

文章编号: 1674 - 5566(2012)01 - 0028 - 05

凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 组织表达的差异研究

黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 温文, 华雪铭, 周洪琪

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用荧光定量 PCR 技术, 检测了凡纳滨对虾不同组织(血淋巴、鳃、肌肉和肝胰腺)中 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的相对表达量。结果表明: 凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 在不同组织间的表达量存在显著差异。Toll 受体 mRNA 在各组织中的相对表达水平由高到低顺序依次为血淋巴 > 鳃 > 肌肉 > 肝胰腺。溶菌酶 mRNA 表达水平则依次为血淋巴 > 鳃 > 肌肉 > 肝胰腺, 但血淋巴和鳃之间无显著差异。溶菌酶 mRNA 和 Toll mRNA 表达量重复测定间的变异度在血淋巴和鳃组织间无显著差异。表明鳃和血淋巴是检测凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的相对表达量的理想实验材料。

研究亮点: Toll 受体能够将异物入侵的信号从细胞外传递到细胞内并引起胞内信号级联反应产生各种免疫效益因子, 因此其表达水平一定程度上可以反映对虾对病原入侵的灵敏性。溶菌酶活性是评判对虾免疫抗菌能力的重要指标。研究 Toll 受体和溶菌酶基因表达的组织差异性, 可以为后续开展对虾营养免疫学研究中免疫相关基因检测时实验材料的选取提供理论基础。

关键词: 凡纳滨对虾; Toll 受体 mRNA; 溶菌酶 mRNA; 血淋巴; 鳃

中图分类号: S 917

文献标志码: A

溶菌酶(lysozyme, LSZ)是普遍存在机体内的一种非特异性免疫抗菌蛋白^[1-2], 机体溶菌酶活性是评判对虾免疫抗菌能力的重要指标^[3-6]。有关对虾溶菌酶基因的研究近年也屡有报道。GROSS 等首次克隆出凡纳滨对虾溶菌酶基因核苷酸序列片段(GenBank: BE188312)^[7]。随后 SOTELO-MUNDO 等以该片段(GenBank: BE188312)为基础克隆出了凡纳滨对虾的溶菌酶基因全长^[8]。日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[9]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[10]、细脚滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)^[11]和斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[12]等对虾体内溶菌酶基因也陆续被克隆出来。

Toll 受体是目前发现的能够识别仅表达在病原微生物上的高度保守结构基序(Motifs) - 病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular pattern, PAMP)的一类重要模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)。Toll 受体在介导对虾体启动天然免疫并释放免疫因子的机制

中起着关键作用。当对虾受微生物入侵时, Toll 受体将异物入侵的信号从胞外传递到胞内, 并引起胞内信号级联反应, 介导细胞启动先天免疫反应^[13-15]。因此, Toll 受体的表达水平一定程度上可以反映对虾对入侵病原识别的灵敏性。而对病原识别的灵敏性则是评价机体免疫机能的核心内容之一。自 2007 年以来, 凡纳滨对虾^[16]、斑节对虾^[17]、中国明对虾^[18]和日本囊对虾^[19]等多种对虾的 Toll 受体基因被克隆出来。

本文检测了凡纳滨对虾不同组织中 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 相对表达水平, 为后续应用 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 表达水平开展对虾营养免疫评价提供有关实验取材方面的指导。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾

试验用对虾取自上海市青浦练塘渔珠场一凡纳滨对虾养殖池塘, 采样期间池塘水质良好, 溶解氧 > 5 mg/L, 水温 30 ℃, 水体氨氮 ≤ 0.3

收稿日期: 2011-09-30 修回日期: 2011-11-02

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(08DZ1981000); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 黄旭雄(1971—), 男, 副教授, 研究方向为水产动物营养与饵料研究。E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

mg/L,pH 为 7.8。池塘对虾摄食正常,无明显病害发生。

1.2 样品的采集

挑选健康活泼、处于蜕皮间期的凡纳滨对虾 [(8.31 ± 0.34) cm] 15 尾,用酒精棉擦拭对虾体表甲壳,然后用灭菌 1.0 mL 注射器分别抽取血淋巴液,用灭菌手术剪和镊子去除甲壳并取其肌肉、鳃和肝胰腺组织,分别放入去 RNA 酶的离心管中,置液氮中带回实验室,转移至 -80 °C 冰箱保存,用于 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 相对表达量检测。

1.3 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的表达检测

将 -80 °C 冻存的凡纳滨对虾各组织样品用 Trizol 试剂按试剂盒 (TaKaRa) 说明书提取总 RNA。所提取 RNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值介于 1.9 ~ 2.0。参照美国国立生物技术信息中心网站上的凡纳滨对虾 Toll 受体基因 (GenBank: DQ923424.1) 和溶菌酶基因 (GenBank: AY170126.2) 设计凡纳滨对虾 Toll 受体基因和溶菌酶基因引物,同时设计 β -actin 引物作为内参,所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成 (表 1)。采用荧光定量 PCR 方法检测,按照 SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit 说明书将提取的总 RNA 先反转录为 cDNA,再采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR 反应,PCR 程序为:95 °C、20 s,一个循环;95 °C、3 s,60 °C、30 s,共 36 个循环;95 °C 熔解曲线检测反应特异性。每尾虾的每个组织样品设 3 复孔和 1 个参照基因 β -actin。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法进行相对定量,分析各组织中溶菌酶 mRNA 和 Toll 受体 mRNA 的相对表达量。

表 1 凡纳滨对虾溶菌酶基因,Toll 受体基因与 β -actin 参照基因引物序列

Tab.1 Primer pairs for lysozyme, Toll receptor and β -actin genes for *Litopenaeus vannamei*

引物	序列
β -actin-SQF	CGCGACCTCACAGACTACCT
β -actin-SQR	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG
Lysozyme-SQF	GTTCCGATCTGATGTCGGATG
Lysozyme-SQR	AAGCCACCCAGCCAGAATAG
Toll receptor-SQF	TGAGAGATGCCCACTGCCTG
Toll receptor-SQR	CGCTTGAAGGTTTGTGAGGGAG

1.4 数据统计分析

mRNA 相对表达量的检测结果用平均数 ± 标

准差表示。计算同一样品的不同重复 (3 个复孔) 的测定结果的变异度 ($V = 3$ 个复孔的测定标准差/3 个复孔的测定平均值),并求算不同样品的测定变异度均值和标准差。使用 SPSS 17.0 分析软件对数据进行单因素方差分析,Duncan's 法进行多重比较,检验处理间的差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

图 1 显示,凡纳滨对虾 Toll 受体 mRNA 在组织中的相对表达水平由高到低顺序依次为血淋巴 > 鳃 > 肌肉 > 肝胰腺,且不同组织间的表达水平均存在显著差异 ($P < 0.05$)。血淋巴 Toll 受体 mRNA 的表达水平是肌肉的 3.35 倍,鳃 Toll 受体 mRNA 的表达水平是肌肉中的 1.7 倍,而肝胰腺表达水平仅为肌肉的 0.025 倍。

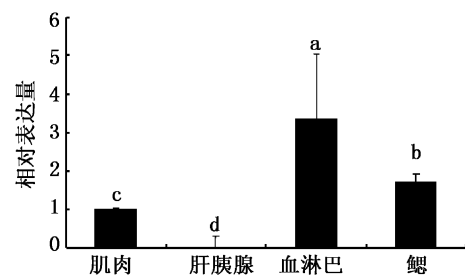


图 1 凡纳滨对虾肌肉、肝胰腺、血淋巴和鳃组织中 Toll 受体 mRNA 相对表达量
Fig.1 Toll receptor mRNA expression levels in muscle, hepatopancreas, haemolymph and gill of *Litopenaeus vannamei*

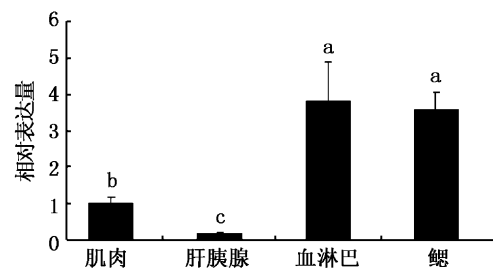


图 2 凡纳滨对虾肌肉、肝胰腺、血淋巴和鳃组织中溶菌酶 mRNA 相对表达量
Fig.2 Lysozyme mRNA expression levels in muscle, hepatopancreas, haemolymph and gill of *Litopenaeus vannamei*

凡纳滨对虾不同组织溶菌酶 mRNA 表达水平也存在显著性差异 ($P < 0.05$) (图 2),组织溶

菌酶 mRNA 表达水平从高到低依次为血淋巴 > 鳃 > 肌肉 > 肝胰腺, 但鳃与血淋巴的溶菌酶 mRNA 表达水平无显著差异; 溶菌酶 mRNA 在血淋巴的表达水平是在肌肉的 3.84 倍, 鳃的表达水平是肌肉的 3.58 倍, 而肝胰腺的表达水平仅

为肌肉的 0.17 倍。

对同一样品不同复孔检测结果的统计表明(表 2), Toll 受体 mRNA 及溶菌酶 mRNA 表达水平的重复间变异度在 4 个组织中无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 凡纳滨对虾不同组织中 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 相对表达量的测定变异度
Tab. 2 The variation coefficients on mRNA expression levels of replicates from the same samples

	肝胰腺	肌肉	血淋巴	鳃
Toll 受体 mRNA 重复间变异度	0.27 ± 0.11	0.13 ± 0.19	0.16 ± 0.10	0.23 ± 0.01
溶菌酶 mRNA 重复间变异度	0.10 ± 0.13	0.03 ± 0.05	0.14 ± 0.07	0.06 ± 0.03

3 讨论

本研究表明凡纳滨对虾 Toll 受体 mRNA 表达水平在组织间存在显著差异, 其表达量在血淋巴中最高。叶旻玉等^[20] 对凡纳滨对虾的鳃、肌肉和肝胰腺三组织的 Toll 受体 mRNA 表达丰度的研究中, 发现在凡纳滨对虾三组织中, 鳃组织 Toll 受体 mRNA 表达水平最高。YANG 等研究表明凡纳滨对虾中 Toll 受体相对表达水平的高低顺序依次是血细胞 > 鳃 > 心 > 脑 > 胃 > 肠 > 幽门盲肠 > 肌肉 > 神经系统 > 精巢 > 眼柄和肝胰腺^[16]。本研究与上述报道结果相吻合。对中国明对虾 Toll 受体在不同组织中表达水平的研究也表明, Toll 受体在鳃和淋巴器官的相对表达量显著高于肌肉等其他组织和器官, 肝胰腺中的相对表达量最低^[18]。而对斑节对虾的研究则发现其 Toll 受体在肝胰腺和肠中表达水平稍微高于鳃组织^[17]。MEKATA 等^[19] 研究发现日本囊对虾的 Toll 受体在鳃、肠、淋巴器官、心脏、造血器官和血细胞等组织都有表达。对不同对虾 Toll 受体组织表达水平的研究结果表明, 尽管 Toll 受体在对虾上的表达丰度存在物种和组织的差异性, 但鳃和血淋巴细胞显然是 Toll 受体表达丰度相对较高的组织。

溶菌酶能破坏细菌细胞壁, 是对虾免疫防御体系的重要组成部分^[1-2, 21]。凡纳滨对虾溶菌酶基因序列已见报道^[7-8]。由凡纳滨对虾溶菌酶基因的全长序列可知, 该溶菌酶由 150 个氨基酸组成, 其氨基酸序列与蛋清溶菌酶的相似度为 46%^[8]。BURGE 等^[22] 研究发现凡纳滨对虾在注射弧菌之后溶菌酶主要表达在血细胞及周围组织中。而本研究发现在血淋巴和鳃组织中表达

最高, 而且两者之间无显著性差异。国内外学者在其他对虾溶菌酶基因检测过程中也发现了类似结果。LIU 等克隆了中国明对虾溶菌酶基因全长并发现其主要表达在血细胞、鳃和肠组织^[19]。HIKIMA 等发现斑节对虾的溶菌酶主要在表达在免疫组织和免疫细胞中, 血细胞中溶菌酶表达水平最高^[9]。

血淋巴细胞是虾类免疫系统最为重要的组分, 虾免疫功能(包括识别、吞噬、黑化、细胞毒和细胞间信息传递)主要通过血淋巴细胞来完成^[23]。许多非细胞免疫因子, 都直接或间接与血淋巴细胞有关。对虾的鳃直接与外界环境接触, 鳃部位的细胞参与多种生理过程(如呼吸, 渗透压调节和解毒作用), 对环境中生物或非生物因子的变化很敏感。当给对虾注射异物颗粒时, 血淋巴细胞产生的免疫反应 - 包裹作用主要在鳃部进行^[24]。LIU 等报道中国明对虾抗脂多糖因子的表达水平在鳃、肠道和血淋巴细胞中的表达水平较高, 而肝胰腺、肌肉和卵巢组织中表达量很低^[25]。给对虾注射的弧菌最后也主要在鳃部位聚集^[24, 26]。在给凡纳滨对虾注射 WSSV 病毒后, 可检测到鳃基因表达发生变化^[27]。上述研究表明, 鳃组织同血淋巴细胞一样, 在抵抗病原微生物攻击中发挥关键作用, 是主要参与非特异免疫反应的免疫器官或组织^[28-31]。虾体内 Toll 受体在识别外来侵扰介导细胞启动先天免疫反应中发挥重要作用^[14-15, 18]。虾的血淋巴和鳃组织是血淋巴细胞聚集的主要组织和器官, 因此 Toll 受体和溶菌酶基因的表达水平在鳃组织和血淋巴中相对较高。

综上所述, 凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 在不同组织间存在表达差异性, 血淋巴和

鳃组织的 Toll 和溶菌酶 mRNA 表达量高,两种基因重复测定间的变异度在组织间无显著差异,因此鳃和血淋巴是检测凡纳滨对虾这两个基因表达量的理想实验材料。

参考文献:

- [1] 荣晓花, 凌沛学. 溶菌酶的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(6): 319-320.
- [2] 吴晓英, 林影, 陈慧英. 溶菌酶的研究进展[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 55-52.
- [3] 黄旭雄, 周洪琪, 蔡生力. 虾类免疫系统组成及免疫机理探讨[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(3): 301-311.
- [4] 曹剑香, 简纪常, 吴灶和. 虾类体液免疫研究进展[J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(1): 89-93.
- [5] 黄旭雄, 周洪琪. 甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价[J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 90-96.
- [6] 黄旭雄, 周洪琪, 宋理平. 急性感染对中国明对虾非特异免疫水平的影响[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 325-331.
- [7] GROSS P S, BARTLETT T C, BROWDY C L, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(7): 565-577.
- [8] SOTELO-MUNDO R R, ISLAS-OSUNA M A, DE-LA-RE-VEGA E, et al. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(4): 325-331.
- [9] HIKIMA S, HIKIMA J, ROJTINNAKORN J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. *Gene*, 2003, 316: 187-195.
- [10] BU X, DU X, ZHOU W, et al. Molecular cloning, recombinant expression, and characterization of lysozyme from Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(5): 723-732.
- [11] MAI W, HU C. cDNA cloning, expression and antibacterial activity of lysozyme C in the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) [J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(7): 837-844.
- [12] SUPUNGUL P, RIMPHANITCHAYAKIT V, AOKI T, et al. Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 490-498.
- [13] HASHIMOTO C, HUDSON K L, ANDERSON K V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein [J]. *Cell*, 1988, 52(2): 269-279.
- [14] LIGOXYGAKIS P, PELTE N, HOFFMANN J A, et al. Activation of *Drosophila* Toll During Fungal Infection by a Blood Serine Protease [J]. *Science*, 2002, 297(5578): 114-121.
- [15] MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2001, 1(2): 135-145.
- [16] YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, et al. A Toll receptor in shrimp [J]. *Molecular immunology*, 2007, 44(8): 1999-2008.
- [17] ARTS J A J, CORNELISSEN F H J, CIJSOUW T, et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 504-513.
- [18] YANG C, ZHANG J, LI F, et al. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 564-574.
- [19] MEKATA T, KONO T, YOSHIDA T, et al. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 122-133.
- [20] 叶旻玉, 刘利平, 戴习林, 等. 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因 cDNA 片段的克隆及序列分析 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 263-267.
- [21] 刘梅, 张士瑾. 溶菌酶 C 及其生物学功能 [J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 465-467.
- [22] BURGE E J, MADIGAN D J, BURNETT L E, et al. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(4): 327-339.
- [23] JOHANSSON M W, KEYSER P, SRITUNYALUCKSANA K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1/3): 45-52.
- [24] BURGENTS J E, BURNETT L E, STABB E V, et al. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Development & Comparative Immunology*, 2005, 29: 681-691.
- [25] LIU F, LIU Y, LI F, et al. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(6): 600-608.
- [26] BURGENTS J E, BURNETT K G, BURNETT L E. Effects of hypoxia and hypercapnic hypoxia on the localization and the elimination of *Vibrio campbellii* in *Litopenaeus vannamei*, the Pacific white shrimp [J]. *The Biological Bulletin*, 2005, 208: 159-168.
- [27] CLAVERO-SALAS A, SOTELO-MUNDO R R, GOLLAS-GALVÁN T, et al. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23

- (2): 459–472.
- [28] MARTIN G G, QUINTERO M, QUIGLEY M. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2000, 20(2): 209–217.
- [29] HASSON K W, LIGHTNER D V, MOHNEY L L, et al. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei* [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 1999, 38: 93–105.
- [30] BAUER R T. Antifouling adaptations of marine shrimp (Decapoda: Caridea): gill cleaning mechanisms and grooming of brooded embryos [J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1979, 65(4): 281–303.
- [31] WANG Y C, CHANG P S, CHEN H Y. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1,3-glucan [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 113–121.

Expressions of Toll receptor and lysozyme mRNA among tissues of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

HUANG Xu-xiong, LUO Ci-xing, GUO Teng-fei, WEN Wen, HUA Xue-ming, ZHOU Hong-qi
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The relative expression levels of Toll receptor and lysozyme mRNA in different tissues (haemolymph, gill, muscle and hepatopancreas) of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, were quantitatively detected with real-time PCR technology. The results indicated that the expressions of Toll receptor and lysozyme mRNA among tissues were significantly different. The relative expression of Toll receptor mRNA in haemolymph was significantly higher than that in gill as well as in muscle and hepatopancreas, and the relative expression of Toll receptor mRNA in gill was significantly higher than those in muscle and hepatopancreas. The relative expressions of lysozyme mRNA in haemolymph and in gill were significantly higher than those in muscle and hepatopancreas. While there was no significant difference between relative expressions of lysozyme mRNA in haemolymph and gill. There was no significant difference between the variation coefficients of Toll receptor and lysozyme mRNA expressions in haemolymph and in gill. It is therefore suggested that haemolymph and gill were the suitable material for assays of Toll receptor and lysozyme mRNA expression levels for *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; Toll receptor mRNA; lysozyme mRNA; haemolymph; gill