

凡纳滨对虾卵巢类围食膜蛋白基因克隆及其在早期胚胎发育中的表达

马欢¹, 褚吉兴¹, 王丽燕^{1*}, 李富花², 相建海²

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 围食膜蛋白最早是从昆虫围食膜中解离得到的, 在保护昆虫免受外源微生物侵染过程中发挥了重要作用。为了解围食膜蛋白在对虾免疫过程中的作用, 实验前期进行了凡纳滨对虾转录组分析, 并克隆获得了凡纳滨对虾2条类围食膜蛋白基因LvPT1和LvPT2, 其编码的2条氨基酸序列相似性极高, 同已报道的其他虾类围食膜蛋白具有较高同源性。利用Real-time PCR方法进行组织表达分析发现, LvPT1和LvPT2与对虾卵巢围食膜蛋白(SOPs)类似, 在卵巢中高度表达, 利用半定量PCR方法, 分析LvPT2在对虾早期发育中的表达情况。结果显示, LvPT2在受精卵时期表达量最高, 随着发育进行, 表达量逐渐降低, 至无节幼体孵出后无明显表达。研究表明, LvPT1和LvPT2与虾SOPs应为同一类围食膜蛋白, 可能参与了受精卵细胞的形成, 并在保护对虾早期胚胎发育时免受外界病原微生物的侵染中发挥着重要作用。

关键词: 凡纳滨对虾; 围食膜; 围食膜蛋白; 胚胎发育

中图分类号: Q 785; S 968.2

文献标志码: A

围食膜(peritrophic membrane, PM)是无脊椎动物肠道内包围摄入食物的一种膜状结构^[1], 将中肠上皮细胞与摄入外源食物分隔开, 由糖蛋白和蛋白聚糖结合于几丁质纤维网络中而形成^[2-4]。围食膜上的蛋白根据洗脱的难易程度分成了4类, 其中对第3类蛋白研究最深入, 此类蛋白被称为围食膜蛋白(peritrophin), 其典型结构特征具有几丁质Ⅱ型结合结构域(chitin-binding domain 2, ChtBD2)^[3, 5]。围食膜蛋白最早是从昆虫PM中解离得到的, 此类蛋白在辅助食物消化和保护昆虫免受外源微生物侵染中都发挥了重要作用^[3-4]。

近年来研究发现, 虾类具有同昆虫类似的围食膜结构和围食膜蛋白^[6-7]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)体内发现2条肠道围食膜蛋白可与WSSV的多种囊膜蛋白相互作用, 可能辅助参与

WSSV的侵染过程^[8]。脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)体内也发现一条肠道类围食膜蛋白可能参与WSSV的侵染过程^[9]。除了肠道组织外, 还发现一些对虾类围食膜蛋白高表达于其他组织中, 如中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的类围食膜蛋白在卵巢组织中呈组成型表达, 并且具有结合细菌和几丁质的活性^[10]。短钩对虾(*Penaeus semisulcatus*)卵巢中发现2条类peritrophin序列, 称之为虾卵巢围食膜蛋白(shrimp ovarian peritrophins, SOPs), 对其功能研究发现, 它们能在受精卵表面形成保护层^[11], 墨吉明对虾(*F. merguensis*)体内也发现一条SOP, 具有抗菌肽活性^[12-13]。这些研究表明, 虾类围食膜蛋白在不同组织中以不同的作用形式在对虾免疫中发挥重要作用。

收稿日期: 2016-07-08 修回日期: 2016-09-29

资助项目: 国家自然科学基金(41076101); 天津市“用三年时间引进千名以上高层次人才”项目(SKQM110029); 天津师范大学引进人才基金项目(SRL130)

通信作者: 王丽燕, E-mail: wly712@163.com

本研究克隆获得了凡纳滨对虾2条类围食膜蛋白基因*LvPT1*和*LvPT2* cDNA全长, 对其结构进行了分析, 并对其在不同组织中的表达模式进行了研究, 发现其在卵巢中高度表达, 为了探究此类围食膜蛋白在卵巢中高表达的作用, 以凡纳滨对虾胚胎和各期幼虫为实验材料, 对*LvPT1*和*LvPT2*在对虾早期发育中的表达进行了研究, 研究结果将为深入了解围食膜蛋白多样性及其免疫功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

实验所用凡纳滨对虾均取自海南广太海洋育种有限公司。实验所用Unizol试剂为上海博星基因芯片有限公司产品(Biostar Genechip, Shanghai, China); M-MLV反转录酶和RQ1 RNase-free DNase均为Promega公司产品; DNA回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; PMD-19-T和DH5 α 为天根公司产品; nuclease-free water为Promega公司产品; SYBR Green Master Mix为Applied Biosystems公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 对虾组织样品制备

分别取5只凡纳滨对虾成虾头胸甲和各个组织(眼柄、鳃、心脏、肝胰脏、肌肉、前肠、中肠、后肠、表皮、神经、附肢、精巢、卵巢、类淋巴器官、血细胞), 保存于液氮中, 进行后续RNA提取、基因克隆和Real-time PCR实验。

选取凡纳滨对虾早期发育的15个时期: 受精卵(fertilized egg)、囊胚期(blastulae)、原肠胚期(gastrulae)、肢芽期(limb buds stage)、膜内无节幼体期(nauplius in membrane)、无节幼体(nauplius)1期、3期和6期、蚤状幼体(zoea)1~3期、糠虾幼体(mysis)1~3期和仔虾(post-larva)1期, 保存于液氮中, 进行后续RNA提取和半定量Real-time PCR实验。

1.3 总RNA提取和cDNA合成

利用Unizol试剂, 按照说明书提取凡纳滨对虾各组织总RNA。取3 μ L RNA用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用Nanodrop 2000超微量分光光度计(Thermo)测OD值。利用RQ1 RNase-free DNase降解总RNA中污染的DNA, 然后各样品分别取1 μ g总RNA作为反转录反应的模板, 按照M-MLV反转录酶说明书, 以AOLP [5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16-3']为引物, BDA-Oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGG G-3') 为接头, 进行第一链cDNA的合成, 用于*LvPT1*和*LvPT2*基因克隆, 或者以随机引物, 进行第一链cDNA的合成, 用于之后的定量和半定量PCR反应。其余RNA置于-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

1.4 *LvPT1*和*LvPT2* cDNA全长克隆

根据本课题组所得凡纳滨对虾头胸甲转录组信息, 设计特异性引物*LvPT1*-F/*LvPT1*-R和*LvPT2*-F/*LvPT2*-R(表1), 以头胸甲cDNA为模板, 分别进行*LvPT1*和*LvPT2*基因克隆。引物由生工

表 1 实验所用引物序列信息

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature	产物长度/bp expected size
<i>LvPT1</i> -F	ATGAGTTCAAATACTTTTTTGTGTGA	53	917
<i>LvPT1</i> -R	GTCATGATTTATTCGAGACACATCG		
<i>LvPT2</i> -F	ATGAGTTCGAATACTTTTTTGTGT	53	915
<i>LvPT2</i> -R	ATTCGAGACACACCGAAGTAGAG		
RT- <i>LvPT1</i> -F	CCTCCTGAACCAGCAGAACTAC	55	217
RT- <i>LvPT1</i> -R	CGACCTCGTAAAAGTTCAAGAACCG		
RT- <i>LvPT2</i> -F	CCTCCTGAACCAGCAGAACTAC	55	223
RT- <i>LvPT2</i> -R	TGCCCTCACTGTAGTAACCTTACTC		
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	55	147
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT		

生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增条件为94℃变性5 min, 1个循环; 94℃变性45 s, 53℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 35个循环; 72℃延伸10 min, 1个循环。1%琼脂糖凝胶电泳验证PCR产物, DNA凝胶回收试剂盒回收目的片段, 具体操作参照试剂盒说明书进行。取2 μL回收产物连接到PMD-19-T载体, 在16℃进行过夜连接, 连接产物经热激转化感受态大肠杆菌DH5α, 转化产物在37℃ 150 r/min条件下振荡培养50 min后涂布于含氨苄的LB固体培养基上, 置于恒温生化培养箱过夜培养(12~16 h), 随机挑选多个单菌落, 接种于含有氨苄的LB液体培养基中, 37℃ 150 r/min振荡培养3 h后, 以菌液作为模板进行PCR检测, 筛选出阳性克隆, 送华大基因(BGI)公司进行测序。

1.5 序列分析

用序列在线比对软件BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)分析比对*LvPT1*和*LvPT2*。在线ExPasy软件(http://web.expasy.org/compute_pi/)进行编码蛋白分子量和等电点预测。在线SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析*LvPT1*和*LvPT2*基因编码氨基酸的结构域特征。采用Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)和MEGA 5.2.2对不同peritrophin家族蛋白进行氨基酸序列比对和蛋白进化分析, 构建系统进化树。

1.6 *LvPT1*和*LvPT2*基因组织表达分析

根据*LvPT1*和*LvPT2*基因克隆产物, 分别设计引物RT-*LvPT1*-F/RT-*LvPT1*-R和RT-*LvPT2*-F/RT-*LvPT2*-R(表1), 进行实时定量PCR检测*LvPT1*和*LvPT2*在各个组织中的表达情况。18S *rRNA*作为管家基因被用作对照, 设计引物18S-F和18S-R(表1)。其中合成的各组织cDNA作为模板, 无RNase的水代替cDNA模板作为阴性对照。

实时定量PCR反应物为25 μL体系, 包含1 U TaKaRa Ex taq hot start, 1×Ex taq buffer (plus Mg^{2+}), 0.2 mmol/L dNTP, 1×SYBR Green Master Mix, 0.2 mmol/L正向引物, 0.2 mmol/L反向引物, 1 μL cDNA模板。反应条件: 94℃, 2 min, 1个循环; 94℃, 15 s; 55℃, 20 s和72℃, 20 s, 40个循环。反应完成后, 进行熔解曲线分析, 确定只有一条特异性的PCR产物被扩增。每个实验进行3次重复, 每个样品取自5只虾。所得数据利

用软件SPSS 11.0单因素方差分析(One-Way ANOVA)法进行样本显著性分析, $P<0.05$ 为差异性显著。

1.7 *LvPT2*基因在早期发育中的表达变化

利用特异性引物RT-*LvPT2*-F/RT-*LvPT2*-R(表1)检测*LvPT2*在对虾15个早期发育时期的表达谱, 18S *rRNA*作为内参基因。半定量PCR的扩增体系为cDNA 1 μL, 10 μmol/L的上、下游引物各1 μL, 2×HD™ Reaction Mix 12.5 μL, Taq DNA聚合酶(2.5 U/μL)0.25 μL, 灭菌超纯水加至25 μL。PCR扩增程序为94℃ 4 min, 1个循环; 94℃ 45 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 25个循环; 72℃延伸10 min。取PCR扩增产物 8 μL用1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 *LvPT1*和*LvPT2*序列分析

本研究克隆获得了2条类围食膜蛋白*LvPT1*和*LvPT2* cDNA全长序列。*LvPT1*全长917 bp, 含有831 bp开放阅读框, 编码277个氨基酸(图1), 而*LvPT2*全长915 bp, 含有828 bp开放阅读框, 编码276个氨基酸(图2)。*LvPT1*和*LvPT2*编码蛋白分子量预测分别为30.997和30.924 ku, 对应等电点分别为5.60和6.11。通过Smart软件在线分析发现, *LvPT1*和*LvPT2*编码蛋白均含有3个典型ChtBD2结构域(图3)。多序列比对显示, *LvPT1*和*LvPT2*与其他虾类围食膜蛋白具有很高的序列相似性(图4), *LvPT1*和*LvPT2*具有90%以上的序列相似性, 与凡纳滨对虾围食膜蛋白、中国明对虾围食膜蛋白、短钩对虾围食膜蛋白1和2、斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢围食膜蛋白1和2以及斑节对虾围食膜蛋白3的同源性都达到70%以上。利用MEGA5.2.2软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树, 结果显示, CPAP1 (cuticular proteins analogous to peritrophins 1)、CPAP3和PMP(peritrophic matrix proteins)家族的围食膜蛋白分别聚在一起, 除了脊尾白虾类围食膜蛋白(EcPT)之外, 其他虾类围食膜蛋白聚为一支, *LvPT1*和*LvPT2*与虾类围食膜蛋白聚为一支(图5)。

2.2 *LvPT1*和*LvPT2*基因的组织表达特征

通过Real-time PCR对*LvPT1*和*LvPT2*在正常对虾不同组织中的表达分析发现, *LvPT1*和*LvPT2*

```

1  ATGAGTTCAAATACTTTTTTGTGTGATGGTCCCTGGGGGTGGCCCTTGTTCAGCCGAAGAGGACTCGCGAGGTGAACGCAGTGTACT
1  M S S N T F F V V M V L G V A L V A A E E D S R G E R S V T
91  ACAGATTACCACTTACTCGAACTGTGCGAATCCAGCCCAACAAATTCATATGCGTCAATTGCAAGACCATGCTCCAGTGTGTGAAG
91  T D Y H D Y S K L C E S Q P N K F I C V N C K T M V Q C V K
181  GGACAGGCCTTCACTCGCCACTGCATCGAGAACCCTACTGTTCAATGAAGCCGAATTTGCCGGTGGAGTCTGCTACCCAGATGAGCCT
181  G Q A F T R H C I E N H Y C S M K P E F G G G V C Y P D E P
271  AAGGCCTGCAATGCGAGAAGGCCAACTCCTCCGAGTGGACCCCTACGACCTCAGAGGTTCTTCTCTTGAAGAACCTTGTAAACCCCC
271  K A C K C E K A N S F R V D P Y D P Q R F F S C K N L V T P
361  CCAGTGAATACAAATGCCAGATGGCATGGTATTCGACGAAGCCTCTGCCAGTGGCAGACAGGAAATGGCCTGCCCAATGTACTGAG
361  P V N Y K C P D G M V F D E A S A Q C Q T G N G L P Q C T E
451  GCTGGTACTTTTGCAACCCGGCTAACTGCAGTGTATACTATTCGTGCATTGGTCTTCGACATGGCTGGCTGCAGAAGAGCTTCCAGTGC
451  A G T F A N P A N C S V Y Y S C I G L R H G W L Q K S F Q C
541  AACAGCGGCTGTATGTACAACAAGGAAAAGGAGTATGTGAAGACCTTGCCTGTACCAAGTTCGTGTGAAGCAGGAAAGCCGATATCCT
541  N S G L M Y N K E K G V C E D P C L Y Q F V C K Q E G R Y P
631  GACCTCTGAACAGCAGAACTACTTTGAATGCTACATGTTGGGTGGCAAGTTACGGCAGTCCGTTACAGCTGCCCTGAAGGCTACAGG
631  D L L N Q Q N Y F E C Y M L G G K L R Q L R Y S C P E G Y R
721  TGGGATGAGATCTCTGCAGGTGTGGCCAGTGTGTGGAGGACCATGACAAAATGCTTCCAAGGGTGCCTTCTTTGGCTGCGACATTCTCT
721  W D E I S A G V G Q C V E D H D K N A S K G A F F G C D I P
811  GACGGCTTCTGTCCGGTCTTGAACCTTTACGAGGTGCGACCTTGCCTTGACACCGGGTGGCGTAAAGCCTGATATATGCTTCGATGTGT
811  D G F C P G S *
901  CTCGAATAAATCATGAC

```

图 1 凡纳滨对虾 *LvPT1* 基因 cDNA 及其编码的氨基酸序列

方框内为起始密码子，“*”表示终止密码子，下同

Fig. 1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *LvPT1* gene

The initiation codon was boxed, “*” indicated the stop codon, the same below

```

1  ATGAGTTCAATACTTTTTTGTGTGCTGGTCCCTGGGAGTAGCCCTTGTCTGCAGCCAGAGACTTGCAGCTAAACGCCGTGTACTACA
1  M S S N T F F V V L V L G V A L A A A R D L R A K R R V T T
91  GATTACCATGATTACTCGAAGATGTGTGAAGCTCAGCCTGACAAATTCATATGCGTCAAGACCATGCTCCAGTGTGTGAAGGGA
91  D Y H D Y S K M C E A Q P D K F I C V D C K T M V Q C V K G
181  CAGGCCTTCACTCGCCACTGCATCGAGGACCACTACTGTTCAATGAAGCCGAGTTTGGCGGGGAGTCTGCTACCCAGATGAGCCTAAG
181  Q A F T R H C I E D H Y C S M K P E F G G G V C Y P D E P K
271  GCCTGCAATGCGAGAAGGCCAACTCCTCCGAGTGGACCCCTACGACCTCAGAAGTCTTCTCTTGAAGAACCTTGTAAACCCCCCA
271  A C K C E K A N S F R V D P Y D P Q K F F S C K N L V T P P
361  GTGAATACAAATGCCAGATGGCATGGTATTCGACGAAGCCTCTGCCAATGCCAGACAGGAAATGGCCTGCCCAATGTACTAGGGCT
361  V N Y K C P D G M V F D E A S A Q C Q T G N G L P Q C T R A
451  GGTACTTTTGCAACCCGGCTAACTGCAGTGTATACTACTCGTGCATTGGCCTTCAAATGGCTGGCTGCAGAAGAGCTTCCAGTGAAC
451  G T F A N P A N C S V Y Y S C I G L Q N G W L Q K S F Q C N
541  AGTGGCTTGTATGTACAACAAGGAAAAGGAGCATGTGAAGACCTTGCCTGTACCAAGTTCGTGTGAAGCAGGAGGGCCGATATCCTGAC
541  S G L M Y N K E K G A C E D P C L Y Q F V C K Q E G R Y P D
631  CTCCTGAACAGCAGAACTACTTTGAATGCTACATGTTGGGTGGCAAGTTACGGCAGTCCGTTACAGCTGCCCTGAAGGCTACAGGTGG
631  L L N Q Q N Y F E C Y M L G G K L R Q L R Y S C P E G Y R W
721  GATGAGATCTCTGAGGTGTGGCCAGTGTGTGGAGGACCATGACAAAATGCTTCCAAGGGTGCCTTCTTTGGCTGCGACATTCTCTGAC
721  D E I S V G V G Q C V E D H D Q N A S K G A F F G C D I P D
811  GGCTTCTGTCCAGTACTTAAGAGTAAGTTACTACAGTGAGGCAACCTGTTGTAACATAAAGTGGAGTAGGGCCAGGCCTCTACTT
811  G F C P G T *
901  CGGTGTGTCTGAAT

```

图 2 凡纳滨对虾 *LvPT2* 基因 cDNA 及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *LvPT2* gene

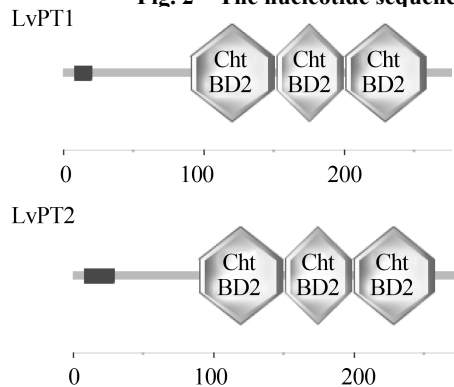


图 3 *LvPT1* 和 *LvPT2* 几丁质 II 型结合结构域

Fig. 3 Chitin-binding domain 2 of *LvPT1* and *LvPT2*

的组织表达情况趋于一致，都在卵巢组织中的表达量最高，其次为精巢、附肢和表皮，在眼柄、消化道、神经和类淋巴器官中也均有表达，而在鳃、心脏、肝胰脏、肌肉和血细胞中的表达量较少甚至无表达(图6)。

2.3 *LvPT2* 基因在对虾早期发育中的表达

通过半定量 Real-time PCR 方法对 *LvPT2* 在凡纳滨对虾早期发育的 15 个时期的表达情况进行了研究。结果显示，在受精卵时期 *LvPT2* 表达量很高，随着发育的进行逐渐下降，发育至膜内无

FcPT.seq	MSSNIFVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	32
FmSOP.seq	MAFYNILILMLMGVVCAYEELHCPGVGRFPDPKSCGAYYDCTPNNAGGYDITNDDCRGYTYDTANRICIDKMCPTSRREVIED	85
LvPT1.seq	MRINTLYVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	32
LvPT2.seq	MSSNIFVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	32
LvPT3.seq	MSSNIFVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	31
PmSOP1.seq	MRSNTYCVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	32
PmSOP2.seq	MRSNTYCVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	32
PsPT1.seq	MRSNTYCVVLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	32
PsPT2.seq	MLALGVAVLPAKE.....DLRSBRVITAD	24
consensus	a r vt d	
FcPT.seq	NEFYSLCKBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	117
FmSOP.seq	NEFYSLCKBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	170
LvPT1.seq	YEDYSKLCBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	117
LvPT2.seq	YEDYSKLCBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	117
LvPT3.seq	YEDYSKLCBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	116
PmSOP1.seq	NEFYSLCKBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	117
PmSOP2.seq	NEFYSLCKBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	117
PsPT1.seq	NEFYSLCKBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	117
PsPT2.seq	NEFYSLCKBKEDEKFIICANCKTLVQCVKGQAFTRECIIDHFCSERTCEGGAVCYPNEFVCTCTANTFFVDEYDSQFFEFCHDV	109
consensus	h ys e p c ckt cvkgqaf r cie cs fgg cyp ep c c an f vd yd q f c	
FcPT.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	202
FmSOP.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	255
LvPT1.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	202
LvPT2.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	202
LvPT3.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	201
PmSOP1.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	202
PmSOP2.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	202
PsPT1.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	202
PsPT2.seq	GSVPEHYKCCDGMVFDEASACQQTASGIFPCVVGTFANFNOSCEYYSCISLRSGWLQKSFMCITNDMMNNEQKDACBIPOLYQEV	194
consensus	p y c dgm fd c p c g fa p c yy ci gwlq f c n ce pc yq v	
FcPT.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	274
FmSOP.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	329
LvPT1.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	276
LvPT2.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	277
LvPT3.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	275
PmSOP1.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	285
PmSOP2.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	277
PsPT1.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	277
PsPT2.seq	CQCEGRYPDLLNKNYFCYMLGGVLCRLRYSCPESEYWDIVSGVGQVEDHGDQ..DSNYPFGQCDIFDNLCPGP.....	269
consensus	c qegrypdlln nyf cy g l q ry cpe y w s gvg c edh f c p	

图4 LvPT1和LvPT2与其他虾类围食膜氨基酸序列比对

基因登录号: AAZ66371.1(中国明对虾围食膜蛋白, FcPT); AAV83539.2(墨吉明对虾围食膜蛋白, FmSOP); AEI26265.1(凡纳滨对虾围食膜蛋白, LvPT); KX110383.1(凡纳滨对虾围食膜蛋白1, LvPT1); KX110384.1(凡纳滨对虾围食膜蛋白2, LvPT2); ABL86146.1(斑节对虾围食膜蛋白3, PmPT3); AAM44049.1(斑节对虾围食膜蛋白1, PmSOP1); AAM44050.1(斑节对虾围食膜蛋白2, PmSOP2); AAF34331.1(短钩对虾围食膜蛋白1, PsPT1); AAF34332.1(短钩对虾围食膜蛋白2, PsPT2)

Fig. 4 Amino acid sequence comparison of LvPT1 and LvPT2 with other shrimp peritrophins

GenBank accession number: AAZ66371.1 (peritrophin of *F. chinensis*, FcPT); AAV83539.2 (ovarian peritrophin of *F. merguensis*, FmSOP); AEI26265.1 (peritrophin of *L. vannamei*, LvPT); KX110383.1 (peritrophin-like protein 1 of *L. vannamei*, LvPT1); KX110384.1 (peritrophin-like protein 2 of *L. vannamei*, LvPT2); ABL86146.1 (peritrophin 3 precursor of *P. monodon*, PmPT3); AAM44049.1 (ovarian peritrophin 1 precursor of *P. monodon*, PmSOP1); AAM44050.1 (ovarian peritrophin 2 precursor of *P. monodon*, PmSOP2); AAF34331.1 (peritrophin-like protein 1 of *P. semisulcatus*, PsPT1); AAF34332.1 (peritrophin-like protein 2 of *P. semisulcatus*, PsPT2)

节幼体期及无节幼体1期时, *LvPT2*表达量很低, 至无节幼体3期时, *LvPT2*无明显表达(图7)。

3 讨论

目前, 病害问题仍然是制约对虾养殖业稳定发展的最大障碍, 研发、制定有效的疾病防控策略成为对虾养殖业亟待解决的难题。昆虫免疫防治研究提示, 以围食膜和围食膜蛋白为

靶标可以达到防治害虫的目的, 因此可知围食膜及其蛋白在保护昆虫抵抗外源微生物侵染过程中发挥着重要作用^[3-4], 近年来, 对虾围食膜及其蛋白功能的研究也逐渐成为热点。本研究克隆获得了凡纳滨对虾2条类围食膜蛋白LvPT1和LvPT2 cDNA全长, 它们编码的氨基酸序列都具有3个典型的ChtBD2结构域, ChtBD2结构域是几丁质结合结构域的一种, 主要存在于围食膜

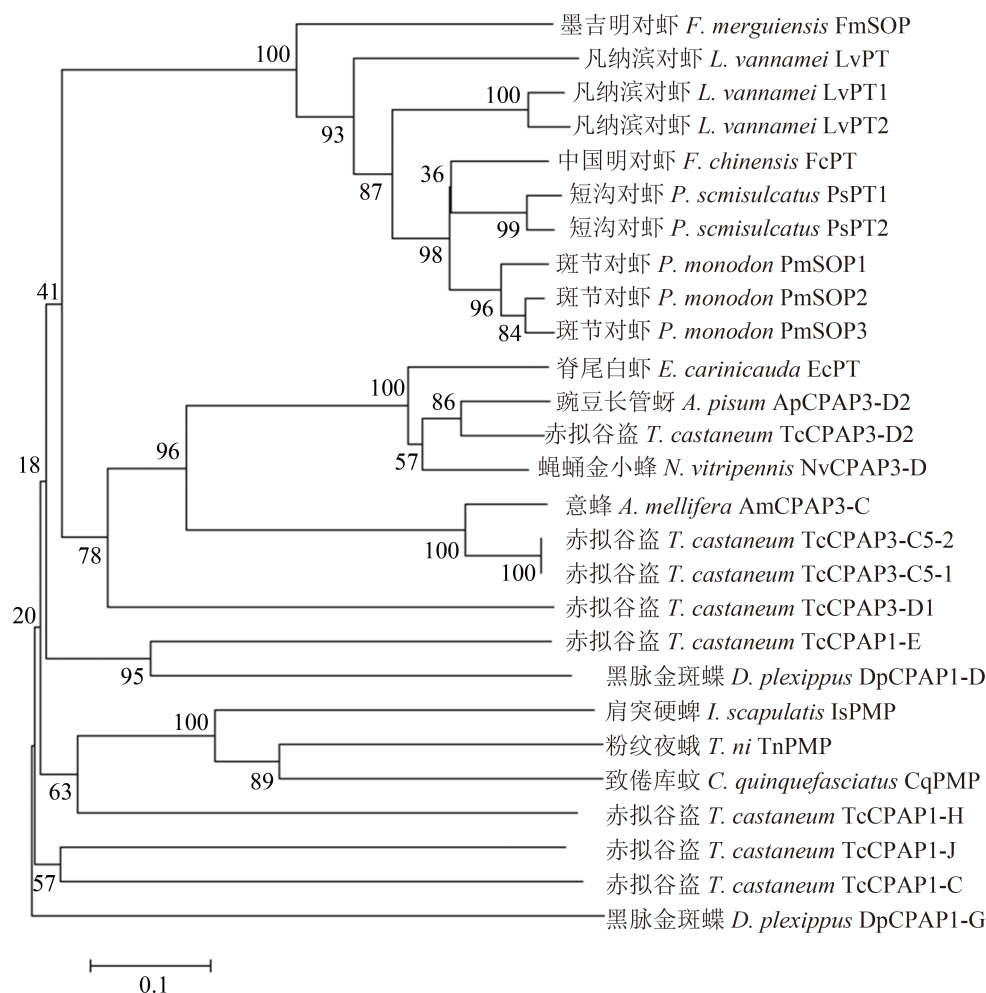


图5 凡纳滨对虾LvPT1和LvPT2与其他虾和昆虫类围食膜蛋白氨基酸序列的系统进化树分析

基因登录号: AAV83539.2(墨吉明对虾, FmSOP); AEI26265.1(凡纳滨对虾, LvPT); AAZ66371.1(中国明对虾, FcPT); AAF34331.1(短沟对虾, PsPT1); AAF34332.1(短沟对虾, PsPT2); AAM44049.1(斑节对虾, PmSOP1); AAM44050.1(斑节对虾, PmSOP2); ABL86146.1(斑节对虾, PmPT3); AGG20312.1(脊尾白虾, EcPT); NP_001165856.1(豌豆长管蚜, ApCPAP3-D2); NP_001073568.1(赤拟谷盗, TcCPAP3-D2); NP_001165853.1(蝇蛹金小蜂, NvCPAP3-D2); NP_001165860.1(意蜂, AmCPAP3-C); NP_001107778.1(赤拟谷盗, TcCPAP3-C5-2); NP_001073569.1(赤拟谷盗, TcCPAP3-C5-1); NP_001161908.1(赤拟谷盗, TcCPAP3-D1); ACY95470.1(赤拟谷盗, TcCPAP1-E); EHV72033.1(黑脉金斑蝶, DpCPAP1-D); EEC19499.1(肩突硬蜱, IsPMP); AAY46199.1(粉纹夜蛾, TnPMP); EDS28614.1(致倦库蚊, CqPMP); ACY95473.1(赤拟谷盗, TcCPAP1-H); ACY95474.1(赤拟谷盗, TcCPAP1-J); ACY95468.1(赤拟谷盗, TcCPAP1-C); EHV65511.1(黑脉金斑蝶, DpCPA1-G)

Fig. 5 The phylogenetic tree of LvPT1 and LvPT2 with peritrophins from other shrimp and insect species

GenBank accession number: AAV83539.2 (*F. merguensis*, FmSOP); AEI26265.1 (*L. vannamei*, LvPT); AAZ66371.1 (*F. chinensis*, FcPT); AAF34331.1 (*P. semisulcatus*, PsPT1); AAF34332.1 (*P. semisulcatus*, PsPT2); AAM44049.1 (*P. monodon*, PmSOP1); AAM44050.1 (*P. monodon*, PmSOP2); ABL86146.1 (*P. monodon*, PmPT3); AGG20312.1 (*E. carinicauda*, EcPT); NP_001165856.1 (*Acyrtosiphon pisum*, ApCPAP3-D2); NP_001073568.1 (*Tribolium castaneum*, TcCPAP3-D2); NP_001165853.1 (*Nasonia vitripennis*, NvCPAP3-D2); NP_001165860.1 (*Apis mellifera*, AmCPAP3-C); NP_001107778.1 (*T. castaneum*, TcCPAP3-C5-2); NP_001073569.1 (*T. castaneum*, TcCPAP3-C5-1); NP_001161908.1 (*T. castaneum*, TcCPAP3-D1); ACY95470.1 (*T. castaneum*, TcCPAP1-E); EHV72033.1 (*Danaus plexippus*, DpCPAP1-D); EEC19499.1 (*Ixodes scapularis*, IsPMP); AAY46199.1 (*Trichoplusia ni*, TnPMP); EDS28614.1 (*Culex quinquefasciatus*, CqPMP); ACY95473.1 (*T. castaneum*, TcCPAP1-H); ACY95474.1 (*T. castaneum*, TcCPAP1-J); ACY95468.1 (*T. castaneum*, TcCPAP1-C); EHV65511.1 (*D. plexippus*, DpCPA1-G)

蛋白、几丁质酶和一些蛋白酶中, 而几丁质酶和其他蛋白酶除了含有几丁质结构域外, 通常还含有其他结构域, 这一特点使得围食膜蛋白

便于进行鉴别^[14]。Jasrapuria等^[15]根据系统进化分析、基因功能及表达特征, 将赤拟谷盗(*T. castaneum*)基因编码中含有ChtBD2结构域的蛋白分

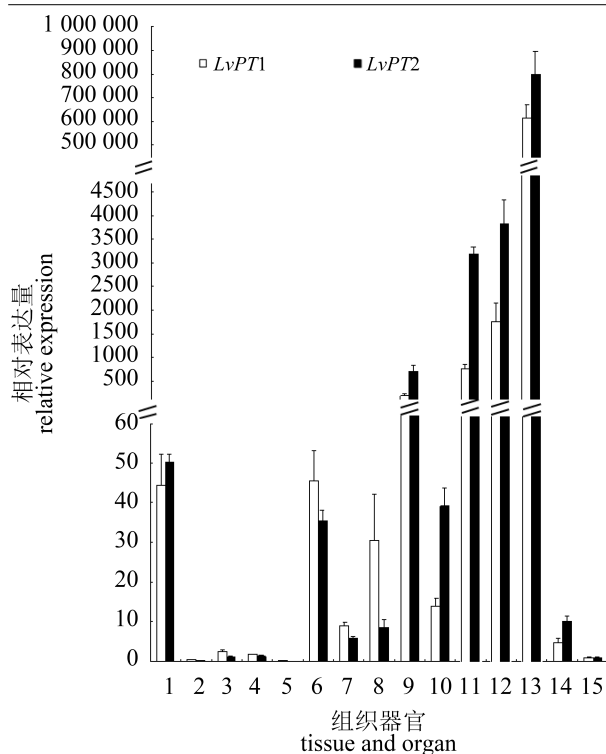


图6 *LvPT1*和*LvPT2*的组织表达

1. 眼柄; 2. 腮; 3. 心脏; 4. 肝胰腺; 5. 肌肉; 6. 前肠; 7. 中肠; 8. 后肠; 9. 表皮; 10. 神经; 11. 附肢; 12. 精巢; 13. 卵巢; 14. 类淋巴器官; 15. 血细胞

Fig. 6 Tissue expression of *LvPT1* and *LvPT2* in *L. vannamei*

1. eyestalk; 2. gill; 3. heart; 4. hepatopancreas; 5. muscle; 6. foregut; 7. midgut; 8. hindgut; 9. skin; 10. nerve; 11. pleopod; 12. testis; 13. ovary; 14. lymphoid organ; 15. hemocyte

成3个家族(PMP、CPAP3和CPAP1)。PMP家族属于肠道特异性蛋白,又称为peritrophin,是围食膜结构形成的主要蛋白成分,而CPAP3和CPAP1家族蛋白则表达于表皮形成相关组织,其功能还未知。*LvPT1*和*LvPT2*两条蛋白序列具有较高的相似性,与已报道的其他虾类围食膜蛋白聚在一起,因此推测*LvPT1*和*LvPT2*与其他虾类围食膜蛋白可能为同一类型的围食膜蛋白。*LvPT1*和*LvPT2*的组织表达分析发现,它们具有相同的组织表达分布趋势,在凡纳滨对虾卵巢组织中的表达量最高。短钩对虾^[11]和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[16]卵巢中也存在不同的类围食膜蛋白基因高表达,称为虾卵巢围食膜蛋白。据报道,在对虾成熟卵细胞的卵膜边缘存在很多杆状结构的皮层颗粒,称为皮层棒(cortical rods, CRs)^[17]。卵细胞排入海水后,皮层棒会发生破裂、溶解,即发生皮层反应,形成凝胶膜(jelly

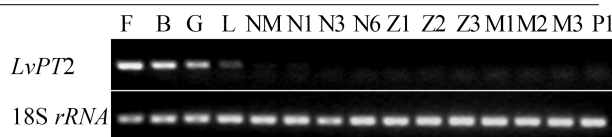


图7 *LvPT2*在凡纳滨对虾早期发育中的表达

F. 受精卵; B. 囊胚期; G. 原肠胚期; L. 肢芽期; NM. 膜内无节幼体; N1. 无节幼体1期; N3. 无节幼体3期; N6. 无节幼体6期; Z1~Z3. 溞状幼体1~3期; M1~M3. 糠虾1~3期; P1. 仔虾1期

Fig. 7 Expression of *LvPT2* in early development of *L. vannamei*

F. fertilized egg; B. blastulae; G. gastrulae; L. limb buds stage; NM. nauplius in membrane; N1. nauplius stage 1; N3. nauplius stage 3; N6. nauplius stage 6; Z1-Z3. zoea stage 1-3; M1-M3. mysis stage 1-3; P1. post-larvae stage 1

layer, JL),在卵细胞受精后可与卵被膜和受精膜共同形成孵化膜(hatching envelope),保护胚胎发育。皮质棒中含有凝胶膜形成的前体蛋白^[18]。研究发现,短钩对虾卵巢围食膜蛋白(PsSOP)^[11]和日本囊对虾卵巢围食膜蛋白(MjSOP)^[16, 19]是存在于皮质棒中的一类蛋白,PsSOP和MjSOP可在卵细胞受精后从皮质棒中释放出来包围受精卵形成保护层。*LvPT1*和*LvPT2*同PsSOP和MjSOP具有很高的同源性,并且在卵巢中高度表达,因此推测,*LvPT1*和*LvPT2*可能在卵巢中发挥了与PsSOP和MjSOP相同的作用。

为了进一步了解*LvPT1*和*LvPT2*在卵巢中高表达的作用,对*LvPT2*在对虾早期发育中的表达情况进行了研究,结果显示,*LvPT2*在受精卵时期表达量最高,随着发育的进行,表达量出现明显降低,当胚胎从孵化膜中孵出后,虽然无节幼体已形成附肢、表皮、眼柄、消化道等组织,但*LvPT2*在这些组织中的表达量要低于卵巢组织上百倍,利用Real-time PCR方法可能不足以显示出其微弱的表达情况,因此无节幼体中未检测出*LvPT2*明显表达。*LvPT2*在发育过程中的表达变化,说明*LvPT2*在早期对虾发育时孵化膜形成过程中可能发挥了某些作用,它们可能与受精卵细胞形成和保护有关。围食膜蛋白通过ChtBD2结构域与几丁质相互作用可以形成膜状结构的围食膜,从而起到保护昆虫中肠上皮细胞免受外界微生物侵袭的作用^[20]。由此推测,SOPs可能也与其他物质相互作用,从而形成具有保护作用的凝胶膜。研究发现SOPs还具有细菌结合活性^[10]和抗菌活性^[12]。因此由SOPs构成的对虾胚胎孵化膜可能在对虾早期发育保护胚胎免

受外界病原微生物侵染过程中发挥了重要作用。

研究表明, 凡纳滨对虾卵巢类围食膜蛋白 LvPT1 和 LvPT2 可能辅助形成受精卵保护层, 在保护对虾早期发育胚胎免受外界病原微生物侵染过程中发挥了重要作用。研究结果为深入了解围食膜蛋白多样性及其免疫功能奠定基础, 丰富了对虾的先天性免疫研究, 为对虾免疫防治提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Wang P, Granados R R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(13): 6977-6982.
- [2] Eisemann C H, Binnington K C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods[J]. International Journal for Parasitology, 1994, 24(1): 15-26.
- [3] Tellam R L, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 29(2): 87-101.
- [4] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, *et al.* New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function[J]. Annual Review of Entomology, 2009, 54(1): 285-302.
- [5] Shen Z C, Jacobs-Lorena M. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates[J]. Journal of Molecular Evolution, 1999, 48(3): 341-347.
- [6] Martin G G, Simcox R, Nguyen A, *et al.* Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability[J]. The Biological Bulletin, 2006, 211(3): 275-285.
- [7] Wang L Y, Li F H, Wang B, *et al.* Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(6): 1285-1291.
- [8] Xie S J, Zhang X J, Zhang J Q, *et al.* Envelope proteins of white spot syndrome virus (WSSV) interact with *Litopenaeus vannamei* peritrophin-like protein (LvPT)[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144922.
- [9] Wang L Y, Li F H, Wang B, *et al.* A new shrimp peritrophin-like gene from *Exopalaemon carinicauda* involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(3): 840-846.
- [10] Du X J, Wang J X, Liu N, *et al.* Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Molecular Immunology, 2006, 43(10): 1633-1644.
- [11] Khayat M, Babin P J, Funkenstein B, *et al.* Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins[J]. Biology of Reproduction, 2001, 64(4): 1090-1099.
- [12] Loongyai W, Avarre J C, Cerutti M, *et al.* Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin with antimicrobial activity from *Fenneropenaeus merguensis*[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(5): 624-637.
- [13] Anuchan S, Deachamag P, Siammai N, *et al.* Antimicrobial activity of engineered shrimp ovarian peritrophin fragments from *Fenneropenaeus merguensis*[J]. Protein & Peptide Letters, 2015, 22(1): 73-80.
- [14] Venancio T M, Cristofolletti P T, Ferreira C, *et al.* The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins[J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(1): 33-44.
- [15] Jasrapuria S, Arakane Y, Osman G, *et al.* Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40(3): 214-227.
- [16] Kim Y K, Kawazoe I, Tsutsui N, *et al.* Isolation and cDNA cloning of ovarian cortical rod protein in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae)[J]. Zoological Science, 2004, 21(11): 1109-1119.
- [17] Rankin S M, Davis R W. Ultrastructure of oocytes of the shrimp, *Penaeus vannamei*: cortical specialization formation[J]. Tissue and Cell, 1990, 22(6): 879-893.
- [18] Clark J W H, Yudin A I, Lynn J W, *et al.* Jelly layer formation in Penaeoidean shrimp eggs[J]. The Biological Bulletin, 1990, 178(3): 295-299.
- [19] Kim Y K, Tsutsui N, Kawazoe I, *et al.* Localization and developmental expression of mRNA for cortical rod protein in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*[J]. Zoological Science, 2005, 22(6): 675-680.
- [20] Lehane M J. Peritrophic matrix structure and function[J]. Annual Review of Entomology, 1997, 42(1): 525-550.

Cloning and expression analysis of shrimp ovarian peritrophin-like gene during early embryonic development in *Litopenaeus vannamei*

MA Huan¹, CHU Jixing¹, WANG Liyan^{1*}, LI Fuhua², XIANG Jianhai²

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science,
Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Peritrophin was one type of proteins which was the important structural component of peritrophic membrane (PM) lining the midgut in invertebrate. It was first separated from insect, and played an important role in protecting insects from invasion by microorganisms. Recently, many peritrophin-like genes were identified from tissues not only intestine in crustacean, which implied that the role of peritrophin-like proteins might be diverse. In this study, two cDNA sequences encoding peritrophin-like protein named as *LvPT1* and *LvPT2* were found and cloned from *Litopenaeus vannamei*. Their deduced amino acid sequences exhibited high similarity to each other and most other shrimp peritrophins which have been reported. Tissue expression analysis by Real-time PCR revealed that *LvPT1* and *LvPT2* were mainly expressed in shrimp ovary, similar with shrimp ovarian peritrophins (SOPs). Semi-quantitative RT-PCR was used for analyzing the expression of *LvPT2* during the early development of *L. vannamei*. The results showed that *LvPT2* expression was the highest in fertilized eggs, and decreased significantly in developing process. There was no obvious expression of *LvPT2* in nauplius hatched out from the hatching membrane. Therefore, we presumed that *LvPT1* and *LvPT2* might be the same kind of peritrophin to play the similar role with other shrimp SOPs, in participating in the formation and protection of fertilized egg, and protecting shrimp embryo against pathogen infection.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; peritrophic membrane (PM); peritrophin; embryonic development

Corresponding author: WANG Liyan. E-mail: wly712@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41076101); Foundation of Tianjin Project "With Three Years of Time to Introduce a Thousand or More High-level Talents" (5KQM110029); Foundation of Talent Introduction Project of Tianjin Normal University (5RL130)