

文章编号: 1674-5566(2013)06-0807-08

凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 型基因 4 种不同剪切体的序列分析

赵永贞, 陈秀荔, 杨春玲, 彭敏, 何莘萍, 陈晓汉

(广西壮族自治区水产科学研究院 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 采用 RT-PCR 技术克隆了凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 基因全长编码序列, 对其核苷酸序列和编码的氨基酸序列进行了生物信息学分析, 并在对虾肌钙蛋白 I 基因的编码区查找了单核苷酸多态性位点。结果显示: 本研究克隆获得了凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 基因的 4 个可变剪切体, 其编码的蛋白质均具有 Troponin 超家族结构域特征, 同源性比对发现该蛋白的氨基酸序列在节肢动物中高度保守。系统进化分析发现凡纳滨对虾 Tn- I 3 和 Tn- I 4 与中国对虾和小龙虾的 Tn- I 遗传距离较近, 而 Tn- I 1 和 Tn- I 2 单独聚为一支, 且与其他物种 Tn- I 遗传距离较远; 通过测序比较不同个体凡纳滨对虾 Tn- I 基因序列发现在 Tn- I 的 4 种不同剪切体编码区共同序列区第 302 位和 472 位碱基分别存在 2 个 (A/G) SNP 位点, 其中位于第 302 位碱基的 (A/G) 错义突变使编码氨基酸由甘氨酸变为了谷氨酸 (G/E)。凡纳滨对虾 Tn- I 基因不同剪切体及编码区错义突变的发现为进一步探讨其基因功能奠定了基础。

研究亮点: 首次克隆获得了凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 的 4 种剪切体全长编码序列, 并发现凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 4 种剪切体编码区的共同区间第 302 位碱基 (A/G) 多态性可导致甘氨酸/谷氨酸错义突变。

关键词: 凡纳滨对虾; 肌钙蛋白 I 基因; 剪切体; 单核苷酸多态性

中图分类号: S 917

文献标志码: A

凡纳滨对虾又称南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 因其具有生长快、适盐性广、味道鲜美等特点被引入中国, 并在沿海地区广泛养殖。然而, 虾类病害的频繁发生及不可治愈性给养虾业带来了巨大的经济损失, 如何寻找有效的治愈方法及开发抗病新品种引起了研究者的关注。对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 是对虾易感病毒之一, 其又称矮小病毒, 该病毒是一种单链 DNA 病毒, 可感染多种对虾, 凡纳滨对虾感染 IHHNV 后生长缓慢, 体形短小^[1]。对虾矮小病毒是如何导致对虾的生长缓慢目前还不清楚。

肌钙蛋白 (Troponin, Tn) 是与骨骼肌和心肌收缩有关的调节蛋白, 主要调节肌肉的收缩和舒张。肌钙蛋白是横纹肌的结构蛋白, 存在于肌原纤维的细丝中, 由 3 个结构不同亚基——肌钙蛋

白 I (Tn-I)、肌钙蛋白 T (Tn-T) 和肌钙蛋白 C (Tn-C) 组成^[2-3]。其中 Tn-I 分子量为 21 ku, 它与肌动蛋白及原肌球蛋白互相作用抑制肌原纤维 ATPase 的活性, 抑制肌球蛋白与肌动蛋白的偶联, 进而松弛骨骼肌或心肌^[4-5]。已有的研究表明, 肌钙蛋白 I 在动物的肌肉生长发育中起着重要作用^[6]。那么造成对虾矮小病的 IHHNV 病毒是否影响了对虾的肌钙蛋白的表达, 进而影响对虾的肌肉发育。因此, 本研究通过构建凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺组织的 cDNA 文库, 然后从文库中随机筛选重组克隆子进行 5' 测序分析得到了 Tn-I 的部分 cDNA 序列, 进一步通过 PCR 反应及测序得到了凡纳滨对虾的 Tn-I 基因的全长表达序列, 利用分子生物学方法分析其功能, 比较感染 IHHNV 群体和正常群体基因组的表达差异位点, 以期为进一步确定其对对虾生长、肉质

收稿日期: 2013-03-28

修回日期: 2013-09-06

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2012GXNSFDA053015); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47)

作者简介: 赵永贞 (1978—), 男, 副研究员, 研究方向为水产遗传育种。E-mail: fisher1152002@126.com

通信作者: 陈晓汉, E-mail: chnxhn@163.com

及感染病毒机理的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及 DNA 抽提

试验所需的凡纳滨对虾来自广西水产科学研究院国家级广西南美白对虾育种中心,选取平均体长为 10~15 cm 的健康凡纳滨对虾,养殖试验在水族馆中进行。对虾的 IHNV 病毒感染方法参考陈秀荔等^[7]报道的方法。酚-氯仿方法提取的对虾肌肉组织 DNA 保存在 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 cDNA 文库的构建及 Tn- I 序列获得

取凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺 2 种组织各 50 mg,放入液氮预冷的研钵中研磨,然后按照 TaKaRa 公司的试剂盒说明书提取总 RNA,纯化 mRNA,反转录合成 cDNA,并将其修饰后连接到载体上,转化到 DH5 α 细胞中构建凡纳滨对虾的 cDNA 文库,从 cDNA 文库中随机挑取单克隆,由上海联合基因科技有限公司进行 5'端测序。

利用 GenBank 在线比对工具对文库测序所得序列进行同源搜索和比对。根据 EST 比对结果获得凡纳滨对虾 Tn- I 的 cDNA 部分序列。利用 PrimerPremier 5.0 软件设计该序列的正向引物 TPNIF1: CTCAGGTTGTTGCTCCGTAAG,以文库 cDNA 为模板,TPNIF1 正向引物与反向引物 T3 载体通用引物(5' - ATTAACCCTCACTAAA GGGAA - 3')扩增得到 Tn- I 的全长 cDNA 序列。

1.3 Tn- I 序列分析

DNASar seq 软件分析凡纳滨对虾的 Tn- I 的氨基酸和核苷酸序列,利用 GenBank 在线比对软件 BlastN 和 BlastX 进行同源性比对,利用蛋白质结构域分析软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析其结构域,采用 DNAMan 软件做聚类分析。

1.4 SNP 分析

利用 PrimerPremier 5.0 软件设计引物 Tpni-1G: AGCTCAGGTTGTTGCTCCGT 和 Tpni-2 G: CTCCTGTAGGTGGGTTATCC,用凡纳滨对虾肌肉组织 DNA 作为模板扩增肌钙蛋白 I 基因组序列,利用北京天根生化科技生物有限公司的 MasterMix 扩增,扩增体系为 50 μ L,扩增程序为

94 °C 变性 3 min,94 °C 20 s,56 °C 30 s,72 °C 40 s,进行 30 个循环,72 °C 延伸 5min,扩增产物纯化回收后送深圳华大研究院测序,通过 NCBI Blast 在线程序对扩增的基因组序列和肌钙蛋白 I 全长 cDNA 序列进行比对,获得肌钙蛋白 I 基因组内含子序列,再分别用感染 IHNV 对虾和正常对虾 30 个个体 DNA 作为模板进行扩增,比较不同个体的测序结果,寻找肌钙蛋白 I 基因组序列上存在的 SNP 位点。

2 结果与分析

2.1 肌钙蛋白 I 基因核苷酸和氨基酸序列分析

通过测序及序列拼接,获得了凡纳滨对虾 Tn- I cDNA 序列及开放阅读框翻译后的氨基酸序列,但是发现凡纳滨对虾肌肉 cDNA 文库中含有肌钙蛋白 I 基因的 4 种剪切体,本文称之为 Tn- I 1、2、3、4,其中 Tn- I 1 CDS 长 651 bp; Tn- I 2 CDS 长 606 bp,该基因剪切了 Tn- I 1 下游 568~613 位间 45 个碱基; Tn- I 3 CDS 长 633 bp,该基因剪切了 Tn- I 1 上游 13~31 位间 18 个碱基; Tn- I 4 CDS 长 588 bp,该基因则分别剪切了 Tn- I 1 上游 13~31 位间 18 个碱基和下游 568~613 位间 45 个碱基。肌钙蛋白 I 基因 4 种剪切体的核苷酸序列比对见图 1。序列提交至 GenBank 收录(GenBank 登录号: AFW99837.1; AFW99838.1; AFW99839.1; AFW99840.1)。

利用 DNASar 中的 Edisecque 程序将 Tn- I 的 4 种剪切体编码序列翻译为相应的氨基酸序列,比对发现其编码的氨基酸残基数、分子量、等电点等理化性质变化不明显。通过 NCBI BLAST 在线软件对 Tn- I 4 种蛋白的一致序列进行结构域分析发现,在 70~155 个氨基酸残基间具有典型的 Troponin 超家族结构域特征(图 2)。

2.2 Tn- I 核苷酸和氨基酸序列同源性分析及系统进化

将肌钙蛋白 I 基因 CDS 序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对,发现该序列与中国对虾肌钙蛋白 I 基因近 82% 的部分同源性达 100%,与果蝇、大西洋无眼裂缝虾、红色陆地蟹肌钙蛋白 I 基因 50% 以上的部分同源性超过 80%。

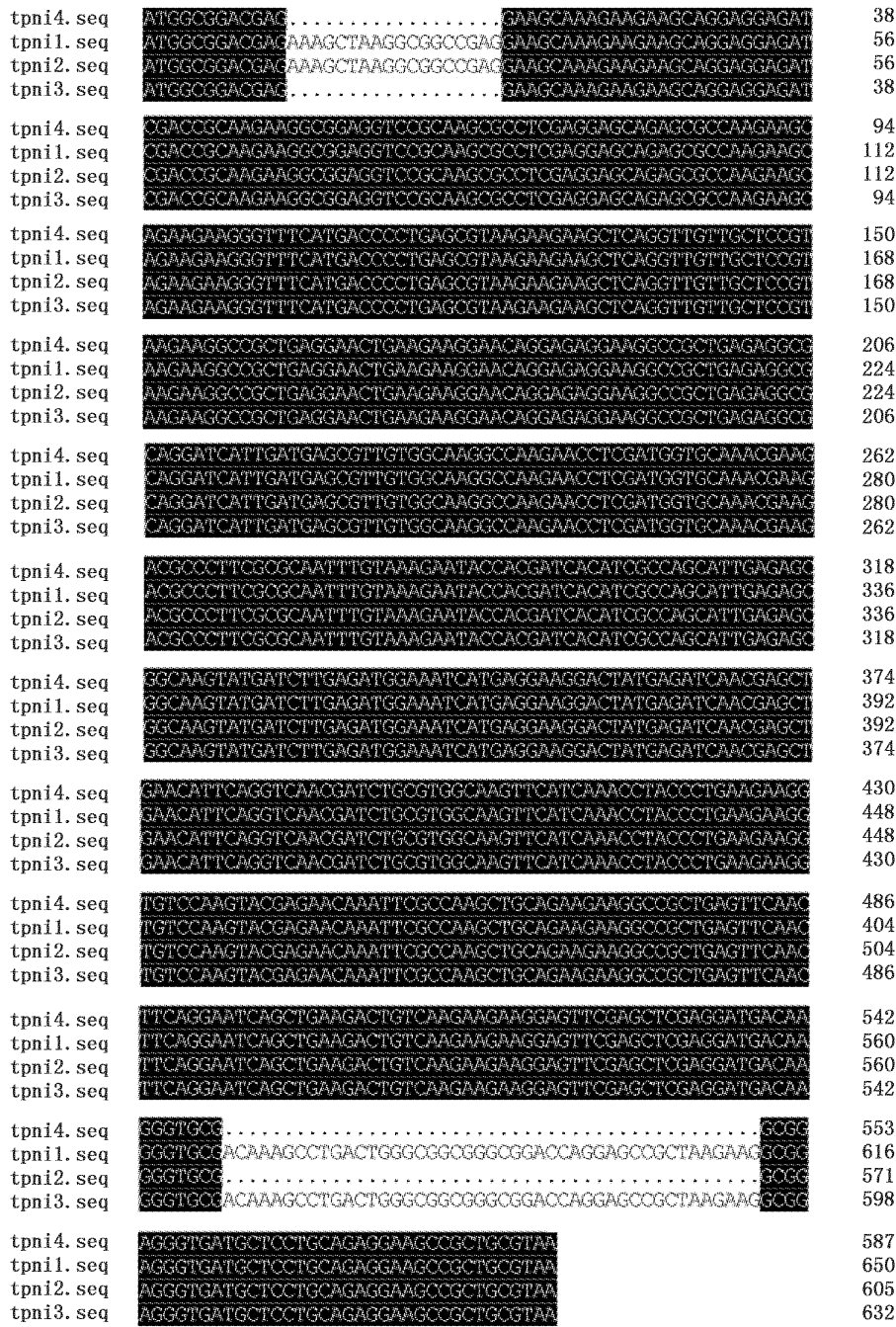


图 1 凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 基因 4 种剪切体的核酸序列比对

Fig.1 The nucleic acid sequence alignment of 4 spliced variant troponin I gene in *Litopenaeus vannamei*

通过 NCBI Blast 软件对该基因编码的氨基酸序列进行在线搜索,发现该蛋白的氨基酸序列在节肢动物中高度保守,在 GenBank 数据库中共有 100 条同源序列,均为节肢动物 Tn- I 氨基酸序列,同源性达 70% 以上,其中与中国对虾 Tn- I 氨基酸序列的同源性最高为 92%,其次为小龙虾 Tn- I 氨基酸序列,同源性为 87%。

利用 DNAMan 软件对凡纳滨对虾 *Litopenaeus*

vannamei Tn- I 1 (AFW99837)、Tn- I 2 (AFW99838)、Tn- I 3 (AFW99839) 和 Tn- I 4 (AFW99840) 与已报道的其他物种如中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (ACV40756. 1)、草地螟 *Loxostege sticticalis* (ABY56688. 1)、野桑蚕 *Bombyx mandarina* (ACN86370. 1)、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* (BAM17672. 1)、家蚕 *Bombyx mori* (NP001037295. 1)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*

(XP001661102.1)、智利鱼虱 *Caligus rogercresseyi* (ACO10529.1)、龙虾 *Crayfish* (P05547.1)、鲑疮痂鱼虱 *Lepeophtheirus salmonis* (ADD38332.1)、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (EDS37511.1)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (ACN79503.1)、篦子硬蜱 *Ixodes ricinus* (JAA67190.1)、黑脚硬蜱 *Ixodes scapularis* (XP002415785.1) 等的 Tn- I 在氨基酸水平上进行分析,并构建系统进化树(图3),结果

显示,其符合物种进化关系,其中凡纳滨对虾 Tn- I 3 和 Tn- I 4 与中国对虾和龙虾进化关系最近,与遗传进化关系较近的蚕、蝶和蝇之间遗传关系较远,与蜱和虱目的遗传距离最远,而由此进化关系图中还发现凡纳滨对虾 Tn- I 1 和 Tn- I 2 之间的遗传距离最近而与其他物种的遗传距离较远。

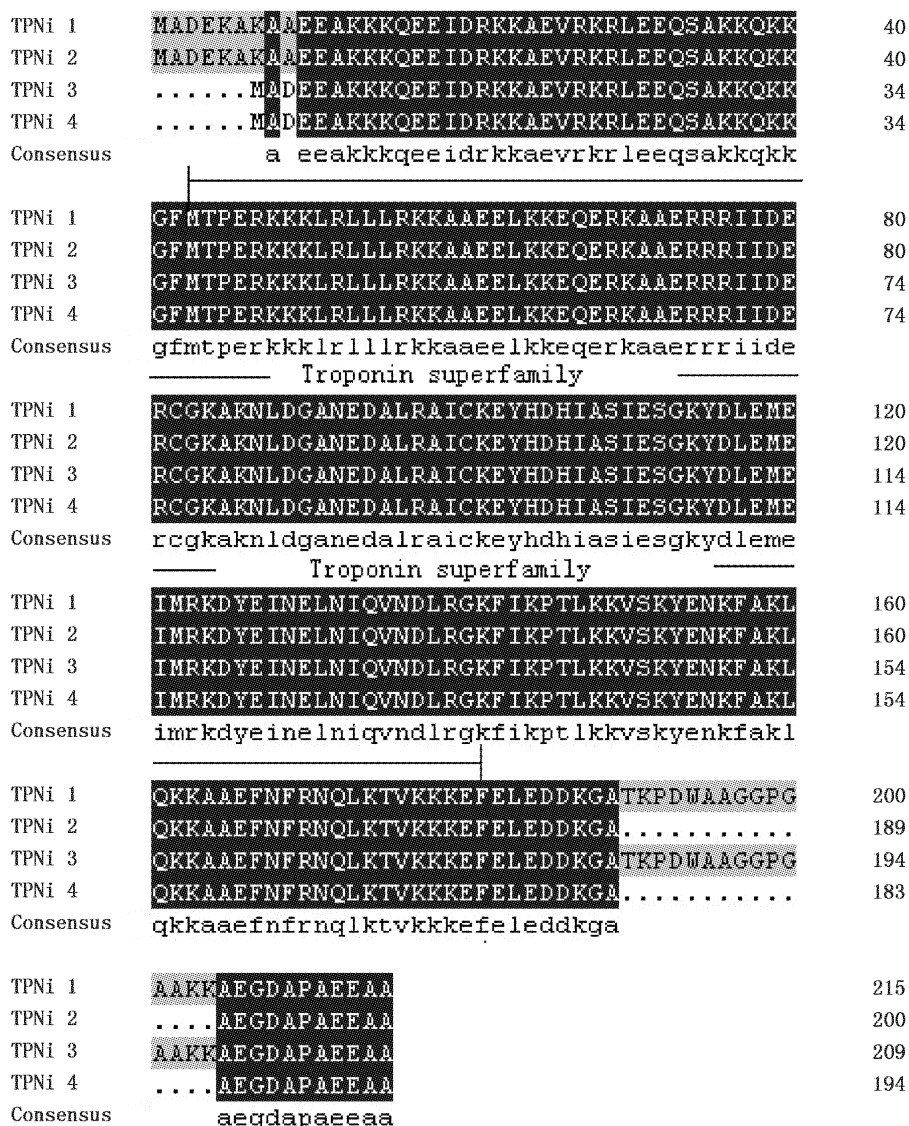


图2 4种 Tn- I 的结构域

Fig. 2 The domain of Tn- I 4 amino acid in *Litopenaeus vannamei*

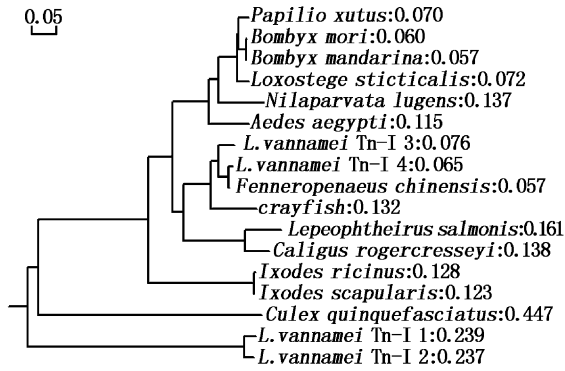


图3 凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of troponin protein I in *Litopenaeus vannamei*

1 AGCTCAGGTT GTTGCTCCGT TAGAAGGCCG CTGAGGAACT GAAGAAGGAA
 51 CAGGAGAGGA AGGCCGCTGA GAGGCGCAGG ATCATTGATG AGCGTTGTGG
 101 CAAGGCCAAG AACCTCGATG GTGCAAACGA AGACGCCCTT CGCGCAATTT
 151 GTAAAGAATA CCACGATCAC ATCGCCAGCA TTG(A/G)GAGCGG CAAGTATGAT
 201 CTTGAGATGG AAATCATGAG GAAGGACTAT GAGATCAACG AGCTGAACAT
 251 TCAGGTCAAC GATCTGCGTG GCAAAGTTCAT CAAACCTACC CTGAAGAAGG
 301 TGTCCAAGTA CGAGAACAAA TTCGCCAAGC TGCAGAAGAA GGCCGCTGAG
 351 TTC(A/G)ACTTCA GGAATCAGCT GAAGACTGTC AAGAAGAAGG AGTTCGAGCT
 401 CGAGGATGAC AAGGGTGCGA CAAAGCCTGA CTGGGCGGCG GCGGACCAG
 451 GAGCCGCTAA GAAGGAAGGG GAAGAGGGCG CTCCGGCGGA GGGTATGCT
 501 CCTGCAGAGG AAGCCGCTGC GTAAGAAGGA TAACCCACCT ACAGGAG

图4 肌钙蛋白 I 部分基因组序列

Fig.4 The part sequence of troponin I gene in *Litopenaeus vannamei*

下划线标注的序列为外显子序列,斜体加粗标注的为内含子序列;方框阴影标注为 SNP 位点。

3 讨论

3.1 肌钙蛋白 I 的结构与功能分析

肌肉是虾体的主要组成部分,占对虾体重的 50% 以上,肌肉生长发育的程度是决定对虾体形大小的主要因素。研究表明肌肉的生长与肌蛋白的生成有关,而肌蛋白生成又与肌肉收缩偶联紧密相关^[8]。横纹肌兴奋收缩偶联的主要调节蛋白是肌钙蛋白,肌钙蛋白包括 T 型、C 型和 I 型,其中 Tn-I 是肌肉舒缩的分子开关^[9],肌钙蛋白 C 型是 EF 手图像超家族成员之一,参与细胞内的 Ca^{2+} 信号传导作用^[10],而肌钙蛋白的 3 种类型结合形成肌钙蛋白复合物(Tn)与原肌球蛋白(Tm)一起构成 Tm-Tn 复合体,调节肌肉收缩

2.3 肌钙蛋白 I 基因组序列的扩增及 SNP 位点的筛查

通过 NCBI Blast 在线程序对肌钙蛋白 I 基因的基因组序列和 cDNA 序列比对,结果发现了 1 个 65 bp 的内含子(图 4)。在通过对 30 尾感染 IHNV 和正常凡纳滨对虾的肌钙蛋白基因组序列比对时发现在 Tn-I 4 种不同剪切体共同序列的编码区内存在 2 个(A/G) SNP 位点,其中位于第 184 位碱基的(A/G)突变引起了氨基酸突变,氨基酸由甘氨酸变为了谷氨酸(G/E)(图 4)。

与舒张的力量和速度^[1-2]。本研究拟通过研究凡纳滨对虾的肌钙蛋白 I 基因结构,揭示肌钙蛋白 I 基因在对虾肌肉生长过程中的作用。结果本研究通过 RT-PCR 方法成功拼接获得了凡纳滨对虾 Tn-I 的完全表达序列,在线比对发现该基因 CDS 序列存在 4 个不同序列,Tn-I 1 CDS 长 651 bp;Tn-I 2 CDS 长 606 bp,其剪切了 Tn-I 1 下游 568 ~ 613 位间 45 个碱基;Tn-I 3 CDS 长 633 bp,其剪切了 Tn-I 1 上游 13 ~ 31 位间 18 个碱基;Tn-I 4 CDS 长 588 bp,它则分别剪切了 Tn-I 1 上游 13 ~ 31 位间 18 个碱基和下游 568 ~ 613 位间 45 个碱基。因此认为凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 基因存在 4 个不同的剪切体。RUKSANA 等^[11]研究发现秀丽线虫肌钙蛋白 I 型基因也存

在 4 种剪切体,而且通过定位研究发现 4 种剪切体存在于秀丽线虫机体的不同部位,Tn- I 1、2 和 3 剪切体存在于体壁肌肉中,而 Tn- I 4 剪切体存在于咽肌中,它们 4 个剪切体各自的功能也不完全一样。因此本研究结果与秀丽线虫 Tn- I 存在 4 种剪切体的报道一致。

将肌钙蛋白 I 基因 CDS 序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对,发现该序列与中国对虾肌钙蛋白 I 基因近 82% 的部分同源性达 100%,与果蝇、大西洋无眼裂缝虾、红色陆地蟹肌钙蛋白 I 基因 50% 以上的部分同源性超过 80%。通过 NCBI Blast 软件对该基因编码的氨基酸序列进行在线搜索,发现该蛋白的氨基酸序列在节肢动物中高度保守,在 GenBank 数据库中共有 100 条同源序列,均为节肢动物 Tn- I 氨基酸序列,同源性达 70% 以上,其中凡纳滨对虾与中国对虾 Tn- I 氨基酸序列的同源性最高为 92%,其次为小龙虾 Tn- I 氨基酸序列,同源性为 87%。因此,确定本研究克隆获得的基因序列为凡纳滨对虾的肌钙蛋白 I 的基因序列。

系统进化分析发现凡纳滨对虾 Tn- I 3 和 Tn- I 4 与中国对虾和小龙虾进化关系最近,与遗传进化关系较近的蚕、蝶和螟之间遗传关系较远,与蝼蛄和虱目的遗传距离最远,而由此进化关系图中还发现凡纳滨对虾 Tn- I 1 和 Tn- I 2 之间的遗传距离最近而与其他物种的遗传距离较远。这一结果暗示了凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 基因的 4 种剪切体的功能可能存在不同。该结论有待于进一步的实验验证。

通过对凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 结构域进行分析发现,在 70 ~ 155 个氨基酸残基间具有典型的 Troponin 超家族结构域特征,因此凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 可能也通过与肌钙蛋白 C 和肌钙蛋白 T 及原肌球蛋白(Tm)一起构成 Tm-Tn 复合体进行肌动蛋白复合体的更新,促进肌肉的生长^[9,12]。因此,当对虾机体内 Ca^{2+} 浓度发生变化时,肌钙蛋白 C 基因发生了改变,进而影响肌钙蛋白 I 基因的变化,最终影响对虾的生长发育。许西奎和田兴国等研究发现野桑蚕和猪的肌钙蛋白 Tn- I 与肌蛋白的生成和肌肉的发育有关^[13-14]。王健等研究发现圆斑星鲽肌钙蛋白 I 基因对鱼类的生长有促进作用^[15]。因此,通过对凡纳滨对虾肌钙蛋白 I 结构的分析,为进一步研

究 Tn- I 的 4 种剪切体的功能奠定了基础。

3.2 肌钙蛋白 I 基因碱基序列变化分析

RUKSANA 等^[11]通过 RNAi 干扰技术研究了 4 种剪切体在秀丽线虫中的作用,他研究发现 Tn- I 1 和 2 基因造成线虫体壁肌肉不正常的收缩,Tn- I 3 导致不正常的肌肉形态、受精失败和便秘等,Tn- I 4 导致大量的死胚胎,由此发现 Tn- I 基因虽然来自相同的遗传基因,但是它们各自的功能不同,表达方式也不同,在 4 个剪切体中以 Tn- I 3 的作用最为重要。ROBINSON 等^[16]研究发现人的快骨骼肌 Tn- I ,Tn-T 和 β -原肌球蛋白发生突变将引起远端关节弯曲综合征,分子遗传研究显示,该病因可能是由基因突变引起的,Tn- I 2 出现 2 个突变,一个是 Arg174Gln 的错义突变,一个是 C→T 的无义突变,Tn-T 基因的 C 端 26 个氨基酸的丢失(Arg156ter)和 Tn T-3 的一个错义突变 Arg63His,这些基因都分别编码快骨骼肌的 Tn- I 和 Tn-T 亚型的基因,因此快骨骼肌的 Ca^{2+} 浓度的改变引起肌钙蛋白基因的突变,从而引起机体的紊乱。由此可见,肌钙蛋白 I 基因的不同剪切体之间不但各自的功能不同,而且该基因如果发生突变机体会产生一定的紊乱。本研究通过对感染 IHNV 和正常的凡纳滨对虾基因组进行肌钙蛋白 I 基因组部分序列测序,结果比分析发现了 2 个突变位点,即第 184 位碱基的(A/G)突变引起了氨基酸突变,氨基酸由甘氨酸变为了谷氨酸(G/E),这一突变造成的影响还有待于进一步实验研究,而且它的成因是否是由于 IHNV 病毒感染后对虾的 Ca^{2+} 浓度发生改变,导致肌钙蛋白 I 基因的功能发生了改变还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] LIGHTNER D V. Virus diseases of farmed shrimp in the western Hemisphere (the Americas): a review [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106 (1):110 - 130.
- [2] FARAH C S, REINACH F C. The troponin complex and regulation of muscle contraction [J]. *FASEB Journal*, 1995, 9(9): 755 - 767.
- [3] CLARK K A, MCELHINNY A S, BECKERLE M C, et al. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2002, 18: 637 - 706.

- [4] PERRY S V. Troponin I: inhibitor or facilitator [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999, 190(1/2): 9-32.
- [5] MACLEAN D W, MEEDEL T H, HASTINGS K E M. Tissue-specific alternative splicing of ascidian troponin I Isoforms [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (51): 32115-32120.
- [6] CLETO C L, VANDENBERGHE A E, MACLEAN D W, et al. Ascidian larva reveals ancient origin of vertebrate-skeletal muscle troponin I characteristics in chordate locomotory muscle [J]. *Molecular of Biology and Evolution*, 2003, 20(12): 2113-2122.
- [7] 陈秀荔, 赵永贞, 彭敏, 等. 凡纳滨对虾围食膜蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1503-1511.
- [8] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. *细胞生物学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 317-327.
- [9] GORDON A M, HOMSHER E, REGNIER M. Regulation of contraction in striated muscle [J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(2): 853-924.
- [10] NARA M, MORII H, TANOKURA M. Infraed study of synthetic peptide analogues of the calcium-binding site III of troponin C: The role of helix of an EF-hand motif [J]. *Biopolymers*, 2013, 99(5): 342-347.
- [11] RUKSANA R, KURODA K, TERAMI H, et al. Tissue expression of four troponin I genes and their molecular interactions with two troponin C isoforms in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genes Cells*, 2005, 10(3): 261-276.
- [12] NONGTHOMBA U, CLARK S, CUMMINS M, et al. Troponin I is required for myofibrillogenesis and sarcomere formation in *Drosophila* flight muscle [J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(9): 1795-1805.
- [13] 许西奎. 野桑蚕肌原纤维钙结合蛋白及相关蛋白的基因分析 [D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [14] 田兴国, 陈瑶生, 凌飞, 等. 猪骨骼肌快肌肌钙蛋白 C2 基因的 cDNA 克隆与表达分析 [J]. *遗传*, 2006, 28(8): 949-955.
- [15] 王健, 苏浩, 高祥刚, 等. 圆斑星鲈肌钙蛋白 I 基因的克隆和序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2010(5): 179-182.
- [16] ROBINSON P, LIPSCOMB S, PRESTON L C, et al. Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and beta-tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function [J]. *FASEB Journal*, 2007, 21(3): 896-905.

Sequence analysis of four different spliced variants of troponin I gene in *Litopenaeus vannamei*

ZHAO Yong-zhen, CHEN Xiu-li, YANG Chun-ling, PENG Min, HE Ping-ping, CHEN Xiao-han

(Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: Troponin I gene of *Litopenaeus vannamei* was clone by RT-PCR technology. The nucleotide and deduced amino acid sequence of troponin I were analyzed. The SNP of troponin I gene was searched by sequencing in different individuals. The results showed four splice variants of troponin I were isolated from *Litopenaeus vannamei* tissues, and the deduced amino acid sequences encoded by different variants of troponin I have same troponin super family domain, and these sequences highly conserve among arthropod animals. The phylogenetic analysis based on amino acid sequence shows that there is higher similarity in Tn- I 3 and Tn- I 4 of *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis* and Crayfish, but Tn- I 1 of *Litopenaeus vannamei* was together with Tn- I 2 of *Litopenaeus vannamei* individually. Two (A/G) SNPs at nucleotide 302 and 472 in the same coding sequences of four splice variants of *Litopenaeus vannamei* Tn- I were found by sequencing, and a transition A-G at nucleotide 302 caused a Glycine-glutamate missense mutation. For the first time four splice variants of troponin I in *Litopenaeus vannamei* were cloned and a missense mutation was founded, these provide a good foundation for further research on its function.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; troponin I; spliced variant; sequence analysis