

doi: 10.7541/2016.63

低温诱导型凡纳滨对虾DEAD-box RNA解旋酶基因的克隆与表达分析

彭金霞^{1*} 吕丽虹^{2*} 韦嫔媛¹ 何莘萍¹ 陈晓汉¹

(1. 广西水产科学研究院, 南宁 530021; 2. 广西水产技术推广总站, 南宁 530021)

摘要: 为研究凡纳滨对虾耐寒性状的分子基础, 克隆鉴定了凡纳滨对虾DEAD-box RNA解旋酶的同源基因。根据差减文库中筛选到的一个低温上调表达的DEAD-box RNA解旋酶基因片段, 通过RACE PCR扩增获得两条高度相似的cDNA全长序列, 两条cDNA均为1430 bp, 包含139 bp 5'UTR、79 bp 3'UTR和1212 bp 开放阅读框, 编码403个氨基酸残基。Blast比对结果显示, 两条cDNA与其他物种的DDX5相似性最高, 推测为凡纳滨对虾DDX5基因的两个变异体, 分别命名为*LvDDX5variant A (LvDDX5A)*和*LvDDX5variant B (LvDDX5B)*, 在系统进化树中, *LvDDX5A*和*LvDDX5B*聚为最近的一支, 并与虾类DDX5、文昌鱼DDX、贝类的DDX5距离较近。Real-time PCR分析结果显示, *LvDDX5A*和*LvDDX5B*都呈多组织遍在表达, 在精巢、鳃、肠、肌肉和卵巢中, *LvDDX5B*表达量高于*LvDDX5A*, 而在肝胰腺中*LvDDX5A*表达量高于*LvDDX5B*。在低温胁迫对虾肝胰腺和心中, *LvDDX5A*呈上调表达而*LvDDX5B*表达量无明显变化。进一步对*LvDDX5A*在不同低温条件胁迫对虾的肝胰腺中表达变化进行了分析。结果显示, *LvDDX5A*在18℃、15℃、13℃和11℃低温胁迫36h均被诱导表达, 并随着15℃和13℃低温胁迫时间的增加呈先上升后下降的表达模式, 在48h达到峰值, *LvDDX5A*的低温诱导表达模式暗示其可能是在凡纳滨对虾低温适应中发挥作用的剪接体。

关键词: 凡纳滨对虾; 低温诱导; DEAD-box; RNA解旋酶; 耐寒

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2016)03-0474-07

低温诱导型DEAD-box RNA解旋酶(DEAD-box RNA helicase)基因是目前发现在古细菌、原核生物、植物等生物中广泛存在的耐寒调控因子。在对15种嗜热古细菌的比较中发现, 9种具有低温诱导型DEAD-box RNA解旋酶基因的菌种的生存温度明显低于6种不具低温诱导型DEAD-box RNA解旋酶的菌种; DEAD-box RNA解旋酶基因也能使嗜冷古细菌*Methanococcoides burtonii*的生存温度从23℃降低到4℃, 表明DEAD-box RNA解旋酶基因可提高古细菌耐受相对低温的能力, 从而降低其生存温度的下限^[1-4]。通过低温诱导型DEAD-box RNA解旋酶基因的表达提高耐寒能力是也原核生物通用的机制, 如大肠杆菌CsdA和

SrmB、枯草杆菌CshA和CshB、蓝细菌的CrhC等均能通过低温诱导表达提高机体耐寒能力^[5-10], 且大肠杆菌CsdA的研究表明, DEAD-box RNA解旋酶基因通过调控RNA二级结构和翻译过程, 使机体细胞产生对低温环境的适应^[11-15]。

在拟蓝芥(*Arabidopsis*) LOS4基因的研究中则找到了低温诱导型DEAD-box RNA解旋酶基因单核苷酸突变(第五外显子G→A突变, 对应氨基酸突变为Gly₃₆₄→Arg)与耐寒能力的关系。并发现LOS4基因通过诱导CBF等下游效应基因的表达, 提高机体耐寒能力, 使22℃生长的植株在4℃正常生长^[16-18]。另外2个低温诱导型拟蓝芥DEAD-box RNA解旋酶基因AtRH9和AtRH25, 则可以挽救大

收稿日期: 2015-06-24; 修订日期: 2015-12-12

基金项目: 广西壮族自治区直属公益性科研院所基本科研业务费(编号: GXIF-2014-002), 国家自然科学基金项目(编号: 31460690); 八桂学者建设专项资金(编号: BGXZ-NMBDX-05); 现代农业产业技术体系建设专项(编号: CARS-47)资助 [Supported by the Fundamental Research Funds for Nonprofit Research Institutes under Guangxi Zhuang Autonomous Region (Grant No. GXIF-2014-002); the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31460690), the Special Funds for Ba Gui Scholars Project Construction (Grant No. BGXZ-NMBDX-05); the China Agriculture Research System (Grant No. CARS-47)]

作者简介: 彭金霞(1981—), 女, 安徽潜山县人; 遗传学博士; 主要从事水产动物遗传育种与分子辅助育种研究。E-mail: pengjinxia@gmail.com; 吕丽虹(1970—), 女, 广西北流人; 主要从事水产技术推广工作。E-mail: Lvlihong5829857@163.com. *共同第一作者

通信作者: 陈晓汉, E-mail: chnahn@163.com

肠杆菌冷休克蛋白的缺失突变,使其从低温敏感型变为低温耐受型^[19],说明DEAD-box RNA解旋酶基因在提高耐寒能力方面的保守性。

Boudet等^[20]从基因进化角度分析了拟蓝芥和果蝇、线虫等动物在DEAD-box RNA解旋酶基因结构上的异同及基因进化规律,但动物中关于DEAD-box RNA解旋酶基因功能的研究主要涉及细胞增殖、癌症的发生、生殖发育等,目前尚未见与耐寒相关的报道。

凡纳滨对虾是我国主导水产养殖品种之一,但凡纳滨对虾为暖水性物种,耐寒能力差是制约其产业发展的重要原因之一。因此,解析耐寒性状的分子调控机制,通过分子辅助耐寒新品种选育是产业发展的迫切需求^[21, 22]。本研究对差减文库中筛选到一个低温上调表达的DEAD-box RNA解旋酶基因进行了全长序列克隆分析,并对其在低温胁迫条件下的表达特征进行了研究,为进一步开展功能研究和应用于分子辅助耐寒品种选育提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所使用凡纳滨对虾均为广西水产科学研究院下属广西SPF南美白对虾遗传育种中心培育的2—3月龄快速生长期家系对虾,规格8—12 g。将实验对虾运至水族实验室后,在40 cm×160 cm可控温的玻璃容器中通气养殖,水温为28℃,盐度为22‰。暂养7d后随机分为均等的5组,一组保持常温养殖,另外4组根据前期预实验确定的目的温度(18℃、15℃、13℃和11℃)和降温速率(4h/1℃)进行降温。15℃和13℃组降至目的温度后的12h、24h、36h、48h、60h和72h采集对虾的肝胰腺组织,18℃和11℃组仅采集了处理36h对虾肝胰腺。降温处理组及同批次的常温组各取样点分别取3—5尾,采集的组织液氮速冻,随后移入-80℃冰箱中冻存备用。常温组另取对虾的心、鳃、肠、肌肉、精巢、卵巢等组织用于组织表达谱分析。

1.2 实验方法

基因克隆 对低温差减文库测序获得的表达序列(ESTs)用DNAStar软件进行拼接获得Contig,然后进行在线blast同源性比对分析。选择低温表达丰度高的DDX同源片段设计上下游引物WK5F/WK5R。根据定向插入pBluescript II SK载体的SMART全长文库插入位点上下游序列设计M13+/M13-引物。以低温胁迫仔虾SMART全长文库^[23]为模板,用M13+/WK5R和WK5F/M13-引物对

分别进行5'和3'RACE扩增。扩增片段经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后,回收目的片段,克隆至PGEM-Teasy载体,转化Top10感受态细胞后,每个片段挑取10个克隆测序。

序列分析 测序结果去除载体和文库接头序列后,用DNAStar软件中的Seqman程序进行拼接,将拼接后所得序列使用EdiSeq程序进行开放阅读框(ORF)的搜索,使用NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的BLASTX软件进行同源比对并下载相关蛋白序列。

荧光定量PCR 用TRizol试剂盒(Invitrogen公司)进行总RNA的抽提,然后取部分RNA溶液通过紫外分光光度计测定RNA的 A_{260}/A_{280} 的值,判断RNA的纯度并计算其浓度,通过1%的琼脂糖电泳分析RNA的完整性。以Random引物(随机6核苷酸序列, Promega C1181),在M-MLV 逆转录酶作用下反转录合成第一链cDNA,将cDNA产物稀释10倍,以 β -actin基因作内参,采用含SYBR Green I Dye荧光染料的THUNDERBIRD qPCR Mix(TOYOBO)进行荧光定量PCR扩增,仪器为ABI 7500-fast。反应体系: 1.0 μ L cDNA, 10 μ L 2×THUNDERBIRD qPCR Mix, 上下游引物各0.5 μ L, 补足水至总体积20 μ L。扩增程序为: 95℃ 20s预变性; 95℃ 3s、60℃ 30s进行40个循环反应。基因的引物序列见表1, DDX1F2/R2用于扩增LvDDX5A, DDX2F/2R用于扩增LvDDX5B。基因的相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对本试验所得数据进行分析获得^[24]。

表1 引物及序列

Tab. 1 Primer name and sequence

引物名称Primer name	引物序列Primer sequence (5'-3')
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	AAACAGCTATGACCATGATTA
WK5 F	GTGGAGGGTATGGTGGCA
WK5 R	TCATAGGGCTGTCTGGTTG
DDX2F	CTACTTGAAGAGATCATGGCAGAA
DDX2R	CTCATTCGCCTGGTCAAATCG
DDX1F2	GCCAGTTGCTCAATGAGA
DDX1R2	CTCCTCAACCCACGAGTA
BQF	GTGTGACGACGAAGTAGC
BQR	GATACCTCGCTTGCTCTG

2 结果

2.1 LvDDX5基因的克隆与序列分析

通过凡纳滨对虾低温差减文库筛选,获得1条851 bp的低温诱导上调表达型contig序列。Blast比对结果显示,该序列与其他物种的DEAD-box RNA

helicase 基因家族的成员DDX5和DDX17同源性最高。根据已获得的contig序列通过5'和3'-RACE扩增, 分别获得一条300 bp左右的5'片段和一条1.2 kb的3'片段。克隆测序结果显示, 5'片段为342 bp, 3'片段为1252 bp, 且3' 1252 bp序列中存在两种不同的变异体, 两个变异体间除了一个109 bp 片段差异, 其他位置碱基完全一致。将5'序列与两条3'序列分别拼接获得两条cDNA序列, Blast比对结果显示, 两条cDNA与其他物种的DDX5和DDX17相似性都很高, 但blastn和blastx比对结果中, 相似性最高的都是DDX5同源基因, 推测扩增获得的是凡纳滨对虾DDX5的两个变异体, 分别命名为*LvDDX5A* (GenBank登录号: KT122790)和*LvDDX5B* (GenBank登录号: KT122791)。 *LvDDX5A*和*LvDDX5B* cDNA全长均为1430 bp, 包含139 bp 5'UTR、79 bp 3'UTR和1212 bp 开放阅读框, 编码403个氨基酸残基。

然后从GenBank下载不同分类地位物种的同源蛋白序列进行进化树构建。如图1所示, *LvDDX5A*

和*LvDDX5B*聚为最近的一支, 与*LvDDX5*遗传距离较近的分别为虾类DDX5、文昌鱼DDX、贝类的DDX5。昆虫的DDX5和DDX17分别聚为两支, 哺乳动物、鸟类、两栖类和鱼类的DDX5和DDX17分别聚为另外两支, *LvDDX5A*和*LvDDX5B*与哺乳动物、鸟类、两栖类和鱼类的DDX5距离较近, 却与昆虫类的DDX17较近。南美白对虾另一个DEAD-box RNA helicase基因PL10作为外类群, 独立于DDX5和DDX17单独聚为一支。

2.2 *LvDDX5*基因的表达谱分析

根据差异序列分别设计特异于*LvDDX5A*和*LvDDX5B*的两对引物, 比较分析两个变异体的表达模式。首先, 将正常对虾心中的表达量定义为1, 分析组织表达谱, 两个变异体都呈多组织遍在表达, 且在肌肉中表达量最高, 在精巢、卵巢、肠和鳃中表达量较高, 心中最低。比较两个变异体的表达量发现, 在精巢、鳃、肠、肌肉和卵巢中, *LvDDX5B*表达量高于*LvDDX5A*, 而在肝胰腺中*LvDDX5A*表

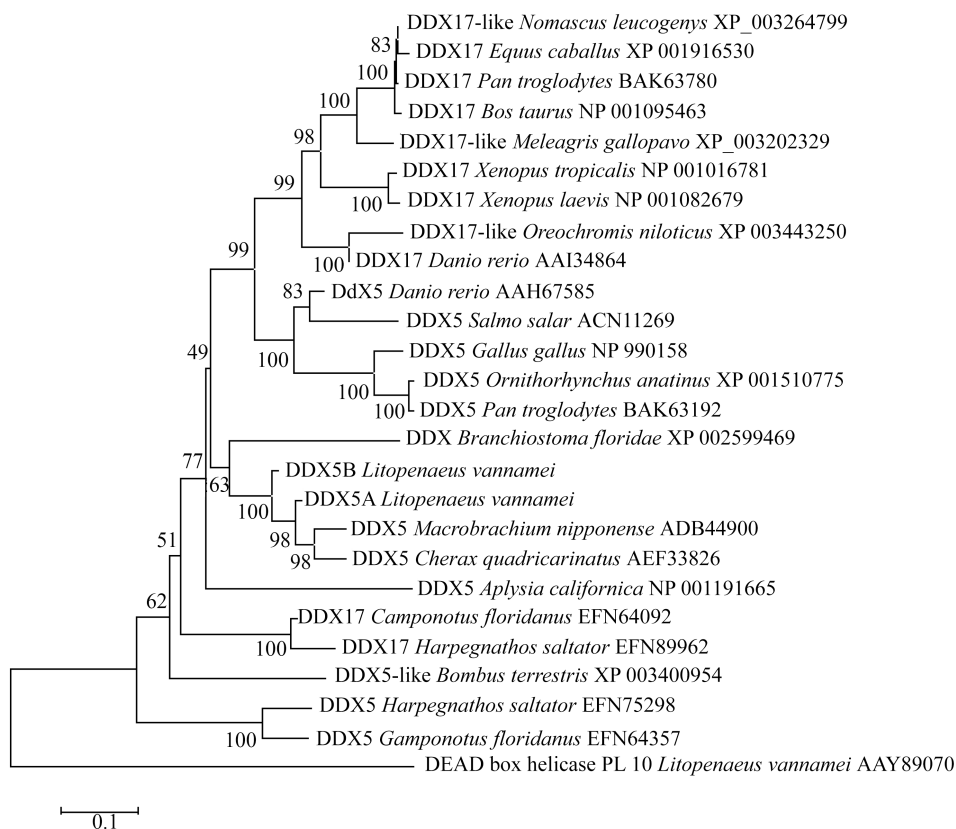


图1 利用MEGA4.1软件构建的基于DDX氨基酸序列的NJ系统树

Fig. 1 NJ tree based on DDX amino acid sequences using MEGA4.1

白颊长臂猿. *Nomascus leucogenys*; 马. *Equus caballus*; 黑猩猩. *Pan troglodytes*; 牛. *Bos taurus*; 火鸡. *Meleagris gallopavo*; 热带爪蟾. *Xenopus tropicalis*; 非洲爪蟾. *Xenopus laevis*; 罗非鱼. *Oreochromis niloticus*; 斑马鱼. *Danio rerio*; 大西洋鲑. *Salmo salar*; 红原鸡. *Gallus gallus*; 鸭嘴兽. *Ornithorhynchus anatinus*; 文昌鱼. *Branchiostoma floridae*; 佛罗里达弓背蚁. *Camponotus floridanus*; 火鸡. *Meleagris gallopavo*; 印度跳蚁. *Harpegnathos saltator*; 加州海兔. *Aplysia californica*; 欧洲熊蜂. *Bombus terrestris*; 佛罗里达弓背蚁. *Camponotus floridanus*; 青虾. *Macrobrachium nipponense*; 红螯螯虾. *Cherax quadricarinatus*

达量高于*LvDDX5B* (图 2)。

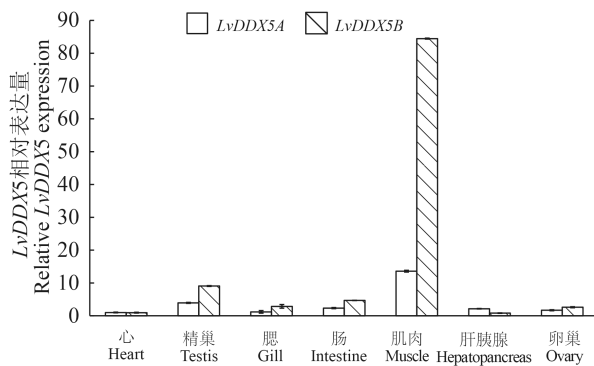


图 2 *LvDDX5*基因在不同组织中的相对表达分析

Fig. 2 The expression of *LvDDX5* gene in different tissues

然后选择在低温胁迫应答中比较重要的组织肝胰腺、心、鳃和肌肉进行两个变异体的低温表达分析。结果如图 3所示, *LvDDX5A*在肝胰腺和心中呈低温上调表达, 在肌肉和鳃中下调表达, 而*LvDDX5B*在低温胁迫对虾肝胰腺和心中表达量无明显变化, 在肌肉和鳃中下调表达。

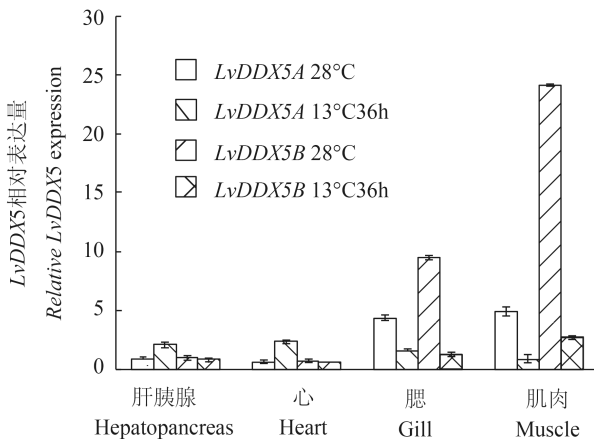


图 3 *LvDDX5*基因在不同组织中的低温表达分析

Fig. 3 The expression of *LvDDX5* gene in different tissues under 13°C cold stress

进一步对*LvDDX5A*在不同低温条件胁迫对虾的肝胰腺中表达变化进行了分析。首先, 在不同强度的低温胁迫下, *LvDDX5A*均被诱导表达, 18°C、15°C、13°C和11°C低温胁迫36h的表达量分别为常温的2.3、1.5、2.1和1.9倍。然后分析了15°C和13°C低温胁迫不同时间下的表达变化。在15°C和13°C低温胁迫的各时间点*LvDDX5A*的表达量均高于常温对照, 两组都随着处理时间的增加呈先上升后下降的表达模式, 且都在48h达到峰值(15°C组: 常温的3.1倍; 13°C组: 常温的5.2倍)(图 4)。

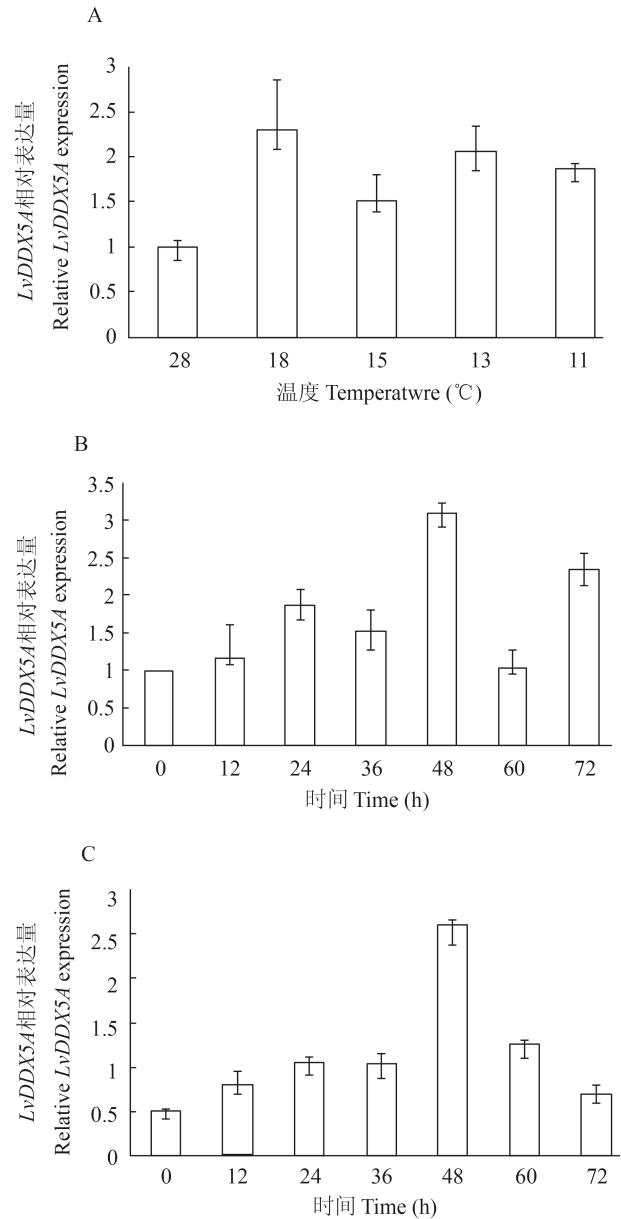


图 4 *LvDDX5A*在肝胰腺中的低温表达分析

Fig. 4 The expression of *LvDDX5A* under cold stress

A. 不同低温条件处理36h对虾; B. 15°C低温处理不同时间; C. 13°C低温处理不同时间

A. *LvDDX5A* mRNA levels in the hepatopancreas of the control (28°C) and exposures at 18°C, 15°C, 13°C and 11°C for 36h; *LvDDX5A* expression trends in the hepatopancreas from 0 to 72h at 15°C (B) and 13°C (C)

3 讨论

3.1 *LvDDX5*基因序列特征分析

DEAD-box RNA解旋酶基因(DDX)是RNA解旋酶的一个亚家族, 具有与ATP水解相关的Asp-Glu-Ala-Asp结构域和保守的催化结构域, 而其他侧翼序列在不同的DEAD-box RNA解旋酶家族成员之间差异很大, 以适应不同功能^[25]。在细胞活动中,

RNA分子容易形成非功能性的二级结构,往往需要在分子伴侣的协助下形成正确的二级结构才能发挥功能。在逆境胁迫条件下,细胞中的翻译起始受阻,导致更多的错误的mRNA二级结构形成,而这些二级结构反过来进一步抑制了翻译活动。DEAD-box RNA解旋酶是一类重要的分子伴侣,它们可借助ATP水解释放的能量解开mRNA错误二级结构,引导正确结构的形成,从而启动低温下的正常翻译活动^[10, 14]。DEAD-box RNA解旋酶基因还可以通过激活转录因子和通过自身磷酸化在转录或翻译水平调控下游低温效应基因的表达^[16, 17, 26]。

Blast比对结果表明, *LvDDX5*与*DDX5*、*DDX17*的相似性都很高,但与*DDX5*的相似性最高。*DDX5*和*DDX17*在其核心催化结构域具有92%相似性,在N端和C端可变区仍有72%和44%相似性,两个基因均具有RNA解旋酶活性并参与基因剪接和转录调控^[27]。在系统进化树中, *LvDDX5A*和*LvDDX5B*与哺乳动物、鸟类、两栖类和鱼类的*DDX5*距离较近,却与昆虫类的*DDX17*较近,因此,通过序列比对推测本研究克隆的是凡纳滨对虾*DDX5*直系同源基因,但从进化分析结果难以确定*LvDDX5*到底是*DDX5*还是*DDX17*,这可能是因为无脊椎动物中*DDX5*/*DDX17*同源基因序列还不够多,而两个基因的相似性又很高,导致进化分析聚类时出现偏差。

基因的选择性剪接是转录后调控的重要部分,在生物的逆境适应中被广泛应用,逆境下选择性剪接使蛋白的定位、结合特性、活性及稳定性发生改变,从而适应新的环境^[28]。在斑马鱼的低温转录组研究中,作者发现197个功能基因在低温胁迫时发生了选择性剪接,主要涉及蛋白酶、转录调控因子、剪接调控因子和抗病因子等^[29]。DEAD-box RNA解旋酶是一类重要的低温转录调控因子,很可能通过选择性剪接实现功能,在斑马鱼中, *DDX5*基因也在编码区的3'端发生选择性剪接,产生2条mRNA序列(NM_212612, NM_001309525),但两个剪接体的具体功能分歧尚未见报道。通过*LvDDX5*基因两个变异体的序列比较分析,推测109 bp外显子的选择与其耐寒功能相关, *LvDDX5A*在肝胰腺和心中呈低温诱导表达,而*LvDDX5B*在低温下表达无上调,因此*LvDDX5A*变异体可能在凡纳滨对虾的耐寒中发挥作用。

3.2 *LvDDX5*基因的表达特征分析

各物种的研究结果均显示,低温诱导上调表达是RNA解旋酶基因发挥功能提高机体耐寒能力的基础^[2, 15]。为了解*LvDDX5A*基因在对虾低温适应

中的可能作用,本研究通过荧光定量PCR对其低温表达谱进行了详细的分析。根据预实验对虾的低温行为反应,本研究设置了一系列低温胁迫条件和取样点,如18℃虽然已经低于对虾适宜生存温度,但并不影响其活动,摄食也基本正常,推测不会引起基因表达的变化,因而只设置一个取样点;在15℃低温时,对虾摄食明显减少且活动减弱,在13℃低温胁迫后,对虾聚集于缸底活动很少,少数个体身体失去平衡呈侧躺状态,15℃和13℃低温对对虾造成了较明显的行为影响,但在其可忍受的范围内,推测此时基因的表达调控起到重要作用,因此设置了不同胁迫时间的取样点进行基因表达量分析;而当温度降到11℃时,对虾全部侧躺,活动微弱,部分个体在胁迫36h死亡,低温对大部分虾体造成不可逆损伤,推测此时对虾应难以通过调整自身的基因表达应对低温。但*LvDDX5A*基因的低温表达谱结果与我们的推测不尽相同, *LvDDX5A*基因在较低强度低温(18℃)胁迫时即上调表达,并在11℃极度低温时仍维持与13℃基本相当的高表达水平。

在甲壳动物中,肝胰腺是反应机体健康、营养、疾病、重金属积累等状况的重要器官^[30],而且*LvDDX5*基因也呈现肝胰腺低温诱导表达现象,因此本研究着眼于肝胰腺中基因表达的量的变化,而肌肉和鳃中的下调表达可能与基因的多功能性相关。*LvDDX5A*和*LvDDX5B*呈现不同的表达模式可能与两个剪接体功能的分歧有关,如在高山离子芥中发现,DEAD-box RNA解旋酶基因*CbGRP*通过选择性剪接产生mRNA *CbDRH.2*和*CbDRH.1*,其中*CbDRH.2*可与已知的低温效应蛋白结合参与提高耐寒性状,而*CbDRH.1*则参与无义介导的mRNA降解^[31]。15℃和13℃低温处理不同时间的表达谱分析表明, *LvDDX5A* mRNA都是呈先上升后下降,并在低温下一直维持高表达水平,与已报道的低温应答基因*AtRH9*、*RCF1*、*CBF2*、*RD29A*等的表达模式相一致^[18, 19, 32]。*LvDDX5A*的表达模式也与实验中观察到的对虾状态一致,在15℃和13℃低温处理组,开始低温胁迫时对虾活动很少且侧躺的个体较多,随着胁迫时间延长,13℃组对虾基本都能逐渐恢复直立状态,而15℃组对虾能恢复到正常游泳状态。可能因为低温胁迫早期,细胞需要大量合成*LvDDX5A* mRNA并不断翻译成蛋白,纠正低温引起的RNA错误折叠,而随着低温胁迫时间的延长,细胞中翻译等活动新的稳态逐渐建立, *LvDDX5A* mRNA表达量逐渐降低并维持在较高水平以维护细胞低温条件下的正常翻译活动。

参考文献:

- [1] Shimada Y, Fukuda W, Akada Y, *et al.* Property of cold inducible DEAD-box RNA helicase in hyperthermophilic archaea [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, **389**(4): 622—627
- [2] Lim J, Thomas T, Cavicchioli R. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, **297**(3): 553—567
- [3] Fukui T, Atomi H, Kanai T, *et al.* Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *The rmococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes [J]. *Genome Research*, 2005, **15**(3): 352—363
- [4] Boonyaratanakornkit B B, Simpson A J, Whitehead T A, *et al.* Transcriptional profiling of the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* in response to lethal heat and non-lethal cold shock [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(6): 789—797
- [5] Cartier G, Lorieux F, Allemand F, *et al.* Cold adaptation in DEAD-box proteins [J]. *Biochemistry*, 2010, **49**(12): 2636—2646
- [6] Hunger K, Beckering C L, Wiegshoff F, *et al.* Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(1): 240—248
- [7] Owtrim G W. RNA helicases and abiotic stress [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34**(11): 3220—3230
- [8] Yu E, Owtrim G W. Characterization of the cold stress-induced cyanobacterial DEAD-box protein CrhC as an RNA helicase [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**(20): 3926—3934
- [9] Broussolle V, Pandiani F, Haddad N, *et al.* Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature [J]. *FEMS Microbiology Letters*, **306**(2): 177—183
- [10] Chamot D, Owtrim G W. Regulation of cold shock-induced RNA helicase gene expression in the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(5): 1251—1256
- [11] Jones P G, Mitta M, Kim Y, *et al.* Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, **93**(1): 76—80
- [12] Charollais J, Pflieger D, Vinh J, *et al.* The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, **48**(5): 1253—1265
- [13] Prud'homme-Genereux A, Beran R K, Iost I, *et al.* Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a cold shock degradosome [J]. *Molecular Microbiology*, 2004, **54**(5): 1409—1421
- [14] Chamot D, Colvin K R, Kujat-Choy S L, *et al.* RNA structural rearrangement via unwinding and annealing by the cyanobacterial RNA helicase, CrhR [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(3): 2036—2044
- [15] Charollais J, Dreyfus M, Iost I. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**(9): 2751—2759
- [16] Vashisht A A, Tuteja N. Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2006, **84**(2): 150—160
- [17] Gong Z, Lee H, Xiong L, *et al.* RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(17): 11507—11512
- [18] Gong Z, Dong C H, Lee H, *et al.* A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(1): 256—267
- [19] Kim J S, Kim K A, Oh T R, *et al.* Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions [J]. *Plant Cell Physiology*, 2008, **49**(10): 1563—1571
- [20] Boudet N, Aubourg S, Toffano-Nioche C, *et al.* Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila* [J]. *Genome Research*, 2001, **11**(12): 2101—2114
- [21] Peng J X, Fang Z F, Wei P Y, *et al.* Sequence and expression analysis of metallothionein from *Litopenaeus vannamei* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(4): 24—28 [彭金霞, 房振峰, 韦媛媛, 等. 凡纳滨对虾MT基因序列及其在卵巢发育和低温胁迫中的表达分析. 水生生物学报, 2013, **37**(4): 24—28]
- [22] Yin Q, Cui L, Peng J X, *et al.* Molecular cloning of *LVANT2* gene and its expression pattern by cold induction [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(1): 678—683 [殷勤, 崔亮, 彭金霞, 等. 凡纳滨对虾ANT2基因的克隆及低温表达谱分析. 水生生物学报, 2012, **36**(1): 678—683]
- [23] Peng J, Fang Z, Wei B, *et al.* Analysis of A cDNA library and 3 copies of troponin i genes in juvenile pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to low temperature [J]. *Fisheries Science*, 2013, **32**(2): 73—79
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [25] Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, *et al.* DEAD-box

- RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs [J]. *Nature Cell Biology*, 2007, **9**(5): 604—611
- [26] Intile P J, Balzer G J, Wolfgang M C, *et al.* The RNA helicase DeaD stimulates ExsA translation to promote expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, **197**(16): 2664—2674
- [27] Fuller-Pace F V. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34**(15): 4206—4215
- [28] Mastrangelo A M, Marone D, Laido G, *et al.* Alternative splicing: enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity [J]. *Plant Science*, 2012, **185**—**186**: 40—49
- [29] Long Y, Song G I, Yan J J, *et al.* Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish [J]. *BMC Genomics*, 2013, **14**: 612
- [30] Guo T F, Huang X X, Su M, *et al.* Effect of dietary copper level on the immunity, vibrio-resistant ability, lysozyme mRNA and toll receptor mRNA expressions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 809—816 [郭腾飞, 黄旭雄, 苏明, 等. 饲料中铜水平对凡纳滨对虾免疫相关基因表达和抗菌能力的影响. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 809—816]
- [31] Yang Y, Sun Z L, Ding C C, *et al.* A DEAD-box RNA helicase produces two forms of transcript that differentially respond to cold stress in a cryophyte (*Chorispora bungeana*) [J]. *Planta*, 2014, **240**(2): 369—380
- [32] Guan Q M, Wu J M, Zhang Y Y, *et al.* A DEAD Box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2013, **25**(1): 342—356

CLONING, CHARACTERIZATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF A COLD-INDUCIBLE DEAD-BOX RNA HELICASE GENE IN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

PENG Jing-Xia¹, LÜ Li-Hong², WEI Pin-Yuan¹, HE Ping-Ping¹ and CHEN Xiao-Han¹

(1. Guangxi Academy of Fisheries Science, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Fisheries Extension Center, Nanning 530021, China)

Abstract: Cold-inducible DEAD-box RNA helicases are conservative regulator of cold tolerance in archaea, prokaryote and eukaryote. We have got a cold-inducible DEAD-box RNA helicase EST from cold tolerant shrimps. In this study, two cDNA sequence of the DEAD-box RNA helicase gene were obtained by RACR PCR. The two cDNAs were 1430 bp in length including a 139 bp 5'UTR, a 79 bp 3'UTR and a 1212 bp open reading frame, encoding a peptide of 403 aa. Blast analysis showed that the two cDNAs had top hit of DDX homologous, thus named *LvDDX5 variant A* (*LvDDX5A*) and *LvDDX5 variant B* (*LvDDX5B*). Phylogenetic analysis revealed that *LvDDX* was related closely to shrimp DDX5, *Branchiostoma floridae* DDX and *Aplysia californica* DDX5. *LvDDX5A* and *LvDDX5B* were widely expressed, and *LvDDX5B* was higher in testis, gill, intestine, muscle and ovary, whereas *LvDDX5A* was higher in hepatopancreas. *LvDDX5A* but not *LvDDX5B* was up-regulated in hepatopancreas and heart by cold induction. *LvDDX5A* can be induced by various low temperatures including 18, 15, 13 and 11°C. With different time treatment at 15 and 13°C, *LvDDX5A* increased firstly, reached to the peak at 48h, and decreased afterward. These results suggest that *LvDDX5A* may play an important role in cold tolerance of *Litopenaeus vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; Cold-inducible; DEAD-box; RNA helicases; Cold tolerant