

凡纳滨对虾内脏几丁质酶基因的克隆、 序列分析与结构预测

黄乾生¹, 陈超琪², 谢晓兰³, 王 焯¹, 石 艳¹, 陈清西¹

(1. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 北京大学城市与环境学院, 北京 100082; 3. 泉州师范学院化学与生命科学学院, 福建 泉州 362000)

摘要:几丁质酶是甲壳动物顺利完成生理性蜕壳的关键功能酶. 已有研究表明几丁质酶是一个多基因家族. 根据甲壳动物几丁质酶保守序列设计引物, 应用反转录 PCR 方法从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 内脏中扩增得到部分几丁质酶编码基因片段, 进一步结合 RACE 法, 克隆得到该几丁质酶完整编码序列. 生物信息学分析表明其含有信号肽序列、几丁质酶催化中心序列、PEST 连接区和几丁质底物结合部位序列. 序列比对发现其与中国对虾 (ABB85237. 1)、斑节对虾 (AF157503. 1) 和日本对虾几丁质酶 (BAA12287. 1) 具有很高的相似度.

关键词:生物信息学; 凡纳滨对虾; 几丁质酶; 基因克隆; 序列比对

中图分类号: Q 356. 1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2009)03-0355-05

几丁质酶 (EC 3. 2. 1. 14) 广泛分布于细菌、真菌、植物和动物中. 在高等动物中, 发现了多种几丁质酶及几丁质酶类似蛋白. 各个几丁质酶在免疫反应中起着重要作用^[1]. 在节肢动物中, 已报道有 18 个几丁质酶及其类似蛋白基因存在于果蝇基因组中^[2]. 这些都表明几丁质酶是一个多基因家族.

在甲壳动物的生长发育过程中, 几丁质酶起着至关重要的作用. 几丁质酶的正常表达可以保证甲壳动物顺利完成蜕壳^[3], 而如果表达出现异常, 则会出现蜕壳不遂等病症, 影响其正常生长发育, 甚至导致死亡. 蜕壳不正常还会使甲壳动物的免疫能力下降, 病毒容易入侵. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是我国最重要的经济虾类之一, 其养殖规模逐年增加, 但是近年来养殖场经常爆发大规模疾病, 导致虾大量死亡, 造成重大经济损失. 发生疾病的主要原因是由于虾免疫能力下降, 病毒入侵引起的.

虽然几丁质酶是一个多基因家族, 但是在凡纳滨对虾中只报道过一种几丁质酶 (nucleotide accession number: AF315689). 因此, 我们尝试克隆新的几丁质酶, 为进一步研究其功能提供基因信息基础.

1 材料与方法

1.1 材料

RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司. Taq 酶来自 Fermentas 公司. M-MLV 反转录酶、限制性内切酶、PMD-18T 载体来自 Takara 宝生物公司. 核酸电泳 Marker 购自北京天根生物公司. 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司. 其他试剂为国产分析纯. 大肠杆菌 DH5 由本实验室保存. 凡纳滨对虾由漳州海澄养殖场提供.

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 按照 Trizol 试剂说明书提取凡纳滨对虾内脏总 RNA, 根据 M-MLV 反转录酶说明书将其反转成 cDNA. 从 NCBI 的 genbank 中搜索得到 3 种甲壳动物几丁质酶, 分别是中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*). 将它们的编码序列进行序列比对, 根据比对得到的保守序列设计引物 chi1-1f 和 chi1-1r (表 1) 并克隆其基因. PCR 反应体系为在 20mm³ 的体积里含有 2mm³ buffer, 2mmol/dm³ MgCl₂, 0.5μmol/dm³ 引物, 1mm³ cDNA 模板, 1U Taq 酶, 0.2mmol/dm³

收稿日期: 2008-09-24

基金项目: 福建省科技重点项目 (2006N0067); 中国博士后科学基金资助项目 (20070410806)

作者简介: 黄乾生 (1982 ~), 男, 博士研究生.

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导); E-mail: chenqx@xmu.edu.cn

将测序所得 800bp 和 400bp 序列分别与 1 448bp 的条带进行拼接. 发现 400bp 的条带可以与 1 448bp 条带拼接. 拼接所得结果如图 3 所示.

```

1   ATGGTGAGCGGACCGCTTTAGCACTGCTGGGGACGCTCGCAGCGTTGGCAACACTGGCGTTGGCTGACCCGAGA
1   M V S G R V L A V L G T L A A L A T L A L A D P R
76  TTCGAGCAAGGAGCCACGCGCGTGGTGGCCGCAAGCCCGCGCGTGTGCTACTACGAGGCCTGG
26  F E Q G A Q R R W V R P E G Q A R R V C Y Y E A W
151 GCCATCTACCGGCCGCGACGGCTTCTACGACATCGAGGACATCCCGCGCGACCTGTGCAGCGCACTCATCTAC
51  A I Y R P G D G F Y D I E D I P A D L C T D L I Y
226 TCGTTCATCGGCGCTGTCCAAGCTCAGTGGGAAGTACTCGTCTCGACGCTGAGTACGACATCAACATGAACGGC
76  S F I G L S N V T W E V L V L D P E Y D I N M N G
301 TTCGGCGGTTTCGTGGCGCTGAAGGACAAGTACCCGACATGAAGACCAACCTCGCTGTGGGCGCTGGGCGCGAG
101 F R R F V A L K D K Y P D M K T N V A V G L G W A E
376 GCGCGCAGGAAGTACTCCAGATCGTGTGCTCCCGGAGAGGAGGCGCTCTTCATCAGGAGCGTCTGCACTTG
126 G G R K Y S Q M V M V P E R R A S F I R S V V Q L
451 CTCACCGACTACGGCTTCGACGGCTGGACTTGGACTGGGACTACCTGGCGGACCCACCGCGGAGGCCAATAT
151 L T D Y G F D G L D L D W E Y P G A T D R G G Q Y
526 GCCGATAAGGACAACCTTCTTAACTGGTGGGAGCTGGCGGAGGCTTCGACACGGTGGGGTTGGGCTGGGAG
176 A D K D N F L K L V R E L R E A F D T V G L G W E
601 ATCAGTGGCGCGTGGCCGCAAGTTCGCGCTGCAGGAGGGCTACCATGTGCCTCAGCTCTGCAGCCTGCTG
201 I T C A V P V A K F R L Q E G Y H V P L G W S L L
676 GACGCCATCCACCTGATGACGTACGACCTGGCGGGCAACTGGGTTGGCTTCGCGGACGCTCCACTCCATGCTGTAC
226 D A I H L M T Y D L R G N W V G F A D V H S M L Y
751 AGCGGCGCGCGCTGCACGACTGGGCTACGAGAAGTGAACGTGAACGACGGCGCTCTCCTGTGGGTGGAATTC
251 R R P G L H E W A Y E K L N V N D G A L L W V E F
826 GGGTGTCGCGGTGATAAGCTGGTGGTGGGACGCCATTTACGGGCGCACCTACACGCTGGGTGACCCTAACAAC
276 G C P R D K L V V G T P F Y G R T Y T L G D P N N
901 AACGACTGCACGCGCCATCAAGAAGTGGGAGGAGGCGCGCTGCCGCGCCCTATACCAACGCCACAGGCACT
301 N D L H K K W E G G G L P G P Y T N A T G T
976 ATGGCTTACTCGAGATTTCCTCATGATGAAGGAGGACTCGGAGTGGTGCATCGATCAGATGACATCGGCCTC
326 M A Y F E I C L M M K E D S E W V D R Y D D I G L
1051 GTCCCTTCACTACAAAGCGCAGTGGTGGGCTACGAGGACCCCGACAGCCTCAAGATCAAGATGGAATTC
351 V P F T H K G D Q W V G Y E D P D S L K I K M D F
1126 ATCCGCGAGCGGTTATCTCGGCGCCATGACCTGGGCGCATCGATCAGGACGACTTCCGGAACCTGGTGGGAAG
376 I R E Q G Y L G A M T W A I D Q D D F R N W C G R
1201 GGACAAAACCGATGATGAACACCATTTACAATGGATGAAGGACTACGTAGTCCCTGTTGCTCCACTTTCCT
401 G Q N P M M N T I Y N G M K D Y V V P V A P T L P
1276 CCGACCACAATACTCTGTTGGACCCGCAACTACCACCACCAACACGAGACCCAGCATCCACCACC
426 P T T T N S W W T P P T T T T T T T R D P S I T T T
1351 ACGAGGATCCCAACTTGGCGACCAACTATGGGCGGATTGACTGTAAGTGTGCAAGAATACTGGCCGATCCG
451 T R D P N L P T T T M G P I D C T V Q E Y W P H P
1426 GACTGTGACAAGTACTGTTGCTTGAAGGCTGCCGCACTGGAGTACTGCCCCGCTGGCACCCTGTGGAAC
476 D C D K Y Y W C F E G V L D V R A K G I P A R S T V W N
1501 CAGGCCATCAAGCGTGGACTGGCCGGTAACGTAGACACCTCCGGCTGCAACATGCCTTGGCTCTGAAGGAC
501 Q A I K A C D W P A N V D T S G C N M P S L S K D
1576 GCCAGCCAGCGGACCTCCACAACGCCATCCCGCTGGAGCTCCGGGCCAAAGGGATCCCGCGCTCGGGCAAGCGG
526 A S V D A K L V H N K A P R A K P A P N K R A D D
1651 CCCAAGTTCTCTCAACATAGTTTCCAAAGAGCCAGCAGCGGCGAAGCCAGCGGTGTCAAGCCTTCGCTGCG
551 P K V P L N I V S K E P A A A K P A R V K P S P A
1726 AAATCCGTTGATGCTAACTAGTTCATAATAAAGCACCACGTGCTAAACCAGCACCTAATAAACGAGCAGATGAC
576 K S V D A K L V H N K A P R A K P A P N K R A D D
1801 AGGCCAGCATGCCAGCCTGACCAAGAATTCCTCAAGTCAAGCCTGCTAAGTCAAGCACCACCTATGCTAATG
601 R P A H A Q P D Q E F P K S D P A K S A P P M L M
1876 AAAAAAATTAATAAAAAA
626 K K N

```

图3 凡纳滨对虾几丁质酶 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig.3 cDNA and deduced amino acid sequences of *L. vannamei* chitinase

2.3 序列分析

将克隆到的几丁质酶的推导氨基酸序列进行结构分析. 该编码区编码 628 个氨基酸, 预测分子量为 70 558. 63Da, 理论等电点为 5. 71. 去掉信号肽的成熟蛋白分子量为 68 465. 03Da, 等电点为 5. 62 通过 Signal P 软件预测, 发现前 22 个氨基酸为信号肽区域. Prosite 软件预测其 156 ~ 164 位为几丁质酶催化活性中心, 463 ~ 519 位为几丁质结合部位. PESTfind 预测其 412 ~ 440 位 PEST 区域.

2.4 序列同源性分析

用 NCB 的 BlastP 去寻找相似蛋白, 所得结果如表 2 所示. 分析发现凡纳滨对虾几丁质酶与中国对虾、斑节对虾、日本对虾几丁质酶序列相似度很高. 与昆虫来源的几丁质酶也具有较高的相似度, 如表 2 所示. 而与凡纳滨对虾已有几丁质酶 (protein accession number: AAN74647) 相似度仅为 27%, 说明我们所获得的几丁质酶为凡纳滨对虾的一种新几丁质酶.

表 2 凡纳滨对虾几丁质酶与其他物种来源几丁质酶蛋白序列相似度比较

Tab 2 Similarity comparisons of *L. vannamei* chitinase protein sequence with that of other organisms

物种	蛋白获取号	氨基酸序列相似度 / %	分值	E 值
中国对虾 (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	ABB85237. 1	0. 89	1 073	0
斑节对虾 (<i>Penaeus monodon</i>)	AF157503_1	0. 91	1 073	0
日本对虾 (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	BAA12287. 1	0. 93	975	0
丽蝇蛹集金小蜂 (<i>Nasonia vitripennis</i>)	XP_001602780. 1	0. 51	1 398	2e-152
赤拟谷盗 (<i>Tribolium castaneum</i>)	NP_001034524. 1	0. 52	1 369	5e-149
家蚕 (<i>Bombyx mori</i>)	BAB13481. 1	0. 49	1 336	3e-145
狗 (<i>Canis familiaris</i>)	XP_537030. 2	0. 34	277	2e-72

3 讨论

几丁质酶是一个多基因的家族, 已发现的几丁质酶产生细菌都可产生多种几丁质酶^[4]. 从低等的真核生物到高等的真核生物, 都发现了同一物种具有多种几丁质酶的现象. 已有一种凡纳滨对虾几丁质酶被克隆. 鉴于几丁质酶是一个多基因家族, 我们尝试从凡纳滨对虾中克隆新的几丁质酶. 通过设计保守序列引物, 结合 RACE 法, 成功地克隆到了一个新的几丁质酶. 该几丁质酶与甲壳纲中其他虾类几丁质酶具有很高的相似度, 而与已克隆的凡纳滨对虾几丁质酶相似度很低. 该酶具有典型的几丁质酶结构特征, 从 N 端到 C 端依次含有信号肽、几丁质酶催化活性中心、PEST 连接区、几丁质底物结合部分, 是一种典型的几丁质酶. 其中催化中心具有天冬氨酸、谷氨酸, 是催化必需氨基酸^[5]. 该几丁质酶的克隆说明在凡纳滨对虾中同样存在多种几丁质酶.

Tan 等 (2000) 研究发现斑节对虾几丁质酶 Pmchit1 在虾肝胰腺和胃中表达^[6]. Pmchit1 的表达具有组织和生长期特异性, 在蜕壳前期 D (2) 期表达量上升, 表明它参与蜕壳前胃表皮几丁质的降解. 该几丁质酶同样来自虾内脏, 其氨基酸序列与斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 几丁质酶 Pmchit1 相似度高达 91%. 这说明它与 Pmchit1 属于同一类型的几丁质酶, 很可能参与凡纳滨对虾内脏表层几丁质的降解, 为虾顺利蜕壳做准备. 这可以通过进一步的实验加以证实.

几丁质酶与 N-acetyl-D-氨基葡萄糖苷酶构成几丁质酶系, 共同催化几丁质的降解. 已经从凡纳滨对虾内脏中纯化得到 N-acetyl-D-氨基葡萄糖苷酶^[7], 并发现其酶活力随着虾生长期而变化, 变化规律与虾蜕壳周期相符^[8]. 几丁质酶活力的变化很可能与 N-acetyl-D-氨基葡萄糖苷酶相同. 我们将进一步尝试纯化凡纳滨对虾几丁质酶蛋白, 研究其与对虾蜕壳的关系.

参考文献:

- [1] Mayumi K, Yuriko H, A tsuko A, et al Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions[J]. Keio J Med, 2007, 56 (1): 21-27.
- [2] Zhu Q S, Deng Y P, Phaneendra V, et al Computational identification of novel chitinase-like proteins in the *Drosophila melanogaster* genome[J]. Bioinformatics, 2004, 20 (2): 161-169.
- [3] Funke B, Spindler KD. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia*[J]. Comp Biochem Physiol, 1989, 94B (4):

691-695.

- [4] 庄群川,王风平.豚鼠气单胞菌 CB101中几丁质酶的纯化 鉴定及其基因克隆 [J].台湾海峡,2007,26(3):362-369.
- [5] Lu YM, Zen KC, Subbaratnam M, et al Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32: 1 369-1 382
- [6] Tan S H, Degnan B M, Lehnert S A. The *Penaeus monodon* chitinase I gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle [J]. *Mar Biotechnol* (NY), 2000, 2 (2): 126-135.
- [7] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, et al Purification and some properties of α -N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Mar Biol*, 2004, 146: 143-148
- [8] 黄乾生,谢晓兰,石艳,等.不同生长期凡纳滨对虾肝胰腺 NAase的基本性质变化 [J].厦门大学学报:自然科学版,2006,45(6):847-850.

Cloning, sequence and structure analysis for the chitinase gene in the viscera of *Litopenaeus vannamei*

HUANG Qian-sheng¹, CHEN Chao-qí², XIE Xiao-lan³, WANG Ye¹, SHI Yan¹, CHEN Qing-xi¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100082, China;

3. Department of Biology, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

Abstract: Chitinase is the key enzyme in the molting of crustacean. It has been reported that chitinases are multi-gene family. A pair of primers was designed according to the conserved nucleotides of chitinases and used to clone partial chitinase cDNA by RT-PCR methods. Then, by RACE (rapid amplification of cDNA ends) technology a full length cDNA of chitinase was obtained. The deduced protein sequence was analyzed with bioinformatics which shows that the proteins contained signal peptide, chitinase catalytic domain, PEST linker and chitin binding domain. It is found that high sequence similarity existed among the chitinases of *Fenneropenaeus chinensis* (ABB85237. 1), *Penaeus monodon* (AF157503. 1) and *Marsupenaeus japonicus* (BAA12287. 1).

Key words: bioinformatics; *Litopenaeus vannamei*; chitinase; gene cloning; sequence comparison

(责任编辑:郭水伙)