

日本沼虾表皮 *Serpin* 基因克隆及免疫功能的初步研究

宁黔冀, 彭彦新, 岳凯迪, 李亦君

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 丝氨酸蛋白酶级联反应介导的黑化是甲壳动物重要的免疫反应, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine proteinase inhibitor, Serpin) 是黑化反应的重要调节因子, 而甲壳动物表皮 Serpin 的有关研究较少. 为了探索表皮 Serpin 在日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 免疫反应中的功能, 基于前期转录组数据, 利用 PCR、RACE 和生物信息学从日本沼虾表皮克隆并鉴定了 1 个新的 *Serpin* 基因, 命名为 *MnSerpin*, 利用 RT-qPCR 和 RNAi 等方法, 研究了该基因时空表达模式、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 攻毒后表皮 *MnSerpin* 的转录水平以及日本沼虾死亡率的变化. 结果显示, *MnSerpin* cDNA 全长 2 181 bp, 编码 419 个氨基酸, 具有 Serpin 结构域. *MnSerpin* 在腹背部表皮、鳃、血细胞、胃、心、肝胰腺等多种组织均有表达; 表皮 *MnSerpin* 的表达与蜕皮周期有关, 与蜕皮间期 (C 期) 相比, 在蜕皮后早期 (A 期) 最高, 增加 6.06 倍 ($P < 0.01$). 嗜水气单胞菌攻毒后, 表皮 *MnSerpin* 的相对表达量在 6 h 达到了峰值, 比对照组增加 3.77 倍 ($P < 0.01$). 在腹背部第二节的关节膜内注射 3 μg dsRNA 溶液, 每 12 h 注射 1 次, 共注射 3 次, 最后一次注射后 12 h, 干扰效率最高, 表皮 *MnSerpin* 的相对表达量同比下降 58% ($P < 0.01$). 在干扰效率最高的时间点攻毒, 120 h 内, 干扰组虾的累计死亡率比未干扰组增加 16% ($P < 0.01$). 结果表明, 日本沼虾表皮 *MnSerpin* 是重要的免疫因子, *MnSerpin* 的表达存在组织以及蜕皮周期不同阶段的差异, 该基因表达下调能显著增加嗜水气单胞菌感染虾的死亡率.

关键词: 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*); 表皮; *MnSerpin*; RNAi

中图分类号: S97.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-2367(2024)02-0123-07

无脊椎动物主要依靠天然免疫系统防御病原体入侵, 其中包括体液免疫^[1]. 黑化是重要体液免疫反应之一, 参与伤口愈合和病原体隔离等^[2]. 黑化需要丝氨酸蛋白酶 (Serine protease, SP) 级联反应启动酚氧化酶原 (prophenoloxidase, proPO) 激活, 产生活性酚氧化酶 (phenoloxidase, PO), PO 催化单酚为醌, 醌聚合形成的黑色素消灭病原体, 但过量的黑色素和中间活性产物 (醌类、超氧化物和 PO 等) 将损伤细胞和组织^[3-4]. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine proteinase inhibitor, Serpin) 是黑化反应的重要调节因子, 维持生物体动态平衡^[5]. 通常, 作为自杀抑制剂, Serpin 反应中心环 (reactive center loop, RCL) 的裂解键 (P1-P1') 被靶蛋白识别和切割, 导致不可逆的构象变化, 进而与靶蛋白形成共价复合物; P1 氨基酸残基决定了 Serpin 的特异性^[6-7]. 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[8]、烟草天蛾 (*Manduca sexta*)^[9] 和家蚕 (*Bombyx mori*)^[5] 等的研究显示, Serpin 负调控 SP, 导致下游的 proPO 不能激活, 抑制黑化.

目前, 已经在斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[10]、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[11]、中华绒螯蟹

收稿日期: 2022-10-29; **修回日期:** 2022-11-18.

基金项目: 国家自然科学基金 (30940008); 河南省自然科学基金 (182300410033).

作者简介 (通信作者): 宁黔冀 (1964—), 女, 河北邯郸人, 河南师范大学教授, 博士生导师, 研究方向为甲壳动物生长发育调控, E-mail: nqjnqj1964@163.com.

引用本文: 宁黔冀, 彭彦新, 岳凯迪, 等. 日本沼虾表皮 *Serpin* 基因克隆及免疫功能的初步研究 [J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 2024, 52(2): 123-129. (Ning Qianji, Peng Yanxin, Yue Kaidi, et al. Cloning and preliminary study on immune function of Serpin gene from the epidermis of *Macrobrachium nipponense* [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2024, 52(2): 123-129. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2022.10.29.0001.)

(*Eriocheir sinensis*)^[12]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[13]的血细胞和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[14]、红帝王蟹(*Paralithodes camtschaticus*)^[15]的肝胰腺等组织克隆并鉴定了 *Serpin*, 发现病原菌攻毒后 *Serpin* 基因表达增加. 研究发现, 甲壳动物的表皮组织不仅起到物理屏障的作用, 而且具有一些免疫功能^[16], 但源于表皮组织的 *Serpin* 基因还未见报道.

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)又名青虾、河虾, 是我国重要的淡水养殖品系^[17]. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种条件致病菌, 导致日本沼虾极高的死亡率^[18]. 为了探索表皮 *Serpin* 在日本沼虾免疫反应中的作用, 本研究首次从表皮克隆了 1 个 *Serpin* 基因, 命名为 *MnSerpin*, 对其进行生物信息学分析; 利用 RT-qPCR 和 RNAi 等方法, 研究了 *MnSerpin* 的时空表达模式、嗜水气单胞菌攻毒以及 *MnSerpin* 敲降后表皮 *MnSerpin* 的转录水平和日本沼虾死亡率的变化, 旨在为阐明表皮组织在甲壳动物免疫系统中的作用积累资料.

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本沼虾购自河南省原阳黄饲渔场, 选取健康虾体长(3.5±0.5) cm 置于实验室玻璃水族箱内, 水温设置为(27±1) °C, 早晚投喂 1 次. 1 周后, 用于实验. 选取 3 尾虾, 解剖鳃、胃、肌肉、心、肝胰腺、血细胞等组织, 分别选取蜕皮间期(C)、蜕皮前早期(D₀)、蜕皮前后期(D₁)、蜕皮后早期(A)和蜕皮后晚期(B)的 3 尾虾, 取腹背部表皮组织, 液氮速冻, -80 °C 保存备用. 参照 KIRIRAT 等^[19]方法, 鉴定虾的蜕皮周期. 除了在蜕皮周期的表达分析外, 选取 C 期虾作为实验材料. 嗜水气单胞菌由新乡医学院实验室提供.

1.2 总 RNA 提取以及 cDNA 合成

按照 Mini BEST Universal RNA Extraction Kit(TaKaRa)说明书提取各组织的总 RNA, 用超微量紫外分光光度计 Nano Drop ONE(赛默飞)检测纯度和浓度, 质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 利用 Prime-Script™ One Step RT-PCR Kit(TaKaRa)合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存.

1.3 *MnSerpin* cDNA 的全长克隆

基于本课题组日本沼虾 C 期头胸甲外骨骼转录组数据库中获得 *MnSerpin* 的核心序列, 使用 Prime primer 5.0 软件设计引物 *MnSerpin*-F 和 *MnSerpin*-R(附录表 S1), 扩增核心序列. 根据验证的核心序列设计 *MnSerpin* 的 3' 和 5' 末端的嵌套引物(附录表 S1), 利用 RACE 的方法分别扩增 3' 和 5' 末端 cDNA 序列. PCR 产物经电泳后, 按照 HiPure Gel Pure DNA Mini Kit(Magen)的方法回收纯化, 连接 pMD19-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性单克隆菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司测序. 根据测序结果, 使用 DNAMAN 软件拼接获得 *MnSerpin* 的全长 cDNA 序列.

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI ORF finder 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析开放阅读框; BLAST 软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析氨基酸序列同源性; 使用 Conserved Domain Search 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测保守结构域; 使用 SignalP 5.0 软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)预测信号肽; 使用 ExPASy 软件(https://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白质的理论等电点与相对分子量; 通过 Clustal W 程序进行多序列比对并利用 MEGA 5.1 软件的邻接法构建系统发育树.

1.5 *MnSerpin* 时空表达

以 β -actin 作为内参基因, 利用 RT-PCR(Reverse Transcription PCR)的方法检测 *MnSerpin* 的组织分布, 50 μ L 反应体系: 2 \times Es Taq Master Mix 25.0 μ L, 各组织 cDNA 模板 1.0 μ L, 上下游引物各 2.0 μ L, 灭菌 ddH₂O 20.0 μ L; 采用降落 PCR 进行扩增, 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C \rightarrow 48 °C, 退火 30 s, 72 °C 延伸 150 s, 共 32 个循环; 72 °C 终延伸 7 min, 电泳检测不同组织对应的条带亮度.

利用 RT-qPCR(quantitative real-time PCR)的方法检测 *MnSerpin* 在蜕皮周期的表达(SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒, TaKaRa). 20 μ L 反应体系: AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10.0 μ L、蜕皮周期各阶

段表皮 cDNA 模板 2.0 μL 、上下游引物各 0.8 μL 、灭菌 ddH₂O 6.4 μL 。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s,共 40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 60 s,97 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 s(融解曲线程序)。每个样品来源于 3 尾虾,重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的方法计算基因的相对表达量^[8]。在 SPSS19.0 中进行统计分析,结果显示为平均值士标准差($n=3$),单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 法进行显著性检验($P<0.05$ 代表差异显著, $P<0.01$ 代表差异极显著)。

1.6 嗜水气单胞菌攻毒对表皮 *MnSerpin* 的表达影响

随机挑选虾 100 尾,平均分为攻毒组和对照组,分别在腹背部第二节的关节膜内注射 2 μL 嗜水气单胞菌菌悬液(2.5×10^8 CFU \cdot mL⁻¹)或 PBS,每个组设置 3 个重复。在注射后 0、3、6、12、24、48 和 72 h,利用 RT-qPCR 分别测定表皮 *MnSerpin* 转录水平。

1.7 dsRNA 对 *MnSerpin* 的干扰效率

参照 ZHUANG 等^[4]方法,根据 *Mnserpin* 的 cDNA 序列,设计含有 T7 启动子及保护碱基的 *MnSerpin* 的 dsRNA 特异性引物(附录表 S1),通过 RT-PCR 扩增 *Mnserpin* 片段,制备合成 dsRNA 的质粒模板后,利用 in vitro Transcription T7 Kit(TaKaRa)合成 dsRNA,经纯化用于 RNAi *Mnserpin* 的表达。随机挑选虾 100 尾,平均分为干扰组和对照组,分别于腹背部第二节的关节膜内注射 3 μg dsRNA 溶液或等体积的 PBS。每个组设置 3 个重复。每 12 h 注射 1 次,共注射 3 次,以加强敲除效率。在最后一次注射后 0、3、6、12、24、48、72 h 取表皮,利用 RT-qPCR 分别测定 *MnSerpin* 转录水平。

1.8 *MnSerpin* 干扰后嗜水气单胞菌攻毒对日本沼虾死亡率的影响

随机挑选虾 150 尾,平均分为对照组、攻毒+未干扰组和攻毒+干扰组。攻毒+干扰组在第 3 次注射 dsRNA 溶液后 12 h,注射 2 μL 嗜水气单胞菌菌悬液(2.5×10^8 CFU \cdot mL⁻¹);对照组、攻毒+未干扰组在第 3 次注射等体积 PBS 后 12 h,分别注射 2 μL PBS 或嗜水气单胞菌菌悬液(2.5×10^8 CFU \cdot mL⁻¹)。每组设置 3 个重复,在最后一次注射后 0、6、12、24、48、72、96、120 h 分别计算各组日本沼虾的累计死亡率。

2 结果

2.1 *MnSerpin* 的克隆和生物信息学分析

MnSerpin 的 cDNA 全长 2 181 bp(GenBank 登录号:OP626166),包括 102 bp 的 5' UTR,819 bp 的 3' UTR 和 1 260 bp 的 ORF,共编码 419 个氨基酸。理论上蛋白质的分子量和等电点分别为 45.99 kDa 和 5.29。该蛋白含有一个 21 个氨基酸残基组成的信号肽和保守的 Serpin 结构域,其中含有 P1 为 Y 的 RCL(附录图 S1 和 S2)。

经 BLASTP 比对,*MnSerpin* 的氨基酸序列和其他甲壳动物 Serpin 的同源性在 43.22%~50.24%,如斑节对虾(*P. monodon*, XP_037790831.1)为 50.24%,凡纳滨对虾(*P. vannamei*, ROT82825.1)为 49.76%(附录图 S2)。基于氨基酸序列构建系统进化树,发现日本沼虾与中国对虾(*Penaeus chinensis*, ABC33916.1) Serpin 聚为一小支,属于甲壳动物的一大支(图 1)。

2.2 *MnSerpin* 的时空表达分析

MnSerpin 在腹背部表皮、鳃、胃、心、肝胰腺、血细胞等多种组织均有表达,但肌肉组织不表达(图 2)。以 C 期为对照,表皮 *MnSerpin* 在 D₀ 期、D₄ 期、A 期和 B 期的表达量极显著增加($P<0.01$),其中在 A 期最高,增加 6.06 倍,具体结果见图 3。

2.3 嗜水气单胞菌攻毒对表皮 *MnSerpin* 表达的影响

嗜水气单胞菌对表皮 *MnSerpin* 的诱导效应出现在攻毒后 6~48 h。如图 4,与同时刻对照组相比,攻毒后 6~48 h,*MnSerpin* 的相对表达量极显著增加,6 h 达到峰值,升高了 3.77 倍($P<0.01$)。

2.4 dsRNA 对 *MnSerpin* 的干扰效率

注射 dsRNA 能显著降低 *MnSerpin* 的表达。与相应的对照组比,6~72 h,干扰组 *MnSerpin* 的转录水平极显著降低,12 h 获得最大干扰率为 58%($P<0.01$,图 5)。

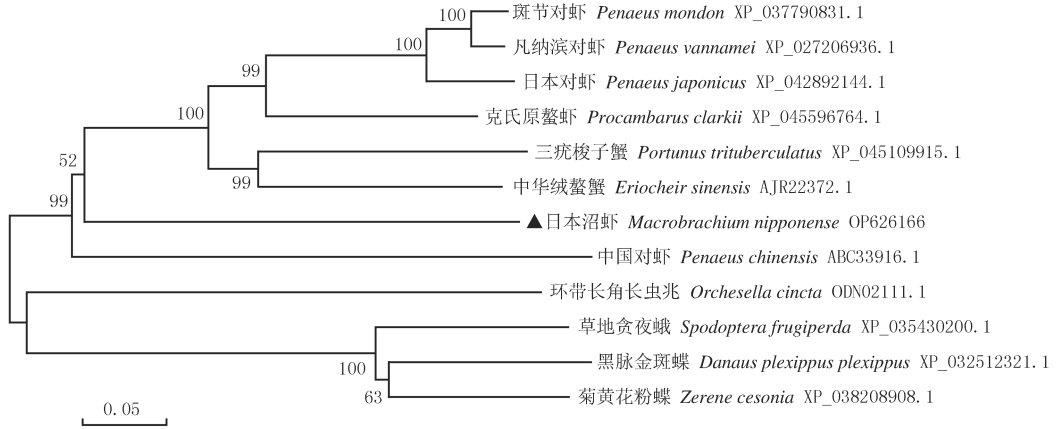
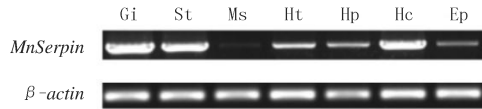


图1 基于MnSerp in氨基酸序列的NJ系统进化树

Fig.1 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on MnSerp in amino acid sequence



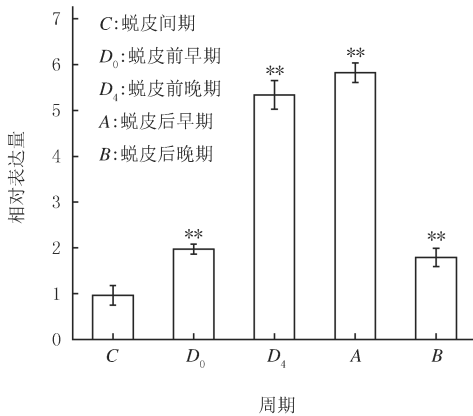
Gi, 鳃; St, 胃; Ms, 肌肉; Ht, 心; Hp, 肝胰腺; Hc, 血细胞; Ep, 腹背部表皮.

图2 MnSerp in 在各组织的表达特征

Fig.2 Expression of MnSerp in different tissues

2.5 MnSerp in 干扰后嗜水气单胞菌攻毒对日本沼虾死亡率的影响

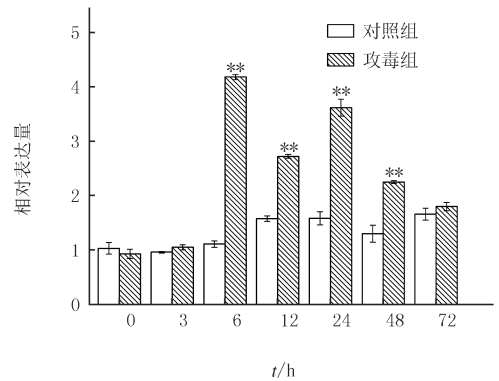
dsRNA 干扰后嗜水气单胞菌攻毒可导致日本沼虾死亡率明显增加.攻毒后 120 h,攻毒+未干扰组日本沼虾的累计死亡率为 58%,而对照组仅为 2%.攻毒后 24 h,攻毒+干扰组日本沼虾累计死亡率开始显著增加,至 120 h,比攻毒+未干扰组增加 16%($P < 0.01$,图 6).



以C期为参照, **表示 $P < 0.01$.

图3 表皮MnSerp in 在蜕皮周期中的表达

Fig.3 Expression of MnSerp in of the epidermis during the molting cycle



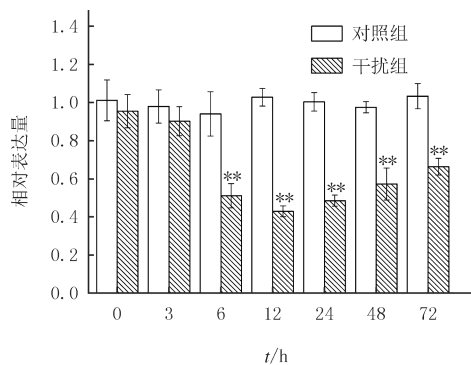
以同时刻对照组为参照, **表示 $P < 0.01$.

图4 嗜水气单胞菌攻毒对表皮MnSerp in 表达的影响

Fig.4 Effects of *A. hydrophila* challenge on the expression of MnSerp in the epidermis

3 讨 论

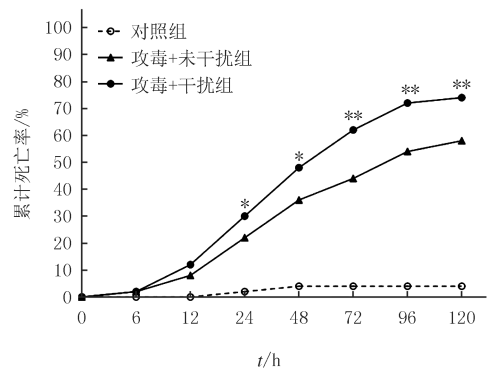
在本研究中,日本沼虾表皮 *MnSerpin* 有 21 个氨基酸残基组成的信号肽和含有 RCL 的保守 *Serpin* 结构域,符合典型 *Serpin* 家族结构特征,与三疣梭子蟹^[13]、中华绒螯蟹^[20] 和中国明对虾^[11] 等 *Serpin* 研究一致。从系统进化树分析可知,*MnSerpin* 的氨基酸序列与中国对虾 *Serpin* 聚为一小支,亲缘关系最近。*MnSerpin* mRNA 的组织分布较广,除了表皮,还包括鳃、胃等多种组织,与凡纳滨对虾^[8]、三疣梭子蟹^[13] 和中华绒螯蟹^[21] 的 *Serpin* 组织表达特征类似。在蜕皮周期中,表皮 *MnSerpin* 在蜕皮前晚期和蜕皮后早期呈高表达,推测可能与表皮上皮细胞活性的变化有关^[22]。



以同时刻对照组为参照, **表示 $P < 0.01$ 。

图5 RNAi对表皮*MnSerpin*表达的影响

Fig. 5 Effects of RNAi on the expression of *MnSerpin* in the epidermis



以同时刻攻毒+未干扰组为参照, *、**分别表示 $0.01 < P < 0.05$ 。

图6 *MnSerpin*干扰后嗜水气单胞菌攻毒对日本沼虾死亡率的影响

Fig. 6 Effects of *A. hydrophila* challenge on the mortality of *M. nipponense* after *MnSerpin* was interfered

据报道,不同甲壳动物 *Serpin* 对病原微生物的应答反应并不一致。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)攻毒后 48 h 内,斑节对虾血细胞 *Serpin* 基因转录水平没有增加^[23]; 凡隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)攻毒后 6~72 h 内,红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)肝胰腺 *Serpin* 转录水平极显著增加; 鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)等攻毒后 48 h 内,凡纳滨对虾 5 种 *Serpin* 在血细胞或肝胰腺等组织表达量增加^[24-25], 本文也获得了与凡纳滨对虾相似的结果(图 4), 表明表皮 *MnSerpin* 可能参与了机体应对嗜水气单胞菌感染的免疫应答。细菌等病原微生物可以诱导黑化,引起丝氨酸蛋白酶的增加。据报道,dsRNA 抑制凡纳滨对虾肝胰腺 *Serpin* 表达后鳗弧菌攻毒,丝氨酸蛋白酶和虾的累积死亡率显著增加^[8], 本文也获得了类似的结果,敲降表皮 *MnSerpin* 的转录水平,嗜水气单胞菌攻毒明显增加了日本沼虾的死亡率(图 6), 推测 *MnSerpin* 表达的抑制导致丝氨酸蛋白酶过表达,产生过量黑化中间产物等增加了对宿主的损害。

综上,本文首次从日本沼虾表皮克隆了 *MnSerpin* cDNA 全长序列,*MnSerpin* 在不同组织均有表达,在 A 期表皮表达量最高;嗜水气单胞菌攻毒能显著增加 C 期表皮 *MnSerpin* 转录水平,敲降 *MnSerpin* 的转录水平再攻毒能明显提高日本沼虾的死亡率。源自表皮的 *MnSerpin* 是日本沼虾重要的免疫因子。

附录见电子版 (DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2022.10.29.0001)。

参 考 文 献

- [1] YANG H, JI T W, XIONG H R, et al. A trypsin-like serine protease domain of masquerade gene in crayfish *Procambarus clarkii* could activate prophenoloxidase and inhibit bacterial growth[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 117:103980.
- [2] CERENIUS L, SÖDERHÄLL K. Immune properties of invertebrate phenoloxidases[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 122:104098.

- [3] ZHANG D M, WAN W S, KONG T T, et al. A clip domain serine protease regulates the expression of proPO and hemolymph clotting in mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 79: 52-64.
- [4] ZHUANG X N, LUAN Y Y, LV T R, et al. PAP1 activates the prophenoloxidase system against bacterial infection in *Musca domestica* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 124: 104184.
- [5] WANG L L, LIU H W, FU H Y, et al. Silkworm serpin32 functions as a negative-regulator in prophenoloxidase activation [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2019, 91: 123-131.
- [6] ESZTERBAUER E, SZEGÖD, URSU K, et al. Serine protease inhibitors of the whirling disease parasite *Myxobolus cerebralis* (Cnidaria, Myxozoa): expression profiling and functional predictions [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0249266.
- [7] LIU Y J, HOU F J, QIAN Z Y, et al. Functional characterization of the clade B serine protease inhibitor SerpinB3 in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 85: 10-17.
- [8] LIU Y J, SUN Y H, WANG Q A, et al. Identification and functional characterizations of serpin8, a potential prophenoloxidase-activating protease inhibitor in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 492-501.
- [9] WANG Y, YANG F, CAO X L, et al. Hemolymph protease-5 links the melanization and Toll immune pathways in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(38): 23581-23587.
- [10] HOMVISES T, TASSANAKAJON A, SOMBOONWIWAT K. *Penaeus monodon* SERPIN, PmSERPIN6, is implicated in the shrimp innate immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 890-898.
- [11] LIU Y, LI F, WANG B, et al. A Serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 345-351.
- [12] 盖云超. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) cDNA 文库的构建、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.
- GAI Y C. Construction of cDNA library of *Eriocheir sinensis*, EST analysis and study on key genes of phenoloxidase system [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009.
- [13] WANG S Y, CUI Z X, LIU Y A, et al. Identification and characterization of a serine protease inhibitor (PtSerpin) in the swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(4): 544-550.
- [14] ZHAO Y R, XU Y H, JIANG H S, et al. Antibacterial activity of serine protease inhibitor 1 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 44(2): 261-269.
- [15] KOSTIN N N, BOBIK T V, SHURDOVA E M, et al. Cloning and characterization of serpin from red king crab *Paralithodes camtschaticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 81: 99-107.
- [16] WANG W F, YANG H, LIU F, et al. A novel effect of imidazole derivative KK-42 on increasing survival of *Aeromonas hydrophila* challenged prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 167-172.
- [17] 杜娟, 张俊芳, 岳凯迪, 等. 咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾表皮矿化的影响 [J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2023, 51(1): 144-148.
- DU J, ZHANG J F, YUE K D, et al. Effect of imidazole derivative KK-42 on mineralization of the cuticle in *Macrobrachium nipponense* [J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2023, 51(1): 144-148.
- [18] CHEN Q Y, ZHANG Z R, TANG H Y, et al. *Aeromonas hydrophila* associated with red spot disease in *Macrobrachium nipponense* and host immune-related gene expression profiles [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 182: 107584.
- [19] KIRIRAT P, PROMWIKORN W, THAWEETHAMSEWEE P. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, 26(5): 765-772.
- [20] WANG L L, MA Z P, YANG J L, et al. Identification and characterization of a serine protease inhibitor Esserpin from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1576-1586.
- [21] LI Q, LIU L H, WANG Y, et al. Characterization and expression analysis of serpins in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Gene*, 2016, 575(2): 632-640.
- [22] ZHENG Y P, HE W Y, BÉLIVEAU C, et al. Cloning, expression and characterization of four serpin-1 cDNA variants from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(2): 165-173.
- [23] LIU Y J, HOU F J, HE S L, et al. Identification, characterization and functional analysis of a serine protease inhibitor (Lvserpin) from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 43(1): 35-46.
- [24] LIU Y J, LIU T, HOU F J, et al. Lvserpin3 is involved in shrimp innate immunity via the inhibition of bacterial proteases and proteases involved in prophenoloxidase system [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 128-135.
- [25] LIU Y J, HOU F J, WANG X Z, et al. Recombinant expression and characterization of a serine protease inhibitor (Lvserpin7) from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 256-263.

Cloning and preliminary study on immune function of *Serpin* gene from the epidermis of *Macrobrachium nipponense*

Ning Qianji, Peng Yanxin, Yue Kaidi, Li Yijun

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Melanization mediated by serine protease cascade reaction is an important immune response of crustaceans in which serine proteinase inhibitor (serpin) are important regulators. However, crustacean epidermal serpin is rarely studied. In order to explore the function of epidermal serpin in the immune response of *Macrobrachium nipponense*, a new *serpin* gene, named *MnSerpin*, was firstly cloned and identified from epidermis using PCR and RACE based on previous transcriptome data. Bioinformatics, RT-qPCR and RNAi methods were used to study the gene sequence characteristics, spatial and temporal expression pattern, transcription level of epidermal *MnSerpin* and mortality of shrimps after *Aeromonas hydrophila* challenge. The results showed that the full length of *MnSerpin* cDNA was 2 181 bp, encoding 419 amino acids, which formed a serpin domain. *MnSerpin* was expressed in abdominal epidermis, gill, hemocyte, stomach, heart and hepatopancreas. The expression level of *MnSerpin* in epidermis was related to the molting cycle. Compared with the intermolt stage (C stage), it was the highest in the early postmolt stage (A stage) and increased by 6.06 times ($P < 0.01$). After *A. hydrophila* challenge, the relative expression of *MnSerpin* in epidermis reached the peak after 6 h, and increased by 3.77 times compared with the control group ($P < 0.01$). 3 μg of dsRNA solution was injected into the abdominal second segment articular membrane every 12 h, 3 injections in total. Compared to control group, RNAi had the highest interference efficiency 12 h after the last injection, where the relative expression of epidermal *MnSerpin* decreased by 58% ($P < 0.01$). Challenge at the time point with the highest interference efficiency and within 120 h, the cumulative mortality of shrimps increased by 16% compared with the non-RNAi-challenged group ($P < 0.01$). The results showed that *MnSerpin* from the epidermis of *M. nipponense* was an important immune factor, its expression was different in tissues and stages of molting cycle, and its down-regulation could significantly increase the mortality of shrimp infected with *A. hydrophila*.

Keywords: *Macrobrachium nipponense*; epidermis; *MnSerpin*; RNAi

[责任编辑 刘洋 杨浦]

附录

表 S1 实验中的引物序列
Tab. S1 Primers used in the experiment

引物名称	序列 (5'-3')	功能
<i>MnSerpin-F</i>	CTTCGGTTGCCATTCTAC	RT-PCR
<i>MnSerpin-R</i>	TAGGCTTCACCTGACATT	RT-PCR
<i>MnSerpin-3'-Out</i>	TTGAGCTCCCTTACGCTGGTGAC	3'-RACE
<i>MnSerpin-3'-In</i>	AGTTCGAAATGTCTGTCCAGGAGGC	3'-RACE
<i>MnSerpin-5'-Out</i>	CTCAGAGGAAGGCAGGAGAAGGAAC	5'-RACE
<i>MnSerpin-5'-In</i>	GACGCTCTTGATTGACCCGCTG	5'-RACE
<i>MnSerpin-qF</i>	CCTCGCCAAAGGAAACGGTG	RT-qPCR
<i>MnSerpin-qR</i>	GGAAGGCAGGAGAAGGAACATTGAG	RT-qPCR
<i>MnSerpins-F</i>	<u>GATCACTAATACGACTCACTATAGGG</u> CTGCAGTGCCTTCTTGTGAACCTTC	RNAi
<i>MnSerpins-R</i>	<u>GATCACTAATACGACTCACTATAGGG</u> GGTAGGGTCAGGTCAATTTAGGCTTC	RNAi
<i>β-actin-qF</i>	TATGCACTTCTCATGCCATC	reference primer
<i>β-actin-qR</i>	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	reference primer

1 GGAGTGGCCCCTGATAAGTGAAGCAGTTGGTGGCTAAAACCTCGGTTGCCATTCTACAAGAGCACCTCCCGCTGCCCTGTCTGACCGTAAGGATCCACCAATC
 1 M
 106 AGGTTCTTAGCAGCAGCATAGTAGGCGCTCTTGGCCTTTGTAGCAGCATCCATGCGCAGTGCTTGACACCGAOGACAGCATCCAGGACACCTCGTCCAGC
 2 R F L A A A S V V G L L A F V S S I H A Q C L T P D D S I Q D T S V S
 211 GCAGAOGTCAGCACAAATCTCTCCAATGTTGACACTTTAGCCTGAGTCTCTTCAAGCAGCTGTCACTCTCAGCCCCAGCAAGAAGTCTTCTTCTCCCCCTAC
 37 A D V S T N L S N V A D F S L S L F K Q L S P L S P S K N F F F S P Y
 316 AGTATCTGGACAGCCCTAACGCTGGCTTACTTTGGGTGGGGGGCAATACCCAAAGGCAGCTGGAAGCTGGCTGAATGTCTGTATAAAGTGTGAGTCTCAGCTCTCAGG
 72 S I W T A L T L A Y F G S A G N T Q R Q L E A A L N V S D K L S A L R
 421 CTTTGGAGGTGGTGAAGATCTGTATAAAAAAGGCAGCAGAAGTCCAGGAGTACACATTCAGGGTGGCCAGCAGAGCTTACTTTGACACCAGCGTTCAACTT
 107 L W R S L E D L Y K K R Q Q K S Q E Y T F R V A S R A Y F D T S V Q L
 526 AGATCCGTGTTGAOGGATGTGCTCCCGGAGAAATCAGCCCTCAGCCTGTGTGATACCTCAGCCTCAGCCAGCACCATCAACACCTTCGTATCAGAGAGACC
 142 R S C L T D V L P G E I Q P L S L V D T S A S A S T I N T F V S E T T
 631 AGCGGTGCAATCAAGACGCTCGTGACCCAGGCGACTCAACCATGCCAGATGGTACTGCTCAACGCTGCCTTCTTCAAGGGCTCGTGAGATATCAATTCGAT
 177 S G R I K S V V T P G D L N H A Q M V L V N A A F F K G S W R Y Q F D
 736 CCTTCCAGACCCTCATGAGACTTCCAAGTCTCGCAAAGGAAACGGTGCCCAAGCAATAATGCTCAAGAAGGCAGCTTCTTATGTTGAATCGGAGGAG
 212 P S Q T L M R D F H V S P K E T V P T A I M S Q E G S F L Y G E S E E
 841 CTAGGCGCTCGAATCCTTGAGCTCCCTTAAGCTGGTGAAGCTGTCTCAATGTTCCCTCTCTCGCTTCTCTGAAGTCCCGCTGACGGGGCAGGCTTGGCCCGG
 247 L G A R I L E L P Y A G D A V S M F L L L P S S E V P A D G A G F A R
 946 ATGGTCTCTAGCCTCAGCAGCTCCACTCTCCGCGAGCCCTGAATTTGGGAAACCTGACGATCTTGACGTCAAAGTGGCTGTGCCCCAAGTTCAAGTTCGAGGAGT
 282 M V S S L S S S T L R R A L N F G N L Q H L D V K V L L P K F K V E V
 1051 GAAGTCAAGGAGAGCTAGTAATGTCCTTAAGACCTTGGGCATCGCTGACCTCTTCGACAAAACCTTGGCCAAACATGAAGTCCCTTACAGCTTACGTTGGCCTG
 317 E V K D E L V M S L K T L G I A D L F D K T L A N M T S F T A Y G G L
 1156 AGTGTGACAAAACCGTCCACAAGCCTTTGTGGAAGTTAACGAAGAAGGCACGACGAGCCAGCTGTCTGGTGAAGTCTTACTCTGCTCTGACCA
 352 S V D K T V H K A F V E V N E E G T E A A A T V L V S F Y S R S E P
 1261 ACCCTGTTGCTTGCAATGAACCTTTGTTTACATCATATGATACTCAGACGAAACATCCTCTTCTGAGGAGCCTTCAAGACCCAAAGGGCTTGTAGATC
 387 T L F A C N E P F V Y I I Y D T Q T N N I L F M G A F R D P R G L *
 1366 TGCAGTAGGAACACCACCACAGCCTTCTCTCGGACTTCAAGATGCAAGGTGCTTATGAATCCTCATTAGGACTGCAGTGCCTTCTGTGAACCTTCAA
 1471 GACCCAGTGGGCTGTAAGTCTCATCAGGCCCCGGTGCCCTTCCAAGGGAGCGTCAAGACCCATGAAGCATCCAAATCTTTAGGACTTCTAAGTCTCTC
 1576 TCCATGGGAGTTCGAAATGTCTGTCCAGGAGGCTGGTAAGTCTTTGTAACCTAATGATCTCTTTTGGACCTCAGTGAAGTGTGTATGTGTTGATGATGTT
 1681 TGGATGTATTCTAAATACCATAACTGAAGAAGGTGAAAAATCATTTTTATTTTCTCCAGTAGTGGTAGCAGCTGTTAAAGTCCCTTAAAGGAACCACTTT
 1786 TAAGCTAAACTATATTTGTGATAACTGCTCTTGTGTTGTTAAATCAAAGTTGAAAAATACTAATGTAGTCACTTCTTAAACATTTGCTGTATCTCAGA
 1891 GAAAAATGTCAGTGAAGCCTAAATGACCTGACCCTACCTAACATGACTTAGAGATCAAGAGTATTCAAGATGTTTAAATCTCTCAAAATAGTCTGACGATC
 1996 TAAGTAGTTTTTTGTTGATAACTACATATGTTGGTTAATTTATGCTTGTAGTTTTGTTATTAGAATTCATTTATACTCTGTTTTAATAATCGTCATTGTTTA
 2101 TGCTGTTGAAACTATATTTTACTGTTACTCTAATGACAAATAAAGCTCCAAATTTCTAAAAAATTTTTTTTTT

起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAG) 用黑色背景标出, polyA 加尾信号波浪线标出, 信号肽由下划线标出, Serpin 结构域用灰色背景标出。

图S1 *MnSerpin* 的cDNA序列全长和推导的氨基酸序列

Fig.S1 cDNA sequence of *MnSerpin* and its deduced amino acid sequence

△ 日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	MRFIAASVIGLLAFVSSIIHACLTPTDSSIQDTSVSADVSTNLSNVADFSLSFKQLSLSPSKNFFSPISLWIALTLAYFGSA	85
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	MKWLSA--VWLLA-VTSVQPCQSEND--DLSIPP--SNDLSCIADFGLELFKEIFVYNTSSNFFSPISVWVALTLAYFGSS	77
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	MKWLSA--VALLA-VTSVRPQCSEED--DLSIPP--SNDLSCIADFGLELFKEIFVYNTSSNFFSPISVWVALTLAYFGSS	77
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	MKWLSA--VALLA-VTSVQPCQSEND--DLSIPP--SNDLSCIADFGLELFKEIFVYNTSSNFFSPISVWSALTLAYFGSG	77
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	MKFAALG--AVAAALVGLAQPCQCTDND--NFLIKV--NTDLSGVTDVGFDLVRRDPSPPSKNFFSPISLWSAFILAYFGSA	78
△ 日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	GNTQRQLEAALNNSDKLSAQRWRSLEDLYKKRQKQSQEYTFRANRAYFDTSVQLRSGLTDLVLPGETQPLSLVDTSASVSTINT	170
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	GNTQAELERLRVEDKVTTLKNWRLEFLYDMRQTNNSDYTFVANRAYFDSTVNLTCGVGDLTINELQVVDVTKTEBAAGTINN	162
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	GNTQAELERLRVEDKVTTLKNWRLEFLYDMRQTNNSDYTFVANRAYFDSTVNLTCGVGDLKNEIQIVDTHTEBAAGTIND	162
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	GNTQSELERLRVTEDKVTTLKNWRLEFLYDMRQANRSDYTFVANRAYFDKTVGLTGVNDLQSELRVLDVSQLQBAAEIIND	162
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	GETEAQLQALRVDCKEIFKIVRALEAMY--QTSNNDYTFNIANRAYIDNVLPVIRPQILEMISNEFRINERDVFSVWNRIN	160
△ 日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	FVSEITSERIKSWTPGDLNHQMVLNAAFFKGSIRVQFDPQTLMRDHFVSPKTEVPTAIVSQEGSEFLYGESEELGARILELP	255
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	FVSNITKGRTPSLVEAKDLINAKMVLNAAFFKGTWLYQFKKSAIRPHLFYSSQNDYTFVDMIQKGNFRHGVEELGAIILELP	247
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	FVSNITKGRTPSLVEAKDLINAKMVLNAAFFKGTWLYQFKKSAIRPHLFYSSQNDYTFVDMIQKGNFRHGVEELGAIILELP	247
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	FVSNITKGRTPSLVEAKDLINAKMVLNAAFFKGTWLYQFKKSAIRPHLFYSTQDDYTFVDMIQKGNFRHGVEELGAIILELP	247
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	FASINPKKINERVTVENLEGIHAIINAAFFKGTWQFQKPTSVSERFVTPQNQMPLMNIQSAFRFCDFQVAASVLELP	245
△ 日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	YACDAVSMFLPLPSSEVPADGAGFARMVSSSSSILRRALNFGNLQHLDMKLLPKFKVEVEVKDELVMSLKTLLGIADLFDKTLA	340
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	YTGAEATSMYLLLP--FISGEQGNAMVENLNTTLHYAI--DDMWRLEVEVVPKFKLEQVGDDELMSLSRIGISDLFTPGA	328
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	YTGAEATSMYLLLP--FISGEQGNAMVENLNTTLHYAI--EVMWRLEVEVVPKFKLEQLVGDDELQSLSRIGISDLFTPGA	328
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	YTGAEATSMYLLLP--FITGEQGNAMVENLNTTLHYAI--DMWRLEVEVVPKFKLEQLIGDELMDSLTRIGINDLFTPTVA	328
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	YTGERSMFLFLPAQ--EPTGEQGNAMVTRSGNNRAATHRKLNRKQDVELKLPKFRMELKLADEMIPALKDGIVDFNSEKV	327
△ 日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	NMTSFTAYGGLSVDKTVHKAFVVEEGETEAAAATVL-VSFYRS--EPTLACNEPFFVYIIVDTQTNLFLMGAFRDPRGL--	419
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	DLSSFADDTLSVGRSIHKAFVVEEGETEAAAATAF-ISLRITARPVGEKFECPNPFPLFVIDNLTKNLFGAYKNPK---	407
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	DLSSFAPDTLSVGRSIHKAFVVEEGETEAAAATAF-ISLRITARPVGEKFECPNPFPLFVIDNLTKNLFGAYKNPKA---	408
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	NLSSFAPDTLSVGRSIHKAFVVEEGETEAGGATAF-ISLRITARPVGEKFECPNPFPLFVIDNLTKNLFGAYKNPKA---	408
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	DLSTLGNLRNLTLEKVIHKAFVVEEGETEAAAATVLTFTLRASLRDPVVPFHCPNPFPLFVIDNLTKNLFGAYRSPDTRS	411

P1

大矩形框代表RCL, 小矩形框代表P1, 其他物种相应的GenBank登录号和名称: ROT82825. 1, 凡纳滨对虾; XP_037790831. 1, 斑节对虾; XP_042892144. 1, 日本对虾; ABC33916. 1, 中国对虾。

图S2 *MnSerpin*与其他甲壳动物丝氨酸蛋白酶抑制剂的氨基酸序列的多序列比对

Fig.S2 Alignment of amino acid sequence of *MnSerpin* with Serpin from other crustaceans