DOI: 10.12264/JFSC2023-0280

凡纳滨对虾易位子相关蛋白 α 亚基(TRAPa)基因解析及其与 WSSV 抗性的关联

王晶晶^{1,2}, 李旭鹏^{2,3}, 薛倩², 曹宝祥², 栾生^{2,3}, 罗坤², 隋娟^{2,3}, 代平^{2,3}, 曹家旺², 谭建², 陈宝龙², 傅强², 孔杰^{2,3}, 高焕¹, 孟宪红^{2,3}

 江苏海洋大学海洋科学与水产学院,江苏省海洋生物资源与环境重点实验室/江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室,山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要:本研究旨在探讨凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)易位子相关蛋白 a 亚基(translocon-associated protein alpha, *TRAPa*)基因特征及其在抗白斑综合征病毒(white spot syndrome, WSSV)中的作用。通过 PCR 和 Sanger测序技术,获得凡纳滨对虾 *TRAPa* 的开放阅读框(open reading frame, ORF)序列,将该基因命名为 *Lv-trapa*,并进行生物信息学分析。采用 real-time PCR 分析 *Lv-trapa* 基因在健康凡纳滨对虾和感染 WSSV 不同时间点的凡纳滨对虾肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄中的 *Lv-trapa* 表达水平。同时,利用重亚硫酸氢盐测序技术(bisulfite sequencing PCR, BSP)检测健康凡纳滨对虾和感染 WSSV 后 96 h 的凡纳滨对虾肝胰腺组织中 *Lv-trapa* 基因上游 DNA 序列的甲基化水平。结果显示, *Lv-trapa* 的 ORF 全长 873 bp,共编码 290 个氨基酸,预测相对分子质量为 32466.4,理论等电点为 4.45。多序列比对发现 TRAPa 蛋白的保守性较高。*Lv-trapa* DNA 序列中有 8 个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP),其中 1 个 SNP 位点处于外显子区域且属于错义突变,其余 7 个 SNP 位点处于内含子区域。real-time PCR 结果显示,*Lv-trapa* 基因在凡纳滨对虾肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄中均有表达,且在感染 WSSV 后显著上调表达(*P*<0.05)。值得注意的是,在感染 WSSV 后 96 h,体内病毒含量不同的凡纳滨对虾肝胰腺中 *Lv-trapa* 的表达水平差异显著,高病毒含量组中 *Lv-trapa* 的表达水平显著高于低病毒含量组(*P*<0.05),提示 *Lv-trapa* 表达水平和 WSSV 复制水平存在正相关性。BSP 结果显示,*Lv-trapa* 基因上游 1 个 CpG 位点(存在于 NCBI 数据库 NW_020872863.1 第 360336-360337 nt 位置)的甲基化水平和 *Lv-trapa* 表达水平呈负相关,该 CpG 位点的甲基化水平和提供理论参考。

关键词:凡纳滨对虾;白斑综合征病毒(WSSV);*TRAP*;表达水平;SNP;DNA 甲基化 中图分类号:S917 文献标志码:A 文章编号:1005-8737-(2024)01-0001-13

凡纳滨对虾(Litopenaeus vannamei)俗称南美 白对虾,原产地在太平洋西岸水域秘鲁北部至墨 西哥桑诺拉。1988年凡纳滨对虾引入中国,随后 其人工繁育技术获得突破,随着国内优质新品种 选育成功和基于无特定病原(specific pathogen free, SPF)虾苗养殖模式的建立,对虾养殖规模逐年扩大。在 20 世纪 90 年代,由于白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)的迅速传播,

收稿日期: 2023-11-13; 修订日期: 2023-12-12.

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFF1000304);国家自然科学基金项目(32172960);国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-48);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项经费项目(2020TD26);湛江市海洋装备与海洋生物揭榜 挂帅制人才团队项目(2021E05032).

作者简介: 王晶晶(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为对虾抗病育种. E-mail: 2894045904@qq.com

通信作者: 孟宪红, 研究员, 研究方向为水产遗传育种与分子生物学. E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

对虾产业受到严重威胁,斑节对虾(Penaeus monodon)、中国对虾(Penaeus chinensis)等养殖品 种大面积减产。而相对于其他对虾品种,凡纳滨 对虾具有较强的抗病能力,养殖周期短,适应范 围广,淡水海水均可养殖等优点,逐渐成为了我 国重要的对虾养殖品种^[1]。但是 WSSV 依然是凡 纳滨对虾养殖业最主要的病原之一,具有很高的 致死率^[2]。因此开展凡纳滨对虾抗 WSSV 研究对 我国对虾养殖业发展具有重要意义。

易位子相关蛋白(translocon-associated protein, TRAP)属于内质网膜蛋白,由4个蛋白质亚基组 成, 分别是 TRAP α 、TRAP β 、TRAP γ 、TRAP $\delta^{[3]}$ 。 其中 TRAPα、TRAPβ 为糖基化蛋白, TRAPγ、 TRAPδ 为非糖基化蛋白。TRAPα 分布在内质网和 核膜上,可以结合钙离子,在人类骨髓细胞中, 会受到巨噬性粒细胞集落刺激因子正调控^[4]。 Mangos 等^[5]首次通过酵母双杂交的方法发现, TRAPβ 在斑马鱼(Danio rerio)胚胎发育期呈现组 成型表达。TRAPy 在 1993 年被发现, Li 等^[6]研究 非洲爪蟾(Xenopus Laevis)时得到结论: TRAPy 的 敲除能够导致非洲爪蟾近球小管的缩短和前肾小 管末梢的缺失,并在前肾组织特异性基因产物转 运时发挥作用。王家庆等^[7]采用同源克隆的方法, 通过RT-PCR结合RACE成功地从虹鳟(Oncorhynchus mykiss)中分离了 TRAPδ 基因, 且克隆了虹鳟 $TRAP\delta$ 的 cDNA 全长序列。TRAP 在乙型肝炎病 毒感染时, HBe 前体(p25)定位到内质网进行加工 的过程中发挥重要作用^[8]。TRAP 主要位于内质网 的转位通道附近, 在机体进行蛋白质生物合成过 程时,蛋白质的前体新生多肽在翻译后经常会被 针对性地转运至内质网,进行下一步的折叠和修 饰,这个复杂的过程需要 TRAP 的亚基通过相互 作用形成复合物共同参与相关过程^[9]。TRAP 复合 物参与未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR), 以维持细胞稳态。当细胞遇到不利条件, 例如病毒感染、氧化应激和葡萄糖剥夺时, TRAP 将被激活^[10]。但是截止到目前,关于水产动物 TRAPa 基因抗病毒方面的研究较少,因此探究 TRAPa基因参与凡纳滨对虾抗 WSSV 的研究具有 重要意义。

基于课题组前期对感染 WSSV 的凡纳滨对 虾、健康凡纳滨对虾肝胰腺转录组和基因组 DNA 甲基化测序数据,筛选到 mRNA 表达量与 DNA 甲基化水平均存在显著差异的 TRAPa 基因。为深 入解析 TRAPa 基因在凡纳滨对虾抗 WSSV 过程 的功能特征,本研究在转录、甲基化、SNP 等水 平进一步验证 TRAPa 基因与抗 WSSV 的相关性, 为揭示凡纳滨对虾抗 WSSV 分子机制提供理论 基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用虾来自于潍坊邦普种业科技有限公司, 平均体重为(2.06±0.90)g,体长为(5.73±2.30)cm。 在消毒后盐度为 29 的 SPF (无特定病原体, specific pathogen free)级海水中暂养 3 d,养殖温 度为 25 ℃,每天喂食 3 次,换水量 30%~40%。 随机选取 6 尾健康凡纳滨对虾作为对照组,分别 采集肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄,迅速置于液氮中 速冻后,存放于-80 ℃冰箱中保存,用于基因表 达水平分析。

随机挑选 90 尾健康凡纳滨对虾进行 WSSV 感染实验,参考孟宪红等^[11]WSSV 毒饵制备及单 尾定量口饲感染方法投喂毒饵。参考 Durand 等^[12] 的 TaqMan real-time PCR 技术检测肌肉组织中的 WSSV 含量。所用引物和探针(WSSV forward primer、WSSV reverse primer、WSSV probe)序列见 表 1。所用 WSSV 毒饵病毒载量为 1×10⁶ copies/mg, 每尾虾进食 WSSV 含量为 1×10⁷ copies。进食毒 饵的对虾转移到 SPF 级海水中继续饲养管理。感 染 WSSV 后 48、72、144、192 h 时间点分别取 6 尾凡纳滨对虾,采集肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄液 氮速冻后,存放于-80 ℃冰箱中保存,用于基因 表达水平分析。

感染 WSSV 后 96 h 取 60 尾凡纳滨对虾的肌 肉组织, 液氮速冻后, 存放于-80 ℃冰箱中保存, 用于基因表达水平与 WSSV 复制水平的相关 分析。

从本课题组构建的 32 个凡纳滨对虾家系中 随机挑选 50 尾凡纳滨对虾用于 SNP 位点筛选。

	-	_
引物/探针名称 primer/probe name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	
WSSV forward primer	TGGTCCCGTCCTCATCTCAG	
WSSV reverse primer	GCTGCCTTGCCGGAAATTA	
WSSV probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA	
18S rRNA gene forward primer	AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA	
18S rRNA gene reverse primer	GTTCCGAAAAACCGACAAAA	
18S rRNA gene probe	CCCGAATGGTCGTGCATGGA	
qLv-trapa forward primer	GCCATTGATGCCTCCTTCCGT	
qLv-trapa reverse primer	GTGGCCTCCTGACGTGGTTT	
18S rRNA forward primer	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	
18S rRNA reverse primer	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	
Lv -trap α forward primer	CAAGTGCTTACATTAGGACGAGAT	
Lv-trapa reverse primer	CCCACATTGGATCTCAGTCTGTC	
BSP-Lv-trapα forward primer	TGTTATATTTGTTTTTGTTTTATGTTTTGT	
BSP-Lv-trapα reverse primer	AAAAATATACTTTCAAATATCAAAACTCCT	
M13-47	AGGGTTTTCCCAGTCACG	
M13-48	GAGCGGATAACAATTTCACAC	

表 1 引物和探针信息 Tab. 1 Primers and probes information

1.2 DNA、RNA 的提取与 cDNA 的合成

取凡纳滨对虾的肝胰腺和肌肉组织进行研磨, 使用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化 科技有限公司)提取 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检 测 DNA 质量,用 NanoPhotometer N50 Touch 分光 光度计仪器测定提取的总 DNA 的浓度和含量。

取凡纳滨对虾的肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄组 织进行研磨,使用 RNA-easy isolation reagent (南 京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取 RNA,用 NanoPhotometer N50 Touch 分光光度计仪器测定 提取的总 RNA 的浓度和含量,再使用 1%的琼脂 糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。

按照HiScript[®]III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)试剂 盒的操作说明对总RNA进行反转录,合成第一链 cDNA。将反转完成的 cDNA 置于-80 ℃冰箱保 存备用。

1.3 cDNA 的 PCR 扩增和 Sanger 测序

根据凡纳滨对虾 *TRAPa* 基因序列(NCBI: XM_027352485.1),利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物(*Lv-trapa* forward primer、*Lv-trapa* reverse primer)序列见表 1。利用 PCR 和 Sanger 测序技术获得凡纳滨对虾 *TRAPa* 的 cDNA 序列,并命名该 基因为 *Lv-trapa*。使用 Quick taqTM HS DyeMix 酶

(TOYOBO)进行 PCR 扩增。PCR 体系总体积 25 μL: Quick taqTM HS DyeMix 酶(TOYOBO) 12.5 μL, 上 下游引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 10.5 μL。 反应程序: 94 ℃预变性 2 min; 94 ℃变性 30 s, 55 ℃ 30 s, 68 ℃ 1 min, 共 35 个循环; 68 ℃ 5 min。Sanger 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 基因序列生物信息学分析

获得开放阅读框(ORF)完整编码序列后,使 用在线软件 ExPASy (http://web.expasy.org/)将 ORF 序列翻译成氨基酸序列,并预测相对分子质 量和等电点、不稳定系数等。使用 TMHMM (https:// services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) 软件分析蛋白质的跨膜区。使用 SignalP 4.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/)软件进行信号肽预测。使用 NetNGlyc 1.0 Server (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGly c-1.0/)软件进行糖基化位点分析。使用 NetPhos 3.1 Server (https://services.healthtech.dtu.dk/services/ NetPhos-3.1/)软件进行磷酸化位点分析。运用 SMART (https://smart.embl.de/)在线工具进行蛋白 质功能结构域预测分析。使用 SOPMA (https:// npsa-prabi.ibcp.fr/)软件进行二级结构预测。使用 DNAMAN 6.0 软件进行同源多序列比对分析。使 用 MEGA 7.0 软件通过邻接法(neighbour-joining method, NJ)进行系统进化树的构建。

1.5 基因表达水平的检测

1.5.1 基因时空表达分析 使用 real-time PCR 技 术检测健康凡纳滨对虾和感染 WSSV 后 48、72、 144、192 h 凡纳滨对虾肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄 4 种组织的 Lv-trapa 表达水平。反应体系和反应 条件按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO)试剂盒说明进行操作。反应体系共 20 µL: SYBR Green Realtime PCR Master Mix 为 10 µL, 上 下游引物分别 0.8 µL, RNase-free ddH₂O 为 6.4 µL, cDNA 模板为 2 μL。反应条件: 95 ℃ 1 min; 60 ℃ 15 s, 95 ℃ 15 s, 72 ℃ 45 s, 共 40 个循环, 熔解 曲线反应条件为: 95 ℃ 15 s; 60 ℃ 1 min; 95 ℃ $1 \min_{\circ} 18S rRNA 作为内参基因,利用 2^{-\Delta\DeltaC} 方法计$ 算 Lv-trapa 基因的相对表达量^[13]。real-time PCR 技 术所用引物(qLv-trapa forward primer、qLv-trapa reverse primer; 18S rRNA forward primer, 18S rRNA reverse primer)见表 1,每个样品设置 3 次平行实 验。使用 SPSS 25.0 软件对数据进行独立样本 t 检验分析,当P<0.05时认为差异显著。

1.5.2 基因表达水平与WSSV复制水平的相关分 析 为探索 *Lv-trapa* 基因的表达水平是否与凡纳 滨对虾体内 WSSV 的复制水平相关,用 TaqMan real-time PCR 技术(方法同 **1.1**)检测感染 WSSV 后 96 h 的 60 尾凡纳滨对虾肌肉中 WSSV 含量。用 18S rRNA 基因作为内参基因,引物和探针(18S rRNA gene forward primer、18S rRNA gene reverse primer、18S rRNA gene probe)序列见表 1。计算 WSSV 含量和 18S rRNA 基因含量的相对值。

将平均病毒含量为 $3.13 \times 10^{-1} \pm 7.6 \times 10^{-2}$ 的6尾 对虾和平均病毒含量为 $1.93 \times 10^{-3} \pm 3.93 \times 10^{-4}$ 的6 尾对虾分别作为高病毒含量(high pathogen content, HPC)组和低病毒含量(low pathogen content, LPC) 组,并取健康凡纳滨对虾作为对照组,利用 real-time PCR 技术检测 *Lv-trapa* 基因在对照组、 HPC 组和 LPC 组的肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄4种 组织中的表达水平。使用 SPSS 25.0 软件对数据 进行独立样本 *t* 检验分析。

重亚硫酸氢盐测序(bisulfite sequencing PCR, BSP)法验证 Lv-trapa 基因甲基化水平

根据课题组前期 DNA 甲基化测序数据, 筛选

出 Lv-trapa 基因上游存在一段甲基化水平与该基 因表达水平显著负相关的区域(NCBI 数据库 NW 020872863.1 第 360201~360600 nt)。为进一 步验证该区域甲基化水平是否与抗 WSSV 相关, 开展以下实验:从 HPC 组、LPC 组和对照组各取 3 尾凡纳滨对虾的肝胰腺提取 DNA (方法同 1.2)。 使用 EpiAit[®] DNA Methylation Bisulifite Kit 试剂 盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)处理上述 DNA, 每组的3份DNA 混样用于后续实验。使用 2×EpiAit[®] HS Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科 技股份有限公司)进行 PCR 扩增, 所用引物(BSP-Lv-trapa forward primer BSP-Lv-trapa reverse primer)见表 1。用 FastPure®Gel DNA Extraction Mini Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)对 PCR 产物进行回收纯化。通过 1%琼脂糖凝胶电 泳检测回收纯化的 DNA 的质量及长度。合格的 DNA 与 pMD[™]-18T Vector Cloning Kit (南京诺唯 赞生物科技股份有限公司)载体连接,转化入 DH5a 感受态细胞, 菌落培养后利用 PCR 技术进 行阳性克隆鉴定。每个样品挑选 8 个克隆送生工 生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。 测序所用引物(M13-47、M13-48)见表 1, 运用 QUMA (http://quma.Cdb.riken.jp/)分析测序结果。

1.7 SNP 位点筛选

从 32 个凡纳滨对虾家系中随机取 50 尾对虾, 提取肌肉组织 DNA (方法同 1.2)。利用 Primer 5.0 软件依据 Lv-trapa 基因 DNA 序列(NCBI: NW_ 020872863)设计 PCR 引物 (Lv-trapa forward primer、Lv-trapa reverse primer)(表 1)。用上述 50 尾对虾肌肉组织 DNA 作为模板,用 Quick taqTM HS DyeMix 酶(TOYOBO)进行 PCR 扩增。PCR 产 物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,挑选明亮且单一 的条带送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。将 Sanger 测序结果与 NCBI 数据库 序列(NCBI: NW_020872863)比对,结合 Sanger 测 序峰图判断 SNP 位点。

根据 SNP 分型结果, 计算各基因型和基因频率, 用 PLINK1.9 软件计算期望杂合度(*H*_e)、观测 杂合度(*H*_o)、最小等位基因频率(MAF)、哈迪-温 伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)等参

第1期

数。依据 Botstein 等^[14]给出的计算公式编写 R 代 码计算多态信息含量(PIC)。

2 结果与分析

2.1 Lv-trapa 基因及编码氨基酸序列分析

本研究中,通过 PCR 和 Sanger 测序技术所得 *Lv-trapa* 基因编码序列和 NCBI 数据库(XM_ 027352485.1)一致。ORF 全长为 873 bp,编码 290 个氨基酸(图 1)。预测相对分子质量为 32466.4, 理 论等电点为 4.45。带负电残基的数量为 53, 带正 电残基的数量为 28。不稳定系数(II)为 41.62, 表 明该蛋白不稳定。脂溶性指数 83.31。亲水性总 平均值-0.286。利用 NetPhos3.1 Server 预测 Lv-trapα蛋白的磷酸化位点有: 11 个丝氨酸磷酸 化位点、10 个苏氨酸磷酸化位点、3 个酪氨酸磷 酸化位点。使用 NetNGlyc 1.0 Server 预测在 140 位

