

凡纳滨对虾水孔蛋白-4 的 cDNA 克隆及盐度胁迫对其肝胰腺 mRNA 表达水平的影响

高 沿^{1,2}, 胡超群¹, 任春华¹, 钱 璟¹, 何香燕^{1,2}, 江 晓¹, 黄 文¹

(1. 中国科学院 南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了探索水孔蛋白(Aquaporin, AQP)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)渗透压调节过程中作用, 本研究通过 RACE 方法获得克隆的凡纳滨对虾 AQP(命名为 *LvAQP4*)的 cDNA 全长序列, 并分析了盐度胁迫对其肝胰腺 mRNA 表达的影响。结果发现: *LvAQP4* cDNA 序列全长为 1 048 bp, 其中包括 75 bp 的 5'UTR, 187 bp 的 3'UTR 和 786 bp 的 ORF。根据 ORF 序列推导出 *LvAQP4* 编码 261 个氨基酸, 预测其分子质量为 27.85 kDa, 等电点为 8.11。推导的氨基酸序列与其他甲壳物种的 AQP 相似度为 48.8% 到 97.3%。进化分析显示 *LvAQP4* 属于 AQP1-like 亚族、AQP4 类。定量 PCR(qPCR)检测到 *LvAQP4* 在不同组织中均有表达, 其中鳃的表达量最高, 肝胰腺、肌肉、脑和眼柄中也较高, 而血淋巴、肠、胃和胸神经节中表达量则较低。在高盐(盐度 40)刺激下, 凡纳滨对虾的肝胰腺 *LvAQP4* mRNA 表达量会随着时间的推移而上升, 到 6 h 达到最高, 而后逐步下降。而在低盐(盐度 4)刺激下, 凡纳滨对虾的肝胰腺 *LvAQP4* mRNA 表达量并无明显变化。在原代分离和培养的肝胰腺细胞中, 培养液中加入额外的 NaCl 会剂量依赖地提高 *LvAQP4* mRNA 表达水平。同样, 通过在培养液中额外加入蔗糖提高培养液渗透压, 也会剂量依赖地提高 *LvAQP4* mRNA 表达水平, 但作用不如 NaCl 明显。这些结果表明盐度与肝胰腺 *LvAQP4* 的表达量有关, *LvAQP4* 对凡纳滨对虾的渗透压调节具有非常重要的作用。

关键词: 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); *LvAQP4*; 盐度胁迫; 渗透压调节

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)02-0061-10

DOI: 10.11759/hyxx20160201003

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 俗称南美白对虾, 是一种广盐性的对虾, 对盐度的耐受范围为 0.5~40^[1]。水环境中的盐度对对虾而言是一种重要的非生物因子, 影响着凡纳滨对虾的生长、存活、蜕皮、呼吸、繁殖、营养需求和对特定病原的抗性等^[2-5]。在自然条件下, 凡纳滨对虾成虾通常在高盐度的海水中进行繁殖, 幼体则迁徙到河口处生活成长, 长成大虾后又回到高盐度的海水中进行繁殖^[6]。在养殖条件下, 受降雨和蒸发的影响, 养殖水体盐度在一段时间内会急剧或缓慢的变化。面对外界环境盐度的改变, 凡纳滨对虾会通过渗透压调节来维持自身内环境的相对稳定。因此了解其渗透压调节的机制对凡纳滨对虾的健康养殖和自然生活周期的理解具有非常重要的意义。

在凡纳滨对虾中, 许多渗透压调节相关的基因已经克隆并分析, 如 Na⁺/K⁺-ATPase^[7]、H⁺-ATPase^[8]、碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)^[9]和 Ca²⁺-ATPase^[10]

等。目前渗透压的调节主要集中在离子调节方面, 而水调节的研究比较缺乏。在哺乳动物中发现水的快速运输需要水孔蛋白(Aquaporin, AQP)的协助^[11]。AQP 是一种以同源四聚体形式存在的膜蛋白, 每个单体都有一个 MIP 结构域, 6 个跨膜区域(TM1-6)和 5 个环形结构 (LoopA-E), 其中 LoopB 和 LoopE 疏水强, A 环、C 环、E 环位于质膜外侧, B 环、D 环、C

收稿日期: 2016-02-01; 修回日期: 2016-05-24

基金项目: 广东省中国科学院全面战略合作专项(2013B091300020); 广东省省级科技计划项目(2014B030301064, 2015B020231007); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2012AA10A404-4)

[Foundation: The Comprehensive Strategic Cooperation Project of The Chinese Academy of Sciences of Guangdong Province, No.2013B091300020; Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China, No.2014B030301064, 2015B020231007; National High-tech Research & Development of China (“863” program), No.2012AA10A404-4]

作者简介: 高沿(1990-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事对虾繁育与增养殖工作, 电话: 15521216043, E-mail: gaoyan13@mails.ucas.ac.cn; 胡超群, 通信作者, 研究员, E-mail: hucq@scsio.ac.cn

端、N 端位于质膜内侧, B 环、D 环上都有一段保守的天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(Asn-Pro-Ala, NPA)基序, 这两段 NPA 基序在空间上并列, 这对形成 AQP 的“沙漏”模型非常重要^[12-13]。到目前为止, 在人类中已经克隆了 13 种 AQP^[14], 在其他物种也发现与人类同源的 AQP, Soto 等^[15]根据 AQP 氨基酸序列相似性, 将其分为 4 个亚族: a. AQP1-like 亚族, 包含 AQP0、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5 和 AQP6 6 类基因, 这一亚族对水分子转运具有高度选择性, 为传统的水孔蛋白; b. AQP3-like 亚族, 包含 AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10 4 类基因, 这一家族除了转运水外, 还转运甘油、尿素等小分子, 称为水甘油通道蛋白(aquaglyceroporins); c. AQP8-like 亚族, 只包括 AQP8 一类基因; d. AQP11-like 亚族, 包含 AQP11 和 AQP12 两类, 又称为超级水孔蛋白(superaquaporins)。然而, 由于绝大部分哺乳动物陆生, 并没有通过体表与外界交换水分子的渗透压调节机制, 因此 AQP 在适应外界水环境中盐度变化的研究还相对比较缺乏。相反在水生生物中, AQP 会在渗透压调节中起到非常重要的作用, 但目前研究主要集中在硬骨鱼类^[16-20], 而在甲壳动物, 尤其是重要的海水经济养殖品种对虾中, 研究则比较缺乏。肝胰腺是对虾的物质代谢中心, 其含有大量的离子转运酶、解毒酶及抗逆酶等, 是凡纳滨对虾渗透压调节的一个重要器官。而目前盐度对 AQP 影响的研究主要集中在鳃和肠等器官, 而其在肝胰腺的表达和作用模式研究则比较缺乏。

