

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2015.06.015

· 研究简报 ·

斑节对虾过氧化氢酶基因全长 cDNA 克隆及表达分析

傅明骏, 赵超, 杨其彬, 周发林, 江世贵, 邱丽华

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300)

摘要: 过氧化氢酶(catalase, CAT)是一种重要的抗氧化酶,防止过氧化氢对机体的氧化应激。该研究以斑节对虾(*Penaeus monodon*)肝胰腺转录组中筛选获得的CAT基因片段为基础,利用RACE技术获得斑节对虾CAT基因(*PmCAT*)cDNA全长。该基因cDNA全长为1 909 bp,开放阅读框为1 563 bp,编码520个氨基酸。*PmCAT*推导的氨基酸序列与其他动物氨基酸序列具有高度的一致性。实时定量PCR结果显示,*PmCAT*基因在斑节对虾的不同组织中均有表达,其中在鳃的表达量最高,肝胰腺和胸神经次之。在硫酸铜(CuSO_4)胁迫下,*PmCAT*基因在肝胰腺中的表达量显著下调($P < 0.05$),在第24和第48小时恢复正常表达量;在pH 7.0胁迫下,*PmCAT*表达量在第12小时升高达最大值($P < 0.05$),然后恢复到正常水平;在pH 9.0胁迫下,*PmCAT*基因表达显著低于正常组($P < 0.05$)。研究表明,*PmCAT*基因参与斑节对虾氧化应激和对环境毒理的适应性反应。

关键词: 斑节对虾;过氧化氢酶;硫酸铜胁迫;pH胁迫

中图分类号: S 917

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2015)06-0107-07

cDNA cloning and expression analysis of catalase from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

FU Mingjun, ZHAO Chao, YANG Qibin, ZHOU Falin, JIANG Shigui, QIU Lihua

(Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Catalase (CAT) is an antioxidant enzyme and plays an important role in protection against oxidative stress by scavenging hydrogen peroxide (H_2O_2). We obtained the full-length cDNA sequence of CAT from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) (denoted as *PmCAT*) by transcriptome sequencing and RACE-PCR. The full-length cDNA of *PmCAT* was 1 909 bp, including an open reading frame (ORF) of 1 563 bp encoding a polypeptide of 520 amino acids, a 5'UTR of 134 bp and a 3'UTR of 212 bp. Blast and phylogenetic analyses suggest that *PmCAT* is a CAT family member. The expression of *PmCAT* mRNA showed a declining trend under the stress of CuSO_4 ($P < 0.05$), and then recovered to normal at 24th hour and 48th hour, being the highest in gill, and then in hepatopancreas and thoracic nerves. Under the stress of pH 7.0, *PmCAT* expression reached the maximum at 12th hour ($P < 0.05$); under the stress of pH 9.0, the expression of *PmCAT* declined ($P < 0.05$). The results reveal that *PmCAT* plays a significant role in adaptive response to conditions of oxidative stress and environmental toxicity.

Key words: *Penaeus monodon*; catalase; CuSO_4 stress; pH stress

收稿日期: 2015-07-21; 修回日期: 2015-08-17

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-47); 国家自然科学基金项目(31101903); 海南省自然科学基金项目(313117); 广东省科技计划项目(2013B040402016); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201300B03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2014TS12)

作者简介: 傅明骏(1983-), 男, 博士, 助理研究员, 从事海洋生物功能基因的研究。E-mail: Fu.mj@scsfri.ac.cn

通信作者: 邱丽华(1971-), 女, 博士, 研究员, 从事海洋生物功能基因的研究。E-mail: qiu902@126.com

过氧化氢酶(catalase, CAT, EC 1.11.1.6)是生物机体中重要的抗氧化酶,能催化具有高氧化活性的过氧化氢(H_2O_2)分解为水(H_2O)和氧气(O_2),从而保护机体免受氧化损伤。根据过氧化氢酶的功能和结合金属离子可分为三类:锰型过氧化氢酶,过氧化氢-过氧化物酶(catalase-peroxidases, CAT-POD)和单功能过氧化氢酶。甲壳动物中发现的过氧化氢酶都属于单功能过氧化氢酶,由同源四聚体组成,每个亚基都含有一个血红素辅基的活性位点,以铁卟啉形式存在,此外,每个亚基还有还原型辅酶 II(NADPH)位点;参与甲壳动物对病原体免疫,环境理化因子及毒理应激等^[1-6]。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)在病原体入侵、环境毒理、环境因子变动下,机体能产生大量的活性氧(ROS),从而诱导机体的抗氧化防御。CAT作为重要的抗氧化酶参与了斑节对虾对病原体免疫应答^[7-8],环境毒理应答^[9-11],环境理化因子变化应答^[12-13]。

斑节对虾 CAT 基因(*PmCAT*)的部分片段在斑节对虾各种转录组测序过程中陆续获得,但迄今为止,尚未克隆到其全长序列^[14-15]。该研究以 RACE-PCR 技术成功获得了斑节对虾 CAT 基因 cDNA 全长序列,并对其进行生物信息学分析,通过实时定量 PCR 技术研究了 *PmCAT* 基因在斑节对虾各组织中的表达分布,及在硫酸铜($CuSO_4$)、海水 pH 7.0、pH 9.0 的环境下 *PmCAT* 基因表达变化规律,为进一步阐明斑节对虾抗氧化防御机制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用斑节对虾为中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地养殖,体质量 15~20 g。含 $7.73\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $CuSO_4$ 、pH 7.0 或 pH 9.0 的海水每天换水 2 次,养殖 6 h、12 h、24 h、48 h 和 96 h 后分别取样($n=3$),保存在 RNAlater 溶液中,以正常组作为对照。并取正常组的心、胸神经、卵巢、精巢、淋巴器官、肝胰腺、肌肉、脑神经、鳃组织保存于 RNAlater 溶液中。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 提取和逆转录 根据 TRIzol 说明书提取斑节对虾各组织、胁迫应激不同时间的肝胰腺组织 RNA。用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,利用核酸蛋白分析仪 Nanodrop2000 进行浓度检测。各取 3 μg 肝胰腺 RNA 用 SMARTTM RACE cDNA Kit (Clontech) 进行逆转录合成 cDNA 和 3' RACE cDNA,用于基因片段的验证及基因全长的扩增。取 1 μg 各样本 RNA,用 PrimeScript^{RT} Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 进行逆转录合成 cDNA,用于基因相对表达量检测。

1.2.2 *PmCAT* 基因全长扩增 以斑节对虾肝胰腺转录组筛选获得 *PmCAT* 基因部分序列为基础,设计 3' RACE 引物(CAT-rF1: ATGCTGCTAACATCCGCCGTGC 和 CAT-rF2: GC-

CTTAGCTGCATCAAGCAATGG)。以斑节对虾 3' RACE cDNA 为模板,根据试剂盒说明书扩增 *PmCAT* 基因 3' cDNA 片段,用 head to toe PCR (CAT-head: AGTCACTCGGTCCTCTGATTACAGTCC 和 CAT-toe: TCACAAAGAAGCCCCATATCA-CAATC)验证 *PmCAT* 基因开放阅读框序列,用 1% 的琼脂糖凝胶检测产物,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对目的条带进行分离和割胶回收。目的片段与 pMD18-T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,重组转化,挑取阳性克隆进行测序。

1.2.3 序列及系统发生分析 利用 NCBI 数据库 Blast 在线软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析序列,利用 ExpASY 软件(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测氨基酸序列的理论等电点及分子量,利用 Expasy 软件(<http://prosite.expasy.org/>)进行功能位点查找,利用 NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)查找磷酸化位点,用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白结构域和功能域的预测和分析,用 Bioedit 软件对不同物种同源序列进行多重序列比对,利用 MEGA 5.0 的 Neighbour-Joining 方法构建系统进化树。

1.2.4 *PmCAT* 基因的表达情况 以得到的 *PmCAT* 基因 cDNA 全长和内参基因 EF- 1α ,设计实时定量 PCR 引物(CAT-qF: CGAGGATTGCTGTGAAGTTTT 和 CAT-qR: ATGAAGGAAGGGAATAGAATAGGAT、EF- 1α -qF: TTCCGAC-TCCAAGAACGACC 和 EF- 1α -qR: GAGCAGTGTGGCAATCA-AGC),对斑节对虾各组织在 $CuSO_4$ 、pH 7.0 和 pH 9.0 海水养殖条件下的 *PmCAT* 基因的表达量进行检测。根据 SYBR[®] Premix EX TaqTM (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行实时定量 PCR 反应,反应总体积为 20 μL : 10 μL SYBR Green、1.5 μL cDNA 模板、0.4 μL 的上游引物 qF 和 0.4 μL 的下游引物 qR,双蒸水补足至 20 μL 。使用 Roche Light-Cycler 480 II 实时定量 PCR 仪,反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 60 s, 40 个循环;溶解温度从 55 $^{\circ}\text{C}$ 升至 97 $^{\circ}\text{C}$; 40 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 5 min。每个样品进行 3 个重复,基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,基因相对表达水平用“平均值 \pm 标准差”($\bar{X} \pm SD$)表示,以统计分析软件 SPSS 18.0 对实验结果进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,差异显著性结果表示为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *PmCAT* 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

PmCAT 基因 cDNA (GenBank 登录号: KR908786) 全长为 1 909 bp,开放阅读框为 1 563 bp,编码 520 个氨基酸,理论等电点为 6.92,分子量为 58.68 kD。5' 非编码区(UTR)为 10 bp, 3' UTR 为 310 bp(图 1)。推导的氨基酸序列存在一个酶活性位点序列(₆₀FDRERIPERVVHAKG₇₅)、1 个血红素结合序列(₃₅₀RLFSYNDTH₃₅₈), 3 个过氧化氢酶

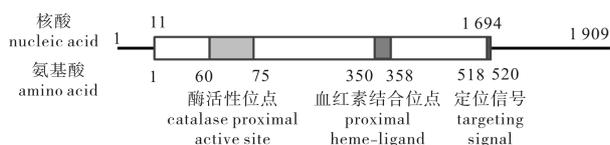


图1 *PmCAT* 基因 cDNA 全长序列示意图
过氧化物酶体定位信号(₅₁₈AKL₅₂₀)、酶活性位点
序列(₆₀FDRERIPERVVHAKGA₇₅)和血红素结合
序列(₃₅₀RLFSYNDTH₃₅₈)分别标示

Fig. 1 A schematic diagram of full-length
cDNA of *PmCAT*

The predicated peroxysome targeting signal (₅₁₈AKL₅₂₀), catalase proximal active site signature (₆₀FDRERIPERVVHAKGA₇₅) and proximal heme-ligand signature sequence(₃₅₀RLFSYNDTH₃₅₈) are indicated by labels and shading.

催化位点保守氨基酸残基(H₇₁, N₁₄₄, Y₃₅₄), 在 C-末端含有一个过氧化物酶体定位信号(₅₁₈AKL₅₂₀)。

用 Bioedit 软件对不同物种的 CAT 进行多重序列比对(图2), 斑节对虾 CAT 氨基酸序列与其他物种中的 CAT 氨基酸序列高度保守。氨基酸序列中的酶活性位点序列(₆₀FDRERIPERVVHAKGA₇₅)、血红素结合序列(₃₅₀RLFSYNDTH₃₅₈)和催化氨基酸残基(H₇₁, N₁₄₄, Y₃₅₄)存在于不同物种 CAT 序列中。斑节对虾过氧化物酶体定位信号(₅₁₈AKL₅₂₀)与中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)一致, 文蛤(*Meretrix meretrix*)的过氧化物酶体定位信号为 AQL, 果蝇(*Drosophila melanogaster*)的为 AKSSKF, 哺乳动物的过氧化物酶体定位信号相对较长, 且差异较大(图2)。

2.2 进化树构建

用 MEGA 5.0 软件构建斑节对虾与其他物种 CAT 系统发育树(图3), 软体动物、甲壳动物、鱼类、鸟类和哺乳类分别聚为一支; 果蝇单独为一支, 为整个进化树的外群。日本囊对虾、斑节对虾、中国明对虾、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)先聚为一支, 再与拟穴青蟹、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)聚为一个支。

2.3 *PmCAT* 基因在各组织的表达

利用实时定量(qPCR)技术对 *PmCAT* 基因在斑节对虾9种组织中的转录表达水平进行检测, 结果表明 *PmCAT* 在各个组织中均有表达, 在斑节对虾鳃组织中表达量最高, 其次是胸神经、肝胰腺, 在精巢组织的表达量最低(图4)。

2.4 CuSO₄ 胁迫下 *PmCAT* 基因的表达

斑节对虾经质量浓度为 7.73 mg · L⁻¹ 的 CuSO₄ 胁迫后, 用 qPCR 方法检测 *PmCAT* 基因表达水平的变化(图5), 结果显示, 总体趋势为先下调后上调后又下调, 暴露 48 h 后

PmCAT 的表达量有一个显著上调的过程, 到第 96 小时又明显抑制。

2.5 pH 胁迫下 *PmCAT* 基因的表达

斑节对虾经 pH 7.0 和 pH 9.0 海水养殖后, 用实时定量方法检测 *PmCAT* 基因表达水平的变化(图6)。结果显示, 在 pH 7.0 海水条件下, *PmCAT* 表达量在第 24 小时显著提高($P < 0.05$), 随后恢复至正常水平; 在 pH 9.0 海水条件下, *PmCAT* 表达水平显著下调($P < 0.05$), 在第 48 和第 96 小时有所上调, 但与正常组(0 h)比较仍然显著性下调表达($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究利用 SMART-RACE 技术获得了斑节对虾过氧化氢酶基因的 cDNA 全长序列, 该序列拥有单功能过氧化氢酶家族的特征序列和活性位点, 如酶活性位点序列(₆₀FDRERIPERVVHAKGA₇₅)、血红素结合序列(₃₅₀RLFSYNDTH₃₅₈)、催化氨基酸残基(H₇₁, N₁₄₄, Y₃₅₄)及过氧化物酶体定位信号(₅₁₈AKL₅₂₀)。实验结果表明所获得的 *PmCAT* 基因属于单功能过氧化氢酶家族的成员。氨基酸序列比对结果表明, *PmCAT* 与甲壳动物 CAT 序列同样存在过氧化物酶体定位信号(AKL), 而文蛤的过氧化物酶体定位信号为 AQL^[16], 哺乳动物的过氧化物酶体定位信号曾相对较长, 而且物种间差异较大。*PmCAT* 与中国明对虾^[4]、日本囊对虾、拟穴青蟹等甲壳动物的 CAT 氨基酸序列具有较高的同源性。系统进化树显示, 甲壳动物 CAT 聚为一支, 软体动物聚为一支, 而果蝇则单独为一支, 系统进化树与物种进化地位基本相符。

PmCAT 基因广泛存在于斑节对虾各种组织中, 在鳃中的表达量最高, 其次是胸神经, 在肝胰腺中的表达量与胸神经接近。这与其他研究者对日本囊对虾、凡纳滨对虾、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)和拟穴青蟹的研究结果不一致, 日本囊对虾、凡纳滨对虾、脊尾白虾和拟穴青蟹 CAT 基因在肝胰腺中的表达量最高^[17-20]。鳃组织直接接触外界水环境, 容易受到外界环境刺激, CAT 基因高表达有助于机体抵抗外界环境应激; 肝胰腺也是甲壳动物非特异性免疫的重要组织, 因此 *PmCAT* 基因在肝胰腺中的表达量也相对较高。

CAT 参与了甲壳动物免疫防御功能, 日本囊对虾感染对虾白斑综合症病毒(WSSV)后 CAT 基因表达量显著提高^[18]。斑节对虾感染 WSSV 24 h 后, 血淋巴中的 CAT 活性显著升高, 在第 48 小时显著降低, 到第 72 小时各组织中的 CAT 活性均显著降低^[8, 21]。亚致死浓度的氰戊菊酯能诱导斑节对虾肝胰腺、鳃和肌肉中的 CAT 活性显著减低^[12]。WSSV 感染后, 斑节对虾血清中的过氧化物酶(POD)活性随时间而波动, 抗氧化酶反应强度与 WSSV 的感染浓度存在一定的关系^[22]。

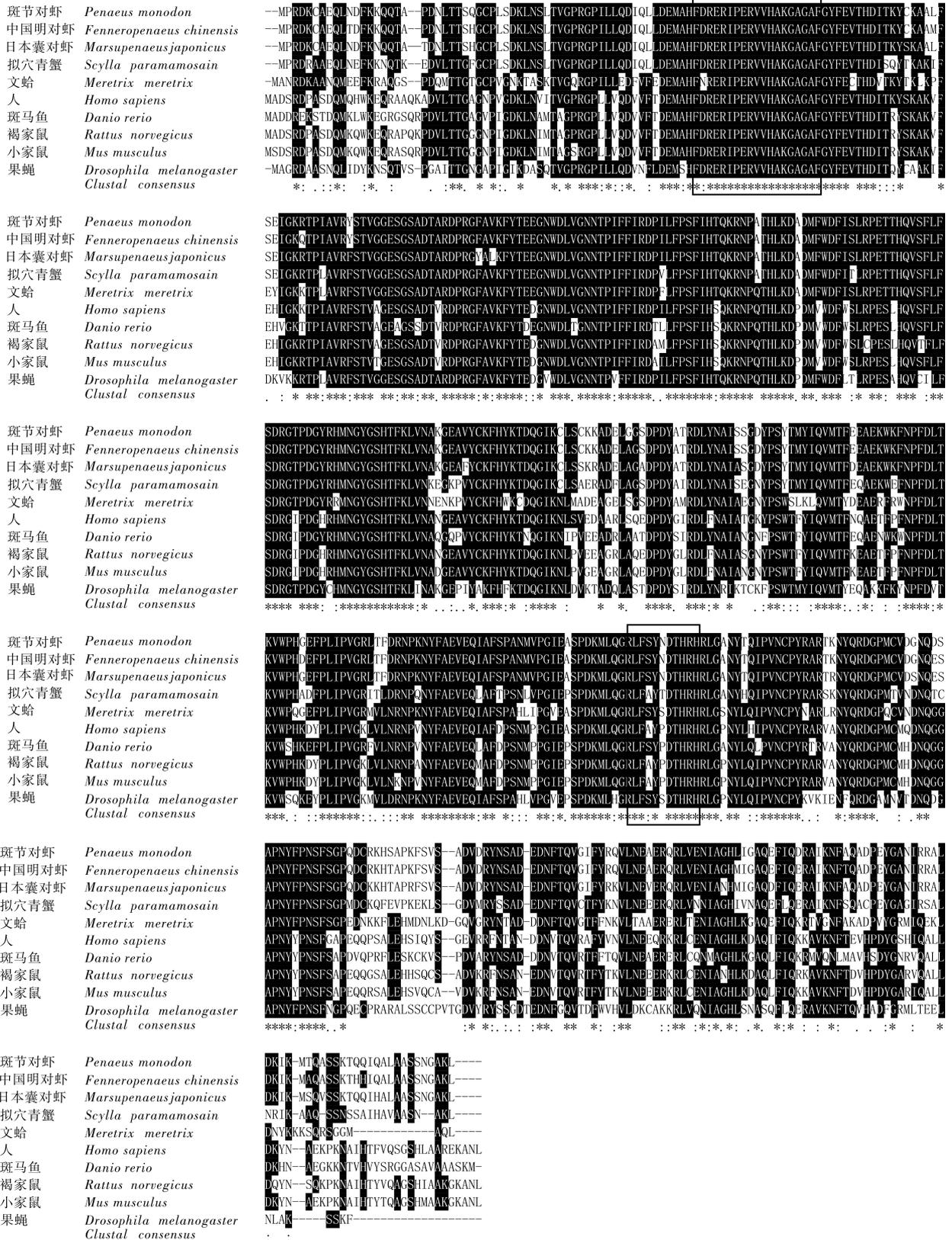


图 2 PmCAT 基因的多重序列比对

黑色阴影为相同序列，加框表示酶活性位点序列和血红素结合序列

Fig. 2 Multiple alignment of PmCAT

The same sequences are shadowed; catalase proximal active site signature and proximal heme-ligand sequence are boxed.

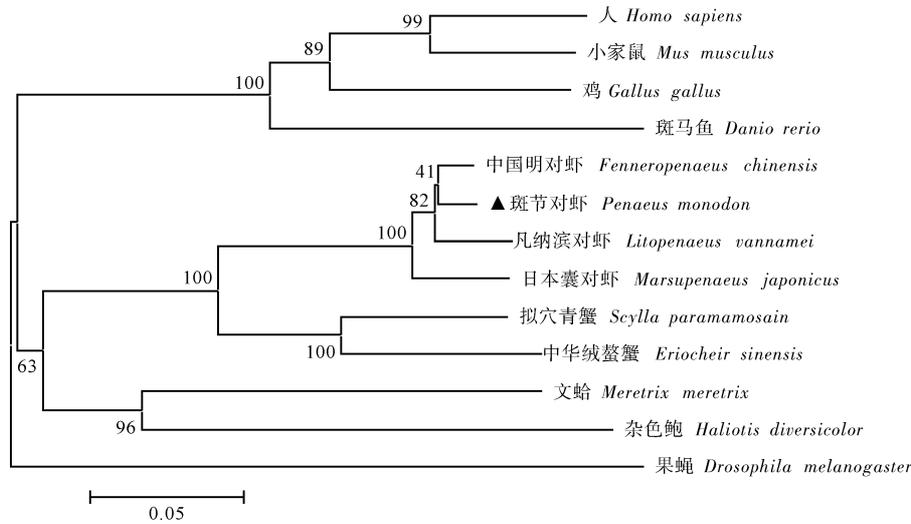


图 3 基于 NJ 法构建过氧化氢酶氨基酸序列的系统发育树 (*PmCAT* 用黑色三角号表示)

Fig. 3 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on CAT (*PmCAT* is marked by black triangle)

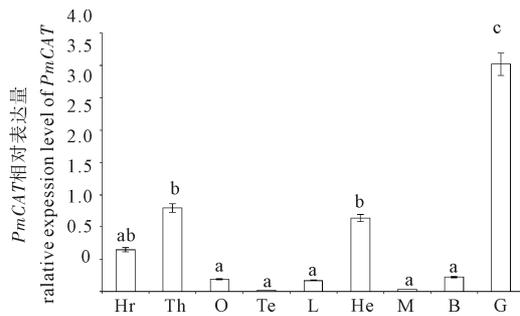


图 4 *PmCAT* 基因在不同组织中的相对表达量

Hr. 心; Th. 胸神经; O. 卵巢; Te. 精巢; L. 淋巴器官; HE. 肝胰腺; M. 肌肉; B. 脑神经; G. 鳃; 相同字母表示差异性不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$), 后图同此

Fig. 4 Expression of *PmCAT* gene expression in different tissues

Hr. heart; Th. thoracic nerve; O. ovary; Te. Testis; L. lymphoid organ; He. Hepatopancreas; M. muscle; B. brain; G. gill. The same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), while different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

The same case in the following figures.

CuSO_4 曾用于虾塘清除丝状藻, 一定浓度的 CuSO_4 能影响斑节对虾蜕皮频率和生长率^[23], 斑节对虾暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的铜离子 (Cu^{2+}) 下, 呼吸爆发活性显著增加^[24], 造成过量的自由基生成, 从而对机体造成损伤。CAT 等抗氧化酶能清除过量的自由基, 保护机体免受损伤。斑节对虾 *PmCAT* 基因在 CuSO_4 胁迫下, 表达量急剧下降, 在 24 ~ 48 h 恢复到正常水平后又下降, 表明 *PmCAT* 参与了 CuSO_4 胁迫的急性应激, 维持机体稳态。对虾养殖过程中, 水质由于受到各种因素的影响, pH 经常发生变化^[25-26]。

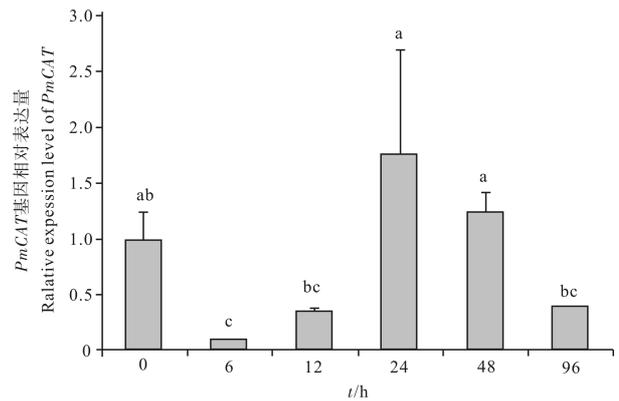


图 5 *PmCAT* 基因在硫酸铜胁迫后的表达变化

Fig. 5 Temporal expression of *PmCAT* gene expression under CuSO_4 stress

pH 与盐度、化学需氧量 (COD) 等理化因子耦合对斑节对虾血淋巴抗氧化活性有明显作用^[27]。pH 胁迫中国明对虾, 各组织 CAT 活性先升高后降低^[28]。*PmCAT* 基因在不同 pH 条件下的表达差异表明其对环境因子的应激, 该结果与凡纳滨对虾 CAT 基因在 pH 变化时的表达变化相似^[29]。

综上所述, 该研究克隆获得了 *PmCAT* 基因 cDNA 全长, 探讨了 *PmCAT* 基因在环境理化因子变化下的表达变化, 结果表明 *PmCAT* 基因参与斑节对虾胁迫应激反应, 为深入探讨甲壳动物抗氧化机制提供了基础资料。

参考文献:

[1] WANG M, WANG L, ZHOU Z, et al. The molecular characterization of a catalase from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Int J Immunogenet, 2013, 40(3): 230-240.
 [2] SHIGEYOSHI D, INADA M, KONO T, et al. Molecular cloning, expression analysis and gene knockdown of catalase gene from Kuru-

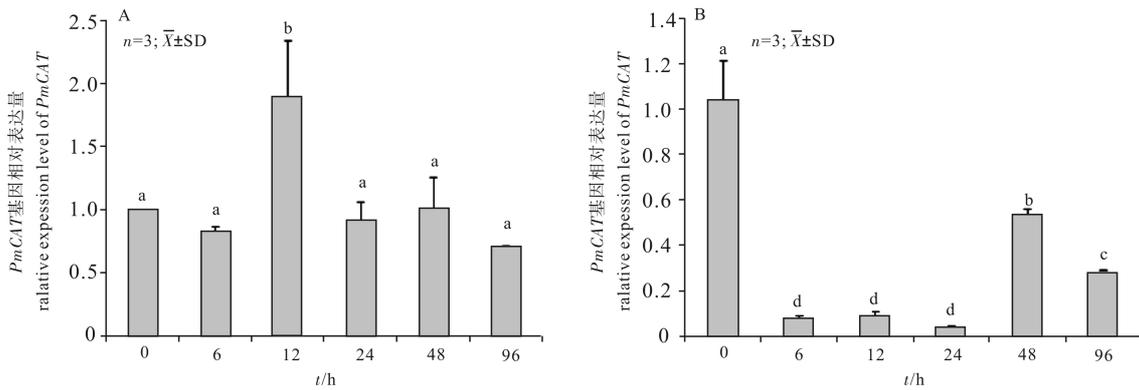


图 6 不同 pH 海水养殖条件下 *PmCAT* 基因在肝胰腺中的转录水平

A. pH 7.0 时 *PmCAT* 的表达变化; B. pH 9.0 时 *PmCAT* 的表达变化

Fig. 6 Temporal expression of *PmCAT* gene in hepatopancreas after pH 7.0 and pH 9.0 challenge

A. temporal expression of *PmCAT* gene expression under stress of pH 7.0; B. temporal expression of *PmCAT* gene expression under stress of pH 9.0

ma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(6): 1738.

- [3] AROCKIARAJ J, EASWVARAN S, VANARAJA P, et al. Molecular cloning, characterization and gene expression of an antioxidant enzyme catalase (*MrCat*) from *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(5): 670-682.
- [4] ZHANG Q L, LI F H, ZHANG X J, et al. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(5): 584-591.
- [5] CHEN P, LI J, LIU P, et al. cDNA cloning, characterization and expression analysis of catalase in swimming crab *Portunus trituberculatus*: cDNA cloning and expression analysis of catalase gene of *Portunus trituberculatus* [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 9979-9987.
- [6] TRASVINA-ARENAS C H, GARCIA-TRIANA A, PEREGRINO-URIARTE A B, et al. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation[J]. Comp Biochem Phys B, 2013, 164(1): 44-52.
- [7] DUAN Y, ZHANG J, DONG H, et al. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 46(2): 354-365.
- [8] RAMESHTHANGAM P, RAMASAMY P. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* fabricius[J]. Aquaculture, 2006, 254(1/2/3/4): 32-39.
- [9] TU H T, SILVESTRE F, BERNARD A, et al. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system[J]. Aquaculture, 2008, 285(1/2/3/4): 244-248.
- [10] DORTS J, SILVESTRE F, TU H T, et al. Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2009, 28(2):

302-310.

- [11] HARIHARAN G, KUMAR C S, PRIYA S L, et al. Acute and chronic toxic effect of lead (Pb) and zinc (Zn) on biomarker response in post larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798)[J]. Toxicol Environ Chem, 2012, 94(8): 1571-1582.
- [12] VIJAYAVEL K, BALASUBRAMANIAN M P. Effect of fenvalerate on oxidative stress biomarkers in the brackish water prawn *Penaeus monodon*[J]. Pestic Biochem Phys, 2009, 95(3): 113-116.
- [13] TU H T, SILVESTRE F, MEULDER B D, et al. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Chemosphere, 2012, 86(1): 83-91.
- [14] LEU J H, CHANG C C, WU J L, et al. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 120.
- [15] UAWISETWATHANA U, LEELATANAWIT R, KLANCHUI A, et al. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp[J]. PLoS ONE, 2011, 6(9): e24427.
- [16] WANG C, YUE X, LU X, et al. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(1): 91-99.
- [17] LIU H P, CHEN F Y, GOPALAKRISHNAN S, et al. Antioxidant enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: gene cloning and gene/protein expression profiles against LPS challenge [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(5/6): 862-871.
- [18] 张曼, 苏永全, 冯文荣, 等. 日本囊对虾过氧化氢酶 cDNA 全长克隆及表达分析 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2013, 52(6): 851-859.
- [19] TAVARES-SANCHEZ O L, GOMÉZ-ANDURO G A, FELIPE-

- ORTEGA X, et al. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection [J]. *Comp Biochem Phys B*, 2004, 138(4): 331-337.
- [20] REN H, LI J, LI J, et al. Cloning of catalase and expression patterns of catalase and selenium-dependent glutathione peroxidase from *Exopalaemon carinicauda* in response to low salinity stress [J]. *Acta Oceanol Sin*, 2015, 34(8): 52-61.
- [21] MATHEW S, KUMAR K A, ANANDAN R, et al. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon* [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2007, 145(3): 315-320.
- [22] 张涛, 黄建华, 温为庚, 等. WSSV⁺ 斑节对虾的血清免疫相关酶对人工感染 WSSV 粗提液的反应 [J]. *南方水产科学*, 2013, 9(1): 35-42.
- [23] CHEN J C, LIN C H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2001, 192(1): 55-65.
- [24] XIAN J A, WANG A L, YE C X, et al. Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free-Ca²⁺ concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2010, 152(2): 182-188.
- [25] 陈金玲, 赖秋明, 苏树叶, 等. 精养虾池主要环境因子的变化特点及其相关性分析 [J]. *南方水产科学*, 2012, 8(4): 49-56.
- [26] 李卓佳, 李烁寒, 杨莺莺, 等. 凡纳滨对虾高位池养殖水体细菌变动及其与理化因子的关系 [J]. *南方水产*, 2010, 6(4): 6-12.
- [27] 文国樑, 张华军, 张家松, 等. 斑节对虾血淋巴免疫指标变化与其养殖池塘理化因子的关系 [J]. *生态科学*, 2014, 31(1): 76-82.
- [28] 王芸, 李健, 李吉涛, 等. pH 胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响 [J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 556-564.
- [29] WANG W N, ZHOU J, WANG P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2009, 150(4): 428-435.