

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211231003

http://www.yykxjz.cn/

李明栋, 王佳佳, 葛倩倩, 秦桢, 刘萍, 李健, 李吉涛. 脊尾白虾水通道蛋白基因 4 和 11 在碱度胁迫过程中的作用. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 51–60

LI M D, WANG J J, GE Q Q, QIN Z, LIU P, LI J, LI J T. The roles of aquaporin gene 4 and 11 of *Exopalaemon carinicauda* under alkalinity stress. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 51–60

脊尾白虾水通道蛋白基因 4 和 11 在碱度胁迫过程中的作用*

李明栋^{1,2} 王佳佳^{1,2} 葛倩倩^{1,2} 秦桢^{1,2}
刘萍^{1,2} 李健^{1,2} 李吉涛^{1,2①}

(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. 青岛海洋科学与技术试点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)

摘要 水通道蛋白(aquaporin)是一种细胞膜上特异性转运水分子及其他中性代谢分子的膜蛋白家族,对生物的细胞内外渗透压稳定具有重要的调节作用。为了了解水通道蛋白在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)应对碱度胁迫中的作用,本研究利用 RACE 技术成功克隆了脊尾白虾水通道蛋白 4 (aquaporin 4, *EcAQP4*)与水通道蛋白 11 (aquaporin 11, *EcAQP11*)基因 cDNA 全长, *EcAQP4* 基因的开放阅读框为 621 bp, 编码 206 个氨基酸, 预测分子量为 21.673 kDa, 理论等电点为 8.30, 为疏水性蛋白, 具有 5 个跨膜结构域; *EcAQP11* 基因的开放阅读框长度为 783 bp, 编码 260 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 28.490 kDa, 理论等电点为 5.40, 为疏水性蛋白, 具有 4 个跨膜结构域。序列比对结果显示, *EcAQP4* 基因与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)同源性最高, 为 94.63%; *EcAQP11* 与斑节对虾(*Penaeus monodon*)同源性最高, 为 81.47%。为验证水通道蛋白的功能, 利用 RNA 干扰技术特异性沉默 *EcAQP4* 和 *EcAQP11* 基因, 结果显示, 碳酸盐碱度胁迫后, 注射干扰后的脊尾白虾死亡率显著升高, *EcAQP4* 干扰组 72 h 死亡率达到 45%, *EcAQP11* 干扰组 72 h 死亡率达到 55%, 与对照组差异显著($P < 0.05$)。同时发现, *EcAQP4* 干扰组在碳酸盐碱度胁迫 24、48 与 72 h 时的血液渗透压变化幅度显著高于对照组($P < 0.05$), 72 h 时渗透压显著升高($P < 0.05$); *EcAQP11* 干扰组血液渗透压在 3 个时间点均显著升高($P < 0.05$)。以上结果表明, 水通道蛋白在脊尾白虾应对碱度胁迫过程中起到了调节渗透压、维持体内外离子平衡的作用。

关键词 脊尾白虾; 水通道蛋白; 基因克隆; 渗透压

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0051-10

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901302)、国家自然科学基金(32072974)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系和中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD46)共同资助 [This study was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901302), National Natural Science Foundation of China (32072974), China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 李明栋, E-mail: lmdanyany@163.com

① 通信作者: 李吉涛, 研究员, E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-31, 收修改稿日期: 2022-02-11

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又称小白虾、迎春虾,主要分布于黄渤海浅海低盐水域,是我国重要的中小型经济虾类。脊尾白虾为广温、广盐、广布种,具有生长速度快、繁殖周期短、适应能力强等优点,现已成为我国沿海地区的特色养殖品种。我国有低洼盐碱水域 4600 万 hm^2 ,具有养殖潜力的盐碱水面积可达 667 万 hm^2 ,盐碱水由于具有高 pH、高碳酸盐碱度及离子组成复杂等特点,阻碍了盐碱水资源的充分开发利用。脊尾白虾作为一种对盐碱环境适应能力强的经济虾类,是开展甲壳类盐碱适应分子机制研究的理想材料。

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一种细胞膜上特异性转运水分子及其他中性代谢分子的膜蛋白家族(冯学超等, 2005; 王渝等, 2014)。目前,共有 13 种哺乳动物水通道蛋白被鉴定,根据其功能可分为三类: AQP0、AQP1、AQP2、AQP4 和 AQP5 仅对水分子有通透性,为水选择性水通道蛋白; AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10 对水、甘油、尿素等均有通透性,为水甘油通道蛋白; AQP11 与 AQP12 的功能还未确定且基因同源性低,为超级水通道蛋白。水通道蛋白对生物的细胞内外渗透压稳定具有重要的调节作用,其对水产动物的生存意义重大。现阶段对水通道蛋白的研究主要集中于植物与哺乳动物,研究表明,植物水通道蛋白可以通过调节根部的导水率来增加水分的吸收以响应盐胁迫与干旱胁迫;在哺乳动物中,水通道蛋白在肾脏的表达量最高,在水运输的主要组织中发挥重要作用(Li *et al.*, 2019; 段梦莎, 2020; 郝建峰, 2020; 李娟等, 2021; 李青云, 2020; 张亚楠等, 2019)。目前,关于水产动物水通道蛋白的研究尚少,主要集中于三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (王渝等, 2014)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (杨志刚等, 2021)、萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*) (甘远迪, 2014)等水产动物中,研究表明,水通道蛋白基因在水产动物的肠道、胃与鳃组织中相对表达量较高,且盐度胁迫可显著改变其表达模式,推测水通道蛋白在水产动物渗透压调节过程中起重要作用。本研究根据前期碱度胁迫下脊尾白虾的转录组测序结果,克隆碱度胁迫下的差异表达基因 *EcAQP4* 和 *EcAQP11*,并分析其序列特征;利用 RNA 干扰技术特异性地沉默 *EcAQP4* 和 *EcAQP11* 基因的表达,然后对脊尾白虾进行碱度胁迫,验证 *EcAQP4* 和 *EcAQP11* 基因在碱度胁迫过程中的作用。结果可为解析脊尾白虾响应碱度胁迫机制提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

实验用脊尾白虾平均体长为(2.1±0.4) cm,均取自山东日照海辰水产有限公司。实验前将脊尾白虾在 100 L 的桶中暂养 7 d,按时投喂饲料,连续充氧。

取 6 尾体长、体重相近且活力旺盛的脊尾白虾,取其鳃、肝胰腺、肌肉、肠、血细胞和胃组织于液氮中储存,用于合成 RACE 模板。

1.2 *AQP4* 与 *AQP11* 基因的 cDNA 全长克隆

使用 *TransZol Up Plus* RNA 试剂盒(TRAN, 中国)提取脊尾白虾 RNA。配制 1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳,检测 RNA 的条带完整性;使用 Thermo NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 的纯度及浓度。RACE 模板第一链使用 SMARTer[®] RACE 5'/3'试剂盒合成。根据脊尾白虾转录组中 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 的测序结果,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'与 5'引物,引物序列见表 1。使用 Advantage 2 Polymerase Mix 高保真聚合酶依据说明书进行目的基因 RACE 5'和 3'

表 1 水通道蛋白基因克隆所用引物序列
Tab.1 The sequence of primers used for *AQP* gene cloning

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>EcAQP4</i> -F1	GGATGCCACATCA ACCCAGCCGTCAC	3'-RACE
<i>EcAQP4</i> -F2	GGAATCCTGGCTG CTGTCTGCTACTC	3'-RACE
<i>EcAQP4</i> -R1	CGCCCGATACCAC AGCAGGTCCGAAT	5'-RACE
<i>EcAQP4</i> -R2	GGAGCCCTGAAGA CATAGGAGTAGACG	5'-RACE
<i>EcAQP11</i> -F1	TGGCTTGAAAGGT CCAACGATCATAT	3'-RACE
<i>EcAQP11</i> -F2	GATGGACCCGGCC CAGTAGACGATGA	3'-RACE
<i>EcAQP11</i> -R1	TCGACGCTGACAG TCATCACCCAGAT	5'-RACE
<i>EcAQP11</i> -R2	CTTACAGCCTGTTG GAGGAATACGTGGA	5'-RACE
UPM-long	CTAATACGACTCAC TATAGGGCAAGCA GTGGTATCA ACGCAGAGT	RACE 通用 RACE universal
UPM-short	CTAATACGACT CACTATAGGGC	RACE 通用 RACE universal
M13F	TGTAACG ACGCCAGT	测序通用引物 Sequencing universal
M13R	CAGGAAACA GCTATGACC	测序通用引物 Sequencing universal

末端巢式 PCR 扩增, 将获得的 PCR 产物进行切胶回收、连接转化, 然后挑取阳性单克隆, 经 M13 通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 并将所筛选的菌液进行测序。

1.3 生物信息学分析

使用 Contig Express 软件进行拼接, 得到 *EcAQP4* 基因与 *EcAQP11* 基因 cDNA 全长, 将 cDNA 序列用 ORFFinder 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框, 得到基因的氨基酸序列后, 使用在线软件 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测其蛋白质信号肽、蛋白质结构域、蛋白跨膜情况、蛋白质特性和亲水性。

利用在线软件 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析基因与其他物种的同源性和一致性; 使用 DNAMAN 软件对多个物种氨基酸序列进行比对; 使用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-joining 进化树。

1.4 RNA 干扰实验

1.4.1 dsRNA 的合成 使用 T7 RNAi Transcription Kit-BOX1 (Vazyme, 中国) 合成 dsRNA。合成干扰的引物需添加 T7 启动子, 使用在线设计软件 https://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl 设计引物, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

本次干扰实验以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein (GFP)为对照, 具体的合成步骤: 将 GFP 质粒溶解, 取 2 μ L 质粒溶液加入 100 μ L 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 再冰浴 2 min, 加入 900 μ L 未加卡那霉素(KAN)的 LB 液体培养基, 200 r/min 震荡培养 45 min。将菌液 6000 r/min 离心 5 min, 取沉淀涂至已加 KAN 的 LB 固体培养基上, 过夜培养 12 h 以上。挑取单克隆菌落至已加 KAN 的 LB 液体培养基中, 震荡培养 12 h。以培养后的菌液为模板, 使用 T7 RNAi Transcription Kit-BOX1 按照 dsRNA 合成步骤合成 GFP, 其引物 GFP-T7F: GATCACTAATACGACTCACT ATAGGGATGGTGAGCAAGGGGGAGGA; GFP-T7R: GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTACTTGTA CAGCTCGTCCA。

1.4.2 dsRNA 的注射 准备 9 个 10 L 整理箱, 每个箱子加入 8 L 海水, 调节其碳酸盐碱度至 8.26 mmol/L, 稳定 24 h, 每天调节 2 次海水碱度。设置 GFP 组、

EcAQP4 组和 *EcAQP11* 组, 每组 3 个平行。挑选体长、体重相近的脊尾白虾进行胁迫实验, 每个箱子放入 10 尾虾, 依据组别在脊尾白虾的第 4 腹足基部注射干扰, 注射量为 1 μ g/g, 观察记录脊尾白虾在 24、48 和 72 h 的死亡率。

另设置空白组、GFP 组、*EcAQP4* 组和 *EcAQP11* 组, 调节其碳酸盐碱度至 8.26 mmol/L, 每个箱子放入 30 尾脊尾白虾, 依据组别在脊尾白虾的第 4 腹足基部注射干扰, 注射量为 1 μ g/g, 空白组不进行胁迫与干扰, 在 24、48 和 72 h 3 个时间点, 取其血液测量渗透压, 并取鳃组织检测其中 *EcAQP* 基因表达量。

1.4.3 干扰后血淋巴渗透压的变化 每个时间点取 6 尾虾的血淋巴混合测量其渗透压。将混合后的血淋巴样品放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 24 h 后, 3000 r/min 离心 15 min, 取 60 μ L 上清液, 使用渗透压测定仪测量渗透压, 每个样品测量 3 次。

1.4.4 干扰后 AQP 基因表达量的检测 在干扰后 24、48 和 72 h 3 个时间点取 GFP 组、*EcAQP4* 组与 *EcAQP11* 组的鳃组织, 液氮研磨, 使用 TransZol Up Plus RNA kit (TRAN, 中国) 提取 RNA。

通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 在不同组织中的表达, 以 18S 基因作为内参基因, 针对 *EcAQP4*、*EcAQP11* 与 18S 设计特异性引物(表 2), 按照 ChamQTM SYBR[®] Color qPCR master mix 说明书, 利用荧光定量 PCR 仪器进行定量分析, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算分析注射干扰后 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因 mRNA 的相对表达量, 利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 运用多重比较进行显著性检验。

表 2 qRT-PCR 所用引物
Tab.2 Primers used for qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
<i>EcAQP4</i> -F	GAAGATCAACGCCGCAAG
<i>EcAQP4</i> -R	GGCGAGAGGTGCAGATCCTT
<i>EcAQP11</i> -F	GAAGATCAACGCCGCAAG
<i>EcAQP11</i> -R	GGCGAGAGGTGCAGATCCTT
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

2 结果与分析

2.1 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因 cDNA 的克隆与序列分析

本研究利用 RACE 技术成功克隆了脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 的 cDNA 全长, 序列分析结果

显示, *EcAQP4* 基因开放阅读框(ORF)长度为 621 bp, 共编码 206 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 21.673 kDa, 理论等电点为 8.30, 为疏水性蛋白(图 1); 跨膜分析结果显示, 该基因跨膜 5 次; SMART 分析显示, 该基因具有 5 个跨膜结构域(图 2)。*EcAQP11* 基因 ORF 长度为 783 bp, 共编码 261 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 28.490 kDa, 理论等电点为 5.40, 为疏水性蛋白(图 3); 跨膜分析结果显示, 该基因跨膜 4 次; SMART 分析显示, 该基因具有 4 个跨膜结构域(图 4)。

2.2 AQP4 与 AQP11 氨基酸序列及同源性分析

将 *EcAQP4* 与 *ECAQP11* 的氨基酸序列在 NCBI 上比对发现, 与 *EcAQP4* 氨基酸序列同源性较高的物种有罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、斑节对虾

(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、三疣梭子蟹(图 5); 与 *EcAQP11* 氨基酸序列同源性较高的物种有斑节对虾、灰眼雪蟹(*Chionoecetes opilio*)、凡纳滨对虾(图 6)。同源性分析显示, *EcAQP4* 具有多个保守区域, 其中与罗氏沼虾同源性最高, 为 94.63%, 与三疣梭子蟹同源性最低, 为 68.14%, 所比对的物种均含有 HINPAVT 和 PLAIGL 这 2 个保守域; *EcAQP11* 比 *EcAQP4* 保守性较差, 与斑节对虾同源性最高, 达到 81.47%, 与灰眼雪蟹同源性最低, 为 67.18%。

2.3 AQP4 与 AQP11 基因系统进化树分析

利用 MEGA 7.0 软件对脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因的氨基酸序列进行系统进化分析(图 7,

```

1 aagcagtggtatcaacgcagagtacatgggtgtatcgggcggtggtcggggggctacgeccccctctATGGTGCAAAATAGCCTTC 84
                                     M V Q I A F
85 GCCTTCGGGGTGACCGTAGCCACTGTGGCTCAGGCAATCGGACACATCTCTGGATGCCACATCAACCCAGCCGTCACATGTGGA 168
   A F G V T V A T V A Q A I G H I S G C H I N P A V T C G
169 TTGCTCGTAGCTCGTTACGTGTCTGTACTGCGCTCCTCTATATCATGTGCTCAGTGCTTGGGAGCACTGGTTGGTGCTGCT 252
   L L V A R Y V S V L R S L L Y I I A Q C L G A L V G A A
253 ATTCTTAAGGGTGTGACCGCCGAAGAGATCCAAGGTAACCTCGGCATGACGCTCGTGAACCCGAAGATCAACGCCGGCCAAGCC 336
   I L K G V T A E E I Q G N L G M T L V N P K I N A G Q A
337 CTCGGCGTGGAACTCATCATCACCTTCGTGTTGGTCTGACGGTGTTCGGCGTGTGCGACGAGAGGAGGAACGACGTGAAAGGA 420
   L G V E L I I T F V L V L T V F G V C D E R R N D V K G
421 TCTGCACCTCTCGCCATAGGACTTCCATCACCACCTGTCATCTCATGGCTATTCCCATCACTGGCTCTTCTATGAACCCCGCC 504
   S A P L A I G L S I T T C H L M A I P I T G S S M N P A
505 CGTACATTGGGACCTGCTGTGGTATCGGGCGTGTGGGCTGATCACTGGGTGACTGGGCTGGACCCATCCTCGGAGGAATCCTG 588
   R T L G P A V V S G V W A D H W V Y W A G P I L G G I L
589 GCTGGTGTGCTCTCTATGTCTTCAAGGCTCCAAAACCTCAGCCTTACGATGACGTACAGATGGACAATTATAACAAGAGA 672
   A G V V Y S Y V F R A P K P Q P Y D D V Q M D N Y N K R
673 GGAAACAACCCTTAAacacctactccagtggtataggcctagcctagaccaagtgttgcctaccgccccgctgaggaaaa 756
   G N N P *
757 ctgcctgatcaagcacccttgaggaccaaaggcgcaactaacaaggcgcttttggtgtccaatattgtctagttttctctcc 840
841 atgcaaaagtatatcataagaaaatcttaaaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 901

```

图 1 *EcAQP4* 基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *EcAQP4*

ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子。图 3 同。
ATG: Initiation codon; TAA: Termination codon. The same as in Fig.3.

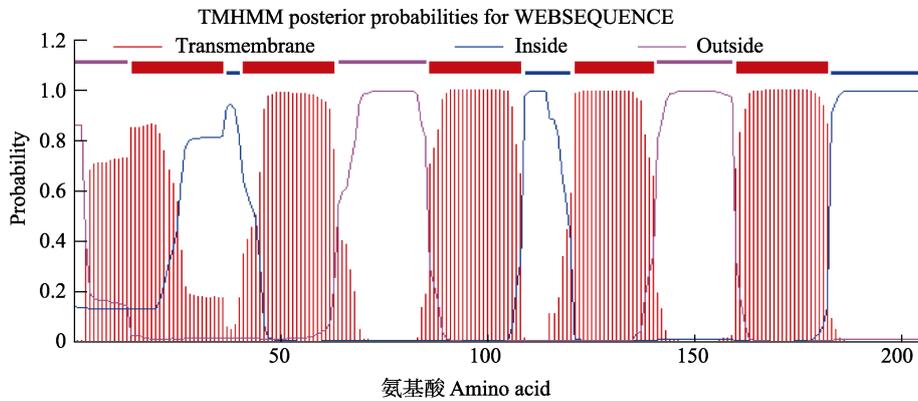


图 2 *EcAQP4* 的跨膜结构域
Fig.2 The transmembrane domain of *EcAQP4*

```

1 ATGTCGATCATAATATCGACGCTGACAGTCATCACCCAGATGGCGCTGTCCGAC 54
  M S I I I S T L T V I T Q M A L S H
55 ATCATCCGCGCGGTTGTCCGAAATAGTGACCAACGAGCTGGTCAAGGGATGC 108
  I I R G R L S E I V T N E L V K G C
109 CTGCTAGAGCTGGTGGCTGCGGAGATGTGCGGCACCTGTTATGAGCTTATT 162
  L L E L V A A A E M C G T C Y E L I
163 ATCATTGCTGATAACTACGGCGTCTACGCTTACGGTGTGTATCTTCTCCTCATG 216
  I I A D N Y G V Y A Y G V Y L F L M
217 ACCATCTGGTGGGGTCAGAGTTGGGGAAGTCCACTGCTTGTCTTACAGCCTG 270
  T I W W G Q S W G T A T A C P Y S L
271 TTGGAGGAATACGTGGAATCTGGTGCCGATGCTGTCTGTGTCCTCAAGATT 324
  L E E Y V E S G A D A V S V V L K I
325 GTATGTCAGGTCATTGGAGGTTTGGCATCATTCAGATGGGTGAAAATGATCTGG 378
  V C Q V I G G L A S F R W V K M I W
379 ATGATGGAATTTGCCGAGACCCACATCGGCCGCGGTGTGGACAGCTGCACGGCT 432
  M M E F A E T H I G R G V D S C T A
433 GACCTGGCTGTACCTGTGCGCGTCCGCTTCTGATTGAGGGTGGCCTCACCTGC 486
  D L A V P V A V G F L I E G G L T C
487 GCTTGCAGAATCGTCTCGAGGACTCTCGGGGAAGTCCGAGCCCAAGTTTGCTGCC 540
  A C R I V S R T L G E L E P K F A A
541 ACTTTCGACTCGTTCTTCTACTTCCATGGTGGTCTCGCTTTCACCACCTCT 594
  T F D S F F S T S M V V L A F T T S
595 GTGGTTACTTCAACCCAGTGTGGCCACTGGCCTGAAGTGGGCTTGGCCGAGGA 648
  G G Y F N P V L A T G L K W A C R G
649 CACACCAACGTCGAGCACATCATCGTCTACTGGCCGCGGTCCATCCTGGGATCC 702
  H T N V E H I I V Y W A G S I L G S
703 ATGCTCTCCATCAGGCTCTGGAACTCCACCTTCAAAAATATGATCGTTGGA 756
  M L S I R L W N T P T F K N M I V G
757 CCTTCAAGCCAAAGGAAGAGTAC 780
  P F K P K E E *
    
```

图 3 *EcAQP11* 基因 ORF 及其推导的氨基酸序列

Fig.3 Open reading frame and deduced amino acid sequence of *EcAQP11*

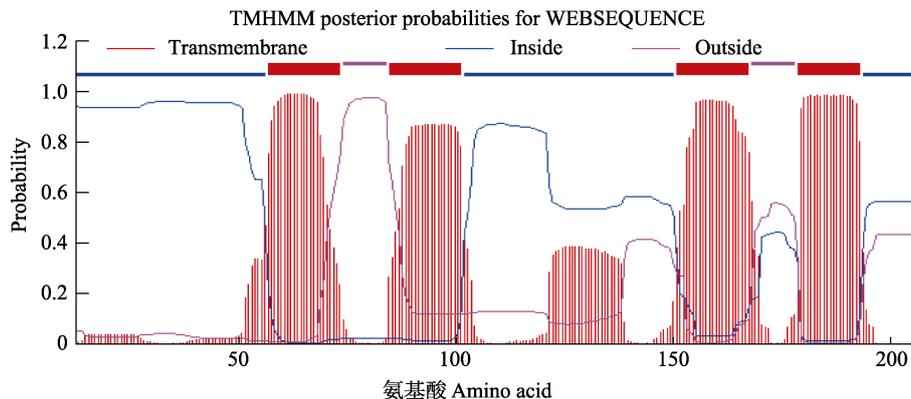


图 4 *EcAQP11* 的跨膜结构域

Fig.4 The transmembrane domain of *EcAQP11*

图 8), 结果显示, *EcAQP4* 基因的进化树分为两支, 第一支为节肢动物门, 第二支为脊索动物门, 脊尾白虾与罗氏沼虾聚为一支, 亲缘关系最为相近, 与其他甲壳纲动物亲缘关系也较近; 脊索动物门中的硬骨鱼类为一支, 与脊尾白虾亲缘关系较远。*EcAQP11* 基因的进化树分为两支, 第一支为昆虫纲, 第二支为甲壳纲, 脊尾白虾与斑节对虾与凡纳滨对虾聚为一支, 亲缘关系较近。

2.4 RNA 干扰后 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 的表达变化

取干扰后脊尾白虾的鳃组织, 提取 RNA, 进行

反转录, 通过 qRT-PCR 检测 2 个基因在各个时间点的表达量。结果显示, 注射 dsRNA 对脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因干扰效果明显。与 GFP 对照组相比, *EcAQP4* 基因在注射干扰 24 h 与 48 h 后的表达量下降 80%左右, 72 h 干扰效果逐渐减弱; *EcAQP11* 基因在注射干扰 24 h 时表达量下降 87%, 干扰效果显著, 48 h 时基因表达量下降 60%, 72 h 时基因表达量下降 35%。

2.5 RNA 干扰对脊尾白虾死亡率的影响

统计每个时间点各组别的死亡率, 如图 10 所示。

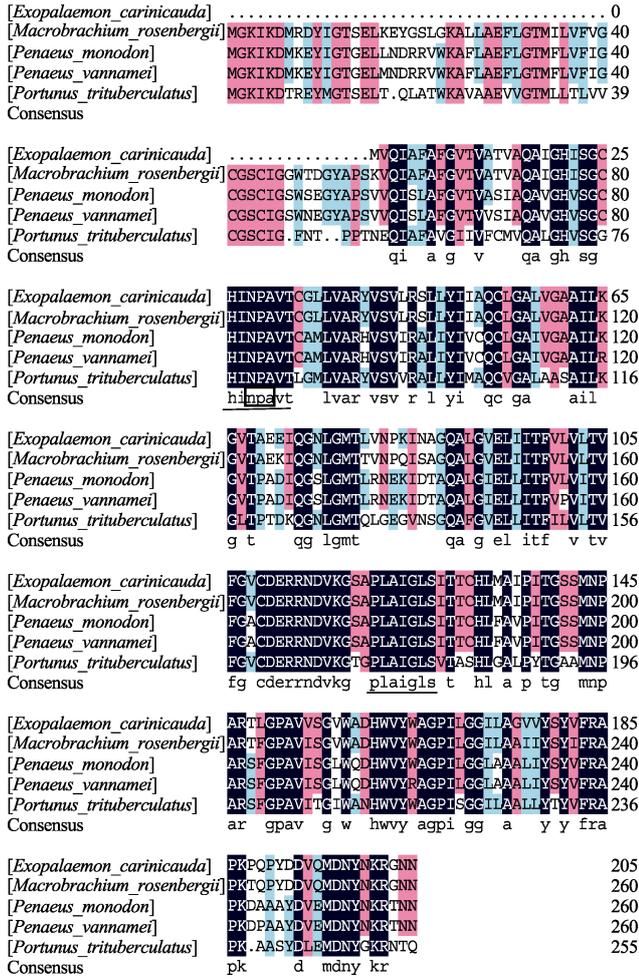


图 5 *EcAQP4* 基因氨基酸序列与其他已知物种同源序列比对

Fig.5 Amino acid sequences alignment of *EcAQP4* with other species' *AQP*

NPA 结构单元以方框表示；2 个保守序列 HINPAVT 和 PLAIGL 以下划线表示。

The NPA structural motifs are marked in the box. Two conserved sequences (HINPAVT and PLAIGL) are underlined.

与 GFP 组相比，注射干扰后，*EcAQP4* 与 *EcAQP11* 组死亡率显著升高($P<0.05$)，说明 RNA 干扰这 2 个基因表达后，脊尾白虾耐碱度能力降低，最终导致死亡。同时，发现 24 h 与 48 h 2 个时间点 AQP11 组死亡率显著高于 AQP4 组($P<0.05$)，在 72 h 时 2 组死亡率接近，相比 *EcAQP4* 基因，*EcAQP11* 基因能够更加快速地影响脊尾白虾渗透压调节能力，在脊尾白虾耐碱机制中起到更为重要的作用。综上所述，*EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因对脊尾白虾耐碱能力有重要的作用。

2.6 RNA 干扰对脊尾白虾血液渗透压的影响

使用渗透压测量仪测量各组在不同时间点脊尾

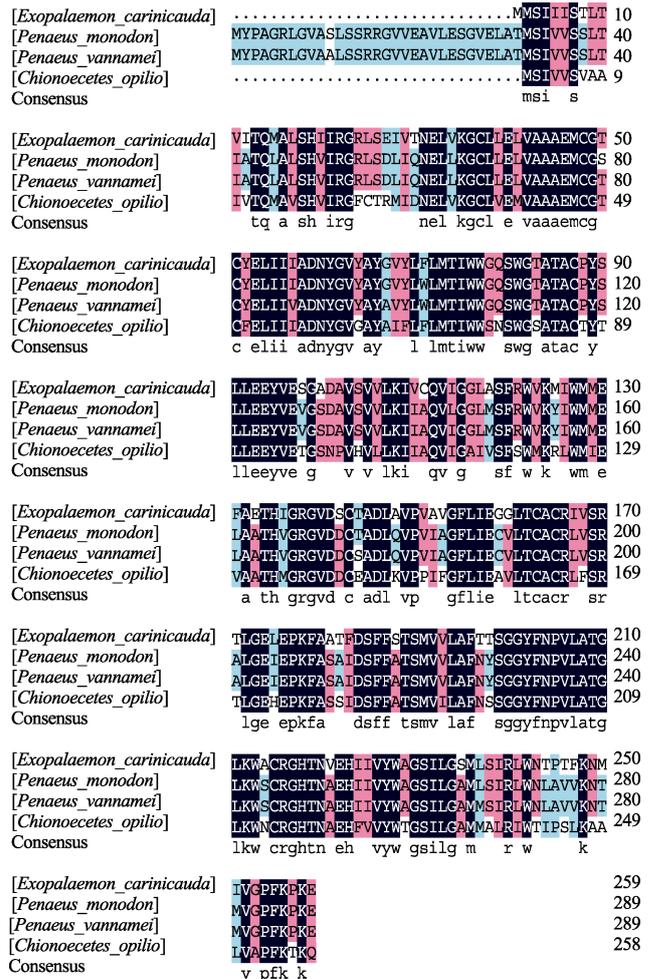


图 6 *EcAQP11* 基因氨基酸序列与其他已知物种同源序列比对

Fig.6 Amino acid sequences alignment of *EcAQP11* with other species' *AQP*

白虾的血液渗透压，结果如图 11 所示。与空白组相比，碱度胁迫后，脊尾白虾血液渗透压显著升高($P<0.05$)，这是由于水体碱度升高，其中的离子浓度也随之升高，脊尾白虾体内累积的离子升高所导致，但总体来看，GFP 组脊尾白虾血液渗透压相对稳定，呈现先上升后下降的趋势；*AQP4* 干扰组渗透压变化趋势与 GFP 组相同，在 48 与 72 h 时 2 个时间点其渗透压高于 GFP 组；*AQP11* 干扰组渗透压则是一直升高的，72 h 时显著升高($P<0.05$)，升高的幅度较大。推测干扰 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因表达后，水分子的转运受到影响，脊尾白虾渗透压调节能力降低，造成 AQP4 组上升与下降趋势大于对照组；AQP11 干扰组脊尾白虾渗透压上升明显，说明 *EcAQP11* 在脊尾白虾渗透压调节过程中发挥重要作用，是脊尾白虾耐碱机制中的重要基因。

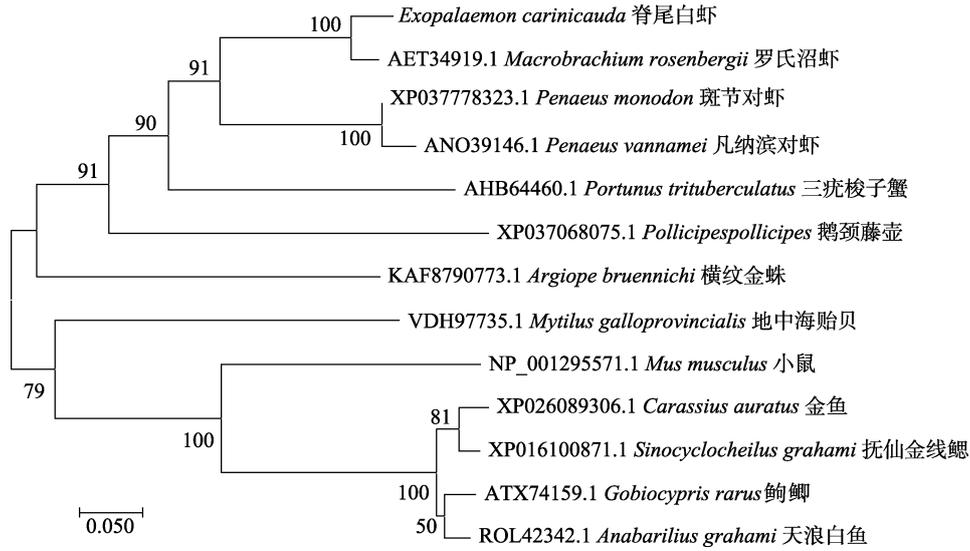


图 7 基于 *EcAQP4* 基因氨基酸序列构建的 Neighbor-joining 进化树
Fig.7 Neighbor-joining phylogenetic tree based on *EcAQP4* amino acid sequences

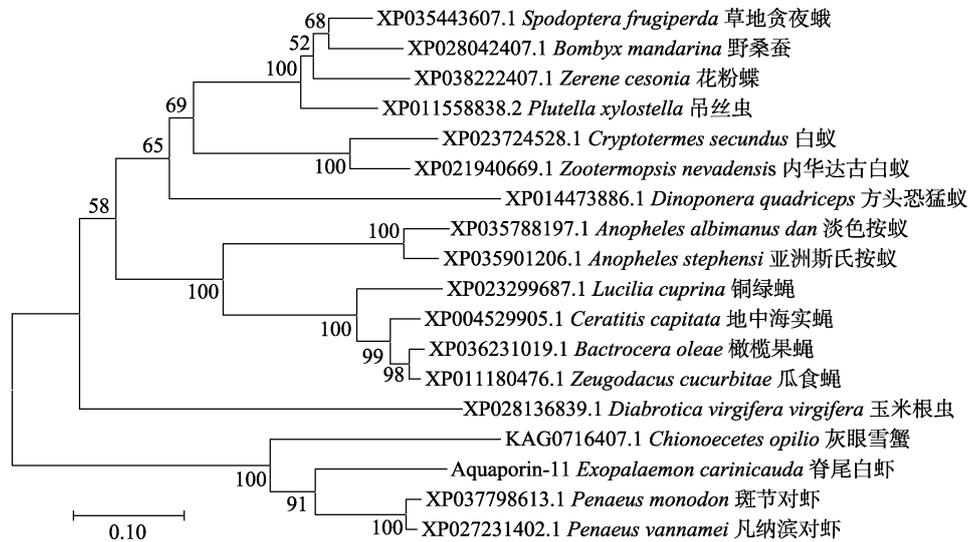


图 8 基于 *EcAQP11* 基因氨基酸序列构建的 Neighbor-joining 进化树
Fig.8 Neighbor-joining phylogenetic tree based on *EcAQP11* amino acid sequences

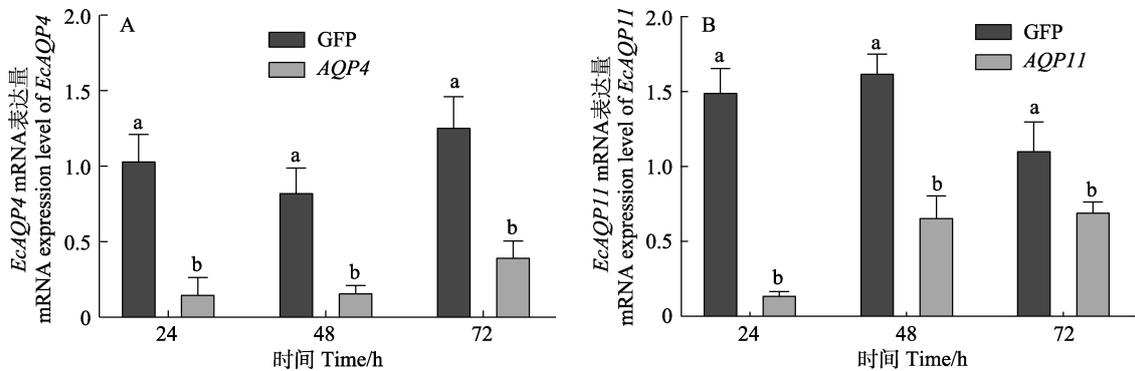


图 9 脊尾白虾注射干扰后 *EcAQP4* (A)与 *EcAQP11* (B)基因的表达情况
Fig.9 The expression of *EcAQP4* (A) and *EcAQP11* (B) after interference

GFP 为对照组。不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同。
GFP was the control group. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

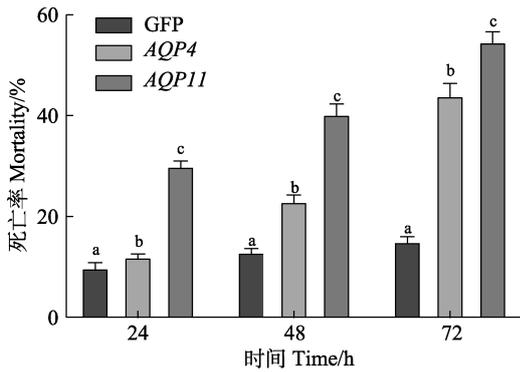


图10 RNA干扰后脊尾白虾的死亡率

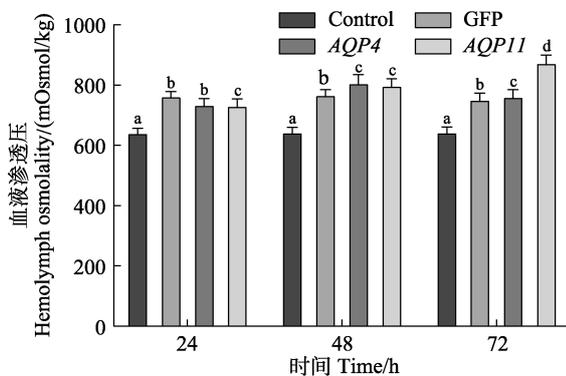
Fig.10 The mortality of *E. carinicauda* after RNA interference

图11 RNA干扰后脊尾白虾的血液渗透压变化

Fig.11 The hemolymph osmolality of *E. carinicauda* after RNA interference

3 讨论

本研究通过对转录组中差异表达基因的分析,发现在碱度胁迫后,与渗透压调节相关的基因大量表达,为了进一步了解脊尾白虾的耐碱机制,我们从差异表达基因中挑选了水通道蛋白这一渗透压调节的关键基因(Deane *et al.*, 2006; Holm *et al.*, 2005; MacIver *et al.*, 2009; Preston *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1996; 隋海心等, 2004),通过 RACE 技术克隆 cDNA 全长并对其进行序列分析,利用 RNA 干扰技术验证其在碱度胁迫过程中的响应机制。

3.1 AQP4 与 AQP11 基因的氨基酸序列及同源性分析

本研究利用 RACE 技术首次克隆获得脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因的 cDNA 全长,并运用生物信息学软件对其序列进行分析。通过比对发现,脊尾白虾 *EcAQP4* 基因保守性较好,具有 HINPAVT 和 PLAIGL 两个保守域,与高沿等(2017)研究结果相同。

3.2 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因的功能验证

水通道蛋白是生物细胞膜转运水分子的重要结构,在维持细胞内外渗透压平衡中起重要作用,现阶段关于水通道蛋白的研究有很多,最初人们在脑星形胶质细胞、胃壁细胞和肾集合小管等部位发现 AQP4 蛋白,它是一种水特异性通道蛋白,仅对水分子具有渗透性,其在人体中主要作用为维持脑内水平衡及脑水肿发生发展(张士保等, 2013)。现阶段对 AQP4 的研究主要集中于其在脑水肿、视神经脊髓炎(Yang *et al.*, 2013)、癫痫(Hsu *et al.*, 2011)等中枢神经系统疾病中所起的作用,其调节机制主要是维持细胞间隙 K^+ 缓冲与渗透压平衡,但在水产动物中的研究还未见报道。*EcAQP11* 基因在各个物种之间的氨基酸同源性低,功能尚不确定,但有研究表明, *EcAQP11* 具有水转运活性,作为水通道发挥作用(Yakata *et al.*, 2007),对体内水的稳态平衡有重要作用(He *et al.*, 2017),其发挥作用的主要方式为维持上皮细胞水和离子的吸收转运,保持细胞渗透压平衡。

为验证 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 两基因在脊尾白虾适应碱度胁迫中所起的作用,本研究设计合成了相应的 dsRNA,对脊尾白虾进行注射干扰后,通过 qRT-PCR 技术检测了碱度胁迫后上述 2 个基因的表达变化,结果显示,与对照组相比,各个时间点基因的表达均发生了显著下降,说明所设计的 dsRNA 具有良好的干扰效果。对脊尾白虾注射干扰后进行碱度胁迫,发现其死亡率明显升高,碱度胁迫 72 h 时, *EcAQP4* 组死亡率达到 45%, *EcAQP11* 组达到 55%,说明基因的沉默对脊尾白虾的耐碱度能力产生明显影响。渗透压测定结果显示,与空白组相比, GFP 对照组血液渗透压升高,各时间点总体变化不大,从侧面反映了脊尾白虾的耐碱能力较强。渗透压的变化趋势总体来说呈现先上升后下降的趋势,与盐碱胁迫对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)血清渗透压变化趋势相同(赵丽慧等, 2014)。在碱度胁迫条件下,脊尾白虾体内的离子逐渐累积增强,导致血液渗透压增高,但脊尾白虾通过体内的渗透压调节机制将渗透压维持稳定。与 GFP 对照组相比, *EcAQP4* 干扰组脊尾白虾的血液渗透压上升下降的幅度变大,说明 *EcAQP4* 基因的沉默表达影响了脊尾白虾的渗透压调节能力,从而导致脊尾白虾耐碱度能力减弱,死亡率升高。相比对照组和 *EcAQP4* 干扰组, *EcAQP11* 干扰组的渗透压升高更明显,且呈现一直升高的趋势,这可能是 *EcAQP11* 基因在脊尾白虾耐碱机制中起到了

更重要的作用, 其对脊尾白虾的渗透压调节影响较大。前文提到, *EcAQP11* 基因现阶段的功能与调控机制尚未完全解析, 但本研究结果表明, *EcAQP11* 基因在脊尾白虾渗透压调节中发挥了重要作用。

本研究成功克隆了脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因, 设计干扰 dsRNA 并对脊尾白虾进行注射沉默上述 2 个基因的表达, 结果发现, 与对照组相比, 注射干扰后的脊尾白虾在碱度胁迫下死亡率明显升高; *EcAQP4* 干扰组脊尾白虾血液渗透压变化幅度增大, *EcAQP11* 干扰组血液渗透压升高明显, 干扰 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 表达后的脊尾白虾耐碱度胁迫能力减弱, 表明上述 2 个基因在脊尾白虾适应碱度胁迫过程中发挥着重要作用。

参 考 文 献

- DEANE E E, WOO N Y S. Tissue distribution, effects of salinity acclimation, and ontogeny of aquaporin 3 in the marine teleost, silver sea bream (*Sparus sarba*). *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 663–671
- DUAN M S. Identification of aquaporin gene in tea tree and study of *CsPIPI1;5* functional. Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 [段梦莎. 茶树水通道蛋白基因的鉴定与 *CsPIPI1;5* 的功能研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2020]
- FENG X C, MA T H. Physiological importance of aquaporin water channels accessed by phenotype studies of aquaporin knockout mice. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, 32(4): 291–297 [冯学超, 麻彤辉. 水通道蛋白的生理功能——水通道基因敲除小鼠表型研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(4): 291–297]
- GAN Y D. cDNA cloning of aquaporin 3 in *Sarotherodon melanothorn*, *Oreochromis niloticus* and tissue expression patterns under salinity stresses. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [甘远迪. 萨罗罗非鱼、尼罗罗非鱼 AQP3cDNA 序列克隆及盐度胁迫下组织表达特征. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- GAO Y, HU C Q, REN C H, *et al.* Molecular cloning of aquaporin-4 (*AQP4*) gene in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the effect of salinity stress on its expression in hepatopancreas. *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 61–70 [高沿, 胡超群, 任春华, 等. 凡纳滨对虾水孔蛋白-4 的 cDNA 克隆及盐度胁迫对其肝胰腺 mRNA 表达水平的影响. *海洋科学*, 2017, 41(2): 61–70]
- HAO J F. Genome-wide identification of aquaporin gene family in cotton and functional characterization in response to osmotic stresses. Master's Thesis of Zhengzhou University, 2020 [郝建峰. 棉花水通道蛋白家族基因鉴定及其渗透胁迫应答功能研究. 郑州大学硕士研究生学位论文, 2020]
- HE L Q, HUANG N, LI H, *et al.* AMPK/ α -ketoglutarate axis regulates intestinal water and ion homeostasis in young pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(11): 2287–2298
- HOLM L M, JAHN T P, MØLLER A L B, *et al.* NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2005, 450(6): 415–428
- HSU M S, SELDIN M, LEE D J, *et al.* Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, 2011, 178: 21–32
- LI J, WANG L, LUO X L, *et al.* Cloning of AQP1 and AQP3 genes and their locations and expressions in different tissues of yak (*Bos grunniens*). *Acta Theriologica Sinica*, 2021, 41(1): 51–58 [李娟, 王利, 罗晓林, 等. 牦牛水通道蛋白 AQP1 和 AQP3 基因克隆及在不同组织中表达和定位. *兽类学报*, 2021, 41(1): 51–58]
- LI Q Y. Genome-wide identification and transcriptome analysis of aquaporin gene family in *Nicotiana tabacum*. Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 [李青云. 普通烟草中水通道蛋白基因家族的鉴定和转录组分析. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2020]
- LI W X, ZHANG D Y, ZHU G Z, *et al.* Combining genome-wide and transcriptome-wide analyses reveal the evolutionary conservation and functional diversity of aquaporins in cotton. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 538
- MACIVER B, CUTLER C P, YIN J, *et al.* Expression and functional characterization of four aquaporin water channels from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Experimental Biology* 2009, 212(17): 2856–2863
- PRESTON G M, CARROLL T P, GUGGINO W B, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 1992, 256(5055): 385–387
- ROBINSON D G, SIEBER H, KAMMERLOHER W, *et al.* PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of arabidopsis thaliana mesophyll. *Plant Physiology*, 1996, 111(2): 645–649
- SUI H X, REN G. Structure and mechanism of water channels. *Progress in Chemistry*, 2004, 16: 145 [隋海心, 任罡. 水分子通道蛋白的结构与功能. *化学进展*, 2004, 16(2): 145–152]
- WANG Y, LÜ J J, LIU P, *et al.* Cloning and characterization of aquaporins 1 and its expression analysis under salinity stress in *Portunus trituberculatu*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(5): 893–901 [王渝, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹水通道蛋白 1 cDNA 及其盐度胁迫下的表达分析. *中国水产科学*, 2014, 21(5): 893–901]
- YAKATA K, HIROAKI Y, ISHIBASHI K, *et al.* Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768
- YANG Y, HUANG D H, WU W P, *et al.* The role of aquaporin-4 antibodies in Chinese patients with neuromyelitis optica.

- Journal of Clinical Neuroscience, 2013, 20(1): 94–98
- YANG Z G, ZHANG L, CHEN C Y, *et al.* Study on cloning, expression and RNA interference of aquaporin 1 gene of *Eriocheir sinensis*. Journal of Fudan University (Natural Science), 2021, 60(1): 93–101 [杨志刚, 张龙, 陈春宇, 等. 中华绒螯蟹水通道蛋白 1 基因的克隆、表达及 RNA 干扰研究. 复旦学报(自然科学版), 2021, 60(1): 93–101]
- ZHAO L H, ZHAO L, JEERAWAT T, *et al.* Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696–1704 [赵丽慧, 赵金良, Jeerawat T, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响. 水产学报, 2014, 38(10): 1696–1704]
- ZHANG S B, DAI D W, DAI Y M. Advances of aquaporin-4 research. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2013, 21(4): 451–455 [张士保, 代大伟, 代亚美. 水通道蛋白-4 的研究进展. 中国临床神经科学, 2013, 21(4): 451–455]
- ZHANG Y N, WANG Y, ZHU J J, *et al.* Analysis of cloning and expression of AQP7 gene in Tibetan goat. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(8): 1956–1960 [张亚楠, 王永, 朱江江, 等. 藏山羊 AQP7 基因克隆和不同组织器官差异表达分析. 西南农业学报, 2019, 32(8): 1956–1960]

(编辑 冯小花)

The Roles of Aquaporin Gene 4 and 11 of *Exopalaemon carinicauda* under Alkalinity Stress

LI Mingdong^{1,2}, WANG Jiajia^{1,2}, GE Qianqian^{1,2}, QIN Zhen^{1,2}, LIU Ping^{1,2}, LI Jian^{1,2}, LI Jitao^{1,2①}

(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, Shandong 266071, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract Aquaporins are a family of cell membrane proteins, and their key role is to specifically transport water molecules and other neutral metabolic molecules. Moreover, aquaporins play an important role in regulating the balance between internal and external osmotic pressure in organisms. Here, aquaporin 4 and 11 genes from *Exopalaemon carinicauda* were successfully cloned using rapid amplification of cDNA ends cloning. The open reading frame of *EcAQP4* is 621 bp, encoding 206 amino acids, with a predicted molecular weight of 21.673 kDa and a theoretical isoelectric point of 8.30; it is a hydrophobic protein with five transmembrane structural domains. The open reading frame of *EcAQP11* is 783 bp, encoding 260 amino acids, with a predicted molecular weight of 28.490 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.40; it is a hydrophobic protein with four transmembrane domains. In sequence alignment, AQP4 in *E. carinicauda* shared the highest homology with that in *Macrobrachium rosenbergii* (94.63%), while AQP11 in *E. carinicauda* shared the highest homology with that in *Penaeus monodon* (81.47%). Furthermore, RNA interference was used for silencing *EcAQP4* and *EcAQP11* expression to verify their function. In carbonate alkalinity stress, the mortality of *E. carinicauda* increased significantly following RNA interference. At 72 h, mortality reached 45% and 55% in the *EcAQP4* and *EcAQP11* groups, respectively, being significantly higher than that in the control group. The blood osmotic pressure of *E. carinicauda* in the *EcAQP4* group was significantly higher than that in the control group. Similarly, the blood osmotic pressure of *E. carinicauda* in the *EcAQP11* group was significantly increased. In summary, aquaporins play important roles in regulating osmotic pressure and maintaining ion balance in response to alkalinity stress in *E. carinicauda*.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Aquaporin; Gene cloning; Osmolality

① Corresponding author: LI Jitao, E-mail: lijtao@ysfri.ac.cn