

文章编号: 1674-5566(2024)05-1074-10

DOI: 10.12024/jsou.20231104350

## 马氏珠母贝L-氨基酸氧化酶基因克隆及表达分析

罗 贝<sup>1</sup>, 林海生<sup>1,2</sup>, 王庆恒<sup>3</sup>, 秦小明<sup>1,2</sup>, 曹文红<sup>1,2</sup>, 高加龙<sup>1,2</sup>, 郑惠娜<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088; 3. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088)

**摘要:** L-氨基酸氧化酶(LAAO)是一种广泛存在于自然界中的免疫蛋白酶,为探究马氏珠母贝LAAO(*Pinctada fucata martensii* LAAO, *PmLAAO*)基因序列的特征及其在副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)刺激后的表达变化,克隆得到了*PmLAAO*的cDNA全长,其开放阅读框(ORF)长度为1 767 bp,共编码588个氨基酸,具有FAD结合域和氨基酸氧化酶的结构域,是氨基酸氧化酶家族的一员。多序列比对结果和系统发育树显示,*PmLAAO*与双壳类动物的亲缘关系较近,其中,与加州贻贝的相似度最高。qRT-PCR结果显示*PmLAAO*在鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、消化腺中均有表达,在鳃组织中表达水平最高;在Vp刺激后,*PmLAAO*在鳃组织中的表达水平显著升高,受刺激后48 h表达量最高。研究结果为新型免疫蛋白酶LAAO在双壳贝类中的功能活性提供了参考。

**关键词:** 马氏珠母贝; L-氨基酸氧化酶; 基因克隆; 实时荧光定量PCR

**中图分类号:** S 917.4      **文献标志码:** A

与哺乳动物的免疫系统相比,双壳贝类的免疫防御缺乏特异性免疫系统<sup>[1]</sup>,其主要通过细胞免疫和体液免疫相结合抵御外来的攻击与感染<sup>[2]</sup>。贝类通过先天性免疫中主要的Toll样模式识别受体(Toll-like receptor, TLR)识别病原体启动特定信号通路,诱导产生大量的免疫防御因子来抵御入侵<sup>[3]</sup>。目前已报道的双壳贝类防御因子,如凝集素<sup>[4-5]</sup>、溶菌酶<sup>[6]</sup>、抗菌肽<sup>[7-8]</sup>、蛋白酶抑制剂<sup>[9]</sup>、热休克蛋白<sup>[10]</sup>等,都在贝类免疫系统中起着至关重要的作用。研究<sup>[11]</sup>发现,副溶血性弧菌刺激能够诱导马氏珠母贝产生抗菌蛋白,其鳃组织中分离出的新型抗菌蛋白能够通过氧化L型氨基酸产生过氧化氢,从而起到抗菌作用,推断其可能为L-氨基酸氧化酶家族成员。

L-氨基酸氧化酶(L-amino acid oxidase, LAAO)是一类以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)或者以黄素单核苷酸(FMN)为辅酶的黄素蛋白酶,

能特异性催化L-氨基酸氧化脱氨以生成对应的 $\alpha$ -酮酸、氨和 $H_2O_2$ ,且伴随氧消耗<sup>[12]</sup>。LAAO在自然界中有着广泛的来源,目前已报道的LAAO分布于真菌<sup>[13]</sup>、细菌<sup>[14]</sup>、鱼类<sup>[15]</sup>、藻类<sup>[16]</sup>、哺乳动物类<sup>[17]</sup>和蛇类<sup>[18]</sup>中,其中蛇毒源LAAO研究较为深入<sup>[19]</sup>。研究表明,LAAO由于其具有诱导细胞凋亡、杀灭寄生虫、抗菌和抗病毒等生物学功能<sup>[20-21]</sup>,在先天性免疫防御中发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。近年来越来越多的海洋来源的LAAO及其功能活性被研究报道,国外研究人员在海兔中分离得到具有抗菌活性的LAAO<sup>[23]</sup>,且在JIMBO等<sup>[24]</sup>的研究中发现LAAO具有一定的底物特异性,主要对L-赖氨酸和L-精氨酸较为敏感,这与常见的蛇毒源LAAO不同,蛇毒源LAAO更倾向于疏水性氨基酸<sup>[25-26]</sup>。KASAI等<sup>[27]</sup>从比目鱼(*Platichthys stellatus*)星状体的黏液中发现了具有抗菌活性的LAAO,并发现可通过在巴斯德毕赤

收稿日期: 2023-11-20      修回日期: 2024-03-19

基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515012137); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-49); 广东海洋大学博士启动项目(R17082); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2021 KJ146); 广东省高等学校科技创新团队项目(2021KCXTD021)

作者简介: 罗 贝(1998—),女,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全。E-mail:675253993@qq.com

通信作者: 林海生, E-mail: haishenglin@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

酵母中重组表达得到与天然提取的LAAO抑菌活性相当的重组LAAO,表明LAAO可在真核体系中有有效表达。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)经LPS和poly(I:C)刺激后其LAAO基因在几个免疫器官中的表达水平均有上调,提示其参与了斜带石斑鱼的免疫防御过程<sup>[28]</sup>。总之,目前关于海洋来源的LAAO的生物活性有了不同层次的研究,但主要还是集中在鱼类、腹足类动物间,目前暂未发现有研究从双壳贝类中分离LAAO并对其生物学活性进行研究。

近年来,随着近海岸水质恶化和马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)过度养殖<sup>[29]</sup>,细菌性感染可能导致大规模死亡,而副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)作为嗜盐菌,易引起海水养殖中的疾病,给水产养殖业造成巨大的经济损失<sup>[30]</sup>,同时也给马氏珠母贝肉加工利用带来食品安全问题。因此,马氏珠母贝免疫因子的研究对产业健康发展意义重大。本研究团队在前期采用副溶血性弧菌刺激马氏珠母贝,并取其鳃组织进行转录组分析的基础上,获得了LAAO基因的cDNA片段,推测其可能在马氏珠母贝的免疫过程中起到了抵御病原体感染的作用。为进一步了解马氏珠母贝LAAO(*Pinctada fucata martensii* LAAO, *PmLAAO*)的基因序列特征和在Vp刺激感染后的表达趋势,本研究通过克隆得到*PmLAAO*的基因全长,在此基础上对其cDNA序列全长进行生物信息学分析,检测其在各组织中的分布情况和经Vp刺激后的表达模式。为探讨LAAO基因在免疫应答功能及其分子机制提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用贝及细菌刺激

马氏珠母贝[壳长(5±1)cm]购自雷州市大邱庄水产养殖有限公司,试验前暂养2 d(暂养温度22℃,其间喂食浓度为2×10<sup>5</sup> cell/mL的等鞭金藻)后,每天换1次海水,暂养第3天向海水中添加体积分数0.01%的混合抗生素(青霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素),24 h后开展细菌刺激试验,将马氏珠母贝随机分为2个组,即对照组(CG)和实验组(EG),实验组使用200 μL浓度为1×10<sup>12</sup> CFU/mL的经过PBS缓冲溶液重悬的副溶血性弧菌(标准菌株GDMCC1.306)菌液<sup>[11]</sup>对马氏

珠母贝进行闭壳肌注射刺激,对照组则使用200 μL PBS缓冲溶液进行注射,注射完毕后将分别转移至已灭菌的洁净海水中暂养。刺激感染3、6、12、24、48、72 h后,分别在实验组和对照组中随机取3只马氏珠母贝,采集其外套膜、鳃、性腺、消化腺、闭壳肌,并立即放入液氮中冷冻保存。

### 1.2 RNA提取及基因克隆

使用总RNA提取试剂盒(Solarbio)并严格按照说明书提示提取马氏珠母贝鳃组织的RNA,所提RNA的完整性和纯度分别通过1%琼脂糖凝胶电泳和A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>进行检测。使用RevertAid第一链cDNA合成试剂盒(Fermentas)合成cDNA第一链。在马氏珠母贝转录组测序结果中挑选了一条注释到LAAO上的序列片段进行基因克隆。首先对该序列片段进行测序验证,再根据测序结果设计特异性引物(表2),以马氏珠母贝的cDNA为模板,使用PrimeSTAR HS DNA高保真聚合酶(TaKaRa)进行扩增。阳性条带用胶回收试剂盒(Omega)进行回收纯化,纯化后的PCR产物与pMD18T载体进行连接,转化后对阳性克隆进行测序。最终克隆得到马氏珠母贝LAAO基因序列全长并命名为*PmLAAO*。

### 1.3 生物信息学分析

生物信息学分析所使用的工具见表1。

### 1.4 定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)

为研究*PmLAAO*在鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、消化腺中的表达情况和受刺激后3、6、12、24、48、72 h后其在鳃组织中的表达模式,参照1.2节中的方法提取RNA,使用HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(Vazyme)将所有RNA逆转录成cDNA样品。根据测序结果设计qRT-PCR实验引物(表2)。通过使用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)试剂,并以组织cDNA为模板,GAPDH为内参基因,在荧光定量PCR仪上进行定量分析,反应程序为95℃,30 s;95℃,10 s,60℃,30 s,40个循环,并根据溶解曲线分析扩增产物的特异性,每个组织样品设3个重复。使用2<sup>-ΔΔCt</sup>法对目标基因的相对表达量进行计算<sup>[31]</sup>,数据处理使用GraphPad Prism 9对实验数据进行普通单因素方差分析(Ordinary one-way ANOVA),并用Tukey's多重比较对均值进行差异显著性分析,显著性水平设为P<0.05。

表1 生物信息学分析所使用的工具  
Tab. 1 Tools used in bioinformatics analysis

目的 Purpose	工具 Tools
分析克隆结果的开放阅读框 Open reading frame for analyzing cloning results	ORF-Rinder( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</a> )
预测蛋白质理化性质 Predicting protein physicochemical properties	ExPASy( <a href="https://web.expasy.org/compute_pi/">https://web.expasy.org/compute_pi/</a> )
分析信号肽序列 Analyzing signal peptide sequences	SignalP 4.1 Server( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a> )
分析蛋白保守结构域 Analyzing protein conserved structural domains	Smart Main Page( <a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a> )
预测亚细胞定位 Predicting subcellular localization	PSORT( <a href="https://psort.hgc.jp/form2.html">https://psort.hgc.jp/form2.html</a> )
分析N-糖基化位点 Analysis of N-glycosylation sites	NetNGlyc 1.0 Server( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a> )
分析O-糖基化位点 Analysis of O-glycosylation sites	NetOGlyc( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/</a> )
氨基酸序列多重比对 Amino acid sequence multiplexing	NCBI BLASTp( <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ) ESPrpt3.0( <a href="https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi">https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi</a> )
同源构建三维结构 Homologous construction of 3D structures	SWISS-MODEL( <a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a> )
邻接法构建系统进化树 Neighbor-joining method for constructing phylogenetic trees	MEGA11 软件

注: *PmLAAO* 和 FAD 结构域的三维结构模型分别基于 *Bothrops atrox* LAAO 模板和 *Corynebacterium ammoniagenes* MAO 模板进行同源构建, 其模型的准确性已由 SWISS-MODEL 提供的 GMQE (全球模型质量评估) 和 QMEAN (定性模型能量分析) 进行了评估, GMQE 分数范围为 0~1, 分数越高表示结果模型可靠性越高, QMEAN 得分在 -4~0, 得分越接近 0 表明模型结构与实验结构之间具有良好的 consistency。

Notes: The 3D structural models of the *PmLAAO* and FAD structural domains were homologously constructed based on the *Bothrops atrox* LAAO template and the *Corynebacterium ammoniagenes* MAO template, respectively, and the accuracy of the models has been assessed by the GMQE (Global Model Quality Evaluation) provided by SWISS-MODEL and the QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis). GMQE scores range from 0 to 1, with higher scores indicating higher reliability of the resultant model, and QMEAN scores range from -4 to 0, with scores closer to 0 indicating good agreement between the model structure and the experimental structure.

表2 本研究中使用的引物  
Tab. 2 Primers used in the experiment

引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5' - 3')	用途 Application
<i>PmLAAO</i> -F	ATGTTTCTCTCCAAAAATC	验证序列
<i>PmLAAO</i> -R	CTCTCGATGAACTGGCTGC	验证序列
<i>PmLAAO</i> -5'-1	TTCTAGGTAGGTTGCT	5'RACE
<i>PmLAAO</i> -5'-2	TAACTTTTTTCGTTTCGAGAT	5'RACE
<i>PmLAAO</i> -5'-3	TTCTTGAGCGACGATATACC	5'RACE
<i>PmLAAO</i> -3'-1	ATGACGGATTTTCGGAGGGACTTC	3'RACE
<i>PmLAAO</i> -3'-2	TACTGGCGTGCCAATCAGGAAAT	3'RACE
<i>PmLAAO</i> -qRT-F	GGGTGGAGAGATGGAGCAAG	qRT-PCR
<i>PmLAAO</i> -qRT-R	CGCTTGGATTGCATCTTCGG	qRT-PCR
GAPDH-F	GCAGATGCTGCCGAGTATGT	内参基因
GAPDH-R	CGTTGATTATCTTGGCGAGTG	内参基因

## 2 结果

### 2.1 马氏珠母贝 LAAO 序列分析

克隆获得 *PmLAAO* 基因的 cDNA 序列全长为 2 265 bp, 其中 5' 端非编码区 (UTR) 和 3' -UTR 分别为 212 bp 和 322 bp。该序列已提交到 NCBI GenBank 数据库, 登录号为 OR754225。其开放阅读框 (ORF) 长度为 1 767 bp, 编码 588 个氨基酸, 相对分子量为 66.9 ku, 总平均亲水系数为 -0.477, 不稳定指数为 39.37 (<40 表示蛋白质稳

定), 表明其属于一种亲水且稳定的蛋白, 理论等电点 (pI) 为 6.94。结构预测结果显示该序列不存在跨膜结构域和信号肽, 表明其不属于膜蛋白或分泌蛋白。二级结构预测结果显示总体以无规则卷曲为主, 占比 44.05%, 其次是  $\alpha$  螺旋结构, 占比 36.05%。结构域预测结果显示, *PmLAAO* 在 90~143 aa 存在 1 个 FAD 结合域, 在 293~572 aa 存在 Amino\_oxidase 结构域, 这两个结果表示其具有 LAAO 家族成员的特征 (图 1)。根据 SWISS-MODEL 预测的结果, *PmLAAO* 和 FAD 结构域模型

的 GMQE 分别为 0.50、0.70, QMEAN 得分分别为 -3.37 和 -0.16, 结果表明所生成两个模型具有一定的可靠性(图 2)。NetNGlyc 和 NetOGlyc 软件分析结果显示, *PmLAAO* 在 173 aa、176 aa、524 aa 处各有 1 个 N-糖基化位点; 分别在 74 aa、81 aa 和 85

aa 处各有 1 个 O-糖基化位点。亚细胞定位结果显示, *PmLAAO* 亚细胞分布为 47.8% 线粒体、21.7% 胞质、13.0% 细胞核、4.3% 细胞骨架、4.3% 内质网、4.3% 液泡、4.3% 过氧化物酶, 可以看出其主要分布在线粒体中。

```

1  ATGTTTCTCTCCAAAAATCGTCTTTATTCCTTCGTGGTATATCGTCGCTCAAGAAATTCATCCAGATATATCTCGAACGAAAAAGGT 90
   M Y L S K K S S L F L R G I S S L K N I H P R Y I S N E K G
91  TATAATAAGGCCCTTAGCAACGGTGCATCTAACACCAACCTACCTACAACAGGATGATGTGCAAGAATTTTTCATGGACATTGGAAAC 180
   Y N K A L A T V H L T P T Y L Q Q D D S A K N F F M D I G N
181 GAGGGACTGCGATTGCTGGGCAAAATACTTCATTCAAAGTAAACACCTGAGTTATATTCTAGGACAAAAACGGACGCCGAAAAAAC 270
   E G L R F A W A K Y F I Q S K A P E L Y S R T K T D A P K N
271 ATCGTCATCGTCGGAGCAGGATTTGCAGGCCTATCAGCACTTATGAACCTGCACAAGTACGTCACAAGGTCAGCATCTTAGAATTACAG 360
   I V I V G A G F A G L S A A Y E L S Q V G H K V S I L E L Q
361 AATAGAGTAGGAGGAAGAGCAAAAGACAATTTATGACGGATTTTCGGAGGGGACTTCATGCAGAAGGAGGTGCTATGAGACTGCCATTAGT 450
   N R V G G R A K T I Y D G F E S E G L H A E G G A M R L P L A
451 GAGCATTTCATGACTAACCACTATATCCGACTACTGGCGTGCCAATCAGGAAATTCCAAATAACAAACGAGACGACAAGACATGGATA 540
   E H F M K T N H Y I R L L G V P I R E F Q N T N E T N K T W I
541 AACCTGTTGGCCAAAGAACATCAGGATGCAAGATTGGGAAGATAATAATTTGGAGCATCTTAAAGAGTTTTTCCAGAGCCAGCCATTTTC 630
   N L F G K N I R M Q D W E D N N L E H L K E F Y P E A A S F
631 ATCGAGAGTCGGGCTTAAAAGCATTGATGAACCTCTATGAGAAAACCATAGAACCTGTCAAGAAAGACTTAGGAAAAGACTCTGGTGTG 720
   I E S R G L K S I D E L Y E K T I E P V K K D L G K D P G V
721 CAAGATTGAAAAAGTGGTGGAGAGATGGAGCAAGTACTCAGTCGAATCATTCTTGAGAGATGGTAAAGTGTGAATGACGAAGGATG 810
   Q D W K K W V E R W S K Y S V E S F L R D G K V L N D E G L
811 AGACCTTGGCCGAAGATGCAATCCAAGCGTATAAGGTGACTTCATATTCGCCAATGACAGATAGGAGTTTAGTAGAGATCTTGAGAGAA 900
   R P W P E D A I Q A Y K V T S Y S P M T D R S L V E I L R E
901 GACCTGGGGGATGGTGGAGTATGAGTATGAGTCTCCTGGTGGATGCAGAGCTTCGCCGAAAAATTCATGGAGAAGTCTCTTGGT 990
   D L G G W W S D E L W T P V A G M Q S F A E K F M E K S L C
991 TGGCACCATGATGTTCCCTGTCCGACAACATAAATATGGGAAAAGAGTCAATACTATTACAATGACCAAAAAATGGGATTTTCAGTTCC 1080
   W H H D V S L S D N I N Y G K R V N T I T M T K N G I S V S
1081 GGTAGATCTACCTTTACAGGAGAAGAATTTAGTTTCAATGGTGACGCATGATTATCACTCTGCTCTGCCCCTTCTCAGACAAAGTTACA 1170
   G R S T F T G E E F S F N G D A C I I T L P L P V L R Q V T
1171 ATGGAAGCAAAACCGATAGTGAACCTATTCAAAGTCCGAAAAGTCTCTCAAATGTCTATTACGAACCGTCAACAAAGATACCTCTC 1260
   I E D K T D S M N L F K V R K V L S N V H Y E P S T K I L L
1261 CAATGCAAGACCCGCTTTTGGGAGAAAGATGTAGGAACGGGGGATTTTCCAAAACGAATCTTCAATCGGTCAGATTCATTATCCAGGT 1350
   C K T R F W E K D V G T G G F S K T N L P I G Q I H Y P G
1351 GATGAAAACCGCCTTCCAAATACAGACAGAGGAATCCTTCTCAGTTACTTGGGGTCAGGACGCAATCATCCTTGGAGCTCAACAGAA 1440
   D E N R L P N T D R G I L L S Y T W G Q D A I I L G A Q P E
1441 CAAGAGGCTGTGACTAGTGCAGTTCCGAGTTGAAAAATATTCATCTGTATAGAAAAATACTTTGAGGTGGGAAAGGTTCAAGCTTGG 1530
   Q E A V T S A V R Q L K N I H P D I E K Y F E V G K V Q A W
1531 ACCAGGACCCCTTTCGCGCAGTTGGCTTTACATATCTGAATCCAAGTCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAAT 1620
   T R D P S A Q L A F T Y L N P S Q Y Q Y S L E T L L M T D T
1621 CATCCGTTATACCTTTCGCGGTGAGGCCCTGTCTGACGCATGGATGGATTCAAGGTCCCTAGAGTCTGGATTGAGGGCCGCTATAAC 1710
   H P L Y L A G E A L S W T H G W I Q G A L E S G L R A A Y N
1711 ATATTCTGCAAAATGAAAAACCCACATCCAGATGGAGTGCAGAAAAAATAAAATGA 1711
   I F C K Y E K P P S T M E S K K L K *

```

红色字为起始密码子和终止密码子;红色箭头表示 FAD 结合域;黑色三角形表示 O-糖基化位点;蓝色星星表示 N-糖基化位点。  
The red word is the start codon and the stop codon; The red arrow indicates the FAD-binding domain; The black triangle indicates the O-glycosylation site; Blue stars indicate N-glycosylation sites.

图 1 *PmLAAO* 核苷酸序列和氨基酸序列对比图  
Fig. 1 Comparison of nucleotide sequence and amino acid series of *PmLAAO*

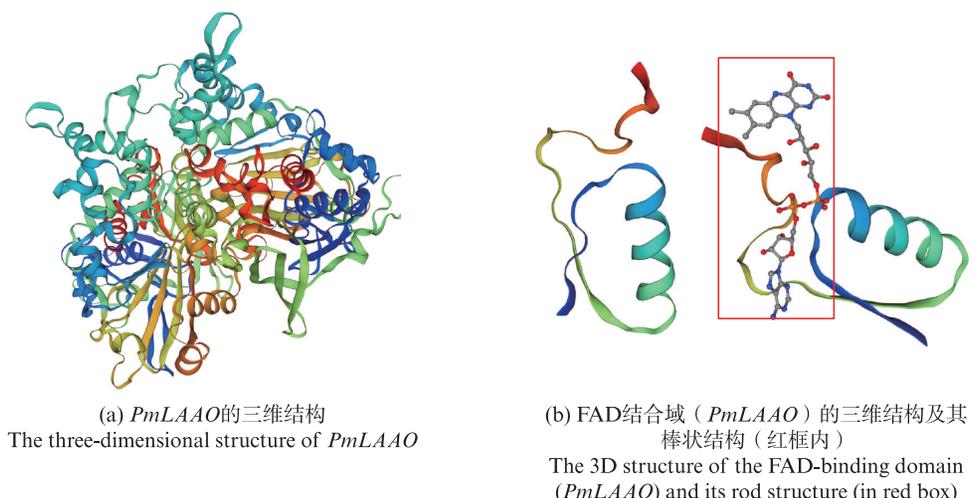


图 2 三维结构预测图  
Fig. 2 3D structure prediction chart

## 2.2 同源性分析

氨基酸序列比对结果显示, *PmLAAO* 与加州贻贝 (*Mytilus californianus*) 的 *LAAO* 相似度最高, 可达到 47.33%, 与硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*) 的相似度为 46.06%, 与斑马贻贝 (*Dreissena polymorpha*) 的相似度为 43.08%。说明马氏珠母贝的 *LAAO* 与海洋双壳类相似度较高。与斑马鱼 (*Danio rerio*)、鳊浪白鱼 (*Anabarilius grahami*) 等海洋来源的脊椎动物的相似度分别只能达到 20.63% 和 20.94%, 说明其在不同物种间保守度不高(图3)。使用 MEGA11 无根邻接连接法构建不同物种的 *LAAO* 的系统发育树, 结果显示, *PmLAAO* 与加州贻贝、斑马贻贝以及硬壳蛤等双壳纲异柱目的软体动物聚为一支, 并与哺乳类、硬骨鱼类、鸟类、爬行类动物的 *LAAO* 聚类为一支, 而腹足纲后鳃目(加州海兔和斑点海兔)单独为一支, 与传统的生物学分类结果并不完全一致(图4)。

## 2.3 马氏珠母贝不同组织中 *LAAO* 的表达情况

为探究 *PmLAAO* 在鳃、外套膜、性腺、闭壳肌、消化腺中的表达情况, 通过实时荧光定量(qPCR)对以上5个组织进行了分析, 结果显示, *PmLAAO* 在5个组织中均有表达, 在鳃组织、消化腺、外套膜中的表达水平都相对较高, 但其在鳃组织中的表达水平具有显著优势, 在消化腺和外套膜中的表达水平相近, 而在闭壳肌和性腺中表达量较低(图5)。

## 2.4 感染刺激后 *LAAO* 在鳃组织的表达模式

为进一步研究受 Vp 刺激后 3、6、12、24、48、72 h 时 *PmLAAO* 的表达模式, 本研究采用 qRT-PCR 对各时间点的表达量进行分析。结果显示, 在感染后的 *PmLAAO* 的表达水平相对于对照组均显著上调, 且总体呈现先上升后下降再上升的趋势, 感染后 3~6 h mRNA 表达水平升高后下降, 直至 12 h 开始逐渐升高, 在 72 h 内的相对表达量在 48 h 时显著最高 ( $P < 0.001$ ) (图6)。

## 3 讨论

本研究克隆得到了马氏珠母贝 L-氨基酸氧化酶(*PmLAAO*)的基因全长, 通过生物信息学分析表明, *PmLAAO* 相对分子量为 66.9 ku, 与已报道

的海洋源动物的 *LAAO* 的相对分子量大小相近<sup>[32-33]</sup>, 目前已报道的海洋动物的 *LAAO* 等电点在 4.0~6.3<sup>[34-35]</sup>, 而 *PmLAAO* 的理论等电点为 6.94, 相较而言, *PmLAAO* 更偏中性。该基因编码的蛋白质含有 FAD 结构域和 amino oxidase 结构域, 从而提示该蛋白酶属于 L-氨基酸氧化酶家族。同源性分析结果表明, *PmLAAO* 与加州贻贝的 *LAAO* 基因有 47.33% 的相似度, 尽管相似度不算太高, 但通过多重序列对比结果可知, 仍有部分氨基酸残基高度保守, 且 *PmLAAO* 与其他海洋源的脊椎动物的同源性仅为 20% 左右, 但与双壳贝类的同源性为 43.08%~47.33%, 这一特征也出现在马氏珠母贝的免疫相关基因(*Lec-8* 基因)的研究报道中<sup>[36]</sup>, 且 *PmLAAO* 也是参与免疫防御相关的基因, 因此推测 *PmLAAO* 与 *PmLec-8* 基因同样具有较高的变异性。此外, 生成的系统发育树结果显示 *PmLAAO* 与其他双壳类动物聚为一支, 说明 *LAAO* 在双壳贝类中的进化方向相对一致, 亲缘关系较近。但与同是软体动物门的腹足纲后鳃目动物之间存在分裂, 这与传统的生物学分类结果并不完全一致。后鳃目动物由于缺少物理外壳的保护, 其体内抵御微生物和其他动物的捕食主要依靠自身独特的免疫防御系统和化学防卫系统<sup>[37-38]</sup>, 因其机体结构和防御系统的特殊性导致其与脊椎动物的进化方向存在分裂<sup>[39]</sup>。后鳃目动物中的 *LAAO* 作为免疫系统的重要分子, 其进化具有复杂性和多样性, 这也是导致其与双壳类分裂的主要原因之一。此外, 研究发现, 腹足纲后鳃目动物的 *LAAO* 保守区与其他腹足纲(如肺螺亚纲和前鳃亚纲)动物的保守区不同, 而其他腹足纲 *LAAO* 的保守区与无脊椎动物(如双壳类)的保守区更接近, 说明腹足纲内生物的基因进化方向并不完全一致<sup>[40]</sup>。由此可见, 与其他生物相比, 腹足纲动物 *LAAO* 基因中的 FAD 结合域存在一些变异, 因此推测软体动物的 *LAAO* 在双壳纲与腹足纲之间的进化保守度不高, 仅在目水平上的聚类存在一致的进化方向。通过同源构建 *PmLAAO* 三维结构的结果可推测其为具有一个 FAD 结合域的同源二聚体的晶体结构, 研究报道的许氏平鲷 (*Sebastes schlegeli*) 中的 SES-*LAAO*<sup>[35]</sup> 和星斑川鲷 (*P. stellatus*) 中的 PS-*LAAO*<sup>[41]</sup> 也被推测为同源二聚体。

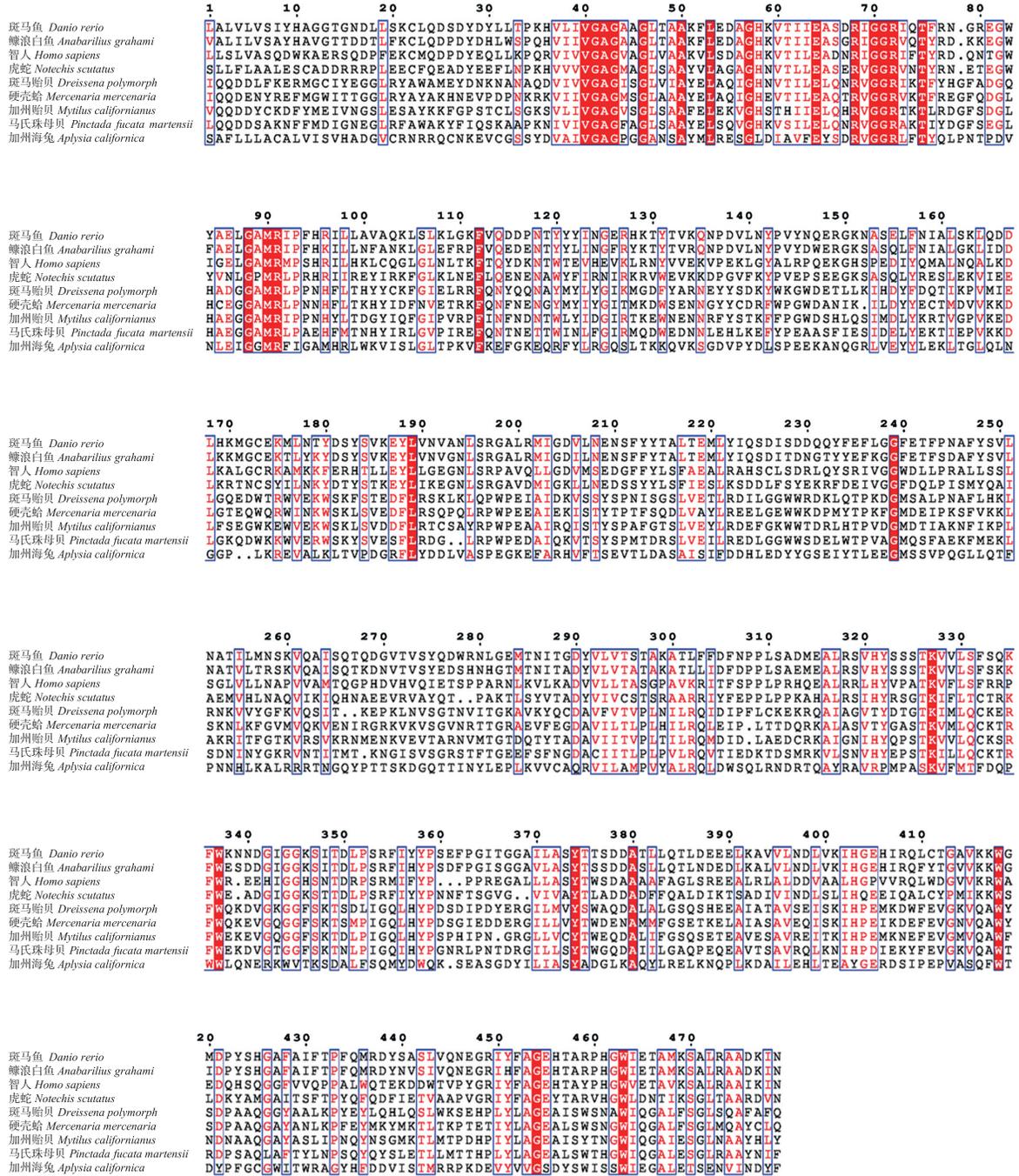
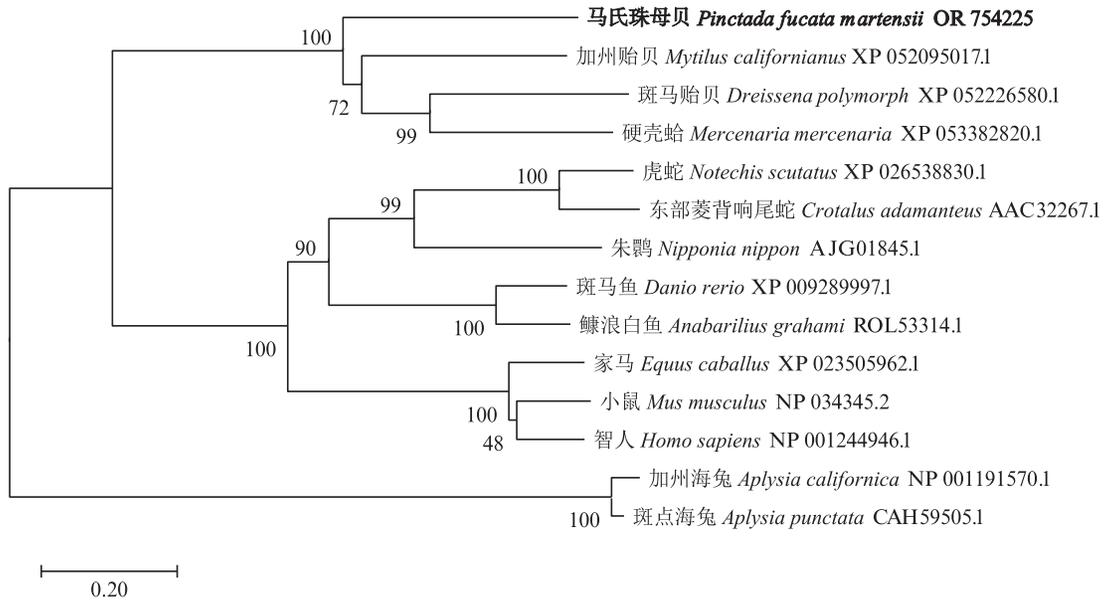
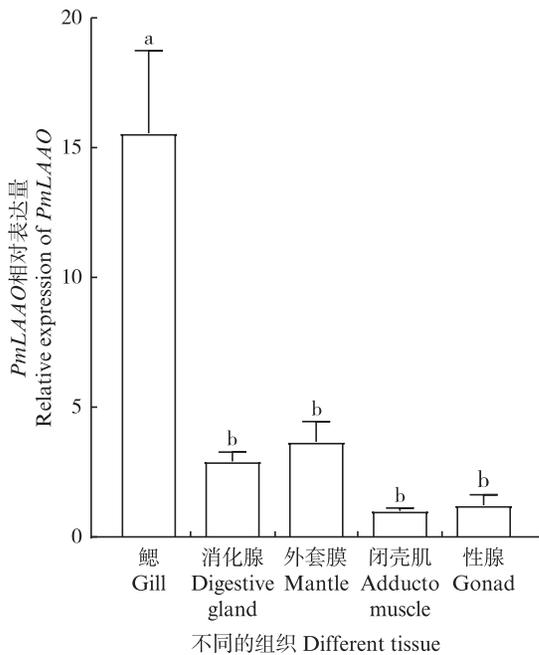


图3 *PmLAAO* 与其他物种 *LAAO* 氨基酸序列之间的多重比对  
 Fig. 3 Multiple comparisons between amino acid sequences of *PmLAAO* and *LAAO* of other species



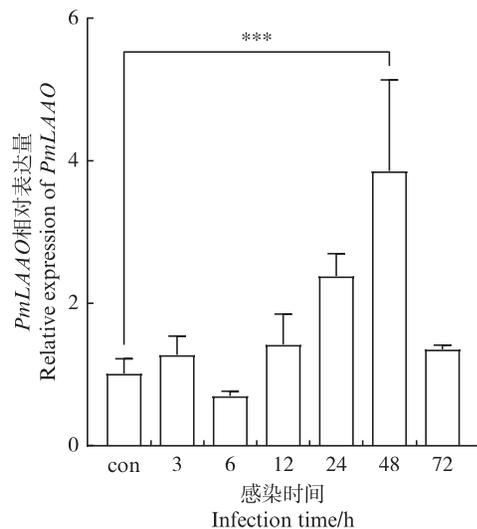
MEGA11 邻接法构建系统进化树, 重复次数为 1 000, 节点上数字表示置信度。  
MEGA11 Neighbor-joining method constructs phylogenetic tree with 1 000 repetitions, and the number on the node indicates the confidence level.

图 4 不同物种 LAAO 系统发育树  
Fig. 4 LAAO evolutionary tree of different species



Y轴表示各组织相对于闭壳肌组织的表达情况, 误差线表示平均值±标准误(n=3); 各组之间的显著差异用小写字母表示(P<0.05)。  
Y-axis indicates expression of each tissue relative to adductor muscle, the data represent as Mean ± SE (n=3). Significant differences between groups are indicated by lower case letters (P<0.05).

图 5 马氏珠母贝不同组织中 PmLAAO 的相对表达量  
Fig. 5 Expression of PmLAAO in different tissues of *Pinctada fucata martensii*



误差线表示平均值±标准误(n=3); \*\*\*表示感染组与对照组相比有显著性差异(P<0.001)。

The data represent as Mean ± SE (n=3); \*\*\* indicates significant difference (P<0.001) between Vp- infected groups and the control.

图 6 副溶血性弧菌刺激后 PmLAAO 在鳃组织中的表达量变化  
Fig. 6 Changes of PmLAAO expression in cheek tissue after infection with *Vibrio parahaemolyticus*

为了更好地表征其生理功能, 研究该蛋白酶在各组织间的表达情况。结果表明, PmLAAO 虽然在研究中的 5 种组织中均有表达, 但与其他组织相比, 鳃组织中的表达水平显著较高, 说明其

表达水平具有较强的组织特异性。由于马氏珠母贝是滤食性动物,鳃组织经常接触到污染物,参与着其先天免疫防御过程并有着重要作用,属于贝类免疫系统中不可或缺的一环,因此本研究推断*PmLAAO*可能在马氏珠母贝的先天免疫防御系统中发挥作用。常见的双壳贝类免疫因子如抗菌肽<sup>[42]</sup>,在免疫防御过程中能快速与病原体产生有效反应,以微生物入侵为例,抗菌肽因具有阳离子特性,可直接连接到细菌的膜上,对细菌造成永久性损伤<sup>[43]</sup>。在硬骨鱼类的免疫研究中发现LAAO同样在抵御微生物入侵时起到免疫作用<sup>[28,44]</sup>,但其抑菌机理是由于氧化L型氨基酸产生的过氧化氢对微生物起到的杀灭或抑制作用。因此推测在双壳贝类的免疫过程中LAAO起到跟硬骨鱼类LAAO相似的作用。一般情况下动物在受到刺激后LAAO的表达量显著升高,其中在6~12 h间上升至最高<sup>[37,45]</sup>,但本研究中马氏珠母贝受到刺激后直至48 h鳃组织中的*PmLAAO*的表达量才上升至最高,相较而言,本研究中的表达量变化比较滞后,但在LIANG等<sup>[46]</sup>的研究中也有类似的情况,该研究通过使用LPS、PGN等不同的物质对马氏珠母贝进行注射刺激,TLSs在同一时间内的表达水平不同且都是受刺激后48 h表达水平显著最高。因此推测不同物种在受到不同刺激时LAAO的表达趋势不尽相同,或是LAAO在感染刺激过程的后半段时期才发挥作用,但这些推测仍需要进一步的实验进行验证。

#### 4 结论

综上所述,本研究成功从马氏珠母贝中克隆了*PmLAAO* cDNA序列,并对其序列进行了分析,通过qRT-PCR证明了马氏珠母贝在受到副溶血性弧菌感染后鳃组织中的LAAO表达水平有升高的趋势,这一发现表明*PmLAAO*在马氏珠母贝的先天免疫中起着积极的作用。为后续研究*PmLAAO*在抗菌、抗肿瘤等生物活性作用方面提供理论基础,且在一定程度上填补了双壳贝类来源LAAO的空白。

#### 参考文献:

[1] PIPE R K, COLES J A. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1995, 5(8): 581-595.

- [2] SONG L S, WANG L L, ZHANG H, et al. The immune system and its modulation mechanism in scallop [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 65-78.
- [3] SOUSA H, HINZMANN M. Review: antibacterial components of the Bivalve's immune system and the potential of freshwater bivalves as a source of new antibacterial compounds [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 971-980.
- [4] SOKOLNIKOVA Y, MOKRINA M, MAGARLAMOV T, et al. Specification of hemocyte subpopulations based on immune-related activities and the production of the agglutinin MkC1qDC in the bivalve *Modiolus kurilensis* [J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e15577.
- [5] ALLAM B, RAFTOS D. Immune responses to infectious diseases in bivalves [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 131: 121-136.
- [6] PALES ESPINOSA E, KOLLER A, ALLAM B. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 132: 63-76.
- [7] ZANNELLA C, MOSCA F, MARIANI F, et al. Microbial diseases of bivalve molluscs: infections, immunology and antimicrobial defense [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(6): 182.
- [8] GERDOL M, VENIER P. An updated molecular basis for mussel immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 17-38.
- [9] ALLAM B, PALES ESPINOSA E, TANGUY A, et al. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(1): 2-11.
- [10] BASSIM S, GENARD B, GAUTHIER-CLERC S, et al. Ontogeny of bivalve immunity: assessing the potential of next-generation sequencing techniques [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2015, 7(3): 197-217.
- [11] LIN H S, ISHIZAKI S, NAGASHIMA Y, et al. Exploration of the antibacterial proteins in pearl oyster *Pinctada fucata* induced by bacterial inoculation [J]. *Fisheries Science*, 2017, 83(3): 489-498.
- [12] FAUST A, NIEFIND K, HUMMEL W, et al. The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(1): 234-248.
- [13] ŽUN G, KOS J, SABOTIČ J. Higher fungi are a rich source of L-amino acid oxidases [J]. *3 Biotech*, 2017, 7(3): 1-7.
- [14] TONG H C, CHEN W, SHI W Y, et al. SO-LAAO, a novel L-amino acid oxidase that enables *Streptococcus oligofermentans* to outcompete *Streptococcus mutans* by generating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from peptone [J]. *Journal of Bacteriology*,

