

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15422

凡纳滨对虾核自身抗原精子蛋白基因克隆及其表达

颜婕, 刘红, 方昱, 蔡生力

上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306

摘要: 利用 cDNA 末端快速扩增技术克隆出凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)核自身抗原精子蛋白(NASP)基因, NASP 基因 cDNA 全长 2258 bp, 其中包括 92 bp 5'端非编码区, 147 bp 3'端非编码区及 2019 bp 开放阅读区, 编码 673 个氨基酸, 预测分子量为 74.18 kD。该序列已提交至 GenBank, 序列号为 KT274811。在 NCBI 上进行序列比对后发现, 其与斑节对虾(*Penaeus monodon*)NASP 序列相似性最高, 为 90%。采用荧光定量 PCR 方法测定了不同发育时期卵巢与肝胰腺中 NASP mRNA 相对表达水平, 结果表明, NASP 在卵巢中的表达量高于肝胰腺中的表达量, 且在 II 期表达量最高, III 期表达量最低。此外, 通过构建系统进化树比较了凡纳滨对虾 NASP 与其他物种间的遗传距离。实验结果为进一步研究该基因在凡纳滨对虾卵巢发育中的作用提供了依据。

关键词: 凡纳滨对虾; NASP; 基因克隆; 序列分析; 荧光定量 PCR

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1073-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又名南美白对虾, 是我国重要的养殖虾类。年养殖产量超过 100 万 t^[1], 相应的亲虾和虾苗需求量十分巨大。由于凡纳滨对虾的特殊卵巢发育机制, 目前人工育苗通常需要切除眼柄才能促使其成熟。人工切除眼柄的直接作用是消除眼柄窦腺-X 复合体分泌的性腺抑制激素(gonadal inhibiting hormone, GIH), 改变对虾繁殖的正常内分泌调控机制, 从而促使卵巢迅速发育成熟。然而切除眼柄除了影响对虾眼柄激素分泌外, 势必也对其他与对虾卵黄发生相关的生理机制、调控基因产生影响^[2-4]。为此本实验室前期利用抑制性消减杂交技术(SSH)研究了切除眼柄后凡纳滨对虾卵巢、肝胰腺等组织中的各种基因表达情况, 发现了一些在对虾卵巢不同发育时期的差异表达基因, 如极孔样蛋白、肌动蛋白、血小板反应蛋白及核自身抗原精子蛋白等基因^[5]。

核自身抗原精子蛋白(nuclear autoantigenic

sperm protein, NASP)基因是利用抑制消减杂交技术发现的与对虾卵黄发生相关的基因, 最初在兔子的睾丸中被发现, 后经鉴定与热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)卵母细胞中的组蛋白结合蛋白 N1/N2 具有同源性^[6]。NASP 作为组蛋白的分子伴侣, 在组蛋白运输过程中起着重要作用, 同时, 经研究发现 NASP mRNA 的表达在细胞周期中与组蛋白 mRNA 表达一致, 推测其与细胞周期调控有关^[7-8]。NASP 主要在细胞质中表达, 调节细胞分化和分裂, 是调控细胞周期和细胞增殖必须的基因, 也是卵母细胞成熟和发育不可或缺的基因。

目前在甲壳动物中, 只有斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[9]的核自身抗原精子蛋白基因 cDNA 序列已被克隆测序(FJ040859.1), 其他脊椎动物如斑马鱼(*Danio rerio*, NM_199782.2)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*, NP_001164988.1)等模式动物的 NASP 基因也已被测序。本实验通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)首次克隆了凡纳滨对虾

收稿日期: 2015-11-13; 修订日期: 2016-03-07.

基金项目: 上海市教育委员会重点科研创新项目(12ZZ160).

作者简介: 颜婕(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生物发育生物学和分子生物学研究. E-mail: yanjie106@163.com

通信作者: 蔡生力, 教授. E-mail: slcai@shou.edu.cn

NASP 基因 cDNA 全长, 对其序列进行了生物学分析, 并通过荧光定量技术对 NASP mRNA 在对虾卵巢各发育时期的表达情况进行了研究, 以此了解 NASP 基因在凡纳滨对虾卵巢发育中的调控作用, 为探讨对虾性腺成熟过程中卵黄蛋白发生的内分泌调控机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用凡纳滨对虾取自海南文昌裕泰育苗场, 样品体长(13.5±1.5) cm。样品解剖后取新鲜卵巢与肝脏组织, 放入离心管后用液氮速冻, 储存在-80℃冰箱备用。样品卵巢发育分期参照文献[10]的研究, 分为 6 期。

Trizol、pMD19-T 质粒载体、LA Taq 酶、反转录、5'RACE、3'RACE、RT-PCR 等试剂盒购于 TaKaRa 公司; 普通 PCR 所用 Mix 购于 LifeFeng; 大肠杆菌 DH₅α、DNA 回收试剂盒等购于天根生物公司; 氨苄青霉素等购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 凡纳滨对虾总 RNA 提取采用 TRIZOL Reagent(Invitrogen)试剂, 按照实验说明进行操作。利用甲醛变性胶与核酸蛋白仪检测提取 RNA 的浓度与纯度。RNA 保存于-80℃超低温冰箱以备用。将符合条件的 RNA 利用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)试剂盒进行逆转录以获得 cDNA, 逆转录产物于-20℃冰箱保存。

1.2.2 cDNA 片段的克隆 根据抑制消减杂交技术得到的凡纳滨对虾 NASP 基因的部分序列及斑节对虾 NASP 基因(ACM66845.1)设计引物 F1、R1(表 1), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以凡纳滨对虾 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 20 μL, 包含: 模板 1 μL, 上下游引物各 0.4 μL(10 μmol/L), Mix 10 μL, ddH₂O 8.2 μL。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 将符合条件的条带使用天根 DNA 回收试剂盒进行纯化, 将纯化产物连接至 PMD19-T 载体上并转化到大

肠杆菌 DH₅α 菌株中, 转化后挑取阳性单菌落在含氨苄的液体培养基中震荡培养过夜, 经 PCR 验证后送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

表 1 实验中所用引物及其序列
Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称	primer name	引物序列(5'-3')	primer sequence(5'-3')
F1		TGAGAAGAACGAGGTAACAG	
R1		CCCCATTCTCACCTTTTGC	
5'GSP1		GCTTGCTTTCTCGTCTACATTCTC	
5'GSP2		GGTTTACTCTTTTCTCCCACTCTG	
3'GSP1		AATGGCACCAATGGGCACACTGAAA	
3'GSP2		ATCACTGGGAAAAGTACGAGCGGC	
18sF		CCTCGGTTCTATTTTGTCTCGGTTT	
18sR		GCAGATGCTTTCGCAGTAGGT	
NaF		CCAGAGGATGAGGTTGAGGGAG	
NaR		TGCCATTGGTGCCATTGT	

1.2.3 cDNA 5'和 3'末端扩增 根据测得的序列与 Blastn 得到的同源序列设计 4 条特异性引物(5'GSP1、5'GSP2、3'GSP1、3'GSP2)用于 RACE 扩增。3'、5'RACE PCR 扩增按照 TaKaRa 的 RACE 试剂盒说明进行操作。PCR 产物纯化与克隆与 1.2.2 方法相同。

1.2.4 荧光定量 RT-PCR 扩增 根据测序得到的 NASP 基因 cDNA 序列设计引物(NaF, NaR), 通过 PCR 验证符合后使用。荧光定量 RT-PCR 参照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书操作。提取不同时期的凡纳滨对虾卵巢及胰腺中的 RNA 并反转录合成 cDNA 作为模板, 每期取 3 条虾的样品, 共 6 个期, 每个样品设置 3 个平行对照, 以 18S 作为内参基因。荧光定量 PCR 体系为 20 μL, SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, 10 μmol/L 上下游引物 0.5 μL, DEPC 处理的 H₂O 8 μL。PCR 程序为两步法标准扩增程序: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 共 40 个循环。

1.2.5 生物信息学分析 利用 NCBI BLAST 程序进行比对分析; NCBI 网站在线工具 ORF(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)获取开放阅读框的位置信息, 并将核苷酸序列翻译成氨基酸序列; 利用 ProParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质的理化性质; 利用 PredictProtein

(<http://www.predictprotein.org>)预测蛋白质二级结构; 利用 smart 在线工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析基因蛋白结构域; 利用 CLUSTALW 和 MEGA7.0 软件进行多重比对和系统进化树构建。

1.2.6 荧光定量数据分析 将原始 C_t 值进行 2^{-C_t} 转换, 从而达到线性关系。核自身抗原精子蛋白 mRNA 基因相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 公式为: $\Delta\Delta C_t = \text{试验组}(C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内标基因}}) - \text{对照组}(C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内标基因}})$ 。所有样品重复 3 次, 目的基因相对表达量用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 NASP 基因克隆与序列分析

NASP 的 cDNA 全长 2258 bp, 其中开放阅读框(opening reading frame, ORF)有 2019 bp, 编码 673 个氨基酸。在起始密码子上游有 92 bp 非编码区, 在终止密码子 TAG 下游有 147 bp 非编码区, 其中包括 poly(A)及加尾信号 AATAA。用 ProParam 在线工具分析其编码的蛋白质理化性质, 结果显示蛋白质分子质量为 74176.3 Da, 理论等电点为 4.46。负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 177 个, 正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 92 个, 不稳定系数为 50.31, 脂肪系数为 50.86。利用 PredictProtein 工具分析蛋白质二级结构, 结果表明所编码蛋白质有 α -螺旋(α -helix)和环(loop)两种类型。通过 smart 在线工具分析蛋白结构域, 结果表明在 399–436 氨基酸残基间具有 SHNi-TPR 结构域, 在 441–471 氨基酸残基间具有 TPR_2 结构域。图 1 显示的是凡纳滨对虾核自身抗原精子蛋白基因及氨基酸序列。

2.2 氨基酸同源性分析及进化树构建

将氨基酸序列进行 BLASTP 比对, 结果显示该氨基酸序列与斑节对虾 NASP 相似性最高, 为 73%, 其次是与斑马鱼、墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*)和非洲爪蟾相似性分别为 38%、38%和 36%。目前甲壳动物中只有斑节对虾核自身抗原精子蛋白序列已知。

选择其他已克隆出的物种 NASP 氨基酸序列与凡纳滨对虾 NASP 氨基酸序列, 利用 Clustal 与 MEGA5.0 软件采用邻位连接法(Neighbor-Joining)

```

1      GAAACACTCCTTTCGGCCTTTGTACGCTCCACACGCCCAACCCCGTCACCCCTCGTTTG
61     TTGCCTCCGAACGTTACTAACAGTTGACCACTGATCGGCTCGCCGTTAAAGCTGCGC
1      M S E S P V K A A
121    AGACCAAGTCCAGCCCTAAGAGCTGCGCGTCTAAGAAAGAGATTGATACAGCACTCAAG
10     E T S A S P K S S P S K K E I D T A T Q
181    CTTTAAATCACTTTGTCTCAGGCAAGAGACACTTAGTTGTTGGTACATATCTCTCGAG
30     A L N H F A Q G K R H L V V G D I S S A
241    TTAATCTTTGCAGGAGGCATGTAGACTCTAGCAGAGCAATACGGTGAAACTGCTCCAG
50     V N S L Q E A C R L L A E Q Y G E T A P
301    AGTGTGGTGTGCTTATTTCTACTATGGCCGAGCATTGCTTGAATGGCAGCAGTGGAGA
70     E C G D A Y F Y Y G R A L L E M A R M E
361    ATGGAGTCTTAGGAAATGCTTTGGATGGAGTTCCTGATGGATCGACATGGACAAATGCC
90     N G V L G N A L D G V P D G V D M D N S
421    AGGTAGAAAATCCTGAGAAAATGACAGAGGATGAGAAGAACGAGGTAAACAGACAGGTTG
110    Q V E N P E K M T E D E K N E V T E Q V
481    GGAAAGCACTGGAAGAGAATTTTAAAGATCTTGAGGATGTGTCAAAAAGTAAATCAGCAA
130    G K A L E E N F K D L E D V S K S K S A
541    AGCAGAATGGAGATGCAAAAGGGTCAGGCATTCGAGTCTTCAGGTGCTGAGGAGGCTAAA
150    K Q N G D A K G Q G S P S S G A E A K E
601    TGGATGTAGATTACAGTGGAGTGTGAGATCCAAAGGTGAAGATGGAGGGGAGAGAAAG
170    M D V D S A G V S E S K G E D G G E K K
661    AAAAAGTAAAGTCAGATGGGGAGGAAAAGATAAACAGAACTCGGACACATGATGGCA
190    E K V K S D G E E K S K P E T S D T D G
721    CCGCCACTTCCAAAGTAGAGGTAGCTCGGTAGATAGTGAATGTAGACGAGGAAAGCA
210    T A T S K V E A S S V D S E N V D E E S
781    AGCCTGAGAAAAGGAAGTGGATACCAAGATGGTTCCAAAGATGAGGCAAGGAATCGG
230    K P E K K E V D T K D G S K D E A K E S
841    AGTGGTGTGATGGAGGAGAAGGTGAGGCTGATGAGGAAGAAGTAAAGCACTGAGAAGG
250    E V V M E E K V E A D E E E G K A T E K
901    GAGAGGAGAGAAGCAAAAGGTATCGGGAGAAAAGTAAAGATGAAAAGGGAAGGAAGATG
270    G E G E K Q K V S G E T K D E K G K E D
961    CCAAAATGAAGAGAAAGTAGAATCTGAAGCAAAAGGAAGAAATGAAATGATGGCG
290    A K I E E K V E S E A S E E M E T D G
1021   CTGAGAAGAAGGAGGAGTACAGAGGAGAGGAGGAAGGAAGGTGATGCTGAAGGTG
310    A E K K E G S T E G E E E E G D A E G
1081   AAGGTGAAGGAGAGGAGAAGAATCTCAAGAAGATCACAAGATGAGGGTGAAGAGAGG
330    E G E G E G E E S Q E E S Q D E G E K E
1141   AAGGTGCCCAAGAAAGAAAGGGAAGAGCTGAAGAGGATGAGGAAGAAGATATCAAACT
350    E G A S Q E E G E K T E E D E E E V S N
1201   TGCAGTCTCTTGGAGATGTTGGAGTTGGCAAGGTATCTACCAAAAGCAACAGGATG
370    L Q L S W E M L E L A K V I Y Q K Q I Q
1261   ACAATCCAGAGATGGCCAAAGATGGCCCAAGTATACCTGAAACTGGAGAAATGAGGCT
390    D N P E M A K K V A Q V Y L K L G E V G
1321   TGGAGAGCGAAAATTTATTCACAGGATTTGAGGATTTCAAAACAGTGTCTGCAATACAGG
1441   L E S E N Y S Q G I E D F K Q C L Q I Q
1381   AGAAGATTCTTGAGGAAGACACAGGTGTTTGGCAGAAACCCATTACACGCTTGGGTAG
430    E K I L E E D N R C L A E T H Y Q L G V
1441   CACACTCCTTCTCGGATGACTTTGACAAAGCAATTGAAAGCTTTACAGCAGCAATGAAGG
450    A H S F S D D F D K A I E S F T A A M K
1501   TTATTGAAATGAGAATTGCTAACCTGAAAAACGGATAAAGGAAAAGAAAGATGGACAG
470    V I E M R I A N L E K R I K E K K E W T
1561   AAGAGCAAGAAAGAAAGATGCTCGAGAGAGAGACCTGATCCATTCTACACTGAGGAAGCG
490    E E Q R K K D A A E R A P D P F Y T E E G
1621   AGATTGAGAATTGAACAAATGTTACCAAGATGAGGAAGGTTACAGATTGAGGAG
510    E I E E L N K L L P E M K E K V T D M E
1681   AAATGAAGAAAGACAGTAAGGATAGACTCCAGAAAGCAAGCAAGGAAGCAATTCATGGCAA
530    E M K K D S K D R L Q K A A K E A F M A
1741   ATGCAATTGGTGGCACTTCCAAGGCTGGTTCCTCATCAAACTGGATTGTGACACCTT
550    N A I G G T S K A G S S S Q T G F D A P
1801   CAAGTTCTCATCTGTAGTCCCGCAGAAATTAAGGCTTCCACATAACTCATCTTGTA
570    S S S T S V V P T E I K A S N I T H L V
1861   GAAAGAAGAGGAAACAGAGGATGAGGTGAGGGAAGAGGTAAAAAGGCAAAAGGTG
590    R K K R K P E D E V E G E V K K A K G
1921   AGAATGGGAAGCACATGGAAGTCTAATGGAAGTACAAATGGCAAGTGGGCAAGTGGG
610    E N G E A H G T A N G T T N G T N G H T
1981   AAACCATGGAACGGAGGAAAAGGATACCCCTTCAAAATGGGGCAAGCACTGAAGAATTAA
630    E T M E T E E K D T P S N G A S T E E L
2041   AGGAGAAAGCAGCTGAAGAGATGAAGAAAACACAGATTGATCACTGGGAAAGTGGAGG
650    K E K A A E E M K K T T D L I T G K T E
2101   CGGCATCTAGATGCCTGTATATGCTTTTAAACACTGCCAGTATTGGACTAAGAACT
670    A A S *
2161   TTTGTATTTTATTGTAATGGAAGCATTATTTACCACTGAACTGTGTTTAAAGATTAA
2221   AAAATAATTTATTTAAATGAAATGTAAAAAATAA

