

斑节对虾亲环素 A (cyclophilinA) 基因的克隆及启动子序列分析

王卫芳^{1,2}, 邱丽华¹, 黄建华¹, 张殿昌¹, 苏天凤¹, 杨其彬¹, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2. 华南农业大学动物科学院, 广东广州 510642)

摘要: 通过同源克隆和RACE技术获得斑节对虾(*Penaeus monodon*)亲环素 A (cyclophilin A, CYPA) 的 cDNA 序列。根据已克隆的 cDNA 序列设计引物, 利用染色体步移技术 (Genomic DNA walking) 从斑节对虾卵巢组织中克隆了 CYPA 基因的启动子和基因组 DNA 序列。测序结果表明, 斑节对虾亲环素 A (PmCYPA) cDNA 全长 834 bp, 其中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 495 bp, 可编码 164 个氨基酸; 5' 非编码区为 31 bp, 3' 非编码区为 308 bp。从斑节对虾基因组文库中扩增的 CYPA 基因组 DNA 全长 3 181 bp, 其中包括启动子区域 1 173 bp, 1 个内含子 426 bp, 2 个外显子序列: 分别为 101 bp 和 399 bp。在 5' UTR 上游区域有明显的启动子序列, 包含一个 GC 盒和 2 个 CAAT 盒, 同时还包含 AP1、CRE 等调控元件, 符合真核生物典型的启动子特征。分析基因的结构表明所克隆的 PmCYPA 符合 PPlase 家族成员特征, 属于此基因家族成员。[中国水产科学, 2009, 16 (3): 324–331]

关键词: 斑节对虾; cyclophilinA 基因; 克隆; 启动子; 序列分析

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)03-0324-08

CYPA 是一类具有肽基脯氨酰顺反异构酶 (peptidyl-prolylcis-trans isomerase, PPlase) 活性的高度保守蛋白质^[1-2], 可结合细胞内蛋白质并加速它们的折叠、装配与转运, 起分子伴侣作用^[3]。它在细胞内不仅能与环孢霉素 A (cyclosporine A, CsA) 结合, 参与免疫抑制; 还可介导细胞内小凹蛋白 (Caveolin-1) /CYPA/ Cyclophilin 40/ 热休克蛋白 56 (heat-shock protein 56, HSP56) 复合物 (胆固醇转运复合物) 的形成^[4], 发挥前炎性因子功能。有研究表明, CYPA 是一种调控免疫相关的心血管疾病中内皮细胞功能的旁分泌和自分泌因子^[5], 如人类重组 CYPA 能激活包括细胞外信号调节激酶和 p38 MAPK 在内的丝裂素活化蛋白激酶, 并促进 E 选择素和血管细胞黏附分子 I 等的表达。此外, CYPA 还具有参与各种肿瘤及病毒感染病的发生发展、参与巨噬细胞和 T 淋巴细胞摄取 HIV、抵抗器官移植后的免疫排斥、缓解氧应激压力^[6] 和调

节细胞内信号转导等作用。

CYP 基因最早是在人类中发现并认证的, 目前对人亲环素 (hCYP) 的研究也最为广泛^[7], 其功能大都集中在作为环孢霉素 A 受体作用于 T 细胞所发挥的免疫抑制作用方面。近年来随着研究的不断深入, 发现 CYP 家族在免疫过程中不容忽视的作用。20 世纪 90 年代初 Harigai 等^[8] 和 Kratz 等^[9] 在人体红斑狼疮患者血清中发现了 CYP 抗体, 之后其他国外学者也相继在类风湿性关节炎、银屑病等自身免疫性疾病患者的血清中发现了抗 CYP 自身抗体。朱锡华^[10] 则发现 HIV-1 相关的 CYPA 通过与细胞受体的相互作用介导病毒的早期感染活动, 另外 Guo 等^[11] 利用基因芯片比较稳定传染 CYPA 或 pcDNA3.1 空载体的 SK-Hep I 一细胞之间的基因表达差别结果显示, CYPA 能够促进若干编码细胞因子及多药耐药蛋白基因的表达, 并可能与肿瘤的药物耐受有关。

收稿日期: 2008-11-12; 修订日期: 2009-01-19.

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目 (2006AA603120); 广东省自然科学基金资助项目 (7003894).

作者简介: 王卫芳 (1983-), 女, 硕士研究生, 从事海洋生物分子生物学研究. E-mail: wwf830610@163.com

通讯作者: 江世贵. E-mail: jiangsg@21cn.com

而CYPA作为CYP家族最主要的成员更值得关注。随着基因克隆技术的发展,目前CYPA基因在很多物种中相继被克隆出来。如人(GenBank No: DQ480736),河内鲶(*Ictalurus punctatus*) (GenBank No: EF424274.1),栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (GenBank No: AY362759.1)等,但在对虾中研究较少。全球性虾类病害频发,导致斑节对虾大量死亡,这引起了人们对斑节对虾免疫机制及相关基因的关注。本实验室近年来逐步开展了斑节对虾相关基因的研究^[12],本研究以斑节对虾为对象,研究对虾亲环素基因及其启动子的结构,并对其基因功能进行预测,旨在为进一步研究该基因在斑节对虾免疫调控过程中的作用奠定前期理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从海南省三亚购置健康鲜活斑节对虾6尾,体质量约200 g,在室内水族箱内暂养3 d,水温控制在24~25℃之间。

1.2 RNA的提取及cDNA的合成

取上述暂养的健康斑节对虾3尾,解剖并取出性腺混合,将大约50 mg性腺混合液于1 mL Trizol (Invitrogen, Japan)中匀浆,按Trizol试剂盒使用手册提取斑节对虾总RNA并用DEPC水悬浮,电泳观察所提取RNA的完整性,并置于-80℃保存。

取上述斑节对虾性腺总RNA 2 μL与反转录引物(5'-GGCCACGCGACTAGTAC(T)₁₆<3') 1 μL(10 pmol/L)混合在反转录酶(M-MLV, Promega, USA)的作用下合成cDNA—链,反应条件: 42℃ 60 min, 70℃ 15 min。

1.3 DNA的提取

取3尾上述健康斑节对虾肌肉组织约20 mg,按照TOYOBO公司的Genomic DNA Extraction Kit步骤进行DNA提取。

1.4 cDNA的克隆及测序

以近源物种人(GenBank No: BC007104.1),鲐(GenBank No: AY391451.1),栉孔扇贝(GenBank No: AY362759.1)和肩板硬蜱(GenBank No: DQ066345)

CYPA 基因序列的保守区设计兼并引物 DXCF(5'-GT(A/C/T)GT(T/C/G)CC(A/C/T)AA(G/A)AC(A/T/G)GC(G/A/T/C)GA(A/G)AA<3')和 DXCR(5'-GTG TT(T/G)G(C/G)(C/G/T)CC(G/A/T)GC(A/G)TT(G/A)GCC AT<3'),以上述反转录cDNA为模板进行PCR扩增。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳,回收纯化后与pMD18-T(Takara, Japan)载体相连接,转化大肠杆菌Top10感受态细胞,涂布含氨苄青霉素(100 μg/mL)的平板培养过夜,挑取白色菌斑,接种含氨苄青霉素的LB培养基,37℃ 220 r/min 振荡过夜,提取质粒,以M13 正反向引物进行PCR鉴定后,进行测序。测序结果用BLAST软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行同源性比对。

根据得到的cDNA片段序列设计特异性引物(F1, F2, R1, R2),利用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)对目的基因的3'和5'末端进行PCR扩增。

在3'RACE中,利用正向引物 F1(5'-GCTTCGGC TACAAGGGTTCC<3')和接头引物 AP(5'-GGCCACG CGACTAGTAC<3')进行PCR扩增,所得PCR产物稀释100倍后取1 μL用 F2(5'-CAAGTCCATCTACGGC AACA<3')和 AP(5'-GGCCACGCGACTAGTAC<3')进行巢式PCR,反应条件: 94℃, 5 min; 94℃, 45 s; 60℃, 30 s; 72℃, 45 s; 35 cycles; 72℃, 10 min。

在5'RACE中,首先利用末端转移酶(TdT, Takara, Japan)在cDNA末端加上poly(C)尾巴后,以加尾的cDNA为模板,以 R1(5'-CAGTGCGAAGTTCT CGTCCT<3')和 oligo-dG(5'-GGGGGGGGGGGGGGG<3')为引物进行一次PCR,所得PCR产物取1 μL用 R2(5'-GGAAGCAGGAACCCTTGTAG<3')和 oligo-dG进行二次PCR,反应程序如下: 94℃, 5 min; 94℃, 45 s; 61℃, 30 s; 72℃, 45 s; 35 cycles; 72℃, 10 min。电泳、DNA片段回收、连接、转化、测序同前述。

利用Clustal W(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)软件将3'RACE和5'RACE结果与兼并引物扩增所得的序列进行拼接。

1.5 序列分析

扩增序列同源性比对和相似性搜索用BLAST

软件进行;多序列联配采用CLUSTAL W 程序;模体用InterPro软件查找;信号肽查找用SignalP程序分析;跨膜区用TMPred程序搜寻。

1.6 斑节对虾cyclophilinA基因组DNA文库构建

根据Clontech公司的DNA 文库构建试剂盒(Clontech Universal Genome Walker Kit) Universal GenomeWalkerTM Kit (TAKARA)的设计,分别用产生平末端的限制酶DraI、EcoRV、PvuII、StuI在100 L体系中完全酶切大约2.5 μ g基因组DNA,之后对酶切产物进行纯化,纯化后基因组DNA与GenomeWalker Adaptors连接,由此建立4个连接特异接头的相应限制性内切酶的DNA“库”。

1.7 染色体步移

根据已克隆cyclophilinA基因cDNA序列在3'UTR区设计特异性引物CYPR(5'-AGGGGTGGGCGGCTAAGGGGAATG-3'),接头引物为AP1(5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCA-3')。分别以1.6中所构建的4个库基因组DNA为模板,用CYPR和AP1为引物进行PCR扩增。PCR反应总体积为50 μ L,包括5.0 μ L的10 $\times$ buffer;4.0 μ L 25 mmol/L MgCl₂;1.6 μ L 10 mmol/L dNTPs;2 μ L 10 nmol/L的引物;2U的Ex-Taq酶。PCR反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 25 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,9个循环;94 $^{\circ}$ C 25 s,67 $^{\circ}$ C 3 min,40个循环;67 $^{\circ}$ C 7 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,切取1~2 kb区域最长片段的凝胶回收纯化后与pMD-18T载体相连接,转化大肠杆菌Top10感受态细胞,涂布含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的平板培养过夜,挑取白色菌斑,接种含氨苄青霉素的LB培养基,37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振荡过夜,提取质粒,以M13和M-47为引物进行PCR鉴定后,送至上海生工生物工程公司测序。

1.8 cyclophilinA基因启动子区的结构与分析

利用Clustal W软件(www.ebi.ac.uk/clustalw)将测序结果进行拼接与比对;利用DNASTAR预测氨基酸的物理性质;利用程序(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)分析DNA可能的启动子;利用数据库TransFac(<http://www.gene-regulation.com>)对启动子区顺势作用原件进行分析;利用程序([http://](http://www.itba.mi.cnr.it/wedgene/)

www.itba.mi.cnr.it/wedgene/)进行TATA盒的查找。

2 结果与分析

2.1 cDNA序列同源性分析

PmCYPA基因全长经BLAST蛋白比对发现与水生生物CYPA基因具有较高同源性,如河内鲶(相似性85%, $E=7e-66$),栉孔扇贝(相似性88%, $E=2e-66$),斑马鱼(*Danio rerio*) (相似性84%, $E=1e-64$)。另外发现与其他生物同源性也较高,如肩板硬蜱(*Ixodes scapularis*) (相似性85%, $E=3e-64$),木槿曼粉蚱(*Maconellicoccus hirsutus*) (相似性90%, $E=1e-66$),人(*Homo sapiens*) (相似性82%, $E=e-62$)。

通过同源克隆获得PmCYPA cDNA全长834 bp,其中ORF为495 bp,编码164个氨基酸,5'非编码区为31 bp,3'非编码区为308 bp;在3'末端有明显的加尾信号AATAAA和12 bp的polyA尾巴结构。用DNASTar预测蛋白质的物理性质得到ORF区编码蛋白的分子量为17.068 kD,理论等电点PI=8.55。分析PmCYPA与其他物种CYPA氨基酸序列(图1)可以看出:PmCYPA和其他物种一样具有肽基脯氨酰胺反异构酶家族标签序列(YKGSCFHRVIPNFMCGG)和相同残基数目的CaS结合位点,4个 β 折叠(Lys⁴⁹-Val⁵⁶, Phe⁶⁰-Gly⁶⁴, Gly⁹⁶-Ala¹⁰³, Gln¹¹¹-Thr¹¹⁶)及1个loop(Lys¹¹⁸-His¹²⁶)结构^[13]。同时还包含13个保守CSA结合残基(图1阴影)和PPIase酶活性必需氨基酸(His⁵⁴, Arg⁵⁵, Phe⁶⁰, Phe¹¹³, His¹²⁶)序列^[14],且位置完全一致。

2.2 PCR结果

由图2可以看出,第1次PCR扩增之后在PVU II库和STUI库中均有明显条带, PVU II库扩增条带接近2 kb, STUI库中有3条带,长度都在1 kb以上,特异性很强,亮度也与Marker相当,与试剂盒预期试验结果一致,说明实验条件完全合适。因为STUI库中扩增条带最长切亮度较高,故用STUI库DNA作为模板重新做50 μ L体系全部电泳,选取STUI库中最长片段切胶回收纯化,TA克隆后测序。根据(图2)测序结果可以看出,第1轮PCR扩增后的序列已经跨越cDNA序列ORF和5' UTR,分析结果显示PmCYPA启动子序列扩增完全,故无须进行第2轮PCR。

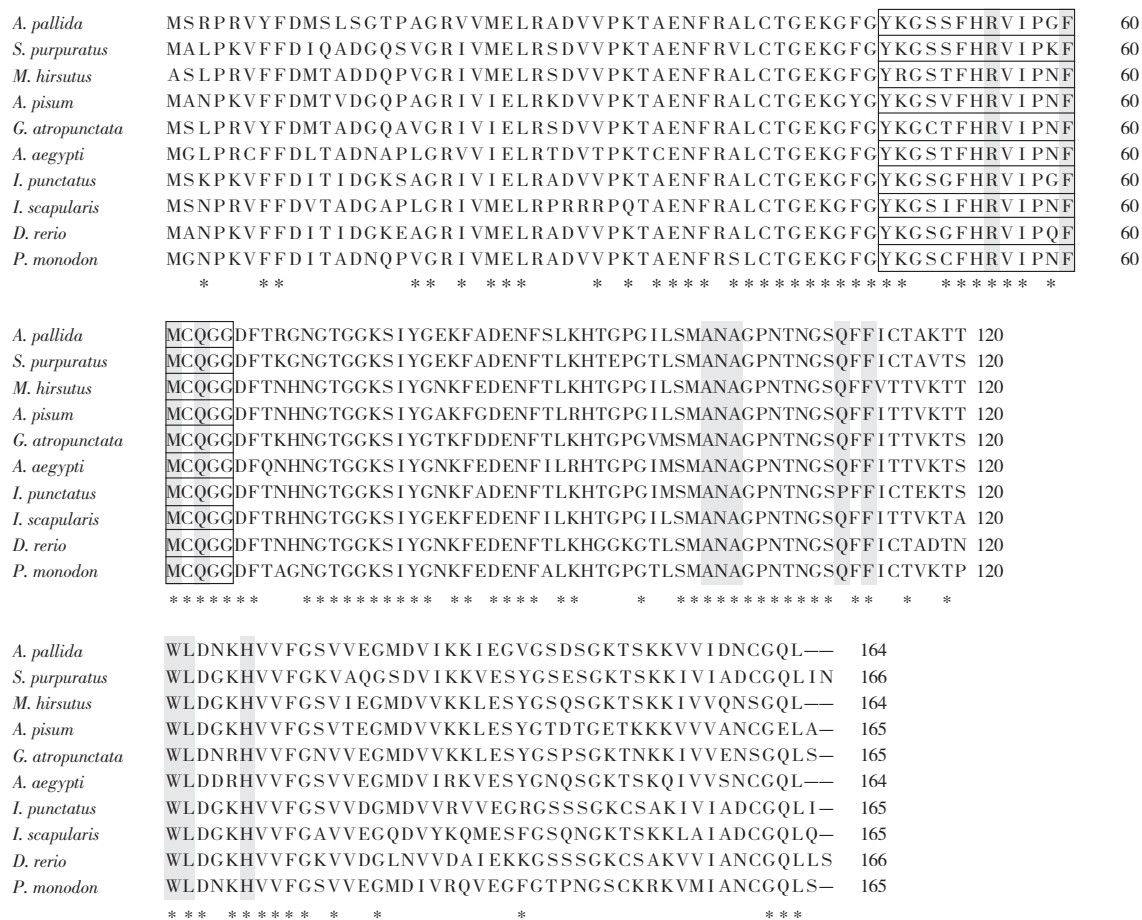


图1 斑节对虾PmCYPA与其他物种CYPA氨基酸多序列联配
*代表同源性; 阴影代表CSA结合位点; 方框代表CYP家族序列标签.

Fig.1 Multiple alignment of *Penaeus monodon* CYPA with other CYPA amino acid sequences
Homologous sites are shown as *; well-conserved CSA-binding site are shown in shadow; CYPA family signature are indicated with boxes.

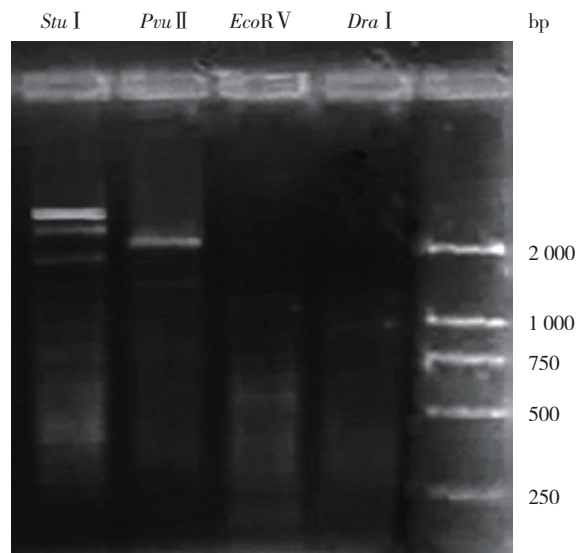


图2 斑节对虾PmCYPA 基因启动子区染色体步移第1轮PCR 扩增图
Fig.2 Primary PCR result of PmCYPA gene promoter region chromosomal walking

2.3 PCR产物克隆测序结果及启动子序列分析

将克隆测序得到PmCYPA基因启动子序列2 908 bp与之前本实验室所扩增的cDNA(EU164775)序列834 bp拼接后获得基因组DNA全长如图3,该基因DNA序列全长3 181 bp,其中启动子长1 173 bp,包含一个GC盒位于转录起始位点上游-152~-147 bp处,2个CAAT盒分别位于-402~-398 bp和-191~-187 bp处。通过与之前所得CYPA基因cDNA序列比对发现该基因包含一个长为399 bp的内含子和2个外显子,长度分别为101 bp和426 bp。

斑节对虾启动子区还包含组成型表达转录因子Sp1、基因上游激活因子USF、增强子AP1、转录激活因子ATF、聚合酶相关蛋白RAP1等,及一个CRE-BP1转录因子调控元件,而在人的启动子区也含有该因子。

3 讨论

通过同源克隆获得PmCYPA cDNA全长834 bp,其中ORF为495 bp,编码164个氨基酸,5'非编码区为31 bp,3'非编码区为308 bp;在3'末端有明显的加尾信号AATAAA和12 bp的polyA尾巴结构,PmCYPA与物种*D. akajei*^[15]、*Griffithsia japonica*^[16]和*C. farreri*(GenBank No: AY362759.1)的CYPA结构一样都有该加尾信号,但在*Blatella*^[17]和*Xenopus laevis*^[18]中CYPA则没有发现该加尾信号。经BLAST同源比对分析发现,PmCYPA与其他已知物种CYP家族基因具有较高同源性,且他们所含有的半胱氨酸都非常保守,PmCYPA氨基酸序列中存在的CYP家族的保守序列YKGSCFHRVIPNFMQCQG完全符合PPIASE家族的标签序列,[FY]-x(2)-[STCNLVA]-x-[FV]-H-[RH]-[LIVMNS]-[LIVM]-x(2)-F-[LIVM]-x-Q-[AGFT]-G,在PmCYPA氨基酸序列中还发现有3处N型糖基化修饰位点(Asn-Xaa-Ser/Thr),分别为NGT(aa⁷¹⁻⁷³)、NGS(aa¹⁰⁸⁻¹¹⁰)、NGS(aa¹⁴⁹⁻¹⁵¹)。而与免疫抑制剂CsA具有较高的亲和力的13个保守CsA结合残基则可能影响PmCYPA氨基酸的结构和功能,同时在PmCYPA中还存在PPIase酶活性必需氨基酸序

列,这些都充分表明本实验所得斑节对虾cDNA属于CYP家族。利用染色体步移技术从构建的Genome Walking文库获得了PmCYPA基因的全长序列,其中包括1个内含子和2个外显子,内含子的两侧都具有RNA正确剪接所必需的识别位点(GT/AG),这与其他基因内含子识别序列完全一致^[19]。

PmCYPA的启动子包含1个GC盒和2个CAAT盒,没有TATA盒;而hCYPA基因启动子包含1个TATA盒及4个GC盒。表明同一基因在不同物种间的表达调控原件存在差异。由图3可以看出,PmCYPA启动子富含A/T碱基,有的区域A/T的重复序列高达9个,有学者认为A/T碱基相对于C/T碱基更易于解链,有利于转录的起始^[20]。同时在启动子序列上游区还存在一系列重复出现的微卫星“CA”片段,推测这可能与该基因的表达调控有关,但在目前已知hCYPA基因启动子中并未发现该现象。

根据YOKO等^[21]的研究推测,受到病毒感染时,CYPA启动子区的CRE顺式作用元件可以与靶DNA蛋白结合调节CYPA表达,以激活IRF-3因子进而诱导IFN- β 转录与激活;而启动子区所包含的另一个转录活性位点HSP-bind,可能在CYPA抑制依赖于HSP因子调控的热休克蛋白表达方面发挥作用^[22];同时启动子区还存在NF-1和CTF因子。赵丽辉博士发现激活小鼠脾脏T淋巴细胞后随着时间增加转录因子NF-1/CTF表达上调,由此证明NF-1和CTF都是转录活动的重要调控因子(未发表)。Kyu等^[23]用PCR定点诱变人类CYPA基因启动子不同区域的CRE作用原件发现,CYPA基因的表达量会随之表现出不同程度的变化,表明该元件在CYPA基因中所表现出的不同转录起始功能;同时发现在低氧环境下CYPA基因的表达可受到HIF-1 α 因子的影响,这是因为该因子可与CRE结合而参与调控。而在PmCYPA基因启动子序列中并未发现该作用原件,但根据PmCYPA基因启动子序列所含有的CRE-BP1原件推测PmCYPA可能通过结合PPIase家族其他基因的CRE以调节细胞内某些转录因子,从而共同作用于动物机体。

[illegible]

图3 斑节对虾PmCYPA基因及启动子区序列结构

划线部分代表转录因子; 阴影代表内含子/外显子拼接位点; 粗体代表 GC 盒; 斜体代表 CAAT 盒; 框代表转录起始位点和保守序列; 黑体代表引物位点; * 代表终止密码子; 阴影下划线代表 N 型糖基化位点。

Fig.3 Sequence and structure of *Penaeus monodon*' s CYPA gene and promoter region

The transcription factors are underlined; the intron/exon splicing sites are shaded; the GC box are bolded; the GAAT box are shown as italic; the transcription start site and conserved sequence are boxed; the primer site are indicated with black body; the stop codon are represented by *. the potential glycosylation sites are underlined and shaded.

参考文献:

- [1] Jing Z G, Melaragno M G, Liao D F, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress [J]. *Circ Res*, 2000, 87 (9): 789–796.
- [2] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin [J]. *Nature*, 1989, 337 (6 206): 473–475.
- [3] Freskgard P O, Irving B A, Crabtree G R, et al. Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase [J]. *Science*, 1992, 258 (5 081): 466–468.
- [4] Smart E J, Ying Y S, Donzdl WC. A role for caveolin in transport of cholesterol From endoplasmic reticulum to plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271; 29 427–435.
- [5] Kim S H, Lessner S M, Sakurai Y, et al. Cyclophilin A as a novel biphasic Mediator of endothelial activation and dysfunction [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164 (5): 1 567–1 574.
- [6] Seko Y, Fujimura T, Taka H, et al. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317: 162–168.
- [7] Braaren D, Luban J. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (6): 1 300–1 309.
- [8] Harigai M, Hara M, Takahashi N, et al. Presence of autoantibodies to peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclosporin A-binding protein) in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1992, 63 (1): 58–65.
- [9] Kratz M, Harding M W, Craft J, et al. Autoantibodies against cyclophilin in systemic lupus erythematosus and Lyme disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 1992: 90–422.
- [10] 朱锡华. Fas 系统研究进展 [J]. *中华微生物和免疫杂志*, 1996, 16 (2): 77–82.
- [11] Guo J H, Saiyin H, Wei Y H, et al. Expression of testis specific ankyrin repeat and SOCS box-containing 17 gene [J]. *Arch Androl*, 2004, 50 (3): 155–161.
- [12] Qiu Lihua, Jiang Shigui, Huang Jianhua, et al. Molecular cloning and mRNA expression of cathepsin C gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 2008, 150: 320–325.
- [13] Hung-Yueh Y, Klesius PH. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. cyclophilin A and B cDNA characterization and expression analysis [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008, 15: 121(3–4): 370–377.
- [14] Liu J, Farmer J J D, Lane W S, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes [J]. *Cell*, 1991, 66 (4): 807–815.
- [15] Tu H B, Yang W L, Jiang X Y, et al. Cloning, sequence analysis and evolutionary conservation of a full-length cDNA encoding cyclophilin A from red stingray *Dasyatis akajei* [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2003, 15: 359–366.
- [16] Lee Y K, Hong C B, Suh Y, et al. A cDNA clone for cyclophilin from *Griffithsia japonica* and phylogenetic analysis of cyclophilins [J]. *Mol Cells*, 2002, 13 (1): 12–20.
- [17] Martinez-Gonzalez J, Hegardt FG. Characterization of a cDNA encoding a cytosolic peptidylprolyl cis-trans-isomerase from *Blattella germanica* [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 234: 284–292.
- [18] Masse' K, Bhamra S, Haldin CE, et al. Cloning and characterisation of the immunophilin X-CypA in *Xenopus laevis* [J]. *Gene Expression Patterns*, 2004, 5: 51–60.
- [19] 张殿昌, 邵艳卿, 苏天凤, 等. 鲮 β -肌动蛋白基因和启动子的克隆及序列特征分析 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14 (3): 345–351.
- [20] Keller B, Heierli D. Vascular expression of the GRP 1.8 promoter is controlled by three specific regulatory elements and one unspecific activation sequence [J]. *Plant Mol Biol Oct*, 1994, 26 (2): 747–756.
- [21] Yoko Obata, Kazuo Yamamoto, Miyazaki M, et al. Role of Cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3 [J]. *Biolog Chem*, 2005, 280 (18): 18 355–18 360.
- [22] Duina A A, Kalton H M, Gaber R F. Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type Cyclophilin in Negative Regulation of the Heat Shock Response [J]. *Biolog Chem*. 1998, 273 (30): 18 974–18 978.
- [23] Kyu Jin Choi, Yu Ji Piao, Min Jin Lim, et al. Overexpressed Cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: (8): 3 654–3 661.

Cloning and analysis of cyclophilin A gene and its promoter sequence in black tiger shrimp *Penaeus monodon*

WANG Wei-fang^{1,2}, QIU Li-hua¹, HUANG Jian-hua¹, ZHANG Dian-chang¹, SU Tian-feng¹, YANG Qi-bin¹, JIANG Shi-gui¹

(1. South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Animal Sciences Institute, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: CyclophilinsA is a family of proteins that bind the immunosuppressive agent cyclosporin A (CsA) with high affinity and belong to the superfamilies of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPIase). CypA has highly conserved structures and exhibits various biological activities which have an important role in cell cycle events. The PPIase activity of CypA can bind to intra-cellular proteins and accelerate folding, assembly and transport of these proteins. It also has molecular chaperones action. The techniques of homology cloning and anchored PCR were used to clone the cyclophilin A (CYPA) gene from *Penaeus monodon*. We obtained the CYPA' S promoter and genomic DNA sequence from the muscular tissue of *Penaeus monodon* on basis of designed primers according to the cloned full-length cDNA using genomic walking technology. The results showed after the sequence was analysed, the cDNA sequence contained 495 bp ORF which could translate a putative peptide of 164 amino acids, 31 bp 5'UTR and 308 bp 3'UTR. The CYPA genomic DNA amplified from *Penaeus monodon* genomic library was 3 181bp which consists of 1 173 bp promoter region, one 426 bp intron and two exons sequences (101 bp, 399 bp). The CYPA genomic DNA has apparent promoter region in the 5'UTR upstream including a GC box and two CAAT box, it also contains AP1 and CRE regulatory element, all these typical characteristics are accord with eukaryon promoter region, these characteristics conform that our cloned gene belongs to the family of PPIase. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (3): 324–331]

Key words: *Penaeus monodon*; cyclophilinA gene; genomic walking; promoter; gene library

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com