

doi: 10.7541/2016.117

## 罗氏沼虾幼体精氨酸激酶基因的cDNA克隆及其在双顺反子病毒感染后的表达特征

田荣<sup>1</sup> 许婷<sup>2</sup> 潘晓艺<sup>2</sup> 沈锦玉<sup>1,2</sup>

(1. 温州医科大学, 温州 325000; 2. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

**摘要:** 为探求罗氏沼虾精氨酸激酶(*Macrobrechium rosenbergii* arginine kinase, *MrAK*)基因特征和与病毒感染的相关性, 研究通过*AK*基因mRNA全长克隆, 并采用QPCR检测病毒感染前后不同时间点罗氏沼虾幼体*AK*基因的转录差异。最终克隆得到的*AK*序列全长为1740 bp (GenBank: KT970484), 其开放阅读框包含1068个碱基, 编码356个氨基酸; 同源性分析显示*MrAK*基因编码区蛋白与多齿新米虾、南极磷虾、鲑鱼海虱和安氏伪镖水蚤的同源性分别为97%、82%、83%和79%; 系统进化树分析表明, 该基因与多齿新米虾的*AK*聚在同一分支簇, 而蟹、对虾和螯虾聚在另一分支; 氨基酸结构分析表明, 其存在一个可能的ATP: 肌基磷酸转移酶的活性位点(Cys<sup>286</sup>-Pro<sup>287</sup>-Thr<sup>288</sup>-Asn<sup>289</sup>-Leu<sup>290</sup>-Gly<sup>291</sup>-Thr<sup>292</sup>); 病毒感染罗氏沼虾幼体后, 其*AK*基因表达在第9h开始出现显著性上调, 在12h时达到峰值, 随后开始降低。以上研究结果表明, *AK*基因在无脊椎甲壳动物中存在多样性, 其蛋白结构存在保守性, 并且其在罗氏沼虾病毒感染过程中起到潜在的能量供给调节作用。

**关键词:** 罗氏沼虾; 双顺反子病毒; 精氨酸激酶; mRNA表达

**中图分类号:** Q344<sup>+</sup>.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2016)05-0908-06

罗氏沼虾(*Macrobrechium rosenbergii*)又名马来西亚大虾, 淡水长臂大虾, 是世界上最大型的淡水虾之一。我国自1976年引进此虾, 现已广泛养殖于广东、广西、湖南、湖北、江苏、上海、浙江等十多个省市自治区, 具有巨大的经济效益, 其中浙江省是主要苗种养殖区之一。但是近几年, 我国罗氏沼虾苗种培育过程中出现大规模死亡现象, 给罗氏沼虾育苗产业造成了重大的经济损失。2010年和2011年, 90%以上的罗氏沼虾育苗场因幼体相继感染发病而停产, 给罗氏沼虾养殖产业造成致命打击。经研究发现“罗氏沼虾双顺反子病毒”为该病主要病原之一<sup>[1]</sup>, 进化分析表明该病毒与桃拉综合症病毒(*Taura syndrome virus*, TSV)标准株(AF277675)具有较高同源性, 和其他已知的双顺反子病毒科病毒也存在一定同源性。双顺反子病毒主要感染昆虫纲的半翅目、膜翅目、双翅目、鳞翅目、直翅目和甲壳纲的十足目, 包括蜜蜂、蚜虫、玻璃翅叶

蝉、果蝇、红火蚁、对虾和锯缘青蟹等<sup>[2]</sup>。

目前关于双顺反子病毒感染机制的研究较少, Cherry等<sup>[3]</sup>利用DCV感染模式动物果蝇, 发现双顺反子病毒可通过clathrin介导的内吞作用进入细胞。关于罗氏沼虾双顺反子病毒的研究主要集中于组织病理学, 快速检测及诊断技术等方面, 而罗氏沼虾双顺反子病毒感染机制未见报道, 采用RT-PCR和RT-LAMP技术, 罗氏沼虾双顺反子病毒快速检测方法已建立<sup>[4]</sup>。

精氨酸激酶(Arginine Kinase, AK)作为磷酸原激酶家族的一员, 主要分布于无脊椎动物体内, 调节无脊椎动物体内磷酸精氨酸与ATP之间的能量平衡、代谢、储存和利用具有重要作用<sup>[5, 6]</sup>。当无脊椎动物能量产生较多时, AK通过MgATP催化可逆磷酸化精氨酸, 形成磷酸精氨酸和MgADP, 从而在细胞活动暴发需要能量时, AK又将磷酸精氨酸分解产生ATP, 这类似于脊椎动物中的肌酸激酶

收稿日期: 2016-01-26; 修订日期: 2016-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(2013skj002); 农业部公益性行业科研专项(20111103034); 浙江省自然科学基金(LY12C19007)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (2013skj002); Special Research for Agro-scientific Research in the Public Interest (20111103034); the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY12C19007)]

作者简介: 田荣(1990—), 女, 江苏南京人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物病害研究。E-mail: 1109787594@qq.com

通信作者: 沈锦玉, 女, 研究员; E-mail: sjinyu@126.com

反应<sup>[7]</sup>。目前,已在多种甲壳类动物中克隆得到精氨酸激酶基因,包括多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)、南极磷虾(*Euphausia superba*)、鲑鱼海虱(*Lepeophtheirus salmonis*)和安氏伪镖水蚤(*Pseudodiaptomus annandalei*)等。对于精氨酸激酶是否能在罗氏沼虾幼体抗双顺反子病毒过程中起到能量供给的调节作用,目前尚没有研究报道。

本研究通过对罗氏沼虾双顺反子病毒刺激前后的罗氏沼虾幼体构建抑制性消减杂交文库,验证筛选基因,并从中筛选获得与潜在免疫反应相关的精氨酸激酶基因进行研究。在筛选得到AK基因EST序列的基础上,通过RACE PCR技术获得其cDNA全长,并对其进行了序列分析、功能预测和同源性比对,在此基础上,使用Realtime-PCR技术检测双顺反子病毒感染罗氏沼虾幼体的表达变化情况,以探求AK在罗氏沼虾幼体的抗病毒感染中的潜在作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 罗氏沼虾病毒感染

取4500尾左右的罗氏沼虾7日龄(发育第四幼体期)健康幼体(经检测双顺反子病毒为阴性),分成3个组别,即实验组、阴性对照组和空白对照组;每个组别分3个平行组,每组幼体500尾左右。实验组为浸泡感染双顺反子病毒后的幼体,阴性对照组为浸泡感染健康罗氏沼虾幼体提取的上清后的幼体,空白对照组为未浸泡感染的幼体。感染方法:在30℃提取液中浸泡感染10min后,暂养在4 L的海水里,养殖温度为30℃,加氧气泵供氧,随后分别于0、3h、6h、9h、12h、24h和48h采集每个组的幼体约20尾,移入液氮保存。

### 1.2 总RNA提取和双链cDNA合成

采用TRizol法提取罗氏沼虾幼体中总RNA,用Thermo Nano Drop 2000和2000c分光光度计定量,确保提取的RNA  $A_{260}/A_{280}$ 在1.8—2.0,并用变性琼

脂糖凝胶电泳证实其结构完整。按照PrimeScript reagent Kit (TaKaRa)操作说明进行反转录,用于荧光定量,反转录cDNA均稀释10倍。反转录体系为:5×PrimeScript Buffer, 2 μL; PrimeScript RT Enzyme Mix I, 0.5 μL; OligodT Primer (50 μmol/L), 0.5 μL; Random 6 mers (100 μmol/L), 0.5 μL; Total RNA, 500 ng; RNase Free H<sub>2</sub>O加至10 μL。反应条件为:37℃, 15min, 85℃, 5s。

### 1.3 罗氏沼虾AK基因全长cDNA序列克隆

3', 5'-RACE cDNA的合成方法参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit说明书进行。利用Primer Premier 5.0 引物软件,参考筛选得到的EST序列,分别设计3'和5'RACE的内引物。引物交由南京金斯瑞生物公司合成,引物序列见表1。PCR产物目的条带通过胶回收法进行纯化。此过程按照TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0胶回收试剂盒回收PCR产物。再进行TA克隆,选阳性克隆测序。

### 1.4 罗氏沼虾AK基因进化分析及三维结构分析

将获得的罗氏沼虾AK基因全长cDNA序列与GenBank中的核酸数据库进行BLAST分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)。同时将cDNA序列开放阅读框(Open reading frame, ORF)翻译成氨基酸序列后,用MEGA6.0软件对其氨基酸序列进行多重比对和同源性分析。将获得的罗氏沼虾AK和其他物种AK的氨基酸序列进行比对,然后用MEGA6.0软件中Neighbor-Joining Tree绘制系统进化树。

采用SWISS-MODEL软件对罗氏沼虾AK进行蛋白特征和结构预测,并与家蚕及果蝇的AK进行结构对比。

### 1.5 罗氏沼虾AK基因表达分析

AK定量检测引物和内参引物见表1,按照SYBR Premix Ex Taq™试剂盒操作,使用real-time PCR仪(STRATA GENE, Mx3005P)进行实时定量PCR反应。程序为两步法,第一步95℃预变性30s,第二步

表1 引物序列

Tab. 1 Sequence of primers

引物Primer	序列Sequence (5'-3')	扩增片段大小Amplified fragment size (bp)	用途Usage
MrAK1-Q142F <sup>a</sup>	AAGATCAAGGGCAACATCAACGCC	142	qRT-PCR
MrAK1-Q142R <sup>a</sup>	AGGCGCTCTTCATGAGGTTCTCAA	142	qRT-PCR
MR-b-actin-F <sup>b</sup>	CATCACCAACTGGGACGACATGGA	68	内参
MR-b-actin-R <sup>b</sup>	GAGCAACACGGAGTTCGTTGT	68	内参
MrAK-1341R	AGGAGTCCTTCGCATTGAGTTGTG	/	RACE扩增
MrAK-5RACE2	TGCCTGGGGAAAGACCGA	/	RACE扩增
MrAK-3RACE1	ACAAGCATCGCCTGGGTTAC	/	RACE扩增
MrAK-3RACE2	AACCGTCATCATCAGATTTTGC	/	RACE扩增

95℃变性5s, 63℃延伸30s, 第二步循环40次。验证PCR产物扩增特异性由融解曲线(55—95℃)来鉴定。选用 $\beta$ -actin作为内参基因。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法确定AK基因mRNA表达量<sup>[8]</sup>。用统计学软件SPSS17.0中的单向方差分析法(ANOVA)进行分析, 当 $P < 0.05$ 时, 差异显著。

## 2 结果

### 2.1 罗氏沼虾AK基因全长序列的克隆和特征分析

采用RACE PCR技术扩增其5'端和3'端(引物见表1)。经过序列拼接及验证后获得AK全长序列, 提交GenBank(序列号KT970484)。AK基因全长1740 bp, 5'端非编码区(UTR)为102 bp, 3'端非编码区(UTR)为570 bp, 含有完整的Poly A加尾序列AATAA。开放阅读框(ORF)全长1068 bp, 编码356个氨基酸, 预测分子量约为39 kD, 等电点(PI)约为6.17。但不含信号肽和跨膜区。使用ExPASy软件对罗氏沼虾AK预测蛋白进行结构分析和功能预测, 结果显示该基因包含一个ATP: 胍基磷酸转移酶的活性位点(Cys<sup>286</sup>-Pro<sup>287</sup>-Thr<sup>288</sup>-Asn<sup>289</sup>-Leu<sup>290</sup>-Gly<sup>291</sup>-Thr<sup>292</sup>), 6个蛋白激酶C磷酸化位点和6个酪蛋白激酶II磷酸化位点(<sup>63</sup>S-Y-K-D<sup>66</sup>; <sup>89</sup>S-D-M-E<sup>92</sup>; <sup>157</sup>T-G-M-D<sup>160</sup>; <sup>270</sup>S-G-K-D<sup>273</sup>; <sup>304</sup>T-R-G-E<sup>307</sup>和<sup>327</sup>S-E-V-E<sup>330</sup>)。

### 2.2 同源性及进化树分析

Blastx结果显示该基因与目前已报道的相关AK序列高度同源, 选取部分GenBank中的甲壳类动物AK序列进行比对, 用clustal X 1.8软件对其进行核苷酸同源性比对分析, 结果显示罗氏沼虾AK与其他甲壳动物的AK相似性较高, 与所选的基因相似度为79%—97%, 其中与多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)同源性最高, 为97%。

根据同源性比对结果, 使用MEGA6.0软件构建进化树(图1), 结果显示, 罗氏沼虾(HQ191218)的AK与多齿新米虾(AB472045)的AK首先聚类在一起, 然后与鱼虱的AK聚类在一起, 这3个物种的AK与水蚤并列形成一个大的分支, 而蟹、对虾和螯虾的AK基因聚为另一大分支。在分类上, 从亚目层次来说, 关系不大; 和科的关系更为密切。蟹属于腹胚亚目下面的蟹科, 聚成分支A1; 对虾属于枝鳃亚目下面的对虾科, 聚成分支A2; 螯虾属于腹胚亚目下面的螯虾科, 聚成分支A3; 大型溞属于溞科, 聚成分支A4, 这4个分支聚成一个大的分支。水蚤属于水蚤科, 聚成分支B1; 鱼虱属于鱼虱科, 聚成分支B2; 沼虾属于长臂虾科, 聚成分支B3, 这3个聚

成一个大的分支, 最终构成了一个进化树。这说明AK在目分类级别上呈现多样性, 在科分类级别上呈现保守性。

### 2.3 罗氏沼虾AK蛋白结构分析及比对

采用空间结构预测软件SWISS-MODEL对获得的罗氏沼虾AK空间结构进行预测(图2)。罗氏沼虾(KT970484)AK与果蝇(NP\_729446)及家蚕(DQ272299)的AK的空间结构非常的相似。根据SWISS-MODEL软件分析得出: 罗氏沼虾AK由一个小的全 $\alpha$ -螺旋的N端结构域和一个大的C端结构域组成: 8-股反平行 $\beta$ -折叠被7个 $\alpha$ -螺旋包绕着。同样, 果蝇和家蚕AK都是由一个小的全 $\alpha$ -螺旋的N端结构域和一个大的C端结构域组成: 8-股反平行 $\beta$ -折叠被6个 $\alpha$ -螺旋包绕着<sup>[9]</sup>。

### 2.4 罗氏沼虾AK基因在不同时间的mRNA表达差异

为了探讨罗氏沼虾AK基因在罗氏沼虾幼体抗双顺反子病毒感染中的作用, 使用QPCR技术检测罗氏沼虾AK基因在双顺反子病毒感染罗氏沼虾幼体不同时间段(0—48h) mRNA的表达变化谱。结果如图3显示, 双顺反子病毒感染罗氏沼虾幼体后9h、12h和24h表达量显著上调, 其中感染后12h表达量达到峰值, 为阴性对照组的7.7倍( $P < 0.05$ )。而在感染后的3h、6h和48h, 变化不显著。

## 3 讨论

罗氏沼虾是我国重要的淡水养殖虾类品种之一, 但是近年来病害频发, 尤其是育苗产业, 自2010年始暴发罗氏沼虾幼体综合症, 研究表明其主要病原之一为罗氏沼虾双顺反子病毒。罗氏沼虾是无脊椎动物, 不具备获得性免疫。抗病原感染主要依赖于天然免疫, 包括天然体液免疫和天然细胞免疫<sup>[10]</sup>。因此, 筛选获得其免疫抗病相关细胞因子进行深入研究意义尤为重大。

本研究从罗氏沼虾中克隆得到了AK基因, 其全长1740 bp, 可以编码356个氨基酸。通过BLAST同源性及多序列比对分析可以发现, 罗氏沼虾AK基因和其他物种的AK基因同源性比较高, 与安氏伪镖水蚤、多齿新米虾、南极磷虾、鲑鱼海虱等AK基因的同源性均在75%以上。系统进化树显示罗氏沼虾AK与多齿新米虾紧密聚为一支, 与蟹及对虾类亲缘关系也相近。其蛋白空间结构的预测与果蝇、家蚕非常相似。罗氏沼虾、多齿新米虾、鲑鱼海虱等相较于其他动物多出来的氨基酸(AESGKD), 在结构上的影响是少了一个 $\beta$ 折叠, 但

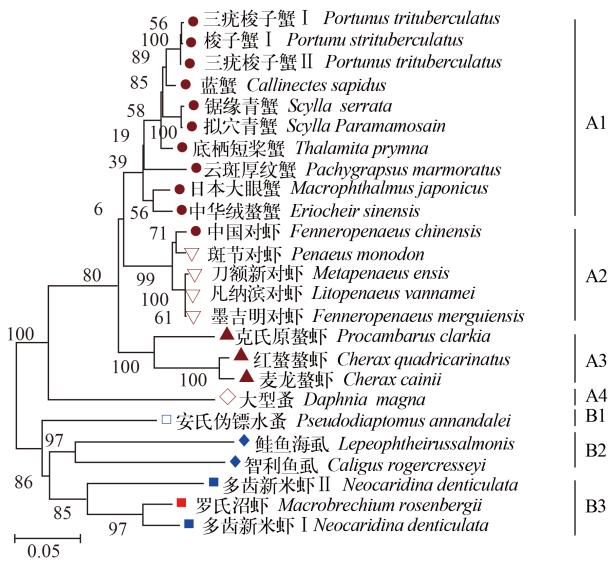


图1 用MEGA6.0软件构建的AK系统进化树

Fig. 1 AK phylogenetic tree constructed by MEGA6.0 software

GenBank 登录号: 三疣梭子蟹 I (HQ185192); 梭子蟹 (JF330792); 三疣梭子蟹 II (JF330791); 蓝蟹 (AF233355); 锯缘青蟹 (GQ851626); 拟穴青蟹 (JN828652); 底栖短桨蟹 (KJ132773); 云斑厚纹蟹 (AF288785); 日本大眼蟹 (KJ653259); 中华绒螯蟹 (GU382901); 中国对虾 (AY661542); 斑节对虾 (GQ246164); 刀额新对虾 (EU497674); 凡纳滨对虾 (EU346737); 墨吉明对虾 (FJ895112); 克氏原螯虾 (JN828651); 澳洲淡水龙虾 (KP299970); 澳洲螯虾 (KP221722); 大型蚤 (KJ944636); 安氏伪镖水蚤 (JX624126); 鲑鱼海虱 (BT077361); 智利鱼虱 (BT076728); 多齿新米虾 II (AB472047); 罗氏沼虾 (HQ191218); 多齿新米虾 I (AB472045)

GenBank accession number: *P. trituberculatus* (HQ185192); *P. trituberculatus* (JF330792); *P. trituberculatus* (JF330791); *C. sapidus* (AF233355); *S. serrata* (GQ851626); *S. paramamosain* (JN828652); *T. prynna* (KJ132773); *P. marmoratus* (AF288785); *M. japonicus* (KJ653259); *E. sinensis* (GU382901); *F. chinensis* (AY661542); *P. monodon* (GQ246164); *M. ensis* (EU497674); *L. vannamei* (EU346737); *F. merguensis* (FJ895112); *P. clarkii* (JN828651); *C. quadricarinatus* (KP299970); *C. cainii* (KP221722); *D. magna* (KJ944636); *P. annandalei* (JX624126); *L. salmonis* (BT077361); *C. rogercresseyi* (BT076728); *N. denticulata* (AB472047); *M. rosenbergii* (HQ191218); *N. denticulata I* (AB472045)

不在活性中心。虽然在氨基酸序列上呈现多样性,但是氨基酸的变化区域都没有出现在AK的活性位点上,说明AK基因在保持多样性的同时在其三维结构上保持高度保守和一致的。

在本研究中,为了探讨AK基因在罗氏沼虾幼体抗双顺反子病毒感染中的作用,使用荧光定量PCR技术对双顺反子病毒感染后不同时间,罗氏沼虾幼体中AK基因表达进行研究,结果表明在感染后0、3h和6h的时候,表达没有显著性差异( $P>0.05$ ),随后表达量显著上调,在12h达到峰值,接着开始下降,到感染后48h回归到初始水平。该结果说明罗氏沼虾AK基因在罗氏沼虾幼体抗双顺反子病毒过程中起到能量供给的调节作用。

本研究在分析罗氏沼虾EST基础上,利用5'RACE法克隆了罗氏沼虾AK cDNA全长,发现其AK酶活性中心功能域氨基酸序列与其他无脊椎动物精氨酸激酶完全一致。精氨酸激酶一般都具有7个氨基酸残基序列(CPTNLGT)组成的酶活性中心区域,由半胱氨酸残基(C)组成的酶活性中心位点<sup>[11, 12]</sup>,这些功能位点具有高度保守性,因此精氨酸激酶在不同甲壳动物中的功能也是高度保守的<sup>[13]</sup>,以及具有能形成离子偶结构的2个氨基酸残基Asp和Arg的典型特征,该离子偶结构对于精氨酸激酶的活性具有重要作用<sup>[14, 15]</sup>。

精氨酸激酶在能量代谢中的作用已经得到广泛证实,最近的研究发现,它还与机体的病原识别、免疫反应<sup>[16-22]</sup>等多种重要的生理过程密切相关。在甲壳动物中,姚翠鸾等<sup>[23]</sup>通过用LPS感染凡纳滨对虾,随后进行RT-PCR实验,发现凡纳滨对虾体内的AK基因和其免疫反应相关;曾勇等<sup>[24]</sup>通过对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)感染螯虾,发现螯虾体内的AK通过产生ATP,提供能量抵御病害的入侵;还有一些研究者

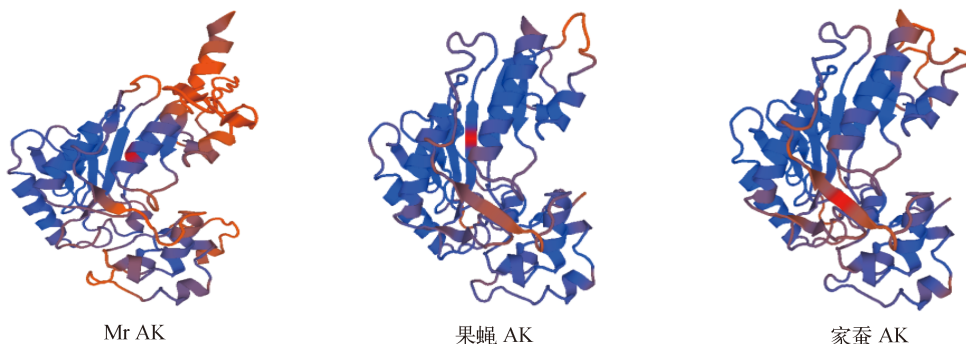


图2 罗氏沼虾、果蝇和家蚕的AK空间预测结构的比较

Fig. 2 Comparison of *M. rosenbergii*, *D. melanogaster* and *B. mori* AK spatial structure prediction

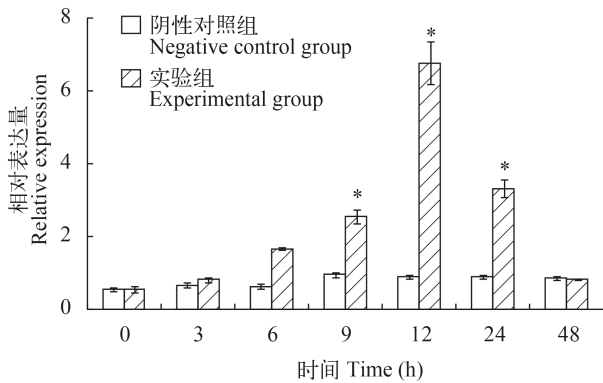


图3 荧光PCR检测Mr AK基因在不同时间的相对表达水平

Fig. 3 Relative expression of *M. rosenbergii* AK gene in different time by Realtime-PCR

通过对对虾免疫调控机理进行研究,发现在受到免疫多糖和病原刺激后,对虾体内的精氨酸激酶表达量发生了明显变化<sup>[23]</sup>。本研究表明,罗氏沼虾体内精氨酸激酶的表达的确受双顺反子病毒感染的影响,可能参与罗氏沼虾幼体抗双顺反子病毒相关反应,是重要的罗氏沼虾抗双顺反子病毒感染相关细胞因子,为进一步深入研究罗氏沼虾和双顺反子病毒感染相互关系及其抗感染机制奠定基础,但是具体相互关系需要进行进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Pan X, Cao Z, Yuan J, *et al.* Isolation and Characterization of a Novel Dicistrovirus Associated with Mortalities of the Great Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, **17**(2): 204
- [2] Zhang D. Establishment and preliminary application of method for rapid detection of *Mud crab dicistrovirus-1* [D]. Thesis for Master of Science. Shanghai Ocean University, Shanghai. 2013 [张迪. 青蟹双顺反子病毒-1快速检测方法的建立及初步应用. 硕士学位论文, 上海海洋大学, 上海. 2013]
- [3] Cherry S, Perrimon N. Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis [J]. *Nature Immunology*, 2004, **5**(1): 81—87
- [4] Pan X Y, Liu D J, Shen J Y, *et al.* Duplex RT-PCR detection and sequences comparison of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and *Macrobrachium rosenbergii* dicistrovirus [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, **21**(6): 996—1002 [潘晓艺, 刘杜鹃, 沈锦玉, 等. 罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒双重RT-PCR检测方法与其序列分析. 上海海洋大学学报, 2012, **21**(6): 996—1002]
- [5] Ellington W R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems [J]. *Annual Review of Physiology*, 2001, (63): 289—325
- [6] Liu C, Zhao P, Liang Y, *et al.* Arginine kinase of *Fenneropenaeus chinensis* and comprehensive effect of white spot syndrome virus structural protein VP31 function research [J]. *Journal of Fisheries*, 2014, **38**(3): 104—110 [刘超, 赵培, 梁艳, 等. 中国明对虾精氨酸激酶与白斑综合征病毒结构蛋白VP31的作用初探. 水产学报, 2014, **38**(3): 104—110]
- [7] Arockiaraj J, Vanaraja P, Easwvaran S, *et al.* Gene profiling and characterization of arginine kinase-1 (MrAK-1) from freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **31**(1): 81—89
- [8] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method [J]. *Nature Protocols*, 2008, **3**(6): 1101—1108
- [9] Pan J C. Studies on the folding and the structure of arginine kinase [D]. Thesis for Doctor of Science. Tsinghua University, Beijing. 2004 [潘继承. 精氨酸激酶的折叠及其部分结构的研究. 博士学位论文, 清华大学, 北京. 2004]
- [10] Iwanaga S, Lee B L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals [J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 2005, **38**(2): 128—135
- [11] Zhou G, Somasundaram T, Blanc E, *et al.* Transition state structure of arginine kinase: Implication for catalysis of bimolecular reactions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(15): 8449—8454
- [12] Uda K, Suzuki T. Role of amino acid residues on the GS region of *Stichopus* arginine kinase and *Danio* creatine kinase [J]. *The Protein Journal*, 2004, **23**(1): 53—64
- [13] Zhang Y C. Gene cloning and expression analysis of odorant receptor and arginine kinase gene from *Helicoverpa assulta* [D]. Thesis for Master of Science. Agricultural University of Henan, Henan. 2011 [张元臣. 烟夜蛾气味受体基因和精氨酸激酶基因的克隆和表达. 硕士学位论文, 河南农业大学, 河南. 2011]
- [14] Fujimoto N, Tanaka K, Suzuki T. Amino acid residues 62 and 193 play the key role in regulating the synergism of substrate binding in oyster arginine kinase [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 2005, **579**(7): 1688—1692
- [15] Takeuchi M, Mizuta C, Uda K, *et al.* Unique evolution of Bivalvia arginine kinases [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**(1): 110—117
- [16] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, *et al.* Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, **19**(4): 317—329

- [17] Rattanarojpong T, Wang H C, Lo C F, *et al.* Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection [J]. *Proteomics*, 2007, **7**(20): 3809—3814
- [18] Abe H, Hirai S, Okada S. Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 2007, **146**(1): 40—46
- [19] García-Orozco K D, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, *et al.* Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2007, **144**(1): 23—28
- [20] Shen Y, Cao M J, Cai Q F, *et al.* Purification, cloning, expression and immunological analysis of *Scylla serrata* arginine kinase, the crab allergen [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, **91**(7): 1326—1335
- [21] Song C, Cui Z, Liu Y, *et al.* Cloning and expression of arginine kinase from a swimming crab, *Portunus striatellus* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(4): 4879—4888
- [22] Wang B, Li F H, Dong B, *et al.* Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, **8**(5): 491—500
- [23] Yao C L, Ji P F, Kong P, *et al.* Arginine kinase of *Litopenaeus vannamei* polyclonal antibody preparation and tissue specific expression analysis [J]. *Journal of Fisheries*, 2009, **33**(6): 1026—1030 [姚翠鸾, 冀培丰, 孔鹏, 等. 凡纳滨对虾精氨酸激酶的多克隆抗体制备及组织特异性表达分析. 水产学报, 2009, **33**(6): 1026—1030]
- [24] Zeng Y, Lu C P. Detection of immune associated genes and analysis of a new serine proteinase inhibitor gene in crayfish *Procambarus clarkia* [J]. *Journal of Fishery Science of China*, 2004, **11**(7): 318—324 [曾勇, 陆承平. 螯虾免疫相关基因的检出及丝氨酸蛋白酶抑制物基因分析. 中国水产科学, 2004, **11**(7): 318—324]

## ARGININE KINASE GENE OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* LARVAE CDNA CLONING AND ITS CHARACTERISTIC EXPRESSION RESEARCH AFTER DICISTRO VIRUS INFECTION

TIAN Rong<sup>1</sup>, XU Ting<sup>2</sup>, PAN Xiao-Yi<sup>2</sup> and SHEN Jin-Yu<sup>1,2</sup>

(1. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

**Abstract:** The current study reported the identification and characterization of arginine kinase (AK) of shrimp *Macrobrachium rosenbergii* (denoted as MrAK). The full length cDNA (1740 bp) of MrAK was identified by SSH cDNA library construction and RACE approaches. Its open reading frame (ORF) was 1068 bp encoding a polypeptide of 355 amino acids. The deduced amino acid of MrAK had a potential ATP: guanidine phosphotransferases active site: (Cys<sup>286</sup>-Pro<sup>287</sup>-Thr<sup>288</sup>-Asn<sup>289</sup>-Leu<sup>290</sup>-Gly<sup>291</sup>-Thr<sup>292</sup>). Homology analysis showed that the putative MrAK shared 97%, 82%, 83% and 79% identities with AKs from *Neocaridina denticulata*, *Euphausia superba*, *Lepeophtheirus salmonis*, and *Pseudodiaptomus annandalei*, respectively. The phylogenetic tree analysis indicated that MrAK was similar to invertebrate AK, suggesting it has high evolutionary conservation. Moreover, the expression of MrAK significantly up-regulated at 9h post-MrDV (*M. rosenbergii* dicistrovirus) immune challenge and reached peak level at 12h post-challenge. These findings suggest that MrAK might involve in host defense system against MrDV infection.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii*; Dicistrovirus; Arginine kinase; mRNA expression