

凡纳滨对虾E75基因可变剪切形式的鉴定与分析

杜江丽^{1,2,3}, 张晓军^{1,2*}, 张小溪^{1,2,3}, 袁剑波^{1,2},
高 羿^{1,2}, 李富花^{1,2}, 相建海^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: E75是对虾蜕皮激素信号通路的关键调控因子。为了深入了解E75基因的结构和功能, 本实验从转录组数据中筛选得到注释为凡纳滨对虾E75基因的转录本, 经与基因组序列比对分析, 鉴定发现凡纳滨对虾E75基因至少存在6种可变剪接体, 分别命名为LvE75-1、LvE75-2、LvE75-3、LvE75-4、LvE75-5和LvE75-6。其中LvE75-1/2/4/5/6均包含DBD和LBD结构域, 与果蝇E75A/C有相同的结构域, 而LvE75-3仅包含LBD结构域, 与果蝇E75D相同。在凡纳滨对虾蜕皮过程中, LvE75-1/2/3/4在D3~D4时期高表达, 而LvE75-5和LvE75-6表达量很低。在成体组织中, LvE75各种剪切形式在所有检测的组织中均有表达, 且在表皮、肠和鳃中表达较高, 在肝脏、血细胞和淋巴组织中仅LvE75-3表达较高。实验通过双链RNA干扰LvE75基因的表达, 在干扰样品中, 检测到Halloween基因中的spo、phm和dib表达下调, shd表达上调, 表明LvE75可能通过调控Halloween基因的表达来影响蜕皮激素的合成; 同时E75基因的干扰也使同为蜕皮激素早期应答基因的Br-C基因和Ftz-F1基因表达下调, HR3基因表达上调, 表明LvE75基因对蜕皮信号通路上下游基因均有作用。在LvE75基因持续干扰12 d后, 凡纳滨对虾的蜕皮率显著低于对照组, 而死亡率显著高于对照组, 说明LvE75基因对凡纳滨对虾的蜕皮和生存具有重要作用。

关键词: 凡纳滨对虾; E75基因; 蜕皮; 可变剪接; RNA干扰

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

蜕皮激素信号通路在蜕皮动物(ecdysozoa)的各种生命过程中起着重要的作用。蜕皮激素通过结合、激活异源二聚体核受体EcR/RXR, 调控下游应答基因, 如E75、BR-C、E74、HR3和FTZ-F1等基因的转录, 通过控制一系列效应基因的表达, 参与多种生理过程, 如胚胎发育、变态发育、生长、蜕皮和繁殖等^[1-3]。在甲壳动物中, 蜕皮激素以类固醇为原料, 在头胸部的Y-器官中合成。细胞色素P450基因家族中的Halloween基因是蜕皮激素合成的关键基因, 包括

spo、phm、sad、dib、shd等, 它们编码的一系列单加氧酶, 催化胆固醇转化成有活性的20E (20-hydroxyecdysone, 20-羟基蜕皮酮)或PoA (ponasterone A, 百日青蜕皮酮)^[2, 4]。在昆虫蜕皮激素信号通路中, E75属于早期应答基因, 其编码蛋白E75(ecdysone-induced protein 75)是调控下游响应因子的关键转录因子。在哺乳动物中, E75存在2种同源基因, NR1D1和NR1D2, 其中NR1D2和heme蛋白结合后, 在NO作用下, 可以调节生理节律^[5-6]。

收稿日期: 2018-01-08 修回日期: 2018-06-24

资助项目: 国家自然科学基金(31672632, 31702320, 41876167)

通信作者: 张晓军, E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) *E75*基因通过可变剪切可以编码4种蛋白, 分别为E75A、E75B、E75C和E75D, 在结构上分为6个区域, 从氨基端到羧基端依次划分为A~F区: 氨基端的A/B区为转录激活结构域, 保守性低; C区为高度保守的DNA结合结构域(DNA binding domain, DBD); D区为可变的铰链区; 羧基端E/F区含有配体结合域(ligand binding domain, LBD)^[7]。家蚕(*Bombyx mori*) *E75*基因也编码4种可变剪切体, 由于转录时选择不同的启动子和5'端外显子而产生, 包括E75A、E75B、E75C和E75D^[8]。黑腹果蝇和家蚕的4种*E75*可变剪切体都有完整的LBD结构域, 在DBD结构域方面, E75A/C有完整的DBD结构域, 含2个C4型锌指结构, E75B有部分DBD结构域含1个C4型锌指结构, 而E75D缺少DBD结构域, 无法和DNA结合^[9-10]。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属甲壳动物亚门(Crustacea)、十足目(Decapoda)、对虾科(Penaeidae), 是我国虾类养殖中最重要的经济品种。目前有关对虾蜕皮信号通路相关基因的研究较少。本实验在对多个转录组和基因组数据信息分析的基础上, 对凡纳滨对虾*E75*基因的可变剪接体和组织分布进行分析, 旨在了解凡纳滨对虾*E75*基因的结构、功能及各组织间的表达情况; 同时通过dsRNA干扰实验, 分析*LvE75*基因对蜕皮激素信号通路上下游基因的影响及对蜕皮的作用, 为了解对虾蜕皮激素信号通路调控对虾生长和发育提供基础。

1 材料与方法

1.1 序列鉴定

基于实验室已有的凡纳滨对虾不同发育时期、不同蜕皮时期和成虾不同组织3批转录组数据(SRA注册号: SRR1460493、SRR1460494、SRR1460495、SRR1460504、SRR1460505、SRX1098368、SRX1098369、SRX1098370、SRX1098371、SRX1098372、SRX1098373、SRX1098374和SRX1098375)^[11-12], 筛选所有注释为*E75*基因的Unigenes或转录本(transcripts)。筛选到的序列经过去冗余, 用Cap3软件(<http://doubi.prabi.fr/software/cap3>)进行拼接, 拼接后的序列提交NCBI网站通过Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行Nr检索; 然后将鉴定的序列提

交ORF Finder软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析各转录本的ORF序列, 并翻译成氨基酸序列; 后者提交SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行结构域分析。基于*E75*基因的氨基酸序列, 用MEGA 5.0软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.2 实验材料

实验所用的凡纳滨对虾来自中国科学院海洋研究所水族楼。挑选健康均匀的个体, 平均体质量(1.12±0.34) g, 暂养在饲养缸中, 使其适应环境, 水温维持在(25±1) °C, 持续充气, 每天早中晚投喂饲料3次, 次日早上清除残余饲料和粪便, 每日定时更换1/2海水。

1.3 总RNA的提取与cDNA合成

凡纳滨对虾组织总RNA用RNAiso Plus试剂(TaKaRa, 日本)提取, 所有操作按照实验操作指南进行。RNA的质量通过1%琼脂糖凝胶电泳检测, RNA浓度在Nanodrop2000(Thermo Fisher Scientific, 美国)上测定。使用Prime Script反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)通过二步法将RNA反转录cDNA, 所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 基因克隆验证

根据筛选获得的*LvE75*基因序列设计PCR引物, 扩增ORF全长引物由上海生工生物工程有限公司(上海)合成(表1)。PCR反应体系: cDNA模板1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL, 2×Ex-Taq mix 12.5 μL, 加水至总体积25 μL。PCR反应条件: 95 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 54 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 共40个循环; 72 °C延伸10 min; 4 °C保存。取1 μL PCR扩增产物, 进行1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。将目的片段产物按照胶回收试剂盒(OMEGA, 中国)说明进行纯化, 并连接至pMD-19T载体, 转化至感受态细胞, 经菌落PCR检测为阳性克隆后送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 *LvE75*基因表达分析

通过分析本实验室的凡纳滨对虾不同蜕皮时期和成虾不同组织的转录组数据, 根据RPKM (reads per kilobase per million mapped reads)值评估*LvE75*基因各种剪切形式在蜕皮过程以及不同组织中的表达量和表达模式($P<0.05$)。

表 1 核苷酸引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primer sequences

引物名 primers	引物序列5'-3' primer sequences from 5' to 3'
LvE75 F	TTCTCCGGTGCTGTAATGTGTC
LvE75 R	CCGAGTTTAGGGCGGGTTT
LvE75-qF	GATACATTCAGGCTTGGGTGC
LvE75-qR	TGTCCGCCTGAGAGTGAGAATA
18s-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18s-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
dsE75-F	TAATACGACTCACTATAGGGGTTGCAGA CTCATATCGTCGTC
dsE75-R	TAATACGACTCACTATAGGGGGCAGA CGTTTGCAAATTC
dsEGFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGCT TCAGCCGTACCC
dsEGFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGTTCAC CTTGATGCCGTTCTT
Lvspo-qF	AAAGTATGGAGACTGCCCTT
Lvspo-qR	GCCGAAGTACAGCCCAA
Lvdib-qF	TTTTATCCATACCGCTCCT
Lvdib-qR	TGTTTGATACCCCTTTA
Lvpdm-qF	AGTTAGCCGAGGAGAGCGA
Lvpdm-qR	TGCGGGAGGTATCTCAGACAA
Lvsad-qF	CCTAAAATCCGCATCGTGG
Lvsad-qR	GGAACCTGCTGGTACGTCTTG
LvHR3-qF	GGTTAGTATGAAGTGGACAAT
LvHR3-qR	ATCAAGCCCATCATTACGTT
LvFzt-f1-qF	ACACACATTAGTACGGGGG
LvFzt-f1-qR	CATTAGAGTCGGGGTCAAC
LvBr-C-qF	CCCCACACTCCTGTACTAA
LvBr-C-qR	TAACCTGGTATCCTGCGG

1.6 LvE75基因干扰实验

根据LvE75基因序列的保守区设计正反向引物, 两端加T7启动子序列如表1所示。PCR扩增反应程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共进行40个循环; 最后72 °C延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物, TIAN gel Midi纯化试剂盒(Tiagen, 中国)纯化。纯化后产物作为模板合成dsRNA, 选择TranscriptAid T7 High Yield转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国)。RNA酶消化反应评估dsRNA稳定性, Nanodrop2000检测dsRNA

浓度。所有合成的dsRNA冻存在-80 °C冰箱, 以备后续使用。

为了解LvE75基因最佳干扰剂量, 进行2组实验, 分别为dsLvE75和dsEGFP组, 每组设立3个dsRNA注射剂量, 分别为1、2和4 μg/尾。注射部位为对虾倒数第三腹节。48 h后, 每组随机挑选4尾, 取头胸部, 置于冻存管, -80 °C保存, 用于后续RNA提取。干扰后各样品的E75基因表达量通过荧光定量PCR检测, 选取E75基因干扰效率最佳的剂量进行后续研究。

正式的RNA干扰实验将凡纳滨对虾分成2组, 分别注射dsLvE75和dsEGFP, 每组内设置3个重复实验, 每个实验组注射20尾对虾, 共计120尾。在dsLvE75组和dsEGFP组中, 注射剂量为2 μg/尾。每天记录每组凡纳滨对虾的蜕皮数目和死亡数目, 持续观察12 d, 每组4 d后再经过一次同剂量的注射, 共注射2次dsRNA, 累计计算蜕皮率和死亡率。

1.7 荧光定量PCR检测

以18S rRNA作为内参基因, 采用SYBR Green染料法检测LvE75基因在被干扰后的表达量变化, 以及蜕皮信号通路上游基因4个Halloween基因(*spo*、*dib*、*pdm*、*sad*)和下游*Br-C*、*Ftz-f1*和*HR3*基因表达变化。各基因的引物见表1。荧光定量PCR扩增体系: cDNA模板1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各0.3 μL, 2×SuperReal PreMix Plus 5 μL, 加无RNA水至总体积10 μL。qPCR反应程序: 95 °C, 预变性2 min; 95 °C变性15 s, 56 °C退火15 s, 72 °C延伸20 s, 共进行40个循环。反应结束后, PCR产物进行升温变性作熔解曲线, 检测扩增片段的特异性。每个组织样品检测时设置4个平行重复, 采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来处理实验数据, 以18S rRNA基因的表达情况作为参照, 计算基因的相对表达量。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾E75基因的鉴定和isoforms分析

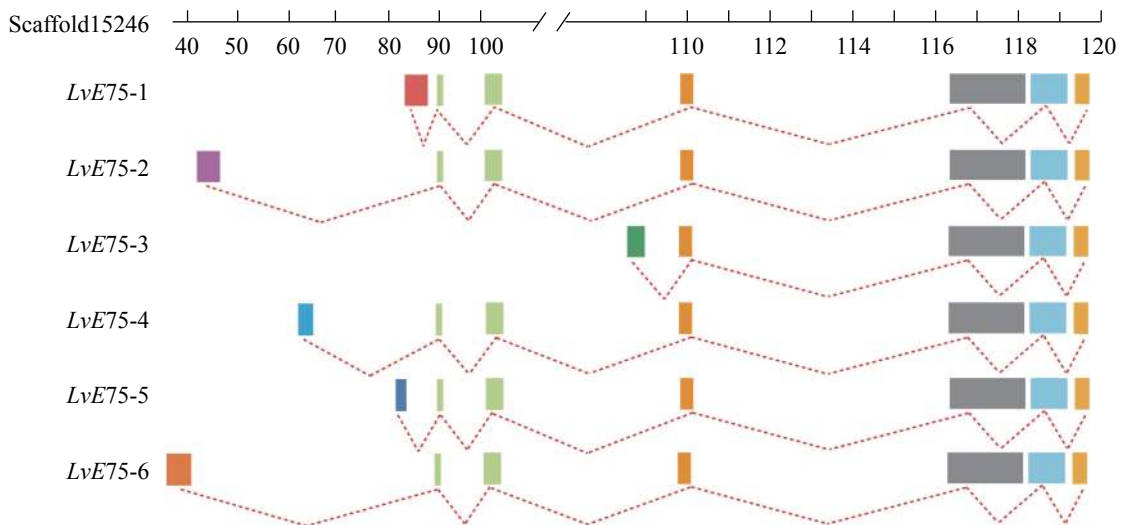
从凡纳滨对虾3组转录组中共筛选得到的12条E75转录本, 经过冗余、Blastx比对和克隆测序鉴定, 得到6条E75基因序列(表2)。通过与基因组序列比对和分析, 6条cDNA序列来自于基因组上同一条基因(图1)。这些序列与果蝇的E75

表2 *LvE75*基因6种可变剪切异构体的序列信息

类型 isoform	转录本编号 transcript ID	长度/bp length	ORF	DBD	LBD	类型 type	GenBank 登录号 accession no.
<i>LvE75-1</i>	CL772.Contig4_All LvaPBhq_59544_3585	3 585	399~2 789(795aa)	√	√	A/C	MG748159
<i>LvE75-2</i>	Unigene0072455-1 c76549_g1	4 012	845~3 229(794aa)	√	√	A/C	MG748160
<i>LvE75-3</i>	CL772.Contig1_All LvaPBhq_38280	3 246	291~2 450(718aa)		√	D	MG748161
<i>LvE75-4</i>	CL772.Contig2_All	2 115	461~2 115(551aa)	√	√	A/C	MG748162
<i>LvE75-5</i>	CL772.Contig3_All LvaPBhq_61458	3 421	207~2 159(650aa)	√	√	A/C	MG748163
<i>LvE75-6</i>	Unigene262_All	3 112	954~>3 110(711 aa)	√	√	A/C	MG748164

可变剪切异构体进行比较, 可以比对上果蝇的 *E75A/C/D* 类型异构体。因此将凡纳滨对虾中得到的6种转录形式, 分别名为 *LvE75-1*、*LvE75-2*、*LvE75-3*、*LvE75-4*、*LvE75-5*和*LvE75-6*。其中4种剪切体具有完整的开放阅读框(open reading frame, ORF): *LvE75-1*的ORF全长为2 388 bp, 编码796个氨基酸; *LvE75-2*的ORF全长为2 382 bp, 编码794个氨基酸; *LvE75-3*的ORF全长为2 157 bp, 编码718个氨基酸; *LvE75-5*的ORF全长为1 953 bp, 编码650个氨基酸; 另外, *LvE75-4*和*LvE75-6*的

ORF分别为1 657 bp编码551个氨基酸和2 160 bp编码719个氨基酸, 但可能不完整。将6种转录本预测的氨基酸序列通过ClustalW2软件进行序列比对分析, 序列间的差异在于A/B区域(图2)。对*LvE75*氨基酸序列进行多重比对, 结果显示*LvE75*具有其他物种*E75*家族的典型特点, 包含调控DNA识别的P-box、D-box和DBD区域以及LBD区域(图3)。*LvE75*基因6种可变剪切异构体中均存在LBD结构域, 而对于DBD结构, *LvE75-1*、*LvE75-2*、*LvE75-4*、*LvE75-5*和*LvE75-6*均具有DBD结构域且包含

图1 凡纳滨对虾 *E75*基因6种可变剪切形式的基因组定位

方框代表外显子区域, 虚线表示内含子区域

Fig. 1 Genomic location of the six alternatively spliced isoforms of *L. vannamei E75* gene

The rectangle boxes stand for exons, and dotted lines stand for introns

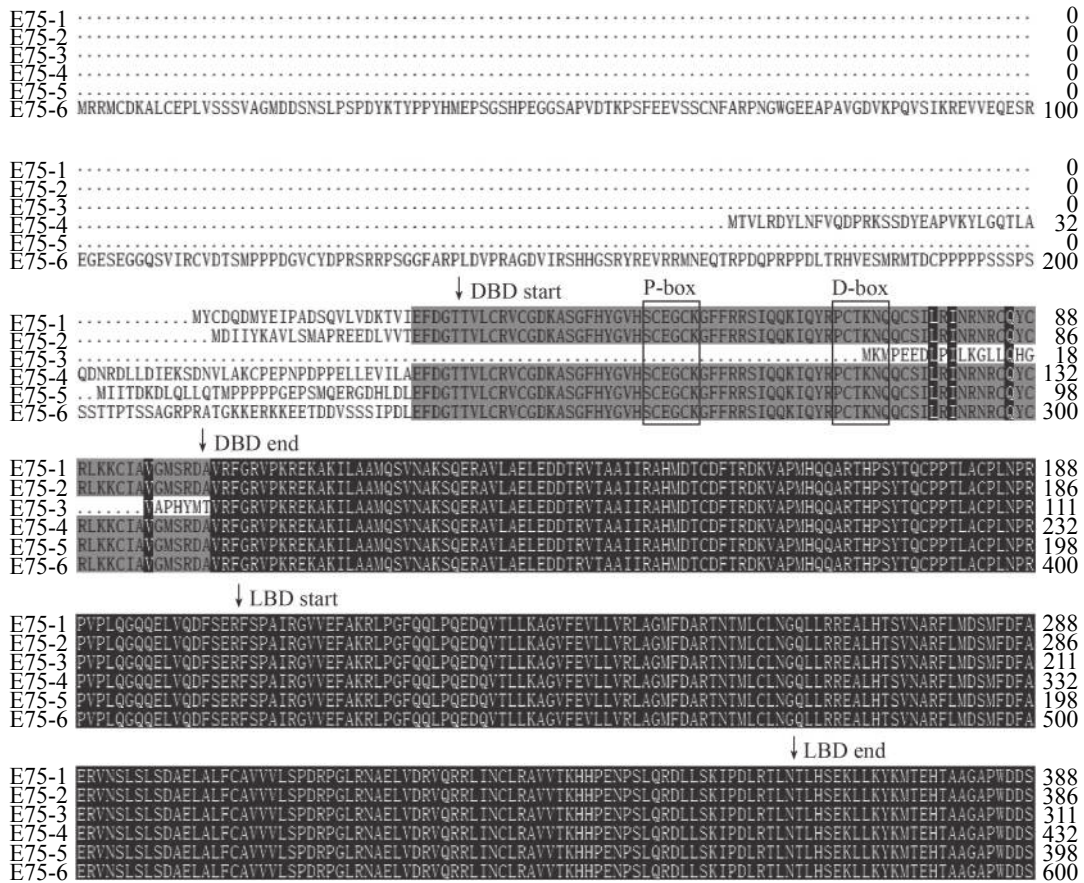


图 2 6种LvE75可变剪切形式预测的氨基酸序列比较

Fig. 2 Deduced amino acid sequences comparison of six alternatively spliced *LvE75* isoforms

2个C4锌指结构, 而*LvE75-3*没有DBD结构域。在凡纳滨对虾基因组中检索发现*E75*基因定位于1条scaffold (Scaffold15246)上, 表明*E75*基因可能为单拷贝。通过基因结构比对发现, 6种*LvE75*基因异构体是由于5'端mRNA进行可变剪切产生的(图1), *E75*氨基酸序列的NJ系统进化分析见图4。

2.2 *LvE75*基因各可变剪切形式在蜕皮周期和不同组织中的表达分布

在凡纳滨对虾不同蜕皮时期中, *LvE75*基因的6种可变剪切形式都有表达。*LvE75-1*、*LvE75-2*和*LvE75-4*的表达模式相近, 表达量在D2期后开始迅速升高, D4时期达到最高, P1时期迅速下降, 呈现先升高再降低的倒V型表达模式, 在其他时期表达量较低; *LvE75-3*在所有蜕皮时期中均呈现高表达, 在D1期表达开始升高, D4时期达到最高, P1~P2时期逐渐下降; 而*LvE75-5*和*LvE75-6*在整个蜕皮过程中表达量普遍较低(图5)。

在凡纳滨对虾不同组织中, *LvE75-1*、*LvE75-2*和*LvE75-4*有类似的组织分布, 在表皮、肠、胃、

神经、眼柄等组织中表达较高, 在肝胰脏、血细胞和淋巴组织中表达较低; *LvE75-3*在所有检测组织中都呈现高表达; *LvE75-5*在表皮、鳃和胃组织中表达量较高; *LvE75-6*在所有检测组织中表达量均很低(图6)。

2.3 *LvE75*基因干扰剂量

为了优化ds*LvE75*干扰剂量, 实验设置3个注射剂量, 1、2和4 μg/尾, 注射48 h后每组随机选择4尾对虾取头胸部组织, 提取总RNA用1%琼脂糖凝胶电泳检测结果。各个总RNA样品反转录成cDNA后, 采用荧光定量PCR检测*E75*基因在头胸部的表达情况, 以确定合适的干扰剂量。注射1和2 μg/尾的样品中, *E75*基因的表达量显著低于对照组, 但2 μg/尾干扰效果最好(图7)。

2.4 *LvE75*基因沉默对蜕皮激素信号通路上下游基因表达的影响

为了探究*E75*基因对蜕皮激素信号通路的上下游基因的调控作用, 利用*LvE75*沉默后的cDNA

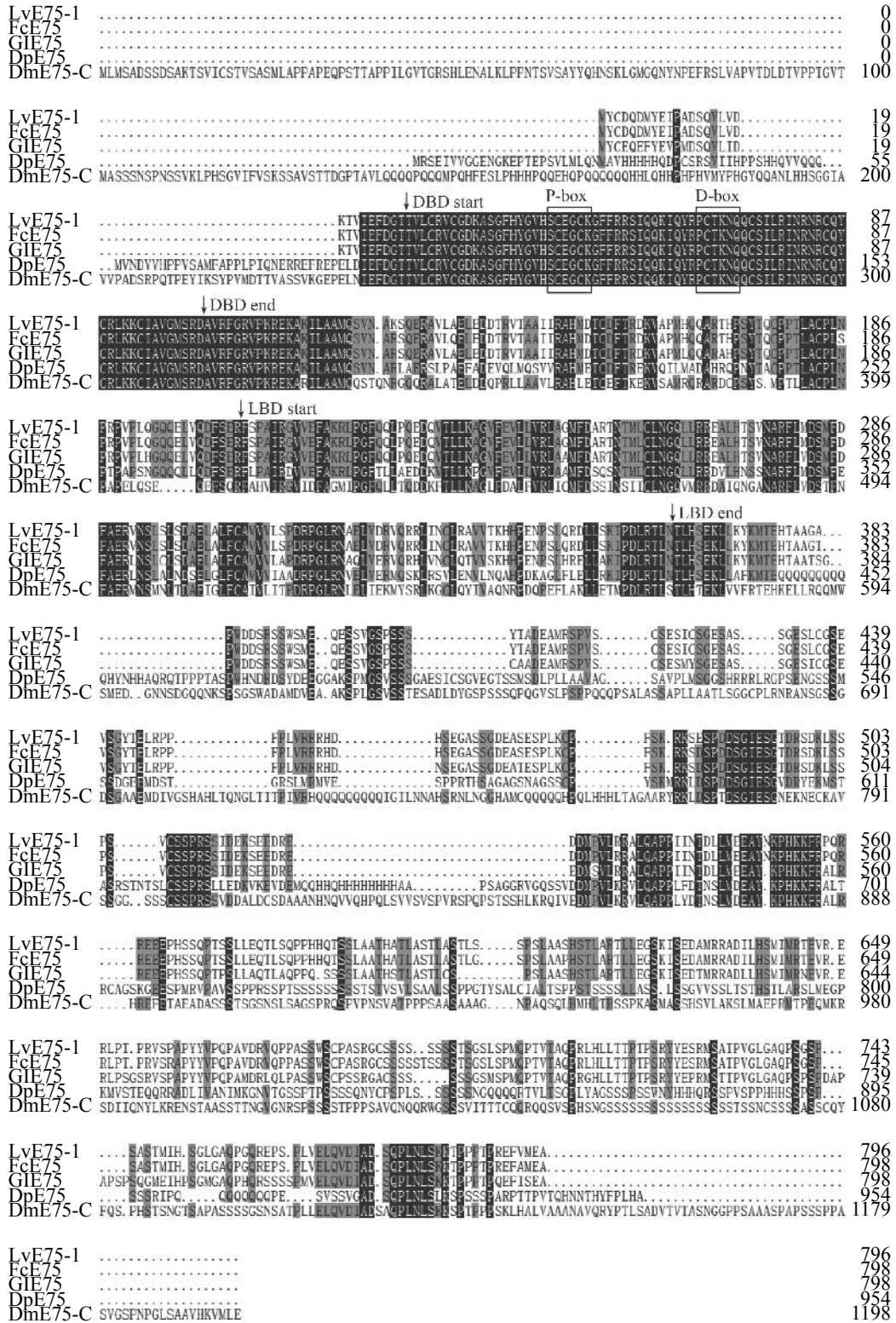


图3 凡纳滨对虾E75氨基酸序列和其他物种E75氨基酸序列比对

LvE75-1(凡纳滨对虾: MG748159); FcE75(中国明对虾: ACF36863.1); GIE75(陆地蟹: AAY89587.2); DpE75(蚤状溞: ADB79814.1); DmE75-C(黑腹果蝇: NP_730322)

Fig. 3 E75 amino acid sequences comparison of *L. vannamei* with different animals

LvE75-1(*L. vannamei*, MG748159), FcE75(*Fenneropenaeus chinensis*, ACF36863.1), GIE75(*Gecarcinus lateralis*, AAY89587.2), DpE75(*Daphnia pulex*, ADB79814.1), DmE75-C(*Drosophila melanogaster*, NP_730322)

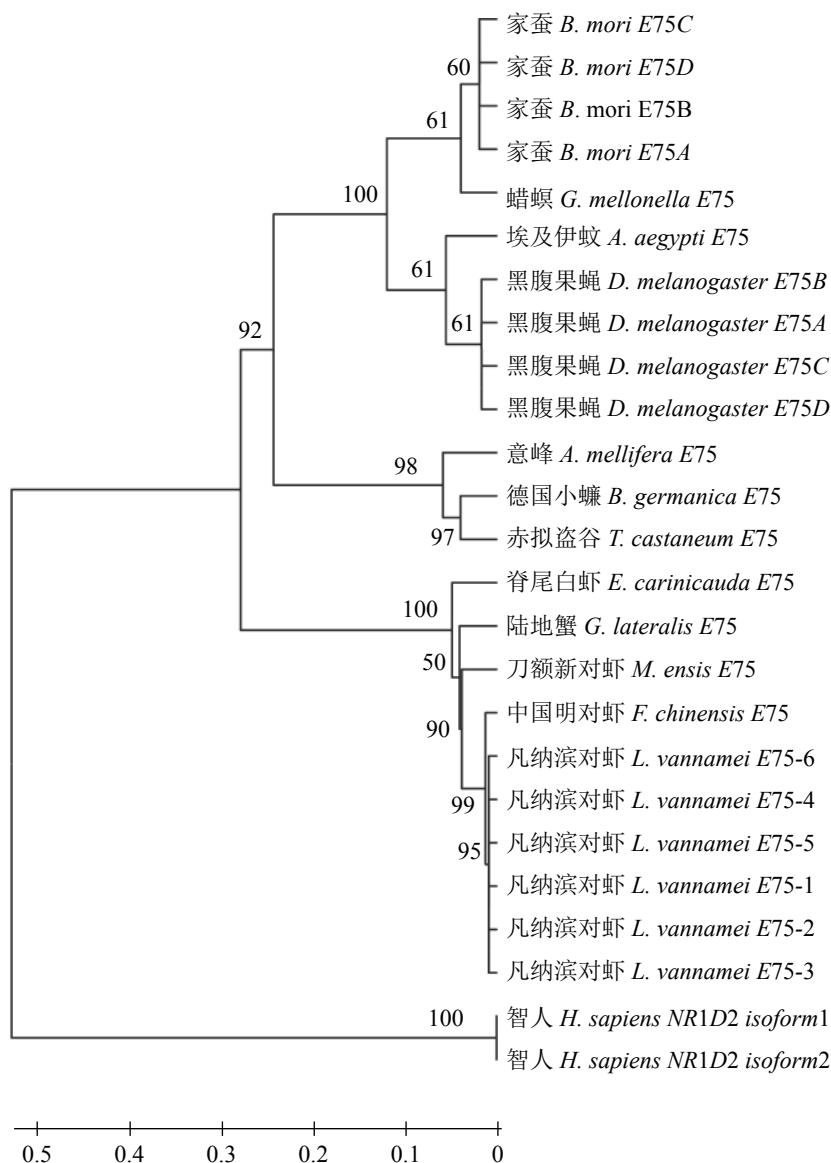


图 4 基于E75氨基酸序列的NJ系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on E75 amino acid sequences

GenBank accession number: *Apis mellifera* (NP_001073579.1); *Tribolium castaneum* (NP_001308599.1); *Blattella germanica* (CAJ87513.1); *Galleria mellonella* (AAA19579.1); *B. mori* E75A (NP_001106079.1); *B. mori* E75B (NP_001106080.1); *B. mori* E75C (NP_001037042.1); *B. mori* E75D (BAR88292.1); *Aedes aegypti* (CAL36974.1); *D. melanogaster* E75C (NP_730322.1); *D. melanogaster* E75A (NP_524133.2); *D. melanogaster* E75B (NP_730321.1); *D. melanogaster* E75D (NP_730323.1); *Exopalaemon carinicauda* (KY471317.1); *G. lateralis* (AAY89587.2); *Metapenaeus ensis* (AAC71770.1); *F. chinensis* (ACF36863.1); *L. vannamei* E75-1 (MG748159); *L. vannamei* E75-2 (MG748160); *L. vannamei* E75-3 (MG748161); *L. vannamei* E75-4 (MG748162); *L. vannamei* E75-5 (MG748163); *L. vannamei* E75-6 (MG748164); *Homo sapiens* NR1D2 isoform1 (NP_005117.3); *Homo sapiens* NR1D2 isoform2 (NP_001138897.1)

样品检测上游基因Halloween(*spo*、*phm*、*dib*和*sad*)和下游基因*Br-C*、*Ftz-f1*和*HR3*的表达水平变化情况。*E75*基因沉默后,和对照组相比,*spo*表达量降低,*phm*和*dib*表达量显著下降,而*sad*表达量显著增加,证明*E75*基因对激素合成通路有明显调控作用(图8)。另外,荧光定量PCR检测发现*Ftz-f1*和*Br-C*表达下调,*HR3*表达上调,表明

*E75*基因对同为蜕皮激素信号通路下游的早期应答基因有不同的作用,对*Ftz-f1*和*Br-C*有正调控作用,对*HR3*存在负调控作用。

2.5 *LvE75*被干扰后对凡纳滨对虾蜕皮和存活情况的影响

*LvE75*基因干扰12 d后,检测凡纳滨对虾蜕

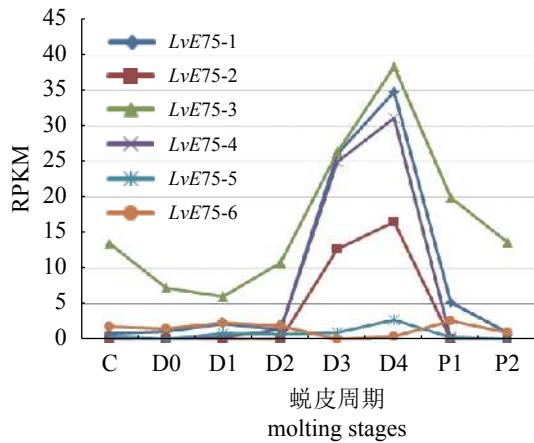


图5 *LvE75*基因6种可变剪切体在不同蜕皮时期的表达情况

C. 蜕皮前期, D0~D4. 蜕皮间期, P1~P2. 蜕皮后期

Fig. 5 Expression levels of six *LvE75* isoforms in different molting stages

C represents pre-molting stage, D0~D4 stand different intermolting stages, and P1~P2 represent postmolting stages

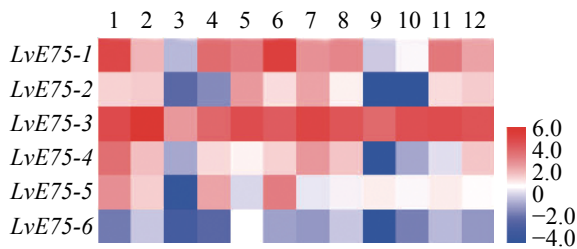


图6 *LvE75*基因6种可变剪切体在不同组织中的表达情况

1. 表皮, 2. 肠, 3. 肝胰腺, 4. 鳃, 5. 神经, 6. 胃, 7. 心脏, 8. 眼柄, 9. 血细胞, 10. 淋巴组织, 11. 脑, 12. 触角腺

Fig. 6 Expression levels of six *LvE75* isoforms in different tissues

1. epidermis, 2. intestines, 3. hepatopancreas, 4. gill, 5. ventral nerve, 6. stomach, 7. heart, 8. eye-stalk, 9. hemocyte, 10. lymphoid tissue, 11. brain, 12. antenna

皮率和死亡率。在ds*LvE75*实验组和dsEGFP对照组中, 凡纳滨对虾的蜕皮数量和死亡数目累计结果如图9所示, ds*LvE75*组和dsEGFP对照组的累计蜕皮率分别为58.33%和36.36%, 实验组的累计蜕皮率显著低于对照组。ds*LvE75*组和对照组累计死亡率分别为47.72%和0, 实验组显著高于对照组, 说明*LvE75*基因干扰后会导致对虾蜕皮异常, 并且严重影响凡纳滨对虾的正常存活。另外, 剪取未完全蜕皮的凡纳滨对虾尾扇, 在显微镜下观察所处的蜕皮时期, 一致处于蜕皮D3~D4时期, 可能是*LvE75*基因沉默后会阻碍正

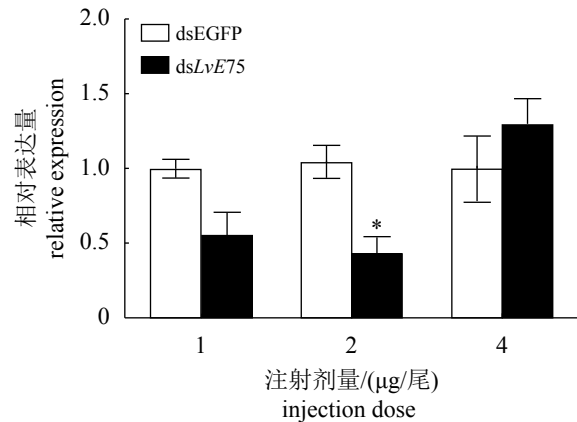


图7 *LvE75*基因在不同干扰剂量的干扰效果

“*”代表与对照组相比差异显著, $P < 0.05$, 下同

Fig. 7 *LvE75* gene dsRNAi effects of different injection doses

“*” indicated the significant difference at $P < 0.05$ with respect to control, mean \pm SD, $n=3$, the same below

常的蜕皮过程, 致使对虾死亡。

3 讨论

本研究发现凡纳滨对虾*LvE75*基因具有至少6种不同可变剪切转录形式。根据已有的报导, *E75*基因的多种可变剪切形式是由于使用不同的启动子和5'端外显子的可变剪切而产生^[13]。黑腹果蝇和家蚕的*E75*基因都存在4种可变剪切体*E75A/B/C/D*^[7-8], 刀额新对虾*E75*基因存在3种*E75A/C/D*^[14], 都具有完整的LBD结构域, 其中A、C型带有2个锌指的DBD结构域, 而D型缺失DBD结构。凡纳滨对虾*LvE75*基因的6种转录序列间相似性高, 均具有LBD结构域, 但对于DBD结构, *LvE75-1/2/4/5/6*都有完整的DBD结构, 包含2个C4锌指结构, *LvE75-3*无DBD结构, 认为*LvE75-3*属于*E75D*型, 而其余的应当属于*E75A/C*型。凡纳滨对虾*E75*氨基酸的DBD区域存在高度保守的P-box和D-box结构, 其中P-box决定与DNA结合的特异性, D-box与同型二聚体的形成有关, 在中国明对虾, 陆地蟹, 大型蚤(*D. magna*)等^[15-17]甲壳动物中有相同的研究结果。

*E75*基因在多种蜕皮动物中已经有大量研究报道, 认为其对蜕皮过程具有重要调控作用。果蝇*E75*基因突变会导致蜕皮激素水平下降, 出现发育阻滞、蜕皮缺陷或羽化后死亡^[18]; 家蚕*E75*基因沉默后同样会降低蜕皮激素水平, 出现发育延迟和蛹化异常的现象^[10]; 处于D0~D2蜕皮时

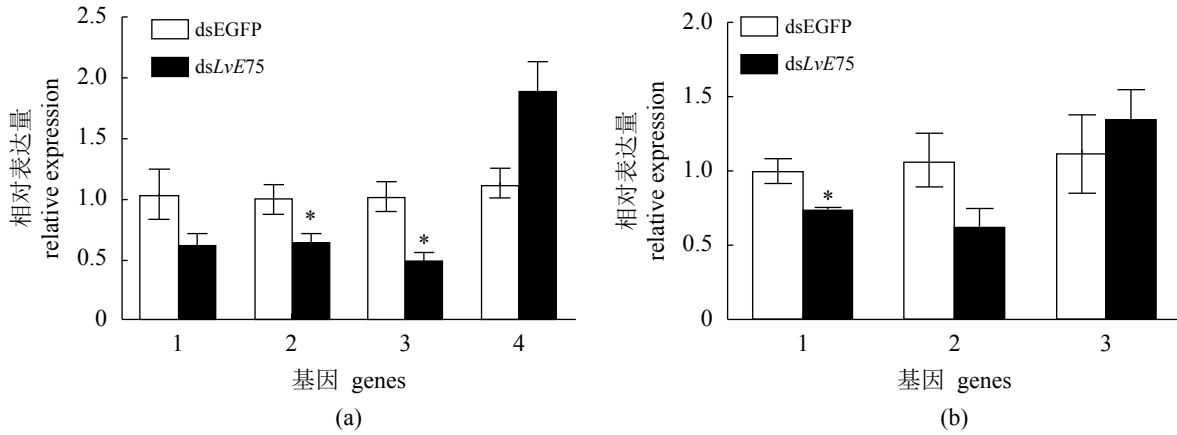


图 8 凡纳滨对虾E75基因沉默对Halloween基因和下游基因的表达变化

(a) Halloween基因; (b)下游基因

Fig. 8 Expression levels of Halloween genes and down-stream genes of ecdysone signal pathway after LvE75 RNAi

(a) Halloween genes (1. *spo*, 2. *phm*, 3. *dib* and 4. *sad*); (b) down-stream genes (1. *Br-C*, 2. *Ftz-f1* and 3. *HR3*)

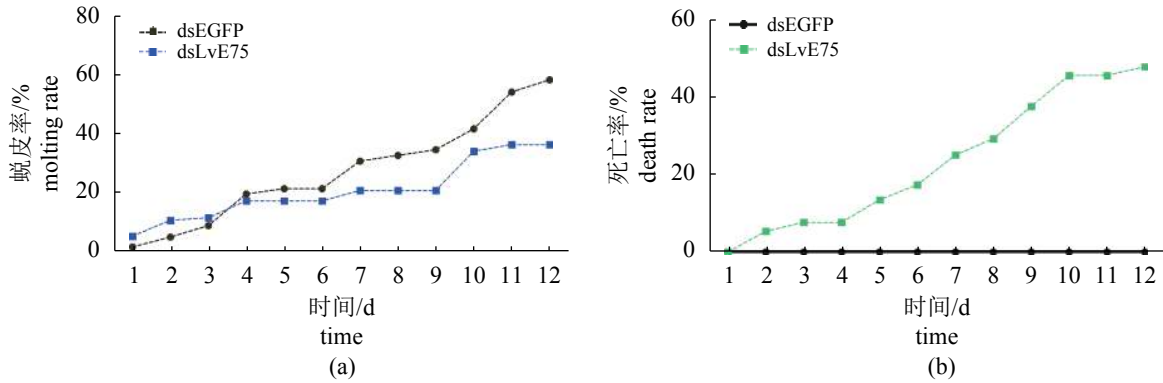


图 9 dsLvE75干扰对凡纳滨对虾蜕皮和死亡情况的影响

Fig. 9 Effects on *L. vannamei* molting and death after LvE75 gene interference

期的脊尾白虾E75基因被沉默后显著降低虾的蜕皮率, 阻滞生长和发育过程^[16]。本研究显示凡纳滨对虾LvE75基因的6种可变剪切形式在不同蜕皮时期均有表达, 在D3~D4时期表达量最高, 同时D3~D4时期属于对虾即将蜕皮的前阶段。LvE75基因被干扰后, 对虾的蜕皮率显著低于对照组, 且死亡率显著增加。对出现濒临死亡症状(侧躺于池底)的凡纳滨对虾进行显微镜观察, 发现均处于D3~D4时期, 推测可能是由于不能进行正常蜕皮活动导致死亡。而有一部分对虾可以完成蜕皮, 可能由于对处于不同蜕皮时期的对虾进行E75基因干扰会产生不同程度的抑制效果所致。

E75是蜕皮信号通路的关键调控因子, 对其进行沉默会严重影响对虾的蜕皮过程。凡纳滨对虾E75基因沉默后, 蜕皮过程出现阻碍, 可能和蜕皮激素的含量以及蜕皮信号通路的下游基

因表达变化有关。已有研究认为, 甲壳动物的蜕皮激素主要为20E和POA^[19], Halloween基因, 包括*spo*、*phm*和*dib*等, 是催化胆固醇合成蜕皮激素过程中的关键基因, 而E75对蜕皮激素的合成有负调控作用^[2]。本实验采用荧光定量PCR方法检测Halloween基因的表达变化, 在E75基因干扰样品中*spo*、*phm*和*dib*的表达发生显著下调, 这与其他蜕皮动物中的现象一致, 而*sad*表达量显著上调, 表明Halloween基因之间存在不同的调控模式, 这个现象和Li等^[20]研究结果类似。Halloween基因表达下降导致蜕皮激素合成减少, 说明凡纳滨对虾E75基因对Halloween基因有负反馈作用, 影响蜕皮激素合成。另外, LvE75基因被干扰后, 蜕皮激素信号通路下游应答基因, *Br-C*和*Ftz-f1*基因表达发生显著下调, 而*HR3*基因表达量上调, 其中*HR3*和*Br-C*是蜕皮激素信号通路

的早期应答基因, *Ftz-f1*属于晚早期应答基因, 说明*LvE75*基因通过上调或下调其他蜕皮激素应答基因的表达, 从而在蜕皮激素信号传递中发挥重要作用。有研究表明, *E75*通过和另一个蜕皮激素早期应答基因*HR3*相互作用调控下游应答基因的表达, *HR3*对下游转录因子起到正激活作用, 而*E75*被认为对*HR3*起到负调控作用^[1, 21-22], *HR3*和*EcR*相互作用抑制20E-*EcR*-*USP*复合体的激活, 下调*Halloween*基因家族表达, 阻碍蜕皮激素合成, 与本研究结果一致。

对虾蜕皮调控是一个复杂的过程, 仅*LvE75*基因的可变剪切形式和表达已经显示出其复杂的模式, 而对这些可变剪切形式各自功能目前还缺乏深入了解。另外, 本研究仅分析了*LvE75*基因对凡纳滨对虾蜕皮的影响, 其他几种蜕皮激素早期应答基因对凡纳滨对虾蜕皮及生长发育的作用仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Hannas B R, Wang Y H, Baldwin W S, *et al.* Interactions of the crustacean nuclear receptors HR3 and E75 in the regulation of gene transcription[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(2): 268-278.
- [2] Song Y, Villeneuve D L, Toyota K, *et al.* Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(8): 4142-4157.
- [3] Nakagawa Y, Henrich V C. Arthropod nuclear receptors and their role in molting[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(21): 6128-6157.
- [4] Dubrovsky E B. Hormonal cross talk in insect development[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2005, 16(1): 6-11.
- [5] Harding H P, Lazar M A. The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(9): 4791-4802.
- [6] Pardee K I, Xu X H, Reinking J, *et al.* The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERB β [J]. *PLoS Biology*, 2009, 7(2): e1000043.
- [7] King-Jones K, Thummel C S. Nuclear receptors—a perspective from *Drosophila*[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(4): 311-323.
- [8] Li K, Guo E E, Hossain M S, *et al.* *Bombyx* E75 isoforms display stage-and tissue-specific responses to 20-hydroxyecdysone[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12114.
- [9] Cruz J, Mane-Padros D, Zou Z, *et al.* Distinct roles of isoforms of the heme-liganded nuclear receptor E75, an insect ortholog of the vertebrate Rev-erb, in mosquito reproduction[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 349(2): 262-271.
- [10] Li K, Tian L, Guo Z J, *et al.* 20-Hydroxyecdysone (20E) primary response gene E75 isoforms mediate steroidogenesis autoregulation and regulate developmental timing in *Bombyx*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(35): 18163-18175.
- [11] Wei J K, Zhang X J, Yu Y, *et al.* Comparative transcriptomic characterization of the early development in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106201.
- [12] 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.
- [13] Segraves W A, Hogness D S. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily[J]. *Genes & Development*, 1990, 4(2): 204-219.
- [14] Chan S M. Cloning of a shrimp (*Metapenaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: an insect homologue of E75 gene[J]. *FEBS Letters*, 1998, 436(3): 395-400.
- [15] Kim H W, Lee S G, Mykles D L. Ecdysteroid-responsive genes, RXR and E75, in the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: differential tissue expression of multiple RXR isoforms generated at three alternative splicing sites in the hinge and ligand-binding domains[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, 242(1-2): 80-95.
- [16] Priya T A J, Li F H, Zhang J Q, *et al.* Molecular characterization of an ecdysone inducible gene E75 of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and elucidation of its role in molting by RNA interference[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and*

- Molecular Biology*, 2010, 156(3): 149-157.
- [17] Litoff E J, Garriott T E, Ginjupalli G K, *et al.* Annotation of the *Daphnia magna* nuclear receptors: comparison to *Daphnia pulex*[J]. *Gene*, 2014, 552(1): 116-125.
- [18] Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, *et al.* Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*[J]. *Developmental Cell*, 2002, 3(2): 209-220.
- [19] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3-5): 196-203.
- [20] Li G, Niu J Z, Zotti M, *et al.* Characterization and expression patterns of key ecdysteroid biosynthesis and signaling genes in a spider mite (*Panonychus citri*)[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 87: 136-146.
- [21] Hiruma K, Riddiford L M. Differential control of MHR3 promoter activity by isoforms of the ecdysone receptor and inhibitory effects of E75A and MHR3[J]. *Developmental Biology*, 2004, 272(2): 510-521.
- [22] Swevers L, Ito K, Iatrou K. The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(44): 41637-41644.

Identification and analysis of alternatively spliced *E75* gene in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

DU Jiangli^{1,2,3}, ZHANG Xiaojun^{1,2*}, ZHANG Xiaoxi^{1,2,3}, YUAN Jianbo^{1,2},
GAO Yi^{1,2}, LI Fuhua^{1,2}, XIANG Jianhai^{1,2}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *E75* is an important regulator of the ecdysone signaling pathway in shrimp. In order to gain insight into the structure and function of this gene, we screened and analyzed all *E75* gene transcripts based on the transcriptome and genome data of *Litopenaeus vannamei*, and identified 6 alternatively spliced *LvE75* isoforms (named *LvE75-1*, *LvE75-2*, *LvE75-3*, *LvE75-4*, *LvE75-5* and *LvE75-6*). *LvE75-1/2/4/5/6* contained DBD and LBD domains consistent with *E75A/C* of *Drosophila melanogaster*, and *LvE75-3* only had LBD domains consistent with *Drosophila E75D*. During molting process, *LvE75s* were highly expressed in D3–D4 stage. In adult tissues, various isoforms of *LvE75* were expressed in all tissues and were highly expressed in the epidermis, gut and gill, with only *LvE75-3* being highly expressed in hepatopancreas, blood cells and lymphoid tissues. According to the conserved domain sequence, we designed primers for double-stranded RNA (dsRNA) interference. In *LvE75* gene RNAi samples, qRT-PCR results showed that *spo*, *phm* and *dib* were down-regulated, and *shd* was up-regulated, indicating that *LvE75* might regulate *Halloween* genes to influence ecdysone synthesis. *Br-C* and *Ftz-f1* were down-regulated and *HR3* was up-regulated after *LvE75* were interfered, indicating *LvE75* might influence the downstream early response genes of ecdysone signal pathway. After continued interference in *LvE75* for 12 days, the molting rate was significantly lower compared with control group, but the death rate of ds*LvE75* group was significantly higher, suggesting *LvE75* gene played an important role in shrimp molting and survival.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *E75* gene; molting; alternatively splicing; RNAi

Corresponding author: ZHANG Xiaojun. E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672632, 31702320, 41876167)