

红螯光壳螯虾酚氧化酶原基因的克隆与表达

王丹丽^{1,2}, 左迪², 王兰梅², 李嘉尧², 赵云龙^{2*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 为深入了解红螯光壳螯虾酚氧化酶原 (proPO) 基因的非特异性免疫机制, 利用 RACE 技术从红螯光壳螯虾血细胞中克隆到酚氧化酶原基因 *cqproPO*, *cqproPO* 基因 cDNA 全长为 2 962 bp, 开放阅读框为 1 998 bp, 编码 665 个氨基酸, 其结构中含有两个铜离子结合位点, 预测分子量为 75.86 ku; 同源性比对结果显示, 红螯光壳螯虾 CqproPO 与克氏原螯虾酚氧化酶原的同源性最高为 79%, 其次是淡水螯虾 74%、挪威龙虾 69%、美国龙虾 67% 等; 进化分析发现 CqproPO 与克氏原螯虾、淡水螯虾、挪威龙虾、美国龙虾等的酚氧化酶原亲缘关系最近; Real time-PCR 实验结果表明, CqproPO 在血细胞中表达水平最高, 其次是肠、触角腺、鳃等; 在肝胰腺中有适量表达; WSSV 感染后红螯光壳螯虾 CqproPO mRNA 在血细胞、肝胰腺和鳃组织中具有不同的时空表达趋势, 但感染组和免疫后感染组 mRNA 表达量分别在感染后 12 h 和 24 h 达到最大值, 且在 3 种组织中 2 个感染组的 CqproPO 表达量为对照组的 1.3~2.55 倍, 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 之后 *cqproPO* 基因的转录水平明显下降。免疫后再受病毒感染的虾, CqproPO mRNA 的表达量在 3 种组织中总体高于感染组, 感染 7 d 后的免疫保护率达到 51.86%, 表明免疫增强剂可使机体的抗病毒能力增强, 对防御 WSSV 感染具有一定的免疫保护作用。

关键词: 红螯光壳螯虾; 酚氧化酶原; 白斑综合征病毒; 克隆; 表达

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 又称红螯螯虾, 具有食性杂、生长快、易养殖等优势, 是目前世界上较名贵的淡水经济虾之一^[1]。我国于 1992 年引进试养, 随着养殖规模的不断扩大及集约化程度的提高, 各种养殖病害也日趋影响红螯螯虾养殖产业的发展。白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是常见的病害之一, 自 20 世纪 90 年代在全世界爆发以来, 其宿主范围广, 不仅侵染各种野生及养殖对虾^[2-3], 而且还涉及几乎所有的水生养殖甲壳类动物^[4-5], 近年来, 在浙江、江苏等地也陆续发生了 WSSV 自然感染红螯螯虾的病例^[6]。提高虾的自身免疫力, 增强其抗病机能是综合防治的根本措施之一。

酚氧化酶原 (Prophenoloxidase, proPO) 系统是甲壳动物最重要的免疫反应体系, 其 PO 活力的强弱与机体的免疫力直接相关, 可作为衡量甲壳动物免疫功能大小的指标之一^[7]。作为甲壳动物免疫系统的重要组分, 进行酚氧化酶原基因结构研究, 是深入研究酚氧化酶原在体内表达调控机制和免疫功能等的基础。Aspán 等^[8]在淡水螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 中首次确定了 proPO 的初级结构, 之后陆续报道了甲壳动物的 proPO 序列, 如叶星等^[9]克隆了短沟对虾 (*Penaeus semisulcatus*) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的 proPO 基因; Ko 等^[10]克隆了锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 的 proPO 基因; Li 等^[11]克隆了

收稿日期: 2012-04-16 修回日期: 2012-10-03

资助项目: 上海市科学技术委员会科技支撑项目 (12391900700); 上海市教育委员会科研创新项目 (11CX18); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903056)

通信作者: 赵云龙, E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的 proPO 基因;孙杰等^[12]克隆了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 proPO 基因。本研究采用 RACE 方法从红螯螯虾血细胞中克隆出 proPO 全长 cDNA,并通过序列分析确定 proPO 的遗传结构和红螯螯虾 proPO 基因的进化地位;通过分析 proPO 基因在不同组织中的表达模式及在 WSSV 感染后和注射免疫多糖后红螯螯虾 proPO 基因 mRNA 的表达情况,从基因水平认识 proPO 基因和红螯螯虾非特异性免疫抗病之间的相互关系,以期为今后对该基因进行重组表达、基因功能调控等方面的研究奠定分子水平的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用红螯螯虾采自上海市金山区漕泾特种水产养殖场,体长(14.65 ± 1.16) cm,体质量(75.26 ± 6.13) g。挑选健康活力强的个体暂养于实验室玻璃水族箱内,水温(25 ± 1) °C,24 h 连续充气。实验前暂养 7 d,每天投喂饲料 1 次。提取总 RNA 的试剂盒为 Axygen 公司产品 and 原平皓天津生物技术有限公司的 RNA 快速提取试剂盒。Real time-PCR 采用 TaKaRa 公司的 Premix Ex Taq™ Hot Start Version 试剂盒,逆转录酶及其他主要试剂为 TaKaRa 公司产品。3',5' RACE PCR 扩增使用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE

cDNA Amplification 试剂盒。PCR 的扩增引物由上海博尚生物公司合成,PCR 产物由上海生工生物公司克隆测序。白斑综合征病毒由本实验室保存。免疫多糖(酵母细胞壁)购于湖北安琪酵母有限公司。

1.2 引物设计

从 GenBank 获得了克氏原螯虾酚氧化酶原基因(EF595973.1),淡水螯虾酚氧化酶原基因(X83494.1),中国明对虾酚氧化酶原基因(ACM61982.1),美国龙虾(*Homarus americanus*)酚氧化酶原基因(AY655139.1)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)酚氧化酶原基因(AY947400.1),根据此序列设计 1 对兼并引物 proPOF 和 proPOR,扩增出 proPO 基因 cDNA 部分片段;再根据此部分片段设计 5'-RACE 和 3'-RACE 的特异性引物 proPO5'R、proPO3'F;根据测序所得的红螯螯虾酚氧化酶原(CqproPO)全长 cDNA 设计实时定量 PCR 引物, β -actin 基因的特异性引物根据之前的报道进行设计。用 1 对特异性引物 proRTF1/proRTR1,1 对 β -actin 基因引物 antin F1/antin R1 来检测红螯螯虾不同组织中 CqproPO mRNA 的表达情况;用 1 对特异性引物 proRTF2/proRTR2,1 对 β -actin 基因引物 antin F2/antin R2 来检测 WSSV 病毒不同刺激时间段中红螯螯虾肝胰腺、血细胞、鳃中 CqproPO mRNA 的表达情况(表 1)。

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

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
proPOF	HCACCACTGGCACTGGCA
proPOR	GTCGAAWGGGAARCCCAT
proPO5'R	ACCACCACATTCGGCAGGGACAG
proPO3'F	CTAAGTCCCAACGCTCTGTCTACGG
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
proPO-S	TCGGGAAGCTCCCTTATT
proPO-V	CCACCATTGTGCCTCCAA
proRTF1	GTTTCGTTGACGGCATCTTTCAGGAG
proRTR1	ACCACATTCGGCAGGGACAG
proRTF2	CGTCACAACAGGAAAGTTAGGGATT
proRTR2	CACATTCGGCAGGGACAGAT
antin F1	GAC TCG TCG TAC TCC TCC TTG GTG
antin R1	ACTGAGCGTGGCTACTCCTTCAC
antin F2	GCTTCCCACGGTCAGGTCA
antin R2	TGTCGCACCTCATGATGGAGCTGTG

注:H = A or C or T,W = A or T,R = A or G。

1.3 血细胞总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

取 -80 °C 保存的红螯光壳螯虾血细胞样品 (100 ~ 200 mg) 用 RNA 提取试剂盒 (Axygen, USA) 提取总 RNA。用反转录试剂盒 (PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit) 进行上述 RNA 反转录以得到 cDNA。37 °C 反转录 15 min, 85 °C 5 s 灭活反转录酶。

1.4 酚氧化酶原基因 cDNA 片段的克隆

以红螯光壳螯虾血细胞 cDNA 为模板, 采用兼并引物 proPOF 和 proPOR 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 50 μ L, 优化后扩增条件: 94 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 ~ 35 个循环; 72 °C 延伸 3 ~ 5 min; 4 °C 保存。PCR 产物送上海生工生物公司进行克隆测序。

1.5 酚氧化酶原 cDNA 全长序列的获得

测序结果在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 BlastX 分析比对, 若以上实验所得酚氧化酶原部分序列与其它物种的酚氧化酶原同源, 则根据测得的序列再设计正向 (proPO5'R)、反向 (proPO3'F) 共 2 条引物用于 RACE 扩增。采用 SMARTTM RACE cDNA 试剂盒 (Clontech) 进行 5' 和 3'-RACE 获得全长 cDNA。

1.6 酚氧化酶原基因表达模式分析

实验分组 分为 4 个处理组, 每组 3 个重复, 每个重复 3 尾。对照组 (control): 于第 1、2 腹节肌肉每尾注射 PBS 缓冲液 0.10 mL; 免疫组 (group I): 每尾注射 1.0% 免疫多糖溶液 0.10 mL; 感染组 (group II): 每尾注射 PBS 缓冲液 0.10 mL, 48 h 后注射 0.14 mL 病毒液。免疫后感染组 (group III): 每尾注射 1.0% 免疫多糖溶液 0.10 mL, 免疫 48 h 后于第 1、2 腹节肌肉注射 0.14 mL WSSV 病毒液。

血细胞及各组织的制备 分别于注射后 0、6、12、24、48 和 72 h 从红螯光壳螯虾胸足基部抽取血淋巴置于离心管中, 加适量抗凝剂, 在 4 °C 条件下, 以 3 700 r/min 离心 10 min 后得血细胞; 分别取肝胰腺、鳃、胃、肠、触角腺、肌肉、精巢和卵巢于 -80 °C 保存备用。感染组和免疫后感染组试验中注射病毒前取样为 0 h 对照组。

实时荧光定量 PCR 分析 首先对引物的

浓度、模板浓度、引物退火温度进行优化。优化后反应条件如下: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。每个组织的样品设 3 次重复。反应结束后确定 Real-time PCR 的扩增曲线和溶解曲线, 数据采集和处理在 StepOne Sequence Detection System 上进行。

实验所得数据以平均值 (mean, M) \pm 标准差 (stdeva, SD) 表示, 所测数据以 SPSS 14.0 软件进行等统计分析, 采用 One-Way ANOVA 法进行显著性检验, 并用 Duncan 检验法进行多重比较。本实验根据 Livak^[13] 的方法进行引物的效率检测, PCR 产物的溶解曲线没有杂峰, 显示产物特异性好。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析处理 qRT-PCR 结果, ΔC_t 定义为内标 (β -actin) C_t 值与目的基因 (*cqproPO*) C_t 值的差值, 以 PBS 对照组的表达量为 1。

1.7 免疫保护率测定

感染组和免疫后感染组分别设 3 个重复, 每个重复 20 只虾。感染组 (对照组): 每尾注射 PBS 缓冲液 0.10 mL, 48 h 后注射 0.10 mL 病毒液; 免疫后感染组: 每尾注射 1.0% 免疫多糖溶液 0.10 mL, 免疫 48 h 后注射 0.10 mL WSSV 病毒液。注射 WSSV 病毒后连续观察 7 d, 记录各组实验螯虾一周内的累积死亡率。免疫保护率 = (对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率。

1.8 生物信息学分析

利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上的 BlastX 工具进行核酸和蛋白序列相似性比对分析; 通过 NCBI 的 ORF Finder 进行开放阅读框分析并预测氨基酸序列; 氨基酸功能域预测用 ExPASy-PROSITE 网站 (<http://prosite.expasy.org/>); SignalP 程序分析信号肽; 采用 Clustal W 软件进行多序列比对分析。用 MEGA 4.0 软件中的 NJ (Neighbor-Joining) 法构建进化树。用自展法 (Bootstrap) 进行 1 000 次重复检验。

2 结果

2.1 红螯光壳螯虾酚氧化酶原 *cqproPO* 基因全长 cDNA 的克隆

以红螯光壳螯虾血细胞 cDNA 为模板, 用兼并引物进行 PCR 扩增, 获得一条约 1 352 bp 的片段, 经 BlastX 分析, 显示与已登录的克氏原螯虾 (ABR12412.1)、淡水螯虾 (CAA58471.1)、挪威

龙虾 (*Nephrops norvegicus*) (CCE46011.1)、美国龙虾 (AY655139.1)、欧洲龙虾 (*Homarus gammarus*) (CAE46724.1) 等酚氧化酶原基因具有较高的同源性。以这段序列设计 5' 和 3'-RACE 引物分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE, 测序后所得序列通过比对拼接得到了一条 2 962 bp 的全长红螯光壳螯虾酚氧化酶原 *cqproPO* 基因序列 (GenBank 登录号: JQ388292), 为验证序列的可靠性, 重新设计 proPO-S、proPO-V 克隆酚氧化酶原全长序列, 结果与拼接结果一致, 证明完整 cDNA 克隆成功。

2.2 红螯螯虾酚氧化酶原 *cqproPO* 基因序列特征分析

红螯螯虾 proPO cDNA 全长为 2 962 bp, 包含了一个 78 bp 的 5'-UTR 区域和一个 886 bp 的

3'-UTR (非编码区) 区域, 其中包括一个终止密码子 (TAA), 2 个多聚腺苷酸加尾信号 (Polyadenylation Signal Site) (AATAAA) 和 polyA 尾。1 998 bp 的开放阅读框 (ORF) 编码了 665 个氨基酸。红螯螯虾酚氧化酶原的理论等电点 (pI) 为 6.15, 计算分子量为 75.86 ku。ORF 含有 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (Tyrosine kinase phosphorylation site); 13 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (Casein kinase II phosphorylation site); 7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (Protein kinase C phosphorylation site); 1 个依赖于 cAMP-and cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 (cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site); 3 个 N-糖基化位点 (N-glycosylation site) (图 1)。

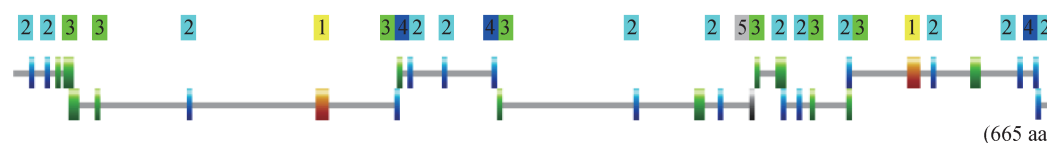


图 1 红螯螯虾酚氧化酶原基因 ORF 中磷酸化位点和糖基化位点示意图

1. 酪氨酸激酶磷酸化位点 (黄色); 2. 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (蓝色); 3. 蛋白激酶 C 磷酸化位点 (绿色); 4. N-糖基化位点 (深蓝); 5. 依赖于 cAMP-and cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 (灰色)。

Fig. 1 The phosphorylation sit and glycosylation site in ORF of prophenoloxidase from *C. quadricarinatus*

1. Tyrosine kinase phosphorylation sit (yellow); 2. Casein kinase II phosphorylation site (blue); 3. Protein kinase C phosphorylation site (green); 4. N-glycosylation site (deep blue); 5. cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (gray).

2.3 红螯螯虾酚氧化酶原 CqproPO 结构分析

红螯螯虾酚氧化酶原 CqproPO 含有 3 个串联的血蓝蛋白结构域: hemocyanin_N 结构域 (残基 43 位 - 108 位), hemocyanin_M 结构域 (残基 112 位 - 386 位) 和 hemocyanin_C 结构域 (残基 392 位 - 658 位) (图 2), 其中第 1 结构域为亚基蛋白的 N 端, 有大量的 α 螺旋二级结构; 第 2 结构域 M 也是 α 螺旋区, 含血蓝蛋白的活性部位, 活性部位共有 2 个铜离子结合位点 (图 3), 这些铜离子结合位点中保守的组氨酸在蛋白中的位置分别为: 177, 181, 203, 337, 341 和 377 以及铜结合位点相邻的氨基酸序列高度保守 (图 3)。

2.4 红螯螯虾 CqproPO 氨基酸序列同源性分析

利用 ClustalW 对红螯螯虾 CqproPO 和其它 14 种甲壳类酚氧化酶原的多序列比对见图 3, 红螯螯虾 CqproPO 与克氏原螯虾酚氧化酶原的同源性最高为 79%, 其次是淡水螯虾 74%、挪威龙虾 69%、美国龙虾 67% 和欧洲龙虾 67%。另外 9 个种类: 中国明对虾、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、珍宝蟹 (*Metacarcinus magister*)、短沟对虾、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、长足龙虾 (*Panulirus longipes*) 与红螯螯虾 CqproPO 相比同源性均为 58% ~ 65%。

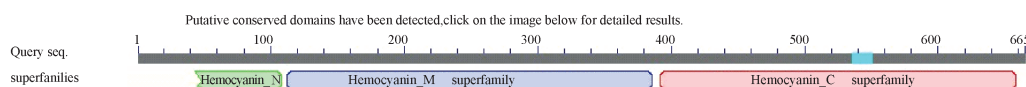


图 2 红螯螯虾酚氧化酶原中的三个串联血蓝蛋白结构域位置示意图

Fig. 2 Distribution of three tandem hemocyanin domain of proPO from *C. quadricarinatus*

	His.	Cu A	
<i>Penaeus onodon</i>	GPEFSGTHLKPEHRISYWREYGINVHHWHWHLIYPPAMGFDRDRKGELF		229
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	GLEFSGTHLKPEHRLSYWREYGINVHHWHWHLIYPPMGFDRDRKGELF		229
<i>Penaeus semisulcatus</i>	GPDFSGTHLKPEHRLSYWREYGINVHHWHWHLIYPPAMGIDRDRKGELF		227
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	GLEFSGTHLKPEHRLSYWREYGLSVHHWHWHLIYVGMGVDRDRKGELF		229
<i>Litopenaeus vannamei</i>	GLEFSGTHLKPEHRLAYWREYGINAHHWHWHLVYPIDMGVNRDRKGELF		231
<i>Portunus trituberculatus</i>	GPEFSSTHLKPEHRVAYWREDFGINSHHWHWHLVYPVDLGVSRDRKGELF		208
<i>Metacarcinus magister</i>	GPEFSSTHLKPEHRVAYWREYGINAHHWHWHLVYPVDLGVMRDRKGELF		206
<i>Eriocheir sinensis</i>	GPEFSSTHLKPEHRVAYWREYGINLHHWHWHLVYPLDMGVDRDRKGELF		214
<i>Panulirus longipes</i>	GPEFSSTNIKPEHRVSYWREYGINSHHWHWHLAYPAGFGDPPDRKGELF		215
<i>Homarus gammarus</i>	GPDFSSNTIKPEHRVAYWREYGMNVHHWHWHLVYPIEMNLRDRKGELF		223
<i>Homarus americanus</i>	GPDFSSAIKPEHRVAYWREYGMNVHHWHWHLVYPIEMDLIRDRKGELF		223
<i>Nephrops norvegicus</i>	GPDFSSTSIKPEHRVSYWREYGLNIHHWHWHLVYPIEMNVNRDRKGELF		223
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	GPEFANTNQKAHRVSYWREDFGINSHHWHWHLVYPIEMNVNRDRKGELF		239
<i>Procambarus clarkii</i>	--AFEADGQLSPNFLFYG--DLHNIGHHWHWHLVYPIDTNVNRDRKGELF		163
Cherax quadricarinatus	GPEFASTNLKPEHRVSYWREYGINSHHWHWHLVYPAEMDVPGDRKGELF		199
	* . : * * ***** ** . *****:		
	His.		
<i>Penaeus monodon</i>	YYMHQQVIARYDIERLCLGLPRVEKLDNWRPIEDGYFPKMTVSISGRNW		279
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	YYMHQQVIARYDIERLCLGLRVEKLPDNWRPIKDGYPKLTISNSGRQW		279
<i>Penaeus semisulcatus</i>	FYMHQQVIARYDIERLCLGLPRVEKLDNWRVPIKDGYPKLTVNNSGRQW		277
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	YYMHQQLIARYDLERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLTISNTGRAW		279
<i>Litopenaeus vannamei</i>	FYMHQQMVARYDMERLSLGLPRVQKLENWRAPIEDGYFPKLTVNNSGRAW		281
<i>Portunus trituberculatus</i>	FYMHQQMLARYDMRSLVGLNRVQKLSNWRIPIDGYFPKLTINNSGQTW		258
<i>Metacarcinus magister</i>	YYMHQQMLARYDMRSLVGLNRVQKLSNWRIPIDGYFPKLTINNSGQAW		256
<i>Eriocheir sinensis</i>	YYMHQQMLARYDMRSLVGLNRVEKLANWRMPIPDGYFSKLTLDNSGQVW		264
<i>Panulirus longipes</i>	FYMHQQMLARYDMERLSVGLTRTEKLENWRIPVDPGYFSKLTVNNTSRAW		265
<i>Homarus gammarus</i>	FYMHQQMIARYDMERLSVGLRRVEKLENWRIPVDPGYFSKLTVNNSGRAW		273
<i>Homarus americanus</i>	FYMHQQMIARYDMERLSVGLRRVEKLENWRIPIDGYFSKLTVNNSGRAW		273
<i>Nephrops norvegicus</i>	FYMHQQMITRYDMERLSVGLRRVEKLENWRIPIDGYFSKLTVNNSGRAW		273
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	YYMHQQMVARYDWERLSVNLNRVEKLENWRVPIPDGYFSKLTANNSGRPW		289
<i>Procambarus clarkii</i>	YYMHQQMIARYDMERLSVNLKRVEKLENWREIPIDGYFSKLTVNNSGRPW		213
Cherax quadricarinatus	YYMHQQMVARYDMERLSVDLNRVEKLENWRVPIRDGYFSKLTNSNSGRAW		249
	:*****::*** :*. :. * . : ** ** * : ****. * : * . : . : *		
<i>Penaeus onodon</i>	GSRQDNTLPKDLRRRELG-EFVDITDMEIWSRLLDAIHQGF MIDRNGDK		328
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	GSRQDNTLPKDLRRRELG-EFVDITDMEIWSRLLDAIHQGF MIDCNGDK		328
<i>Penaeus semisulcatus</i>	GSRQDNTLPKDLRRRELG-EFVDITDLEIWSRLLDAIHQGF MIDRNGDK		326
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	GTRQDNTLPKDFRRREIG-EFVDITDLEIWSRLLDAIHQGF MVDRKGNK		328
<i>Litopenaeus vannamei</i>	GSRQDDTVMQDFLRNDFGLDFTDVTDLEIWSRLLDAIHQGF MIDRAGKR		331
<i>Portunus trituberculatus</i>	GSRQDNTLMQEYRREEFGLQPFDVSDLELWHRRIMDAIHQGYLINRDGNL		308
<i>Metacarcinus magister</i>	GTRQDNTLMQDYKRDDFGLPQTDVSELEQWHSRIMDAIHQGF VDREGKH		306
<i>Eriocheir sinensis</i>	GSRQDGTLLQEYRRNEFMLEPFVDTDLEQHSRLLMDAIHQGHLDREGKR		314
<i>Panulirus longipes</i>	GTRQDNSMLMDFKRQDLGLDPIDTDIEIWSRLLDAIHQGYMIDRNGDK		315

<i>Homarus gammarus</i>	LLDAIHQGYMKNPNGDT 323	
<i>Homarus americanus</i>	GTRQDNTYLKDFRRNDFGLQPLDITELEVWRSRLLDIAHQGYMKNPNGDT 323	
<i>Nephrops norvegicus</i>	GTRQDTTNMKDFRRNDIGLQQLDITELEVWRNRLMDIAHQGYMKNKAGDT 323	
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	GTRQDNTFIKDFRRNDAGLDFIDISDMEIWRSLMDIAHQGYMLNRNGER 339	
<i>Procambarus clarkii</i>	GTRQDNTLLKDLRRNEFGLDVTDISDMELWRSRLMDIAHQGYMLNRNGER 263	
<i>Cherax quadricarinatus</i>	GTRQDDSLMKDFRRTDFGLDFIDITVMEIWM SRLMDIAHQGYMINRNGDR 299	
	*:*** : : * : *:::* *::*****:.*	
		His.
<i>Penaeus onodon</i>	VPLRDDVTS-GKRGIDILSEALEADAELSVNFPY	YGD LH NRG H DILAFSH 377
<i>Femmeropenaeus chinensis</i>	VPLRDDVTS-GKRGIEILSEALEADAELSVNFPY	YGD LH NRG H DILAFSH 377
<i>Penaeus semisulcatus</i>	VPLRDDVTS-GKRGIEILSEALEADAGLSVNFPY	YGD LH NRG H DILAFSH 375
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	VPIRDDVTS-GQRGIDILAEALEADEDLSINYPF	YG SL H NFG H DILAFSH 377
<i>Litopenaeus vannamei</i>	VVLSDDVTS-GKRGIDILADALEADSNSVNSPY	YGD LH NM GH VLIAFSH 380
<i>Portunus trituberculatus</i>	IKLTDKVKPEKRGIDLLGDTVEADSSLSNYPF	YGD LH NM GH VLIAAAH 358
<i>Metacarcinus magister</i>	TKLSDDVKLPQKRGIDLIADALGADSTLSLNSPF	YGD LH NM GH VVISASH 356
<i>Eriocheir sinensis</i>	VRLTDEGVAPNRRGIVLLGDALEADAGLSVNSPF	YGD LH NS GH VIIAAAH 364
<i>Panulirus longipes</i>	VPLSDDVTS-GKRGIDILGDAFEADRRLSVNSLY	YGD LH NL G H VVIAFTH 364
<i>Homarus gammarus</i>	IPLSDDVTS-GKRGIDILGDTLEADADLSPHYQF	YGD LH NM S H VLISFSH 372
<i>Homarus americanus</i>	IPLSDDVTS-GKRGVDILGDTLEADADLSPHYQF	YGD LH NM CH VLISFSH 372
<i>Nephrops norvegicus</i>	IHLSDDVTT-GKRGIDILGDAFEADSSLSPHFQF	YGD LH NM AH VLISFSH 372
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	VPLSDNVTT-GKRGIDILGDAFEADAQLSPNYLF	YGD LH NT GH VLLAFCH 388
<i>Procambarus clarkii</i>	IPLSDNVTT-GKRGIDILADAFEADGQLSPNFLF	HGD LH N I G H LMLAFCH 312
<i>Cherax quadricarinatus</i>	VPLSDNVTT-GKLGIEILGDAFEADASLSPNALF	YGD LH NL G H LMIAFTH 348
	: * . : * : : : . : * * * * : : : * . * * * * : : : * *	
		CuB His.
<i>Penaeus onodon</i>	DPD NAH KEEMGVVGD L GTSLRDPVFFRL	H KLVDDLFQEYKVTQPPYTEEE 427
<i>Femmeropenaeus chinensis</i>	DPD NAH KEEMGVVGD L GTSLRDPVFFLL	H KLVDDLFQEYKVTQPPYTEAE 427
<i>Penaeus semisulcatus</i>	DPD NAH KEEMGVVGD L GTSLRDPVFFLL	H KLVDDLFQEYKVTQRPYTEAE 425
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	DPD NAH KEEMGVMGDTATAMRDPVFFYRW	H KFVDDTFQEYKLMQRPYTEEE 427
<i>Litopenaeus vannamei</i>	DPD FAH KEEMA V MGDTSTAMRDPVFFYRW	H KFVDDTFQEYKLMQRPYTEQD 430
<i>Portunus trituberculatus</i>	DPD NAH QENLGVMSETATAMRDPVFFYRW	H KYIDDIFQEYKLTQPPYTAEE 408
<i>Metacarcinus magister</i>	DSD NAH REQLGVMSDTATAMRDPVFFYRW	H KYIDDIFQEYKLIQRPYTVEE 406
<i>Eriocheir sinensis</i>	DPD NAH REN L GVMSDTSTAMRDPVFFYRW	H KYIDDLFQEYKLTQPPYTMEQ 414
<i>Panulirus longipes</i>	DSD NAH KEEDMGVMGDSSTAMRDPVFFYRW	H KFVDDVFQEYKLTQQPYSLED 414
<i>Homarus gammarus</i>	DND NAH KEELGVMGDPATSMRDPVFFYRL	H KFVDDVFQAYKLTQRPYTMED 422
<i>Homarus americanus</i>	DND NAH KEELGV L GDPATSMRDPVFFYRL	H KFIDDVFQAYKLTQRPYTMED 422
<i>Nephrops norvegicus</i>	DND NAH KEEMGVMGDSATAMRDPVFFYRL	H KFVDDVFQAYKLTQRPYTLEN 422
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	DND NSH REEIGVMGDSATALRDPVFFYRW	H KFVDDIFQEYKLTQPPYTMED 438

图3 红螯螯虾酚氧化酶原与其它甲壳类同源序列的多序列比对

阴影显示2个铜离子CuA和CuB的位点及铜离子结合位点的6个组氨酸残基,用粗体H表示。

Fig. 3 Multiple alignment of *C. quadricarinatus* proPO with the other crustacean proPO

The two sites of CuA, CuB and the six histidine residues within the copper-binding sit (bold letter H) are shown in the shadow.

利用 MEGA 4.0 软件对节肢动物中 25 个不同的酚氧化酶原序列进行了分子系统学分析,在构建系统发生树的基础上研究了红螯螯虾 CqproPO 和其它种类酚氧化酶原之间的进化关系(图 4)。结果显示,不同物种来源的酚氧化酶原之间是保守的并且在一定程度上是相关的。从系统进化树上可以看到酚氧化酶原在甲壳动物中被分为两个亚群。红螯螯虾 CqproPO 与克氏原螯虾、淡水螯虾、长足龙虾、挪威龙虾、美国龙虾和欧洲龙虾等甲壳动物的酚氧化酶原分为一个亚群。甲壳纲的大型溞(*Daphnia magna*)、蚤状溞(*Daphnia pulex*)和昆虫纲的家蝇(*Musca domestica*)、疟蚊(*Anopheles gambiae*)、朝鲜黑金龟(*Holotrichia diomphalia*)、家蚕(*Bombyx mori*)、大蜡螟螟(*Galleria mellonella*)酚氧化酶原属于另

外一个亚群。红螯螯虾首先与克氏原螯虾和淡水螯虾聚类,之后与长足龙虾、挪威龙虾、美国龙虾、欧洲龙虾聚为一支,再与由凡纳滨对虾、日本囊对虾、斑节对虾、中国明对虾和短沟对虾形成的一支聚在一起,进而与三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、珍宝蟹、普通黄道蟹(*Cancer pagurus*)、罗氏沼虾和叶虾(*Nebalia kensleyi*)聚为一亚群。我们发现 CqproPO 在进化上与克氏原螯虾、淡水螯虾、长足龙虾、挪威龙虾、美国龙虾、欧洲龙虾等虾的酚氧化酶原亲缘关系最近,其次与凡纳滨对虾、日本囊对虾、斑节对虾、中国明对虾和短沟对虾的酚氧化酶原基因相关联;与三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、珍宝蟹等一些蟹类的酚氧化酶原在分子进化上距离相对较远。

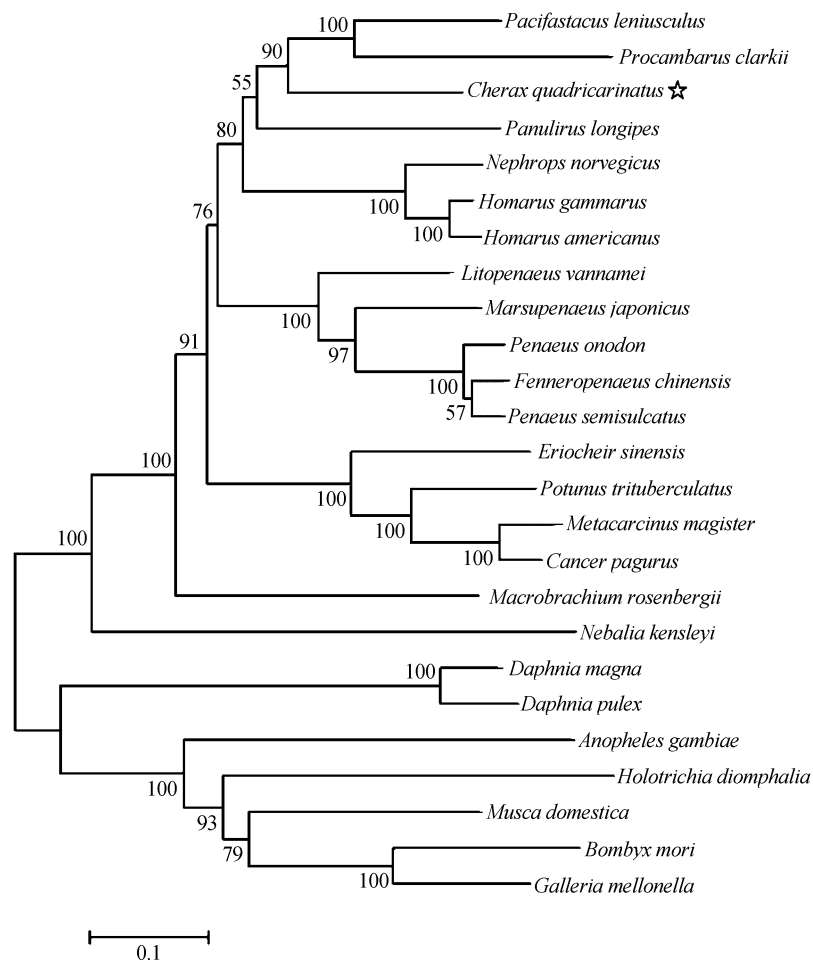


图 4 根据 NJ 法构建的 25 种节肢动物的酚氧化酶原基因进化树
 Fig. 4 Neighbor-Joining phylogenetic tree of prophenoloxidase amino acid sequences from 25 different species of arthropod

2.5 CqproPO mRNA 在红螯螯虾各个组织中的表达特征

利用 qRT-PCR 相对定量方法分析了红螯螯虾酚氧化酶原 CqproPO 在不同组织中的表达, 基因的表达特征图谱如图 5 所示。CqproPO 在血细

胞中表达水平最高, 远高于其它各组织 ($P < 0.01$); 其次是肠、触角腺、鳃和卵巢; 在肝胰腺中有适量表达, 在胃和肌肉中有微量表达, 而在精巢中几乎无表达。这说明 CqproPO 的表达具有明显的组织特异性。

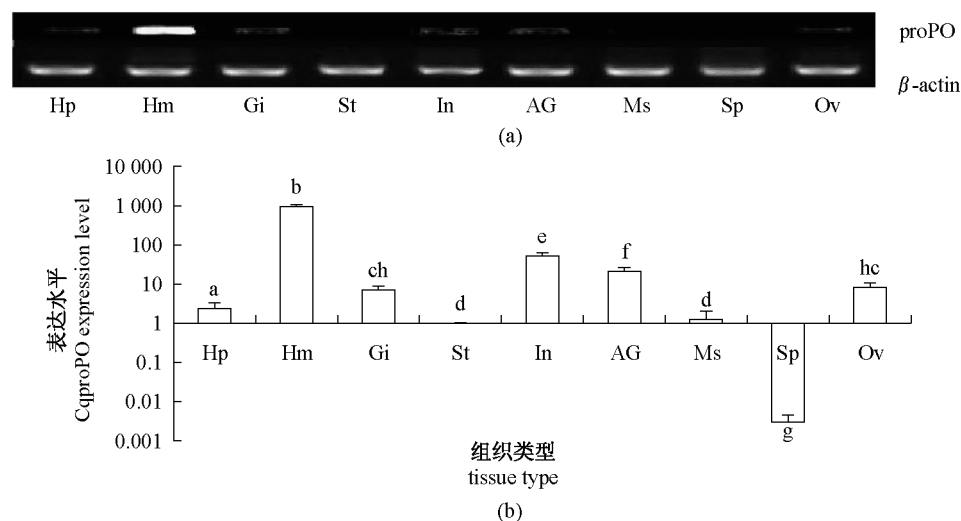


图 5 红螯螯虾 *cqproPO* 基因 (a) 和 *CqproPO* mRNA 在各个组织中表达 (b)

Hp. 肝胰腺, Hm. 血细胞, Gi. 鳃, St. 胃, In. 肠, AG. 触角腺, Ms. 肌肉, Sp. 精巢, Ov. 卵巢. 图上 a, b, c 等不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Tissue distribution of *CqproPO* mRNA (a) and *cqproPO* gene expression (b)

Hp. hepatopancreas, Hm. haemocytes, Gi. gill, St. stomach, In. intestine, AG. antennal gland, Ms. muscle, Sp. spermary, Ov. ovary. Bars with different letters (a, b, c, etc.) indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.6 WSSV 病毒感染后红螯螯虾 *cqproPO* 基因的表达变化

白斑综合征病毒感染后红螯螯虾酚氧化酶原 *cqproPO* 基因在血细胞、肝胰腺和鳃中的表达特征图谱如图 6-8 所示。注射 WSSV 后, 在血细胞中感染组 (group II) 和免疫后感染组 (group III) 的 *cqproPO* 基因表达量分别在 12 h 和 24 h 时达到最高值, 且显著高于对照组 ($P < 0.05$), 为对照组的 1.3 ~ 1.6 倍, 之后明显下降, 至 72 h 时 2 感染组分别比对照组下降了 2.9 ~ 9 倍 (图 6); 在肝胰腺和鳃中感染组 (group II) 和免疫后感染组 (group III) 的 *cqproPO* 基因表达量均在 24 h 时达到最高值, 且明显高于对照组 ($P < 0.05$), 随着感染时间延长 *cqproPO* 基因表达量呈显著下降趋势 (图 7-8)。免疫后感染组由于在感染 WSSV 前注射了免疫多糖, 所以在 3 种组织中基因表达量总体高于感染组。

2.7 免疫多糖对红螯螯虾免疫保护率的影响

免疫多糖对红螯螯虾免疫保护率的影响结果

见图 9。由图 9 可知, 注射 WSSV 7 d 后, 对照感染组的死亡率高达 90%, 免疫后感染组由于在感染病毒前注射了免疫多糖, 死亡率仅为 43.33%, 明显低于对照组 ($P < 0.05$), 免疫保护率达到 51.86%。

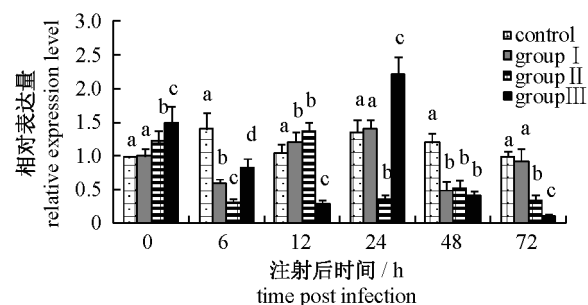


图 6 *CqproPO* mRNA 在红螯螯虾血细胞中的表达 图上 a, b, c 等不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 6 Real time-PCR analysis of *CqproPO* gene expression from hemocyte of *C. quadricarinatus*

Bars with different letters (a, b, c, etc.) indicate significant difference ($P < 0.05$).

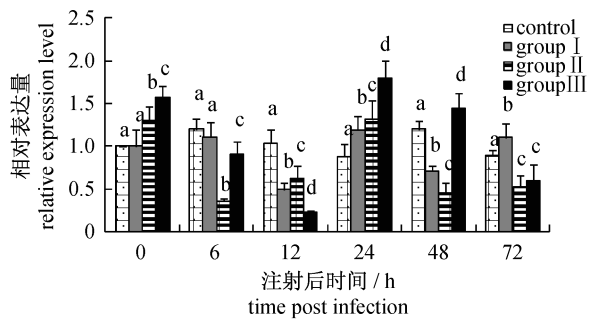


图7 CqproPO mRNA 在红螯螯虾肝胰腺组织中的表达
图上 a, b, c 等不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Real time-PCR analysis of CqproPO gene expression from hepatopancreas of *C. quadricarinatus*

Bars with different letters (a, b, c, etc.) indicate significant difference ($P < 0.05$).

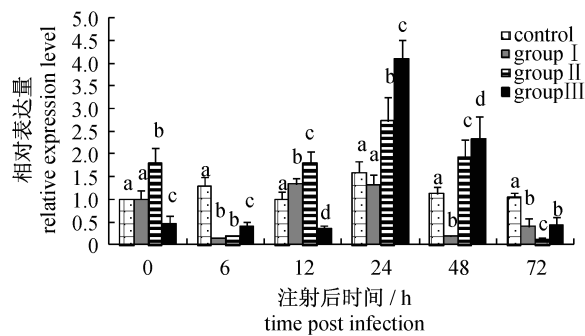


图8 CqproPO mRNA 在红螯螯虾鳃组织中的表达
图上 a, b, c 等不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 8 Real time-PCR analysis of CqproPO gene expression from gill of *C. quadricarinatus*

Bars with different letters (a, b, c, etc.) indicate significant difference ($P < 0.05$).

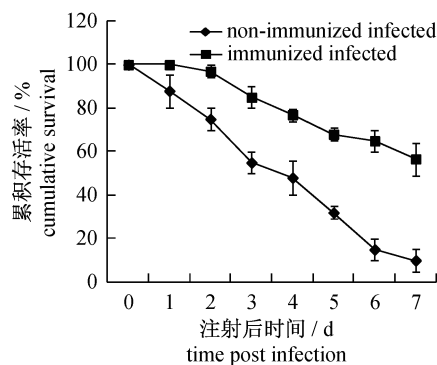


图9 WSSV 感染对红螯螯虾累积存活率的影响

Fig. 9 Cumulative survival against time post-infection for *C. quadricarinatus* challenged with WSSV

3 讨论

酚氧化酶原序列最显著的特征是具有两个铜结合位点即 CuA 和 CuB, 每个铜离子都与 3 个保守的组氨酸残基结合^[14]。这对铜离子是酚氧化酶与分子氧和它的酚类底物相互作用的部位。将红螯螯虾 *cqproPO* 基因的 2 个铜离子结合位点、位于铜结合位点内的 6 个组氨酸残基及其相邻氨基酸序列与数据库序列进行比较, 显示红螯螯虾酚氧化酶原与许多种类的酚氧化酶原具有显著同源性, 尤其是铜结合位点内的 6 个组氨酸高度保守^[10,15] (图 3)。CqproPO 结构中也发现 3 个保守的血蓝蛋白结构域, 分别为 Hemocyanin-N, Hemocyanin-M 和 Hemocyanin-C, 这再次证明甲壳动物和昆虫的 proPO 都是血蓝蛋白家族的基因^[16] (图 2)。

本研究红螯螯虾 proPO cDNA 全长为 2 962 bp, 1 998 bp 的开放阅读框 (ORF) 编码了 665 个氨基酸。与最新 NCBI 网上公布的红螯螯虾 proPO 序列 (GenBank 登录号: JQ040507) 相比, 其 cDNA 全长为 2 930 bp, 在编码了 665 个氨基酸的开放阅读框 (ORF) 中, 第 233 位、269 位编码了不同的氨基酸, 前者为精氨酸和天冬氨酸, 后者为丝氨酸和谷氨酸, 这可能是动物个体的差异或是实验的方法不同所致, 还需今后进一步的证实。从 ORF 包含的氨基酸序列中我们还可以看到, 有 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点; 13 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; 7 个蛋白激酶磷酸化位点; 1 个依赖于 cAMP-and cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点; 3 个 N-糖基化位点。目前克隆的十足目 proPO 基因中大多数含有 5 个 N-糖基化结合位点^[10,15], 克氏原螯虾酚氧化酶原多达 8 个 N-糖基化位点^[11], 这可能与物种进化差异相关。蛋白质的磷酸化、糖基化是完成其生理功能的结构基础, 特别是该蛋白序列中酪蛋白激酶 II 磷酸化位点有 13 个, 表明酪蛋白激酶 II 对该蛋白生物功能的发挥具有重要的调节作用^[17-18]。红螯螯虾酚氧化酶原 CqproPO 的 ORF 有多个位点有可能发生磷酸化修饰和糖基化修饰, 这些存在的位点可能就是 CqproPO 被转运到某个特定的细胞器后的加工位点, 通过此翻译后加工来实现其生理功能。当酚氧化酶原被激活后, 去掉 N-末端的一个多肽, 为酚类底物进入活性位点开启了一个很大的入口, 从而实现酚氧

化酶活性^[19-20]。至于这些可能与免疫活性相关的位点以及 CqproPO 确切的翻译后加工机制还需要以后进一步的深入研究。

Sritunyalucksana 等^[21]通过 Northern Blot 分析证实了对虾的酚氧化酶原是在血细胞中合成而不在肝胰腺合成,酚氧化酶原合成部位的分布特点可能与快速防御反应有关。本研究中,qRT-PCR 的结果显示红螯螯虾酚氧化酶原 CqproPO mRNA 表达量在血细胞中最高,其次是肠、触角腺、鳃和卵巢;在肝胰腺中有适量表达。在其他甲壳类十足目种类中,从中国明对虾中克隆的酚氧化酶 FCproPO 在血细胞中表达最高,其次是肝胰腺、肠和鳃^[12];在克氏原螯虾^[11]、锯缘青蟹^[10]和凡纳滨对虾^[15]中克隆的酚氧化酶原均在血细胞中表达量最高。

白斑综合征病毒 WSSV 是一种大型的双链 DNA 病毒,该病毒侵袭性和复制能力很强,宿主死亡率可达 100%,且宿主范围很广,可侵袭对虾的多种组织^[22]。酚氧化酶(phenoloxidase, PO)又称为酪氨酸酶(tyrosinase),它是一种含铜的酶,能够催化单酚羟化成二酚,并把二酚氧化成醌,醌在非酶促条件下形成最终的反应产物黑色素。这些黑色素协同具有细胞毒性的醌类中间产物沉积到入侵的病原体周围,起到隔离杀死病原体的作用,即所谓的黑化包被反应^[21]。在较高等的无脊椎动物如节肢动物中,PO 具有多种功能,它不仅参与黑色素形成、角质的硬化和伤口愈合,而且在宿主的防御反应中还作为非自身识别系统发挥功能,在识别异物、释放调理素(opsonin)、促进血细胞的吞噬和包裹反应以及促进颗粒血细胞和半颗粒血细胞释放颗粒、产生多种介导凝集因子及抗菌肽等免疫功能方面发挥着重要的作用^[7,23-25]。孙杰等^[12]的研究表明中国明对虾被 WSSV 感染后其酚氧化酶基因表达水平明显上调。本研究中红螯螯虾酚氧化酶原 CqproPO 在 WSSV 感染后 mRNA 的表达特征在血细胞、肝胰腺和鳃组织中具有不同的时空表达趋势,但具 WSSV 症状的红螯螯虾 CqproPO 的 mRNA 表达量均在病毒感染后先下调,6 h 或 12 h 时最低,之后迅速上升,2 个感染组分别在 12 h 和 24 h 达到最大值,且在 3 种组织中 2 个感染组的 CqproPO 表达量为对照组的 1.3 ~ 2.55 倍,显著高于对照组($P < 0.05$)。感染初期 CqproPO mRNA 表达量下降可能意味

着动物处在感染后的不适和恢复期,之后 CqproPO 的高水平转录可能用来合成并补充那些参与免疫应答而活化的酚氧化酶,感染 24 h 后 *cqproPO* 基因的转录水平下降,意味着这个阶段酚氧化酶的逐渐失活。这个过程也说明了当病毒进入红螯螯虾体内,触发了红螯螯虾免疫系统并产生免疫反应,促进了红螯螯虾酚氧化酶 PO 的生物合成,从而提高了机体杀死病原体的活力。但随着感染时间的延长,病毒迅速扩繁,机体的免疫防御机能受损,以致在病毒感染后期致使酚氧化酶失活^[26-27]。这一结果和作者研究的 WSSV 感染后红螯螯虾 PO 含量的变化基本一致(另文发表)。相似的研究结果还有 Piti 等^[28]用 WSSV 刺激斑节对虾后 proPO mRNA 表达量的变化,而与孙杰等^[12]通过 WSSV 刺激中国明对虾后 FCproPO mRNA 的表达量在 6 h 内持续升高略有不同,但和 6 h 之后 proPO 基因的转录水平呈下降趋势相似。本实验可明显看出注射免疫多糖后,红螯螯虾体内 *cqproPO* 基因的表达量在 3 种组织中均有上升趋势,且在 24 h 时最高,与用脂多糖注射锯缘青蟹后 proPO mRNA 的表达相一致^[10]。从免疫多糖对红螯螯虾免疫保护率也显示免疫后感染组由于在感染病毒前注射了免疫多糖,7 d 后死亡率明显低于对照组($P < 0.05$),免疫保护率达到 51.86%。相似的研究结果有曹剑香等^[29]对凡纳滨对虾和苏永腾等^[30]对罗氏沼虾的免疫保护率研究。这些研究表明免疫增强剂可使机体的抗病毒能力增强,对防御 WSSV 感染具有一定的免疫保护作用。

参考文献:

- [1] 慕峰,成永旭,吴旭干.世界淡水螯虾的分布与产业发展[J].上海水产大学学报,2007,16(1):64-72.
- [2] 周化民.斑节对虾白斑综合征杆状病毒(WSBV)的形态和感染的组织病理研究[J].徐州师范大学学报:自然科学版,1999,17(4):59-62.
- [3] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp[M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society,1996:304-307.
- [4] Chen L L, Lo C F, Chiu Y L, et al. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 40(2):

- 157 - 161.
- [5] Zhan W, Zhang L, Wang Y, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infection to crabs [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39 (suppl.): 153 - 158.
- [6] 沈锦玉,袁军法,潘晓艺,等. 红螯螯虾感染白斑综合征病毒 [J]. *水产学报*, 2007, 31 (4): 556 - 560.
- [7] Johansson M W, Lind M I, Holmblad T, *et al.* Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood [J]. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, 1995, 216 (3): 1079 - 1087.
- [8] Aspán A, Huang T S, Cerenius L, *et al.* cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 1995, 92 (4): 939 - 943.
- [9] 叶星,郑清梅,白俊杰,等. 短沟对虾和斑节对虾酚氧化酶原基因的克隆和序列分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34 (5): 533 - 540.
- [10] Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B, *et al.* Cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of mud crab *Scylla serrate* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31 (1): 12 - 22.
- [11] Li Y H, Zheng F L, Chen H Q, *et al.* Cloning and sequence analysis of prophenoloxidase from haemocytes of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8 (3): 369 - 379.
- [12] 孙杰,王宝杰. 中国对虾血蓝蛋白基因 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. *渔业科学进展*, 2010, 31 (1): 80 - 88.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 - 408.
- [14] Jackman M P, Hajnal A, Lerch K. Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase [J]. *Biochemistry Journal*, 1991, 274 (3): 707 - 713.
- [15] Lai C Y, Cheng W, Kuo C M. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2005, 18 (5): 417 - 430.
- [16] 谢维,栾云霞. 节肢动物血蓝蛋白家族的组成与演化 [J]. *生命科学*, 2011, 23 (1): 106 - 114.
- [17] 邱建丁,荣联清,梁汝萍,等. 基于疏水性小波分析的膜蛋白结构预测 [J]. *分析测试学报*, 2004, 23 (6): 1 - 4.
- [18] 刘庆慧,韩文君,王清印,等. WSSV-VAP1 基因克隆与序列分析 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (3): 352 - 356.
- [19] Morioka C, Tachiy, Suzuki S, *et al.* Significant enhancement of monooxygenase activity of oxygen carrier protein hemocyanin by urea [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128 (21): 6788 - 6789.
- [20] 严芳,章跃陵,罗活强. 凡纳滨对虾血蓝蛋白酚氧化酶活性的研究 [J]. *水产科学*, 2008, 27 (1): 5 - 8.
- [21] Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, *et al.* Activation of prophenoloxidase agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *P. monodon*, by immunostimulants [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1999, 9: 21-30.
- [22] van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, 286 (1): 7 - 22.
- [23] Delphine D, Marcello M, Celine C, *et al.* Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge [J]. *Cell Science*, 2000, 113: 461 - 469.
- [24] Soderhall K. Invertebrate immunity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23 (4 - 5): 263 - 266.
- [25] 孟凡伦,张玉臻,孔健,等. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价 [J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30 (1): 110 - 116.
- [26] 孔繁翔. 环境生物学 [M]. 北京:高等教育出版社, 2000: 68 - 73.
- [27] 方允中,李文杰. 自由基与酶 [M]. 北京:科学出版社, 1989: 47 - 178.
- [28] Piti A, Walaiporn C, Anchalee T. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33 (2): 247 - 256.
- [29] 曹剑香,简纪常,吴灶和. 溶藻弧菌疫苗对凡纳滨对虾免疫功能的影响 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2004, 24 (6): 11 - 17.
- [30] 苏永腾,刘波,周群兰,等. 大黄萘醌提取物对罗氏沼虾抗鳃弧菌感染的研究 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (3): 455 - 463.

cDNA cloning and expression analysis of prophenoloxidase in *Cherax quadricarinatus*

WANG Danli^{1,2}, ZUO Di², WANG Lanmei², LI Jiayao², ZHAO Yunlong^{2*}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, is a crustacean belonging to the order Decapoda, family Parastacidae. In recent years, the cultivation of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) is developing, and the disease of *C. quadricarinatus* was one of the major factors in its culture and even caused redclaw crayfish to die. The viral disease was found in polyculture of redclaw crayfish with *Penaeus vannamei*. To explore the pathogenic mechanism of *C. quadricarinatus* infected by WSSV (white spot syndrome virus), a prophenoloxidase gene (CqproPO) was cloned from haemocytes of *C. quadricarinatus* by Rapid Amplification Complementary DNA Ends (RACE) method, the proPO gene expression patterns in different tissues and the mRNA expression of proPO gene in hemocyte, hepatopancreas and gill tissues of *C. quadricarinatus* artificially infected by WSSV were studied. The results indicated that the full length cDNA of CqproPO consisted of 2 962 bp with a 1 998 bp Open Reading Frame (ORF), which encoded 665 amino acids, and the predicted molecular mass was 75.86 ku. Sequence analysis showed CqproPO contained two conserved copper-binding sites; The secondary and tertiary structure assay also showed that the CqproPO has α -helices and β -strands, which is delimiting a cavity where the hydrophobic ligands are bound just as other HCs. ORF contains two tyrosine kinase phosphorylation sites, 13 casein kinase II phosphorylation sites, 7 protein kinase C phosphorylation sites, one dependent on cAMP- and cGMP protein kinase phosphorylation sites and three N-glycosylation sites, and these sites were structural basis of the physiological functions completed. The deduced amino acids sequence of CqproPO shared 79% homology with *Procambarus clarkii* and 74%, 69%, 67%, 67% with *Pacifastacus leniusculus*, *Nephrops norvegicus*, *Homarus americanus*, *Homarus gammarus* respectively; Phylogenetic analysis revealed that CqproPO and prophenoloxidase from *P. clarkii*, *P. leniusculus*, *N. norvegicus*, *H. americanus*, *H. gammarus* and *Panulirus longipes* were in the same phylogenetic branch; The Realtime-PCR results showed that CqproPO was widely distributed, with the highest expression level in haemocytes, small amount of expression in intestine, antennal gland, gills, ovary and hepatopancreas, detectable expression level in stomach and muscle, while expression was almost undetectable in testis; The expression levels of prophenoloxidase (proPO) in haemocytes, hepatopancreas and gills from *C. quadricarinatus* were studied and compared by means of artificial WSSV infection. The results indicated that the expression level of CqproPO in the non-immunized infected group (group II) and immunized infected group (group III) reached the maximum at 12 h and 24 h, which was 1.3 – 2.55 times higher than that in the control group, and was noticeably higher than the controls ($P < 0.05$). But the expression level of prophenoloxidase gene had sharply declined with the time extending of the infection. The expression level of proPO gene from crayfishes injected by immune polysaccharides before an infected virus (group III) were higher than the directly affected groups (group II) in haemocytes, hepatopancreas and gills, showing an immunoprotective rate of 51.86% 7 days after exposure. These observations indicated that the immunopotentiator could improve the innate anti-viral ability of the crustaceans against WSSV.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; prophenoloxidase; WSSV; gene clone; expression analysis

Corresponding author: ZHAO Yunlong. E-mail: ylzha@bio.ecnu.edu.cn