

文章编号: 1674 - 5566(2013)01 - 0007 - 10

斑节对虾腺苷酸转移酶(PmANT)基因的 cDNA 克隆与表达分析

孙文文^{1,2}, 周发林¹, 黄建华¹, 邱丽华¹, 杨其彬¹, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用 RACE 技术获得了斑节对虾(*Penaeus monodon*) ANT 基因(PmANT)的 cDNA 序列。该序列全长 1 388 bp, 开放阅读框(ORF)为 930 bp, 3'非编码区(UTR)为 393 bp, 5'非编码区(UTR)为 65 bp。ORF 可编码 309 个氨基酸, 分子量大约为 33.622 ku。与所有 ANT 家族成员一样, PmANT 蛋白具有 3 个重复同源的线粒体跨膜结构域, 但不含信号肽和糖基化位点。相似性、同源性及系统进化树分析显示, 斑节对虾的 ANT 基因与凡纳滨对虾的同源性和相似性最高, 并与其聚为一支。采用荧光定量的方法研究了 ANT 基因在雌雄个体不同组织、卵巢不同发育阶段及未成熟和成熟精巢的差异表达情况。结果表明: PmANT 的 mRNA 在各组织中都有表达, 其中, 在雄性个体的肌肉中表达量最高, 其次为雌性肌肉, 在精巢的表达量最低, 且未成熟精巢低于成熟精巢。PmANT 的 mRNA 在卵巢的表达量高于精巢, 且在Ⅲ期卵巢表达量最高, Ⅳ期最低。为今后进一步研究该基因在斑节对虾性腺发育中的作用提供基础材料。

研究亮点: 目前对斑节对虾性腺发育的分子调控机理还知之甚少, 有大量性腺发育相关基因还不为人所知。本论文研究了腺苷酸转移酶在斑节对虾卵巢发育各期和未成熟及成熟精巢的表达谱, 为阐明斑节对虾性腺发育分子调控机理提供基础材料。

关键词: 斑节对虾; 腺苷酸转移酶; 克隆; 组织表达

中图分类号: S 917

文献标志码: A

腺苷酸转移酶(adenine nucleotide translocase, ANT)是线粒体中最丰富的蛋白质之一, 约占细胞线粒体总蛋白的 1% ~ 10%^[1]。其主要作用是介导 ADP/ATP 在细胞质和线粒体基质之间的运输^[2-3], 生物体大约 1/3 ~ 1/2 的基础电子传递由 ANT 催化, 它是保持细胞内能量代谢的关键蛋白^[4-5]。近来的研究表明, ANT 在 MPT 和细胞凋亡诱导过程中起重要作用^[6-8], 是各种细胞凋亡因子或凋亡抑制因子的作用靶位^[9-12]。另也有研究表明, ANT 参与了肿瘤坏死因子诱导的细胞凋亡^[13]。

目前已报道的人(*Homo sapiens*)的 ANT 基因有 4 个^[14], 其中, ANT2 和 ANT3 被定位于 X 染色体^[15-16]上, 大鼠(*Rattus norvegicus*)有 3 个^[17-18], 河鲀(*Takifugu rubripes*)有 3 个^[19]。人的 4 个

ANT 蛋白异构体之间有 60% 到 80% 的保守性, ANT1、ANT2 和 ANT4 组织特异性表达, 而 ANT3 是组成性表达^[14,20]。其中, ANT4 主要表达于睾丸和生殖细胞中^[14], 且在精子形成过程中起重要作用^[21]。在大鼠中, ANT 的表达具有组织特异性^[17], 其中, ANT4 特异性地表达于睾丸的生殖细胞中, 且它的表达能够限制成鼠配子的产生, 其启动子低甲基化也只能在精巢中检测到^[22]。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)是世界上三大对虾主要养殖品种之一。但是, 到目前为止, 对其繁殖与成熟的许多机理仍然不是很清楚, 特别是其性腺发育的分子调控机理。已有的研究表明, 腺苷酸转移酶(ANT)对人类等高等动物的性腺发育起着重要作用^[14,20-22]。因此, 本研究克隆分析斑节对虾 ANT 的 cDNA 序列, 并对其在斑节

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(40976101); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(2012TS04); 广东省海洋与渔业科技推广专项(A201001B01, 201101B03); 虾产业技术体系(CARS-47); 海南省重点科技计划项目(ZDXM20110016)

作者简介: 孙文文(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物分子生物学。E-mail: sunwenwen_2008@yeah.net

通信作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@21cn.com

对虾雌雄个体不同组织、卵巢不同发育阶段及未成熟和成熟精巢的表达模式进行了分析,希望能为斑节对虾性腺发育的分子调控机理提供一定的基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斑节对虾养殖于南海水产研究所深圳基地,在 25 ~ 30 °C 充气的自然海水中暂养 3 d 后取样。取未成熟的雌雄斑节对虾(体长 6 ~ 7 cm) I 期卵巢、未成熟精巢、肝胰腺、心脏、脑神经、眼柄神经、肌肉、胃、肠、鳃、淋巴和血细胞;健康成熟的雌、雄斑节对虾(雌虾经切除眼柄催熟,体质量 150 ~ 260 g)取性腺。所取组织均用 RNA Sample Protector (TaKaRa) 保存,各卵巢组织同时用 Bouin's 液固定。

1.2 实验方法

1.2.1 卵巢分期的确定

本实验采用解剖学、组织学和分类学相结合

的方法^[23]确定卵巢分期。样品用石蜡包埋切成 5 ~ 6 μm 的薄片后用苏木精-伊红染色。卵巢的发育阶段根据大多数的卵母细胞的外观判断。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

雌雄个体均取 4 尾进行组织取样(每个样品约 10 mg),同种组织样品混合均匀,参照 Trizol Reagent (invitrogen) 操作说明书提取斑节对虾上述各组织总 RNA。用于 RACE 的组织为卵巢、精巢、肝胰腺的混合样品。提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳确定其完整性,经 NanoDrop 2000/2000c 分光光度计测定纯度及浓度。

用于做 RACE 的样品按照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 使用说明进行反转录。其中, Oligo (dT) 改用 Oligo (dT) 17-adapter (表 1)。进行荧光定量的样品按照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real-time) 使用说明进行反转录。模板为 1 μg 总 RNA。所得 cDNA 用 actin 引物检测后稀释 5 倍, -80 °C 保存备用。

表 1 实验中所用引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers used in experiments

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
Oligo (dT) 17-adapter	GGCCACGCGTCGACTAGTACT17	3'RACE 逆转录 cDNA
actin-F	GGTATCCTCACCCCTCAAGTA	检测逆转录 cDNA
actin-R	AAGAGCGAAACCTTCATAGA	
Adaptor primer	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'RACE-PCR, 接头引物
ANT-3-F	GCCAAGAATGAAGGTAGTGCTGGC	3'RACE-PCR
rANT-F	CCACCATCTCCGGCATTATC	ANT Real-time PCR
rANT-R	AACGCAGCACTACCTTCATTTC	
EF-F	ATGGTTGTCAACTTTGCCCC	EF Real-time PCR
EF-R	TTGACCTCCTTGATCACACC	

1.2.3 斑节对虾 PmANT 基因的 cDNA 克隆及序列分析

对本实验室构建的斑节对虾卵巢 cDNA 文库的测序结果进行分析,将获得的 EST 序列进行 BLASTn 和 BLASTx 分析,得到一条 1 104 bp 的 EST 序列(EST no. Contig293)与凡纳滨对虾(*L. vannamei*)的 ANT2 基因具有较高的同源性(97%),且结果显示含 ORF 和 5'非编码区,然后利用 RACE 技术获得 PmANT 基因的 cDNA 全长。所用引物见表 1。

利用 DNATool 6.0 软件预测氨基酸序列;利用 ProtParam 软件(<http://au.expasy.org/tools/>

<http://www.shhydxxb.com>)对推导出的蛋白序列进行蛋白理化特性预测;蛋白结构域分析用 NCBI 结构分析工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/index.shtml>)和 SMART 4.0 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)程序;信号肽预测用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)程序;利用 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测糖基化位点;用 NCBI 中的 Blast 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索用于 ANT 同源性和相似性分析与系统树构建的氨基酸序列。利用 MatGAT 软件计算相似性和同源性;多序列比对采用 Clustal X 程序;利用

Clustal X 程序和 MEGA 5.0 软件,以邻位相连(Neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树;3D 结构预测采用 SWISS-MODEL 软件,模型查看用 RasWin 软件。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

根据斑节对虾 ANT 基因的全长序列设计荧光定量 PCR 引物 rANT-F 和 rANT-R(表 1),选 EF-1 α 为内参基因,相对定量引物设计为 EF-F 和 EF-R(表 1)。以雌、雄个体不同组织(6 期卵巢、未成熟和成熟精巢、肝胰腺、心脏、脑神经、眼柄神经、肌肉、胃、肠、鳃、淋巴、血细胞)cDNA 为模板进行荧光定量 RT-PCR 扩增。反应体系为 20 μ L,包括 12.5 μ L Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(invitrogen),0.5 μ L 引物(10 μ mol/L),1 μ L 模板和 5.5 μ L 双蒸水,以蒸馏水代替模板作为阴性对照,每个样品设 3 个重复,反应参数为 50 $^{\circ}$ C 预热 2 min,95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 45 个循环,最后进行溶解曲线(melting curve)分析。实验数据采用相对 CT 法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)进行 ANT mRNA 在雌、雄个体各组织的表达特征分析。

1.2.5 统计学分析

运用统计学软件 SPSS 13.0 进行相对独立的单因素方差分析(ANOVA),并进行 Duncan's 多重比较分析各组织间的差异显著性($P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著)。结果值以平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。

2 结果

2.1 斑节对虾 ANT 基因的 cDNA 克隆及序列分析

通过克隆得到斑节对虾 ANT cDNA 全长,命名为 PmANT(GenBank 登录号:JQ670911)。PmANT cDNA 全长 1 388 bp,开放阅读框为 930 bp,3'非编码区(UTR)为 393 bp,包含一个加尾信号 AATAAA 和 18 个碱基的 poly(A)尾。5'非编码区(UTR)为 65 bp。ORF 可编码 309 个氨基酸,分子量大约为 33.622 ku,理论等电点为 9.62。斑节对虾 ANT cDNA 核酸及相应氨基酸序列如图 1 所示。

利用 NCBI 结构分析工具和 SMART 分析知,

PmANT 蛋白具有 3 个重复的同源的线粒体跨膜结构域(图 1),分别在其第 6~105 位、111~208 位、208~304 位,每个结构域含 2 个跨膜区。这与目前已知的蛋白质结构功能域数据库中许多物种的腺苷酸转移酶具有相似的结构功能域。经 SingalP 4.0 和 NetNGlyc 1.0 分析,斑节对虾 ANT 序列中不含信号肽和糖基化位点。

2.2 同源性分析

斑节对虾 ANT 基因的全长序列经 BLAST 分析发现与其他生物的 ANT 基因具有较高的同源性。从 NCBI 上检索其他物种的 ANT 氨基酸序列并利用 MatGat 软件对其进行蛋白质和核苷酸序列同源性和相似性分析。图 2 表明:不同物种间的 ANT 序列较保守,其中,PmANT 与凡纳滨对虾(*L. vannamei*,AEK78307.1)和日本囊对虾(*M. japonicas*,ABN04118.1)的同源性和相似性最高。

SWISS-MODEL 结果显示,PmANT 的三维结构与人类的 ANT1 和 ANT4 的三维结构较相近(图 3)。

根据 PmANT 及其他物种的 ANT 氨基酸序列,使用 Clustal X 1.81 软件和 MEGA 5.0 软件,采用 NJ(Neighbor-joining,参数:10 000 replicates,bootstrap phylogeny test)法构建了它们的系统进化树(图 4)。从系统树可以看出,无脊椎动物与脊椎动物的腺苷酸转移酶被很好地区分开来,且脊椎动物中 ANT 基因的各亚型很好地聚集于各自所属的类群中。其中,斑节对虾的 ANT 基因与凡纳滨对虾的 ANT2 基因聚为一支后又与日本囊对虾的 ANT 聚在一起,最后与其它节肢动物聚合。同时由图可知,斑节对虾 ANT 基因与脊椎动物的 ANT4 亚型亲缘关系较近,其次为 ANT1 亚型。

2.3 PmANT 的组织表达分析

选择 EF-1 α 作为参照,利用实时荧光定量 PCR 技术对斑节对虾 ANT 基因在其雌、雄个体各组织的表达情况进行检测。PCR 结果显示,试验重复性良好, T_m 值与预期一致,表明反应体系和条件都得到很好地优化。同时,PCR 扩增结束后所得的溶解曲线为单峰,无杂峰,表明试验无污染,引物的特异性高,RT-PCR 的验证结果可信。ANT 在斑节对虾各组织的表达情况见图 5。由图可知,PmANT mRNA 在雌、雄个体的心脏、性腺、肌肉、眼柄神经、脑神经、淋巴、胃、肠、肝胰腺、鳃

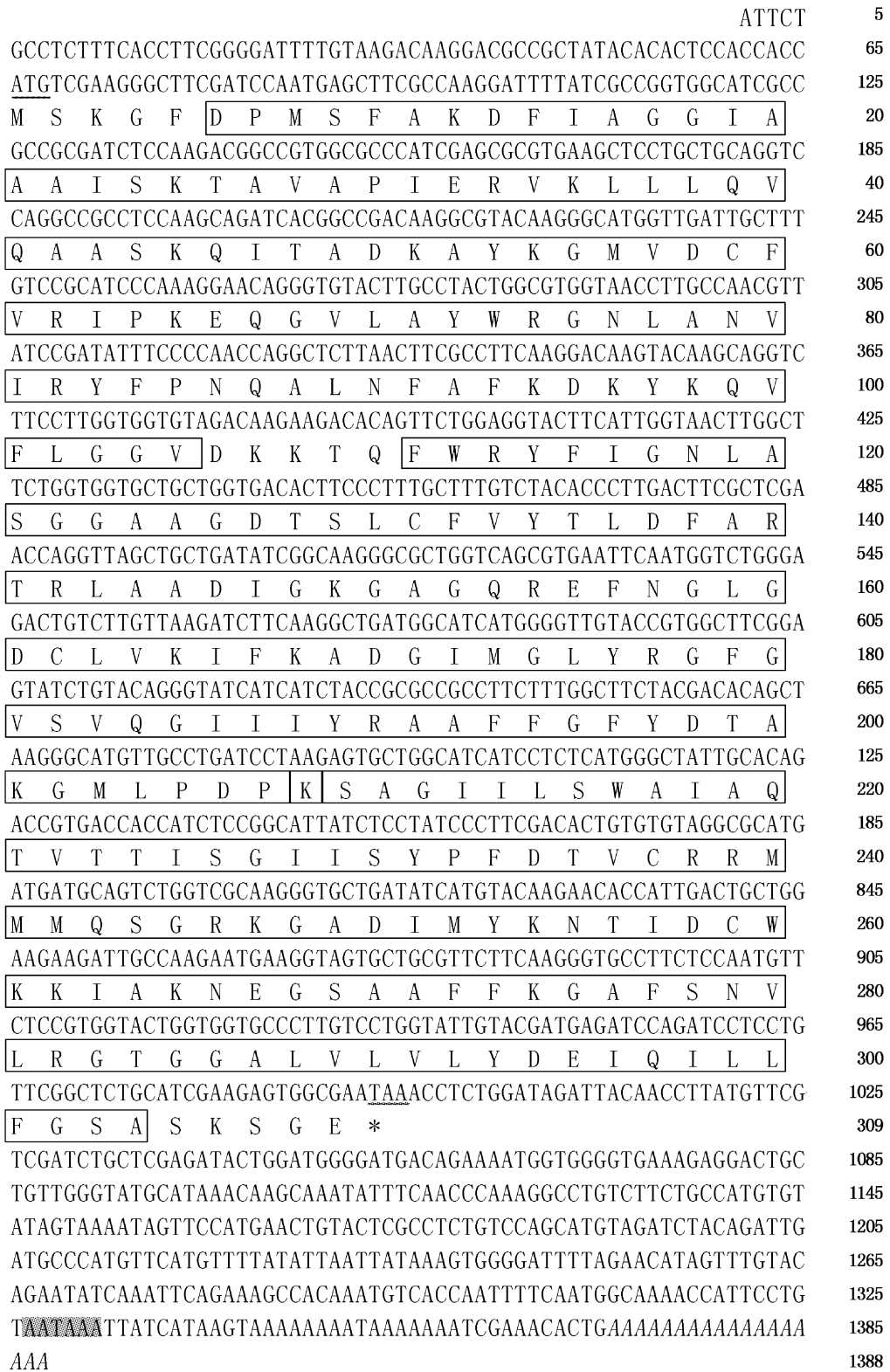


图 1 斑节对虾 ANT 的核酸和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *Penaeus monodon* ANT

右边每行标注的序号是指核苷酸和氨基酸的位置;起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用下划线标出; poly(A)加尾信号(AATAAA)用阴影标出; poly(A)尾巴用斜体字标出; 3 个跨膜结构域用方框标出。

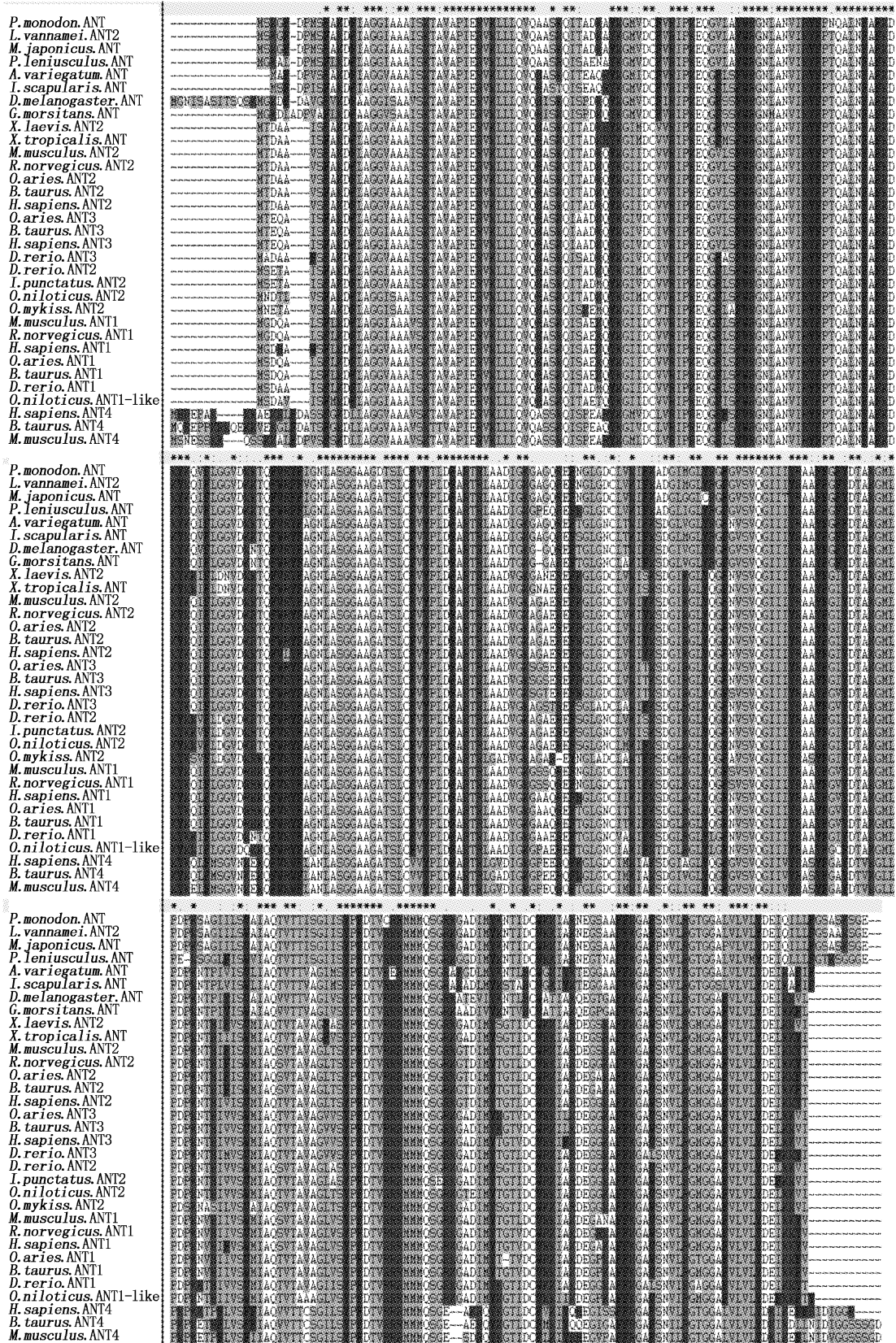


图2 PmANT 的氨基端序列与其它物种 ANT 的氨基酸多序列比对
 Fig. 2 Multiple alignment of the predicted amino acid sequence of PmANT with other eukaryote ANT amino acid sequences

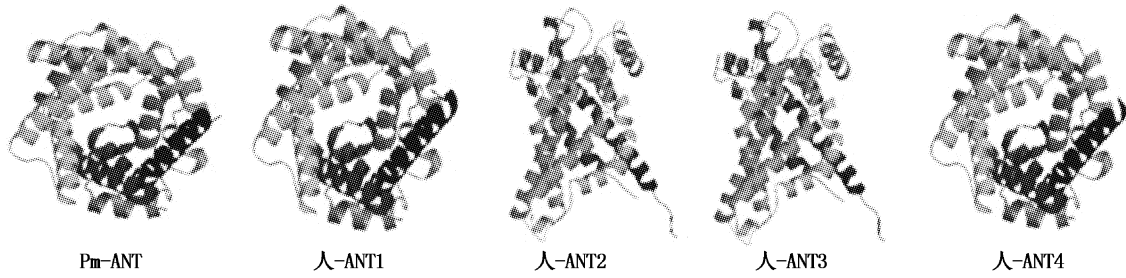


图3 PmANT 和人类 ANT 蛋白的三维空间结构示意图

Fig. 3 The three-dimensional ribbon structure compares thePmANT model with human ANT model

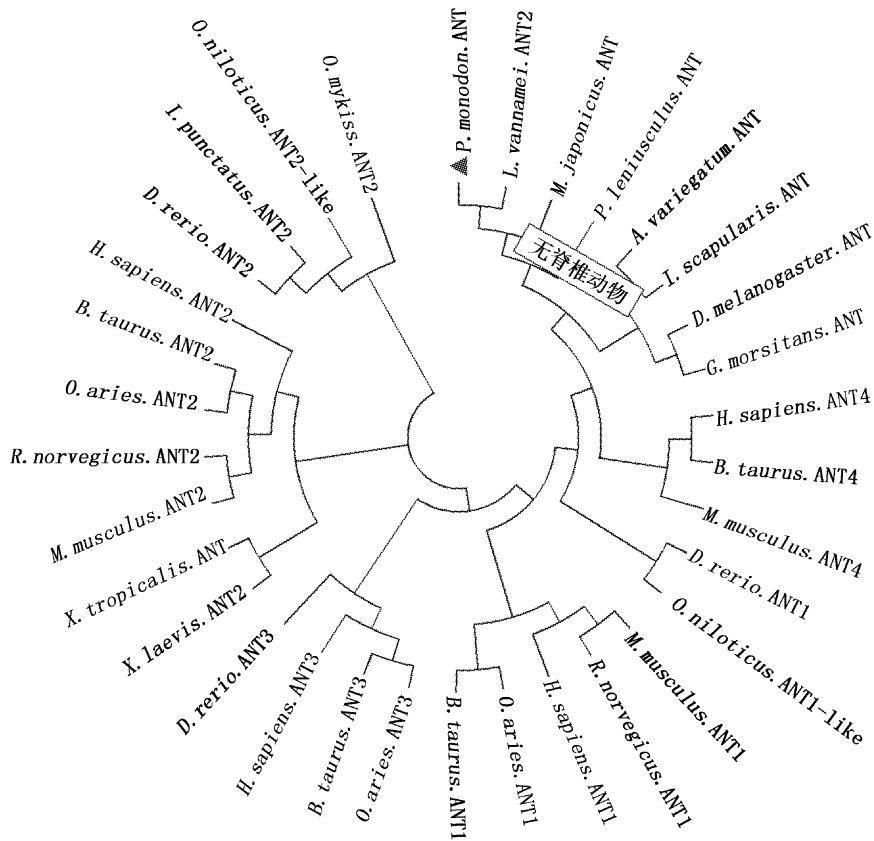


图4 以邻位相连法构建 ANT 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of ANT by Neighbor-joining method

和血细胞中均有表达,其中在雄性个体的肌肉中表达量最高,其次为雌性肌肉,而精巢的表达量最低。雌、雄个体的心脏和肠中表达量也较高。PmANT mRNA 在雌、雄个体间的心脏、肌肉、胃、肝胰腺组织中的表达情况为雄性个体显著($P < 0.05$)高于雌性个体,而肠组织中则表现为雌性个体显著($P < 0.05$)高于雄性个体,其他组织中的表达在雌、雄个体间则无显著差异。而其在精巢的表达情况则表现为成熟精巢极显著($P <$

0.01)高于未成熟精巢(图6)。

经组织切片确定斑节对虾卵巢分为6期^[23-24]: I期(卵原细胞期)、II期(核染色质期)、III期(周边核仁期)、IV期(卵黄囊期)、V期(成熟期)和VI期(枯竭期或恢复期)。对已确定分期的卵巢进行斑节对虾 ANT 基因的表达模式研究,结果如图7。由图可以看出,PmANT 在III期卵巢表达量最高,其次为VI期,且都显著($P < 0.05$)高于I期、II期和IV期。

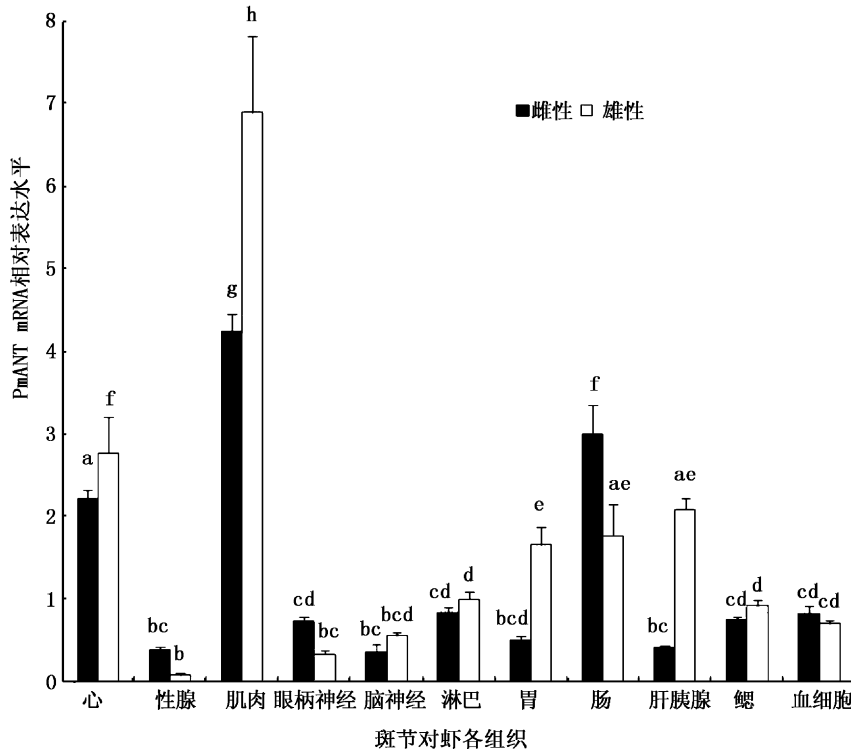


图 5 斑节对虾 ANT 在各组织的表达情况

Fig. 5 The expression of *Penaeus monodon* ANT in different tissues

图中数值为平均值 \pm 标准差,小写字母不同表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

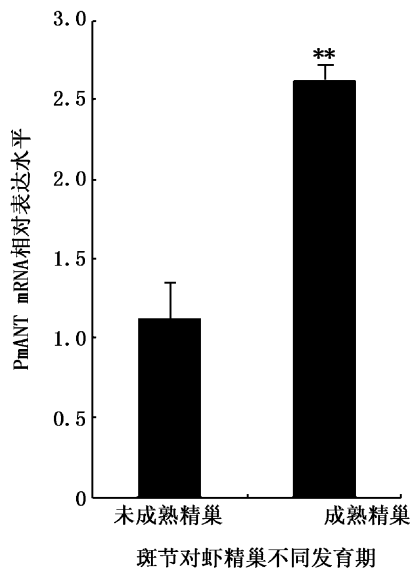


图 6 斑节对虾 ANT 在精巢的表达情况

Fig. 6 The expression of *Penaeus monodon* ANT in testis

3 讨论

从低等真核生物、无脊椎动物到脊椎动物,都存在多个 ANT 亚型。由系统进化树的结果可

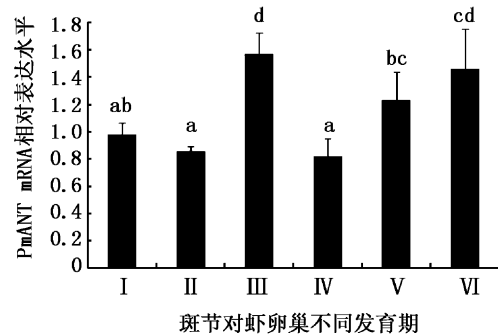


图 7 斑节对虾 ANT 在卵巢发育 6 期的表达情况

Fig. 7 The expression of *Penaeus monodon* ANT in six different periods of ovarian growth

图中数值为平均值 \pm 标准差,小写字母不同表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

以看出,斑节对虾的 ANT 基因与凡纳滨对虾的 ANT2 基因同源性最高(图 2),但并不能就此认为该基因即为 ANT 基因亚型 2。因为 ANT 基因在不同物种间高度保守,其在酵母与哺乳动物间的相似性约 45%,而哺乳动物各物种间的 ANT 基因的相似性则高达 90% 以上,所有物种的 ANT 蛋白也都是由 3 个同源的、重复的结构域组

成^[25]。由氨基酸序列比对可知,斑节对虾 ANT 与其它物种的 ANT2 同源性较高;而系统进化树分析结果显示,PmANT 与脊椎动物的 ANT4 亲缘关系最近,其次为 ANT1;同时,斑节对虾的 ANT 基因的三维结构与人的 ANT1 和 ANT4 的三维结构较相似。但从组织表达的结果来看,PmANT 基因在各组织中均有表达,这与人的 ANT3 基因的表达相似^[26]。其中,PmANT mRNA 在肌肉和心脏中表达最高,这又与人和家鼠中的 ANT1 主要表达于心脏和骨骼肌^[27]有些相似。因此,PmANT 基因属于哪种亚型,还需对其进行更深地功能研究才能确定。

不同的组织对能量的需求和对线粒体 ATP 的需求水平也不同。其中,肌肉和心脏对线粒体提供的能量需求量较大^[28],由于 ANT 在细胞质中 ADP 和线粒体内 ATP 的跨膜交换中起重要作用^[29],斑节对虾 ANT mRNA 在其肌肉和心脏中表达量较高,可能与肌肉与心脏对线粒体提供的能量需求量大有关。而 PmANT 在雌、雄个体间的心脏、肌肉、胃、肝胰腺、肠组织间的表达存在显著性差异,表明 PmANT mRNA 的表达存在雌、雄个体差异。

DUPONT 和 STEPIEN^[30]的研究表明,小鼠 ANT4 在精子形成过程中特异性表达,其主要功能是介导 ATP 的运输,为精子鞭毛的运动提供能量^[2-3]。虽然本研究克隆得到的斑节对虾 ANT 基因还不能确定其亚型,参照其在精巢中的表达情况——成熟精巢高于未成熟精巢可知,PmANT 可能类似小鼠 ANT4 在游动精子的运动中起重要作用,因为成熟精巢中含大量有活力的精子。

UAWISETWATHANA 等^[31]的研究表明,在切除眼柄后的第 4 天(卵巢呈浅绿色)到第 7 天(卵巢呈暗绿色),与能量新陈代谢机制相关的基因(NADH 脱氢酶亚基 4L、ATP 合成酶 FO 亚基 6、细胞色素 c 氧化酶亚基 I, II, III, VII 等)在卵巢中的表达量很高,并由此推测,切除眼柄后卵巢发育对能量的需求增加。本研究的结果表明 PmANT 在斑节对虾卵巢中的表达与上述基因类似,由此可以推断该基因在卵巢发育过程中起一定的作用。已有的研究表明 ANT 是能量代谢相关的基因^[2-5],因此,PmANT 的主要功能可能是为斑节对虾卵巢发育提供能量。卵巢的第 VI 期为枯竭期或恢复期,此时,卵巢内未排出体外的

成熟卵子裂解死亡,原来处于休止状态的卵母细胞开始发育。已有的研究表明,ANT 的过表达会引起线粒体内膜膜电势的下降,导致细胞凋亡^[34-35]。PmANT 在卵巢第 VI 期的表达量较高,表明 PmANT 可能在卵母细胞发育过程的能量供应中起一定的作用,但其是否也参与了此时卵母细胞的凋亡过程还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] SANTAMARIA M, LANAVE C, SACCONI C. The evolution of the adenine nucleotide translocase family [J]. *Gene*, 2004, 333:51-59.
- [2] DAHOUT-GONZALEZ C, NURY H, T TRÉZÉGUET V, et al. Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21:242-249.
- [3] BAMBER L, HARDING M, MONNE M, et al. The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes [J]. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 2007, 104(26):10830-10834.
- [4] ZHANG Y Q, ROOTE J, BROGNA S, et al. Stress sensitive B encodes an adenine nucleotide translocase in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 1999, 153(2):891-903.
- [5] BRUSTOVETSKY N, KLINGENBERG M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} [J]. *Biochemistry*, 1996, 35:8483-8488.
- [6] WALTHER T, TSCHOPE C, STERNER-KOCK A, et al. Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease [J]. *Circulation*, 2007, 115(3):333-344.
- [7] HALESTRAP A. Biochemistry: a pore way to die [J]. *Nature*, 2005, 434:578-579.
- [8] KANTROW S P, TATRO L G, PLANTADOSI C A. Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(2):251-260.
- [9] GARCIA N, MARTÍNEZ-ABUNDIS E, PAVÓN N, et al. Copper induces permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase [J]. *Cell Biological International*, 2007, 31(9):893-899.
- [10] MÖNKKÖNEN H, AURIOLA S, LEHENKARI P, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2006, 147:437-445.
- [11] ATLANTE A, BOBBA A, de BARI L, et al. Caspase-dependent alteration of the ADP/ATP translocator triggers the mitochondrial permeability transition which is not required for the low-potassium-dependent apoptosis of cerebellar granule

- cells[J]. *Journal of Neurochemistry*,2006,97(4):1166 – 1181.
- [12] KLINGEBBERG M. Transport viewed as a catalytic process [J]. *Biochimie*,2007,89(9):1042 – 1048.
- [13] YANG Z, CHENG W, HONG L, et al. Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor induced apoptosis of MCF-7 cells [J]. *Molecular Biology of the Cell*,2007,18(11):4681 – 4689.
- [14] DOLCE V, ASCARCIA P, IACOPETTI D, et al. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution [J]. *FEBS Letters*,2005,579(3):633 – 637.
- [15] SCHIEBEL K, MERTZ A, WINKELMANN M, et al. Localization of the adenine nucleotide translocase gene ANT2 to chromosome Xq24-q25 with tight linkage to DXS425 [J]. *Genomics*, 1994,24:605 – 606.
- [16] DIETZEL S, SCHIEBEL K, LITTLE G, et al. The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity [J]. *Experimental Cell Research*, 1999,252(2):363 – 375.
- [17] SHINOHARA Y, KAMIDA M, YAMAZAKI N, et al. Isolation and characterization of cDNA clones and a genomic clone encoding rat mitochondrial adenine nucleotide translocator [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1993,1152(1):192 – 196.
- [18] DÖRNER A, OLESCH M, GIESSEN S, et al. Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*,1999,1417(1):16 – 24.
- [19] ITOI S, MISAKI R, HIRAYAMA M, et al. Identification of three isoforms for mitochondrial adenine nucleotide translocator in the pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Mitochondrion*,2005,5(3):162 – 172.
- [20] STEPIEN G, TORRONI A, CHUNG A B, et al. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*,1992,267(21):14592 – 14597.
- [21] BROWER J V, RODIC N, SEKI T, et al. Evolutionarily conserved mammalian adenine nucleotide translocase 4 is essential for spermatogenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2007,282:29658 – 29666.
- [22] RODIC N, OKA M, HAMAZAKI T, et al. DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells (Dayton, Ohio) [J]. *Stem Cells*,2005,23(9):1314 – 1323.
- [23] 黄建华,周发林,马之明,等. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察 [J]. *热带海洋学报*,2006,25(3):47 – 52.
- [24] 黄建华,马之明,周发林,等. 南海北部野生斑节对虾卵巢解剖结构及组织学的研究 [J]. *南方水产*,2005,1(3):49 – 53.
- [25] SANTAMARIA M, LANAVE C, SACCONI C. The evolution of the adenine nucleotide translocase family [J]. *Gene*,2004,333:51 – 59.
- [26] SLIM R, LEVILLIERS J, LÜDECKE H J, et al. A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation [J]. *Genomics*,1993,16(1):26 – 33.
- [27] LEVY S E, CHEN Y S, GRAHAM B H, et al. Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes [J]. *Gene*,2000,254(1/2):57 – 66.
- [28] LI K, HODGE J A, WALLACE D C. OXBOX, a positive transcriptional element of the heart-skeletal muscle ADP/ATP translocator gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*,1990,265:20585 – 20588.
- [29] BOF M, BRANDOLIN G, SATRE M, et al. The mitochondrial adenine nucleotide translocator from *Dictyostelium discoideum*, functional characterization and DNA sequencing [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999,259(3):795 – 800.
- [30] DUPONT P Y, STEPIEN G. Computational analysis of the transcriptional regulation of the adenine nucleotide translocator isoform 4 gene and its role in spermatozoid glycolytic metabolism [J]. *Gene*,2011,487(1):38 – 45.
- [31] UAWISETWATHANA U, LEELATANAWIT R, KLANCHUI A, et al. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp [J]. *PLoS One*, 2011,6(9):e24427.
- [32] LUCIAKOVA K, KOLLAROVIC G, BARATH P, et al. Growth-dependent repression of human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) transcription: evidence for the participation of Smad and Sp family proteins in the NF1-dependent repressor complex [J]. *Biochemical Journal*, 2008,412(1):123 – 130.
- [33] JANG J Y, CHOI Y, JEON Y K, et al. Suppression of adenine nucleotide translocase-2 by vector-based siRNA in human breast cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth in vitro and in vivo [J]. *Breast Cancer Research*, 2008,10(1):R11.
- [34] BAUER M K, SCHUBERT A, ROCKS O, et al. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis [J]. *The Journal of Cell Biology*,1999,147(7):1493 – 1502.
- [35] ZAMORA M, GRANELL M, MAMPEL T, et al. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells [J]. *FEBS Letters*,2004,563(1/3):155 – 160.

Molecular cloning and expression analysis of adenine nucleotide translocase (PmANT) in *Penaeus monodon*

SUN Wen-wen^{1,2}, ZHOU Fa-lin¹, HUANG Jian-hua¹, QIU Li-hua¹, YANG Qi-bin¹, JIANG Shi-gui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The adenine nucleotide translocase (ANT) is the most abundant mitochondrial inner membrane protein, which catalyzes the exchange of ADP and ATP between cytosol and mitochondria and participates in many models of mitochondrial apoptosis. In the present study, the full sequence of *P. monodon* ANT gene was cloned and named PmANT. The full length cDNA of PmANT contained a 5' untranslated region (UTR) of 65 bp, a 3' UTR of 393 bp and an ORF of 930 bp encoding a polypeptide of 309 amino acids with an estimated molecular mass of 33.622 ku. Like other animal ANTs, the structure of the PmANT protein consists of three homologous repeated domains. But there are no signal peptide and glycosylation sites in PmANT protein. Sequence alignment analysis showed that the PmANT with the ANT of *Litopenaeus vannamei* shared a similarity of 98.7% and the homology of 97.4%. Analysis of the tissue expression pattern of the PmANT showed that the PmANT mRNA was expressed in all tested tissues, including heart, ovary, testis, muscle, eye stable nerve, cranial nerve, lymphoid tissue, stomach, intestines, hepatopancreas, gill, hemocyte, with the highest levels in muscle of male and the lowest level in immature testis. Furthermore, the PmANT expression was found to be at a higher level in mature testis than in immature testis. The PmANT expression was found in the six ovarian stages of development and the expression level of ovarian growth in the third growth phase was significantly higher than that of others except the sixth growth phase, while lowest in the fourth growth phase. The study provided essential materials and laid a firm foundation for the further research of the function of PmANT in gonad development of *P. monodon*.

Key words: *Penaeus monodon*; adenine nucleotide translocase; clone; expression