

# 脊尾白虾酚氧化酶原基因克隆及表达分析\*

李洋<sup>1,2</sup> 刘萍<sup>1</sup> 李健<sup>1</sup> 李吉涛<sup>1</sup> 马朋<sup>1</sup> 高保全<sup>1</sup> 段亚飞<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 大连海洋大学 大连 116023; 3. 上海海洋大学 上海 201306)

**提要** 利用 RACE 方法获得了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)酚氧化酶原(Prophenoloxidase, proPO)基因。该基因 cDNA 全长 3092bp, 开放阅读框 2013bp, 编码 671 个氨基酸, 其预测分子量为 74.82kDa。脊尾白虾酚氧化酶原基因推导的氨基酸序列与其他虾类酚氧化酶原氨基酸序列同源性较高(65%—78%), 该氨基酸序列具有铜离子结合位点等酚氧化酶原基因所具有的典型特征位点。组织表达分析结果表明, proPO 基因在脊尾白虾血细胞中表达量最高, 其次是鳃和肝胰腺组织, 在肌肉中几乎不表达。利用荧光定量 PCR 分析了不同盐度胁迫下脊尾白虾血细胞和鳃组织中的表达变化规律, 结果发现在不同盐度胁迫后血淋巴 proPO 表达量显著高于对照组, 盐度胁迫初期鳃组织 proPO 表达量显著高于对照组。本研究结果表明脊尾白虾酚氧化酶原基因参与了盐度胁迫引起的机体应激反应。

**关键词** 脊尾白虾; 酚氧化酶原; 基因克隆; 表达; 盐度胁迫

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20121225001

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白虾、小白虾、五须虾、青虾等, 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属(*Exopalaemon*), 属于热温带海区底栖虾类, 尤以黄、渤海产量最高(刘瑞玉, 1955)。因脊尾白虾具有生长快、繁殖强和适应性广等优点, 随着沿海滩涂的开发利用, 特别是近年来脊尾白虾养殖面积不断扩大, 已成为池塘单养、鱼虾贝类混养和虾池秋冬季养殖的重要品种(王兴强等, 2005)。

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是一种广泛分布于动植物、微生物中含有铜离子结合位点的氧化酶, 在分子氧作用下将酚类氧化成邻苯醌, 醌类可抑制微生物的感染并参与到宿主的防御反应中(白霜等, 2008)。而酚氧化酶一般情况下以无活性的酶原形式—酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)存在, proPO 通过酚氧化酶级联反应转化成具有活性的 PO(Nappi *et al*, 2005)。酚氧化酶原激活系统由 proPO、PO、丝氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂以及一些模式识别

蛋白所构成, 在整个非特异性免疫机制中起到非常重要的作用并发挥多种功能(Cerenius *et al*, 2004)。目前为止, proPO 基因已经从罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*(DQ182596)、斑节对虾 *Penaeus monodon*(AF521948)、中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*(EU 015060)、凡纳对虾 *Litopenaeus vannamei*(AY723296)、日本对虾 *Marsupenaeus japonicus*(AB065371, AB073223)、短钩对虾 *Penaeus semisculcatus*(AF521949)、美国龙虾 *Homarus americanus*(AY655139)、欧洲龙虾 *Homarus gammarus*(AJ581662)等虾类动物上克隆得到, 所有的 proPOs 均包含两个铜离子结合位点, 一段保守的区域和一个蛋白水解激活位点, 但是均缺乏信号肽。但是关于脊尾白虾 proPO 基因的研究还未见报道。

大量研究表明, 养殖环境变化尤其是盐度突变会削弱水产动物的免疫系统中酚氧化酶的活性(Vargas-Albores *et al*, 1998; Daniel *et al*, 2006; Bindhu *et al*, 2007; Li *et al*, 2010)。近年来脊尾白虾的低盐驯化和养殖已经广泛开展, 而盐度变化对脊尾白虾免

\* 国家高技术研究发展计划(863)项目资助, “主要养殖甲壳类良种培育”, 2012AA10A409 号; 国家虾产业技术体系项目资助, CARS-47 号; 公益性行业(农业)科研专项课题资助, 201103034 号; 中国水产科学研究院基本科研业务费项目资助, 2013A0701 号。李洋, E-mail: liyang\_able@163.com

通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-12-25, 收修改稿日期: 2013-05-16

疫功能的影响机理尚不清楚。因此,本研究克隆了脊尾白虾酚氧化酶原基因,利用荧光定量 PCR 方法分析其组织表达分布,并分析了盐度变化对酚氧化酶原基因表达的影响,以期为脊尾白虾健康养殖提供理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用脊尾白虾来自昌邑海丰水产养殖有限责任公司,选取体长在(4.50±0.50)cm的健康活虾,实验前于 200L 的 PVC 桶中暂养一周时间,水温 21°C,盐度 32, pH8.0,连续充气,早晚各投喂混合饵料一次。

