

对虾血淋巴脂蛋白的生化特征及分子克隆研究进展

Biochemical characteration and molecular cloning of penaeid shrimp hemolymph lipoproteins

李晓华^{1,2}, 王宝杰², 王雷², 熊冬金¹, 刘梅², 蒋克勇²

(1. 南昌大学 生命科学学院, 江西 南昌 330031; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q513

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)11-0080-04

脂类是海洋无脊椎动物包括对虾能量的主要来源, 脂类在其生长发育的很多重要过程中起作用, 如蜕皮和繁殖。虾蟹及鱼类优先使用脂类作为能源, 因此, 它们的血淋巴脂蛋白水平较高。脂蛋白是对虾体内一种重要的蛋白质, 其主要作用是: 参与组织或细胞间脂类的运输和重分配; 参与免疫防御反应过程; 能与细胞膜上的特异受体结合, 影响脂类摄取。此外, 卵黄蛋白和卵黄蛋白原可为正在发育的胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素、磷和硫等营养和功能物质。研究表明极高密度脂蛋白参与卵巢的发育, 可能为胚胎发育提供部分营养物质。作者主要论述了几种对虾血淋巴脂蛋白结构及基因的特点, 它们之间的差异, 并且对不同血淋巴脂蛋白基因的组织表达差异进行了综述, 使读者对对虾的血淋巴脂蛋白的研究进展有更详细的了解。

对虾血淋巴脂蛋白像其它甲壳动物的脂蛋白一样, 可以根据其含水量不同分为 3 类: 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL 1.006~1.06 g/mL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL 1.07~1.21 g/mL) 和极高密度脂蛋白 (very high density lipoprotein, VHDL 1.22 g/mL 以上)^[1,2]。目前, 已经从对虾血淋巴中发现了 2 种脂蛋白, 存在于雌虾和雄虾中的非性别特异脂蛋白, 只存在于成熟雌虾中的性别特异脂蛋白。这些脂蛋白都属于高密度或极高密度脂蛋白。目前, 还没有低密度脂蛋白的相关报道。

1 非性别特异脂蛋白

1.1 高密度脂蛋白

早期对虾类血淋巴脂蛋白的研究主要侧重于蛋白的分离纯化与结构分析, Teshima 等^[3]通过超速离心法分离了日本囊对虾 (*Marasipnaeus japonicus*) 的血清脂蛋白, 并在雌虾和雄虾中检测到 2 种 HDL, 2 种 HDL 的主要脂质成分是磷脂, 分别占整

个脂质成分的 40%~47% 和 72%~87%, 蛋白质在 2 种脂蛋白中占的比例分别为 26% 和 32%。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和加州对虾 (*Penaeus californiensis*) 的 HDL 的密度分别为 1.364 和 1.139 g/mL^[4,5], 并且均有一个约为 100~112 ku 的载脂蛋白成分, 它们的 N 端序列相似, 其中所含的主要脂质成分是卵磷脂。凡纳滨对虾的 HDL 约含有 57% 脂质^[6], 其中磷脂占了 43%。在已报道的对虾脂蛋白中所含的主要脂类成分是磷脂^[7]。

Yepiz 等^[5]确认了凡纳滨对虾和加州对虾的血淋巴高密度脂蛋白是 β -1, 3-葡聚糖结合蛋白 (high density-lipoprotein β -glucan binding protein β GBP-HDL)。运用分子生物学手段, 目前已经克隆出凡纳滨对虾的 β GBP-HDL 的基因^[8]。 β GBP-HDL 的全长 cDNA 为 6.3 kb, 1966 个核苷酸的 3' 非翻译区位于终止密码和 polyA+ 之间。此蛋白开放阅读框编码长度为 1454 个氨基酸, 成熟蛋白的 N 端序列位于开放阅读框的 198 个氨基酸位置。推导的氨基酸序列与淡水螯虾 (*Astacopsis gouldi*) 的有 54% 的相似性。对已知的蛋白二级结构推导的氨基酸序列进行分析, 发现了类似葡聚糖酶的序列和 RGD 基序, 这 2 种序列与它参与的防御和脂质运输作用相关。

通过 RT-PCR 和 RNA 印迹法检测 β GBP-HDL 在肝胰腺、肌肉、附肢和鳃中表达, 但在血细胞中无表达, 其中 Northern 杂交法在肝胰腺中检测的信号最强, 说明肝胰腺是主要的脂类储存组织和血淋巴脂蛋白的合成场所。利用原位杂交技术进一步检

修稿日期: 2008-08-06 收回日期: 2008-09-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (30600458)

作者简介: 李晓华 (1982), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子遗传学, 电话: 0532-82898723, E-mail: huaxiaohere@163.com; 王雷, 通讯作者, 研究员, 博导, E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn

测,发现肝胰腺 F 细胞是 β GBP-HDL 的主要表达位点,在神经中枢细胞有微量表达,而在皮层神经胶质和轴突纤维中无表达^[9]。在淡水螯虾中 β GBP 只在肝胰腺中表达^[10],这种差异可能是淡水和海洋甲壳动物间的不同造成的。

为了研究对虾 β GBP-HDL 在体内脂类运输中的作用,Adriana 等^[11]对凡纳滨对虾进行了饥饿处理,分别在摄食 2 h, 24 h, 72 h, 120 h 后,对 β GBP-HDL 的含量进行了测定。发现摄食 2 h 后,当脂类在对虾血淋巴中增加时,肝胰腺中 β GBP-HDL 的合成增加。饥饿 24 h, 72 h, 120 h 后, β GBP-HDL 的 mRNA 量明显下降。可见 β GBP-HDL 的合成量与对虾血淋巴中脂质含量成正相关, β GBP-HDL 是对虾体内一种重要的营养相关蛋白。

1.2 极高密度脂蛋白

在对虾血淋巴中已经发现了一种无性别特异的 VHDL,日本囊对虾的此种脂蛋白的密度 ≥ 1.22 g/mL,包括 81% 的蛋白和 19% 的脂质。其中主要的脂质是磷脂,占整个脂蛋白量的 14%,占脂质的 69%~72%^[3]。Yeh 等^[12]分离了斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的 VHDL 并进行研究,测得了此蛋白密度为 0.003~0.012 g/mL。凡纳滨对虾的凝血蛋白分子质量约 440 ku,由两个大小约 200 ku 的亚基通过二硫键链接而成同源二聚体^[13],密度梯度离心所得密度为 1.155~1.212 g/mL,其中脂质占纯化蛋白的 9%~15%。 α 螺旋和 β 折叠片分别占 32% 和 33%,二级结构与斑节对虾的相似。

Hall 等^[14]确认淡水螯虾的此种 VHDL 即凝血蛋白(CP),是 1 种有 2 种功能的血淋巴脂蛋白。此后,在凡纳滨对虾和斑节对虾中都得到确认。Cheng 等^[15]克隆测序了凡纳滨对虾和日本囊对虾的凝血蛋白基因。日本囊对虾的 CP 基因 cDNA 全长 5 660 bp,推断 CP 的前体包括一个信号肽,信号肽后是一个由 1 671 个氨基酸组成的亚基。CP 的整个氨基酸序列包括 2 个 RGD 基序和 3 个潜在的 N 端糖基化位点,与斑节对虾和淡水螯虾的凝血蛋白分别有 80% 和 38% 的相似性。凡纳滨对虾的 CP 基因全长 5 541 bp,推导的蛋白由 1 666 个氨基酸残基组成。这 2 个蛋白都有转谷氨酰胺酶交联位点,N 端有 7 个 Ser-Lys-Thr 重复,中间位置色氨酸和谷氨酰胺含量丰富,色氨酸和谷氨酰胺形成共价连接,这种特殊的结构可能与其凝集作用有关。在对虾中 CP 的 2 个 RGD 序列是非常保守的,但其功能现在还不是很清楚。

此外,斑节对虾的 CP 基因也曾被克隆并进行过结构分析^[16]。斑节对虾的 CP 基因 cDNA 全长

6 124 bp,此 cDNA 编码了一个由 1 670 个氨基酸组成的蛋白,包括 14 个氨基酸的信号肽。由于有 4 个潜在的 N 端糖基化位点,整个蛋白含 3.8% 的甘露聚糖。斑节对虾的 CP 与淡水螯虾的有 36% 的同源性,但与昆虫的卵黄蛋白原家族相似性却很低。整个蛋白谷氨酰胺含量丰富,有 5 个 Ser-Lys-Thr-Ser 的重复,说明凝血蛋白可能是转谷氨酰胺酶的作用底物。蛋白中的 2 个 RGD 序列侧面没有二硫桥相连,也没发现它们有其它构象化的约束,并且没有检测到它们与血细胞间的连接。此蛋白的 RGD 序列是否与其它类型的细胞相互作用,目前还不清楚。

运用 RT-PCR 方法研究了斑节对虾 CP 基因的组织表达^[16],发现其在鳃、中枢神经、淋巴器官、心脏、肝胰腺、血细胞和肌肉中的表达量依次递减,但是 Northern blot 法没有发现其在血细胞中表达。从整个实验可以看出,鳃、中枢神经和淋巴器官是 CP 基因的主要表达位点,第一次发现神经系统是 CP 的转录和翻译位点,其生理学意义有待进一步研究。日本囊对虾的 CP 基因在表皮、鳃、中枢神经和心脏中都有表达^[15],这与斑节对虾的 CP 表达部位相似,最近进一步研究发现表皮是 CP 的一个重要的表达位点。

2 雌性特异脂蛋白

除了雌雄共有的脂蛋白类型外,对虾血淋巴中还有一种雌性特有的脂蛋白,但这种脂蛋白在无卵黄的雌性中不存在,大致与卵黄生成有关。卵黄蛋白原(Vg)和卵黄磷蛋白(Vt)是 2 种相关蛋白^[2],实际上,卵黄蛋白原是卵黄磷蛋白的前体,卵黄蛋白在卵巢中的形成过程就是一个处理卵黄蛋白原前体的过程。不同对虾和甲壳动物的 Vg 同样是一种高密度脂蛋白,与非性别特异高密度脂蛋白相比,它们具有更高的密度,说明含有较少的脂类。

刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 的 Vt 是一个脂糖蛋白,氨基酸组成与其它虾的 Vg 和 Vt 相似。它是由 4 个载脂蛋白成分组成的一个 350 ku 的蛋白,2 个主要的亚基分别为 76 ku 和 102 ku^[17]。Shaul 等^[18]从凡纳滨对虾卵巢中分离出了 5 个分子质量分别为 179, 113, 78, 61 和 42 ku 的高密度脂蛋白亚基,这些亚基都是卵黄蛋白原基因的产物。

用刀额新对虾的卵黄蛋白原基因片段作为探针筛选基因组 DNA 文库,发现了 6 个不同的 λ 克隆,其中 2 个克隆用于进一步研究^[19]。通过 3', 5', RACE 方法,获得了其 cDNA 全长为 7.97 kb,包括一个 7 776 bp 长的开放阅读框。不像昆虫和脊椎动物的卵黄蛋白原前体,推导的 Vg 没有多个色氨酸重

复区域。通过系统发生分析, Me Vg1 与甲壳动物的有很高的同源性, 但与其它无脊椎动物和脊椎动物的亲缘关系比较远。

Shaul 等^[18] 克隆测序了凡纳滨对虾的全长 Vg 基因, 第一次测序了对虾体外纳精器的 Vg cDNA。基因全长 7941bp, ORF 显示 5' 非翻译区有 29 个氨基酸, 3' 非翻译区有 151 个氨基酸, 包括 polyA+ 尾巴。整个基因编码 2 587 个氨基酸的多肽, 分子质量 283 462 u, 与其它对虾的 Vg 有高达 85% 的相似性。

有关卵巢是对虾卵黄蛋白合成位点报道很多。Tseng 等^[20] 利用 RT-PCR 在斑节对虾肝胰腺中合成了部分卵黄蛋白原基因, 由此确定肝胰腺是斑节对虾卵黄蛋白的另一个合成位点。最近发现肝胰腺也是罗氏沼虾^[21] 和日本囊对虾^[22] Vg 重要的合成位点。自然成熟的日本囊对虾和短沟对虾 (*Penaeus semisulcatus*) 的 Vg mRNA 水平在肝胰腺和卵巢中相当^[22, 23]。通过 RT-PCR 发现, 刀额新对虾 Vg1 在肝胰腺和卵巢中表达, 而其 Vg2 仅在肝胰腺中表达^[19]。中国明对虾卵巢发育的 4 个阶段肝胰腺和卵巢中 Vg 基因都表达^[24], 只是不同阶段表达量不同。由此, 基本可以说明在中国明对虾中, 卵巢和肝胰腺中均存在卵黄蛋白原的 mRNA。

关于甲壳动物中卵黄蛋白的来源, 在过去的研究中一直存在争议, 早期研究以体外培养为主, 大多得出卵巢是唯一或主要的合成场所的结论^[25], 近期研究多从卵黄蛋白原 mRNA 的表达着手, 发现在很多甲壳类中如日本囊对虾、克氏螯虾 (*Procambarus olarkii*) 等中, 肝胰腺也是卵黄蛋白原的重要合成部位^[22, 26], 有时甚至是主要或唯一的合成部位^[27, 28]。

3 结论

关于对虾无性别特异和雌性特异血淋巴脂蛋白的报道已有很多, 最初的研究侧重于脂蛋白的分离及结构鉴定, 研究它们的分子质量、氨基酸组成和氮端氨基酸序列。一旦对虾血淋巴脂蛋白能够被分离纯化, 对它的特异吸收机制如从细胞膜内吞或卸载就能够了解的比较详细。近年来, 随着分子生物学技术在这一领域的应用, 在脂蛋白基因的分子克隆与表达特征方面开展了大量工作。运用 RT-PCR 和 RACE 技术成功克隆了部分脂蛋白的基因, 并对基因结构进行了分析, 通过建立系统发生树, 研究了不同对虾同种脂蛋白间的亲缘关系, 发现其 cDNA 序列和蛋白有很高的保守性, 并且发现了一些特定的分裂位点和结构域, 从而为研究对虾间的亲缘关系提供一定依据。

通过半定量 RT-PCR、realtime RT-PCR 和

Northern blot 法研究了不同脂蛋白的组织表达, 结果存在差异, 可能是种群不同造成的, 也可能是实验动物处于不同的发育阶段。对不同刺激下的表达差异进行了研究, 进而分析了它们的作用。不同脂蛋白的具体作用及其在对虾体内的传递路线有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Teshima S, Kanazawa A. Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. Bull[J]. **Jpn Soc Sci Fish**, 1980, 46: 57-62.
- [2] Lee R. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates[J]. **Adv Comp Environ Physiol**, 1991, 7: 187-207.
- [3] Teshima S, Kanazawa A. Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. Bull[J]. **Jpn Soc Sci Fish**, 1980, 46: 57-62.
- [4] Yepiz P G, Sotelo M R, Vazquez M L, et al. A non-sex specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1995, 111B: 181-187.
- [5] Yepiz P G, Vargas A F, Jimenez V F, et al. Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (β GBP): comparison of biochemical characteristics [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1998, 121B: 309-314.
- [6] Ruiz V L M, Garcia B M L, Vargas A F, et al. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1997, 118B: 91-96.
- [7] Komatsu M, Ando S, Teshima S I. Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of crustacea [J]. **J Exp Zool**, 1993, 266: 257-265.
- [8] Mar a G R F, Claudia V R, Rogerio R S M, et al. Molecular cloning of a β -glucan pattern recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure[J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2004, 28: 713-726.
- [9] Wang Yr chi, Chang Polr shing, Chen Houng yung. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2007, 23: 1161-1177.
- [10] Cerenius L, Liang Z, Duvic B, et al. Structure and biological activity of a 1, 3- β -D-glucan binding protein in crustacean blood[J]. **J Biol Chem**, 1994, 269: 29462-29467.
- [11] Adriana M A, Arturo S P, Fernando G C, et al. Star

- vation and diet composition affect mRNA levels of the high density-lipoprotein β glucan binding protein in the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2005, 142B: 209-216.
- [12] Yeh Maw-sheng, Huang Chang-jen, Cheng Jirr-haw, *et al.* Tissue Specific expression and regulation of the haemolymph clottable protein of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2007, 23: 272-279.
- [13] Gloria Y P, Florinda J V, Mar a G R F, *et al.* Molecular characterization of bifunctional VHDLr-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2002, 132: 585-592.
- [14] Hall M, Vanheusden M C, Söderläll K. Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1995, 216: 939-946.
- [15] Cheng W, Tsai I H, Huang C J, *et al.* Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2008, 32: 265-274.
- [16] Yeh Maw-sheng, Huang Chang-jen, Leu Jianr-hong, *et al.* Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. **Eur J Biochem**, 1999, 266: 624-633.
- [17] Qiu Y W, Ng T B, Chu K H. Purification and characterization of vitellin from the ovaries of the shrimp *Metapenaeus ensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) [J]. **Invertebr Reprod Dev**, 1997, 31: 217-223.
- [18] Shaul R, Shmuel P, Carmen S, *et al.* Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced subadult females [J]. **General and Comparative Endocrinology**, 2006, 145: 39-50.
- [19] Tsang Wing-sze, Scott Q L, Billy K C Ch, *et al.* Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas [J]. **Gene**, 2003, 303: 99-109.
- [20] Tseng Deng-yu, Chen Ying-nan, Kou Guang-hsiung, *et al.* Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2001, 129A: 909-917.
- [21] Yepiz P G, Vargas A F, Jimenez V F, *et al.* Shrimp plasma HDL and β glucan binding protein (β GBP): comparison of biochemical characteristics [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1998, 121B: 309-314.
- [22] Tsutsui N, Kawazoe I, Ohira T, *et al.* Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. **Zool Sci**, 2000, 17: 651-660.
- [23] Avarre J C, Michelis R, Tietz A, *et al.* Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs [J]. **Biol Reprod**, 2003, 69: 355-364.
- [24] 张成锋, 刘红, 高祥刚等. 中国对虾卵黄蛋白原合成部位的研究 [J]. **海洋水产研究**, 2006, 6: 7-13.
- [25] Yano I, Chinzei Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1987, 86B: 213-218.
- [26] Serrana P V, Landais I, Ogliastro M H, *et al.* Vitellogenin mRNA expression in *Cherax quadricarinatus* during secondary vitellogenesis at first maturation females [J]. **Molecular Reproduction and Development**, 2004, 69: 17-21.
- [27] Yang W J, Ohira T, Tsutsui N, *et al.* Determination of amino acid sequence and site of mRNA expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **Experimental Zoology**, 2000, 287: 413-422.
- [28] Jayasankar V, Tsutsui N, Jasmani S, *et al.* Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **Experimental Zoology**, 2002, 293: 675-682.

(本文编辑: 梁德海)