



日本沼虾表皮酚氧化酶原激活因子基因的克隆及功能

彭彦新, 岳凯迪, 杜娟, 宁黔冀*

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为了探索表皮酚氧化酶原激活因子 (prophenoloxiase activating factors, PPAFs) 在甲壳动物免疫反应中的功能, 基于前期转录组数据, 本实验利用 PCR 和 RACE 技术从日本沼虾表皮克隆并鉴定了一个新的 PPAF 基因, 命名为 *MnPPAF1* (GenBank 登录号为 OP784577), 利用生物信息学、实时荧光定量 PCR (qPCR) 和 RNA 干扰 (RNAi) 等方法, 研究了该基因序列特征、时空表达模式、嗜水气单胞菌攻毒后表皮 *MnPPAF1* 的转录水平、酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 活性以及日本沼虾死亡率的变化。结果显示, *MnPPAF1* cDNA 全长 1 718 bp, 编码 460 个氨基酸, 具有夹子结构域丝氨酸蛋白酶 (clip-domain serine proteinases, Clip-SPs) 和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (trypsin-like serine proteases, Tryp-SPs) 结构域。*MnPPAF1* 在腹背部的表皮、血细胞、鳃、胃、心脏、肝胰腺等多种组织均有表达; 表皮 *MnPPAF1* 的表达与蜕皮周期有关, 与蜕皮间期 (C 期) 相比, 蜕皮前晚期 (D₄ 期) *MnPPAF1* 表达量增加 857%。嗜水气单胞菌攻毒后, 表皮 *MnPPAF1* 表达水平在 6 h 达到了峰值, 较对照组增加 227%, 而表皮 PO 活性在 12 h 达到峰值, 同比增加 24%。在腹背部第 2 节注射 3 μg dsRNA 溶液, 每 12 小时注射 1 次, 共注射 3 次, 最后 1 次注射后 12 h, 干扰效率最高, 表皮 *MnPPAF1* 表达同比下降 71.79%, 至 24 h, 表皮 PO 活性降低 72.31%。在干扰效率最高的时间点攻毒, 在 120 h, 攻毒+干扰组虾的累计死亡率比攻毒+未干扰组增加 26%。结果表明, *MnPPAF1* 是表皮重要的免疫因子, 参与调节酚氧化酶原系统的激活, 该基因表达下调能显著增加嗜水气单胞菌感染虾的死亡率。本研究为阐明表皮在甲壳动物免疫系统中的作用积累了资料。

关键词: 日本沼虾; 表皮; *MnPPAF1*; RNAi; 嗜水气单胞菌

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

甲壳动物主要依靠天然免疫系统防御病原体入侵, 其中包括体液免疫^[1]。酚氧化酶原 (prophenoloxidase, proPO) 激活系统是重要体液免疫反应之一, 类似于脊椎动物的补体系统, 具有细胞因子、调理素和杀菌活性等功能^[2]。酚氧化酶原激活因子 (prophenoloxiase activating factors, PPAFs) 作为 proPO 激活系统的关键因子, 水解 proPO 产

生活性酚氧化酶 (phenoloxidase, PO)^[3-4]。PPAFs 属于夹子结构域丝氨酸蛋白酶 (clip-domain serine proteinases, Clip-SPs) 家族, 已经在一些甲壳动物中报道, 如在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 血细胞^[5-8]、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 肝胰腺^[9]、三疣梭子蟹 (*Por-*

收稿日期: 2022-03-31 修回日期: 2022-11-14

资助项目: 河南省自然科学基金 (182300410033)

第一作者: 彭彦新 (照片), 从事甲壳动物生长发育调控研究, E-mail: Pengyanxin2021@163.com

通信作者: 宁黔冀, 从事经济甲壳动物 (虾类) 生长发育调控研究, E-mail: nqjnqj1964@163.com



tunus trituberculatus) 眼柄^[10] 等组织克隆并鉴定的 PPAFs 基因全长; 病原微生物可诱导 PPAF 基因表达^[10-11], 敲降 PPAF 基因导致 PO 活性下降^[6-7]。目前, 对甲壳动物表皮 PPAFs 的研究亦有报道, 如蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)^[12] 和斑节对虾^[13] 表皮 PPAF 基因表达变化与蜕皮周期有关, 但涉及表皮 PPAF 的免疫功能尚未见报道。

为了探索表皮 PPAFs 在甲壳动物免疫反应中的作用, 本实验首次克隆了日本沼虾 (*M. nipponense*) 表皮中的一个 PPAF 基因, 命名为 *MnPPAF1*, 对其进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time, qPCR) 和 RNA 干扰 (RNAi) 等方法, 研究了 *MnPPAF1* 的时空表达模式、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 攻毒后表皮 *MnPPAF1* 的转录水平、PO 活性以及日本沼虾死亡率的变化, 研究结果为阐明表皮在甲壳动物免疫系统中的作用积累了资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本沼虾购自河南省原阳黄寺鱼场, 选取体长 (3.5±0.5) cm 的日本沼虾置于实验室玻璃水族箱内。水温 (27±1) °C, 早晚投喂 1 次。饲养 1 周后, 进行实验。嗜水气单胞菌由新乡医学院提供。本研究获得了河南师范大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (审批号为 HNSD-2023-BS0420), 实

