

凡纳滨对虾围食膜蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

陈秀荔, 赵永贞, 彭敏, 杨春玲, 蒋伟明, 李咏梅, 曾地刚,
马宁, 黎铭, 陈晓汉*, 吴铁军

(广西水产研究所, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 为研究凡纳滨对虾围食膜蛋白在 IHHNV 感染虾体过程中的作用, 实验采用 SMART 技术构建了凡纳滨对虾肠道组织的全长 cDNA 文库, 电子拼接获得了对虾围食膜蛋白基因全长 cDNA 序列, 并进行了功能分析。全长 cDNA 文库的库容达 1.05×10^6 pfu/mL, 重组率为 95%。随机挑选 1 600 个克隆进行测序, 去除载体后得到插入长度 ≥ 450 bp 的有效序列 1 531 条, 根据同源片段长度不小于 100 bp, 90% 同源性的原则对这些序列归并 unigene, 得到 unigene 399 条。从所测克隆中得到一个围食膜蛋白基因, 其 cDNA 序列长度为 1 002 bp, 编码由 303 个氨基酸组成的蛋白, 基因序列比对发现该序列与斑节对虾卵巢围食膜蛋白 1 和 2、围食膜蛋白前体 3, 短钩对虾围食膜蛋白 1、2, 以及中国对虾围食膜蛋白编码序列的同源性较高, 均达到 80% 以上。通过半定量 RT-PCR 对该基因在不同组织的表达分析结果表明该基因在抗感染对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 的对虾的心脏和胃中高表达, 在肝脏、肠和肌肉中表达较低, 在鳃中表达最弱, 在眼中不表达; 该基因在感染 IHHNV 病毒的对虾的心脏表达明显减弱, 在肝脏、眼、肌肉和鳃中表达较低, 在肠道和胃中几乎不表达, 说明该基因参与对虾抵御病原体侵入过程。

关键词: 凡纳滨对虾; 围食膜蛋白; 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒; 克隆

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖业是我国海水养殖业的支柱产业, 对我国渔业经济稳定发展具有重要意义。然而, 病毒性疾病的传播和蔓延仍是影响凡纳滨对虾养殖业稳定发展的最大障碍。解析凡纳滨对虾病毒性疫病的传播途径、爆发规律和致病机理, 研发解决病毒性疾病的综合防控措施一直是凡纳滨对虾养殖业亟待解决的难题, 也是当前凡纳滨对虾流行病学研究的热点。在凡纳滨对虾养殖过程中, 残食感染病毒对虾或尸体是引起养殖对虾疾病大面积爆发的主因。消化道是病毒感染的主要窗口。因此, 发掘参与病毒感染肠道的关键基因, 阐释病毒在凡纳滨对虾肠道感染的分子机制, 对于指导凡纳滨对虾抗病育种、口服型抗病毒药物筛选等均具有应用价值。

围食膜 (peritrophic membrane, PM) 是普遍存在于节肢动物肠道内的一种重要结构, 是外源物质通过消化道进入体内的第一道屏障。围食膜蛋白和几丁质是围食膜的重要组成部分, 二者相结合保证围食膜结构的完整性, 在动物消化吸收营养物质的过程中, 能将外源病原体和毒素等有害物质隔绝在消化道之外。甲壳类动物的围食膜是一类具有多重生理功能的、非细胞的、多层膜的管状结构, 主要产生于中肠的主干部分, 它可能具有抵御微生物、细菌和病毒入侵的作用^[1]。围食膜主要由几丁质、蛋白和糖组成^[2], 围食膜蛋白有众多几丁质结合功能域, 其与几丁质以共价或者非共价键形式结合成致密的网状结构^[3]。迄今为止, 人们已经对澳大利亚蝇 (*Lucilia*

收稿日期: 2012-02-27 修回日期: 2012-06-20

资助项目: 广西科学研究与技术开发计划课题 (桂科攻 11107012-1-3); 广西自然科学基金重点项目 (2012GXNSFDA053015); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47)

通讯作者: 陈晓汉, E-mail: chenxhan@yahoo.com.cn

cuprina)^[4]、按蚊(*Anopheles gambiae*)^[5]、食肉蝇(*Chrysomya bezziana*)^[6]和猫虱(*Ctenocephalides felis*)^[7]等无脊椎动物的围食膜进行了相关研究。已鉴定和描述了4类围食膜蛋白,其中研究较多的是第三类围食膜蛋白,这些围食膜蛋白都是几丁质结合蛋白,具有抗水解能力,从而保护围食膜结构的稳定^[8]。

因此,开展凡纳滨对虾围食膜蛋白功能研究,对揭示对虾肠道感染病毒性疾病的机制具有重要的研究价值。然而,目前尚没有凡纳滨对虾围食膜蛋白基因序列的报道。为了研究与病毒感染对虾的途径相关的基因,本研究利用 SMART (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 技术和 LD-PCR (long distance PCR) 技术构建了对虾肠道组织的全长 cDNA 文库,对该文库随机测序发现了围食膜蛋白基因,克隆了凡纳滨对虾围食膜蛋白基因的全长 cDNA 序列,并对其结构进行了分析,研究了其在抗传染性皮下及造血组织坏死病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) 对虾和易感 IHNV 对虾不同组织中的表达模式,为进一步开展病毒性疾病预防研发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所需的凡纳滨对虾由广西水产研究所国家级南美白对虾遗传育种中心提供;感染 IHNV 和抗感染 IHNV 对虾由本实验室体外攻毒检测获得;总 RNA 抽提试剂盒为 GIBCO BRL 公司产品, mRNA 纯化试剂盒为 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits, RT-PCR 试剂盒 (ImProm-IITM. Reverse Transcription System)、pBluescript II SK 载体、氨苄青霉素、X-gal、IPTG 购自 promega 公司;SMART PCR cDNA Library Construction Kit 以及 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司,其它试剂均为国产分析纯;大肠杆菌 Top10 由本室保存。

1.2 实验方法

凡纳滨对虾 IHNV 易感群体和抗感染群体的获得通过肌肉注射和不间断饲喂感染 IHNV 对虾组织的方法对凡纳滨对虾进行 IHNV 攻毒,采用 PCR 法和组织切片法对注射 IHNV 病毒对虾进行检测,获得易感 IHNV 凡纳滨对虾和抗感染 IHNV 凡纳滨对虾^[9]。

总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化 按 GIBCO BRL 公司的总 RNA 抽提试剂盒 Trizol reagent 操作说明提取感染 IHNV 病毒和正常对虾肠道组织总 RNA,抽提出的 RNA 通过 2% 的琼脂糖电泳分析 RNA 的完整性。按 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 操作说明纯化 mRNA。用紫外分光光度计测定 RNA 和 mRNA A_{260} 和 A_{280} 值,用于判断 RNA 的纯度并计算浓度。

对虾肠道组织 cDNA 文库构建 SMART PCR cDNA Library Construction 根据试剂盒说明书进行文库的构建:以 mRNA 为模板,在逆转录酶的作用下合成 cDNA 第一链;利用 LD-PCR 方法合成双链 cDNA,再利用 *Sfi* I 限制性内切酶酶切;按试剂盒操作要求将 cDNA 分级分离后连接到 pBluescript II SK 载体上,转化大肠杆菌;通过统计菌落个数和蓝白斑的比例计算出该文库的滴度、重组效率 (cDNA 文库的滴度 (pfu/mL) = 总菌落数 × 稀释倍数 × 10/所取连接产物的体积;重组效率 = 白斑个数/总菌落数 × 100%);用测序通用引物鉴定 cDNA 文库的质量,并进行序列测定,将获得的 cDNA 序列在 GenBank 数据库进行序列同源性比较,查找围食膜蛋白基因。

序列的拼接与生物信息学分析 利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。将所得基因序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框 (ORF) 的预测与氨基酸序列的翻译。对推导出的蛋白序列通过 Interpro Scan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) 进行蛋白质功能结构域分析,通过 Motif Scan 程序 (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 分析蛋白质功能位点,使用 DNAMAN 软件进行核苷酸序列比对。

半定量 RT-PCR 根据已获得的围食膜蛋白基因序列设计引物 (PT1: 5'-ACAAGCCTTCACTCGCCAC-3'; PT2: 5'-TCGAATACCATGCCATCTG-3'),该引物用于感染 IHNV 和抗感染 IHNV 对虾肠道、肝胰腺等组织表达谱的研究,设立内参 β -actin (引物序列为 actin1: 5'-CGAGAAATCGTTCGTGAC-3'和 actin2: 5'-GATGAGTTGTAGGTGGTCT-3')。半定量 RT-PCR 的扩增体系为 cDNA 1 μ L, 10 μ mol/L 的上、下游引

物各 1 μL , 2 \times MasterMix 12.5 μL , 灭菌超纯水加至 25 μL 。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共 25 个循环。取 PCR 扩增产物 5 μL 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 cDNA 双链的合成

将 LD-PCR 扩增合成的双链 cDNA 产物取 3 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果扩增片段大小 0.2 ~ 3.5 kb, 且在 1.0 kb 处存在一条较亮的带结果见图 1, 这表明合成的双链 cDNA 较为完整, 质量较好, 满足 cDNA 文库构建的要求。



图 1 LD-PCR 扩增合成的双链 cDNA 产物

Fig. 1 Double strand cDNA from LD-PCR amplification
M. Marker

2.2 文库滴度及重组效率的测定

实验所获得的载体连接产物量为 1 000 μL 。取连接产物 1 μL 转化后, 所获得的总菌落数为 1 048 个/板, 其中白斑 992 个, 蓝斑 56 个, 重组率为 95%, cDNA 文库容量达 1.05×10^6 pfu/mL。

2.3 插入片段大小鉴定及序列测定与分析

随机挑取 29 个克隆进行测序, 屏蔽掉载体, 去掉 400 bp 以下的序列后还剩 22 条有效序列。对这 22 条序列进行 unigene 归并, 得到 19 条 unigene, unigene 比例为 86%; 同时对序列进行全长分析, 在 22 条序列中有 16 条序列有相关同源信息, 结果为其中 3 条全长, 完整性比率达 19%。

2.4 文库测序及围食膜蛋白基因序列的获得和分析

挑取 1 600 个克隆进行测序, 去除载体后得到插入长度 ≥ 450 bp 的有效序列 1 531 条, 根据同源片段长度不小于 100 bp, 90% 同源性的原则对这些序列归并 unigene, 得到 unigene 399 条, 形成一个 unigene 库。

2.5 Peritrophin 基因序列及分析

Peritrophin 基因序列 通过 DNASTar seq 软件将围食膜蛋白基因与上述 unigene 库进行比对, 获得了凡纳滨对虾围食膜蛋白基因的全长 CDS 序列(图 2)。

```

1 GGG AAGGG G ACCCCCTCG AGGTCGACG GTATCGATA AGCTTGATA TCGAATTCG
55 TATCGGCCA TTACGGCCG GGGAGACAC AAATCGAAG ATGAGACTG AATACGTTA
                                     M R L N T L
109 TATGTTGTG TTGGCCTTG GGTGTAGCA CTAGTCTCG GCCAATGAT AACTTAAGA
    Y V V L A L G V A L V S A N D N L R
163 AGTCGACGC AGTGTTACT CCAGATTAC CACGATTAC TCGAAGTTG TGTGAGAAT
    S R R S V T P D Y H D Y S K L C E N
217 CAGCCTGAT GCATACATG TGCGCCGAC TGCAAAAACC ATGATCCTG TGTGTGAAG
    Q P D A Y M C A D C K T M I L C V K
271 GGACAGGCC TTCACTCGC CACTGCATC GAGGACCAC TACTGTTCA GTGAGGCC
    G Q A F T R H C I E D H Y C S V R P
325 GAGTTTGGC GGGGGAGTC TGCTACCCA GATGAGCCT AAGGCCTGC AAATGCGAG
    E F G G G V C Y P D E P K A C K C E
379 AAGGCCAAC TCCTCCGA GTGGACCAC TACGACCCT CAGAAGTTC TTCGTCTGC
    K A N S F R V D H Y D P Q K F F V C
433 AAAGCTGTT GGATCGGCC CCTTTGACC TACACATGC CCAGATGGC ATGGTATTC
    K A V G S A P L T Y T C P D G M V F
487 GATGTAGCC TCGGCACAG TGCCATACC TCGGGTGGC ATGCCCCCT TGTGTTGAG
    D V A S A Q C H T S G G M P P C V E
  
```

```

541 CCAGGTACT TTTGCCAAC CCGGCCAAC TGCAGTGAA TACTACTCG TGCATTGGC
    P G T F A N P A N C S E Y Y S C I G
595 CTGCGACAT GGCTGGCTG CAGAGTAGC TTCCAGTGT AACAGTGGC CTGATGTAC
    L R H G W L Q S S F Q C N S G L M Y
649 AACCAGGAT AAAAAAGCG TGTGAAAAC CCTTGCCTG TACCAGTTC GTGTGCCAG
    N Q D K K A C E N P C L Y Q F V C Q
703 CAGGAGGGC CGATATCCT GACCTCCTG AACCAGCAG AACTACTTT CAATGCTAC
    Q E G R Y P D L L N Q Q N Y F Q C Y
757 ATGTTGGGT GGCAAGTTA CGGCAGCTC CGCTACAGC TGCCCTGAA GCTACAGGT
    M L G G K L R Q L R Y S C P E A T G
811 GGGATGAGA TCTCTATGG GTGTTGGCC AGTGTGTTG AAGATCACG AGCATGTTT
    G M R S L W V L A S V L K I T S M F
865 CTACCGGTG CCTTCGGTA ACTGCCACA TCCCTGACG ACTTTTGTC CAGGCACAT
    L P V P S V T A T S L T T F V Q A H
919 GAGCACTTA CTACAGAAG CCCTGTCGA ACAACCAGT GGAAAAGGG CCAAGTCT
    E H L L Q K P C R T T S G K G P K S
973 CTAATTCGA TGTCTCTTA ATAAAATTT TAATACTT CACAAAAA AAAAAAAA
    L L R C L L I K F *

```

图2 凡纳滨对虾围食膜蛋白基因及氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *L. vannamei* peritrophin

Peritrophin 基因序列分析 将 Peritrophin 基因 CDS 序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对,发现该序列与斑节对虾卵巢围食膜蛋

白 1、2、围食膜蛋白前体 3,短钩对虾围食膜蛋白 1、2,以及中国对虾围食膜蛋白编码序列的同源性较高,均达到 80% 以上(图 3)。

| | | |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <i>L. vannamei</i> | ATGAGACTGAAATACGTTATATGTTGTGTTGGCCCTTGGGTGAGCACTAGTCTCGGCCAAT | 60 |
| <i>P. mono ovaria</i> PT1 | ATGAGGTCAAATACTTTATTGTTGTTGTTGGCCCTAGGGTTTGGCCCTGGCAGCAGCCAAAT | 60 |
| <i>P. mono ovaria</i> PT2 | ATGAGGTGCAATAACATTCTTTGTTGTGCTGGCCCTGGGGTTAGCCCTTGTTCAGCCAAA | 60 |
| <i>P. mono</i> PT3 | ATGAGGTGCAATAACATTCTTTGTTGTGCTGGCCCTGGGGATAGCCCTTGTTCAGCCCAAG | 60 |
| <i>P. semi</i> PT1 | ATGAGGTGCAATACTTTCTTTGTTGTGCTGGTCTCTGGTGGTAGCCCTTGTTCGCGCTAAG | 60 |
| <i>P. semi</i> PT2 | TATGCTGGCTCTGGGGGTAGCCCTTGTTCAGCCAAAGGAGGACTTGCGAAGCACACGCGAG | 60 |
| <i>P. chin</i> PT | ATGAGTTGCAATAACATTCTTTGTTGTGCTGGCCCTGGGGGTAGCCCTTGTTCAGCCCAAG | 60 |
| Consensus | atgaggtcgaatac ttctttgttgtgctggccctgggggtagcccttgtttcagccaaag | |
| | | |
| <i>L. vannamei</i> | GATAACTTAAGAAGTCGACGGCAGTGTACTCCAGATTACCACGATTACTCGAAGTTGTGT | 120 |
| <i>P. mono ovaria</i> PT1 | GATGGCTTGCAGCTGAAAGCAGTGTACTCGGAGATAACCACCCTTACTCGAAGCTATGT | 120 |
| <i>P. mono ovaria</i> PT2 | GAGGACTTGCAGAGCGAAGCCAGCCTTACGGGAGATAACCACCCTTACTCGAAGCTATGT | 120 |
| <i>P. mono</i> PT3 | GAGGACTTGCAGAGCGAAGCCAGCCTTACTCCAGATAACCACCCTTACTCGAAGCTACGT | 120 |
| <i>P. semi</i> PT1 | GAAGACTGAAAAGCAAGCCAGTGTACTACAGACAACCACCCTTACTCGAAGCTGTGC | 120 |
| <i>P. semi</i> PT2 | TGTTACTACAGACAACCACCCTTACTCGAAGCTGTGTGAGAAAACAGCCAGACCAATTCAAT | 120 |
| <i>P. chin</i> PT | GAGGACTTGCAGAGCGAAGCCAGTGTACTCCAGACAACCACCCTTACTCGAAGCTGTGT | 120 |
| Consensus | ga gacttgcgaagcgaacgcagtggttactgcagataaccacccttactcgaagct tgt | |
| | | |
| <i>L. vannamei</i> | GAGAAATCAGCCTGATGCATACATGTGCGCCGACTGCAAAACCATGATCCTGTGTGTGAAG | 180 |
| <i>P. mono ovaria</i> PT1 | GA AAAACACCTGACAAATTCATTGCGGCCAAGTGC AAGACCTTGTATCCAGTGTGTGAAG | 180 |
| <i>P. mono ovaria</i> PT2 | GAGAAACACCTGACAAATTCATTGCGGCCAAGTGC AAGACCTTGTATCCAGTGTGTGAAG | 180 |
| <i>P. mono</i> PT3 | GAGAAACACCGAGACAAATTCATCTGCGGCCAAGTGC AAGACGTTGTTCCAAATGTGTGAAG | 180 |
| <i>P. semi</i> PT1 | GAGAAACACCGCAGACAAATTCATTGCGGCCAAGTGC AAGACCTTGTATCCAGTGTGTGAAG | 180 |
| <i>P. semi</i> PT2 | TTGCGCCAAGTGC AAGACCTTGTATCCAGTGTGTGAAGGACAGGCCCTTCACTCGCCACTG | 180 |
| <i>P. chin</i> PT | GAGAAACACCTGACAAATTCATTGCGGCCAAGTGC AAGACCTTGTATCCAGTGTGTGAAG | 180 |
| Consensus | gagaaacaacctgacaaattcatttgcg caactgcaagaccttgcagctgtgtgaag | |

| | | |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <i>L. vannamei</i> | GGACAGGCCTTCACTGCCCACATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTT | 240 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | GGCAGGCCTTCACTGCCCACATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTT | 240 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | GGCAGGCCTTCACTGCCCACATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTT | 240 |
| <i>P. mono PT3</i> | GGCAGGCCTTCACTGCCCACATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTT | 240 |
| <i>P. semi PT1</i> | GGACAGGCCTTCACTGCCCACATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTT | 240 |
| <i>P. semi PT2</i> | CATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTTGGGGGGTGGTGTCTCTACCCAAA | 240 |
| <i>P. chin PT</i> | GGACAGGCCTTCACTGCCCACATCGAGGACCCTACTGTTTCACTGAGGCCCGAGTTT | 240 |
| Consensus | gg caggccttcaactcgccactgcattgaggaccacttctgttcggaaggaccagttt | |
| <i>L. vannamei</i> | GGCGGGGAGTCTGTGCTACCCAGATGAGCCCTAAGGCCGTGCAAAATGGAGAAGGCCAATCC | 300 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | GGCGGTGGTGTCTGTGCTACCCAAATGAACTCTGGACTGCACCTGGTGAAGGCCAACGAG | 300 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | GGCGGTGGTATCTGTCTACCCAAATGAACTCTGGACTGCACCTGGTGAAGGCCAACGAA | 300 |
| <i>P. mono PT3</i> | GGCGGTGGTATCTGTCTACCCAAATGAACTCTGGACTGCACCTGGTGAAGGCCAACGAG | 300 |
| <i>P. semi PT1</i> | GGCGGTGGTGTCTGTGCTACCCAAATGAACTCTGGAAATGCACCTGGTGAATGCAACTCG | 300 |
| <i>P. semi PT2</i> | TGAACCTACAGAATGCACCTGGCTGACTGCCAATCTGTTTCACTGAGGCCCTATGACCC | 300 |
| <i>L. vannamei</i> | TTCCGAGTGGACCACTACGACCCTGAGAAGTTCCTTCTGTCGCAAGCTGTTGGATCGGCC | 360 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | TTCCGAGTGGACCCCTACGACTCTGAGAGGTTCTTCTCTGCAAGGCTGTTGGCTCCACC | 360 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | TTCCGAGTGGACCCCTACGACACTGAGAGGTTCTTCTCTGCAAGGCTGTTGGCTCCACC | 360 |
| <i>P. mono PT3</i> | TTCCGAGTGGACCCCTACGACACTGAGAGGTTCTTCTCTGCAAGGCTGTTGGCTCCACC | 360 |
| <i>P. semi PT1</i> | TTCCGAGTGGACCCCTATGACTCTGAGAGGTTCTTCTCTGCAAGGATATTGGCTCCACT | 360 |
| <i>P. semi PT2</i> | TCAGAGGTTCTTCTCTGCAAGGATATTGGCTGCAATCCCAAGACTACAAGTCCAG | 360 |
| <i>P. chin PT</i> | TTCCGAGTGGACCCCTACGACTCTGAGAGGTTCTTCCCTGCAAGGATGTTGGCTCCGTC | 360 |
| Consensus | ttccgagtgaccctacgac ctcagaggttcttctcttgcaggctggttggtccacc | |
| <i>L. vannamei</i> | CCTTTGACCTACACATGCCAGATGGCATGGTATTCGATGTAGCCTGGGCACAGTGCCAT | 420 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | CCCGACAACCTACAAGTCCCAGATGGTATGGTCTTTCGATGAAGGCTGGGCACAGTGCCAG | 420 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | CCCGAGAACTACAAGTCCCAGATGGTATGGTCTTTCGATGAAGGCTGGGCACAGTGCCAG | 420 |
| <i>P. mono PT3</i> | CCCGAARACTACAAGTCCCAGATGGTATGGTCTTTCGATGAAGGCTGGGCACAGTGCCAG | 420 |
| <i>P. semi PT1</i> | CCCAAGAACTACAAGTCCCAGATGGTATGACCTTCGATGAAGGCAGGGCACAGTGCCAG | 420 |
| <i>P. semi PT2</i> | TGGTATGACCTTCGATGAAGGCAGGCACAGTGCCAGCGCAAGTGGCTGCCTGCATG | 420 |
| <i>P. chin PT</i> | CCCGAGACTACAAGTCCCAGATGGTATGGTCTTTCGATGAAGGCTGGGCACAGTGCCAG | 420 |
| Consensus | cccgagaactacaagtgcccagatggtatggtcttctgatgaaggctcggcacagtgccag | |
| <i>L. vannamei</i> | ACCTCGGGTGGCATGCCCCCTTGTGTTGAGCCAGGTACTTTTGCCAACCCGGCCAACTGC | 480 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | ACGGCAAGTGGCTGCCCTCCATGCGTGGTGGGGGTACTTTTGCCAACCCAAAGCAACTGC | 480 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | ACGGCAAGTGGCTGCCCTCCATGCGTGGTGGGGGTWHHTTTTGCCAACCCAAAGCAACTGC | 480 |
| <i>P. mono PT3</i> | ACGGCAAGTGGCTGCCCTCCATGCGTGGTGGGGGTACTTTTGCCAACCCAAAGCAACTGC | 480 |
| <i>P. semi PT1</i> | ACGGCAAGTGGCTGCCCTCCATGCGTGGTGGCTGGTACTTTTGCCAACCCACGCAACTGC | 480 |
| <i>P. semi PT2</i> | CGTGGTGGCTGGTACTTTTGCCAAACCCACCAACTGCAGTCACTACTACTCTGTCATTA | 480 |
| <i>P. chin PT</i> | ACGGCAAGTGGCTGCCCTCCATGCGTGGTGGGGGTACTTTTGCCAACCCAAAGCAACTGC | 480 |
| Consensus | acggcaagtggcctgctccatgctggtggggggtacttttgccaaccaagcaactgc | |
| <i>L. vannamei</i> | AGTGAATACTACTCGTGCATTGGCCTGCGACATGGCTGGCTGCAGAGTAGCTTCCAGTGT | 540 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | AGTGAATACTACTCGTGCATTAGCCTGCGAAGCGGATGGCTGCAGAAATCGTTCATGTGC | 540 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | AGTGAATACTACTCGTGCATTAGCCTGCGAAGCGGATGGCTGCAGAAATCGTTCATGTGC | 540 |
| <i>P. mono PT3</i> | AGTGAATACTACTCGTGCATTAGCCTGCGAAGCGGATGGCTGCAGAAATCGTTCATGTGC | 540 |
| <i>P. semi PT1</i> | AGTCACTACTACTCGTGCATTAACTTTCGCAAGTGGATGGCTGCAGAAATCGTTCATGTGC | 540 |
| <i>P. semi PT2</i> | CCCTTCGCAAGTGGATGGCTGCAGAAATCGTTCATGTGCAGCAATGTACAACCA | 540 |
| <i>P. chin PT</i> | AGTGAATACTACTCGTGCATTAGCCTGCGAAGCGGATGGCTGCAGAAATCGTTCATGTGC | 540 |
| Consensus | agtgaataactactcgtgcattagcctgcg agtggatggctgcagaagtcgttcagtgcc | |
| <i>L. vannamei</i> | AACAGTGGCTGATGTGCAACCAGGATAAAAAAGCGTGAAAAACCTTGCCGTGATACCAG | 600 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | ACCAATGACATGATGTGCAACGAAACAAAAGGATGCATGTGAAGATCCGTGCATATACCAG | 600 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | ACCAATGACATGATGTGCAACGAAACAAAAGGATGCATGTGAAGATCCGTGCATATACCAG | 600 |
| <i>P. mono PT3</i> | ACCAATGACATGATGTGCAACGAAACAAAAGGATGCATGTGAAGATCCGTGCATATACCAG | 600 |
| <i>P. semi PT1</i> | ACCAGTGGCATGATGTGCAACGAAACAAAAGGAAAGCTTGTGAAGATCCCTGCTTGTACCAG | 600 |
| <i>P. semi PT2</i> | ACGCAAGGAAGCGTGTGAMGATCCCTGCTTGTACAGTTCGTTTCCAGCAAGAGGGCCG | 600 |
| <i>P. chin PT</i> | ACCAATGACATGATGTGCAACGAAACAAAAGGCTGCATGTGAAGATCCCTGCTTGTACCAG | 600 |
| Consensus | accaatgacatgatgtgacaacgaaacaaaaggatgcatgtgaagatcc tgcataataccag | |
| <i>L. vannamei</i> | TTCTGTGGCAGCAGGAGGGCCGATTTCCCTGACCTCTGAAACAGCAGAACTACTTTCAA | 660 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | TTCTGTGGCAGCAGGAGGGCCGTTACCTGACCTTCTGAACAAGCAGAACTACTTTGAA | 660 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | TTCTGTGGCAGCAGGAGGGCCGTTACCTGACCTTCTGAACAAGCAGAACTACTTTGAA | 660 |
| <i>P. mono PT3</i> | TTCTGTGGCAGCAGGAGGGCCGTTACCTGACCTTCTGAACAAGCAGAACTACTTTGAA | 660 |
| <i>P. semi PT1</i> | TTCTGTTGGCAGCAAGAGGGCCGATTTACCTGACCTTCTGAACAAGCAGAACTACTTTGAA | 660 |
| <i>P. semi PT2</i> | ATACCTGACCTTCTGAAACAAGCAGAACTACTTTGAAATGCTATATGCTTGGTGGCTGTT | 660 |
| <i>P. chin PT</i> | TTCTGTGGCAGCAGGAGGGTCGATTTACCTGACCTTCTGAACAAGCAGAACTACTTTGAA | 660 |
| Consensus | ttctgtgcccagcaggaggccgataccctgaccttctgaacaagcagaattactttgaa | |
| <i>L. vannamei</i> | TGCTACATGTTGGGTGGCAAGTTACGGCAGCTCGGCTACAGCTGGCCGTGAAGCTACAGG | 719 |
| <i>P. mono ovaria PT1</i> | TGCTACATGCTTGGTGGCGTGTTCAGCAGCTACGTTACAGCTGGCCGTGAGAGCTACAGG | 720 |
| <i>P. mono ovaria PT2</i> | TGCTACATGCTTGGTGGCGTGTTCAGCAGCTACGTTACAGCTGGCCGTGAGAGCTACAGG | 720 |
| <i>P. mono PT3</i> | TGCTACATGCTTGGTGGCGTGTTCAGCAGCTACGTTACAGCTGGCCGTGAGAGCTACAGG | 720 |
| <i>P. semi PT1</i> | TGCTATATGCTTGGTGGCGTGTTCAGCAGCTCGGCTACACCTGGCCGTGAAGCTACAGG | 720 |
| <i>P. semi PT2</i> | GCAGCAGTTGCGTTACAGCTGCCCTGAAAGCTACAGGTGGGAGATGCTATCTCGAGGTGT | 720 |
| <i>P. chin PT</i> | TGCTACACGTTTGGTGGCGTGTTCAGCAGCTACGTTACAGCTGGCCGTGAGAGCTACAGG | 720 |
| Consensus | tgctacatgcttgggtggcaggttacggcagctcggctacagctggccgtgagagctacagg | |

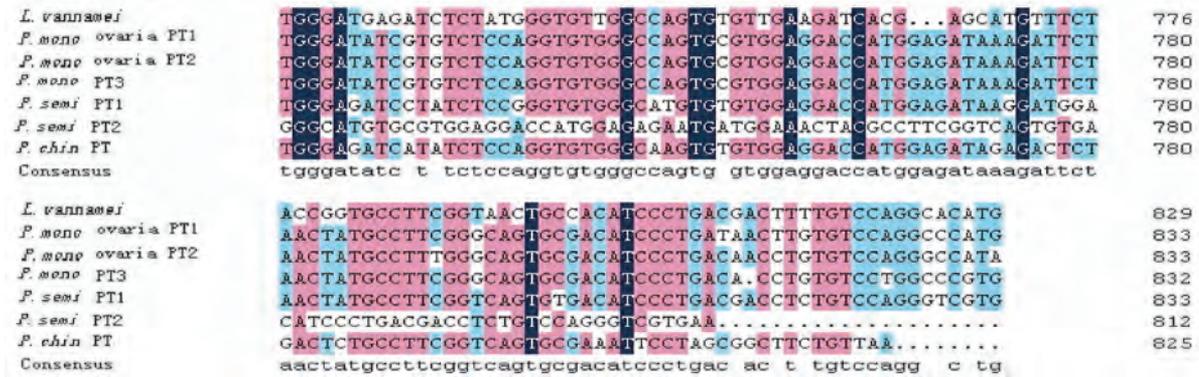


图 3 围食膜蛋白基因 CDS 序列比对

Fig. 3 CDS sequence alignment of peritrophins

利用 DNASTar 中的 Edisequce 程序将 *Peritrophin* 基因的编码序列翻译为相应的氨基酸序列,其编码的氨基酸残基数、分子量、等电点等理化性质总结见下表 1。

表 1 围食膜蛋白基因的氨基酸序列理化性质

Tab. 1 The physicochemical properties of amino acid sequence of peritrophin

| 名称 name | 分子量 molecular weight | 等电点 isoelectric point | 氨基酸残 amino acids | 碱性氨基酸数 basic amino acids | 酸性氨基酸数 acidic amino acids | 疏水性氨基酸数 hydrophobic amino acids | 极性氨基酸数 polar amino acids |
|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Peritrophin | 33.838 | 7.987 | 303 | 30 (K, R) | 24 D, E | 88 (A, I, L, F, W, V) | 105 (N, C, Q, S, T, Y) |

通过 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 在线软件分别对 Peritrophin 蛋白的氨基酸序列进行结构域分析发现,在 91 ~ 144 和 146 ~ 199 氨基酸残基间具有典型的 ChtBD2 结构域特征(图 4)。

通过 NCBI Blast 软件对所得基因编码的氨基酸序列进行在线搜索,发现该蛋白的氨基酸序列与斑节对虾卵巢围食膜蛋白 1、2、围食膜蛋白前体 3,短钩对虾围食膜蛋白 1、2,以及中国对虾围食膜蛋白的同源性分别达到 72%、71%、71%、

70%、72% 和 68% (图 5)。

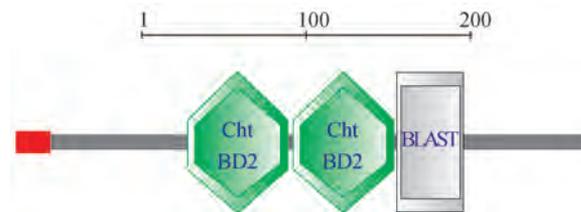


图 4 围食膜蛋白结构域
Fig. 4 Peritrophin domain

| 登录号 accession | 蛋白说明 description | 对比区域 query coverage | E 值 E-value | 相似性 max ident |
|------------------|---------------------------------------------------|------------------------|----------------|------------------|
| AEI26265.1 | peritrophin <i>L. vannamei</i> | 100% | 0.0 | 100% |
| ABL86146.1 | peritrophin 3 precursor <i>P. monodon</i> | 97% | 1e-142 | 71% |
| AAF34332.1 | peritrophin-like protein 2 <i>P. semisulcatus</i> | 97% | 1e-142 | 72% |
| AAM44049.1 | ovarian peritrophin 1 precursor <i>P. monodon</i> | 99% | 3e-139 | 72% |
| AAZ66371.1 | peritrophin <i>P. chinensis</i> | 98% | 5e-138 | 68% |
| AAM44050.1 | ovarian peritrophin 2 precursor <i>P. monodon</i> | 99% | 4e-137 | 71% |
| AAF34331.1 | peritrophin-like protein 1 <i>P. semisulcatus</i> | 100% | 8e-137 | 70% |

图 5 围食膜蛋白氨基酸序列同源性比较

Fig. 5 Similarities between peritrophin of *L. vannamei* and other proteins

2.6 凡纳滨对虾围食膜蛋白基因的表达特征

通过半定量 RT-PCR 对该基因在正常对虾不同组织的表达分析表明,该基因在心脏、肝胰腺、肠道、胃、眼睛和鳃组织中基本不表达。半定量 RT-PCR 对该基因在感染 IHNV 病毒对虾和抗 IHNV 对虾不同组织的表达分析表明,该基因在抗感染 IHNV 病毒的对虾的心脏和胃中高表达,在肝脏、肠和肌肉中表达较低,在鳃中表达最弱,在眼中不表达;该基因在感染 IHNV 病毒的对虾的心脏表达明显减弱,在肝脏、眼、肌肉和鳃中表达较低,在肠道和胃中几乎不表达(图 6)。

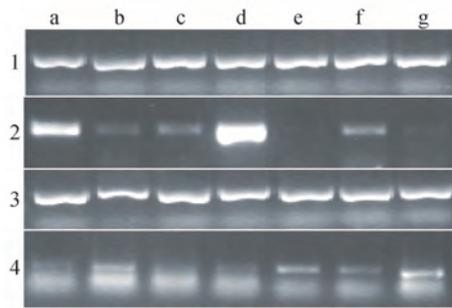


图 6 半定量 RT-PCR 检测围食膜蛋白基因在凡纳滨对虾感染和抗 IHNV 不同组织的表达量

1. β -actin 基因在抗 IHNV 对虾不同组织半定量检测结果; 2. 围食膜蛋白基因在抗 IHNV 对虾不同组织半定量检测结果; 3. β -actin 基因在感染 IHNV 对虾不同组织半定量检测结果; 4. 围食膜蛋白基因在感染 IHNV 对虾不同组织半定量检测结果。

a. 心; b. 肝; c. 肠; d. 胃; e. 眼; f. 肌; g. 鳃。

Fig. 6 Expression patterns of peritrophin gene in different tissues of IHNV-infected and IHNV-resistant *L. vannamei*

1. Semi-quantitative PCR analysis of β -actin gene in different tissues of IHNV-resistant *L. vannamei*; 2. Semi-quantitative PCR analysis of peritrophin gene in different tissues of IHNV-resistant *L. vannamei*; 3. Semi-quantitative PCR analysis of β -actin gene in different tissues of IHNV-infected *L. vannamei*; 4. Semi-quantitative PCR analysis of peritrophin gene in different tissues of IHNV-infected *L. vannamei*.

a. heart; b. hepatopancreas; c. intestinal; d. gastric; e. eyestalk; f. muscle; g. gills.

3 讨论

在凡纳滨对虾养殖过程中比较常见的病毒性疾病有白斑病毒(WSSV)、桃拉病毒(TSV)和传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV),这些病毒性疾病仍是影响凡纳滨对虾养殖业稳定发展的

最大障碍。如何抑制病毒性疾病的传播是凡纳滨对虾健康养殖领域的研究热点和重点,也是保证凡纳滨对虾养殖业持续健康发展亟待解决的重要问题。采食病死对虾或者感染病毒的饵料是导致凡纳滨对虾病毒性疫病传播最为迅速和普遍的途径,对虾肠道便是病毒进入虾体的重要门户。因此,阐明对虾肠道感染病毒性疾病的机制是进一步开展病毒性疾病预防攻关的研发基础和关键。

本研究构建了凡纳滨对虾正常肠道组织全长 cDNA 文库,文库库容量为 1.05×10^6 pfu/mL,去掉载体后平均插入片段为 450 bp,重组率为 95%,克隆测序后,根据 90% 同源性的原则对这些序列归并 unigene,得到 unigene 399 条,形成一个 unigene 库。利用 DNASTar seq 软件将 *Peritrophin* 基因与上述 unigene 库进行比对,获得了凡纳滨对虾 *Peritrophin* 基因的全长 CDS 序列与 GenBank 数据库比对发现其与斑节对虾卵巢围食膜 1,2 前体(AF510331.1 和 AF510332.1)及短沟对虾围食膜样蛋白 1(AF095580.1)基因序列具有较高的同源性,达到了 90% 以上。该基因编码的蛋白质在 91~144 和 146~199 氨基酸残基间具有典型的 ChtBD2 结构域特征。该结构域被认为同几丁质的结合有关,这些 CBDs 包括 6~10 个保守的半胱氨酸残基和少数芳香族氨基酸残基,形成分子内和分子间二硫键,以维持围食膜蛋白的稳定性,有助于围食膜结构的正常形成^[3,10-11]。氨基酸序列比对发现,该基因编码的蛋白质的氨基酸序列与斑节对虾卵巢围食膜蛋白 1,2、围食膜蛋白前体 3,短沟对虾围食膜蛋白 1,2,以及中国对虾围食膜蛋白的同源性分别达到 72%、71%、71%、70%、72% 和 68%。由此确定本研究获得的基因序列为凡纳滨对虾围食膜蛋白基因序列。

目前,对昆虫肠道围食膜的生理功能及其组成蛋白的结构和功能已有大量深入的研究^[12]。围食膜是位于昆虫肠道上皮细胞和食物之间的一道有效屏障,具有保护昆虫肠道免受粗糙食物机械损伤,防止病毒、细菌侵入等重要功能^[13-15]。本研究首次克隆获得了凡纳滨对虾的围食膜蛋白基因,鉴于昆虫围食膜在防止病毒、细菌侵入等重要功能,本研究比较了围食膜蛋白基因在易感染 IHNV 病毒和抗感染 IHNV 病毒凡纳滨对虾胃、肠等消化道组织中的表达差异,结果显示该基

因在感染 IHNV 病毒的对虾肠道和胃中几乎不表达,而在抗感染 IHNV 病毒对虾的胃中高表达,在肠组织相对胃中的表达较低,由此显示与昆虫围食膜蛋白一样,对虾围食膜蛋白也与防止病毒侵入有关。

近年来,人们从对虾繁殖和免疫等方面逐渐关注围食膜蛋白生理功能。Khayat 等^[16]在短钩对虾(*P. semisulcatus*)中研究发现围食膜蛋白样基因高表达于卵子发生过程中,在卵子表面形成一层保护层,且围食膜蛋白在胰腺的表达仅限于卵黄期。Kim 等^[17]从日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中发现在受精的卵子表面也形成一层凝胶状的保护层。杜欣军^[18]研究发现中国明对虾围食膜蛋白在卵巢中高水平表达且不受细菌刺激影响。Pongsomboon 等^[19]比较了围食膜蛋白在正常斑节对虾和感染 WSSV 病毒对虾淋巴组织中的表达情况,发现在感染 WSSV 的对虾淋巴组织中表达围食膜蛋白基因,认为围食膜蛋白可能参与免疫反应。然而,杜欣军^[18]研究发现中国明对虾围食膜蛋白在正常和细菌刺激的胰腺中都没有表达,在细菌刺激后的血细胞、心、胃、鳃、肠和精巢中检测到这一基因的表达,而在相同的正常组织中则没有信号。本研究结果表明,围食膜蛋白基因在抗感染 IHNV 病毒的凡纳滨对虾的心脏和胃中高表达,在肝脏、肠和肌肉中表达次之,在眼、鳃中不表达;而该基因在感染 IHNV 病毒的凡纳滨对虾心、眼、鳃、肌中均弱表达。围食膜蛋白在卵子发育和受精卵孵化过程中是否也扮演着防止病原入侵的屏障,以及该蛋白在其他组织发挥怎样的生理功能,仍需要进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Lehane M J. Peritrophic matrix structure and function [J]. *Annual Review of Entomology*, 1997, 42: 525 - 550.
- [3] Wang P, Granados R R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential P M target sites for insect control [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2001, 47(2): 110 - 118.
- [4] Tellam R L, Vuocolo T, Eisemann C, *et al.* Identification of an immuno-protective mucin like protein, peritrophin-55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(2): 239 - 252.
- [5] Shen Z, Jacobs-Lorena M. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. Cloning, expression, and characterization [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(28): 17665 - 17670.
- [6] Lehane M J. *The biology of the insect midgut* [M]. London: Chapman and Hall, 1999: 86 - 114.
- [7] Gaines P J, Walmsley S J, Wisniewski N. Cloning and characterization of five cDNAs encoding peritrophin-A domains from the cat flea, *Ctenocephalides felis* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(11): 1061 - 1073.
- [8] Tellam R L, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(2): 87 - 101.
- [9] 赵永贞, 陈秀荔, 辛文伦, 等. 凡纳滨对虾抗传染性皮下及造血组织坏死病毒感染的初步研究 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31(10): 54 - 57.
- [10] Wang P, Granados R R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential P M target sites for insect control [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology Arch Insect Biochem Physiol*, 2001, 47(2): 110 - 118.
- [11] Shen Z, Jacobs-Lorena M. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates [J]. *Journal of Molecular Evolution J Mol Evol*, 1999, 48(3): 341 - 347.
- [12] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, *et al.* New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function [J]. *Annual Review of Entomology Annu Rev Entomol*, 2009, 54: 285 - 302.
- [13] Toprak U, Baldwin D, Erlandson M, *et al.* Insect intestinal mucins and serine proteases associated with the peritrophic matrix from feeding, starved and moulting *Mamestra configurata* larvae [J]. *Insect Molecular Biology Insect Mol Biol*, 2010, 19(2): 163 - 175.
- [14] Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, *et al.* Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacteria infection in *Drosophila melanogaster* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(38):

- 15966 – 15971.
- [15] Toprak U, Harris S, Baldwin D, *et al.* The role of enhancing in *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus virulence: Selective degradation of host peritrophic matrix proteins [J]. *The Journal of General Virology*, 2012, 93(4): 744 – 753.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 杜欣军. 中国明对虾先天免疫的模式识别与效应分子 [D]. 青岛: 山东大学, 2007.
- [19] Pongsomboon S, Wongpanya R, Tang S, *et al.* Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 485 – 93.

Cloning and analysis of full length cDNA of peritrophin in *Litopenaeus vannamei*

CHEN Xiu-li, ZHAO Yong-zhen, PENG Min, YANG Chun-ling, JIANG Wei-ming, LI Yong-mei,
ZENG Di-gang, MA Ning, LI Ming, CHEN Xiao-han*, WU Tie-jun
(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Health Cultivation of Guangxi,
Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Abstract: In order to study the peritrophin function of *Litopenaeus vannamei* related to IHNV invasion, the full-length cDNA library from intestinal tissue of *Litopenaeus vannamei* was constructed by switching mechanism at 5' end of the RNA transcript technique (SMART), a full-length cDNA of peritrophin was obtained by gene splicing and its characterization was analyzed. The capacity of constructed library was up to 1.05×10^6 pfu/mL, and its recombinant coefficient was 95%. 1 600 clones selected randomly were sequenced, 1 531 available sequences with inserted length ≥ 450 bp were obtained after removing vector. One cDNA of peritrophin gene sequence of 1 002 bp was obtained from the clones, its protein encodes 303 amino acids. The nucleotide sequences of *Litopenaeus vannamei* have an overall similarity of 80% to peritrophin 1, 2 precursor and peritrophin 3 precursor of *Penaeus monodon*. Expression of peritrophin gene in different tissue was analyzed by semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR), the result showed that the expression of peritrophin transcript in myocardium and gastric was higher, the expression was lower in hepatopancreas, intestines and muscle, the minimal expression was in gills, but not in eyes; Expression was obviously weakened in heart of IHNV injected *Litopenaeus vannamei*, expression was lower in hepatopancreas, eyestalk, muscle and gills tissues, there was almost no expression in intestines and stomach. These results suggest that peritrophin of *Litopenaeus vannamei* was involved in prevention of IHNV invasion.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; peritrophin; infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV); cloning

Corresponding author: CHEN Xiao-han. E-mail: chenxhan@yahoo.com.cn