- 2008, 190(13): 4716-4721.
- [15] KITANI Y, NAGASHIMA Y J. L-Amino acid oxidase as a fish host-defense molecule [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 685-690.
- [16] ITO K, HORI K, MIYAZAWA K. Purification and some properties of L-amino acid oxidase from *Amphiroa crassissima* Yendo [C]//Proceedings of the Twelfth International Seaweed Symposium. Sao Paulo: Springer, 1987: 563-569.
- [17] ZHANG H L, LIU H, KATAOKA S, et al. L-amino acid oxidase 1 in sperm is associated with reproductive performance in male mice and bulls [J]. *Biology of Reproduction*, 2021, 104(5): 1154-1161.
- [18] TAN K K, BAY B H, GOPALAKRISHNAKONE P. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential[J]. *Toxicon*, 2018, 144: 7-13.
- [19] GUO C M, LIU S Q, YAO Y W, et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase[J]. *Toxicon*, 2012, 60(3): 302-311.
- [20] LI R J, HOU Y L, GAO Y Q, et al. Immune defense enzymes: Advances in L-amino acid oxidase of marine animals[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(6): 2085-2090.
- [21] NIKODIJEVIĆ D D, JOVANKIĆ J V, CVETKOVIĆ D M, et al. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 910: 174466.
- [22] HUGHES A L. Origin and diversification of the L-amino oxidase family in innate immune defenses of animals [J]. *Immunogenetics*, 2010, 62(11/12): 753-759.
- [23] DERBY C D, GILBERT E S, TAI P C. Molecules and Mechanisms underlying the antimicrobial activity of *Escapin*, an L-amino acid oxidase from the ink of sea hares [J]. *The Biological Bulletin*, 2018, 235(1): 52-61.
- [24] JIMBO M, NAKANISHI F, SAKAI R, et al. Characterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplysianin A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein [J]. *Fisheries science*, 2003, 69(6): 1240-1246.
- [25] BREGGE-SILVA C, NONATO M C, DE ALBUQUERQUE S, et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom [J]. *Toxicon*, 2012, 60(7): 1263-1276.
- [26] CHEN H S, WANG Y M, HUANG W T, et al. Cloning, characterization and mutagenesis of Russell's viper venom L-amino acid oxidase: insights into its catalytic mechanism [J]. *Biochimie*, 2012, 94(2): 335-344.
- [27] KASAI K, HASHIGUCHI K, TAKAHASHI H, et al. Recombinant production and evaluation of an antibacterial L-amino acid oxidase derived from flounder *Platichthys stellatus* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6693-6703.
- [28] LEU J H, TSAI C H, YANG C H, et al. Identification and characterization of L-amino acid oxidase 2 gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 120: 104058.
- [29] 周童, 刘宝锁, 张博, 等. 类胡萝卜素对合浦珠母贝热休克蛋白基因 *HSP22* 表达的影响 [J]. *南方水产科学*, 2018, 14(5): 60-69.
- ZHOU T, LIU B S, ZHANG B, et al. Effect of carotenoids on expression of heat shock protein 22 gene in pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(5): 60-69.
- [30] LI L Z, MENG H M, GU D, et al. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis [J]. *Microbiological Research*, 2019, 222: 43-51.
- [31] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [32] SHEN Y B, FU G H, LIU F, et al. Cloning and characterization of the gene for L-amino acid oxidase in hybrid tilapia [J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, 42(12): 1593-1601.
- [33] WANG F H, XIE M Q, LI A X. A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 32-41.
- [34] KITANI Y, FERNANDES J M O, KIRON V. Identification of the Atlantic cod L-amino acid oxidase and its alterations following bacterial exposure [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 50(2): 116-120.
- [35] NAGASHIMA Y, KIKUCHI N, SHIMAKURA K, et al. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegelii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 136(1): 63-71.
- [36] 吴羽媛, 郭志颖, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 *PmLec-8* 基因的克隆与表达分析 [J]. *广东海洋大学学报*, 2017, 37(4): 1-7.
- WU Y Y, GUO Z Y, LIANG H Y, et al. Clone and expression analysis of *PmLec-8* gene from *Pinctada fucata martensii* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2017, 37(4): 1-7.
- [37] KRON N S. In search of the *Aplysia* immunome: an in silico study [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 543.
- [38] 张文, 郭跃伟. 后鳃亚纲软体动物化学防御物质研究进展 [J]. *生态学报*, 2007, 27(3): 1192-1205.
- ZHANG W, GUO Y W. Research development on chemically defensive substances of opisthobranch molluscs

- [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1192-1205.
- [39] 杜贾贾, 江飏, 唐嘉嘉, 等. 斜带石斑鱼 L-氨基酸氧化酶基因克隆及表达分析[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(2): 303-309.
- DU J J, JIANG B, TANG J J, et al. Molecular cloning and expression analysis of L-amino acid oxidase in grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 303-309.
- [40] SUWANNAPAN W, CHUMNANPUEN P, E-KOBON T. Amplification and bioinformatics analysis of conserved FAD-binding region of L-amino acid oxidase (LAAO) genes in gastropods compared to other organisms [J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2018, 16: 98-107.
- [41] KASAI K, ITO Y, NITTA A, et al. Metal coordination by L-amino acid oxidase derived from flounder *Platichthys stellatus* is structurally essential and regulates antibacterial activity [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(22): 9645-9654.
- [42] WANG K, JIAO X D, CHU J L, et al. Bait microalga harboring antimicrobial peptide for controlling *Vibrio* infection in *Argopecten irradians* aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2023, 565: 739128.
- [43] WANG K, CHU J L, HU Z L, et al. Using bait microalga as an oral delivery vehicle of antimicrobial peptide for controlling *Vibrio* infection in mussels [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 136: 108713.
- [44] HUANG Y X, HAN X, PENG H, et al. Analysis of inhibition mechanisms of *Streptococcus agalactiae* by *Siganus oramin* L-amino acid oxidase [J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(17): 6205-6218.
- [45] HUANG Y, HAN X, PENG H, et al. Expression profile of the fish immune enzyme L-amino acid oxidase (LAAO) after *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 119: 104040.
- [46] LIANG H Y, ZHANG M Z, SHEN C N, et al. Cloning and functional analysis of a trypsin-like serine protease from *Pinctada fucata martensii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 126: 327-335.

## Cloning and expression analysis of L-amino acid oxidase gene in *Pinctada fucata martensii*

LUO Bei<sup>1</sup>, LIN Haisheng<sup>1,2</sup>, WANG Qingheng<sup>3</sup>, QIN Xiaoming<sup>1,2</sup>, CAO Wenhong<sup>1,2</sup>, GAO Jialong<sup>1,2</sup>, ZHENG Huina<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China;  
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Zhanjiang 524088, Guangdong, China;  
3. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China)

**Abstract:** L-amino acid oxidase (LAAO) is a kind of immune protease widely found in nature. In order to explore the gene sequence characteristics of LAAO (*PmLAAO*) and its expression changes after stimulation by *Vibrio parahaemolyticus*, the full-length cDNA of *PmLAAO* was cloned in this study. The length of its open reading frame (ORF) is 1767 bp, encoding a total of 588 amino acids, and has the structure domain of FAD-binding domain and amino acid oxidase (Amino\_oxidase), which is a member of the amino acid oxidase family. The results of multiple sequence comparisons and phylogenetic trees showed that *PmLAAO* was closely related to bivalve, among which LAAO was the most similar to the *Mytilus californianus*. qRT-PCR results showed that *PmLAAO* was expressed in gill, mantle, adductor muscle, gonadal gland and digestive gland, with the highest expression level in gill tissue. After stimulation by Vp, the expression level of *PmLAAO* in gill tissue was significantly increased, and the expression level was the highest 48 h after stimulation. These results provide a reference for the functional activity of the novel immune protease LAAO in bivalve shellfish.

**Key words:** *Pinctada fucata martensii*; L-amino acid oxidase; cloning; real time quantitative PCR