本研究从凡纳滨对虾中获得一个 AQP(*LvAQP4*)的 cDNA 全长序列并对其进行生物信息学分析, 同时分析了高盐、低盐对活体肝胰腺以及不同浓度 NaCl 和蔗糖对离体肝胰腺细胞中 *LvAQP4* mRNA 表达的影响, 为进一步研究凡纳滨对虾渗透压调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的凡纳滨对虾(体质量约 10 g)来源于广东省湛江市东方实业有限公司凡纳滨对虾良种养殖基地。实验前将室外养殖的凡纳滨对虾移至室内圆桶内暂养一周, 暂养期间海水盐度为 32, 24 h 充气, 每天定时投 3 次料, 每天换水 1/3。

1.2 *LvAQP4* 基因克隆

用 TRIzol 试剂从鳃组织中提取总 RNA(Invitrogen)

并用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)进行第一条链 cDNA 的合成。全长 cDNA 利用 SMATRer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)获得。5'/3'-RACE 的特异性引物是根据 Genbank 的部分 *LvAQP* cDNA 部分序列来设计(ID: KF548550), 5'-RACE 特异性引物为 GSP5 和 GSPn5(表 1), 3'-RACE 特异性引物为 GSP3 和 GSPn3(表 1)。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖进行电泳并用 PCR purification Kit (TaKaRa)进行切胶纯化。纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T vector (TaKaRa)连接, 然后转化到 *E. coli* cells JM109(TaKaRa)。重组子根据蓝白斑进行筛选并测序。

表 1 实验中用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
GSP5	CGTCGTTCTACGCTCATCACA
GSPn5	TCAAGATGGCTGCCCGAC
GSP3	TCCGGCTGCCACATCAAC
GSPn3	ATGCTGGTTGCCCGTCAC
F1	GCAGCCATCTTGAAGGGAGTG
R1	CGTCGTTCTACGCTCATCACA
β-actinF	ACCATCCAGGCTGTGCTTTC
β-actinR	ACCTTCATAAACGGGGACCA

1.3 生物信息学分析

利用 BioEdit 软件寻找 *LvAQP4* ORF 并翻译成蛋白质, *LvAQP4* 结构域的预测利用在线的 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 等电点、分子质量预测和疏水性分析利用在线的 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)。从 NCBI 检索不同物种的 AQP 序列并利用 Clustalx 1.8 软件进行多序列比对。用 Mega 6 软件构建进化树, 参数为 Neighbour-Joining method (pairwise deletion), protein difference (p distance), bootstrap (1000)。

1.4 组织分布与高盐、低盐刺激

随机从 5 尾对虾中取鳃、肌肉、脑、眼柄、肝胰腺、血淋巴、肠、胃和胸神经节组织并立即放入液氮中保存, 作组织分布检测用。

将在盐度 32 的海水中暂养的对虾随机放到盐度 4(低盐)和盐度 40(高盐)的海水中进行急性盐度刺激, 在 1.5、3、6、12 和 24 h 分别取肝胰腺组织样品, 并立即放到液氮中保存作后续定量 PCR 用。

1.5 对虾肝胰腺细胞分离与孵育

凡纳滨对虾肝胰腺细胞的分离根据先前描述的方法^[21], 即取 10 尾凡纳滨对虾的肝胰腺, 用无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 HBSS 溶液洗 3 次(Sigma), 然后用含 EDTA(1 mmol/L)的无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 HBSS 溶液孵育 5 min, 随后肝胰腺的残片用含胶原酶 IV(1 mg/mL, Sigma)和 DNaseII (0.01 mg/mL, Sigma)的无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 HBSS 溶液在 28℃ 孵育 30 min, 孵育后用吸管轻轻吹打, 然后用 30 μm 的筛网过滤肝胰腺细胞, 过滤后的肝胰腺细胞培养液在 4℃ 100 × g 离心 5 min, 去上清并收集沉底的肝胰腺细胞。获得的肝胰腺原代细胞在 Dulbecco modified Eagle medium , DMEM)/F-12 (1 : 1, GibcoBRL, USA)培养液中培养。将细胞稀释到 0.4×10^6 个/mL, 然后转移到 24 孔的聚乙烯亚胺预涂板上, 在 28℃ 的培养箱中培养。

分离的肝胰腺细胞培养 24 h 后, 用额外添加不同浓度的 NaCl (50、100、200、300、400 mmol/L) 和蔗糖(100、200、400、600、800 mmol/L)的 DMEM/F-12 培养液进行刺激培养, 刺激 6 h 后收集细胞并进行后续分析。

1.6 实时定量 PCR

按照 1.2 方法进行提取不同组织、活体实验高盐、低盐刺激肝胰腺样品和离体肝胰腺细胞孵育样

品的总 RNA, 并进行第一条链 cDNA 的合成。*LvAQP4* 的 mRNA 表达水平利用实时定量 PCR(qPCR) 进行检测。利用 SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa) 试剂盒和 RotorGene RG-3000 real-time PCR System (Corbett Research) 进行定量分析。qPCR 中 *LvAQP4* 的特异性引物序列为 F1 和 R1 (表 1) 并利用 β -actin 作为内参基因, 序列为 β -actinF 和 β -actinR (表 1)。每个样本做 3 个重复, 反应程序为 95℃ 60 s 预变性, 接着 95℃ 15 s 变性, 60℃ 30 s 复性, 72℃ 40 s 延伸 40 个循环并在 72℃ 进行信号获取。*LvAQP4* 的相对表达量利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行处理和分析。数据用 SPSS17.0 单因素方差分析处理(ANOVA)。

2 结果

2.1 *LvAQP4* cDNA 克隆与结构分析

克隆到的 *LvAQP4* cDNA 全长为 1048 bp (Genbank 登录号 KU497721), 其中包括 75 bp 的 5' UTR, 187 bp 的 3'UTR 和 786 bp 的 ORF(图 1)。根据 ORF 序列推导出 *LvAQP4* 含 261 个氨基酸, 分子质量为 27.85 kDa, 等电点为 8.11。预测 *LvAQP4* 的 MIP 结构域位于 16~234 AA 位置处, 6 个跨膜区域分别在 25~45 AA, 56~74 AA, 101~139 AA, 145~163 AA, 177~189 AA 和 218~238 AA 位置处, 在 83~85 AA 及

cggcgcgcgcgtcgccgcgcgcagaccagctccgctcctttctccccaaaacaaaaacaaagaacatcaacca	100
gggcaagatcaag	5
gacatgaaggagtagacatcgccacggcgagctcatgaatgaccgcgcgcgtgtggaaggcttctctggcggagttctctgggcaccatgttc	180
D M K E Y I G T G E L M N D R R V W K A F L A E F L G T M F	35
ctcgtgttcatcgctcgccgtcctgtatcggtctctgaatgaggatagcccccagtgctgtccagatctactcgctctcggggtc	270
L V F I G C G S C I G S W N E G Y A P S V V Q I S L A F G V	65
accgtggcttccatcgccaggctgtgggtcatgtctccgctgtcatatcaaccagccgtgacatgcgcatgctgggtgcccgctcac	360
T V V S I A Q A V G H V S G C H I N P A V V T C A M L V A R H	95
gtctccgtcatccgggactgatctacatcggtgccagtgctcggtgccatcgctcggggcagccatcttgaggggagtgaccnccgca	450
V S V I R A L L I Y I V C Q C L G A I V G A A I L R G V T P A	125
gacatccaggggtcccttggcatgacctgaggaaacgagaagatcgacaccgctcaggcatgtgggcatcgaaactctctcatcaccttctgtc	540
D I Q G S L G M T L R N E K I D T A Q A L G I E L L I T F V	155
cccgtcatcaccgtctctcggggctgtgatgagcgtaggaaacgacgtgaagggatcagctcctctcgccattggcgtgtccatcaccaact	630
P V I T V F G A C D E R R N D V K G S A P L A I G L S I T T	185
tgccatctcttcggctgccatcacagggtcttcgatgaaccnccagaggagtctcggtccagctgttcactctccggtctctggcaggac	720
C H L F A V P I T G S S M N P A R S F G P A V I S G L W Q D	215
cactgggtatcacgggtcgggcttatctcgggtggcttggcagcagctcttatctactcctacgtattccgagcccaaggagcccgct	810
H W V Y R A G P I L G G L A A A L I Y S Y V F R A P K D P A	245
gcttatgacgtggagatggacaactataacaagagaaccaacaatgcttaagagaaaagatctacttggtctggcccgatcatggcgggt	900
A Y D V E M D N Y N K R T N N A *	260
cttctcccgccgggtttacaaaataacctggccaggagacgaagaagaccaaggaagacaaccacaagaagaagagagagaac	991
gagaagaacatcgagaaagagaagaacaacgagaaaaaataaaaaaaaaaaaaa	1078

图 1 *LvAQP4* 的 cDNA 全长序列及推导的氨基酸

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *LvAQP4*

推导的氨基酸序列放在相应的 ORF 下面。MIP 结构域用灰色表示。起始密码子和终止密码子加粗表示,“*” 终止密码子,“==” 加尾信号,“ ” 跨膜区,方框 NPA 基序

The amino acid sequence deduced from ORF is presented along with the corresponding cDNA sequence, the MIP domain is marked by gray, the start and stop codons (asterisk) are in boldface, the polyadenylation signal (AATAA) is double-underlined, probable transmembrane regions are underlined, and two NPA motifs are boxed

198~201 AA 位置处有两个保守的 NPA 基序, 分别位于 LoopB 和 LoopE。

2.2 多序列比对及进化分析

LvAQP4 与其他物种的 AQP 的比较结果见图 2。LvAQP4 与斑节对虾(*Penaeus monodon*), 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*), 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和鱼虱(*Caligus rogercresseyi*)的 AQP 相似性分别为 97.3%、73.9%、63.3%和 48.8%。多序

列比对发现它们都具有两个保守的 NPA 基序, 6 个跨膜区域。

N-J 进化树进化分析表明(图 3), LvAQP4 属于 AQP1-like 亚家族、AQP4 类, 属于一种传统的水通道蛋白。AQP4 类分为脊椎动物与无脊椎动物两类, LvAQP4 与无脊椎动物的 AQP 聚为一类, 其中 LvAQP4 与斑节对虾的 AQP 的遗传距离最小, 进化关系最近。

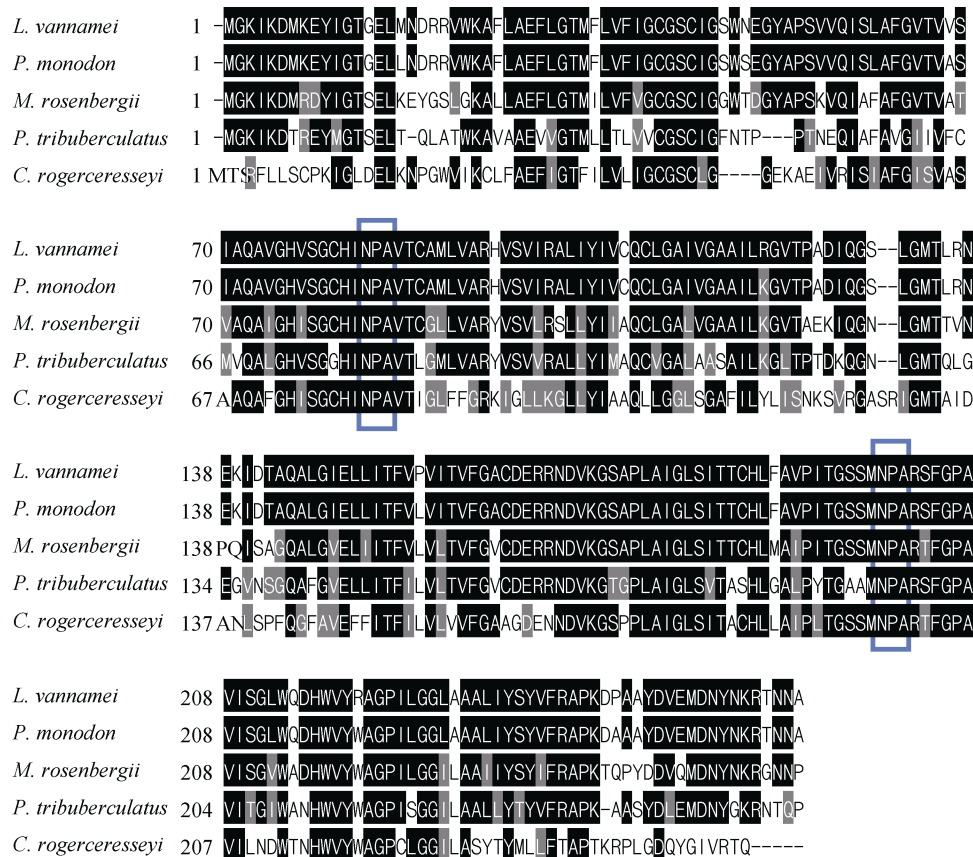


图2 LvAQP4 与斑节对虾(AEI25531)、罗氏沼虾(AET34919)、三疣梭子蟹(AHB64460)和鱼虱(ACO10737) 多序列比对
Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of LvAQP4 and AQP from *Penaeus monodon* (AEI25531), *Macrobrachium rosenbergii* (AET34919), *Portunus trituberculatus* (AHB64460), and *Caligus rogercresseyi* (ACO10737)

保守性强的区域用黑表示, 保守性低的区域用灰色表示。NPA 基序用方框表示

The conserved amino acid residues are in black shadow and similar amino acid residues are in gray shadow. NPA motif is shown in a box

2.3 LvAQP4 组织表达分布

qPCR 检测到 LvAQP4 在不同组织中均有表达(图 4), 在这些组织中, 鳃中的表达量最高, 其次为肌肉、脑、眼柄和肝胰腺, 而在血淋巴、肠、胃和胸神经节中表达量则较低。

2.4 盐度刺激下肝胰腺LvAQP4表达量的变化

在高盐刺激下(图 5A), 凡纳滨对虾肝胰腺中 LvAQP4 mRNA 表达水平随着刺激时间的延长而逐

步上升, 在刺激后 1.5 h 表达量就显著上升($P < 0.05$), 在 3 和 6 h 组表达量较对照组有极其显著性上升($P < 0.01$), 其中在 6 h 表达量达到最高, 为对照组的 4.83 倍, 而刺激后的 3 和 6 h 两时间点之间表达量无显著变化($P > 0.05$)。在高盐刺激后 12 h, 凡纳滨对虾肝胰腺中 LvAQP4 mRNA 表达水平又下降到与对照组水平($P > 0.05$)。而在低盐刺激下(图 5B), 凡纳滨对虾肝胰腺中 LvAQP4 mRNA 表达水平在各时间点与对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$)。

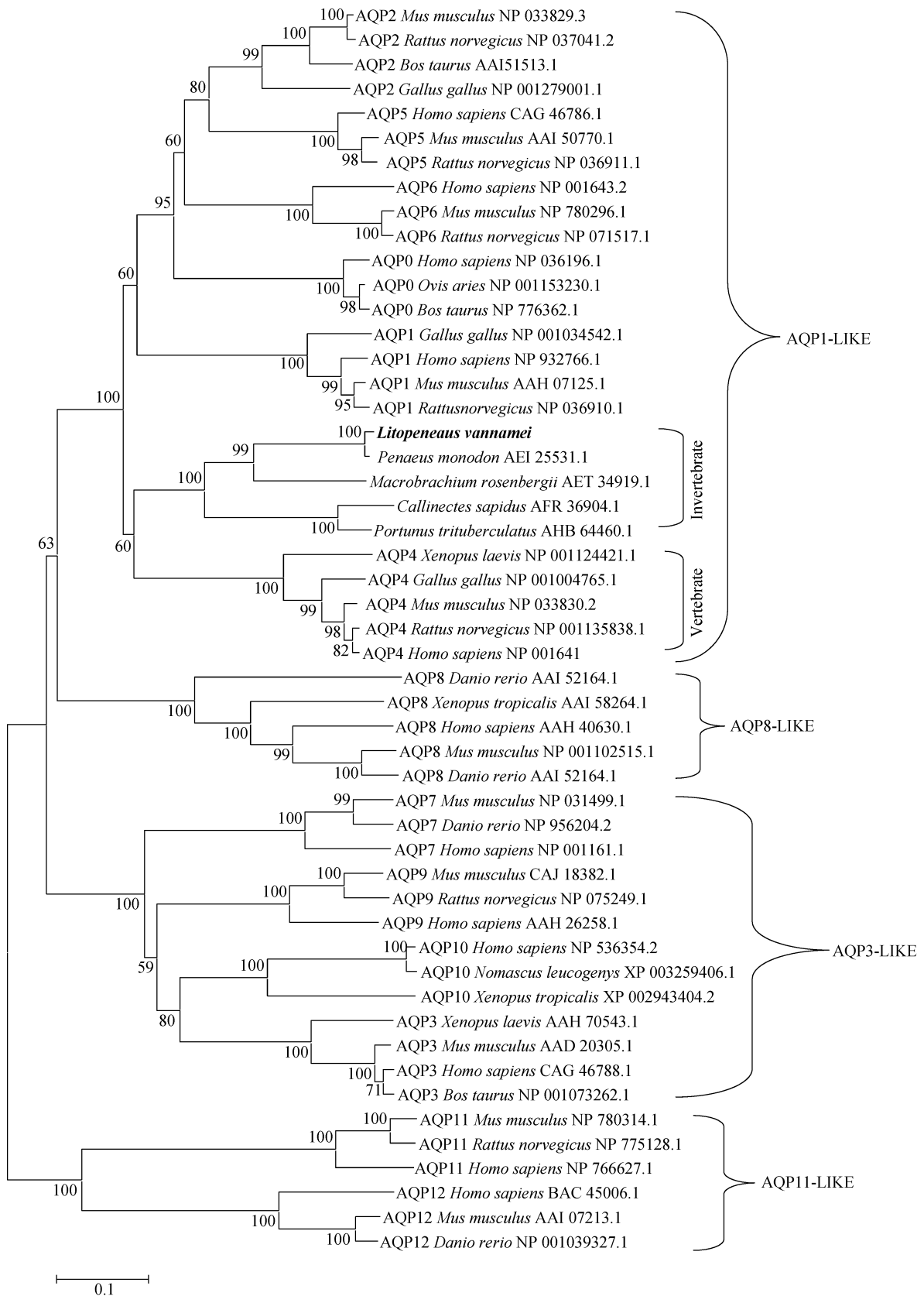


图 3 LvAQP4 与其他物种 AQP 的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of LvAQP4 with AQP family members in other species

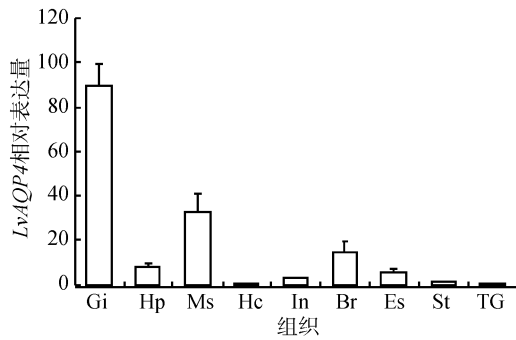


图 4 *LvAQP4* 在不同组织中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression level of *LvAQP4* in various tissues

数据表示为平均值 ± 标准误; Gi.鳃; Hp.肝胰腺; Ms.肌肉; Hc.血细胞; In.肠; Br.脑; Es.眼柄; St.胃; TG.胸神经节

Data were presented as mean ± S.E.; Gi. Gill; Hp. Hepatopancreas; Ms. Muscle; Hc. Hemocyte; In. Intestine; Br. Brain; Es. Eyestalk; St. Stomach; TG. Thoracic ganglion

2.5 高渗透压对肝胰腺原代细胞 *LvAQP4* 表达量的影响

本研究采取加入 NaCl(图 6B)和蔗糖(图 6C)两种方法提高细胞培养液的渗透压, 来研究高渗透压对 *LvAQP4* mRNA 表达水平的影响。在额外添加 NaCl 的实验中发现, 随着额外添加 NaCl 浓度的提高, *LvAQP4* mRNA 总体上出现剂量依赖的表达量提升。当额外添加的 NaCl 浓度在 100 mmol/L 及以下时, *LvAQP4* mRNA 的表达量无显著变化($P>0.05$)。当额外添加的 NaCl 浓度在 200 mmol/L 及以上时, *LvAQP4* mRNA 的表达量随着 NaCl 浓度的升高而显著增加($P<0.05$), 呈现出明显的剂量效应。

在额外添加蔗糖的实验中同样发现, 随着额外添加蔗糖浓度的提高 *LvAQP4* mRNA 表达量会有提

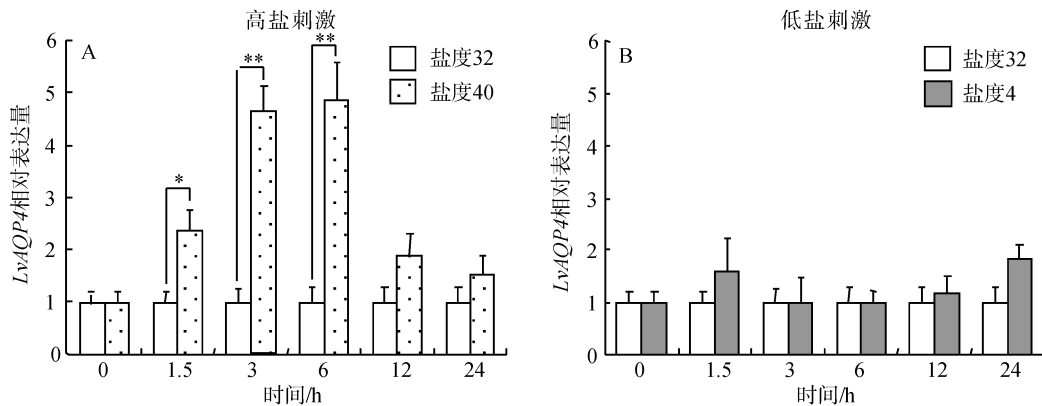


图 5 肝胰腺的 *LvAQP4* 在 40(A)或 4(B)盐度刺激下相对表达量(数据表示为平均值 ± 标准误)

Fig. 5 The relative expression level of *LvAQP4* in hepatopancreas after 40(A) or 4 (B) salinity treatment (data were presented as mean ± S.E.)

“*”, $P < 0.05$; “**”, $P < 0.01$

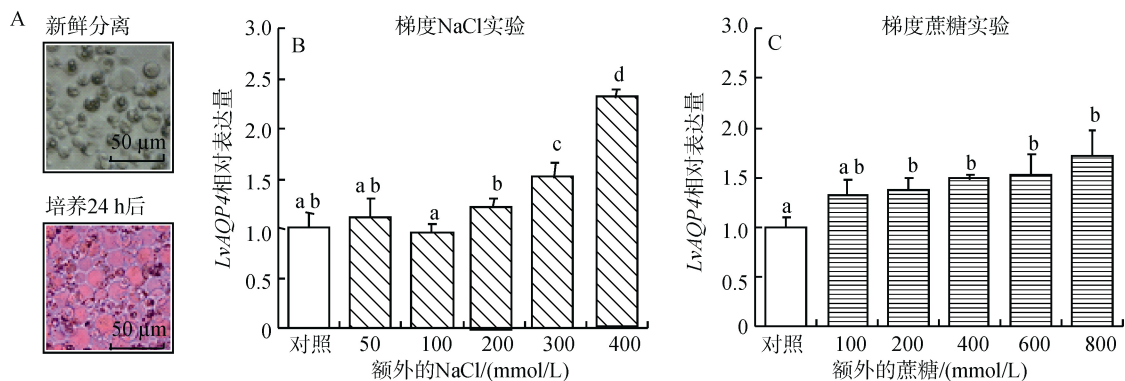


图 6 NaCl 和蔗糖对肝胰腺原代细胞 *LvAQP4* mRNA 表达水平的影响

Fig. 6 Effects of sodium chloride and sucrose on *LvAQP4* mRNA expression in hepatopancreatic primary culture cells

A. 新鲜分离的原代细胞与培养后的细胞; B. 不同浓度 NaCl 对肝胰腺原代细胞 *LvAQP4* mRNA 表达水平的影响; C. 不同浓度蔗糖对肝胰腺原代细胞 *LvAQP4* mRNA 表达水平的影响; 不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)

A. Fresh isolated and cultured primary cells; B. Dose-dependent effects of sodium chloride on *LvAQP4* mRNA expression in hepatopancreatic primary cells; C. Dose-dependent effects of sucrose on *LvAQP4* mRNA expression in hepatopancreatic primary culture cells, Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$); same letters indicate no significant differences ($P > 0.05$)

升。当额外添加的蔗糖质量浓度在 100 mmol/L 以下时, *LvAQP4* mRNA 的表达量无显著变化($P > 0.05$)。当额外添加的 NaCl 浓度在 200 mmol/L 及以上时, *LvAQP4* mRNA 的表达量较对照组而显著增加($P < 0.05$), 但 200 mmol/L 及以上组之间的 *LvAQP4* mRNA 表达量无显著变化($P > 0.05$)。而在 400 mmol/L 的 NaCl 或 800 mmol/L 的蔗糖等渗的情况下, 加入 NaCl 组 mRNA 的表达水平为对照组的 2.34 倍, 而蔗糖组只有对照组的 1.53 倍, NaCl 比蔗糖对 *LvAQP4* mRNA 表达的提升作用更明显。

3 讨论

本研究采用 RACE 技术获得了 *LvAQP4* cDNA 全长序列, 其 ORF 长度为 786 bp, 预测编码 261 个氨基酸, 分子质量为 27.85 kDa。 *LvAQP4* 编码的蛋白质 *LvAQP4* 与其他 AQP 结构一样^[12], 都有一个典型的 MIP 结构域, 6 个跨膜区域和 5 个连接环。在 *LvAQP4* 中发现两个保守的 NPA 基序, 第一个 NPA 基序上游为 VSGCH, 第二个 NPA 基序第一个氨基酸为 R, 第二个氨基酸不是 D, 这是传统 AQP 中所常见的序列结构^[22], 这表明 *LvAQP4* 属于传统 AQP, 传统 AQP 是一类对水分子转运具有高度选择性的水孔蛋白。NJ 进化分析进一步表明 *LvAQP4* 属于传统的 AQP、AQP1-like 亚族 AQP4 类。多序列比对分析显示 *LvAQP4* 与其他甲壳动物的 AQP 相似度为 48.8%~97.3%, 这表明 *LvAQP4* 具有相对保守性。水孔蛋白是一个多基因家族, 目前在哺乳动物种已经克隆出 13 种^[14], 在鱼类已经克隆出 7 种^[16], 香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 中已经克隆出 10 种^[23], 在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 发现了 8 种^[24]。而目前凡纳滨对虾只有本研究的 *AQP4* 同源基因一种, 凡纳滨对虾中是否存在更多未知的水孔蛋白基因需要进一步研究。

本研究对 *LvAQP4* 在不同组织中的表达水平进行了定量分析。结果显示, 与其他物种中观察到的类似^[19, 23], *LvAQP4* 在凡纳滨对虾不同组织中也是广泛表达的, 这表明 *LvAQP4* 对凡纳滨对虾的生理功能具有非常重要的作用。研究发现在这些组织中, 鳃的表达量最高, 在尖吻角鲨 (*Squalus acanthias*)^[19] 和香港牡蛎^[23] 中同样发现在其鳃中表达量比其他组织明显高, 这可能与鳃是最重要的渗透压调节器官有关^[25-26]。而在肌肉、脑、眼柄和肝胰腺中, *LvAQP4* mRNA 的表达量也较高。肝胰腺也是渗透压调节的

重要器官, 面对外界盐度胁迫的压力时, 凡纳滨对虾会改变消化酶的活性为血淋巴进行渗透压调节提供能量^[27]。

在体外活体实验中发现, 在高盐刺激下凡纳滨对虾肝胰腺中 *LvAQP4* mRNA 表达水平随着刺激时间的延长而逐步上升, 在 6 h 表达量达到最高, 为对照组的 4.83 倍, 随后在 12 h 表达量又下降到对照组水平。而在低盐刺激下, 凡纳滨对虾肝胰腺中 *LvAQP4* mRNA 表达水平较对照组均无显著变化。而在同属甲壳动物的三疣梭子蟹中却发现不同的结果, 在高盐(盐度 45)刺激后的 3 h, 三疣梭子蟹肝胰腺 *AQP* mRNA 开始下降, 直到 72 h 才恢复到刺激前水平。在低盐(盐度 11)刺激后的前 3 h 表达量无显著变化, 在 6 h 和 24 h 表达量显著下降, 直到 24 h 表达量才显著上升, 随后又显著下降, 直到 72 h 还未恢复到刺激前水平^[28]。凡纳滨对虾与三疣梭子蟹水孔蛋白受高低盐刺激后有不同的表达水平, 这可能与它们具有不同的渗透压调节类型有关^[29]。凡纳滨对虾是强的渗透压调节者, 可以在淡水中长期生活, 而三疣梭子蟹是弱的渗透压调节者, 其生长需在一定的盐度水域中, 不能在淡水中存活。由于强和弱的渗透压调节者受盐度刺激时, 有不同的离子转运酶来进行离子转运, 离子浓度的变化而引起渗透压的改变, 最终影响凡纳滨对虾与三疣梭子蟹水孔蛋白有不同的表达水平。

在分离的肝胰腺原代细胞中进一步证实了高渗刺激会使 *LvAQP4* 的表达量升高。在额外添加 NaCl 和蔗糖的细胞培养液中, 随着额外加入的 NaCl 和蔗糖浓度的提高, *LvAQP4* mRNA 表达量均会出现剂量依赖的提升。这表明高渗诱导 *LvAQP4* 的表达是一个直接的细胞反应, 而不需要内分泌因子调控。此外, 等渗 NaCl 和蔗糖下, *LvAQP4* 表达量上有差异, 这表明两个可能存在不同的反应机制。在哺乳动物中离体实验中, 高渗条件使离体的老鼠星状胶质细胞 *AQP4* 的表达量升高^[30], 但在人的视网膜色素上皮细胞系中却又发现高渗条件会造成 *AQP4* 表达量的下降^[31], 这表明 *AQP4* 的表达水平在不同的物种不同的细胞之间有显著性差异。

凡纳滨对虾渗透压调节是一个复杂的过程, 在面对外界盐度的变化, 凡纳滨对虾会从个体、组织到分子水平的一系列适应性调整, 以适应外界环境盐度的变化。在分子调节方面, 主要由两部分组成, 即离子的调节和水的调节。目前, 在凡纳滨对虾中已经

分析了许多离子转运相关的酶^[7-10],并证明它们在渗透压调节方面的作用,而水的调节研究还比较缺乏。在鱼类中发现帮助水运输的水孔蛋白对渗透压调压具有非常重要的作用^[16-20],并且是不同的水孔蛋白相互合作来进行渗透压的调节。在对舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[17]的研究中发现,不同盐度下 *AQP1* 和 *AQP3* 具有不同的表达模式,在高盐条件下 *AQP1* 在肾和肠中表达量比在低盐中高,而在鳃中表达量几乎相同,因为在高盐条件下,对舌齿鲈通过肠上皮进行水的吸收和肾的重吸收来补偿体内水份的丢失;而在低盐条件下, *AQP3* 在鳃的表达量比在高盐条件下显著升高,而在肾和肠中几乎都没有表达,因为在低盐的调节下,对舌齿鲈通过鳃的 *AQP3* 将外界的水运输到血淋巴,而不需要肠上皮进行水的吸收和肾进行水的重吸收。水孔蛋白家族是一个多基因家族,凡纳滨对虾中可能同样存在其他的水孔蛋白,在不同的盐度下,通过调节不同水孔蛋白的表达来参与渗透压调节,使个体能够适应外界盐度的变化。

在对凡纳滨对虾研究中发现不同的盐度下, *LvAQP4* 有着不同表达水平,这表明 *LvAQP4* 有着不同的调节机制。已有的研究发现 AQP 的调节有两种机制:第一种是控制 AQP 的磷酸化和去磷酸化来控制 AQP 的活性,但这种机制只在某些植物和微生物中发现^[32],在动物中尚未有这样的调节机制的报道。第二种是控制单位面积细胞膜的 AQP 的量。直接的方法就是通过增加或降低基因的表达和蛋白质的合成和降解^[33]。间接方法的是通过 AQP 的易位调节,其中研究最广泛的哺乳动物的 AQP2,抗利尿激素通过受体来调节 AQP 的位置,从而进行调节水孔蛋白^[34]。在凡纳滨对虾肝胰腺中发现,高渗会导致 *LvAQP4* mRNA 表达水平的变化,这暗示高渗条件下凡纳滨肝胰腺 *LvAQP4* 可能是通过控制基因的表达量来调节水的运输。而在低渗条件下, *LvAQP4* mRNA 表达无显著变化,这可能是因为低渗对凡纳滨肝胰腺 *LvAQP4* 无影响或者低渗会引起 *LvAQP4* 通过易位来调节水的运输。了解 *LvAQP4* 的调节机制,对了解凡纳滨对虾的水分运输及渗透压调节机制具有非常重要的意义。目前 *LvAQP4* 调节机制尚不明确,需要以后的进一步的研究。

本研究首次获得了 *LvAQP4* 的 cDNA 全长序列,并分析了高盐、低盐对活体肝胰腺 *LvAQP4* mRNA 及不同浓度 NaCl 和蔗糖对离体肝胰腺细胞 *LvAQP4*

mRNA 表达的影响。这是在对虾中首个对 *AQP* 进行的研究。由于凡纳滨对虾中可能存在更多的水孔蛋白基因,所以在后续研究中,需要发掘更多的水孔蛋白基因,并结合离子调节与自由氨基酸调节机理的研究,进一步阐释凡纳滨对虾的渗透压调节机制。

参考文献:

- [1] Bray W A, Lawrence A L, Leung-Trujillo J R. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity [J]. Aquaculture, 1994, 122(2): 133-146.
- [2] Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios C A, Ross L G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931 [J]. Aquaculture, 1997, 157(1-2): 107-115.
- [3] 李英,王芳,董双林,等. 盐度突变对凡纳滨对虾稚虾蜕皮和呼吸代谢的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(7): 47-52.
Li Ying, Wang Fang, Dong Shuanglin, et al. Effects of salinity fluctuation on the molt and respiratory metabolism of juvenile *Litopenaeus vannamei* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(7): 47-52.
- [4] 黄凯,王武,卢洁,等. 盐度对南美白对虾的生长及生化成分的影响 [J]. 海洋科学, 2004, 28(9): 20-25.
Huang Kai, Wang Wu, Lu Jie, et al. Salinity effects on growth and biochemical composition of *Penaeus vannamei* [J]. Marine Sciences, 2004, 28(9): 20-25.
- [5] 向赞,王刚,叶国锋,等. 盐度变化对携带白斑综合症病毒 (WSSV) 的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 426-435.
Xiang Yun, Wang Gang, Ye Guofeng, et al. Effects of salinity changes on latent infection of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(2): 426-435.
- [6] Roy L A, Davis D A, Saoud I P, et al. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 147(2): 404-411.
- [7] Sun H, Zhang L, Ren C, et al. The expression of Na, K-ATPase in *Litopenaeus vannamei* under salinity stress[J]. Marine Biology Research, 2011, 7(6): 623-628.
- [8] Wang L, Wang W N, Liu Y, et al. Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(6): 6427-6438.
- [9] Liu M, Liu S, Hu Y, et al. Cloning and expression

- analysis of two carbonic anhydrase genes in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, induced by pH and salinity stresses [J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 391-400.
- [10] Wang Y, Luo P, Zhang L, et al. Cloning of sarco/ endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) gene from white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and its expression level analysis under salinity stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(11): 6213-6221.
- [11] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein [J]. *Science*, 1992, 256(5055): 385-387.
- [12] Cheng A, Van Hoek A N, Yeager M, et al. Three-dimensional organization of a human water channel [J]. *Nature*, 1997, 387(6633): 627-629.
- [13] Jung J S, Preston G M, Smith B L, et al. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP, The hourglass model [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(20): 14648-14654.
- [14] Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals [J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2009, 13(2): 107-117.
- [15] Soto G, Alleva K, Amodeo G, et al. New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: orthologous identification and functional transfer is possible [J]. *Gene*, 2012, 503(1): 165-176.
- [16] Martinez A S, Cutler C P, Wilson G D, et al. Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression [J]. *Biology of the Cell*, 2005, 97(8): 615-627.
- [17] Giffard-Mena I, Boulo V, Aujoulat F, et al. Aquaporin molecular characterization in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*): the effect of salinity on AQP1 and AQP3 expression [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148(2): 430-444.
- [18] Cutler C P, Cramb G. Branchial expression of an aquaporin 3 (AQP-3) homologue is downregulated in the European eel *Anguilla anguilla* following seawater acclimation [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(17): 2643-2651.
- [19] Cutler C P, MacIver B, Cramb G, et al. Aquaporin 4 is a ubiquitously expressed isoform in the dogfish (*Squalus acanthias*) shark [J]. *Frontiers in Physiology*, 2011, 2: 107.
- [20] Tipsmark C K, Sørensen K J, Madsen S S. Aquaporin expression dynamics in osmoregulatory tissues of Atlantic salmon during smoltification and seawater acclimation [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(3): 368-379.
- [21] Chen T, Zhang L P, Wong N K, et al. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) is predominantly expressed in the brain and negatively regulates hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression [J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(3): 743-745.
- [22] Ishibashi K, Kondo S, Hara S, et al. The evolutionary aspects of aquaporin family [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 300(3): R566-R576.
- [23] 万茜. 香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)水通道蛋白基因家族的克隆与表达分析 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2014: 53-69.
Wan Qian. Molecular cloning and expression analysis of aquaporin gene family in *Crassostrea hongkongensis* [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014: 53-69.
- [24] Kuwahara M, Asai T, Sato K, et al. Functional characterization of a water channel of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2000, 1517(1): 107-112.
- [25] Barra J A, Pequeux A, Humbert W. A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water [J]. *Tissue and Cell*, 1983, 15(4): 583-596.
- [26] 周双林, 姜乃澄, 卢建平, 等. 甲壳动物渗透压调节的研究进展. 鳃的结构与功能及其影响因子 [J]. *东海海洋*, 2001, 19(1): 44-51.
Zhou Shuanglin, Jiang Naicheng, Lu Jianping, et al. Progress of the study on osmotic regulation in crustaceans I. The gill's structure and function and its' concerned factors [J]. *Journal of East China Sea*, 2001, 19(1): 44-51.
- [27] 黄凯, 杨鸿昆, 战歌, 等. 盐度对凡纳滨对虾幼虾消化酶活性的影响 [J]. *海洋科学*, 2007, 31(3): 37-40.
Huang Kai, Yang Hongkun, Zhan Ge, et al. Effect of salinities on digestive enzyme activities of juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone [J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(3): 37-40.
- [28] 王渝, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹水通道蛋白 1 cDNA 及其盐度胁迫下的表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2014, 21(5): 893-901.
Wang Yu, Lü Jianjian, Liu Ping, et al. Cloning and characterization of aquaporin-1 and its expression analysis under salinity stress in *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fishery Science of China*, 2014, 21(5): 893-901.
- [29] McNamara J C, Faria S C. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(8): 997-1014.
- [30] Arima H, Yamamoto N, Sobue K, et al. Hyperosmolar

- mannitol stimulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(45): 44525-44534.
- [31] Willermain F, Janssens S, Arsenijevic T, et al. Osmotic stress decreases aquaporin-4 expression in the human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 34(2): 533-538.
- [32] Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, et al. Structural mechanism of plant aquaporin gating[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 688-694.
- [33] Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A. Regulation of brain aquaporins[J]. *Neuroscience*, 2004, 129(4): 945-953.
- [34] Fenton R A, Moeller H B, Hoffert J D, et al. Acute regulation of aquaporin-2 phosphorylation at Ser-264 by vasopressin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(8): 3134-3139.

Molecular cloning of aquaporin-4 (*AQP4*) gene in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the effect of salinity stress on its expression in hepatopancreas

GAO Yan^{1, 2}, HU Chao-qun¹, REN Chun-hua¹, QIAN Jing¹, HE Xiang-yan^{1, 2},
JIANG Xiao¹, HUANG Wen¹

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology/Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb. 1, 2016

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *LvAQP4*; salinity stress; osmoregulation

Abstract: In this study, to explore the function of aquaporin (AQP) in the osmoregulation of *Litopenaeus vannamei*, the full-length cDNA of *L. vannamei* aquaporin-4 (termed as *LvAQP4*) was cloned by RACE method, and the effect of salinity stress on the transcriptional expression of *LvAQP4* in the hepatopancreas was examined. The results showed that the full length cDNA of *LvAQP4* was 1048 bp in length, containing a 75 bp 5' UTR, a 187 bp 3' UTR, and a 786 bp ORF that encode for a deduced protein of 261 amino acids with the estimated molecular mass of 27.85 kDa and an isoelectric point of 8.11. The *LvAQP4* protein shared identities from 48.8% to 97.3% with its counterparts in other decapod species. Additionally, the phylogenetic analysis suggested that *LvAQP4* belonged to AQP1-like subfamily and clustered with other AQP4s. Quantitative real-time PCR (qPCR) showed that the expression of *LvAQP4* was ubiquitous, with the highest expression in the gills. The expression levels of *LvAQP4* were also high in the hepatopancreas, muscle, brain, and eyestalk but low in hemocytes, intestine, stomach, and thoracic ganglion. Under hypersalinity stress (40), the expression levels of *LvAQP4* mRNA in the hepatopancreas increased consistently from the beginning to 6 h, reaching the highest level at 6 h, and then decreased after that. Under hypersalinity stress (4), on the contrary, the mRNA levels of *LvAQP4* showed no significant change. In the hepatopancreatic primary cells, the expression levels of *LvAQP4* mRNA exhibited a dose-dependent upregulation when increased dosage of NaCl was added. Similar results were observed with addition of sucrose in the culture medium to increase the osmotic pressure, but the effect of sucrose on *LvAQP4* transcripts was weaker than that with NaCl. These results suggested that the expression of *LvAQP4* in the hepatopancreas was affected by salinity and *LvAQP4* may play important roles in the osmoregulation of *L. vannamei*.

(本文编辑: 谭雪静)