

青虾(*Macrobrachium nipponense*)Kazal 型 丝氨酸蛋白酶抑制因子基因全长 cDNA 的克隆及表达*

张响¹ 乔慧² 傅洪拓^{1,2} 吴滢² 龚永生²
蒋速飞² 熊贻伟²

(1. 南京农业大学渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心
农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081)

摘要 采用 RACE 技术,首次从青虾精巢中克隆得到 KSPI 基因全长 cDNA。青虾 KSPI 基因 cDNA 全长 890bp,包括 80bp 的 5'UTR,546bp 的 3'UTR 和编码 87 个氨基酸残基的 264bp 开放阅读框。预测蛋白包含 1 个保守的 Kazal 型结构域(C X₅C X₍₆₎VC X₍₅₎TYXNXC X₆C X₁₂C),结构域中 P1 活性位点为苏氨酸残基。应用 MEGA 4.1 软件对青虾与已报道的虾类共 15 种 KSPI 氨基酸序列进行系统进化分析,结果表明,青虾 KSPI 与同样来源于精巢的罗氏沼虾 KSPI 进化关系最近聚为一支,其它虾类来源于肝胰腺和血细胞的 KSPI 聚为另外两支。采用定量 PCR 技术分析其组织分布,结果显示,KSPI 基因在精巢、心脏和卵巢中有较高表达,其中精巢表达水平极高,并与心脏和卵巢表达差异分别达到显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)水平,其它组织表达较弱。

关键词 日本沼虾,青虾,精巢,丝氨酸蛋白酶抑制因子,cDNA,定量 PCR
中图分类号 Q786;S917

丝氨酸蛋白酶抑制因子(Serine proteinase inhibitor, SPI)是一类广泛存在于各种生物体内的蛋白,在变态、伤口愈合、先天免疫等过程中具有重要的作用(Jiravanichpaisal *et al*, 2006)。丝氨酸蛋白酶抑制因子主要包括 serpin、 α -巨球蛋白、Kazal 型、Kunitz 型等抑制因子家族,其中 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子(Kazal-type serine proteinase inhibitor, KSPI)是研究最广泛的酶抑制因子家族之一。KSPI 最早发现于哺乳动物(Kazal *et al*, 1948),随后又在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) (Johansson *et al*, 1994)、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*) (Jimenez *et al*, 2005)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Nawarat *et al*, 2006)、罗氏

沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (Li *et al*, 2008)等多种动物中被鉴定。KSPI 在抗凝血、调控自我吞噬和机体防御等过程中具有重要的作用(Quinton *et al*, 2004; Chera *et al*, 2006; Christeller, 2005)。最近研究发现,KSPI 在生殖方面有着重要的功能。Li 等(2009)在罗氏沼虾的研究中发现,KSPI 能够抑制生殖腺中精子明胶酶的活性,推测 KSPI 可能在罗氏沼虾生殖过程中发挥某种重要作用。Jalkanen 等(2006)在小鼠的研究中发现,KSPI 对小鼠精子的成熟起调节作用。

青虾(*Macrobrachium nipponense*)是我国重要的淡水养殖经济品种。目前青虾的分子研究多集中在群体遗传多样性方面(傅洪拓等, 2010; 冯建彬等, 2010),

* 国家“十二五”科技支撑计划,2012BAD26B04 号,2012BAD25B07 号; 农业科技成果转化资金项目,2010GB23260592 号; 江苏省科技支撑计划,BE2010368 号; 中央级基本科研业务费专项,2011JBFA02 号,2011JBFC01 号。张响, E-mail: zhangxiang6@163.com

通讯作者: 傅洪拓, 博士, 研究员, E-mail: fuht@ffrc.cn

收稿日期: 2012-02-28, 收修改稿日期: 2012-04-19

其基因克隆研究较少,而对青虾丝氨酸蛋白酶抑制因子基因的研究尚未见报道。本研究以青虾为实验材料,根据本实验室青虾精巢cDNA文库中筛选到的一个Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制因子基因片段,通过RACE技术克隆出该基因全长cDNA序列,并采用定量PCR技术对该基因在青虾中的组织分布和表达模式进行分析,以期为后续青虾丝氨酸蛋白酶抑制因子基因功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验虾为野生成体青虾,于2011年3月采自太湖无锡湖区(120°13'44"E, 31°28'22"N),体重在1.67—2.70g,室内曝气自来水中暂养3d后,挑取健康个体活体解剖,取心脏、精巢、卵巢、脑、肝脏及肠道6个组织,液氮速冻后于-80℃冰箱中保存,用于RNA的提取。

1.2 实验方法

1.2.1 总RNA的提取和cDNA的合成 取青虾6个组织各100mg,用RNAiso Reagent抽提总RNA,以DNase 酶去除总RNA中残留的基因组DNA。通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,紫外分光光度计测定RNA浓度。

每个样品各取1μg总RNA进行逆转录,使用BIO-RAD公司提供的(iScript cDNA Synthesis Kit)逆转录试剂盒,进行逆转录合成cDNA的第一条链,反应体系:4μl 5×iScript reaction mix, 1μl iScript reverse transcriptase, 1μg总RNA,加Nuclease-free water至总反应体积为20μl。反应条件:25℃ 5min; 42℃ 30min; 85℃ 5min; 4℃ 5min。合成的cDNA于-20℃保存备用。

1.2.2 青虾KSPI基因的克隆 从本实验室构建的青虾精巢cDNA文库的测序结果中,通过拼接组装及比对分析,筛选到了一个青虾KSPI基因片段,作为中间序列。根据已知中间序列,采用Primer 5.0软件分别设计5'RACE和3'RACE的特异性引物,以青虾精巢cDNA为模板,结合套式PCR技术对KSPI基因5'端和3'端进行扩增。引物序列见表1,由上海生工生物工程有限公司(Sangon)合成。3'RACE, 5'RACE试剂盒购自宝生物(大连)有限公司(Takara)。PCR产物均用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小,0.5% E.B染色,凝胶成像系统进行拍照观察。扩增的PCR产物使用Sangon的胶回收试剂盒进行纯化,并连接到pMD18-T载体(Takara),重组质粒转化到大肠杆菌

TOP10菌株,产生的阳性克隆经PCR验证后送往上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.3 青虾KSPI基因的生物信息学分析 采用ContigExpress软件将中间序列、3'端序列、5'端序列拼接得到青虾KSPI基因全长cDNA序列。运用DNASTAR 5.0软件分析cDNA序列,寻找开放阅读框并翻译为相应的氨基酸。在NCBI中用BLASTP程序进行氨基酸序列同源性检索。运用ExPASy在线软件进行理化特性分析。采用SignalP 3.0 Server在线搜索查找信号肽序列,并用NCBI的Conserved Domains查找工具分析蛋白质结构域。分别使用ClustalX 2.0和MEGA 4.1进行氨基酸序列同源性及系统进化树分析。

1.2.4 青虾KSPI基因的表达分析 本研究采用了荧光定量PCR技术对KSPI基因在青虾不同组织中的分布情况进行定量分析。由于已报道的相关研究较多使用半定量PCR技术进行表达分析,为了便于比较,本研究同时采用了半定量PCR技术对KSPI基因在青虾不同组织中的分布情况进行定量分析。

以青虾6种组织的cDNA为模板,18S rRNA作内参基因,根据KSPI基因的全长cDNA序列和文库中筛选到的青虾18S rRNA序列,分别设计并筛选出优化的定量PCR引物KSPI-QF和KSPI-QR,以及18S-QF和18S-QR(表1)。半定量PCR反应体系为25μl,PCR反应程序为:95℃预变性1min;然后进入30个循环,每个循环中95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸40s;72℃延伸10min,4℃保温。反应结束后取5μl产物,1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。荧光定量反应在IQ5 PCR仪(Bio-Rad)上进行。25μl的反应体系中包含:10μl SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)、13μl DNase-free water、1μl primer和1μl cDNA template。采用两步PCR法进行扩增,即首先95℃预变性1min,然后进入40个循环,每个循环中95℃变性10s,60℃延伸30s,循环结束后,从55℃缓慢升温到95℃,绘制熔解曲线。共进行3次重复实验,每次反应都设置阴性对照和无模板对照,每个反应设3个重复。荧光定量的实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析,计量数据资料均用平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 青虾KSPI基因全长cDNA克隆

根据ContigExpress软件拼接中间序列、3'端序列、5'端序列的结果,得到KSPI基因cDNA全长序

表 1 本研究所用的引物及其序列
Tab.1 Primers and their sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'—3')
5' GSP Outer Primer	GACATCCCCGTTACCAAAGC
5' GSP Inner Primer	TATGTTTGTCCGTCGGTGCC
3' GSP Outer Primer	CTCATCGGGGTTGCATCTGG
3' GSP Inner Primer	GCACCGAACTTCCAATG
KSPI-QF	TCATCGGGGTTGCATCTGG
KSPI-QR	ATGTTTGTCCGTCGGTGCC
18S-QF	GGTCCGTTCACTTGCTT
18S-QR	TTCTCCGTCACCCGTAA

列为 890bp, 将其命名为 KSPI-Fu。该全长序列包括 264bp 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)、80bp 5'末端非翻译区(Untranslated Regions, UTR)和 546bp 3'UTR 组成。其中 3'末端发现含有 4 个典型的加尾信号 AATAAA 和的 Poly(A)尾(图 1)。KSPI-Fu cDNA 提交 GenBank, 登录号为 JQ837820。

2.2 生物信息学分析

根据获得的青虾 KSPI-Fu 基因 cDNA 序列推测相应的氨基酸序列, 结果表明, 264bp 的 ORF 序列编码 87 个氨基酸, 通过 ExPASy 在线软件预测其相对分子量为 9.32kDa, 理论等电点 6.50。使用 SignalP 3.0 对该蛋白进行分析, 发现预测蛋白具有典型的包含 22 个氨基酸的信号肽特征序列(图 1), 为分泌型蛋白。通过 NCBI 的 CDD(conserved domain)工具分析发现, 该氨基酸序列含有一个 Kazal 型超家族的保守结构域。用 BLASTP 程序在 GenBank 非冗余数据库中搜索, 结果显示该基因编码蛋白与 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子有很高的相似性, 也进一步验证了该蛋白属于典型的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子家族的一员。

2.3 系统发育分析

利用 MEGA 4.1 软件对青虾 KSPI-Fu 和来自其它甲壳动物 KaZal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子氨基酸序列进行系统发育分析。对比序列分别为克氏原螯虾(*P. clarkii*)的 hcPcSPI1、hcPc SPI2、hpPcSPI3 及 hpPcSPI4 (GenBank 登录号: GU062746, GU062747, GU062748, GU062749), 斑节对虾(*P. monodon*)的 hpPmSPI1、hpPmSPI2 及 hcSPIPm2 (GenBank 登录号: AAP92780, ABB03697, APP92779), 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 FcSPI 1-FcSPI4 (Gen-

Bank 登录号: ACL 36280, ACL36281, ACL36282, ACL36283), 南美白对虾(*L. vannamei*)的 hcLvSPI 和 hpLvSPI (GenBank 登录号: AAT09421, ABB29298)以及罗氏沼虾(*M. rosenbergii*)的 MRPINK (GenBank 登录号: AAX83134)。

由图 2 的结果可知: 进化树可按照组织来源不同总体上分为 3 大支。青虾 KSPI 与同样来源于精巢的罗氏沼虾 KSPI 进化关系最近, 聚为一支, 来源于肝胰腺的对虾 KSPI 聚为一支, 来源于血细胞的对虾及克氏原螯虾 KSPI 聚为一支。其中, 来源于克氏原螯虾肝胰腺的两个抑制因子 hpPcSPI3 和 hpPcSPI4 形成一个较小的分支, 从进化关系上看与其它肝胰腺型的抑制因子距离较远。

2.4 青虾 KSPI 基因在不同组织中的表达分析

2.4.1 半定量分析 从半定量 PCR 结果(图 3)可见, KSPI-Fu 基因在青虾心脏、精巢、卵巢组织中均有表达, 其中精巢中表达量最高, 而在脑、肝脏和肠道

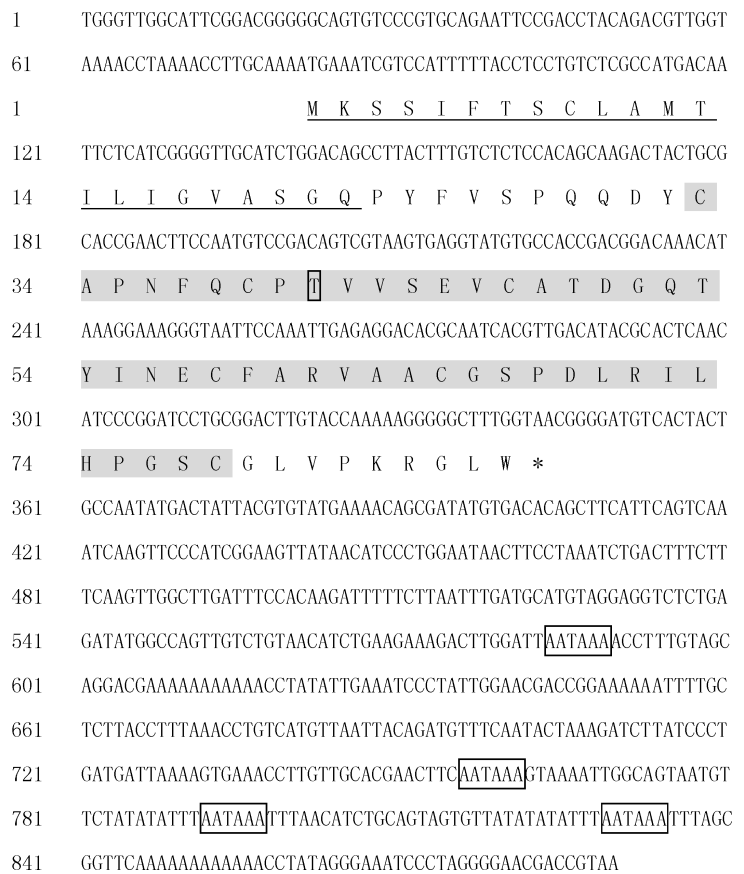


图 1 青虾 KSPI-Fu 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of full-length KSPI-Fu cDNA in *M. nipponense*
注: 划线部分为推测的信号肽序列, 灰色部分为保守的 Kazal 型结构域, 黑框内为 P1 活性位点, 框内字母为加尾信号, *为终止密码子

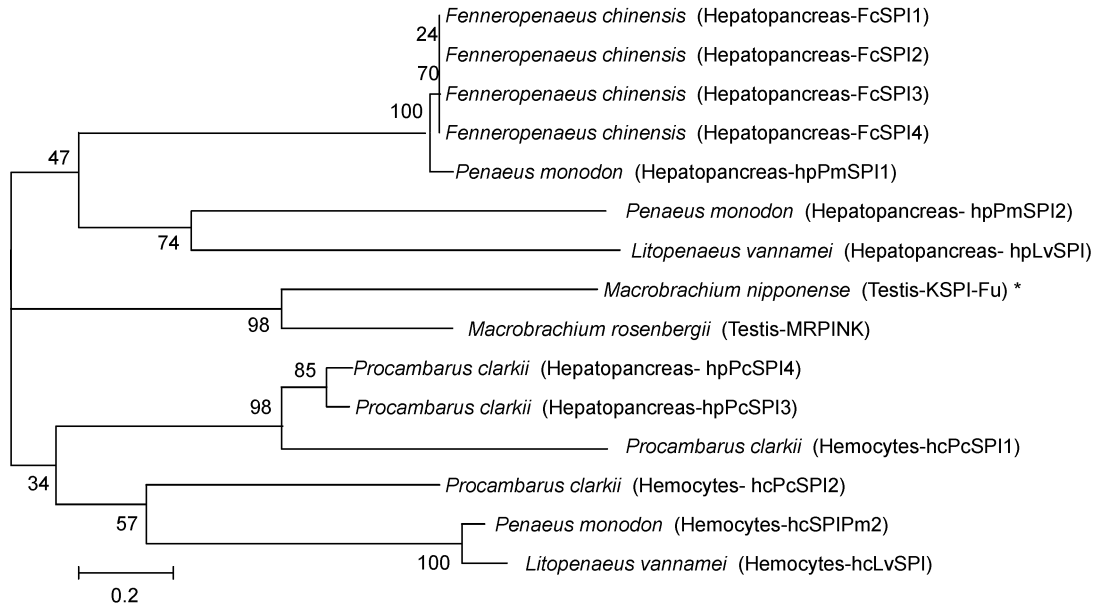


图2 青虾 KSPI-Fu 及其它甲壳类动物的 Kazal 型蛋白酶抑制因子(基于 BLSATP 结果)进化树分析
 Fig.2 Phylogenetic analysis of the KSPI-Fu through comparison of Kazal-type inhibitors in other crustacean species based on the BLASTP database

注:图中标出了蛋白酶抑制因子的物种名称、组织来源及基因名称,其中*为青虾 KSPI

中未检测到表达。

2.4.2 荧光定量分析 荧光定量 PCR 技术检测 KSPI-Fu 组织分布,结果如图 4 所示。KSPI-Fu 基因在青虾 6 种组织中均有表达,表达量由高到低依次为:精巢>心脏>卵巢>肝脏>脑>肠。其中肝脏、脑和肠中仅为微量表达。精巢中 KSPI 基因的表达量极高,是肠中表达量的 142.9 倍($P<0.01$)。精巢与心脏中表达量相比,两者有显著差异($P<0.05$)。精、卵巢相比,精巢中表达量为卵巢的 4.1 倍,两者差异达到极其显著($P<0.01$)。

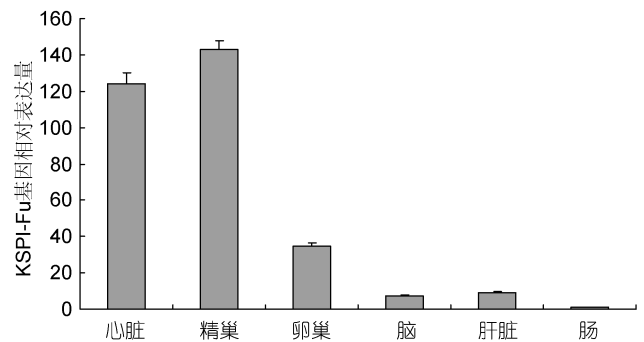


图4 荧光定量 PCR 方法分析 KSPI-Fu 基因在青虾不同组织中的表达

Fig.4 Quantitative RT-PCR analysis of KSPI-Fu expression in different tissues of *M. nipponense*

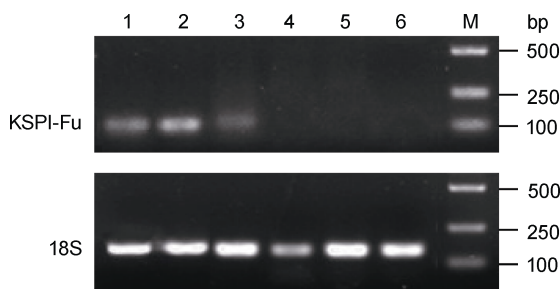


图3 青虾 KSPI-Fu 基因表达的半定量 RT-PCR 检测结果 (18S 为内参)

Fig.3 Detection of KSPI-Fu gene expression by semi-quantitative RT-PCR (18S was used as control) in *M. nipponense*

M. DL-2000 分子量标准; 1. 心脏; 2. 精巢; 3. 卵巢; 4. 脑; 5. 肝脏; 6. 肠

3 讨论

KSPI 是丝氨酸蛋白酶抑制因子家族中最重要的 一类抑制因子,已经在多种物种中被研究。在同一个物种的不同组织中发现有多种结构有差异的 KSPI,目前已有超过两百多种的 KSPI 被识别,并在生物体内的作用有所差异。早期对腔肠动物和昆虫的研究发现, KSPI 具有杀灭细菌和保护机体免受微生物分解的作用(Augustin *et al*, 2009; Nirmala *et al*, 2001)。最近的甲壳类研究发现, KSPI 在抗病毒和抗细菌的先天免疫方面具有重要作用(Somprasong *et al*, 2006; Jimenez *et al*, 2005)。在哺乳动物的研究中发现, KSPI

除了具有保护生殖道免受危害性蛋白水解作用外,它们还参与生殖过程(Irwin *et al.*, 1983; Moritz *et al.*, 1991)。综上所述, KSPI 是一类具有多种功能的基因家族。

将青虾 KSPI 与已报道的甲壳类 KSPI 进行氨基酸聚类, 分析发现: (1) 同一物种、相同组织中可能存在多种不同的 KSPI, 如克氏原螯虾血细胞和肝胰腺中分别发现 2 种 KSPI, 斑节对虾肝胰腺中也发现了 2 种 KSPI。(2) 同一物种、不同组织来源的 KSPI 之间差异较大, 如斑节对虾中分别来源于肝胰腺和血细胞的 KSPI 之间进化关系较远, 最终聚为不同的两类, 这一现象在南美白对虾中也有相同的结果。(3) 不同物种、相同组织来源的 KSPI 进化关系较近, 如来源于斑节对虾和南美白对虾肝胰腺中的 KSPI 首先聚为一支, 并与中国名对虾肝胰腺 KSPI 共同聚为一类; 来源于斑节对虾和南美白对虾血细胞的 KSPI 聚为一支, 最终与克氏原螯虾血细胞 KSPI 聚为一类; 同样来源于精巢的青虾和罗氏沼虾的 KSPI 聚为一类。基于以上聚类分析, 作者推测 KSPI 是一个很复杂的基因家族; 不同组织之间存在不同的 KSPI, 这些 KSPI 可能承担不同的功能; 同一组织也可能存在不同的 KSPI, 同一组织中的 KSPI 与组织间 KSPI 相比, 差异相对较小。

KSPI 蛋白 N 末端通常有一段长度大约为 20 个氨基酸的信号肽并具有一个或多个 Kazal 结构域。根据 Kazal 结构域中半胱氨酸残基数量不同, 可以分为典型和非典型 Kazal 型结构域两种。典型 Kazal 型结构域通常由 50—60 个氨基酸残基组成, 其中包括六个半胱氨酸残基以 1-5、2-4 和 3-6 的模式形成三对二硫键和一个较为保守的序列模型: $C X_{(1-7)}C X_{(6)}VC X_{(5)}TYXNXC X_{(2-6)}C X_{(9-16)}C [X_{(n)}, X$ 与 n 分别表示任意残基和残基的数目]。本研究克隆得到了青虾 KSPI-Fu 基因的全长 cDNA 序列, 通过软件对预测蛋白分析发现, 该蛋白 N 端含有一段 22 个氨基酸的信号肽, 且包含 1 个典型的 Kazal 型结构域, 该结构域保守序列为: $C X_5C X_6VC X_5TYXNXC X_6C X_{12}C$, 与典型 Kazal 型结构域的结构模型一致。Kazal 型结构域从 C 端方向开始, 第二个半胱氨酸残

基之后的第二个氨基酸位点被称为 P1 位点, 此位点在很大程度上决定了抑制因子的专一性(Lu *et al.*, 1997)。有研究表明, P1 残基为 Arg 或 Lys 时, 对胰蛋白酶有显著的抑制作用; P1 残基为 Tyr、Phe、Pro、Met、Glu 或 Leu 时, 能抑制糜蛋白酶; P1 残基为 Ser 或 Ala 时, 能抑制类弹性蛋白酶; P1 残基为 Asp 或 Thr 时, 能抑制蛋白酶 K 和枯草杆菌蛋白酶(Laskowski *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1987; Saxena *et al.*, 1997; Kanost, 1999)。青虾 KSPI 结构域 P1 残基为 Thr, 作者推测其可能对蛋白酶 K 和枯草杆菌蛋白酶具有抑制作用。Cao 等(2007)在罗氏沼虾精巢中发现的 KSPI 具有 2 个 Kazal 结构域, 且 P1 残基分别为 Leu 和 Pro, 因此作者推断本研究从青虾精巢中得到的 KSPI 与 Cao 等(2007)在罗氏沼虾精巢中发现的 KSPI 不是同一种基因。

已报道的甲壳类 KSPI 组织分布研究大多采用的是印迹杂交和半定量 PCR 技术。Donpudsa 等(2010)采用了半定量 PCR 和 Western blot 技术对斑节对虾的 KSPI 的组织分布进行了分析, 发现 hcSPI m_2 主要在血细胞以及血细胞丰富的组织如鳃、心脏中表达, 另外在触角腺、胃和上肢中也有表达, 研究其功能发现该抑制因子在 WSSV 病毒感染过程中有免疫作用; 李新苍(2010)¹⁾使用半定量 PCR 方法检测了克氏原螯虾不同组织中 KSPI 分布情况, 发现 hcPcSPI1 和 hcPcSPI2 主要分布在血细胞中, hpPcSPI3 和 hcPcSPI4 主要分布在心和肝胰腺中, 以肝胰腺含量最高, 功能研究发现 hcPcSPI1 和 hcPcSPI2 在克氏原螯虾抗细菌先天免疫中起重要作用; Cao 等(2007)采用了 Northern blot 技术对罗氏沼虾 KSPI 进行组织分布分析, 发现 MRPINK 仅在雄性生殖系统中有高表达, 在肌肉、肝胰腺、心脏、鳃、胃、血细胞、卵巢、脑、肠、胸神经节等组织中都未检测到表达; 李晔(2006)²⁾通过后续功能研究发现, MRPINK 可以通过抑制精子上的类明胶酶(MSG)影响精子的活性, 并推测其可能对罗氏沼虾的受精具有调节功能。本研究中两种定量技术均显示青虾 KSPI-Fu 在精巢中表达量最高, 与心脏和卵巢表达差异分别达到显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)水平, 因此作者推测青虾 KSPI-Fu 基因可能

1) 李新苍, 2010. 克氏原螯虾 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子基因克隆、表达及功能分析. 济南: 山东大学博士学位论文, 57—58

2) 李晔, 2006. 罗氏沼虾雄性生殖系统相关的 Kazal 型蛋白酶抑制剂(MRPINK)的生物学功能研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 62—63

参与青虾生殖过程并对雄性生殖起到重要作用。另一方面,本研究中半定量PCR结果显示,青虾KSPI-Fu在精巢、心脏和卵巢中都有较高的表达,其中在精巢表达最高,而在肝脏、脑和肠道中未检测到表达;而荧光定量PCR结果显示,青虾KSPI-Fu在精巢中表达量最高,心脏和卵巢中也有较高的表达,同时在肝脏、脑和肠道中也检测到了微量表达。两种定量分析技术的结果表明,半定量技术灵敏度相对较弱,与实际情况有一定的差别。荧光定量PCR技术在低丰度基因的表达研究中更加灵敏,具有更高的可信度和良好的应用前景。

参 考 文 献

- 冯建彬, 马克异, 李家乐等, 2010. 日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析. 水产学报, 34(5): 688—695
- 傅洪拓, 乔慧, 李法君等, 2010. 长江不同江段青虾的遗传多样性. 水产学报, 34(2): 204—212
- Augustin R, Siebert S, Bosch T C, 2009. Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system. *Dev Comp Immunol*, 33: 830—837
- Cao J X, Dai J Q, Dai Z M *et al*, 2007. A male reproduction-related kazal-type peptidase inhibitor gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: molecular characterization and expression patterns. *Mar Biotechnol*, 9: 45—55
- Chera S, Rosa R, Miljkovic-Licina M *et al*, 2006. Silencing of the hydra serine protease inhibitor Kazal gene mimics the human SPINK1 pancreatic phenotype. *J Cell Sci*, 119: 846—857
- Christeller J T, 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J*, 272: 5710—5722
- Donpudsa S, Ponprateep S, Prapavorarat A *et al*, 2010. A Kazal-type serine proteinase inhibitor SPIPm2 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* is involved in antiviral responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 34: 1101—1108
- Irwin M, Nicholson N, Haywood J T *et al*, 1983. Immunofluorescent localization of a murine seminal vesicle proteinase inhibitor. *Biol Reprod*, 28: 1201—1206
- Jalkanen J, Kotimaki M, Huhtaniemi I *et al*, 2006. Novel epididymal protease inhibitors with Kazal or WAP family domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 349: 245—254
- Jimenez V F, Vargas A F, 2005. A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Dev Comp Immunol*, 29: 385—391
- Jiravanichpaisal P, Lee B L, Soderhall K, 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213—236
- Johansson M W, Keyser P, Soderhall K, 1994. Purification and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. *Eur J Biochem*, 223: 389—394
- Kanost M R, 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Devel Comp Immunol*, 23: 291—301
- Kazal L A, Spicer D S, Brahinsky R A, 1948. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc*, 70: 3034—3040
- Laskowski M, Kato I, 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*, 49: 593—626
- Li Y, Ma W, Dai J *et al*, 2008. Inhibition of a novel sperm gelatinase in prawn sperm by the male reproduction-related Kazal-type peptidase inhibitor. *Molecular Reproduction and Development*, 75: 1327—1337
- Li Y, Qian Y Q, Ma W M *et al*, 2009. Inhibition mechanism and the effects of structure on activity of male reproduction-related peptidase inhibitor Kazal-type (MRPINK) of *Macrobrachium rosenbergii*. *Mar Biotechnol*, 11: 252—259
- Lu W, Apostol I, Qasim M A *et al*, 1997. Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases. *J Mol Biol*, 226(2): 441—461
- Moritz A, Lilja H, Fink E, 1991. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding the human acrosin-trypsin inhibitor (HUSI-II). *FEBS*, 278: 127—130
- Nawarat S, Vichien R, Anchalee T, 2006. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. *Devel Comp Immunol*, 30: 998—1008
- Nirmala X, Kodrik D, Zurovec M *et al*, 2001. Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur J Biochem*, 268: 2064—2073
- Quinton T M, Kim S, Derian C K *et al*, 2004. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem*, 279: 18434—18439
- Saxena I, Tayyab S, 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell Mol Life Sci*, 53: 13—23
- Scott M J, Huckaby C S, Kato I *et al*, 1987. Ovoinhibitor introns specify functional domains as in the related and linked ovomucoid gene. *J Biol Chem*, 262: 5899—5907
- Somprasong N, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A, 2006. A five-domain kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. *Dev Comp Immunol*, 30: 998—1008

**THE FULL LENGTH cDNA CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF
KAZAL-TYPE SERINE PROTEINASE INHIBITOR GENE FROM
*MACROBRACHIUM NIPPONENSE***

ZHANG Xiang¹, QIAO Hui², FU Hong-Tuo^{1,2}, WU Yan², GONG Yong-Sheng²,
JIANG Su-Fei², XIONG Yi-Wei²

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, 214081; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and
Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081)

Abstract A full-length KSPI cDNA sequence was cloned from the testis of *Macrobrachium nipponense* for the first time, using RACE technique. The full length KSPI cDNA is 890bp, containing a 80bp 5' UTR, a 546bp 3' UTR and a 246bp open reading frame encoding 87 amino acids. Amino acid sequence analysis revealed that its encoded amino acids contained a conserved Kazal-type domain. The conserved sequence was C X₅C X₍₆₎VC X₍₅₎TYXNXCX₆C X₁₂C, and its P1 active site was threonine. The phylogenetic tree based on 15 species KSPI proteins showed that KSPI from testis of *M. nipponense* shared the closetest relationship with *M. rosenbergii*, and KSPI from hepatopancreas and hemocytes of other species form the other two main branches. Quantitative PCR was used to detect the distribution of KSPI. According to the results, KSPI was rarely expressed in liver, brain and intestine, whereas the expression levels were relatively higher in ovary, heart and testis. Interestingly, KSPI was highly expressed in testis, while the expression of KSPI in testis was significantly different with the expression in heart ($P < 0.05$) and ovary ($P < 0.01$).

Key words *Macrobrachium nipponense*, Oriental river prawn, Testis, Serine proteinase inhibitor, cDNA, Quantitative PCR