

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17355

中国明对虾 *NHE3* 基因克隆及其在 pH 胁迫下的表达

李政道^{1,2}, 李健^{1,3}, 葛倩倩¹, 王佳佳¹, 何玉英¹, 王培春⁴

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 水产科学国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海 201306;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
4. 日照海辰水产有限公司, 山东 日照 276805

摘要: 为研究钠/氢交换体(Na^+/H^+ -exchanger, NHE)在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)响应 pH 胁迫过程中发挥的作用, 首先采用静水毒性实验方法确定了中国明对虾酸碱半致死 pH, 然后利用 RACE 技术克隆了中国明对虾 Na^+/H^+ -exchanger isoform 3 (命名为 *FcNHE3*) 基因, 并通过荧光定量 PCR 及 RNA 干扰技术分析了其在 pH 胁迫下的表达特征及功能。结果显示, 72 h 酸性半致死 pH 和碱性半致死 pH 分别为 5.2 和 9.1。克隆获得 *FcNHE3* 基因(GenBank: MF373587) cDNA 序列全长 3508 bp, 开放阅读框 2805 bp, 编码 934 个氨基酸, 具有信号肽和 12 个跨膜结构域; 蛋白同源分析发现, *FcNHE3* 与青蟹(*Carcinus maenas*) 同源性最高, 达到 74%; 系统进化分析显示, *FcNHE3* 与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 和青蟹亲缘关系最近。荧光定量 PCR 分析表明, *FcNHE3* 基因在鳃组织中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$); 酸性半致死 pH (pH 5.2) 胁迫下, *FcNHE3* 基因在整个胁迫过程中显著上调表达($P < 0.05$); 碱性半致死 pH (pH 9.1) 胁迫下, *FcNHE3* 基因在前 48 h 显著下调表达($P < 0.05$), 12 h 表达量最低, 仅在 72 h 出现上调表达。RNA 干扰后, *FcNHE3* 基因表达受到抑制, pH 5.2 胁迫下对虾存活率相比对照组显著下降。研究表明相较于高 pH 胁迫, *FcNHE3* 基因在中国明对虾响应低 pH 胁迫过程中可能发挥更重要的调节作用。

关键词: 中国明对虾; 钠/氢交换体(NHE); 基因克隆; pH 胁迫; RNA 干扰

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-0958-09

pH 是水产养殖环境中的重要因子之一, pH 突变会对甲壳动物的生长、繁殖、免疫和抗氧化能力等产生重要影响^[1-3]。如水环境中 pH 过高会使对虾血淋巴 pH 升高, 腐蚀鳃组织, 造成呼吸障碍, 还可能造成机体组织 DNA 损伤及免疫相关酶活性和抗病力下降^[4-6]。水环境中 pH 过低则会使虾血液 pH 下降, 削弱其载氧能力, 造成缺氧症, 影响虾的矿化作用, 从而诱发一系列疾病, 如黄鳃、锈壳、黑死病等^[7-8]。甲壳动物应对 pH 胁迫过程中, 如何调节其体内酸碱平衡的机理尚未见报道。

钠/氢交换体(Na^+/H^+ -exchanger, NHE)是机体

维持酸碱平衡的膜离子转运系统中一类重要的膜蛋白, 其主要功能是调控细胞内的 pH 和细胞体积, 也可能通过增加细胞内 pH 而影响细胞分裂^[9]。目前有关 NHE 的研究主要集中在调控肿瘤细胞内外酸碱平衡方面^[10]; 在水产动物中关于其酸碱调节的功能研究较少。在鲢(*Tribolodon hakonensis*) 和青鳉(*Oryzias latipes*) 适应酸性环境实验中, Hirata 等^[11]和 Liu 等^[12]研究发现 NHE 可以与碳酸酐酶、碳酸氢根转运体发挥协调作用; Evans 等^[13]研究发现鱼类机体内 Na^+/H^+ 交换体系主要分布于鳃上皮顶部细胞膜, 水环境中的 Na^+ 和细胞内代

收稿日期: 2017-09-29; 修订日期: 2017-12-04.

基金项目: 国家虾产业技术体系项目(CARS-48); 2015 年山东省泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022016009); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31702319).

作者简介: 李政道(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事对虾健康养殖研究. E-mail: zd_li@qq.com

通信作者: 李健, 研究员, 主要从事海水健康养殖技术研究. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

谢出来的 H^+ 主要是通过此交换体系进行交换; 目前 *NHE* 基因在甲壳动物中的研究相对更少, 且主要集中于其组织定位及在渗透调节中的作用^[2, 14]。马金武等^[15]克隆获得了三疣梭子蟹 *NHE3* 基因, 并研究了其在盐度胁迫下的调控作用。但是目前有关该基因在甲壳动物酸碱胁迫下的功能研究尚未见报道。

中国明对虾是我国黄渤海地区主要养殖对象^[16], 养殖过程中大量换水、浮游动植物种群的突然改变和残饵等因素均可能导致水体 pH 突变, 从而会影响其养殖产量。本研究通过静水毒性实验法^[17-18]测定中国明对虾对 pH 的耐受性, 并确定了其酸碱半致死 pH, 其后采用 RACE 技术克隆获得 *FcNHE3* 基因 cDNA 全长序列, 研究其在不同组织及 pH 胁迫下的表达特征, 最后通过 RNA 干扰实验探究 *FcNHE3* 基因在响应 pH 胁迫中的重要作用。本研究旨在了解 *NHE3* 在中国明对虾适应 pH 胁迫中的作用机制, 并为中国明对虾耐 pH 新品系的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品采集

实验用虾为 100 日龄中国明对虾‘黄海 3 号’品种, 体重 (3.0 ± 0.5) g。实验在山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司进行, 暂养 7 d, 实验全程保持充气维持水体含氧量, 水温维持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每天换水清污 1 次, 换水量为 1/3; 暂养期间, 早晚喂食常规条状颗粒饲料各 1 次。实验设置低 pH 组(pH 梯度为 4.6、5.1、5.6、6.1 和 6.6)、高 pH 组(pH 梯度为 8.1、8.5、8.9、9.3 和 9.7)以及自然海水对照组(pH 7.9), 每个 pH 梯度设置 3 个平行, 每个平行 10 尾虾, 水体 pH 调节利用盐酸(AR)、氢氧化钠(AR)和碳酸氢钠(AR), 与自然海水混匀调制, 实验前水体经过充分曝气, 实验期间的投喂和饲养管理与暂养期相同。胁迫后 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 记录死亡数目, 计算累计死亡率, 并根据结果运用寇氏法^[19]计算出酸性及碱性半致死 pH, 然后以此作为胁迫 pH 进行实验, 每组设置 3 个平行, 每个平行 30 尾虾。以胁迫 0 h 作为空白对照组, 分别在胁迫后 3 h、6 h、12 h、

24 h、48 h、72 h 取鳃组织置于液氮罐中保存。另取未经胁迫的中国明对虾各组织用以检测基因在组织中的表达分布情况, 包括鳃、肝胰腺、脑、肌肉、触角腺、肠和心脏置于液氮罐中保存。

1.2 *FcNHE3* 基因 cDNA 全长克隆

Trizol 法提取组织的总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计监测 RNA 的完整度和质量, 使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 按照说明书要求操作, 分别合成 3'和 5'RACE 的 cDNA 第一链。应用本实验室中国明对虾转录组文库检索到的 *FcNHE3* 基因 EST 序列, 通过 PCR 反应并测序验证其序列正确性。随后利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5'RACE 特异性引物(表 1), 引物在生工生物工程股份(上海)有限公司合成。随后进行巢式 PCR, 对目的基因的 3'和 5'末端序列进行快速扩增。利用琼脂糖凝胶分别检测扩增产物, 胶回收过程使用回收试剂盒, 连接转化使用载体为 pEASY-T1, 感受态细胞为 TransT1。最后取阳性单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 目的单克隆菌液送到上海生工公司进行测程序。

1.3 序列分析

利用 DNASTar 软件进行再拼接, 得到 *FcNHE3* 基因 cDNA 全长, 采用 ORF Finder 进行基因开放阅读框预测, 用 Blast 程序分析基因与其他物种的同源性和一致性, 使用 DNAMAN 软件比对多个物种同一基因序列。其他基因编码蛋白的基本物理性质、结构域、信号肽等利用 ProtParam tool、SMART、TMHMM Server v.2.0 和 SignalP-3.0 等在线工具检测。利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法构建 NJ 系统进化树。

1.4 反转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

取 Trizol 法提取的各组中国明对虾鳃、肝胰腺、脑、肌肉、触角腺、肠、心脏等组织的总 RNA, 使用 TaKaRa Prime ScriptTM RT 试剂盒进行反转录合成 cDNA。根据 *FcNHE3* 基因开放阅读框序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量引物, 内参选择 18S rRNA, 于生工生物工程股份(上海)有限公司合成。使用 ABI 7500 Real Time PCR 仪和 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq II 试剂对中国明对虾各组织及 pH 胁迫下基因的表达进

表 1 实验用 PCR 引物序列
Tab. 1 Primer used in the study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
<i>FcNHE</i> -F	AGGTGGTGGACTTGCTGAGT	RT-qPCR
<i>FcNHE</i> -R	TTGGTTGGTGAATCTGGTGA	RT-qPCR
<i>Fc18s</i> -F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	RT-qPCR
<i>Fc18s</i> -R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	RT-qPCR
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
<i>NHE3</i> '	GCGTCAAGAGAGCAGAGAAGCGAACACT	3'RACE
<i>NHE5</i> '	GAAGAAGACATCAGAGGTGAGAGGAGAC	5'RACE
si-1 sense	CCUCUGAUGUCUUCUUCUUTT	RNAi
si-1 antisense	AAGAAGAAGACAUCAGAGGTT	RNAi
si-2 sense	CCAUCAACUCGUCCCAUTT	RNAi
si-2 antisense	AUGUGGGACGAGUUGAUGGTT	RNAi
si-3 sense	CCAUCGCUAUGGUCUAUUUTT	RNAi
si-3 antisense	AAAUAGACCAUAGCGAUGGTT	RNAi
NC sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	RNAi
NC antisense	ACGUGACACGUUCGAGAATT	RNAi

行分析。反应体系采用 TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq II 说明书中 20 μL 体系标准, PCR 反应程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。 *FcNHE3* 基因的相对表达分析采用 2^{-ΔΔC_t}法, 数据处理使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 检验, 利用 Origin Pro 9.0 对统计结果进行作图, *P*<0.05 表示具有显著差异性。

1.5 RNA 干扰实验

在 RNA 干扰(RNA interference, 简称 RNAi)实验中, 根据 Elbashir S 的 siRNA 设计规则^[20-21], 利用 siDirectversion2.0 在线软件(<http://sidirect2.rnai.jp/>)设计 *FcNHE3* 基因的 3 个 siRNA 靶序列, 3 对 siRNA(si-1, si-2, si-3, 见表 1)均在生工生物工程股份(上海)有限公司合成, 另有 1 对阴性对照 siRNA(NC)。本次干扰实验用虾体重为(3.0±0.5) g, 在进行干扰实验之前, 通过预实验确定了干扰试剂的使用浓度, 发现 1 μg/g 和 2 μg/g 的注射浓度影响差异不大, 确定 1 μg/g 足以达到干扰目的, 因此本实验注射剂量为 1 μg/g。将 50 尾虾平均分成 5 组, 每组 10 尾, 以只注射 DEPC 水和注射了 NC siRNA 的虾作为阴性对照组, 注射 si-1、si-2、si-3 的虾为实验组, 于注射后 3 h 和 6 h, 每组分别

取 3 尾虾的鳃, 用 RNA 组织保存液保存, 根据 2.4 节所述方法检测 *FcNHE3* 基因的表达情况。另设置相同的一系列实验组, 每组 3 个平行, 每个平行 10 尾虾, 调节水体 pH 至 5.2, 定时调节保持后期 pH 值稳定, 观察并记录注射 siRNA 后 0~24 h 期间(1、3、6、12、24 h)死亡个体数量, 计算对虾在 pH 胁迫下的存活率。

2 结果与分析

2.1 pH 胁迫 72 h 累计死亡率及半数致死 pH

各个 pH 梯度胁迫下死亡率结果如表 2 所示, pH 为 4.6 和 9.7 时, 72 h 累计死亡率达到 100%, pH 为 6.6 和 8.1 时出现极少量死亡个体, 通过寇氏法计算出中国明对虾酸性半致死 pH 值及碱性半致死 pH 分别为 5.2 和 9.1。

2.2 *FcNHE3* 基因 cDNA 序列分析及多序列比对

FcNHE3 cDNA 全长 3508 bp, GenBank 登录号 MF373587, 其 5'和 3'端非编码区分别为 530 bp 和 173 bp, 开放阅读框(ORF)长 2805 bp, 编码 934 个氨基酸(图 1), 预测蛋白的分子量为 104.8 kD, 理论等电点为 6.66。SMART 分析预测表明该基因具有信号肽, 编码蛋白结构域包括 12 个跨膜螺旋结构 M1-M12(图 1) (5~24 aa、79~101 aa、114~131 aa、

141~163 aa、170~192 aa、207~226 aa、279~301 aa、321~343 aa、363~385 aa、395~417 aa、436~458 aa 和 468~490 aa)。Blast 对比分析表明, *FcNHE3* 基因编码氨基酸序列与青蟹(*Carcinus maenas*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、端足虫(*Hyalomma azteca*)、澳洲蓝螯虾(*Cherax cainii*)、体虱(*Pediculus humanus corporis*)和柑橘凤蝶(*Papilio xuthus*)的同源性分别为 74%、66%、60%、59%、

57%和 55%。氨基酸序列多重比对分析表明, *FcNHE3* 基因氨基酸序列在 110~700 氨基酸区段内保守性较高。

2.3 *FcNHE3* 基因系统进化树

系统发育进化树显示, 中国明对虾 *FcNHE3* 与三疣梭子蟹和青蟹亲缘关系最近, 聚为一支, 然后与澳洲蓝螯虾和佛罗里达蓝螯虾聚为一类, 与昆虫类和脊椎动物亲缘关系较远(图 2)。

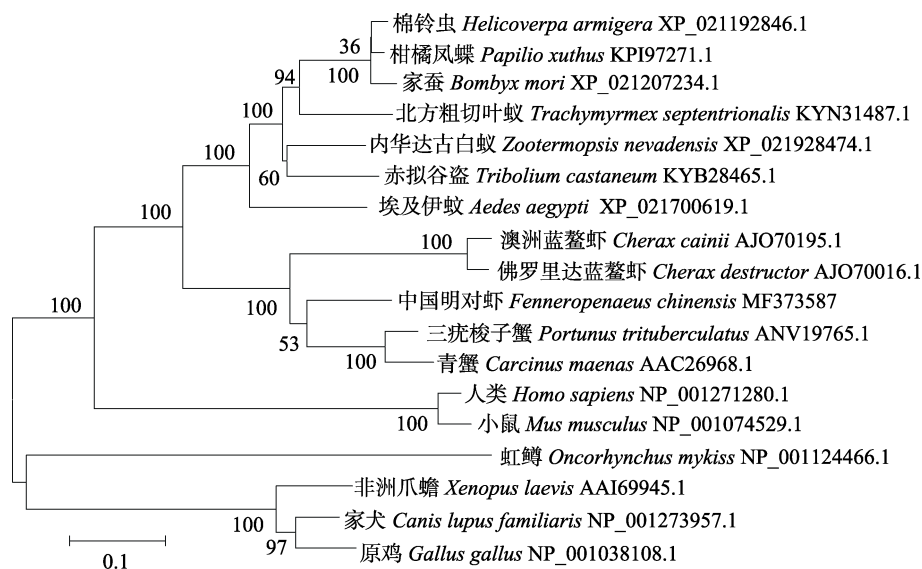


图 2 基于 NHE 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

节点上的数字表示为 bootstrap 的置信度。

Fig. 2 The Neighbor-Joining phylogenetic tree of NHE from *Fenneropenaeus chinensis* and other animals. Bootstrap values are indicated at nodes.

2.4 *FcNHE3* 基因的组织表达分布和不同 pH 胁迫下的表达分析

利用 RT-qPCR 分析了 *FcNHE3* 基因在不同组织中的表达分布情况, 结果显示, *FcNHE3* 基因在鳃中表达量最高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其次为脑和心脏, 在肌肉中表达量最低(图 3)。

如图 4 所示, 低 pH 胁迫后, 相较于 0 h, 中国明对虾鳃组织中 *FcNHE3* 基因在整个实验阶段均显著上调表达 ($P < 0.05$), 且表达量呈逐渐上升趋势。高 pH 胁迫后 3~48 h, 中国明对虾鳃组织中 *FcNHE3* 基因表达量相比空白对照组明显下调 ($P < 0.05$), 在 12 h 表达量最低, 随后有回升趋势, 至 72 h 表达量上调。

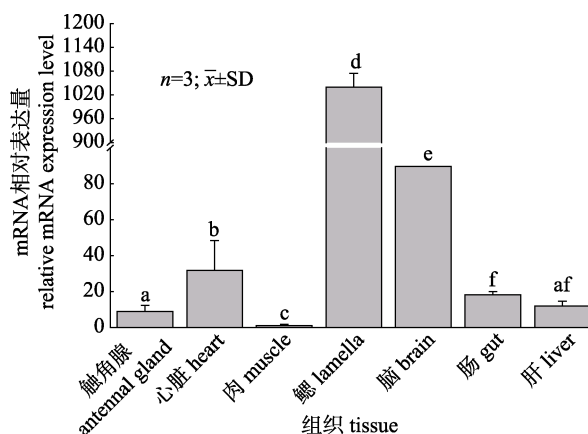


图 3 *FcNHE3* 基因在中国明对虾各组织表达情况
不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 *FcNHE3* gene expression in various tissues of healthy *Fenneropenaeus chinensis*. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

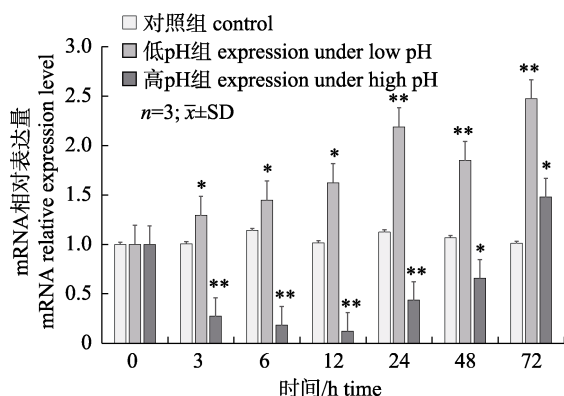


图4 pH胁迫下各实验组中国明对虾

FcNHE3 基因表达情况

*代表各胁迫时间点与0 h差异显著($P<0.05$), **代表各胁迫时间点与0 h差异极显著($P<0.01$).

Fig. 4 *FcNHE3* gene expressions under pH stress in different *Fenneropenaeus chinensis* groups
* indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates highly significant difference ($P<0.01$).

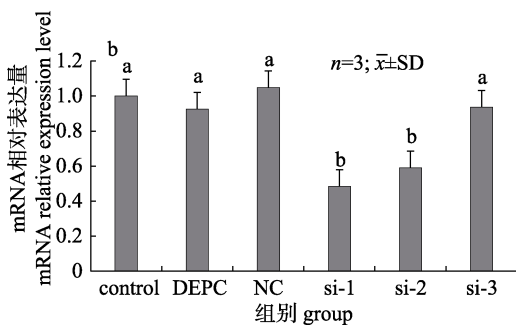
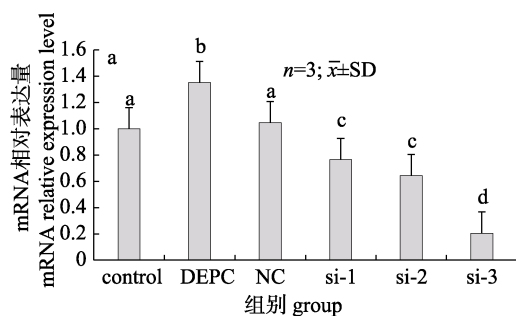


图5 注射 siRNA3 h (a)和 6 h (b)后各实验组

FcNHE3 基因表达情况

不同字母代表差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 *FcNHE3* gene expression after RNA interference for 3 h (a) and 6 h (b) in different *Fenneropenaeus chinensis* groups
Different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.5 RNA 干扰后 *FcNHE3* 基因的表达分析

如图5所示,注射试剂3 h后,si-1、si-2、si-3三组实验组的 *FcNHE3* 基因表达均有不同程度下调趋势;干扰3 h后,相比NC对照组,si-1、si-2

和 si-3 的干扰效率分别达到 23.4%、35.7%和 79.5%。6 h后 si-1 和 si-2 两组仍处于下调水平,干扰效率分别为 51.7%和 41%,而 si-3 组 *FcNHE3* 基因表达则恢复至对照组水平。

低 pH 胁迫下,在分别注射 *FcNHE3* 基因的 3 个干扰 siRNA 后进行累计存活计算,发现注射干扰靶点 siRNA1 和 siRNA2 后,对虾均在 12 h 开始出现死亡个体,至 24 h 存活率分别为 33.3%和 66.7%。注射干扰靶点 siRNA3 后,对虾在 3 h 即出现死亡个体,随后存活率不断下降,至 24 h 累计存活率达到 66.7%,明显低于对照组和 NC 组(图6)。

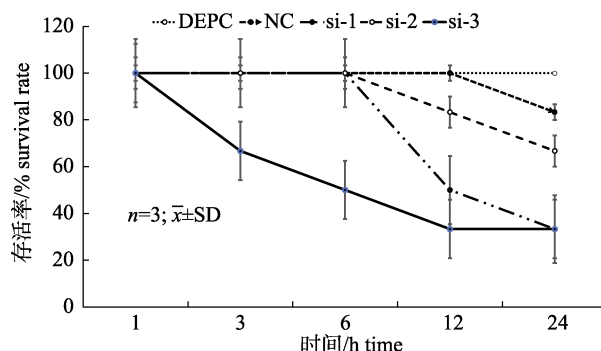


图6 pH胁迫下注射 siRNA 后各实验组对

中国明虾存活率

Fig. 6 Survival rates after RNA interference under pH stress in different *Fenneropenaeus chinensis* groups

3 讨论

本研究通过 RACE 技术克隆得到 *FcNHE3* 基因 cDNA 全长,预测编码蛋白 934 个,编码蛋白质结构中含有信号肽,并有 12 个跨膜结构域,其中第 3~12 个跨膜区域与家族其他成员身份一致,且第 6 和第 7 个跨膜结构具有高度保守性,可预测该片段与离子的跨膜转运相关性^[22-24]。这之前报道的三疣梭子蟹、青蟹、蓝鳌虾等生物一致,均属于 NHE 家族。系统进化分析表明, *FcNHE3* 基因与甲壳类亲缘关系较近,且在 110~700 氨基酸区段内保守性较高,表明这一区域所含结构对于其功能是非常重要的,也提示该基因在不同生物中可能有着相似的功能;而与昆虫类和脊椎动物亲缘关系较远,显示了甲壳类进化的特异性及 NHE 在进化中随物种进化而发生同源性改变。

不同 pH 胁迫后的累计死亡率说明中国明对虾的安全 pH 范围是 6.6~8.1, 半致死胁迫实验得出的高 pH 和低 pH 半数致死 pH 分别为 9.1 和 5.2, 本研所得安全 pH 范围比之前一些研究得出的 pH 范围稍大^[1, 25-27]。如房文红等^[6]研究发现, 在 20℃, pH9.4 的环境下, 24 h 中国明对虾全部死亡; 王芸等^[25]研究发现, 1 天 4 次调节水 pH, 水温 30℃下, pH 7 即对中国明对虾产生低 pH 胁迫作用; 推测适宜 pH 范围可能受温度和水环境 pH 调节周期综合影响。

RT-qPCR 分析结果表明 *FcNHE3* 基因的表达具有组织特异性, 鳃中 *FcNHE3* 基因表达量显著高于其他组织 ($P<0.05$), 推测鳃组织可能是 *FcNHE3* 响应 pH 胁迫的靶器官。鳃在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 等甲壳动物中是最重要的渗透调节器官^[22], 主要的离子转运酶均在其中大量分布^[2]。该结果与本研究 *NHE3* 在三疣梭子蟹鳃中极显著表达一致^[14]。

根据 pH 胁迫过程中各实验组和对照组鳃组织中 *FcNHE3* 基因的表达规律及特点, 可以看出 *FcNHE3* 基因在机体适应高低 pH 环境过程中均起到一定的作用。由于在 pH 为 5.1 时, 中国明对虾死亡率随着胁迫时间延长逐渐升高, 并且 *FcNHE3* 基因在低 pH 胁迫实验组 (pH 5.2) 中始终处于上调表达水平, 推测该基因在对虾抵御低 pH 胁迫过程中起到正调控的作用, 以使其适应酸性环境。这类似于鱼类适应酸性环境的调节机制, 在碳酸酐酶 (CA), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ co-transporter (NBC) 和 NHE 等多种基因的作用下, 排出体内多余的 H^+ , 吸入外界的 Na^+ , 以维持机体在酸性环境的生长^[11]。在三疣梭子蟹等多种甲壳动物中 *NHE3* 也是以同样的机制维持渗透平衡^[14]。而高 pH 组 (pH9.1) 中该基因表达在前期受到抑制, 仅在 72 h 出现表达上调。分析不同 pH 胁迫下的死亡率发现, 在 pH 8.9 时中国明对虾 72 h 累计死亡率仅为 16.67%, 而在 pH 9.3 时 72 h 累计死亡率升高至 73.33%, 说明 pH 8.9~9.3 是影响中国明对虾存活的关键区间, 而本实验中是在

半致死 pH 9.1 的碱性环境中检测 *FcNHE3* 基因表达情况, 正好在此范围内, 可能由于在前期胁迫程度较大, 严重影响对虾的存活, 抑制了该基因的表达, 后期逐渐适应碱性环境, *FcNHE3* 基因表达上调, 开始发挥调节作用。该结果与马金武等^[15]得出的三疣梭子蟹在高盐环境下 *NHE3* 表达下调结果一致, 推测是因为高盐度或高 pH 环境对基因表达产生抑制。而在凡纳滨对虾碳酸氢钠协同转运蛋白 (NBC) 响应 pH 胁迫的作用机制研究中, 发现高 pH 胁迫下 NBC 基因上调表达^[28]。本研究发现酸性半致死 pH 胁迫下 *FcNHE3* 基因仍然能发挥正调节作用, 而在碱性半致死 pH 胁迫下该基因受到一定程度的抑制, 推测中国明对虾在高 pH 胁迫下, *NHE3* 可能并非主要作用基因, 而是类似于依赖 NBC 排出大量 HCO_3^- 缓解生存压力。

根据干扰实验中基因表达和死亡率的结果, 可知三组干扰试剂干扰效果不甚相同, 但均起到一定的干扰效果, si-1 的干扰效果从 3 h 到 6 h 逐渐显现, si-2 的干扰效果不明显且稳定, si-3 初期干扰效果明显, 而后失效也快。而对虾存活率与不同干扰靶点干扰效率相符合, 即注射干扰效率最高的靶点后中国明对虾在低 pH 胁迫下出现较高的死亡率。此结果进一步表明 *FcNHE3* 基因在中国明对虾响应 pH 胁迫中发挥的重要作用。推测 *FcNHE3* 基因可能与对虾体内一些重要的生物过程相关联, 在基因表达水平降低时触发一种未知的反馈机制。与此前关于淡水鱼离子调控相关基因研究结果一致^[29-30]。研究青鳉等海水鱼的渗透调节机理的工作中, 同样发现 *NHE3* 基因在离子转运的重要作用^[12]。

综合以上结果得出: 通过对中国明对虾 *NHE3* 基因的克隆、鉴定以及表达分析, 发现该基因主要在鳃中表达, 并在低 pH 胁迫下始终高表达, 高 pH 胁迫下表达受到一定程度抑制, 干扰该基因表达后中国明对虾在低 pH 胁迫下的存活率显著降低。初步明确了该基因的序列特征及其在适应 pH 胁迫过程中的生理作用, 为水生甲壳动物 *NHE3* 基因分子方面的研究和中国明对虾耐 pH 抗性品种选育提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] Yu T J, Li J, Li J T, et al. The effects of pH changes on antioxidant enzyme activities of ridgetail white prawn (*Palaeomon carinicauda*)[J]. Marine Sciences, 2015, 39(5): 47-53. [于天基, 李健, 李吉涛, 等. pH 胁迫对脊尾白虾抗氧化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(5): 47-53.]
- [2] Pan L Q, Liu H Y. Review on the osmoregulation of crustacean[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 109-114. [潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 109-114.]
- [3] Wang Y, Li J, Li J T, et al. Effects of pH stress on antioxidant system enzyme activities and gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 556-564. [王芸, 李健, 李吉涛, 等. pH 胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 556-564.]
- [4] Li C, Chen J. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 701-709.
- [5] Wang W, Zhou J, Wang P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology, 2009, 150(4): 428-435.
- [6] Fang W H, Wang H, Lai Q F, et al. Toxicity of carbonate-alkalinity and pH to larval *Penaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(4): 78-81. [房文红, 王慧, 来琦芳, 等. 碳酸盐碱度、pH 对中国对虾幼虾的致毒效应[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 78-81.]
- [7] Zhang P D, Zhang X M, Li J, et al. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)[J]. Aquaculture, 2006, 256(1-4): 579-587.
- [8] Walton W E, Compton S M, Allan J D, et al. The effect of acid stress on survivorship and reproduction of *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera)[J]. Canadian Journal of Zoology, 2011, 60(4): 573-579.
- [9] Padan E, Landau M. Sodium-Proton (Na^+/H^+) Antiporters: Properties and Roles in Health and Disease[J]. Metal Ions in Life Sciences. 2016, 16: 391-458.
- [10] Loo S Y, Chang M K, Chua C S, et al. NHE-1: A promising target for novel anti-cancer therapeutics[J]. Current Pharmaceutical Design, 2012, 18(10): 1372-1382.
- [11] Hirata T, Kaneko T, Ono T, et al. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake[J]. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2003, 284(5): 1199-1212.
- [12] Liu S T, Horng J L, Chen P Y, et al. Salt secretion is linked to acid-base regulation of ionocytes in seawater-acclimated medaka: new insights into the salt-secreting mechanism[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31433.
- [13] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P, et al. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. Physiological Reviews, 2005, 85(1): 97-177.
- [14] Zhou S L, Jiang N C, Lu J P, et al. Progress of the study on osmotic regulation in crustaceans I. The gill's structure and function and its' concerned factors[J]. Donghai Marine Science, 2001, 19(1): 44-51. [周双林, 姜乃澄, 卢建平, 等. 甲壳动物渗透压调节的研究进展 I. 鳃的结构与功能及其影响因子[J]. 东海海洋, 2001, 19(1): 44-51.]
- [15] Ma J W, Lü J J, Liu P, et al. Na^+/H^+ -exchanger in swimming crab (*portunus trituberculatus*): cloning, characterization and mRNA expression under salinity stress[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(5): 902-907. [马金武, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 Na^+/H^+ -exchanger 基因克隆鉴定及在盐度胁迫下的表达分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5): 902-907.]
- [16] Li J, Liu P, He Y Y. Artificial selection in the new breed of *Fenneropenaeus chinensis* named "Yellow Sea 1" based on fast growth trait[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 1-5. [李健, 刘萍, 何玉英. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 1-5.]
- [17] Yang F Y, Sun L M, Yang X Q. Toxicity of Carbonate alkalinity to *Penaeus vannamei* Juveniles[J]. Fisheries Science, 2004, 23(9): 3-6. [杨富亿, 孙丽敏, 杨欣乔. 碳酸盐碱度对南美白对虾幼虾的毒性作用[J]. 水产科学, 2004, 23(9): 3-6.]
- [18] Yang F Y, Shao Q C, Li J L, et al. Toxicity of pH and carbonatealkalinity on tadpoles of frog *Rana chensinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(1): 43-48. [杨富亿, 邵庆春, 李景林, 等. 碳酸盐碱度和 pH 对中国林蛙蝌蚪的毒性作用[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 43-48.]
- [19] Pan R W, Ma L, Zhang Y C, et al. Comparison between Up-and-Down Procedure and Karber test in determining tetanus toxin LD_{50} in mice[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2012, 22(12): 28-30. [潘若文, 马力, 张勇朝, 等. Up and Down 法与寇氏法测定破伤风毒素 LD_{50} 的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(12): 28-30.]
- [20] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002, 26(2): 199-213.
- [21] Bu Z Y, Fu H T, Sun S M, et al. Molecular characterization and developmental expression of Ras-related nuclear protein in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference on ovarian maturation[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 459-469. [卜宗元, 傅洪拓, 孙盛明, 等. 青虾 *Ran* 基因的克隆、表达及其在卵巢发育中的功能[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 459-469.]
- [22] Orlowski J, Grinstein S. Na^+/H^+ exchangers of mammalian cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(36): 22373-22376.
- [23] Numata M, Petrecca K, Lake N, et al. Identification of a mitochondrial Na^+/H^+ exchanger[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(12): 6951-6959.
- [24] Dibrov P, Fliegel L. Comparative molecular analysis of Na^+/H^+ exchangers: a unified model for Na^+/H^+ antiport?[J]. FEBS Letters, 1998, 424(1-2): 1-5.

- [25] Wang Y, Li J, Zhang Z, et al. Effects of pH and ammonia-N stresses on HSP90 gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 43-50. [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43-50.]
- [26] Li Y Q. Effects of pH stress on activities of phosphatase in *Exopalaemon carinicauda* Holthuis[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(6): 1098-1101. [李玉全. pH 胁迫对脊尾白虾代谢酶活力的影响[J]. 南方农业学报, 2014, 45(6): 1098-1101.]
- [27] Zhao X Y, Li J, Chen P, et al. Effects of pH stress on survival rate and activities of iontransport enzyme, immunere-related enzymes in three species of shrimps[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(5): 720-728. [赵先银, 李健, 陈萍, 等. pH 胁迫对 3 种对虾存活率、离子转运酶和免疫酶活力的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(5): 720-728.]
- [28] Cai Y M, Chen T, Ren C H, et al. Molecular characterization of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) sodium bicarbonate cotransporter (NBC) and its role in response to pH stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 64: 226-233.
- [29] Dymowska A, Hwang P P, Goss G G, et al. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill[J]. Respiratory Physiology and Neurobiology, 2012, 184(3): 282-292.
- [30] Uchiyama M, Komiyama M, Yoshizawa H, et al. Structures and immunolocalization of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, Na^+/H^+ exchanger 3 and vacuolar-type $\text{H}^+\text{-ATPase}$ in the gills of blennies (Teleostei: Blenniidae) inhabiting rocky intertidal areas[J]. Journal of Fish Biology, 2012, 80(6): 2236-2252.

Molecular cloning and sequence analysis of Na^+/H^+ -exchanger isoform 3 in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression in response to pH stress

LI Zhengdao^{1,2}, LI Jian^{1,3}, GE Qianqian¹, WANG Jiajia¹, HE Yuying¹, WANG Peichun⁴

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China;
3. Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
4. Haichen Aquatic Products Co. Ltd., Rizhao 276805, China

Abstract: Na^+/H^+ -exchanger is a membrane-associated enzyme responsible for the active transport of Na^+ and H^+ ions across cell membranes, and generates chemical and electrical gradients. It plays an important role in the aquatic adaptation of aquatic crustaceans. To investigate the function of the Na^+/H^+ -exchanger in *Fenneropenaeus chinensis* under pH stress, Na^+/H^+ -exchanger 3 cDNA of *Fenneropenaeus chinensis*, named *FcNHE3* (GenBank:MF373587), was cloned from the gill tissues of the animal by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The full-length of *FcNHE3* cDNA was 3508 bp (base pairs), including a 2805 bp open reading frame (ORF) encoding a 934-amino acid peptide with one signal peptide and 12 transmembrane domains. Comparison with homologous proteins showed that the deduced *FcNHE3* amino acid sequence has the highest sequence identity with *Carcinus maenas* (74%), and along with *Portunus trituberculatus*, were clustered into one group by phylogenetic analysis. Results of RT-qPCR showed that *FcNHE3* expression level in the gills was significantly higher than in other tissues ($P < 0.05$). The expression level of *FcNHE3* in the gills was up-regulated under low pH stress (pH 5.2) during the entire duration of exposure. The expression level of *FcNHE3* in the gills was down-regulated during the first 48 h and up-regulated at 72 h under high pH stress (pH 9.1). After the knockdown of *FcNHE3* expression by RNA interference (RNAi), shrimp mortality was found to be significantly higher under low pH stress when compared with the control group. The results suggest that *FcNHE3* may play a more important role in regulating acid-base balance under low pH stress than under high pH stress.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; Na^+/H^+ -exchanger (NHE); gene cloning; pH stress; RNA interference (RNAi)

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn