

短蛸(*Octopus ocellatus*)过氧化物还原酶 (OoPrx-4)基因的克隆及其对鳃弧菌 胁迫的转录调控分析*

徐 洁^{1,2} 韦秀梅² 王卫军² 杨建敏²
刘相全² 杨顶珑^{1,2} 陈建强²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋水产研究所
山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 从本研究前期构建的短蛸(*Octopus ocellatus*)cDNA 文库中克隆得到过氧化物还原酶(OoPrx-4)基因的 cDNA 全长, 该基因 cDNA 全长 934bp, 包括 5'非编码区(UTR)19bp, 3'UTR 177bp, 开放阅读框(ORF)738bp, 共编码 245 个氨基酸, 理论等电点为 6.65, 预测分子量 27.1kDa。采用实时荧光定量 PCR 法分析了 OoPrx-4 基因在短蛸各组织及鳃弧菌胁迫下的表达规律, 结果表明, OoPrx-4 在短蛸血细胞、肌肉、系统心脏、鳃、胃、肾囊、性腺、外套膜和肝胰腺等检测组织中都有表达, 其中在肝胰腺的表达量最高。经鳃弧菌刺激后, Prx-4 在血细胞中的表达量分别在 6h 和 48h 出现了两次明显上调。Prx-4 作为抗氧化酶可能在减少机体因抵御鳃弧菌胁迫所产生的过氧化物方面发挥重要的作用。

关键词 短蛸; 过氧化物还原酶-4; 实时荧光定量 PCR; 鳃弧菌

中图分类号 Q953

过氧化物还原酶(Peroxiredoxin, Prx)广泛存在于原核生物和真核生物中, 属于抗氧化蛋白超家族, 能有效地应对生物体内因氧的消耗而产生的过氧化物, 以调节体内氧及其副产物的正常生理代谢。氧是好氧生物基本代谢的能量来源, 对于好氧生物来说必不可少, 但在好氧生物的基本代谢过程中, 氧的消耗同时也会产生一些副产物, 如 H₂O₂、超氧阴离子(O₂⁻)、羟基自由基(·OH)、烷基过氧化氢物(ROOH)和过氧亚硝酸根(ONOO⁻)等, 它们统称为活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS 参与生物体的免疫应答、细胞增殖与分化、信号传导和离子运输等重要生理生化过程(Aguirre *et al*, 2005; Wood *et al*, 2003), 但大量 ROS 的存在也会引起细胞成分的无限氧化, 破坏生物大分子活性, 引起生物体蛋白质和核酸的氧化、脂

膜的过氧化和谷胱甘肽的耗竭等, 甚至导致生物体细胞组织的死亡(Wang *et al*, 2006)。为了有效调节体内 ROS 的水平, 维持正常的生命代谢, 生物在长期的进化过程中, 产生了多种抗氧化酶以调控 ROS 在细胞内的正常代谢水平(Elsayed, 2001), Prx 就是其中一类常见的抗氧化酶。哺乳动物的 Prx 主要包括六个成员: Prx-1、2、3、4、5、6, 其 N-端都具有一个保守的半胱氨酸(cys)残基, 部分成员在 C-端也有保守的 cys 残基。根据各成员间的同源性和 cys 残基数目的不同, Prx 家族蛋白又可分为 3 个亚类, 即 2-cys Prx (Prx-1—4), 非典型 2-cys Prx (Prx-5)和 1-cys Prx (Prx-6), 其中 Prx-1—4 含有两个保守的半胱氨酸残基, Prx-5 含两个额外的保守性较低的半胱氨酸残基, Prx-6 只在 N-端存在一个保守的半胱氨酸残基(母昌

* 国家自然科学基金项目, 31272643 号; 烟台市科技发展计划项目, 2011068 号; 水生动物营养与饲料“泰山学者”岗位资助。徐洁, 硕士研究生, E-mail: xujie20075303@yeah.net

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2012-04-13, 收修改稿日期: 2012-06-15

考, 2009¹⁾。

目前有关 Prx 的研究主要集中在哺乳类动物, 对于海洋生物 Prx 报道较少, 节肢动物 Prx 的报道有中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (Mu *et al*, 2009)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (Chen *et al*, 2011)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Zhang *et al*, 2007)等, 在软体动物中有鲍(*Haliotis discus discus*) (Chamilani *et al*, 2009)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Elise *et al*, 2007)等。但是上述研究主要以 Prx-1 和 Prx-6 为主, 对 Prx-4 的研究相对较少, 迄今未见对短蛸(*Octopus ocellatus*)Prx-4 的研究报道。短蛸属于软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、八腕目(Octopoda)、无须亚目(Incirrata)、蛸科(Octopodidae)、蛸属(*Octopus*), 肉质鲜美, 营养丰富, 出口日本和韩国等地, 是我国北部沿海章鱼中最重要的经济种类之一(董正之, 1988; 张伟伟等, 2006)。本研究以短蛸为实验材料, 从前期构建的 cDNA 文库中克隆获得短蛸的 Prx-4(OoPrx-4)基因序列, 并检测其在短蛸各个组织及受到鳃弧菌刺激后在血细胞中的表达规律, 旨在了解 Prx-4 在短蛸受到鳃弧菌胁迫后发挥的抗氧化作用机制。

1 材料与方法

1.1 OoPrx-4 cDNA 全长的克隆

从课题组前期构建的短蛸 cDNA 文库中筛选得到一个 Prx 基因, 将对应质粒转化到 Trans 5 α 感受态细胞(全式金)中, 培养后挑取单菌落, 利用引物 M13F: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'和 M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'克隆后进行序列测定, 拼接获得 OoPrx-4 基因全长 cDNA 序列。

1.2 OoPrx-4 的序列分析

分别采用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和蛋白质性质分析软件(<http://www.expasy.org/>)对 OoPrx-4 序列及其推断的氨基酸序列进行分析; 使用 SingalP 查找信号肽; 采用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对氨基酸结构进行预测; 采用 <http://www.bioinformatics.org/sms/>进行同源性检测; 多序列比对采用的是 Clustal X1.83 软件, 并在此基础上利用 MEGA4.1 软件, 以邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统进化树, 对每个分支

bootstrap values 进行 1000 次计算(Wei *et al*, 2012b)。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成

实验用海捕短蛸(*Octopus ocellatus*)购自山东省烟台市, 体长 15cm 左右, 在 20℃ 的海水中暂养一周。随机取暂养后的短蛸 6 只, 解剖取其肌肉、外套膜、鳃、系统心脏、肝胰腺、肾囊、胃和性腺。采用注射器提前吸入等体积预冷的抗凝剂(0.1mol/L 葡萄糖, 15mmol/L 柠檬酸钠, 13mmol/L 柠檬酸, 10mmol/L EDTA, 0.45mol/L NaCl, pH 7.0)抽取短蛸血淋巴(Saleem *et al*, 2008; Wei *et al*, 2012a), 在 4℃ 下 4000r/min 离心 5min 获得血细胞。采用 TRIzol Reagent (Invitrogen)试剂盒, 并按照其说明书提取短蛸各组织的总 RNA。按照 M-MLV RT (Promega)使用说明, 以含有 DNase (Promega)的 RNA 为模板加入 2 \times oligo dT (GGCCACGCGTCTCGACTAGTACT17)作为引物, 在 42℃ 反应 1h, 再 95℃ 5min 以终止反应(Wei *et al*, 2012b)。所得的 cDNA 模板保存在 -80℃ 备用。

1.4 短蛸不同组织 OoPrx-4 基因 mRNA 的表达分析

采用 Primer Premier 5.0 软件根据 OoPrx-4 序列特异性设计引物 OoPrxF: 5'-ATACAG ATAGCCATGGAG A GGTGTG-3'和 OoPrxR: 5'-CTTGTCTAGTTGGGTCTG GGATG-3', 采用 β -Actin 基因作为内参基因进行反转录和模板的校正, β -Actin 的扩增引物为 AF: 5'-GAT GATGAAGTCGCTGCTCTCG-3'和 AR: 5'-TCCCAGT TGGTAACAATACC GTGT-3'。将 -80℃ 保存的组织模板稀释 100 倍后进行实时荧光定量 PCR。反应体系 25 μ l, 含 cDNA 模板 100 倍稀释液 2.5 μ l, 12.5 μ l 2 \times SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 正反引物各 1 μ l 和 8 μ l 水。使用实时荧光定量 PCR 仪(eppendorf Mastercycler ep realplex)进行 PCR 扩增, 反应程序为: 50℃ 2min, 95℃ 10min; 94℃ 30s, 58℃ 60s, 35 个循环, 检测溶解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 OoPrx-4 基因 mRNA 的相对表达量, 结果用 *t* 检验进行显著性分析。

1.5 短蛸受鳃弧菌刺激后不同时间点 OoPrx-4 基因 mRNA 的表达分析

鳃弧菌(*Listonella anguillarum*)以 2216E 液体培养基 28℃ 过夜培养, 室温条件下 10000r/min 离心 10min 收集菌体后加到短蛸养殖水体中, 使海水中鳃弧菌浓度为 1×10^7 CFU/ml (李凌, 2009²⁾; Kong *et al*,

1) 母昌考, 2009. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) Peroxiredoxin 6 和 Thioredoxin 1 基因的克隆及表达. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 1—105

2) 李 凌, 2009. 栉孔扇贝抗鳃弧菌感染性状候选基因的多态性研究. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 1—96

2010), 以不处理短蛸为对照(0h)。分别在刺激后 6、12、24、48h 随机取 6 只短蛸, 抽取血淋巴, 经 4℃, 4000r/min, 离心 5min, 弃上清, 加入 1ml TRIzol Reagent (Invitrogen), 重悬后用以提取 RNA, 再经反转录获得 cDNA 模板, 进行实时荧光定量 PCR 分析。实验数据采用 *t* 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 说明具有显著性差异, $P < 0.01$ 说明差异极显著。

2 结果

2.1 OoPrx-4 全长 cDNA 的特征

OoPrx-4 基因(GenBank 登录号: KC352998)cDNA 全长为 934bp, 包括 5' 的非编码区(UTR)19bp, 3' UTR 177bp, 在 3' 端存有推测的多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 polyA 尾巴, 开放阅读框(ORF)738bp, 共编码 245 个氨基酸的蛋白(图 1)。理论等电点为 6.65, 预测分子量 27.1kDa。经过 SMART 分析预测, 在编码的氨基酸序列的 1(M)—19(G)为 OoPrx-4 的信号肽, 51(I)—201(L)是还原酶结构域。

```

1      M S S V C L V F L L F A V S
1  ACGCTTCAAATCAGCAAAATGTCCTTCTGTTTGCCCTGTAATCCTGCTGTTTGCAGTTTC
15  A V C L G E D T C Y S Y A G G Q V Y P Q
61  AGCTGTTTGGTGGGAGGATACCTGTTTCTTATGCTGGTGGTCAGGTTTATCCACA
35  E D R K L S G H T I Q W S K A I I S K P
121  GGAAGATAGGAACTGCTGGACATACGATTCATGGAGCAAGCCATAATTTCTAAACC
55  A P D W N G T A V I N G K F E E I S L K
181  AGCCCTGATGGAAATGGTACTGCTGTGATTAATGGAAAAATGGAAGAGATCAGCCTCA
75  S F H G K Y L V F F F Y P L D F T F V C
241  AAGTTTTCATGGCAAATATCTCGTGTCTCTTTTATCCACTTGACTTTACATTTGTATG
95  P T E I I A F S D R I G E F K A I N T A
301  TCCAACAGAAATAAATGCTTTCAGTGACAGAAATGGAGAATTAAAGCTATAAATACTGC
115  V V A C S V D S H F T H L A W I N T P R
361  TGTGGTTCGCTGCTCTGTGACTCTCAATTTACCCACTTACGATGGATCAATACACCAG
135  N K G G L G P L N I P L L S D L T H E I
421  AAACAAAGGAGGTTTAGGACCACTGAATATTCACACTACTCTGACCTCACACAGAAAT
155  S K S Y G V F L Q N L G H S L R G L F I
481  CTCCAAATCTTATGGTGTATTCCTTCAGAACTCTGGCCACAGTCTACGTTGGTCTGTTAT
175  I D S K G T L R Q I T M N D L P V G R S
541  CATCGACTCCAAAGGAACTCTGGCTCAGATCACAATGAATGATCTGCCAGTTGGTCGATC
195  V D E T L R L V Q A F Q Y T D S H G E V
601  TGTGACGAAACACTACGTCTGGTCAAGCCCTTCAGTATACAGATAGCCATGGAGAGGT
215  C P A G W K P G G D T I I P D P T D K L
661  GTGTCCAGCAGGCTGGAAGCTGGTGGCGATACGATCATCCAGACCACTGACAAGCT
235  K Y F E K A N K S N K *
721  GAAATATTTGAAAAAGCCAACTAATAAATAAATTTTCAATGCATCTATTATTTT
781  TTTAATCTTTATTTGCAACCACTCAAAAAATGTCAAAATGTTTAAATTCATATCTA
841  TGTTCATTTCCATGTAACCTCCAGTTATAACTAAGCACTTCAGCTCAATAAACTTTT
901  TTCATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 OoPrx-4 全长 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 1 Full-length cDNA and deduced amino acid sequences of OoPrx-4

注: 在数字左边为每一行的基因序列或氨基酸序列。星号(*)标记的为终止密码子。加尾信号(AATAAA)用加粗表示; 信号肽由下划线标出; 预测的还原酶结构域由阴影标出; 方框标出的是半胱氨酸(cys)残基

2.2 OoPrx-4 基因的同源性分析

BLAST 分析结果显示 OoPrx-4 的氨基酸序列与长牡蛎 Prx-4 (EKC37672)和光滑双脐螺 Prx-4 (ACI42880) 同源性最高, 相似度分别为 78%和 73%。OoPrx-4 编码的氨基酸与其它 5 个物种共 7 种 Prx 氨基酸的多序列比对结果显示 OoPrx-4 氨基酸序列中含有两个包含 cys 残基的区域“FYPLDFTFVCPTEI”和“GEVCPA”(图 2), 该区域在这 8 种 Prx 氨基酸中高度保守。

2.3 OoPrx-4 基因的系统进化分析

以 OoPrx-4 和长牡蛎、鼠(*Mus musculus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、人(*Homo sapiens*)等 14 个物种的共 23 种 Prx 的氨基酸序列构建系统进化树(图 3), 结果显示这 23 种 Prx 蛋白分成 2-cys Prx、1-cys Prx 和非典型 2-cys Prx 三大分支, OoPrx-4 与其它动物的 Prx-1、Prx-2、Prx-3、Prx-4 同在 2-cys Prx 分支中, OoPrx-4 首先与长牡蛎和光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)的 Prx-4 聚在一起, 然后再与其它脊椎动物的 Prx-4 聚群。

2.4 OoPrx-4 的 mRNA 在短蛸不同组织中的表达规律

利用实时荧光定量 PCR 方法检测了 OoPrx-4 的 mRNA 在健康短蛸不同组织中的表达情况。OoPrx-4 在外套膜、肌肉、胃、肾囊、肝胰腺、鳃、系统心脏、血细胞和性腺中都有表达, 其中以肝胰腺组织中表达最强, 是血细胞中表达量的 70 倍, 在外套膜、肌肉、胃、肾囊、肝胰腺、鳃、系统心脏中的表达量较低, 而在血细胞中的表达量最低(图 4)。

2.5 OoPrx-4 的 mRNA 在短蛸受到鳃弧菌刺激后不同时间点的表达规律

利用实时荧光定量 PCR 方法检测了短蛸受到鳃弧菌刺激后各个时间点血细胞中 OoPrx-4 的表达规律。在鳃弧菌刺激后 6h, OoPrx-4 表达量明显上升, 为对照组的 5.7 倍($P < 0.01$); 随后在 12h 和 24h 小幅度下降; 在刺激后 48h 显著升高, 为对照组的 28 倍($P < 0.01$), 达到刺激后表达量的最高值(图 5)。

3 讨论

过氧化物还原酶(Prx)属于进化相对保守的抗氧化物超家族, 它通过严格调控细胞或组织内的过氧化物浓度不仅能够有效的保护生物体免受过氧化物的损害(Dayer *et al*, 2008), 而且可以准确的控制完成正常生理过程所需的过氧化物浓度(Wood *et al*, 2003)。在本实验中, 由短蛸 cDNA 文库中发现了 OoPrx-4 基因, 其预测蛋白经过 BLAST 分析发现,

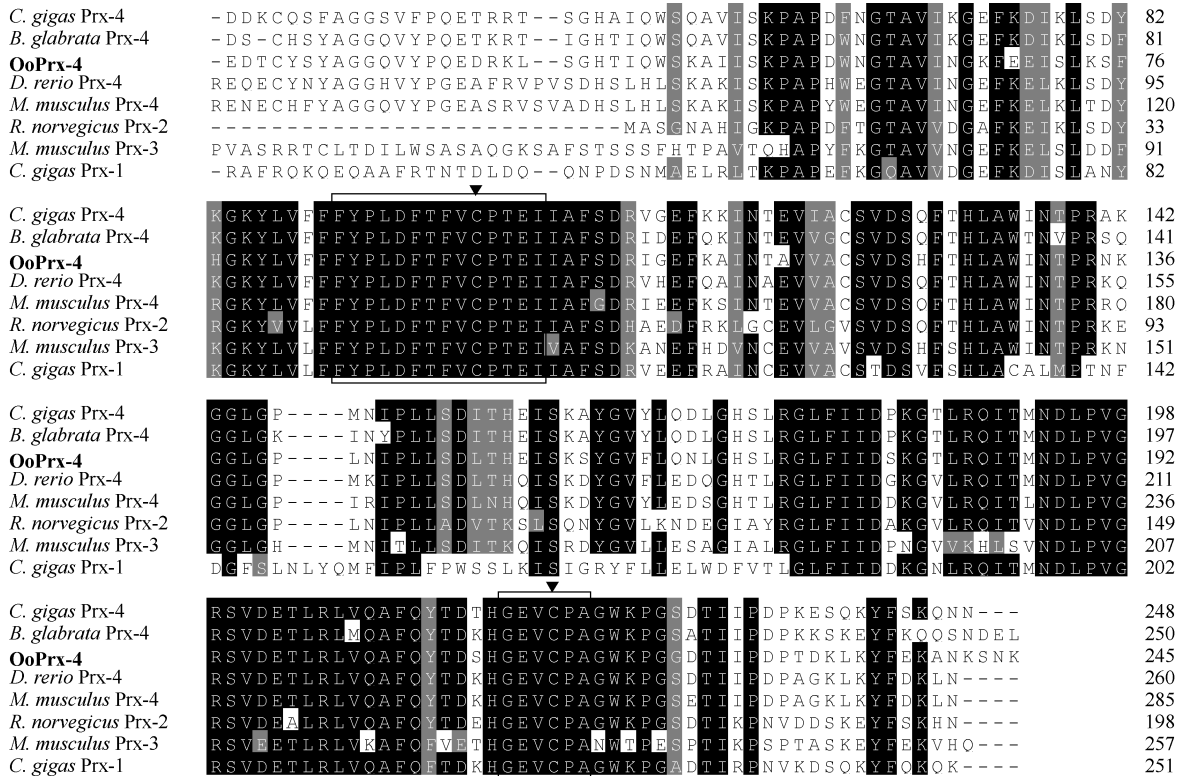


图 2 OoPrx-4 与其它物种 Prxs 的多序列比对结果

Fig.2 Multi sequence alignment of OoPrx-4 with Prxs from other species

注: 包括长牡蛎(*C. gigas* Prx-1: EKC32047; Prx-4: EKC37672)、褐家鼠(*R. norvegicus* Prx-2: NP_058865)、鼠(*M. musculus* Prx-3: AAH05626; Prx-4: EDL40843)、斑马鱼(*D. rerio* Prx-4: AAI34157)和光滑双脐螺(*B. glabrata* Prx-4: ACI42882)。保守氨基酸残基至少 80%相同的标记为黑色阴影, 相似的为灰色阴影。过氧化物还原酶基因特征保守区域(FYPLDFTFVCPTEI 和 GEVCPA)以方框标出, 半胱氨酸(cys)残基以倒三角形标出

OoPrx-4 与长牡蛎 Prx-4 (EKC37672)和光滑双脐螺 Prx-4 precursor (ACI42880)高度相似, 其同源性分别为 78%和 73%。与已报道的 Prx-4 相同, 在 OoPrx-4 基因序列的 N-端和 C-端各有一个保守的 cys 残基, 并在 N-端存在分泌信号肽, 这是 Prx 家族中 Prx-4 所特有的结构(Okado *et al*, 2000)。在多序列比对图和进化树中可以看出, Prx-4 序列都存在两个保守序列位点“FYPLDFTFVCPTEI”和“FYPLDFT”, 并与其它物种的典型 2-cys 过氧化物还原酶进化关系最为接近, 以上结果都说明 OoPrx-4 基因属于 2-cys Prx 家族。

Prx 家族的 6 个成员在组织表达和细胞定位上有所不同: Prx-1 和 Prx-2 主要定位在细胞质, 在多种组织中都有表达(岳海英等, 2007); Prx-3 和 Prx-5 在 N-端具有线粒体转位信号, 但 Prx-3 主要位于线粒体中, 先由内质网合成, 后经线粒体转位信号转移至线粒体(Chang *et al*, 2004; Yamamoto *et al*, 1989), 而在 Prx-5 的 C-端还具有过氧化物酶体定位信号, 存在于

细胞质、过氧化物酶体和线粒体中; Prx-6 只有一个半胱氨酸残基, 是双功能蛋白, 存在于细胞质中; 在 Prx-4 的 N-端具有分泌信号, 该蛋白在内质网合成后转运至细胞外, 具有结合肝素的能力(章波等, 2004; Okado *et al*, 2000)。实时荧光定量 PCR 检测 OoPrx-4 基因 mRNA 在各个组织中的表达量, 其中以肝胰腺中的表达量最高, 可能与 Prx-4 的肝素结合能力相关, 也暗示了肝胰腺可能是机体重要的抗氧化器官。

Prx 表达量是可被过氧化物诱导的, 例如当酵母菌暴露于 H₂O₂ 环境中时, 细胞质内的 Prx-1 表达量明显升高(Demasi *et al*, 2001)。对于中国明对虾 Prx 的研究发现, 在中国明对虾在受到鳃弧菌刺激后, 血细胞及肝胰腺中的 Prx 表达量都出现了明显上升的现象(Zhang *et al*, 2007)。经过实时荧光定量 PCR 对鳃弧菌刺激后血细胞中 OoPrx-4 的表达情况显示, 在血细胞中, OoPrx-4 基因的 mRNA 呈现先上升, 后平稳, 又上升的过程, 与中国明对虾的 Prx 在菌刺激后的表达

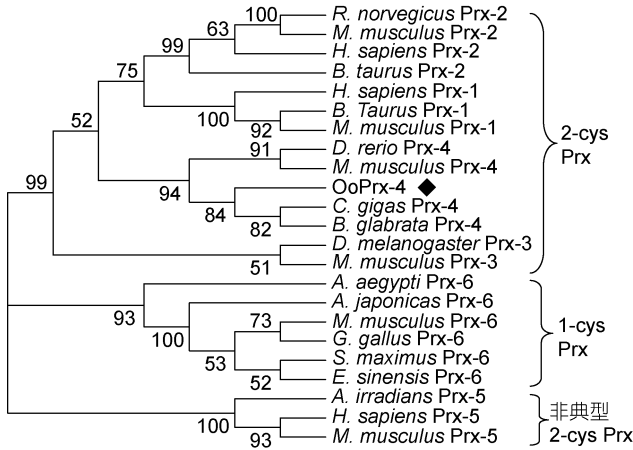


图3 OoPrx-4 与其它物种 Prxs 的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of OoPrx-4 with Prxs from other species
 注: 包括长牡蛎(*C. gigas* Prx-1: EKC32047; Prx-4: EKC37672)、斑
 马鱼(*D. rerio* Prx-4: AAI34157)、鼠(*M. musculus* Prx-1: CAM16508;
 Prx-2: AAH86783; Prx-3: AAH05626; Prx-4: EDL40843;
 Prx-5: AAG13450; Prx-6: AAP21829)、埃及按蚊(*A. aegypti*
 Prx-6: XP_001661250)、海湾扇贝(*A. irradians* Prx-5: ADQ57291)、
 果蝇(*D. melanogaster* Prx-3: AAF55431)、刺参(*A. japonicas*
 Prx-6: AEG79718)、大菱鲆(*S. maximus* Prx-6: ADJ57694)、中华绒
 螯蟹(*E. sinensis* Prx-6: ACF35639)、光滑双脐螺(*B. glabrata*
 Prx-4: ACI42883)、鸡(*G. gallus* Prx-6: NP_001034418)、褐家鼠(*R.*
norvegicus Prx-2: NP_058865)、牛(*B. taurus* Prx-1: NP_776856;
 Prx-2: NP_777188)和人(*H. sapiens* Prx-1: CAG28580;
 Prx-2: CAG46588; Prx-5: CAG33484)

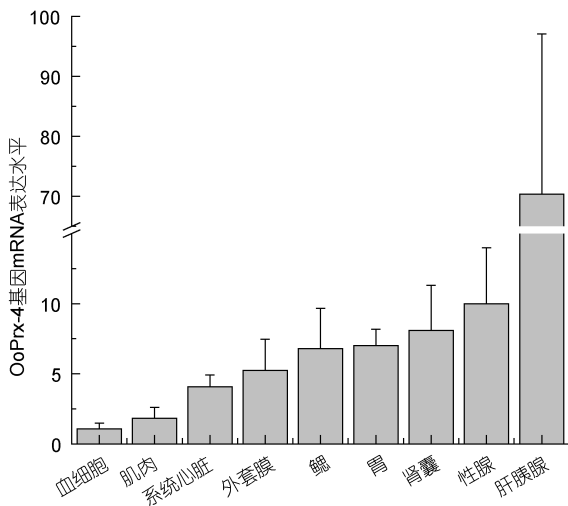


图4 OoPrx-4 基因 mRNA 在短蛸不同组织中的表达

Fig.4 OoPrx-4 mRNA expression in different tissues of *O. ocellatus*

规律相似(Zhang *et al*, 2007)。出现的两次上升过程表明, 在鳃弧菌刺激后的前 6h, Prx-4 可能参与了鳃弧菌刺激对短蛸引起的急性免疫反应; 在鳃弧菌侵染 48h 后 Prx-4 转录水平明显上升, 此时机体已经基本

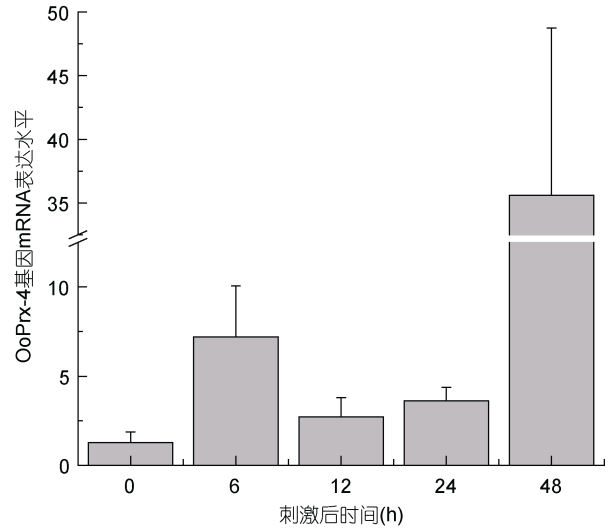


图5 鳃弧菌刺激后短蛸血细胞中 OoPrx-4 基因 mRNA 的表达量变化

Fig.5 Temporal expression of OoPrx-4 mRNA in *O. ocellatus* hemocytes after *L. anguillarum* challenge

完成对病原微生物的清除, 合成的 Prx 主要是用来清除机体在抵御鳃弧菌胁迫过程中形成的过量 ROS, 以减少过多的过氧化物对机体的损害, 并维持体内正常的 Prx 水平。

参 考 文 献

张伟伟, 雷晓凌, 2006. 短蛸不同组织的营养成分分析与评价. 湛江海洋大学学报, 26(4): 91—93
 岳海英, 黎丹戎, 李 媛, 2007. Peroxiredoxin 研究进展. 医学研究杂志, 36(2): 101—102
 章 波, 向渝梅, 白 云, 2004. 抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 家族研究进展. 生理科学进展, 35(4): 352—354
 董正之, 1988. 中国动物志: 软体动物门 头足纲. 北京: 科学出版社, 174—176
 Aguirre J, Momberg M R, Hewitt D *et al*, 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. Trends in Microbiology, 13(3): 111—118
 Chamilani N, Mahanama D Z, Ilson W *et al*, 2009. Molecular cloning, characterization and expression analysis of Peroxiredoxin 6 from disk abalone *Haliotis discus discus* and the antioxidant activity of its recombinant protein. Fish & Shellfish Immunology, 27: 239—249
 Chang T S, Cho C S, Park S *et al*, 2004. Peroxiredoxin , a mitochondrion-specific peroxidase, regulate apoptotic signaling by mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 279: 41975—41984
 Chen P, Li J T, Gao B Q *et al*, 2011. cDNA cloning and characterization of peroxiredoxin gene from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Aquaculture, 322—323: 10—15
 Dayer R, Fischer B B, Eggen R I *et al*, 2008. The peroxiredoxin

- and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179: 41—57
- Demasi A P D, Pereira G A G, Netto L E S, 2001. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS Letters*, 509: 430—434
- Elise D, Arnaud T, Dario M, 2007. Peroxiredoxin 6 gene: A new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 84: 389—398
- Elsayed N M, 2001. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition*, 17(10): 828—834
- Kong P F, Wang L L, Zhang H *et al*, 2010. Two novel secreted ferritins involved in immune defense of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4): 604—612
- Mu C K, Zhao J M, Wang L L *et al*, 2009. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin 6 from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 821—827
- Okado M A, Matsumoto A, Fujii J *et al*, 2000. Peroxiredoxin IV is a secret-able protein with heparin-binding properties under reduced conditions. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 127(3): 493—501
- Saleem A, Mohammad G M, Belinda F *et al*, 2008. *In vitro* effects of noradrenaline on Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 151: 691—697
- Wang Y, Feistein S I, Manevich Y *et al*, 2006. Peroxiredoxin 6 gene-targeted mice show increase lung injury with paraquat-induced oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8: 229—237
- Wei X M, Liu X Q, Yang J M *et al*, 2012a. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 132—140
- Wei X M, Yang J M, Yang D L *et al*, 2012b. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 178—185
- Wood Z A, Poole L B, Karplus P A, 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 300: 650—653
- Yamamoto T, Matsui Y, Natori S *et al*, 1989. Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. *Gene*, 80: 337—343
- Zhang Q L, Li F H, Zhang J Q *et al*, 2007. Molecular cloning, expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein. *Molecular Immunology*, 44: 3501—3509

CLONING OF A PEROXIREDOXIN (OoPrx-4) GENE FROM *OCTOPUS OCELLATUS* AND ANALYSIS OF ITS TRANSCRIPTIONAL REGULATION AGAINST *LISTONELLA ANGUILLARUM*

XU Jie^{1,2}, WEI Xiu-Mei², WANG Wei-Jun², YANG Jian-Min²,
LIU Xiang-Quan², YANG Ding-Long^{1,2}, CHEN Jian-Qiang²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai, 264006)

Abstract The full-length cDNA encoding peroxiredoxin-4 (designated as OoPrx-4) was cloned from *Octopus ocellatus*. The full-length cDNA was 934bp, containing a 19bp 5' untranslated region (UTR), a 177 bp 3'UTR with a poly (A) tail, and a 738 bp open reading frame (ORF) of encoding a polypeptide of 245 amino acids. The predicted molecular mass of the amino acid is 27.1kDa with an estimated pI of 6.65. The expression patterns of OoPrx-4, in both normal and *Listonella anguillarum*-challenged tissues were then characterized by Real-Time PCR (RT-PCR). OoPrx-4 was found expressed in many tissues, including hemocyte, muscle, systemic heart, gill, stomach, saccus renalis, gonad, mantle, and hepatopancreas, and especially, it was highly expressed in hepatopancreas. The mRNA expression of OoPrx-4 in hemocytes was significantly up-regulated ($P<0.01$) at 6h and 48h post challenge. The results indicate that OoPrx-4 played an important role in scavenging ROS generated during *L. anguillarum* invasion.

Key words *Octopus ocellatus*; peroxiredoxin-4; Real-time PCR; *Listonella anguillarum*