#### 盐度胁迫实验

设置盐度梯度为 4、11、18、25、32、39、46;取样时间设定为 0、2、4、8、16、24、32、48、72h。每个梯度设置 3 个平行,每桶 135 只脊尾白虾,取样时每个时间点每个平行组取 15 只虾进行血淋巴和鳃组织样品采集,每 5 只虾的样品合并到一个采样管中。鳃组织样品取完后立刻放入液氮罐中,血液样品 800g 4°C 离心 10min 取血细胞加入 Trizol(Invitrogen)后放入液氮罐中保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 脊尾白虾总 RNA 提取及 cDNA 的合成** 采集脊尾白虾不同组织样品,液氮研磨,每 50mg 组织中加入 1ml Trizol,提取总 RNA,所得总 RNA 使用紫外分光光度计定量检测,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳确认其完整性,保证所提总 RNA 质量高,可以满足后续实验要求。用 RQ1 RNase-free DNase(Promega)消化总 RNA 样品中残留的 DNA。脊尾白虾 cDNA 合成体系(25μL)为: 1μL(1μg/μL)消化处理后的 RNA, Oligo d(T) 2.5μL, H<sub>2</sub>O 5μL, 72°C 水浴 5min, -80°C 冰浴 2min, 5μL 5×缓冲液, 1.25μL dNTP(10mmol/L), 0.625μL RNase 抑制剂, 1.25μL M-MLV 逆转录酶, DEPC(焦碳酸二乙酯)水 4.375μL。轻轻混匀,离心,42°C 保温 1h, 70°C 保温 15min。所得产物-20°C 保存备用。

**1.2.2 脊尾白虾酚氧化酶原基因 cDNA 片段的克隆** 参照 GenBank 上已公布的酚氧化酶原基因序列: 日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)(AB073223)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(EF493829)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)(AY655139)以及龙虾(*Homarus gammarus*)(AJ581662), 采用 Clustalx 软件进行对比,进行兼并引物设计 proPOF、proPOR(见表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 实验中所用的引物序列  
Tab.1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
proPOF	ATGVMCWYATGGAGCAGC
proPOR	GGTCGAASGGYAAGCCCA
proPO 3'race1	GACCGAGCCTATCATCATCAACCAAG
proPO 3'race2	TGACAATCAATAACTCGGGAAGGGCA
proPO 5'race1	CTTGTTGATGATGATAGGCTCGGTC
proPO 5'race2	CCCTCAGCATCGTGTGTCTTGTGCGC
proPO HF	AAACGATTCGACTACCATCTCCA
proPO HR	GTTTCATTCGGTTTCCCTCTC
18S HF	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S HR	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

以脊尾白虾血细胞 cDNA 为模板进行扩增,其反应体系如下(25μL): cDNA 1μL, 10×缓冲液 2.5μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5μL, dNTP 0.5μL, proPOF 2.5μL, proPOR 2.5μL, Taq DNA 聚合酶 0.25μL。反应程序: 95°C 变性 5min, 1 个循环; 94°C 变性 30s, 55°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 28 个循环; 72°C 延伸 10min, 1 个循环; 4°C 保存。所得 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果及片段大小,使用 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收纯化,与 pMD18-T 载体进行连接,重组质粒转化至 Top10 感受态细胞,挑选阳性克隆经 PCR 验证由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

**1.2.3 proPO 基因的 3'RACE 和 5'RACE 扩增** 以测序所得 proPO 基因片段为模板设计 3'和 5'RACE 所需引物 proPO 3'race1、proPO 3'race2、proPO 5'race1、proPO 5'race2(见表 1),使用 SMART™ RACE 试剂盒说明进行 3'和 5'RACE 扩增,反应条件如下: 94°C 变性 5min, 1 个循环; 94°C 变性 30s, 72°C 延伸 3min, 5 个循环; 94°C 变性 30s, 70°C 退火 30s, 72°C 延伸 3min, 5 个循环; 94°C 变性 30s, 68°C 退火 30s, 72°C 延伸 3min, 25 个循环; 72°C 延伸 10min, 1 个循环; 4°C 保存。扩增产物回收纯化,克隆、测序。

**1.2.4 序列拼接与生物信息学分析** 测序结果使用 NCBI 网站提供的 VecScreen 工具进行载体去除与序列拼接 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), 拼接所得序列使用 NCBI 提供的 BLAST 程序进行比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), 利用 DNAMAN 软件进行蛋白质的翻译,利用 EditSeq 程序进行开放阅读框的预测。利用 SMART 和 Interpro Scan 软件进行蛋白质功能域及结构域的预测与分析,分别利用 Clustalx 和 MEGA 进行多重序列比对和系统进化树构建。

**1.2.5 荧光定量 PCR 方法分析 proPO 组织表达和盐度胁迫后的表达变化** 提取脊尾白虾血细胞、鳃、肝胰腺和肌肉中的总 RNA, 分别合成 cDNA, 以 proPO 基因的 cDNA 序列为模板, 设计引物 proPO HF 和 proPO HR(见表 1), 根据已公布的脊尾白虾线粒体 RNA 设计一对内参引物 18S HF 和 18S HR(见表 1)利用定量 RT-PCR 方法进行组织表达检测。RT-PCR 扩增体系(20 $\mu$ L)为: SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ), 10 $\mu$ L; PCR Forward Primer(10 $\mu$ mol/L), 0.8 $\mu$ L; PCR Reverse Primer(10 $\mu$ mol/L), 0.8 $\mu$ L; ROX Reference Dye (50 $\times$ )\*3, 0.4 $\mu$ L; DNA 模板, 0.6 $\mu$ L; dH<sub>2</sub>O, 7.4 $\mu$ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s。每份样品做 3 组平行, 结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。以不同盐度处理组的脊尾白虾血淋巴和鳃总 RNA 为模板, 合成 cDNA, 利用 RT-PCR 方法进行 proPO 在盐度胁迫下表达变化特征的检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 脊尾白虾 proPO 基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

所提总 RNA 质量较高(图 1a), 以反转录 cDNA 为模板, 扩增获得长约 400bp 的中间片段(图 1b)。利用 3'和 5'RACE 分别获得一条长约 1500bp 和 1200bp 的特异性条带(图 1c)。

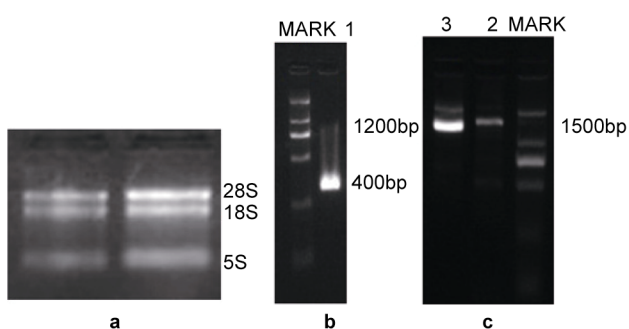


图 1 脊尾白虾电泳图谱

Fig.1 The electrophoretogram of *E. carinicauda*

a: 总 RNA 电泳图谱; b: proPO 基因 cDNA 中间片段; c: proPO 基因 3'和 5'race 产物

脊尾白虾 proPO 基因 cDNA 全长 3092 bp。利用 EditSeq 程序分析, 其开放阅读框(ORF)为 2013bp, 编码 671 个蛋白质, 其 5'端和 3'端各包含 64bp 和 1015bp 的非编码区, 且包括 1 个 polyA 尾结构、1 个加尾信号 AATAAA 结构和与 Cu 结合的氨基酸残基特征序列

(图 2)。该基因所编码的蛋白推导分子量为 74.82kDa, 理论等电点为 6.23。使用 SMART 工具进行分析, 脊尾白虾酚氧化酶原基因蛋白含有 3 个串联的血蓝蛋白结构域分别为 Hemocyanin-N 结构域(43—120)、Hemocyanin-M 结构域(124—396)和 Hemocyanin-C 结构域(402—666)(图 3)。脊尾白虾 proPO 基因 cDNA 序列已提交 GenBank(登录号: JQ812983)。

### 2.2 同源序列比对及构建系统进化树

通过 NCBI 网站提供 Blast 软件对编码甲壳动物酚氧化酶原基因的氨基酸序列进行比对(图 4), 该序列与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*, DQ182596)同源性为 78%、与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*, EF565469)同源性为 66%、与斑节对虾(*Penaeus monodon*, AF521948)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*, EU015060)、南美短沟白对虾(*Penaeus semisulcatus*, AF521949)的同源性均为 65%。利用 MEGA4.0 软件对所比对的 proPO 氨基酸序列进行系统树构建如图 5, 其中脊尾白虾与罗氏沼虾、中华绒螯蟹聚为一个亚群, 中国对虾、凡纳滨对虾、斑节对虾等聚为一个亚群, 表明酚氧化酶原基因在进化过程中具有较高的保守性。

### 2.3 脊尾白虾 proPO 基因在各组织中的表达分布

利用 RT-PCR 技术对脊尾白虾各组织中 proPO 的表达量进行分析(图 6), proPO 的表达量在血淋巴中最高, 其次为鳃和肝胰腺, 在肌肉中的表达量最低。

### 2.4 脊尾白虾盐度胁迫后血淋巴和肝胰腺 proPO 表达变化情况

不同盐度胁迫后各组织 proPO 的变化特征如图 7, 在血细胞中, proPO 表达量随着盐度胁迫时间的延长逐渐升高, 至 24h 时各处理组 proPO 基因表达量均达到最高, 且与对照组 proPO 基因表达量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 胁迫 48h 后对照组与各处理组 proPO 基因表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 趋于稳定。

盐度胁迫后 proPO 基因在鳃中的表达变化如图 8 所示, 低盐度处理组(盐度 4、11、18、25)在胁迫后 2h proPO 基因表达量达到最高, 且与对照组和高盐度处理组 proPO 基因表达量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 随后逐渐下降; 而高盐度处理组(盐度 39、46)在胁迫后 8h 和 24h proPO 基因表达量出现 2 次波动, 且与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 随后各处理组 proPO 基因表达量逐渐恢复至正常水平。

## 3 讨论

甲壳动物酚氧化酶在免疫反应时通过黑化作用

```

1 atggagagctcctcttctacaagactccttacagagctgataagaaggaggtccaccagtaatcATGGCTAGCGAGCAAAATCCAGATCCT
1 M A S E Q I Q I L
91 CGAGCTTTTCCAAACACCCGTTTCAGAGAGGGAGGGAGGTTGGAGGCACCCGGTATCACCTTCCCTTCAGATGGGGGCGTTGCAACCGGGT
E L F Q H P F R E G G G G G T G I T F P S D G G V A T R V
10 AGGCCTTGGAGATCGAACACCGGACCTTGGCTACGCCACCACCATCCCAAGAGGGAGGGTTTCTCGCCGTCTTCAAGGGACACCGCAG
G L G D R T P D L G Y A T T I P R G R V F S P F F K G H R R
181 AGCGGCCAAAGAGTCTCTGTGACTACTTTAATAGAGCTCGTAATGCCAATGAACTGGTAAGGCTGGCTAAAGGATGCCAAAACCTGGTCAA
A A K S L C D Y F N R A R N A N E L V R L A K G C Q N L V N
70 CGAGCAATTTGACATTTATGCTCTGTCTCTCGTATCGGAAACCCGAAATGAGGAGACTTCGTATACCAACAGTTATCGAAAACITTT
E Q L Y I Y A L S F V I I R K P E M R R L R I P T V I E T F
361 CCCAAATAAATTCGCTTCCCAGGAGATGTTGCAGCAAGCTCAGAAATGAAACGCTGAGGAATCCAACACGGACCGACCTATCATCATCAA
P N K F A S Q E M L Q Q A Q N E T L R N P T R T E P I I I N
100 CCAAGAGTTTTTCAGGAACCTCCTCAAAGCCGAGCACAGGGTCTCTATTTGGCGGAAGACTATGGCATCAACGTACACCCTGGCAGT
Q E F S G T L L K A E H R V S Y W R E D Y G I N V H H W H W
160
*
631 GCACCTTGTTTTCCCTATTGAACTGGACGTCAACAGGGATCGGAAAGGAGAAATCTTCTTACATGCACCAGCAGATGCTGGCCAGGTA
H L V F P I E L D V N R D R K G E I F F Y M H Q Q M L A R Y
190
*
721 TGACATGGAGCGACTCAGCGTTGGTTTTGAACCGGGTTATTCGCTGAACAGCTTAAGAGAGCCATTCCAGATGGATATTTCTCTAAGAT
D M E R L S V G L N R V I P L N S L R E P I P D G Y F S K M
220 GCAATCAATAAATTCGGGAAGGGATCGGGAACCGGACCAAGCAACACAGTGTGAGGGATATAAGGCGAGATGACTTTGGCTTAGGATT
T I N N S G R A W G T R Q D N T M L R D I R R D D F G L L G F
811 CATCAATCTCTGAAATGAAATCTATTACTCAAGAACTTGGATGCAAGTTCATCAAGGGTATATGATGATAGCAAGGCAACCGGACT
I N L S E M E I Y Y S R I L D A V H Q G Y M M D R Q G N R V
250 TCCCTCTCGGACGACCTCCCAACACCGCAAGAGAGAAATCGAAGCTTGGGAGACGCTTCGAGGCCAGCTCCAGCTCAGCGTCAA
P L S D D P P N N G K R G I D L L G D A F E A D V Q L S V N
991 TCACCTTTCTATGGCGACTTCCATAAATCTCGGCCATGTCGCTCGGTTTCAGCCAGATCCGGATGGCTCTCAGCGGAAGAAATCGG
H P F Y G D F H N L G H V V L G F S H D P D G S H R E E I G
340
*
1171 TGCTATTGGAGATCCGGCCACATCCATGAGAGATCCAGTGTTTTACAGATTCCACAAGTTTGTGCGAGCATCTCTCGAAAAGTACAAGCT
A I G D P A T S M R D P V F Y R F H K F V D D L F E K Y K L
370
*
1261 GCTGCAAAGGCCTTATCCAAACGAGGAGTTGGGTGTGCCAGGCGTCAGGGTGACCAGGGTGGGCGTTATTCAAGAGGGTGTCCCAATAA
L Q R P Y S N E E L G V P G V R V T R V G V I Q E G V P N N
400 CCTCAAACCCGGTGGAGCCAACCGCAGCTTTGAAGCTGGCAGAGGACTGGACTTCGGAAGTACGGCTCCGGTTCTATTGAGGTTGACTCA
L K T G W S Q R D F E A G R G L D F G S T A P V L L R L T H
1351 TCTGGATCAAAACGATTCGACTACCATCTCCAGATGATAAATAGCTTATCAGCTGAGAAGAAGTGAAGTCCCGAATTTTCTGGCTCC
L D H K R F D Y H L Q I V N S L S A E K E V T V R I F L A P
430 TACGCTTGATGAGAGGGGAAAACCGAATGAACCTTCATGGACCAGCGCTCTGTGGGCTGAGATGGATAAGTTTGTACGAAAATTAACGCG
T L D E R G N R M N F M D Q R L L W A E M D K F V T K L T P
1441 TGGTGAAAACCAACTCGTCAGATCGTCAGCTGCTGATCAGGGACCCGAAAGAGCCACTTTCAGGAAATGGAAAGCAGGACCGCA
G E N N L V R S S L D S S I T G P E E A T F R E L E A G R E
460 GATAGAGCTAGGATCACAAGATGCAATGAATTTGGGCAATCGGATGTGGGTGGCCTCAACACATGCTTCTGCCAAGGGGAAATGCCCA
I E L G S Q D A I E F G Q C G C G W P Q H M L L P R G M P Q
1531 AGGGATGGACTACCAGCTCTTTGTGATACTCTGATTATGCAAGGACAGGGTTGAACAGGTAATCAGAAACAGGGCGTGAATAACGG
G M D Y Q L F V I L S D Y A R D R V E Q V I R N R A C N N G
490 CGTCTCTACTGCGCATCTGGATTCCAAATTCGCGGACGCCGCCATGGGCTTCCCTTCGATCGCAGGAATCCAGAGCAGATCAA
V S Y C G I L D S K F P D A R P M G F P F D R R N P E Q I N
1621 TGGAAACGTTATCCAGACAGCCGAAATTCGCAGCAGCTCGATAACATGCTCATGGAGGACATCAAGATCACCTTCGTAGGAAATAA
G N V I Q T A E E F A A Q F D N M L M E D I K I T F V G N N
520 TCTTTGaatatcaaaagccgctacggaagagtgctagaaaagctccttctacttctatgaattgttgcgagataattactatgaacaa
L *
2071
670
2161 aagagaagtgatgattatgataataatgtaattcttaaacacagtaaatatctaatgatcattgacgtgataacacaatgctcagc
aacaactgtatagttaacatagtaaatgacctgcaaaagtactttacaacacttttaagaaaacaataattattgttatgagstaaacaa
2251 atggcagctcctgggaagacaatgagaacagataatgagtttaagctccttaatacaagaaaacacttgcgaacctatattatgaattg
2341 caagtcatctctattttgaagtttagacatgtttgttaagcttcacctgttatcattaaaaataatttttactgaatggaacaagtctga
2431 aagctcaccatattgcatcgagccagcattgcatataacctattatattatcattatcattattattattgttattattattattatgagct
2521 aagatacaaccctagttgggaagtaggatactataagcccaagtcccaaacagsgaaaataagtcggtaggaaaagaaaataaactac
2611 atgagagccatgactagtgatataagaatctcctgataccggaatagtttaaaatagatctgcatatacaactataaacgagagac
2701 ttatgtcacctgttcaacataaaaacattcctgacagtttaacttctcaagttcctacgattcatcaaaagctcttattactgt
2791 tgaacatttagttcgaagagaactaaagttgatgttattaatgtttatctgtagcgaatcaatcagcaacagcttatgatgatgatg
2881 tgatgaatgtagcaaatatcacgagactcgtcacttgagttgtattacaagttgaatccagagtagattctaaattcttccataaaa
2971 taagaaagataaaagcctaaaaaataaaaaa
3061

```

图 2 脊尾白虾 proPO 基因的 cDNA 核苷酸序列及其预测的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of prophenoloxidase gene in *E. carinicauda*

ATG: 起始密码子; TGA: 终止密码子; — 推导的 proPO 的特征序列; 灰色部分: 3 个血蓝蛋白结构域; \*: 6 个负责与 Cu 结合的氨基酸残基

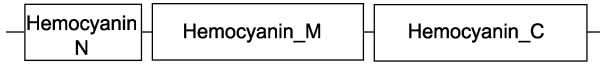


图 3 脊尾白虾酚氧化酶原中三个血蓝蛋白结构域

Fig.3 Distribution of three tandem hemocyanin in domains of proPO from *E.carinicauda*

的形式参与宿主的防御反应(Ashida *et al*, 1990)。酚氧化酶一般情况下以无活性的酶原形式存在即酚氧化

酶原 proPO, proPO 通过酚氧化酶级联反应转化成具有活性的 PO, 酚氧化酶原激活系统在非特异性免疫系统中起着非常重要的作用(Soderhall *et al*, 1998)。近年来, 人们认识到酚氧化酶原激活系统在环境应激反应中也具有重要的作用, 对于酚氧化酶原基因的克隆及表达方面进行了大量的研究。三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus*、中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*、

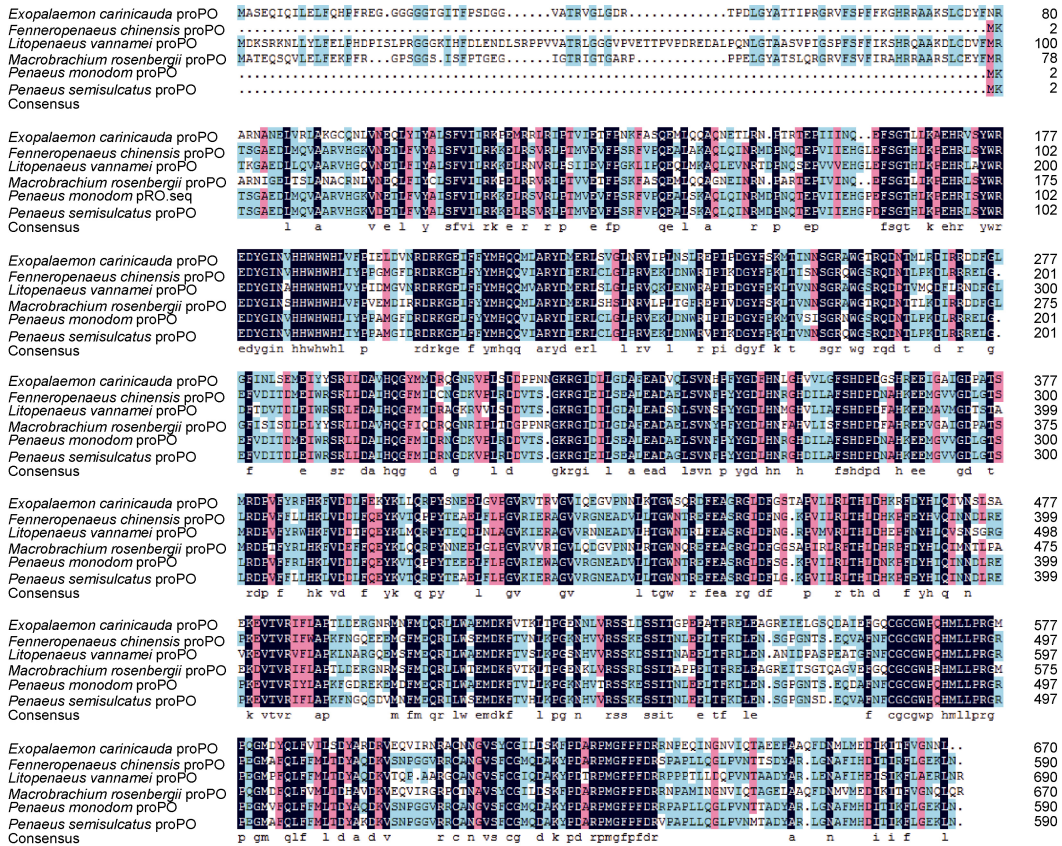


图 4 脊尾白虾 proPO 氨基酸序列与其他物种 proPOs 氨基酸序列比较

Fig.4 Amino-acid sequence alignment of *E.carinicauda* proPO with different animals propos

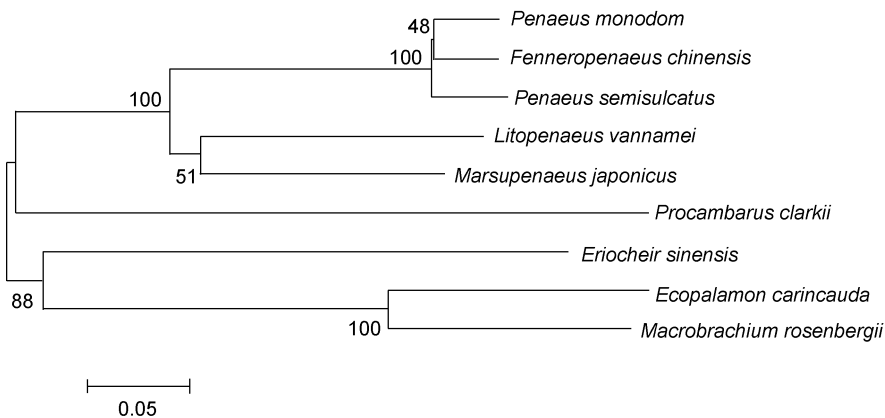


图 5 利用 MEGA4 软件 NJ 法构建的 proPO 系统进化树

Fig.5 NJ tree based on proPO amino acid sequences using MEGA 4

锯缘青蟹 *Scylla serrata*、短沟对虾 *P. semiculcatus*、罗氏沼虾 *M. rosenbergii*、日本对虾 *M. japonicus* 等甲壳动物酚氧化酶原基因已经被克隆得到(叶星等, 2003; Liu *et al*, 2006; Ko *et al*, 2007; Gai *et al*, 2008; Chen *et al*, 2010; 孙杰等, 2010)。本研究通过同源克隆方法得到脊尾白虾酚氧化酶原基因的全序列, 该基因 cDNA 全长为 3092bp, 开放阅读框为 2013bp 长, 编码 671 个氨基酸, 其预测分子量为 74.82kDa, 甲壳动物酚氧化酶是一种含双铜的氧化还原酶, 其分子量在 70kDa 左右(汪小峰等, 2003)。通过氨基酸序列比对发现其与罗氏沼虾 *M. rosenbergii* 的同源性最高达到 78%; 另外发现脊尾白虾 proPO cDNA 序列中含有 3 个串联的血蓝蛋白特征结构域分别为 Hemocyanin-N 结构域(残基 43—120)、Hemocyanin-M 结构域(残基 124—396)、Hemocyanin-C 结构域(残基 402—666), 而且与其他甲壳动物酚氧化酶原保守血蓝蛋白结构域之间的相似性很高, 证明甲壳动物的

proPO 基因也是血蓝蛋白基因家族的一员。利用 RT-PCR 技术分析了脊尾白虾 proPO 基因在 4 种组织中的表达分布, 结果发现 proPO 基因在血细胞中的表达量是最高的, 在肌肉中的表达量最低, 这与斑节对虾(Piti *et al*, 2009)和中国对虾(孙杰等, 2010)的研究结果相一致。

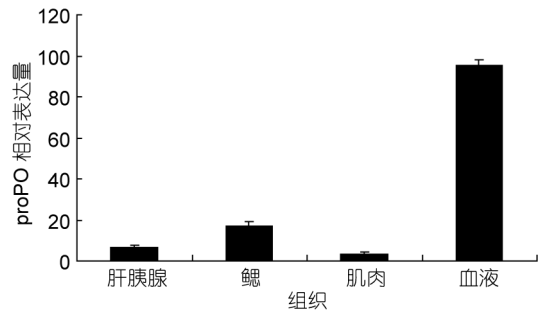


图 6 脊尾白虾 proPO 在不同组织中的表达

Fig.6 Real time PCR analysis of proPO gene expression from different tissues of *E. carinicauda*

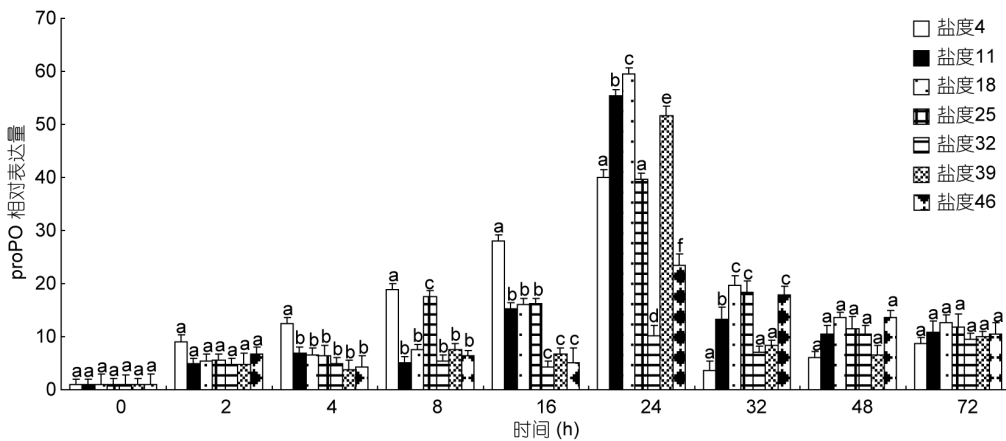


图 7 盐度胁迫后 proPO 基因在血细胞中的表达变化

Fig.7 The expression of proPO in haemocytes after salinity stress

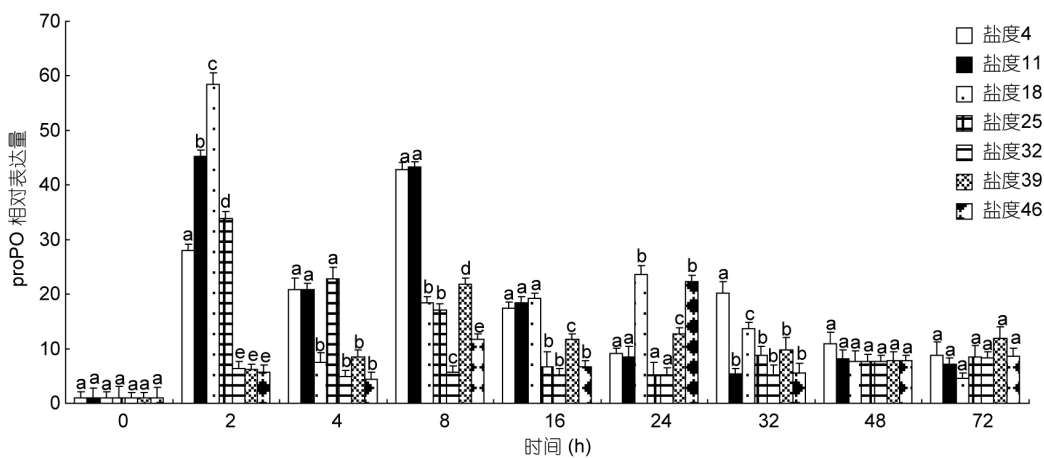


图 8 盐度胁迫后 proPO 基因在鳃组织中的表达变化

Fig.8 The expression of proPO in gills after salinity stress

集约化养殖中的虾类面临着各种环境应激, 环境因子(温度、盐度、溶解氧、pH 和氨氮等)的改变都可引发虾机体的应激反应, 这虽是一种保护性反应, 但若长期处于应激状态下, 虾机体的免疫功能会受到抑制, 容易诱发疾病甚至死亡。为了了解养殖过程中的环境因子突变带来的潜在性危害, 必须进一步探讨虾免疫和环境胁迫之间的相互关系。已有研究表明, 盐度变化能够影响血淋巴 proPO 的活性(Vargas- Albores *et al*, 1998)。盐度从 20 升至 45 会显著削弱波纹龙虾 *Panulirus homarus* PO 的活性(Bindhu *et al*, 2007); 而低盐度胁迫会降低悉尼岩石牡蛎 *Saccostrea glomerata* PO 的活性(Daniel *et al*, 2006)。本研究在不同盐度不同时间的胁迫作用下, 脊尾白虾 proPO 基因在血细胞和鳃组织中的表达变化呈现在 24—48h 呈现波动的趋势, 特别是当胁迫 24h 时在血细胞中的表达量达到峰值; 当胁迫 48h 后达到稳定, 此时低盐度组的表达量仍然高于正常盐度和高盐度组的表达值, 这与凡纳滨对虾的研究结果相似(Li *et al*, 2010), 上述结果说明, 低盐驯化时, 盐度降低对于脊尾白虾 proPO 基因的表达具有一定的促进作用, 这有助于其酚氧化酶原激活系统更好地发挥作用, 推测低盐驯化过程中盐度降低对于脊尾白虾的免疫调控机制会起到一定的促进作用, 有助于其抗应激能力的提高, 具体的影响方式与机理还有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- 刘瑞玉, 1955. 中国北部的经济虾类. 北京: 科学出版社, 48—49
- 王兴强, 阎斌伦, 马 甦等, 2005. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展. 齐鲁渔业, 22(8): 21—24
- 白 霜, 张立军, 宋广周等, 2008. 酚氧化酶研究进展. 杂粮作物, 28(2): 87—89
- 叶 星, 郑清梅, 白俊杰, 2003. 短沟对虾和斑节对虾酚氧化酶原基因的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 34(5): 533—540
- 孙 杰, 王宝杰, 李晓华等, 2010. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征. 水产学报, 34(1): 56—66
- 汪小峰, 樊廷俊, 2003. 中国对虾酚氧化酶的部分生物化学特性的初步研究. 海洋科学, 27(4): 71—75
- Ashida M, Yamazaki H, 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. Molting and Metamorphosis. In: Ohnishi E, Ishizaki H eds. Springer Verlag, Berlin, Germany: 239—265
- Bindhu V, Radhakrishnan E V, Abinash P, 2007. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). Fish Shellfish Immunol, 23(5): 928—936
- Nappi A J, Christensen B M, 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic actions: applications to insect innate immunity. Insect Biochem Mol Biol, 35(5): 443—459
- Cerenius L, Soderhall K, 2004. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. Immunol Rev, 198(1): 116—126
- Chen P, Li J, Li J *et al*, 2010. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fish Shellfish Immunol, 28(1): 106—112
- Daniel B, Kim S, David R, 2006. The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. Aquaculture, 251(2): 159—166
- Gai Y, Zhao J, Song L *et al*, 2008. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis. Fish Shellfish Immunol, 24(2): 156—167
- Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B, 2007. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. Dev Comp Immunol, 31(1): 12—22
- Li C C, Yeh S T, Chen J C, 2010. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. Fish Shellfish Immunol, 28(1): 121—127
- Liu C H, Tseng D Y, Lai C Y, 2006. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase cDNA from haemocytes of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult-stage. Fish Shellfish Immunol, 21(1): 60—69
- Piti A, Walaiporn C, Anchalee T, 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol, 33(2): 247—256
- Soderhall K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr Opin Immunol, 10(1): 23—28
- Vargas-Albores F, Baltazar P H, Clark G P *et al*, 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowlegs shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. Aquac Res, 29(8): 549—553

## CLONING AND EXPRESSION OF PROPHENOLOXIDASE GENE IN *EXOPALAEMON CARINICAUDA*

LI Yang<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, LI Ji-Tao<sup>1</sup>, MA Peng<sup>1</sup>, GAO Bao-Quan<sup>1</sup>, DUAN Ya-Fei<sup>3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;  
2. Ocean University of Dalian, Dalian 116023, China; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** The cDNA sequence of prophenoloxidase (proPO) gene was cloned from *Exopalaemon carinicauda* using RT-PCR and RACE method. The full-length cDNA of proPO consisted of 3092 bp with a 2013 bp open reading frame (ORF), which encoded 671 amino acids. The predicted molecular mass of proPO protein is 74.82 kDa. The deduced amino acid sequence shows higher homology (65%—78%) to other shrimps with characteristic proPO. Tissue specific expression analysis showed that the expression level of proPO mRNA is highest in haemocytes and lowest in muscle. Real time-PCR analysis showed that the expression level of proPO gene is significantly higher in haemocytes than that of the control after 24 h exposure. The expression level of proPO mRNA in gills is significantly higher than that of the control at the early stage of salinity stress. The results show that the proPO gene might be involved in the stress response in *E. carinicauda*.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; prophenoloxidase; cloning; expression; salinity stress