



日本沼虾 *Bax* 基因克隆及其在低氧胁迫过程中的作用

赵倩倩¹, 孙西超¹, 郑 诚¹, 薛 程¹, 孙盛明^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为探究细胞凋亡相关基因 *Bax* (B-cell lymphoma-2 associated X protein) 在日本沼虾低氧胁迫过程中所发挥的作用, 实验采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) PCR 技术获得日本沼虾细胞凋亡相关基因 *Bax* 的 cDNA 全长序列, 采用半定量 RT-PCR 与实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析其在本沼虾不同组织、不同低氧阶段的表达情况, 同时采用 Western blot 与免疫组化分析了低氧下日本沼虾 *Bax* 蛋白的表达与定位。日本沼虾 *Bax* 基因 cDNA 全长 2 287 bp (NCBI 登录号: MZ823353), 包括 5'非编码区 (UTR) 为 42 bp, 3'UTR 为 814 bp, 开放阅读框 (ORF) 1 431 bp, 编码 476 个氨基酸。通过软件和生物信息网站对其序列进行分析, 氨基酸相似度比对显示, 日本沼虾细胞凋亡基因 *Bax* 富含高度保守的 BH1、BH2 及 BH3 结构域。系统进化树分析显示, 日本沼虾 *Bax* 基因与斑节对虾等甲壳动物 *Bax* 聚为一支, 具有最近的亲缘关系。RT-PCR 结果表明, 日本沼虾 *Bax* 基因在肝胰腺中表达量最高, 在脑中表达量最低。在低氧胁迫 1~96 h 时, 日本沼虾鳃和肝胰腺组织 *Bax* 基因表达量均显著高于对照组, 这与日本沼虾 *Bax* 蛋白表达丰度基本相似。通过构建原核表达载体获得体外重组蛋白 *Bax*, 并将纯化重组蛋白免疫兔子获得抗血清。免疫组化结果显示, 鳃和肝胰腺 *Bax* 蛋白阳性信号主要定位在鳃上皮细胞和肝细胞中。最后, 采用流式细胞仪分析表明, 日本沼虾血细胞死亡率在低氧胁迫 96 h 时显著高于对照组, 这与日本沼虾 *Bax* 基因转录水平和蛋白表达丰度相吻合。研究表明, 日本沼虾 *Bax* 基因在日本沼虾不同组织应答低氧胁迫分子过程中均具有促凋亡作用。本研究可为探明日本沼虾不耐低氧的分子机制提供理论参考。

关键词: 日本沼虾; *Bax*; 细胞凋亡; 低氧; 原核表达

中图分类号: Q 785; S 966.12

文献标志码: A

池塘水体出现的低氧现象是水产养殖中常见且危害较为突出的胁迫因子, 它会对水产养殖的动物在行为、生长、繁殖等方面产生严重的限制, 甚至导致大规模死亡现象发生, 在经济方面造成巨大损失^[1]。长期以来, 由于水中浮游动物消耗水体氧气、季节和气候的变化、有机物的氧化分解等, 都会导致养殖水体中溶解氧含量降低; 特别是在集约化养殖系统中, 由于单位水体养殖密

度和养殖产量的增加, 导致底栖虾蟹类容易缺氧浮头, 从而制约虾蟹类高密度集约化池塘养殖的健康、持续发展^[2]。日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 属十足目 (Decapoda) 长臂虾科 (Palaemonidae) 沼虾属 (*Macrobrachium*), 是我国淡水养殖虾类重要品种之一, 尤其在江浙等地的水产养殖中拥有着十分重要的地位。然而, 日本沼虾不耐低氧易翻塘的生物学特性是其集约化高密度养殖的一个

收稿日期: 2022-03-31 修回日期: 2022-05-30

资助项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B0202010001); 宁夏回族自治区重点研发计划 (2022ZDYF0569); 国家自然科学基金 (31672633); 上海市科技创新行动计划 (23XD1421600, 22015820700)

第一作者: 赵倩倩 (照片), 从事逆境生理学、分子免疫学研究, E-mail: zhaopianqian1202@163.com

通信作者: 孙盛明, 从事逆境生理学、分子免疫学研究, E-mail: sunshengming621416@163.com



瓶颈^[3-4], 迄今为止, 低氧引起日本沼虾死亡的原因及其机制尚未完全阐明, 日本沼虾细胞凋亡相关基因克隆与功能解析显得尤为迫切。

细胞凋亡是一种复杂的生理保护机制, 目的是清除体内受伤、多余或有害的细胞, 而细胞凋亡过多可引起机体损伤。早在 1858 年, 德国生物学家鲁道夫·维尔绍就曾描述过一种细胞死亡的方式, 即“自然失去活的部分”导致细胞死亡, 这与细胞坏死完全不同^[5]。文献报道, 甲壳动物细胞凋亡途径主要分为三条: 死亡受体介导的细胞凋亡途径, 线粒体介导的细胞凋亡途径, 以及内质网介导的细胞凋亡途径^[6], 尤其当甲壳动物细胞受到内部凋亡刺激因子的作用, 例如细胞缺氧、DNA 损伤等通常会激活线粒体介导的细胞凋亡途径^[7-9]。近年来, 研究证实了 Bcl-2 蛋白家族调控线粒体膜的通透性, 释放细胞色素 c 并与 Apaf-1 结合, 激活 Caspase9 和 Caspase3, 激活线粒体介导的细胞凋亡途径^[10]。在甲壳动物的研究中也发现了 PI3K/Akt 信号通路, 通过调节 Bax (B-cell lymphoma-2 associated X protein) 表达水平来调节细胞存活^[11]。Bcl-2 家族蛋白约有 20 多种。总体分为两类, 一类是抑制细胞凋亡蛋白, 主要包括 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等。另一类是促进细胞凋亡蛋白, 主要包括 Bax、Bak 和 Bok 等, 促凋亡蛋白中还含有一类特殊的 BH3-only 亚家族 BNIP3^[12]。已有研究表明, Bcl-2 家族蛋白中促细胞凋亡蛋白在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)^[13]、大鳞钩吻鲑 (*Oncorhynchus tshawytscha*)^[14]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coloides*)^[15]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[16]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[17]、仿刺参 (*Apostichopus japonicus*)^[18]、香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*)^[19]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[20]、果蝇 (*Drosophila*)^[21]、小鼠 (*Mus musculus*)^[22] 等动物中相继克隆与表达分析, 但迄今为止, 关于甲壳动物日本沼虾 Bcl-2 家族蛋白的研究却鲜有报道。

随着日本沼虾养殖业如火如荼地发展, 人们应清醒地认识到, 低氧作为一种特殊的应激源, 对日本沼虾生命活动具有重要影响。为了探索日本沼虾不耐低氧的分子机制, 本研究克隆了 Bax 基因全长 cDNA 序列, 研究了该基因在日本沼虾不同组织和不同低氧阶段的表达模式, 探明低氧胁迫下日本沼虾 Bax 蛋白的表达与定位, 并观察

低氧胁迫下日本沼虾血细胞凋亡率的变化规律。本研究旨在探明 Bax 在日本沼虾应答低氧胁迫中的作用, 以期为高密度集约化日本沼虾养殖提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用日本沼虾购自东海养殖场, 在实验室鱼缸中暂养 2 周, 实验用水为曝气自来水并 24 h 充氧, 养殖水体温度 (25±1) °C, 溶解氧 (DO) 含量 (6.5±0.2) mg/L, pH 值 7.6~7.8, 氨氮 <0.1 mg/L。实验组和对照组分别饲养于不同水槽 (100 cm × 60 cm × 50 cm), 且各设置 3 个平行对照。每个水槽放置健康日本沼虾 30 尾, 每尾体重为 (3.0±0.4) g, 以不同浓度 DO 处理进行急性低氧胁迫实验 [对照组, (6.6±0.2) mg/L; 实验组, (1.8±0.2) mg/L], 依据前期日本沼虾窒息点测定结果^[23], 主要通过向实验缸中充入氮气的方式, 将水中 DO 含量保持在 (1.8±0.2) mg/L, 水体 DO 测量仪器为便携式溶氧仪 (YSI 公司, 美国), 具体方法参照 Sun 等^[23]。分别在对照组与低氧处理组 1、3、6、12、24、48 和 96 h 时, 从每个水槽 (3 个重复) 中随机选取 2 尾日本沼虾解剖, 取鳃和肝胰腺组织立即放入液氮中, 转移至 -80 °C 冰箱中保存用于后续荧光定量 PCR 和 Western blot 分析。同时取 3 尾虾的鳃和肝胰腺组织, 用 4% 多聚甲醛保存, 用于不同低氧时间点的免疫组化分析。另外选取 3 尾健康的日本沼虾, 将其解剖分离, 取脑、鳃、肝胰腺、心脏、肌肉、肠道、精巢、卵巢等 8 种组织, 立即将其放入 -80 °C 冰箱保存, 用于后续组织表达分析。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

依照 TRizol 法提取总 RNA 的步骤进行 RNA 的提取。首先将组织中加入 TRizol 研磨成匀浆后, 加入氯仿离心, 转上层水相后进行总核糖核酸的提取, 然后再加入相同体积的异丙醇溶液离心, 完成 RNA 的纯化, 使用 75% 乙醇溶液洗脱 2 次, 最终干燥后加入 RNase-free water 溶解。利用琼脂糖凝胶电泳测定总核糖核酸的完整性。基于 Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 逆转录试剂盒的使用说明, 将提取好的 RNA 进行反转录, -80 °C 冰箱保存, 用于之后探究 Bax 基因不同组织和不同低氧阶段的表达模式。

1.3 日本沼虾 *Bax* 基因的 cDNA 克隆

根据实验室构建的日本沼虾肝胰腺转录组测序文库, 以及已验证获得的 *Bax* 基因序列片段, 使用引物 Primer premier 5.0 软件分别为 5'RACE 和 3'RACE 克隆设计特异性引物 (表 1)。以结合套式聚合酶链反应, 使用日本沼虾的肝胰腺组织

cDNA 为模板, 扩增出 *Bax* 基因的 5'端和 3'端。聚合酶链反应体系为 50 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

表 1 实验所用的引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物名称 primer	序列(5'-3') primer sequence	引物类别 primer function
<i>Bax</i> -3'Race-out <i>Bax</i> -3'Race-in	CGTTTG CAGATGGG TAAAGGAAGCT TTGGGGTGCAGTATTGAGCAGAGGA	3' RACE特异引物 specific primer for 3' RACE
<i>Bax</i> -5'Race-out <i>Bax</i> -5'Race-in	GAGGAGGGCC TAGAGAAGGTAGAGG GTGTGAGTCTTACGACGTTACCCCG	5' RACE特异引物 specific primer for 5' RACE
<i>Bax</i> -RT-F <i>Bax</i> -RT-R	CAGGGGCAGTGG AACCATATCAAG TGAGTGACGCTGACTAGGTGAGG	荧光定量引物 real-time quantitative primer
β -actin-F β -actin-R	TATGCACTTCCTCATGCCAT AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	内参引物 internal primers

1.4 生物信息学分析平台及用途

利用在线网站 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 上的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 推断开放阅读框序列, 并将其翻译为氨基酸序列。使用 NCBI 中 CD-search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测结构域, 使用 SWISS-MODE 工具 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白质的三级结构, 以及 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索与 *Bax* 序列同源性的序列^[24]。采用 DNAMAN 软件进行多物种的 *Bax* 序列比对, 并在结果中标注重要结构域位点。最后在此基础上利用 MAGE 5.1 软件, 通过比对不同物种的 *Bax* 氨基酸序列的相似性, 构建系统发育进化树^[25]。

1.5 日本沼虾不同组织 *Bax* 基因的表达分析

使用半定量 RT-PCR 方法检测日本沼虾 *Bax* 基因在脑、鳃、肝胰腺、心脏、肌肉、肠道、精巢和卵巢中的表达分布。通过 *Bax* 基因全长 cDNA 序列来设计荧光定量特异性引物, 选择日本沼虾的 β -actin 基因作为荧光定量反应的内参基因 (表 1)。使用 TaKaRa 试剂盒、*Bax* 基因、 β -actin 内参基因的特异性上下游引物, 按照实验说明, 进行 RT-PCR 反应: Premix TaqTM (Ex TaqTM version 2.0 plus dye) 10 μ L, 各组织 cDNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, RNase free H₂O 9.2 μ L。经过变性 98 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min 等程序并进行 35 个循环, 将所扩增的 PCR

产物进行 1.2% 凝胶核酸电泳, 得到 *Bax* 基因在不同组织的电泳条带。

1.6 低氧胁迫下日本沼虾鳃和肝胰腺组织 *Bax* 基因的表达分析

采用 qPCR 检测不同低氧条件下 *Bax* 基因转录水平。使用 Hieff UNICON[®] qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒, 反应体系共 20 μ L, 包含 9.2 μ L cDNA 模板 (200 ng), 10 μ L 2 \times SYBR Green qPCR Mix, 0.4 μ L 的 10 μ mol/L 上游引物, 0.4 μ L 的 10 μ mol/L 下游引物。PCR 反应温度依次为 95 $^{\circ}$ C 处理 30 s, 94 $^{\circ}$ C 处理 10 s, 60 $^{\circ}$ C 处理 30 s, 循环 40 次。溶解曲线由 BIO-RAD iQ5 的实时分析软件分析, 确保基因特异性扩增。对照组和实验组日本沼虾的鳃与肝胰腺组织 cDNA 样品分别设置 3 个重复, 荧光定量实验数据用 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法分析^[26], 测量数据均以平均值 \pm 标准误表示 ($n=3$)。使用 Graphpad prism 软件作图, 方差分析和多重比较使用 SPSS 19.0 软件和 *t* 检验法 (Student's *t* test), 显著性差异设为 $P<0.05$, 极显著差异设为 $P<0.01$ 。

1.7 原核表达与抗血清制备

根据日本沼虾 *Bax* 基因序列合适区域设计特异性引物并通过 PCR 扩增出足够量的 PCR 产物, 首先, 根据设计的引物识别 PCR 产物以及质粒载体的特异性酶切位点, 并进行酶切, 然后通过连接酶连接切后的两部分, 将连接液转入 TOP10 感受态中, 检测筛选出阳性克隆并进行检测实验,

从而获得重组质粒。得到的重组质粒转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞, 加以热刺激, 在具有相应抗生素的平板上进行涂布培养, 然后筛选单克隆产物, 再转移至含有抗生素的液体培养基上继续培养。当 OD 值为 0.6 时, 加入诱导剂 IPTG 后连续培养 (20 °C, 16 h; 37 °C, 4 h), 以未添加 IPTG 诱导剂的实验组作为阴性对照, 之后进行菌体收集以及后续的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证及蛋白纯化。

免疫抗原分为两种, 一种为以等体积的蛋白抗原和弗氏完全佐剂进行混匀乳化, 作为其初免抗原, 另一种为等体积的蛋白抗原与弗氏不完全佐剂进行混匀乳化, 作为二、三、四免抗原。共 4 次免疫, 初免与二免之间间隔 20 d, 其他免疫间隔均为 14 d, 免疫结束后采血离心获得抗体血清, 使用 Elisa 法检测抗血清效价, 以尚未进行免疫的小兔血清作为阴性对照组, 含有抗体的血清进行梯度稀释, 利用酶标仪 (科华 ST-371) 测定在 450 nm 条件下各组样品的 OD 值。当处理组/阴性对照组的光吸收值比值 ≥ 2 时认定为阳性, 则抗体效价即为 ELISA 反应的阳性血清最大稀释度。

1.8 Western blot 和免疫组化分析

将低氧 0、1、3、6、12、24、48 和 96 h 的鳃与肝胰腺组织用蛋白裂解液裂解细胞, 收集上清液, 使用酶标仪进行蛋白定量, 定量后的蛋白加 Loding buffer 后煮沸, 使蛋白变性, 参照 Sun 等^[27] 的方法进行 Western blot 分析。将含有 20 μ L 蛋白样品装入 12% SDS-PAGE 凝胶分离通道, 在 120 V 下电泳, 待 Marker 条带清晰后, 取出放入转膜液中 (条件 300 mA、50 min), 使条带转到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上。印迹后, 在含 5% 脱脂奶粉的 Tris Buffered Saline Tween-20 (TBST) 中 4 °C 培养 1 h, 封闭膜, 然后用抗体缓冲液 (稀释比 1 : 1 000, 体积比) 孵育 12 h (实验组: 实验室制备的 Bax 抗体, 对照组: β -Actin 抗体/ β -Actin (13E5) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, 美国)。使用 TBST 摇匀漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1 : 5 000 比例稀释), 孵育 1 h, 重复上述清洗步骤, 使用天能凝胶成像系统 (Tanon 5 200 Multi) 拍照。参照孙盛明等^[28] 的方法进行免疫组化分析: 将不同低氧阶段下日本沼虾鳃与肝胰腺组织进行包埋、固化、切片。切片后进行脱蜡、抗原修复、封片后, 用 Bax 抗血清 (1 : 500) 孵育, PBST 洗 2 遍孵二抗 (1 : 1 000), 使用 DAB 显色剂进行显色, 然后浸泡于

苏木精中染色, 经过水洗以及不同浓度乙醇分化, 脱水后封片, 最后用荧光显微镜 (ECLIOSE Ci-L, NIKON) 观察。

1.9 细胞凋亡检测

使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (AnnexinV-FITC/PI Apoptosis Detection Kit) 评估细胞凋亡率^[29], 具体方法: 分别选取常氧对照和低氧 96 h 处理组中各 15 尾日本沼虾, 使用 1 mL 注射器从虾的腹足处插入抽取血淋巴, 每次抽取前使用抗凝剂以防止凝固, 每 5 尾虾的血淋巴放入 1 个离心管中 (设置 3 重复), 1 000 \times g 离心 5 min, 弃上清液, 用 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 轻轻重悬细胞并计数 (细胞数量不少于 1×10^5), 然后 1 000 \times g 离心 5 min, 收集血细胞。加入 400 μ L $1 \times$ Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 依次添加 5 μ L AnnexinV-FITC, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min, 10 μ L PI 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置 5 min。采用 FACSCalibur 流式细胞术 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, 美国) 检测血细胞凋亡情况。

2 结果

2.1 日本沼虾 Bax 基因全长 cDNA 序列分析

通过克隆获得日本沼虾 Bax 基因全长 cDNA 序列, GenBank 登录号为 MZ823353。Bax 基因 cDNA 全长序列为 2 287 bp (图 1-b), 5'非编码区 (UTR) 为 42 bp, 3' UTR 为 814 bp, 包含典型的加尾信号 ATAAA 和 31 个碱基 poly (A) 尾, 开放阅读框 (ORF) 1 431 bp 编码 476 个氨基酸 (图 1)。推测日本沼虾 Bax 蛋白分子质量为 52.9 ku, 理论等电点 pI 为 5.48。基因中包含 Bel-2 保守结构域 BH3 (LRKLADAF A)、BH1 (ELFMGGITRETV ALF-TFV)、BH2 (RWVKEAGGWGAVLS) 结构域。Bax 蛋白的三级结构是由 α 螺旋、 β -转角和无规则卷曲等二级结构所组成, 并且日本沼虾与哺乳动物的三级结构存在差异 (图 1-b)。

2.2 Bax 基因的同源性及其结构域分析

通过 NCBI 数据库中查找并下载不同物种 Bax 基因氨基酸序列 (图 2), 与克隆得到的日本沼虾 Bax 基因氨基酸序列利用 DANMAN 软件进行多重序列比对, 发现甲壳动物与鱼类物种间的 BH 结构域具有一定的保守性。

2.3 Bax 基因的系统进化树分析

通过 Mega 5.1 软件, 采用 NJ (neighbor join-

```

ACGTACCGGTAATTCGGCCGTAAGCAACGCACAGTGTCA 42
ATGGCCATCAATACTCCCATGGTGAAGAAAGCTTTCAGAGACACTGCGATCCAAGGAT 102
M A I N T P H G E K A V Q R P S A S K D
GGTGTGATACCTCTGAAGAGCTCAGAAATGCTGCAAGTGGGCGCCAGCATGAAAATCTCC 162
G D P S E F T Q N A A S G R Q H E T S
AATGATGATTCAGGGCGATGGAACCATATCAGGCTTAGTAGTACGAGGAACTTGGCT 222
N D D F R G S G T I S S L S S Q E V L P
TCGAGACTTCAATCACCCTTTCAAGCTTCACTTACCTTCACTACCTGAGCGGCTACTCA 282
S A L S S P F Q S S C P L P S P S Q R H S
TTAACCCCTCCATCAGACTAGAAATCCCTTTCGCTCCATCACTTACCGCATTCT 342
F N P S P S Q L L E S P L S S P Y L Q P S
TCGTTTTCACTCATCTCTTCACTTCACTTCCCGATCTCTCCATCTCCTTAGA 462
L L S S S S S L Q S P P G S L P S P Y E
AGAGGCAATAATAATTCATAGAACTAACTAACCTTTTACAAGATAGTGAAGAAC 522
R G N N I S I E Q L N E L A L Q D S E N
AATAATGTAGTAGAATAATCAAGGCTTTGACCAATATGCTGGAGTTGCCACGAT 582
N N V D E N S N Q G F D Q Y A G V A H D
TATGTGCCAGATCAATCTGAAGACTCTGTAAGACAGCAGTATCCAAGTGAAGAGAC 642
Y V P D Q S V R R P R V R A Q Y P T G R D
CAGCGTACAGGAGCCCTAGTAATATGAGCAACTAACCTAATAGAGAAAGAGCAAGT 702
Q P D R T P S N E I A I P L M R R R S
AGCAGCTAGTTTTTCACTAGGAGAAATTTGCTGAAGATTTAGCTTGCTCACCCACT 762
S S S S F S H R R N L S E D L A C S P T
ACAAATTTTCAATTTTGATGATGACTCAGCAAGGATAGAGATGACAGGTTACA 822
T N E S Y E D D S A Q G N E V D R L P
AGACTTCCAATATCATGCTAGTCAAGAGATTCATGCTGTCAGGCTCGGCCCTACCC 882
R P N Y Q N S H D E W S R C S P R L P
CCCAAGAAGCACCATTCTTCACTGCTGCAAGAATCTGGCTTTAAACTTAAGA 942
P Q E D P S F S S V T R I L P L N L R
GGTGGGTGACGCCCCAGCCACCAGCTAGACGTATAGAGATGATGATGCTCAA 1002
G G G Y G P Q P C P P L D G S I E D D A Q
GATTATTAAGCAACTTACTTGTAACTCTACTAGAATGCTTCCGAGCCCCAGC 1062
D L L S N F T S L R N L R N R L P N P S
ACAGCATTATACATCAAGGATTCGCAATCTGCTTATATAGATTTGACAGGAACTC 1122
T A I I H Q G Y R N P A L Y R V G Q E
AGGAAATAGCTGATGATTTGCCAAAACAGAGGAAAGCGAAGATTTCAAGCTATGGCG 1182
R K L A D A F A T A K T E R R N V R Q R
GAGCTGTTCACCTGGAGAGATCAATATGGAATAATTTTTCAGCTCGACAGAAITTA 1242
S V H L E S I E N E F P Q L C T E
TTATGGGAGGAAIAACCGAGAACTGATGATGATTTTACCTTTTGTTGGGAGAGIT 1302
M G G I T R K E L R A L F T F V V G D
CGAGCTTCATGTGGCGGCCAGGACAGAGTCTCTCAGGTGTATTAAGAAATGGICA 1362
E P F H R R N Q Q V L P G V A K K
TTGCAGTATTAGTAGATCAGCTTTGCAAGTGGTAAAGGAAGCTGGGGCTGGGGTCA 1422
G I A T G A C A G A G A G C A A T T G C A C T G A T A G A A C T G C G T H T T H C T T A
V L S R G A N A L Y R T A V F V F C L I
GGAACAGTTCGCTGGTGTGATTTTGTAAAACTGAAGACTGGTAAAGCAAAAAAT 1482
G T V A A G V Y V V K T L K D W
ATTATAGGAGTGTAAATGAATTTTCATGCTCACCACCACTAATGTTAAAGCAAAATT 1542
TTCATGTCATCATCACTCAACATTTCTCTGTAATAATTTTGTATGGTTTCAATA
TTAAGTTTGAATACTAATTAAGTTAAAGTAAATGATAGCTTAAATTTTGACITTAG
TTAAGAAGTAGATTTTGAATTAAGTTTGGCTGTAAGTAATTTTGTACAAAATTTGAT 1722
TTTTTGAAAAATATGCAATTCAGTCTTTTGGCTGAAATAGATTATACGTAAGTGT 1782
TTTGATGAGTCTAGTATGACAAATCAAGACTGTACATTAAGAAAAAGAGTGTGTA 1842
GTGATAACAAGTTTGTGATTTGGAAGACATTTTGATGATGTTTTTAAAGTATTT 1902
CTGTAGCTTTTGGCAATAGTTTGAAGAATGTTTGGCTGTGTTGTTGCTTCAAGTACT 1962
TTAAAGGACAGATAAGATAAATCAGTCACTAACCATCTGAAGACTTGCATATATTG 2022
TTTATTAATCAAGACATTTTGTAGTGTAGGTTAGTTTAAATATAAATTAATGATGCA 2082
TTATTTAAAAAATAAAACATTTTAGTCACTGTAACAGCTTAGAGTTGACATGAA 2142
TATTCATCTTTTCAGATAACTCAAGGAAATTAATAGTTTAAATTAATCTGATGAAG 2202
TTTCCAATGTTGGTTTCAGGATTAAGAAATGGAATGTCATAGTGTCAAAAAA 2262
AAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
  
```

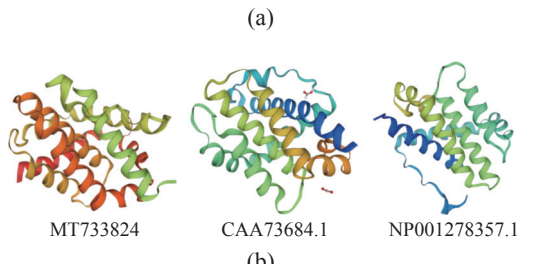


图 1 日本沼虾 *Bax* 基因序列及其编码的氨基酸序列 (a) 起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 分别用黑色方框表示, 3'端 poly (A) 多聚腺苷酸加尾信号 (ATAAA) 和 poly(A) 尾巴以粗体表示, Bcl-2 类超家族结构域用灰色底框表示, 下划线分别表示结构域 BH3 (LRKLADAF A)、BH1 (ELFMGGITRETVALFTFV)、BH2 (RWWKEAGGWGAVLS); (b) 日本沼虾 (MT733824)、小鼠 (CAA73684.1)、人类 (NP001278357.1) 三级结构比较。

Fig. 1 Nucleotides and deduced amino acid sequences of the *Bax* cDNAs from *M. nipponense* (a) the initiation codon (ATG) and stop codon (TAA) were boxed, respectively, the poly (A) special sequence (ATAAA) and the poly (A) tail were highlighted in bold, Bcl-2 like superfamily structural domain is shown in gray boxes, the underline indicates the potential BH3 (LRKLADAF A), BH1 (ELFMGGITRETVALFTFV), BH2 (RWWKEAGGWGAVLS); (b) *M. nipponense* (MT733824), *M. musculus* (CAA73684.1), *H. sapiens* (NP001278357.1).

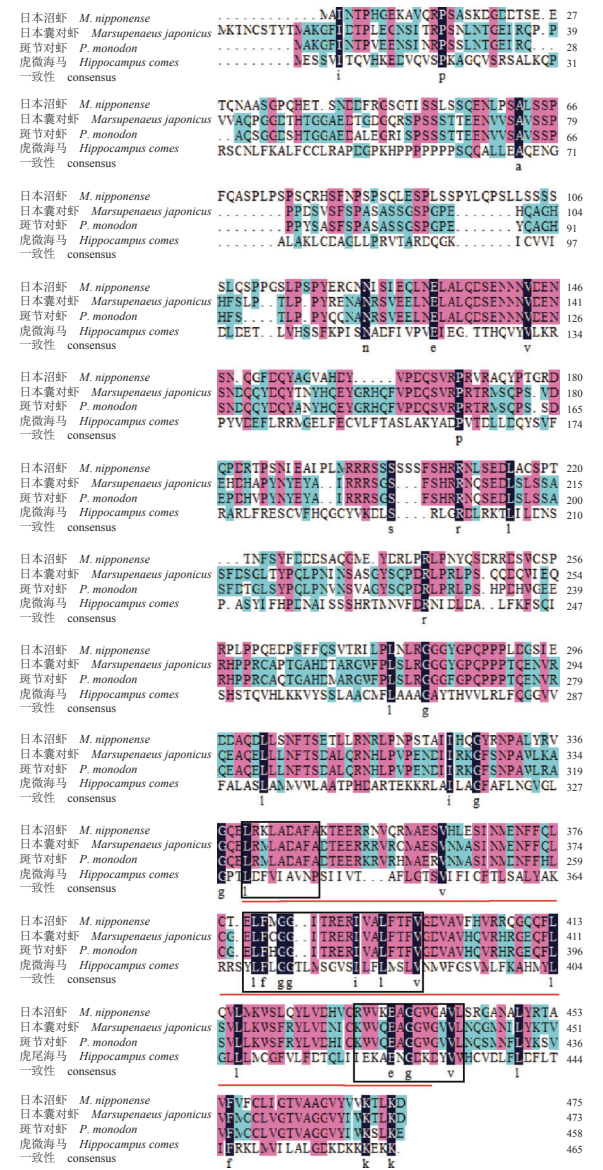


图 2 日本沼虾 *Bax* 氨基酸序列与其他 3 个物种的 *Bax* 氨基酸序列比对结果

日本沼虾, MT733824; 日本囊对虾, XP_042870848.1; 斑节对虾, XP_037789141.1; 虎尾海马, XP_019737524.1。共享残基代表了不同物种之间的相似区域。结构域 BH3 (LRKLADAF A)、BH1 (ELFMGGITRETVALFTFV)、BH2 (RWWKEAGGWGAVLS) 用方框表示。下划线表示 Bcl-2 类超家族结构域。

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of *M. nipponense* *Bax* and other three species *M. nipponense*, MT733824; *Marsupenaeus japonicus*, XP_042870848.1; *P. monodon*, XP_037789141.1; *Hippocampus comes*, XP_019737524.1. The shared residues represented the similar regions between the different species. The potential BH3 (LRKLADAF A), BH1 (ELFMGGITRETVALFTFV), BH2 (RWWKEAGGWGAVLS) are shown in squares. Bcl-2 like superfamily structural domain is underlined.

ing) 法的 bootstrap 方法进行多次重复计算, 构建日本沼虾 *Bax* 基因和其他 18 个物种的系统发育树。

将 *Bax* 基因氨基酸序列与其他动物同源序列进行多重序列比对, 研究表明, 无脊椎动物和脊椎动物 *Bax* 基因是聚类在不同分支的, 其中日本沼虾

与其他甲壳动物聚为一大支, 且与斑节对虾及凡纳滨对虾 *Bax* 的亲缘程度最高 (图 3)。

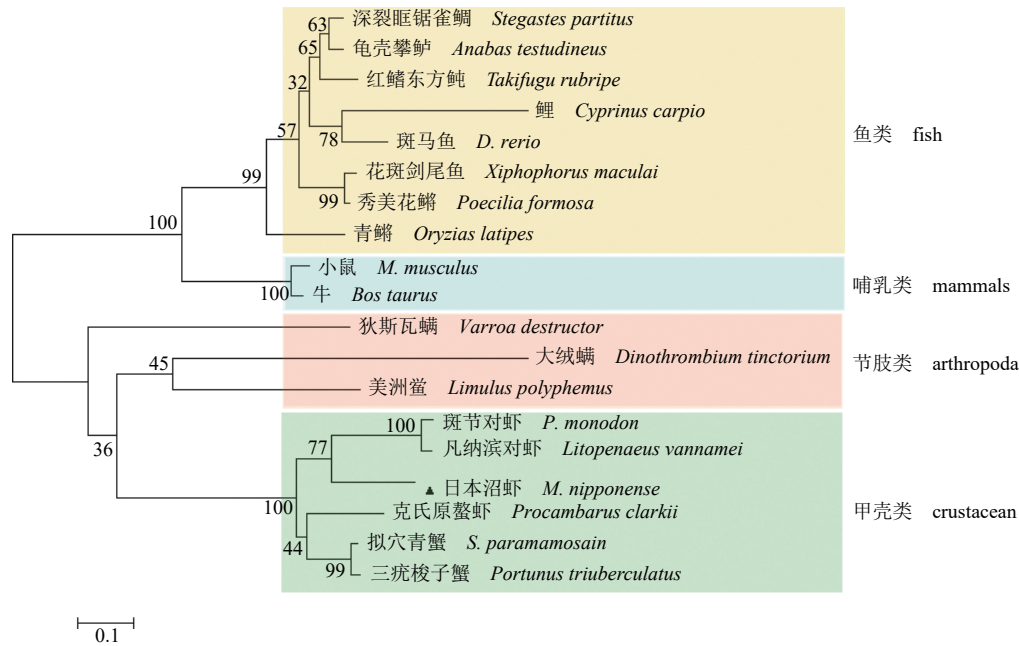


图 3 日本沼虾 *Bax* 与其他物种 *Bax* 的系统进化树

日本沼虾 (MT733824); 龟壳攀鲈 (AGO20701.1); 深裂眶锯雀鲷 (XP_008302498.1); 红鳍东方鲀 (XP_003964831.1); 鲤 (AHV90609.1); 斑马鱼 (NP_571637.1); 花斑剑尾鱼 (XP_005796771.1); 秀美花鱗 (XP_007558256.1); 青鱗 (XP_004071362.1); 牛 (NP_776319.1); 小鼠 (NP_031553.1); 美洲蚶 (XP_013784388.2); 狄斯瓦螨 (XP_022651856.1); 大绒螨 (RWS17507.1); 三疣梭子蟹 (QDF82319.1); 拟穴青蟹 (AQS99485.1); 凡纳滨对虾 (QBB84825.1); 克氏原螯虾 (XP_045605690.1); 斑节对虾 (XP_037789141.1)。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the *Bax* sequence in *M. nipponense* and other species

M. nipponense (MT733824); *Anabas testudineus* (AGO20701.1); *Stegastes partitus* (XP_008302498.1); *Takifugu rubripes* (XP_003964831.1); *Cyprinus carpio* (AHV90609.1); *D. rerio* (NP_571637.1); *Xiphophorus maculatus* (XP_005796771.1); *Poecilia formosa* (XP_007558256.1); *Oryzias latipes* (XP_004071362.1); *Bos taurus* (NP_776319.1); *M. musculus* (NP_031553.1); *Limulus polyphemus* (XP_013784388.2); *Varroa destructor* (XP_022651856.1); *Dinothrombium tinctorium* (RWS17507.1); *Portunus trituberculatus* (QDF82319.1); *S. paramamosain* (AQS99485.1); *Litopenaeus vannamei* (QBB84825.1); *Procambarus clarkii* (XP_045605690.1); *P. monodon* (XP_037789141.1).

2.4 重组质粒酶切验证及融合蛋白表达检测

根据引物设计的酶切位点对筛选得到的阳性重组表达质粒进行酶切处理, 并通过琼脂糖凝胶电泳 (1.0%) 实验, 结果与预期相符合 (图 4-a)。将重组质粒培养诱导, 收集菌体制样准备 SDS-PAGE 检测, 目的条带分子量约 60 ku, 与预期相符 (图 4-b)。融合蛋白经过纯化, SDS-PAGE 电泳检测理论分子质量±5 ku 相应位置出现明显条带 (图 4-c), 可初步确定融合蛋白成功得到了纯化 (图 4-d), 体外重组蛋白用于免疫动物制备日本沼虾 *Bax* 多克隆抗体。通过 ELISA 法检测, 抗体效价值 ≥2.5×阴性值, 制备的日本沼虾 *Bax* 多克隆抗体的效价 ≥5.12×10⁵ (图 4-e), 可以进行后续的 Western blot 和免疫组化实验。

2.5 日本沼虾不同组织中 *Bax* 基因的表达情况

采用半定量方法分析日本沼虾脑、鳃、肝胰腺、心脏、肌肉、肠道、精巢和卵巢等组织中 *Bax* 基因的表达情况。结果显示, 在以上被检测的不同组织中, 日本沼虾 *Bax* 基因均有表达, 并且 *Bax* 基因在肝胰腺组织中表达量最高, 在脑组织中表达量相对较低 (图 5)。

2.6 低氧胁迫对日本沼虾肝胰腺和鳃组织 *Bax* 表达的影响

低氧 1~24 h 时, 日本沼虾鳃组织中 *Bax* 基因 mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且在低氧 96 h 时实验组 *Bax* 基因 mRNA 表达量达到最大值 (图 6-a)。低氧 6、48 和 96 h 时, 日本沼虾

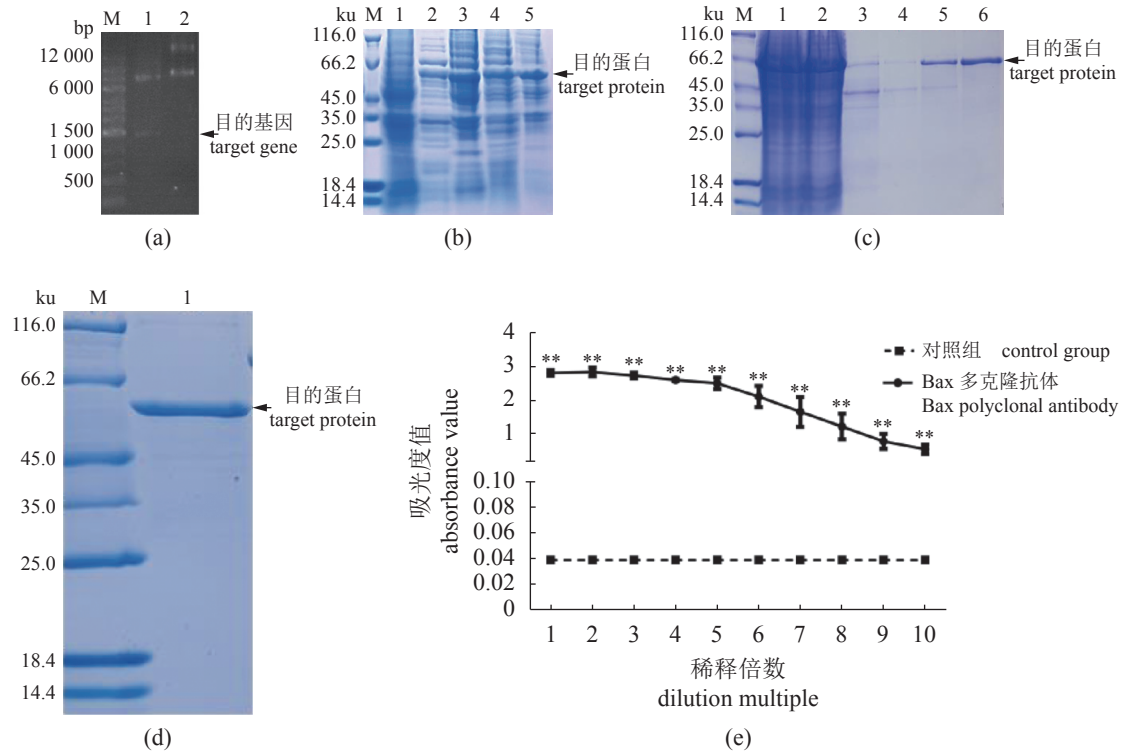


图 4 重组质粒酶切验证及融合蛋白表达检测

(a) 融合表达载体酶切验证, M. DNA marker, 1. 双酶切后的目的基因, 2. 质粒。(b) SDS-PAGE 鉴定 Bax 重组蛋白, M. marker, 1. 诱导前总蛋白, 2. 20°C 上清液, 3. 20°C 沉淀, 4. 37°C 上清液, 5. 37°C 沉淀。(c) SDS-PAGE 鉴定纯化的 Bax 重组蛋白, M. marker, 1. 上样, 2. 流出, 3-4. 20 mmol/L 咪唑洗脱组分, 5. 50 mmol/L 咪唑洗脱组分, 6. 500 mmol/L 咪唑洗脱组分。(d) 检测 Bax 重组蛋白, M. marker, 1. 含重组蛋白的总菌体。(e) Bax 多克隆抗体效价检测, 1. 1×10^3 , 2. 2×10^3 , 3. 4×10^3 , 4. 8×10^3 , 5. 16×10^3 , 6. 32×10^3 , 7. 64×10^3 , 8. 128×10^3 , 9. 256×10^3 , 10. 512×10^3 。* 表示实验组与对照组差异显著, $P < 0.05$; ** 表示实验组与对照组差异极显著, $P < 0.01$, 下同。

Fig. 4 Recombinant plasmid digestion verification and fusion protein expression detection

(a) fusion expression vector with restriction enzyme, M. marker, 1. target gene after double digestion, 2. plasmid. (b) recombinant Bax protein by SDS-PAGE, M. protein marker; 1. total protein before induction, 2. supernatant at 20°C, 3. 20 °C pellet, 4. 37°C supernatant, 5. 37°C pellet. (c) purified recombinant Bax protein, M. protein Marker, 1. load sample; 2. outflow; 3-4. 20 mmol/L imidazole elution fractions, 5. 50 mmol/L imidazole elution fractions, 6. 500 mmol/L imidazole elution fractions. (d) verification of recombinant Bax protein, M. protein marker, 1. total protein of Bax. (e) effect detection of the Bax polyclonal antibody, 1. 1×10^3 , 2. 2×10^3 , 3. 4×10^3 , 4. 8×10^3 , 5. 16×10^3 , 6. 32×10^3 , 7. 64×10^3 , 8. 128×10^3 , 9. 256×10^3 , 10. 512×10^3 . * represents significant difference between experimental group and control group, $P < 0.05$, ** represents extremely significant difference between experimental group and control group, $P < 0.01$, the same below.

肝胰腺组织中 *Bax* 基因 mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 且在低氧 6 h 时上调幅度最大

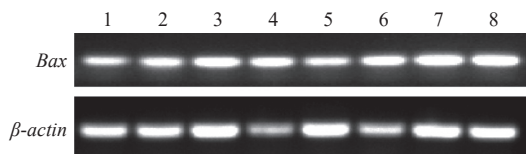


图 5 日本沼虾各组织 *Bax* 基因 RT-PCR 图

1. 脑, 2. 鳃, 3. 肝胰腺, 4. 心脏, 5. 肌肉, 6. 肠道, 7. 精巢, 8. 卵巢。

Fig. 5 RT-PCR figure of *Bax* gene in tissues of *M. nipponense*

1. brain, 2. gill, 3. hepatopancreas, 4. heart, 5. muscle, 6. intestine, 7. testis, 8. ovary.

(图 6-b)。同时通过 Western blot 方法也证实低氧 96 h 时, 日本沼虾鳃与肝胰腺组织 *Bax* 蛋白表达丰度达到最大值 (图 6-c~d), 这与基因转录水平基本相似。

2.7 低氧胁迫对日本沼虾肝胰腺和鳃组织的影响

采用免疫组化方法研究 *Bax* 在肝胰腺和鳃组织中的定位。日本沼虾肝胰腺由分泌细胞 (B 细胞)、存储细胞 (R 细胞)、纤维细胞 (F 细胞) 和胚细胞 (E 细胞) 和管腔组成。以非免疫血清代替一抗的阴性对照切片中, *Bax* 无阳性染色反应产物 (图版 I-1)。对照组 (图版 I-2) 阳性信号较弱, 而低氧处理组随着低氧时间延长表现为呈逐渐加强

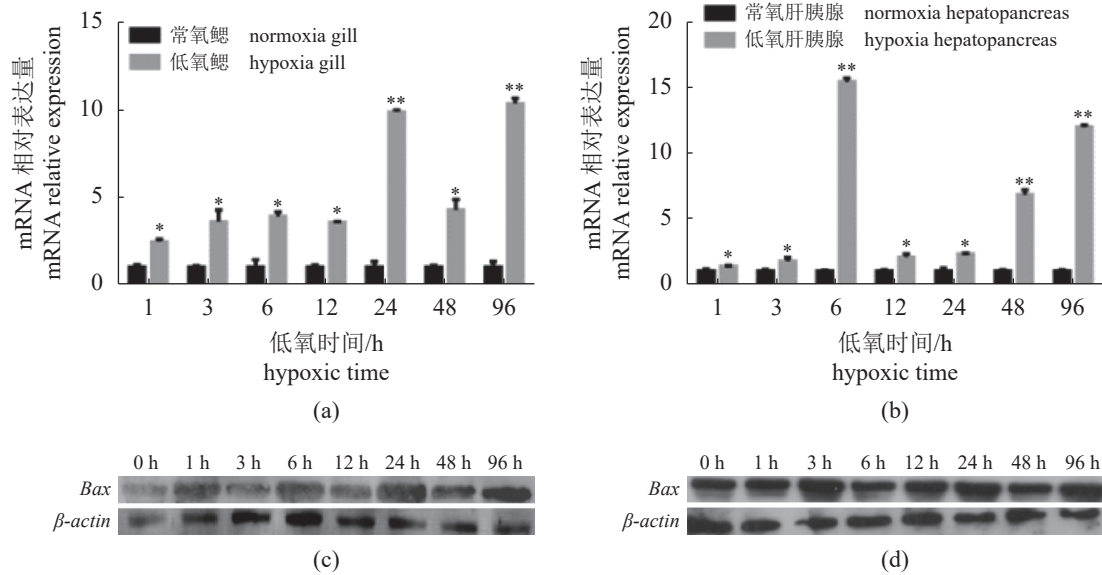


图6 低氧胁迫不同时间段鳃和肝胰腺组织 *Bax* 转录水平 (a, b) 和蛋白丰度 (c, d) 表达变化

Fig. 6 Expression profile of *Bax* gene transcriptional levels (a, b) and protein abundance (c, d) in gills and hepatopancreas of *M. nipponense* in response to hypoxia

的阳性信号 (图版 I -3~9), 主要定位在肝细胞中。鳃是甲壳动物进行气体交换和离子调节的重要器官, 具有鳃轴及许多分枝的鳃丝, 其中鳃丝是鳃的主要部分, 并分布很多分支很细的血管, 在以非免疫血清代替一抗的阴性对照切片中, *Bax* 完全无阳性染色反应产物 (图版 II -1)。对照组 (图版 II -2) 和低氧组 (图版 II -3~9) 主要定位在鳃组织的上皮细胞和血细胞中, 也同时观察到在低氧 96 h 与常氧组相比, 阳性信号较强。

2.8 细胞凋亡检测

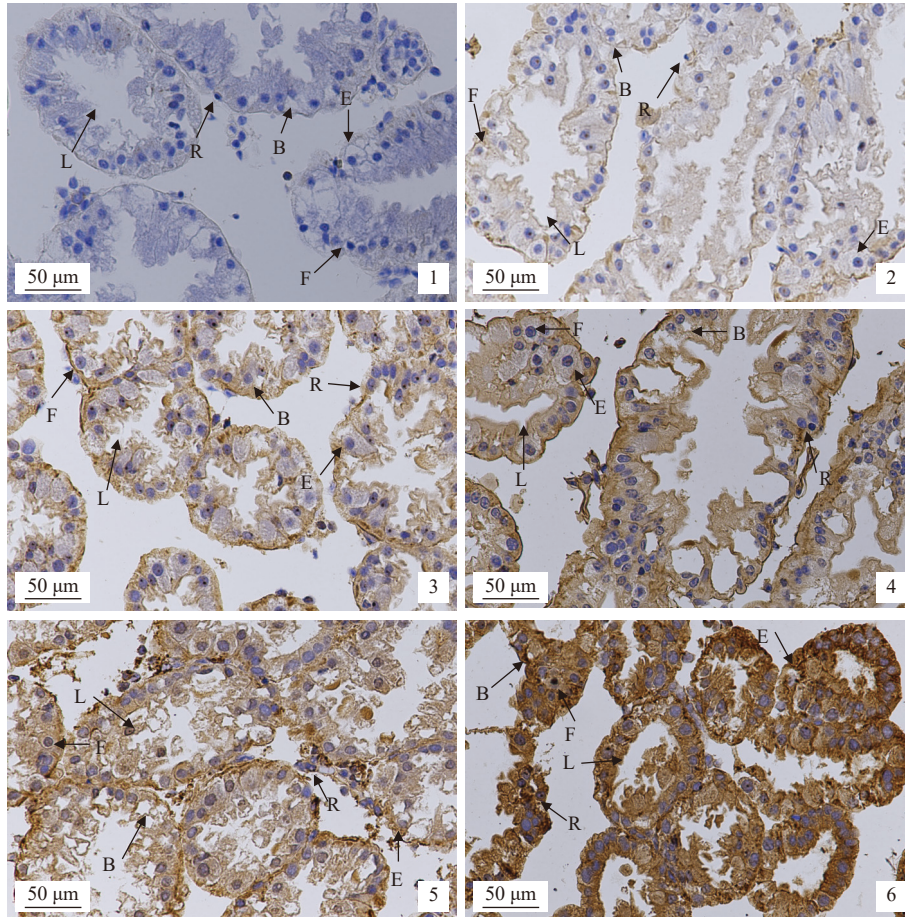
从流式细胞术检测结果可以看出, 常氧对照组日本沼虾血细胞大部分集中在活细胞区域, 低氧处理后日本沼虾血细胞凋亡数明显增加 (图 7-a)。对凋亡情况进行统计分析, 低氧 96 h 组日本沼虾血细胞凋亡率极显著高于对照组 (图 7-b)。

3 讨论

通过氨基酸序列分析表明, 日本沼虾 *Bax* 与其他物种一样, 都含有 Bcl-2 家族保守的 BH1、BH2、BH3 结构域, 主要利用 BH3 结构域 (α 螺旋结构) 发挥其促凋亡功能。日本沼虾与小鼠及人类等哺乳动物的三维结构相似性较高, 已有研究报道拟穴青蟹、鱼类和人类 *Bax* 基因均含有 3 个 BH 结构域, 与本实验克隆得到的 *Bax* 基因结构域相一致 [15, 30-32]。根据氨基酸序列的多重序列比对结果, 发现与亲缘关系较近物种的氨基酸序列相似

性均高达 50% 以上, 如与斑节对虾 *Bax* 的同源性为 57.41%。将日本沼虾氨基酸序列与鱼类中的虎尾海马氨基酸比对分析发现, 氨基酸序列具有一定的相似性, 其中 3 个 BH 结构域相对保守。通过系统发育树也发现日本沼虾 *Bax* 基因与虾蟹类聚为一支, 再与昆虫等节肢类动物聚为一支; 而另一分支是鱼类和哺乳动物, 这基本上与传统的动物系统发生和分类次序一致。

日本沼虾 *Bax* 基因在所有被检测组织中均有表达, 但在不同的组织中表达的情况有一定的差异, *Bax* 基因在肝胰腺组织中表达量最高, 这与杂交黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) [33]、斜带石斑鱼 [15]、大鼠 (*Rattus norvegicus*) [34] 等动物报道相一致。日本沼虾肝胰腺是物质代谢的重要器官, 而鳃组织是进行气体交换的主要器官 [35], 以低氧胁迫下最易受到影响的鳃和肝胰腺为靶组织分析 *Bax* 基因时空表达规律。发现在低氧胁迫 96 h 时, 日本沼虾鳃和肝胰腺组织中 *Bax* 基因表达量与蛋白表达丰度均显著升高, 其原因是低氧诱导 *Bax* 基因表达量升高, 改变线粒体膜的通透性释放细胞色素 c, 从而激活 Caspase 级联反应促使细胞凋亡 [36]。上述结果与草鱼的研究结果相吻合 [16]。*Bax* 重组蛋白与抗体制备成功, 为后续深入研究日本沼虾细胞凋亡信号传导途径奠定基础, 在本研究中, 通过荧光显微镜观察免疫组化切片可以看出, 日本沼虾肝胰腺组织 *Bax* 蛋白表达丰度在



图版 I 低氧胁迫下日本沼虾肝胰腺组织免疫组化分析

1. 阴性对照, 2. 常氧对照, 3. 低氧 12 h, 4. 低氧 24 h, 5. 低氧 48 h, 6. 低氧 96 h, 下同。B. B 细胞, E. E 细胞, F. F 细胞, L. 内腔, R. R 细胞。

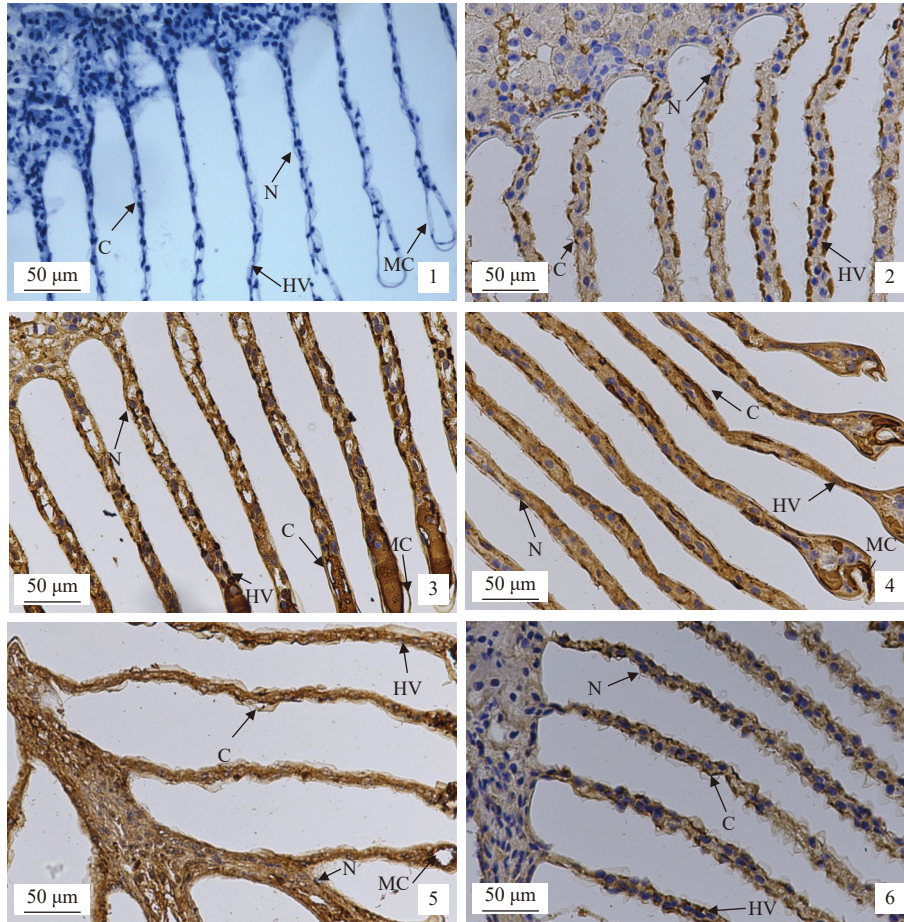
Plate I Immunohistochemical analysis of hepatopancreas tissue of *M. nipponense* in response to hypoxia

1. negative control, 2. control group, 3. hypoxia 12 h, 4. hypoxia 24 h, 5. hypoxia 48 h, 6. hypoxia 96 h, the same below. B. B cells, E. E cells, F. F cells, L. lumen, R. R cells.

96 h 达到最大值, 且在日本沼虾肝胰腺 B 细胞、E 细胞、F 细胞和 R 细胞中均有抗体阳性信号, 鳃组织的上皮细胞核和血淋巴血管中有阳性信号。利用流式细胞仪检测了低氧胁迫下日本沼虾血细胞凋亡率, 结果发现, 低氧胁迫 96 h 时, 日本沼虾血细胞凋亡率显著高于对正常氧组, 这与低氧胁迫下哺乳动物内皮细胞和心肌细胞的研究结果相吻合^[37-38]。许多学者对水生动物 Bcl-2 蛋白家族中促凋亡蛋白进行了大量研究, 如克氏原螯虾^[11] Bax 基因也参与了白斑综合征病毒 (WSSV) 刺激引起的机体细胞凋亡; 干扰草鱼 CIK 细胞 *mst2* 后经 LPS 应激会激活 *Bad* 从而诱发细胞凋亡^[39]。由此可知, Bcl-2 蛋白家族中 Bax 基因在日本沼虾应答低氧胁迫过程中具有促凋亡作用。

前期研究表明, 低氧胁迫主要先激活 Bax, 促使细胞色素 c 释放, 激活 Caspase 级联反应, 从

而激活日本沼虾线粒体凋亡途径, 严重低氧胁迫能够活化 Caspase9, 激活 Caspase3, 从而致使细胞凋亡^[40]。此过程在水生动物低氧胁迫下的不同组织中均有研究, 如低氧胁迫致使鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 心肌细胞^[41]、青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 脑细胞^[42] 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 心肌细胞^[43] 中促凋亡基因 Bax 表达显著升高, 并激活 Caspase-9 和 Caspase-3 介导的细胞凋亡途径。近期研究发现, 在三疣梭子蟹感染副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 或 WSSV 的过程中, 三疣梭子蟹肝胰腺组织中 Bax 蛋白表达丰度和基因转录水平均显著升高, 采用 RNAi 实验证实 Bax 通过调节细胞凋亡参与病原体急性感染^[44]。研究表明, 日本沼虾 Bax 基因参与线粒体细胞凋亡分子途径, 流式细胞仪检测细胞凋亡率与对照组相比显著升高即证明了这一结



图版 II 低氧胁迫下日本沼虾鳃组织免疫组化分析

MC. 边缘通道, C. 角质层, N. 上皮细胞核, HV. 血淋巴血管。

Plate II Immunohistochemical analysis of gill tissue of *M. nipponense* in response to hypoxia

MC. marginal channel; C. cuticle; N. epithelial cell nuclei; HV. hemolymph vessel.

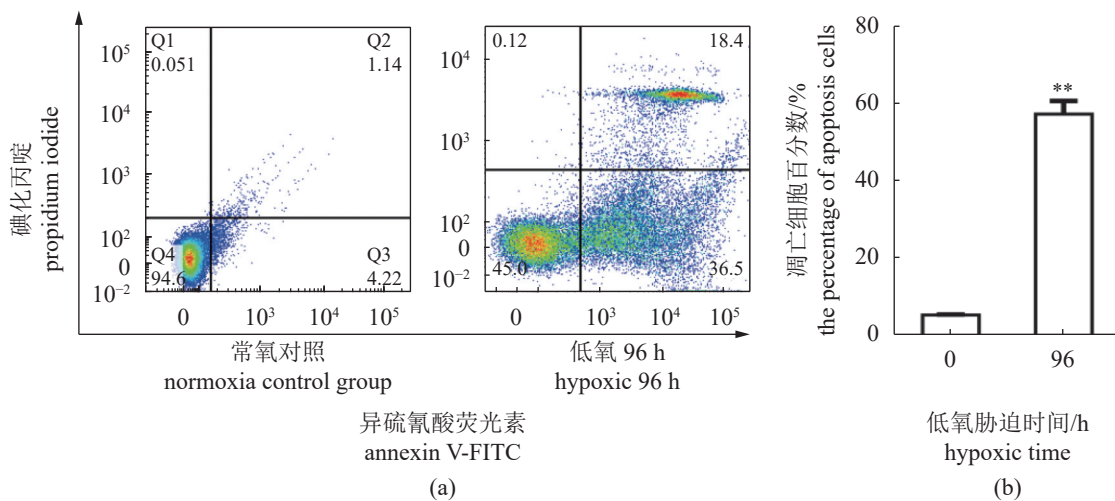


图 7 低氧胁迫对日本沼虾血细胞凋亡的影响

(a) 流式细胞术检测血细胞凋亡结果, (b) 血细胞凋亡率统计结果。

Fig. 7 Effects of hypoxia on apoptosis of hemocytes from *M. nipponense*

(a) cells apoptosis by flow cytometry, (b) apoptosis rate of haemocytes statistic results.

论, 但迄今为止, 日本沼虾 Bax 蛋白表达如何促使细胞色素 c 释放, 其详细的分子调控机制还有待深入探究。

综上所述, 本研究系统分析了日本沼虾 Bax 基因的序列结构域、组织表达特征以及低氧胁迫后该基因的表达模式, 并进行 Bax 基因原核表达及其抗血清的制备, 采用 Western blot 与免疫组化在鳃与肝胰腺组织进行表达与定位分析, 并利用流式细胞仪观察低氧下日本沼虾血细胞凋亡率, 为深入解析低氧下日本沼虾细胞凋亡的分子途径及其机制奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Vaquer-Sunyer R, Duarte C M. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(40): 15452-15457.
- [2] Delgado P C, Avnimelech Y, McNeil R, *et al.* Physical, chemical and biological characteristics of distinctive regions in paddlewheel aerated shrimp ponds[J]. *Aquaculture*, 2003, 217(1-4): 235-248.
- [3] 孙盛明, 祝孟茹, 潘方艳, 等. 低氧对甲壳动物的影响及其分子调控研究进展[J]. *水产学报*, 2020, 44(4): 690-704.
- Sun S M, Zhu M R, Pan F Y, *et al.* Research progress on the effects of hypoxia stress on crustacean and its molecular regulation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 690-704 (in Chinese).
- [4] Xu L, Zhang W Y, Qiao H, *et al.* Integrated metabolomics and transcriptomic analysis of hepatopancreas in different living status *Macrobrachium nipponense* in response to hypoxia[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(1): 36.
- [5] Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology[J]. *Nutrition Reviews*, 1989, 47(1): 23-25.
- [6] D'Arcy M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(6): 582-592.
- [7] Felix-Portillo M, Martínez-Quintana J A, Arenas-Padilla M, *et al.* Hypoxia drives apoptosis independently of p53 and metallothionein transcript levels in hemocytes of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chemosphere*, 2016, 161: 454-462.
- [8] Duarte-Gutiérrez J, Peregrino-Uriarte A B, Gómez-Jiménez S, *et al.* HIF-1 is involved in the regulation of expression of metallothionein and apoptosis incidence in different oxygen conditions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2021, 262: 111072.
- [9] Gong Y, Kong T T, Ren X, *et al.* Exosome-mediated apoptosis pathway during WSSV infection in crustacean mud crab[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(5): e1008366.
- [10] Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: regulation and function in cell death[J]. *Biochimie*, 2017, 135: 111-125.
- [11] 张慧静. 克氏原螯虾中 PI3K 信号通路对调节白斑综合征病毒 (WSSV) 复制的作用 [D]. 海口: 海南大学, 2018.
- Zhang H J. PI3K signaling pathways modulated white spot syndrome virus (WSSV) replication in *Procambarus clarkii*[D]. Haikou: Hainan University, 2018 (in Chinese).
- [12] Glab J A, Cao Z P, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins, beyond the veil[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2020, 351: 1-22.
- [13] Lin S M, He Y Y, Gong Y, *et al.* SpBOK inhibits WSSV infection by regulating the apoptotic pathway in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 106: 103603.
- [14] Huang H L, Wu J L, Chen M H C, *et al.* Aquatic birnavirus-induced ER stress-mediated death signaling contribute to downregulation of Bcl-2 family proteins in salmon embryo cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22935.
- [15] Luo S W, Wang W N, Sun Z M, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of (B-cell lymphoma-2 associated X protein) Bax in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 60: 66-79.
- [16] Wang H, He L B, Pei Y Y, *et al.* Cloning and characterization of Bax1 and Bax2 genes of *Ctenopharyngodon idellus* and evaluation of transcript expression in response to grass carp reovirus infection[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(5): 1369-1382.
- [17] Kratz E, Eimon P M, Mukhyala K, *et al.* Functional

- characterization of the *Bcl-2* gene family in the zebrafish[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2006, 13(10): 1631-1640.
- [18] Guo M, Lv M, Shao Y N, *et al.* Bax functions as coelomocyte apoptosis regulator in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 102: 103490.
- [19] Xiang Z M, Qu F F, Wang F X, *et al.* ChBax/Bak as key regulators of the mitochondrial apoptotic pathway: cloned and characterized in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 225-232.
- [20] Lee Y, Whang I, Lee S, *et al.* Two molluscan BCL-2 family members from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: molecular characterization and immune responses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1628-1634.
- [21] Monserrate J P, Chen M Y Y, Brachmann C B. *Drosophila* larvae lacking the *bcl-2* gene, *buffy*, are sensitive to nutrient stress, maintain increased basal target of rapamycin (Tor) signaling and exhibit characteristics of altered basal energy metabolism[J]. *BMC Biology*, 2012, 10: 63.
- [22] Husain M A, Ishqi H M, Sarwar T, *et al.* Identification and expression analysis of alternatively spliced new transcript isoform of *Bax* gene in mouse[J]. *Gene*, 2017, 621: 21-31.
- [23] Sun S M, Chen Y X, Hu R. Aquatic hypoxia disturbs oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) testicular development: a cross-generational study[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266: 115093.
- [24] Ge H W, Sun L, Yu J H. Fast batch searching for protein homology based on compression and clustering[J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 508.
- [25] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, *et al.* Molecular cloning, mRNA expression and characterization of membrane-bound hemoglobin in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 207: 36-42.
- [28] 孙盛明, 傅洪拓, 宣富君, 等. 日本沼虾C型凝集素结构域家族3的cDNA克隆、原核表达和定位分析[J]. 水产学报, 2019, 43(11): 2317-2326.
- Sun S M, Fu H T, Xuan F J, *et al.* Molecular cloning, prokaryotic expression and localization analysis of C-type lectin 3 (*MnLec3*) cDNA from *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(11): 2317-2326 (in Chinese).
- [29] 牛虹博, 胡鹏, 程鹏丽, 等. *dusp1*敲降对低温诱导斑马鱼ZF4细胞凋亡的作用[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 995-1002.
- Niu H B, Hu P, Cheng P L, *et al.* The role of *dusp1* downregulation in apoptosis of zebrafish ZF4 cells under cold stress[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 995-1002 (in Chinese).
- [30] 顾文彬. 拟穴青蟹干露胁迫应答及其细胞凋亡机制的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- Gu W B. The apoptosis responding mechanism under air-exposure stress in mud crab *Scylla paramamosain*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [31] Ishibashi Y, Nishimaki K, Asoh S, *et al.* Pore formation domain of human pro-apoptotic Bax induces mammalian apoptosis as well as bacterial death without antagonizing anti-apoptotic factors[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 243(2): 609-616.
- [32] Zhai D Y, Jin C F, Huang Z W, *et al.* Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(15): 9580-9586.
- [33] Pei X Y, Chu M X, Tang P, *et al.* Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxygen sensors, respiratory metabolism, oxidative stress, and apoptosis in hybrid yellow catfish "Huangyou-1"[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(5): 1429-1448.
- [34] 林喜秀, 瞿树林, 周桔, 等. 低氧训练对大鼠心、肝、肾、海马组织细胞凋亡的影响及其机制研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2012, 31(2): 146-156.
- Lin X X, Qu S L, Zhou J, *et al.* Effect and mechanism of hypoxic training on the apoptosis of heart, liver, kidney

- and hippocampus in rat[J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2012, 31(2): 146-156 (in Chinese).
- [35] 梁忠秀, 李健, 谭志军, 等. 塔玛亚历山大藻对中国明对虾肝胰腺及鳃SOD、GST和MDA的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(8): 1192-1197.
- Liang Z X, Li J, Tan Z J, *et al.* Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on MDA, SOD and GST in hepatopancreas and gill of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(8): 1192-1197 (in Chinese).
- [36] Reyna D E, Gavathiotis E. Self-regulation of BAX-induced cell death[J]. Oncotarget, 2016, 7(41): 66326-66327.
- [37] Lian N F, Chen M X, Zhang S Y, *et al.* Decreased expression of PPAR γ is associated with aortic endothelial cell apoptosis in intermittently hypoxic rats[J]. Sleep and Breathing, 2021, 25(4): 2241-2250.
- [38] 杨莹, 程德云, 樊莉莉, 等. 骨形成蛋白在低氧性肺动脉高压发病中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(9): 662-666.
- Yang Y, Cheng D Y, Fan L L, *et al.* The role of bone morphogenetic protein-2 in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2007, 30(9): 662-666 (in Chinese).
- [39] 李亚男, 唐美珍, 卢志杰, 等. 草鱼*mst2*在免疫应答中的作用机制[J]. 水产学报, 2021, 45(9): 1453-1464.
- Li Y N, Tang M Z, Lu Z J, *et al.* Mechanism of *mst2* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during the immune response[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(9): 1453-1464 (in Chinese).
- [40] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of caspase-3 from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* when exposed to acute hypoxia and reoxygenation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 62: 291-302.
- [41] 丁晨雨, 胡利双, 李云, 等. 低氧胁迫对鲢心肌细胞凋亡及其调控基因*Bax*、*Bcl-2*表达的影响[J]. 淡水渔业, 2018, 48(2): 10-15.
- Ding C Y, Hu L S, Li Y, *et al.* Effects of hypoxia stress on cardiomyocyte apoptosis and the control for *Bax*, *Bcl-2* expressions in *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(2): 10-15 (in Chinese).
- [42] 陈付菊, 付生云, 马敏, 等. 低氧胁迫对青海湖裸鲤端脑抗氧化酶活性、细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2023: 47(04): 572-580.
- Chen F J, Fu S Y, Ma M, *et al.* Effects of hypoxia stress on the activity of antioxidant enzymes, neuronal apoptosis and expression of related genes of telencephalon in *Gymnocypris przewalskii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(4): 572-580. (in Chinese).
- [43] 吴鑫杰. 低氧对团头鲂细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- Wu X J. The effects of hypoxia on cell apoptosis and the activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [44] Zhang Y B, Wang L, Xu Y, *et al.* Identification and functional characterization of two Bcl-2 family proteins in swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. Aquaculture, 2022, 553: 738086.

Cloning of *Bax* gene in *Macrobrachium nipponense* and its role in hypoxia stress

ZHAO Qianqian¹, SUN Xichao¹, ZHENG Cheng¹, XUE Cheng¹, SUN Shengming^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Hypoxia phenomenon in pond water is a common and prominent stress factor in aquaculture, which will severely restrict the behavior, growth, reproduction and other aspects of aquaculture animals, and even lead to large-scale death. *Bax* is a pro-apoptotic protein in the Bcl-2 protein family, although most studies have investigated the function of *Bax* in many vertebrates, little information to date was observed in the crustaceans. The full-length cDNA sequence of pro-apoptotic *Bax* gene was obtained by RACE (rapid-amplification of cDNA ends) PCR technology to explore the role of *Bax* (B-cell lymphoma-2 associated X protein) in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* under hypoxic stress. RT-PCR was used to analyze the distribution of *Bax* gene in different tissues of *M. nipponense*. Meanwhile, real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to detect the expression of *Bax* gene in different hypoxic stress stages. *Bax* recombinant protein and antiserum were prepared, and the localization of *Bax* protein was analyzed by immunohistochemistry. The present results showed that the full-length cDNA of *Bax* gene was 2 287 bp (NCBI accession no MZ823353), including 42 bp of 5' non-coding region (UTR), 814 bp of 3' UTR, 1 431 bp of open reading frame (ORF) encoding 476 amino acids. Sequence analysis showed that *Bax* was rich in highly conserved BH1, BH2 and BH3 domains. Phylogenetic tree analysis showed that *Bax* gene of *M. nipponense* was closely related to the *Bax* gene of *Penaeus monodon*. RT-PCR results showed that *Bax* mRNA expression was the highest in the hepatopancreas and the lowest in the brain. qPCR results indicated that *Bax* expression level in the gill and hepatopancreas tissues of *M. nipponense* was significantly higher than that of the control group under hypoxia 1-96 h. Western blot analysis also confirmed that *Bax* protein expression level was basically similar to gene transcription level. The recombinant *Bax* protein was obtained by constructing prokaryotic expression vector *in vitro*, which were immunized rabbits to obtain antiserum. Immunohistochemical results showed that the positive signal of *Bax* protein in the gill and hepatopancreas were mainly located in the gill epithelial cells and hepatocytes. Finally, flow cytometry analysis showed that the apoptosis rate of haemocytes in hypoxia 96 h group significantly higher than those in the control group, which was consistent with the expression pattern of *Bax* protein expression abundance and gene transcription level. These results suggest that *Bax* gene can promote apoptosis in different tissues of *M. nipponense* in response to hypoxic stress. The present study has provided theoretical reference for exploring the molecular mechanism of hypoxia sensitivity in *M. nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; *Bax*; apoptosis; hypoxic; prokaryotic expression

Corresponding author: SUN Shengming. E-mail: sunshengming621416@163.com

Funding projects: Key Technology Research Project of Guangdong Province (2020B0202010001); Key Technology Research Project of Ningxia Province (2022ZDYF0569); National Natural Science Foundation of China (31672633); Shanghai Science and Technology Program (23XD1421600, 2201580700)