

短蛸(*Octopus ocellatus*)酪氨酸蛋白激酶基因的克隆及其 mRNA 在细菌刺激后的表达规律*

张冉冉^{1,2} 韦秀梅² 杨建敏² 王卫军² 刘相全² 冯艳微²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 从前期构建的短蛸(*Octopus ocellatus*)cDNA 文库中克隆获得了一个短蛸酪氨酸蛋白激酶(OoBtk)基因的 cDNA 全长, 其 cDNA 全长 1191 bp, 包括 5'非编码区(UTR)259 bp, 3'UTR 227 bp, 开放阅读框(ORF)705 bp, 编码 234 个氨基酸, 预测理论等电点为 8.50, 分子量为 27.7 kDa。运用实时荧光定量 PCR 法分析了在健康短蛸的不同组织以及鳗弧菌和藤黄微球菌刺激后血细胞中 OoBtk 的表达规律, 结果表明: OoBtk 在肌肉、外套膜、鳃、鳃心、系统心脏、肝胰脏、肾囊、胃、性腺和血细胞等各检测组织中均有表达, 其中在肝胰脏的表达量最高; 短蛸经鳗弧菌和藤黄微球菌刺激后, OoBtk 在血细胞中的表达量呈现出了明显的被诱导表达趋势, 在鳗弧菌和藤黄微球菌刺激后 6 h 表达即增强, 并分别在鳗弧菌刺激后 48 h 和藤黄微球菌刺激后 12 h 达到最高。OoBtk 参与短蛸对于鳗弧菌和藤黄微球菌刺激的应答过程。

关键词 短蛸; 酪氨酸蛋白激酶; 实时荧光定量 PCR; 藤黄微球菌; 鳗弧菌

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20140900240

蛋白质可逆磷酸化是细胞内生物信号转导的基本方式, 磷酸化过程在多种蛋白激酶的催化作用下进行, 其中, 酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)是一类主要的蛋白激酶(曹川, 2008)。TPK 催化腺苷三磷酸(ATP)的 γ -磷酸基, 使其转移至靶蛋白酪氨酸(Tyr)酚残基上, 形成 P-O 键, 从而催化多种底物蛋白酪氨酸残基磷酸化。活化的 TPK 通过蛋白质磷酸化的级联反应来调节细胞代谢, 参与细胞生长、增殖、分化和恶变等有关的生理生化过程。根据 TPK 是否存在细胞膜受体, 可将其分为受体型和非受体型: 受体型 TPK 位于细胞膜上; 非受体型 TPK 存在于胞质和胞内颗粒中, 不具备和配体结合的能力, 按其同源性分为 Src、Tec、Jak 等 11 个家族。Bruton's agammaglobulinaemia tyrosine kinase (Btk)属于非受体酪氨酸激酶 Tec 家族的成员。

Btk 发现于 1993 年(Vetrie *et al*, 1993), 最初被确定为 X 连锁无丙种球蛋白血症的致病基因。Btk 包含五个结构域: PH 结构域(Pleckstrin homology domain)、TH 结构域(Tee homology domain)、SH3 结构域(Srchomology 3 domain)、SH2 结构域(Srchomology 2 domain)和催化结构域(Tyrosine kinase domain)。PH 结构域是 Btk 激酶家族所特有的, 可识别并结合膜磷脂的代谢产物磷脂肌醇三磷酸, 以此将 Btk 结合到细胞膜上, 从而参与胞外刺激引发的信号转导(DiNitto *et al*, 2006; Glassford *et al*, 2003)。SH3 结构域能特异性识别富含脯氨酸序列的蛋白质。Btk 可以活化下游信号通路, 参与 Toll 样受体介导的信号通路和其它多种信号通路, 对细胞的增殖、分化和凋亡具有十分重要的作用(赵静, 2010)。

目前已有对于大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) (王

* 国家自然科学基金项目, 31272643 号, 31302215 号; 山东省自然科学基金项目, ZR2013CQ030 号; 烟台市科技发展计划项目, 20111068 号; 水生动物营养与饲料“泰山学者”岗位资助。张冉冉, 硕士研究生, E-mail: zrr5723@163.com

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

收稿日期: 2014-09-10, 收修改稿日期: 2014-10-28

贤丽等, 2009)、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Øvergård *et al.*, 2010)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) (吴小凤等, 2012)、日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*) (芦静, 2010)、斑马鱼(*Danio rerio*) (Haire *et al.*, 1998)等海洋脊椎动物 TPK 的研究。而有关海洋无脊椎动物 TPK 的研究较少, 目前仅见多孔动物居蟹皮海绵(*Suberites domuncula*) (Cetkovic *et al.*, 2004)、棘皮动物海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) (Lapraz *et al.*, 2006)、软体动物长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Gricourt *et al.*, 2003)、扁形动物日本血吸虫(*Lethenteron japonicum*) (Wu *et al.*, 2012)等 TPK 的研究报道, 且上述已报道的 TPK 中, 仅有日本七鳃鳗、居蟹皮海绵、日本血吸虫的 TPK 属于 Btk 型, 对短蛸(*Octopus ocellatus*) Btk 的研究未见有报道。短蛸隶属于软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda), 肉质嫩, 味鲜美, 营养丰富, 药用价值高, 是我国北部沿海地区头足类中最重要的经济种类之一(董正之, 1988; 张伟伟等, 2006)。本研究将短蛸作为实验动物, 以分子克隆的方法从前期构建的短蛸 cDNA 文库中克隆获得了酪氨酸蛋白激酶(OoBtk)基因序列, 对 OoBtk 的序列结构和系统进化进行了分析, 并运用实时荧光定量 PCR 法检测了健康短蛸各组织和细菌刺激后血细胞中 OoBtk mRNA 的表达规律, 旨在分析 OoBtk 在短蛸抵御细菌入侵过程中发挥的作用, 了解短蛸对于细菌入侵的免疫应答机制。

1 材料与方法

1.1 OoBtk cDNA 全长的克隆

从前期研究已构建的短蛸 cDNA 文库中筛选获得了一个 Btk 基因的 EST 序列, 提取其对应的质粒并转化入 Trans 5 感受态细胞中, 用含有氨苄的培养基筛选单菌落阳性克隆, 利用 pDONRTM222 载体的两个通用引物(正向引物 M13F: 5'-GTAAAA CGACGGCC AG-3'和反向引物 M13R: 5'-CAGGA AACAGCTATGACC-3')进行筛选, 然后对其产物进行测序, 通过拼接获得了 OoBtk 基因的 cDNA 全长。

1.2 OoBtk 的序列分析

对 OoBtk 序列进行生物信息学分析: 利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 进行氨基酸序列同源性比对; 采用 <http://www.expasy.org/> 分析蛋白质性质; 采用 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 预测氨基酸结构; 以 Clustal X1.83 和 Mega 4.1 进行多序列比对和系统进化树构建, 以邻位相连法(Neighbor-joining)进行计

算(Wei *et al.*, 2012)。

1.3 短蛸组织中 RNA 的提取和 cDNA 模板的合成

实验所用短蛸体长 15 cm 左右, 体重 35g 左右, 购自山东省烟台市, 在水温为 20°C 的海水中暂养一周。随机取 6 只短蛸, 将提前预冷的抗凝剂(0.1 mol/L 葡萄糖, 13 mmol/L 柠檬酸, 15 mmol/L 柠檬酸钠, 0.45 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, pH 7.0) 吸入注射器中(Saleem *et al.*, 2008), 抽取等体积短蛸血淋巴, 将其在 4°C、4000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清获得血细胞。取腕部肌肉后, 沿胴部腹中线剪开, 取外套膜、鳃、肾囊、鳃心、系统心、胃、肝胰脏和性腺。按照 TRIzol Reagent (Invitrogen)试剂盒的说明对各组织分别提取总 RNA, 再用 DNase (Promega)降解 DNA 后, 采用 M-MLV RT (Promega)以引物 2 × oligo dT (GGCCACGCGTCGACTAGTACT17)经反转录获得 cDNA 模板, 存入-80°C 超低温冰箱备用(Wei *et al.*, 2012)。

1.4 健康短蛸不同组织中 OoBtk 基因 mRNA 的表达分析

根据 OoBtk 基因序列采用 Primer Premier 5.0 软件, 设计特异性引物 OoBtk-F: 5'-ATAAAGTCCCA CCCGCCA-3'和 OoBtk-R: 5'-TTCTCCCCTCGTTTG TTCTTGC-3'; RT-PCR 的内参基因选用 β -Actin 基因, 其引物序列为 AF: 5'-GATGATGAAGTCGCTGCT CTCG-3'和 AR: 5'-TCCCAGTTGGTAACAATACCG TGT-3'。将 cDNA 模板进行稀释, 使其终浓度约 60ng/μL。使用实时荧光定量 PCR 仪 Mastercycler ep realplex (Eppendorf)进行扩增。反应体系如下: 2 × SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μL、cDNA 2.5 μL、正反引物各 1 μL 和 PCR 水 8 μL。反应程序为: 50°C 2 min, 95°C 10 min; 94°C 30 s, 58°C 60 s, 35 个循环, 检测溶解曲线。OoBtk 基因 mRNA 的相对表达量以 2^{-CT} 法计算, 结果显著性分析用 *t* 检验进行: $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

1.5 细菌刺激后短蛸血细胞中 OoBtk 基因 mRNA 的表达规律分析

以 2216E 液体培养基在 28°C 条件下对鳃弧菌(*Listonella anguillarum*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)进行过夜培养, 常温下 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清收集菌体, 以海水将其重悬。将鳃弧菌和藤黄微球菌分别加入到实验组短蛸养殖水体中, 保证海水中细菌终浓度均为 1×10^7 CFU/mL (李凌, 2009;

Kong *et al.*, 2010)。空白对照为未作任何处理的健康短蛸。每组分别在刺激后 6、12、24、48 h 随机取 6 只短蛸, 用注射器抽取血淋巴, 在 4°C 下 4000 r/min 条件下离心 5min, 弃上清获得血细胞, 以 1mL TRIzol Reagent (Invitrogen) 将其重悬。经提取总 RNA 反转录获得 cDNA 模板后, 运用实时荧光定量 PCR 来检测经细菌刺激后 OoBtk 的表达规律。采用 *t* 检验对实验数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 OoBtk 的 cDNA 全长及其氨基酸序列特征

OoBtk 基因(GenBank 登录号: KM066123)的 cDNA 全长为 1191bp, 5'和 3'非编码区(UTR)分别为 259 和 227 bp, 3'UTR 区域包含腺苷酸 Poly(A)尾巴,

开放阅读框(ORF)为 705 bp, 共编码 234 个氨基酸的蛋白(图 1)。经预测其分子量为 27.67 kDa, 理论等电点为 8.50。利用 SMART 软件预测发现 OoBtk 因编码的氨基酸序列中 8(E)—118(K)为 PH 结构域, 119(N)—157(E)为 BTK 基序, 183(K)—232(P)为 SH3 结构域。

2.2 OoBtk 的多序列比对和系统进化分析

同源性分析显示 OoBtk 的氨基酸序列与海兔子(*Aplysia californica* XP_005111038.1)的 Btk 相似度最高, 同源性为 42%。OoBtk 编码的氨基酸与斑马鱼、罗非鱼、鸽子、美国短吻鳄、人、鼠、非洲爪蟾和海兔子 8 个物种的 Btk 氨基酸序列进行比对, 结果显示 OoBtk 氨基酸序列中含有 PH 结构域、BTK 基序和 SH3 结构域, 该区域在这 9 种 Btk 氨基酸高度保守(图 2)。

```

1  AGCGACAGGACATCGTTACTTCTTCTTGGATTGTTGTTAGTGTGATTATACGTGCTTTCTTCAAATTTTTCTT
76  TATCTTCTGTCCCTTAAGTGACTTTATACAACCAGAAAGAATCTTTTCATAACCCAGTTGCCTCCTCGAGCTGTG
151 AAGAGGCTACAGTACGAGTTTTAAATGGAGTCTTCTTGGAGTAAAACCAAATTAACAATTTAAAGGAGATAA
1      M S Q H N N C E L L C D F M
226 TCCAAGCTTGTCTGATGTTGTCCTTGGTCCCAACATGTCACAGCATAACAATGTGAGTTACTCTGTGATTTTCAT
15  K K R S Q N K K T I T R Q C Y K N R W F V I D S N
301 GAAGAAACGCTCTCAAACAAGACCATTACCAGACAATGCTACAAGAACCGGTGGTTTGTGATTGACAGCAA
40  F L S Y Y D G T P M K R G T K K G A I S L E K I H
376 TTTTCTGTCGTACTACGATGGTACTCCAATGAAAAGGGGTACCAAGAAGGGTGAATAAGTTTGAAAAAATTC
65  V V E E V E N L S L D Q L I N V L Q I V Y E E Y G
451 TGTGTTGAAGAAGTGGAGAACCTTTCTTTGGACCAGCTTATAAATGTCTCCAGATTGTGTATGAAGAATATGG
90  E C Y T L Y I V A D T S K Q R E T W I S T I R H E
526 AGAATGTTACAGTGTATATTGTTGCGGATACCAGCAAACAGCGAGAAACCTGGATATCTACTATACGACATGA
115  C L K K N A S F Y L K Y H P G V W T K S L K K Y K
601 ATGCTGAAGAAAATGCCAGTTTCTACCTGAAATACCATCCTGGGGTATGGACAAAAGCTTAAAGAAGTACAA
140  C C D Q I D R N A P G C K L S F I E R H D E V P A
676 ATGCTGTGACCAGATTGACCGCAATGCTCCAGGATGCAAAGTCTTTTCATTGAGAGACATGATGAAGTTCCTGC
165  R L N K V P T R H P D V S E S S N E K I Y V A I Y
751 TCGCTTGAATAAAGTTCCACCCGCCACCCAGATGTGAGTGAATCAAGTAACGAGAAGATATACGTTGCTATCTA
190  D Y S P Y D K Q D L Q L T T G E R Y E I L N D S N
826 TGACTACTCACCGTACGATAAACAAGATCTCCAAGTACCACAGGAGAGCGCTATGAAATACTTAATGACTCCAA
215  E H W W L A R T N E G R K A T F H P T M *
901 CGAGCACTGGTGGCTTGCAAGAACAACGAGGGGAGAAAGGCTACATCCATCCAACTATGTGAAAGAAATTTGTGT
976 GATCTGGAAATATTTGATGTTGTTATTATAAAGACATCACTCGACAATATTTGTGAGATGCTGTTGAAGAAGGATGTT
1051 CGTGATGGCTGTTTCATGGTGGGATTCACAACGAAAGGAAATGTCTACACAATCTCTGTTTATTGTTAAAGAG
1126 TAAGTACCTCAAACAACCTCCAGTAAATGAGTCTCAATTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 OoBtk 的核苷酸及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of OoBtk
图中阴影部分为 PH 结构域和 SH3 结构域, 方框内为 BTK 基序, 粗体表示起始密码子和终止密码子

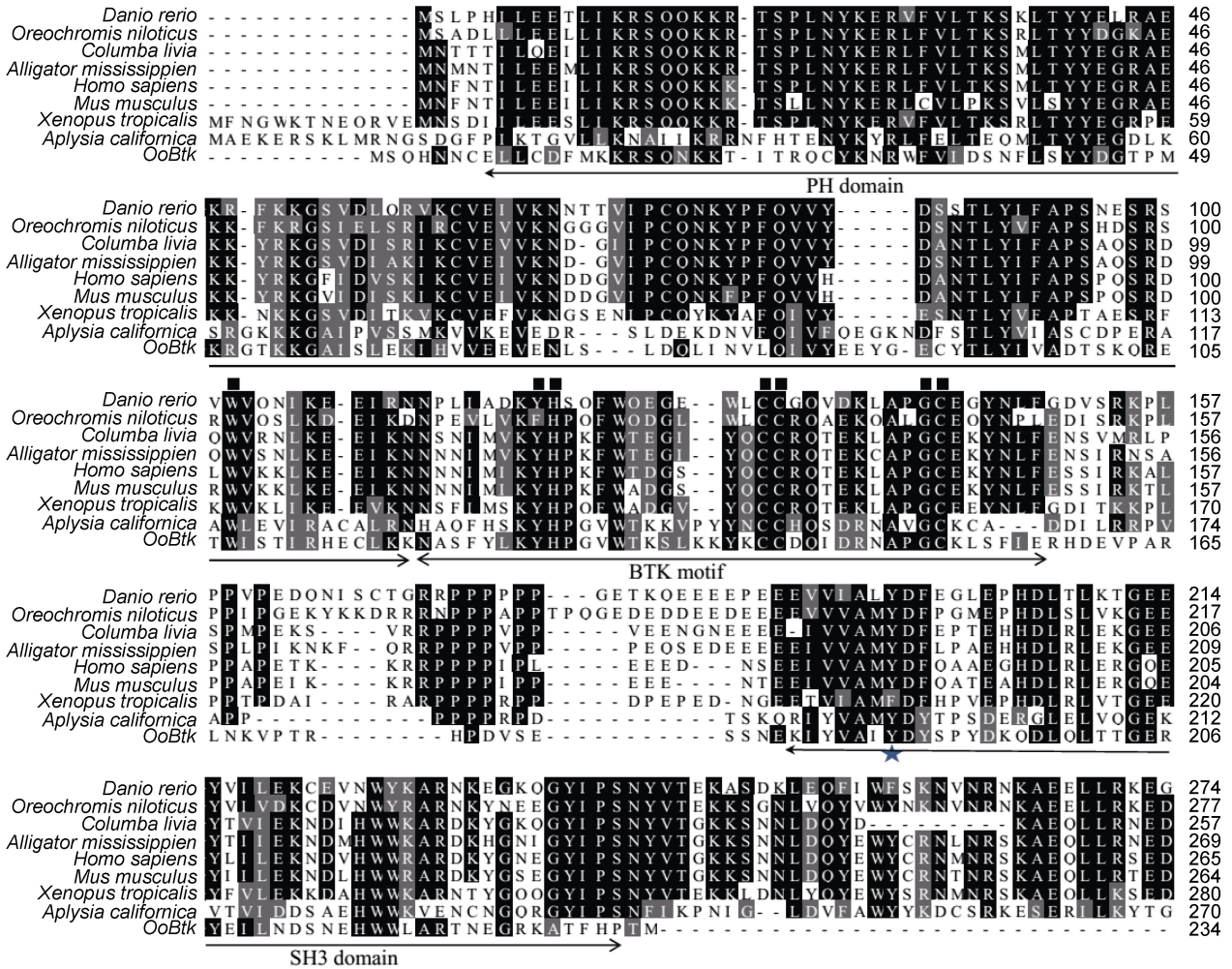


图2 OoBtk与其它8个物种Btk的多序列比对结果

Fig.2 The multiple sequence alignment of OoBtk with Btk from other 8 species *Danio rerio* (NP_001108215.1), *Oreochromis niloticus* (XP_003456492.1), *Alligator mississippiensis* (XP_006276388.1), *Homo sapiens* (NP_003206.2), *Mus musculus* (NP_001106931.1), *Aplysia californica* (XP_005111038.1), *Columba livia* (EMC82927.1), *Xenopus tropicalis* (XP_002933505.2). 黑色阴影表示相同的氨基酸, 灰色阴影表示60%相似度。图中下划线分别是OoBtk的PH结构域、BTK基序和SH3结构域。星号位置(Y)表示酪氨酸磷酸化位点。表示保守氨基酸

根据 OoBtk 和海兔子、长牡蛎、赤拟谷盗、豌豆蚜、罗非鱼、斑马鱼、安乐蜥、蚤状蚤、美国短吻鳄、海龟、鼠和人的 Btk 共 13 种 Btk 氨基酸序列, 以 Mega4.1 软件采用邻位相连法法构建 OoBtk 的系统进化树。结果表明: 这 13 种 Btk 主要分成脊椎动物和无脊椎动物两大分支; OoBtk 先与软体动物海兔子、长牡蛎的 Btk 聚群, 然后与赤拟谷盗、蚤状蚤和豌豆蚜等节肢动物的 Btk 一起聚群于无脊椎动物分支(图 3)。

2.3 健康短蛸不同组织中 OoBtk 基因 mRNA 的表达规律

运用实时荧光定量 PCR 方法检测了 OoBtk 在健康短蛸不同组织中的表达规律, 结果显示: OoBtk 在

所有被检测的组织中均有表达, 其中在肝胰脏中表达量最高, 为血细胞中表达量的 188 倍; 在鳃心、胃、性腺和肾囊的表达量较高, 在系统心、肌肉、外套膜、鳃和血细胞中的表达量较低(图 4)。

2.4 细菌刺激后短蛸血细胞中 OoBtk 基因 mRNA 的表达规律

运用实时荧光定量 PCR 方法检测了鳃弧菌和藤黄微球菌刺激后 OoBtk 在短蛸血细胞中的表达规律, 结果显示: 在鳃弧菌刺激 6 h 后, OoBtk 基因的表达量明显上升, 为空白对照组的 11.83 倍($P < 0.01$); 在 12 h 小幅下降后, 24 h 显著上升为空白对照组的 30.26 倍($P < 0.01$), 随后在 48 h 达到刺激后表达量的最高值, 为空白对照的 36.07 倍($P < 0.01$)(图 5)。在藤黄微球菌

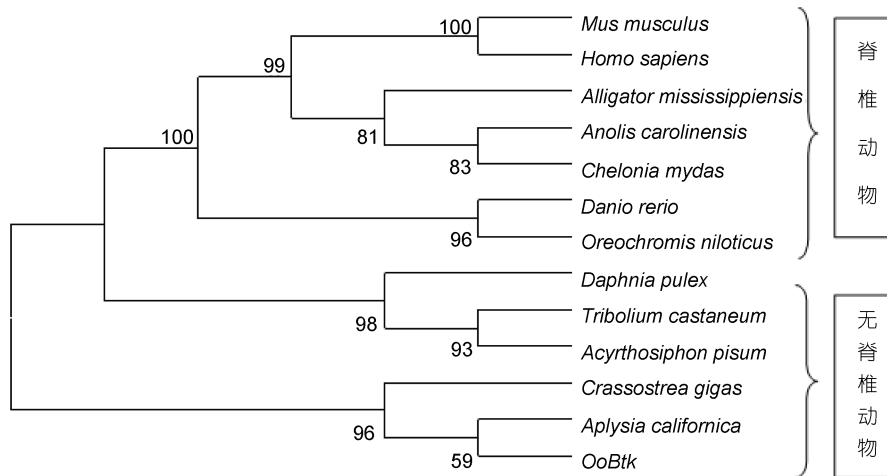


图3 OoBtk与其它12个物种Btk的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed of OoBtk with Btk from other 12 species

Aplysia californica (XP_005111038.1), *Anolis carolinensis* (XP_008115817.1), *Homo sapiens* (NP_003206.2), *Mus musculus* (NP_001106931.1), *Danio rerio* (NP_001108215.1), *Oreochromis niloticus* (XP_003456492.1), *Tribolium castaneum* (XP008191687.1), *Crassostrea gigas* (EKC33678.1), *Chelonia mydas* (XP_007071088.1), *Alligator mississippiensis* (XP_006276388.1), *Acyrthosiphon pisum* (XP_001945897.2), *Daphnia pulex* (EFX89558.1)

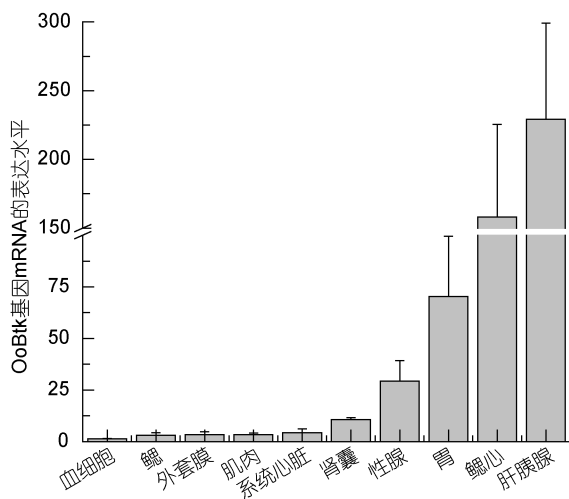


图4 OoBtk的mRNA在短蛸不同组织中的表达水平
Fig.4 The mRNA expression level of OoBtk in different tissues of *O. ocellatus*

刺激6 h后, OoBtk表达量小幅上升, 在12 h达到最高, 为空白对照组的77.63倍($P < 0.01$); 24 h显著下降后, 48 h再次升高, 为空白对照组的49.06倍($P < 0.01$)(图6)。

3 讨论

Btk参与生物体内多种信号通路, 活化下游信号通路; 并参与Toll样受体介导的信号通路, 对于细胞的增殖、分化和凋亡具有十分重要的作用。作为非受体型TPK, Btk的作用机制为: 当细胞因子与其受体结合后, 受体分子发生二聚化或寡聚化, 导致与其

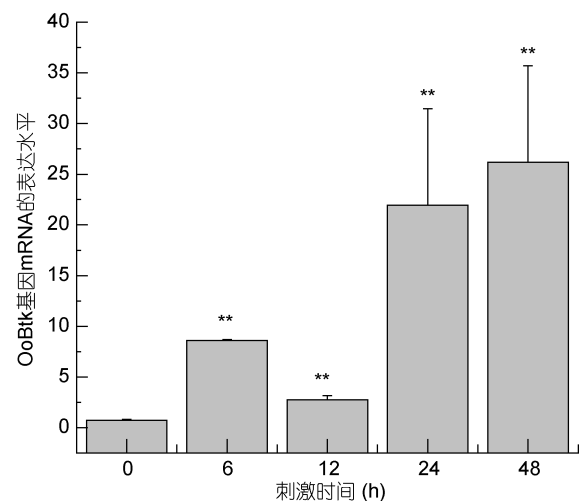


图5 鳃弧菌刺激后OoBtk基因的mRNA在短蛸血细胞中的表达水平

Fig.5 The mRNA expression level of OoBtk in *O. ocellatus* hemocytes after *L. anguillarum* challenge

偶联的非受体型TPK相互靠近, 由交互的酪氨酸残基的磷酸化作用而激活, 使得相应的信号转导途径发生级联磷酸化, 并最终导致基因的上调表达(赵静, 2010)。

本研究从短蛸cDNA文库中获得一个酪氨酸蛋白激酶基因, 并克隆获得了其cDNA全长。经SMART软件分析预测, 该基因编码的氨基酸序列中包含N末端的PH结构域、BTK基序和SH3结构域, 其中PH结构域和BTK基序为非受体型TPK中Tec家族中Btk基因的特征性结构(Vihinen *et al*, 1994)。PH结

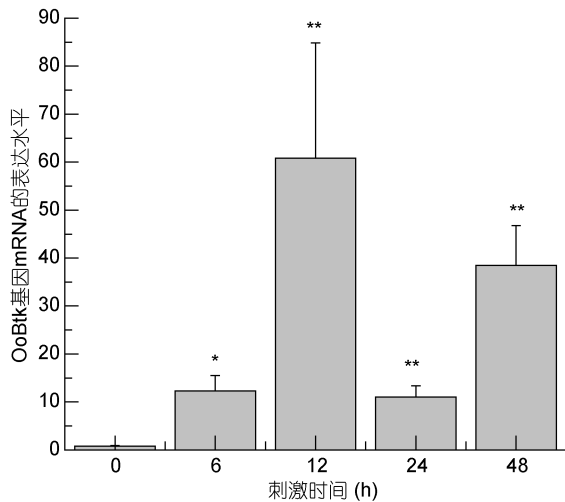


图 6 藤黄微球菌刺激后 OoBtk 基因的 mRNA 在短蛸血细胞中的表达水平

Fig.6 The mRNA expression level of OoBtk in *O. ocellatus* hemocytes after *M. luteus* challenge

构域通过识别并结合膜磷脂的代谢产物磷脂肌醇三磷酸, 将 TPk 募集到细胞膜上, 从而参与胞外刺激引发的信号转导(DiNitto *et al.*, 2006); BTK 基序为 TH 结构域的重要组成部分; 而 SH3 结构域通过与 Syk/ZAP70 等分子发生相互作用来参与下游磷脂肌醇信号途径的激活(Qiu *et al.*, 2000; Krstufek *et al.*, 2007)。

通过多序列比对和系统进化分析发现, OoBtk 在序列结构上相对保守, 与其它物种的 Btk 类似, 都具有 PH 结构域、TH 结构域和 SH3 结构域。Btk 基因独有的 PH 结构域有保守的氨基酸 W。TH 结构域部分包括 BTK 基序, 此处的保守氨基酸包括 YH、CC、GC。半胱氨酸残基能够通过二硫键形成胱氨酸, 有增强细胞氧化还原功能, 使肝胰脏功能旺盛, 并能中和毒素, 可阻止病原菌繁殖, 有助于抵御外来微生物。但是 TH 结构域处缺少脯氨酸富含区。在 SH3 结构域中有一个酪氨酸磷酸化位点(Y), 激酶结构域处缺乏一个磷酸化位点。OoBtk 在亲缘关系上与海兔子、长牡蛎最近, 聚首于软体动物门, 再与节肢动物聚首于无脊椎动物门, 最后与脊椎动物相聚首。以上结果证明 OoBtk 为 Btk 型 TPk。

TPk 广泛表达于动物多种组织中, 但不同亚家族的 TPk 基因在不同物种中的表达存在差异。在对海洋脊椎动物 TPk 的研究表明: 鳊鱼非受体型 TPk 的 JAK2 基因在性腺、肝脏、鳃、脑、脾、心脏、肠、后肾、前肾组织中都有表达, 但是在性腺中表达最高,

在肌肉中未见表达(Guo *et al.*, 2009); 而虹鳟非受体型 TPk 的 LCK 基因在胸腺中表达最高, 在脾脏、肾脏中微弱表达(Laing *et al.*, 2007)。草鱼 JAK2 基因在肝脏、肌肉、脑、心脏、脾脏等所有检测组织中均有表达, 尤其在肝脏组织中表达最高, 显著高于其它组织($P < 0.05$)(吴小凤等, 2012)。而对日本血吸虫的 Btk 基因的研究发现: Btk 基因在血细胞、肝脏、鳃、肾脏中均有表达, 肝脏中的表达量最高(Wu *et al.*, 2012)。本研究发现 OoBtk 具有组织分布广泛性, 并且在肝胰脏中表达量最高, 这可能与肝胰脏具有解毒功能相关。

在对于大菱鲂和日本血吸虫 TPk 的研究中发现, 当机体受到病原菌感染时, TPk 基因的表达量会呈现出明显的被诱导表达趋势。日本血吸虫的 Btk 在经过脂多糖(LPS)刺激后 Btk 血细胞中的表达量最高是对照组的 10 倍, 是刺激后肝脏中表达量的 3 倍(Wu *et al.*, 2012)。当鳊鱼感染大菱鲂脾脏组织后, 非受体型 TPk 的 LCK 基因的表达量出现了明显上升的现象(王贤丽等, 2009)。在本研究中短蛸在受到鳊鱼和藤黄微球菌刺激后, 血细胞中 OoBtk 的表达量也呈现出明显的被诱导表达趋势, 在刺激 6h 后表达量均显著上升, 鳊鱼刺激在 12 h 略有下降后, 在 24 h 时再次上升并在 48 h 时达到峰值; 在藤黄微球菌的刺激后, 在 12 h 时达到峰值。在 24 h 略有下降, 48 h 再次表达上调。在刺激前期出现的上调表达暗示 OoBtk 参与了短蛸的急性免疫反应, 在刺激后期的高表达则可能是在短蛸清除微生物后, 抵抗氧化反应对机体造成的损伤。虽然在鳊鱼和藤黄微球菌刺激后 OoBtk 表达量的变化的总趋势类似, 但是在达到峰值和维持高表达的时间及其相对表达量高低等方面存在差异, 表明 OoBtk 对革兰氏阴性菌和阳性菌的响应机理。OoBtk 在短蛸受到藤黄微球菌刺激后达到峰值的时间短, 表达量高, 说明 OoBtk 更容易被革兰氏阳性菌诱导, 且对革兰氏阳性菌刺激的应答更迅速。

参 考 文 献

- 王贤丽, 张玉喜, 孟亮等, 2009. 大菱鲂 T 淋巴细胞酪氨酸激酶(LCK)基因全长 cDNA 的克隆及表达分析. 中国水产科学, 16(5): 660—667
- 芦静, 2010. 日本七鳃鳗非受体酪氨酸激酶 BTK 的全长 cDNA 克隆和生物信息学分析. 大连: 辽宁师范大学硕士学位论文, 1—67
- 李凌, 2009. 栉孔扇贝抗鳊鱼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
- 吴小凤, 李小勤, 冷向军等, 2012. 草鱼 JAK2 基因片段序列的克隆及其组织表达分析. 上海海洋大学学报, 21(1): 21—27
- 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
- 赵 静, 2010. 日本七鳃鳗 Btk 的原核表达、抗体制备及相关免疫学研究. 大连: 辽宁师范大学硕士学位论文, 1—54
- 曹 川, 戴 霞, 李世荣, 2008. 受体酪氨酸蛋白激酶的研究. 医学综述, 14(12): 1780—1781
- 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
- Cetkovic H, Müller W E, Gamulin V, 2004. Bruton tyrosine kinase-like protein, BtkSD, is present in the marine sponge *Suberites domuncula*. Genomics, 83(4): 743—745
- DiNitto J P, Lambright D G, 2006. Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. Biochim Biophys Acta, 1761(8): 850—867
- Glassford J, Soeiro I, Skarell S M *et al*, 2003. BCR targets cyclin D via Btk and the p85 alpha subunit of PI3-K to induce cell cycle Progression in Primary mouse B cells. Oncogene, 22(15): 2248—2259
- Gricourt L, Bonnac G, Boujard D *et al*, 2003. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. General and Comparative Endocrinology, 134(1): 44—56
- Guo C J, Zhang Y F, Yang L S *et al*, 2009. The JAK and STAT family members of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: Molecular cloning, tissues distribution and immunobiological activity. Fish & Shellfish Immunology, 27(2): 349—359
- Haire R N, Strong S J, Litman G W, 1998. Tec-family non-receptor tyrosine kinase expressed in zebrafish kidney. Immunogenetics, 47(4): 336—337
- 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
- Krstufek D, Aspalter R M, Eibl M M *et al*, 2007. Characterization of novel Bruton's tyrosine kinase gene mutations in Central European patients with agammaglobulinemia. Mol Immunol, 44(7): 1639—1643
- Laing K J, Dutton S, Hansen J D, 2007. Molecular and biochemical analysis of rainbow trout LCK suggests a conserved mechanism for T-cell signaling in gnathostomes. Mol Immunol, 44: 2737—2748
- Lapraz F, Röttinger E, Duboc V *et al*, 2006. RTK and TGF-signaling path ways genes in the sea urchin genome. Developmental Biology, 300(1): 132—152
- Øvergård A C, Nerland A H, Patel S, 2010. Cloning, characterization, and expression pattern of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L) CD4-2, Lck, and ZAP-70. Fish & Shellfish Immunology, 29(6): 987—997
- Qiu Y, Kung H J, 2000. Signaling network of the Btk family kinases. Oncogene, 19(49): 5651—5661
- 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
- Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras *et al*, 1993. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. Nature, 361(6409): 226—233
- Vihinen M, Nilsson L, Smith C I, 1994. Tee homology (TH) adjacent to the PH domain. FEBS Letters, 350: 263—265
- Wei X M, Yang J M, Yang D L *et al*, 2012. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. Fish & Shellfish Immunology, 32: 178—185
- Wu F, Zhao J, Chen L *et al*, 2012. A novel BTK-like protein involved in immune response in *Lethenteron japonicum*. Immunology Letters, 146: 57—63

CLONING OF A TYROSINE PROTEIN KINASE GENE FROM *OCTOPUS OCELLATUS* AND THE EXPRESSION PATTERN AFTER BACTERIA STIMULATION

ZHANG Ran-Ran^{1,2}, WEI Xiu-Mei², YANG Jian-Min², WANG Wei-Jun²,
LIU Xiang-Quan², FENG Yan-Wei²

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

Abstract A full-length cDNA encoding OoBtk was cloned from the cDNA Library of *Octopus ocellatus* in this study. It was 1191 bp, containing a 5' untranslated region of 259 bp, a 3'UTR of 277 bp, and an open reading frame (ORF) of 705 bp encoding a polypeptide of 234 amino acids with an isoelectric point of 8.50 and predicted molecular weight of 27.7 kDa. The mRNA expression patterns of an OoBtk in tissues and haemocytes after *Listonella anguillarum* or *Micrococcus luteus* challenge were characterized by real-time PCR. The results show that OoBtk was widely expressed in muscle, mantle, gill, branchial heart, systemic heart, hepatopancreas, saccus renalis, stomach, gonad, and hemocyte, highest in hepatopancreas. The mRNA expression of OoBtk in hemocytes showed an obviously induced trend after *L. anguillarum* or *M. luteus* stimulation; it was significantly up-regulated at 6h post stimulation, and peaked at 48h or 12h post stimulation, respectively. Therefore, OoBtk in *O. ocellatus* is involved in the response against *L. anguillarum* or *M. luteus* challenge.

Key words *Octopus ocellatus*; tyrosine protein kinase; real-time PCR; *Listonella anguillarum*; *Micrococcus luteus*