

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15449

斑节对虾增殖细胞核抗原基因克隆及表达分析

王成扬^{1,2}, 赵超^{1,3}, 傅明骏^{1,3}, 邱丽华^{1,3,4}

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
3. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
4. 热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018

摘要: 为研究增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢发育中的功能, 利用 RACE 技术克隆得到了斑节对虾 PCNA 基因(*PmPCNA*)的 cDNA 全长序列。该序列全长 978 bp, 包括 135 bp 的 5'非编码区(5'UTR)、60 bp 的 3'UTR 和编码 260 个氨基酸的 783 bp 的开放阅读框(ORF)。同源性分析结果表明, *PmPCNA* 与其他物种具有很高的蛋白同源性。组织表达模式分析表明, *PmPCNA* 在所监测的各组织中为组成性表达, 其中在卵巢和脑中表达量较高; 卵巢发育不同阶段基因的表达分析则表明 *PmPCNA* 在 期表达量最高, 是其他各期表达量的 2 倍; 注射五羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)后, *PmPCNA* 在卵巢中表达量明显上升, 其中在 48 h 表达量升高幅度最大, 是对照组的 5 倍左右。利用原核表达技术获得了 PCNA 的体外重组蛋白, Western Blot 分析证实该重组蛋白为 PCNA 蛋白。以上研究结果表明, *PmPCNA* 蛋白是斑节对虾卵巢发育过程中的重要调节因子, 本研究为进一步认识斑节对虾卵巢发育机制提供了基础资料。

关键词: 斑节对虾; 增殖细胞核抗原(PCNA); 卵巢发育; 实时荧光定量 PCR; 5-羟色胺(5-HT); 原核表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1052-11

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一类主要存在于各组织增殖细胞中的蛋白, 属于 DNA 滑动夹子家族的成员, 与 DNA 复制密切相关^[1]。自 Miyachi 等^[2]于 1978 年在对系统性红斑狼疮患者的研究中发现该蛋白以来, 已有大量文献对 PCNA 在高等脊椎动物中的作用进行了研究报道, 如 Tománek 等^[3]研究发现 PCNA 能够促进猪(*Sus scrofa*)卵巢的生长发育; Motiwale 等^[4]在对小鼠(*Mus musculus*)上皮肿瘤细胞的研究中发现, PCNA 的高表达会引起细胞大量增殖; Witko-Sarsat 等^[5]研究发现, 在人(*Homo sapiens*)嗜中性粒细胞中 PCNA 能够调控该类细

胞的生存能力。PCNA 被认定为是真核生物复制体的重要组成部分, 作为 DNA 聚合酶的辅酶参与到 DNA 复制活动中, 从而调节细胞的增殖^[6-7]。随着研究的不断深入, PCNA 更多的功能和参与的细胞活动也被研究和报道。研究证实, PCNA 在脊椎动物中具有高度保守的空间结构以及相对保守的生物学功能, 通常在 DNA 的复制与修复、细胞周期的调控、染色体重组等活动中直接或间接起重要的调控作用^[8-10]。生物的生长发育过程离不开细胞的增殖分化与生理调控, PCNA 在细胞增殖分裂与调控过程中起着重要的作用^[11], 在脊椎动物中 PCNA 不仅参与调控卵泡的生长发育,

收稿日期: 2015-11-30; 修订日期: 2016-01-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101903); 海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014057); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201300B03); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501A11); 引进国际先进农业科学技术计划(948计划)项目(2015-Z20).

作者简介: 王成扬(1990-), 男, 硕士研究生, 从事水产养殖方面研究. E-mail: wchengyangnhs@126.com

通信作者: 邱丽华(1971-), 博士, 研究员, 从事海洋生物功能基因的研究. E-mail: qiu902@126.com

还能指示卵母细胞的生长, 因此对 PCNA 进行研究有助于阐明卵巢发育的机理^[12-13]。PCNA 在大鼠 (*Rattus norvegicus*)^[14]、牛 (*Bos taurus*)^[15]、狒狒 (*Papio hamadrayas*)^[16] 等脊椎动物的卵泡发生过程中所起的作用均有研究报道, 然而在无脊椎动物特别是甲壳类动物中, PCNA 与卵巢发育相关的作用却鲜有报道。

斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 作为世界三大养殖虾类之一, 是我国南方重要的水产经济动物^[17]。在对虾繁育过程中, 雌性亲虾性腺发育参差不齐, 极大地限制了对虾养殖的产业化发展。而通常所采用的眼柄切除技术对亲虾具有不可逆的损害^[18-19], 因此对对虾卵巢发育相关机理进行研究, 并探寻新的替代眼柄切除的技术势在必行。本研究以斑节对虾为实验对象, 对 *PmPCNA* 进行了分子克隆和相关生物信息学分析, 利用体外重组的方法对 PCNA 进行了体外重组表达, 并在转录水平上分析了 *PmPCNA* 在不同组织、卵巢发育不同时期的表达特征。5-羟色胺 (5-hydroxy tryptamine, 5-HT) 作为与卵巢发育相关的重要的神经递质, 与卵巢发育进程密切相关^[20]。因此, 本研究进行了 5-HT 的注射实验, 探究其对卵巢中 PCNA 转录表达的影响, 以期研究斑节对虾的卵巢发育相关机理提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 实验用 虾

实验用斑节对虾来自深圳实验基地 (深圳市大鹏新区南澳街道大碓村 83 号), 体重为 100~180 g。斑节对虾共 50 尾, 池中暂养 3 d, 水温控制在 24~25℃, 保证供氧充足。3 d 后解剖提取斑节对虾组织样品, 包括卵巢、肝胰腺、心脏、肠、鳃、胃、脑、肌肉, 用于后续的基因克隆及分析。根据形态学^[21]初步观察确定卵巢发育时期, 然后分别取发育期 ~ 期的斑节对虾卵巢贮存于 -80℃ 备用。

1.2 5-HT 注射 实验

为研究 5-HT 对斑节对虾卵巢 *PCNA* 表达的影响, 将 5-HT 用 1×PBS 稀释至浓度为 25 μg/μL 的注射液。实验室条件下 (温度 26~28℃, 盐度 20 左

右), 培育斑节对虾 7 d。将斑节对虾分为 2 组, 每组 18 只, 其中实验组在第一腹节处注射 5-HT, 注射剂量为每克虾体质量注射 50 μg 试验药剂, 对照组注射等体积的 1×PBS, 分别于注射后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 取样, 样品放置在 -80℃ 冰箱备用。

1.3 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

根据 Trizol (Invitrogen, USA) 说明书提取斑节对虾上述组织样品的总 RNA, 溶解于 DEPC 处理水, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量, 紫外分光光度计检测其浓度。以总 RNA (2 μg) 为模板, 以 Oligo-dT/adaptor [5'-GGCCACGCGACTAGTAC (T)₁₆-3'] 为反转录引物, 在反转录酶 M-MLV (Promega, USA) 的作用下合成 cDNA 第一链, 反应条件: 42℃ 60 min, 70℃ 15 min。

1.4 斑节对 虾 *PmPCNA* 基因的克隆与测 序

根据本实验室斑节对虾转录组测序结果筛选得到的斑节对虾 *PmPCNA* 基因 EST 序列, 设计 3'RACE 基因特异性引物 3'PCNAF (5'-GGAGGA-AGCAGTCGTTATTG-3') 和 3'PCNAR (5'-CCAAG-ATTGAGGACGAAGACT-3')。cDNA 模板链的合成试剂盒是 SMARTTM RACE 合成试剂盒 (Clontech, USA), 再采用降落 PCR (touchdown PCR) 技术和半巢式 PCR (semi-nest PCR) 技术扩增 *PmPCNA* 的 3' 末端。具体方法参考戴文婷等^[22]。所得的扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测长度正确后, 切胶回收后并连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa, Japan) 上, 16℃ 连接 4 h 后转化 *E. coli* DH5α, 挑取阳性单克隆送公司测序。

1.5 序列分 析

使用在线软件 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 对测序片段进行比对拼接; 使用 NCBI 在线的 ORF Finder 工具和 BLAST 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 查找基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF)、起始密码子和终止密码子; 序列的同源性分析使用的是 NCBI 的 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); 蛋白结构域的分析使用 SMART 工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/>)

scanprosite/)在线程序;信号肽预测使用 SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/);糖基化位点预测使用 NetNGlyc 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/);磷酸化位点预测使用 NetPhos 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/);多重序列比对使用 Clustalx 2.0^[23]工具和 BioEdit 工具;进化树分析使用 Mega 5.0^[24]。

1.6 *PmPCNA* 在转录水平上的时空表达特征

将斑节对虾不同组织、卵巢发育不同时期的样品以及 5-HT 注射的实验组、对照组的卵巢组织分别提取总 RNA,采用 SYBR Premix Ex TaqTM Kit (TaKaRa, Japan)逆转录合成 cDNA 第一链。设计 *PmPCNA* 基因定量引物 QPCNAF(5'-TGTGCCGCTAACGATGAC-3')和 QPCNAR(5'-GTTTCTGGAATGCCAAGATG-3')。内参基因选择斑节对虾延伸因子 1 (*EF-1 α*),并设计引物 EF-F (5'-AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT-3')和 EF-R (5'-CGTGGTGCATCTCCACAGACT-3')。以蒸馏水代替 cDNA 作为阴性对照,每个样品 3 个重复,在 LC480 定量仪器(ROCHE Light Cycler 480/480II, Switzerland)上进行实时定量反应,反应按照以下程序进行:预变性,94℃ 30 s;PCR 反应,94℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 40 个循环;72℃ 10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *PmPCNA* 基因的相对表达量。

1.7 斑节对虾 *PCNA* 的体外重组表达分析

根据 *PmPCNA* 的基因序列设计原核表达引物:PEPCNAF (5'-GGATCCATGTTTCGAAGCCCGCCTGGTGCAAGGG-3')和 PEPCNAR (5'-GAATTCTGAGTCTTCGTCTCAATCTTGGGGGCC-3'),分别在上下游引物的 5'端插入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点,然后用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制酶双酶切 *PCNA* 目的基因和 pGEX-4T-1 质粒;琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收产物用 T₄ DNA 连接酶 16℃ 连接过夜。转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取阳性单克隆,PCR 反应检测后送公司测序;提取 PCNA-pGEX-4T-1 重组质粒,转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,挑取阳性单克隆,PCR 反应检测后送公司测序。取 2 mL 重组质粒菌液,接种于 200 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃,220 r/min 振

荡培养 3 h,使菌液 OD 值达到 0.6~0.8,先取 2 mL 菌液作为空白对照,然后加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至最终浓度为 0.6 mmol/L,30℃ 继续振荡培养,每隔 2 h 取样 2 mL,于 2 h、4 h、6 h、8 h 这 4 个时间点取样。样品离心沉淀菌体,加入 200 μ L PBS 重悬菌体,按 1:4 体积比加 50 μ L 的预染上样缓冲液,开水煮沸 10 min,离心后取 10 μ L 于聚丙烯酰胺凝胶系统(SDS-PAGE),凝胶考马斯亮蓝染色过夜,脱色液脱色后拍照。

1.8 免疫印迹

样品经 SDS-PAGE 后,进行凝胶转膜、牛奶封闭、洗脱、抗体孵育、避光显色、拍照。抗体使用的是 GST Tag HRP 抗体试剂盒(华安生物公司),抗体稀释倍数为 2000,使用 PBST (1 \times PBS 中加入 3%吐温)稀释,10 μ L 抗体加入 20 mL PBST 中;洗脱液使用 PBST,洗脱 3 次,每次洗脱 15 min;显色反应用的是 HRP-DAB 增强型显色试剂盒(天根生化有限公司)。

1.9 数据分析

使用 SPSS 22.0 软件进行数据单因素方差分析,结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm SD$)表示, $P<0.05$ 认为差异显著。Sigma Plot12.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *PmPCNA* 基因的 cDNA 序列分析

设计使用基因特异性引物,采用 SMART RACE 技术获得斑节对虾 *PmPCNA* 基因全长 cDNA 序列(图 1)。*PmPCNA* 基因 cDNA 全长 978 bp,包括 135 bp 的 5'UTR、60 bp 的 3'UTR 和 783 bp 的 ORF (GenBank 注册号: KU380336)。ORF 共编码 260 个氨基酸,PCNA 蛋白的理论等电点和分子量大小分别是 4.59 和 28.83 kD。BLAST 同源性分析以及 SMART 分析显示,PCNA 蛋白具有一个 PCNA/RFC (replication factor C)结构域,结构域位于 208 aa 与 254 aa 之间,是 PCNA 蛋白家族一员。SignalP 4.0 软件分析结果显示,*PmPCNA* 没有信号肽。分别采用 NetNGlyc 2.0 和 NetPhos 2.0 预测 *PmPCNA* 的翻译后修饰情况,发现 *PmPCNA* 有 1 个 N-糖基化位点和 12 个磷酸化位点(包括 8 个

```

1 CTTCGAAGCGGGCGTCAGCACAGGACGTGTTTTTAAAAAACC GAACGTCACACAAA 60
61 ACCCACCCTCCACCCCTCCATCCTCCTCCCGATTCTAGTCTCCAGTAAAAACCAACCAAAA 120
121 GCCACCACCACCACCATGtcgaagcccgcctgggtgcaaggagcctcctgaagaaggtg 180
1 M F E A R L V Q G S L L K K V 15
181 ctggaagccatcaaggacctgctgaacgagcgtcgtgggactgcccgcactcgggcatc 240
16 L E A I K D L L N E A S W D C A D S G I 35
241 cagctgcagcgcgatggacaactcgcacgtgctcgtgggtgcctgaacctccgcgcgag 300
36 Q L Q A M D N S H V S L V S L (N) L R A E 55
301 ggcttcgacaagtaccgctgacaggaacctcatcatgggcatgaatctcagcagcatg 360
56 G F D K Y R C D R N L I M G M N L T S M 75
361 tccaaaatcctcaagtgtgccgctaacgatgacatcatcacaatgaagcccaggataac 420
76 S K I L K C A A N D D I I T M K A Q D N 95
421 gcagacaccgtcacattcatgttcgaatctcccaaccagaaaagggtcctcgattatgaa 480
96 A D T V T F M F E S P N Q E K V S D Y E 115
481 atgaagctgatgaacctcgcaggaacatcttggcattccagaacagattatgcatgt 540
116 M K L M N L D Q E H L G I P E T D Y A C 135
541 gttatcaaatgcatctggtgaattggccgtatctgcagagatcttagtcagtttggaa 600
136 V I K L P S G E F A R I C R D L S Q F G 155
601 gagagcattgtcattgctgtacaaaggaaggagtc aaattctctgcagcaggagacatt 660
156 E S I V I A C T K E G V K F S A A G D I 175
661 ggtactgcaaacatcaagctggcacagacctccagtggtggacaagaggaggaaagcagtc 720
176 G T A N I K L A Q T S S V D K E E E A V 195
721 gttattgagatgcaggagcctgtcacattaacctttgctgcagatacctgaacatgttc 780
196 V I E M Q E P V T L T F A C R Y L N M F 215
781 acaaaagcaaccactttccccacaggctccctttccatgtcccctgatgtacccttg 840
216 T K A T P L S P Q V S L S M S P D V P L 235
841 gtcgttgaatattcaattggcgagattggccacatccgttacttcttggcccccaagatt 900
236 V V E Y S I G E I G H I R Y F L A P K I 255
901 gaggacgaagactcaaaaACTTGAAGAATAGGCTTCTTAGGGGGGAACAATAAGGATGT 960
256 E D E D S * 260
961 ACAAAAAAAAAAAAAAG 978s
    
```

图 1 *PmPCNA* cDNA 序列与氨基酸序列展示

每列左右两侧的数字表示氨基酸或者核酸在序列中的位置; 方框内序列表示起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA); 灰色部分表示 PCNA/RFC 结构域; 圆圈部分为糖基化位点; 下划线为加尾信号(AATAA).

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *PmPCNA*

Numbers on the right and left of each row represent amino acid or nucleotide position. The boxed sequences represent the initiation code (ATG) and termination code (TAA), respectively. The PCNA/RFC domain is shown in grey. The predicted N-glycosylation site is shown in the circle. The underlined sequence (AATAA) was polyadenylation signal.

丝氨酸、1 个苏氨酸和 2 个酪氨酸位点)。

从 NCBI 选取节肢动物类、鱼类、两栖类、哺乳类等物种的 PCNA 氨基酸序列, 与斑节对虾的 PCNA 氨基酸序列进行多重比对, 比对结果显示 *PmPCNA* 与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 同源性最高(99%), 其他依次为内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*) (86%)、果蝇(*Drosophila melanogaster*) (81%)、牛(*Bos taurus*) (75%)、人(*Homo sapiens*) (74%)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (74%) (图 2)。系统进化树结果显示, 斑节对虾首先与中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)聚为一支, 然后再与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本囊

对虾(*Marsupenaeus japonicus*)等物种聚为一支后, 最后与蚤状溞(*Daphnia pulex*)聚为一支(图 3)。

2.2 *PmPCNA* mRNA 在组织中的表达差异

半定量 PCR 结果表明 *PmPCNA* 在卵巢和脑中表达量要高于其他组织, 鳃中表达量最低(图 4)。实时荧光定量 PCR 技术进一步检测确定 *PmPCNA* mRNA 在斑节对虾各个组织中的表达情况, 结果表明 *PCNA* 在不同组织中均有表达, 卵巢中表达量最高, 脑次之, 鳃中表达量最低。选取心脏表达量作为基准, 卵巢和脑的表达量分别是心脏的 4.8 倍和 4 倍左右, 而表达量最低的鳃是心脏的 0.15 倍左右。*PmPCNA* mRNA 在各组织中表

