



## 凡纳滨对虾丝氨酸蛋白酶同源物基因 (*Lv-SPH*) 的克隆及免疫应答特征

尹丝雨<sup>1</sup>, 何雨欣<sup>1</sup>, 于 娇<sup>1</sup>, 张亦陈<sup>1</sup>,  
刘逸尘<sup>1\*</sup>, 耿绪云<sup>2</sup>, 孙金生<sup>1</sup>

(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. 天津市水产研究所, 天津 300221)

**摘要:** 丝氨酸蛋白酶 (SP) 是一类分布广泛的蛋白水解酶, 行使着一系列重要的生理功能, 包括参与消化作用、血液凝结、胚胎发育和免疫应答过程等, 但在甲壳动物中仅见初步报道。对虾的养殖持续面临着病害的困扰, 深入开展对虾免疫防御机制研究, 将会为寻找抗病新思路提供借鉴。本研究利用 RACE 技术克隆获得了一个新的凡纳滨对虾丝氨酸蛋白酶同源物 (serine protease homologs, *SPHs*) 基因 (*Lv-SPH*) 的全长 cDNA 序列, 通过生物信息学方法分析了其序列特点, 并利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法探讨了其组织分布特征和应答病毒感染的表达变化模式。生物信息学分析显示该基因全长 1 249 bp, 开放阅读框 (ORF) 区长 1 005 bp, 5'-UTR 为 156 bp, 3'-UTR 为 88 bp, ORF 区编码 334 个氨基酸, 氨基端的 16 个氨基酸为预测的信号肽序列。经在线分析软件 SMART 分析显示, *Lv-SPH* 含有一个 clip 结构域和一个高度保守的 SP 结构域 (Tryp-SPc), 后者具有 3 分子活性催化位点, 前 2 个是组氨酸和天冬氨酸, 第 3 位为甘氨酸。该基因在凡纳滨对虾各种组织中有不同程度的表达, 其中在血细胞中表达量最高, 在胰腺、心脏和肠道中广泛表达, 而在肌肉中表达量最低。注射白斑综合征病毒 (WSSV) 后 24 h, *Lv-SPH* 的相对表达量显著升高, 病毒感染后 48 h 达到最高, 约为对照组的 3 倍。*Lv-SPH* 具备典型的 SPH 家族成员特征, 具有一定的组织表达特异性, WSSV 可以显著诱导该基因表达上调, 表明其可能参与了 WSSV 引发的凡纳滨对虾免疫应答过程。研究结果为深入探讨对虾天然免疫调控机制提供了参考, 在对虾健康养殖及病害防治方面具有潜在的应用价值。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 丝氨酸蛋白酶同源物; 基因表达; 病毒感染; 天然免疫应答

**中图分类号:** Q 786; S 941.41

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是当前世界范围内养殖规模最大的经济对虾品种, 然而随着对虾养殖规模的扩大, 在病原活跃、养殖环境恶化和宿主抵抗力下降的共同作用下, 对虾病害频发, 持续困扰着全世界的对虾养殖业<sup>[1-2]</sup>, 其中,

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 引发的疾病最严重。因此, 深入开展对虾免疫防御机制研究, 寻找抗病的新思路显得尤为重要。无脊椎动物缺乏获得性免疫系统, 依靠天然免疫系统来抵御和杀死入侵的病原。甲壳动物的体液

收稿日期: 2021-12-26 修回日期: 2022-04-01

资助项目: 天津市自然科学基金 (19JCYBJC29700, 15JCZDJC33800); 国家自然科学基金 (31472299); 天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金 (TJAE2015005)

第一作者: 尹丝雨 (照片), 从事水产动物分子免疫学研究, E-mail: 1947599110@qq.com

通信作者: 刘逸尘, 从事水生动物分子免疫学及抗病育种研究, E-mail: skylyc@tjnu.edu.cn



免疫主要利用凝血级联反应、酚氧化酶系统、丝氨酸蛋白酶及其抑制剂等一系列免疫效应因子,广泛参与个体的天然免疫应答反应,包括血淋巴凝集、抗菌肽合成、细胞黏附和黑化反应等<sup>[3]</sup>。通常,模式识别受体的识别反应能激活细胞外丝氨酸蛋白酶的级联反应,以此来放大信号和触发下游分子,最终导致病原的死亡<sup>[4-5]</sup>。

酚氧化酶原激活系统 (prophenoloxidase-activated system, proPO-AS) 是由酚氧化酶原 (proPO)、酚氧化酶 (PO)、酚氧化酶激活酶 (PPAE)、丝氨酸蛋白酶 (SP)、模式识别蛋白和蛋白酶抑制剂构成的一个复杂的级联反应系统,这一过程类似于高等动物中的补体激活途径。目前已知这些蛋白酶的4种控制机制,包括由于微生物感染引起的酚氧化酶原激活蛋白酶 (PAP) 前体的诱导合成、通过蛋白酶级联反应激活 PAP 酶原、在辅因子参与下 PAP 激活酚氧化酶原以及丝氨酸蛋白酶抑制剂对 PAP 的抑制。PPAE、SPH 和蛋白酶对酚氧化酶激活系统具有重要作用,统称为酚氧化酶激活因子 (PPAFs)。它们包含高度保守的 C 端丝氨酸蛋白酶结构域和 N 端具有调节功能的 clip 结构域。其中 clip 结构域一般有 30~65 个碱基长,包含 6 个高度保守的半胱氨酸残基,形成 3 个二硫键<sup>[6]</sup>。这种结构单元在节肢动物的 SP 和 SPH 中被广泛发现<sup>[4]</sup>。该酶可以通过识别其他蛋白酶来行使其调控功能。有学者在甲壳动物克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 血细胞中提取并克隆了一种 PPAF<sup>[7]</sup>,其在不含额外蛋白辅助因子的作用下,能将 proPO 裂解成有活性的 PO。在蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 中克隆报道了编码 PPAF 的 cDNA<sup>[8]</sup>。在日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 中发现肽聚糖可以诱导表达 pseudo-clip SPH<sup>[9]</sup>。斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 中的 SPH 可以发挥细胞黏附分子<sup>[10]</sup> 和与黄头病毒 (Yellow head virus, YHV) 相结合的功能<sup>[11]</sup>。中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中含 clip 结构域的 SP 和 SPH 可以应答鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的刺激<sup>[12]</sup>。本实验从凡纳滨对虾血细胞中克隆获得了一个新的 *Lv-SPH*, 探讨了其序列特点及组织分布特征,分析了其应答 WSSV 感染的表达变化模式,研究结果为深入探讨其作为免疫调控基因在对虾防御应答过程中的作用机制提供参考,并将有望应用于对虾的健康养殖和病害防治。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、试剂与仪器

**实验动物** 凡纳滨对虾 (体长 10~15 cm, 体质量 15~20 g), 购于天津市汉沽区养殖站, 在水族箱中充气暂养 6 d, 使其适应实验室的环境再开展实验。

**实验试剂** TRIzol (Invitrogen, 美国), GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, 美国), GoTaq® Green Master Mix (Promega, 美国), AceQ® qPCR-SYBR® Green Master Mix (Vazyme, 中国), 其他试剂均为国产或进口分析纯产品。

**实验仪器** Veriti™ PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, 美国), 台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), 微量移液器 (Eppendorf, 美国), LightCycler® 480 System (Roche, 瑞士), Gel Doc™ XR+成像系统 (Bio-Rad, 美国), 高压灭菌锅 (SX-5002, 日本) 等。

### 1.2 凡纳滨对虾总 RNA 提取和 cDNA 合成

18 尾健康凡纳滨对虾平均分为 3 个平行组, 解剖分离其血细胞、肝胰腺、鳃、肠道、胃、心脏、神经、游泳足和肌肉等共 9 种组织。利用 TRIzol 提取各组织的总 RNA, 经 1% MOPs 琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪 (NanoDrop 2000) 进行定性和定量检测, -80 °C 保存备用。根据 GoScript™ Reverse Transcription System 说明书, 以 2 μg 各组织总 RNA 为反转录模板, 用接头引物 AOLP 和 BDA 合成 cDNA, 以凡纳滨对虾  $\beta$ -actin 作为内参基因检测 cDNA 质量, 扩增引物为 Actin-F 和 Actin-R (表 1)。

### 1.3 *Lv-SPH* 全长 cDNA 的克隆

在实验室前期转录组学研究的基础上<sup>[13]</sup>, 依照设计引物原则, 设计其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 区特异性引物 *Lv-SPH-F*、*Lv-SPH-R* 引物 (表 1), 以上述合成的血细胞 cDNA 为模板扩增 *Lv-SPH*, 利用 PCR 方法进行扩增, 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 总延伸 10 min; 4 °C 保温。克隆获得凡纳滨对虾 *Lv-SPH* 的 cDNA 完整 ORF 区序列, 与克隆载体 pMD18-T 连接, 挑取阳性克隆进行测序验证。

### 1.4 生物信息学分析

应用在线软件 BLAST 将 *Lv-SPH* (GenBank

表 1 实验所用引物信息

Tab. 1 Information of primers used in this study

基因 genes	引物名称 primer names	引物序列 (5'-3') sequences (5'-3')
	BDA	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
	AOLP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16(A/C/G)-3'
<i>β-actin</i>	<i>Actin-f</i>	5'-ACAAGATGTGTGACGACGAAGTAG-3'
<i>β-actin</i>	<i>Actin-r</i>	5'-GGATACCTCGCTTGCTCTGG-3'
<i>Lv-SPH</i>	<i>Lv-SPH-F</i>	5'-TGCCCAGACTACAGAACAATG-3'
<i>Lv-SPH</i>	<i>Lv-SPH-R</i>	5'-GGTTCCTACTCTATGTTGTTCTT-3'
<i>Lv-SPH</i>	<i>Lv-SPHqF</i>	5'-CCAACCGAGGAAGAGTGC-3'
<i>Lv-SPH</i>	<i>Lv-SPHqR</i>	5'-CGAAGTCACCGAGACGAAC-3'
<i>β-actin</i>	<i>β-actinF</i>	5'-GAAGTAGCCGCCCTGGTTG-3'
<i>β-actin</i>	<i>β-actinR</i>	5'-CGGTTAGCCTTGGGGTTGAGGGGAG-3'

登录号: KR020739) 与 GenBank 中的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行比对分析。使用 ExPASy 在线工具计算 *Lv-SPH* 预测蛋白的分子量和等电点, Signalp 4.1 Server 软件进行信号肽分析, SMART 在线软件分析蛋白质的结构域和功能位点。利用 Clustal-X 和 MEGA 5.0 软件进行多序列比对和聚类分析, 系统进化树采用 Neighbour-Joining 方法构建。

