



脊尾白虾 *Strawberry Notch1* 基因的克隆及免疫功能

陈昊¹, 戴琴¹, 干雅梅¹, 高焕^{1,2,3}, 阎斌伦^{1,2,3}, 赖晓芳^{1,2,3*}

(1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点实验室,
江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室, 江苏 连云港 222005;
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005;
3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探究 *Strawberry Notch1* 基因 (*SBNO1*) 在甲壳动物中的免疫功能, 实验对脊尾白虾 *SBNO1* 的 cDNA 序列全长、系统进化、组织分布以及副溶血性弧菌感染后 *SBNO1* 和 Notch 信号通路中相关基因表征进行了研究。结果显示, 脊尾白虾 *SBNO1* cDNA 序列全长 4 353 bp, 共编码 1 380 个氨基酸, 预测相对分子质量 158.91 ku, 理论等电点 4.81。qPCR 分析显示, 脊尾白虾 *SBNO1* 在各组织中均有表达, 其中在肝胰腺中表达量最高, 性腺次之。利用 RNAi 干扰 *SBNO1* 显示, 脊尾白虾在感染副溶血性弧菌后, 干扰组死亡率显著高于未干扰组。副溶血性弧菌感染脊尾白虾后显著影响了 Notch 信号通路中 *SBNO1*、*Numb* 与 *Delta* 在肝胰腺中的转录情况, 而 *Jagged* 的表达差异不显著。*SBNO1* 和 *Numb* 的表达量随时间延长都呈现出先上升后下降的趋势, *Delta* 的表达量呈现出先下降后上升的趋势。研究表明, Notch 信号通路参与了脊尾白虾副溶血性弧菌感染后的免疫。本研究有助于阐明无脊椎动物先天免疫的机制, 为抗病脊尾白虾的分子育种提供理论依据。

关键词: 脊尾白虾; *Strawberry Notch1*; 副溶血性弧菌; RNA 干扰

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

Notch 信号通路在进化上高度保守, 对于生物体中许多参与免疫调控以及细胞增殖基因的表达至关重要^[1]。Notch 最早于 1919 年被发现, 因在果蝇翅膀边缘部分会出现缺口样的性状而得名^[2]。不久后, Notch 被证实具有介导蛋白质跨膜运输的功能, 在细胞间相互通讯, 扮演着重要角色^[3]。经研究表明, Notch 信号通路主要由 Notch 受体、Notch 配体和细胞效应器分子构成。

Strawberry Notch1 (*SBNO1*) 是解旋酶超家族 2 的新型染色质因子, 可以在 Notch 信号通路下游运作^[4]。目前, 针对斑马鱼 (*Danio rerio*) 的研究表明, *SBNO1* 在胚胎神经系统区域呈现高表达。此外, 在斑马鱼胚胎中注射 *SBNO1* 抑制剂会阻碍

Notch 信号的结合, 造成基因表达延迟等现象, 该研究还表明, *SBNO1* 可以正向调节其靶标的转录, 从而激活 Notch 信号通路^[5]。尽管在模式动物中对 *SBNO1* 进行了较好的报道, 但很少有报道证明其在无脊椎动物中存在并参与 Notch 信号通路调控。目前, 对于海洋甲壳类动物 *SBNO1* 功能有关知识的掌握仍然有限, 对 *SBNO1* 的研究可能有助于理解和追踪无脊椎动物免疫系统的进化。

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 属甲壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 长臂虾科 (Palaeomonidae) 白虾属 (*Exopalaemon*), 主要分布在我国黄渤海海域^[6-7]。因其具有生长快、环境适应性强、繁殖周期短等优点, 为池塘单养、混养主要品种

收稿日期: 2020-12-23 修回日期: 2021-10-17

资助项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX20_2884); 江苏省优势学科建设工程 (PAPD); 国家重点研发计划 (2018YFD0901302)

第一作者: 陈昊 (照片), 从事海洋生物繁殖与遗传育种研究, E-mail: 2458155367@qq.com

通信作者: 赖晓芳, 从事海洋生物繁殖与遗传育种学研究, E-mail: lai.xiaofang@163.com



之一。随着养殖密度的增加,病原菌会在虾类中流行,导致产量大幅下降。由副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)引起的急性肝胰腺坏死病已成为虾塘减产的主要疾病之一^[8-9]。脊尾白虾也像其他无脊椎动物一样,依靠自身先天免疫机制来抵御病原菌的侵袭。本研究拟克隆脊尾白虾*SBNO1* cDNA,研究个体在*SBNO1* RNA干扰和副溶血性弧菌感染后,*SBNO1*与Notch信号通路中下游相关基因的表达,为脊尾白虾病害防御机制研究提供相应的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用脊尾白虾由实验室自繁而来,均为健康活泼个体,平均体长为(6.2±0.4) cm,平均体质量为(2.3±0.2) g。RNA干扰下副溶血性弧菌感染实验所用虾在室内循环养殖室养殖(pH 8.2、盐度23、温度26℃),每日投喂2次(9:00和17:30)。副溶血性弧菌样品来自中国菌种保藏中心。RNA干扰实验中,注射无菌生理盐水(SPSS)作为对照。

1.2 总RNA提取及第一链合成

选取3尾脊尾白虾,分别提取眼柄、心脏、性腺、胃、肝胰腺、鳃、肌肉、肠、腹索神经等9个组织样品各约18 mg。采用UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)提取脊尾白虾中的总RNA,1.2%琼脂糖凝胶电泳验证RNA完整性,使用GeneQuant pro仪器检测RNA的浓度以及纯度,-80℃保存。

采用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)将脊尾白虾各组织的RNA反转录成cDNA。另取脊尾白虾各组织的混合RNA,通过SMARTer RACE 5'/3' Kit试剂盒(TaKaRa)以每管10 μL的量分别合成5'和3' RACE-ready cDNA。

1.3 *SBNO1* 基因cDNA全长克隆

根据本实验室获得的脊尾白虾转录组序列,经Blast分析表明,脊尾白虾核心序列与凡纳滨对虾*SBNO1*具有高度的相似性。通过Primer Premier 5.0软件设计5'和3' RACE引物(表1)进行快速扩增,PCR的反应体系和反应程序按照上述反转录试剂

表1 研究相关引物序列

Tab. 1 Research related primer sequences

引物 primers	序列 sequence	用途 application
ntr-93	ATCCTCCTCTTCATCCCATTCTCTG	5'RACE
ntr-277	TACTGAGGAGGCTGGTTGGGTTTC	5'RACE
ntf-3754	GCTCAAGAACATTGGGAAGAACAGTA	3'RACE
ntf-3856	GAAATTGGGTTGCGTCGCCGTACTTA	3'RACE
nf-1	TCTCGTGATCTTTCGTCA	qPCR
nr-1	ATGCTATCTTTGGTA	qPCR
18S-f	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	qPCR
18S-r	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	qPCR
Jagged-f	GTCGTGCTGTTCATTT	qPCR
Jagged-r	CGCCATAGTTTCTCTT	qPCR
Delate-f	GTCAATCCCCTTCAGTTT	qPCR
Delate-r	TCATCGTCAGTCCAATCT	qPCR
Numb-f	ACGGACTCAGGGTTGTTG	qPCR
Numb-r	CATGGCTAATCTCTCGC	qPCR
N-RNAi-A1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGCAG GACACATACACGTAATT	RNAi
N-RNAi-B1	AATTACGTGTATGTGTCTGCCCTATAGTG AGTCGTATTAGTGATC	RNAi
N-RNAi-C1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTACG TGTATGTGTCTGCTT	RNAi
N-RNAi-D1	AAGCAGGACACATACGTAACCCTATAGTG AGTCGTATTAGTGATC	RNAi

盒说明进行。由 PCR 扩增得到的产物经胶回收、克隆转化后, 将菌液送至上海生工生物工程股份有限公司测序。测序结果通过 DNAMAN 8 软件进行拼接, 得到 *SBNO1* 基因完整的 cDNA 序列。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库中 Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 分析 *SBNO1* 的 cDNA 和氨基酸序列。采用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf-finder/>) 分析 *SBNO1* 的开放阅读框。使用 ExPASy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行理论等电点与相对分子量的预测。用 Clustalx 软件进行氨基酸序列的多重比对, 再用 DNAMAN 8 软件作图。根据 MEGA 7.0 软件通过邻接法构建系统发育树。

1.5 实时荧光定量 PCR

依据所获得的脊尾白虾 *SBNO1* 核心序列设计荧光定量引物 (表 1), 采用 18S rRNA 作为内参基因。本实验采用 chamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (vazyme), 模板为脊尾白虾不同组织的 cDNA。PCR 反应体系为 20 μ L, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s (熔解曲线程序)。

1.6 RNA 干扰

脊尾白虾随机分为 4 组 (第 1 组 SPSS+SPSS, 第 2 组 RNAi+SPSS, 第 3 组 SPSS+VP, 第 4 组 RNAi+VP), 每组 3 个平行, 每个平行 30 尾虾。第 1 组和第 3 组预先在脊尾白虾心腔注射 10 μ L 无菌生理盐水, 第 2 组和第 4 组注射 10 μ L RNA 干扰试剂 (表 1)。24 h 后, 第 1 组和第 2 组在脊尾白虾尾部第二腹节处注射 10 μ L 无菌生理盐水, 第 3 组和第 4 组注射 10 μ L 副溶血性弧菌悬液 (1×10^8 CFU/mL)。第 2 次注射后, 在 0、3、6、12、24、48、72 和 96 h 时取样并记录死亡率, 每组取 3 尾脊尾白虾肝胰腺用于检测基因表达量。

1.7 数据分析

实验最终各定量结果采用 SPSS 19.0 和 Excel 软件进行统计分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法处理数据, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异, 其中 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,

最后采用 Oringin 2019b 软件作图。

2 结果

2.1 脊尾白虾 Notch 信号通路中 *SBNO1* 的克隆和序列分析

脊尾白虾 *SBNO1* cDNA 序列全长为 4 353 bp (图 1), 其中 5' 非翻译区 (5'-UTR) 21 bp, 3' 非翻译区 (3'-UTR) 189 bp, 开放阅读框 (PRF) 4 143 bp, 编码 1 个由 1 380 个氨基酸残基构成的蛋白质。预测蛋白质相对分子量为 158.91 ku, 理论等电点为 4.81。应用 SMART 在线软件对其蛋白质保守结构域预测, 发现该蛋白在 287~588 氨基酸处有 AAA_34 保守结构域、在 720~830 氨基酸之间存在 SV2 保守结构域、在 855~1 129 氨基酸处有 Helicase_C_4 结构域。

2.2 氨基酸序列比对及系统进化分析

通过 Clustalx 软件将脊尾白虾 *SBNO1* 的氨基酸序列与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、方鼻卷甲虫 (*Athalia rosae*)、小鼠 (*Mus musculus*)、白鹭 (*Egretta garzetta*) 和斑马鱼等物种进行多序列比对, 结果显示, *SBNO1* 的氨基酸序列与凡纳滨对虾的同源性最高 (82%), 其次是方鼻卷甲虫 (80%)。选取脊尾白虾 855~1 129 氨基酸处 strawberry notch 家族特有结构域 (Helicase_C_4) 进行多序列比对, 其与凡纳滨对虾同源性最高 (95.29%), 其余物种均高于 85.56%, 表明不同物种间 Helicase_C_4 氨基酸序列具有较高的保守性 (图 2)。

利用 Neighbor-Joining 法构建脊尾白虾 *SBNO1* 系统进化树, 脊尾白虾与同为甲壳动物门的凡纳滨对虾 *SBNO1* 亲缘关系最近, 聚为一小支, 再与无脊椎动物中的方鼻卷甲虫、根虫 (*Hyalella azteca*)、光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*) 等聚为一大支, 斑马鱼、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、白鹭、小鼠以及智人 (*Homo sapiens*) 等脊椎动物聚为一大支 (图 3)。

2.3 脊尾白虾 *SBNO1* 在不同组织中的表达特征

为进一步研究脊尾白虾 *SBNO1* 在不同组织中的表达水平, 以 18S RNA 为内参基因, 利用 RT-qPCR 检测脊尾白虾 *SBNO1* 表达量, 脊尾白虾 *SBNO1* 在 9 个组织中均有表达, 其中在肝胰腺中的表达量最高, 性腺次之 (图 4), 在肌肉和腹索神经中表达量最低。



图 2 脊尾白虾与其他物种 *SBNO1* Helicase_C_4 结构域的氨基酸多序列比对

黑色.高度相似区域, 红色.较高相似区域, 蓝色.相对相似区域

Fig. 2 Multiple sequence alignment of Helicase_C_4 domain of *SBNO1* in *E. carinicauda* and other species

Black. highly similar domain, red. not very similar domain, blue. relatively similar domain

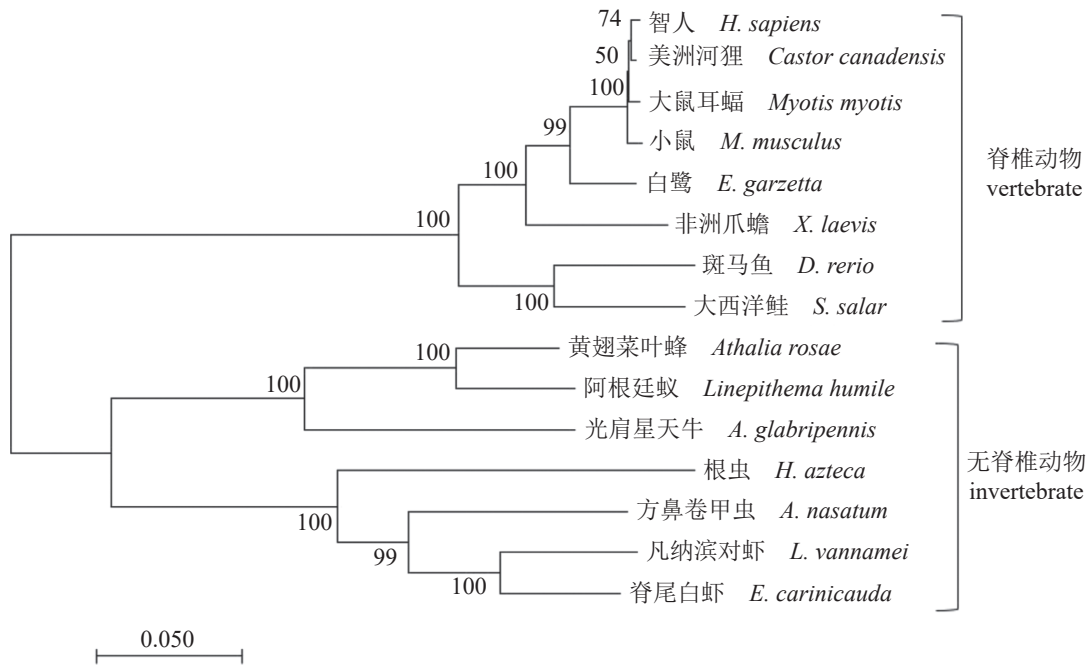


图 3 *SBNO1* 序列 NJ 系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on *SBNO1* sequence

2.4 RNA 干扰

为探究脊尾白虾 *SBNO1* 在感染副溶血性弧菌后的免疫应答, 利用 RNAi 干扰沉默脊尾白虾 *SBNO1* 的表达量, 通过 RT-qPCR 检测 *SBNO1* 在肝胰腺中的干扰效率。RNA 干扰组各时间点脊尾白虾 *SBNO1* 表达量均显著低于未干扰组, 96 h 时干扰效率出现下降, 整体干扰效率超过 50%(图 5-a)。

对脊尾白虾 *SBNO1* 进行干扰后, 再注射副溶血性弧菌, 统计死亡率。RNAi+VP 组的累计死亡率显著高于 SPSS+VP 和未注射副溶血性弧菌的

对照组 ($P<0.05$)。RNAi+VP 组、SPSS+VP 组、RNAi+SPSS 组以及 SPSS+SPSS 组的最终死亡率分别为 67.8%、49.9%、5.6% 和 4.4%(图 5-b)。

未注射 RNA 干扰试剂的情况下, 感染副溶血性弧菌后脊尾白虾 *SBNO1* 的表达量如图 5-c 所示, 呈现先上升后下降的趋势。在 0~6 h 表达量基本稳定, 12~72 h 表达量显著升高, 且在 48 h 达到最大值, 约为未感染组的 6 倍, 且未感染组在 0~96 h 无显著变化。

感染副溶血性弧菌的情况下, RNA 干扰组和

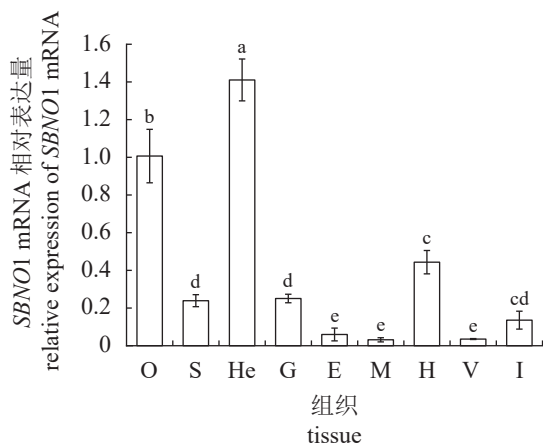


图4 脊尾白虾 *SBNO1* 在各组织中的表达情况

O. 性腺, S. 胃, He. 肝胰腺, G. 鳃, E. 眼, M. 肌肉, H. 心脏, V. 腹索神经, I. 肠, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Expression of *SBNO1* in different tissues of *E. carinicauda*

O. gonad, S. stomach, He. hepatopancreas, G. gill, E. eye, M. muscle, H. heart, V. ventral nerve, I. intestine, different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

未干扰组脊尾白虾 *SBNO1* 的表达量如图 5-d 所示, 呈现出先上升后下降的趋势, 且干扰组在 12~72 h 显著低于未干扰组, 48 h 时, 未干扰组 *SBNO1* 的表达量约为干扰组的 2 倍。

感染副溶血性弧菌后, Notch 信号通路相关基因的表达情况如图 5-e 所示, *Numb* 整体呈现出先上升后下降的趋势, 6~48 h 表达量上升, 48 h 达到最大值, 72~96 h 表达量下降, 其中 0~3 h 干扰组表达量高于未干扰组。*Delta* 表达量呈先下降后上升的趋势, 且在 48 h 达到最小值, 干扰组显著低于未干扰组的表达量, 6~48 h 表达量降低, 在 0~3 h 和 72~96 h 时基本保持稳定。*Jagged* 表达量在各时间内, 两组间均无显著差异。

3 讨论

由病毒或细菌引起的流行病已对虾类养殖业造成严重威胁^[10]。疾病的产生与发展通常是复杂的宿主与病原体相互作用的结果, 病原体感染宿主后可能会引起该信号通路中基因的免疫表达^[11]。宿主 Notch 信号通路与免疫相关基因和抗病功效有关^[12]。*SBNO1* 被认为是 Notch 信号通路下游重要的介体^[13], 通过与 Notch 转入活性物质相互结合和调节 Notch 转入活性, 促进多种靶标的表达^[14]。本研究发现脊尾白虾 *SBNO1* 蛋白结构中含有与此功能相关的 NTP 水解酶 proe-1 磷酸结合环的结构

域 (AAA-34)、转运糖类等大分子物质的蛋白序列 (SV2)。系统进化树分析表明, 脊尾白虾 *SBNO1* 的氨基酸序列与凡纳滨对虾 *SBNO1* 聚为一小支, 而来自节肢动物门的 *SBNO1* 聚为一大支, 说明 *SBNO1* 符合生物进化规律, 按照对应的进化层次分类。

据报道, Notch 信号通路参与许多生理过程, 例如细胞凋亡、细胞增殖和分化等^[15]。作为 Notch 信号通路中的下游基因, *SBNO1* 基于 Notch 亲和力会在各组织中表达。本研究表明, *SBNO1* 在眼柄、心脏、肝胰腺、性腺、胃、肠、腹索神经、肌肉和鳃等 9 个组织中均有表达, 其中在肝胰腺和性腺中的表达量显著高于其他组织。Takano 等^[5]敲除小鼠胚胎中 *SBNO1*, 导致囊胚腔无法形成, 推测 *SBNO1* 是生物组织分化与发育的重要基因, 脊尾白虾在性腺中 *SBNO1* 高表达能验证这一观点。虾肝胰腺是消化和代谢中心, 并在免疫应答方面有着重要的作用, 通过 Notch 信号通路的调节, *SBNO1* 可能参与了脊尾白虾的免疫调控。

经研究表明, Notch 信号通路主要由 Notch 受体、Notch 配体和细胞效应器分子构成。Notch 配体又称为 DSL 蛋白, 而在模式动物果蝇中, Notch 配体仅有两种类型: Delta 和 Jagged^[16], 它们都属于跨膜运输类蛋白, 在配体胞外区含有数个能与 Notch 受体结合的区域^[17]。Delta 与 Jagged 在通路中行使的大部分功能不同但又有部分的重叠, 在细胞增殖分化中都有着重要的作用。*Numb* 是一种膜相关蛋白, 在 Notch 信号通路中起到修饰的作用^[18]。现有的研究认为, *Numb* 能通过结合 Notch 活化产物来抑制 Notch 信号的传递^[19]。本研究显示, 脊尾白虾在感染副溶血性弧菌后, 干扰组 *SBNO1* 表达量总体呈现出表达量先上调后下降到趋于正常水平的趋势, 且干扰组的死亡率显著高于无菌生理盐水对照组, 推测脊尾白虾 *SBNO1* 可能是参与 Notch 信号通路免疫系统调节中的重要成员, 在抵御病原体侵入中发挥着一定的作用。有研究表明, 当 Notch 信号通路被阻断时, 体内 T 细胞发育将受阻, 随即产生大量异常的 B 细胞^[20]。另据报道, Notch 通路信号被激活后, 能够显著提高 *Delate* 基因的活性, 以此促进边缘 B 细胞的发育来提升免疫力^[21]。本研究发现, 当 *SBNO1* 基因被 RNA 干扰时, *Delta* 基因的表达量显著降低, *Jagged* 的表达量却并未出现急剧的变化, 推测 *SBNO1* 在免疫反应中可能与 *Numb* 与

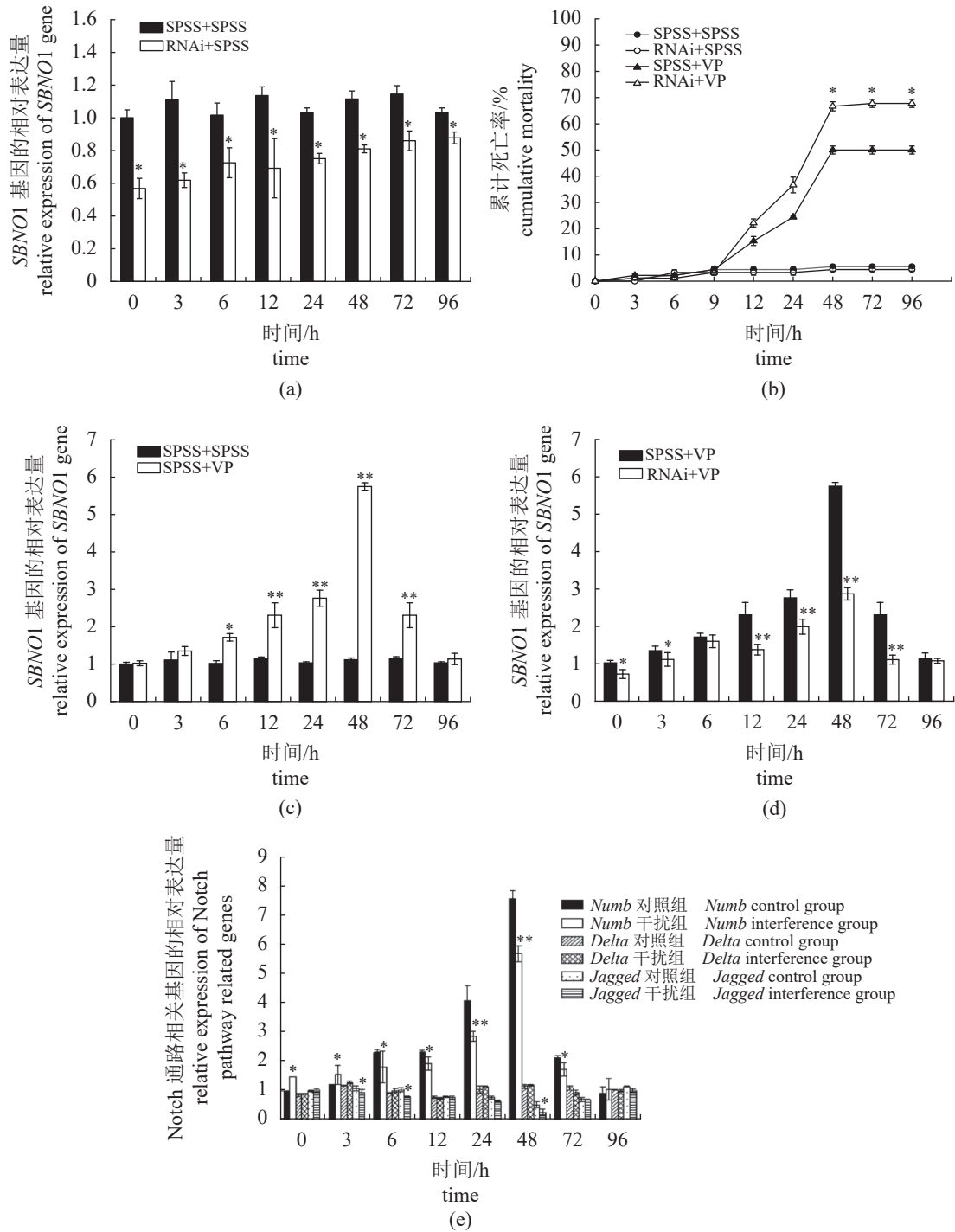


图 5 RNA 干扰下感染副溶血性弧菌脊尾白虾 Notch 信号通路相关基因表达

*.与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), **.与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$)

Fig. 5 Expression characteristic of Notch signal pathway related genes infected by *V. parahaemolyticus* in *E. carinicauda* under RNA interference

*. significant difference compared to the control group ($P<0.05$), **. extremely significant difference compared to the control group ($P<0.01$)

Delta 之间存在的相互作用有关, 而与 *Jagged* 无关。

综上所述, *SBNO1* 介导的 Notch 信号通路可能在免疫调节中发挥重要的作用, 然而基因间如何相互作用进行免疫调节有待后续研究, 敲除

SBNO1 以及免疫共沉淀分析 *SBNO1* 与 *Numb* 以及 *Delta* 之间的相互作用, 可进一步阐明上述机制。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Sega F V D, Fortini F, Aquila G, *et al.* Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1130.
- [2] 付亚娟, 叶枫, 吕卫国, 等. Notch信号通路的研究现状[J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4(5): 447-450.
- Fu Y J, Ye F, Lü W G, *et al.* Recent researches on the Notch signaling pathway[J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2007, 4(5): 447-450 (in Chinese).
- [3] Kamińska A, Pardyak L, Marek S, *et al.* Notch signaling regulates nuclear androgen receptor AR and membrane androgen receptor ZIP9 in mouse Sertoli cells[J]. *Andrology*, 2020, 8(2): 457-472.
- [4] Watanabe Y, Miyasaka K Y, Kubo A, *et al.* Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (*Sbno1*) to synergistically activate *Cdx2* during specification of the trophectoderm[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46135.
- [5] Takano A, Zochi R, Hibi M, *et al.* Expression of *strawberry notch* family genes during zebrafish embryogenesis[J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(6): 1789-1796.
- [6] 梁俊平, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾生物学特性与人工繁育的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(17): 109-116.
- Liang J P, Li J, Liu P, *et al.* Research progress of biological characteristics and artificial breeding of ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(17): 109-116 (in Chinese).
- [7] Ma H K, Gao H, Xu W Y, *et al.* Cloning and functional study of fatty acid-binding protein-like gene of the ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Aquaculture International*, 2020, 28(4): 1517-1530.
- [8] 窦全伟, 李吉涛, 刘萍, 等. 脊尾白虾血蓝蛋白大亚基基因的克隆及表达分析[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(1): 86-93.
- Dou Q W, Li J T, Liu P, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of hemocyanin subunit gene in *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(1): 86-93 (in Chinese).
- [9] Apitanyasai K, Chang C C, Ng T H, *et al.* *Penaeus vannamei* serine proteinase inhibitor 7 (*LvSerpin7*) acts as an immune brake by regulating the proPO system in AHPND-affected shrimp[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 106: 103600.
- [10] 陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp_{AHPND}*)的定量分析[J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93-100.
- Chen M M, Dong X, Qiu L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp_{AHPND}*) in infected *Litopenaeus vannamei*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93-100 (in Chinese).
- [11] Sang X X, Dong J, Chen F M, *et al.* Molecular cloning and immune function study of an oyster *IκB* gene in the NF-κB signaling pathway[J]. *Aquaculture*, 2020, 525: 735322.
- [12] 牛春雪, 马蕾, 薛海波, 等. Notch1信号通路参与自身免疫性疾病发病机制的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2020, 40(1): 67-71.
- Niu C X, Ma L, Xue H B, *et al.* Research progress of Notch1 signaling pathway involved in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. *Current Immunology*, 2020, 40(1): 67-71 (in Chinese).
- [13] 王艳桥, 郑自力, 雷欣, 等. Notch信号通路配体DLL4通过促进M1型巨噬细胞分化加重糖尿病肾病免疫损伤[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(11): 926-934.
- Wang Y Q, Zheng Z L, Lei X, *et al.* Notch signaling pathway liand DLL4 aggravates diabetic nephropathy immune damage by promoting M1 macrophage differentiation[J]. *Immunological Journal*, 2020, 36(11): 926-934 (in Chinese).
- [14] Ryoyama N, Imai H, Terashima T, *et al.* *Sbno1* is required for growth of the cerebral cortex during embryogenesis[J]. *Neuroscience Research*, 2011, 71 Suppl 1: e123.
- [15] 黄林明, 刘东强. Notch信号通路抑制剂DAPT对白血病干细胞的分化和增殖作用[J]. *智慧健康*, 2020, 6(11): 42-46.
- Huang L M, Liu D Q. Differentiation and proliferation of primary leukemia stem cells by Notch signaling pathway inhibitor DAPT[J]. *Smart Healthcare*, 2020, 6(11): 42-46 (in Chinese).
- [16] 刘兆国, 朱智杰, 周梁, 等. Notch信号通路与肿瘤研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(8): 1045-1048.
- Liu Z G, Zhu Z J, Zhou L, *et al.* On Notch signaling pathway and tumor[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, 28(8): 1045-1048 (in Chinese).
- [17] 马菁昌, 时光旭, 王莉, 等. Notch信号通路在神经胶质瘤中的作用与机制研究进展[J]. *临床神经外科杂志*, 2020, 17(4): 477-480.
- Ma J C, Shi G X, Wang L, *et al.* Role and mechanism of

- Notch signaling pathway in glioma[J]. *Journal of Clinical Neurosurgery*, 2020, 17(4): 477-480 (in Chinese).
- [18] Petersen P H, Tang H, Zou K, *et al.* The enigma of the numb-notch relationship during mammalian embryogenesis[J]. *Developmental Neuroscience*, 2006, 28(1-2): 156-168.
- [19] Gonulcu S C, Unal B, Bassorgun I C, *et al.* Expression of Notch pathway components (Numb, Itch, and Siah-1) in colorectal tumors: a clinicopathological study[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2020, 26(26): 3814-3833.
- [20] Tanigaki K, Tsuji M, Yamamoto N, *et al.* Regulation of $\alpha\beta/\gamma\delta$ T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling[J]. *Immunity*, 2004, 20(5): 611-622.
- [21] Saito T, Chiba S, Ichikawa M, *et al.* Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development[J]. *Immunity*, 2003, 18(5): 675-685.

Cloning and immunological function of *SBNO1* gene in *Exopalaemon carinicauda*

CHEN Hao¹, DAI Qin¹, GAN Yamei¹, GAO Huan^{1,2,3}, YAN Binlun^{1,2,3}, LAI Xiaofang^{1,2,3*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment,

Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222005, China;

3. Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to explore the immune function of *Strawberry Notch1* gene (*SBNO1*) in crustaceans, the full length of *SBNO1* gene cDNA sequence, phylogeny, tissue distribution, the expression of *SBNO1* and related genes in Notch signaling pathways by *Vibrio parahaemolyticus* (VP) injection were studied in this paper. The results showed that the cDNA sequence of *SBNO1* was 4 353 bp, encoding a total of 1 380 amino acids. The predicted molecular weight of protein is 158.91 ku and theoretical isoelectric point is 4.8. According to the RT-qPCR analysis, it can be found that *SBNO1* was expressed in all tested tissues, among which hepatopancreas had the highest level and gonad followed. Furthermore, after RNAi interference, compared with the non-inference group, the death rate of the inference group injected with VP was significantly higher. The transcription of *SBNO1*, *Numb* and *Delta* in the hepatopancreas in Notch signaling was obviously influenced by VP. However, there was no significant difference in the expression of *Jagged*. In the group injected with VP, the expression levels of *SBNO1* and *Numb* increased first and then decreased over time, while the expression of *Delta* decreased first and then increased. The results indicate that Notch signaling pathway plays an important role in the immunity of *E. carinicauda* by VP injection. This study helps to clarify the mechanism of invertebrate innate immunity and provides a theoretical basis for molecular breeding of *E. carinicauda*.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; *Strawberry Notch1*; *Vibrio parahaemolyticus*; RNA inference

Corresponding author: LAI Xiaofang. E-mail: lai.xiaofang@163.com

Funding projects: Jiangsu Province Graduate Research and Practice Innovation Project (KYCX20_2884); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD); National Key R & D Program of China (2018YFD0901302)