

# 凡纳滨对虾造血激素基因全长序列 分析及其克隆与表达

梁高峰<sup>1,2</sup> 梁艳<sup>2</sup> 成君军<sup>2</sup> 张士瑾<sup>1</sup> 黄捷<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>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)

**摘要** 虾造血激素(astakine, AST)是节肢动物中具有促进造血组织细胞分化和增殖的一种细胞因子。在对白斑综合征病毒(WSSV)感染分子机制的研究中发现, WSSV 的一个可能受体蛋白与 AST 存在特异性结合。为进一步了解 WSSV 感染与对虾细胞分化之间的关系, 本研究应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术, 成功克隆了凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 造血激素基因(*lvast*)全长 cDNA (GenBank 登录号: HM594944), 并对该基因进行了生物信息学分析。*lvast* 全长共 1 846bp, 含有 1 个 372bp 的开放阅读框, 编码 124 个氨基酸, 估算分子量为 13.3kD。其编码的氨基酸序列包含一个前动力蛋白(Prokineticin)结构域。基因序列和氨基酸序列同源性比较表明, 凡纳滨对虾造血激素(LvAST)与斑节对虾和软尾太平洋扇贝 AST 同源性较高, 与脊椎动物的同源性较低。通过构建包含 *lvast* 基因 ORF 重组表达载体 pBAD/gIIIa-*lvast*, 本研究成功表达出与预期相符合的目的蛋白, 为进一步研究 LvAST 的结构与功能提供了理论依据和实验基础。

**关键词** 凡纳滨对虾 虾造血激素 RACE 原核表达

**中图分类号** S945.4+9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)02-0076-10

## Cloning, full-length sequence analysis and prokaryotic expression of astakine gene of *Litopenaeus vannamei*

LIANG Gao-feng<sup>1,2</sup> LIANG Yan<sup>2</sup> CHENG Jun-jun<sup>2</sup>

ZHANG Shi-cui<sup>1</sup> HUANG Jie<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup>Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,  
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** Astakine (AST) is a cytokine that promotes cell differentiation and proliferation of hemocytes in the hematopoietic tissue, which plays important roles in crustacean immune responses. Evidence from our previous studies showed that WSSV may compete with AST for a common receptor. By rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR, the full-length gene of *Litopenaeus vannamei* astakine gene (*lvast*) was obtained, which consisted of 1,846 bp with a

公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201103034)、国家虾现代产业技术体系(CARS-47)岗位专家经费、国家重点基础研究发展计划项目课题和基本科研业务费(2010-cb-06)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062

收稿日期: 2011-03-05; 接受日期: 2011-05-12

作者简介: 梁高峰(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事渔业生物病害及防治研究。E-mail: lgf6054313@163.com

372 bp ORF, encoding 124 amino acids with the predicted molecular mass of 13.3 kDa. The deduced protein contained a prokineticin (PK) domain. Homological comparison among LvAST and other species showed that the homogeneities were higher in comparison with those of *Penaeus monodon* and *Pacifastacus leniusculus*, and lower in comparison with those of vertebrates. The recombinant protein of LvAST was successfully expressed with the constructed recombinant vector pBAD/g IIIA-lvast containing the *lvast* ORF. The results laid a theoretical basis for further functional studies of astakine.

**KEY WORDS** *Litopenaeus vannamei* Astakine RACE Prokaryotic expression

无脊椎动物缺乏像脊椎动物免疫系统的适应性和记忆能力,没有真正的抗体和特异性的免疫细胞,它们的免疫防御主要依赖自身先天的非特异免疫机制(Roch 1999; Takahashi *et al.* 1995)。在甲壳动物中,先天免疫反应在防止病原入侵方面起着非常重要的作用。当机体被感染后造血细胞数量急剧下降(Lorenzon *et al.* 1999),而新的血细胞对于维持甲壳类动物的机能十分关键(Johansson *et al.* 2000)。在脊椎动物中细胞因子可以调节造血作用和免疫反应,但在无脊椎动物中细胞因子的作用却所知甚少。近年来研究发现,一种新型类细胞因子的虾造血激素(Astakine, AST)在软尾太平喇蛄 *Pacifastacus leniusculus* 中参与了造血作用,具有促进造血组织细胞分化和细胞增殖的作用(Lin *et al.* 2009),因此虾造血激素在甲壳类免疫防御反应中所起的作用不容忽视。

白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是一种广受关注的甲壳类病毒,自 1993 年暴发以来给对虾养殖业带来了巨大的损失(黄 捷等 1995)。经研究发现,WSSV 选择 BP53 (ATP 合酶  $\beta$  亚基)作为侵染宿主的靶点(Liang *et al.* 2010),而在软尾太平喇蛄中发现 ATP 合酶  $\beta$  亚基作为虾造血激素的受体参与了细胞分化(Lin *et al.* 2009),即 WSSV 与虾造血激素有相同的作用蛋白——BP53。根据已有的研究结果,作者推测 WSSV 可能与虾造血激素或其类似物竞争受体,干扰细胞分化,进而导致宿主病变。进一步了解虾造血激素与 WSSV 的作用机制,可以为解析 WSSV 感染的分子机制提供理论依据。

针对虾造血激素的研究才刚刚开始,目前只有两种虾造血激素的 cDNA 序列被克隆和测序,分别为软尾太平喇蛄(Lin *et al.* 2009)和斑节对虾 *Penaeus monodon* (Hsiao *et al.* 2009)。本研究利用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增技术(RACE, Rapid Amplification of cDNA Ends),成功克隆了凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 造血激素基因(*lvast*)全长 cDNA,并实现了原核表达,为进一步研究凡纳滨对虾生长过程中该基因的表达规律及功能奠定了基础,丰富了凡纳滨对虾的基础数据资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

活的健康凡纳滨对虾于 2010 年 4 月购自青岛南山水产品批发市场,体长 8 cm,实验室暂养 3 d 后使用。

### 1.2 引物的设计与合成

根据斑节对虾造血激素基因(*pmast*)序列(GenBank 检索号:AY787657)设计特异引物 A-S 和 A-A,以凡纳滨对虾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物进行测序后根据序列设计用于 RACE 的引物(表 1),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.3 *lvast* 基因全长 cDNA 的克隆

#### 1.3.1 对虾总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

取凡纳滨对虾鳃 50 mg 置于 1 ml Trizol 试剂(Invitrogen)中,按试剂所附操作方法提取总 RNA,经 1%琼

脂糖凝胶电泳检验后,以提取的总 RNA 为模板,以 Oligo (dT)为反转录引物,使用 Trans Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒 (Transgen),按试剂盒操作手册进行 cDNA 第一链的合成。

