

# 氨氮胁迫下中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)谷氨酸脱氢酶基因的表达分析\*

何玉英<sup>1,2</sup> 李少飞<sup>3</sup> 王清印<sup>1</sup> 李 健<sup>1,2①</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;

3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

**摘要** 采用 RACE 技术克隆获得中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)谷氨酸脱氢酶 GDH 基因(*FcGDH*)。FcGDH 基因全长 1779 bp, 包括 1 个 1659 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 552 个氨基酸, 预测分子量大小为 61.3 kDa, 理论等电点为 6.54。同源性分析显示, FcGDH 氨基酸序列与其他动物高度保守, 其中, 与凡纳滨对虾最为相似, 高达 98%, 其次为中华绒螯蟹, 为 89%。系统进化树分析显示, FcGDH 氨基酸序列与凡纳滨对虾 GDH 聚为一支, 之后依次为: 中华绒螯蟹、黑腹果蝇、埃及按蚊。组织表达分析发现, FcGDH 基因在肌肉、鳃、肝胰腺、胃、肠、淋巴和血淋巴中均有表达, 其中, 肌肉中表达量最高。氨氮胁迫后, FcGDH 基因在肌肉和肝胰腺组织中变化显著, 在胁迫后期, FcGDH 基因表达量均上调, 且与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), 说明 FcGDH 基因在氨氮解毒代谢过程中发挥了重要作用。

**关键词** 中国明对虾; 谷氨酸脱氢酶; 基因克隆; 基因表达; 氨氮胁迫

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0083-09

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的海水养殖种类, 具有较高的经济价值。在中国明对虾养殖中, 由于过量投饵、施肥以及排泄物的积累, 尤其是温度和 pH 值上升致使水体中氨氮升高, 中国明对虾长期生活在高  $\text{NH}_3$  浓度的水体中, 影响体内氮废物的排泄及氮代谢。若  $\text{NH}_3$  从水体渗入组织液内, 就会形成血氨中毒(乔顺风等, 2006)。作为水产养殖环境中普遍存在的一种有毒物质, 氨氮是重要的环境胁迫因子, 影响对虾的呼吸(Chen *et al.*, 1993)、代谢(Chen *et al.*, 1994)、免疫(Cheng *et al.*, 2002)、渗透调节(Chen *et al.*, 2000)、排泄(Chen *et al.*, 1992)及蜕皮和生长(Koo *et al.*, 2005), 甚至会导致死亡(王娟等, 2007)。

谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH)

是一种利用 NAD 或 NADP 辅助因子, 催化谷氨酸氧化脱氨基转变成  $\alpha$ -酮戊二酸的线粒体酶(Nisman, 1954; Frieden, 1963; Pahlich *et al.*, 1971; Smith *et al.*, 1975), 产物为氨, 该反应为可逆反应, 在动态反应中, 谷氨酸的形成超过氨的形成(即在上述反应式中  $\Delta G_0 \approx 30 \text{ kJ/mol}$ ), 氨的浓度越高, 毒性越大, 因此, 这个平衡点在生理学上至关重要。

微生物和动植物对氨的同化作用主要是依靠 GDH 和谷氨酰胺合成酶(GS)的联合作用, 20 世纪 70 年代, 学者们先后发现细菌(Tempest *et al.*, 1970)和植物(Lea *et al.*, 1974)可分别利用 GDH 或 GS 来完成氨氮的代谢。动物中, GDH 将氨氮转化成谷氨酸加以储存是氨氮解毒的一种重要途径。此外, Pennington 等

\* 国家虾现代产业技术体系项目(CARS-47)、泰山产业领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)、鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和国家自然科学基金项目(31172401)共同资助。何玉英, E-mail: heyiy@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-08-17, 收修改稿日期: 2015-10-19

(2003)在埃及按蚊体内发现一种脯氨酸循环,能够短暂地将氨基酸脱氨基产生的氨氮衍生物转化为无毒物质加以储存。Scaraffia等(2005)研究指出, GDH催化形成谷氨酸反应(去氨化方向)在合成脯氨酸、维持脯氨酸循环方面十分重要。Iwata等(1981)在研究弹涂鱼的氨氮解毒途径时发现, GDH(去氨氮方向)在硬骨鱼类尿素合成中起着关键作用,且去氨氮方向的酶活显著高于哺乳类的(Wilson, 1973; Walton *et al.*, 1977)。甲壳动物中关于 GDH 基因的全长克隆较少, Li 等(2009)对凡纳滨对虾的 GDH 基因的克隆发现, 凡纳滨对虾体内存在 2 种 GDH 基因, GDH A 和 GDH B, 二者前 462 个氨基酸序列完全相同; Wang 等(2012)对中华绒螯蟹的 GDH 基因进行了克隆, 该基因开放阅读框长度为 1695 bp, 编码 564 氨基酸。此外, 熊泽泉(2010)<sup>1)</sup>还对 5 种十足目甲壳动物的 GDH 序列进行了部分克隆, 发现 GDH 氨基酸序列十分保守, 在真核生物中均存在一段氨基酸序列-GGVTVs。

本研究利用本实验室中国明对虾转录组测序所得的 GDH 基因片段, 采用 RACE 技术, 克隆获得该基因的 cDNA 全长序列, 并对其在氨氮浓度胁迫下的组织表达规律进行初步研究, 探究其在氨氮代谢过程中的作用, 为中国明对虾健康养殖提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采用中国水产科学研究院黄海水产研究所培育的中国明对虾“黄海 3 号”, 体长为(9.27±0.37) cm, 体重为(10.48±1.40) g。实验前 7 d 将中国明对虾“黄海 3 号”放入 200 L 的 PVC 桶中暂养, 每桶 20 尾。暂养期间, 养殖水温控制在(25.0±1.0)℃, 盐度为 28, pH 为 8.5±0.2, 持续充气, 每天换水 1/3, 投喂配合饲料。TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购于 Clontech 公司; DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂和 pMD18-T 载体以及大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 氨氮胁迫实验

氨氮胁迫实验共设 2 组, 氨氮浓度设置参照王娟等(2007), 分别为对照组(养殖池塘海水)和氨氮胁迫组(16 mg/L)。采用奈氏试剂法测定氨氮浓度, 实测值

分别为(1.147±0.123) mg/L 和(16.651±0.546) mg/L。实验组采用浓度为 1 g/L 的 NH<sub>4</sub>Cl 溶液进行调整。将暂养的健康中国明对虾随机移入各实验组中, 每组 3 个平行, 每个平行 20 尾对虾, 实验期间每天换水 1 次, 换水量在 2/3 以上, 换水后重新胁迫。每天早、中、晚各投喂颗粒饲料 1 次。各组分别于胁迫后的 1、3、6、12、24、48、72 h 取肌肉和鳃组织, 每个时间点取 6 尾, 液氮保存, 用于 RNA 提取。

### 1.3 cDNA 全长的克隆及测序

根据本实验室 454 转录组测序所得的 GDH 基因片段, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物, 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

提取健康中国明对虾肌肉组织的 RNA, 使用 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 制备 RACE cDNA 模板。3'和 5'末端扩增使用 Advantage 2 PCR Kit 进行。3'RACE 使用引物 GDH3'-1(表 1)和通用引物 UPM 配对进行 3'端扩增; 5'RACE 使用引物 GDH5'-3(表 1)和通用引物 UPM 进行 5'端扩增。反应程序: 94℃ 3 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, 30 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。3'和 5'RACE 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD18-T 载体连接, 重组质粒转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后, 送上海桑尼生物科技有限公司测序。

### 1.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成

中国明对虾各组织总 RNA 提取利用 TRIzol 试剂, 方法参照 Invitrogen 说明书; 核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。使用 DNase I RNase-free (Fermentas) 试剂盒处理提取的总 RNA, 以去除 DNA 污染。

cDNA 合成体系(20 μl): 10 μl 总 RNA, 2 μl Oligo DT(50 μmol/L), 72℃ 水浴 5 min, 冰浴 2 min, 离心数秒使溶液聚集于底部。之后向管中依次加入 1.0 μl dNTP Mixture(each 10 mmol/L)、5×M-MLV Buffer 4.0 μl、0.5 μl RNase Inhibitor(40 μl/ml, TaKaRa)和 1.0 μl M-MLV 反转录酶(TaKaRa), 用 DEPC 补足体积; 42℃ 孵育 1 h; 72℃ 孵育 15 min; 4℃ 孵育 20 min。合成的 cDNA 用于中国明对虾 GDH 基因的 Real-time PCR 检测。

1) 熊泽泉. 十足目(Crustacea: Decapoda)经济甲壳动物谷氨酸脱氢酶基因的研究. 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2009, 13-30

## 1.5 序列分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序所得结果进行载体序列去除, 然后用 EditSeq 程序进行开放阅读框的预测并翻译氨基酸。中国明对虾谷氨酸脱氢酶(*FcGDH*)基因的核苷酸序列和推导氨基酸序列使用 BLAST(<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对。利用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白质理化性质预测。利用 SignalP3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽的预测。利用 NCBI 的保守结构域(CDD)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守结构域和特殊位点的预测。利用 NetNGlyc 1.0 Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)进行 N-糖基化位点的预测。运用 DNAMAN 进行多重序列比对。利用 MEGA 4.0 软件, 以邻接法(Neighbor-joining)构建系统进化树。

## 1.6 *FcGDH* 组织分布特征的分析

分别根据中国明对虾 18S rRNA 和 *FcGDH* 基因, 设计正反引物(18S-F/R 及 GDH-Primer F/R) (表 1), 用于 Real-time PCR 检测。按照前述选择 6 尾健康的中国明对虾, 取其肌肉、鳃、肝胰腺、胃、肠、淋巴及血淋巴保存于液氮, 用于各组织 RNA 的提取并反转录合成 cDNA。取不同组织 cDNA 各 1  $\mu$ l, 利用 Real-time PCR 对不同组织中 *FcGDH* 的表达情况进行检测。以 18S rRNA 作为内参基因, 反应体系为 20  $\mu$ l: 10  $\mu$ l SYBR® Premix ExTaq™ II ( $\times 2$ ), 0.8  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 引物 GDH Primer F, 0.8  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 引物 GDH Primer R, 0.4  $\mu$ l ROX Reference Dye II ( $\times 50$ ), 2.0  $\mu$ l cDNA, 6.0  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算 *FcGDH* 基因的相对表达量, 用 SPSS 11.0 软件进行分析。

表 1 本研究所用引物序列  
Tab.1 Sequences of the primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
GDH3'-1	ATGGACCTACGACCCCGCTGCTGAC
GDH5'-3	TGCCACCTTGTTGATGGGCTTGC
GDH Primer F	GGCTTTGGTAATGTCGGTCTT
GDH Primer R	ATAGCAGCAGGAATGAGGATGT CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA
UPM-5'	GTGGTATCAACGCAGAGT
18S-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC
18S-R	TTCTCCATGTCGTCCCAGT

## 1.7 氨氮胁迫下 *FcGDH* 基因的表达变化分析

分别提取胁迫后各实验组不同时间中国明对虾肌肉和鳃的总 RNA, 逆转录合成 cDNA。取各个稀释后的 cDNA 样品 1  $\mu$ l, 18S rRNA 基因作为内参, 以 40 个循环扩增目的基因和内标基因片段, 检测不同浓度氨氮胁迫下中国明对虾鳃和肌肉中 *FcGDH* 基因的表达量。反应体系、反应程序、数据处理及分析同上所述。

## 2 结果

### 2.1 *FcGDH* 基因 cDNA 的克隆与序列分析

采用 RACE 方法扩增获得 *FcGDH* 基因全长 cDNA, GenBank 登录号: KF781120。GDH 基因全长 1779 bp, 包括 1 个 1659 bp 的开放阅读框(ORF)、40 bp 的 5' 端非编码区(UTP)和 80 bp 的 3'非编码区, 其中包括 1 个终止密码子(TAA)和 PolyA 尾。

