

# 脊尾白虾血蓝蛋白基因 cDNA 的克隆与表达分析

于 戈<sup>1,2</sup> 李 健<sup>2\*</sup> 李吉涛<sup>2</sup> 李 华<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大连海洋大学, 116023)

(<sup>2</sup>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)

**摘 要** 应用 RACE 技术克隆了脊尾白虾血蓝蛋白基因全长 cDNA 序列, 并对该序列进行了分析。结果显示, 该基因全长 2 158 bp, 开放式阅读框长 1 992 bp, 5' 非编码区长 26 bp, 3' 非编码区长 140 bp, 将该基因命名为 *EcHc*。*EcHc* 编码 663 个氨基酸, 前 15 个氨基酸组成信号肽, 推测成熟肽的分子量为 75.05kDa。Blast 比对结果显示, 由脊尾白虾血蓝蛋白 cDNA 序列推导的氨基酸序列与日本沼虾、信号小龙虾血蓝蛋白氨基酸序列的同源性分别为 86%、68%, 由此推断该 cDNA 序列可能属于血蓝蛋白家族。利用 Real-time PCR 方法, 分别研究了鳃弧菌和白斑综合征病毒 (WSSV) 感染脊尾白虾后, 肝胰腺组织中 *EcHc* 基因在不同时间点的表达变化。实验结果表明, 细菌或病毒感染后, *EcHc* 基因在肝胰腺组织中的表达量显著增加, 且均在感染后 6 h 达到最高值, 揭示脊尾白虾血蓝蛋白基因 *EcHc* 在脊尾白虾的免疫防御中具有重要作用。

**关键词** 脊尾白虾 血蓝蛋白 基因克隆 表达分析

**中图分类号** Q785, S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0074-07

## cDNA cloning and expression analysis of hemocyanin gene in *Exopalaemon carinicauda*

YU Ge<sup>1,2</sup> LI Jian<sup>2\*</sup> LI Ji-tao<sup>2</sup> LI Hua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dalian Ocean University, 116023)

(<sup>2</sup>Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** In this study, a hemocyanin cDNA named *EcHc* was cloned from the hepatopancreas of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* by reverse transcription PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA end (RACE) methods. The full-length cDNA of *EcHc* was 2 158 bp and had an open reading frame(ORF) of 1 992bp encoding 663 amino acids which contained a signal peptide sequence(1~15 amino acid residues). The predicted molecular weight of the mature peptide was 75.05kDa, and the theoretical pI was 5.69. The homology analysis of *EcHc* with other hemocyanin showed higher similarity with *Macrobrachium nipponense* (86%). Quantitative real-time RT-PCR analysis revealed that microbial challenge resulted in mRNA up-regulation, up to 6h post injection of *Vibrio anguillarum* or white spot syndrome

国家 863 计划课题(2012AA10A409)、国家虾产业技术体系(CARS-47)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2013A0701)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830183

收稿日期: 2012-03-01; 接受日期: 2012-04-25

作者简介: 于 戈 (1987-), 女, 硕士, 主要从事海洋生物功能基因研究。E-mail: yugege415@126.com, Tel: 13455230589

virus (WSSV). The results indicated that the *EcHc* plays important roles in the immune defense system of *E. carinicauda*.

**KEY WORDS** *Exopalaemon carinicauda* Hemocyanin Cloning Expression

脊尾白虾 *Exopalaemon carinicauda* 又名白虾、小白虾和迎春虾等, 隶属长臂虾科 Palaemonidae、长臂虾属 *Palaemon*、白虾亚属 *Exopalaemon*, 系黄渤海区重要底栖虾类, 其产量仅次于中国对虾和中国毛虾(刘瑞玉 1955), 具有生长速度快、繁殖能力强、环境适应性广、食性杂和经济价值高等优点(李凌云 1994)。近年来, 脊尾白虾作为新兴的养殖虾, 人工养殖规模不断扩大, 已成为沿海滩涂地区主要的特色水产养殖品种。

近 20 年来, 病毒病和细菌病的暴发, 给虾养殖业的发展造成了很大的影响(Lightner *et al.* 1983), 针对虾类非特异性免疫防御机制的研究正在广泛开展(Roch *et al.* 1999)。近年的研究发现, 血蓝蛋白 Hemocyanin 不仅与蛋白储存、渗透调节、蜕皮周期以及外骨骼的形成有关(Adachi *et al.* 2005; Jaenicke *et al.* 1999; Paul *et al.* 1998), 还参与机体的免疫防御。血蓝蛋白及其降解片段除了具有酚氧化酶活性(Decker *et al.* 2004), 还具有抗细菌(Destoumieux-Garzón *et al.* 2001)、抗病毒(Zhang *et al.* 2004; 罗展等 2007)等多种免疫学功能。

目前, 日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* (GenBank: JF683437.1)、凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* (Sellos *et al.* 1997)、中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (孙杰等 2010) 等养殖虾类的血蓝蛋白基因 cDNA 已相继被克隆。Lei 等(2008)研究发现, WSSV 感染日本对虾后, 其血蓝蛋白的 PjHcL 亚基的表达量显著上升; 潘鲁青等(2009)研究发现, 感染哈维氏弧菌的凡纳滨对虾的血蓝蛋白 mRNA 的表达量上调; 孙杰等(2010)在给中国对虾注射鳃弧菌和 WSSV 粗提液后发现, 两种病原都可引起血蓝蛋白基因的表达量增加。本研究首次克隆了脊尾白虾血蓝蛋白基因 cDNA, 并分析了鳃弧菌和白斑综合征病毒感染后该基因的表达变化, 以期了解血蓝蛋白基因在脊尾白虾免疫防御中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及样品的制备

脊尾白虾于 2010 年 8 月 31 日购自青岛宝荣水产科技发展有限公司, 体长  $4.33 \pm 0.26$  cm。饲养于 200L 的 PVC 桶中, 暂养 7d 后于 2010 年 9 月 7 日进行实验, 实验为期 2d。在实验前, 用对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)现场快速高灵敏检测试剂盒(来自中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室)对随机挑选脊尾白虾进行检测, 证明没有 WSSV 感染。选取暂养的健康脊尾白虾 360 尾(每桶 40 尾)分为 3 个组, 设鳃弧菌感染组、WSSV 感染组和对照组, 每组 3 个平行, 分别进行鳃弧菌感染和 WSSV 感染实验。

#### 1.1.1 菌悬液的制备

将鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 菌种(本实验室保存)接种于 2216E 液体培养基中, 28℃ 培养 24h, 于固体培养基上划线纯化 1 次; 选取单菌落接种于 2216E 液体培养基中, 28℃ 培养 8~10h, 使活菌数在  $10^8$  CFU/ml 左右。将菌悬液离心, 弃上清液, 用生理盐水对菌体进行反复洗涤, 重悬后, 使菌体的浓度达到  $10^8$  CFU/ml。

#### 1.1.2 WSSV 粗提液的制备

取实验室 -80℃ 保存的感染 WSSV 的凡纳滨对虾病虾(中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室赠送)头尖组织(剔除肝胰腺)5g, 加入适量 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS) 20 000r/min 冰浴匀浆, 获得的匀浆液 4℃ 3 000g 离心 15min, 取上清液反复离心 3 次(4 000g 15min, 6 000g 15min, 8 000g 15min), 所得上清液用 0.45μm 滤膜过滤除菌, 分装并保存于 -80℃ 冰箱中。

实验时将菌悬液、WSSV 粗提液用微量注射器从脊尾白虾的第 2 腹节处注入(20μl/尾)。对照组, 注射 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液(20μl/尾)。对照组, 不做任何注射(0h)。在注射后的 3、6、12、24、48 h 取样, 每个时间点, 实验组和对照组各取 6 尾虾, 取肝胰腺组织, 用于总 RNA 提取。

取脊尾白虾肝胰腺组织,加液氮研磨成粉末,取 50mg 样品迅速转移至 1.5ml 离心管(内含 1ml Trizol 液),置于 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,用于总 RNA 提取。

## 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取脊尾白虾肝胰腺组织总 RNA,提取的总 RNA 用快速核酸/蛋白分析仪进行纯度和浓度测定,用 MOPS 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性。在合成 cDNA 之前,用 DNase I, RNase-free (Fermentas) 试剂盒除去总 RNA 中残留的基因组 DNA。

cDNA 合成体系(20 $\mu\text{l}$ ):在 0.2ml 离心管中加入 1.6 $\mu\text{g}$  总 RNA,50  $\mu\text{mol/L}$  Oligo d(T)<sub>18</sub> 引物 2  $\mu\text{l}$ ,70 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5min,立即冰浴 2min,瞬时离心,使溶液聚集于管底;再向管中加入 5  $\times$  MMLV Buffer 4 $\mu\text{l}$ ,10mmol/L dNTP 4 $\mu\text{l}$ ,20 Units RNase Inhibitor(TaKaRa)和 160 Units M-MLV 反转录酶(Promega),用 Nuclease-Free Water 补足体积;42 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1h;72 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15min;4 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20min。合成的 cDNA 用于脊尾白虾血蓝蛋白基因中间片段的克隆和 Real-time PCR 检测。血蓝蛋白基因 5'和 3'端序列扩增所需模板按 SMART<sup>TM</sup>RACE cDNA Amplification Kit 所述方法进行合成。

## 1.3 脊尾白虾血蓝蛋白基因 cDNA 中间片段的克隆

根据从 GenBank 获得的斑节对虾 *Penaeus monodon* 血蓝蛋白基因(AF431737.1)、凡纳滨对虾血蓝蛋白基因(AJ250830.1)、日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* 血蓝蛋白基因(EF375711.1)和中国对虾血蓝蛋白基因(FJ594414.1)序列设计简并引物 Hc F 和 Hc R(上海生工生物工程有限公司合成)。PCR 反应体系(25 $\mu\text{l}$ ): TaKaRa Taq(5U/ $\mu\text{l}$ )0.2 $\mu\text{l}$ ;10 $\times$ PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus)2.5 $\mu\text{l}$ ;dNTP Mixture(各 2.5mmol/L)2 $\mu\text{l}$ ;脊尾白虾肝胰腺 cDNA 1 $\mu\text{l}$ ;Hc F 1 $\mu\text{l}$ ;Hc R 1 $\mu\text{l}$ ;ddH<sub>2</sub>O 17.3 $\mu\text{l}$ 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$  5min;94 $^{\circ}\text{C}$  30s,58.6 $^{\circ}\text{C}$  30s,72 $^{\circ}\text{C}$  30s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  7min;4 $^{\circ}\text{C}$  保存。用 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)纯化 PCR 扩增特异性产物,连接到 pMD<sup>®</sup> 18-T Vector(TaKaRa)上,重组质粒转化到 *E. coli* TOP10 感受态细胞(北京天根生化科技有限公司)中,阳性克隆经菌液 PCR 验证后进行测序。

## 1.4 cDNA 5'和 3'末端的扩增

根据测序得到的中间序列设计正向引物(Hc 3'RACE1)、反向引物(Hc 5'RACE1、Hc 5'RACE2)扩增脊尾白虾血蓝蛋白基因 cDNA 全长序列。按照 SMART<sup>TM</sup>RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)推荐的反应体系和反应条件进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序同上所述。

## 1.5 序列分析

将测序结果去载体后,用 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序进行序列比对,利用 DNAMAN 软件进行序列分析,采用 SMART 软件预测功能域,SignalP 4.0 程序分析信号肽,采用 Clustal X 软件进行不同来源的血蓝蛋白的氨基酸序列多序列比对,利用 MEGA 5.0 软件(Tamura *et al.* 2011)中的 Neighbor-joining 法(Saitou *et al.* 1987)构建系统树。

## 1.6 鳃弧菌感染后脊尾白虾血蓝蛋白基因 *EcHc* 的表达分析

提取鳃弧菌感染后不同时间点脊尾白虾肝胰腺总 RNA,按前述方法合成 cDNA 进行 Real-time PCR,18S 作

表 1 实验中所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in the experiments

引物名称 Primer	引物序列 Sequence
Hc F	GCGTCATGAAGCACTYATGCT
Hc R	GGGAAYTGACCKCCATACTT
Hc 3'RACE1	CATGCAATGCAAGACCTGGGACTG
Hc 5'RACE1	GTCTCCATATTTGTCTTCCCACCAG
Hc 5'RACE2	TGTGACTTGTCCGCTACTGGGTCAAAGG
Hc RT-F	GCTTTGCCCCACACTATCTAC
Hc RT-R	TGTCACGAACTCTTGCTACTCCA
18S RT-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S RT-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

为内参基因。反应体系(20 $\mu$ l):SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup>(2 $\times$ ) 10 $\mu$ l,PCR 正向引物(10 $\mu$ mol/L) 0.8 $\mu$ l,PCR 反向引物(10 $\mu$ mol/L) 0.8 $\mu$ l,ROX Reference Dye(50 $\times$ ) 0.4 $\mu$ l,cDNA 模板 2 $\mu$ l,RNase Free 水 6.0 $\mu$ l。反应程序:95 $^{\circ}$ C 30s;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 34s,40 cycles;95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,95 $^{\circ}$ C 15s。Real-time PCR 结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法,用 SPSS 10.0 软件进行分析(任伟成等 2007)。

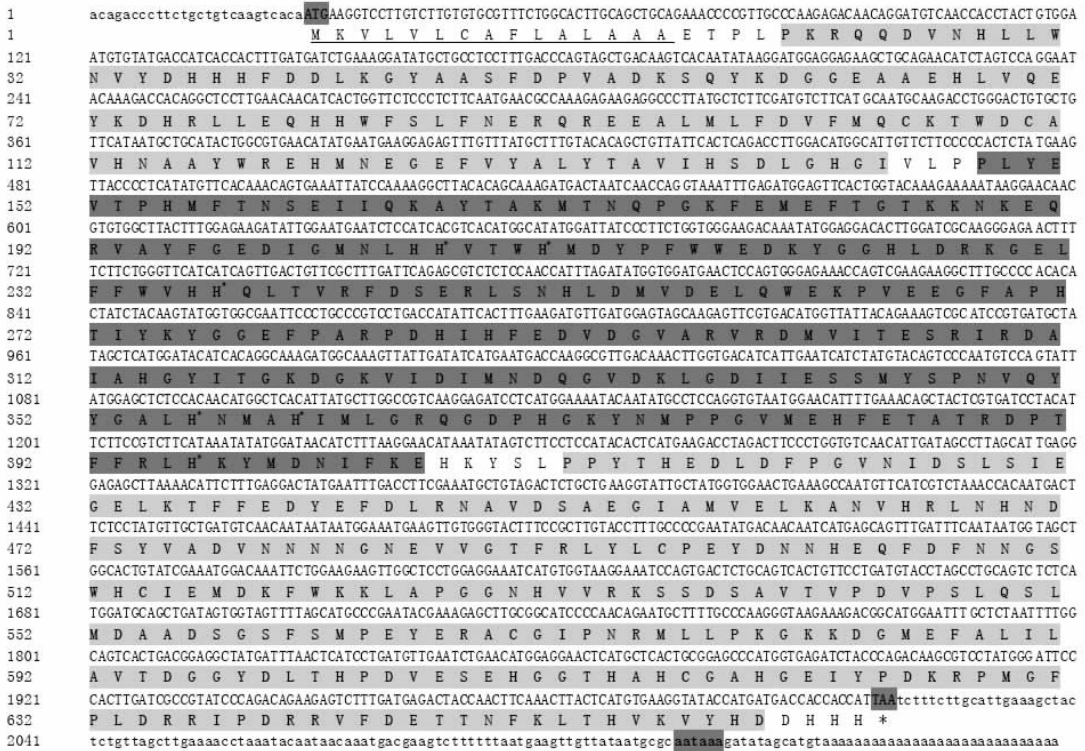
### 1.7 白斑综合征病毒感染后脊尾白虾 *EcHc* 的表达分析

提取 WSSV 感染后不同时间点脊尾白虾肝胰腺总 RNA,按前述方法合成 cDNA 进行 Real-time PCR。反应体系、反应程序、数据处理同 1.6 所述。

## 2 结果分析

### 2.1 脊尾白虾血蓝蛋白基因 cDNA 特征及编码蛋白结构预测

利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得脊尾白虾血蓝蛋白基因 cDNA 全长,共 2 158bp,命名为 *EcHc*(GenBank 登录号:JF939200)。该基因开放式阅读框(ORF)长 1 992bp,编码 663 个氨基酸,5' UTR(非编码区)和 3' UTR 分别长 26、140bp,PolyA 尾前有加尾信号 AATAAA。Signal P 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析显示,此氨基酸序列 N 端前 15 个氨基酸组成信号肽,脊尾白虾血蓝蛋白的预测分子量为 75.05kDa,理论等电点(pI)为 5.69。



ATG、TAA 和 aataaa 分别为起始密码子、终止密码子和加尾信号,带下划线的序列是信号肽,用星号标记与铜离子结合的 6 个组氨酸,血蓝蛋白的 3 个结构域用阴影表示。

ATG、TAA and aataaa are the start codon, the stop codon and the poly(A) signal sequence.

The signal peptide sequence is underlined. The six copper-binding histidine residues are indicated by asterisks, and the three domains of hemocyanin are indicated in the shadow

图 1 脊尾白虾血蓝蛋白基因的 cDNA 核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *E. carinicauda* hemocyanin

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) 软件分析表明, 脊尾白虾血蓝蛋白含有 3 个结构域-Hemocyanin\_N (18~144 aa)、Hemocyanin\_M (148~405 aa) 和 Hemocyanin\_C (411~659 aa)(图 2)。与结构域 Hemocyanin\_M 中两个铜离子结合的 6 个组氨酸的位置分别为 His<sup>206</sup>、His<sup>210</sup>、His<sup>237</sup>、His<sup>356</sup>、His<sup>360</sup> 和 His<sup>396</sup>。



图 2 脊尾白虾血蓝蛋白 3 个结构域的位置

Fig. 2 The sites of three domains in *E. carinicauda* hemocyanin

## 2.2 *EcHc* 基因同源性分析

用 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行程序比对的结果显示, *EcHc* 蛋白序列与日本沼虾血蓝蛋白 (AEC46861.1) 有 86% 的同源性, 与信号小龙虾血蓝蛋白 2 (AAO47336.1) 有 68% 的同源性, 与钩虾 *Gammaurus roeselii* 血蓝蛋白亚基 1 (CAI78901.1) 有 67% 的同源性。

利用 Clustal X 软件进行比对 18 个不同物种的血蓝蛋白序列,

用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 树 (图 3)。结果显示, 血蓝蛋白在甲壳纲软甲亚纲十足目中被分为两个分支。脊尾白虾 *EcHc* 与日本沼虾 (AEC46861.1)、信号小龙虾 (AAO47336.1)、美国螯龙虾 *Homarus americanus* (CAB75960.1)、普通龙虾 *Palinurus vulgaris* (CAC69244.1)、棘刺龙虾 *Palinurus elephas* (CAD56697.1) 等动物的血蓝蛋白为一个亚群。日本对虾 (ABR14693.1)、斑节对虾 (AEB77775.1)、中国对虾 (ACM61982.1)、凡纳滨对虾 (CAA57880.1)、珍宝蟹 *Metacarcinus magister* (AAA96966.2) 和蓝蟹 *Callinectes sapidus* (AAF64305.1) 等动物的血蓝蛋白属于另外一个亚群。*EcHc* 在进化上与日本沼虾的血蓝蛋白亲缘关系最近, 与钩虾 (CAI78901.1)、斯氏鲸虱 *Cyamus scammoni* (ABB59715.1)、斑点海虱 *Eurydice pulchra* (ACS44712.1)、蛀木水虱 *Limnoria quadripunctata* (ADE58570.1) 等动物的血蓝蛋白相关联, 与叶虾 *Nebalia kensleyi* (ACV33306.1) 和蝉形齿指虾蛄 *Odontodactylus scyllarus* (CAX46430.1) 等动物的血蓝蛋白亲缘关系较远。

## 2.3 病原刺激后脊尾白虾血蓝蛋白基因 *EcHc* 的表达变化

如图 4 所示, 鳃弧菌、WSSV 刺激后, 脊尾白虾肝胰腺血蓝蛋白基因 *EcHc* 表达表现出一定的时间依赖性, 总体表现为先升高后降低的趋势。*EcHc* 表达量在鳃弧菌感染后 6h 达到峰值, 表达量约为对照组的两倍, 并有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 6h 以后 *EcHc* 表达持续下降, 24h 表达量下降到与对照组表达量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 到感染后 48h, *EcHc* 表达量依旧维持稳定。WSSV 感染后, 脊尾白虾肝胰腺在 48h 内呈峰值变化, 在

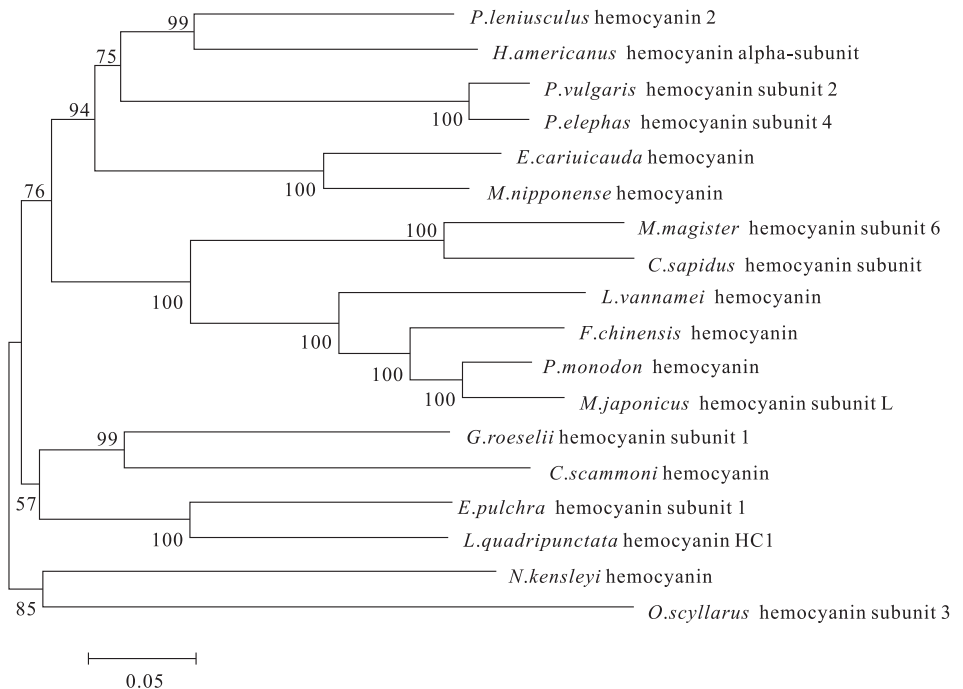


图 3 基于血蓝蛋白氨基酸序列构建的 NJ 系统树

Fig. 3 NJ tree based on hemocyanin amino acid sequences

6h 达到最大值, 表达量约是对照组的 3 倍( $P < 0.05$ ); *EcHc* 基因的表达量 6h 后持续下降, 12、24h 的表达量也显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 到 48h 表达量接近于对照组( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

血蓝蛋白是节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白, 脱氧时为无色, 结合氧时为蓝色。血蓝蛋白在十足目动物的肝胰腺中合成(Spindler *et al.* 1992)。本研究中, 作者首次从脊尾白虾肝胰腺组织中克隆了血蓝蛋白基因 cDNA 全长, 预测分子量为 75.05kDa。与已分离的凡纳滨对虾的血蓝蛋白亚基分子量类似(章跃陵等 2005)。

典型的节肢动物血蓝蛋白每个亚基有 3 个结构域, 第 2 个结构域是  $\alpha$  螺旋区, 含血蓝蛋白的活性部位, 在活性位点, 1 个  $O_2$  分子螯合 1 对铜离子, 每个铜离子结合 3 个组氨酸(Burmester 2004)。本研究中, SMART 分析结果显示, 脊尾白虾血蓝蛋白有 3 个结构域 Hemocyanin\_N(18~144 aa)、Hemocyanin\_M(148~405 aa) 和 Hemocyanin\_C(411~659 aa)。其中, Hemocyanin-M 中有两个铜离子结合位点, 与铜离子结合的组氨酸的位置分别为 His<sup>206</sup>、His<sup>210</sup>、His<sup>237</sup>、His<sup>356</sup>、His<sup>360</sup> 和 His<sup>396</sup>。系统进化分析结果显示 *EcHc* 与日本沼虾血蓝蛋白亲缘关系最近, 与信号小龙虾、美国螯龙虾、普通龙虾、棘刺龙虾等甲壳动物的血蓝蛋白亲缘关系次之。

一般认为, 血蓝蛋白的主要生理功能是运输氧, 但近年来的研究发现, 血蓝蛋白是一种具有抗细菌和抗病毒等多种免疫活性的多功能蛋白。章跃陵等(2005、2008)研究发现, 人工感染溶藻弧菌 6h 后, 凡纳滨对虾肝胰腺中血蓝蛋白 p75 和 p73 两个亚基变化最为明显; 另外, 血蓝蛋白也是血清中与金黄色葡萄球菌、溶藻酸弧菌、嗜水气单胞菌和哈维氏弧菌直接结合的主要蛋白, 从而推断血蓝蛋白可能在对虾免疫中发挥重要作用, 并具有一定的抗菌活性。有研究表明, 酸性环境中, 信号小龙虾血蓝蛋白 C 端能水解产生由 16 个氨基酸组成抗菌肽-阿肽西啉 1 (As-tacidin 1), 对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很强的抑制作用(Lee *et al.* 2003)。Destoumieux-Garzón 等(2001)从凡纳滨对虾和南美蓝对虾 *Penaeus stylirostris* 中分别得到分子质量为 2.7、7.9、8.3 kDa 的广谱抗真菌活性多肽, 这些抗真菌肽的氨基酸序列与其血蓝蛋白 C 端的氨基酸序列有 95% 以上的相似度, 当有病原感染时, 血浆中抗真菌肽含量就会升高。综上所述, 在虾类的免疫系统中, 血蓝蛋白或其降解片段, 具有相当重要的作用。本研究中, 脊尾白虾血蓝蛋白基因 *EcHc* 在鳃弧菌感染 6h 后, 其表达量达到最高值, 之后下降, 与孙杰等(2010)研究发现注射鳃弧菌后, 中国对虾血蓝蛋白基因在肝胰腺中的表达量显著增加, 并具有不同的时空表达趋势的结果相一致, 提示血蓝蛋白在虾类的免疫防御中具有抗菌作用。鳃弧菌感染脊尾白虾后, 在感染后期肝胰腺组织中的 *EcHc* 基因表达量恢复到正常水平并维持稳定(图 4), 推测可能由于鳃弧菌的入侵激活了脊尾白虾的免疫体系, 血蓝蛋白和血细胞等免疫因子共同作用将鳃弧菌从体内清除(郭志勋等 2006)。

为了减小 WSSV 给虾养殖产业造成的损失, 有关虾类抗病毒的研究越来越受到重视。Zhang 等(2004)首次研究发现, 血蓝蛋白本身具有广谱抗病毒活性。为了寻找日本对虾与抗病毒相关的免疫基因, Pan 等(2005)利用抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)研究发现, 血蓝蛋白基因在消减文库中的出现次数最多, 证明血蓝蛋白在日本对虾抗 WSSV 感染的过程中发挥了重要作用。Lei 等(2008)研究表明, 血蓝蛋白可以延缓 WSSV 对日本对虾的感染, 进一步研究发现, 当 WSSV 入侵时, 血蓝蛋白的 PjHcL 亚基的表达量显著上升。本研究中, 脊尾白虾血蓝蛋白基因 *EcHc* 在 WSSV 感染后表现出不同的时空表达趋势, 表达量先升高后降低, 在 6h 达到最高值, 与孙杰等(2010)研究发现中国对虾人工感染 WSSV 后血蓝蛋白基因在肝胰腺中的表达量显著增加的结果相一致, 表明了血蓝蛋白在虾类的免疫防御中还具有抗病毒的作用。与鳃弧菌感染 24h 后, *EcHc* 表达量维持稳定不同, WSSV 感染脊尾白虾后肝胰腺组织中的 *EcHc* 基因表达量在 6h 达到峰值后, 持续下

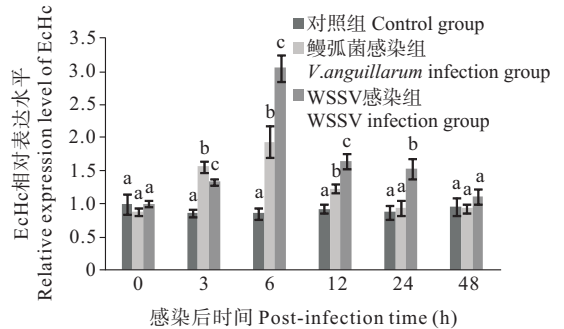


图 4 鳃弧菌、WSSV 感染脊尾白虾后肝胰腺组织 *EcHc* 的表达情况

Fig. 4 Expression level of *EcHc* in *E. carinicauda* hepatopancreas after the infection by *V. anguillarum* or WSSV at different time

降。可能因为病毒复制过程中产生的早期蛋白刺激了血蓝蛋白基因的表达,故6h前 *EcHc* 基因的表达量会持续上升,到6h达到最高值;当WSSV的扩增进入对数期,WSSV就会抑制脊尾白虾的免疫防御系统,使得6h后 *EcHc* 的表达量持续下降,推测48h后,脊尾白虾肝胰腺组织中 *EcHc* 基因的表达量还将会有一些的减少(Lei *et al.* 2008)。

潘鲁青等(2009)研究发现,注射哈维氏弧菌对凡纳滨对虾血蓝蛋白合成、酚氧化酶活力有显著的影响。结果表明,病原入侵可以启动虾类的血蓝蛋白合成,使血蓝蛋白 mRNA 的表达量上调,血蓝蛋白还可以表现出酚氧化酶活性,协同机体其他免疫因子共同参与机体的免疫防御,这与本研究结果相一致。鳃弧菌和WSSV入侵后,脊尾白虾肝胰腺中 *EcHc* 基因的表达量上调,从而可以启动脊尾白虾体内血蓝蛋白的合成,新合成的血蓝蛋白一部分可以降解为抗菌肽清除病原,一部分可以表现出酚氧化酶活性,参与免疫防御,从而提升了血淋巴中酚氧化酶系统的免疫调节作用。这些都充分表明了血蓝蛋白在虾类的免疫防御中具有抗菌和抗病毒的双重作用。血蓝蛋白基因作为一种抗病相关基因越来越受关注,这也充分奠定了血蓝蛋白在甲壳动物非特异性免疫防御中的重要地位。

## 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
- 任伟成, 王崇明, 李 赞. 2007. 荧光实时定量 PCR 技术及其在水产养殖研究中的应用. 海洋水产研究, 28(6): 97~103
- 孙 杰, 王宝杰, 孙姝娟, 李晓华, 姜 珊, 刘 梅, 蒋克勇, 王 雷. 2010. 中国对虾血蓝蛋白基因 cDNA 的克隆与序列分析. 渔业科学进展, 31(1): 80~88
- 李明云. 1994. 池塘脊尾白虾的繁殖、生长及其最大持续轮捕量的初步探讨. 水产学报, 18(2): 85~92
- 罗 展, 黄 捷, 周 丽. 2007. 抗白斑综合征病毒(WSSV)感染途径研究进展. 海洋水产研究, 28(5): 116~123
- 郭志勋, 冯 娟, 王江勇. 2006. 斑节对虾血淋巴细胞对鳃弧菌的清除作用. 中国水产科学, 13(1): 28~32
- 章跃陵, 卓奕明, 朱永飞, 王三英, 黄通旺. 2005. 南美白对虾人工感染细菌后肝胰腺中主要变化蛋白的研究. 水产科学, 24(6): 19~23
- 章跃陵, 林智建, 李祖江, 严 芳, 李远友, 叶向群. 2008. 凡纳滨对虾血清中直接与病原菌相结合的主要蛋白的鉴定. 水产学报, 32(1): 105~111
- 潘鲁青, 李彦飞. 2009. 注射病原菌对凡纳滨对虾血蓝蛋白合成、酚氧化酶活力的影响. 中国海洋大学学报, 39(5): 889~896
- Adachi, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Miyamoto, N., Kokubo, T., Nishioka, T., and Hirata, T. 2005. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. *Pigment Cell Res.* 18(3): 214~249
- Burmester, T. 2004. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins. *Micron.* 35(1-2): 121~122
- Decker, H., and Jaenicke, E. 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 673~687
- Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Céline, J., Bulet, P., and Bachère, E. 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276(50): 47 070~47 077
- Jaenicke, E., Föll, R., and Decker, H. 1999. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. *J. Biol. Chem.* 274(48): 34 267~34 271
- Lightner, D. V. 1983. CRC Handbook of Mariculture(McVey, J. P., ed). Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 289~320
- Lee, S. Y., Lee, B. L., and Söderhäll, K. 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 278(10): 7 927~7 933
- Lei, K. Y., Li, F., Zhang, M. C., Yang, H. J., Luo, T., and Xu, X. 2008. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Dev. Comp. Immunol.* 32(7): 808~813
- Pan, D., He, N. H., Yang, Z. Y., Liu, H. P., and Xu, X. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 103~112
- Paul, R. J., and Pirow, R. 1998. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology (Jena)*, 100(4): 298~306
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172(1-2): 125~145
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406~425
- Sello, D., Lemoine, S., and Wormhoudt, A. V. 1997. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS*, 407(2): 153~158
- Spindler, K. D., Hennecke, R., and Gellissen, G. 1992. Protein production and the molting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842): II. Hemocyanin and protein synthesis in the midgut gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85(2): 248~253
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2 731~2 739
- Zhang, X. B., Huang, C. H., and Qin, Q. W. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antivir. Res.* 61(2): 93~99