

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171106002

http://www.yykxjz.cn/

李旭鹏, 孔杰, 孟宪红, 栾生, 罗坤. WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 106–113

Li XP, Kong J, Meng XH, Luan S, Luo K. Effect of white spot syndrome virus infection on *bantam* and candidate target genes in the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 106–113

WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响*

李旭鹏¹ 孔杰^{1,2①} 孟宪红¹ 栾生^{1,2} 罗坤¹

(1. 农业农村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;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 *Bantam* 能够调控细胞增殖、细胞凋亡等过程, 影响生物的免疫过程。本研究利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对感染 WSSV 的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肝胰腺和鳃组织内 *bantam* 表达水平进行检测, 发现感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾肝胰腺中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的(0.16±0.03)($P<0.05$)、(0.63±0.26)、(0.32±0.06)($P<0.05$)和(0.41±0.13)倍; 中国明对虾鳃中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的(0.30±0.17)($P<0.05$)、(1.88±0.26)($P<0.01$)、(0.84±0.36)和(0.51±0.25)倍。利用 miRanda 软件进一步对中国明对虾 *bantam* 靶基因进行预测分析, 评分最高的靶基因是泛素缀合酶 E2。中国明对虾泛素缀合酶 E2 包含 UBCc 功能域。多序列比对显示, UBCc 功能域氨基酸残基序列在不同物种间保守性较高。进化树分析显示, 分类学地位相近的物种的泛素缀合酶 E2 聚为一类。qRT-PCR 检测感染 WSSV 的中国明对虾肝胰腺和鳃中的泛素缀合酶 E2 表达水平, 结果显示, 在感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾肝胰腺中泛素缀合酶 E2 的表达水平分别是对照组的(0.54±0.10)、(1.19±0.62)、(3.69±0.51)($P<0.01$)和(1.94±0.07)($P<0.05$)倍; 中国明对虾鳃中泛素缀合酶 E2 的表达水平分别是对照组的(0.22±0.05)、(1.34±0.38)、(4.29±0.52)($P<0.01$)和(1.28±0.79)倍。研究表明, *bantam* 和泛素缀合酶 E2 的表达都受 WSSV 侵染的影响, 可能与中国明对虾和 WSSV 之间的互作相关。但 *bantam* 和泛素缀合酶 E2 表达水平的变化是对虾抵抗 WSSV 侵染过程的免疫反应, 还是宿主基因被病毒胁迫后的结果, 需要进一步验证。

关键词 中国明对虾; WSSV; *bantam*; 泛素缀合酶 E2; 表达

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0106-08

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国传统养殖品种, 其肉质鲜美, 营养价值高。中国明对虾

自然群体主要分布于中国的黄海、渤海海域以及朝鲜半岛的西海岸附近(孟宪红, 2010)。白斑综合征(White

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017GH07; 2018GH10)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022015013)、山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2014CQ001)、泰山学者种业人才团队项目、现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)和国家自然科学基金面上项目(41676148; 31572616)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017GH07; 2018GH10), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institutes (20603022015013), Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2014CQ001), Taishan Scholar Program for Seed Industry, China Agriculture Research System(CARS-48), and National Natural Science Foundation of China (41676148; 31572616)].

李旭鹏, E-mail: lixupeng@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-11-06, 收修改稿日期: 2017-12-23

spot syndrome, WSS)是目前对虾养殖业中主要病害之一,该病发病后对虾死亡速度快、死亡率高,10 d 内死亡率接近 100%。该病的病原是白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV),该病毒属于线形病毒科(Nimaviridae),是一种双链 DNA 病毒(Huang *et al*, 2002; van Hulten *et al*, 2001; Yang *et al*, 2001)。WSSV 对中国明对虾的致死率高,对虾死亡速度快,人工感染实验中的中国明对虾平均存活时间约为 5~7 d(冯亚萍等, 2017)。microRNA (miRNA)是一类长度约为 21~25 bp 的小分子非编码 RNA,参与转录后调控过程,能够与目标靶基因的 mRNA 结合来调控目的基因的翻译过程,从而起到对基因表达水平的调控。研究表明,miRNA 能够参与宿主与病原的互作过程。前期研究发现,半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miR-223 参与免疫应答过程,在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后的免疫组织中呈现差异表达趋势(颜慧等, 2015)。感染 WSSV 后的斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内 11 种 miRNA 呈现差异表达趋势(Kaewkascholkul *et al*, 2016),日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中发现,miR-965 和 miR-100 可能与对虾和病毒间的互作相关(Le *et al*, 2016; Yang *et al*, 2014)。这些研究提示,特殊 miRNA 在对虾和病毒间互作过程中可能发挥调控作用,但是,哪些 miRNA 发挥了具体调控作用目前还不清楚。*Bantam* 是一种 miRNA,研究表明, *bantam* 能够参与调控生物生长(Hipfner *et al*, 2002)、细胞增殖与凋亡(Nolo *et al*, 2006)。在感染苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)后的斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)中, *bantam* 表达水平呈上调趋势,提示其在宿主-病毒互作中发挥调控作用(Shi *et al*, 2016)。作者对感染 WSSV 后的中国明对虾 *bantam* 及其靶基因特征进行研究,期望能在 miRNA 水平为中国明对虾抗 WSSV 研究提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用中国明对虾为中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心培育的“黄海 2 号”新品种。对虾养殖水经砂滤、紫外线消毒、5 mg/L 有效氯等方法进行处理。

1.2 病毒悬液制备和浓度测定

取感染 WSSV 后死亡的中国明对虾肌肉组织,在冰浴中剪碎,按照 1 g 肌肉组织加入 10 ml PBS,

使用 Precellys 24 组织破碎仪(Bertin, 法国)进行破碎,对匀浆液使用 Centrifuge 5804R 离心机(Eppendorf, 德国) 12000 r/min 离心后,取上清液,作为 WSSV 病毒悬液。使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪和 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)(TaKaRa)试剂盒,利用探针法 qRT-PCR 技术对病毒悬液中的 WSSV 含量进行检测。引物和探针序列见表 1。PCR 反应体系: 10 μl Premix Ex Taq (Probe qPCR)(2×), 0.4 μl ROX Reference Dye II, 0.4 μl WSSV forward primer (10 μmol/L), 0.4 μl WSSV reverse primer (10 μmol/L), 0.8 μl WSSV probe (10 μmol/L), 2 μl 病毒悬液, dH₂O 补足 20 μl。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环。根据 WSSV 标准品浓度和 C_t 值进行线性回归分析,根据待检测病毒悬液的 C_t 值,计算其中的病毒浓度,平行实验重复 3 次。

1.3 WSSV 人工感染实验

使用注射器从中国明对虾第 5 腹节处注射 10 μl 病毒悬液。每尾对虾的 WSSV 注射量为 1×10⁵ copies。分别在注射病毒悬液后的 6、12、24、48 h,取对虾肝胰腺和鳃组织。取正常对虾作为对照。每组实验取 3 个生物学重复,肝胰腺和鳃组织经过液氮速冻后,放入-80℃保存,用于后期 RNA 提取。

1.4 miRNA 提取及 qRT-PCR

使用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒(天根),按照说明书进行 miRNA 的提取。提取后的 miRNA 保存在-80℃,用于后期 qRT-PCR 实验。采用 Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit(Clontech, 美国)进行 miRNA 加 A 尾反转录,合成 cDNA 模板。根据 *bantam* 序列(5'-UGAGAUC AUUGUGAAAGCUGAUU-3')设计 qRT-PCR 引物(表 1)。使用 qRT-PCR 技术,对感染 WSSV 后不同时间段的中国明对虾肝胰腺和鳃组织中的 *bantam* 表达水平进行检测。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa)试剂盒。内参检测选用试剂盒自带的 U6 引物。反应体系: cDNA 模板 2 μl、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)(2×) 10 μl、ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μl、RT primer (10 μmol/L) 0.4 μl、mRQ 3' Primer 0.4 μl、ddH₂O 6.8 μl。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 熔解曲线分析。所有实验设置 3 个平行,使用 2^{-ΔΔC_t} 法对结果进行处理,实验中所涉及的数据均为平均值±标准差(Mean±SD),使用 SPSS 软件 *t* 检验进行显著性分析, *P*<0.05 为差异显著, *P*<0.01 为差异极显著。

1.5 靶基因分析

使用 miRanda 软件 (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 和本实验室已有的中国明对虾高通量转录组测序数据中的 3'UTR 序列, 对 *bantam* 靶基因进行预测。取评分最高靶基因作为研究对象。使用 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit (Clontech) 试剂盒, 利用 RACE 技术获得靶基因 cDNA 序列。利用 NCBI 数据库中的 Search for Conserved Domains within a protein or coding nucleotide sequence 功能 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对靶基因序列进行功能域分析。从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找其他物种的靶基因氨基酸序列, 利用 MEGA 5 软件 (<http://www.megas-oftware.net>) 进行进化树分析, 用 DNAMAN (version 6) (Lynnon Biosoft, 加拿大) 软件进行多序列对比分析。

提取感染 6、12、24、48 h 后的中国明对虾肝胰腺和鳃组织总 RNA, 按照 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(天根)说明书操作。利用 qRT-PCR 技术对靶基因表达水平进行检测。内参选择 18S rRNA, 引物序列见表 1。反应体系和程序同 *bantam* 表达水平检测实验。

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

探针/引物名称 Probe/primer name	序列 Sequences
WSSV forward primer	TGGTCCCCTCCTCATCTCAG
WSSV reverse primer	GCTGCCTTGCCGAAATTA
WSSV probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTA TCACACA
<i>bantam</i> RT primer	TGAGATCATGTGAAAGCTGATT
E2 RT forward primer	TGATGATGTCAGCGAACAAAG
E2 RT reverse primer	ATGGAAGCATGAGGTAACGAA
18S forward primer	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S reverse primer	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

2 结果

2.1 *bantam* 表达水平

研究结果显示, 感染 WSSV 的中国明对虾肝胰腺中的 *bantam* 表达水平呈现下调趋势。在感染 WSSV 后的 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾肝胰腺中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的 $(0.16 \pm 0.03)(P < 0.05)$ 、 (0.63 ± 0.26) 、 $(0.32 \pm 0.06)(P < 0.05)$ 和 (0.41 ± 0.13) 倍。感染 WSSV 的中国明对虾鳃中的 *bantam* 表达水平呈现波动趋势。在感染 WSSV 后的 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾鳃中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的

$(0.30 \pm 0.17)(P < 0.05)$ 、 $(1.88 \pm 0.26)(P < 0.01)$ 、 (0.84 ± 0.36) 和 (0.51 ± 0.25) 倍。

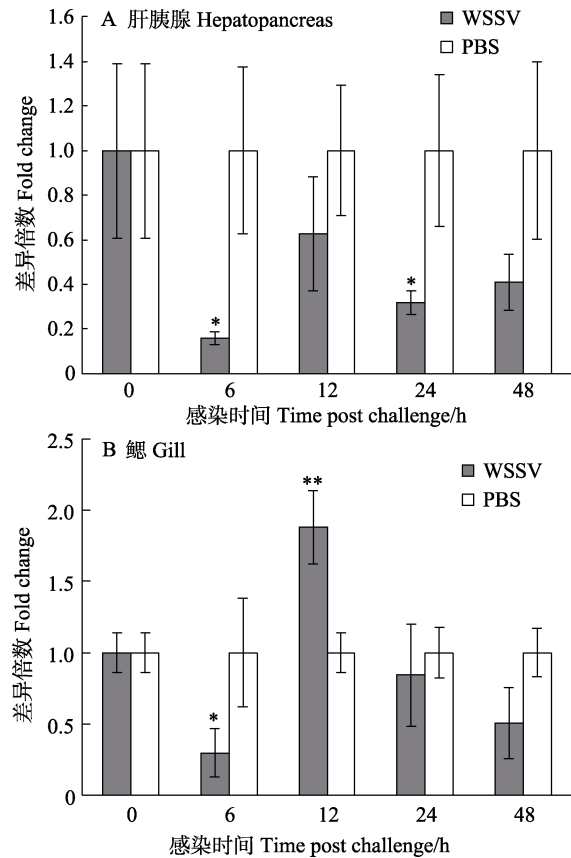


图 1 感染 WSSV 后中国明对虾肝胰腺和鳃中 *bantam* 表达水平

Fig.1 Expression level of *bantam* in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp

*为差异显著 ($P < 0.05$); **为差异极显著 ($P < 0.01$)。下同
* denoted significant difference ($P < 0.05$); ** denoted highly significant difference ($P < 0.01$). The same as below

2.2 *bantam* 靶基因预测及序列分析

miRanda 软件预测评分最高的中国明对虾 *bantam* 候选靶基因是泛素缀合酶 E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2), miRanda 评分为 183, 预测 *bantam* 与靶基因泛素缀合酶 E2 结合位点的自由结合能是 -27.89 kcal/mol。

中国明对虾泛素缀合酶 E2 基因编码区共 540 bp, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAG, 共编码 179 个氨基酸。功能域预测结果显示, 第 33~80 氨基酸残基构成 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 的 catalytic (UBC_e) 功能域 (图 2)。由来自 5 种脊椎动物、5 种无脊椎动物、3 种真菌和 2 种植物的泛素缀合酶 E2 氨基酸序列进化树分析结果显示, 中国明对虾的泛素缀合酶 E2 蛋白首先与甲壳动物端足虫 (*Hyalella azteca*) 聚为一支, 其他无脊椎动物赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、果蝇

(*Drosophila serrata*)、地中海实蝇(*Ceratitis capitata*)泛素缀合酶 E2 聚为一支。5 种脊椎动物分别是小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、人类(*Homo sapiens*)、珍珠鸡(*Numida meleagris*)、大山雀(*Parus major*)泛素缀合酶 E2 聚为一支。3 种子囊菌(*Umbilicaria pustulata*、*Diplocarpon rosae*、*Madurella mycetomatis*)泛素缀合酶 E2 聚为一支。2 种植物分别是可可(*Theobroma cacao*)和菠萝(*Ananas comosus*)泛

素缀合酶 E2 聚为一支(图 3)。多序列比对结果显示,泛素缀合酶 E2 蛋白的 UBCc 功能域氨基酸残基序列在不同物种间保守性较高。其中,5 种脊椎动物的泛素缀合酶 E2 氨基酸序列均以 MASQN 氨基酸残基序列开始,4 种无脊椎动物的泛素缀合酶 E2 氨基酸序列均以 MAQN 氨基酸残基开始。分类学地位较远的物种间的泛素缀合酶 E2 蛋白 N 端氨基酸序列变化较大,保守性总体略低于 C 端氨基酸序列(图 4)。

```

1 M A Q N I A P G N S T T A S P S K G N S D R A I A G R D S H
1 ATGGCCCAAAATATCGCACCAGGGAACAGCACGCGGAGTCCGAGCAAAGGGAACAGCGACAGGCCATAGCGGGGAGAGACTCGCAC
31 S V S K R L Q H E L M T L M M S A N K G I S A F P E G D N L
91 TCAGTCAGCAAAAGACTTCAACATGAGCTCATGACTTTGATGATGTCAGCGAACAAAGGCATCTCGGCTTCCAGAAAGGTGACAATCTC
61 F K W I G T I I G P A S T V Y E G L S Y K L S L E F P S S Y
181 TTCAAATGGATCGGCACAATCATTGGTCCAGCCTCCACGGTGTATGAGGGACTCTCCTACAAACTGTCTCTAGAATTCCTAGCAGTTAT
91 P Y S A P T V K F V T S C F H P N V D L H G N I C L D I L K
271 CCCTACAGCGCACCAACAGTCAAGTTCGTTACCTCATGCTTCCATCAAATGTCGACCTCCACGGTAACATCTGTCTAGACATCTTAAAA
121 E K W S A S Y D V R S I L L S I Q S L L G E P N N D S P L N
361 GAGAAGTGGTCTGCGTCATACGATGTGCGGTCGATTCTCCTTTTCATCCAGTCACTTACTTGGAGAACC GAATAATGACAGTCCCTGAAC
151 G H A A E L W A N Q V A Y K K H L L E H Y K K N N G D E K *
451 GGCCATGCAGCTGAGCTCTGGGCCAACCAAGTGGCATAAGAAACACCTGTTAGAGCACTACAAGAAGAATAATGGCGACGAGAAATAG
    
```

图 2 泛素缀合酶 E2 核酸以及预测氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the ubiquitin-conjugating enzyme E2 起始密码子和终止密码子用方框标出。UBCc 功能域用下划线标出
The initiation and termination codons are boxed. The UBCc domain is underlined

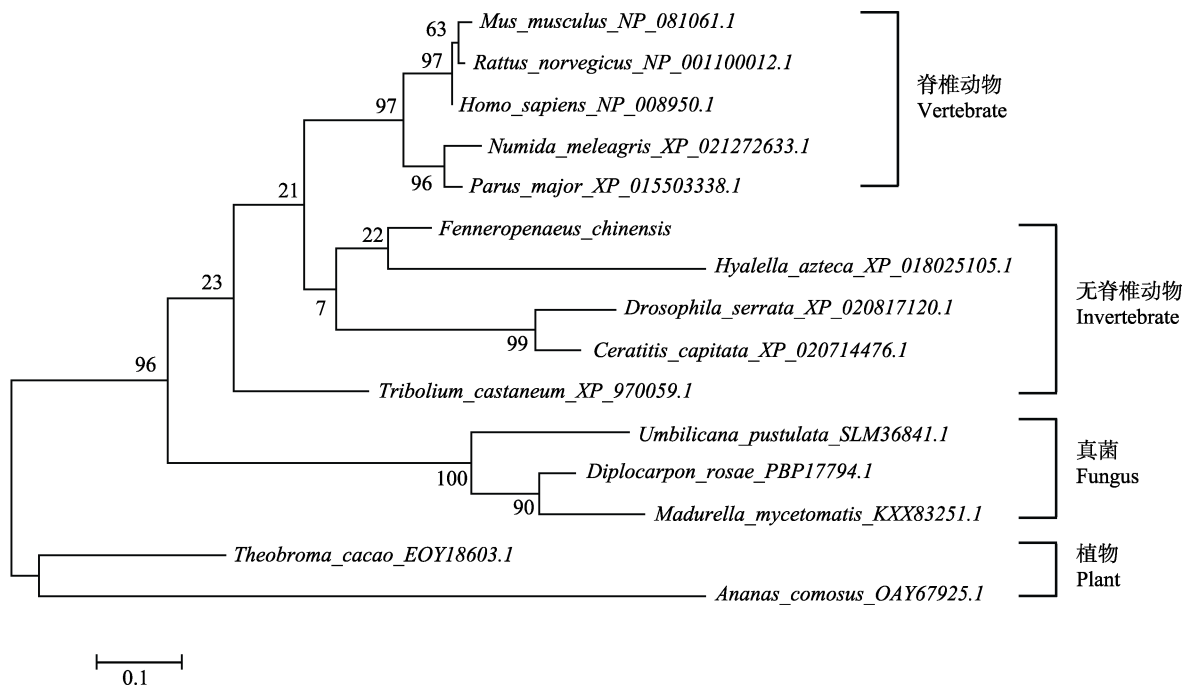


图 3 基于泛素缀合酶 E2 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis based on the deduced amino acid sequences of the ubiquitin-conjugating enzyme E2

2.3 泛素缀合酶 E2 表达水平

qRT-PCR 结果显示,在感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h 的中国明对虾肝胰腺中,泛素缀合酶 E2 的表达水平分别是对照组的(0.54±0.10)、(1.19±0.62)、

(3.69±0.51)($P<0.01$)和(1.94±0.07)($P<0.05$)倍。在感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h 的中国明对虾鳃中,泛素缀合酶 E2 表达水平是对照组的(0.22±0.05)、(1.34±0.38)、(4.29±0.52)($P<0.01$)和(1.28±0.79)倍(图 5)。

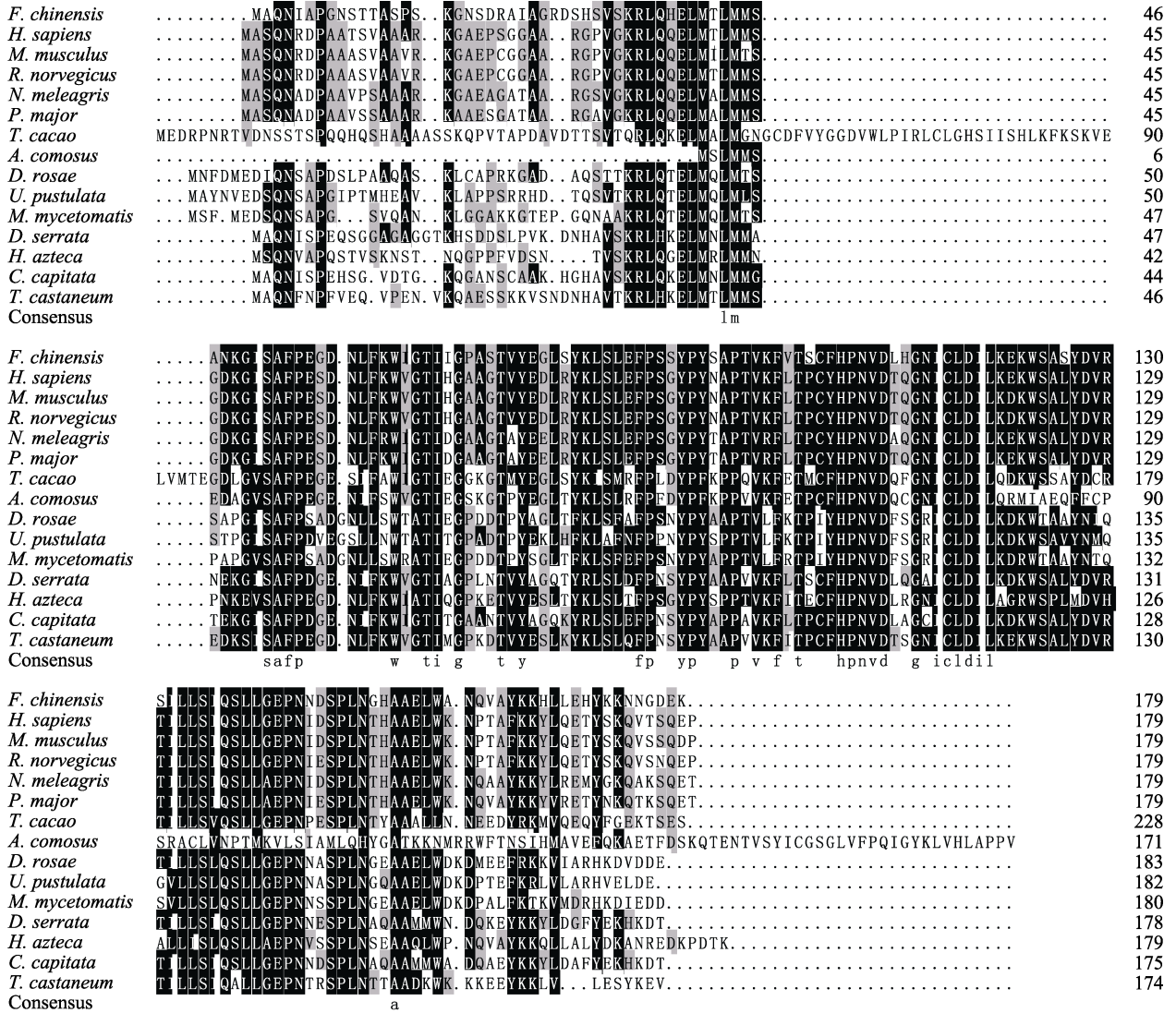


图 4 泛素缀合酶 E2 氨基酸多序列比对

Fig.4 Multiple alignments of deduced amino acid sequences of the ubiquitin-conjugating enzyme E2

多序列比对所用序列与图 3 中所用序列一致

The sequences used in the multiple alignments are the same sequences shown in Fig.3

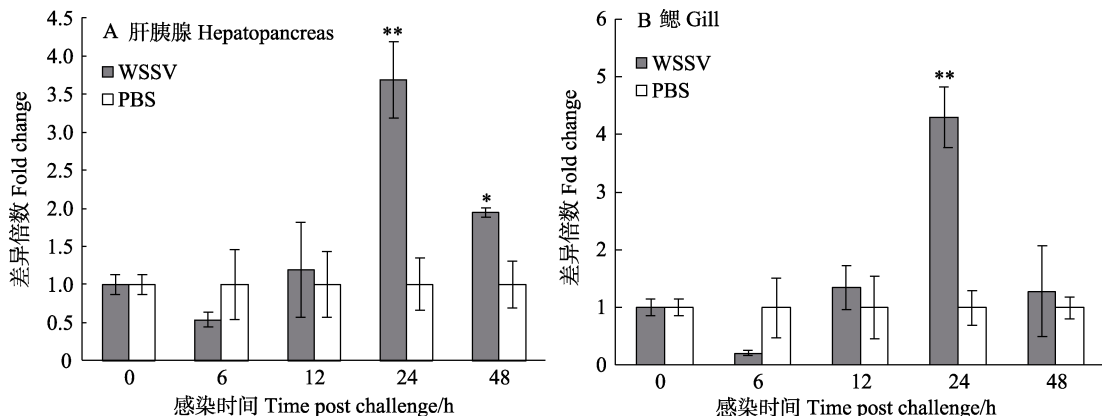


图 5 感染 WSSV 后中国明对虾肝胰腺和鳃内泛素缀合酶 E2 基因表达水平

Fig.5 Gene expression level of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp

3 讨论

高致死率的 WSSV 对中国明对虾产业发展带来巨大的影响。目前, 在中国明对虾抗 WSSV 研究领域, miRNA 方面的研究相对较少。针对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的研究表明, 8 种 miRNA 在感染 WSSV 后的对虾体内呈现差异表达(Zeng *et al.*, 2015)。在桃拉病毒感染的凡纳滨对虾体内, 22 种 miRNA 发生差异表达, 其中, 有 8 种 miRNA 上调表达, 14 种下调表达(马宁等, 2015)。这些研究提示, miRNA 在对虾与病毒互作中可能发挥重要调控作用。

本研究表明, *bantam* 在感染 WSSV 后的中国明对虾体内呈现显著的表达变化。研究表明, *bantam* 主要参与调控细胞增殖、细胞凋亡过程(Brennecke *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014)。同时, 有关于 *bantam* 参与免疫过程的报道。在感染桃拉病毒后的凡纳滨对虾肝胰腺内, *bantam* 的表达量下降到正常水平的 0.34 倍(马宁等, 2015)。感染 WSSV 的凡纳滨对虾肝胰腺内 *bantam* 的表达水平显著下调至正常对虾的 0.3 倍(Zeng *et al.*, 2015)。上述研究结果与本研究类似。*bantam* 在感染 WSSV 初期的对虾肝胰腺中呈现下调表达趋势, 提示 *bantam* 可能与对虾和病毒间的互作过程相关。但是, 本研究发现感染 WSSV 后的中国明对虾鳃中 *bantam* 表达呈现出先下调后上调的波动变化。肝胰腺是发挥免疫作用的组织, 鳃是 WSSV 侵染的主要靶器官, WSSV 的侵染对这 2 种组织内 *bantam* 表达水平的影响不同, 提示不同组织应答病毒侵染的机制不同。考虑到 *bantam* 主要参与调控细胞增殖和细胞凋亡过程, 这可能提示, 通过 *bantam* 的转录后调控过程, 病毒侵染影响了宿主的细胞凋亡过程。

泛素缀合酶 E2 是参与蛋白泛素化反应的酶, 蛋白的泛素化通过泛素活化酶 E1、泛素缀合酶 E2、泛素蛋白连接酶 E3 将泛素与蛋白酶连接, 泛素化蛋白酶发挥水解作用。因此, 该酶在生物细胞周期调控、细胞增殖、细胞凋亡过程中发挥重要作用(Chang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2009)。陈学昭等(2015)研究报道, 泛素缀合酶 E2 在鳃弧菌感染后的松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)肝脏、脾脏内表达水平迅速上升, 提示该基因与鱼类的免疫功能可能相关。Jeena 等(2012)在斑节对虾抗 WSSV 研究中发现, 感染 WSSV 后 24 h, 对虾体内的泛素缀合酶 E2 表达水平显著升高, 随后表达水平开始下降, 泛素缀合酶 E2 表达特征与本研究十分相似, 进一步提示, 泛素缀合酶 E2 可能与对虾和 WSSV 互作过程相关。

bantam 和泛素缀合酶 E2 都是与细胞增殖、细胞凋亡过程相关的调控因子。研究表明, 在感染 WSSV 后的中国明对虾体内 *bantam* 和泛素缀合酶 E2 呈现显著表达变化($P < 0.05$), 提示中国明对虾在感染 WSSV 后可能通过泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-proteasome pathway, UPP)对某些特殊靶蛋白进行选择降解, 影响细胞的凋亡过程。但是, 这种变化是中国明对虾对 WSSV 侵染过程的免疫应答, 还是宿主基因被 WSSV 挟持为病毒侵染过程服务, 需要进一步研究来证实。

参 考 文 献

- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, *et al.* *bantam*, encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 2003, 113(1): 25–36
- Chang R, Wei L, Lu Y, *et al.* Upregulated expression of ubiquitin-conjugating enzyme E₂Q₁ (UBE₂Q₁) is associated with enhanced cell proliferation and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Molecular Histology*, 2015, 46(1): 45–56
- Chen XZ, Zhang L, Yu SS, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2-D2 in roughskin sculpin, *Trachidermus Fasciatus*. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(10): 133–140 [陈学昭, 张雷, 于珊珊, 等. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)泛素结合酶 E2-D2 基因的分子克隆及组织表达分析. *海洋学报*, 2015, 37(10): 133–140]
- Feng YP, Kong J, Luo K, *et al.* The comparison of the sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 78–84 [冯亚萍, 孔杰, 罗坤, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 对白斑综合征病毒的敏感性比较. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 78–84]
- Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. The *bantam* gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*, 2002, 161(4): 1527–1537
- Huang C, Zhang X, Lin Q, *et al.* Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2002, 1(3): 223–231
- Huang H, Li J, Hu L, *et al.* *Bantam* is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling. *Developmental Biology*, 2014, 385(2): 211–217
- Jeena K, Prasad KP, Pathan MK, *et al.* Expression profiling of

- WSSV ORF 199 and shrimp ubiquitin conjugating enzyme in WSSV infected *Penaeus monodon*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2012, 25(8): 1184–1189
- Jiang L, Bao Y, Luo C, *et al.* Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E₂C/UbcH₁₀ expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis *in vitro*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2010, 136(2): 211–217
- Kaewkascholkul N, Somboonviwat K, Asakawa S, *et al.* Shrimp miRNAs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection. Developmental and Comparative Immunology, 2016, 60: 191–201
- Lam V, Tokusumi T, Tokusumi Y, *et al.* *bantam* miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 453(3): 467–472
- Le S, Li C, Zhang X. The role of shrimp miR-965 in virus infection. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 54: 427–434
- Ma N, Zeng DG, Li M, *et al.* Study on differential expression of microRNAs in *Litopenaeus vannamei* induced by Taura syndrome virus infection. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(5): 2310–2315 [马宁, 曾地刚, 黎铭, 等. 桃拉综合症病毒感染诱导的凡纳滨对虾 microRNA 表达差异的研究. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2310–2315]
- Maeda H, Miyajima N, Kano S, *et al.* Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer. Molecular Cancer Research, 2009, 7(9): 1553–1562
- Meng XH. The analysis of WSSV resistance of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [孟宪红. 中国对虾“黄海 2 号”对 WSSV 的抗病性分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- Nolo R, Morrison CM, Tao C, *et al.* The *bantam* microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. Current Biology, 2006, 16(19): 1895–1904
- Shi X, Ran Z, Li S, *et al.* The effect of microRNA *bantam* on Baculovirus AcMNPV infection *in vitro* and *in vivo*. Viruses, 2016, 8(5): 136
- van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology, 2001, 286(1): 7–22
- Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virology, 2001, 75(23): 11811–11820
- Yan H, Zeng Y, Gong GY, *et al.* The expression pattern of miR-223 in different tissues of *Cynoglossus semilaevis* and the regulation of expression in response to infections. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 37–44 [颜慧, 曾艳, 公光业, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miR-223 的表达特征及免疫应答分析. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 37–44]
- Yang L, Yang G, Zhang X. The mir-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 146–153
- Zeng DG, Chen XL, Xie DX, *et al.* Identification of highly expressed host microRNAs that respond to white spot syndrome virus infection in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). Genetic and Molecular Research, 2015, 14(2): 4818–4828

(编辑 马瑾艳)

Effect of White Spot Syndrome Virus Infection on *bantam* and Candidate Target Genes in the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

LI Xupeng¹, KONG Jie^{1,2}①, MENG Xianhong¹, LUAN Sheng^{1,2}, LUO Kun¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract *Bantam* is a type of miRNA involved in cell proliferation and apoptosis, and can affect immune processes in animals. In the present study, *bantam* expression in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* was determined using the qRT-PCR technique. The results showed that *bantam* expression in the hepatopancreas of Chinese shrimp 6, 12, 24, and 48 h post infection was (0.16±0.03)($P<0.05$), (0.63±0.26), (0.32±0.06) ($P<0.05$), and (0.41±0.13) fold that of the expression in the controls, respectively. *Bantam* expression in the gill of Chinese shrimp 6, 12, 24, and 48 h post infection was (0.30±0.17) ($P<0.05$), (1.88±0.26) ($P<0.01$), (0.84±0.36), and (0.51±0.25) fold that of the expression in the controls, respectively. The target genes of *bantam* were predicted using the miRanda software. The ubiquitin-conjugating enzyme E2 was the predicted target gene with the highest score. The Chinese shrimp ubiquitin-conjugating enzyme E2 contains the ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic (UBCc) domain. Multiple alignment results showed that the UBCc domain was relatively conserved among different species. Phylogenetic analysis showed that the ubiquitin-conjugating enzyme E2 in species with closer taxonomic status was clustered in a branch. Pair-wise and multiple sequence alignment revealed that the ubiquitin-conjugating enzyme E2 was relatively well-conserved. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 expression in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp was further determined using qRT-PCR. The results showed that the expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the hepatopancreas of Chinese shrimp 6, 12, 24, and 48 h post-WSSV infection was (0.54±0.10), (1.19±0.62), (3.69±0.51)($P<0.01$), and (1.94±0.07)($P<0.05$) fold that of the expression in the controls, respectively. The expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the gill of Chinese shrimp 6, 12, 24 and 48 h post WSSV infection was (0.22±0.05), (1.34±0.38), (4.29±0.52) ($P<0.01$), and (1.28±0.79) fold that of the expression in the controls. These results suggest that both *bantam* and the target gene ubiquitin-conjugating enzyme E2 might be involved in the interaction between Chinese shrimp and WSSV. Whether the altered expression of *bantam* and ubiquitin-conjugating enzyme E2 represents the immune response of shrimps to WSSV infection, or the hijacking of cells by WSSV during the viral infection process, needs further study.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; WSSV; *bantam*; Ubiquitin-conjugating enzyme E2; Expression

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn