

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)半乳糖凝集素 *PtGAL* 的基因克隆与原核重组表达*

郝贵杰^{1,2} 林 锋² 母昌考¹ 李荣华¹ 姚嘉赞² 潘晓艺²
袁雪梅² 沈锦玉² 王春琳¹

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养重点实验室 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

摘要 半乳糖凝集素(Galectin)是动物凝集素家族的一员,在脊椎动物和无脊椎动物中都参与了重要的免疫防御反应,是一种重要的免疫因子。通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)半乳糖凝集素基因全长,并命名为 *PtGal*。该基因全长 875bp,开放阅读框为 669bp,编码 222 个氨基酸,包含一个糖识别结构域 CRD(位于 16—142 位氨基酸),预测蛋白的分子量(Mw)为 23529.4Da,理论等电点(pI)为 5.21。同源性比对结果显示,*PtGal* 编码的氨基酸序列与中华绒螯蟹、南美白对虾、日本囊对虾 galectin 的同源性分别为 77%、66%、58%。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果表明,*PtGal* 在三疣梭子蟹肝胰腺、肌肉、肠、胃、鳃、心脏、性腺中都有表达,其中在性腺中的表达量最高,在肝胰腺中的表达量最低,但人工感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)后,肝胰腺的表达呈先升高后降低的趋势。利用原核表达系统对三疣梭子蟹 *PtGal* 进行了重组表达,并通过纯化复性获得了重组目的蛋白 *rPtGal*,ELISA 检测 *rPtGal* 与不同细菌及真菌的结合活性,结果表明,该重组蛋白与革兰氏阳性菌、阴性菌和真菌均有较强的结合。本研究为进一步深入研究三疣梭子蟹半乳糖凝集素的功能奠定了基础。

关键词 三疣梭子蟹;半乳糖凝集素;实时荧光定量 PCR;溶藻弧菌;重组蛋白

中图分类号 Q78 doi: 10.11693/hyh20160700147

半乳糖凝集素(Galectins)是生物体内广泛存在的一种保守糖蛋白,从真菌到哺乳动物均有发现,也是动物凝集素家族的成员之一(Vasta, 2009),可特异性识别糖链末端的 β -半乳糖苷,为非膜整合性的可溶性蛋白(Barondes, 1984; 贺雪明等, 2012)。迄今为止,在哺乳类动物中至少已发现 15 种不同的半乳糖凝集素,它们均含有糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD),根据其分子结构不同,一般被分为 3 种类型:原型、嵌合型和串联重复型。其中原型只含有 1 个 CRD 结构域,并且会形成非共价结合的同源

二聚体;嵌合型含有 1 个 C 端 CRD 结构域和 N 端富含脯氨酸和甘氨酸的结构域;串联重复型含有 2 个 CRD 结构域,中间由一段功能肽段连接(Yang *et al*, 2008)。近年来,在软体动物中又发现了一种独特的 quadruple-galectin (Song *et al*, 2011; Maldonado-Aguayo *et al*, 2014),其对 Galectins 家族的结构是一个新的补充。半乳糖凝集素广泛存在于大部分细胞尤其是免疫相关细胞中,它们通过与细胞表面的糖复合物结合,在多种生物过程中发挥重要的作用,如细胞增殖、黏附、凋亡、免疫反应等(秦欣欣等, 2012;

* 国家自然科学基金项目,41376150 号;国家农业科技成果转化资金项目,2014GB2C220151 号。郝贵杰,博士研究生,副研究员, E-mail: 391601350@qq.com

通讯作者:王春琳,博士生导师,教授, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn;沈锦玉,硕士生导师,研究员, E-mail: shenjinyu@126.com

收稿日期:2016-07-06,收修改稿日期:2016-07-24

Wang *et al.*, 2013)。

随着水生动物免疫学研究的深入,越来越多的水生动物半乳糖凝集素被发现,从鱼类(Yang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016)、甲壳类(Shi *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2015)、软体动物(Yamaura *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012)到海绵(Kawsar *et al.*, 2008)。众多的研究表明,半乳糖凝集素在脊椎动物和无脊椎动物非特异性免疫中起到重要作用,尤其是作为模式识别受体(Pattern Recognition Molecular, PRR)发挥抵抗病原微生物的作用(Song *et al.*, 2015)。例如,中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的半乳糖凝集素 *EsGal* 对多种病原菌具有较强的凝集活性,而且这种凝集可被 D-半乳糖和 α -乳糖抑制(Wang *et al.*, 2016); 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的半乳糖凝集素可结合派琴虫(*Perkinsus*)和弧菌(*Vibrio*)表面的半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺而进行病原菌的识别(Kim *et al.*, 2008)等。然而目前尚未见三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)半乳糖凝集素的相关报道。

三疣梭子蟹隶属甲壳纲(*Crustacea*),十足目(*Decapoda*),梭子蟹科(*Portunidae*),梭子蟹属(*Portunus*),因其味道鲜美且营养价值高,现已成为沿海各省海水养殖的主导产品。然而,近年来,由于集约化养殖及养殖环境污染等因素,导致梭子蟹自身的抗病力下降,对病害的易感性增加,疾病频繁发生(王国良等, 2006; 许文军等, 2006; 刘淇等, 2007; 阎斌伦等, 2012)。三疣梭子蟹缺乏特异性免疫系统,主要依靠非特异性免疫系统进行病原的识别及清除,已有很多免疫相关分子如模式识别受体及免疫效应因子陆续报道(Pan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016),但关于三疣梭子蟹半乳糖凝集素的研究却鲜有报道。本研究从三疣梭子蟹转录组数据库中鉴定得到了一个半乳糖凝集素基因 EST(命名为 *PtGal*),对序列进行了末端扩增及生物信息学分析,并开展了基因表达组织分析及溶藻弧菌刺激响应规律以及重组表达蛋白功能的研究,以期在三疣梭子蟹分子育种及抗病选育提供依据,并为认识梭子蟹半乳糖凝集素以及对该分子进化、结构和功能进行深入研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