验过程中操作人员严格遵守实验动物饲养管理使用指南和伦理规范, 并按照河南师范大学实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 总 RNA 提取以及 cDNA 合成

利用 Mini BEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒提取日本沼虾组织 (鳃、胃、肌肉、心脏、血细胞、肝胰腺和腹背部的表皮) 和不同蜕皮时期腹背部的表皮总 RNA, 使用凝胶电泳、超微量紫外分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 分别检测总 RNA 的完整性、浓度。按照试剂盒 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit (TaKaRa, 日本) 说明书合成 cDNA 第一条链, -20 °C 保存备用。参照 Kirirat 等^[14] 方法鉴定蜕皮周期。

1.3 *MnPPAF1* 的 cDNA 序列全长克隆

根据转录组测序获得 *MnPPAF1* 的保守序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (*MnPPAF1*-F 和 *MnPPAF1*-R, 表 1), 扩增保守序列; 根据 *MnPPAF1* 的 3' RACE 和 5' RACE 嵌套引物 (表 1), 利用 RACE 的方法分别扩增 3' 末端和 5' 末端 cDNA 序列。PCR 产物经电泳后, 按照 HiPure Gel Pure DNA Mini Kit (广州美基生物科技有限公司) 的方法回收纯化, 纯化产物连接 pMD19-T 载体, 转化到 DH 5 α 感受态细胞, 筛选阳性单克隆菌株送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。根据测序

表 1 实验中的引物序列

Tab. 1 Primers used in the experiment

引物 primers	序列 (5'-3') sequences	功能 function
<i>MnPPAF1</i> -F	CTGGACTCCGTGCTTGTA	RT-PCR
<i>MnPPAF1</i> -R	CTCAGTAAGCCTTCGTCAG	RT-PCR
<i>MnPPAF1</i> -3'Out	TCTCTCATTCATCCTCAGGTTGTCC	3'-RACE
<i>MnPPAF1</i> -3'In	GCTCTCCACTGGTCTGTGCGGTAG	3'-RACE
<i>MnPPAF1</i> -5'Out	CAGTGCAAAATCGTTCAGAGGG	5'-RACE
<i>MnPPAF1</i> -5'In	GAACGGTTGGGTCCAATCCTAATGT	5'-RACE
<i>MnPPAF1</i> -qF	TCATTACTGATGGTGCCGGCC	qPCR
<i>MnPPAF1</i> -qR	CATTTTGTCTGGATGGGAGGATTG	qPCR
β -actin-qF	TATGCACTTCTCATGCCATC	内参引物 reference primer
β -actin-qR	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	内参引物 reference primer
<i>MnPPAF1</i> ds-F	GATCACTAATACGACTCACTATAGG GGTTTGCCACGTTCTAGCCACC	RNAi
<i>MnPPAF1</i> ds-R	GATCACTAATACGACTCACTATAGG GCCATCCAGGGAAATTCACCAAACCT	RNAi

结果, 使用 DNAMAN 软件拼接获得 *MnPPAF1* 的全长 cDNA 序列。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI ORF finder 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析开放阅读框; BLAST 软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析氨基酸序列同源性; 使用 Conserved domain Search 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测保守结构域; 使用 SignalP 5.0 软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 预测信号肽; 使用 ExPASy 软件 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 预测蛋白质的理论等电点与相对分子量; 通过 Clustal X 程序进行多序列比对并利用 MEGA 5.1 软件的邻接法 (NJ) 构建系统发育树。

1.5 *MnPPAF1* 的时空表达

以 β -actin 作为内参基因, 利用逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 的方法检测 *MnPPAF1* 的组织表达, 50 μ L 反应体系: 2 \times Es Taq Master Mix 25.0 μ L, 各组织 cDNA 模板 1.0 μ L, 上下游引物各 2.0 μ L, 灭菌 ddH₂O 20.0 μ L; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min; 电泳检测不同组织对应的条带亮度。

利用 qPCR 的方法检测 *MnPPAF1* 在蜕皮周期过程中的表达 (SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒, TaKaRa, 日本)。20 μ L 反应体系: AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10.0 μ L、表皮 cDNA 模板 2.0 μ L、上下游引物各 0.8 μ L、灭菌 ddH₂O 6.4 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 60 s, 97 $^{\circ}$ C 变性 1 s (熔解曲线程序)。每个样品来源于 3 尾实验虾, 重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算基因的相对表达量, 进行 *t* 检验, 分析显著性差异 ($P < 0.05$ 代表差异显著, $P < 0.01$ 代表差异极显著)。

1.6 嗜水气单胞菌攻毒对表皮 *MnPPAF1* 的表达及 PO 活性的影响

随机挑选处于蜕皮间期的健康幼虾平均分成攻毒组和对照组各 50 尾, 分别在腹背部第 2 节注

射 2 μ L 嗜水气单胞菌菌悬液 (2.5×10^8 CFU/mL) 或磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 注射后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 各取 3 尾实验虾的表皮, 分别测定 *MnPPAF1* 表达水平和 PO 活性。PO 活性测定参照 Phupet 等^[15] 方法。

1.7 *MnPPAF1* 的 dsRNA 干扰效果

使用含有 T7 启动子的干扰链的引物 (表 1) 和表皮 cDNA 模板, 按照 *in vitro* Transcription T7 Kit (TaKaRa, 日本) 的方法合成 dsRNA。随机挑选处于蜕皮间期健康幼虾分为干扰组 and 对照组各 50 尾, 分别在腹背部第 2 节注射 3 μ g dsRNA 溶液或等体积的 PBS。每 12 h 注射一次, 共注射 3 次, 以加强敲除效果。在最后一次注射后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 各取 3 尾实验虾的表皮, 分别测定 *MnPPAF1* 表达水平和 PO 活性。

1.8 嗜水气单胞菌攻毒对日本沼虾死亡率的影 响

随机挑选蜕皮间期健康幼虾分为对照组、攻毒+未干扰组和攻毒+干扰组各 50 尾, 每个组设置 3 个重复。攻毒+干扰组在第 3 次注射 dsRNA 溶液后 12 h, 注射 2 μ L 嗜水气单胞菌菌悬液 (2.5×10^8 CFU/mL); 对照组、攻毒+未干扰组在第 3 次注射等体积 PBS 后 12 h, 分别注射 2 μ L PBS 或嗜水气单胞菌菌悬液 (2.5×10^8 CFU/mL)。在最后一次注射后 0、6、12、24、48、72、96 和 120 h 分别计算各组日本沼虾的累计死亡率。

2 结果

2.1 *MnPPAF1* 的克隆和生物信息学分析

MnPPAF1 的 cDNA 全长 1 718 bp, ORF 长度为 1 383 bp, 其中 5'UTR 为 87 bp, 3'UTR 为 248 bp, 编码 460 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子量和等电点分别为 49.34 ku 和 5.13。该蛋白 N 端具有一个 19 个氨基酸组成的信号肽和 Clip-SPs 结构域, C 端含有一个胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (trypsin-like serine proteases, Tryp-SPs) 结构域 (图 1)。Tryp-SPs 结构域具有保守的催化三联体 (H₂₃₇-D₂₈₇-S₃₉₀) (图 2)。

经 BLAST 比对, *MnPPAF1* 的氨基酸序列和其他甲壳动物 PPAF 同源性在 52.04%~66.38%, 如斑节对虾 (ABE03741.1) 为 66.38%, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*, AFW98993.1) 为 65.82%,

```

1   gagcagttggctctctggactccgtgtctgtgtacaacagtgattcgacgatctatttctaactctgccttcgcaaaagaaatcaga
88   ATCAAGTTTGCCACGTTCTAGCCACCGTGGTGGCTTTGGCTGGTGTCAAGAATGGATGCTTCTGGTGGGAACCGAATAACAACCTGC
1   M K F A T F L A T V V A L A G V T N G C F W W E P N N N C
175  GATGAAAATGGAGGCGCAGCTGCTGCTGAGCAAACCAAGCGGTGAAATGCCCTGTTGCAAAATACGACCGAAGAACAGCTCGTTCT
30   D E N G G A A A A A A N P S G G N A P V A N T T E T A R S
262  AATCCGAATCCCAACGATCGCATCAGCAACGTTGGAGGTGCTGCAAACGTCACCGTACCCTTAACGACGTTCCAGCACCCTTAAC
59   N P N P N D R I S N V G G A A N V P V P L N D V P A P L N
349  GCCAGCCACGCCGTCGGAGATCTGAAAATTACTCACCTGTAACAACAACCTAGGCCGATGCGTTCATATTACCTTTGCCGAGAA
88   A S P A V G D P E S Y S P C N N N L G R C V P Y Y L C R E
436  GGAATATCATTACTGATGGTCCGGCCTTATTGACATTAGGATTGGACCAACCGTCTGGGGCCAGTGGTGATACAGTCTCCAGT
117  G N I I T D G A G L I D I R I G P N R S G A S G D T V S S
523  TCCGAATGCCACAGTTTTGGATGTTTGTGCAACAGCCAGAACAGAACCTATTCCAATCCCAATCCTCCATCCAGCAAAAA
146  S E C P Q F L D V C C N S P E T E P I P I P N P P I Q Q K
610  TGTGGATTACGAAATGAAGAAGGTGCCACACGAATCTTAGGATTCAAGGACAATCAGGCCAGTTGGTGAATTTCCCTGGATG
175  C G L R N E E G V H T R I L G F K D N Q A Q F G E F P W M
697  GCAGCCATCTTGAGGAAGAATTCATCGAAGATAAGGAAATCAGCCTCTATGTATGTTGGAGGATCTCTATTCACTCCTCAGTTGTC
204  A A I L R K E F I E D K E I S L Y V C G G S L I H P Q V V
784  CTAACAGCTGCCCACTGCGTTTCATTCAAAGGACGCCAAGTCTCTCAAGGTACGCTCTGGGAGAGTGGGACCCAGAGAACATACGAA
233  L T A A H C V H S K D A K S L K V R L G E W D T Q R T Y E
871  CTGTACCTCACATCGACCGTAACGTCGTAGATGTAGTACCCACCCAGGTTTCAACGACGAGTCCCTCTGGAACGATTTTGCCTG
262  L Y P H I D R N V V D V V T H P G F N A G A L W N D F A L
958  CTGTTTTGGAAACTCCAGCTGACCTTGCCCTAATGTAGGAAGTGTATGCTTCCAGTTCAAGGCCAGAAATTTGATCTCAACACT
291  L F L E T P A D L A P N V G T V C L P V Q G Q K F D L N T
1 045 TGCTGGCTACTGGCTGGGAAAGGACGAGTTTGGTAAAGGAGTAACATCAGAATGTACTCAAGGAAGTAGCACTGCCCATCGTT
320  C W A T G W G R D E F G K G G N Y Q N V L K E V A L P I V
1 132 CCTAGGGCCCAATGTGAACTGCTCTCAGGACCACCGCTGGGAATGTTCTCAAGCTTGACCAGTCTTTATGTGTCTGGAGGT
349  P R A Q C E T A L R T T R L G M F F K L D Q S F M C A G G
1 291 AAACCGGTCTGGATACATGAAGGTGATGGAGGCTCTCCACTGGTCTGTGCGGTAGCACCAAACTACTCATACTATTGTGCAGGGC
378  K P G L D T C K G D G G S P L V C A V A P N T H T Y V Q A
1 306 GGTATCGTTGCATGGGCATGGCTGTGGAGAAAATGGTATACCTGGAGTCTATGCCGATGTTGCAGGGCCTCAGACTGGATTATT
407  Q I V A W G I G C G E N G I P G V Y A D V A G A S D W I I
1 393 CAAAAGGCTGACGAAGGCTTACTGAGGTTGATGGCTCCGAACCCGAAAACCTACTGGCGAAATACAAGAACACTAActctagatg
436  Q K A D E G L L R L Y G V R T T E N Y W R N Y K N *
1 480 agttatctatttatgttagacacctatattcatcttttctcaeccacagcaaatcttatgttgaagttttcagacatata
1 567 gggcgtataggcgcaaacatgttatatgcattgatacacttccctccattagtaactatattagtagtgattttagtttttcta
1 654 tgtgatatttaattacctaatttatattatataaatttatacattctaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 MnPPAF1 的 cDNA 序列全长和推导的氨基酸序列

黑色阴影代表起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA); 波浪线代表 poly A 加尾信号序列; 浅灰色阴影代表信号肽; 下划线和双层下划线分别代表 Clip-SPs 结构域和 Tryp-SPs 结构域。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of MnPPAF1

Black shadows represent the start codon (ATG) and the stop codon (TAA); wavy line represented the poly A tail-signal sequence; light gray shadow represented the signal peptide; Clip-SPs domain was underlined, and Tryp-SPs domain was double-layer respectively.

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*, ACU65942.1) 为 52.04% (图 2)。基于氨基酸序列构建系统进化树, 发现 *MnPPAF1* 与对虾属 PPAFs 聚为一支 (图 3)。

2.2 MnPPAF1 的时空表达

MnPPAF1 在腹背部的表皮、鳃、胃、心脏、

肝胰腺、血细胞等多种组织均有表达, 但肌肉组织不表达 (图 4)。以蜕皮间期 (C 期) 为对照, 表皮 *MnPPAF1* 在蜕皮前后期 (D₄ 期) 和蜕皮后早期 (A 期) 分别增加 857%、58% ($P<0.01$), 而蜕皮后晚期 (B 期) 降低 40% ($P<0.05$) (图 5)。

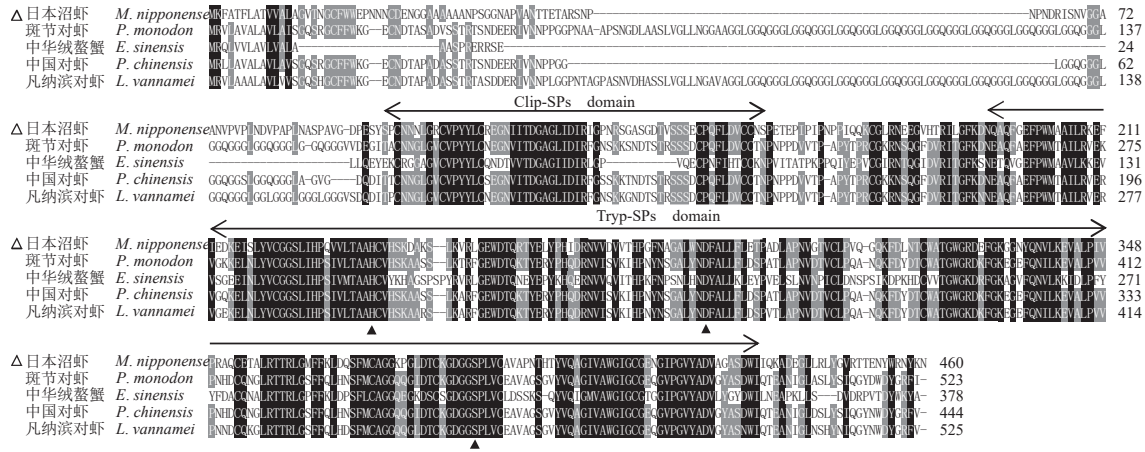


图2 MnPPAF1与其他甲壳动物PPAF的多序列比对

斑节对虾 (ABE03741.1), 中华绒螯蟹 (ACU65942.1), 中国对虾 (AFW98986.1), 凡纳滨对虾 (AFW98993.1); 黑色三角形分别代表催化三联体 (H、D、S), 箭头线所指为 Clip-SPs 结构域和 Tryp-SPs 结构域。

Fig. 2 Alignment of MnPPAF1 with PPAF from other crustaceans

P. monodon (ABE03741.1), *E. sinensis* (ACU65942.1), *P. chinensis* (AFW98986.1), *L. vannamei* (AFW98993.1); black triangle represents catalytic triad (H, D, S), respectively. The arrow lines refer to the Clip-SPs domain and the Tryp-SPs domain.

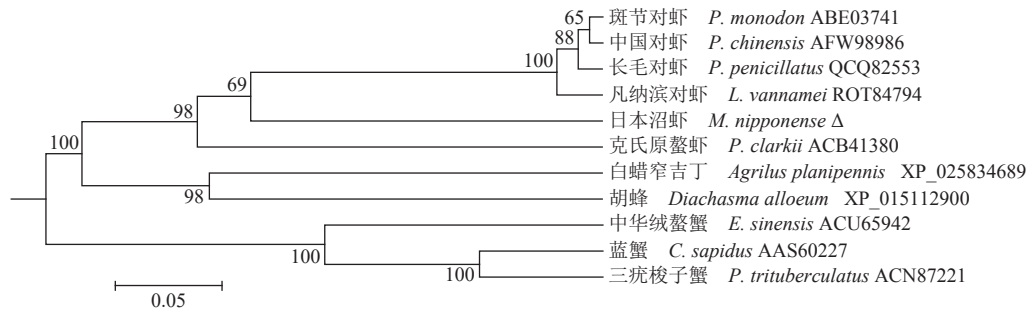


图3 MnPPAF1 序列的 NJ 系统进化树

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree of MnPPAF1

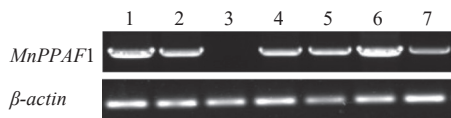


图4 MnPPAF1 在各组织的表达

1. 鳃, 2. 胃, 3. 肌肉, 4. 心脏, 5. 肝胰腺, 6. 血细胞, 7. 腹背部的表皮。

Fig. 4 Expression of MnPPAF1 at different tissues

1. gill, 2. stomach, 3. muscle, 4. heart, 5. hepatopancreas, 6. hemocyte, 7. ventral and dorsal epidermis.

2.3 嗜水气单胞菌攻毒对表皮 MnPPAF1 的表达及 PO 活性的影响

嗜水气单胞菌对表皮 MnPPAF1 表达和 PO 活性的诱导效应出现在攻毒后早期。与对照组相比, 攻毒后 3 h, MnPPAF1 表达量显著增加, 6 h 达到峰值, 增加 227% ($P<0.01$, 图 6-a); 表皮 PO 活性也呈现类似的变化趋势 (图 6-b), 攻毒后 12 h 达到峰值, 酶活性比对照组增加 24% ($P<0.05$)。

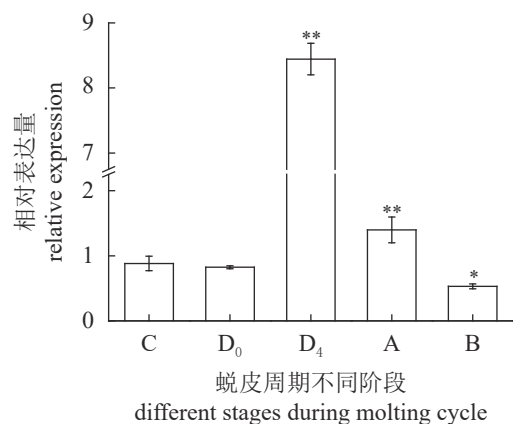


图5 表皮 MnPPAF1 在蜕皮周期中的表达

C. 蜕皮间期, D₀. 蜕皮前早期, D₄. 蜕皮前晚期, A. 蜕皮后早期, B. 蜕皮后晚期; C 为参照, *代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$; 下同。

Fig. 5 Expression of MnPPAF1 in epidermis during the molting cycle

C. intermolt, D₀. early premolt, D₄. later premolt, A. early postmolt, B. later postmolt; C is the calibrator, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; the same below.

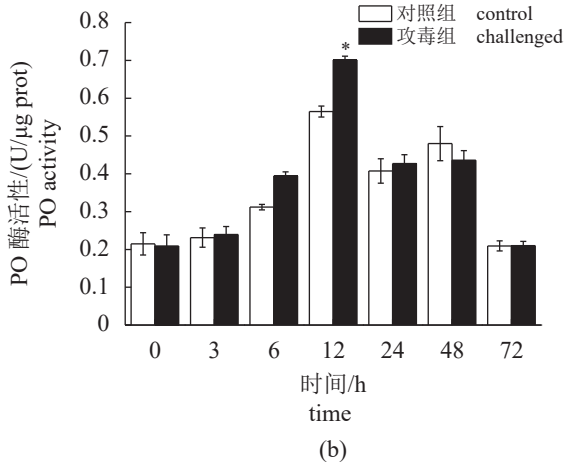
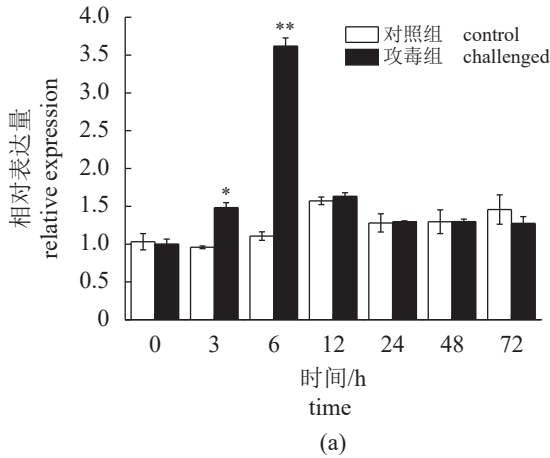


图 6 嗜水气单胞菌攻毒对表皮 *MnPPAF1* 的表达 (a) 及 PO 活性 (b) 的影响

Fig. 6 Effects of *A. hydrophila* challenge on the expression of *MnPPAF1* (a) and PO activity (b) in the epidermis

2.4 dsRNA 对 *MnPPAF1* 的干扰效果

注射 dsRNA 能显著降低 *MnPPAF1* 的表达。注射后 3~48 h, 干扰组 *MnPPAF1* 的表达量较对照组明显降低 ($P < 0.05$, 图 7-a), 在 12 h 获得最大干扰效率 (71.79%); 在 12~48 h, 干扰组 PO 活性比对照组显著降低 ($P < 0.05$), 尤其在 24 h, PO 活性降低 72.31% (图 7-b)。

2.5 嗜水气单胞菌攻毒对日本沼虾死亡率的影响

dsRNA 干扰后嗜水气单胞菌攻毒可导致日本沼虾死亡率明显增加 (图 8)。攻毒后 120 h, 攻毒+未干扰组日本沼虾的累计死亡率为 58%, 而对照组仅为 2%。攻毒后 12 h, 攻毒+干扰组日本沼虾的累计死亡率明显增加 ($P < 0.01$), 至 120 h, 比攻

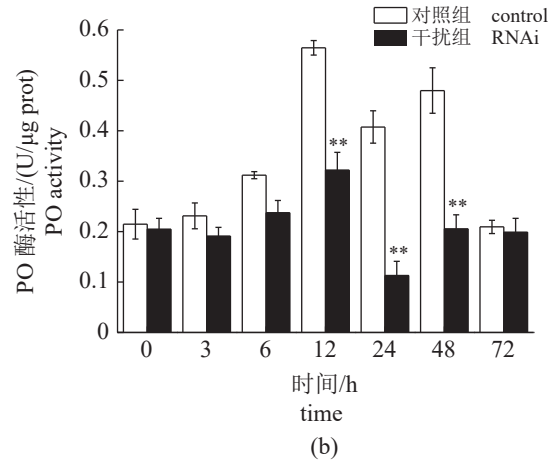
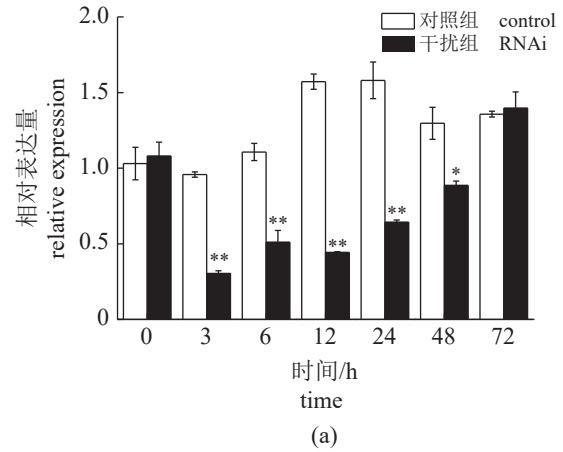


图 7 RNAi 对表皮 *MnPPAF1* 的表达 (a) 及 PO 活性 (b) 的影响

Fig. 7 Effects of RNAi on the expression of *MnPPAF1* (a) and PO activity (b) in the epidermis

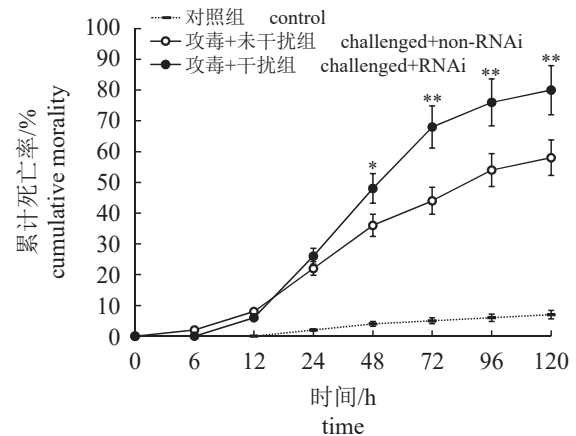


图 8 嗜水气单胞菌攻毒对日本沼虾死亡率的影响以攻毒+未干扰组为参照。

Fig. 8 Effects of *A. hydrophila* challenge on the mortality of *M. nipponense*

The challenged + non-RNAi group is the calibrator.

毒+未干扰组增加 26%。

3 讨论

日本沼虾表皮 *MnPPAF1* 的蛋白具有 Clip-SPs 和 Tryp-SPs 结构域, 符合典型夹子结构域丝氨酸蛋白酶结构特征^[16]。Clip-SPs 结构域最初在中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 的凝血酶原中发现^[17], 之后在拟穴青蟹^[8]、三疣梭子蟹^[10] 和斑节对虾^[13] 等甲壳动物 PPAF 中表征。Tryp-SPs 结构域表现典型的丝氨酸蛋白酶特征, 含有催化三联体结构, 与 *MnPPAF1* 所具有 H₂₃₇-D₂₈₇-S₃₉₀ 的结构一致^[8]。系统进化树分析表明, *MnPPAF1* 与对虾属 PPAFs 聚为一支, 亲缘关系较近。

本研究发现, *MnPPAF1* 除了在腹背部的表皮表达外, 在鳃、胃等多种组织中均可表达, 与斑节对虾 *PmPPAF* 表达基本类似^[13]。甲壳动物各组织 PPAFs 基因的表达水平差异较大, 有的在鳃和血细胞高表达, 有的分别在眼柄、肝胰腺高表达^[9-10,18]。在蜕皮周期中, 表皮 *MnPPAF1* 在蜕皮前期呈高表达, 与蓝蟹和斑节对虾表皮中 PPAF 基因相似, 这可能与蜕皮周期过程中表皮上皮细胞活性的变化有关^[12-13]。

嗜水气单胞菌攻毒能明显上调表皮 *MnPPAF1* 转录水平, 提示表皮 *MnPPAF1* 参与动物的免疫应答反应, 这与维氏气单胞菌 (*A. veronii*) 或副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 攻毒后拟穴青蟹血细胞、日本沼虾肝胰腺等 PPAFs 基因表达变化基本一致^[19-20]。proPO 激活系统是甲壳动物最重要的防御系统之一, 通常使用 PO 活性来检测 PPAF 表达效应^[6-7]。结果显示, 攻毒后 12 h, 表皮 PO 活性显著增加, 呈现出与 *MnPPAF1* 转录水平相似的变化趋势。这在罗氏沼虾也有所报道, 感染传染性皮下及造血组织坏死病毒 (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV) 后, 肝胰腺 PPAF 基因 mRNA 水平在攻毒后 3 h 增加, PO 活性在 6 h 开始增加^[9]。敲降 PPAFs 基因, 血淋巴中 PO 活性下降^[6-7,18], 本实验结果亦显示, 干扰 *MnPPAF1* 的表达, 表皮 PO 酶活性降低, 表明表皮 *MnPPAF1* 应该参与日本沼虾 proPO 系统的激活。

PPAF 基因下调将导致甲壳动物抗感染能力降低。据报道, RNAi 抑制斑节对虾血细胞 PPAF 基因表达后哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 攻毒 120 h, 虾累计死亡率比攻毒的未干扰组显著增加且清除菌

的能力显著下降^[7]。嗜水气单胞菌攻毒可导致日本沼虾死亡率增加^[21-22], dsRNA 抑制 *MnPPAF1* 表达后再攻毒, 日本沼虾的死亡率同比显著增加, 进一步表明表皮 *MnPPAF1* 在日本沼虾体内具有免疫功能。

综上, *MnPPAF1* 是表皮重要的免疫因子, 参与调节 proPO 系统的激活, 该基因表达下调能显著增加嗜水气单胞菌感染日本沼虾的死亡率。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Yang H, Ji T W, Xiong H R, *et al.* A trypsin-like serine protease domain of masquerade gene in crayfish *Procambarus clarkii* could activate prophenoloxidase and inhibit bacterial growth[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 117: 103980.
- [2] Cerenius L, Söderhäll K. Immune properties of invertebrate phenoloxidases[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 122: 104098.
- [3] Zhuang X N, Luan Y Y, Lv T R, *et al.* PAPI activates the prophenoloxidase system against bacterial infection in *Musca domestica*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 124: 104184.
- [4] Ding Z L, Kong Y Q, Chen L Q, *et al.* A clip-domain serine proteinase homolog (SPH) in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* provides insights into its role in innate immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 336-342.
- [5] Wang R G, Lee S Y, Cerenius L, *et al.* Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(4): 895-902.
- [6] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, *et al.* Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(7): 811-820.
- [7] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, *et al.* *PmPPAF2*, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(1): 115-124.
- [8] Wang J, Jiang K J, Zhang F Y, *et al.* Characterization

- and expression analysis of the prophenoloxidase activating factor from the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3): 8847-8860.
- [9] Arockiaraj J, Easwaran S, Vanaraja P, *et al.* Prophenoloxidase activating enzyme-III from giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: characterization, expression and specific enzyme activity[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 1377-1386.
- [10] Cui Z X, Liu Y, Wu D H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(4): 679-686.
- [11] Jang I K, Pang Z G, Yu J P, *et al.* Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *BMC Immunology*, 2011, 12: 70.
- [12] Buda E S, Shafer T H. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(4): 521-531.
- [13] Ma T H T, Benzie J A H, He J G, *et al.* PmPPAF is a prophenoloxidase activating factor involved in innate immunity response of the shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 163-172.
- [14] Kirirat P, Promwikorn W, Thaweethamseewee P. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, 26(5): 765-772.
- [15] Phupet B, Pitakpornprecha T, Baowubon N, *et al.* Lipopolysaccharide- and β -1, 3-glucan-binding protein from *Litopenaeus vannamei*: purification, cloning and contribution in shrimp defense immunity via phenoloxidase activation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 81: 167-179.
- [16] Chu Y, Hong F, Liu Q Z, *et al.* Serine protease SP105 activates prophenoloxidase in Asian corn borer melanization, and is regulated by serpin-3[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45256.
- [17] Muta T, Hashimoto R, Miyata T, *et al.* Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(36): 22426-22433.
- [18] Pang Z G, Kim S K, Yu J P, *et al.* Distinct regulation patterns of the two prophenoloxidase activating enzymes corresponding to bacteria challenge and their compensatory over expression feature in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 158-167.
- [19] Zhang F Y, Jiang K J, Sun M M, *et al.* Multiplex immune-related genes expression analysis response to bacterial challenge in mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 712-716.
- [20] Han C, Zhang Z P, Li Q, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of *Macrobrachium nipponense* in response to *Aeromonas veronii* or *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2022, 40(1): 347-359.
- [21] Chen Q Y, Zhang Z R, Tang H Y, *et al.* *Aeromonas hydrophila* associated with red spot disease in *Macrobrachium nipponense* and host immune-related gene expression profiles[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 182: 107584.
- [22] 王佩, 吕黎, 张哲亮, 等. 咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾 α 2-巨球蛋白基因表达的影响 [J]. *水产学报*, 2014, 38(7): 913-919.
- Wang P, Lü L, Zhang Z L, *et al.* Effect of imidazole derivative KK-42 on expression of α 2-macroglobulin in *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(7): 913-919 (in Chinese).

Cloning and function of prophenoloxidase activating factors gene from the epidermis of *Macrobrachium nipponense*

PENG Yanxin, YUE Kaidi, DU Juan, NING Qianji*

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Prophenoloxidase activation is a crucial innate immune response in crustaceans against pathogenic microorganisms infections, with prophenoloxidase-activating factors (PPAFs) being pivotal in this activation. Despite their importance, crustacean epidermal PPAFs have been seldom studied. To elucidate the role of epidermal PPAFs in crustaceans immunity, a novel PPAF gene, *MnPPAF1* (GenBank accession: OP784577), was cloned and characterized from the epidermis of *Macrobrachium nipponense* using PCR and RACE techniques, based on prior transcriptome data. Bioinformatics, qPCR and RNAi methods were employed to analyze the gene sequence, spatial and temporal expression patterns, transcription levels of epidermal *MnPPAF1*, phenoloxidase (PO) activity, and shrimps mortality following *Aeromonas hydrophila* challenge. The complete *MnPPAF1* cDNA sequence is 1 718 bp, encoding a 460-amino acid protein with clip-domain serine proteinase (Clip-SP) and trypsin-like serine protease (Tryp-SP) domains. *MnPPAF1* expression was detected in various tissues, including ventral and dorsal epidermis, hemocytes, gills, stomach, heart, hepatopancreas, with epidermal expression correlating to the molting cycle. Expression levels in the later premolt stage (D₄ stage) were 857% higher than in the intermolt stage (C stage). After *A. hydrophila* challenge, epidermal *MnPPAF1* expression peaked at 6 h, increasing by 227% over the control group, while epidermal PO activity peaked at 12 h, increasing by 24%. 3 μg of dsRNA solution was injected into the second segment of the abdomen and back every 12 h, 3 injections in total. RNAi has the highest interference efficiency 12 h after the last injection, where the expression of epidermal *MnPPAF1* decreased by 71.79%, compared to the control group, and after 24 h, the activity of epidermal PO decreased by 72.31%. Challenge at the time point with the highest interference efficiency and within 120 h, the cumulative mortality of shrimp in the challenged + RNAi group increased by 26% compared with that in the challenged + non-RNAi group. These findings indicate that *MnPPAF1*, an important immune factor in the epidermis, was involved in regulating the activation of the prophenoloxidase system. The down-regulation of this gene expression can significantly increase the mortality of shrimp infected by *A. hydrophila*. This study contributes to a better understanding of the epidermis's role in the crustaceans immune system.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; epidermis; *MnPPAF1*; RNAi; *Aeromonas hydrophila*

Corresponding author: NING Qianji. E-mail: nqjnqj1964@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Henan Province (182300410033)