

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01166

脊尾白虾丝氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆及表达分析

李洋^{1,2}, 刘萍², 李健², 李吉涛², 马朋², 高保全²

1. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 采用 RACE 方法获得了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)丝氨酸蛋白酶抑制剂 *serpin* 基因的 cDNA 序列。该基因全长 1 516 bp, 开放阅读框 1 245 bp, 编码 414 个氨基酸, 其预测分子量为 45.06 kD, 理论等电点为 5.694, 并含有两个糖基结合位点。同源性分析发现其与斑节对虾(*Penaeus monodon*)同源性最高, 达到 49%。组织表达分析表明, *serpin* 基因在脊尾白虾血细胞中表达量最高, 其次是肝胰腺和鳃组织, 在肌肉中表达量最低。不同盐度胁迫后脊尾白虾的血细胞 *serpin* 基因表达量在盐度胁迫 8 h 时显著高于对照组($P < 0.05$), 肝胰腺组织中 *serpin* 基因表达量在盐度胁迫后 2 h 和 24 h 出现明显峰值, 且显著高于对照组($P < 0.05$)。上述结果表明, 脊尾白虾 *serpin* 基因参与了急性盐度胁迫下机体的应激反应。本研究通过克隆脊尾白虾酚氧化酶原激活系统中的丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 cDNA 全长, 分析盐度胁迫后其在血细胞和肝胰腺组织中的表达变化规律, 以期对脊尾白虾的健康养殖提供理论基础和参考依据。

关键词: 脊尾白虾; 丝氨酸蛋白酶抑制剂基因; 组织表达; 盐度胁迫; 应激反应

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1166-09

丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, SPI)是对丝氨酸蛋白水解酶有抑制活性的一类蛋白质, 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 是自然界中种类最多, 含量最为丰富的蛋白酶抑制剂^[1-3]。丝氨酸蛋白酶抑制剂在一系列生理、病理过程凝血、补体活化、感染、细胞迁移等方面发挥着关键性的调控作用^[4-6], 是生物体内免疫系统的重要组成部分, 是维持机体内环境稳定的重要调控因子。在过去的十几年里, 已从无脊椎动物中鉴定出了几百种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 足见丝氨酸蛋白酶抑制剂的重要性^[7-9]。根据序列特征、拓扑结构和功能的相似性, 丝氨酸蛋白酶抑制剂可以被分为 74 个家族, 包括 Serpin、Kazal 型和 pacifastin 等^[8]。在烟草天蛾(*Manduca sexta*)、

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[10-13]等节肢动物中发现有 Serpins 家族成员, 而且 Serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因在免疫反应中发挥了非常重要的作用^[11-12, 14-15]。但有关脊尾白虾 *serpin* 基因的研究尚未见报道。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白虾、小白虾和迎春虾等, 隶属长臂虾科(Palaemonidae)、长臂虾属(Palaemon)、白虾亚属(*Exopalaemon*), 系黄渤海区重要底栖虾类, 其产量仅次于中国明对虾和中国毛虾^[16]。脊尾白虾具有肉质细嫩、繁殖能力强、生长速度快、环境适应性广等优点。近年来, 作为虾蟹混养和虾池秋冬季养殖的重要种类, 脊尾白虾养殖面积不断扩

收稿日期: 2013-01-21; 修订日期: 2013-05-08.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A409); 国家虾产业技术体系项目(CARS-47); 公益性行业(农业)科研专项(201103034); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2013A0701).

作者简介: 李洋(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: liyang_able@163.com

通信作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

大。集约化养殖的虾类面临着各种环境应激, 环境因子(温度、盐度、溶解氧、pH 和氨氮等)的改变都可引发虾机体的应激反应, 若长期处于应激状态下, 虾机体的免疫功能会受到抑制, 容易诱发疾病甚至死亡。随着低盐度养殖的兴起, 盐度变化对养殖生物的影响特别是免疫系统的影响越来越引起了广泛的关注。水生动物可以根据水体的盐度调节体内的渗透压, 但是这种调节是有一定限制的, 当内外渗透压差过大时, 会消耗大量的能量来调节渗透压, 这势必会影响水生动物的生理功能, 造成生长发育缓慢、抵抗力减弱、生理紊乱等, 严重时会造成死亡^[17]。因此, 盐度的改变作为一种外源刺激和环境胁迫因子可以引起无脊椎动物相关免疫指标及机体抵抗力的变化^[18]。但是关于盐度变化对免疫相关基因表达的影响研究报道较少, 本研究克隆获得了脊尾白虾酚氧化酶原激活系统中的丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 cDNA 全长, 并分析了盐度胁迫后其在血细胞和肝胰腺组织中的表达变化规律, 以期对脊尾白虾的健康养殖提供理论基础和参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用脊尾白虾来自昌邑海丰水产养殖责任有限公司, 选取体长在(4.50±0.50) cm 的健康活虾。实验前于 200 L 的 PVC 桶中暂养 1 周, 水温 21℃, 盐度 32, pH 8.0, 连续充气, 早晚各投喂混合饵料一次。

盐度胁迫实验 设置盐度梯度为 4、11、18、25、32、39、46, 每个梯度设置 3 个平行, 每桶 135 只脊尾白虾, 取样时间设定为 0、2、4、8、16、24、32、48、72 h。取样时每个时间点每个平行取 15 只虾进行血淋巴和肝胰腺组织样品采集, 每 5 只虾同一组织的样品合并到一个采样管中。肝胰腺组织样品取完后立刻放入液氮罐中, 血液样品 800 g 离心 10 min 取血细胞加入 Trizol 后放入液氮罐中保存。

1.2 脊尾白虾总 RNA 提取及 cDNA 的合成

采集脊尾白虾不同组织样品, 液氮研磨, 每

0.05 g 组织中加 1 mL Trizol, 按 Trizol 法提取总 RNA, 所得总 RNA 使用紫外分光光度计定量检测, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认其完整性, 用 RQ1 RNase-free DNase 消化总 RNA 样品中的残留的 DNA。脊尾白虾 cDNA 合成体系(25 μL)为: 1 μL(1μg/μL)消化处理后的 RNA、Oligo dT2.5 μL、H₂O 5 μL, 72℃水浴 5 min, -80℃冰浴 2 min, 5 μL 5×buffer, 1.25 μL dNTP(10 mmol/L), 0.625 μL RNase inhibitor, 1.25 μL M-MLV, DEPC 水 4.375 μL。轻轻混匀, 离心, 42℃保温 1 h, 70℃保温 15 min。所得产物-20℃保存备用。

1.3 脊尾白虾丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 cDNA 片段的克隆

根据 NCBI 中 GenBank 所公布的三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)(AFA42363)、日本对虾 (*Marsupenaers japonicus*)(BAI50776)、中国明对虾 (ABC33916)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)(ACY66635) 的 *serpin* 基因序列, 使用 DNAMAN 软件进行比对, 找出保守区序列设计兼并引物 F1、R1 和 F2、R2(表 1), 利用这两对引物进行中间目的片段的扩增, 所得目的片段进行 Blast 比对确认其正确性。

表 1 实验中所用的引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence of primer (5'-3')
Serpin F1	AGMGGCGTGGYGCGRTGGC
Serpin R1	ACGGCGAGRYGYTKGTTCA
Serpin F2	TTCAACTACVARKMYGAGGA
Serpin R2	GGCTCCMACKCGCGTRTA
Serpin F3	CCCAACAAGGCTACTGCCAGAACTAAAG
Serpin R3	CACTGGTAGAGATGCGTGAAGTGGATGC
Serpin F4	AGGCGCGAATCTACTCTCCA
Serpin R4	CCACTCATCACCAAAAGACATCAA
18S HF	TATACGCTAGTGAGCTGGAA
18S HR	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

以脊尾白虾血细胞 cDNA 为模板进行扩增, 所得 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果及片段大小, 使用 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收纯化, 与 pMD18-T 载体进行连接, 重组质粒转

化至 Top10 感受态细胞, 挑选阳性克隆经 PCR 验证后由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 *serpin* 基因的 3'RACE 和 5'RACE 扩增

以测序所得 *serpin* 基因片段为模板设计 3'和 5'RACE 所需引物(表 1), 使用 SMARTTM RACE 试剂盒说明进行 3'和 5'RACE 扩增, 扩增产物回收纯化, 克隆、测序。

1.5 序列拼接与生物信息学分析

测序结果使用 NCBI 网站提供的 VecScreen 工具进行载体去除与序列拼接(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), 拼接所得序列使用 NCBI 提供的 BLAST 程序进行比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), 利用 DNAMAN 软件进行蛋白质的翻译, 利用 EditSeq 软件进行开放阅读框的预测, 利用 SMART 和 Interpro Scan 软件进行蛋白质功能域及结构域的预测与分析, 分别利用 ClustalX 和 MEGA 软件进行多重序列比对和系统进化树构建。

1.6 *serpin* 基因组织表达和盐度胁迫后的表达变化特征

提取脊尾白虾血细胞、鳃、肝胰腺和肌肉中的总 RNA, 分别合成 cDNA, 以 *serpin* 基因的 cDNA 序列为模板, 设计引物 Serpin F3 和 Serpin R3(表 1), 根据已公布的脊尾白虾线粒体 RNA 设计内参引物 18S HF 和 18S HR(表 1), 利用定量 RT-PCR 方法进行组织表达检测。RT-PCR 扩增体系(20 μ L)为: SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(2 $\times$), 10 μ L; PCR Forward Primer(10 μ mol/L), 0.8 μ L; PCR Reverse Primer(10 μ mol/L), 0.8 μ L; ROX Reference Dye II(50 $\times$)*3, 0.4 μ L; DNA 模板, 0.6 μ L; ddH₂O, 7.4 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。每份样品做 3 组平行, 以不同盐度处理组的脊尾白虾血淋巴和肝胰腺组织总 RNA 为模板合成 cDNA, 利用 RT-PCR 方法检测 *serpin* 在盐度胁迫后的表达变化特征。荧光定量 PCR 检测结果所得数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算脊尾白虾 *serpin* 基因的表达量, 利用 SPSS 11.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 脊尾白虾 *serpin* 基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

以反转录的 cDNA 为模板得到长度为 700 bp 的 *serpin* 基因 cDNA 的中间片段, 经克隆测序后与 NCBI 已公布序列进行比对, 结果发现与斑节对虾(ADC42877)的同源性最高, 达到 49%。利用所得目的片段设计 RACE 引物 Serpin F3 和 Serpin R3 分别进行 3'、5'RACE 扩增, 分别得到 1 条 270 bp 和 500 bp 的特异性条带(图 1)。

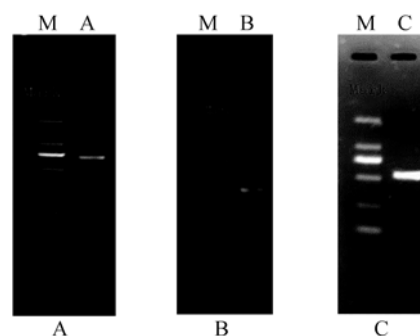


图 1 脊尾白虾 *serpin* 基因 cDNA 扩增结果

M: DNA 标准物; A 为 *serpin* 基因 cDNA 中间片段; B 为 *serpin* 基因 cDNA 5'RACE 产物; C 为 *serpin* 基因 cDNA 3'RACE 产物。

Fig. 1 The amplification results of *serpin* gene cDNA sequence from *E. carinicauda*

M: DNA ladder; A, cDNA fragment of *serpin* gene; B, 5' RACE result of *serpin* gene; C, 3' RACE result of *serpin* gene

将克隆测序结果拼接后获得一条 1 516 bp 长的脊尾白虾 *serpin* 基因序列, 其开放阅读框(ORF)为 1 245 bp 长, 编码 414 个蛋白质, 5'端和 3'端各包含 193 bp 和 88 bp 长的非编码区, 且包含一个 polyA 尾结构及一个信号肽区域和两个糖基结合位点(图 2), 其相对分子量为 45.06 kD, 理论等电点为 5.694。脊尾白虾 *serpin* 基因 cDNA 序列已提交 GenBank(登录号: JQ838045)。利用 SMART 工具进行分析发现, 脊尾白虾 *serpin* 基因编码蛋白含有一个信号肽区域以及一个 *serpin* 功能域(46~406)如图 3 所示。

使用 SignalP 4.0 软件进行信号肽预测, 结果如图 4 所示, *serpin* 基因编码氨基酸 1~19 位具有明显的信号肽特征。

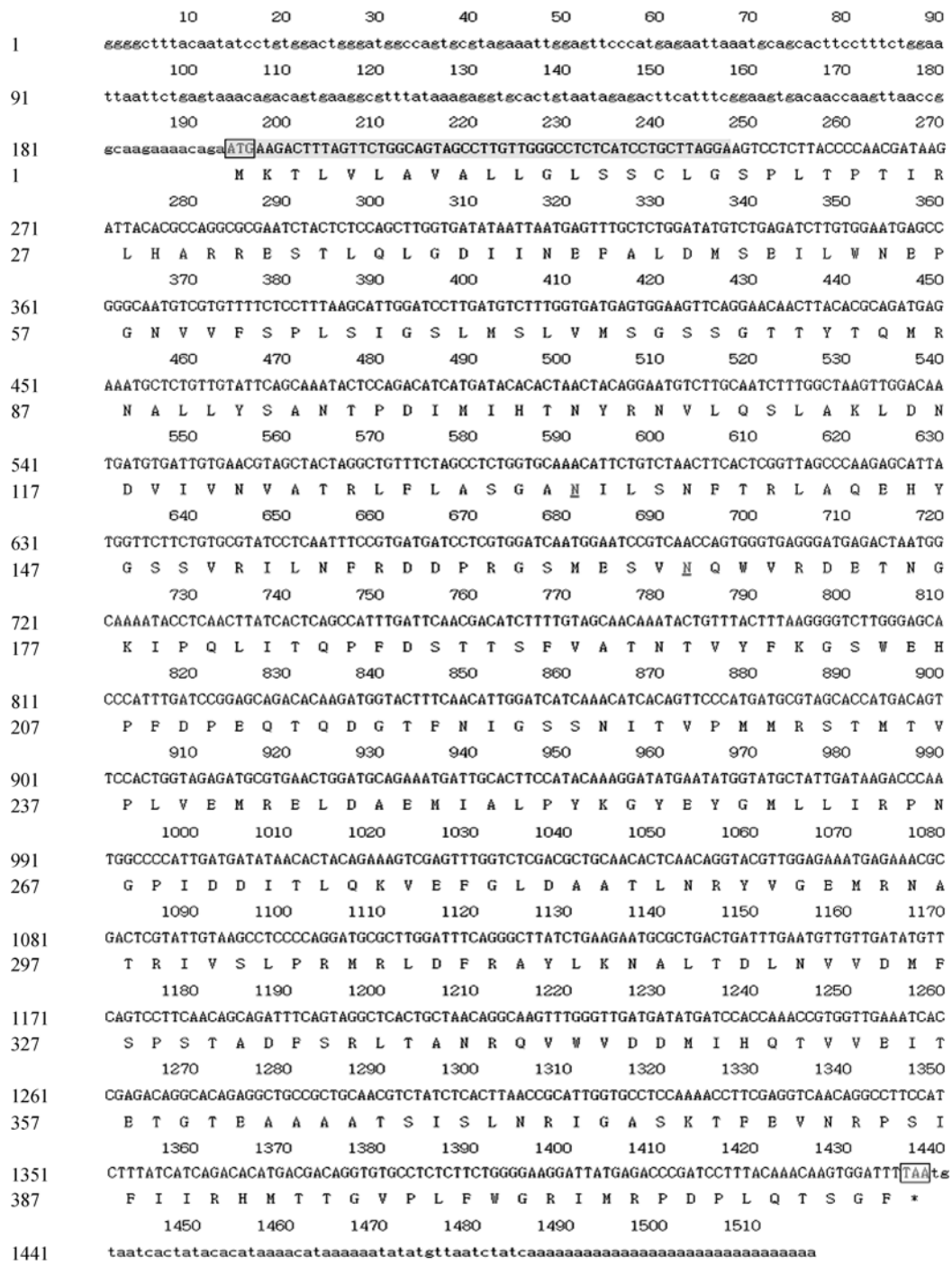


图 2 脊尾白虾 *serpin* 基因的 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

ATG 和 TAA 分别表示其起始密码子和终止密码子, 灰色部分为信号肽区域, 两个糖基结合位点用双下划线标出。

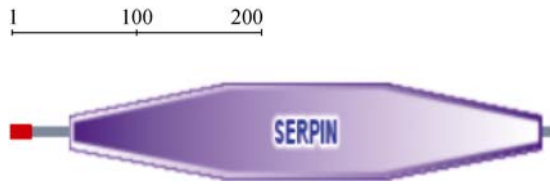
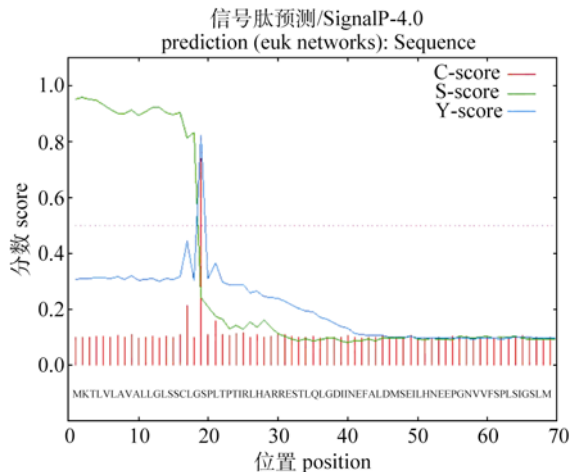
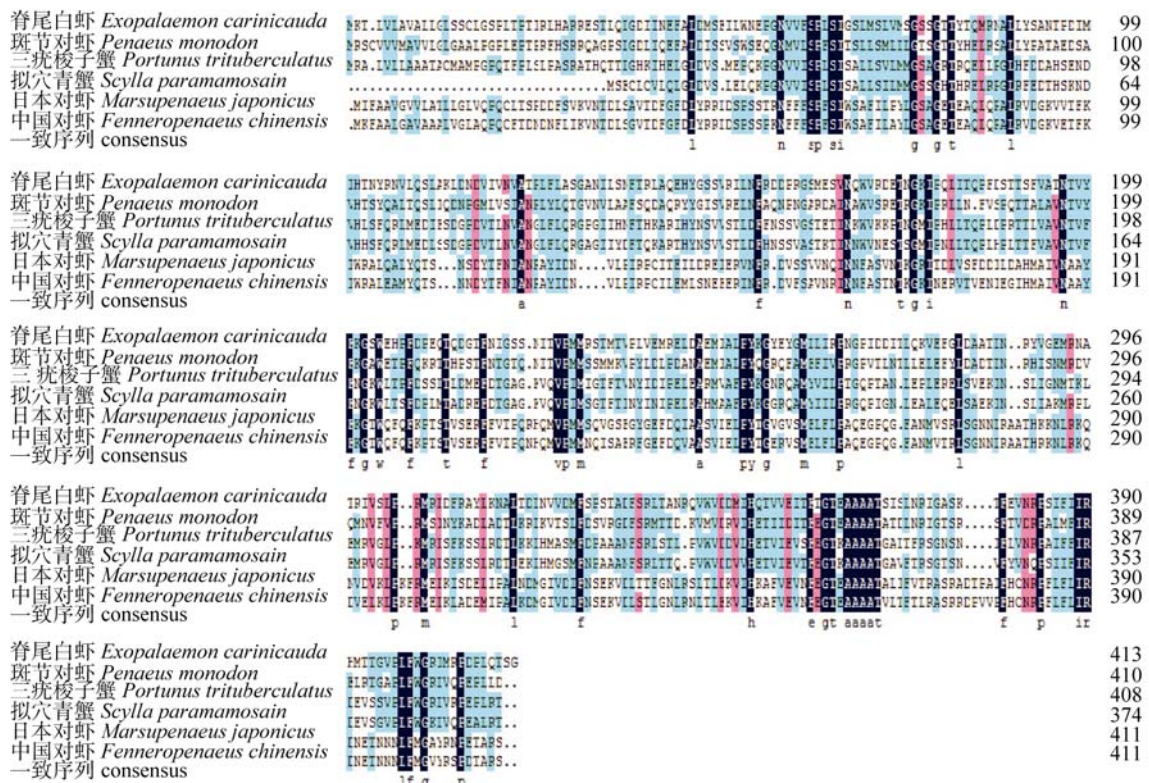
Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *serpin* gene from *E. carinicauda*

The letters in box indicated the start codon (ATG) and the stop codon (TAA). The signal pepetide was shaded and two binding sites for glycosylation were double underlined.

2.2 同源序列比对及构建系统进化树

通过 BlastP 对已公布的编码丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的氨基酸序列进行比对, 结果发现脊尾

白虾 *serpin* 与斑节对虾(ADC42877)、三疣梭子蟹 (AFA42363)、拟穴青蟹(ACY66635)、文昌鱼 (*Branchiostoma lanceolatum*)(CAD68157)的同源

图 3 脊尾白虾 *serpin* 信号肽及功能域Fig. 3 Signal peptide and functional domain of *serpin* from *E. carinicauda*图 4 脊尾白虾 *serpin* 基因信号肽分析结果Fig. 4 The signal peptide result of *serpin* sequence of *E. carinicauda*图 5 脊尾白虾 *serpin* 氨基酸序列与其他物种 *serpins* 氨基酸序列对比Fig. 5 Amino-acid sequence alignment of *E. carinicauda* *serpin* with different animals *serpins*

性分别为 49%、43%、44%和 32%。利用 MEGA 4.0 软件对所比对的 *serpin* 氨基酸序列进行系统树构建如图 6 所示, 其中脊尾白虾 *serpin* 与斑节对虾亲缘关系最近聚为一支, 然后与三疣梭子蟹、拟穴青蟹和斑马鱼聚为一个亚群。而中国对虾与日本对虾聚为一支, 然后与海虱和文昌鱼聚为一个亚群, 说明丝氨酸蛋白酶抑制剂在漫长的进化过程中出现了一定程度的分化。

2.3 脊尾白虾 *serpin* 基因组织表达分布

利用 RT-PCR 技术对正常盐度脊尾白虾各组织中 *serpin* 的表达量进行分析, 结果表明, *serpin* 在脊尾白虾血细胞中的表达量最高, 然后为肝胰腺和肌肉, 在鳃中的表达量最低。

2.4 脊尾白虾 *serpin* 经不同盐度胁迫后的表达变化

不同盐度不同时间胁迫后各组织进行取样分析结果显示(图 8), 血细胞中 *serpin* 随着盐度胁迫时间延长表达量增加, 8 h 时表达量达到最大值, *serpin* 相对表达量在不同盐度梯度间由高到低依次为盐度 11>盐度 46>盐度 4>盐度 39>盐度 18>

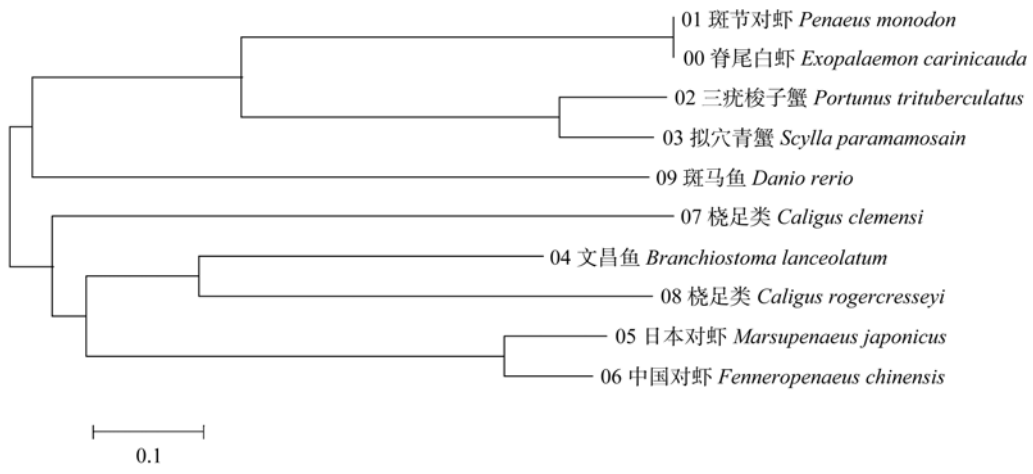


图 6 利用 MEGA4 软件 NJ 法构建的 serpin 氨基酸序列系统树

Fig. 6 NJ tree based on serpin amino acid sequences using MEGA 4.0

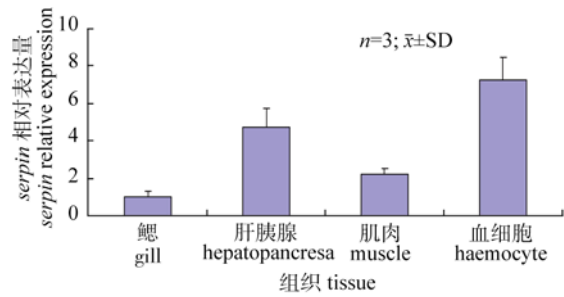


图 7 脊尾白虾 serpin 在不同组织中的表达

Fig. 7 Real time-PCR analysis of serpin gene expression from different tissues of *E. carinicauda*

盐度 25>盐度 32(对照组), 各盐度胁迫 32 h 后基本保持稳定, 此时的表达量以盐度 4 和盐度 11 最高, 盐度 18 和盐度 39 最低, 但都显著大于对照组盐度($P<0.05$)。

肝胰腺 serpin 表达在不同盐度胁迫 2 到 4 h

时显著升高并达到最大值($P<0.05$)(图 9), 而后急剧下降, 在 8 h 时全部降到最低值, 且最低值显著低于对照组($P<0.05$), 而后继续升高, 在 24 h 时各处理均达到最大值, 随着胁迫时间的延长逐渐下降, 从 48 h 逐渐达到稳定状态, 且稳定状态时相对表达量均大于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

丝氨酸蛋白酶抑制剂家族一般由 350~400 个氨基酸构成单一肽链, 并具有 8~9 个 α 螺旋和 3 个 β -片层形成的 β -夹层结构共同组成的保守三级结构, 其功能域位于 C 端, 其中 P1 位点决定了丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的抑制特异性^[6, 19]。本研究通过同源克隆获得了脊尾白虾 serpin 基因 cDNA 全长, 开放阅读框 1 245 bp, 编码 414 个氨

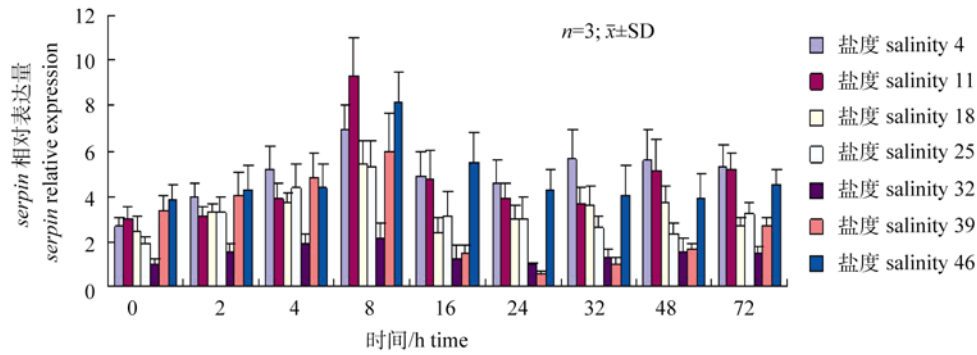


图 8 盐度胁迫后 serpin 基因在脊尾白虾血细胞中的表达变化

Fig.8 The expression of serpin in haemocyte after salinity stress of *E.carinicauda*

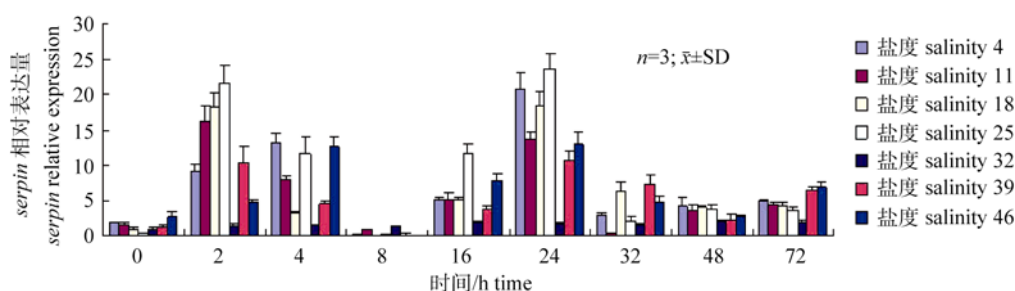


图 9 盐度胁迫后 *serpin* 基因在脊尾白虾肝胰腺中的表达变化

Fig.9 The expression of *serpin* in hepatopancreas of *E. caxinicauda* after salinity stress

基酸,其预测分子量为 45.06 kD。通过 SMART 工具进行分析,发现前 19 位氨基酸具有明显的信号肽特征,46~406 位氨基酸是 *serpin* 典型功能域,这与烟草天蛾 *serpin* 的结构类似^[10]。另外发现脊尾白虾 *serpin* 基因含有两个糖基结合位点,这与皱纹盘鲍 *serpin* 基因的序列特征一致^[15]。通过多序列比对,发现脊尾白虾 *serpin* 与其他甲壳动物 *serpin* 同源性较高,系统进化分析显示脊尾白虾 *serpin* 与斑节对虾亲缘关系最近聚为一支,然后与三疣梭子蟹和拟穴青蟹等聚为一个亚群。据此我们可以推断,本研究中克隆得到的脊尾白虾 *serpin* 为一种 *serpin* 家族的基因,而且可能具有与其他物种 *serpin* 相同的功能,这是首次在脊尾白虾报道的 *serpin* 家族基因。

无脊椎动物体内 *serpin* 基因家族具有不同的分布特点,在中国对虾和斑节对虾体内发现的 *serpin* 主要在淋巴器官、血细胞和鳃中表达,肝胰腺中的表达量很低^[11, 13]。克氏原螯虾体内的 *serpin* 基因主要在血淋巴中表达,而在肝胰腺中没有检测到^[20]。但对脊尾白虾的 *serpin* 基因组织表达研究发现, *serpin* 基因在血细胞中的表达量最高,其次是肝胰腺和肌肉,而鳃中的表达量较少,这一结果与上述对虾和小龙虾 *serpin* 基因的组织分布略有差异。推测原因可能是由于物种差异,以及开放的血液循环系统而导致的肝胰腺组织存有少量血淋巴,造成脊尾白虾肝胰腺组织中 *serpin* 基因的检测表达量有所增高所致。

酚氧化酶原系统是由 PO、SP 及相关抑制因子所组成的一个级联反应系统,在无脊椎动物免疫系统中具有非常重要的作用^[21]。但是大量研究

证实盐度变化会影响无脊椎动物酚氧化酶原系统的活性^[22-25]。本研究设置 7 个盐度梯度对脊尾白虾进行胁迫,利用荧光定量 PCR 检测了不同盐度胁迫后血细胞和肝胰腺组织中 *serpin* 基因的表达变化规律,结果发现胁迫 32 h 后低盐度能显著提高血细胞 *serpin* 基因的表达量;而在肝胰腺中低盐度组 *serpin* 基因表达量呈现胁迫 4 h 后表达量升高,8 h 后降到最低值,24 h 后达到峰值且趋于稳定,两种组织中 *serpin* 基因的表达模式呈现出明显的组织差异性和表达变化规律。说明脊尾白虾 *serpin* 基因参与了机体的环境应激反应。相似的研究结果有,中国对虾 *serpin* 基因在细菌或病毒感染后表达先下调,而后上升至与空白组相当或略高于空白组的水平^[11];鳗弧菌感染皱纹盘鲍后会导致鳃组织中 *serpin* 基因的表达水平呈现先降低,后升高,最后趋于正常^[15];烟草天蛾使用大肠杆菌和藤黄球菌感染后,该基因的 mRNA 及蛋白浓度感染初期降低,随后会逐渐升高^[26]。但本研究中脊尾白虾血细胞和肝胰腺组织中 *serpin* 基因的表达变化趋势与中国对虾和皱纹盘鲍中的研究结果不太一致,推测原因可能与胁迫源及胁迫途径、机体反应途径差异有关,相关的机制尚需深入研究。

参考文献:

- [1] Ashida M, Sasaki T. A target protease activity of serpins in insect hemolymph[J]. Insect Biochem Molec, 1994, 24: 1037-1041.
- [2] Simser JA, Palmer AT, Munderloh UG, et al. Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line[J]. Appl Environ Microb, 2001, 67: 546-552.

- [3] Sritunyalucksana K, Soderhall K. The proPO and clotting system in crustaceans[J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 53–69.
- [4] Ye S, Goldsmith EJ. Serpins and other covalent protease inhibitors[J]. *Curr Opin in Struc Biol*, 2001, 11: 740–745.
- [5] Gettings PG. Serpin structure, mechanism and function[J]. *Chem Rev*, 2002, 102: 4751–4803.
- [6] Van Gent D, Sharp P, Morgan K, et al. Serpins: structure, function and molecular evolution[J]. *Int J Biochem Cell B*, 2003, 35: 1536–1547.
- [7] Jiang H, Wang Y, Gu Y, et al. Molecular identification of a bevy of serine proteinases in *Manduca sexta* hemolymph[J]. *Insect Biochem Molec*, 2005, 35: 931–943.
- [8] Zdobnov E M, Von Mering C, Letunic I, et al. Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*[J]. *Science*, 2002, 298: 149–159.
- [9] Simonet G, Claeys I, Franssens V, et al. Genomics, evolution and biological functions of the pacifastin peptide family: a conserved serine protease inhibitor family in arthropods[J]. *Peptides*, 2003, 24: 1633–1644.
- [10] Jiang H, Wang Y, Yu X Q, et al. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs[J]. *Insect Biochem Molec*, 2003, 33: 1049–1060.
- [11] Liu Y C, Li F H, Wang B, et al. A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 345–351.
- [12] 盖云超. 中华绒螯蟹 EST 分析及其酚氧化酶系统关键基因的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.
- [13] Homvises T, Tassanakajon A, Somboonwivat K. *Penaeus monodon* SERPIN, PmSERPIN6, is implicated in the shrimp innate immunity[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(5): 890–898.
- [14] 朱玲. 扇贝丝氨酸蛋白酶及其抑制剂基因的克隆与表达[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006.
- [15] 丁鉴锋. 皱纹盘鲍溶菌酶及两种蛋白酶抑制因子的克隆与表达[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011.
- [16] 刘瑞玉. 中国北部的经济虾类[M]. 北京: 科学出版社, 1955: 48–49.
- [17] Brito R, Chimal ME, Rosas C. Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity of early juveniles of *Farfante Penaeus brasiliensis* (Deeapoda: Penaeidae)[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2000, 244: 253–263.
- [18] 苏诗娟. 不同酸碱度和盐度对对虾氧自由基的产生和抗氧化系的影响[D]. 广州: 华南师范大学, 2007.
- [19] Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 227–233.
- [20] Liang Z, Soderhall K. Isolation of cDNA encoding a novel serpin of crayfish hemocytes[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1995, 112: 385–391.
- [21] Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system in invertebrates[J]. *Immunol Rev*, 2004, 198: 116–126.
- [22] Cheng W, Chen JC. Effects of environmental factors on the immune responses of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and other decapod crustaceans[J]. *Fish Soc*, 2002, 29: 1–19.
- [23] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 121–131.
- [24] Perazzolo LM, Gargioni R, Ogliari P, et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress[J]. *Aquaculture*, 2002, 214: 19–33.
- [25] Daniel B, Kim S, David R. The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*[J]. *Aquaculture*, 2006, 251: 159–166.
- [26] Zou Z, Jiang H. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 14341–14348.

Cloning and expression analysis of serine protease inhibitors gene of *Exopalaemon carinicauda*

LI Yang^{1,2}, LIU Ping², LI Jian², LI Jitao², MA Peng¹, GAO Baoquan²

1. Ocean University of Dalian, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: *Exopalaemon carinicauda* belongs to Palaemonidae, Palaemon, and *Exopalaemon*, which is an important demersal species in the Yellow Sea and Bohai Sea. Its production ranks only second to that of *Fenneropenaeus chinensis* and *Acetes chinensis* in China. This species is mainly characterized by its tender meat, high reproduction, fast growth and adaption to a wide range of environment. Recently, the aquaculture area has been expanded gradually, but under the condition of centralization-breeding factor, the shrimp is easy in stressing conditions, which may cause diseases even death. In this study, we isolated the cDNA sequence of serine protease inhibitors (serpin) gene from *Exopalaemon carinicauda* using RT-PCR and RACE methods. The full-length cDNA of the serine protease consisted of 1 516 bp with a 1 245 bp open reading frame (ORF), encoding 414 amino acids. The predicted molecular mass of serine protease protein was 45.06 kD, and the theoretical isoelectric point was 5.694. The serine protease protein sequence contained two glycosyl binding sites, which had 49% homology with that of *Penaeus monodon*. Tissue expression analysis suggested that serpin mRNA expression was highest in the hemocytes and lowest in the muscle. Real time-PCR analysis revealed that the expression of serpin gene was significantly higher in hemolymph 8 h after salinity exposure compared to the control group. Furthermore, the serpin gene expression in the hepatopancreas exhibited two obvious peaks at 2 h and 24 h after salinity stress compared with the control group. Our results suggest that serpin gene plays an important role in the salinity stress response of *E. carinicauda*.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; tissue expression; cloning; salinity stress; stress response

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn