

# 三疣梭子蟹几丁质酶基因克隆鉴定及在低盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析\*

张 凤<sup>1,2</sup> 吕建建<sup>1</sup> 刘 萍<sup>1①</sup> 高保全<sup>1</sup> 李 健<sup>1</sup> 陈 萍<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 几丁质酶在甲壳动物中参与多个生物学进程, 发挥重要作用。本研究采用 RACE 技术, 克隆获得总长为 3694 bp 的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶基因全长 cDNA 序列, 命名为 *PtCht* 基因。该基因 5' 和 3' 非编码区分别为 200bp 和 455bp, 开放阅读框为 3039bp, 推测编码 1012 个氨基酸, 预测分子量为 113.4kDa, 理论等电点为 6.289。生物信息学分析表明, *PtCht* 基因含有 2 个催化结构域和 1 个几丁质结合结构域 ChtBD2, 催化结构域具有几丁质酶第 18 家族的保守基序 Motif 、 、 、 ; 同源性和系统进化分析表明, 三疣梭子蟹 *PtCht* 基因与亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)*Cht* 的同源性最高; 荧光定量 RT-PCR 分析表明, *PtCht* 基因在各组织中均有表达, 而在眼柄和表皮中的相对表达量较高。*PtCht* 基因在蜕皮周期中的表达规律表明, *PtCht* 基因在不同蜕皮时期存在明显变化, 在表皮中先下调后上调; 在眼柄中, 呈整体上调趋势。通过分析 *PtCht* 基因在低盐胁迫进程中的表达规律发现, 低盐胁迫可显著改变 *PtCht* 基因在鳃和肝胰腺中的表达模式, 整体呈先下降后上升最后下降的表达趋势。该研究结果表明 *PtCht* 基因在三疣梭子蟹蜕皮发育和渗透压调节中发挥重要作用, 为深入研究三疣梭子蟹和其它甲壳动物几丁质酶的功能提供了重要信息。

**关键词** 几丁质酶; 蜕皮; 低盐胁迫; 三疣梭子蟹; 几丁质外骨骼; 基因表达

中图分类号 S9 doi: 10.11693/hyhz20140800220

甲壳类几丁质酶基因(*Chitinase*)属于 18 家族糖苷键水解酶多家族基因(Zhang *et al.*, 2014), 几丁质酶结构域典型: 第 18 家族几丁质酶催化结构域、富含 S/T 的连接区和结合几丁质的结构域, 其基本功能可以特异降解几丁质。甲壳动物在蜕皮过程中必须通过 *Chitinase* 消化旧的几丁质外骨骼。因此, *Chitinase* 是甲壳动物生长不可或缺的酶。除此之外, *Chitinase* 在甲壳动物中还具有其它重要的生理功能, 包括消化几丁质类食物以及参与免疫防御等(Arakane *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014)。相比昆虫而言(Zhu *et al.*, 2008; Arakane *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011), 由于缺少基因组背景, 甲壳类 *Chitinase* 研究开展较晚, 然而

由于其重要性, 近几年已成研究热点。目前在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)、日本仿长额虾 (*Pandalopsis japonica*) 以及日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 中均已开展 *Chitinase* 基因克隆、分类及功能研究。研究表明: 甲壳类几丁质酶基因至少分六类(陈少波等, 2004), 可能在甲壳类蜕皮及消化中发挥重要作用(Huang *et al.*, 2010; Proespraiwong *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014)。

通过筛选本实验室构建的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)高通量转录组文库, 发掘到一个三疣

\* 国家高技术研究发展计划(863 计划), 2012AA10A409 号; 农业科技成果转化资金项目, 2013GB23260589 号; 山东省自主创新专项, 2013CX80202 号; 国家自然科学基金, 41306177 号。张凤, 硕士研究生, E-mail: fenger8709@126.com

通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-08-17, 收修改稿日期: 2015-01-23

梭子蟹 *Chitinase* 基因, 命名为 *PtCht*。该基因在不同盐度胁迫下三疣梭子蟹鳃组织中显著差异表达(Lv *et al.*, 2013), 且通过聚类分析发现其不属于任何一个已知甲壳类 *Chitinase* 分类, 反而与昆虫 *Chitinase* 基因聚为一类, 暗示其可能为甲壳类中新的 *Chitinase* 成员。本研究根据转录组文库中 *PtCht* 基因部分序列, 通过 RACE 技术克隆该基因 cDNA 全长; 通过实时定量 PCR 研究该基因在三疣梭子蟹各组织中的表达分布以及在不同蜕皮时期中表达规律; 同时研究其在三疣梭子蟹低盐胁迫进程中鳃和肝胰腺组织中的表达变化。研究结果将丰富甲壳类 *Chitinase* 研究内容, 为进一步研究甲壳类 *Chitinase* 的功能提供了重要信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料来自于本实验养殖在昌邑市海丰水产养殖有限责任公司的健康三疣梭子蟹, 体质量 ( $5.78 \pm 1.11$ )g。暂养于 20m<sup>3</sup> 的蟹池中, 每池 200 只, 共 6 池, 暂养 3d。自然海水养殖(盐度 33), 水温控制在 24—26°C 左右, pH 8.7, 保持供氧充足, 每天更换 1/3 的水量, 暂养期间每天 18:00 喂食蓝蛤。

### 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

Trizol 试剂分别提取各组织的总 RNA, 用核酸定量仪(Biodropsis, BO-1000)与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量及完整性; 分别取相同量的第六对鳃和肝胰腺的总 RNA 混匀, 进行 3'和 5'RACE 的 cDNA 第一链的合成, 具体方法参照 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 说明书。

### 1.3 全长 cDNA 的克隆及测序

根据从三疣梭子蟹 cDNA 文库中获得的 *Chitinase* 的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物。3'和 5'末端扩增使用 Advantage 2 PCR Kit 进行。用特异性引物 Cht-F 和通用引物 UPM 进行 3'末端扩增, 用特异性引物 Cht-R 和通用引物 UPM 进行 5'末端扩增(表 1), 方法同段亚飞等(2013)。PCR 程序设为: 94°C 30 s, 65°C 1 min, 72°C 3 min, 30 个循环。

### 1.4 序列分析

利用 Vecror NTI 11.0 软件对测得的序列去除冗余序列并进行序列拼接, 开放阅读框的预测和氨基酸的翻译用软件 DNASTar 的 EditSeq 完成(徐文斐等, 2014)。同源性比对、蛋白质理化性质预测、蛋白质功能结构域分析、蛋白信号肽分析、*PtCht* 与其它物

表 1 三疣梭子蟹 *Chitinase* 克隆和 mRNA 相对表达分析所用引物序列

Tab.1 Sequences of primers used for *PtCht* cloning and relative mRNA expression analysis

引物	序列(5'-3')
Cht-F	ACGAAGGGTCTGGGTGGAGTGAT
Cht-R	TGTGGCTGCAAATGAAGGGGTCGA
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC
QCh-F	CTGCGAGAACACGACTTTGA
QCh-R	ATCAGGACCGACAGGAACAG
$\beta$ -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
$\beta$ -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC

种的 *Cht* 氨基酸序列多序列比对、构建系统进化树的具体方法见段亚飞等(2013)。

### 1.5 蜕皮周期实验

将三疣梭子蟹放在 20m<sup>3</sup> 蟹池自然海水中暂养 3d, 分 2 个池子, 每池 150 只, 按照朱冬发(沈洁等, 2011)的方法, 用解剖剪剪下游泳足趾节末端置于干净载玻片上, 于 Olympus CX21FS 显微镜下观察, 分别挑出处于蜕皮间期、前期、后期的三疣梭子蟹各 3 只。分别取第 1 对鳃、第 6 对鳃、肠、胃、表皮、肌肉、肝胰腺、心脏、眼柄、血细胞, 于液氮中冻存, 用于 RNA 的提取。

### 1.6 盐度胁迫实验

随机挑取暂养 3d 的三疣梭子蟹分为 2 组, 对照组(自然海水 33)和低盐组(盐度 11), 每组设 3 个平行, 每个平行 100 只, 于 3m<sup>3</sup> 蟹池中进行实验。低盐组盐度配制方法为往自然海水中注入淡水, 混匀, 使其盐度降至 11, 用 YSI 盐度仪进行盐度校准, 具体方法见隋延鸣等(2012)。各组分别于胁迫 0、3、6、12、24、48 和 72h 取鳃和肝胰腺, 每个时间点分别取 3 只三疣梭子蟹, 于液氮中冻存, 用于后续试验 RNA 的提取。

### 1.7 *PtCht* 基因 mRNA Real-time PCR 定量检测

Trizol 试剂分别提取对照组和实验组三疣梭子蟹所取组织的总 RNA, 使用 PrimeScript RT reagent Kit 反转录合成 cDNA。

根据已知的三疣梭子蟹管家基因  $\beta$ -actin 和拼接获得的 *PtCht* 基因 cDNA 全长序列, 分别设计一对正反特异引物( $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R, QCh-F 和 QCh-R)(表 1-1), 对不同时间中盐度胁迫的三疣梭子蟹鳃和肝胰腺中 *PtCht* 基因的相对表达量进行检测。使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂在 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪上利用 Real-time PCR 方法对胁迫进程中以及各个组织中 *PtCht* 基因的表达情

况进行分析。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 *PtCht* 基因的相对表达量, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 提取

利用 Trizol 试剂提取获得三疣梭子蟹所取各个组织的总 RNA, 经核酸定量仪检测, 其  $OD_{260}/OD_{280}$  均在 1.9—2.0 之间, 总 RNA 有较高的纯度; 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 呈现 3 条清晰的条带, 分别是 28S RNA、18S RNA 和 5S rRNA, 表明总 RNA 完整性较好, 可用于进行后续实验。

### 2.2 *PtCht* 基因的全长 cDNA 克隆

以三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织的总 RNA 混合物为模板, 反转录得到 3'RACE 和 5'RACE 的 cDNA 第一链。以特异引物 Cht-F 和 Cht-R 分别与通用引物 UPM 配对, 进行 3'和 5'RACE 扩增, 分别获得大小为 857bp 和 630bp 的 cDNA 片段。将两片段与已知表达序列标签(EST)拼接, 得到三疣梭子蟹几丁质酶 Chitinase 基因 cDNA 全长序列, 命名为 *PtCht*, GenBank 登录号: KM100753。该基因 cDNA 序列全长为 3694bp, 其中, 开放阅读框(ORF)3039bp, 5'端非编码区(5'-UTR)200bp, 3'非编码区(3'-UTR)455bp。3'端存在加尾信号 AATTA 和多聚腺苷酸 Poly A 尾(图 1)。

### 2.3 *PtCht* 基因序列分析及结构域预测

氨基酸序列分析可知, *PtCht* 基因编码一个由 1012 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 113.4kDa, 理论等电点为 6.289。氨基酸组成分析表明, *PtCht* 蛋白带有负电的氨基酸残基为 127 个(Asp 和 Glu), 带有正电的氨基酸残基为 116 个(Arg 和 Lys), 疏水性氨基酸残基为 316 个(Ala, Ile, Leu, Phe, Trp 和 Val), 极性氨基酸残基为 253 个(Asn, Cys, Gln, Ser, Thr 和 Tyr), 不稳定系数为 36.25, 亲水性总平均数为 -0.458, 属于稳定蛋白。结构域分析表明, 其 N 端含有 21 个氨基酸组成的信号肽, InterProScan 软件分析表明, *PtCht* 序列存在两个几丁质酶第 18 家族活性位点  $^{228}\text{FDGLDLDWE}^{236}$ ,  $^{664}\text{FDGLDIDWE}^{672}$ 。在 113—457 氨基酸和 549—894 氨基酸处分别存在两个几丁质酶第 18 家族催化结构域, 在 946—1004 氨基酸处存在含 6-Cys 的 Type-2 几丁质结合结构域(ChtBD2)。

### 2.4 *PtCht* 基因的同源性分析

BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *PtCht* 的氨基酸

序列, 得知三疣梭子蟹 *PtCht* 基因与亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)Cht 的同源性最高, 为 74%。与其它物种如翅膀带黑白斑的果蝇 (*Drosophila grimshawi*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambia* str.)、嗜凤梨果蝇 (*Drosophila ananassae*)、黑翅果蝇 (*Drosophila persimilis*) 和甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 的同源性分别为 67%、73%、72%、72% 和 72%。通过与亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 等动物的 Cht 氨基酸序列比对发现, 几丁质酶第 18 家族的催化结构域保守基序 Motif 、 、 、 和含 6 个 Cys 的几丁质结合结构域 ChtBD2 在几个物种中都存在(图 2)。

利用 MEGA 5.0 软件进行系统进化分析表明, 第 18 家族 型几丁质酶主要聚为两大类群: 昆虫类和甲壳动物, 三疣梭子蟹 (*P. trituberculatus*) 与昆虫类黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambia* str.) 紧密聚为一支, 之后的聚类顺序依次为与赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 等(图 3)。

### 2.5 *PtCht* 基因组织表达分析

**2.5.1 *PtCht* 基因的组织表达分布** 利用实时荧光定量 PCR 分析了三疣梭子蟹 *PtCht* 基因在不同组织中的表达分布特征, 结果表明, *PtCht* 基因在第 1 对鳃、第 6 对鳃、眼柄、肝胰腺、血细胞、心脏、肌肉、胃和肠中均有表达。在所有实验组织中, 表达量最高的是表皮, 依次是眼柄、胃、第 6 对鳃、第 1 对鳃、肠、肌肉、和心脏, 而在肝胰腺和血细胞中的表达量非常低(图 4)。

**2.5.2 *PtCht* 基因在不同蜕皮周期中的表达分析** 三疣梭子蟹不同蜕皮周期中 *PtCht* 基因在表皮和眼柄中的相对表达量如图 5 所示。与间期相比, 在表皮中, 前期 *PtCht* 基因的相对表达量出现显著下调, 后期 *PtCht* 基因的相对表达量出现显著上调; 与间期相比, 在眼柄中, 前期和后期 *PtCht* 基因的相对表达量呈整体上调趋势。

**2.5.3 *PtCht* 基因在盐度胁迫中的表达分析** 三疣梭子蟹盐度胁迫后 *PtCht* 基因在第六对鳃中的相对表达量如图 6 所示。与对照组相比, 低盐胁迫组中, *PtCht* 基因的相对表达量于低盐胁迫 3h 后出现显著下调, 6h 出现轻微的上调后, 于 12h 达到最小值, 相对表达量为对照组的 0.30 倍 ( $P < 0.05$ ); 随后, *PtCht* 的相对表达量开始显著上调, 于 24h 达到最大值, 相对

1 AA CAG CGG GCC CCG GGT AGA GCT GTG GCG GTG GCA GTA AGT GTG GTG TGA GGT TCC CCG CTG TCT CTC TCT CTC TGT CTC ACT CGC GCG 89  
90 CGC CGT CTC GAG CAA ACG AAA CCA CCT GCG CCT GGA CTT TGA GTG GTG AGA AGA GGA GGG TTC TGA CTC CCT ACT GGT GCT TCA ACC CGC 179  
180 CCT CCC TCC CTT CAC GAC ACA ATG AGG CTA CGC TGG ATA CTG CTG GGG GTT GTG TTG CTG GCC GCT CTC ACC ACA TCC CTA GAG CAA CGC 269  
M R L R W I L L G V V L L A A L T T S L E Q R  
270 GGA ACT TCG AGA TTC AGA GGC AGA CTA AGG GCA GGA CAG GCG ACG TCA GCT TCC GTT CAG ACT GAA ACG GCA GTG AAC GCG GTG GGG CGA 359  
G T S R F R G R L R A G Q A T S A S V Q T E T A V N A V G R  
360 AGG CGA CTG GCG ACG GGA ACC TCA ACG AAC ACT GTG AGC AGG AGA AGG CAG AGC GGC GGC ACC TCC AGG AAC AGA GTA AGG GTA CGC CCT 449  
R R L A T G T G T S T N T V S R R R Q S G G T S R N R V R V R P  
450 CGC ATC AAC TTG GCA GCG GGA AGA AGA GAT GAT GAC AAC GGC AAT GGC AAC GAT AAT GGC AAA TCC GGA GAC TCA GAC TAC AAC 539  
R I N L A A G R R R R D D D D N G N G N D N G K S G D S D Y K  
540 GTC GTT TGC TAC TAC ACC AAC TGG TCG CAA TAC AGA CAG AAG ATC GGC AAG TTC CTC CCA GAG CAC ATC GAC CCC TTC ATT TGC AGC CAC 629  
V V C Y Y T N W S Q Y R Q K I G K F L P E H I D P F I C S H  
630 ATC ATC TAC GCC TTC GGG TGG ATG AAG AAG GGC AGG CTC TCC TCC TTC GAA GCT AAC GAC GAA ACT AAA GAC GGC AAG ACT GGA TTT TAC 719  
I I Y A F G W M K K G R L S S F E A N D E T K D G K T G F Y  
720 GAG CAA GTG AAT GGA CTC AAG AAG CAG AAC CCC AAG TTA AAG GTT CTT CTC GCC CTT GGT GGA TGG TCC TTT GGT ACC AAG AAA TTC AAG 809  
E Q V N G L K K Q N P K L K V L L A L G W S F G T K K F K  
810 GAC ATG TCA GCC ACG AGA TAC ACG AGG CAG ACC TTC ATC TTC AGC GCC ATT CCC TTC CTG CGA GAA CAC GAC TTT GAT GGT CTT GAT CTT 899  
D M S A T R Y T R Q T F I F S A I P F L R E H D F D G L D L  
900 GAC TGG GAG TAC CCG AAA GGA AAC ATC GAT AAG GCT AAC TTC GTC CTG CTC CTG AAG GAA CTG TAC GAG GCT TTC GAG GCA GAG GCG AAA 989  
D W E Y P K G N I D K A N F V L L K E L Y E A F E A E A K  
990 GAA ACA GAA AAC CCC CGA CTG CTC CTT ACT GCT GCT GTT CTT GCT GGT CCT GAT ATT AAG GGA GGA TAT GAT GTC CCA GCT GTC TCC 1079  
E T G N P R L L L T A A V P V G P D N I K G G Y D V P A V S  
1080 AGG TAC CTC GAT TTC ATC AAC GTC ATG GCC TAC GAT TTC CAT GGC AAG TGG GAG AAC ACA GTC GGC CAC AAT GCC CCG GTG CAT GCC CCC 1169  
R Y L D F I N V M A Y D F H G K W E N T V G H N A P V H A P  
1170 TCT GAG GAC ACG GAG TGG AGG AAG CAG CTC TCT GTC GAT CAC GCA TCC AAC CTG TGG GCC AAG CTG GGA GCA CCA AAG GAG AAG CTG ATC 1259  
S E D S E W R K Q L S V D H A S N L W A K L G A P K E K L I  
1260 ATC GGC ATG CCA ACC TAC GGC CGC ACC TTC ACT CTC TCC AAC CCA GCA CGC AAC TCG GTC AAC TCC CCA GCC AGC GGT GGA GGC GAG GCA 1349  
I G M P T Y G R T F T L S N P A R N S V N S P A S G G G E A  
1350 GGG AAG TAC ACA GGC GAG GAA GGA TTC ATG GCA TAC TAT GAG GTA TGT GAG CAC CTA CGG ACT GGA GGT GAG TAC ATC TGG CAC GAG GAG 1439  
G K Y T G E E G F M A Y Y E V C E H L R T G G E Y I W H E E  
1440 ATG CAG GTG CCG TAC ATG GTG AAG GGC AAG CTC TGG GTT GGC TTT GAT GAC GAG CGC GCC ATT CGG AAC AAG ATG AAC TGG CTC AAG AAG 1529  
M Q V P Y K G K L W V G F D D E R A I R N K M N W L K K  
1530 GGA GGA TTT GGA GGC GCA ATG GTC TGG ACG GTG GAC ATG GAC GAC TTT ACC GGT GAA GTC TGC GGT GGT GGT GTC AAG TAC CCT CTC ATC 1619  
G G F G G A M V W T V D M D D F T G E V C G G V K Y P L I  
1620 GGT ATC ATG ACA GAG GAG CTG CTG GGA AGA CCA CGA GGA GGC AAG GAT GTG GAC TGG GCA GCG GTG ACC AAG ACC TCC ATT GCG AGA CCC 1709  
G I M T E E L L G R P R G G K D V D W A A V T K T S I A R P  
1710 ACT ACC CTG CCA CCA CCC ATC TCT GTT AAC CCC ATG GAG GTG ATC CCG GAG TAC CAA GCC ACT CTA AAG CAA CAG CAG ATC AGC TCA CGT 1799  
T T L P P P I S V N P M E V I R E Y Q A T L K Q Q Q I S S R  
1800 ATT GAC ATC ATT GAC ATC TTA CCT GAA CTG CCA AAG GAT GCC CCT AAG GTA ATG TGC TAC TTC ACC TCA TGG TCT GTC AAG AGC CCT GGC 1889  
I D I I D I L P E L P K D A P K V M C Y F T S W S T P R G  
1890 GCT GGA AGG TTC GAG GTG GAA AGT ATC GAT CCC TTC CTC TGC ACC CAT GTT ATC TAT GCC TTT GGT GGG ATG GAT AAC TAC CGC CTG GCT 1979  
A G R F E V E S I D P F L C T H V I Y A F G G M D N Y R L A  
1980 CCG GGT CAC CCC TCT GAT GTT GGC GAC GGA TTC AAG GAC GGA ACT TAC ACT CGC CTC ATG AAG CTC AAG GAA AAG AAC CCG AAT CTC AAG 2069  
P G H P S D V G D G F K D G T Y T R L M K L K E K N P N L K  
2070 ATC CTG TTG GCC CTC GGT GGA TGG TCT TTT GGA TCC AAC CCT TTC CAG GAC CTT GTT TCA AGC CAG TAC AGA ATG AAC GGC TTT GTG TAC 2159  
I L L A L G G W S F G S K P F Q D L V S S Q Y R M N G F V Y  
2160 GAC TCC CTG GAA TTC CTT CGC ACT CAT GAG TTT GAT GGA CTG GAC ATT GAC TGG GAG TAC CCA AGA GGA CCA GAC GAC AAG GCA AAC TAT 2249  
D S L E F L R T H E F D G L D I D W E Y P R G P D D C A N Y  
2250 GTG AAT CTT CTC AAG GAA CTT CGT ATT GCC TTT GAA GGA GAG GCA TCA TCC ACT GGC CAT TCC CGT CTC CTC CTC TCT GCC GCT GTA CCT 2339  
V N L L K E L R I A F E G E A S S T G H S R L L L S A A V P  
2340 GCC TCC TTT GAA GCT CTG GCT GCT GGC TAT GAT GTG CCA GAG ATC AGC AAG TAC CTG GAC TAC ATC AAC GTC ATG TCC TAC TTT CAT 2429  
A S F E A L A A G Y D V P E I S K Y L D Y I N V M S Y D F H  
2430 GGC ATG TGG GAC AAC GTG GTG GGA CAC AAC TCT CCC CTG CTG CCC CTC GAG ACA GCC TCC TCC TAC CAG AAG AAG CTG ACC ATG GAC TAC 2519  
G M W D N V V G H N S P L L P L E T A S S Y Q K K L T M D Y  
2520 AGT GTC AAG GAG TGG ATG AAA CAG GGG GCA CCA GCA CAG AAG ATC ATG GTG GGA ATG CCA ATG TAC GGT CGC TCC TTC ACC CTC AAG AAC 2609  
S V K E W M K Q G A P A Q K I M V G M P M Y G R S F T L K N  
2610 ACC ACA CAG TTT GAC ATT GGA GCT GAG GTG ATG GGA GGT GGA CAT GCT GGC CGG TAC ACG CAG GAG GAG GGA TTT ATG GCT TAC TAT GAG 2699  
T T Q F D I G A E V M G G G H A G R Y T Q E E G F M A Y Y E  
2700 GTG TGT GAC TTC CTG TAC GAG GAG AAC ACT ACG CTG GTG TGG GAC AAC CAG CAG GAT GTC CCC TTC GCC TAC AAT GGG GAT CAG TGG ATC 2789  
V C D F L Y E E N T T L V W D N E Q Q V P F A Y N G D Q W I  
2790 GGC TTT GAT GAG CGC TCT CTT GGT GTT AAG GGT GAC TGG CTC AAG ACG AAG GGT CTG GGT GGA GTG ATG TCG AGT GTT GAC ATG 2879  
G F D E R S L G V K G D W L K T K G L G G V M I W S V D M  
2880 GAT GAC TTC CGA GGC AAC TGT GGC ACT GGC AAG TAC CCG CTG CTT GCC TCA CTC AAT GAA ATG ATT TCC AAC TAC TCT GTG GCA CTC ACC 2969  
D D F R G N C G T G K Y P L L A S L N E M I S N Y S V A L T  
2970 TAT GAG GGC CCC TAT GAG AAC ACT GGC ACT CTG CAT GGA ACC AGT GCC AAG AAG GAC CCC AAT GTG ATT TCC TGC GAC GAG GCG GAC GGA 3059  
Y E G P Y E N T G T L H G T S A K K D P N V I S C D E A D G  
3060 CAC ATC AGC TAC TAT GAA GAC AAG CAG GAC TGC ACA CGT TAT TTC ATG TGT GAG GGG GAG AGG AAG CAC CAC ATG CCC TGC CCT GTC AAC 3149  
H I S Y Y E D K Q D C T R Y F M C E G E R K H H M P C P V N  
3150 CTG GTG TTC AAT GCG GCC CAG AGC GTG TGT GAC TGG CCT GAG AAT GTC CCT GGG TGT GAG ACG GCC ATT TCC AAC CCT GCA GCG CCG TGA 3239  
L V F N A A Q S V C D W P E N V P G C E T A I S N P A R \*  
3240 ACA GAT TCA AAC ACT GAT TCT TTT TAG CTT TTA ATG TGA AAT TTC TCT ATC GGA TTT TTT TTC TCT GGT TGG TTT TGT TTT GAT GTG 3329  
3330 AAT TGC AAA CTT TTA AGG TCT TCT ATA TAT GAG AAT GTT TGT TTT CTT TTG GTT TTT ATG ATT TTT TTG TAT ATA TTT ACA AAT TAT TAT 3419  
3420 TTT TGT TAT TTT ATT ATT TTT AGA TGT GAT AGG TAA AGT ACG GAA GAA AAT TAT TAT TAT TAT TTT TTT TTT TAT TCA TTT ACG 3509  
3510 AAT GAG GAA AGG ATC TGA TCG AGA GAA AAA AAA ACA AGA AAA GAT CAT TGT CAT TTA CTT CAC AAG ATC AGA TAA GGC GTT GAA ATA TCG 3599  
3600 TCT TTT ATT TAT CTG TAT TTC ATT TAT CGT TAT ATC CTT TAT CAT ATA TAA TTA AAC GTA TAA CAA ATG CTA AAA AAA AAA AAA AAA 3689  
3690 AAA AA 3694

图 1 三疣梭子蟹 *PtCht* 基因 cDNA 全长核苷酸序列和其推导出的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PtCht* gene

起始密码子(ATG)、加尾信号(AATTTAA)和终止密码子(TGA)用细线方框标出;粗线方框内为几丁质酶第 18 家族保守基序;信号肽以细下划线标出;ChtBD2 结构域用粗下划线标出

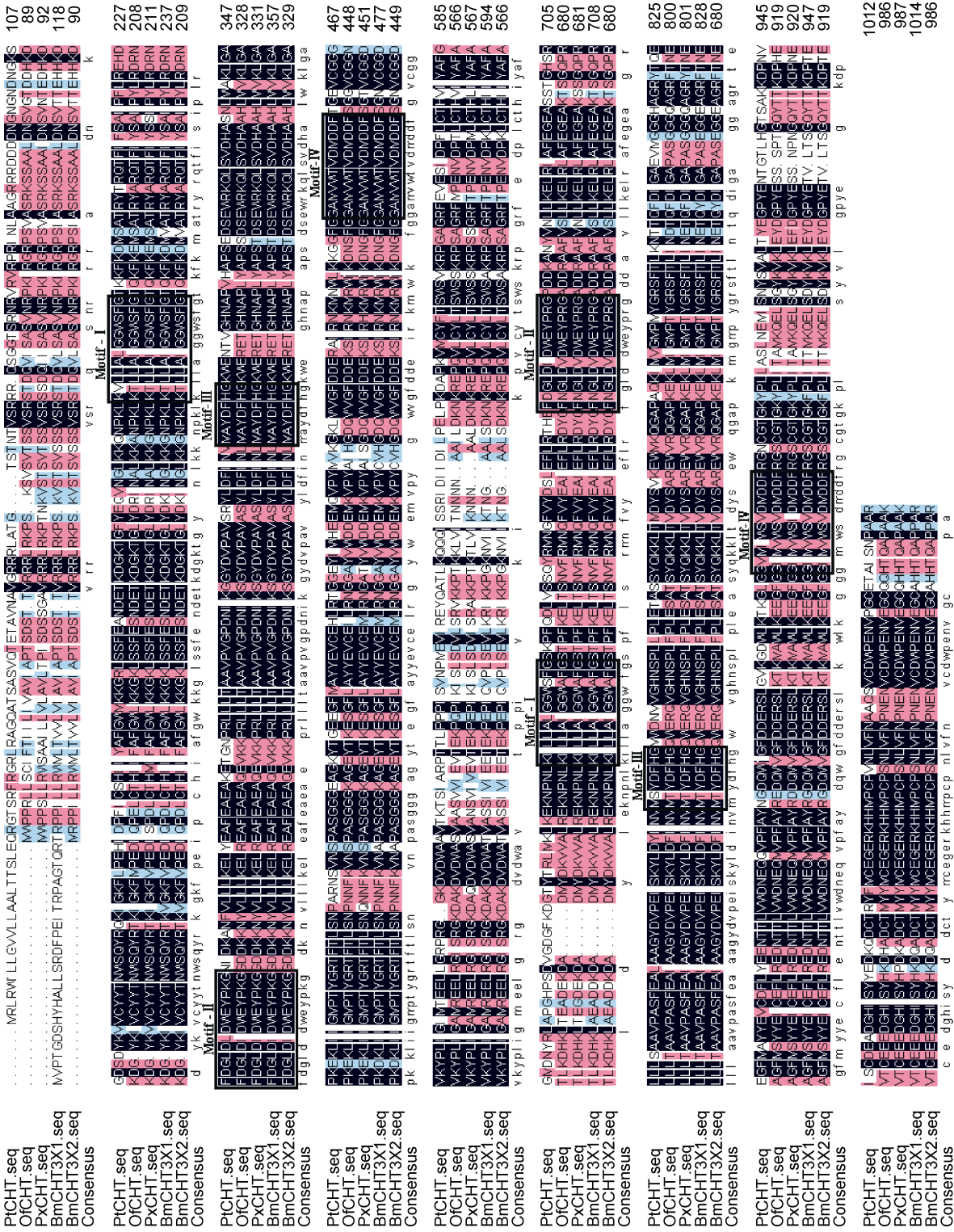


图 2 三疣梭子蟹 *Pichia* 氨基酸序列的多序列比对  
 Fig.2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Pichia* with chitinases of other species  
 几丁质酶第 18 家族保守基序以方框表示

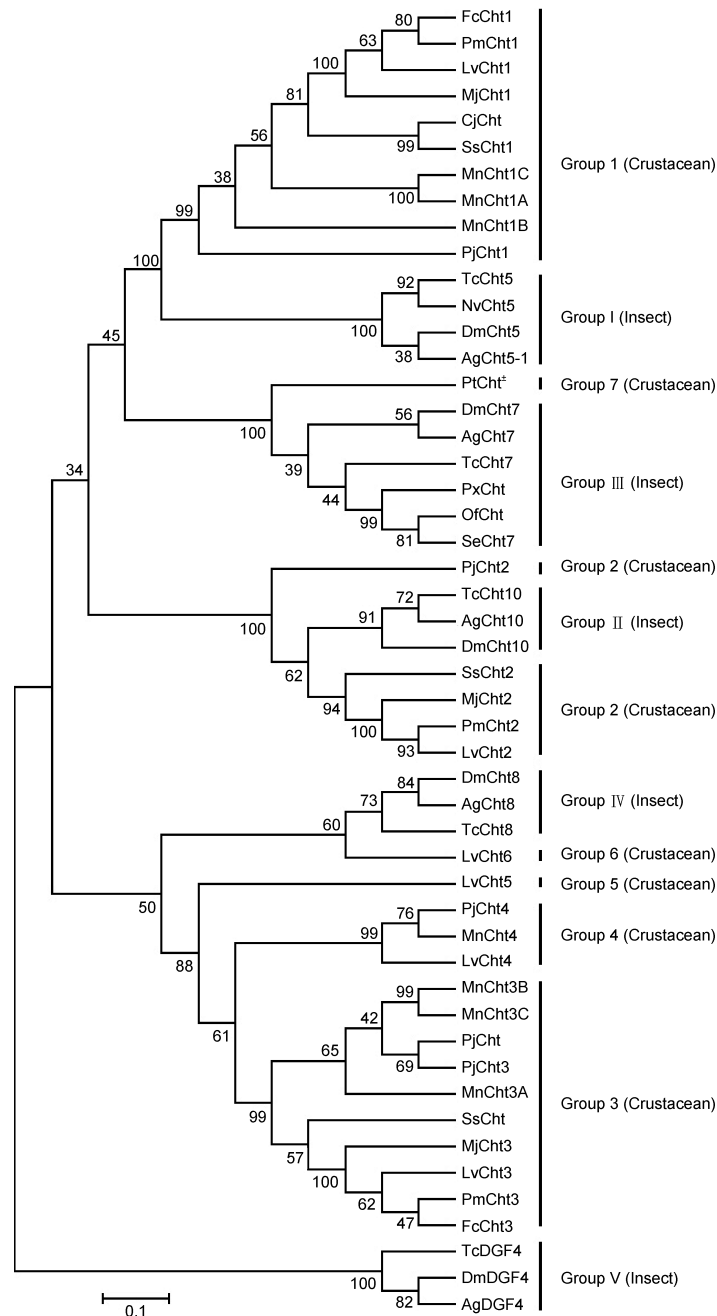


图 3 三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 *PtCht* 的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis on *chitinase* protein of *P. trituberculatus*

三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 *PtCht*; 各物种几丁质酶蛋白 Cht GenBank 登录号: 日本沼虾 Cht1A (KF466274.1); 日本沼虾 Cht1B (KF466275.1); 日本沼虾 Cht1C (AHL24866.1); 日本沼虾 Cht3A (KF466276.1); 日本沼虾 Cht3B (KF466277.1); 日本沼虾 Cht3C (KF466278.1); 日本沼虾 Cht4 (KF466279.1); 中国对虾 Cht1 (ABB85237.1); 中国对虾 Cht3 (DQ000159.1); 斑节对虾 Cht1 (AAD40313.1); 斑节对虾 Cht2 (ADG22164.1); 斑节对虾 Cht3 (ADG22163.1); 锯缘青蟹 Cht (ABY85409.1); 锯缘青蟹 Cht1 (ACG60512.1); 锯缘青蟹 Cht2 (ACZ53950.1); 日本蟳 Cht (AFF59213.1); 日本囊对虾 Cht1 (BAA12287); 日本囊对虾 Cht2 (BAA14014); 日本囊对虾 Cht3 (BAA22854); 凡纳滨对虾 Cht1 (EU883591.1); 凡纳滨对虾 Cht2 (EU861222.1); 凡纳滨对虾 Cht3 (AAN74647.1); 凡纳滨对虾 Cht4 (FJ888480.1); 凡纳滨对虾 Cht5 (FJ888481.1); 凡纳滨对虾 Cht6 (GQ916594.1); 日本仿长额虾 Cht (AFC60660.1); 日本仿长额虾 Cht1 (JF694836.1); 日本仿长额虾 Cht2 (JN982965.1); 日本仿长额虾 Cht3 (JF694838.1); 日本仿长额虾 Cht4 (JF694837.1); 黑腹果蝇 Cht5 (NP\_650314.1); 黑腹果蝇 Cht7 (NP\_647768.2); 黑腹果蝇 Cht8 (NP\_611542.1); 黑腹果蝇 Cht10 (EAA46011.1); 赤拟谷盗 Cht5 (NP\_001034524.1); 赤拟谷盗 Cht7 (NP\_001036035.1); 赤拟谷盗 Cht8 (NP\_001036067.1); 赤拟谷盗 Cht10 (NP\_001038091.1); 冈比亚按蚊 Cht5-1 (HQ456129); 冈比亚按蚊 Cht7 (XP\_308858.4); 冈比亚按蚊 Cht8 (XP\_316448.2); 冈比亚按蚊 Cht10 (XP\_317398.3); 丽蝇蛹集金小蜂 Cht5 (NP\_001155084.1); 亚洲玉米螟 Cht (AGX32025.1); 小菜蛾 Cht (AFI55112.1); 甜菜夜蛾 Cht7 (AFM38213.1)

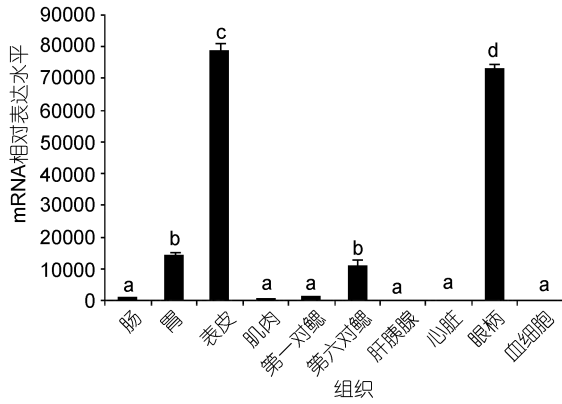


图 4 三疣梭子蟹 *PtCht* 基因在不同组织中的表达分布  
Fig.4 Distribution of *PtCht* gene expression in different tissues of *P. trituberculatus*  
不同组织表达量均以与血细胞相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著( $P<0.05$ )

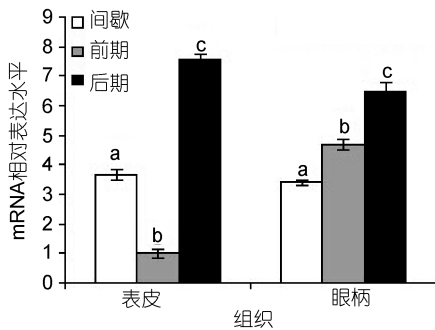


图 5 不同蜕皮周期三疣梭子蟹表皮和眼柄中 *PtCht* 基因的表达情况  
Fig.5 Expression of *PtCht* gene in *P. trituberculatus* cuticle and eyestalk tissues during different molting cycle  
不同组织各蜕皮周期表达量均以与表皮前期相比较的倍数表示, 同组织不同英文字母表示差异显著( $P<0.05$ )

表达量分别为对照组的 2.27 倍( $P<0.05$ ), 随后相对表达量于 48—72h 再次出现下调现象(图 6)。

Real-time PCR 检测了三疣梭子蟹盐度胁迫后不同时间点肝胰腺中 *PtCht* 基因的相对表达情况。与对照组相比, 低盐胁迫后, *PtCht* 基因的相对表达量于 3 h 出现下调现象, 并于 12 h 达到最小值, 差异显著( $P<0.05$ ); 随后于 12—48 h 出现显著上调, 并于 48 h 达到最大值, 相对表达量为对照组的 4.63 倍( $P<0.05$ ), 然后于 48—72 h 出现下调现象(图 7)。

### 3 讨论

几丁质酶在甲壳动物的蜕皮过程中起着重要的生理作用, 消化旧的外骨骼, 将其变成可溶性物质, 部分被机体重吸收, 合成新的外骨骼(Huang *et al.*, 2010)。本实验克隆出一个全长为 3694bp 的几丁质酶

基因 *PtCht*。结构预测发现 *PtCht* 存在典型的几丁质酶结构, 表明其具有几丁质分解活性, 确为第 18 家族几丁质酶家族成员(陈少波等, 2004)。进化树分析表明其于已知的任何一种甲壳类几丁质酶成员均聚不到一类, 反而与昆虫几丁质酶基因聚为一支, *PtCht* 含有两个催化结构域, 昆虫型几丁质酶也有两个催化结构域(Zhu *et al.*, 2008), 广泛存在于昆虫、节肢动物中的型几丁质酶都归于第 18 家族(Bormann *et al.*, 1999), 暗示 *PtCht* 可能与昆虫一些几丁质酶基因同源。

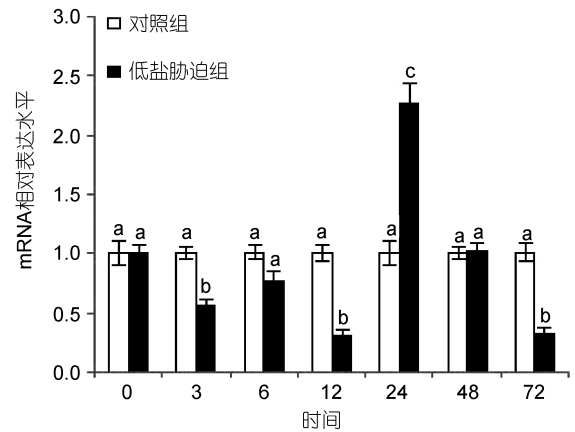


图 6 低盐胁迫下三疣梭子蟹第六对鳃中 *PtCht* 基因的表达情况  
Fig.6 Expression of *PtCht* gene in *P. trituberculatus* gill tissue under low salinity stress  
低盐胁迫后不同时间点表达量均以与各时间点对照相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著( $P<0.05$ )

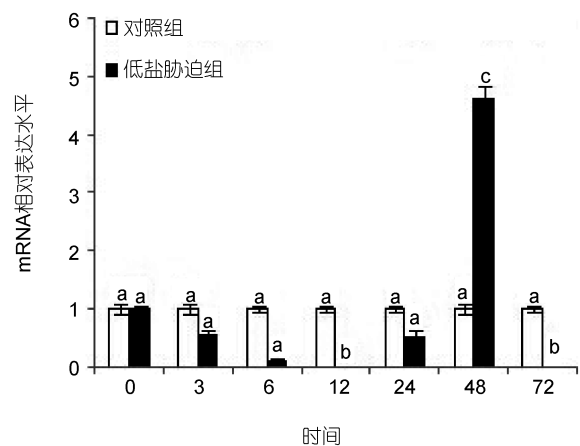


图 7 低盐胁迫下 *PtCht* 基因在三疣梭子蟹肝胰腺中的表达变化  
Fig.7 Expression of *PtCht* in *P. trituberculatus* hepatopancreas tissue under low salinity stress  
低盐胁迫后不同时间点表达量均以与各时间点对照相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著( $P<0.05$ )

甲壳动物个体的生长发育伴随有周期性的蜕皮过程。眼柄-窦腺复合体为甲壳类重要的神经内分泌器官,是甲壳类蜕皮调控的重要器官,而甲壳类蜕皮首先需要降解旧的几丁质表皮,之后合成新的几丁质表皮,显而易见,眼柄和表皮是调控甲壳类蜕皮的关键组织。研究发现,甲壳动物几丁质酶在甲壳动物蜕皮周期中发挥作用,但基因不同,其在蜕皮过程中起的作用也可能不同(吕黎等,2011)。日本对虾(*Penaeus japonicus*) *PjCht2* (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1997)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) *PmCht1* (Tan *et al.*, 2000)和 *PmCht2* (Zou, 2009)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Priya *et al.*, 2009) *FcCht1* 和 *FcCht3*、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) (Zhang *et al.*, 2014) *MnCht1A*、*MnCht1B* 和 *MnCht3B* 等几丁质酶基因的表达在甲壳动物不同蜕皮阶段中表现出一定的波动变化,这种变化和血淋巴中的蜕皮激素含量存在相关性(吕黎等,2011)。

本实验组织表达分布结果表明, *PtCht* 基因在所研究组织中均有表达,在表皮和眼柄中表达量较高,说明该基因的主要功能很可能与三疣梭子蟹蜕皮相关。与间期相比,在表皮中,前期 *PtCht* 基因的相对表达量出现显著下调,后期 *PtCht* 基因的相对表达量出现显著上调,表达量达到最大;与间期相比,在眼柄中,发现 *PtCht* 在蜕皮前期表达上调,到后期表达量达到最大,表明几丁质酶 mRNA 的表达可能受到了蜕皮激素的调节而参与蜕皮过程。这与昆虫第十八家族几丁质酶 group 基因的时空表达特性基本一致,东亚飞蝗(*Locusta migratoria*) *LmCht1* 也是在表皮中特异表达,并在昆虫发育后期表达量越来越高;东亚飞蝗 *LmCht6* 在表皮中表达量也较高,随着昆虫发育表达量越来越高,到成虫阶段,表达量降低;RNAi 结果表明 *LmCht6* 在东亚飞蝗蜕皮过程中发挥着非常重要的作用(李大琪等,2011)。作为昆虫型几丁质酶成员赤拟谷盗 *TcCht7* 和黑腹果蝇 *DmCht7* 可能在组织分化中起作用(Ren *et al.*, 2005),纯化的壁虱型几丁质酶存在于新旧表皮之间,在蜕皮生理中发挥着一定的作用(You *et al.*, 2003)。

盐度变化可以开启甲壳动物个体本身的渗透压调节机制,在一定阈值内,盐度的下降会导致甲壳动物蜕皮发育周期的缩短、蜕皮率增高,从而促进甲壳动物的生长(Bray *et al.*, 1994; Mu *et al.*, 2005; 杨其彬等,2008; 王冲等,2010)。鳃又是三疣梭子蟹的重要器官,可以在水中进行气体交换,调节渗透压和调节离

子平衡(韩晓琳等,2014)。比较本实验室转录组研究结果发现,该基因在不同盐度胁迫下三疣梭子蟹鳃中表达具有显著差异(Lv *et al.*, 2013),这些结果均暗示第六对鳃可能参与三疣梭子蟹渗透压调节进程。低盐胁迫下 *PtCht* 基因的表达在第六对鳃中总体呈先下调后稍微回升再下调到最低,再回升最后又下调的表达规律,在肝胰腺中呈现先下调后回升再下调的表达规律。表明 *PtCht* 基因参与了三疣梭子蟹低盐胁迫应答,在其透压调节进程中起到了一定的作用,提高了三疣梭子蟹抵抗盐度胁迫的能力,但是其具体的调节机制还有待于进一步的探索。

#### 4 结论

首次克隆出了三疣梭子蟹 *PtCht* 基因 cDNA 序列全长,分析 *PtCht* 基因在三疣梭子蟹蜕皮周期和低盐胁迫进程中的表达规律,得知 *PtCht* 基因在三疣梭子蟹蜕皮发育和渗透压调节中都发挥了一定的作用,可初步认为 *PtCht* 参与了三疣梭子蟹的盐度适应性调节过程,进一步推测 *PtCht* 可能是盐度影响三疣梭子蟹蜕皮的重要调控因子之一,为深入研究几丁质酶在三疣梭子蟹和其它甲壳动物蜕皮机制中的功能提供了重要信息。

#### 参 考 文 献

- 王 冲,姜令绪,王仁杰等,2010. 盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响. 水产科学, 29(9): 510—514
- 吕 黎,宁黔翼,2011. 甲壳动物几丁质酶基因结构与功能的研究进展. 生理科学进展, 42(6): 457—459
- 李大琪,杜建中,张建琴等,2011. 东亚飞蝗几丁质酶家族基因的表达特性与功能研究. 中国农业科学, 44(3): 485—492
- 杨其彬,叶 乐,温为庚等,2008. 盐度对斑节对虾蜕壳、存活、生长和饲料转化率的影响. 南方水产, 4(1): 16—21
- 沈 洁,朱冬发,胡则辉等,2011. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. 水产学报, 35(10): 1481—1487
- 陈少波,吴根福,2004. 几丁质酶研究进展. 科技通报, 20(3): 258—262
- 段亚飞,刘 萍,李吉涛等,2013. 脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析. 动物学研究, 34(1): 39—46
- 徐文斐,刘 萍,李吉涛等,2014. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) *vasa* 基因 cDNA 克隆及其在卵巢发育中的表达分析. 海洋与湖沼, 45(3): 574—582
- 隋延鸣,高保全,刘 萍等,2012. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析. 大连海洋大学学报, 27(5): 398—401
- 韩晓琳,高保全,王好锋等,2014. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃



- 和肝胰腺显微结构及家系存活的影响. 渔业科学进展, 35(1): 104—110
- Arakane Y, Muthukrishnan S, 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. Cellular and Molecular Life Sciences, 67(2): 201—216
- Bormann C, Baier D, Hörr I *et al*, 1999. Characterization of a novel, antifungal chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity. Journal of Bacteriology, 181(24): 7421—7429
- Bray W A, Lawrence A L, Leung-Turgillo J R, 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. Aquaculture, 122(2—3): 133—146
- Huang Q S, Yan J H, Tang J Y *et al*, 2010. Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 29(1): 75—81
- Lv J, Liu P, Wang Y *et al*, 2013. Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation. PLoS One, 8(12): e82155
- Mu Y C, Wang F, Dong S L *et al*, 2005. The effects of salinity fluctuation in different ranges on intermolt period and growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. Acta Oceanologica Sinica, 27(2): 122—126
- Priya T A J, Li F H, Zhang J Q *et al*, 2009. Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on E75 and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 153(1): 121—129
- Proespraiwong P, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V, 2010. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 156(2): 86—96
- Ren N, Zhu C M, Lee H *et al*, 2005. Gene expression during *Drosophila* wing morphogenesis and differentiation. Genetics, 171(2): 625—638
- Rocha J, Garcia-Carreño F L, Muhlia-Almazán A *et al*, 2012. Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molting cycle. Aquaculture, 330—333: 111—115
- Tan S H, Degnan B M, Lehnert S A, 2000. The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. Marine Biotechnology, 2(2): 126—135
- Watanabe T, Kono M, 1997. Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zoological Science, 14(1): 65—68
- Watanabe T, Kono M, Aida K *et al*, 1996. Isolation of cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 5(4): 299—303
- You M, Xuan X, Tsuji N *et al*, 2003. Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. The Journal of Biological Chemistry, 278: 8556—8563
- Zhang J Q, Sun Y Y, Li F H *et al*, 2010. Molecular characterization and expression analysis of chitinase (*Fcchi-3*) from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Molecular Biology Reports, 37(4): 1913—1921
- Zhang J, Zhang X, Arakane Y *et al*, 2011. Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). PLoS One, 6(5): e19899
- Zhang S Y, Jiang S F, Xiong Y W *et al*, 2014. Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 167: 30—40
- Zhu Q S, Arakane Y, Banerjee D *et al*, 2008. Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38(4): 452—466
- Zou E M, 2009. Effects of hypoxia and sedimentary naphthalene on the activity of *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in the epidermis of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. Bulletin of Environment Contamination and Toxicology, 82(5): 579—582

## CLONING AND EXPRESSION OF CHITINASE UNDER LOW SALINITY STRESS DURING MOLTING IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

ZHANG Feng<sup>1,2</sup>, LV Jian-Jian<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, GAO Bao-Quan<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** Chitinase is an essential enzyme in crustaceans involved in several biological processes, including digestion, moulting, and defense against viruses. We identified a chitinase gene in swimming crab *Portunus trituberculatus*, named *PtCht*, according to established expressed sequence tag (EST) information using Rapid Amplification of the cDNA Ends (RACE) technique. The full-length cDNA of *PtCht* was 3694 bp, containing a 5'-untranslated region (UTR) in 200 bp, 3'-UTR in 455 bp with a poly (A) tail, an open reading frame (ORF) in 3039 bp, encoding a 1012 amino-acid polypeptide; molecular weight was predicted for 113.4 kDa and isoelectric point estimated for 6.289. Sequence analysis revealed that the conserved domains in chitinases family 18 were predicted in the amino acid sequence of *PtCht*, containing a signal peptide, two glycoside hydrolase catalytic domains that contain conserved Motif I, II, III, and IV, a serine/threonine-rich linker, and a chitin-binding domain. Homologous analysis showed that *PtCht* has the highest homology to chitinase of *Ostrinia furnacalis*. The quantitative real-time RT-PCR showed that *PtCht* gene could be detected in all tested tissues of *P. trituberculatus*, in higher expression level in cuticle and eyestalk. During the moulting cycle, the expression of *PtCht* gene in cuticle, fell first, then rose; in eyestalk, kept rising. After challenged by low salinity, the expressions of *PtCht* gene in gill and hepatopancreas of *P. trituberculatus* fell first, then rose. Analysis of the moulting cycle and low-salinity (at 11) stimulation provided further evidence that *PtCht* played pivotal roles during moulting in osmotic regulation. Future investigations shall focus on the functions of chitinase in *P. trituberculatus* and other crustaceans.

**Key words** Chitinase; moulting; low salinity stress; *Portunus trituberculatus*; chitin exoskeleton; gene expression