

翘嘴鳊 NADPH 氧化酶三个调节亚基 cDNA 的克隆及表达特征

胡宝庆¹, 刘毅², 文春根^{1,*}

(1. 南昌大学 生命科学学院, 江西 南昌 330031; 2. 江西师范大学 生命科学学院, 江西 南昌 330022)

摘要: 吞噬细胞NADPH氧化酶能生成用于清除病原微生物的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS), 在机体的防御体系中起着非常重要的作用。该文利用RT-PCR结合RACE-PCR的方法, 对翘嘴鳊 (*Siniperca chuatsi*) NADPH氧化酶的3个调节亚基p40phox、p47phox和p67phox的cDNA进行了克隆。结果显示p40phox基因cDNA序列全长为1406 nt, 开放阅读框长度为1050 nt, 翻译成349个氨基酸; p47phox基因cDNA序列全长为1686 nt, 开放阅读框为1209 nt, 翻译成402个氨基酸; p67phox基因cDNA序列全长为2185 nt, 开放阅读框长度为1488 nt, 翻译成495个氨基酸。半定量PCR分析显示在翘嘴鳊血液、脑、鳃、性腺、心脏、头肾、肠、肾、肝、脾、胸腺组织中都能检测到这3个亚基的mRNA表达, 然而, 它们在不同组织中的表达强度具有差异。经柱状黄杆菌灭活苗FKG₄免疫后, p40phox亚基mRNA在翘嘴鳊血液和头肾中的表达量显著上升, p47phox在头肾和脾脏中的表达量显著上升, 而p67phox在血液、头肾和脾脏中的表达量均显著上升。由此推断NADPH氧化酶参与了翘嘴鳊机体的抗菌免疫应答。

关键词: 翘嘴鳊; NADPH 氧化酶; 分子克隆; 柱状黄杆菌

中图分类号: Q78; Q959.483; Q959.483.06 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)03-0250-11

cDNA Cloning and Expression Characterization of Three Regulatory Subunits of NADPH Oxidase Within Cytoplasm from Mandarin Fish, *Siniperca chuatsi*

HU Bao-Qing¹, LIU Yi², WEN Chun-Gen^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

2. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: The phagocyte NADPH oxidase plays a crucial role in host defense against invading microorganisms by catalyzing the formation of reactive oxygen species, which is the precursor of a variety of microbicidal oxidants such as hydrogen peroxide (H₂O₂). In the present study, full-length cDNAs of three regulatory subunits of NADPH oxidase, including p40phox, p47phox, p67phox were cloned from head kidney of mandarin fish utilizing the reverse transcription polymerase chain reaction and rapid amplification of cDNA ends. Sequence analysis showed that the full length cDNA of p40phox is 1406 nt, containing a 1050 nt open reading frames that encodes a 349 amino acid protein, the full length cDNA of p47phox is 1686 nt, containing a 1209 nt open reading frames that encodes a 402 amino acid protein, the full length cDNA of p67phox is 2185 nt, containing a 1488 nt open reading frames that encodes a 495 amino acid protein. Semi-quantitative RT-PCR analyses from various tissues indicated that mRNAs of the three subunits can be detected in the blood, brain, heart, spleen, kidney and thymus, but their expression intensity are different in tissues. Stimulating the mandarin fish with formalin killed *Flavobacterium columnare* G4 significantly up-regulated the expression of p40phox in blood and head kidney; and p47phox in head kidney and spleen; and p67phox in blood, head kidney and spleen. The results suggested that mandarin NADPH oxidase was involved in the immune responses against bacteria.

Key words: *Siniperca chuatsi*; NADPH oxidase; Molecular cloning; *Flavobacterium columnare*

收稿日期: 2009-09-14; 接受日期: 2009-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960296); 江西省科技攻关项目(2004)

*通讯作者 (Corresponding author), 文春根 (1963-), 男, 汉族, 江西南昌人, 教授, 主要从事水产动物疾病方面的研究。E-mail: cgwen@ncu.edu.cn

第一作者简介: 胡宝庆 (1972-), 男, 江西波阳人, 讲师, 主要从事水产动物疾病研究。E-mail: baoqinghu@sina.com

NADPH 氧化酶主要存在于中性粒细胞及其它吞噬细胞的细胞膜上, 能够产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 具有杀菌作用, 并参与宿主细胞的免疫应答(Babior, 1999)。它由位于细胞膜上和细胞质内的多种蛋白成分组成。细胞膜上的 NADPH 氧化酶成分是异源二聚体跨膜蛋白, 称为细胞色素 b558, 由 gp91phox 和 p22phox 两个催化亚基组成(Nauseef, 2004)。细胞质中的成分包括 p40phox, p47phox, p67phox 亚基及一个小分子量 GTP 结合蛋白 Rac, 这些亚基对于酶的活化起着调节作用, 吞噬细胞受到细胞因子、激素或病原微生物刺激时, 它们会装配到细胞色素 b558 上, 形成具有完整生物活性的多酶复合体(Nauseef, 2004)。人(*Homo sapiens*) (Rooyer-Pokora et al, 1986; Volpp et al, 1989; Leto et al, 1990; Wientjes et al, 1993)、鼠(*Mus musculus*) (Bjorgvinsdottir et al, 1996; Jackson et al, 1994; Mizuki et al, 1998)、野牛(*Bison bison*) (Gauss et al, 2002)和海豚(*Tursiops truncatus*) (Inoue et al, 2000, 2001)细胞膜上和细胞质中 NADPH 氧化酶的 5 个亚基均已被克隆和描述。

除 Rac 外, 鱼类 NADPH 氧化酶的 5 个亚基的 cDNA 也已从红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) (Inoue et al, 2004)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Mayumi et al, 2008)中克隆。此外, 在 NCBI 数据库中搜索到虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和香鱼(*Plecoglossus altivelis*)的这 5 个亚基的 cDNA 全序列以及大西洋鲑(*Salmo salar*)的 gp91phox、p47phox、p67phox 亚基的 cDNA 全序列。

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)在我国分布广泛, 具有较高经济价值, 享有“淡水石斑”之誉。柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)是引起淡水鱼类烂鳃病发生的病原体。本文克隆了翘嘴鳊细胞质中 NADPH 氧化酶的 3 个调节亚基基因 cDNA 全长, 并利用灭活柱状黄杆菌菌苗(FKG₄)对鳊鱼进行免疫, 检测这些亚基 mRNA 在鳊鱼不同组织中的表达情况, 以期了解鱼类呼吸爆发的机制及柱状黄杆菌疫苗的免疫途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物处理、FKG₄ 的制备及免疫注射

翘嘴鳊购自武汉市江夏区牛山湖渔场, 为人工网箱养殖, 实验前, 将购得的鱼(450±50) g 在实验室自动充气水循环系统中人工饲养 14 d, 水温保

持(25±1) °C, 每日投喂小杂鱼作为饲料, 选取健康的鱼作实验用。

取 25 °C 振荡培养 36 h 的柱状黄杆菌培养液 100 mL, 10 000 g 离心 10 min, 沉淀用无菌 PBS (pH7.2) 清洗 3 次, 用含 1.0% 福尔马林的 PBS 重悬, 室温下灭活 24 h, 10 000 g 离心 10 min, PBS 清洗两次, 离心, 用无菌 PBS 稀释到约 1.0×10⁸ cell s/mL, 置于 4 °C 冰箱备用。

免疫注射前, 将 FKG₄ 菌苗取出升温至室温, 实验鱼用 MS222 溶液(1 mg/L)麻醉, 分为 2 个组, 每组 6 条, 一组每尾鱼经胸鳍下注射 0.1 mL 的 FKG₄, 另一组则每尾注射同等剂量的灭菌 PBS 作为对照组, 然后继续饲养 7 d 取样。

1.2 主要试剂及菌株

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, Ex-Taq 聚合酶, DL-2000 分子质量标准, PMD-18T 载体、pTA2 载体均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司, 其它试剂均为国产分析纯。菌株 *F. columnare G4* 由中国科学院水生生物研究所提供, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由本实验室保存。

1.3 引物的设计与合成

根据已报道的红鳍东方鲀和虹鳟的 NADPH 氧化酶 p40phox、p47phox 和 p67phox 亚基 cDNA 序列设计简并引物, 特异性引物根据扩增出来的中间片段设计, 所用引物均由上海华诺公司合成(表 1)。

1.4 总 RNA 的提取和 SMART cDNA 的合成

分别取翘嘴鳊头肾和脾脏混合, 按 Trizol 试剂盒说明书介绍的方法提取组织的总 RNA。琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的质量。按照 Clontech 公司的 SMART RACE cDNA Amplification Kit 方法进行第一链 cDNA 合成。具体操作按说明书进行。

1.5 各亚基中间片段及全长 cDNA 的扩增

根据表 1 所列引物, 以第一链 cDNA 做为模板, 先用简并引物扩增出基因的 cDNA 片段, 再根据各个基因对应的特异性引物, 用 5'-RACE 引物和 SMART 5'锚定引物(5'-AAGCAGTGGTAACAA-CGCAGAGTACGCGGG-3')扩增基因的 5'端, 用 3'-RACE 引物和 SMART 3'锚定引物(5'-AAGCAG-TGGTAACAACGCAGAGTACT30VN-3')扩增基因的 3'端。扩增产物经克隆、测序后, 拼接基因的 5'端和 3'端序列, 获得各基因的全长 cDNA 序列。

1.6 基因的氨基酸推测和序列比较分析

将测序所得到的 cDNA 序列用 NCBI 网站(<http://>

//www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)的 BLASTN、BLASTX 和 TBLASTX 软件进行同源基因的搜索, 查找与其相关的同源序列; 氨基酸序列的推断和疏水性分析通过 ExPASy 网站上(<http://www.expasy.org/>)的软件完成; 氨基酸序列同源性比较由 ClustalW1.8 程序完成。结构域分析用 SMART 软(<http://smart.embl-heidelberg.de>)预测, 按照 MEGA 3.1 中的邻接法 (neighbor-joining method)构建基于推导氨基酸的无根系统发生树, 树的可靠性以 1 000 次 bootstrap 重复来评判。

1.7 组织表达与实时荧光 PCR

利用反转录 PCR 方法检测翘嘴鲌 NADPH 氧化酶各调节亚基在鱼体组织中的表达。提取健康鱼血液、脑、鳃、性腺、心脏、头肾、肠、肾、肝、脾、胸腺组织的总 RNA 反转录成 cDNA, 然后将它们稀释成相同的浓度, 并以其为模板进行 PCR 反应。反应产物的电泳条带的亮度强弱指示各亚基基因表达的高低。

用实时荧光 PCR 方法定量分析翘嘴鲌 NADPH 氧化酶各调节亚基在经 FKG4 免疫注射后的鱼体组织中表达变化。免疫注射 FKG4 后 7 d 提取免疫组和对照组翘嘴鲌血液、鳃、头肾、肠及胸腺和脾脏中的总 RNA, 逆转录成 cDNA。用 Real-time PCR 引物扩增各基因序列 (表 1), PCR 产物用 DNA 胶纯化试剂盒纯化后克隆进入载体 pTA2。质粒 DNA 经纯化后用于制作标准浓度曲线, 曲线的斜率应在 -3.6 与 -3.2 之间, 相关系数应大于 0.96。cDNA 质粒溶液的浓度以 OD₂₆₀ 光密度值下进行测定, 相应的基因拷贝数按 1 μg 的 1000 bp DNA 约等于 9.1×10^9 分子的公式进行换算 (Overbergh et al, 2003)。定量实时荧光 PCR 在 Chromo4 Real-Time (MJ Research) 上进行; 分别将翘嘴鲌 NADPH 氧化酶 3 个调节亚基在各组织中的基因拷贝数除以 β-actin 基因的拷贝数以得到均一化, 所得比值用来进行统计分析, 免疫组和对照组之间特异基因表达的差异用 *t*-检验分析, *P* < 0.05 为显著性差异。

表 1 克隆及检测翘嘴鲌 NADPH 氧化酶 p40phox、p47phox 和 p67phox 亚基的引物
Tab. 1 Primers used in cloning and detecting p40phox, p47phox and p67phox subunit of NADPH oxidase of *Siniperca chuatsi*

引物名 Name	序列 Sequence (5'-3')	用途 Application
P40-J-F	ATGTCGCTGCCGCGGCAGT(C)TA	简并引物, 正向
P40-J-R	TAATGATTTTCAGAAAG(C)GA	反向
P47-J-F	GTCAGGCATGTGG(C)AGT(C)TGCTG	正向
P47-J-R	GATGAGT(C)TCAGGA(G)CTGGGCCG	反向
P67-J-F	ATGTCT(A)TTTC(G)TGG(A)AC(T)ACTCT	正向
P67-J-R	AATTG(A)TAAGGAACAAGTCCC	反向
P40-N-F	CATTAAGCCCCTCCCAGAGAGT	3'-RACE 反应
P40-N-R	CGGAGACGCCTGAGGGCTCGCAG	5'-RACE 反应
P47-N-F	CCGCTGAGGGAGAGGAAGAACCA	3'-RACE 反应
P47-N-R	GAGGTCGCTCCATTTACCATCA	5'-RACE 反应
P67-N-F	AGGGTCTGACAACCTGGGCATCT	3'-RACE 反应
P67-N-R	ATCCTGAGTGCTTCTGACAAATC	5'-RACE 反应
P40-Q-F	TGGCAATAAGCGGGAGAT	普通与 Real-time PCR, 正向
P40-Q-R	GGTAGGTGGACGGAGACG	反向
P47-Q-F	CTGCCACTCTCATCAAC	正向
P47-Q-R	AAGTCTGCGACCACTCTGT	反向
P67-Q-F	AAGTGTGTGGAGTTGTGCC	正向
P67-Q-R	TGATTGTAATCGCCTTCGTG	反向
β-actin-F	GACATCAAGGAGAAGCTGTGCT	正向
β-actin-R	ATGCTGTTGTAGGTGGTCTCGT	反向

2 结果

2.1 翘嘴鳊 NADPH 氧化酶各调节亚基的 cDNA 全长及特征

翘嘴鳊 NADPH 氧化酶 3 个调节亚基 cDNA 的全长序列登录号为 DQ341372 (p40phox)、DQ341374 (p47phox) 和 DQ341373 (p67phox)。p40phox 亚基 cDNA 序列全长为 1406 bp, 开放阅读框长度为 1050 bp, 5'UTR 长度为 138 bp, 3'UTR 长度为 218 bp 包含 mRNA 不稳定信号、加尾信号和 poly(A) 尾各 1 个。由 cDNA 序列推断的蛋白包含 349 个氨基酸, 预测相对分子质量为 40.4 k, 理论 pI 为 6.50。p47phox 亚基 cDNA 序列全长为 1686 bp, 开放阅读框长度为 1209 bp, 5'UTR 长度为 296 bp 包含 1 个微卫星序列(AC), 3'UTR 长度为 181 bp 包括 mRNA 不稳定信号、加尾信号、poly(A) 尾各 1 个。该 cDNA 序列编码 402 个氨基酸, 预测其相对分子质量为 46.2 k, 理论 pI 为 9.27。p67phox 亚基 cDNA 序列全长为 2 185 bp, 开放阅读框长度为 1488 bp, 5'UTR 长度为 59 bp, 3'UTR 长度为 638 bp 包括 1

个 mRNA 不稳定信号、3 个加尾信号和 1 个 poly(A) 尾。该 cDNA 序列翻译成 495 个氨基酸, 预测其相对分子质量为 55.4 k, 理论 pI 为 5.81。3 个 cDNA 序列推断的蛋白质序列均无信号肽和跨膜区。

2.2 翘嘴鳊与其他动物的对应调节亚基的氨基酸序列比对及进化树分析

用 BLAST 程序对翘嘴鳊 NADPH 氧化酶 3 个调节亚基基因编码的蛋白质进行同源性搜索 (表 2)。翘嘴鳊 NADPH 氧化酶的 3 个亚基与红鳍东方豚和虹鳟的同源亚基的氨基酸序列同源性在 65.9%~82.5% 之间, 而与人、鼠、野牛、海豚等哺乳动物的对应亚基同源性在 44.2%~55.8% 之间。

运用 ExPASy 网站的软件分析各亚基的结构与功能域发现, 翘嘴鳊的 p40phox 蛋白含有 PX 结构域(His18-Thr138)、SH3 结构域(Pro172-Lys227)、PB1(Leu246-Ala339)结构域各 1 个。P47phox 蛋白序列包括 PX 结构域(Asn4-Arg121)和 SH3 结构域(Glu200-Gly255) 各 1 个。p67phox 蛋白包括 3 个 TPR 基序(motif) (Ser37-Leu70; Ala71-Asn104; Cys121-Ala154)、1 个 PB1 结构域(Gln347-

表 2 由翘嘴鳊 p40phox、p47phox 和 p67phox 亚基的 cDNA 推断的氨基酸序列与其他动物对应亚基氨基酸比较
Tab. 2 Comparison of the amino acid homology among deduced amino acid sequences of p40phox, p47phox and p67phox subunit cDNA from *Siniperca chuatsi* and homologous genes from other species

物种 species	同源基因 Homologous gene	GenBank 登陆号 Accession number	氨基酸同源性 (%) Amino acid homology
人 <i>Homo sapiens</i>	p40phox	BAA89792	54.6
	p47phox	NP_000256	48.5
	p67phox	NP_000424	45.1
野牛 <i>Bison bison</i>	p40phox	AAL11887	55.8
	p47phox	AAL11888	49.2
	p67phox	AAL11889	44.2
鼠 <i>Mus musculus</i>	p40phox	AAC53122	54.9
	p47phox	AAF90134	50.0
	p67phox	BAA25650	45.3
海豚 <i>Tursiops truncatus</i>	p40phox	BAB11805	55.5
	p47phox	BAA96544	50.6
	pP67phox	BAA96543	45.7
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	p40phox	BAD60782	73.4
	p47phox	BAD60781	65.9
	p67phox	BAD60783	67.5
红鳍东方豚 <i>Takifugu rubripes</i>	p40phox	BAC79223	82.5
	p47phox	BAC79222	74.9
	p67phox	BAC79221	73.3

		PX	
Mandarin	-MSLPRQLRGESDFDQLPDIPIVTTATADIEEKKGFIDYFMFVIEVKTGGGSKYLIYRRY		59
Human	-MAVAQQLRAESDFEQLPDDVAISANIADIEEKRGFTHFVVFVIEVKTGGGSKYLIYRRY		59
Bison	-MAKAQQLRAESDFDQLPDDIAISANIADIEEKRGFTHFVVFVIEVKTGGGSKYLIYRRY		59
Mouse	-MALAQQLRSEDFEQLPDDVAISANIADIEEKRGFTHFVVFVIEVKTGGGSKYLIYRRY		59
Dolphin	-MATAQQLRAESDFNQLPDDIATSANIADIEEKRGFTHFVVFVIEVKTGGGSKYLIYRRY		59
Rainbow trout	MSSLPKQLRDESDFDQLPDIPIVTTATADIEEKKGFIDYRFVIEVTRGGGSKYLIYRRY		60
Fugu	-MSL-QQLRDESDFDQLPDIINVAVTTATADIEEKKGFIDYRFVIEVKTGGGSKYLIYRRY		58
	: :*** ***:*** :.. :*.*****:* .. :***:*****:*****		
Mandarin	REFFNLHQILESKEYSPEDPERPGPNSCILFSPGKVFIGNKREIAESRIPELNTYMKRLI		119
Human	RQFHALQSKLEERFGPDS--KSSALACTLPTLPKAVYVGVKQIEAEMRIPALNAYMKSLI		117
Bison	RQFYALQSKLEERFGQES--KTSPLTCILPTLPKAVYVGVKQIEAEMRIPALNAYMKHLI		117
Mouse	RQFYALQSKLEERFGPES--KNSPFTCNLPTLPKAVYMGAKQIEAETRIPALNAYMKNL		117
Dolphin	RQFYALQSKLEERFGPEN--KASPYICILPTLPKAVYVGVKQIEAEMRIPALNAYMKHLI		117
Rainbow trout	EQFFNLHSDLELKHSPGDQGTSGPNTCRLPTLPKGVFIGNKKEIAENRIPELNTYMKRLI		120
Fugu	REFFTLHQTLSEKYSPEESDRQGQNTCPPLPGKVFIGNKREIAEGRIPELNTYMKRLI		118
	:*. *:. ** :.. . * **:* **:* * **:* ** * **:* ** * **:* ** *		
Mandarin	GLPTWLLLEALRMFFYQTDQDSQHELRLRRLRPTRKVKTVKP--KMDLFSSPRAEV		176
Human	SLPVVWLMDVDVRIFFYQSYDSEQVPQALRRLRPTRKVKSVSPQGNVDRMAAPRAEA		177
Bison	SLPIVWLMDVDVRIFFYQSYDAEQVPQALRRLRPTRRVKSESPQAAGIDRMAAPRAEA		177
Mouse	SLPVCVWLMDVDVRIFFYQSYDAEQVPQALRRLRPTRKIKGVSPQGAIMDRMAAPRAEA		177
Dolphin	SLPIVWLMDVDVRIFFYQSYDAEQVPQALRRLRPTRKVKSTSPQAGFDRMAAPRAEA		177
Rainbow trout	GLPTWVLLDDDIRMFFYQTESDSQHPRALRRLRPTRKVKTVKTN--QTDVSSPRAEV		178
Fugu	GLPAWFLDDTLRMFFYQTDQDSQQPRALRRLRPTRKVKTIKP--KMDLFSSPRAEV		175
	.*. *:. :*:***: *:. :***** **:* .. * : *****		
	SH3		
Mandarin	IFDFRGNKAEINLKRGEVIFLLQRVNADWLEGTVNNQTFIPQSFVKIIRKLPESDTEG		236
Human	LFDFTGNSKLELNFKAGDVIFLLSRINKDWLEGTVRGATGIFPLSFVKILKDFPEEDDPT		237
Bison	LFDFTGNSKHELNFKAGDVIFLLSRINKDWLEGTVRGTTGIFPVSFVKILKDFPEEDDPT		237
Mouse	LFDFTGNSKLELNFAGDVIFLLSKINKDWLEGTSGATGIFPFSFVKILKDFPEDEDTT		237
Dolphin	LFDFTGNSKLELNFKAGDVIFLLSRINKDWLEGTVRGTTGIFPVSFVKILKDFPEEDDPT		237
Rainbow trout	VDFDSGSRLELSMKAGEVIFLLRRVNTDWLEGTVSNRTGIFPFSFVKIIRKLPESDSDG		238
Fugu	MFDFRNGKKEELNKKGEVIFLLQRVNADWLEGTVNNQTFIPQSFVKIIRKLPDSNTEG		235
	:*** *.. :*. * :***** :*: ***** . ***** **:* * :.. :		
Mandarin	D----GEGN-TYSLRCFLMTPPGVDTRDVCVQENLTIQPRYKDLLSRMRNVFKED-DI		289
Human	N-----WLRYYYYEDTISTIKDIAVEEDLSSTPLLDLLELRREFQRE-DI		283
Bison	N-----WLRYYYYEDTISTIKDIAVEEDLSSTPLFKDLLELMRREFQRE-DI		283
Mouse	N-----WLRCYFYEDTGKTIKIDIAVEEDLSSTPLFKDLLELMRREFQRE-DI		283
Dolphin	N-----WLRYYYYEDTISTIKDIAVEEDLSTPLFKDLLELMRREFQRE-DI		283
Rainbow trout	ESGGASGKAGSYSCLRCYLLTPQGVDRDVCVEEDISTQPSYKELLARMRDVKVDGNI		298
Fugu	E----GEGH-TYSLRCFLMTPPGVDTRDVCVEEELTQPTYKDLLFHRMRNVFKVN-DI		288
	: :*.:.. * **:* * * : : *		
	PC motif		
Mandarin	ALNYRDPEGDLIRLDDVQLMIKESKGGQGVKRPVNFQFWELHVTLASDFSVYNAEA		349
Human	ALNYRDAEGDLVRLSDEVDALMVRAKGLPSQKR---LFPWKLHITQKDNRYVYNTMP		339
Bison	ALNYRDAEGDLVRLSDEVDKLMVRAKGLPSQKR---LFPWKLHVTQEDNYKYNTVTP		339
Mouse	ALSYQDAEGDLVRLSDEVDGLMVRAKGLPSQKR---LFPWKLHVTQKDNYSVYNTVTP		339
Dolphin	ALNYQDAEGDLVRLSDEVDRLMVKWTGLPSQKH---LFPWKLHITQEDNYKYNTVTP		339
Rainbow trout	ALNYRDPEGDLVRLDDGDVALMVADGGRQSKVVRPNVNFQFWELHVTAAASDLVSYNTEI		358
Fugu	ALNYRMEGDLIRVDDEDIQLMIKESKGGQESKIKRPVNFQFWELYVTLASDFSVYNTL		348
	**.*: * **:* **:* **:* :* : : * **:* **:* : * **:		

图 1 翘嘴鲮 p40phox 与其他脊椎动物 p40phox 之间的氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of p40phox amino acid sequences of *Siniperca chuatsi* with that of other vertebrates

*: 相同氨基酸; . (或): 相似氨基酸; PX 结构域; 实线框: SH3 结构域; 虚线框: PC motif, 假定的 p67phox 结合位点; 向下箭头: 推定的磷酸化位点。用于比较的氨基酸序列 GenBank 登录号列于表 2。

Amino acid residues shared by all the sequence are denoted by an asterisk. Similar amino acids residues are denoted by (. or :). Dashed boxes indicate predicted PX domain, Solid box indicates predicted SH3 domain, and PC motif indicates potential putative p67phox binding site. Under arrows indicate putative phosphorylation sites. GeneBank accession numbers of all used amino acid sequences are shown in Tab. 2.

图 2 翘嘴鳊 p47phox 与其他脊椎动物 p47phox 之间的氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of p47phox amino acid sequences of *Siniperca chuatsi* with that of other vertebrates

实线分别指示可能的富含脯氨酸区(PXXP)(a)、可能的细胞色素 b558 结合位点(b)及推定的与 p40phox SH3 结构域结合的 PRR 位点(c)。Solid lines indicate the potential amino-terminal proline-rich SH3 domain binding site (a), the potential putative p67phox/flavocytochrome b binding site (b), and proposed to associate with p67phox SH3-C domain binding site (c).

Lys425) 和 2 个 SH3 结构域 (Glu243-Glu298; Ile436-Pro491)。另外, 通过 CLUSTAL 比对显示这些亚基的结构域与人、鼠、野牛、海豚等哺乳动物对应的亚基蛋白质序列的结构域和功能位点基本上匹配(图 1—3), 说明这些亚基的功能与哺乳动物对应的亚基相似。

对 7 种动物 NADPH 氧化酶 3 个调节亚基建立 NJ 系统树(图 4a, b, c), 结果显示鱼类独立于哺乳类动物之外, 聚在同一枝上。翘嘴鳊 NADPH 氧化酶 3 个调节亚基在进化上与红鳍东方鲀的亲缘关系最近。

2.3 翘嘴鳊 p40phox、p47phox 和 p67phox 亚基组织表达及免疫刺激后的基因表达

翘嘴鳊 NADPH 氧化酶 3 个调节亚基在鱼体血液、脑、鳃、性腺、心脏、头肾、肠、肾、肝、脾、胸腺组织中的基因表达强度不同(图 5)。在 11 种组织中都能检测到各亚基的基因表达。p40phox 在肝脏组织中表达最弱, 在其他 10 种组织中表达都较强。p47phox 在头肾、鳃、心脏、脾组织中表达较强, 在其余 7 种组织中的表达较弱; p67phox 在头肾、鳃、脾组织中表达较强, 在血液、脑、性腺、心脏、肠、肾、胸腺组织中表达较弱, 然而, 在肝脏组织中几乎检测不到。

经 FKG4 免疫后, 翘嘴鳊 3 个调节亚基在血液、鳃、头肾、肠、脾及胸腺组织中的表达也有差异(图 6)。在对照组鳊鱼的头肾中, 3 个亚基的表达量都很高。经过免疫注射 7d 后, p40phox 在鳊鱼血液和头肾组织中的表达显著上升; p47phox 在头肾和脾组织中的表达显著上升; p67phox 在血液、头肾和脾组织中的表达显著上升; 然而, 3 个调节亚基在鳃、肠及胸腺中的表达均无显著地变化。

3 讨论

翘嘴鳊 p40phox 氨基酸序列长度比红鳍东方鲀 p40phox 长 1 个氨基酸, 比虹鳟 p40phox 短 9 个氨基酸, 但比人、野牛、鼠、海豚等哺乳动物 p40phox 长 10 个氨基酸; p47phox 的氨基酸序列长度比红鳍东方鲀 p47phox 短 21 个氨基酸, 比虹鳟 p47phox 短 9 个氨基酸, 比人、野牛、鼠和海豚等哺乳动物

p47phox 分别长 12、10、12 和 11 个氨基酸; p67phox 的氨基酸序列长度与红鳍东方鲀 p67phox 相同, 比虹鳟 p67phox 短 9 个氨基酸, 比人、野牛、鼠、海豚等哺乳动物 p67phox 分别短 21、22、20、21 个氨基酸。虽然翘嘴鳊 NADPH 氧化酶的 3 个调节亚基 p40phox、p47phox 和 p67phox 的氨基酸序列与人、鼠、野牛及海豚的相应亚基长度不一, 且相似性较低, 但是它们都有类似的结构和功能域以及相互作用位点。人的 p40phox 和 p47phox 的 PX 结构能有选择地识别 PtdIns(3)P 和 PtdInsP2, 这有助于它们在活化后被锚定到细胞膜上, 进而装配成有活性的多酶复合体, Arg57、Arg58、Tyr59、Arg105 残基对于维持这一功能是必要的(Nauseef, 2004; Karathanassis et al, 2002)。这一结构在翘嘴鳊以及其它动物内都存在, 并且这些位点均保守。人的 p40phox 的 SH3 结构域能够与 p47phox 的 C 端的 PRR 结构相互作用, PC 基序是与 p67phox 发生作用的部位 (Nauseef, 2004)。翘嘴鳊也像其他动物一样均具有类似的结构。人的 p67phox 的 TPR 结构与 Rac 亚基相互作用(Nauseef, 2004), 这一结构在其他动物中均存在。由此推断翘嘴鳊与人的 NADPH 氧化酶亚基都拥有相似的活化机制。

哺乳动物 p67phox 亚基的脯氨酸富裕区(PRR)是与亚基 p47phox 相互作用的重要区域(Wientjes et al, 2003), 而鱼类的该区域都不保守。由此推测在鱼类的 p67phox 亚基与 p47phox 亚基的相互作用可能比哺乳动物弱。人的 p47phox 的 PX 结构有两个可区分的碱性区域, 在空间结构上呈两个口袋状, 能识别磷脂酰肌醇, 有助于 p47phox 在质膜上的锚定; Arg43、Phe44 和 Arg90 是第一个碱性袋必需的; Arg70、Lys55 和 His51 对第二个碱性袋的存在是必需的, 两个疏水性残基 Ile65 与 Trp80 在结合时插入到质膜或溶酶体膜上(Karathanassis et al, 2002; Stahelin et al, 2003)。虽然预测的翘嘴鳊 p47phox 蛋白的 Ile65、Trp80 残基和 Arg70、Lys55、His51 很保守, 但是 Arg43、Phe44 残基分别被 Thr 和 Tyr 残基替代。因此, 推测翘嘴鳊 p47phox 的 PX 结构的第一个碱性袋可能不存在, 表明 p47phox 结合到质膜或溶酶体膜上的能力比哺乳动物要弱。过去认

图 3 翘嘴鳊 p67phox 与其它脊椎动物 p67phox 之间的氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of p67phox amino acid sequences of *Siniperca chuatsi* with that of other vertebrates
实线分别指示可能的 Rac 结合位点(a)、激活域(b)及富含脯氨酸 SH3 结构域的结合位点(c)。
Solid lines indicated the potential Rac binding site (a), active domain (b), and proline-rich, SH3 domain binding site (c).

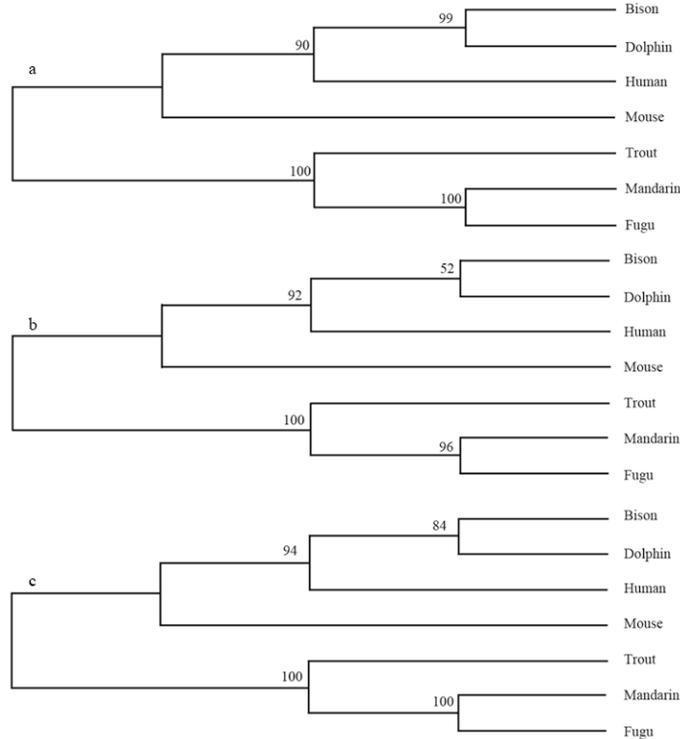


图 4 用 7 种动物 p40phox(a)、p47phox(b)、p67phox(c)亚氨基酸序列构建的 NJ 系统树
Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from amino acid sequences of subunits of p40phox(a), p47phox(b), p67phox(c) from seven animals

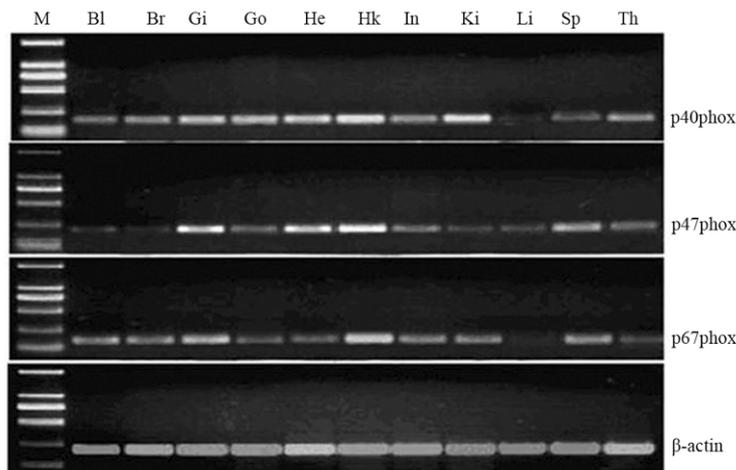


图 5 翘嘴鳊 p40phox, p47phox, p67phox 亚基在不同组织中的基因表达
Fig. 5 Expression of *Siniperca chuatsi* p40phox, p47phox, p67phox transcripts in a variety of tissues
M: DNA 标记; Bl: 血液; Br: 脑; Gi: 鳃; Go: 性腺; He: 心脏; Hk: 头肾; In: 肠; Ki: 肾; Li: 肝; Sp: 脾; Th: 胸腺。
M. Markers; Bl, blood; Br, brain; Gi, gill; Go, gonad; He, heart; Hk, head kidney; In, intestine; Ki, kidney; Li, liver; Sp, spleen; Th, thymus.

为 p47phox N 端 PX 结构域中的 PXXP 结构域起着自动抑制的作用, 它能与 p47phox C 端的 SH3 区域相互作用, 掩盖了磷脂酰肌醇结合位点, 因而阻止

了细胞质亚基复合物与膜的结合 (Hiroaki et al, 2001)。最近资料认为 p47phox 的两个 SH3 结构能形成一个小沟, p47phox 的碱性区域被掩盖在这个

小沟内, 在细胞静息期, 小沟中保守的 Trp193 和 Trp263 残基与碱性区域的核心结构(296~304 残基)相互作用, 从而起到自动抑制作用, 这 2 个 SH3 对于维持这种作用都是必需的(Groemping & Rittinger, 2005)。红鳍东方鲀、虹鳟的 p47phox 像其他动物一样, 都包含 2 个 SH3 结构域 (Inoue et al, 2004), 但是翘嘴鲌 p47phox 仅有 1 个 SH3 结构, 而且 Trp193 残基缺失, 因此推测翘嘴鲌碱性区域与 SH3 结构域之间的相互作用可能不存在或很弱, 它的分子间自动抑制作用可能是由 PXXP 与 SH3 区域相互作用造成。

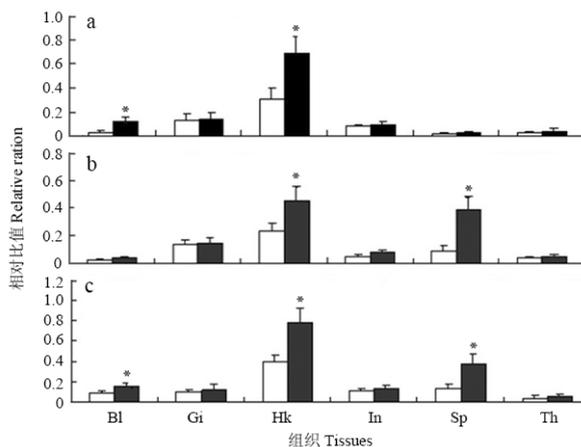


图 6 翘嘴鲌 p40phox (a)、p47phox (b) 及 p67phox (c) 在免疫鱼(■)与对照鱼(□) 6 种组织中的表达

Fig. 6 Expression of *Siniperca chuatsi* p40phox (a), p47phox (b) and p67phox (c) in 6 tissues of vaccinated (■) and control fish (□)

*: 免疫组与对照组之间有显著差异。

Column bar with an asterisk (*) indicates the value is significantly different between vaccinated and control fish.

磷酸化作用被认为是 NADPH 氧化酶活化过程中的一个关键的事件。大多数的亚基(除 Rac 和 gp91phox)在活化过程中都显示不同程度的磷酸化, 人的 p47phox 有 11 处磷酸化位点, 分别位于丝氨酸 303、304、310、315、320、328、345、348、359、370 和 379 (Groemping & Rittinger, 2005)。p40phox

有 2 处磷酸化位点, 位于 Thr154 和 Ser315(Groemping & Rittinger, 2005), p67phox 仅确定 Thr233 发生磷酸化(Groemping & Rittinger, 2005)。翘嘴鲌的这些亚基绝大多数磷酸化位点都很保守, 然而, p40phox 的 Gly321 代替了相应位点的 Ser315; p47phox 的 Ser345、Ser359 分别被 Ala、Lys 代替; p67phox 中 Thr233 被 Glu233 取代, 由此表明翘嘴鲌 NADPH 氧化酶 3 个亚基的磷酸化作用比哺乳动物弱。

鱼类脾脏的椭圆体、头肾中的造血组织、心脏的围心腔及血液等组织中含有较为丰富的吞噬细胞(Ellis, et al, 1976)。鳃、肠作为鱼类主要的黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue), 也含有较为丰富的吞噬细胞 (McMillan et al, 1997; Lin et al, 1998)。这些吞噬细胞都能够产生呼吸爆发(respiratory burst) (Lin et al, 1999; Clerton et al, 1998)。因此, 翘嘴鲌的 3 个亚基的 mRNA 在头肾、脾脏、血液中表达量较高, 这与鲫鱼和红鳍东方鲀的表达模式是一致的(Inoue et al, 2004; Mayumi et al, 2008)。即使在同一组织中, 三个亚基的 mRNA 表达量也有些差异, 可能是由于各亚基基因的转录时间差异造成的。利用 LPS 体外刺激人或红鳍东方鲀的粒细胞 6~24 h 后, NADPH 氧化酶的各亚基中, 均只有 p47phox 的 mRNA 表达显著上升, 其他亚基的 mRNA 表达无明显变化(Inoue et al, 2004; Cassatella et al, 1991)。然而, 用 FKG4 对翘嘴鲌进行免疫刺激后发现, 不仅 p47phox 在头肾、脾中的表达显著上升, 而且 p40phox 和 p67phox 在头肾、脾和血液中的表达也显著上升。这可能是由于活体免疫刺激了鱼体的这些主要免疫器官, 从而导致组织中粒细胞含量增多; 在鳃、肠、胸腺中的表达变化不显著, 可能是由于这些组织在鱼体免疫系统中处于次要地位。

致谢: 本研究得到了中国科学院水生生物研究所聂品实验室的帮助, 在此表示感谢!

参考文献:

- Babior BM. 1999. NADPH oxidase: An update [J]. *Blood*, **93**(5): 1464-1476.
- Bjorgvinsdottir H, Zhen L, Dinuer MC. 1996. Cloning of murine gp91phox cDNA and functional expression in a human Xlinked chronic granulomatous disease cell line [J]. *Blood*, **87**(5): 2005-2010.
- Cassatella MA, Bazzoni F, Amezaga MA, Rossi F. 1991. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components[J]. *Biochem Soc Trans*, **19**(1): 63-67.
- Clerton P, Troutaud D, Deschaux P. 1998. The chemiluminescence response of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **8**: 73-76.
- Ellis AE, Munroe ALS. 1976. Defence mechanisms in fish. 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected

- particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) [J]. *J Fish Biol*, **8**: 67-78.
- Gauss KA, Bunger PL, Siemsen DW, Young CJ, Nelson-Overton L, Prigge JR, Swain SD, Quinn MT. 2002. Molecular analysis of the bison phagocyte NADPH oxidase: Cloning and sequencing of five NADPH oxidase cDNAs[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, **133**(1): 1-12.
- Groemping Y, Rittinger K. 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective [J]. *Biochem J*, **386** (Pt3): 401-416.
- Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H, Kohda D. 2001. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain [J]. *Nat Struct Biol*, **8** (6): 526-530.
- Inoue Y, Itou T, Jimbo T, Sakai T, Ueda K, Imajoh-Ohmi S, Iida T. 2000. Molecular cloning and identification of bottle-nosed dolphin flavocytochrome b gp91phox and p22phox subunits[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, **76**(1-2): 137-150.
- Inoue Y, Itou T, Jimbo T, Sakai T, Ueda K, Imajoh-Ohmi S. 2001. Molecular cloning and identification of bottle-nosed dolphin p40(phox), p47(phox) and p67(phox) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, **78**(1): 21-33.
- Inoue Y, Suenaga Y, Yoshiura Y, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T. 2004. Molecular cloning and sequencing of Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) NADPH oxidase cDNAs[J]. *Dev Comp Immunol*, **28**(9): 911-925.
- Jackson SH, Malech HL, Kozak CA, Lomax KJ, Gallin JI, Holland SM. 1994. Cloning and functional expression of the mouse homologue of p47phox [J]. *Immunogenetics*, **39**(4): 272-275.
- Karathanassis D, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W, Williams RL. 2002. Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction [J]. *EMBO J*, **21**(19): 5057-5068.
- Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JM, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JI, Malech HL. 1990. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src [J]. *Science*, **248**(4956): 727-730.
- Lin SH, Davidson GA, Secombes CJ. 1998. Morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon [J]. *J Fish Biol*, **53**: 560-568.
- Lin SH, Ellis AE, Davidson GA, Secombes CJ. 1999. Migratory, respiratory burst and mitogenic responses of leucocytes isolated from the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **9**: 211-226.
- Mayumi M, Takeda Y, Hoshiko M, Serada K, Murata M, Moritomo T, Takizawa F, Kobayashi I, Araki K, Nakanishi T, Sumimoto H. 2008. Characterization of teleost phagocyte NADPH oxidase: molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) phagocyte NADPH oxidase[J]. *Mol Immunol*, **45**(6): 1720-1731.
- McMillan DN, Secombes CJ. 1997. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes(IEL) and measurement of their cytotoxic activity [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **7**: 527-541.
- Mizuki K, Kadomatsu K, Hata K, Ito T, Fan QW, Kage Y, Fukumaki Y, Sakaki Y, Takeshige K, Sumimoto H. 1998. Functional modules and expression of mouse p40phox and p67phox, SH3-domain-containing proteins involved in the phagocyte NADPH oxidase complex [J]. *Eur J Biochem*, **251**(3): 573-582.
- Nauseef WM. 2004. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase [J]. *Histochem Cell Biol*, **122**(4): 277-291.
- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression[J]. *J Biomol Tech*, **14**(1): 33-43.
- Rooyer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. 1986. Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location[J]. *Nature*, **322**(6074): 32-38.
- Stahelin RV, Burian A, Bruzik KS, Murray D, Cho W. 2003. Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox [J]. *J Biol Chem*, **278**(16): 14469-14479.
- Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. 1989. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**(18): 7195-7199.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. 1993. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains [J]. *Biochem J*, **296**(Pt3): 557-561.
- Wientjes FB, Segal AW. 2003. PX domain takes shape [J]. *Curr Opin Hematol*, **10** (1): 2-7.