

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) Pthyastatin 抗菌肽基因的克隆与表达分析*

申望 叶茂 石戈 王日昕

(海洋生物资源及分子工程实验室 浙江海洋学院海洋科学学院 舟山 316004)

提要 采用构建三疣梭子蟹血细胞全长 cDNA 文库的方法克隆了一个新型抗菌肽基因 Pthyastatin, 并用荧光定量 RT-PCR 方法, 进行 Pthyastatin 的表达研究。结果表明, Pthyastatin 前体由 16 个氨基酸残基的信号肽和成熟肽两部分组成, 其中 Pthyastatin 成熟肽有两个结构域: N 端的富含 Pro/Arg 结构域和 C 端的包含 6 个保守 Cys 残基与对虾抗菌肽 penaeidins 同源的结构域, 表明 Pthyastatin 属于对虾抗菌肽 penaeidins 家族; 荧光定量 RT-PCR 分析结果表明 Pthyastatin 在血细胞中高水平组成型表达; 致病菌副溶血弧菌诱导后 Pthyastatin 在血细胞中表达先下调、后上调, 在诱导后 24h 表达量又基本恢复到诱导前水平, 支持 Pthyastatin 在血细胞中高水平组成型表达的观点, 但致病菌诱导后表达变化机制不明。

关键词 三疣梭子蟹, 血细胞, 抗菌肽, Pthyastatin, mRNA 表达

中图分类号 Q956

无脊椎动物体液中并没有免疫球蛋白, 因此缺乏抗体介导的特异性免疫系统, 依赖先天性非特异免疫系统识别和清除入侵的微生物, 维持机体健康 (Begum *et al*, 2000)。甲壳动物是无脊椎动物中一个重要类群, 同时虾、蟹是大宗养殖品种, 有巨大经济价值, 研究甲壳动物非特异免疫机理可为甲壳动物养殖疾病防治提供理论依据和新的思路, 因此该领域一直是无脊椎动物免疫系统的研究热点。已报道的甲壳动物体液免疫相关因子主要有抗菌肽、溶菌酶、酚氧化还原酶、凝集素、脂多糖/1, 3-葡聚糖结合蛋白、细胞粘着蛋白、蛋白酶抑制剂等 (Iwanaga *et al*, 2005)。其中甲壳动物抗菌肽由于具有广谱抗细菌、抗真菌活性以及独特的作用机理, 在医学和农业上具有潜在的应用价值, 极有可能成为抗菌、抗病毒及抗肿瘤药物的新来源而备受关注 (李义等, 2006)。

甲壳动物抗菌肽根据结构和来源可大致归为三个家族 (Lee *et al*, 2003; Vazquez *et al*, 2009): (1) 对虾

抗菌肽 Penaeidins 家族: N 端富含脯氨酸, C 端含有 6 个 Cys, 形成 3 个分子内二硫键, 两个结构域的功能互补, 富含脯氨酸的 N 端结构域在锚定微生物的细胞膜中起重要作用, 而富含 Cys 的 C 端结构域则起抗菌作用; (2) Crustins 家族抗菌肽: Crustins 家族抗菌肽以其 C 端的 WAP (whey acidic protein) 结构域为标志, 与甲壳类中发现的其它富含 Cys 的抗菌肽区分开来 (如同样富含 Cys 但不含 WAP 结构域的 Penaeidins), WAP 结构域是由 8 个保守的 Cys 位点形成四个二硫键构成的一个紧密结构, 因此又被称作 4-DSC 核 (four-disulphide core); (3) 血蓝蛋白水解产生的抗菌肽: 该类型抗菌肽可能来源于蛋白水解酶对血蓝蛋白的加工, 与血蓝蛋白 C 端部分区段高度同源或完全相同, 如细角滨对虾 (*Penaeus stylirostris*) 抗菌肽 PsHct1、PsHct2, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 抗菌肽 PvHct, 淡水螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 抗菌肽 astacidin 1 等。

* 国家科技支撑计划项目, 2007BAD43B08 号; 浙江省重大科技专项重大项目, 2007C02001 号; 浙江省面上项目, 2009C32019 号; 浙江省教育厅项目, 20061141 号。申望, 讲师, E-mail: shenwangzs@163.com

通讯作者: 王日昕, 教授, E-mail: wangrixin1123@126.com

收稿日期: 2009-06-19, 收修改稿日期: 2009-08-25

抗菌肽 Hyastatin 是 Sperstad 等(2009b)从蛛形互爱蟹(*Hyas araneus*)血细胞中纯化鉴定的一种对 G+/G-菌、真菌均有抑制活性的新型抗菌肽,其 C 端结构域与对虾抗菌肽 Penaeidins 同源,也有 6 个保守的 Cys 残基,形成 3 对分子内二硫键,因此 Hyastatin 属于 Penaeidins 家族抗菌肽。本研究通过对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)血细胞全长 cDNA 文库克隆进行测序,克隆到与蛛形互爱蟹 Hyastatin 同源,但结构存在显著差异的新型 Hyastatin(命名为 Pthyastatin)抗菌肽全长 cDNA 序列,并对不同组织中 Pthyastatin 表达量差异及感染致病菌副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)后血细胞中 Pthyastatin 表达量变化进行分析,为研究 Pthyastatin 在三疣梭子蟹免疫防御反应过程的地位和作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 三疣梭子蟹血细胞全长 cDNA 文库的构建及 Pthyastatin 基因克隆

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)采自浙江舟山海域。成年雄性蟹采集后饲养于恒温水族箱(25 ℃),饲养 24h 后,以内含抗凝剂(0.45mol/L NaCl, 0.1mol/L 葡萄糖, 26mmol/L 柠檬酸, 30mmol/L 柠檬酸钠, 10mmol/L EDTA, pH 4.6; Söderhäll *et al*, 1983)的注射器从蟹肢体未硬化部位抽取血淋巴,立即离心(4 ℃, 2000g, 5min)收集血细胞,采用 TRIZOL 法提取血细胞总 RNA, mRNA 的分离按 Invitrogen 公司 FastTrack 2.0Kit 试剂盒操作手册进行,通过 poly(T)纤维素柱亲和层析,从血细胞总 RNA 中得 poly A⁺ mRNA。全长 cDNA 文库的构建按 Clontech 公司 SMART cDNA 全长文库构建试剂盒说明书进行,连接载体使用 pGEM-T easy T 载体,转化菌株为 *E. coli* (DH10B)。文库随机测序使用引物 M13F (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'),当由于 poly(A)的出现使测序效果差时改用引物 M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3')反向测序。测得的 ESTs 序列通过 BLASTX 检索 Genbank nr 蛋白数据库寻找同源基因。

1.2 三疣梭子蟹抗菌肽 Pthyastatin 的分析

1.2.1 三疣梭子蟹抗菌肽 Pthyastatin 序列分析 DNSP 4.10 分析 Pthyastatin 单倍型多态位点、核苷酸多样性、单倍型频率、单倍型多样性(Rozas *et al*, 2003); SignalP 3.0 在线分析信号肽序列(Emanuelsson *et al*, 2007); 核苷酸及氨基酸序列比对使用 Clustal W (Thompson *et al*, 1994); 等电点预测使用 ExPASy 服

务器的 Compute pI/Mw tool (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) (Bjellqvist *et al*, 1994)。

1.2.2 系统发生分析 三疣梭子蟹抗菌肽 Pthyastatin 氨基酸序列和以下抗菌肽进行序列比对(Sperstad *et al*, 2009b): 蛛形互爱蟹抗菌肽 Hyastatin (ACQ76432), 凡纳滨对虾抗菌肽 penaeidin-2 (CAA75142), penaeidin-3a1 (AAK73084), penaeidin-3d(AAK77533), PEN4-1 (ABA55000)和 penaeidin-1 (P81056), 白滨对虾(*L. setiferus*)抗菌肽 penaeidin-2d (AAK83453), penaeidin-3l (AAK83454)和 penaeidin-4d (AAK83455), 斑节对虾(*Penaeus monodo*)抗菌肽 penaeidin (AAQ05769), 南方滨对虾(*L. schmitti*)抗菌肽 PEN4-1(AAX58699)和 PEN2-1 (AAX58697), 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗菌肽 penaeidin-5-1 (AAZ79334) 和 penaeidin-3-1 (AAP33450), 细角滨对虾抗菌肽 penaeidin-2 (AAQ62565)和 penaeidin-3 (AAQ62566), 长毛明对虾(*F. penicillatus*)抗菌肽 pen3-p (ABY56821), 保罗美对虾(*Farfantepenaeus paulensis*)抗菌肽 PEN2-1 (AAX58695), 巴西美对虾(*F. brasiliensis*)抗菌肽 penaeidin (ABO93324), 小褐美对虾(*F. subtilis*)抗菌肽 penaeidin (ABO93321)。切除所有抗菌肽 C 端 Cys 富集区第一个 Cys 残基前的 N 端序列, MEGA 4.1 软件包(Kumar *et al*, 2008)中邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统树,参数设置为默认的泊松校正算法,不考虑插入/缺失位点,同时应用自举检验(bootstrap test)重抽样 500 次估计系统树中节点的自引导值(bootstrap value)。

1.3 Pthyastatin 基因表达的荧光定量 RT-PCR 分析

1.3.1 Pthyastatin 基因在三疣梭子蟹不同组织中的差异表达分析 从 5 只雄性三疣梭子蟹分别采集等量的血细胞、肌肉、肝胰脏、眼组织,按组织差别将 5 个体来源的组织合并后提取总 RNA。血细胞总 RNA 提取按 1.1 方法进行;其它组织采集后先液氮研磨,再用 TRIZOL 法提取总 RNA。分别以 4 个组织的总 RNA 为模板, oligo(dT)₁₈ 为引物,按全式金 EasyScript Reverse Transcriptase 说明书操作反转录合成 cDNA 第一链。以三疣梭子蟹核糖体蛋白 S18(RpS18)为内参基因采用荧光定量 RT-PCR 技术研究 Pthyastatin 基因在不同组织中的差异表达。RpS18 基因 RT-PCR 引物:Ptrs18-F :5'-AGG AGG AGG TTG AGA AGA TTG T-3', Ptrs18-R : 5'-GCA GCT TGG TTT CCA GGT AG-3', 扩增片段长度 141bp; Pthyastatin 基因 RT-PCR 引物: Pthya-F : 5'-CGG GAG TAG TTG GAG TCA

GTC-3', Pthya-R : 5'-CAC CTC GCA TTA CCG CTT-3', 扩增片段长度 151bp。RT-PCR 反应体系 第 1 链 cDNA 2 μ l, SYBR Premix Ex *Taq*TM(2 \times) 12.5 μ l, 上游引物 0.5 μ l (10 μ mol/L), 下游引物 0.5 μ l (10 μ mol/L), 加 9.5 μ l 去离子水至总体积 25 μ l, 复孔数均为 3。扩增条件: 95 预变性 2min; 94 变性 10s, 60 40s, 40 个循环。反应在 ABI 7500Fast 实时定量 PCR 仪上进行, 定量的数据结果采用 2^{-Ct}法(Livak *et al.*, 2001)进行分析。

1.3.2 三疣梭子蟹血细胞 Pthyastatin 基因在副溶血弧菌诱导下表达的时空差异分析 副溶血弧菌在 LB 液体培养基扩大培养后离心收集细菌, 无菌去离子水洗涤 3 次, 最后用无菌去离子水稀释到 10⁹ CFU/ml 备用。5 只雄性三疣梭子蟹(重 250—300g/只)在恒温水族箱(25)暂养 24h 后, 每只抽取 0.3ml 血淋巴, 合并后按 1.1 方法提取总 RNA, 然后每只蟹注射 50 μ l 菌液, 并在注射菌液后的 3、6、12、24h 时如前所述抽取血淋巴并提取总 RNA。实时荧光定量 PCR 分析操作按 1.3.1 进行。

```

ACTGAAAGCACGGGAGCCTCAGTACAAGCACCATGCATGTCCTTCTCTCTGGCCTGCCTCGCGGCT 68
          M H V L L L L A C L A A
GTGGGCAATGCTTACAACGCCAAGGTACCAGTCCAGGTCCTGCCAGAGAGATTTCGATACCTTCCCGGGA 137
V G N A Y N A K V P V Q V L P E R F D T F P G
AGAAATCCATCCTTGACCAGACCAGCAGTAGTGGGAGTTCAGACGCTCCAGGAAGAGTGCCACCTCAG 206
R N P S L T R P A V V G V Q T L P G R V P P Q
ACTTTACCGGGAGTAGTTGGAGTCAGTCCCTTGGTCTCCCGGGCCGCCAGGCATCACAGGCTCCGTC 275
T L P G V V G V S P L V S P G R P G I T G S V
AGGCCCTTCCAACGTCCAGGCCAATACTCGTTCACCCGCTACAACGCAGGAGACAATGCCCGGGGTAC 344
R P F Q R P G Q Y S F T R Y N C R R Q C P G Y
GAAAGCGGTAATGCGAGGTGCTGCAGGCTGTCTGGTACTGTTGCGGCAATTCCTATCCAATCCCTTAC 413
E S G N A R C C R L S G D C C G N S Y P I P Y
AAAGGCTAGAGTAAAGCAACACCTTTCATACACCAAAATGAATCTGGACCCTCCTGATGACGACACAT 482
K G *
GACCGCAGCCGACCATCTTACCTGGGAAATCCAACCTTCCACCAGATACGAGTACATCCCTGACCAC 551
CAGCACACCCTCAGCCTCCCGTGTAGCTTTCTCACTTAGCTTAGTCTACTGCGCAGGTGTACAGTTAC 620
TTGTACCCCTGCACCTGTTGATCTAATGTTGCTGTTACTGTTGCTGCTTTGTACGTGAGTTGAGA 689
GTTAATAGTGCATTCATGAGTCTTAAATGTAAAGTGATTAAGATATGTTTATGTTAATGTTGTG 758
TTTGTGTTCTGAACGTGAGCTGAGTTAGTGGTGTTTTTATTGAGTCTTAAATGTATCCCTGCATAAAG 827
GAATAAAAGAAAATAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 869

```

图 1 三疣梭子蟹 Pthyastatin 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Pthyastatin
注: 下划线示信号肽; 方框示加尾信号; 星号示终止密码子

2 结果

2.1 三疣梭子蟹血细胞全长 cDNA 文库的构建与测序
采用 Clontech 公司 SMART 技术成功构建了三疣梭子蟹血细胞全长 cDNA 文库。在测序的克隆中有 37 个克隆的核苷酸序列经 BLAST X 检索 Genbank nr 蛋白数据库发现与蛛形互爱蟹 Hyastatin 基因同源。

2.2 三疣梭子蟹 Pthyastatin 基因的序列分析

测序的 37 个 Pthyastatin 克隆都由 5'-UTR、编码区、3'-UTR 和 poly(A)组成, 长度介于 818—848bp [不包括 poly(A)]之间, 长度差异主要出现在 3'-UTR 末端, 可能是由于转录体 3'末端剪切加 poly(A)过程中剪切差异引起的, 典型 Pthyastatin 基因及编码的氨基酸序列如图 1 所示, 信号肽序列为 N 端 16 个氨基酸残基(图 1)。成熟肽理论等电点 pI 为 9.91, 是一个碱性多肽。删除 3'-UTR 末端不匹配部分后, 保留 822 个核苷酸位点, 经 DNSP4.10 分析共检测到插入/缺失位点 6 个, 多态位点 20 个, 其中单碱基突变位点 11 个, 简约信息位点 9 个。在 37 个克隆中共定义了 18

个单倍型, 单倍型多样性(*h*)为 0.887 (表 1)。所有单倍型都提交 GenBank 数据库, 在数据库中的登录号为: GU111230—GU111247。

18 个单倍型编码区共编码 8 个不同多肽, 其中 3 个多肽(Hap_3、Hap_15、Hap_18)由于有单碱基插入发生移码突变(重测序验证表明非测序错误), 均编码 107 个氨基酸残基, 而 5 个 Pthyastatin 多肽, 分别编码 127(Hap_10)和 129(Hap_1、Hap_7、Hap_11、Hap_13)个氨基酸残基。氨基酸序列比对显示 3 个移码突变多肽与 5 个 Pthyastatin 多肽 N 端 64 个氨基酸残基完全相同, 而 C 端由于移码而无同源性。BLAST 检索 NCBI nr 蛋白库未发现与 3 个移码突变多肽显著同源的蛋白质或多肽。

5 个三疣梭子蟹 Pthyastatin 前体氨基酸残基序列比

表 1 三疣梭子蟹 Pthyastatin 的多态位点、核苷酸多样性、单倍型多样性

Tab.1 The polymorphic sites, nucleotide polymorphism and haplotype diversity of the Pthyastatin

单倍型编号	12222222222223334444555556667 4222222337777880381336077880898 3456789394789032210027348681021	单倍型 频率
Hap_1	TTGGAGTT-AAGG-C-AGCGCC-CGTTTTAG	7
Hap_2-.....-.....T.....	1
Hap_3TG.....AA.....C	1
Hap_4-G.....AA.....	1
Hap_5-G.....AA.....	8
Hap_6-G.....AA.....C...	2
Hap_7-G.....AA.....G.	4
Hap_8-G.....AA.....C.....	1
Hap_9-G.....AA.....C.....	1
Hap_10-G.....AA.C.....	1
Hap_11-G.....A.AA.....	1
Hap_12C-G.....AA.....	1
Hap_13-GTCC-T.....AA.....	1
Hap_14-.....-G.....A-T.....	2
Hap_15	C.....-.....A.....A-T.....	1
Hap_16-.....-.....A-T.....C.	1
Hap_17-.....-.....A-T.....	2
Hap_18-TCT.....A-T.....	1
多态位点数	20	
核苷酸多样性()	0.00404	
单倍型数	18	
单倍型多样性(h)	0.887	

对结果显示 Pthyastatin 前体中有 1 个缺失位点和 3 个突变位点(图 2); 与蛛形互爱蟹 Hyastatin 抗菌肽前体氨基酸残基序列比对结果表明, 蛛形互爱蟹 Hyastatin 前体的 N 端信号肽区、Pro/Arg 区、C 端 Cys 富集区与 Pthyastatin 前体同源性高, 氨基酸残基一致性分别为 56.25%、41.8%—47.06%和 45.45%—48.48%, 特别是 C 端 Cys 富集区, Cys 位点完全保守, 提示该区域二者结构可能相同; 而在 Pthyastatin 中没有蛛形互爱蟹 Hyastatin 相应的 Gly 富集区, 代之以延长的 Pro/Arg 区(图 2), 氨基酸残基一致性仅为 16.90%—18.31%。值得注意的是, 蛛形互爱蟹 Hyastatin C 末端酰胺化位点 Gly 在 Pthyastatin 中也同样保守(图 2), 提示成熟的 Pthyastatin 可能也需酰胺化加工。

2.3 抗菌肽 Hyastatin 的系统发生

为阐明 Pthyastatin 与甲壳类其它已报道的具有相似 C 末端结构抗菌肽之间的系统发生关系, 将其与对虾 penaeidins、蛛形互爱蟹 Hyastatin 先进行氨基酸序列比对, 再将 C 末端自第一个 Cys 后的序列构建 NJ 系统树, 结果显示不同的对虾抗菌肽 penaeidins 亚家族聚为单系群, 而 Pthyastatin 与蛛形互爱蟹 Hyastatin 聚在一枝, 且蟹类 Hyastatin 与对虾抗菌肽 penaeidins 4 聚在一枝(图 3)。提示在 C 端具有 6 个

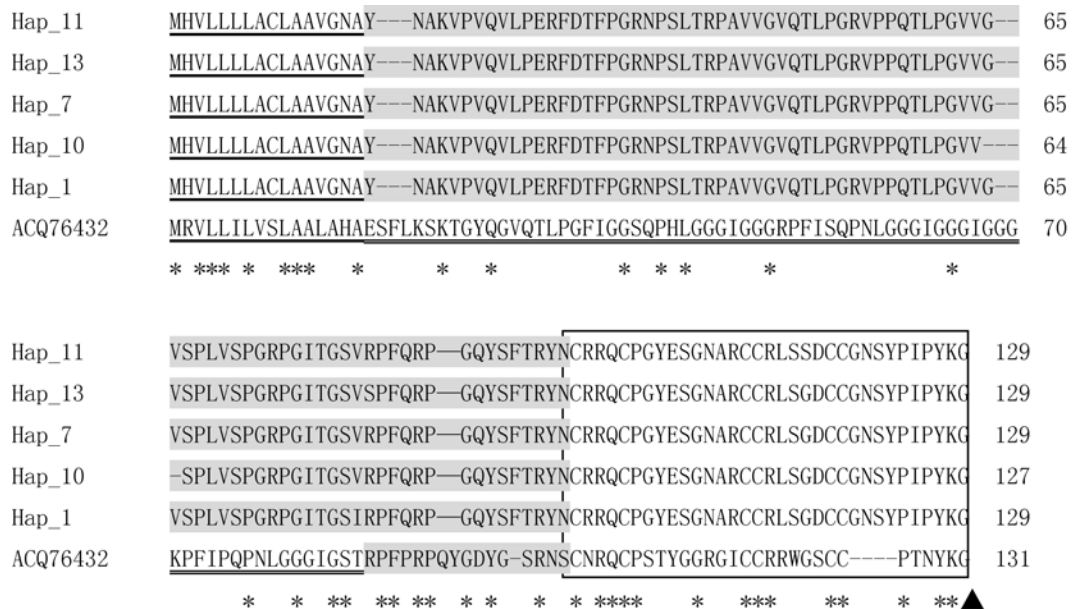


图 2 Pthyastatin 与蛛形互爱蟹 Hyastatin 氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple alignment of the a sequences of Hyastatins from *H. araneus* and *P. trituberculatus*
注: Hap_1/7/10/11/13 分别为 5 个 Pthyastatin 异构体, ACQ76432 为蛛形互爱蟹 Hyastatin; *示相同氨基酸位点; 示 C 末端甲酰化 Gly 位点; 灰框示信号肽区, 斜线框示 Gly 富集区, 竖线框示 Pro/Arg 区; 黑框示 Cys 富集区

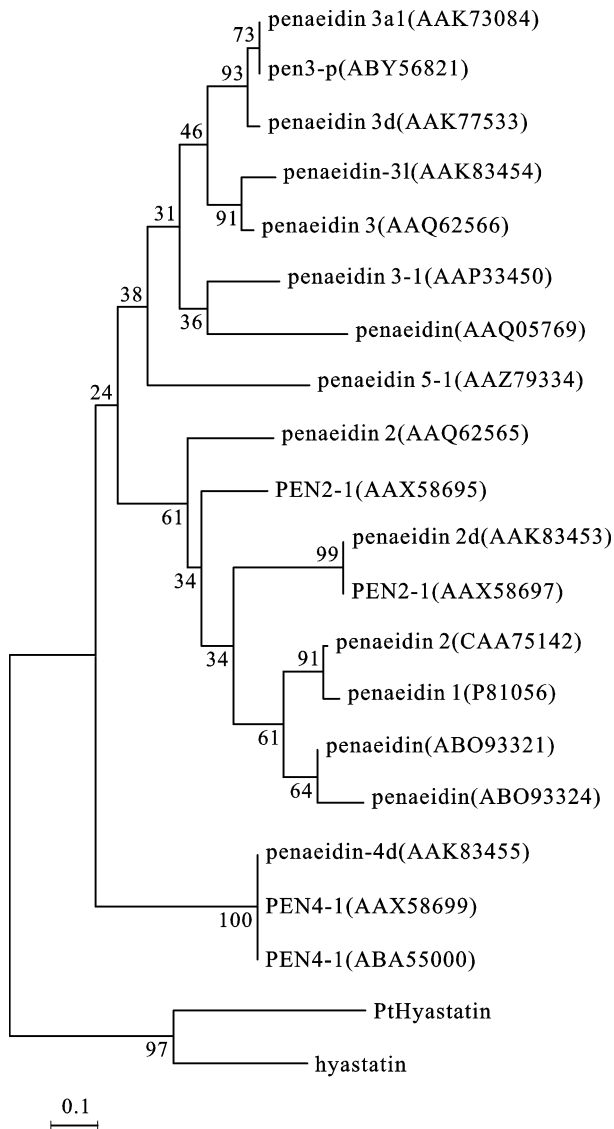


图3 Pthyastatin 在对虾抗菌肽 penaeidins 家族的系统发生
 Fig.3 Phylogenetic analysis on Hyastatins and selected penaeidin sequences

注：基于 C 端第一个 Cys 残基后的序列构建的 penaeidins 家族抗菌肽 NJ 无根系统树，重抽样 500 次计算的自引导值标注在节点上；对虾抗菌肽 penaeidin 不同类群聚在一起，两种蟹 Hyastatin 聚在一枝

Cys 结构域的甲壳类抗菌肽家族中，蟹类 Hyastatin 亲缘关系较近，与物种系统发生一致，Pthyastatin 与蛛形互爱蟹 Hyastatin 的分化晚于虾蟹类的分化；同时

蟹类 Hyastatin 与对虾抗菌肽 penaeidins 4 聚在一枝，提示对虾抗菌肽 penaeidins 4 可能代表了 penaeidins 家族的祖先基因型。

2.4 三疣梭子蟹 Pthyastatin 的表达分析

荧光定量 RT-PCR 分析未诱导的三疣梭子蟹血细胞、肝胰脏、肌肉和眼等组织中 Pthyastatin 表达差异显示：Pthyastatin 在血细胞、眼和肌肉中均有表达，而在肝胰脏中未检测到 Pthyastatin 的表达。血细胞中 Pthyastatin 表达量最高，比眼和肌肉中 Pthyastatin 表达量分别高 909 倍和 7692 倍(表 2)。

以未诱导三疣梭子蟹血细胞 Pthyastatin 表达量为对照，荧光定量 RT-PCR 分析副溶血弧菌诱导后不同时间血细胞 Pthyastatin 表达量变化结果显示：诱导 3h、6h、12h 和 24h 后 Pthyastatin 表达量分别相当于与诱导前的 0.37、1.31、1.27 和 1.01 倍(表 2)，表明副溶血弧菌诱导后，血细胞中 Pthyastatin 表达量先降低，后上升，大约 24h 后又恢复到诱导前水平。

3 讨论

三疣梭子蟹是我国重要的经济蟹类，南北沿岸浅海均产，是 20 世纪 90 年代虾病暴发和流行后发展起来的大宗养殖品种。但近年来养殖病害呈现逐年上升趋势，成为制约该产业健康发展的重要因素。而迄今为止关于三疣梭子蟹免疫相关因子及免疫防御机制的研究极少，如已报道基因的三疣梭子蟹免疫相关因子仅见酚氧化酶(Chen *et al*, 2010)、热休克蛋白 Hsp70 (Cui *et al*, 2010)、C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP; Kong *et al*, 2008)等。本研究从三疣梭子蟹血细胞全长 cDNA 文库中测序鉴定了一个新的免疫相关因子基因，即与蛛形互爱蟹抗菌肽 Hyastatin 同源的三疣梭子蟹 Pthyastatin 基因。推导的三疣梭子蟹 Pthyastatin 抗菌肽前体与蛛形互爱蟹 Hyastatin 抗菌肽前体氨基酸序列比对显示二者结构相似，三疣梭子蟹 Pthyastatin 前体有对虾抗菌肽 Penaeidins 家族的典型结构特征(Cuthbertson *et al*, 2005)，即信号肽区、Pro/Arg 区和 C 端的 Cys 富集区，因此三疣梭子蟹 Pthyastatin 也属 Penaeidins 家族。系

表 2 实时定量 RT-PCR 分析 Pthyastatin 的差异表达
 Tab.2 Differential expression analysis on Pthyastatin by RT-PCR

Pthyastatin 在不同组织中的表达差异	组织类型	血细胞	肝胰脏	肌肉	眼组织	
	相对表达量	1	0	0.00013	0.0011	
血细胞 Pthyastatin 诱导前后表达变化	诱导时间(h)	0	3	6	12	24
	相对表达量	1	0.37	1.31	1.27	1.01

统分析表明两种蟹类 Hyastatin 的系统关系较近, 独立于虾类 Penaeidins 聚在一枝。同时本研究从 cDNA 文库中共测序鉴定了 37 个三疣梭子蟹 Pthyastatin 克隆, 共定义了 18 个单倍型, 表明 Pthyastatin 在基因组中有多个基因座位。其中 3 个单倍型由于在编码区发生移码突变而编码与典型 Pthyastatin 不同的多肽, 这也可能是由于多基因座位的存在, 相对选择压力较轻造成的。

两种蟹类的 Hyastatin 抗菌肽与对虾来源的 Penaeidins 家族相比, 在信号肽后的 N 端都多出一段结构域, 在蛛形互爱蟹 Hyastatin 中为 Gly 富集区, 而在本研究发现的三疣梭子蟹 Pthyastatin 中该结构域 Pro/Arg 含量相对较高, 类似于一个延长的 Pro/Arg 结构域。同时值得注意的是: 两种蟹类的 Hyastatin 抗菌肽与对虾 Penaeidins 家族相对应的结构域(信号肽区、Pro/Arg 区和 C 端的 Cys 富集区)相对保守, 氨基酸残基一致性为 41.8%—56.25%; 而信号肽区与 Pro/Arg 区之间这段多出的结构域则氨基酸残基一致性很低, 仅为 16.90%—18.31%。对虾抗菌肽 Penaeidins 的 Pro/Arg 结构域主要赋予 Penaeidins 的靶微生物的种类特异性, 但也发现大西洋白对虾(*L. setiferus*)的 Penaeidin-4 的 Pro/Arg 结构域单独就是一个有活性抗菌肽, 它与全序列的 Penaeidin-4 具有相同的靶微生物范围(Cuthbertson *et al*, 2004), 而 Sperstad 等(2009b)研究表明蛛形互爱蟹 Hyastatin Gly 富集区有甲壳素结合活性。因此, 三疣梭子蟹 Pthyastatin 信号肽后的 Pro/Arg 结构域是否具有抗菌活性, 或是执行其它功能是一个值得关注的问题。

荧光定量 RT-PCR 分析显示三疣梭子蟹 Pthyastatin 主要在血细胞中组成型表达, 与蛛形互爱蟹 Hyastatin 以及其它甲壳类抗菌肽如 arasin 1、crustin、penaeidins 等在不同组织表达差异研究得出的结论一致(Kang *et al*, 2004; Stensvag *et al*, 2008; Sperstad *et al*, 2009a)。提示 Pthyastatin 的表达模式可能也与抗菌肽 penaeidins、crustin 等类似, 即在血细胞中组成型转录、合成与存储, 在入侵微生物的诱导下释放, 肌肉、眼等组织中检测到的 Pthyastatin 微量表达可能是组织血管中血细胞造成的(Destoumieux *et al*, 2000; Smith *et al*, 2008)。

甲壳类免疫相关因子在致病微生物诱导前后表达量的变化是一个比较令人困惑的问题, 不同类型免疫相关因子、甚至同一类型免疫相关因子在不同物种或不同微生物诱导前后的表达量都可能不同, 出

现上调、下调或是不变(Lorgeril *et al*, 2005; Smith *et al*, 2008)。例如, 淡水螯虾在感染大肠杆菌(*E. coli*)后 crustin 家族抗菌肽 Plcrustin1 和 Plcrustin3 表达在血细胞、造血组织中都上调, 而 Plcrustin 3 表达量没有变化(Jiravanichpaisal *et al*, 2007); 欧洲龙虾(*Homarus gammarus*)II 型 crustin 在感染绿色气球菌(*Aerococcus viridans*)后表达上调, 而感染利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)后表达下调(Hauton *et al*, 2006)。因此, 研究甲壳动物免疫相关因子在感染微生物前后表达量的变化, 探讨免疫相关因子在甲壳动物免疫防御过程中的作用方式和地位一直是研究者关注的重点问题。在本研究中, 通过荧光定量 RT-PCR 分析观察到三疣梭子蟹血细胞 Pthyastatin 表达量受致病菌副溶血弧菌的影响, 但波动幅度较小。副溶血弧菌诱导后 Pthyastatin 表达先下调, 诱导 3h 时表达量约为诱导前的 0.37 倍; 然后上调, 诱导 6h、12h 后的表达量分别约为诱导前的 1.31 倍和 1.27 倍, 大约 24h 后又基本恢复到诱导前水平。这一现象支持三疣梭子蟹血细胞中 Pthyastatin 属组成型表达的观点, 但 Pthyastatin 在副溶血弧菌诱导后表达量为何表现为先下调、后上调、最后回复到诱导前水平这一特别的变化趋势, 以及其在三疣梭子蟹免疫防御系统的地位和作用机制还有待在后续研究中给予解答。

参 考 文 献

- 李 义, 吴婷婷, 李红霞等, 2006. 甲壳动物抗微生物肽研究进展. 水生生物学报, 30: 477—481
- Begum N, Matsumoto M, Tsuji S *et al*, 2000. The primary host defense system across humans, flies and plants. *Current Trends in Immunology*, 3: 59—74
- Bjellqvist B, Basse B, Olsen E *et al*, 1994. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 15: 529—539
- Chen P, Li J, Li J *et al*, 2010. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase gene in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 106—112
- Cui Z, Liu Y, Luan W *et al*, 2010. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Fish Shellfish Immunol*, 28: 56—64
- Cuthbertson B J, Büllesbach E E, Fievet J *et al*, 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function.

- J Biochem, 381: 79—86
- Cuthbertson B J, Yang Y, Bachère E *et al*, 2005. Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. *J Biol Chem*, 280: 16009—16018
- Destoumieux D, Munoz M, Cosseau C *et al*, 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci*, 113: 461—469
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G *et al*, 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, 2: 953—971
- Hauton C, Brockton V, Smith V J, 2006. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Mol Immunol*, 43: 1490—1496
- Iwanaga S, Lee B L, 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 128—150
- Jiravanichpaisal P, Lee S Y, Kim Y A *et al*, 2007. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. *Dev Comp Immunol*, 31: 441—455
- Kang C J, Wang J X, Zhao X F *et al*, 2004. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 513—525
- Kong H J, Park E M, Nam B H *et al*, 2008. A C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 311—314
- Kumar S, Dudley J, Nei M *et al*, 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299—306
- Lee S Y, Lee B L, Soderhall K, 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biology Chemistry*, 278: 7927—7933
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-Ct} methods. *Methods*, 25: 402—408
- Lorgeril J, Saulnier D, Janech M G *et al*, 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol Genom*, 21: 174—183
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X *et al*, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496—2497
- Smith V J, Fernandes J M O, Kemp G D *et al*, 2008. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol*, 32: 758—772
- Sperstad S V, Haug T, Paulsen V *et al*, 2009a. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Dev Comp Immunol*, 33: 583—591
- Sperstad S V, Haug T, Vasskog T *et al*, 2009b. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Molecular Immunology*, 46: 2604—2612
- Söderhäll K, Smith V J, 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology*, 7: 229—239
- Stensvag K, Haug T, Sperstad S V *et al*, 2008. Arasin 1, a proline-arginine rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Dev Comp Immunol*, 32: 275—285
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673—4680
- Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G *et al*, 2009. Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15: 179—188

cDNA CLONING, CHARACTERIZATION AND mRNA EXPRESSION OF A HYASTATIN-LIKE GENE FROM SWIMMING CRAB *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

SHEN Wang, YE Mao, SHI Ge, WANG Ri-Xin

(Laboratory of Marine Biology Resources and Molecular Engineering, Ocean Science College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

Abstract Pathogenic challenges in decapod crustaceans are combated by innate immune responses, including the production and secretion of soluble antibacterial peptides into hemolymph. Hyastatin antimicrobial homologues, containing a domain of six Cys residues at the C-terminus, had been identified from the haemocyte library of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* and designated Pthyastatin. Sequence analysis of these cDNAs indicated the presence of five isoforms of Pthyastatin. The full-length cDNA of Pthyastatins contain an open reading frame of 381 or 387bp encoding a precursor of 127 or 129 amino acids that comprise 16 amino acid signal peptides and 111 or 113 amino acid mature peptides. The putative mature peptides consist of two distinctly different domains: a Pro/Arg-rich region at the amino-terminus and a C-terminal region containing six Cys residues with a Cys pattern resembling the one found in penaeidins. Sequences alignment with *Hyas araneus* Hyastatin and Pthyastatins indicated the signal peptide domain and six-Cys domain conserved, but Pthyastatin lacked of a Gly-rich domain which is in the N-terminal region of the mature *H. araneus* Hyastatin, instead of an extended Pro/Arg-rich domain. It suggests that Pthyastatin is a new member of the antimicrobial peptide group containing a six-Cys-residue domain at the C-terminus. Quantitative reverse transcriptase Real-Time PCR (qRT-PCR) assay were developed to assess the mRNA expression of Pthyastatin in different tissues and the temporal expression of Pthyastatin in the hemocytes challenged by pathogen, *Vibrio Parahaemolyticus*. The results indicate that Pthyastatin transcript is constitutively expressed and mainly found in hemocytes. But the expression of Pthyastatin in the hemocytes was enigmatic, down-regulated in the initial hours and up-regulated subsequently and returned to unstimulated level about 24 h, after stimulated by *V. parahaemolyticus*.

Key words *Portunus trituberculatus*, Hemocyte, Antimicrobial peptide, Pthyastatin, mRNA expression