

罗氏沼虾谷氨酰胺合成酶基因的克隆与表达

卢志杰^{1,2}, 叶成凯^{1,2}, Sarath Babu V², 张晓君³,
刘晓丹³, 赵丽娟², 潘淦^{1*}, 林鑫^{2*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东广州 510631;

2. 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;

3. 扬州大学动物科技学院, 江苏扬州 225000)

摘要: 谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是一种广泛分布在动植物体内的酶, 并参与细胞多种代谢调控。在甲壳动物中, GS在能量代谢和渗透压调节过程中起着重要作用。实验克隆了罗氏沼虾GS基因。GS基因cDNA全长1 965 bp, 开放读码框(ORF)为1 086 bp, 编码361个氨基酸(aa), 分子量大小为40.75 ku, 等电点为5.81。进化树分析发现, 罗氏沼虾GS基因与凡纳滨对虾、斑节对虾和中国明对虾GS聚为一支, 氨基酸相似性达到95%。氨基酸多序列比对分析结果显示, 罗氏沼虾GS属于无脊椎动物分支的GS II群, 有5个保守区域。实验对罗氏沼虾GS蛋白进行表达并制备了多克隆抗体。采用荧光定量PCR技术(qRT-PCR)和免疫印迹(Western blot)对罗氏沼虾蜕壳前后的不同组织GS表达进行检测。qRT-PCR结果显示, GS基因在所检测的8个组织中均有表达; 蜕壳前, 其相对表达量顺序为: 肝胰脏>肌肉>胃>肠>鳃>心脏>脑>血淋巴。蜕壳后和蜕壳前GS基因在组织中的差异表达比较结果显示, 除了在肝胰脏表达下调外, 其他7个组织都表达升高, 其相对表达量的差异顺序为: 脑>鳃>胃>肠>肌肉>心脏>血淋巴。Western blot结果显示, 蜕壳后GS蛋白在鳃和肌肉组织表达量上调, 与其mRNA表达一致。此外, 罗氏沼虾蜕壳后肝胰脏GS酶的活性和谷氨酰胺的含量下调, 而其在鳃、肌肉和血淋巴中上调, 结果与其基因表达一致。研究表明, GS基因在不同组织中表达的差异可能和罗氏沼虾的能量代谢、渗透压调节有关。

关键词: 罗氏沼虾; 谷氨酰胺合成酶; 组织表达; 蜕壳

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)自然分布于东南亚、印度、斯里兰卡等的淡水和咸淡水水域, 由于其生长快, 适应性强等优点, 不少国家和地区争相引进, 并成为当地的主要经济虾类^[1]。我国最早于1976年从日本引进罗氏沼虾, 并在1977年成功实现人工繁殖育苗, 此后在江苏、广东和广西等推广养殖, 使得我国罗氏沼虾养殖产业迅速发展^[1]。

蜕壳是节肢动物的重要生理现象, 罗氏沼

虾的生长、发育、繁殖都与蜕壳有关^[2]。蜕壳前1~3 d摄食量减少, 蜕皮过程在数分钟内完成。蜕壳后约10 h内虾体柔软, 不能正常游泳、爬行和进食, 因此很容易受到同类或其他敌害的伤害。由于在蜕壳过程中罗氏沼虾不进食, 因此, 蜕壳过程中消耗的能量来自于自身的能量源(糖类、蛋白质和脂肪)。在蛋白质方面, 游离氨基酸是主要的能量代谢物。与此同时, 随着大量氨基酸的代谢, 罗氏沼虾体内氨含量会迅

收稿日期: 2018-05-06 修回日期: 2018-06-08

资助项目: 广东省高等教育“创新强校工程”专项(KA170500G); 江苏省渔业科技创新项目(D2017-3)

通信作者: 潘淦, E-mail: pg2829@sina.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

速升高,对机体本身产生毒性作用^[3]。此时,谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)可以将有毒性的氨(NH₃)催化成谷氨酰胺(glutamine, Gln),谷氨酰胺是中性无毒物质。水生甲壳动物的渗透压调节机理,主要集中在渗透压调节器官、离子转运、血淋巴渗透压^[4-6]。罗氏沼虾在淡水和低盐环境中时,血淋巴总自由氨基酸含量仅有0.85~1.0 mmol/L,而在高盐下时总自由氨基酸含量急剧上升到2.1 mmol/L^[7-8]。蜕壳过程中,会涉及到体内渗透压生理的变化。其中,谷氨酰胺是一种非必需氨基酸,是血液中最丰富的一种游离自由氨基酸,参与血淋巴渗透压调控来维持机体正常的生命活动^[9-11]。

谷氨酰胺合成酶普遍存在于动植物体内,催化氨和谷氨酸转化为谷氨酰胺,是“谷氨酸-谷氨酰胺”循环中的一种关键酶^[12]。GS参与多种生化途径,如细胞生长、能量代谢、神经递质谷氨酸循环、蛋白质分解代谢以及氨基酸、葡萄糖六磷酸形成过程中谷氨酰胺底物的合成^[13-14]等。GS主要有3种亚型,GS I型主要存在于原核生物中,GS II型主要存在于真核生物和少数细菌中,GS III型存在于一些原核生物中^[15]。GS在脊椎动物中的研究相对较多,如中国仓鼠(*Chinese griseus*)、人(*Homo sapiens*)和鸡(*Gallus domesticus*)体内中GS基因克隆、表达与功能的研究^[16-18]。但是在无脊椎动物中的研究相对较少,目前已在昆虫,如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)幼虫和成虫、沙蝇(*Lutzomyia longipalpis*)^[19]、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)^[20]神经系统、肌肉、脂肪体、中肠和马氏管等组织中发现GS基因表达。在甲壳动物和软体动物已经报道过GS基因的物种有克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[21]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[22]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[15]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[23]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[24]。

作为水生甲壳动物调节能量、渗透压和氨氮解毒代谢的谷氨酰胺合成酶基因在罗氏沼虾中目前还没有报道,而且罗氏沼虾蜕壳过程中GS参与能量代谢和生理渗透压生理调节的机理也处于空白。本实验采用qRT-PCR和Western blot对罗氏沼虾蜕壳前后的不同组织GS基因表达进行检测,并检测了GS酶活性和Gln的含量,研究结果将为罗氏沼虾蜕壳过程的能量代谢和渗透压调控提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用罗氏沼虾来自广州市金洋水产养殖有限公司养殖基地,选取体长10~13 cm成虾暂养在水族缸中,并观察其蜕壳周期。用显微镜观察第二腹肢,根据腹肢中刚毛腔的半透明基质含量来确定具体的蜕壳时期,本实验选取了蜕壳前期和蜕壳后期的成虾进行组织采样,取其肝脏脏、鳃、肌肉、胃、肠、心脏、脑和血淋巴,分装于RNAiso Plus试剂(TaKaRa公司,大连)和PBS缓冲液中,放进液氮,然后冻存于-80 °C备用。从罗氏沼虾活体腹节基部的血窦中抽取血淋巴,加入1/10体积的抗凝剂(27 mmol/L柠檬酸三钠, 385 mmol/L氯化钠, 115 mmol/L葡萄糖, 10 mmol/L HEPES, pH 7.5);血淋巴在4 °C下3 200 r/min离心10 min,分别收集血淋巴和血浆,血淋巴用于总RNA提取,血浆用于谷氨酰胺合成酶活性和谷氨酰胺含量的测定。