实验用三疣梭子蟹为宁波鑫亿鲜活水产有限公司养殖基地人工繁育并养殖,规格 50±3g,投喂冰鲜

小杂鱼,每天换水 1/3,于 22—25°C 充气海水中暂养一周后,选取健康的梭子蟹 100 只,有 5 只蟹分别取肝胰腺、胃、肠等组织快速置于液氮罐中,其它蟹进行溶藻弧菌感染实验(菌株由宁波大学海洋学院王国良老师惠赠),并设置对照组,分别于感染前(即 0h),感染后 3h、6h、12h、24h、48h 和 72h 随机挑取 5 个个体,取肝胰腺,快速置于液氮罐中备用。

实验试剂 RNAsimple Total RNA kit、FastQuant cDNA RT Kit (with gDNA)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; PrimeSTAR HS DNA 酶、*TaKaRa LA Taq*、3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase、Agarose Gel DNA Purification Kit、pMD19-T simple vector 购自大连宝生物(*TaKaRa*); Trans1-T1, BL21(DE3)购自北京全式金公司, Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;其它为国产分析纯。引物合成及序列测定由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 三疣梭子蟹总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

各组织经液氮研磨后取 50—100mg,按照 RNAsimple Total RNA kit 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取。用 NanoDrop2000 超微量分光光度计对 RNA 进行浓度和纯度测定,最后各样品统一定量为 2 μ g,根据 FastQuant RT Kit (with gDNase)试剂盒说明书进行 cDNA 第一链的合成,反转录产物用于 PCR 或 qRT-PCR 扩增。

1.3 三疣梭子蟹 *PtGal* 末端序列的 RACE 扩增及全长序列的确定

在三疣梭子蟹卵巢转录组数据库中筛选到一种半乳糖凝集素基因编码框 cDNA 序列,设计用于 3'RACE 扩增末端 PolyA 序列的引物 *PtGal*-GSP1 和 *PtGal*-GSP2(表 1),按照 *TaKaRa* 3'-Full RACE 扩增试剂盒说明书,使用 3'RACE Adaptor 引物进行反转录反应,再利用引物 *PtGal*-GSP1 和 3'RACE Outer Primer 进行 Outer PCR 反应,反应条件为: 94°C 3min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 20 个循环; 72°C 10min。以第一轮 PCR 产物为模版, *PtGal*-GSP2 和 3'RACE Inner Primer 进行 Inner PCR 反应,反应条件为: 94°C 3min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 30 个循环; 72°C 10min。PCR 产物回收克隆至 pMD19-T 后蓝白斑筛选,阳性克隆送至南京金斯瑞生物公司测序,所得序列用 DNASTAR 软件拼接获得完整的全长序列。

1.4 序列分析、结构预测及氨基酸序列比对

半乳糖凝集素基因及氨基酸同源序列从 NCBI 数

数据库中获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 由 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)分析氨基酸序列的一致性。利用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)对半乳糖凝集素等电点 pI 及分子量(Mw)进行预测; SignalIP4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>)查找半乳糖凝集素信号肽; 蛋白质保守结构域的预测由在线软件 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)完成(<http://smart.embl-heidelberg.de/>); N-糖基化位点预测用 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>); 用 BioEdit 进行不同物种半乳糖凝集素氨基酸序列比对。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析(qRT-PCR)

应用 qRT-PCR 检测三疣梭子蟹半乳糖凝集素

PtGal 转录本的组织分布情况及对溶藻弧菌刺激的反应模式。根据 PtGal 基因序列设计特异性定量引物 qPtGal-F 和 qPtGal-R, 并选取 β -actin 基因作为内参基因(引物信息见表 1), 根据 SuperReal Premix Plus (SYBR Green)说明书配制 qRT-PCR 反应体系, 用 Mx3005P 荧光定量 PCR 仪(Stratagene 公司)进行扩增完成。反应条件为: 95°C 15min; 95°C 10s, 58°C 20s, 72°C 30s, 40 个循环; 72°C 10min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法处理数据(Livak *et al*, 2001), 其中 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{感染组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ 。应用 SPSS 19.0 中单因素方差分析进行显著性分析, $P < 0.01$ 表示差异极显著。应用 GraphPad Prism 5 进行柱状图的制作。

表 1 实验中用到的引物
Tab.1 Primers used in the experiments

引物名称	序列(5'—3')
PtGal-GSP1	5'-CCCCACAATACTCCAGTCCCCA-3'
PtGal-GSP2	5'-TACTGGGCATTTTGCAGTGTGA-3'
q PtGal -F	5'-GGCTGAGGGTGTGATTGGTTCGCA-3'
q PtGal -R	5'-CTGGAGATGTTGAGGAAGGTGAG-3'
β -actin-F	5'-ATGTGGACAGATGGGACG-3'
β -actin-R	5'-CTCACAAATCGACTTACA-3'
PtGal -BD-F	5'-CCCATATG ATCGCTGGAGGTTTTGCTCCCGG-3'
PtGal -BD-R	5'-CCTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGAACAGTGACATCTTGGCTAGTG-3'

1.6 PtGal 的表达和纯化

1.6.1 表达载体的构建 根据 PtGal 序列和 pET-21a(+)表达序列的特征, 设计原核表达引物 PtGal-BD-F/R(表 1)。上游引物 5'端含 *Nde* I 酶切位点, 下游引物 5'端含 *Xho* I 酶切位点。以肝胰腺 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 将产物纯化后克隆至 pMD19-T 载体, 筛选阳性克隆并测序。再用常规酶切连接方法构建重组表达质粒 pET-21a(+)-PtGal, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 筛选阳性克隆进行测序, 同时保种待用。

1.6.2 重组蛋白的诱导表达及分析 取 30 μ L 上述保存的菌液, 接种于 3mL LB 液体培养基中(含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素), 37°C, 250r/min 过夜培养, 第二天取新鲜菌液继续分管培养, 37°C 250r/min 恒温摇至 OD₆₀₀ 达到 0.6—0.8 时, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导, 同时设置未诱导组, 分别放至 15°C 摇床培养 16h, 37°C 摇床培养 4h, 8000r/min 离心收集菌体, 2 倍体积 PBS 重悬菌体, 加入终浓度为 1mg/mL 溶菌

酶后超声破碎, 分别取全细胞裂解液及经离心处理的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.3 蛋白纯化与 LC-MS 鉴定 37°C 大量培养重组菌液, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 移至 15°C 摇床继续诱导培养 16h 并收集菌体。纯化重组蛋白采用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒(可溶性蛋白), 按照试剂盒说明依次进行装柱、平衡、菌体裂解、离心、上柱、冲洗、洗脱等。收集洗脱蛋白液, SDS-PAGE 分析纯化效果, 并切下目的条带, 进行质谱鉴定。

1.7 ELISA 检测重组蛋白 rPtGal 与不同细菌及真菌的结合

参考王鹏等(2014)的方法略作修改, 所用菌株为革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌, 枯草芽孢杆菌), 革兰氏阴性菌(溶藻弧菌, 副溶血弧菌, 哈维氏弧菌, 鳃弧菌, 大肠杆菌, 嗜水气单胞菌), 真菌(酵母菌)。具体步骤如下: 将各菌株培养到 OD₆₀₀ 为 1.0 左右, 并用包被液重悬使其终浓度为 5×10^8 ind/mL。按 100 μ L/孔将菌液加入 96 孔酶标板, 4°C 孵育过夜。用

PBST(含 0.5mL/L Tween20 的 PBS)洗液满孔洗涤 3—4 次, 每次 3—5min。然后每孔加入 200 μ L 含 3% BSA 的 PBS, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅封闭 3h, 同上洗涤。各孔加入不同浓度的重组蛋白 *PtGal* (16 μ g/mL 倍比稀释至 0.5 μ g/mL)100 μ L, PBS 作为阴性对照, 30 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 同上洗涤; 每孔加入 100 μ L 一抗 His-tag 抗体 (1 : 1000, *V/V*), 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, 同上洗涤; 再加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(1 : 250, *V/V*), 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, 同上洗涤; 每孔加入 200 μ L TMB 显色液, 避光孵育 10—30min, 然后每孔加入 50 μ L 2mol/L 硫酸溶液中止反应, 于 450nm 测定吸光度, 将至少 2 倍于对照读数的结果定义为阳性, 结合指数定义为: 蛋白的 A_{450} 读数/PBS 的 A_{450} 读数。

2 结果

2.1 三疣梭子蟹半乳糖凝集素基因 *PtGal* 的序列特征

根据克隆测序拼接得到 *PtGal* 全长为 875bp (GenBank 登录号: KU648403), 包括 5'-UTR 76bp、编码区、3'-UTR 123bp 和 poly(A)组成, 其 ORF 编码含有 222 个氨基酸残基的蛋白(图 1a)。其理论分子量为 23529.4Da, 等电点 pI 为 5.21。SMART 检索表明该蛋白包含一个半乳糖识别结构域, 位于 N 端 16—142 位氨基酸, 靠 C 端有两个富含脯氨酸/甘氨酸低复杂区, 分别为 150—164 及 195—220 位氨基酸(图 1b)。和其它半乳糖凝集素相似, *PtGal* 没有信号肽, 但它有一个潜在的 N-糖基化位点(Asn¹³²-Ile¹³³-Ser¹³⁴-Ser¹³⁵)。序列同源性在线比对结果显示, *PtGal* 编码的氨基酸序列与其它甲壳类具有较高的相似性, 如与中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 的相似性为 77%, 与凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 的相似性为 66%, 与日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* 的相似性为 58%。运用 BioEdit 软件制作 *PtGal* 基因编码的氨基酸序列与上述甲壳类氨基酸序列比对图(图 2), 结果显示 galectin 糖结合区高度保守。

2.2 三疣梭子蟹 *PtGal* 的表达分析

PtGal 基因组织表达分析: 以 β -actin 为内参基因检测了 *PtGal* mRNA 在健康梭子蟹个体不同组织中的表达差异性(图 3), 结果表明: *PtGal* mRNA 在眼柄中没有表达, 在肝胰腺、鳃、肌肉、肠、胃、心、性腺中都有表达, 但表达量存在明显的差异。以肝胰腺的表达量为参考, *PtGal* 在性腺中的表达量最高, 为肝胰腺的 51.65 倍($P < 0.01$), 其次是在肌肉中, 为肝胰腺的 28.4 倍($P < 0.01$)。

```

a
1 aggcagcctcctctctttgtcagaccacattgacaggttagcgagccagacccctgaactaca
62 actgattgaattaagATGGGACAGCCAGTATATATCCAGGTCAGCCATGCATGATCCOC
1 M G Q P V Y N P G Q P C M I P
122 ATGCTGGAGGTTTGTCTCCGGCAAGATCCTCCACGTTGACGGGACCTTCACTCCCGCT
16 I A G G F A P G K I L H V T G T F T P A
182 GCTAACAGCTTTGTTATGAACTTCAGTCAGGACAAGTTGGGACCCCACTGATGAGATT
36 A N S F V M K L Q S G Q V G D P T D E I
242 GGCTTGTATCTACGGACGGTGGCTGAGGGTGTGATTGGTCGCAATGCCTTACCOCG
56 G L C I Y G R V A E G V I G R N A F T R
302 GCGCTGGCTGGGGCAGGAGGAGGCCACCGTTCCTCTGCTTTGCTGTGGCCAGAAC
76 A A G W G Q E E A T S S P A F A R G Q N
362 TTGACATCAGCATCCTGTGTGACCCAGCACAGTTCAAGATTGCCTCAACCAGAACCC
96 F D I T I L C D P A Q F K I A L N Q N H
422 TTGCTGAGTTCAACCACCGGCCAACCCGCCAGCCTCACTTCCCTCAACATCTCCAGC
116 F A E F N H R A N P A S L T F L N I S S
482 ACTAGCCAAGATGTCAGTGTGCCTGCGTTTGGGTTGAAGTGGCCAGGGCACCTCAG
136 T S Q D V T V A C V W V E D G P G A P Q
542 CCACAACAGGCTTTGCCACGCCCGCTCTGCTGCTTTGAACCCCAACCATACTCT
156 P Q P G F A Q P P V S G F E P P P P Y S
602 GGAGTCTCGATTGGCCCAATACTCCAGTCOCCAAATGTACCAGCAGGCTGTCCOG
176 G G P G F A P Q Y S S P Q M Y Q Q A V P
662 AACTACCAGCAATCCACCAGCCGTACATGCCACCGGACCCAGCCAGCCGCGCAC
196 N Y Q Q P I P P Q P Y M P P G A T P P H
722 TATGGTGTAGGTCGAGTTCTAGcaagccttgccttgcctcctcaaacctctgttctta
216 Y G V G P R F *
782 tcctcagtgaagagtattttgtcagtttaaccaagatttcacatgttgctttc
842 ctcagtaatccaataccaaccaacgcaaaaaa

```

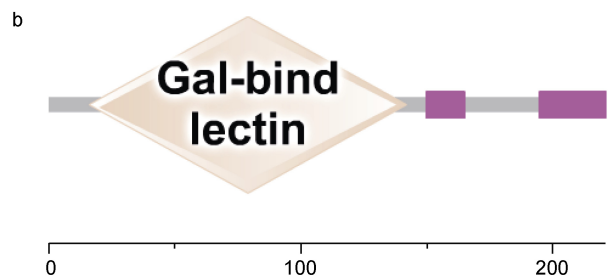


图 1 *PtGal* 的全长 cDNA、推导的氨基酸序列及 SMART 预测的结构图

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *PtGal* and the graph predicted by SMART

注: a: ORF 区用大写字母显示, 5'UTR 和 3'UTR 用小写字母显示。灰色阴影标示 SMART 预测的半乳糖结构域。终止子用“*”表示。下划线 ATG 为起始密码子, TAG 为终止密码子; b: SMART 预测的结构图, 菱形区为糖结合区域, 粉色区为富含脯氨酸/甘氨酸低复杂区域

PtGal 在溶藻弧菌感染后的表达模式: 以三疣梭子蟹肝胰腺为靶组织, qRT-PCR 分析 *PtGal* 基因在溶藻弧菌感染后不同时间表达量的变化, 结果表明, 溶藻弧菌感染后 3h, *PtGal* 的表达已开始慢慢的上调, 于 12h 时表达量达到最大值, 然后慢慢回落, 总体表现为先升高、后降低的趋势。

2.3 重组蛋白 *PtGal* 的诱导表达和纯化

原核表达重组质粒 pET-21a(+)-PtGal, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)阳性转化菌经 IPTG 诱导表达后, 利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白 *rPtGal* 的表达(图 5), 结果发现: 宿主菌的蛋白表达谱发生了变化, 该蛋白在 37 $^{\circ}$ C 诱导 4h 时主要为包涵体表达, 而在 15 $^{\circ}$ C 诱导

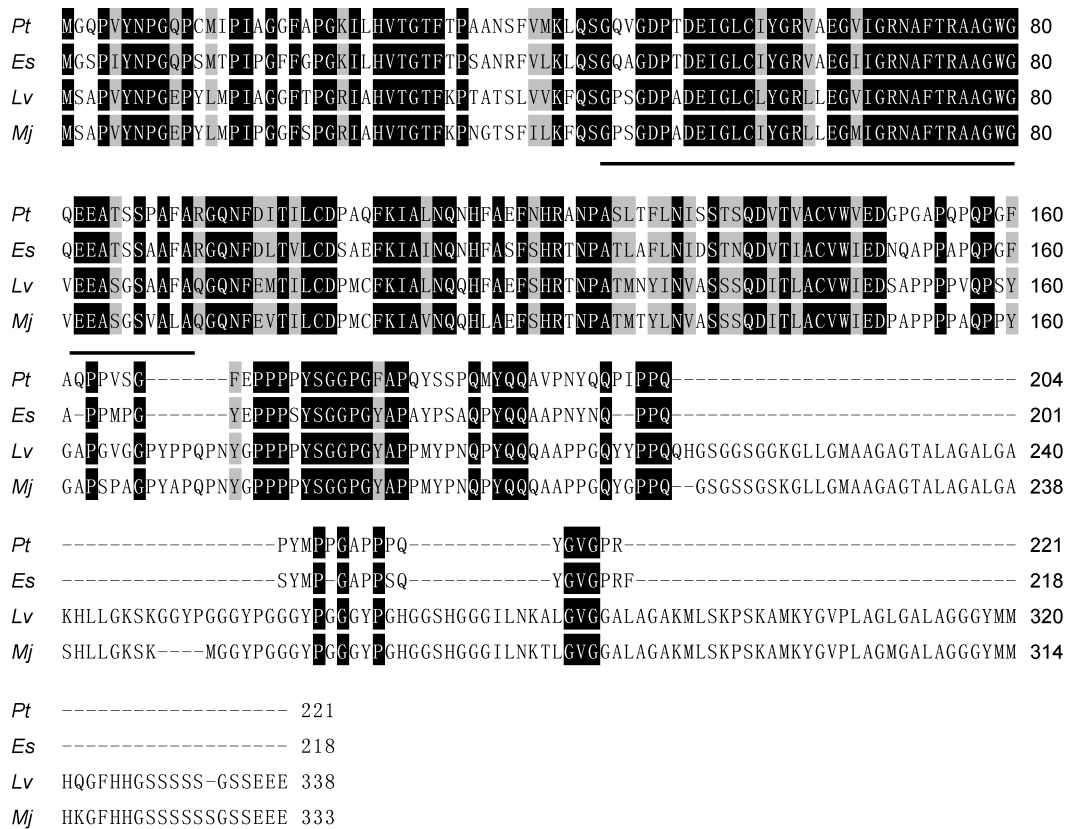


图 2 不同物种 Galectin 氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment by BioEdit

注: 各物种及其 GenBank 登录号为: *Pt*: 三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus*; *Es*: 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* (GI: 294718621); *Lv*: 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* (GI: 540070879); *Mj*: 日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* (GI: 387165448); 划线处为 *PtGal* 糖识别结合区

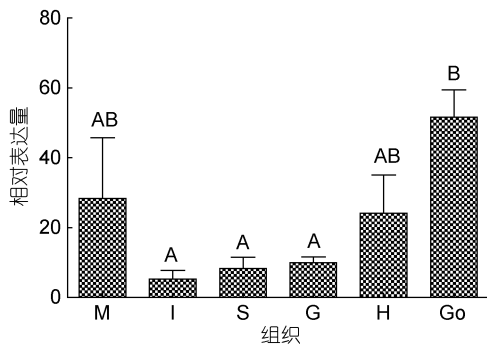


图 3 *PtGal* 在不同组织中的表达分布

Fig.3 Distribution of *PtGal* gene in different tissues of *P. trituberculatus* measured by Quantitative Real-time PCR

注: 所有数据按照平均值±S.D(n=5)表示。不同字母之间表示两组组织之间 *PtGal* 基因表达量差异极显著(P<0.01)。M. 肌肉; I. 肠; S. 胃; G. 鳃; H. 心脏; Go. 性腺

16h 检测到可溶性表达。由于重组蛋白带有一个 His 标签, 所以目的蛋白的分子量略大于其预测的理论分子量, 约为 26.kDa。利用 Ni-Agarose 技术对超声波破碎菌体上清中的重组蛋白进行分离纯化, 电泳检测显示在目的带位置有一条单一主带, 这与预期结

果一致。纯化的目的蛋白得率约为 1.5mg/L。

2.4 重组蛋白 *rPtGal* 的质谱鉴定结果

为了验证上述蛋白谱带就是重组目的蛋白, 对纯化蛋白普带进行了胶内酶解及 MALDI-TOF/TOF 质谱分析鉴定, 结果表明所切下的重组蛋白有三个肽段与三疣梭子蟹半乳糖凝集素推导的氨基酸序列完全匹配, 其中图 6 为匹配序列-RAAGWGQEEAT

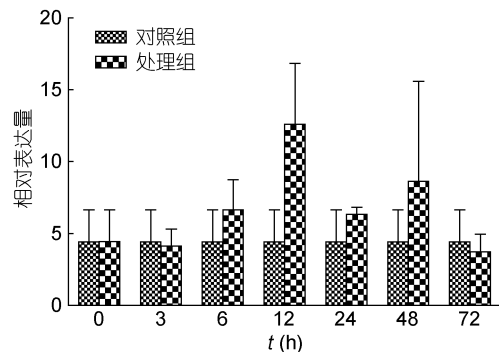


图 4 溶藻弧菌感染后 *PtGal* 在肝胰腺中的表达情况
Fig.4 *PtGal* mRNA expression level after *V. alginolyticus* challenge in hepatopancreas

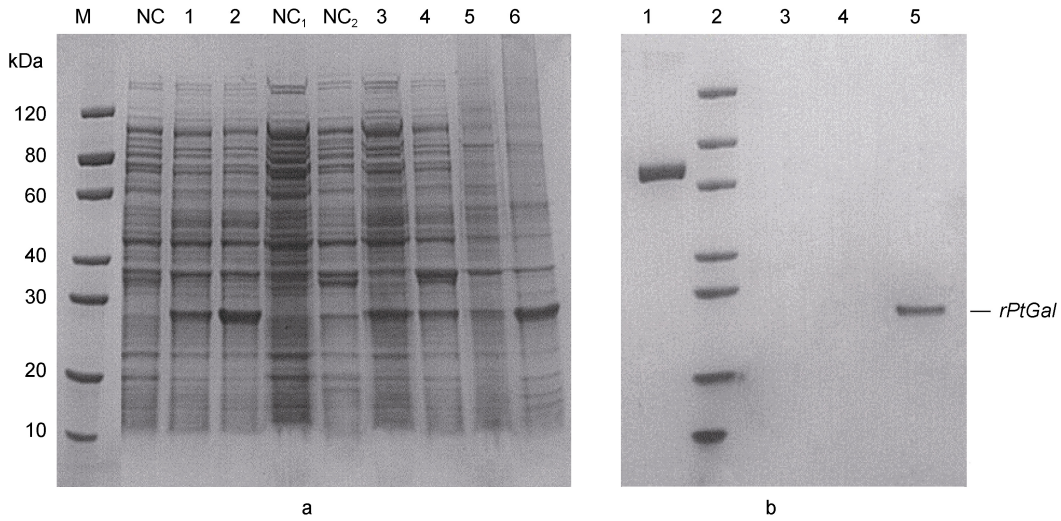


图 5 *PtGal* 在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 Expression and purification of the target fusion protein

注: a. 泳道 M: 蛋白 marker; 泳道 NC: 未诱导的全细胞裂解液; 泳道 1: 15°C 诱导 16h 的全细胞裂解液; 泳道 2: 37°C 诱导 4h 的全细胞裂解液; 泳道 NC₁: 未诱导的细胞裂解液上清; 泳道 NC₂: 未诱导的细胞裂解液沉淀; 泳道 3: 15°C 诱导 16h 的细胞裂解液上清; 泳道 4: 15°C 诱导 16h 的细胞裂解液沉淀; 泳道 5: 37°C 诱导 4h 的细胞裂解液上清; 泳道 6: 37°C 诱导 4h 的细胞裂解液沉淀。b. 泳道 1: BSA 对照; 泳道 2: 蛋白 marker, 分子量同 A; 泳道 3、4: 空白; 泳道 5: 纯化后的重组 *rPtGal* 蛋白

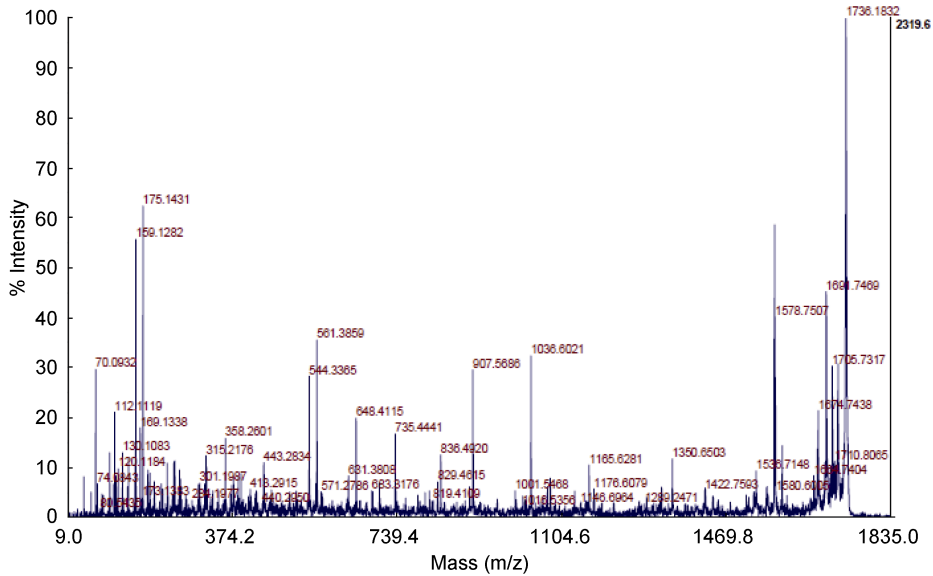


图 6 重组目的蛋白中与 *PtGal* 相匹配肽段的二级质谱图

Fig.6 Characteristic spectrum of matched peptide fragments recombinant protein with *PtGal*

SSPAFARG-的二级质谱图。由此可以判定, 上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白 *rPtGal*, *PtGal* 成功地获得了体外重组分泌表达。

2.5 重组蛋白 *rPtGal* 与不同细菌及真菌的相互作用

为了检测 *rPtGal* 能否与病原菌进行相互作用, 我们分别使用不同浓度的重组蛋白与革兰氏阳性菌代表菌 2 株、革兰氏阴性菌 6 株(代表株大肠杆菌及海水常见弧菌类)以及真菌(酵母菌)进行孵育, 然后

进行 ELISA 检测, 发现蛋白会随着浓度的升高更好地与病菌结合, 结合指数最高达到 8.9, 但每种菌的结合指数有一个高峰, 除了溶藻弧菌和哈维氏弧菌在蛋白浓度为 2 μ g/mL 时结合指数达到最高时, 其它均为 8 μ g/mL 时达到高峰(图 7)。

3 讨论

半乳糖凝集素 galectin 是一种不依赖于钙离子的

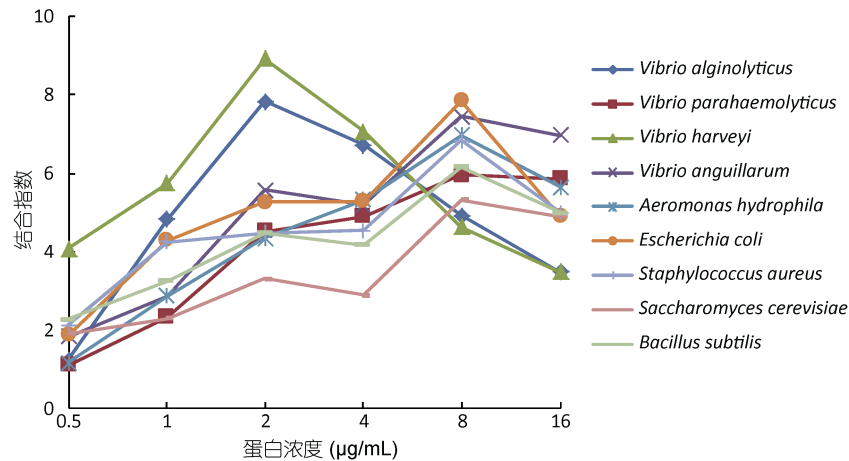


图 7 *rPtGal* 与细菌及真菌的结合

Fig.7 Binding of *rPtGal* to bacteria and fungus

注: 溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*; 副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*; 哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*; 鳎弧菌 *Vibrio anguillarum*; 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*; 大肠杆菌 *Escherichia coli*; 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*; 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*; 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*

结合指数=蛋白的 A_{450} 读数/PBS 的 A_{450} 读数, 结果为 3 次重复的平均值

可溶性凝集素, 为 S 型凝集素, 由于其与 β -半乳糖苷的特殊亲和力而得名(Barondes *et al*, 1994), 尽管其结构上与其它凝集素有不同, 但所有的凝集素成员都含有一个共同的结构, 称为糖识别结构域 CRD, 赋予其结合糖结构的活性(Zelensky *et al*, 2005), 发挥着多种多样的生物学功能。本研究从三疣梭子蟹中筛选出了一个半乳糖凝集素基因 *PtGal*, 通过对其序列及蛋白结构的分析, 发现 *PtGal* 与已知的无脊椎动物半乳糖凝集素结构相似, 没有信号肽而且只含有典型的半乳糖凝集素结构域, 这一点与脊椎动物的半乳糖凝集素结构也一致, 推测 *PtGal* 也是通过非经典的分泌方式到达细胞外(Almkvist *et al*, 2002), 但还需要进一步的实验验证。SMART 分析结果表明 *PtGal* 在 N 末端有一个糖结合结构域 CRD, 在 C 末端有两个富含脯氨酸/甘氨酸的低复杂区域(图 1b), 与已知的哺乳动物嵌合型半乳糖凝集素结构相似, 但 CRD 位置相反, 哺乳动物的 CRD 是在 C 末端(Yang *et al*, 2008), 这一现象在南美白对虾 *LvGal* 及中华绒螯蟹 *EsGal* 等结构中也被发现(Cha *et al*, 2015; Wang *et al*, 2016)。与其它甲壳类半乳糖凝集素进行同源性比对发现 *PtGal* 的结构域高度保守, 且与糖结合的氨基酸残基也都高度保守, 符合半乳糖凝集素家族成员具有保守糖识别位点的结构特征(Leffler, 2001)。

qRT-PCR 检测 *PtGal* 在三疣梭子蟹各组织中的表达, 在被检测的 8 种组织中, 除了眼柄中没有表达, 在健康个体的不同组织都有表达, 这一点与其它甲

壳类或贝类的 galectin 一样(Wang *et al*, 2011; 郑利兵等, 2015), 但表达量存在显著的差异, 其在性腺中表达量最高, 在肝胰腺中的表达量最低, 说明 *PtGal* 基因的表达不具有组织特异性, 但表达量具有一定的组织特异性。已有的研究表明, 水生动物经病原微生物感染后, 其体内的半乳糖凝集素基因 mRNA 水平上调, 如经鳎弧菌或藤黄微球菌感染的海湾扇贝, 其 *AiGal1*、*AiGal2* mRNA 的表达量显著上调(Song *et al*, 2010; Song *et al*, 2011); 经溶藻弧菌感染的南美白对虾, 其 *Lvgalectin* mRNA 的表达量显著上调(Cha *et al*, 2015)等等。本研究中溶藻弧菌感染三疣梭子蟹后, *PtGal* 基因的表达在 3h 已开始慢慢的上调, 于 12h 时表达量达到最大值, 为 0h 的 3.5 倍, SPSS 进行差异性分析为差异不显著。而 Song 等(2010)报道的海湾扇贝感染鳎弧菌后 9h, 其 *AiGal1* 表达量达到最高, 为 0h 的 1.52 倍, 差异显著($P < 0.05$); 感染藤黄微球菌后 18h, *AiGal1* 表达量达到最高, 为 0h 的 2.89 倍, 差异极显著($P < 0.01$), 分析原因为本试验的样本比较小, 而组间 5 个样本表达量差异较大, 导致其显著性水平受到了影响。

为了进一步探索 *PtGal* 的功能, 我们重组表达并纯化了 *rPtGal*, 经质谱鉴定为目的蛋白后, 并用 ELISA 方法测定了纯化蛋白与病原菌的结合试验, 结果发现 *rPtGal* 对革兰氏阴性菌、阳性菌和真菌的菌体都有明显的结合, 而且这种结合会随着蛋白浓度的增加而增强, 但与每种菌的结合到了最适浓度

时, 结合指数会有所下降(图 7)。这与 Wang 等(2016)报道的 ELISA 测定的中华绒螯蟹 *rEsGal* 与病原体相关分子模式(PAMPs)LPS、PGN、GLU 的结合, 在所测定的浓度范围内具有浓度依赖性模式有所不同; 也与 Cha 等(2015)报道的 ELISA 测定的凡纳滨对虾 *rLvgalectin* 与多糖 LPS、LTA 及 PGN 的结合, 在所测定的浓度范围内具有浓度依赖性模式有所不同, 分析原因可能是半乳糖识别结合能力依赖于微生物表面的分布密度、呈现形式等, 而单独测定与这些表面多糖的结合不受其它因素影响, 会随着蛋白浓度的增加而增强(Shi *et al*, 2014), 但我们所用的为病原菌菌体, 一方面不同菌的表面多糖密度和结构有所不同, 因此会有不同的结合指数及最适结合指数; 另一方面蛋白与菌体表面多糖结合时, 会引起本身或其它产物的结构变化, 因而影响蛋白与多糖的结合, 以至于菌体与蛋白的结合不具有蛋白浓度依赖性, 具体结合指数及强度的不同, 还有待进一步研究。

综上, 本研究从三疣梭子蟹肝胰腺中克隆获得了一个半乳糖凝集素基因, 并对其序列结构及表达模式进行了分析, 对其结构域进行了原核重组表达及活性分析, 初步探讨了其在梭子蟹先天免疫中的可能作用, *PtGal* 其它功能如其在梭子蟹生殖发育中的作用还需进一步研究, 这些工作为探索三疣梭子蟹半乳糖凝集素精确的生物功能提供有用的信息和资料。

参 考 文 献

- 王 鹏, 王 维, 吕志强, 2014. 家蚕半乳糖凝集素 BmGalectin-4 的表达、纯化及性质分析. 昆虫学报, 57(7): 806—814
- 王国良, 金 珊, 李 政等, 2006. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)乳化病的组织病理和超微病理研究. 海洋与湖沼, 37(4): 297—303
- 刘 淇, 李海燕, 王 群等, 2007. 梭子蟹牙膏病病原菌——溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析. 海洋水产研究, 28(4): 9—13
- 许文军, 徐汉祥, 施 慧等, 2006. 三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* (Miers)血卵涡鞭虫病诊断与综合防治措施. 现代渔业信息, 21(11): 27—28, 19
- 郑利兵, 吴 彪, 刘志鸿等, 2015. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)半乳糖凝集素(*SbGal*)基因 cDNA 的克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 46(5): 1061—1070
- 贺雪明, 唐 丽, 贺福初, 2012. 半乳糖凝集素 1 的免疫功能. 生物技术通讯, 23(6): 896—899
- 秦欣欣, 孙红梅, 赵海平等, 2012. 半乳糖凝集素 1 蛋白及其生物学功能. 中国畜牧兽医, 39(6): 141—145
- 阎斌伦, 张晓君, 梁利国等, 2012. 三疣梭子蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及定居因子抗原基因检测. 水产学报, 36(3): 391—398
- Almkvist J, Karlsson A, 2002. Galectins as inflammatory mediators. Glycoconjugate Journal, 19(7—9): 575—581
- Barondes S H, 1984. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. Science, 223(4642): 1259—1264
- Barondes S H, Cooper D N W, Gitt M A *et al*, 1994. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. The Journal of Biological Chemistry, 269(33): 20807—20810
- Cha G H, Liu Y, Peng T *et al*, 2015. Molecular cloning, expression of a galectin gene in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the antibacterial activity of its recombinant protein. Molecular Immunology, 67(2): 325—340
- Hao G J, Lin F, Mu C K *et al*, 2015. SNP E4-205 C/T in C-type lectin of *Portunus trituberculatus* is association with susceptibility/resistance to *Vibrio alginolyticus* challenge. Aquaculture, 442: 125—131
- Hou F J, Liu Y J, He S L *et al*, 2015. A galectin from shrimp *Litopenaeus vannamei* is involved in immune recognition and bacteria phagocytosis. Fish & Shellfish Immunology, 44(2): 584—591
- Kawsar S M A, Fujii Y, Matsumoto R *et al*, 2008. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 150(4): 349—357
- Kim J Y, Kim Y M, Cho S K *et al*, 2008. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. Developmental & Comparative Immunology, 32(10): 1131—1141
- Leffler H, 2001. Galectins structure and function—a synopsis. In: Crocker P R ed. Mammalian Carbohydrate Recognition Systems: Results and Problems in Cell Differentiation. Berlin Heidelberg: Springer, 33: 57—83
- Li M, Wang J F, Song S Q *et al*, 2016. Molecular characterization of a novel nitric oxide synthase gene from *Portunus trituberculatus* and the roles of NO/O₂⁻-generating and antioxidant systems in host immune responses to *Hematodinium*. Fish & Shellfish Immunology, 52: 263—277
- Liu Y, Cui Z X, Li X H *et al*, 2012. A new anti-lipopolysaccharide factor isoform (PtALF4) from the swimming crab *Portunus trituberculatus* exhibited structural and functional diversity of ALFs. Fish & Shellfish Immunology, 32(5): 724—731
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. Methods, 25(4): 402—408
- Maldonado-Aguayo W, Teneb J, Gallardo-Escárate C, 2014. A galectin with quadruple-domain from red abalone *Haliotis rufescens* involved in the immune innate response against to *Vibrio anguillarum*. Fish & Shellfish Immunology, 40(1): 1—8
- Pan L Q, Yue F, Miao J J *et al*, 2010. Molecular cloning and characterization of a novel c-type lysozyme gene in

- swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(2): 286—292
- Shi X Z, Wang L, Xu S *et al*, 2014. A galectin from the Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) functions as an opsonin and promotes bacterial clearance from hemolymph. *PLoS One*, 9(3): e91794
- Song L S, Wang L L, Zhang H *et al*, 2015. The immune system and its modulation mechanism in scallop. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1): 65—78
- Song X Y, Zhang H, Wang L L *et al*, 2011. A galectin with quadruple-domain from bay scallop *Argopecten irradians* is involved in innate immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(5): 592—602
- Song X Y, Zhang H, Zhao J M *et al*, 2010. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(2): 326—332
- Vasta G R, 2009. Roles of galectins in infection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6): 424—438
- Wang M Q, Wang L L, Huang M M *et al*, 2016. A galectin from *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing microbe agglutination and haemocytes encapsulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 55: 10—20
- Wang X W, Wang J X, 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1—2): 27—38
- Wang Z L, Jian J C, Lu Y S *et al*, 2011. A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Marine Genomics*, 4(3): 229—236
- Wei X M, Yang J M, Liu X Q *et al*, 2012. Identification and transcriptional analysis of two types of lectins (SgCTL-1 and SgGal-1) from mollusk *Solen grandis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(2): 204—212
- Yamaura K, Takahashi K G, Suzuki T, 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(1): 168—175
- Yang H, Yu S S, Chai Y M *et al*, 2013. A galectin from roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*: molecular cloning and characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(3): 815—824
- Yang R Y, Rabinovich G A, Liu F T, 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10: e17
- Zelensky A N, Gready J E, 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*, 272(24): 6179—6217
- Zhang D L, Lv C H, Yu D H *et al*, 2016. Characterization and functional analysis of a tandem-repeat galectin-9 in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 52: 167—178

CLONING AND PROKARYOTIC EXPRESSION OF GALECTIN FROM *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

HAO Gui-Jie^{1,2}, LIN Feng², MU Chang-Kao¹, LI Rong-Hua¹, YAO Jia-Yun², PAN Xiao-Yi²,
YUAN Xue-Mei², SHEN Jin-Yu², WANG Chun-Lin¹

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Agriculture Ministry Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract Galectins are a family of Ca²⁺-independent soluble lectins characterized by their affinity to β -galactosides, and play important roles in innate immunity of vertebrates and invertebrates. A cDNA of galectin with one carbohydrate recognition domain (CRD) was cloned from *Portunus trituberculatus* (designated *PtGAL*) in RT-PCR and RACE technique. The full length of *PtGAL* was 875bp. The open reading frame encoded a polypeptide of 223 amino acids containing one carbohydrate recognition domain. The predicted molecular weight was 23529.4Da, and the theoretical isoelectric point was 5.21. The results of multiple amino acid sequences alignment show that the identity of *PtGAL* shared with *Eriocheir sinensis*, *Litopenaeus vannamei*, and *Marsupenaeus japonicas* was 77%, 66%, and 58%, respectively. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed to investigate the mRNA of *PtGAL* distribution in all tested tissues, including hepatopancreas, muscle, intestines, stomach, gill, heart, and gonad. The highest expression level was observed in gonad, while the lowest in hepatopancreas. After being challenged with *Vibrio alginolyticus*, the relative mRNA expression level of *PtGAL* in hepatopancreas was up-regulated and reached the maximum level at 12h (3.49 fold) post challenge. The recombinant *PtGAL* (*rPtGAL*) showed strong ability to combine G⁺ bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, or G⁻ bacteria such as *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and so on, and *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, as a new member of the galectin family, *PtGAL* is involved in the immune responses against bacterial infection.

Key words *Portunus trituberculatus*; galectin; quantitative real-time PCR; *Vibrio alginolyticus*; recombinant protein