

凡纳滨对虾酚氧化酶原激活因子基因的克隆及表达分析

赵永贞, 陈秀荔, 曾地刚, 杨春玲, 彭敏,
何苹萍, 李咏梅, 彭金霞, 韦嫔媛, 陈晓汉*

(广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 为研究酚氧化酶原激活因子 (prophenoloxidase-activating factor, PPAF) 在凡纳滨对虾感染传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 过程中所起的免疫作用, 实验采用逆转录聚合酶链式反应和 cDNA 末端快速扩增技术克隆了凡纳滨对虾 PPAF 基因的全长 cDNA 序列, 并通过实时荧光定量 PCR 技术分析了该基因在正常凡纳滨对虾和感染 IHHNV 凡纳滨对虾不同组织的表达情况。结果显示, 克隆获得了 1 986 bp 凡纳滨对虾 PPAF 基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号 JQ684529), 其中含有一个 1 629 bp 开放阅读框 (ORF), 两翼分别存在 21 bp (5'端) 和 336 bp (3'端) 的非翻译区。该基因的开放阅读框共编码 542 个氨基酸, 氨基酸序列 269~517 处存在功能结构域——丝氨酸蛋白酶结构域, 氨基酸序列 494~502 区域存在一个 ALPHA-2 巨球蛋白免疫蛋白功能位点, 316~321 区域有一个组氨酸酶活性位点; 定量 PCR 分析发现, 该基因无论在正常对虾还是感染 IHHNV 对虾的心脏、肝胰腺、肠、胃和肌肉中的表达量均较低, 在血液和鳃腺中的表达量明显高于其他组织, 但感染 IHHNV 对虾不同组织中 PPAF 基因的表达量均低于正常对虾相应组织中的表达量。定量检测 PPAF 基因在对虾鳃腺组织中的表达情况显示, 对虾感染 IHHNV 后, PPAF 基因的表达量急剧降低, 3 h 时至最低, 之后表达量逐渐上升, 48 h 时达最高值。研究表明, IHHNV 可抑制 PPAF 基因的表达, 因而抑制酚氧化酶原免疫系统的有效激活, 或是其感染对虾并在对虾组织内增殖的原因之一。

关键词: 凡纳滨对虾; 酚氧化酶原激活因子 (PPAF); 传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV); 克隆

中图分类号: Q 785; S 966

文献标志码: A

酚氧化酶原系统是一种普遍存在于无脊椎动物中的重要且已认知的先天性免疫系统, 是无脊椎动物体内主要的免疫应答反应^[1-2]。无脊椎动物中酚氧化酶常以无活性酶原的形式存在于血淋巴细胞和表皮外壳里, 具有单酚氧化酶和醌氧化酶活性双重功能, 只有被酚氧化酶原激活酶激活后才形成具有活性的酚氧化酶, 进而对病原产生免疫反应。酚氧化酶原系统的激活需要多种蛋白酶和一些额外的具有生物功能性的因子共同作用, 类似于脊椎动物的补体系统^[3-4], 其也在甲壳

类动物的蜕皮、外骨骼形成和表皮硬化等生理过程起着重要的作用^[5-8]。酚氧化酶原激活因子 (prophenoloxidase-activating factor, PPAF) 是酚氧化酶原激活酶 (prophenoloxidase-activating enzyme, PPAE) 及其辅因子丝氨酸同系物 (serine proteinase homologues, SPH) 活化的重要因子, 直接影响酚氧化酶的活力和机体的免疫防御机制, 其在海洋无脊椎动物非特异性免疫防御中发挥关键的作用。

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界上

收稿日期: 2013-11-13 修回日期: 2014-05-09

资助项目: 广西自然科学基金项目 (2012GXNSFDA053015); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47); 国家现代农业产业技术体系广西凡纳滨对虾产业创新团队项目 (nycytxgxcxt-03-14)

通信作者: 陈晓汉, E-mail: chnxhn@163.com

最大的水产养殖品种之一,也是我国海水养殖的主导品种。然而凡纳滨对虾容易感染对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus, IHNV),生长期对虾感染 IHNV 后蜕壳迟缓,生长缓慢,造成养殖群体规格参差不齐,养殖产量低,经济效益不高。解析 IHNV 对凡纳滨对虾酚氧化酶原系统激活的影响,以及 IHNV 感染凡纳滨对虾后酚氧化酶原系统的免疫应答反应机制,对于制定 IHNV 的防控措施具有重要的指导价值。然而,目前有关 IHNV 与凡纳滨对虾酚氧化酶激活系统的相关研究尚未见报道,凡纳滨对虾 PPAF 基因序列也仍未见公布。因此本研究克隆并分析了凡纳滨对虾 PPAF 基因 cDNA 全长序列,并通过实时定量 PCR 比较 PPAF 基因在正常对虾组织和感染 IHNV 病毒的对虾组织中的表达情况,阐明 IHNV 感染对凡纳滨对虾 PPAF 表达变化的影响,为进一步解析凡纳滨对虾酚氧化酶系统对 IHNV 的免疫机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所需凡纳滨对虾来自广西水产科学研究院凡纳滨对虾遗传育种中心选育的无特定病原对虾,体质量 10 ~ 15 g,体长 10 ~ 12 cm,饲养于 400 L 的圆形 PVC 桶中,养殖水温为 28 °C,盐度为 28, pH 7.0,持续充气,将 45 尾凡纳滨对虾分成 3 组,设 1 个对照组和 2 个感染组,每组设 3 个平行,凡纳滨对虾 IHNV 病毒感染试验参考陈秀荔^[9]的方法,每只凡纳滨对虾于第三尾节处注射 40 μL 的病毒液。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取肝胰腺、鳃、胃、肠、心、肌肉和血液等 7 种组织,保存于液氮中备用;总 RNA 提取试剂盒(RNAiso PLUS), RT-PCR 试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser), SMARTTM RACE Kit & Polymerase Mix, LA Taq DNA 聚合酶以及 DNA Marker 购自大连宝生物公司(TaKaRa)。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取与 cDNA 第一链合成 取健康及感染 IHNV 对虾的心脏、肝脏、肠道、胃、鳃、肌肉、血液各 0.5 g,迅速放入研钵中用液氮研磨,待研磨成细粉后立即用 2 ~ 3 mL 的

Trizol 裂解液覆盖粉末,待其自然溶解后将其收集置 DEPC 水处理的无 RNA 酶污染的 EP 管中,Trizol 法提取总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,经核酸蛋白测定仪测定 RNA 纯度和浓度。

取健康对虾的肝胰腺和肌肉组织 RNA,将 2 者等体积混合后按照 TaKaRa 公司的 Smart RACE cDNA amplification kit 说明书进行 RACE cDNA 的合成;其他组织样本利用 Promega 公司的 M-MLV 酶合成 cDNA,产物于 -20 °C 保存备用。

酚氧化酶原激活因子 cDNA 的克隆及测序

(1) 酚氧化酶原激活因子部分 cDNA 的克隆及测序。参考 GenBank 公布的斑节对虾(*Penaeus monodon*) 酚氧化物酶前体激活因子基因全长 CDS 序列(DQ455050.1)设计用于扩增凡纳滨对虾酚氧化酶原激活因子的引物,分别为 PPAF1: 5'-CGTCTGCGTGCCTATTATC-3'; PPAF2: 5'-CCGTAGTCCCAGTCATATCC-3',以凡纳滨对虾肝胰腺和肌肉组织的 cDNA 为模板,50 μL PCR 反应体系中加入 1 μL 的 cDNA 模板,10 × LA PCR Buffer II(Mg²⁺ Plus)5 μL, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)8 μL,上下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, TaKaRa LA Taq(5 U/μL)0.5 μL,加水至总体积为 50 μL。按以下程序进行 PCR 扩增:94 °C 3 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 40 s,35 个循环,72 °C 5 min 延伸。1% 的琼脂糖凝胶电泳观察。利用 TaKaRa 公司的胶回收试剂盒回收纯化,连接转化至感受态大肠杆菌 Top10 涂板,37 °C 培养后,挑取阳性克隆子送至深圳华大公司测序。

(2) 酚氧化酶原激活因子 RACE 扩增、克隆与测序。用上述引物进行凡纳滨对虾 PPAF 基因 cDNA 片段的扩增,产物经测序和同源性对比鉴定后,设计 RACE 特异扩增引物,3'端和 5'端的引物和巢式引物分别为 PPAF-3: 5'-CGTGTATGTCCAAGCGGGCATCGTG-3'; PPAF-3N: 5'-GAAGCCAACATCGGTCTTAATTCCCAC-3'; PPAF-5: 5'-GGATTGGGATTGGTGCAGCAGACGTC-3'; PPAF-5N: 5'-TGTCGTTCCCCTTCTTGCTGTTGCC-3',引物由深圳华大公司合成。

以 RACE cDNA 为模板在灭菌的 0.2 mL 的反应管进行 PCR 扩增,按照 TaKaRa 公司产品说

明书构建 50 μL 的体系,采用降落式 PCR 扩增程序,94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,70~58 $^{\circ}\text{C}$ (递减 1 $^{\circ}\text{C}$ /每 3 个循环)30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,25 个循环。取 3 μL 反应产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。对 PCR 扩增产物回收、克隆及测序。

序列的拼接与生物信息学分析 利用软件 SeqMan 对测序所得结果进行载体序列的去除和拼接,将所获得序列进行比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),利用软件 EdiSeq 进行开放阅读框 (ORF) 预测和氨基酸序列的翻译。Interpro Scan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) 进行蛋白质功能结构域用分析,用 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测理化特性, Motif Scan 程序 (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 分析蛋白质功能位点, CLUSTAL W 软件进行不同物种 PPAF 氨基酸序列比对和进化树制作。

荧光定量 PCR 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, PPAFF: 5'-CGTCTGCGTGCCTT-ATTATCTCT-3'; PPAFR: 5'-TCGTTCCCCTTC-TTGCTGTT-3', 对感染 IHNV 病毒前后凡纳滨对虾肝胰腺、血淋巴等组织中 PPAF 基因的表达谱进行分析,以凡纳滨对虾 18S RNA 基因为内参, 18s-F: 5'-CTCTGCTGAACCGCATTACTTG-3'; 18s-R: 5'-TGCCGAGGGTTTGGTCT-3', 定量 PCR 的扩增体系为 2 μL cDNA, 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物, 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times), 8.5 μL ddH₂O, 设 3 个平行样, 阴性对照加入 RNase free ddH₂O。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 利用荧光定量分析软件分析结果。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾 PPAF 基因 cDNA 的分离与鉴定

以凡纳滨对虾肝胰腺和肌肉组织的混合 cDNA 为模板, 利用引物 PPAF1 和 PPAF2 进行扩增, 将片段纯化回收及克隆测序后获得长度为 1 047 bp 的片段, 将该结果提交至 GenBank 数据库中进行同源比对分析。结果表明, 该片段与斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 丝氨酸蛋白酶样蛋白基因相似性达 97%, 与斑节对虾酚氧化物酶前体激活因子相似性达 80%, 从而确定该序列为凡纳

滨对虾 PPAF 基因的部分 cDNA 序列。

分别以 5' 和 3'-RACE cDNA 为模板, 以 RACE 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现, 引物 PPAF-3 扩增出的条带不清晰, PPAF-5 第一次扩增没有获得任何清晰的条带, 再以引物 PPAF-3 和 PPAF-5 的扩增产物为模板, 以 PPAF-3N 和 PPAF-5N 引物分别进行巢式扩增, 结果经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现 PPAF-3N 引物扩增获得了 400 bp 左右的条带, PPAF-5N 扩增获得了 700 bp 左右的条带 (图 1)。

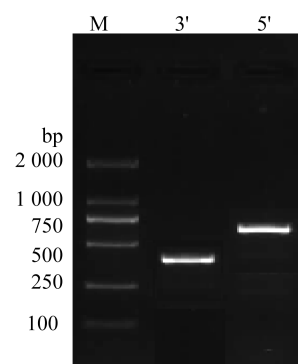


图 1 PPAF 基因 RACE 扩增结果

Fig. 1 RACE amplification result of PPAF gene

将上述所得的 PPAF 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 的扩增产物纯化后回收, 克隆测序, 去除冗余序列后发现获得了 408 bp 和 670 bp 的两段序列。将所有序列进行电子拼接, 获得 1 986 bp 的 cDNA 序列, 因此, 初步确定该序列为凡纳滨对虾的 PPAF 基因的全长 cDNA 序列。GenBank 数据库登录号为 JQ684529。

2.2 凡纳滨对虾 PPAF 基因序列分析

使用 DNASTar 软件的 EdiSeq 程序对获得的 PPAF 基因的开放阅读框 (ORF) 预测, 发现 PPAF 基因含有一个 1 629 bp 的开放阅读框 (ORF), 两侧分别存在 20 bp 的 5' 端和 336 bp 的 3' 端非翻译区 (图 2)。EditSeq 分析发现, 其编码 542 个氨基酸的蛋白前体, 分子量为 56.237 ku, 等电点为 6.07, 该蛋白的氨基酸序列中含有 40 个碱性氨基酸 (K, R), 45 个酸性氨基酸 (D, E), 169 个疏水性氨基酸 (A, I, L, F, W, V), 151 个极性氨基酸 (N, C, Q, S, T, Y); 对开放阅读框中碱基组成分析发现, G、C 碱基的含量 (54.03%) 高于 A、T 碱基的含量 (45.97%)。

IACGCGGATC CACAGCCTA CTGATGATC AGTCGATGG AAAAGTCAT CCGGTGGAG
 M I S R W K S H P V E
 55AGCGAGAGG GAAGGACGA ATTGTGCTC GTGTGTATC TTTGCCTCC ACGTCAGTT
 S E R E G R I V L V C I F A S T S V
 109TCAAAGATG CGGGTGTTG GCAGCAGCG TTGGCAGTG TTGGTAGTC AGTGGCCAG
 S K M R V L A A A L A V L V V S G Q
 163 TCCACGGC TGCTTCTT TGGAAGGGA GAATGTAAT GATACAGCC CCAGCGGAC
 S H G C F F W K G E C N D T A P A D
 217 GCCAGCAGC ACACGCAGG GCCAGCGAT GATGAACGA ATTGTTAAT AACCCACTA
 A S S T R T A S D D E R I V N N P L
 271 GGAGGCCCC AACACAGCC GGTCCCTGCC AGCAACGTG GACCACGCA AGTAGTCTC
 G G P N T A G P A S N V D H A S S L
 325 GTTGGCCTT CTCAACGGA GCTGTAGCA GGCGGTCTC GGGGGTCAA GGAGGAGGT
 V G L L N G A V A G G L G G Q G G G
 379 CTCGGAGGT CAAGGAGGA GGTCTCGGA GGTCAAGGA GGCGGTCTC GGAGGTCAA
 L G G Q G G G L G G Q G G G L G G Q 433
 GGAGGCGGT CTTGGAGGT CAAGGAGGT GGTCTCGGA GGTCAAGGA GGCGGTCTT
 G G G L G G Q G G G L G G Q G G G L
 487 GGAGGACAA GGAGGCGGT CTCGGAGGC TTAGGAGGT GGAATGGA GGCGGTCTC
 G G Q G G G L G G L G G G L G G G L
 541 GGAGGTGGT GTCAGCGAT CAAGACATA ACACCTTGT AACAACGGA TTGGGCGTC
 G G G V S D Q D I T P C N N G L G V
 595 TGCGTGCCT TATTATCTC TGCAACGAA GGAACGTC ATAACGGAC GGCGCTGGC
 C V P Y Y L C N E G N V I T D G A G
 649 CTTATTGAT ATCAGGTTT GGCAACAGC AAGAAGGGG AACGACACC AGCACCAGA
 L I D I R F G N S K K G N D T S T R
 703 TCCAGTTC GACTGCCCG CAGTTCCTC GACGTCTGC TGCACCAAT CCCAATCCC
 S S S D C P Q F L D V C C T N P N P
 757 CCGGACGTG GTCACCCCC GCCCCTAC ACGCCCCGC TGCGGCAAG AGGAACTCG
 P D V V T P A P Y T P R C G K R N S
 811 CAAGGCTTC GACGTCCGC ATCACTGGA TTCAAGAAT AACGAGGCC CAGTTCGCC
 Q G F D V R I T G F K N N E A Q F A
 865 GGGTTCCTC TGGATGACG GCCATCCTG CGAGTGGAG AGAGTGGC GAGAAGGAG
 G F P W M T A I L R V E R V G E K E
 919 CTGAACCTG TACGTGTGC GGTGGCTCC CTCATCCAT CCATCCATC GTTCTACA
 L N L Y V C G G S L I H P S I V L T
 973 GCCGCTCAC TCGTACAC TCAAAGGCT GCAAGATCA CTCAAGGCC CGTTTCGGA
 A A H C V H S K A A R S L K A R F G
 1027 GAGTGGGAC ACCAGAAG ACGTACGAG CGGTATCCT CACCAGGAC AGGAACGTC
 E W D T Q K T Y E R Y P H Q D R N V
 1081 ATCAGCGTG AAAATCCAT CTAACACTAC AACTCAGGC GCTCTCTAC AACGACTTC
 I S V K I H P N Y N S G A L Y N D F
 1135 GCTCTCTC TTCCTGAC AGCCCCGTT ACCCTGGCC CCCAACGTG GACACCGTC
 A L L F L D S P V T L A P N V D T V
 1189 TGCCTCCCG CAAGCAAAC CAGAAGTTC GACTACGAC ACCTGCTGG GCCACTGGC
 C L P Q A N Q K F D Y D T C W A T G
 1243TGGGGCAAG GACAAGTTC GGCAAGGAG GGAGAATTC CAAAACATC CTCAAGGAA
 W G K D K F G K E G E F Q N I L K E
 1297GTGGCTCTC CCTGTCGTC CCCAACAAT GACTGTCAG AAGGGTCTC AGAACCACT
 V A L P V V P N N D C Q K G L R T T
 1351CGGCTCGGA AGCTTCTC CAGCTGCAC AACTCCTTC ATGTGCGCT GGCGGCCAA
 R L G S F F Q L H N S F M C A G G Q
 1405CAGGGTCTC GACACGTGC AAGGGCGAC GGCGGTCC CCCTGGTG TGCGAGGCA
 Q G L D T C K G D G G S P L V C E A
 1459GTGAAGGGC TCGGGCGTG TATGTCAA GCGGGCATC GTGGCCTGG GGCATCGGG
 V K G S G V Y V Q A G I V A W G I G
 1513TGGGGCGAG CAGGGCGTC CCTGGGGTT TACGCCGAC GTGGGTAC GCCTCGAAC
 C G E Q G V P G V Y A D V G Y A S N
 1567TGGATCCAG ACCGAAGCC AACATCGGT CCTAATCC CACTACAAT ATCCAAGGT
 W I Q T E A N I G P N S H Y N I Q G
 1621TATAACTGG GACTACGGA AGATTTGTT TAA AGGACT TCCAAGCGA GCTGACACT
 Y N W D Y G R F V *

```

1675GTTAGCCAG GAACACTTT CAGGACGTG AGGCTAATC GATGTTCTC AGATGCTTA
1729 GAATGCATT GGGCGGAGC AGGAGATAC AAAATAATC GTAAATCAA GAAACCAGT
1783 GACCTTCG GAAGGGAGA AACCAAGTA ACTGGGCTA AACATGTTG AGCTCGAAG
1837 AAACCTTTC TTTTCCCAT TAAAAATAC CTTTCAATG TTTGACACT TCTATGTAT
1891 TATATTTAT CACATCTGT ATTTATGTA AATAAAAAA GTTGACATT CAAAAAAA
1945 AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA

```

图2 凡纳滨对虾 PPAF 基因编码区和推导出的氨基酸序列

阴影部分 ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子

Fig. 2 Coding sequence and deduced amino acid sequence of *L. vannamei* PPAF gene

The start codon is indicated grey background. The stop codon is indicated grey background and an asterisk

2.3 PPAF 氨基酸序列功能分析

将 PPAF 的氨基酸序列进行 Blast 比对, 分析凡纳滨对虾 PPAF 的氨基酸序列结构域, 结果发现, 285 ~ 522 区域为胰蛋白酶功能域, 245 ~ 525

区域为胰蛋白酶家族中的类丝氨酸蛋白酶功能域, 在 316 ~ 321 区域有一个组氨酸酶活性位点 (图 3)。

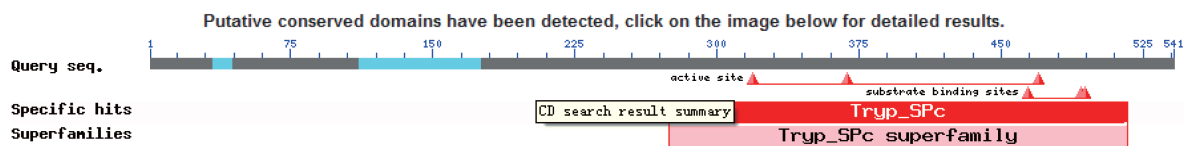


图3 PPAF 氨基酸序列功能位点分布

Fig. 3 The functional sites distribution of PPAF amino acid sequences

经 SMART 软件推测, 269 ~ 517aa 处是 PPAF 的功能区域, 且 PPAF 无信号肽和跨膜区域。用 Motif Scan 程序 (<http://myhits.isb-sib.ch>) 分析蛋白质功能位点, 发现在 495 ~ 503 位置有一 ALPHA-2 巨球型免疫蛋白功能位点, 在 316 ~ 321 区域有一丝氨酸蛋白酶功能位点和组氨酸活性位点。

用在线软件 ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) 分析 PPAF 蛋白疏水性/亲水性, 结果表明: 疏水性最高分值为 3.013, 亲水性最高分值为 -3.258, 亲水性氨基酸分布均匀, 且多于疏水性氨基酸, 整条多肽链表现为亲水性, 即 PPAF 属于亲水性蛋白。

2.4 凡纳滨对虾 PPAF 氨基酸序列比对及进化树构建

将 PPAF 的氨基酸序列进行 Blast 比对, 发现凡纳滨对虾 PPAF 的氨基酸序列与斑节对虾的同源性为 93%。因此推断该蛋白为凡纳滨

对虾酚氧化物酶前体激活因子蛋白。

利用 Clustal W 在线软件对凡纳滨对虾与其他物种的 PPAF 氨基酸序列进行比对发现, 凡纳滨对虾蛋白序列与斑节对虾和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的相似性较大, 与其他物种的氨基酸序列在 70 ~ 150 区域存在较大的变异 (图 4)。

使用 MEGA 4.1 软件的邻接法构建 NJ 系统树 (Neighbor-Joining, NJ), 设置 1 000 次 bootstraps 进行评估。结果表明, 凡纳滨对虾编码氨基酸序列与斑节对虾编码的氨基酸序列高达 88.1%, 与小龙虾的相似性为 53.8%, 与青蟹的相似性为 49.6%, 与果蝇的相似性为 42.2%, 与家蚕的相似性为 40.2%, 与丽蝇蛹集金小蜂的相似性为 43.9%, 与库蚊的相似性为 42.2%, 由于各自都有其生存竞争的压力所以存在一些变异, 凡纳滨对虾 PPAF 与斑节对虾的亲缘关系最接近 (图 5)。

<i>Bombyx mori</i>	-----MYKLLLIGFLASACQNMDTG-----DLESIINQIFT-----SAKPPTG-----	1
<i>Drosophila grimshawi</i>	-----MMKIKCFIIVIFACYLGGDT-----SLNDLIAEIFKTD-SSTPATP-----	1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	MLLRRLPTVATLVVALLGFSQAQDDDA-----LFESVFNNPDTSSNLAPVPTT-----	1
<i>Nasonia vitripennis</i>	MKPVFGIVSTLLLIGSSWAAPQQQDVAKDGKDLNGLIADVFGNGNKAEPQQQVASTTS	1
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	-----IRLLAVLAVLAVSQQ-----SRGCFWKGECNDTAPADASSTRIT	1
<i>Penaeus monodon</i>	-----IRVLAVALAVLAISGQ-----SRGCFWKGECNDTASADVSTRIT	1
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-----IRVLAVALAVLVVSGQ-----SHGCFWKGECNDTAPADASSTRIT	1
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	-----MWSLIALVITVAAVTATPRRRRQASDECFWEPGC-----TTPIDPAKETIT	1
<i>Scylla paramamosain</i>	-----IRHLAVLALVALAAG-----PRRRRGTIT	1
<i>Bombyx mori</i>	-----LQP-VTQPS-----VADRAPST-----	40
<i>Drosophila grimshawi</i>	-----IQPIHPTQPS-----QTAETP-----	42
<i>Culex quinquefasciatus</i>	-----AAPLPPPPSAGQPQAPIAP-----	50
<i>Nasonia vitripennis</i>	LDDLIGSVFNPTNPNPSVTDKLGAGSG-----	61
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	SNDEERIVNPPGG-----LGGQGGGLGGQGGSLGGQG	41
<i>Penaeus monodon</i>	SNDEERIVNPPGGPAA-APSNGLAASLVGLLNGGAAGLGGQGGGLGGQGGGLGGQG	41
<i>Litopenaeus vannamei</i>	ASDDERIVNPLGGPNTAGPASNVDAHSSLVGLLNGAVAGLGGQGGGLGGQGGGLGGQG	41
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	G-----NPSG-----PVPVENTNPVERVEGGN-----	47
<i>Scylla paramamosain</i>	-----	26
<i>Bombyx mori</i>	-----LVPGVSTND	56
<i>Drosophila grimshawi</i>	-----K	58
<i>Culex quinquefasciatus</i>	-----IPPQ	70
<i>Nasonia vitripennis</i>	-----	90
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	GGLAG-----VG	74
<i>Penaeus monodon</i>	GGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGVV	100
<i>Litopenaeus vannamei</i>	GGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGGLGGQGGV	101
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	-----	70
<i>Scylla paramamosain</i>	-----	26
<i>Bombyx mori</i>	DLSQOTSDGQEGECVNYLLCMAANNTIITDGTNVIDIRVG-----SGP-----GSSYI	65
<i>Drosophila grimshawi</i>	EKTKYESCGIQKECVPRILC-ANDTINTSGENIIDIRFD-----GT-----GSNYL	59
<i>Culex quinquefasciatus</i>	HEPVYTCNG-ECVPYYLGN-NNEIITDGTGIDIRVG-----EDTTQENECPNYL	74
<i>Nasonia vitripennis</i>	-----AGNGD-CECVYYQCG-NGTILDNVGLIDIRLQ-----G-----PCDNYL	90
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	DQDITTCNGLGVCVPYYLCS-EGNVIDTGAGLIDIRFGSSKKTNDISTRSSDCPQFL	81
<i>Penaeus monodon</i>	DEGITACNGLGVCVPYYLGN-EGNVIDTGAGLIDIRFGNSKKSNDISTRSSDCPQFL	160
<i>Litopenaeus vannamei</i>	DQDITPCNGLGVCVPYYLGN-EGNVIDTGAGLIDIRFGNSKKGNDISTRSSDCPQFL	148
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	---YALGNNGEGSCVPYYLGR-EGDVIDTGAGLIDIRFG-----GNTIVTRSSDCPQFL	70
<i>Scylla paramamosain</i>	---EYERCGDGTKVCVPYYLCG-DGKVIDTGSVIDIRIT-----ASGGSNYL	26
<i>Bombyx mori</i>	DVCCALPDRPPTDPIITPRPETLPMNQGCGWRNPDGVAFRITGDVDGETKFGFFPMMVAI	113
<i>Drosophila grimshawi</i>	ELCCEIPI-----NKKEKPDISIPIIDRCCGYQNPNGVGFITGALDGEAEFGFFPMMVAI	104
<i>Culex quinquefasciatus</i>	DTCCCKSDVLEPPPTATQAPPNNQYGGQRNADGLGFRITGNKAGESEYGFPPMMVAI	122
<i>Nasonia vitripennis</i>	DVCCAAPDVVH-DXITPRPETER-KCCGORNPEGVGFRIITGAKDNEAQFGEFPMMVAI	129
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	DVCCCTNP-NPPDVVTPAP-----YTPRCGKNSQGFVRIITGFKDNEAQFAEFPMMVAI	139
<i>Penaeus monodon</i>	DVCCCTNP-NPPDVVTPAP-----YTPRCGKNSQGFVRIITGFKDNEAQFAEFPMMVAI	218
<i>Litopenaeus vannamei</i>	DVCCCTNP-NPPDVVTPAP-----YTPRCGKNSQGFVRIITGFKDNEAQFAEFPMMVAI	206
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	DVCCCTNP-QTVVPTPIPI-----YSDCGRRNPQGNARILGFKDNEAQFAEFPMMVAI	121
<i>Scylla paramamosain</i>	DVCCADP-HTTDPVTPDRG-HVSRCCVRNYNGIDVRIQGFQGNETQVAEFPMMVAI	69
<i>Bombyx mori</i>	LK-VEPVDDNEPEGKLNYYVCGGSLIHPNVVLTAAHYVA-AAKELKIRAGEWDTQTK	173
<i>Drosophila grimshawi</i>	LR-EESQ-----LNLVYCGGSLIAPDVILTAACHVHNKDAKSLIVRAGEWDTQTKV	159
<i>Culex quinquefasciatus</i>	LR-EDKVMDS-----TLNLYCGGSLIAPNVVLTAAHCVATKQREILVVRAGEWDTQTKN	182
<i>Nasonia vitripennis</i>	LK-EEAVGGKPE-----KLNLYCGGSLIHPRVVLTAGHCVNKKAAPSLKVRAGEWDTQTKN	184
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	LR-VERVGGKE-----LNLVYCGGSLIHPSIVLTAACHVHKAASSLKARAGEWDTQTKY	192
<i>Penaeus monodon</i>	LR-VERVGGKE-----LNLVYCGGSLIHPSIVLTAACHVHKAASSLKARAGEWDTQTKY	271
<i>Litopenaeus vannamei</i>	LR-VERVGGKE-----LNLVYCGGSLIHPSIVLTAACHVHKAASSLKARAGEWDTQTKY	259
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	LRQEEVVDKPI-----VNLVYCGGSLIHPSVLTAAHCVASWDAGVLKVRAGEWDTQRTY	174
<i>Scylla paramamosain</i>	LK-KEVVSAGE-----LNLVYCGGSLIHPSIVLTAACHVHNKHLSSDLRVRAGEWDTQNEY	123

<i>Bombyx mori</i>	E I Y P Y Q D R T V K E I V I H K D F N K G N L E Y D I A L L F L E T P V S A P N V G V A C L P P A R E R A P A G V R	230
<i>Drosophila grimshawi</i>	E I I P H E D R Y V K E I Y H E Q F N K G S L Y N D V A L L F L E N P F N L Q M N I Q P I C L P N I G E E F E L - D R	209
<i>Culex quinquefasciatus</i>	E I Y P H Q D R R V R E V I V H E K L N K G S L A N D I A L L I L E Q P F O L A E N I Q P A C L P P K N T K F D G - A N	236
<i>Nasonia vitripennis</i>	E I F P H Q D R Q V Q H V I V H E K F H S G A L Y N D F G L L I L S E P V E I I D N V D I V C L P E A N E V F D Y - S R	240
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	ERYPHQDRNVISVKIHPNNSGALYNDFALLFLDSPATLAPNVDTVCLPQANQKFDYDT-	246
<i>Penaeus monodon</i>	ERYPHQDRNVISVKIHPNNSGALYNDFALLFLDSPATLAPNVDTVCLPQANQKFDYDT-	325
<i>Litopenaeus vannamei</i>	ERYPHQDRNVISVKIHPNNSGALYNDFALLFLDSPVTLAPNVDTVCLPQANQKFDYDT-	313
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	ELFPHQDRNVAKVVVHQGYKSGPLNDFALLFLDQPFELAPNVDTLCLPQDGNLLGVE-	229
<i>Scylla paramamosain</i>	EPYKHQDRVSAVVIHPRFNGSNLHNDYALLYLOTPAELSRNVVYICLDNPTILAPHHN	177
<i>Bombyx mori</i>	CFATGWGKDKFGKEGRVQVIMKKVDIPVVDRTCCSQLRRLGRFFQLHSTFMCAGGEP	290
<i>Drosophila grimshawi</i>	CYATGWGKDKFGKEGEYQVILKKIDLPVVSNAKCAANLRRETRLGRHFILHDSFMCAGGK	268
<i>Culex quinquefasciatus</i>	CFASGWGNIFGKEGYQVILKKVQLPVVAHDKCAASLRKTRLRGRFRLDPSFVCAAGRA	295
<i>Nasonia vitripennis</i>	CFASGWGKDFGKEGYQVILKRVELPVVPHDSQQNSLRTRRLGKIFQLDKSFICAGGEP	299
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	CIATGWGRDKFGKEGEFQNLKKEVALPVVPHDCCNGLRTRRLGSFFQLHNSFMCAGGQQ	305
<i>Penaeus monodon</i>	CIATGWGRDKFGKEGEFQNLKKEVALPVVPHDCCNGLRTRRLGSFFQLHNSFMCAGGQQ	384
<i>Litopenaeus vannamei</i>	CIATGWGKDKFGKEGEFQNLKKEVALPVVPHDCCNGLRTRRLGSFFQLHNSFMCAGGQQ	372
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	CIATGWGKDRFGKEGEFQNLKGLTPNDKCAALRTRRLGKFFVLDKSFACAGGEA	288
<i>Scylla paramamosain</i>	CLVTGWGKDRFGKGVFQNLKIDLPVYPHGECCQALRTRRLGFFKLDKSFACAGGEA	237
<i>Bombyx mori</i>	DKDTCRGDGGSPVLCPIDYEKRYVQYGI VAWG I GCGEDGTPGVYVDVSNLRTWIDDKVA	350
<i>Drosophila grimshawi</i>	GRDTCRGDGGSPVLCPIKNQPNRFSKAGI VAWG I GCGEENIPGVYAKVSLRPWIDQKLA	328
<i>Culex quinquefasciatus</i>	GEDTCRGDGGSPVLCPIAGSPTHYVQAGI VAWG I GCGEDNIPGVYVNVPLFRDWIDQQLA	355
<i>Nasonia vitripennis</i>	GKDTCKGDGGSPVLCPIKSDPRRYSQAGI VAWG I GCGENQIPGVYANVANARPWIDQOMA	359
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	GIDTCRGDGGSPVLCPEAVAGSGVYVQAGI VAWG I GCGEGVPGVYADVGYASDWIQTEAN	365
<i>Penaeus monodon</i>	GIDTCRGDGGSPVLCPEAVAGSGVYVQAGI VAWG I GCGEGVPGVYADVGYASDWIQTEAN	444
<i>Litopenaeus vannamei</i>	GIDTCRGDGGSPVLCPEAVKSGVYVQAGI VAWG I GCGEGVPGVYADVGYASNWIQTEAN	432
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	GLDTCRGDGGSPVLCQVSPN--KYVQAGI VAWG I GCGEGIPGVYANPYASKWIKDTSN	348
<i>Scylla paramamosain</i>	GKDSGSDGGSPVLCLDAT-KTQYVQVGI VAWG I GCGTSNIPGVYADVLYGYDWIVAEAD	297
<i>Bombyx mori</i>	GKGYDTRSYEP-----	410
<i>Drosophila grimshawi</i>	LRQVDSIYFTP-----	388
<i>Culex quinquefasciatus</i>	TRKVDAKHYTYSG-----	415
<i>Nasonia vitripennis</i>	NYGLDSREYQYRP-----	419
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	I GLDSLYSIQGYNDYGRFV	425
<i>Penaeus monodon</i>	I GLASLYSIQGYNDYGRFI	504
<i>Litopenaeus vannamei</i>	I GPNSHYNIQGYNDYGRFV	492
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	SILSILKVTVGNYNDYIPS-	406
<i>Scylla paramamosain</i>	KLLASP---VVDYWGVD---	356

图 4 凡纳滨对虾 PPAF 氨基酸序列比对结果

Fig. 4 The PPAF amino acid sequence alignment results of *L. vannamei*

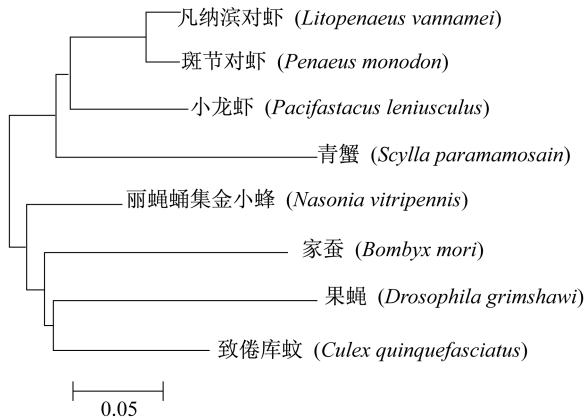


图 5 凡纳滨对虾与其他动物 PPAF 氨基酸序列进化树

Fig. 5 Amino acid sequence phylogenetic tree of *L. vannamei* PPAF

2.5 荧光定量 PCR 分析

利用荧光定量 PCR 方法对该基因在正常对虾和感染 IHHNV 对虾的不同组织、不同感染时间的表达分析表明, PPAF 基因在心脏、肝胰腺、肠道、胃、鳃、肌肉和血液等不同组织中的表达情况出现组织特异性,在血液和鳃组织中表达量较大,而在其他几种组织中的表达量相对较低,最大差异约达到 25 倍,表明该基因在血细胞和鳃中优势表达(图 6)。

由于 PPAF 基因在鳃组织中表达量最大,实验以凡纳滨对虾鳃腺组织为材料,检测 PPAF 基因在对虾感染 IHHNV 0、3、6、12、24、48 和 72 h 时的相对表达量,结果显示,对虾鳃腺组织 PPAF 基因的表达量在病毒感染后急剧降低,随后逐渐增加,48 h 后出现表达高峰,但仍然比正常组织的表

达量低,随着感染时间的延长,*PPAF* 基因的表达量又开始降低(图 7)。

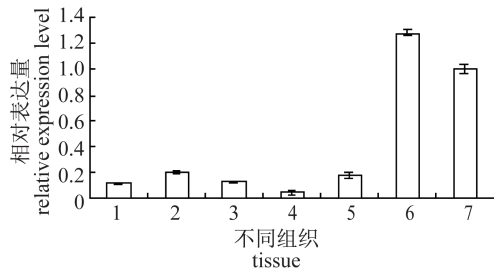


图 6 *PPAF* 基因在正常对虾不同组织中的相对表达

1. 心,2. 肝胰腺,3. 肠,4. 胃,5. 肌肉,6. 鳃腺,7. 血液

Fig. 6 Relative expression of *PPAF* gene in different tissues of normal shrimp

1. heart,2. hepatopancreas,3. intestine,4. stomach,5. muscle,6. gill,7. blood

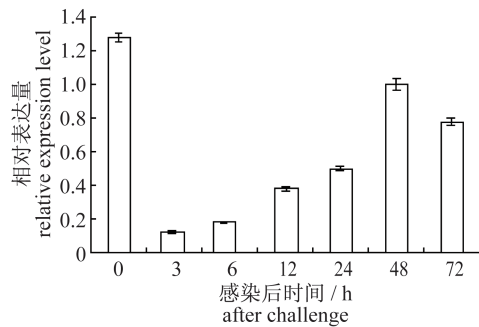


图 7 *PPAF* 基因在感染 IHHNV 后在鳃腺组织的相对表达

Fig. 7 Relative expression of *PPAF* gene in the gill tissue after challenge with IHHNV

对凡纳滨对虾感染 IHHNV 72 h 时的不同组织进行表达分析发现,*PPAF* 基因表达的组织分布和正常对虾的分布一致,但是每种组织的 *PPAF* 基因表达量都比正常组织的表达量低(图 8),说明不同组织中 *PPAF* 基因的表达都受病毒感染的影响。

3 讨论

酚氧化酶原激活系统 (prophenoloxidase-activating system, proPO-AS) 在无脊椎动物中广泛存在,它与哺乳动物的补体系统非常类似。proPO-AS 是甲壳动物最重要的体液免疫系统,在抵御病原微生物入侵、伤口愈合和表皮硬化着色等生理反应中发挥重要作用^[10-13]。近年来,对先天性免疫的研究越来越受到重视,研究酚氧化酶

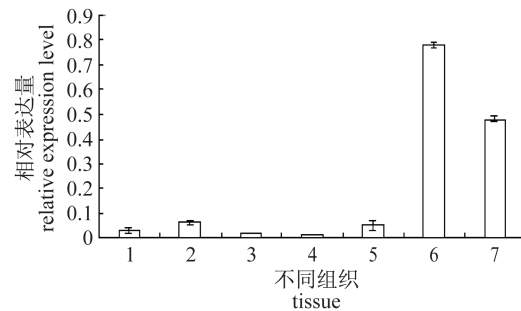


图 8 *PPAF* 基因在感染 IHHNV 72 h 后

不同组织的相对表达

1. 心,2. 肝胰腺,3. 肠,4. 胃,5. 肌肉,6. 鳃腺,7. 血液

Fig. 8 Relative expression of *PPAF* gene in different tissues of IHHNV-infected shrimp after 72 h

1. heart,2. hepatopancreas,3. intestine,4. stomach,5. muscle,6. gill,7. blood

激活系统对宿主防御功能的研究有着重要的意义。目前从家蚕、淡水小龙虾等节肢动物中鉴定出了酚氧化酶原活化酶或氧化酶原活化因子^[14-16]。本研究克隆出 1 条凡纳滨对虾全长 cDNA 序列,该序列编码 542 个氨基酸,具有典型的 *PPAF* 功能域,其在 269 ~ 517aa 为 tryp-spc 超家族功能区域,在 494 ~ 502aa 位置为 ALPHA-2 巨球型免疫蛋白功能位点,316 ~ 321aa 区域有一个组氨酸酶结合位点,且其编码的氨基酸序列与斑节对虾 *PPAF* 的同源性最高为 93%,与螯虾 *PPAF* 的同源性为 65%,与中华绒螯蟹 *PPAF* 的同源性为 55%。据此推断,本研究克隆获得的基因序列为凡纳滨对虾酚氧化酶原激活因子全长序列。

无脊椎动物中酚氧化酶原的活化主要通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应引起^[17]。在昆虫中已有许多分离酚氧化酶激活酶原的报道,例如从家蚕、黑腹果蝇以及东北大黑鳃金龟血淋巴中分离出的酚氧化酶活化因子均为丝氨酸蛋白酶^[16]。本研究所得的 *PPAF* 基因其氨基酸序列 285 ~ 517aa 区域是胰蛋白酶家族中的类丝氨酸蛋白酶位点,应同样具有活化凡纳滨对虾酚氧化酶原的功能。酚氧化酶激活系统所产生的活性物质对无脊椎动物自身也具毒性,无脊椎动物中酚氧化酶通常以无活性酶原的形式存在,其活化因子的活性通常情况下也处于被抑制状态,因此,*PPAF* 作为酚氧化酶系统的重要调节因子,其如何调控酚氧化酶原活化一直是一项重要的研究内容之一。巨球蛋白可通过影响 *PPAF* 的活性而阻

止酚氧化酶原活化^[11]。本研究结果显示凡纳滨对虾 PPAF 495 ~ 503aa 区域有一个 ALPHA-2 巨球蛋白免疫蛋白功能位点,可能为巨球蛋白抑制剂的结合位点。由此推测,凡纳滨对虾 PPAF 在酚氧化酶原激活过程中具有双重功能,既可通过丝氨酸蛋白酶的水解功能活化酚氧化酶酶原,又可结合巨球蛋白抑制剂影响 PPAF 活性进而影响酚氧化酶原的活化,从而保证酚氧化酶在不同的生理或病理状态下具有适当的限制性酶活。

作为无脊椎动物重要的体液免疫系统,酚氧化酶激活系统是一个高效的异己识别系统,其系统的启动常由病菌和病毒等外源微生物的入侵引起。鳃腺是对虾的主要的免疫器官之一,且本研究结果显示,无论是正常对虾还是感染 IHNV 病毒的对虾鳃腺组织中 PPAF 的表达量均最高,因此,实验定量分析了凡纳滨对虾 PPAF 基因在感染 IHNV 0、3、6、12、24、48 和 72 h 时鳃腺组织的相对表达量,结果显示对虾鳃腺组织 PPAF 的表达量在病毒感染后急剧降低,随后逐渐增加,48 h 后出现表达高峰,随着感染时间的延长,PPAF 基因的表达量又开始降低。由此可以看出,IHNV 感染凡纳滨对虾初期极大地抑制了 PPAF 的表达,PPAF 表达量随着病毒感染时间的延长而逐渐升高,至 48 h 达到高峰,至 72 h 病毒和机体免疫系统的抑制和反抑制达到平衡。IHNV 又称对虾矮小综合征病毒,可感染凡纳滨对虾并导致对虾生长缓慢,体格矮小,但该病毒并不能导致凡纳滨对虾死亡。IHNV 感染对虾后,PPAF 在不同时段的表达量也与 IHNV 感染对虾的病理特征相符合,即 IHNV 感染对虾可抑制对虾生长导致其罹患矮小综合征,但不能完全破坏凡纳滨对虾的酚氧化酶免疫系统,导致其死亡。

本研究定量比较分析了正常对虾和感染 IHNV 对虾的 PPAF 基因在心脏、肝胰腺、肠道、胃、鳃、肌肉和血液等不同组织中的表达情况,发现无论是正常对虾还是感染 IHNV 对虾,该基因在以上组织均只低量表达,在血液和鳃腺中的表达量明显高于其他组织,但感染 IHNV 对虾不同组织中 PPAF 基因的表达量均低于正常对虾相应组织中的表达量。PPAF 基因在不同组织的表达特点符合酚氧化酶原体液免疫系统的组织分布特点,但其广谱表达特征也暗示 PPAF 基因除

免疫功能外还具有其他生理功能。Buda 等^[18]通过定量 PCR 和 Northern 印迹法研究蓝蟹皮下组织相关关节和背侧 PPAF 的表达模式时发现,预蜕皮蓝蟹组织中 PPAF 的 RNA 转录水平高,而蜕皮后下降,PPAF mRNA 的增加发生在 3 ~ 4 h 后蜕皮蓝蟹的关节膜皮下组织而不是背侧皮下组织,这表明 PPAF 可能参与预蜕皮角质层的活性,且蜕皮后角质层的沉积发生在非钙化区而不是钙化区。蜕皮是节肢动物生长发育的重要特征之一,凡纳滨对虾 PPAF 基因是否参与对虾的蜕皮过程,IHNV 是否通过抑制 PPAF 基因表达进而影响对虾的蜕皮过程造成对虾生长缓慢,其原因需进一步研究。

参考文献:

- [1] Hiruma K, Riddiford L M. Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm; regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone [J]. *Developmental Biology*, 1988, 130(1): 87 - 97.
- [2] Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Corzo G, et al. The trypsin inhibitor panulirin regulates the Prophenoloxidase-activating system in the spiny lobster *Panulirus argus* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288 (44): 31867 - 31879.
- [3] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates [J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 116 - 126.
- [4] Cerenius L, Lee B L, Soderhall K. The proPO-system; pros and cons for its role in invertebrate immunity [J]. *Trends in Immunology*, 2008, 29(6): 263 - 271.
- [5] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 990 - 1001.
- [6] Hopkins T L. Insect Cuticle Sclerotization [J]. *Annual Review of Entomology*, 1992, 37: 273 - 302.
- [7] 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 and Comparative Immunology*, 2009, 33(7): 811 - 820.
- [8] Ma T H, Benzie J A, He J G, et al. PmPPAF is a pro-phenoloxidase activating factor involved in innate

- immunity response of the shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Development and Comparative Immunology*, 2014, 44(1):163 – 172.
- [9] Chen X L, Zhao Y Z, Peng M, *et al.* Cloning and analysis of full length cDNA of peritrophin in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10):1503 – 1511. [陈秀荔, 赵永贞, 彭敏, 等. 凡纳滨对虾围食膜蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析. *水产学报*, 2012, 36(10):1503 – 1511.]
- [10] Ashida M. The prophenoloxidase cascade in insect immunity [J]. *Research In Immunology*, 1990, 141(9):908 – 910.
- [11] Söderhäll K, Cerenius L, Johansson M W. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1994, 712(1):155 – 161.
- [12] Johansson M W, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates [J]. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 1996, 15:46 – 66.
- [13] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1):23 – 28.
- [14] Kanost M R, Jiang H, Wang Y, *et al.* Hemolymph proteinases in immune responses of *Manduca sexta* [J]. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 2001, 484:319 – 328.
- [15] Hergenahn H G, Aspan A, Söderhäll K. Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma [J]. *The Biochemical Journal*, 1987, 248(1):223 – 228.
- [16] Söderhäll K, Aspán A, Duvic B. The proPO-system and associated proteins role in cellular communication in arthropods [J]. *Research in immunology*, 1990, 141(9):896 – 907.
- [17] Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity [J]. *Annual Review of Entomology*, 1997, 42:611 – 643.
- [18] 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 & Molecular Biology*, 2005, 140(4):521 – 531.

Cloning and analysis of full length cDNA of prophenoloxidase activating factor in *Litopenaeus vannamei*

ZHAO Yongzhen, CHEN Xiuli, ZENG Digang, YANG Chunling, PENG Min, HE Pingping,
LI Yongmei, PENG Jinxia, WEI Pinyuan, CHEN Xiaohan*

(Guangxi Academy of Fishery Sciences, Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and
Healthy Aquaculture, Nanning 530021, China)

Abstract: Prophenoloxidase-activating factor (PPAF) plays a key role in prophenoloxidase activation system of crustacean's humoral immune system. In this study, the full-length cDNA sequence was cloned by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE), the expression patterns of PPAF gene in various tissues of normal shrimp and IHHNV-infected shrimp were determined by Quantitative real-time PCR. The results showed that the full-length cDNA sequence of PPAF was 1 986 bp, which contained a 21 bp 5'-UTR (untranslated region), 336 bp 3'-UTR (untranslated region), and the 1 629 bp open reading frame (ORF) encoded 542 amino acid. There was a serine protease domain between 269 – 517 amino acids residues of *Litopenaeus vannamei* PPAF, an ALPHA-2 macroglobulin functional site and a histamine enzyme active site were found within the 494 – 502 and 316 – 321 amino acids residues of *Litopenaeus vannamei* PPAF respectively. The expression of the gene in various tissues was analyzed by Real-time quantitative PCR, the result showed that the expression of the gene was higher in blood and gill than in heart, hepatopancreas, intestines, stomach and muscle of the normal shrimp or IHHNV-infected shrimp, but the expression of PPAF in various tissues of IHHNV-infected shrimp was lower than in same tissues of normal shrimp. The expression of PPAF in gill of *Litopenaeus vannamei* drastically reduced after infected with IHHNV, the expression levels reached a minimum within 3 hours, which was about 1/8 times as compared to the control group. After 3 hours shrimp infected with IHHNV, the expression of PPAF in gill increased gradually, and up to highest level after 48 hours. The results suggested IHHNV can protect them from the immunity of Prophenoloxidase by decreasing the expression of PPAF of shrimp when they infect shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; prophenoloxidase-activating factor; IHHNV; clone

Corresponding author: CHEN Xiaohan. E-mail: chnxhn@163.com