

凡纳滨对虾 G 蛋白 G_s 基因的克隆和功能鉴定

金利华¹, 骆晶晶², 邹海鹰¹, 林圣彩¹, 叶志云^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;

2. 加拿大阿尔伯特卡尔加里大学 生物化学与分子生物学系, 加拿大)

摘要: 寻找并克隆凡纳滨对虾 G 蛋白 α 亚基因, 为对虾的生理调控研究提供理论基础. 通过简并 PCR 和 RACE 技术获得目的基因的全长 cDNA 序列. 将该基因的编码序列克隆到 pCMV5 表达载体, 通过免疫共沉淀实验和胞内 cAMP 浓度的测定鉴定该基因表达产物的功能. 用半定量 RT-PCR 和 Western blotting 确定该基因的表达产物在对虾身体各部位的分布. 克隆到凡纳滨对虾的 G 蛋白短式剪切模式 G_s α 亚基因, 将其表达产物命名为 pvG_s-s. pvG_s-s 的序列和功能与其它物种的 G_s 具有高度保守性. 它在对虾身体各部位存在普遍分布, 尤其在脑神经和腮中大量表达, 在触角、眼等部位也有适量分布. 说明 pvG_s-s 在对虾生命活动中的重要性, 为研究对虾的生理调控奠定了理论基础.

关键词: G 蛋白; 克隆; 凡纳滨对虾

中图分类号: Q 344

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)03-0409-06

G 蛋白信号转导机制普遍存在于各种生物体内, 控制着细胞生长、分化和凋亡等许多生命过程. G 蛋白信号转导的主要途径之一就是异源三聚体 G 蛋白(α 、 β 、 γ 亚基)接受外界信号, 通过细胞膜上具有 7 个跨膜片段结构特征的 G 蛋白偶联受体, 将信号传递给腺苷酸环化酶(AC, adenylyl cyclase), AC 将 ATP 转化为 cAMP 的过程中释放能量, 激活蛋白激酶 A(PKA, protein kinase A), 从而引起一系列生理效应. 这一信号途径在真核生物进化史上最古老和保守的^[1].

凡纳滨对虾 [*Litopenaeus vannamei*, *Penaeus vannamei*: (Boone, 1931)] 是对虾属中仅有的属于开放性纳精囊类型的种类之一, 也是世界养殖产量最高的三大虾种之一. 该品种原产于美洲太平洋沿岸水域. 自 1988 年引入我国后, 国内科学工作者已经对它的生活习性、育苗、养殖、抗病等多方面进行了大量研究. 但是从分子生物学的角度去研究凡纳滨对虾的生长、发育等调控机制的报道还很少见. 很多实验表明, G 蛋白在无脊椎动物(包括美国龙虾 *Homarus americanus*) 的嗅觉和视觉信号途径中起着极其重要的作用^[2,3], 而气味、光线、食物等因素在对虾等低等生物的生活习性中都是重要的因素. 因此, 我们主要寻找并克隆对虾 G 蛋白信号途径中的功能基因, 并就该基因的功能鉴定做了一定的研究, 旨在为对虾的生长、发育、抗病及

养殖等生理调控提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

体长 8 cm 左右的凡纳滨对虾购自厦门大学白城菜市场. 将对虾的触角、脑神经、眼和眼杆、尾部肌肉迅速取出进行总 RNA 的提取. 提取试剂为 RNeasy mini kit 试剂盒(Qiagen 公司), 操作过程见说明书. RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色鉴定. OD_{260 nm} 测定 RNA 浓度. 分别取各组织总 RNA 2 μ g, 用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech 公司)合成第一链 cDNA. 操作过程见说明书.

1.2 简并 PCR

根据其它物种已知的 G 蛋白 α 亚基的高度保守序列设计一对简并引物, 正向引物序列为 5'-AGCACI(A/T)T(ACT)(AG)TIAA(AG)CA(AG)ATG-3', 反向引物序列为 5'-TTGAA(AG)CA(AGCT)TG(AGT)ATCCA(CT)TT-3'. 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成. 25 μ L 简并 PCR 反应体系如下: 上述第一链 cDNA 1.5 μ L, 10 μ mol/L 的两向引物各 2 μ L, 10 mmol/L 的 dNTP 0.6 μ L, Taq DNA 聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司)1.25 U, 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, 超纯水 16.2 μ L. PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 42 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 3 min. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段并克隆到 pBluescript SK(-) 载体, 由上海生工测序.

收稿日期: 2005-06-03

基金项目: 国家高技术“863”计划项目(2002AA629060)资助

作者简介: 金利华(1975-), 女, 博士研究生.

*通讯作者: yzy1893@xmu.edu.cn

1.3 快速扩增 cDNA 末端反应(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)

根据上述克隆测序所得结果,设计两条特异引物分别进行 5 端 RACE 和 3 端 RACE 反应. 进行 5 端 RACE 反应的特异性引物 G_s5 序列为 5'-CCTGTTCCGTCGGGGTATAGTCGTTCTG-3', 进行 3 端 RACE 反应的特异性引物 G_s3 序列为 5'-CATCCGCGACGCAATCTTGACCATCAC-3'. RACE 反应按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段,克隆到 pBluescript SK(-) 载体并测序.

1.4 表达载体的构建

将所得目的基因的全长编码序列按照常规分子克隆技术克隆到哺乳动物表达载体 pCMV5 上,并带上血凝素 HA 标记,得到 pCMV5-HA-pvG_{s-s} 表达载体. 凡纳滨对虾的 G 蛋白 α 亚基 pvG₁ (待发表) 和人的 G₁ 亚基(hG₁) 全长编码序列带上 Flag 标记克隆到 pCMV5 表达载体,得到 pCMV5-Flag-pvG₁ 和 pCMV5-Flag-hG₁ 表达载体.

1.5 免疫共沉淀和 Western blotting 分析

取适当浓度的人胚胎肾细胞(HEK 293)铺于 60 mm 细胞培养板,在含 10% 小牛血清的 DMEM(Gibco 公司)培养液中培养. 24 h 后,用阳离子聚合物聚醚酰亚胺 PEI(Polyethylenimine, Poly science 公司)将 pCMV5-HA-pvG_{s-s} 分别与空载体、pCMV5-Flag-pvG₁ 和 pCMV5-Flag-hG₁ 各 2 μ g,共转染到细胞中. 36 h 后收获细胞,按照 Sternweis 等人^[4]的方法提取细胞膜蛋白. 将膜蛋白重悬于缓冲液(Hepes 30 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, DTT 0.1 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, GDP 0.1 mmol/L, Lubrol-PX 0.1%) 中^[5]. 取 800 μ L 浓度为 4 mg/mL 的膜蛋白,冰上放置 30 min,然后离心 20 min 后去掉不溶物. 在上清溶液中加入 anti-Flag M2-beads(Sigma 公司) 5 μ L,于 4 $^{\circ}$ C 混和器上缓慢旋转过夜. 1 000 r/min 离心收集沉淀产物,同上缓冲液洗 3 次. 然后按 Luo 等人的方法^[6]进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 分析.

1.6 cAMP 浓度的测定

铺适当浓度的 HEK 293 细胞于 60 mm 细胞培养板,瞬时转染 5 μ g pCMV5-HA-pvG_{s-s} 表达载体,以转染空载体的细胞作为对照. 36 h 后将该细胞分在 96 孔黑色细胞培养板,细胞贴壁后按 cAMP Hit Hunter Fluorescence Assay 试剂盒(Amersham 公司)说明书进行分析. 该分析所用的刺激药物为 1 μ g/mL 的霍乱

毒素 CTX(Sigma 公司),处理 2 h,同时用没有处理的相同细胞做对照.

1.7 半定量两步 RT-PCR

取上述各组织总 RNA 各 1 μ g,同样方法进行反转录. 取 cDNA 产物各 3 μ L 进行 PCR 反应. 根据 RACE 所得序列设计一条特异引物 5'-ATGGGTTGT TTTGGTAGCGCTGG-3',与上述 G_s5 引物一起进行 PCR 反应. PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,循环 25 次;最后 72 $^{\circ}$ C 3 min. 用 1 μ g 总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,以确定各组织用来反转录的 RNA 量的一致性.

1.8 Western blotting 鉴定蛋白分布

分别提取对虾的触角、额角、腮、尾部肌肉、步行足、游泳足、尾扇、脑神经、心脏、肝胰脏、胃、肠、眼和眼杆中的膜蛋白. 提取方法参考文献[4]. 分别取这些膜蛋白 8 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 分析. 其中用来检测目的蛋白的特异性一抗为的针对 G_s 蛋白 C 末端 10 个氨基酸残基的 Anti-G_s-subunit 抗体(Calbiochem 公司).

2 结果

2.1 凡纳滨对虾 G 蛋白 α 亚基基因的全长 cDNA 序列

以凡纳滨对虾不同组织 cDNA 为模板,简并 PCR 得到 500 bp 的 DNA 条带(图 1). 回收该 DNA 片段,

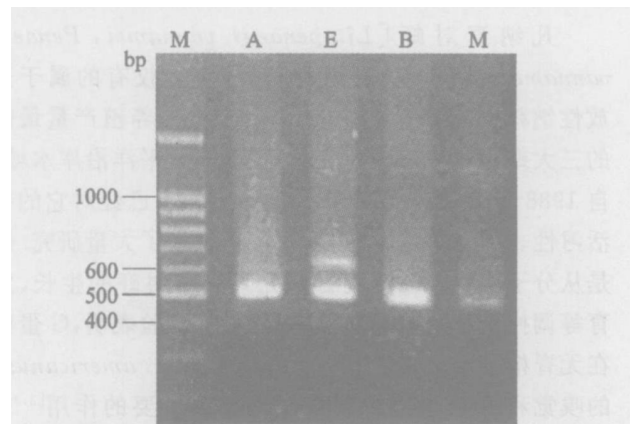


图 1 凡纳滨对虾 G 蛋白 α 亚基基因的简并 PCR 产物琼脂糖电泳图

第 1 泳道为 100 bp DNA 分子量标准. 第 2 到 5 泳道分别为以对虾的触角(A)、眼和眼杆(E)、脑神经(B)和尾部肌肉(M)的 cDNA 为模板进行的简并 PCR 产物. 其中 500 bp 的带为目的条带,第 2 泳道中 620 bp 左右的带为非特异 PCR 产物

Fig. 1 Electrophoresis analysis of degenerate PCR products of G_s subunit gene of *L. vannamei*

```

gggtgcaagtgtgacagatgattggcgatgatgggaacgactgagatcagtgatcttggaccatcgccggcatccatggccaggtggctgccacttcaactcagtgaca
tgtagactggatccatgacactagtgacgagatcagccgcaaaaataggcaactggctcggaacgagacagggccgcgaggactccgcgcctgctgaggctaggagct
ttcttccaaagagtgtactaatgtc[atg] ggt tgt ttt ggt agc gct ggg gcg aaa ggt gag gcc gaa cac aga agg cgg aaa gaa gct aac
M G C F G S A G A K G D A E E H R R R K E A N
aag aag ata aac aag cag att cag caa gac aaa caa gtc tac cga gcg acg cac aga ttg tta cta tta gga gcc gga gaa tca ggg aag agc
K K I N K Q I Q Q D K Q V Y R A T H R L L L L G A G E S G K S
aca att gta aaa cag atg aga att cta cat gtc gat gga ttc agt gaa gat gag aag aga gac aag att aaa gct att cga tgc aac atc cgc
T I V K Q M R I L H V D G F S E D E K R D K I K A I R C N I R
gac gca atc ttg acc att acc ggc aac atg tcc acc ttg acg ccc cgg ata gac cta gag aac ccc gcc cac cag ttc cgc gtc gac tac atc
D A I L T I T G N M S T L T P I A L E N P A H Q F R V D Y I
cag gac gtc gcc tcc agc aag gac ttc gac tac ccc gac gag ttc tac gag cac acc gag atc ctg tgg aag gac cag gga gtc cag gcg
Q D V A S S K D F D Y P D E F Y E H T E I L W K D Q G V Q A
tgc tag gag cgc tcc aac gag tac cag ctc ata gat tgt gcc aag tat ttc ctc gac cgc gtc cac ata gat cgc cag gag gac tat acc cgg
C Y E R S N E Y Q L I D C A K Y F L D R V H I V R Q N D Y T P
acg gaa cag gat att ctc cga tgt cga gtc ctc acc tta ggc att ttc gag aca aga ttt caa gta gac aaa gtt aat ttc cat atg ttc gac gtc
T E Q D I L R C R V L T L G I F E T R F Q V D K V N F H M F D V
ggc ggt caa cgc gat gag agg cgg aag tgg atc caa ttt ttc aat gag gtc acg gcc atc atc ttc gtc acc gct tgc tct tac aac atg gtc
G G Q R D E R R K W I Q C F N D V T A I I F V T A C S S Y N M V
ctt cgg gaa gac ccc agt caa aac cgg ctg cgg gag tgc tta gat ctc ttc aaa ayt ata ggg aac aac agg tgg cta cgc aca atc agc atc
L R E D P S Q N R L R E S L D L F K S I W N N R W L R T I S I
atc ctg ttt cta aac agc caa gac ctc ctg gtc gag aag atc ggc gct ggc agg agc agg tta gaa gat tct tct cct gac ttt gct cgg tat cag
I L F L N K Q D L L A E K I R A G R S R L E D S F P D F A R Y Q
acc cca ctc gat gct acc gtc gaa cca gaa gaa gat cca gag gtc gtc cgc gca aag tac ttc atc agg gat gaa ttt cta agg ata agc acg
T P L D A T V E P C E D P E V V R A K Y F I R D E F L R I S T
gca agt ggt gat ggc aag gat tat tgc tac cct cac ttc ata tgc gcc gtc gac agc gaa aac atc cgc cga gtc ttc aat gac tgc agg gac
A S G D G K H Y C Y P H F T C A V D T E N I R R V F N D C R D
ata ata caa agg atg cac ctc aga caa tat gaa ctt ttg [tga] tggccagtaggtgtgggtactcggccggcaacagtagatcctcgtcgcagcgagcaggcc
I I Q R M H L R Q Y E L L
aggcaggctgggtggaatggggcgggggataccggaggcaggagtgaccctcccgtctagttctctcagaggatgggtctcgtccctcaggacttctctccccctctc
cgcccatgaaagcttttctctcgcctcaagcgtggcacaacatcaacttctctcaaccagtttttggtttaggtctctctgttttggttttcttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 pvG s-s 亚基基因的全长 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列
Fig. 2 The full length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of pvG s-s

Shrimp	mgcfaagakgdae	hrrrke	ankkinkoie	qkkyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	71
Lobster	mgcfaagakgdae	hrrrke	ankkinkoie	qkkyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	71
Snail	mgcfaagakgdae	hrrrke	ankkinkoie	qkkyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	68
Frog	mgclmskttedqrne	kaqreankkiekql	qkdkvyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	71	
Mouse-s	mgclmskttedqrne	kaqreankkiekql	qkdkvyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	72	
Mouse-l	mgclmskttedqrne	kaqreankkiekql	qkdkvyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	79	
Human	mgclmskttedqrne	kaqreankkiekql	qkdkvyvrathrlllllgagesgksti	vkqmrllhvdgtsed	79	
Shrimp	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	143
Lobster	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	143
Snail	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	140
Frog	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	143
Mouse-s	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	144
Mouse-l	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	158
Human	-----	skrdika	rcbir	dallt	itgmsct	159
Shrimp	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	223
Lobster	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	223
Snail	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	220
Frog	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	223
Mouse-s	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	224
Mouse-l	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	238
Human	vgacyeraneyqli	dcakf	lrdvhlv	rsqyeste	qdil	239
Shrimp	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	303
Lobster	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	303
Snail	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	300
Frog	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	303
Mouse-s	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	304
Mouse-l	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	318
Human	ndvtailfv	gassynmvl	rednqtr	lqsal	lflksiw	319
Shrimp	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	379
Lobster	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	379
Snail	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	376
Frog	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	379
Mouse-s	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	380
Mouse-l	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	394
Human	qglddsv	gggedp	evvrak	yfirdef	lrist	395

图 3 pvG s-s 亚基氨基酸全序列与其它物种 G_s 亚基氨基酸全序列比对
Shrimp, *L. vannamei*, Genbank No. AAU12181; Lobster, *H. americanus*, Genbank No. AAB66332; Snail, *Lymnaea stagnalis*, Genbank No. CAA78808; Frog, *Xenopus laevis*, Genbank No. CAA39571; Mouse-s, *Mus musculus*, Genbank No. AAH61496; Mouse-l, *M. musculus*, Genbank No. AAH38067; Human, *Homo sapiens*, Genbank No. AAH08855

Fig. 3 Comparison of the amino-acid sequence of pvG s-s with G_s from other species

将其克隆并测序,根据所得片段序列设计特异引物,进行5'端和3'端RACE反应.通过两端RACE扩增产物的克隆并测序,得到该基因全长1676 bp的cDNA序列.利用Blastx软件和DNASTAR软件分析,只有249 bp位点的起始密码子为正确翻译阅读框的起始密码子.推断该cDNA序列5'端248 bp为5'-非编码序列(Untranslated Region, UTR),3'端288 bp为3'-UTR,编码序列(249 bp~1388 bp,共1140 bp)翻译成含379个氨基酸残基的蛋白质(图2).该DNA和蛋白质序列的Genbank数据库编号分别为AY626794和AAU12181.

利用Genedoc软件将该氨基酸序列与其它物种的G_s蛋白序列进行比对,发现该序列与其它G_s蛋白具有相当高的同源性(图3).与脊椎动物小鼠、非洲爪蟾和人类G_s具有72%的序列同源性,与无脊椎动物蜗牛、果蝇的G_s具有77%的序列同源性,与美国龙虾G_s之间的序列同源性高达92%.而且该序列含有其它G_s家族成员的保守结构和功能区域,如鸟苷酸和受体结合位点C末端序列, Mg²⁺的调节位点Ser⁵⁴和Thr¹⁸⁹残基,通过-磷酸基团之间形成离子键并促使G_s与GTP形成氢键的Gly²¹¹和Trp²¹⁹残基等等^[7].所有这些结果表明,我们克隆到的新基因就是凡纳滨对虾的G_s基因.

G_s基因表达产物有4种不同的剪切模式:2种长式G_s-L和2种短式G_s-s. G_s-L缺失从Gly⁷²到Gly⁸⁶位的氨基酸残基序列即为G_s-s.这4种蛋白质在结构上非常相近,在功能上也没有什么差别^[8].结果表明我们克隆出来的cDNA序列为对虾短式G_s(图3),将其表达产物命名为pvG_s-s(*P. vannamei* G_s, short form).

2.2 pvG_s-s的功能

由于G蛋白信号途径在进化史上的高度保守性,使我们能用哺乳动物细胞来研究对虾G蛋白的功能.在低浓度Mg²⁺和高浓度GDP存在的情况下,G蛋白3种亚基(α、β、γ)容易以三聚体的形式存在^[5].所以我们在pvG_s-s与G_i的体外免疫共沉淀分析中,提供这些适合G蛋白三聚体存在的条件.实验结果表明,在这种条件下pvG_s-s不仅能与凡纳滨对虾的G_i共沉淀,还能与人的同源蛋白G_i共沉淀(图4A).

在对过量表达pvG_s-s的胞内cAMP浓度测定实验中发现,与空载体相比,大量表达pvG_s-s能明显提高胞内cAMP浓度(图4B).这些结果说明pvG_s-s在功能上也是相当保守的.

2.3 pvG_s-s在凡纳滨对虾身体各部位的分布

如图5A,以cDNA为模板的各样品PCR产物中

都有610 bp的目的条带,而以总RNA为模板的PCR产物中没有该条带出现,说明该RT-PCR反应没有基因组DNA的污染.结果表明,pvG_s-s在脑神经中的表达量明显高于触角、眼和眼杆,在尾部肌肉中的相对最少.

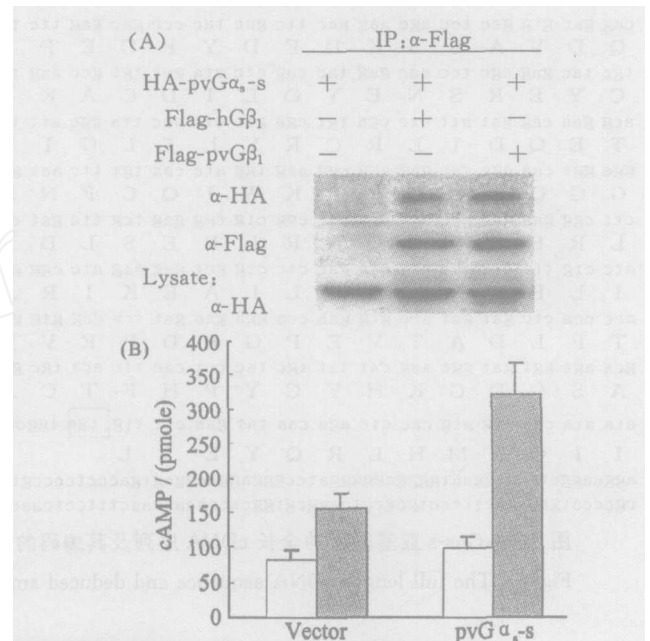


图4 pvG_s-s的基本功能分析

A:免疫共沉淀分析.图中上面和中间的带型分别表示免疫共沉淀和免疫沉淀的信号,下面的带型表示细胞裂解液中pvG_s-s的表达情况.

B:胞内cAMP浓度的测定.白色柱代表为不用药物刺激,灰色柱代表用CTX刺激.数据为3次实验结果的平均值

Fig. 4 Basic functional assays of pvG_s-s

由于pvG_s-s氨基酸序列的高度保守性,尤其是C末端最后10个氨基酸残基的完全保守,使我们能够用商品化抗G_s的抗体来检测pvG_s-s在对虾身体各部位的分布.各部位膜蛋白的Western blotting分析结果表明,pvG_s-s普遍存在于凡纳滨对虾身体各部位,在脑神经中表达量最高,这与RT-PCR结果一致.在腮、眼和眼杆也有大量表达.其它各部位都有相对较少的分布,尾部肌肉组织中几乎检测不到pvG_s-s的存在(图5B).该抗体检测到各样品中都有46 ku和48 ku的两条带,说明对虾中除了短式pvG_s-s,还存在G_s的长式剪切模式.

3 讨论

G蛋白三聚体的功能之一就是分辨、处理并传递不同的外界信号.很多证据表明,G_s亚基参与了嗅觉

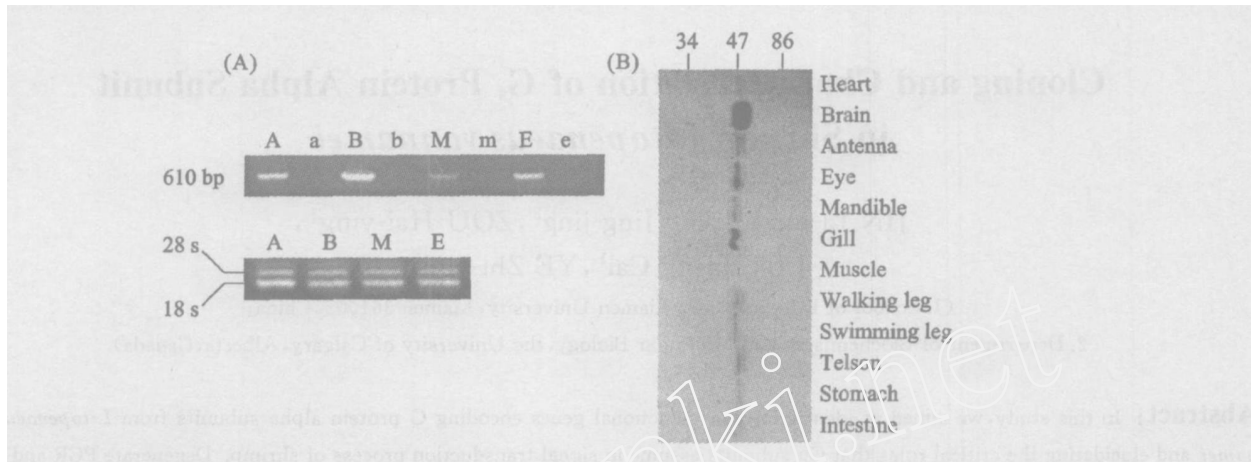


图 5 pvG_{s-s} 在对虾身体各部位的分布

A. 半定量两步 RT-PCR 分析. 上面的带型中 A、B、M、E 代表以 cDNA 为模板的 PCR 产物, a、b、m、e 代表以总 RNA 为模板的 PCR 产物. 下面的带型表示相应部位总 RNA 1 μg 的琼脂糖凝胶电泳图, 条带为 28s 和 18s RNA. A(a), 触角; B(b), 脑神经; M(m), 尾部肌肉; E(e), 眼和眼杆. B. 各部位膜蛋白的 Western blotting 图. 上边数字为蛋白分子量标准(ku)

Fig. 5 Tissue distributions of pvG_{s-s} in shrimp

信号转导过程^[1]. G 蛋白偶联受体接受外界气味的刺激, 通过 G_s 亚基将信号传递给 AC, 导致第二信使 cAMP 浓度的上升从而引起嗅觉生理效应. 我们发现 pvG_{s-s} 在凡纳滨对虾的嗅觉器官触角中存在明显分布, 并大量存在于脑神经中, 说明 pvG_{s-s} 可能参与了接受嗅觉刺激并经过脑神经分辨信号, 然后通过第二信使产生嗅觉生理效应的过程. 腮是对虾的呼吸和滤食器官, pvG_{s-s} 在对虾的腮中也有大量表达, 表明 G_s 在对虾的呼吸和滤食的信号转导过程中可能也起着重要调控作用. pvG_{s-s} 在对虾中普遍的分布, 表明了 G 蛋白信号途径在对虾生命活动调节中的重要性. pvG_{s-s} 的发现为研究凡纳滨对虾的生活习性奠定了理论基础. 对虾 G 蛋白信号途径的上游受体及相应配体的发现以及不同配体刺激经受体-G 蛋白传递到对虾体内产生什么样的生理效应, 还有待进一步研究.

参考文献:

[1] Marinissen M J, Gutkind J S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms [J]. Trends Pharmacol Sci. ,2001, 22(7): 368 - 376.
 [2] Fadool D A, Estey S J, Ache B W. Evidence that a G_q protein mediates excitatory odor transduction in lobster olfac-

tory receptor neurons [J]. Chem. Senses, 1995, 20(5): 489 - 498.

[3] Kosloff M, Elia N, Joel-Almagor T, et al. Regulation of light-dependent Gqalpha translocation and morphological changes in fly photoreceptors [J]. EMBO J. ,2003, 22(3): 459 - 468.
 [4] Sternweis P C, Robishaw J D. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain [J]. J. Biol. Chem. ,1984, 295(22): 13806 - 13813.
 [5] Xu F, Hollins B, Landers T M, et al. Molecular cloning of a lobster Gbeta subunit and Gbeta expression in olfactory receptor neuron dendrites and brain neuropil [J]. J. Neurobiol. ,1998, 36(4): 525 - 536.
 [6] Luo W, Ng W W, Jin L, et al. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation [J]. J. Biol. Chem. ,2003, 278(39): 37451 - 37458.
 [7] Lambright D G, Noel J P, Hamm H E, et al. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein [J]. Nature, 1994, 369(6482): 621 - 628.
 [8] Bray P, Carter A, Simons C, et al. Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein [J]. PNAS, 1986, 83(23): 8893 - 8897.

Cloning and Characterization of G_s Protein Alpha Subunit in Shrimp *Litopenaeus vannamei*

JIN Li-hua¹, LUO Jing-jing², ZOU Hai-ying¹,
LIN Sheng-Cai¹, YE Zhi-yun^{1*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, the University of Calgary, Alberta, Canada)

Abstract : In this study, we aimed at identifying new functional genes encoding G protein alpha subunits from *Litopenaeus vannamei* and elucidating the critical roles that G subunits assume in signal transduction process of shrimp. Degenerate PCR and RACE techniques were employed to achieve the full length of G subunit in *L. vannamei*. Co-immunoprecipitation analysis and measurement of accumulated cAMP in HEK 293 cells overexpressed with this new G subunit were used to identify the basic functions. Semi-quantitative two-step RT-PCR and Western blotting were employed to detect the distributions of the G subunit. The short form of G_s was cloned from *L. vannamei*, and was thus termed pvG_s-s. pvG_s-s was highly conserved in both primary structures and basic functions. The expression patterns revealed that pvG_s-s was widely expressed in many shrimp tissues, especially enriched in brain and gills, it also obviously existed in antennae and eyes. pvG_s-s may play crucial roles in sensory responses and leaching food for shrimp *L. vannamei*.

Key words : G protein; cloning; *Litopenaeus vannamei*