氨基酸序列分析(图 1)显示, *FcGDH* 编码 1 个由 552 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 61.3 kDa, 理论等电点为 6.54。该序列包含 2 个超家族结构, 分别为 ELFV dehydrog N 和 NAD bind amino acid DH, 含 10 个 NAD(P)结合位点、4 个 GDP 结合位点和 14 个 GLFV 脱氢酶活性位点; 同时, SignalP3.0 预测显示, 此氨基酸序列 N 端前 29 个氨基酸组成信号肽, 信号肽的断裂点位于第 29-30 之间。

### 2.2 *FcGDH* 氨基酸序列比对及同源性分析

使用在线软件 BLAST 对 *FcGDH* 基因编码的氨基酸序列与其他物种的 GDH 氨基酸序列进行同源性比较, 结果显示, 与甲壳类的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)最为相似, 同源性分别为 98%和 89%。与节肢动物黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和埃及按蚊(*Aedes aegypti*)的同源性分别为 78%和 74%。与脊椎动物 GDH 氨基酸序列的同源性也很高, 如与泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、小家鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性分别为 75%、74%和 70%。

利用 DNAMAN 软件将 *FcGDH* 氨基酸序列与其他物种的氨基酸序列比对发现, *FcGDH* 氨基酸具有 9 个 GLFV 脱氢酶家族保守活性位点, NAD(P)结合位点和 GDP 结合位点也显示出极高的保守性(图 2)。

### 2.3 *FcGDH* 系统进化分析

通过 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 法构建 NJ

```

1 ATCAACCGCAGGCTACATAGGGAGTCAGACGCTTGTCCGAGA ATG TTG CGG TTA GGA ACA TCC GTA GTG AGG GCC GTG GTG CAG GCC GGG GCG GCG GAG ACC 100
    M L R L G T S U U R A U U Q A G A A E T
101 CTG CTG AAG ACC AGC GCC CPT GCC GCC GGC GTG GCC AAG CGC TGG CAG GGC GAG TAC GAG CGC CAC CAG ATC CCC GAG CGC CTT GAG TAC 190
    L L K T S A P A A G U A K R M Q G D V E R H Q I P E R R L Q Y
191 ATG CCC GAC GCG GAG GAC CCT TCG TTC TTC GAG ATG GTC GAG TAC TTC TTC CAT CGC GGG TGT CAG GTT GTG GAG GAC CAG CTG GTC GAG 280
    H P D A E D P S F F E H U E Y F F H R G C Q U U E D Q L U E
281 GAG ATG AAG GAG CGT ATC CCC CTC GAG GAG AAG CGC AAC AAG ACC CGA GGC ATC CTG AAC ATC ATG GAG CCC TGC CAT CAC CTG CTG GAG 370
    E M K E R I P L E E K R N K T R G I L N I H E P C H H U L E
371 GTC GCC TTC CCC GTC AAG AGG GAC AAC GGC ACC TAC GAG ATG ATC CAC GGC TAG CGT GCC CAG CAC TCC CTC CAC CGT ACC CCG ACC AAG 460
    U A F P U K R D N G T V E H I H G V R A Q H S L H R T P T K
461 GGC GGT ATC CGT TAC TCC TTA GAC GTG TGC GCC GAC GAA GTA AAG GCT TTG TCT GCC CTG ATG ACA TTC AAG TGT TCC TGC GTG GAC GTC 550
    G G I R Y S L D U C A D E U K A L S A L M T F K C S C U D U
551 CCC TTC GGC GGT GCC AAG GCC GGT CTC AAG ATA AAC CCC AGG GAC TAC TCC ATC AAT GAG CTG GAG AAG ATC ACT CGT CGA TTC ACC CTC 640
    P E G G A K A G L K I N P R D Y S I N E L E K I T R R F T L
641 GAG TTG GCC AAG AAG GGG TTC ATT GGC CCG GGT GTG GAT GTC CCC GCA CPT GAT ATG GGG ACA GGA GAG CGG GAG ATG TCT TGG ATT GCA 730
    E L A K K G F I G P G U D U P A P D H G T G E R E H S W I A
731 GAT ACT TTC GCC AAA ACC ATT GGA CAT CTT GAC ATC AAT GCT CAT GCC TGT GTC ACG GGC AAG CCC ATC AAC CAA GGT GGC ATC CAC GGC 820
    D T F A K T I G H L D I N A H A C U T G K P I N Q G G I H G
821 CGA ACA TCT GCC ACT GGG CGA GGT GTG TTC CAC GGG CTG GAA AAC TTC ATC AAT GAG GCT TCA TAC ATG ATG GGC ATC ACT CCT 910
    R T S A T G R G U F H G L E N F I N E A S Y H S M I G I T P
911 GGA TGG GGT GGA AAA ACT TTC ATT GTG CAG GGC TTT GGT AAT GTC GGT CTT CAG AGT ATG ACA TAT CTT CAC CGT GCA GGA GCC ACT TGC 1000
    G W G G K T F I U Q G F G N U G L H S H R Y L H R A G A T C
1001 GTA GGT ATC AAG GAA GTC GAT GGC TCA ATC TAC AAC CCC AAT GGT ATT GAT CCT AAG GAA CTG GAG AAT TGG AAG ATT GAG AAT GCT ACA 1090
    U G I K E U D G S I Y N P N G I D P K E L E N W K I E N G T
1091 ATC ATG GGA TTC CCT GGT GGT GAG ACT TAC GAA GGA GAG AAC CTT CTG TAC GAG AAG TGT GAC ATC CTC ATT CCT GCT GCT ATT GAG AAG 1180
    I M G F P G A E T V E G E N L L Y E K C D I L I G A A I E K
1181 GTC ATT CAC AAG GGC AAT GCA CAT AAG ATC CAG GCC AAG ATC ATT GCT AAG GCT GCC AAT GGA CCT ACG ACC CCC GCT GCT GAC GAG ATT 1270
    U I H K G N A H K I Q A K I I A E A A N G T T T P A A D Q I
1271 CTA CAG GAC ATG AAT GTC TTG GTC ATC CCA GAT CTC TAC AAT GCT GGT GGT GTC ACT GTG TCA TAC TTT GAA TGG CTG AAG AAT CTC 1360
    L Q D M N U L U I P D L V I N A G G U T U S Y F E W L K N L
1361 AAC CAC GTG TCA TAT GGT CBT ATT ACC TTC AAA TAT GAG AGA GAA TCC AAC TAC CAT CTG TTA GAA TCT GTT CAG GAG TCT CTT GAG CCG 1450
    N H U S Y G R L T F K Y E R E S N Y H L L E S U Q E S L E R
1451 CBT TTT GGT CBT GTG GGT GGC AAG ATT CCC ATC GTG CCA TCA GAG GCT TTC CAG GAA CGC GTT TCT GGT GCA TCT GAG AAA GAT ATT GTC 1540
    R F G R U G G K I P I U P S E A F Q E R U S G A S E K D I U
1541 CAC TCT GGT TTG GAC TAC TCC ATG GAA CGC TCT GCC AGA GCC ATC ATG AGA ACT GCA ATC AAG TAT AAC TTG GGC ATT GAT CTC CBT ACT 1630
    H S G L D Y S M E R S A R A I M R T A I K Y N L G I D L R T
1631 GCT GCT TAT GTC AAT TCC ATT GAG AAG ATC TTC AAC ACC TAC AAG GAG GCT GGT CTT ACA TTC ACC TAA AATCCCTTTTGGCATATGGCAAATTCA 1727
    A A Y U N S I E A K I F N T Y K E A G L T F T *
1728 TGGCGTGTTCCTACACAGATTAAGAAAGAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1779

```

图 1 *FcGDH* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列  
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *FcGDH* gene

粗方框中 ATG 为起始密码子；\*为终止密码子；↑为信号肽切割位点；虚线为 GLFV 脱氢酶活性位点；下划线为 NAD(P)结合位点；椭圆为 GDP 结合位点；阴影为 ATP 结合位点；2 个大框中分别为 ELFV dehydrogen N super family 和 NAD bind amino acid DH super family  
Start codon (ATG) was marked with thick box. The asterisk indicated the stop codon. The cleavage site of the mitochondrial signal peptide was indicated with an arrow. The GLFV dehydrogenases active sites, NAD(P) binding sites, GDP binding sites were annotated with dotted line, underline and ellipses, respectively. The completed ELFV dehydrogen N super family and NAD bind amino acid DH super family domain were boxed

系统进化树(图 3)，进化分析显示，节肢动物门 GDH 聚类亲缘关系较近，而与脊椎动物的鱼类、爬行以及哺乳类的亲缘关系较远。不同物种 GDH 氨基酸序列比较发现，*FcGDH* 与甲壳纲的 GDH 最为相似(89%–98%)。与其他节肢动物的相似性(74%–82%)高于脊椎动物(70%–76%)。*FcGDH* 氨基酸序列与凡纳滨对虾 GDH 聚为一支，之后的聚类次序依次为中华绒螯蟹、黑腹果蝇、埃及按蚊。

2.4 *FcGDH* 基因在不同组织中的表达分析

利用 RT-PCR 分析 *FcGDH* 基因在不同组织中的表达水平，结果显示，*FcGDH* 基因在中国明对虾肌肉、鳃、肝胰腺、胃、肠、淋巴和血淋巴中均有表达，其中，肌肉中表达量最高，其次为鳃和肝胰腺，在淋巴和血淋巴中表达量最低(图 4)。

2.5 氨氮胁迫后肌肉和肝胰腺中 *FcGDH* 基因的表达分析

氨氮胁迫后中国明对虾肌肉中 *FcGDH* 基因的相

对表达量变化见图 5。结果显示，与对照组相比，胁迫过程中 *FcGDH* 基因上调，随时间变化呈上升–下降–上升的趋势，于 48 h 达到最大值，并极显著高于对照组( $P < 0.01$ )。

氨氮胁迫后中国明对虾肝胰腺组织中 *FcGDH* 基因的表达变化见图 6。3 h 之前，*FcGDH* 基因表达被抑制，表达量下调，显著低于对照组( $P < 0.05$ )；6–24 h 逐渐恢复；48–72 h 基因表达量上调，并于 72 h 达到极值，并极显著高于对照组( $P < 0.01$ )；整个胁迫过程中呈现上升的趋势。

3 讨论

3.1 *FcGDH* 基因的 cDNA 全长克隆及序列分析

GDH 是水生动物氨基酸代谢的关键酶(Willett et al, 2003)，在无脊椎甲壳动物中，仅 Li 等(2009)和 Wang 等(2012)对凡纳滨对虾和中华绒螯蟹 GDH cDNA 全长进行了克隆。本研究通过对中国明对虾转

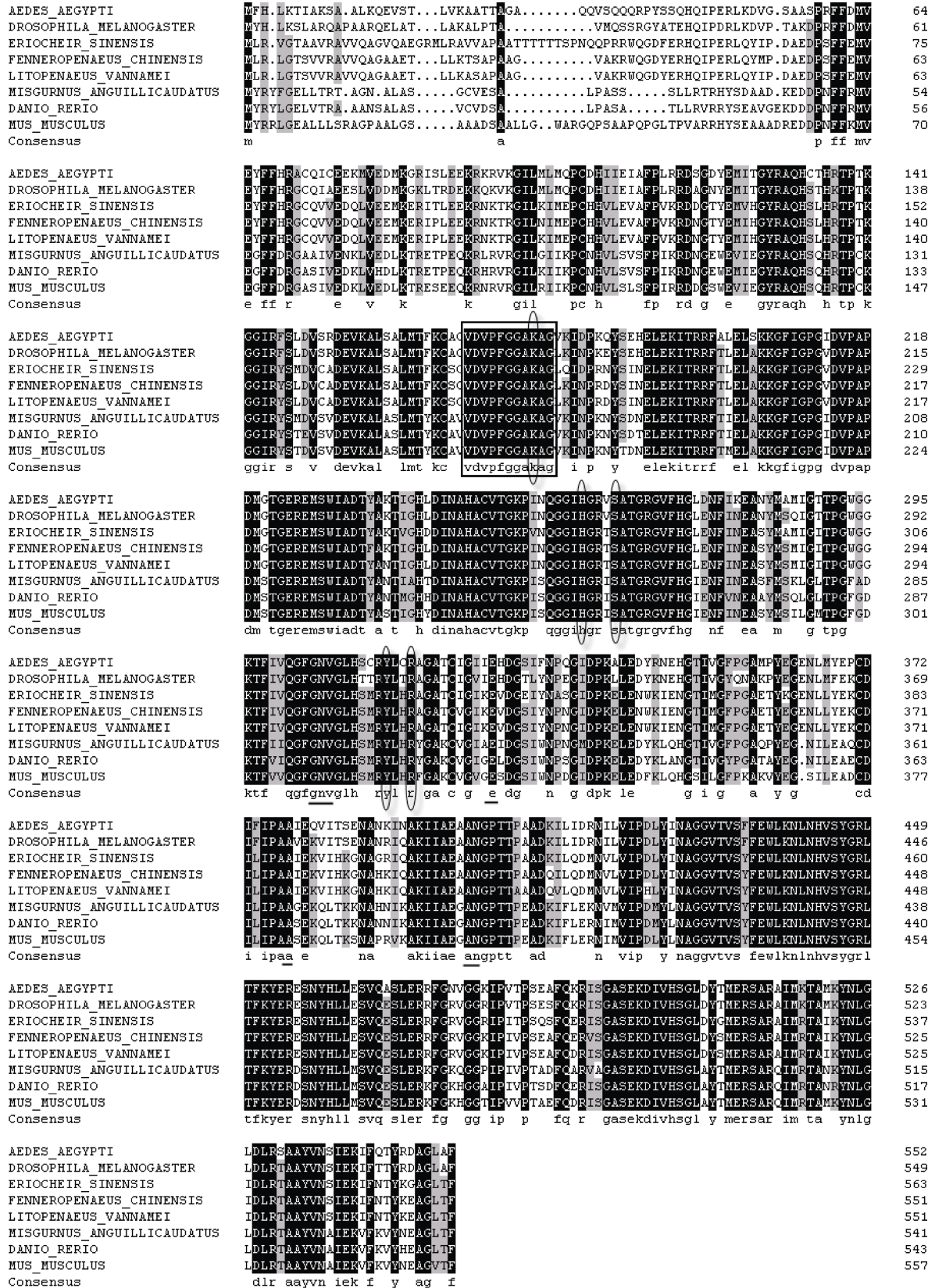


图 2 中国明对虾 *FcGDH* 氨基酸与其他物种 GDH 氨基酸序列的比较

Fig.2 Alignment of *F. chinensis* GDH amino acid sequence with those of other species

方框中为 GLFV 脱氢酶活性位点; 下划线为 NAD(P)结合位点; 椭圆为 GDP 结合位点  
Box: GLFV dehydrogenases active site; Underline: NAD(P) binding site; Oval: GDP binding site

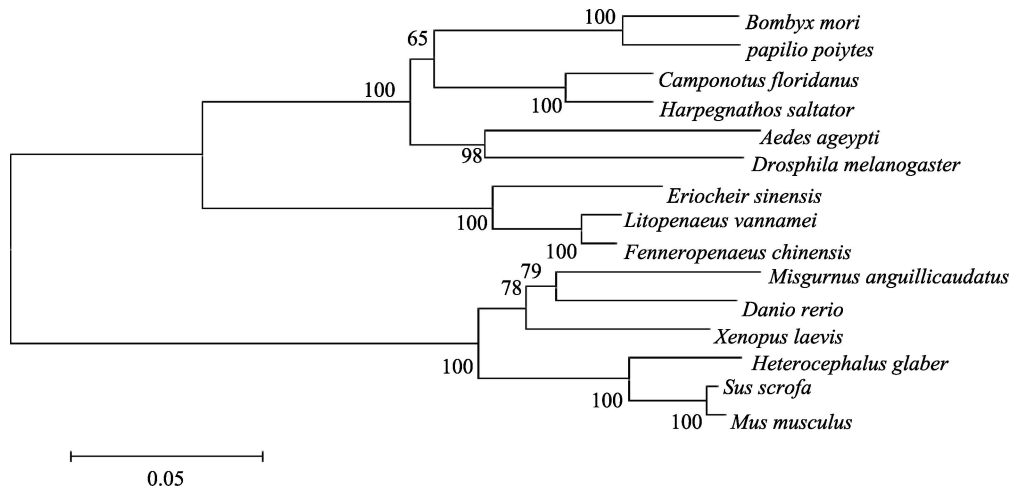


图 3 利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 GDH 氨基酸序列的 NJ 系统进化树  
Fig.3 NJ phylogenetic tree based on GDH amino acid sequences by MEGA 4.0

各物种 GOT 序列登录号: 凡纳滨对虾 *L. vannamei* (ACC95446.1)、中华绒螯蟹 *E. sinensis* (AEO72077.1)、黑腹果蝇 *D. melanogaster* (CAA82304.1)、埃及按蚊 *A. aegypti* (XP\_001660861.1)、小家鼠 *M. musculus* (NP\_032159.1)、斑马鱼 *D. rerio* (NP\_997741.1)、泥鳅 *M. anguillicaudatus* (AEX31556.1)、家蚕 *Bombyx mori* (NP\_001040245.1)、佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* (EFN70808.1)、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* (EFN77465.1)、玉带凤蝶 *Papilio polytes* (BAM20330.1)、非洲爪蟾 *Xenopus laevis* (NP\_001087023.1)、野猪 *Sus scrofa* (NP\_001231430.1)、裸鼯鼠 *Heterocephalus glaber* (EHB00320.1)

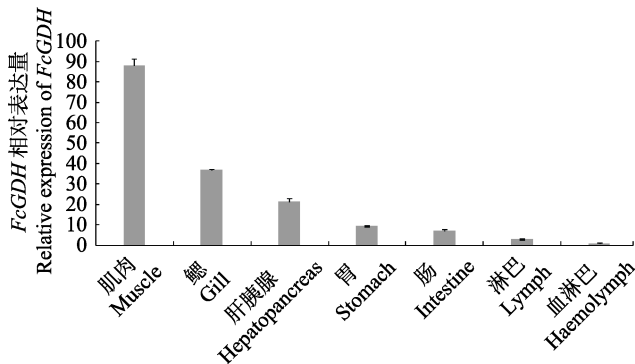


图 4 *FcGDH* 基因在不同组织中的表达  
Fig.4 *FcGDH* gene expression in different tissues

录组序列查找, 获得 GDH 基因的部分片段序列, 首次克隆获取该基因全长, 命名为 *FcGDH*。该基因全长 1779 bp, 包括 1 个 1659 bp 的 ORF, 编码 552 个氨基酸, 经多重序列比对发现, 该氨基酸序列高度保守, N 端具有一段信号肽序列, 这一点与 Li 等(2009)克隆的凡纳滨对虾 2 种 GDH 序列和 Wang 等(2012)克隆的中华绒螯蟹 GDH 序列相一致。*FcGDH* 基因属于 ELFV 脱氢酶家族, 具有一段多种脱氢酶活性位点 (Glu/Leu/Phe/Val), 与熊泽泉(2010)<sup>1)</sup>对十足目 5 种甲壳动物的 GDH 基因部分克隆得到的结果相一致。多重比对发现, 这段氨基酸序列与其他物种同样十分相似, 只有脊椎动物和埃及按蚊在该活性位点的第 10 位由亮氨酸变为缬氨酸, 埃及按蚊和中华绒螯蟹在

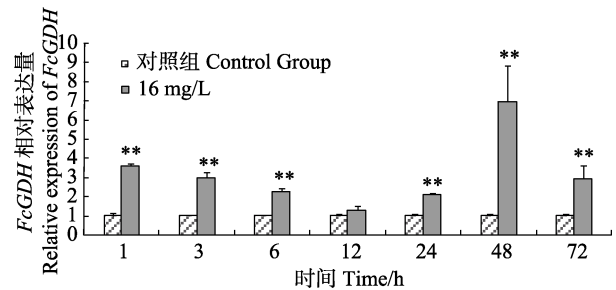


图 5 *FcGDH* 基因在肌肉组织中的表达水平  
随氨氮胁迫时间的变化

Fig.5 Expression profiles of *FcGDH* gene in muscle after ambient ammonia stress

\*\*代表同一时间实验组与对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ )  
\*\* indicated highly significant differences ( $P < 0.01$ ) at the same time point

第 13 位天冬酰胺变为天冬氨酸。此外, 在谷氨酸丰富的区域还存在 1 个保守的赖氨酸活性位点 (Nagata *et al*, 1988; Takada *et al*, 1991; Britton *et al*, 1992; Benachenhou-Lahfa *et al*, 1993; Tang *et al*, 1993)。一般认为, GDH 可分为 4 种: GDH-1 和 GDH-2 是一种小型六聚体酶, 广泛分布于动植物组织中, 在氨同化作用中十分重要 (Miñambres *et al*, 2000; Brown *et al*, 1997); GDH-3 是一类分子较大的 GDH, 作用于谷氨酸盐的分解代谢过程, 只在真菌和原生物中有所发现 (Andersson *et al*, 2003); GDH-4 仅发现于真菌中 (Miñambres *et al*, 2000)。

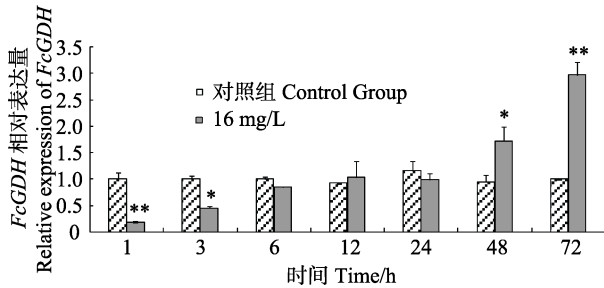


图 6 *FcGDH* 基因肝胰腺组织中表达水平随氨氮胁迫时间的变化

Fig.6 Expression profiles of *FcGDH* gene in hepatopancreas after ambient ammonia stress

\*\*代表同一时间实验组与对照组差异极显著( $P<0.01$ ),

\*代表实验组与对照组差异显著( $P<0.05$ )

\*\* indicated highly significant differences ( $P<0.01$ ), \* indicated significant differences ( $P<0.05$ ), at the same time point

### 3.2 *FcGDH* 基因组织表达分析

本研究利用 RT-PCR 技术对 *FcGDH* 基因在不同组织中的表达量进行了测定, 发现 *FcGDH* 基因在各组织中广泛表达, 但各组织中的表达量差异很大, *FcGDH* 基因在肌肉中表达量最高, 这与 Li 等(2009)和 Wang 等(2012)中凡纳滨对虾和中华绒螯蟹 GDH 基因组织表达结果一致。这种组织特异性可能与 GDH 参与谷氨酸、丙氨酸和脯氨酸循环有关(Willett *et al.*, 2003; Plaitakis *et al.*, 2001)。肌肉是蛋白质沉积的主要组织, 也可能是氨基酸储存的主要组织, 大部分的氨基酸代谢发生在肌肉中, 因此, 在氨基酸分解代谢过程中的 GDH 主要在肌肉中表达。

### 3.3 *FcGDH* 基因在氨氮胁迫下的表达规律分析

通常情况下, GDH 可催化机体中各组织(包括脑)(Cooper *et al.*, 1987)氨基酸代谢产生的氨与  $\alpha$ -酮戊二酸反应, 生成谷氨酸, 这是消耗体内氨的主要方式(Jürss *et al.*, 1995)。在排尿素动物体内, GDH 和 GS 联系紧密, 并称为“氨清除体系”(王镜岩等, 2002), GDH(去氨氮方向)催化形成谷氨酸, 随后 GS 催化谷氨酸反应形成无毒的谷氨酰胺加以储存, 在排尿素动物体内尿素循环欠缺情况时, 这一“氨清除体系”起到降低生物体内氨氮的作用。正常情况下, 甲壳动物体内氮的主要代谢产物是氨态氮, 体内 60%–70%的

氮是以氨态氮的形式由鳃排出体外(Regnault *et al.*, 1987), 当甲壳动物受到氨氮胁迫, 体内氨氮浓度过高时, 甲壳动物的氨氮解毒代谢途径主要包括: 1) 降低鳃组织对  $\text{NH}_3$  的通透性, 增加对  $\text{NH}_4^+$  的排出; 2) 减少体内蛋白质和氨基酸的分解, 降低内生性氨氮; 3) 合成谷氨酰胺、谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸等无毒害作用的氨基酸; 4) 加强尿素循环, 增加尿素氮的排泄(岳峰, 2010)<sup>2)</sup>。

为了研究 *FcGDH* 基因在氨氮代谢中的作用, 本研究测定了 *FcGDH* 基因在 2 种不同组织中的变化规律。肌肉组织中, 胁迫组 *FcGDH* 基因的表达量上调并于 48 h 达到极值, 说明 *FcGDH* 基因对氨氮胁迫具有积极的应答反应, 这可能是 GDH 参与氨基酸(包括谷氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺)合成以减少体内氨氮含量的缘故。Chen 等(2000)对不同浓度  $\text{NH}_4\text{Cl}$  胁迫下斑节对虾体内的氨基酸含量进行了研究, 发现肌肉组织中谷氨酸的含量随  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度的增大而减少, 谷氨酰胺的含量随  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度的升高而增加, 而 GDH 活力在氨氮胁迫下升高已在青蟹和黄道蟹中被证实(King *et al.*, 1985), 这可能是 GDH 催化合成的谷氨酸又作为底物参与了谷氨酰胺的合成。Scaraffia 等(2005)研究表明, 在对埃及按蚊饲喂血粉后(增加蛋白含量, 使体内氨氮含量增大), *AaGDH* 在脂肪体(具有解毒和排泄作用)和中肠(消化吸收作用)的表达量急剧上调, 并认为这是因为 GDH 基因参与了机体的谷氨酸和脯氨酸合成, 加以储存以降低氨氮毒性。Srivastava 等(1987)研究表明, 植物在高温、干旱、高盐以及病原菌侵染等逆境条件下, GDH 的活性均会升高, 其原因可能是: 在逆境中容易造成植物体蛋白质降解, 释放出大量的铵引起植物中毒, 此时 GS/GOGAT(谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶)途径受到限制, GDH 在缓解植物铵中毒的过程中发挥主要作用。

肝胰腺是甲壳动物解毒的重要组织, *FcGDH* 基因在肝胰腺中的表达规律与肌肉中完全不同, 胁迫初期 *FcGDH* 基因被抑制, 随后呈逐渐上升的趋势, 并于 72 h 达到极值。这种现象可能是由 16 mg/L 组的高氨氮浓度引起的, 从 1 h *FcGDH* 基因的表达量也可看出 16 mg/L 组的表达量极显著低于对照组。张克俭(1993)指出, 当氮浓度高于 10.44 mg/L 时, 中国明对虾肝胰腺遭到破坏, 吸收细胞转化为分泌细胞, 并

1) 熊泽泉. 十足目(Crustacea: Decapoda)经济甲壳动物谷氨酸脱氢酶基因的研究. 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2009, 13–30

2) 岳峰. 三疣梭子蟹在氨氮胁迫下免疫应答与解毒代谢机制的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010

逐渐解体。而随着胁迫时间的延长,对虾对高氨氮环境逐渐适应, *FcGDH* 基因表达量逐渐上升并于 48 h 上调,加速体内氨氮的转化及谷氨酸的合成。但 Chen 等(2000)的研究表明,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  胁迫后肝胰腺中的游离氨基酸含量下降,其中,谷氨酸含量降低了 27%,这有可能是氨基酸分解代谢产能的缘故。在胁迫后期,胁迫组 *FcGDH* 基因表达量上调,且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),说明 *FcGDH* 基因在氨氮解毒代谢过程中发挥了重要作用。

本实验针对 GDH 在中国明对虾氨氮代谢过程中的作用进行了研究,对 *FcGDH* 基因进行了 cDNA 全长的克隆,并研究了其在氨氮胁迫下肌肉和肝胰腺组织内的表达规律,发现其不同组织中表达模式有所差异,但胁迫组基因表达量较对照组有所上调,进一步证明了 *FcGDH* 在降低中国明对虾体内氨氮方面具有重要作用,为深入研究中国明对虾氨氮代谢途径提供了依据。

## 参 考 文 献

- 王娟, 曲克明, 刘海英, 等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对中国对虾的急性毒性效应. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 1-6
- 王镜岩, 朱胜庚, 徐长法. 生物化学(第三版). 北京: 高等教育出版社, 2002, 306-308
- 乔顺风, 刘恒义, 谨秀云. 养殖水体氨氮积累危害与生物利用. 河北渔业, 2006(1): 20-22
- 张克俭. 锌和氨氮对对虾肝胰腺的毒性作用. 水产学报, 1993, 17(1): 52-59
- Andersson JO, Roger AJ. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. BMC Evol Biol, 2003, 3(1): 14
- Benachenhou-Lahfa N, Forterre P, Labedan B. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. J Mol Evol, 1993, 36(4): 335-346
- Brown JR, Doolittle WF. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61(4): 456-502
- Britton KL, Baker PJ, Rice DW, et al. Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. Eur J Biochem, 1992, 209(3): 851-859
- Chen JC, Nan FH. Effects of ammonia on oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaues chinensis* after prolonged exposure to ammonia. Bull Environ Contam Toxicol, 1993, 51(1): 122-129
- Chen JC, Cheng SY, Chen CT. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaues japonicus* exposed to ambient ammonia. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 1994, 109(2): 339-347
- Chen JC, Lin JN. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaues chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol, 1992, 102(2): 287-291
- Chen JM, Chen JC. Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaues monodon* exposed to elevated ambient ammonia. Aquat Toxicol, 2000, 50(1): 27-37
- Cheng W, Chen JC. The virulence of Enterococcus to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(2): 97-109
- Cooper AJ, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol Rev, 1987, 67(2): 440-519
- Frieden C. L-Glutamate dehydrogenase. In: Boyer PD, Lardy H and Myrback K (Eds.), The Enzymes, 2nd Ed. Vol. 7, Academic Press, New York, 1963, 3-24
- Iwata K, Kakuta I, Ikeda M, et al. Nitrogen metabolism in the mudskipper, *Periophthalmus cantonensis*: a role of free amino acids in detoxification of ammonia produced during its terrestrial life. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 1981, 68(4): 589-596
- Jürss K, Bastrop R. Amino acid metabolism in fish. Biochem Mol Biol Fish, 1995, 4(6): 159-189
- King FD, Cucci TL, Bidigare RR. A pathway of nitrogen metabolism in marine decapod crabs. Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem, 1985, 80(3): 401-403
- Koo JG, Kim SG, Jee JH. Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). Aquacult Res, 2005, 36(1): 79-85
- Lea PJ, Mifflin BJ. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature, 1974, 251(5476): 614-616
- Li EC, Arena L, Chen LQ, et al. Characterization and tissue-specific expression of the two glutamate dehydrogenase cDNAs in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J Crustacean Biol, 2009, 29(3): 379-386
- Miñambres B, Olivera ER, Jensen RA, et al. A new class of glutamate dehydrogenases (GDH) biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39529-39542
- Nagata S, Tanizawa K, Esaki N, et al. Gene cloning and sequence determination of leucine dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* and structural comparison with other NAD(P)<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases. Biochemistry, 1988, 27(25): 9056-9062
- Nisman B. The stickland reaction. Bacteriol Rev, 1954, 18(1): 16
- Pahlich E, Joy KW. Glutamate dehydrogenase from pea roots: Purification and properties of the enzyme. Can J Biochem, 1971, 49(1): 127-138
- Pennington JE, Goldstrohm DA, Wells MA. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the Mosquito *Aedes aegypti*. J Insect Physiol, 2003, 49(2): 115-121
- Plaitakis A, Zaganas I. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. J Neurosci Res, 2001, 66(5): 899-908
- Regnault M, Egnault M. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. Biol Rev, 1987, 62(1): 1-24
- Scaraffia PY, Isoe J, Murillo A, et al. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol, 2005, 35(5): 491-503
- Smith EL, Austen BM, Blumenthal KM, et al. Glutamate dehydrogenases In: Boyer PD (Ed.), The Enzymes, 3rd Ed., Vol. 11, Academic Press, New York, 1975, 293-367



- Srivastava HS, Singh RP. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry*, 1987, 26(3): 597–610
- Takada H, Yoshimura T, Ohshima T, *et al.* Thermostable phenylalanine dehydrogenase of *Thermoactinomyces intermedius*: cloning, expression, and sequencing of its genes. *Biochemistry*, 1991, 109(3): 371–376
- Tang L, Hutchinson CR. Sequence, transcriptional, and functional analyses of the valine (branched-chain amino acid) dehydrogenase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriology*, 1993, 175(13): 4176–4185
- Tempest DW, Meers JL, Brown CM. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochemical Journal*, 1970, 117(2): 405
- Walton MJ, Cowey CB. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem*, 1977, 57(2): 143–149
- Willett CS, Burton RS. Characterization of the glutamate dehydrogenase gene and its regulation in a euryhaline copepod. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2003, 135(4): 639–646
- Wilson RP. Nitrogen metabolism in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II: evidence for an apparent incomplete ornithine-urea cycle. *Comp Biochem Physiol*, 1973, 46B: 625–634
- Wang YR, Li EC, Yu N. Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *PLoS One*, 2012, 7(5): 1–10

(编辑 冯小花)

## cDNA Cloning and Expression Analysis of Glutamate Dehydrogenase in Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) Exposed to Ambient Ammonia

HE Yuying<sup>1,2</sup>, LI Shaofei<sup>3</sup>, WANG Qingyin<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>①

(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; 3. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

**Abstract** Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is an ecologically and economically important shrimp species. During the culture, *F. chinensis* were exposed to a series of stressors that adversely affect biological activities including growth rate. Ammonia, a product of protein degradation and bacterial activity, is a strong stressor in shrimp aquaculture. Glutamate dehydrogenase (GDH) is an abundant and ubiquitous mitochondrial enzyme that catalyzes reversible amination of glutamate. cDNA of GDH from *F. chinensis* (*FcGDH*) was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The *FcGDH* cDNA was 1779 bp in size, and it included a 1659-bp open reading frame (ORF) that encoded a 522 amino-acid polypeptide of which the isoelectric point (pI) was 6.54 and the molecular mass was 61.3 kDa. Homology analysis revealed that the amino acid sequence of *FcGDH* was highly conserved with its homologs in other arthropod. The similarities between *FcGDH* and GDHs of *Litopenaeus vannamei* and *Eriocheir sinensis* were 98% and 89% respectively. Phylogenetic analysis showed that *FcGDH* was in the same branch with that of *L. vannamei* and then in the same branches with those of *E. sinensis*, *Drosophila melanogaster*, and *Aedes aegypti* in order. The tissue expression analysis showed that *FcGDH* was detected in all tested tissues including muscle, gill, hepatopancreas, stomach, intestine, lymph, and hemocytes. The highest expression of *FcGDH* was in the muscle that was an amino acid pool and the major tissue for protein deposition. After exposure to ambient ammonia, the expression of *FcGDH* gene was up-regulated significantly in muscles compared to the control group ( $P < 0.01$ ). The expression level of *FcGDH* in hepatopancreas was down-regulated significantly at 3 h ( $P < 0.05$ ), and was then stabilized up to 24 h. The expression of *FcGDH* was increased significantly after 48 h and reached the maximum at 72 h compared to the control group ( $P < 0.01$ ). These results implied that *FcGDH* might play an important role in the process of ammonia detoxification.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Glutamate dehydrogenase; Gene cloning; Gene expression; Ammonia stress

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn