

斑节对虾溶菌酶基因克隆及序列分析

郑清梅 叶 星 白俊杰 吴锐全 罗建仁

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要: 参考对虾溶菌酶基因和类溶菌酶基因及其他多种生物的溶菌酶基因序列, 设计并合成引物。运用 RT-PCR 技术, 从斑节对虾血细胞总 RNA 中扩增获得特异性片段。所获片段回收纯化后克隆到 pGEM-T Easy Vector 系统的 T 载体上。重组子的序列分析表明, 所克隆的斑节对虾溶菌酶基因片段长 658bp, 包括溶菌酶基因开放阅读框(ORF) 477bp 和 3' 端非编码区的 181bp。477bp ORF 共编码 158 个氨基酸, 包括溶菌酶成熟肽 140 个氨基酸残基和信号肽 18 个氨基酸残基。斑节对虾溶菌酶成熟肽推测分子量为 16.32kd, 等电点为 8.78。与南美白对虾溶菌酶基因的碱基序列及推测氨基酸序列比较, 同源性分别为 89.5% 和 93.0%; 与日本对虾类溶菌酶基因的同源性分别为 84.0% 和 91.0%。进一步的序列分析表明, 斑节对虾溶菌酶氨基酸序列与多种类群生物的 ϵ 型溶菌酶氨基酸序列具有较高的同源性, 并具有与 ϵ 型溶菌酶相同的活性位点氨基酸残基 Glu⁵¹ 和 Asp⁶⁸, 且与活性位点相邻的序列高度保守。斑节对虾溶菌酶氨基酸序列还具有与 ϵ 型溶菌酶相同的结构氨基酸——8 个半胱氨酸残基。因而可认为所克隆的斑节对虾溶菌酶基因属 ϵ 型溶菌酶基因。

关键词: 斑节对虾; 溶菌酶; 克隆; 序列分析

中图分类号: S945.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)04-0413-05

溶菌酶 (Lysozyme, EC 3.2.1.17) 又称胞壁质酶 (Muramidase), 是一种能水解粘多糖的碱性酶, 能催化细菌细胞壁中粘多糖 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4 糖苷键的水解, 导致细菌细胞壁破裂、内容物逸出而使细菌死亡^[1]。许多报道表明^[2-6], 溶菌酶是机体重要的非特异性免疫因子之一, 参与机体多种免疫反应, 能改善和增强巨噬细胞吞噬能力和消化功能, 在溶菌过程中形成一个水解体系, 破坏和消除侵入体内的异物, 从而实现机体的免疫防御。研究还发现溶菌酶能与带负电荷的病毒蛋白直接作用形成复合物, 使病毒失活^[4]。

目前普遍认为虾类和其他无脊椎动物一样, 体液中不具有免疫球蛋白, 缺乏脊椎动物所具有的特异性免疫机制, 依靠体内的非特异免疫因子来抵抗外来病原的入侵^[7-8]。不合理的高密度养殖削弱对虾的免疫能力导致对虾对病原的易感性增强^[9]。深入研究对虾免疫机制是对虾病害防治的关键。溶菌酶作为对虾的非特异性免疫因子之一而受到重视。

国内近年来有关于对虾血清溶菌酶的生化特征的研究报道。通过对对虾的血清溶菌活力测定, 并根据其溶菌活力的高低来衡量对虾的免疫状态^[10-13]。对虾溶菌酶基因的研究国内外尚不多见, 从 Gen. Bank 上仅查到南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 溶菌酶基因序列 (AF425673) 和日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的类溶菌酶基因片段序列 (AF321519)。本实验克隆了斑节对虾溶菌酶基因并进行了序列分析, 为深入研究对虾溶菌酶的免疫机理和直接的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 体重约 20g 的斑节对虾购自广州黄沙市场。限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶等主要试剂购自 Promega 公司或华美生物工程公司。逆转录试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; RNA 提取试剂盒 SV Total RNA Isolation 和克隆载体 pGEM-T Easy Vector 为

收稿日期: 2002-12-10; 修订日期: 2004-01-02

基金项目: 广东省自然科学基金资助 (No. 20010673)

作者简介: 郑清梅 (1978-), 女, 广东省茂名市人; 硕士; 研究方向: 水产生物技术。实验完成过程得到劳海华、简清两位助理研究员的帮助, 特此致谢!

通讯作者: 叶 星 E-mail: yexing@163.net

Promega公司产品。大肠杆菌 JM109 由本室保存。引物 P1 由上海生工生物工程公司合成。

1.2 斑节对虾血细胞总 RNA 的提取 参照文献^[14]的配方配制对虾血细胞抗凝剂: 100mmol/L 葡萄糖, 30mmol/L 柠檬酸三钠, 26mmol/L 柠檬酸, 510mmol/L 氯化钠, 10mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, 用 1mol/L 氢氧化钠调至 pH4. 6, 经低压灭菌后于 4℃ 保存备用。用 2. 5mL 无菌注射器预先抽取适量的预冷抗凝剂, 对虾围心窦抽血, 12, 000r/ min 离心 30s 收集血细胞, 依 RNA 提取试剂盒介绍的方法提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。

1.3 引物设计与 RT-PCR 参照已报道的日本对虾、南美白对虾及其他生物的溶菌酶基因序列 (AF425673, AF321519) 设计并合成 PCR^{5'} 端引物 P1: 5'-GTG ATA ATA CTT GGA TCA TAG AAA TG-3' (3' 端最后 3 个碱基为起始密码子)。3' 端引物 P2 用试剂盒提供的 M13Primer M4: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AG-3'。反转录引物用逆转录试剂盒提供的 Oligo dT- Adaptor Primer。按逆转录试剂盒介绍的方法进行 cDNA 合成和 PCR 扩增。反转录时拟从 mRNA 的 Poly (A) 开始, 在逆转录酶的作用下合成 cDNA 第一链。其反应条件为 30℃ 10min, 50℃ 30min, 95℃ 2min, 5℃ 5min; 接着以 5' 端引物 P1 和 3' 端引物 P2 进行 PCR 扩增, 反应条件: 首先 94℃ 预变性 2min, 然后进行 35 个循环, 其反应条件为 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 3min。取 5μL PCR 产物作 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测 PCR 扩增结果。

1.4 目的基因克隆与测序分析 目的基因片段经低熔点琼脂糖电泳回收, 与 T 载体以约 1: 1 的浓度比例进行连接, 4℃ 过夜。连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞; 铺于含氨苄的 LB 平板, 37℃ 培养过夜。提取质粒, 电泳及酶切筛选鉴定重组子。重组子在 ABI PRISMTM 377 全自动荧光测序仪上进行序列测定。用 DNA 分析软件 VECTOR NTI 6. 0 和 Internet 上的 BLAST 程序进行序列分析比较。

2 结果

2.1 斑节对虾溶菌酶基因的克隆与测序

所提取的对虾血细胞总 RNA 经电泳显示有清晰明亮的条带(图 1)。以总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增产物电泳检测在约 700bp 处有明亮的特异带(图 2)。克隆到 T- 载体的重组子经 *Not* I 酶切后电泳检测有两条亮带, 其中有一条约 700bp 的亮带(图 3 箭头所示)。



图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 The gel electrophoresis pattern of total RNA



图 2 RT-PCR 产物电泳图

Fig.2 The gel electrophoresis of the RT-PCR products 1. The RT-PCR products of lysozyme; 2. 100bp DNA Marker

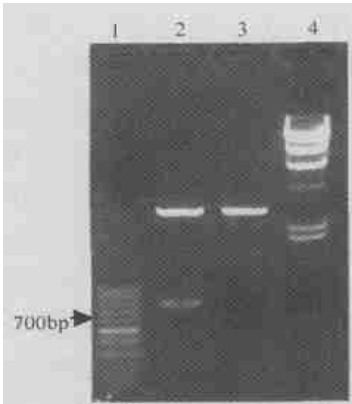


图 3 重组子限制性内切酶酶切电泳图

1. 100bp DNA Marker 2. 重组子/ *Not* I 酶切 3. pGEM-T Easy Vector/ *Not* I 酶切 4. λ DNA/ *Hind* III DNA Marker

Fig. 3 The restriction map of the recombinants

所克隆基因片段全长 681bp(含 PCR 引物 P1 序列)。其中溶菌酶基因片段 658bp, 包括开放阅读框 (ORF) 477bp(从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA) 和 3' 端非编码区的 181bp。477bp 的 ORF 共编码 158 个氨基酸, 其中编码溶菌酶成熟肽 140 个氨基酸残基和信号肽 18 个氨基酸残基。DNA 分析软

件分析结果显示,斑节对虾溶菌酶成熟肽推测分子量为 16, 32kD, 等电点为 8. 78。在 3' 端的非编码区中有 polyA 信号序列 AATAAA 的出现。该序列已登录 GenBank 数据库, 序号为 AF539466。

2.2 斑节对虾与其他生物的溶菌酶基因序列分析

通过 Vector NTI Suite 6. 0 软件进行序列分析和应用 NCBI 网上的 BLAST 程序与 GenBank、EMBL、DDBJ 及 PDB 数据库上的序列进行同源性比较, 结

果表明所克隆的斑节对虾溶菌酶与同属对虾科的南美白对虾和日本对虾的同源性最高, 其中与南美白对虾溶菌酶基因的碱基序列及氨基酸序列的同源性分别为 89. 5% 和 93. 0%; 与日本对虾类溶菌酶基因的同源性分别为 84. 0% 和 91. 0%。与日本牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 及虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的推测氨基酸序列同源性为 46%; 与人 (*Homo sapiens*) 的为 46%; 与鸡 (*Gallus gallus*) 的为 45%。

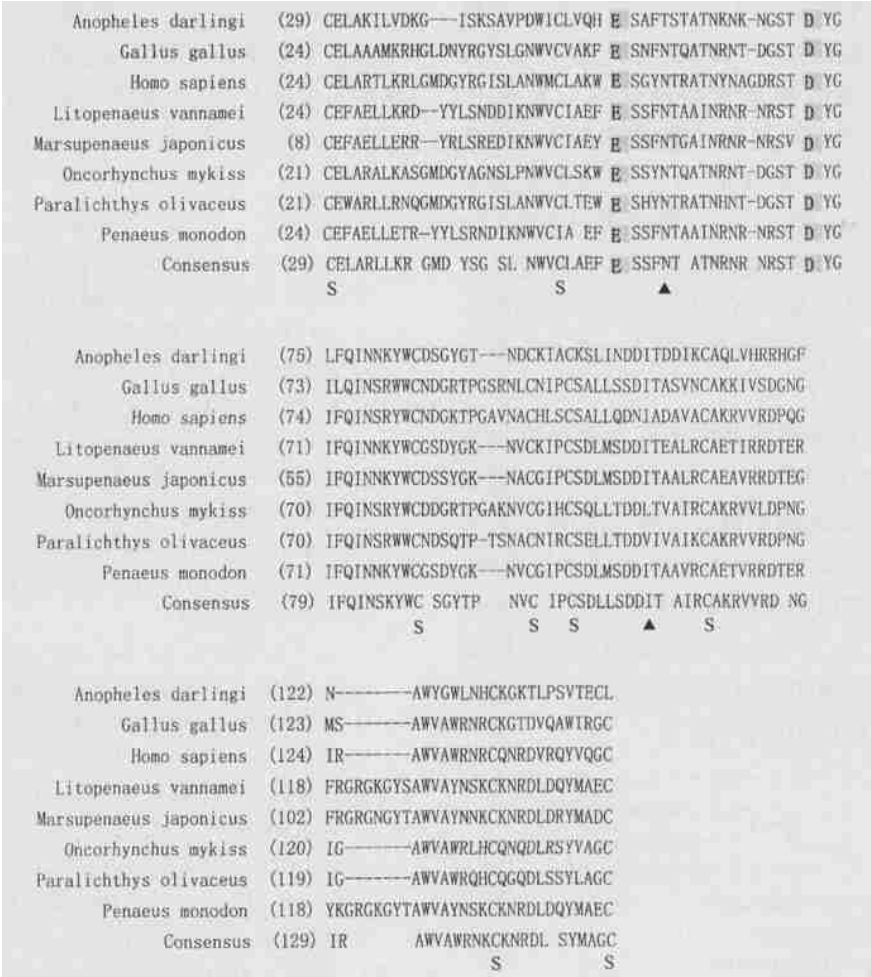


图 4 斑节对虾溶菌酶基因与其他种类 ϵ -型溶菌酶活性位点及相邻序列同源性比较
阴影显示两个活性位点氨基酸

Fig 4 Comparison of the conserved catalytic residues of *P. monodon* and ϵ type lysozyme of other species
The black shades indicate the catalytic residues (Glu⁵¹ and Asp⁶⁸); 's' represent the cysteine residues;
'▲' indicate the special active sites N (Asn⁵⁵) and I (Ile¹¹⁰)
残基 E (Glu⁵¹) 和 D (Asp⁶⁸), "s" 代表 8 个半胱氨酸残基, "▲" 为特异性酶结合位点 N (Asn⁵⁵) 和 I (Ile¹¹⁰)

3 讨论

溶菌酶按其进化地位和氨基酸序列的差异大致可分为 5 类: 鸡蛋清溶菌酶 (ϵ 型)、鹅溶菌酶 (γ 型)、噬菌体溶菌酶 (ρ 型)、植物溶菌酶和细菌溶菌酶。不同类型的溶菌酶氨基酸序列差异程度不同。 ϵ 型

溶菌酶与 γ 型溶菌酶同源性很低, 如日本牙鲆的 ϵ 型溶菌酶 (AB050589) 与其 γ 型溶菌酶 (AB050590) 的同源性约只有 10%。相对于 γ 型与 ρ 型溶菌酶, ϵ 型溶菌酶的进化地位比较古老^[15]。酶的催化作用依赖于其活性中心。对于 γ 型溶菌酶而言, Weaver 等通过对其酶结构与活力的关系分析, 认为

只要在溶菌酶活力中心中有一个保守活性位点氨基酸残基就足够保证溶菌酶的溶菌活性^[16]。而用 X-射线衍射法研究表明鸡蛋清溶菌酶(σ 型溶菌酶) 的活力位点由 2 个保守的氨基酸残基谷氨酸残基 Glu (E) 和天门冬氨酸残基 Asp (D) 构成,这 2 个活性中心的氨基酸残基 Glu、Asp 通过协同作用引起糖苷键的水解^[17-18]。人溶菌酶具有保守活性位点 Glu⁵³、Asp⁷¹; 蚕 (*Bombyx mori*) 溶菌酶中也具有 Glu⁵⁰、Asp⁶⁷ 保守活性位点^[19-21]。此外 σ 型溶菌酶的 8 个结构半胱氨酸残基 Cys (C) 能形成 4 个二硫键,对稳定溶菌酶的构象及酶的活性起重要作用^[17]。斑节对虾溶菌酶基因的推测氨基酸序列具有两个活性位点 Glu⁵¹ 和 Asp⁶⁸、8 个半胱氨酸残基 Cys (C) (图 4), 并且 BLAST 的结果显示与其他生物类群 σ 型溶菌酶的同源性较高, 故可认为所克隆的斑节对虾溶菌酶基因属 σ 型溶菌酶基因; 推测斑节对虾溶菌酶基因编码的溶菌酶应具有与其他 σ 型溶菌酶相似的功能。

根据斑节对虾溶菌酶基因和其他类群生物的 σ 型溶菌酶基因的推测氨基酸序列建立的系统进化树表明, 斑节对虾溶菌酶基因与亲缘关系较近的、同属对虾科的南美白对虾及日本对虾的同源性最高, 与同属于节肢动物门的按蚊的同源性次之。相对而言与脊椎动物如人、鸡和鱼等的溶菌酶基因的同源性较差些。说明溶菌酶基因推测氨基酸序列的同源性传统的分类地位相吻合(图 5)。

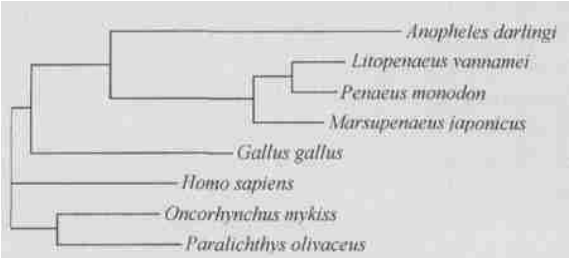


图 5 依斑节对虾溶菌酶基因和其他种类的 σ 型溶菌酶基因的推测氨基酸序列建立的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on lysozyme deduced amino acids of *P. monodon* and other species *A. darlingi* (Accession no. AAB61345), *G. gallus* (CAA23711), *H. sapiens* (NP_000230), *O. mykiss* (AAG34564), *P. olivaceus* (BAB 18249. 1), *P. monodon* (AAN 16375), *L. vannamei* (AAL 23948) *M. japonicus* (BAB 78483)

虽然无脊椎动物中有些种类如昆虫、双壳类的血淋巴中已证实具有类似溶菌酶活性^[9], 但关于对虾血液是否具有溶菌酶活性的问题一直有争论。有研究表明南美白对虾血淋巴中有溶菌酶活性, 但在 *P. setiferus* 的血淋巴中则没有发现溶菌酶活性。Ro-

jiinnakorn 等通过表达序列标签法 (Expressed sequence tag, EST) 研究被对虾白斑综合征病毒 (White spot syndrome baculovirus, WSSV) 感染后的日本对虾的基因表达情况。从 cDNA 文库筛选到的免疫相关基因的推导蛋白质中有 28 种具有生物保护作用。这些蛋白质大致可分为酚氧化酶原系统、抗菌肽类和免疫相关蛋白三类。其中 σ 型溶菌酶是其抗菌肽类的重要组成成分之一。由于血细胞中有较大量的 σ 型溶菌酶基因的转录, 推测也应有溶菌酶基因的翻译。至于是否检测到溶菌酶的活性可能与检测方法的灵敏度有关。目前有关斑节对虾溶菌酶基因工程及其产物的活性研究正在进行中。

参考文献:

[1] Rong X H, Ling F X. The study of the development of lysozyme [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1999, **20** (6): 319—320 [荣晓花, 凌沛学. 溶菌酶的研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 1999, **20** (6): 319—320]

[2] Xie Z X, Liu Q, Chen F, et al. Effect of activity on chicken lysozyme by hot negative electric charge [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 1997, **13**: 148—149 [谢秩勋, 刘雄, 陈奉等. 热负电荷对血清溶菌酶活性的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 1997, **13**: 148—149]

[3] Sonomi M, Jur ichi H, Ikuo H, et al. Expression of Japanese flounder σ type lysozyme cDNA in insect cells [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2001, **25**: 439—445

[4] Lou S X, Mao D L. The study of the development of lysozyme [J]. *Chinese Tumour Clinic*. 1994, **21** (9): 709—711 [楼善贤, 苗德林. 溶菌酶的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 1994, **21** (9): 709—711]

[5] Chipman D M, Sharon N. Mechaniam of lysozyme action [J]. *Science*, 1969, **165**: 454

[6] Zhu Q, Chen Y. Lysozyme and is application [J]. *Journal of Biology*, 1998, **33** (10): 9—10 [朱奇, 陈彦. 溶菌酶及其应用 [J]. *生物学通报*, 1998, **33** (10): 9—10]

[7] Wang J P, Wu Q F. The current study of hemocytes and humoral immunity [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2000, **19** (4): 354—360 [王建平, 吴雄飞. 虾类血细胞及体液免疫的研究现状 [J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2000, **19** (4): 354—360]

[8] Munoz M F, Vandenbulcke D, Saulnier et al. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp [J]. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 2678—2689

[9] Alabi A O, Latchford J W, Jones D A. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2000, **187**: 15—34

[10] Liu H, Li G Y. The study of the effects of immunopolysaccharide on cultured white shrimp [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica* [J], 1998, **29** (2): 113—118 [刘恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1998, **29** (2): 113—118]

- [11] Liu S Q, Jiang X L, Mou H J, *et al.* Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activity of *Penaeus Chinesis* serum [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, **30**(3): 278—283 [刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用 [J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(3): 278—283]
- [12] Bachere E, Mialhe E, Rodriguez J. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1995, **5**: 597—612
- [13] Huang X H, Li C L, Liu C W, *et al.* Study on two microalgae improving environment of shrimp pond and strengthening anti disease ability of *Penaeus vannamei*. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2002, **26** (4): 343—347 [黄翔鹤, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池土环境增强凡纳对虾抗病力的研究. 水生生物学报, 2002, **26** (4): 343—347]
- [14] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, **25**: 565—577
- [15] Jun I H, Sonmi M, Ikou H, *et al.* Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001, **1520**: 35—44
- [16] Weaver L H, Giltter M G, Matheqs B W. The refined structure of goose lysozyme and its complex with a bound Trisaccharide [J]. *J. Mol. Biol.* 1995, **245**: 54—68
- [17] Funahashi J, Takano K, Yamagata Y, *et al.* Positive contribution of hydration structure on the surface of human lysozyme to the conformational stability [J]. *J. Biol. Chem.* 2002, **277** (24): 21792—21800
- [18] Shen T, Wang J Y. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Publishing company. 1998, 266—272 [沈同, 王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社. 1998, 266—281]
- [19] Feng L, Ziling Wen. Cloning and expression pattern of the lysozyme C gene in zebrafish [J]. *Mechanisms of Development*, 2002, **11**: 369—372
- [20] Soushi F, Izumi T T, Keiko K, *et al.* Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri silkworm, *Samia Cynthia ricini* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2001, **128**: 709—718
- [21] Lee W J, Paul T B. Isolation and characterization of the lysozyme encoding gene from the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Gene*, 1995, **161**: 199—203

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE LYSOZYME-ENCODING GENE FROM THE BLACK TIGER SHRIMP, *PENAEUS MONODON*

ZHENG Qing-Mei, YE Xing, BAI Jun-Jie, WU Rui-Quan and LUO Jiar-Ren

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

Abstract: Lysozyme is an enzyme which acts as a hydrolase to break down the Beta(1, - 4) linkages in the peptidoglycan layer of bacterial cell walls. Bacteria is either destroyed directly or is opsonized, enabling its destruction through phagocytosis. Researches showed that lysozyme is also an important immune factor in shrimps. Lysozyme activity has been considered as one of the basic biochemical characters to estimate the immune state of shrimps. In order to study the immune function of lysozyme in shrimps, it is necessary to isolation the shrimp lysozyme gene. Lysozyme gene of *Penaeus monodon* was cloned by RT-PCR (reverse transcription PCR). The primer was designed referring to the lysozyme gene and lysozyme-like gene sequences of shrimps and other species. High quality total RNA was isolated from hemocytes of *Penaeus monodon*. The first strand cDNAs encoding lysozyme were obtained by using total RNA as templates and then amplified. A specific band about 700bp in length in PCR products was showed by gel electrophoresis. After purified the amplified cDNA fragments were inserted into pGEM-T Easy vector and sequenced. Sequencing result showed that the total length of the cDNA is 658bp, containing an open reading frame (ORF) of 477bp and a 181bp 3'-untranslated region. Of the 477bp ORF sequence, 421bp encode 140 amino acid residues of the mature peptide and 54bp for 18 amino acid residues of the signal peptide. The estimated molecular mass of the mature peptide (140 amino acids) is 16, 32kD and *pI* is 8. 78. Alignment analyses showed that the similarities of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of lysozyme between *P. monodon* and *Litopenaeus vannamei* are 89. 5% and 93. 5%, and that are 84. 0% and 91. 0% between *P. monodon*'s and *Marsupenaeus japonicus*'s. Further analysis showed that the lysozyme from *P. monodon* possesses high homology with that of chicken type lysozyme of other species. The lysozyme from *P. monodon* has the conserved Glu⁵¹ Asp⁶⁸ catalytic sites, as well as the eight structural cysteine residues, which are highly conserved across many species of chicken type lysozymes. In addition, the sequences around the catalytic site are quite conserved too. Therefore the cloned *P. monodon* lysozyme is presumed to be chicken type lysozyme.

Key words: *Penaeus monodon*; Lysozyme; Molecular cloning; Characterization