

Tropomyosin 基因在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 卵巢发育过程中的表达

水 燕¹, 徐增洪¹, 周 鑫^{1,2}

- (1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081)

摘 要: 原肌球蛋白 Tropomyosin 是虾蟹类的主要致敏物质, 除此以外在其他方面功能的研究非常少。本研究克隆了克氏原螯虾 *Tropomyosin* 基因, 进行了同源序列比对, 并分析了 *Tropomyosin* 基因在克氏原螯虾卵巢发育过程中的转录水平表达模式。研究结果显示, Tropomyosin 蛋白序列高度保守, 在虾蟹类甲壳动物中, 8 个抗原决定簇序列几乎完全一致。本研究克隆的基因存在 3 个核苷酸位置 (c61—t, g118—a, c359—t) 的变化, 但是均不处于抗原决定簇内, 免疫原性不受影响。*Tropomyosin* 基因 mRNA 在克氏原螯虾卵巢组织中表达量很低, 但是随着卵巢的发育存在表达差异, 即呈现一个先提高再降低的峰型特征。本研究暗示 Tropomyosin 除过敏原特性外, 可能也受性腺发育的部分调控影响。

关键词: 克氏原螯虾; 原肌球蛋白; 过敏原; 转录表达

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0042-05

Expression of the tropomyosin gene during the ovarian development of Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*)

SHUI Yan¹, XU Zenghong¹, ZHOU Xin^{1,2}

- (1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;
2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081)

Abstract: Tropomyosin is a main allergen in Decapod; however, studies on its other aspects are very limited. In this study, tropomyosin mRNA sequence in *P. clarkii* was cloned and the homologous sequence alignments were conducted. The transcriptional levels of the gene during the ovarian development of *P. clarkii* were quantified. The results showed that the tropomyosin amino acid sequence was highly conserved in decapod crustaceans and eight antigen decision cluster sequences were almost exactly the same. There were three nucleotide positions changes (c61—t, g118—a, c359—t) in the new cloned sequence, but the immunogenicity was not affected because they were not within in the antigenic determinant (AD). Although the *Tropomyosin* mRNA level in *P. clarkii* ovarian tissue was very low, its differences in different developmental stages were still detected. In brief, the expression of the tropomyosin gene showed a peak type pattern (first increased, and then decreased). This study suggested tropomyosin, a allergen, is partially regulated by the gonadal development.

Key words: *Procambarus clarkii*; tropomyosin; allergen; transcriptional expression

收稿日期: 2015-08-17

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金 (2015JBFM16) 和江苏省水产三新工程项目 (D2014-18) 共同资助。

作者简介: 水 燕, 助理研究员。E-mail: shuiy@ffrc.cn

* 通信作者: 周 鑫, 研究员。E-mail: crayfish1201@163.com

虾类食品是一类重要的高致敏性食物,可引起各种速发型超敏反应症状,如荨麻疹、风疹、喉痉挛、哮喘等,甚至可能危及生命^[1]。研究资料显示,引发食物过敏反应的食用性甲壳类(如对虾、蟹、螯虾等),其致敏物质主要为原肌球蛋白(Tropomyosin)^[2]。原肌球蛋白是一种分子量约32~40 kD的热稳定、水溶性糖蛋白,存在于一切脊椎动物和无脊椎动物中,是主要的泛过敏原^[3]。过敏者IgE与不同甲壳动物的原肌球蛋白有很高的交叉反应,甚至与软体动物、尘螨和蟑螂等无脊椎动物的原肌球蛋白也具有交叉反应^[4]。因此对虾类原肌球蛋白进行研究,对于食品致敏机理研究、致敏原分析和脱敏食品开发等都具有广泛的指导意义。

近年来,国内外对于甲壳动物原肌球蛋白的研究重点在其致敏性。主要包括:不同虾类(罗氏沼虾、中国明对虾、凡纳滨对虾等)原肌球蛋白的基因克隆与序列分析、原肌球蛋白的重组表达与致敏性及交叉反应分析、原肌球蛋白的致敏原因分析、原肌球蛋白的脱敏研究和原肌球蛋白的检测等方面^[5-8]。但是,关于原肌球蛋白在其他方面的研究鲜少有人关注。由于本研究之前的研究基础,观察到在克氏原螯虾卵巢发育的主要阶段(III期过渡到VI期),该蛋白的表达量存在一个明显的变化(与III期相比,VI期表达量至少下调2倍以上)^[9],暗示其在甲壳类性腺发育过程中可能也发挥某些重要作用。因此,本研究对于原肌球蛋白在克氏原螯虾卵巢发育过程中的功能产生兴趣,利用分子克隆技术,先从克氏原螯虾肌肉组织中克隆到原肌球蛋白基因,然后对该基因在卵母细胞发育过程中的表达模式进行分析,为原肌球蛋白在甲壳动物性腺发育中的功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克氏原螯虾雌性幼虾于2014年5月初取自江苏大丰宝龙集团养殖公司试验基地。选取雌性、体质健壮、活动力强、附肢完整的幼虾,体长5.0~15.0 cm,体重13.5~30.0 g。实验室条件下暂养于室内水箱中(规格:70 cm×50 cm×40 cm),箱内有水草等隐蔽物。取卵巢组织和肌肉组织用于提取RNA。

1.2 试验方法

1.2.1 总RNA提取及Tropomyosin基因克隆 根据赵维信等^[10]以及王顺昌^[11]对克氏原螯虾卵巢发育作出的划分标准,分别解剖、提取新鲜的克氏原螯虾肌肉和各发育时期卵巢组织,用液氮研磨充分

后立即采用TRIzolTM试剂(Invitrogen, USA)提取总RNA样品,置于-80℃保存待用。测定RNA的浓度以及琼脂糖电泳检测RNA样品的完整性。取肌肉组织总RNA样品分别用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI, USA)反转录试剂盒进行cDNA第一条链的合成,反应条件按照说明书要求完成,得到的20 μl cDNA模板放于4℃保存。

根据NCBI公布的克氏原螯虾原肌球蛋白(GenBank No: FJ769183, GI: 225348411)的基因序列设计其上下游引物:5'-CCGATCATGGACGCCATCAAGA-3'和5'-AGTCTCGTTAGTAGCCAGTCA G-3'(引物由上海生工合成,下同)。以反转录的产物为模板,利用特异性合成的引物进行PCR反应。反应程序如下:95℃变性5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 70℃ 1 min 运行30个循环;72℃延伸10 min,结束反应。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,并使用PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit进行割胶回收(Invitrogen, USA)。扩增产物在16℃与pMD18-T载体(Promega)连接过夜,转化到DH5α感受态细胞之后在LB Amp+平板上37℃培养过夜,挑取阳性单菌落进行DNA测序(由上海英俊生物技术有限公司进行)。

1.2.2 序列分析及同源性比对 将测序所得序列通过GenBank进行序列比对,同时推导其相应氨基酸序列。利用ProtParam进行编码蛋白的各种基本理化特性分析,利用在线程序Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)将所得克隆与已知罗氏沼虾基因进行多序列比对,分析其序列同源性。

1.2.3 Tropomyosin基因在不同发育时期卵巢组织的表达动态 使用iScript SYBR Green One Step RT-PCR试剂盒(Bio-Rad, USA),运用RT-PCR技术对原肌球蛋白在克氏原螯虾卵巢不同发育时期基因表达水平进行检测。每个发育时期随机选取3个RNA样本进行混合,作为该时期Tropomyosin基因RT-PCR反应的模板。根据扩增测序得到的基因序列设计上下游引物为5'-GTAACCTGAGGCCGACCTTGAGCGTGC-3'和5'-CATAATCCrIT11GTGACTCAAC-3',扩增片段大小为358 bp;内参基因18S rDNA使用的检测引物为5'-TGGTGCATGGCCGTTCTTA-3'和5'-CATAATCCrIT11GTGACTCAA C-3'。RT-PCR的操作按照试剂盒说明书进行,反应条件均为:95℃ 10 s(预变性);95℃ 30 s, 60℃ 15 s, 40个循环;72℃ 30 s。反应结束后,设定阈值,利

cus(DQ151457); “.” means conservative mutation, “.” means semi-conservative mutation, “*” means consistent sequence, and the boxes are labeled as the epitopes.

图 1 *Tropomyosin* 基因同源氨基酸序列的多重序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of homologous amino acids of *Tropomyosin*

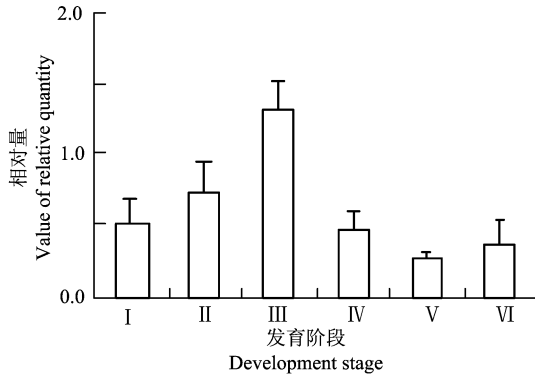


图 2 克氏原螯虾 *Tropomyosin* 基因在不同发育阶段的卵巢组织的相对表达水平

Figure 2 Relative *Tropomyosin* expression levels in ovary of *P. clarkii* at different developmental stages

将测序结果进行序列同源性比较,发现它们与 GenBank 中已知的甲壳纲十足目动物(中国明对虾、罗氏沼虾、凡纳滨对虾、野生褐对虾、宽沟对虾等)的原肌球蛋白蛋白序列同源性非常高(99%以上),与蝇、螺、贝等也具有很高的同源性(90%以上)(图 1)。图中根据 Ayuso 等^[12]标示了 8 个抗原表位(方框表示),3 个不同核苷酸均不在所有抗原表位内。

2.2 克氏原螯虾 *Tropomyosin* 基因在幼体不同发育阶段的卵巢组织中的表达差异

为观察克氏原螯虾 *Tropomyosin* 基因在幼体不同发育阶段的卵巢组织中的表达差异,采取荧光实时定量 PCR 检测 mRNA 的表达水平,以 18s rDNA 基因作为内参照。

用 *Tropomyosin* 基因特异引物进行荧光实时定量 PCR 反应可扩增 358 bp 的片段,用内参基因特异引物进行荧光实时定量 PCR 反应则扩增 187 bp 的片段。在扩增效率曲线分析中,根据梯度稀释 cDNA 分别进行 *Tropomyosin* 基因和内参基因 real-time PCR 反应,得出各自的斜率,再根据公式扩增效率 $E = 10^{(-1/\text{斜率})}$,分别计算出 2 个基因的 PCR 扩增效率分别为 2.13 (*Tropomyosin* 基因)和 2.07 (18s rDNA 基因),结果表明这两个基因的实时定量 PCR 扩增效率是非常接近的,可以用公式 $\text{RATE} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ 去计算基因的相对表达水平。经过统计分析后, *Tropomyosin* 基因的 mRNA 相对表达水平如图 2 所示。图 2 显示, *Tropomyosin* 基因在雌性幼虫卵巢发育过程中随着发育阶段的不断递进,其

转录水平存在明显的差异。从卵巢发育初期 I 期开始到 III 期阶段,转录表达量呈现显著的上升趋势 ($P < 0.05$), III 期基因表达量基本达到 I 期的 2 倍;从 III 期进入到 VI 期阶段,转录表达量呈现一个明显的下降趋势 ($P < 0.05$),相差超过 2 倍以上;在 IV 期阶段到 V 期阶段最后进入 VI 期阶段时,其转录水平呈现一个小幅度的波动,变化不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

虾类属于世界粮农组织公布的八大食物过敏原之一^[13],无论其国内消费量还是出口量均处于较高地位。因此,虾类过敏原的研究一直受到研究者的重视。大量的研究已表明原肌球蛋白 *Tropomyosin* (Pen a 1) 是虾中普遍存在的一种主要过敏原, *Tropomyosin* 主要存在于肌细胞中,它在引起肌内收缩的肌动蛋白相关的钙调节系统中起重要作用^[14]。随着研究的深入, *Tropomyosin* 的抗原表位信息越来越明朗。其中, Ayuso 等^[12]通过交叠融合方法并结合虾过敏患者血清鉴定,认为 Pen a 1 含有 5 个线性 IgE 结合区,8 个抗原表位(aa43 ~ 55、aa88 ~ 101、aa137 ~ 141、aa144 ~ 151、aa187 ~ 197、aa249 ~ 259、aa266 ~ 273 和 aa273 ~ 281 位氨基酸残基处)。Zheng 等^[15]利用生物信息学方法分析 Pen a 1 的二级结构、亲水性、可塑性、抗原指数等多个指标,并结合在线网站筛选后,最终预测出 10 个抗原表位。其中第 3 个抗原表位氨基酸位点为 89 ~ 105,与 Ayuso 等的第 2 个结合区的结果基本趋于一致。

抗原决定簇中氨基酸残基的替换会显著地减弱或完全丧失免疫原性,通常 2 个及以上的氨基酸残基的替换会使抗原决定簇几乎完全丧失免疫原性,非保守的替换更容易使抗原决定簇丧失免疫原性,例如, *Tropomyosin* 在 255 位上的 R 被 D 替换会使 aa251 ~ 259 位的抗原决定簇完全丧失免疫原性^[16]。 *Tropomyosin* 作为主要的肌肉蛋白出现在所有动物细胞内,并且在不同分类阶元间高度保守,例如虾蟹类甲壳动物与脊椎动物间氨基酸序列一致性均达 54.6% 以上^[6-7]。虽然脊椎动物 *Tropomyosin* 基因与虾蟹类高度相似,但其并不能引起过敏反应,原因在于 8 个抗原决定簇上。脊椎动物 *Tropomyosin* 基因与虾蟹同源基因不仅序列一致性低,而且存在较多非保守性替换,因此,脊椎动物 *Tropomyosin* 不

具有免疫原性。与此不同, 在虾蟹等甲壳动物中, 克氏原螯虾 *Tropomyosin* 的基因序列一级结构(已有文献及本研究结果)以及 8 个抗原决定簇序列与褐对虾、凡纳滨对虾、斑节对虾及罗氏沼虾基本完全一致, 由此可以部分解释克氏原螯虾与其他甲壳动物一样会引起过敏体质人体的过敏反应, 并且与其他甲壳动物存在交叉免疫。

本研究通过特异性 PCR 反应成功克隆出我国江苏省人工养殖克氏原螯虾 *Tropomyosin* 基因, 经序列测定和分析表明, 该克隆序列与 NCBI 公布的序列有 99.7% 的同源性, 其中有 3 个核苷酸存在差异(c61-t, g118-a, c359-t)。但是这 3 位差异的核苷酸都不包含在上述的 8 个抗原决定簇内。因此可以推断, 本研究克隆获得的序列是克氏原螯虾 *Tropomyosin* 基因序列, 含有全部完整的抗原决定簇, 具备类似其他虾蟹类的免疫原性。3 个非决定簇核苷酸的差异有可能暗示了不同地区的克氏原螯虾存在遗传多样性(SNP 等)。其实 *Tropomyosin* 基因序列的非决定性差异这一方面的研究在美洲大蠊的研究中也有所提及^[17], 但是具体还需要后续更多的实验结果进行分析。

Tropomyosin 基因 mRNA 在克氏原螯虾卵巢组织中表达量很低, 但是随着卵巢的发育存在表达量的差异。简单说来呈现一个先提高再降低的峰型特征, 本研究对 *Tropomyosin* 基因转录水平的检测结果与之前对该基因在翻译水平的检测结果^[9]一致, 即, 从发育中期(III期)到发育后期(VI期)阶段, *Tropomyosin* 基因的转录水平和翻译水平都经历一个快速降低的过程。据此, 本研究推测, 伴随着克氏原螯虾卵巢发育的进程, 卵母细胞对积累卵黄蛋白的需求愈加迫切, 在此阶段肌动蛋白相关的钙调系统活动减弱可能暗示了此时卵母细胞骨架系统及胞间连丝在内的信号传输系统活跃度被削减。此外, *Tropomyosin* 基因表达量的降低也暗示了虾蟹类卵巢组织及卵母细胞免疫原型的降低, 致过敏性能力减弱。

目前关于 *Tropomyosin* 除过敏原特性外其他方面的研究非常少, 但是本研究可以窥见 *Tropomyosin* 可能也受性腺发育的部分调控影响, 总之这部分的研究还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] WANG S, DELGADO J C, RAVKOV E, et al. *Penaeus monodon* tropomyosin induces CD4 T-cell proliferation in shrimp-allergic patients[J]. *Human Immunology*, 2012, 73(4): 426-431.
- [2] REESE G, AYUSO R, CARL C, et al. IgE-binding epitopes of shrimp tropomyosin, the major allergen Pen a 1[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1999, 118(2-4): 300-301.
- [3] AYUSO R, LEHRER S B, REESE G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1(Tropomyosin)[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 127(1): 27-37.
- [4] 郑礼娜. 虾类过敏原的活性分析及其抗原表位的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 24-27.
- [5] SHIOMI K, SATO Y, HAMAMOTO S, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2008, 146(2): 91-98.
- [6] 罗伟芝, 符春荣, 鄂玉兰, 等. 罗氏沼虾原肌球蛋白基因的克隆表达及变应原性鉴定[J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2012, 36(4): 425-430.
- [7] 杜欣军, 张伟伟, 孙伟英, 等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(4): 38-43.
- [8] 黄素文, 杨文潮, 朱海, 等. 淡水小龙虾主要过敏原原肌球蛋白基因的克隆、表达及其免疫活性鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(7): 642-647.
- [9] SHUI Y, GUAN Z B, XU Z H, et al. Proteomic identification of proteins relevant to ovarian development in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Aquaculture*, 2012(14-18): 370-371.
- [10] 赵维信, 白桦, 马晓萍. 克氏原螯虾卵黄发生过程中卵巢和大颚器孕酮含量的变化[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(3): 232-236.
- [11] 王顺昌. 克氏原螯虾的生物学和生态养殖模式[J]. *淡水渔业*, 2003, 33(4): 59-61.
- [12] AYUSO R, REESE G, LEONG-KEE S, et al. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 129(1): 38-48.
- [13] Food and Agriculture Organization. Report of the FAO technical consultation on food allergens[R]. Rome: 1995: 3-7.
- [14] CASTILLO R, CARRILO T, BLANCO C, et al. Shellfish hypersensitivity: clinical and immunological characteristics[J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 1994, 22(2): 83-87.
- [15] ZHENG L N, LIN H, PAWAR R, et al. Mapping IgE binding epitopes of major shrimp (*Penaeus monodon*) allergen with immunoinformatics tools[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(11): 2954-2960.
- [16] LEHRER S B, AYUSO R, REESE G. Seafood allergy and allergens: a review [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2003, 5(4): 339-348.
- [17] 刘志刚, 何毅华, 吴海强, 等. 美洲大蠊 *Per a 7* 基因的克隆、表达及免疫学鉴定[J]. *昆虫学报*, 2007, 50(4):

330-334.