

刺参虾青素基因的克隆及不同体色个体间表达差异的分析

赵鹤凌^{1,2}, 杨红生¹, 赵欢^{1,2}, 刘石林¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)的体色变化很大,多数背腹均为黄褐色,极少数呈白化特征,背腹均为纯白色。经人工繁育实验发现,白化仿刺参的子代仍多具白化特征。本文研究了虾青素基因与刺参白化特征的相关性。在克隆虾青素基因 cDNA 全长的基础上,比较了普通仿刺参和白化仿刺参在不同发育时期虾青素基因表达量的差异。结果表明,该基因的 cDNA 含有 2058 个核苷酸,编码 560 个氨基酸。经实时定量 PCR 分析,白化成参体壁中虾青素基因表达量显著低于普通成参;而在仿刺参色素沉积的早期,白化稚参体壁中虾青素基因表达量从受精后第 39 天开始显著低于普通稚参。可见,仿刺参体壁中虾青素基因的低表达与刺参白化特征的发生密切相关。

关键词: 虾青素; 仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka); 白化; 基因克隆; 实时定量 PCR 分析

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)03-0022-07

仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka), 又称刺参, 属棘皮动物门, 海参纲, 楯手目, 刺参科, 仿刺参属, 为典型的温带种类, 主要分布于我国辽宁、山东、河北等省浅海沿岸, 具有补肾、益精、养血之功能, 营养价值极高, 是我国重要的海珍品之一。刺参的体色变化很大, 一般背面为黄褐色或栗子褐色, 腹面为浅黄褐色或赤褐色^[1]; 极少数呈白化特征, 背腹均为纯白色。前期实验发现, 白化刺参表现出正常的繁殖能力, 且其子代的体色仍呈白化特征。

为探究刺参白化特征发生的内在机理, 分别对普通刺参及白化刺参转录组进行了 454 高通量测序分析, 对刺参白化相关基因进行了筛选。经转录组分析, 普通刺参转录组库中虾青素(Astacin)基因出现的频率是白化刺参转录组库的数倍。虾青素是海洋甲壳类动物和鱼类体内色素中主要的类胡萝卜素^[2]。众多研究表明, 在水产品饵料中添加适量的虾青素可改善其皮肤和肌肉的颜色, 提高观赏鱼类的观赏性, 提高商品鱼、虾等的商品价值^[3]。虾青素家族为新兴的金属内肽酶家族, 其成员在水螅至人类的发育系统中都有分布^[4]。虾青素家族成员有相似的氨基酸序列、结构和底物特异性。结构上, 由 NH₂-端信号肽和酶原序列组成, 其锌金属肽酶功能域含有保守的 HEXXHXXGFXHEXXRXDRD 序列模式^[5]。

本文利用 rapid amplification of the cDNA ends (RACE) PCR, 克隆了刺参虾青素基因的 cDNA 序列

全长。并利用 real time RT-PCR, 研究了普通刺参和白化刺参中该基因表达的差异。初步探讨了虾青素基因与刺参白化特征发生的相关性, 为研究刺参体色的调控机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物

实验用普通成参与白化成参(湿质量 102.07g±21.65g)于 2010 年 3 月收集于胶南自然海区。在烟台东方海洋养殖场驯养 14 d 后(水温 15℃±1℃, 溶解氧 7.7~8.3, pH 7.9~8.1, 盐度 33), 取普通成参与白化成参各 5 只, 剖取刺参体壁迅速放入液氮中, 存于 -80℃超低温冰箱, 用以检测虾青素基因在组织中的分布。其余刺参做为亲参继续饲养于养殖场内, 每日换水 2 次, 换水后投饵。2010 年 6 月, 经阴干流水刺激法, 分别获得白化刺参子代和普通刺参子代。在稚参发育的初期, 白化刺参子代和普通刺参子代的外观并无差异。当个体发育至 1 cm 左右, 普通刺参子

收稿日期: 2011-07-21; 修回日期: 2011-09-12

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100304/2006AA10A411); 国家自然科学基金项目(40976089); 海洋公益性行业科研专项重点项目(200805069)

作者简介: 赵鹤凌(1984-), 女, 四川成都人, 博士研究生, 主要从事海洋生态分子生物学研究, 电话: 0532-82898705, E-mail: irene8419@hotmail.com; 杨红生, 通信作者, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

代的体表开始出现明显的色素沉积, 其体壁呈青绿或红褐色, 成为“变色参”; 而白化刺参子代的体表几乎没有色素沉积, 其体壁仍为白色, 呈白化特征。鉴于稚参发育的前期为色素沉积的重要时期, 取受精后第 25、32、39、46、53、60、67、74、81、88 天的稚参(表 1), 以检测虾青素基因的表达量。

表 1 白化稚参和普通稚参的体长(平均值±标准差)
Tab. 1 The body lengths of sampled albino and normal juveniles. Values are denoted as mean ± stand deviation (SD, n=100)

取样时间 (d)	体长(mm)	
	白化稚参	普通稚参
25	0.684±0.308	0.792±0.352
32	1.821±1.021	2.106±1.165
39	3.152±1.854	3.621±1.659
46	4.361±2.291	4.742±2.499
53	5.281±2.411	5.943±2.548
60	6.318±2.832	7.074±2.731
67	7.172±2.548	7.902±2.836
74	8.076±2.445	8.953±2.855
81	9.031±2.655	10.047±2.987
88	10.111±2.932	10.922±3.183

1.1.2 实验用引物

所有引物均由 Invitrogen 公司合成, 如表 2。

1.2 RNA 的提取

将样品放入液氮中研磨, 每 30~60 mg 组织加入 1 mL Trizol(Invitrogen); 加入 0.2 mL 氯仿, 用力震荡 15 s, 并于室温放置 5 min。12 000 g, 4℃, 离心 15 min; 离心后将水相移至 Eppendorf 管中,

加入等体积异丙醇, -20℃放置 15 min; 12 000 g, 4℃, 离心 15 min, 沉淀 RNA; 加 1 mL 75%的乙醇洗涤 RNA 沉淀, 12 000 g, 4℃, 离心 10 min, 弃上清, 重复洗涤一次。经琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 无降解后, -80℃保存备用。

1.3 第一链 cDNA 合成

在进行反转录之前, 先进行 DNase 消化, 反应体系为 RNA 2 μg, RQ1 RNase-Free DNase (Promega)1 μL, RNase-Free RNase inhibitor 0.5 μL, 5×M-MLV Buffer 2 μL, RNase-Free water 调整总体积至 11.5 μL。37℃温浴 20 min, 在上述体系中加入 Stop solution 1.0 μL。65℃10 min 灭活 DNase I。再在以上体系中加入 Oligo dT 2.0 μL; 70℃热变性 5 min, 迅速冰浴 2 min。

反转录时, 在已完成变性反应的以上体系中加入 5×M-MLV 反应缓冲液 3.0 μL, 无 RNase dNTP(10 mmol/L each)1.25 μL, M-MLV 反转录酶 (Promega, 200U)1.0 μL, RNase inhibitor 0.5 μL, RNase-Free water 调整总体积至 25 μL 稍离心。42℃反转录 1 h, 95℃10 min 灭活反转录酶, -20℃保存。

1.4 虾青素基因 cDNA 全长克隆

根据 454 高通量测序获得的虾青素 cDNA 片段序列(GenBank 注册号 HQ638207), 设计特异性引物 GSP1 和 GSP2, 利用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增, 以获得虾青素基因 cDNA 全长。

表 2 RACE PCR、RT-PCR 及 real-time PCR 所用引物(N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)
Tab. 2 Sequences of RACE PCR, RT-PCR and real-time PCR primers (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)

引物	序列
ActinF	5'-TGGCGTGAGGAAGAGCAT-3'
ActinR	5'-CATTCAACCTAAAGCCAACA-3'
AstacinF	5'-AGTTGCCTTCTTGGTCTT-3'
AstacinR	5'-CTCGGAATCCATCTTACA-3'
UPM	Long 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' Short 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
GSP1	5'-CCTCTTCTGATTCTTGTTCTCTCTGAC-3'
GSP2	5'-CCGAAAGAGGAGAATGCTCTCGGAAT-3'
5'-CDS Primer A	5'-(T)25VN-3'
3'-CDS Primer A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN-3'

以接头引物 5'-CDS/3'-CDS Primer A 和 SMARTer II A Oligonucleotide 在 SMARTScribe™ 反转录酶的作用下引导反转录合成 5'cDNA/3'cDNA。用接头通用引物 UPM 和基因特异性引物 GSP1/GSP2 进行 5'RACE-PCR/3'RACE-PCR, 扩增基因 5'/3'末端。95℃变性 30 s, 68℃退火 30 s, 72℃延伸 3 min, 共 30 个循环。PCR 产物纯化后, 连接到 pMD-18 T 载体 (TaKaRa) 上, 转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa), 阳性克隆经 PCR 筛选后测序。

1.5 虾青素 cDNA 序列的生物信息学分析

用 NCBI 网站中的 Blast 软件搜索序列相似性、比对同源性和拼接序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 用 ExPASy Proteomics tools 网站中的 Translate 软件翻译获得的虾青素 cDNA 序列, SMART 软件查找蛋白结构和功能域。采用 CLUSTALW 程序进行多序列联配 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)。采用 MEGA 软件, 以邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建进化树, 采用 bootstrap 检验。

1.6 实时定量 PCR 法定量虾青素基因的表达

本研究通过 real-time PCR 反应, 得到每个 PCR 反应的 Ct 值, 以 β -actin 基因为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行分析 (Livak and Schmittgen, 2001), 检测了虾青素基因的相对表达量。根据得到的虾青素 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 AstacinF、AstacinR, 用于 real time RT-PCR。按照前述方法提取各样本的 RNA, DNase 消化后, Oligo dT 引导反转得到 cDNA。对于任意一个样本, 目标基因 (刺参虾青素基因) 和内参基因 (刺参 β -actin 基因, 其特异性引物为 ActinF、ActinR) 扩增时加入等量的模板。按照如下反应条件和体系, 利用 SYBR Green PCR 试剂盒 (Takara), 在 Mastercycler eppendorf realplex 实时定量 PCR 仪上进行扩增, 对部分扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳、测序以验证扩增的特异性和准确性。PCR 条件为: 95℃预变性 5 s, 1 个循环; 95℃变性 5 s, 59℃退火 20 s, 72℃延伸 30 s, 共 40 个循环。反应体系为 25 μ L: cDNA 2 μ L, SYBR

Green PCR master Mix 12.5 μ L, Forward primer 0.5 μ L, Reverse primer 0.5 μ L, DEPC water 9.5 μ L。

2 结果

2.1 虾青素基因全长 cDNA 克隆与分析

2.1.1 虾青素基因的序列分析

刺参虾青素基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列见图 1, cDNA 全长为 2058 bp, 其中 5'非编码区 (UTR) 为 187 bp, 3'UTR 为 188 bp, 开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 包括 1683 bp (第 188-1870 bp), 开放阅读框编码 560 个氨基酸残基。虾青素是金属内肽酶, 从第 107 个氨基酸起至第 248 个氨基酸之间的序列是其锌金属肽酶功能域, 含有虾青素家族保守性序列模式 HEXXHXXGFXHEXXRXDRD, 其中 HEXxH 为 Zn 结合位点必需氨基酸。虾青素基因和氨基酸序列 GenBank 注册号为 HQ655812。3'UTR 末端为推测的虾青素基因的 mRNA 多聚腺苷酸加尾位点 (Polyadenylation Site)。

2.1.2 虾青素蛋白序列的同源性分析和进化分析

多序列比对发现 (图 2), 刺参虾青素锌金属肽酶功能域和其他无脊椎动物中的虾青素蛋白的相应区域具有较高的同源性, 特别在 HEXXHXXGFXHEXXRXDRD 保守区域, 各无脊椎动物虾青素的同源性很高。由虾青素进化树 (图 3) 可见, 刺参虾青素与海胆虾青素进化距离最近, 其次, 贝类虾青素聚成一支, 甲壳类聚成一支, 线虫类聚成一支, 鱼类聚成一支。刺参虾青素的分子进化地位与刺参的生物学分类地位基本一致。虾青素多序列比对和构建进化树所用的序列见表 3。

2.2 白化刺参与普通刺参虾青素基因表达的差异

2.2.1 白化成参与普通成参虾青素基因表达的差异

利用实时定量 PCR 方法分析虾青素基因在不同体色刺参体壁中的表达, 结果 (图 4) 表明: 白化刺参体壁中虾青素基因的表达量显著低于普通刺参 ($P < 0.05$)。普通刺参体壁中该基因的表达量是白化刺参的 (2.73 \pm 0.08) 倍。

2.2.2 白化稚参与普通稚参虾青素基因表达的差异

在稚参发育的初期 (受精后第 25 天至第 32 天), 白化刺参和普通刺参中虾青素基因的表达量无显著差异。在稚参发育的前期 (受精后第 39 天至第 88 天), 白化刺参中虾青素基因的表达量显著低于普通刺参

```

acatggagcatttttagtagcattgtgtacaggaacggaccaacaggggtgtaaaatgtg
gtgggttttacaacaccttggtaccgagatgatgcgtcttatgtgagacgagacttc
gtgttttctgccaggatgaactgcattgacgggtggaagtggattataagtaacctgt
tatcatc
atggagatcaaatcatcgtctcctcatcttagcgtcttgatgtgtggtccgcggtt
M E I K S S L S L I L A V L M C W S A V
gggagcatcgagctggagtagaggaggtggacgtaaaatctcatgggtgcagatggc
G S I A A G V R G G G R K I S H G A D G
caacgccacagatggaggaagcgtcaaggaaacgaacgagattgaaaagatgcaatg
Q R H R M E E A S R N E T R F E K D A M
gcggatattttgatgaaaacagaagaataaataaagaaatggcaaggttagaggagaa
A D I L Y E N R R I N K E I A K G R G E
cataactagtagaggagacatactagttcattcttccaattccagcagtcggaataag
H N L V E G D I L V H S S N S S S R N K
aggacagtgccagaagagggagtaaaatggccaggagctgtgtgccttatatagta
R T V A R R R E G V K W P G A V V P Y I V
gactcagctttcagggmcagagagaaaagaattatattcgtgctatgcaacttttcat
D S A F R X R E K R I I F G A M Q R F H
gacgagctctgtatcaaatttcggaacgcacaactcagccagaccatttatttact
D E S C I K F R K R T I E P D H L F I T
ccagaaaaggggtgttgatcaatggctgtagcaggggtgatgcaaaaatattccttg
P G K G C W S M V G R Q G G M Q K L S L
gttgaaactgtaaaagtcggaaggtaccataatgcacgaactgatgcattgtctaggg
V G T C K V R K G T I M H E L M H C L G
tttcggcagcaataacagacactgaccgagatgagtagacataagaataatcgccaaaac
F R H E H N R P D R D E Y I R I M R Q N
attgaaactcggttacagtgaaaactttatgcaacttcaaacactgaggttgatagatg
I E L G Y S E N F I E H S N T E V D T M
aatacaagatgatgactactctattatgcaactaccctctcgccttctcttccaat
N T R Y D Y Y S I M H Y P L S A F S S N
ggtcagtgagcattcaaccctcgcaactttatcacagctaccgagcgggtggaaccctg
G Q W T I Q P L A L Y H S Y G A V G S R
cacgacttcagcgaagatagcagcagtaaatcaactttacaactgtggcgcgtgt
H D F S E Q D I S R V N Q L Y N C G A C
acagatcaagatagtttatattgccagatggggcaatgaggggcaatgccagcagaat
T D Q D S L Y C P V W A M R G E C Q R N
attgcatggatggccgaacactgccctctaagctgtgatactgtccagacacgcgagga
I A W M A E H C P L S C D T C P D T R G
tgcagaagagttatgtaaaaaattgtgatgacagcaacgaacatgccacattggggc
C R R V Y V K N C D D S N E Q C P H W A
gaaagagagaatgctctcgaatccatcttacatggaacccattgtcgcagaagctgt
E R G E C S R N P S Y M E R H C R R S C
ctcctgtgttacgtogatgtaactggagtcaggaggaacaagaatcagaagaggaag
L L C Y V D V T W S Q E E Q E S E E E E
gaagtgttagagaccacaattctctgtgccagagtgggccccccttggatgtatt
E V C R D H N S L C P E W A A L G E C I
cgtagctcttcatgattacagactgcagagaagctgtcaactttgtcaagcaacagt
R S P Y M I T D C R E S C Q L C Q S N S
attatcaacagagcttgcaaacgcaagaaggaactgtgcagattggggccagagaggc
I I N R A C Q D Q E G N C A D W A R E G
ctgtgtggaaccctcagcctcatctgtaaacactgtgaagaagctgcaagatgtgt
L C G T H A A Y M L K H C K K S C K V C
agtaccagccttaacaagaggcagagggcggcgaagaagctcggtaggtcagcaac
S T R P N K E A R G G R K R L G E V S N
gaaatccttgatgagacgatacaccgggacgaagatgagaatgttgcctgttcaatcac
E I L D E T I H R D E D E N V A V V N H
tgtactgacctcataccatctgtagtcagtgggcagaagtaagatgattcaccacat
C T D L H T T C S Q W A R S N E C I T N
gcagatggatggcagcaactgtcgaatagttgtgactctgtggaacagtggcata
A E W M A I N C P N S C G L C G N S G I
tag
S
tcagcttgcgtggatcgtcaccagaactgtacccttgggctacggaaggagattgcgag
cagtttccaactggatgctggacaagtgtcctgttagctgccattttgttaccaaaa
gaaactgaacaagttccttgacaaatattcgcaccgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaa
polyadenylation
site

```

图 1 刺参虾青素核苷酸和推导的氨基酸序列

Fig. 1 Structure and deduced amino acid sequence of *A. japonicus* astacin full-length cDNA
 锌金属肽酶功能域用□标出; HEXXHXXGFXHEXXRXDRD 保守序用灰色阴影标出; 多聚腺苷酸加尾位点用横线标出
 The Zn-metalloendopeptidases function domain is included in a box; the highly conserved HEXXHXXGFXHEXXRXDRD domain is shaded; the polyadenylation site in the 3'-UTR is underlined

<i>A.japonicus</i>	EGVKWPGAVVPIVDS-APFRXREKRIIFGAMQRFHDESCIKFRKRTIE--PDHL-FITPGKGCWSMVGRRQGGM
<i>S.purpuratus</i>	RESLWPGGAVPYV IDG-YYNINHHKQILAGMQRFHEKTCIRFVPTIE--RDYI-FFTQNLGCWSMVGRTGGR
<i>P.fucata</i>	NILRWPKGEVPPYFDNRGYNVDVKYFVRVAMREWEKYTCLFRFRERTNE--QNYV-LFQDGYGCNSQLGMVGGP
<i>A.astacus</i>	DEYLWSSGVIPYTFAG--VSGADQSAILSGMQELEKTCIRFVPTTE--SDYVEIFTSGSGCWSYVGRISGA
<i>C.briggsae</i>	TYLKWEQARIPYTISS-QYSSYSRTKIAEAEIEEYRKKTCIDFSPKSAG-DLDYIHIVPDD-GCYSLVGRIGGK
<i>C.elegans</i>	TYLKWEQARIPYTISS-QYSSYSRSKIAEAEIEEYRKKTCIDFSPKSAG-DLDYIHIVPDD-GCYSLVGRIGGK
<i>C.remanei</i>	TYLKWEQARIPYTISS-QYSSYSRTKIAEAEIEEYRKKTCIDFSPKSAG-DLDYIHIVPDD-GCYSLVGRIGGK
<i>B.malayi</i>	FYRRWPNGEIPYAISS-RYGPYSRSVIAKAMRKFHDISCVRFVPRVHNQHSYDLYIMPHD-GCYSLVGRAGGR
<i>H.magnipapillata</i>	IGGRWPNNIVPYDLRS--LSRQNPQMVQLAIENYHKKTCIKFVQRTNQ--VEYLSFYHGR-GCSSDVGFRRYR
	* :** . : : :*: * : : : : ** * :*
<i>A.japonicus</i>	QKLSLVGTCKVRKGTIMHELMHCLGFRHEHNRPRDEYIRIMRQNIELGYSENFIEHSNTEVDTMNTRYDYYS
<i>S.purpuratus</i>	QKISLSGTCRGSRGVIMHELMHAIGFRHEHNRPRDGYIDVYVQNIKAGFTTNFRKYSNDQVQTLGTGYDFMS
<i>P.fucata</i>	QVLNLDKNGCRFKGLYLHEIAHAVGLIHEHQRPIRDSYIDIRYENVQPVMRQWFKYPDREVNVSFGVDYDYSS
<i>A.astacus</i>	QQVSLQANGCVYHGTIIMHELMHAIGFYHEHTRMDRDNVVTINYQNVDPMSNTSFDIDTYS--RYVGEDYQYYS
<i>C.briggsae</i>	QPVS LGDG-CIQKGIIMHELMHAVGFFHEQSRADRDEYVKINWSNVEAGLQDQDFDKYSLN MIDHLGTKYDYGS
<i>C.elegans</i>	QPVS LGDG-CIQKGIIMHELMHAVGFFHEQSRADRDEYVKINWSNVEAGLQDQDFDKYSLN MIDHLGTKYDYGS
<i>C.remanei</i>	QPVS LGDG-CIQKGIIMHELMHAVGFFHEQSRADRDEFVKINWSNVEAGLQDQDFDKYSLN MIDHLGTKYDYGS
<i>B.malayi</i>	QLLSLEAD-CIQSGTIIMHELMHAVGFFHEQSRPRDEYIEIMWQNVMRGAEDQDFDKSLRHLIDLSEPYDYSS
<i>H.magnipapillata</i>	VNQISLANGCFIIGTVMHEIGHSLGFYHEQSRPRDEYVTIWRNIQSDMQYNFNKHSNLTIDSLGTLDYDYS
	* :** : * : * : ** : * ** : : : * : * . . . * : *

图 2 刺参虾青素功能域和其他物种虾青素的多序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of *A. japonicus* astacin function domain with other known animal astacin proteins

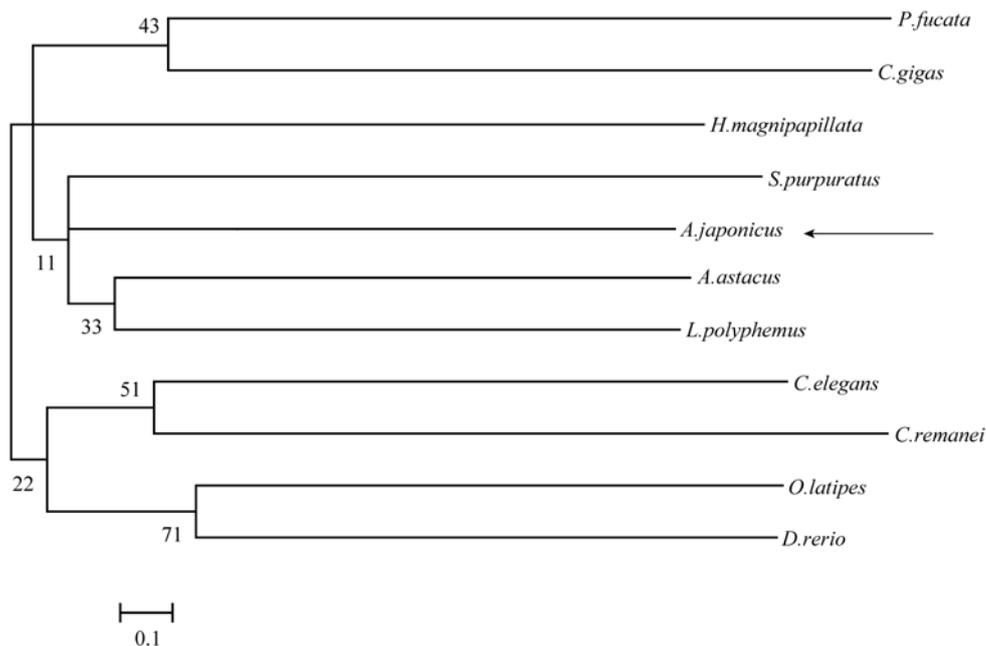


图 3 刺参虾青素和其他物种虾青素构建的系统进化树(箭头表示刺参虾青素)

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *A. japonicus* astacin with other known animal astacins (The arrow denotes *A. japonicus* astacin)

表 3 虾青素多序列比对和构建进化树所用序列

Tab. 3 Protein sequences used in alignment and phylogenetic analysis

NCBI/GeneBank 序列号	中文名称	拉丁文
XP_786540	紫海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
XP_002164184	大乳头水螅	<i>Hydra magnipapillata</i>
XP_001897453	马来丝虫	<i>Brugia malayi</i>
XP_002645932	秀丽隐杆线虫	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
NP_510549	秀丽小杆线虫	<i>Caenorhabditis elegans</i>
XP_003106206	新小杆线虫	<i>Caenorhabditis remanei</i>
AAX56337	合浦珠母贝	<i>Pinctada fucata</i>
AAQ13464	太平洋牡蛎	<i>Crassostrea gigas</i>
CAA64981	北欧螯虾	<i>Astacus astacus</i>
CAQ16892	马蹄蟹	<i>Limulus polyphemus</i>
NP_001098208	青鳉	<i>Oryzias latipes</i>
XP_001342763	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>

($P < 0.05$)(图 5)。当稚参发育至第 39 天, 白化刺参中虾青素基因的表达量开始显著低于普通刺参。随着刺参不断发育, 白化刺参和普通刺参中虾青素基因的表达量差异逐渐增大。待稚参发育至第 53 天, 白化刺参和普通刺参中虾青素基因的表达量差异达到最大, 此时普通刺参体壁中该基因的表达量是白化刺参的(2.39±0.07)倍。直到稚参发育至第 88 天, 白化刺参中虾青素基因的表达量仍显著低于普通刺参。

3 讨论

3.1 刺参虾青素基因序列特征

采用 454 高通量测序, 结合 RACE 技术, 获得了刺参虾青素基因的全长 cDNA 序列。该序列全长 2058 bp, 编码 560 个氨基酸。推导的刺参虾青素序列中, 从第 107 个氨基酸起至第 248 个氨基酸之间的序列是其锌金属肽酶功能域, 含有虾青素家族保

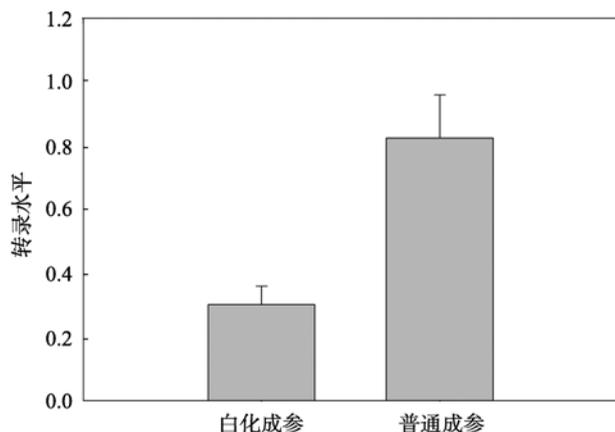


图4 刺参虾青素基因在白化成参与普通成参中转录水平的差异

Fig. 4 Relative mRNA abundance of astacin in the body wall of albino and normal adults. Values are denoted as mean \pm standard deviation (SD) ($n=5$)

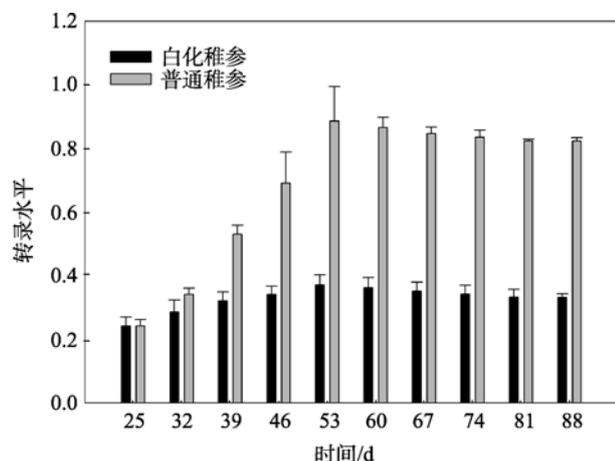


图5 刺参虾青素基因在白化稚参与普通稚参中转录水平的差异

Fig. 5 Relative mRNA abundance of astacin in *A. japonicus* juveniles at various sampling times. Values are denoted as mean \pm standard deviation (SD) ($n=5$)

守性序列模式 HEXXHXXGFXHEXXRXDRD, 其中 HEXxH 为 Zn 结合位点必需氨基酸。虾青素家族金属内肽酶生物学功能的发挥需要该位点与 Zn 的结合, Zn 的丢失能够导致酶活性的丧失^[6]。HEXXHXXGFXHEXXRXDRD 保守性氨基酸序列对于机体维持 Zn 金属肽酶的结构和功能至关重要^[7]。此外, 刺参虾青素与其他无脊椎动物的相应蛋白序列具有高度的同源性。因此, 克隆到的序列属虾青素家族, 为本研究的目的序列, 为研究刺参白化特征的发生机理及刺参体色的调控机制奠定了基础。

3.2 刺参虾青素基因与白化特征发生的相关性

虾青素基因最早发现于螯虾的肝胰腺^[8], 是水产生动物呈色的重要物质。最近的研究发现, 部分鱼类可将黄体素、玉米黄质转变成虾青素, 几乎所有甲壳类可将 β -胡萝卜素、黄体素、玉米黄质转变成虾青素^[9]。研究发现白化虹鳟皮肤的类胡萝卜素含量比正常虹鳟低得多^[10], 且在饲料中添加富含虾青素的酵母、藻类或类胡萝卜素有助于改善水产动物的体色^[11]。而虾青素对刺参体色的调控作用尚未见报道。

本研究发现, 白化刺参体壁中虾青素基因的表达量显著低于普通刺参, 该结果与 454 高通量测序分析的结果相符合。在稚参发育的初期(受精后第 25 天至第 32 天), 白化稚参和普通稚参中虾青素基因的表达量无显著差异, 此阶段白化稚参和普通稚参的外观也并无差异。当稚参发育至第 39 天, 白化刺参中虾青素基因的表达量开始显著低于普通刺参, 此时白化稚参和普通稚参的体长分别为 $3.152\text{mm} \pm 1.854\text{mm}$ 、 $3.621\text{mm} \pm 1.659\text{mm}$, 其外观仍无差异。直至稚参发育至第 81 天, 普通稚参的体长为 $10.047\text{mm} \pm 2.987\text{mm}$, 体壁呈青绿或红褐色, 成为“变色参”; 而白化刺参子代的体长为 $9.031\text{mm} \pm 2.655\text{mm}$, 体壁仍为白色。可见, 白化刺参与普通刺参中虾青素基因表达差异的发生早于其表观差异的发生, 且虾青素基因的低表达与刺参白化特征的发生相关联。

鉴于虾青素家族为新兴的金属内肽酶家族, 有关虾青素基因功能的研究报道尚十分有限。目前虾青素的研究主要集中在甲壳类, 已报道的棘皮动物虾青素只有紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)虾青素, 对棘皮动物中虾青素的具体功能目前尚不完全清楚。因此, 针对刺参虾青素的具体功能及调控机制, 还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Hyman L H. The invertebrates, Echinodermata Vol. 4[M]. New York: McGraw Hill, 1955: 763.
- [2] 冷向军, 李小勤. 水产动物着色的研究进展[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 138-142.
- [3] 宋光泉, 阎杰, 王荣辉, 施进. 天然虾青素的提取纯化及其应用[J]. 广东化工, 2007, 34(11): 63-66.
- [4] Judith S B, Robert J B. The astacin family of metalloendopeptidases [J]. Protein Science, 1995, 4:

- 1247-1261.
- [5] Bode W, Gomis-Ruth F X, Stocker W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins” [J]. *FEBS Lett*, 1993, 331:134-140.
- [6] Wolz R L, Bond J S. Meprins A and B[J]. *Methods Enzymol*, 1995, 248: 325-345.
- [7] Bode W, Gomis-Ruth R F, Huber R, et al. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases[J]. *Nature*, 1992, 358: 164-167.
- [8] Vogt G, Stocker W, Storch V, et al. Biosynthesis of Asiaticus protease a digestive enzyme from crayfish[J]. *Histochemistry*, 1989, 91: 373-381.
- [9] 黄永政. 鱼类体色研究进展[J]. *水产学杂志*, 2008, 21(1): 89-94.
- [10] Yamaguchi K, Miki W . Comparison of pigments in the integument of cobalt, albino, and normal rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*[J] . *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 1981, 68(4): 517-520.
- [11] 张晓红, 吴锐全, 王海英, 欧阳冰. 鱼类体色的色素评价及人工调控[J]. *饲料工业*, 2008, 29(4): 58-61.

Cloning and expression of astacin gene in albino and normal sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)

ZHAO He-ling^{1, 2}, YANG Hong-sheng¹, ZHAO Huan^{1, 2}, LIU Shi-lin¹

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

Received: Jul., 21, 2011

Key words: astacin; *Apostichopus japonicus*; albinism; gene cloning; real-time PCR

Abstract: In normal individuals of *Apostichopus japonicus*, dorsal and ventral surfaces turn yellowish brown in color. However, in albino individuals, little pigment is deposited on their dorsal and ventral surfaces, and the offspring also suffer from albinism. To investigate the correlation between astacin gene expression and albinism in *A. japonicus*, we cloned the astacin full-length cDNA of *A. japonicus* and analyzed the differences of astacin mRNA expression in the adult body wall and juveniles between albino and normal individuals. The full-length cDNA of *A. japonicus* astacin contained 2058 nucleotides that encodes an astacin protein of 560 amino acids. The real-time PCR analysis showed that astacin expression levels were significantly lower in albino adults compared to normal adults. In *A. japonicus* juveniles, compared to normal juveniles the astacin expression levels were significantly lower in albino individuals by 39 days after fertilization. We therefore suggest that the albinism in *A. japonicus* might be due to low astacin expression.

(本文编辑: 梁德海)