

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00646

中国明对虾抗菌肽基因应答 WSSV 侵染的表达及其 SNP 分析

高焕^{1,2}, 赖晓芳^{1,2}, 孟宪红¹, 罗坤¹, 孔杰¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 淮海工学院, 江苏 连云港 222005

摘要: 通过白斑综合征病毒(WSSV)感染实验, 利用实时定量 PCR 技术研究了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)应答病毒侵染后, 已知的 3 种抗菌肽(对虾肽)在肝胰腺、肌肉、肠和鳃 4 种组织中的差异表达情况。结果显示, 虽然 3 种抗菌肽表现出明显的组织表达特异性, 即在不同组织中的表达趋势和表达丰富度存在明显的差异, 但是就同一个组织而言, 3 种抗菌肽在 1~120 h WSSV 侵染区间内的表达趋势基本一致, 在 0 h(未侵染病毒)时, 3 种抗菌肽的表达量极低(为 0); 在 6~24 h 期间, 检测到明显的表达量; 48~120 h 期间, 3 种抗菌肽的表达量总体呈现下降的趋势。这暗示 3 种抗菌肽在对虾机体内可能具有相似的生物学功能。在此基础上, 本研究对各类型中国明对虾抗菌肽的 SNP 位点进行了筛选, 进一步对不同 SNP 类型与抗 WSSV 或易感 WSSV 的关联程度进行了分析, 结果显示 3 种抗菌肽基因的 SNP 位点很少, 且在抗性和易感对虾群体内不存在明显的偏向分布。

关键词: 中国明对虾; 对虾肽; SNP; 表达差异; WSSV

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0646-08

抗菌肽是生物体产生的一类具有免疫防御功能的小分子多肽, 在植物、两栖类、哺乳类、昆虫、鱼、虾、蟹、贝等生物中已经发现了多达 1 200 多种抗菌肽^[1]。尽管这些抗菌肽在长度上千差万别, 但其高级结构无论是以 α 螺旋还是以 β 折叠出现, 通常为碱性小分子, 富含带正电荷的氨基酸, N 端亲水, C 端疏水, 具有双亲的性质^[2-3]。抗菌肽的生成和释放是生物机体免疫反应的重要组成部分, 也是宿主防御细菌、真菌等病原微生物入侵的重要分子屏障, 并且其在防御和抵抗病毒侵染上也起到重要的作用, 因此近年来受到广泛的关注。

Destoumieux 等^[4]首次从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中分离出几种对虾类抗菌肽, 这也是首次报道的甲壳动物抗菌肽氨基酸序列, 随后

在圣保罗对虾(*Farfantepenaeus paulensis*)和史密斯对虾(*L. schmitti*)^[5]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[6]和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[7-9]等中也发现了几种抗菌肽。自康翠洁等^[7]首次在中国明对虾中发现抗菌肽以来, 目前在 NCBI 核苷酸序列数据库中注册的中国明对虾抗菌肽已多达 6 个。根据其编码基因的序列差异, 这些抗菌肽被划分为 3 个不同基因编码的类型, 这些不同类型的抗菌肽在中国明对虾免疫功能上是否存在差别尚未明确。本研究希望通过分析 WSSV 感染后 3 种抗菌肽基因表达的差异情况, 来探索 3 种抗菌肽在对虾防御功能上的差异, 同时通过对不同抗菌肽 SNP 类型的分析, 研究各 SNP 基因型与抗 WSSV 的关联性, 为了解对虾抗 WSSV 的遗传机制提供理论参考。

收稿日期: 2010-06-29; 修订日期: 2010-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072206, 310722); 中国博士后科学基金(20090461273); 江苏省自然科学基金(SBK200930340).

作者简介: 高焕(1976-), 男, 博士后, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: huanmr@163.com

通信作者: 孔杰, 研究员, 博士生导师. Tel: 0532-85823291; E-mail: kongjie@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

检测不同抗菌肽表达差异的实验材料为来源于同一个家系的中国明对虾个体。实验对虾投喂含有等量 WSSV 病毒的饵料, 之后继续投喂蛤蜊并辅之配合饲料至实验结束。实验水温(28.5±0.5)℃, 盐度约 28。分别在感染后 0(未感染)、6、12、24、48、72、96、120、156 h 收集对虾个体, 并用液氮保存运回实验室提取 RNA, 每个感染时间阶段取 3~6 个样本。

收集病毒感染后 3 d 内死亡的个体, 把其作为 WSSV 病毒易感染群体(简称易感群体); 收集 7 d 后仍然未死亡的个体, 把其作为抗 WSSV 病毒感染群体(简称抗感群体)。

1.2 RNA 提取及 qRT-PCR 分析

根据试剂盒说明, 利用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取各个对虾个体的肝胰腺、肠、肌肉和鳃 4 种组织的总 RNA, 利用不含有 RNA 酶的 DNase I 处理 RNA 以去除可能存有的 DNA 后, 再利用反转录酶[M-MLV reverse transcriptase(BBI)]以 T₇d(T)₁₂(表 1)为引物合成 cDNA 第一链。

以 18S rRNA 基因作为内参基因(表 1), 通过实时定量 PCR 技术对各个 WSSV 侵染时期对虾个体的抗菌肽基因表达情况进行相对定量分析。荧光实时定量 PCR 采用 20 μL 扩增体系, 反应体系

各成分终浓度为: 1×SYBR® Premix Ex Taq™II、正反向引物量各为 400 nmol/L、1×ROX Reference Dye II、40 ng cDNA。采用 7500 型荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems Inc.)进行扩增, 扩增程序为: 95℃变性 15 s; 再以 95℃变性 5 s、60℃复性 34 s, 进行 40 个循环; 最后是 1 个熔解曲线程序(95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 再 95℃ 15 s)。采用比较 C_t 法对获得的定量结果进行分析。

1.3 SNP 分析

1.3.1 引物设计 搜索 NCBI 核苷酸序列数据库, 共找到 6 个中国明对虾抗菌肽序列, 序列号分别为 AY260151.2(PEN3-1)、DQ308408.1(PEN3-2)、DQ153253.1(PEN5-1)、DQ154152.2(PEN5-2)、DQ308407.1(PEN5-3)和 AY669323.1(Penaeidin)。经序列对比发现, 这 6 个抗菌肽序列可以分为 3 类: AY260151.2(PEN3-1)和 DQ308408.1(PEN3-2)为同一类序列, DQ153253.1(PEN5-1)和 AY669323.1(Penaeidin)(本文中重新编号为 PEN1-1)为最接近的同一类序列, DQ154152.2(PEN5-2)和 DQ308407.1(PEN5-3)为最接近的同一类序列。因此最终分别以 AY669323.1(PEN1-1)、AY260151.2(PEN3-1)、DQ154152.2(PEN5-2)为代表, 设计相应的 PCR 引物筛选 SNP 位点。其中根据 AY669323.1(PEN1-1)设计 2 个引物对, 编号为 PEN1-1-1 和 PEN1-1-2; 根据 AY260151.2(PEN3-1)设计 1 对引物, 编号为

表 1 本研究所用 PCR 引物序列
Tab. 1 All primers used in the studies

	引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	引物设计扩增区/bp amplification zone	片段大小/bp fragment length
	T ₇ d(T) ₁₂	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTT		
PEN1-1-1	正向 former	TGGTCTGCCTGGTCTTCTTG	51-190	140
	反向 reverse	AGGGTCTGGACGAGTGATTG		
PEN1-1-2	正向 former	GGTTAGGACGCTGTTGTTCT	246-507	262
	反向 reverse	TAGGCACATACATCCACAT		
PEN3-1-2	正向 former	TTCATGCCACGTTCTTAC	180-482	302
	反向 reverse	AGGACCTGCTGGGACAAA		
PEN5-2-1	正向 former	ATCCTGGCTTTACAGCGTG	320-489	170
	反向 reverse	CGTCATTCAATTCGTGGAAG		
18S rRNA	正向 former	TATACGCTAGTGAGCTGGAA		
	反向 reverse	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT		

PEN3-1-2; 根据 DQ154152.2(PEN5-2)设计 1 对引物, 编号为 PEN5-2-1, 引物序列见表 1。采用单链构象多态性(PCR-SSCP)技术验证不同抗菌肽基因型在抗性群体和易感群体中的分布规律。

1.3.2 PCR 反应及电泳 采用 10 μ L PCR 扩增体系, 利用 BBI 的 *Taq* 酶体系进行扩增, PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, $T_m=65^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s, 进行 15 个循环, 每个循环 T_m 值降低 1 $^{\circ}$ C; 接着 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, $T_m=50^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s, 进行 20 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物与含有 98% 去离子甲酰胺的上样缓冲液等比例混合后, 98 $^{\circ}$ C 变性 7 min 后取出 4 $^{\circ}$ C 保存。采用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 100 V 电泳 15 h, 最后经银染法显示电泳条带, 对电泳条带进行扫描纪录各个个体的 SNP 的基因型。

利用非参数检验方法(卡平方检验, χ^2)对易感和抗感群体中各 SNP 基因型分布是否存在偏离进行检验, 以寻找与抗感或易感相关联的 SNP 基因型。

2 结果与分析

2.1 不同抗菌肽应答 WSSV 侵染的表达特征

分别以 PEN1-1-1、PEN3-1-2、PEN5-2-1 共 3 对引物, 研究相应 3 种类型抗菌肽于 WSSV 侵染后在对虾肝胰腺、肌肉、鳃、肠 4 种组织中的表达特征。在肝胰腺中 3 种抗菌肽的表达特征基本一致: 0 h 时(未侵染病毒)3 种抗菌肽的表达量极低(为 0); 在 6~24 h 期间, 检测到明显的表达量; 48~120 h 期间, 3 种抗菌肽的表达量总体呈现下降的趋势; 而在 156 h 时, 表达量又明显的上升(图 1)。与肝胰腺组织比较, 在肌肉组织中 0 时(未侵染病

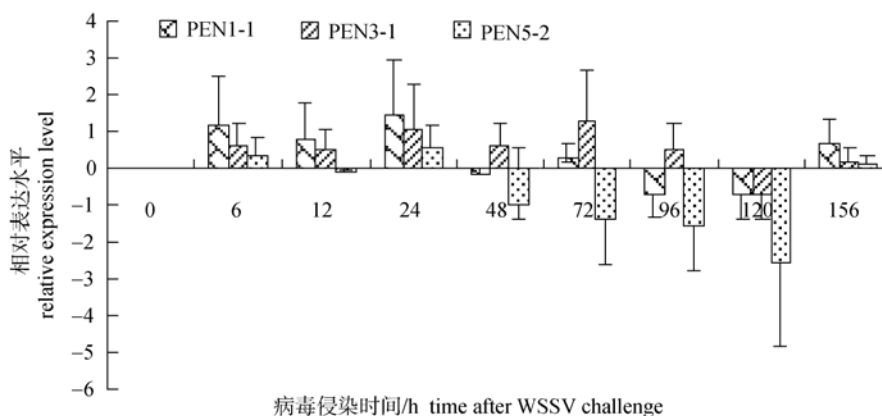


图 1 3 种抗菌肽在中国明对虾肝胰腺中的表达差异

Fig. 1 Expression difference of penaeidins in hepatopancreas of *Fenneropenaeus chinensis*

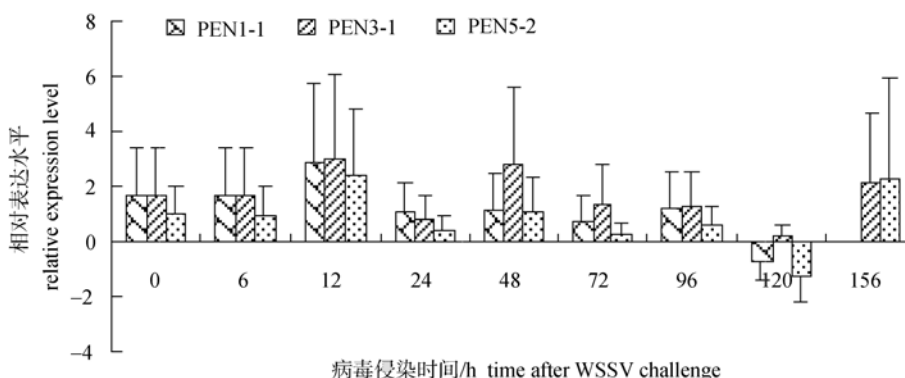


图 2 对虾抗菌肽在肌肉组织中的表达差异

Fig. 2 Expression difference of penaeidins in muscle of *Fenneropenaeus chinensis*

毒)3 种抗菌肽的表达量较高, 在 12 h 达到峰值之后总体呈下降趋势(24~96 h 期间有一定波动), 但在 156 h(PEN1-1 型抗菌肽在 156 h 未检测到表达量)又表现为上调表达(图 2) (图 2)。

在鳃中, 3 种抗菌肽在 0 h 具有仅次于肠的较高的表达量, 其后在 0~12 h 表现为上调表达, 在 12~120 h 表现为持续的下调表达, 而在 156 h 又呈上调表达(图 3)。在肠中, 相较于其他 3 种组织而言, 3 种抗菌肽在肠中的起始表达量(0 h)是 4 种组织中最高的; 在 6 h, 3 种抗菌肽均达到一个峰值, 其后缓慢下降; 但 3 种抗菌肽在 156 h 表现出一定的表达差异, PEN1-1-1 和 PEN3-1-2 表现为上升表达, 而 PEN5-1-1 仍表现为下调表达(图 4)。

上述结果表明, 虽然对于同一个个体的不同组

织而言, 3 种抗菌肽基因的表达情况具有较大的差异, 总体上看, 表达量由大到小依次为: 肠、鳃、肌肉、肝胰腺, 但就同一种组织而言, 3 种抗菌肽基因总体上的表达趋势是相似的。如在肝胰腺中, 3 种抗菌肽在 WSSV 感染的 0~24 h 期间都表现为上调表达, 在 48~120 h 期间又都呈下调表达。

2.2 抗菌肽基因 SNP 分析及其在抗性和易感群体中的分布频率差异

对于 PEN1-1 类型抗菌肽, 设计了 1 对引物(编号为 PEN1-1-1)研究该基因的 SNP 位点及其在抗性和易感中国明对虾个体中的频率分布差异。对于引物 PEN1-1-1 而言, 该扩增区域的 SNP 位点较少, 在抗性群体 30 只对虾中只检测到 3 个个体含有突变位点(图 5 中的 16、18 和 27 泳道); 在

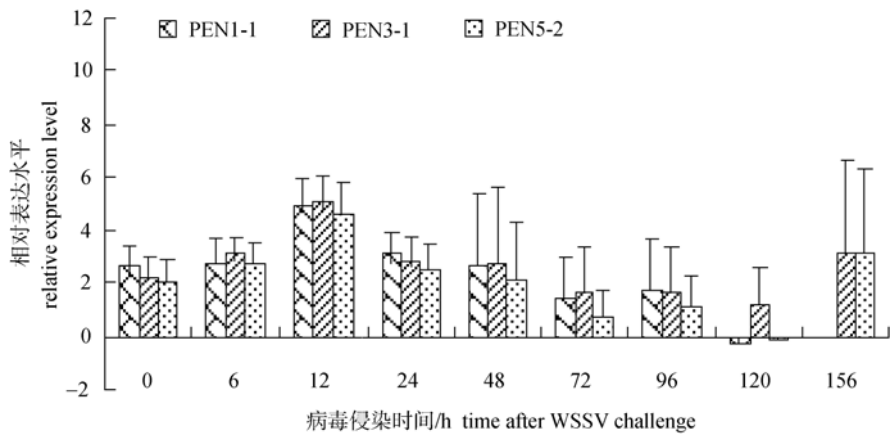


图 3 对虾抗菌肽在鳃中的表达差异

Fig. 3 Expression difference of penaeidins in gill of *Fenneropenaeus chinensis*

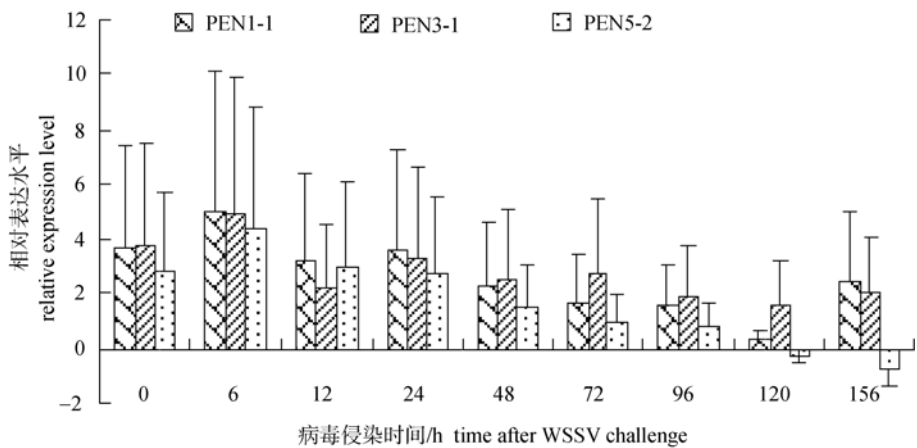


图 4 对虾抗菌肽在肠中的表达差异

Fig. 4 Expression difference of penaeidins in intestine of *Fenneropenaeus chinensis*

易感群体 30 个个体中,也只检测到 3 个个体含有突变位点(图 6 中的 12、13、25 泳道)。未发现在抗性群体或易感群体中具有明显偏分布的基因型,即各 SNP 基因型与个体是否具有抗 WSSV 能力没有明显关联。

对于 PEN3-1 类型抗菌肽,也设计了 1 对引物(编号为 PEN3-1-2)研究该基因的 SNP 位点及其在抗性和易感中国明对虾个体中的频率分布差异。对于引物 PEN3-1-2 而言,该扩增区域的 SNP 位点较少,在抗性群体 30 个对虾中(图 7)没有检测到明显的突变位点;在易感群体 30 个个体中,只检测到 1 个个体含有突变位点(图 8 中的 28)。也没有发现在抗性群体或易感群体中具有明显偏分

布基因型存在。

对于 PEN5-2 类型抗菌肽,设计了 1 对引物(编号为 PEN5-2-1)研究该基因的 SNP 位点及其在抗性和易感中国明对虾个体中的频率分布差异。该对引物扩增区域在抗性和易感群体中具有较高的遗传多态性(图 9、图 10 和表 2、表 3)。在抗性群体中,检测到 3 种基因型: AA(如图 9 中 3 号个体)、AB(如图 9 中 9、10 号等个体)、BB(如图 9 中 4 号个体),抗性群体中各基因型分布频率见表 2。在易感群体中也检测到 3 种基因型: AA(如图 10 中 7 号个体)、AB(如图 10 中 9 和 10 号个体)、BB(如图 10 中 3 和 19 号个体)。易感群体中各基因型分布频率如表 2 所示。

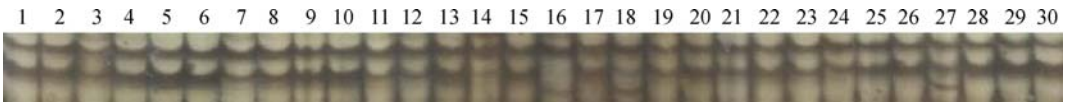


图 5 抗菌肽 PEN1-1 在中国明对虾 WSSV 抗性群体中的 SNP 分布
Fig. 5 SNP genotypes of penaeidin (PEN1-1) found in anti-WSSV population of *Fenneropenaeus chinensis*



图 6 抗菌肽 PEN1-1 在中国明对虾 WSSV 易感群体中的 SNP 分布
Fig. 6 SNP genotypes of penaeidin (PEN1-1) found in WSSV-susceptible population of *Fenneropenaeus chinensis*



图 7 抗菌肽 PEN3-1 在中国明对虾 WSSV 抗性群体中的 SNP 分布
Fig. 7 SNP genotypes of penaeidin (PEN3-1) found in anti-WSSV population of *Fenneropenaeus chinensis*

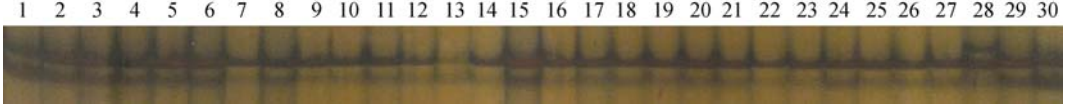


图 8 抗菌肽 PEN3-1 在中国明对虾 WSSV 易感群体中的 SNP 分布
Fig. 8 SNP genotypes of penaeidin (PEN3-1) found in WSSV-susceptible population of *Fenneropenaeus chinensis*



图 9 抗菌肽 PEN5-2 在中国明对虾 WSSV 抗性群体的 SNP 分布
Fig. 9 SNP genotypes of penaeidin (PEN5-2) found in anti-WSSV population of *Fenneropenaeus chinensis*

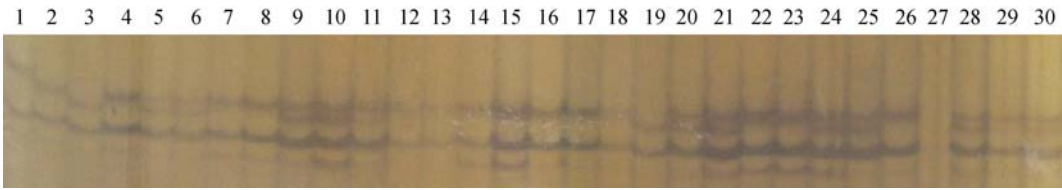


图 10 抗菌肽 PEN5-2 在中国明对虾 WSSV 易感群体中的 SNP 分布

Fig. 10 SNP genotypes of penaeidin (PEN5-2) found in WSSV-susceptible population of *Fenneropenaeus chinensis*

表 2 抗菌肽 PEN5-2 在中国明对虾 WSSV 抗性和易感个体中的 SNP 基因型频率分布

Tab. 2 SNP genotype distribution of penaeidin (PEN5-2) in anit-WSSV and WSSV-susceptible populations of *Fenneropenaeus chinensis*

群体 population	参数 parameter	基因型 genotype		
		AA	AB	BB
抗感群体 anti-WSSV population	个数 <i>n</i>	16	13	1
	总数 total		30	
	频率/% frequency	53.3	43.3	3.3
易感群体 WSSV-susceptive population	个数 <i>n</i>	12	15	2
	总数 total		29	
	频率/% frequency	41.4	51.7	6.9

卡方检验 (χ^2) 表明, $\chi^2 = 2.1 < \chi^2_{0.05,(2)} = 5.99$, $P > 0.05$, 故可以认为该 SNP 基因型在抗感和易感群体中的分布不存在显著差异, 即没有在抗感或者易感群体中发现明显与抗 WSSV 或易感 WSSV 病毒相关 SNP 基因型的存在。

3 讨论

对虾中的抗菌肽是组成型表达的基因类型, 其合成后通过血液运输到肠、鳃等器官, 并储藏于颗粒细胞或半颗粒细胞的细胞质中^[10]。本研究得到的结果与此相吻合, 肝脏是造血器官, 造出血液后即被运往其他组织器官储藏, 因此在肌肉、肠和鳃中均能检测到比肝胰腺组织中表达量更丰富的抗菌肽。虽然 3 种抗菌肽表现出明显的组织表达特异性, 但是就任何一个组织而言, 3 种抗菌肽的表达趋势基本一致, 如在感染 WSSV 病毒 0~120 h 的时间内, 3 种抗菌肽在鳃中的表达情况均为先上调表达, 再下降表达。这个结果也显示, 3 种抗菌肽在机体内各个组织中可能具有相似的生物学功能。事实上, 从已报道的水产动物

抗菌肽序列来看, 其多肽的氨基酸序列的同源性都比较低, 而且种间差异极大, 但也存在一些共同特征, 如结构上具有一定共性^[11]。由此可推测, 不同序列类型的抗菌肽行使相似的生物学功能。但是生物有机体为什么需要如此多类型的抗菌肽, 是否存在对某种病菌具有特定防御功能的抗菌肽, 这些都是有待深入研究的问题。本研究结果表明, 虽然不同抗菌肽类型在 0~120 h 区间内应答 WSSV 侵染表达的趋势类似, 但是在 156 h 时却表现出明显的不同, 如在肠中, 2 种抗菌肽类型表现为上调表达, 而 PEN5-2 却表现为下调表达。这是样品取样误差造成的还是不同抗菌肽类型本身的组织表达差异造成的, 还有待更深入地研究。

对虾肽和蚩素等海洋抗菌肽具有几丁质黏和结构域, 具有结合几丁质的能力, 因此对虾肽的释放过程与结合几丁质活动相关, 其负责几丁质的装配和对虾外骨骼的合成及伤愈, 特别是在蜕皮中对于对虾暴露于微生物感染时具有保护意义^[12]。目前的研究表明, 这些抗菌肽主要是针对细菌侵染具有防御功能, 对于病毒的防御功能还报道的不多。因此本研究希望进一步探讨不同抗菌肽类型对于目前危害对虾养殖业的 WSSV 病毒是否具有防御功能。如果某个基因在生物的生长或抗病等方面起着重要的作用, 一般不同的 SNP(Single Nucleotide Polymorphisms, 单核苷酸位点突变)所代表的各基因型相应的也会表现出一定的生物学功能差异^[13-15]。但是遗憾的是, 本研究没有发现与抗 WSSV 或者易感 WSSV 明显相关的 SNP 基因型。同时本研究发现几种抗菌肽的 SNP 位点均较少, 说明各抗菌肽基因是序列比较保守的一类, 这也间接说明这类基因在甲壳类生物免疫防御方面具有重要的作用, 但是可能主要体现在抵抗细

菌类侵染方面,而对于防御 WSSV 病毒上没有明显的作用。

需要指出的是,在筛选 SNP 位点时,在有些对虾个体中检测出 4 条带(属于标准的 SNP 突变类型),而有些则是 3 条带。在本研究中把这 2 种类型都归于突变类型。正如利用高效液相色谱技术检测 SNP 位点会出现检测出的多态性与某一特定序列突变位点并不存在一一对应的关系一样^[16],本研究中利用 PCR-SSCP 技术检测出来的 SNP 突变也可能并不全是某一个序列位点的突变,因此在以后深入研究中将对这些突变位点进一步的进行识别,但是可以肯定的是,谱型的不同说明这些对虾个体间确实存在着碱基组成上的差异。

参考文献:

- [1] 于道德, 宁璇璇, 任贵如, 等. 贻贝抗菌肽的研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 2(3): 100–104.
- [2] 李晓华, 陶冉, 孙杰. 对虾抗菌肽的研究进展及其在水产养殖业的应用前景[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 167–168.
- [3] 黄平, 章怀云. 鱼类抗菌肽研究进展[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(2): 170–174.
- [4] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) [J]. J Biol Chem, 1997, 272(45): 28398–28406.
- [5] Barracco M A, de Lorgeril J, Gueguen Y, et al. Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 250(1): 117–120.
- [6] Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, et al. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach[J]. Dis Aquat Organ, 2004, 61(1–2): 123–135.
- [7] 康翠洁, 王金星, 赵小凡, 等. 中国对虾抗菌肽成熟肽的 cDNA 克隆[J]. 山东大学学报: 理学版, 2002, 37(6): 552–556, 565.
- [8] Kang C J, Wang J X, Zhao X F, et al. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(4): 513–525.
- [9] Kang C J, Xue J F, Liu N, et al. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Mol Immunol, 2007, 44(7): 1535–1543.
- [10] Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, et al. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge[J]. J Cell Sci, 2000, 113(3): 461–469.
- [11] 王海静, 王福生, 边艳青, 等. 水产动物基因工程抗菌肽及其应用前景的研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(3): 100–104.
- [12] 洪旭光, 孙修勤, 张进兴, 等. 海洋抗菌肽研究进展[J]. 高技术通讯, 2004, 14(2): 105–110.
- [13] 王卓, 咎林森. 秦川牛 H-FABP 基因第 1 外显子 SNP 及其与部分肉用性状相关性的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(11): 11–15.
- [14] 刘福平, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及其生长相关的 SNPs 位点[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 817–823.
- [15] 唐永凯, 李建林, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼 MSTN 基因结构及其多态性与生长性状的相关性[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 44–51.
- [16] 刘德武, 杜颖军, 张豪, 等. 猪 Leptin 基因的 SNP 筛查及其与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 251–257.

Expression of three kinds of penaeidins after WSSV challenge and their SNPs detection in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*

GAO Huan^{1,2}, LAI Xiaofang^{1,2}, MENG Xianhong¹, LUO Kun¹, KONG Jie¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology; Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

Abstract: According to gene sequences, penaeidins (one kind of antibacterial peptide in shrimps) in genome of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, could be assorted into three kinds. In order to explore the expression differences among the three penaeidins after WSSV challenge, real-time quantitative PCR was used to detect the expression characteristics of these penaeidins at different time after WSSV challenge in Chinese shrimp. Shrimps used in the experiment came from the same parentage. After fed each individual the same dose of WSSV, 3–6 samples were collected at 0 h (uninfected), 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h and 156 h after infection. The individuals dying in three days were regarded as WSSV-susceptible population, while those still living after seven days were regarded as anti-WSSV population. The results showed that the expression of penaeidins was tissue specific in four tissues of hepatopancreases, muscles, gills, and intestines, and the richness of expression and expression tendency from 0 h to 156 h was significantly different ($P < 0.05$). However, as far as one tissue was concerned, the tendency of expression for three penaeidins was similar in the period from 0 to 120 hours after challenge. For example, the expression of three penaeidins' mRNA in hepatopancreas was 0 at 0 h, and increased at 6–24 h, then decreased at 48–120 h, however increased again at 156 h. The results suggest that the three kinds of penaeidins have the similar biology function, though their DNA sequences were different from each other. Additionally, in order to study the correlation between penaeidins and anti-WSSV character, SNPs of each penaeidin were screened using PCR-SSCP. No significant correlation was found between SNPs and anti-WSSV or between SNPs and WSSV-susceptive shrimps ($P > 0.05$). It seemed that the penaeidins of shrimps might mainly take part in resisting bacteria, not in resisting WSSV.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; penaeidin; SNP; expression difference; WSSV

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@sina.com