

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170220001

http://www.yykxjz.cn/

史晓丽, 孟宪红, 孔杰, 栾生, 罗坤, 曹宝祥, 曹家旺, 陈宝龙. 中国明对虾 *FBA* 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 112–119

Shi XL, Meng XH, Kong J, Luan S, Luo K, Cao BX, Cao JW, Chen BL. cDNA cloning of the *FBA* gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression and functional analysis after WSSV infection. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 112–119

# 中国明对虾 *FBA* 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析\*

史晓丽<sup>1,2</sup> 孟宪红<sup>1,2①</sup> 孔杰<sup>1,2</sup> 栾生<sup>1,2</sup> 罗坤<sup>1,2</sup>  
曹宝祥<sup>1,2</sup> 曹家旺<sup>1,2</sup> 陈宝龙<sup>1,2</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. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 醛缩酶(*FBA*)是糖酵解和糖异生中的关键酶,参与多种生物过程。本研究采用 RACE 技术,克隆获得中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)*FBA* 基因(*FcFBA*)的全长 cDNA 序列,并对其进行生物信息学分析。结果显示,中国明对虾 *FcFBA* 基因的 cDNA 全长为 2496 bp,其中,ORF 长 1098 bp,5' UTR 长 79 bp,3' UTR 长 1319 bp。完整的阅读框编码 365 个氨基酸,分子量为 39.8 kDa,预测的理论等电点为 6.6。同源性及系统进化分析表明,*FcFBA* 与节肢动物的 *FBA* 聚为一类,与卤虫(*Artemia franciscana*)、家蚕(*Bombyx mori*)、沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)的相似度分别是 86%、79% 和 78%。荧光定量 PCR 结果显示,*FcFBA* 在肌肉中的相对表达量最高,肝胰腺中最低。WSSV 感染后,该基因在鳃、肝胰腺和肌肉中呈现出不同的时空表达特点。*dsRNA* 干扰 24 h 以后,抑制效率达到最大。与 PBS 对照组相比,*FcFBA* 干扰组(*dsRNA* 组)加快了对虾染病后的死亡速度。本研究表明,*FcFBA* 基因可能参与了我国明对虾生物胁迫的应答反应。

**关键词** 中国明对虾; *FBA* 基因; 基因克隆; 组织表达; 基因干扰

中图分类号 Q785; S966.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)02-0112-08

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的土著海水养殖种类之一,近十几年来,其养殖产业饱受病害困扰。在诸多病原中,白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是对对虾养殖生产毒害最大的病毒之一(Lightner, 1996),它所导致的疾病传播快、破坏性强且防治困难,已经给我国乃至全

球的对虾养殖业造成了极大危害,严重制约了对虾养殖业的健康发展。国内外学者展开了大量的研究工作,如消除传染源、切断传播途径、控制水质、提高对虾抵抗力等,以降低其危害,但效果不显著(Yang *et al*, 2001; He *et al*, 2012; Yang *et al*, 2012; 曹家旺等, 2017)。研究对虾对病原感染的免疫应答机制,可以

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017001)、国家自然科学基金(41676148)、泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS(20603022017001), National Natural Science Foundation of China (41676148), Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System(CARS-48)]. 史晓丽, E-mail: shixiaoli209@163.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-20, 收修改稿日期: 2017-03-21

为有效地进行对虾的病害防治提供重要的理论指导。

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA)(EC 4.1.2.13)是糖酵解和糖异生过程中的一种关键酶,它普遍存在于动植物及微生物体内。到目前为止,醛缩酶已在多个物种,尤其是细菌和脊椎动物中得到了广泛研究,研究重点在其结构、动力学参数、酶活特性和治疗中的潜在功能(Giegé *et al.*, 2003; Lorentzen *et al.*, 2004; Rodaki *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2013)。哺乳动物醛缩酶通过与控制肌动蛋白聚合的 WASP/Arp2/3 复合物相互作用,从而在细胞内吞中起作用,最终影响了细胞增殖(Lew *et al.*, 2012、2013)。尤其引人注意的是,醛缩酶基因的干扰可以抑制细胞增殖,单核酸突变也可以降低酶活并抑制脊椎动物的生长(Van den Berghe, 1994; Haake *et al.*, 1999)。最新研究表明,醛缩酶还在控制 RNA 聚合酶 III 转录中起作用(Cieśła *et al.*, 2014)。而在水产动物中,该基因相关的报道则较少,仅在电鳗(*Electrophorus electricus*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、红耳龟(*Trachemys scripta*)等少数物种中,有部分酶活分析和 SNP 研究(De-Simone *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; 曹婷婷等, 2012; 李玺洋等, 2012; Dawson *et al.*, 2013)。

在中国明对虾感染 WSSV 后的表达谱芯片研究中,我们发现醛缩酶基因出现了显著差异表达。此外,该基因内部出现了与抗病性状呈显著关联的 SNP 位点。因此,本研究采用 RACE 技术克隆中国明对虾的醛缩酶基因(以下称 *FcFBA* 基因),研究其在感染 WSSV 后的时空表达特点,并进一步利用基因干扰技术初步分析其在对虾染病后的表达特点,以期为中国明对虾抗 WSSV 育种提供理论依据和实践材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国明对虾实验群体取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心,对虾大小均匀,体重为(1.01±0.21) g。实验前,暂养 1 周。实验用水为砂滤后海水,养殖期间的水温为 24.8℃~25.4℃,盐度为 28,持续充氧,每天换水,并投喂配合饲料。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 Trizol 法提取中国明对虾肝胰腺组织的总 RNA,具体操作方法参照说明书(Invitrogen, 美国)。采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳,检测所提取 RNA 的质量及完整性。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit(Clontech, 美国)反转录合成 cDNA 第一条链。

### 1.3 *FcFBA* 基因全长 cDNA 的克隆及测序

根据本实验室的中国明对虾 454 转录组测序获得的醛缩酶基因的部分 EST 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 5' RACE 和 3' RACE 引物(表 1),利用 AD 酶,分别进行 RACE 扩增。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,利用胶回收试剂盒回收目的片段,连接到 pMD18-T simple 载体上,转化入 Top 10 感受态细胞。使用 M13 引物(表 1)对克隆进行菌落 PCR 鉴定,阳性克隆经确定后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.4 基因生物信息学分析

通过 NCBI 网站上的 BLASTX 对测序结果进行序列同源性比对分析,利用 DNASTAR 软件进行全长

表 1 引物序列及信息  
Tab.1 Primer sequences in RACE, qRT-PCR and RNAi

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
5' outer primer	AGAGAGGAAGGTCACGCCAG	RACE
5' inner primer	CGGAAAGAGCAACCACTGT	RACE
3' outer primer	ACCCTCCTCAAGCCCAACAT	RACE
3' inner primer	TCAGTCCTGCCCAAGAAAT	RACE
RT-F	ACCCTCCTCAAGCCCAACAT	qRT-PCR
RT-R	AGAGAGGAAGGTCACGCCAG	qRT-PCR
18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	qRT-PCR
18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	qRT-PCR
RNAi F	TAATACGACTCACTATAGGGGCCAGAAGGCCGATGATGGAA	RNAi
RNAi R	TAATACGACTCACTATAGGGTTAGCAACCTCCTGGGGAGT	RNAi
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌落鉴定 Colony PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	菌落鉴定 Colony PCR

序列拼接, 在线生物学软件 ExPASy 对全长序列编码的氨基酸序列进行生物信息学分析, 使用 MEGA 5.0 软件的邻接法(NJ)构建系统进化树。

### 1.5 人工 WSSV 感染实验

实验前随机挑选暂养的健康中国明对虾 180 尾, 平均分为 2 组(WSSV 感染组和对照组), 每组 3 个平行。WSSV 感染组, 从第 5 腹节处注射病毒含量为  $10^3$  copies/ $\mu\text{l}$  的病毒悬液 10  $\mu\text{l}$ , 各组分别在实验开始后的 0、6、12、24、48 h, 取鳃、肝胰腺和肌肉组织, 每个时间点各取 3 尾存于液氮中, 用于后续 RNA 的提取及荧光定量验证。

### 1.6 *FcFBA* dsRNA 的合成

以中国明对虾肝胰腺 cDNA 为模板, 用正向引物 RNAi F 和反向引物 RNAi R, PCR 扩增 *FcFBA* 基因的 cDNA 片段。采用 *rTaq* 酶进行扩增, PCR 扩增体系为 20  $\mu\text{l}$ , 包括模板 2  $\mu\text{l}$ , 正反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$  各 1  $\mu\text{l}$ , PCR Buffer 2  $\mu\text{l}$ , dNTP (2.5 mmol/L each) 1.6  $\mu\text{l}$ 。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 1 个循环。PCR 结束后, 采用胶回收试剂盒进行纯化。由此, 获得 *FcFBA* dsRNA 的体外转录模板。采用 *in vitro* Transcription T7 Kit 进行体外转录, 实验方法参见(for siRNA Synthesis)说明书 (TaKaRa, 日本)。

### 1.7 dsRNA 干扰

设置 dsRNA 实验组和 PBS 对照组, 每组 30 尾对虾, 2 个平行。注射前, 取 3 尾对虾作为空白对照。对照组每尾对虾从第 5 腹节处注射 10  $\mu\text{l}$  的 PBS, 实验组每尾对虾从第 5 腹节处注射 10  $\mu\text{l}$  的 dsRNA (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), 注射后的 6、12、24、48 和 72 h 分别取肝胰腺组织用于 RNA 提取, 以进行后续基因表达分析。在干扰后的 24 h, 2 组分别再注射 10  $\mu\text{l}$   $10^3$  copies/ $\mu\text{l}$  的 WSSV 病毒悬液, 统计 2 组的死亡率。

### 1.8 基因的时空表达分析

以 18S rRNA 作为 real-time PCR 反应的内参基因, 采用 TaKaRa 的荧光定量 PCR 试剂盒对基因进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测。所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪, 各个基因引物序列见表 1。20  $\mu\text{l}$  反应体系包含: 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu\text{l}$ , 正向和反向引物各 1  $\mu\text{l}$  (2  $\mu\text{mol/L}$ ), 稀释后的 cDNA 模板 1  $\mu\text{l}$  (1:10 稀释), 循环参数参照说明书。实验重复 3 次, 以平均值进行后续数据分析。根据  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

方法计算出每个基因的相对表达量, 所得数据用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 比较均值的差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FcFBA* 基因 cDNA 全长序列的克隆

根据实验室前期获得的醛缩酶基因部分 EST 序列设计 RACE 引物, 获得 5'RACE 片段和 3'RACE 片段, 长度分别为 594 bp 和 1366 bp, 拼接后得到全长 cDNA 序列。*FcFBA* cDNA 序列全长为 2496 bp, 其中, ORF 为 1098 bp, 编码 365 个氨基酸(GenBank No. KJ686589), 含有 5 个保守的氨基酸位点, 包括 Lys<sub>231</sub>。该蛋白预测的理论等电点为 6.6, 分子量为 39.8 kDa。序列中的 5' UTR 长 79 bp, 3' UTR 长 1319 bp, 终止密码子为 TAA(图 1)。

### 2.2 *FcFBA* 蛋白系统进化分析

氨基酸序列比对表明, *FcFBA* 的蛋白序列与节肢动物的相似度最高, 如与卤虫(*Artemia franciscana*)、家蚕(*Bombyx mori*)、沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)的相似度分别是 86%、79%和 78%, 而与小鼠(*Mus musculus*)醛缩酶的 A 型、C 型、B 型的相似度分别是 68%、66%和 62%。系统进化分析表明, 包括中国明对虾在内的节肢动物的醛缩酶自成一类, 然后再和高等动物的聚为一类(图 2)。

### 2.3 *FcFBA* 基因的组织表达分析

*FcFBA* 基因在中国明对虾各组织中的相对表达量分析结果显示, 该基因在鳃、肝胰腺、肌肉中均有表达。其中, 肌肉中的表达量最高, 鳃中次之, 肝胰腺中的表达量最少(图 3A)。

*FcFBA* 基因在感染 WSSV 的对虾不同组织中的相对表达量变化结果显示(图 3), 与对照组相比, *FcFBA* 基因在肝胰腺中, 表现为先上调后下降再上调的趋势, 在 6 h 和 48 h 显著上调, 分别是对照组的 20.7 和 14.7 倍( $P < 0.05$ ); 鳃中, 表现为先下调后上升的趋势, 在 6 h 达到最低, 为对照组的 0.31 倍, 在 12 h 达到最高, 为对照组的 2.15 倍, 但差异均不显著; 肌肉中, 表现为先上调后再下降的趋势, 6 h 达到最高, 为对照组的 2.88 倍( $P < 0.05$ ), 12 h 和 24 h 均高于对照组, 但无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 2.4 *FcFBA* 基因在 RNAi 后的表达变化

对虾肝胰腺 *FcFBA* 基因在干扰后的相对表达量结果显示, 与对照组相比, 干扰组 *FcFBA* 基因的

```

1                                     M T T Y
1  cgcgatccacagcctactgatgatcagtcgatggaaaaacagcgtcgctagccacggctcacagccacatcagatccaccATGACTACTTA
5  F T Y P E P A L R E E L R R I A N A I V A P G K G I ┌ A A └ D
91 CTTCACTACCCGAGCCAGCCCTCCGCGAGGAGCTGAGGAGGATTGCCAATGCCATCGTCCGCTCCCGGCAAGGGCATCCTGGCTGCCCA
151 E S V S T M G K R L A D I N V E N T E E N R R K Y R Q L L F
181 CGAGTCTGTCTCCACCATGGGCAAGCGCTGGCTGACATCAACGTCGAGAACAACCTGAGGAGAACCAGCGCAAGTACCGCCAGCTCCTCTT
65 T A D K T V A D N I P G V I L F H E T L Y Q K A D D G T P L
271 CACCGTGACAAGACCGTAGTGACAACATCCCTGGCGTGATCCTCTCCACGAAACCTTTACCAGAAGGCCGATGATGAACTCCCT
95 V N L I K E K G I I P G I K V D K G V V P L M G S E G E S T
361 GGTAACTCATCAAGGAGAAGGGCATCATTCCCGCATCAAGGGTTGACAAAGTGTGTCCCTCATGGGATCTGAAGCGAGAGCAC
125 T Q G L D D L S Q R C A Q Y K K D G C D F A K W R C V L K I
451 AACCCAGGGTCTTGATGACCTCTCCAGCGTTGTGCTCAGTACAAGAAGGACGGCTGTGACTTCGTTAAGTGGCGTGTCTCTGAAGAT
155 G K N T P S Y Q G M L E N A N V L A R Y A S I C Q M N G L V
541 TGGCAAGAATACCCAGCTACCAGGGCATGTTGGAGAAGCCAAATGTCTCGCTCGTATGCCTCCATCGCCAGATGAATGGTCTTGT
185 P I V E P E V L P D G E H D L D R A Q K V T E T V L A F V Y
631 TCCTATTGTGAGCTGAGGTCTTCCCGATGGTGAGCAGCCTGGACCGTGACAGAAGGTGACTGAGACCGCTCTGGCCTTTGTGTA
215 K A L N D H H V Y L E G T L L K P N M V T A G Q S C P K K Y
721 CAAGGCTCTGAATGATCACCACGTGTACCTTGAGGGCACCTCTCAAGCCCAACATGGTCACTGCTGGTCACTCTGCCCAAGAAATA
245 T P Q E V A K A T V V A L S R T M P A A V P G V T F L S G G
811 CACTCCCAGGAGTGTGTAAGGCCACAGTGGTGTCTTTCCCGACCATGCCCGTGTCTCTGGCGTACCTCTCTCTGGTGG
275 Q S E E E A S V H L D A I N K S T D A K K P W A L T F S Y G
901 TCAGTCTGAGGAAGAGGCCCTCAGTCCATCTTGATGCTATTAACAAGAGCACTGATGCTAAGAAGCCATGGGCTTACCTCAGTATGG
305 R A L Q A S V L R A W G G K D E N V K A G Q E E L M K R A K
991 TCGCGTCTCCAGGCTTGTCTCAGGGCATGGGTGGCAAGGATGAGAACGTCGAAGGCTGGCCAGGAGAACTCATGAAGCGGCCAA
335 A N G D A S L G K Y E W G S C K G Y A G D A G L F I K D H A
1081 GGCTAATGGTGATGTTCTCTCGGCAAGTACGAATGGGGCTCATGAAGGGCTACGCTGGTGACGCTGGACTCTTCATCAAGGATCACGC
365 Y *
1171 TTAATAAGagaacgtcaaggctggccaggaggaactcatgaagcgcgcaaggctaatggatgcttctctcgccaagtacgaatgggg
1261 ctcatgcaagggtcagcctggtagcctggactcttcatcaaggatcacgcttactaagtccttcccaacgacaagcaagtaagatct
1351 catatctccgacagatgttggggaattattatcttggagcgcctgtagctatccctaaaaatcatgtacagttcgacattaaattcac
1441 ataccctttgccagaggatttaggtctcaaccagatgattttagtctgggatcatcacgctcaggtctaaataatgttaagcagttttt
1531 tgatcggtgatttagaatgtacctgttaattgtaactgtagctgatttttaagtccaacaacagctgtgctaaatgctaaaga
1621 cataatagtaataaaacagattataatagaaatgactattgaagtatcaataatcttttatctcatcttaactcttgaattcc
1711 atattcatctcagatgtgttgaataaattctgtgtcttttggtagcttcttctgtgaaacaagatggaaggctcaggaaacgagaaaa
1801 agagagtaaccggttgaaaagaaatcaagtaactgtgcttccattctttgtacgcgaggttcgaaccaaaatcttgggtctctca
1891 tgtctggctcccttgcaataagaatttttttttaagaataataacagcaagaagaatcgacttattatgtgtccactgtatttata
1981 tattatcatgtgctgtagttatttgcgaagggcagtttaaagaagcaggtaaaggacagatacaaaaagtgtcggttcagcacctgtg
2071 tgagagtcagctatgtatatactttgtatagaatgaagtgtatagatattgtattgttattgagcctgtggtatgttgaatca
2161 tgccatagcgaagagaagtcttatcagttgttcaataggagcagtgtaacaaaaaaataaattgtgataaaaagtgttgaaaaagt
2251 catctatttaattataaaagattcattggcagatccttatacagtttcacttttaataattttttattgtttattttttatcatgg
2341 ctctttctgtgtaagactgatttttttttttttttttaatacatgatttatgaaaaggtcctaataattttttgatgatgcacgaa
2431 acaataaataatattatgtattgttcggggaaaaaatacatataaaactaaaaaataaaaaa

```

图 1 *FcFBA* cDNA 全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the *FcFBA* gene

起始密码子和终止密码子用下划线表示, 保守位点用框表示

The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are underlined. The conserved active sites and their codons are boxed

表达量表现出先上调再下调的趋势, 感染后 6 h 干扰组 *FcFBA* 表达为对照组 1.8 倍( $P>0.05$ ), 24 h 干扰组的表达量达到最低, 为对照组的 0.28 倍( $P<0.05$ ) (图 4A)。

### 2.5 干扰后对虾感染 WSSV 的死亡率

dsRNA 干扰组和 PBS 对照组在干扰以后 24 h 再进行 WSSV 病毒感染实验, 共持续 9 d。感染后的死亡结果显示, 各组累计死亡率均为 100% (图 4B)。对照组中, 在感染后 48 h 开始出现死亡个体。干扰组中, 感染后 24 h 出现 1 尾死亡对虾, 但没有表现出白斑症状, 推测原因是注射后由于对虾自身的抵抗力弱而导致的死亡。从感染后 42 h 开始, 2 组出现的死亡个体都具有明显的白斑症状。

### 3 讨论

本研究是醛缩酶在对虾中的首次系统研究, 克隆的 *FcFBA* 基因 ORF 全长为 1098 bp, 编码 365 个氨基酸。序列分析表明, 其含有醛缩酶的保守功能位点, 包含 I 型醛缩酶的功能位点 Lys<sub>231</sub>。氨基酸的进化分析表明, 该醛缩酶基因与其他节肢动物的醛缩酶基因明显聚为一类。ORF 序列分析、蛋白保守位点分析及蛋白的系统进化分析均表明, *FcFBA* 基因与其他物种的醛缩酶具有较高的相似性, 因此, 确定本研究克隆的 *FcFBA* 基因为中国明对虾的醛缩酶基因。

自然界中存在 2 种不同机制的醛缩酶: I 型和 II 型, 前者存在于高等真核生物尤其是动物和高等植物中, 它们能在底物的羰基和自身活性部位的赖氨酸之

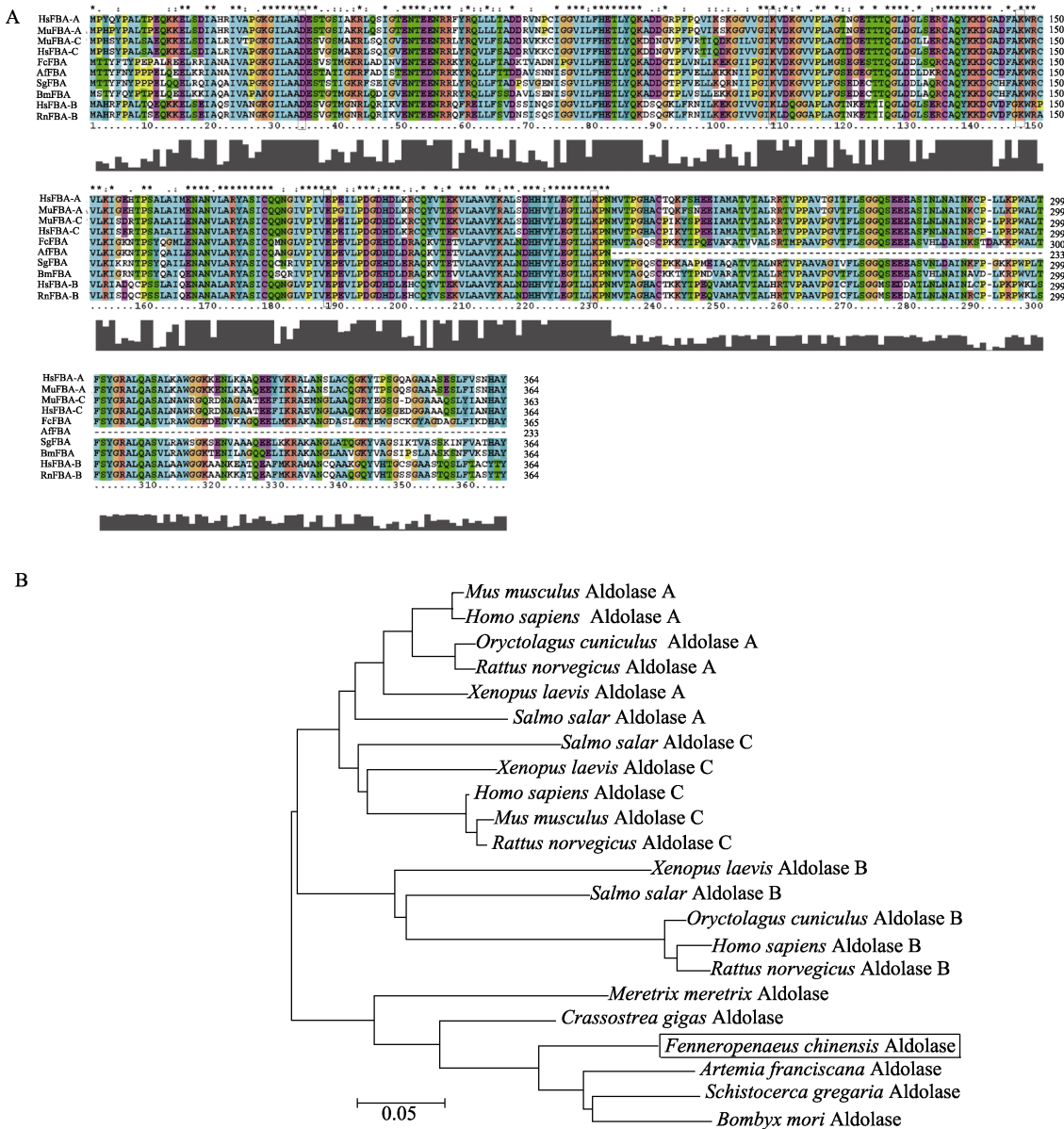


图 2 FcFBA 的氨基酸序列比对(A)及系统进化分析(B)

Fig.2 The analysis of amino acid sequence (A) and phylogenetic tree analysis (B) of FcFBA from various species

A: 氨基酸序列比对, 序列如下: 人的 A 型醛缩酶(HsFBA-A, AAH16800), 小鼠的 A 型(MuFBA-A, AAH89495), 人的 C 型(HsFBA-C, AAC09348), 小鼠 C 型(MuFBA-C, NP\_033787), 人的 B 型(HsFBA-B, BAA00125), 大鼠 B 型(RnFBA-B, CAA26156), 中国明对虾(FcFBA, KJ686589), 家蚕(BmFBA, NP\_001091766), 沙漠蝗(SgFBA, AEV89754), 卤虫(AfFBA, ACH81781)

A: The amino acid sequence: *Homo sapiens* aldolase A (HsFBA-A, AAH16800), *M. musculus* aldolase A (MuFBA-A, AAH89495), *H. sapiens* aldolase C (HsFBA-C, AAC09348), *M. musculus* aldolase C (MuFBA-C, NP\_033787), *H. sapiens* aldolase B (HsFBA-B, BAA00125), *Rattus norvegicus* aldolase B (RnFBA-B, CAA26156), *F. chinensis* aldolase (FcFBA, KJ686589), *B. mori* aldolase (BmFBA, NP\_001091766), *S. gregaria* aldolase (SgFBA, AEV89754), and *A. franciscana* aldolase (AfFBA, ACH81781)

间形成一个西弗碱中间物(Schnarrenberger, 1990); 后者则存在于真核绿藻、真菌以及原核细菌中, 催化裂合反应的时候需要一个二价的过渡态金属离子如  $Zn^{2+}$ (Rutter, 1964)。脊椎动物中, I 型醛缩酶分为 3 种组织特异性的同工酶: A 型、B 型和 C 型。A 型

在肌肉中表达, B 型在肝脏、肾脏、胃及肠道中表达, 而 C 型则在脑、心脏及卵巢中表达(余南等, 2005)。这些同工酶有不同的催化功能: 3 种同工酶都参与糖酵解, B 型相对于 A 型和 C 型来说, 又参与糖异生。在本研究中, *FcFBA* 基因在肌肉中的表达量最高, 暗

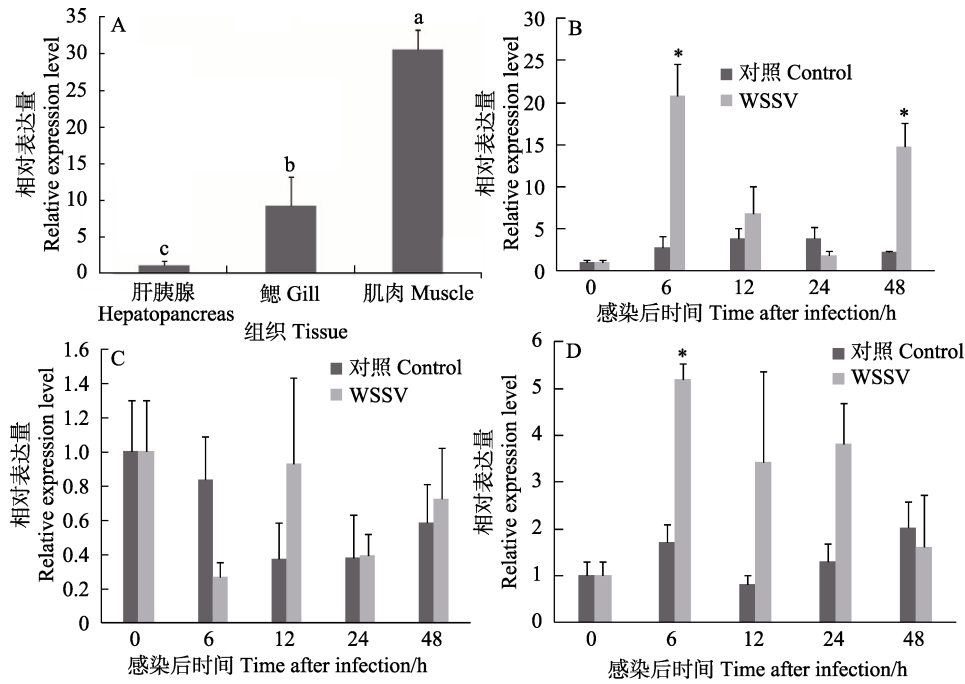


图 3 *FcFBA* mRNA 的组织表达

Fig.3 The expression profiles of *FcFBA* mRNA in hepatopancreas, gill and muscle

A: 正常组织; B: 感染后肝胰腺; C: 感染后鳃; D: 感染后肌肉  
 A: Control shrimp, B: Hepatopancreas post WSSV challenge; C: Gill post WSSV challenge; D: Muscle post WSSV challenge

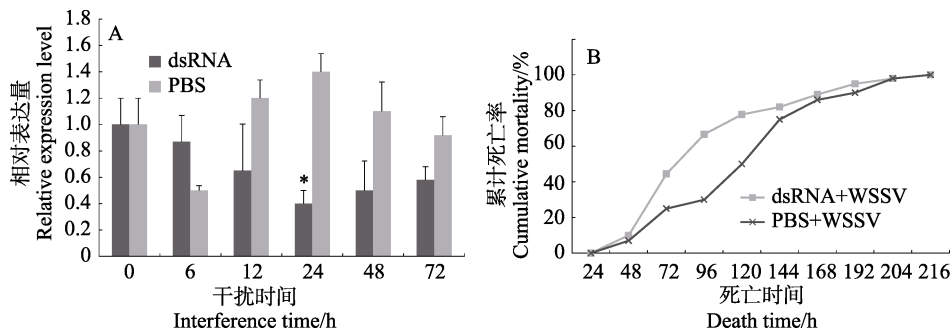


图 4 dsRNA 注射后的死亡率及干扰后 *FcFBA* 基因的表达

Fig.4 The mortality of shrimp after dsRNA injection and the *FcFBA* expression after RNAi

A: 干扰后的基因表达变化; B: 累计死亡率  
 \*表示实验组和对照组之间差异显著( $P<0.05$ )

A: Expression profile after RNAi; B: Mortality of shrimp

\* indicated the difference between experiment and control group was statistically significant ( $P<0.05$ )

示中国明对虾的醛缩酶是 A 型醛缩酶。

本研究还分析了对虾在感染 WSSV 后该基因的表达趋势。结果显示,肝胰腺和肌肉中该基因出现了明显的上调表达,其中,肝胰腺对 WSSV 感染最敏感,说明 WSSV 对该基因是一个明显的刺激,这和已有的研究报道结果一致。有学者在中国明对虾感染 WSSV 后获得的差异表达基因中,发现了醛缩酶基因的表达量在感染后的 6 h 提高了 100 多倍(Wang *et al.*,

2006),凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在感染 WSSV 后,醛缩酶基因的表达在 6 h 和 36 h 显著上调,在感染后 12 h 则下调(Wang *et al.*, 2007)。以上结果表明,该基因与对虾抗 WSSV 有关,在对虾抗病中起作用,为对虾抗病相关基因。

已有研究显示,利用 dsRNA 干扰对任何一个基因产生的敲降作用为正常基因表达水平的 10%~40% (Collins *et al.*, 2005)。据报道,目的基因 dsRNA 的注



射量在一定范围内与干扰效率呈正相关,一旦超出这一范围,干扰效果将不再增加,可能原因是目标基因 mRNA 结合的 siRNA 已达到饱和。Robalino 等(2004)将体外转录获得的 WSSV 的外壳蛋白 VP19 的编码基因的 dsRNA 导入凡纳滨对虾体内,发现不同剂量的 dsRNA 抑制病毒的效率有很大的差别。注射 10  $\mu\text{g}$  特异 dsRNA 时,对虾的保护率是 81%;注射 1  $\mu\text{g}$  时,保护率是 72%,而注射 0.1  $\mu\text{g}$  保护率仅为 29%。此外,不同物种 dsRNA 的有效注射量是不同的,如蜜蜂中 dsRNA 的注射量为每克软体重 50  $\mu\text{g}$ ,对虾的注射量为 15  $\mu\text{g}$  (Robalino *et al.*, 2004);太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)以每克软体重注射 20  $\mu\text{g}$  dsRNA 时,产生的干扰效率为 80%,而当每克软体重注射量为 4~5  $\mu\text{g}$  时,干扰效率为 14%(Fabioux *et al.*, 2009)。在对虾基因干扰的研究中,很多学者采用 1  $\mu\text{g/g}$  的剂量进行注射,取得了较好的结果。本研究通过前期对不同干扰计量的摸索发现,注射 dsRNA 的浓度为 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  时(按照体重估算是 1  $\mu\text{g/g}$ ),干扰效果最好(未发表数据)。研究人员发现,长 dsRNA 引起靶基因的沉默效率要高于短 dsRNA,一般情况下,体外合成 dsRNA 的长度不小于 300 bp (Robalino *et al.*, 2004),无脊椎动物对长 dsRNA 的吸收率高于短 dsRNA,因此,本研究设计的 dsRNA 为 600 bp 左右,符合基因干扰实验对长度的要求。与 PBS 对照组相比,醛缩酶基因在干扰以后表达量随时间下降,尤其是在干扰后 24 h, dsRNA 注射组的基因表达量显著低于对照组,说明干扰成功。同时,通过干扰后对虾的死亡率比较,发现干扰对虾在 WSSV 感染后,明显提高了死亡速度。

本研究首次在中国明对虾中获得了醛缩酶基因的全长 cDNA 序列,分析了 WSSV 感染后,该基因在不同组织中的表达特征,并进一步通过基因干扰结果分析,推断该基因可能在对虾抗病中起作用,但其在病毒感染后的作用机制仍需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- Cao JW, Kong J, Luo K, *et al.* Immune priming response induced by heat-inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* at different temperature. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 128–136 [曹家旺, 孔杰, 罗坤, 等. 热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在不同温度下的免疫致敏反应. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 128–136]
- Cao TT, Bai JJ, Yu LY, *et al.* Polymorphisms of SNPs in ALDO B gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 481–488 [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 多态性及其与生长性状的关联分析. *水产学报*, 2012, 36(4): 481–488]
- Cieřla M, Mierzejewska J, Adamczyk M, *et al.* Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843(6): 1103–1110
- Collins RE, Cheng XD. Structural domains in RNAi. *FEBS Letters*, 2005, 579(26): 5841–5849
- Dawson NJ, Biggar KK, Storey KB. Characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase during anoxia in the tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*: An assessment of enzyme activity, expression and structure. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68830
- De-Simone SG, de Salles CM, Batista e Silva CM, *et al.* Purification and amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the electric organ of *Electrophorus electricus* (L.). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2006, 61(11–12): 884–888
- Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, *et al.* *In vivo* RNA interference in oyster-*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 2009, 276(9): 2566–2573
- Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, *et al.* Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 2140–2151
- Haake V, Geiger M, Walch-Liu P, *et al.* Changes in aldolase activity in wild-type potato plants are important for acclimation to growth irradiance and carbon dioxide concentration, because plastid aldolase exerts control over the ambient rate of photosynthesis across a range of growth conditions. *Plant Journal*, 1999, 17(5): 479–489
- He YD, Zhang XB. Comprehensive characterization of viral miRNAs involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *RNA Biology*, 2012, 9(7): 1019–1029
- Lew CR, Tolan DR. Aldolase sequesters WASP and affects WASP/Arp2/3-stimulated actin dynamics. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2013, 114(8): 1928–1939
- Lew CR, Tolan DR. Targeting of several glycolytic enzymes using RNA interference reveals aldolase affects cancer cell proliferation through a non-glycolytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(51): 42554–42563
- Li XY, Bai JJ, Yu LY, *et al.* Association analysis between mutation of aldolase A 3'-UTR and growth traits in *Ctenopharyngodon idella*. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 13–16 [李玺洋, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼醛缩酶 A3'-UTR 突变与生长性状相关研究. *淡水渔业*, 2012, 42(5): 13–16]
- Lightner DV. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique*, 1996, 15(2): 579–601
- Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, *et al.* Structure, function and evolution of the Archaeal class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32(2): 259–263
- Robalino J, Browdy CL, Prior S, *et al.* Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology*, 2004, 78(19): 10442–10448
- Rodaki A, Young T, Brown AJP. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: Implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(8): 1371–1377
- Rutter WJ. Evolution of aldolase. *Federation Proceedings*, 1964, 23: 1248–1257
- Schnarrenberger C. Characterization and compartmentation, in

- green leaves, of hexokinases with different specificities for glucose, fructose, and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta*, 1990, 181(2): 249–255
- Van den Berghe G. Inborn errors of fructose metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 1994, 14: 41–58
- Wang B, Li FH, Dong B, *et al.* Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(5): 491–500
- Wang C, Wang HX, Li Y, *et al.* Identification of a fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene and association of the single nucleotide polymorphisms with growth traits in the clam *Meretrix meretrix*. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 5017–5024
- Wang HC, Wang HC, Leu JH, *et al.* Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(7): 672–686
- Yang F, He J, Lin XH, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811–11820
- Yang JY, Chang CI, Liu KF, *et al.* Viral resistance and immune responses of the shrimp *Litopenaeus vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins. *Immunology Letters*, 2012, 148(1): 41–48
- Yu N, He A, Li ZY, *et al.* Characterization and analysis of *Toxoplasma gondii* aldolase gene and intron. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2005, 21(7): 580–583 [余南, 何蔼, 李卓雅, 等. 刚地弓形虫醛缩酶基因及其内含子的分析. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(7): 580–583]

(编辑 马璀璨)

## cDNA Cloning of the *FBA* Gene in *Fenneropenaeus chinensis* and Its Expression and Functional Analysis After WSSV Infection

SHI Xiaoli<sup>1,2</sup>, MENG Xianhong<sup>1,2①</sup>, KONG Jie<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>1,2</sup>, LUO Kun<sup>1,2</sup>,  
CAO Baoxiang<sup>1,2</sup>, CAO Jiawang<sup>1,2</sup>, CHEN Baolong<sup>1,2</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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) is a key glycolytic enzyme involved in both the glycolytic and gluconeogenic pathways. In the present study, fructose-1,6-bisphosphate aldolase from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* (*FcFBA*) was cloned and sequenced. The full-length complementary DNA (cDNA) sequence of *FcFBA* is 2496 bp long, which contains a 79-bp 5'-untranslated region (UTR), 1319-bp 3'-UTR, and 1098-bp open reading frame, encoding a polypeptide of 365 amino acids with a molecular mass of 39.8 kDa and a theoretical isoelectric point of 6.6. Multiple sequence alignments showed the high similarity of *FcFBA* with the aldolases of other arthropods. Phylogenetic analysis showed that *FcFBA* of shrimp belonged to the same class as that of other arthropod aldolases. The transcript of *FcFBA* showed the highest expression in the muscle and lowest expression in the hepatopancreas, which indicates that *FcFBA* is similar to the muscle type (type A) aldolase that acts in the glycolytic pathway. The expression profile of *FcFBA* in the hepatopancreas, gills, and muscle was modulated when the shrimp were stimulated by white spot syndrome virus (WSSV), which resulted in differential expression of *FcFBA*. Further, RNA interference (RNAi) was used to analyze the role of *FcFBA*. After RNAi, the mortality of shrimp after WSSV infection was altered compared with that after phosphate-buffered saline injection. Within 24 h of RNAi, the expression level of *FcFBA* was significantly down regulated. These results show that *FcFBA* is inducible and might be involved in the immune response of shrimp.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene; Cloning; Expression; RNA interference

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn