *et al.* 1999)。作者在对虾的嗅觉器官触角中检测到 $G_{\beta 1}$ 的分布,说明 $G_{\beta 1}$ 在对虾的嗅觉反应中也起着重要的作用。

综上所述,本文克隆并鉴定了凡纳滨对虾 G 蛋白 β 亚基,为我国主要水产养殖凡纳滨对虾的生理效应的分子机理研究及调控奠定了一定的理论基础。凡纳滨对虾 G 蛋白偶联受体及相关配体的发现,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- Bruch, R. C., Medler, K. F., Tran, H. N. *et al.* 1997. Gprotein beta gamma subunit genes expressed in olfactory receptor neurons. *Chem. Senses*, 22: 587 ~ 592
- Chen, Y., Weng, G., Li, J. *et al.* 1997. A surface on the Gprotein β -subunit involved in interactions with adenylyl cyclases. *PNAS*, 94: 2 711 ~ 2 714
- Dolph, P. J., Man-Son-Hing, H., Yarfitz, S. *et al.* 1994. An eye-specific G beta subunit essential for termination of the phototransduction cascade. *Nature*, 370 (6484): 59 ~ 61
- Funkenstein, B., and Jakowlew, S. B. 1997. Piscine (*Sparus aurata*) alpha subunit of the Gprotein transducin is homologous to mammalian cone and rod transducin. *Vision Res.* 37(18): 2 487 ~ 2 493
- Hamm, H. E. 1998. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273 (2): 669 ~ 672
- Kobayashi, Y., Hisatomi, O., and Tokunaga, F. 2004. Phosphorylation of teleost phosducins and its effect on the affinity to Gprotein beta gamma subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 322(2): 477 ~ 482
- Liu, M., Yu, B., Nakanishi, O. *et al.* 1997. The Ca^{2+} -dependent binding of calmodulin to an N-terminal motif of the heterotrimeric Gprotein subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 18 801 ~ 18 807
- Luo, W., Ng, W. W., Jin, L. *et al.* 2003. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. *J. Biol. Chem.* 278: 37 451 ~ 37 458
- Ryan, J. C., Crouch, R. K., and Ma, J. X. 2001. Cloning and characterization of three salamander retinal Gprotein beta subunits. *Mol. Vis.* 7: 222 ~ 227
- Schandar, M., Laugwitz, K. L., Boekhoff, I. *et al.* 1998. Odorants selectively activate distinct Gprotein subtypes in olfactory cilia. *J. Biol. Chem.* 273(27): 16 669 ~ 16 677
- Sternweis, P. C., and Robishaw, J. D. 1984. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J. Biol. Chem.* 259: 13 806 ~ 13 813
- Xu, F., Hollins, B., Landers, T. M. *et al.* 1998. Molecular cloning of a lobster G beta subunit and G beta expression in olfactory receptor neuron dendrites and brain neuropil. *J. Neurobiology*, 36: 525 ~ 536
- Xu, F., Bose, S. C., and McClintock, T. S. 1999. Lobster Gprotein coupled receptor kinase that associates with membranes and G(beta) in response to odorants and neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* 415 (4): 449 ~ 459
- Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. 1997. C-terminal mutation of Gprotein β subunit affects differentially extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways in human embryonal kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7 602 ~ 7 607
- Zhang, S., Coso, O. A., Collins, R. *et al.* 1996. A C-terminal mutant of the Gprotein β subunit deficient in the activation of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 271: 20 208 ~ 20 212