

文章编号: 1674-7054(2013)01-0017-08

日本囊对虾 *apo-14* 基因的全克隆及序列分析

乔莹, 王军, 钟声平, 刘洪涛, 毛勇

(厦门大学海洋与地球学院 福建 厦门 361005)

摘要: 以日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 肝胰腺组织为实验材料, 提取总 RNA, 通过 3' 以及 5'-RACE 基因克隆技术, 首次在日本囊对虾中克隆到载脂蛋白 *apolipoprotein-14* (*apo-14*) 基因的全长序列, 包含完整的 ORF 以及 3'-UTR 和 5'-UTR。日本囊对虾 *apo-14* cDNA 序列全长为 784 bp, 其中 ORF 长度为 420 bp, 编码 139 个氨基酸。对虾 *apo-14* 氨基酸序列与其他鱼类 *apo-14* 氨基酸序列有较高的相似性。

关键词: 日本囊对虾; 载脂蛋白; *apo-14*; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q 781

文献标志码: A

载脂蛋白 (apolipoprotein) 是动物体内脂质的主要载体, 除了在血脂的运输中起重要作用外, 还可以作为某些生物酶的辅助因子、配体结合受体蛋白和脂质转运载体, 以调节生物体组织内脂蛋白的代谢和吸收^[1-2]。载脂蛋白基因编码的 14 kDa 载脂蛋白作为高密度脂蛋白 HDL 的重要组成成分, 最早是在日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 中鉴定获得的^[3]。随后, 在鲤 (*Cyprinus carpio*)、河豚 (*Takifugu rubripes*)、橙点石斑鱼 (*Epinephelus bleekeri*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 以及黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 等 11 种硬骨鱼中都有发现^[4]。其主要作用是参与鱼类各个组织的代谢, 特别是参与鱼的消化器官内脂质运输与代谢作用, 维持脂质代谢的稳态与平衡。

日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 广泛分布于印度、澳大利亚、红海、坦桑尼亚、菲律宾及日本的东南沿海海域, 是我国重要的经济养殖虾类。已有研究表明, 富含脂类的食物对虾类的体质量增长^[5]、性腺的发育、增强应激性^[6-7] 以及幼虾的生长和蜕皮过程均有显著的影响^[8]。因此, 清楚了解对虾脂质代谢和运输过程, 对于日本囊对虾育种、品种改良以及养殖过程中饲养成本的控制均具有重要的指导意义。目前, 对于虾类养殖过程中的脂类营养代谢以及脂类运输途径的研究较少。笔者通过基因克隆, 首次在对虾体内得到了载脂蛋白 *apolipoprotein-14* (*apo-14*) 基因的全长序列, 并与其他物种的蛋白序列进行了比对分析, 旨在为深入研究该基因的具体功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 以鲜活的日本囊对虾肝胰腺组织为实验材料, 提取总 RNA。反应中用的 dNTP、PCR 缓冲液、*Taq* 酶、限制性内切酶、GeneRuler DNA Mixture ladder、Trizol 试剂和琼脂糖均购自 MBI Fermentas 公司; 反转录试剂盒、胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 RNA 提取 取 0.5 g 对虾肝胰腺置于预冷的玻璃匀浆器中, 加入 300 μ L 的 Trizol 进行组织匀浆; 再加入 300 μ L 的氯仿均匀混合, 4 $^{\circ}$ C 32 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min; 小心吸取上清液, 移入离心管中, 再加入相同体积预冷的异丙醇, 4 $^{\circ}$ C 3 200 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min; 移去上清液, 用 1 mL $\varphi = 70\%$ 的乙醇冲洗沉淀 2 次, 加入适量经 DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理过的蒸馏水溶解, -80 $^{\circ}$ C 保存。

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 国家虾产业技术体系岗位专家项目“日本囊对虾育种”(CARS-47)

作者简介: 乔莹 (1986-) 男, 山西临汾人, 厦门大学海洋与地球学院 2008 级硕士研究生。

通信作者: 毛勇 (1970-) 男, 湖南张家界人, 厦门大学海洋与地球学院高级工程师。E-mail: maoyong@xmu.edu.cn

1.3 引物设计与 RT-PCR 反应 参照已报道的其他物种的 *apo-14* 基因序列,设计并合成 PCR 5'端以及 3'端引物。按照逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 逆转录合成和 PCR 扩增反应。扩增完成后,取 5 μ L 的 PCR 产物做 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳,检测 PCR 扩增结果。

1.4 目的基因克隆与序列分析 目的基因经回收纯化后,根据 T 克隆试剂盒说明指导,连接于 PMD18T 克隆载体。将连接产物转化于 DH5 α 感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑菌于液体 LB 培养基中培养,提取质粒,通过 PMD18T 克隆载体通用引物 PCR 反应和酶切反应,鉴定筛选重组子。阳性克隆菌液送生物公司测序鉴定。运用 SignalP 3.0 进行信号肽预测,采用 NetNGlyc 1.0、NetOGlyc 3.1 和 NetPhos 2.0 进行糖基化和磷酸化位点的分析。采用 Bioedit 进行多重序列一致性与遗传距离比对,用 MEGA4.1 构建系统进化树。

2 结果与分析

克隆得到的日本囊对虾 *apo-14* 基因 cDNA 序列全长为 784 bp,包含 1 个 420 bp 的单一开放阅读框,起始密码子 ATG 位于 57 ~ 59 位,终止密码子位于 474 ~ 476 位。其编码 139 个氨基酸,相对分子质量约为 14×10^3 的蛋白。该基因 cDNA 序列 3' - 非编码区长约 308 bp,多腺苷酸化信号序列位于 669 ~ 674 位,3' - 末端具有 poly(A) 尾(见图 1)。

TGGTGCAGTTGACTCCACTGCTTTATTTCTCTCTACAGGAATTCTCACCAGCACAAG

57	ATG	AAG	CTG	ACA	TTT	GCT	CTC	ATC	CTT	GCA	CTC	CAA	GTG	TCA	GTG	TGT	TTC	AGT	TCT	TTG	
1	M	K	L	T	F	A	L	I	L	A	L	Q	V	S	V	C	F	S	S	L	20
117	CCT	GAG	CCC	GAC	AAG	GAG	TTA	GTT	GAG	AAA	TAT	ACT	GGG	CTG	AAG	GAA	GTT	TTC	CTT	AAG	
21	P	E	P	D	K	E	L	V	E	K	Y	T	G	L	K	E	V	F	L	K	40
177	AGG	CTT	GTC	ACT	GCT	TAT	GGA	AAG	TTC	AAA	GAC	GCC	ATT	CAG	CCA	CTG	CTA	GAG	AGC	TCA	
41	R	L	V	T	A	Y	G	K	F	K	D	A	I	Q	P	L	L	E	S	S	60
237	CCA	ACA	GGA	GAA	AAA	GCC	AAG	GAG	GTT	TTT	GAA	GAA	CTG	AAG	CAA	AGC	CCA	AGA	GTG	GAA	
61	P	T	G	E	K	A	K	E	V	F	E	E	L	K	Q	S	P	R	V	E	80
297	AGC	GCT	GTA	AAA	ATT	ATC	AGT	GGT	CTG	GCC	ACT	GAG	CTC	GAG	CCT	GTC	GTG	GAA	AAA	GCT	
81	S	A	V	R	I	I	S	G	L	A	T	E	L	E	P	V	V	E	K	A	108
357	CGC	TIG	GCT	CTT	CTC	GGT	GCT	TAT	GGC	CAT	TAT	CTC	CGG	CCC	TAC	GTT	GGC	GAA	CAC	CTG	
101	R	L	A	L	L	G	A	Y	G	H	Y	L	R	P	Y	V	G	E	H	L	120
417	GAC	GCA	GCA	ATC	ACC	AAC	GTC	AAG	CCA	GTG	CTG	GAT	ATC	GTC	CTG	CCT	CAT	GAT	GGT	TAG	
121	D	A	A	I	T	N	V	R	P	V	L	D	I	V	L	P	H	D	G		140

AGTCCGCTGCTCGTCAACCACTGACTACTTCAACCCAGCAAACATGCATTTTCACTGCTTCAATAATGGATCCAAATCTG
AAACTATCTGACAGCTGTGTGCCAGCACAGTCATCATGTCAGTACAGTCTTCTTTTGCATGTATATACTGTATCTGTGT
ATTTGATACTGTTCTGTTTACTGTCAGGAAAAAATAAATAACATCCGGTCCAGCATTAAATAGATTATGAATTATGTGAT
TTTGTGTGCCCTCATAAAGAAACAAGACTCATTCTAAATAAAAAACCTCTGAAAAATGCAAAAAAAAAAAAA

图 1 日本囊对虾 *apo-14* 基因 cDNA 序列全长

Fig. 1 Full cDNA sequence of *apo-14* of *Marsupenaeus japonicus*

通过 signalP3.0 分析,预测 N-端 18 个氨基酸为信号肽序列(见图 2)。与几种鱼类的 *apo-14* 氨基酸序列比对后发现,日本囊对虾的 *apo-14* 较为保守,与鱼类的 *apo-14* 蛋白具有相似的结构,在其 N-端具有由 33 个氨基酸残基组成的 codon block,以及 5 个脂亲性的 α -螺旋区域(区域 1 ~ 5),这些区域多由 11 个或 22 个氨基酸残基构成,各个区域之间由脯氨酸(Pro)间隔,此结构是载脂蛋白结合脂质的区域,如图 3 所示。

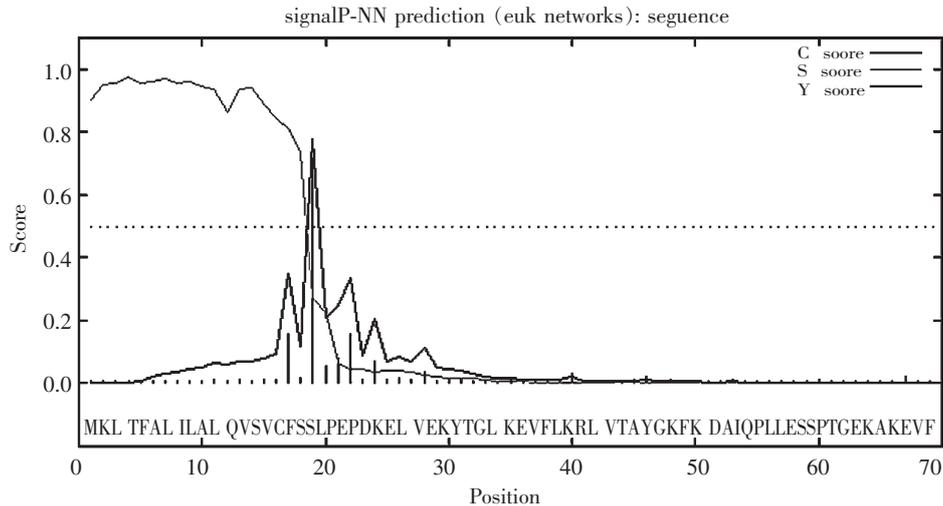


图 2 *apo-14* 氨基酸序列信号肽预测

Fig. 2 Signal peptide prediction of amino acid sequence of *apo-14*

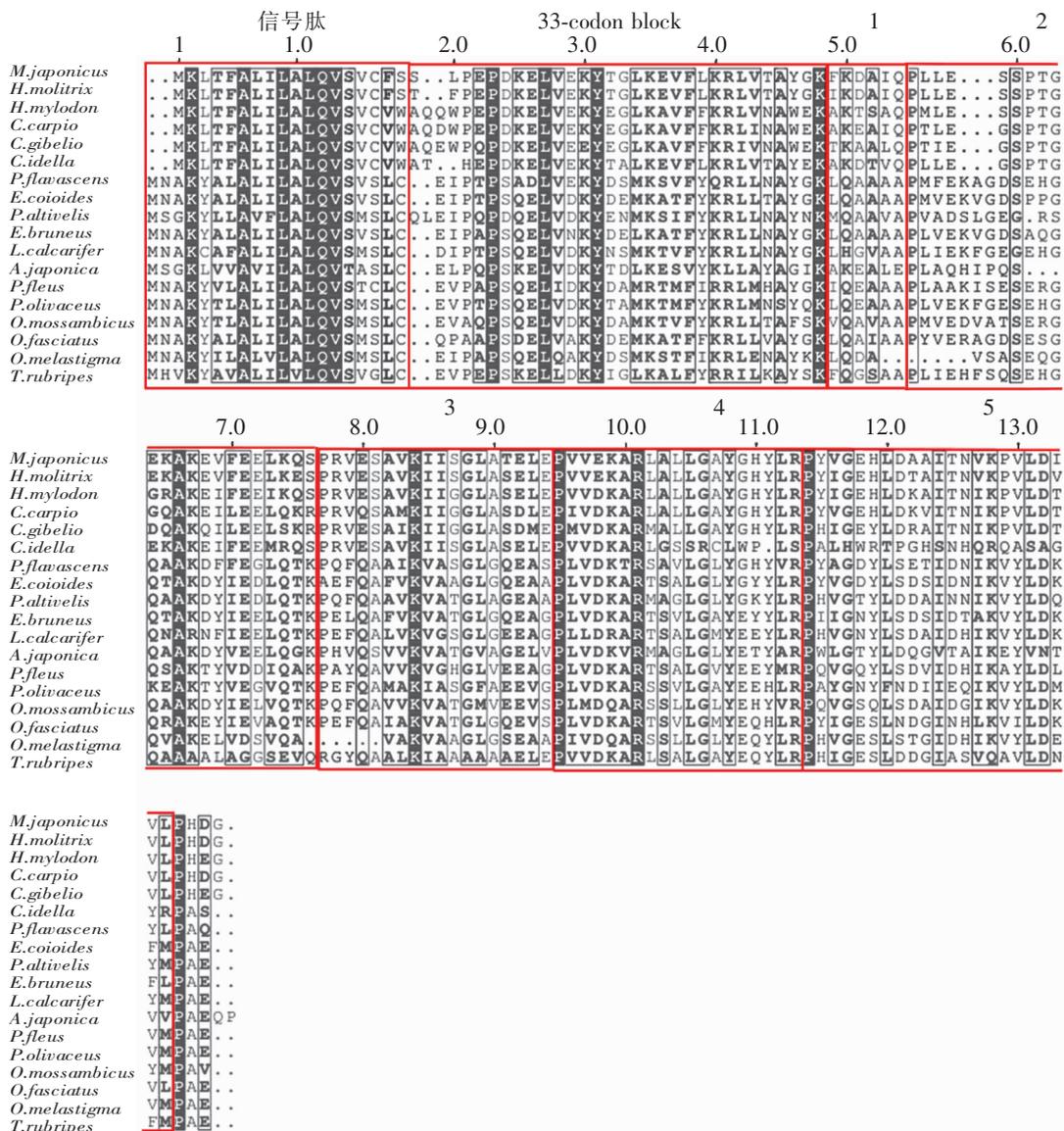


图 3 *apo-14* 氨基酸序列的同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of amino acid sequence of *apo-14*

NetNGlyc1.0 和 NetOGlyc 3.1 分析表明,日本囊对虾 *apo-14* 序列不存在 N-糖基化和 O-糖基化位点。NetPhos 2.0 分析显示,第 19、60、76 以及 81 位的丝氨酸(Ser)可能为磷酸化位点(见图 4)。

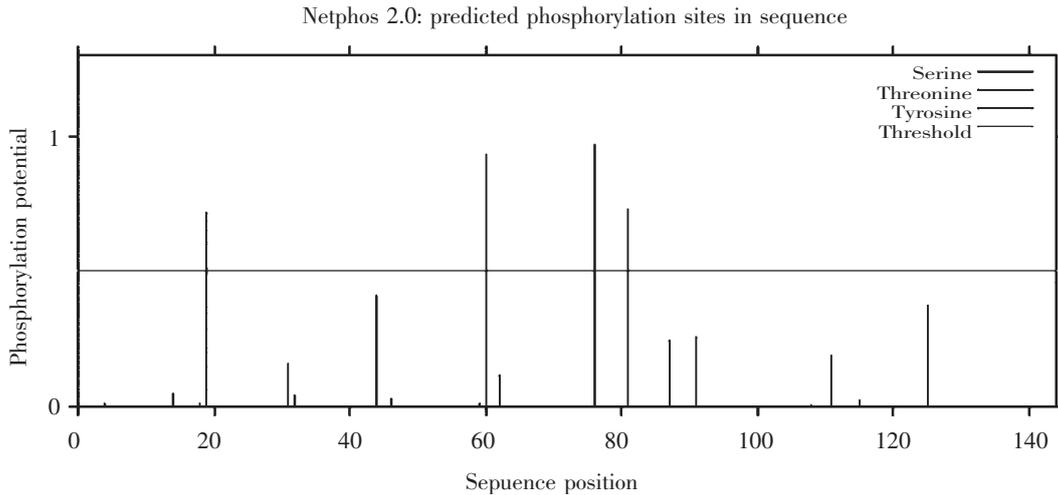


图 4 *apo-14* 氨基酸序列磷酸化位点预测

Fig. 4 Phosphorylation sites prediction of amino acid sequence of *apo-14*

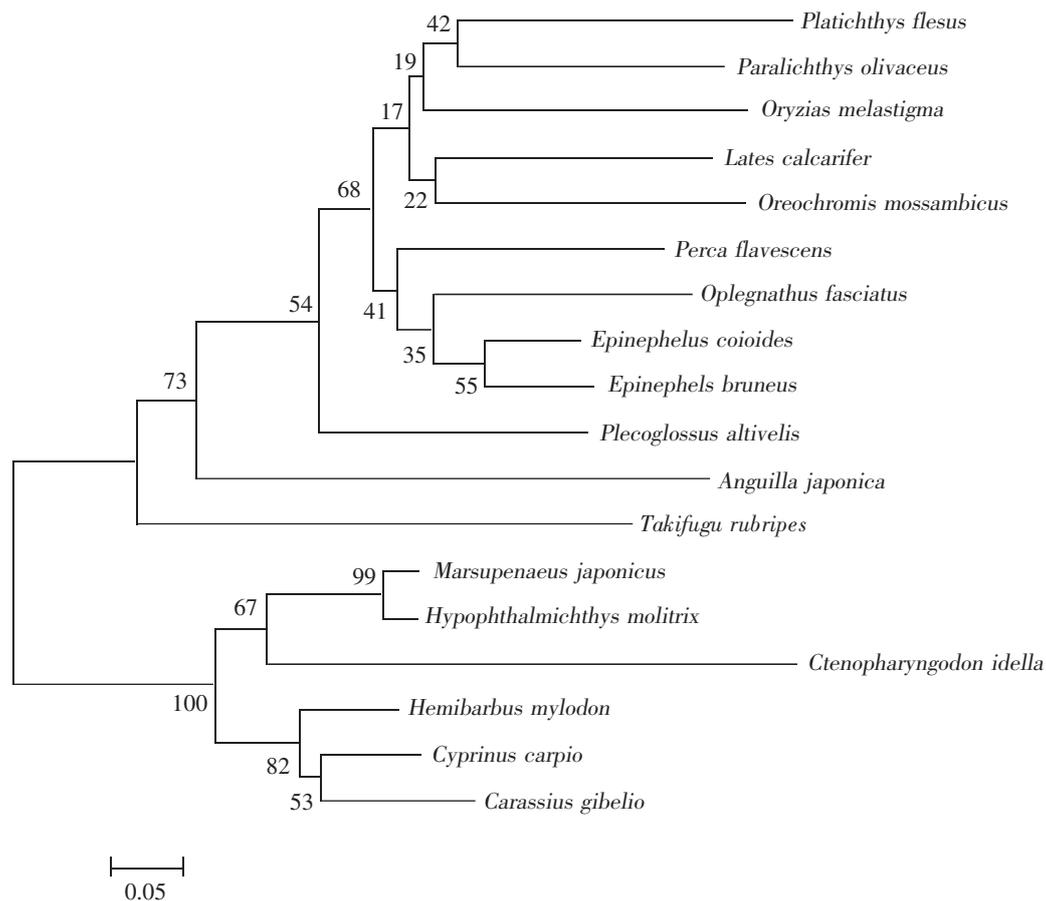
序列一致性和遗传距离比对分析结果显示,日本囊对虾 *apo-14* 蛋白序列与鲢 *apo-14* 蛋白具有 94.2% 的一致性,与朝鲜骨鱼(*Hemibarbus mylodon*)与锦鲤(*Cyprinus carpio*) *apo-14* 蛋白的一致性也达到 79.4% 与 75.1%。其遗传距离分别为 0.106 7、0.398 0、0.493 4(见表 1)。

表 1 *apo-14* 蛋白的一致性和遗传距离分析
Tab. 1 Identities and distances of *apo-14* proteins

	<i>M. japonicus</i>	<i>H. molitrix</i>	<i>H. mylodon</i>	<i>C. carpio</i>	<i>C. gibelio</i>	<i>C. idella</i>	<i>P. flavescens</i>	<i>E. coioides</i>	<i>P. altivelis</i>	<i>E. bruneus</i>	<i>L. calcarifer</i>	<i>A. japonica</i>	<i>P. flesus</i>	<i>P. olivaceus</i>	<i>O. mossambicus</i>	<i>O. fasciatus</i>	<i>O. melastigma</i>	<i>T. rubripes</i>
<i>M. japonicus</i>	-	0.1067	0.3980	0.4934	0.6433	0.8200	1.3966	1.4336	1.4864	1.4568	1.5805	1.4787	1.6676	1.5619	1.6738	1.5904	1.5400	1.4235
<i>H. molitrix</i>	0.942	-	0.3787	0.4877	0.6036	0.8100	1.4070	1.4605	1.5153	1.4360	1.6180	1.4939	1.6628	1.5729	1.6985	1.5718	1.5018	1.4436
<i>H. mylodon</i>	0.794	0.801	-	0.2755	0.3764	0.8771	1.3920	1.4285	1.4883	1.4332	1.6512	1.5239	1.6957	1.5992	1.5996	1.4465	1.5397	1.3971
<i>C. carpio</i>	0.751	0.751	0.858	-	0.3104	1.0194	1.3759	1.4050	1.4249	1.4300	1.6081	1.4414	1.6215	1.5196	1.6440	1.5396	1.4651	1.5211
<i>C. gibelio</i>	0.687	0.702	0.808	0.836	-	1.1546	1.4170	1.4474	1.3496	1.4133	1.6232	1.4714	1.7269	1.6032	1.6757	1.6061	1.5726	1.5144
<i>C. idella</i>	0.635	0.635	0.617	0.567	0.524	-	1.9885	2.0075	2.1016	1.9632	2.0378	2.0007	2.1648	1.9872	2.0653	2.0998	2.0936	2.1190
<i>P. flavescens</i>	0.462	0.462	0.458	0.458	0.452	0.337	-	0.4917	0.7934	0.5947	0.6988	1.4890	1.0142	1.8638	0.7366	0.7941	0.8904	1.4041
<i>E. coioides</i>	0.455	0.448	0.452	0.452	0.438	0.337	0.762	-	0.6678	0.2838	0.5772	1.3598	0.7749	0.7708	0.6549	0.6025	0.7332	1.2359
<i>P. altivelis</i>	0.431	0.424	0.438	0.445	0.465	0.331	0.634	0.682	-	0.8203	0.8111	1.0374	1.0074	0.9720	0.8166	1.0481	0.9747	1.4324
<i>E. bruneus</i>	0.455	0.462	0.458	0.452	0.458	0.351	0.720	0.853	0.627	-	0.5978	1.2932	0.8111	0.7203	0.7572	0.5615	0.8049	1.2175
<i>L. calcarifer</i>	0.427	0.420	0.417	0.417	0.410	0.344	0.671	0.720	0.620	0.713	-	1.5600	0.7659	0.6830	0.7512	1.8349	0.8915	1.2711
<i>A. japonica</i>	0.431	0.424	0.421	0.435	0.428	0.346	0.455	0.475	0.554	0.496	0.434	-	1.3402	1.4162	1.3998	1.6057	1.4742	1.6167
<i>P. flesus</i>	0.393	0.393	0.390	0.397	0.369	0.310	0.566	0.650	0.558	0.636	0.643	0.475	-	0.7314	0.8406	1.0204	0.7777	1.2763
<i>P. olivaceus</i>	0.420	0.420	0.417	0.424	0.410	0.358	0.622	0.657	0.579	0.671	0.678	0.468	0.657	-	0.7931	0.8177	0.9288	1.2201
<i>O. mossambicus</i>	0.400	0.393	0.410	0.397	0.390	0.324	0.664	0.699	0.627	0.657	0.657	0.468	0.629	0.650	-	0.8102	0.8402	1.3969
<i>O. fasciatus</i>	0.413	0.420	0.452	0.424	0.404	0.337	0.650	0.713	0.558	0.741	0.629	0.420	0.566	0.643	0.636	-	0.8079	1.3020
<i>O. melastigma</i>	0.388	0.395	0.393	0.406	0.386	0.298	0.559	0.615	0.531	0.594	0.559	0.406	0.594	0.552	0.573	0.587	-	1.2807
<i>T. rubripes</i>	0.448	0.448	0.458	0.424	0.431	0.337	0.468	0.517	0.448	0.524	0.496	0.406	0.496	0.510	0.468	0.496	0.461	-

注: ID(identity 序列一致性), Dist(distance 遗传距离);表左下半为 Id, 右上半为 Dist

系统进化树分析表明,日本囊对虾 *apo-14* 与鲢、朝鲜骨鱼、锦鲤、银鲫以及草鱼的 *apo-14* 成簇(见图 5)。

图 5 *apo-14* 蛋白全长氨基酸序列的 NJ 树构建Fig. 5 Neighbor joining tree of full length amino acid sequence of *apo-14* protein

3 讨论

脂类物质是包括甲壳类在内的所有生物体不可或缺的大分子物质,为生物体提供主要的能量来源,并且是组成生物膜系统的主要成分。某些脂类例如胆固醇^[9-10]和多不饱和脂肪酸(PUFA)作为必要的营养元素,对于虾类等甲壳动物的正常生长发育有重要的作用^[11]。虾类通过血淋巴进行脂质运输,在其血淋巴中已经鉴定到 HDL(高密度脂蛋白)和 VHDL(极高密度脂蛋白)2 种脂蛋白^[12-14],而载脂蛋白作为各类脂蛋白的主要组成成分,在脂质运输过程中,发挥着重要的作用。

目前,对于对虾养殖的研究主要停留在饲料营养成分的分析、优化以及饲料加工工艺的改进上,而对于其消化系统的作用机理和对不同营养成分的吸收情况的研究还较少。但有研究表明,饲料中的脂类物质对于虾类的生长发育、应激性以及免疫力的提高均具有重要的作用。所以,进一步研究载脂蛋白的功能和作用机理,了解虾类脂质代谢过程,对于虾类的生产活动具有重要的意义。

apolipoprotein-14 载脂蛋白,作为动物体内脂质的主要运输载体,在血脂运输中发挥着重要的作用。*apo-14* 基因首次在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)中克隆得到^[3],现在至少在 14 种硬骨鱼中鉴定到。但是 *apo-14* 一直被认为是 1 个硬骨鱼类特殊的载脂蛋白基因,在其他动物基因组中尚未发现^[15]。

笔者首次在日本囊对虾中克隆得到载脂蛋白全长 cDNA 序列,共 784 bp,其编码 139 个氨基酸。N-端的 18 个氨基酸为信号肽序列。通过同源序列分析发现,氨基酸序列与其他鱼类同源序列具有较高的相似性,最高达到 94.2%。日本囊对虾 *apo-14* 载脂蛋白与鱼类 *apo-14* 载脂蛋白一样,在其序列 C-端存在多个由 11 个或 22 个氨基酸组成的、以脯氨酸起始的串联重复的 α -螺旋结构域,该结构域被认为是脂质的结合区域。有研究表明,该区域重复串联的个数以及氨基酸残基的不同组成,有可能造成不同载脂

蛋白对于不同类型的脂蛋白具有不同的结合能力^[16]。笔者推测,日本囊对虾 apo-14 与鱼类 apo-14 载脂蛋白同属于载脂蛋白家族,具有相同的运输脂质的功能,且由于其蛋白结构比哺乳动物 apo-II 载脂蛋白多 3 个 α -螺旋区,因此,虾类在其生理生化活动中,较哺乳动物对于脂类的依赖性较大^[17]。

目前,对于载脂蛋白功能的研究,多局限于哺乳动物或鱼类。然而,与哺乳动物利用糖类作为主要能量来源不同的是,鱼类主要依赖于脂类物质。这说明相对于恒温动物,脂类代谢以及脂蛋白生化指标对于鱼类等变温动物的体内稳态平衡更加具有重要的意义^[15]。在斑马鱼^[18]、鲮鱼^[19]、橙点石斑鱼^[20]的研究中还发现,在正常的胚胎发育、个体发育以及组织再生过程中,都需要载脂蛋白的参与。

CHOUDHURY 认为,非哺乳动物的 apo-14 与哺乳动物类的 apoA-II 具有同源性^[17]。在雌雄同体的橙点石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 和多倍体的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) 体内发现, apo-14 基因在胚胎形成过程中大量表达。其首先是在原肠胚 YSL(蛋黄合包层) 中开始高水平的转录,随后则主要集中在后续的胚胎发育和幼虫的消化系统中^[20-22]。敲除异育银鲫中的 apo-14 可导致消化系统的严重破坏并影响卵黄脂质的转运和利用。上述研究表明, apo-14 在胚胎形成和早期幼体发育过程中,尤其在消化系统的发生过程以及肝脏的形态发生和器官发生过程中发挥重要的作用^[22]。

在橙点石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 的研究中,发现 apo-14 主要在脑组织和肝脏组织中大量表达,这可以证明鱼类肝脏和脑器官中具有高效率的脂质代谢以及合成作用。由此可推测, apo-14 似乎在神经生长和组织修复中也发挥着重要的作用。

在异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) 中敲除 *cagapo-14* 可以导致消化系统如肝脏、肠道、胰脏以及鱼鳔严重的功能障碍,且其在成鱼组织内都有表达,说明 *cagapo-14* 在内源性营养时期以及内外源过渡营养时期均有重要作用。另外,在异育银鲫血清中也存在高浓度的 apo-14,说明其在血液循环系统中也发挥作用。且鱼类利用脂质而不是糖类碳水化合物作为其主要的能量来源, KONDO 认为, apo-14 是鱼类所特有的,与其他载脂蛋白相比, apo-14 有可能在鱼类生理生化过程中发挥着重要的作用。而在本研究中,笔者第 1 次从虾类中扩增到载脂蛋白 apolipoprotein 784 bp 的全长 cDNA 序列,证明虾类中也有载脂蛋白的存在。因此推测,脂质的利用和代谢对虾类的生长发育也具有重要的作用。

另外,值得注意的是在草鱼体内 apo-14 以及 apoE 的转录水平随着绕足类寄生虫大中华鲩 *Sinergasilus major* 的感染而显现出上调趋势^[23]。在对黑头呆鱼进行 2 μ g - DNT 攻毒试验后,同样也发现 apo-14, apoA-I, apoB 转录水平的上调^[24]。这说明鱼的消化器官,不但具有消化和吸收营养物质的功能,而且在防止环境毒素对于鱼体的损害的排毒过程中以及在免疫保护中均发挥重要的作用^[25-27]。笔者推测,与鱼类 apo-14 具有相似结构的日本囊对虾 apo-14 可能在虾类生命活动中也具有相似的作用,可以使虾类顺利应对恶劣环境以及寄生虫的感染。

笔者首次对日本囊对虾载脂蛋白 apolipoprotein-14 基因进行了克隆,通过蛋白序列分析,证明了日本囊对虾 apo-14 蛋白较保守,与鱼类 apo-14 蛋白具有相似的结构,同属于载脂蛋白家族。由此推测,虾类与鱼类相似,脂质的代谢对于其生长发育过程以及免疫力均具有重要的作用。这一结果,为后续进一步深入研究该基因的具体功能奠定了基础,可以更好地了解日本囊对虾生长过程中脂质代谢的过程和机理,对于对虾养殖的生产实践也具有潜在的指导意义。

参考文献:

- [1] VAN LENTEN B J, NAVAB M, SHIH D, et al. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation [J]. Trends Cardiovasc Med. ,2001, 11(3/4): 155-161.
- [2] SAITO H, LUND-KATZ S, PHILLIPS M C. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins [J]. Prog. Lipid. Res. ,2004, 43(4): 350-380.
- [3] KONDO H, KAWAZOE I, NAKAYA M, et al. The novel sequences of major plasma apolipoproteins in the eel *Anguilla japonica* [J]. Biochim. Biophys. Acta. ,2001, 1531(1/2): 132-142.
- [4] KIM K Y, CHO Y S, BANG I C, et al. Isolation and characterization of the apolipoprotein multigene family in *Hemibarbus mylodon* (Teleostei: Cypriniformes) [J]. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. ,2009, 152(1): 38-46.
- [5] DEERING M J, FIELDER D R, HEWITT D R. Growth and fatty acid composition of juvenile leader prawns, *Penaeus mon-*

- odon*, fed different lipids [J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1/4): 131–141.
- [6] MONTA O M, NAVARRO J C. Fatty acids of wild and cultured *Penaeus vannamei* larvae from Ecuador [J]. *Aquaculture*, 1996, 142(3/4): 259–268.
- [7] SHIAU S-Y. Nutrient requirements of penaeid shrimps [J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1/4): 77–93.
- [8] MIDDLEDITCH B S, MISSLER S R, HINES H B, et al. Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation [J]. *J. Chromatogr.*, 1980, 195(3): 359–368.
- [9] VAN DEN OORD A. The absence of cholesterol synthesis in the crab, *Cancer pagurus* L. [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1964, 13: 461–472.
- [10] ZANDEE D I. Absence of sterol synthesis in some arthropods [J]. *Nature*, 1964, 202: 1335–1336.
- [11] XU X L, JI W J, CASTELL J D, et al. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis* [J]. *Aquaculture*, 1994, 127(1): 29–40.
- [12] KOMATSU M, ANDO S. A novel low-density lipoprotein with large amounts of phospholipid found in the egg yolk of crustacea—a sand crayfish *Ibacus ciliatus*: its function as vitellogenin-degrading proteinase [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 186(1): 498–502.
- [13] SPAZIANI E, WANG W L, NOVY L A. Serum high-density lipoproteins in the crab *Cancer antennarius*—IV. Electrophoretic and immunological analyses of apolipoproteins and a question of female-specific lipoproteins [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 111(2): 265–276.
- [14] YEPIZ-PLASCENCIA G M, SOTELO-MUNDO R, VAZQUEZ-MORENO L, et al. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 111(2): 181–187.
- [15] KONDO H, MORINAGA K, MISAKI R, et al. Characterization of the pufferfish *Takifugu rubripes* apolipoprotein multigene family [J]. *Gene*, 2005, 346: 257–266.
- [16] BABIN P J, THISSE C, DURLIAT M, et al. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1997, 94(16): 8622–8627.
- [17] CHOUDHURY M, YAMADA S, KOMATSU M, et al. Homologue of mammalian apolipoprotein A-II in non-mammalian vertebrates [J]. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)*, 2009, 41(5): 370–378.
- [18] MONNOT M J, BABIN P J, POLEO G, et al. Epidermal expression of apolipoprotein E gene during fin and scale development and fin regeneration in zebrafish [J]. *Dev. Dyn.*, 1999, 214(3): 207–215.
- [19] LANGE S, DODDS A W, GUDMUNSDOTTIR S, et al. The ontogenic transcription of complement component C3 and Apolipoprotein A-I tRNA in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)—a role in development and homeostasis? [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2005, 29(12): 1065–1077.
- [20] ZHOU L, WANG Y, YAO B, et al. Molecular cloning and expression pattern of 14 kDa apolipoprotein in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2005, 142(4): 432–437.
- [21] XIA J H, LIU J X, ZHOU L, et al. Apo-14 is required for digestive system organogenesis during fish embryogenesis and larval development [J]. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008, 52(8): 1089–1098.
- [22] WANG R, LI Z, WANG Y, et al. An Apo-14 promoter-driven transgenic zebrafish that marks liver organogenesis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22555.
- [23] CHANG M X, NIE P, LIU G Y, et al. Identification of immune genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella* in response to infection of the parasitic copepod *Sinergasilus major* [J]. *Parasitol Res.*, 2005, 96(4): 224–229.
- [24] WINTZ H, YOO L J, LOGUINOV A, et al. Gene expression profiles in fathead minnow exposed to 2,4-DNT: correlation with toxicity in mammals [J]. *Toxicol Sci.*, 2006, 94(1): 71–82.
- [25] WALLACE K N, PACK M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish [J]. *Dev. Biol.*, 2003, 255(1): 12–29.
- [26] STAINIER D Y. No organ left behind: tales of gut development and evolution [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1902–1904.
- [27] BATES J M, MITTGE E, KUHLMAN J, et al. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation [J]. *Dev. Biol.*, 2006, 297(2): 374–386.

Cloning and Sequence Analysis of the *apo-14* Gene in *Marsupenaeus japonicus*

QIAO Ying , WANG Jun , ZHONG Shengping , LIU Hongtao , MAO Yong
(College of Ocean and Earth Sciences , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract: Full length of apolipoprotein-14 (*apo-14*) gene was cloned from the total RNA of *Marsupenaeus japonicus*. Sequence analysis showed that the full cDNA sequence was 784 bp in length including the coding region of 420 bp and encoded 139 amino acids. Homology analysis of the *apolipoprotein-14* amino acid sequence indicated high sequence similarity in *apo-14* amino acid sequences between *M. japonicus* and other fish.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; apolipoprotein; *apo-14*; cloning; sequence analysis

(上接第 10 页)

Isolation and Identification of *Staphylococci warneri* from Diseased Tilapia Fry

LI Xiaotuo¹ , CHEN Qin¹ , LIAO Chenghong¹ , GUO Guiying^{1 2} , LI Xiang¹ ,
JIA Xiaolin¹ , ZHENG Jiping¹ , YU Jinan¹

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources , Ministry of Education;

2. Academic Affairs Office , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: Strains of *Staphylococci* , the largest Gram positive stains , were isolated by direct plating and Gram stain from the samples of livers and gallbladders from the diseased Tilapia fry collected in Haikou. Analysis of 16S rRNA gene sequence showed that these isolates were highly homologous with *Staphylococcus pasteurii* and *Staphylococcus warneri* , but further identified to be *Staphylococcus warneri* by PCR amplification of the *sodA* gene for superoxide dismutase.

Key words: tilapia; *Staphylococcus warneri*; 16S rRNA; *sodA* gene