斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响

周发林¹,陈劲松^{1,2},黄建华¹,杨其彬¹,邱丽华¹,马振华¹,江世贵¹ 1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所,农业部南海渔业资源开发利用重点实验室,广东广州 510300; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306

摘要:采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得了斑节对虾(*Penaeus monodon*) 谷氨酸脱氢酶基因(*PmGDH*)的 cDNA 序列。该序列全长 2386 bp,开放阅读框(ORF)为 1677 bp, 3'非编码区(UTR) 为 688 bp,包括含有 27 个碱基的 poly(A)尾,5'非编码区(UTR)为 21 bp。ORF 可编码 558 个氨基酸,预测分子量为 61.837 kD,理论等电点为 6.57。序列含有 ELFV dehydrog N 与 NAD bind 1 Glu DH 两个保守结构域,37 个磷酸化 位点,3 个糖基化位点。通过同源性、相似性以及系统进化树分析,斑节对虾的 GDH 基因与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)GDH 基因的同源性和相似性最高,并与其聚为一支。采用荧光定量的方法研究了 *PmGDH* 基因在斑节对 虾不同组织、氨氮胁迫过程中差异表达情况。结果表明, *PmGDH* 的 mRNA 在各组织中都有表达,其中,在肌肉组 织中表达量最高,其次为眼柄神经,在血淋巴与肠组织中表达量最低。96 h 氨氮胁迫后,荧光定量 PCR 分析结果 表明 *PmGDH* 在肝胰腺和鳃组织中的表达与对照组相比都具有显著差异(*P*<0.05),都具有不同程度的表达上调。表明 *PmGDH* 在氨氮代谢方面具有重要的作用,参与了斑节对虾机体的急性氨氮胁迫应答反应。

关键词: 斑节对虾; 谷氨酸脱氢酶; 氨氮胁迫; 基因克隆; 组织表达 中图分类号: S917 ______文献标志码: A _______文章编号: 1005-8737-(2016)06-1236-11

谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, EC1.4.1.2, 简称 GDH)作为一种线粒体酶广泛存 在于植物、动物和微生物中,是氨基酸分解代谢 的关键性酶,其在动物肝、肾和脑等组织中广泛 分布,活性很强,可催化谷氨酸发生氧化脱氨基 反应,在甲壳动物氨氮代谢过程中发挥非常重要 的作用^[1-2]。

根据现有文献报道,谷氨酸脱氢酶共有 4 种 亚型,其中GDH-1和GDH-2是小型六聚体酶,广 泛分布于动植物组织中,在氨同化过程中起着重 要作用^[3-5];GDH-3 是一类分子较大的谷氨酸脱 氢酶,作用于谷氨酸盐的分解代谢过程,只在真 菌和原生生物中有所发现^[6];目前GDH-4 仅发现 于真菌中^[4]。在人类体内 GDH-1 与 GDH-2 都存 在,GDH-2 在酸性条件下活性更高,除了可以降 低体内氨氮浓度,GDH还有助于器官维持体内酸 碱平衡^[7]。Jin 等^[8]于 2015 年的研究表明 GDH-1 可以通过调控癌细胞内的α-酮戊二酸含量来维 持癌细胞内的氧化还原平衡。在甲壳动物中,关 于谷氨酸脱氢酶基因的研究目前还比较少。Wang 等^[9]于 2012 年对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的 GDH 基因进行了克隆,结果表明其开放阅读框长 度为 1695 bp,编码 564 个氨基酸,并发现其对甲 壳动物的渗透调节起着重要作用。熊泽泉^[10]于 2010 年对 5 种十足目甲壳动物的 *GDH* 序列片段 进行了克隆,发现 GDH 氨基酸序列十分保守,但 是在脊椎动物与无脊椎动物中稍有差异,其中脊 椎动物 GDH 中的一个甘氨酸在无脊椎动物中变

收稿日期: 2016-02-03; 修订日期: 2016-04-08.

基金项目: 虾产业技术体系项目(CARS-47); 广东省省级科技计划项目(2013B020201001, 2014B020202003); 广东省海洋与渔 业科技推广专项(A201501A06); 海南省自然科学基金项目(313117); 深圳市生物产业发展专项资金现代农业生物产 业推广扶持计划项目(NYSW201400331010053).

作者简介:周发林(1975-),男,副研究员,从事水产动物遗传育种与分子生物学研究. E-mail: zhoufalin@aliyun.com 通信作者: 江世贵,研究员. E-mail: jiangsg@21cn.com

成了丙氨酸。Li 等^[11]于 2009 年对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)的 *GDH* 基因进行了克隆, 发现凡纳滨对虾体内也存在两种 *GDH* 基因, *GDH A* 和 *GDH B*,其中 *GDH A* 开放阅读框 1422 bp,编 码 474 个氨基酸,而 *GDH B* 开放阅读框大小 1656 bp, 编码 552 个氨基酸,并且两者前 462 个氨基酸序 列完全相同。刘胜男等^[12]于 2015 年的研究表明, 在氨氮胁迫条件下,三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的鳃组织以及肝胰腺中的 *GDH* 基因都

有不同程度的表达上调。李少飞^[2]于 2014 年对中国明对虾(Fenneropenaeus chinensiss)的谷氨酸脱氢酶进行克隆和功能分析,结果表明该基因 cDNA序列全长 1779 bp,在氨氮解毒代谢过程中发挥了重要作用。在斑节对虾(Penaeus monodon)中,还未见 GDH 基因的相关报道。

氨氮是水产养殖环境中的一种重要环境污染 因子,对甲壳动物机体的免疫系统、生长发育、 组织损伤、渗透调节、代谢等都有重要影响^[13-15]。 目前,我们对斑节对虾氨氮胁迫的应答和氨氮代 谢分子调控机制的研究尚不够深入,特别是其氨 氮解毒代谢涂径中起到调控作用的关键基因研究 仍较为缺乏[16]。已有的研究表明,谷氨酸脱氢酶 基因在中国明对虾的氨氮解毒代谢过程中发挥着 至关重要的作用^[2]。因此,本实验通过 RACE 技 术克隆得到斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因 (PmGDH) cDNA 序列全长,分析了其在斑节对虾不同组织 及在氨氮胁迫过程中在斑节对虾肝胰腺与鳃组织 内各时间点的表达变化规律,希望能为斑节对虾 氨氮胁迫应答以及体内氨氮代谢分子调控机理的 解析提供一定的基础数据,并为斑节对虾养殖健 康发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的斑节对虾养殖于中国水产科学研 究院南海水产研究所深圳基地。选取体长 14~16 cm, 体重为 35~40 g 的亚成虾用于 cDNA 克隆, 以及 肝胰腺、脑神经、眼柄神经、肌肉、胃、肠、鳃、 淋巴、胸神经和卵巢等组织的表达分析。选取体 长 6~7 cm, 体重 3~4 g 的幼虾用于氨氮胁迫实验。 实验用虾在水温(25±1)℃、盐度为 30 的循环水池 中暂养 3 d 后使用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

总 RNA 的提取按照 Trizol Reagent (Invitrogen) 的操作说明书进行操作,提取斑节对虾上述各组 织以及氨氮胁迫各时间点样品的总 RNA,通过琼 脂糖凝胶电泳确定其完整度。

用于 RACE 分析的样品按照 PrimeScript II 1stStrand cDNA Synthesis Kit 的操作说明书进行 反转录。其他用于荧光定量表达分析的样品依照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real-time) (TaKaRa)的使用说明进行反转 录。模板为500 ng的总RNA,所得 cDNA用β-actin 引物检测后稀释 10 倍, -80℃保存备用。

1.3 斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因的 cDNA 克隆

根据本实验室转录组测序所得的谷氨酸脱氢 酶序列片段,用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 结合 RACE 技术获得谷氨酸脱氢酶基因的 cDNA 全长。所用引物见表 1。

表1 实验中所用引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers used in the experiments				
引物名称 primer	: 引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 function		
GT-F1	AAATGTTGCGGTTAGGAA	已知片段验证		
GT-R1	GGTTTTGGCGAAAGTATCT	cDNA cloning		
GT-F2	CGCCGACGAGGTAAAGG	已知片段验证		
GT-R2	GCCAACATGCCAAAAAGG	cDNA cloning		
GT-F3	CATTGTCCACTCTGGTTTG	已知片段验证		
GT-R3	TCCCTGTGTTGCCATTAT	cDNA cloning		
GTS1	GGTGACGACCTCTGGATGGCG	3'RACE		
GTS2	AGGCTCGTCCGCACCATCTG			
GTA1	TCCACAACCTGACACCC	5'RACE		
GTA2	GCCCTCACTACGGATGTTC			
β -actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA	内参基因		
β -actin-R	TTCTCCATGTCGTCCCAGT	reference gene		
GTD-F	GATGGCTCAATCTACAAC	荧光定量 PCR		
GTD-R	TCTCCTTCATAAGTCTCAG	RTFQ-PCR		

1.4 序列分析

利用 Emboss(http://emboss.bioinformatics.nl/) 软件预测氨基酸序列; 对推导出的蛋白序列进行

蛋白理化特性预测用 ProtParam 软件(http://web. expasy.org/protparam/); 通过 SMART 4.0 (http://smart. embl-heidelberg.de/smart/set mode.cgi?GENOMIC= 1)进行蛋白结构域分析; 信号肽预测用 SingalP 3.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/)程序; 糖基化位点预测利用(http://www.cbs.dtu.dk/services/ NetNGlyc/); 磷酸化位点预测用 NetPhos(http://www. cbs.dtu.dk/services/NetPhos/); 用 NCBI 中的 Blast 程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)搜索用于谷氨 酰胺合成酶同源性和相似性分析与系统树构建的 氨基酸序列; 多重序列比对采用 Clustal X 程序; 利用 Clustal X 程序和 MEGA 6.0 软件, 构建 NJ 系统进化树;利用 GOR 方法(https://npsa-prabi.ibcp. fr/cgi-bin/npsa automat.pl?page=npsa gor4.html) 进 行二级结构预测, 三维结构预测采用 SWISS-MODEL 软件。

1.5 斑节对虾 PmGDH 基因的表达分析

1.5.1 斑节对虾 PmGDH 基因组织表达分析 取 3 尾体长 14~16 cm 雌虾的肝胰腺、脑神经、眼柄 神经、肌肉、胃、肠、鳃、淋巴、胸神经和卵巢 组织(每个样品约 10 mg), 3 尾虾的同种组织样品 混合均匀, 并用 RNA Later (Ambion)保存, 用于 斑节对虾 PmGDH 基因组织表达分析。

根据斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因的全长序列 设计荧光定量 PCR 引物 GTD-F 和 GTD-R(表 1), 选 β -actin 为内参基因(表 1)。以斑节对虾的不同 组织(眼柄神经、脑组织、淋巴、肝胰腺、胃、肠、 鳃、肌肉、血淋巴、胸神经)的 cDNA 为模板进行 荧光定量 RT-PCR 扩增。反应体系为 10 µL,包括 5 µL SYBR Premix Ex *Taq*(Tli RnaseH Plus) (Ta-KaRa), 0.2 µL 引物(10 µmol/L), 1.5 µL 模板,双蒸 水补足 10 µL,并以蒸馏水代替模板设置阴性对 照,每个样品设 3 个重复,反应程序为 95℃预变 性 30 s; 95℃变性 20 s, 60℃退火 5 s, 45 个循环; 65℃延伸 15 s;熔解温度从 55℃升至 97℃; 37℃ 冷却 5 min。实验数据采用相对 $C_{\rm T}$ 法(2^{-ΔΔC_T}法) 进行谷氨酸脱氢酶 mRNA 的表达量计算。

1.5.2 斑节对虾 *PmGDH* **基因氨氮胁迫后的表达** 分析 预实验共设计 6 个氨氮浓度梯度, 分别是 0、40 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、120 mg/L、140 mg/L。 每个浓度梯度一个泡沫箱,每个泡沫箱放 20 L 海水,30 尾虾。挑选大小均匀的 180 尾幼虾随机 分布于 6 个泡沫箱中。96 h 实验期间每隔 2 h 统 计 1 次每个梯度的死亡数量,捞取死虾。预实验 期间不投喂任何饵料。96 h 实验结束后,通过直 线内插法^[17]算出半致死浓度(LC₅₀)为 90 mg/L,并 通过公式求出其安全浓度(SC)^[18]为 9 mg/L。

正式实验共设计 3 组,分别是高浓度胁迫组, 胁迫浓度为半致死浓度 90 mg/L;低浓度胁迫组, 胁迫浓度为安全浓度 9 mg/L;对照组,使用养殖 用的海水。每一组都设 3 个平行,每个平行一个 泡沫箱。通过向实验用水中添加氯化铵(分析纯) 的方式来控制氨氮浓度,每12 h换一次实验用水, 每次全部换掉,与预实验相同,每个泡沫箱加入 20 L海水,放 30 尾虾,温度为(29.0±1.5)℃,pH为 7.0±0.5,盐度为 30±0.5。每隔 2 h 统计 1 次每个 泡沫箱的死亡数据,捞取死虾;分别于胁迫时间 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h和96 h共7 个时间点进行取样,每次取样在每个泡沫箱中各 选取两条活力较好的个体取其肝胰腺与鳃组织分 别混合均匀保存于 RNA Later(Ambion)中。

按照前述方法分别提取氨氮胁迫后各个时间 点斑节对虾肝胰腺和鳃的总 RNA,按照上述方法 逆转录合成 cDNA。取各个稀释后的 cDNA 样品 为模板, β-actin 为内参进行定量表达检测。反应体 系,反应程序,数据处理方法同上组织表达。

1.6 统计学分析

运用统计学软件 SPSS 18.0 进行相对独立 的单因素方差分析(ANOVA),并进行 Duncan's 多 重比较分析各组织间的差异显著性(*P*<0.05 为差 异显著)。结果表示为平均值±标准差(*x*±SD)。

2 结果与分析

2.1 斑节对虾谷氨酸脱氢酶 cDNA 的克隆及序 列分析

通过克隆得到斑节对虾谷氨酸脱氢酶 cDNA 全长,命名为 *PmGDH* (GenBank 登录号: KP984-793)。*PmGDH* cDNA 全长 2386 bp, 开放阅读框 (ORF)长度 1677 bp, 3'非编码区(UTR)为 688 bp, 含有 27个碱基的 poly(A)尾, 5'非编码区(UTR)为 21 bp。ORF 可编码 558 个氨基酸,其中甘氨酸含量 最高为 9.7%,预测分子量为 61.837 kD,理论等电 点为 6.57。本序列包含 37 个磷酸化位点(其中丝 氨酸位点 17 个,苏氨酸位点 8 个,酪氨酸位点 12 个),3 个 N-糖基化位点,并且与其他甲壳动物 GDH相似,都含有 ELFV dehydrog N与 NAD bind 1 Glu DH两个超家族结构。同时,利用 Signal P3.0 预测显示,此氨基酸序列 N端前 18 个氨基酸组成 信号肽,信号肽的断裂点位于第 18 个和第 19 个 氨基酸之间(图 1)。

2.2 同源性分析

利用 GOR 法对 PmGDH 蛋白质二级结构预测 后发现,整条氨基酸序列的二级结构由 α 螺旋、 延伸链以及无规则卷曲构成,其中 α 螺旋占 37.10%,延伸链占 17.74%,无规则卷曲比例最大 占 45.16%。SWISS-MODEL 结果显示,PmGDH 的 三维结构由 α 螺旋以及连接的无规则卷曲构成, 蛋白结构呈不规则的三角盘状。并且,PmGDH 的 三维结构与人类的 GDH-1 的三维结构较相近,同 源性达到 74.65%(图 2)。

斑节对虾 GDH 基因编码的氨基酸序列经 BLAST 比对分析发现与其他生物的 GDH 具有较 高的同源性。从 NCBI 上检索其他物种的 GDH 氨 基酸序列并利用 Clustal-X 软件对其氨基酸序列 进行多重序列比对分析。结果表明,不同物种间 的 GDH 序列较为保守, 其中, PmGDH 与凡纳滨 对虾(Litopenaeus vannamei: ACC95446.1)相似度 最高达到 98%, 其次是中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis: AIB04221.1), 同源性也达到了 97%。与其他节肢动物的同源性为:中华绒螯蟹 (Eriocheir sinensis:AEO72077.1) 89%, 佛罗里达 弓背蚊(Eriocheir sinensis: EFN70808.1) 81%, 豌 豆长管蚜(Acyrthosiphon pisum: XP_001951708.1) 81%, 家蚕(Bombyx mori: ABD36303.1)77%, 蝇蛹 金小蜂(Nasonia vitripennis: XP_001607265.1) 77%, 黑腹果蝇(Drosophila melanogaster: CAA72173.1) 75%。其与脊椎动物 GDH 的同源性也很高、与非

TGCGTGCAGGTCGACGATTAAatgttgcggttaggaacatccgtagtgagggccgtggtg 60 M L R L G T S V V R A V V 13 61 caggccggggcggcagagaccctgctgaaggccagcgcccctgccgccggcgtggccaaa 120 140 A G A A-E T L L K A S A P A A G V A K $121\ {\tt cgctggcaggcgactacgagcgccaccagatccccgagcgccttcagtacatccccgac}\ 180$ 34 R W Q G D Y E R H Q T P E R L Q Y T P D $181\ {\tt gcggaggacccttcgttcttcgagatggtcgagtacttcttccatcgcggatgtcaggtt\ 240}$ 54 A E D P S F F E M V E Y F F H R G C Q V 73 241 gtggaggaccagctggtcgaggagatgaaggagcgcatccccctcgaggagaagcgcaac 74 V E D Q L V E E M K E R I P L E E K R N 93 14 V L Coccagageatectgaagatecatgageccetgecatecacgtgetggagetgecette 94 K T R G I L K I M E P C H H V L E V A F 360 113 361_cccgtcaagagggacaacggcacctacgagatgatccacggttaccgcgcccagcacte 420 114 P V K R D N G T Y E M I H G Y R A Q H S 133 ctccaccgtaccccaaccaagggcggtatccgttactccttagacgtttgcgccgacgag 134 L H R T P T K G G I R Y S L D V C A D E 153 540 481 gtaaaggetttgtcageeetgatgacattcaagtgtteetgegggaegteeettegge 154 V K A L S A L M T F K C S C V D V P F G 173 600 ggtgccaaggctggtctcaagataaaccccagggactactccatcaatgagctggagaa 174 GAKAGLKINPRDYSI 193 NELE K 660 601 <u>atcacccgtcgattcaccctcgagctggccaagaaggggttcattggacctggtggga</u> 194 I T R R F T L E L A K K G F I G P G V D 213 661 gtgccggcccccgacatgggtactggtgaacgagagatgtcatggattgctgacac 720 214 V P A P D M G T G E R E M S W I A D T Y 233 780 721 gccaacacaattggacatcttgacatcaatgctcatgcctgtgtcacgggcaagcccatc 234 A N T I G H L D I N A H A C V ΤG KP Т 253 781 aaccaaggtggcatccatggccgtacatctgccactgggcgaggtgtgttccacgggctg 840 254 N Q G GIHGR ΤS A TGRG V FHG L 273 900 841 <u>gaaaacttcatcaatgaggcatcatacatgtccatgattggcatcactcctggatgggg</u> 274 E N F I N E A S Y M S M I G I T P G W G 293 901 <u>ggaaaaactttcattgtgcagggctttggtaatgtcggtcttcacagtatgagatatc</u> 294 G K T F I V Q G F G N V G L H S M R Y L 960 L 313 1020 961 caccgtgcaggagccacttgcataggtatcaaggaagtcgatggctcaatctacaaccc H R A G A T C I G I K E V D G S I Y N P 314 H R A 333 Р 1080 102° aatggtattgatcctaaggaactggagaattggaagattgagaatggtad 334 N G I D P K E L E N W K I E N G T I M G 353 1081 tteectgggcgggacttatgaaggagagaacettetgtacgagaagtgcgacateet 354 F P G A E T Y E G E N L L Y E K C D I L 1140 37 1200 1141 atccctgctgctattgagaaggtcattcacaagggcaatgcacataagatccaggcaag 374 I P A A I E K V I H K G N A H K I Q A K 393 1260 1201_atcattgctgaggctgccaatggacctacaacccctgctgctgaccaagttctacaaga 394 I I A E A A N G P T T P A A D Q V L ۵ D 413 1320 1261 atgaatgttttggtcatcccagatctctacatcaatgctggtggtgtaactgtgtcatac 414 M N V L V I P D L Y I N A G G V T Y 433 1380 434 F E W 453 1440 454 RESNYHLLESVQESLERRFG 473 1500 1441 cgtgtgggtggcaagattcccatcgtgccgtcagaggctttccaggaacgcatttctgg 474 R V G G K I P I V P S E A F Q E R I SG 493 1560 1501 gcatctgagaaagacattgtccactctggtttggttgtccactctggtttggactactc 494 A S E K D I V H S G L V V H S G 513 LDYS 1561 <u>atggaaagetetgecagagecatcatgagaactgcaatcaagtataacttgggcattgat</u> 514 M E R S A R A I M R T A I K Y N L G I D 1620 533 1680 1621 ctccgtactgctgcttatgtcaattccattgagaagatcttcaacacctacaaggagget 534 L R T A A Y V N S I E K I F N T Y K E A 1681 ggtcttacattcacc<u>taa</u>AATCCTTTTTGGCATGTTGGCAAATTCATGGGCTGTTTCCAT 1740 554 G L. ΤF Т 1801 GAAAAGTATGGATGGTACAAGAATTTCACATCTGTATTATACCAAGTGAAATTGCATTTA 1860 1861 AAGTATGGTGGCAAGAATGTTTCACAAATTTTTGGAGTGCAAGCAGAAAGGGTTTCTCTGT 1920 1921 CAGCTTTTATTAATGAAAGTGTTATGCAGCTGATTTCTTTTTGCTTTATGGTTAACAGAC 1980 1981 TTGAGATGAGGAGTTGAATGTTTTTATAGGTATTTGATTCATACATCAGAACGGTATTTT 2040 2041 TTGATTCAGGGAACAGAAAGGAATATAAAAATGAATGGTATTTTTTACCAAACTTGTAAA 2100 2101 TTACAAATAAATGTTAATAGGGTACCACATTGTTTCTTCGTCACATCATCTATTTAATTA 2160 2161 ACATTGCAGTAAAGAGGATATAATGCTTTTGATGATAATGGCAACACAGGGATTTTCTTG 2220 2221 TCCATACACATTAGCCAAATTGTTAGTATGGTATGGTAATTCATTTAAATGGTAATGGATA 2280

图 1 斑节对虾 GDH 基因的 cDNA 全长序列及 推导的氨基酸序列

两边每行标注的序号是指核苷酸和氨基酸的位置; 起始密码 子(ATG)和终止密码子(TAA)用下划线标出; poly(A)尾巴用 斜体字标出; -- 为信号肽切割位点; 两个方框中分别为:

ELFV dehydrog N 超家族和 NAD bind 1 Glu DH 超家族.

Fig. 1 Nucleotid and amino acid sequences of *PmGDH* The serial numbers on both sides of each row refer to the location of the nucleotide and amino acid; start codon (ATG) and termination codon (TAA) are underlined; the poly (A) signal is marked in italics; The cleavage site for the mitochondrial signal peptide is indicated by "--"; the completed ELFV dehydrog N super family and NAD bind 1 Glu DH super family domain are boxed. 洲爪蟾(Xenopus laevis: NP 001087023.1)与小家 鼠(Mus musculus: NP_032159.1)的同源性都为 74%, 与大猩猩(Pan troglodytes: AAU03136.1)和大



图 2 斑节对虾 GDH 蛋白与人类 GDH-1 蛋白三维结构空间示意图 Fig. 2 The three-dimensional ribbon structure of PmGDH

protein and Homo sapiens GDH-1

西洋鲑(Salmo salar: NP_001117108.1)的同源性都 为 72%, 与智人(Homo sapiens: CAA30521.1)的同 源性为 71%, 与斑马鱼(Danio rerio: NP 997741.1) 的同源性为 70%, 与环纹背带线虫(Teladorsagia circumcincta: AEO44571.1) 和秀丽隐杆线虫 (Caenorhabditis elegans: NP_502267.1)的同源性 分别为 64%和 63%。(图 3)。

利用 MEGA 6.0 软件, 采用 NJ 法构建了 PmGDH及其他物种的 GDH 的系统进化树(图 4)。 从系统树可以看出,节肢动物的 GDH 聚类亲缘 关系较近, 无脊椎动物与脊椎动物的 GDH 明显 的被区分开来。其中, 斑节对虾的 PmGDH 氨基 酸序列先与凡纳滨对虾的 GDH 聚为一支后又与

凡纳滨对虾 Litopenaeus vannamei	1	MLRLGTSVVRAVVQAGAAETLLKASAPAAGVAKRWQCDYERHQIPERLQYIP-DAEDPSFEBMVEYFFHRCCQVVEDQLVEBMKER 85
中国对虾 Fenneropenaeus chinensis	1	MLRLGTSVVRAVVQAGAABTLLKTSAPAAGVAKRWQGDYERHQIPERLQYMP-DAEDPSFBBMVEYFFHRGCQVVEDQLVDEMKBR 85
中华绒螯蟹 Eriocheir sinensis	1	MLRVGTAAVRAVVOAGVOAEGRMLRAVVAPAATTTTTTSPNOOPRRWOGDFERHOIPERLOVIP-DAEDDSFEEMWEVEFHRGCOVVEDOLVEMKER 97
家蚕 Bombyx mori	1	MLHLKN-IAKSVVPPLKNSV9NEALNTMFRIIPAGVN-VCCRTYASHEIPDKLKDIP-TSANPKPPHWVEYFPHRACOVVEDKLVEDLKSR 88
蛹蛹金小峰 Nasonia vitripennis	1	MEHVRG-LTRTSAMLKOTGELAOTAALVRLONRGYADHOLDEKLKDVP-TAANPKREDMVEYFEHRACOTVEDKLVEDVGKRSR 82
佛罗里达弓背蛇 Camponotus floridanus	1	MERVES-LTRSSTALKOAPGNDVVISMLARAALAAVOTAARRGFADHOTEDRUKDVP-FAPNEREDDWVEVEEHRACOTTEDKLVEDINKRSB 91
豌豆长管蚜 Acyrthosiphon pisum	î	MYNT SR-L GRWYS
黑腹果蛹 Drosonhila melanogaster	î	WHI KS-LARGAPMARGEI ATLAKALPTAVMOSSRCYATEHOLEORI KOVE-TAKDEREDAVEVEHERGCOLARESI VDDMKGK 83
短人 Homo saniens	1	
小家鼠 Mus musculus	î	
游马角 Danio rerio	î	
大西洋餅 Salmo salar	1	
委爾隆杆线由 Caenorhabditis alagans	1	
万丽感行线虫 Cuenor nadanis elegans	1	
所以自市线虫 Teladorsagia circumcincia	1	
示理理 Fun trogloayles	1	MINITARALLI SRAD MALOSAANASAALLORGI
中的小编 Aenopus laevis	1	
対 TP XJ HF Penaeus monoaon	1	MURUGI SA MKAAA MAGAMET
日纳滨对虾 Litonengeus vannamei	86	TO BRENT POTT KINDOUHVERVARDVERNETVENDEVRAGES HPTOTYCATEVSTINGADEVEAL SALVERVOCUDVDRCARAGE KINDON 185
中国对斯 Formanonanagus ahinanai	86	
中国内站 Tenner Openaeus Chinensi	00	
中午 筑重强 Eriocheir sinensi 家本 Pombur mori	90 90	
家虫 Domoya mon 崛極合小略 Nagania vitnin annia	07	
佛田田法已悲劇 Components	03	
南京长傍照 Annthemistry normanus	72	FIDERARY WITH LOPOD HER PROVIDED FOR THE INFORMATION FOR THE PROVIDENT AND THE PROVI
到安氏官对 Acyrthosiphon pisum	12	MOVED ANALYING I DEGNAPCENTILET SEPTIMINUS GOTEMITI GIRAGINSTITIKI POVINCE UVALI GIRAGUNAL PARAGUNA POVINCE TAT
無限未蝿 Drosophila melanogaster 知し Hammanniana	84 02	LIRDEAN AVIAG IMILAP CHILI DI APPLIKI DAGVI EN ILG RACIS I HILI PIAGO RESULVISI DE VALISALMI FICACIO VPEGANAGLA I NYA 183
省人 Homo sapiens	93	ESEBUARNRINGTERTITATION VISUS EPIPTIRADUS WEITTEGTRACHSUNKTURGETRYSTIDIS VIDEVRALASUMTINGAV DVPPGGARAGIVATINIAN 192
小豕鼠 Mus musculus	93	ESEBUKKNRINGT DRI TI NCOMMUSISSEPPI IRKDUSS WEUTEGY RACHSUNKT POKOGO IRYSTI DVSVIDE VRADASUMTI INCAW DVPPOGARAGVKI NPRN 192
如与但 Danio rerio	79	EIPEURKHRYRGTIATITNPCMHVISVSFPTARDNEEWEATTEGYRACHSUHKTPCKGGTRYSTERVSVDEVRALASUMTINCAVVDVPPGGANAGVRTNPNN 178
人四洋壁 Salmo salar	74	EIPEUANKRYRGTIDNTINFONHVISVSFPTIRRDNEEWEVVEGYRACHSQHRTPCRGGTRYSEEVSVDEVRALASLMTPRCAVVDVPGGARAGVRTNVIN 173
旁朋愿什线虫 Caenorhabaitis elegans	/1	LSQRDRNNLVSGTLGATRPVNRVDYTTFPTRRDNEEFEVTEAWRAQHSEHRTPTRGGTRYSDDVCEDEVKALSALMTYRCAWVDVPGGARGGVRTDPN3 170
坏以育带线虫 Teladorsagia circumcincta	72	MSTRURRNLUNGTURATREVNRVLYTTFPTRRUNEEFEUTEAWRACHSEHRTPTRGGTRYSMOVCEDEVRALSALMTYRCAAMDVPFGGARGGVRTUPRH 171
黑猩猩 Pan troglodytes	93	ESBEGKKNRVRGTIJKTIRPONHVISISFPTIRKDJOSWBYTEGYRAQHSQHKTPCKGGTRYSTDVSVDEVKALASILMTYKCAVVDVPFGGAKAGVKTNPNN 192
非洲爪蝽 Xenopus laevis	75	ETBECKRERVIKGTERTEXPONIVESVSPPTKRDNGEWEWTEGYRACHSCHRTPCKGGTRYSTEVSVDEVKALASEMTYKCAWVDVPFGGAKAGVKTNPRN 174
斑节对虾 Penaeus monodon	86	IPUBEKRNKTRGIJKIMBPCHHVIBVABPVKRDNCTVBMIHCVRAQHSLHNTPTKGGIRVSUDVCADEVKAUSAIMTEKCSCVDVPPCGAKAGIKINERD 185
日 · 加沱对 亦 Liton on gous upper an ai	100	
中国对斯 Formation and a himmain	180	THE NULL AFT IN A VERY AND A THE AND A VERY
中国内站 Tenner Opendeus Chinensis	180	TO INCLUSE TRADET LECARKOFT OF OF DAVID OF AF DAVID OF ACTION AT A DAVID ANTI OF A DAVID A DAVIDA D
中午级蛋蛋 Eriocheir sinensis 安本 Pombur mori	198	1 DINIZLEK LINKE I LELAKKUP I OF OVDY FAF DWOI UERDWINT AND I AKTI GENOVINIA VI UKE UNQOLINGA DAKUT HOLEME INEADIMAT 271 VICHELE KYLTERDERI ELA KWERTEROVINIA AND GEROVINICA DINIZATI KATA KATA GEROTATANI A VITYERT TAVACI HOLEMETI ELA
家蛋 Dombys mori 解解会小終 Nagonia vituinonnia	189	10 metelski i transferior i degarande forgovor far ding i gerlenski i ladi i anti gerleng di transferior forgovor far ding i gerlenski i ladi i anti gerleng di transferior forgovor and transferiore di tr
地理中达已把的Comments	183	15 DIVELEK I IKKY LELAKKOF GYGY DVAR DAGI GEREMONTAD I TAN I GHIDINARACY I GAF I NGOTINA I SATUKOF NGLEN I INEM IMMI 262
m多主达与自致 Camponotus Jioriaanus	192	1 SERIELEK I TREP I LELARKEP GEVE DVAR DMOT GEREMONT ADJ TAN I TOTU DINARACY TORT I NOOGTROKT SATURNOV PROLENT I NEATMANN 291
到豆氏官对 Acyrinosipnon pisum	172	S DREEDE I TREP TE LARGET GEGE DVAR DREEDENSET ADT FAN IT GELE DTANAACY TOP I NGGETHORY SATIGKOVENDE LEN TIMEAN THE 2/1
羔腹禾蝇 Drosophila melanogaster	184	TSERELEKTI TRAFTELELARMAGT GEVENDVAPDMOT GEREMSNI ADT YANT I GELDTVAHACY TGAT I NGG THORV SATGROVPHOLENT I NEAMMAS 283
管人 Homo sapiens	193	Y III NELEK I I RRET IWELAKKOF I GPGI DVPAPDNSI GEREMS WIADI YASI I GHIDI NAHACVI VRAPI SQGGHIGRI SA I GROFFIGIENTI NEASYMSI 292
小豕鼠 Mus musculus	193	YIIINELEKITREFINELAKKGFIGPGIDVPAPDNSIGEREMSWIADIYASIIGHDINAHACVIGKPISQGGIHGRISAIGRGVFHGIENFINEASYNSI 292
功当世 Danio rerio 上面送付 C 1 1	179	TSUTIELEK FERRET HELARKOF GPGIDVAPDAS TEREMSWIAD I YANIM GHIDI NAHAOV TERPI SOGOTHERI SATOROVINCIENI MEAAMMS 2278
人四汗壁 Salmo salar	174	YSUNELEKTTRRTHIELAKKGFTGPGIDVPAPDASTGBREASWIADTYANTTAHIDTNAHAOVTGRPTSOGGTHGRUSATGROVHIGHENFTNEASYMSM 273
旁丽愿针线虫 Caenorhabditis elegans	171	VIDYBTEKT FRITATEPAKKGELOPGYDVPAPD0GTGEREDGWTADTYACTTGELDRDASAGTTGERPIVSGETHGRVSATGRGVWKGLEVETDDADTMKM 270
 	172	YTDYDIEKTTRKLATEHAKKGFLGPGVDVPAPDMCTGEREMEWTADTYAOTTGHLDRDAAACHTGKPTVACGTHGRVSATGRGVWKGLEVBAKBPEYMNK 271
黑猩猩 Pan troglodytes	193	YTENELEK I TRRETMELAKKGF I GPGYDYPAPDUNTGEREMSWI ADI YASI I GHYDI NAHACVI GKPI SOGG I HGRI SATGROVFHG I ENFI NEASYMSI 292
非洲八ns Xenopus laevis	175	FSDAELEKTTREFTIELAKKGFTGPGIDVPAPDMSTGEREMSWIADTYANTIGHTDINAHACVTGKPTSQGGTHGRISATGRGVFHGTENFINEASYMSQ 274
斑节对虾 Penaeus monodon	186	YSINELEKITRRFTLELAKKGFIGPGVDVPAPDMGTGEREMSWIADTYANTIGHLDINAHACVTGKPINQGGIHGRTSATGRGVFHGLENFINEASYMSM 285

⁽图 3 待续 Fig.3 to be continued)



图 3 PmGDH 的氨基酸序列与其他物种 GDH 的氨基酸多重序列比对 Fig. 3 Multiple alignment of the predicted amino acid sequence of PmGDH with other eukaryote GDH amino acid sequences

中国明对虾的 GDH 聚在一起,最后与其他节肢动物聚合。

2.3 PmGDH 基因的组织表达分析

选择 β-actin 作为参照,利用实时荧光定量 PCR 技术对 PmGDH 基因在斑节对虾各组织中的 表达进行检测。PmGDH 在各组织的表达情况如 图 5 所示。由图可以看出, PmGDH 在斑节对虾的 脑组织、眼柄神经、鳃组织、淋巴、肝胰腺、胃、 胸神经、肠组织、肌肉、心脏以及血淋巴中均有 表达,且各组织中表达量存在显著差异(P<0.05), 其中肌肉组织中表达量最高,其次在眼柄神经, 鳃组织,以及肝胰脏中表达量都较高,而在肠组 织与血淋巴中的表达量最低。(图 5)。

2.4 PmGDH 基因不同浓度氨氮胁迫下表达分析

通过 Real-time PCR 检测, 在不同浓度氨氮胁 迫过程中斑节对虾 GDH 基因在肝胰腺中的表达 的变化趋势如图 6。结果表明, 低浓度组与高浓度 组在氨氮胁迫实验开始后的表达量都有所上调并 显著高于对照组(P<0.05)。低浓度组在 12 h 达到 峰值并在 24 h 后开始下降并趋于平稳。而高浓度 组在实验开始 6 h 迅速达到第 1 个峰值之后出现表 达下调, 但与对照组差异并不显著(P<0.05), 之后



图 4 利用 MEGA 6.0 软件构建的基于 PmGDH 氨基酸序列的 NJ 系统进化树 Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on PmGDH amino acid sequences by MEGA 6.0





Fig. 5 The expression of *Penaeus monodon GDH* in different tissues

M: muscle; E: eyestalk nerve; G: gill; HE: hepatopancreas;
L: lymph; H: heart; S: stomach; B: brain; TG: thoracic ganglia;
I: intestines; HA: haemolymph. Values with different letters are significantly different from each other (*P*<0.05).

在 48 h 又开始上调并在 72 h 到达第 2 个峰值,显 著高于对照组(*P*<0.05)。

在不同浓度氨氮胁迫过程中斑节对虾 GDH



图 6 斑节对虾肝胰腺中 PmGDH 基因在氨氮 胁迫过程中表达变化情况 同一时间内小写字母不同表示实验组与对照组 差异性显著(P<0.05).

Fig. 6 Expression profiles of PmGDH gene in *Penaeus* monodon hepatopancreas during ambient ammonia stresses Values with different letters at the same time are significantly different from the control group (P<0.05).

基因在鳃组织中表达的变化趋势与在肝胰腺中有 些类似(图 7)。高浓度组与低浓度组的变化趋势有 所不同。在低浓度组中, GDH 基因的表达量在实 验开始 6 h 后明显下调并显著低于对照组(P< 0.05), 之后开始表达上调并在 48 h 到达峰值,在 72 h 后 开始下降并趋于正常水平。

而在高浓度组中, GDH 基因的表达水平在实验开始 6 h 明显上调并显著高于对照组(P<0.05), 到达极值。12~48 h 期间有所恢复, 48 h 后再次表达上调并在 72 h 到达第二个峰值,显著高于对照组(P<0.05),之后在 96 h 表达明显被抑制,显著低于对照组(P<0.05)。



同一时间闪小与子可不同表小头短组与对照组 差异性显著(P<0.05).

Fig. 7 Expression profiles of *PmGDH* gene in *Penaeus monodon* gill during ambient ammonia stresses Values with different letters at the same time are significantly different from the control group (*P*<0.05).

3 讨论

本实验成功克隆了斑节对虾谷氨酸脱氢酶 (*PmGDH*)基因,经多重序列比对发现,该氨基酸 序列十分保守,与凡纳滨对虾^[11]和中国明对虾^[2]相 似性最高,序列都存在3个糖基化位点,在N端 有信号肽序列,并且都含有ELFV dehydrog N与 NAD bind 1 Glu DH 两个保守结构域。PmGDH 蛋 白质二级结构预测结果显示其由α螺旋、延伸链 以及无规则卷曲构成,各部分所占比例与大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)GDH 十分相似^[1]。此外, PmGDH 的三维结构与人类的 GDH-1 的三维结构 较相近,同源性达到 74.65%。上述结果表明,本 实验克隆得到的是斑节对虾 *GDH* 基因。

PmGDH 基因在斑节对虾各组织中广泛表达, 但各组织间的表达量差异很大,存在组织特异性 表达, 推测 PmGDH 的这种组织特异性与 GDH 参 与氨基酸分解以及丙氨酸和脯氨酸循环有关[19-20]。 PmGDH 基因在斑节对虾肌肉中表达量最高,其 次在鳃组织, 肝胰腺以及眼柄中表达量也很高, 而在血淋巴中表达量最低,这一趋势与 Li等^[11]于 2009 年和李少飞^[2]于 2014 年对凡纳滨对虾和中 国明对虾 GDH 基因组织表达分析的结果基本一 致。谷氨酸脱氢酶在斑节对虾肌肉中大量表达, 这可能与甲壳动物的大量氨基酸代谢发生在肌肉 中, 而谷氨酸脱氢酶又直接参与氨基酸分解代谢 有关^[2]。除此之外, GDH 在维持甲壳动物体内氨 氮浓度以及氨氮解毒代谢过程中发挥着重要作用, 而肝胰腺与鳃是甲壳动物的主要氨氮解毒代谢场 所与氨氮排泄器官^[12],所以 PmGDH 在肝胰腺与 鳃组织中表达量也很高。

甲壳动物为排氨动物,正常情况下体内大部 分的氨氮可通过尿素及尿酸的形式经鳃排出体 外^[21-22]。当甲壳动物受到氨氮胁迫,可通过肝胰 腺以及鳃等组织解毒代谢来降低体内氨氮浓度, 减轻外界高氨环境对组织器官造成的损伤^[23-25], 已有的研究表明,谷氨酸脱氢酶(去氨氮方向)催 化形成谷氨酸,随后谷氨酰胺合成酶催化谷氨酸 反应形成无毒的谷氨酰胺加以储存, 起到降低体 内氨氮的作用^[26]。为了研究谷氨酸脱氢酶(GDH) 在斑节对虾氨氮解毒代谢中的作用, 本研究分别 使用高浓度组与低浓度组对斑节对虾进行氨氮胁 迫实验,分析了在不同浓度氨氮胁迫过程中斑节 对虾 GDH 基因在肝胰腺与鳃组织中表达变化趋 势。肝胰腺是甲壳动物的主要氨氮解毒代谢器官, 其中含有大量的酶与蛋白质, 而且水生动物摄入的 饲料蛋白后被吸收的氨基酸有 80%进入肝代谢[27]。 本实验结果表明, 肝胰腺中 PmGDH 基因对于氨 氮的刺激反应十分迅速, 高浓度组与低浓度组在 实验开始 6 h 后表达量都明显上调,显著高于对 照组(P<0.05)。所不同的是,高浓度组的上调幅度 更大, 而且随着实验的进行, 高浓度组的反应也 比低浓度组更加强烈一些:低浓度组在12h到达 峰值,显著高于对照组(P<0.05),随后就逐渐下

降并趋于稳定,最终与对照组无显著差异(P<0.05); 而高浓度组在 6 h 迅速到达第 1 个峰值之后表达 量有所下降,在48h再次表达上调并于96h到达 第2个峰值,显著高于对照组。这表明氨氮低浓 度组也就是安全浓度对于斑节对虾的影响不大, 可以通过机体自身调节消除, 而高浓度组也就是 半致死浓度对于斑节对虾的生理影响较为严重, 需要机体进行量两次调节,而 PmGDH 基因在实 验过程中的显著上调也说明 PmGDH 基因在氨氮 解毒代谢过程中发挥了重要作用。相关研究表明, 胡子鲇在两种不同浓度的 NH4Cl 胁迫下肝中的谷 氨酸脱氢酶(去氨化方向)活性显著上调,同时谷 氨酸含量也随即上调^[28]。李少飞^[2]于 2014 年的研 究结果表明,中国明对虾肝胰腺中的 FcGDH 基 因在 4 mg/L 与 16 mg/L 两组氨氮浓度胁迫下均表 现出不同程度的表达上调,并且 16 mg/L 浓度组上 调幅度大于4mg/L浓度组。

鳃是大多数水生甲壳动物氨氮排泄器官^[29]。 在氨氮胁迫过程中, PmGDH在鳃组织中的表达规 律与在肝胰腺中相似, 高浓度组在 6 h 迅速达到 第 1 个峰值并显著高于对照组与低浓度组(P< 0.05), 之后在 72 h 达到第 2 个峰值, 而在 96 h 又 急速下降并显著低于对照组(P<0.05); 低浓度组 则在实验开始后逐步表达上调,在48h达到峰值 并显著高于对照组(P<0.05), 之后就开始下降最 终趋于正常值(P<0.05)。这表明 PmGDH 在鳃组织 中的表达模式与在肝胰腺中的类似, 在氨氮代谢 过程中发挥重要作用,当甲壳动物体内氨氮浓度 过高时,机体会通过降低鳃组织对 NH₃的通透性, 增加对 NH44的排出来进行调节^[25]。而高浓度组在 96 h 突然大幅度表达下调, 推测是由于长时间的 高浓度氨氮胁迫损伤了斑节对虾鳃组织,已有研 究表明, 甲壳动物的鳃组织在氨氮胁迫下会受到 氧化损伤, 鳃上皮细胞结构受到破坏, 并且随着 氨氮浓度的升高这种损伤也相应加重^[30]。

参考文献:

 Mu X S. Gene cloning, specific expression in different tissues and recombinant protein preparation of 4 biomarkers in *Scophthalmus maximus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [穆小生.大菱鲆4种生物标志物基因的克隆, 组织特异性表达研究及重组蛋白制备[D]. 青岛:中国海 洋大学, 2013.]

- [2] Li S F. cDNA cloning and expression analysis of the enzyme genes related to ammonia metabolism in *Fenneropenaeus chinensis* and study on effect of these enzymes in the detoxification of ammonia following ambient ammonia stresses [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2014. [李少飞. 中国 对虾氨氮代谢酶基因的 cDNA 克隆及其在氨氮解毒代谢 过程中的作用[D]. 大连: 大连海洋大学, 2014.]
- [3] Benachenhou-Lahfa N, Forterre P, Labedan B. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaebacteria in the universal tree of life[J]. J Mol Evol, 1993, 36(4): 335–346.
- [4] Miñambres B, Olivera E R, Jensen R A, et al. A new class of glutamate dehydrogenases (GDH) biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring nad-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39529–39542.
- [5] Brown J R, Doolittle W F. Archaea and the prokaryoteto-eukaryote transition[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61(4): 456–502.
- [6] Andersson J O, Roger A J. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes[J]. BMC Evol Biol, 2003, 3(1): 14–23.
- [7] Spanaki C, Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism[J]. Neurotoxic Res, 2012, 21(1): 117–127.
- [8] Jin L, Li D, Alesi G N, et al. Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth[J]. Can Cell, 2015, 27(2): 257–270.
- [9] Wang Y, Li E, Yu N, et al. Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. PloS ONE, 2012, 7(5): e37316.
- [10] Xiong Z Q. Study on glutamate dehydrogenase gene of the economic macro-decapods (Crustacea) species[D]. Shanghai: East China Normal University, 2010. [熊泽泉. 十足目(Crustacea: Decapoda)经济甲壳动物谷氨酸脱氢酶基因的研究
 [D]. 上海: 华东师范大学, 2010.]
- [11] Li E, Arena L, Chen L, et al. Characterization and tissue-specific expression of the two glutamate dehydrogenase cDNAs in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. J Crust Biol, 2009, 29(3): 379–386.

- [12] Liu S N, Pan L Q, Liu M Q. Effects of ammonia exposure on key detoxification metabolism associated genes expression in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Transactions Oceanology and Limnology, 2015(2): 97–104. [刘胜男, 潘 鲁青, 刘茂琪. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹解毒代谢关键基因 表达的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2015(2): 97–104.]
- [13] Chen J C, Chen C T. Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia[J]. Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1996, 114(1): 35–38.
- [14] Cheng W, Chen J C. The virulence of enterococcus to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(2): 97–109.
- [15] Wang J, Qu K M, Liu H Y, et al. Acute toxic effects of nutrite and non-ion ammonia on *Fenneropenaeus chinensis* at different dissolved oxygen levels[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 28(6): 1-6. [王娟, 曲克明, 刘海英, 等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对中国对虾的急性毒性 效应[J]. 海洋水产研究, 2008, 28(6): 1-6.]
- [16] Huang J H, Li Y, Yang Q B, et al. Comparison of tolerance to ammonia-N in *Penaeus monodon* families[J]. South China Fisheries Scince, 2012, 8(6): 37–43. [黄建华, 李永, 杨其彬, 等. 斑节对虾家系氨氮耐受性的比较[J]. 南方水产科学, 2012, 8(6): 37–43.]
- [17] Zheng W Y, Weng E Q. Introduction to Environmental Toxicology[M]. Xiamen: Xiamen University Press,1993: 57-60. [郑微云, 翁恩琪. 环境毒理学概论[M]. 厦门: 厦 门大学出版社, 1993: 57-60.]
- [18] Zang W L, Xu X C, Dai X L, et al. Toxic effects of Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ and NH₃ on Chinese prawn[J]. Chin J Oceanol Limnol, 1993, 3: 254–259.
- [19] Willett C S, Burton R S. Characterization of the glutamate dehydrogenase gene and its regulation in a euryhaline copepod[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2003, 135(4): 639–646.
- [20] Plaitakis A, Zaganas I. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain[J]. J Neurosci Res, 2001, 66(5): 899-908.
- [21] Regnault M. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea[J]. Biol Rev, 1987, 62(1): 1–24.
- [22] Weihrauch D, Morris S, Towle D W. Ammonia excretion in

aquatic and terrestrial crabs[J]. J Exp Biol, 2004, 207(26): 4491-4504.

- [23] Hong M, Chen L, Sun X, et al. Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia[J]. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol, 2007, 145(3): 363– 369.
- [24] Chen J M, Chen J C. Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia[J]. Aquat Toxicol, 2000, 50(1): 27–37.
- [25] Yue F. Immune response and detoxification mechanism of swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to ambient ammonia[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
 [岳峰. 三疣梭子蟹在氨氮胁迫下免疫应答与解毒代谢机 制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [26] Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biological Chemistry[M].
 Beijing: Higher Education Press, 2002: 306–308. [王镜岩,
 朱胜庚, 徐长法. 生物化学: 第 3 版[M]. 北京: 高等教育
 出版社, 2002: 306–308.]
- [27] Walton D J. Stereochemistry of reduction of D-glyceraldehyde catalyzed by a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent dehydrogenase from skeletal muscle[J]. Biochemistry, 1973, 12(18): 3472–3478.
- [28] Saha N, Dutta S, Haussinger D. Changes in free amino acid synthesis in the perfused liver of an air-breathing walking catfish, *Clarias batrachus* infused with ammonium chloride: a strategy to adapt under hyperammonia stress[J]. J Exp Zool, 2000, 286(1): 13–23.
- [29] Li Y. Artificial selection of *Penaeus monodon* and impacts of ammonia-N on immune parameters, detoxification[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [李永. 斑节对 虾人工选育及氨氮对其免疫, 解毒代谢影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [30] Zeng Y Y, Chen X F, Ai C X, et al. Effects of Ammonia-N stress on haemolymph physiological and biochemical indexes and microstructure of gill and hepatopancreas of *Scylla paramamosain*[C]. The 11th Annual Meeting and Academic Seminar of the Chinese Society of Crustaceans, 2011: 107. [曾媛媛, 陈曦飞, 艾春香, 等. 氨氮胁迫对拟穴青蟹血淋 巴生理生化指标及鳃和肝胰腺显微结构的影响[C]. 中国 甲壳动物学会第十一届年会暨学术研讨会论文摘要集, 2011: 107.]

Molecular cloning and expression analysis of glutamate dehydrogenase (*GDH*) in *Penaeus monodon* under ammonia nitrogen stress

ZHOU Falin¹, CHEN Jinsong^{1, 2}, HUANG Jianhua¹, YANG Qibin¹, QIU Lihua¹, MA Zhenhua¹, JIANG Shigui¹

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Glutamate dehydrogenase (GDH) is found widely in many plants, animals and microorganisms as a mitochondrial enzyme, and it is the key enzyme in amino acid catabolism. It is distributed extensively in animal tissues such as the hepatopancreas, kidney and brain. GDH activity is very strong and it may catalyze the glutamic acid oxidative deamination reaction. To explore the function of the GDH gene during ammonia nitrogen metabolism of black tiger shrimps (Penaeus monodon), the complete cDNA sequence of GDH from P. monodon (denoted *PmGDH*) was obtained by rapid amplification of cDNA ends. The full length of the sequence of *PmGDH* was 2386 bp containing a 5'UTR of 21 bp and a 3'UTR of 688 bp, and the length of the open reading frame (ORF) was 1677 bp encoding 558 amino acids. The predicted molecular mass of the amino acid (aa) sequence was 61.837 kD with an estimated pI of 6.57, and there was a poly A with 27 bp. In common with the GDH of other animals, the structure of the PmGDH protein contained two conservative domains, ELFV dehydrog N and NAD bind 1 Glu DH. There were 37 phosphorylation sites and three glycosylation sites in this protein. Through multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis, it was concluded that the homology and similarity between PmGDH and the GDH of Litopenaeus vannamei was the highest. Analysis of the tissue expression pattern of PmGDH showed that the *PmGDH* mRNA was expressed in all tissues tested, including lymphoid tissue, ovary, eyestalk nerve, brain, stomach, muscle, intestines, thoracic nerve, hemolymph, hepatopancreas and gill. The highest levels were found in muscle, the next highest in the eyestalk and the lowest levels in the hemolymph. To study the functions of PmGDHin *P. monodon* under conditions of ammonia nitrogen stress, the hepatopancreas and gill were sampled at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after exposure to different concentrations of ammonia nitrogen. The expression of PmGDH in the hepatopancreas and gill was significantly different compared with the control group (P < 0.05), and the expression levels differed between hepatopancreas and gill. The results showed that PmGDH may play an important role in shrimp ammonia metabolism and may be involved in responses to acute ammonia stress.

Key words: *Penaeus monodon*; GDH; ammonia nitrogen stress; gene clone; tissue expression Corresponding author: JIANG Shigui. E-mail: jiangsg@21cn.com