

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)Akt/PKB 基因在病原刺激下的表达和功能分析*

迟艳红^{1,2} 李诗豪^{1,2} 王冬冬^{1,2} 孙玉苗¹
李富花¹ 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 本文在对中国明对虾转录组数据进行生物信息学分析的基础上,克隆获得了其 Akt/PKB 基因(FcAkt)的开放阅读框(ORF)的 cDNA 序列,分析了对虾 FcAkt 基因的结构特征,并利用实时定量 RT-PCR 技术分析了 FcAkt 基因在鳃弧菌、溶壁微球菌和白斑综合征病毒(WSSV)注射后的转录表达变化。结果表明,中国明对虾 FcAkt 基因的 ORF 全长为 1536bp,编码 511 个氨基酸,预测蛋白分子量为 58.9kDa,理论等电点 pI 为 5.60。同源比对显示该基因的氨基酸序列在不同物种之间具有较高的保守性。进化分析发现 FcAkt 与地蟹、果蝇、埃及伊蚊、家蚕等节肢动物的蛋白激酶 B(Akt/PKB)亲缘关系较近。FcAkt 的转录表达在不同细菌或 WSSV 刺激后具有明显的变化,提示对虾 FcAkt 基因可能在对虾的免疫防御中发挥了重要作用。

关键词 中国明对虾, Akt/PKB, 基因克隆, 表达分析

中图分类号 Q789

对虾作为重要的水产养殖动物,其养殖产业在我国的水产养殖中占有至关重要的地位。由于对虾养殖病害的频发,特别是 1993 年以来开始爆发的病毒性疾病,使我国对虾养殖的产量由 1992 年的 20 多万 t 减至 1993—1994 年的 5—6 万 t,给对虾养殖业的发展造成了巨大损失(相建海, 2001)。近年来,由于凡纳滨对虾的引进和成功养殖,再加上对虾养殖技术的改进和养殖新模式的建立,对虾养殖产量达到了 100 多万 t,其中凡纳滨对虾的产量占 80%以上。尽管如此,养殖病害的频发所造成的经济损失还是相当大。对对虾的免疫学进行研究,有助于理解对虾的免疫机制,为开发有效的病害防治策略,维持对虾养殖业的可持续发展提供理论依据。

近年来随着对对虾的重要免疫分子,包括免疫识别分子如 Toll 受体(叶旻玉等, 2008)、凝集素(Xu *et*

al, 2010)等、信号转导分子如 NF-KappaB (Li *et al*, 2010; Huang *et al*, 2010)、效应分子如不同类型的抗菌肽(康翠洁等, 2002; Vargas *et al*, 2004)等的鉴定,对对虾免疫系统的认识逐渐加深。但是有关对虾免疫学的认识仍然相当贫乏。随着对更多对虾免疫相关分子的鉴定和功能分析,有望系统了解对虾的先天免疫体系,为对虾的病害防治提供理论指导。

Akt 蛋白,又称为蛋白激酶 B(PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸激酶(Jones *et al*, 1991),它作为重要的细胞信号转导分子,在细胞存活、细胞代谢、转录调控、细胞周期调控、免疫防御等多种生物学过程中发挥着重要作用(姜华等, 2004)。在哺乳动物中,蛋白激酶 B (Akt/PKB)存在三种亚型(周颖等, 2006): PKB α /Akt1、PKB β /Akt2 和 PKB γ /Akt3,这三种亚型具有相似的结构域:包括 PH 结构域、激酶/催化结构域和调节结构

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目, 2012CB114403; 国家虾产业体系项目, CARS-47 号。迟艳红, E-mail: chiyanhonglucky@163.com

通讯作者: 李富花, 研究员, E-mail: fhli@qdio.ac.cn

收稿日期: 2011-12-23, 收修改稿日期: 2012-02-14

域。在信号转导过程中, PH 结构域介导 Akt 与其它组分, 特别是与其上游的调节因子结合。近年来, 随着对 Akt 研究的深入, 发现其在物质代谢、细胞凋亡、细胞调控、转录调控、胚胎发育等多种生物过程中起着重要作用。Akt 不仅可从多个水平上调节葡萄糖代谢(Cross *et al.*, 1995; Dugani *et al.*, 2005), 还可通过磷酸化活化 mTOR 以及失活 TSC2 来实现对蛋白质合成的调控(Jozwiak *et al.*, 2005), 从而调控细胞的凋亡(Datta *et al.*, 1997)、细胞周期(Fatrai *et al.*, 2006), 或通过解除 I κ B 对 NF κ B 的抑制作用(Julia *et al.*, 1999), 使 NF κ B 发挥其免疫调控作用。在哺乳动物中, Rac1、PI3K 以及 Akt 共同组成了由 TLR2 介导的 Toll 通路。Toll 通路在无脊椎动物抵御外界感染中发挥着重要作用(Liew *et al.*, 2005; Gay *et al.*, 2006)。目前关于 Akt 的研究主要集中在哺乳动物中, 在对虾等甲壳动物中尚未见任何报道。本文以中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为材料, 克隆获得了中国明对虾 Akt 基因的 cDNA 序列, 并对其结构特征进行了分析。利用定量 PCR 分析了细菌和 WSSV 感染后 Akt 基因转录表达的变化, 为深入理解对虾免疫体系奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 实验对虾

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)购自青岛附近的养殖场, 体长(14.5±0.6)cm, 体重(30.8±2.6)g。实验前在水族箱中充气暂养 5—7d, 使其适应实验室内养殖环境。随机抽取 6 只对虾用于不同组织的取样, 这些组织包括: 血细胞、鳃、眼柄、肌肉、胃、肠、肝胰腺、心脏、Oka、神经、精巢、卵巢, 将组织取样后放于-80℃冰箱保存备用。对虾血细胞的抽取是自对虾第一腹节基部腹窦处抽取血淋巴, 按照 1:1 比例加入抗凝剂, 置于离心管(4℃预冷)后 800g 离心 10min, 上清液为血清, 沉淀为血细胞。分离出血细胞后将其放置于-80℃冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 提取以及 cDNA 合成

中国明对虾各组织总 RNA 提取按照 Unizol 试剂盒(上海博星公司)所述方法进行, 提取的总 RNA 用紫外分光光度计进行定量检测, 然后进行琼脂糖凝胶电泳, 确认 RNA 完整无降解后, -80℃保存备用。在进行反转录之前使用 RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA) 去除总 RNA 中残留的基因组 DNA。cDNA 合成体系如下: 在 25 μ L 的反应体系中加入 1 μ g

总 RNA, 1 \times MMLV 缓冲液, 0.5mmol/L dNTP, 0.4mmol/L HEX 随机引物, 20units RNase 抑制剂(Promega)和 200units MMLV 反转录酶(Promega)。37℃反转录 1h, 95℃ 5min 灭活反转录酶。合成的 cDNA 直接作为 PCR 反应的模板, -20℃保存备用。

1.3 中国明对虾 Akt 基因 ORF 全长的获得

利用中国明对虾大规模测序获得 EST 数据, 通过组装、拼接、比对获得了 Akt 基因的开放阅读框。为验证序列的准确性, 根据该序列设计了多对特异性引物(表 1)。以中国明对虾肌肉的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增从而验证了中国明对虾 Akt 基因的 ORF。PCR 反应体系为 25 μ L: 1 μ L cDNA 模板, 1 \times reaction 缓冲液, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTP, 2mmol/L 正向引物, 2mmol/L 反向引物以及 1.25U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa), ddH₂O 补足到 25 μ L。PCR 扩增条件: 94℃变性 4min, 1 个循环; 94℃变性 50s, 60℃退火 50s, 72℃延伸 90s, 35 个循环; 72℃延伸 10min, 1 个循环。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增片段大小, 并利用 DNA 胶回收试剂盒(上海生工公司)对目的片段进行切胶回收, 然后克隆到 pMD19-T 载体(大连宝生物公司), 重组质粒转化到大肠杆菌 TOP10 菌株, 产生的阳性克隆经 PCR 验证后测序。

1.4 生物信息学分析

所获得的 cDNA 序列使用 NCBI BLASTX 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行序列同源性比对以及相似性分析。利用 Expasy 软件(<http://www.expasy.org/>)对目的蛋白的氨基酸序列进行预测, 对推导出的蛋白序列使用 Protparam 软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白理化特性预测, Smart 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测功能域, 采用 Clustal W 软件对不同物种的 Akt 基因进行多序列比对分析, 利用 MEGA 4.1 软件进行系统发生和进化的分析, 系统树采用 Neighbor-joining 方法构建。

1.5 利用 Real-time PCR 分析 FcAkt mRNA 的组织分布

根据中国明对虾 Akt 的 cDNA 序列设计了一对特异性引物 FcAkt-RTF1 和 FcAkt-RTR1 用于 Real-time PCR 检测, 扩增片段大小为 166bp。提取正常的中国明对虾不同组织(包括血细胞、鳃、眼柄、肌肉、胃、肠、肝胰腺、心脏、Oka、神经、精巢、卵巢)的 RNA, 按照前述体外反转录的方法分别合成 cDNA 模板进行实时荧光定量 PCR。以 18S rRNA 基因作为内参基因, 其正向引物为 18S-F (5'TATACGCTAGTGGAGC-

TGGAA3'), 反向引物为 18S-R (5'GGGGAGGTAGTG-ACGAAAAAT3'), 扩增产生 136bp 的 cDNA 片段。定量 PCR 仪采用 Eppendorf realplex 4S, Real-time PCR 反应程序为: 94℃ 变性 2min, 1 个循环; 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 40 个循环。RT-PCR 反应体系为 25μl: 1U Takara Ex taq, 1×Ex taq buffer (含 Mg²⁺), 0.2mmol/L dNTP, 1×SYBR Green Master Mix (Applied Bio systems, Framingham, USA), 0.2mmol/L 正向引物, 0.2mmol/L 反向引物, 1μl cDNA 模板。目的基因进行 Real-time PCR 的反应条件: 94℃ 变性 2min, 1 个循环; 94℃ 变性 30s, 62℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 40 个循环。每个组织的样品设 3 次重复。数据处理采用 2^{-ΔΔCt} 法, 并且利用 SPSS 软件对数据进行统计分析。

1.6 利用 Real-time PCR 分析溶壁微球菌以及鳃弧菌注射后不同时间 FcAkt 基因的转录表达

选取暂养的中国明对虾幼虾若干尾, 体长 (6.37±0.73)cm, 体重为 (3.25±1.14)g, 进行溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 和鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 注射实验。在溶壁微球菌实验组中, 使用 PBS 缓冲液稀释实验室保存的溶壁微球菌原液 (Sigma) 至浓度为 0.2μg/μl, 每只对虾注射 10μl; 在鳃弧菌实验组中, 使用 PBS 缓冲液稀释实验室保存的灭活鳃弧菌原液至 1.2×10⁹ cells/mL, 每只对虾注射 10μl; 对照组中, 每只对虾注射 10μl PBS 缓冲液作为对照; 无任何注射的对虾作为空白组 (0h)。在注射后 1h、3h、6h、12h、24h 后分别取虾 4 尾, 取其头胸部, 提取总 RNA, 并按照前述反转录的方法分别合成 cDNA 模板。每个 cDNA 样品做两组 PCR, 一组为目的基因, 另一组为内参基因。PCR 反应体系及反应程序同上所述, 最后采用 2^{-ΔΔCt} 数据处理法以及 SPSS 软件分析经过溶壁微球菌和鳃弧菌刺激不同时间后 FcAkt mRNA 的表达特征。

1.7 利用 Real-time PCR 分析 WSSV 刺激后 FcAkt mRNA 的表达

选取暂养的中国明对虾幼虾若干尾, 体长为 (8.06±0.91)cm, 体重为 (5.95±1.96)g, 进行 WSSV 感染实验。实验前随机取 5 尾, 提取基因组 DNA, 用 PCR 检测证实没有 WSSV 感染。实验组中, 使用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 稀释实验室保存的 WSSV 原液至病毒拷贝数为 80 拷贝/μl, 从对虾最后腹节进行注射, 每只对虾注射 10μl; 对照组中, 每只对虾注射 10μl PBS 缓冲液作为对照; 无任何注射的对虾作为空白组

(0h)。在注射后 1h、3h、6h、12h、24h、48h、72h 后分别取虾 4 尾, 取其头胸部, 用于总 RNA 的提取, 并按照前述反转录的方法分别合成 cDNA 模板。每个 cDNA 样品做两组 PCR, 一组为目的基因, 另一组为内参基因, PCR 反应体系及反应程序同上所述, 采用 2^{-ΔΔCt} 数据处理法以及 SPSS 软件分析经过 WSSV 刺激不同时间后 FcAkt mRNA 的表达。

表 1 PCR 扩增所用的特异性引物
Tab.1 Specific primers used in PCR amplification

引物名称	引物序列(5'—3')
FcAkt-F1	GGCTTGGGGCGAGAAGCTCA
FcAkt-R1	GCCCCTGAGGAGGTCTCGTG
FcAkt-F2	ATGGGTGAGGCGGGAGAGG
FcAkt-R2	TCTCGCCCCAAGCCCATCAT
FcAkt-3R1	TCACTTTACCCTTCTTCTGTAACAT
FcAkt-RTF1	ACGAGGTGTTGATTGGTGGGGC
FcAkt-RTR1	GCCCCTGAGGAGGTCTCGTG

2 结果

2.1 中国明对虾 FcAkt 基因推导的氨基酸序列特征

从中国明对虾肌肉组织中提取总 RNA, 以反转录后的 cDNA 作为模板, 利用设计的特异性引物经过 PCR 扩增后获得中国明对虾 Akt 基因的开放阅读框 (ORF), 命名为 FcAkt, 此开放阅读框为 1536bp, 共编码 511 个氨基酸 (图 1)。预测的 FcAkt 蛋白的理论等电点 (pI) 为 5.60, 分子量为 58.92kDa。通过 Smart 软件预测结构域, 显示 FcAkt 蛋白包含三个保守结构域: PH 结构域 (残基 12—114 位), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化 (S_TKc) 结构域 (残基 163—420 位), 丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶 (S_TK_X) 结构域 (残基 421—489 位) (图 2)。其中 PH 结构域被认为是 Akt 的结合结构域, S_TKc 结构域为催化结构域而 S_TK_X 结构域有可能是 FcAkt 的调节结构域。

2.2 FcAkt 基因同源序列分析

通过 Blast 比对发现 FcAkt 蛋白序列与其它物种的 Akt 有较高的相似性。它与地蟹 (*Gecarcinus lateralis*) (ADM87425.3) Akt 有 90% 的相似性, 与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (AAF55275.1) Akt1 有 65% 的相似性, 与埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (AAP37655.1)、家蚕 (*Bombyx mori*) (ABY50539.1) 的 Akt 相似性分别为 63%、61%。对 23 个来自不同物种的蛋白激酶 B/Akt 的氨基酸序列利用 MEGA 4.0 软件系统学分析并构建

```

1 ATGGGTGAGGCGGAGAGGCGCCGACCCAGCTGTGGTGAAGAGGGATGGCTCAACAAACAGGTTGAGCACATCAAGAATTGGCGGCAG 90
  M G E A G E A P T P A V V K E G W L N K R G E H I K N W R Q
91 CGGTACTTCTTCCTCTAGAGGATGGGACTCTCCTGGGCTTCAAGACCAAGCCAGAACATGGACTGGCAGACCCCTTAATAATTTCACT 180
  R Y F F L L E D G T L L G F K T K P E H G L A D P L N N F T
181 GTAAGCGCTGCCAGATTCTGAAAACAGAGAAGCCACGTCCTCCAACTTTTATTATACGAGGTCTACATTGGACTACTGTCATAGAGCGA 270
  V K R C Q I L K T E K P R P N T F I I R G L H W T T V I E R
271 ACTTTTAAATGCACAGTCTGCTAGTGACAGAGAAGCATGGATGGAAGCAATAAAGCAAGTGGCGGAGCGAATAGCAGAGGTGGATGCAACG 360
  T F N A Q S A S D R E A W M E A I K Q V A E R I A E V D A T
361 TCTGGTCAGAATGTCCAGATCCAGCCAGCAGATTGCGTTGACATTAACATCAATTATTACAGGAGGATGATGATGGGCTTGGGGCGAGA 450
  S G Q N V Q I Q P A D C V D I K L N Y S Q E D D D G L G A R
451 AGCTCAAAGAAGAAAAGAAAATTACATTGGATAATTTTGAATTTCTAAAGTACTTGGGAAAGGCACATTGGAAAAGTAATCTTGTGT 540
  S S K K K R K I T L D N F E F L K V L G K G T F G K V I L C
541 CGAGAGAAGAGTAGTAATCACTTTTATGCTATCAAGATCCTTCGTAAGGATGTAATTATTAACCGGATGAAGTGTCTCACACACTGACA 630
  R E K S S N H F Y A I K I L R K D V I I K R D E V A H T L T
631 GAAAACCGAGTATTGCAAAGGGTTGACCACCCTTTCTTAACGTACCTCAAGTACTCATTCCAAACAAATGACCGCCTGTGCTTTGTAATG 720
  E N R V L Q R V D H P F L T Y L K Y S F Q T N D R L C F V M
721 GAATATGTGAATGGTGGAGAGCTCTTCTTCCACCTCAACCAGGAACGCATCTTCCCAGAGGAACGTGCCAAATTTACGGGGTGAGATC 810
  E Y V N G G E L F F H L N Q E R I F P E E R A K F Y G A E I
811 TGCTTAGCTCTGGGATACCTTACGAGAGAAACATTATATATCGTGATTTAAAGCTAGAGAACTTACTCCTGGATGCTGATGGTCACATT 900
  C L A L G Y L H E R N I I Y R D L K L E N L L L D A D G H I
901 AAGATTGCTGATTTTGGTTTATGCAAAGAAGATATATCATATGGTTCTACGACACGAACCTTCTGTGGTACACCAGATATCTGGCTCCT 990
  K I A D F G L C K E D I S Y G S T T R T F C G T P E Y L A P
991 GAGGTACTGGAAGAAAATGACTATGGACGAGGTGTTGATTGGTGGGGCTATGGAGTGTGTCTCTATGAGATGATGGTAGGACGCTTCCC 1080
  E V L E E N D Y G R G V D W W G Y G V C L Y E M M V G R L P
1081 TTTTATGACAAGATCATGACAACTCTTCCAACTCATCGTTTGTGAAGATGTAAGATTTCCACGTACAATATCACAAGAAGCAGCAGAC 1170
  F Y D K D H D K L F Q L I V C E D V R F P R T I S Q E A R D
1171 CTCTCAGGGGCTGTGTCACAAGGACCCAAACACACGCTTGGAGGTGGACCTAGAGATGTAAGAGGTTGAGAATCACCCTTCTAC 1260
  L L R G L L H K D P N T R L G G G P R D V K E V Q N H P F Y
1261 ATCACCATCAACTGGAATATTCTGGAGGAGAAGAAAATCACACCTCCTTTCAAACCACAAGTAACAAGTGAGACGGATAACCGTACTTC 1350
  I T I N W K L L E E K K I T P P F K P Q V T S E T D T R Y F
1351 GACCGAGAGTTTACAGGAGAGTCGGTGCAGCTCACTCCCCAGACCAGGGAGAACATCTCAACAGTATTGATGAAGAGTCAGAATACTTT 1440
  D R E F T G E S V Q L T P P D Q G E H L N S I D E E S E Y F
1441 ACGTTCACCAGTTTTTCATACCAGGATATCTCATCAACCCTTGGCAGCTCACTAGCATCAAGCATCAATTCCTAGATGTTACAGAAGAA 1530
  T F N Q F S Y Q D I S S T L G S S L A S S I N S L D V T E E
1531 GGGTAA 1536
      G *

```

图 1 中国明对虾 FcAkt ORF 全长及推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequence of FcAkt ORF and its deduced amino acid sequence

注: 下划线分别标示为相应的起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA), 阴影中显示的是蛋白的保守结构功能域

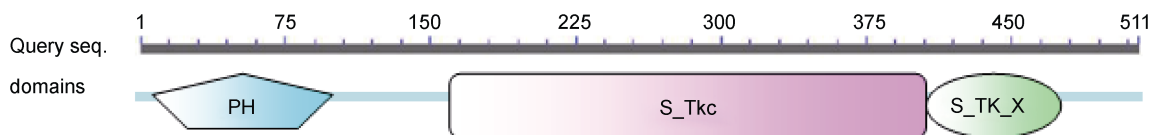


图 2 中国明对虾 FcAkt 的 3 个保守结构域位置

Fig.2 Distribution of three conserved domains of FcAkt from *F. chinensis*

了 Akt 的系统发生树(图 3)。结果表明, Akt 被分为两个分支, 节肢动物的 Akt, 包括中国明对虾 FcAkt、地蟹(ADM87425.3)、长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*) (BAK26531.1)、水蚤(*Daphnia pulex*)(EFX86288.1)、印度跳蚊(*Harpegnathos saltator*)(EFN84927.1)、果蝇

(AAF55275.1)、埃及伊蚊(AAP37655.1)、家蚕(ABY50539.1)等聚为一个分支; 脊椎动物如非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (NP_001085101.1)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (XP_003447866.1)、斑马鱼(*Danio rerio*)(NP_937789.1)、家犬(*Canis lupus familiaris*)

(XP_548000.3)等的 Akt 聚为另外一个分支。

2.3 FcAkt mRNA 在中国明对虾中的组织分布

利用 Real-time PCR 相对定量方法分析了 FcAkt mRNA 在中国明对虾不同组织中的表达分布(图 4)。FcAkt 在检测的所有组织中都有表达, 其中在性腺、神经、心脏中的表达最高, 而在眼柄中的表达量最低。

2.4 不同病原(溶壁微球菌、鳃弧菌、WSSV)刺激后 FcAkt 基因的转录表达

中国明对虾幼虾在不同细菌(溶壁微球菌、鳃弧菌)注射后 FcAkt 基因的转录表达如图 5 所示。在溶壁微球菌和鳃弧菌刺激后, FcAkt 的转录表达出现了明显变化。在溶壁微球菌实验组中, 与对照组相比, 中国明对虾在经过溶壁微球菌刺激后 1h, FcAkt 表达出现明显上调, 在刺激 3h、6h 后表达逐渐下调, 在 24h 后表达量与对照组相比几乎无差别; 在鳃弧菌实验组中, 与 PBS 对照组相比显示, 中国明对虾经过鳃弧菌刺激 1h 后 FcAkt 表达明显上调, 在刺激 3h、6h、12h 后目的基因表达量有不同程度的下调, 而在 24h 后表达量与对照组相比又出现明显上调。

对虾在 WSSV 注射后的转录表达变化如图 6 所示。与 PBS 对照组相比, 中国明对虾在经过 WSSV 刺激后 3h, FcAkt 基因的表达量出现一定的下调, 在其它时间没有明显变化。

3 讨论

本研究获得了中国明对虾 FcAkt 基因, 其推导的氨基酸序列中含有介导与脂类相关作用的 PH 结构域、发挥其功能的催化结构域以及调节结构域。通过

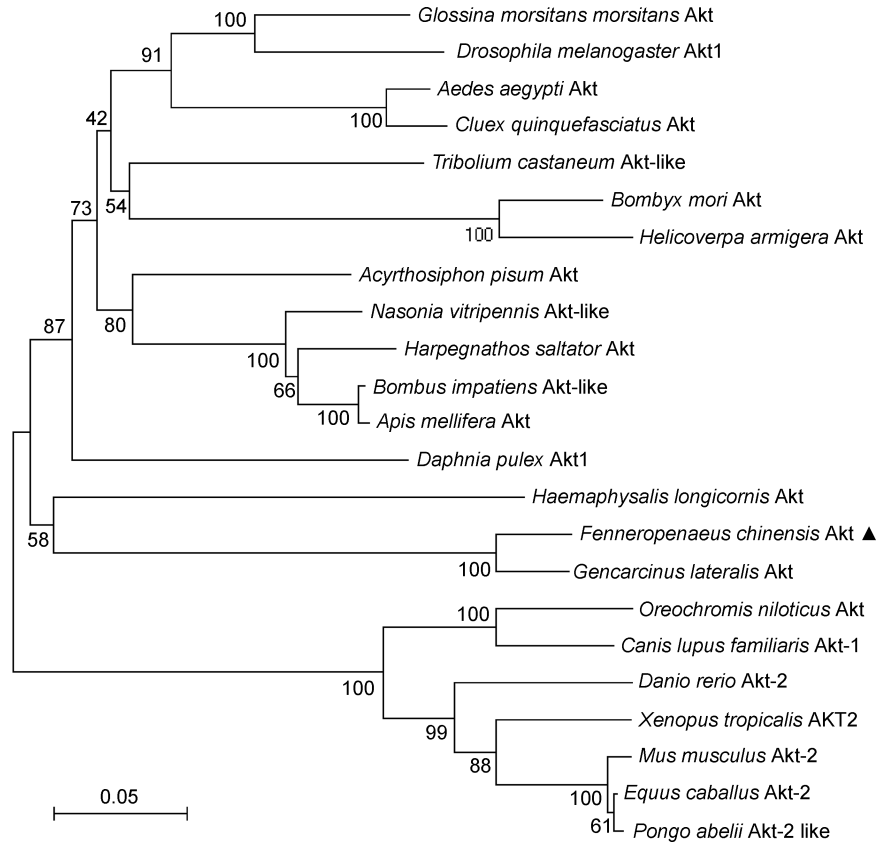


图 3 中国明对虾 FcAkt 和其它物种 Akt 构建的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree based on the amino acid sequence of FcAkt and Akt from other species

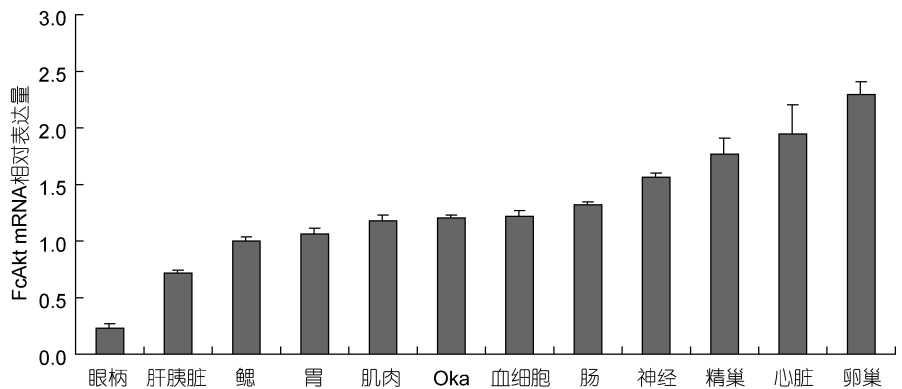


图 4 FcAkt 基因在中国明对虾不同组织中的表达

Fig.4 The relative expression of FcAkt in different tissues of *F. chinensis*

多物种同源比对以及系统进化分析显示, Akt 在从无脊椎动物到脊椎动物不同物种的进化上极为保守, 中国明对虾 Akt 与果蝇等节肢动物 Akt 聚为一类, 并且与家犬等哺乳动物 Akt 的相似性达到了 60%左右。由此可以推测, 中国明对虾 FcAkt 可能具有与果蝇及其它高等动物 Akt 蛋白相似的生物学功能, 在中国明对虾生长发育及免疫防御中起着重要作用。

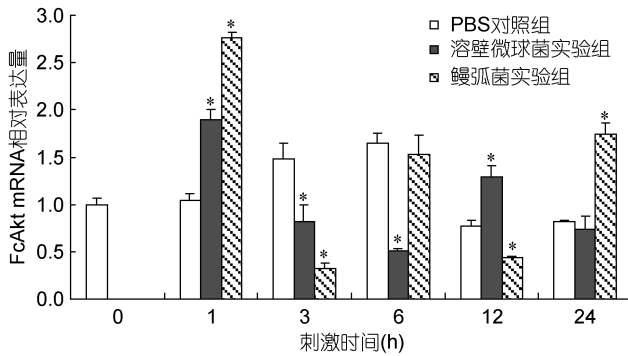


图5 中国明对虾经过细菌(溶壁微球菌、鳃弧菌)刺激后 FcAkt 基因的表达变化

Fig.5 The expression profiles of FcAkt in shrimp after stimulation with *M. lysodeikticus* or *V. anguillarum*

注: *表示不同类型细菌刺激后 FcAkt 的转录表达与对照组相比存在显著性差异($P < 0.05$)

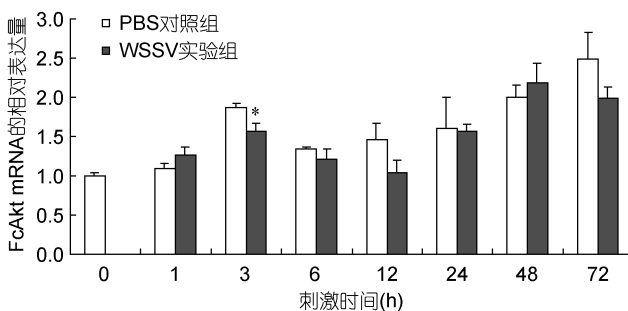


图6 中国明对虾经过 WSSV 刺激后 FcAkt 基因的表达变化

Fig.6 The expression profiles of FcAkt in shrimp after WSSV injections

注: *表示 WSSV 刺激后 FcAkt 的转录表达与对照组相比存在显著性差异($P < 0.05$)

组织表达分析显示, FcAkt 在中国明对虾各组织中呈组成型表达, 并且在性腺、神经和心脏中表达量最高, 在眼柄中表达量最低。依据以上实验结果推测, 可能是由于 Akt 在进行物质代谢、细胞周期调控、细胞存活等基本生命功能中发挥着重要作用从而导致了其在各组织中的广泛表达。Akt 在胚胎发育、神经发育及维持神经细胞的存活中发挥了关键作用(Oriki *et al*, 2001; Rodgers *et al*, 2002), 因而推测 FcAkt 在性腺与神经中的较高表达量与胚胎发育、神经发育等过程密切相关, 可能在中国明对虾生长发育中起到了非常重要的作用。

信号转导分子 NF κ B 在免疫反应中发挥着关键的调控作用, Akt 可以通过磷酸化活化 IKK, 解除 I κ B 对 NF κ B 的抑制作用, 从而间接在免疫应答过程中发挥作用。有研究显示, 果蝇 Akt 在细菌感染过程中发

挥着重要作用(Marc *et al*, 2006)。为了研究中国明对虾 FcAkt 在免疫应答中的作用, 本实验设计了细菌和病毒的攻毒实验, 结果表明, 在经过溶壁微球菌(G+)和鳃弧菌(G-)刺激后, 与对照组相比 FcAkt 的转录水平均出现了明显变化。并且两种菌刺激实验组中 FcAkt 的转录水平表达变化趋势有相似之处, 均是在刺激 1h 后 FcAkt 表达显著上调, 而在刺激 3h 后表达量出现下调, 在随后的 3—24h 后的表达量有不同的浮动。由以上结果推测, FcAkt 作为 Toll 通路上的一个重要因子有可能参与了中国明对虾在抵御细菌早期的免疫应答反应。与对照组相比, 中国明对虾经过 WSSV 感染后 3h, FcAkt 基因在转录水平出现一定的下调, 说明 FcAkt 可能参与了对虾的抗病毒免疫过程。有研究显示, WSSV 的感染会引起对虾的细胞凋亡(Clarissa *et al*, 2003; Wu *et al*, 2004), 而 Akt 在调控细胞凋亡过程中发挥着非常重要的作用。因此下一步开展中国明对虾 Akt 在蛋白水平上的研究对进一步深入了解 Akt 在病原(细菌、病毒)刺激时的应答机制具有重要意义。目前对中国明对虾 Akt 与其它功能因子之间的相互作用关系, 以及其在中国明对虾中其它潜在的重要功能还未进行深入研究。通过研究 FcAkt 与其它因子的相互作用, 一方面为进一步推动对虾免疫信号通路的研究提供理论指导, 另一方面为揭示 FcAkt 在中国明对虾中其它重要的生物学功能以及在生长发育过程中的作用奠定理论基础。

参 考 文 献

- 叶旻玉, 刘利平, 戴习林等, 2008. 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因 cDNA 片段的克隆及序列分析. 上海水产大学学报, 17(3): 263—267
- 周颖, 王建, 贺福初, 2006. 蛋白激酶 B(PKB/Akt)的结构、调控与功能. 生命的化学, 26(3): 226—228
- 相建海, 2001. 海水养殖生物病害发生与控制. 北京: 海洋出版社, 1—200
- 姜华, 张学军, 2004. PKB/Akt: 一个具有多种功能的蛋白激酶. 生命科学, 16(3): 148—164
- 康翠洁, 王金星, 赵小凡等, 2002. 中国对虾抗菌肽成熟肽的 cDNA 克隆. 山东大学学报(理学版), 37(6): 552—556
- Clarissa B G, Luis F A, Oscar M V *et al*, 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. Dis Aquat Org, 54: 73—78
- Cross D A, Alessi D R, Cohen P *et al*, 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature, 378: 785—789
- Datta S R, Dudek H, Tao X *et al*, 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death ma-

- chinery. Cell, 91: 231—241
- Dugani C B, Klip A, 2005. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. EMBO Rep, 6(12): 1137—1142
- Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N *et al*, 2006. Akt induces β -cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. Diabetes, 55(2): 318—325
- Gay N J, Gangloff M, Weber A N, 2006. Toll-like receptors as molecular switches. Nature, 6: 693—698
- Huang X D, Yin Z X, Jia X T *et al*, 2010. Identification and functional study of a shrimp Dorsal homologue. Dev Comp Immunol, 34: 107—113
- Huang X D, Yin Z X, Liao J X *et al*, 2009. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue. Fish Shellfish Immun, 27: 230—238
- Jones P F, Jakubowicz T, Pitossi F J *et al*, 1991. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 4171—4175
- Jozwiak J, Sergiusz J, Tomasz G *et al*, 2005. Positive and negative regulation of TSC2 activity and its effects on downstream effectors of the mTOR pathway. Neuromolecular Med, 7(4): 287—296
- Julia A Romashkova, Sergei S Makarov, 1999. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. Nature, 401(6748): 86—90
- Li F H, Wang D D, Li S H *et al*, 2010. A Dorsal homolog (FcDorsal) in the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to both bacteria and WSSV challenge. Dev Comp Immunol, 34: 874—883
- Liew F Y, Xu D, Brint E K *et al*, 2005. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. Nat Rev Immunol, 5: 446—58
- Marc S Dionne, Linh N Pham, Mimi Shirasu-Hiza *et al*, 2006. Akt and foxo Dysregulation Contribute to Infection-Induced Wasting in *Drosophila*. Current Biology, 16: 1977—1985
- Orike N, Middleton G, Borthwick E *et al*, 2001. Role of PI3-kinase, Akt and Bcl-2-related proteins in sustaining the survival of neurotrophic factor-independent adult sympathetic neurons. J Cell Biol, 154: 995—1005
- Rodgers E E, Theibert A B, 2002. Functions of PI3-kinase in development of the nervous system. Int J Dev Neurosci, 20: 187—197
- Vargas A F, Yepiz P G, Jiménez V F *et al*, 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. Comp Biochem Phys B, 138: 415—422
- Wu J L, Muroga K, 2004. Apoptosis does not play an important role in the resistance of 'immune' *Penaes japonicus* against white spot syndrome virus. J Fish Dis, 27: 15—21
- Xu W T, Wang X W, Zhang X W *et al*, 2010. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Amino Acids, 39: 1227—1239

EXPRESSION AND FUNCTION ANALYSIS OF Akt/PKB IN PATHOGENS-CHALLENGED CHINESE SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS*

CHI Yan-Hong^{1,2}, LI Shi-Hao^{1,2}, WANG Dong-Dong^{1,2}, SUN Yu-Miao¹,
LI Fu-Hua¹, XIANG Jian-Hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

Abstract Akt/PKB is a serine/threonine protein kinase that plays a key role in multiple cellular processes. Based on the bioinformatics analysis of transcriptome data, an Akt/PKB gene (FcAkt) was obtained from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the protein structures of FcAkt was analyzed. Real-time PCR was applied to study the transcription profiles of FcAkt after Gram-positive (G+) bacteria (*Micrococcus lysodeikticus*), Gram-negative (G-) bacteria (*Vibrio anguillarum*) or WSSV injection in shrimp. The open reading frame (ORF) of FcAkt consists of 1536bp encoding 511aa. The predicted molecular weight (MW) of the deduced protein of FcAkt was 58.92kDa, and its theoretical pI was 5.60. Homology analysis showed that the amino acid sequence of Akt had high conservation among different species, and phylogenetic analysis showed that FcAkt and Akt from other arthropods had close genetic relationship. The transcription of FcAkt showed apparent changes after bacteria or WSSV challenge. The present data provide clues that FcAkt might play potential important roles in the innate immunity of shrimp.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; Akt/PKB; Gene cloning; Expression analysis