

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240122003

http://www.yykxjz.cn/

薛倩, 李旭鹏, 李洋, 栾生, 罗坤, 孔杰, 邢群, 孟宪红. 凡纳对虾 *parkin* 共调基因和 *parkin* 在抗白斑综合征病毒中的表达分析和 SNP 开发. 渔业科学进展, 2025, 46(1): 194-209

XUE Q, LI X P, LI Y, LUAN S, LUO K, KONG J, XING Q, MENG X H. Expression analysis and SNP mining of the *parkin* co-regulated gene (*PACRG*) and *parkin* in *Penaeus vannamei* against white spot syndrome virus. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(1): 194-209

凡纳对虾 *parkin* 共调基因和 *parkin* 在抗白斑综合征病毒中的表达分析和 SNP 开发*

薛倩¹ 李旭鹏^{2,3} 李洋² 栾生^{2,3} 罗坤²
孔杰^{2,3} 邢群⁴ 孟宪红^{2,3①}

(1. 浙江海洋大学水产学院 浙江 舟山 316021; 2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237; 4. 邦普种业科技有限公司 山东 潍坊 261311)

摘要 本实验室前期研究中基于全基因组关联分析(GWAS)方法筛选到抗白斑综合征病毒(WSSV)候选基因: *parkin* 共调基因(*PACRG*)。 *PACRG* 与帕金森病相关基因 *parkin* 共用一个双向启动子, 二者共同参与细胞自噬过程, 从而在细胞保护方面发挥作用。本研究对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*) *PACRG* 和 *parkin* 在抗 WSSV 中的功能进行探讨, 对其 mRNA 和氨基酸序列进行特征分析, 利用 real-time PCR 技术检测对虾感染 WSSV 后不同时间、不同组织中 *PACRG* 和 *parkin* 的表达水平。通过荧光原位杂交技术(FISH)进行空间定位。利用 PCR 和 Sanger 测序技术获得单核苷酸多态性位点(SNP)并进行抗 WSSV 的关联分析。结果显示, *PACRG* 开放阅读框(ORF)全长 600 bp, 编码 199 个氨基酸, 预测包含一个 ParcG 结构域。*parkin* ORF 序列全长 1 653 bp, 编码 550 个氨基酸, 预测包含 UBQ、IBR 结构域和一个信号肽结构。与多物种进行同源序列比对发现, 凡纳对虾 *PACRG* 氨基酸序列与日本对虾(*Penaeus japonicus*)的同源性高达 89.70%; 凡纳对虾 *parkin* 氨基酸序列与中国对虾(*Penaeus chinensis*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)的同源性高达 93.45%。*PACRG* 和 *parkin* 蛋白的保守性较高。感染 WSSV 后, *PACRG* 和 *parkin* 在对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达水平发生显著变化, 其中, 眼柄中 *PACRG* 和 *parkin* 表现出极相似的组织表达模式。在肌肉中, *PACRG* mRNA 和 WSSV 在空间位置上呈现高度重叠状态。结合上述结果, 推测 *PACRG* 和 *parkin* 在凡纳对虾与 WSSV 的互作中发挥功能。在 *PACRG* 中筛选到 2 个 SNP 位点, 在 *parkin* 中筛选到 15 个 SNP 位点, 其中位于 *parkin* 非翻译区(UTR)的 5 个 SNP 位点与抗 WSSV 性状显著相关。本文为研究凡纳对虾抗 WSSV 的分子机制和抗病分子育种提供了理论依据和参考数据。

关键词 凡纳对虾; 白斑综合征病毒(WSSV); *parkin* 共调基因(*PACRG*); *parkin* 基因; SNP
中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2025)01-0194-16

* 国家重点研发计划(2022YFF1000304)、国家自然科学基金(32172960)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-48)、中国水产科学研究院科技创新团队项目(2020TD26)和湛江市海洋装备与海洋生物揭榜挂帅制人才团队项目(2021E05032)共同资助。薛倩, Email: 13011754639@163.com

① 通信作者: 孟宪红, 研究员, Email: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-01-22, 收修改稿日期: 2024-03-12

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)因具有生长迅速、抗病性强、经济效益好等特点,已成为世界范围内养殖对虾的主要品种(Chen *et al*, 2019; Hou *et al*, 2022)。随着水产养殖规模的不断扩大,细菌、真菌和病毒性疾病的暴发对全球虾类养殖业构成了重大威胁。其中,白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)对凡纳对虾、日本对虾(*Penaeus japonicus*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)等多种商业重要对虾品种具有高致死率。感染 WSSV 后对虾死亡率可达 100% (Chen *et al*, 2007; 董丽君等, 2019; 冯亚萍等, 2017)。因此,开展对虾抗 WSSV 的相关机制研究对于对虾养殖业发展具有重要意义。

本实验室前期研究基于全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)方法筛选到抗 WSSV 候选基因: *parkin* 共调基因(*parkin* co-regulated gene, *PACRG*)。 *PACRG* 以头对头的方式与 DNA 反义链上的 *parkin* 连接,共用一个 5'核心双向启动子,二者共同参与细胞自噬过程,从而在细胞保护方面发挥作用(West *et al*, 2003)。*parkin* 编码的蛋白是一种与帕金森病相关的 RBR (RING-between-RING) E3 泛素连接酶,通过泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)来降解异常折叠蛋白,同时参与氧化应激及线粒体功能调控等多种途径(Scott *et al*, 2017; Winklhofer, 2014)。UPS 是一种蛋白质降解途径,在 DNA 损伤修复、细胞周期检查点控制和免疫反应调节等多个细胞过程中发挥重要作用(Dagar *et al*, 2023)。研究表明,泛素化修饰在先天免疫和炎症反应中发挥重要作用(Di Napoli *et al*, 2003)。在高等动物体内, *parkin* 能够泛素化病原菌或机体的某些蛋白,作为信号招募自噬膜的延伸然后形成包含病原菌的自噬体,进而介导自噬体与溶酶体融合降解病原菌。*PACRG* 蛋白高度保守,主要参与微管蛋白的调节,对鞭毛、纤毛的运动和精子的发育具有重要作用(Mizuno *et al*, 2016)。*PACRG* 蛋白还能够与分子伴侣热休克蛋白 90、70 (Hsp90、Hsp70)和 T-复合物 1 (TCP1 α 、TCP1 β 和 TCP1 θ)相互结合,起到保护细胞的作用,同时, *PACRG* 还在肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号传导中发挥作用(Meschede *et al*, 2020)。Trinklein 等(2004)研究发现,共用一个双向启动子的基因表达具有显著的相关性和功能关联性。在果蝇(*Drosophila*)和人类(*Homo sapiens*)基因组中发现同一区域的基因呈现共同表达的特性(Caron *et al*, 2001; Spellman *et al*, 2002)。*PACRG* 与 *parkin* 共用一个双向启动子,它们在功能上可能存在相关性。研究证实, *PACRG* 与

parkin 蛋白的相互结合能够减弱 *parkin* 底物类内皮素受体(*parkin* associated endothelin receptor-like, Pael-R)的毒性作用,从而增加细胞成活率(Imai *et al*, 2003)。*PACRG* 和 *parkin* 共享调控区域中的单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)分析结果显示, *PACRG* 与麻风病、伤寒副伤寒、癌症、肺结核等疾病的发生具有相关性(赵海洲等, 2018)。

本研究旨在通过模拟自然环境中凡纳对虾进食感染 WSSV,探究凡纳对虾感染 WSSV 后 *PACRG* 和 *parkin* 基因是否参与抵御 WSSV 的免疫应答反应。为深入解析凡纳对虾 *PACRG* 和 *parkin* 基因在病毒感染中发挥的功能,本研究在转录、mRNA 空间定位、SNP 等水平进一步验证 *PACRG* 和 *parkin* 基因与抗 WSSV 的相关性,旨在为揭示凡纳对虾抗 WSSV 分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

凡纳对虾取自潍坊邦普种业科技有限公司,平均体长为(8.52 \pm 0.87) cm,平均体重为(4.7 \pm 1.5) g。实验地点为山东省青岛市即墨区中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心。所有的凡纳对虾均在实验平台(3 m² \times 1.2 m)饲养,并按照相同的管理模式进行日常管理。实验开始前将凡纳对虾在盐度为 29 \pm 1、水温为(26 \pm 1) $^{\circ}$ C 的无菌海水中暂养 3 d。每日分别于 08:00、14:00 和 20:00 投喂饲料,换水量为 40%~50%,提供充足的氧气,使凡纳对虾的生存状态保持稳定。

1.2 WSSV 胁迫处理

利用单尾、等量、口饲法对 150 尾健康凡纳对虾进行 WSSV 感染实验,参考孟宪红等(2013)研究中的 WSSV 毒饵制备及口饲的方式对每尾虾投喂 10 mg 病毒载量为 1 \times 10⁶ copies/mg 的对虾碎肌肉组织,使用红色食用色素将 WSSV 毒饵进行染色,以便观察对虾的食用情况。随机采集健康和感染 WSSV 后 24、48、72、96、144、192 和 228 h 各 5 尾凡纳对虾的肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄,保存在 RNAstore reagent (TIANGEN)中, -80 $^{\circ}$ C 冷冻用于基因表达水平分析。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 RNA-easy isolation reagent (Vazyme)提取肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的总 RNA。使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。使用 Nano-

Photometer N50 Touch 分光光度计(Thermo Fisher Scientific)在 260 nm 和 280 nm 下定量总 RNA。使用 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme)试剂盒反转录获得 cDNA, 于-80 °C 保存备用。

1.4 基因序列生物信息学分析

基于 NCBI 数据库中 *PACRG* 基因的参考序列 (XM_027379415.1) 和 *parkin* 基因的参考序列 (XM_027357483.1), 使用 EditSeq 软件预测氨基酸序列。使用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质分子质量、理论等电点、不稳定系数等。使用 TMHMM 软件(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)分析蛋白质的跨膜区。使用 SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)软件进行信号肽结构预测。使用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)进行糖基化位点分析。使用 NetPhos 3.1 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)进行磷酸化位点分析。运用 SMART (<https://smart.embl.de/>)在线工具进行蛋白质功能结构域预测分析。使用 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)软件进行蛋白质二级结构预测。使用 DNAMAN 6.0 进行同源氨基酸多序列比对分析。使用 MEGA 7.0 软件通过邻接法(neighbour-joining method, NJ)进行系统进化树构建。

1.5 *PACRG* 和 *parkin* 基因的表达定量分析

使用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO)试剂, 在 Applied Biosystems[™] QuantStudio 1 Real-Time PCR 定量仪中进行 real-time PCR, 检测 *PACRG* 和 *parkin* 在凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达水平。以 18S rRNA 基因作为内参基因。引物序列信息(q*PACRG*-F、q*PACRG*-R; q*parkin*-F、q*parkin*-R; 18S-F、18S-R)见表 1。Real-time PCR 体系总体积为 20 μ L: SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO) 10 μ L, 上下游引物(0.2 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 模板(100 ng/ μ L) 2 μ L, RNase Free ddH₂O 6.4 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 60 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环。每个样品设置 3 个平行重复实验。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 *PACRG* 和 *parkin* 在感染 WSSV 后不同时间凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的相对表达水平。同时, 利用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件对计算结果进行独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

1.6 荧光原位杂交分析

PACRG 特异性探针用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记。WSSV 特异性探针用花青素荧光染料 3 (cyanine, Cy3)标记。特异性探针序列 (*PACRG*-probe、*WSSV*-probe)信息见表 1。细胞核用 DAPI 染色。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测所用特异性探针由武汉塞维尔生物科技有限公司合成。选取健康和感染 WSSV 96 h 后 *PACRG* 表达水平最高的凡纳对虾的肌肉组织在 Servicebio[®]原位杂交固定液(动物) (Servicebio)中固定并于 4 °C 保存过夜。经过切片、探针杂交和 DAPI 染色后, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.7 SNP 位点的筛选及抗 WSSV 关联分析

将 32 个家系中的 960 尾凡纳对虾进行单尾、定量投喂 WSSV 毒饵(方法同 1.2), 测试 WSSV 抗性。测试至 530 h 结束, 死亡 855 尾对虾, 存活 105 尾对虾。死亡对虾的平均存活时间为(392.00 \pm 209.57) h。取所有测试死亡和存活个体的肌肉组织于-80 °C 酒精保存。筛选前期死亡的 30 尾对虾[存活时间(123.8 \pm 19.42) h]作为敏感组, 后期存活 530 h 的 30 尾对虾作为抗性组, 进行 SNP 位点的筛选和抗 WSSV 关联分析。使用 TIANamp Marine Animals DNA Kit (TIANGEN)提取敏感组和抗性组中对虾肌肉组织的 DNA。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。使用 NanoPhotometer N50 Touch 分光光度计(Thermo Fisher Scientific)在 260 nm 和 280 nm 下检测 DNA 的浓度和纯度。

基于 NCBI 数据库中的参考序列(*PACRG*, NW_020871716.1; *parkin*, NW_020869090.1), 利用 primer 3 在线引物设计工具(<https://primer3.ut.ee/>)设计 *PACRG* 和 *parkin* 基因的 DNA 序列扩增引物, 引物序列信息 (*PACRG*-F、*PACRG*-R; *parkin*-F、*parkin*-R)见表 1。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 于-20 °C 保存备用。以提取的 DNA 为模板, 使用特异性引物扩增 *PACRG* 和 *parkin* 基因的 DNA 序列。使用 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)进行 PCR, 反应体系为 50 μ L: 2 \times Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) 25 μ L, 上下游引物(0.2 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 (100 ng/ μ L) 4 μ L, RNase Free ddH₂O 19 μ L。PCR 程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 68 °C 延伸 5 min。扩增反应结束后, 利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定扩增产物特异性和扩增片段大小。PCR 产物委托生工生物过程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。使用 SeqMan

表 1 引物和探针信息
Tab.1 Information of primers and probes

引物/探针名称 Primer/probe name	序列 Sequence
PACRG-F	AGACGTCCGCGTGATCTGCA
PACRG -R	CCACCCACCATTTTTATGCTTG
parkin-F	CCTGCCTTAATGGCTGTGGA
parkin-R	CCCTGCTAAATAATTGAGTAACTGT
qPACRG-F	CAAGATCCTCCCGGTCCATCC
qPACRG-R	AAGAGATTCAGCGTCGGGAGG
qparkin-F	GCCAGATGACATGGTAATGCG
qparkin-R	TCTCAACTTCAGAAGGCCCG
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
PACRG-probe	UCUCGGGUGUUGAGGGCACUCUUA AUAGGCA
WSSV-probe	CTCTTTGAGGAACGGCGACGGACAG

软件将测序样本的 *PACRG* 和 *parkin* 的 DNA 序列与 NCBI 数据库参考序列进行比对, 同时结合 Sanger 测序峰图筛选出所有的 SNP 位点。

根据 SNP 位点的分型结果, 统计各基因型频率, 使用 PLINK1.9 软件(Purcell *et al.*, 2007)计算观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、最小等位基因频率(MAF)、

多态信息含量(PIC)和哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)等遗传多样性参数。通过质控, 去除群体中 $MAF < 0.05$ 的 SNP 位点, 不做进一步的关联分析。 $PIC < 0.25$ 为低度多态性, $0.25 \leq PIC \leq 0.50$ 为中度多态性, $PIC > 0.50$ 为高度多态性。利用 IBM SPSS 25.0 软件对分型结果进行卡方检验(χ^2), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, 分析 SNP 位点与凡纳对虾抗 WSSV 性状的相关性。

2 结果与分析

2.1 *PACRG* 基因及氨基酸序列分析

PACRG 的 ORF 序列全长 600 bp, 编码 199 个氨基酸(图 1)。预测带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)有 29 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)有 27 个。分子量为 23.26 kDa。理论等电点为 6.44。不稳定系数为 56.68, 归类为不稳定蛋白。脂肪族指数为 89.55, 亲水性总平均值为-0.566。无跨膜蛋白, 无信号肽结构, 无糖基化位点。磷酸化位点分析预测有 8 个丝氨酸、7 个苏氨酸和 3 个酪氨酸。在 27~195 氨基酸位置处包含一个 *ParcG* 基因结构域(图 1)。预测的二级结构中, α -螺旋(105 个氨基酸)占 52.76%, 延伸链(21 个氨基酸)占 10.55%, β -转角(12 个氨基酸)占 6.03%, 无规则卷曲(61 个氨基酸)占 30.65%。

```

1 M Q E R I D E Q S R R D L R V D V D K L N Y H H F F D D I R
1 ATGCAAGAGAGAATAGATGAGCAAAGCAGAAGATTTGAGAGTCGACGTGGACAAGCTGAACTACCACCACTTCTTCGACGATATAAGA
31 K T S R R G Q V D V D K L D Y H H Y L P L F F D G L R E T S
91 AAGACTAGTCGACGTGGACAAGTCGACGTGGACAAGCTCGACTACCACCACTACCTCCCCCTCTTCTTCGACGGCCTGAGGGAGACGAGC
61 H P Y D F F S R A G I R D L L S R G G D K I L P V H P E L I
181 CACCCCTACGACTTCTTCAGCAGGGCGGGCATCCGGGACCTTCTCTCCCGGGGGGACAAGATCCTCCCGTCCATCCCGAGCTTATT
91 L P I K S A L N T R D V R V I C T V L K V L Q E L V M S A P
271 CTGCCTATTAAGAGTGCCCTCAACACCCGAGACGTCGCGGTGATCTGCACCGTCTGAAGGTCTGCAGGAGCTGGTGATGTCGGCGCCC
121 L V G E S L V P Y Y R Q I L P T L N L F K H K N G G E L W D
361 TTGGTCGGGAGTCCCTGGTCCCTACTACAGGCAGATCCTCCCGACGCTGAATCTCTTCAAGCATAAAAATGGTGGTGAATCTGGGAC
151 E I D Y S Q Q R R E N L G D L I Q G N S R D T G E R H G G X
451 GAGATCGACTACTACAGCAACGTCGAGAGAATCTTGAGACCTTATTC AAGGAACTCTCGAGATACTGGAGAGACACGGCGGANGA
181 D A Y I N I K Y M V P T Y Q S C M M N *
541 GACGCATATATTAATATTAAGTATATGTTGCCGACGTACCAGTCTTGTATGATGAAT TGA
    
```

图 1 *PACRG* 基因 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the *PACRG* gene

起始密码子和终止密码子用方框标出; 预测的结构域用下划线标出;

预测的磷酸化位点用加粗字体标出; SNP 位点用红色字体标出。

The start and stop codons are indicated by boxes. The predicted structural domain is indicated by an underline.

The predicted phosphorylation sites are indicated in bold font. The SNP sites are indicated in red font.

2.2 *parkin* 基因及氨基酸序列分析

parkin mRNA 长 2 329 bp, 包括 1 653 bp 的 ORF, 100 bp 的 5'非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR),

576 bp 的 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR), 编码 550 个氨基酸(图 2)。预测带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)有 69 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)

有 49 个。分子量为 60.15 kDa。理论等电点为 5.15。不稳定系数为 46.96, 归类为不稳定蛋白。脂肪族指数为 75.29。亲水性总平均值为-0.254。无跨膜蛋白。1~27 氨基酸位置为信号肽结构。糖基化位点分析预测, 在 95、191 和 279 氨基酸位置有 NHSI、NRSC 和 NATC 基序的 N-糖基化位点。预测有 8 个丝氨酸、7 个苏氨酸和 3 个酪氨酸磷酸化位点。在 33~104 氨基酸位置处包含一个 UBQ 基因结构域, 400~460 氨基酸位置包含一个 IBR 结构域, 487~543 氨基酸位置包含一个 IBR 结构域(图 2)。预测的二级结构中, α -螺旋(116 个氨基酸)占 21.09%, 延伸链(130 个氨基酸)占 23.64%, β -转角(14 个氨基酸)占 2.55%, 无规则卷曲(290 个氨基酸)占 52.73%。

2.3 PACRG 氨基酸序列比对及系统进化树分析

将凡纳对虾与多个物种 PACRG 氨基酸序列进行同源比对(图 3), 结果显示, 凡纳对虾 PACRG 氨基酸序列与日本对虾的同源性最高, 为 89.70%, 与其他物种同源性: 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 87.27%, 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 86.67%, 中国对虾(*Penaeus chinensis*) 86.67%, 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 85.45%, 露斯塔野鲮(*Labeo rohita*) 68.48%, 白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*) 64.53%, 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 64.53%, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) 63.95%, 小鼠(*Mus musculus*) 63.80%, 人(*Homo sapiens*) 63.80%, 家蝇(*Musca domestica*) 46.45%。

对 PACRG 进行系统进化树分析, 进一步研究 PACRG 与所选脊椎动物和无脊椎动物的进化关系(图 4)。系统进化树与该物种的分类地位一致, 凡纳对虾与中国对虾和日本对虾聚为一支, 他们的亲缘关系最近, 形成一个独立的分支。接着与中华绒螯蟹和三疣梭子蟹聚为一支, 与克氏原螯虾、菲律宾蛤仔、白氏文昌鱼、非洲爪蟾、露斯塔野鲮、小鼠、人和家蝇的亲缘关系较远。

2.4 parkin 氨基酸序列比对及系统进化树分析

将凡纳对虾与多个物种 parkin 氨基酸序列进行同源比对发现(图 5), 凡纳对虾的 parkin 氨基酸序列与中国对虾和斑节对虾的同源性最高, 为 93.45%。与其他物种同源性: 克氏原螯虾 72.48%, 三疣梭子蟹 69.04%, 内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*) 58.76%, 穴兔(*Oryctolagus cuniculus*) 51.08%, 虎斑响尾蛇(*Crotalus tigris*) 50.29%, 米兰达果蝇(*Drosophila*

mirand) 45.96%, 斑马鱼(*Danio rerio*) 44.03%, 蚤状溞(*Daphnia pulex*) 41.23%, 人 40.49%, 菲律宾蛤仔 39.93%, 银鲳鱼(*Anoplopoma fimbria*) 31.86%。

对 parkin 进行系统进化树分析, 进一步研究 parkin 与所选脊椎动物和无脊椎动物的进化关系(图 6)。系统进化树与该物种的分类地位一致, 凡纳对虾与中国对虾和斑节对虾最先聚为一支, 它们的亲缘关系最近, 形成一个独立的分支。接着与三疣梭子蟹和克氏原螯虾聚为一支, 与内华达古白蚁、穴兔、虎斑响尾蛇、米兰达果蝇、斑马鱼、蚤状溞、人、菲律宾蛤仔和银鲳鱼的亲缘关系较远。

2.5 健康凡纳对虾 PACRG 和 parkin 在不同组织中的表达

Real-time PCR 结果显示, PACRG 在健康的凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中均有表达, 且各组织的表达水平基本相同, 无显著差异。肌肉中 PACRG 的表达水平高于肝胰腺、鳃和眼柄。PACRG 在鳃中的表达水平约为肝胰腺的 0.97 倍, 在肌肉中的表达水平约为肝胰腺的 1.28 倍, 在眼柄中的表达水平约为肝胰腺的 0.99 倍(图 7)。

parkin 在健康凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中均有表达, 且各组织的表达水平基本相同, 无显著差异。parkin 在鳃中的表达水平与肝胰腺相同。parkin 在肌肉中的表达水平约为肝胰腺的 0.98 倍。parkin 在眼柄中的表达水平约为肝胰腺的 0.99 倍(图 8)。

2.6 感染 WSSV 后 PACRG 在不同组织中的表达

凡纳对虾感染 WSSV 后 48、96、144、192 和 228 h, PACRG 在肝胰腺中的表达水平分别为对照组的(0.67±0.09)、(0.66±0.16)、(1.84±0.38)、(0.45±0.13)和(0.48±0.13)倍, 其中 48 h 和 96 h 差异显著($P<0.05$), 144、192 和 228 h 差异极显著($P<0.01$)(图 9A)。凡纳对虾感染 WSSV 后 48、72、96、144、192 和 228 h, PACRG 在鳃中的表达水平分别为对照组的(0.46±0.11)、(0.72±0.06)、(0.28±0.10)、(0.23±0.06)、(0.24±0.03)和(0.24±0.02)倍, 差异极显著($P<0.01$)(图 9B)。凡纳对虾感染 WSSV 后 96、192 和 228 h, PACRG 在肌肉中的表达水平分别为对照组的(18.12±9.89)、(12.80±4.06)和(4.98±1.32)倍, 差异极显著($P<0.01$)(图 9C)。凡纳对虾感染 WSSV 后 72、144、192 和 228 h, PACRG 在眼柄中的表达水平分别为对照组的(0.31±0.06)、(0.50±0.18)、(0.31±0.10)和(0.10±0.03)倍, 差异极显著($P<0.01$)(图 9D)。

```

1 tcttggaacgtaaacaaaaatcagctgttacttcgccggagcccgagaacggcagaaatggaagtgaagagtttattatattggagataa
1 M L S Y L I E L L S G I W Q S I M A L F G F G S S Q A
91 ccaaagtgaATGCTTAGTTATCTAATTGAACCTCTGTCTGGAATATGGCAGTCCATTATGGCCTTATTTGGATTGGTTCGTCGCAGGC
28 A V S N E L E V Y V R T N T G E K V S V R L D Q S W T V S Q
181 TGCGGTGTCAAATGAGCTGGAGGTTACGTCAGAACAAACACAGGGGAGAAGGTGAGTGAAGGCTCGACCAGTCATGGACGGTATCACA
58 I K T T L A P K L Q S P A D N L R I I F A G K E L P D D M V
271 GATCAAGACTACCCTGGCCCCAAACTTCAGAGTCCAGCTGACAACCTAAGAATTATATTTGCTGGTAAGGAATTGCCAGATGACATGGT
88 M R Q C D L G [N H S I] L H A V R V V S K E D E G K G A A G P
361 AATGCGTCAGTGTGACTTAGCAATCACAGCATACTTCATGCTGTTAGGGTTGTCTCGAAAGAAGACGAAGGAAAAGGAGCTGCCGGGCC
118 S E V E N V A S S S N T Q E D G V G G T E V T Q T E K E D G
451 TTCTGAAGTTGAGAATGTTGCCCTCCTCATCTAACACGCAGGAGGACGGTGTGGAGAACAGAAGTCACACAGACTGAGAAAAGACGG
148 R L Q E V E V P S T S S G H T D A E V D L R S K A A S P P L
541 AAGGCTACAGGAAGTGAAGTACCATCAACATCTTCTGGACACACAGATGCAGAAGTCGATCTCAGGAGTAAAGCAGCATCACCACCCCT
178 P E D P C L M P G P S T S [N R S C] G R L L C D A S T V I T I
631 TCCAGAAGATCCTTGTCTCATGCCAGGGCCCTCGACATCTAATAGGTCTTGTGGAAGGCTGCTCTGTGATGCTCAACCGTTATAACTAT
208 Q M T E A E Q K S I R D L K S Y D G M G E R P H F Y V Y C V
721 ACAAATGACAGAGGCAGAGCAGAAGAGTATTCGGGATCTTAAAAGTTATGACGGGATGGGAGAGCGACCTCACTTCTACGTCTATTGTGT
238 V P C N S V Q V G K L R V R C A S C K Q G A L T L H R D P C
811 AGTGCCATGCAATTCAGTACAAGTAGGAAAGTTACGTGTGAGATGCCCGTCTGCAAGCAAGGAGCTCTGACACTTCATCGTGATCCGTG
268 N W E D V L Q P G K I [N A T C] E T P D C S G T Q A E F F F K
901 CAACTGGGAGGATGTTCTCCAGCCTGGGAAGATAAATGCAACATGTGAGACACCAGATTGCAGTGGCACCCAGGCAGAATTCTTCTTCAA
298 C R G H E T S G E D D T S V A L Y L V R A N L P A V P C L A
991 ATGCCGAGGTGATGAAACAAGTGGTGAAGATGATACTTCAGTAGCTCTACTTGGTCCGAGCAAACCTTCTGCTGTGCCTTGCTTGGC
328 C T D V S S P V V V F E C A D A H V M C L D C F V T Y C V S
1081 TTGTACAGATGTGTCATCGCCTGTTGTGGTGTGTAATGCGCAGATGCTCACGTTATGTGCCTCGATTGCTTTGTCACTATTGTGTGTC
358 R L N E R Q F I Q D E R L G Y T L S C P I G C Q D S L I R E
1171 AAGATTAATGAAAGGCAGTTCATACAAGATGAGAGACTAGGTTATACTCTGTCTATGCAATAGGTTGCCAGGACTCTCTCATCCGTGA
388 V H H F K L M G D N N Y E R Y Q R W G T E E A V L A A G G V
1261 AGTACATCATTCAAGCTAATGGGTGATAACAATTATGAACGGTACCAGCGCTGGGGAACAGAGGAAGCTGTCTTAGCTGCTGGAGGTGT
418 L C P Y P G C G Q G I I P D Q D C R R V A C L N G C G Y V F
1351 CTTATGTCCATAACCTGGCTGTGGTCAAGGTATCATTCCAGACCAAGATTGCCGTAGAGTAGCTGCCTAATGGCTGTGGATATGTATT
448 C R L C L Q G Y H I G E C N P E D G N G P N V I G N S G S F
1441 TTGTCGACTTTGTCTCCAAGTTATCACATAGGAGAGTGAATCCTGAAGATGGAATGGCCCCAATGTTATAGGTAACCTCAGGTAGTTT
478 A V D P S R A A G S R W D E A T S L A I R V T T K P C P K C
1531 TGCTGTTGATCCTTCCAGTGTGCTGGCTCTCGATGGGATGAGGCAACATCGCTTGCATACGTGTTACAACAAAGCCATGCCCAAGTG
508 R T P T E R D G G C M H M V C T R A S C G F H W C W V C Q T
1621 TCGTACCCTACTGAACGGGATGGTGGCTGCATGCACATGGTCTGCACTCGAGCGTCTGTGGTTTCCACTGGTGTGGGTTGCCAGAC
538 E W T R E C M A A H W F G *
1711 AGAATGGACCCGAGAGTCATGGCAGCTCATTGGTTTGGATAAAtagctactaaattcctttacagtcagtaaaataaacaccttgaaat
1801 agtttcatcagctgtatagatatattttgcagaaattaactgtatattgtgtgaaacatatcaggtaataaatcattttcattgttttg
1891 ttactcagaacttttgaagaatatgatagtgacagggcaagaatgagggtcagtatctgtcatgagtgcaatcattaatgtaagcagag
1981 ataagtgagttgatacatgcacataaaaattttcctttcctaagaatttaataagaataaaagatctttattatacagttactcaattat
2071 ttagcagggtaatagaatctgttagaagtagtgtttatatacgtacataaaagttatgtagaatcttatggtgctttttcattaat
2161 agttttatttttaacaaagtgtctcataaaactctttaccctcactctggatgggtttctcccatattgtctgtgaaagtttcatctccat
2251 tcatactgtcatgattaacgactcttttagaacggcttaatttccttttaggcagatgatactctttgatgattgatgtt

```

图 2 *parkin* 基因 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

Fig.2 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the *parkin* gene

起始密码子和终止密码子用方框标出; 预测的结构域用下划线标出; 预测的磷酸化位点用加粗字体表示; 预测的糖基化位点用“[]”标出; SNP 位点用红色字体标出。

The start and stop codons are indicated by boxes. The predicted structural domain is indicated by an underline. The predicted phosphorylation sites are indicated in bold font. The predicted glycosylation sites are indicated by square brackets. The SNP sites are indicated in red font.

凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	MQERIDEQSRRD...LIRDVDKIN...YHFFED...DIRKTSRRGQDVKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	84
日本对虾 <i>P. japonicus</i>	TVEAFTPASRMRGAV...VAGPPRIGVFRPRPAPPTTFRKMYERGDVEVIT...HDDHGHGHLRWKVDVKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	TVEAFTPASRMRGAT...VGGPPKVEFRPRPSPPTTFRKMYERGDVEVIT...HDDHGHGHLRWKVDVKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	AVAAFTPASRIKIGAT...VSGPPKVEFRPRPSPPTTFRKMYERGDVEVIT...HDDHGHGHLRWKVDVKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	TVEAFTPASRMRGAV...VAGPPRIGVFRPRPAPPTTFRKMYERGDVEVIT...HDDHGHGHLRWKVDVKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	AVQPTTPASRMRGAR...VGRPPRLGVFRPRPAPPTTFRKMYERGDVEVIT...HDDHGHGHLRWKVDVKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
露斯塔野鲮 <i>L. rohita</i>	KTEGFTVKSSTMKNSV...VVGPPAAGAFRRPAPKPTAFRRKMYERGDVEVIT...EHDTSKGNRIAWKVEIKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
白氏文昌鱼 <i>B. belcheri</i>	ETEGFTTKSRLRNAK...VLAPPNAGAFKRRPAPKPTAFRRKMYERGDVEVIT...EHDTSKGNRIAWKVEIKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	VLKGFITQSVQKHAQKIFENPPKAGAFSERFTTKAFRRKMYERGDVEVIT...EHDTSKGNRIAWKVEIKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	109
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	DSEGFTVKAMMKNSV...VVGPPAAGAFKRRPAPKPTAFRRKMYERGDVEVIT...EHDTSKGNRIAWKVEIKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
小鼠 <i>M. musculus</i>	VSEGFTVKAMMKNSV...VVGPPAAGAFKRRPAPKPTAFRRKMYERGDVEVIT...EHDTSKGNRIAWKVEIKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
人 <i>H. sapiens</i>	VSEGFTVKAMMKNSV...VVGPPAAGAFKRRPAPKPTAFRRKMYERGDVEVIT...EHDTSKGNRIAWKVEIKIKLYHYYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	107
家蝇 <i>M. domestica</i>	IVPAFTYQALQSNIT...VEPRKIDLFKKRPVKETFFRVYLLRRGDFPVARSGKVLRRKNATEFPLKFCAPQDILDYCYLPIFDGIRRETSHPYDFFSACIRDLISRGGDKITP	113

凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	VHEELIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	198
日本对虾 <i>P. japonicus</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
露斯塔野鲮 <i>L. rohita</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
白氏文昌鱼 <i>B. belcheri</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	221
小鼠 <i>M. musculus</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
人 <i>H. sapiens</i>	VIPOLIIIFIKSAINIRSDVRVICIVLKVLCQINMSAPIVGGSIIVPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	219
家蝇 <i>M. domestica</i>	VIEKMLIFPKRFRFNIDSKRI...IAAKVLIQMMVLVAPVCGQALVPPYRQIIFITINLFRKHN...VNSGDRITYSQQRRENIGDI...IQNSRDTGFRHGGXAVINTIKYMWPTYQSQMM	223

图 3 PACRG 的氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple comparison of amino acid sequences for PACRG

PACRG 序列 GenBank 登录号: 凡纳对虾(XP_027235216.1)、日本对虾(XP_042860455.1)、中华绒螯蟹(XP_050695651.1)、三疣梭子蟹(XP_045128156.1)、中国对虾(XP_047498046.1)、

克氏原螯虾(XP_045582115.1)、露斯塔野鲮(XP_050988658.1)、白氏文昌鱼(XP_019623365.1)、菲律宾蛤仔(XP_060575230.1)、非洲爪蟾(XP_041418715.1)、小鼠(NP_081308.1)、人(NP_001073847.1)、家蝇(XP_005176069.2)。

The GenBank accession numbers of PACRG amino acid sequences are as follows: *P. vannamei* (XP_027235216.1), *P. japonicus* (XP_042860455.1), *E. sinensis* (XP_050695651.1), *P. trituberculatus* (XP_045128156.1), *P. chinensis* (XP_047498046.1), *P. clarkii* (XP_045582115.1), *L. rohita* (XP_050988658.1), *B. belcheri* (XP_019623365.1), *R. philippinarum* (XP_060575230.1), *X. laevis* (XP_041418715.1), *M. musculus* (NP_081308.1), *H. sapiens* (NP_001073847.1), *M. domestica* (XP_005176069.2).

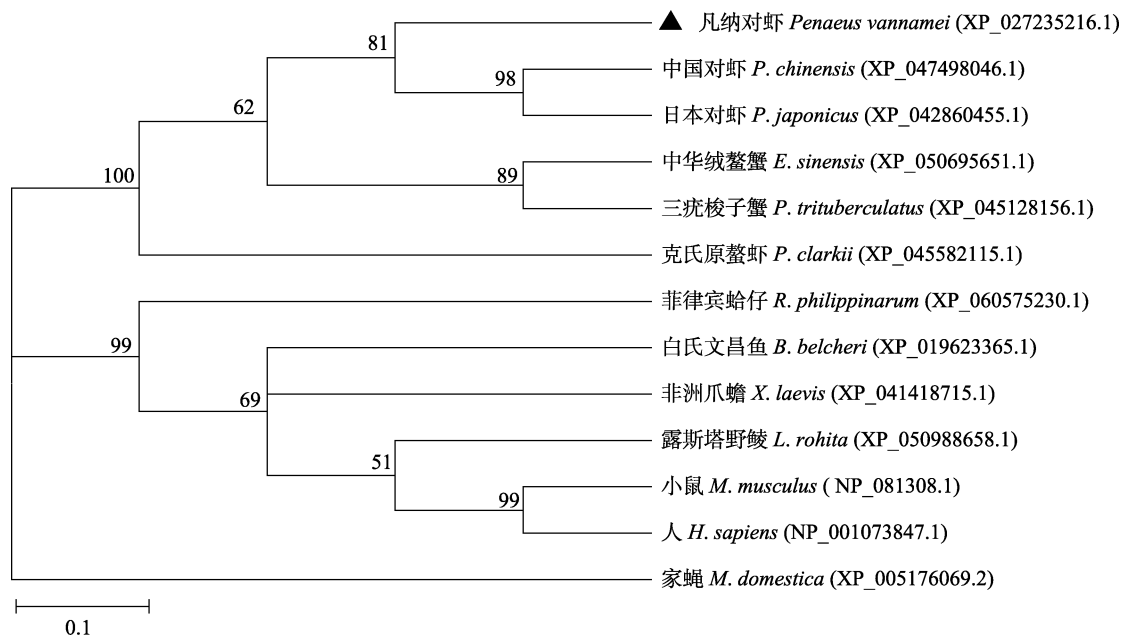


图 4 PACRG 系统进化树分析
Fig.4 The analysis of phylogenetic tree for PACRG

2.7 感染 WSSV 后 parkin 在不同组织中的表达

凡纳对虾感染 WSSV 后 48、96、192 和 228 h, parkin 在肝胰腺中的表达水平分别为对照组的(0.54±

0.09)、(0.59±0.14)、(0.47±0.08)和(0.44±0.07)倍, 差异显著(P<0.05)(图 10A)。凡纳对虾感染 WSSV 后 24、48、72、96 和 228 h, parkin 在鳃中的表达水平

凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	MLSYLIRLISGIIQSIIMALFGFSSQAAVSNELFVYVRNTGKVSURLDQSWTSQITTTIAPKIQSPADNLRITFAGKELPDMVMRCDDIIGNHS	97
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	MLSYLIRLISGIIQSIIMALFGFSSQAAVSNELFVYVRNTGKVSURLDQSWTSQITTTIAPKIQSPADNLRITFAGKELPDMVMRCDDIIGNHS	97
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	MLSYLIRLISGIIQSIIMALFGFSSQAAVSNELFVYVRNTGKVSURLDQSWTSQITTTIAPKIQSPADNLRITFAGKELPDMVMRCDDIIGNHS	97
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	MLGFFFRIFAGLWQSIIMALFGFSSQAAVSNELFVYVRNTGKVSURLDQSWTSQITTTIAPKIQSPADNLRITFAGKELPDMVMRCDDIIGNHS	97
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	MLQYLFNLFGLWHTILTMFGLQAKPAVSTLFLVFRNTGKVSURLDQSWTSQITTTIAPKIQSPADNLRITFAGKELPDMVMRCDDIIGNHS	97
内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i>	MSFTINFRKILQTMQLVSVS...KRTISNINIVYKTNIGCTLSVLDPKWYIKDVLVAPRTGLSPEFVKITFAGKELHDSITVEEDDIIIGOS	94
穴兔 <i>O. cuniculus</i>	REKGLPFAVSPQWAPRACCORSORTALRSOEPVFRVFNSSHGFPVEVSDTSISQIKREAVAKRQVAPDQLRVLFAKELHDSITVEEDDIIIGOS	97
虎斑响尾蛇 <i>C. tigris</i>	MSFTIFELITSFVRMLELITLFG...GKTLKNTLKYVKTNGRPLTVNLEPQWIDKRVKELVAROLGLOPEEVKITFAGKELSDATITMOODIIIGOS	0
米兰达果蝇 <i>D. mirand</i>	MSFTIFELITSFVRMLELITLFG...GKTLKNTLKYVKTNGRPLTVNLEPQWIDKRVKELVAROLGLOPEEVKITFAGKELSDATITMOODIIIGOS	0
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	MTVFRVFNSSHGFPVEVSDTSISQIKREAVAKRQVAPDQLRVLFAKELHDSITVEEDDIIIGOS	65
蚤状蚤 <i>D. pulex</i>	MIKWLLSLIRSLNLRILRFWP...SDSSEFTLPHIKAGGKTEFLIEMSRDWDVARTKFTAPKVLKVEDISTILACKSLADLLLEEDDIIIGOS	94
人 <i>H. sapiens</i>	MTVFRVFNSSHGFPVEVSDTSISQIKREAVAKRQVAPDQLRVLFAKELHDSITVEEDDIIIGOS	65
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	MSTSNVITOLAKNKOVIDISOANCIEDVKNELCKTGMNTEFFDLIACGKLLPVEVSLKDNIIIGOS	67
银鲱鱼 <i>A. fimbria</i>	MLVFRVFNSSHGFPVEVSDTSISQIKREAVAKRQVAPDQLRVLFAKELHDSITVEEDDIIIGOS	65
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
穴兔 <i>O. cuniculus</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
虎斑响尾蛇 <i>C. tigris</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
米兰达果蝇 <i>D. mirand</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
蚤状蚤 <i>D. pulex</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
人 <i>H. sapiens</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
银鲱鱼 <i>A. fimbria</i>	TIHAVRVVSKRDEG...KGAAGPSEVENVASSNTOEDVGGTEVTQTEKRDGRIQVEVPESTSSGHTDAEVDLRSKAAVSPPIPEDPCIMPGPS	188
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
穴兔 <i>O. cuniculus</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
虎斑响尾蛇 <i>C. tigris</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
米兰达果蝇 <i>D. mirand</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
蚤状蚤 <i>D. pulex</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
人 <i>H. sapiens</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
银鲱鱼 <i>A. fimbria</i>	TSNRSCGRLLCDASTVITITQTEARQKRSIR...DLKSYDGMGERPHEVYVGVPCNSVOVGLRVRCAASK...CGALTLHR...DCNVEDVQBRK	277
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
穴兔 <i>O. cuniculus</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
虎斑响尾蛇 <i>C. tigris</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
米兰达果蝇 <i>D. mirand</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
蚤状蚤 <i>D. pulex</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
人 <i>H. sapiens</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
银鲱鱼 <i>A. fimbria</i>	INATIEET...PDCSSTQAEFFKCRGHETSSEDTSVAIVYVRAILPAVPLACTVSSPVVVEEADAHVMGIDCFVIVYVSRINERQITO	366
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
穴兔 <i>O. cuniculus</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
虎斑响尾蛇 <i>C. tigris</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
米兰达果蝇 <i>D. mirand</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
蚤状蚤 <i>D. pulex</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
人 <i>H. sapiens</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
银鲱鱼 <i>A. fimbria</i>	DERLGYTISCPITSCODSITREVEHFKTIMDNNVRYORWGTREAVIAGGVLCYPCGGOGITIPDQCRVACTIN...CGYVFCRCLQGYHIG	458
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
穴兔 <i>O. cuniculus</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
虎斑响尾蛇 <i>C. tigris</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
米兰达果蝇 <i>D. mirand</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
蚤状蚤 <i>D. pulex</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
人 <i>H. sapiens</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549
银鲱鱼 <i>A. fimbria</i>	ECNPRDGG...NGPNVIVSSGSAFVAPBSRAAGSRWDEATSLA...RVITKPCPKQRTPTERRDCCGMHVCVTRSGCFHWCWCQTEWTRCMAAHNF	549

图 5 Parkin 的氨基酸序列比对

Fig.5 Multiple comparison of amino acid sequences for Parkin

Parkin 序列 GenBank 登录号: 凡纳对虾(XP_027213284.1)、中国对虾(XP_047495255.1)、斑节对虾(XP_037789710.1)、克氏原螯虾(XP_045609795.1)、三疣梭子蟹(MPC14914.1)、内华达古白蚁(XP_021912942.1)、穴兔(XP_051711121.1)、虎斑响尾蛇(XP_039174700.1)、米兰达果蝇(XP_033242207.1)、斑马鱼(NP_001017635.1)、蚤状蚤(XP_046458662.1)、人(KAI4020493.1)、菲律宾蛤仔(XP_060589880.1)、银鲱鱼(XP_054483181.1)。

The GenBank Accession No. of Parkin amino acid sequences: *P. vannamei* (XP_027213284.1), *P. chinensis* (XP_047495255.1), *P. monodon* (XP_037789710.1), *P. clarkii* (XP_045609795.1), *P. trituberculatus* (MPC14914.1), *Z. nevadensis* (XP_021912942.1), *O. cuniculus* (XP_051711121.1), *C. tigris* (XP_039174700.1), *D. mirand* (XP_033242207.1), *D. rerio* (NP_001017635.1), *D. pulex* (XP_046458662.1), *H. sapiens* (KAI4020493.1), *R. philippinarum* (XP_060589880.1), *A. fimbria* (XP_054483181.1)。

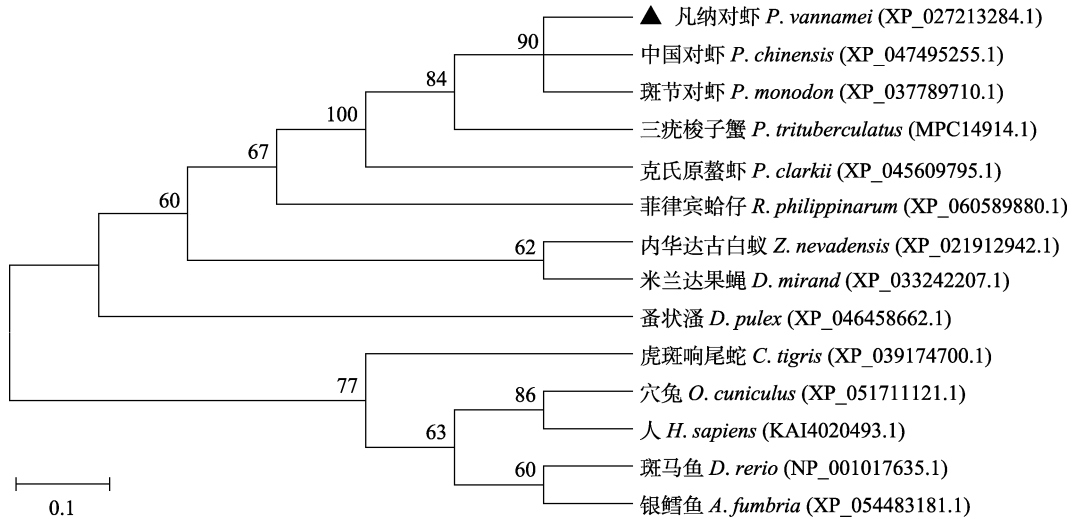
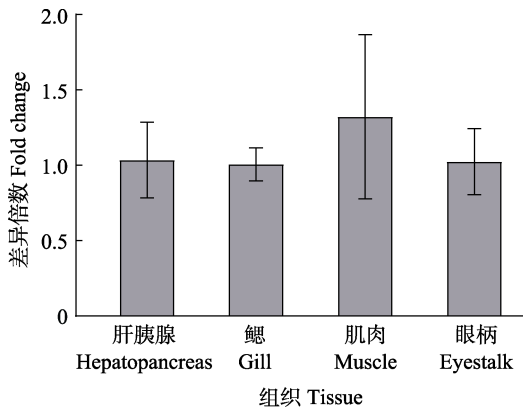
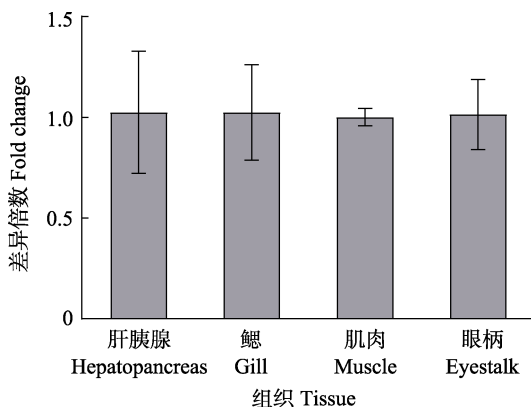


图 6 parkin 系统进化树分析

Fig.6 The analysis of phylogenetic tree for parkin

图 7 健康凡纳对虾 *PACRG* 在肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达Fig.7 Expression profile of *PACRG* in hepatopancreas, gill, muscle, and eyestalk of healthy *P. vannamei*图 8 健康凡纳对虾 *parkin* 在肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达Fig.8 Expression profiles of *parkin* in hepatopancreas, gill, muscle, and eyestalk of healthy *P. vannamei*

分别为对照组的(0.60±0.26)、(1.47±0.33)、(0.60±0.14)、(1.98±0.70)和(1.91±0.27)倍,其中 228 h 差异极显著($P<0.01$),其他时间点差异显著($P<0.05$) (图 10B)。凡纳对虾感染 WSSV 后 24、48、72、96、192 和 228 h, *parkin* 在肌肉中的表达水平分别为对照组的(2.56±0.97)、(0.73±0.05)、(0.63±0.19)、(2.19±0.66)、(2.67±0.78)和(2.44±0.66)倍,其中 48 h 和 96 h 差异极显著($P<0.01$),其他时间点差异显著($P<0.05$) (图 10C)。凡纳对虾感染 WSSV 后 48、96 和 144 h, *parkin* 在眼柄中的表达水平分别为对照组的(1.59±0.43)、(1.98±0.41)和(1.54±0.21)倍,其中 48 h 差异显著($P<0.05$),其他时间点差异极显著($P<0.01$) (图 10D)。

2.8 *PACRG* mRNA 和 WSSV DNA 的空间定位

选取感染 WSSV 96 h 后 *PACRG* 表达水平最高的凡纳对虾肌肉组织进行 *PACRG* mRNA 和 WSSV DNA 空间定位,结果如图 11 所示。与对照组相比,感染 WSSV 96 h 后凡纳对虾肌肉中 *PACRG* 的表达量明显增加,并且 *PACRG* mRNA 的表达位置大多与 WSSV 的位置呈现重合的状态(图 11)。

2.9 *PACRG* 基因 SNP 位点的筛选及多态性分析

测序结果显示,在凡纳对虾 *PACRG* ORF 中共筛选到 2 个 SNP 位点,分别在 ORF 的 369 bp 和 411 bp 处,命名为 SNP1 和 SNP2 (表 2),编码甘氨酸和亮氨酸,2 个 SNP 位点均属于同义突变。

通过 PLINK1.9 软件对 *PACRG* SNP 位点的多态性进行分析。结果表明,敏感组群体的 H_0 为 0.400~0.500, H_e 为 0.375~0.491, MAF 为 0.250~0.433。PIC 为 0.305~0.371,表现为中度多态性。无 $MAF<0.05$

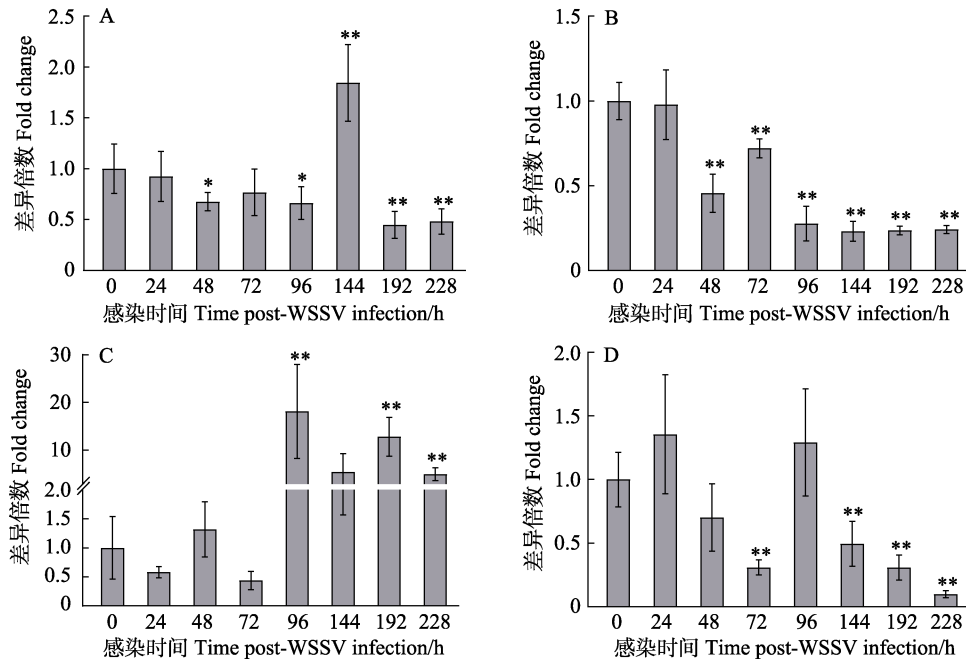


图 9 感染 WSSV 后 *PACRG* 在凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达

Fig.9 Expression profiles of *PACRG* in hepatopancreas, gill, muscle, and eyestalk of *P. vannamei* post-WSSV infection

A: 肝胰腺; B: 鳃; C: 肌肉; D: 眼柄。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, 下同。

A: Hepatopancreas; B: Gill; C: Muscle; D: Eyestalk. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. The same below.

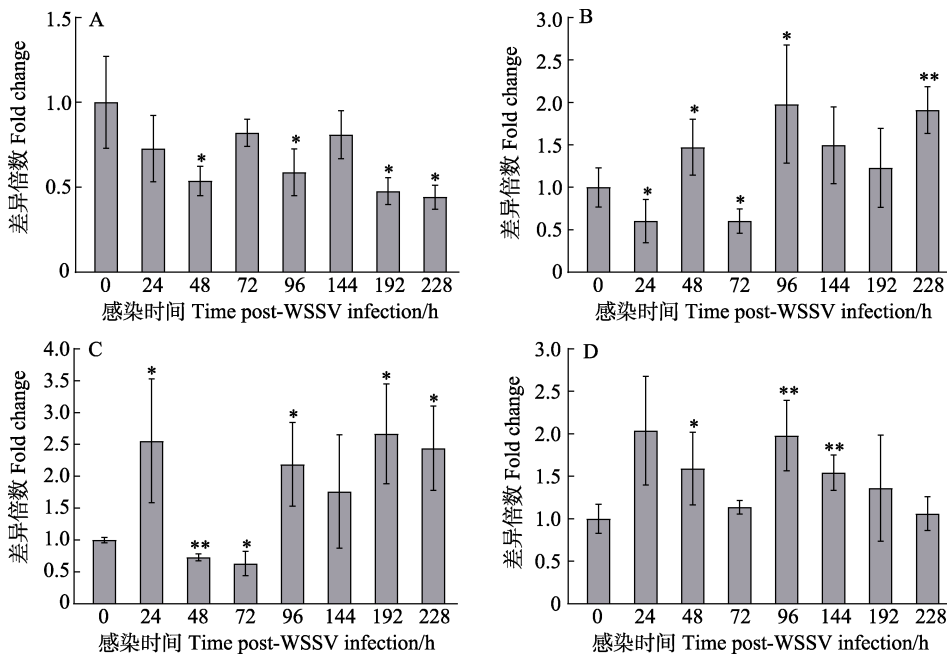


图 10 感染 WSSV 后 *parkin* 在凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达

Fig.10 Expression profiles of *parkin* in hepatopancreas, gill, muscle, and eyestalk of *P. vannamei* post-WSSV infection

A: 肝胰腺; B: 鳃; C: 肌肉; D: 眼柄。

A: Hepatopancreas; B: Gill; C: Muscle; D: Eyestalk.

的 SNP 位点。HWE 结果表明, SNP1 和 SNP2 位点均符合 HWE (表 2)。抗性群体的 H_o 为 0.300~0.467, H_e 为 0.480~0.499, MAF 为 0.400~0.483。PIC 为

0.365~0.375, 表现为中度多态性。无 $MAF < 0.05$ 的 SNP 位点。HWE 结果表明, SNP1 位点符合 HWE, SNP2 位点偏离 HWE (表 2)。

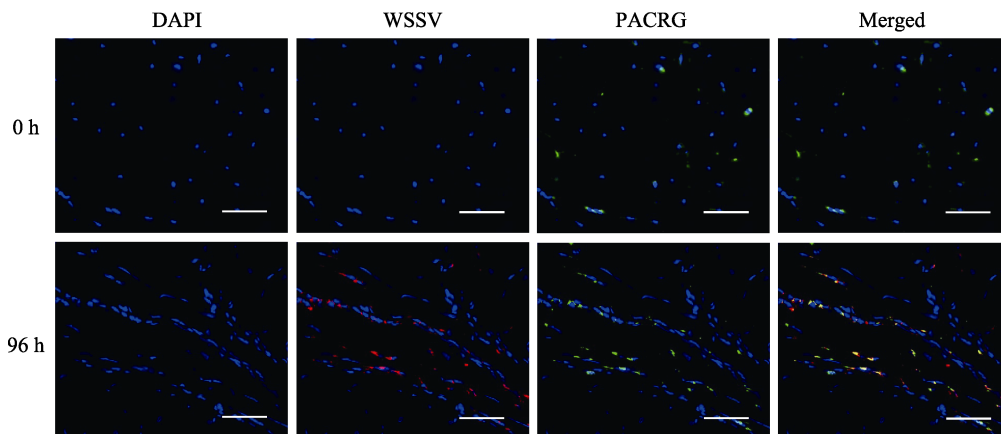


图 11 凡纳对虾肌肉中 *PACRG* mRNA 和 WSSV DNA 的位置(比例尺为 50 μm)

Fig.11 The location of *PACRG* mRNA and WSSV DNA in the muscle of *P. vannamei* (The scale bar is 50 μm)

表 2 *PACRG* 基因敏感组和抗性组 SNP 位点突变类型及多态性分析

Tab.2 Analysis of SNP mutation types and polymorphism in *PACRG* between susceptible group (SG) and resistant group (RG)

名称 Name	位置 Location /bp	碱基类型 Type of base	观测杂合度 H_o		期望杂合度 H_e		最小等位基因 频率 MAF		多态信息含量 PIC		哈迪-温伯格平衡 HWE	
			敏感组	抗性组	敏感组	抗性组	敏感组	抗性组	敏感组	抗性组	敏感组	抗性组
			SG	RG	SG	RG	SG	RG	SG	RG	SG	RG
SNP1	ORF-369	G/A	0.500	0.467	0.375	0.480	0.250	0.400	0.305	0.365	0.144	1.000
SNP2	ORF-411	G/A	0.400	0.300	0.491	0.499	0.433	0.483	0.371	0.375	0.454	0.032

2.10 *PACRG* 基因 SNP 位点与抗 WSSV 性状的关联

利用卡方检验(χ^2)分析 *PACRG* 基因 2 个 SNP 位点的基因分型结果与抗 WSSV 性状之间的关联性,结果见表 3。SNP1 和 SNP2 位点与抗 WSSV 性状无显著关联。

表 3 *PACRG* 基因 SNP 位点与抗 WSSV 性状的关联分析

Tab.3 Correlation analysis between SNP sites and WSSV resistance traits in the *PACRG* gene

名称 Name	基因型 Genotype	敏感组 SG	抗性组 RG	卡方值 Chi-Square	P 值 P value
SNP1	AA	15	11	5.650	0.059
	GG	0	5		
	AG	15	14		
SNP2	AA	11	11	0.958	0.619
	GG	7	10		
	AG	12	9		

2.11 *parkin* 基因 SNP 位点的筛选及多态性分析

测序结果显示,在凡纳对虾 *parkin* 中共筛选到 15 个 SNP 位点,每个 SNP 的位置从 *parkin* mRNA 序列(XM_027357483.1)开始,命名为 SNP1~15 (表 4)。

SNP1 位点为同义突变,位于 *parkin* 的 ORF 区。其余 SNP 位点均位于 3'-UTR 区。

对 SNP 位点的多态性进行分析结果显示,敏感组群体的 H_o 为 0.100~0.600, H_e 为 0.095~0.491, MAF 为 0.050~0.433。PIC 为 0.090~0.371, SNP5、SNP6、SNP7、SNP8、SNP11、SNP12、SNP14 和 SNP15 位点表现为低度多态性, SNP1、SNP2、SNP3、SNP4、SNP9、SNP10 和 SNP13 位点表现为中度多态性。无 MAF<0.05 的 SNP 位点。HWE 结果表明,15 个 SNP 位点均符合 HWE (表 4)。抗性组群体的 H_o 为 0.167~0.700, H_e 为 0.153~0.495, MAF 为 0.083~0.450, PIC 为 0.141~0.372, SNP6、SNP8、SNP11、SNP12、SNP14 和 SNP15 位点表现为低度多态性, SNP1、SNP2、SNP3、SNP4、SNP5、SNP7、SNP9、SNP10 和 SNP13 位点表现为中度多态性。无 MAF<0.05 的 SNP 位点。HWE 结果表明,15 个 SNP 位点均符合 HWE(表 4)。

2.12 *parkin* 基因 SNP 位点与抗 WSSV 性状的关联分析

利用卡方检验(χ^2)分析 *parkin* 基因 15 个 SNP 位点的基因分型结果与抗 WSSV 性状之间的关联性,结果见表 5。其中, SNP3、SNP4、SNP5、SNP7 和 SNP9 位点与抗 WSSV 性状显著相关。

表 4 *parkin* 基因敏感组和抗性组 SNP 位点突变类型及多态性分析Tab.4 Analysis of SNP mutation types and polymorphism in *parkin* between susceptible group (SG) and resistant group (RG)

名称 Name	位置 Location /bp	碱基类型 Type of base	观测杂合度 H_o		期望杂合度 H_e		最小等位基因 频率 MAF		多态信息含量 PIC		哈迪-温伯格平衡 HWE	
			敏感组	抗性组	敏感组	抗性组	敏感组	抗性组	敏感组	抗性组	敏感组	抗性组
			SG	RG	SG	RG	SG	RG	SG	RG	SG	RG
SNP1	ORF-1627	C/G	0.600	0.500	0.444	0.375	0.333	0.250	0.346	0.305	0.102	0.144
SNP2	UTR-1762	T/A	0.400	0.600	0.320	0.420	0.200	0.300	0.269	0.332	0.560	0.304
SNP3	UTR-1779	G/A	0.300	0.700	0.455	0.495	0.350	0.450	0.351	0.372	0.102	0.061
SNP4	UTR-1785	T/A	0.300	0.633	0.455	0.495	0.350	0.450	0.351	0.372	0.102	0.265
SNP5	UTR-1876	A/G	0.167	0.367	0.153	0.406	0.083	0.283	0.141	0.324	1.000	0.655
SNP6	UTR-1882	A/C	0.167	0.333	0.153	0.278	0.083	0.167	0.141	0.239	1.000	0.563
SNP7	UTR-1895	C/A	0.233	0.367	0.206	0.433	0.117	0.317	0.185	0.339	1.000	0.413
SNP8	UTR-1898	G/A	0.133	0.200	0.124	0.231	0.067	0.133	0.117	0.204	1.000	0.414
SNP9	UTR-1922	C/T	0.400	0.700	0.420	0.495	0.300	0.450	0.332	0.372	1.000	0.061
SNP10	UTR-1923	A/T	0.400	0.667	0.420	0.491	0.300	0.433	0.332	0.371	1.000	0.077
SNP11	UTR-1936	G/A	0.300	0.200	0.255	0.180	0.150	0.100	0.222	0.164	1.000	1.000
SNP12	UTR-1957	G/T	0.100	0.233	0.095	0.206	0.050	0.117	0.090	0.185	1.000	1.000
SNP13	UTR-1999	G/T	0.333	0.533	0.491	0.480	0.433	0.400	0.371	0.365	0.132	0.711
SNP14	UTR-2002	C/A	0.133	0.167	0.124	0.153	0.067	0.083	0.117	0.141	1.000	1.000
SNP15	UTR-2004	T/A	0.167	0.233	0.153	0.206	0.083	0.117	0.141	0.185	1.000	1.000

3 讨论

PACRG 与 *parkin* 基因共用一个双向启动子,二者均受 UPS 的调控,将泛素与受损或错误折叠的蛋白质结合,随后被蛋白酶体降解,发挥维持细胞稳态的作用(Taylor *et al.*, 2007; West *et al.*, 2003)。*parkin* 是一种具有泛素蛋白 E3 连接酶活性的多结构域蛋白,可通过类似线粒体的自噬途径对病原菌的某些蛋白进行泛素化标记并清除。许玲(2016)在日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 中鉴定出泛素连接酶 *parkin*, 表明进入细胞内的 WSSV 病毒的囊膜蛋白被 *parkin* 泛素化修饰,然后通过蛋白酶体和自体自噬的方式被清除。*PACRG* 在甲壳类动物中的功能研究较少,在哺乳动物中的研究较为广泛。Taylor 等(2007)通过探究 *PACRG* 与帕金森病发病机制的相关性,表明 *PACRG* 受 UPS 的调节,可能在帕金森病的发病机制中发挥作用(Taylor *et al.*, 2007)。Liu 等(2021)通过重组表达来探究 *PACRG* 的生物学功能,发现 *PACRG* 参与泛素依赖的蛋白质代谢过程,同时可能在基因转录调控中发挥重要作用。

本研究对凡纳对虾中 *PACRG* 和 *parkin* 基因进行 mRNA 和预测氨基酸序列的特征分析,其中, *PACRG* ORF 序列全长 600 bp, 编码 199 个氨基酸, 包含一个 *ParcG* 结构域。对凡纳对虾 *PACRG* 蛋白与不同物种

间的氨基酸序列进行同源性分析发现,凡纳对虾的 *PACRG* 与日本对虾的氨基酸序列同源性最高,为 89.70%。凡纳对虾与中国对虾和日本对虾的亲缘关系最近。推测 *PACRG* 具有较高的进化保守性。这与 Dawe 等(2005)证实 *PACRG* 是一种保守的轴丝蛋白的结果相一致。*parkin* ORF 序列全长 1 653 bp, 编码 550 个氨基酸, 包含一个信号肽结构, 在 33~104 氨基酸位置处包含一个 UBQ 基因结构域, 400~460 氨基酸位置包含一个 IBR 结构域, 487~543 氨基酸位置包含一个 IBR 结构域(图 2)。对 *parkin* 蛋白在不同物种间的氨基酸序列进行同源性分析,发现凡纳对虾的 *parkin* 与中国对虾和斑节对虾的同源性最高,为 93.45%。凡纳对虾与中国对虾和斑节对虾的亲缘关系最近。推测 *parkin* 同样具有较高的进化保守性。

为了证实 *PACRG* 和 *parkin* 基因在防御 WSSV 感染过程中发挥作用,采用 real-time PCR 技术对健康和感染 WSSV 后不同时间凡纳对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中 *PACRG* 和 *parkin* 基因的表达水平进行检测。结果显示,健康凡纳对虾中的 *PACRG* 和 *parkin* 在肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中均有表达,且无显著差异。West 等(2003)分析表明, *PACRG* 和 *parkin* 在人体许多组织中共表达,如脑、心脏和肌肉。感染 WSSV 后 48、96、192 和 228 h,对虾肝胰腺中 *PACRG* 和 *parkin* 的表达水平均呈现显著的下调趋势。感染 WSSV 后 48、72、96、144、192 和 228 h,对虾鳃中

表 5 *parkin* 基因 SNP 位点与抗 WSSV 性状的关联分析
Tab.5 Correlation analysis between SNP sites and WSSV resistance traits in the *parkin* gene

名称 Name	基因型 Genotype	敏感组 SG	抗性组 RG	卡方值 Chi-Square	P 值 P value
SNP1	CC	11	15	1.888	0.389
	CG	18	15		
	GG	1	0		
SNP2	TT	18	12	2.400	0.121
	AT	12	18		
SNP3	AA	15	3	12.800	0.002**
	GG	6	6		
	AG	9	21		
SNP4	AA	15	4	10.017	0.007**
	TT	6	7		
	AT	9	19		
SNP5	AA	0	3	7.226	0.027*
	GG	25	16		
	AG	5	11		
SNP6	AA	25	20	2.222	0.136
	AC	5	10		
SNP7	AA	23	15	6.573	0.037*
	CC	0	4		
	AC	7	11		
SNP8	AA	0	1	1.584	0.453
	GG	26	23		
	AG	4	6		
SNP9	CC	15	6	6.312	0.043*
	TT	3	3		
	CT	12	21		
SNP10	AA	15	7	4.909	0.086
	TT	3	3		
	AT	12	20		
SNP11	AG	9	6	0.800	0.371
	GG	21	24		
SNP12	GG	27	23	1.920	0.166
	TG	3	7		
SNP13	TT	12	4	5.607	0.061
	GG	8	10		
	TG	10	16		
SNP14	CC	26	25	0.131	0.718
	AC	4	5		
SNP15	AT	5	7	0.417	0.519
	TT	25	23		

注：*：显著相关($P<0.05$)，**：极显著相关($P<0.01$)。

Note: *: Significant correlation ($P<0.05$), **: Highly significant correlation ($P<0.01$).

PACRG 的表达水平呈极显著的下调趋势；而感染 WSSV 后 48、96 和 228 h，对虾鳃中 *parkin* 的表达水平呈现显著的上调趋势。感染 WSSV 后 96、192 和 228 h，对虾肌肉中 *PACRG* 和 *parkin* 的表达水平均呈现显著的上调趋势。感染 WSSV 后眼柄中 *PACRG* 和 *parkin* 表现出相似的组织表达模式。研究显示，双向启动子基因通常表现出相似的组织表达模式和生物功能，或者基因产物通常在共同的途径中发挥作用 (Li *et al*, 2006)。本研究中，凡纳对虾在感染 WSSV 后不同时间、不同组织中的 *PACRG* 和 *parkin* 表达水平有显著变化，推测其可能参与凡纳对虾抗 WSSV 的过程。此外，FISH 结果表明，感染 WSSV 96 h 后，凡纳对虾肌肉中 *PACRG* mRNA 和 WSSV 的位置呈现重合状态，推测 *PACRG* 可能在凡纳对虾与 WSSV 的相互作用中发挥功能。

SNP 突变引起的碱基改变可以使其编码的蛋白质结构和功能发生改变，从而直接影响生物体的性状 (杜玮南等, 2000)。有研究表明，麻风病、结核病、伤寒病、白血病和星形胶质细胞肿瘤这些疾病的易感性与 *PACRG* 和 *parkin* 共有的双向启动子区域的变异有关 (Mira *et al*, 2000; Ali *et al*, 2006; Ichimura *et al*, 2006)。*parkin* 基因的突变或缺失与常染色体隐性遗传的青少年帕金森病有关 (Kitada *et al*, 1998)。本研究对 960 尾凡纳对虾进行 WSSV 感染并按照死亡时间筛选出敏感组和抗性组进行 SNP 分析，其中，在 *PACRG* 的 ORF 区共筛选到 2 个 SNP 位点，在 *parkin* 的 ORF 区筛选到 1 个 SNP 位点，在 *parkin* 的 UTR 区筛选到 14 个 SNP 位点。将这些 SNP 位点进行抗 WSSV 性状的关联分析后发现，位于 *parkin* UTR 区的 SNP3、SNP4、SNP5、SNP7 和 SNP9 位点与抗 WSSV 性状显著相关。尽管非翻译区的 SNP 不能直接改变蛋白质的氨基酸序列，但对 mRNA 的稳定性和翻译调控具有重要作用 (余光创等, 2007)。

综上所述，共用一个双向启动子的 *PACRG* 和 *parkin* 具有较高的进化保守性。凡纳对虾感染 WSSV 后，*PACRG* 和 *parkin* 在对虾肝胰腺、鳃、肌肉和眼柄中的表达水平发生显著变化，其中，眼柄中的 *PACRG* 和 *parkin* 表现出极为相似的组织表达模式。FISH 结果表明，在对虾肌肉中 *PACRG* mRNA 和 WSSV DNA 的位置呈重合状态，进一步提示 *PACRG* 在凡纳对虾与 WSSV 的相互作用中发挥功能。通过 SNP 位点与抗 WSSV 性状关联分析，*parkin* UTR 区发现有抗 WSSV 性状相关的 SNP。上述结果提示 *PACRG* 和 *parkin* 可能参与凡纳对虾的抗 WSSV 过程，但具体功能需要进一步研究。

参 考 文 献

- ALI S, VOLLAARD A M, WIDJAJA S, *et al.* PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clinical and Experimental Immunology*, 2006, 144(3): 425–431
- CARON H, VAN SCHAİK B, VAN DER MEE M, *et al.* The human transcriptome map: Clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science*, 2001, 291(5507): 1289–1292
- CHEN J, LI Z J, HEW C L. Characterization of a novel envelope protein WSV010 of shrimp white spot syndrome virus and its interaction with a major viral structural protein VP24. *Virology*, 2007, 364(1): 208–213
- CHEN K, LI E, XU C, *et al.* Growth and metabolomic responses of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to different dietary fatty acid sources and salinity levels. *Aquaculture*, 2019, 499: 329–340
- DAGAR G, KUMAR R, YADAV K K, *et al.* Ubiquitination and deubiquitination: Implications on cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, 2023, 1866(4): 194979
- DAWE H R, FARR H, PORTMAN N, *et al.* The Parkin co-regulated gene product, *PACRG*, is an evolutionarily conserved axonemal protein that functions in outer-doublet microtubule morphogenesis. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(23): 5421–5430
- DI NAPOLI M, PAPA F. The proteasome system and proteasome inhibitors in stroke: controlling the inflammatory response. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2003, 4(11): 1333–1342
- DONG L J, LUO K, CAO J W, *et al.* Comparison of WSSV-resistant traits of different commercial larvae of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 69–75 [董丽君, 罗坤, 曹家旺, 等. 凡纳滨对虾商业苗种抗 WSSV 性能比较. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 69–75]
- DU W N, SUN H X, FANG F D. The research development of single nucleotide polymorphism. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2000, 22(4): 392–394 [杜玮南, 孙红霞, 方福德. 单核苷酸多态性的研究进展. *中国医学科学院学报*, 2000, 22(4): 392–394]
- FENG Y P, 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]
- HOU C H, SONG W L, YUAN H, *et al.* Comparative transcriptome analysis revealed that dietary zymosan-A improved the immunity of *Penaeus vannamei* by regulating the TLR signaling pathway. *Aquaculture*, 2022, 561: 738603
- ICHIMURA K, MUNGALL A J, FIEGLER H, *et al.* Small regions of overlapping deletions on 6q26 in human astrocytic tumours identified using chromosome 6 tile path array-CGH. *Oncogene*, 2006, 25(8): 1261–1271
- IMAI Y, SODA M, MURAKAMI T, *et al.* A product of the human gene adjacent to *parkin* is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(51): 51901–51910
- KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI N, *et al.* Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998, 392(6676): 605–608
- LI Y Y, YU H, GUO Z M, *et al.* Systematic analysis of head-to-head gene organization: Evolutionary conservation and potential biological relevance. *PLoS Computational Biology*, 2006, 2(7): e74–112
- LIU T K, ZHAO H Z, JIAN S F, *et al.* Functional expression, purification and identification of interaction partners of *PACRG*. *Molecules*, 2021, 26(8): 2308–2322
- MENG X H, ZHANG T S, KONG J, *et al.* Equivalent and quantitative test method of white spot syndrome virus resistance of prawns. ZL201210107377.8. 2013-12-25 [孟宪红, 张天时, 孔杰, 等. 对虾抗白斑综合症病毒能力的等量、定量测试方法. ZL201210107377.8. 2013-12-25]
- MESCHÉDE J, ŠADIĆ M, FURTHMANN N, *et al.* The *parkin*-coregulated gene product *PACRG* promotes TNF signaling by stabilizing LUBAC. *Science Signaling*, 2020, 13(617): eaav1256–1269
- MIRA M T, ALCAÍS A, NGUYEN V T, *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* and *PACRG*. *Nature*, 2004, 427(6975): 636–640
- MIZUNO K, DYMEK E E, SMITH E F, *et al.* Microtubule binding protein *PACRG* plays a role in regulating specific ciliary dyneins during microtubule sliding. *Cytoskeleton*, 2016, 73(12): 703–711
- PURCELL S, NEALE B, TODD-BROWN K, *et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 2007, 81(3): 559–575
- SCOTT L, DAWSON V L, DAWSON T M. Trumping neurodegeneration: Targeting common pathways regulated by autosomal recessive Parkinson's disease genes. *Experimental Neurology*, 2017, 298(B): 191–201
- SPELLMAN P T, RUBIN G M. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *Journal of Biology*, 2002, 1(1): 5
- TAYLOR J M, SONG Y J C, HUANG Y, *et al.* *Parkin* co-regulated gene (*PACRG*) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of parkinsonian diseases. *Neurobiology of Disease*, 2007, 27(2): 238–247

- TRINKLEIN N D, ALDRED S F, HARTMAN S J, *et al.* An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Research*, 2004, 14(1): 62–66
- WEST A B, LOCKHART P J, O' FARELL C, *et al.* Identification of a novel gene linked to *parkin* via a bi-directional promoter. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 326(1): 11–19
- WINKLHOFER K F. *Parkin* and mitochondrial quality control: Toward assembling the puzzle. *Trends in Cell Biology*, 2014, 24(6): 332–341
- XU L. E3 Ligase *Parkin* mediates the immune response against white spot syndrome virus by ubiquitin-proteasome and xenophagy pathways. Master's Thesis of Shandong University, 2016 [许玲. 泛素连接酶 *Parkin* 通过蛋白酶体与异体自噬途径介导对虾的抗病毒免疫反应. 山东大学硕士研究生学位论文, 2016]
- YU G C, QIN Y D, BO X C, *et al.* Translational control of eukaryotic gene depending on higher structures in 5' untranslated regions. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(11): 881–887 [余光创, 秦宜德, 伯晓晨, 等. 依赖于 5'端非编码区高级结构的真核生物 mRNA 翻译调控. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(11): 881–887]
- ZHAO H Z, LI J, MA Y H, *et al.* Research progress of *Parkin* co-regulated gene. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2018, 34(10): 1333–1336 [赵海洲, 李军, 马延红, 等. *Parkin* 共调基因调控功能与疾病研究进展. *中国药理学通报*, 2018, 34(10): 1333–1336]

(编辑 冯小花)

Expression Analysis and SNP Mining of the *Parkin* Co-Regulated Gene (*PACRG*) and *parkin* in *Penaeus vannamei* Against White Spot Syndrome Virus

XUE Qian¹, LI Xupeng^{2,3}, LI Yang², LUAN Sheng^{2,3}, LUO Kun², KONG Jie^{2,3}, XING Qun⁴, MENG Xianhong^{2,3①}

(1. School of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China; 2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China; 4. BLUP Aquabreed Co., Ltd., Weifang 261311, China)

Abstract In a preliminary study conducted in our laboratory, the *parkin* co-regulated gene (*PACRG*) was identified as a candidate for white spot syndrome virus (WSSV) resistance using a genome-wide association approach. *PACRG* is genetically closely linked to the Parkinson's disease-associated gene *parkin*, both of which are regulated by a bidirectional promoter. The *PACRG* and *parkin* genes have been found to interact with each other, associate with autophagy, and participate in cellular protection. Therefore, the functions of *PACRG* and *parkin* in WSSV resistance in *Penaeus vannamei* were investigated. The mRNA and amino acid sequences were analyzed, and the expression levels in shrimp infected with WSSV at different times and tissues were detected by real-time PCR. Spatial localization was performed using fluorescence *in situ* hybridization. PCR and Sanger sequencing were employed to obtain single nucleotide polymorphisms (SNPs) and conduct an association analysis of these SNPs with resistance to WSSV. Our findings illustrated that the complete open reading frame (ORF) sequence of *PACRG* was 600 bp, encoded 199 amino acids, and was predicted to contain the ParcG structural domain. The complete sequence of *parkin* mRNA was 2,329 bp, comprising a 1,653 bp ORF, 100 bp 5'-untranslated region (UTR), and a 576 bp 3'-UTR, encoding 550 amino acids. *Parkin* is predicted to contain UBQ and IBR structural domains and a signal peptide structure. Amino acid sequence alignment

① Corresponding author: MENG Xianhong, Email: mengxianhong@ysfri.ac.cn

and phylogenetic tree analysis showed that the homology of *PACRG* between *P. vannamei* and *Penaeus japonicus* was the highest at 89.70% similarity. The phylogenetic relationship of *P. vannamei* was the closest to *Penaeus chinensis* and *P. japonicus*. Thus, *PACRG* may exhibit high evolutionary conservation. The *parkin* homology between *P. vannamei* and *P. chinensis* was the highest, with a similarity of 93.45%. It has been speculated that the *parkin* protein exhibits a high degree of evolutionary conservation. Herein, real-time PCR results suggested that *PACRG* and *parkin* were expressed in the hepatopancreas, gill, muscle, and eyestalk of healthy *P. vannamei*, with no significant difference. Following the challenge with WSSV, the *PACRG* and *parkin* expression levels in the hepatopancreas, gill, muscle, and eyestalk of *P. vannamei* were significantly altered. Post-WSSV infection for 48, 96, 192, and 228 h, the *PACRG* and *parkin* expression levels in the hepatopancreas of *P. vannamei* were significantly downregulated. At 48, 72, 96, 144, 192, and 228 h post-WSSV infection, *PACRG* expression in the gill of *P. vannamei* were significantly downregulated. However, at 48, 96, and 228 h post-WSSV infection, the *parkin* expression levels in the gill of *P. vannamei* were significantly upregulated. Post-WSSV infection at 96, 192, and 228 h, the *PACRG* and *parkin* expression levels in *P. vannamei* muscle were significantly upregulated. Post-WSSV infection, *PACRG* and *parkin* exhibited similar expression patterns in the eyestalk. The location of *PACRG* mRNAs mostly overlapped with the WSSV replication site in the shrimp muscle, suggesting that *PACRG* plays a functional role in the interaction between *P. vannamei* and WSSV. Two SNPs were identified within the ORF of the *PACRG*, One SNP was identified within the ORF of *parkin*, and one SNP was identified in the UTR of *parkin*. After conducting association analyses of these SNPs with WSSV resistance, SNPs located in the UTR of *parkin*-specific SNP3, SNP4, SNP5, SNP7, and SNP9 were significantly associated with resistance to WSSV. This study provides a theoretical reference for future research on the molecular mechanisms underlying *P. vannamei*'s resistance to WSSV.

Key words *P. vannamei*; White spot syndrome virus; *parkin* co-regulated gene; *parkin*; Single nucleotide polymorphism