```

图 1 凡纳滨对虾核自身抗原精子蛋白基因核苷酸

及推测的氨基酸序列

起始密码子以方框表示, 终止密码子以“*”表示,

poly(A)尾用下划线表示。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of nuclear autoantigenic sperm protein gene of *Litopenaeus vannamei*. The start codon ATG is boxed, the stop codon is marked by an asterisk and the poly(A) signal sequence is underlined.

构建系统进化树(图 2)。从系统进化树可以看出,核自身抗原精子蛋白主要分为两支,其中凡纳滨对虾与斑节对虾处于单独的一支。在另一支中,斑马鱼先与墨西哥脂鲤聚为一簇,然后与孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)聚合,最后与西部锦龟(*Chrysemys picta bellii*)、非洲爪蟾等脊椎动物聚为一大簇。由此看出,分子进化分析与其生物系统分类地位基本符合。

2.3 凡纳滨对虾卵巢及肝胰腺中 NASP mRNA 表达
荧光定量 PCR 后得到的熔解曲线为单峰且无杂峰,表明引物无非特异性扩增,实验结果可信。在此基础上对实验结果进行分析,得到在不同发

育时期卵巢与肝胰腺中 *NASP* 基因的表达情况。如表 2 所示,以表达量最少的 III 期肝胰腺中的表达量作为标准,对比不同发育时期 *NASP* mRNA 在卵巢和肝胰腺中的相对表达量。从表 2 可以看出, *NASP* 基因在卵巢与肝胰腺中的表达量差异比较大,卵巢中的表达量明显高于肝胰腺,相比较而言在肝胰腺中的表达可以忽略不计。*NASP* 基因在卵巢中 I 期、II 期表达水平最高,分别为 62616.8 和 64472.3,两者之间无显著差异($P>0.05$),其后随着卵巢发育,表达量迅速下降,III 期达到最低,为 21625.3,之后又逐步上升,VI 期时恢复到较高水平,为 56653.5。

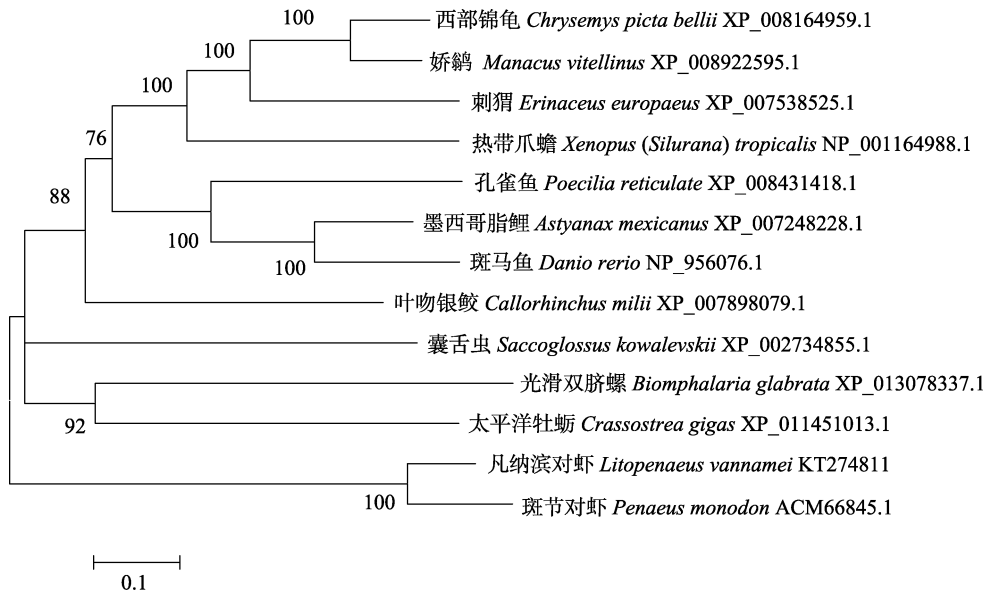


图 2 凡纳滨对虾等物种的核自身抗原精子蛋白系统进化树

此图采用邻位连接法构建进化树;重复抽样 500 次;分支处数字表示此图通过 Bootstrap 检验的百分比;标尺表示物种间的进化距离。

Fig. 2 Phylogenetic tree of nuclear autoantigenic sperm protein of *Litopenaeus vannamei* and some species. The phylogenetic tree was constructed by neighbor joining method. Sampling was repeated 500 times. Numbers near the branches indicate the percentage by Bootstrap test. 0.1 means 10% changes were observed between two sequences.

表 2 不同发育时期凡纳滨对虾卵巢及肝胰腺中核自身抗原精子蛋白 mRNA 的相对表达量
Tab. 2 The relative expression level of *NASP* mRNA at different developmental stages of *Litopenaeus vannamei*

$n=3; \bar{x} \pm SD$

组织 tissue	发育时期 developmental stage					
	I	II	III	IV	V	VI
卵巢 ovary	62616.8±5192.0 ^a	64472.3±4238.3 ^a	21625.3±1203.9 ^b	21931.0±1915.3 ^b	27279.4±284.4 ^b	56653.5±3784.5 ^a
肝胰腺 hepatopancreas	1.3±0.1	1.2±0.07	1	1.3±0.04	1.1±0.07	1.7±0.06

注:同行上标不同字母的数据间差异显著($P<0.05$).

Note: Different superscript letters in the same row denote significant difference among developmental stages ($P<0.05$).

3 讨论

本研究通过 RACE 技术克隆出凡纳滨对虾卵巢中 *NASP* cDNA 序列全长。通过分析 *NASP* 家族的序列结构以及它们与蛋白结合的特异性, 发现其特点与 N1-N2 家族很相似, 推测它们属于同源蛋白, N1-N2 蛋白是 H3/H4、H1 组蛋白的分子伴侣^[11]。在动物早期胚胎中, *NASP* 通过调节热休克蛋白 Hsc70 和 Hsp90 的活性来帮助组蛋白 H3H4 储存^[12-13]。在细胞分裂、从染色质变为染色体的过程中, 组蛋白先与 *NASP* 结合, 通过 *NASP* 的转运作用再与 DNA 结合参与核小体的形成^[14-15]。除此之外, *NASP* 的表达还与细胞周期调控有关, 其过度表达会导致细胞停留在 G1/S 期边缘; 反之, 在小鼠中 *NASP* 基因的破坏会导致早期胚胎的死亡^[7-8, 16]。由此总结, *NASP* 有直接或间接参与 DNA 复制、细胞增殖、调节细胞周期、参与组蛋白转运与存储等功能。

通过分析各物种 *NASP* 结构发现, 其均含有 TPR 与 SHNi-TPR 结构域。TPR 结构域一般由 34 个氨基酸以螺旋-转角-螺旋结构折叠而成, 为介导蛋白质-蛋白质相互作用和多蛋白复合物的装配提供结构骨架^[17]。研究发现, 含有 TPR 结构域的蛋白质涉及多种生物学过程, 包括调节细胞周期、控制转录、过氧化酶蛋白运输以及蛋白质的折叠。不同的 TPR 类型与组蛋白结合的亲和力不同, 例如 TPR-2 主要与组蛋白 H1 相结合, 而 TPR-4 主要与 H3/H4 结合^[12, 18]。SHNi-TPR 结构域是 3 种结构蛋白 Sim3-Hif1-*NASP* interrupted TPR 组合而来。Sim3 是染色质着丝粒里的着丝粒蛋白, 在染色质的正确定位中发挥着至关重要的作用, 同时还与 Asf1 共同作为组蛋白 H3/H4 分子伴侣参与折叠, 这与 *NASP* 具有的分子伴侣功能相对应^[19-20]。此外, 研究发现酿酒酵母中的 Hif1p 可以结合组蛋白 H3/H4 并促进其形成核小体^[21-22]。由此可见, *NASP* 的生物学功能主要是通过结构域发挥作用。

方昱^[5]通过抑制消减杂交技术发现, *NASP* 在卵巢发育 I、II 期表达量很高, 在此基础上本研究

利用荧光定量 PCR, 检测 *NASP* 基因在凡纳滨对虾 6 个不同发育时期在卵巢与胰腺中的表达量。结果表明, 与卵巢相比, 胰腺中 *NASP* mRNA 表达量几乎可以不计。从结果看出, 卵巢中 *NASP* 在 I、II 期表达量较高, 但到 III、IV 期时下降到最低水平, 后又逐渐升高, 直到 VI 期时恢复到初期水平。由于在卵巢发育的 I、II 期中, 主要进行的是卵母细胞、滤泡细胞等细胞的分裂活动, 而在 III、IV 期细胞分裂作用减小, 随之增加的是卵黄蛋白原等糖脂蛋白加工活动, 开始卵黄蛋白合成, 因此 *NASP* mRNA 表达量下降。而在卵巢发育恢复期, 即 VI 期, 由于卵巢即将开始下一次发育, 相关细胞有丝分裂活动又开始增强, 因而表达量又快速上升。对虾卵巢可以多次发育成熟, 因此卵原细胞等与发育有关的细胞在整个卵巢发育阶段都能持续分裂增殖, 尤其在卵巢发育的前期(I、II 期)和后期(VI 期)。由本研究可以看出, *NASP* 基因在卵巢发育期间, 对细胞分裂、增殖活动起着重要的作用。

参考文献:

- [1] Yang C H. Reproductive and developmental biology of shrimp[M]. Jinan: Shandong Science Press, 1999: 26-28. [杨丛海. 对虾繁殖和发育生物学[M]. 济南: 山东科学出版社, 1999: 26-28.]
- [2] Zhang A P. Advances in studies on physiology biochemistry and gene cloning of eyestalk hormones in shrimps and crabs[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2001, 14(1): 11-20. [张爱萍. 虾蟹类眼柄激素的生理生化及基因克隆研究进展[J]. 水产学杂志, 2001, 14(1): 11-20.]
- [3] Cai S L, Dai X L, Zang W L, et al. Behaviors of maturation, mating, spawning and fertilization in *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(4): 335-339. [蔡生力, 戴习林, 臧维玲, 等. 南美白对虾的性腺发育、交配、产卵和受精[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 335-339.]
- [4] Shui Y, Shi Y H, Xu Z H, et al. Advances of growth and development in crustaceans induced by eyestalk ablation[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 21: 124-126+135. [水燕, 史永红, 徐增洪, 等. 眼柄切除快速诱导甲壳动物生长发育研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(21): 124-126+135.]
- [5] Fang Y. Effect of eyestalk-ablation on differential expressed genes and profile of the important genes during ovarian de-

- velopment stages of shrimp *Litopenaeus vannamei*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [方昱. 切除眼柄对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)差异表达基因的影响及几种重要基因在不同卵黄发生阶段的表达量变化[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [6] Welch J E, Zimmerman L J, Joseph D R, et al. Characterization of a sperm-specific nuclear autoantigenic protein. I. Complete sequence and homology with the *Xenopus* protein N1/N2[J]. Biol Reprod, 1990, 43: 559–568.
- [7] Richardson R T, Batova I N, Widgren E E, et al. Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein[J]. Biol Chem, 2000, 275(39): 30378–30386.
- [8] Niu X B. Advances of human nuclear autoantigenic sperm protein[J]. Journal of Modern Urology, 2011, 16(4): 382–383. [牛晓兵. 人细胞核自身抗原精子蛋白的研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2011, 16(4): 382–383.]
- [9] Karoonuthaisiri N, Sittikankeaw K, Preechaphol R, et al. A cDNA microarray for identification of reproduction-related genes in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* and characterization of a novel nuclear autoantigenic sperm protein (NASP) gene[J]. Comp Biochem Physiol, 2009: 90–99.
- [10] Li Y Y, Cai S L, Liu H. Quantitative analysis of vitellogenin mRNA expression in *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11): 1667–1674. [李媛媛, 蔡生力, 刘红. 实时荧光定量 PCR 检测凡纳滨对虾和罗氏沼虾卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的表达[J]. 水产学报, 2012, 36(11): 1667–1674.]
- [11] De Koning L, Corpet A, Haber J E, et al. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(11): 997–1007.
- [12] Dilworth S M, Black S J, Laskey R A. Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly *in vitro*: role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts[J]. Cell, 1987: 51: 1009–1018.
- [13] Cook A L, Gurard-Levin Z, Vassias I, et al. A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain[J]. Mol Cell, 2011, 44: 918–927.
- [14] Alekseev O M, Widgren E E, Richardson R T, et al. Association of NASP with HSP90 in mouse sperm atogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei[J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8846–8852.
- [15] Richardson R T, Bencic D C, O'Rand M G, et al. Comparison of mouse and human NASP genes and expression in human transformed and tumor cell line[J]. Gene, 2001, 274: 67–75.
- [16] Richardson R T, Alekseev O M, Grossman G, et al. Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), a linker histone chaperone that is required for cell proliferation[J]. Biol Chem, 2006, 281(30): 21526–21534.
- [17] D'Andrea L D, Regan L. TPR proteins: the versatile helix[J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(12): 655–662.
- [18] Wang H, Ge Z, Walsh S T, et al. The human histone chaperone sNASP interacts with linker and core histones through distinct mechanisms[J]. Nucl Acid Res, 2012, 40(2): 660–669.
- [19] Dunleavy E M, Pidoux A L, Monet M, et al. A NASP (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres[J]. Mol Cell, 2007, 28(6): 1029–1044.
- [20] Tanaka K, Horiuchi T, Yamakawa T, et al. Sim3 shares some common roles with the histone chaperone Asf1 in fission yeast[J]. FEBS Lett, 2012, 586(23): 4190–4196.
- [21] Poveda A, Pamblanco M, Tafrov S, et al. Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus[J]. Biol Chem, 2004, 279(16): 16033–16043.
- [22] Ai X, Parthun M R. The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly[J]. Mol Cell, 2004, 14(2): 195–205.

Molecular cloning and expression analysis of the gene encoding nuclear autoantigenic sperm protein from white prawn (*Litopenaeus vannamei*)

YAN Jie, LIU Hong, FANG Yu, CAI Shengli

College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Many genes that play roles in shrimp vitellogenesis, such as that encoding nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), have been identified by suppression subtractive hybridization. In shrimp, NASP plays an important role in ovarian maturation. In this study, the *NASP* gene was cloned from *Litopenaeus vannamei* using the rapid amplification of cDNA ends technique. The full-length cDNA of *NASP* consisted of 2258 bp with a 92-bp 5'-untranslated region (UTR), a 174-bp 3'-UTR, and a 2019-bp open reading frame, which encoded a protein of 673 amino acids with a predicted isoelectric point of 4.46 and a predicted molecular weight of 74.18 kDa. The sequence has been submitted to GenBank under the accession number KT274811. The putative protein had two conserved regions: SHNi-TPR and TPR_2. A sequence alignment analysis revealed that the *L. vannamei* NASP showed the highest similarity to the NASP of *Penaeus monodon* (GenBank accession number: FJ040859.1). We constructed a phylogenetic tree based on NASP sequences to evaluate the evolutionary relationships of NASPs between *L. vannamei* and other species. In the phylogenetic tree, the NASP of *L. vannamei* was in the same branch as that of *P. monodon*. The transcript levels of *NASP* were investigated in the ovary and hepatopancreas of *L. vannamei* at different ovary developmental stages by real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that *NASP* transcripts were present at all stages, with the highest levels at the second stage and the lowest levels at the third stage. The *NASP* transcript levels were higher in the ovary than in the hepatopancreas, in which the transcript level was negligible. These results provide the basis for further research on the role of NASP in ovarian development in *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; gene cloning; nuclear autoantigenic sperm protein gene; sequence analysis; fluorescent quantitative PCR

Corresponding author: CAI Shengli. E-mail: slcai@shou.edu.cn