

# 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) $\alpha 2$ -巨球蛋白 cDNA 全长的克隆和表达分析\*

王有昆<sup>1,2</sup> 刘 萍<sup>1①</sup> 段亚飞<sup>3</sup> 李吉涛<sup>1</sup> 李 健<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300)

**摘要** 根据本实验室前期获得的脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)  $\alpha 2$ -巨球蛋白基因 EST 序列, 采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA end, RACE)技术克隆获得脊尾白虾  $\alpha 2$ -巨球蛋白基因 cDNA 全长, 命名为 *Eca2M* 基因。该基因全长 4823 bp, 由 4413 bp 的开放阅读框、64 bp 的 5'端非编码区以及 346 bp 的 3'端非编码区组成。开放阅读框编码 1470 个氨基酸, 分子量为 163.0 kDa, 理论等电点为 5.03。序列分析显示, *Eca2M* 序列 N 端含有 23 个氨基酸组成的信号肽。同源性分析显示, 脊尾白虾 *Eca2M* 氨基酸序列与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)  $\alpha 2M$  的同源性最高, 达到 80%。荧光定量 PCR 分析结果显示, *Eca2M* 基因在血细胞、肝胰腺、肌肉、鳃、卵巢、眼柄、胃及肠中均有表达, 其中在血细胞中的相对表达量最高。感染鳃弧菌和 WSSV 后, 脊尾白虾血细胞中 *Eca2M* 的相对表达量于 6 h 达到最大值且显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 肝胰腺中 *Eca2M* 的相对表达量于 3 h 达到最大值且显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 相对表达量变化具有明显的时间差异性。

**关键词** 脊尾白虾;  $\alpha 2$ -巨球蛋白; 基因克隆; 基因表达

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0063-08

丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serine protease inhibitor, SPI)是对丝氨酸蛋白水解酶具有抑制活性的一类蛋白质的总称, 在凝血、补体活化、细胞迁移、感染等一系列重要生理病理过程中发挥关键性的调控作用, 是生物体内免疫系统的重要组成部分, 有利于维持机体内环境的稳定(Simser *et al*, 2001; Ye *et al*, 2001; Gettings, 2002; van Gent *et al*, 2003)。根据其功能、结构特点以及结合机制可以将 SPI 家族分为以下 4 种: Kazal 型、Kunitz 型、 $\alpha$ -巨球蛋白型和 Serpin 型(Kanost, 1999)。 $\alpha 2$ -巨球蛋白( $\alpha 2$ -Macrogloblin,  $\alpha 2M$ )是一类广泛存在于动物血浆中的大分子糖蛋白, 作为丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的一种,  $\alpha 2$ -巨球蛋白可以通过介导清除内源性和外源性的多种蛋白酶来维持机体

血液和其他体液内环境的稳定, 在免疫和疾病发生过程中起到了至关重要的作用(鲍玉洲等, 1996; 梅承芳等, 2002; 施志仪等, 2008)。当机体发生炎症时,  $\alpha 2M$  被大量合成并进入组织, 通过与组织释放的过量蛋白酶结合, 进而达到清除过量蛋白酶、防止组织被破坏的目的; 此外,  $\alpha 2M$  还可以与病原体和寄生虫释放的毒素以及蛋白酶相结合, 并将其清除, 从而达到降低宿主受到的伤害以及增强宿主抗病力的目的(鲍玉洲等, 1996; 梅承芳等, 2002; Ma *et al*, 2010)。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)具有繁殖能力强、生长季节长、环境适应性广的特点(王兴强等, 2005; 段亚飞等, 2013), 是我国重要的底栖虾类。近年来随着我国沿海滩涂地区的开发, 脊尾白虾已经成

\* 国家虾产业技术体系项目(CARS-47)、国家自然科学基金课题(31472275)和南通市科技项目(HL2013010)共同资助。  
王有昆, E-mail: wangyoukun1989@sina.com

①通讯作者: 刘 萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-02-28, 收修改稿日期: 2014-06-21

为我国重要的经济养殖品种,但随着养殖面积的扩大,病害问题日益严重,给养殖户造成了严重的经济损失(许文军等,2010)。脊尾白虾为甲壳动物,具有先天性免疫防御功能,深入研究其免疫相关基因及其作用机制,可为其养殖病害防治提供理论依据。目前, $\alpha 2M$ 基因在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Ma *et al.*, 2010)、印度明对虾(*Fenneropenaeus indicus*) (Shanthi *et al.*, 2014)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (Lin *et al.*, 2008)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Lin *et al.*, 2007)等虾类中已见相关报道,且在免疫调节中发挥了重要作用。但脊尾白虾  $\alpha 2M$  基因的相关研究尚未见报道。

为了探讨  $\alpha 2M$  基因在脊尾白虾抵抗细菌和病毒入侵机体过程中的免疫应答作用,本研究采用 RACE 技术成功克隆了脊尾白虾  $\alpha 2M$  基因 cDNA 全长,分析了该基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)以及白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)感染后 72 h 内在血细胞和肝胰腺中的表达量变化,为探讨脊尾白虾  $\alpha 2M$  基因在细菌、病毒的刺激下发挥免疫功能的途径和抗病机理提供依据,同时也为脊尾白虾的抗病选育奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用健康脊尾白虾于 2012 年 6 月取自黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司,体长为(4.13±0.27) cm,体重为(1.15±0.28) g。每 30 尾脊尾白虾为一组,于 200 L PVC 桶中暂养 7 d。养殖水温(24±1)℃、盐度 25、pH 8.0,每日换水 1/3,投喂配合饲料。

SMART™ RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购买于 Clontech 公司, TRIzol Reagent 购买于 Invitrogen 公司, DNA 胶回收试剂盒购买于生工生物工程(上海)股份有限公司,大肠杆菌 Top 10 感受态细胞和 pMD18-T 载体均购买于北京天根生化科技有限公司, SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)购买于宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 脊尾白虾总 RNA 提取及 cDNA 的合成

用 TRIzol 试剂按照 Invitrogen 说明书的方法提取脊尾白虾血细胞总 RNA,其质量和完整性利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计检测。

### 1.3 脊尾白虾 $Eca2M$ 基因全长 cDNA 的克隆

根据本实验室前期获得的脊尾白虾  $\alpha 2M$  基因的

EST 序列设计 3' RACE 和 5' RACE 特异性引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 SMART™ RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 进行 3'和 5' RACE 扩增。将引物 A2MF1(表 1)和通用引物 UPM 配对,进行 3'端扩增;引物 A2MR1(表 1)和通用引物 UPM 配对,进行 5'端扩增。反应程序:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25 个循环; 72℃ 10 min。

表 1 实验所用引物名称及序列

Tab.1 Names and sequences of the primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
A2MF1	AGGTGGATTCTGCGTGT
A2MR1	CACTCTGATGTCGCCGCA
A2MF2	GCCATTGACTGCTTACACCAT
A2MR2	GGACTTTCCTTCATCGGTAGC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC
18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

3' RACE 和 5' RACE 扩增产物进行凝胶电泳检测,对目的片段使用 DNA 胶回收试剂盒回收并纯化。纯化产物连接 pMD18-T 载体,连接产物转化大肠杆菌 Top 10 感受态细胞。将经菌落 PCR 鉴定的阳性克隆菌液送往上海桑尼生物科技有限公司测序。

### 1.4 序列分析

利用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>)去除载体序列,然后用 DNAStar 软件进行序列拼接、开放阅读框(ORF)的预测和氨基酸翻译。使用 BLAST(<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对获得的  $Eca2M$  基因序列进行同源性比对。使用 ExPASy(<http://www.expasy.org/tools/>)进行蛋白质功能结构域分析、理化性质预测及信号肽序列分析。使用 DNAMAN 软件对脊尾白虾  $Eca2M$  与其他物种的  $\alpha 2M$  氨基酸序列进行多序列比对,采用 MEGA 4.0 软件构建 NJ 系统进化树。

### 1.5 鳃弧菌和 WSSV 感染实验

取感染 WSSV 的凡纳滨对虾去除头胸甲附肢和肝胰腺的头胸部组织 5 g,加入适量 4℃预冷的 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS),20000 g 冰浴匀浆,获得的匀浆液 4℃ 3000 g 离心 15 min,取上清液反复离心 3 次(4000 g 15 min、6000 g 15 min、8000 g 15 min),所得上清液用 0.45 μm 滤膜过滤除菌,制成实验用 WSSV 粗提液,分装并保存于-80℃冰箱中。实验用鳃弧菌

为本实验室保存,于实验前一天进行菌种活化,活化方法参考段亚飞等(2013),以 PBS 稀释至菌悬液终浓度为  $2 \times 10^8$  CFU/ml,于  $4^\circ\text{C}$  保存备用。实验前用白斑病毒综合征检测试剂盒对随机挑取的 10 尾脊尾白虾进行检测,证实其均未感染 WSSV。

将暂养 7 d 的健康脊尾白虾每 50 尾一组随机分为 3 组: 鳃弧菌感染组、WSSV 感染组和对照组。鳃弧菌感染组每尾虾注射鳃弧菌菌悬液 20  $\mu\text{l}$ , WSSV 感染组每尾虾注射 WSSV 粗提液 20  $\mu\text{l}$ , 对照组每尾虾注射 PBS 20  $\mu\text{l}$ , 注射部位均为第二腹节基部。于注射后 0、3、6、12、24、48、72 h 每组分别随机取 6 尾虾的血细胞和肝胰腺,用于 RNA 提取。另取 6 尾健康脊尾白虾的血细胞、肝胰腺、肌肉、鳃、卵巢、肠、胃和眼柄组织分别提取 RNA,检测脊尾白虾 *Eca2M* 基因在不同组织中的表达水平。

### 1.6 *Eca2M* 基因的组织表达分析

根据脊尾白虾 *Eca2M* 基因 cDNA 全长和内参基因 18S rRNA 的全长序列,分别设计 1 对正反引物 (A2MF2/R2 及 18S F/R) (表 1),利用 Real-time PCR 检测鳃弧菌和 WSSV 感染后的脊尾白虾血细胞和肝胰腺中不同时间点 *Eca2M* 基因的相对表达量。反应体系和程序参考 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 说明书,采用 20  $\mu\text{l}$  反应体系,包括 10  $\mu\text{l}$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (2 $\times$ )、0.4  $\mu\text{l}$  ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) $\times$ 3、0.8  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  引物 A2MF2、0.8  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  引物 A2MR2、6.0  $\mu\text{l}$  DEPC 水、2.0  $\mu\text{l}$  cDNA。反应程序:  $95^\circ\text{C}$  30 s;  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  34 s, 40 个循环;  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $60^\circ\text{C}$  1 min,  $95^\circ\text{C}$  15 s。*Eca2M* 基因的相对表达量通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算得到,使用 SPSS 17.0 软件对结果进行显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 *Eca2M* 基因 cDNA 全长的克隆及序列分析

经紫外分光光度计和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,脊尾白虾血细胞提取获得的总 RNA 的  $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$  为 1.88, 18S 和 28S rRNA 条带清晰且完整,表明所提取的总 RNA 质量和纯度较高,能够满足后续实验的要求。分别用特异性引物 A2MF1 和 A2MR1 与通用引物 UPM 配对进行 RACE 扩增,获得 693 bp 和 4433 bp 的 PCR 产物。将 PCR 扩增产物分别测序,测序结果与已有的 EST 序列拼接,获得脊尾白虾  $\alpha$ 2M 基因 cDNA 全长序列(GenBank 登录号为 JX514705)并将其命名为 *Eca2M*。该基因全长 4823 bp,包含 4413 bp

的开放阅读框、64 bp 的 5'端非编码区(UTR)以及 346 bp 的 3'端非编码区。

氨基酸序列分析可知, *Eca2M* 基因编码一个由 1470 个氨基酸组成的蛋白质,分子量为 163.0 kDa,理论等电点为 5.03,其 N 端含有 23 个氨基酸组成的信号肽。生物信息学分析显示,脊尾白虾 *Eca2M* 氨基酸序列中含有 3 个主要的功能区,分别为诱饵区(688–803)、内部硫酯键(990–994)和受体结合区(1335–1466);同时含有 6 个 N-linked 糖基化位点,分别位于 127–129、296–298、396–398、445–447、887–889、1081–1083 位置。

### 2.2 *Eca2M* 基因的同源性分析

对脊尾白虾 *Eca2M* 基因编码的氨基酸序列使用 BLAST 进行同源性分析,发现脊尾白虾 *Eca2M* 氨基酸序列与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)  $\alpha$ 2M 的同源性最高,为 80%。与其他虾蟹类如通讯鳌虾(*Pacifastacus leniusculus*)、中国对虾、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的  $\alpha$ 2M 的同源性分别为 60%、57%、55%、52%和 51%;与其他无脊椎动物如鲎(*Limulus* sp.)、佛罗里达弓背蚁(*Camponotus floridanus*)和安德逊蝇虎(*Hasarius adansonii*)的  $\alpha$ 2M 的同源性分别为 38%、38%和 38%。将脊尾白虾 *Eca2M* 与拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、凡纳滨对虾和中华绒螯蟹等甲壳动物的  $\alpha$ 2M 氨基酸序列进行比对发现,其均具有典型的硫酯键结构(GCGEQ)、诱饵区以及受体结合区(图 1)。利用 MEGA 4.0 软件进行系统进化分析表明,脊尾白虾 *Eca2M* 与罗氏沼虾  $\alpha$ 2M 紧密聚为一支,之后与通讯鳌虾、拟穴青蟹、中华绒螯蟹、中国对虾和凡纳滨对虾等甲壳类  $\alpha$ 2M 聚为一支(图 2)。

### 2.3 *Eca2M* 基因的组织表达分析

利用 Real-time PCR 分析了脊尾白虾 *Eca2M* 基因在不同组织中的表达情况,发现 *Eca2M* 基因在多种组织均有表达,包括血细胞、肝胰腺、肌肉、鳃、卵巢、眼柄、胃及肠。其中,在血细胞中的表达量最高,在肌肉中的表达量最少(图 3)。

注射鳃弧菌和 WSSV 后不同时间点脊尾白虾血细胞中 *Eca2M* 基因的表达情况使用 Real-time PCR 检测。结果显示,鳃弧菌感染组 *Eca2M* 基因表达量于注射后 0–6 h 开始不断上升,并于 6 h 达到最高值;然后于 12 h 表达量开始下降,并于 24 h 显著低于对照组( $P < 0.05$ ),48 h 到达最低值;随后于 72 h 表达量

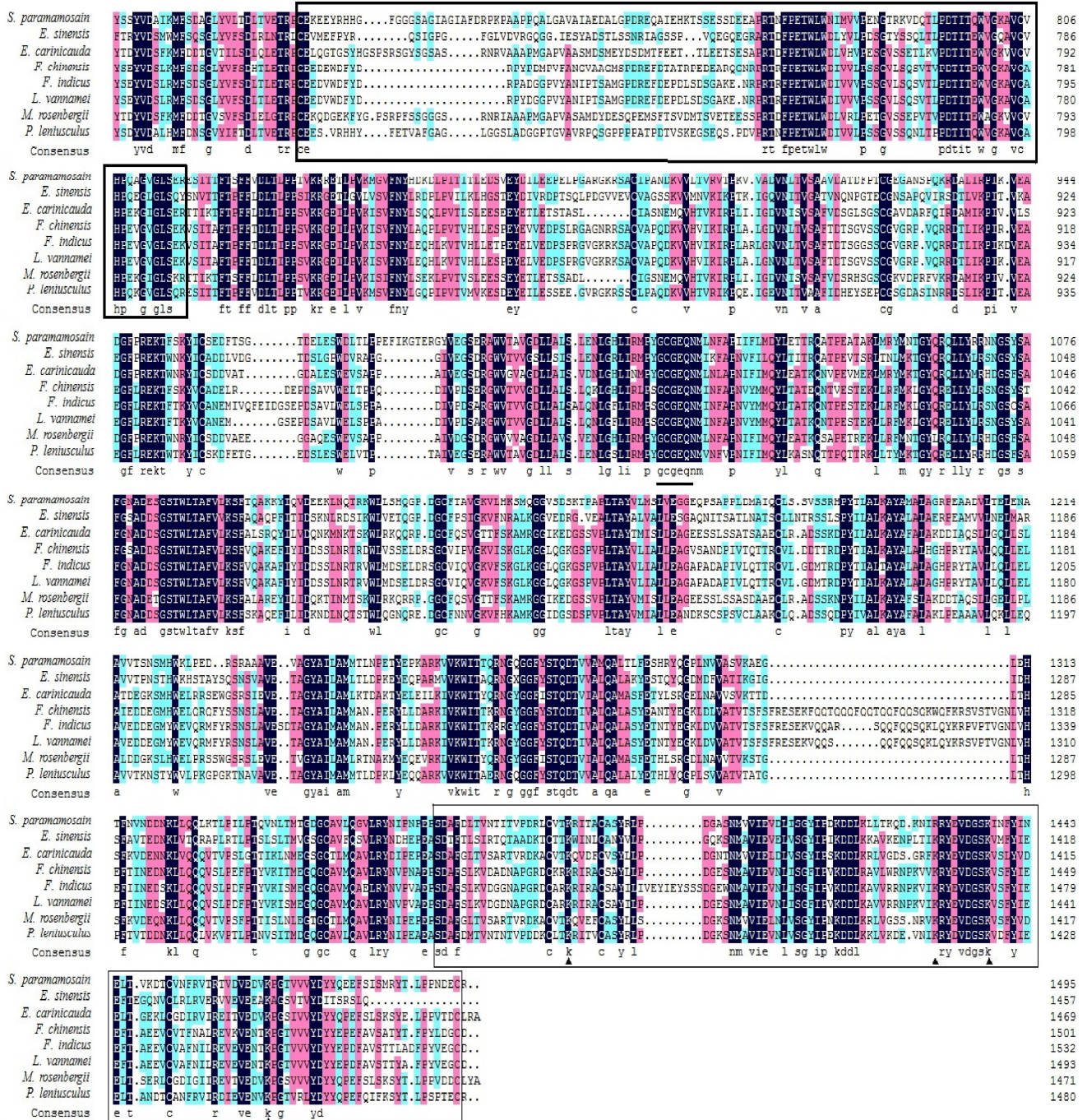


图1 脊尾白虾 *Eca2M* 推导氨基酸序列与其他物种  $\alpha 2M$  氨基酸序列的比对  
 Fig.1 Multiple alignments of *E. carinicauda Eca2M* with  $\alpha 2M$  in other species

诱饵区用粗线框标出, 硫酯键用粗下划线标出, 受体结合区用细线框标出, 保守的赖氨酸残基用三角号表示。各物种  $\alpha 2M$  序列登录号: 拟穴青蟹(CCW43201)、中华绒螯蟹(ADD71943)、中国对虾(ABP97431)、印度明对虾(ADT91769)、凡纳滨对虾(ABI79454)、罗氏沼虾(ABK60046)、通讯螯虾(AEC50080)

The bait region was marked with thick box; Internal thiolester is marked with thick underline; Receptor-binding domain is marked with thin box; Conservative lysine residues were marked with triangle. The GenBank accession numbers of  $\alpha 2M$  were as follows: *Scylla paramamosain* (CCW43201), *Eriocheir sinensis* (ADD71943), *Fenneropenaeus chinensis* (ABP97431), *Fenneropenaeus indicus* (ADT91769), *Litopenaeus vannamei* (ABI79454), *Macrobrachium rosenbergii* (ABK60046), and *Pacifastacus leniusculus* (AEC50080)

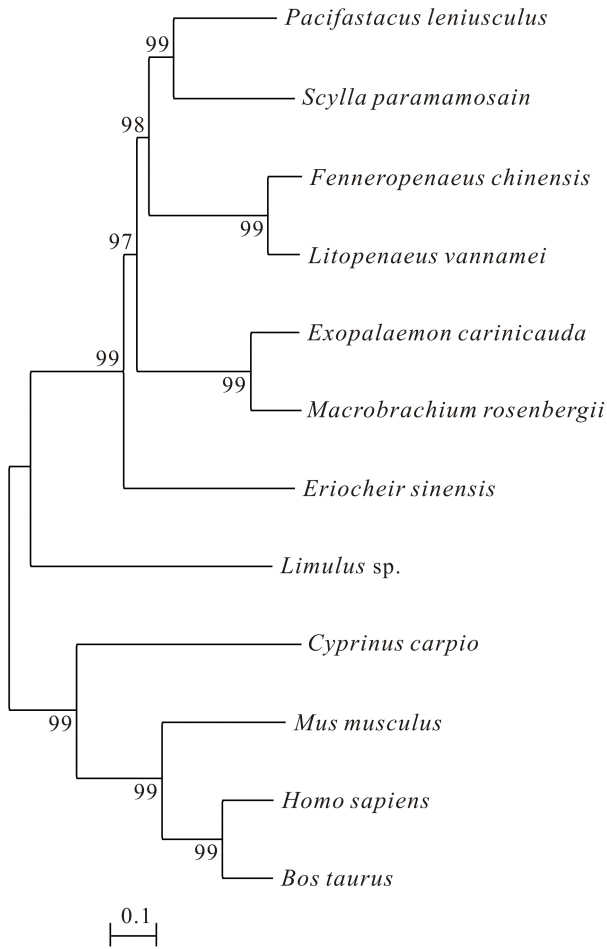


图 2 基于  $\alpha$ 2M 氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig.2 NJ tree based on  $\alpha$ 2M amino acids of different species

各物种  $\alpha$ 2M 序列登录号: 罗氏沼虾(ABK60046)、通讯螯虾(AEC50080)、拟穴青蟹(CCW43201)、中华绒螯蟹(ADD71943)、中国对虾(ABP97431)、凡纳滨对虾(ABI79454)、鲎(*Limulus sp.*) (BAA19844)、人(*Homo sapiens*)(AAT02228)、小鼠(*Mus musculus*)(AAA39508)、牛(*Bos Taurus*)(NP-001103265)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(BAA85038)

The GenBank accession numbers of  $\alpha$ 2M were as follows:

*Macrobrachium rosenbergii* (ABK60046), *Pacifastacus leniusculus* (AEC50080), *Scylla paramamosain* (CCW43201), *Eriocheir sinensis* (ADD71943), *Fenneropenaeus chinensis* (ABP97431), *Litopenaeus vannamei* (ABI79454), *Limulus sp.* (BAA19844), *Homo sapiens* (AAT02228), *Mus musculus* (AAA39508), *Bos Taurus* (NP-001103265), and *Cyprinus carpio* (BAA85038)

略有回升(图 4)。而 WSSV 感染组血细胞中 *Eca2M* 基因表达量于注射后 0-3 h 下降, 随后于 3-6 h 开始上升, 6 h 时表达量达到最高值; 然后于 12 h 表达量开始下降, 并于 48 h 达到最低值且显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 72 h 后表达量缓慢回升(图 5)。

脊尾白虾感染鳃弧菌和 WSSV 后, 肝胰腺中 *Eca2M* 基因的表达情况如图 6 和图 7 所示。结果显

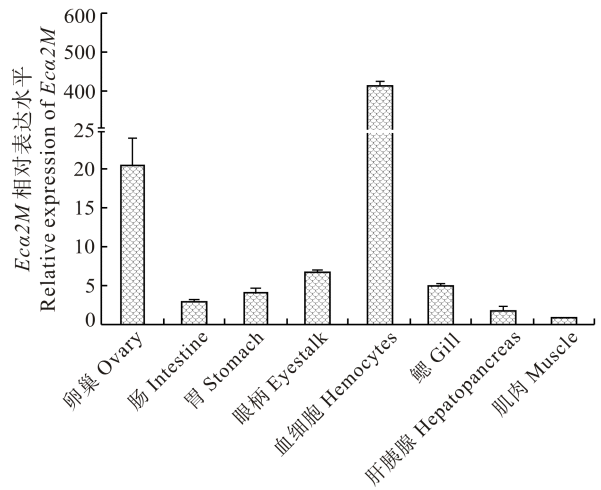


图 3 *Eca2M* 基因在脊尾白虾不同组织中的表达分布  
Fig.3 Distribution of *Eca2M* in different tissues of *E. carinicauda*

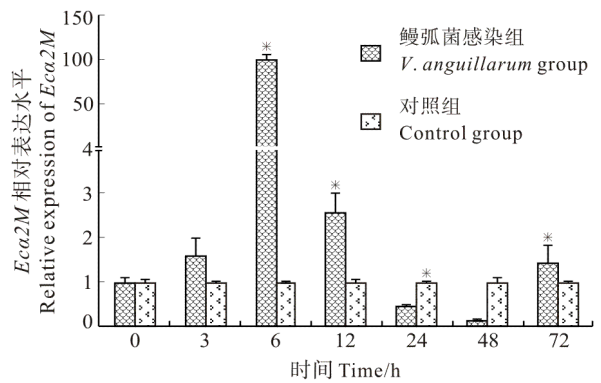


图 4 鳃弧菌感染后脊尾白虾血细胞中 *Eca2M* 基因的表达情况  
Fig.4 The expression of *Eca2M* gene in *E. carinicauda* hemocytes after *V. anguillarum* challenge  
\*表示同一时间点, 与对照组相比, 组间差异显著( $P < 0.05$ ), 下同  
Compared with the control group, significant differences ( $P < 0.05$ ) in the same observed period is marked with asterisk, the same below

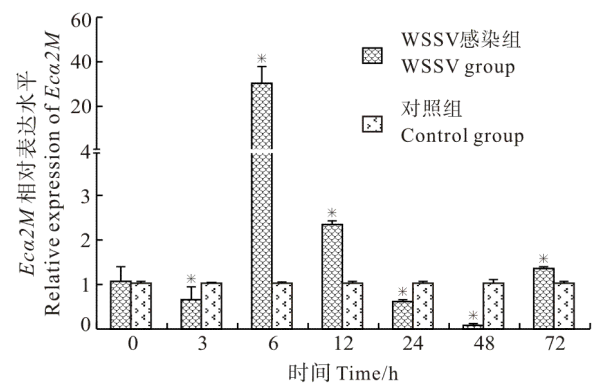


图 5 WSSV 感染后脊尾白虾血细胞中 *Eca2M* 基因的表达情况  
Fig.5 The expression of *Eca2M* gene in *E. carinicauda* hemocytes after WSSV challenge

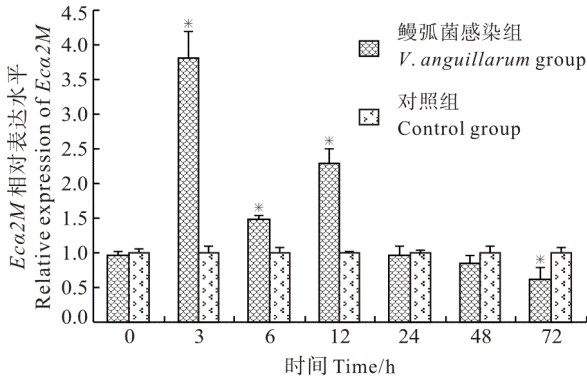


图6 鳃弧菌感染后脊尾白虾肝胰腺中 *Eca2M* 基因的表达情况  
Fig.6 The expression of *Eca2M* gene in *E. carinicauda* hepatopancreas after *V. anguillarum* challenge

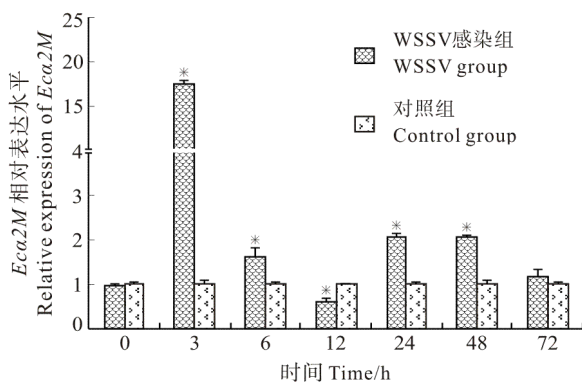


图7 WSSV 感染后脊尾白虾肝胰腺中 *Eca2M* 基因的表达情况  
Fig.7 The expression of *Eca2M* gene in *E. carinicauda* hepatopancreas after WSSV challenge

示,鳃弧菌感染组 *Eca2M* 基因表达量于注射后 0–3 h 开始不断上升,并于 3 h 达到最高值;于 3–6 h 表达量开始下降,6–12 h 表达量有所回升,12 h 后表达量再次下降并于 48 h 显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),72 h 到达最低值(图 6)。而 WSSV 感染组血细胞中 *Eca2M* 基因表达量于注射后 0–3 h 开始不断上升,并于 3 h 达到最高值;然后 3–12 h 表达量下降,并于 12 h 达到最低值且显著低于对照组 ( $P < 0.05$ );12–24 h 表达量回升,然后于 24 h 后表达量再次缓慢下降(图 7)。

### 3 讨论

$\alpha 2$ -巨球蛋白是一类存在于动物血浆中的大分子糖蛋白,可以调节多种蛋白酶的活性,参与免疫防御和调节以及多种生理功能(梅承芳等, 2002)。本研究克隆得到脊尾白虾  $\alpha 2$ -巨球蛋白 *Eca2M* 基因序列,其同其他物种的  $\alpha 2M$  基因一样也存在 3 个基本的功能区: 硫酯键结构(990-GCGEQ-994)、诱饵区(688–803)以及受体结合区(1335–1466) 3 个功能区; 6 个 N-linked 糖基化位点,其中 445–447 的 N-linked 糖基化位点比

较保守,与拟穴青蟹、中华绒螯蟹和罗氏沼虾一致。在许多动物  $\alpha 2M$  基因中都发现相应的 N-linked 糖基化位点,其中日本对虾和斑节对虾  $\alpha 2M$  基因中都含有 8 个 N-linked 糖基化位点(Rattanachai *et al*, 2004; Lin *et al*, 2007),锯缘青蟹  $\alpha 2M$  基因中存在 11 个 N-linked 糖基化位点(Vaseeharan *et al*, 2007)。系统进化树分析发现脊尾白虾先与罗氏沼虾聚为一支,再与其他虾蟹类聚在一起,且同源性 > 50%。中国对虾中发现 3 种类型的  $\alpha 2$ -巨球蛋白(Ma *et al*, 2010),而本研究仅发现脊尾白虾  $\alpha 2M$  的 1 种基因类型,因此是否存在其他类型还有待进一步研究。哺乳动物  $\alpha 2M$  基因硫酯键是由 Cys 和 Gln 构成(胡宝庆等, 2010),经多序列比对发现 *Eca2M* 基因的硫酯键也是由 Cys<sub>991</sub> 和 Gln<sub>994</sub> 组成,环绕硫酯键周围的区域比较保守。 $\alpha 2M$  基因 C 末端存在受体结合区,可以通过与病原体表面受体结合使其介导产生胞吞作用。通过将脊尾白虾与其他动物的  $\alpha 2M$  基因比对,发现其受体结合区具有高度保守性,其中包括 6 个保守的赖氨酸残基,这与日本对虾(Rattanachai *et al*, 2004)的  $\alpha 2M$  基因一致。同时在日本对虾中发现第 4 个 Lys 被 Val 替代,这在脊尾白虾中并没有发现。脊尾白虾  $\alpha 2M$  基因诱饵区在序列长短与氨基酸组成都与其他动物具有较大的差异性,多序列比对结果显示,拟穴青蟹、三疣梭子蟹、中国对虾和凡纳滨对虾等物种的诱饵区也存在同样的现象。这种现象的产生很可能是一种协同进化的结果,宿主为清除病原微生物产生的特异性蛋白酶,同时又不破坏宿主的蛋白酶,从而产生了这种差异性(Armstrong, 2001)。

脊尾白虾 *Eca2M* 基因表达具有组织特异性,在多种组织中均有表达。其中,在血细胞中的表达量最高,这与中国对虾的研究结果一致(Ma *et al*, 2010),说明血细胞是脊尾白虾 *Eca2M* 基因存储释放的主要器官。

$\alpha 2M$  主要储存在血细胞的颗粒中(Armstrong *et al*, 1999),可以通过与内源性和外源性的多种蛋白酶结合并介导清除,达到维持机体内环境稳定的目的,因此其在免疫防御和调节中的作用日益受到重视。印度明对虾  $\alpha 2M$  在副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和 WSSV 侵染后表达量持续升高(Shanthi *et al*, 2014),褶纹冠蚌注射嗜水气单胞菌 6 h 后发现  $\alpha 2M$  表达量明显升高(胡宝庆等, 2010);中国对虾注射 WSSV 病毒及鳃弧菌后 6–14 h,  $\alpha 2M$  含量明显增加(Ma *et al*, 2010),因此  $\alpha 2M$  可能在对细菌和病毒的防御过程中起到了重要作用。为了研究  $\alpha 2M$  在脊尾白虾非特异性免疫中的作用,本研究分别使用鳃弧菌和 WSSV 对脊尾白虾进行了细菌和病毒感染实验,通过

实验发现, *Eca2M* 在细菌和病毒感染后的脊尾白虾血细胞和肝胰腺中的表达均有明显时间差异性。注射鳃弧菌和 WSSV 后, 血细胞当中的 *Eca2M* 基因表达量在 6 h 达到峰值, 与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), 这可能是因为 *Eca2M* 参与了免疫反应的应答过程。感染后 6–48 h, *Eca2M* 表达量下降, 这一现象在中国对虾的研究当中也有类似发现(Ma *et al.*, 2010), 这可能是因为脊尾白虾机体处于感染后的恢复期(孙杰等, 2010)。注射鳃弧菌和 WSSV 后, 肝胰腺当中的 *Eca2M* 基因表达量在 3 h 达到峰值, 与对照组差异显著, 然后呈先下降再上升再下降的变化趋势, 这与中国对虾的研究结果相一致(Ma *et al.*, 2010)。

为了研究脊尾白虾 *Eca2M* 的生物学功能及其在免疫反应中的作用, 本研究成功克隆获得了脊尾白虾 *Eca2M* 基因 cDNA 序列全长, 初步探究了该基因在脊尾白虾受到鳃弧菌和 WSSV 感染后血细胞和肝胰腺中的表达变化, 证明其确实参与了脊尾白虾的免疫应答, 为脊尾白虾免疫机制研究和病害防治提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- 王兴强, 阎斌伦, 马甦, 等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展. 齐鲁渔业, 2005, 22(8): 21–24
- 许文军, 谢建军, 施慧, 等. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 396–402
- 孙杰, 王宝杰, 李晓华, 等. 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, 2010, 34(1): 56–66
- 胡宝庆, 谢彦海, 代功园, 等. 褶纹冠蚌  $\alpha_2$  巨球蛋白基因的分子克隆与序列分析. 水生生物学报, 2010, 34(2): 452–458
- 段亚飞, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析. 动物学研究, 2013, 34(1): 39–46
- 施志仪, 杨显祥, 陈晓武, 等. 三角帆蚌  $\alpha_2$  巨球蛋白 cDNA 全长的克隆及表达特征. 水产学报, 2008, 32(4): 526–532
- 梅承芳, 马洪明, 麦康森.  $\alpha$ -巨球蛋白研究进展. 海洋科学, 2002, 26(9): 16–19
- 鲍玉洲, 陈勤, 陈本樊.  $\alpha_2$ -巨球蛋白的研究进展. 国外医学: 输血及血液学分册, 1996, 19(1): 34–39
- Armstrong PB, Quigley JP.  $\alpha_2$ -macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. Dev Comp Immunol, 1999, 23(4): 375–390
- Armstrong PB. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. Trends Immunol, 2001, 22(1): 47–52
- Gettings PG. Serpin structure, mechanism and function. Chem Rev, 2002, 102: 4751–4803
- Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Dev Comp Immunol, 1999, 23: 291–230
- Lin YC, Vaseeharan B, Ko CF, *et al.* Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin ( $\alpha_2$ -M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Mol Immunol, 2007, 44(6): 1065–1074
- Lin YC, Vaseeharan B, Chen JC. Molecular cloning and phylogenetic analysis on  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Dev Comp Immunol, 2008, 32(4): 317–329
- Ma H, Wang B, Zhang J, *et al.* Multiple forms of alpha-2 macroglobulin in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and their transcriptional response to WSSV or *Vibrio pathogen* infection. Dev Comp Immunol, 2010, 34(6): 677–684
- Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of  $\alpha_2$ -macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. Fish & Shellfish Immunol, 2004, 16(5): 599–611
- Shanthi S, Vaseeharan B. Alpha 2 macroglobulin gene and their expression in response to GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV pathogens in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 2014, 418: 48–54
- Simser JA, Palmer AT, Munderloh UG, *et al.* Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 546–552
- van Gent D, Sharp P, Morgan K, *et al.* Serpins: structure, function and molecular evolution. Int J Biochem Cell B, 2003, 35: 1536–1547
- Vaseeharan B, Lin YC, Ko CF, *et al.* Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. Fish & Shellfish Immunol, 2007, 22(1): 115–130
- Ye S, Goldsmith EJ. Serpins and other covalent protease inhibitors. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11(6): 740–745

(编辑 冯小花)

## The Cloning and Expression of Alpha2-Macrogloblin Gene of *Exopalaemon carinicauda*

WANG Youkun<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>①, DUAN Yafei<sup>3</sup>, LI Jitao<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

**Abstract** *Exopalaemon carinicauda* is one of most commercially important shrimps in China Sea due to its advantage in reproduction, longer growing seasons, and ecological flexibility. However, a variety of shrimp diseases have become an increasingly serious issue that lead to economic loss. *E. carinicauda* relies on the innate immunity to fight against invading pathogens. Alpha2-Macrogloblin ( $\alpha$ 2M) is an inhibitor of diverse proteases ubiquitous in animals. Alpha2M enfolds the target proteases and block their interactions. Therefore  $\alpha$ 2M plays an important part in avoiding the deleterious effects of its active components. Based on the EST sequence from a cDNA library of *E. carinicauda* hemocyte, we cloned the cDNA of alpha2-macrogloblin of *E. carinicauda* (namely *Eca2M*) using rapid amplification of cDNA ends (RACE). The *Eca2M* cDNA was 4823 bp in length, which contained an open reading frame (ORF) of 4413 bp, a 64 bp 5' untranslated region, and a 346 bp 3' untranslated region. The open reading frame encoded an N-terminal signal sequence of 23 residues, and a mature protein consisting of 1470 amino acids. The molecular mass of this protein was 163.0 kDa and the estimated pI was 5.03. Homology analysis revealed that the amino acid sequence of *Eca2M* was highly similar to its homologs in other crustaceans. The similarity of *Eca2M* was 80% between *E. carinicauda* and *Macrobrachium rosenbergii*. We also analyzed the expression of *Eca2M* in different tissues with quantitative real-time PCR. *Eca2M* was detected in all tested tissues of *E. carinicauda*, including hemocytes, gill, hepatopancreas, muscles, ovary, intestine, stomach and eyestalk, and the expression was the highest in hemocytes. After challenged with *Vibrio anguillarum* and white spot syndrome virus (WSSV), the expression of *Eca2M* was up-regulated in hemocytes and hepatopancreas of *E. carinicauda*. Our results suggested that *Eca2M* might play an important role in the prawn immune response.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; alpha2-macrogloblin; Gene cloning; Gene expression

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn