

凡纳滨对虾 G 蛋白 G_q 基因的克隆和功能鉴定

叶志云¹, 金利华^{1,2}, 邹海鹰¹, 骆晶晶^{1,3}, 林圣彩¹

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 材料学院 生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005; 3. 加拿大阿尔伯特卡尔加里大学 生物化学与分子生物学系, 加拿大)

摘要: 为了寻找并克隆凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) G 蛋白 亚基, 为研究对虾的生理调控提供理论基础, 通过简并 PCR 和 RACE 反应获得目的基因的全长 cDNA 序列; 用 Blast, DNASTAR 和 Genedoc 软件对所得序列进行分析, 确定所得序列为凡纳滨对虾 G 蛋白 G_q 基因, 命名为 pvG_q。将该基因的编码序列克隆到表达载体, 通过免疫共沉淀实验和胞内 Ca²⁺, IP₃ 浓度的测定鉴定该 G_q 亚基的功能, 发现该亚基的序列和功能与其他 G_q 家族成员具有高度保守性。用 Western blotting 分析发现 pvG_q 在对虾身体各部位存在普遍分布, 尤其在脑神经、眼柄、腮和颚片中有大量表达, 在嗅觉器官触角也有适量分布。说明了 pvG_q 在对虾生命活动中的重要性, 为研究对虾的生理调控奠定了理论基础。

关键词: G 蛋白; 克隆; 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)08-0064-06

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界养殖产量最高的三大虾种之一。该品种原产于美洲太平洋沿岸水域。自 1988 年引入我国后, 国内科学工作者就它的生活习性、育苗、养殖、抗病等方面做了大量研究。但是从分子生物学的角度去研究凡纳滨对虾的生长、发育等调控机制的报道还很少见。

很多实验表明, G 蛋白在无脊椎动物(包括美国龙虾 *Homarus americanus*) 的嗅觉和视觉信号途径中起着极其重要的作用^[1-3]。而气味、光线、食物等因素在对虾等低等生物的生活习性中都是很重要的因素。因此, 作者主要寻找并克隆对虾 G 蛋白信号途径中的功能基因 G 蛋白 亚基, 并就该亚基的结构和功能进行分析, 旨在为对虾的生长、发育、抗病及养殖等生理调控提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

体长 8 cm 左右的凡纳滨对虾购自厦门大学白城菜市场。将活体对虾的脑神经迅速取出, 用 RNeasy mini kit 试剂盒(美国 Qiagen 公司)提取总 RNA, 操作过程见试剂盒说明书。RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色鉴定, 260 nm 处测定 RNA 吸光度。取总 RNA 2 μg, 用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(美国 Clontech 公司)合成第一链 cDNA。操作过程见说明书。

1.2 简并 PCR

根据已知其他物种 G 蛋白 亚基的高度保守序

列设计一对简并引物, 正向引物序列为 5'-AGCACI(AT)T(ACT)(AG)TIAA(AG)CA(AG)ATG-3', 反向引物序列为 5'-TTGAA(AG)CA(AGCT)TG(AGT)ATCCA(CT)TT-3'。引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。25 μL 简并 PCR 反应体系如下: 上述第一链 cDNA 1.5 μL, 10 μmol/L 的两向简并引物各 2 μL, 10 mmol/L 的 dNTP 0.6 μL, Taq DNA 聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司) 1.25 U, 10 × 缓冲液 2.5 μL, 超纯水 16.2 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 42 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 40 次; 最后 72 °C 延伸 3 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段 DNA 并克隆到 pBluescript SK(-) 载体, 由上海生工测序。

1.3 快速扩增 cDNA 末端反应

快速扩增 cDNA 末端反应(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)。上述克隆的测序结果通过 NCBI 网站 Blastx 软件比对, 初步确定为目的基因后, 根据片段序列设计两条特异引物分别进行 5' 端和 3' 端 RACE 反应。进行 5' 端 RACE 反应的引物序列为 5'-CTCATA GTCCACCGCTCGCACCA GAT -3', 进

收稿日期: 2005-09-27; 修回日期: 2008-05-15

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2002AA629060)

作者简介: 叶志云(1962-), 女, 广西南宁人, 高级工程师, 学士, 主要从事生物化学研究, 电话: 0592-2182993, E-mail: zzy1893@xmu.edu.cn

行 3 端 RACE 反应的引物序列为 5'-ATGATCAGGGCCA TGGACCTTCTTCAA-3'。RACE 反应按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段,克隆到 pBluescript SK(-) 载体并测序。

1.4 表达载体的构建

将所得目的基因的全长编码序列按照常规分子克隆技术克隆到哺乳动物表达载体 pCMV5 上,并在 N 末端接上血凝素 HA 标记,构建成 pCMV5-HA-G_q 表达载体。同样,将凡纳滨对虾 *pVg₁* 基因(待发表)和人的 *G₁* 基因克隆到 pCMV5 载体并接上 Flag 标记,构建成 pCMV5-Flag-pvG₁ 和 pCMV5-Flag-hG₁ 表达载体。

1.5 免疫共沉淀和 Western blotting 分析

取适当浓度的人胚胎肾细胞 HEK 293 铺于 60 mm 细胞培养板,在含 10% 小牛血清的 DMEM (美国 Gibco 公司) 培养液中培养。24 h 后,用阳离子聚合物聚醚酰亚胺 PEI (Polyethylenimine, 美国 Poly science 公司) 将 pCMV5-HA-pvG_q 分别与空载体、pCMV5-Flag-pvG₁ 和 pCMV5-Flag-hG₁ 各 2 μg, 共转染到细胞中。36 h 后收获细胞,按照 Sternweis 等^[4] 的方法提取细胞膜蛋白。将膜蛋白重悬于缓冲液 (Hepes 30 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, DTT 0.1 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, GDP 0.1 mmol/L, Lubrol-PX 0.1%) 中^[5]。取 800 μL 质量浓度为 4 g/L 的膜蛋白,冰上放置 30 min,然后离心 20 min 去掉不溶物。在上清溶液中加入 anti-Flag M2-beads (美国 Sigma 公司) 5 μL,于 4 °C 混和器上缓慢旋转过夜,1 000 r/min 4 °C 离心收集沉淀产物,同上缓冲液洗 3 次。然后按参考文献^[6] 进行 SDS-PAGE 电泳、Western blotting 分析。

1.6 细胞内 Ca²⁺ 和 IP₃ 浓度的测定

将 pCMV5-HA-pvG_q 5 μg 转染到 HEK 293 细胞中,同时用转染空载体的细胞作为对照。36 h 后分散细胞,取 6 × 10⁴ 个细胞于 Eppendorf 管。500 g 离心 3 min,用 Hank 平衡盐溶液 HBSS (NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, 葡萄糖 1 g/L, KH₂ PO₄ 60 mg/L, Na₂ HPO₄ 47.5 mg/L, pH 7.2) 洗细胞 3 次。细胞在 10 μmol/L 的 FLUO-3/AM (德国 CalBiochem 公司) 中 37 °C 温育 30 min,加 HBSS (含 1% FBS) 400 μL,继续温育

30 min。再用 HEPES 缓冲液 (HEPES 10 mmol/L, Na₂ HPO₄ 1 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, MgCl₂ 0.5 mmol/L, 葡萄糖 5 mmol/L, BSA 0.1%, pH 7.4) 洗两次。加 180 μL HEPES 缓冲液,将细胞转移到黑色 96 孔板,加入 10 mmol/L LiCl 20 μL, 30 μmol/L AlCl₃ 与 10 mmol/L NaF 的混合物 30 μL,温育 20 min 后加入高氯酸终止反应^[7]。酶标仪分析 96 孔板,485 nm 激发,526 nm 吸收波长检测。实验结果取 3 次独立实验的平均值。

细胞内三磷酸肌醇 IP₃ 浓度的测定中细胞转染同钙离子浓度测定方法,氟化铝刺激分别 5, 10, 20 min。测定 IP₃ 具体过程见 d-myo-Inositol 1, 4, 5- Trisphosphate (IP₃) Hit Hunter Fluorescence Polarization Assay (Green Tracer) 试剂盒说明书(美国 Amersham 公司)。

1.7 膜蛋白的提取和 Western blotting 分析

分别提取对虾的触角、大颚、小颚、腮、尾部肌肉、步行足、游泳足、尾扇、脑神经、心脏、肝胰脏、胃、肠、眼柄中的膜蛋白。提取方法参考文献^[4]。取这些膜蛋白各 8 μg 进行 SDS-PAGE 电泳、Western blotting 分析。其中用来检测目的蛋白的特异性一抗为 anti-G_{q11} (德国 Calbiochem 公司)。

2 结果

2.1 *pVg_q* 基因的全长 cDNA 序列

以凡纳滨对虾脑 cDNA 为模板,简并 PCR 得到 500 bp 的 DNA 带(图 1)。根据该 DNA 片段克隆并

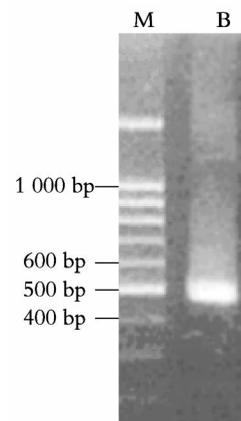


图 1 凡纳滨对虾 G 蛋白 亚基基因的简并 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Degenerate PCR product of G subunit of *L. vannamei*
M. 100 bp 的 DNA 分子质量标准; B. 从脑 cDNA 中简并 PCR 扩增的产物
M. 100 bp DNA marker; B. the PCR product amplified from brain cDNA

测序的结果设计特异引物,进行 5 端和 3 端 RACE 反应。两端 RACE 扩增产物的克隆测序,得到该基因全长 1 424 bp 的 cDNA 序列。利用 Blastx 软件和 DNASTAR 软件分析,发现只有 210 bp 位点的起始密码子为正确翻译阅读框的起始密码子。推断该 cDNA 序列 5 端 209 bp 为 5 端非编码序列(Untranslated Region, UTR), 3 端 153 bp 为 3'-UTR, 开放阅读框(210 ~ 1 271 bp, 共 1 062 bp) 翻译成含 353 个氨基酸残基的蛋白质(图 2)。该 cDNA 和氨基酸序列的 Genbank 数据库收录编号分别为 AY626792 和 AA T44837。

利用 Genedoc 软件将该氨基酸序列与 Genbank 数据库序列进行比对,发现该序列与其他物种的 G_q

蛋白序列具有相当高的同源性。与脊椎动物小鼠、非洲爪蟾和人类的 G_q 之间分别具有 83%, 82% 和 84% 的序列同源性,与无脊椎动物果蝇的 G_q 具有 81% 的序列同源性,与美国龙虾的 G_q 之间的序列同源性高达 94% (图 3)。从图中还可以看出,该序列含有 G_q 家族成员共有的重要功能区域^[8],如 G_q 与细胞膜锚定的 N 末端 MXCC 位点,霍乱毒素 ADP 核糖基化作用位点 Arg¹⁷⁷ 残基, GTP 在 G_q 上的结合位点 G⁴⁰ TGES, G_q 与各种受体的结合区域 C 末端等等,这些重要的功能位点在作者得到的对虾新基因编码蛋白序列上都是完全一致的。所有这些结果表明,作者获得的该基因就是凡纳滨对虾的 G_q 基因,作者将其表达产物命名为 $pV G_q$ 。

```

GAGACGGCCGGACCAAACCCACCCCATTTGGCTTTGGGATTTTGTGTGGAGGAAATAAG 60
CCCAAAATTGAGAAAATTCCTCCGATTAACGCCGCTTCCCTTCGTGGCGAAAGCGGGC 120
TGAAAGAGGAGAGGAAGGAGGTGAAATTAAGTCCCGAAGTTGGAGTGAAGGAAGTCAAAA 180
TTGGTAATAATATTAGTTGATCAGCAAACATGGCGTGTGTTAAGCGAAGAAGCCAAGG 240
M A C C L S E E A K
AACAGAAGAGGATAAACCAAGAAATAGAACGACAATTAAGGAAAAGATAAGAGAGATGCCA 300
E Q K R I N Q E I E R Q L R K D K R D A
GAAGAGAACTCAAACACTGTTATTGGGCACAGGAGAATCTGGCAAATCTACCTTCATCA 360
R R E L K L L L L G T G E S G K S T F I
AGCAGATCGCTATTATCCACGGTGCAGGTTATAGCGATGATGACAAACGAGGGTTCATCA 420
K Q M R I I H G A G Y S D D D K R G F I
AGCTGGTCTTCCAGAACATCTTCATGGCCATGCAGTCAATGATCAGGGCCATGGACCTTC 480
K L V F Q N I F M A M Q S M I R A M D L
TTCAAATATCTTATGGAGACTCTGCAAACAGTGAACACGCAGATCTGGTGCGAGCGGTGG 540
L Q I S Y G D S A N S E H A D L V R A V
ACTATGAGTCAGTCACAACGTTTGGAGGCCATATGTAAGTCCATGAAAAGCTTATGGG 600
D Y E S V T T F E E P Y V T A M K S L W
CTGACACCGGCATCCAACACTGCTATGATCGTCGCAGAGAGTACCAGCTCACAGATTGAG 660
A D T G I Q H C Y D R R R E Y Q L T D S
CAAAATATTCTTGTATGTTGGAGCGTATCATATCATCGGACTTCTTACCGACCGAGC 720
A K Y Y L D D L R R I I S S D F L P T E
AGGATATTCTTAGGGCTCGAGTACCAACCCTGGAATCATTGAGTACCCCTTTGATCTGG 780
Q D I L R A R V P T T G I I E Y P F D L
ACTCAATCATCTTAGAATGGTAGATGTCGGTGGTCAGCGATCTGAGCGACGGAAGTGG 840
D S I I F R M V D V G G Q R S E R R K W
TTCATTGCTTCGAGAATGTCACTCTATCATTTTCTGGTTCGCACTTTCTGAGTATGATC 900
I H C F E N V T S I I F L V A L S E Y D
AGATCTTGTGTTGAGTCTGACAATGAGAACC GAATGGAAGAATCAAAGGCCCTGTTCAAGA 960
Q I L F E S D N E N R M E E S K A L F K
CCATTATCACATACCCCTGGTTCAGCACTCGTCTGTTATTCTTCTCCTTAACAAGAAGG 1 020
T I I T Y P W F Q H S S V I L F L N K K
ATCTGTTGGAGGAGAAGATCATGTAATCATCTGGTGGACTATTTCCAGAATATGATG 1 080
D L L E E K I M Y S H L V D Y F P E Y D
GCCACAGAGGGATGCCATTGCAGCCCGGAGTTTCATCCTACGTATGTTGTAGAATTA 1 140
G P Q R D A I A A R E F I L R M F V E L
ATCCTGATCCTGAGAAGATTATATTTACATTTTACATGCGCGACAGACTGAGAACA 1 200
N P D P E K I I Y S H F T C A T D T E N
TAAGGTTTCGTCTTCGCTGCCGTCAAAGACACAATCCTGCAGCTAAATCTAAAGGAATACA 1 260
I R F V F A A V K D T I L Q L N L K E Y
ATCTGGTGTAAACGTAGAGCTGTGCCAACTCTGGCCGAAAGTGTACCCAAGGTGAAGTGA 1 320
N L V
CAGCATACCCCTACTCTTGTGAGGGGCTGTGCGGTTGABBCCTCACTTCATCACCCCTAA 1 380
TATGGACACTAAACTATGAAGGCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA A 1 424
    
```

图 2 $pV G_q$ 的全长 cDNA 序列和相应编码的氨基酸序列
 Fig. 2 The full length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of $pV G_q$

shrimp	: -----MACCLSEEAKEQKRINQEIERQLRKDKRDARRELKLLLLGTGESGKSTFIKQMR	: 54
lobster	: -----e.....k..r.....	: 54
fly	: -----e.....k..r.....	: 54
frog	: mtlesi.....ar..d...r.....	: 60
mouse	: -----ar..d...hv.r.....	: 54
human	: mtlesi.....ar..d...r.....	: 60
shrimp	: IIHGAGYSDDDKRGFIKLVFNIFMAMQSMIRAMDLLQISYGDSANSEHADLVRADVYES	: 114
lobster	:e.....i.....s.....	: 114
fly	:s....e....y.....k...m.k...qgeh..l...msi...t	: 114
frog	:s....e....t...y...t...a....et.k.p.kyeh.kg..l...e..v.k	: 120
mouse	:s....e....t...y...t...a....t.k.p.kyeh.ka..q...e..v.k	: 114
human	:s....e....t...y...t...a....t.k.p.kyeh.ka..q...e..v.k	: 120
shrimp	: VTTFEEPYVTAMKSLWADTGIQHCHYDRRREYQLTDSAKYYLDDLERIISSDFLPTEQDIL	: 174
lobster	:n...q.....t...d.aak.yvs.l...	: 174
fly	:d..ln.i.t..d.a...e.....k..d.vaqpay.....	: 174
frog	: .as..n..d.i.y..n.p...e.....s..t...n.vd..atqgy...q..v.	: 180
mouse	: .sa..n..d.i...n.p...e.....s..t...n..d.vadpsy...q..v.	: 174
human	: .sa..n..d.i...n.p...e.....s..t...n..d.vadpay...q..v.	: 180
shrimp	: RARVPTTGIIIEYPFDLDSIIIFRMVDVGGQRSERRKWIHCFENVTSIIFLVALSEYDQILF	: 234
lobster	: .v.a.....ee.r.....	: 234
fly	: .v.....ee.r.....	: 234
frog	: .v.....q.v.....m.....v.v	: 240
mouse	: .v.....q.v.....m.....v.v	: 234
human	: .v.....q.v.....m.....v.v	: 240
shrimp	: ESDNENRMEESKALFKTIITYPWFQHSVILFLNKKDLLEEKIMYSHLVDYFPEYDGPQR	: 294
lobster	:rk	: 294
fly	:r.....n.....	: 294
frog	:r.....n.....	: 300
mouse	:r.....n.....	: 294
human	:r.....n.....	: 300
shrimp	: DAIAAREFILRMFVELNPDPEKIIYSHFTCATDTENIRVFVAAVKDTILQLNLKBYNLV	: 353
lobster	:s.....	: 353
fly	: ..t.....d...s.....s.....	: 353
frog	: ..q.....k..d...sd.....	: 359
mouse	: ..q.....k..d...sd.....	: 353
human	: ..q.....k..d...sd.....	: 359

图3 pvG_q 亚基全长氨基酸序列与其他物种 G_q 亚基全长序列比对

Fig. 3 Comparison of the predicted amino-acid sequence of pvG_q with G_q-subunits from other species

Shrimp, *L. vannamei*; Lobster, *H. americanus*; Fly, *Drosophila melanogaster*; Frog, *Xenopus tropicalis*; Mouse, *Mus musculus*; Human, *Homo sapiens*. Genbank 序列号分别为 AA T44837, AAB49314, NP_523718, S45699, P21279 和 AA G61117。图中的点表示与 pvG_q 序列相同的序列;灰色标记中 MXCC 表示棕榈酰化位点, G⁴⁰ TGES 表示 GTP 结合位点,第 177 位 Arg 残基表示霍乱毒素 ADP 核糖基化作用位点

Shrimp, *L. vannamei*; Lobster, *H. americanus*; Fly, *Drosophila melanogaster*; Frog, *Xenopus tropicalis*; Mouse, *Mus musculus*; Human, *Homo sapiens*. Genbank accession numbers are AA T44837, AAB49314, NP_523718, S45699, P21279 and AA G61117, respectively. Dots represent residues that were identical to pvG_q. Of particular note, MXCC motif for palmitoylation, G⁴⁰ TGES motif for GTP-binding, and Arg¹⁷⁷ for cholera toxin ADP-ribosylation are highlighted in gray

2.2 pvG_q 的功能

由于 G 蛋白信号途径在进化史上的高度保守性,使我们能用哺乳动物细胞来研究对虾 G 蛋白的功能。在低浓度的 Mg²⁺ 和高浓度的 GDP 存在的情况下, G 蛋白三种亚基(α, β, γ)容易以三聚体的形式存在^[5]。所以作者在 pvG_q 与 G_i 的免疫共沉淀分析中,提供了这些适合 G 蛋白三聚体存在的条件。结果表明,体外适当条件下, pvG_q 不仅能与凡纳滨

对虾的 G_i 共沉淀,还能与人的同源蛋白 G_i 共沉淀(图 4)。

氟化铝(AlF₄⁻)能与以 G-GDP 结合形式存在的许多 G 蛋白 亚基结合,使 G 蛋白 亚基保持在与 GTP 结合的构象^[9]。图 5 表明,氟化铝刺激细胞后,过量表达了 pvG_q 的细胞中 Ca²⁺ 和 IP₃ 浓度明显高于转染空载体的细胞。说明 pvG_q 能刺激细胞内磷脂酶(phospholipase C, PLC)的活性。

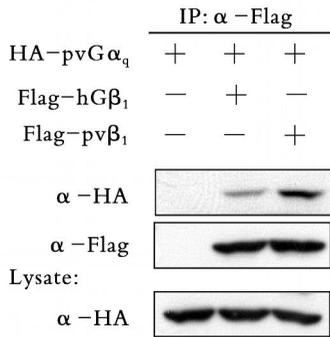


图4 免疫共沉淀的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of co-immunoprecipitation. 上面的电泳图表示免疫共沉淀的 HA-pvG α_q , 中间的电泳图表示免疫沉淀的 Flag-hG β_1 和 Flag-pvG β_1 , 下面的电泳图表示细胞裂解液中 HA-pvG α_q 的表达水平

Top panel: the co-immunoprecipitated HA-pvG α_q signals detected with anti-HA antibody; Middle panel: the immunoprecipitated Flag-hG β_1 and Flag-pvG β_1 signals detected with anti-Flag antibody; Bottom panel: the expression patterns of pvG α_q from total cell lysates probed by anti-HA antibody

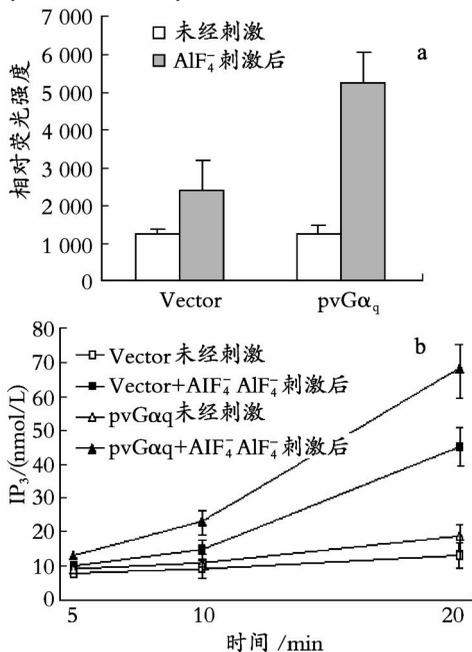


图5 胞内 Ca²⁺ 和 IP₃ 浓度测定

Fig. 5 Measurement of Ca²⁺ and IP₃

a. 用相对荧光强度 (RFU) 表示的 Ca²⁺ 浓度; b. IP₃ 浓度; 数据为 3 次实验的平均值

a. The levels of Ca²⁺ according to the relative fluorescence (RFU); b. The IP₃ levels; The data represent the mean values \pm SD. of triplicate experiments

2.3 pvG α_q 在凡纳滨对虾身体中的分布

pvG α_q C 末端完全的序列同源性,使得我们能利用商业化的抗 G $\alpha_q/11$ 的抗体来进行 Western blotting 分析。该抗体是以 G $\alpha_q/11$ C 末端 QLNLKEYNLV 合成多肽为抗原制备的多克隆兔抗体,能特异性识别 G α_q 和 G α_{11} ,与其他百日咳毒素不敏

感的 G 蛋白家族成员没有交叉反应。从图 6 中可以看出,Western blotting 只检测到约 45 ku 的单一一条带,可能对虾体内只有一种 G $\alpha_q/11$ 亚基,或者还存在其他分子质量完全一样的 G $\alpha_q/11$ 亚基。G α_q 在对虾体内存在广泛分布,其中在脑和眼部有大量表达,在触角、颚片、腮等部位也有比较多的表达,其他部位都有相对较少的分布,尤其是在尾部肌肉中几乎检测不到 G $\alpha_q/11$ 的信号。

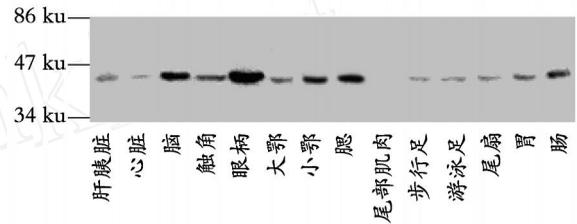


图6 pvG α_q 在对虾身体各部位的分布

Fig. 6 Distribution of pvG α_q in shrimp

3 讨论

由于 G 蛋白 α 亚基高度的序列同源性,使我们能用简并 PCR 的方法寻找对虾体内的 G 基因。从作者克隆到的新基因 cDNA 序列、相应编码的氨基酸序列以及基本功能的分析可以确定,该新基因就是凡纳滨对虾的 G α_q 蛋白 α 亚基基因。pvG α_q 在序列和功能上与其他物种 (包括脊椎动物和无脊椎动物) 的 G α_q 亚基都是非常保守的。由此,可以推断出 pvG α_q 在对虾许多生理效应调控中的重要作用。

G 蛋白在无脊椎动物的光信号传导途径中起重要作用^[10]。跨膜光受体视蛋白接受光信号后通过 G 蛋白将信号传递给胞内 PLC。在这一过程中,PLC 催化磷脂酰肌醇水解产生磷酸肌醇 (IP₃) 和 二脂酰甘油 (DAG),IP₃ 的产生使胞内潴留内钙离子迅速释放。因为光信号途径中很多效应分子都是 Ca²⁺ 依赖性的,所以胞内游离钙离子浓度的上升就会产生一系列的生理效应。在环节动物、节足动物和软体动物的光感受器官中都有发现 G α_q 的存在^[10]。作者在对虾的眼柄提取物中发现大量的 G α_q ,说明 G α_q 在对虾的视觉信号传导途径中起着重要作用。

由于大多数无脊椎动物感受外界环境都以嗅觉为主要方式,所以无脊椎动物 (包括甲壳类) 的嗅觉系统进化得非常敏感并且特异^[11]。IP₃ 在嗅觉信号传导过程中功能的重要性在越来越多的无脊椎动物中得到证实。比如气味能刺激龙虾嗅觉反应细胞中 cAMP 和 IP₃ 的产生。McClintock 等人在龙虾的嗅觉器官触角和神经系统中克隆到 G α_q 和 PLC,在蚕的嗅觉反应提取物、果蝇嗅觉器官的嗅觉神经、中枢神经系统中也都有检测到 G α_q 。作者在凡纳滨对虾的触角中也检测到 G α_q 明显的分布,说明 G α_q 在对虾的嗅觉反应中也起着重要作用。

综上所述,作者推断利用 G_q亚基的 G 蛋白信号传导途径在甲壳类凡纳滨对虾的视觉、嗅觉、神经系统等活动中也是十分保守的。凡纳滨对虾 G_q亚基基因的克隆,为对虾的生长、发育、抗病及养殖等生理调控奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Lans H, Rademakers S, Jansen G. A network of stimulatory and inhibitory G α subunits regulates olfaction in *Caenorhabditis elegans* [J]. **Genetics**, 2004, **167** (4) : 1 677-1 687.
- [2] Fadool D A, Estey S J, Ache B W. Evidence that a G α protein mediates excitatory odor transduction in lobster olfactory receptor neurons [J]. **Chem Senses**, 1995, **20** (5) : 489-498.
- [3] Kosloff M, Elia N, Joel-Almagor T, et al. Regulation of light-dependent G α translocation and morphological changes in fly photoreceptors [J]. **EMBO J**, 2003, **22** (3) : 459-468.
- [4] Sternweis P C, Robishaw J D. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain [J]. **J Biol Chem**, 1984, **295** (22) : 13 806-13 813.
- [5] Xu F, Hollins B, Landers T M, et al. Molecular cloning of a lobster G β subunit and G β expression in olfactory receptor neuron dendrites and brain neuropil [J]. **J Neurobiol**, 1998, **36** (4) : 525-536.
- [6] Luo W, Ng W W, Jin L, et al. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation [J]. **J Biol Chem**, 2003, **278** (39) : 37 451-37 458.
- [7] Robinson J A, Jenkins N S, Holman N A, et al. Ratiometric and nonratiometric Ca²⁺ indicators for the assessment of intracellular free Ca²⁺ in a breast cancer cell line using a fluorescence microplate reader [J]. **J Biochem Biophys Methods**, 2004, **58** (3) : 227-237.
- [8] Jacquir-Joly E, Francois M C, Burnet M, et al. Expression pattern in the antennae of a newly isolated lepidopteran G α protein alpha subunit cDNA [J]. **Eur J Biochem**, 2002, **269** (8) : 2 133-2 142.
- [9] Bigay J, Deterre P, Pfister C, et al. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP [J]. **EMBO J**, 1987, **6** (10) : 2 907-2 913.
- [10] Pepe I M. Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction [J]. **Prog Retin Eye Res**, 2001, **20** (6) : 733-759.
- [11] Krieger J, Breer H. Olfactory reception in invertebrates [J]. **Science**, 1999, **286** (5 440) : 720-723.

Identification of a novel G protein G_q gene in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

YE Zhi-yun¹, JIN Li-hua^{1,2}, ZOU Hai-ying¹, LUO Jing-jing^{1,3}, LIN Sheng-cai¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Research Center of Biomedical Engineering, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, the University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N1)

Received: Sep. 27, 2005

Key words: G protein; Cloning; *Litopenaeus vannamei*

Abstract: In this study, we aimed to identify new functional genes encoding G protein alpha subunits from *Litopenaeus vannamei* and elucidate the critical roles that G subunits assume in a signal transduction process of shrimp. Degenerate PCR and RACE techniques were employed to achieve the full length of G subunit in *L. vannamei*. Co-immunoprecipitation analysis and measurement of second messengers of Ca²⁺ and IP₃ in HEK 293 cells overexpressed with this new G subunit were used to identify the basic functions. Western blotting analysis was employed to detect the distribution of the G subunit. In the results, the predicted encoding protein of the novel cDNA sequence shared high similarity to G_q from other organisms, and was thus termed pvG_q. pvG_q was highly conserved in both primary structures and basic functions. The expression pattern revealed that pvG_q was widely expressed in many shrimp tissues, especially enriched in brain and eyes, it also obviously existed in gills, maxillas and antennae. These results indicated that pvG_q may play critical roles in sensory responses and nerve system of shrimp *L. vannamei*, which provided a basis for the research of physiological regulation of shrimp.

(本文编辑:刘珊珊)