

三疣梭子蟹脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白 基因的克隆及表达模式分析

张 樱, 金 珊*, 赵青松, 王国良, 余 开, 王春琳

(宁波大学 生命科学与生物工程学院教育部应用海洋生物重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 脂多糖- β -1, 3-葡聚糖结合蛋白(LGBP)作为一种模式识别受体在甲壳动物的先天免疫中占有重要地位。利用 SMART RACE 技术, 从三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 血细胞中克隆得到一条 LGBP 基因。该基因 cDNA 序列全长为 1 378 bp, 包括 1 095 bp 的开放阅读框(ORF), 共编码 365 个氨基酸, 在基因的 5'端还含有 138 bp 的非编码区(UTR), 3'端含有 144 bp 的 UTR。预测的成熟肽相对分子质量为 39825.24 k, 等电点为 4.49。同时, 用生物信息学方法对该基因的序列和二级结构进行了初步分析。RT-PCR 结果显示: LGBP 基因在被检测的组织, 包括血细胞、肝胰腺、心脏、鳃和肌肉中都有表达。用金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 刺激三疣梭子蟹后, 发现在实验 48 h 内, 混合细菌刺激组血细胞中 LGBP 基因的表达量明显高于生理盐水对照组, 推测该基因在抵抗细菌感染的免疫过程中发挥着积极的作用。

关键词: 三疣梭子蟹; LGBP; SMART RACE; RT-PCR

中图分类号: Q78; Q959.223.63

文献标志码: A

文章编号: 0254-5853-(2010)06-0587-08

Cloning and expression pattern analysis of a lipopolysaccharide -and β -1,3-glucan-binding protein in *Portunus trituberculatus*

ZHANG Ying, JIN Shan*, ZHAO Qing-Song, WANG Guo-Liang, YU Kai, WANG Chun-Lin

(Faculty of Life Science and Biotechnology of Ningbo University, Key Laboratory of Applied Marine Biological by the
Ministry of Education, Ningbo 315211, China)

Abstract: The lipopolysaccharide -and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) is a pattern recognition receptor, which is fundamental for the innate immune response of crustaceans. A LGBP gene was cloned from the haemocytes of *Portunus trituberculatus* using SMART RACE methods. The full-length LGBP cDNA (1 378 bp) had a 1 095 bp open reading frame encoding a protein of 365 amino acid residues including a 16 amino acid residues signal peptide, a 138 bp 5' untranslated region (UTR) and a 144 bp untranslated region in the 3' UTR with a 29 bp polyA tail. The calculated molecular mass of the mature protein (349 amino acid residues) is 39,825.24 with an estimated pI of 4.49. The gene sequence and secondary structure of LGBP were analyzed by bio-informatics. Additionally, a Glyco_hydro_16 domain was identified. The expression of *P. trituberculatus* in various tissues were detected through RT-PCR methods. The results showed that the LGBP gene expressed in all the tissues detected, including haemocytes, hepatopancreas, heart, gills and muscle. In response to the challenge of *Staphylococcus aureus* and *Vibrio alginolyticus*, the LGBP gene expression in haemocytes of the group challenged with mixed bacteria were higher than the control group within 48 h. It suggested that the LGBP gene plays an active role in immunologic process against bacterial infection.

Key words: *Portunus trituberculatus*; LGBP; SMART RACE; RT-PCR

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 俗称白蟹, 是我国重要的出口创汇品种之一。近几年随着
养殖规模的不断扩大, 养殖病害也日益严重。目前, 三疣梭子蟹的病害防治仍是以药物为主, 这不仅易

收稿日期: 2010-03-09; 接受日期: 2010-09-16

基金项目: 教育部创新团队项目(IRT0734); 宁波市科技局项目(2008A610073; 2008C11001); 宁波大学研究生科研创新基金资助

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

第一作者简介: 张樱 (1985—), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生物学和水产动物病害防控研究

造成环境污染,同时也危害着人类的健康。因此,对环境无污染且效果良好的免疫防治是今后蟹类病害防治的研究热点也是发展的方向。Medzhitov & Janeway(1997)提出了模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs)和病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的概念,论证了 PRRs 的模式识别作用赋予免疫系统识别“自己”与“非己”的能力,初步揭示了先天免疫的重要免疫生物学意义。三疣梭子蟹由于没有获得性免疫,因此其先天免疫的“非己”识别更为重要,该阶段对于其免疫应答的发生与否具有决定性的作用(Yao et al, 2006)。

目前,在无脊椎动物中已确立了多种模式识别受体,如肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)、革兰氏阴性菌结合蛋白(gram negative bacteria binding proteins, GNBPs)、脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白(lipopolysaccharide- β -1,3-glucan binding protein, LGBP)、TOLL 样受体(toll like receptors, TLRs)、凝集素(lectin)等。据 Du (2007)报道,脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白是一种多功能的血浆因子,它能够识别革兰氏阴性菌的细胞壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)和真菌的细胞壁成分 β -1,3-葡聚糖(β -1,3- glucan, β G)。在异物侵入机体时,该模式识别蛋白不仅能够促进血淋巴细胞的吞噬、黑化、包裹、凝集等作用,还可以激活蛋白酶级联反应,引起抗菌肽的合成 (Yu et al, 2002)。最近已从通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)、南美兰对虾(*Penaeus stylirostris*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等水产动物中获得脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白,并已证明其与革兰氏阴性菌结合能力很强 (Su et al, 2004)。

本研究利用 SMART RACE 技术,从受金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)刺激后的三疣梭子蟹血细胞中成功克隆到一种脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白 (GenBank 注册号为 GU328036)并进行了生物信息学分析,通过 RT-PCR 方法检测了 LGBP 基因在三疣梭子蟹组织中的分布,同时研究了血细胞中 LGBP 基因受混合细菌刺激后表达量的变化。该基因的获得对进一步研究三疣梭子蟹的免疫识别模式及探讨三疣梭子蟹的免疫防御机理具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验用三疣梭子蟹购自宁波庄市梭子蟹暂养场,同一批个体,蟹体健康、附肢完整,体重 100~160 g,壳长 12~14 cm,于实验室暂养备用。

1.1.2 主要试剂

Unizol 试剂购于上海博星; PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthseis Kit, pMD18T, ExTaq, LA Taq 购于 TaKaRa 公司; SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、氯仿、异丙醇、DEPC 水等为上海生工产品。

1.1.3 引物

实验中所用引物通过 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海英骏公司合成,见表 1。

表 1 实验中应用的引物及序列
Tab. 1 Primers used in the experiments

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
Lgf1	CCCGTGCATGATCTTCGA
Lgr1	ACTTCTGGTCAAGGGCG
GSP31	CCACCTTGTTTCATAAAGCCGC
GSP32	TACCTGGCGTGTAGACTGGACC
GSP51	CGGTCGCATCCATAGTTCTGGTTGG
GSP52	CGTGGCATCTTGGCCCGAACCTC
Adaptor	GGCCACGCGTCGACTAGTACT
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Lrt1	TTCGGAGACCCAGTCAACATC
Lrt2	TTTCAGCGATGCCGTCAGG
actinF	CCTGACTGCCTACCTCACCAA
actinR	ATGCCGACAGATTCCATACCC

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取

选取健康三疣梭子蟹若干只,用浓度均为 10⁷ cells·mL⁻¹ 的金黄色葡萄球菌和溶藻弧菌等比例混合菌悬液注射蟹,每只蟹注射 20 μ L。刺激 6 h 后用无菌注射器(10 mL)于蟹第三步足基关节处抽取血淋巴,将血淋巴液与抗凝剂 (EDTA·Na₂ 10 mmol/L, NaCl 450 mmol/L, KCl 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L)1:1 混合均匀后,4 000 r/min, 4℃ 离心 10 min,得到血细胞沉淀。每 50~100 mg 血细胞中加入 1 mL Unizol 试剂,经匀浆后按照试剂说明书提

取总 RNA。提取的总 RNA 用超微量核酸蛋白测定仪及琼脂糖凝胶电泳确认完整性后, -80°C 保存备用。

1.2.2 SMART cDNA 的合成

取 $5\text{ }\mu\text{g}$ 三疣梭子蟹血细胞的总 RNA, 以 Oligo dT 为引物, 用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 反转录 SMART cDNA。

1.2.3 保守序列的克隆

根据 GenBank 中相近物种 LGBP 核酸序列的保守区合成同源引物 Lgf1 和 Lgr1 (表 1)。以三疣梭子蟹的血细胞 SMART cDNA 为模板, $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系进行 PCR 扩增: 超纯水 $15.8\text{ }\mu\text{L}$, SMART cDNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{PCR buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 (25 mmol/L) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP (2.5 mmol/L) $2.0\text{ }\mu\text{L}$, Lgf1 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, Lgr1 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, *ExTaq* ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为: 94°C 4 min; 94°C 40s, 54°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收, 再经 pMD18T 连接和大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞转化后, 涂于含氨苄青霉素 (终浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的 LB 琼脂平板上, 37°C 过夜培养, 挑取单菌落, 筛选阳性克隆产物后送上海英骏公司测序。

1.2.4 3' RACE 扩增

网上比对本实验获得的 LGBP 部分序列与其他物种 LGBP 的同源性, 根据测得的序列设计正向内引物 GSP31 和外引物 GSP32, 分别与反向接头引物 AP 配对, 以 3' RACE Adaptor 为引物合成的第一链 cDNA 作为模板, 进行巢式 PCR, 反应体系以及产物的回收、测序方法同 1.2.3 段所述。

1.2.5 5' RACE 扩增

通过克隆得到的基因片段设计两条特异性反向引物 GSP51 和 GSP52, 按照 Clontech 的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 进行 5' 端的扩增。产物的回收、测序方法同 1.2.3 段所述。

1.2.6 生物信息学分析

序列的拼接用 DNASTar 软件完成。利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 工具进行数据库基因序列的相似性及同源性查找, 多序列比对用 Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) 进行分析。信号肽和蛋白质性质的预测利用 Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/>) 在线软件进行。N-糖基化位点和磷酸化位点的预测分别用 NetGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlyc/>) 和 NetPhos2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)

完成。结构域的预测在 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 网站上进行。进化树的构建使用 MEGA4.1 软件。应用 DNASTar 的 Protean 模块来分析 LGBP 的二级结构, 其中运用 Chou-Fasman 和 Garnier-Robson 法预测蛋白质分子中的 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角以及无规卷曲等二级结构区域; 用 Karplus-Schulz 法预测蛋白质柔韧性; Kyte-Doolittle 法预测蛋白质的亲水区和疏水区; Emini 法预测特定氨基酸形成蛋白质表面区域的可能性。

1.2.7 三疣梭子蟹 LGBP 基因的表达模式分析

1.2.7.1 RT-PCR 分析 分别取正常三疣梭子蟹血细胞、肝胰腺、心脏、鳃和肌肉等组织提取总 RNA, 用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录成 cDNA 第一链后, 利用优化的 PCR 条件扩增内标基因 β -actin (所用引物为 actinF 和 actinR) 和 LGBP 基因 (所用引物为 Lrt1 和 Lrt2), PCR 反应体系同 1.2.3 段所述。 β -actin 基因的扩增条件为: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 56°C 40 s, 72°C 1 min, 28 个循环; 72°C 10 min。LGBP 基因的扩增条件为: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 56°C 40 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。

1.2.7.2 微生物刺激后 LGBP 基因的表达定量研究 取不同时间混合细菌刺激组 (浓度均为 $10^7\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的金黄色葡萄球菌和溶藻弧菌等比例混合菌悬液) 和生理盐水对照组的三疣梭子蟹血细胞 cDNA, 通过 β -actin 基因调整各样品模板浓度, 在相同模板量的条件下进行 RT-PCR 扩增, PCR 反应体系和扩增条件同 1.2.7.1 段所述。RT-PCR 均重复三次, 电泳后用 Quantity One 4.6.2 软件分析电泳图片, 求得的 LGBP 基因与 β -actin 基因 PCR 产物量的比值用柱形图表示, 并用此值代表 LGBP 基因 mRNA 的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

提取的三疣梭子蟹血细胞总 RNA $\text{OD}_{260/280}$ 在 1.9 左右, 再经琼脂糖凝胶电泳检测证实获得的总 RNA 完整性较好, 质量较高, 可进行后续实验。

2.2 保守序列的克隆

利用同源引物通过 PCR 从三疣梭子蟹血细胞 SMART cDNA 中克隆得到一条长约 800 bp 左右的核酸片段 (图 1A)。BLAST 结果显示, 这段序列与其他物种的 LGBP 有很高的相似性, 证实为 LGBP 基因片段。

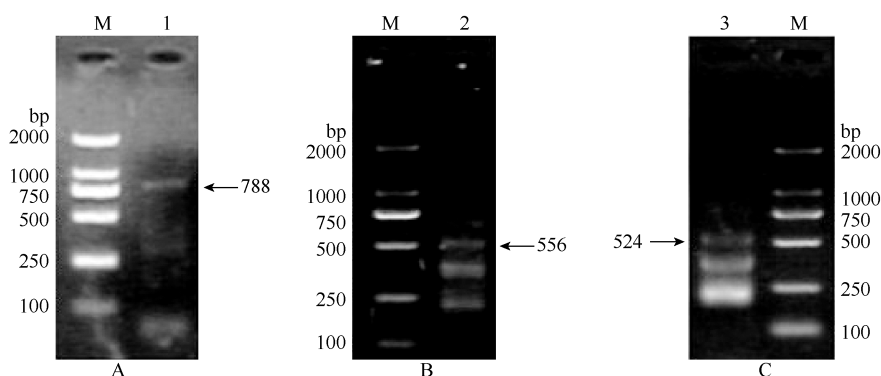


图 1 三疣梭子蟹血细胞 LGBP 的基因克隆

Fig. 1 Gene cloning of LGBP in haemocytes from *Portunus trituberculatus*

M: DNA 相对分子质量标准 DL2000; (A),1: 保守序列扩增结果; (B),2: 3'RACE 扩增结果; (C),3: 5'RACE 扩增结果。

M: DNA marker DL2000; (A),1: Amplification of conserved sequence; (B),2: Amplification of 3'RACE; (C),3: Amplification of 5'RACE.

2.3 3' RACE 扩增

以 3' RACE Adaptor 为引物合成的第一链 cDNA, 经巢式 PCR 后获得一条长约 550 bp 的目的条带(图 1B), 经回收、测序和 BLAST 分析后, 发现该序列与其他物种的 LGBP 有较高的相似性, 并且有 127 bp 与预先得到的保守序列完全重叠, 因此, 确定为三疣梭子蟹 LGBP 基因的 3'端序列。

2.4 5' RACE 扩增

根据 5'RACE 操作流程, 两轮 PCR 后获得预期目的条带(图 1C), 回收、测序后得 524 bp 的序列。经 BLAST 分析表明, 该片段与其他物种的 LGBP 有较高的相似性, 且有 227 bp 与保守序列完全重叠, 因此, 证实为三疣梭子蟹 LGBP 基因的 5'端序列。

2.5 LGBP 基因的生物信息学分析

将扩增得到的保守序列、5'端和 3'端序列进行拼接, 去除共有序列即三疣梭子蟹 LGBP 基因的完整 cDNA 序列(图 2)。该 cDNA 序列全长为 1 378 bp (GenBank 注册号为 GU328036), 其中包含 1 095 bp 的开放阅读框(ORF), 在基因的 5'端含有 138 bp 的非编码区(UTR), 3'端含有 144 bp 的 UTR, AATAAA 为加尾信号。这一基因编码的蛋白质由 365 个氨基酸组成, 其中前 16 个氨基酸为信号肽序列。预测的成熟肽相对分子质量为 39825.24 k, 等电点为 4.49。氨基酸序列分析表明, 三疣梭子蟹 LGBP 含有两个可抑制结节形成的细胞黏附肽 RGD(Arg- Gly-Asp)基元; 两个潜在的 N-糖基化位点 NRS 和 NDS; 一个激酶 C 的磷酸化位点 SAR; 从蛋白 78 位至 280 位氨基酸为 Glyco_hydro_16 结构域。二级结构预测表明, 三疣梭子蟹的脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白结构中既有 α 螺旋, 也有 β 折叠, 此外还有一定数

量的 β 转角以及无规卷曲, 因此在分类结构上属于 α + β 的混合型蛋白(图 3)。

将获得的三疣梭子蟹 LGBP 基因序列登录 GenBank(注册号: GU328036), 通过多序列比对发现核苷酸及氨基酸序列与中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*(FJ605172.1)、中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*(AY871267.1)、克氏原螯虾 *Procambarus clarkii*(FJ410910.1)、细角滨对虾 *Litopenaeus stylirostris*(AF473579.1)、凡纳滨对虾 *L.vannamei*(EU102286.1)、罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*(GQ228481.1)和通讯螯虾 *P.leniusculus*(AJ250128.1)的同源性分别为 74%、71%、71%、71%、71%、71%、69%和 68%, 相对应的氨基酸序列同源性分别为 72%、69%、70%、67%、67%、71%和 63%。

利用 MEGA4.1 软件进一步对几种无脊椎动物的脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白和 β -1,3-葡聚糖结合蛋白(β -1,3-glucan binding protein, β GBP)氨基酸序列进行了分子系统学分析, 将氨基酸序列转化成遗传距离, 用 N-J 方法进行聚类分析, 从系统进化树上(图 4)可以看出: 三疣梭子蟹的 LGBP 与细角滨对虾的 LGBP 有相同的起源, 聚合为一个独立的分支, 与中华绒螯蟹 (*E.sinensis*)、通讯螯虾 (*P.leniusculus*) 的进化距离也较近; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的 β GBP 与中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、墨吉明对虾 (*F.merguiensis*) 的 LGBP 也具有显著同源性。

2.6 三疣梭子蟹 LGBP 基因的表达模式分析

RT-PCR 分析 LGBP 基因在三疣梭子蟹不同组织中的表达, 结果发现在血细胞、肝胰腺、心脏、

GAGAAGCGAGAGCTCTGCTCCTCCGTCACACCACCGGTCTTATCAACGTAACGAAAGCCTACATCTTG	69
TACCAATGCCACTGGTACATCACACCGTCACTACCACCTCCTCAGTGCTGCGCAGGTTATCAGGTCAAG	138
ATGCAGGCCGCCCTATGTGCATTACTCCTAGTCTCGGGAGCCCTCGTGACAGCTGCTGGATCCCGCC	207
<u>M Q A A L C A L L L V S G A L A A D V L D P A</u>	23
TCCTGCACTGCCTTTCCTTGTCTGATCTTCGACGAGGAATTCAACTCTTTTGACCATGATACCTGGGAA	276
S C T A F P C L I F D E E F N S F D H D T W E	46
CACGAGATCACAATGTCCGGCGGTGGGAAGTGGGAATTTCAAGCTTATCTCAACAACAGAAGTGTGAGC	345
H E I T M S G G G N W E F Q A Y L N <i>N R S</i> V S	69
TACACCCGCGACTCCACCTTGTTTCATAAAGCCGCAACTGATGAGTGATTGGAAGGCGAGGACTTCCTG	414
Y T R D S T L F I K P Q L M S D W K G E D F L	92
AGCAGCGCGGAGCTCAACCTGTGGGAATGAACGGACGTGGCGATGTGTGCACCGCAACCAGAAGTAT	483
S S G E L N L W G M N G R G D V C T A N Q N Y	115
GGATGCGACGATTTCGGAGACCCAGTCAACATCATCAATCCCATCATGAGCGCCAGGCTTCGATCCCTC	552
G C D R F G D P V N I I N P I M <u>S...A...R</u> L R S L	138
CCGAGCTTCGCCTTCAGGTATGGACGATTGAGGTTCGGGCCAAGATGCCACGTGGAGACTGGCTGTGG	621
P S F A F R Y G R I E V R A K M P R G D W L W	161
CCGGCCGTGTGGTTGCTGCCGAATACTTACCTACGGACTGTGGCCAGCCAGCGTGAAATTGACATT	690
P A V W L L P Q Y F T Y G L W P A S G E I D I	184
CTGGAATCAAGGGTAATGACGACTACGGTGACCTGAGTAACAGAAATGCCGGCACCACCTTCACTGG	759
L E S R G N D D Y G D L S N R N A G T T L H W	207
GGACCTACTGGCCTCTTAACCTTCTACGAAAAGACAATGGTTGAATACACGCCAACGACGGTTCATTC	828
G P Y W P L N F Y E K T M V E Y T A N D G S F	230
GCCGACAGCTTCATACCTGGCGTGTAGACTGGACGAGCACTGAAATTAAGGCGTATCTGGATGACGAG	897
A D S F H T W R V D W T S T E I K A Y L D D E	253
CTGAAGATAACGATCGACCCGGTCACCAACTTCTGGAACCTTGCCGGCTTGGACGACTCTATTGACAAT	966
L K I T I D P V T N F W N F A G L D D S I D N	276
CCTTGGACTTCAGGAAGCAAGATGGCGCCTTTTACCAGAAGTTCTACATCGTCATTAACCTTGTGTG	1035
P W T S G S K M A P F D Q K F Y I V I N L A V	299
GGCGGCACCGGTGGATTCTCCCTGACGGCATCGCTGAAAAGCCTTGGTCCAACGATTGCCACAAGCC	1104
G G T G G F F P D G I A E K P W S <i>N D S</i> P Q A	322
TTCCTCGACTTCTGGAACGACGTGGGAAGTGGTGCCACGTGGGAACAGGGTGAGGGCAAGATCAGC	1173
F L D F W N G R G K W L P T W E Q G E G K I S	345
GAGAAGGCAGCATTGCAAGCGGATTACATCAAAGTATGGAAGATGACTAGCTCCGAGGAATAAAGTAAT	1242
E K A A L Q A D Y I K V W K M T S S E E *	365
GAAGAATGAGCCATGGAAGGCACGCAAAACACTGTACGTTTGTGGCAGATGTTCTTCCATACATGAT	1311
TGTAAAGTAAAAACAAATAAGTAATATGATCGCCTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1378

图 2 三疣梭子蟹 LGBP 基因 cDNA 序列及其对应的氨基酸序列

Fig. 2 Complete cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of LGBP from *Portunus trituberculatus*

*表示翻译终止; 下划线表示信号肽; 阴影斜体部分为预测的 N-糖基化位点; 方框中的两个 RGD(Arg-Gly-Asp)表示细胞黏附肽; 点式下划线的 SAR 为激酶 C 的磷酸化位点。

The asterisk (*) indicates the stop of coding and the underlined amino acid sequence represents the signal peptide; Potential N-glycosylation sites are shaded and italic; Two RGD (Arg-Gly-Asp) putative cell adhesive peptides are boxed; A dotted line marks a potential kinase C phosphorylation site.

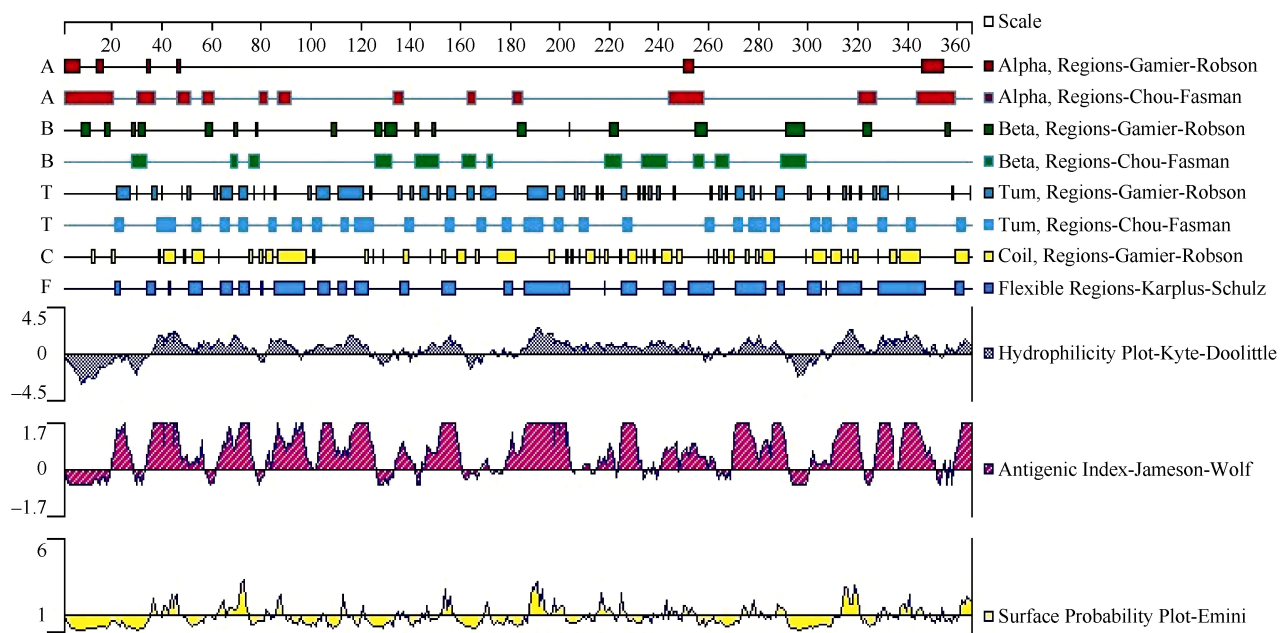


图 3 三疣梭子蟹 LGBP 的二级结构分析
Fig. 3 Prediction of secondary structure of LGBP from *Portunus trituberculatus*

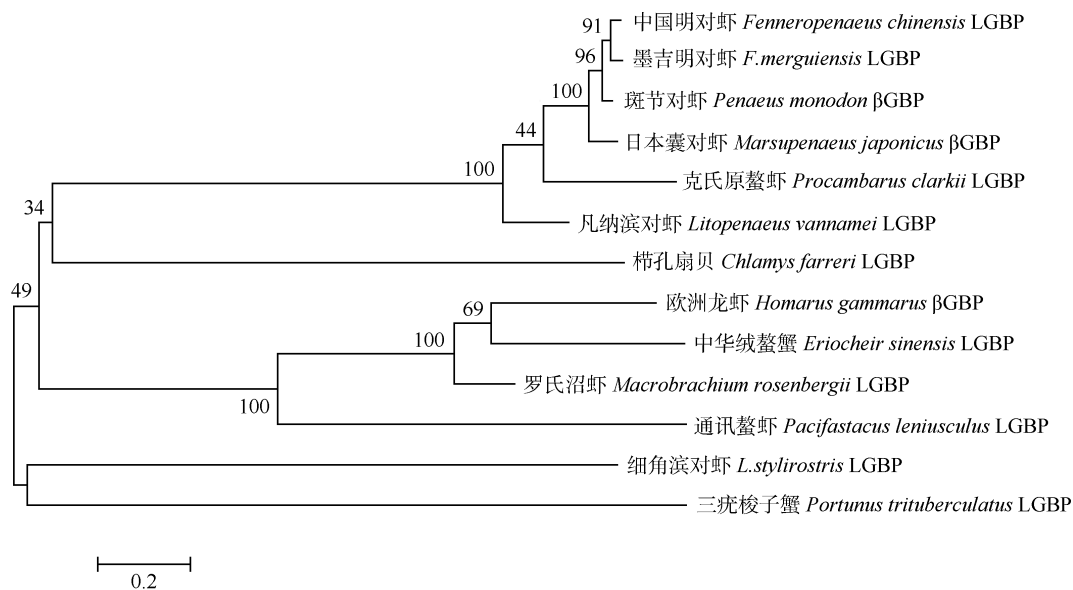


图 4 不同物种 LGBP/βGBP 氨基酸序列系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic analysis of LGBP and βGBP with different species

中国明对虾 LGBP: *Fenneropenaeus chinensis* LGBP (AAZ41363.1); 墨吉明对虾 LGBP: *F.merguensis* LGBP(ACR56806.1); 斑节对虾 βGBP: *Penaeus monodon* βGBP(AAM73871.1); 日本囊对虾 βGBP: *Marsupenaeus japonicus* βGBP (BAD36807.1); 克氏原螯虾 LGBP: *Procambarus clarkii* LGBP(ACR20474.1); 凡纳滨对虾 LGBP: *Litopenaeus vannamei* LGBP(ABU92557.1); 栉孔扇贝 LGBP: *Chlamys farreri* LGBP(AAP82240.1); 欧洲龙虾 βGBP: *Homarus gammarus* βGBP (CAE47485.1); 中华绒螯蟹 LGBP: *Eriocheir sinensis* LGBP(ACR56716.1); 罗氏沼虾 LGBP: *Macrobrachium rosenbergii* LGBP(ACT33045.1); 通讯螯虾 LGBP: *Pacifastacus leniusculus* LGBP(CAB65353.1); 细角滨对虾 LGBP: *L.stylirostris* LGBP(AAM73871.1); 三疣梭子蟹 LGBP: *Portunus trituberculatus* LGBP(GU328036, 本研究)。

鳃和肌肉中都可检测到 LGBP 基因转录本的存在,但在血细胞、肝胰腺中的表达量明显高于心脏、鳃和肌肉(图 5 和图 6)。受混合细菌刺激后不同时间内三疣梭子蟹血细胞 RT-PCR 分析发现, LGBP 基因的

表达量在短时间(6 h)上调比较明显,随后略有下降,整体变化幅度不大;生理盐水对照组的表达量在 6 h 时也明显上调,随后维持在较低水平,72 h 时又有所恢复,变化幅度较大(图 7 和图 8)。

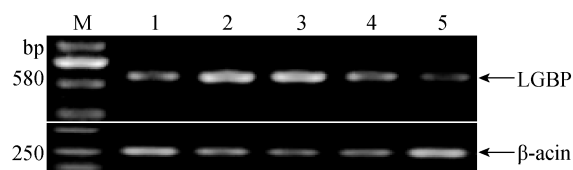


图 5 LGBP 基因在三疣梭子蟹各组织中的表达 (β -actin 基因作内参)

Fig. 5 Expression pattern of LGBP gene in different tissues from *Portunus trituberculatus* (β -actin gene was used as control)

M: DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1: 鳃; 2: 肝胰腺; 3: 血细胞; 4: 心脏; 5: 肌肉。

M: DNA marker DL2000; Samples from left to right (1-5): Gills, hepatopancreas, haemocytes, heart, muscle.

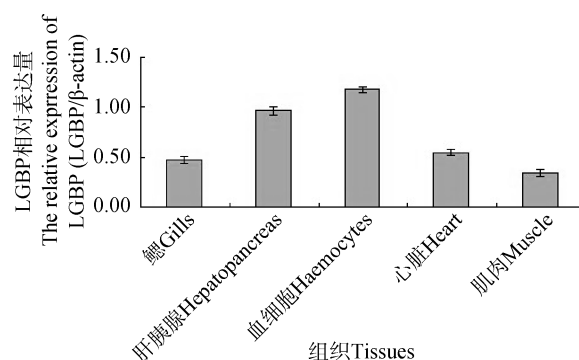


图 6 RT-PCR 检测三疣梭子蟹不同组织中 LGBP 的表达差异

Fig. 6 RT-PCR analysis of LGBP gene expression in different tissues from *Portunus trituberculatus*

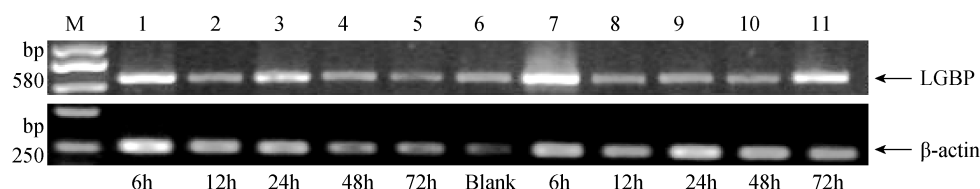


图 7 三疣梭子蟹血细胞 LGBP 在混合细菌刺激后的 RT-PCR 电泳图谱 (β -actin 基因作内参)

Fig. 7 Electrophoregrams of LGBP gene in haemocytes from *Portunus trituberculatus* after bacterial challenge by RT-PCR methods (β -actin gene was used as control)

M: DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1~5: 混合细菌刺激组; 6: 空白; 7~11: 生理盐水对照组。

M: DNA marker DL2000; Samples from left to right: 1-5: Group challenged with mixed bacteria; 6: Blank; 7-11: Control group.

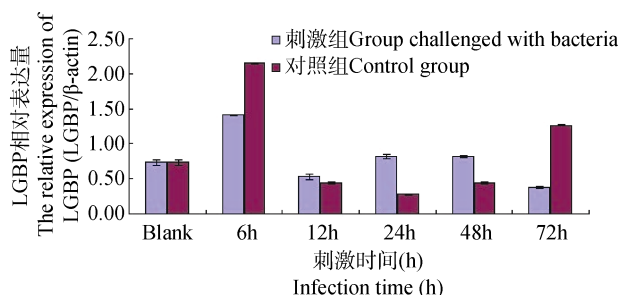


图 8 RT-PCR 检测混合细菌刺激后三疣梭子蟹血细胞中 LGBP 基因的表达差异

Fig. 8 RT-PCR analysis of LGBP gene in haemocytes from *Portunus trituberculatus* after bacterial challenge

3 讨论

无脊椎动物由于没有获得性免疫, 因此模式识别受体在激活先天免疫中发挥着重要的作用。本研究从三疣梭子蟹血细胞中克隆得到一种模式识别受体基因——脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白基因 (LGBP), 通过 BlastP 的网上比对发现, 除了与中华绒螯蟹 (ACR56716.1)、细角滨对虾 (AAM73871.1) 等虾类的脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白相似性均在 60% 以上外, 三疣梭子蟹的 LGBP 还与 β GBP、

GNBP 等模式识别蛋白具有相似性。其中与斑节对虾 (AAM73871.1) 的 β GBP 相似性为 69%, 与白蚁 (*Nasutitermes pluvialis*) (AAZ08487.1) 的 GNBP 相似性也达到了 51%。这种高度相似性说明这类模式识别受体在无脊椎动物中具有很高的保守性, 推测其功能可能也较为相似。此外, 氨基酸序列分析发现三疣梭子蟹 LGBP 中具有两个 RGD 基元。据资料显示, RGD (Arg-Gly-Asp) 是细胞外基质及体内多种黏连蛋白分子所共有的细胞黏附和分子识别位点, 许多整合蛋白 (integrin) 能够识别并结合 RGD, 凡纳滨对虾 (ABU92557.1) 的 LGBP、斑节对虾 (AAM73871.1) 的 β GBP 中就包含这种整合蛋白结合位点 (Cheng et al, 2005; Kallaya et al, 2002; Ruoslahti, 1996)。Liu (2005) 研究中国对虾 (AY871267.1) 的模式识别蛋白后推测当 LGBP 与 LPS 或 β G 结合后, 构像发生变化, 通过 RGD 基元与血细胞膜上的整合蛋白相结合, 然后经一系列的信号转导, 启动胞内的各种免疫反应, 行使免疫功能。由此看来, LGBP 不是膜蛋白, 而是一种存在于胞外基质中的蛋白。另在通讯螯虾 (CAB65353.1)、日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* (ABY89089.1) 等

甲壳动物 LGBP 中发现构成葡聚糖酶中水解 β -1,3 和 β -1,4 糖苷键活性中心的四个普遍存在的保守氨基酸残基(Lee et al, 2003; Lin et al, 2008), 它们在三疣梭子蟹 LGBP 成熟肽中的位置分别是 W 176、E 181、I 182、D 183。

从基因表达特点看, Zhao et al (2009)研究发现, LGBP 基因在中华绒螯蟹 (ACR56716.1)的血细胞、鳃、肠、肌肉、肝胰腺和胃中均有表达, 且在血细胞中的表达量最高, 在肝胰腺和胃中的表达量则较低; 但 Yeh et al(2009)研究发现, 罗氏沼虾 (ACT33045.1)的 LGBP 基因主要表达于肝胰腺, 在血细胞和上皮细胞中的表达量很低。本研究结果显示, LGBP 基因在三疣梭子蟹血细胞和肝胰腺中的表达量较高, 在心脏、鳃和肌肉中相对较低。经混

合细菌和生理盐水刺激后, 血细胞 LGBP 基因的表达量在 6 h 时均明显上调, 作者推测这可能与梭子蟹的应激性反应有关。随后 LGBP 基因的表达量略有下降, 并维持在一定水平, 但实验 48 h 内, 混合细菌刺激组的表达量明显高于生理盐水对照组, 说明 LGBP 基因表达与细菌刺激有一定的相关性, 提示该基因在抵抗细菌感染过程中发挥着积极的作用。实验 72 h 时细菌刺激组的表达量显著下降, 作者认为这与溶藻弧菌是三疣梭子蟹的致病菌, 此时已造成三疣梭子蟹主要组织细胞的损伤有关, 从而影响了 LGBP 基因的表达, 这一点也从对实验蟹解剖观察后得到证实。至于 72 h 时生理盐水对照组表达量上升, 这可能与三疣梭子蟹的个体差异有关。

参考文献:

- Cheng W, Liu CH, Tsai CH, Chen JC. 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunol*, **18**: 297-310.
- Du XJ. 2007. Pattern Recognition and Effectors of Innate Immunity in Chinese Shrimp(*Fenneropenaeus chinensis*) [D]. Ph.D. thesis, Shandong University. [杜欣军. 2007.中国明对虾先天免疫的模式识别与效应分子. 山东大学博士论文.]
- Kallaya S, So YL, Kenneth S. 2002. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Dev Comp Immunol*, **26**: 237-245.
- Lee SY, Wang R, Soderhall K. 2003. A lipopolysaccharide -and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *J Biol Chem*, **275**(2): 1337-1343.
- Lin YC, Baskaralingam V, Chen JC. 2008. Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Dev Comp Immunol*, **32**: 1260-1269.
- Liu FS. 2005. Study on Antimicrobial Factors and A Pattern Recognition Protein of Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Ph.D. thesis, Graduate University of Chinese Academy of Sciences. [柳峰松. 2005. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗菌因子及模式识别蛋白的研究. 博士论文.中国科学院研究生院.]
- Medzhitov R, Janeway CA. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response[J]. *Curr Opin Immunol*, **9**: 4-9.
- Ruoslahti E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins[J]. *Annu Rev Cell Biol*, **12**: 697-715.
- Su JG, Song LS, Xu W, Wu LT, Li HL, Xiang JH. 2004. cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide-and β -1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri*[J]. *Aquaculture*, **239**: 69-80.
- Yao CL, Wang ZY, Xiang JH. 2006. Crustacean haemocytes and their function in immune responses[J]. *Zool Res*, **27**(5): 549-557. [姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 2006.甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能. 动物学研究, **27**(5): 549-557.]
- Yeh MS, Chang CC, Cheng W. 2009. Molecular cloning and characterization of lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its transcription in relation to foreign material injection and the molt stage[J]. *Fish Shellfish Immunol*, **27**: 701-706.
- Yu XQ, Zhu YF, Ma C, Fabrick JA, Kanost MR. 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, **32**: 1287-1293.
- Zhao DX, Chen LQ, Qin CJ, Zhang H, Wu P, Li EC, Chen L, Qin JG. 2009. Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Comp Biochem Phys B*, **154**(1): 17-24.