

## 青石斑鱼细胞色素C氧化酶亚基I (COX I) 基因的克隆鉴定及表达分析

施大卫<sup>1,2</sup>, 王利<sup>1</sup>, 娄绘芳<sup>1</sup>, 黄艳青<sup>1</sup>, 朱保健<sup>1</sup>, 吴信忠<sup>1</sup>

(1. 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310029; 2. 北仑出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315800)

**摘要:** 细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase, COX)是线粒体内呼吸链电子传递的终末复合物,是线粒体氧化能力的关键调节物质。细胞色素C氧化酶亚基I(COX I)是细胞色素C氧化酶具有酶催化活性的3个亚基之一。本研究以本实验室构建的青石斑鱼消减杂交cDNA文库中587 bp的EST序列为基础,采用RACE-PCR方法克隆鉴定出青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)细胞色素C氧化酶亚基I基因。研究表明:青石斑鱼COX I全长1 659 bp,5'端非编码区3 bp,3'端非编码区105 bp,开放阅读框1 551 bp,编码516个氨基酸。序列分析表明,青石斑鱼COX I与线纹刺尾鲷COX I同源性最高,达96.9%。采用半定量RT-PCR方法研究COX I基因在青石斑鱼各组织中的表达特征,结果表明COX I基因在正常的青石斑鱼和注射了副溶血弧菌灭活疫苗的青石斑鱼的脾、肝、心、头肾、肾、肌肉和鳃中都有转录表达。注射副溶血弧菌灭活疫苗后,除了鳃组织,其他组织中COX I基因表达量较对照组都有显著提高( $P < 0.05$ ),而鳃组织中的COX I基因表达量没有显著变化。[中国水产科学,2009,16(4):467-476]

**关键词:** 青石斑鱼; 细胞色素C氧化酶; 克隆; 表达分析; 副溶血弧菌灭活疫苗

**中图分类号:** Q959.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2009)04-0467-10

细胞色素C氧化酶(Cytochrome oxidase, COX)是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,是含血红素-铜(heme/copper)终端氧化酶的超家族(细胞色素C氧化酶Cox和辅酶Q氧化酶UQox)成员之一,是调节线粒体氧化能力的关键部位<sup>[1]</sup>。COX承担着从细胞色素c(Cytochrome c, Cyt c)到氧分子(O<sub>2</sub>)的电子传递功能,催化氧分子还原为水分子,并与质子泵功能相偶联。反应过程中形成水所需要的质子来源于细菌或线粒体内膜的内侧,而Cyt c则位于内膜的外侧。这种底物间的隔离造成了电化学质子梯度( $\Delta\mu\text{H}$ )的产生。而在传递电子的同时,每个反应循环中伴随着4个质子由膜内侧泵向外侧,这进一步加剧了质子电化学梯度。生物体就是利用这种质子电化学梯度推动ATP合成的,因此COX在生物体代谢过程中至关重要<sup>[2-4]</sup>。

细胞色素C氧化酶是由多个亚基组成的复杂酶

分子,在真核细胞中,该酶作为一种跨膜整合蛋白存在于线粒体内膜上(不对称地横跨在膜上)。哺乳动物的COX由13个亚基组成,其中最大的和疏水性最强的3个核心亚基(COX I、COX II和COX III)由线粒体DNA(mtDNA)编码,而其余10个亚基(COX IV, COX Va, COX Vb, COX VIa, COX VIb, COX VIc, COX VIIa, COX VIIb, COX VIIc和COX VIII)均由核DNA(nDNA)编码,经胞浆中的核糖体翻译后再通过不同途径转运至线粒体<sup>[5]</sup>。COX I是细胞色素C氧化酶亚基中最大最保守的亚基。它含有12个跨膜螺旋,这些螺旋以近似三重轴对称方式排列在膜中,膜外部分很少,COX I结构中还含有低度螺旋的血红素a(heme a)和高度螺旋的血红素a<sub>3</sub>(heme a<sub>3</sub>)2个血红素,其中heme a<sub>3</sub>与铜离子(Cu<sup>B</sup>)一起形成O<sub>2</sub>还原催化部位的双核中心,而heme a则被认为参与了电子传递过程<sup>[6]</sup>。

收稿日期:2008-10-30; 修订日期:2009-01-22.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671619);浙江省重点科技计划项目(2004C23041).

作者简介:施大卫(1983-),男,硕士研究生,主要从事海洋生物分子免疫学研究. E-mail: david101131@sina.com

通讯作者:吴信忠(1957-),教授,博导,从事海洋生物分子免疫及疾病防治. Tel: 0571-86971960; E-mail: wuxz@zju.edu.cn

青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 属鲈形目 (Perciformes), 鲷科 (Serranidae), 石斑鱼亚科 (Epinephelinae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*) 的海洋珊瑚礁鱼类, 在中国南方广泛养殖。近年来由于养殖密度过大、养殖环境污染等原因, 石斑鱼的疾病时有发生, 广东、福建、浙江、海南等省都有养殖石斑鱼大规模死亡的报告, 造成了巨大的经济损失<sup>[7]</sup>。目前对青石斑鱼的免疫和疾病机制的研究尚少, 也缺乏对其各项生理活动的整体研究。在本实验室已构建了以脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激的青石斑鱼脾脏组织的消减 cDNA 文库<sup>[8]</sup>的基础上, 本研究通过从文库中筛选出的一个 587 bp 的 EST 序列, 运用 RACE-PCR 方法, 克隆鉴定了细胞色素 C 氧化酶亚基 I (*COX I*) 基因, 分析了其蛋白质肽链的结构特性, 并将该基因序列与其他物种的同源基因序列进行了比对分析, 通过构建分子系统发育树探讨了这几个物种的分子进化关系, 并进行了细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因在正常和副溶血弧菌灭活疫苗刺激下青石斑鱼不同组织中的表达分析, 为进一步研究青石斑鱼线粒体基因组提供了参考, 也从免疫抗病方面对监测和抵抗鱼类病害进行了基础理论研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 副溶血弧菌灭活疫苗准备** 在普通海水培养基 (酵母粉 1 g, 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 琼脂粉 20 g, 加 1.5% 海水定容至 1 000 mL, 调 pH 值到 7.3, 混匀后高压灭菌 20 min, 冷却至约 55 °C 后倾倒在平板) 上 28 °C 培养副溶血弧菌 24 h。从平板上小心刮落细菌, 用 10 mmol·L<sup>-1</sup> PBS 冲洗 3 次, 重悬于 PBS 后加入 0.5% (V/V) 福尔马林溶液, 4 °C 灭活 48 h。4 °C, 7 000 r/min 离心 30 min 弃上清, 沉淀重新用 PBS 悬浮并调整细菌浓度到 1 × 10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 4 °C 保存。上述操作均在无菌条件下完成。

**1.1.2 实验动物** 青石斑鱼体质量 (450 ± 50) g, 购自杭州水产市场, 实验前在全自动循环水族缸中饲养一周, 健康的鱼用于实验。对照组 5 尾鱼腹腔注

射 0.9% 的氯化钠溶液, 处理组 5 尾鱼腹腔注射副溶血弧菌灭活疫苗 0.3 mL。48 h 后, 分别取脾、肾、头肾、肝、心、肌肉、鳃等组织冻存于液氮待用。

**1.1.3 试剂** BD SMART RACE cDNA Amplification Kit 为 BD Clontech 产品 (日本)。质粒提取试剂盒、PCR 凝胶回收试剂盒、pMD-19 T 载体、Trizol Reagent 为 Takara 产品 (日本)。反转录试剂盒为 Promega 公司产品 (美国)。

**1.1.4 引物** 以本实验室构建的青石斑鱼消减杂交 cDNA 文库中 587 bp 的 EST 片段设计 RACE 引物: P-5 和 P-3 是分别用来扩增 5' 和 3' 末端序列的特异引物, P-1 和 P-2 是用于 RT-PCR 的引物。10 × UPM (Universal Primer Mixture) 是 RACE 试剂盒中扩增 5' 和 3' 末端序列的通用引物。P-a 和 P-b 是 RT-PCR 的参照物青石斑鱼微管蛋白基因 (*α-tubulin*) 的引物。引物交由上海生工生物工程技术有限公司合成。

UPM: 5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC  
AGTGGTATCAACGCAGAGT-3',

P-5: 5' -CCCTCCGTGAAGCGTAGCCAATC-3'

P-3: 5' -GGGAGACCCGATTCTTTACCAGC-3'

P-1: 5' -TCTTGTATTTGGTGCCTGAG-3'

P-2: 5' -CTGGGTCAAAGAAAGTGGA-3'

P-a: 5' -GTGCACTGGTCTTCAGGGGTT-3'

P-b: 5' -GGGAAGTGGATGCGTGGGTAT-3'

### 1.2 实验方法

**1.2.1 总 RNA 的提取和 *COX I* 基因的 cDNA 全长克隆与分析** 用 Trizol Reagent 提取脾脏总 RNA, 用 1.0% 变性琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度和质量。置于 -80 °C 保存。

取 1.0 μg 总 RNA, 利用 BD SMART PCR cDNA Synthesis Kit 合成 5' cDNA 和 3' cDNA; 使用配套的 BD Advantage 2 PCR Kit 进行目的扩增。5' -RACE 和 3' -RACE 的引物分别是 P-5、10 × UPM 和 P-3、10 × UPM。PCR 扩增条件为 94 °C 30 s, 72 °C 3 min (5 个循环), 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min (5 个循环), 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min (28 个循环)。将 PCR 产物克隆入 pMD19-T 载体, 筛选阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司

测序。使用DNASar软件和NCBI数据库中的Blast程序进行序列分析<sup>[9-10]</sup>,使用Scanview (<http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite/scanview/>) 程序分析结构域,使用ClustalW 1.83程序进行氨基酸序列同源性分析<sup>[11]</sup>,使用MEGA3.1软件作系统发生树评估不同动物*COX I*之间的进化关系。

**1.2.2 RT-PCR检测*COX I*基因在青石斑鱼各组织中的差异表达研究** 利用Trizol Reagent试剂盒,抽提对照组和实验组青石斑鱼(各5尾)的肝脏、心脏、肾脏、头肾、脾脏、肌肉、鳃的总RNA。分别取各组织总RNA 1.0  $\mu\text{g}$ ,以寡聚(dT)<sub>18</sub>为引物,使用M-MLV H反转录酶合成第一链cDNA。*COX I*基因的引物是P-1和P-2,扩增条件为94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,54.2  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  40 s。PCR的参照物微管蛋白基因( *$\alpha$ -tubulin*)的引物是P-a和P-b。扩增条件为94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55.5  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  40 s,分别于20、25、30、35、40个循环扩增 *$\alpha$ -tubulin*和*COX I*,以确定各样品的稀释倍数和最佳循环次数。PCR产物在用Goldview染色的1%琼脂糖凝胶上电泳。图像处理及分析使用软件ChampGel™ 3.2凝胶图像分析系统。以 *$\alpha$ -tubulin*作为内参照校正,用总体光密度值(IOD, Integrated Optical Density)表示目的基因和内标表达丰度。用目的基因和 *$\alpha$ -tubulin*条带光密度的比值表示相对表达单位(relative unit)。全部数据采用SPSS 10.0统计软件进行统计学分析,计量数据资料均用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )表示。差异显著性检验用独立样本*t*检验和单因子方差分析(Oneway ANOVA)。RT-PCR检测*COX I*基因在青石斑鱼各组织中的差异表达研究分为5个独立重复实验进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 青石斑鱼细胞色素C氧化酶亚基 I (*COX I*) 的克隆和序列分析

以本实验室构建的青石斑鱼消减杂交cDNA文库中<sup>[8]</sup>—长587 bp的EST序列为基础设计引物进行RACE-PCR,在青石斑鱼脾脏的总RNA中克隆获得2个长度约为1 000 bp大小的片段,经测序鉴定

为细胞色素C氧化酶亚基I基因的5'和3'端序列(图1),拼接成获得长1 659 bp的*COX I*全长cDNA序列(GenBank序列号为:EU363802)。5'端非编码区3 bp,3'端非编码区105 bp,开放阅读框1 551 bp,编码516个氨基酸(图2)。*COX I*预测分子量为57.0 kD,理论pI值为6.48。

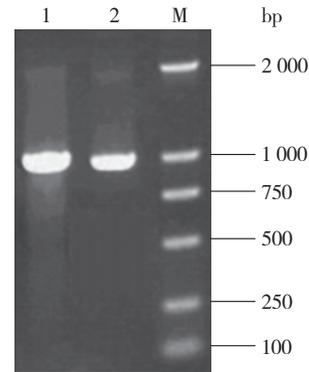


图1 青石斑鱼细胞色素*COX I*基因RACE-PCR扩增图  
1: 5'-RACE扩增条带; 2: 3'-RACE扩增条带; M: 标准分子量。

Fig.1 1% agarose gel electrophoresis of RACE-PCR products of yellow grouper *COX I* gene

Lane 1: Product of *COX I* 5'-RACE;

Lane 2: Product of *COX I* 3'-RACE; M: Marker.

在GenBank中同源性检索比较青石斑鱼*COX I*推测的氨基酸序列与其他物种的*COX I*氨基酸序列。结果表明,青石斑鱼*COX I*与线纹刺尾鲷(*Acanthurus lineatus*)*COX I*同源性最高,达96.9%,与斑马鱼(*Danio rerio*)为94.2%,与人(*Homo sapiens*)为86.5%,与家鼠(*Mus musculus*)为88.7%。其中该蛋白的功能域血红素-铜氧化酶催化区(位置在第235~292位氨基酸)与其他物种如人、家鼠、斑马鱼、线纹刺尾鲷的相同区域相似性为91%~100%。青石斑鱼*COX I*推测的氨基酸序列与其他物种*COX I*的比对结果详见图3。对青石斑鱼*COX I*编码的蛋白进行系统进化树分析,结果表明*COX I*蛋白聚成两大支:脊椎动物*COX I*和无脊椎动物*COX I*。在脊椎动物*COX I*分支中,哺乳动物的*COX I*聚在一起,鱼类*COX I*聚在一起。青石斑鱼*COX I*与其他硬骨鱼*COX I*归为一类,与线纹刺尾鲷*COX I*的亲缘关系最近(图4)。

```

1 CCT GTG GCC ATC ACA CGT TGA TTT TTC TCG ACT AAT CAC AAA GAC ATT GGC ACC CTT TAT CTT GTA TTT GGT GCC TGA
  M A I T R W F F S T N H K D I G T L Y L V F G A W
79 GCG GGA ATA GTA GGA ACA GCC CTT AGC CTA CTA ATT CGA GCT GAG CTA AGC CAG CCG GGA GCT CTA CTA GGC GAC GAC
  A G M V G T A L S L L I R A E L S Q P G A L L G D D
157 CAG ATC TAT AAT GTA ATT GTT ACA GCA CAT GCT TTT GTA ATA ATC TTT TTT ATA GTA ATA CCA ATT ATG ATT GGT GGC
  Q I Y N V I V T A H A F V M I F F M V M P I M I G G
235 TTT GGA AAC TGA CTT ATT CCA CTT ATA ATC GGT GCC CCA GAC ATA GCA TTC CCT CGA ATG AAT AAT ATA AGC TTC TGA
  F G N W L I P L M I G A P D M A F P R M N N M S F W
313 CTC CTT CCC CCA TCC TTC CTG CTT CTT CTT GCC TCT TCT GGT GTA GAA GCC GGT GCT GGC ACT GGC TGA ACA GTC TAC
  L L P P S F L L L L A S S G V E A G A G T G W T V Y
391 CCA CCC CTG GCC GGA AAC CTA GCC CAC GCA GGT GCA TCA GTA GAC TTA ACT ATT TTC TCA CTA CAT TTA GCG GGA ATT
  P P L A G N L A H A G A S V D L T I F S L H L A G I
469 TCA TCA ATT CTA GGC GCA ATC AAC TTT ATC ACA ACC ATC ATT AAC ATG AAA CCT CCT GCT ACC TCT CAA TAC CAA ACA
  S S I L G A I N F I T T I I N M K P P A T S Q Y Q T
547 CCT TTA TTT GTG TGA GCA GTA TTG ATT ACA GCA GTA CTC CTA CTC CTT TCC CTT CCC GTC CTT GCC GCT GGC ATC ACA
  P L F V W A V L I T A V L L L L S L P V L A A G I T
625 ATG TTA CTC ACT GAT CGT AAC CTT AAT ACC ACT TTC TTT GAC CCA GCC GGA GGG GGA GAC CCG ATT CTT TAC CAG CAC
  M L L T D R N L N T T F F D P A G G G D P I L Y Q H
703 TTA TTT TGA TTC TTC GGC CAC CCA GAG GTT TAT ATT CTT ATT CTT CCT GGC TTC GGA ATG ATC TCC CAC ATC GTT GCA
  L F W F F G H P E V Y I L I L P G F G M I S H I V A
781 TAT TAT TCC GGT AAA AAA GAA CCA TTT GGC TAT ATA GGA ATA GTT TGA GCC ATA ATG GCA ATT GGC CTT CTA GGA TTC
  Y Y S G K K E P F G Y M G M V W A M M A I G L L G F
859 ATT GTA TGA GCA CAT CAC ATG TTT ACG GTT GGA ATA GAC GTA GAC ACA CGT GCT TAC TTT ACA TCA GCT ACT ATA ATT
  I V W A H H M F T V G M D V D T R A Y F T S A T M I
937 ATT GCA ATC CCC ACT GGC GTT AAA GTC TTC AGC TGA TTG GCT ACG CTT CAC GGA GGG TCC ATT AAA TGA GAA ACC CCC
  I A I P T G V K V F S W L A T L H G G S I K W E T P
1015 CTC CTA TGG GCA CTC GGC TTT ATT TTC CTC TTT ACA GTA GGG GGT CTA ACG GGA ATT GTC CTA GCT AAT TCT TCA CTC
  L L W A L G F I F L F T V G G L T G I V L A N S S L
1093 GAC ATT GTC TTA CAC GAT ACA TAC TAT GTC GTT GCC CAC TTC CAC TAT GTA CTC TCA ATG GGA GCC GTG TTT GCC ATT
  D I V L H D T Y Y V V A H F H Y V L S M G A V F A I
1171 GTA GCT GCC TTT GTA CAC TGA TTC CCA CTA TTT ACA GGC TAC ACT CTT CAT AGC ACC TGA ACA AAA ATC CAC TTT GGC
  V A A F V H W F P L F T G Y T L H S T W T K I H F G
1249 ATT ATG TTT GTA GGT GTA AAC CTC ACC TTC TTC CCT CAA CAC TTC CTA GGA CTA GCC GGA ATA CCT CGT CGA TAC TCA
  I M F V G V N L T F F P Q H F L G L A G M P R R Y S
1327 GAC TAC CCA GAC GCC TAT ACC CTC TGA AAT ACT GTC TCT TCT ATT GGC TCT ATA ATC TCA CTC GTG GCC GTA ATT ATA
  D Y P D A Y T L W N T V S S I G S M I S L V A V I M
1405 TTC CTT TTC ATC ATC TGA GAA GCA TTT GCT TCT AAA CGT GAA GTA CTT GCA GTA GAA CTA ACC ATG ACC AAC GTA GAA
  F L F I I W E A F A S K R E V L A V E L T M T N V E
1483 TGA CTC CAC GGC TGC CCT CCC CCA CAT CAC ACA TTT GAA GAG CCC GCA TTT GTT CAA ATT CGA CCA TAC TAA ACG AGA
  W L H G C P P P H H T F E E P A F V Q I R P Y *
1561 AAG GGA GGA GTT GAA CCC CCG TGT GTT GGT TTC AAG CCA ACC ACA TAA CCG TTC TGT CAC TTT CTT TAT AAA AAA AAA
1639 AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

```

图2 青石斑鱼细胞色素C氧化酶亚基I (*COX I*) 基因全长 cDNA 序列及翻译的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and predicted amino acid sequence of yellow grouper *COX I* cDNA



图3 青石斑鱼COX I翻译的氨基酸序列与其他物种COX I氨基酸序列的比较

线纹刺尾鲷(*Acanthurus lineatus*, EU273284); 斑马鱼(*Danio rerio*, AC024175); 青石斑鱼(*Epinephelus awoara*, EU363802); 人(*Homo sapiens*, NC\_001807); 家鼠(*Mus musculus*, AB042524); “\*”表示5行序列中相同处; 功能域即血红素-铜氧化酶催化区氨基酸残基,用下划线表示。

Fig. 3 Multiple sequence alignment of the predicted yellow grouper COX I protein with the other known COX I protein \* indicates identity between the five sequences. The yellow grouper COX I domain is underlined. Sequences were taken from GenBank database: Acanthuridae fish (*Acanthurus lineatus*, EU273284); zebrafish (*Danio rerio*, AC024175); yellow grouper (*Epinephelus awoara*, EU363802); human (*Homo sapiens*, NC\_001807); house mouse (*Mus musculus*, AB042524).

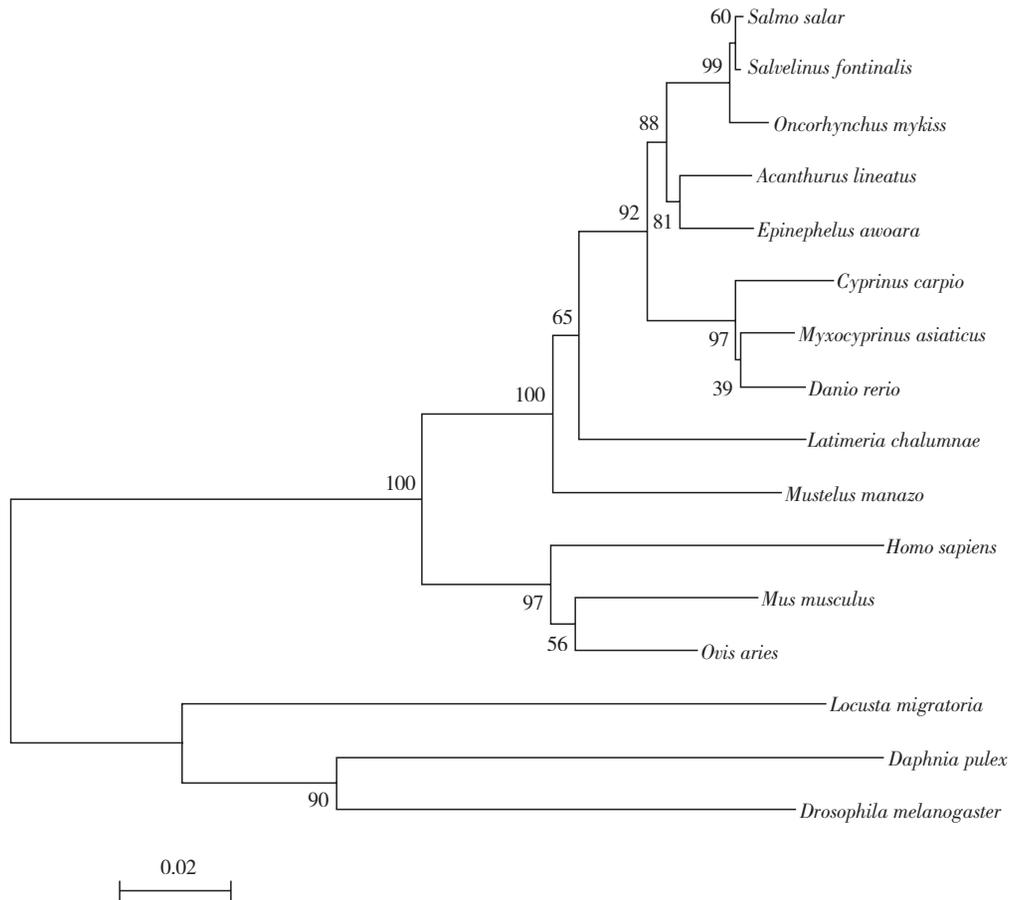


图4 应用MEGA 3.1构建的青石斑鱼 *COX I* 基因与来源于其他动物 *COX I* 的系统进化树分析

线纹刺尾鲷 (*Acanthurus lineatus*, EU273284); 斑马鱼 (*Danio rerio*, AC024175); 鲤 (*Cyprinus carpio*, AB045144); 蚤状溞 (*Daphnia pulex*, AF117817); 青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*, EU363802); 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, U37541); 人 (*Homo sapiens*, NC\_001807); 矛尾鱼 (*Latimeria chalumnae*, U82228); 飞蝗 (*Locusta migratoria*, X80245); 家鼠 (*Mus musculus*, AB042524); 星鲨 (*Mustelus manazo*, AB015962); 胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*, NC\_006401); 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, L29771); 绵羊 (*Ovis aries*, AF010406); 大西洋鲑 (*Salmo salar*, U12143); 红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*, AF154850)

Fig. 4 Phylogenetic tree of yellow grouper *COX I* with other known *COX I*

Sequences were taken from GenBank database: Acanthuridae fish (*Acanthurus lineatus*, EU273284); zebrafish (*Danio rerio*, AC024175); yellow grouper (*Epinephelus awoara*, EU363802); human (*Homo sapiens*, NC\_001807); house mouse (*Mus musculus*, AB042524); carp (*Cyprinus carpio*, AB045144); daphnia (*Daphnia pulex*, AF117817); drosophila (*Drosophila melanogaster*, U37541); coelacanth (*Latimeria chalumnae*, U82228); migratory locust (*Locusta migratoria*, X80245); Smoothhound (*Mustelus manazo*, AB015962); Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*, NC\_006401); rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L29771); sheep (*Ovis aries*, AF010406); Atlantic salmon (*Salmo salar*, U12143); brook charr (*Salvelinus fontinalis*, AF154850)

## 2.2 细胞色素C氧化酶亚基I基因在正常和副溶血弧菌灭活疫苗刺激下青石斑鱼不同组织中的表达分析

采用 RT-PCR 方法研究 *COX I* 基因在对照组和实验组青石斑鱼各组织中的表达情况。以反转录合成的第一链 cDNA 为模板,用  $\alpha$ -tubulin 作为参照。结果发现: *COX I* 基因在正常的青石斑鱼和注射了副溶

血弧菌灭活疫苗的青石斑鱼的脾、肝、心、头肾、肾、肌肉和鳃中都有转录表达(图5)。注射副溶血弧菌灭活疫苗后,在除了鳃以外的其他组织中的 *COX I* 基因表达量较对照组都有显著提高 ( $P < 0.05$ )。注射副溶血弧菌灭活疫苗后,鳃组织中的 *COX I* 基因表达量与对照组相比没有显著变化(图6)。

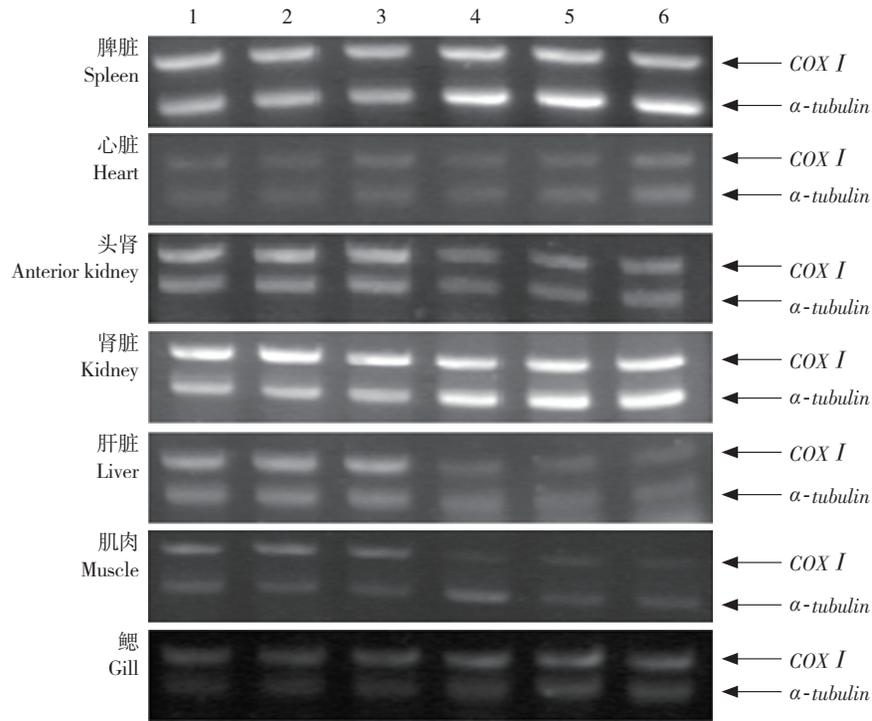


图5 RT-PCR检测 *COX I* 在正常青石斑鱼和注射副溶血弧菌灭活疫苗的青石斑鱼各组织中的表达  
1-3为正常青石斑鱼;4-6为注射副溶血弧菌灭活疫苗的青石斑鱼;实验结果为5次独立重复实验  
Fig. 5 RT-PCR analysis of yellow grouper *COX I* expression in various tissues from normal groups (1-3) and group treated at 2 days after injection of FI-Vp (4-6)  
The results were from 5 independent experiments.

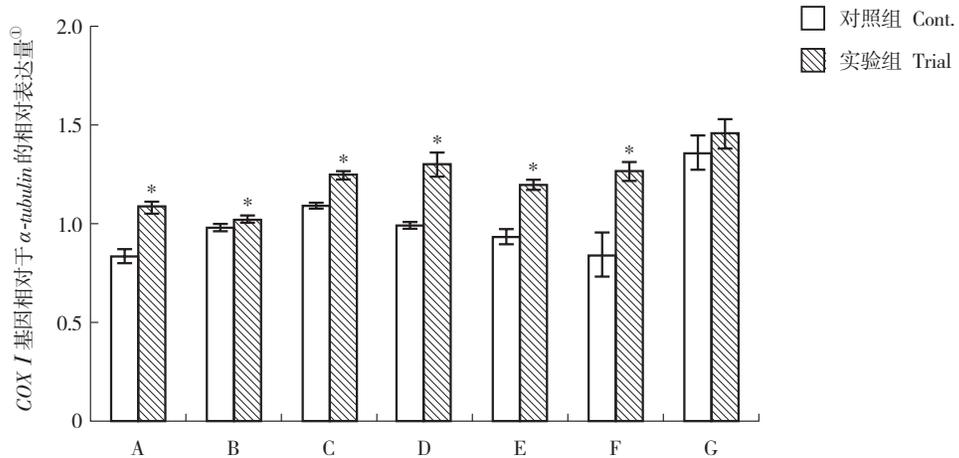


图6 *COX I* 在正常青石斑鱼和注射副溶血弧菌灭活疫苗的青石斑鱼的不同组织中的表达情况比较图  
①目的基因和  $\alpha$ -tubulin 条带光密度的比值表示相对表达量. 全部数据采用SPSS统计软件进行统计学分析.

“\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ ). 实验结果为5次独立重复实验  
A-脾脏; B-心脏; C-头肾; D-肾脏; E-肝脏; F-肌肉; G-鳃

Fig. 6 Tissue-specific expression profile of the *COX I* mRNA

①The expression level of *COX I* gene was performed by a comparison with  $\alpha$ -tubulin level and tissue ratios which were calculated from the mean results of five independent experiments. The data were analyzed by *t*-test and error bars were presented as SEMs of 5 independent experiments. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  and represented by an asterisk.

A: spleen; B: heart; C: anterior kidney; D: kidney; E: liver; F: muscle; G: gill

### 3 讨论

由于传统网箱养殖密度大、水交换量差、小杂鱼及饵料喂养致水体污染严重、且渔场多布置在近海区,导致近海地区青石斑鱼养殖的水环境日益恶化,造成网箱养殖青石斑鱼普遍的抗病力降低、疾病频发。恶化的养殖环境与病原感染是造成鱼类发病和死亡的重要外在条件,因此,研究环境污染和病原感染对鱼类机体的作用和致病机制,对于找到合理、有效的鱼类疾病防治的途径和方法,保证鱼类养殖产业发展具有重要意义。目前对各种环境化学因素引起的机体损伤和疾病尚难以找到肯定、有效的疗法,这促使人们对于环境化学污染物毒性作用机制的研究系统地深入到细胞器乃至分子水平。在各种细胞器中,线粒体由于能通过呼吸作用为有机体提供90%ATP能源而受到关注。研究表明,许多环境化学污染物以线粒体呼吸链系统作为其毒性作用的主要靶标<sup>[12-14]</sup>,通过对它的直接和间接作用影响线粒体以及细胞的正常运转,甚至导致细胞死亡。

线粒体是一种结构和功能复杂而敏感多变的细胞器,有其自身的遗传物质mtDNA。mtDNA的主要作用是编码与线粒体呼吸链相关的蛋白亚单位,其复制与表达规律有别于细胞核基因组,不受细胞周期的限制,在线粒体内独立进行,因而有其固有的特性<sup>[15]</sup>。mtDNA缺乏组蛋白保护,损伤修复系统不健全,易遭受氧化物等损伤因子的攻击而发生突变。由于mtDNA的编码信息为呼吸链的重要组成成分,与线粒体氧化磷酸化和能量代谢有直接关系,因而对其结构和功能的研究已受到广泛重视<sup>[16]</sup>。COX由细胞核DNA(nDNA)基因组和mtDNA基因组分别编码的亚基共同组成,它与线粒体功能及细胞能量的产生密切相关<sup>[17]</sup>,被认为是研究线粒体和核两基因组间转录、翻译及其调节等相互作用的一个典型,研究此相互作用将有利于弄清在特定组织线粒体生物起源的变化和检测从两基因组发展而来的特定mRNA的改变<sup>[18]</sup>。

本研究通过RACE-PCR方法,首次筛选、鉴定出了青石斑鱼COX I的cDNA全长序列,并对COX I推

测的氨基酸序列与其他物种COX I进行了序列对比和系统进化树分析。线粒体COX I基因为独立于核基因组以外的线粒体环状DNA,编码的呼吸链细胞色素氧化酶普遍存在于原核生物和真核生物中,它的进化速度快,包含从种内到种间的遗传进化信息,可用于比较生物体进化之间的相互关系<sup>[19]</sup>。COX I已被广泛用于分析绦虫<sup>[20]</sup>及灵长类<sup>[21]</sup>的系统发育规律,最近也逐渐被用来分析鲈形目鱼类的分子进化规律及亲缘关系<sup>[22]</sup>。本研究结果表明不同物种的COX I间具有较高的相似性,各物种COX I的功能域序列高度一致,COX I在物种进化过程中相对保守。进化树分析表明青石斑鱼COX I与其他鱼类COX I的亲缘关系较近,而各物种COX I相似性高低与其来源的物种间的亲缘关系的远近是一致的。

COX编码基因的改变、表达及酶活性的发挥对细胞在生理和病理情况下的机能、代谢和形态结构有直接影响<sup>[17]</sup>。一旦COX受损,将会引起线粒体功能降低,导致ATP合成减少,并还可能导导致线粒体呼吸链电子单价泄露增强而产生更多的活性氧ROS(Reactive oxidase species, ROS)产物,介导程序性细胞死亡(Programmed cell death, PCD)信号转导通路的活化,严重者将导致细胞死亡(凋亡或坏死)<sup>[23]</sup>。目前大多数学者皆是通过研究COX各蛋白质亚基及其mRNA水平来观察、分析其调节机制(转录或转录后)<sup>[24]</sup>。已有研究报道氧浓度、激素、年龄、腺苷酸浓度等多种因素会对线粒体COX亚基的表达产生影响<sup>[25]</sup>。Joris等<sup>[26]</sup>认为镉污染条件下贝类COX I基因表达量的增加是为了弥补线粒体活力的下降及更有效地消耗分子氧,减少细胞中活性氧的产生从而限制镉对细胞的损害。根据已有研究,动物在病原性或非病原性抗原刺激下,能激活单核/巨噬细胞系统和淋巴细胞释放一系列被称为细胞介素的化合物<sup>[27]</sup>,这类化合物主要包括白细胞介素1(IL1),白细胞介素6(IL6)和肿瘤坏死因子(TNF),它们不仅能激活免疫系统,使得动物处于免疫应激状态,而且还能通过对靶组织的直接作用或通过改变动物体内某些激素的水平来调节免疫应激过程中动物体内各种养分的代谢,包括提

高整个机体的蛋白质周转速度及急剧增加糖类的利用<sup>[28-31]</sup>。这些代谢的加快都需要依赖线粒体呼吸链的能量供应。*COX*作为线粒体呼吸链的主要限制酶,*COX I*基因表达量的增加可以提高整条呼吸链的效率,从而为细胞提供更多的能量。或许这可以解释本研究发现的注射副溶血弧菌灭活疫苗后,不仅在主要的免疫器官(脾脏、头肾、肾),而且在其他组织(肝、心、肌肉)中*COX I*的表达量都显著提高的现象。而推测鳃组织中*COX I*基因表达量未见显著提高的原因可能是因为作为鱼类呼吸的主要器官,正常状态下鳃组织的*COX I*表达量已较高,故刺激后表达量未见显著提高,但具体原因还有待进一步深入研究确认。

#### 参考文献:

- [1] Ostermeier C, Iwata S, Michel H. Cytochrome c oxidase. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, 6: 460-466.
- [2] 李连之, 黄仲贤. 细胞色素c氧化酶研究新进展[J]. *无机化学学报*, 2001, 17(6): 761-774.
- [3] Sugie K, Nishino I. Complex IV (cytochrome c oxidase [J]. *Nippon Rinsho*, 2002, 60 (Suppl4): 490.
- [4] Coenen M J, van den Heuvel L P, Smeitink J A. Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001, 14 (6) : 777-781.
- [5] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学下册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 118-144.
- [6] Abramson J, Svensson-Ek M, Byrne B, et al. Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2001, 1544 (1-2): 1-9.
- [7] 杨霞, 吴信忠. 赤点石斑鱼的普通变形菌病原学研究[J]. *水产科学*, 2005, 9: 5-7.
- [8] Wang L, Wu X. Identification of differentially expressed genes in lipopolysaccharide-stimulated yellow grouper *Epinephelus awoara* spleen [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23 (2): 354-363.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (金冬雁, 黎孟枫译). *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 152-159.
- [10] 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 63-93.
- [11] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nuc Acids Res*, 1994, 22: 4 673-4 680.
- [12] Bragadin M, Dell' Antone P. Mitochondrial bioenergetics as affected by cationic detergent [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1996, 30: 280-284.
- [13] Kehrler J P, Jones D P, Lemasters J J, et al. Contemporary issue in toxicology: Mechanisms of hypoxic cell injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, 160: 165-178.
- [14] Nicminon A L, Gores G J, Dawson T L, et al. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes [J]. *Biol Chem*, 1990, 265: 2 399-2 408.
- [15] 章静波, 林建银, 杨恬. 医学分子细胞生物学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002: 87-94.
- [16] Poulton J, Marchington DR. Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications [J]. *Reproduction*, 2002, 123 (6): 751-755.
- [17] Gennis R, Ferguson Miller S. Structure of cytochrome c oxidase, energy generator of aerobic life [J]. *Science*, 1995, 269 (5 227): 1 063-1 064.
- [18] 谢燕, 江海洪, 龚茜芬, 等. 大鼠脑线粒体细胞色素C氧化酶亚基转录水平的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25 (11): 987-989.
- [19] 张亚平, 施立明. 动物线粒体DNA多态性的研究概述[J]. *动物学研究*, 1992, 13: 289-298.
- [20] Gasse RB, Zhu X, McManus DP. 1999. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda) [J]. *Int J Parasitol*, 29 (12): 1 965-1 970.
- [21] Wu W, Schmidt T.R, Goodman M, et al. Molecular evolution of cytochrome c oxidase subunit I in primates: Is there coevolution between mitochondrial and nuclear genomes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2000, 17 (2): 294-304.
- [22] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidi) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 26 (3): 354-368.
- [23] Kadenbach B, Barth J, Akgün R, et al. Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1 271 (1): 103-109.
- [24] 柏干荣, 陆松敏. 线粒体 DNA 编码细胞色素氧化酶亚基基因的进展[J]. *国外医学: 分子生物学分册*, 2003, 25(6): 354-357.
- [25] Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1980, 34: 341-367.
- [26] Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, et al. Cytochrome c oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves [J]. *Biometals*, 2006, 19 (3): 237-244.
- [27] 袁志航, 文利新. 动物免疫应激研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007,

- 28(7): 63-65.
- [28] 余冰,陈代文,张克英,等. 试论免疫应激对动物生产的影响[J]. 饲料博览,2002(1): 25-27.
- [29] 李建文,陈代文,张克英,等. 免疫应激对仔猪理想氨基酸平衡模式影响的研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(1): 34-37.
- [30] 李建涛,蔡辉益,刘国华,等. 免疫应激对肉仔鸡采食量能量及氮消化率和内源氮损失的影响[J]. 河北农业大学学报,2005,28(6): 91-93.
- [31] 黄庆军,赵亚朴,甘露,等. 免疫应激对小鼠行为的影响[J]. 白求恩军医学院学报,2003(1): 4-7.

## Molecular cloning and characterization of a homologue of Cytochrome C oxidase subunit I in yellow grouper *Epinephelus awoara*

SHI Da-wei<sup>1,2</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, LOU Hui-fang<sup>1</sup>, HUANG Yan-qing<sup>1</sup>, ZHU Bao-jian<sup>1</sup>, WU Xin-zhong<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Beilun Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of China, Ningbo 315800, China)

**Abstract:** *COX I* is the subunit one of the Cytochrome c oxidase which provides a critical function during respiration by transferring electrons from Cytochrome c to oxygen and contributing to ATP generation. A *COX I* cDNA sequence (GenBank accession number: EU363802) was isolated and identified from the total RNA of *Epinephelus awoara* spleen using the combined methods of BD SMART<sup>TM</sup> cDNA synthesis and RACE-PCR. The full length sequence of *COX I* cDNA was 1 659 bp, containing 3 bp 5' UTR, 105 bp 3' UTR and an open reading frame of 1 551 bp that encodes a protein composed of 516 amino acids. The deduced molecular weight was 56.0 kDa and the theoretical pI was 6.48. The amino acid sequence of *E. awoara COX I* shared 86.5%-96.9% of residue identity with *Homo sapiens* (86.5%), *Mus musculus* (88.7%), *Danio rerio* (94.2%) and *Acanthurus lineatus* (96.9%). Semi-quantitative RT-PCR analysis was used to study the tissue distribution and expression level of mRNA coding for *COX I* and it showed that expression of *COX I* could be detected in the spleen, heart, liver, anterior kidney, kidney, muscle and gill of the normal and the formalin-inactivated *Vibrio Parahaemolyticus* vaccine-challenged groups of *E. awoara*. Following vaccine-challenges, *COX I* expression in all tissues except gill was up-regulated ( $P < 0.05$ ), compared with the normal *E. awoara*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(4): 467-476]

**Key words:** *Epinephelus awoara*; Cytochrome C oxidase; *COX I*; molecular cloning; mRNA expression; formalin-inactivated *Vibrio Parahaemolyticus* vaccine

**Corresponding author:** WU Xin-zhong. E-mail: wuxz@zju.edu.cn