

# 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长 cDNA 克隆及组织分布\*

王修芳<sup>1,2</sup> 刘庆慧<sup>2,3①</sup> 吴 垠<sup>1①</sup> 黄 健<sup>2,3</sup>

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** coat-ε 基因表达的蛋白是组成 COP I 的 coatomer 复合体的一个亚基, 为获得中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长序列, 采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA end, RACE)技术, 扩增出 coat-ε 基因的 3'端和 5'端, 测序结果经 DNAMAN 比对拼接得出 coat-ε 基因全长, 基因全长 1402 bp, 5'非编码区(UTR) 84 bp, 3'非编码区(UTR) 310 bp, 开放阅读框 1008 bp, 预测编码 335 个氨基酸, 其中, 第 230–300 的氨基酸属于 TPR 超家族, SignalP 3.0 Server 预测氨基酸序列没有信号肽, TMHMM Server v. 2.0 分析此氨基酸不存在跨膜结构, PSORT II Prediction 预测该蛋白位于线粒体、细胞质、内质网中, 属胞内蛋白。系统进化树显示, 中国明对虾的 coat-ε 基因与节肢动物门的动物亲缘关系相近。采用实时荧光定量方法分析该基因在鳃、上皮、胃、肌肉、肝胰腺等不同组织中的相对表达, 结果显示, coat-ε 在肌肉中的相对转录表达量最高, 在鳃和附肢的表达次之。本研究获得的中国明对虾 coat-ε 全长序列, 可为该基因功能研究提供基础。

**关键词** 中国明对虾; coat-ε; 基因克隆; 组织分布

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0147-06

在细胞的胞吞和胞吐过程中, 会在膜上形成不同的包被小泡, 由不同的蛋白所包被, 从而特异性地完成大分子及颗粒物质的运输, 目前在细胞中发现 3 种不同类型的有被小泡: 网格蛋白有被小泡, COP II 被膜小泡, COP I 被膜小泡。它们具有不同的物质运输作用, 其中, COP I 被膜小泡主要负责将蛋白质由高尔基体运回到内质网中, 包括将外侧和内侧高尔基体中的蛋白质运回到内质网, COP I 被膜小泡在高尔基体表面的形成主要是胞浆中两大部分的聚集, 分别是 ARF 家族 G 蛋白和大小在 550 kDa 左右的 coatomer 复合体, 其中, coatomer 复合体由 α、β、β'、γ、δ、ε、ζ 7 个亚基共同组成(Waters *et al.*, 1991; Serafini *et al.*, 1991)。coatomer 复合体通过 ARF-GTP 附着于膜的表面, 然后组装形成笼型有被小泡(Bremser *et al.*, 1999;

Nickel *et al.*, 1998)。目前, COP I 笼型结构的电子显微重建以及 coatomer 复合体的晶体结构已经被报道, coatomer 复合体的 7 个亚基分别组合为两部分(βδ/γζ-COP 和 αβ'ε-COP), 而 coat-ε 是其中比较小的亚基, coat-ε 蛋白是酵母生长所必需的, 它的缺失会造成 coat-α 的不稳定(Duden *et al.*, 1998)。

研究发现, COP I 不仅在高尔基体的物质运输中发挥作用, 而且在细胞的内存作用或内存小泡的维持方面发挥作用(Styers *et al.*, 2008; Gabriely *et al.*, 2007)。COP I 在细胞表面受体的表达及细胞膜脂质成分的调节起到了重要作用(Misselwitz *et al.*, 2011)。Coatomer 复合体功能的多样性为病毒利用这一复杂蛋白提供了机会。本研究通过 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA end, RACE)法扩增出中

\* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、泰山学者"建设工程专项经费"和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。王修芳, E-mail: wang\_xiufang@yeah.net

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; 吴 垠, 教授, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn

收稿日期: 2015-06-17, 收修改稿日期: 2015-07-29

国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全序列,为进一步研究 coat-ε 基因表达蛋白甚至 COP I 被膜小泡在各种病毒侵染过程中的作用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用中国明对虾购自山东昌邑水产养殖公司,体长 6 cm,经 PCR 检测不携带 WSSV,在(22±1)℃ 室温下的海水箱中暂养 3 d。TRIzol 试剂、pMD18-T 载体、PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒购自 TaKaRa,大肠埃希菌 Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司,引物及测序均在上海生工生物技术有限公司完成,荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司。

### 1.2 cDNA 合成

利用 RNAiso Plus(TaKaRa)提取中国明对虾总 RNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳查看 RNA 的提取效果,根据 3'端 RACE 和 5'端 RACE 的不同,3'端加入 3'-CDS 合成 3' RACE cDNA 模板;5'端加入 5'-Adapter,5'-CDS 合成 5'RACE cDNA 模板。设计 3'-和 5'-RACE 特异性引物(表 1),3'端第一次扩增以混合的 UPM 和 Gsp1 为引物,反应条件:94℃,5 min;94℃ 30 s,72℃ 2 min,5 个循环;94℃ 30 s,70℃(68℃) 30 s,72℃ 2 min,5 个循环;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 2 min,25 个循环;72℃ 5 min,4℃。以第一次 PCR 产物为模板,以 NUP 和 Gsp2 为引物,进行巢式 PCR,反应条件与第一步相同。5'端扩增在第一次扩增过程中以 UPM 和 Gsp3 为引物,巢式 PCR 扩增过程中以 UPM 和 Gsp4 为引物,反应条件与 3'端相同。

### 1.3 coat-ε 基因 cDNA 的克隆

3'-和 5'-RACE 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,条带按照 DNA 回收试剂盒(TIANGEN)说明书切胶回收,将目的片段 1 μl 与 pMD18-T(TaKaRa)载体 16℃连接 30 min,取 5 μl 连接产物加入 Top10 感受态细胞中,置于冰上 30 min,42℃热激 60 s,将连接产物转化入感受态细胞中,加入 750 μl LB 液体培养基,37℃摇菌 1 h,取 100 μl 菌液涂布在 LB(Amp<sup>+</sup>, 50 μg/ml)平板上,37℃培养 14 h,挑取单菌落,接种于 LB(Amp<sup>+</sup>, 50 μg/ml)液体培养基,在摇床上培养 4 h 后,进行菌落 PCR。经琼脂糖凝胶后,电泳条带正确的菌液送测序。

### 1.4 生物信息学分析

经测序获得的结果通过 DNAMAN 进行比对、拼接。完成拼接的序列通过在线 ORG Finder 找出开放阅读框,运用 Translate Tool 将开放阅读框的核苷酸序列翻译为氨基酸序列,应用 SignalP 3.0 Server 预测氨基酸序列有无信号肽,用 TMHMM Server v. 2.0 软件预测氨基酸序列有无跨膜结构,用在线软件 ProtParam tool 分析氨基酸序列组成以及等电点和分子量,用 PSORT II Prediction 预测蛋白的亚细胞定位,利用在线软件 NPS Network Protein Sequence Analysis 分析蛋白的二级结构,用三级结构预测软件 SWISS-MODEL 预测该蛋白的空间结构,应用 BLAST 比对同源氨基酸序列,并用 MEGA 5.05 构建系统发育树。

### 1.5 coat-ε 基因的各组织表达

分别取 3 只中国明对虾的附肢、肝胰腺、上皮、心脏、胃、肠、眼柄、肌肉、鳃、类淋巴、血淋巴组织,加入 RNAiso,依照 RNAiso 试剂盒说明书提取 RNA,采用 1.0%琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计分析提取 RNA 质量和完整性。使用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)将提取的 RNA 反转录为 cDNA,-20℃保存备用。以得到的 cDNA 稀释 10 倍为模板,分别用 β-actin(内参)、coat 引物进行荧光定量 PCR(表 1)。qPCR 反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(2×) 12.5 μl, cDNA 模板 1 μl,上下游引物各 0.5 μl(10 μmol/L),DEPC 处理水 10.5 μl。PCR 反应条件:94℃,5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环;65℃ 5 s,95℃ 50 s。

利用 Bio-Rad CFX Connect 自带软件,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 coat-ε 基因的相对表达量,以肝胰腺 coat-ε 转录表达作为标准 1。

表 1 引物序列  
Tab.1 Sequences of the primers

名称 Name	序列 Sequence(5'-3')
Gsp1	AGTCAGATGCCCTTGAGTGCCG
Gsp2	GCAACACTCACACAGATGGCTC
Gsp3	CTCCTTACGGGCAGCATCAAGACGC
Gsp4	ACGAAGTGCTCCCTCATAGTTATCC
β-actinF	CATCAAGGAGAACTGTGCT
β-actinR	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT
CoatF	TCCTTCTATATCGGGAATTACC
CoatR	CACAATGGTTACCCTGTTACTG

## 2 结果

### 2.1 coat-ε 基因全序列分析

根据 3'端和 5'端 RACE 得到的目的片段测序结果拼接, 得出 coat-ε 基因序列全长为 1402 bp, 其中, 5'非编码区(UTR) 84 bp, 3'非编码区(UTR) 310 bp, 通过在线 ORF Finder 找出开放阅读框(ORF) 1008 bp, 编码 335 个氨基酸。在 3'非编码区内有加尾信号(AAATAA), 且 3'末端具有 polyA 尾巴。经过 DNAMAN 将 coat-ε 基因序列开放阅读框预测编码氨基酸序列(图 1)。全长序列提交 GenBank 数据库(No: KT253584)。

### 2.2 生物信息学分析

将中国明对虾 coat-ε 基因编码的氨基酸序列使用 BLAST 进行同源性分析, 发现其与欧洲熊蜂的同源性最高(图 2)。中国明对虾 coat-ε 基因编码的氨基

酸在 230–300 之间属于 TPR 超家族(图 3), 该蛋白质的等电点为 5.95, 分子量为 38143.25 Da, 此氨基酸序列没有信号肽和跨膜结构, 带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)43 个, 占总蛋白的 12.8%, 带正电荷氨基酸(Arg + Lys)有 38 个, 占总蛋白的 11.3%, 蛋白序列中有 7 个半胱氨酸, 不稳定指数为 40.51, 是一种不稳定蛋白, 脂溶性为 87.4, 总平均亲水性为-0.468。预测蛋白质亚细胞定位于线粒体的可能性为 78.3%, 细胞质的可能性为 17.4%, 内质网的可能性为 4.3%, 内质网上的保留信号为: 在 C 末端有 KKXX-类似的序列, 而在该序列中 C 末端为 KQYA。二级结构分析显示, coat-εα 螺旋占比例很高, 为 55.52%, β-转角占 7.46%, 延伸链占 10.75% (图 4)。预测的中国明对虾 coat-ε 蛋白的空间结构模型见图 5。

### 2.3 系统进化树的构建

通过 coat-ε 全基因开放阅读框翻译, 得出预测

1	AAGCAGTGGTATCAACCCAGAGTACCGGGTGTGGTGGCCCTCTGATGCTGCCCGTAAGAGCTGAAGACTCTCCAAAGAAAGG
85	ATGCCAAGCACTCACACAGATGGCTCAGGGCTTGGACCCACATTGCCACCGGGGGGTGAGAAACTGCCAGGATGCCACTACTACATATACC
169	AAGAGTGTGGCAAGAACGTCTATCTGTCAACATGGCCACCGAGGTGGACGAGCTGTTCCAGGTCAGAAATTCCTCTCTAT
253	ATCGGGAAATACCCAGCACTGTATCAACCGAGGCGCCACAGCTACAGGTCAGCTCAGCCAGGCTCCGACAGGAGAGACATATCTTC
337	CTCTACCGCGCTCTCCTAGCTCAGCCGCAAGTATGGAGTGGTTTCAGAGTGAATAAAGGCATCGGCTCCAGCTCCACTACAGCT
421	TTAAGTGTGGTGGCTCAGTACTTCCAGTTCGCCAGTACAGGGTAAACCATTTGTGAGCAGGCTGGAGCTCAGACTGAGCCAGTCCAAAT
505	CTTCATCTGTCCAAACAGCCCTCTCATTGTGGCTCCAGCCATCTACTGCCATCAGGATTAAGTATCAGCCAGCCACTTGTGGCC
589	CTCAGTCACTCAGATGCCCTTGAAGTGGCTGGCTTGTGGTGGCAGCTTACCTGAAAGATGGAGCGCTCTTGATGCTGCCCGTAAG
673	GAGCTGAAGACTCTCCAAAGAGAGGATGATGATGCAACACTCACACAGATGGCTCAGGGCTGGCCCGTGTATTGCCAAGCGGGGCT
757	GAGAACTCCAGGATGCCCTACTACTACATATACCAAGCTTGTGGCAAGAACCTCAGCAGCCCTTCTCCTTAATGCCAGGCA
841	CTCTGTGTTCCCTGGCCAGCCAAAATATCAAGAGGCTGAGAGTGGCCCTTCAAGAGCCCTTGATAAGGCCCAAGCAACCCCTGAC
925	ACCCCTCATCACTTGTATGGTCCCTTTCACACCCACAGCCAAAACCCACAGGCGGTTGCCAAGCCGATATTAGTGCAGTTGCCAGAC
1009	GAACACAGGGCCACAGTTCGTAGAAGACATCGCAACCAAGGAGGATGATTTCAACCCGTTGGTTAAGCAGTATGGCCATATA*
1093	ACAGTGGTTCITGATATATATATATATCACTCTCTCCITTTCTGATATATTTTGTGACATTTTATTTTGAAGGTTATTC
1177	ATATAGAGCATATGTAAAACCCAGTACTTGTGTTTGCAGTCAITGTTTTTCTTTATCTTTTATTTTATGTAGATTTTTTAA
1261	AGATATTTTATTACTATACAAAACCTGAAGACATGTTTTACGGATGGCTAAGGAAATATTGGCCATTTTGTGCCACATTCCAA
1345	ATAACCTGTTGTTATATTTTGAATAAATGTTTAAAAAARAAAAAARAAAAAARAAAAAARAAAAAARAAAAAARAAAAAARAAAAA

图 1 中国明对虾 coat-ε 基因全长 cDNA 序列及相应的氨基酸序列推测

Fig.1 Predicted amino acid sequences of coat-ε cDNA in *F. chinensis*

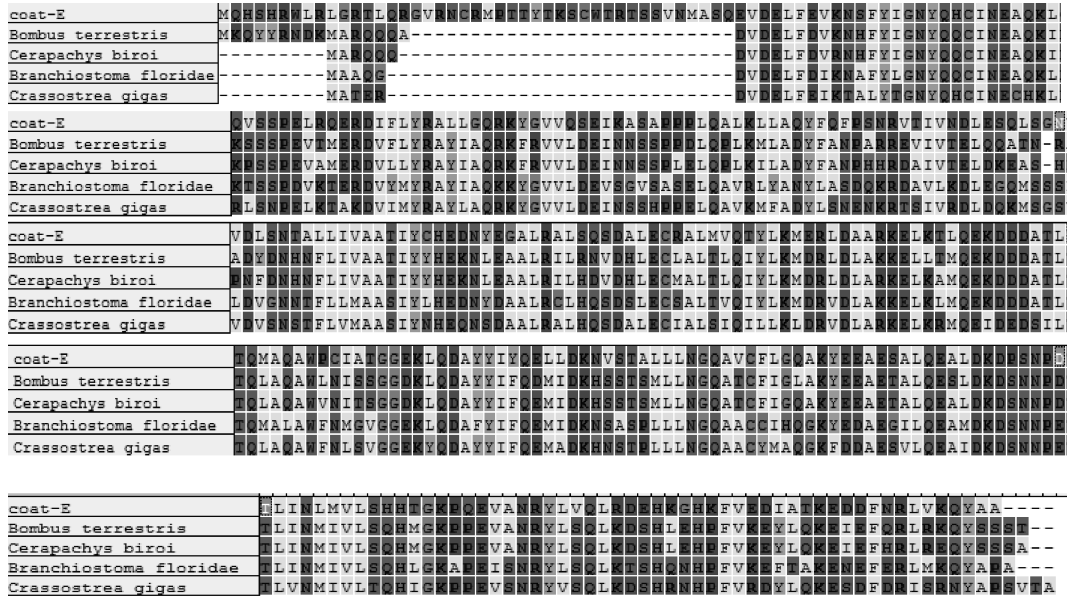


图 2 中国明对虾 coat-ε 氨基酸序列与其他物种 coat-ε 氨基酸序列的比较

Fig.2 Multiple alignments of amino acid sequences of coat-ε in *F. chinensis* and other species

各物种 coat-ε 序列登录号: 欧洲熊蜂(XP012169272.1)、毕氏粗角蚁(XP011333357.1)、  
佛州文昌鱼(XP002586747.1)、长牡蛎(XP011436400.1)

The GenBank accession numbers of coat-ε: *Bombus terrestris* (XP012169272.1), *Cerapachys biroi* (XP012169272.1), *Branchiostoma floridae* (XP002586747.1), *Crassostrea gigas* (XP011436400.1)

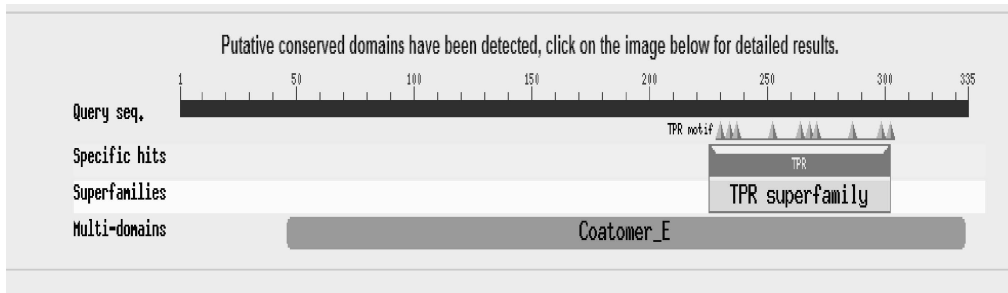


图 3 预测的中国明对虾 coat-ε 蛋白功能域

Fig.3 Putative conserved domains of coat-ε in *F. chinensis*

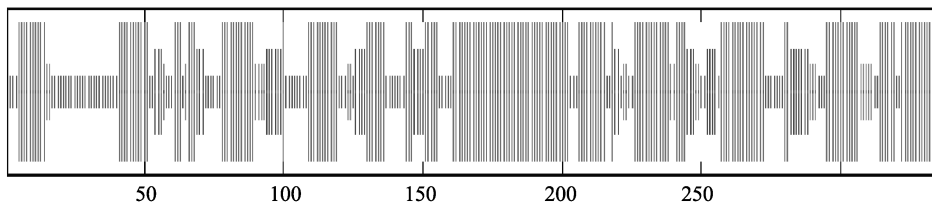


图 4 coat-ε 蛋白二级结构分析

Fig.4 Secondary structure analysis of coat-ε

的氨基酸序列, 将此序列输入到 NCBI 的 protein blast 序列框中, 比对得出同源的氨基酸序列。结果显示, 中国明对虾 coat-ε 氨基酸序列与欧洲熊蜂 (*Bombus terrestris*)、毕氏粗角蚁 (*Cerapachys biroi*)、木蚁 (*Camponotus floridanus*)、爪蟾 (*Xenopus laevis*)、佛州文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*)、长牡蛎

(*Crassostrea gigas*) 等的相似性分别为 64%、63%、62%、59%、58%、57%。从基于 MEGA 5.05 建立的系统发育树可以看出(图 6), 该基因进化过程中与膜翅目的蜂、蚁的亲缘关系相近, 它们都属于节肢动物门, 而与野猪、骆驼等哺乳动物的亲缘关系相对远一些。

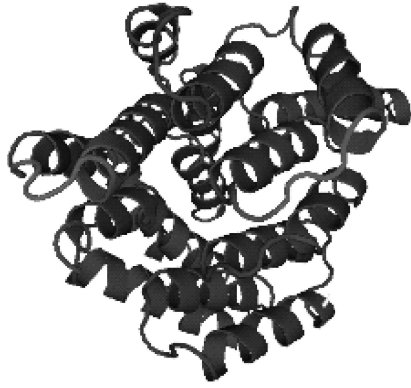


图 5 coat-ε 蛋白的空间结构模型

Fig.5 The spatial structure of coat-ε protein

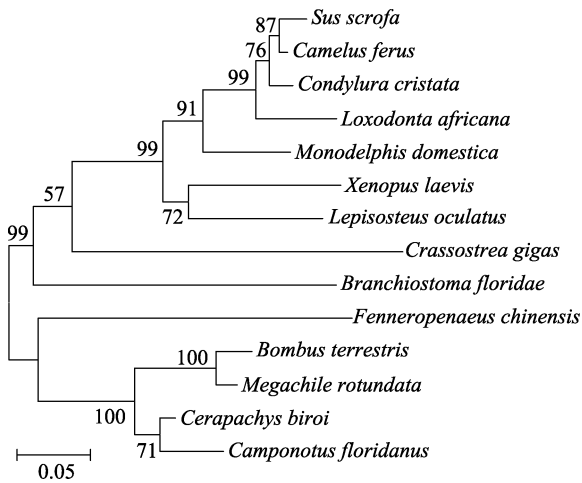


图 6 不同物种 coat-ε 氨基酸序列的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on coat-ε amino acids of different species

野猪(XP003123584.1)、野骆驼(XP006186292.1)、星鼻鼹(XP004688653.1)、非洲象(XP003413572.1)、灰短尾负鼠(XP001363383.1)、爪蟾(NP001085327.1)、雀鳝(XP006640066.1)、佛罗文昌鱼(XP002586747.1)、中国明对虾、欧洲熊蜂(XP012169272.1)、苜蓿切叶蜂(XP003699284.2)、毕氏粗角蚁(XP011333357.1)、木蚁(XP011267506.1)  
*Sus scrofa* (XP003123584.1), *Camelus ferus* (XP006186292.1), *Condylura cristata* (XP004688653.1), *Loxodonta Africana* (XP003413572.1), *Monodelphis domestica* (XP001363383.1), *Xenopus laevis* (NP001085327.1), *Lepisosteus oculatus* (XP006640066.1), *Crassostrea gigas* (XP011436400.1), *Branchiostoma floridae* (XP002586747.1), *Fenneropenaeus chinensis*, *Bombus terrestris* (XP012169272.1), *Megachile rotundata* (XP003699284.2), *Cerapachys biro* (XP011333357.1), *Camponotus floridanus* (XP011267506.1)

#### 2.4 中国明对虾 coat-ε 基因在各组织中的表达

通过 Real-time PCR 技术分析 coat-ε mRNA 在中国明对虾不同组织中的表达, 结果显示, coat-ε 基因在中国明对虾的这 11 个组织中均有表达(图 7), 其中, 在肌肉、鳃、附肢中的表达量最高。经统计分析, 除鳃之外, 肌肉与附肢中的表达量差异显著( $P < 0.05$ ), 与其

他组织的差异均极显著( $P < 0.01$ )。

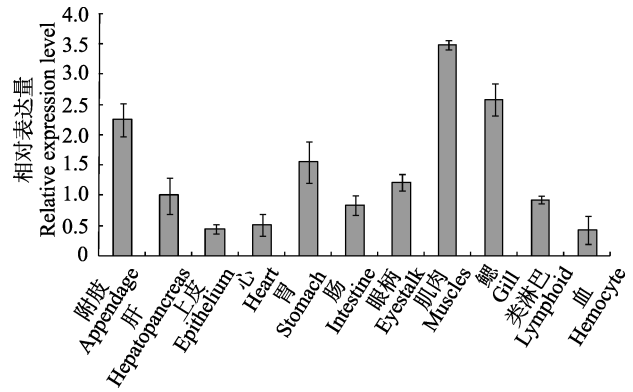


图 7 中国明对虾 coat-ε 基因在各组织的分布

Fig.7 Tissues distribution of *F. chinensis* coat-ε

### 3 讨论

目前, 在节肢动物门的蚂蚁、蜜蜂及脊椎动物亚门的野猪、野骆驼等的 coat-ε 基因的全长已经克隆, 而在甲壳动物中的报道非常少。本研究首次克隆出中国明对虾的 coat-ε 基因全长, 所表达的蛋白是 coatomer 复合体的一个小亚基, coat-ε 基因编码的蛋白无跨膜区和信号肽, 亚细胞定位预测其是一种胞内蛋白, 可能在细胞内发挥各种功能。从构建的系统发育树可以发现, 中国明对虾与欧洲熊蜂、苜蓿切叶蜂、毕氏粗角蚁、木蚁聚为一类, 它们都属于节肢动物门, 与其他脊索动物门的野骆驼、佛周文昌鱼等聚类关系都较远, 而且在同源性方面与其他种类的相似性均在 60%–50% 左右, 说明在进化过程中保守性不高。转录分析显示其在肌肉、鳃和附肢组织有较高的分布。

coat-ε 基因表达的蛋白是组成 coatomer 复合体的  $\beta\delta/\gamma\zeta$ -COP 必不可少的, 虽然对于 COP I 普遍认为是将内质网上的逃逸蛋白从高尔基体运回到内质网, 但是许多研究发现其还存在很多其他功能, 例如通过未感染细胞的 COP I 功能的研究发现, COP I 在病毒的复制中发挥着一定作用, 通过 siRNA 干扰实验发现, COP I 在牛痘、脊髓灰质炎和流感病毒的复制中起作用(Zhang *et al*, 2009; Cherry *et al*, 2006; Konig *et al*, 2010)。通过更深一步的研究发现, COP I 在病毒的生活周期中起着多种作用, 包括病毒的入侵、RNA 的复制和病毒的胞内运输。通过 COP I 的 4 个亚基的 RNA 干扰实验, 发现它们是流感病毒在体内复制的重要因素(Konig *et al*, 2010)。细胞中缺乏 coat-ε 会使疱疹性口炎(Vesicular stomatitis, VSV)和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest viruses)的感染降低(Daro *et al*, 1997), 并且在进一步的 RNA 干扰试验中印证了这一

结论(Cureton *et al.*, 2012)。coat- $\epsilon$  基因是否参加对虾病毒感染过程尚不清楚, 本研究获得的 coat- $\epsilon$  基因全长为研究 COP I 在对虾病毒感染中的作用提供基础。

### 参 考 文 献

- Bremser M, Nickel W, Schweikert M, *et al.* Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*, 1999, 96(4): 495–506
- Cherry S, Kunte A, Wang H, *et al.* COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(10): 900–912
- Cureton DK, Burdeinick-Kerr R, Whelan SPJ. Genetic inactivation of COPI coatomer separately inhibits vesicular stomatitis virus entry and gene expression. *J Virol*, 2012, 86(2): 655–666
- Daro E, Sheff D, Gomez M, *et al.* Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatomer (COP I) component  $\epsilon$ -COP. *J Cell Biol*, 1997, 139(7): 1747–1759
- Duden R, Kajikawa L, Wuestehube L, *et al.*  $\epsilon$ -COP is a structural component of coatomer that functions to stabilize  $\alpha$ -COP. *EMBO J*, 1998, 17(4): 985–995
- Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, 399(6736): 541–8
- Gabriely G, Kama R, Gerst JE. Involvement of specific COP I subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(2): 526–540
- Konig R, Stertz S, Zhou Y, *et al.* Human host factors required for Influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463(7282): 813–817
- Misselwitz B, Dilling S, Vonaesch P, *et al.* RNAi screen of Salmonella invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and CDC42. *Mol Sys Biol*, 2011, 7(1): 474
- Nickel W, Malsam J, Gorgas K, *et al.* Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS *in vitro*. *J Cell Sci*, 1998, 111(5): 3081–3090
- Serafini T, Orci L, Amherdt M, *et al.* ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 1991, 67(2): 239–253
- Styers ML, O'Connor AK, Grabski R, *et al.* Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(6): 1485–1498
- Waters MG, Serafini T, Rothman JE. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, 1991, 349(6306): 248–251
- Zhang L, Lee SY, Beznoussenko GV, *et al.* A role for the host coatomer and KDEL receptor in early vaccinia biogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(1): 163–168

(编辑 冯小花)

## cDNA Cloning of Coat-Epsilon Gene and Its Tissue Distribution in *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Xiufang<sup>1,2</sup>, LIU Qinghui<sup>2,3①</sup>, WU Yin<sup>1①</sup>, HUANG Jie<sup>2,3</sup>

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** Coat-epsilon protein (coat- $\epsilon$ ) is a subunit of the coatomer complex that forms COP I. To obtain the full-length sequence of coat- $\epsilon$  of *Fenneropenaeus chinensis*, we first acquired the sequences of 3' and 5' ends using rapid amplification of cDNA ends (RACE). The results were then spliced by DNAMAN to obtain the full-length 1402 bp sequence. The predicted 5' non-coding region (UTR) had 84 bp and the 3' non-coding region (UTR) had 310 bp. The open reading frame had 1008 bp that was supposed to encode 335 amino acids. The fragment including 230aa to 300aa belonged to the TPR superfamily. Signalp 3.0 server and TMHMM Server Version 2.0 analysis suggested that the amino acid sequence did not contain a signal peptide or a transmembrane structure. PSORT II Prediction showed that coat-epsilon was probably located in mitochondria, cytoplasm, and endoplasmic reticulum. The phylogenetic tree analysis showed that coat- $\epsilon$  of *F. chinensis* was closely related to that of Arthropoda. We also analyzed the mRNA expression of coat- $\epsilon$  in different tissues with quantitative real-time PCR, and found that it was expressed in all tested tissues including appendage, hepatopancreas, epithelium, heart, stomach, intestine, eyestalk, muscles, gill, lymphoid organ and hemocytes. The expression level was the highest in muscles, followed by the gill and appendage. Our results provided important information for the functional study of coat- $\epsilon$ .

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Coat- $\epsilon$ ; Gene clone; Tissue distribution

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; WU Yin, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn