长毛明对虾核转录因子NF-κB家族基因的克隆及在细菌侵染过程 中的表达变化

梁芳梅¹,朱鹏¹,邱春桃¹,王艳梅¹,刘丽丽¹,蔡双虎²,王鹏良¹,张虹¹,陈俭清¹, 许尤厚¹

1. 北部湾大学, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州 535011;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088

摘要:核转录因子 NF-κB 家族在无脊椎动物抵抗病原刺激中起着重要作用。本研究通过 RACE 技术克隆了长毛明 对虾(Fenneropenaeus penicillatus) NF-κB 家族基因,分别命名为 FpRelish 和 FpDorsal。FpRelish cDNA 全长为 5373 bp,其中 5'UTR 88 bp,3'UTR 1667 bp,编码区 3618 bp,编码 1205 个氨基酸;FpDorsal cDNA 全长为 4816 bp, 其中 5'UTR 611 bp,3'UTR 2147 bp,编码区 2058 bp,编码 685 个氨基酸,两者均具有 RHD 结构域。同源性和系统 进化分析表明,FpRelish 和 FpDorsal 都分别与甲壳动物首先聚为一支。qPCR 分析表明,两基因在检测的血液、心 脏、肝胰脏、鳃、肠道、性腺、肌肉、神经和胃组织中均有表达,且均在肝胰脏中最低,在血细胞中最高,相差 8~ 10.7 倍。嗜水气单胞菌(Aeromonas hydrophila)刺激后,FpRelish 和 FpDorsal 基因在包含的血液、心 的表达变化模式,鰓中 FpRelish 基因 6 h 表达最高,为对照组 2.7 倍,FpDorsal 基因 9 h 表达最高,为对照组 2.1 倍; 肝胰脏中 FpRelish 基因在 9 h 高表达,最高表达量在 48 h,为对照组的 4.5 倍,FpDorsal 基因 9 h 表达最高,为对照 组 22 倍。溶藻弧菌(Vibrio aliginolyticus)刺激后, 鰓中 FpRelish 基因 24 h 表达最高,为对照组 1.9 倍,FpDorsal 基 因 24 h 表达最高,为对照组 1.5 倍; 肝胰脏中 FpRelish 基因 3 h 达最高表达量,FpDorsal 基因 6 h 表达最高,均为 对照组的 1.5 倍。本研究表明 FpRelish 和 FpDorsal 在长毛明对虾免疫调控中发挥了重要作用。

关键词: 长毛明对虾; NF-κB 家族基因; 细菌侵染; 克隆与表达 中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2022)11-1551-13

长毛明对虾(Fenneropenaeus penicillatus)俗称明虾,其具有较高的经济价值,在20世纪80、90年代成为我国东南沿海的主要养殖对象,但随着对虾疾病的不断暴发,其数量急剧减少,在2005年长毛明对虾已作为濒危物种被录入《中国物种红色目录》^[1-3]。对虾属于无脊椎动物,主要依靠先天性免疫系统抵御外界病原的入侵^[4]。 NF-κB转录因子在先天性免疫反应的诱导和调节中起着核心作用^[5]。它是一种几乎存在于所有细胞类型中的核转录因子,自被发现以来 NF-κB 因 子及其调控机制的研究一直是许多领域的研究热 点^[6]。目前节肢动物已经鉴定的 NF-κB 家族成员 有 Relish、Dorsal 和 Dif 等^[7]。它们在 N 端都有一 个 Rel 同源结构域(Rel homology domain, RHD), 该结构域承担 DNA 的结合、二聚化、核定位以 及与其抑制蛋白 IκB 的结合^[8]。病原体刺激机体 后,含有 RHD 的 N 末端部分转移到细胞核中,与 抗菌肽和其他靶基因启动子/增强子区域中相应 的 κB 位点结合,从而调控免疫相关基因的转录, 进而对外界病原刺激作出免疫应答^[9]。Relish 通

收稿日期: 2022-02-28; 修订日期: 2022-04-21.

基金项目:国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(U20A2065).

作者简介:梁芳梅(1996-),女,硕士研究生,研究方向为水产动物增养殖技术.E-mail: 2256176878@qq.com

通信作者:许尤厚,教授,研究方向为海洋动物养护. E-mail: 36714447@qq.com

过 IMD 通路参与机体抵御革兰氏阴性菌和病毒 入侵^[10-11], Dorsal 则参与 Toll 通路抵御真菌、革兰 氏阳性菌和病毒的感染过程^[12-14]。

关于 Relish 和 Dorsal 已在无脊椎动物中开展 了广泛研究。Li 等^[15]和 Sun 等^[16]研究发现, 当受 到细菌或白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)刺激时, 中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis) FcDorsal 基因在血细胞和淋巴器 官中的表达量明显上调,日本囊对虾(Marsupenaeus japonicus) MjDorsal 蛋白在血细胞、肠和鳃 中表达水平增加,用 dsRNA 方法研究 FcDorsal 的功能,结果表明 FcDorsal 与对虾 Penaeidin5 基 因的转录有关, 而沉默 MjDorsal 后, 虾的细菌清 除率和存活率显著下降,细菌刺激导致 MjDorsal 易位并增加其磷酸化水平,表明 Dorsal 在虾的先 天免疫中起着重要的作用。Huang 等^[17]对凡纳滨 对虾(Litopenaeus vannamei)利用双荧光素酶检测 发现, LvDorsal 可以反式激活对虾 Penaeidin4 基 因, 表明 LvDorsal 可以调节对虾 Penaeidin4 基因 的转录; RT-PCR 分析发现 LvRelish 和 sLvRelish mRNA 在组织中表达水平不同, LvRelish 可以调节 Penaedin4 基因的转录^[5]。张卓星^[9]在克氏原螯虾 (Procambarus clarkii)发现了一种长亚型 LPcRelish 和一种具有内含子保留的短亚型 SPcRelish, 在副 溶血性弧菌感染后两者在血细胞、鳃和肠的转录 水平均呈现上调;并利用 RNAi 技术,探明了 SPcRelish 和 LPcRelish 在弧菌感染过程中对抗菌 肽的调控作用不同。Li 等^[18]研究发现中国明对虾 FcRelish 基因组织表达具有显著差异,在血细胞 和淋巴器官中的表达水平最高; 鳗弧菌(Vibrio anguillarium) 和 溶 壁 微 球 菌 (Micrococcus lysodeikticus)对虾的刺激都会影响 FcRelish 的转 录。Tanaka 等^[19]在家蚕(Bombyx mori)中鉴定出 BmRelish1 和 BmRelish2, 且 BmRelish1 的激活可 被 BmRelish2 抑制。Zhong 等^[20]发现烟草尖蛾 (Manduca sexta) Relish 的两个同二聚体亚型 (MsRel2A 和 MsRel2B)可激活抗菌肽基因,并与 MsDorsal 形成异二聚体, 负调控抗菌肽基因的表 达,以防止抗菌肽的过度激活。Fan 等^[21]发现鲎 (Carcinoscorpius rotundicauda) Relish 蛋白的 RHD 结构域能结合人 κB 组件, 并激活下游基因表达。 选择性剪接产生 Relish 亚型, 促进了其先天免疫 防御功能的多样性。

除此以外,在中华绒螯蟹^[22](Eriocheir sinensis)、三疣梭子蟹^[7](Portunus trituberculatus)和 合浦珠母贝^[23-24](Pinctada fucata)等都有关于 Relish 或 Dorsal 在免疫方面的研究,而对长毛明 对虾 Relish 和 Dorsal 基因的研究尚未见报道。本 研究以长毛明对虾为对象,通过 PT-PCR、RACE 技术成功克隆了核转录因子 Relish 和 Dorsal cDNA 全长,通过分析 FpRelish 和 FpDorsal 基因 在不同组织中的表达模式及在细菌感染后长毛明 对虾 FpRelish 和 FpDorsal 基因 mRNA 的表达情 况,从基因水平认识 FpRelish、FpDorsal 基因和 长毛明对虾非特异性免疫抗病之间的相互关系, 阐明对虾对病原感染的免疫应答机制,有助于更 好地了解对虾的先天性免疫机制,并有助于开发 更有效的预防虾病的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生长毛明对虾来自北部湾海域,在12月经 渔民捕捞获得,选择体色正常、活性较好、大小 规格相当的个体(湿重 15.2~0.5 g、全长 13.5~ 16.5 cm)用于实验。

 1.2 长毛明对虾 RNA 提取及 cDNA 第一链合成 解剖健康长毛明对虾,收集血液、心脏、肝 胰脏、鳃、肠道、性腺、肌肉、神经和胃共 9 种 组织,利用 Trizol 试剂提取长毛对虾的总 RNA。
 经 1%琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪 (NanoDrop 2000)进行定性和定量检测, -80 ℃保 存备用。以 2 μg各组织总 RNA 为反转录模板,根 据 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(宝日医生物技术有限公司,北 京)合成第一链 cDNA, cDNA产物保存于-40 ℃ 备用。

1.3 FpRlish 和 FpDorsal 基因克隆及测序

根据实验室已有的长毛明对虾转录组中获得 *FpRelish、FpDorsal* 基因的部分序列,利用 Oligo 软件设计扩增引物(表 1),生工生物工程(上海)股 份有限公司进行引物的合成。以上述合成的第一链 cDNA 为模板使用 Tks GflexTM DNA Polymerase 试 剂盒(宝日医生物技术有限公司,北京)进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件: 94 ℃预变性 3 min; 95 ℃变 性 30 s, 62 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 3 个循 环; 95 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 3 个循环; 95 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 5 个循环; 95 ℃变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 26 个循环; 72 ℃延伸 5 min; 4 ℃保存。3′、5′RACE PCR 扩增使用 SMARTer[®] RACE5′/3′Kit User Manual 试剂盒(宝 日医生物技术有限公司, 北京), PCR 扩增条件: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 30 s, 68 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 25 个循环。

表 1 PCR 引物序列 Tab. 1 Primers used for PCR

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
FpRelish-F1	CTTAGGTCTCGTTTGGTTGTGAT	CDS
FpRelish-R1	TCTCACTTCTTACGCCTGGTCC	
FpDorsal-F1	TCTATTGGTCTCGGCGTTGAC	CDS
FpDorsal-R1	AATGGCTATCATCTGAACCTATTG	
FpRelish-5'RACE	CCCACCATCTCACTCTTGTAGCG	5'RACE
FpRelish-3'RACE	GCGAGAACGACTTGCCAGCCACC	3'RACE
FpDorsal-5'RACE	GCTGGTTGGAGGAAGTACGCTGGGCA	5'RACE
FpDorsal-3'RACE	ATCCCACACAATGTTCCGCCTCAG	3'RACE
FpEf1F1	CTACTCACCTGTGCTTGATTGC	qRT-PCR
FpEf1R1	TTGCTGGGAACCATCTTTACGA	
FpRelishdlF1	GTCCATTGTGCTGCCCAGAT	qRT-PCR
FpRelishdlR1	ATTGATGGCTTGGGTTACTG	
FpDorsaldIF1	ATCCGCAGTACCTAAAGAGA	qRT-PCR
FpDorsaldIR1	GCTACTCTGATGGGTCGTGG	

通过电泳检测 PCR 产物,并用琼脂糖凝胶回 收试剂盒回收纯化。将纯化的产物连接到 Blunt Simple (全式金生物技术股份有限公司,北京)载 体上,并转化到感受态细胞 Trans5α (全式金生物 技术股份有限公司,北京)中,次日挑单个菌体在 37 ℃中培养 12~16 h,菌液进行 PCR 验证是否连 接成功,使用快速质粒小提试剂盒提取质粒送广 州生工生物科技有限公司测序。

1.4 FpRelish 和 FpDorsal 基因组织表达分析

利用 Oligo 软件设计 *FpRelish、FpDorsal* 基 因定量引物,内参引物参考 Cai 等^[25](表 1),使用 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒(宝日医生物 技术有限公司,北京)以各组织 cDNA 为模板进行 实时荧光定量 PCR, PCR 反应条件如下: 95 ℃预 变性 3 min; 95 ℃变性 10 s, 60℃退火 30 s, 39 个 循环。实验采用 2^{-ΔΔC_t}法分析处理 qRT-PCR 结果, ΔC_t 定义为内参 C_t 值与目的基因 C_t 值的差值,定 量引物特异性经过电泳及熔解曲线检验。

1.5 *FpRelish* 和 *FpDorsal* 基因在弧菌侵染下的 表达变化分析

对溶藻弧菌(Vibrio alginolyticus)和嗜水气单 胞菌(Aeromonas hydrophila)(广西大学梁静真老 师惠赠)进行复苏,并对其进行鉴定。将细菌分别 接种到 LB 固体培养基中于 37 ℃、225 r/min 过夜 培养 16 h 左右,次日挑单个菌体于 LB 液体培养 基中 37 ℃、225 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.12~0.15, 离心后弃去培养基,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS) 将细菌重悬,将细菌浓度调至 10⁷ CFU/mL,作为 侵染长毛明对虾的菌液。

将渔获的野生长毛明对虾暂养在曝氧 48 h 以 上的海水中 3 d,水温为(22±2) ℃,海水盐度在 25 左右,养殖容器长×宽×高约为 80 cm×50 cm× 60 cm,暂养期间适量投喂食物,并保持溶氧充 足。选用 150 只健康的长毛明对虾随机分为两个 实验组、一个对照组(每组 50 只, 10 只/桶), 对照 组从第二腹节与第三腹节间注射 100 µL 的无菌磷 酸盐缓冲液(PBS)溶液, 实验组分别注射 100 µL 的 溶藻弧菌悬液和嗜水气单胞菌悬液(10^7 CFU/mL)。 在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h 各时间 点每组取 3 只活虾, 解剖取其免疫组织鳃和肝胰 脏放置-80 ℃冰箱保存, 用于提取总 RNA 并反转 录为 cDNA, 作为实时荧光定量 PCR (qPCR)反应 的模板。使用 2^{-ΔΔC_t}法计算 *FpRelish* 和 *FpDorsal* 基因相对表达量并利用 SPSS 软件进行 T-test 分析 其差异显著性情况。

1.6 生物信息学分析

在线分析核苷酸序列推导氨基酸序列和开放 阅读框(ORF)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov, http:// www.expasy.org),并通过 NCBI 中 BLAST 工具进 行序列比较,以发现 Relish 和 Dorsal 与其他物种 的同源性(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。用 SingalP-5.0 预测信号肽(http://www.cbs.dtu.dk/services/ SignalP/)。通过 Prosite、Motif Scan、Protter 程序 检测和分析蛋白质功能位点(https://prosite. expasy.org/)、(https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_ scan)、(http://wlab.ethz.ch/protter/start/)。DNAMAN 和MEGA10 (http://www.megasoftware.net/)软件用 于序列比对和系统发育分析,采用自展法(bootstrap)进行 1000 次重复检验。

2 结果与分析

2.1 FpRelish 和 FpDorsal 基因的克隆与序列分析

将长毛明对虾各组织混合提取总 RNA, 经琼 脂糖凝胶电泳可以看到非常清晰的 18S、28S 条带 (图 1a),说明 RNA 没有降解可用于后续实验。通 过 PCR 扩增获得 FpRelish 和 FpDorsal 的 CDS (图 1b, 1c)。经 BLAST 分析, FpRelish 和 FpDorsal 分 别显示与已登录的甲壳动物 Relish、Dorsal 基因 具有较高的同源性。再通过 CDS 设计 3'、5'RACE 扩增引物克隆非编码区,将测序获得的序列拼接 起来获得 FpRelish 和 FpDorsal cDNA 全长。

长毛明对虾 *FpRelish* cDNA 全长为 5373 bp, 其中 5'-UTR 88 bp, 3'-UTR 1667 bp, 其中包括 1 个终止密码子(TAA), 2 个多聚腺苷酸加尾信号 (polyadenylation signal site)(AATAAA)和 polyA 尾。*FpDorsal* cDNA 全长为 4816 bp, 包含了 1 个 611 bp 的 5'UTR 区域和 1 个 2147 bp 的 3'UTR (非 编码区)区域。通过 ORF finder 和 Expasy 程序预



图 1 长毛明对虾 FpRelish 和 FpDorsal 基因的克隆

a. 长毛明对虾 RNA 的电泳图谱; b. 长毛明对虾 *FpRelish* 基因的克隆, M: DL10000 DNA marker,
1: *FpRelish* 扩增产物; c. 长毛明对虾 *FpDorsal* 基因的克隆, M: DL10000 DNA marker, 1: *FpDorsal* 扩增产物. Fig. 1 Cloning of the *FpRelish* and *FpDorsal* genes of *Fenneropenaeus penicillatus*a. The electrophoretic patterns of the RNA of *F. penicillatus*; b. Cloning of the *FpRelish* gene of *F. penicillatus*,
M: DL10000 DNA marker, 1: amplification product of *FpRelish*; c. Cloning of the *FpDorsal* gene of *F. penicillatus*, M: DL10000 DNA marker, 1: amplification product of *FpRelish*; c. Cloning of the *FpDorsal*.

测出 FpRelish 编码区全长 3618 bp, 编码 1205 个 氨基酸,含量第一的是谷氨酰胺(9.3%),分子量 为 134.98 kD, 等电点为 5.31, 蛋白分子式为 C₅₈₃₈H₉₂₃₂N₁₆₉₈O₁₈₈₈S₄₉; *FpDorsal* 编码区全长 2058 bp, 编码 685 个氨基酸, 含量第一的是丝氨 酸(10.4%), 分子量为 73.90 kD, 等电点为 6.89, 蛋白分子式为 C3239H5133N905O1014S29, FpRelish 和 FpDorsal 蛋白均是弱酸性蛋白。应用 SignalP 预测 信号肽显示 FpRelish 和 FpDorsal 蛋白无信号肽, 用 Softberry 分析 FpRelish 和 FpDorsal 蛋白亚细 胞定位情况,表明均位于细胞质中。FpRelish 开 放阅读框含有酪氨酸激酶磷酸化位点(tyrosine kinase phosphorylation site); 酪蛋白激酶 II 磷酸化 位点(casein kinase II phosphorylation site); 蛋白 激酶 C 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site); cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸 化位点(cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site); N-糖基化位点(N-glycosylation site); N-酰基化位点(N-myristoylation site)等其他 位点, FpDorsal 氨基酸序列也具有上面提到的相 关位点(图 2a, 2b)。

SMART 分析 FpRelish、FpDorsal 蛋白结构, 结果显示 FpRelish 和 FpDorsal 蛋白都具有 RHD (氨基酸 52-251、82-252)、IPT (氨基酸 258-360、 257-358)结构域和低复杂度区域,此外 FpRelish 蛋白还有 6 个 ANK 锚蛋白序列和 2 个卷曲螺旋 结构。用 DNAStar 中 Protean 分析 FpRelish 和 FpDorsal 蛋白二级结构,结果表明 FpRelish 蛋白 质二级结构包含 41 个 α-螺旋、67 个 β-折叠、54 个 T-转角和 49 个无规则卷曲, FpDorsal 蛋白二级 结构包含 24 个 α-螺旋、54 个 β-折叠、39 个 T-转角和 37 个无规则卷曲(图 2c, 2d)。

将推测的 FpRelish、FpDorsal 氨基酸序列进行 Blast 检索分析, FpRelish 分析结果显示其与中国明对虾两个亚型的相似性最高,分别为96.39%、96.43%,与凡纳滨对虾、斑节对虾、日本囊对虾、中华绒螯蟹、的相似性分别为93.81%、95.30%、89.61%、75.63%; FpDorsal 分析结果显示其与斑节对虾、日本囊对虾、中国明对虾的相

似性分别为 98.06%、93.85%、99.52%。用 MEGA10 构建系统进化树, 分析了 FpRelish 和 FpDorsal 与 其他含有 RHD 和 IPT 结构域的同源蛋白之间的亲 缘关系。结果表明不同物种来源的核转录因子之 间是保守的,并且在一定程度上是相关的。从系 统进化树上看 FpRelish、FpDorsal 主要与甲壳动 物聚在一支, 与其他无脊椎动物的亲缘关系相对 较远(图 3)。利用 DNAMAN 软件对 FpRelish、 FpDorsal 与中国明对虾、日本囊对虾、凡纳滨对 虾和拟穴青蟹的RHD和IPT结构域分别进行了多 序列比对分析,结果显示, FpRelish 的 RHD 结构 域与 LvRelish、PcRelish 和 EsRelish 分别具有 98.06%、96.00%、83.00%的一致性, FpRelish 的 IPT 结构域与 LvRelish、EsRelish 分别具有 98.06%、87.38%的一致性,与中国明对虾完全一 致; FpDorsal 与其比对物种的 RHD 和 IPT 结构域 也具有高度一致性, 这说明 NF-κB 家族的 RHD 和 IPT 结构域在进化上高度保守(图 4)。

2.2 FpRelish 和 FpDorsal 基因的组织表达分析

通过 qRT-PCR 技术检测 *FpRelish* 和 *FpDorsal* 基因在不同组织中的表达情况,结果表明 *FpRelish* (图 5a)和 *FpDorsal* (图 5b)在检测的9个 组织中都有表达。将心脏中的基因表达水平设定 为1.0, *FpRelish* 和 *FpDorsal* 均在肝胰脏中表达量 最低,均在血细胞中表达量最高, *FpRelish* 血细胞 表达量为肝胰腺的8倍; *FpDorsal* 血细胞表达量 为肝胰腺的10.7倍,两者在肌肉、鳃、心脏的转 录水平比其他组织高, *FpRelish* 在其余的组织中 表达量没有显著差异(P>0.05), *FpDorsal* 在性腺和 神经的表达量相对肠道、胃和肝胰脏略高。

2.3 *FpRelish* 和 *FpDorsal* 基因在细菌侵染下的 表达变化特征分析

人工侵染溶藻弧菌和嗜水气单胞菌后,分析 长毛明对虾鳃中 *FpRelish、FpDorsal* 基因在侵染 后不同时间点的表达变化特征。结果显示,细菌 侵染明显改变了 *FpRelish* 和 *FpDorsal* 基因在长毛 明对虾鳃中的表达模式。

2.3.1 *FpRelish* 基因表达分析 细菌侵染下鳃中 *FpRelish* 表达结果显示(图 5c), 与细菌感染组相



图 2 FpRelish 和 FpDorsal 氨基酸序列位点和蛋白二级结构示意图

a. FpRelish 氨基酸序列位点图; b. FpDorsal 氨基酸序列位点图; c. FpRelish 蛋白二级结构; d. FpDorsal 蛋白二级结构. Fig. 2 Schematic diagram of amino acid sequence sites and protein secondary structures of FpRelish and FpDorsal a. FpRelish amino acid sequence site; b. FpDorsal amino acid sequence site; c. Secondary structures of FpRelish protein; d. Secondary structures of FpDorsal protein.

比,对照组的 *FpRelish* 表达水平保持更稳定 (*P*>0.05)。*FpRelish* mRNA 的表达在嗜水气单胞菌 刺激后 3 h、6 h、9 h、12 h和 24 h均显著上调 (*P*<0.05),48 h显著下调(*P*<0.05)。整体变化呈上 升后下降趋势,受到细菌刺激后 3 h迅速上调,约 为同一时间对照组的 2.4 倍,持续上升在 6 h达到 最高表达强度,约为同一时间对照组的 2.7 倍;然 而 *FpRelish* mRNA 的表达在溶藻弧菌刺激后 9 h、 12 h、24 h和 48 h均显著上调(*P*<0.05),3 h和 6 h 没有显著变化,在感染后 12 h增加至同一时间对 照组 1.6 倍,并显示出显著的上升趋势,24 h 最终 达到其最高强度,约为同一时间对照组的 1.9 倍, 整体规律为先上升后下降。

细菌侵染下肝胰脏中 *FpRelish* 表达模式显示 (图 5d), *FpRelish* 基因 mRNA 的表达在嗜水气单 胞菌刺激后的 3~24 h 呈上升再下降的变化趋势, 在 9 h 呈高转录水平,约为同一时间对照组的 2 倍,之后 48 h 迅速上调,达到最高表达量,约为 同一时间对照组的 4.5 倍,除 3 h 没有显著变化, 其他时间点均显著上调(*P*<0.05)。在溶藻弧菌刺激 下 3 h 和 24 h 均显著上调(*P*<0.05),9 h、12 h 和 48 h 均显著下调(*P*<0.05),6 h 没有显著变化,3 h





达最高表达量,约为对照组的1.5倍。

2.3.2 FpDorsal 基因表达分析 细菌侵染下鳃 中 FpDorsal 表达结果显示(图 5e),对照组内各时间点间波动不明显。嗜水气单胞菌感染组在 3 h 受到细菌刺激迅速上调,6 h 的相对表达量略有下降,9 h 的相对表达量达到最高,约为同一时间对照组的 2.1 倍,之后在感染 12 h、24 h 和 48 h 的相对表达量下降,但与对照组相比,仍是显著上调(P<0.05)。溶藻弧菌感染组在感染后的 6~24 h 呈上升趋势,感染后 24 h 的相对表达量达到最高,为同一时间对照组水平的 1.5 倍,之后在感染的 48 h 的相对表达量下降。在 3 h、12 h 和 24 h 均显著上调(P<0.05),9 h 显著下调(P<0.05),6 h 和 48 h 没有显著变化。

细菌侵染下肝胰脏中 FpDorsal 表达模式显示

(图 5f), 嗜水气单胞菌感染组在 6h、9h、12h和 48h均显著上调(P<0.05), 24h显著下调(P<0.05), 3h没有显著变化。在 3~24h呈上升再下降的规 律, 在 9h转录水平最高,约为对照组的 22倍, 48h恢复上调模式,表达量约为对照组 5倍。溶 藻弧菌感染组在 3h、6h和 9h均显著上调 (P<0.05), 24h显著下调(P<0.05), 12h和48h没有 显著变化,整体先上升再下降变化趋势, 6h达最 高表达量,约为对照组的 1.5倍。

总结图 5 可以得到, FpRelish 和 FpDorsal 基因对两种细菌敏感度不同,两者均对嗜水气单胞菌更敏感,在细菌刺激下 FpRelish 和 FpDorsal 基因转录水平几乎都显示上调,不同免疫器官表达模式不同,推测 FpRelish 和 FpDorsal 都参与了机体的免疫过程。



图 4 FpRelish、FpDorsal 与其他无脊椎动物 Relish、Dorsal 同系物 RHD 结构域(a, c)和 IPT 结构域(b, d)的多序列比对 Fig. 4 Multiple sequence alignment for the RHD domain (a, c) and IPT domain (b, d) of FpRelish, FpDorsal with homologues from other invertebrates

3 讨论

3.1 *FpRelish* 和 *FpDorsal* 基因序列特征及系统 进化关系

对虾作为一种无脊椎动物只能依靠天然免疫 系统抵御病毒、细菌和真菌入侵。抵御真菌、革 兰氏阳性菌和病毒侵染主要通过 Toll 信号通路, 而 IMD 信号通路主要抵御革兰氏阴性菌的感染 和病毒的入侵^[4]。在本研究中,作者从长毛明对虾 中克隆了 *Relish*、*Dorsal*基因,分别命名为 *FpRelish*和*FpDorsal*,均属于 NF-κB 家族。NF-κB 是一类重要的核转录因子,其中 Relish 是 IMD 信 号通路的重要转录因子,Dorsal 是 Toll 信号通路 的重要转录因子^[26]。FpRelish 蛋白 N 端有高度保 守的 RHD 和 IPT 结构,其中包含 DNA 结合、二 聚化以及与 IκB 家族成员的相互作用位点,在 C 端具有多个 ANK 重复序列,除此还有低复杂度 区域、卷曲螺旋区,第 64~69 位氨基酸残基含有 Relish 标签 FRYKSE,与经典的 Relish 的结构一 样^[27]。FpDorsal 蛋白包含 RHD 和 IPT 结构域, 95~101 位氨基酸残基含有 Dorsal 标签 FRYICEG。 NF-κB 家族蛋白中经典 Dorsal 蛋白有 RHD 结构 域,并在 C 端具有在氨基酸一级结构上并不保守 的转录激活域,例如果蝇 Dorsal 蛋白^[28]。然而已 鉴定的中国明对虾 FcDorsal^[15]和三疣梭子蟹 Pt-Dor^[7]蛋白 C 端没有通常情况下 Dorsal 蛋白所 具备的转录激活域序列;真海鞘(*Halocynthia roretzi*)和玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)中的 As-Rel1、



Fig. 5 Expression of *FpRelish* and *FpDorsal* genes in healthy *Fenneropenaeus penicillatus* tissues (a, b) and stimulated by *V. alginolyticus* and *A. hydrophila* (c, d, e, f)
 Expression patterns of *FpRelish* and *FpDorsal* in gill (c, e) and hepatopancreas (d, f) after

infection with Aeromonas hydrophila and Vibrio alginolyticus.

As-Rel2、Ci-Rel1、Ci-Rel2、As-Rel1、Ci-Rel1 是 经典的 NF-κB 蛋白, As-Rel2、Ci-Rel2 较经典的 NF-κB 蛋白缺少 C 端特有区域, As-Rel2 较经典 NF-κB 蛋白缺少核定位信号和 C 端部分经典 Rel/NF-κB 蛋白的特有区域, As-Rel1 和 As-Rel2 是由同一基因经过可变剪切得到的, 真海鞘的 As-Rel2 抑制 As-Rel1 的核转录激活作用, Ci-Rel2 调控某些具有 κB 位点基因的转录, 而 Ci-Rel2 调 控 Ci-Rel1 的转录激活作用^[29-30]。而关于 Relish 的结构形式也有较多报道,中国明对虾^[18,31]、凡 纳滨对虾^[5]、克氏原螯虾^[9]和家蚕^[19]均发现了 Relish 两个亚型,在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和斑节对虾(*P. monodon*)中只发现了 长型 MrRelish 和 PmRelish^[32-33]。埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)有 3 种 Rel家族蛋白形式: Relish、IkB-type 和 Rel-type^[34]。这种结构上的差异并不是随机的, 而是经过不同的裁剪方式,产生不同的 mRNA 在 功能上进行更细致的分工或合作。综上,推测长 毛明对虾极有可能还存在 Dorsal 和 Relish 蛋白的 另一种形式,具体还有待进一步验证。

序列比对分析结果发现 FpRelish 和 FpDorsal 与其他甲壳动物的 Relish、Dorsal 有很高的同源 性,说明甲壳动物 Relish 和 Dorsal 的蛋白结构域 高度保守。进化树显示, FpRelish、FpDorsal 均与 其他对虾、蟹聚为一个分支,昆虫、软体动物等 分别各聚为一支,说明 FpRelish 和 FpDorsal 特征 结构及亲缘关系和甲壳动物较近。

3.2 FpRelish 和 FpDorsal 基因组织分布特点

实时荧光定量 PCR 结果显示, FpRelish 和 FpDorsal 在所有检测组织均有表达, 但表达丰度 有所不同, 说明它们可能参与不同组织的先天免 疫过程。FpRelish 和 FpDorsal 均在血细胞中表达 量最高,其次在肌肉、鳃、心脏中也丰富存在,两 者最低表达量均为在肝胰脏中。FpRelish 的分布 结果与克氏原螯虾 LPcRelish^[9]、中国明对虾 FcRelish^[18]和罗氏沼虾 MrRelish^[32]极为相似,均 是在血细胞丰度最高, 肝胰脏最低。FpDorsal 分 布特征与中国明对虾 FcDorsal 相似^[15],同在血细 胞、肌肉中丰富存在,在肝胰脏最低,但和其他对 虾有区别,如MrDorsal在血细胞和鳃组织中表达 量较高,而在心脏和淋巴器官中表达量非常少[35], LvRelish 在鳃、血细胞高表达, 而在肌肉、心脏和 肝胰脏低表达^[13],可能是由于物种不同引起的。 血细胞是主要的免疫活性细胞, 介导宿主对入侵 微生物的免疫防御反应,如对病原或异物的吞 噬、包埋、杀灭和排除作用和产生效应因子等^[36]。 鳃也是虾的主要免疫器官之一, 在异物滤过方面 发挥重要作用。所以,从组织表达水平也可以推 测长毛明对虾中的 FpRelish 和 FpDorsal 可能与免 疫关系密切、与其他物种中的 Rel/NF-кB 家族蛋 白一样,在免疫过程中起到重要作用。

3.3 细菌侵染下鳃和肝胰脏中 *FpRelish*、 *FpDorsal* 基因表达模式

为初步研究并探讨 FpRelish 和 FpDorsal 的功能,利用 qPCR 技术分析 FpRelish 和 FpDorsal 基因在嗜水气单胞菌(G⁻)、溶藻弧菌(G⁻)感染后的表达情况。结果显示,在细菌侵染下,鳃中 FpRelish、FpDorsal 基因和肝胰脏中 FpDorsal 基

因主要呈现上升再下降的表达变化模式, 而肝胰 脏中 FpRelish 基因 3~24 h 呈上升再下降的变化趋 势, 之后 48 h 迅速上调, 达到最高表达量, 说明 病原的刺激对免疫组织中 FpRelish 和 FpDorsal 的转录产生了影响。与之类似,中国明对虾^[15,18]、 罗氏沼虾^[32]、斑节对虾^[33]和家蚕^[19]在细菌或病毒 刺激下,组织中 Relish 或 Dorsal 均出现先升后降 的表达变化模式。Li 等^[18]发现中国明对虾在溶壁 微球菌刺激下,头胸部中 FcRelish 在 1~12 h 呈上 升再下降, 24 h 再迅速上升达到最高表达, 与肝 胰脏中 FpRelish 基因表达变化模式极为相似, 而 Sun 等^[16]发现日本囊对虾金黄色葡萄球菌刺激后 1~6 h 肠道、鳃、血细胞中 MiDorsal 基因表达量 一直是上升趋势,黄欣^[35]发现白斑综合征病毒感 染罗氏沼虾后, MrDorsal 在鳃组织中 0~36 h 没有 明显变化,48h突然上升,张卓星^[9]研究副溶血性 弧菌刺激鳌虾后,得出 SPcRelish 和 LPcRelish 在 血细胞、鳃和肠道均是持续上升趋势。综上,本 研究结果与已有的研究结果既有类似也有不同, 这一差异能为筛选对虾有效的抗菌病害免疫多肽 提供数据参考,也能为对虾细菌病防治策略提供 参考,不同结论可能是因为使用的侵染菌株、实 验物种和细菌胁迫时间长短不同造成的,具体原 因有待进一步研究。

在细菌刺激下 FpRelish 和 FpDorsal 基因显著 上调,且在嗜水气单胞菌刺激下上调的趋势比溶 藻弧菌刺激更明显,猜测 FpRelish 和 FpDorsal 对 嗜水气单胞菌刺激更敏感。已报道的 FcRelish^[18]、 PmRelish^[33]、LvDorsal^[17]和 MjDorsal^[16]等在受到细 菌或病毒刺激时都出现显著上调,并通过 RNA 干 扰技术验证 Relish、Dorsal 与 AMP 的转录密切相 关,表明 Relish、Dorsal 参与对虾抵御细菌或病毒 免疫反应,本研究结果与之相似,说明 FpRelish 和 FpDorsal 基因可能也参与机体抗菌肽转录和 抵御细菌的免疫应答,但关于其如何调控抗菌肽 和参与免疫应答中的功能作用还需深入研究。

嗜水气单胞菌刺激后,在鳃中 *FpRelish* 基因 3 h 迅速上调,持续上升,在 6 h 达到最高表达量, *FpDorsal* 基因则在 9 h 达到最高表达量,推测在 嗜水气单胞菌刺激下鳃中 *FpRelish* 基因先起了免 疫作用。在肝胰脏中 *FpRelish* 基因 9 h 达到呈高 转录水平,48 h 达到最高表达量,*FpDorsal* 基因 9 h 达到最高表达量,48 h 仍保持高表达。*FpRelish* 基因在两种组织里不同的表达模式表明其不同组 织参与嗜水气单胞菌侵染的作用模式可能有所不 同,而 *FpDorsal* 基因在两种组织中应答嗜水气单 胞菌感染的作用模式可能较为类似。在鳃中 *FpRelish、FpDorsal* 基因受到溶藻弧菌感染时其 表达模式极其相似,最高表达量均在24 h。在肝 胰脏中 *FpDorsal* 基因在 6 h 表达水平最高,类似 日本囊对虾 Toll 通路被细菌激活后,血细胞、肠 和鳃中的 Dorsal 蛋白水平均在 6 h 达到最高表达 量^[16],表明 *Dorsal* 参与对虾抵御的细菌免疫反

应。从图 5 可以看出细菌刺激下肝胰脏中的最高 表达量比鳃中高, 推测在细菌侵染下肝胰脏组织 起的免疫应答作用比鳃组织强。

果蝇 Dorsal、DIF、和 Relish 基因通过 Toll、 IMD 通路参与机体抗菌肽产生、黑色素化、吞噬 等生命活动^[37]。目前已被鉴定的核转录因子几乎 都被证实与机体产生抗菌物质密切相关,根据研 究结果推测 FpRelish和 FpDorsal 参与了机体对弧 菌的免疫应答过程,但其在免疫过程中起的具体 作用还有待研究。

参考文献:

- [1] Zhang G L, Li Z B, Wang Z L, et al. Study status and perspective of *Fenneropenaeus penicillatus*[J]. Modern Fisheries Information, 2010, 25(2): 7-10. [张桂玲, 黎中宝, 王展林,等. 长毛明对虾的研究现状与展望[J]. 现代渔业 信息, 2010, 25(2): 7-10.]
- [2] Yang S P, Wang C G, Li Y H, et al. Adaptability of juvenile *Fenneropenaeus penicillatus* to salinity and temperature[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(10): 298-301. [杨世 平, 王成桂, 李扬海, 等. 长毛明对虾幼虾对盐度和温度 的适应性[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 298-301.]
- [3] Wei G B, Wu Y Z, Zhang Y L, et al. cDNA cloning and tissue expression of prophenoloxidase gene in *Fenneropenaeus penicillatus*[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(11): 4910-4918. [韦光本, 伍元植, 张依琳, 等. 长毛明 对虾酚氧化酶原基因 cDNA 克隆及组织表达分析[J]. 基 因组学与应用生物学, 2019, 38(11): 4910-4918.]
- [4] Zhang Y H, Gu Z M, Lan J F. Recent advances in study of immune response of shrimp to pathogen infection: A

review[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(3): 119-130. [张英豪,顾泽茂,兰江风. 虾应对感 染的先天免疫反应研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(3): 119-130.]

- [5] Huang X D, Yin Z X, Liao J X, et al. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 230-238.
- [6] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46(5): 705-716.
- [7] Zhao J J, Tao Z, Zhou S M, et al. Cloning and expression of NF-KB family genes in *Portunus trituberculatus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(2): 298-304. [赵姣姣, 陶 震,周素明,等. 三疣梭子蟹 NF-κB 家族基因 Relish 和 Dorsal 的克隆及表达特征[J]. 水生生物学报, 2019, 43(2): 298-304.]
- [8] Liu W J. Cloning and expression analysis of *TLR22 & Relish* genes in *Penaeus monodon*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [刘文静. 斑节对虾 TLR22 及 Relish 基因 的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [9] Zhang Z X. Study on the function of Relish, Toll and Pellino in innate immunity of *Procambarus clarkii*[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2020. [张卓星. Relish、Toll 和 Pellino 在克氏原螯虾先天免疫中的功能研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2020.]
- [10] Avadhanula V, Weasner B P, Hardy G G, et al. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(9): e1000582.
- [11] Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, et al. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(21): 9465-9469.
- [12] Xi Z Y, Ramirez J L, Dimopoulos G. The Aedes aegypti toll pathway controls dengue virus infection[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(7): e1000098.
- [13] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in Drosophila adults[J]. Cell, 1996, 86(6): 973-983.
- [14] Zambon R A, Nandakumar M, Vakharia V N, et al. The Toll pathway is important for an antiviral response in Drosophila[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(20): 7257-7262.
- [15] Li F H, Wang D D, Li S H, et al. A Dorsal homolog (FcDorsal) in the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

is responsive to both bacteria and WSSV challenge[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(8): 874-883.

- [16] Sun J J, Lan J F, Shi X Z, et al. β-arrestins negatively regulate the toll pathway in shrimp by preventing dorsal translocation and inhibiting dorsal transcriptional activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(14): 7488-7504.
- [17] Huang X D, Yin Z X, Jia X T, et al. Identification and functional study of a shrimp Dorsal homologue[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(2): 107-113.
- [18] Li F H, Yan H, Wang D D, et al. Identification of a novel relish homolog in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and its function in regulating the transcription of antimicrobial peptides[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(10): 1093-1101.
- [19] Tanaka H, Matsuki H, Furukawa S, et al. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2007, 1769(9-10): 559-568.
- [20] Zhong X, Rao X J, Yi H Y, et al. Co-expression of dorsal and Rel2 negatively regulates antimicrobial peptide expression in the tobacco hornworm *Manduca sexta*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20654.
- [21] Fan Z H, Wang X W, Lu J H, et al. Elucidating the function of an ancient NF-kappaB p100 homologue, CrRelish, in antibacterial defense[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(2): 664-670.
- [22] Yu A Q, Jin X K, Li S, et al. Molecular cloning and expression analysis of a dorsal homologue from *Eriocheir* sinensis[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(4): 723-727.
- [23] Huang X D, Liu W G, Guan Y Y, et al. Molecular cloning and characterization of class I NF-κB transcription factor from pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(3): 659-666.
- [24] Wu X, Xiong X H, Xie L P, et al. Pf-Rel, a Rel/nuclear factor-kappaB homolog identified from the pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(7): 533-539.
- [25] Cai S H, Huang Y C, Wang B, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) participates in peroxinectin gene expression in *Fenneropenaeus penicillatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 64: 193-201.
- [26] Uvell H, Engström Y. A multilayered defense against infection: Combinatorial control of insect immune genes[J]. Trends in Genetics, 2007, 23(7): 342-349.
- [27] Yan H. Cloning and expression of nuclear transcription

factors Rel/NF-кB family genes in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008. [阎慧. 中国明对虾核 转录因子 NF-кB 家族基因的克隆与表达分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2008.]

- [28] Liu T, Luo K J. Immunity-related domains of Toll and IMD signaling pathways in Drosophila[J]. Journal of Environmental Entomology, 2011, 33(3): 388-395. [刘甜, 罗开珺. 果蝇 Toll 和 IMD 信号通路中的功能结构域[J]. 环境昆虫 学报, 2011, 33(3): 388-395.]
- [29] Kawai N, Shimada M, Kawahara H, et al. Regulation of ascidian Rel by its alternative splice variant[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(22): 4459-4468.
- [30] Kawai N, Takahashi H, Nishida H, et al. Regulation of NF-κB/Rel by IκB is essential for ascidian notochord formation[J]. Developmental Biology, 2005, 277(1): 80-91.
- [31] Wang D D. Functional studies on the regulation of immunity in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus cinensis* by the nuclear transcription factor, NF-κB family genes[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012. [王冬冬. 中国明对虾核转录因子 NF-kB 家族基因在免疫 调控中的功能研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋 研究所), 2012.]
- [32] Shi Y R, Jin M, Ma F T, et al. Involvement of *Relish* gene from *Macrobrachium rosenbergii* in the expression of anti-microbial peptides[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2015, 52(2): 236-244.
- [33] Visetnan S, Supungul P, Hirono I, et al. Activation of *Pm*Relish from *Penaeus monodon* by yellow head virus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 42(2): 335-344.
- [34] Shin S W, Kokoza V, Ahmed A, et al. Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF-kappa B transcription factor Relish from the mosquito *Aedes aegypti*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(15): 9978-9983.
- [35] Huang X. Study on immune function of lectin, dorsal and ras in main economic shrimps[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018. [黄欣. 凝集素、Dorsal 及 Ras 在主要经 济虾中的免疫功能研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2018.]
- [36] Liu Y C. Cloning and expression of immune genes related to coagulation reaction in *Penaeus chinensis*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2005. [刘逸尘. 中国明对虾体内凝结反应过程中相关免疫基因 的克隆与表达研究[D]. 青岛:中国科学院研究生院(海洋 研究所), 2005.]
- [37] Kim T, Kim Y J. Overview of innate immunity in Drosophila[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(2): 121-127.

Cloning and expression analysis of NF-kB family genes under bacterial infection of *Fenneropenaeus penicillatus*

LIANG Fangmei¹, ZHU Peng¹, QIU Chuntao¹, WANG Yanmei¹, LIU Lili¹, CAI Shuanghu², WANG Pengliang¹, ZHANG Hong¹, CHEN Jianqing¹, XU Youhou¹

Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, Beibu Gulf University, Qingzhou 535011, China;
 College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Fenneropenaeus penicillatus is an important economic species naturally distributed in China. The Beibu Gulf sea area is currently one of the main wild resource distribution areas of F. penicillatus. In the 1990s, due to its delicious meat and fast growth rate in the later stages of its growth, it became the main species of prawn cultured along the coast of South China. Unfortunately, with the outbreak of disease and the successful cultivation and promotion of the introduced species Litopenaeus vannamei, F. penicillatus has been gradually replaced, and currently only fishing is the mainstay. Due to overfishing and environmental pollution, F. penicillatus now is listed as a red book species. With the frequent occurrence of prawn bacterial diseases, the combination of native prawn species to develop new strains of prawn disease resistance is a current research hotspot. Nuclear transcription factor NF-KB family genes control many important immune signaling pathways in invertebrates and produce immune effector factors to resist external pathogenic stimuli, playing a very important role. RACE and real-time quantitative PCR technology were used to systematically study the expression of NF-KB family genes (*Relish* and Dorsal) of F. penicillatus harvested from the Beibu Gulf under the infection of Vibrio alginolyticus and Aeromonas hydrophila, and the genes were named FpRelish and FpDorsal, respectively. The full-length cDNA of FpRelish is 5373 bp, including an 88 bp of 5'-UTR region, 1667 bp of 3'-UTR region (non-coding region); and a 3618 bp coding region encoding 1205 amino acids. The full-length cDNA of FpDorsal is 4816 bp, including a 611 bp of 5'-UTR region, 2147 bp of 3'-UTR region (non-coding region), and 2058 bp coding region encoding 685 amino acids. Both FpRelish and FpDorsal have RHD domains shared by Rel/NF-KB family members. Homology analysis showed that the nucleotide sequence of *FpRelish* had a 96% similarity to the two subtypes of the *Relish* gene in Penaeus chinensis. The nucleotide sequence of FpDorsal is 98 percent homologous to the Dorsal gene in Penaeus monodon. Phylogenetic analysis showed that both FpRelish and FpDorsal first converged with crustaceans, respectively. The real-time fluorescence quantitative RT-qPCR analysis showed that *FpRelish* and *FpDorsal* were expressed in all detected tissues. The expression levels of FpRelish and FpDorsal were the lowest in the hepatopancreas and the highest in blood cells, with a difference of 8-10.7 times. The expression patterns of *FpRelish* and *FpDorsal* genes in gill and hepatopancreas were significantly altered by bacterial infection. After A. hydrophila stimulation, FpRelish and FpDorsal genes were upregulated first and then downregulated in both the gill and hepatopancreas. The expression of the *FpRelish* gene in the gill was the highest at 6 h, which was 2.7 times that of the control group, and the expression of the *FpDorsal* gene at 9 h was 2.1 times higher than that in the control group. In the hepatopancreas, the *FpRelish* gene was highly expressed at 9 h, and the highest expression level was at 48 h, which was 4.5 times that of the control group. The 9 h expression of the FpDorsal gene in the hepatopancreas was 22 times higher than that in the control group. After V. alginolyticus stimulation, *FpRelish* gene expression in the gills was the highest at 24 h, which was 1.9 times that of the control group and the expression of *FpDorsal* gene at 24 h was 1.5 times that of the control group. In the hepatopancreas, the expression of *FpRelish* gene was the highest at 3 h and the *FpDorsal* gene was the highest at 6 h, which were 1.5 times that in the control group. These results suggest that NF- κ B transcription factor plays an important role in the immune regulation of F. penicillatus. This study will help us better understand the innate immune mechanism of prawn and help us to obtain more effective methods to prevent prawn disease.

Key words: *Fenneropenaeus penicillatus*; NF-κB family genes; bacterial infection; cloning and expression **Corresponding author:** XU Youhou. E-mail: 36714447@qq.com