

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19034

## 中国对虾 V-ATPase c 亚基基因的克隆及其在高 pH 胁迫下的表达分析

胡硕<sup>1,3</sup>, 何玉英<sup>2,3</sup>, 李健<sup>2,3</sup>, 张海恩<sup>1,3</sup>, 韩旭<sup>1,3</sup>

1. 上海海洋大学, 上海 201306;
2. 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;
3. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

**摘要:** 采用 RACE 技术克隆了中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)V-ATPase c 亚基基因, 命名为 *FcVHA-c* 基因, 检测该基因在高 pH 胁迫下的基因应答, 并采用 RNAi 技术验证其功能。基因分析表明, *FcVHA-c* 基因 cDNA 全长为 2128 bp, 开放阅读框 483 bp, 编码 160 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 16 kD, 理论等电点 7.82, 具有 4 个跨膜结构域。同源性和系统进化分析表明, *FcVHA-c* 具有较高的保守性, 其中与南美白对虾(*Penaeus vannamei*)同源性最高, 为 99%, 与南美白对虾首先聚为一支。组织表达分析显示, *FcVHA-c* 基因在中国对虾各个组织中均有表达, 在鳃中表达量显著高于其他组织( $P < 0.05$ )。pH 8.8 胁迫下, 该基因的表达量在 12 h 达到峰值, 为对照组的 1.206 倍, 在 48 h 达到最低值, 为对照组的 0.166 倍; pH 9.2 胁迫下, 该基因表达量在 1 h 达到峰值, 为对照组的 1.577 倍, 在 12 h 达到最低值, 为对照组的 0.104 倍。结果表明, 高 pH 对该基因具有一定的抑制作用。干扰结果显示, 高 pH 胁迫下干扰组较对照组的死亡率显著增高( $P < 0.05$ ), 表明该基因表达量越高, 越有利于中国对虾的存活。本研究结果表明, *FcVHA-c* 基因参与了高 pH 胁迫下中国对虾的离子调控, 高 pH 胁迫抑制 *FcVHA-c* 基因的调控能力。

**关键词:** 中国对虾; V-ATP 酶; c 亚基; pH 胁迫; RNAi

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)06-1064-11

pH 胁迫是对虾养殖中主要胁迫因子之一, pH 值异常会干扰对虾体内细胞及整体水平上的 pH 平衡和离子稳态。水环境中 pH 值的变化不仅可以影响水体中氨氮、硫化氢和重金属离子等化学物质的存在形式, 而且还能够直接或间接地影响水生动物存活、生长和免疫活性<sup>[1]</sup>。当 pH 值过高时, 有毒的氨增加( $\text{NH}_4^+$ 转变为  $\text{NH}_3$ ), 腐蚀虾的鳃组织, 造成虾呼吸障碍, 严重时使虾窒息<sup>[2]</sup>。一般来说, pH 越高, 氨的毒性也随之增强。鳃是甲壳动物的主要的渗透压调节器官之一<sup>[3]</sup>, 甲壳动物可以通过鳃进行  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  和  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换, 在一定程度上能调节体液的 pH 值, 以适应逆境环境<sup>[4-5]</sup>。

在目前的研究中, 水生动物主要的离子转运机制包括: 钠/氢交换体( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NHE)、质子泵( $\text{H}^+$ -ATPase)、碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)、钠/钾 ATP 酶( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, NKA)和液泡型  $\text{H}^+$ -ATPase(Vacuolar-type  $\text{H}^+$ -ATPase, V-ATPase)等<sup>[4, 6-8]</sup>。

Vacuolar-type  $\text{H}^+$ -ATPase (V-ATPase)是一种进化高度保守的酶, 存在于所有的真核生物细胞, 是定位于细胞膜和细胞器膜上的氢离子转运酶, 在多种水生动物的酸碱平衡<sup>[9]</sup>、渗透调节<sup>[10]</sup>和排氨<sup>[11]</sup>等活动中占有重要的地位。V-ATPase 作为 pH 胁迫响应酶, 在胁迫条件下能通过改变其结构、状态及数量以适应环境的变化, 有效降低逆

收稿日期: 2019-02-14; 修订日期: 2019-04-01.

基金项目: 农业农村部国家虾蟹产业技术体系项目(CARS-48); 山东省泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002); 国家自然科学基金项目(31772842).

作者简介: 胡硕(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事中国对虾遗传育种研究. E-mail: hushuoHS@163.com

通信作者: 何玉英, 研究员. E-mail: heyuy@ysfri.ac.cn

境对生物体的伤害<sup>[12]</sup>。V-ATPase c 亚基是目前发现的最大的 V-ATPase 亚基基因家族,其主要功能是利用 ATP 水解提供的能量,将 H<sup>+</sup> 泵入囊泡腔中或泵出细胞外<sup>[13]</sup>,这也暗示了其在抗 pH 胁迫中可能具有的重要功能。实验证明 V-ATPase c 亚基在动植物的抗逆响应过程中发挥了重要作用,例如,在植物受到酸碱、盐、重金属、低温、高温及外源性激素胁迫时,c 亚基表现的更为敏感并参与了抗胁迫响应<sup>[14-19]</sup>。目前在水产动物中,关于 V-ATPase 的研究只在斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[20]</sup>,青鳉鱼(*Oryzias latipes*)<sup>[21]</sup>,三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)<sup>[22]</sup>,淡水螯虾(*Cherax destructor*)<sup>[23]</sup>等中有相关报道,在中国对虾中尚未开展。

本研究通过探究高 pH 胁迫下 V-ATPase c 亚基基因在中国对虾鳃中的表达情况,探讨 c 亚基与高 pH 胁迫的关联机制,为中国对虾的环境适应性调控机制提供重要数据支持,也为更好地选育抗性新品种提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验中国对虾来自潍坊昌邑海丰水产养殖有限责任公司,选择健康、有活力的中国对虾进行 pH 胁迫实验。实验用虾体长(7.35±1.35) cm,体重(4.47±2.47) g,将其置于室内养殖池暂养 1 周。实验期间,海水温度(27~30)℃,盐度 32~35, pH 8.14~8.20;暂养期间连续充气,每天换水清污,换水量约为总体积的 1/3;每天按时投喂,按照中国对虾体重的 5%投喂配合饲料。

### 1.2 组织采集

挑选 9 尾健康的未经任何处理的中国对虾,每 3 尾为一组,取其肝胰腺、鳃、肠、血淋巴细胞、胃、心脏、眼柄、眼球、肌肉和触角腺,迅速放入液氮保存,随后转移至-80℃冰箱保存,用于总 RNA 的提取和 RACE 模板的合成。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 pH 胁迫实验** 挑选健康、规格整齐的中国对虾共 270 尾,实验中使用 NaOH 调整海水 pH 值,在 60 L 的小型养殖箱中展开实验。

参照哈承旭等<sup>[24]</sup>以及王芸等<sup>[25]</sup>的实验设计,

结合本研究的目的,本实验共设置 3 组,其中设置 pH 8.4 为对照组, pH 8.8, 9.2 为高 pH 胁迫组,每组设置 3 个平行,每个平行 30 尾中国对虾。使用 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值,当 pH 值调节稳定后,将虾放入养殖箱中进行实验。pH 胁迫实验开始后第 0、1、6、12、24、48、72 小时分别从每个实验组中随机挑选 9 尾中国对虾取鳃组织,迅速放入液氮保存,随后转移至-80℃保存,用于总 RNA 的提取。实验开始后每 2~3 h 对 pH 值校正一次。

### 1.3.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

采用液氮研磨法和机器匀浆法处理收集的组织,其中体积较大的组织块使用液氮研磨,较小的组织用低温匀浆机处理。使用总 RNA 提取试剂盒(天根,北京)提取总 RNA,-80℃保存备用。使用微量紫外可见分光光度计(Termo,美国)检测 RNA 的质量和浓度,通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3' Kit (宝生物,大连)试剂盒合成 3'、5'RACE 模板,-80℃保存备用。

**1.3.3 中国对虾 V-ATPase c 亚基基因克隆** 从中国对虾转录组中筛选获得的一段 V-ATPase c 亚基的 EST 序列。使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1),利用 RACE 扩增获得基因全长。将中国对虾全组织的 RACE 模板混合作为 RACE 模板,进行 PCR 扩增。扩增产物连接至 T 载体(全式金,北京)后转化至 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞(诺唯赞,南京)中,挑取阳性单克隆菌株进行测序。使用 DNAMAN 软件对 PCR 获得的中间片段序列进行比对验证;使用软件 ContigExpress 拼接 5'和 3'端扩增序列;使用在线分析软件 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找开放阅读框。

**1.3.4 生物信息学分析** 使用在线软件 NCBI 中 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)功能对测序结果进行比对分析,使用 Protein Blast 比对基因氨基酸同源性;使用软件 MEGA 7 构建 N-J 进化树。使用在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽,使用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构域,使用在线软件 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

预测蛋白跨膜情况,使用在线软件 ExPASy 中 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质特性, ExPASy 中 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 推测蛋白质亲水性。

**1.3.5 *FcVHA-c* 基因 siRNA 干扰实验** 根据克隆获得的 *FcVHA-c* 基因 cDNA 序列,设计 3 个干扰靶点,分别编号为: c-1, c-2, c-3(表 2)。本实验所用的 siRNA 均由生工生物工程(上海)用化学方法进行合成。设置预实验,从中挑选出干扰效果最佳的 siRNA 靶点。本实验以注射 NC 作为对照组,分别注射 c-1, c-2, c-3 作为干扰组,每组 3 个平行,每个平行 10 尾虾,根据体重注射干扰试剂,注射量为 1  $\mu\text{g/g}$ ,注射部位为第二腹节,肌肉注射。注射后第 12、24、48 小时,每组随机挑选 3 尾虾取鳃,立即保存于液氮中。利用荧光定量法检测注射干扰试剂后 *FcVHA-c* 基因在鳃中的表达变化,并以此为根据,挑选的最佳干扰靶点。根据预实验结果和 pH 胁迫实验,干扰实验设置 2 个实

验组:以注射 NC 并进行 pH8.8 胁迫作为对照组,以注射最佳干扰靶点并进行 pH8.8 胁迫作为干扰组。每组设置 3 个平行,每个平行 10 尾虾,统计实验开始后 0—48 h 中国对虾死亡率。实验开始后 2—3 h 校正 pH 值。

**1.3.6 *FcVHA-c* 基因表达的实时定量分析** 根据克隆获得的 *FcVHA-c* 基因 cDNA 序列,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 qRT-PCR 引物 c-F1, c-R1 (表 1)。提取处理后鳃组织的 RNA,使用 HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (gDNA wiper) (诺唯赞,南京)试剂盒进行反转录。使用 ChamQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Color qPCR Master Mix 试剂盒 (诺唯赞,南京),和 7500 Real Time PCR System (ABI, 美国)仪器检测高 pH 胁迫后和干扰后该基因在鳃中的表达变化规律,并筛选该基因的最佳干扰靶点;使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量,使用 Excel 软件进行单因素方差分析,使用 OriginPro 2016 软件作图。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 The sequence of primers used in this research

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 purpose
c-F	CACTCTCTATCAGGGCTTTGT	PCR 扩增
c-R	TTGACGACCACCCAGGC	PCR 扩增
5'-c	CAAACCATACAGACCCAATACCTCAGCGAA	克隆 V-ATPase c 基因
3'-c	CATGTCTCATGTGAGGAACACTACGTTCCCAT	克隆 V-ATPase c 基因
c-ORF-F	ATGGCAGAGGAAATCCGATG	验证 ORF
c-ORF-F	TTAGCTGCTTGAGGTCTTGGTG	验证 ORF
c-F1	CATTTACGGTCTGGTGGTG	定量
c-R1	CTGCTGTGCTGTTCCCTCG	定量
18S-F	TATACGCTAGTGAGCTGGAA	定量内参引物
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	定量内参引物

表 2 本研究所用 siRNA 序列与 NC 序列  
Tab. 2 The sequences of siRNA and NC used in this research

编号 No.	小干扰 RNA siRNA	序列(5'-3') sequence
c-1	c-158	Sense: AUGACGACGGGAAUGAUGCTT Antisense: AUGACGACGGGAAUGAUGCTT
c-2	c-216	Sense: GCUCAUUGCUGGAAAGCUUTT Antisense: AAGCUUCCAGCAAUGAGCTT
c-3	c-449	Sense: CCAUCUACCUCUACACCAATT Antisense: UUGGUGUAGAGGUAGAUGGTT
NC	NC	Sense: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT Antisense: ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

### 2 结果与分析

#### 2.1 *FcVHA-c* 基因序列分析

克隆获得中国对虾 V-ATPase c 亚基基因 cDNA 全长。将该基因命名为 *FcVHA-c*, 基因全长

2128 bp, 基因登录号为: MK028305, 开放阅读 (ORF)框长度为 483 bp, 5'端非编码区(5'-UTR)和 3'端非编码区(3'-UTR)分别包含 105 bp 和 1540 bp, 编码 160 个氨基酸(图 1)。信号肽分析显示, 该基因不包含信号肽。



图 1 *FcVHA-c* 基因 cDNA 序列和推测的氨基酸序列  
推导的氨基酸序列用大写字母表示; 红色划线区是起始密码子(ATG), 星号(\*)表示终止密码子(TAA); 红色方框区域为跨膜结构域, 共有 4 个跨膜区; 黑色方框为谷氨酸位点。

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *FcVHA-c* gene  
Translated amino acid sequence was shown under nucleotide sequence as uppercase. The initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) were marked by a red underline and an asterisk, respectively. Four transmembrane domains were shown with the red box region. The glutamate site was shown with a black box.



2.2 FcVHA-c 基因同源性分析及系统进化分析

将 FcVHA-c 基因的氨基酸序列在 NCBI 网站上比对, 获得与该基因相关的其他物种信息, 再使用 DNAMAN 软件将中国对虾 FcVHA-c 基因氨基酸序列与其他物种的 V-ATPase c 亚基氨基酸序列进行同源比对。结果显示, 中国对虾 FcVHA-c 与其他物种的氨基酸同源性较高, 其中与南美白对虾同源性最高, 为 99%, 且在不同物

种之间, 都具有一个谷氨酸残基位点(图 2 红色方框)。

基于上述 FcVHA-c 基因氨基酸序列的同源性分析, 使用软件 MEGA 7 构建 N-J 进化树(图 3)。结果显示, 进化树分为两大支, 第一支为节肢动物门昆虫纲, 第二支为节肢动物门甲壳纲。其中中国对虾归于第二支, 与南美白对虾首先聚为一支, 其次为端足虫。

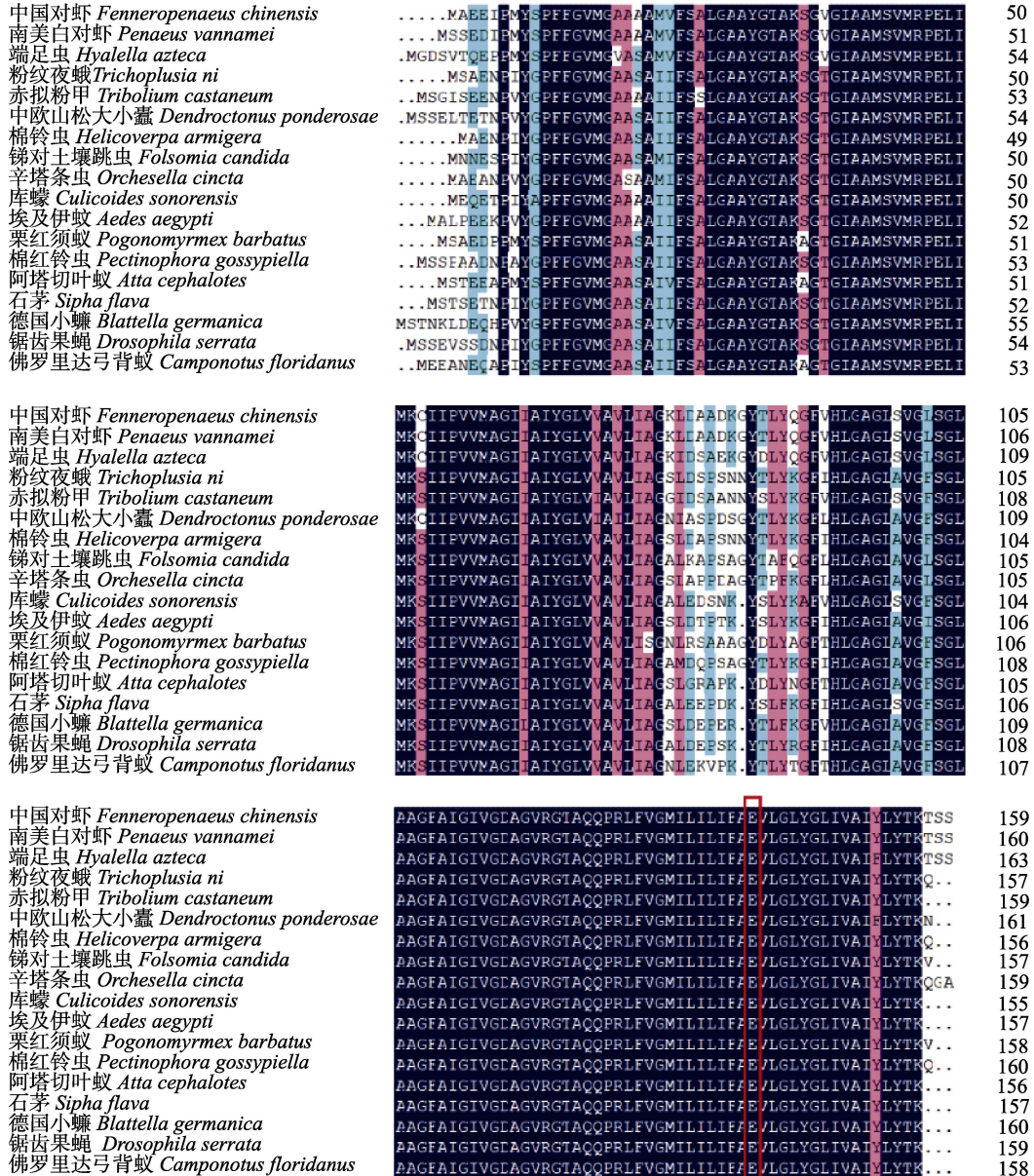


图 2 FcVHA-c 基因氨基酸序列与其他物种已知同源序列比对

图中红色框处为谷氨酸残基位点。

Fig. 2 Multiple alignment of FcVHA-c gene deduced amino acid sequence with other orthologues. The glutamate site was shown with a red box.

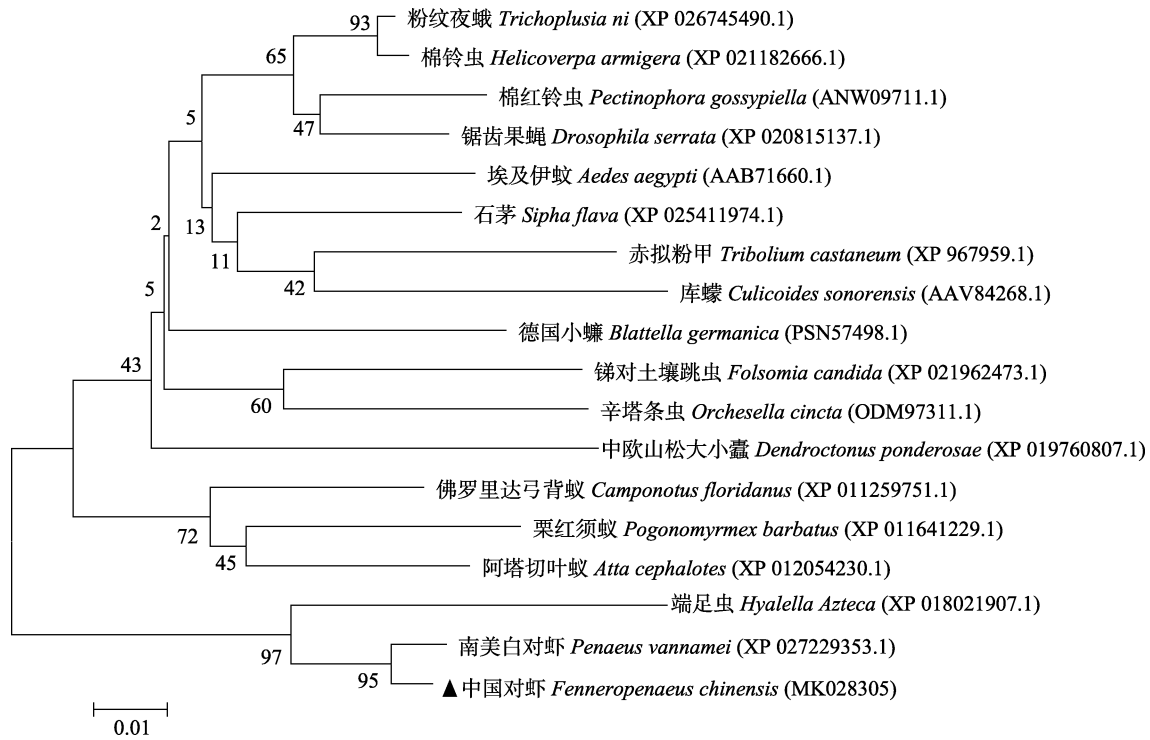


图 3 基于 *FcVHA-c* 基因氨基酸序列构建的 N-J 进化树

Fig. 3 NJ tree based on *FcVHA-c* gene amino acid sequences

### 2.3 *FcVHA-c* 蛋白质结构域预测及其跨膜情况

使用在线软件 ExPASy 对 *FcVHA-c* 基因编码的蛋白特性进行详细分析, 结果显示, 预测的蛋白分子量约为 16 kD, 蛋白质等电点为 7.82, 稳定系数为 18.04, 是较为稳定的蛋白质, 脂肪系数较高, 为 125.06; 蛋白质亲水性结果表明, *FcVHA-c* 编码的蛋白亲水性平均值为 1.116, 是疏水性蛋白。使用在线软件 SMART 预测 *FcVHA-c* 蛋白结构域, 结果显示, 该基因编码的蛋白包括四个跨膜结构域(TM1-TM4), 跨膜区起始位置分别为: 10-32, 53-75, 90-112, 133-156。使用在线软件 TMHMM Server v. 2.0 软件预测基因的跨膜情况, 结果表明, *FcVHA-c* 基因编码的蛋白跨膜 4 次。

### 2.4 *FcVHA-c* 基因组织表达分析

利用荧光定量法检测 *FcVHA-c* 基因在中国对虾各组织中的表达情况。结果如图 4 所示, *FcVHA-c* 基因在各个组织中均有表达, 其中在鳃中表达量显著高于其他组织( $P<0.05$ ), 其次在眼柄、肠、肝胰腺和血淋巴细胞中表达量较高, 在心脏中表达量最低。

### 2.5 高 pH 胁迫下 *FcVHA-c* 基因在中国对虾鳃中的表达分析

利用荧光定量法检测 pH 胁迫下 *FcVHA-c* 基因在中国对虾鳃中的表达变化(图 5)。除 pH8.8 胁迫 12 h 和 pH9.2 胁迫 1 h 外, 与对照组相比, 高 pH 胁迫组 *FcVHA-c* 基因在中国对虾鳃中下调表达。其中, *FcVHA-c* 基因在 pH8.8 组胁迫 12 h 显著上调表达( $P<0.05$ ), 为对照组的 1.206 倍, 在 48 h 表达量最低, 为对照组的 0.166 倍; 在 0~72 h 该基因先下调后上调再下调并保持较低的表达水平; 在 pH9.2 组胁迫 1 h 显著上调表达( $P<0.05$ ), 为对照组的 1.577 倍, 在 12 h 表达量最低, 为对照组的 0.104 倍。除 1 h 和 48 h 外, pH9.2 组 *FcVHA-c* 基因在鳃中表达量显著低于 pH8.8 组( $P<0.05$ )。

### 2.6 *FcVHA-c* 基因的功能验证分析

**2.6.1 siRNA 干扰靶点筛选** RNAi 干扰后 *FcVHA-c* 基因在中国对虾鳃中的相对表达量如图 6 所示。与对照组相比, 注射不同干扰试剂后, *FcVHA-c* 基因在鳃中的表达量在 12—48 h 均呈现显著降低的趋势( $P<0.05$ )。其中注射 c-1 后 12—48 h,

基因表达量分别为对照组的 0.713 倍, 0.574 倍和 0.442 倍; 注射 c-2 后, 基因表达量在 12—48 h 分别为对照组的 0.449 倍, 0.861 倍和 0.677 倍; 注射 c-3 后, 基因表达量在 12—48 h 分别为对照组的 0.409 倍, 0.678 倍和 0.471 倍。经过比较, c-1 干扰效果最好, 选择干扰靶点 c-1 进行后续实验。

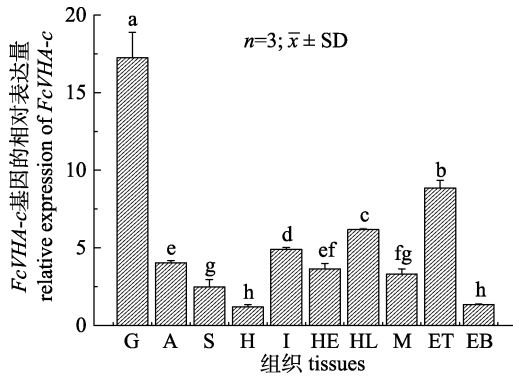


图 4 *FcVHA-c* 在中国对虾组织中表达分布  
A: 触角腺, EB: 眼球, ET: 眼柄, G: 鳃, H: 心脏,  
HE: 肝胰腺, HL: 血淋巴细胞, I: 肠,  
M: 肌肉, S: 胃; 柱上不同的小写字母代表  
不同组织中差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
Fig. 4 Expression profiles of *FcVHA-c* in different  
tissues of *Fenneropenaeus chinensis*  
A, antennary gland; EB, eyeball; ET, eyestalk; G, gill;  
H, heart; HE, hepatopancreas;  
HL, hemo lymphocyte; I, intestine; M, muscle;  
S, stomach. Different lowercase letters indicated  
difference significance ( $P < 0.05$ ).

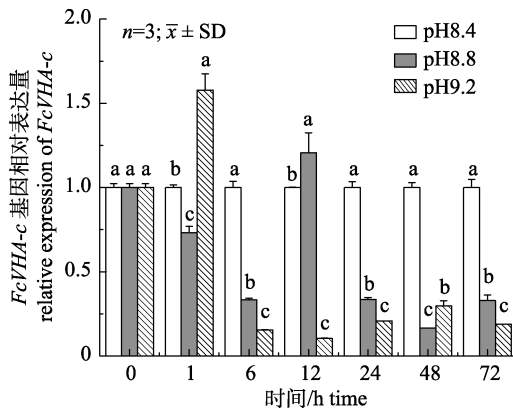


图 5 pH 胁迫下 *FcVHA-c* 基因在鳃中的相对表达量  
不同小写字母表示不同分组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
Fig. 5 Relative gene expression of *FcVHA-c* in gill of  
*Fenneropenaeus chinensis* under pH stress  
Different small letters indicate significant difference in  
different groups ( $P < 0.05$ ).

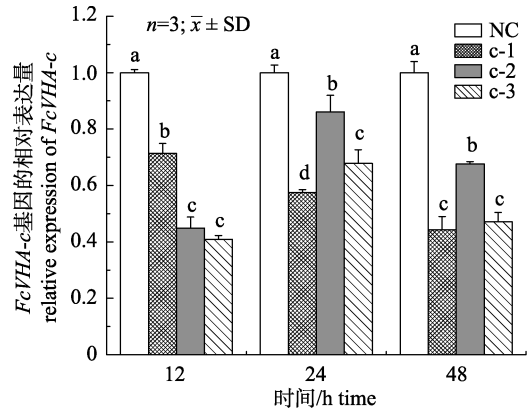


图 6 注射 c-1, c-2 和 c-3 后 *FcVHA-c* 基因在  
鳃中的表达量  
不同小写字母表示不同分组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
Fig. 6 Expression of *FcVHA-c* gene in gill after c-1,  
c-2 and c-3 injection  
Different small letters indicate significant difference in  
different groups ( $P < 0.05$ ).

**2.6.2 高 pH 胁迫下干扰 *FcVHA-c* 基因的死亡率统计**  
向中国对虾注射 *FcVHA-c* 基因 siRNA 干扰试剂 c-1, 统计其 0—48 h 内的死亡率结果如图 7 所示。与对照组相比, 干扰组死亡率在 0—48 h 的累积死亡率 (33.33%) 显著高于对照组 (20%) ( $P < 0.05$ )。其中 0—12 h 干扰组死亡率为 3.33%, 对照组为 6.67%; 12—24 h 干扰组死亡率为 10%, 对照组为 3.33%。

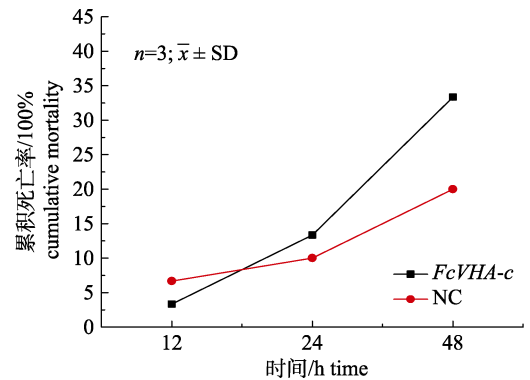


图 7 pH 8.8 胁迫注射干扰的中国对虾的死亡率  
Fig. 7 Mortality of *Fenneropenaeus chinensis* after pH  
stress (8.8) and siRNA interference

### 3 讨论

本研究通过 RACE 技术在中国对虾中首次克隆得到 *FcVHA-c* 基因 cDNA 全长, 预测编码蛋白

分子量为 16 kD, 包括 4 个跨膜结构域, 且第 4 个跨膜区包含与转运质子相关的谷氨酸残基位点。这一结果与 c 亚基在其他物种中如星星草(*Puccinellia tenuiflora*)<sup>[19]</sup>, 马蔺(*Iris lactea*)<sup>[26]</sup>, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[27]</sup>等物种中预测结果相同。*FcVHA-c* 基因编码的氨基酸序列与其他物种同源性较高, 这表明该蛋白在物种间具有较高的保守性, 具有 V-ATPase c 亚基的典型序列结构和特征; *FcVHA-c* 氨基酸序列含有多个跨膜区, 表明其定位于膜上; 其谷氨酸残基位点(140)位于第四跨膜区域, 根据相关报道<sup>[28]</sup>, c 亚基第四个跨膜区 TM4 中的谷氨酸位点通过羧基质子化和去质子化, 进行质子的转运, 这表明该亚基跨膜部分具有 H<sup>+</sup>转运功能, 推测 *FcVHA-c* 基因在离子调节中具有重要作用。

组织分布结果显示, *FcVHA-c* 基因在中国对虾鳃中显著表达( $P<0.05$ ), 这与 Uchiyama 等<sup>[29]</sup>的研究结果相一致。鳃是水生动物呼吸, 调节渗透压和维持酸碱平衡的重要组织, 与养殖水体直接接触, 是感受水体变化的敏感器官, 亦是主要的调节器官。V-ATPase c 亚基是参与 H<sup>+</sup>转运的主要部分, *FcVHA-c* 基因在鳃中高表达正是印证了该基因的功能。除此之外该基因在眼柄、肝胰腺、肠中均有着较高的表达, 其中 V-ATPase c 亚基在肠中表达量较高与马金武等<sup>[22]</sup>的研究表明结果相一致。对虾眼柄中含有 X-器官, 是窦腺系统的一部分, 它具有综合激素的功能; 肝胰腺作为蛋白质、脂质等的代谢中心, 可以在急性胁迫条件下自我调节, 自我保护, 是甲壳动物重要的免疫防御组织<sup>[30-31]</sup>; 肠是主要的营养吸收和排泄器官, 与对虾疾病的防御息息相关。该基因在眼柄、肝胰腺、肠中高表达说明这些组织参与了丰富的质子转运活动, 也表明 *FcVHA-c* 基因还可能与激素的合成分泌, 蛋白质脂质代谢及免疫相关。

高 pH 胁迫下, 除 pH 8.8 胁迫 12 h 和 pH 9.2 胁迫 1 h 外, *FcVHA-c* 基因在中国对虾鳃中下调表达, 这表明基因的表达受到抑制。除 1 h 和 48 h 外, pH 9.2 组 *FcVHA-c* 基因在鳃中表达量显著低于 pH 8.8 组( $P<0.05$ ), 表明 pH 越高, 抑制作用越显著, 这一结果与其他研究报道结果一致。李政道等<sup>[6]</sup>研究发现, 高 pH 胁迫使中国对虾鳃组织中

*FcNHE* 基因的表达量较对照组显著下调, 基因受到一定程度抑制。张林娟等<sup>[9]</sup>对日本囊对虾(*Mar-supenaesus japonicus*)的研究表明, 随着 pH 值的升高 V-ATPase 活力降低, Pan 等<sup>[32]</sup>研究表明 V-ATPase 活性与 pH 呈负相关。pH 9.2 胁迫 1 h, 该基因在中国对虾鳃中显著上调表达( $P<0.05$ ), 可能和初期的应激反应有关, 推测是急性高 pH 胁迫刺激中国对虾 V-ATPase c 亚基在短时间内迅速上调表达, 以此适应环境的变化。Wang 等<sup>[33]</sup>研究了南美白对虾 V-ATPase 在高低 pH 胁迫下的基因应答, 结果显示, 在 pH 9.3 胁迫下, V-ATPase 的基因表达量在 3 h 增加, 为对照的 10 倍, 随后基因下调表达。该研究结果与本文结果相同。在 pH 8.8 组该基因表达量呈现先下调后上调再下调的表达趋势, 其中在 12 h, c 亚基显著上调表达( $P<0.05$ ), 推测在 pH 胁迫初期中国对虾试图提高 c 亚基的表达量以维持酸碱平衡, 但之后渗透调节失败。这与高 pH 胁迫红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)<sup>[34]</sup>的研究结果相似。已有研究报道<sup>[35-37]</sup>, V-ATPase 是通过质膜将 H<sup>+</sup>泵入或者泵出细胞, 其表达受外部 pH 变化的影响, 但是尚未有研究报道 V-ATPase 表达水平在不同 pH 下的作用机制。为了验证在高 pH 胁迫下 V-ATPase c 亚基是否起到一定调节作用, 利用 siRNA 干扰 *FcVHA-c* 基因, 结果显示, 中国对虾干扰组死亡率较对照组显著升高( $P<0.05$ ), 表明干扰 V-ATPase c 亚基基因的表达影响了中国对虾的存活, 推测 V-ATPase c 亚基表达量越高, 将有利于中国对虾在高 pH 胁迫下的存活。相关研究表明, V-ATPase V<sub>1</sub> 和 V<sub>0</sub> 结构域在参与离子转运中首先经过组装激活, 而每个亚基都是装配过程必不可少的部分<sup>[38-39]</sup>。由此可见, 利用 siRNA 干扰 *FcVHA-c* 基因, 可能导致大部分的 c 亚基的表达缺失, V-ATPase 无法成功装配, 中国对虾的自我调节能力降低, 从而降低了高 pH 胁迫下的存活率。

V-ATPase 是一个结构复杂, 亚基众多, 功能多样的酶, 在水生动物离子转运、酸碱平衡中扮演重要角色, 而 c 亚基是 V-ATPase 众多亚基中最重要的之一。本研究首次克隆获得了中国对虾 V-ATPase c 亚基基因(*FcVHA-c*), 并对该基因功能



进行了初步探究。研究表明, *FcVHA-c* 基因主要在鳃中表达; 高 pH 胁迫抑制 *FcVHA-c* 基因的表达, 且随着 pH 值的增高, 基因表达量降低, 即对该基因的抑制作用越大; 在干扰该基因表达的条件下, 高 pH 胁迫造成了死亡率的显著升高( $P < 0.05$ )。为了更深入的了解 V-ATPase 在中国对虾中的调节机制, 之后我们将继续探索 *FcVHA-c* 基因在高 pH 胁迫下蛋白水平的表达变化规律, 以期对其功能进行深入探索。

### 参考文献:

- [1] Wang F G, Liu J C. Studies on relations between the water environmental factors and diseases of Chinese shrimp[J]. *Donghai Marine Science*, 1992, 10(4): 37-41. [王方国, 刘金灿. 水体环境因子与对虾疾病关系[J]. *东海海洋*, 1992, 10(4): 37-41.]
- [2] Tao Y F, Qiang J, Wang H, et al. Acute toxicity of high pH stress and its effect on enzymes activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(11): 1694-1704. [陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 高 pH 胁迫对克氏原螯虾的急性毒性和鳃、肝胰腺中酶活性及组织结构的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(11): 1694-1704.]
- [3] 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.]
- [4] Henry R P. Functional evidence for the presence of a carbonic anhydrase repressor in the eyestalk of the euryhaline green crab *Carcinus maenas*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(13): 2595-2605.
- [5] Wickins J F. The effect of hypercapnic sea water on growth and mineralization in penaeid prawns[J]. *Aquaculture*, 1984, 41(1): 37-48.
- [6] Li Z D, Li J, Ge Q Q, et al. Molecular cloning and sequence analysis of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger isoform 3 in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression in response to pH stress[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 958-966. [李政道, 李健, 葛倩倩, 等. 中国明对虾 NHE3 基因克隆及其在 pH 胁迫下的表达[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 958-966.]
- [7] Forgac M. Structure and properties of the vacuolar ( $\text{H}^+$ )-ATPases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(19): 12951-12954.
- [8] Yan J J, Chou M Y, Kaneko T, et al. Gene expression of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in zebrafish  $\text{H}^+$ -ATPase-rich cells during acclimation to low- $\text{Na}^+$  and acidic environments[J]. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2007, 293(6): C1814-C1823.
- [9] Zhang L J, Pan L Q, Luan Z H. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 758-764. [张林娟, 潘鲁青, 栾治华. pH 变化对日本囊对虾仔虾离子转运酶活性和存活、生长的影响[J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 758-764.]
- [10] Lucena M N, Pinto M R, Garçon D P, et al. A kinetic characterization of the gill V( $\text{H}^+$ )-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a diadromous palaemonid shrimp[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 15-25.
- [11] Ren Q, Pan L Q, Zhao Q, et al. Ammonia and urea excretion in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 187: 48-54.
- [12] Horng J L, Lin L Y, Hwang P P. Functional regulation of  $\text{H}^+$ -ATPase-rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment[J]. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2009, 296(4): C682-C692.
- [13] Hinton A, Bond S, Forgac M. V-ATPase functions in normal and disease processes[J]. *European Journal of Physiology*, 2009, 457(3): 589-598.
- [14] Di N. Study on the function of subunit c genes of vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase in *Arabidopsis thaliana*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2006. [邸娜. 拟南芥液泡  $\text{H}^+$ -ATPase c 亚基基因功能的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.]
- [15] Xu C X, Zheng L, Gao C Q, et al. Overexpression of a vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase c subunit gene mediates physiological changes leading to enhanced salt Tolerance in *Transgenic tobacco*[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29(2): 424-430.
- [16] Zhou A M, Wu D, Che D D, et al. Cloning of vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase subunit c genes from Japanese iris, and functional characterization in yeast[J]. *Journal of Forestry Research*, 2011, 22(3): 361-366.
- [17] Tyagi W, Rajagopal D, Singla-Pareek S L, et al. Cloning and regulation of a stress-regulated *Pennisetum glaucum* vacuolar ATPase c gene and characterization of its promoter that is expressed in shoot hairs and floral organs[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(8): 1411-1422.
- [18] Baisakh N, RamanaRao M V, Rajasekaran K, et al. Enhanced salt stress tolerance of rice plants expressing a vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase subunit c1 (*SaVHAc1*) gene from the

- halophyte grass *Spartina alterniflora* L6isel[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(4): 453-464.
- [19] Zhou A M. The role of VHA-c subunit in plant growth and salt stress tolerance through modulation of V-ATPase activity and vesicle trafficking[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014. [周爱民. V-H<sup>+</sup>-ATPase c 亚基对植物生长和耐盐性作用机制的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.]
- [20] Monteiro J, Aires R, Becker J D, et al. V-ATPase proton pumping activity is required for adult zebrafish appendage regeneration[J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e92594.
- [21] Lin C C, Lin L Y, Hsu H H, et al. Acid secretion by mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) acclimated to acidic freshwater[J]. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2012, 302(2): R283-R291.
- [22] Ma J W. Physicochemical index analysis of haemolymph and cloning and functional study of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-exchanger and V-ATPase genes in swimming crab (*Portunus trituberculatus*) under different salinity[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016. [马金武. 三疣梭子蟹不同盐度下血淋巴理化指标分析及 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger 和 V-ATPase 基因的克隆和功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.]
- [23] Zare S, Greenaway P. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, and V-ATPase in the freshwater Crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 119(3): 739-745.
- [24] Ha C X, Liu P, He Y Y, et al. Effects of high pH on immune enzymes of "Huanghai No.1" population of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(2): 303-306. [哈承旭, 刘萍, 何玉英, 等. 高 pH 胁迫对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 303-306.]
- [25] Wang Y, Li J, Liu P, et al. The responsive expression of a caspase gene in Chinese shrimp[J]. Aquaculture Research, 2011, 42(8): 1214-1230.
- [26] Fu H J, Zhou A M, Che D D, et al. Cloning and sequence analysis of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit c family from *Iris lactea*[J]. Crops, 2010(3): 60-64. [付慧娟, 周爱民, 车代弟, 等. 马蔺 V-ATPase c 亚基基因家族的克隆及序列分析[J]. 作物杂志, 2010(3): 60-64.]
- [27] Sze H, Schumacher K, Müller M L, et al. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(4): 157-161.
- [28] Arai H, Berne M, Forgac M. Inhibition of the coated vesicle proton pump and labeling of a 17,000-dalton polypeptide by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(23): 11006-11011.
- [29] Uchiyama M, Komiyama M, Yoshizawa H, et al. Structures and immunolocalization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in the gills of blennies (Teleostei: *Blenniidae*) inhabiting rocky intertidal areas[J]. Journal of Fish Biology, 2012, 80(6): 2236-2252.
- [30] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 1998, 10(1): 23-28.
- [31] Arun S, Subramanian P. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 121(3): 273-277.
- [32] Pan L Q, Zhang L J, Liu H Y. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae[J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 711-720.
- [33] Wang L, Wang W N, Liu Y, et al. Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(6): 6427-6438.
- [34] Ali M Y, Pavasovic A, Mather P B, et al. Expression patterns of two carbonic anhydrase genes, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and V-type H<sup>+</sup>-ATPase, in the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, exposed to low pH and high pH[J]. Australian Journal of Zoology, 2017, 65(1): 50-59.
- [35] Havird J C, Henry R P, Wilson A E. Altered expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and other osmoregulatory genes in the gills of euryhaline animals in response to salinity transfer: a meta-analysis of 59 quantitative PCR studies over 10 years[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2013, 8(2): 131-140.
- [36] Weihrauch D. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae)[J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(26): 4623-4631.
- [37] Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D, et al. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: Participation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, V-type H<sup>+</sup>-ATPase and functional microtubules[J]. Journal of Experimental Biology, 2002, 205(18): 2765-2775.
- [38] Gräf R, Harvey W R, Wiczorek H. Purification and properties of a cytosolic V<sub>1</sub>-ATPase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(34): 20908-20913.

[39] Parra K J, Keenan K L, Kane P M. The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cyto-

solic V1 complexes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(28): 21761-21767.

## Expression analysis of V-ATPase subunit c under high pH stress in *Fenneropenaeus chinensis*

HU Shuo<sup>1,3</sup>, HE Yuying<sup>2,3</sup>, LI Jian<sup>2,3</sup>, ZHANG Haien<sup>1,3</sup>, HAN Xu<sup>1,3</sup>

1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Functional Laboratory of Marine Fishery Science and Food Production Process, Qingdao 266071, China;
3. 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

**Abstract:** Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) is a kind of hydrogen ion transport enzyme, in which subunit c plays an important role in maintaining the normal acid-base environment in cells. To investigate the function of the V-ATPase subunit c in *Fenneropenaeus chinensis* under high pH stress, the full-length cDNA of V-ATPase subunit c in *F. chinensis*, named *FcVHA-c*, was first cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). Then, the response of *FcVHA-c* under high pH stress was detected. Subsequently, RNA interference (RNAi) technology was used to verify gene function. The full length of *FcVHA-c* cDNA sequences consisted of 2128 base pairs (bp), including a 483 bp open reading frame (ORF), which encodes a 160-amino acid peptide with four transmembrane domains. The predicted protein molecular weight of the *FcVHA-c* protein was 16 kD, and the theoretical isoelectric point (pI) was 7.82. Homology and phylogenetic analysis showed that the deduced *FcVHA-c* amino acid sequence was highly conservative, had the highest amino acid sequence identity (99%) with *Penaeus vannamei*, and clustered into one group first with *P. vannamei* as well. Results of RT-qPCR showed that *FcVHA-c* was expressed in all tissues of *F. chinensis*, and the expression level in the gills was significantly higher than that in other tissues ( $P < 0.05$ ). Under the stress of pH 8.8, the expression level of *FcVHA-c* reached a peak at 12 h, which was 1.206 times that of the control group, and reached the lowest value at 48 h, which was 0.166 times that of the control group. Under pH 9.2 stress, the expression level of *FcVHA-c* peaked at 1 h. It was 1.577 times that of the control group and reached its lowest value at 12 h, which was 0.104 times that of the control group. The results showed that high pH had a certain inhibitory effect on *FcVHA-c*. Silencing the *FcVHA-c* by RNAi, under the high pH stress, resulted in mortality that was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The results suggested that the *FcVHA-c* may play an important role in ion regulation under the condition of high pH stress, whereas excessive high pH-stress inhibits the ability to regulate *FcVHA-c*.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; V-ATPase; subunit c; high pH stress; RNAi

**Corresponding author:** HE Yuying. E-mail: hey@ysfri.ac.cn