

学校编码: 10384
学号: 22320131151425

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

日本囊对虾 MjML 基因的克隆与表达研究

The cloning, expression and characterization of the
Marsupenaeus japonicus ML gene (MjML)

徐伊桦

指导教师姓名: 苏永全教授
专业名称: 海洋生物学
论文提交日期: 2016年05月
论文答辩时间: 2016年05月
学位授予日期: 2016年 月

2016年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

| | |
|--|-----------|
| 缩略词中英文对照表..... | I |
| 摘要..... | II |
| Abstract..... | IV |
| 第一章 绪论 | 1 |
| 1.1 日本囊对虾简介..... | 1 |
| 1.1.1 分类学地位与形态学特征..... | 1 |
| 1.1.2 分布和习性..... | 1 |
| 1.1.3 繁殖和生活史..... | 2 |
| 1.1.4 两种形态变异类型..... | 2 |
| 1.1.5 养殖与病害..... | 3 |
| 1.1.6 先天免疫..... | 3 |
| 1.2 ML 家族蛋白的研究进展..... | 4 |
| 1.2.1 ML 家族蛋白结构与功能..... | 4 |
| 1.2.2 脊椎动物中 ML 家族蛋白研究进展..... | 5 |
| 1.2.3 无脊椎动物中 ML 家族蛋白的研究进展..... | 10 |
| 1.3 本研究的目的是和意义..... | 15 |
| 1.4 实验技术路线..... | 16 |
| 第二章 日本囊对虾 MjML 基因的克隆与组织表达分析 | 17 |
| 2.1 实验材料..... | 17 |
| 2.1.1 实验动物..... | 17 |
| 2.1.2 实验用仪器..... | 17 |
| 2.1.3 相关试剂、载体和菌株..... | 18 |
| 2.1.4 相关溶液的配制..... | 19 |
| 2.2 实验方法..... | 19 |
| 2.2.1 总 DNA 的提取..... | 19 |
| 2.2.2 总 RNA 的提取..... | 20 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 2.2.3 cDNA 第一链合成 | 20 |
| 2.2.4 3'RACE 模板制备 | 21 |
| 2.2.5 MjML cDNA 及基因组 DNA 的克隆 | 22 |
| 2.2.6 生物信息学分析 | 25 |
| 2.2.7 实时荧光定量 PCR | 26 |
| 2.3 结果 | 27 |
| 2.3.1 MjML 序列分析 | 27 |
| 2.3.2 序列比对及系统发生树 | 28 |
| 2.3.3 MjML 的组织表达 | 31 |
| 2.3.4 早期幼体发育过程中 MjML 表达量变化 | 32 |
| 2.4 讨论 | 33 |
| 2.4.1 MjML 序列分析 | 33 |
| 2.4.2 MjML 组织表达分析 | 34 |
| 2.4.3 早期幼体发育过程中 MjML 表达分析 | 34 |
| 第三章 重组 MjML 的原核表达及活性验证 | 36 |
| 3.1 实验材料 | 36 |
| 3.1.1 原核表达主要质粒和克隆、表达用菌株 | 36 |
| 3.1.2 实验用仪器 | 36 |
| 3.1.3 主要试剂 | 37 |
| 3.1.4 实验用试剂配置 | 37 |
| 3.2 实验方法 | 39 |
| 3.2.1 重组 pET-28a-MjML 质粒的构建 | 39 |
| 3.2.2 重组 MjML 蛋白的诱导表达 | 44 |
| 3.2.3 重组 MjML 蛋白的纯化 | 48 |
| 3.2.4 重组 MjML 蛋白的脱盐 | 48 |
| 3.2.5 重组 MjML 蛋白的浓度测定 | 49 |
| 3.3 结果 | 50 |
| 3.3.1 日本囊对虾重组 MjML 蛋白诱导表达条件的优化 | 50 |
| 3.3.2 日本囊对虾重组 MjML 蛋白的可溶性分析 | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.3 日本囊对虾重组 MjML 蛋白的 Western Blot 分析 | 55 |
| 3.3.4 日本囊对虾重组 MjML 蛋白的大量表达及纯化 | 56 |
| 3.3.5 重组 MjML 蛋白的 LPS 结合实验 | 57 |
| 3.4 讨论 | 58 |
| 第四章 总结 | 60 |
| 4.1 研究结论 | 60 |
| 4.2 特色与创新 | 61 |
| 4.3 展望 | 61 |
| 参考文献 | 62 |
| 致谢 | 71 |
| 在学期间参与的项目与成果 | 73 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

| | |
|--|----|
| List of abbreviation | I |
| Abstract in Chinese | II |
| Abstract | IV |
| Chapter 1 Introduction | 1 |
| 1.1 Brief introduction of Marsupenaeus japonicus | 1 |
| 1.1.1 Taxonomic staus and biological charateristics..... | 1 |
| 1.1.2 Geographical distributions and living habits | 1 |
| 1.1.3 Life history..... | 2 |
| 1.1.4 Two morphologically similar varieties | 2 |
| 1.1.5 Breeding and diseases | 3 |
| 1.1.6 Innate immune mechanisms..... | 3 |
| 1.2 Research progress of ML family proteins | 4 |
| 1.2.1 Structure and function of ML family proteins | 4 |
| 1.2.2 Research progress in vertebrates..... | 5 |
| 1.2.3 Research progress in invertebrates..... | 10 |
| 1.3 Purpose and significance of this study | 15 |
| 1.4 Technical route | 16 |
| Chapter 2 The cloning, tissue expression and characterization of MjML | 17 |
| 2.1 Materials | 17 |
| 2.1.1 Experimental animals..... | 17 |
| 2.1.2 Experimental equipments..... | 17 |
| 2.1.3 Reagent | 18 |
| 2.1.4 Preparation of usual solutions..... | 19 |
| 2.2 Methods | 19 |
| 2.2.1 Extraction of total DNA..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2 Extraction of total RNA | 20 |
| 2.2.3 Synthesis of first-strand cDNA | 20 |
| 2.2.4 Synthesis of first-strand cDNA for 3'RACE | 21 |
| 2.2.5 Cloning of cDNA and gDNA..... | 22 |
| 2.2.6 Bioinformatics analysis..... | 25 |
| 2.2.7 Real-time quantitative PCR | 26 |
| 2.3 Results | 27 |
| 2.3.1 Sequence analysis of MjML | 27 |
| 2.3.2 Sequence alignment and phylogenetic tree..... | 28 |
| 2.3.3 Tissue distribution of MjML..... | 31 |
| 2.3.4 Expression pattern of MjML during early larval development..... | 32 |
| 2.4 Discussion | 33 |
| 2.4.1 Sequence analysis of MjML | 33 |
| 2.4.2 Tissue distribution analysis of MjML..... | 34 |
| 2.4.3 Expression pattern analysis of MjML during early larval development | 34 |
| Chapter 3 Expression and function assays of MjML | 36 |
| 3.1 Materials | 36 |
| 3.1.1 Vectors and strains for prokaryotic expression | 36 |
| 3.1.2 Experimental equipments..... | 36 |
| 3.1.3 Reagents | 37 |
| 3.1.4 Preparation of usual solutions..... | 37 |
| 3.2 Methods | 39 |
| 3.2.1 Construction of recombinant pET-28a-MjML plasmid | 39 |
| 3.2.2 Inducible expression of recombinant MjML protien | 44 |
| 3.2.3 Purification of recombinant MjML protien | 48 |
| 3.2.4 Desalination of recombinant MjML protien | 48 |
| 3.2.5 Concentration of recombinant MjML protien..... | 49 |
| 3.3 Results | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1 Optimizing the expression condition | 50 |
| 3.3.2 Solubility of recombinant MjML protien..... | 54 |
| 3.3.3 Western Blot..... | 55 |
| 3.3.4 Protein purification | 56 |
| 3.3.5 LPS binding assey..... | 57 |
| 3.4 Discussion..... | 58 |
| Chapter 4 Conclusion..... | 60 |
| 4.1 Results of this research | 60 |
| 4.2 Characteristic and innovation | 61 |
| 4.3 Prospects | 61 |
| References | 62 |
| Acknowledgements..... | 71 |
| Project participated and papers published..... | 73 |

缩略词中英文对照表

| 缩写 | 英文 | 中文 |
|----------|---|------------------|
| Amp | Ampicillin | 氨苄青霉素 |
| BLAST | Basic local alignment search tool | 基本局域联配搜寻工具 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| BSA | Bovine serum albumen | 牛血清蛋白 |
| CD14 | Cluster of differentiation 14 | 白细胞分化抗原 14 |
| cDNA | Complementary Deoxyribonucleic acid | 互补脱氧核糖核酸 |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate | 焦碳酸二乙脂 |
| DTT | Dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| dNTP | Deocyrinediamine triphoshate | 脱氧核糖核苷三磷酸 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| EDTA | Ethylene diamine teraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| EST | Expressed sequence tag | 表达序列标签 |
| ERP | Ecdysteroid-regulated protein | 蜕化类固醇调控蛋白 |
| GM2A | GM2 activator protein | GM2 激动蛋白 |
| Ig | Immunoglobulin | 免疫球蛋白 |
| Kana | Kanmycin | 卡那霉素 |
| kDa | Kilodalton | 千道尔顿 |
| LB | Luria-Bertani medium | LB 培养基 |
| LPS | Lipopolysachcaride | 细菌脂多糖 |
| LTA | lipoteichoic acid | 脂磷壁酸 |
| MEGA | Molecular evolutionary genetics analysis | 分子进化分析软件包 |
| MD-2 | myeloid differentiation factor-2 | 髓样分化蛋白-2 |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid | 信使 RNA |
| NCBI | National center for biotechnology information | 美国国家生物信息中心 |
| NPC2 | Niemann-Pick type C2 protein | 尼曼匹克蛋白 2 |
| ORF | Open reading frame | 开放阅读框 |
| PAGE | Polyacrylanide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PBS | Phosphate buffer saline | 磷酸盐缓冲液 |
| RACE | Rapid amplification of cDNA ends | 快速扩增 cDNA 末端 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| RT | Reverse transcription | 反转录 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylanide gel electrophoresis | SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| TBE | Tris-boric acid-EDTA Buffer | Tris-硼酸-EDTA 缓冲液 |
| TLR-4 | Toll like receptor-4 | Toll 样受体 4 |
| Tm | Melting temperature | 退火温度 |
| UTR | Untranslated region | 非翻译区 |
| WSSV | White spot syndrome virus | 白斑综合征病毒 |

摘要

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)是我国四大养殖对虾品种之一,具有重要的经济价值。日本囊对虾幼体发育过程复杂,受精卵孵化后需要经过无节幼体,溞状幼体,糠虾幼体和仔虾 4 个发育阶段,发育过程中蜕皮频繁,蜕皮周期较短。近年来,随着日本囊对虾养殖规模的逐步扩大,各种细菌性疾病对其养殖业的发展造成了巨大的影响,并造成了严重的经济损失。

ML(MD-2-related Lipid-recognition)家族为一类具有保守 ML 单结构域的蛋白质,能够直接和脂类结合,从而参与先天免疫和脂类的识别与代谢过程。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了日本囊对虾形态变异类型 I 的 ML 基因——MjML。该基因的 cDNA 全长 614 bp,开放阅读框长 453 bp,编码 150 个氨基酸,理论等电点为 4.55,相对分子质量为 15865.23 Da。通过基因组 PCR 扩增得到 1678 bp 的 MjML 的基因组序列,其中含有 4 个外显子与 3 个内含子。MjML 具有 6 个在 ML 蛋白中相对保守的半胱氨酸残基,可能形成 3 对二硫键。同源性比对发现,MjML 的氨基酸序列与凡纳滨对虾的 LvML 一致性最高(84.0%)。实时荧光定量 PCR 结果显示 MjML 主要在肝胰腺中表达,在心脏、血细胞、肌肉、胃、鳃、神经、肠、眼柄中表达均极微量。在日本囊对虾早期幼体发育过程中,MjML 表达量在阶段性的蜕皮与变态后有大幅的升高;在仔虾期间,MjML 表达量呈现阶段上升的特征。

为了进一步研究 MjML 基因的相关功能,本研究根据已获得的 MjML 的 cDNA 序列构建重组 pET-28a-MjML 质粒进行原核表达,并通过 Western Blot 确定为带 6×His 标签的重组 MjML 蛋白。MjML 蛋白最佳诱导条件为: IPTG 浓度 0.1 mmol/L, 30 °C 220 rpm, 诱导培养 6 h, 且重组蛋白主要以不可溶的包涵体形式存在。收集包涵体,经过尿素溶解变性、梯度透析法复性、过 Ni 柱纯化和脱盐后,得到浓度为 1.02 mg/mL 的可溶性重组蛋白。LPS(lipopolysaccharide, 细菌脂多糖)结合实验显示重组蛋白对 LPS 有明显的结合活性。

本论文实验研究表明,日本囊对虾早期幼体发育过程中 MjML 的表达量变化与肝胰腺的发育程度有一定的相关性,同时与早期幼体发育过程中的变态以及仔虾期间的蜕皮也可能有一定的关联。而重组 MjML 蛋白对于 LPS 的直接结合

作用,则提示了 MjML 可能参与日本囊对虾识别革兰氏阴性菌的先天免疫过程。

关键词: 日本囊对虾; ML 蛋白; 基因克隆; 表达分析; 原核表达

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicas*) is one of the four shrimp species that have been widely cultured in China, having significantly economic values. *M. japonicus* has a complex larval development process. There are six nauplius, three protozoa, and three mysis larval stages, followed by the development of post-larvae to adult. During the larval development, larval shrimps molt frequently and the molting period is short. With the breeding scale of *M. japonicus* expanded quickly recent years in China, its development has been seriously affected by the outbreak of bacterial diseases, causing greatly economic losses.

ML superfamily proteins have a single ML domain, which can bind to specific lipids and play important roles in innate immunity, lipid-recognition and metabolism. In our study, we identified the cDNA and gene of the ML protein from *M. japonicus* by using RACE and RT-PCR and named it MjML. The full length cDNA of MjML is 614 bp, with a 453 bp open reading frame that encoded 150 amino acid residues. The MjML gene is 1678 bp in length, and consists of four exons and three introns. The putative MjML protein contains 6 cysteines which may form 3 disulfide bonds. MjML is most similar to LvML of *Litopenaeus vannamei* (84.0%). Real-time quantitative PCR results showed that MjML mRNA was expressed highest in the hepatopancreas, and the expression levels in heart, hemocyte, muscle, stomach, gill, nerve cord, gut and eyestalk were very low. During the early larval development of *M. japonicus*, especially after the metamorphosis, the expression would have a sharply risen. In the post-larvae stage, it increased step by step.

A recombinant protein was successfully expressed by using the prokaryotic expression system. And the Western blot analysis showed that the recombinant protein is the fusion protein of MjML. After optimizing the expression condition, the expressed proteins as inclusion bodies were solubilized, denaturation and refolding in proper buffer to harvest the active soluble protein proteins. The protein concentration was 1.02 mg/mL. The Binding ability of recombinant MjML to immobilized LPS

showed that the recombinant MjML could specially binds LPS.

The results indicate there may be a correlation between the expression of MjML mRNA and the molting and metamorphosis in shrimp larval development during the early larval development. And the binding ability to LPS suggests that MjML may play roles in the shrimp innate immune in *M. japonicus* against Gram-negative bacterial infection.

Key Words: *Marsupenaeus japonicas*; MD-2-related lipid-recognition superfamily; gene clone; expression analysis; prokaryotic expression.

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

1.1 日本囊对虾简介

1.1.1 分类学地位与形态学特征

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*), 曾称日本对虾, 俗称花虾、竹节虾、竹虾、青尾虾等, 日本称车虾, 英文名为 Kuruma prawn。分类学上隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、对虾科(Penaeidea), 囊对虾属(*Marsupenaeus*)。

日本囊对虾属大型虾类, 一般来说雌性体长范围 130-160 mm, 雄性体长范围 110-140 mm。身体分为头胸部和腹部, 体型长而侧扁, 由 20 节组成, 头部 5 节, 胸部 8 节, 腹部 7 节。其中头部和胸部愈合为头胸部, 分节不明显; 末节(尾节)与尾肢组成尾扇。除尾节外, 各体节均有 1 对附肢。日本囊对虾体表光滑, 有鲜艳的横斑纹。头胸甲和腹部体节上有棕色和蓝色相间横斑。尾肢末有较狭窄的蓝、黄横斑和红色边缘毛。齿式 8-10/1-2。额角侧沟略窄于额角后脊, 雄虾交接器中叶顶端有比较粗大的凸起伸出于侧叶末端; 雌虾交接器前部末端变圆, 故得名囊对虾。下缘 1-2 齿, 头胸甲上方具有眼胃脊、触角刺、胃上刺和肝刺。中央沟及额角侧沟到达头胸甲后缘^[1,2]。

1.1.2 分布和习性

日本囊对虾为亚热带种类, 其地理分布广泛, 整个印度-西太平洋海域均有广泛分布, 非洲东海岸、红海、印度、马来西亚、菲律宾、日本、朝鲜以及我国东海、南海等海区都具有丰富的野生日本囊对虾资源。我国以广东省为多, 海南省的西部海域崖县、临高沿海, 广西北部湾沿海均有分布。其适温范围广, 15-32 ℃ 均可完成正常生活, 其中 25-30 ℃ 为其最适生存温度, 在 8-10 ℃ 时停止摄食, 水温高于 32 ℃ 或者低于 5 ℃ 时死亡。盐度的适宜范围也较广, 为 5-30。日本囊对虾主要栖息于 10-40 米水深的沙质底海区, 幼虾栖息水域相对较浅, 成虾栖息水域较深, 潜沙性较强, 其深度在沙面 3 厘米以下, 白天多潜伏于沙底少活动, 夜晚活动频繁并进行索饵。日本囊对虾为肉食性, 以摄食动物性饵料为主, 多为

底栖动物，兼食底层浮游动物和游泳动物^[3,4]。

1.1.3 繁殖和生活史

日本囊对虾繁殖产卵期较长，每月2月中旬至10月中旬均可产卵，产卵盛期为5-8月，且具有多次发育、多次产卵现象。其产卵盛期，雌性大于雄性，其它时期个体大小大致相等，雌虾性腺发育成熟或接近成熟时皆可产卵，夜晚为其产卵行为高发时间段^[5]。

日本囊对虾生活史较复杂，共有6期无节幼体，3期蚤状幼体，3期糠虾幼体，以及仔虾、幼虾和成虾6个阶段，蜕壳多数出现在夜晚，时间仅需几分钟。无节幼体的身体不分节，无完整口器和消化道，不摄食，以体内卵黄为营养物质来源，靠3对附肢做间歇性游动生活，有趋光性和群集性。蚤状幼体已经出现了明显覆盖前端的头胸甲，后段出现分节，身体开始分为7节。复眼开始出现，仍具中眼，具有完整的口器和肝胰腺等消化器官，开始以小型浮游生物为食，游泳呈爬状。糠虾幼体头胸部愈合，与腹部出现明显分离，具有较深的褐色斑纹，在水中呈倒立状态，游泳频率降低、主要靠腹部的弓弹动作^[6]，捕食能力增强，依旧以小型浮游动物为食。仔虾期其形态已经和成虾相当相似，主要靠游泳做平衡运动，初期不能进行完全水平运动，仍以捕食浮游动物为主，再经过4-5次蜕壳之后才转入底栖生活^[2]。

1.1.4 两种形态变异类型

近十年来，日本囊对虾根据头胸甲侧面斜纹的差别区分为两大类群，分别为头胸部侧面斜纹延伸至头部腹面的形态变异类型 I (variety I)和头胸部侧面斜纹延伸至头胸部中部的形态变异类型 II(variety II)。最早是 Tzeng 等^[7,8]发现东海和台湾海峡这两个地理群体的日本囊对虾形态差异显著。2005年 Tsoi 等^[9]对日本囊对虾这两种形态变异类型进行了形态学和线粒体基因的比对，发现在形态学上这两种类型并没有明显差异，却有较大的遗传分化。2007年，Tsoi 等^[10]又利用2个微卫星分子标记分析了西太平洋海域及地中海海域两种形态变异类型的遗传多样性。期间，蔡晓鹏^[11]、董洪标^[12]和何永琴^[13]等人对于这两种形态变异类型的日本囊对虾，从形态差异、生长特性和遗传多样性方面的差异性进行了进一步的研究。2014年 Tsoi 等^[14]通过分子分类学方法确认了这两种形态变异类型属于

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.