1 tgagtaaagggacagaagcaaacacgctgtcagtcaaggtagaagcacgaagaaagttgt [M F G S L K K L L L L L V V L P 1 61 gggagacatcATGITTGGATCACTGAAGAAATTATTACTTCTCCTCCTGGTGGTTCTTCC 18 V V I T V V D E G R S V A Y A Q E D E V 121 AGTGGTTATCACTGTGGTTGATGAAGGCCGCAGTGTAGCCTATGCACAGGAGGATGAGGT 38 D G E E D D I I D D E E V N V D D G T E 181 TGATGGAGAAGAGGATGACATCATTGATGATGAAGAGGTTAATGTTGATGATGGGACAGA 58 S E V E Q V D G T E E E E E E E M T A 241 ATCGGAAGTAGAACAAGTTGATGGAACGGAAGAGGAAGAAGAAGAAGAAGAAATGACTGC 78 K G S P D A D T I I Y F T K P V G T G S 301 CAAGGGATCCCCAGATGCTGACACCATCATCTACTTCACCAAGCCTGTGGGCACTGGCTC 98 D L P A G K L V E F L V G F T N N G D K 118 D F I L D A I D A S F R Y P M D F N F Y 421 AGACTTCATCTTGGATGCCATTGATGCCTCCTTCCGTTACCCTATGGACTTCAACTTTTA 138 I Q <u>N F T A</u> I P Y N R A V K P R Q E A T 481 CATCCAGAACTTTACCGCCATCCCCTACAACCGTGCTGTTAAACCACGTCAGGAGGCCAC 158 V M Y S F Y P A E A F A G R P L G L T V 541 AGTTATGTACTCCTTCTACCCTGCTGAAGCCTTTGCTGGTCGTCCCCTTGGCTTAACTGT 178 N L A Y H D A D G N V F V D P V F N Q T 198 V NIVEVDEGMDGETFFLYIF 661 TGTGAACATTGTTGAGGTCGATGAGGGAATGGATGGAGAAACCTTCTTCCTATACATCTT 218 M L A F A V L L L V A G H H F L S S F G 721 CATGCTTGCCTTTGCTGTACTGCTGCTTGTGGCTGGCCATCACTTTCTCTCCTCATTCGG 238 R R R G G K R H T V E M G T K K S N S V 781 TCGCAGGCGAGGTGGCAAGAGGCACACCGTTGAAATGGGTACCAAGAAGAGCAACAGTGT 258 D Y D W L P K E L L S E I K K S P R Q S 841 TGACTATGACTGGCTACCCAAGGAACTCCTCAGTGAGATCAAGAAGAGTCCACGTCAGTC 278 P R Q R K A A R E T N S K _* 901 TCCCAGGCAGCGGAAGGCAGCCCGTGAAACTAATTCTAAGTAAacctatggagttgacct 961 caaaggacacccaagtagctgtcctagaggaaaatcctgatgaacagcagagttaccatc 1021 attcgtgctgtgagatgagtggaagaaagcacccactggaggtggagagcccaggtgatt 1081 atccactttgggtcatgattaatcttgaccaggaattgtggctcctattgatgaaatgtt 1141 ttttttcgtctgacaatcaaaactttgtctgtgtctggccaccagaaacactgaggaaca 1201 actttaagcaagatgacttatgtattactatactaatagcccccagagttatcttcaggt 1261 aaggtgactaacaatgggaaaggtccacattaacactgtgttgttagatgccatatcaaa 1321 agattcctttgggggcagaatttcagcattctttggttgtggatgtttgctgtaaaagga $1381\ aaatcgaattaatgtctttgttgctatttatgtatgaaataatcaaatggaccaataaag$ 1441 cttgctgaatcagtgttca

图 1 Lv-trapa 基因 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

[]内为信号肽区域; 糖基化位点用加粗和下划线标出; 起始密码子和终止密码子用方框标出;

磷酸化位点用绿色字体表示;标黄背景为外显子 SNP 位点.

Fig. 1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of Lv-trapa gene

[] is the signal peptide region, glycosylation sites are marked with bold and underlined, the start and end codons are boxed, phosphorylation sites are indicated in green font, the exon SNP site is shown in yellow background.

点、195 位点有 NFTA、NQTV 基序的 N-糖基化 位点。

预测 Lv-TRAPα 蛋白有跨膜区,说明该蛋白 是跨膜蛋白。预测 Lv-trapα蛋白有信号肽结构,剪 切位点位于 21~22 号氨基酸之间。预测去掉信号 肽的 Lv-trapα 蛋白的二级结构中,α 螺旋占 23.05% (62 个氨基酸),延伸链占 22.68% (61 个氨 基酸),β转角占 7.43% (20 个氨基酸),无规则卷曲 结构占 46.84% (126 个氨基酸) (图 2)。

2.2 TRAPα 多序列比对及系统进化树分析

对 TRAPα 的氨基酸序列进行多序列比对(图

3)和系统进化树分析(图 4),发现凡纳滨对虾



图 2 Lv-TRAPα 的二级结构预测





图 3 TRAPα 的多重氨基酸序列比对

TRAPα 序列 GenBank 登录号:中国对虾(XP_047492382.1),克氏原螯虾(XP_045583197.1),三疣梭子蟹(XP_045113123.1),红 螯螯虾(XP_053627371.1),美洲龙虾(XP_042227466.1),中华绒螯蟹(XP_050722110.1),堆砂白蚁(XP_023726309.1),南美飞蝗(XP_049779984.1),松叶蜂(XP_046472440.1),甜瓜(XP_008447984.1),蜗牛(XP_013076474.1),蓝星睡莲(XP_031494816.1),人(NP_003135.2),小鼠(NP_001347771.1),黄牛(NP_001095592.1),狗(NP_001003270.1).

Fig. 3 Multiple comparison of amino acid sequences for TRAPa

The GenBank accession numbers of TRAP α amino acid sequences are as follows: *Penaeus chinensis* (XP_047492382.1), *Procambarus clarkii* (XP_045583197.1), *Portunus trituberculatus* (XP_045113123.1), *Cherax quadricarinatus* (XP_053627371.1), *Homarus americanus* (XP_042227466.1), *Eriocheir sinensis* (XP_050722110.1), *Cryptotermes secundus* (XP_023726309.1), *Schistocerca cancellata* (XP_049779984.1), *Neodiprion pinetum* (XP_046472440.1), *Cucumis melo* (XP_008447984.1), *Biomphalaria glabrata* (XP_013076474.1), *Nymphaea colorata* (XP_031494816.1), *Homo sapiens* (NP_003135.2), *Mus musculus* (NP_001347771.1), *Bos taurus* (NP_001095592.1), *Canis lupus familiaris* (NP_001003270.1).





TRAPa 氨基酸序列与中国对虾 TRAPa 氨基酸序 列同源性最高,为 99.31%。与其他物种同源性为: 克氏原螯虾,79.38%;三疣梭子蟹(Procambarus trituberculatus),77.05%;红螯螯虾(Cherax quadricarinatus),79.73%;美洲龙虾(Homarus americanus),79.04%;中华绒螯蟹,78.26%;堆砂白蚁 (Cryptotermes secundus),55.78%;南美飞蝗(Schistocerca cancellata),54.55%;松叶蜂(Neodiprion pinetum),52.2%;甜瓜(Cucumis melo),28.57%; 蜗牛(Biomphalaria glabrata),50.34%;蓝星睡莲 (Nymphaea colorata),26.67%;人(Homo sapiens), 50.67%;小鼠(Mus musculus),47.06%;黄牛(Bos taurus),46.95%;狗(Canis lupus familiaris),51.11%。

2.3 时空表达

利用 real-time PCR 的方法检测了 *Lv-trapa* 在 健康凡纳滨对虾和感染 WSSV 不同时间点的凡纳 滨对虾肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄 4 种组织中的表 达情况。结果如图 5 所示, *Lv-trapa* 基因在健康对虾 4 种组织中均有表达,基因表达水平无显著差异。

如图 6a 所示, 感染 WSSV 后 48、72、144、 192 h, 凡纳滨对虾肝胰腺中的 *Lv-trapa* 表达水平 分别是对照组的(1.03±0.16)、(2.06±0.45)(*P*<0.05)、 (1.75±0.57)(*P*<0.05)、(0.84±0.44)倍。如图 6b 所示, 感染 WSSV 后 48、72、144 和 192 h, 鳃中的 *Lv-trapa* 表达水平分别是对照组的(2.32±1.21)、





(3.66±1.10)(P<0.05)、(6.22±0.79)(P<0.01)、(7.20± 4.35)(P<0.05)倍。如图 6c 所示,感染 WSSV 后 48、 72、144 和 192 h,肌肉中的 *Lv-trapa* 表达水平分 别是对照组的(1.51±0.68)、(1.86±0.85)、(4.50±1.56) (P<0.01)、(2.67±0.63)(P<0.01)倍。如图 6d 所示,感 染 WSSV 后 48、72、144 和 192 h,眼柄中的 *Lv-trapa* 表达水平分别是对照组的(6.32±2.12)(P< 0.01)、(10.01±2.32)(P<0.01)、(9.08±2.76)(P<0.01)、 (14.81±3.17)(P<0.01)倍。

2.4 *Lv-trapa* 表达水平与 WSSV 复制水平的相关 分析

如图 7 所示, HPC 组和 LPC 组肝胰腺中 Lv-trapa 表达水平分别是对照组的(2.12±0.58)



图 6 感染 WSSV 后不同时间 Lv-trapa 基因在凡纳滨对虾各组织中的表达情况 a. 肝胰腺组织; b. 鳃组织; c. 肌肉组织; d. 眼柄组织. HPC: 高病毒含量(平均病毒含量为 3.13×10⁻¹±7.60×10⁻²); LPC: 低病毒含量(平均病毒含量为 1.93×10⁻³±3.93×10⁻⁴). **表示差异极显著(P<0.01), *表示差异显著(P<0.05).

Fig. 6 Expression of *Lv-trapa* gene in tissues of *Litopenaeus vannamei* at different times post WSSV infection a. Hepatopancreatic tissue; b. Gill tissue; c. Muscle tissue; d. Eye stalk tissue. HPC: high pathogen content (the mean pathogen content is $3.13 \times 10^{-1} \pm 7.60 \times 10^{-2}$); LPC: low pathogen content (the mean pathogen content is $1.93 \times 10^{-3} \pm 3.93 \times 10^{-4}$). ** indicates extremely significant difference (*P*<0.01), * indicates significant difference (*P*<0.05).



图 7 高病毒含量组(HPC)、低病毒含量组(LPC)和对照组 中 Lv-trapa 基因表达情况 不同字母表示有显著性差异(P<0.05). HPC: 平均病毒含量为

Fig. 7 Expression profile of Lv-trapa in the high pathogen content (HPC), low pathogen content (LPC) and control group Different letters indicate significant difference (P < 0.05). HPC: the mean pathogen content is $3.13 \times 10^{-1} \pm 7.60 \times 10^{-2}$; LPC: the mean pathogen content is $1.93 \times 10^{-3} \pm 3.93 \times 10^{-4}$.

(P<0.05)、(1.09±0.46)倍, HPC 组和 LPC 组之间差 异显著(P<0.05)。HPC 组和 LPC 组鳃中的 Lv-trapa 表达水平分别是对照组的(11.26±3.77)(P<0.01)、 (8.17±5.23)(P<0.05)倍。HPC 组和 LPC 组肌肉中 的 Lv-trapa 表达水平分别是对照组的(11.30±5.76) (P<0.05)、(15.45±4.03)(P<0.01)倍。HPC 组和 LPC 组眼柄中的 Lv-trapa 表达水平分别是对照组的 (6.22±1.83)(P<0.01)、(3.97±3.89)倍。

2.5 甲基化水平

QUMA 分析结果显示 *Lv-trapa* 基因上游区域 (NCBI 数据库 NW_020872863.1 第 360201~ 360600 nt)存在 6 个 CpG 位点。该区域在对照组 肝胰腺中甲基化率为 97.91%;在 HPC 组肝胰腺 中甲基化率为 91.66%;在 LPC 组肝胰腺中甲基化 率为 95.83%。其中 NCBI 数据库 NW_020872863.1 第 360336-360337 nt 位置的 CpG 位点在对照组肝 胰腺甲基化率为 100%, 在 HPC 组的肝胰腺中甲 基化率为 50%, 在 LPC 组的肝胰腺中甲基化率为 75% (图 8)。卡方检验结果显示该 CpG 位点甲基 化水平在 HPC 组中显著低于对照组(*P*=0.021)。



图 8 凡纳滨对虾 Lv-trapa 基因上游区域 6 个 CpG 位点的甲基化率

a. 对照组, b. 高病毒含量组(平均病毒含量为
3.13×10⁻¹±7.60×10⁻²); c. 低病毒含量组(平均病毒含量为
1.93×10⁻³±3.93×10⁻⁴). 每个圆圈代表一个 CG 位点; 实心圆
代表发生甲基化的位点; 空心圆代表未发生甲基化的位点.

Fig. 8 Methylation rate of six CpG sites in the upstream region of *Lv-trapa* in *Litopenaeus vannamei* a. Control group; b. High pathogen content group (the mean pathogen content is $3.13 \times 10^{-1} \pm 7.60 \times 10^{-2}$); c. Low pathogen content group (the mean pathogen content is

 $1.93 \times 10^{-3} \pm 3.93 \times 10^{-4}$). Each circle represents a CG site, solid circles represent CG sites where methylation occurs, hollow circles represent CG sites that have not undergone methylation.

2.6 SNP 筛选及多态性分析

根据测序峰图(图 9)及序列比对结果共筛选 到 8 个 SNP 位点,分布位置见图 10。SNP 位点突 变类型及多态性分析结果见表 2。7 个 SNP 处于 内含子区域。1 个 SNP 处于外显子区域,属于错 义突变,密码子编码氨基酸由 Glu (谷氨酸)突变 为 Lys (赖氨酸)。多态性分析结果如表 2 所示。 HWE 检验结果表明, 8 个位点均符合 HWE。



图 9 Sanger 测序结果(部分) 红色箭头所指为 SNP-CT 基因型. Fig. 9 Sanger sequencing results (partial) The red arrow points to SNP-CT genotype.

2.7 突变型 Lv-trapα 氨基酸序列分析

预测去掉信号肽的突变型 Lv-trapα 的二级结构

中,α螺旋占23.42%(63个氨基酸),延伸链占23.42% (63个氨基酸),β转角占6.69%(18个氨基酸),无 规则卷曲结构占46.4%(125个氨基酸)(图11)。

3 讨论

3.1 TRAPa 的生物信息学分析

TRAP 在生物体合成蛋白过程中发挥重要功 能,蛋白的前体新生多肽在转运至内质网的过程 中需要 TRAP 的参与^[9,15]。TRAP 除了参与蛋白合 成过程,也对异常蛋白降解具有重要作用。TRAP 在内质网相关蛋白降解(ER-associated protein degradation, ERAD)过程中, 会介导错误折叠的蛋 白从内质网进入胞质中[16]。通过本研究发现, Lv-trapa 蛋白存在信号肽, 推测合成过程可能需 要跨膜运输。本研究中也预测到 Lv-TRAPα 蛋白 的跨膜区,这与内质网膜蛋白的功能定位一致。 凡纳滨对虾 TRAPα 氨基酸序列与中国对虾相似 性最高, 而与人、小鼠等哺乳动物的相似性较低。 上述结果提示随着生物界的进化, TRAPa 氨基酸 序列发生了较大改变。预测 Lv-TRAPα 蛋白存在 磷酸化、糖基化位点, 提示 Lv-TRAPa 功能可能 受糖基化和磷酸化作用调控。

3.2 SNP 位点多样性分析

Lv-trapa 基因中存在一个错义突变 SNP, 该 突变造成密码子编码氨基酸 Glu (谷氨酸)突变为 Lys (赖氨酸)。谷氨酸属于酸性氨基酸, 赖氨酸属 于碱性氨基酸。谷氨酸在生物体内的蛋白质代谢 过程中占重要地位。人类的 β-珠蛋白基因 26 位密 码子 GAG 突变为 AAG 导致谷氨酸变成赖氨酸, 进而导致珠蛋白肽链合成减少或缺失, 临床表现 为不同程度的进行性溶血性贫血^[17]。该 SNP 突变 对 Lv-trapa 蛋白二级结构造成一定程度的改变, 是否会对蛋白功能造成影响值得进一步研究。

3.3 WSSV 感染对 Lv-trapa 基因表达水平的影响

TRAP 参与生物体应对外源胁迫和病毒感染 过程。根腐线虫(*Pratylenchus goodeyi*)在受到龙葵 (*Solanum nigrum*)提取物胁迫时, TRAP 表达水平 升高^[18]。HBe 前体(p25)是乙型肝炎病毒合成 HBe 抗原的先驱蛋白, TRAP 在 HBe 前体(p25)定位到 内质网进行加工的过程中发挥重要作用。本研究 中, Lv-trapa 在WSSV 感染的凡纳滨对虾 4 种组织 中均显著上调表达。感染 WSSV 后,眼柄中 Lv-trapa 基因表达水平上调程度最高。在患铁虾 综合征的罗氏沼虾(Macrobrachium rosenbergii)眼 柄转录组研究中,发现较多免疫相关的差异基因, 提示眼柄在甲壳类动物先天免疫中发挥重要作 用^[19]。鳃是 WSSV 侵染的重要靶器官,*Lv-trapa* 在感染 WSSV 的凡纳滨对虾鳃中随着 WSSV 感染

GCCGCAGTGTAGCCTATGCACAGGAGGATGAGGTTGATGGAGAAGAGGATGACATCATTG 1 ATGATGAAGAGGTTAATGTTGATGATGGGACAGAATCGGAAGTAGAACAAGTTGATGGAA 61 CGGAAGAGGAAGAAGGAAGAAGAAATGACTGCCAAGGGATCCCCAGATGCTGACACCA 121 TCATCTACTTCACCAAGCCTGTGGGCACTGGCTCAGGTCAGTGTGAAAGTATATGGTTTC 181 AATATACCTGAAGGAGGGCTGTGTGGGACAGCAATGAGGGCTGTAGCTCCTCTAGGTTTCA 241 301 TCCTGTCTGTTTCTCCCGATTTTTTTTTTTCATGTTTTCCTCATCACATGGTTTCTTGTCT 361 TTTCTTCTTTATGATTTTTCTCCCTTCCCATCCTTCCCCATTTTACTTCCCCCTTCCA 421 481 **GCTGTCATTAAATAGGCTAATATTCTTGTTTTTACAGACCTGCCAGCTGGTAAGCTTGTA GAGTTCCTGGTGGGCTTCACAAACAATGGGGACAAAGACTTCATCTTGGATGCCATTGAT** 541 GCCTCCTTCCGTTACCCTATGGACTTCAACTTTTACATCCAGAACTTTACCGCCATCCCC 601 TACAACCGTGCTGTTAAACCACGTCAGGAGGCCACAGTTATGTACTCCTTCTACCCTGCT 661 GAAGCCTTTGCTGGTCGTCCCCTTGGCTTAACTGTCAACCTTGCTTACCATGATGCTGTG 721 781 AGTTTGATATGGCTTTTCCCATGGATGATATAACCCTTATCGGATTAATGTTGTTTGGAT AGCAGATGTTTGAAATTATGATGTAAAGTTTGTGATTGTTGGAAGCAGTAATATATAGTA 841 TGGAATATTGTTTTTGCTACATTGATTAATTACAAGAGAATACATCCTTTTCTCACTTG 901 TTTTATCAGTTGTACTTTCCAAAAAACTTTTAATGTAGCAAAAAGGCTCTGTAGCCTTT 961 1021 TGTGTTTGTTGATCCAGTGTTCAACCAGACTGTGAACATTGTTGAGGTCGATGAGGGAAT 1081 **GGATGGAGAAACCTTCTTCCTATACATCTTCATGCTTGCCTTTGCTGTACTGCTGCTTGT** 1141 1201 GGCTGGCCATCACTTTCTCTCCTCATTCGGTCGCAGGCGAGGTGGCAAGAGGCACACCGT TGAAATGGGTACCAAGAAGAGCAACAGTGTTGACTATGACTGGCTACCCAAGGAACTCCT 1261 1321 CAGTGAGATCAGTGAGTTTGATGTTTTTTGTGCAGGTGAAAGTTGTGATGAAATACAAAG 1381 TGTACATTTACTCATTTGTGTCCAATCTGTGTTGCAGAGAAGAGTCCACGTCAGTCTCCC 1441 AGGCAGCGGAAGGCAGCCCGTGAAACTAATTCTAAGTAAACCTATGGAGTTGACCTCAAA 1501 1561 **GGACACCCAAGTAGCTGTCCTAGAGGAAAATCCTGATGAACAGCAGAGTTACCATCATTC** GTGCTGTGAGATGAGTGGAAGAAAGCACCCACTGGAGGTGGAGAGCCCAGGTGATTATCC 1621 ACTTTGGGTCATGATTAATCTTGACCAGGAATTGTGGGCTCCTATTGATGAAATGTTTTT 1681 1741 TTCGTCTGACAATCAAAACTTTGTCTGTGTCTGGCCACCAGAAACACTGAGGAACAACTT 1801 TAAGCAAGATGACTTATGTATTACTATACTAATAGCCCCCAGAGTTATCTTCAGGTAAGG TGACTAACAATGGGAAAGGTCCACATTAACACTGTGTTGTTAGATGCCATATCAAAAGAT 1861 1921 TCCTTTGGGGGGCAGAATTTCAGCATTCTTTGGTTGTGGATGTTTGCTGTAAAAGGAAAAT 1981 CGAATTAATGTCTTTGTTGCTATTTATGTATGAAATAATCAAATGGACCAATAAAGCTTG 2041 CTGAATCAGTGTTCA 图 10 SNP 位点在 DNA 序列中位置

灰色部分为 CDS 区; 加粗和下划线为 SNP 位点. Fig. 10 The position of the SNP locus in the DNA sequence The gray part is the CDS area, and the SNPs are shown in bold and underlined.

	Tab. 2Analysis of SNP mutation types and polymorphism									
SNP 名称	位置 location	碱基类型 type of base	突变类型 type of mutation	最小等位基因频率 MAF	多态信息含量 PIC	观测杂 合度 H。	期望杂 合度 H _e	哈迪–温伯格 平衡 HWE		
L262	内含子(262 bp)	T/G	Ν	0.01	0.0196	0.02	0.0198	1		
L302	内含子(302 bp)	A/G	Ν	0.07	0.1217	0.14	0.1302	1		
L319	内含子(319 bp)	G/T	Ν	0.01	0.0196	0.02	0.0198	1		
L392	内含子(392 bp)	T/C	Ν	0.06	0.1064	0.08	0.1128	0.1468		
L443	内含子(443 bp)	C/T	Ν	0.08	0.1364	0.16	0.1472	1		
L541	外显子(541 bp)	G/A	Mm Glu→Lys	0.01	0.0196	0.02	0.0198	1		
L1713	内含子(1713 bp)	T/A	Ν	0.01	0.0196	0.02	0.0198	1		
L1789	内含子(1789 bp)	G/T	Ν	0.01	0.0196	0.02	0.0198	1		

表 2 SNP 位点突变类型及多态性分析 Tab. 2 Analysis of SNP mutation types and polymorphi

注: M 表示错义突变; N 表示未发生突变.

Note: M means missense mutation, N means no mutations have occurred.

10	20	30	40	50	60	
VVDEGRSVAYA	QEDEVDGEEDDI	IDDEEVNVDDG	TESEVEQVD	GTEEEEEEE	MTAKGSPDADI	IIYF
eetttceeeec	chhhccccchhe	ecccceeectt		<mark>t cc</mark> hhhhhhh	hhhcccccce	eeee
TKPVGTGSDLP	AGKLV <u>K</u> FLVGFT	NNGDKDFILDA	IDASFRYPM	DENEYIQNET	AIPYNRAVKPF	QEAT
eccccccccc	ttcceeeeeec	cttccceeeek	hhhcccccc	ccheehhhhh	hcccccccc	ccce
VMYSFYPAEAF	AGRPLGLTVNLA	YHDADGNVFVD	PVFNQTVNI	VEVDEGMDGE	TFFLYIFMLAF	AVLL
eeeeecccccc	ccccc eeeeee	eccttcceeek	hhhhtceee	eetttcccth	heeeeehhhh	hhhh
LVAGHHFLSSF	GRRRGGKRHTV	EMGTKKSNSV	DYDWLPKELI	LSEIKKSPRQ	SPRQRKAARE	TNSK
eehhhhhhhhh		ecccccccc	c ee ccchhhl	hhh cccccc	ccccccccc	cccc

 图 11 突变型 Lv-TRAPα 的二级结构预测
 c: 无规则卷曲, e: 延伸链, h: α-螺旋, t: β-转角. 加粗和下划线表示突变氨基酸.

Fig. 11 Secondary structure prediction of mutant Lv-TRAPα c: random coil, e: extended strand, h: α-helix, t: β-turn. Bold and underline indicate the mutant amino acids.

时间的增加表达水平呈现明显上调的趋势。不同 的是 Lv-trapa 在肝胰腺和肌肉中表达水平呈现先 上升后下降的趋势。这提示不同组织应答 WSSV 侵染的机制不同。尤其在具有重要免疫功能的肝 胰腺中, HPC 组 Lv-trapa 基因的表达水平显著高 于 LPC 组。上述结果提示 Lv-trapa 表达水平与凡 纳滨对虾体内 WSSV 含量呈现正相关。在凡纳滨 对虾和 WSSV 互作过程中, Lv-trapa 可能在宿主 或病毒蛋白合成过程中发挥重要调控作用, 具体 功能值得深入研究。

3.4 甲基化水平与基因表达水平、WSSV 病毒含量的相关分析

已有研究表明, DNA 甲基化水平与宿主抗病 基因表达与宿主抗性都存在相关性。程鸿星等^[20] 发现,副猪嗜血杆菌感染的猪脑组织中 FRMD1 和 GBP1 基因表达水平与 DNA 甲基化水平呈正相 关关系, STXBP2 基因表达水平与 DNA 甲基化水 平呈负相关关系。本研究发现 Lv-trapa 基因上游 一个 CpG 位点(NCBI 数据库 NW_020872863.1 第 360336~360337 nt)甲基化水平与 Lv-trapa 表达水 平呈现负相关,同时该位点甲基化水平与凡纳滨 对虾体内 WSSV 含量呈现负相关性。提示该甲基 化位点能够影响 Lv-trapa 表达水平和凡纳滨对虾 体内 WSSV 复制水平。

综上所述,凡纳滨对虾 Lv-trapa 在受到 WSSV 感染后显著上调表达,且表达水平与凡纳 滨对虾体内 WSSV 含量呈现正相关性。Lv-trapa 基因上游存在与基因表达和 WSSV 复制水平均呈 现负相关性的甲基化位点,结果提示 Lv-trapa 可 能在凡纳滨对虾抗 WSSV 中发挥重要调控作用,具体功能值得深入研究。

参考文献:

- Zhang W Q. Biological profile of important world aquaculture species-*Penaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 1990, 14(3): 69-73. [张伟权. 世界重要养殖品种——南美白对虾 生物学简介[J]. 海洋科学, 1990, 14(3): 69-73.]
- [2] Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia[J]. Aquaculture, 2016, 452(1): 69-87.
- [3] Holthuis J C M, van Riel M C H M, Martens G J M. Translocon-associated protein TRAP delta and a novel TRAP-like protein are coordinately expressed with pro-opiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary[J]. Biochemical Journal, 1995, 312 (1): 205-213.
- [4] Hirama T, Miller C W, Koeffler H P. Translocon-associated protein α transcripts are induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and exhibit complex alternative

polyadenylation[J]. FEBS Letters, 1999, 455(3): 223-227.

- [5] Mangos S, Krawetz R, Kelly G M. The translocon-associated protein β (TRAPβ) in zebrafish embryogenesis. I. Enhanced expression of transcripts in notochord and hatching gland precursors[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000, 215(1-2): 93-101.
- [6] Li D H, Chan T C, Satow R, et al. The role of *XTRAP-γ* in *Xenopus* pronephros development[J]. International Journal of Developmental Biology, 2005, 49(4): 401-408.
- [7] Wang J Q, Liu X H, Guo R, et al. The cloning and analysis of trapd full-length cDNA derived from *Oncorhynchus mykiss*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2009, 31(4): 723-726, 745. [王家庆, 刘晓慧, 郭冉, 等. 虹鳟鱼 trapd 基因 cDNA 的克隆与序列特征分析[J]. 江西农业大 学学报, 2009, 31(4): 723-726, 745.]
- [8] Zábranská H, Zábranský A, Lubyová B, et al. Biogenesis of hepatitis B virus e antigen is driven by translocon-associated protein complex and regulated by conserved cysteine residues within its signal peptide sequence[J]. The FEBS Journal, 2022, 289(10): 2895-2914.
- [9] Hartmann E, Görlich D, Kostka S, et al. A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 214(2): 375-381.
- [10] Kunst C B, Mezey E, Brownstein M J, et al. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions[J]. Nature Genetics, 1997, 15(1): 91-94.
- [11] Meng X H, Zhang T S, Kong J, et al. Equivalent and quantitative test method of white spot syndrome virus resistance of prawns: ZL201210107377.8[P]. 2013-12-25.
 [孟宪红,张天时,孔杰,等.对虾抗白斑综合征病毒能力的等量、定量测试方法: ZL201210107377.8[P]. 2013-12-25.]
- [12] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp[J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(7): 381-389.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the

 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

- [14] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [15] Bodescot M, Brison O. Cloning and sequence analysis of the β subunit of the human translocon-associated protein[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1994, 1217(1): 97-100.
- [16] Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, et al. A novel ER α-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation[J]. EMBO Reports, 2001, 2(5): 415-422.
- [17] Du M. Analysis of fetal hemoglobin associated quantitative trait polymorphism in patients with Hb/β-thalassemia and hematopoietic stem cell culture in vitro[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2017. [杜萌. Hb E/β-地贫患者胎儿血红蛋白相关数量性状位点多态性 分析及造血干细胞体外培养[D]. 昆明:昆明理工大学, 2017.]
- [18] Pestana M, de O Abrantes I M, Gouveia M. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding a Translocon-Associated Protein (TRAPδ) from the root-lesion nematode *Pratylenchus goodeyi*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 139(2): 289-298.
- [19] Wang G H, Dong X, Wang Y T, et al. Study on the eyestalk transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii* suffering from iron prawn syndrome[J]. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 64-74. [王国浩, 董宣, 王一婷, 等. 患铁虾综合征 罗氏沼虾眼柄转录组研究[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 64-74.]
- [20] Cheng H X, Sun P Y, Yang Y Q, et al. Conjoint analysis of expression levels of candidate genes and DNA methylation in the brain tissue of pigs infected with *Glaesserella parasuis*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(5): 1-5, 11, 132-13. [程鸿星, 孙培燕, 杨雅琼, 等. 副猪 嗜血杆菌感染猪脑组织中候选基因表达水平与 DNA 甲基 化联合分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(5): 1-5, 11, 132-133.]

Analysis of the translocon-associated protein alpha subunit ($TRAP\alpha$) gene and association study of $TRAP\alpha$ with WSSV resistance in *Litopenaeus vannamei*

WANG Jingjing^{1, 2}, LI Xupeng^{2, 3}, XUE Qian², CAO Baoxiang², LUAN Sheng^{2, 3}, LUO Kun², SUI Juan^{2, 3}, DAI Ping^{2, 3}, CAO Jiawang², TAN Jian², CHEN Baolong², FU Qiang², KONG Jie^{2, 3}, GAO Huan¹, MENG Xianhong^{2, 3}

- 1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University; Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment of Jiangsu Province, Lianyungang 222005, China;
- 2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
- Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China

Abstract: This study aims to explore the genetic characteristics of the translocon-associated protein alpha subunit $(TRAP\alpha)$ of Litopenaeus vannamei and its role in resistance to white spot syndrome virus (WSSV). The ORF (open reading frame) sequence of TRAPa from L. vannamei was obtained through PCR and Sanger sequencing techniques. The gene was named Lv-trapa and bioinformatics analysis was conducted. Real-time PCR was used to analyze the expression level of the Lv-trapa gene in the hepatopancreas, gills, muscle, and eyestalk of healthy L. vannamei and those infected with WSSV at different time points. Meanwhile, bisulfite sequencing PCR (BSP) was used to detect the methylation level of the upstream DNA sequence of the Lv-trapa gene in the hepatopancreas of healthy L. vannamei and those infected with WSSV after 96 h. The results showed that the ORF of Lv-trapa was 873 bp in length, encoding 290 amino acids. The predicted relative molecular mass was 32466.4 and theoretical isoelectric point was 4.45. Multiple sequence alignment with various species including Penaeus chinensis, Procambarus clarkii, and Portunus trituberculatus revealed that conservation of the TRAPa protein was relatively high. Through PCR and Sanger sequencing techniques, eight single nucleotide polymorphism (SNP) sites were found in the Lv-trapa DNA sequence, among which one SNP site was located in the exon region and belonged to a missense mutation, while the other seven SNP sites were located in intron regions. Real-time PCR showed that the Lv-trapa gene was expressed in the hepatopancreas, gills, muscle, and eyestalk of L vannamei, and its expression was significantly up-regulated (P < 0.05) after infection with WSSV. Notably, 96 h post infection with WSSV, the expression level of Lv-trapa in the hepatopancreas of L. vannamei with different internal viral loads showed significant differences. The expression level of Lv-trapa in the HPC group was significantly higher than that in the LPC group (P < 0.05), suggesting that the expression level of Lv-trapa was positively correlated with the replication level of WSSV. Results of bisulfite sequencing technology showed that the methylation level of an upstream CpG site (located at position 360336-360337 in the NCBI database NW 020872863.1) of the Lv-trapa gene was negatively correlated with the expression level of Lv-trapa, and the methylation level of this CpG site was also negatively correlated with the WSSV viral load in L. vannamei. This study provides a theoretical reference for in-depth research on the molecular mechanisms of L. vannamei resistance to WSSV and molecular-assisted breeding for disease-resistance.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; white spot syndrome virus (WSSV); *TRAP*; expression level; SNP; DNA methylation

Corresponding author: MENG Xianhong. E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn