

咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾 $\alpha 2$ -巨球蛋白基因表达的影响

王 佩, 吕 黎, 张哲亮, 吕艳杰, 杨 洪, 宁黔冀*

(河南师范大学生命科学学院,河南 新乡 453002)

摘要:为探讨 KK-42 提高感染嗜水气单胞菌的日本沼虾幼虾成活率的机制,实验首次克隆了 $\alpha 2M$ 部分序列,研究了 $\alpha 2M$ 基因的时空表达以及 KK-42 对其表达和活力的影响。将体长 3.5 ~ 5.0 cm 的日本沼虾幼虾随机分为 2 组,分别用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 溶液和不含 KK-42 的溶液浸泡处理 1 min,12 h 后,每组再分为 2 个亚组,分别向虾腹部注射嗜水气单胞菌菌悬液(菌攻毒实验组和菌攻毒对照组)或生理盐水(实验组-1 和对照组-1),于不同时间点测定幼虾的成活率、 $\alpha 2M$ 基因表达水平和活力的变化。结果显示, KK-42 预处理可显著提高感染嗜水气单胞菌的日本沼虾幼虾成活率。经 BLAST 比对,克隆的 $\alpha 2M$ 部分 mRNA 序列与罗氏沼虾 $\alpha 2M$ 具有 90% 以上同源性。实时荧光定量 PCR 实验显示, $\alpha 2M$ 基因表达水平在血细胞中最高,且以蜕皮前期最为显著。KK-42 处理的幼虾血细胞 $\alpha 2M$ 基因的表达无显著性差异;嗜水气单胞菌刺激使血细胞 $\alpha 2M$ mRNA 水平在 3 h 比 0 h 提高了 580%,其活力在 24 h 增幅为 47.5%;而菌攻毒实验组 mRNA 水平在 6 ~ 48 h 明显高于菌攻毒对照组,尤其在 12 h,增幅为 511%,其活力水平也呈同样的变化趋势。研究表明, KK-42 预处理能上调感染嗜水气单胞菌的幼虾血细胞 $\alpha 2M$ 基因的转录水平,诱导 $\alpha 2M$ 活力增强,这可能增强了幼虾的免疫水平,从而提高成活率。

关键词:日本沼虾;嗜水气单胞菌;KK-42; $\alpha 2$ -巨球蛋白($\alpha 2M$);基因表达

中图分类号: Q 459; S 966.1

文献标志码: A

甲壳动物的免疫防御主要依靠非特异性免疫系统,其中,体液免疫通过血淋巴中的一些非特异性酶或因子来进行,如酚氧化酶原系统(prophenoloxidase system, proPO 系统)、溶血素、凝集素以及蛋白酶抑制剂等。目前已在甲壳动物的血淋巴中发现了多种蛋白酶抑制剂, $\alpha 2$ -巨球蛋白($\alpha 2$ -macroglobulin, $\alpha 2M$)就是其中一种。

研究表明, $\alpha 2M$ 参与控制和调节 proPO 系统^[1],后者与动物体内的黑化反应、细胞毒性反应、细胞粘附、封装和吞噬作用等多种免疫反应有关^[2]。在淡水龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)中, $\alpha 2M$ 通过抑制一种叫做 ppA (proPO-activating enzyme) 的丝氨酸蛋白酶调控 proPO 系统的激活^[3]。另外, $\alpha 2M$ 可能承担着类似调理素 C3 的作用^[4],在马蹄蟹(*Limulus polyphemus*)中, $\alpha 2M$ 与

血浆中的一种富含硅铝的酸性凝集素结合,抑制凝集素的溶血能力和细胞溶解能力^[5]。对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的研究发现, $\alpha 2M$ 还可与同线蛋白(一种在信号转导途径中连接多种分子的衔接蛋白)结合^[6],被白斑综合征病毒感染后, $\alpha 2M$ 与同线蛋白的表达呈显著上调。虽然 $\alpha 2M$ 在甲壳动物免疫过程中详细的分子机制有待更深入研究,但目前的报道显示,其基因表达的上升与动物免疫反应之间存在关联。在日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)^[7]和斑节对虾^[8]中, $\alpha 2M$ 经一种潜在的免疫增强剂——肽聚糖刺激后表达量升高;注射脂多糖后,锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[9]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[10]血细胞中 $\alpha 2M$ mRNA 水平显著升高;细菌、真菌或病毒感染可导致多种虾蟹 $\alpha 2M$ 基因转录上调^[11-13]。

收稿日期:2014-02-28 修回日期:2014-04-14

资助项目:国家自然科学基金(30940008);河南省基础与前沿技术研究项目(142300410021)

通信作者:宁黔冀, E-mail: ningqianji1964@163.com

KK-42 是一种咪唑类物质,常用作昆虫生长调节剂,我们实验室前期研究显示,该物质还可促进凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 幼虾的生长^[14-15],提高其成活率^[16-17]。最新研究发现, KK-42 能显著提高感染嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 幼虾成活率。本研究首次克隆出 $\alpha 2M$ 的部分序列,采用 Real-Time PCR 方法,分析了 $\alpha 2M$ 基因在日本沼虾幼虾中的时空表达以及 KK-42 对其表达的影响,测定了 $\alpha 2M$ 活力水平的变化,进一步分析了日本沼虾成活率与 $\alpha 2M$ 基因表达之间的关系。

1 材料与方法

1.1 日本沼虾成活率的测定

日本沼虾(河南原阳黄寺浴场提供)经实验室适应性暂养后,选取健康幼虾(体长 3.5~5.0 cm) 600 尾,随机分为 KK-42 实验组(KK-42 treatment)和 KK-42 对照组(KK-42 control)。KK-42 实验组用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42(烟台大学应用化学系提供,纯度 $\geq 95\%$) 溶液浸泡处理 1 min^[14],取出迅速控干水分后,投入到水族箱中,按正常方式饲养;KK-42 对照组用不含 KK-42 的溶液处理,方法同上。KK-42 预处理后 12 h,分别向 KK-42 实验组虾腹部血窦注射 20 μ L 浓度为 3.0×10^7 个/mL 的嗜水气单胞菌(新乡医学院细胞工程中心实验室馈赠)菌悬液(菌攻毒实验组, KK-42 treatment-A. *hydrophila*) 或 20 μ L 生理盐水(实验组 - 1, treatment-1); KK-42 对照组按同样方法处理,分为 2 组:菌攻毒对照组(control-A. *hydrophila*) 和对照组 - 1(control-1)。实验设 3 个重复,分别于注射后 0、3、6、12、24 和 48 h 记录各组的累计成活数,计算成活率。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

用 RNAiso Plus(TaKaRa)提取日本沼虾血淋巴、肝胰腺、表皮、鳃、肠、肌肉组织的总 RNA,总 RNA 的完整性和纯度用凝胶电泳检测, RNA 的浓度根据 A_{260} 进行定量。按照 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa)操作说明合成 cDNA 第一链。

1.3 $\alpha 2M$ 基因的克隆与序列测定

根据已知甲壳类巨球蛋白高度保守区域设计简并引物,正向引物为 5'-ATGGGGACTGGAA-CGAGTTG-3',反向引物为 5'-CGAAGAGTGTA-

CGGAAGATT-3'。25 μ L PCR 反应体系: TaKaRa TaqTM (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 3 μ L, dNTP 1.5 μ L, cDNA 1 μ L, 引物各 1 μ L, 用 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 扩增产物进行检测纯化,按照 T₄ DNA Ligase Kit(Promega)要求连接在 pGEM-T 载体上进行转化测序。

1.4 $\alpha 2M$ mRNA 水平的定量测定

实验所用引物为实时定量 PCR 特异性引物,即目的基因 $\alpha 2M$ 正向引物为 5'-ACTTTGG-GCAGCCAGTCAGTG-3',反向引物为 5'-GACG-GTCTTGAAACTAACGGGAG-3';内参基因 18S rRNA 正向引物为 5'-TGTTACGGGTGAC-GGAGAA-3',反向引物为 5'-CATTCCAATTA-CGCAGACTCCGG-3'。Real-Time PCR 按照 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa)要求进行,在 20 μ L 反应体系中依次加入灭菌 ddH₂O 8.8 μ L、2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 8 μ L、ROX Reference Dye 0.4 μ L、正反向引物各 0.4 μ L、cDNA 模板 2.0 μ L,离心,按照两步法 PCR 扩增标准程序进行扩增,PCR 循环条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,循环 1 次;95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s,循环 40 次。实验过程中,血细胞 RNA 的提取和蜕皮周期的鉴定分别依据刘清兰等^[18]和 Cesar 等^[19]的方法。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析,实验所得数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 多重极差检验法统计分析($P < 0.05$)。

1.5 $\alpha 2M$ 活力的测定

日本沼虾幼虾血细胞 $\alpha 2M$ 活力的测定参照 Galván 等^[20]的方法。

2 结果

2.1 KK-42 对感染嗜水气单胞菌的日本沼虾幼虾成活率的影响

在实验期间,对照组 - 1 和实验组 - 1 成活率保持在 90% 以上。注射菌悬液后 48 h 内,菌攻毒对照组成活率迅速下降,而菌攻毒实验组在 12~48 h 与菌攻毒对照组相比成活率呈显著增高,增幅均在 133% 以上,尤其在 12 h 时成活率高达 140% (表 1)。

2.2 血细胞 $\alpha 2M$ 基因部分 mRNA 序列

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检

测,仅出现 1 条与目的产物分子量相近的条带,测序为 1 109 bp(图 1)。序列进行 BLAST 比对,证实为日本沼虾 $\alpha 2M$ 基因部分 mRNA 序列,与罗氏沼虾 $\alpha 2M$ 基因具有 90% 以上同源性,现已在 NCBI 注册(JQ345707)。

2.3 $\alpha 2M$ 基因的时空表达

$\alpha 2M$ 基因在各组织中都有表达,其中,血细胞中 mRNA 水平最高(图 2)。血细胞 $\alpha 2M$ 基因表达水平在蜕皮前期较高,蜕皮后期和蜕皮间期没有显著性差异(图 3)。

表 1 KK-42 预处理的感染嗜水气单胞菌的日本沼虾成活率的变化

Tab.1 The time-course change of the survival rate of KK-42 treated-*M. nipponense* injected with *A. hydrophila*

组别 group	感染后时间/h time post injection				
	3	6	12	24	48
对照组 -1 成活率 control-1	100.0	93.3	93.3	93.3	93.3
实验组 -1 成活率 treatment-1	100.0	100.0	96.7	96.7	96.7
菌攻毒对照组成活率 control- <i>A. hydrophila</i>	86.7	66.7	16.7	10.0	10.0
菌攻毒实验组成活率 KK-42 treatment- <i>A. hydrophila</i>	93.3	83.3*	40.0**	23.3*	23.3*

注:“*”和“**”分别表示与菌攻毒对照组相比,有显著或极显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)

Notes: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control-*A. hydrophila* at the same time

```

1      ATGGGGACTG GAACGAGTTG GATGGGGTCC ATGCTATTGG TAGCCTTCTT CTTTCTGGA
61     GCTTTAGGAA GCTACATGAT TATAATACCA AACTCCTTGG AACTGGGTGG AAAGATGCAA
121    GTCTGCATCA CTGTAGATGA CAACACAGCT CCTGCCGGGA AACTGACGTT CAGCGGGGTT
181    GGACAAAGGT ACATATCCTA CTCAGAACGA AAGGAAAATC CAGATATAGA CGCGGGAGTT
241    GTCGTCTTAC CCACAACGAC AATCGACGTT CCTGTGGGAC GCAAGGACTT CTGCAAAAGAA
301    ATGGGCTCGT CTACCTCGGA ACATTTCCTG CACGATGCAT CTCTGAACAT CCTGGGGGAA
361    ATAGCTGGAG TCAGCGTCAA CTACACAGAG AACATTGAAG TTGAAAACCA GAAGAAAAGTG
421    ACTGTCATAC AGACAGACAA GTACTTATAC CAACCTGGAC AGACGGTGAA GTTTAGGATC
481    CTCACTTTTT CTGGGTCITT CATGGACATA TCGACAAAGA ATTACCCTAT TGTGTGGGTG
541    ACGTCACCC TACAAACAAG GATAGCACAA TGGAGGAATG TCGACAATTC GGACGGCCTG
601    GTTCATCTGG AGATGACGCT GGTGGAGGAG CCCGAAAGAG GTACTTACAG AATTCACGTC
661    CAGAAATGAAG ATTTATCAGA GGAACGACC AACTTCAAAG TGGAGGAGTA TGTTCCTCC
721    CGGTTTCGAG TGACGATCGA GTCTCCAAAG TACGTCCTGT CACGTGATAC CGGCTTCTCC
781    TTCAAAAGTT GTGCTAAGTA TACTTTTGGG CAGCCAGTCA GTGGAGAGTT GTCTGTTAGA
841    ATCAGCAATA ACGGACAGAA GAAATGTTAC ACCACCATAA CACGGAACGA AACATTCAGT
901    GGATGTAAGG AGTTCGAAGT GGTGAACTCG GATATGAGAA CTGTGACTG CAGTATCTAT
961    TCAGTATCCG TCAGAGCCCT GCTTACTGAG GAAGGTACCG GTGTTGAGAT GACACAATCT
1021   TCTAGCATCG AAGTATCGAG GACTCCCGTT AGTTTCAAAG CCGTCTACAA CGATCGATAC
1081   ATGAAGTACA ATCTTCCGTA CACTCTTCG

```

图 1 日本沼虾 $\alpha 2M$ cDNA 部分序列

Fig.1 Part of sequence of $\alpha 2M$ cDNA in *M. nipponense*

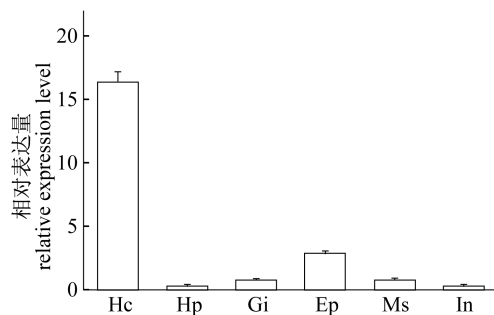


图 2 $\alpha 2M$ 基因在日本沼虾不同组织的表达量

Hc. 血细胞; Hp. 肝胰腺; Gi. 鳃; Ep. 表皮; Ms. 肌肉; In. 肠
 $n = 5$ /组织

Fig.2 Relative mRNA levels of $\alpha 2M$ gene at different tissues in *M. nipponense*

Hc. haemocyte; Hp. hepatopancreas; Gi. gill; Ep. epidermis; Ms. muscle; In. intestine. $n = 5$ /each tissue

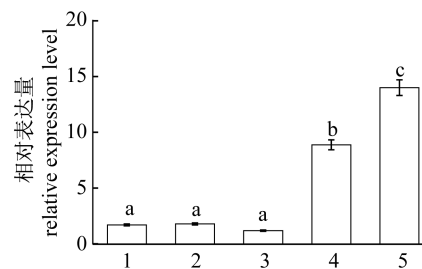


图 3 血细胞 $\alpha 2M$ 基因在日本沼虾各蜕皮阶段的表达量

1, 2. 蜕皮后期; 3. 蜕皮间期; 4, 5. 蜕皮前期
 $n = 5$ /蜕皮阶段; 不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)

Fig.3 Relative mRNA levels of $\alpha 2M$ gene in haemocytes of *M. nipponense* at different molt stages

1, 2. post molt stages; 3. intermolt; 4, 5. premolt

$n = 5$ /each molt stage; Groups with different superscripts are significantly different($P < 0.05$)

2.4 KK-42 和嗜水气单胞菌对日本沼虾血细胞 $\alpha 2M$ 基因表达的影响

在实验观察期间, KK-42 对照组 $\alpha 2M$ mRNA 水平呈明显的波动性变化, 而 KK-42 实验组 $\alpha 2M$ mRNA 水平与之相比无显著性差异(图4), 说明仅用 KK-42 处理对 $\alpha 2M$ 基因的转录影响不大。菌攻毒对照组 $\alpha 2M$ mRNA 水平在 3 h 时升高, 与 0 h 相比升高了 580% ($P < 0.05$), 在 6 h 时恢复到正常水平; 菌攻毒实验组 $\alpha 2M$ mRNA 在 6、12 和 48 h 与菌攻毒对照组比呈显著升高, 尤其在 12 h, 增幅高达 511% (图5)。

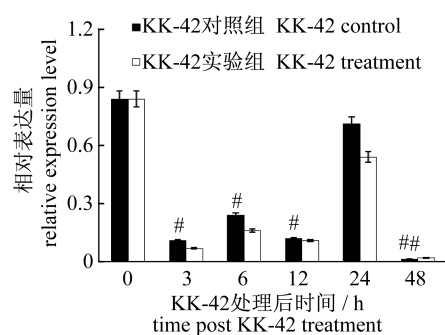


图4 KK-42 处理对日本沼虾血细胞 $\alpha 2M$ 基因表达量的影响 $n = 9$ /组/时间点; 材料取自蜕皮前期幼虾(余同); “#”“##”表示与 0 h KK-42 对照组相比有显著或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

Fig. 4 Effects of KK-42 treatment on transcriptional levels of $\alpha 2M$ gene in haemocytes of *M. nipponense*

$n = 9$ /each group/each time point; Materials are derived from prawns at premolt (The same as the following); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs KK-42 control at 0 h

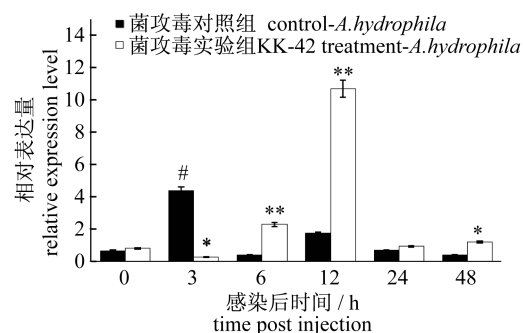


图5 KK-42 预处理对感染嗜水气单胞菌的日本沼虾血细胞 $\alpha 2M$ 基因表达的影响

$n = 9$ /组/时间点; “*”“**”表示与相应菌攻毒对照组相比有显著或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), “#”表示与 0 h 菌攻毒对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Effects of KK-42 pretreatment on $\alpha 2M$ gene expression in haemocytes of *M. nipponense* injected with *A. hydrophila*

$n = 9$ /each group/each time point; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control-*A. hydrophila* at the same time, # $P < 0.05$ vs control-*A. hydrophila* at 0 h

2.5 KK-42 和嗜水气单胞菌对日本沼虾血细胞中 $\alpha 2M$ 活力的影响

实验过程中, KK-42 对照组 $\alpha 2M$ 活力有大幅度波动, 并始终维持在一定的水平, KK-42 实验组 $\alpha 2M$ 活力只在 24 和 48 h 有明显的波动性变化 ($P < 0.05$) (图6)。嗜水气单胞菌能显著提高 $\alpha 2M$ 的活力, 菌攻毒对照组 $\alpha 2M$ 活力仅在 24 h 显著高于 0 h, 菌攻毒实验组 $\alpha 2M$ 活力在 6、12 和 48 h 比菌攻毒对照组明显增高(图7)。

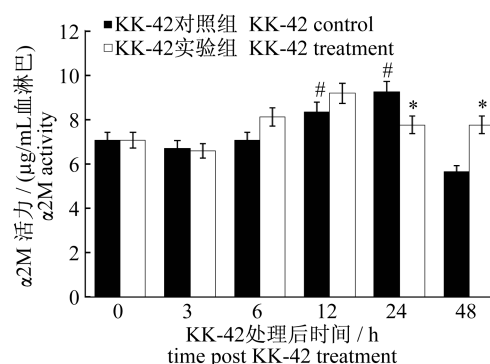


图6 KK-42 处理对日本沼虾血细胞 $\alpha 2M$ 活力的影响 $n = 9$ /组/时间点; “*”表示与 KK-42 对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), “#”表示与 0 h KK-42 对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 6 Effects of KK-42 treatment on $\alpha 2M$ activity in haemocytes of *M. nipponense*

$n = 9$ /each group/each time point; * $P < 0.05$, vs KK-42 control at the same time, # $P < 0.05$ vs KK-42 control at 0 h

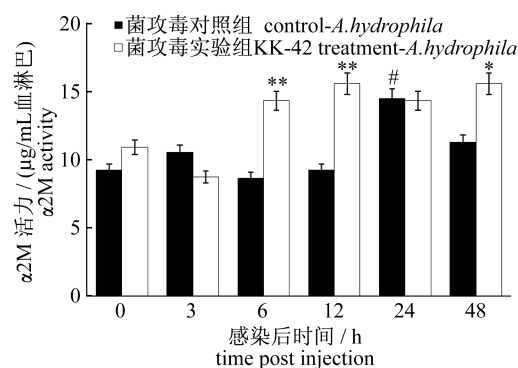


图7 KK-42 预处理对感染嗜水气单胞菌的日本沼虾血细胞 $\alpha 2M$ 活力的影响

$n = 9$ /组/时间点; “*”“**”表示与相应菌攻毒对照组相比有显著或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); “#”表示与 0 h 菌攻毒对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 7 Effects of KK-42 pretreatment on $\alpha 2M$ activity in haemocytes of *M. nipponense* injected with *A. hydrophila*

$n = 9$ /each group/each time point; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control-*A. hydrophila* at the same time, # $P < 0.05$ vs control-*A. hydrophila* at 0 h

3 讨论

日本沼虾是我国重要的淡水养殖品种,在实验室条件下养殖,幼虾死亡率很低。为了探讨 KK-42 对日本沼虾幼虾成活率的影响,采用水体常见致病菌嗜水气单胞菌体内攻毒方法导致幼虾的高死亡率,本实验结果表明,在实验观察期间, KK-42 预处理可使幼虾成活率明显升高。

$\alpha 2M$ 被定义为广泛存在的高分子量蛋白酶抑制剂,通过捕获外源酶和过度激活内源性蛋白酶发挥作用^[1],开放式的血液循环使血细胞能够参与识别、黑化、吞噬等多种生化反应^[2],血细胞内 $\alpha 2M$ 基因表达可能会降低病原体感染对宿主造成的毒害作用^[1,21-22]。本研究中 $\alpha 2M$ 基因转录物在多组织内被检测到,尤以血细胞中最高,与相关报道一致^[7,9]。另外, $\alpha 2M$ 基因的表达水平随蜕皮周期的变化而变化,在蜕皮前期最高,推测原因是在旧外壳的降解和新外壳的形成过程中一些病原体很容易渗入到机体^[23],刺激机体的免疫器官联合抵抗病原体的侵染^[24]。

据报道,多种十足类动物在被细菌、真菌、病毒或微生物组分如肽聚糖、脂多糖感染后会致 $\alpha 2M$ 基因上调^[8,12-13],本实验结果显示,感染嗜水气单胞菌 3 h 后,日本沼虾血细胞 $\alpha 2M$ mRNA 水平明显升高(图 5)。虽然, KK-42 单独处理对幼虾血细胞 $\alpha 2M$ 基因的表达影响不大(图 4),但 KK-42 预处理 + 注射嗜水气单胞菌可显著诱导血细胞 $\alpha 2M$ 基因转录, mRNA 水平在 6、12 和 48 h 时显著升高(图 5);其活力水平也呈相应的变化趋势(图 7)。理论上,真核生物基因的转录是 RNA 聚合酶与顺式作用元件如启动子、增强子等相互作用,并在蛋白质辅助因子的协同下完成,但实验推测, KK-42 可能通过某种途径增强了来自嗜水气单胞菌的肽聚糖或脂多糖对 $\alpha 2M$ 基因转录的调节,使 RNA 聚合酶更有效地结合到基因的启动子上,从而提高转录效率,详细机制有待今后研究。

参考文献:

[1] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates[J]. Immunological Reviews, 2004, 198(1): 116 - 126.
 [2] Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis,

coagulation, melanization and opsonization [J]. Immunobiology, 2006, 211(4): 213 - 236.

- [3] Aspán A, Hall M, Söderhäll K. The effect of endogenous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes [J]. Insect Biochemistry, 1990, 20(5): 485 - 492.
 [4] Ma H, Wang B, Zhang J, et al. Multiple forms of alpha-2 macroglobulin in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and their transcriptional response to WSSV or *Vibrio* pathogen infection [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(6): 677 - 684.
 [5] Swarnakar S, Asokan R, Quigley J P, et al. Binding of $\alpha 2$ -macroglobulin and limulin; regulation of the plasma hemolytic system of the American horseshoe crab, *Limulus* [J]. Biochemical Journal, 2000, 347(3): 679 - 685.
 [6] Tonganunt M, Phongdara A, Chotigeat W, et al. Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 120(2): 135 - 145.
 [7] Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, et al. Molecular cloning and expression analysis of $\alpha 2$ -macroglobulin in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16(5): 599 - 611.
 [8] Lin Y C, Vaseeharan B, Ko C F, et al. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin ($\alpha 2$ -M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(6): 1065 - 1074.
 [9] Vaseeharan B, Lin Y C, Ko C F, et al. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing alpha2-macroglobulin ($\alpha 2$ -M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(1-2): 115 - 130.
 [10] Lu Y K, Sung H J, Liu C L, et al. Differentially enhanced gene expression in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* challenged *in vivo* with lipopolysaccharide [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 100(1): 9 - 15.
 [11] Shanthi S, Vaseeharan B. Alpha 2 macroglobulin gene and their expression in response to GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV pathogens in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* [J]. Aquaculture, 2014, 418 - 419: 48 - 54.
 [12] Qin C J, Chen L Q, Qin J G, et al. Molecular cloning

- and characterization of alpha 2-macroglobulin ($\alpha 2$ -M) from the haemocytes of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2):195 – 203.
- [13] Perazzolo L M, Bachère E, Rosa R D, *et al.* Alpha2-macroglobulin from an Atlantic shrimp: biochemical characterization, sub-cellular localization and gene expression upon fungal challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6):938 – 943.
- [14] Ning Q J, Fu S G, Xu X J, *et al.* A new and practical application of JH antagonist KK-42 to promoting growth of shrimp *Penaeus schmitti* [J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1 – 4):422 – 426.
- [15] Xia X C, Wang W F, Li X, *et al.* The inhibitory effect of juvenile hormone antagonist KK-42 on HMGR expression in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8):1198 – 1203. [夏西超, 王文峰, 李昕, 等. 保幼激素拮抗物 KK-42 对凡纳滨对虾 HMGR 表达的抑制. *水产学报*, 2010, 34(8):1198 – 1203.]
- [16] Ning Q J, Yang H, Cheng H X, *et al.* The application of juvenile hormone antagonist solution to improve the survival rate of aquaculture crustaceans: China, CN200510017350. X[P]. 2005-07-27. [宁黔冀, 杨洪, 程鸿轩, 等. 保幼激素拮抗物溶液及其提高水产养殖甲壳动物成活率方法: 中国, CN200510017350. X[P]. 2005-07-27.]
- [17] Li X, Xia X C, Ning Q J, *et al.* The induction of imidazole derivative KK-42 on heat shock Protein expression in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10):1458 – 1462. [李昕, 夏西超, 宁黔冀. KK-42 对凡纳滨对虾热激蛋白基因表达的诱导作用. *水产学报*, 2011, 35(10):1458 – 1462.]
- [18] Liu Q L, Chen X L, Guo A L, *et al.* An Improved Method of RNA Extraction from *Macrobrachium nipponensis* Haemolymph [J]. *Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition*, 2012, 40(6):134 – 136. [刘清兰, 陈香丽, 郭爱莲, 等. 日本沼虾血淋巴 RNA 提取方法的改进. *河南师范大学学报: 自然科学版*. 2012, 40(6):134 – 136.]
- [19] Cesar J R O, Zhao B P, Malecha S, *et al.* Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle [J]. *Aquaculture*, 2006, 216(2):688 – 694.
- [20] Galván T G, Mundo R R S, Plascencia G Y, *et al.* Purification and characterization of $\alpha 2$ -macroglobulin from the white prawn *Penaeus vannamei* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 134(4):431 – 438.
- [21] Lee S Y, Söderhäll K. Early events in crustacean innate immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5):421 – 437.
- [22] Armstrong P B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense [J]. *Trends in Immunology*, 2001, 22(1):47 – 52.
- [23] Moullac G L, Groumellec M L, Ansquer D, *et al.* Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle; protection against vibriosis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7(4):227 – 234.
- [24] Cheng W, Chen J C. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(1):53 – 63.

Effect of imidazole derivative KK-42 on expression of α 2-macroglobulin in *Macrobrachium nipponense*

WANG Pei, LÜ Li, ZHANG Zheliang, LÜ Yanjie, YANG Hong, NING Qianji *

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: KK-42 pretreatment can promote the survival rate of *Macrobrachium nipponense* infected with *Aeromonas hydrophila*. In order to investigate the possible molecular mechanism of KK-42 action, the partial sequence of α 2M gene was first cloned and the spatio-temporal expression of the gene as well as the effects of KK-42 on its gene expression and activity were measured. The prawns, 3.5 – 5.0 cm long, were soaked for 1 min in KK-42 solution at a concentration of 1.95×10^{-4} mol/L (KK-42 treatment) or 0 (KK-42 control), respectively. The KK-42 treatment group was injected individually with *A. hydrophila* suspension (KK-42 treatment-*A. hydrophila*) or saline (treatment-1) into the ventral sinus at 12 h after KK-42 treatment and the KK-42 control group was divided into groups as control-*A. hydrophila* and control-1, according to the same way. Then the survival rate was surveyed at different time points, and the α 2M mRNA level and activity derived from different tissues were measured. Results showed that the survival rate of KK-42 treatment-*A. hydrophila* dramatically increased by 133% than that of the control-*A. hydrophila* group. Sequence comparison indicated that the α 2M deduced amino acid sequence of *M. nipponense* had an overall similarity of 90% to that of *Macrobrachium rosenbergii*. Real-time PCR analysis revealed that α 2M was mainly expressed in haemocytes, and higher at premolt. Compared with the KK-42 control group, the changes of α 2M mRNA level and activity from KK-42 treatment group were not statistically significant. In control-*A. hydrophila* group, the α 2M gene mRNA level and its activity in haemocytes obviously increased by 580% and 47.5%, respectively, only at 3 and 24 h post-injection compared to 0 h. In KK-42 treatment-*A. hydrophila* group, the α 2M mRNA transcripts were significantly higher at 6 – 48 h and reached the maximum at 12 h with an increase of 511% than that of control-*A. hydrophila* group. The change trend of α 2M activity was basically similar to that of its expression. In conclusion, our present results indicated that KK-42 pretreatment could significantly up-regulate the α 2M gene expression as well as its activity in haemocytes of *M. nipponens* infected with *A. hydrophila*. This might lead to the enhancement of immunity in the prawns, which was likely one of the molecular mechanisms of KK-42 acting for increasing survival rate of the prawns infected with *A. hydrophila*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; *Aeromonas hydrophila*; KK-42; α 2M; gene expression

Corresponding author: NING Qianji. E-mail: ningqianji1964@163.com