



## 罗氏沼虾胞质锰超氧化物歧化酶的功能

李亚男<sup>1</sup>, 陆霖青<sup>1</sup>, 张鹏<sup>2</sup>, 张博<sup>2</sup>, 林鑫<sup>1\*</sup>, 秦真东<sup>1\*</sup>

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,

广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

**摘要:** 为了解超氧化物歧化酶 (SOD) 分子生物学特性和免疫功能, 实验克隆了罗氏沼虾胞质锰 SOD 基因 (*MrcMnSOD*), 制备多克隆抗体, 并分析在嗜水气单胞菌感染下该基因的表达模式。结果显示, 嗜水气单胞菌感染可显著诱导 *MrcMnSOD* 在转录水平和蛋白质水平进行高表达。为探究 *MrcMnSOD* 参与免疫应答的机制, 进一步的抑菌实验表明, 该蛋白质可显著抑制 3 种革兰氏阴性细菌 (大肠杆菌、副溶血性弧菌、嗜水气单胞菌) 和 2 种革兰氏阳性细菌 (无乳链球菌、金黄色葡萄球菌) 的生长, 且抑制作用与蛋白质浓度的关系不显著。研究表明, *MrcMnSOD* 可能作为一种免疫相关分子参与免疫应答反应。本研究初步探讨了 *MrcMnSOD* 的免疫生物学功能, 旨在为深入研究罗氏沼虾 SOD 的功能奠定相关基础。

**关键词:** 罗氏沼虾; MnSOD; 表达模式; 抑菌

中图分类号: S 945.1

文献标志码: A

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda) 软甲纲 (Malacostraca) 沼虾属 (*Macrobrachium*), 原产于东南亚, 自 20 世纪 60 年代从日本引进中国, 现已成功实现人工繁育, 目前在国内多省市均有养殖。罗氏沼虾因其生长快、肉质鲜美, 经济效益明显, 已成为我国重要的水产经济虾类之一<sup>[1]</sup>。然而近年来, 随着养殖密度的加大, 细菌性疾病、真菌性疾病、病毒性疾病和寄生虫病等不断暴发, 严重危害沼虾养殖业, 给该行业带来了巨大的经济损失<sup>[2-3]</sup>。

罗氏沼虾缺乏比较完善的获得性免疫系统, 主要依靠凝血、凝集、吞噬、酚氧化酶原激活系统、抗菌肽以及呼吸爆发产生活性氧分子 (ROS) 等先天性免疫方式抵御病原入侵<sup>[4-6]</sup>。其中, 持续高水平的 ROS 在发挥杀菌功能的同时, 会增加机体氧化应激水平, 引发氧化损伤, 细胞凋亡等,

降低机体防御能力<sup>[7-10]</sup>, 因此, 合理的 ROS 水平对于维持机体稳态、提高抵抗力至关重要。研究表明, 超氧化物歧化酶 (SODs) 是消除生物体内过量 ROS 的第一道防线, 可特异性地将超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 歧化为过氧化氢 ( $H_2O_2$ ), 进一步由过氧化氢酶 (CAT) 转化为无毒的水分子<sup>[11]</sup>, 蛋白质<sup>[8-10]</sup>是无脊椎动物先天性免疫非常重要的组成部分<sup>[12-13]</sup>。但是, SODs 在水产甲壳动物中的研究还处于初级阶段, 详细了解其分子生物学特性和免疫功能对于良种培育和病害防控都有积极的意义。因此, 本研究克隆了罗氏沼虾胞质 *MnSOD* 基因 (*MrcMnSOD*), 制备了多克隆抗体, 对其在不同组织中的表达模式进行了转录水平和蛋白质水平的分析, 此外, 初步探讨了该蛋白质的免疫功能, 旨在为深入研究罗氏沼虾 SOD 的功能奠定基础。

收稿日期: 2021-08-25 修回日期: 2022-01-19

资助项目: 广东省渔业生态环境重点实验室开放基金 (FEEL-2021-10)

第一作者: 李亚男 (照片), 从事水产动物抗氧化免疫研究, E-mail: liyanan@zhku.edu.cn

通信作者: 林鑫, 从事水产病害与免疫研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn;

秦真东, 从事水产病害与免疫研究, E-mail: qinzhendongse@163.com



## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用罗氏沼虾购自广东金洋水产养殖有限公司, 平均体长 (10±2) cm, 暂养于实验室 28 °C 充气循环水中, 适应 1 周后开始实验, 经麻醉后取样, 样品置于 -80 °C 冰箱用于后续提取 RNA。实验所用嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 使用前先于 37 °C 无抗 LB 培养基中过夜活化, 后用无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗菌体 3 次, 使用无菌 PBS 重悬菌液至浓度为 1×10<sup>6</sup> CFU/mL<sup>[14]</sup> 时进行腹部注射。本研究获得了仲恺农业工程学院动物科技学院实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守相关规范, 并按照伦理委员会制定的规章制度执行实验操作。

### 1.2 实验试剂

TRIzol Reagent、PCR Mix、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞、EcoR I 和 Xho I 限制性内切酶、His 标签特异性层析柱购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司 (TaKaRa)。逆转录试剂盒 Goldenstar<sup>TM</sup> RT6 cDNA Synthesis Kit 购自北京擎科生物科技有限公司。一步克隆试剂盒 (ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit)、凝胶回收试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 采用 quantinova-SYBR-Green PCR 试剂盒。Bradford 蛋白质浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。小鼠 (*Mus musculus*) 抗 His-tag 抗体, HRP 标记山羊抗小鼠 Ig G 购于北京博奥森生物技术有限公司。引物以及其他无特殊说明的试剂均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

### 1.3 总 RNA 提取和基因克隆

使用 TRIzol 法进行总 RNA 提取后, 使用超

微量分光光度计 NP80 (IMPLEN, 德国) 检测 RNA 的纯度, 当  $A_{260}/A_{280}$  达到 1.8~2.0 后进行下一步操作。根据逆转录试剂盒操作说明, 逆转录合成单链 cDNA。根据 GenBank 中 *MrcMnSOD* 开放阅读框序列 (ABU55005.1, 编码 286 个氨基酸), 设计该基因一步克隆引物 *MrcMnSOD*-32a S 和 *MrcMnSOD*-32a A (表 1), 以 cDNA 为扩增模板, 扩增 *MrcMnSOD* 序列, 扩增得到的基因序列需经胶回收纯化。

### 1.4 重组蛋白质表达与纯化

根据一步克隆试剂盒操作说明, 将纯化后的基因扩增产物与线性化的 PET-32a 载体进行同源重组反应, 构建重组质粒 PET-32a-*MrcMnSOD*。将重组质粒转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 进行阳性克隆子筛选。阳性克隆子经测序检验正确后, 进一步提取质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达菌株进行重组蛋白质表达。37 °C、200 r/min 的条件下, 表达菌在含有氨苄的 LB 培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 后, 添加 0.1 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷在 37 °C 下继续振荡培养 5~6 h, 诱导重组蛋白质大量表达。离心收集菌体, PBS 清洗菌体 3 次后, 重悬菌体并在低温下进行超声波破碎, 使用 12% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白质检测融合蛋白质的表达情况。使用宝日医生物技术 (北京) 有限公司 His 标签特异性层析柱对上清蛋白质进行纯化回收, 操作详见使用手册。

### 1.5 抗体制备与检测

收集纯化后的重组蛋白质送至武汉福因德公司免疫新西兰大白兔 (*Oryctolagus cuniculus*), 获得兔源性 *MrcMnSOD* 多克隆抗体。抗体制备完成后, 采用酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 检测抗体效价。为检测抗体特异性, 采集罗氏沼虾新鲜组

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primers	序列 (5' - 3') sequences	用途 purpose
<i>MrcMnSOD</i> S1	CCCAGATTGCTGACATTTACTCC	qRT-PCR
<i>MrcMnSOD</i> A1	CTGTTGCTGCTTTAAGGTTGTTG	
<i>Mr18S</i> F	TAGCAATTCGCCGTCGTTATTC	qRT-PCR
<i>Mr18S</i> R	CTACCCCCGGAAGCTCAAAGACT	
<i>MrcMnSOD</i> -32a S	TATTTTCAGGGATCCGAATTCATGGCTGACAAGGATGCATACA	重组质粒构建
<i>MrcMnSOD</i> -32a A	GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTCAATGTCCAGCAGCCTTGC	

织样品 0.5 mg 制备组织蛋白质样品: 加入 1 mL RIPA 裂解液, 冰上研磨至组织充分裂解, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液与蛋白质上样缓冲液混合煮沸 10 min 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳后进行半干转膜, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min。5% 脱脂奶粉稀释小鼠抗 His-tag 抗体至 1:1 000 (体积比), 4 °C 过夜孵育, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min。再用 HRP 标记山羊抗小鼠二抗 Ig G (1:10 000) 孵育 1 h 后, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。其中, 脱脂奶粉溶于 TBST 中。最后 ECL 显色 1 min, 使用化学发光及荧光成像系统 Chemi Scope 6000 拍照。

### 1.6 组织表达模式分析

将罗氏沼虾随机分为实验组和对照组。实验组每尾虾腹肌注射活化后的 100  $\mu$ L  $1 \times 10^6$  CFU/mL 嗜水气单胞菌, 对照组每尾注射等量无菌 PBS。注射后 0、3、6、12 和 24 h, 采集肝胰腺和肠组织进行总 RNA 提取、cDNA 逆转录和 qRT-PCR, 以 18S *rRNA* 为内参基因 (表 1), 分析基因转录水平表达模式。每个时间点取 3 尾虾进行混样, 平均取 3 次。20  $\mu$ L qRT-PCR 反应体系: 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix QN 10  $\mu$ L, RNase-free water 7  $\mu$ L, cDNA 模板 (5 倍稀释) 2  $\mu$ L, 引物 *MrcMnSOD* S1/ *MrcMnSOD* A1 各 0.5  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 mRNA 水平相对表达量。蛋白质水平表达模式分析取攻毒后 12 和 24 h 的肝胰腺、肠组织保存于 4% 的多聚甲醛中, 后送至武汉赛维尔生物科技有限公司进行组织蜡片制备和组织免疫荧光分析。

### 1.7 抑菌实验

抑菌实验参照 Zheng 等<sup>[15]</sup> 的方法进行, 略作修改。选取 3 种革兰氏阴性菌 [嗜水气单胞菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)] 以及 2 种革兰氏阳性菌 [无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)], 与 *MrcMnSOD* 进行共培养, 检测重组蛋白质的抑菌效果。实验开始前, 先将菌株过夜活化, 使用无菌 PBS 清洗菌体 3 次后, 重悬菌液调整浓度至  $2 \times 10^7$  CFU/mL。培养实验在 37 °C 下、96 孔酶标板中进行, 蛋白质终浓度分别设置为 50 和 100  $\mu$ g/mL, PBS 作为空白对照, 每组设置 3 个重复, 每小时用酶标仪读取  $A_{630}$  值。

## 1.8 数据分析

使用 SPSS 21.0 软件中单因素方差分析 (ANOVA) 进行数据处理, 分析差异性。所有数据均以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) ( $n=3$ ) 表示。 $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  分别被认为有显著差异和极显著差异。使用 Graphpad prism 7.0 软件进行作图。

## 2 结果

### 2.1 重组蛋白质表达与纯化

经 0.1 mmol/L IPTG 37 °C 诱导 5~6 h 后, 重组蛋白质可在上清液中大量表达 (图 1)。*MrcMnSOD* 蛋白质开放阅读框由 286 个氨基酸组成, 分子质量约为 31 ku, PET-32a 载体标签蛋白质约为 18 ku, 因此推测表达的融合蛋白质约为 49 ku, 与 SDS-PAGE 检测结果一致。纯化后的上清液重组蛋白质纯度可达 95% 以上, 浓度达到 1 mg/mL, 满足后续抗体制备送样要求。用制备的 *MrcMnSOD* 多克隆抗体作为一抗进行免疫印迹实验, 检测罗氏沼虾组织样品中的 *MrcMnSOD* (图 1, 第 1 泳道), 在约 31 ku 处检测到 1 条特异性蛋白质条带, 大小和预测的 *MrcMnSOD* 蛋白质一致, 说明制备的多克隆抗体特异性好。

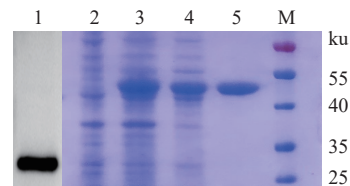


图 1 *MrcMnSOD* 的 SDS-PAGE 检测图

M. 蛋白质 marker, 1. *MrcMnSOD* 多克隆抗体鉴定, 2. IPTG 诱导前菌体总蛋白质, 3. IPTG 诱导后菌体总蛋白质, 4. 诱导后上清液总蛋白质, 5. 纯化后的重组蛋白质。

### Fig. 1 SDS-PAGE detection of *MrcMnSOD*

M. protein marker, 1. detection of polyclonal antibody of *MrcMnSOD*, 2. total protein from *E. coli* BL21 (DE3) before IPTG induction, 3. total protein from *E. coli* BL21 (DE3) after IPTG induction, 4. total supernatant protein, 5. the purified recombinant protein.

### 2.2 抗体效价检测

ELISA 效价检测结果显示, 制备的 *MrcMnSOD* 多克隆抗体效价可达 6 250 000 倍 (图 2)。

### 2.3 转录水平表达模式分析

为了评估 *MrcMnSOD* 是否参与罗氏沼虾对嗜水气单胞菌的免疫反应, 采用 qRT-PCR 分析了嗜水气单胞菌感染罗氏沼虾后肝胰腺和肠组织中的

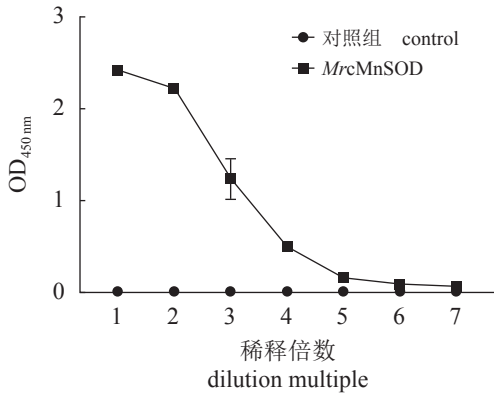
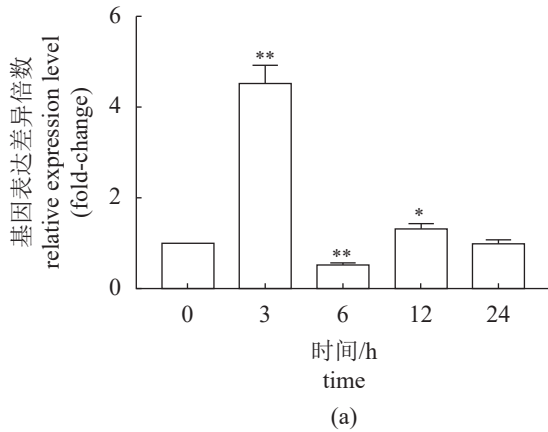


图2 *MrcMnSOD* 多克隆抗体效价检测  
Fig. 2 Titer detection of *MrcMnSOD* polyclonal antibody

1.1 : 10000, 2.1 : 50000, 3.1 : 250000, 4.1 : 1250000, 5.1 : 6250000, 6.1 : 31250000, 7.1 : 156250000.



基因表达变化。结果显示, *MrcMnSOD* 在肝胰腺中的表达量在感染后 3 h 达到峰值, 随后逐渐恢复 (图 3-a)。肠组织中, *MrcMnSOD* 表达量随着感染时间的延长不断增大, 感染后 6 h 达到峰值, 之后表达量虽有所降低, 但依然显著高于对照组 (图 3-b)。该结果表明, 嗜水气单胞菌感染可显著激活 *MrcMnSOD* 的基因表达水平。

2.4 蛋白质水平表达模式分析

嗜水气单胞菌感染后, 采用组织免疫荧光法检测罗氏沼虾肝胰腺和肠组织中 *MrcMnSOD* 表达变化。结果显示, 肝胰腺中 *MrcMnSOD* 随着感染时间的延长表达水平持续增高, 感染后 24 h 达到峰值 (图版 I)。肠中 *MrcMnSOD* 表达水平在感染后 12 h 达到峰值, 之后表达水平下降 (图版 II)。结

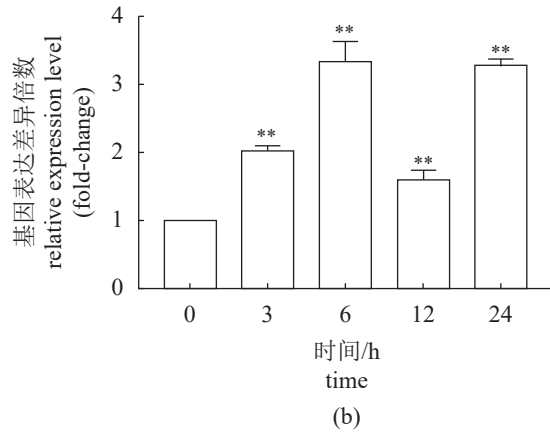
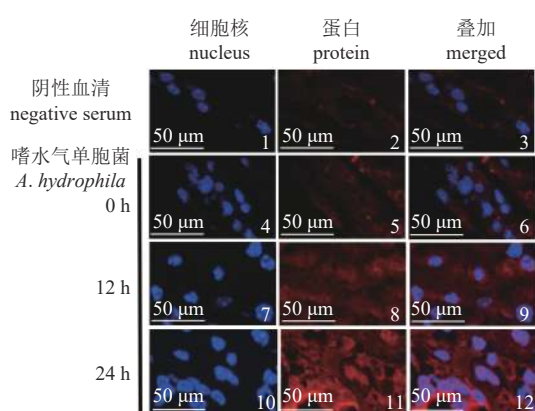


图3 嗜水气单胞菌感染后 *MrcMnSOD* 表达变化

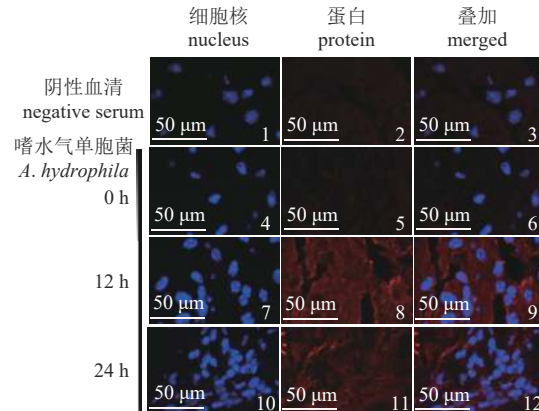
(a) 肝胰腺; (b) 肠。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Expression of *MrcMnSOD* after *A. hydrophila* infection

(a) hepatopancreas; (b) intestine. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



图版 I 嗜水气单胞菌感染后肝胰腺组织免疫荧光  
Plate I Immunofluorescence of hepatopancreas after *A. hydrophila* infection



图版 II 嗜水气单胞菌感染后肠组织免疫荧光  
Plate II Immunofluorescence of intestine after *A. hydrophila* infection

果表明, 嗜水气单胞菌感染可显著激活 *MrcMnSOD* 的蛋白质表达水平。

## 2.5 抑菌实验

为了初步探究 *MrcMnSOD* 参与免疫反应的机制, 本研究选取 5 种常见细菌与重组蛋白质进行共培养实验。结果显示, 相比于对照组,

*MrcMnSOD* 可显著抑制 3 种革兰氏阴性菌和 2 种革兰氏阳性菌的生长。对于嗜水气单胞菌而言, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  重组蛋白质的抑菌效果高于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而在其他几种细菌的培养实验中, *MrcMnSOD* 抑菌效果与蛋白质浓度的依赖关系不显著 (图 4)。

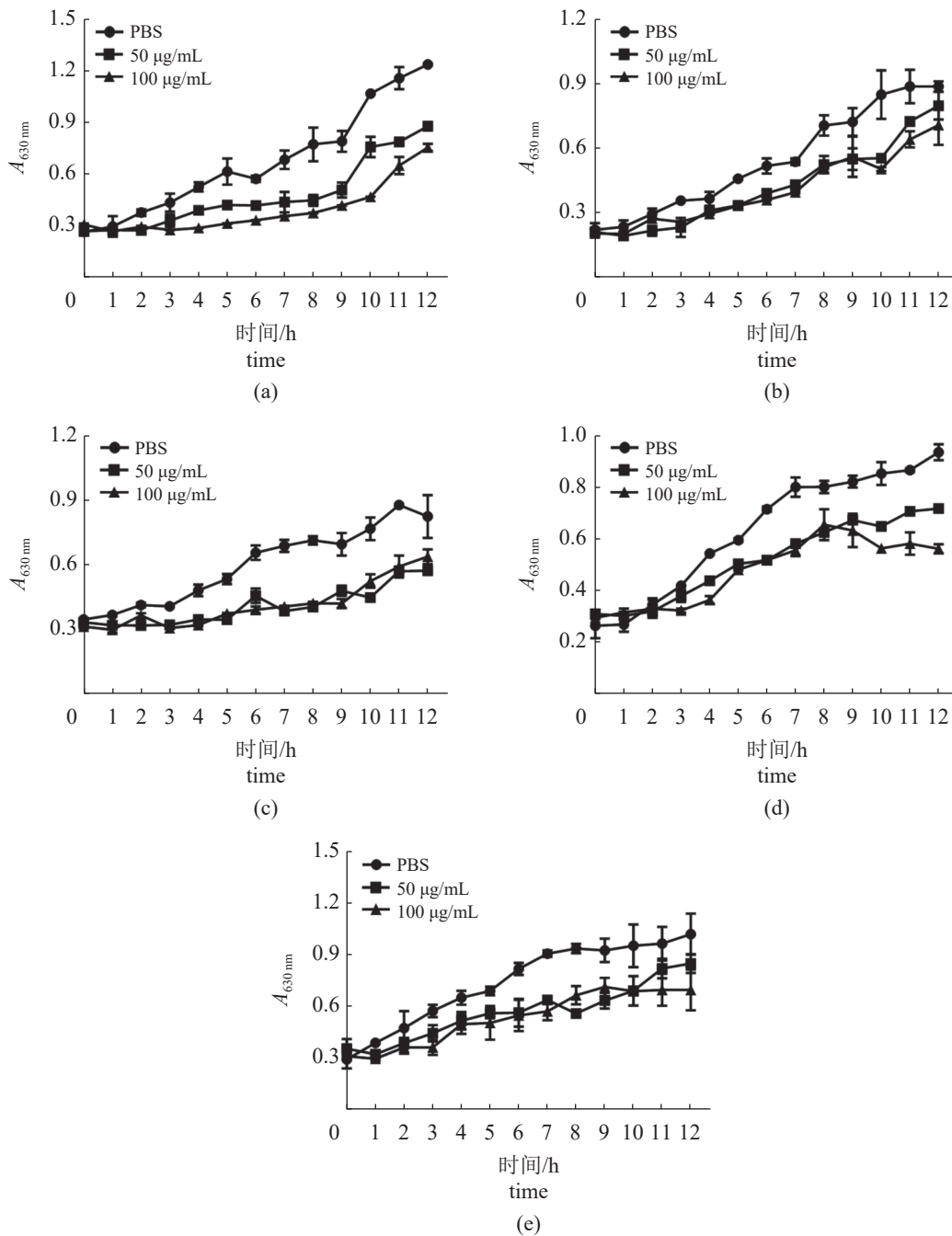


图 4 *MrcMnSOD* 抑菌效果检测

(a) 嗜水气单胞菌; (b) 副溶血性弧菌; (c) 大肠杆菌; (d) 无乳链球菌; (e) 金黄色葡萄球菌。

Fig. 4 Antibacterial effect detection of *MrcMnSOD*

(a) *A. hydrophila*; (b) *V. parahaemolyticus*; (c) *E. coli*; (d) *S. agalactiae*; (e) *S. aureus*.

### 3 讨论

罗氏沼虾口味鲜美, 富含丰富的微量元素和氨基酸, 受到消费者的喜爱。据统计, 2020 年中国罗氏沼虾的养殖产量接近 14 万 t<sup>[16-17]</sup>, 是中国重要的经济水产养殖动物之一。但是, 近年来随着养殖规模的扩大以及集约型养殖模式的推广, 罗氏沼虾养殖业病害频发, 严重危害该产业的健康发展<sup>[18-19]</sup>。嗜水气单胞菌是养殖水体中一类重要的条件致病菌, 可感染罗氏沼虾肝胰腺, 引起孵化期和生长期的较高死亡率<sup>[20-21]</sup>。研究发现, 对虾黑斑坏死病与嗜水气单胞菌属和其他病原菌, 如弧菌和假单胞菌的联合感染有关。因此, 嗜水气单胞菌侵染过程中的免疫机制近年来也备受关注<sup>[14]</sup>。

SODs 是无脊椎动物先天性免疫的重要组成部分<sup>[7, 22]</sup>。在哺乳动物中, MnSOD 被认为是一种应激因子, 其表达水平可能受环境和生物刺激的影响<sup>[23]</sup>。本研究中, 嗜水气单胞菌感染期间, 罗氏沼虾 *MrcMnSOD* 在基因表达水平和蛋白质表达水平都被显著激活, 表明该基因参与了细菌感染期间机体氧化还原稳态的调节与抗菌免疫, 这与前人的研究报道相一致。如 Lin 等<sup>[24]</sup>克隆了日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的 *cMnSOD*, 并发现在溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 的刺激下, 该基因能在血淋巴中异常高表达。有学者报导 *cMnSOD* 可在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 感染白斑综合征病毒免疫应答中发挥作用<sup>[25]</sup>。Cheng 等<sup>[26]</sup>虽克隆了 *MrcMnSOD*, 证实该基因参与与格氏乳球菌 (*Lactococcus garvieae*) 的免疫应答, 但并未对其免疫机制做进一步解释, 硬骨鱼类、甲壳类和软体动物中也报道了类似的发现<sup>[7, 27-30]</sup>。然而, 以上研究主要集中在病原体入侵后该基因表达水平的变化, 少有研究其蛋白水平的表达变化, 对其抗菌免疫机制也未做进一步研究。

本研究通过抑菌实验, 初步探究了 *MrcMnSOD* 参与免疫反应的可能机制。与对照组相比, 实验组添加 *MrcMnSOD* 后, 5 种细菌生长明显受到抑制, 提示 *MrcMnSOD* 可能作为一种免疫相关因子参与免疫应答。但对于不同细菌而言, 抑菌效果不尽相同, 如嗜水气单胞菌抑菌实验中, 抑菌效果随着蛋白质浓度的增大而增强, 这种现象在其他几种细菌中并不显著, 推测这可能与不同细菌表面组成差异相关。有研究发现, 鲈 (*Liza haema-*

*tocheila*) 的 MnSOD 可显著抑制格氏乳球菌、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 和大肠杆菌的生长<sup>[31]</sup>。Zheng 等<sup>[15]</sup>对魁蚶 (*Scapharca broughtonii*) MnSOD 抗菌功能研究表明, 魁蚶 MnSOD 可抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌的生长, 且抑制作用与蛋白质浓度关系不显著, 与当前实验结果一致。另有报道称, 罗氏沼虾 CuZnSOD 可通过凝集效应发挥抑菌效果<sup>[32]</sup>, 但 *MrcMnSOD* 是否具有和 CuZnSOD 同样的抑菌机制尚不清楚, 有待进一步研究证实。总之, 本研究阐释了 *MrcMnSOD* 可能作为免疫相关分子参与抗菌应答的依据, 为今后罗氏沼虾病害防控相关研究奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 肖楚康, 方刘, 阮国良, 等. 罗氏沼虾淡化养殖的现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 29-33.  
Xiao C K, Fang L, Ruan G L. Situation and prospect of desalination culture of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2019, 47(8): 29-33 (in Chinese).
- [2] Khuntia C P, Das B K, Samantaray B R, et al. Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 301-310.
- [3] 董学洪, 陈正兴. 罗氏沼虾养殖中常见病害及防治[J]. 水产养殖, 2015, 36(11): 46-48.  
Dong X H, Chen Z X. Diseases and control of *Macrobrachium rosenbergii* farming[J]. *Aquaculture*, 2015, 36(11): 46-48 (in Chinese).
- [4] Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1-2): 111-123.
- [5] Ratcliffe N A, Rowley A F, Fitzgerald S W, et al. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances[J]. *International Review of Cytology*, 1985, 97: 183-350.
- [6] Bachère E. Shrimp immunity and disease control[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 3-11.
- [7] Li Y N, Lu Z J, Zhan F B, et al. Nrf2 modulates host defense during antibacterial immunity response in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 536: 736474.
- [8] Murphy R, Decoursey T E. Charge compensation during

- the phagocyte respiratory burst[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2006, 1757(8): 996-1011.
- [9] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, *et al.* Electron transfer between cytochrome c and p66<sup>Sbc</sup> generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis[J]. *Cell*, 2005, 122(2): 221-233.
- [10] Nordberg J, Arnér E S J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1312.
- [11] Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 12(1): 64-76.
- [12] Li Y N, Xue K, Chen J W, *et al.* Characteristics of the copper, zinc superoxide dismutase of a hadal sea cucumber (*Paelopatides* sp.) from the mariana trench[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(5): 169.
- [13] 李亚男, 张海滨. 海洋无脊椎动物抗氧化酶研究进展[J]. *海洋通报*, 2018, 37(3): 241-253.
- Li Y N, Zhang H B. Progress in antioxidant enzymes study of marine invertebrates[J]. *Marine Science Bulletin*, 2018, 37(3): 241-253 (in Chinese).
- [14] Srisapoom P, Klongklaew N, Areechon N, *et al.* Molecular and functional analyses of novel anti-lipopolysaccharide factors in giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, De Man) and their expression responses under pathogen and temperature exposure[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 357-375.
- [15] Zheng L B, Wu B, Liu Z H, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from ark shell, *Scapharca broughtonii*: molecular characterization, expression and immune activity analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 656-665.
- [16] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fisheries and Fisheries Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. 2020 China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020 (in Chinese).
- [17] Guo H, Deng M Y, Liang J R, *et al.* Gill transcriptome alterations in *Macrobrachium rosenbergii* under copper exposure[J]. *Chemosphere*, 2019, 233: 796-808.
- [18] Hameed A S S, Yoganandhan K, Widada J S, *et al.* Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 127-133.
- [19] Rao R, Zhu Y B, Alinejad T, *et al.* RNA-seq analysis of *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Gut Pathogens*, 2015, 7: 6.
- [20] Onming S, Thongda W, Li C, *et al.* Bioinformatics characterization of a cathepsin B transcript from the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: homology modeling and expression analysis after *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 221-222: 18-28.
- [21] Sung H H, Hwang S F, Tasi F M. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp.[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76(4): 278-284.
- [22] Li Y N, Kong X, Zhang H B. Characteristics of a novel manganese superoxide dismutase of a hadal sea cucumber (*Paelopatides* sp.) from the mariana trench[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(2): 84.
- [23] Bresciani G, da Cruz I B M, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation[J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2015, 68: 87-130.
- [24] 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.
- [25] Gómez-Anduro G A, Barillas-Mury C V, Peregrino-Urriarte A B, *et al.* The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006, 30(10): 893-900.
- [26] Cheng W, Tung Y H, Liu C H, *et al.* Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 438-449.
- [27] Perera N C N, Godahewa G I, Lee S, *et al.* Manganese-superoxide dismutase (MnSOD), a role player in

- seahorse (*Hippocampus abdominalis*) antioxidant defense system and adaptive immune system[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68: 435-442.
- [28] Umasuthan N, Bathige S D N K, Revathy K S, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 753-765.
- [29] Gu W, Chen J, Hou L B, *et al.* The superoxide dismutase from red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*: molecular cloning and characterization analysis[J]. *Zoological Science*, 2014, 31(11): 725-734.
- [30] Zhao D X, Chen L Q, Qin J G, *et al.* Molecular characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(4): 9429-9442.
- [31] Sirisena D M K P, Perera N C N, Godahewa G I, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from red lip mullet, *Liza haematocheila*: evaluation of molecular structure, immune response, and antioxidant function[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 73-82.
- [32] Du J, Zhu H X, Ye M S, *et al.* *Macrobrachium rosenbergii* Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and evaluation of the immune function to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 363-375.

## Function of cytoplasmic manganese superoxide dismutase of *Macrobrachium rosenbergii*

LI Yanan<sup>1</sup>, LU Linqing<sup>1</sup>, ZHANG Peng<sup>2</sup>, ZHANG Bo<sup>2</sup>, LIN Li<sup>1\*</sup>, QIN Zhendong<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** Superoxide dismutase (SOD) is one of the main antioxidant enzymes, and its expression level may be significantly affected by environmental and biological stimuli. Therefore, SOD is considered as an important component of invertebrate innate immunity, though the mechanism of its contribution to immune responses is rarely reported. In this study, we cloned the cytoplasmic manganese SOD of *Macrobrachium rosenbergii* (*MrcMnSOD*), prepared its polyclonal antibodies, and analyzed its expression pattern under *Aeromonas hydrophila* infection. The results showed that *A. hydrophila* infection significantly increased the expression of *MrcMnSOD* both on the transcription level and protein level. In order to explore the possible mechanism of *MrcMnSOD* involvement in the immune response, further antibacterial assays were conducted. The results showed that *MrcMnSOD* can significantly inhibit the growth of three gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *A. hydrophila*) and two gram-positive bacteria (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), and the inhibitory effect is largely irrespective of protein concentration. The present study indicates that *MrcMnSOD* may participate in the immune response as an immune-related molecule. This study reports the immunobiological function of *MrcMnSOD* preliminarily, aiming to lay the relevant foundation for further research on SOD.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii*; MnSOD; expression pattern; antibacterial assay

**Corresponding authors:** LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;

QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com

**Funding projects:** Fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment (FEEL-2021-10)