

日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 基因全长 cDNA 克隆及表达

王文锋^{1,2}, 关建义^{1,2}, 吕黎¹, 刘方¹, 杨洪¹, 宁黔冀^{1*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 新乡医学院生命科学技术系, 河南 新乡 453003)

摘要: 利用 RACE 技术从日本沼虾肝胰腺中克隆了 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 基因 cDNA 全长序列。*cytMnSOD* 基因 cDNA 全长 1 233 bp, 开放阅读框为 858 bp, 编码 286 个氨基酸, N 端含有 60 个氨基酸残基组成的延伸区; *mtMnSOD* 基因 cDNA 全长 1 113 bp, 开放阅读框为 654 bp, 编码 218 个氨基酸, N 端含有 20 个氨基酸残基组成的信号肽; *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 预测蛋白分子量及等电点分别为 31.33、24.05 ku 和 5.62、7.12。日本沼虾 *cytMnSOD* 推导的氨基酸序列与其 *mtMnSOD* 的相似性为 40%, 二者均含有 MnSOD 的特征肽段(DVWEHAYY)、4 个 Mn²⁺ 结合位点和 2 个 N-糖基化位点。Real-time PCR 结果表明, *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 在日本沼虾肝胰腺、肌肉、血细胞、大颚器官、卵巢和鳃等组织均有表达, 其中肝胰腺表达量最高; 肝胰腺 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 基因的表达量在蜕皮间期最高, 蜕皮后期和蜕皮前期较低。嗜水气单胞菌刺激后 3 h, 肝胰腺 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 的表达量显著增加, 推测 MnSOD 是参与机体免疫防御反应的一种重要分子。

关键词: 日本沼虾; *cytMnSOD*; *mtMnSOD*; 克隆; 表达

中图分类号: S 917; Q 785; Q 786

文献标志码: A

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 又称河虾、青虾, 是我国重要的淡水养殖品种。近年来, 随着环境污染和病害问题的增多, 日本沼虾的养殖生产受到了严重威胁。通过对免疫相关基因的研究来阐明其免疫机制, 可为动物的健康养殖奠定理论基础。

研究表明, 当甲壳动物机体受到外界病原刺激时, 则会引起呼吸爆发及其他多种免疫反应, 这些都会引发大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生^[1-2]。由于 ROS 反应缺乏特异性, 过量的 ROS 不仅可以杀灭入侵的病原微生物, 同时也会对宿主的细胞、组织和器官造成严重伤害, 进而导致机体生理机能的损伤和免疫系统的破坏^[3]。包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 在内的抗氧化酶能及时消除病原感染机体内过量的 ROS, 以维持相关细胞的正常代谢, 因此, 成为生物免疫系统抗氧化防御途径中

极其重要的酶类^[4-5]。SOD 分布广泛, 几乎存在于各种需氧生物中。根据所结合金属离子的不同, 可将 SOD 分为 6 种, 甲壳动物体内含有两种 MnSOD (线粒体型 *mtMnSOD*、胞质型 *cytMnSOD*) 和胞外型的 Cu/ZnSOD^[6-7]。目前, 已经从罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)、日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和青蟹 (*Carcinus maenas*) 等甲壳动物中克隆得到 *mtMnSOD* 和 *cytMnSOD* 基因^[8-12]。本研究采用 RACE 方法首次从日本沼虾肝胰腺中克隆出 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 全长 cDNA, 并对其进行了序列分析、时空表达分析以及嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 攻毒实验等, 为揭示 MnSOD 基因的结构和功能积累资料, 也为甲壳动物免疫调控机制的研究奠定理论基础。

收稿日期: 2011-09-29 修回日期: 2011-11-04

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30940008); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20094104110003); 河南省高校科技创新人才支持计划 (2009HASTIT022)

通讯作者: 宁黔冀, E-mail: ningqianji1964@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本沼虾于2010年10月捕捞于河南原阳黄寺渔场。选取体长(4.5 ± 0.5) cm的健康虾,将其饲养于流水养殖水槽(Φ800, H1200 mm,上海海圣工贸有限公司),水温(27 ± 1) °C,每天投喂2次,1周后用于实验。

1.2 总RNA提取以及cDNA合成

用RNAiso Plus(TaKaRa)提取日本沼虾各组织的总RNA,凝胶电泳检测总RNA的完整性和纯度,RNA的浓度根据 A_{260} 进行定量。使用RQ1 RNase-Free DNase(Promega, USA)去除总RNA中残留的基因组DNA。以总RNA为模板,oligo(dT)18为反转录引物,按照PrimeScript™ RT试剂盒(TaKaRa)操作说明合成cDNA第一链。合成的cDNA于-20 °C保存备用。

1.3 全长cDNA的克隆

根据已知甲壳类*cytMnSOD*和*mtMnSOD*高度保守序列设计两对简并引物*cytSOD-1*、*cytSOD-2*和*mtSOD-1*、*mtSOD-2*(表1),引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。以日本沼虾肝胰腺cDNA为模板,进行PCR扩增,扩增条件:94 °C 4 min;94 °C 40 s,57 °C 40 s,72 °C 1 min,30个循环;72 °C 10 min。根据已获得的*cytMnSOD*和*mtMnSOD*基因片段,应用DNAMAN软件分别设计3' RACE和5' RACE嵌套引物*cytSOD-3-1*、*cytSOD-3-2*、*mtSOD-3-1*、*mtSOD-3-2*和*cytSOD-5-1*、*cytSOD-5-2*、*mtSOD-5-1*、*mtSOD-5-2*(表1),参照试剂盒(TaKaRa)说明书分别扩增3'末端和5'末端cDNA序列。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶纯化试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]纯化后克隆至pGEM-T(Promega)载体上,转化到*E. coli* DH5α感受态细胞,所获得的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司进行测序。最后,对所获得的序列进行拼接获得完整的*cytMnSOD*和*mtMnSOD*全长cDNA。

1.4 序列分析

用NCBI中BLAST软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对核苷酸和氨基酸序列同源性进行在线比对分析;ORF finder工具分析mRNA序列的开放阅读框;Protparam软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)预测蛋白理化性质;信号肽和N-糖基化位点的预测分别用SignalP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)程序;采用DNAMAN软件进行氨基酸多序列比对分析;基于氨基酸全序列构建的系统发育树利用Clustal X和MEGA4.0软件采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建,并用Bootstrap重复1000次计算各分支的置信度。

1.5 *cytMnSOD*和*mtMnSOD*基因的时空表达分析

根据日本沼虾*cytMnSOD*(HQ852226)、*mtMnSOD*(HQ852225)和18S rRNA(DQ531769.1)的cDNA序列设计目的基因引物*cytSOD-F*、*cytSOD-R*、*mtSOD-F*、*mtSOD-R*和内参基因引物18SRNA-F、18SRNA-R(表1)。提取不同组织、不同蜕皮时期肝胰腺总RNA,反转录合成cDNA,依照SYRB Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒进行Real-time PCR分析。20 μL体系包括:SYRB Premix Ex Taq™ 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL,cDNA模板1.0 μL,ROX Reference Dye 0.4 μL,ddH₂O 7.8 μL。反应条件:95 °C 30 s,1循环;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40循环。每个样品来源于3只动物,重复3次,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析,实验数据采用SPSS 10.0软件统计分析($P < 0.05$)。

表1 实验中用到的引物及其序列
Tab.1 Primers used in the experiments

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequences
<i>cytMnSOD</i>	
<i>cytSOD-1</i>	GTTYKCCYATATCAATGCTG
<i>cytSOD-2</i>	CKRAGGTTCTTGACTGAMGG
<i>cytSOD-3-1</i>	TCACGTTCTCTCCCTCGA
<i>cytSOD-3-2</i>	TTCTGGTTGGGGCTGGCTTG
<i>cytSOD-5-1</i>	ATGTGTAAGCTGAAGGGGGTCC
<i>cytSOD-5-2</i>	CAAGCCAGCCCCAACAGAA
<i>cytSOD-F</i>	CCCAAATGGAGGTGGAGAAC
<i>cytSOD-R</i>	TAGGACAGTAGCCAAGCCAGC
<i>mtMnSOD</i>	
<i>mtSOD-1</i>	CTYCACTCAAAAGCATCACC
<i>mtSOD-2</i>	CTCCACACATCRATCCAAA
<i>mtSOD-F</i>	AGGTTCAATGGAGGAGGTCACA
<i>mtSOD-R</i>	AGTGCCCCCTTTTGCTTGTTA
<i>mtSOD-3-1</i>	AGGTTCAATGGAGGAGGTCACA
<i>mtSOD-3-2</i>	GGGCTCAGGATGGGGTTGGTTA
<i>mtSOD-5-1</i>	AGTGCCCCCTTTTGCTTGTTA
<i>mtSOD-5-2</i>	TGTGACCTCCTCCATTGAACCT
18S rRNA	
18S RNA-F	TGTTACGGGTGACGGAGAA
18S RNA-R	CATCCAATTACGCAGACTCGG

1.6 嗜水气单胞菌体内攻毒实验

选取蜕皮间期(C期)的健康虾,无菌生理盐水稀释嗜水气单胞菌浓度至 5.0×10^6 cells/mL,从虾最后腹节注射,每只 20 μ L。注射后 3、6、12、24 h,分别测定肝胰腺 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* mRNA 的水平。每个样品来源于 3 只动物,重复 3 次,数据处理方法同上。

2 结果

2.1 日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 全长 cDNA 克隆与序列

日本沼虾 *cytMnSOD* cDNA 全长 1 233 bp,其中开放阅读框为 858 bp,编码 286 个氨基酸;5' UTR 为 73 bp,3'UTR 为 302 bp,包括一个终止密码子、多聚腺苷酸加尾信号(AATATA)和 polyA 尾。日本沼虾 *mtMnSOD* cDNA 全长 1 113 bp,其中开放阅读框为 654 bp,编码 218 个氨基酸;5'

UTR 为 31 bp,3'UTR 为 428 bp,包括一个终止密码子、多聚腺苷酸加尾信号(AATATA)和 polyA 尾(序列未显示)。*cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 编码蛋白推测分子量分别为 31.33 和 24.05 ku,理论等电点(pI)分别为 5.62 和 7.12。*cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* cDNA 提交 GenBank,登录号分别为 HQ852226 和 HQ852225。

2.2 日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 结构特征与氨基酸序列

由 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 推导的氨基酸序列均含有 MnSOD 的特征肽段(DVWHHAYY)、4 个 Mn^{2+} 结合位点(H110、H158、D243、H247 和 H48、H96、D180、H184)和 2 个 N-糖基化位点(NHT、NMS 和 NHT、NLS);在 N 端,*mtMnSOD* 含有一个由 20 个氨基酸残基组成的信号肽,而 *cytMnSOD* 缺少这个信号肽,但多了一段 60 个氨基酸残基组成的保守延伸区(图 1,图 2)。

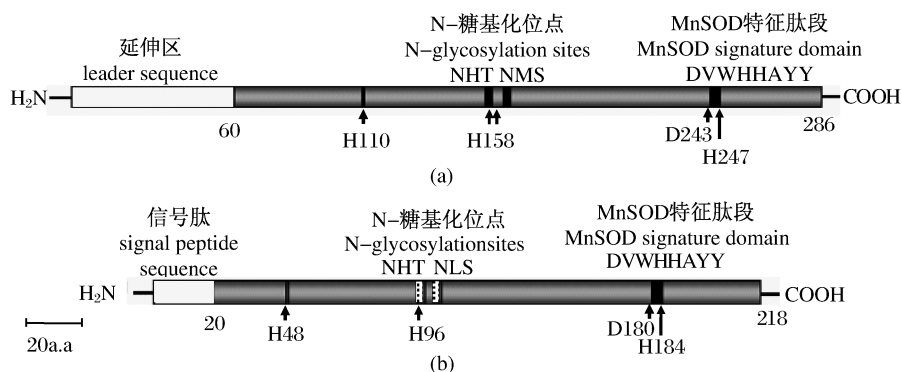


图 1 日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 的结构

(a) *cytMnSOD* 的延伸区(白色方框), (b) *mtMnSOD* 的信号肽(白色方框); 2 个 N-糖基化位点(黑色点状方框); 箭头表示 4 个 Mn^{2+} 结合位点; MnSOD 的特征肽段 DVWHHAYY(黑色实心方框)。

Fig. 1 CytMnSOD and mtMnSOD domain of *M. nipponense*

(a) The white box indicated the leader sequence peptide of *cytMnSOD*, (b) the signal sequence peptide of *mtMnSOD*, respectively. The arrow showed putative manganese binding sites. The black dot box and the black solid box indicated two N-glycosylation sites and manganese superoxide dismutase domain(DVWHHAYY), respectively.

多序列比对分析发现,日本沼虾 *cytMnSOD* 推导的氨基酸序列与其 *mtMnSOD* 的氨基酸序列相似性为 40%;与罗氏沼虾、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、青蟹、日本对虾等的 *cytMnSOD* 氨基酸序列相似性分别为 98%、81%、79%、79% 和 78%。日本沼虾 *mtMnSOD* 推导的氨基酸序列与罗氏沼虾、日本对虾、中国对虾、青蟹等物种的 *mtMnSOD* 氨基酸序列相似性分别为 97%、88%、86% 和 84%。

基于氨基酸序列构建的系统树显示, MnSOD 共分为两大亚群,来着日本沼虾的 MnSOD 与罗氏沼虾的 MnSOD 亲缘关系最近, *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 分别被归为胞质亚群和线粒体亚群(图 3)。

2.3 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 时空表达

cytMnSOD 和 *mtMnSOD* mRNA 在肝胰腺、血细胞、肌肉、大颚器官、卵巢和鳃等组织部位均有表达,其中肝胰腺最高,大颚器官较低(图 4)。

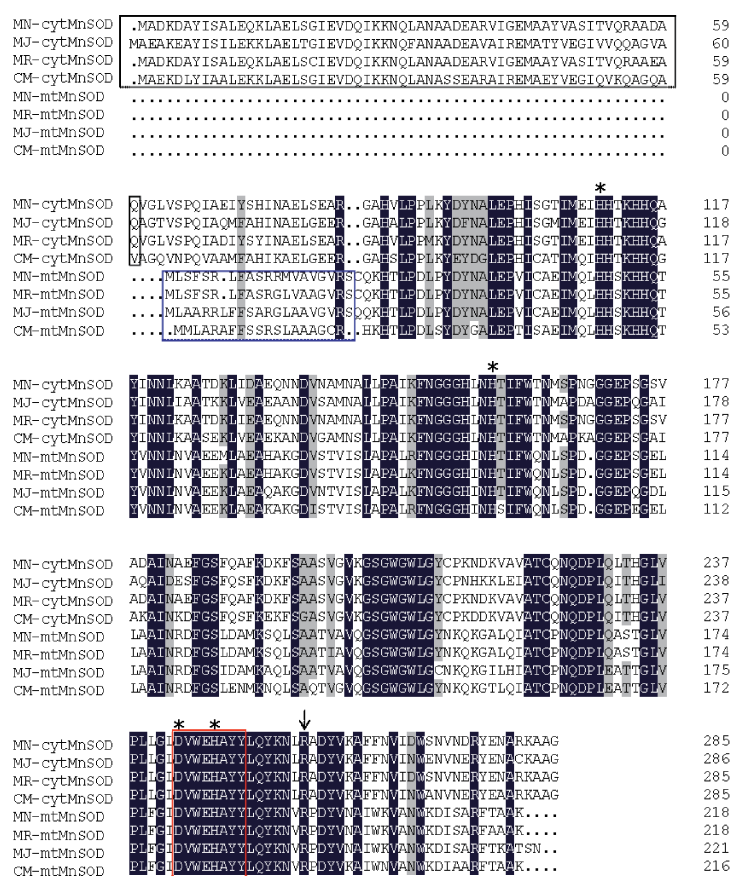


图2 日本沼虾 MnSOD 与其他甲壳动物 MnSOD 多序列比对

黑色方框表示 cytMnSOD 的 N 端延伸区,蓝色方框表示 mtMnSOD 的信号肽序列,红色方框表示 MnSOD 的特征肽段,星号表示 Mn^{2+} 结合位点,箭头处 R 位点与 MnSOD 结构稳定性有关。

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of MnSOD from *M. nipponense* and other crustaceans

The black box indicated the leader sequence peptide of cytMnSOD. The blue box showed the signal sequence peptide of mtMnSOD. The red box showed manganese superoxide dismutase domain or signature. The putative manganese binding sites for MnSOD were showed with asterisks. The arrow indicated the R residual involved in the structural stability of MnSOD.

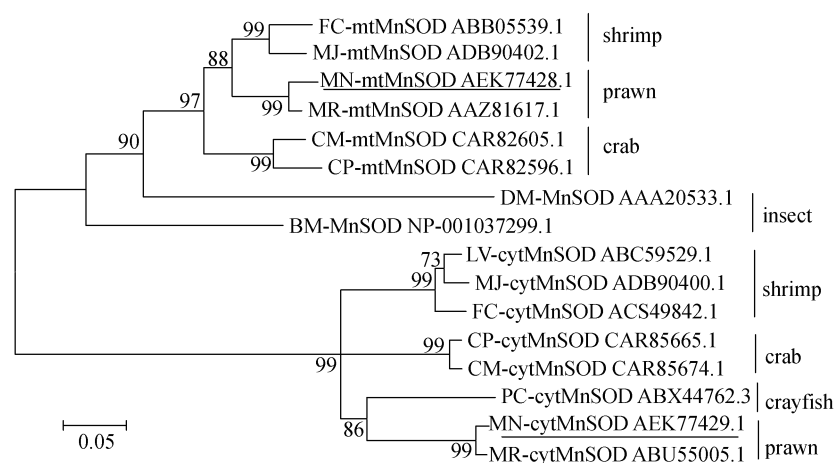


图3 不同节肢动物 MnSOD 系统进化树分析

日本沼虾的两种 MnSOD 用下划线标出。

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree of cytMnSOD and mtMnSOD amino acid sequence from different arthropod species

The two MnSOD of *M. nipponense* are underlined.

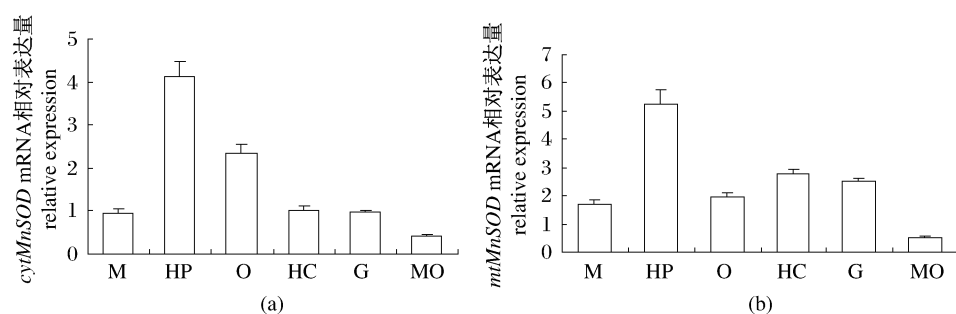


图4 日本沼虾 *cytMnSOD* (a) 和 *mtMnSOD* (b) 基因的组织表达

M. 肌肉; HP. 肝胰腺; O. 卵巢; HC. 血细胞; G. 鳃; MO. 大颚器官。

Fig. 4 Real-time PCR analysis of *cytMnSOD* (a) and *mtMnSOD* (b) transcripts from different tissues

M. muscle; HP. hepatopancreas; O. ovary; HC. haemocytes; G. gill; MO. mandibular organ.

肝胰腺 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 基因表达水平的波动性变化与蜕皮周期有关,蜕皮后 B 期较

A 期逐渐升高,蜕皮间期 C 最高,蜕皮前期 D 逐渐降低,D2-3 期最低(图 5)。

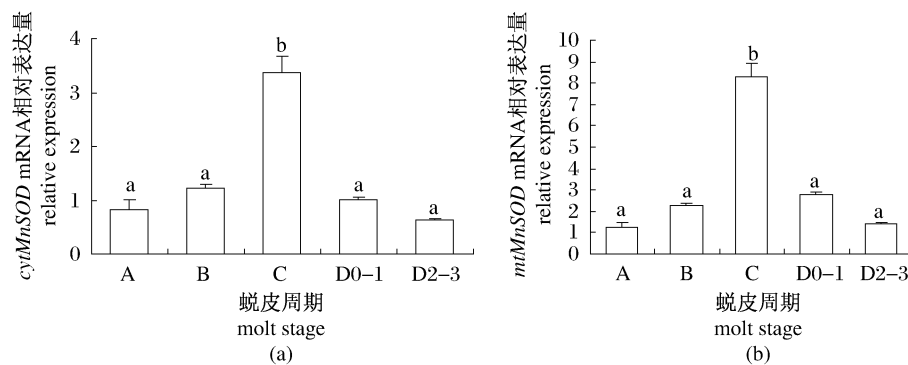


图5 日本沼虾肝胰腺 *cytMnSOD* (a) 和 *mtMnSOD* (b) 基因表达随蜕皮周期的变化

字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 5 Change of *cytMnSOD* (a) and *mtMnSOD* (b) transcripts in hepatopancreas expression during the molt cycle

Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$).

2.4 嗜水气单胞菌刺激对 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 表达的诱导作用

嗜水气单胞菌可快速诱导肝胰腺中

cytMnSOD 和 *mtMnSOD* mRNA 表达,3 h 达到峰值,6 h 后逐渐恢复到正常水平(图 6)。

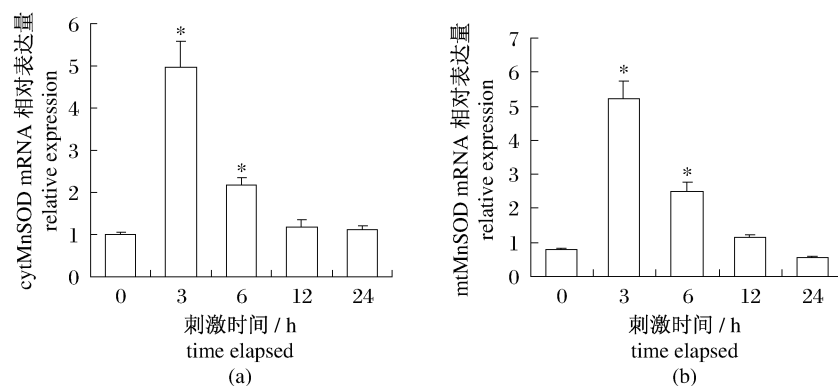


图6 嗜水气单胞菌对日本沼虾 *cytMnSOD* (a) 和 *mtMnSOD* (b) 基因表达的诱导作用

* 与 0 h 比较, $P < 0.05$ 。

Fig. 6 The induction of *cytMnSOD* (a) and *mtMnSOD* (b) expressions by *A. hydrophila*

* $P < 0.05$, vs 0 h.

3 讨论

目前已证实,以血蓝蛋白携氧的甲壳动物细胞内, *cytMnSOD* 取代了脊椎动物细胞内普遍存在的 *cytCu/ZnSOD*, 这种以 *MnSOD* 代替 *Cu/ZnSOD* 的现象似乎与血蓝蛋白合成时对铜离子的需求有关^[13]。我们首次克隆出日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 基因, 推导氨基酸序列均含有 *MnSOD* 的特征肽段(DVWHHAYY)和4个 Mn^{2+} 结合位点(H, H, D 和 H)(图1, 图2), 分别在 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 氨基酸序列的257位和194位, 含有一保守的精氨酸残基(R), 此R残基靠近 *MnSOD* 的特征肽段(图2), 与 *MnSOD* 的结构稳定性有关, 这点已在其他物种得到证实^[14]。另外, 日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 3'UTR 处的多聚腺苷酸加尾信号(AATATA)和ATTTA序列也均与维持 mRNA 的稳定性有关^[15]。

cytMnSOD 和 *mtMnSOD* 是由不同基因编码的蛋白质, 其主要区别是蛋白分子的N端^[11]。所有甲壳类 *mtMnSOD* 分子N端都含有一个由20个氨基酸残基组成的信号肽, 而 *cytMnSOD* 合成后仍驻留在细胞质中, 所以缺少这个信号肽; 与 *mtMnSOD* 相比, *cytMnSOD* 在N端多了一段60个氨基酸残基组成的延伸区。对蓝蟹(*Callinectes sapidus*) *cytMnSOD* 结构分析表明, 其蛋白序列起始于氨基酸残基的60位, 暗示前1~59位残基组成了多肽的延伸区^[16]。日本沼虾 *cytMnSOD* 氨基酸序列的60位含有一可能切割位点, 预测成熟肽分子量为24.8 ku, 与罗氏沼虾和蓝蟹的成熟肽分子量接近^[10, 13]。切除日本沼虾 *mtMnSOD* 信号肽序列后, 预测成熟肽分子量为21.8 ku, 与 Yao 等^[17] 从日本沼虾肌肉纯化到的 *MnSOD* 蛋白分子量(21.7 ku)相一致, 故推测已纯化的 *MnSOD* 为 *mtMnSOD*。

甲壳动物的蜕皮是一个复杂的生理过程, 体内多种因子都受这种周期性变化的影响^[18-19], 关于 *MnSOD* 基因表达与蜕皮周期的关系研究较少。对蓝蟹的研究表明, 在蜕皮间期, 肝胰腺内 *cytMnSOD* 活性最强, 在蜕皮后期, 几乎检测不到其酶活性, 而在整个蜕皮周期均能检测到 *mtMnSOD* 活性^[13]。本研究显示, 2种 *MnSOD* 表达的波动性变化受蜕皮周期的影响, 在蜕皮间期

最高, 提示该基因的转录可能受蜕皮激素的调节; 另外, 蜕皮期间机体耗氧量等的巨大变化应是影响 *MnSOD* 表达的因素之一^[18], 其相应的酶活性变化目前正在研究中。

Real-time PCR 结果表明, 日本沼虾 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* mRNA 在肝胰腺、血细胞、卵巢、鳃等组织中均有表达, 与中国对虾、罗氏沼虾和凡纳滨对虾等的研究相一致^[8-12]; Wang 等^[20] 利用原位杂交技术在凡纳滨对虾肝胰腺 F 细胞中检测到 *cytMnSOD* 的转录物。 *MnSOD* 组织表达的广泛性与其功能有关, 肝胰腺和血细胞是参与免疫的主要器官, 鳃参与病原的过滤和清除等, 作为一种重要的抗氧化酶, *MnSOD* 在维持组织正常功能方面可能发挥重要作用^[21]。 Campa-Cordova 等^[5, 22] 发现饲喂免疫增强剂后, 南美白对虾血细胞和肌肉中 *SOD* 的活性上升, 感染病菌后的存活率升高, 表明 *SOD* 在虾免疫反应中具有调节作用。鉴于 *MnSOD* 在蜕皮间期及肝胰腺中的高表达, 我们以蜕皮间期的虾为实验材料, 研究发现, 注射嗜水气单胞菌后 3 h, 肝胰腺 *cytMnSOD* 和 *mtMnSOD* 的表达迅速升高。而罗氏沼虾在注射格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) 3 h 后, 肝胰腺 *cytMnSOD* 表达量下降, *mtMnSOD* 没有明显变化^[9-10]。中国对虾感染 WSSV 病毒 3 h 后, 肝胰腺 *mtMnSOD* 的表达显著上调, 而 *cytMnSOD* 在感染后 23 h 才开始有大幅度上升^[12]。上述结果的差异, 可能是由于种属、病原种类及其浓度等不同引起的。如较低浓度的病原对虾机体的刺激会使虾细胞内产生较多的 ROS, 机体为了清除这些 ROS, 会提高 *MnSOD* 基因的表达; 较高浓度的病原入侵会对甲壳动物组织和细胞造成损伤, 表达 *MnSOD* 细胞数量减少, 导致其基因表达量下降^[23]; 另外, 不同种类的病原给虾机体造成的氧化压力不同、不同种属的虾类对机体免疫压力下产生的活性氧的清除能力不同等都有可能引起 *MnSOD* 表达的差异。

参考文献:

- [1] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed invertebrates [J]. *Aquaculture*, 1999, 172 (1-2): 125-145.
- [2] Munoz M, Cedeno R, Rodriguez J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in aemocytes of the penaeid shrimp,

- Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2000, 191 (1) : 89 – 107.
- [3] Warner H R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease [J]. Free Radical Biology Medicine, 1994, 17 (3) : 249 – 258.
- [4] Holmblad T, Soderhall K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity [J]. Aquaculture, 1999, 172 (1 – 2) : 111 – 123.
- [5] Campa-Cordova A I, Hernandez-Saaverdra N Y, De Philippis R, *et al.* Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12 (4) : 353 – 366.
- [6] Fink R C, Scandalios J G. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutase [J]. Archives Biochemistry and Biophysical, 2002, 399 (1) : 19 – 36.
- [7] Lin Y C, Vaseeharan B, Chen J C. Identification of the extracellular copper-zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following β -glucan and peptidoglycan injections [J]. Molecular Immunology, 2008, 45 (5) : 1346 – 1355.
- [8] Gomez-Anduro G A, Barillas-Mury C V, Peregrino-Urarte A B, *et al.* The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*; molecular cloning and expression [J]. Development Comparative Immunology, 2006, 30 (10) : 893 – 900.
- [9] Cheng W, Tung Y H, Chiou T T, *et al.* Cloning and characterization of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21 (4) : 453 – 466.
- [10] Cheng W, Tung Y H, Liu C H, *et al.* Molecular cloning and characterization of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20 (4) : 438 – 449.
- [11] Lin Y C, Lee F F, Wu C L, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMnSOD) and mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28 (1) : 143 – 150.
- [12] Zhang Q L, Li F H, Wang B, *et al.* The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: Cloning, distribution and expression [J]. Development Comparative Immunology, 2007, 31 (1) : 429 – 440.
- [13] Marius B, Thea H B, Walter G, *et al.* Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport [J]. Biochemistry Journal, 2003, 374 (1) : 219 – 228.
- [14] Gabbianelli R, Battistoni A, Politicelli F, *et al.* Effect of Lys175 mutation on structure function properties of *Propionibacterium shermanii* superoxide dismutase [J]. Protein Engineering Design and Selecting, 1997, 10 (9) : 1067 – 1070.
- [15] Malter J, Hong Y. A redox switch and phosphorylation are involved in the post-translational up-regulation of the adenosine-uridine binding factor by phorbol ester and ionophore [J]. Journal of Biology Chemistry, 1991, 266 (5) : 3167 – 3171.
- [16] Brouwer M, Brouwer T H, Grater W, *et al.* The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondrion does not apply to a large group of marine arthropods [J]. Biochemistry, 1997, 36 (43) : 13381 – 13388.
- [17] Yao C L, Wang A L, Wang W N, *et al.* Purification and partial characterization of Mn superoxide dismutase from muscle tissue of the shrimp *Macrobrachium nipponense* [J]. Aquaculture, 2004, 241 (1 – 4) : 621 – 631.
- [18] Engel D W, Brouwer M, Mercaldo A R, *et al.* Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the American lobster, *Homarus americanus* [J]. Marine Environmental Research, 2001, 52 (3) : 257 – 269.
- [19] Rao M S, Rajitha B, Pavitra E, *et al.* Changes of copper and protein profiles in hepatopancreas and hemolymph tissues during different molt stages of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Biotechnology, 2008, 7 (1) : 153 – 156.
- [20] Wang Y C, Chang P S, Chen H Y. Tissue

- expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23 (6): 1161 – 1177.
- [21] 许燕, 杨洁, 孙静秋, 等. 凡纳滨对虾不同组织内 SOD、POD 酶的细胞化学定位 [J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 402 – 406.
- [22] Campa-Cordova A I, Hernandez-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 133(4): 557 – 565.
- [23] 刘振兴, 陈昌福, 高宇, 等. 嗜水气单胞菌对克氏原螯虾免疫相关因子活性的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(3): 358 – 363.

cDNA cloning and expression analysis of *cytMnSOD* and *mtMnSOD* from *Macrobrachium nipponense*

WANG Wen-feng^{1,2}, GUAN Jian-yi^{1,2}, LÜ Li¹, LIU Fang¹, YANG Hong¹, NING Qian-ji^{1*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Department of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The *cytMnSOD* and *mtMnSOD* genes were cloned from hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense* using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method for the first time. The full-length cDNA of *cytMnSOD* was 1 233 bp with a 858 bp of open reading frame (ORF) encoding a 286 amino acids (aa) protein with a 60 aa leader sequence; whereas the full-length cDNA of *mtMnSOD* was 1 113 bp with a 654 bp of ORF encoding a 218 aa protein with a 21 aa signal peptide sequence in the N-terminus. The calculated molecular masses and estimated pI of translated *cytMnSOD* and *mtMnSOD* proteins were 31.33 ku, 24.05 ku and 5.62, 7.12, respectively. The deduced amino acid sequence of *cytMnSOD* had 40% of similarity to that of *mtMnSOD*. Both *cytMnSOD* and *mtMnSOD* contained a manganese superoxide dismutase domain (DVWEHAYY), four conserved amino acids responsible for binding manganese (H110, H158, D243, H247 and H48, H96, D180, H184), and two N-glycosylation sites (NHT, NMS and NHT, NLS). The constructed phylogenetic tree indicated that arthropod MnSODs could be classified into two distinct branches, *cytMnSODs*, and *mtMnSODs*. The MnSODs from *M. nipponense* were more closely related to *Macrobrachium rosenbergii* MnSODs than that from other crustaceans. Real-time RT-PCR analysis showed that both *cytMnSOD* and *mtMnSOD* from *M. nipponense* were expressed in hepatopancreas, muscle, haemocytes, ovarian, mandibular organ and gill, but relatively higher in the hepatopancreas. The levels of both *cytMnSOD* and *mtMnSOD* transcripts in hepatopancreas were the highest in stage C among the molt cycle. Injection of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila* resulted in the significant increase of *cytMnSOD* and *mtMnSOD* expressions 3 h after treatment, indicating that MnSOD may act as an important molecule involved in immune defense against *A. hydrophila*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; *cytMnSOD*; *mtMnSOD*; cloning; expression

Corresponding author: NING Qian-ji. E-mail: ningqianji1964@163.com