



日本沼虾血清淀粉样蛋白A(SAA)基因的克隆及其免疫功能

江红霞, 林鑫辉, 李书凯, 王洁琛, 李学军*

(河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为探索血清淀粉样蛋白A(SAA)在日本沼虾免疫防御系统中的作用, 实验利用RACE方法克隆了日本沼虾SAA(*MnSAA*)基因cDNA全长序列, 采用实时荧光定量PCR(QPCR)分析其在本沼虾不同组织、不同发育时期的表达情况, 以及溶壁微球菌、嗜水气单胞菌和白斑综合征病毒(WSSV)感染后*MnSAA*在血淋巴细胞和肝胰腺中的表达情况, 同时还利用RNA干扰(RNAi)技术检测了*MnSAA*基因沉默后, 日本沼虾再感染嗜水气单胞菌后其肝胰腺中激活子蛋白-1(*AP-1*)和B类清道夫受体(*CD36*)基因表达变化及虾的累积死亡率变化。结果显示, *MnSAA*基因cDNA全长649 bp (GenBank登录号: MK292888), 包含21 bp 5'非编码区, 232 bp 3'非编码区, 369 bp开放读码框, 编码131个氨基酸残基; 氨基酸序列比对及系统进化分析结果显示, *MnSAA*蛋白属于急性期血清淀粉样蛋白A蛋白(A-SAA), 在进化上与无脊椎动物香港牡蛎的亲缘关系最近; mRNA表达分析显示, *MnSAA*基因在日本沼虾的各组织和各生长阶段均有表达, 分别在肝胰腺和成虾阶段中的表达量最高; 病原体感染实验表明, 在日本沼虾感染溶壁微球菌、嗜水气单胞菌和白斑综合征病毒后12~72 h, 其血淋巴和肝胰腺中的*MnSAA*基因表达量与对照组相比均显著升高; RNAi实验显示, *MnSAA*基因沉默后, 日本沼虾肝胰腺中*AP-1*和*CD36*基因分别在其感染嗜水气单胞菌后12~72 h和6~72 h与对照组相比显著下降, 日本沼虾累积死亡率在感染嗜水气单胞菌后与对照组相比明显升高。研究表明, *MnSAA*参与日本沼虾的抗病原体感染的反应, 在日本沼虾的免疫防御体系中具有重要的作用。

关键词: 日本沼虾; 血清淀粉样蛋白A; 基因克隆; 组织表达; 病原体感染; RNA干扰

中图分类号: Q 785; S 945.4

文献标志码: A

动物的先天免疫是一种快速的、非特异性的对抗外来病原体的免疫机制, 而急性期反应(acute phase response, APR)是许多动物的先天免疫反应的核心组成^[1], 它能减少组织损伤, 破坏外来入侵的微生物并促进机体的修复, 从而使动物快速恢复健康状态^[2-4]。急性期蛋白质(acute phase proteins, APPs)是一组主要由肝细胞产生和释放的血浆蛋白质, 在APR期间它们在血浆中的

浓度可以在数小时或数天内增加或减少^[5-7]。血清淀粉样蛋白A(serum amyloid A, SAA)是一种重要的APP, 它参与众多的炎症反应的调节^[4]。SAA是1个蛋白家族, 由急性期血清淀粉样蛋白A蛋白(A-SAA)和组成型血清淀粉样蛋白A蛋白(C-SAA)组成^[8]。A-SAA存在于所有脊椎动物体内, 在炎症反应期, 其表达可以被诱导, 从而超过静息时血浆水平的1 000倍, 它主要由炎症

收稿日期: 2018-12-17 修回日期: 2019-04-14

资助项目: 国家自然科学基金(31972812); 河南省教育厅科学技术重点研究项目(13A240509); 河南师范大学博士科研启动费支持项目(qd17142); 河南省重点科技攻关项目(192102110081); 河南师范大学个人科研项目结余经费资助专项(20180531)

通信作者: 李学军, E-mail: xjli@htu.cn

因子IL-1、IL-6和TNF α 介导分泌合成^[2], 而C-SAA, 其表达在APR期间低程度地被诱导, 且只在人和小鼠体内被发现^[9-10]。

近年来, SAA主要在脊椎动物体内被鉴别出来, 它在哺乳动物、鸟类、鱼类和爬行动物等脊椎动物中广泛存在^[2, 7, 11-13]。到目前为止, 仅在少数无脊椎动物中鉴别出SAA, 包括土壤跳虫(*Folsomia candida*)(GenBank登录号: XM_022112887.1)、褐腹狡蛛(*Dolomedes mizhoanus*)(GenBank登录号: KC480151.1)、文蛤(*Meretrix meretrix*)(GenBank登录号: KM850989.1)和香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)(GenBank登录号: KF156832.1)。甲壳动物的SAA目前尚未见报道。甲壳动物日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)隶属于十足目(Decapoda)、长臂虾科(Palaemonidae)、沼虾属(*Macrobrachium*), 又称河虾、青虾。它肉味鲜美, 营养丰富, 具有很高的经济价值。再加上它食性杂, 适应性强, 因而在中国得到广泛的养殖。目前, 日本沼虾已成为我国淡水养殖的主要种类之一, 据《中国渔业统计年鉴2017》^[14]公布的数据, 2016年全国日本沼虾养殖年产量27.26万t, 在淡水虾类养殖产量中位居第3位。但随着日本沼虾养殖业的发展迅速进入旺盛时期, 其养殖过程中出现的问题也越来越多, 如水质环境变差、疾病蔓延, 导致日本沼虾大量死亡, 给日本沼虾养殖业带来了巨大的经济损失。为了研究日本沼虾的抗病机理, 本研究克隆出了其SAA基因(*MnSAA*)的全长cDNA序列, 研究了该基因在日本沼虾不同组织和不同发育阶段的表达模式, 以及在病原体攻击下*MnSAA*基因的表达变化, 另外, 还研究了*MnSAA*基因沉默后, 在病原体攻毒下, 日本沼虾肝胰腺中激活子蛋白-1(AP-1)和B类清道夫受体(CD36)基因的表达变化, 以及日本沼虾的累积死亡率的变化。本研究旨在提高对*MnSAA*在日本沼虾先天免疫反应中的作用的认知, 从而在养殖实践中增强日本沼虾抵抗疾病的能力, 提高养殖的质量和产量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康的成体日本沼虾(3.5 \pm 0.5)g来源于新乡水产市场, 实验室暂养7 d[水温(25 \pm 2) $^{\circ}$ C, pH

(7.27 \pm 0.40), 溶解氧充足, 每天喂食商品饲料2次]后, 用于组织样品的采集和病原体感染实验。采集组织样品时, 冰上解剖6尾虾, 取其血淋巴液、卵巢、精巢、肝胰腺、鳃、心脏、胃、肠和肌肉9个组织。采集的血淋巴液立即加入等体积的抗凝剂肝素钠, 混匀, 4 $^{\circ}$ C下, 12 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 得到血淋巴细胞, 立即进行RNA的提取。采集的其他组织立即放入RNastore Reagent(天根, 北京)中, 并于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存, 直到进行RNA的提取。

1.2 不同发育时期的日本沼虾样品的采集

采用常规方法观察记录日本沼虾胚胎及幼体发育各阶段的特征。取受精卵(受精后2 h内)、无节幼体(受精后10 d)、蚤状幼体(受精后20 d)、糠虾幼体(孵化后10 d)、仔虾(孵化后30 d)及成虾(孵化后60 d)期的整只虾样。各发育时期取样6次(n=6), 样品获得后立即放入RNastore Reagent(天根, 北京)中, 并于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存, 直到进行RNA的提取。

1.3 日本沼虾SAA基因全长的获得

按试剂盒Total RNA kit II(Omega公司)的说明书对日本沼虾肝胰腺组织提取总RNA。利用NanoDrop 2000c微量紫外分光光度计(Thermo, 美国)测定RNA的浓度和纯度, 并利用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。然后按primeScriptTM RT Master Mix试剂盒(TaKaRa, 大连)的说明书合成第一链cDNA。根据本实验室日本沼虾转录组测序(NCBI SRA数据库登录号: SRP063589)中得到的SAA基因片段设计中间片段引物: *MnSAA-F*和*MnSAA-R*(表1), 以日本沼虾肝胰腺cDNA作为模板进行PCR扩增, 获得*MnSAA*基因的中间片段序列。在已获得的中间片段序列的基础上设计3'-RACE和5'-RACE的特异性引物*MnSAA-3'-GSP*和*MnSAA-5'-GSP*(表1), 采用SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit(Clontech公司)试剂盒, 利用试剂盒中的通用引物(universal primer, UMP)和设计的3'-RACE和5'-RACE特异性引物分别扩增目的基因的3'和5'末端序列。PCR扩增产物回收纯化、连接转化后挑选阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司测序。将所获得的中间片段序列、3'和5'末端序列拼接后获得日本沼虾SAA基因cDNA全长序列。

表 1 实验中所用的引物

Tab. 1 Primers used in the study

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 usage
<i>MnSAA</i> -F	CTTCTTCTCCCGCCTCG	中间片段克隆 partial sequence PCR
<i>MnSAA</i> -R	TCCACCAACAGCCACAG	
<i>MnCST</i> -3'-GSP	<u>GATTACGCCAAGCTT</u> CCAGCAGCCAGTGCCGCCGACCAAGAAGA	3'端扩增 3'RACE PCR
<i>MnCST</i> -5'-GSP	<u>GATTACGCCAAGCTT</u> GGGCAGCGTCGTGGTTCCCTCTT	5'端扩增 5'RACE PCR
UPM	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	通用引物 universal primer
<i>MnSAA</i> -qf	TGTTGGTGGAAGTTTTGCTGC	荧光定量 PCR
<i>MnSAA</i> -qr	TCATCCTCACGCCTGTTGTATT	QPCR
<i>AP-1</i> -qf	CAGGCGTGTCTTTGGCAGT	
<i>AP-1</i> -qr	CCTCTTTGATGGATGTGTGGG	
<i>CD36</i> -qf	TCTTCCTGGGCGTCTTTCC	
<i>CD36</i> -qr	ACCTGCTTGAGTTTGGGCTT	
β -actin-qf	AATGTGTGACGACGAAGTAG	内参基因 housekeeping gene
β -actin-qr	GCCTCATCACCGACATAA	
T7- <i>MnSAA</i> -f1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> TCTCGTTGCTGTGGTTGTTT	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
<i>MnSAA</i> -r1	CTCCCTGGCATTGCTGAT	
<i>MnSAA</i> -f2	TCTCGTTGCTGTGGTTGTTT	
T7- <i>MnSAA</i> -r2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACT</u> CCCTGGCATTGCTGAT	
T7-EGFP-f1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> GCCCATCCTGGTCGAGCT	
EGFP-r1	TGCACGCTGCCGTCCTCGAT	
EGFP-f2	GTGCCATCCTGGTCGAGCT	
T7-EGFP-r2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> GACGCTGCCGTCCTCGAT	

注: 单下划线部分为15 bp的载体同源序列, 双下划线部分为T7启动子序列

Notes: the 15 bp vector homologous sequence was underlined, T7 promoter sequence was double-underlined

1.4 序列对比分析

使用在线软件对MnCST进行序列分析, 包括开放阅读框的预测(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)、蛋白的理论相对分子质量以及理论等电点的预测(http://web.expasy.org/compute_pi/)、蛋白的磷酸化位点预测(<http://www.dabi.temple.edu/disphos/>)、蛋白的信号肽预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、蛋白的功能结构域预测(<http://smart.embl-heidelberg.de/index2.cgi>)和蛋白的跨膜结构预测(https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)等。应用ClustalX 2程序进行氨基酸多重序列比对(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)，应用MEGA 5.0软件以邻接法构建系统进化树。

<http://www.scxuebao.cn>

1.5 *MnSAA*的mRNA表达模式分析

*MnSAA*在日本沼虾不同组织和不同发育阶段的表达模式利用实时荧光定量PCR(QPCR)法进行。首先按试剂盒Total RNA kit II (Omega公司)的说明书对日本沼虾的不同组织和不同发育阶段的整虾提取总RNA。RNA的浓度、纯度和完整性的检测同“不同发育时期的日本沼虾样品的采集”。使用PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒对组织的总RNA进行反转录。依据已克隆的MnSAA全长序列设计荧光定量引物MnSAA-qf和MnSAA-qr, 以 β -actin为内参基因(表1)。使用CFX96实时荧光PCR检测系统(Bio-Rad, USA)和SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa, 大连)试剂进行qRT-PCR, 反应体系(25 μ L): SYBR[®] Premix Ex Taq II 12.5 μ L,

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

上、下游引物各1.0 μL , cDNA模板2.0 μL , ddH₂O 8.5 μL ; 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共40个循环。每个样本设置3个重复, 依据 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 法分析实验样本*MnSAA*的相对表达量, SPSS 20.0软件One-Way ANOVA统计分析所得数据, 进行LSD和Duncan氏比较, 以 $P < 0.05$ 作为具有显著性差异, 结果用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示。

1.6 病原体感染实验

将400只健康的成体日本沼虾分为4组: 溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)(革兰氏阳性菌)感染组、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)(革兰氏阴性菌)感染组、白斑综合征病毒(WSSV)感染组和对照组各100只, 分别放入4个水族箱中(100 cm \times 30 cm \times 74 cm), 养殖条件同“实验材料”中日本沼虾的实验室暂养条件。3种病原体均来自于本实验室所保存。实验组分别注射10 μL 溶壁微球菌(4.0×10^{10} CFU/mL)、嗜水气单胞菌(1.0×10^8 CFU/mL)和WSSV(80个/ μL), 对照组注射等体积的PBS, 并于注射后0、6、12、24、48和72 h后, 分别随机选取6尾虾, 分离虾的血淋巴细胞和肝胰腺组织, 用于总RNA的提取。总RNA的提取和反转录反应仍按试剂盒Total RNA kit II (Omega公司)和PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)的说明书进行, 然后利用QPCR技术, 检测3种病原体感染后日本沼虾血淋巴细胞和肝胰腺组织中*MnSAA*基因表达的变化, QPCR具体过程参照“*MnSAA*的mRNA表达模式分析”中的实验步骤进行。

1.7 RNA干扰(RNAi)实验

*MnSAA*基因和增强型绿色荧光蛋白(*EGFP*)基因的双链RNA(dsRNA)的合成按照Qian等^[15]的体外转录的方法合成, 使用的引物序列见表1。取健康的日本沼虾200只(平均每尾体质量约4.0 g)分为2组, 实验组和对照组各100只。按照Bai等^[16]的实验方法, 实验组和对照组分别肌肉注射4 μg dsRNA/g体质量的*MnSAA*-dsRNA和*EGFP*-dsRNA, 在注射后的第48小时各组随机选取6尾虾, 分别采集虾的肝胰腺, 提取总RNA, 利用QPCR检测dsRNA注射后*MnSAA*基因沉默的效率。并在dsRNA注射后的第48小时后, 实验组和对照组均再注射嗜水气单胞菌, 在注射细菌的0、6、12、24、48和72 h后, 计数每组虾的死亡

数目, 分析虾的累积死亡率, 并从每组中随机取6尾虾, 采集虾的肝胰腺, 进行总RNA的提取, 利用QPCR检测*AP-1*和*CD36*基因表达的变化。总RNA的提取依然按试剂盒Total RNA kit II (Omega公司)的说明书进行, QPCR参照“*MnSAA*的mRNA表达模式分析”中的实验步骤进行。

2 结果

2.1 *MnSAA*基因cDNA全长和氨基酸序列分析

所克隆序列经测序和拼接, 结果显示*MnSAA*基因cDNA序列全长649 bp (GenBank登录号: MK292888), 其中5'非编码区长21 bp, 3'非编码区长232 bp, poly(A)尾前有1个加尾序列AATAAA(图1-a)。该基因开放阅读框396 bp, 编码131个氨基酸, 推导的蛋白分子量为13.756 ku, 理论等电点为5.61, 分子式为C₆₀₂H₉₀₇N₁₇₉O₁₈₈S₃, 富含丙氨酸(19.1%)、甘氨酸(13.7%)和天冬氨酸(6.9%), 组氨酸和异亮氨酸含量最低(0.8%)。另外, 在该氨基酸序列上预测到4个磷酸化位点, 为4个酪氨酸(Tyr)。利用在线软件分析显示*MnSAA*氨基酸序列上有1个信号肽序列, 位于第1~19位氨基酸; 1个SAA(血清淀粉样蛋白A)结构域, 位于第31~131位氨基酸; 在第3~15位氨基酸还有一个低复杂度区域(low complexity region, LCR)(图1-a, 1-b)。

2.2 *MnSAA*蛋白序列同源性比较及系统进化分析

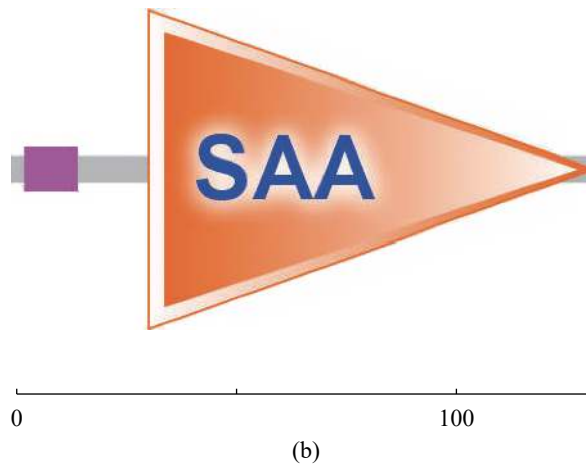
利用NCBI BLASTP软件, 将*MnSAA*基因编码的氨基酸序列与其他已知动物的SAA蛋白氨基酸序列进行同源性比对。结果显示*MnSAA*与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的SAA氨基酸序列相似性最高, 达65%, 其次为斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, 64%)、褐腹狡蛛(63%)和中华鳖(*Pelodiscus sinensis*, 63%)。与其他几种无脊椎动物香港牡蛎、文蛤与土壤跳虫的SAA氨基酸序列相似性分别为56%、50%和46%。使用Clustal X将*MnSAA*与其他已知物种的SAA氨基酸序列进行多重比对, 发现在SAA氨基酸序列的N-端都有1个信号肽, 在序列的中间都有2个 α -螺旋区和2个 β -折叠区, 并都具有SAA结构域(图2)。利用MEGA 6.0构建系统进化树, 进化树分为两支, 脊椎动物聚为一支, 无脊椎动物聚为一支。日本沼虾SAA与无脊椎动物香港牡蛎、褐腹狡蛛、文蛤与土壤跳虫SAA聚为一支, 这与日本沼虾的分类地

```

1      GTTGGTTTTCTTCAGAACAAAATGAAACTTCTCGTTGCTGTGGTTGTCTTTCAGCCGTCGCTGCCGGCACGGAGGGC
1      K L L V A V V V L A A V A A G T E G
79     GCCCCAGGTTTCTGGGACACCATCACCAAACCCCTTCAGTTTCGCTAAGGAAGCTGTCCAGGGCGCAGGAGATATGGCC
20     A P G F W D T I T K P   F S F A K E A V Q G A G D M A
157    GGAGCTTATGGCGACATGAGAGAAGCCAAGTGAAGAACTCAGACAAGTACTTCCATGCAAGAGGGAAACCACGACGCT
46     G A Y G D M R E A N W K N S D K Y F H A R G N H D A
235    GCCCAGAGGGGACCCGGAGGTGCCTGGGCAGCTGAGGTTATCAGCAATGCCAGGGAGACAGTAGACCAATGGCGTGGT
72     A Q R G P G G A W A A E V I S N A R E T V D Q W R G
313    GGAGACCCAGCAGCCAGTCCCGCCGACCAAGAAGCCAACAATTGGGGACGAGGTGGTGGAGATTCTAACAAGTACCGC
98     G D P A A S A A D Q E A N N W G R G G G D S N K Y R
391    CCTGCCGACTTCTTCAATACTGAAGGAGTATTGAGGACCCCTGAAGTTTTTCCAAGAAGTGCCCAAGAATT
124    P A G L P S Q Y *
469    GATGACTTTAATGGGATTCTTTGAGTTCGTATAGGGTTGGTGCTCATGTTTCAGAGTAGTACTATACGTATAGTACT
547    ACATTCTCATGAATTCTTTTGCTATATATGTTATTTCTGTTACGTTGTGACCATGAATTGTTTAAAATAATAAAAGT
625    TTTAAAGTAGAAAAAAAAA

```

(a)



(b)

图1 MnSAA基因全长cDNA序列和氨基酸序列分析

(a) *MnSAA*基因全长cDNA序列和推导的氨基酸序列。ORF区的起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)用细单下划线指示,长条框内为信号肽序列,灰色背景部分为SAA结构域序列,粗下划线指示低复杂度区域,星号为氨基酸的终止,黑色三角(▲)指示预测的磷酸化位点,双下划线指示poly A加尾信号(AATAAA)。(b) 预测的MnSAA结构域。橘红色部分为SAA结构域,粉红色部分为低复杂度区域

Fig. 1 Sequence analysis of the full-length cDNA and amino acid of *MnSAA*

(a) sequences of the full-length cDNA and amino acid of *MnSAA*. The start (ATG) and stop codon (TAG) of the ORF are underlined with fine lines. Signal peptide sequence is boxed. SAA domain is indicated by gray backgrounds. Low complexity region is indicated by thick underline. An asterisk denotes the termination codon. The phosphorylation sites are marked by ▲. Putative polyadenylation sites (AATAAA) are double-underlined. (b) predicted domain of MnSAA. The orange part is the SAA domain. Pink part is low complexity region

位相一致(图3)。

2.3 MnSAA mRNA组织表达模式

QPCR检测*MnSAA* mRNA在成体日本沼虾不同组织中的表达模式,结果显示*MnSAA*在日本沼虾肝胰腺中相对表达量最高,显著高于其他组

织 ($P < 0.05$), 其次为精巢、卵巢和血淋巴细胞,在心脏中的表达量最低。*MnSAA* mRNA在成体日本沼虾雌雄性腺精巢和卵巢中的表达量没有显著差异 ($P > 0.05$), 在鳃、心脏、胃、肠和肌肉中的表达量也无显著性差异 ($P > 0.05$)(图4)。

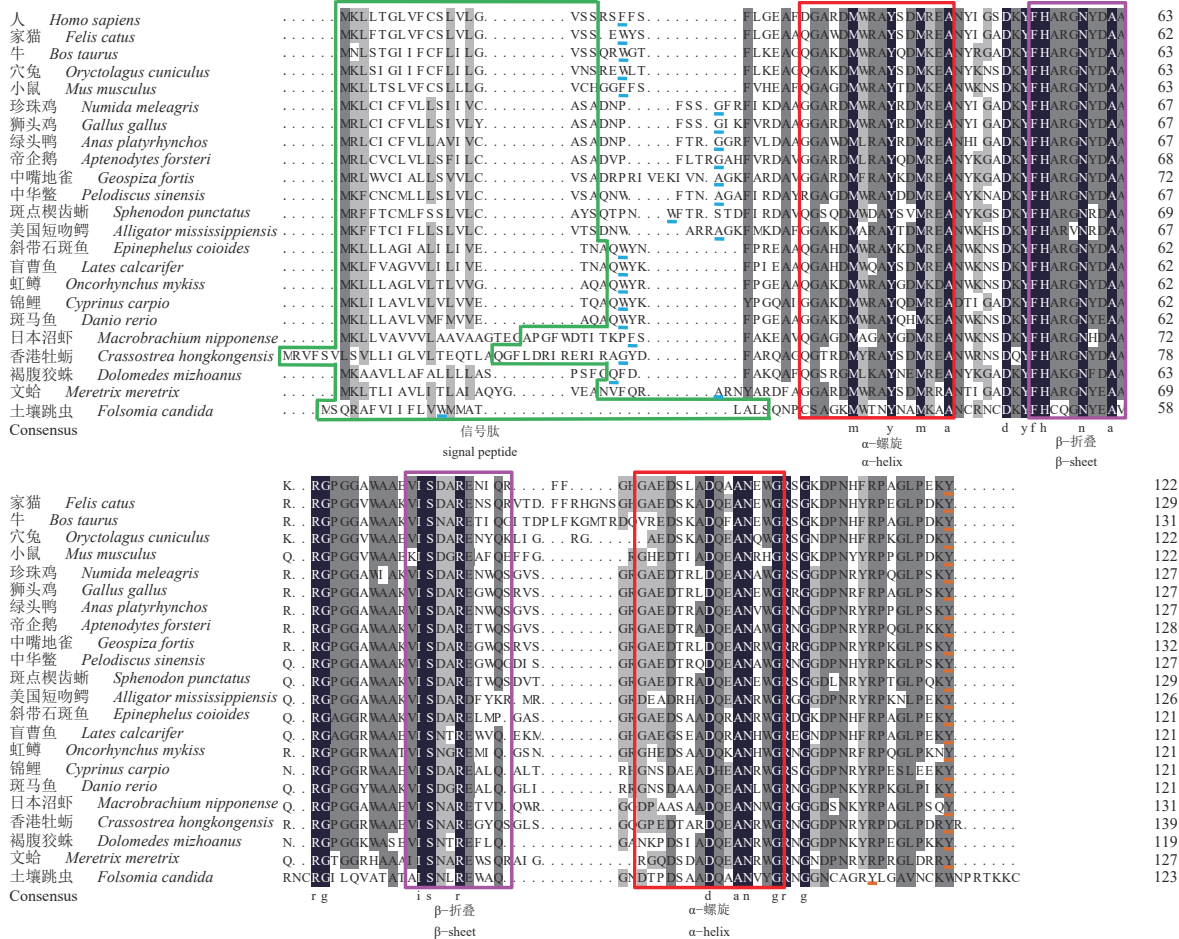


图 2 日本沼虾SAA与其他已知物种SAA氨基酸序列比对

使用Clustal X进行多重序列比对, 绿色框为信号肽序列, 红色框为 α -螺旋区, 紫色框为 β -折叠区, 蓝色短线指示SAA结构域的起始氨基酸, 橘色短线指示SAA结构域的结尾氨基酸, 从起始氨基酸开始到结尾氨基酸结束的序列组成SAA结构域

Fig. 2 Alignment of SAA in *M. nipponense* with those of other known animals

The program Clustal X is used to align the SAA sequences. The signal peptide sequence, α -helix region, β -sheet region are boxed with green, red and purple colors, respectively. The blue short lines indicate the first amino acid of the SAA domain, the orange short lines indicate the last amino acid of the SAA domain, and the amino acid sequence from the first to the last amino acid constitutes the SAA domain

2.4 MnSAA mRNA在日本沼虾不同发育时期的表达模式

MnSAA mRNA在不同发育阶段的日本沼虾中的表达结果显示, MnSAA mRNA在成虾中的相对表达量最高, 显著高于其他发育阶段 ($P<0.05$), 其次为仔虾, 在仔虾中的相对表达量显著高于受精卵、无节幼体、溞状幼体和糠虾幼体 ($P<0.05$)。受精卵、无节幼体、溞状幼体和糠虾幼体中的MnSAA mRNA的表达量无显著性差异 ($P>0.05$)。MnSAA mRNA在受精卵中的表达量最低(图5)。

2.5 溶壁微球菌感染对日本沼虾MnSAA基因表达的影响

溶壁微球菌感染日本沼虾6、12、24和48

h后, 血淋巴细胞中MnSAA基因表达量与对照组(PBS注射组)相比极显著升高 ($P<0.01$), 其基因表达量分别为对照组的62.2、86.8、105.0和45.2倍, 感染溶壁微球菌72 h后, 血淋巴细胞中MnSAA基因表达量与对照组相比显著升高 ($P<0.05$), 其基因表达量为对照组的2.7倍(图6-a); 溶壁微球菌感染日本沼虾6、12、24、48和72 h后, 肝胰腺中MnSAA基因表达量与对照组相比均极显著升高 ($P<0.01$), 其基因表达量分别为对照组的10.8、14.6、24.5、20.7和49.2倍(图6-b)。

2.6 嗜水气单胞菌感染对日本沼虾MnSAA基因表达的影响

日本沼虾感染嗜水气单胞菌6、12、24、48和72 h后, 血淋巴细胞中MnSAA基因表达量与

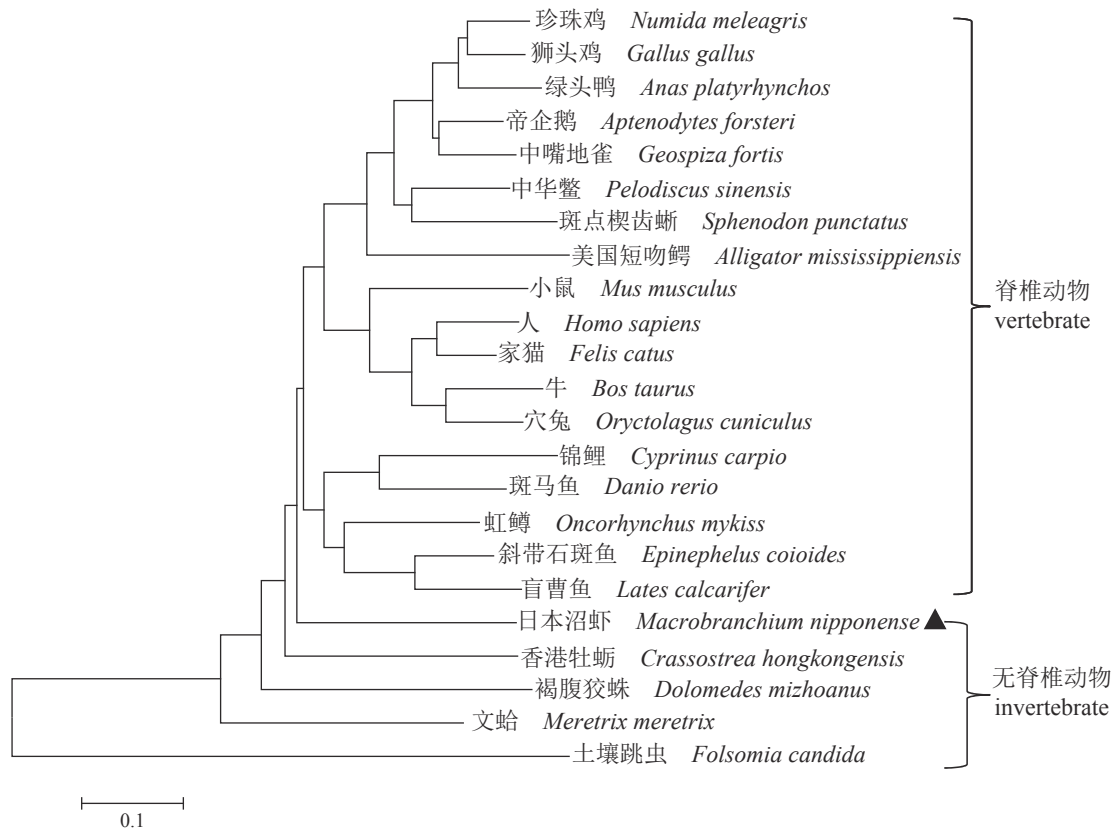


图3 SAA系统进化树

SAA所用序列登录号: 珍珠鸡(XP_021257885.1)、狮头鸡(ADF56353.1)、绿头鸭(NP_001297733.1)、帝企鹅(XP_009287041.1)、中嘴地雀(XP_005427242.1)、中华鳖(AEB77777.1)、斑点楔齿蜥(AAM46103.1)、美国短吻鳄(XP_014457668.1)、小鼠(NP_001344422.1)、人(NP_000322.2)、家猫(NP_001035288.1)、牛(NP_851359.2)、穴兔(NP_001075771.1)、锦鲤(ARO38309.1)、斑马鱼(NP_001005599.1)、虹鳟(NP_001117908.1)、斜带石斑鱼(AFQ00088.1)、盲曹鱼(ADE05545.1)、香港牡蛎(AHY23235.1)、褐腹狡蛛(AGR53514.1)、文蛤(AJF23095.1)、土壤跳虫(XP_021968579.1)

Fig. 3 Phylogenetic tree of SAA from vertebrate and invertebrate

Accession number of SAA: *N. meleagris* (XP_021257885.1), *G. gallus* (ADF56353.1), *A. platyrhynchos* (NP_001297733.1), *A. forsteri* (XP_009287041.1), *G. fortis* (XP_005427242.1), *P. sinensis* (AEB77777.1), *S. punctatus* (AAM46103.1), *A. mississippiensis* (XP_014457668.1), *M. musculus* (NP_001344422.1), *H. sapiens* (NP_000322.2), *F. catus* (NP_001035288.1), *B. taurus* (NP_851359.2), *O. cuniculus* (NP_001075771.1), *C. carpio* (ARO38309.1), *D. rerio* (NP_001005599.1), *O. mykiss* (NP_001117908.1), *E. coioides* (AFQ00088.1), *L. calcarifer* (ADE05545.1), *C. hongkongensis* (AHY23235.1), *D. mizhoanus* (AGR53514.1), *M. meretrix* (AJF23095.1), *F. candida* (XP_021968579.1)

对照组相比均极显著升高($P < 0.01$), 其基因表达量分别为对照组的425.1、396.5、446.4、355.1和340.2倍(图7-a); 日本沼虾感染嗜水气单胞菌12、24、48 h后, 肝胰腺中*MnSAA*基因表达量与对照组相比极显著升高($P < 0.01$), 其基因表达量分别为对照组的16.6、31.0和39.2倍, 感染嗜水气单胞菌72 h后, 肝胰腺中*MnSAA*基因表达量与对照组相比显著升高($P < 0.05$), 其基因表达量为对照组的13.8倍(图7-b)。

2.7 WSSV感染对日本沼虾*MnSAA*基因表达的影响

WSSV感染日本沼虾12和24 h后, 血淋巴细

胞中*MnSAA*基因表达量与对照组相比显著升高($P < 0.05$), 其基因表达量分别为对照组的146.8和92.1倍, 感染日本沼虾48和72 h后, 血淋巴细胞中*MnSAA*基因表达量与对照组相比极显著升高($P < 0.01$), 其基因表达量分别为对照组的60.4和116.1倍(图8-a); WSSV感染日本沼虾12 h后, 肝胰腺中*MnSAA*基因表达量与对照组相比显著升高($P < 0.05$), 其基因表达量为对照组的13.9倍, 感染日本沼虾24、48和72 h后, 肝胰腺中*MnSAA*基因表达量与对照组相比极显著升高($P < 0.01$), 其基因表达量分别为对照组的40.1、10.1和11.7倍(图8-b)。

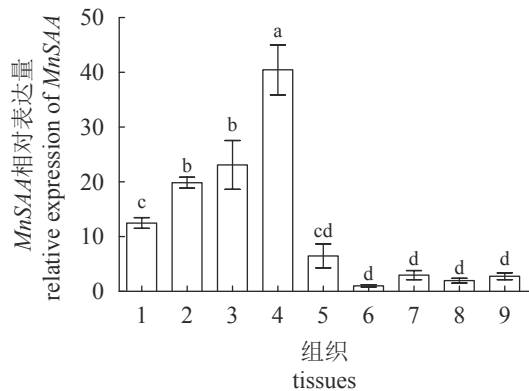
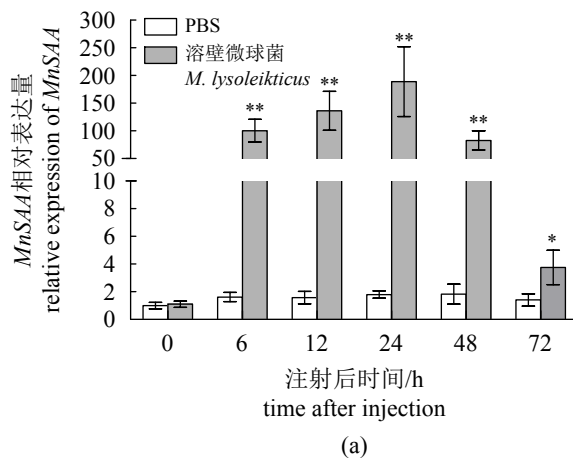


图4 *MnSAA*组织分布

1. 血淋巴细胞; 2. 卵巢; 3. 精巢; 4. 肝胰腺; 5. 鳃; 6. 心脏; 7. 胃; 8. 肠; 9. 肌肉。不同小写字母代表差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 4 Tissue distribution of *MnSAA* by Real-time PCR

1. hemocytes; 2. ovary; 3. testis; 4. hepatopancreas; 5. gill; 6. heart; 7. stomach; 8. intestine; 9. muscle. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below



(a)

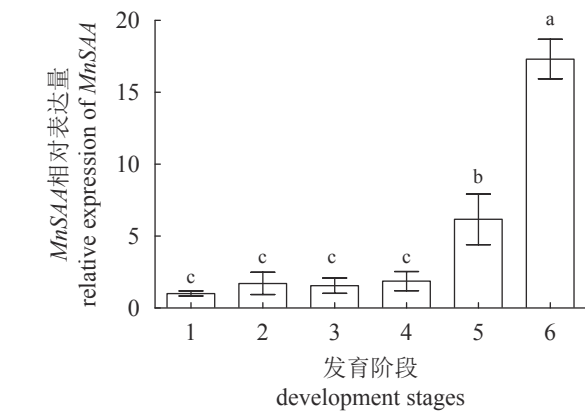
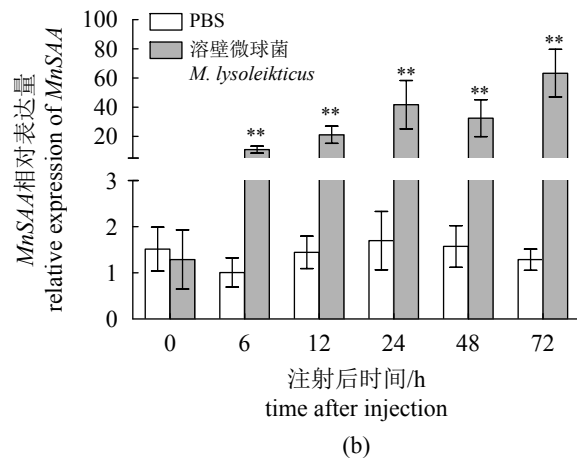


图5 *MnSAA*在日本沼虾不同发育阶段的表达

1. 受精卵; 2. 无节幼体; 3. 蚤状幼体; 4. 糠虾幼体; 5. 仔虾; 6. 成虾

Fig. 5 Expressions of *MnSAA* in *M. nipponense* at different growth stages

1. fertilized eggs; 2. nauplius; 3. zoea; 4. mysis; 5. postlarva; 6. adult prawn



(b)

图6 溶壁微球菌感染对日本沼虾血淋巴细胞(a)和肝胰腺(b)中*MnSAA*基因表达的影响

*代表与PBS组相比差异显著($P<0.05$), **代表与PBS组相比差异极显著($P<0.01$), 下同

Fig. 6 Effects of *M. lysoleikticus* infection on the expression of *MnSAA* in hemocytes (a) and hepatopancreas (b) of *M. nipponense*

*represents significant difference compared with the PBS group ($P<0.05$), **represents extremely significant difference compared with the PBS group ($P<0.01$), the same below

2.8 RNAi实验结果

为研究*MnSAA*在日本沼虾免疫过程中参与的调控作用, 向日本沼虾体内注射*MnSAA*-dsRNA 48 h后, 检测了*MnSAA*的沉默效果, 在注射*MnSAA*-dsRNA 48 h后, 日本沼虾肝胰腺中的*MnSAA*的mRNA表达量显著低于对照组即EGFP-dsRNA注射组(下降了90%)($P<0.05$)(图9-a), 说明*MnSAA*基因沉默是成功的。*MnSAA*基因成功沉默之后又向日本沼虾体内注射了嗜水气单胞菌, 结果发现,

嗜水气单胞菌感染12和72 h后, 日本沼虾肝胰腺中*AP-1*的mRNA表达量显著低于对照组($P<0.05$), 感染24和48 h后, *AP-1*的mRNA表达量极显著低于对照组($P<0.01$)(图9-b)。嗜水气单胞菌感染6和48 h后, 日本沼虾肝胰腺中*CD36*的mRNA表达量显著低于对照组($P<0.05$); 嗜水气单胞菌感染12、24和72 h后, *CD36*的mRNA表达量极显著低于对照组($P<0.01$)(图9-c)。日本沼虾累积死亡率在感染嗜水气单胞菌后与对照组相比均升高, 在感染嗜水气单胞菌24、48和72 h后, 与对照组

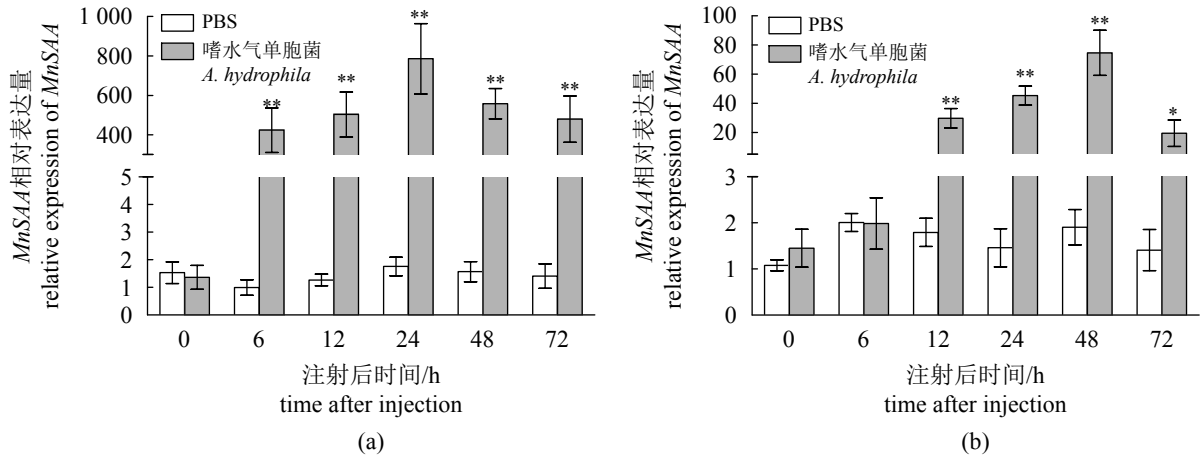


图 7 嗜水气单胞菌感染对日本沼虾血淋巴细胞(a)和肝胰腺(b)中 MnSAA 基因表达的影响

Fig. 7 Effects of *A. hydrophila* infection on the expression of MnSAA in hemocytes (a) and hepatopancreas (b) of *M. nipponense*

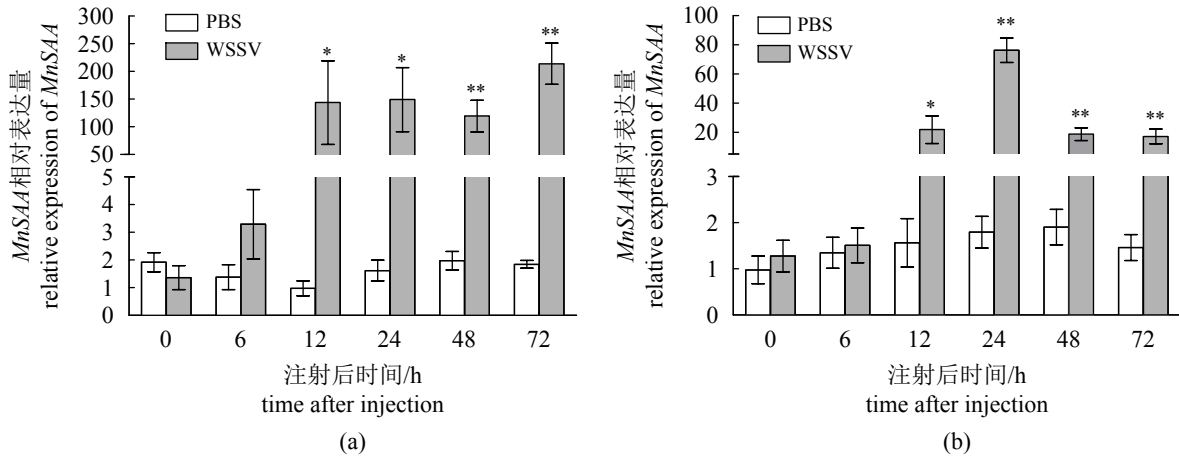


图 8 WSSV 感染对日本沼虾血淋巴细胞(a)和肝胰腺(b)中 MnSAA 基因表达的影响

Fig. 8 Effects of WSSV infection on the expression of MnSAA in hemocytes (a) and hepatopancreas (b) of *M. nipponense*

相比累积死亡率分别升高了114%、246%和223% (图9-d)。

3 讨论

SAA作为一种重要的急性期免疫效应因子,从硬骨鱼类到哺乳动物都得到了广泛的研究^[2, 7, 11-13],而在无脊椎动物中的研究迄今为止非常有限^[17-18]。本研究首次从十足目甲壳动物日本沼虾的肝胰腺中克隆得到SAA基因的cDNA全长序列,命名为MnSAA基因。该基因开放阅读框长396 bp,编码131个氨基酸,其编码的氨基酸与虹鳟的SAA氨基酸序列相似性最高,但在系统分化上与无脊椎动物香港牡蛎的亲缘关系最近。MnSAA具有典型的SAA家族蛋白的特征:一个

信号肽和一个保守的SAA结构域。据研究SAA由A-SAA和C-SAA组成, C-SAA是由氨基酸构成的多肽链,有一个插入的八肽序列,而A-SAA的二级结构为典型的球蛋白分子,具有 α -螺旋和 β -折叠^[19]。本研究的氨基酸序列分析表明MnSAA不具有C-SAA典型的八肽序列,但氨基酸序列的多重比对分析表明MnSAA与其他物种的A-SAA的氨基酸序列一样都具有 α -螺旋和 β -折叠结构,因此MnSAA是一个典型的A-SAA。

在脊椎动物中, SAA被证明在各种组织中广泛表达,尤其在肝脏中的表达量最高,因为SAA主要是由肝脏合成并分泌的一种急性时相反应蛋白^[2, 20]。本研究中,在日本沼虾的9个组织和6个发育阶段中均检测到MnSAA的mRNA转录

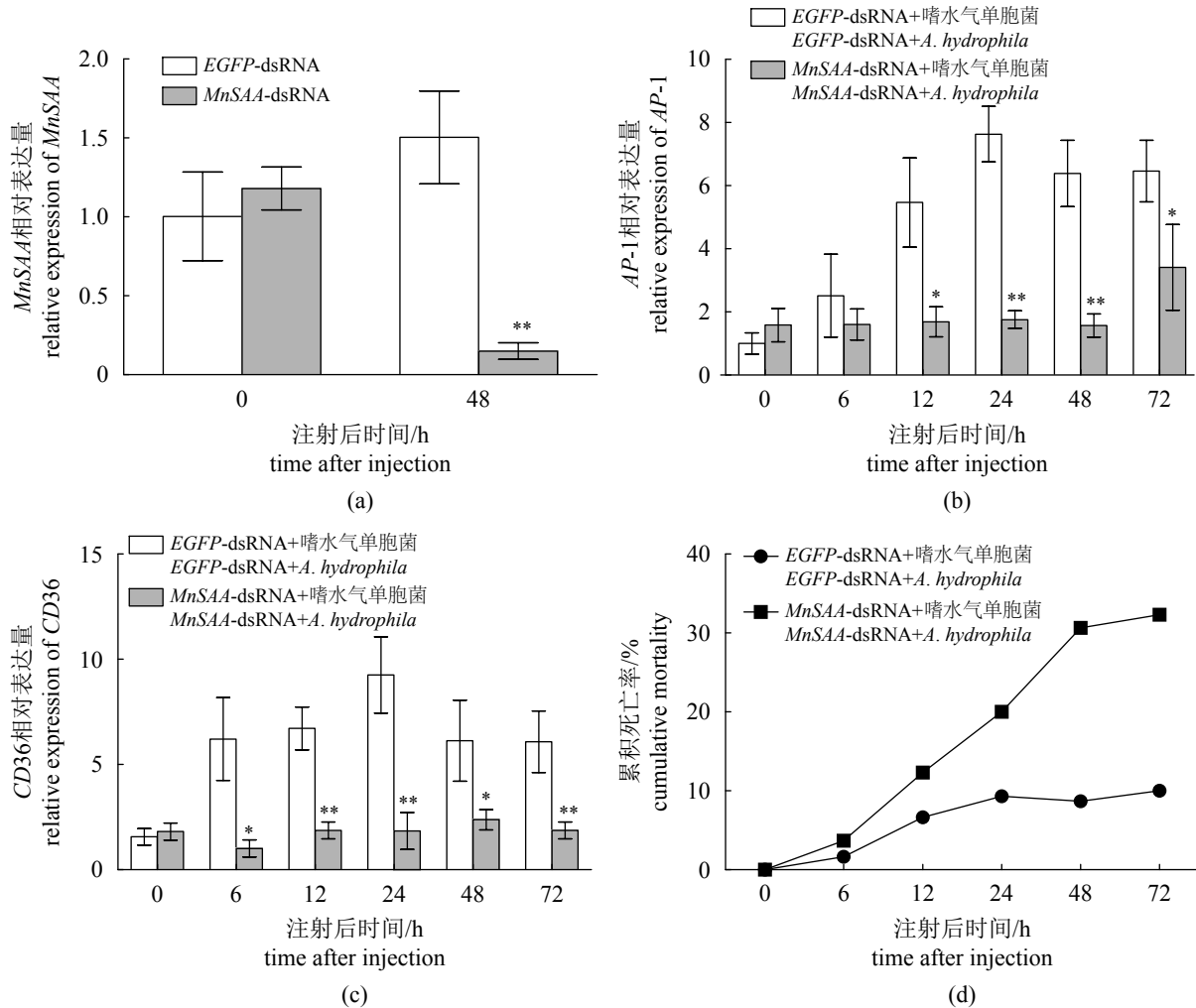


图 9 注射 *MnSAA*-dsRNA 并感染嗜水气单胞菌后日本沼虾肝胰腺中 *MnSAA*(a)、AP-1(b)、CD36(c) 基因 mRNA 表达量和虾累积死亡率(d) 检测

Fig. 9 *MnSAA* (a), AP-1 (b), CD36 (c) mRNA expression in hepatopancreas and cumulative mortality (d) of dsRNA injected *M. nipponense* post challenge with *A. hydrophila*

本, 表明 *MnSAA* 既不是组织特异性基因, 也不是发育阶段特异性基因, 该基因是普遍存在且组成性表达的。*MnSAA* 在日本沼虾肝胰腺中的表达量最高, 这与脊椎动物的研究结果一致, 说明无脊椎动物日本沼虾的 SAA 也主要由肝脏合成和分泌。在日本沼虾的 6 个发育阶段中, 成虾中 *MnSAA* 的基因表达量最高, 受精卵中最低, 且随着发育阶段的延长, 其基因表达量基本上是不不断增加的, 这可能与日本沼虾生长过程中肝胰腺组织不断发育, 从而合成 SAA 的功能也不断健全有关, 同时也说明随着日本沼虾的发育, 其机体的免疫功能是不断增强的。至于受精卵中所存在的 *MnSAA* mRNA 则可能是来源于母体。

通常认为所有生物都处于一个有各种生物

和非生物组分时刻进行侵害的富有挑战性的环境中, 并且需要高度协调的防御系统来应对外界入侵。APR 是由组织损伤、感染和炎症激活的复杂的早期防御系统^[1-2], 其诱导许多 APP 的浓度发生显著的改变^[6]。APP 是先天免疫系统的必需成分^[21-22], 在各种生物的免疫防御活动中发挥重要作用, 如杀死传染性微生物, 修复受损组织和恢复健康状态^[23]。在脊椎动物中, APP 可根据其在 APR 期间在血浆中的浓度变化分为三大类: 主要 APP (浓度增加 10 倍、100 倍或高达 1 000 倍)、中度 APP (浓度增加 2 倍到 10 倍) 和次要 APP (浓度仅略微增加); 根据其变化方向又可分为两大类: 正向 APP (浓度增加) 和负向 APP (浓度降低)^[1, 5, 7, 24]。SAA 已被证明是作为一个主要的正向 APP 在生物

体的免疫防御中发挥着重要作用。在本研究中,日本沼虾血淋巴细胞和肝胰腺中的*MnSAA*在溶壁微球菌、嗜水气单胞菌和白斑综合征病毒感染下的时序表达模式表明,*MnSAA* mRNA的表达可以被这3种病原体迅速而灵敏地启动(图6,图7,图8),同时也说明日本沼虾SAA对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和病毒都有广泛而灵敏的反应,*MnSAA*参与了日本沼虾对抗细菌和病毒的先天免疫防御的相关途径。日本沼虾血淋巴细胞和肝胰腺中的*MnSAA*的表达量在2种细菌和1种病毒感染的感染下,与对照组相比均几十至数百倍地上升,表明日本沼虾的SAA和脊椎动物的SAA蛋白一样是一种主要的正向APP。结合上述*MnSAA*的序列分析,本结果也进一步表明*MnSAA*是A-SAA家族的成员而不是C-SAA家族的成员。此外,可以推断,A-SAA在病原体的刺激下而显著上调在各种生物体中都是普遍存在的,A-SAA在脊椎动物和无脊椎动物体内都具有抵抗病原体的保护性生物学功能。

据研究,人类SAA在血浆中的增加会诱导细胞因子^[25-26]、趋化因子^[27]和基质金属蛋白酶(MMPs)^[28]的产生,SAA起着吞噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞的诱导剂的作用^[29-31]。SAA已被证明可与多种受体结合,包括TLR2^[32]、TLR4^[33]、甲酰肽受体1(FPRL1)^[34]和CD36^[35]。因此,SAA的生理效应是多样的,例如,SAA具有抗炎作用,可抑制中性粒细胞的氧化爆发^[36-37],以及刺激抗炎细胞因子如IL-10的产生^[25-26];SAA作为中性粒细胞的引发剂^[38],还可诱导免疫细胞产生细胞因子如TNF- α 和IL-1^[25-26,39]并诱导产生抗菌效应^[34]。AP-1是对TNF- α 和IL-1的作用产生反应的一种重要的转录因子,在这种转录因子介导下,通过AP-1信号通路,可以产生许多对炎性过程和免疫反应起作用的蛋白质^[40]。CD36是B级清道夫受体家族的一员,近期大量研究发现CD36是SAA介导促炎活动的一个受体,在SAA介导的促炎活动中,CD36主要介导SAA的绑定和调节SAA诱导的细胞因子的分泌^[41]。在本研究的RNAi试验中,*MnSAA*基因沉默后,日本沼虾肝胰腺中AP-1和CD36基因分别在虾感染嗜水气单胞菌后12~72 h和6~72 h与对照组相比显著下降($P < 0.05$)(图9-b, 9-c),说明*MnSAA*基因沉默后嗜水气单胞菌感染不能上调转录因子AP-1的表达,从而也不能启动AP-1信号通路来产生抗炎因子和

免疫蛋白,同时*MnSAA*基因沉默后嗜水气单胞菌感染也不能上调CD36的表达来绑定SAA和调节SAA诱导的细胞因子分泌。总之,*MnSAA*基因沉默后日本沼虾对抗嗜水气单胞菌感染的免疫功能降低,图9-d中日本沼虾在感染嗜水气单胞菌后,累积死亡率与对照组相比不断升高即证明了这一结论。

综上所述,本研究克隆得到了日本沼虾SAA(*MnSAA*)基因cDNA全长序列。该基因所编码的*MnSAA*蛋白具有1个SAA结构域,属于A-SAA,在进化上与无脊椎动物香港牡蛎的亲缘关系最近。*MnSAA*基因在日本沼虾的各组织和各生长阶段均有表达,分别在肝胰腺和成虾中的表达量最高。在日本沼虾感染溶壁微球菌、嗜水气单胞菌和白斑综合征病毒后12~72 h,其血淋巴和肝胰腺中的*MnSAA*基因表达量与对照组相比均显著升高。*MnSAA*基因沉默后,日本沼虾肝胰腺中AP-1和CD36基因分别在其感染嗜水气单胞菌后12~72 h和6~72 h与对照组相比显著下降,其累积死亡率在感染嗜水气单胞菌后与对照组相比升高。*MnSAA*在日本沼虾的抗菌免疫防御中具有重要的作用,同时也具有一定的抗病毒功能,本研究为日本沼虾抗病机理的研究奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] Cray C, Zaias J, Altman N H. Acute phase response in animals: a review[J]. *Comparative Medicine*, 2009, 59(6): 517-526.
- [2] Uhlar C M, Whitehead A S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265(2): 501-523.
- [3] Kushner I. The phenomenon of the acute phase response[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982, 389(1): 39-48.
- [4] Jensen L E, Whitehead A S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response[J]. *Biochemical Journal*, 1998, 334(3): 489-503.
- [5] Bayne C J, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 725-743.
- [6] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1999, 340(6): 448-454.

- [7] Steel D M, Whitehead A S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein[J]. *Immunology Today*, 1994, 15(2): 81-88.
- [8] Villarroel F, Casado A, Vásquez J, *et al.* Serum amyloid A: a typical acute-phase reactant in rainbow trout?[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(10): 1160-1169.
- [9] De Beer M C, Kindy M S, Lane W S, *et al.* Mouse serum amyloid A protein (SAA5) structure and expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(6): 4661-4667.
- [10] Whitehead A S, De Beer M C, Steel D M, *et al.* Identification of novel members of the serum amyloid A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(6): 3862-3867.
- [11] Lin B, Chen S W, Cao Z, *et al.* Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4): 295-301.
- [12] Rebl A, Goldammer T, Fischer U, *et al.* Characterization of two key molecules of teleost innate immunity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): MyD88 and SAA[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 131(1-2): 122-126.
- [13] Wei J G, Guo M L, Ji H S, *et al.* Molecular cloning, characterization of one key molecule of teleost innate immunity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): serum amyloid A[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 296-304.
- [14] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 34.
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 34(in Chinese).
- [15] Qian Z Y, He S L, Liu T, *et al.* Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2014, 172: 10-30.
- [16] Bai H K, Qiao H, Li F J, *et al.* Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation[J]. *Gene*, 2015, 562(1): 22-31.
- [17] Zou L H, Liu B Z. Identification of a Serum amyloid A gene and the association of SNPs with *Vibrio*-resistance and growth traits in the clam *Meretrix meretrix*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 301-309.
- [18] Qu F F, Xiang Z M, Yu Z N. The first molluscan acute phase serum amyloid A (A-SAA) identified from oyster *Crassostrea hongkongensis*: molecular cloning and functional characterization[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 145-151.
- [19] 陈长强. 血清淀粉样蛋白A在疾病应用中的研究进展[J]. *检验医学*, 2012, 27(9): 776-779.
- Chen C Q. Research progress of serum amyloid A in disease application[J]. *Laboratory Medicine*, 2012, 27(9): 776-779(in Chinese).
- [20] Meek R L, Urieli-Shoval S, Benditt E P. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(8): 3186-3190.
- [21] Baumann H, Gauldie J. The acute phase response[J]. *Immunology Today*, 1994, 15(2): 74-80.
- [22] Revathy K S, Umasuthan N, Whang I, *et al.* A novel acute phase reactant, serum amyloid A-like 1, from *Oplegnathus fasciatus*: genomic and molecular characterization and transcriptional expression analysis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 37(2): 294-305.
- [23] Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview[J]. *The Veterinary Journal*, 2004, 168(1): 28-40.
- [24] Zhou X X, Wang L, Feng H, *et al.* Acute phase response in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) with *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(4): 441-451.
- [25] Lee H Y, Kim M K, Park K S, *et al.* Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes[J]. *Molecular Pharmacology*, 2006, 70(1): 241-248.

- [26] Song C J, Hsu K, Yamen E, *et al.* Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207(2): 374-383.
- [27] Lee H Y, Kim S D, Shim J W, *et al.* Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181(6): 4332-4339.
- [28] Lee H Y, Kim M K, Park K S, *et al.* Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 989-998.
- [29] Badolato R, Wang J M, Murphy W J, *et al.* Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 180: 203-209.
- [30] He R L, Zhou J, Hanson C Z, *et al.* Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2[J]. *Blood*, 2009, 113(2): 429-437.
- [31] Xu L, Badolato R, Murphy W J, *et al.* A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion[J]. *The Journal of Immunology*, 1995, 155(3): 1184-1190.
- [32] Cheng N, He R, Tian J, *et al.* Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181(1): 22-26.
- [33] Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, *et al.* Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist?[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, 83(5): 1174-1180.
- [34] Björkman L, Karlsson J, Karlsson A, *et al.* Serum amyloid A mediates human neutrophil production of reactive oxygen species through a receptor independent of formyl peptide receptor like-1[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, 83(2): 245-253.
- [35] Baranova I N, Bocharov A V, Vishnyakova T G, *et al.* CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(11): 8492-8506.
- [36] Gatt M E, Urieli-Shoval S, Preciado-Patt L, *et al.* Effect of serum amyloid A on selected *in vitro* functions of isolated human neutrophils[J]. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1998, 132(5): 414-420.
- [37] Linke R P, Bock V, Valet G, *et al.* Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 176(3): 1100-1105.
- [38] Hatanaka E, Pereira Ribeiro F, Campa A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 38(1): 81-84.
- [39] Furlaneto C J, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 268(2): 405-408.
- [40] 戴黎明, 李力仙. TNF- α 和IL-1的共同信号通路[J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 1999, 26(3): 125-127.
- [40] Dai L M, Li L X. Common signaling pathway of TNF- α and IL-1[J]. *Foreign Medical Sciences Section on Neurology and Neurosurgery*, 1999, 26(3): 125-127(in Chinese).
- [41] 肖桃源, 邓文蓉. SAA的受体及其相关信号通路[J]. *医药前沿*, 2013(6): 66-67.
- [41] Xiao T Y, Deng W R. SAA receptors and related signaling pathways[J]. *Medical Frontiers*, 2013(6): 66-67(in Chinese).

Molecular cloning and characterization of *serum amyloid A* gene and the analysis of its immune function in *Macrobrachium nipponense*

JIANG Hongxia, LIN Xinhui, LI Shukai, WANG Jiechen, LI Xuejun*

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In order to study the function of *serum amyloid A* (*SAA*) in the immune defense of *Macrobrachium nipponense*, the full-length cDNA sequence of the *SAA* gene in *M. nipponense*, named *MnSAA*, was cloned using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The expression levels of *MnSAA* in different tissues and different development stages of *M. nipponense*, and the expression profile of *MnSAA* in hemocytes and hepatopancreas of *M. nipponense* after *Micrococcus lysolei* (*Micrococcus lysolei*), *Aeromonas hydrophila* and white spot syndrome virus (WSSV) infections were also examined by quantitative real-time PCR (QPCR). At the same time, the expression changes of *activator protein-1* (*AP-1*) and *class B scavenger receptor* (*CD36*) genes in hepatopancreas and cumulative mortality of prawn after *MnSAA* gene silencing plus *A. hydrophila* infection were further investigated using RNA interference (RNAi) technology. The results showed that the full-length cDNA of *MnSAA* was 649 bp, including a 21 bp 5'-untranslated region (UTR), a 232 bp 3'UTR, and a 369 bp open reading frame (ORF) encoding a deduced protein with 131 amino acids. Sequence and phylogenetic analyses revealed that *MnSAA* belongs to acute-serum amyloid A (A-SAA) and had the closest relationship with the invertebrate *Crassostrea hongkongensis*. mRNA expression analysis revealed that *MnSAA* gene was ubiquitously expressed in various tissues and growth stages of *M. nipponense*, and abundantly expressed in the hepatopancreas and adult prawn stage. Pathogen infection experiment showed that the expressions of *MnSAA* in hemocytes and hepatopancreas were all significantly increased compared with the control group after *M. lysolei*, *A. hydrophila* and WSSV infections for 12-72 h. The RNAi experiment showed that after *MnSAA* silencing, *AP-1* and *CD36* gene expressions in hepatopancreas of *M. nipponense* were all significantly decreased compared with the control group after 12-72 h and 6-72 h, respectively, of *A. hydrophila* infection, and the cumulative mortality of prawn was increased compared with the control group after *A. hydrophila* infection. These results suggested that *MnSAA* is involved in the activity of anti-pathogen infection in *M. nipponense* and plays an important role in the immune defense system of *M. nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; serum amyloid A; gene cloning; tissue expression; pathogen infection; RNA interference

Corresponding author: LI Xuejun. E-mail: xjli@htu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31972812); Key Projects of Science and Technology Research of the Department of Education in Henan Province (13A240509); the Fund for the Doctoral Program of Henan Normal University (qd17142); Key Technology Research Project of Henan Province (192102110081); Special Project of Surplus Funds from Personal Scientific Research Projects of Henan Normal University (20180531)