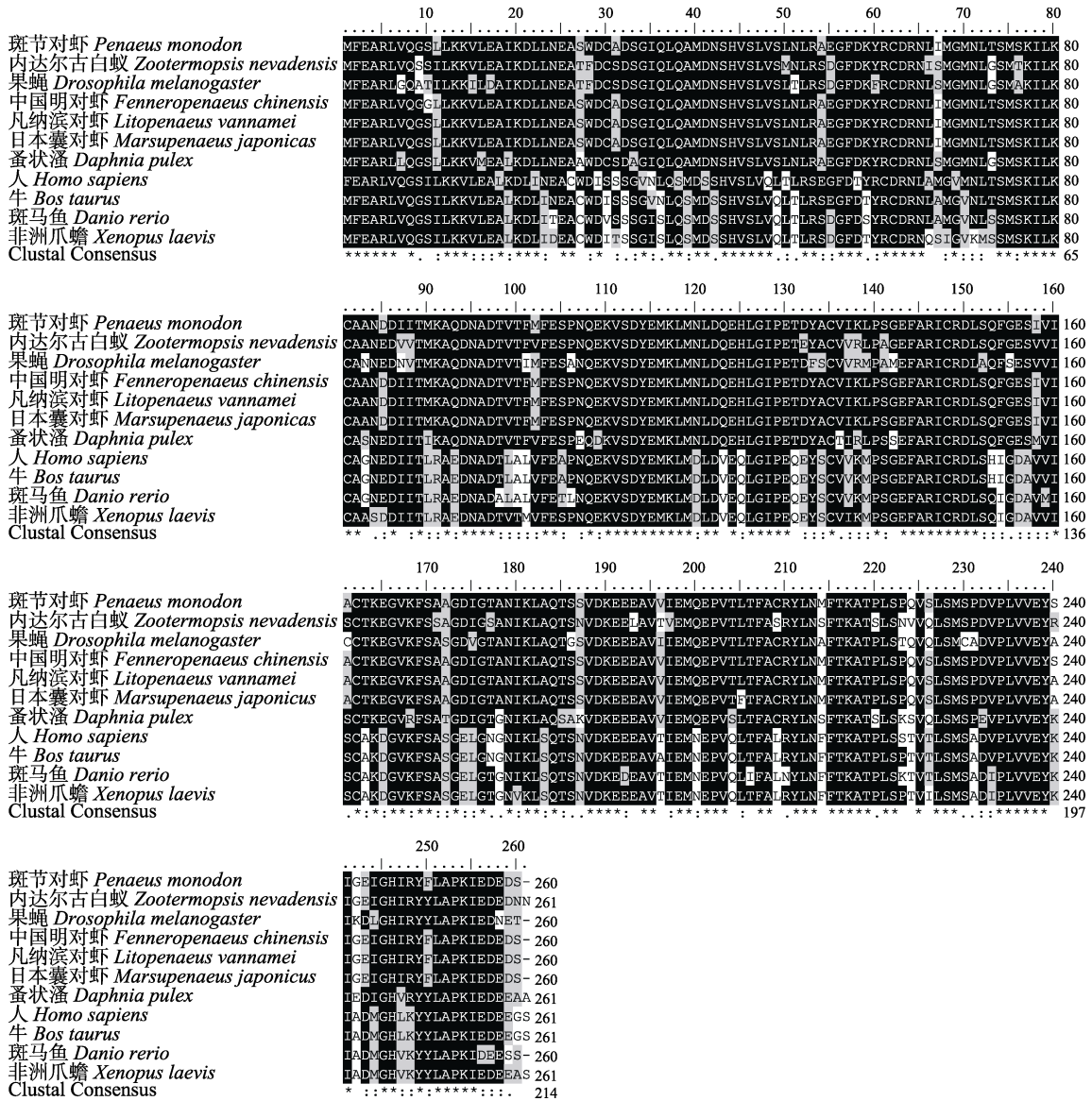


图 2 PmPCNA 和其他物种 PCNA 氨基酸序列多重比对
 黑色部分代表一致性，灰色部分代表相似性。

GenBank 序列号分别是：凡纳滨对虾(AEJ89927.1)，日本囊对虾(ACA09718.1)，中国明对虾(ABM66815.1)，内华达古白蚁(KDR11193.1)，人(NP_002583.1)，牛(NP_001029666.1)，果蝇(NP_476905.1)，非洲爪蟾(NP_001081011.1)，蚤状溞(EFX70582.1)，斑马鱼(NP_571479.2)。

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of PCNA from *Penaeus monodon* and other species
 Residues in black and grey background indicate identical and similar sites, respectively.

The GenBank access numbers are as follows: *Litopenaeus vannamei*(AEJ89927.1), *Marsupenaeus japonicus*(ACA09718.1), *Fenneropenaeus chinensis*(ABM66815.1), *Zootermopsis nevadensis*(KDR11193.1), *Homo sapiens*(NP_002583.1), *Bos taurus*(NP_001029666.1), *Drosophila melanogaster*(NP_476905.1), *Xenopus laevis*(NP_001081011.1), *Daphnia pulex*(EFX70582.1), *Danio rerio*(NP_571479.2).

达量由高到低依次是：卵巢、脑、肝胰腺、心脏、肌肉、胃、肠、鳃(图 5)。

2.3 斑节对虾卵巢发育各时期 PmPCNA mRNA 的相对表达

利用实时荧光定量 PCR 技术检测 PmPCNA

mRNA 在斑节对虾卵巢发育各时期的表达情况，结果显示，PmPCNA mRNA 在卵巢发育的各个时期普遍表达，其中在 III 期表达量最高($P>0.05$)，其他各期间表达量差异不显著($P>0.05$)，III 期表达量是其他各期表达量的 2 倍左右(图 6)。

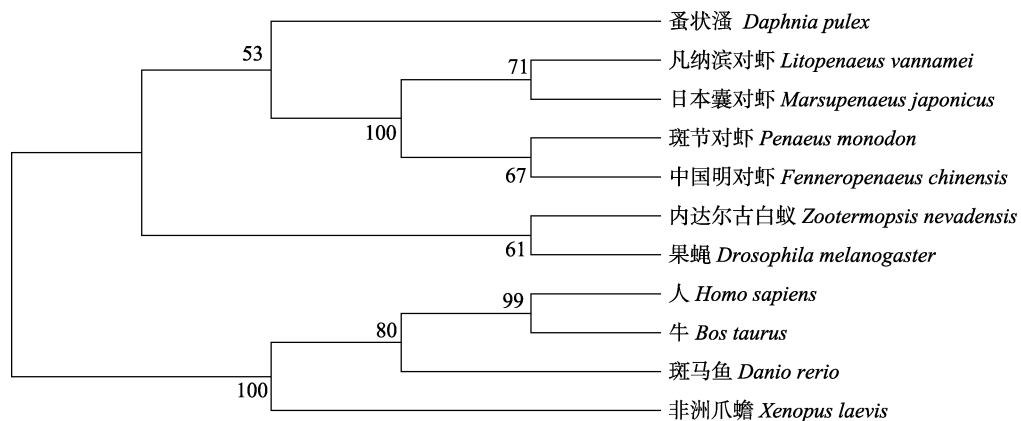


图 3 利用 MEGA 5.0 软件基于 *PCNA* 基因编码的氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度百分比。

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on amino acid sequence encoded by *PCNA* via MEGA 5.0 software
The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1000 replicates).

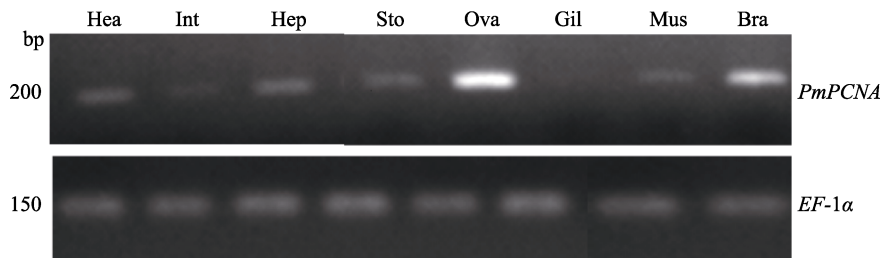


图 4 斑节对虾各组织半定量 PCR 电泳图

EF-1α 为内参基因; Marker, DNA 分子量; Hea: 心脏; Int: 肠; Hep: 肝胰腺; Sto: 胃; Ova: 卵巢; Gil: 鳃; Mus: 肌肉; Bra: 脑。

Fig. 4 Electrophoresis results of *PmPCNA* and *EF-1α* expression in different tissues of *Penaeus monodon*
Using *EF-1α* as the internal control gene. Marker, molecular weight. Hea: heart; Int: intestines; Hep: hepatopancreas; Sto: stomach; Ova: ovary; Gil: gill; Mus: muscle; Bra: brain.

2.4 注射 5-HT 后斑节对虾卵巢中 *PmPCNA* mRNA 的表达

利用实时荧光定量 PCR 技术进一步检测验证斑节对虾在注射 5-HT 后 *PmPCNA* 在卵巢中表达量的变化情况, 结果表明, 注射 5-HT 12 h 内注射组卵巢中 *PmPCNA* 表达量与对照组无显著差异 ($P>0.05$); 12 h 后, 卵巢中 *PmPCNA* 的表达水平均出现上调, 在 48 h 时表达差异显著 ($P<0.05$), 约是对照组表达量的 5 倍; 72 h 后表达水平开始下降, 较对照组表达量仍有上调趋势, 约为对照组表达量的 3 倍 ($P<0.05$, 图 7)。

2.5 斑节对虾 PCNA 蛋白体外重组表达结果

通过生物信息学预测, *PCNA*-pGEX-4T-1 重组蛋白大小为 55 kD, 用 IPTG 诱导重组表达菌株, 样品经处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶染色结果显示诱导 2 h 后已经出现表达的蛋白, 并且表

达量随着时间变化而提升(图 8A)。选取表达量较高的 6 h 和 8 h 的样品, 用带有 GST 标签的抗体进行 Western Blot 验证, 结果表明该蛋白与预测 *PCNA* 蛋白大小一致, 为目的蛋白(图 8B), 纯化得到的目的蛋白进行多克隆抗体制备, 为后续实验做准备材料。

3 讨论

PCNA 属于滑动夹子家族成员, 是 DNA 复制过程中的必需因子, 滑动夹子家族成员还有 T_4 噬菌体的 gene45 蛋白、DNA 聚合酶 III 的 β 亚基, 这些蛋白都能有效提高 DNA 聚合酶的工作效率, 加快 DNA 复制进程^[8, 25]。此外, *PCNA* 还能通过与其他蛋白间的相互作用参与到细胞活动中, *PCNA* 与核酸酶结合可以提高 DNA 损伤修复效率^[26], *PCNA* 还能促进周期蛋白依赖性蛋白激酶 2

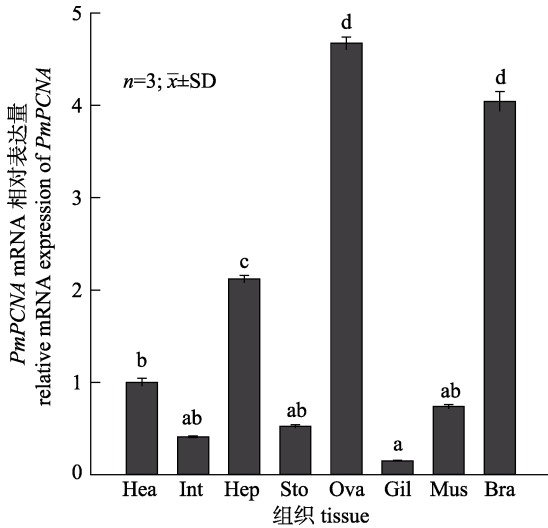


图 5 *PmPCNA* mRNA 在斑节对虾各个组织中的相对表达量柱形图上方不同字母表示各组织间存在显著性差异($P<0.05$). Hea: 心脏; Int: 肠; Hep: 肝胰腺; Sto: 胃; Ova: 卵巢; Gil: 鳃; Mus: 肌肉; Bra: 脑.

Fig. 5 Relative mRNA expression of *PmPCNA* in different tissues of *Penaeus monodon*. Significant differences between various tissues were indicated with different letters above vertical bars ($P<0.05$). Hea: heart; Ins: intestines; Hep: hepatopancreas; Sto: stomach; Ova: ovary; Gil: gill; Mus: muscle; Bra: brain.

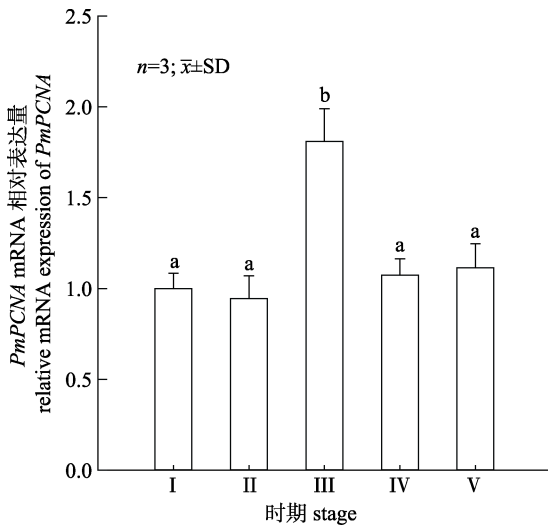


图 6 *PmPCNA* mRNA 在斑节对虾卵巢发育各时期的表达柱形图上方不同字母表示各时期差异显著($P<0.05$). I 期: 卵原细胞期; II 期: 核染色质期; III 期: 周边核仁期; IV 期: 卵黄囊期; V 期: 成熟期.

Fig. 6 Relative expression levels of *PmPCNA* mRNA in different development stages of ovary of *Penaeus monodon*. Different letters above vertical bars indicate significant difference between different stages ($P<0.05$). I: ovogonium stage; II: chromatin nucleolus stage; III: perinucleolus stage; IV: yolky stage; V: cortical rod stage.

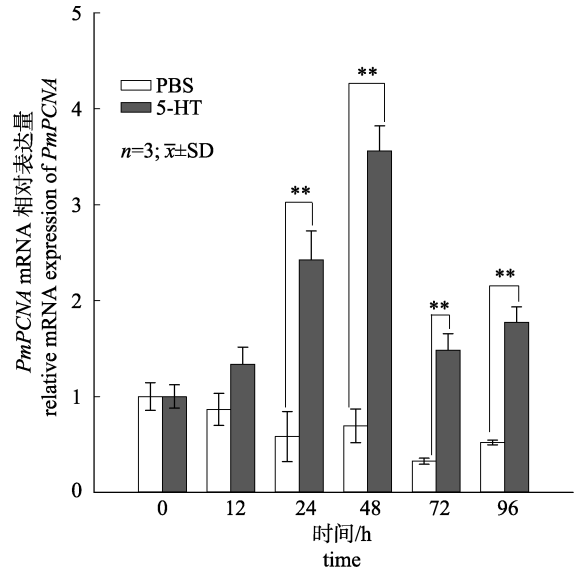


图 7 注射 5-HT 后不同时间 *PmPCNA* mRNA 在斑节对虾卵巢中的表达。PBS 为对照组, 时间为注射 5-HT 后的取样时间; **表示与对照组间存在极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 7 Mean relative expression levels of *PmPCNA* in ovaries of *Penaeus monodon* at different times after injection of 5-HT. PBS was used in the control group. Extremely significant differences between trial and control were indicated with ** ($P<0.01$).

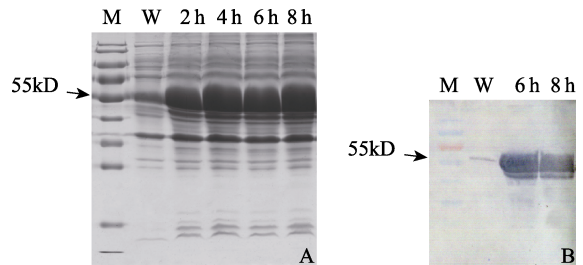


图 8 PCNA-pGEX-4T-1 体外重组表达

A. PCNA-pGEX-4T-1 诱导表达的 SDS-PAGE 凝胶图; B. PCNA-pGEX-4T-1 免疫印迹图. M: 标准蛋白分子量; W: 未诱导组; 2 h, 4 h, 6 h, 8 h 分别代表诱导时间.

Fig. 8 Recombinant expression of PCNA-pGEX-4T-1 *in vitro*. A. SDS-PAGE analysis of recombinant expression of PCNA-pGEX-4T-1; B. Western blot of PCNA-pGEX-4T-1. M: protein marker; W: non-induced; 2 h, 4 h, 6 h, 8 h represent the induced time.

(cyclin-dependent kinases 2, CDK2)与它的底物的磷酸化作用^[27-28]。PCNA 作为细胞增殖活动中的重要因子, 其在增殖组织中的表达量尤为显著, 而甲壳动物中的增殖组织主要是卵巢、肝胰腺等组织, 因此, 对斑节对虾 PCNA 进行研究分析将

有助于对斑节对虾卵巢发育、成长机制的深入研究。

本研究克隆得到了斑节对虾 *PmPCNA* 的 cDNA 全长序列(图 1), 包括 783 bp 的 ORF, 135 bp 的 5'UTR 和 60 bp 的 3'UTR, 共 978 bp。生物信息学分析结果显示, 斑节对虾 PCNA 蛋白共包括 260 个氨基酸, 蛋白的理论等电点和分子量大小分别是 4.59 kD 和 28.83 kD, 序列含有 1 个 N-糖基化位点和 12 个潜在的磷酸化位点。同时该氨基酸序列含有一个 PCNA/RFC (replication factor C) 结构域, 功能主要是协助 PCNA 与 DNA 链的结合, 从而提升 DNA 复制的效率^[29]。Thompson 等^[30]研究发现, 当 RFC 与 PCNA 结合时伴随着大量的滑动夹子复合物的形成, 同时 RFC 除了结合 PCNA 外还能打开 PCNA 结构, 以多种方式协助 PCNA 调控 DNA 复制进程。同源性比对和进化树分析结果显示斑节对虾与中国明对虾^[31]、日本囊对虾^[32]等序列具有高度同源性, 表明 *PmPCNA* 属于 PCNA 家族成员, 与节肢动物或其他高等物种的 PCNA 蛋白可能有着相似的功能。

PmPCNA 在斑节对虾不同组织中的 mRNA 相对表达结果显示(图 5), *PmPCNA* 在各组织中均有表达, 在卵巢、脑中表达量显著高于其他组织, 胰腺次之, 鳃中表达量最低。在同等物种的研究中, de-la-Re-Vega 等^[7]发现 *PCNA* 基因在凡纳滨对虾肌肉中表达量最高, 胰腺次之; Xie 等^[31]研究结果显示, *PCNA* 基因在中国明对虾卵巢和胰腺中的表达量要高于其他组织。类似的研究结果表明, *PCNA* 基因在卵巢、胰腺等增殖组织中的表达量要高于其他组织, 说明 *PCNA* 可能作为重要的调控因子参与细胞生长及相关基因的转录调控过程。*PmPCNA* 在脑中表达量显著高于其他组织, 这一现象可能是在生物体不同的发育阶段各组织的细胞活动行为不一致而导致的。在卵巢各期的表达量分析结果显示, *PmPCNA* 在发育的各个时期均有表达, 其中在发育 III 期的 *PmPCNA* 表达量要高于其他 4 期, 其他 4 期表达差异不显著, III 期表达量是其他各期表达量的 2 倍左右(图 5)。黄建华等^[21]的研究结果表明, 斑节对虾卵巢发育 I 期到 II 期是卵原细胞成长为卵黄发生前卵母细胞

的过程, 是卵巢开始发育的时期; III 期到 IV 期则是卵巢快速发育期, 细胞内卵黄颗粒增加, 细胞活动活跃; V 期是卵巢发育成熟期。斑节对虾卵巢发育 III 期的 *PmPCNA* 表达量要明显高于其他时期(图 5), 表明 *PmPCNA* 在卵巢快速发育过程中及卵黄颗粒的形成中可能发挥了重要的作用; 其他各期表达结果差异不显著, 说明 *PmPCNA* 在卵巢发育不同阶段可能行使了不同的功能。*PmPCNA* 在不同组织和卵巢各期的差异表达结果表明, *PCNA* 在卵巢发育中扮演着至关重要的角色, 与卵巢发育密切相关。

5-HT 是一种重要的生物活性物质, 可作为神经递质来促进生物生理过程, 可促进多种激素的释放, 如高血糖激素、性腺刺激激素等^[33]。在甲壳动物研究中对 5-HT 的研究主要集中在卵巢发育方面, 如 Tinikul 等^[34]研究发现, 5-HT 能够促进罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)卵巢卵黄生成素的合成; Wongprasert 等^[35]研究发现, 注射 5-HT 对斑节对虾卵巢发育起促进作用; 魏华等^[36]在克氏原螯虾(*Procambrus clarkii*)也发现 5-HT 对其卵巢发育起促进作用, 并研究了 5-HT 在卵巢各期的分布情况。为了进一步探究 *PmPCNA* 对斑节对虾卵巢发育的重要性, 本研究利用 5-HT 对斑节对虾进行注射。相对表达分析结果显示, 注射 5-HT 后 *PmPCNA* 的表达水平显著提升, 随着注射时间延长表达量逐渐提升, 在注射 5-HT 48 h 时表达量极显著高于对照组($P < 0.01$), 约是对照组表达量的 5 倍, 72 h 后表达水平开始下降但是表达量依然高于对照组, 是对照组表达量的 3 倍左右(图 7)。该结果表明 *PCNA* 在斑节对虾卵巢发育过程中可能起着至关重要的作用。

本研究还构建了 *PCNA*-pGEX-4T-1 重组表达质粒, 转化到大肠杆菌中后进行了诱导表达, 凝胶显色结果表明, *PCNA*-pGEX-4T-1 在 2 h 就开始表达, 试验范围内表达量随诱导时间延长而升高(图 7), 条带显示蛋白分子量在 55 kD 左右, 与重组蛋白大小相符。利用 Western Blot 技术对重组蛋白进行了初步验证, 印迹膜 GST 抗体孵育后避光显色结果与凝胶结果相符(图 8B), 表明重组蛋

白正确并大量被诱导, 未诱导组出现杂带的原因可能是封闭不彻底。该重组蛋白的表达为 PmPCNA 蛋白功能研究提供了理论基础和材料保障。

本研究克隆得到了斑节对虾 *PmPCNA* 基因全长, 探究了 *PmPCNA* 在各组织、卵巢各期的表达水平, 并探索了 5-HT 注射对 *PmPCNA* 在卵巢中表达的影响。结果表明 *PmPCNA* 在卵巢中表达量要显著高于其他组织, 并且 5-HT 在促进卵巢发育的同时伴随着 *PmPCNA* 的大量表达, 预示 PCNA 可能对斑节对虾卵巢发育起着至关重要的作用。但是 *PmPCNA* 参与卵巢发育的机制尚不明确, 还需要进一步的研究探索。

参考文献:

- [1] Carrasco-Miranda J S, Lopez-Zavala A A, Arvizu-Flores A A, et al. Crystal structure of the shrimp proliferating cell nuclear antigen: structural complementarity with WSSV DNA polymerase PIP-box[J]. PLoS ONE, 2014, 9(4): e94369.
- [2] Miyachi K, Fritzler M J, Tan E M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells[J]. Immunology, 1978, 121(6): 2228–2234.
- [3] Tománek M, Chronowska E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44(4): 269–274.
- [4] Motiwale L, Ingle A D, Rao K V K. Mouse skin tumor promotion by sodium arsenate is associated with enhanced PCNA expression[J]. Cancer Lett, 2005, 223(1): 27–35.
- [5] Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, et al. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival[J]. J Exp Med, 2010, 207(12): 2631–2645.
- [6] Bravo R, Frank R, Blundell P, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ [J]. Nature, 1987, 326(6112): 515–517.
- [7] de-la-Re-Vega E, Muhlia-Almazan A, Arvizu-Flores A A, et al. Molecular modeling and expression of the *Litopenaeus vannamei* proliferating cell nuclear antigen (PCNA) after white spot syndrome virus shrimp infection[J]. Results Immunol, 2011, 1(1): 24–30.
- [8] Wang K, Li R G, Cheng D L. Development of function and the crystal structure of proliferating cell nucleus antigen (PCNA)[J]. Journal of Shandong Polytechnic University, 2013, 25(3): 25–31. [王珂, 李荣贵, 程殿林. 增殖细胞核抗原(PCNA)功能及晶体结构研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报: 自然科学版, 2013, 25(3): 25–31.]
- [9] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation[J]. Ann Bot, 2011, 107(7): 1127–1140.
- [10] Moldovan G L, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork[J]. Cell, 2007, 129(4): 665–679.
- [11] Zhao H, Ho P C, Lo Y H, et al. Interaction of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) with c-Abl in cell proliferation and response to DNA damages in breast cancer[J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e2941.
- [12] Atilgan R, Kuloğlu T, Boztosun A, et al. Investigation of the effects of unilateral total salpingectomy on ovarian proliferating cell nuclear antigen and follicular reserve: experimental study[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015, 188: 56–60.
- [13] Langerak P, Nygren A O, Krijger P H, et al. A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification[J]. J Exp Med, 2007, 204(8): 1989–1998.
- [14] Oktay K, Schenken R S, Nelson J F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat[J]. Biol Reprod, 1995, 53(2): 295–301.
- [15] Wandji S, Srsen V, Voss A, et al. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles[J]. Biol Reprod, 1996, 55(5): 942–948.
- [16] Wandji S, Srsen V, Nathanielsz P, et al. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*[J]. Hum Reprod, 1997, 12(9): 1993–2001.
- [17] Yang Q B, Jiang S, Huang J H, et al. The compensatory growth of *Penaeus monodon* after starvation[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(5): 25–31. [杨其彬, 姜松, 黄建华, 等. 斑节对虾的饥饿试验和补偿生长[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 25–31.]
- [18] Zhou J. Reseach of some hormones and genes being correlation with ovary development from *Penaeus monodon*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [周俊. 斑节对虾几种激素和基因与卵巢发育相关性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [19] Okumura T, Sakiyama K. Hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones in female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) during natural reproductive cycle and induced ovarian development by eyestalk ablation[J]. Fish Sci, 2004, 70(3): 372–380.
- [20] Chen Y N, Fan H F, Hsieh S L, et al. Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2003, 228(1–4): 383–395.
- [21] Huang J H, Zhou F L, Ma Z M, et al. Morphological and histological observation on ovary development of *Penaeus monodon* from northern South China Sea[J]. Journal of

- Tropical Oceanography, 2006, 25(3): 47–52. [黄建华, 周发林, 马之明, 等. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(3): 47–52.]
- [22] Dai W T, Fu M J, Zhao C, et al. Molecular cloning and expression analysis of *CDK2* gene from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*)[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 1–11. [戴文婷, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 CDK2 基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 1–11.]
- [23] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [24] Mukhopadhyay N, Almasly L, M, Mulvihill W, et al. Mega 2: data-handling for facilitating genetic linkage and association analyses[J]. Bioinformatics, 2005, 21(10): 2556–2557.
- [25] Giovanni M, Ulrich H. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. J Cell Sci, 2003, 116(15): 3051–3060.
- [26] Song N M, Sang J L, Xu H. Development of molecular structure and the biological function of proliferating cell nucleus antigen (PCNA)[J]. Progress in Natural Science, 2006, 16(10): 1201–1209. [宋楠楠, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2006, 16(10): 1201–1209.]
- [27] Koundrioukoff S, Jónsson Z O, Hasan S, et al. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(30): 22882–22887.
- [28] Zhu X N, Kim D H, Lin H R, et al. Proteolysis of *Xenopus* Cip-type CDK inhibitor, p16^{Xic2}, is regulated by PCNA binding and CDK2 phosphorylation[J]. Cell Div, 2013(8): 5.
- [29] Matsumiya S, Ishino S, Ishino Y, et al. Physical interaction between proliferating cell nuclear antigen and replication factor C from *Pyrococcus furiosus*[J]. Genes Cells, 2002, 7(9): 911–922.
- [30] Thompson J A, Marzahn M R, O'donnell M, et al. Replication factor C is a more effective proliferating cell nuclear antigen (PCNA) opener than the checkpoint clamp loader, Rad24-RFC[J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 2203–2209.
- [31] Xie Y S, Wang B, Li F H, et al. Molecular cloning and characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2008, 151(2): 225–229.
- [32] Zhang Z P, Shen B L, Wang Y L, et al. Molecular cloning of proliferating cell nuclear antigen and its differential expression analysis in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. DNA Cell Biol, 2010, 29(4): 163–170.
- [33] Dong Y N. Study on collaborative maturation-promoting effect of 5-hydroxytryptamine and eyestalk ablation on the ovary of female *Marsupenaeus japonicus*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2014. [董燕妮. 5-羟色胺和切眼柄对日本囊对虾卵巢协同促熟效应的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.]
- [34] Tinikul Y, Mercier A J, Sobhon P. Distribution of dopamine and octopamine in the central nervous system and ovary during the ovarian maturation cycle of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Tissue Cell, 2009, 41(6): 430–442.
- [35] Wongprasert K, Asuvapongpatana S, Poltana P, et al. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1447–1454.
- [36] Wei H, Sha X J, Chen A Q, et al. Distribution of 5-HT and DA in the ovary and hepatopancreas during the ovarian development in *Procambrus clarkii*[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 42(6): 21–26. [魏华, 沙晓姣, 陈阿琴, 等. 克氏原螯虾不同发育时期 5-HT 与 DA 在卵巢和肝胰腺中的分布[J]. 淡水渔业, 2013, 42(6): 21–26.]

Molecular cloning and expression analysis of *PCNA* from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

WANG Chengyang^{1,2}, ZHAO Chao^{1,3}, FU Mingjun^{1,3}, QIU Lihua^{1,3,4}

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China;
4. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Sanya 572018, China

Abstract: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a member of the sliding clamp protein family that plays important roles in DNA replication, and is strongly expressed in proliferating tissues. Several studies have discovered other biological roles of PCNA, for example, in DNA repair, cell cycle regulation, and chromosome recombination. When culturing shrimp, the first problem is how to induce maturation of the ovary; therefore, it is important to understand ovarian development. We focused on PCNA because it plays an important role in cell proliferation. The *PCNA* gene (*PmPCNA*) was cloned from *Penaeus monodon* using the rapid amplification of cDNA ends technique. The sequence encoded a protein of 260 amino acids that showed high homology to PCNA proteins from other species. The full-length *PmPCNA* cDNA was 978 bp long and contained a 5'-untranslated region (UTR) of 135 bp, a 3'-UTR of 60 bp, and an open reading frame of 783 bp. The protein was predicted to have a molecular weight of 28.83 kDa and an isoelectric point of 4.59. Analyses of *PmPCNA* transcript levels by quantitative real-time PCR indicated that it was transcribed in all tissues, with high transcript levels in the ovary and brain. During ovarian maturation, there were higher transcript levels of *PmPCNA* in the stage III ovary than in ovaries at other stages ($P < 0.05$). Previous research has shown that 5-hydroxytryptamine (5-HT) can stimulate ovary growth and development. Injection of 5-HT resulted in increased transcript levels of *PmPCNA* in the ovaries, with the peak transcript levels at 48 h post-injection. The *PmPCNA* protein was successfully expressed in a prokaryote, providing a platform for further research. These results provide important information on the role of *PmPCNA* in the development of the shrimp ovary.

Key words: *Penaeus monodon*; ovarian development; *PmPCNA*; 5-HT; qRT-PCR; prokaryotic expression

Corresponding author: QIU Lihua. E-mail: qiu902@126.com