### 1.3.2 3'-RACE

用接头引物 Adapter-dT 取代 Trans Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒中的 Oligo(dT)<sub>18</sub>,以虾鳃总 RNA 为模板合成 cDNA,20 μl 体系中含 500 ng RNA 模板,10 pmol Adapter-dT,10 μl 2 × TS Reaction Mix,1 μl Enzyme Mix,42 °C 保温 30 min 后,于 85 °C 5 min 终止反应,冰上冷却。产物用接头通用引物 Adapter 分别与基因特异的正向引物 3-W 和 3-N 进行套式 PCR,扩增基因的 3'末端,扩增产物按 Frolanman 等(1988)的方法进行 TA 克隆,挑取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.3.3 5'-RACE

用 Trans Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒反转录虾鳃总 RNA。所得 cDNA 取 10 μl 加入到含 5.0 μl 5 × 加尾缓冲液,12.5 nmol dCTP,2.5 μl 0.1% BSA 的 10 μl 体系中,于 94 °C 热变性 2~3 min,置于冰上冷却 1 min 后稍离心,然后在反应体系中加 1 μl TdT 末端转移酶 (TaKaRa),于 37 °C 反应 30 min 加 poly C 尾,然后于 65 °C 孵育 10 min 灭活 TdT 末端转移酶。以加尾的 dC-cDNA 为模板,用接头通用引物 Adapter-dG 分别与基因特异的反向引物 5-W 和 5-N 进行套式 PCR,扩增基因的 5'末端,扩增产物按上述方法进行 TA 克隆与测序。

### 1.3.4 全长 *lvast* cDNA 序列及其编码的多肽序列分析

利用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和在线 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 分析全长 *lvast* cDNA 序列及其编码的多肽序列,利用 MEGA 4.02 软件建立相关进化树。

## 1.4 表达载体质粒的构建和诱导表达

### 1.4.1 表达载体的构建

设计扩增 *lvast* ORF 全长的引物,以凡纳滨对虾鳃 cDNA 为模板进行 PCR,25 μl 反应体系中含 2.5 μl 10 × Buffer,5 nmol dNTP,引物 ast-F 和 ast-R 各 25 pmol,1U rTaq 酶 (TaKaRa),500 ng cDNA 模板,于 94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 40 s,50 °C 40 s,72 °C 30 s 进行 10 个循环,再 94 °C 40 s,59.2 °C 40 s,72 °C 30 s 进行 25 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳,切取 390~400 bp 左右的区带,经 DNA 凝胶回收试剂盒 (Zymo) 回收后,所得 DNA 产物取 800 ng,加入 20 μl 体系进行双酶切,含 10U *Nco* I,10U *Xba* I,16 °C 连接过夜,连接产物然后转化到 *E. coli* Top10 (Invitrogen) 感受态细胞中,利用蓝白斑筛选方法和菌落 PCR 筛选重组体,提取重组载体质粒,并对该重组载体质粒进行测序鉴定。

### 1.4.2 *LvAST* 的诱导表达

挑取正确克隆的单菌落接种到含 50 μg/ml 氨苄青霉素 (Amp) 的 800 ml LB 液体培养基中,37 °C 活化 8~10 h,再按 1% 体积将活化的培养物接种到 800 ml LB 液体培养基 (Amp,50 μg/ml) 中,37 °C 培养到 OD<sub>600</sub> 值约 0.6 时,加入 L-阿拉伯糖溶液至终浓度为 0.4 mmol/L 进行诱导培养 6 h。离心收集菌体,超声破碎裂解后于 10 000 ×g 离心 10 min,分别收集上清液和沉淀。

## 1.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

对诱导表达的菌体裂解物上清液和沉淀进行 SDS-PAGE,按 Laemmli (1970) 的方法进行。将 SDS-

表 1 实验中用到的引物及其序列

Table 1 Primers used in the experiments

编号 Name	序列 Sequence(5'-3')
A-S	ATTGAATTCATGGCCGTGTCCAGT
A-A	CTCCTCGAGATCTTTGTAGAGCGAATTG
3-W	TGTCCAGTGCAGTCAGAATGT
3-N	CGACTGTTCTTCAAGTGCTG
5-W	TGTAGAGCGAATTGTCTCTCT
5-N	AGGGACACATTCCGTGGTAT
Adapter	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Adapter-dT	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) <sub>16</sub>
Adapter-dG	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(G) <sub>10</sub>
ast-F	AACCATGGAAATGGCCGTGT
ast-R	CCTCTAGACCATCTCTGTAGAGCGAG

PAGE 后的蛋白带用半干转移法于 280mA 经 80 min 转移到 PVDF 膜 (Millipore) 上, 4 °C 用 1% BSA (溶解于 PBST, 含 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 封闭过夜。用 PBST 漂洗 10 min 后, 浸入含 Anti-His-HRP 抗体 (3 000 : 1) (Solarbio) 的 PBST, 在室温下孵育 2 h, PBST 漂洗 3 次, 每次 3 min, 最后用 DAB 浓缩型试剂盒 (Solarbio) 显色。

## 1.6 原核表达的 LvAST 蛋白纯化

收集自 800 ml 诱导表达的裂解物沉淀, 重悬于 100 ml A 液 (6 mol/L 盐酸胍, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4), 经 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液加到 Co<sup>2+</sup> 亲和层析柱 (Clontech), 上样流速 1 ml/min, 用 100 ml A 液冲洗层析柱至吸光值为零后, 再用不同浓度 (20~500 mmol/L) 的咪唑缓冲液 (20~500 mmol/L 咪唑, 5.4 mol/L 盐酸胍, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) 进行梯度洗脱, 洗脱流速 1 ml/min, 收集 150 mmol/L 以上咪唑缓冲液的洗脱峰。将洗脱的 LvAST 蛋白移至透析袋中, 置于复性缓冲液 (50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 4 mol/L 尿素, 1% 甘氨酸) 中, 逐级降低尿素浓度使蛋白复性。

## 2 结果

### 2.1 *lvast* 基因全长的分段扩增

用斑节对虾造血激素基因设计的特异性引物对凡纳滨对虾 cDNA 进行扩增, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物大小约为 390 bp (图 1-A), 从凝胶回收后与 pMD18-T 载体连接, 筛选阳性克隆, 经后续测序表明, 扩增片段的准确长度为 372 bp。

根据已知的 *lvast* 部分序列, 设计外侧引物 3-W, 根据 3'-RACE 操作流程进行第 1 次扩增, 没有得到明显的特异条带 (图 1-B)。再以第 1 次扩增产物的 1/10 稀释度为模板, 用内侧引物 3-N 进行套式 PCR, 结果出现了约 1 000 bp 的特异条带 (图 1-C), 从凝胶回收后进行 TA 克隆并测序, 得到 1 249 bp 核苷酸序列。

同样, 根据已知的 *lvast* 部分序列, 设计外侧引物 5-W, 根据 5'-RACE 操作流程进行第 1 次扩增, 没有得到明显的特异条带 (图 1-D)。进一步以第 1 次扩增的产物的 1/10 稀释度为模板, 用内侧引物 5-N 进行套式 PCR, 结果出现了约 500bp 的特异条带 (图 1-E), 从凝胶回收该条带后进行 TA 克隆并测序, 得到 437bp 核苷酸序列。

### 2.2 *lvast* 基因序列特征

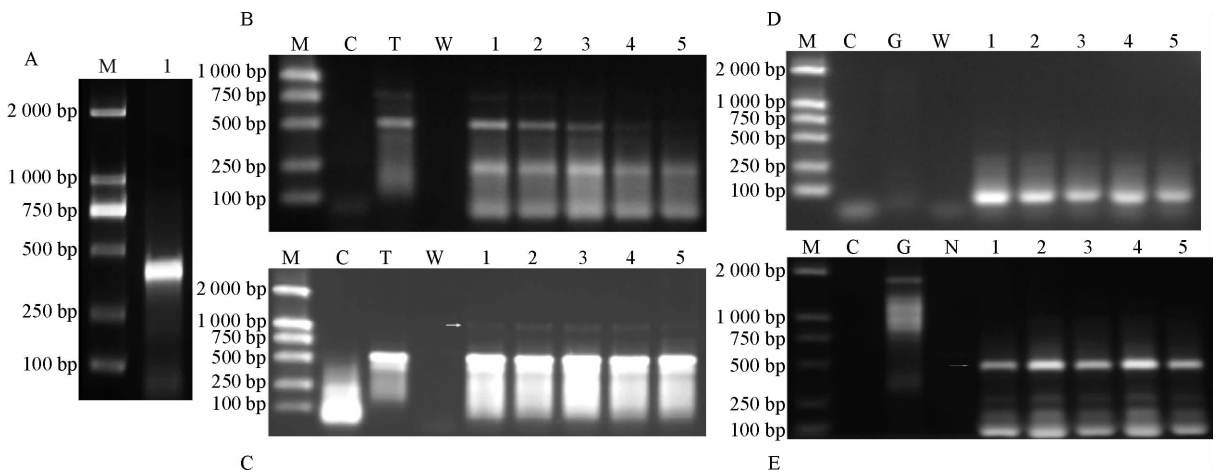
根据 5'-RACE 和 3'-RACE 的结果拼接得 *lvast* 基因全长序列 (GenBank Accession Number: HM594944) (图 2)。该 cDNA 全长共 1 486bp, 含有 1 个 372 bp 开放阅读框, 编码 124 aa, 估算分子量为 13.3kD, 5'-UTR (非编码区) 为 160 bp, 3'-UTR (非编码区) 为 954 bp, 其中包括 1 个 poly A 尾。

### 2.3 LvAST 蛋白结构特征分析

通过在线 SMART 的 PFAM 域分析, 表明 LvAST 蛋白序列的 9~107aa 范围内包含一个前动力蛋白 (Prokineticin) 功能区, 该功能区最明显的特征是存在 10 个半胱氨酸残基, 能形成 5 对二硫键; 对其进行 SMART 的信号肽域分析, 表明 1~21aa 范围包含一个信号肽 (图 3)。对其进行蛋白修饰域 (Motif) 分析, 表明氨基酸序列中 30~33 (SSAD) 和 112~115 (STLD) 为 Casein kinase II 磷酸化位点, 37~42 (GACCTV) 和 89~94 (GMCPGR) 为 N-myristoylation 位点, 110~113 (NEST) 为 N-糖基化位点 (图 2)。疏水性和跨膜性分析表明, 在 1~22aa 的信号肽区域疏水性较强, 在 8~21aa 处具有较强的跨膜性。经二级结构分析表明, 在信号肽区具有较强的 α-螺旋趋势, 在 80~85aa 范围也存在 α-螺旋趋势, 而多数区域以 β-片层为主, 其中有少量 β-转角位点 (图 3)。

### 2.4 虾造血激素基因及其同源基因的分子系统学分析

从 GenBank 上获得了 22 个不同的无脊椎动物来源的虾造血激素基因及其同源的脊椎动物前动力蛋白基



A. *lvast* 基因的扩增。其泳道 M:DL2000 DNA marker,泳道 1:PCR 产物;

B. 3'-RACE 第 1 次扩增。其泳道 M:DL2000 DNA marker;泳道 C:空白对照(无模板);泳道 T:只加接头引物 Adapter-dT;泳道 G:只加外引物 3-W;泳道 1~5:目的片段的温度梯度扩增;

C. 3'-RACE 第 2 次扩增。其泳道 M:DL2000 DNA marker;泳道 C:空白对照(无模板);泳道 T:只加接头引物 Adapter-dT;泳道 G:只加外引物 3-N;泳道 1~5:目的片段的温度梯度扩增;

D. 5'-RACE 第 1 次扩增。其泳道 M:DL2000 DNA marker;泳道 C:空白对照(无模板);泳道 T:只加接头引物 Adapter-dG;泳道 G:只加外引物 5-W;泳道 1~5:目的片段的温度梯度扩增;

E. 5'-RACE 第 2 次扩增。其泳道 M:DL2000 DNA marker;泳道 C:空白对照(无模板);泳道 T:只加接头引物 Adapter-dG;泳道 G:只加外引物 5N;泳道 1~5:目的片段的温度梯度扩增

- A. PCR amplification of astakine gene from *L. vannamei*. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: PCR production;
- B. The first round PCR amplification results of 3'-RACE. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane C: control without template; Lane T: only primer Adapter-dT; Lane G: only primer 3-W; Lane 1~5: amplification of the target gene by gradient temperature.
- C. The second round PCR amplification results of 3'-RACE. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane C: control without template; Lane T: only primer Adapter-dT; Lane G: only primer 3-N; Lane 1~5: amplification of the target gene by gradient temperature.
- D. The first round PCR amplification results of 5'-RACE. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane C: control without template; Lane T: only primer Adapter-dG; Lane G: only primer 5-W; Lane 1~5: amplification of the target gene by gradient temperature.
- E. The second round PCR amplification results of 5'-RACE. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane C: control without template; Lane T: only primer Adapter-dG; Lane G: only primer 5-N; Lane 1~5: amplification of the target gene by gradient temperature

图 1 *lvast* 基因全长的分段扩增

Fig. 1 Amplification of the fragments of *lvast* gene at full-length

因 *pk* 序列,利用 MEGA 4.02 软件对这些序列进行了分子系统学分析,在构建了系统发生树的基础上研究了 *lvast* 基因和其他来源的虾造血激素同源基因之间的进化关系(图 4)。*lvast* 基因序列与斑节对虾造血激素基因(GenBank: AY787657)的相似度为 91%;与软尾太平喇蛄造血激素基因(GenBank: AY787656)有 61%的相似性,与丽蝇蛹集金小蜂的类造血激素基因(GenBank: XM\_001605610)有 45%的相似性;与体虱 Bv8 precursor (GenBank: XM\_002431122)有 44%相似性,而与脊椎动物的 *pk* 前动力蛋白基因的相似性为 43%~36%。比较说明,无脊椎动物的虾造血激素基因与脊椎动物的前动力蛋白基因 *pk* 虽然关系较远,但存在与物种的进化关系相符的重要分子进化关系,表明该基因在各种动物的基本生理机能上具有重要作用。

## 2.5 不同种类造血激素蛋白保守性分析

通过在 NCBI 数据库中的比对,LvAST 的蛋白序列与斑节对虾 AST 及其变体的相似性为 87%~84%;与软尾太平喇蛄 AST 2a/2b 的相似性为 56%,与昆虫的类造血激素相似性为 43%~35%,与脊椎动物的前动力蛋白相似性为 43%~36%。

蛋白序列保守性分析表明,从无脊椎动物到脊椎动物的所有 AST 及其同源蛋白都具有富含半胱氨酸结构域的 C-端(图 5-A),在 10 个半胱氨酸残基上显示出高度的保守性,可形成 5 对二硫键,其中一个半胱氨酸-脯氨酸-半胱氨酸(CPC)的连续结构域在所有物种中完全没有变化,是该蛋白的核心结构,上述比较说明 10 个半

```

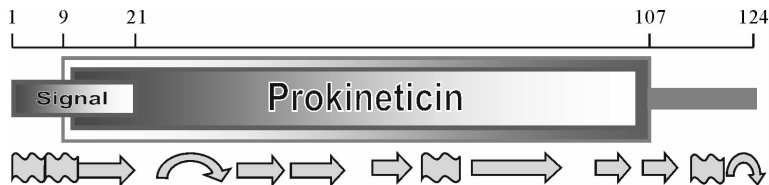
1  CCGATCAGTT GAACGTTGAC TTGGAAGAGT AAGGTTGTCA AGGTCGCCTT TGGGATCGGC
61  GCGCGCATAT TTACC CGGAA ACCGCCGAGT ATTAAGAAGT GGATCTCTG TGTCTCTTAT
121 TATCGGCTTA ACTACATTC AGCAGCGATC AATCAACGGA ATGGCCGTGT CCAATGCAGT
                                     M A V S S A V
181 CAGAAATGTTG GCAGCGGCCT GCCTTGTTGGT GTCAGCAGTC GGAATGCGCA GACTGGGCGA
    R M L A A A V L V V S A V G M R R L G D
241 CTGTTCTTCA AGTGTGACT GCGGACCTGG CGCCTGCTGT ACAGTAGGCT TCAACCGCTA
    C S S S A D C G P G A C C T V G F N R Y
301 CAGCGTGCCG CAGTGTACTC CCCTGGGCGA CCTGGGGAC TGGTGTGCA TCATGAACCC
    S V P Q C T P L G D L G D W C R I M N P
361 CCCGC GGGAG CTGAATCTTG CGTACC CCAA CGGCC TTCAG ATTGTCC TTA CGGATACATA
    P R E L N L A Y P N G L Q I V L T D T Y
421 CCACGGAA TGTCCTGCA GACCTGAGCT CGTCTGCTCC AGGCGCTCGT GCACCTGCCA
    H G M C P C R P E L V C S R A S S T C Q
481 GTTGC CGAAC GAGAGCAGCG TGGACCAGGA GGACA ACTCG CTCTACAGAG ATTAATCGGC
    L P N E S T L D Q E D N S L Y R D -
541 TGC GC TTTAA GCGAGCTGAG AGCTGCGCAA GCTCAATCCA AAGG GAAAGA TTTCTCTAAA
601 GACAAAACCC AAAAGCGGTG ACAGAAAGACC CAA GTTCTTG CACA GAAAGA CGA GTCGCCT
661 TCGTGTTC CC CGAACCTCCA GTCAGAGGT TGTGTA TTGCA TATC AGCTTC CTC TTC CGCG
721 TTA CTATA TC TG TACCTGTT ACTACACTCC CGTGC TTCGA ATCT AGATTT TGG TTT CGTC
781 TGT GAGGAAG TT CGTGAAG TTAGGGCCCT TTGTC FCCCT CTTTGTATAC GGAGTTGTCA
841 TACTCAGCAC ATGTGTGTGT GCATCAGAA TATGTCACACA TTATGTGTGTC TTCAATGAA
901 GCATAGCC TC AAATACTAT GAGT TTTCAA GCAACTTTTC CAATGAGCAC GCTAATGAAA
961 ACAAGACGTT ATTTT TTTGT TTTGTT TTTG TTTGACTGGT GTTGCTCAT T GAGTCAATCA
1021 AAACCATAGT TTTT TGTGGC TGTT TATATGG TAAATATCTA TAAACAAGAT GCATTTAAA
1081 CAGTTG CAGT ACCTT GGAAG CTGAGCTTGA TAGGTATTAT TTCA TCCGC T TCTAAATACA
1141 GAGTACATAC GAAGTACAAA CGCATATTTA AACAGAAAT TGGATGCAA AGAATCATTC
1201 TTCGGTTGAT GTTACTTGA ACAACA CATC AGATGGAATG TGCCATGTTA TAGTTGACGT
1261 TGTAGGTTCT GAAGTAGTGG GAGTGTGTTG ATGAAAATAC CAGAGCATTC TTAGCAGCGA
1321 GATAAACGTT TTCTCTGTAT ATGTAAAGCAC ACTAATATTA TATACTTTG CTTTATTGCC
1381 TTTTGTATG ATATTC CAG CACC TTGAGG CTGAGGAGGT ACCAAAGATA GCC TTCATGG
1441 GCATTTGATA ATGATTTTAT GAAA TAAAGA ATAGCGACAT GAAAAA
    
```

氨基酸序列中 Casein kinase II 磷酸化位点(SSAD,STLD)、N-myristoylation 位点(GACCTV,GMCP CR)和 N-glycosylation 位点(NEST)在图中加灰色阴影和下划线表示

The Casein kinase II phosphorylation site (SSAD, STLD), the N-myristoylation site (GACCTV, GMCP CR), and the N-glycosylation site (NEST) are marked by the gray background and underline

图 2 *lvast* 基因 cDNA 全长序列及编码氨基酸序列

Fig. 2 The full-length nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence of *lvast* gene cDNA



蛋白序列的 1~21aa 包含一个信号肽序列;9~107aa 包含一个前动力蛋白(Prokineticin)功能区;波浪块代表  $\alpha$ -螺旋;横向箭头代表  $\beta$ -片层;弯箭头代表  $\beta$ -转角

A signal domain was found among 1~21aa, and a prokineticin (PK) domain was found among 9~107aa; the wave blocks express the  $\alpha$ -helixes; the right arrows express  $\beta$ -sheets; and the bent arrows express the  $\beta$ -turns

图 3 *LvAST* 氨基酸序列的 SMART 蛋白功能分析及二级结构预测

Fig. 3 The SMART analysis for the protein function and the secondary structure prediction on the amino acid sequence of the *LvAST*

胱氨酸和 CPC 结构域在保证该类蛋白的基本生物学功能上具有十分重要的意义。在无脊椎动物水平,还存在 RYS 保守序列(图 5-B)。在甲壳类水平,CPC 的结构域扩大为连续的 6 个氨基酸 GMCP CR 保守结构,还存在 CGP、TCQ 等保守序列(图 5-C)。

## 2.6 *lvast* 基因重组表达载体的构建及原核表达产物分析

利用 *lvast* 基因的特异引物进行 PCR,扩增出了 372 bp 的 ORF 片段。将该片段与 pBAD/gIII A 质粒连接,构建重组表达载体 pBAD/gIII A-*lvast*,转化 *E. coli* 后,经 L-阿拉伯糖 37℃ 诱导,以包涵体形式成功表达

出 LvAST。包涵体沉淀的 SDS-PAGE 分析显示,在约 20kD 处有明显条带(图 6-A),分子量与预期相符。进一步用 6×His-tag 抗体进行 Western-blot 分析,表明只有 *lvast* 的重组表达载体的包涵体沉淀在约 20kD 处出现明显条带(图 6-B),验证了该区带有 6×His-tag,说明成功表达出重组凡纳滨对虾造血激素蛋白(rLvAST)。

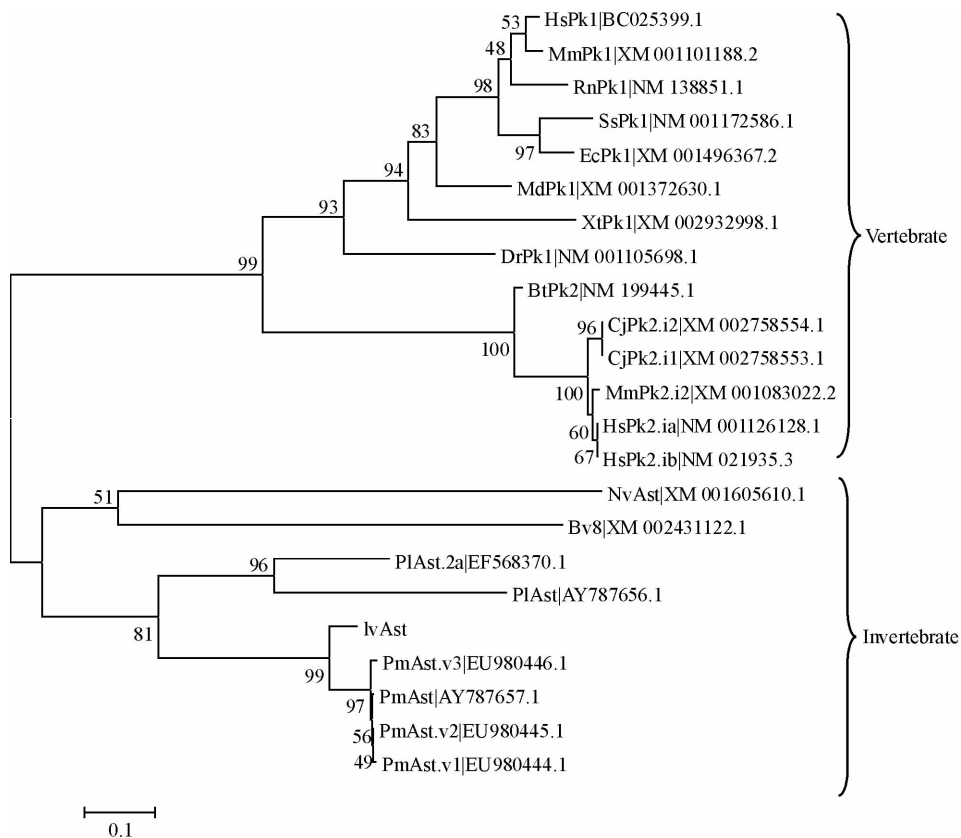
## 2.7 rLvAST 蛋白纯化

将复性后的蛋白经截留分子量为 3kD 的超滤管(Millipore)超滤浓缩后,经 SDS-PAGE 电泳后在 20kD 的位置出现了一条蛋白条带(图 7),通过质谱分析,此条带为 LvAST 蛋白。

## 3 讨论

AST 最早于 2009 年由 Lin 等在软尾太平洋喇蛄中发现,命名为 Astakine,其词意为“螯虾细胞因子”;同年 Hsiao 等(2009)从斑节

对虾克隆出了斑节对虾造血激素,并取中文名为“造血激素”。与软尾太平洋喇蛄造血激素和斑节对虾造血激素(Hsiao *et al.* 2009)相似,本研究克隆到的凡纳滨对虾造血激素蛋白序列中包含有一个脊椎动物前动力蛋白(Prokineticin, PK)功能域,PK 是一类分泌蛋白,存在于脊椎动物中,如蛙类、鱼类、哺乳类等(Hsiao *et al.* 2009),并在不同的组织中有分布,如肝脏、心脏、生殖器官、各种腺体等(Elly *et al.* 2008)。该蛋白在脊椎动物中有促血管内皮细胞增生的作用,在血管生成、神经形成调节、创伤感应、昼夜节律控制和其他复杂行为的调制等方面具有重要作用(Melchiorri *et al.* 2001; Ng *et al.* 2005; Matsumoto *et al.* 2006)。另外也有报道该类蛋白参与心肌梗塞、造血、免疫调节、肿瘤发生和炎症过程(LeCouter *et al.* 2004; Martucci *et al.* 2006)。PK 蛋白 N-端保守序列被认为是受体结合位点(Bullock *et al.* 2004)。LvAST 具有 PK 家族所具有的 10 个半胱氨酸残基和 CPC 结构域,但其 N-端没有 PK 蛋白中保守的 AVITGA。保守的 CPC 结构域在甲



lvAst=*L. vannamei* astakine; HsPk1=*Homo sapiens* Prokineticin 1; MmPk1=*Macaca mulatta* prokineticin-1; RnPk1=*Rattus norvegicus* prokineticin-1 precursor; EcPk1=*Equus caballus* similar to Prokineticin 1; SsPk1=*Sus scrofa* prokineticin-1; MdPk1=*Monodelphis domestica* similar to prokineticin 1; XtPk1=*Xenopus tropicalis* prokineticin-1-like; DrPk1=*Danio rerio* prokineticin-1; CjPk2 i2=*Callithrix jacchus* prokineticin-2-like isoform 2; CjPk2 i1=*Callithrix jacchus* prokineticin-2-like isoform 1; MmPk2 i2=*Macaca mulatta* prokineticin-2 isoform 2; HsPk2 ib=*Homo sapiens* prokineticin-2 isoform b precursor; HsPk2 ia=*Homo sapiens* prokineticin-2 isoform a precursor; BtPk2=*Bos taurus* prokineticin-2 precursor; PmAst v2=*P. monodon* astakine variant 2; PmAst v1=*Penaeus monodon* astakine variant 1; PmAst=*Penaeus monodon* astakine; PmAst v3=*P. monodon* astakine variant 3; PIAst 2a=*Pacifastacus leniusculus* astakine 2a; PIAst=*P. leniusculus* astakine; NvAst=*Nasonia vitripennis* similar to astakine; Bv8=*Pediculus humanus* corporis Bv8

图4 利用 NJ 法绘制的不同动物的虾造血激素同源基因进化树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of nucleotide sequences of astakine genes and its homologous gene *pk* from different species

```

PmAst|Q56R10.1      --MAVSSAVRMLSVACLIVVSAAG--MRRIGDCSSS--ADCGPGACCTIGF 44
lvAst               --MAVSSAVRMLAAACLIVVSAVG--MRRIGDCSSS--ADCGPGACCTVGF 44
PlAst|Q56R11.1     -----MKMRGVSVGVLVVAMMSG--LAMAGSCNSQEPDPCGPECCIQGW 42
NvAst|XP_001605660.1 --MTSAVILLLSIMIGSLYAAAEIQSIPP--SWVECTSHLDCRPGSCCTIGQ 48
HsAst|EFN86043.1   --MSSILSILLIITVGLVFSNQG-----CTNNDACLSDECCLLGP 39
EcPk1|XP_001496417.1 MRGATRVSLMLLVT-----VSDCAVITGACERDVQCGPGTCCAVSL 42
HsPk1|AAH25399.1  MRGATRVSLMLLVT-----VSDCAVITGACERDVQCGAGTCCALS 42
SsPk1|NP_001166057.1 MRGGAQVSVMLLVT-----VSDCAVITGACERDVQCGPGTCCAVSL 42
MmPk2.i2|XP_001083022.1 MRSPRCAPLILLLLPPLILLTPRVGDAAVITGACDKDQSCGGGMCCAVSI 50
Bv8|XP_002431167.1  MMKKEFFKSALFASVFLILLTASIVDTRPPYIECSDTLECGLYCVCVLGN 50

```

: \* . \* \* .

```

PmAst|Q56R10.1      NRYSIPOCTPLGDLGDCRVMPRELS-LAYPNGLQVLLTDSYHGMCP 93
lvAst               NRYSVPOCTPLGDLGDCRVMPRELN-LAYPNGLQVLLTDSYHGMCP 93
PlAst|Q56R11.1     MRYSYTRGCAPLGEGSSCNVFI-----QAPVKGFIYGMCP 78
NvAst|XP_001605660.1 QRYSI PMCSQPPTLGEQCRPNPRLTINTTLYPDGSTILIKDAYLMLCP 98
HsAst|EFN86043.1   MRYSYTPICIPYQKGDQCRVN-AEFVTINLTYPNNSHLEVRNVSYLCP 88
EcPk1|XP_001496417.1 WLRGLRMCTPLGREGDDCHPGS-----HKI PFFRKRQHHTCP 80
HsPk1|AAH25399.1   WLRGLRMCTPLGREGEECHPGS-----HKI PFFRKRQHHTCP 80
SsPk1|NP_001166057.1 WLRGLRICTPLGEGEQCHPGS-----HKV PFFSRKRQHHTCP 80
MmPk2.i2|XP_001083022.1 WVKSIRICTPMGKLGDSCHPLT-----RKV PFFSRKRQHHTCP 88
Bv8|XP_002431167.1  GRYSLPRCVQLGKINDYCRPGLNPLNVT-VSYPDGENVELSHIYSTMCPC 99

```

- \* . . \* .

\*\*\*

```

PmAst|Q56R10.1      RPELACSRATS--TCQLPQESTHQEDNSLYKD 124
lvAst               RPELVCSRASS--TCQLPNESTLDQEDNSLYRD 124
PlAst|Q56R11.1     RAGLWCTRPSA--TCQLP--SQDNTLDSYY-- 104
NvAst|XP_001605660.1 STGLSCDSRIG--LCQVKQQAEEA----- 119
HsAst|EFN86043.1   VKETSCKNETG--ICD----- 102
EcPk1|XP_001496417.1 LPNLLCARGPDGGRYRCSTLDLKNIF----- 105
HsPk1|AAH25399.1   LPNLLCSRFPDGRYRCSDMLKNIF----- 105
SsPk1|NP_001166057.1 LPNLLCSRALGGYRCSADLKNIF----- 105
MmPk2.i2|XP_001083022.1 LPGLACLRTSFNFICTLARK----- 108
Bv8|XP_002431167.1  QEGLYCSDNSG--MCIDQLEDLLNTI----- 124

```

A

```

PmAst|Q56R10.1      MAVSSAVRMLSVACLIVVSAAGMRRIG-----DCSSSADCGPGACCTIGFNRYSIPOCTIP 54
lvAst               MAVSSAVRMLAAACLIVVSAVGMRRIG-----DCSSSADCGPGACCTVGFNRYSVPOCTIP 54
NvAst|XP_001605660.1 MTSAVILLLSIMIGSLYAAAEIQSIPP--SWVECTSHLDCRPGSCCTIGQRYSI PMCS 58
HsAst|EFN86043.1   MSSILSILLIITVGLVFSNQG-----CTNNDACLSDECCLLGPMRYSTPTICP 49
PlAst|Q56R11.1     MKMRGVSVGVLVVAMMSGLAMAGSCN-----SQEPDPCGPECCIQGWMRYSTRGCAP 52
Bv8|XP_002431167.1  MMKKEFFKSALFASVFLILLTASIVDTRPPYIECSDTLECGLYCVCVLGN 60

```

\* : . : \* \* \* \* \*

```

PmAst|Q56R10.1      LGDLGDCRVMPRELS-LAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELACSRATSTCQLPQEST 113
lvAst               LGDLGDCRVMPRELN-LAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELVCSRASSSTCQLPNEST 113
NvAst|XP_001605660.1 QPTLGEQCRPNPRLTINTTLYPDGSTILIKDAYLMLCPSTGLSCDSRIGLCQVKQQAEE 118
HsAst|EFN86043.1   YQKGDQCRVN-AEFVTINLTYPNNSHLEVRNVSYLCPVKETSCKNETGICD----- 102
PlAst|Q56R11.1     LGEAGSSCNVFI-----TQAPVKGFIYGMCP RAGLWCTRPSATCQLPQSDN 98
Bv8|XP_002431167.1  LGKINDYCRPGLNPLNVT-VSYPDGENVELSHIYSTMCPCQEGLYCVCVLGN 119

```

.. \* . : : : \* \* \* \* \* \* . \*

```

PmAst|Q56R10.1      QHQEDNSLYKD 124
lvAst               LDQEDNSLYRD 124
NvAst|XP_001605660.1 A----- 119
HsAst|EFN86043.1   -----
PlAst|Q56R11.1     TLDSYY----- 104
Bv8|XP_002431167.1  LLNTI----- 124

```

B

```

PmAst.v1|ACI02321.1 MAVSSAVRMLSVACLIVVSAAGMRRIGDCSSS--ADCGPGACCTIG-FNRYSIPOCTPLGDL 58
PmAst.v2|ACI02322.1 MAVSSAVRMLSVACLIVVSAAGMRRIGDCSSS--ADCGPGACCTIG-FNRYSIPOCTPLGDL 58
PmAst.v3|ACI02323.1 MAVSSAVRMLSVACLIVVSAAGMRRIGDCSSS--ADCGPGACCTIGSNRYSIPOCTPLGDL 59
PmAst|Q56R10.1      MAVSSAVRMLSVACLIVVSAAGMRRIGDCSSS--ADCGPGACCTIG-FNRYSIPOCTPLGDL 58
lvAst               MAVSSAVRMLAAACLIVVSAVGMRRIGDCSSS--ADCGPGACCTVGF-FNRYSVPOCTPLGDL 58
PlAst.2a|ABQ23255.1 MLERSGVNVLVIMCGVTMAA-HRRLGHCSSST-ASCSPSSCCRVG-QMRYSIPTCVPHGDL 57
PlAst.2b|ABQ23256.1 MLERSGVNVLVIMCGVTMAA-HRRLGHCSSST-ASCSPSSCCRVG-QMRYSIPTCVPHGDL 57
PlAst|Q56R11.1     MKMRG--VSVGVLVAMMSGLAMAGSCNSQEPDPCGPECCIQG-WMRYSTRGCALPGA 56

```

\* . : \* . \* \* \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

```

PmAst.v1|ACI02321.1 GDWCRVMPRELSLAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELACSRATSTCQLPQESTHQED 118
PmAst.v2|ACI02322.1 GDWCRVMPRELSLAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELACSRATSTCQLPQESTHQED 118
PmAst.v3|ACI02323.1 GDWCRVMPRELSLAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELACSRATSTCQLPQESTHQED 119
PlAst|Q56R10.1     GDWCRVMPRELSLAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELACSRATSTCQLPQESTHQED 118
lvAst               GDWCRVMPRELNLAYPNGLQVLLTDSYHGMCP RPELVCSRASSSTCQLPNESTLDQED 118
PlAst.2a|ABQ23255.1 GDWCKTSAESQDNTLNYPNDLQTKIEDGYLGMCP RAGLVCSRSTSTCQLPRTNP--ED 115
PlAst.2b|ABQ23256.1 GDWCKTSAESQDNTLNYPNDLQTKIEDGYLGMCP RAGLVCSRSTSTCQLPRTNP--ED 115
PlAst|Q56R11.1     GSSCNVFI-----QAPVKGFIYGMCP RAGLWCTRPSATCQLP-----SQD 97

```

\* . \* . : \* : . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

```

PmAst.v1|ACI02321.1 NSLYKD- 124
PmAst.v2|ACI02322.1 NSLYKD- 124
PmAst.v3|ACI02323.1 NSLYKD- 125
PmAst|Q56R10.1     NSLYKD- 124
lvAst               NSLYRD- 124
PlAst.2a|ABQ23255.1 NTLGIH 122
PlAst.2b|ABQ23256.1 NTLGIH 122
PlAst|Q56R11.1     NTLDSYY 104

```

C

\* : \*



- A. LvAST 与不同物种同源性氨基酸序列比较;  
 B. LvAST 与不同无脊椎同源性氨基酸序列比较;  
 C. LvAST 与其他虾造血激素氨基酸序列比较

A. Comparison of amino acid sequences of astakine from *L. vannamei* and other species (invertebrates and vertebrates);

B. Comparison of amino acid sequences of astakine from *L. vannamei* and other invertebrates;

C. Comparison of amino acid sequences of astakine from *L. vannamei* and other Shrimps. A. lvAst=*Litopenaeus vannamei* astakine;

HsPk1=*Homo sapiens* Prokineticin 1; SsPk1=*Sus scrofa* prokineticin-1; MmPk2 i2=*Macaca mulatta* prokineticin-2 isoform 2;

PmAst=*Penaeus monodon* astakine; PlAst=*P. leniusculus* astakine; NvAst=*Nasonia vitripennis* similar to astakine;

Bv8=*Pediculus humanus* corporis Bv8; EcPk1=*Equus caballus* similar to Prokineticin 1; HsAst=*Harpegnathos saltator*. astakine.

B. lvAst=*L. vannamei* astakine; PmAst=*Penaeus monodon* astakine; PlAst=*P. leniusculus* astakine;

NvAst=*Nasonia vitripennis* similar to astakine; Bv8=*Pediculus humanus* corporis Bv8; HsAst=*Harpegnathos saltator*. astakine.

C. lvAst=*L. vannamei* astakine, PmAst=*Penaeus monodon* astakine, PmAst v1=*Penaeus monodon* astakine variant 1,

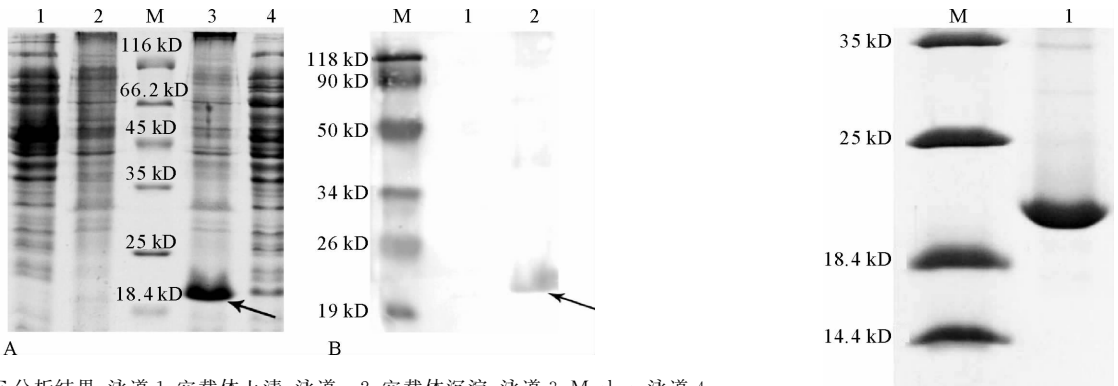
PmAst v2=*Penaeus monodon* astakine variant 2, PmAst v3=*Penaeus monodon* astakine variant 3, PlAst=*Paci fastacus leniusculus* astakine,

PlAst 2a=*P. leniusculus* astakine 2a, PlAst 2b=*P. leniusculus* astakine 2b

图5 LvAST 与其同源性氨基酸序列比较(含有 10 个半胱氨酸,形成 5 对二硫键)

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences of astakine from *L. vannamei* and other species

(The protein contains 10 cysteine residues that can form five disulfide bridges)



A

B

A. SDS-PAGE 分析结果:泳道 1. 空载体上清,泳道 2. 空载体沉淀,泳道 3. Marker,泳道 4.

重组菌沉淀,泳道 5. 重组菌上清;

B. Western-blot 分析结果:泳道 1. 空载体上清,泳道 2. 空载体沉淀,泳道 3. Marker,泳道 4.

重组菌沉淀,泳道 5. 重组菌上清

A. SDS-PAGE analysis: Lane 1: pBAD/ gIII A supernatant; Lane 2: pBAD/ gIII A sedi-

ment; Lane 3: Protein marker; Lane 4: pBAD/ gIII A-*lvast* inclusion body sediment;

Lane 5: pBAD/ gIII A-*lvast* inclusion body supernatant;

B. Western-blot analysis: Lane 1. Protein marker; Lane 2. pBAD/ gIII A sediment; Lane 3,

pBAD/ g III A-*lvast* inclusion body sediment

图6 原核表达产物分析

Fig. 6 Analysis of prokaryotic expression product

壳类中扩大为连续的 6 个氨基酸 GMCP CR 较保守序列,该序列还被发现存在于 CTP 合酶(ZP05024868)中。说明 LvAST 可能不仅具有 PK 蛋白的一些功能,还有自身独特的一些功能。

对 LvAST 氨基酸序列分析表明,在其 N-端含有一段信号肽。信号肽是蛋白前体 N-端的一段氨基酸序列,一般包含有疏水核心或有疏水氨基酸组成,其主要作用是引导蛋白质跨膜、分泌及在细胞的正确定位(Williams *et al.* 2000)。当蛋白质跨膜后,信号肽被剪掉并可能被消化降解(Izard *et al.* 1994)。信号肽可以通过互换以确保蛋白能独立穿膜,这种互换既可以发生在同一机体的不同器官,也可以发生在不同物种中(Roggenkamp *et al.* 1981; Talmadge *et al.* 1980)。信号肽 C-端氨基酸序列也可能参与了转膜运动。此外,信号肽氨基酸的疏水性与转膜有一定的相关性(Williams *et al.* 2000)。LvAST 蛋白的前 21 个氨基酸信号肽区域疏水性较强,这表明 LvAST 蛋白存在跨膜作用,经跨膜切割信号肽后的成熟蛋白可能会具有分泌能力。

本研究曾尝试使用 RACE 试剂盒进行全基因克隆,但未得到满意的结果,后改用经典的 RACE 克隆方法

泳道 M: Marker,泳道 1: 纯化的重组 LvAST 蛋白

Lane M: Marker; Lane 1: purified rLvAST.

图7 钴亲和层析纯化重组 LvAST 蛋白

Fig. 7 Purification of rLvAST using Co<sup>2+</sup> chelating affinity chromatography

才获得 *lvast* 全长 cDNA。经典的 RACE 克隆方法虽然步骤较专业试剂盒繁琐,但在成本方面具有一定的优势,且成功率并不低于试剂盒。

在本实验室对 WSSV 感染机制的研究中,发现 LvAST 蛋白对 WSSV 感染有一定的免疫保护作用,且 BP53 对 VP37 和 LvAST 均有结合作用(待发表)。本研究构建 pBAD/ gIII $\alpha$ -*lvast* 重组表达载体,通过亲和层析法制备了大量的纯化蛋白,将为上述研究的深入提供物质保障。目前,本实验室正在深入开展这几种蛋白的功能研究,以期进一步了解 AST 与 WSSV 的作用机制。

## 参 考 文 献

- 陈受宜,朱立煌. 1994. PCR 聚合酶链式反应. 北京:科学出版社,25~35
- 罗展,黄捷,周丽. 2007. 抗白斑综合征病毒(WSSV)感染途径研究进展. 海洋水产研究, 28(5):116~123
- 黄捷,蔡生力,宋晓玲,王崇明,于佳,杨丛海. 1995. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究. 海洋水产研究,16(1): 51~58
- Bullock, C. M., Li, J. D., and Zhou, Q. Y. 2004. Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. Mol. Pharmacol. 65(3): 582~588
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. 1988. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(23): 8998~9002
- Hoogerwerf, W. A. 2006. Prokineticin 1 inhibits spontaneous giant contractions in the murine proximal colon through nitric oxide release. Neurogastroenterology and Motility,18(6): 455~463
- Hsiao, C. Y., and Song Y. L. 2010. A long form of shrimp astakine transcript: Molecular cloning, characterization and functional elucidation in promoting hematopoiesis. Fish & Shellfish Immunology, 28(1): 77~86
- Izard, J. W., and Kendall, D. A. 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. Mol. Microbiol. 13(5): 765~773
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., and Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191: 45~52
- Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., and Kreil, G. 2003. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions, EMBO Reports,4(2 003), 469~473
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(7): 680~685
- LeCouter, J., Zlot, C., Tejada, M., Peale, F., and Ferrara, N. 2004. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(48): 16813~16818
- Lorenzon, S., De Guarrini, S., Smith, V. J., and Ferrero, E. A. 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*. Fish & Shellfish Immunol. 9(1): 31~50
- Liang, Y., Cheng, J. J., Yang, B., and Huang, J. 2010. The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Virol, J. 7: 144~152
- Lin, X., Kim, Y. A., Lee, B. L., Söderhäll, K., and Söderhäll, I. 2009. Identification and properties of a receptor for the invertebrate cytokine astakine, involved in hematopoiesis. Exp. Cell Res. 315(7): 1171~1180
- Martucci, C., Franchi, S., Giannini, E., Tian, H., Melchiorri, P., Negri, L. *et al.* 2006. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. Br. J. Pharmacol. 147(2): 225~234
- Matsumoto, S., Yamazaki, C., Masumoto, K. H., Nagano, M., Naito, M., Soga, T. *et al.* 2006. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(11): 4140~4145
- Melchiorri, D., Bruno, V., Besong, G., Ngomba, R. T., Cuomo, L., De Blasi, A. *et al.* 2001. The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways. Eur. J. Neurosci. 13(9): 1694~1702
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., and Melchiorri, P. 2007. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. Life Sci. 81(14): 1103~1116
- Ng, K. L., Li, J. D., Cheng, M. Y., Leslie, F. M., Lee, A. G., and Zhou, Q. Y. 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. Science, 308(5730): 1923~1927
- Ngan, E. S., and Tam, P. K. 2008. Prokineticin-signaling pathway. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40(9): 1679~1684
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture, 172(1-2): 125~145
- Roggenkamp, R., Kustermann-Kuhn, B., and Hollenberg, C. P. 1981. Expression and processing of bacterial  $\beta$ -lactamase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(7): 4466~4478
- Talmadge, K., Stahl, S., and Gilbert, W. 1980. Eucaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(6): 3369~3373
- Takahashi, Y., Itami, T., and Kondo, M. 1995. Immundefense system of Crustacean. Fish Pathol. 30(2): 141~150
- Williams, E. J., Pal, C., and Hurst, L. D. 2000. The molecular evolution of signal peptides. Gene, 253(2): 313~322