

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血淋巴中凝血蛋白的分离纯化、鉴定及 cDNA 片段克隆、组织表达谱分析*

王宝杰^{1,2} 刘梅¹ 蒋克勇¹ 张国范¹ 王雷¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 采用层析技术、N 末端氨基酸序列分析及同源基因克隆等技术对中国对虾血淋巴中的凝血蛋白(CP)进行了研究。结果表明,纯化的 CP 约为 380kDa,其亚基的分子量约为 190kDa,说明该蛋白是由两个相同的亚基组成的同源二聚体;中国对虾 CP 的 N 末端氨基酸序列与凡纳滨对虾、保罗美对虾具有 100%的相似性,与其它对虾的也具有很高的相似性;获得了 CP 基因 518bp 的 cDNA 片段,分析表明该基因序列与其它虾类 CP 基因序列的具有很高的同源性;CP 基因的组织表达谱分析发现心脏和表皮是该基因主要的合成表达部位。

关键词 中国对虾,凝血蛋白,分离纯化,cDNA 克隆,组织表达谱

中图分类号 Q55

高效的免疫防御系统和凝血反应机制无论对于脊椎动物还是无脊椎动物都是至关重要的(张天时等, 2010)。关于无脊椎动物的凝血机制非常多样化,且相关研究较少。目前在无脊椎动物中发现了两种凝血反应机制,一种是螯虾和对虾等甲壳动物体内普遍存在的依赖转谷氨酰胺酶的凝血反应系统(Kopáček *et al.*, 1993),另一种是中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)体内来源于血细胞的凝血级联反应系统(Kawabata *et al.*, 1996)。

目前已在甲壳动物中包括淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)(Kopáček *et al.*, 1993)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)(Yeh *et al.*, 1998)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Montaño-Pérez *et al.*, 1999)、保罗美对虾(*Farfantepenaeus paulensis*)(Perazzolo *et al.*, 2005)及日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)(Cheng *et al.*, 2008)体内发现鉴定了多种 CP,它们都是分子量为 380—420kDa 的同源二聚体脂糖蛋白,由两个分子量约 200kDa 的亚基通过二硫键组成。甲壳动物 CP 的

分子量大小、氨基酸组成和 N 端的氨基酸序列都非常相似。除了参与凝血反应,CP 还是一种极高密度脂蛋白(VHDL),参与色素、脂类、糖类的运输,并且在饥饿时作为蛋白储备,是对虾体内一种非常重要的多功能蛋白。黄冰心等(2009)采用 SDS-PAGE 结合液相色谱与串联质谱技术对中国对虾血浆蛋白质组进行研究,也发现了 CP 的存在。本研究对中国对虾血淋巴中的 CP 进行了分离纯化,对纯化的 CP 的亚基组成和 N 末端氨基酸序列进行了分析;利用同源克隆方法获得了中国对虾 CP 的部分 cDNA 序列,并采用 RT-PCR 方法对 CP 在不同组织的表达情况从分子水平进行研究,为进一步探讨中国对虾的凝血机制及 CP 的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

填料 Q Sepharose HP、Phenyl Sepharose HP、HiTrap Disalting (5ml 预装柱)(GE Healthcare 公司);

* 国家自然科学基金资助项目,30600458 号。王宝杰,博士,助理研究员, E-mail: wangbaojie@qdio.ac.cn

通讯作者:王雷,博士,研究员, E-mail: wanglei@qdio.ac.cn

收稿日期:2010-04-16,收修改稿日期:2010-06-28

DTT、丙烯酰胺、甲双丙烯酰胺、TEMED、APS、Tris、甘氨酸和 SDS (Bio-Rad 公司)。M-MLV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、Rnasin(Promega 公司); 质粒小量抽提及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海生工公司); Unizol(联合基因公司); 其它试剂均使用国产分析纯试剂。

PCR 引物与基因测序均由上海生工公司完成。

1.2 主要仪器

高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); AKTA™ Purifier 蛋白纯化仪(GE Healthcare 公司); PCR 仪、GelDoc 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司); 纯水装置(Millipore 公司); BG-verMINI 迷你垂直电泳仪(北京百晶生物技术有限公司)。

1.3 样品采集与制备

用于取血的中国对虾[体长(13.5±0.5)cm]购自青岛即墨田横对虾养殖场, 均处于褪皮间期, 表观健康。用盛有预冷抗凝剂的注射器从对虾第一腹节的血窦, 按照 1 : 1 比例采血, 新鲜收集的对虾血淋巴以 800g 于 4℃ 下离心 10min, 以沉淀除去血细胞, 收集上清液, 得到无细胞的血浆(plasma); 收集沉淀的血细胞悬浮于 10mmol/L 二甲酸钠缓冲液(含 0.4mol/L NaCl, pH 7.4)中, 经超声波破碎细胞, 然后以 12000g、4℃ 离心 30min, 收集血细胞裂解上清液(HLS)。或者不添加抗凝剂, 置于 4℃ 下自然凝固 1h, 然后以 12000g、4℃ 离心 20min, 舍弃血细胞及血凝块等沉淀物, 所得上清液为血清(serum)。将血浆、血清分装并保存于 -70℃ 冰柜。蛋白质浓度测定按 Bradford 蛋白质浓度测定法(Bradford, 1976), 用牛血清白蛋白作标准曲线。

1.4 中国对虾 CP 的分离纯化

1.4.1 脱盐柱置换缓冲液 用 A1 液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)平衡 HiTrap Disalting(脱盐柱), 然后上样中国对虾血浆 1.5ml, 对其进行缓冲液置换(取代透析), 以便于后续的离子交换层析。

1.4.2 离子交换层析 用 A1 液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)以 2ml/min 流速平衡 Q Sepharose HP (XK16/20 柱), 然后上样 2ml, B1 液为(50mmol/L Tris, 1mol/L NaCl, pH 8.0), 采用 NaCl 分段梯度洗脱(30%, 45%, 60%), 收集 60%的目的蛋白洗脱峰。

1.4.3 疏水作用层析 用 A2 液(20mmol/L PBS, 1.7mol/L (NH₄)₂SO₄, pH 7.0)对 Phenyl Sepharose HP

进行平衡, 流速为 2ml/min。平衡结束后开始上样, 上样量为 2ml, 用 A2 液淋洗, 流速为 2ml/min, 直至紫外吸收值恢复基底值。然后使用 B2 液(20mmol/L PBS, pH 7.0)进行梯度洗脱, 结合上的蛋白使用硫酸铵梯度洗脱(1.7—0mol/L), 收集洗脱峰。

1.5 SDS-PAGE

按照 Laemmli(1970)所述方法进行不连续电泳, 使用的分离胶浓度为 7.5%, 以测定 CP 在还原和非还原状态下的分子量, 电泳后进行考马斯亮蓝 R-250 染色, GelDoc 凝胶成像系统采集图像, Quantity One 软件进行图像分析。

1.6 中国对虾 CP 的体外凝血实验

中国对虾血浆与纯化的 CP 的体外凝血实验参考 Kopáček 等(1993)方法进行。血浆(56mg/ml)和纯化的 CP(2.8mg/ml)通过 HiTrap Disalting 置换缓冲液为 A3 液(50mmol/L Tris-HCl, 0.4mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH 7.4)。然后分别取 0.4ml 的上述样品与 0.05ml A3 液, 35μl HLS (4.0mg/ml)和 15μl 1mol/L CaCl₂ 于 20℃ 下孵育 5h。对照组一以豚鼠的肝转谷氨酰胺酶代替 HLS (1IU/ml), 对照组二是将纯化的 CP 与 0.2mol/L EDTA(代替 1mol/L CaCl₂)孵育。观察凝血反应情况(是否形成凝胶状)。

1.7 N-末端氨基酸序列分析

纯化后的 CP 用 SDS-PAGE 分离后, 用 CAPS 缓冲液系统将其电转印至 PVDF 膜, 采用 Edman 降解法测定氨基酸 N 端序列, 通过反相 HPLC 分析和乙腈洗脱, 然后在 Procise 491 型(Applied Biosystems)蛋白自动测序仪对蛋白 N 端的 15 个氨基酸序列进行测定(由北京大学生命科学院完成)。

1.8 中国对虾 CP 基因的 cDNA 部分序列克隆及组织表达检测

利用 Unizol Reagent 提取中国对虾心脏的总 RNA, 并反转录成 cDNA, 方法按参考文献进行。应用 Primer premier5.0 软件, 根据 NCBI 搜索的甲壳动物 CP 的同源序列设计引物, 上游引物为 5'-CCAACA AGGAGCAACACGAG-3', 下游引物为 5'-GCGAAG GCTGACACCAATAC-3'。以获得的 cDNA 为模板, 对其序列进行扩增, PCR 扩增条件为: 反应条件: 94℃, 2min; 94℃, 30s; 57℃, 45s; 72℃, 45s, 35 个循环; 72℃, 10min。将 PCR 产物经过凝胶纯化回收后, 然后克隆到 pMD18-T 载体的连接。转化感受态细胞 *E. coli* DH5α。将 PCR 鉴定为阳性的菌株寄至上海生工公司

测序,测定的 DNA 序列用 Blast 程序进行同源性检索比较。

确定测序片段为 CP 的基因序列后,取中国对虾的心脏、肝胰腺、表皮、血细胞、鳃、肌肉、胃等组织,分别提取总 RNA。对不同组织提取的 RNA 进行 RT-PCR,检测该基因的组织表达特异性。

2 结果

2.1 中国对虾 CP 的分离纯化及鉴定

中国对虾血淋巴中的 CP 采用离子交换层析结合疏水作用层析得到了有效的分离,获得了较高纯度的 CP 样品。置换缓冲液后的对虾血浆样品采用离子交换层析进行粗分离,研究采用 NaCl 分段洗脱,首先以 30% B 和 45% B 分别洗脱,分别得到一个较小的和很大的蛋白洗脱峰,经电泳分析证明主要为血蓝蛋白(图 1,泳道 1、2),是甲壳类动物血淋巴中最

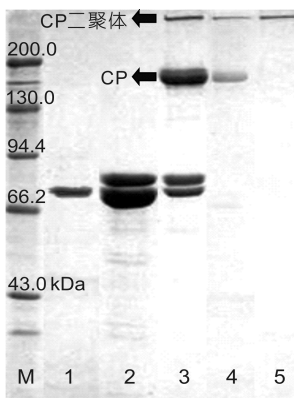


图 1 中国对虾 CP 及纯化过程中收集各组分的 SDS-PAGE (7.5%)

Fig.1 SDS-PAGE (7.5%) analysis of the clottable proteins from *F. chinensis* plasma and other collected fractions

注: M. 蛋白分子量标准;

1. 对应于 Q Sepharose HP 层析第一个蛋白峰的收集组分;
2. 对应于 Q Sepharose HP 层析第二个蛋白峰的收集组分;
3. 对应于 Q Sepharose HP 层析第三个蛋白峰的收集组分;
4. 对应于 Phenyl Sepharose HP 层析第二个蛋白峰的收集组分(纯化的 CP);
5. 非变性条件下对应于 Phenyl Sepharose HP 层析第二个蛋白峰的收集组分(纯化的 CP 二聚体)

主要的高丰度蛋白;然后以 60% B(即 0.46 mol/L NaCl)洗脱,得到一个较小的洗脱峰,经电泳分析该洗脱峰主要为 CP(图 2,泳道 3);将 60% B 的洗脱峰收集可以直接用于后面的疏水作用层析,在高盐的条件下将 CP 结合到疏水填料上(Phenyl Sepharose HP),然后使用线性梯度洗脱,将 CP 与其它蛋白组分分离开来,第二峰主要组分为 CP(图 1,泳道 4)。整个纯化步骤上下衔接紧密,可以在很短的时间内实现对 CP 的高效分离。

2.2 中国对虾 CP 的分子量与亚基组成

经过上述纯化步骤所得 CP 经 SDS-PAGE 分析在还原条件下为一 190kDa 条带(图 1,泳道 4),而在非还原条件下为 380kDa 条带(图 1,泳道 5)。由此分析,该蛋白是

由两个相同的亚基经二硫键连接为同源二聚体。

2.3 中国对虾 CP 的体外凝血实验

通过体外凝血实验发现无论是血浆还是纯化的 CP 在 HLS 和 Ca^{2+} 存在的条件下都可以形成稳定凝胶状(血凝块)。而对照实验发现,当以 EDTA 代替 $CaCl_2$ 时则 CP 无法形成凝胶状;而以商品化的转谷氨酰胺酶代替 HLS 时也可以发挥同样的作用形成凝胶状。见表 1。

表 1 中国对虾血浆与纯化 CP 的体外凝血反应
Tab.1 *In vitro* coagulation assay using the crude plasma and the purified CP of *F. chinensis*

样品	凝胶形成情况
血浆 + HLS + Ca^{2+}	+
CP + HLS + Ca^{2+}	+
CP + HLS + EDTA	-
CP + 豚鼠 Tgase + Ca^{2+}	+

注: +表示形成稳定凝胶, - 表示无凝胶形成

2.4 中国对虾 CP 亚基的 N 端氨基酸序列分析

采用 Edman 降解法获得了中国对虾的 N 末端氨基酸残基序列,并且与报道过的其它甲壳动物的 N 末端氨基酸序列进行了比对分析(图 2),中国对虾 CP 的 N 末端序列(LQPGLEYQYRYSARV)与凡纳滨对虾、保罗美对虾的完全一致。

2.5 中国对虾 CP 基因的部分 cDNA 序列

以中国对虾心脏的 cDNA 为模板,利用特异性引物进行 RT-PCR 扩增,扩增片段经琼脂糖凝胶电泳检

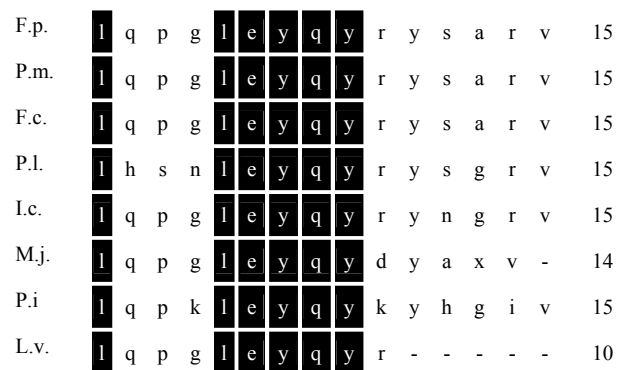


图 2 中国对虾 CP N-末端氨基酸序列与其它甲壳动物 CP 的 N-末端氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of the N-terminal amino acid sequences of the clotting proteins of *F. chinensis* with the CPs from other crustaceans

注: *Litopenaeus vannamei* (L.v.), *Farfantepenaeus paulensis* i (F.p.), *Penaeus monodon* i (P.m.), *Marsupenaeus japonicus* i (M.j.), *Pacifastacus leniusculus* i (P.l.), *Panulirus interruptus* i (P.i.), *Ibacus ciliatus* i (I.c.)

测, 扩增出 500bp 左右的 DNA 带, 与预期产物分子量大小基本一致(图 3A)。将扩增的 DNA 片段回收后, 与载体进行连接, 转化大肠杆菌, 筛选重组子, 进行序列分析。结果表明, 克隆插入片段的长度为 518bp, 推导出 172 个氨基酸残基(图 4)。所得序列用 Blast 程序进行比对, 发现该序列与 GenBank 上已发表的其它对虾的 CP 有很高的同源性, 同源性分析表明, 所获得的中国对虾 CP 基因序列与其它虾类 CP 基因序列的同源性较高, 如与斑节对虾的同源性为 100%, 与凡纳滨对虾的同源性为 99%, 与日本囊对虾的同源性为 86%, 与淡水螯虾的同源性为 90%。

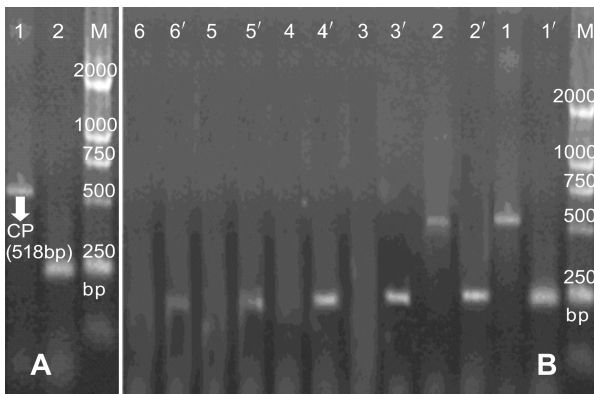


图 3 中国对虾 CP(518bp)cDNA 片段(A)与 CP 基因组织表达分析(B)

Fig.3 PCR amplification of the CP gene from *F. chinensis* (A) and expression of tissue-specific CP transcripts in various tissues of *F. chinensis* (B)

注: A: 泳道 1 为 CP cDNA 片段; 泳道 2 为 β -actin cDNA 片段; M: DL2000。B: 泳道 1—6 依次为 CP 在中国对虾心脏、表皮、肝胰腺、血细胞、鳃、肌肉组织中的表达; 泳道 1'—6'依次为 β -actin 在中国对虾心脏、表皮、肝胰腺、血细胞、鳃、肌肉组织中的表达, 作为内参; M: DL2000

2.6 中国对虾 CP 基因的组织表达谱分析

通过 RT-PCR 检测了 CP 基因在中国对虾心脏、表皮、肝胰腺、血细胞、鳃、肌肉组织等 8 种组织中的表达情况(图 3B): CP 基因在心脏和表皮中均有表达, 且在心脏中的表达丰度较高, 其它组织中几乎检测不到。

3 讨论

3.1 中国对虾 CP 的分离纯化方法

目前已有多个甲壳动物的 CP 得到了鉴定, 并且有多种方法用于其分离纯化, 包括以磷酸盐缓冲液在低离子强度下透析从而使其沉淀(Kopáček *et al*,

```

1  N K E Q H E Q V D T F T N Q T L E L K A
1  ccAACAAGGAGCAACACGAGCAAGTGGACACCTTACCAACAGACCTTAGAGCTGAAGG
21  V R E V G E P I T V T Y D V H P H Y S W
61  CTGTGCGTGAGGTTGGGAGCCCATCACTGTTACTTATGACGTCCACTCTACTACAGCT
41  Q Y D I E G P Q G D Q F I P L E Q V L T
121  GGCAGTATGATATCGAAGGGCCACAGGGCGACCAGTTCATTCTCTGGAGCAGGTCCCTCA
61  G R P V T G Q I V N G I M E Y I K K T V
181  CAGGCAGGCCGGTCACTGGCCAAATTGTTAACGGCATCATGGAATACATCAAGAAAACCG
81  D D L S H R M E H Y P A K P E N L A Y I
241  TCGACGACCTCTCGCACCGCATGGAGCATTACCCGGCCAAAGCAGAGAACCTTGCTTACA
101  I G R L V E A V A N L D Y P Y I Q T L Y
301  TCATTGGCCGCTCGTCGAAGCCGTGCCAACCTCGACTATCCATACATCCAGACTCTTT
121  T H F D G K G T L Q K Y I F T Q L V I Y
361  ACACCCACTTCGACGGCAAAGGCACACTGCAGAAATACATCTTTACCGAGTTGGTGATCT
141  A G T E P S V N F A V D N L S D S L F Y
421  ACGCCGGCAGACAACCATCAGTCAATTTTGCAGTTGATAACCTCAGTGATAGTCTCTTCT
161  I T F Y E S I G V S L R
481  ACATTACTTTCTACGAGAGATTGGTGTGACGCTTCGCA
    
```

图 4 中国对虾 CP 基因部分 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.4 cDNA sequence and deduced amino sequence of CP in *F. chinensis*

1993), 等电点沉淀(pH 5.0)之后通过凝胶过滤层析(Fuller *et al*, 1971), 亲和层析(肝素亲和层析)(Montaño-Pérez *et al*, 1999)以及离子交换层析(Yeh *et al*, 1998)。本文中中国对虾血淋巴中的 CP 采用离子交换层析结合疏水作用层析得到了有效的分离, 获得了较高纯度的 CP 样品。首先使用预装 Sephadex G-25 填料的 Hitrap Disalting 脱盐柱, 可以快速置换缓冲液。传统的方法一般采用 4℃ 透析过夜, 因为对虾血淋巴液中盐分较高, 如果直接用于离子交换层析, 会对实验造成一定不利的影响。置换缓冲液后的对虾血浆样品采用离子交换层析进行粗分离, 在已经报道过的有关对虾 CP 的研究中, 离子交换层析是使用最多的方法。本文采用 NaCl 分段洗脱, 首先将 CP 粗分离, 然后将收集的 CP 粗提液可以直接用于后面的疏水作用层析, 蛋白质表面一般有疏水与亲水集团, 疏水层析是利用蛋白质表面某一部分具有疏水性, 与带有疏水性的载体在高盐浓度时结合。洗脱时, 将盐浓度逐渐降低, 因其疏水性不同而逐个地先后被洗脱而纯化。疏水作用层析非常适合与离子交换层析配合使用, 第二步离子交换层析所得的含有 CP 的洗脱峰含有较高的盐分, 而疏水作用层析正是利用这一特点, 在高

盐的条件下将 CP 结合到疏水填料上, 然后使用线性梯度洗脱, 将 CP 与其它蛋白组分分离开来。整个纯化步骤上下衔接紧密, 可以在很短的时间内实现对 CP 的高效分离。

3.2 中国对虾 CP 的亚基组成与鉴定

甲壳动物的 CP 大多是由两个约 200kDa 的亚基组成(Sritunyalucksana *et al*, 2000)。在本研究中纯化的中国对虾的 CP 经 SDS-PAGE 分析, 结果表明在非还原状态下中国对虾 CP 的分子量大约为 380kDa, 在还原条件下亚基的分子量约 190kDa, 略微小于其它甲壳动物中的 CP, 例如凡纳滨对虾(420kDa)、淡水螯虾(420kDa)、加州刺龙虾(420kDa)。但是它们的氨基酸组成和 N 末端氨基酸序列都是非常相似的, N 末端氨基酸序列经过比对中国对虾与凡纳滨对虾、斑节对虾与保罗美对虾的完全一致。另外与其它一些虾类的 CP 比对也具有很高的一致性, 例如日本囊对虾(80%)、淡水螯虾(73%)、加州刺龙虾(66%)与毛缘扇虾的 VHDL(87%), 证明上述这些蛋白是同源蛋白。另一方面, 所有的 N 末端氨基酸序列都表现出与卵黄蛋白原具有一定的相似度(Yeh *et al*, 1998), 卵黄蛋白原是所有卵生动物卵黄的糖脂蛋白的前体。CP 和卵黄蛋白原都含有一个同血管性血友病因子(von Willebrand factor)的 D 结构域相似的区域, 而该结构域是参与哺乳动物凝血反应的(Baker, 1988)。

尽管有很高的相似性, 不同甲壳动物的 CP 也表现出一些变异性, 目前至少在分子量上以及 N 末端氨基酸序列是这样的。有趣的是, 中国对虾(380kDa)与保罗美对虾(341kDa)、斑节对虾(380kDa)表现出一致的 N 末端氨基酸序列而它们的分子量也都小于其它几个十足目动物(420kDa)。

3.3 中国对虾 CP 的凝血功能验证

纯化的中国对虾 CP 在体外 Ca^{2+} 和 HLS 存在的条件下可以形成稳定的血凝块, 这证明凝血反应是由来自于血细胞裂解液中的 Ca^{2+} 依赖性的转谷氨酰胺酶来催化的, 类似的情况也存在于其它甲壳动物中(Kopáček *et al*, 1993; Yeh *et al*, 1998; Hall *et al*, 1999; Montaña-Pérez *et al*, 1999)。通过该实验从功能上对纯化的 CP 进行了鉴定, 同时也验证了对虾凝血反应的基本过程需要 Ca^{2+} 与转谷氨酰胺酶的参与。这对于具有开放循环系统的对虾等甲壳动物而言具有重要的生理意义, 通过有效的凝血反应来愈合伤口以防止血淋巴的损失和捕获病原微生物以防止其扩散进入血腔。

3.4 中国对虾 CP 基因的克隆与组织表达谱分析

目前斑节对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾的 CP 基因通过分子克隆获得了基因全长(Cheng *et al*, 2008)。斑节对虾的 CP 基因 cDNA 全长 6124bp, 此 cDNA 编码了一个由 1670 个氨基酸组成的蛋白, 包括 14 个氨基酸的信号肽。由于有四个潜在的 N 端糖基化位点, 整个蛋白含 3.8% 的甘露聚糖。日本囊对虾的 CP 基因 cDNA 全长 5660bp, 推断 CP 的前体包括一个信号肽, 信号肽后是一个由 1671 个氨基酸组成的亚基。CP 的整个氨基酸序列包括两个 RGD 基序和三个潜在的 N 端糖基化位点, 与斑节对虾和淡水螯虾的 CP 分别有 80% 和 38% 的相似性。凡纳滨对虾的 CP 基因全长 5541bp, 推导的蛋白由 1666 个氨基酸残基组成。凡纳滨对虾和日本囊对虾的 CP 都有转谷氨酰胺酶交联位点, N 端有多个 Ser-Lys-Thr 重复, 说明 CP 可能是转谷氨酰胺酶的作用底物, 中间位置色氨酸和谷氨酰胺含量丰富, 色氨酸和谷氨酰胺形成共价连接, 这种特殊的结构可能与其凝血作用有关。对虾 CP 的含有两个非常保守 RGD 序列, 但其功能现在还不是很清楚。本文通过同源克隆技术获得了中国对虾 CP 的 cDNA 片段, 同源性分析表明, 所获得的中国对虾 CP 基因序列与其它虾类 CP 基因序列的同源性较高, 特别是与斑节对虾(100%)、凡纳滨对虾(99%), 上述结果证实了该基因是一个进化上非常保守的基因。

本文运用 RT-PCR 方法研究了中国对虾 CP 基因的组织表达情况, 发现在心脏和表皮中均有表达, 而在肝胰腺、血细胞、鳃、肌肉等其它组织中未检测到。同样通过 RT-PCR 分析, 发现日本囊对虾的 CP 在多数组织中有表达, 特别是表皮组织、腮丝、中枢神经系统与心脏(Cheng *et al*, 2008); 对斑节对虾的研究结果发现, CP 在鳃、中枢神经、淋巴器官、心脏、肝胰腺、血细胞和肌肉中的表达量依次递减(Yeh *et al*, 2007)。可能由于实验灵敏度的原因, 本研究在其它组织中未检测到 CP 基因的表达, 但是综合目前的研究证明对虾的表皮是合成表达 CP 的重要部位。这些发现与 CP 在对虾的免疫防疫、愈伤和生长方面等具有重要功能是相一致的。

关于凝血反应是如何启动、凝血反应的程序如何控制, 在免疫防御过程中凝血反应如何与其它体液免疫协同作用等机制问题还有待于进一步研究。

参 考 文 献

张天时, 李素红, 孔 杰, 2010. 中国对虾(*Fenneropenaeus*

- chinensis*)自然感染与人工感染 WSSV 抗病力的比较. 海洋与湖沼, 41(5): 763—768
- 黄冰心, 蒋 昊, 张继泉等, 2009. SDS-PAGE 与液质联用技术分离和鉴定中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血浆蛋白. 海洋与湖沼, 40(2): 208—213
- Baker M E, 1988. Invertebrate vitellogenin is homologous to human von Willebrand factor. *Biochem J*, 256: 1059—1063
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Cheng W T, Tsai I H, Huang C J *et al*, 2008. Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3): 265—274
- Fuller G M, Doolittle R F, 1971. Studies of invertebrate fibrinogen: I. Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. *Biochemistry*, 10: 1305—1311
- Kawabata S L, Muta T, Iwanaga S, 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta G R ed. *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, 255—283
- Kopáček P, Hall M, Söderhäll K, 1993. Characterization of a clotting protein isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem*, 213: 591—597
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680—685
- Montaño-Pérez K, Yepiz-Plascencia G, Higuera-Ciapara I *et al*, 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B*, 122: 381—387
- Perazzolo L M, Lorenzini D M, Daffre S *et al*, 2005. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp Biochem Physiol B*, 142: 302—307
- Sritunyalucksana K, Söderhäll K, 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191: 53—69
- Yeh M-S, Chen Y-L, Tsai I-H, 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comp Biochem Physiol B*, 121: 169—176
- Yeh M-S, Huang C-J, Cheng J-H *et al*, 2007. Tissue-specific expression and regulation of the hemolymph clottable protein of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol*, 23: 272—279

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND EXPRESSION OF THE HEMOLYMPH CLOTTABLE PROTEIN OF CHINESE SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS*

WANG Bao-Jie^{1,2}, LIU Mei¹, JIANG Ke-Yong¹, ZHANG Guo-Fan¹, WANG Lei¹

(1. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;*

2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)*

Abstract A clottable protein (CP) was purified from the hemolymph of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by anion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The shrimp CP was able to form stable clots in vitro in the presence of hemocyte lysate and Ca²⁺, suggesting that the clotting reaction is catalyzed by a Ca²⁺-dependent transglutaminase in shrimp hemocytes. The molecular mass of the CP was found to be 380kDa under non-reducing conditions and 190kDa under reducing conditions determined by SDS-PAGE. CPs exist as disulfide-linked homodimers and oligomers. The N-terminus amino acid sequence of this CP was 100% identical to that of the penaeids *Litopenaeus vannamei*, *F. paulensis*, and *Penaeus monodon*; and 66% to 80% identical to the CPs of other decapods. By Homologous Cloning method, the cDNA fragment of CP was cloned and sequenced, and it contained 518bp and with deduced amino acid sequence of 172 residues. The sequence analysis indicated that it shared high identity with CP gene from other previously reported shrimps. RT-PCR analysis revealed that the sub-cuticular and the heart were identified as the tissues that express the most of CP in *F. chinensis*.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, Clottable protein, Purification, cDNA clone, Tissue-specific expression