

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220901003

http://www.yykxjz.cn/

苏曼文, 张晓军, 袁剑波, 张小溪, 杨铭, 李富花. 凡纳滨对虾类胰岛素肽基因的结构及表达分析. 渔业科学进展, 2024, 45(1): 105-117

SU M W, ZHANG X J, YUAN J B, ZHANG X X, YANG M, LI F H. Gene structure and expression analysis of insulin-like peptide in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(1): 105-117

凡纳滨对虾类胰岛素肽基因的结构及表达分析*

苏曼文^{1,2,3} 张晓军^{1,2,3①} 袁剑波^{1,2} 张小溪^{1,2} 杨铭⁴ 李富花^{1,2,3}

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

2. 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; 4. 福州市海洋与渔业技术中心 福建 福州 350005)

摘要 类胰岛素肽(ILP)是胰岛素超家族的成员,具有进化保守性,是影响动物生命活动的重要因素之一。本研究克隆了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *ILP1* (*LvILP1*)全长基因, mRNA 长度为 812 bp, 其中开放阅读框长 543 bp, 编码 180 个氨基酸。序列分析显示, *LvILP1* 蛋白预计分子量为 20.81 kDa, 理论等电点为 9.45, 不稳定系数为 96.20, 具有一个信号肽, 没有跨膜结构, 推导其为碱性、不稳定的分泌蛋白。结构预测显示, 该蛋白具有胰岛素超家族保守的 IIGF 结构域, 由 N 端信号肽、B 链、C 肽和 A 链组成, 同时具有 6 个保守的半胱氨酸位点和 2 个断裂位点。系统进化分析显示, *LvILP1* 与斑节对虾(*Penaeus monodon*) *ILP7* 亲缘关系最近, 与甲壳动物 *ILP1* 聚为一支, 然后分别与无脊椎动物 *ILP7*、脊椎动物松弛素(Relaxin)、胰岛素(Insulin)、胰岛素样生长因子(IGF)聚在一起。无脊椎动物 *ILP7* 类与外群海葵(*Actinia tenebrosa*) *ILP* 的进化关系最近, 表明这类 *ILP* 可能与胰岛素超家族的祖先较为相似。转录因子预测显示, *LvILP1* 可能的转录因子为叉头框蛋白 O3 (FoxO3)、糖皮质激素受体(GR)、CAAT 区/增强子结合蛋白(C/EBP)、信号传导及转录激活蛋白(STAT)等; 蛋白互作分析显示, *LvILP1* 与细胞膜上的胰岛素受体(IR)、神经信号分子(VGLUT1、SYT 1_3)、糖蛋白激素(GPHB5)、鞣化激素(Bursicon)等相互作用; 对这些转录因子和互作蛋白的生物功能进行分析, 进而推测 *LvILP1* 可能具有调节生长发育、激素刺激反应、神经系统稳态、碳水化合物稳态、蜕皮后组织重建以及生殖发育等作用。分析发现, *LvILP1* 在凡纳滨对虾早期发育阶段有较高表达, 在成体各个组织中均有表达, 但在眼柄中表达量最高。本研究结果为深入了解凡纳滨对虾 *ILP* 的基因结构、进化、功能及表达提供了重要信息, 同时为凡纳滨对虾的分子育种和健康养殖提供线索。

关键词 凡纳滨对虾; 类胰岛素肽; 基因结构; 功能预测; 表达分析

中图分类号 Q173 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)01-0105-13

在脊椎动物中, 胰岛素超家族由胰岛素(insulin)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、松弛素(relaxin)等成员组成, 它们在结构上高度保守, 均具有 N 端信号肽、B 链、C 肽和 A 链; 在功能上,

* 国家自然科学基金(31972782; 32273102)、国家重点研发计划(2018YFD0900103; 2018YFD0900404)、中国科学院先导专项(XDA24030105)和财政部和农业农村部: 现代农业产业技术体系(CARS-48)共同资助。苏曼文, E-mail: mwsu@qdio.ac.cn

① 通信作者: 张晓军, 研究员, E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2022-09-01, 收修改稿日期: 2022-09-28

这些分子通过与细胞膜上的受体结合激活胰岛素信号通路,从而调节生物新陈代谢、生长发育、繁殖与寿命等关键生理过程(Hoffmann *et al*, 2011)。目前,在无脊椎动物中未发现胰岛素或 IGF,但在果蝇(*Drosophila melanogaster*) (Riehle *et al*, 2006)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (Liu *et al*, 2016)、东澳岩龙虾(*Sagmariasus verreauxi*) (Chandler *et al*, 2017)、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) (Zheng *et al*, 2018)、紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) (Perillo *et al*, 2014)、澳大利亚斑点海葵(*Oulactis* sp.) (Mitchell *et al*, 2021)等物种中发现了多种胰岛素的类似物——类胰岛素肽(insulin-like peptides, ILPs),这些 ILP 都具有胰岛素超家族保守的结构特征与功能,表明 ILP 是一个古老的胰岛素超家族成员。

昆虫 ILP 主要由大脑的神经分泌细胞产生,功能上比脊椎动物胰岛素更加广泛和复杂,在调控代谢、生长、变态、繁殖、免疫、蜕皮和昼夜节律等方面发挥重要作用(Wu *et al*, 2006)。例如,在长红锥蝽(*Rhodnius prolixus*)和柞蚕(*Antheraea pernyi*)中,ILP 基因的表达能够调节碳水化合物代谢和海藻糖代谢(Li *et al*, 2021; Haddad *et al*, 2022);在果蝇中过表达 *DILP1* 可以促进蛹期器官组织的生长(Liao *et al*, 2020);在马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)中干扰 *LdILP* 表达会导致成蛹时间延长(Fu *et al*, 2016);在柑桔木虱(*Diaphorina citri*)中干扰 *DcILP1* 和 *DcILP2* 表达会导致产卵数量显著减少,且卵巢空泡化使其发育受到极大的抑制(Wang *et al*, 2022);在蓖麻蚕(*Samia cynthia ricini*)中 *ScILP* 能够刺激促前胸腺激素(Prothoracicotropic hormone, PTTH)的活性,从而进一步调控蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)的合成与释放(Nagata *et al*, 1999);而在果蝇中敲除 *DILP5* 会严重影响昼夜节律的周期(Yamaguchi *et al*, 2022)。

甲壳动物中 ILP 基因的相关研究较少。已有的研究结果显示,ILP 主要在脑、眼柄、性腺和触角腺等组织中表达(Chandler *et al*, 2017; Jiang *et al*, 2020)。在功能方面,ILP 参与调控代谢、生长、免疫和生物与环境相互作用等生命活动。例如,在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中过表达 *LvILP1* 能够降低血淋巴中葡萄糖的含量(Su *et al*, 2022; Wang *et al*, 2020);罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中干扰 ILP 表达能够降低肝胰腺中海藻糖和糖原水平(Jiang *et al*, 2020);在日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)中干扰 ILP 表达显著减缓了其生长速度(Li *et al*, 2019);中华绒螯蟹中 *EsILP* 在眼柄和血细胞中高表达以参与机体对嗜

水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染的免疫反应(Wang *et al*, 2020);而在飞马哲水蚤(*Calanus finmarchicus*)中鉴定出 4 种 *CfILP* 前体,研究发现,其可能参与控制生物体与环境的相互作用,例如季节性亚成体滞育的调节(Christie *et al*, 2016)。

凡纳滨对虾因具有生长快、出肉率高、抗病性强、耐粗饲料等诸多优点,已成为我国和世界上最具经济价值的水产养殖虾类。作为重要的水产经济物种,其生长性状的遗传学基础一直倍受关注(方振朋等, 2020; 刘峻宇等, 2021)。在最近的研究中,本课题组鉴定了凡纳滨对虾胰岛素信号通路中的一些重要基因,如胰岛素受体(insulin receptors, *InRs*)、胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins, *IGFBPs*),以及通路下游的磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, *PI3K*)、叉头框蛋白 O (forkhead box O, *FoxO*)、糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, *GSK3*)等基因,初步的功能研究显示,干扰这些基因的表达会影响对虾的生长速度(Pang *et al*, 2021a, b),由此确认对虾中存在胰岛素信号通路,该通路可以调控虾类的生长。而作为激活该信号通路的开关分子 ILP,其基因结构、系统进化以及分子功能尚不清楚。本研究从凡纳滨对虾转录组数据中鉴定出一条 ILP 基因,通过生物信息学分析方法预测其结构、系统进化、转录因子、互作蛋白等,并通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测该基因在各组织中的相对表达量,这些研究结果可为后续对虾 ILP 的结构与功能研究及筛选胰岛素信号通路基因作为分子遗传育种的靶点提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的凡纳滨对虾来自山东日照养殖基地,在中国科学院海洋研究所(山东青岛)的水族楼中养殖至少 1 周以稳定其生存状态。养殖海水清洁无菌,氧气充足,温度为(25.0±0.2)℃,盐度为 30, pH 值为 7.5±0.1。每日 09:00、15:00 和 21:00 分别使用颗粒饲料(烟台大乐饲料公司)喂食一次,每日更换一次养殖海水。

1.2 组织采集

选取 9 尾健康雌性对虾,体长为(6.7±0.8) cm,体重为(4.5±0.7) g。取样组织为眼柄、卵巢、表皮、肌肉、胃、脑、肠、鳃、肝胰腺、腹神经、血细胞、胸神经节、淋巴器官和心脏,共计 14 种组织。将每

3 尾虾的相同组织混为 1 个样品(确保样品量足够后续分析), 共取 3 个生物学重复。取样完成后, 将样品迅速放入液氮中冷冻, 最后将所有样品放置 -80°C 超低温冰箱储存。

1.3 实验方法

1.3.1 *LvILP1* 基因序列鉴定 从本实验室前期获得的凡纳滨对虾基因组和转录组数据中筛选并提取所有注释为 *ILP* 基因的序列。所获得的序列作为 query, 在 NCBI Blast 网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上进行比对, 筛选出与其他物种 *ILP* 基因相似度较高的序列。将这些序列提交至 ExPASy translate tool 网站(<http://web.expasy.org/translate/>), 得到翻译后的氨基酸序列。所有的氨基酸序列提交至 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 预测其是否具有典型的功能结构域。最后, 对这些序列的结构域进行筛选, 最终鉴定出一条 *ILP* 基因序列, 并命名为 *LvILP1*。

将 *LvILP1* 基因的 cDNA 序列在对虾基因组网站(<http://www.shrimpbaseset.net/lva/download.html>)进行 BLASTN 比对, 获得该基因在基因组上的位置信息。根据比对结果, 当某段序列和基因组的比对率在 97% 以上时被认定为精确匹配, 从而得到基因的结构信息。

1.3.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 将收集的样品进行预处理, 体积较大的组织(如肌肉、肝胰腺), 采用液氮研磨法处理, 其他体积较小的组织低温匀浆处理。将处理好的对虾组织样品使用 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa, 日本)提取总 RNA, 通过 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)和 1.5% (w/v)琼脂糖凝胶电泳分别检测 RNA 的浓度和质量, 最后使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent kit (TaKaRa, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA。

1.3.3 *LvILP1* 基因克隆 将 *LvILP1* 基因序列提交至 Primer 3 Plus 网站(<https://www.primer3plus.com/>)并设计扩增全长的引物(表 1)。以脑组织的 cDNA 作为模板, 使用 PCR 仪进行扩增。PCR 程序: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 20 s, 60°C 退火 40 s, 72°C 延伸 20 s, 40 个循环; 72°C 延长 10 min。获得的 PCR 产物经 1.5% (w/v)琼脂糖凝胶电泳检测, 验证条带大小一致后, 使用 MiniBEST DNA fragment purification 试剂盒(TaKaRa, 日本)进行纯化。纯化后的 DNA 连接到 pMD19-T vector (TaKaRa, 日本)中, 连接体系: pMD19-T vector 0.5 μL , Solution I 5.0 μL 及 DNA 纯化产物 4.5 μL , 置于 16°C 水浴锅中连接 12 h。之后转入 *E. coli* Trans DH5 α 感受态细胞(TaKaRa, 日本)

中过夜培养, 筛选阳性单克隆并进行菌落 PCR 鉴定, 将含有目的基因的菌液进行测序(上海生工)。

1.3.4 *LvILP1* 基因序列分析 通过在线网站工具推断 *LvILP1* 基因的核苷酸序列与氨基酸序列所包含的生物学信息, 采用 ExPASy 中的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的相对分子质量、等电点、不稳定系数和平均疏水率(Wilkins *et al*, 1999); SignalIP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalIP-5.0>)预测信号肽; TMHMM Server 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)预测蛋白质有无跨膜结构域; PSORT II Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>)预测蛋白质亚细胞定位; SMART 预测蛋白质结构域; SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白质二级结构; QUARK (<https://zhanggroup.org/QUARK/>)预测蛋白质三级结构, 预测结果用 SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>)进行质量评估; NeuroPred (<http://stagbeetle.animal.uiuc.edu/cgi-bin/neuropred.py>)预测形成成熟多肽的断裂位点; MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)预测 CpG 岛; AnimalsTFDB 3.0 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/#/>)和 PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promo.cgi?dirDB=TF_8.3&calledBy=algggen)预测转录因子(Messeguer *et al*, 2002); STRING (<https://cn.string-db.org/>)预测互作蛋白; Jalview 软件比对 *LvILP1* 与其他物种及胰岛素超家族基因在序列上的保守性; SMART 预测获得 *LvILP1* 及胰岛素超家族成员的结构域区段序列, 使用 MEGA-X 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)对这些序列进行系统进化分析, 同时使用 MEME 网站(<https://meme-suite.org/meme/>)预测序列保守的 motif。

1.3.5 *LvILP1* 基因在发育时期的表达特征 凡纳滨对虾早期发育过程大体可分为胚胎期、无节幼体期、溞状幼体期、糠虾幼体期和仔虾期 5 个阶段。本实验室前期收集了凡纳滨对虾早期发育各阶段多个时期的混合样品作为检测样品, 完成了早期发育 5 个阶段的转录组测序(Wei *et al*, 2014), 并获得每个转录本的相对表达量 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)值。本研究从中提取 *LvILP1* 基因在每个发育时期的 FPKM 值, 并导入 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。

1.3.6 *LvILP1* 基因组织表达的实时定量分析 在 Primer 3 Plus 网站上设计荧光定量的引物(表 1), 设置检测片段长度为 200 bp 左右。将组织样品的 cDNA 稀释至适当浓度, 使用 Eppendorf Mastercycler ep realplex

表1 本研究所用引物
Tab.1 The primers used in this study

| 引物 Primer | 引物序列 Primer sequence (5'~3') | 用途 Purpose |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>LvILP1</i> -F | CCGAAAAGATGGTGATGTCGATG | PCR |
| <i>LvILP1</i> -R | GCCAATAGATACTGGTGCAAA | PCR |
| <i>rtLvILP1</i> -F | TGACTTCGTTTCGACAGATTGAGA | 定量 Quantitative |
| <i>rtLvILP1</i> -R | TCATCAGACTCTGCCGGAAG | 定量 Quantitative |
| 18S-F | TATACGCTAGTGGAGCTGGAA | 定量内参 Quantitative internal |
| 18S-R | GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT | 定量内参 Quantitative internal |

(Eppendorf, 德国)仪器进行 RT-qPCR 检测 *LvILP1* 在各组织中的相对表达量, 同时 18S rRNA 的表达量作为参照。RT-qPCR 程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环; 72 °C 延长 10 min。每个样品有 4 个技术重复, 引物的熔融曲线被作为 PCR 产物特异性的依据。最后, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *LvILP1* 基因序列分析

从凡纳滨对虾转录组数据中筛选得到一条与斑节对虾(*Penaeus monodon*) *ILP* 有 87.93%相似性的序列, SMART 预测显示, 其具有完整的 IIGF 结构域, 该结构域是胰岛素超家族的特征结构域, 由此我们确认该基因为凡纳滨对虾 *ILP* 基因, 将其命名为 *LvILP1* (GenBank 登录号: ON973859)。在凡纳滨对虾基因组网站上进行 BLASTN 比对, 发现 *LvILP1* 基因位于基因组的 LVANscaffold_2976 上, 由 6 个外显子组成。序列分析显示, *LvILP1* 基因 mRNA 全长为 812 bp, 开放阅读框为 543 bp, 编码 180 个氨基酸。ProtParam 预测其编码的蛋白分子量为 20.81 kDa, 理论等电点为 9.45, 不稳定系数为 96.20, 平均疏水率为 -0.795, 由此推测, *LvILP1* 为碱性不稳定的亲水蛋白。TMHMM Server 2.0、SignalIP-5.0 和 PSORT II Prediction 预测显示, *LvILP1* 没有跨膜结构, 有一个 N 端信号肽, 且定位在细胞膜外, 属于分泌型蛋白。NeuroPred 预测显示, *LvILP1* 存在 KR 和 RRRR 两个可能的断裂位点, 蛋白水解酶通过断裂位点将其中间的序列(C 肽)切割以形成成熟的多肽; 信号肽之后与 KR 断裂位点前的序列为 B 链, RRRR 断裂位点之后的序列为 A 链, A 链、B 链上分别存在 4 个和 2 个保守的半胱氨酸, 其中, Cys156-Cys162 由 A 链内的二硫键相连, Cys47-Cys157 和 Cys59-Cys171 由链间二硫键相连, 共形成 3 个二硫键(图 1 和图 2A、B)。SOPMA 和 QUARK 预测显示, *LvILP1* 的 A、B 链均

主要由 2 个 α -螺旋结构组成, A 链的 α -螺旋由 1 个 Loop 连接, B 链内的 2 个 α -螺旋由 β -转角连接(图 2C)。

2.2 *LvILP1* 多序列比对及系统进化

通过 Jalview 软件将推导的 *LvILP1* 氨基酸序列与其他物种 *ILP* 及胰岛素超家族基因编码的氨基酸

```

1 atggtgatgtcgatgatgttggccgttttcctgctctgctcgacg
  M V M S M M L A V F L L C S T
46 tctctcgctctcgatcctgacttcggttcgacagattgagagcagg
  S L A L D P D F V R Q I E S R
91 acggagctcgagtggcaggccctgtggagcgaggagaggctggcg
  T E L E W Q A L W S E E R L A
136 ctgtgccggggccaagctgagggcagaacctggacgccatctgcggg
  L C R A K L R Q N L D A I C G
181 aaggacgtgttccggaggctcgctcggtcgagagggcgtcgctcgcgcc
  K D V F R R S S V E R R R R R
226 gataagcgagacgagggctcgagacggaagcaaaccttccggca
  D K R D E G R D G S K P L P A
271 gagtctgatgaggtgcctcggtccaacccttccacacctgacacc
  E S D E V P R A N P S T P D T
316 ggacaggctcccgacaagcggaggtgccttctctgagcgtgacg
  G Q A P D K R R S P F L S V Q
361 caggccaacctgttcgtgacaacgtgggtgcacgaccaagggggg
  Q A N L F V T T W V H D Q G G
406 cggcgcagggcgaggtcccactacaggcgccgctgcgcagctgcgcc
  R R R G R S H Y R R R R Q S P
451 tccatcaccaccgagtgctgcacggctgcggcgtgcacctgggaa
  S I T T E C C T V A G C T W E
496 gagtatgcgagtagtactgcccgtcgccaaccgagcgcgggttctta
  E Y A E Y C P S S N R A R F L
541 taa
  *

```

图1 *LvILP1* 基因序列

Fig.1 *LvILP1* gene sequence

蓝色字体代表信号肽序列; 红色加粗字体代表保守的氨基酸位点; 黑色加粗字体代表断裂位点; 绿色方框内的序列代表 A、B 链, B 链在信号肽序列后; 斜体代表 C 肽。

A signal peptide sequence is highlighted in blue font; the conserved amino acid sites are indicated in red bold; the cleavage sites are bolded with black font; the sequences in green box represent A-chain and B-chain, and B-chain is following signal peptide; C-peptide is marked in italics.

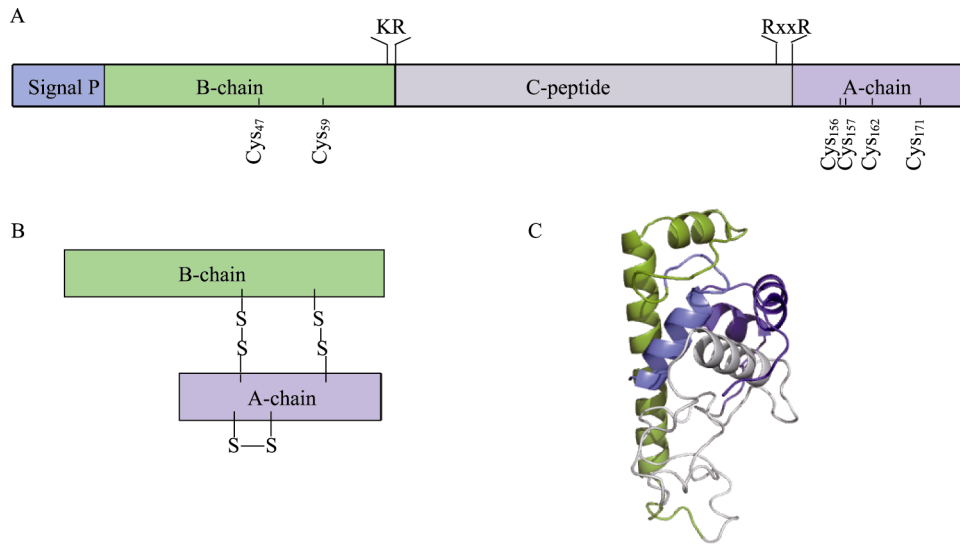


图 2 LvILP1 的结构模型
Fig.2 Structure model of LvILP1

A: LvILP1 线性结构模型; B: LvILP1 加工为激素的线性结构模型; C: 预测的 LvILP1 蛋白三级结构。
蓝色代表信号肽, 绿色代表 B 链, 灰色代表 C 肽, 紫色代表 A 链。

A: Linear structure model of LvILP1; B: Linear structure model of LvILP1 processing as hormone;
C: Predicted 3-D structure of LvILP1 protein. The color blue represents signal peptide, the green represents B-chain, the gray represents C-peptide, and the purple represents A-chain.

序列进行比对, 结果显示, 该序列与斑节对虾 ILP7 相似性最高 (87.78%), 其次是东澳岩龙虾 ILP1 (53.20%)、红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) ILP1 (52.80%)、蚤状溞 (*Daphnia pulex*) ILP1 (40.74%), 与黑

腹果蝇 ILP7、人类 (*Homo sapiens*) relaxin、人类 insulin 相似性较低 (33% 以下), 表明 ILP 氨基酸序列在不同物种中及与胰岛素超家族成员之间保守性不高, 但它们都具有保守的 6 个半胱氨酸与 2 个断裂位点 (图 3)。

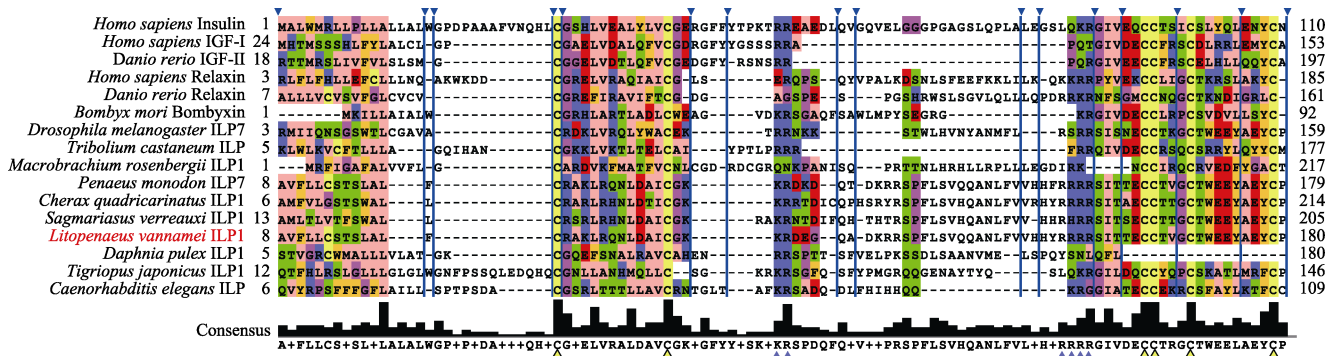


图 3 LvILP1 多序列比对
Fig.3 Multiple sequence alignment of LvILP1

黄色三角形表示保守的半胱氨酸位点, 蓝色三角形表示保守的断裂位点。

Yellow triangles indicate the conserved cysteine sites and blue triangles represent the conserved cleavage sites.

GenBank accession number: 人类 *Homo sapiens* insulin (AAA59172.1), 人类 *H. sapiens* IGF- I (CAA40342.1), 斑马鱼 *Danio rerio* IGF- II (AAH85623.1), 人类 *H. sapiens* relaxin (CAA00599.1), 斑马鱼 *D. rerio* relaxin (AEL22115.1), 家蚕 *Bombyx mori* bombyxin (BAA00246.1), 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* ILP7 (NP_570070.1), 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* ILP (EEZ99258.2), 罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* ILP1 (QIW91885.1), 斑节对虾 *Penaeus monodon* ILP7 (XP_037788563.1), 红螯螯虾 *Cherax quadricarinatus* ILP1 (AIU40992.1), 东澳岩龙虾 *Sagmariasus verreauxi* ILP1 (AIU40991.1), 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* ILP1 (ON973859), 蚤状溞 *Daphnia pulex* ILP1 (EFX76240.1), 日本虎斑猛水蚤 *Tigriopus japonicus* ILP1 (AIW65597.1), 秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* ILP (AAC33275.1).

将多个物种的胰岛素超家族成员 insulin、IGF-I、IGF-II、relaxin 和 ILP 的氨基酸序列通过 SMART 网站预测结构域, 显示它们均具有 IIGF 结构域; 不同的是, IGF-II 比其他成员多了一个 Pfam IGF2 结构域(图 4A)。选取结构域区段序列采用邻接法构建系统进化树(图 4B), 结果显示, 以海葵 ILP 作为外群, 该进化树可以分为 3 个大支: 一是凡纳滨对虾 ILP 与斑节对虾 ILP7、红螯螯虾 ILP1、东澳岩龙虾 ILP1、美

洲鲛 ILP7、果蝇 ILP7、肩突硬蜱 ILP7 以及柱头虫 ILP7 亲缘关系最近, 聚为一支; 二是脊椎动物与棘皮动物 Relaxin 聚为一支; 三是脊椎动物 IGF-I、IGF-II 及 Insulin 聚为一支, 然后依次与家蚕 bombyxin、果蝇 ILP7 之外的 ILPs 聚为一大支。对这些序列进行 motif 预测, 发现所有胰岛素超家族成员都具有 motif1、motif2 和 motif3, 而 motif4 仅存在于 IGF-II, motif5 仅存在于甲壳动物中。对 motif 序列进行分析发现,

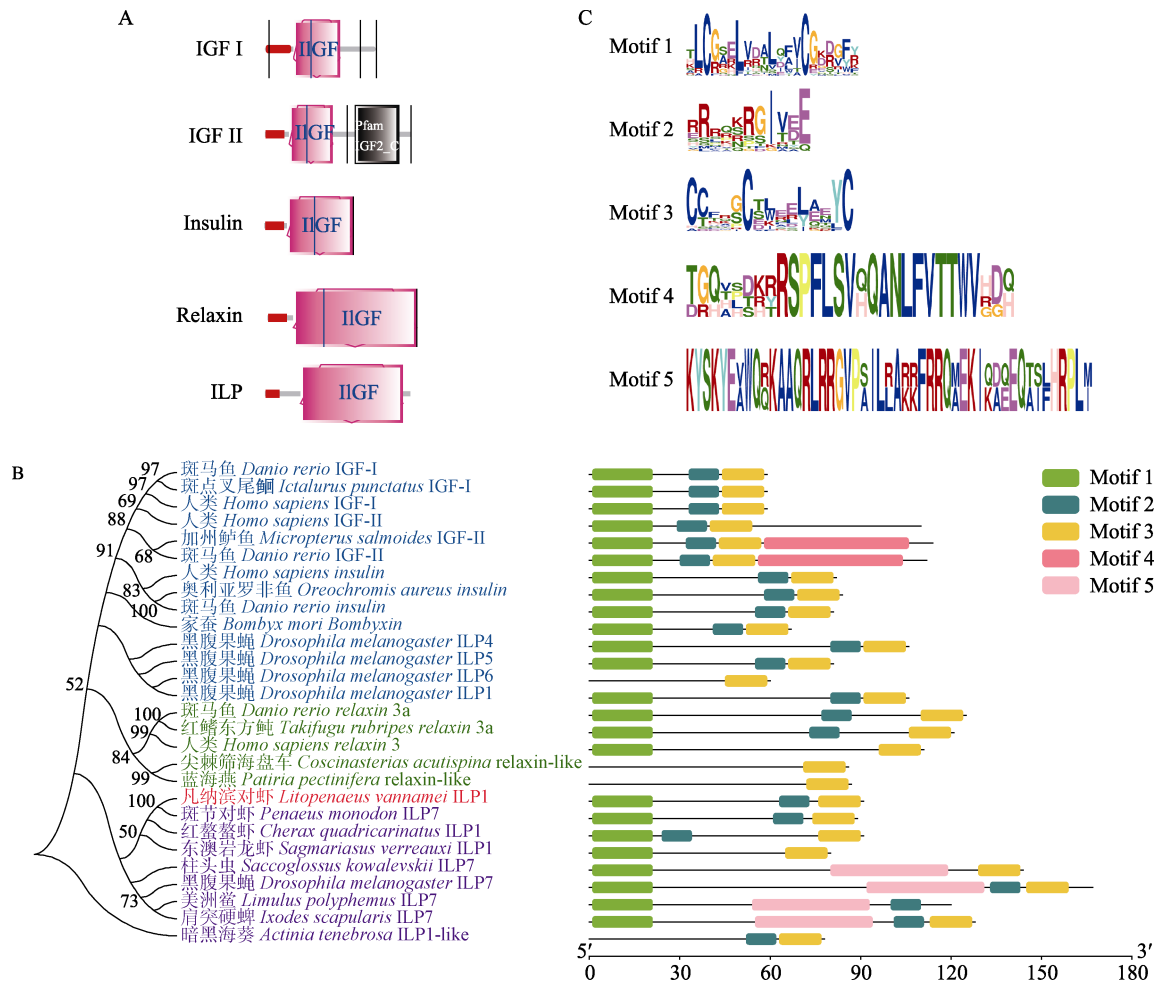


图 4 LvILP1 的系统进化树及 motif 预测

Fig.4 Evolutionary tree and predicted motif of LvILP1

A: 胰岛素超家族成员的 IIGF 结构域; B: LvILP1 的系统进化树; C: 胰岛素超家族成员预测的 motif。

A: The IIGF domain of insulin superfamily members; B: Evolutionary tree of LvILP1;

C: Motif predicted with insulin superfamily members.

GenBank accession No.: *Danio rerio* IGF- I (NP_571900.1), *Ictalurus punctatus* IGF- I (AAZ28918.1), *Homo sapiens* IGF- I (CAA40342.1), *H. sapiens* IGF- II (NP_001278791.1), *Micropterus salmoides* IGF- II (ACS92730.1), *D. rerio* IGF- II (AAH85623.1), *H. sapiens* insulin (AAA59172.1), *Oreochromis aureus* insulin (XP_031615350.1), *D. rerio* insulin (CAC20109.1), *Bombyx mori* bombyxin (BAA00246.1), *Drosophila melanogaster* ILP4 (NP_648361.1), *D. melanogaster* ILP5 (NP_996037.2), *D. melanogaster* ILP6 (NP_570000.1), *D. melanogaster* ILP1 (NP_648359.1), *D. rerio* relaxin 3a (NP_001032892.1), *Takifugu rubripes* relaxin 3a (NP_001092112.1), *H. sapiens* relaxin 3 (AAL40345.1), *Coscinasterias acutispina* relaxin-like (BAU68093.1), *Atiria pectinifera* relaxin-like (BAQ35470.1), *Ixodes scapularis* ILP7 (XP_029841940.1), *Limulus polyphemus* ILP7 (XP_022245174.1), *D. melanogaster* ILP7 (NP_570070.1), *Saccoglossus kowalevskii* ILP7 (XP_006815151.1), *Sagmarisus verreauxi* ILP1 (AIU40991.1), *Cherax quadricarinatus* ILP1 (AIU40992.1), *Penaeus monodon* ILP7 (XP_037788563.1), *Litopenaeus vannamei* ILP1 (ON973859), *Actinia tenebrosa* ILP1-like (XP_031575451.1).

motif1 具有 2 个高度保守的半胱氨酸位点, 存在于 B 链; motif2 存在多个保守的精氨酸位点, 为 A 链前端的 RxxR 断裂位点; motif3 具有 4 个高度保守的半胱氨酸位点, 存在于 A 链(图 4C)。

2.3 *LvILP1* 基因的 CpG 岛预测

通过 MethPrimer 程序预测, 在 *LvILP1* 基因的转录起始位点上游 NW_020870482.1 c38863-36863 区域(启动子区域)内存在一个 CpG 岛, 大小为 203 bp,

GC 含量大于 50%, 包含 16 个 CpG 位点(图 5)。

2.4 *LvILP1* 基因的转录因子预测

从 AnimalTFDB 3.0 和 PROMO 网站上同时预测 *LvILP1* 基因 5'侧翼区 2 Kb 序列上的转录因子结合位点, AnimalTFDB 3.0 预测的转录因子设定 $P < 10^{-13}$, PROMO 预测的转录因子设置最大矩阵相异率(容错率)为 0。选取最优预测的前 12 个转录因子, 统计其参与的生物过程, 并进行功能归类。结果显示, *LvILP1*

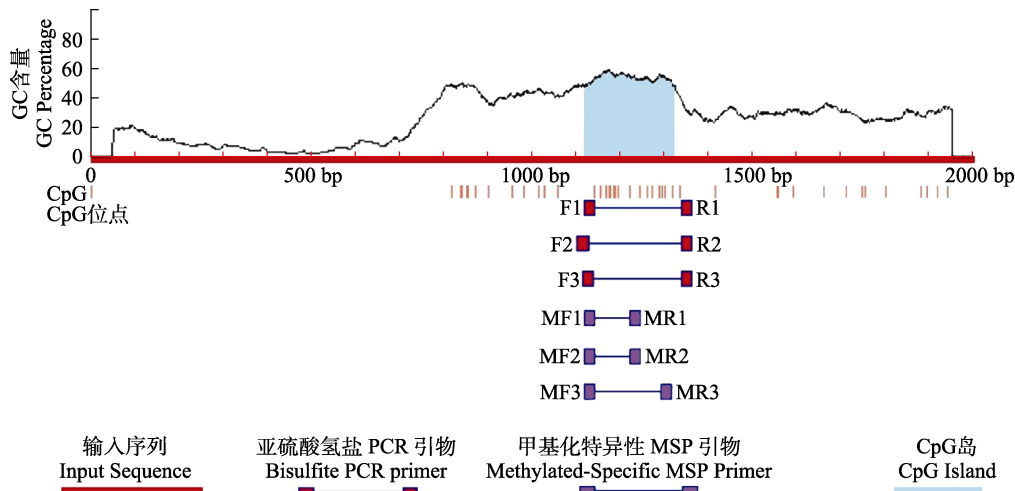


图 5 *LvILP1* 启动子区域内的 CpG 岛
Fig.5 CpG island in the promoter region of *LvILP1*

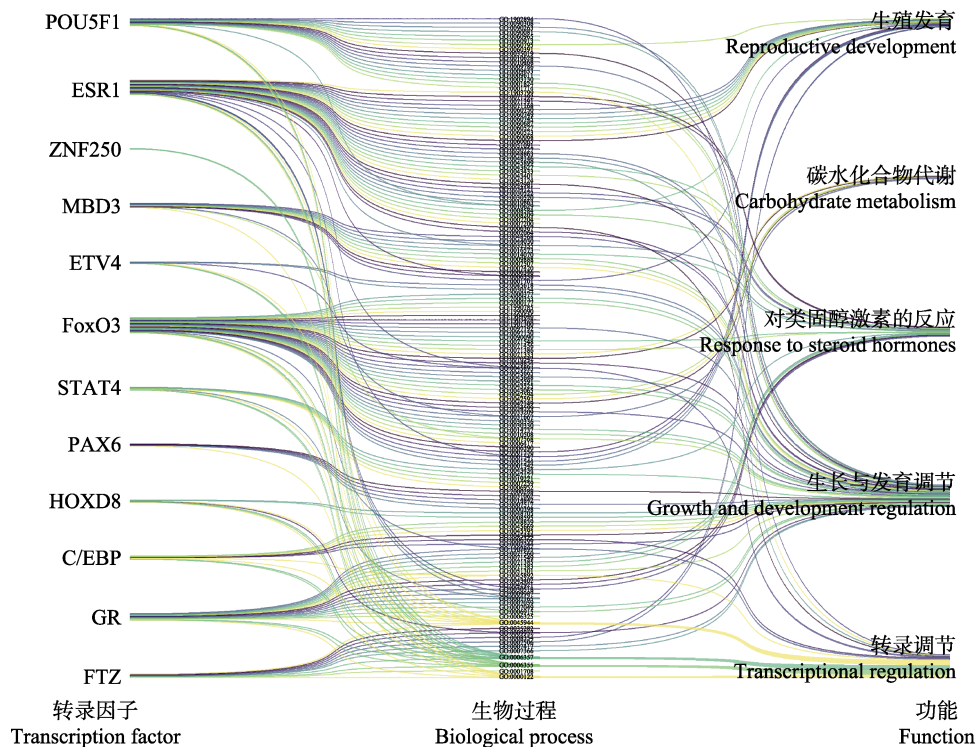


图 6 *LvILP1* 的转录因子及功能预测
Fig.6 Transcription factor and functional prediction of *LvILP1*

基因的转录因子主要具有 5 类功能, 分别是转录调节、生长与发育调节、对类固醇激素的反应、碳水化合物代谢、生殖发育。此外, 预测的转录因子叉头框蛋白 O3 (forkhead box O3, FoxO3) 是胰岛素通路的下游基因, 糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR) 是胰岛素的转录因子, CAAT 区/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP)、信号传导及转录激活蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)是 *IGF-1* 的转录因子(图 6)。

2.5 *LvILP1* 基因的互作蛋白预测

通过 STRING 在线数据库检索与 *LvILP1* 相互作用的蛋白, 要求最低的交互分数为 0.4。如图 7 所示, *LvILP1* 与多个胰岛素超家族的受体 INSR (insulin receptor)、InR (insulin-like receptor)、Putative ILP

receptor、IGF-1R (insulin like growth factor 1 receptor), 胰岛素受体底物(insulin receptor substrate 2-B, IRS-2B)以及 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)等相互作用, 同时也与含特定结构域(STTK、BZIP)的蛋白质, 神经相关的蛋白 VGLUT1 (vesicular glutamate transporters 1)、putative SYT 1_3 (synaptotagmin), 表皮与骨架相关的蛋白 Bursicon alpha、DSPP (dentin sialophosphoprotein), 糖蛋白激素(glycoprotein hormone beta 5, GPHB5), 胰岛素通路下游蛋白 PI3K、Akt (threonine/serine protein kinase) 相互作用。对这些互作蛋白参与的生物过程进行分析, 从而推测 *LvILP1* 参与了跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞对激素刺激的反应、葡萄糖稳态、脂质稳态、对饥饿的反应、正向调节生长发育以及正向调节边界卵泡细胞的迁移等生物过程。

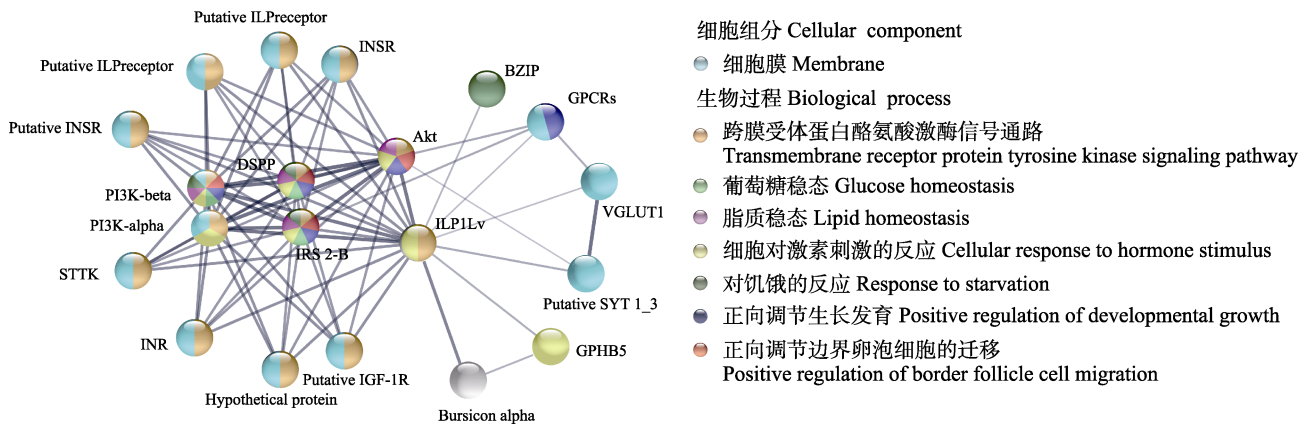


图 7 *LvILP1* 互作蛋白及其参与的生物过程

Fig.7 Interacting proteins of *LvILP1* and the biological processes involved

2.6 *LvILP1* 基因的表达

凡纳滨对虾早期发育阶段的转录组数据显示, *LvILP1* 在早期不同的发育阶段均有表达, 在蚤状幼体时期表达量最高, 之后表达量逐渐下降(图 8A)。RT-qPCR 分析凡纳滨对虾成体不同组织中 *LvILP1* 的表达特征, 结果显示, *LvILP1* 在凡纳滨对虾各组织中均有表达, 但表达量有差异, 在眼柄中表达量最高, 其次是卵巢、表皮、肌肉、胃、脑、肠等组织(图 8B), 这表明 *LvILP1* 基因表达广泛, 在多种组织中具有重要的生物学作用。

3 讨论

本研究鉴定了一种凡纳滨对虾 *ILP* 基因, 蛋白理化性质分析结果显示 *LvILP1* 属于碱性不稳定的亲水性蛋白。在脊椎动物中, 胰岛素是通过与细胞表面的

糖蛋白受体结合从而发挥作用(Kahn, 1985), 与之一致的是, *LvILP1* 定位在细胞膜外, 可能与胰岛素一样通过与细胞膜上的受体结合从而发挥生物学功能。结构分析显示, *LvILP1* 具有胰岛素超家族典型的 IIGF 结构域, 由 N 端信号肽、B 链、C 肽、A 链组成, 说明 *LvILP1* 属于胰岛素超家族成员。Pierce 等(2001)将秀丽隐杆线虫中的 40 种 *ins* 基因根据其二硫键的排列顺序分为 α 、 β 和 γ 三种类型; *LvILP1* 在 A 链上有 4 个保守的半胱氨酸, 其中第 1 个保守的半胱氨酸通过二硫键连接到第 3 个, 而第 2 个和第 4 个通过链间二硫键分别与 B 链中的 2 个保守半胱氨酸相连, 共形成 3 个二硫键, 属于 γ 型蛋白。胰岛素的 A 链是由 Loop 连接的 2 个 α -螺旋组成, B 链由延伸的 N-末端、 α -螺旋、 β -转角和延伸的 C-末端组成(Murray-Rust *et al*, 1992), 不同的是, 凡纳滨对虾 *LvILP1* 具有无规卷曲结构, 且 A、B 链均主要由 2 个 α -螺旋结构

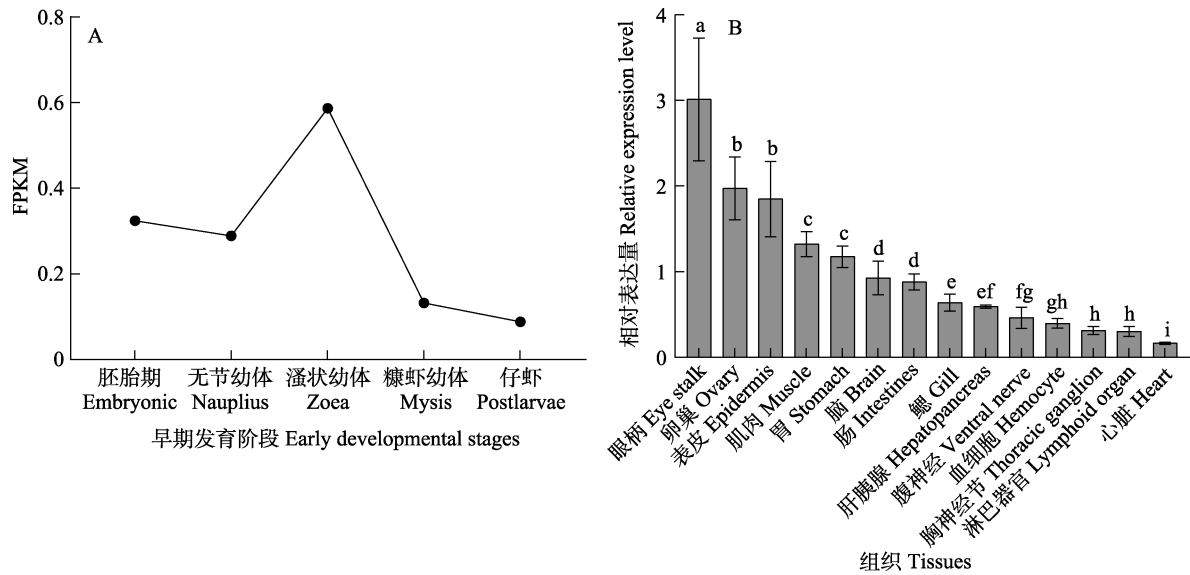


图 8 *LvILP1* 基因的表达特征
Fig.8 The expression profiles of *LvILP1* gene

A: *LvILP1* 在早期发育阶段中的表达; B: *LvILP1* 在对虾各组织中的表达。柱上不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

A: Expression of *LvILP1* in early development stages; B: Expression of *LvILP1* in adult tissues.
Different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

组成, 由此推测 α -螺旋结构中存在 *LvILP1* 发挥功能的位点, 但其具体的功能位点及机制有待进一步研究。

多序列比对显示, 无脊椎动物中 *ILP* 基因的序列并不保守, 但都具有 IIGF 结构域, 这可能与 A、B 链上存在保守的半胱氨酸以及保守的断裂位点有关, 这些保守位点对 *ILP* 基因的功能结构域十分重要, 所以在长期进化过程中被保留, 而基因序列的变化可能是为了适应生存环境变化而不断发生的突变。此外, 我们发现, 无脊椎动物中软甲纲十足目的 *ILP* 结构域区段序列最长, 且在 C 肽内存在特别的 motif5, 说明十足目 *ILP* 在进化过程中发生了序列扩张。系统进化分析显示, 海葵 *ILP* 作为外群, 胰岛素超家族基因初步分为 3 个大支, 无脊椎动物 *ILP7* 类与甲壳动物 *ILP* 聚为一个大支, 脊椎动物与棘皮动物 *Relaxin* 聚为一支, 脊椎动物 *IGF-I*、*IGF-II*、*Insulin* 与 *ILP7* 之外的昆虫其他 *ILPs* 聚为一个大支。其中, 无脊椎动物 *ILP7* 类在进化距离上与海葵 *ILP* 最近, 暗示 *ILP7* 类可能更接近于胰岛素超家族的祖先基因; 果蝇 *ILP7* 与甲壳动物 *ILP* 聚在一起, 说明果蝇中 *ILP7* 与甲壳动物 *ILP* 的亲缘关系较近, 其可能与昆虫 *ILP* 的起源有关; 脊椎动物 *Relaxin 3* 与棘皮动物 *Relaxin-like* 聚为一支, 说明 *Relaxin* 在进化中比较保守, 它们的进化关系介于无脊椎动物 *ILP7* 类、甲壳动物 *ILP* 与脊椎动物 *IGF*、*Insulin* 及昆虫 *ILPs* 之间; *ILP7* 之外的昆虫其他 *ILPs* 与脊椎动物 *Insulin* 聚在一起, 表明昆

虫一部分 *ILPs* 与脊椎动物 *Insulin* 的亲缘关系较近。在基因进化研究中, Cui 等(2021)发现, 昆虫 *ILP7* 类比胰岛素超家族其比成员更古老; 此外, 人类中的研究显示 *Relaxin 3* 是 *Relaxin* 家族的祖先基因(Chan *et al*, 2011), 同时, 鱼类中发现 *Relaxin* 与 *Insulin*、*IGF* 的祖先同源性较高(Caruso *et al*, 2011), 而哺乳动物 *Relaxin* 和 *Insulin-like* 基因的单拷贝祖先在产生功能分化之前经历了 2 轮全基因组复制(Hoffmann *et al*, 2011)。这与本研究的结果基本一致, 由此说明无脊椎动物 *ILP7* 类可能是更为古老的基因, 胰岛素超家族成员的进化顺序可能为 *ILP*、*Relaxin*、*Insulin*、*IGF-II*、*IGF-I*。它们的结构特点也提供一些线索, *ILP*、*Relaxin*、*Insulin* 形成成熟的蛋白需要切割 C 肽, 而 *IGF-I* 与 *IGF-II* 则是需要切割在羧基末端存在的 E 肽(为预测的 motif4) (Pierce *et al*, 2001)。

早期发育阶段的转录组数据显示, *LvILP1* 在早期发育阶段均有表达, 这与 *IGF* 促进生长发育的功能相似(Alekseenkova *et al*, 2022), 说明 *LvILP1* 对对虾的生长发育有重要作用。荧光定量分析显示, *LvILP1* 在成体对虾各组织中均有表达, 这与果蝇 *ILP7* 只在少数神经细胞表达不同; *LvILP1* 在眼柄中相对表达量最高, 这与罗氏沼虾中的结果一致(Jiang *et al*, 2020), 甲壳类动物眼柄中的 X-器官-窦腺复合体(X-organ-sinus gland complex, XO-SG)是重要的神经内分泌器官, 也是神经肽激素的表达位置(Grunewald

et al, 1995; Amo *et al*, 2011), 这与昆虫中多种 *ILP* 主要在大脑神经分泌细胞中表达相似; 此外, *LvILP1* 在卵巢、表皮、肌肉、胃等组织中表达量较高, 推测 *LvILP1* 对这些组织中的特异性生理活动具有调节作用。

LvILP1 基因转录因子预测显示, 关键转录因子 FoxO3 是胰岛素信号通路的下游基因, GR 是胰岛素的转录因子, C/EBP 和 STAT 是 *IGF- I* 的转录因子, 它们在控制细胞周期、细胞凋亡与自噬、细胞分化与增殖、生长发育、新陈代谢等一系列基本生物过程中具有重要作用(Lu *et al*, 2005; Xin *et al*, 2020; Yin *et al*, 2020; Calissi *et al*, 2021), 因此, 我们推测 FoxO3、GR、C/EBP 和 STAT 参与调控 *LvILP1* 基因的转录。另一方面, 基因转录与启动子区中 CpG 岛的甲基化状态有关, 若 CpG 序列中的 C 未被甲基化, 基因可以正常转录, 反之基因转录被抑制(Jones *et al*, 2022); 本研究在 *LvILP1* 启动子区域内发现一个 203 bp 的 CpG 岛, 其中包含 16 个 CpG 位点, 这可能对 *LvILP1* 基因的转录具有重要的调节作用。

互作蛋白预测显示, *LvILP1* 能够与胰岛素超家族基因的受体相结合, 同时与 VGLUT1、Putative SYT 1_3、GPHB5、Bursicon alpha 等分子相互作用; VGLUT1 是囊泡型谷氨酸转运蛋白 1, 其功能是将中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)中的主要兴奋性神经递质谷氨酸输送到突触囊泡中(Du *et al*, 2020); Putative SYT 1_3 是突触结合蛋白, 介导神经元和神经内分泌细胞中的超快胞吐作用, 从而促进神经递质和神经肽激素的分泌(Park *et al*, 2018); GPHB5 是糖蛋白激素, 可激活促甲状腺激素释放激素受体结合活性, 作用于甲状腺激素介导的信号通路参与生长发育的调节(Querat, 2021); Bursicon 称为鞣化激素, 是昆虫蜕皮后过程中的主要调节激素, 在旧表皮层脱落后, 鞣化激素被合成并释放到血淋巴中, 促进新表皮层硬化(Dong *et al*, 2015; Scopelliti *et al*, 2016)。

进化树分析显示 *LvILP1* 与果蝇 *ILP7* 聚在一支, 说明它们很可能具有相似的功能。在果蝇中表达 *ILP7* 的神经元参与 Bursicon 引起的外骨骼硬化(Flaven-Pouchon *et al*, 2020), 说明 *ILP7* 可能与 Bursicon 有互作以调节表皮组织的形成; 雌性果蝇需要特异性 *ILP7* 表达来促进产卵中输卵管的功能(Garner *et al*, 2018); 埃及伊蚊中 *ILP7* 参与调节脂质代谢, 从而控制卵巢发育所需的能量(Ling *et al*, 2017)。

以上结合 *LvILP1* 基因的表达特征、转录因子预测、互作蛋白分析及果蝇 *ILP7* 的研究, 我们推测

LvILP1 在调控对虾生长发育、对激素刺激的反应、神经系统稳态、碳水化合物稳态、蜕皮后组织重建以及生殖发育中发挥作用。本研究为进一步探索凡纳滨对虾 *ILP* 基因的结构与功能打下基础, 同时也为凡纳滨对虾的分子遗传育种提供候选基因。

参 考 文 献

- ALEKSEENKOVA E N, SELKOV S A, KAPUSTIN R V. Fetal growth regulation via insulin-like growth factor axis in normal and diabetic pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*, 2022, 50(7): 947-960
- AMO K, ARAI H, UEBANSO T, *et al*. Effects of xylitol on metabolic parameters and visceral fat accumulation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2011, 49(1): 1-7
- CALISSI G, LAM E W, LINK W. Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(1): 21-38
- CARUSO M A, SHERIDAN M A. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(2): 227-247
- CHAN L J, HOSSAIN M A, SAMUEL C S, *et al*. The relaxin peptide family—structure, function and clinical applications. *Protein and Peptide Letters*, 2011, 18(3): 220-229
- CHANDLER J C, GANDHI N S, MANCERA R L, *et al*. Understanding insulin endocrinology in decapod crustacea: Molecular modelling characterization of an insulin-binding protein and insulin-like peptides in the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(9): 1832
- CHRISTIE A E, RONCALLI V, LENZ P H. Diversity of insulin-like peptide signaling system proteins in *Calanus finmarchicus* (Crustacea; Copepoda) - Possible contributors to seasonal pre-adult diapause. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 236: 157-173
- CUI Z X, LIU Y, YUAN J B, *et al*. The Chinese mitten crab genome provides insights into adaptive plasticity and developmental regulation. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2395
- DONG S, ZHANG H, CHEN X, *et al*. The neuropeptide bursicon acts in cuticle metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2015, 89(2): 87-97
- DU X, LI J, LI M, *et al*. Research progress on the role of type I vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases. *Cell Bioscience*, 2020, 10: 26
- FANG Z P, MENG X H, LI X P, *et al*. Genetic diversity analysis of domestic commercial brands seedlings of *Litopenaeus vannamei* based on microsatellite molecular markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 101-109 [方振朋, 孟宪红, 李旭鹏, 等. 基于微卫星分子标记的凡纳滨对虾商业苗种遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(5):

- 101–109]
- FLAVEN-POUCHON J, ALVAREZ J V, ROJAS C, *et al.* The tanning hormone, bursicon, does not act directly on the epidermis to tan the *Drosophila* exoskeleton. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 17
- FU K Y, ZHU T T, GUO W C, *et al.* Knockdown of a putative insulin-like peptide gene *LdILP2* in *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference impairs pupation and adult emergence. *Gene*, 2016, 581(2): 170–177
- GARNER S R C, CASTELLANOS M C, BAILLIE K E, *et al.* *Drosophila* female-specific *Ilp7* motoneurons are generated by Fruitless-dependent cell death in males and by a double-assurance survival role for Transformer in females. *Development*, 2018, 145(1): dev150821
- GRUNEWALD R W, WEBER I I, KINNE R K. Renal inner medullary sorbitol metabolism. *American Journal of Physiology*, 1995, 269(5 Pt 2): F696–701
- HADDAD A N, LEYRIA J, LANGE A B. Identification of a tachykinin receptor and its implication in carbohydrate and lipid homeostasis in *Rhodnius prolixus*, a chagas disease vector. *General and Comparative Endocrinology*, 2022, 320: 114010
- HOFFMANN F G, OPAZO J C. Evolution of the relaxin/insulin-like gene family in placental mammals: Implications for its early evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 2011, 72(1): 72–79
- JIANG Q, JIANG Z, GU S, *et al.* Insights into carbohydrate metabolism from an insulin-like peptide in *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 293: 113478
- JONES E R, GRIFFITT R J. Oil and hypoxia alter DNA methylation and transcription of genes related to neurological function in larval *Cyprinodon variegatus*. *Aquatic Toxicology*, 2022, 251: 106267
- KAHN C R. The molecular mechanism of insulin action. *Annual Review of Medicine*, 1985, 36: 429–451
- LI F, ZHANG S, FU C, *et al.* Molecular and functional analysis of the insulin-like peptides gene in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 280: 209–214
- LI Y N, REN X B, LIU Z C, *et al.* Insulin-like peptide and FoxO mediate the trehalose catabolism enhancement during the diapause termination period in the Chinese oak silkworm (*Antheraea pernyi*). *Insects*, 2021, 12(9): 784
- LIAO S, POST S, LEHMANN P, *et al.* Regulatory roles of *Drosophila* insulin-like peptide 1 (DILP1) in metabolism differ in pupal and adult stages. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 180
- LING L, KOKOZA V A, ZHANG C, *et al.* MicroRNA-277 targets insulin-like peptides 7 and 8 to control lipid metabolism and reproduction in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(38): e8017–e8024
- LIU J Y, LIU J H, KONG J, *et al.* Development of SNP markers and verification analysis of relationship on family in *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 108–116 [刘峻宇, 刘均辉, 孔杰, 等. 凡纳滨对虾 SNP 标记开发与家系亲缘关系验证分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 108–116]
- LIU Y, LIAO S, VEENSTRA J A, *et al.* *Drosophila* insulin-like peptide 1 (DILP1) is transiently expressed during non-feeding stages and reproductive dormancy. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26620
- LU N Z, CIDLOWSKI J A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Molecular Cell*, 2005, 18(3): 331–342
- MESSEGUER X, ESCUDERO R, FARRÉ D, *et al.* PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 2002, 18(2): 333–334
- MITCHELL M L, HOSSAIN M A, LIN F, *et al.* Identification, synthesis, conformation and activity of an insulin-like peptide from a Sea Anemone. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1785
- MURRAY-RUST J, MCLEOD A N, BLUNDELL T L, *et al.* Structure and evolution of insulins: Implications for receptor binding. *Bioessays*, 1992, 14(5): 325–331
- NAGATA K, MARUYAMA K, KOJIMA K, *et al.* Prothoracicotropic activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 266(2): 575–578
- PANG Y, ZHANG X, YUAN J, *et al.* Characterization and expression analysis of insulin growth factor binding proteins (IGFBPs) in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021a, 22(3): 1056
- PANG Y, ZHANG X, YUAN J, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 gene is important in growth and molting of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Marine Science*, 2021b, 8: 681966
- PARK Y, RYU J K. Models of synaptotagmin-1 to trigger Ca²⁺-dependent vesicle fusion. *FEBS Letters*, 2018, 592(21): 3480–3492
- PERILLO M, ARNONE M I. Characterization of insulin-like peptides (ILPs) in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*: Insights on the evolution of the insulin family. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 205: 68–79
- PIERCE S B, COSTA M, WISOTZKEY R, *et al.* Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes and Development*, 2001, 15(6): 672–686

- QUERAT B. Unconventional actions of glycoprotein hormone subunits: A comprehensive review. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 731966
- RIEHLE M A, FAN Y, CAO C, *et al.* Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Expression, cellular localization, and phylogeny. *Peptides*, 2006, 27(11): 2547–2560
- SCOPELLITI A, BAUER C, CORDERO J B, *et al.* Bursicon- α subunit modulates dLGR2 activity in the adult *Drosophila melanogaster* midgut independently to Bursicon- β . *Cell Cycle*, 2016, 15(12): 1538–1544
- SU M, ZHANG X, YUAN J, *et al.* The role of insulin-like peptide in maintaining hemolymph glucose homeostasis in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(6): 3268
- WANG L, CHEN H, WANG L, *et al.* An insulin-like peptide serves as a regulator of glucose metabolism in the immune response of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 108: 103686
- WANG Z, TAN D, WANG F, *et al.* Insulin peptides and their receptors regulate ovarian development and oviposition behavior in *Diaphorina citri*. *Insect Science*, 2022, 30(1): 95–108
- WEI J, ZHANG X, YU Y, *et al.* Comparative transcriptomic characterization of the early development in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106201
- WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology*, 1999, 112: 531–552
- WU Q, BROWN M R. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annual Review of Entomology*, 2006, 51: 1–24
- XIN P, XU X, DENG C, *et al.* The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology*, 2020, 80: 106210
- YAMAGUCHI S T, KOBAYASHI R, TOMITA J, *et al.* The regulation of circadian rhythm by insulin signaling in *Drosophila*. *Neuroscience Research*, 2022, 183: 76–83
- YIN H M, YAN L F, LIU Q, *et al.* Activating transcription factor 3 coordinates differentiation of cardiac and hematopoietic progenitors by regulating glucose metabolism. *Science Advances*, 2020, 6(19): 9466
- ZHENG S, CHIU H, BOUDREAU J, *et al.* A functional study of all 40 *Caenorhabditis elegans* insulin-like peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(43): 16912–16922

(编辑 冯小花)

Gene Structure and Expression Analysis of Insulin-Like Peptide in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*

SU Manwen^{1,2,3}, ZHANG Xiaojun^{1,2,3①}, YUAN Jianbo^{1,2}, ZHANG Xiaoxi^{1,2}, YANG Ming⁴, LI Fuhua^{1,2,3}

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Oceanic & Fishery Technology Center of Fuzhou, Fuzhou 350005, China)

Abstract Insulin-like peptide (ILP) is a member of the insulin superfamily with evolutionary conservation and is one of the most important factors affecting animal life activities. In this study, a full-length of *ILP1* gene in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, was cloned, and the mRNA length consisted of 812 bp with an open reading frame (ORF) of 543 bp, encoding 180 amino acids. Sequence analysis showed that the predicted molecular weight of LvILP1 protein was 20.81 kDa, and the theoretical isoelectric point was 9.45 and the instability coefficient was 96.20. There was a signal peptide, no transmembrane structure. It was deduced that it was located outside the cell and is an alkaline unstable secreted protein. Structure prediction found that LvILP1 protein had the conserved IIGF domain of the insulin superfamily, which was composed of the N-terminal signal peptide, B-chain, C-peptide and

① Corresponding author: ZHANG Xiaojun, E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

A-chain, as well as six conserved cysteine sites and two cleavage sites. Phylogenetic analysis found that LvILP1 was most closely related to ILP7 in *Penaeus monodon*, and clustered with ILP1 of Crustaceans to form a branch, and then clustered with ILP7 of Invertebrate, Relaxin, Insulin and Insulin-like growth factor (IGF) of vertebrate; ILP7 of Invertebrate was evolutionarily closest to outgroup sea anemone ILP1, suggesting that it may be more similar to the ancestor gene of the insulin superfamily. Transcription factor prediction found that the possible transcription factors of *LvILP1* are Forkhead box protein O3 (FoxO3), Glucocorticoid receptor (GR), CAAT region/enhancer binding protein (C/EBP) and Signal transduction and transcription activator protein (STAT); The protein interaction analysis found that *LvILP1* interacted with Insulin receptor (IR) on the cell membrane, nerve signaling molecules (VGLUT1, SYT 1_3), Glycoprotein hormone beta 5 (GPHB5), Bursicon alpha, etc. By analyzing the biological function analysis of these transcription factors and interacting proteins, it is speculated that *LvILP1* may play an important role in regulating shrimp growth and development, response to hormonal stimulation, nervous system homeostasis, carbohydrate homeostasis, postmolt tissue remodeling and reproductive development. The analysis showed that *LvILP1* was expressed in the early developmental stage of shrimp, and expressed in all tissues of adults, but the expression level in the eye stalk was the highest. This study provides important information for in-depth understanding of the structure, evolution, function and expression of *ILP* in shrimp, as well as clues for molecular breeding and healthy farming of shrimp.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Insulin-like peptide; Gene structure; Functional prediction; Expression analysis