

蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)两种 Wap65 基因克隆及蛋白功能的研究*

王丹妮¹ 郑春静² 江婷佳¹ 刘军^{1①}

(1. 中国计量学院 杭州 310018; 2. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315010)

摘要 采用同源克隆及 Race 技术获取了蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 基因的 cDNA 全长序列, 长度分别为 1659 bp 和 1725 bp, 各自编码 426 和 436 个氨基酸。通过 ClustW 同源性及进化树分析表明: 蓝点马鲛 Wap65-1 与 Wap65-2 基因的同源性为 60%, 处于不同的分支上。进一步对该鱼的幼体进行热诱导, 通过 qRT-PCR 分析表明: 两种基因在高温诱导下均有上调, 而 Wap65-2 基因上调呈现显著性差异($P < 0.05$)。在此基础上, 构建两种基因冷休克表达系统, 成功实现了两种蛋白的可溶性表达, 而且发现 Wap65-2 对高温胁迫下 *E. coli* BL21 (DE3) 的存活具有较强的保护作用。本研究为蓝点马鲛耐热品种的培育奠定了理论基础。

关键词 蓝点马鲛; Wap65; 基因克隆; 表达; 功能研究

中图分类号 Q78 **doi:** 10.11693/hyhz20150700206

Wap65 蛋白(Warm temperature acclimation 65kDa protein)是血浆蛋白的一种, 最早发现于金鱼、鲤鱼体内(Kikuchi *et al.*, 1995)。实验结果表明, 金鱼和鲤鱼在高温诱导下, 有一种分子量为 65kDa 的蛋白大量存在于各组织中, 被命名为 Wap65, 此蛋白与哺乳动物的血红素结合蛋白高度同源(Altruda *et al.*, 1985; Nikkila *et al.*, 1991; Morgan *et al.*, 1993; Tolosano *et al.*, 2002)。研究发现, Wap65 基因在不断进化中, 由于受到串联机制和全基因组重复的影响(Sha *et al.*, 2008), 产生了两种不同的异构体, 分化为两种蛋白, 分别为 Wap65-1 和 Wap65-2。目前, 已经在许多鱼类发现了该基因, 包括青鳞鱼(Hirayama *et al.*, 2004)、蓝鲱鱼(Peatman *et al.*, 2008)、斑点叉尾鲷(Sha *et al.*, 2008)、剑尾鱼(Aliza *et al.*, 2008)、红鳍东方鲀(Hirayama *et al.*, 2003)、真裸南极鱼(Clark *et al.*, 2008)、香鱼(Shi *et al.*, 2010)、鲈鱼(Sarropoulou *et al.*, 2010)、大鳞泥鳅(Cho *et al.*, 2012)等。

蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)属于辐鳍亚纲、鲈形目、鲭亚目、鲭科、马鲛属, 广泛分布于北

太平洋西部, 在我国产于东海、黄海和渤海, 在南海以海南文昌铺前附近海域最为著名。由于近年来人们对蓝点马鲛的肆意捕捞以及环境不断恶化, 导致蓝点马鲛的产量急剧减少, 目前已经在中国宁波象山建立了蓝点马鲛的保护基地。蓝点马鲛属近海水温性洄游鱼类, 因此高温是蓝点马鲛的生存及生产的重要因素之一。

在 NCBI 数据分析中发现, 对蓝点马鲛 Wap65 的研究主要集中在微卫星的研究上, 本研究通过克隆 Wap65-1 和 Wap65-2 的基因全长序列, 并表达相应蛋白, 研究其功能, 以期能为蓝点马鲛耐热品种的培育提供资料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

2014 年 5 月在浙江省宁波市象山港捕捞蓝点马鲛样本 12 尾[平均重(750±5)g], 取头、肌肉、肝脏、脾脏、头肾这 5 个组织迅速投入液氮中保存, 根据 TRIzol[®] Plus RNA Purification Kit (Invitrogen)提取上

*宁波市重大(重点)科技攻关计划项目, 2012C10035 号。王丹妮, 硕士研究生, E-mail: 1260870118@qq.com

通讯作者: 刘军, 副教授, E-mail: liujuncjlu@163.com

收稿日期: 2015-07-29, 收修改稿日期: 2015-08-21

述 5 个组织的总 RNA(步骤见说明书), 并采用 SuperScript™ First-Strand Synthesis Kit 逆转录为 cDNA, 并保存于-20°C 冰箱备用。热诱导实验所用的鱼苗来自宁波市海湾苗种繁育中心, 共取 24 尾[平均重(1.0±0.2)g], 热处理后, 保存于液氮中备用。

1.2 方法

1.2.1 Wap65-1 和 Wap65-2 基因全长的克隆 根据 NCBI 中黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)的 Wap65-1 以及真裸南极鱼(*Harpagifer antarcticus*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、鲈鱼(*Miichthys miiuyi*)的 Wap65-2 氨基酸序列, 利用 ClustalW 对以上序列进行

保守性分析并分别设计简并性引物(见表 1)。

以蓝点马鲛肝脏 cDNA 为模板, 采用巢式 PCR (第一轮引物采用 F1 和 R1, 第二轮引物采用 F2 和 R2), 克隆 Wap65-1 和 Wap65-2 的部分片段, 采用 Platinum® PCR SuperMix High Fidelity 酶(Invitrogen), 进行两轮 PCR, 体系为 25μL, 反应条件均为: 94°C 预变性 2min; 94°C 30s, 62°C 30s, 68°C 2min, 38 个循环, 产物保存于-20°C。

然后根据已获得的 Wap65-1 和 Wap65-2 基因部分片段分别设计 3'和 5'RACE 特异性引物(见表 1), 利用 Gene RACE™ Kit 扩增得到 cDNA 全长。第一轮 PCR 反应体系为 12.5μL, 反应条件: 94°C 预变性 2min;

表 1 实验中所用到的引物序列
Tab.1 The sequence of primers used in this study

引物名称	序列(5'—3')	用途
1-F1	GAGTCCTTCKCWGAGTTGGAT	Wap65-1 中间片段克隆
1-R1	GGTCATCCTTGATCATGTAA	
1-F2	GACCACAAGGTGTTTCAGCTAT	
1-R2	CAGCGTCCACCTCACTGTG	
2-F1	CAGCTTGATGACATCCATAACA	Wap65-2 中间片段克隆
2-R1	TCAATCAGGGTGTAGTGAG	
2-F2	GATGACAAGGTGTTTCAGCTA	
2-R2	GATGTACACCTGATCATCCTTA	
r1-R1	CTCCTTGAAGGCACTCTCGATGGTGTCA	Wap65-1 5'RACE 合成
r1-R2	GTGCAGTTTGGCATTTGTCGTGAACCTCT	
r1-F1	CCACCTGGATGCTGCTGTGGAGTGTC	Wap65-1 3'RACE 合成
r1-F2	GGAGTTCACGACAATGCCAAACTGCACA	
r2-R1	GTCACGATGGGTGTCCAGACGCATGTA	Wap65-2 5'RACE 合成
r2-R2	CAGCCAGCGTAAAGCAGAAGTGCAGACA	
r2-F1	CATGGTCCCACCTGCCTGTCTGCACTT	Wap65-2 3'RACE 合成
r2-F2	CCGAAGGATGCCCGCAGTACTTTCAT	
q1-F	CTGCACATCTGCTTTCGCTT	Wap65-1 荧光定量引物
q1-R	CCACGTGGTCGCTATCTTCACT	
q2-F	CAGAGCACCCAGATGAACACGAT	Wap65-2 荧光定量引物
q2-R	GGATACCCGTCCTCCAGATTG	
18S-F	GAGGCCCTGTAATTGGAATGAGTA	内参引物
18S-R	CTGCAGCAACTTTAAGATACGCT	
1-F3	CTACCGTGGACCAGAGGACT	检测 Wap65-1 全长
1-R3	GTGGTCAAATCTTGCGAGTGTTA	
2-F3	GCTCCACAGTGAGACTCCACAT	检测 Wap65-2 全长
2-R3	CACCGATAAGCAGATGACTGTGAGA	
pCol-Nde-65-1NF	GCATCATCATCATCATATGAAGCTGCTCACCCACATC	Wap65-1 表达载体构建
pCol-Eco-65-1NR	CAGGTCGACAAGCTTGAATTCCTTGTAGTGGTCACAGCCAAAC	
pCol-Nde-65-2NF	GCATCATCATCATCATATGAAGCTGCTCACAAAACTCTC	Wap65-2 表达载体构建
pCol-Eco-65-2NR	CAGGTCGACAAGCTTGAATTCCTAATCCCGACATCCCATCAT	

98°C 10s, 72°C 30s, 5个循环; 98°C 10s, 70°C 30s, 5个循环; 98°C 10s, 65°C 30s, 25个循环; 最后, 68°C 彻底延伸 5min。第二轮 PCR 反应体系 20 μ L, 反应条件: 94°C, 2min, 98°C 10s, 65°C 30s, 30个循环; 最后 68°C 彻底延伸 5min。PCR 产物保存于-20°C。

上述所有 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接, 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 培养过夜, 每块板随机挑选 5 个菌落, 然后进行菌落检测, 选取阳性菌, 送往上海生物工程有限公司进行测序。

序列拼接后, 得到 Wap65-1 和 Wap65-2 基因的 cDNA 序列全长, 并设计引物, 进行全长克隆, 克隆所得的基因序列与拼接序列一致, 从而确定基因的序列。

1.2.2 生物信息学的分析 运用 NCBI 中的 BLASTN 对 Wap65-1 和 Wap65-2 基因的同源性进行分析, 用 MEGA 5 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, 并利用 PredictProtein 软件对 Wap65-1 和 Wap65-2 蛋白序列进行功能位点分析, 采用 DNAMAN 软件将蓝点马鲛的这两种氨基酸序列和已知的其它鱼类的氨基酸序列进行比对和分析, 采用 Signal P 4.1 工具进行蛋白信号肽分析。

1.2.3 蓝点马鲛幼体高温胁迫及两种基因的表达特征分析 将蓝点马鲛的幼体在 20°C、25°C、30°C、35°C 的温度下进行 1h 的热诱导, 然后提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA, 用于荧光定量表达分析。根据 Beacon Designer 7.0 设计目的基因及内参引物(见表 1)。采用 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 进行荧光定量 PCR(反应体系及反应条件见说明书)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 Wap65-1 和 Wap65-2 基因的表达量并进行分析, 并用 SPSS11.0 软件进行显著性分析。

1.2.4 蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 原核表达及 *E. coli* BL21 (DE3) 热耐受性实验 设计特异性引物(见表 1), 扩增两个基因 ORF, 用 *EcoR* I 和 *Nde* I 对目的基因及 pCold TF 载体分别双酶切, 根据 In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech) 构建重组质粒并导入表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3), 37°C 培养至 OD 值 0.4—0.6 之间, 15°C 进行冷休克, 然后加入 IPTG(至终浓度为 0.5mmol/L), 15°C 低温诱导 20 h。之后离心, 收集总蛋白, 剩下的菌液超声破碎, 收集上清, 然后将总蛋白及上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。再取一部分样品, SDS-PAGE 电泳后, 用 His-Tag Monoclonal Antibody 一抗, 做 Western blot 分析, 经过转膜、杂交及显色, 分析蛋白的表达情况。

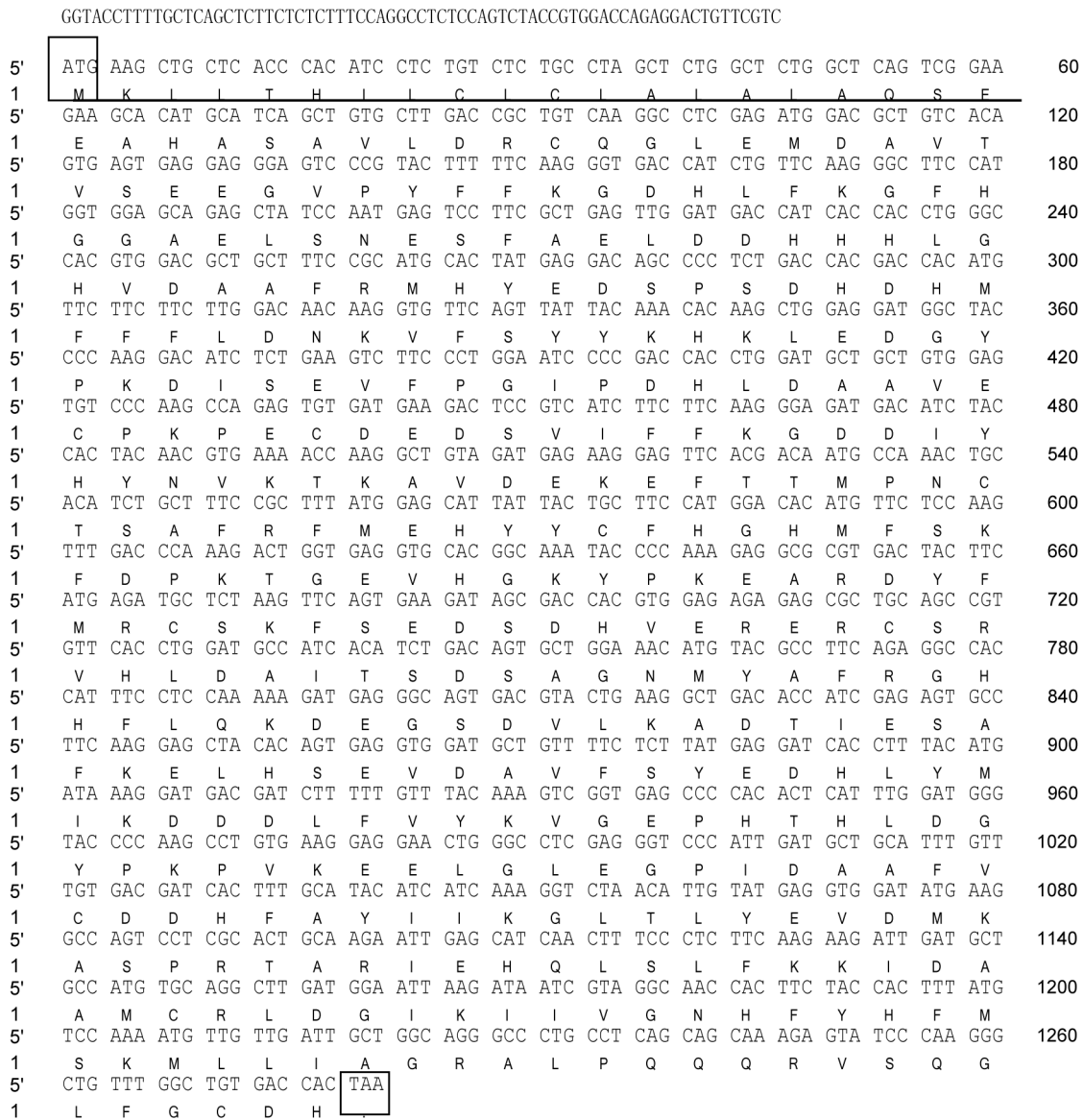
在热耐受性实验中, 将带有 pCold TF、Wap65-1-pCold TF、Wap65-2-pCold TF 基因的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株, 接种后, 37°C 扩大培养使其 OD 值在 0.5, 然后加入 IPTG(终浓度 0.5mmol/L) 低温诱导 20h 后, 取出测其 OD 值均在 0.6—0.7, 在保证菌液浓度一致的前提下, 分别取 1mL 的细菌转移到 45°C 条件下, 热处理 0、15、30、45 和 60min, 每个时间点的菌液浓度保持一致, 并在每个时间点取 50 μ L 菌液, 然后稀释 50 倍后, 取 100 μ L 涂板, 37°C 过夜培养, 计算每个培养板的菌落数目。运用 SPSS 软件进行分析, 并计算细菌生存率, 数据以平均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 Wap65-1 和 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列分析

采用 RACE 的方法获得 Wap65-1 和 Wap65-2 的 cDNA 序列全长。登录号分别为: KT356862 和 KT356863。Wap65-1 基因长度为 1659bp, 其中 5'和 3'未参与编码的碱基长度分别为 71bp 和 307bp, 开放阅读框(ORF)为 1281bp, 编码区编码 426 个氨基酸, 预测分子量大小约为 48.74kDa, 理论等电点为 5.5, 3'端含有终止密码子 TAA 及一个 ploy(A)尾巴。运用 Predictprotein 分析蓝点马鲛的 Wap65-1 蛋白功能位点, 发现具有多个功能位点的蛋白序列, 包括 2 个 N-糖基化位点(67—70 和 179—182), 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(362—364 和 365—367); 8 个酪蛋白磷酸化位点(40—43, 69—72, 93—96, 199—202, 286—289, 293—296, 316—319 及 353—356); 5 个酪氨酸激酶磷酸化位点(113—120, 155—162, 185—191, 211—219 及 302—309); 3 个 N-甲基化位点(62—67, 252—257 及 420—425)。

Wap65-2 基因长度为 1725bp, 其中, 5'和 3'的未参与编码的碱基长度分别为 83bp 和 331bp, 开放阅读框(ORF)为 1311bp, 编码区编码 436 个氨基酸, 预测分子量大小约为 48.45kDa, 理论等电点为 5.7, 3'端含有终止密码子 TAA 及一个 ploy(A)尾巴。运用 Predictprotein 分析蓝点马鲛的 Wap65-2 蛋白序列的功能位点, 同样发现具有多个功能位点的蛋白序列, 包括 3 个 N 糖基化位点(78—81 和 208—211, 220—223), 7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(80—82, 179—181, 277—279, 290—292, 334—336, 373—375 和 411—413), 11 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(51—54, 80—83, 144—147, 251—254, 257—260, 277—280, 290—293, 296—299, 303—306, 316—329 及 334—337), 2 个酪氨



GAGGTGTGCTTGACAGGACTGAATCACATACAACACAGTGAACTTGAAAAACAACAGCACCAACAACATCGTGCAGGAGGCCCTAATAACT
 CGCAAGATTTGACCACAAGTGCTTACAGAGGATGGTGATTCTAGTTGTTCCCTCTGTGCTTACCTCAAATAACCCCTTCTCTGTTTTATTT
 CCTTTGGAGGAGATTCTTTTCATAATTAAGCTCTGTGGTCCAACTGATTCAATTTGTACAGTGTGATGTGAATAAATTTGAGTGGCGACA
 AACAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1 Wap65-1 开放阅读框核苷酸序列及推导编码的氨基酸

Fig.1 The open reading frame of full length cDNA of Wap65-1 gene and deduced amino acid sequence
 方框里 ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子, 下划线为信号肽

酸激酶磷酸化位点(166—173 和 196—202), 3 个肉蔻酰基位点(32—37, 240—245 和 387—392)。

2.2 Wap65-1 和 Wap65-2 基因多序列比对及系统进化树分析

使用 DNAMAN 软件对蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 的氨基酸序列进行同源序列分析, 结果如图 3 所示, 蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)Wap65-1

基因与花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的同源性为 86%, 与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)的同源性为 85%。利用 MEGA5 软件进行系统进化分析, 结果表明, 蓝点马鲛 Wap65-1 基因与花鲈的亲缘关系比较近。蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)Wap65-2 基因与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、花鲈(*Lateolabrax*

AAAAAGGGCATTCACATGCACAGCTACACCTCTGCTCCACAGTGAGACTCCACATCTGAGGACTCCATCAGGACTGGACATC

5'	ATG	AAG	CTG	CTC	ACC	AAA	ACT	CTC	TTT	TTG	TGC	TTA	GTT	ATT	TGC	CTC	ACT	AAC	GGA	GCC	60
1	M	K	L	L	T	K	T	L	F	L	C	L	V	I	C	L	T	N	G	A	
5'	CCT	GCG	CAC	CAC	GAA	CAT	GCA	GCA	GTA	GAA	GAT	GGA	GGC	ACT	GAT	GCA	GCT	CTG	CCA	GAC	120
1	P	A	H	H	E	H	A	A	V	E	D	G	G	T	D	A	A	L	P	D	
5'	CGG	TGT	GCA	GGG	ATT	GAG	TTT	GAT	GCA	ATA	ACT	CCT	GAT	GAG	AAA	GGA	ACA	ACT	TTC	TTC	180
1	R	C	A	G	I	E	F	D	A	I	T	P	D	E	K	G	T	T	F	F	
5'	TTC	AAA	GAT	GGC	TAT	GTA	TGG	AAG	GGC	TTC	GGT	GGT	GCA	GCT	CAT	CTC	TCC	AAT	GAG	TCC	240
1	F	K	D	G	Y	V	W	K	G	F	G	G	A	A	H	L	S	N	E	S	
5'	TTC	AAG	GAG	CTG	GAT	GAC	ATC	CAC	AAC	ATA	GGC	CAT	GTT	GAC	GCC	GCC	TTC	CGT	ATG	CAC	300
1	F	K	E	L	D	D	I	H	N	I	G	H	V	D	A	A	F	R	M	H	
5'	AAC	ACA	GAG	CAC	CCA	GAT	GAA	CAC	GAT	CAT	GTC	TTT	TTC	TTC	CTG	GAT	GAC	AAG	GTG	TTC	360
1	N	T	E	H	P	D	E	H	D	H	V	F	F	F	L	D	D	K	V	F	
5'	AGC	TAC	TTT	GGC	CAC	AAT	CTG	GAG	GAC	GGG	TAT	CCA	AAA	GAA	ATC	CAG	GAG	GCC	TTC	CCA	420
1	S	Y	F	G	H	N	L	E	D	G	Y	P	K	E	I	Q	E	A	F	P	
5'	GGA	GTC	CCT	ACT	CAC	CTG	GAT	GCT	GCT	GTG	GAG	TGT	CCC	AAA	GGA	GAG	TGC	ACG	GCC	GAC	480
1	G	V	P	T	H	L	D	A	A	V	E	C	P	K	G	E	C	T	A	D	
5'	TCG	GTT	TTG	TTC	TTC	AAG	GGA	CAT	GAT	GTG	CAT	GTT	TAT	GAT	ATT	GCC	ACA	AAG	ACA	GTG	540
1	S	V	L	F	F	K	G	H	D	V	H	V	Y	D	I	A	T	K	T	V	
5'	AAG	ATC	AAG	ACA	TGG	TCC	CAC	CTG	CCT	GTC	TGC	ACT	TCT	GCT	TTA	CGC	TGG	CTG	GAG	CAC	600
1	K	I	K	T	W	S	H	L	P	V	C	T	S	A	L	R	W	L	E	H	
5'	TAC	TAC	TGT	TTC	CAT	GGA	CAC	AAC	TTC	ACC	AAC	TCA	GTA	TCA	GGA	GAG	GAG	GTG	AAT		660
1	Y	Y	C	F	H	G	H	N	F	T	K	F	N	S	V	S	G	E	V	N	
5'	GGT	ACC	TAC	CCG	AAG	GAT	GCC	CGC	AGT	TAC	TTC	ATG	TCG	TGC	CCC	GGC	TTT	GGC	CAT	GGA	720
1	G	T	Y	P	K	D	A	R	S	Y	F	M	S	C	P	G	F	G	H	G	
5'	GGT	CGT	TAT	ACA	GTC	CCT	AAA	TGC	AGT	GAA	ACC	AAA	ATA	GAT	GCC	ATC	ACC	ACT	GAT	GAT	780
1	G	R	Y	T	V	P	K	C	S	E	T	K	I	D	A	I	T	T	D	D	
5'	GCA	GGC	AAA	ACT	TAT	TTC	TTT	GCA	GGT	CAT	ATC	TAC	ATG	CGT	CTG	GAC	ACC	CAT	CGT	GAC	840
1	A	G	K	T	Y	F	A	G	H	I	Y	M	R	L	D	T	H	R	D		
5'	GGC	CTT	CAC	GCC	TTC	CCA	ATC	ACC	AGG	TCA	TGG	AAG	GAG	GTG	ACC	ACG	GGG	GTG	GAT	GCT	900
1	G	L	H	A	F	P	I	T	R	S	W	K	E	V	T	T	G	V	D	A	
5'	GTC	TTC	TCC	TAT	GAT	GAC	AAA	ATC	TAT	TTG	ATT	AAG	GAC	GAT	CAG	GTT	TAC	ATC	TAC	AAA	960
1	V	F	S	Y	D	K	I	Y	L	I	K	D	D	Q	V	Y	I	Y	K		
5'	GCA	GCT	GGT	CAG	TAC	ACA	CTG	ATT	GAA	GGC	TAC	CCT	AAA	ACC	CTG	AAG	GAA	GAG	CTG	GGC	1020
1	A	A	G	Q	Y	T	L	I	E	G	Y	P	K	T	L	K	E	E	L	G	
5'	ATT	GAA	GGG	CAT	GTG	GAC	GCT	GCT	TTT	GTC	TGT	CCC	AGT	GAA	CAC	ACG	GTT	CAC	ATA	ATC	1080
1	I	E	G	H	V	D	A	A	F	V	C	P	S	E	H	T	V	H	I	I	
5'	CAA	GGA	CAG	AAG	ATG	CAT	GAC	GTC	GAC	CTA	ACT	GCC	ACG	CCA	AGG	GTT	GTG	ACC	CAA	GAT	1140
1	Q	G	Q	K	M	H	D	V	D	L	T	A	T	P	R	V	V	T	Q	D	
5'	CAT	TCT	TTG	ACC	TTG	GAT	GGC	GTT	GAT	GCT	GGT	CAG	TGT	GGT	CCA	GAG	GGA	ATT	AAT	CTG	1200
1	H	S	L	T	L	D	G	V	D	A	G	Q	C	G	P	E	G	I	N	L	
5'	TTC	AAG	GGC	CCA	CAG	TTT	TAC	CAC	TAT	GAG	AGC	GCA	AAG	GCA	CTG	GCT	GAA	AGC	ACA	GTC	1260
1	F	K	G	P	Q	F	Y	H	Y	E	S	A	K	A	L	A	E	S	T	V	
5'	ACC	CCT	GCG	CCT	CAA	CCT	ATC	ACC	GCA	GCA	ATG	ATG	GGA	TGT	CGG	GAT	TAG				
1	T	P	A	P	Q	P	I	T	A	A	M	M	G	C	R	D					

GAGTCAGAGATGGGAGAATATCTCACAGTCATCTGCTTATCGGTGCCCGCCCAACAATACAGAGGAACAAGAGACAGGAAGACAG
 AACACGCATCAAAATAAATCTTCTTATCAGTTATTTTCATGAGTGGATGAAAGAAGGTTAACATCAGGGAATCAGATAGAGAAAGATC
 TGGATTTGTGGACCAATGCAGTGAATAAAAGTTTATCATTAAAGAAAATTAAGTTGCCCCCTTGCATACAAAAGAGTGTGGGAA
 TCAAAATTTGACTTTTGTCCGGTGAATAAAAGTGGGAAAGAAAAGTGTAAAAA

图2 Wap65-2 开放阅读框核苷酸序列及推导编码的氨基酸

Fig.2 The open reading frame of full length cDNA of Wap65-2 gene and deduced amino acid sequence
 方框里 ATG 为起始密码子, TAG 为终止密码子, 下划线为信号肽

japonicus)的同源性为 84%, 与南极真裸鱼(*Harpagifer antarcticus*)、鲑鱼(*Miichthys miiuy*)的同源性为 82%, 与大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)的同源性为 80%。利用 MEGA5 软件进行系统进化分析, 结果表明, 蓝点马鲛 Wap65-2 与条石鲷、花鲈的亲缘关系比较近。

2.3 Wap65-1 和 Wap65-2 在不同温度下 mRNA 的表达特征分析

qRT-PCR 结果表明: 蓝点马鲛 Wap65-1 基因和 Wap65-2 基因在 20°C、25°C、30°C、35°C 分别都有表达, 而 Wap65-2 的表达量随着温度的增高而明显增高, 这一结果与所查文献所得出的结果类似, 在蓝

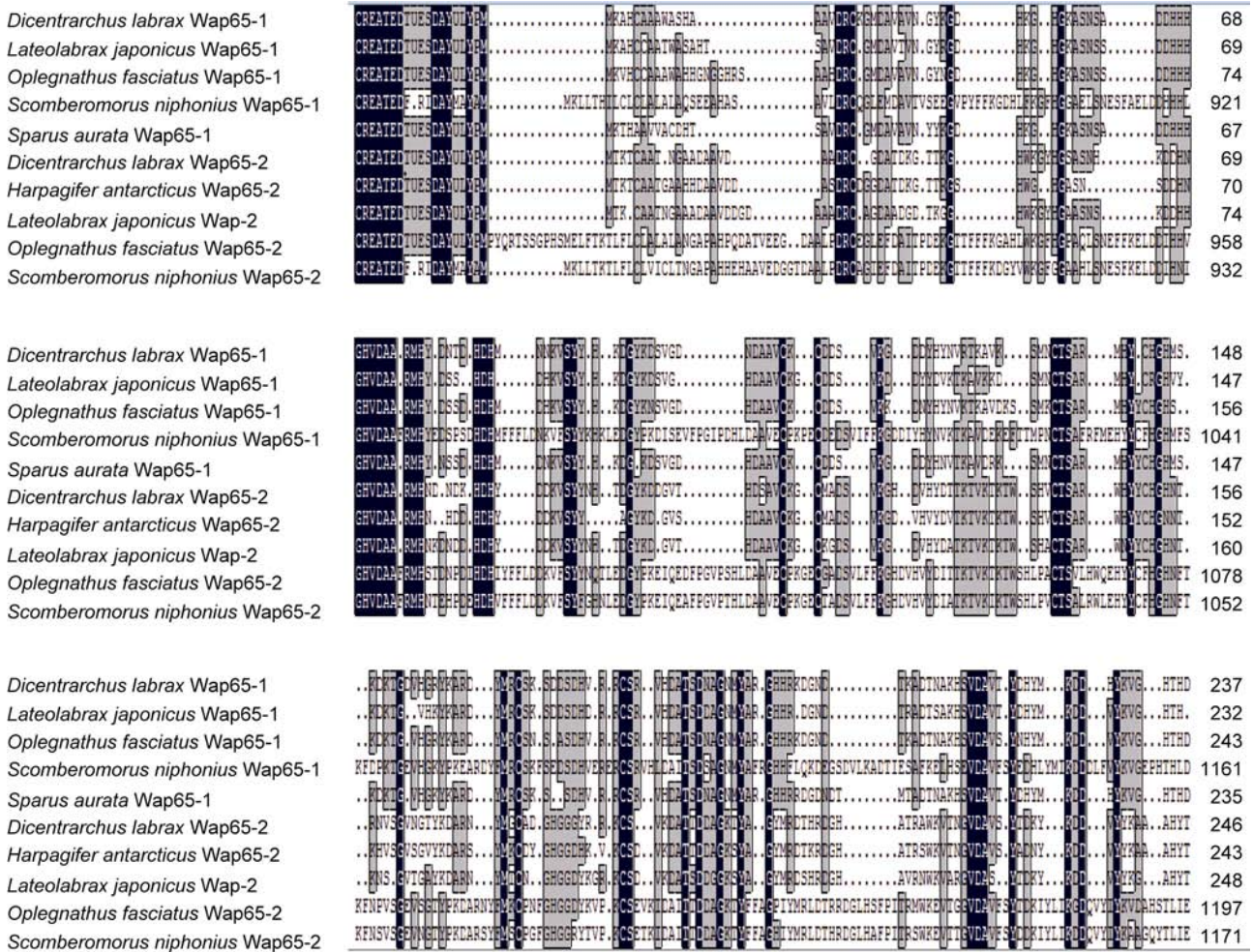


图 3 蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 氨基酸序列与其它鱼类氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of Wap65-1 and Wap65-2 from *S. niphonius* with other fishes
同种氨基酸用相同颜色背景表示; 缺失的氨基酸用“-”表示

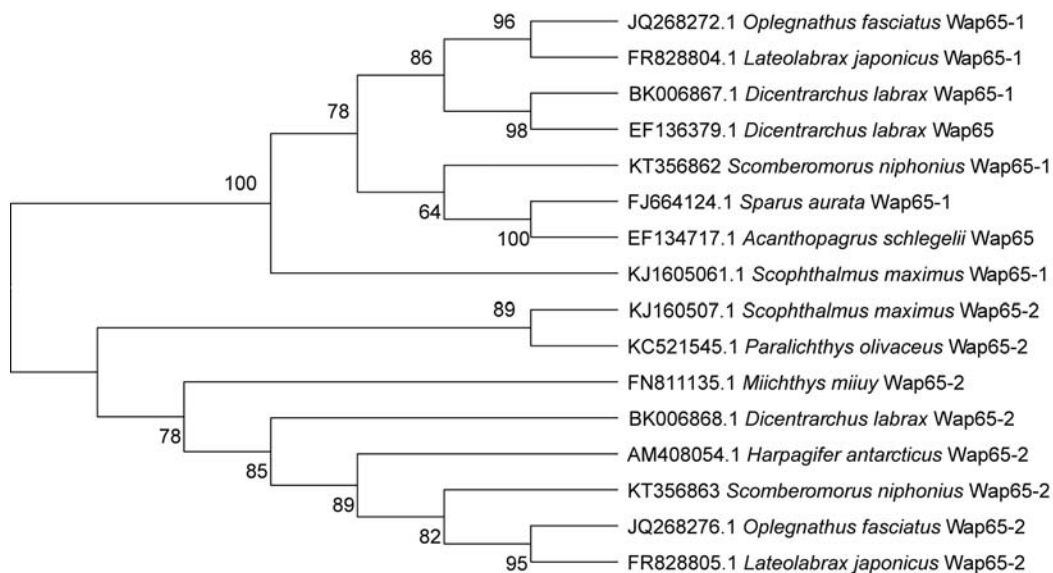


图 4 蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 基因与其它鱼类的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of Wap65-1 and Wap65-2 from *S. niphonius* and other fishes

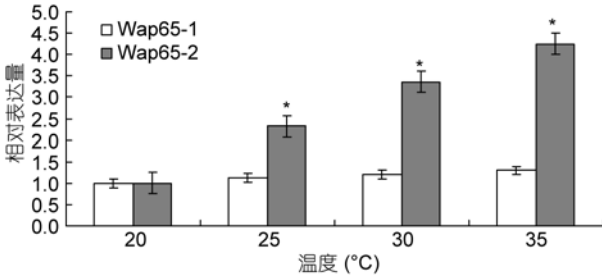


图5 蓝点马鲛幼体在不同温度下 Wap65-1 和 Wap65-2 的相对表达量

Fig.5 Expression characterization of Wap65-1 and Wap65-2 transcript in different temperature

点马鲛体内, 主要参与温度调节的基因是 Wap65-2。

2.4 蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 原核表达及 *E. coli* BL21 (DE3)热耐受性实验

重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测表明在相对分子质量为 100kDa 处出现浓度较高的表达条带, 由于 pCold TF 载体自带表达伴侣, 所以表达出的蛋白分子量应减掉自带分子伴侣的分子量(48kDa)。经过计算后, 所得蛋白的分子量与预测一致, 并且用 His-Tag Monoclonal Antibody 一抗进行 Western blot 分析(见图 6)。

通过对表达 pCold TF、Wap65-1-pCold TF、Wap65-2-pCold TF 的 *E. coli* BL21 (DE3)进行 45°C 的热处理, 在处理 15、30、45 和 60min 后, 细菌生存率

分别是 40%、22%、15%、7%, 以及 75%、60%、45%、30%; 而对照组(含 pCold TF)细菌生存率在上述各时间点分别是 30%、17%、10%和 5%(见图 7), 这说明热刺激条件下, Wap65-1-pCold TF 和 Wap65-2-pCold TF 对细菌都起到了一定程度的保护作用, 而 Wap65-2 与空白对照组比较, 表明其保护作用尤为显著。

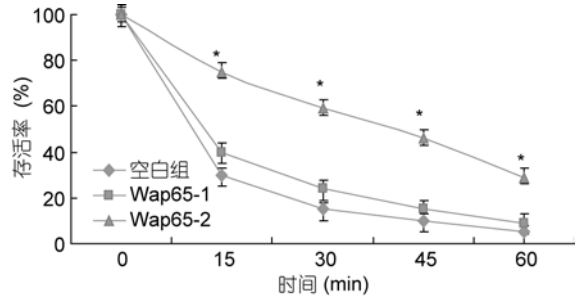


图7 Wap65 基因在高温胁迫下保护实验

Fig.7 The protection experiments of Wap65 under high temperature stress

3 讨论

Wap65 广泛存在于硬骨鱼类的血浆蛋白, 参与了体内多种机制的调控。本次研究通过克隆技术获得了蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 的 cDNA 全长序列, 通过 SDS-PAGE 电泳检测结果表明, Wap65-1 和 Wap65-2 的分子量大约为 48kDa, 与理论大致吻合。两个基因的 N 端都有 19 个氨基酸序列为信号肽序列, 与花鲈及其它硬骨鱼类的 Wap65 基因一样。虽然 Wap65-1 与 Wap65-2 是具有同源性的, 但是, Wap65-2 蛋白具有鱼类 Wap65 的典型结构特征, 具有保守的 7 个疏水残基和 2 个组氨酸残基, 这些都与血红素结合区的形成有关(史雨红等, 2012), 而 Wap65-1 却没有。

通过对蛋白质氨基酸的分析, 发现在氨基酸的组成中, 两种蛋白赖氨酸和组氨酸的含量比较高, 其氨基酸上含有多个功能位点, 例如糖基化、磷酸化等, 有助于进一步研究蛋白的结构稳定性和功能, 同样也促进了蛋白质的主要定位。

通过对其进化的分析, 结果表明: 蓝点马鲛的 Wap65-1 与花鲈亲缘关系最近, Wap65-2 与条石鲷、花鲈的 Wap65-2 亲缘关系最近。

许多资料证明, Wap65-1 与 Wap65-2 除了在分子特征的差异, 其表达量在不同温度下, 也有差异。在高温处理的蓝点马鲛幼体组织定量结果表明, Wap65-2 的表达量随着温度的升高表达量呈显著性差异($P < 0.05$), 与所查文献结果一致。这就说明了在

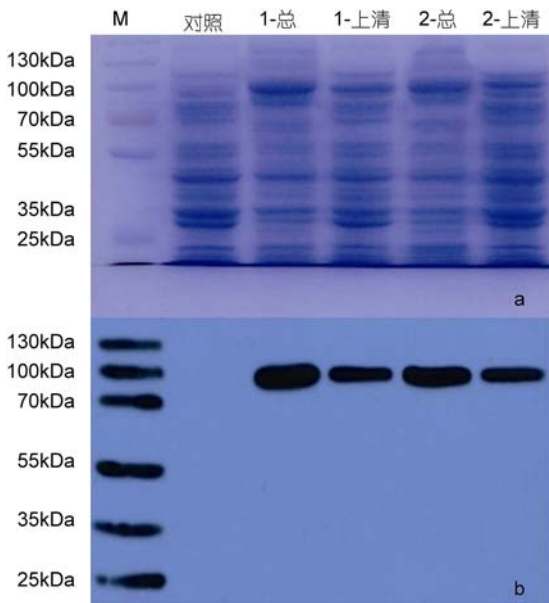


图6 蓝点马鲛 Wap65 基因的原核表达

Fig.6 Prokaryotic expression of *S. niphonius*

a. Wap65 两种蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果; b. Wap65 两种蛋白的 Western bolt 分析结果

蓝点马鲛体内, 其参与温度调节的主要是 Wap65-2。

鱼类 Wap65-1 和 Wap65-2 表达的差异性证明了它们之间的功能的差异性。通过对鱼类在进化过程中适应性的分析, 可以知道 Wap65-2 仍然处于快速的进化当中, 其中也存在着一些选择位点, 称为正达尔文选择位点, 尤其是在 Wap65-2 中该位点更多一些 (Sarpoulou et al, 2010)。

目前, 对 Wap65 这类蛋白的功能研究还不是很多, 除了与温度有关, 还与其它多种环境应激因子有关, 例如水的盐度(Choi et al, 2008), 重金属胁迫等有关(George et al, 2004; Hayes et al, 2004; Berthet et al, 2005; Burgos et al, 2005)。另外, 许多数据研究发现, 鱼类的免疫系统与 Wap65 之间的关系非常密切, 而且细菌、LPS 也会诱导 Wap65 的上调(Peatman et al, 2008), 此外, 转录调控区 NF-IL6 存在于 Wap65-2 基因 5'调控区, 表明免疫因子调节与 Wap65-2 的表达可能相关。但是, 目前在功能和作用途径仍不清楚。

本次研究成功克隆了蓝点马鲛 Wap65-1 和 Wap65-2 基因的 cDNA 序列全长, 并通过不同温度下其表达量的差异, 进一步确定 Wap65-2 与温度之间的关系, 在温度调节过程中起着重要的作用, 为以后深入研究 Wap65 基因在鱼类或者其它动物的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- 史雨红, 陈 炯, 高珊珊等, 2012. 花鲈 Wap65-2 基因的克隆、理化性质及其表达与哈维氏弧菌感染的相关性. 动物学研究, 33(5): 481—486
- Aliza D, Ismail I S, Kuah M-K et al, 2008. Identification of Wap65, a human homologue of hemopexin as a copper-inducible gene in swordtail fish, *Xiphophorus helleri*. Fish Physiol Biochem, 34(2): 129—138
- Altruda F, Poli V, Restagno G et al, 1985. The primary structure of human hemopexin deduced from cDNA sequence: Evidence for internal, repeating homology. Nucleic Acids Res, 13(11): 3841—3859
- Berthet B, Mouneyrac C, Pérez T et al, 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. Comp Biochem Physiol C, 141(3): 306—313
- Burgos M G, Winters C, Stürzenbaum S R et al, 2005. Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: multivariate statistical analysis of relationships between exposure, biomarkers, and ecologically relevant parameters. Environ Sci Technol, 39(6): 1757—1763
- Cho Y S, Kim B S, Kim D S et al, 2012. Modulation of warm-temperature-acclimation -associated 65-kDa protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments. Fish Shellfish Immunol, 32(5): 662—669
- Choi C Y, An K W, Choi Y K et al, 2008. Expression of warm temperature acclimation-related protein 65-kDa (Wap65) mRNA, and physiological changes with increasing water temperature in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. J Exp Zool Part A: Ecol Genet Physiol, 309A(4): 206—214
- Clark M S, Burns G, 2008. Characterisation of the warm acclimated protein gene (wap65) in the Antarctic plunderfish (*Harpagifer antarcticus*). DNA Seq, 19(1): 50—55
- George S, Gubbins M, MacIntosh A et al, 2004. A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution. Mar Environ Res, 58(2—5): 571—575
- Hayes R A, Regondi S, Winter M J et al, 2004. Cloning of a chub metallothionein cDNA and development of competitive RT-PCR of chub metallothionein mRNA as a potential biomarker of heavy metal exposure. Mar Environ Res, 58(2—5): 665—669
- Hirayama M, Kobiyama A, Kinoshita S et al, 2004. The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme. J Exp Biol, 207: 1387—1398
- Hirayama M, Nakaniwa M, Ikeda D et al, 2003. Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes*. Fish Physiol Biochem, 29(3): 211—224
- Kikuchi K, Yamashita M, Watabe S et al, 1995. The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression. J Biol Chem, 270(29): 17087—17092
- Morgan W T, Muster P, Tatum F et al, 1993. Identification of the histidine residues of hemopexin that coordinate with heme-iron and of a receptor-binding region. J Biol Chem, 268: 6256—6262
- Nikkila H, Gitlin J D, Muller-Eberhard U, 1991. Rat hemopexin. Molecular cloning, primary structural characterization, and analysis of gene expression. Biochemistry, 30(3): 823—829
- Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P et al, 2008. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. Mol Immunol, 45(2): 553—566
- Sarpoulou E, Fernandes J M O, Mitter K et al, 2010. Evolution of a multifunctional gene: the warm temperature acclimation protein Wap65 in the European seabass *Dicentrarchus labrax*. Mol Phylogenet Evol, 55(2): 640—649
- Sha Z X, Xu P, Takano T et al, 2008. The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. Mol Immunol, 45(5): 1458—1469
- Shi Y H, Chen J, Li C H et al, 2010. Molecular cloning of liver Wap65 cDNA in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes following *Listonella anguillarum* infection. Mol Biol Rep, 37(3): 1523—1529
- Tolosano E, Altruda F, 2002. Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA Cell Biol, 21(4): 297—306

MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF TWO DIFFERENT Wap65 GENES FROM *SCOMBEROMORUS NIPHONIUS*

WANG Dan-Ni¹, ZHENG Chun-Jing², JING Ting-Jia¹, LIU Jun¹

(1. China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Ningbo Institute of Marine and Fishery, Ningbo 315010, China)

Abstract Full-length cDNA sequences of Wap65-1 and Wap65-2 were cloned first time from the *Scomberomorus niphonius* by homology cloning and RACE techniques. The Wap65-1 and Wap65-2 sequences are 1659bp and 1725bp, encoding 426 and 436 amino acids respectively. Sequences comparison and phylogenetic analysis showed that the homology of Wap65-1 and Wap65-2 is 60%, which located in different branches. Furthermore, the fish larva were induced by high temperature, the real-time quantitative PCR results showed that the expression of two different genes are up-regulated under the high temperature induced, and the expression of Wap65-2 gene show significant difference ($P<0.05$). On this basis, we succeeded getting the soluble expression of two proteins by contracting two kinds of Cold-Shock expression system, and found Wap65-2 had better strong effect on survival protection under high temperature stress. The study laid a theoretical foundation for breeding heat resistant varieties of *S. niphonius*.

Key words *Scomberomorus niphonius*; Wap65; gene cloning; expression; function research