

# 香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)水通道蛋白基因 AQP1 的克隆、分子特性和表达分析\*

万茜<sup>1,2,3</sup> 张扬<sup>1,2</sup> 张跃环<sup>1,2</sup> 喻子牛<sup>1,2</sup>①

(1. 中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室及广东省应用海洋生物重点实验室 广州 510301;  
2. 南海资源开发与保护协同创新中心 广州 510275; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 水通道蛋白 1 (Aquaporin1, AQP1) 是一类通过渗透梯度将水或一些小的中性分子快速穿过细胞膜的通道蛋白。通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了香港牡蛎 AQP1 基因全长, 并命名为 *ChAQP1* (GenBank 登录号: KJ704847)。该基因全长 1153bp, 开放阅读框长度为 888bp, 编码 295 个氨基酸残基。*ChAQP1* 基因包括 1 个保守的 MIP 结构域、6 个跨膜区、5 个连接环、2 个 NPA (Asn-Pro-Ala) 基序和选择性水孔构件 ar/R (aromatic/arginine)。系统学分析表明 *ChAQP1* 属于 AQP1-like 型水通道蛋白。mRNA 组织分布结果显示, *ChAQP1* 在各个组织中均有表达, 其中在闭壳肌和外套膜中表达量相对较高。利用实时定量 PCR 分析高、低盐胁迫下其在鳃中的表达模式, 结果表明, *ChAQP1* mRNA 表达量在低盐处理下基本没有太大变化; 在高盐胁迫下, 第 1 天 ( $P < 0.01$ )、第 3 天和第 5 天 ( $P < 0.05$ ) 显著下调; 这说明 *ChAQP1* 基因参与了香港牡蛎的渗透压平衡调节。

**关键词** 香港牡蛎; 水通道蛋白 1; 盐度; 实时定量 PCR

**中图分类号** Q95 doi: 10.11693/hyh20140400127

水通道蛋白 (Aquaporin, AQP) 是一类参与生命活动中水分子跨膜运输的调控蛋白, 属于主要内嵌蛋白超家族成员 (major intrinsic protein superfamily), 它主要介导水分由低渗区向高渗区的跨膜转运, 也能转运甘油、尿素、氨水等中性小分子。自从 Pretson 等 (1992) 发现了第一个水通道蛋白 1 (CHIP28) 以来, 研究人员已经发现水通道蛋白广泛分布于古菌、真菌和真核生物组成的三界系统中。水通道蛋白在脊椎动物和植物中已经有很多研究报道, 人类 13 种水通道蛋白 (从水通道蛋白 0 到 12) 已经被发现并且鉴定; 但是, 无脊椎动物水通道蛋白的研究相对较少, 并且主要集中在模式生物线虫、果蝇和昆虫中; 在软体动物中研究甚少 (Yang, 2000; Huang *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2008; Ishibashi *et al.*, 2011; Pieńkowska *et al.*, 2014)。水通道蛋白是一个多亚型的蛋白家族, 根据氨

基酸序列的同源性可以分为四种类型: 第一类为 AQP1-like 型 (包括 AQP0, 1, 2, 4, 5 和 6, 属于典型的传统 AQP, 只转运水分子), 第二类为 AQP3-like 型 (包括 AQP3, 7, 9 和 10, 属于水甘油通道蛋白, 除了水分子, 还可以转运甘油、尿素、氨水等中性小分子), 第三类为 AQP8-like 型 (只包括 AQP8 这一种传统水通道蛋白), 第四类为 AQP11-like 型 (包括 AQP11 和 12, 属于非传统 AQP) (Soto *et al.*, 2012)。所有的水通道蛋白都是以同源四聚体形式存在于细胞膜表面, 每个单体包括 6 个跨膜区段 (I—VI) 和 5 个环形结构 (loopA-E)。根据“砂漏”模型 (Agre *et al.*, 1993), B 环和 E 环从两侧半嵌入膜内形成一个开放式狭窄的水通道。保守的 NPA 基序 (Asn-Pro-Ala) 和选择性水孔构件 ar/R (aromatic/arginine, 芳香族/精氨酸区) 被认为是最主要的控制水或其它中性小分子渗透性的关键

\*广东省海洋与渔业局重点项目资助, A201501B03 号; 国家自然科学基金项目资助, 2010CB126404 号; NSFC-广东联合基金项目资助, U1201215 号。万茜, E-mail: wanqian.89@163.com

通讯作者: 喻子牛, 教授, 博导, E-mail: carlzyu@scsio.ac.cn

收稿日期: 2014-04-27, 收修改稿日期: 2014-08-19

区域(Eric *et al.*, 2006)。

香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)是我国华南沿海养殖的主要经济种, 主要分布在广东、广西等地, 年产量在 130 多万 t, 产值在 80—100 亿元(中国渔业年鉴, 2013)。香港牡蛎与其它牡蛎种类相比较, 其价值主要体现在体大肉肥、味道鲜美, 另外其市场价值远高于其它种类牡蛎, 深受广东、广西、港澳、东南亚一些国家消费者青睐(张跃环等, 2012)。作为河口区域典型牡蛎经济种(Lam *et al.*, 2003), 它对低盐有较强的抗性, 但对高盐仍具有一定的耐受性, 更适宜于栖息在河口咸淡水环境(谢忠明, 2003)。水通道蛋白作为促进水分子跨膜运输的重要蛋白, 参与渗透平衡的调节, 在盐度变化剧烈的环境中发挥重要作用。目前, 对编码牡蛎水通道蛋白的基因研究甚少, 且不清楚盐度胁迫下水通道蛋白基因的表达特性。因此, 本文采用 RACE 技术首次克隆了香港牡蛎水通道蛋白 1(AQP1)基因 cDNA 全长, 分析该基因编码蛋白序列特征、理化性质和空间结构, 通过实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在香港牡蛎中的组织分布及 7 天盐度胁迫下的表达情况, 旨在为进一步研究香港牡蛎的广盐适应机制提供分子理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料、盐度处理及取样

实验材料为壳高在 120mm 左右的 2 龄香港牡蛎, 采自广东省阳江市阳西县程村。在实验室 27°C, 盐度为 18 海水中暂养一周后, 选取健康香港牡蛎个体, 快速吸取出淋巴液, 离心(12000 r/min, 30s)后弃上清, 立即加入等量 TRIzol reagent (Invitrogen 公司)重悬沉淀, 继续提取 RNA 或者冻存于-80°C。另外, 取下小块外套膜、鳃、闭壳肌、消化腺和整个心脏, 加入 1mL TRIzol reagent, 匀浆, 继续提取 RNA 或者冻存于-80°C。

盐度处理时, 将 200 只健康牡蛎随机分为 4 组, 即 4 盐度组、18 盐度组、32 盐度组和 42 盐度组。由于香港牡蛎最适盐度范围为 10—20 (谢忠明, 2003), 所以本实验以 18 盐度组作为对照组。用 0.8%扁藻喂养, 并且每天换 3 次海水。处理开始后, 在时间节点 1 天(24h)、3 天(72h)、5 天(120h)和 7 天(168h)对四组分别随机挑取 5 个个体, 取出一小块鳃组织, 立即加入 TRIzol, 匀浆后冻存。

### 1.2 试剂与仪器

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、克隆载体 pMD<sup>TM</sup>19-T、

exTaq 酶、DNAMarker、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、DNA 片段纯化回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、逆转录试剂盒 PrimeScript II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit、用于定量实验的逆转录试剂盒 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 购于宝生物工程(大连)有限公司。TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司。RACE 试剂盒 BD SMART RACE cDNA Amplification kit 购于 Clontech 公司。实时定量试剂盒 2 $\times$ SYBR Green Master Mix 购于 Roche 公司。用罗氏的 LightCycler 480 II 仪器进行 Real-time PCR。引物合成和测序工作在北京六合华大进行。

### 1.3 香港牡蛎总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成

根据 TRIzol reagent (Invitrogen 公司)的产品说明操作提取淋巴及匀浆后的各个组织总 RNA, 用 Nanodrop 2000c (Thermo 公司)测定 RNA 的纯度和浓度, 并用电泳检测 RNA 质量。用 PrimeScript II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成, 反转录产物用于 PCR 扩增或者保存在-20°C。

### 1.4 香港牡蛎 AQP1 基因片段的 RT-PCR 扩增

根据在 NCBI 太平洋牡蛎 EST 数据库中获得的一段序列, 设计引物 *ChAQP1F1* 和 *ChAQP1R1* (表 1), 以混合各个组织 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。反应条件为: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 50°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 共 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收纯化目的片段。将纯化产物连接至 pMD19-T 质粒载体上, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 培养过夜, 挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对, 初步确定获得片段为香港牡蛎水通道蛋白 1 基因。

### 1.5 香港牡蛎 AQP1 末端序列的 RACE 扩增及全长序列的确定

根据上述克隆获得的片段序列, 设计用于 5'RACE 扩增的基因特异性引物 *ChAQP1R2* 和 *ChAQP1R3*, 用于 3'RACE 扩增的基因特异性引物 *ChAQP1F2* 和 *ChAQP1F3*(表 1)。按照 BD SMART RACE cDNA Amplification kit 试剂盒说明, 利用引物 GR5P/*ChAQP1R2* 和 GR3P/*ChAQP1F2* 进行 5'RACE 和 3'RACE 第一轮反应, 反应条件为: 94°C 3min; 94°C 30s, 72°C 2min, 5 个循环, 94°C 30s, 70°C 30s, 72°C 2min, 5 个循环, 94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 2min, 25 个循环; 72°C 10min。以第一轮 PCR 产物为模板,

表 1 本文中所用引物序列  
Tab.1 Sequences of designed primers used in this study

引物名称	引物序列(5'—3')	注释
GR5P	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5'接头引物
GR5NP	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	
GR3P	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	
GR3NP	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	3'接头引物
<i>ChAQP1F1</i>	TACCTTGTGTTTGTGTTCTCTG	中间片段引物
<i>ChAQP1R1</i>	TGTGTAGCCTCTTCGTTTGATA	
<i>ChAQP1R2</i>	CTGGCTAATAACCCCAAGGAAACG	5'RACE 引物
<i>ChAQP1R3</i>	CTCCAACGATGGCACCGATTATTT	
<i>ChAQP1F2</i>	GGGACTATGACACACACTGGGTAT	3'RACE 引物
<i>ChAQP1F3</i>	GATTGGTCTCACTGTTGCGATGCT	
<i>ChAQP1F4</i>	AAATCAACGGCAGACAACAACACT	全长引物
<i>ChAQP1R4</i>	ATGTGCGTCACTTCTAAATCCTT	
<i>ChAQP1F5</i>	ATTCTGACATTTTGCTCGTTTTTCG	<i>ChAQP1</i> 定量引物
<i>ChAQP1R5</i>	GGAGCATCGCAACAGTGAGACCAATC	
$\beta$ -actin F1	AAAAAGCTTCCATGAGGGTATTCT	内参 $\beta$ -actin 定量引物
$\beta$ -actin R1	TTTCTCGAGTCGGTATCTATCTGGT	
GAPDHF1	GGATTGGCGTGGTGGTAGAG	内参 GAPDH 定量引物
GAPDHR2	GTATGATGCCCTTTGTTGAGTC	

F 代表正向引物, R 代表反向引物

引物 GR5NP/*ChAQP1R3* 和 GR3NP/*ChAQP1F3* 进行第二轮反应, 反应程序为: 94°C 3min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 2min, 25 个循环; 72°C 10min。PCR 产物进行切胶回收纯化, 连 T 载体, 转化, 挑克隆, 送测序, 获得测序结果经 Blast 比对后, 用 DNASTAR 软件拼接所得序列片段, 最后获得完整全长序列。

根据已拼接的基因序列设计特异性引物 *ChAQP1F4* 和 *ChAQP1R4* (表 1), PCR 扩增香港牡蛎 AQP1 的编码区, 反应条件为: 94°C 3min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 2min, 30 个循环; 72°C 10min。1.2%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果, 测序验证。

#### 1.6 序列分析、结构预测及分子进化树的构建

从 NCBI 蛋白数据库中获得水通道蛋白 1 同源序列, MatGAT2.02 软件分析氨基酸序列的一致性 (Tamura *et al*, 2007)。ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质基本理化性质。蛋白质保守结构域的预测由在线软件 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)完成 (<http://smart.emblheidelberg.de/>)。氨基酸多序列分析由 ClustalX 1.81 软件完成。分子进化树由 MEGA 4.0 软件构建获得。蛋白质亲水性分析通过 ProtScale 在线服务器预测 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) (Kyte *et al*,

1982)蛋白质三级结构预测在 SWISS-MODEL 中进行, 用 Rasmol 2.7.0.1 查看预测的结构。

#### 1.7 实时定量 PCR 分析

以香港牡蛎不同组织总 RNA 及不同盐度胁迫下鳃组织中总 RNA 1 $\mu$ g 为底物, 按照 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 产品说明合成用于实时定量 PCR 的单链 cDNA 模板。根据全长 AQP1 序列信息, 设计特异定量引物 *ChAQP1F5* 和 *ChAQP1R5*; 以看家基因  $\beta$ -actin 为内参基因, 设计内参定量引物  $\beta$ -actin F1 和  $\beta$ -actin R1(表 1), 用于测定香港牡蛎 AQP1 基因在不同组织中的时空表达量; 以看家基因 GAPDH 为内参基因, 设计内参定量引物 GAPDHF1 和 GAPDH R1(表 1), 用于测定香港牡蛎 AQP1 基因在不同盐度胁迫下的表达量; 定量 PCR 反应体系 20 $\mu$ L 为: 10  $\mu$ mol/L 的上、下游引物各 2 $\mu$ L; 2 $\times$ SYBR Green Master Mix (Roche, USA) 10  $\mu$ L; cDNA 模板 2  $\mu$ L; 灭菌超纯水 H<sub>2</sub>O 4 $\mu$ L。定量 PCR 反应条件为: 95°C 预变性 1min; 95°C 变性 10s, 55°C 退火 15 s, 72°C 延伸 20s 共 40 个循环。为检测定量 PCR 的特异性, 在反应结束时进行熔解曲线分析。数据由 LightCycler 480 II 1.5 软件生成并且记录。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析香港牡蛎 AQP1 mRNA 在不同组织中的相对表达量。

## 1.8 数据分析

采用 SPSS 软件包单因素方差分析法(one-way ANOVA)中的 Duncan 多重比较检验法对实时定量 PCR 中的数据进行分析, 比较香港牡蛎 AQP1 在组织分布及不同盐度胁迫下鳃中的相对表达量(平均值±标准差)差异。

## 2 结果

### 2.1 香港牡蛎 *ChAQP1* 基因的克隆和分析

以香港牡蛎各个组织混合 cDNA 为模板, 使用引物 *ChAQP1F1* 和 *ChAQP1R1* 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测获得约 600bp 的核酸条带(图 1a), 测序获得核酸序列。将核酸序列在 NCBI 中 Blast 比对, 初步确定获得香港牡蛎 AQP1 基因序列。再用特异性引物 *ChAQP1R2*、*ChAQP1R3* 和 *ChAQP1F2*、*ChAQP1F3* 分别进行 5'RACE 和 3'RACE 两轮 PCR 扩增, 分别获得 1 条大小约 503 bp (图 1b) 和 353 bp (图 1c)的核酸条带。将 3 段序列拼接后得到长度为 1153 bp 的香港牡蛎水通道蛋白 1 基因全长序列。其 5'非编码区(UTR)长度为 165 bp, 3'非编码区长度为 100 bp, 基因编码区长为 888 bp, 编码 295 个氨基酸(图 2)。设计包含编码区及以外若干序列的特异引物 *ChAQP1F4* 和 *ChAQP1R4* 扩增获得 1060 bp 的核酸条带(图 1d), 经测序验证为目的基因, 将此基因命名为 *ChAQP1*。将序列提交至 GenBank, 获得登录号 KJ704847。

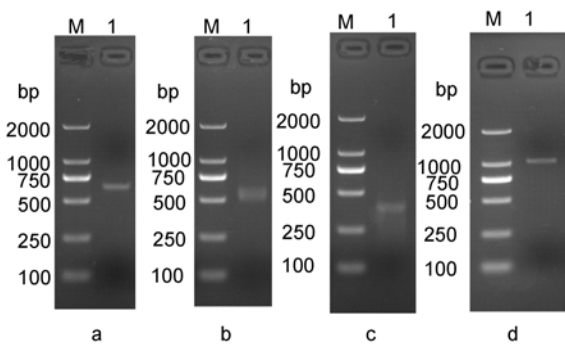


图 1 香港牡蛎 *ChAQP1* PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR amplification products of *ChAQP1* in *C. hongkongensis*

M: DL2000 marker; a: 中间片段; b: 5'端片段扩增; c: 3'端片段扩增; d: 全长 cDNA 片段

### 2.2 *ChAQP1* 蛋白质基本理化性质分析及结构预测

ProtParam 在线预测软件表明该蛋白分子式为  $C_{1463}H_{2278}N_{370}O_{400}S_{14}$ , 分子量为 31.89 kDa, 等电点为

8.61, 负电荷氨基酸总残基数(Asp+Glu)为 21, 正电荷氨基酸总残基数(Arg+Lys)为 24, 脂肪系数为 99.19, 亲水性总平均数为 0.439, 为脂溶性蛋白, 不稳定系数为 20.16, 属于一类稳定的蛋白。

SMART 在线服务软件对获得的 *ChAQP1* 基因进行蛋白质结构域预测, 结果表明有 1 个与该基因匹配的蛋白质结构域 MIP (major intrinsic protein superfamily), 位于第 31—243 位氨基酸(图 2)。

ProtScale 分析蛋白质疏水性表明, 该蛋白二级结构中具有 6 个跨膜螺旋 TM1—TM6, 5 个连接环 A—E (图 3)。

MatGAT 分析表明, *ChAQP1* 氨基酸序列除了与太平洋牡蛎氨基酸序列一致性为 87.8%以外, 与其它都只有 30%左右的一致性(表 2)。由于与人类 AQP1 氨基酸序列一致性为 40.2%, 故选择人类 AQP1 (PDB ID:1H6I)为模板, 利用 SWISS-MODEL 中 Target-Template Alignment 进行 *ChAQP1* 蛋白三级结构预测。结果发现(用 Rasmol 查看)两者有相似的结构, 都存在六个跨膜结构域, 2 个半跨膜结构域和 5 个连接环(图 4、图 5)。

### 2.3 *ChAQP1* 蛋白序列比对和分子进化树的构建

Clustal 同源多序列比对结果(图 6)表明 *ChAQP1* 有两个保守的 NPA(天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸)结构基序, 位于第 93—95 和第 208—210 位氨基酸处, 这与其它物种 AQP1 中序列一致。ar/R 选择性水孔构件由 F73、H196、S205 和 R211 四个位点构成, 除了 S205 位点相对不保守, 其它三个位点存在高度保守性, 这表明 *ChAQP1* 属于传统的水通道蛋白, 只允许水分子通过该孔道。另外, 在第一个 NPA 基序上游发现有 ISGGH 序列(第 87—91 位), 在其它传统 AQP 氨基酸序列中也普遍存在。此结果进一步说明, 水通道蛋白 1 的 NPA 基序和 ar/R 结构在不同物种中存在很高的进化保守性。

使用 MEGA 4.0 软件中的 N-J 建树方法对 *ChAQP1* 蛋白序列和其它物种中的 AQP1 及 AQP 家族成员构建分子进化树(图 7)。结果显示, AQP 家族成员聚类分成 4 个主要分支, 即 AQP1-like, AQP3-like, AQP8-like 和 AQP11-like 四类, *ChAQP1* 属于 AQP1-like 分支。将 AQP1-like 分支序列中 AQP1 序列重新构建进化树(图 8), 结果表明, 脊椎动物能较好地聚为一类, 无脊椎动物则不能聚为一类。在无脊椎动物中, 香港牡蛎与太平洋牡蛎聚为一类, 亲缘关系最近, 这显示了它们中水通道蛋白 1 相似性但也存在差异。

```

1 tgggggaatacgtatagatcatatcggaaacgaaatcaacggcagacaacaaactaat
61 tgtttcggactagtctcataatatccgaaattactgtgaaatcgggaactattct
121 tctattgcagaactattgtgtgtgtcaagtaaaggtcgtcgaaaATGGAGGGTTATTC
1 M E G Y F
181 ATGCACGTTTCCAAAAAAGTTGCAGAAGCGAGGTTTGGGAAAGAGGAAGAGGAGGAGAAA
6 M H V S K K V A E A R F G K E E E E E K
241 GTTACTCTGTGCGGGAGCTGAAGACCTGGAAGTTTGGCGAGCGGTGATGCGGGAGTTC
26 V Y S V R E L K T W K F W R A V M A E F
301 GTGGGAACCATGTTGTTTGTCTGGGCTGTCCTCAACTCTGACCAATCCAGTCAAC
46 V G T M L F V F L G C A S T L T N P V N
361 CCCGTCAGGGTGGCGCTCGCCTTGGACTTGCCATCATGGCTCTGATTGAGATGTCGGG
66 P V R V A L A F G L A I M A L I Q M F G
421 CACATTCGGGTGGTCATTTCAACCCCGCGTTTCTTGGGGTTATTAGCCAGTTTTCAG
86 H I S G G H F N P A V S L G L L A S F Q
481 ATTACCATATTTAGAGCCCTGTTTATACAATAGCTCAAATAATCGGTGCCATCGTTGGA
106 I T I F R A L F Y T I A Q I I G A I V G
541 GGCATGATTCTGAAGGGGCGACTCCTGGATCTTTTCATGCTAATCTGGAGTAACAAAA
126 G M I L K G A T P G S F H A N L G V T K
601 GTTGCCAATGGTTACACCTTGTTCAGGAGTGGCATCGAATTGATTCTGACATTTTGC
146 V A N G Y T L V Q G V G I E L I L T F C
661 CTCGTTTTCGTGATTTGCAACTACGGACGGCAATCGTACCGATTTTGAAGCGTCTCT
166 L V F V I V A T T D G N R T D F G S V S
721 CTCAAGATTGGTCTCACTGTTGCGATGCTCCATTTTCTTGTATCACGTTGACTGGATCT
186 L K I G L T V A M L H F S C I T L T G S
781 AGTATGAACCCCGCGTTCTCTGGGGAGTGCCTGGCCTCTGGGGACTATGACACACAC
206 S M N P A R S L G S A V A S G D Y D T H
841 TGGGTATATTGGGTGGGCTTACTTGGGGTTGTATTGCTACTGCTATACAAATTC
226 W V Y W V G P I L G G C I A T L L Y K F
901 CTTTCAAGCCTCACAGAGGAGCAATATCAAACGAAGAAGCTACACAAAATTGCTTGA
246 L F K P H R G A I S N E E A T H K L L A
961 GAAGGAGATATGATGCCATTCCAAGAGATTATTTACCGGAAGTTCAGAGGCGTCTCT
266 E G D M I A I P R D Y F T G S S E A S S
1021 AACGGCAAAAAGCTCGAGTCCTTCAAATTGTAAaaaaggatttagaagtgacgcacatta
286 N G K K L E S F K L *
1081 agcgtataggatacaaatatgtaatactgttcagggaagagctgaaaaaaaaaaaaaaaa
1141 aaaaaaaaaaaaaa

```

图2 *ChAQPI* 的全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列Fig.2 The cDNA sequence of *ChAQPI* and deduced amino acid sequences

ORF 区用大写字母显示, 5'UTR 和 3'UTR 用小写字母显示。灰色阴影标示 SMART 预测的 MIP 结构域。椭圆框显示的是 NPA 基序。终止子用“\*”表示

表2 *ChAQPI* 与其它已知 *AQPI* 同源序列氨基酸一致性比较Tab.2 Amino acid identity comparison of the *ChAQPI* with other known *AQPI* homologues

物种名	GenBank 登录号	氨基酸一致性(%)
香港牡蛎( <i>Crassostrea hongkongensis</i> )	KJ704847	100.0
太平洋牡蛎( <i>Crassostrea gigas</i> )	EKC24616	98.5
人类( <i>Homo sapiens</i> )	NP_932766	40.3
牛( <i>Bos taurus</i> )	NP_777127	37.0
小家鼠( <i>Mus musculus</i> )	NP_031498	38.6
非洲爪蟾( <i>Xenopus laevis</i> )	NP_001085391	39.3
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )	NP_996942	39.9
大西洋鲑鱼( <i>Salmo salar</i> )	NP_001133472	39.7
静水椎实螺( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	AHL29026	33.2
沼泽椎实螺( <i>Stagnicola palustris</i> )	AHL29028	33.5
池塘椎实螺( <i>Catascopia terebra</i> )	AHL29027	32.6
线虫( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	CCD66276.1	22.5
克什曼血吸虫( <i>Schistosoma mansoni</i> )	ACI31185	22.2



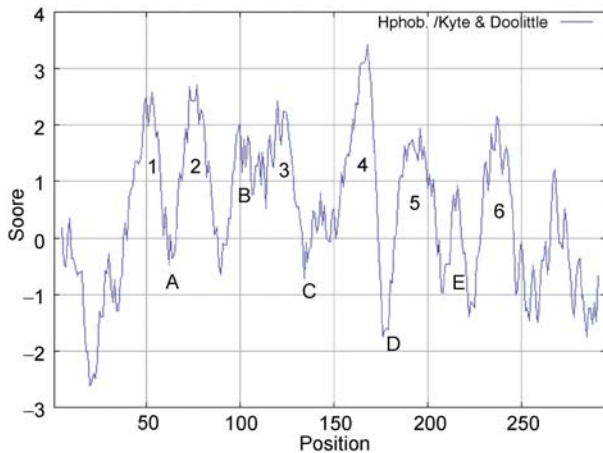


图 3 *ChAQP1* 疏水性图

Fig.3 Hydropathy plots of *ChAQP1*

数字 1—6 表示跨膜结构域, 字母 A—E 表示 5 个连接环

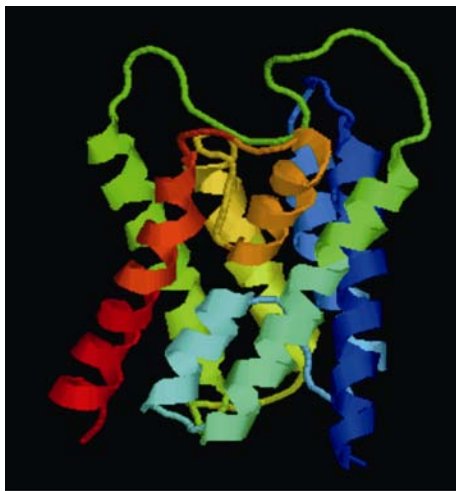


图 4 *ChAQP1* 蛋白预测的三级结构

Fig.4 The predicted 3D structure of *ChAQP1*

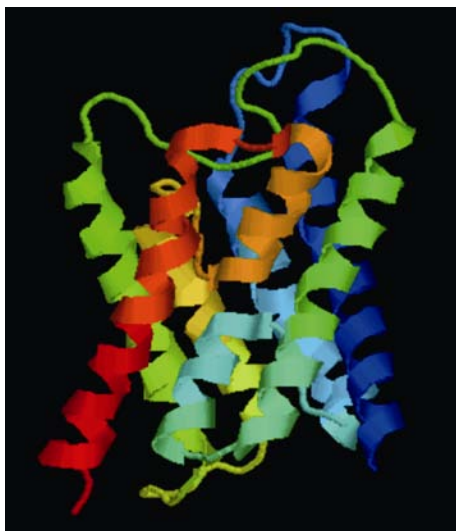


图 5 1H6I 蛋白三级结构

Fig.5 The 3D structure of 1H6I

## 2.4 *ChAQP1* 基因在香港牡蛎中的组织分布

*ChAQP1* mRNA 在各个组织中的表达量可以通过实时定量 PCR 的方法进行检测, 结果表明 *ChAQP1* 基因在香港牡蛎鳃、外套膜、闭壳肌、消化腺、性腺、心脏和淋巴中都有表达, 其中在闭壳肌中表达量最高, 其次是外套膜、性腺、消化腺、鳃。心脏、淋巴中表达量较低(图 9)。

## 2.5 盐度胁迫下 *ChAQP1* 基因的表达量分析

7 天盐度胁迫实验结果如图 10。香港牡蛎最适盐度为 18, 故以之作为对照组。低盐处理后(盐度为 4), *ChAQP1* 基因的表达量与对照组表达量相近, 并随盐度胁迫时间的延长维持在一个相对稳定的水平, 1 天、3 天、5 天、7 天分别为对照组的 1.06、0.90、0.72、0.92 倍。在 32 高盐胁迫下, *ChAQP1* 基因的表达量在前五天呈现出略微下降的趋势, 分别为对照组的 0.65、0.76、0.86 倍, 而在第 7 天恢复正常水平(1.11 倍)。42 高盐胁迫下, *ChAQP1* 基因的表达量在前五天迅速下降, 随时间延长维持在一个较低水平, 分别为对照组的 0.18 ( $P < 0.01$ )、0.48、0.28 ( $P < 0.05$ ) 倍, 在第 7 天恢复正常水平(1.03 倍)。

## 3 讨论

本研究采用 RACE 技术从香港牡蛎中克隆获得其香港牡蛎水通道蛋白 1 基因 *ChAQP1* (KJ704847), 对其进行蛋白保守区段预测发现, 该蛋白具有一个典型的 MIP 结构域、6 个跨膜螺旋、5 个连接环。在氨基酸同源性序列比对中, *ChAQP1* 含有两个保守的 NPA 基序, 这与其它物种中水通道蛋白 1 一致; ar/R 区氨基酸组成在 F73、H196 和 R211 这三个位点上与其它物种 AQP1 中的也是高度一致, 这符合传统水通道蛋白的特性, ar/R 区氨基酸形成的孔径正好允许水分子通过(Beitz *et al.*, 2006)。第一个 NPA 基序上游的 ISGGH 序列也是高度保守的, 可见, *ChAQP1* 是非常传统的, 只允许水分子穿过双分子膜的水通道蛋白, 在关键的功能结构域上具有较高的保守性。系统进化分析表明, 该蛋白属于 AQP-1like 类型的水通道蛋白。对不同物种 AQP1 序列进行聚类分析发现, *ChAQP1* 与同科同属的太平洋牡蛎 AQP1 遗传距离最近, 与同为软体动物门的腹足纲蜗牛(*Lymnaea stagnalis*, *Catascopia occulta* 和 *Stagnicola palustris*)遗传距离比较近, 而与哺乳动物中的人类及鼠遗传距离相对较远, 符合其遗传进化关系。

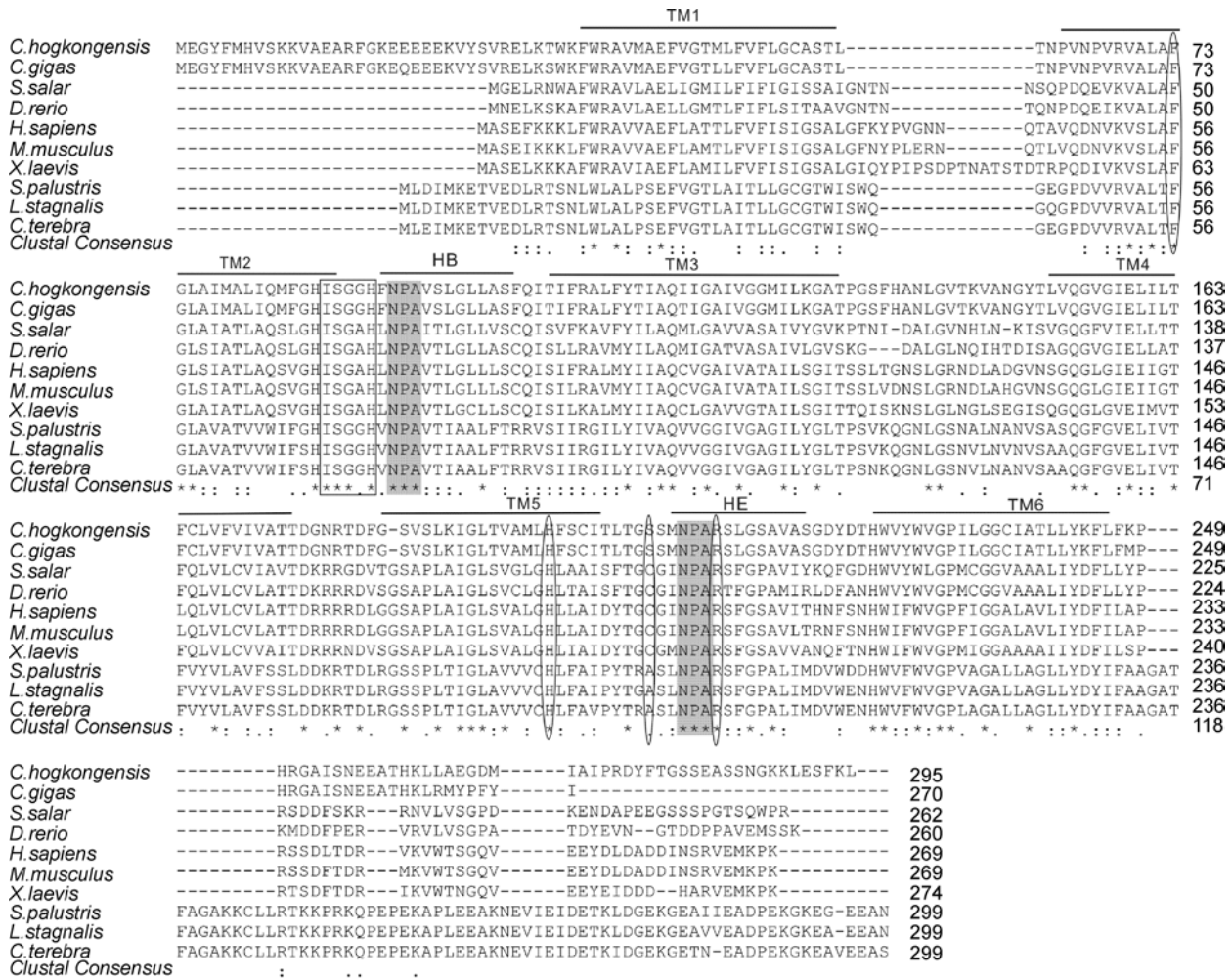


图 6 *ChAQP1* 与其它物种 AQP1 氨基酸序列比对

Fig.6 Multiple alignment of *ChAQP1* amino acid sequences with other AQP1 proteins

“\*”代表一致,“:”代表高度保守,“.”代表低度保守。2个阴影部分代表2个NPA基序,椭圆标示ar/R结构并且方框标示ISSGGH序列。横线标示保守的跨膜结构域。AQP1来源及GenBank登录号详见表2

组织分布结果显示 *ChAQP1* mRNA 在香港牡蛎主要组织鳃、外套膜、闭壳肌、消化腺、性腺、心脏和淋巴中都有表达,其中鳃、外套膜、闭壳肌、消化腺和性腺表达量相对较高些,这说明着 *ChAQP1* 可能在转运水分子的相关生理过程中起到重要作用。Moon 等(1993)研究发现人类 AQP1 也存在各个组织器官组成型表达的现象,人类 AQP1 广泛分布于红细胞、肾、眼、肺和血管内皮细胞等组织中。Pieńkowska 等(2014)研究蜗牛 AQP1,发现在脑、肾、足和消化腺等组织器官中都有广泛分布。Tipsmark 等(2010)发现大西洋鲑鱼 AQP-1a 也广泛分布在肠、肾、鳃、脑等组织中。在 7 天盐度胁迫实验中,以盐度 18 作为对照,当盐度达到 42 时, *ChAQP1* 基因表达受到抑制,而在低盐(4)组没有太大的变化,在高盐(32)组呈现出

略微下降的趋势。这与 Meng 等(2013)利用转录组数据分析太平洋盐度适应性时,发现的 3 个 AQP 基因在高盐(盐度为 40)和低盐(盐度为 10)下均为呈下调趋势的结果不太一致。这是因为太平洋牡蛎最适盐度为 30,为了维持细胞膨胀与收缩的稳定,机体通过增加蛋白质磷酸化来降低水通道蛋白活性,从而保护机体免于更多水分的进入,而在盐度 4 到 32 范围内,香港牡蛎 *ChAQP1* 基因表达量和正常盐度下表达量波动不是很大,这说明在该盐度范围内 AQP1 基因参与盐度调节的能力是有限的,尤其是在低盐下。这种现象同样出现在鲑鱼中, Ivone 等发现鲑鱼在低盐下,鳃组织中 AQP1 基因表达量并没有变化(Giffard-Mena *et al*, 2007)。而在高盐下, AQP1 基因表达量普遍存在下调趋势。在 42 盐度下,香港牡蛎 *ChAQP1* 基因表

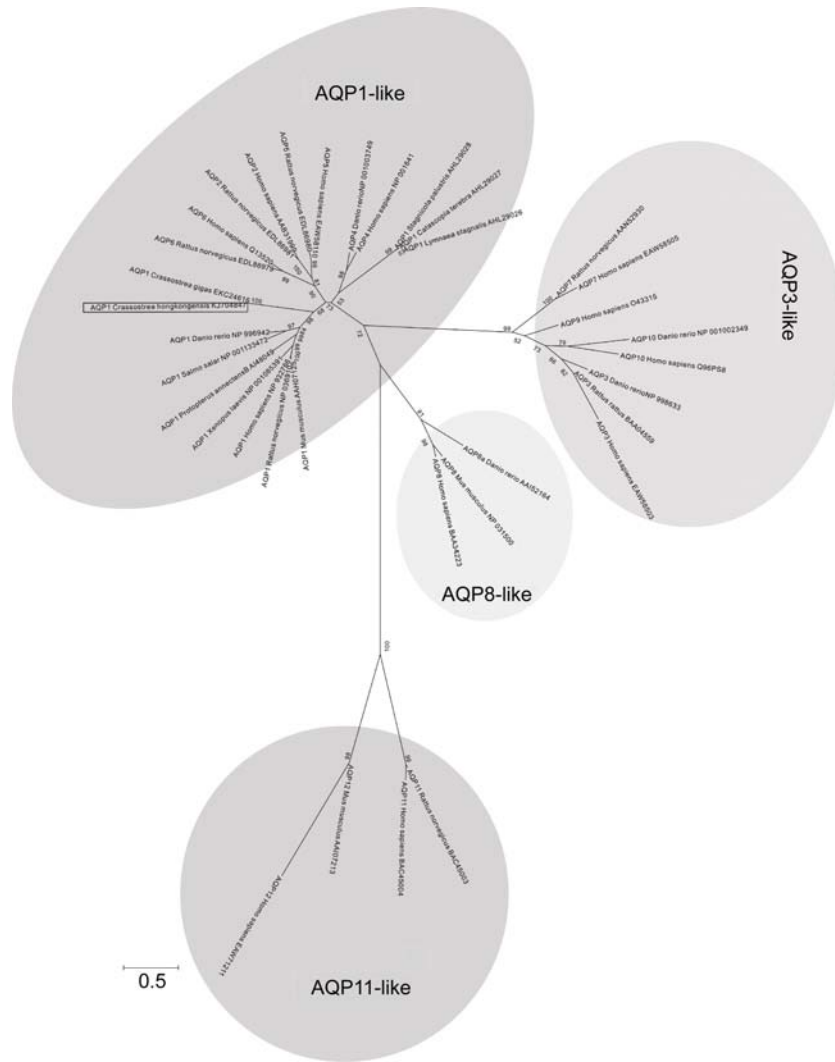


图 7 *ChAQP1* 与其它物种水通道蛋白的系统进化分析

Fig.7 Phylogenetic analysis of *ChAQP1* with AQP family members of other species

置信水平通过在每个分支节点上进行 1000 次重复获得。标尺显示发生 0.2% 概率氨基酸位点变异的长度。序列信息由缩写名、物种全名和登录号构成。方框标示 *ChAQP1* 蛋白

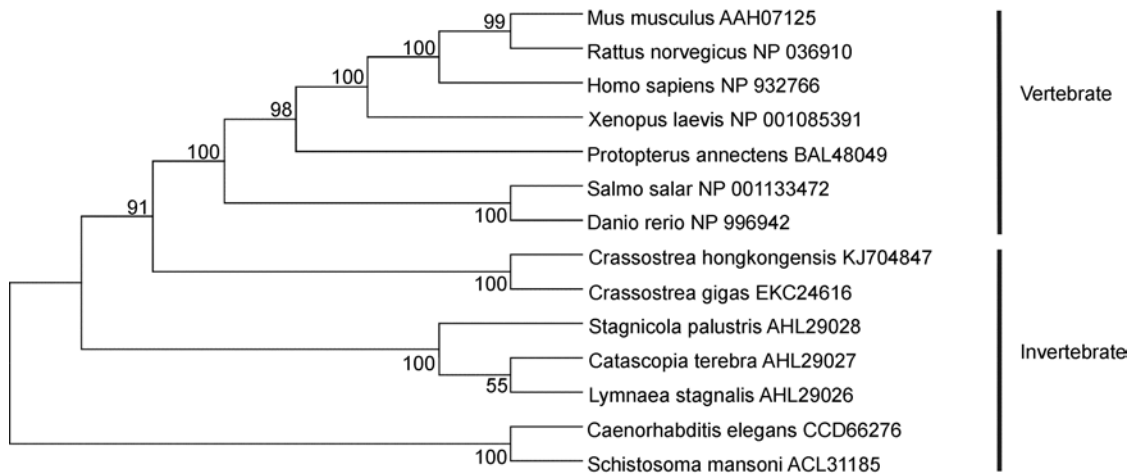


图 8 *ChAQP1* 与其它物种 AQP1 的系统进化分析

Fig.8 Phylogenetic analysis of *ChAQP1* with AQP1 of other species



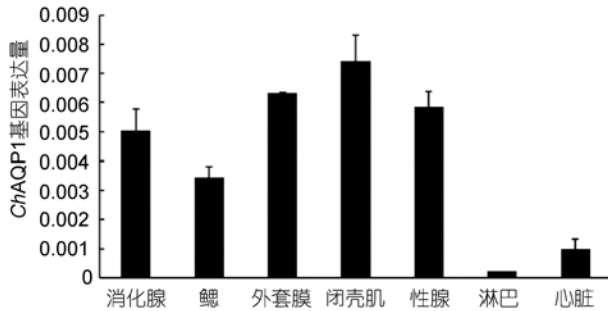


图9 *ChAQP1* mRNA 在不同组织表达量分布图

Fig.9 Tissue distribution of *ChAQP1* mRNA expression level  
每个 bar 代表平均值归一化的表达水平( $n=3$ )

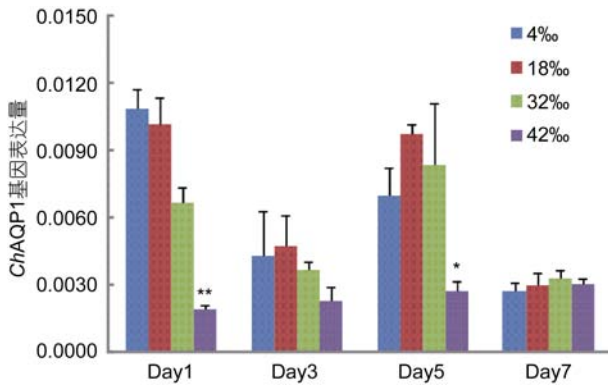


图10 7天盐度处理对 *ChAQP1* 基因表达的影响

Fig.10 Relative expression level of *ChAQP1* was analyzed under salinity stress in 7 days

图中数据为平均值 $\pm$ S.E ( $n=5$ ), 显著性差异用 1 个星号( $P<0.05$ )和 2 个星号( $P<0.01$ )标示

定量显著下降, 这说明机体通过降低该基因的表达来降低 AQP1 蛋白的活性, 抑制机体内水分的流失, 保持机体内水盐平衡, 提高机体对逆境的耐受力。同样的现象也出现在大西洋鲑鱼中, 从淡水到海水的过程中, 鲑鱼 AQP1-a 基因在鳃中表达量也明显下调 (Tipsmark *et al*, 2010)。以上结果表明, 在香港牡蛎中, AQP1 参与了调节渗透压平衡, 为探讨香港牡蛎广盐适应性提供一定的实验数据和根据。

### 参 考 文 献

农业部渔业局, 2013. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社  
张跃环, 王昭萍, 闫喜武等, 2012. 香港巨牡蛎和长牡蛎幼虫及稚贝的表型性状. 生态学报 32(4): 1105—1114  
谢忠明, 2003. 海水经济贝类养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 557—578  
Agre P, Preston GM, Smith BL *et al*, 1993. Aquaporin CHIP: the

archetypal molecular water channel. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 265(4): F463—F476  
Beitz E, Wu B H, Holm L M *et al*, 2006. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(2): 269—274  
Campbell E M, Ball A, Hoppler S *et al*, 2008. Invertebrate aquaporins: a review. Journal of Comparative Physiology B, 178(8): 935—955  
Giffard-Mena I, Boulo V, Aujoulat F *et al*, 2007. Aquaporin molecular characterization in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*): The effect of salinity on AQP1 and AQP3 expression. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 148(2): 430—444  
Huang C G, Lamitina T, Agre P *et al*, 2007. Functional analysis of the aquaporin gene family in *Caenorhabditis elegans*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 292(5): C1867—C1873  
Ishibashi K, Kondo S, Hara S *et al*, 2011. The evolutionary aspects of aquaporin family. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 300(3): R566—R576  
Kyte J, Doolittle R F, 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. Journal of Molecular Biology, 157(1): 105—132  
Lam K, Morton B, 2003. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. Aquaculture, 228(1—4): 1—13  
Meng J, Zhu Q H, Zhang L L *et al*, 2013. Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*. PLoS ONE, 8(3): e58563  
Moon C, Preston G M, Griffin C A *et al*, 1993. The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization. The Journal of Biological Chemistry, 268(21): 15772—15778  
Pieńkowska J R, Kosicka E, Wojtkowska M *et al*, 2014. Molecular Identification of First Putative Aquaporins in Snails. The Journal of Membrane Biology, <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-014-9629-0>  
Preston G M, Carroll T P, Guggino W B *et al*, 1992. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. Science, 256(5055): 385—387  
Soto G, Alleva K, Amodeo G *et al*, 2012. New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: Orthologous identification and functional transfer is possible. Gene, 503(1): 165—176  
Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24(8): 1596—1599  
Tipsmark C K, Sørensen K J, Madsen S S, 2010. Aquaporin expression dynamics in osmoregulatory tissues of Atlantic salmon during smoltification and seawater acclimation. The Journal of Experimental Biology, 213(3): 368—379  
Yang B X, 2000. The human aquaporin gene family. Current Genomics, 1(1): 91—102

## MOLECULAR CLONING, CHARACTERIZATION, AND EXPRESSION OF AQUAPORIN1 GENE IN *CRASSOSTREA HONGKONGENSIS*

WAN Qian<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-Huan<sup>1,2</sup>, YU Zi-Niu<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology and Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. South China Sea Bio-resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510275, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Aquaporin1 (AQP1) is one of water channel proteins that facilitate water and/or small solutes across cell membrane responding to osmotic gradients. We cloned the AQP1 gene by RT-PCR and RACE technology in mollusk *Crassostrea hongkongensis* and named *ChAQP1* (GenBank accession number: KJ704847). The full-length cDNA of *ChAQP1* is 1153bp in length with ORF of 888bp, encoding a peptide of 295 amino acids. *ChAQP1* includes a conserved MIP domain, six transmembrane regions, five loops, two NPA boxes, and an ar/R (aromatic/arginine) selectivity filter. Phylogenetic analysis showed that *ChAQP1* belongs to the AQP1-like subfamily. Tissue distribution of *ChAQP1* mRNA indicates that *ChAQP1* is constitutively expressed in all detected tissues, especially in adductor muscle and mantle. Furthermore, as shown in the expression pattern in gill under osmotic stress revealed in real-time PCR analysis, *ChAQP1* mRNA stayed almost unchanged in hypo-osmotic exposure, whereas its mRNA level was significantly down-regulated on Days1 ( $P<0.01$ ), 3, and 5 ( $P<0.05$ ) upon hyper-osmotic exposure. Thus, the expression pattern of *ChAQP1* mRNA in gill is inducible under salinity stress, which strongly discloses the involvement of the gene in the regulation of osmotic homeostasis in *C. hongkongensis*. With these basic molecular findings, future works shall focus on the mechanism of euryhaline adaptation in *C. hongkongensis*.

**Key words** *Crassostrea hongkongensis*; Aquaporin1; salinity; Real-Time PCR