1.2 谷氨酰胺合成酶基因(GS)的克隆和生物信息学分析

总RNA的提取按照RNAiso Plus试剂说明书进行,各组织的总RNA用Nano-200分光光度计(ALLSHENG杭州奥盛仪器有限公司)测定其纯度和浓度;然后使用HIScript[®] Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme)合成cDNA,在-20 °C保存备用。根据Clone Manager软件预测罗氏沼虾转录组中GS基因全长序列开放读码框(ORF)设计引物(表1)。PCR反应体系20 μL:模板cDNA 1 μL,上下游引物各1 μL(10 μmol/L), 2×Taq Mix 10 μL, ddH₂O 7 μL。反应程序为95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C终延伸10 min, 4 °C保存30 min。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR反应产物,根据Marker的大小切下含有目的基因条带的凝胶,然后使用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根生化科技北京有限公司)回收目的条带,并连接到pMD[™]18-T Vector(TaKaRa公司,大连),转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α中,涂布于含氨苄(50 μg/mL)LB培养基平板,静置2 min后倒扣放置37 °C恒温培养箱培养12~16 h。挑取单菌落于5 mL含氨苄LB培养基扩大培养,然后进行菌液PCR检测,使用质

表1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence from 5'-3'	用途 usage
GS-F1	CTTCGCATCCCAGGAGGAATT	RT-PCR
GS-R1	GGACAGCTGGAACATCTCCTT	
GS-F2	GGATCC CTTCGCATCCCAGGAGGAATT	构建重组质粒
GS-R2	AAGCTT GGACAGCTGGAACATCTCCTT	
GS-F3	AGCCTGCCTCTACTGGTA	qRT-PCR
GS-R3	TGACGCCGAAATCTTCAGCT	
β -actin-F	GTCGTGACTTGACCGATTACCT	qRT-PCR
β -actin-R	ATCTCTGCTCGAAGTCCAATG	

粒小提试剂盒(天根生化科技北京有限公司)对阳性菌液进质粒提取后, 送公司测序; 将测序结果序列与转录组中GS基因序列进行比对。

使用Emboss(<http://emboss.Bioinformatics.NI/>)软件预测氨基酸序列; ProtParam蛋白质理化性质在线分析对预测的开放读码框(ORF)氨基酸序列进行理化特性预测(<http://web.expasy.org/protParam/>); SMART软件(<http://samrt.emblheidelberg.de>)预测蛋白质的结构域; TMHMM法分析蛋白质的跨膜区(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 信号肽预测SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); GS的ORF氨基酸序列的同源性分析和用于系统进化树构建的不同物种间氨基酸序列用Blast进行预测(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>); 多重序列比对采用Clustal X程序, 使用Clustal X程序和MEGA 6.0软件, 采用Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树; 三级结构预测用WISS-MOEDL软件完成。

1.3 GS多克隆抗体制备及其特异性检测

GS重组质粒的构建、融合蛋白的表达、纯化和检测 在普通PCR引物基础上添加合适的酶切位点和保护碱基重新设计表达蛋白引物, 扩增GS基因的ORF区域, PCR反应条件相同。将琼脂糖凝胶回收的PCR产物进行双酶切后连接到pET-32A质粒(TaKaRa公司), 构建含有His-tag标签的融合蛋白表达重组质粒pET-32A-GS。将阴性pET-32A质粒和阳性重组质粒分别转

化到原核表达载体*E. coli* BL21(DE3)进行原核表达蛋白, 使用0.6 mmol/L IPTG在37 °C下180 r/min振荡扩大培养5~6 h, 分别吸出2 mL菌液, 4 °C下12 000 r/min离心2 min, 用100 μ L PBS缓冲液重悬沉淀, 加入25 μ L 5 \times loading buffer沸水煮沸12 min, 12 000 r/min离心1 min。取上清液等量上样于浓度为10% SDS-PAGE胶, 80 V电泳2.5 h后染色、脱色和照胶, 检测融合蛋白的表达。根据福因德生物《蛋白表达与抗体制备》技术手册和His标签特异性层析柱(TaKaRa公司)进行对包涵体纯化与回收, 并分装成1 mL冻存于-80 °C备用。将纯化的pET-32A载体和GS融合蛋白按照同样的方法进行SDS-PAGE胶电泳, 2.5 h后进行半干式转膜, 随后在室温条件下含有5%脱脂奶粉的Tris Buffered Saline和1% Tween[®]20去污剂(TBST)中封闭1~2 h, 封闭后在TBST洗涤5 min, 小鼠(*Mus musculus*)抗His-tag抗体(1:1 000)稀释于5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中, 在4 °C过夜孵育; TBST缓冲液洗涤3次, 每次5 min; 再用HRP标记山羊抗小鼠二抗Ig G(1:10 000)(北京博奥森生物技术有限公司)稀释于5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中孵育1 h后, TBST缓冲液洗涤3次, 每次5 min; ECL显色1 min, 使用ChemiScope 6000照相。

GS多克隆抗体制备及其特异性检测 用纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔(广东省医学实验动物中心), 获得GS多克隆抗体。采集罗氏沼虾鳃新鲜组织0.1 g剪成细小的碎片, 加入1 mL RIPA裂解液(包括1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L氟化钠, 1 mmol/L原硫酸钠)(上海碧云天生物技术有限公司), 用玻璃研磨棒于冰上研磨, 直至充分裂解, 4 °C下12 000 r/min离心3 min, 取上清液。用Bradford蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定其浓度, 上样量为20 μ g。后续SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、抗体孵育、显色等实验步骤按上述“GS重组质粒的构建、融合蛋白的表达、纯化和检测”方法进行, 其中孵育膜的一抗是GS多克隆抗体, 稀释比例为1:1 000。

1.4 罗氏沼虾GS基因与蛋白的组织表达分析

罗氏沼虾GS基因mRNA的组织表达分析 根据罗氏沼虾GS基因的全长序列设计荧光定量PCR(qRT-PCR)上、下引物, 选择 β -actin作为内参基因(表1)。取6尾体长10~13 cm蜕壳前、后成虾的不同组织: 肝胰脏、鳃、肌肉、胃、肠、

心脏、脑和血淋巴的同种组织样品混合均匀的cDNA为模板进行qRT-PCR扩增。反应体系和反应程序参照AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix试剂说明书(Vazyme), 反应于Roche LightCycler 480(Roche, 美国)仪器进行; 其中每个样品的目的基因和内参基因分别做3次重复。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算, 用Graphpad prism 7软件进行作图, 数据表示方式为平均值 \pm 标准差, 并运用软件自带的单因素方差分析进行统计分析, $P>0.05$ (ns)表示无显著差异, $P<0.05$ (*)表示差异显著, $P<0.01$ (**)表示差异极显著。

罗氏沼虾GS蛋白的组织表达分析 取6尾体长10~13 cm蜕壳前、后成虾的鳃和肌肉组织, 按照“GS多克隆抗体制备及其特异性检测”方法提取组织总蛋白和检测浓度方法提取鳃和肌肉组织的总蛋白和浓度测定。检测罗氏沼虾蜕壳前、后GS蛋白在鳃和肌肉组织表达, 参照上述“GS重组质粒的构建、融合蛋白的表达、纯化和检测”方法进行, 以 β -actin作为内参蛋白, 并利用软件Image-Pro plus 6.0分析GS蛋白和 β -actin蛋白条带的光密度(OD)来计算灰度值。

1.5 GS酶活性和Gln含量测定

罗氏沼虾蜕壳前、后的肝胰脏、鳃、肌肉和血淋巴组织GS酶活性采用谷氨酰胺合成酶(GS)活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)进行测定。谷氨酰胺含量是用虾谷氨酰胺(Gln)ELISA检测试剂盒进行测定(上海卡迈舒生物科技有限公司)。组织匀浆按照组织质量(g)与提取液体积(mL)为1:5~1:10的比例(建议称取约0.1 g组织, 加入1 mL提取液), 进行冰浴匀浆。4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心10 min, 取上清液, 置冰上待测。血淋巴样品直接检测。

2 结果

2.1 罗氏沼虾GS基因 cDNA的克隆和生物信息学分析

罗氏沼虾GS基因cDNA全长1 965 bp, ORF为1 086 bp, 编码361个氨基酸(aa); 5'非编码区(UTR)为76 bp, 3'非编码区(UTR)为803 bp, 含有13个碱基的poly(A)结构。ProtParam在线软件预测ORF编码的氨基酸分子量为40.75 ku, 等电点为5.81, 是亲水酸性蛋白, 无跨膜结构和信号肽。GS

蛋白在C端第107到356 aa之间含有250个aa的谷氨酰胺催化结构域(Gln-synt_C)(图1)。

罗氏沼虾GS氨基酸序列与其他生物的GS具有较高的同源性, 不同甲壳动物物种之间的GS序列较为保守, 其中罗氏沼虾GS与斑节对虾和中国明对虾的同源性最高达到91%, 其次是凡纳滨对虾88%、克氏原螯虾85%, 与泥蚶(*Tegillarca granosa*)一致性也有73%, 最后与黑腹果蝇、长牡蛎相似度都是72%(图2); 其中有5个保守位点(表2)。

利用MEGA 6.0软件, 采用NJ法构建罗氏沼虾GS基因和其他物种的GS基因的系统进化树(图3)。从系统进化树可知, 脊椎动物和无脊椎动物的GS基因相距远, 明显被区分开来。其中罗氏沼虾GS基因与凡纳滨对虾、斑节对虾和中国明对虾GS基因聚为一支。SWISS-MODEL结果显示, 罗氏沼虾GS蛋白的三级结构由 α 螺旋以及连接的无规则卷曲构成, 蛋白结构呈现蝴蝶状, 与人类的GS蛋白三级结构相似性达到69.01%(图4), 表明GS蛋白在进化和功能上具有很高的保守性。

2.2 GS多克隆抗体制备及特异性检测

SDS-PAGE蛋白胶分析可知, 重组的GS蛋白主要表达在包涵体中(图5), 使用His-tag一抗可以检测到重组GS蛋白在58 ku左右有一条明显的条带, 而且大小和预测的一致(His-tag大小为18 ku左右, GS蛋白大小为40.75 ku, 合计58.75 ku), 说明重组蛋白含有His-tag标签(图5-b)。用GS兔多克隆抗体进行免疫印迹检测罗氏沼虾鳃中GS蛋白, 结果显示, 检测到1条分子量约为40 ku清晰的特异蛋白条带, 大小和预测的GS一致(图5-b)。

2.3 罗氏沼虾GS在mRNA和蛋白水平上的组织表达分析

用显微镜观察罗氏沼虾第二腹肢, 根据腹肢中刚毛腔的半透明基质含量确定蜕壳前、后2个时期(图6); 蜕壳前期特征是腹肢中刚毛腔的半透明基质只占五分之一(图6-a, b), 蜕壳后期特征是半透明基质已经完全充满整个刚毛腔(图6-c, d)。qRT-PCR结果发现, GS在各组织中均有表达, 以血淋巴表达量作参照, 设定为1, 其他组织的表达量顺序: 肝胰脏>肌肉>胃>肠>鳃>心脏>

```

1  ACGTGTGCTCTCCGATCTGGAAGCTTTTGTACTTCGCATCCCAGGAGGAATTTATGCTCAAAGGCTATCAAGatggcatatggaactaataaaaca 100
1  M A Y G I N K T 8
101 gtcttgacagatacctgagacttgaatccctgatcagaaatgtcaggctatgtacgtctgggtagatggtacaggagagaacctgaggtctaagaaa 200
9  V L D R Y L R L E I P D Q K C Q A M Y V W V D G I G E N L R S K I R 42
201 gaactctcaacttactcccaagagccctagtgaaacttcccatctggaactttgacggctcttcaactggacaagctgaaggcagtaacagtgacgtgta 300
43  T L N F T P K S P S E L P I W N F D G S S T G Q A E G S N S D V Y 75
301 tctgcaccagttgctatctacagagatcctttcagacttggtaacaacaactggttctctgtgaaacctacaataacaacaagaacccactgacacc 400
76  L H P V A I Y R D P F R L G N N K L V L C E T Y K Y N K K P T D I 108
401 aacaacagatggagctgtctggaagtcatgaaggaggcggaagaacagcatccttggttggcatggaacaagaatatacccttttgatattgacaagc 500
109  N K R W S C L E V M K E A E E Q H P W F G M E Q E Y T L L D I D K H 142
501 accctcttgctggccaagaacggttaccagggtcccaggggccttactactcgggttagtgctagcaagtatatggccgtgacattgttgaagc 600
143  P L G W P K N G Y P G P Q G P Y Y C G V G A S K V Y G R D I V E A 175
601 tcactacagagcctcctctacactggttattaacatttctggagaaaatgctgaggtcatgctcctgccagtggaattccaggtcggccttgcgaagc 700
176  H Y R A C L Y T G I N I S G E N A E V M P A Q W E F Q V G P C E G 208
701 atcacgatgggagatgacctctggtggccagatattctcctccatcgctagctgaagatttccggctcattgtgctactggaccctaagcctattctctg 800
209  I T M G D D L W M A R Y L L H R V A E D F G V I V S L D P K P I P G 242
801 gagactggaacggtgcccgtatgcacaccaacttctccagaaagctatgcgtgaccagacggcatcgtcgaatcgaatctgctattgacaagatgct 900
243  D W N G A G M H I N F S T K A M R D P D G I V E I E S A I D K M S 275
901 caaggtccacgacaagcacatcaggccctatgaccccatgaggcaaggacaacgagggcgttactgggctccatgaaacctcctcaattcacgac 1 000
276  K V H D K H I R A Y D P H G G K D N E R R L T G L H E I S S I H D 308
1 001 ttctcagcaggtgtagccaacagaggagcgtctataagaatccctcgtggcgttggcgaagaagacagcctacctagaggaccgtagaccattctcca 1 100
309  F S A G V A N R G A S I R I P R G V A E E R I G Y L E D R R P S S N 342
1 101 acgccgaccctacgttggctgtgagagactggtacgcactatctcctgaacgagcagtagAATCGCTGCTGCATATCATCGCATATCATATCAAGGAG 1 200
343  A D P Y V V S E R L V R T I C L N E Q * 361
1 201 ATGTTCCAGCTGCCAGAGTACAATATTGTGTGTTAGCTAGATATACCTGTTTCATATGTTATGTTCTCACCGGCTATGCTTGTCTGGCTGTAAC 1 300
1 301 GTGTCCCTGATCAGGACGAATCGATAAAAAACAGGAACTGCTCTGGACACACTTAAAAAAAATAGGACTACCTTCGTGGTGCCTGATGAAGAAITAGA 1 400
1 401 AAATCCCTGACGCCCTTTCATTAACAGTTTCGTTTTACGTTGGCATATAGTGTATGCACCTGTTATCTGATCGTCACAGTTGCTTTACAGTGCAAAATTATAT 1 500
1 501 ATATATATATATATCCAAAGCAAGCTCTCTTAGGTTTTGTTTTACGCAATGCAGTACATATAAAACAATGTTATTTCTGATTACGCAAAATGTAAAAACA 1 600
1 601 GTTTTCAAAGTCAAATTCAGGATTATCTATCTTCAAGAAACACATGTTATCTTAATCTCACCCAAATGTAACATATGATTTTCATCACCAACTGCTGATT 1 700
1 701 CTCTAGTATCGGGGTTATTTATACCATTCTATGTAATTGTTTTGTTCCGGTGAAAGACTCAAGAGACATGAAACCGTTTACTTTACAACATATCTTAAT 1 800
1 801 TAAAAACTTGGCTTTTCATCGCGACATTCTTTTACACACACACACTCCTCACCTTCTTAGCACAGTGTITGTGGATCTTTTTTTTATAAAAAAAT 1 900
1 901 TTCTCTGATATAAATATTTTATGATAAATATTTTCTATAATGTAATGAAAAAAAAAAAA 1965

```

图 1 罗氏沼虾GS基因的cDNA全长序列及氨基酸序列

带箭头的下画粗线所示为谷氨酰胺结合结构域; 起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)对应的氨基酸用方框标出, poly(A)尾巴用下画黑粗线标出

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequences of the cDNA of GS in *M. rosenbergii*

The glutamine binding domain was indicated with bold underline arrows; the AA corresponding to start codon (ATG) and termination codon (TAA) was shown in the box, and the poly (A) was underlined

脑。在肝胰脏和肌肉中有较高的表达量, 分别为血淋巴中表达量的150.22和75.60倍($P<0.01$), 差异极显著; 在脑组织表达量最低, 仅为血淋巴中表达量的6.27倍($P>0.05$), 无显著差异(图7-a)。罗氏沼虾蜕壳后, 以肝胰脏的表达量作为参照, 其中在血淋巴、心脏、肌肉、肠、胃、鳃和脑7个组织GS相对表达量上升, 脑、鳃和肌肉组织

上调倍数分别是8.88倍($P<0.01$, 差异极显著)、3.18倍($P<0.05$, 差异显著)和1.82倍($P>0.05$, 差异不显著); 但在肝胰脏组织中GS相对表达量下降(图7-b)。为了进一步验证mRNA表达得结果, 我们选择了鳃和肌肉作为检测对象, 对其GS蛋白进行Western blot检测, 结果表明其表达量较蜕壳前升高(图8)。

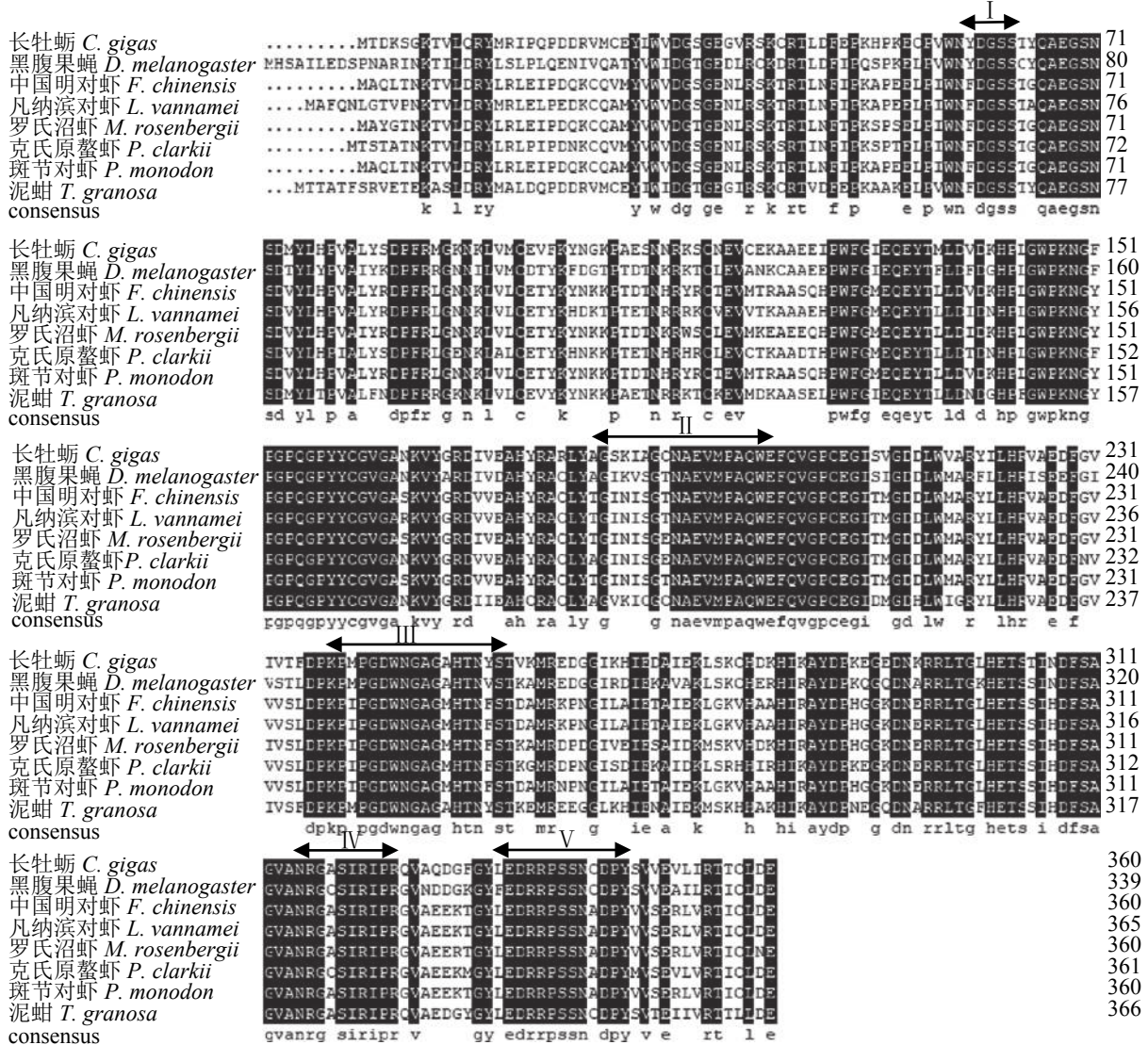


图2 罗氏沼虾与其他物种GS的氨基酸序列比对

黑色阴影表示一致序列，·表示缺失氨基酸，罗马数字 I, II, III, IV, V 表示不同物种之间的保守片段；物种的GenBank ID如下：罗氏沼虾 GS (*M. rosenbergii*)，长牡蛎 (*C. gigas*): CAD92144.1，黑腹果蝇 (*D. melanogaster*): NP.727525.1，中国明对虾 (*F. chinensis*): ACB59229.1，凡纳滨对虾 (*L. vannamei*): AEO80035.1，克氏原螯虾 (*P. clarkii*): AFD5298.1，斑节对虾 (*P. monodon*): AMD09631.1，泥蚶 (*T. granosa*): ADM94277.1

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of GS from *M. rosenbergii* and other animal species

The identical amino acids among different animals are shown with black shadow, and the dot (·) represents missing amino acid; five conserved regions are marked with I, II, III, IV, V respectively; the GenBank IDs of reference sequences are shown as follows: *C. gigas* (CAD92144.1), *D. melanogaster* (NP.727525.1), *F. chinensis* (ACB59229.1), *L. vannamei* (AEO80035.1), *P. clarkii* (AFD5298.1), *P. monodon* (AMD09631.1), *T. granosa* (ADM94277.1)

2.4 罗氏沼虾蜕壳前、后GS酶活性变化

罗氏沼虾蜕壳前GS酶活性最高的是肝胰脏组织，依次是鳃和肌肉组织，活性最低的是血淋巴组织(图9-a)；蜕壳后肝胰脏组织中的GS酶活性下降，下调的倍数是0.72倍，鳃、肌肉和血淋巴组织中的GS酶活性升高，上调的倍数分别

是2.27倍、2.05倍和2.16倍(图9-b)。

2.5 罗氏沼虾蜕壳前、后Gln含量的变化

蜕壳前Gln含量最高的是肝胰脏组织，依次是肌肉、血淋巴和鳃组织(图9-c)。蜕壳后肝胰脏组织中的Gln含量下降，下降的倍数是0.86倍，鳃、肌肉和血淋巴组织的Gln含量却升高，升高

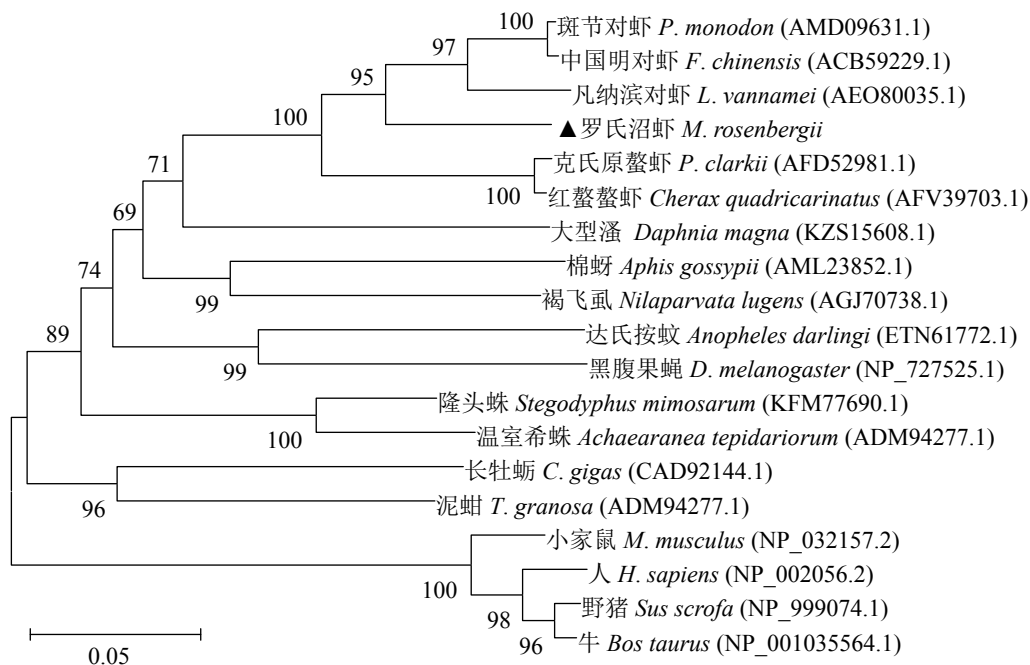


图 3 罗氏沼虾与其他物种GS基因的系统进化树

节点处的数字为1 000次引导值中该节点的自举置信水平; 黑色三角形标记为罗氏沼虾GS基因

Fig. 3 Phylogenetic tree of GS from *M. rosenbergii* and other species

Numbers at each branch indicates the percentage bootstrap values on 1, 000 replicates; GS of *M. rosenbergii* was marked with black triangle

表 2 GS II超家族与罗氏沼虾GS中的5个最保守的区域

Tab. 2 The five conserved regions of GS II superfamily and *M. rosenbergii* GS

保守区 conserved regions	GS II 超家族 GS II superfamily	罗氏沼虾GS GS of <i>M. rosenbergii</i>
I: the latch	F/Y-D-G-S-S	F-D-G-S-S
II	G-X(8)-E/K-V-X(3)-Q-W-E	G-(INISGTNA)-E-V-(MPA)-Q-W-E
III: ATP-binding site	K-P-X(4,5)-N-G-A-G-X-H-T-H-T-N-X-S	K-P-(IPGDW)-N-G-A-G-M-H-T-N-F-S
IV: Glutamate binding site	N/S-R-X(3)-I-R-I-P-R	N-R-(GAS)-I-R-I-P-R
V	F/L-E-D-R-X-P-S-X-N-X-D-P-Y	L-E-D-R-R-P-S-S-N-A-D-P-Y

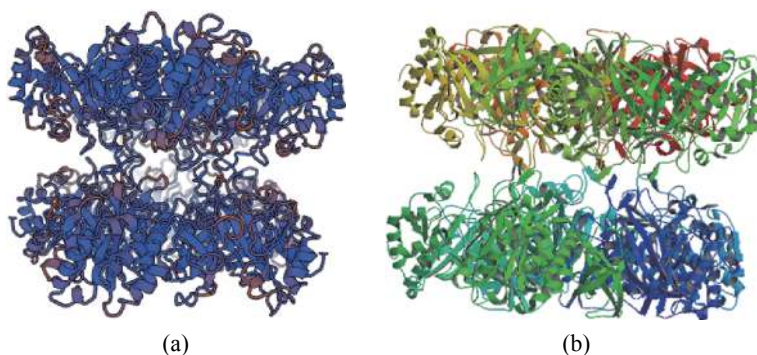


图 4 罗氏沼虾(a)和人(b)的GS蛋白三级结构比较

Fig. 4 Comparison of the tertiary structures of GS proteins in *M. rosenbergii* (a) and *Homo sapiens* (b)

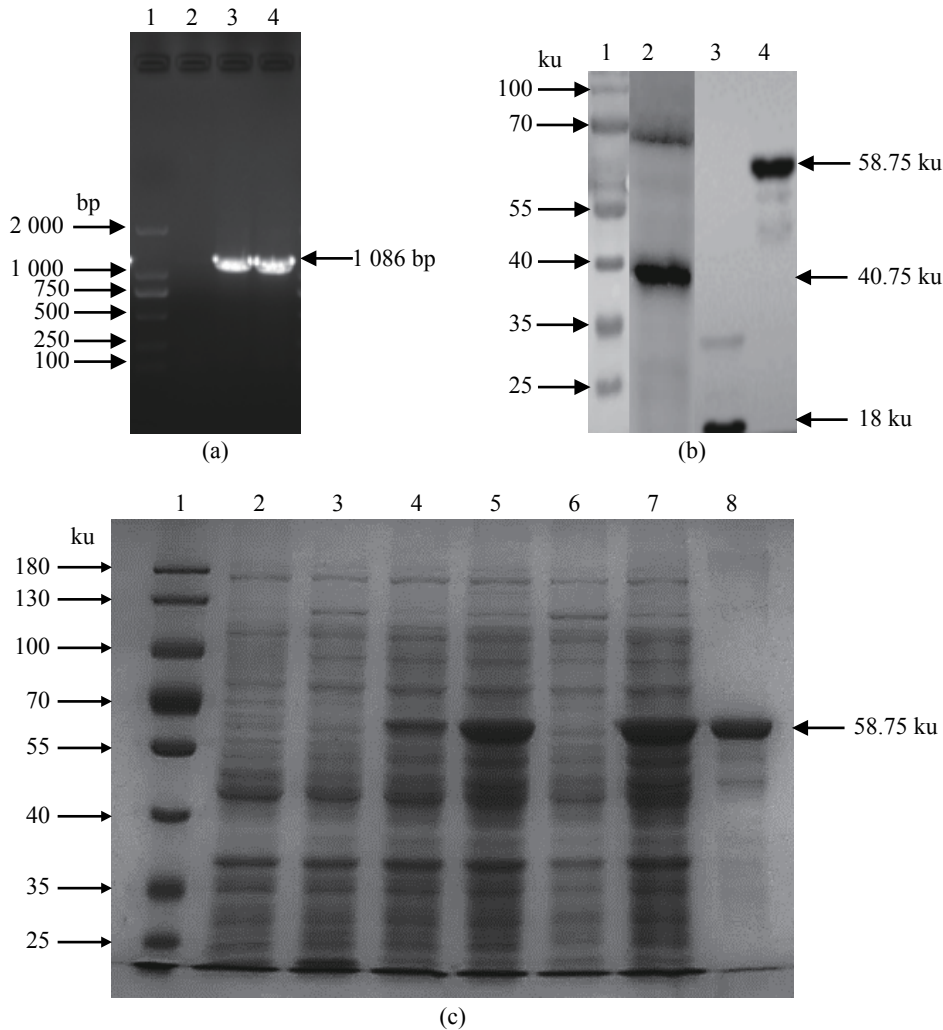


图5 罗氏沼虾GS基因克隆、表达与多克隆抗体制备

(a) GS基因的克隆: 1. DNA Marker, 2. ddH₂O阴性对照, 3. 罗氏沼虾GS DNA PCR片段, 4. 阳性重组质粒PCR鉴定; (b) 罗氏沼虾GS多克隆抗体特异性鉴定: 1. 蛋白Marker, 2. 鳃组织的总蛋白, 条带分子量为40.75 ku, 和GS大小一致, 3. 表达的pET-32A空载的蛋白样品, 4. 表达的pET-32A-GS的蛋白样品; (c) SDS-PAGE鉴定纯化的GS重组蛋白: 1. 蛋白Marker, 2. 未加IPTG诱导的pET-32A空载, 3. IPTG诱导的pET-32A空载, 4. 未加IPTG诱导的重组蛋白, 5. IPTG诱导的重组蛋白, 6. 重组蛋白上清, 7. 沉淀的重组蛋白, 8. 重组蛋白的纯化

Fig. 5 Molecular cloning and expression of GS and preparation of polyclonal antibody

(a) GS gene cloning: 1. DNA Marker, 2. negative control of ddH₂O, 3. PCR fragment of GS, 4. verification of positive recombinant plasmid by PCR; (b) polyclonal antibody of GS: 1. protein marker, 2. total protein of gill, 3. *E. coli* BL21 with pET-32A vector, 4. *E. coli* with pET-32A-GS; (c) purified recombinant GS protein by SDS-PAGE: 1. protein marker, 2. *E. coli* BL21 with pET-32A vector without IPTG, 3. *E. coli* BL21 with pET-32A vector with IPTG, 4. *E. coli* with pET-32A-GS protein without IPTG, 5. *E. coli* with pET-32A-GS with IPTG, 6. Supernatant of *E. coli* with pET-32A-GS, 7. pellet of *E. coli* with pET-32A-GS, 8. purified recombinant GS protein

的倍数分别是1.46倍、1.09倍和1.27倍(图9-d)。这个结果和GS酶的活性一致。

3 讨论

谷氨酰胺合成酶(GS)催化谷氨酸和NH₄⁺合成谷氨酰胺^[25], 而谷氨酰胺在氨基酸代谢与能量代谢、细胞增殖、蛋白质合成和降解、细胞的凋亡及渗透压调节都起着重要作用, 参与氨基

酸分解过程中毒性氨的运输^[26-28], 还作为血淋巴渗透压效应物自由氨基酸来调节渗透压^[4, 29]。本实验首次在罗氏沼虾中克隆了谷氨酰胺合成酶的cDNA序列, 并从基因水平和蛋白水平上分别研究了其在罗氏沼虾蜕壳前、后二个时期不同组织的表达变化。系统进化树分析发现罗氏沼虾GS基因与甲壳动物的凡纳滨对虾、中国明对虾和斑节对虾聚为一支, 而且氨基酸多序列比对发现

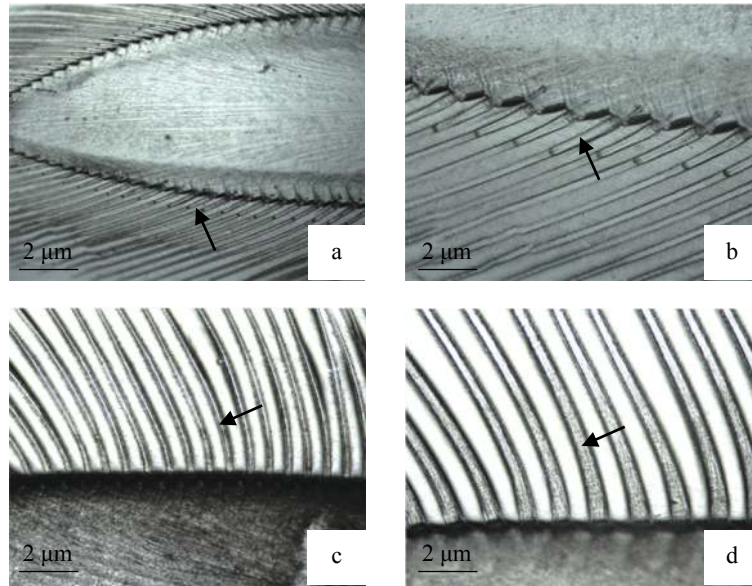


图6 罗氏沼虾蜕壳前、后时期腹肢观察

(a)(b). 蜕壳前期, 第二腹肢; (c)(d). 蜕壳后期, 第二腹肢; 箭头代表刚毛腔的半透明基质

Fig. 6 Observation on ventral branches of *M. rosenbergii* before and after molting

(a)(b). before molting, the second ventral branches; (c)(d). after molting, the second ventral branches; the translucent substrate in bristly cavity was indicated with arrows

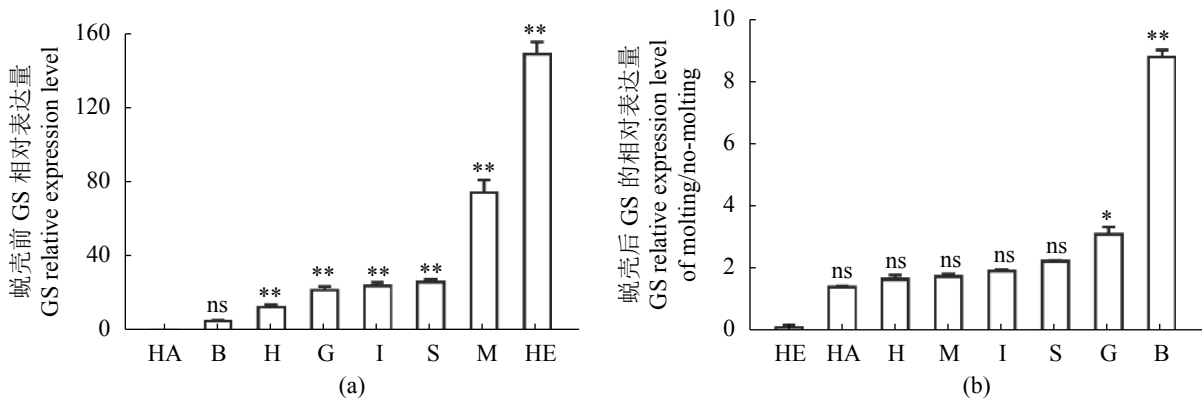


图7 GS基因在罗氏沼虾蜕壳前、后二个时期不同组织中的表达

(a) 蜕壳前, (b) 蜕壳后; HA. 血淋巴, B. 脑, H. 心, G. 鳃, I. 肠, S. 胃, M. 肌肉, HE. 肝胰腺; 下同

Fig. 7 The expression profiles of *Mr-GS* in different tissues of giant freshwater prawn

(a) before molting, (b) molting; HA. haemolymph, B. brain, H. heart, G. gills, I. intestines, S. stomach, M. muscle, HE. hepatopancreas; the same below

在甲壳动物中有5个保守位点, 说明在不同物种间GS基因保守性较强。

本实验首先研究在蜕皮前罗氏沼虾GS基因在不同组织中的自然分布。结果表明, 其在肝胰腺、鳃、肌肉、胃、肠、心脏、脑和血淋巴8个组织中都有表达, 这个结果与凡纳滨对虾和斑节对虾GS基因表达相类似^[23-24]。在蜕壳前, GS基因在肝胰腺表达量最高, 这可能与肝胰腺组织利用GS酶催化合成谷氨酰胺, 并用于蛋白

质的合成有关, 这与日本对虾(*Penaeus japonicus*)结果一致^[30-31]。GS基因在肌肉组织表达量也较高, 可能和肌肉中的游离的谷氨酰胺用于生理渗透压调节有关。我们更加关注罗氏沼虾蜕壳后, 上述组织中GS基因和蜕壳前的表达差异。结果表明, 除了肝胰腺外, GS在其他7个组织相对表达量上升, 其差异表达大小顺序: 脑>鳃>胃>肠>肌肉>心脏>血淋巴。罗氏沼虾在蜕壳期间, 经历了激烈的生理变化, 主要是能量和渗

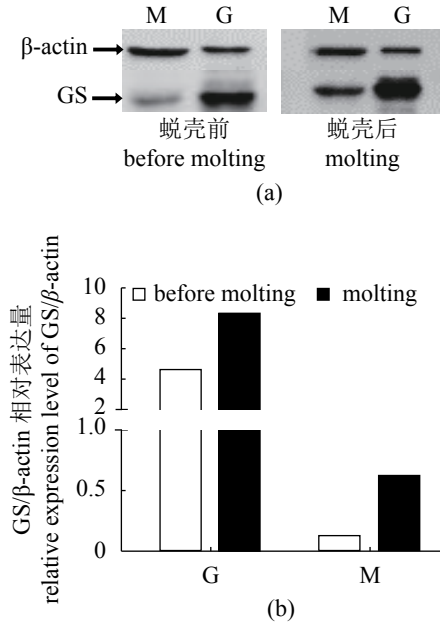


图8 罗氏沼虾蜕壳前和蜕壳后GS蛋白在不同组织中的表达

(a) Western blot检测GS蛋白在鳃(G)和肌肉(M)组织中的表达, (b) GS蛋白相对β-actin蛋白条带的灰度值

Fig. 8 The protein expression profiles of GS in different tissues of *M. rosenbergii* prawn before and after molting

(a) the expression of GS protein in the gill (G) and muscle (M) from *M. rosenbergii* by Western blot, (b) histogram analysis of GS/β-actin bands

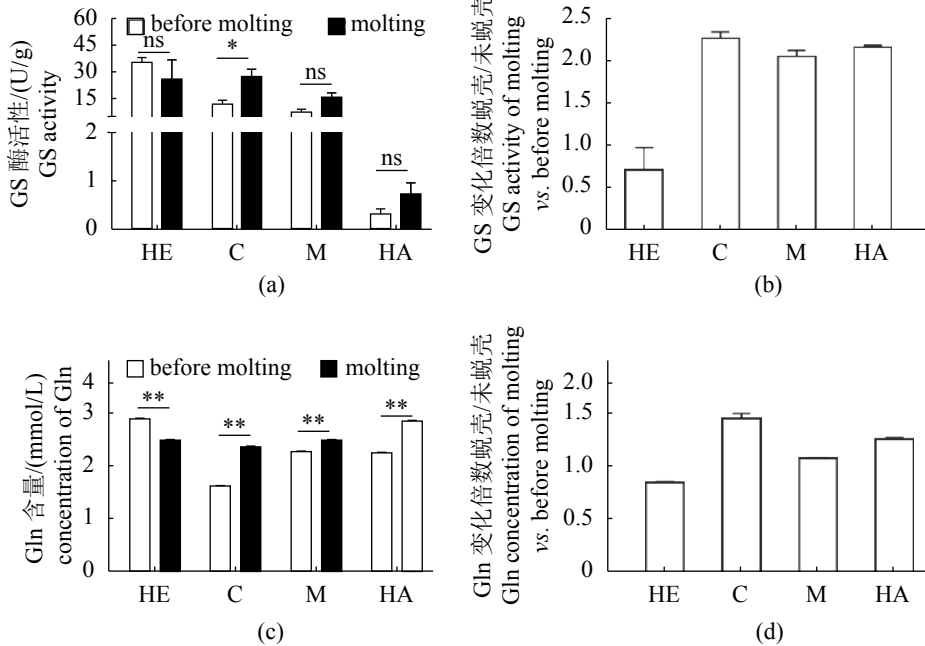


图9 罗氏沼虾蜕壳前、后时期GS酶活性和Gln含量的变化

Fig. 9 The activity of GS protein and the Gln concentration from *M. rosenbergii* before and after molting

透压的变化。蜕壳后的短时间内, 罗氏沼虾不能进食, 消耗的能量来自于自身蛋白质的分解和氨基酸的代谢, GS基因在这些组织中的大量表达, 可以合成更多的谷氨酰胺提供能量和参与调节机体的渗透压^[29, 31]。随着大量氨基酸的代谢, 罗氏沼虾体内氨含量会迅速升高, 会对生物机体本身产生毒性作用^[32]。因为鳃组织是大多数水生甲壳动物氨氮排泄和渗透压调节器官, 这也许和GS基因在鳃组织表达量上调有关。谷氨酰胺是水生甲壳动物氨主要运输方式, 运输到排泄部位鳃组织后, 经鳃内谷氨酰胺酶的分解成游离的氨, 便可以借助自由扩散作用将有毒性的氨排出体外, 进而达到解毒和渗透压调节作用^[3]。谷氨酰胺可促进水生动物肠上皮细胞的增殖分化, 提高肠上皮细胞蛋白质合成能力和肠黏膜蛋白质合成量, 并提高肠上皮细胞的抗氧化和氨基酸吸收的能力^[33-35]。GS基因在肠组织表达量升高, 这可能与蜕壳后肠上皮细胞需要增殖分化有关。但是蜕壳后, GS基因在肝胰脏组织表达量下调, 这可能与蜕皮期机体已经消耗大量的能量, 肝胰脏需要合成大量的蛋白有关^[31]。我们也测定了蜕皮前后Gln的含量变化, 其结果和GS酶活性一致。关于GS基因表达调控的分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈文静, 熊国根, 邓勇辉, 等. 罗氏沼虾生物学研究[J]. 江西水产科技, 2000(4): 15-19.
Chen W J, Xiong G G, Deng Y H, *et al.* Study on Biology of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Jiangxi Aquatic Science and Technology, 2000(4): 15-19(in Chinese).
- [2] 李旭光, 周刚, 谷孝鸿. 水生甲壳类蜕皮发生过程及其影响因素的研究与进展[J]. 动物学杂志, 2014, 49(2): 294-302.
Li X G, Zhou G, Gu X H. Review of aquatic crustaceans molting and its influencing factors[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(2): 294-302(in Chinese).
- [3] 刘胜男, 潘鲁青, 刘茂琪. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹解毒代谢关键基因表达的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2015(2): 97-104.
Liu S N, Pan L Q, Liu M Q. Effects of ammonia exposure on key detoxification metabolism associated genes expression in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2015(2): 97-104(in Chinese).
- [4] 潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 109-14.
Pan L Q, Liu H Y. Review on the osmoregulation of crustacean[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 109-14(in Chinese).
- [5] Boudour-Bouchecker N, Boulo V, Charmantier-Daures M, *et al.* Differential distribution of V-type H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*[J]. Cell and Tissue Research, 2014, 357(1): 195-206.
- [6] Boudour-Bouchecker N, Boulo V, Charmantier-Daures M, *et al.* Osmoregulation in larvae and juveniles of two recently separated *Macrobrachium* species: expression patterns of ion transporter genes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2016, 195: 39-45.
- [7] Huong D T, Yang W J, Okuno A, *et al.* Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2001, 128(2): 317-326.
- [8] Wilder M N, Ikuta K, Atmomarsono M, *et al.* Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 119(4): 941-950.
- [9] 徐宾朋. 拟穴青蟹蜕皮周期中离子转运相关基因的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
Xu B P. The functional study of the ions transport related molecules in *Scylla paramamosain* during the molt cycle[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016(in Chinese).
- [10] 阎斌伦, 薛蓓, 赵莲, 等. 甲壳类生长相关基因研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2016(4): 97-104.
Yan B L, Xue B, Zhao L, *et al.* Progress on the research of the growth-related genes in crustaceans[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2016(4): 97-104(in Chinese).
- [11] Tok C Y, Chew S F, Peh W Y X, *et al.* Glutamine accumulation and up-regulation of glutamine synthetase activity in the swamp eel, *Monopterus albus* (Zuiew), exposed to brackish water[J]. The Journal of Experimental Biology, 2009, 212(Pt 9): 1248-1258.
- [12] 李少飞. 中国对虾氨氮代谢酶基因的cDNA克隆及其在氨氮解毒代谢过程中的作用[D]. 大连: 大连海洋大学, 2014.
Li S F. cDNA cloning and expression analysis of the enzyme genes related to ammonia metabolism in *Fenneropenaeus chinensis* and study on effect of these enzymes in the detoxification of ammonia following ambient ammonia stresses[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2014(in Chinese).
- [13] Caizzi R, Bozzetti M P, Caggese C, *et al.* Homologous nuclear genes encode cytoplasmic and mitochondrial glutamine synthetase in *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 212(1): 17-26.
- [14] Avisar N, Shiftan L, Ben-Dror I, *et al.* A silencer element in the regulatory region of glutamine synthetase controls cell type-specific repression of gene induction by glucocorticoids[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(16): 11399-11407.
- [15] 贾玉萍. 中国明对虾SWD抗菌肽、谷氨酰胺合成酶和Ras基因的表达与功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.

- Jia Y P. Expressing and functional analysis of SWD antimicrobial peptide, glutamine synthetase and Ras in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Ji'nan: Shandong University, 2008(in Chinese).
- [16] Hayward B E, Hussain A, Wilson R H, *et al.* The cloning and nucleotide sequence of cDNA for an amplified glutamine synthetase gene from the Chinese hamster[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(2): 999-1008.
- [17] Pu H F, Young A P. The structure of the chicken glutamine synthetase-encoding gene[J]. *Gene*, 1989, 81(1): 169-175.
- [18] Gibbs C S, Campbell K E, Wilson R H. Sequence of a human glutamine synthetase cDNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(15): 6293.
- [19] Ramalho-Ortigão J M, Temporal P, de Oliveira S M, *et al.* Characterization of constitutive and putative differentially expressed mRNAs by means of expressed sequence tags, differential display reverse transcriptase-PCR and randomly amplified polymorphic DNA-PCR from the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*[J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001, 96(1): 105-111.
- [20] Smartt C T, Chiles J, Lowenberger C, *et al.* Biochemical analysis of a blood meal-induced *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28(12): 935-945.
- [21] McKinnon E, Hargittai P T, Grossfeld R M, *et al.* Glutamine cycle enzymes in the crayfish giant nerve fiber: implications for axon-to-glia signaling[J]. *Glia*, 1995, 14(3): 198-208.
- [22] Tanguy A, Boutet I, Moraga D. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2005, 1681(2-3): 116-125.
- [23] 孙武卫. 低盐胁迫下凡纳滨对虾消减cDNA文库构建及谷氨酰胺合成酶cDNA克隆和表达[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- Sun W W. Construction of a SSH cDNA library, cDNA cloning and expression of glutamine synthetase in *Litopenaeus vannamei*, Boone induced by hypo-osmotic stress[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012(in Chinese).
- [24] 陈劲松, 周发林, 江世贵, 等. 斑节对虾谷氨酰胺合成酶基因的克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 497-507.
- Chen J S, Zhou F L, Jiang S G, *et al.* Molecular cloning and the expression analysis of glutamine synthetase (GS) in *Penaeus monodon* under the condition of ammonia nitrogen stress[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(4): 497-507(in Chinese).
- [25] Hong M L, Chen L Q, Sun X J, *et al.* Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 145(3): 363-369.
- [26] 张军民, 高振川. 谷氨酰胺营养生理研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1999(2): 55-58.
- Zhang J M, Gao Z C. Progress in research of glutamine nutritional physiology[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 1999(2): 55-58(in Chinese).
- [27] 余冰, 田刚. 动物的谷氨酰胺营养[J]. 饲料研究, 2000(12): 15-18.
- Yu B, Tian G. Glutamine nutrition of animals[J]. *Feed Research*, 2000(12): 15-18(in Chinese).
- [28] Ip Y K, Loong A M, Ching B, *et al.* The freshwater Amazonian stingray, *Potamotrygon motoro*, up-regulates glutamine synthetase activity and protein abundance, and accumulates glutamine when exposed to brackish (15‰) water[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(23): 3828-3836.
- [29] 王悦如, 李二超, 龙丽娜, 等. 中华绒螯蟹对盐度变化的适应及其渗透压调节的研究进展[J]. 海洋渔业, 2011, 33(3): 352-360.
- Wang Y R, Li E C, Long L N, *et al.* Review on the osmoregulation and adaptation to salinity changes of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(3): 352-360(in Chinese).
- [30] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities[J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1-4): 385-390.
- [31] Marangos C, Brogren C H, Alliot E, *et al.* The Influence of water salinity on the free amino acid concentration in

- muscle and hepatopancreas of adult shrimps, *Penaeus japonicus*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1989, 17(7-8): 589-594.
- [32] 李永. 斑节对虾人工选育及氨氮对其免疫、解毒代谢影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Li Y. Artificial selection of *Penaeus monodon* and impacts of ammonia-N on immune parameters, detoxification[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012(in Chinese).
- [33] 叶元土, 王永玲, 蔡春芳, 等. 谷氨酰胺对草鱼肠道L-亮氨酸、L-脯氨酸吸收及肠道蛋白质合成的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(1): 28-32.
- Ye Y T, Wang Y L, Cai C F, *et al.* Effects of the L-Glutamine on the absorption of L-Leucine, L-Proline and the protein synthesis in intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in vitro[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(1): 28-32(in Chinese).
- [34] Jiang J, Zheng T, Zhou X Q, *et al.* Influence of glutamine and vitamin E on growth and antioxidant capacity of fish enterocytes[J]. Aquaculture Nutrition, 2009, 15(4): 409-414.
- [35] 姜俊. 鲤鱼IECs GLS和TOR基因cDNA克隆及Gln对IECs蛋白合成的影响和机理研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2009.
- Jiang J. Carp (*Cyprinus carpio*) IECs GLS and TOR gene cDNA clone and Gln to IECs protein synthesis influence and mechanism research[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2009(in Chinese).

Cloning and expression of glutamine synthetase from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

LU Zhijie^{1,2}, YE Chengkai^{1,2}, Sarath Babu V², ZHANG Xiaojun³,
LIU Xiaodan³, ZHAO Lijuan², PAN Gan^{1*}, LIN Li^{2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

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

3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract: Glutamine synthetase (GS) is a widely distributed enzyme in animals and plants, which is involved in various cellular activities. In crustaceans, GS plays a major role in the regulation of energy metabolism and osmotic pressure. In the present report, a full cDNA of the *GS* gene with 1 965 bp in length was obtained from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). The open reading frame (ORF) encoded a 361 amino acid (aa) polypeptide with the predicted molecular weight of 40.75 ku. Analysis of amino acid sequences showed that the GS of *M. rosenbergii* contained 5 conserved regions that belong to the GS group of invertebrates. Phylogenetic analysis of GS of *M. rosenbergii* shared the highest identity within the clade of GS from *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, and *Fenneropenaeus chinensis* with 95% similarities at aa level. Polyclonal antibody against GS of *M. rosenbergii* was generated. Furthermore, we detected the expression profiles of *GS* mRNA and proteins in various tissues of *M. rosenbergii* by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) and Western blotting. *GS* mRNA was differentially expressed in 8 detected tissues of *M. rosenbergii* before molting in the order of hepatopancreas>muscle>stomach>intestine>gill>heart>brain>haemolymph. The expressions of *GS* in different tissues were compared before and after molting. The results showed that, except in hepatopancreas, the mRNA expression of *GS* was up-regulated in the other 7 tissues in the order of brain>gill>stomach>intestine>muscle>heart>haemolymph. By Western blot, the expressions of *GS* protein in the gill and muscles were up-regulated after molting, which was identical with the expression profiles at mRNA level. In addition, the activity of *GS* enzyme and the concentration of glutamine were decreased in hepatopancreas after molting, and by contrast, they were increased in the gill, muscle and haemolymph. These results were also identical with the *GS* mRNA expression. The differentiated expressions of *GS* gene in different tissues before and after molting suggest that it might be involved in the regulation of energy metabolism and osmotic pressure during the molting.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; glutamine synthetase; tissue expression; molting

Corresponding author: PAN Gan. E-mail: pg2829@sina.com; LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: Innovation and Strong Universities Special Funds (KA170500G) from the Department of Education of Guangdong Province; Fisheries Scientific Innovation Program of Jiangsu Province (D2017-3)