

以唐学家 JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

DOI: 10.11964/jfc.20201212548



脊尾白虾 Strawberry Notch1 基因的克隆及免疫功能

赖晓芳^{1,2,3*} 昊1, 琴¹、 于雅梅1, 焕^{1,2,3}、 阎斌伦^{1,2,3}、 陈 戴 高 (1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室,江苏连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014)

摘要: 为探究 Strawberry Notch1 基因 (SBNO1) 在甲壳动物中的免疫功能、实验对脊尾白 虾 SBNO1 的 cDNA 序列全长、系统进化、组织分布以及副溶血性弧菌感染后 SBNO1 和 Notch 信号通路中相关基因表征进行了研究。结果显示,脊尾白虾 SBNO1 cDNA 序列全长 4 353 bp, 共编码 1 380 个氨基酸, 预测相对分子质量 158.91 ku, 理论等电点 4.81。qPCR 分析显示,脊尾白虾 SBNO1 在各组织中均有表达,其中在肝胰腺中表达量最高,性腺次 之。利用 RNAi 干扰 SBNO1 显示,脊尾白虾在感染副溶血性弧菌后,干扰组死亡率显著高 于未干扰组。副溶血性弧菌感染脊尾白虾后显著影响了 Notch 信号通路中 SBNO1、Numb 与 Delta 在肝胰腺中的转录情况,而 Jagged 的表达差异不显著。SBNO1 和 Numb 的表达量 随时间延长都呈现出先上升后下降的趋势, Delta 的表达量呈现出先下降后上升的趋势。 研究表明, Notch 信号通路参与了脊尾白虾副溶血性弧菌感染后的免疫。本研究有助于阐 明无脊椎动物先天免疫的机制,为抗病脊尾白虾的分子育种提供理论依据。

关键词: 脊尾白虾; Strawberry Notch1; 副溶血性弧菌; RNA 干扰 中图分类号: O 785; S 917.4

Notch 信号通路在进化上高度保守, 对于生 物体中许多参与免疫调控以及细胞增殖基因的表 达至关重要^[1]。Notch 最早于 1919 年被发现,因 在果蝇翅膀边缘部分会出现缺口样的性状而得 名^[2]。不久后,Notch 被证实具有介导蛋白质跨膜 运输的功能,在细胞间相互通讯,扮演着重要角 色^[3]。经研究表明, Notch 信号通路主要由 Notch 受体、Notch 配体和细胞效应器分子构成。

Strawberry Notch1 (SBNO1) 是解旋酶超家族2 的新型染色质因子,可以在 Notch 信号通路下游 运作^[4]。目前,针对斑马鱼 (Danio rerio)的研究表 明,SBNO1 在胚胎神经系统区域呈现高表达。此 外,在斑马鱼胚胎中注射 SBNO1 抑制剂会阻碍

文献标志码:A

Notch 信号的结合,造成基因表达延迟等现象, 该研究还表明,SBNO1可以正向调节其靶标的转 录,从而激活 Notch 信号通路^[5]。尽管在模式动物 中对 SBNO1 进行了较好的报道,但很少有报道证 明其在无脊椎动物中存在并参与 Notch 信号通路 调控。目前,对于海洋甲壳类动物 SBNO1 功能有 关知识的掌握仍然有限,对 SBNO1 的研究可能有 助于理解和追踪无脊椎动物免疫系统的进化。

脊尾白虾 (Exopalaemon carinicauda)属甲壳 纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 长臂虾科 (Palaemonidae) 白虾属 (Exopalaemon), 主要分布在我国 黄渤海海域[6-7]。因其具有生长快、环境适应性强、 繁殖周期短等优点,为池塘单养、混养主要品种

资助项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX20_2884); 江苏省优势学科建设工程 (PAPD); 国家重点研 发计划 (2018YFD0901302)



中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

https://www.china-fishery.cn

收稿日期: 2020-12-23 修回日期: 2021-10-17

之一。随着养殖密度的增加,病原菌会在虾类中流行,导致产量大幅下降。由副溶血性弧菌 (Vibrio parahaemolyticus)引起的急性肝胰腺坏死 病已成为虾塘减产的主要疾病之一^[8-9]。脊尾白虾 也像其他无脊椎动物一样,依靠自身先天免疫机 制来抵御病原菌的侵袭。本研究拟克隆脊尾白虾 SBNO1 cDNA,研究个体在 SBNO1 RNA 干扰和副 溶血性弧菌感染后, SBNO1 与 Notch 信号通路中 下游相关基因的表征,为脊尾白虾病害防御机制 研究提供相应的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用脊尾白虾由实验室自繁而来,均为 健康活泼个体,平均体长为(6.2±0.4)cm,平均体 质量为(2.3±0.2)g。RNA干扰下副溶血性弧菌感 染实验所用虾在室内循环养殖室养殖(pH 8.2、 盐度23、温度26℃),每日投喂2次(9:00和17: 30)。副溶血性弧菌样品来自中国菌种保藏中心。 RNA干扰实验中,注射无菌生理盐水(SPSS)作为 对照。

1.2 总 RNA 提取及第一链合成

选取3尾脊尾白虾,分别提取眼柄、心脏、 性腺、胃、肝胰腺、鳃、肌肉、肠、腹索神经等 9个组织样品各约18 mg。采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程股份有 限公司)提取脊尾白虾中的总 RNA, 1.2% 琼脂糖 凝胶电泳验证 RNA 完整性,使用 GeneQuant pro 仪器检测 RNA 的浓度以及纯度, -80 ℃ 保存。

采用 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa)将脊尾白虾各组织的 RNA 反转录成 cDNA。另取脊尾白虾各组织的混 合 RNA, 通过 SMARTer RACE 5'/3'Kit 试剂盒 (TaKaRa) 以每管 10 µL 的量分别合成 5'和 3' RACEready cDNA。

1.3 SBNO1 基因 cDNA 全长克隆

根据本实验室获得的脊尾白虾转录组序列, 经 Blast 分析表明,脊尾白虾核心序列与凡纳滨对虾 SBNO1 具有高度的相似性。通过 Primer Premier 5.0 软件设计 5'和 3' RACE 引物 (表 1)进行快速扩增, PCR 的反应体系和反应程序按照上述反转录试剂

Tab. 1 Research related primer sequences		
引物 primers	序列 sequence	用途 application
ntr-93	ATCCTCCTCTTCATCCCATTCTTCTG	5'RACE
ntr-277	TACTGAGGAGGTCTGGTTTGGGTTTC	5'RACE
ntf-3 754	GCTCAAGAACATTGGGAAGAACAGTA	3'RACE
ntf-3 856	GAAATTGGGTTGCGTCGCCGTACTTA	3'RACE
nf-1	TCTCGTGATCTTTCGTCA	qPCR
nr-1	ATGCTATCTTCTTTGGTA	qPCR
18S-f	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	qPCR
18S-r	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	qPCR
Jagged-f	GTCGTGCTGTTCATTT	qPCR
Jagged-r	CGCCATAGTTTCTCTT	qPCR
Delate-f	GTCAATCCCGTTCAGTTT	qPCR
Delate-r	TCATCGTCAGTCCAATCT	qPCR
Numb-f	ACGGACTCAGGGTTGTTG	qPCR
Numb-r	CATGGCTTAATCTCTCGC	qPCR
N-RNAi-A1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGCAG GACACATACACGTAATT	RNAi
N-RNAi-B1	AATTACGTGTATGTGTCCTGCCCCTATAGTG AGTCGTATTAGTGATC	RNAi
N-RNAi-C1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTACG TGTATGTGTCCTGCTT	RNAi
N-RNAi-D1	AAGCAGGACACATACACGTAACCCTATAGTG AGTCGTATTAGTGATC	RNAi

表1 研究相关引物序列

盒说明进行。由 PCR 扩增得到的产物经胶回收、 克隆转化后,将菌液送至上海生工生物工程股份 有限公司测序。测序结果通过 DNAMAN 8 软件 进行拼接,得到 SBNO1 基因完整的 cDNA 序列。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库中 Blast (https://www.ncbi. nlm.nih.gov) 分析 SBNO1 的 cDNA 和氨基酸序列。 采用 ORF finder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) 分析 SBNO1 的开放阅读框。使用 ExPASy (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) 进行理论等 电点与相对分子量的预测。用 Clustalx 软件进行 氨基酸序列的多重比对,再用 DNAMAN 8 软件 作图。根据 MEGA 7.0 软件通过邻接法构建系统 发育树。

1.5 实时荧光定量 PCR

依据所获得的脊尾白虾 *SBNO*1 核心序列设 计荧光定量引物 (表 1),采用 18S rRNA 作为内参 基因。本实验采用 chamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (vazyme),模板为脊尾白虾不同组织的 cDNA。PCR 反应体系为 20 µL,反应程序: 95 ℃ 变性 2 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 复性 1 min, 40 个循环;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 复性 1 min,95 ℃ 变性 15 s (熔解曲线程序)。

1.6 RNA 干扰

脊尾白虾随机分为4组(第1组 SPSS+SPSS, 第2组 RNAi+SPSS,第3组 SPSS+VP,第4组 RNAi+VP),每组3个平行,每个平行30尾虾。 第1组和第3组预先在脊尾白虾心腔注射10μL 无菌生理盐水,第2组和第4组注射10μL RNA 干扰试剂(表1)。24h后,第1组和第2组在脊尾 白虾尾部第二腹节处注射10μL无菌生理盐水, 第3组和第4组注射10μL副溶血性弧菌悬液 (1×10⁸ CFU/mL)。第2次注射后,在0、3、6、12、 24、48、72和96h时取样并记录死亡率,每组取 3尾脊尾白虾肝胰腺用于检测基因表达量。

1.7 数据分析

实验最终各定量结果采用 SPSS 19.0 和 Excel 软件进行统计分析,采用 2^{-△ΔC} 方法处理数据,采 用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和最小显 著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异,其中 P<0.05 表示差异显著, P<0.01 表示差异极显著, 最后采用 Oringin 2019b 软件作图。

2 结果

2.1 脊尾白虾 Notch 信号通路中 SBNO1 的克 隆和序列分析

脊尾白虾 SBNO1 cDNA 序列全长为 4 353 bp (图 1),其中 5'非翻译区 (5'-UTR) 21 bp,3'非翻 译区 (3'-UTR) 189 bp,开放阅读框 (PRF) 4143 bp, 编码 1 个由 1380 个氨基酸残基构成的蛋白质。预 测蛋白质相对分子量为 158.91 ku,理论等电点为 4.81。应用 SMART 在线软件对其蛋白质保守结构 域预测,发现该蛋白在 287~588 氨基酸处有 AAA_34 保守结构域、在 720~830 氨基酸之间存 在 SV2 保守结构域、在 855~1129 氨基酸处有 Helicase_C_4 结构域。

2.2 氨基酸序列比对及系统进化分析

通过 Clustalx 软件将脊尾白虾 SBNO1 的氨基 酸序列与凡纳滨对虾 (Litopenaeus vannamei)、方 鼻卷甲虫 (Athalia rosae)、小鼠 (Mus musculus)、 白鹭 (Egretta garzetta)和斑马鱼等物种进行多序列 比对,结果显示, SBNO1 的氨基酸序列与凡纳滨 对虾的同一性最高 (82%),其次是方鼻卷甲虫 (80%)。选取脊尾白虾 855~1129 氨基酸处 strawberry notch 家族特有结构域 (Helicase_C_4) 进行多 序列比对,其与凡纳滨对虾同一性最高 (95.29%), 其余物种均高于 85.56%,表明不同物种间 Helicase_C_4 氨基酸序列具有较高的保守性 (图 2)。

利用 Neighbor-Joining 法构建脊尾白虾 SBNO1系统进化树,脊尾白虾与同为甲壳动物门 的凡纳滨对虾 SBNO1亲缘关系最近,聚为一小支, 再与无脊椎动物中的方鼻卷甲虫、根虫(Hyalella azteca)、光肩星天牛(Anoplophora glabripennis)等 聚为一大支,斑马鱼、非洲爪蟾(Xenopus laevis)、 白鹭、小鼠以及智人(Homo sapiens)等脊椎动物 聚为一大支(图 3)。

2.3 脊尾白虾 SBNO1 在不同组织中的表达特征

为进一步研究脊尾白虾 SBNO1 在不同组织中的表达水平,以 18S RNA 为内参基因,利用 RT-qPCR 检测脊尾白虾 SBNO1 表达量,脊尾白虾 SBNO1 在 9 个组织中均有表达,其中在肝胰腺中的表达量最高,性腺次之(图 4),在肌肉和腹索神经中表达量最低。

1 GAAGCAGTGTAAAGGAGAGAGAGATGCCGCGTCCAGCTAAAGCTGCATCGAAGCAAGGCAAATTTAAAGATGAATCGGAGAGTAGTGAT M P R P A K A A S K Q G K F K D E S E S S I 88 TCAGAAGAATGCGATGAAGAGGAGGAGGATCTTGACAACATGAATGTTCCAGGGGGAGGAACTACATTAGGGGTTTTTAAAAGGTGAGCGC V K K E G S E L S S L G T S S S G L T L N S L L S A F
 32
 E
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 F
 M K G L E G I T A P S L K G L E S I A S A A G L Q N R A 110 436 TTGCAGCAGCAGCTGATGCAGAGGGGGGCTAATTACAAAAGCTGCATACTCTCCCAGGTTATCAGGTTCTGCGCCCCAGATGGTCATATT 139 L Q Q Q L M Q R G L T K A A Y S P G Y Q V L R P D G H J 523 CCT6CCA6A6CAA6CAT66GGTATGAT6GGCA6CCTTA6GAATGAT6GGT66CAACCCCTTA6CA6CACA6GGAATGAT6CA6T6CAT A R A S M G M M G S L G M M G G N P L A A Q G M M Q S I 168 100 TIGCATGACAGCTCGGGCTTGATATGGGCTACCCGTGATGCACAGCGATGAGCAGCAATGAGCATGTGCCACGCT 197 M A M R A P G L D M S N P V I A Q L M M Q Q A M S M S Q T 697 GGGGCACCTCAGGTTCAGAAACTGATGGGGCTTGTATCCAGGGATGGGAATGCAAGTGGACCCTCTATGCTGGGCCCACCCTGGTGCAA Q V Q K L M G L Y P G M G M Q V N P L MLA Α 220 784 GAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGATGAAGATATGGGTATTGCAGAAACCTATTCAGACTACATGCCCTCAAAATTGAAAATTGGCATCAAG F F F F F F F F M G T A F T Y S D Y M P S K L K T CATCCTGACCAGGTTGTAGAAACTGCGTCCATGTCATCCGTAGAGCCGCCTGATGTTTGGTATGAGATGGTCATTCCAGATGAATCA D Q V V E T A S M S S V E P P D V W Y E M V I P D 284 1 045 AGAGCTGGGTTCCTTGTTGGTGATGGTGCTGGTGTAGGTAAAGGCCGTACAATAGCGGGGCATAATATATGAAAATTACCTGAAAGGT 342 R A G F L V G D G A G V G K G R T I A G I I Y E N Y L K G 132 <u>GAMAGAATCATATGGGTCAGTGTCATGATTTAAAATATGGCCGAGCGGATTTGAAGCACTGGGTGCAGGACACATA</u> 371 R K S I W V S V S N D L K Y D A E R D L K D I G A G H I 1 219 CACGTAAATTTTCTTAGTAAAATGAAAATATGGCAAGATTAATTCGAATTAAATGGAAACGTGAAGAAAGGAGTTTTATTTGCAACG LSKMKYGKINSDLN 1 306 TATTCGGCTCTGATTGGAGAGTCCTCCAGCGGCAAGGCAAATACAAGACCCGATTAAAACAGATTCTGAATTGGTGGGGGATGAC 429 Y S A L I G E S S S G Q G K Y K T R L K Q I L N W C G D D 1 393 TTTGATGGTTGTATTGTGTTTGATGAGTGTCACCGCGCCAAAAATCTCTGCCCTGTCGGGTCTGGAAAACCAACAAAAACTGGTACA 458 F D G C I V F D E C H R A K N L C P V G S G K P T K T G T 1 480 ACAGTTTTAGAACTACAGAATAAGTTACCAAAAGCCAGAGTTGTGTATGCCTCAGCTACTGGAGCGTCAGAGCCAAAGAATATGGCA I. E. I. O. N. K. I. P. K. A. R. V. Y. A. S. A. T. G. A. S. F. P. 1 567 TACATGGTCCGTATAGGAATTTGGGGGAAGGGCACACCCTTCCCAGAATTTTCTGACTTCATCAGTGCAGTTGAAAAAAGGGGTGTT IGI W G K G T P F P E F S D F I S A 1 654 GGTGCTATGGAAATTGTGGCTATGGATATGAAGCTTCGTGGAATGTACATAGCGAGACAGTTAAGTTTCCACGGAGTAGGCTTCAGA VAMDMKLRGMY TAROLS
 545
 G
 A
 M
 D
 M
 L
 K
 G
 M
 I
 I
 A
 K
 Q
 L
 S
 H
 G
 A
 M
 L
 K
 G
 M
 I
 I
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 M
 A
 A
 M
 A
 M
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A
 A< INAEKGMKKSMWGQFWSSHQRF ASEI Q S T G E A R T L E Q L E K D D G E L S D F V S T A 2 263 <u>TACAAGGAACTGCATTCAGATAAGAAGATGAATCCGACTTGAAATGCCAGGTGAAAGATGAAGAAGAAGATGAAGAAGAATGCT</u> 748 Y K E L H S D N E D D S D F E M S G E S G Q E E D E E D A 2 350 TATTCATCAGAAGCTTCTTCAGGATTTCTCAGGAATTAGTGATTTTGATGATGAAGATACGTGGGGGCCGCCAAAAAAACGAGGCAAA 777 Y S S E A S S D F S G I S D F D D E D T W G R P K K R G K KTELLKAIDNLGRKLPPN 835 NRV TIDO 2 611 <u>GAACTTGGGGGCCCTGAAATGTTGCCGAATGACAGGAACAAAGGGAGGTGCTGCAAGGGGATATGGCCAAGTTCAGTATGAA</u> 864 E L G G P E N V A E M T G R K G R V V Q G D D G Q V Q Y E 864 E L G G P E N V A E M T G R K G R V V Q G D D G Q V Q Y E 2 698 TCGCGTTCGGAAGTTGATGTGTCTTTAGAAATTTTAAATATAAAGAAAAGAAGGTTATGAATTCAGAAAAAGATATAGCCATT SLEI L N IKEK D V
 975
 3
 K
 5
 V
 D
 Y
 E
 1
 I
 K
 B
 K
 D
 K
 D
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I 2 959 ATTTCGGAGTTACCCGCCGAGAGGAGGTTTGCATCTATCGTTGCAAAAAGATTAGGAAGTTAGGTGCGTTGACAACATGGGACAG 980 I S E L A G E R R F A S I V A K R L E S L G A L T H G D I 3 046 AGAGCAACAGAATCTCGTGATCTTCGTCATTTAACATAGATAACAAATATGGTCGTATGGCTCTGGAATCTACCATGAAGACCATG 1 009 R A T E S R D L S S F N I D N K Y G R M A L E S T M K T M 1033 ATGGCTATGAGCATOCTATAGTACCTOCACCTGAAGATTATAAAGGCGATTCTTCTCCGAAGATCCGGAATGGCTTGGTGGTGGTG 1038 M G Y E H P I V P P P E D Y K G D F F S D I Q N A L V G V 3 220 GGCATAATTACCAAAGAAGATAGCATTTATCAGCTAGATAAGGACTACCAATAATTAGGATAATTCCTAAATAGAATACTAGGATAT EDSIYQLDKDY N N M KF 1.067 N R 3 307 CCTGTCGAACTTCAAAATAGATTGTTCCAGTATTTTACTGATACATTAGCAGCTATAATAAGTCAAGCAAAGAGAACCGGGAAATAT 1 1 2 5 L D L G I G G E G C K K T K T K T W V G K H A T G 1423 ASIA ACAGCAAMACAGAAMITCATACAGITCITGETGAAGAGGEGETCITGEGCAGAGAATCAGGAAMAGTGGGEGEGAACTACAGGAAMAGTGGGEGEGAACTACAGGAAMAGTGGGEGEGAACTACAGGAAGAGTGGEGAGAACTAGAGGAGGEGEGAGACAATAAAAAAACTGCAGTTCITGGGGCGGAGGGGTCTGGGGCGCACACACCCCCGGAACCATCACCCCGGTACT SHQ V R N N K K T A V L A A L E P 183 LEGFY 3 655 AAGAAGAAAGAAGAAGAAAAATAATAGAATGTTCATTCTTTACCGGCCAAATACAGGAATGCAGATGAAGCAAGAGTGTTATTCAGATCTA K K K Y K K V T P D E A Q E H W E E Q Y K A S S H T C 1 241 1 299 L V L N V W A K V E D V L S S S P H S S S T K M Q V 003 CTCAAAACCAGTGACGGCATAAAACTTGTAGGAACCCTCATTCCTAATAACCTTGTTGGAAGATTGTCAGCCGTCATGGAAGAAGAG 4003 CICADATCANTINATION TRADATOR INFORMATION AND CONTRACTOR TRADATOR TO CONCENTRATION AND A TABLE TO THE ADDITION AND A TABLE TO THE ADDITI C T E S Y E E T F T D E D S K D G T G D D N K E 1 357 4 264 4 351 AAA

图 1 脊尾白虾 SBNO1 cDNA 序列及氨基酸序列

ATG)为起始密码子, TAG)为终止密码子, 下划线为 AAA_34 结构域, 双下划线为 SV2 结构域, 波浪线为 Helicase_C_4 结构域

Fig. 1 cDNA and amino acid sequence of SBNO1 in E. carinicauda

 $\overline{\text{ATG}}$ is the initiation codon, $\overline{\text{TAG}}$ is the termination codon, the underlined part is AAA_34, the double underlined part is the SV2, and the Helicase C 4 is underlined with the wavy line

https://www.china-fishery.cn





黑色.高度相似区域,红色.较高相似区域,蓝色.相对相似区域

Fig. 2 Multiple sequence alignment of Helicase_C_4 domain of SBNO1 in E. carinicauda and other species

Black. highly similar domain, red. not very similar domain, blue. relatively similar domain





2.4 RNA 干扰

为探究脊尾白虾 SBNO1 在感染副溶血性弧 菌后的免疫应答,利用 RNAi 干扰沉默脊尾白虾 SBNO1 的表达量,通过 RT-qRCR 检测 SBNO1 在 肝胰腺中的干扰效率。RNA 干扰组各时间点脊尾 白虾 SBNO1 表达量均显著低于未干扰组,96 h 时 干扰效率出现下降,整体干扰效率超过 50% (图 5-a)。

对脊尾白虾 SBNO1 进行干扰后,再注射副 溶血性弧菌,统计死亡率。RNAi+VP 组的累计死 亡率显著高于 SPSS+VP 和未注射副溶血性弧菌的

对照组 (P<0.05)。RNAi+VP组、SPSS+VP组、 RNAi+SPSS 组以及 SPSS+SPSS 组的最终死亡率 分别为 67.8%、49.9%、5.6% 和 4.4% (图 5-b)。

未注射 RNA 干扰试剂的情况下,感染副溶 血性弧菌后脊尾白虾 SBNO1 的表达量如图 5-c 所 示,呈现先上升后下降的趋势。在 0~6 h 表达量 基本稳定,12~72 h 表达量显著升高,且在 48 h 达到最大值,约为未感染组的 6 倍,且未感染组 在 0~96 h 无显著变化。

感染副溶血性弧菌的情况下, RNA 干扰组和





O.性腺, S.胃, He.肝胰腺, G.鳃, E.眼, M.肌肉, H.心脏, V.腹 索神经, I.肠, 不同字母表示差异显著 (*P*<0.05)

Fig. 4 Expression of SBNO1 in different tissues of E. carinicauda

O. gonad, S. stomach, He. hepatopancreas, G. gill, E. eye, M. muscle, H. heart, V. ventral nerve, I. intestine, different letters indicate significant difference (P<0.05)

未干扰组脊尾白虾 SBNO1 的表达量如图 5-d 所示, 呈现出先上升后下降的趋势,且干扰组在 12~ 72h显著低于未干扰组,48h时,未干扰组 SBNO1 的表达量约为干扰组的2倍。

感染副溶血性弧菌后,Notch 信号通路相关 基因的表达情况如图 5-e 所示,Numb 整体呈现出 先上升后下降的趋势,6~48 h 表达量上升,48 h 达到最大值,72~96 h 表达量下降,其中 0~3 h 干 扰组表达量高于未干扰组。Delta 表达量呈先下降 后上升的趋势,且在48 h 达到最小值,干扰组显 著低于未干扰组的表达量,6~48 h 表达量降低, 在 0~3 h 和 72~96 h 时基本保持稳定。Jagged 表达 量在各时间内,两组间均无显著差异。

3 讨论

由病毒或细菌引起的流行病已对虾类养殖业 造成严重威胁^[10]。疾病的产生与发展通常是复杂 的宿主与病原体相互作用的结果,病原体感染宿 主后可能会引起该信号通路中基因的免疫表达^[11]。 宿主 Notch 信号通路与免疫相关基因和抗病功效 有关^[12]。*SBNO*1 被认为是 Notch 信号通路下游重 要的介体^[13],通过与 Notch 转入活性物质相互结 合和调节 Notch转入活性,促进多种靶标的表达^[14]。 本研究发现脊尾白虾 SBNO1 蛋白结构中含有与此 功能相关的 NTP 水解酶 proe-1 磷酸结合环的结构 域 (AAA-34)、转运糖类等大分子物质的蛋白序列 (SV2)。系统进化树分析表明,脊尾白虾 SBNO1 的氨基酸序列与凡纳滨对虾 SBNO1 聚为一小支, 而来自节肢动物门的 SBNO1 聚为一大支,说明 SBNO1 符合生物进化规律,按照对应的进化层次 分类。

据报道,Notch 信号通路参与许多生理过程, 例如细胞凋亡、细胞增殖和分化等^[15]。作为Notch 信号通路中的下游基因,SBNO1 基于Notch 亲和 力会在各组织中表达。本研究表明,SBNO1 在眼 柄、心脏、肝胰腺、性腺、胃、肠、腹索神经、 肌肉和鳃等9个组织中均有表达,其中在肝胰腺 和性腺中的表达量显著高于其他组织。Takano等^[5] 敲除小鼠胚胎中SBNO1,导致囊胚腔无法形成, 推测SBNO1 是生物组织分化与发育的重要基因, 脊尾白虾在性腺中SBNO1 高表达能验证这一观点。 虾肝胰腺是消化和代谢中心,并在免疫应答方面 有着重要的作用,通过Notch 信号通路的调节, SBNO1 可能参与了脊尾白虾的免疫调控。

经研究表明, Notch 信号通路主要由 Notch 受体、Notch 配体和细胞效应器分子构成。Notch 配体又称为 DSL 蛋白, 而在模式动物果蝇中, Notch 配体仅有两种类型: Delta 和 Jagged^[16], 它 们都属于跨膜运输类蛋白,在配体胞外区含有数 个能与 Notch 受体结合的区域^[17]。Delta 与 Jagged 在通路中行使的大部分功能不同但又有部分的重 叠,在细胞增殖分化中都有着重要的作用。 Numb 是一种膜相关蛋白,在 Notch 信号通路中起 到修饰的作用^[18]。现有的研究认为, Numb 能通过 结合 Notch 活化产物来抑制 Notch 信号的传递^[19]。 本研究显示,脊尾白虾在感染副溶血性弧菌后, 干扰组 SBNO1 表达量总体呈现出表达量先上调后 下降到趋于正常水平的趋势,且干扰组的死亡率 显著高于无菌生理盐水对照组,推测脊尾白虾 SBNO1 可能是参与 Notch 信号通路免疫系统调节 中的重要成员,在抵御病原体侵入中发挥着一定 的作用。有研究表明,当 Notch 信号通路被阻断 时,体内T细胞发育将受阻,随即产生大量异常 的 B 细胞^[20]。另据报道, Notch 通路信号被激活 后,能够显著提高 Delate 基因的活性,以此促进 边缘 B 细胞的发育来提升免疫力^[21]。本研究发现, 当 SBNO1 基因被 RNA 干扰时, Delta 基因的表达 量显著降低, Jagged 的表达量却并未出现急剧的 变化, 推测 SBNO1 在免疫反应中可能与 Numb 与





*.与对照组相比差异显著 (P<0.05), **.与对照组相比差异极显著 (P<0.01)

Fig. 5 Expression characteristic of Notch singal pathway releated genes infected by *V. parahaemolyticus* in *E. carinicauda* under RNA interference

*. significant difference compared to the control group (P<0.05), **. extremely significant difference compared to the control group (P<0.01)

Delta 之间存在的相互作用有关,而与 Jagged 无关。 综上所述, SBNO1 介导的 Notch 信号通路可 能在免疫调节中发挥重要的作用,然而基因间如 何相互作用进行免疫调节有待后续研究,敲除 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries SBNO1 以及免疫共沉淀分析 SBNO1 与 Numb以及 Delta 之间的相互作用,可进一步阐明上述机制。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Sega F V D, Fortini F, Aquila G, *et al.* Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1130.
- [2] 付亚娟, 叶枫, 吕卫国, 等. Notch信号通路的研究现 状[J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(5): 447-450.
 Fu Y J, Ye F, Lü W G, *et al.* Recent researches on the Notch signaling pathway[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2007, 4(5): 447-450 (in Chinese).
- [3] Kamińska A, Pardyak L, Marek S, *et al.* Notch signaling regulates nuclear androgen receptor AR and membrane androgen receptor ZIP9 in mouse Sertoli cells[J]. Andrology, 2020, 8(2): 457-472.
- [4] Watanabe Y, Miyasaka K Y, Kubo A, *et al.* Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate *Cdx2* during specification of the trophectoderm[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46135.
- [5] Takano A, Zochi R, Hibi M, *et al.* Expression of *straw-berry notch* family genes during zebrafish embryogenesis[J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(6): 1789-1796.
- [6] 梁俊平,李健,刘萍,等. 脊尾白虾生物学特性与人工 繁育的研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(17): 109-116. Liang J P, Li J, Liu P, *et al.* Research progress of biological characteristics and artificial breeding of ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(17): 109-116 (in Chinese).
- [7] Ma H K, Gao H, Xu W Y, et al. Cloning and functional study of fatty acid-binding protein-like gene of the ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[J]. Aquaculture International, 2020, 28(4): 1517-1530.
- [8] 窦全伟,李吉涛,刘萍,等. 脊尾白虾血蓝蛋白大亚基基因的克隆及表达分析[J]. 水生生物学报, 2018, 42(1): 86-93.
 Dou Q W, Li J T, Liu P, *et al.* cDNA cloning and expres-

sion analysis of hemocyanin subunit gene in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(1): 86-93 (in Chinese).

- [9] Apitanyasai K, Chang C C, Ng T H, et al. Penaeus vannamei serine proteinase inhibitor 7 (LvSerpin7) acts as an immune brake by regulating the proPO system in AHPND-affected shrimp[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 106: 103600.
- [10] 陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰 https://www.china-fishery.cn

腺坏死病副溶血弧菌(Vp_{AHPND})的定量分析[J]. 渔业科 学进展, 2018, 39(4): 93-100.

- Chen M M, Dong X, Qiu L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus (Vp*_{AHPND}) in infected *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 93-100 (in Chinese).
- [11] Sang X X, Dong J, Chen F M, *et al.* Molecular cloning and immune function study of an oyster *IκB* gene in the NF-κB signaling pathway[J]. Aquaculture, 2020, 525: 735322.
- [12] 牛春雪,马蕾,薛海波,等. Notch1信号通路参与自身免疫性疾病发病机制的研究进展[J].现代免疫学,2020,40(1):67-71.

Niu C X, Ma L, Xue H B, *et al.* Research progress of Notch1 signaling pathway involved in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. Current Immunology, 2020, 40(1): 67-71 (in Chinese).

[13] 王艳桥,郑自力, 雷欣, 等. Notch信号通路配体DLL4通 过促进M1型巨噬细胞分化加重糖尿病肾病免疫损 伤[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(11): 926-934.
Wang Y Q, Zheng Z L, Lei X, *et al.* Notch signaling pathway liand DLL4 aggravates diabetic nephropathy immune damage by promoting M1 macrophage differentiation[J]. Immunological Journal, 2020, 36(11): 926-934 (in Chinese).

- [14] Ryoyama N, Imai H, Terashima T, et al. Sbno1 is required for growth of the cerebral cortex during embryogenesis[J]. Neuroscience Research, 2011, 71 Suppl 1: e123.
- [15] 黄林明,刘东强. Notch信号通路抑制剂DAPT对白血 病干细胞的分化和增殖作用[J]. 智慧健康, 2020, 6(11): 42-46.

Huang L M, Liu D Q. Differentiation and proliferation of primary leukemia stem cells by Notch signaling pathway inhibitor DAPT[J]. Smart Healthcare, 2020, 6(11): 42-46 (in Chinese).

- [16] 刘兆国,朱智杰,周梁,等. Notch信号通路与肿瘤研究[J].中国药理学通报, 2012, 28(8): 1045-1048.
 Liu Z G, Zhu Z J, Zhou L, *et al.* On Notch signaling pathway and tumor[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2012, 28(8): 1045-1048 (in Chinese).
- [17] 马菁昌,时光旭,王莉,等. Notch信号通路在神经胶质 瘤中的作用与机制研究进展[J]. 临床神经外科杂志, 2020, 17(4): 477-480.
 Ma J C, Shi G X, Wang L, *et al.* Role and mechanism of 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

Notch signaling pathway in glioma[J]. Journal of Clinical Neurosurgery, 2020, 17(4): 477-480 (in Chinese).

- [18] Petersen P H, Tang H, Zou K, et al. The enigma of the numb-notch relationship during mammalian embryogenesis[J]. Developmental Neuroscience, 2006, 28(1-2): 156-168.
- [19] Gonulcu S C, Unal B, Bassorgun I C, et al. Expression of Notch pathway components (Numb, Itch, and Siah-1) in colorectal tumors: a clinicopathological study[J]. World Journal of Gastroenterology, 2020, 26(26): 3814-

3833.

- [20] Tanigaki K, Tsuji M, Yamamoto N, *et al.* Regulation of αβ/γδ T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling[J]. Immunity, 2004, 20(5): 611-622.
- [21] Saito T, Chiba S, Ichikawa M, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development[J]. Immunity, 2003, 18(5): 675-685.

Cloning and immunological function of SBNO1 gene in Exopalaemon carinicauda

CHEN Hao¹, DAI Qin¹, GAN Yamei¹, GAO Huan^{1,2,3}, YAN Binlun^{1,2,3}, LAI Xiaofang^{1,2,3*} (1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222005, China;

3. Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to explore the immune function of *Strawberry Notch*1 gene (*SBNO*1) in crustaceans, the full length of *SBNO*1 gene cDNA sequence, phylogeny, tissue distribution, the expression of *SBNO*1 and related genes in Notch signaling pathways by *Vibrio parahaemolyticus* (VP) injection were studied in this paper. The results showed that the cDNA sequence of *SBNO*1 was 4 353 bp, encoding a total of 1380 amino acids. The predicted molecular weight of protein is 158.91 ku and theoretical isoelectric point is 4.8. According to the RT-qPCR analysis, it can be found that *SBNO*1 was expressed in all tested tissues, among which hepatopancreas had the highest level and gonad followed. Futhermore, after RNAi interference, compared with the non-inference group, the death rate of the inference group injected with VP was significantly higher. The transcription of *SBNO*1, *Numb* and *Delta* in the hepatopancreas in Notch signaling was obviously influenced by VP. However, there was no significant difference in the expression of *Jagged*. In the group injected with VP, the expression levels of *SBNO*1 and *Numb* increased first and then decreased. The results indicate that Notch signaling pathway plays an important role in the immunity of *E. carinicauda* by VP injection. This study helps to clarify the mechanism of invertebrate innate immunity and provides a theoretical basis for molecular breeding of *E. carinicauda*.

Key words: Exopalaemon carinicauda; Strawberry Notch1; Vibrio parahaemolyticus; RNA inference

Corresponding author: LAI Xiaofang. E-mail: lai.xiaofang@163.com

Funding projects: Jiangsu Province Graduate Research and Practice Innovation Project (KYCX20_2884); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD); National Key R & D Program of China (2018YFD0901302)