

中国明对虾 TOR 基因的克隆及精氨酸、亮氨酸对其表达的影响

孙姝娟¹, 刘梅¹, 彭劲松², 王宝杰¹, 蒋克勇¹, 王雷¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 北海市海水养殖种苗场, 广西北海 536000)

摘要: 首次从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肌肉组织中克隆得到 TOR 基因的 cDNA, 全长共 7 638 bp, 开放阅读框 7 389 bp, 编码 2 462 个氨基酸。氨基酸序列比对和结构域分析均证实其为目前已知的 TOR 激酶的同源蛋白。应用实时定量 PCR 的方法研究 TOR 在中国明对虾中的组织分布特异性, 以及注射等浓度的亮氨酸和精氨酸后, 肌肉组织中 TOR mRNA 表达水平在 3, 6, 12, 24 h 的变化, 探讨营养水平对 TOR 基因表达的影响。结果显示, 注射亮氨酸和精氨酸 24 h 的对虾 TOR mRNA 表达量是对照组的 3~4 倍, 显著升高($P < 0.05$), 证实氨基酸对 TOR 的表达具有调节作用。

关键词: 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*); TOR; 精氨酸; 亮氨酸; 实时定量 PCR

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)06-0071-10

TOR(target of rapamycin)是一个分子质量约为 280 ku 的大分子蛋白, 属于 Ser/Thr 激酶家族。作为免疫抑制剂雷帕霉素(rapamycin)和 FKBP12 复合物在生物体内的靶蛋白而得名。FKBP12 是 Rapamycin 在真核细胞内的直接受体, 是一个 12 ku 的小分子蛋白。TOR 信号途径是一条广泛存在于真核生物中的信号转导通路, 在果蝇、拟南芥、哺乳动物中都分离得到了 TOR 蛋白^[1-3], 酵母中分离到了两种 TOR 蛋白(TOR1 和 TOR2)^[4]。TOR 蛋白包含多个功能域, 从 N 端起依次为 HEAT 串联重复序列、FAT 域、FRB 域、催化域和 FATC 域^[5]。rapamycin 通过 FKBP12 结合在 FRB 域后能够抑制 TOR 蛋白激酶的活性, 从而抑制 TOR 信号转导通路^[6]。

TOR 在细胞生长的营养调控中起到中枢作用, 能够通过激活下游信号通路, 介导 4E-BP1、S6K、eEF2 等一系列翻译调节因子的磷酸化作用传递外界营养状况、生长因子等生长刺激信号, 调节细胞内核糖体发生、蛋白质合成等生理过程, 进而综合调控细胞的生长、增殖、凋亡、自噬^[7]。另外, TOR 还参与调节真核细胞中 mRNA 和蛋白质的稳定性、细胞大小、细胞周期、转录和营养物质运输等与细胞生长密切相关的生理过程^[8-10]。

目前已知的真核生物 TOR 信号通路的激活主要通过两条途径: 一是生长因子(如胰岛素)激活通路, 二是营养物质激活通路。生长因子与定位于细胞膜上的生长因子受体结合后, 生长因子受体被激活, 通

过 PI3K/Akt 信号级联放大系统, 最终可以直接激活 TOR 蛋白激酶或者通过抑制 TOR 的负向调节因子上调 TOR 蛋白激酶的活性^[11]。营养素对 TOR 信号通路的调控主要是由细胞内的氨基酸浓度决定的^[12], 有研究表明, 某些特定的氨基酸, 如亮氨酸和精氨酸, 对 TOR 信号通路的调节作用尤其显著^[13,14]。酵母中已经发现了一种细胞表面氨基酸受体^[15], 在哺乳动物细胞中, 尽管有实验表明也存在这样的受体^[16], 但至今还没有真正分离出来。

中国明对虾是重要的海洋经济物种, 目前对它的营养调控的分子机理方面的报道还尚未见报道。本研究克隆了中国明对虾 TOR 蛋白的 cDNA 全序列, 对其进行比对和分析, 用实时定量 PCR 的方法检测特定氨基酸对 TOR 基因表达水平的影响。本研究首次在甲壳动物中克隆得到 TOR 基因序列, 证实了在甲壳动物中同样存在 TOR 信号通路, 而且与营养水平密切相关。这不仅对研究比较虾蟹等水产动物的营养调控机理有重要意义, 而且对于指导水产养殖实践, 促进养殖动物生长和提高养殖产量等也将具有一定的理论指导意义。

收稿日期: 2009-09-25; 修回日期: 2010-02-12

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2008AA100805)

作者简介: 孙姝娟(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物分子营养学研究, 电话: 0532-82898723, E-mail: qiqi1709@163.com; 王雷, 通信作者, 电话: 0532-82898722, E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

养殖的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)购自即墨田横养殖场, 健壮无疾病, 体长 13.5 cm ± 0.5 cm。

1.2 基因的克隆

1.2.1 引物设计与合成

根据 TOR 基因 DNA 序列的保守性, 利用已知的 TOR 序列设计一套巢氏简并引物 P1F, P1R, P2F,

P2R。得到保守片段的 DNA 序列后, 根据保守序列, 使用 Primer 5 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 的特异性引物 P31, P32, P51, P52。P6F, P6R, P7F, P7R 分别是 TOR 和内参 β -actin 实时定量 PCR 的引物。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 分子克隆

1.2.2.1 cDNA 制备

取中国明对虾肌肉组织约 0.1 g, 用 Trizol 法抽提总 RNA, 以 oligo d(T)为引物, 用 M-MLV 反转录合成 cDNA, 贮存在 -20 °C 冰箱中。

Nested primers	P1F 5'-GAGCAGTGGCACGAGGGTTTGGAGGAAGC-3'
	P1R 5'-CAAACCGACACCAGCCGATATAGCACTGGCA-3'
	P2F 5'-GGACCWCARACHYTBAAGG-3'
	P2R 5'-ATRKCCAACCATHGACAT-3'
3'RACE primer	P31 5'-AGCACACACAAGGAGATGACCTCGCACG-3'
	P32 5'-TGGTTTAAGAGCCCCTCCTCGGAAGTGT-3'
5'RACE primer	P51 5'-GGACGTGCAGGGACGATTGGACTTGACT-3'
	P52 5'-GATACAGATGACAGGGGAGTTTGGAGCA-3'
Real-time PCR primers	TOR
	P6F 5'-TCTACGAAGCCTTGGTGGATG-3'
	P6R 5'-GAGCCTGTGGATGATGTTTGC-3'
	P7F 5'-GAGCGAGAAATCGTGCGTGA-3'
Actin	P7R 5'-AGGAGGAAGCAGCGGTGGTC-3'

1.2.2.2 保守片段的克隆

以制备的 cDNA 为模板, P1F, P1R, P2F, P2R 为引物扩增对虾 TOR 的部分片段。取 50 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 用 3S 柱离心式琼脂糖 DNA 小量快速纯化试剂盒回收。回收的产物连接到 PMD18-T 载体上, 转入 DH5 大肠杆菌中进行序列测定, 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.2.3 基因全长的克隆

3'RACE: 以 3'CDS 为引物反转录合成 cDNA 为模板, UPM/P31 和 NUP/P32 为引物进行巢氏 PCR。电泳, DNA 片段回收, 连接, 转化, 测序方法同前。

5'RACE: 以 5'CDS 为引物反转录合成 cDNA 为模板, UPM/P51 和 NUP/P52 为引物进行巢氏 PCR。电泳, DNA 片段回收, 连接, 转化, 测序方法同前。

将 3'RACE 和 5'RACE 的结果与克隆得到的保守片段进行序列拼接, 得到基因全长。

1.2.3 序列分析

在 GenBank 中查找相似序列, 应用 ClustalW2

软件进行序列相似性比对和系统进化树的构建, 利用 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 网站提供的蛋白质序列分析工具查找功能域。

1.3 TOR 的组织分布与功能研究

1.3.1 实验分组与取样

购买中国明对虾成虾, 养殖于室内水槽中, 分别取肌肉、肝胰腺、心脏、血液、胃、鳃丝、表皮、性腺(精巢)各组织, 血液按 1:1 比例加抗凝剂抽取后 4 3000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 保存血细胞。提取组织总 RNA。

将对虾随机分成 3 组, 分养在室内水槽中, 环境条件为室温(20~22 °C)、养殖海水盐度为 30 以及自然光周期。实验前暂养 7 天左右使其适应室内养殖环境。第一组注射 0.01 mol/L pH7.4 PBS 缓冲液, 第二组注射 0.1 mol/L 亮氨酸, 第三组注射 0.1 mol/L 精氨酸, 每尾虾自尾节处体腔注射 100 μ L。从 0 时起, 分别在 3,6,12,24 h 取样。每尾虾取肌肉组织约 0.1 g, 提取组织总 RNA, 每组每个时间点做 4 组平行。

1.3.2 实时定量 PCR 分析

采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR, 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq 7.5 μ L, primer(10nM)0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 5.7 μ L, 共 15 μ L。实时定量 PCR 反应条件为: 95 30 s; 95 5 s, 60 20 s, 共 45 个循环。以中国明对虾 *-actin* 为内参, 运用 Line-Gene K 软件对得到的各样品的 C_t 值进行均一化处理, 采用 2^{-C_t} 法求得各样品 mRNA 的相对含量, 然后运用 Excel 和 MINITAB 软件对各数据进行统计分析。

2 结果

2.1 TOR 基因的克隆和序列分析

利用简并引物, 用 nested-PCR 的方法在中国明对虾的肌肉组织中扩增得到约 800 bp 的 DNA 片段, 克隆、测序后通过同源性比对证实为 TOR 的一个片段。根据这段序列设计 RACE PCR 的特异性引物,

3'RACE 得到一段 900 bp 的片段, 5'RACE 扩增得到 6 000 bp 的序列。

将上述序列拼接得到 TOR 的 cDNA 全序列, 全长 7 638 bp, 开放阅读框 7 389 bp, 3'非翻译区 126 bp, 5'非翻译区 126 bp, 翻译得到 2 462 个氨基酸。与目前已知的其他物种的 TOR 相同, 中国明对虾的 TOR 蛋白, 自 N 端起, 依次包含 HEAT 串联重复序列 (776~813)、FAT 域(1474~1819)、Rapamycin 结合域 FRB(1926~2025)、催化域 PI3Kc(2094~2386)和 FATC 域(2430~2462), 详见图 1。TOR 结构域示于图 2。

将中国明对虾 TOR 的氨基酸序列与埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*), 德国小蠊 (*Blattella germanica*), 致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*), 果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 斑马鱼 (*Danio rerio*), 小鼠 (*Mus musculus*), 人 (*Homo sapiens*) 等的 TOR 氨基酸序列进行比对, 相似性分别是 54%, 62%, 54%, 51%, 58%, 58%, 58%。中国明对虾 TOR 功能域的氨基酸序列与

```

1 catcgcaagccccacagggagaggaacagggcgagttgcttttattttcttgtattt
61 tctgcatgggacgcgaggatgagcagttacagtgagaggaatgtgagtgattgacagcc
1 M S N V K M T Q F V A G L K S R N E E
121 aagATGAGTAACGTGAAGATACCCAGTTCGTTGCGGGGCTGAAGTCCCACAACGAGGAG
20 T R V R A A C D L Q R Y V T T E L R E V
181 ACCAGGTGAGGGCGGCTTGTGACCTCCAGCGTTATGTCACCACTGAGTTGAGAGAGGTG
40 S L D E L L T F L D E F N H H I F E M V
241 TCTCTGGATGAGTTGCTGACATTCCTAGATGAATCAACCATCACATTTTGTAGATGGTG
60 S S N D I N E K K G G I Y A I M S L V D
301 TCCTCCAATGACATCAATGAGAAAAAGGGAGGCATCTATGCTATTATGAGTTTGGTGGAT
80 V D V G Q T G V R I S R F A N Y L K N L
361 GTTGATGTAGGTCAGACAGGAGTGCATCAGTCGATTTGCAAACCTCAAGAACCTC
100 V N S P D T G V T E L T A K A V G R L A
421 GTCAACAGCCCAGACACTGGTGTGACAGAGCTTACAGCCAAGGCAGTTGGCCGCTTGGC
120 L A S G T F T A E Y V E D L V K R S F E
481 CTGGCCTCTGGGACATTCACAGCAGAGTATGTGGAAGATCTAGTAAAGAGGTCAATTTGAG
140 W L Q G D R N E G R R H A A V L V L R E
541 TGGCTACAGGGTGATCGCAATGAGGGAAGGAGACATGCTGCAGTGCTTGTGCTAAGAGAA
160 L A L S V P T Y F F Q Q V Q Q F L D V I
601 CTGGCACTGTCTGTCCCAACATATTTCTTCCAACAAGTCCAGCAGTTTCTTGATGTGATA
180 F N A V R D P K P Q I R E G A V A A L R
661 TTCAATGCAGTTCGCGACCCAAAGCCCAGATTCGAGAAGGAGCAGTGGCAGCTCTTCGG
200 V A L A I T A Q R E T K E M Q Q T M W Y
721 GTGGCACTAGCAATTACAGCCCAGAGAGACAAAGGAAATGCAACAGACCATGTGGTAT
220 K Q C L T E V W A G F D D Q A N N K D R
781 AAGCAGTGTCTCACTGAAGTGTGGGAGGCTTTGATGATCAAGCCAACAACAAGGACAGG
240 S L T R D D R I H G S L L G L N E L L R
841 AGTCTGACACGTGATGATCGCATCCATGGCTCATTGCTTGGTCTCAATGAGTTACTGAGA
260 C S N T E W E R L V K Q L R H L T H Y Q
901 TGCAGCAACACCGAGTGGGAGAGGTTGGTGAAGCAGCTGAGGCACCTGACACATTACCAA
280 T P P P K K D S M S S V V K R L R G Q G
961 ACCCCACCCCAAGAAGGATAGCATGTCCTCAGTGGTGAAGCGTCTGCGTGGTCAGGGA
    
```

300 S L S T S S H T P H D L L S A L P S H T
 1021 TCTCTTCCACTTCTTCTCACACTCCTCATGACCTGCTTTCAGCTCTGCCTTCACACACC
 320 N N T I G G T E I T I L D Q P C E S R T
 1081 AATAACACAATTGGGGGCACGGAAATTACAATATTGGATCAACCCTGTGAGAGCCGCACT
 340 C R E L I L E K Y D S I S T Q V L N Q K
 1141 TGCAGGGAGTTGATTCTTGA AAAAGTATGATAGTATAAGTACGCAGGTTCTTAATCAAAAAG
 360 T S R N N I I Q S A L L Q I I P R L A A
 1201 ACAAGCAGAAATAATATCATCCAGAGTGCCTGCTGCAAATCATACCAAGGCTAGTGCA
 380 L N K E K F S Q S Y L S G T M T Y L L G
 1261 CTGAATAAGGAGAAAATTTTCACAGAGTTACCTGTGAGGGACGATGACGTACCTGCTGGGG
 400 C L R G R D K E R P T A F I T L G L L A
 1321 TGCTTGCAGGGCCGGACAAGGAGAGGCCACAGCATTATCACCTTGGGTCTCCTTGCC
 420 V A V G P A I K K Y L P K I M E V I K A
 1381 GTGGCTGTGGACCGCCATCAAGAAGTACCTGCCAAGATCATGGAAGTGATCAAAGCT
 440 S L P T K D T P S K K R V V E P A V Y V
 1441 TCGTTGCCACCAAGGACACCCCAAGCAAGAAACGTGTTGTAGAGCCAGCTGTTTATGTG
 460 C V S L V A R G V E G A V R N D V K E L
 1501 TCGCTCAGTTTGGTAGCACGGGGTGAAGGAGCAGTCCGGAATGATGTCAAAGAAGCTG
 480 L E P M M A T G L S P P L T L A L Q E L
 1561 CTGGAACCTATGATGGCCACAGGACTTTCACCCCACTGACTCTAGCTCTCCAGGAGTTG
 500 A T E I P S L K R D I A E G L L R M L S
 1621 GCCACAGAGATCCCTTCACTCAAGCGTGACATTGCAGAGGGATTGCTGAGGATGCTTTCC
 520 Q I L M H R S T P H S R S G A A P P P S
 1681 CAGATCCTGATGCACCGTTCACCCCGCATTCTCGATCGGGTCCGGCCCTCCCCCTTCC
 540 S P D H P D T G S L V L A L R T L G S F
 1741 TCCCCAGACCACCCAGACACCGGGAGCCTCGTCTGGCACTCCGGACACTAGGATCCTTT
 560 D F E G Q S L M Q F V R H V A D H Y L S
 1801 GACTTTGAGGGCCAGTCACTGATGCAGTTTGTAAAGACACGTAGCTGACCACTATCTTAGC
 580 S E H R E V R L E T V R T C C H L L R P
 1861 AGTGAACATAGAGAAGTACGTCTGGAGACTGTGCGAACTGCTGTACCTTCTGAGACCG
 600 T F A S L G R R A S Q S Q T H I I F N I
 1921 ACCTTTGCTTCTCTTGGTTCGACGAGCATACAATCACAGACTCATATAATTTTCAACATT
 620 V S K V L W V C V T D M D P D V R L C V
 1981 GTGAGCAAGGTGCTGTGGGTCTGTGTAACGGATATGGATCCTGATGTCCGTCTGTGTGTG
 640 L A S L D E S F D S H L A Q P E N L N A
 2041 CTGGCATCCCTTGATGAGAGTTTTCAGCCACTTAGCCCAACCAGAGAATCTAAACGCT
 660 L I Y A L S D E V F E I R E H A I T I L
 2101 CTAATTTATGCTTCTTAGTGATGAAGTCTTTGAAATTCGAGAACCGCAATAACAATACTA
 680 G R L S A I N P A Y V H P L L R K A L L
 2161 GGAGTCTCTCAGCCATAAATCCTGCATATGTCCATCCCTCTTGCAGGCTCTCCCTC
 700 K I L D E L D Y S G I G R N R E L S A H
 2221 AAGATTCTGGACGAGTTGACTACAGTGGCATAGGTCGCAACAGGGAAGTCTAGTGCACAC
 720 M L G Q L I G N A Q R F M R Q F V Q A I
 2281 ATGCTAGGCCAGCTCATCGCAATGCACAGAGGTTTATGCGGCAGTTTGTACAAGCCATT
 740 M S V L V P K L K D Q D P N P A V T M Y
 2341 ATGTCCGTTCTTGTTCCTAAACTGAAAGACCAGGATCCTAATCCAGCTGTTACCATGTAT
 760 V L M A I G D L A Q V S G G G E M **Q K W L**
 2401 GTCTTGATGGCTATTGGAGATTTAGCACAGGTGAGTGGGGGAGAGATGCAGAAGTGGCTC
 780 **P E L M P L L L E M L A D G T S G W K R**
 2461 CCAGAACTCATGCCACTCTTGTGGAGATGCTAGCAGATGGCACTTCTGGCTGGAAGAGA
 800 **R V A L W T L G Q L V E N T** G Y V V H P
 2521 CGCGTTGCTCTCTGGACCCTGGGCAGCTAGTCGAGAACACAGGTTATGTAGTCCACCA
 820 Y T Q H P T L L D V L L S F L R T E Q Q
 2581 TACTCAGCATCCCCTCTGCTGGATGTCTGCTATCATTCTTGAGGACTGAGCAGCAA

840 P A V R R E T I R V L G L L G A L D P Y
 2641 CCTGCAGTAAGACGAGAAACAATCCGTGTCTTAGGCTTGCTTGGTGCTCTAGACCCTTAC
 860 K H K M N V G M I K I Q E D T G V A V I
 2701 AAACACAAGATGAATGTTGGTATGATTAAGATCCAGGAGGACACAGGTGTTGCTGTCATT
 880 S T S E N K T D E L S G E M G T S E M L
 2761 TCCACAAGCGAGAATAAACAGATGAGCTGTCTGGAGAAATGGGAACAAGTGAGATGTTA
 900 V N L N Y S S L E E F Y P T C A I A M L
 2821 GTCAACCTCAACTATTTCATCTCTAGAGGAGTTTTACCCTACATGTGCAATTGCCATGCTT
 920 M K V I K D P T L G Q H Y N E V V R A V
 2881 ATGAAGGTGATCAAGGACCCTACCTTGGGTCAGCACTACAATGAAGTGGTCAGGGCTGTG
 940 T F I F K S L G V K G V P Y L A Q V I P
 2941 ACCTTCATCTTCAAATCCCTAGGGGTGAAAGGAGTGCCTTACTTGGCTCAGGTTATCCCC
 960 S L L Y V I R T A D A N F R D Y L F Q Q
 3001 TCGCTTCTCTATGTCATCAGGACTGCAGACGCAAATTTCCGAGATTATTTGTTCCAACAG
 980 L A T L I G I V K Q H I R N Y L D D I T
 3061 TTGGCGACTCTGATTGGCATTGTAAAACAGCATATTAGGAATATTTAGATGATATTACT
 1000 E V L K E F W V T G G K L E T T I T I I
 3121 GAAGTTTTAAAAGAATTCTGGGTGACTGGTGGTAAGCTAGAGACAACAATAACAATTATT
 1020 T V V E S I A L A V G S E F K I Y L K E
 3181 ACAGTTGTTGAAAGCATTGCATTAGCAGTTGGCTCAGAGTCAAGATCTATCTCAAAGAA
 1040 L V P M I L K S C I N D S K E K Q V T G
 3241 CTCGTTCCCATGATCCTAAAGTCTTGATCAACGACTCTAAGGAGAAGCAAGTTACTGGC
 1060 K L L L A F Q K F G A T L E E F L H M I
 3301 AAGCTCCTGTTAGCCTTCCAGAAGTTGGAGCCACACTAGAGGAGTTCCTGCACATGATA
 1080 L P H I A K L F D A S D V P L S V R R T
 3361 CTTCCCACATCGGAAGCTGTTGATGCTAGCGATGTTCTCTGTCTGTTGCTGCGACA
 1100 A L E T V D H F A D Y L D L S D Y T S K
 3421 GCCCTTGAGACAGTTGATCACTTTGAGATTACCTTGACCTCTCTGATTATACCTCGAAG
 1120 I I H P L L R T L D T C P D L R D Q A M
 3481 ATCATTATCCATTGCTCAGAACTCTAGACACTTGCCAGACCTCAGAGATCAAGCCATG
 1140 E V L C A L A T Q L G R S Y E C F I P I
 3541 GAAGTGTGTGTGCCCTGGCGACTCAGTTGGGCAGGTATATGAGTGTTCATCCCCATC
 1160 V H H I T T K H K I H H P R Y D I L V A
 3601 GTCCACCACATAACCACCAAACACAAGATCCACCATCCCAGATATGACATCCTGGTGGCA
 1180 K V V R G L T V S D D E M T I I T A H Q
 3661 AAGGTGGTGAGGGGTCTAACAGTCTCGGATGATGAAATGACAATCATAACAGCTCACAA
 1200 R A R R P M S R D H Q L E A D S T T I K
 3721 CGTGCCAGACGCCTATGTCAAGAGATCATCAGTTAGAAGCGGATTCTACAACCATCAAA
 1220 K H T V G V Q S L Q K A W L F T R L V S
 3781 AAACATACAGTAGGGGTGCGTCACTCCAGAAAGCATGGTTATTACCAGGCTTGTGAGC
 1240 K D D W L E W L R R F S I E L M K A S P
 3841 AAAGACGACTGGCTGGAATGGCTTCGGAGATTGAGCATTGAATTGATGAAGGCTTCTCCA
 1260 S P A L R S C C S V A T T Y V Q L S R D
 3901 TCTCCGGCCCTAAGATCCTGTGCTCAGTTGCCACAACATACGTGCAGCTTTCCGCGAT
 1280 L F N A A F V S C W S E L N E P L Q D D
 3961 CTCTTCAATGCCGCTTTTGTCTCTTGCTGGAGTGAATTGAATGAGCCTCTCAGGATGAC
 1300 L L Q S L R Q A L T S Q D I P E I T Q N
 4021 CTCCTCAGTCCCTGCGTCAAGCTTAACCTCCCAAGACATACCTGAAATCACACAAAA
 1320 L L N L A E F M E R C D K G P L P L E L
 4081 CTCCTCAATCTGAGAGTTCATGGAACGTTGTGACAAGGGCCATTGCCACTAGAAGT
 1340 Q L L G E K A M E C R A Y A K A L H Y K
 4141 CAGCTCTTAGGAGAGAAGGCCATGGAGTGCCGTGCTTATGCAAAGGCACTTCATTACAAA
 1360 E E E F H K G P T S E V L E H L I S I N
 4201 GAAGAGGAATTCCACAAGGGCCCAACGTGAGGTCCTGGAACACCTGATTTCCATCAAC

1380 N K L G Q K E A A A G L L E Y A R K N N
 4261 AATAAACTGGGGCAGAAGGAGGCTGCAGCAGGTCTATTGGAGTATGCTCGTAAGAACAAT
 1400 R T D M K V Q E R W H E K L H D W D Q A
 4321 CGCACAGACATGAAAGTGCAAGAAAGGTGGCATGAAAAATTACACGACTGGGACCAGGCT
 1420 L Q A Y Q T K L E T R P D D L E L T L G
 4381 CTGCAGGCTTATCAGACAAAGCTAGAGACACGGCCTGATGACCTGGAATCAGCTGGGT
 1440 Q M R R L E A L G E W G E L Y S V S C E
 4441 CAGATGAGGCGTCTGGAGGCCCTTGAGAATGGGGTGAGCTGTACAGTGTATCTGTGAG
 1460 W W S S S M N D E C R A Q M A R V A A A
 4501 TGGTGGAGCAGTTCATGAATGACGAGTGTCTGTCACAGATGGCCCGGGTGGCAGCAGCA
 1480 S A W A M G Q W T S M E E Y T K F I P R
 4561 TCAGCCTGGGCCATGGGGCAATGGACATCCATGGAGGAATACACCAAGTTTATCTCTCGA
 1500 D T Q E G A F Y R A V L S V H K D Q Y Q
 4621 GACACGACGAGGGAGCCTTCTACCGGGCTGTCTCTCGGTGCATAAAGATCAGTACCAG
 1520 V A Q Q L I D S A R D L L D T E L T A M
 4681 GTTGCTCAGCAGTTAATTGATTCTGCAAGAGATCTTCTTGACACTGAGCTGACAGCCATG
 1540 V G E S Y Q R A Y S A M V A V Q M L A E
 4741 GTTGGTGAGATTATCAGCGTGCATACAGTGCCATGGTGGCTGTGCAAATGTTAGCAGAA
 1560 L E E V I Q Y K L V P E R R Q P I T Q I
 4801 CTGGAAGAAGTCATTCAGTATAAACTGGTTCAGAGAGAAGGCAACCTATTACACAAATC
 1580 W W E R L Q G C Q R V V E D W Q K I L Q
 4861 TGGTGGGAAAGACTGCAGGGATGCCAACGAGTGGTAGAGGACTGGCAGAAGATCCTACAG
 1600 V R S L V L S P Q E D M R P W L K F A S
 4921 GTCCGTTGCTTGTCTCCTCAGTCCACAGGAAGACATGAGACCTTGGCTGAAGTTTGCCTCA
 1620 L C R K S G R L T L S H K T L V R L L G
 4981 CTCTGCCGAAGTCTGGGCGGCTCACACTCTCTACAAGACCTTAGTGAGGCTCCTGGGC
 1640 C D P S T N T Q Q V L P A T H P R V T Y
 5041 TGCGATCCGTCACAAAACCCAGCAAGTCTTCCCGCAACTCACCTCGTGTGACGTAC
 1660 Q Y C K H I Y T Y P N R R H E A Y G H L
 5101 CAGTACTGCAAGCACATCTACACTTATCCCAACAGACGTCATGAAGCCTATGGGCACCTT
 1680 Q S F L Q Y I A P A V V V G G C H N N D
 5161 CAAAGTTTCTCAATACATTGCCCCAGCGGTGGTGGTGGTGTGCAACAATGAC
 1700 N K L R E L V S R V Y L K L G E W Y E Q
 5221 AACAAATTGCGTGAGCTGGTATCCCGTGTCTACCTCAAGTTAGGAGAATGGTATGAGCAA
 1720 L H G L N E D N I N T I L T Y Y T H A K
 5281 CTGCATGGCCTTAATGAAGACAACATAAACACAATCCTGACGTATTATACGCATGCAAAA
 1740 D T D K S C Y K A W H A Y A Y M N F E A
 5341 GACACAGACAAGTCATGTTATAAGGCTTGGCAGCCTATGCGTACATGAACTTTGAGGCA
 1760 I L F Y K N K A D S G K A E N G D D T S
 5401 ATACTTTTCTACAAGAACAAGCAGATTCTGGGAAAGCAGAAAATGGGGATGATACCAGC
 1780 T P S K K K K S A G D F T I A A V K G F
 5461 ACACCAAGCAAAAAGAAGAAATCAGCAGGGGACTTCACCATAGCGGCCGTCAAGGGTTC
 1800 I R S I S L S D G N S L Q D T L R L L T
 5521 ATCCGATCAATCTCTTTGAGTGATGGCAACAGCCTTCAGGACACGCTGCGTCTCCTTACA
 1820 V W F E H G H Q S G V Y E A L V D G L K
 5581 GTCTGGTTTGAACATGGCCACCAATCTGGAGTCTACGAAGCCTTGGTGGATGGACTCAAG
 1840 T I Q I D T W L Q V I P Q P I A R I D T
 5641 ACGATCCAGATTGATACTTGGTTGCAGGTAATCCCTCAGCCGATTGCTCGATTGACACC
 1860 P R T L V G K L I H Q L L M D I G K H H
 5701 CCTCGAACACTAGTAGGAAAATGATTACCAACTTCTCATGGATATCGGCAACATCAT
 1880 P Q A L I Y P L T V A A K S S V V A R S
 5761 CCACAGGCTCTTATCTACCCCTTACTGTGGCTGCAAAGTCTCTGTTGTGGCAGTTCA
 1900 Q A A E K I L K N M R E H S A N L V Q Q
 5821 CAGGCAGCAGAGAAGATTCTTAAGAATATGCGTGAACATTCTGCAAATCTAGTCCAACAG

1920 A M M V S E E L I R V A I L W H E I W H
5881 GCCATGATGGTATCAGAAGAGCTGATCAGAGTGGCAATCCTGTGGCATGAGATATGGCAT
1940 E G L E E A S R L Y F G E R N E S G M F
5941 GAGGGTCTAGAAGAGGCTAGTCGACTGTACTTTGGAGAGCGCAATGAGTCTGGGATGTTC
1960 R T L E P L H A M M E R G P Q T F K E M
6001 CGTACTGGAGCCTTACATGCCATGATGGAACGTGGACCTCAAACATTTAAGGAAATG
1980 S F S Q A Y G P D L R D A Q E W C R R Y
6061 TCCTTTAGCCAGGCATATGGTCTGACTTGCAGATGCACAGGAGTGGTCCGTCGTTAC
2000 Q R T G N V R E L N Q A W D L Y Y H V F
6121 CAGCGGACAGGAAATGTGCGGAATTGAACCAGGCTGGGACTTATACTATCACGTGTTC
2020 R R I S R Q L P Q L T S L E L Q S V S P
6181 CGCCGTATCTCTCGTCAATTACCCAGCTAACATCTCTGGAGCTCCAGTCAGTCTCTCCA
2040 R L L K C R D L D I A V P G S Y A P N S
6241 AGACTCCTTAAGTGCCGGACCTGGATATTGCTGTGCCAGGATCCTATGCTCCAAACTCC
2060 P V I C I S Q V Q S S L H V L T S K Q R
6301 CCTGTCATCTGTATCAGTCAAGTCCAATCGTCCCTGCACGTCTCACTTCAAAAAGAGA
2080 P R K L C I R G S N G R D I V F L L K G
6361 CCACGGAACTCTGCATCCGAGGCAGCAACGGTAGAGACATTGTCTTCTGTGAAGGGC
2100 H E D L R Q D E R V M Q L F G L V N T L
6421 CATGAGGATCTGAGGCAGGATGAGAGGGTTATGCAGTTATTCGGTCTGGTCAATACGCTT
2120 L I S N P D T F R R N L T I Q R F A V I
6481 CTGATCAGCAACCCTGATACCTTCCGCCGAATCTTACCATTACAGAGATTGCTGTCTATT
2140 P L S T N S G L I G W V P H C D T L H A
6541 CCATTATCTACCAACTCAGGTCTCATTGGCTGGGTGCCCACTGTGATACGCTTCATGCC
2160 L I R D W R E K K K I L L N I E H R I M
6601 CTCATCCGAGACTGGCGTGAAAAGAAGAAGATCCTTGAACATTGAGCACAGGATCATG
2180 M R M A Q D L E H L T L M Q K V E V F E
6661 ATGCGAATGGCCAGGATCTGGAACACCTCACACTATGCAGAAAGTGGAGGTCTTCGAA
2200 H A L E H T Q G D D L A R L L W F K S P
6721 CATGCACTCGAGCACACACAAGGAGATGACCTCGCACGCCTCTGTGGTTAAGAGCCCC
2220 S S E V W F D R R T N Y T R S L A V M P
6781 TCCTCGGAAGTGTGGTTGACCGTGTACGAACTACACAGTTCAGTGGCAGTGATGCCT
2240 M V D Y V L G L G D R H P S Q P S C W T
6841 ATGTTGACTATGTCTGGGTCTAGGCGACCGTATCCATCCCAACCCTCATGTTGGACC
2260 S C L E K L F I L T L V T A L K L P M T
6901 AGTGTCTGAAAAAATTATTCATATTGACTTTGGTGACTGCTTTGAAGTTGCCATGACC
2280 R E K F P E K I P F R L T R M L I N A M
6961 CGTGAGAAATCCCGAAAAGATTCTTTCCGCTTAACTCGTATGCTTATAAACGCCATG
2300 E V T G I D G T Y R M T C E S V M S L I
7021 GAGGTGACTGGAATAGATGGTACTTACCGATGACTTGGGAGTCTGTCATGAGCCTCATT
2320 R R N K D S P M A M L E A F V Y D P L L
7081 AGACGAAACAAAGATTCTCCATGGCTATGCTTGAAGCCTTTGTCTATGATCCTCTATTG
2340 N W R L M D H A Q P K S K R S V V G E T
7141 AATTGGCGTCTCATGGATCATGCTCAGCCAAAGAGTAAACGCTCAGTGGTTGGGAAACT
2360 V S G G G V A A T D T G H T P I M E A A
7201 GTCAGTGGGGTGGTGTAGCAGCAACAGACAGGACATACCCCAATAATGGAAGCAGCC
2380 F T S S G A P A S S Q T K K M E V R E D
7261 TTTACATCATCAGGAGCTCCAGCAAGTTCACAGACCAAGAAAATGGAGGTCAGGGAAGAC
2400 F G A S E A L N K K A V A I V N R V R D
7321 TTTGGGCATCAGAAGCACTCAACAAGAAAGCAGTAGCAATTGTCAATCGCTTCGTGAC
2420 K L T G R D F N N D E P L D V H K Q V E
7381 AAAGTACTGGCAGAGACTTCAACAACGATGAACCGCTTGATGTACATAAACAGGTGGAG
2440 L L I A Q A T S H E N L C Q C Y I G W C
7441 CTGCTTATGCCAGGCCACATCCCATGAAAACCTGTGCCAATGCTATATTGGATGGTGT

```

2460 P F W *
7501 CCATTCTGGTAGaagttcacatgtcttatgtttttaggggaagttctgttgactatat
7561 atatccattgtaatttggcattgaaaaggtaaaatacacttgtccataacaagaatg
7621 gtgtaaacacttcatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图1 中国明对虾 TOR 的完整 cDNA 序列及推断的氨基酸序列

Fig. 1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of TOR from *F. chinensis*
 阴影中显示的分别为起始密码子(ATG), 终止密码子(TAG), 以及 5 个保守结构域
 The letters in the shadow indicate the start codon (ATG), the stop codon (TAG), and the five conserved domains

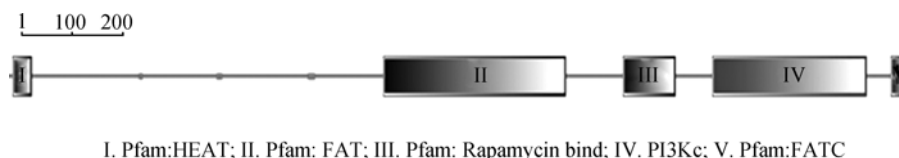


图2 TOR 结构域示意图

Fig. 2 Domain diagram of TOR

其他已知的 TOR 蛋白的相似性更高, 其中 Rapamycin 结合域和催化域与人的 TOR 的相似性分别是 81%和 68%。由此可以证明对虾的 TOR 是目前已发现的 TOR 基因的同源基因, 该基因在进化上的具有一定的序列保守性和功能一致性。

2.2 TOR 基因表达的组织分布

TOR 在中国明对虾的血细胞、心脏、胃、鳃丝、性腺(精巢)、表皮、肌肉、肝胰腺等组织中均有表达(图 3), 但肌肉组织中表达量明显高于其他组织, 说明 TOR 的表达是有组织特异性的, 这与其在生长和营养调控方面的生理功能有关。

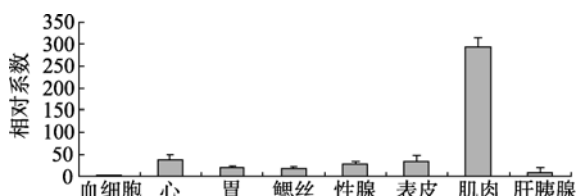


图3 中国明对虾 TOR 在不同组织中的表达

Fig. 3 Realtime-PCR analysis of TOR gene expression in different tissues of *F. chinensis*

2.3 注射亮氨酸和精氨酸能够刺激 TOR 的表达

为了进一步验证进化中 TOR 在功能上的保守性和氨基酸在营养调控的信号通路中对 TOR 表达的促进作用, 选择 TOR 对其较为敏感的亮氨酸和精氨酸进行体腔注射, 用实时定量 PCR 来检测中国明对虾肌肉组织中 TOR 表达量应答不同的体外刺激而产生的变化。以 0 时没有注射任何试剂的对虾肌肉组织中的 TOR mRNA 含量为对照, 计算和分析注射 PBS(对照组)、亮氨酸和精氨酸后 3, 6, 12, 24 h 时对虾 TOR 表达量的变化, 结果如图 4。

对照组在注射 PBS 后的 3, 6, 12, 24 h 时 TOR 的相对表达量分别是正常水平(0 时)的 0.83 倍, 0.86 倍, 1.36 倍, 0.72 倍, 无显著变化。注射亮氨酸和精氨酸的实验组在 0~12 h 间 TOR 的相对表达量与对照组相比一直没有显著变化。至 24 h 时, 亮氨酸组 TOR 的相对表达量分别是正常水平的 2.81 倍, 和对照组相比有显著增高 ($P<0.05$); 精氨酸组 TOR 的相对表达量分别是正常水平的 4.16 倍, 和对照组相比有极显著增高($P<0.01$)。

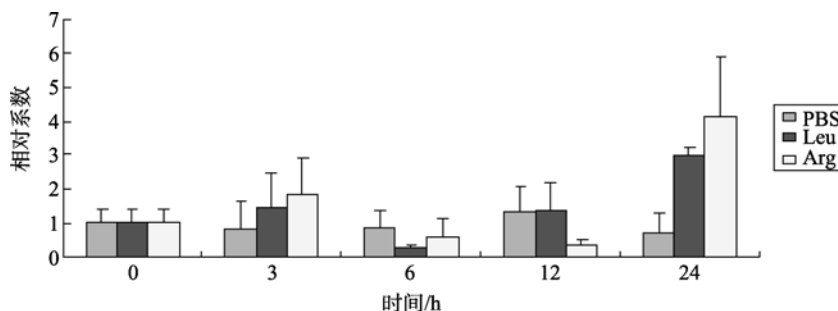


图4 注射 Leu 和 Arg 对 TOR mRNA 表达影响的时程分析

Fig. 4 Time-course expression analysis of TOR mRNA in *F. chinensis* in response to Leu or Arg injection

3 讨论

本研究首次在甲壳动物中克隆到 TOR 基因, 将中国明对虾和其他动物的 TOR 氨基酸序列进行比对, 发现它们之间的相似性较高, 在 51% 到 62% 之间, 特别是 TOR 的特征序列 Rapamycin 结合域 FRB 和催化域 PI3Kc, 相似性达到 81% 和 68%, 证明了它们在进化上的同源性。系统树的分析把中国明对虾与其他节肢动物分在了不同的分支, 说明甲壳动物与气管类动物(包括六足亚门的昆虫等陆地生活的节肢动物)相比在进化上的变异比较大。

本研究设计了两组氨基酸的等浓度注射, 观察它们对中国明对虾肌肉组织 TOR 表达的影响。结果发现与对照组相比, 注射亮氨酸或精氨酸都会使中国明对虾 TOR 的表达量在 24 h 内出现显著增高, 表明亮氨酸和精氨酸都对 TOR 的表达有促进作用。而且, 注射亮氨酸和精氨酸的两个实验组是在相同的时间(24 h)内表现出 TOR 表达量的升高, 其表达量之间也没有显著差异。对果蝇的研究显示, 氨基酸水平的变化能够调节 TOR 信号通路的活性, 通过后者对某些生长相关基因的转录和翻译的调节, 进一步调控氨基酸代谢、细胞生长和个体发育^[17,18]。人类等哺乳动物的 TOR 信号通路也受氨基酸水平的调节^[14], 并且有研究认为与细胞外氨基酸浓度相对于胞内氨基酸浓度而言, 更直接造成 TOR 信号通路激活^[19]。因此, 氨基酸通过调节 TOR 的表达继而影响细胞生长和营养代谢在真核生物中具有一定的普遍性。

TOR 信号通路的调控主要是通过通过对下游转录因子的磷酸化作用, 细胞内转录因子的磷酸化和去磷酸化作用通常在氨基酸水平发生变化的数小时内完成。而氨基酸对中国明对虾 TOR 表达的调节是一个相对缓慢的过程, 注射亮氨酸或精氨酸后 12 h 内 TOR mRNA 含量一直没有显著变化, 到 24 h 才出现显著升高。可见氨基酸对 TOR 信号通路的调控是通过两种不同的方式进行: 快速调节通过磷酸化反应的方式在蛋白质水平对转录因子进行修饰, 这一过程发生在细胞质中; 慢速调节则是在转录水平上对细胞核内基因表达进行调节。

目前对甲壳动物动物的营养学研究大多是在机体水平上研究各种营养素对机体的作用、在机体内的代谢与平衡、影响机体吸收营养素的因素等问题。本实验对 TOR 基因的克隆以及对氨基酸和 TOR 信号通路间关系的研究首次从分子水平对甲壳动物营

养代谢进行研究, 下一步将结合在蛋白质水平上的研究, 进一步探索甲壳动物营养的分子机理。

参考文献:

- [1] Hoskins R A. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin[J]. **Science**, 2007, **316** (5831), 1 625-1 628.
- [2] Menand B. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2002, 99: 6 422.
- [3] Chiu M I. RAPT1, a mammalian homolog of yeast TOR, interacts with the FKBP12/rapamycin complex[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1994, 91: 12 574.
- [4] Heitman J. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast[J]. **Science**, 1991, 253: 905.
- [5] Dames S A. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability[J]. **Biol Chem**, 2005, 280: 20 558.
- [6] Harding M W, Galat A, Uehling E, *et al.* Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle[J]. **Nature**, 1989, **341** (6 244): 758-760.
- [7] Avruch. Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase[J]. **Oncogene**, 2006, 25: 6 361-6 372.
- [8] Cardenas M E. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients[J]. **Genes**, 1999, 13: 3 271-3 279.
- [9] Schmelzle T, Hall M N. TOR, a central controller of cell growth[J]. **Cell**, 2000, 103: 193-200.
- [10] Rohde J, Heitman J, Cardenas M E. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth[J]. **Biol Chem**, 2001, 276: 9 583-9 586.
- [11] Gingras A C, Raught B, Sonenberg N. Control of translation by the target of rapamycin proteins[J]. **Prog Mol Subcell Biol**, 2001, 27: 143-174.
- [12] Proud C G. Regulation of mammalian translation fac-

- tors by nutrients[J]. *Biochem*, 2002, 269: 5338-5349.
- [13] Kimball S R. Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells[J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 2001, 26: 155-184.
- [14] Hara K. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 14 484-14 494.
- [15] Iraqui I. Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 989-1 001.
- [16] Mortimore G E. Leucine-specific binding of photoreactive Leu7-MAP to a high molecular weight protein on the plasma membrane of the isolated rat hepatocyte[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 203: 200-208.
- [17] Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, *et al.* A nutrient sensor mechanism controls drosophila growth[J]. *Cell*, 2003, 114(6): 739-749.
- [18] Guertin D A, Guntur K V, Bell G W, *et al.* Functional genomics identifies TOR-Regulated genes that control growth and division[J]. *Curr Biol*.2006,16(10): 958-970.
- [19] Proud C G. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 429-436.

Molecular cloning of the TOR gene from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression in response to arginine or leucine

SUN Shu-juan¹, LIU Mei¹, PENG Jin-song², WANG Bao-jie¹, JIANG Ke-yong¹, WANG Lei¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Mariculture seed field, Beihai 536000, China)

Received: Sep., 25, 2009

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; TOR; arginine; leucine; real-time PCR

Abstract: The full length cDNA of TOR (Target of Rapamycin) gene from the muscle of *Fenneropenaeus chinensis* was cloned for the first time. The cDNA was 7638 bp, containing the 7389 bp open reading frame, which encoded 2462 amino acids. The deduced TOR amino acid sequences of *F. chinensis* was compared with other known sequences and domains. The results confirmed their homology. Real-time PCR was used to detect the tissue-specific expression of TOR in *F. chinensis* and response of TOR mRNA in muscle at 3, 6, 12, 24h to injection of leucine or arginine. The results showed that TOR mRNA was 3~4 times that of the control 24 hours after the injection of leucine or arginine, indicating amino acids had a regulatory role in the expression of TOR.

(本文编辑: 梁德海)