### 1.5 *Lv-SPH* 的组织表达分析

实验用 18 尾虾, 每 6 尾的组织作为 1 组, 共 3 个平行组 ( $n=3$ )。以反转录的各组织 cDNA 为模板, 以 *Lv-SPHqF* 和 *Lv-SPHqR* 为目的基因扩增引物, 利用 qPCR 的方法分析 *Lv-SPH* 在不同组织中的表达情况, 以 *β-actin* 为内参基因, 内参基因扩增引物为 *β-actinF* 和 *β-actinR* (表 1)。反应程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 40 个循环; 最后经 60 °C 升温到 95 °C, 每个循环上升 0.5 °C 进行熔解曲线分析。所获得的数据经统计分析后使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算, 采用 *T* 检验分析目的基因 *Lv-SPH* 差异显著性。

### 1.6 人工感染 WSSV 对凡纳滨对虾 *Lv-SPH* 表达的影响

所用对虾 WSSV 于实验室富集并提取。实验前用配制灭菌的 TN 缓冲液将 WSSV 稀释至需要的浓度 ( $10^5$  个/ $\mu\text{L}$  的拷贝), 并保存于 4 °C 待用。选用健康的凡纳滨对虾, 设置为实验组、对照组和空白组, 每组选取 54 尾健康的凡纳滨对虾。使用 WSSV 对凡纳滨对虾进行人工感染, 实验组每

尾对虾注射 10  $\mu\text{L}$  WSSV 悬液 ( $10^5$  个/ $\mu\text{L}$  的拷贝), 对照组每尾对虾注射 10  $\mu\text{L}$  灭菌 TN 缓冲液, 空白组对虾无任何注射。取空白组对虾血细胞, 并在注射后的 6 个时间点 (0.5、5、12、24、48 和 72 h) 分别随机选取 9 尾对照组和实验组对虾血细胞, 每 3 尾的血细胞分为 1 组, 共 3 个平行组 ( $n=3$ ), 提取其总 RNA 并反转录为 cDNA。以免疫刺激后不同时间点的血细胞 cDNA 为模板, 目的基因和内参基因的扩增引物同“*Lv-SPH* 的组织表达分析”, 利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法检测 *Lv-SPH* 应答 WSSV 免疫刺激的相对表达情况。qPCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环; 最后经 1 个循环, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s 进行熔解曲线分析。反应结束后导出结果, 应用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  算法, 将所得数据进行计算, 分析 *Lv-SPH* 的相对表达量, 并应用 SPSS 软件进行 *t* 检验, 分析差异显著性 ( $P<0.05$  表示差异显著,  $P<0.01$  表示差异极显著)。

## 2 结果

### 2.1 *Lv-SPH* 克隆及生物信息学分析

本实验克隆获得了一个新的凡纳滨对虾 SPH (*Lv-SPH*) 全长 cDNA 序列 (GenBank: KR020739), 该基因全长 1 249 bp, ORF 区为 1 005 bp, 编码 334 个氨基酸, 5'-UTR 为 156 bp, 3'-UTR 为 88 bp。预测其蛋白分子量为 36.095 4 ku, 理论等电点为 4.84。氨基端含有 16 个氨基酸信号肽。通过 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>) 在线分析, *Lv-SPH*



编码的蛋白质含有一个 clip 结构域和一个高度保守的 SP 结构域 (Tryp-SPc), Tryp-SPc 结构域中的

三联体催化活性位点为 His、Asp 和 Gly, 具备典型的 SPH 分子的特征 (图 1)。



图 1 凡纳滨对虾 Lv-SPH 的核酸序列及推导的氨基酸序列

黄色阴影部分为信号肽序列; 蓝色下划线部分和灰色阴影部分分别为 clip 结构域和 SP 结构域; 绿色阴影部分为半胱氨酸, 可以形成二硫键; 红色阴影部分分别为组氨酸、天冬氨酸、甘氨酸 3 个活性位点; 黑色三角代表信号肽的断裂位点; 箭头代表预测的结构域活性断裂位点

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Lv-SPH

The signal peptide is marked by yellow shade; the clip domain is blue underlined; the serine protease-like domain is marked by gray shade; the green shaded part indicates cysteine, which can form disulfide bonds; the replacement catalytic triad (H, D, and G) are marked as red shade, the black triangle indicates the putative cleavage site for the signal peptide; the arrow indicates the putative active cleavage sites of the domain

2.2 Lv-SPH 的多重序列比对及系统进化分析

BLAST 同源性比对分析发现, Lv-SPH 与其他物种的 SPH 大致有 31%~74% 的相似度。其中与日本囊对虾 SPH 同源性最高, 达到 74%; 同时与中国明对虾、斑节对虾、中华绒螯蟹 (Eriocheir sinensis) 等的 SP 也有较高的同源性; 与人 (Homo sapiens)、非洲爪蟾 (Xenopus laevis)、褐家鼠 (Rattus norvegicus)、原鸡 (Gallus gallus) 的甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 (MASP) 相似度较低。将 Lv-SPH 氨基酸序列与其他物种该结构域序列进行多重比对分析发现, 在无脊椎动物中 SPH 的相似度较高, 尤其在虾类中相似度都高达 50% 以上, 具有较保守的 SP 结构域 (Tryp-SPc), 三联体催化活性位点中只有 Gly 不保守, 与普通的丝氨

酸蛋白酶不同 (图 2)。系统进化分析结果显示, Lv-SPH 与日本囊对虾 SPH 的亲缘关系最近, 在进化上聚为同一支; 甲壳类动物的 SP 与其他节肢动物 SP 整体聚为一大支; 脊椎动物人、非洲爪蟾、褐家鼠、原鸡的 MASP 与它们亲缘关系较远, 处在一个独立的分支上 (图 3)。

2.3 Lv-SPH 的组织表达分析

本实验利用 qPCR 检测的方法, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 对 Lv-SPH 在凡纳滨对虾各组织中的分布及表达进行了分析。Lv-SPH 在对虾的 9 种组织中均有不同程度的表达, 其表达量在不同组织中有较为明显的差异, 其中在血细胞中表达量最高, 在肝胰腺、心脏、肠道、胃中有一定程度的表达, 在神经、鳃和游泳足中表达量较低, 在肌肉中几

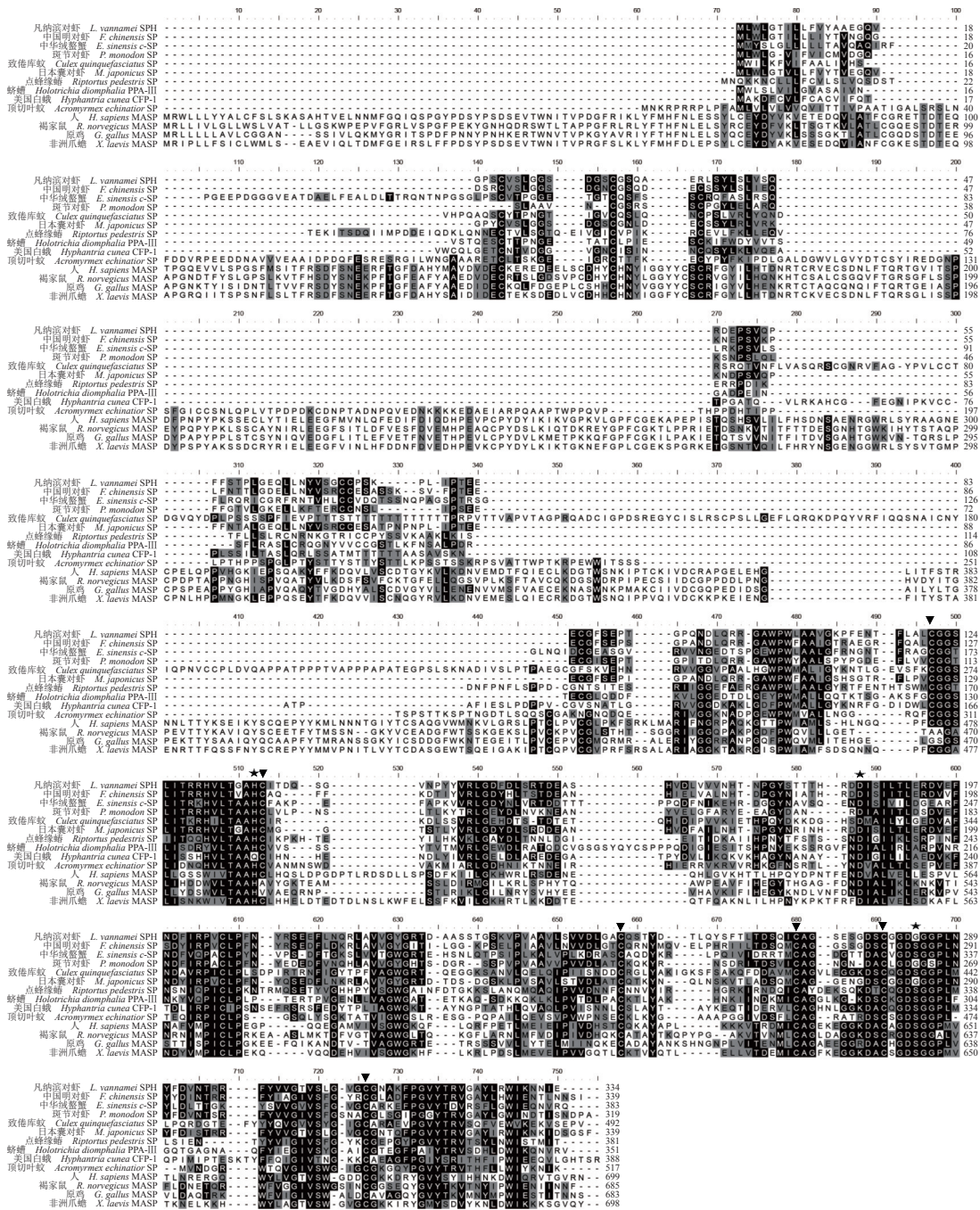


图2 凡纳滨对虾 SPH (*Lv-SPH*) 与其他物种 SPH 蛋白的多序列比对

黑色三角标注的为半胱氨酸, 可以形成二硫键, 黑色五角星标注的为 SP 结构域的 3 个活性位点; 中国明对虾 SP (ACR15870.1), 中华绒螯蟹 c-SP (ACP19733.1), 斑节对虾 SPH (AAQ93679.1), 致倦库蚊 SP (XP\_001845946.1), 日本囊对虾 SPH (BAD34945.1), 点蜂缘蝽 SP (BAN21441.1), 蛴螬 PPA-III (BAC15604.1), 美国白蛾 CFP-1 (AAL31705.1), 切叶蚁 SP (EGIS7133.1), 人 MASP (D28593.1), 褐家鼠 MASP (NM\_172043.1), 原鸡 MASP (AY567828.1), 非洲爪蟾 MASP (D83276.1)

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of Lv-SPH with that of other species

The black triangle represents the position of cysteine, which can form disulfide bond; the black pentagram represents the location of three active sites in SP domain; *F. chinensis* SP (ACR15870.1), *E. sinensis* c-SP (ACP19733.1), *P. monodon* SPH (AAQ93679.1), *Culex quinquefasciatus* SP (XP\_001845946.1), *M. japonicus* SPH (BAD34945.1), *Riptortus pedestris* SP (BAN21441.1), *Holotrichia diomphalia* PPA-III (BAC15604.1), *Hyphantria cunea* CFP-1 (AAL31705.1), *Acromyrmex echinator* SP (EGIS7133.1), *Homo sapiens* MASP (D28593.1), *R. norvegicus* MASP (NM\_172043.1), *G. gallus* MASP (AY567828.1), *X. laevis* MASP (D83276.1)



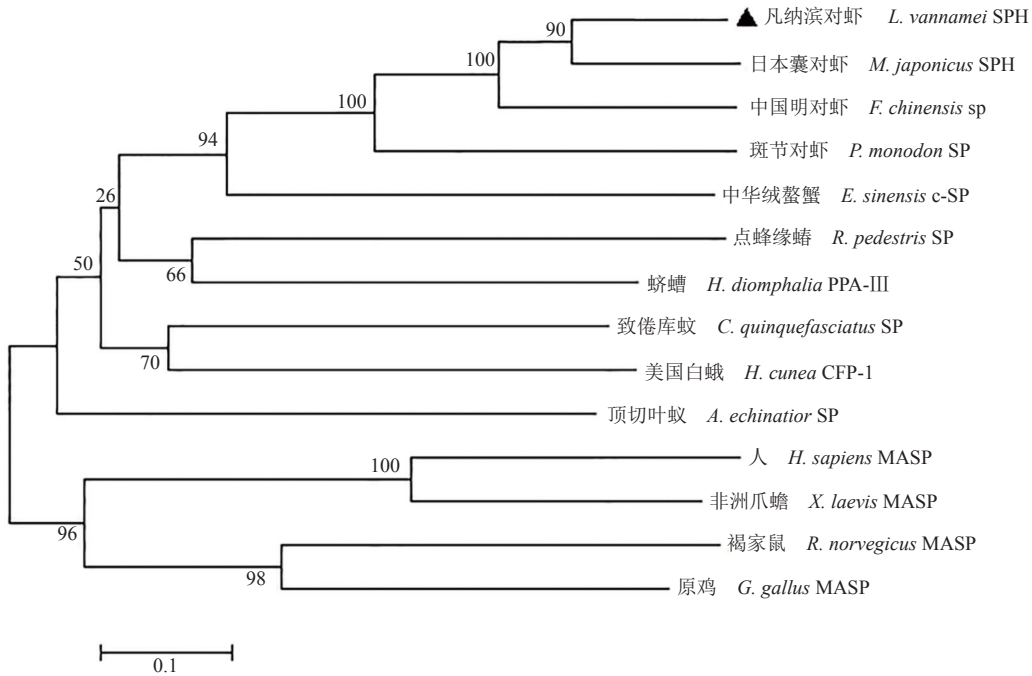


图3 凡纳滨对虾 SPH (Lv-SPH) 与其他物种 SP 或 SPH 的进化分析

黑色三角标示的为 Lv-SPH

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the Lv-SPH with SP or SPH from others species

A black triangle is marked after Lv-SPH

乎没有表达 (图 4)。

### 2.4 Lv-SPH 应答 WSSV 免疫刺激的表达变化特征分析

利用 qPCR 方法分析了人工感染 WSSV 后不同时间点, 凡纳滨对虾血细胞中 Lv-SPH 的表达变化特征。结果显示, 与对照组相比, 在注射 WSSV 后早期 (0.5 h), Lv-SPH 的表达量开始上调表达。感染后 24 h, 该基因的相对表达量显著升高, 在 48 h 达到最高, 约为对照组的近 3 倍, 具有极显著的差异 (P<0.01)。72 h 时 Lv-SPH 的表达量略有下降, 但与对照组相比, 仍有极显著变化 (P<0.01)。在实验的整个感染进程中, 该基因均呈现不同程度的上调表达模式 (图 5)。

### 3 讨论

在无脊椎动物中, 含 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶家族成员在胚胎发育和防御应答的信号级联反应中都发挥重要作用, 例如, 在中国鲎 (Tachypleus tridentatus) 的血液凝固反应<sup>[14]</sup>、黑腹果蝇 (Drosophila melanogaster) 的抗菌肽合成<sup>[15]</sup>、昆虫和甲壳纲动物中酚氧化酶原系统的激活<sup>[6]</sup>等。但目前对于丝氨酸蛋白酶在节肢动物中的作用机理还研究

甚少。本研究中克隆得到的 Lv-SPH 编码的氨基酸具有一个典型的信号肽结构, 表明其在胞外执行功能, 利用在线分析软件 SMART 预测发现, Lv-SPH 的氨基端含有一个 clip 结构域, 羧基端含有一个 Tryp\_SPC 结构域。Tryp\_SPC 结构域主要执行

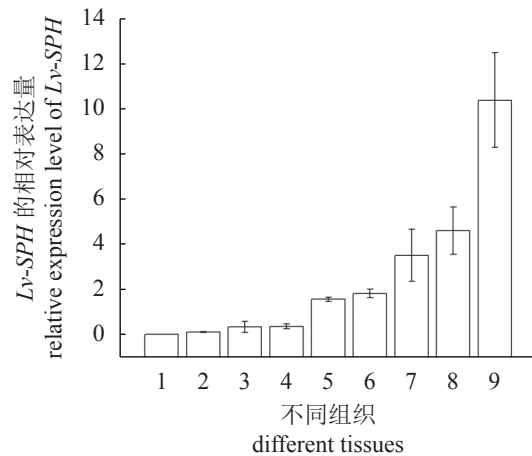


图4 凡纳滨对虾 Lv-SPH 的组织表达特征

1. 肌肉, 2. 游泳足, 3. 鳃, 4. 神经, 5. 胃, 6. 肠道, 7. 心脏, 8. 肝胰腺, 9. 血细胞

Fig. 4 Relative expression of Lv-SPH in different tissues of L. vannamei

1. muscle, 2. pleopod, 3. gill, 4. nerve, 5. stomach, 6. intestine, 7. heart, 8. hepatopancreas, 9. hemocytes

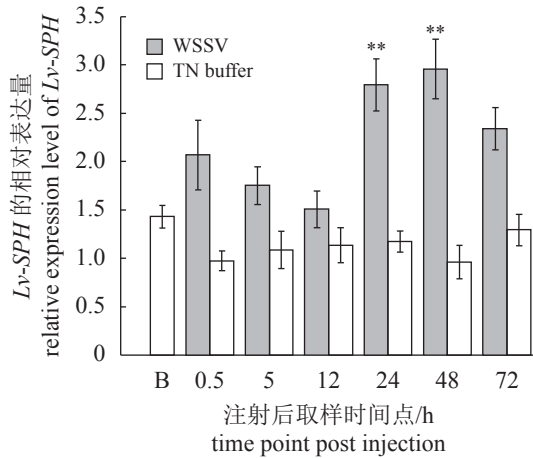


图5 *Lv-SPH* 应答 WSSV 免疫刺激的表达变化特征

B 为没有任何注射的空白组, WSSV 为注射 WSSV 的实验组, TN buffer 为注射 TN 缓冲液的对照组; “\*\*\*”表示 *Lv-SPH* 的相对表达量在各实验组间具有极显著差异 ( $P < 0.01$ )

**Fig. 5 Expression profile analysis of *Lv-SPH* in *L. vannamei* at different time post WSSV challenge**

B. blank group; WSSV. white spot syndrome virus injection group (experimental group); TN buffer. TN buffer injection group (control group); “\*\*\*” indicates extremely significant differences ( $P < 0.01$ ) for the *Lv-SPH* expression levels among groups

着消化和催化的功能。普通的丝氨酸蛋白酶家族成员通常主要具有消化的功能, 而含有 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶则主要参与免疫应答过程, *Lv-SPH* 分子的氨基端具有一个典型的 clip 结构域, 因此推断它可能也是在免疫过程中发挥作用。那些参与更多复杂生理过程的蛋白酶通常不止包含具催化功能的结构域, 额外的结构域可以帮助其达到适宜的蛋白-蛋白之间的相互作用, 以更好地调节蛋白酶的活性, 并将反应定位到特定分隔的区域。在一些节肢动物中, 含有具二硫键结构的 clip 结构域的 SP 相当重要, 它们可通过调节丝氨酸蛋白酶的活性参与防御应答或胚胎发育过程<sup>[4]</sup>。

多序列同源性比对结果显示, *Lv-SPH* 与日本囊对虾的同源性最高, 与人、原鸡、非洲爪蟾、褐家鼠的甘露糖相关丝氨酸蛋白酶相似度最低。clip 结构域的序列并不是很保守, 但其中的 6 个半胱氨酸非常保守。本研究中 *Lv-SPH* 的 clip 结构域具有保守的 6 个半胱氨酸, 可以形成 3 个二硫键, 预测这些二硫键在稳定蛋白结构中可能发挥一定的作用。有研究表明, clip 结构域可能提供了一个用于蛋白酶和其上游激活剂、下游蛋白底物或调节酶活性的辅因子相互作用的位点, 使得在局部损伤和感染源的部位可以形成酶复合物<sup>[5]</sup>。

*SPH* 在氨基酸序列上与 *SP* 类似, 但由于一个或多个催化残基的缺失或突变导致其明显缺乏酰胺酶活性。*SP* 中胰蛋白酶家族都具有保守的底物结合空穴, 其中的 Asp 定位于该结合空穴的底部, 它通过与底物断裂位点的 Lys 或 Arg 之间离子力的相互作用而决定着酶作用的特异性<sup>[16]</sup>。在 *Lv-SPH* 的 Tryp\_SPc 结构域中, 具有三分子活性催化位点中的两个 (His 和 Asp), 而另一个位点通常应为 Ser, 但在该序列中被 Gly 所替换, 目前已知的丝氨酸蛋白酶同源物 (*SPH*) 成员均具有该特点, 普遍认为 *SPH* 可能并不具有丝氨酸蛋白酶的催化活性, 而是在免疫过程中发挥作用。在无脊椎动物中, *SPH* 可以参与抗微生物应答<sup>[17]</sup>、模式识别<sup>[18]</sup>以及免疫应答等作用<sup>[19]</sup>。*Lv-SPH* 具备了典型的 *SPH* 家族成员特征, 可能在在对虾应答病原感染的免疫过程中发挥重要作用, 本研究获得的 *Lv-SPH* 可能属于丝氨酸蛋白酶基因家族中的新的成员。

利用 qPCR 技术分析了该基因在对虾的血细胞、肝胰腺、鳃、肠道、胃、神经、心脏、肌肉和游泳足共 9 种组织中的分布情况。*Lv-SPH* 在凡纳滨对虾中具有一定的组织表达特异性。其中在肝胰腺、血细胞和心脏组织中表达量较高, 尤其是在血细胞中表达量最高, 而在肌肉中表达量最低, 与之前报导的凡纳滨对虾 *SP*<sup>[20]</sup>、斑节对虾 *SPH* 在肌肉中表达量低相符<sup>[11]</sup>, 有研究显示哺乳动物丝氨酸蛋白酶在其肌肉的塑造中发挥重要作用, 但节肢动物中 clip-SPs 并不具有此功能。肝胰腺、血细胞和心脏都是重要的免疫器官或细胞, *SP* 或 *SPH* 在血细胞中的高表达可能与宿主自身的免疫防御作用有关<sup>[21]</sup>。基因的组织表达特征分析能为预测其基因功能提供有价值的参考, 这种组织上明显的表达差异也许暗示着某种功能上的差异, *Lv-SPH* 的组织表达特征也间接表明了其在对虾免疫调控过程中的作用。

白斑综合征是对虾的一种急性、高死亡率传染病, 主要通过虾的排泄物以及健康虾吞食患病虾的途径传播。其病原 WSSV 是虾类养殖业的最大威胁之一。它已成为养殖对虾的一种主要病原, 病毒病的频发给对虾养殖业造成了巨大损失<sup>[2]</sup>, 所有感染此病毒的对虾在几天内就会全部死亡, 实验室感染条件下 48 h 内就有很高的死亡率。探讨对虾关键免疫基因应答 WSSV 侵染的表达变化特征, 将有助于研究该基因在抗病毒免疫应答过程中的可能作用。在本研究中利用 qPCR 技术检

验 WSSV 感染后 *Lv-SPH* 的相对表达量, 以具有较稳定表达水平的磷酸丙糖异构酶基因 (*TPI*) 作为内参基因, 分析了对虾血细胞中 *Lv-SPH* 应答 WSSV 感染的表达变化特征。结果显示, 在注射 WSSV 病毒后极早期 (0.5 h), *Lv-SPH* 的相对表达量有明显的上调表达, 表明该基因在感染初期可能就参与了机体应答病毒侵染的应答过程, 中国明对虾 *CH-SPase* 在 WSSV 刺激后表达也有显著上调, 与本研究结果较为相似<sup>[21]</sup>。本实验室前期研究发现, 中国明对虾的 rSPH 重组蛋白有明显的抑菌和清除体内外源病原微生物的效果<sup>[23]</sup>。在感染后 24 和 48 h, 该基因的相对表达量显著升高, 约为对照组的近 3 倍, 可能通过进一步上调表达参与到病毒引发的免疫应答过程。感染后 72 h, 该基因的表达量仍呈现极显著的高表达特征, 此时病毒大量复制, 机体需要进一步激活酚氧化酶原途径或启动抗病毒免疫应答来共同抵御病毒的感染。WSSV 在一定范围内诱导了 *Lv-SPH* 转录水平的增强, 该基因可能通过应答后的显著上调表达来参与对虾的先天免疫反应。本研究克隆获得了凡纳滨对虾血细胞中的 *Lv-SPH*, 探讨了其序列特点, 分析了其组织分布特征及应答病毒侵染的表达变化模式。作为一种分布较为广泛的蛋白, 其在免疫过程中的诸多应答和级联反应中可能具有重要功能。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制 [M]. 北京: 海洋出版社, 2001.  
Xiang J H. Disease occurrence and control strategies of mariculture organisms[M]. Beijing: China Ocean Press, 2001 (in Chinese).
- [2] Flegel T W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019, 50(2): 249-266.
- [3] Loker E S, Adema C M, Zhang S M, *et al.* Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 10-24.
- [4] Jiang H B, Kanost M R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30(2): 95-105.
- [5] Piao S, Song Y L, Kim J H, *et al.* Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(24): 4404-4414.
- [6] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 23-28.
- [7] Sricharoen S, Kim J J, Tunkijjanukij S, *et al.* Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, 29(12): 1017-1031.
- [8] Buda E S, Shafer T H. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(4): 521-531.
- [9] Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, *et al.* Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(1): 39-48.
- [10] Lin C Y, Hu K Y, Ho S H, *et al.* Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006, 30(12): 1132-1144.
- [11] Sriphajit T, Flegel T W, Senapin S. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(11): 1145-1158.
- [12] Ren Q, Xu Z L, Wang X W, *et al.* Clip domain serine protease and its homolog respond to *Vibrio* challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(5): 787-798.
- [13] Xue S X, Liu Y C, Zhang Y C, *et al.* Sequencing and *De Novo* analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76718.
- [14] Iwanaga S, Kawabata S I, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions[J]. *Journal of Biochemistry*, 1998, 123(1): 1-15.
- [15] Veillard F, Troxler L, Reichhart J M. *Drosophila melanogaster* clip-domain serine proteases: structure, function and regulation[J]. *Biochimie*, 2016, 122: 255-269.



- [16] Perona J J, Craik C S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases[J]. *Protein Science*, 1995, 4(3): 337-360.
- [17] Kawabata S I, Tokunaga F, Kugi Y, *et al.* Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity[J]. *FEBS Letters*, 1996, 398(2-3): 146-150.
- [18] Huang T S, Wang H Y, Lee S Y, *et al.* A cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase homologue similar to *Drosophila* masquerade[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(14): 9996-10001.
- [19] Sakamoto M, Ohta M, Suzuki A, *et al.* Localization of the serine protease homolog BmSPH-1 in nodules of *E. coli*-injected *Bombyx mori* larvae and functional analysis of its role in nodule melanization[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(5): 611-619.
- [20] Jiménez-Vega F, Vargas-Albores F, Söderhäll K. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(2): 101-108.
- [21] Park J W, Kim C H, Rui J, *et al.* Beetle immunity[M]//Söderhäll K. *Invertebrate Immunity. Advances in experimental medicine and biology*. Boston, MA: Springer, 2010, 708: 163-180.
- [22] Xue S X, Yang W J, Sun J S. Role of chymotrypsin-like serine proteinase in white spot syndrome virus infection in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 403-409.
- [23] 杨燚, 刘逸尘, 张亦陈, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)丝氨酸蛋白酶同源物基因(*Fc-SPH*)的重组表达及活性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 852-856.
- Yang Y, Liu Y C, Zhang Y C, *et al.* Recombinant expression and bioactivity analysis of a serine proteinase homologue gene (*Fc-SPH*) from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 852-856 (in Chinese).

## Molecular cloning and characterization of a novel serine protease homologues (*Lv-SPH*) in immune response from *Litopenaeus vannamei*

YIN Siyu<sup>1</sup>, HE Yuxin<sup>1</sup>, YU Jiao<sup>1</sup>, ZHANG Yichen<sup>1</sup>,  
LIU Yichen<sup>1\*</sup>, GENG Xuyun<sup>2</sup>, SUN Jinsheng<sup>1</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Sciences,

Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin 300221, China)

**Abstract:** Serine protease (SP) is a kind of important and widely distributed proteolytic enzyme, which participates in a series of important physiological processes, including digestion, blood coagulation, embryonic development and immune response. But there are only a few preliminary reports about SP in crustaceans. Shrimp farming is constantly threatened by diseases. Further research on shrimp immune defense mechanism will provide clues for finding new ideas of disease resistance. In this study, the full-length cDNA sequence of a novel serine protease homologs (SPH) gene (*Lv-SPH*, GenBank accession number: KR020739) was cloned from hemocytes of *Litopenaeus vannamei* according to our previous transcriptome results. The sequence characteristics were analyzed by bioinformatics method. Tissue distribution and expression profile in response to virus infection were discussed by real-time fluorescence quantitative PCR. Bioinformatics analysis showed that the total length of the gene was 1 249 bp, the open reading frame (ORF) region was 1 005 bp encoding 334 aa with 156 bp 5'-UTR and 88 bp 3'-UTR. The deduced amino acid sequence contained a signal peptide sequence with 16 amino acids at the amino end. SMART analysis showed that *Lv-SPH* contained a clip domain and a highly conserved SP domain (Tryp-SPc), which had two of the three active catalytic sites (His and Asp), and the third one is Gly. *Lv-SPH* was expressed in different tissues of *L. vannamei*. The main expression was in hemocyte, followed by hepatopancreas, heart and intestine. The lowest expression level was in muscle. Real time fluorescence quantitative PCR analysis showed that white spot syndrome virus (WSSV) could induce the up-regulated expression of *Lv-SPH* significantly. The relative expression of *Lv-SPH* increased significantly at 24 h and reached the highest level at 48 h, which was about three times that of the control group. *Lv-SPH* has typical characteristics of SPH family members and has tissue expression specificity. WSSV can significantly induce the up-regulated expression of *Lv-SPH* gene, indicating that it may be involved in the immune response process of *L. vannamei* induced by WSSV. The results provide a reference for further exploring shrimp innate immune regulation mechanism, and have potential application value in shrimp healthy culture and disease control.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; serine protease homologue; gene expression; virus infection; innate immune response

**Corresponding author:** LIU Yichen. E-mail: skylyc@tjnu.edu.cn

**Funding projects:** Natural Science Foundation of Tianjin (19JCYBJC29700, 15JCZDJC33800); National Natural Science Foundation of China (31472299); Open Research Funding of Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture (TJAE2015005)