

# 白斑综合征病毒感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD* 基因的表达\*

刘鹏飞<sup>1,2</sup> 刘庆慧<sup>2,3①</sup> 吴 垠<sup>1①</sup> 黄 健<sup>2,3</sup>

(1. 大连海洋大学 大连 116023;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

**摘要** 为比较凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的氧化反应和信号转导相关基因在白斑综合征病毒(WSSV)感染中的变化情况,采用实时荧光定量PCR,分析WSSV感染凡纳滨对虾6、12、24、48、72 h后,鳃和类淋巴组织中硫氧还原蛋白(*TRx*)、p38信号通路(*LvP38*)、过氧化氢酶(*CAT*)及过氧化物酶(*POD*)在mRNA转录水平的变化。结果显示,感染对虾的类淋巴组织中,*TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD*在72 h时表达量最高,与对照组差异显著( $P < 0.05$ );而在鳃组织中,该4种基因在12 h时表达量最高,呈先升高后下降的趋势。推断*TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD*与WSSV感染密切相关。

**关键词** 凡纳滨对虾; WSSV; 硫氧还原蛋白; *LvP38*; 过氧化氢酶; 过氧化物酶

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0089-05

硫氧还原蛋白(Thioredoxin, *TRx*)是一种广泛存在于原核生物及真核生物、大小为12 kDa的多功能蛋白质,其含量在氧化反应中会升高(Miwa *et al.*, 2003),它与许多细胞反应相关,包括基因表达/调控、细胞增殖、细胞信号传导和细胞凋亡途径等(Holmgren, 1985)。丝裂酶原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内重要的信号转导系统之一(Antoniak *et al.*, 2013)。过氧化氢酶(Catalase, *CAT*)是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的抗氧化酶,具有催化 $H_2O_2$ 分解、防止羟自由基的形成、保护生物体组织免受毒害的重要作用(Wang *et al.*, 2013)。过氧化物酶(Peroxidase, *POD*)是一类从生物体中提取的氧化酶,通过氧化多种有害底物而防止羟自由基的形成(宋林生等, 2003)。

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)每年都会给对虾养殖业带来巨大的经济损失(Zhou, 1999; Lightner, 1996)。Tavares-Sánchez等(2004)研究

发现,WSSV感染导致对虾产生呼吸暴发并释放活性氧分子,但与氧化反应和信号转导相关基因在WSSV感染中的变化情况尚不十分清楚。

本研究采用实时定量PCR方法,从mRNA的转录水平来研究凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染WSSV后不同时间*TRx*、*LvP38*、*CAT*及*POD*在类淋巴及鳃组织中的表达变化情况,从而为凡纳滨对虾对WSSV感染的抗氧化防御及相关信号通路研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 WSSV和实验对虾

WSSV为中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室保存。凡纳滨对虾于2013年10月4日购自山东省青岛市崂山区沙子口对虾养殖厂,平均体长为(13.55±1.00) cm,

\* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、国家自然科学基金(30871942)和泰山学者"建设工程专项经费"共同资助。刘鹏飞, E-mail: 845171392@qq.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; 吴 垠, 教授, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn

收稿日期: 2014-07-02, 收修改稿日期: 2014-07-31

平均体重为(14.23±1.00) g, 经 PCR 检测不携带 WSSV, 在室温为(22±1)°C 的海水箱中暂养 7 d。

### 1.2 对虾感染

取 36 尾凡纳滨对虾, 其中 15 尾于腹部第 2 节注射 30  $\mu$ l PBS 作为对照组, 另取 15 尾于腹部第 2 节注射 30  $\mu$ l WSSV( $10^7$  个病毒粒子/ $\mu$ l)作为感染组。分别于处理前(即 0 h)和处理后的 6、12、24、48 和 72 h 取对照组和感染组各 3 尾虾, 分别装入无 RNA 酶的 EP 管中, 用液氮速冻, 置于-80°C 冰箱中保存, 备用。

### 1.3 总 RNA 的提取

分别提取对虾的鳃和肝胰腺的总 RNA。采用 TRIzol 法提取组织中的总 RNA。在各组织研磨后提取的上清液中加入 TRIzol(宝生物, 大连), 振荡混匀后静置 5 min; 加入 600  $\mu$ l 氯仿, 摇匀, 静置 5 min; 4°C、12000 r/min 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积异丙醇, 静置 10 min; 4°C、12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 沉淀中加入 1 ml DEPC 水配制的 75%乙醇溶液洗涤, 搅碎沉淀, 4°C、12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 室温放置干燥; 加入 20  $\mu$ l DEPC 水溶解, 分光光度计(Nano Drop 2000)测其纯度和浓度。

### 1.4 cDNA 的合成

按照 PrimeScript® RT Regent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real-Time)(TaKaRa)的说明书操作, 在 10  $\mu$ l 的体系中分别加入 5 $\times$ g DNA Eraser Buffer 2  $\mu$ l、g DNA Eraser 1  $\mu$ l、Total RNA 1  $\mu$ l、RNA Free dH<sub>2</sub>O 加至总体积 10  $\mu$ l, 42°C 变性 2 min, 4°C 冷却。在上述反应管中加入反转录反应体系, 包括 5 $\times$ Prime Script® Buffer 2 (for real-time) 4  $\mu$ l、PrimeScript® RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ l、RT Prime Mix 1  $\mu$ l、RNase Free dH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ l, 共 20  $\mu$ l 反应体系, 37°C、15 min, 85°C、5 s, 得到 cDNA, 以 NanoDrop 2000 测定浓度, 用 DEPC 水稀释为 50 ng/ $\mu$ l, 储存于-20°C 冰箱中。

### 1.5 引物

根据已报道的  $\beta$ -actin、TRx、LvP38、CAT、POD 引物序列(表 1), 送交生工生物工程(上海)有限公司合成。

### 1.6 Real-time PCR 分析

以得到的 cDNA 为模板, 分别用  $\beta$ -actin(内参)、TRx、LvP38、CAT、POD 引物进行荧光定量 PCR(表 1)。25  $\mu$ l 反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq™ (2 $\times$ ) 12.5  $\mu$ l、cDNA 模板 1  $\mu$ l、上下游引物各 0.5  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L)、

表 1 引物序列

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
$\beta$ -actinF	CATCAAGGAGAACTGTGCT
$\beta$ -actinR	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT
TRxF(Tavares-Sánchez <i>et al</i> , 2004)	TTAACGAGGCTGGAAACA
TRxR	AACGACATCGCTCATAGA
P38F	TGCTGAACTCAAAGGGCTACAC
P38R	AGTGGACGGTTGGATAACATTTC
CATF(Tavares-Sánchez <i>et al</i> , 2004)	CAAGTGGCGATTACCCCTCAT
CATR	CCCATGAGGCCATACTTTGGT
PODF(Liu <i>et al</i> , 2005)	TGGACCTCGCGGGAGAT
PODR	GACCGATAGCCACCATGCTT

DEPC 水 10.5  $\mu$ l。在 Bio-Rad CFX Manager 荧光定量 PCR 仪的反应条件: 94°C 预变性 30 s; 94°C 变性 30 s, 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 45 个循环; 72°C 延伸 10 min。 $\beta$ -actin(内参)、TRx、LvP38、CAT 的退火温度为 60°C, POD 的退火温度为 61°C。

### 1.7 统计分析

根据 Rotor Gene 3000 仪器自带软件采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法, 以 0 h 的实验组为基准, 以 PBS 组为对照组, 进行 PCR 结果分析, 采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 组间数比较用 LSD *t* 检验, 显著性检验水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 TRx、LvP38、CAT 和 POD 在类淋巴组织中的表达

TRx、LvP38、CAT 和 POD 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的基因表达量均在 72 h 时达到最高值, 分别为对照组表达量的 5.4 倍、9.5 倍、37 倍和 18.5 倍, 两组间存在显著性差异; 而在 6、12、24、48 h 时, WSSV 感染组与对照组间的基因表达量无显著性差异(图 1-A、图 1-B、图 1-C、图 1-D)。

### 2.2 TRx、LvP38、CAT 和 POD 在鳃组织中的表达

TRx 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在 12 h 达到最高值, 约为对照组表达量的 13 倍, 两组间存在显著性差异; 在 24 h 时, 其基因表达量显著下降, 而在 48 h 与 72 h 时又逐步升高, 且在该时间段, 感染组与对照组之间存在显著性差异(图 1-E)。

LvP38 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在 12 h 达到最高值, 约为对照组表达量的 9.3 倍, 两

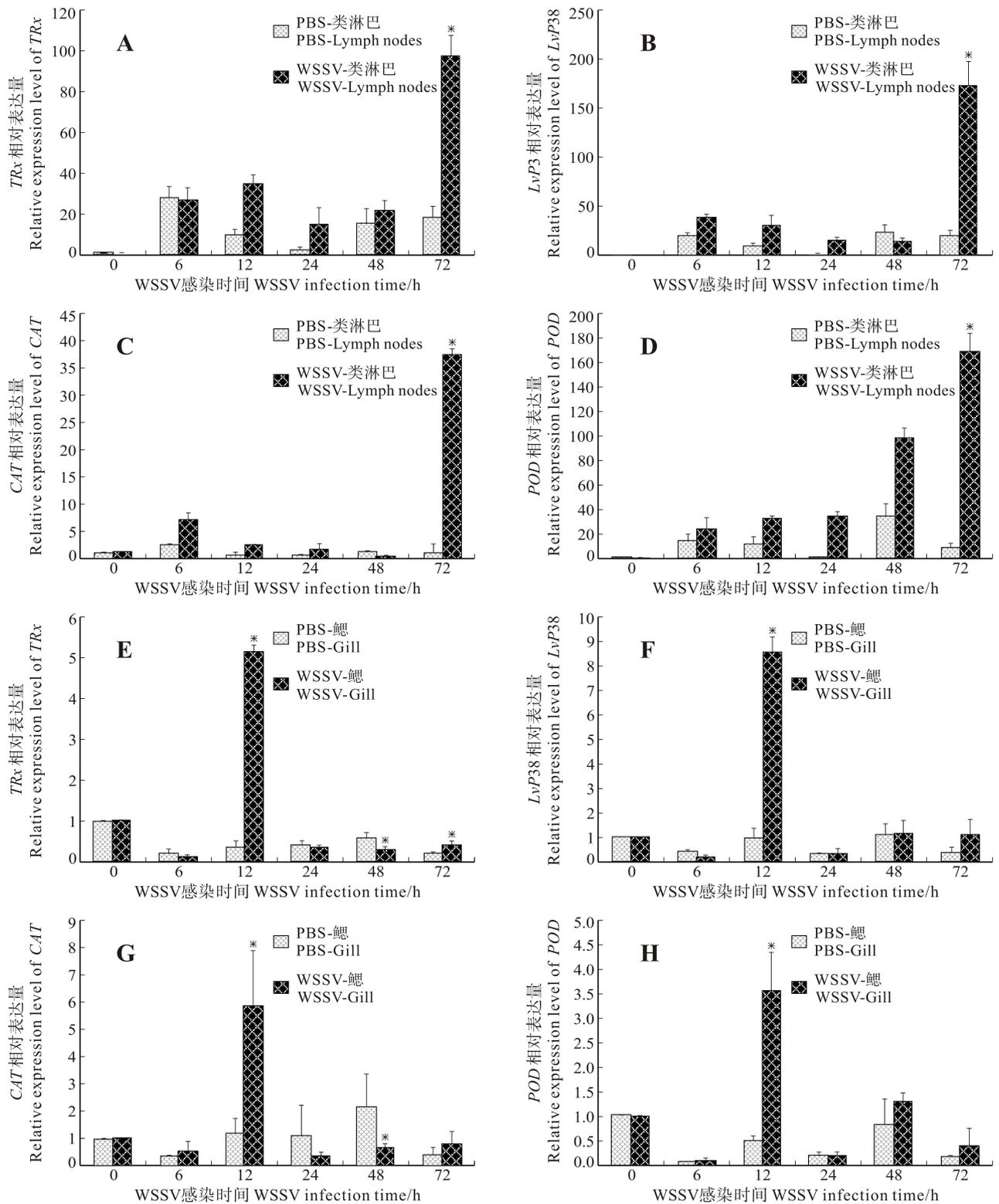


图 1 凡纳滨对虾类淋巴和鳃中 *TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD* 的表达量  
Fig.1 Relative expression levels of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* in lymph nodes and gill of *L. vannamei*

星号(\*)表示各 WSSV 感染组与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )

Asterisks denote statistically significant differences between WSSV infection groups and the control ( $P < 0.05$ )

组间存在显著性差异; 在 24 h 时, 其基因表达量显著下降, 而在 48、72 h 时又逐步升高, 但两组间不

存在显著性差异(图 1-F)。

*CAT* 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在

12 h 达到最高值, 约为对照组表达量的 5.2 倍, 两组间存在显著性差异; 在 24 h 时, 其基因表达量显著下降, 而在 48、72 h 时又逐步升高, 且在 48 h 时, 对照组的基因表达量约为 WSSV 感染组的 3.2 倍, 两组间存在显著性差异(图 1-G)。

*POD* 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在 12 h 达到最高值, 约为对照组的 7.1 倍, 两组间存在显著性差异; 其他时刻两组间无显著性差异(图 1-H)。

### 3 讨论

鳃是对虾等甲壳动物的主要呼吸器官, WSSV 主要通过鳃及口腔进入到虾体内, 而类淋巴组织是对虾机体的主要免疫器官, 因此, 本研究选取对虾的鳃和类淋巴组织作为研究样品(Lei *et al*, 2002; Rameshthangam *et al*, 2006; Alday-Sanz *et al*, 2002)。本研究发现, *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 在感染 WSSV 的对虾类淋巴与鳃中的表达量不尽相同, 而在对照组中无显著变化, 表明这 4 种基因与 WSSV 感染密切相关。在感染 72 h 时, 对虾类淋巴组织中的 *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 的 mRNA 转录表达量显著高于对照组。而在感染的鳃组织中, *TRx* 的转录表达量在 12、48、72 h 时, 与对照组间存在显著性差异。实验组与对照组 *POD* 与 *LvP38* 在 12 h 时的转录表达量存在显著性差异, 而 *CAT* 在 12 和 48 h 时的转录表达量存在显著性差异。比较类淋巴与鳃组织各基因 mRNA 含量及变化可以看出, *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 在类淋巴组织的含量显著高于鳃组织, 且 4 种基因在类淋巴组织中对 WSSV 响应变化在 72 h 达到最高, 而在鳃组织中 4 种基因对 WSSV 响应变化在 12 h 达到最高, 说明类淋巴组织是对虾氧化反应的一个重要器官。

Ren 等(2010)研究表明, 在感染对虾 6–24 h 期间, *TRx* 在鳃组织中含量升高, 这与本研究感染组对虾鳃组织中 *TRx* 表达量的变化类似。但在感染对虾的类淋巴组织中, *TRx* 的表达量在 72 h 达到最高, 说明类淋巴与鳃组织的免疫响应不同。

Antoniak 等(2013)研究表明, p38 在宿主的免疫防护过程中可以通过产生细胞因子而抵御病毒的侵袭。通过激活 p38 MAPK 通路, 可以促进仙台病毒诱导 I IFNs 和 IL-12 基因表达量的增加, 从而在抗病毒中起到重要作用(Mikkelsen *et al*, 2009)。本研究表明, *LvP38* 的表达量在感染 WSSV 的病虾的类淋巴组织中 72 h 时达到最高, 而在鳃组织中 12 h 时达到最高, 表明 *LvP38* 参与 WSSV 的感染并起到了一定作用。

刘庆慧等(2005)认为, 对虾群体在 WSSV 感染初期 *CAT* 迅速增加, 而后随着 WSSV 的增殖, *CAT* 逐

渐下降, 这可能是由于一方面 WSSV 的增殖可抑制 *CAT* 的表达量, 另一方面对虾肌体中 *CAT* 可能也参与免疫反应。本研究结果表明, *CAT* 的表达量在感染 WSSV 的病虾鳃组织中 12 h 时达到最高, 而在之后的时间段内逐渐下降且表达量很低, 这与该结论相符合。但其在感染 WSSV 的病虾类淋巴组织中却是 72 h 时达到最高, 说明类淋巴与鳃组织的免疫响应不同。

本研究表明, 在感染 WSSV 对虾的类淋巴组织中, *POD* 的表达量在 72 h 达到最高, 这与王专伟等(2011)报道的感染 WSSV 的斑节对虾血清 *POD* 活性在 60 h 达到最大值的观点相似, 而在感染 WSSV 对虾的鳃组织中, *POD* 的表达量则是在 12 h 达到最高, 之后又逐渐降低, 这与雷质文等(2001)、邱德全等(2007)认为感染后期 *POD* 活性降低的观点相同。由此可知, 这既可能与对虾种类不同有关, 也可能与所取对虾的不同组织有关。

综上所述, 本研究通过荧光定量 PCR 的方法分析了 *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 在感染 WSSV 的对虾类淋巴与鳃组织中, 72 h 内转录表达量的变化趋势, 说明这 4 种基因与 WSSV 感染密切相关。该研究可为探讨凡纳滨对虾的氧化反应和信号转导相关因子参与 WSSV 过程提供依据。

### 参 考 文 献

- 王专伟, 黄建华, 杨其彬, 等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1851–1854
- 刘庆慧, 黄健, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22–27
- 邱德全, 杨士平, 邱明生. 氨氮促使携带白斑综合症病毒凡纳滨对虾发病及其血细胞、酚氧化酶和过氧化氢酶变化. 渔业现代化, 2007, 34(1): 36–39
- 宋林生, 苏建国, 蔡中华, 等. 正常与感染白斑病的凡纳滨对虾几项免疫指标变化的初步研究. 北京: 科学出版社, 2003, 335–340
- 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46–51
- Alday-Sanz V, Roque A, Turnbull JF. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org, 2002, 48(2): 91–99
- Antoniak S, Owens AP 3rd, Baunacke M, *et al*. PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection. J Clin Invest, 2013, 123(3): 1310–1322
- Holmgren A. Thioredoxin. Annu Rev Biochem, 1985, 54: 237–271
- Lei ZW, Huang J, Mo ZL. Pathological research on white spot syndrome virus (WSSV) of *Exopalaemon carinicauda* artificially infected by WSSV. Chin J Vet Sci Technol, 2002, 32(10): 23–25

- Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996, 304–307
- Liu CH, Cheng W, Chen JC. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesized in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18(5): 431–444
- Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, *et al.* RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem*, 2009, 284(16): 10774–10782
- Miwa K, Kishimoto C, Nakamura H, *et al.* Increased oxidative stress with elevated serum thioredoxin level in patients with coronary spastic angina. *Clin Cardiol*, 2003, 26(4): 177–181
- Rameshthangam P, Ramasamy P. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 2006, 254(1–4): 32–39
- Ren Q, Zhang RR, Zhao XF, *et al.* A thioredoxin response to the WSSV challenge on the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2010, 151(1): 92–98
- Tavares-Sánchez OL, Gómez-Anduro GA, Felipe-Ortega X, *et al.* Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem Physiol B*, 2004, 138(4): 331–337
- Wang C, Yue X, Lu X, *et al.* The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(1): 91–99
- Zhou HM. Study of morphology and tissue pathology of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon*. *J Xuzhou Normal Univ (Natural Science Edition)*, 1999, 17(4): 59–62

(编辑 冯小花)

## Expression of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* Gene of *Litopenaeus vannamei* Response to WSSV Infection

LIU Pengfei<sup>1,2</sup>, LIU Qinghui<sup>2,3①</sup>, WU Yin<sup>1①</sup>, HUANG Jie<sup>2,3</sup>

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

**Abstract** In order to understand the change in the expression of genes associated with the oxidation and the signaling pathway, we infected the shrimp with the white spot syndrome virus, then we used quantitative real-time PCR to analyze the mRNA expression of thioredoxin (*TRx*), *Litopenaeus vannamei* p38 (*LvP38*), catalase (*CAT*), and peroxidase (*POD*) genes in the lymph nodes and gill of the shrimp at different time points after the infection (0, 6, 12, 24, 48 and 72 h). The shrimps were divided into two groups (the WSSV-injected group and the PBS-injected group), and we collected 3 shrimps from each group at 0, 6, 12, 24, 48, and 72 h after the injection, and isolated individual samples of the lymph nodes and gills. After the extraction of the total RNA, we synthesized and quantified the first-strand cDNAs with a kit and NanoDrop 3000 respectively, and performed quantitative real-time PCR using Rotor Gene 3000. The results showed that in the WSSV-injected group, the expression levels of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* in lymph nodes reached the maximum at 72 h post infection, and there was no significant difference between the WSSV-injected group and the PBS-injected group during the period of 6–48 h. The expression level in the gill of the WSSV-injected group was the highest at 12 h post infection, and then decreased over time. Significant differences in *TRx* mRNA expression were observed at 48 h and 72 h, and there was a significant difference in *CAT* mRNA expression at 48 h between the WSSV-injected group and the PBS-injected group. Our data indicated that *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* might be correlated with the WSSV infection.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; White spot syndrome virus; *TRx*; *LvP38*; *CAT*; *POD*

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; WU Yin, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn