

文章编号: 1000-0615(2017)02-0171-11

DOI: 10.11964/jfc.20160410376

凡纳滨对虾*ARMC8*基因的克隆及表达

黄金凤¹, 杨奇慧^{1,2}, 董晓慧^{1,2}, 迟淑艳^{1,2},
刘泓宇^{1,2}, 谭北平^{1,2}, 章双^{1,2*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 珠海 519082)

摘要: 为了研究含Armadillo重复蛋白8在凡纳滨对虾抗病感染过程中所起的免疫作用, 本实验采用RACE-PCR技术首次克隆得到凡纳滨对虾*ARMC8*基因(*LvARMC8*, GenBank注册号: KX058562)的cDNA序列全长, 并利用在线软件进行生物信息学分析; 采用实时荧光定量PCR (Rt-PCR)技术对*LvARMC8*基因在凡纳滨对虾不同组织及感染白斑综合征病毒和副溶血弧菌过程中的表达变化特征进行分析。结果显示, *LvARMC8*基因全长为2917 bp, 其中开放阅读框长2046 bp, 编码681个氨基酸, 5'非编码区长49 bp, 3'非编码区长822 bp。预测分析显示*LvARMC8*编码的蛋白质含有6个ARM结构域。同源性分析发现, *LvARMC8*基因与内华达古白蚁*ARMC8*基因的相似度最高, 为71%。系统进化分析结果显示, *LvARMC8*和多种无脊椎动物*ARMC8*聚为一支, 其中与昆虫类动物赤拟谷盗、致倦库蚊和柑橘凤蝶的亲缘关系最近。Rt-PCR分析发现, *LvARMC8*基因在凡纳滨对虾多个组织中均能检测出, 在表皮中表达量最高, 眼柄中表达量最低。WSSV感染后12 h, *LvARMC8*基因在凡纳滨对虾血液中的表达量显著降低, 但48 h后显著升高, 72 h达到最高水平。除副溶血弧菌感染后24 h外的时间点, *LvARMC8*基因在凡纳滨对虾血液中的表达量均显著升高。研究表明, *LvARMC8*基因可能参与凡纳滨对虾抗病免疫应答途径。

关键词: 凡纳滨对虾; *ARMC8*基因; 基因克隆; 组织表达; WSSV感染; 副溶血弧菌

中图分类号: Q 785; S 945.4

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾, 隶属节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、游泳亚目 (Natantia)、对虾科 (Penaeidae), 是当今世界产量最高的对虾养殖品种, 也是我国对虾养殖业的主要品种。然而, 近年来以白斑综合征 (white spot syndrome, WSS) 及急性肝胰腺坏死综合征 (acute hepatopancreas necrosis syndrome, AHPND) 为主的多种病害给我国对虾养殖业带来了巨大的经济损失, 养殖效益大幅度下降^[1]。对虾发病是其自身和环境以及病原三者相互作用导致,

养殖生产中亦需综合考虑这三个重要因素来防治白斑综合征病毒 (WSSV)。其中增强对虾的自身免疫力、提高其抗病能力是防治病害的根本措施之一。因此, 为了更好地防治病害, 深入开展对虾免疫机制的研究非常重要。近年来, 越来越多的免疫信号通路陆续被发现并证实抗病中发挥功能, 主要包括Toll信号通路、免疫缺陷 (immune deficiency, IMD) 信号通路及Janus激酶/信号转导与转录激活子 (janus kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT) 信号通路等^[2], 但总体而言, 对于对虾先天性免疫

收稿日期: 2016-04-23 修回日期: 2016-09-23

资助项目: 广东省自然科学基金—博士启动项目(2014A030310184); 广东省自然科学基金—自由申请项目(2016A030313757); 广东普通高校毕业生创新创业人才项目(2014KQNCX079); 广东海洋大学优秀青年骨干教师特别资助计划(HDYQ2015004)

通信作者: 章双, E-mail: 18820436396@126.com

机制相关的知识还十分的欠缺，有待深入研究。

β -链蛋白(β -catenin)是Wnt信号通路的关键作用因子，也是含Armadillo重复蛋白(armadillo repeat-containing protein, ARMC)家族重要成员之一^[3-4]。Armadillo (ARM)重复是一段大约长40个氨基酸的串联重复序列，最初在果蝇(*Drosophila melanogaster*)体内作为体节极性基因的产物而被发现^[5]。含ARM重复蛋白家族是一类参与细胞增殖、细胞分化、细胞粘连、细胞间信号转导、基因表达及肿瘤发生等多种细胞活动的蛋白家族^[6-7]，在真核生物中高度保守，主要成员有 β -链蛋白(β -catenin)^[3]、输入蛋白 α (importin- α)^[8]、斑珠蛋白(plakoglobin)^[9]，结肠腺瘤样息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)^[10-11]及亲斑蛋白(plakophilin)^[12]等。ARMC8是一个最近被发现的ARMC家族成员，包含14个ARM重复序列。ARMC8作为I型无脑回综合症同源结构域羧基端(C-terminal to lissencephaly type-1-like homology motif, CTLH)复合体的关键组成部分，参与 α -链蛋白(α -catenin)^[13]及果糖-1, 6-二磷酸激酶(fructose-1, 6-bisphosphatase)^[14]等多种蛋白的降解，在肝癌^[15]、肺癌^[16]、乳腺癌^[17]、卵巢癌^[18]等多种肿瘤发生中亦发挥重要作用。最新研究发现，ARMC8通过激活经典Wnt信号通路进而提高非小细胞肺癌细胞的增殖与入侵^[16]。目前有关ARMC8的研究主要集中于脊椎动物中，虽然相关的同源基因序列已经在赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)和柑橘凤蝶(*Papilio xuthus*)等无脊椎物种中报道，但有关该基因的功能研究还十分缺乏。

2013年，Zhu等^[19]发现Wnt信号通路参与调节果蝇S2细胞对WSSV的吞噬作用；Chen等^[20]对WSSV感染前后凡纳滨对虾肝胰腺转录组进行分析后发现，Wnt信号通路相关基因在WSSV感染前后的表达量存在显著差异。这些研究结果提示Wnt信号通路可能参与了对虾的先天性免疫应答。此外，本团队前期的研究结果发现，凡纳滨对虾 β -catenin基因被沉默后，其抗WSSV病毒和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的能力都显著降低，说明 β -catenin基因在凡纳滨对虾抗病免疫过程中可能发挥重要作用^[21]。考虑到ARMC8与 β -catenin同属ARMC家族成员，且其可通过调控Wnt信号通路发挥作用，本研究拟在克隆凡纳滨对虾ARMC8基因的基础上，对其进行序列和生物信息学分析，并进一步分析其组织表达特征和应

答WSSV与副溶血弧菌感染的表达变化模式，研究结果为深入探讨对虾抗病免疫机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾(8~10 g)购于湛江腾飞实业有限公司，实验前在水族箱循环系统中暂养7 d，使其适应实验室内养殖环境。携带WSSV的凡纳滨对虾及副溶血弧菌由本实验室保存。RNeasy Mini Kit购自德国Qiagen公司；SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit购自美国Clontech公司；Primer Script™1 st Strand cDNA Synthesis Kit、LaTaq酶、pMD19-T载体、DH5 α 感受态细胞、PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)购自日本TaKaRa公司；胶回收试剂盒及DNA Marker购于广州东盛生物科技有限公司；实验所用引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 凡纳滨对虾ARMC8基因cDNA全长的克隆及测序

根据前期凡纳滨对虾转录组测序结果，获得ARMC8基因的EST序列，利用Primer Premier 6.0软件设计5'RACE和3'RACE特异性引物(表1)，

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 PCR primers used in this study	
引物 primers	序列 sequences (5' -3')
5' RACE1	TGAAAGAGAATGAAGACACCTAACAG
5' RACE2	AGCAGTGGGTGTGTCTTTGAGG
3' RACE1	GCTGCCCTGAAGGTCTATGC
3' RACE2	CAGCCTGCCCACCAATCC
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
M13-F	CGCCAGGGTTTCCCACTCAGCAGC
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
qPCR-F	CCTGCCCACCAATCCAGTTAG
qPCR-R	TCCTGAAAAGTTGCTCCTGAGTGTG
EF1 α -F	TGCACCACGAAGCCCTTAC
EF1 α -R	CAGGGTGGTTGAGGACGATC

所有引物均为英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

5'RACE以SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit反转录合成的cDNA第1链为模板, 使用引物5'RACE1和通用引物UPM配对, 按照TaKaRa公司产品说明书构建50 μL体系, 采用降落式PCR扩增程序进行5'端第1次扩增。以第1次扩增产物稀释50倍为模板, 使用引物5'RACE2和通用引物NUP配对, 进行5'端第2次扩增。反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 62~57 °C(递减0.5 °C/每循环)30 s, 72 °C 2 min, 10个循环; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 2 min, 28个循环; 72 °C 10 min。

3'RACE分别使用3'RACE1和通用引物UPM、引物3'RACE2和通用引物NUP配对进行第1次和第2次扩增, 扩增体系和程序同5'RACE。

RACE扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 然后与PMD19-T载体进行连接, 转化入DH5α感受态细胞, 阳性克隆经菌落PCR鉴定后(所用引物为M13-F和M13-R), 送往英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

1.3 凡纳滨对虾 *ARMC8* 基因序列的生物信息学分析

利用软件SeqMan对测序所得结果进行载体序列的去除和拼接, 将所获得序列进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), 利用软件EditSeq进行开放阅读框(ORF)预测和氨基酸序列的翻译, 使用http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1网站在线分析蛋白质功能结构域信息。在NCBI的Protein Blast数据库中搜寻具有较高同源性的*ARMC8*蛋白质序列, 利用ClustalX和MEGA 5.0软件进行多序列比对和聚类分析, 系统发育树采用Neighbour-Joining方法构建。

1.4 凡纳滨对虾 *ARMC8* 基因的组织表达分析

凡纳滨对虾暂养1周后, 随机采集15尾, 5尾为一组, 分别采集血液、肝胰腺、鳃、眼柄、肌肉、表皮、胃、肠、后盲囊、神经和心脏共11个组织, 储存于RNA later中, 室温下放置1 h或4 °C过夜后转移至-80 °C保存。其中血细胞先与抗凝剂混合, 待充分相溶后于4 °C 5000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 加入适量的RNA later重悬后与其他组织的样品一同保存。利用RNeasy Mini Kit提取总RNA, PrimeScript® RT reagent Kit

with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒用于合成荧光定量PCR所用的cDNA模板。参照SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)的说明, 采用qPCR-F/qPCR-R引物对不同组织中*ARMC8*基因的表达情况进行定量分析, 延伸因子1α (elongation factor 1α, EF1α, GenBank序列号no. GU136229)基因作为内参基因。反应程序: 95 °C 30 s; 94 °C 5 s, 57 °C 30 s, 78 °C 5 s, 40个循环。Rt-PCR检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。

1.5 凡纳滨对虾 *ARMC8* 基因应答WSSV及副溶血弧菌感染的表达分析

WSSV悬液的制备参照Melena等^[22]方法, 副溶血弧菌的培养及浓度鉴定参照Balcázar等^[23]方法。实验将凡纳滨对虾分为3组, 每组80尾, 分别注射WSSV悬液(10^6 拷贝/g)、副溶血弧菌菌液(5.5×10^6 CFU/g)及PBS (对照), 注射后0、4、8、12、24、48和 72 h取凡纳滨对虾的血细胞作为Rt-PCR的样品以检测*ARMC8*基因的相对表达量, 每3条虾的血细胞为一个混合样品, 每个组同一个时间点取3个平行。RT-PCR方法同“凡纳滨对虾*ARMC8*基因的组织表达分析”, 检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析, 以*t*检验分析*ARMC8*基因的显著性差异。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾 *ARMC8* 基因cDNA全长及序列分析

5'RACE和3'RACE扩增产物分别测序后拼接, 获得凡纳滨对虾*ARMC8*基因(*LvARMC8*, GenBank注册号: KX058562)全长cDNA 2917 bp, 包含长49 bp的5'端非编码区(5'UTR), 长2046 bp的ORF区及822 bp的3'端非编码区(5'UTR), 编码的蛋白序列含681 aa, 预测的分子量为75.04 ku, 等电点为6.62 (图1)。利用在线软件SMART分析显示*LvARMC8*氨基酸序列含有6个ARM保守结构域(残基42~84、380~421、422~464、466~506、551~594和596~636) (图2)。

2.2 *LvARMC8* 的多重序列比对分析

利用NCBI网站上的BLAST搜索工具和ClustalW2 软件分析不同物种间*ARMC8*蛋白之间的相似度, 结果显示, *LvARMC8*与其他物种*ARMC8*之间的相似度为57%~71%, 其中, 与内华达古

```

1                                     M E V L P T Y M D V E H S R A Y I D Q
1  atgggacacaagaaccggcctagggagaatcacatcaaaatctcttataATGGAGGTTTTACCCACATATATGGATGTGGAACATAGCCGAGCCTATATCGACCA
20  L Y S N D P Q K C F Q A V S E L K F A V I G S V R E K G S I I E Q G V
106 ACTATATTCTAATGATCCTCAAAATGCTTCCAAGCAGTTAGTGAATTAAGTTTGCAAGTTATGGTAGTGAAGGAAAAGGGTCTATAATTGAGCAGGAGT
55  V V R L L Q I L R A Q E F D L I L K T E V A T V L N S L A K G L P E H
211 TGTAAGTGCATTACTTCAGATTCTCGTGCACAAGAGTTTGATCTAATCTTAAACAGAAAGTAGCAACTGTACTGAATTCACCTGCAAAAGGCTACACAGAGCA
90  A A A L V Q A G L L P V L W E Q L E A C G G G G G A N A Y T S M V L C
316 TGCAGCAGCATTAGTGAAGCAGGACTTCTACCTGTTTGTGGGAACAACCTGAAGCATGTGGCGAGGAGGGGGCCAAACGCATATACCTCAATGGTCTCTG
125  C L R S V Y R Q G C A P P P P A W D H K L L T T L I Q H G Y H P P S N
421 TTGCTCCGATCAGTCTATCGGCAGGGTTGTGCGCCCCACCTCGCTGGGACCACAACTCCTAACGACACTTATACACATGGGTATCATCTCTCTGACAA
160  Q E C V A N I L A H A C K V S R T C E Q Q Q Q L V E A G G A D L V A C
526 CCAGGAATGTGTTGCCAATCCTTGCTCATGCATGCAAGGTATCCAGGACTTGTGAACAGCAGCAGCAATAGTAGAAGCAGGAGGAGCAGATCTTGTGCGCTG
195  M L C S P V S R V Q L P A L H C L A A M C Y N N E R V S S I I A T K S
631 TATGTTGTGTTCACTGTGTCCAGAGTTCAGCTTCCTGCTTACACTGTTTGGCAGCCATGTTTACAACAATGAGAGAGTTTCGTCTATCATAGCTACTAAGAG
230  Y G G K A V P D L L V G L M A R D R P C D M Q L A A A T A L T F L H R
736 TTACGGTGGTAAAGCTGTGCCAGACTTGCTTGTGGTTAATGGCAAGAGATCGGCCTGTGATATGCAGCTTGCTGCAGCTACTGCGTAACATTCCTGCATCG
265  A G A L S A D D P K V I F K T L Q C L V R M C R R D R E I W E R V E A
841 TGCAGGGCAGCTGTGAGTGTATCCAAAGTCATATTAAGACTTTACAATGCTTGGTTCGAATGTGCTCGAGATAGGGAATATGGGAACGTTGTAAGC
300  A N T L A Y L T E V S T E L Q R T A A M T D H L I H I M N D Y L K D T
946 AGCTAACACATTAGCTTATCTGACTGAAGTGAGTACAGAACTACAAAGCAGCAGCCATGACAGACCACTTAATTCATATAATGAATGATTACCTCAAGACAC
335  P T A G A S A P Q G I S V S P I S C R Q Y D N P S T W P D L M L E A A
1051 ACCCACTGCTGGAGCTTCAGCACCACAGGAATTAGTGTTCCTCAATTTCTTGTGACAGTATGATAATCAAGTACATGGCCTGATCTTATGCTAGAGCTGC
370  L K V Y A S L G A N D E D I R Q R V I N T E G L M N T I V G A L S A A
1156 CCTGAAGTCTATGATCTCTGGGGCAATGATGAAGATATTCGCCAAGAGTAATAATACAGAGGGCTGATGAACACAATGTGCGTGCTTGTCTGCAGC
405  C P P I Q L A A V R C L H S L S R S V H T L R T T F Q D H M V W R P L
1261 CTGCCACCAATCCAGTTAGTGCTGTAGTGCTTCATCTCTTCAAGACTGTGACACACTCAGGACAACCTTTTCAAGATCATAGTGTGAGACCTCT
440  M T V L K T S N S E E L V T V A S S T L C N L L L E F S P S K E H A C I L
1366 TATGACAGTTTAAAGACCTCAACTCTGAGGAAGTACAGTACTTCTTCGACACTCTGTAACCTCTTACTTGAATTTTCAACATCAAGGAACACATCCT
475  D Q G A A V E F L C G L T R R P H P G L R L N A V W A L M N A F Q A E
1471 TGATCAAGGTGCGGTGAATTTCTTGTGGACTAACAGACGACCTACCCAGGTTTAAAGACTTAATGCTGTGTGGGCACTAATGAACATGGCTTCAAGCAGA
510  H R V K A S I L H H L G T D Q I F R L L S D T D V H I L M K T L G L L
1576 GCACAGAGTGAAGGCTTCCATCTGCACCACCTTAGGAAGTATCAATATTCGACTACTGTGGACACAGATGTTACATCCTCATGAAACTTTAGTCTGCT
545  R N L L S T K A H I D Q I M Q S H G K E I M Q A I I L I L E G E H S A
1681 GAGAAATCTTGTCAACAAAGGCCATATTGACCAGATTATGCAAGCCATGAAAAAGAAATTATGCAGGCAATCATCTTAATCTTAGAAGGAGAACTCAGC
580  E V K E Q A L C I L A N I A D G D M A K S A I M S N E D V L K K L M N
1786 CGAGGTGAAGGAACAAGCACTCTGCATTTTGGCTAATATGCTGATGGAGACATGGCCAACTGCGCATTATGTCATGAAGATGCTCAAGAACTAATGAA
615  Y M V I P N V K L Q I A A T F C I S N L I W N V E E G A P E R Q N K L
1891 TTATATGTTATACCAATGTAAACTACAGATAGCAGCACCTTCTGCATAAGCAATCTTATTGGAATGCGAAGAGGGAGCCCTGAGAGACAAAAACAACT
650  R E M G V Y K L L Q N L M T T T D T G L F D K V K T A L Q Q F L *
1996 TCGTGAGATGGGAGTATACAACTATTACAAATCTAATGACTACCACCGATAGTGATTATTTGACAAGGTGAAGACAGCAATTGACAGAGTCTCTTAGcattg
2101 aggtacaactggtagacaataaggttttgatattatgataatttcataattgtaccccatatattgggttatcttaggtgtgcagatgtgatgttgatgatac
2206 aagctaatacaggtggccatagatgaataaattattatatctttatgtagataacttgatttatggtagacttgattagttcaactaaaaggettattgtt
2311 ttgttttagatgctcatgctttatgtaacatgtatatagttattacagtttaagaagaaaaaagtgatacatatttaagagaagggtttattacctttattttgt
2416 gaatatatgtgagtggttcataatgatttgtaagcaatatatatatatatttaattgtagcttactcaaaatttgattttgtgataaagccttgcttgctttgtt
2521 tatgaagtgtcacaagatagaggggtgggggaagaggaagccatccatgactgagctataagtttgactgctatcaagatggattttattttgaaggaatgtt
2626 gaagaatactgtttatttggtatgtttttgtctggaattaaagagtatgtttctcactactgcataagttatataatctgaggggtatgaagcaaatgtttaaag
2731 aatattatgcttaacaatatattacaattcaggtgaagtagtggacttggcaaaattacagttctttttgtgtggaatacacacaacatttcttatggaag
2836 gtgactctgtaataagatattttttaagtagcagaataaaagtacaacattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图1 凡纳滨对虾 *ARMC8* 基因的核苷酸序列及预测氨基酸序列

预测氨基酸序列在cDNA序列之上；起始密码子和终止密码子用粗体表示；6个ARM结构域均用阴影部分表示；多聚腺苷酸的加尾信号aataaa用下划线标出

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *ARMC8* gene from *L. vannamei*

The nucleotide (lower row) and deduced amino acid (upper row) sequences are shown and numbered on the left; the translation initiation codon (ATG) and stop codon (TAG) are in bold; six ARM domains are shaded; the aataaa are underlined

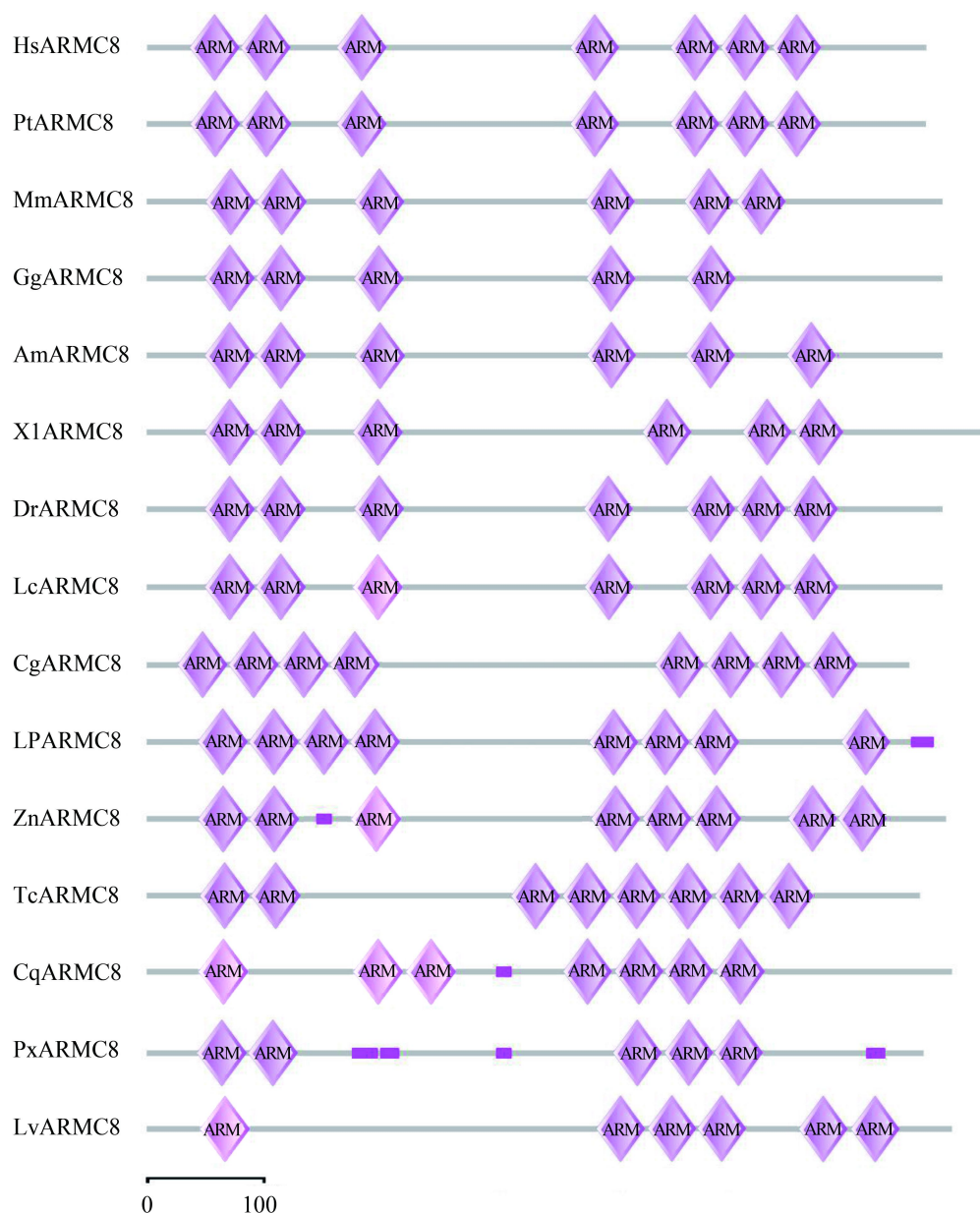


图 2 不同物种 *ARM C8* 蛋白结构简图

灰色线条表示无特殊结构区域, 菱形框表示 Armadillo 重复, 节点表示卷曲螺旋。ARM C8 蛋白及 GenBank 注册号分别为 LvARM C8, 凡纳滨对虾 *ARM C8* (KX058562); HsARM C8, 人 *ARM C8* (NP_056211); PtARM C8, 黑猩猩 *ARM C8* (XP_003310059); MmARM C8, 小鼠 *ARM C8* (NP_083044); GgARM C8, 原鸡 *ARM C8* (NP_001239092); AmARM C8, 美国短吻鳄 *ARM C8* (XP_006270507); XlARM C8, 非洲爪蟾 *ARM C8* (NP_001090243); DrARM C8, 斑马鱼 *ARM C8* (NP_001073151); LcARM C8, 大黄鱼 *ARM C8* (KKF19959); CgARM C8, 长牡蛎 *ARM C8* (EKC28448); LpARM C8, 美洲螯 *ARM C8* (XP_013791573); ZnARM C8, 内华达古白蚁 *ARM C8* (KDR21196); TcARM C8, 赤拟谷盗 *ARM C8* (XP_970234); CqARM C8, 致倦库蚊 *ARM C8* (EDS35823); PxARM C8, 柑橘凤蝶 *ARM C8* (KPI97227); 下同

Fig. 2 Schematic description of the domain topologies of *ARM C8* in different species

Gray lines indicate the region with no specific structural area, the diamond represents Armadillo repeat and the nodes represent a coiled-coil. GenBank accession number: LvARM C8, *L. vannamei* *ARM C8* (KX058562); HsARM C8, *Homo sapiens* *ARM C8* (NP_056211); PtARM C8, *Pan troglodytes* *ARM C8* (XP_003310059); MmARM C8, *Mus musculus* *ARM C8* (NP_083044); GgARM C8, *Gallus gallus* *ARM C8* (NP_001239092); AmARM C8, *Alligator mississippiensis* *ARM C8* (XP_006270507); XlARM C8, *Xenopus laevis* *ARM C8* (NP_001090243); DrARM C8, *Danio rerio* *ARM C8* (NP_001073151); LcARM C8, *Larimichthys crocea* *ARM C8* (KKF19959); CgARM C8, *Crassostrea gigas* *ARM C8* (EKC28448); LpARM C8, *Limulus polyphemus* *ARM C8* (XP_013791573); ZnARM C8, *Zootermopsis nevadensis* *ARM C8* (KDR21196); TcARM C8, *T. castaneum* *ARM C8* (XP_970234); CqARM C8, *C. quinquefasciatus* *ARM C8* (EDS35823); PxARM C8, *P. xuthus* *ARM C8* (KPI97227); the same below

白蚁(*Zootermopsis nevadensis*) ARMC8的相似性最高, 为71% (图3)。利用MEGA 5.0软件进行系统进化分析, 发现LvARMC8与多种无脊椎动物ARMC8聚为一支, 其中与昆虫类动物赤拟谷盗、致倦库蚊和柑橘凤蝶的亲缘关系最近(图4)。

2.3 *LvARMC8*基因的组织表达分析

利用Rt-PCR方法分析了*LvARMC8*在不同组织中的表达特征(图5), 结果显示该基因在11种组织中都被检测出, 其中在眼柄中的表达量最低, 在表皮中表达量最高, 约为眼柄中的12.49倍。

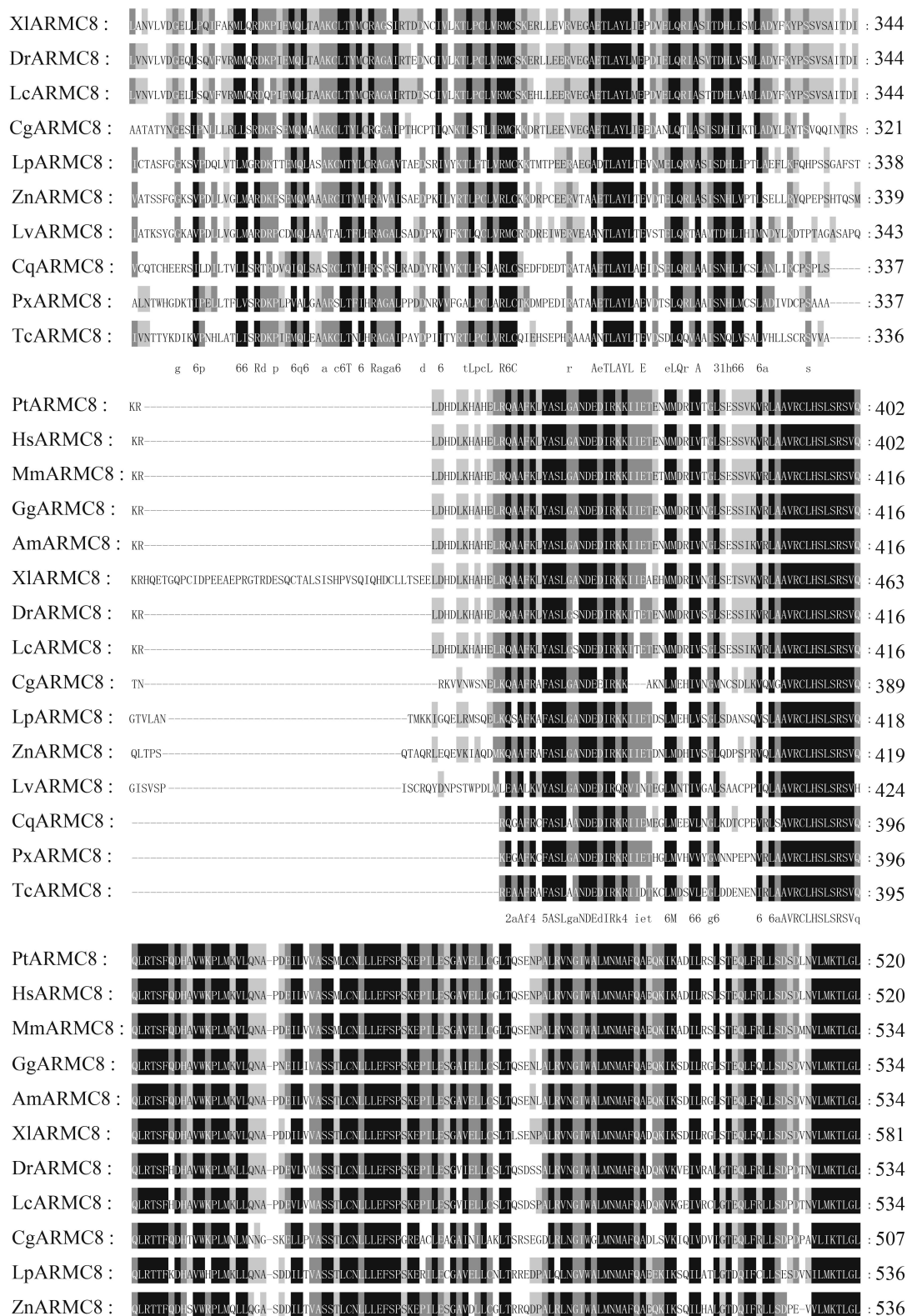
PtARMC8 : -----MEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 104
HsARMC8 : -----MEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 104
MmARMC8 : MACLETPIRMSVLSEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 118
GgARMC8 : MACVLEAPLRMSVLSEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 118
AmARMC8 : MACVLEAPLRMSVLSEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 118
XIARMC8 : MACVLEPPLRMSVLSEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 118
DrARMC8 : MACLEAPLRISVLSEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 118
LcARMC8 : MACLEAPLRISVLSEVTASSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 118
CgARMC8 : -----MVDSLSSEKDWLESMVCKNRYIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 95
LpARMC8 : MYTVIQP-----YMDVESSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 111
ZnARMC8 : MTCWIGA-----VDQCDVEGSRISVDELSSSEEDKLEATCLKNVIGSNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 113
LvARMC8 : MEVLPT-----YMDVESSRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 111
CqARMC8 : ---MALEP-----FACFMDVENSRISVDELSSSEEDKLEATCLKNVIGSNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 112
PxARMC8 : ---MQQ-----LTFMDIESSRISVDELSSSEEDKLEATCLKNVIGSNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 110
TcARMC8 : MIFEMQP-----FTTFMNVESRHVDRLEDPDQAVLCGVTDKNVIGNKQKRALIVLGAVERLLYLQETSSTELKTECAVVLGSLAGTENNKSLICHIPALQGLSPD : 113

r y6D 6 k 6 6Kn VIG n4 K 61 G 6pRL6 6 6 a 6gSLa Gt L6 6 6 6

PtARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSLSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 211
HsARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSLSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 211
MmARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSPSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 225
GgARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 225
AmARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 225
XIARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 225
DrARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 225
LcARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 225
CgARMC8 : ---LKFTEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 202
LpARMC8 : ---SKYVEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 219
ZnARMC8 : ---ARLFEACRLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 220
LvARMC8 : GGGANATSMVLCGLRSYRQGCAPPAP---DHKLTTLQHGTHPPS---NDCQANLAHAGVSRCTCEQVQVEAGADLIACMLCPVS---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 224
CqARMC8 : ---TDRLEMETGALKTLYQYFALTELHSTNGNQLQASPSSTIQCOYANLFPVPLCHSS---HCKNLCQANVPHARATVOLT---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 223
PxARMC8 : ---IDTKLMEVLSAKSETHPPAPVSAIPVMDL---ARLTQAR---EGSLNRSR---VRLSLIVGGP---LEKALSSSGALHAAALSSDTPPPNLPALPDLLAAMPENAKVSI : 223
TcARMC8 : ---EPRLDACLRLTFTSPVTEELLVTDATVIPHLLALSRSR---TOEYTCQFSHCCGCP---DHQTLFNHGAVQNALHLLTSSY---KVRQALKCFSLAFENPOVSM : 222

eacl cL43 p 1 L qe 6 I Ck Q 1 ga A 66 6 6 Lc 6 5 N Vs

PtARMC8 : LVNVLDGELLQIFVKMLQRDKPIEMOLTSKCLTMRAGAIRTDNGLKTLPCLRMCSNERLLEERVEGAFTLAYLIPVIELQRIASITDHLIAMLADFYPPSSVSATIDI : 330
HsARMC8 : LVNVLDGELLQIFVKMLQRDKPIEMOLTSKCLTMRAGAIRTDNGLKTLPCLRMCSNERLLEERVEGAFTLAYLIPVIELQRIASITDHLIAMLADFYPPSSVSATIDI : 330
MmARMC8 : LVNVLDGELLQIFVKMLQRDKPIEMOLTSKCLTMRAGAIRTDNGLKTLPCLRMCSNERLLEERVEGAFTLAYLIPVIELQRIASITDHLIAMLADFYPPSSVSATIDI : 344
GgARMC8 : LVNVLDGELLQIFVKMLQRDKPIEMOLTSKCLTMRAGAIRTDNGLKTLPCLRMCSNERLLEERVEGAFTLAYLIPVIELQRIASITDHLIAMLADFYPPSSVSATIDI : 344
AmARMC8 : LVNVLDGELLQIFVKMLQRDKPIEMOLTSKCLTMRAGAIRTDNGLKTLPCLRMCSNERLLEERVEGAFTLAYLIPVIELQRIASITDHLIAMLADFYPPSSVSATIDI : 344

图3 *LvARMC8*氨基酸与其他物种 *ARMC8*氨基酸的多序列比对结果Fig. 3 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence of *LvARMC8* with *ARMC8*s from other species

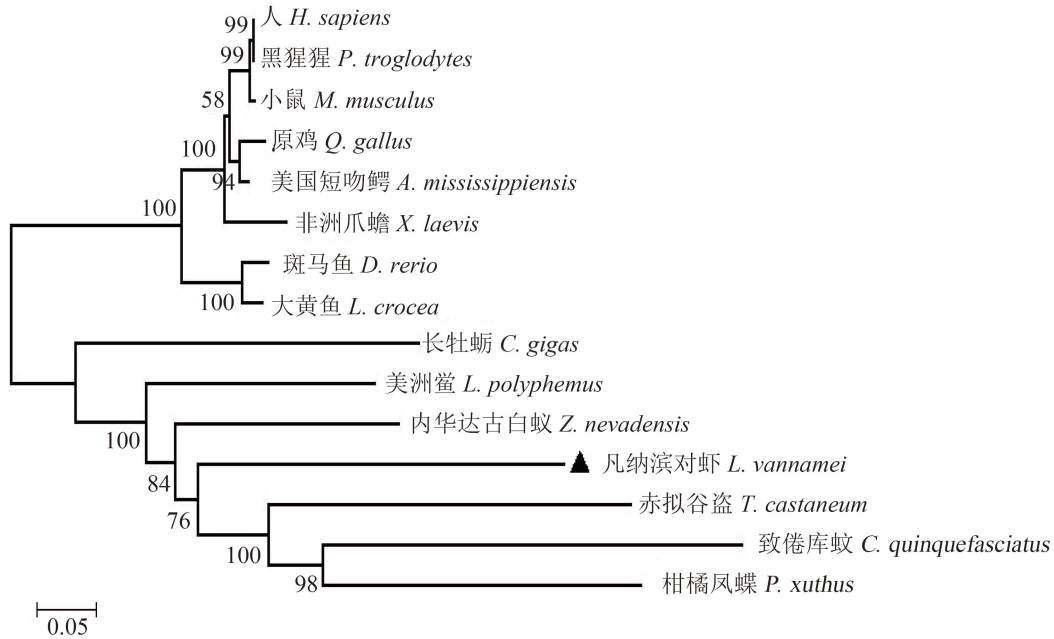


图4 ARMC8蛋白进化树分析

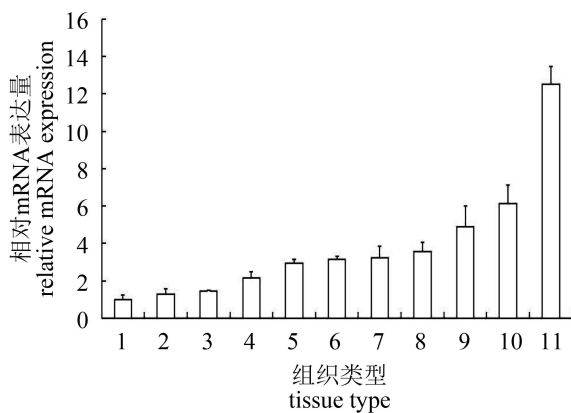
Fig. 4 Phylogenetic analysis of ARMC8 proteins

此外, *LvARMC8*在肠道及神经组织中表达量也处于较高水平。

2.4 *LvARMC8*基因应答WSSV感染的表达变化特征

对WSSV感染后凡纳滨对虾血细胞中*LvARMC8*的表达量进行分析, 结果显示, 注射WSSV后, 凡纳滨对虾血细胞中*LvARMC8*的表达量呈先下

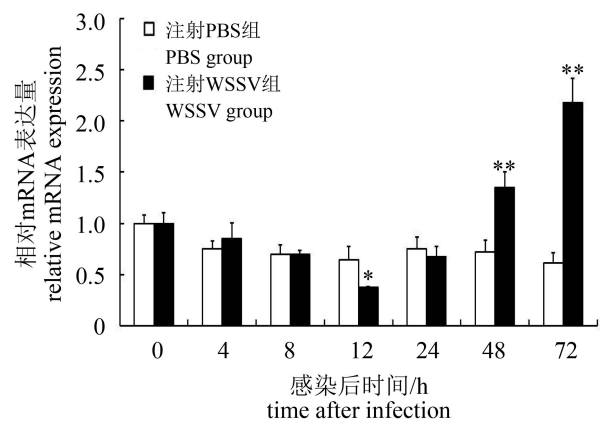
降后上升趋势(图6)。在注射WSSV初期(4、8 h), *LvARMC8*的表达量没有显著变化; 注射后12 h, *LvARMC8*的表达量显著低于对照组($P<0.05$); 随后, *LvARMC8*的表达量逐渐升高, 注射后48 h即显著高于对照组($P<0.01$), 并于注射后72 h达到最高水平, 约为对照组的3.53倍。

图5 *LvARMC8*基因在不同组织中的表达分布

1. 眼柄; 2. 心脏; 3. 后盲囊; 4. 血液; 5. 肝胰腺; 6. 鳃; 7. 肌肉; 8. 胃; 9. 神经; 10. 肠; 11. 表皮

Fig. 5 Distribution of *LvARMC8* gene expression in different tissues of *L. vannamei*

1. eyestalk; 2. heart; 3. pyloric caecum; 4. hemocyte; 5. hepatopancreas; 6. gill; 7. muscle; 8. stomach; 9. nerve; 10. intestine; 11. epithelium

图6 WSSV感染后凡纳滨对虾血细胞中*LvARMC8*基因的表达模式

*. 差异显著($P<0.05$), **. 差异极显著($P<0.01$), 下同

Fig. 6 Expression profile of *LvARMC8* gene after WSSV challenge in hemocytes of *L. vannamei*

*. significant difference ($P<0.05$), **. extremely significant difference ($P<0.01$), the same below

2.5 *LvARMC8* 基因应答副溶血弧菌感染的表达变化特征

对副溶血弧菌感染后凡纳滨对虾血细胞中 *LvARMC8* 的表达量进行分析, 结果显示, 注射副溶血弧菌后, 凡纳滨对虾血细胞中 *LvARMC8* 的表达量呈先上升后下降趋势, 副溶血弧菌感染可以显著诱导 *LvARMC8* 基因的表达(图7)。除注射后24 h外的所有时间点, 感染组中 *LvARMC8* 基因的表达量均显著高于对照组($P < 0.01$), 在注射后8 h, *LvARMC8* 基因的表达量达到最高水平, 约为对照组的3.22倍。

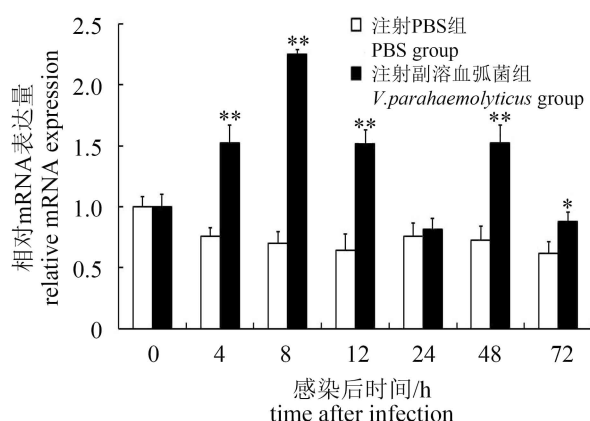


图7 副溶血弧菌感染后凡纳滨对虾血细胞中 *LvARMC8* 基因的表达模式

Fig. 7 Expression profile of *LvARMC8* gene after *V. parahaemolyticus* challenge in hemocytes of *L. vannamei*

3 讨论

作为新发现的 *ARMC* 家族成员, *ARMC8* 的相关研究还十分缺乏, 主要集中于其在人类肿瘤发生中的功能研究。目前, 在人类之外的多个物种体内均已发现 *ARMC8* 的存在, 但甲壳类中还未曾见到。本研究在凡纳滨对虾中克隆获得 *ARMC8* 基因, 并发现其在应答病原感染时表达量发生显著变化, 提示 *ARMC8* 基因可能参与凡纳滨对虾抗病免疫。这是目前国际上首次在甲壳类动物中对 *ARMC8* 基因进行的研究, 也是首次对 *ARMC8* 基因在免疫过程中发挥的功能进行探讨。

通过搜索NCBI数据库, 对不同物种中 *ARMC8* 的蛋白结构进行分析发现, 虽然不同物种 *ARMC8* 蛋白均含有保守的 *ARM* 结构域, 但其数目有较大差异, 为5~8个, 保守的 *ARM* 结构域在不同

ARMC8 蛋白中所处的位置亦有很大差异, 无明显规律可寻。此外, 少数物种 *ARMC8* 蛋白还包含卷曲螺旋结构。凡纳滨对虾 *ARMC8* 与小鼠、美国短吻鳄及非洲爪蟾 *ARMC8* 结构较为相似, 均含有6个 *ARM* 结构域, 且无卷曲螺旋结构, 而与亲缘关系较近的赤拟谷盗(含8个 *ARM* 结构域)、致倦库蚊(含7个 *ARM* 结构域)及柑橘凤蝶(含5个 *ARM* 结构域) *ARMC8* 蛋白结构有明显差异, 所含 *ARM* 结构域数目均不相同, 这可能与 *ARMC* 家族蛋白结构的可变性相关, 也预示着 *ARMC* 家族成员在不同物种中功能的多样性。

在人类体内, *ARMC8* 与肝脏^[15]、肺^[19]、乳腺^[4]、卵巢组织^[10]等肿瘤细胞的增殖密切相关, 但有关其在不同物种各组织中分布的信息还未见报道, 本研究以凡纳滨对虾为对象, 首次较为系统地分析 *ARMC8* 在不同组织中的表达情况, 结果显示, *LvARMC8* 具有一定的组织表达特异性, 该基因在对虾表皮、肠道及神经组织中高度表达。*LvARMC8* 在凡纳滨对虾不同组织中的分布情况与同为 *ARMC* 家族的 *Lvβ-catenin* 有很大相似性^[21], 提示 *LvARMC8* 可能与 *Lvβ-catenin* 有类似的功能。

已有研究证实, *ARMC8* 可通过激活经典 Wnt 信号通路发挥作用^[19]。 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键因子^[20], 在凡纳滨对虾中已经发现, β -catenin 沉默后增强了凡纳滨对虾应答 WSSV 和副溶血弧菌感染的易感性, 表明 β -catenin 在凡纳滨对虾抗细菌和病毒感染中发挥了积极作用。在本研究中, WSSV 和副溶血弧菌感染均刺激凡纳滨对虾血细胞中 *LvARMC8* 的表达, 提示 *LvARMC8* 可能也参与了凡纳滨对虾抗病免疫, 具体原因可能与其结构上与 *Lvβ-catenin* 类似、且能激活 Wnt 信号通路有关, 但是相关作用机制还有待深入研究。

综上所述, 本研究系统分析了 *LvARMC8* 基因的结构特点、组织表达特征以及病毒和细菌感染后该基因的表达量变化模式, 对细菌和病毒如何侵染凡纳滨对虾有更深入的了解, 为凡纳滨对虾的病害防治奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Flegel T W, Lightner D V, Lo C F, et al. Shrimp disease control: past, present and future[C]//Asian Fisheries Society. Diseases in Asian Aquaculture VI. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 2008: 355-378.
- [2] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate

- immune responses in shrimp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 973-980.
- [3] McCrea P D, Turck C W, Gumbiner B. A homolog of the *armadillo* protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin[J]. Science, 1991, 254(5036): 1359-1361.
- [4] Yang Y Z. Wnt signaling in development and disease[J]. Cell & Bioscience, 2012, 2(1): 14.
- [5] Riggleman B, Wieschaus E, Schedl P. Molecular analysis of the *armadillo* locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene[J]. Genes & Development, 1989, 3(1): 96-113.
- [6] Coates J C. Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom[J]. Trends in Cell Biology, 2003, 13(9): 463-471.
- [7] Hatzfeld M. The armadillo family of structural proteins[J]. International Review of Cytology, 1998, 186: 179-224.
- [8] Görlich D, Prehn S, Laskey R A, *et al.* Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import[J]. Cell, 1994, 79(5): 767-778.
- [9] Franke W W, Goldschmidt M D, Zimbelmann R, *et al.* Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(11): 4027-4031.
- [10] Kinzler K W, Nilbert M C, Vogelstein B, *et al.* Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers[J]. Science, 1991, 251(4999): 1366-1370.
- [11] Groden J, Thliveris A, Samowitz W, *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene[J]. Cell, 1991, 66(3): 589-600.
- [12] Hatzfeld M, Kristjansson G I, Plessmann U, *et al.* Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the *armadillo* multigene family[J]. Journal of Cell Science, 1994, 107(8): 2259-2270.
- [13] Suzuki T, Ueda A, Kobayashi N, *et al.* Proteasome-dependent degradation of α -catenin is regulated by interaction with ARMC8 α [J]. Biochemical Journal, 2008, 411(3): 581-591.
- [14] Kobayashi N, Yang J, Ueda A, *et al.* RanBPM, Muskelein, p48EMLP, p44CTLH, and the *armadillo*-repeat proteins ARMC8 α and ARMC8 β are components of the CTLH complex[J]. Gene, 2007, 396(2): 236-247.
- [15] Zhao Y, Peng S L, Jia C J, *et al.* Armc8 regulates the invasive ability of hepatocellular carcinoma through E-cadherin/catenin complex[J]. Tumor Biology, 2016, 37(8): 11219-11224.
- [16] Xie C Y, Jiang G Y, Fan C F, *et al.* ARMC8 α promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by activating the canonical Wnt signaling pathway[J]. Tumor Biology, 2014, 35(9): 8903-8911.
- [17] Fan C F, Zhao Y, Mao X Y, *et al.* Armc8 expression was elevated during atypia-to-carcinoma progression and associated with cancer development of breast carcinoma[J]. Tumor Biology, 2014, 35(11): 11337-11343.
- [18] Jiang G Y, Yang D L, Wang L, *et al.* A novel biomarker ARMC8 promotes the malignant progression of ovarian cancer[J]. Human Pathology, 2015, 46(10): 1471-1479.
- [19] Zhu F, Zhang X B. The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in *Drosophila*[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 2069.
- [20] Chen X H, Zeng D G, Chen X L, *et al.* Transcriptome analysis of *Litopenaeus vannamei* in response to white spot syndrome virus infection[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73218.
- [21] Zhang S, Shi L L, Lu K, *et al.* Cloning, identification and functional analysis of a β -catenin homologue from Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 411-418.
- [22] Melena J, Echeverría F, Panchana F, *et al.* Delayed mortality of juvenile shrimp *Penaeus vannamei* challenged to White spot syndrome virus (WSSV) previously exposed to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) or inactivated WSSV[J]. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 2015, 8(2): 51-57.
- [23] Balcázar J L, Rojas-Luna T, Cunningham D P. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 96(2): 147-150.

Cloning and expression profile analysis of *ARMC8* gene from *Litopenaeus vannamei*

HUANG Jinfeng¹, YANG Qihui^{1,2}, DONG Xiaohui^{1,2}, CHI Shuyan^{1,2},
LIU Hongyu^{1,2}, TAN Beiping^{1,2}, ZHANG Shuang^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. South China Sea Resource Exploitation and Protection Collaborative Innovation Center, Zhuhai 519082, China)

Abstract: The purpose is to study the potential role of *Litopenaeus vannamei* armadillo repeat-containing protein 8 (*ARMC8*) in the immune response triggered by the virus and bacterial pathogens. Full-length cDNA sequence of *ARMC8* gene from *L. vannamei* (named *LvARMC8*, GenBank Accession Number: KX058562) was first cloned using RACE method. The full-length cDNA sequence of *LvARMC8* was 2917 bp, which contains a 50 bp 5'UTR, 822 bp 3'UTR and 2046 bp open reading frame (ORF) that encoded 681 amino acid residues. SMART analysis results showed that *LvARMC8* contains six armadillo repeat (ARM) domains. Multiple alignment analysis shows that *LvARMC8* shared 71% amino acid identity with *Zootermopsis nevadensis*, which is the highest. Phylogenetic analysis showed that *LvARMC8* was clustered together of invertebrates groups and most closely related to *Tribolium castaneum* *ARMC8*, *Culex quinquefasciatus* *ARMC8* and *Papilio xuthus* *ARMC8*. RT-PCR analysis showed that *LvARMC8* was constitutively expressed in all the examined tissues with the highest expression in epithelium and lowest expression in eyestalk. Upon WSSV challenge, the expression of *LvARMC8* was significantly down-regulated at 12 hpi (hours past infection) but significantly up-regulated starting at 48 hpi, reaching the peak at 72 hpi. By *V. parahaemolyticus* challenging, the level of *LvARMC8* expression were markedly increased at all the detected time points except 24 hpi. The result suggests that *LvARMC8* might take part in the innate immune response of *L. vannamei* triggered by pathogens.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; armadillo repeat-containing protein 8; gene cloning; tissue expression; WSSV infection; *Vibrio parahaemolyticus*

Corresponding author: ZHANG Shuang. E-mail: 18820436396@126.com

Funding projects: The PhD Start-up Fund of Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2014A030310184); Free Application Fund of Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2016A030313757); Youth Innovation Talent Project of Ordinary University in Guangdong Province, China (2014KQNCX079); Special Support Program for Outstanding Young Teachers of Guangdong Ocean University (HDYQ2015004)