



## CYP2J3 样基因在不同生长速率凡纳滨对虾中的差异表达

黄世玉<sup>1</sup>, 张丽莉<sup>1</sup>, 王国栋<sup>1\*</sup>, 王艺磊<sup>1</sup>,  
卢锡琴<sup>1</sup>, 黄永裕<sup>1</sup>, 杨章武<sup>2\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361000)

**摘要:** 为了获得对虾生长差异的分子机制, 通过比较不同生长速率凡纳滨对虾的转录组(速长组和慢长组), 获得了一条编码 P450 的差异表达基因, 经过 cDNA 全长验证后命名为 *LvCYP2J3-like*, 其开放阅读框为 1 488 bp, 编码 495 个 aa, 含有一个完整的 P450 功能域, 功能分析表明, 该基因可能参与了蜕皮激素的灭活。方差分析表明, *LvCYP2J3-like* 在不同组织、发育阶段和蜕皮周期的表达量都存在显著性差异, 并且速长群体的表达量显著性低于慢长群体。表明该基因参与了发育和蜕皮过程, 其表达量与环境胁迫关系密切。在 *LvCYP2J3-like* 和其预测转录因子基因中分别发现了 4 和 11 个速长组和慢长组等位基因频率显著差异的单核苷酸多态性 (SNP) 标记, 说明这些基因遗传差异与其活性和表达量相关, 从而影响生长速率。研究结果为凡纳滨对虾遗传和育种研究提供了参考资料。

**关键词:** 凡纳滨对虾; P450; 生长; 基因表达; 单核苷酸多态性 (SNP)

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是我国最主要的养殖对虾。随着养殖技术的持续进步, 养殖的工业化水平逐渐提高, 高密度工厂化养殖已经成为我国凡纳滨对虾养殖的主流<sup>[1-3]</sup>。这种养殖方式可以充分发挥凡纳滨对虾生长速率快的特性, 在较短时间内获得商品规格的对虾。因此凡纳滨对虾养殖业对速生型的优良品种需求旺盛。经过多年持续努力, 国内外对虾育种学家培育了数个以生长迅速为主要特征的优良品种, 极大提高了凡纳滨对虾的生长速率, 缩短了养殖周期<sup>[4]</sup>。但是目前对凡纳滨对虾速生的分子基础尚不清楚, 而且对虾病害日益严重也

对抗病性状提出了更高的要求, 因此具有速生、抗病复合性状的优良品种成为对虾养殖业的迫切需求<sup>[5]</sup>。生产性状的分子机制是进行优良品种培育的基础; 我国多样的对虾养殖环境需要良种多样化, 满足地方养殖特色的需求; 只有在了解优良性状分子遗传的基础上, 才能针对性地进行优良品种培育。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是一类含有血红素的酶, 催化氧原子进入非活化态的 C-H 键, 其底物种类繁多, 是一类强大的氧化酶<sup>[6]</sup>。在节肢动物中, CYP 参与了蜕皮激素<sup>[7]</sup>、保幼激素<sup>[8]</sup> 和几丁质长链多糖合成<sup>[9]</sup> 等多种与生

收稿日期: 2020-09-18 修回日期: 2020-11-27

资助项目: 福建省种业创新与产业化工程 (2017FJSCZY02); 福建省科技项目 (2018I0013); 国家自然科学基金 (31702339)

第一作者: 黄世玉 (照片), 从事水生动物发育与遗传研究, E-mail: 1623250489@qq.com

通信作者: 王国栋, E-mail: gdongwang@163.com; 杨章武, E-mail: yzw6010163@163.com



长密切相关的生理过程<sup>[10]</sup>。本研究通过比较同一凡纳滨对虾群体中生长速率两极个体的转录组,发现 *LvCYP2J3-like* 表达量具有显著差异,该基因在不同组织、不同蜕皮和发育阶段的表达水平也提示其参与了生长过程,并且在速长群体和慢长群体中,该基因的5个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)频率具有显著差异,表明其具有作为分子标记的潜力。本研究的结果能够为凡纳滨对虾生长的分子机制研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 种虾及其后代苗种

种虾为福建省水产研究所留种的4个繁育群体,通过自交和正反交繁育子代虾苗共16组。所有交配组合均在3d内完成,按凡纳滨对虾常规育苗方法,培育至仔虾11~12期(P11~12)。每组子代虾苗随机取2万尾暂养于小水泥池(面积18 m<sup>2</sup>、水深1.5 m),按照水泥池养殖进行日常管理。暂养7~10 d后,虾苗平均体长达到1.5 cm以上时,计数进入实验小网箱进行养殖试验。

### 1.2 虾苗培育及养成

网箱用8目筛绢网制成,规格为1.0 m×1.0 m×1.3 m,吃水深1 m,共48个,放置在8.0 m×20.0 m×1.6 m的室内水泥池中。每个网箱配有2个圆柱形大号气泡石,水泥池四周排布气管以微孔充气,保持网箱内有充足溶解氧。

每组子代虾苗投放在3个不同的网箱中,分别计作生物学重复1、2、3。以随机单位组设计的方法将16组虾苗分别分配到48个网箱中。水泥池放苗前的肥水方法、放苗管理和日常操作同常规水泥池对虾养殖方法。每个网箱初始投放虾苗1 000尾,每30 d以密度最低网箱为标准调整一次密度,收获时每个网箱有对虾300尾左右。

### 1.3 生长差异样品取样、总RNA提取

养殖到120 d时,清理每个网箱内所有对虾,并测量个体体质量,取体质量排名前5名和最后5名的个体作为速长组和慢长组。根据不同的生物学重复形成速长组1、速长组2、速长组3和慢长组1、慢长组2、慢长组3。解剖获得取样个体的眼柄、肝胰腺和肠道于RNA later保护液中单独保存。同时取其肌肉组织于95%乙醇

中保存。

每个个体取0.1 g肝胰腺、全部眼柄和肠道进行RNA提取。将速长组1的肝胰腺样品放入液氮中碾磨成粉末并混合均匀后,取50 mg至1 mL Trizol溶液(Roche公司)中,按照说明书提取样品总RNA,经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后,用微量紫外分光光度计测定浓度和纯度。按同样的方法获得速长组1的眼柄和肠道的总RNA。等量混合3种组织的RNA,形成速长组RNA测序样品1。按同样的步骤获得速长组RNA测序样品2和3,以及慢长组RNA测序样品1~3。

### 1.4 RNA测序、差异基因筛选、差异SNP筛选

RNA测序样品送广州基迪奥生物科技有限公司,采用Illumina测序平台测序,以凡纳滨对虾基因组<sup>[11]</sup>为参考进行序列比对和注释,筛选速长组与慢长组差异表达基因。同时按照Yu等<sup>[12]</sup>和Mullen等<sup>[13]</sup>等描述的方法筛选速长组和慢长组的SNP,舍弃质量得分(quality score)小于30或在任何一组中测序深度(read depth)小于10的低质量SNP。

以与基因组序列不同的核苷酸作为突变,与基因组序列相同的核苷酸为参考,含有突变核苷酸的读子(read)的数目除以含参考核苷酸与突变核苷酸读子的和,获得最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)。筛选MAF差异的SNP作为差异SNP。用R语言调用Fisher's exact test筛选差异MAF,依次输入速长组突变读子数和参考读子数、慢长组突变读子数和参考读子数,获得概率值 $P$ ,小于0.05者为差异显著。

### 1.5 DNA提取、靶序列扩增及重测序

将“生长差异样品取样、总RNA提取”中取样的肌肉样品从乙醇取出,用吸水纸吸干乙醇后,称取0.1 g。将速长组1样品在液氮中碾磨成粉末并均匀混合,取50 mg至1 mL DNAzol溶液(Thermo Fisher公司)中,按照说明书提取基因组DNA,经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后,用微量紫外分光光度计测定浓度和纯度,作为速长组DNA样品1。同理获得速长组DNA样品2和3,以及慢长组DNA样品1~3。

根据转录组测序筛选的*LvCYP2J3-like*频率差异SNP前后各150 bp的序列,设计引物;以速长组和慢长组的DNA为模板进行PCR;扩增靶序列。PCR产物回收后,微量紫外分光光度

计测定浓度和纯度后, 等量将速长组的 3 个样品混合, 同样等量混合慢长组 PCR 回收产物。DNA 样品送广州基迪奥生物科技有限公司, 采用 Illumina 测序平台进行 DNA 重测序, 以 *LvCYP2J3-like* 靶序列为参考, 进行速长组和慢长组两个样品的 SNP 频率分析。

### 1.6 各组织、发育阶段和蜕皮阶段样品取样

取健康凡纳滨对虾 10 尾 ( $19.12 \pm 0.96$ ) g, 分别解剖获得肝胰腺、肌肉、眼柄、血细胞、肠和鳃等组织, 按照“生长差异样品取样、总 RNA 提取”中的方法提取其总 RNA。取来自 5 组亲虾各发育阶段的样品(胚胎、无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾), 提取其总 RNA。显微镜观察同一小水泥池中虾苗(体长 1.5 cm 左右)的尾扇, 按照 Gao 等<sup>[14]</sup>的标准根据表皮外观、色素沉积、刚毛形成情况和刚毛腔情况区分不同蜕皮阶段, 每个时期分别取 7 尾虾, 液氮冻存储存。提取 RNA 时将整尾虾碾磨成粉末混匀后, 取 50 mg 提取总 RNA。

### 1.7 *LvCYP2J3-like* 基因全长 cDNA 验证及相关基因 qPCR 表达谱获取

取“生长差异样品取样、总 RNA 提取”中肝胰腺来源的总 RNA 1.5  $\mu$ g 与 1  $\mu$ L *LvCYP2J3-like* 序列特异性引物 SP1 (10  $\mu$ mol/L) 混合, 按照 SMART PCR Synthesis Kit (Clontech 公司) 的说明合成 cDNA, 以表 1 中 cDNA 全长验证引物进行 PCR 扩增, 回收 PCR 产物并测序, 进行 *LvCYP2J3-like* 基因全长 cDNA 验证。

将“生长差异样品取样、总 RNA 提取”和“各组织、发育阶段和蜕皮阶段样品取样”中提取的总 RNA, 以 oligo (dT) (10  $\mu$ mol/L) 为引物合成 cDNA, 以表 1 的定量引物按照 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 公司) 的说明进行 qPCR, 以 EF1 $\alpha$  为内参基因。检测扩增产物溶解曲线和扩增曲线, 并测序确认其扩增特异性。计算每个样品的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  为 RQ 值, 基因表达水平表示为 RQ 平均值  $\pm$  标准误。基因组织表达分析以 6 个组织为 6 个处理水平, 以每尾虾作为 1 个重复, 每个处理水平有 10 个重复, 用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析和 Duncan 氏多重比较法进行组织间差异性检测。以 8 个蜕皮周期为 8 个处理水平, 每个水平有 7 尾虾作为 7 个重复, 进行数据处理, 过程同组织表达分析。以 5

表 1 所用引物及其序列

Tab. 1 Primer sequences used in the experiment		
引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequences	目的 purpose
Head	TCGTGAAGTGGTGCAGGAG	验证cDNA
Toe	CTCCAGGCAGACACGCTTT	验证cDNA
<i>CYP2J3</i> -F	CCTGACCGTTTCTACCCTGA	定量PCR
<i>CYP2J3</i> -R	CTCCAGGAAAACCGATGAA	定量PCR
Target-F	TCAATTTGTCGCACGGTTTA	靶向扩增
Target-R	CGTGTTAACCATGATGTTATTCC	靶向扩增
<i>PTF</i> -F	GGCCATCGGGTATATCTCCT	定量PCR
<i>PTF</i> -R	CAACTCCGTGAAGGTGTGAG	定量PCR
<i>PTF1A</i> -F	CTTGGACAGCTTCTGTGCT	定量PCR
<i>PTF1A</i> -R	ACCACCAGGAGCACTTCATC	定量PCR
<i>PTF1A1</i> -F	TGTTTTCTGATCGTTGTGG	定量PCR
<i>PTF1A1</i> -R	TCTGCGCCTTATGAGT	定量PCR
<i>TBP</i> -F	CACAGGTGCGAAAGTGAGAA	定量PCR
<i>TBP</i> -R	AGGAAGCGGTCATTCTTTT	定量PCR
<i>TBP1</i> -F	TATGAGAGCAGCAAGCTGGA	定量PCR
<i>TBP1</i> -R	CAGAGAAGGAGCACACCACA	定量PCR
<i>TMF</i> -F	GCGGAAAACACAAAGCTCTC	定量PCR
<i>TMF</i> -R	GCTCTGAAGGGCTGATGTC	定量PCR

个发育阶段为 5 个处理水平, 每个水平有来自不同亲本的 5 组后代作为 5 个重复, 按照上述方法进行数据分析。速长组和慢长组各含有 3 个重复, 用 SPSS 20.0 统计软件进行 *t* 检验分析。上述所有数据分析的显著性水平为  $P < 0.05$ 。

### 1.8 *LvCYP2J3-like* 基因的序列分析

用 EMBOSS (<http://imed.med.ucm.es/EMBOSS/>) 的 prettyseq 程序进行核酸序列和蛋白序列翻译。使用 ExPASy (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)、NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 TMHMM2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 程序分别预测其编码蛋白分子量及等电点、磷





```

1 AAAAGGCCAAACAAGAAGCGATGTCGGGGTTGATCCGCCATCCTGCCAGCGTGGGAGGAACGACCTAGTCTCGTGAAGTGGTGGCAG 90
91 GAGGACCACGACCCGACAGCTCTGCAGGATAACAGGAGACCTTCTTATAGTGATCACACCCAGCAAGatgttgactactatagccc 180
1 M W T T I A L 7
181 tcgecttaacgggtgctttttataatcttcaaacgctccttaacgaccacatgttttctccagctccattcgtttgccaattgtgg 270
8 A L T V L F I I F Y K A A L R P P C F P P G P F A L P I V G 37
271 gaagtattttctctatcttaccatcaccaaaggaatccttcagtagattcagaagaatatggacctatagttagctacaagctttg 360
38 S I F S I L P S P K E S F S R F Q K K Y G P I C S Y K V F D 67
361 ataactggtccatcatgtgaatgaccagcactgatgaagccacttcttccgaccagatatttctggaccaaaccctctactgt 450
68 N W S I I V N D P A L M K P L L A D P V F S G R K H L Y L F 97
451 ttctactacgagatgaagtatcagtggggaaaagatgcttctgggcatattaggaaccagcggagatgtgtgaaaaccagcgagctt 540
98 S L R D E V I S G E K M P L G I L G T S G D V W K N Q R R F 127
541 ttactaagagagctcaagatctaggatttggcagaataatgagccattatgagaagaattggaggacttgaacaacct 630
128 T L R S L K D L G F G R N S I E P I M Q K E L E D L I N T F 157
631 ttcccaactgaaggtcaaaagtgcagttgggtgacattcaacagcagatcatcaactgctggccatggttatttgggaagc 720
158 S Q T E G Q K V D V G L T F N S S I I N V I W A M V I G K R 187
721 gettttctcacgaagatgtccgtctgtagaactgtgcataaagtcaacaagatgctgcagctttaaacctttccaccagcttata 810
188 F S H E D V R L L E L V D K V N K M L Q S F N P F H P A S 217
811 gattccaattatagaagttcttccaacttggatgtatacaagagtcaagacttacatgagacaactcttgagttttattgagg 900
218 F P I I K K F P N L D V Y K S Q D T Y M R Q L L S F I E D 247
901 atgaaactgctcaatatgaaaaggaattgttagctgatgaaagctccttagttatattagagcatacttaagaaatgaaaagcag 990
248 E T A Q Y E K E L L A D E S S F S Y I R A Y L K E M K E A E 277
991 aaactgaaggaagagacaccattaaatatgcaccatcgaagccaacatttttgagctgtttctggctggaagtgaacaactgcat 1 080
278 T E G K E T P L N M H H L K A N I F E L F L A G S E T T A S 307
1 081 ctacctatggtggcggtatattcttggcaccacccagatgtccaaaaactatacagaaggaatagatgaagtatttggggagg 1 170
308 T L W W A V Y L L A S N P D V Q K T I Q K E L D E V I G E D 337
1 171 ataaattgctacattagctcacatggacagtttgccttatacaacgctgtctatatatgaagtgcagcgcgttgacagctgttcccat 1 260
338 K L P T - L A H M D S L P Y T T A A I Y E V Q R I V A D L V P F 367
1 261 ttgcagttcccctgagacaactgagatgcaactgtgtcggctaccgtatcccaaaaggcacaacagttatgttcaatttgcgcagc 1 350
368 A V P H E T T E D A T V S G Y R I P K G T T V M F N L S H G 397
1 351 gtttaaaggatcccaactggaacgaccctgacgtttctaccctgagcattttctcacagaggaggaaagccttacaagcctgaga 1 440
398 L K D P K Y W R Y P D R F Y P E H F L T E E G K P Y K P E N 427
1 441 attttgccttttggatcaggaagcgtgtctgctgggagaatctctgctgattggaattgttctgctttttcgaactctgttc 1 530
428 F M P F G S G K R V C L G E S L A R L E L F L F F A T L V H 457
1 531 atcggttttctggaagtgtcagatgacccaatagtagtgggagaaaagtagtctctctctcctccagattcatggttgaaita 1 620
458 R F S W K L S D D P I V W E K S I V L S R P P R F M V E I A S 487
1 621 gcaatagaactcaaatgacgtgttttaacttgaattatatacaaaataattcatttggtaagatttgcacattgcacattgaaaaaag 1 710
488 N R N S N A V F * 495
1 711 AGGTCTTTAACAGTCTCAATCCATGTGTCGAAATATGTCCATTTTCTTACTGTTTGTCTCTTCCTGATTGCTTTACACAGA 1 800
1 801 TGTCCTCAATAGTCTTAATCACCAGGAGTCAATTAAGTCTACCTATCACACCTATTTACCTTTTCCATGATTTTCAGAGATTAT 1 890
1 891 TATTTTAAATGCTATTAGTATTATTAAGAACACCAATAGAATGATCATAATAATAACAATGATGATAGCACTCAATATTAAGC 1 980
1 981 ATCAGAAAAACAACATTTTAAATGAAAACCAAGGAAATAGGAAAGCATGTGAGAAAGCAGATTAGGCATAGCTGATTAGCTCTCTGT 2 070
2 071 GGCTCAGCACCTGTGGACCATCTAAGTCAAAATAAAATCAAAAATAAAATTAACAATTGA 2 132

```

图 2 *LvCYP2J3-like* 基因的 cDNA 及推导的氨基酸序列

图中加粗 taa 为终止子; 绿色条表示 α 螺旋, 其上字母表示 α 螺旋序号 (自蛋白 N 开始编号); 下划线表示环区; 方框表示 SNP; 虚线方框分别为 P450 的 3 个特征基序; 红色斜体表示脯氨酸簇

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequence of *LvCYP2J3-like* gene from *L. vannamei*

The stop codon (taa) is characterized in bold. The green strip means α helix which is marked with letter from the N-terminal of protein. The loops are underlined. The SNPs are boxed. The three motifs of P450 are boxed with dotted line. The cluster of prolines is in red italics

昆虫中保守性最高的分子是白符跳 (*Folsomia candida*) 的 *CYP2J3*, 二者的序列一致性和相似性分别为 36% 和 57%。黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的同源分子是 *CYP18A1*, 相似性分别为 50% 和 54%。*LvCYP2J3-like* 与大部分哺乳类同源分子的相似性大于 55% (图 3)。三级结构预测表明, *LvCYP2J3-like* 与智人 (*Homo sapiens*) *CYP2D6* 的三级结构相似性最大, 为 37%, 二者与血红素结合核心区域几乎完全重叠 (图 4)。

在凡纳滨对虾基因组中分别发现了 *TBP* (LOC 113828014) 及其类似物 *TPB1* (LOC113801791)、*TMF* (TATA element modulatory factor) (LOC113822948); 虽然没有发现 *PDX*, 但存在其类似物 *PTF* (LOC113808028)、*PTF1A* (LOC113818329) 和 *PTF1A1* (LOC 113802458)。

### 2.2 *LvCYP2J3-like* 的组织表达

在所取样组织中均能检测到 *LvCYP2J3-like* 基因的表达, 方差分析表明存在显著性差异 ( $P <$

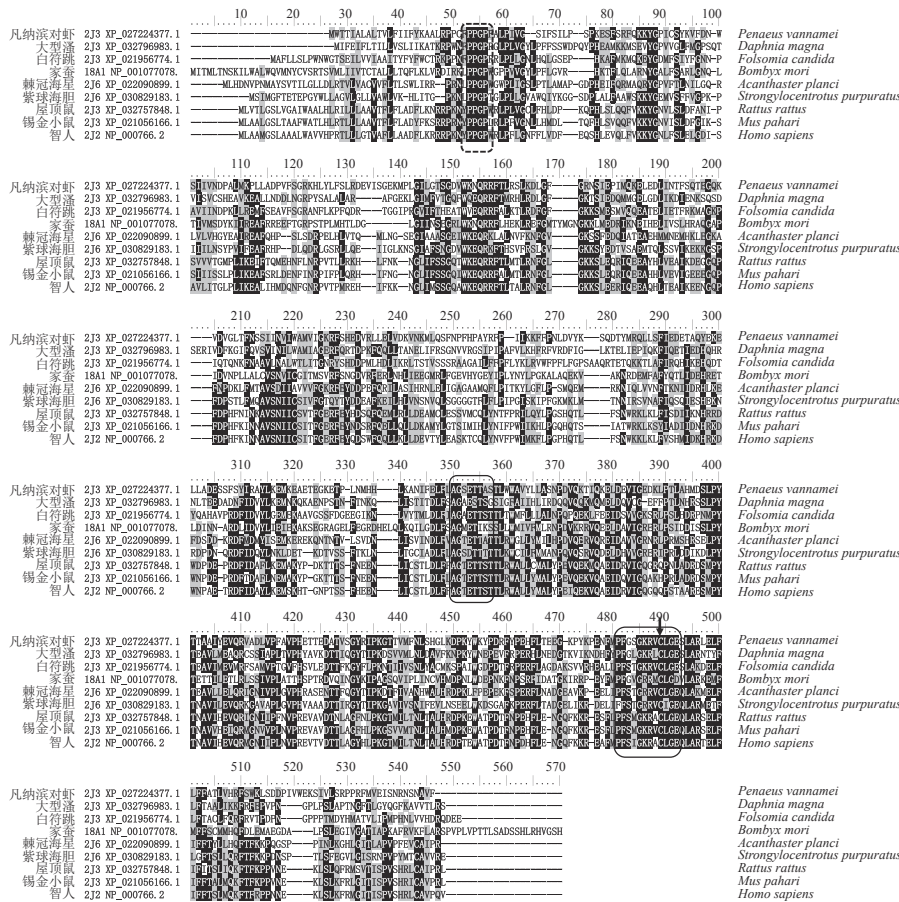


图 3 LvCYP2J3-like 和类似蛋白的序列比较分析

实线方框表示 P450 特征基序, 虚线方框表示脯氨酸簇, 箭头标注半胱氨酸残基

Fig. 3 Amino acid sequences alignment of LvCYP2J3-like and its homologues

The rectangular boxes mean the conserved motif of P450, the dotted line box means the cluster of prolines (Pro-Pro-X-Pro), the cysteine residues are marked by arrows

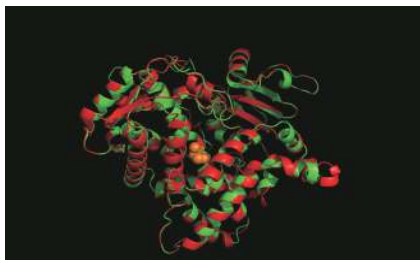


图 4 LvCYP2J3-like 的三级结构

红色为 LvCYP2J3-like, 绿色为智人 CYP2D6; 结合血红素区域为 α-螺旋 D、E、I、J、K 和 L, 以及 2 个 β-折叠; 黄色球为 Cys 残基, 可以与血红素中亚铁离子形成配位键

Fig. 4 3D model of LvCYP2J3-like

LvCYP2J3-like is in red, and human CYP2D6 is in green; the region of binding heme comprises six α-helices (D, E, I, J, K and L) and two β-sheets; yellow sphere labeled Cys forms coordination bond with ferrous ion in heme

0.05) (图 5), 表达量从高到低依次为眼柄、鳃、肠道、肌肉、肝胰腺和血细胞, 多重比较表明

各组织两两之间均有显著性差异 (P<0.05)。PTF1A 的表达模式与 LvCYP2J3-like 类似, 在眼柄中表达量最高, 鳃次之, 但其他组织中没有检测到表达。其他 5 个预测转录因子基因的表达模式与 LvCYP2J3-like 存在较大差异。

### 2.3 LvCYP2J3-like 及预测转录因子基因在发育各阶段的表达

方差分析表明 LvCYP2J3-like 在 5 个发育阶段的表达水平都存在显著性差异 (P<0.05), 自胚胎开始, 表达水平持续升高, 至糠虾幼体阶段达到最高, 在仔虾阶段表达水平开始降低。多重比较分析表明, 表达水平在各发育阶段均存在显著性差异 (P<0.05)。PTF 和 PTF1A1 的发育表达谱与 LvCYP2J3-like 相似, 都是先升高后降低; 但 PTF 和 PTF1A1 最高值出现在无节幼体阶段 (图 6)。其他 4 个预测转录因子基因都是自胚胎

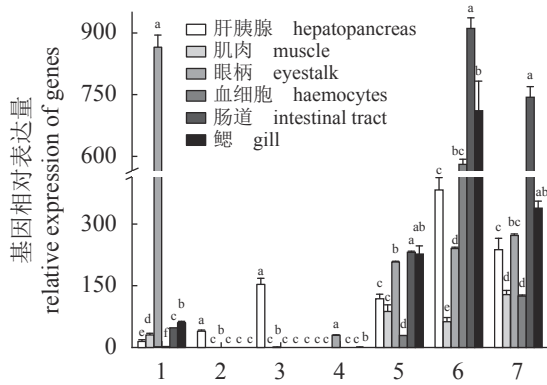


图5 *LvCYP2J3-like* 基因及预测转录因子基因在各组织中的相对表达量

1. *LvCYP2J3-like*, 2. *PTF*, 3. *PTF1A1*, 4. *PTF1A*, 5. *TBP*, 6. *TBP1*, 7. *TMF*. 不同字母表示同一基因在不同组织间有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 5 Expression level of *LvCYP2J3-like* and its predictive transcription factor genes in different tissues

1. *LvCYP2J3-like*, 2. *PTF*, 3. *PTF1A1*, 4. *PTF1A*, 5. *TBP*, 6. *TBP1*, 7. *TMF*. Different letters mean that there is a significant difference among different tissues for a gene ( $P < 0.05$ ), the same below

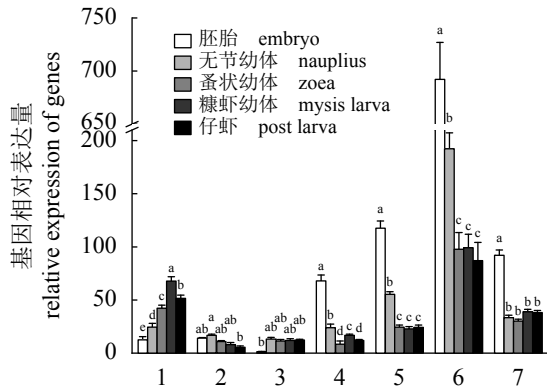


图6 *LvCYP2J3-like* 基因及预测转录因子基因在各发育阶段中的表达量

Fig. 6 Expression level of *LvCYP2J3-like* and its predictive transcription factor genes in different developmental stages

阶段开始下降。

### 2.4 *LvCYP2J3-like* 及预测转录因子基因在蜕皮周期中的表达

*LvCYP2J3-like* 和 *TBP* 在蜕皮过程中的表达趋势一致, 都在蜕皮期 D1 显著高于其他时期 ( $P < 0.05$ ), 蜕皮期 D2~D4 的表达量显著低于其他时期 ( $P < 0.05$ )(图 7), 蜕皮间期、蜕皮期 D0 和蜕皮后期之间没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。PTF1A 与 *LvCYP2J3-like* 的表达趋势在蜕皮过程中类似, D0 和蜕皮

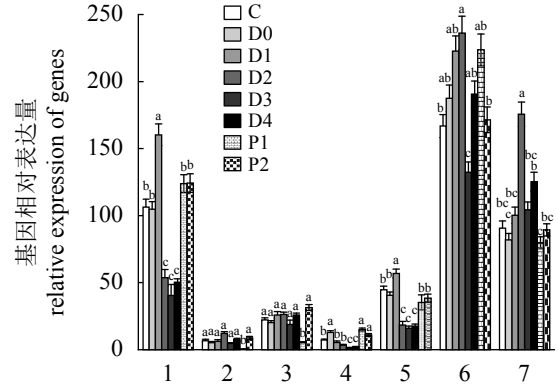


图7 *LvCYP2J3-like* 基因及预测转录因子基因在蜕皮周期中的表达量

C. 蜕皮间期, D0~D4. 蜕皮前期, P1~P2. 蜕皮后期

Fig. 7 Expression of *LvCYP2J3-like* and its predictive transcription factor genes in molting cycle

C. intermolt stage, D0-D4. premolt stage, P1-P2. post molt

后期的表达量显著高于其他时期 ( $P < 0.05$ ), D3 和 D4 显著低于其他时期 ( $P < 0.05$ )。其他 4 个预测转录因子的表达模式与 *LvCYP2J3-like* 差异较大。

### 2.5 *LvCYP2J3-like* 及预测转录因子基因在速长组和慢长组中的表达

*LvCYP2J3-like* 与 *PTF* 和 *TBP* 的表达模式相同, 在慢长组中的表达水平显著高于速长组 ( $P < 0.05$ )(图 8), 而 *PTF1A1*、*TBP1* 和 *TMF* 则在慢长组的表达水平显著低于速长组 ( $P < 0.05$ ), *PTF1A* 在

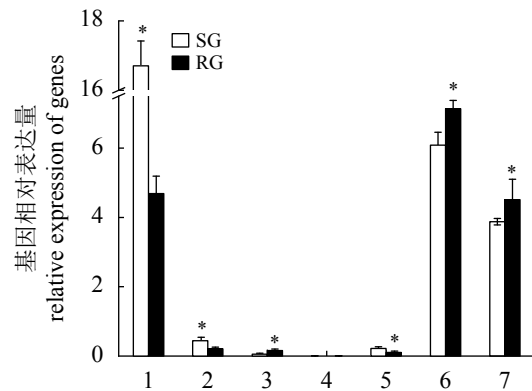


图8 *LvCYP2J3-like* 基因及预测转录因子基因在不同生长速率群体中的表达量

SG. 慢长组, RG. 速长组, \*表示在慢长组和速长组之间存在显著性差异

Fig. 8 Expression of *LvCYP2J3-like* and its predictive transcription factor genes in different growth groups

SG. slow-growing group, RG. rapid-growing group. \* means there is a significant difference between SG and RG ( $P < 0.05$ )

两组间没有显著性差异 ( $P>0.05$ )。

## 2.6 速长组和慢长组 *LvCYP2J3-like* 差异 SNP

*LvCYP2J3-like* 差异 SNP 见表 2, 按照参考序列碱基、序列位置和突变序列碱基组合的方式进行命名。转录组测序数据中共筛选获得了 2 个差异 SNP, 分别为 G132303T 和 G127622A, 均为错义突变; 这 2 个 SNP 慢长组的 MAF 都显著低于快长组 ( $P<0.05$ )。G132303T 位于 *LvCYP2J3-like* 的核心区突变对蛋白三级构象影响更大, 且 Fisher 精确检验  $P$  值更低。进行了 G132303T 两端各 150 bp 基因组序列的靶序列重测序, 发现了 3 个 SNP, 但没有检测到 G132303T。新发现的 C132313T 为错义突变 R409C, 但 MAF 没有显著性差异 ( $P>0.05$ ); 其他 2 个 SNP 位于内含子, 其 MAF 在慢长组的频率都显著高于快长组 ( $P<0.05$ )。

在 *LvCYP2J3-like* 的预测转录因子中发现了 11 个差异 SNP, *PTF* 基因有 3 个全部位于 3'UTR, *TMF* 基因有 8 个, 其中 2 个位于 3'UTR, 其他的

全部为同义突变。其他预测转录因子基因中没有发现差异 SNP。

## 3 讨论

本研究验证了 *LvCYP2J3-like* 的全长 cDNA 序列, 其蛋白具有一个完整的 P450 功能域。P450 功能域一级序列的保守性较低, 其序列一致性大多低于 20%<sup>[15]</sup>。但是其三级结构保守性高, 尤其是与血红素结合的核心区域<sup>[16]</sup>(图 2, 图 3, 图 4)。核心区含有 P450 的保守基序 Phe-X-X-Gly-X-Cys-X-Gly, 在 *LvCYP2J3-like* 中为 Phe-Gly-Ser-Gly-Lys-Arg-Val-Cys-Leu-Gly (图 1, 图 4), 该基序与电子和质子传递以及氧激活密切相关<sup>[13]</sup>。该基序中的 Cys 与血红素中的铁离子形成第 5 个配位键。另一个 P450 保守基序为 Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser, 在 *LvCYP2J3-like* 中为 Ala-Gly-Ser-Glu-Thr-Thr, 该基序位于  $\alpha$ -螺旋 I, 紧邻血红素, 参与了质子的传递<sup>[15]</sup>。此外, P450 还具有一

表 2 候选 SNP 在快长组和慢长组中的频率

Tab. 2 Candidate SNPs frequencies between groups with different growth rates

基因 gene name	SNP名称 SNP name	慢长组MAF MAF in SG	速长组MAF MAF in RG	功能类型 function type	氨基酸 amino acid	结构类型 structure type	费希尔精确检验 Fisher exact test
<i>LvCYP2J3-like</i>	C132313T <sup>1</sup>	0.207 4	0.243 9	错义突变	R409C	外显子	0.510 1
<i>LvCYP2J3-like</i>	C132394G <sup>1</sup>	0.294 4	0.200 0			内含子	0.016 8*
<i>LvCYP2J3-like</i>	C132422T <sup>1</sup>	0.801 8	0.608 9			内含子	0.000 007 293*
<i>LvCYP2J3-like</i>	G127622A	0.678 9	0.933 3	错义突变	E107K	外显子	0.004 586 933*
<i>LvCYP2J3-like</i>	G132303T	0.000 0	0.119 0	错义突变	K405N	外显子	0.000 311 182*
<i>PTF</i>	-93283C	0.000 0	0.282 1			3'UTR	0.023 693 170*
<i>PTF</i>	G93318A	0.384 6	0.054 1			3'UTR	0.009 234 175*
<i>PTF</i>	TT93254-	0.312 5	0.000 0			3'UTR	0.002 290 648*
<i>TMF</i>	A569618G	0.000 0	0.148 9	同义突变	P1267P	外显子	0.014 567 190*
<i>TMF</i>	C571850T	0.043 5	0.312 5			3'UTR	0.002 575 160*
<i>TMF</i>	G562117A	0.169 8	0.000 0	同义突变	E934E	外显子	0.002 925 184*
<i>TMF</i>	G565808A	0.210 5	0.038 5	同义突变	T1117T	外显子	0.008 982 754*
<i>TMF</i>	G568882A	0.146 3	0.000 0	同义突变	A1189A	外显子	0.010 280 900*
<i>TMF</i>	G570487A	0.000 0	0.153 8	同义突变	E1383E	外显子	0.009 317 472*
<i>TMF</i>	T570454C	0.326 9	0.085 1	同义突变	F1372F	外显子	0.005 861 298*
<i>TMF</i>	T571775A	0.000 0	0.400 0			3'UTR	0.006 797 676*

注: SNP名称标注上标1的数据来自靶向序列重测序, 未标注的来自转录组测序。MAF为最小等位基因频率。\*表示SG和RG间存在显著性差异  
Notes: the data of SNP name marked with superscript 1 were from targeted sequence re-sequencing, the others were from transcription sequencing. MAF, minor allele frequency. \* means there is a significant difference between SG and RG



个高度保守的基序 Glu-X-X-Arg, 在 LvCYP2J3-like 中为 Glu-Val-Gln-Arg, 位于  $\alpha$ -螺旋 K 上, 能够稳定核心区的空间结构。LvCYP2J3-like 还具有一个 Pro-Pro-Glu-Pro 组成脯氨酸簇, 为翻译暂停信号, 有助于后续序列折叠成一个球形蛋白(图 2)。这种结构存在于大多数真核生物的 P450 中。总之, LvCYP2J3-like 具有 P450 基本序列特征, 与催化相关的空间结构保守性较好。

哺乳类 CYP2J3 主要参与花生四烯酸的代谢, 将其氧化为环氧二十碳三烯酸<sup>[17]</sup>; 也可作为维生素 D 的羟化酶, 将其转化为 25-羟基维生素 D<sup>[18]</sup>。昆虫 CYP2J3 的同源物 CYP18A1 能够将蜕皮激素羟化灭活, 在果蝇和家蚕中, 通过降低蜕皮激素活性影响众多生物学过程, 如蜕皮周期和幼虫变态等<sup>[19-21]</sup>。岸蟹 (*Carcinus maenas*) 的同源物 CYP330A1 也参与了蜕皮激素的分解代谢<sup>[22]</sup>, 这提示 LvCYP2J3-like 也可能参与了蜕皮激素的失活过程。在蜕皮间期和蜕皮后期, 凡纳滨对虾蜕皮激素含量极低, 在蜕皮前期 (D2~D4) 急剧升高<sup>[23-24]</sup>。而 LvCYP2J3-like 表达水平则是在 D2~D4 期最低, 与蜕皮激素含量呈负相关。其同源基因 CYP18A1 和 CYP330A1 的表达量同样与蜕皮激素含量呈负相关<sup>[19-21]</sup>, 这种类似的表达模式表明 LvCYP2J3-like 能够参与蜕皮激素灭活过程, 在调节蜕皮中具有重要作用。蜕皮激素在甲壳动物的幼体发育中具有重要作用, 其浓度需要精确调节<sup>[25]</sup>。甲壳动物在蚤状幼体形成复眼后开始自主合成蜕皮激素, 在蚤状幼体时蜕皮激素含量最高, 而糠虾幼体或大眼幼体蜕皮激素含量最低, 发育为仔虾或稚蟹后蜕皮激素含量重新升高<sup>[26]</sup>。蜕皮激素这种变化模式与 LvCYP2J3-like 的表达水平具有较好的负相关性, 这也表明 LvCYP2J3-like 在精确调节蜕皮激素浓度过程中具有重要作用。甲壳动物很多组织器官都具有代谢蜕皮激素的能力, 将蜕皮激素羟基化后增加其极性以利于排泄。触角腺、肠道和鳃是甲壳类蜕皮激素排泄的主要器官<sup>[27]</sup>, 凡纳滨对虾的肠道和鳃 LvCYP2J3-like 具有较高的表达水平, 表明 LvCYP2J3-like 可能参与了蜕皮激素的排泄。甲壳动物蜕皮激素合成主要由眼柄中 X 器官分泌的蜕皮抑制激素 (MIH) 调控<sup>[27]</sup>。在本研究所检测的组织中, 眼柄 LvCYP2J3-like 的表达水平最高, 这可能与 X 器官负调控蜕皮激素合成有关。

切除眼柄解除 MIH 对蜕皮激素合成的抑制

后, 蜕皮激素合成水平与 mTOR 信号通路活性呈正相关<sup>[28]</sup>, 这表明甲壳动物 mTOR 参与了调节蜕皮激素的合成<sup>[28]</sup>。mTOR 作为一种代谢调节因子, 可以根据机体的营养状况对生长进行调节<sup>[25]</sup>; 在营养物质供给充足的情况下, mTOR 信号通路活性高, 提高同化作用, 促进生长, 反之则抑制生长。这表明蜕皮激素与机体生长关系密切。生长快的凡纳滨对虾个体的 LvCYP2J3-like 表达水平显著低于生长慢的个体, 表明作为调节蜕皮激素含量的因子, LvCYP2J3-like 也可能参与对生长过程的调节。

岸蟹 CYP330A1 在不同生长速率个体的表达情况<sup>[22]</sup> 与本研究的结果相同, 不同生长速率个体在外壳颜色、蜕皮周期和行为等方面均存在差异, 表明其遗传背景不同。生长慢的岸蟹面临毒性物质暴露或盐度骤变等环境胁迫时, 其 CYP330A1 和其他 CYP 基因上调, 表达水平更高<sup>[22]</sup>; 这提示生长慢的个体对环境胁迫响应程度高, 更敏感。

凡纳滨对虾速长组和慢长组的转录组比较过程中, 共发现了 2292 个差异表达基因, 92% 的基因在慢长组中上调表达, 上调表达 10 倍以上的基因占差异基因的 67%, 这表明慢长组的转录过程非常活跃<sup>[29]</sup>。在 1488 个注释的差异基因中, 参与应激和代谢的基因分别占 62% 和 27%, 表明慢长组的环境胁迫响应程度处于非常高的水平<sup>[30]</sup>, 这种情况与岸蟹非常相似。并且凡纳滨对虾速长组和慢长组之间约有 4000 个 SNP 的 MAF 存在显著性差异, 表明其遗传背景显著不同<sup>[29]</sup>。

本研究所检测的 LvCYP2J3-like 的 G132303T (其氨基酸突变为 K405N) 就是 MAF 显著差异的 SNP 之一。但是重测序时并没有发现该位点存在 SNP, 反而是发现了 C132313T (其氨基酸突变为 R409C)、C132394G 和 C132422T。利用桑格测序检测对单个个体的 PCR 产物进行鉴定, 发现上述 4 个 SNP 都存在。这表明转录组测序和靶向重测序在进行 SNP 发掘时可能会有所差异。G132303T (K405N) 为错义突变可能会影响 LvCYP2J3-like 的三级构象, 对其催化活性产生影响。而 C132313T (R409C) 发生在密码子第一位, 突变氨基酸 Cys 在所有 CYP2J3 同源基因中都未发现, 并且其更接近  $\alpha$  螺旋 L, 估计对 LvCYP2J3-like 的结构有一定影响, 但该 SNP 的 MAF 在慢长组和速长组中没有

显著性差异。位于外显子的 SNP 难以解释 *LvCYP2J3-like* 表达水平的差异。位于内含子的 C132422T 的 MAF 差异显著程度最高, 可能与 *LvCYP2J3-like* 的表达水平有关。

此外, 脊椎动物 *CYP* 基因的表达通常由核受体家族和 bHLH-PAS 家族等转录因子调控<sup>[30]</sup>, 因此实验考察了 *LvCYP2J3-like* 预测转录因子的表达和 SNP 频率情况。生物信息学预测 *LvCYP2J3-like* 的 5'侧翼区具有 5 个转录因子结合位点, 预测转录因子分别为 PTF 和 TBP。PTF 属于 bHLH 蛋白家族, 参与了多个器官的细胞分化<sup>[31-34]</sup>。甲壳动物的 bHLH 可作为环境因子感受分子参与调节生长、繁殖、昼夜节律和溶解氧感知等多种生理过程<sup>[35]</sup>。但是在 PTF、PTF1A 和 PTF1A1 中没有发现 PAS 功能域, 不属于 bHLH-PAS 家族。在凡纳滨对虾的 87 个 bHLH 蛋白中<sup>[35]</sup>, 只有 PTF、PTF1A 和 PTF1A1 在 *LvCYP2J3-like* 的 5'侧翼区具有结合位点, 推断这 3 个基因可能发挥了与 bHLH-PAS 家族类似的功能, 可以感知环境变化, 进而调节 *LvCYP2J3-like* 的表达。

在不同生长速率的样品中, *LvCYP2J3-like* 与 *PTF* 表达谱类似。*PTF* 的差异显著 SNP 位于 3'UTR, 3'UTR 的多态性与其转录调控相关, 影响基因表达水平。由于 PTF 可以感知环境因子, 可以推断慢长组对于环境因子的变化更加敏感。*PTF* 在慢长组和速长组间 SNP 的差异也暗示两组的 *PTF* 转录水平不同, 有遗传影响的因素。这种遗传差异可能是 *LvCYP2J3-like* 和 *PTF* 在速长组和慢长组表达差异的原因。

转录组数据含有丰富的 SNP 信息, 以此进行遗传分析, 不仅可以极大地降低序列的复杂性, 而且可以获得准确性极高的功能信息, 非常适合非模式生物<sup>[24, 36]</sup>。测序时若能增加个体数目, 可以评估 SNP 等位基因频率在不同样本中的分布情况; 如果能同时结合 SNP 所在序列的表达水平, 有助于解释 SNP 与表观性状之间的因果关系。本研究中的 *LvCYP2J3-like* 及其预测转录因子的 SNP 就是通过转录组数据发掘获得, 希望能够为有效利用转录组数据提供样本, 为对虾遗传和育种的数据积累提供一种途径。

#### 参考文献 (References):

[1] 岑剑伟, 王剑河, 李来好, 等. 不同养殖模式的凡纳滨  
<https://www.china-fishery.cn>

对虾品质的比较[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 39-44.

Cen J W, Wang J H, Li L H, *et al.* Comparative study on quality evaluation of *Litopenaeus vannamei* cultured in different models[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1): 39-44(in Chinese).

[2] 臧维玲, 戴习林, 徐嘉波, 等. 室内凡纳滨对虾工厂化养殖循环水调控技术与模式[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 749-757.

Zang W L, Dai X L, Xu J B, *et al.* The technique and mode of regulating-controlling circulation water for indoor industrial culture of *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(5): 749-757(in Chinese).

[3] 谭建, 罗坤, 栾生, 等. 循环水养殖系统在凡纳滨对虾种虾养殖中的应用效果初探[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(4): 63-70.

Tan J, Luo K, Luan S, *et al.* Preliminary application of the recirculating aquaculture system in *Litopenaeus vannamei* breeding[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(4): 63-70(in Chinese).

[4] 金武, 栾生, 孔杰, 等. 基因型与环境互作条件下凡纳滨对虾多性状复合育种方案的遗传和经济评估[J]. 水产学报, 2013, 37(12): 1770-1781.

Jin W, Luan S, Kong J, *et al.* Genetic evaluation and investment appraisal of the multi-trait selection breeding program in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(12): 1770-1781(in Chinese).

[5] 曹宝祥, 孔杰, 罗坤, 等. 凡纳滨对虾选育群体与近交群体、引进群体生长和存活性能比较[J]. 水产学报, 2015, 39(1): 42-51.

Cao B X, Kong J, Luo K, *et al.* Comparison of growth and survival performance among selected population, imported population and inbreeding population in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(1): 42-51(in Chinese).

[6] Urlacher V B, Girhard M. Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthetic biology[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(8): 882-897.

[7] Rewitz K F, O'Connor M B, Gilbert L I. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(8): 741-753.

- [ 8 ] Helvig C, Koener J F, Unnithan G C, *et al.* CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach *corpura allata*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(12): 4024-4029.
- [ 9 ] Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, *et al.* An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(37): 14858-14863.
- [10] Humble J L, Carmona-Antoñanzas G, McNair C M, *et al.* Genome-wide survey of cytochrome P450 genes in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837)[J]. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 563.
- [11] Zhang X J, Yuan J B, Sun Y M, *et al.* Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 356.
- [12] Yu Y, Wei J K, Zhang X J, *et al.* SNP Discovery in the transcriptome of white pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* by next generation sequencing[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87218.
- [13] Mullen M P, Creevey C J, Berry D P, *et al.* Polymorphism discovery and allele frequency estimation using high-throughput DNA sequencing of target-enriched pooled DNA samples[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 16.
- [14] Gao Y, Zhang X J, Wei J K, *et al.* Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144350.
- [15] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: A success story[J]. *Genome Biology*, 2000, 1(6): reviews3003.1.
- [16] Graham S E, Peterson J A. How similar are P450s and what can their differences teach us?[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 369(1): 24-29.
- [17] Veith A, Moorthy B. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species[J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2018, 7: 44-51.
- [18] Aiba I, Yamasaki T, Shinki T, *et al.* Characterization of rat and human CYP2J enzymes as vitamin D 25-hydroxylases[J]. *Steroids*, 2006, 71(10): 849-856.
- [19] Li Z Q, Ge X, Ling L, *et al.* CYP18A1 regulates tissue-specific steroid hormone inactivation in *Bombyx mori*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 54: 33-41.
- [20] Rewitz K F, Yamanaka N, O'Connor M B. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*[J]. *Developmental Cell*, 2010, 19(6): 895-902.
- [21] Guittard E, Blais C, Maria A, *et al.* CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis[J]. *Developmental Biology*, 2011, 349(1): 35-45.
- [22] Rewitz K, Styriehave B, Andersen O. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310(2): 252-260.
- [23] Chan S M, Rankin S M, Keeley L L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose[J]. *The Biological Bulletin*, 1988, 175(2): 185-192.
- [24] Gayral P, Melo-Ferreira J, Glémin S, *et al.* Reference-free population genomics from next-generation transcriptome data and the vertebrate-invertebrate gap[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(4): e1003457.
- [25] Hyde C J, Elizur A, Ventura T. The crustacean ecdysone cassette: a gatekeeper for molt and metamorphosis[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 185: 172-183.
- [26] Tuberty S R, McKenney Jr C L. Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides[J]. *Integrative & Comparative Biology*, 2005, 45(1): 106-117.
- [27] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3-5): 196-203.
- [28] Shyamal S, Das S, Guruacharya A, *et al.* Transcriptomic analysis of crustacean molting gland (Y-organ) regulation via the mTOR signaling pathway[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7307.
- [29] Reid D G, Abelló P, Kaiser M J, *et al.* Carapace colour,

- inter-moult duration and the behavioural and physiological ecology of the shore crab *Carcinus maenas*[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1997, 44(2): 203-211.
- [30] 刘峻圣. 凡纳滨对虾生长相关基因及 SNP 的筛选 [D]. 厦门: 集美大学, 2020.
- Liu J S. Screening of genes related to growth and their SNPs in *Litopenaeus vannamei*[D]. Xiamen: Jimei University, 2020 (in Chinese).
- [31] Gotoh O. Evolution of cytochrome P450 genes from the viewpoint of genome informatics[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(6): 812-817.
- [32] Rose S D, Swift G H, Peyton M J, *et al.* The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(47): 44018-44026.
- [33] Krapp A, Knöfler M, Ledermann B, *et al.* The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(23): 3752-3763.
- [34] Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, *et al.* The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors[J]. *Nature Genetics*, 2002, 32(1): 128-134.
- [35] Fujitani Y, Fujitani S, Luo H J, *et al.* Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development[J]. *Development*, 2006, 133(22): 4439-4450.
- [36] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57-63.

## Expression analysis of CYP2J3-like gene at different growth rates of *Litopenaeus vannamei*

HUANG Shiyu<sup>1</sup>, ZHANG Lili<sup>1</sup>, WANG Guodong<sup>1\*</sup>, WANG Yilei<sup>1</sup>,  
LU Xiqin<sup>1</sup>, HUANG Yongyu<sup>1</sup>, YANG Zhangwu<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian;

2. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361000, Fujian)

**Abstract:** As the most important cultured shrimp in China, *Litopenaeus vannamei* constitutes about 70% of the world's cultured shrimp production, and has high commercial value. With the development of culturing technology, high-density farming has become a trend. In order to obtain a commercial size in a short time, it is necessary to cultivate some varieties that grow fast. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) brought genetic diversity research into a new stage. SNPs widely existed in genome, and they serve as suitable markers for linkage map, genome wide association studies (GWAS), and marker assisted selection (MAS) of target traits. There were few researches to discover SNPs of important phenotype in *L. vannamei*, and therefore there was still insufficient information of SNPs available for genetic diversity studies of *L. vannamei*. Especially, the discovery of growth-related SNPs by transcriptome sequencing was rarely reported in *L. vannamei*. With the development of next generation sequencing (NGS), the cost of sequencing has greatly fallen, which makes SNPs identification feasible in non-model species. RNA-seq based on NGS has been used widely, and it can identify SNP markers efficiently, because it focuses on the functional information in the genome with expression level of functional gene. In this study, SNPs of a P450 gene and its potential transcriptional factors were detected in different growth rate individuals by RNA-seq. We hope to give an example for the effective use of transcriptome data and a way for the accumulation of genetic and breeding data of shrimp. The inbreeding and crossbreeding offspring of four *L. vannamei*



strains with diverse genetic backgrounds were cultured in net cages of ponds. The top five fastest growing individuals or top five slowest growing individuals in each net cage were put into a pool, respectively. The two kinds of RNA pools (rapid-growing group, RG; slow-growing group, SG), which were sequenced by RNA-seq, were used to find different expression genes and SNPs. The target DNA fragments, which were amplified from two kinds of DNA pools (RG and SG) by PCR, were sequenced by NGS to find SNPs. A different expression P450 gene, which was selected by comparing transcriptomes of two RNA pools of *L. vannamei*, was named *LvCYP2J3-like* with a 1 488 bp open reading frame encoding a protein of 495 aa and an integral P450 domain, which might be involved in the inactivation of ecdysones. Six transcription factors of *LvCYP2J3-like* were predicted by bioinformatics. They are TATA-box-binding protein (TBP), TBP1, TATA element modulatory factor (TMF), pancreas transcription factor (PTF), PTF1A and PTF1A1. The variance analysis of the 7 gene by q-PCR showed there was significant difference of expression levels in tissues, development stages and molting cycle. *LvCYP2J3-like* was detected in all tissues samples. The expression levels from high to low were eyestalk, gill, intestinal tract, muscle, hepatopancreas and haemocytes. Multiple comparisons showed that there were significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ). The expression pattern of *PTF1A* was similar to that of *LvCYP2J3-like*, with the highest expression in eyestalk and the second in gill ( $P < 0.05$ ), but no expression was detected in other tissues. *LvCYP2J3-like* had significantly different expressions in five development stages, with the highest in mysis larva stage ( $P < 0.05$ ). The expression pattern of *PTF* and *PTF1A* was similar to *LvCYP2J3-like* in development stages. *LvCYP2J3-like* had a similar pattern with *TBP* in molting cycle, and there was the highest expression level in premolt stage D1 ( $P < 0.05$ ). The expression level of *LvCYP2J3-like*, *PTF* and *TBP* in SG were higher than that in RG ( $P < 0.05$ ), but *PTF1A1*, *TBP1* and *TMF* had higher expression levels in RG ( $P < 0.05$ ). There were 4 and 11 SNPs with significant difference of allele frequency ( $P < 0.05$ ), in sequences of *LvCYP2J3-like* and its predictive transcription factors, respectively. The expression pattern of *LvCYP2J3-like* implied that it played a role in development and molting cycle. Its expression level was closely related to environmental stress. The results suggested that genetic diversity of these genes was related to their activities and expressions, which affects the growth rate of shrimp. This study will provide useful data for the genetic and breeding research of *L. vannamei*.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; cytochrome P450; growth; gene expression; SNP (single nucleotide polymorphism)

**Corresponding authors:** WANG Guodong. E-mail: gdongwang@163.com;  
YANG Zhangwu. E-mail: yzw6010163@163.com

**Funding projects:** Seed Industry Innovation and Industrialization Project of Fujian Province (2017FJSCZY02); Science and Technology Projects of Fujian Province (2018I0013); National Natural Science Foundation of China (31702339)