

三疣梭子蟹几丁质酶基因(*PtCht6*)的克隆及其在免疫中的功能分析*

宋柳^{1,3} 吕建建^{2,3} 王磊^{1,3} 孙东方³ 刘萍^{2,3}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266235; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

摘要 几丁质酶(chitinase)在甲壳动物的蜕皮、消化和免疫等很多生物学过程中发挥重要功能,为深入探讨几丁质酶的免疫防御机制,本实验利用 RACE 技术克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)*PtCht6* 基因。该基因 cDNA 全长 2736bp, 开放阅读框(ORF)2103bp, 编码 700 个氨基酸, 具有几丁质酶 GH18 家族典型特征。利用实时荧光定量技术分析 *PtCht6* 在三疣梭子蟹不同组织、不同蜕皮阶段、不同病原感染以及低盐胁迫(11)下的表达特征, 结果显示: *PtCht6* 在各组织中均有表达且在肝胰腺中的表达量最高; 在不同蜕皮时期的肝胰腺中, 其表达量由蜕皮后期(A/B)、蜕皮间期(C)、蜕皮前期(D)依次递减($P<0.05$); 人工感染 WSSV 和副溶血弧菌后, *PtCht6* 的表达量在肝胰腺中分别于 12h、72h 达到最大值, 在血细胞中均于 12h 达到最大值, 且相较于对照组, 整体显著上调表达($P<0.05$); 低盐胁迫能够显著抑制该基因的表达, 最高抑制 73 倍($P<0.05$)。同时发现, 低盐环境下感染 WSSV 后, 该基因达到峰值的时间明显延迟(至少延迟 12h, $P<0.05$)。该研究结果预示 *PtCht6* 作为免疫因子参与三疣梭子蟹的病原防御, 且低盐胁迫在一定程度上抑制了该基因的免疫功能。

关键词 三疣梭子蟹; 几丁质酶; 白斑综合征病毒(WSSV); 副溶血弧菌; 低盐胁迫

中图分类号 Q78 **doi:** 10.11693/hyhz20190100001

几丁质酶(chitinase)是一种广泛存在于节肢动物, 参与机体蜕皮生长、变态发育及免疫应答等生理过程的关键酶类, 可通过裂解几丁质(chitin)从而发挥多种功能(李旭光等, 2017; 张文宜等, 2018; Ravichandran *et al.*, 2018)。节肢动物几丁质酶属于 18-糖苷键水解酶(GH18)多基因家族, 目前大多研究集中于昆虫中, 其成员被归类为 8 个组别(Group1—8) (Zhou *et al.*, 2018a)。相比于昆虫, 甲壳动物在该方面的研究相对滞后, 目前仅发现 7 组几丁质酶基因, 其中在日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)中发现了 10 个, 在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中发现了 6 个, 研究表明其在消化、蜕皮及免疫应答调控中发挥一定功能

(Salma *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2018b)。三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶基因研究刚刚起步, 仅有 *PtCht3*(Group 3)(张凤等, 2017)、*PtCht* (Group 7)(张凤等, 2015)和 *PtChti*(Group 3)(王伟等, 2015)等几例, 功能研究主要聚焦于蜕皮及盐度适应等。Group 5 是甲壳动物几丁质酶基因家族的重要成员, 在斑节对虾(*Penaeus monodon*)(Zhou *et al.*, 2018a)、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Huang *et al.*, 2010)及拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)(Zhou *et al.*, 2018b)等中均已被挖掘, 研究发现其在机体免疫防御中发挥重要功能(Niu *et al.*, 2018)。但目前尚未见三疣梭子蟹 Group 5 几丁质酶基因的相关研究报道。

* 国家虾蟹产业技术体系, CARS-48 号; 泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划, LJNY2015002 号; 国家自然科学基金面上项目, 41576147 号, 41776160 号; 青岛市应用基础研究计划项目, 17-1-1-95-jch 号。宋柳, 硕士研究生, E-mail: 1448067483@qq.com

通信作者: 刘萍, 研究员, 硕士生导师, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-01-01, 收修改稿日期: 2019-03-06

三疣梭子蟹是重要的海水经济蟹类(任海波等, 2018), 对虾白斑综合征病毒(WSSV) (Marques *et al.*, 2011)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(Sullivan *et al.*, 2018)是致其死亡的主要病原。盐度是三疣梭子蟹养殖中的重要环境因子(张凤等, 2015), 由于阴雨天气及大换水等常会导致养殖水体盐度急剧变化, 使得三疣梭子蟹产生应激反应, 生理代谢紊乱(韩晓琳等, 2014; 张凤等, 2015, 2017), 进而免疫力下降, 极易引起疾病的爆发, 甚至大量死亡。我们的实验也表明在低盐度 11 的情况下, 无论是感染 WSSV 还是副溶血弧菌, 其死亡率均显著高于正常盐度海水。

本实验克隆了三疣梭子蟹几丁质酶基因 *PtCht6*, 属于 GH18 家族 Group 5 成员, 分析了其结构特征和功能, 查清了该基因在不同组织、不同蜕皮时期及病原感染和盐度胁迫下的响应模式, 研究结果证明了 *PtCht6* 在三疣梭子蟹免疫防御中的功能, 对于解析低盐影响三疣梭子蟹免疫的分子机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验样品的采集

实验材料为随机挑选的平均体重为 $25\pm 6\text{g}$ 的 80 日龄健康三疣梭子蟹。实验全程于黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产有限公司进行, 在 20m^3 的室内水泥池中暂养 7 天, 暂养期间, 维持水温 $25\pm 3^\circ\text{C}$, 盐度 35, pH 8.7, 持续充氧, 每天更换 1/3 体积的海水且定时投喂新鲜杂鱼。随机选取 9 只暂养后健康有活力的三疣梭子蟹分别取其 9 个组织(血细胞、心脏、肝胰腺、鳃、肠、肌肉、表皮、胃、眼柄)存于液氮, 设 3 个平行, 每个平行 3 只, 用于组织表达分布分析, 其中血细胞的获得方法参照 Yue 等 (2010)。

根据沈洁等(2011)三疣梭子蟹蜕皮分期的鉴定方法, 取部分暂养后健康的三疣梭子蟹分成三个蜕皮时期: 蜕皮后期(A/B)、蜕皮间期(C)、蜕皮前期(D), 各时期均取 3 只, 设 3 个平行。将分期的蟹的肝胰腺分离, 置于液氮中冷冻保存, 为后期实验备用。

1.2 实验方法

1.2.1 病原感染实验 随机选取 30 只暂养后健康的三疣梭子蟹, 平均分成 3 组, 依据张杰等(2017)报道的注射 WSSV 和副溶血弧菌的剂量浓度进行预实验, 在自然海水饲养条件下, 感染副溶血弧菌 6h 后出现死亡个体, 感染 WSSV 12h 后出现死亡个体, 由此确定其致病性和浓度。正式实验另选取 270 只三疣

梭子蟹, 平均分成 3 组, 均于游泳足第一关节基膜处(谢建军等, 2011; Ren *et al.*, 2017)进行注射, 空白对照组注射 $100\mu\text{L}$ 无菌的海洋甲壳动物生理盐水, 实验组分别注射 $100\mu\text{L}$ 的 3.7×10^7 copy/mL WSSV 和 10^7 CFU/mL 副溶血弧菌, 其中 WSSV 粗提液和副溶血弧菌悬液参照窦全伟等(2018)的方法提取制备。实验期间饲养管理与暂养期一致。在注射后 0、3、6、12、24、48、72h 各时间点分别取血细胞和肝胰腺组织置于液氮中保存, 每组取 3 只。

1.2.2 低盐胁迫及胁迫下的病原感染实验 随机选取 30 只暂养后健康的三疣梭子蟹进行 72h 半致死盐度(72h-LC₅₀)预实验(隋延鸣等, 2012a, b; 韩晓琳等, 2014), 确定 72h-LC₅₀ 为 11。在此基础上, 另取暂养后三疣梭子蟹进行正式实验, 分为 2 组: 一组进行低盐胁迫实验, 分为空白对照组(自然海水盐度 35)和实验组(低盐度 11), 各 30 只, 重复 3 次, 低盐度的调配方法详见隋延鸣等(2012a); 另一组, 进行低盐胁迫下的病原感染实验, 重复 1.2.1 注射操作后置于低盐度(11)条件下进行胁迫。实验期间饲养管理与暂养期一致。在胁迫后 0、3、6、12、24、48、72h 各时间点分别取血细胞和肝胰腺组织置于液氮中保存, 每组取 3 只。

1.3 *PtCht6* cDNA 全长的克隆

取未处理三疣梭子蟹的心脏、鳃、肝胰腺、表皮等组织样品采用 TRIzol[®] Reagent (Roche 公司)方法进行总 RNA 提取, 利用紫外分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo)和 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的质量和浓度。将各组织中高质量的总 RNA 均匀混合, 使用 SMARTer[®] RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa 公司)合成 3'和 5' RACE cDNA 模板。根据从本实验室构建的三疣梭子蟹转录组数据库中筛选验证得到的 *PtCht6* 基因 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5' RACE 特异性引物及通用引物(表 1) (上海生工生物工程有限公司合成), 使用 TransTaq[®] DNA Polymerase High Fidelity (HiFi)高保真聚合酶(北京全式金生物公司)参照说明书进行 RACE 3'和 5'末端巢式 PCR 扩增。将获得的 PCR 产物回收纯化、连接转化, 挑取阳性单克隆, M13-47/48 引物进行菌落 PCR 鉴定后筛选目的菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.4 序列的生物信息学分析

利用 Contig Express 软件将克隆序列与 EST 序列进行拼接、验证, 得到 *PtCht6* 基因的 cDNA 全长, 分

别采用 NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线软件对序列进行比对分析及开放阅读框(ORF)的预测。蛋白质基本物理性质、功能结构域、信号肽、糖基化活性位点及抗菌肽位点均通过 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)、ExPASy (<https://web.expasy.org/computepi/>)、Signal4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 AMP C(<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>)在线程序进行预测。借助 MEME Suite (<http://memesuite.org/index.html>)在线程序及 TB Tools 软件预测构建不同物种的 Motif 图, 并利用 MEGA6.0 软件采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统进化树。

expasy.org/computepi/), Signal4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 AMP C(<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>)在线程序进行预测。借助 MEME Suite (<http://memesuite.org/index.html>)在线程序及 TB Tools 软件预测构建不同物种的 Motif 图, 并利用 MEGA6.0 软件采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统进化树。

表 1 本研究中所用引物序列

Tab.1 The nucleotide sequences of the PCR primers used in this study

引物	序列(5'—3')	用途
<i>PtCht6</i> -3' F1	AGCGAAGAAGGAGACGAAGGG	3'-RACE
<i>PtCht6</i> -3' F2	GCCACAGCGGCACCTATTTCA	3'-RACE
<i>PtCht6</i> -5' R1	GGTGCCTGTGGACGCTTGGAG	5'-RACE
<i>PtCht6</i> -5' R2	CACGCCATCACGGGCTCCT	5'-RACE
<i>PtCht6</i> -vcf	ATGTATAGCCCAAAGTCTTCATCTT	ORF 验证
<i>PtCht6</i> -vcr	TCAGTAGGAGTAATTGGAAGGGGAT	ORF 验证
<i>PtCht6</i> -F	CTTCGTCTCCTTCTTCGC	qRT-PCR
<i>PtCht6</i> -R	GATGCTCGGCTACAATGA	qRT-PCR
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物
M13F (-47)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	DNA 测序
M13R (-48)	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	DNA 测序
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	qRT-PCR 内参
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR 内参

1.5 *PtCht6* 的组织表达及各实验组的表达特征分析

使用 TRIzol (Roche 公司)方法提取总 RNA, 总 RNA 的质量和浓度的检测方法同 1.3。选取高质量的 RNA 样品借助 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) kit (南京诺维赞)进行反转录成 cDNA, 用于后续的实时荧光定量 PCR 分析。根据已获得的 *PtCht6* cDNA 全长序列, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计实时荧光定量 PCR 特异性引物, 内参基因选用 β -actin(表 1)。使用 Applied BiosystemsTM 7500 Real Time PCR instrument 定量仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方法进行样品的相对荧光定量分析, 10 μ L 反应体系: 5 μ L 2 \times ChamQ Universal SYBR Qpcr Master Mix、0.2 μ L Primer F (10 μ mol/L)、0.2 μ L Primer R (10 μ mol/L)、2 μ L Template cDNA、2.6 μ L ddH₂O, 程序: 95 10min; 95 30s, 95 5s, 60 34s, 40 个循环; 95 15s; 60 1min; 95 15s。使用 SPSS19.0 软件对实验过程中产生的数据进行单因素方差分析, 借助 OriginPro 和 Excel 软件将统计结果整理形成图表, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *PtCht6* 基因 cDNA 全长及序列的结构特征

实验已获得的三疣梭子蟹几丁质酶基因 *PtCht6* (GenBank 登录号 MH160827)的结构特征见图 1。cDNA 全长为 2736bp, 包括 348bp 5'-UTR、2103bp ORF 和 285bp 3'-UTR, 共编码 700 个氨基酸, 预测分子量为 76.603kDa, 理论等电点(pI)为 6.29, 由于其较高的不稳定系数(Instability index)53.24 和亲水性平均系数(Grand average of hydropathicity, GRAVY)-0.381, 推测为不稳定亲水蛋白。借助 Signal4.1 及 SMART 在线软件预测分析 *PtCht6* 氨基酸结构特征, 结果显示, 该氨基酸序列具有几丁质酶 GH18 家族典型特征(图 2), 包括 N 端 38 个氨基酸组成的信号肽、第 18 家族催化结构域、含 6 个半胱氨酸残基(Cys)的几丁质结合结构域及位于后两者之间的富含苏氨酸和脯氨酸的连接区域。此外, NCBI Conserved Domains 分析 *PtCht6* 糖基化活性位点为 ²⁷¹FDGLDLWE²⁷⁹, AMCA 预测此氨基酸存在 13 个抗菌肽残基(图 3)。

```

1      ACATGGGATGGGACGTAGTTCCCTGAGGCAGCGAGGGAGGTGCCGCTGCGCTTCCCGCCTGCTGGCACTGCTCAGCAGCGAACAATTGACCAACGTGACCT
106    ACATGTGCTGGCTGGTTAGGTGACTGACTGGCTCAGGGCTGGTGGTGTACTGGCTGCCCGGTAACCTCATCCCTGTCTCCCCTGCTGGCTTCCGTGACC
211    AAGCAACCATCACACTACACAAGACTCTAAAGAGAAGCCCACTGCATGACGGAAAGGATTACAGTGCAGCCATTAGCATTGCCCGCATACACCCACCACTA
316    CCACCACCGCCACCAACAACACTATACTATTAACATGTATAGCCCAAGTCTTCATCTTACCTTCTCTCTTCTCCCTGCTGGCTTTCCTTTCATT
1      M Y S P K S S S S P S S L F L L L F C H L L F I
421    CATGTCTAAATTTCTCAGTCTAATTTCTCCCTGCCCAAGGTGCGTGTGCTACTAAGGCTGACCAGAACTCTTTCCTCCCATTTTCCTTCTCCTCTGAA
25     H V L I F L S L L I S P C Q G R V A T K A D Q N S L P S P F S S S S F S E
526    TACAATGCATCATCTTCTTCTGACCACCGACTCCTCATCTCCTCCTCCTCCTCCTTCTTCTTTCATCAAAGGCAACATCATCTCTCCTCCTCGTCT
60     Y N A S S S S S A T D S S S S S S S S S S S S S S S S S S S S S S K A T S S S S P L S S
631    TCTTACGTCTTCTTCATCATCTTTTCCACCTCTTCTCTATCTCCTCCTCCTCCTCCTCTTCTCCTATAATCACACTACATCAAGTCAAGTGTGACA
95     S Y V F S S S S S T S S P L S S S S S S S S S S S S S S S S S S Y N H T T Y A S Q D V T
736    CGAAGAGCCAAAGGGAGAAGGCTTGGCCACGCCAGCCACCACATGACAGCCCGAAGGAGGCCGTGATGGCGTGCTACTTCGGCTCTTGGCGGTATAC
130    R A R A K G R R K L A T P S H H M T A P K E E P V M A C Y F G S W A V Y
841    AGACCAGCCCTGGTAAATTTGACGTAGAGGATATTGACCTTTCTGTCACCCAGGCCCTTACGCCCTTTCGGCTTCCCAAGGCTCCACAGCATTCGTT
165    R P G L G K F D V E D I D P F L C T H A L Y A F A G L Q A S T G T I V
946    AGCCTAGACCCGTACAACGATCTCTATGACAACCTACGGCAAAGGGCGGTACATTCGCTTCACCTCCCTTAAAGAGATTAACCCAGACCTCAAGACCCTGTCTCC
200    S L D P Y N D L Y D N Y G K G G Y I R F T T S L K K I N P D L K T L L S
1051   ATTGGTGGCTGGAACGAGGGATCCATCAAGTATCCCAAGTGGTGTGAGTGCCACTTCAAGTGACCTTCATCACCAGCTGCGTTAAGTTCCTCCTCAAGTAT
235    I G G W N E G S I K Y S K M V S S A T S R S T F I T S C V K F L L K Y
1156   GGCTTTCAGCGGCCTCGACTCGACTGGGAGTATCCAGCAATGCGAGGAGGACAGCCCAAGGACAAGGAAAACCTTTCCTCCTGCAAGAGATGAAGCGVAGT
270    G F D G L D L D W E Y P A M R G G Q P K D K E N F A L L L L Q E M K A S
1261   TTCAAGCAGCATAAGTACTGCTGACCTCGGCCGTGTCCAGCGGAAAGGACAGCAGTATGCTGCTCAATATCACAGCCCTAGCCAGTACTGGACTACGTV
305    F K Q H K L L L T S A V S A G K A T I D L S Y N I T A L A S Y L D Y V
1366   TTCCTCATGTCTCAGACTTCCATGGCAGTGGGAAAATAGCCCATCACCACTCGCCCTCCTACGGCTACAAGAGGACAAGGGCGCCACGAAGACCCTCAAT
340    F L M S Y D F H G T W E K Y A H H S S P L Y A Y K E D K G A T K T L N
1471   GTGGATTTGCGCTCAGATACTGGTTCGCTGGCGCTTCCCTTCACTGCTGGTGTGGGTCTCAGGCAGGCTTCACTCTAGCCAGGCGAGAG
375    V D F A V R Y W I R L L G L P P S R L V M G V G L Y G R C F T L A K A E
1576   AATCATGATATACGCCCCAGCGCCCAACCAGGACTCCCGGGCCCTACCTCGCTTCCAGGATGCTCGGCTACAATGAGATGTGAGAAGCAGCTGAGC
410    N H D I Y A P A P Q P G L P G P Y T R S P G M L G Y N E I C E K Q L T
1681   GAGAAGTGGACAGTGGTGAAGGACAAGAACATAGTAGCCGCTACGCTTACTGCGGCAGACAATGGTGGCTATGATGATGAAGTCCGTGACAGTCAAGACT
445    E K W T V V R D K N I V A P Y G Y C G R Q W C G Y D D V K S V T V K T
1786   AAATACATCAATCCCTGGGTGGCTGGCGCGGCTGGTGTGCTGACAGCAGATTCACGGGACATGCCAGAGAGCGCAGGATGAAGGTGATGAAGC
480    K Y I K S L G L A G A M V W S I E T D D F H G T C Q R A Q D E G D A S
1891   GAAGAAGGAGACGAAGGGAGGAAGAAGATGAGATAACCGAGGACAAGAAGAATTTCCCTCATTACGACAATCGTGAAGTITTAAGGGAGGGGGCCATT
515    E E G D E G R E E D E I T E D K K N F P L L T T J R E V L R D G R P L
1996   CCTAGACCCACCGCCACAGCGGCACCTATTTCAACGCCCCACGACGACGAACACCCACCCACCCACCTCCACCAACAAGGGAGGGCGCCATCC
550    P R P T P T A A P I S T P T T J N I T T T T T T S T T T Q G P P T P
2101   CGCCTTCCACAGTGTGCCACATGGAGGGCTCAACGCTGATCCTCAAGGAGACTGTACTATCTTTACATTTGTACCCAGGTGGGGCTGAGGTGGCTGGCTTG
585    P P S T V C H M E G L N A D P Q G D C T F Y I C H O V G L R W L A W
2206   CTGTTCCACTGTCTCCAGGCCAGGTTGTGGAGGAGATGCAAGCTTGTGACTTCCAGATGGACACCCCGCTGTCTCTTCTCCCTTCCCTTCCACTAACCC
620    L F H C P P G T R F V E E M Q A C D F P D G H P P C P L L P P F T N P
2311   ACCACCACACTACTACTACCACCGATACCACCACCGACACTACTTCTACCCAGCACCACCTACTACCACCACCGATACCTACCACCACCGAGTCCCAACT
655    T T T T T T T D T T T T T T D T T S T D T T T T T T T S P T
2416   ACAACTTCAACATCCCTTCAATTTACTCCTACTGATGTTCCCTCCACAATAACACCACATCACCATCTCACTTCAATCACCAGTACCAGACACTAAGCGCTACCA
690    T T S T S N Y S Y *
2521   CCAATCCAGTGCACCTTACTACTCGGATATTGCCGCTAGAGTACTCCACCGTCCATCTCTGCCCTCTTATCAATCTCTCCCTTGGCCTAGTGGTCCCGCC
2626   ATCGACCGCCGCTCAGGTAATGGCATCAATATTCCCCAACTTTGTTACTCCTTGGAGGATTTCAAGAGGCACAAACAGATAAAATAATGAAAAAAAATAA
2731   AAAAAA
    
```

图 1 三疣梭子蟹 *PtCht6* 基因 cDNA 全长及其推导的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *P. trituberculatus PtCht6*

注: 红色方框: 起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA); 黑色加粗字体: N-信号肽; 灰色阴影区: 几丁质酶第 18 家族催化结构域(Glyco-18 catalytic domain); 实线下划线: 几丁质结合结构域(ChtBD2); 虚线下划线: 苏氨酸和脯氨酸连接区域; 红色三角形: 半胱氨酸残基; 黑色方框: 几丁质酶第 18 家族保守基序; 斜体字: Poly A 结构

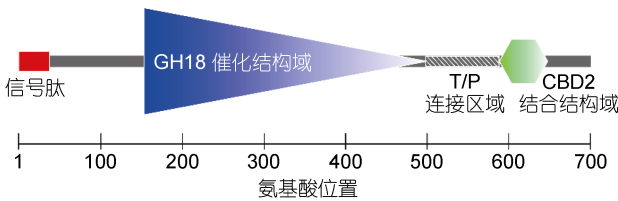


图 2 三疣梭子蟹 *PtCht6* 基因编码蛋白结构域位置

Fig.2 The protein domain architecture of *P. trituberculatus PtCht6*

2.2 *PtCht6* 氨基酸同源性及系统进化树分析

使用 NCBI-BLAST 在线软件对三疣梭子蟹 *PtCht6* 基因编码的氨基酸序列与其他物种几丁质酶基因编码的蛋白进行同源性比对分析, 结果显示, 该

氨基酸序列与拟穴青蟹 *SpCht5* 的同源性最高(85%), 其次是南美白对虾 *LvCht5*(64%)、斑节对虾 *PmCht5* (63%)及南美白对虾 *LvCht5'* (62%)。通过 DNAMAN 5.2.9 软件对这 5 个不同的氨基酸序列进行比对发现(图 4), 其氨基酸序列均存在几丁质酶 GH18 家族的典型结构。利用 MEGA 6.0 软件对三疣梭子蟹 *PtCht6* 基因氨基酸序列进行系统进化分析, 采用 Bootstrap 方法计算 1000 次后构建系统进化树(图 5)。结果表明, 这些甲壳类几丁质酶基因分为七组, 其中 Group1、Group2、Group3 和 Group6 分别由 *Cht1*、*Cht2*、*Cht3* 和 *Cht6* 家族基因组成, Group 5 由 *PtCht6* 和 *SpCht5*、*LvCht5*、*PmCht5*、*LvCht5'* 等组成, 单独将三疣梭子

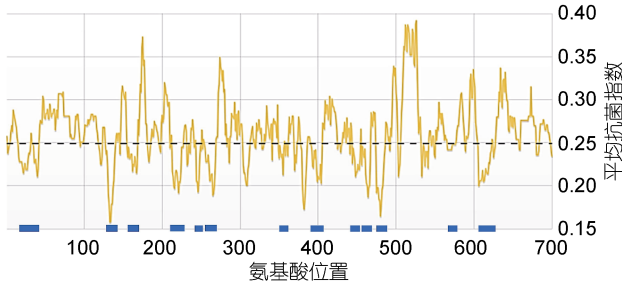


图3 利用 AMPA 算法形成的三疣梭子蟹 *PtCht6* 抗菌谱 (阈值 0.249, 仅用于确定抗菌延伸的长度, 不影响抗菌谱) 及预测的抗菌肽区域在基因中的位置

Fig.3 The antimicrobial profile of *P. trituberculatus PtCht6* (the threshold value is 0.249, which is used to determine the length of antimicrobial stretches only and does not affect the antimicrobial profile). The positions of the predicted antibacterial peptide regions in the gene are generated by AMPA algorithm
注: 蓝色方框表示抗菌肽区域

蟹 *PtCht* 基因分为 Group 7。此外, 结合 Motif 图(图 5, 表 2)分析发现, 几丁质酶 GH18 家族基因均含有 4 个保守基序(吕黎等, 2011; Huang *et al*, 2012; Zhou *et al*, 2018a) (motif1-FDGXDLDWEYP-Motif , motif2-MXYDXXG-motif , motif3-GXXXXXDD-motif , motif8-KXXXXXGGW-motif ; X 代表非特异性氨基酸), 而其他氨基酸序列的进化同样具有一定的保守性。

2.3 *PtCht6* 组织表达分布

利用实时荧光定量 PCR 分析三疣梭子蟹 *PtCht6* 基因在不同组织中的相对表达情况, 结果如图 6 所示, 该基因在心脏、肝胰腺、眼柄、肌肉、血淋巴、鳃、表皮、胃和肠 9 个组织中均有表达, 但在肝胰腺中表达量最高, 其次是眼柄、肌肉、胃和心脏, 与其他组织表达量比较有显著性差异($P<0.05$)。

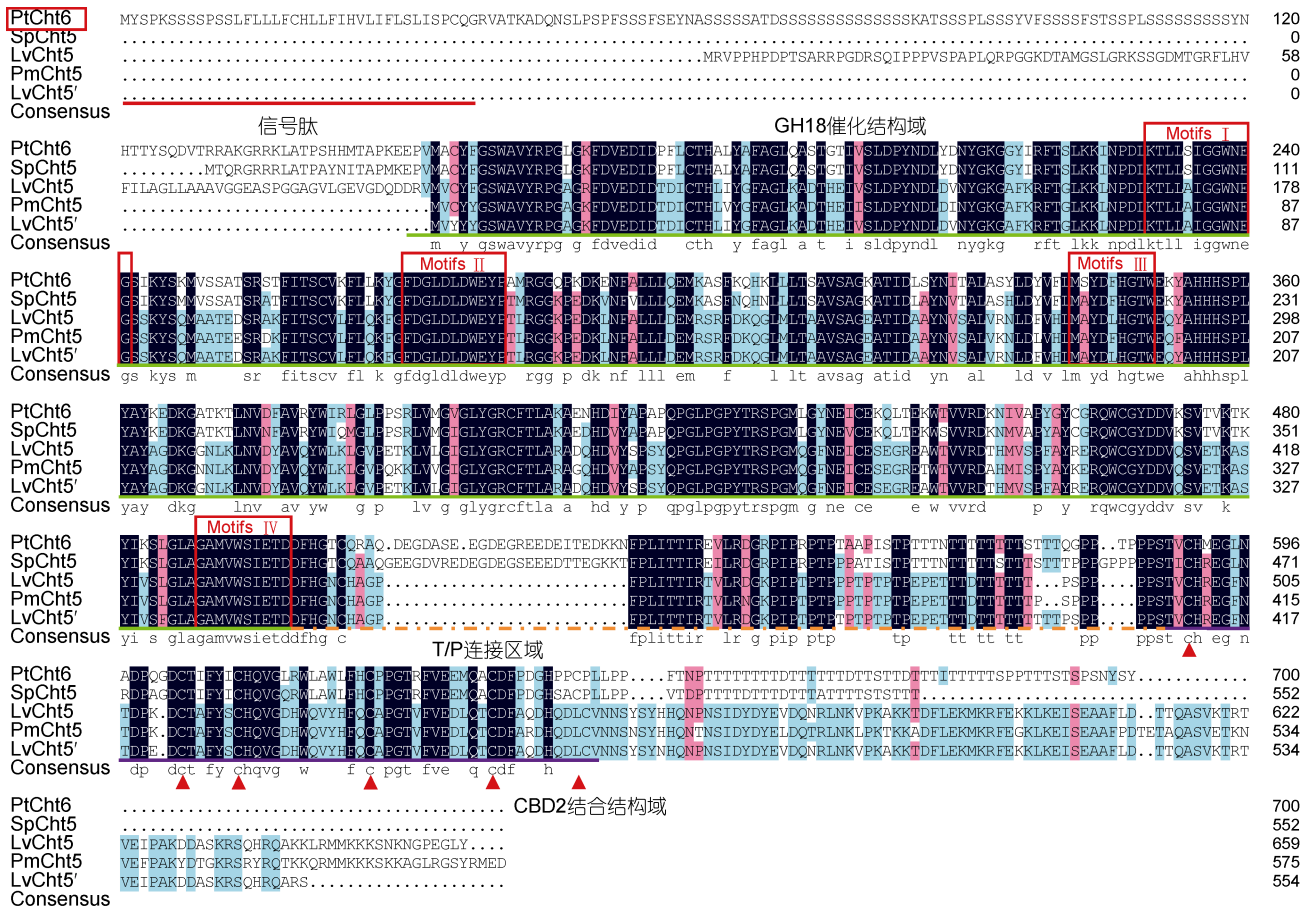


图4 三疣梭子蟹 *PtCht6* 氨基酸序列的多序列比对

Fig.4 The multiple sequences alignment of amino acid sequences of *P. trituberculatus PtCht6*

注: 各物种名称及 GenBank 登录号: 拟穴青蟹 *SpCht5* AWU46593.1; 南美白对虾: *LvCht5* AWD73767.1, *LvCht5'* ACR23315.1; 斑节对虾: *PmCht5* ARM20252.1)

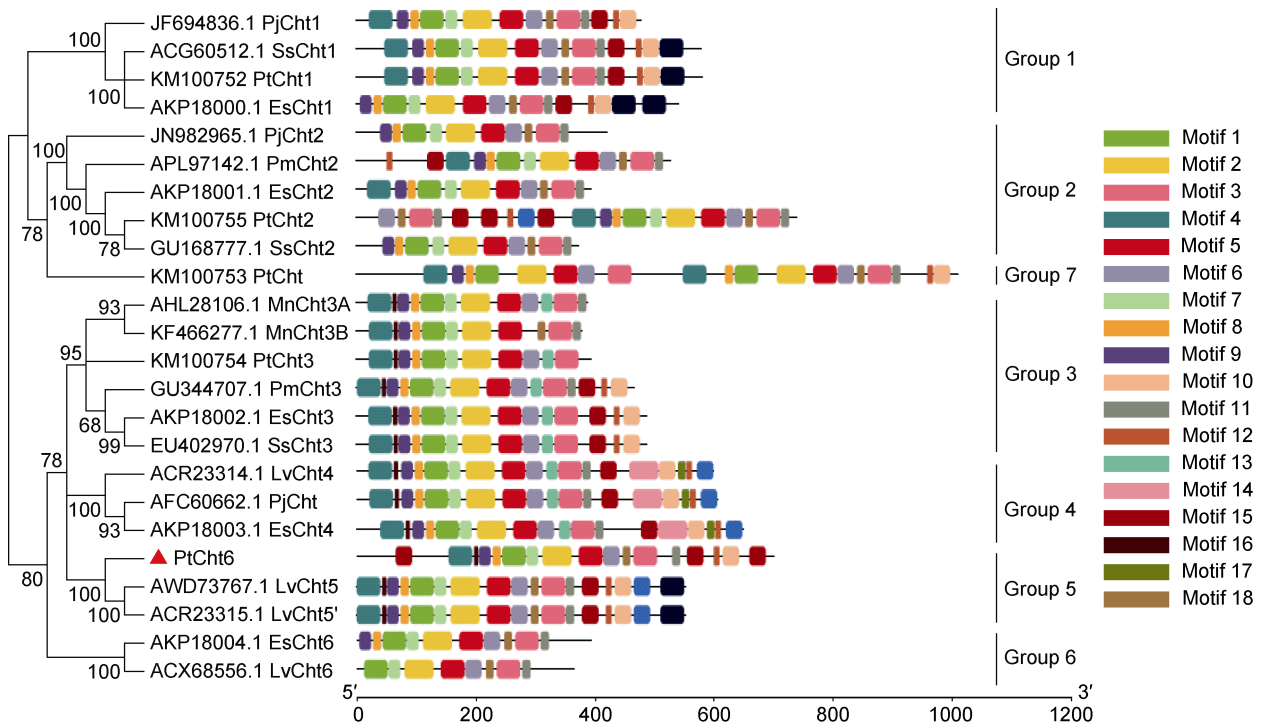


图 5 基于 *PtCht6* 氨基酸序列构建的不同物种的系统进化树及其对应的 Motif 图

Fig.5 Phylogenetic tree and the corresponding Motif of each species based on *PtCht6* amino acid sequences
 注: 各物种名称: 三疣梭子蟹 Pt; 日本沼虾 Mn; 南美白对虾 Lv; 斑节对虾 Pm; 锯缘青蟹 Ss; 日本仿长额虾 Pj; 中华绒螯蟹 Es

表 2 图 5 中所述的 Motif 序列对照表
 Tab.2 The comparison table of Motif sequences in Figure 5

序号	Motif 序列	置信度	序号	Motif 序列	置信度
1		5.0e-694	7		1.4e-263
2		2.0e-775	8		8.4e-199
3		1.6e-647	9		1.9e-159
4		4.2e-568	11		6.9e-82
5		1.4e-539	12		4.7e-76
6		9.2e-377	13		8.0e-96
10		3.7e-155	16		2.7e-41

续表

序号	Motif 序列	置信度	序号	Motif 序列	置信度
14		5.0e-86	17		1.7e-33
15		5.1e-81	18		9.4e-41

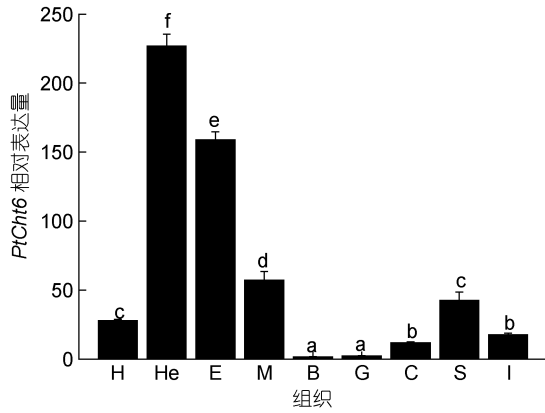


图 6 三疣梭子蟹 *PtCht6* 在不同组织中的表达

Fig.6 Relative expression of *PtCht6* gene in the various tissues of *P. trituberculatus*
注: H: 心脏; He: 肝胰腺; E: 眼柄; M: 肌肉; B: 血细胞; G: 鳃; S: 胃; C: 表皮; I: 肠。不同小写字母代表表达量的差异显著性 ($P<0.05$)

2.4 不同蜕皮时期 *PtCht6* 组织表达特征

PtCht6 基因在三疣梭子蟹不同蜕皮时期的肝胰腺中均有表达(图 7), 蜕皮后期(A/B)表达量最高, 蜕皮间期(C)次之, 蜕皮前期(D)最低, 呈明显下降的趋势, 各时期之间的表达量呈显著性差异($P<0.05$)。

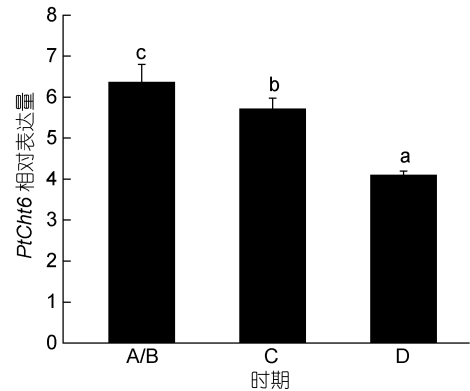


图 7 三疣梭子蟹 *PtCht6* 在不同蜕皮时期的肝胰腺中的表达

Fig.7 Relative expression of *PtCht6* gene in hepatopancreas during molting cycle of *P. trituberculatus*
注: A/B: 蜕皮后期; C: 蜕皮间期; D: 蜕皮前期。不同小写字母代表表达量的差异显著性 ($P<0.05$)

2.5 不同病原刺激下 *PtCht6* 在肝胰腺及血细胞中的表达特征

在不同病原刺激下, *PtCht6* 在肝胰腺及血细胞中的表达情况如图 8 所示。注射 WSSV 后, *PtCht6* 在肝胰腺中的表达主要呈先上升后下降的趋势, 在 12h 达到最大值($P<0.05$), 为对照组的 3.11 倍, 此后相比于

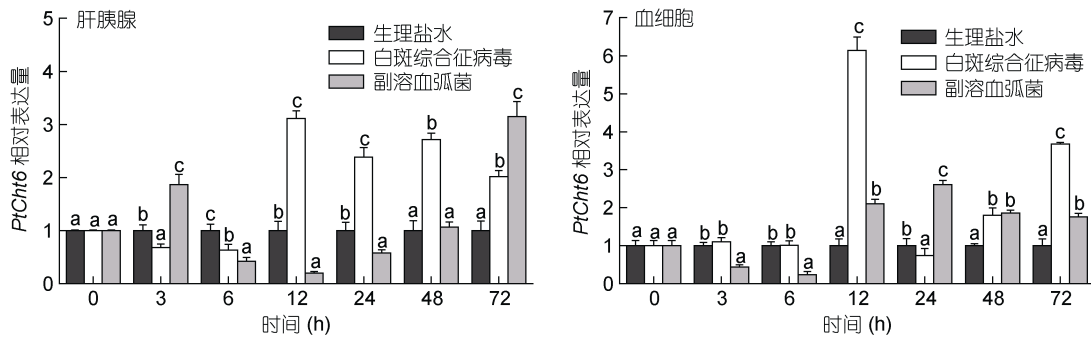


图 8 *PtCht6* 在不同病原刺激下的三疣梭子蟹的肝胰腺和血细胞中的表达

Fig.8 Relative expression of *PtCht6* gene response to the challenges of different pathogens in hepatopancreas and blood cell of *P. trituberculatus*
注: 不同小写字母代表表达量的差异显著性 ($P<0.05$)

对照组均呈上调表达,而在血细胞中的表达趋势为先上升后下降再上升,相较于对照组,除 24h 外均呈上调表达,12h 达到最大值($P<0.05$),为对照组的 6.14 倍。感染副溶血弧菌后,*PtCht6* 在肝胰腺中的表达呈上升、下降后再上升的趋势,72h 达到最大值($P<0.05$),为对照组的 3.15 倍,12h 表达量为最小值($P<0.05$),为对照组的 0.2 倍,*PtCht6* 在血细胞中的表达量与对照组相比,感染后的 12—72h 均呈上调表达,24h 达到最大值($P<0.05$),为对照组的 2.6 倍。

2.6 低盐胁迫及胁迫下感染不同病原后 *PtCht6* 的表达特征

三疣梭子蟹在处理 72h 内,*PtCht6* 在肝胰腺及血细胞中的表达结果(图 9)显示:在低盐胁迫下,与对照组相比,*PtCht6* 在肝胰腺及血细胞中 0—24h 的表达均呈显著下调($P<0.05$),48h 均为显著上调表达($P<0.05$),不同之处在于,在胁迫 72h 后,*PtCht6* 在肝胰腺中的表

达继续升高至峰值($P<0.05$),为对照组的 3.40 倍,而在血细胞中的表达急剧下降至对照组的 0.84 倍($P<0.05$)。注射 WSSV 后,*PtCht6* 在肝胰腺中的表达与对照组相比,12h 前均呈显著下调($P<0.05$),6h 达到最小值,为对照组的 0.40 倍,12h 后(含 12h)呈显著上调($P<0.05$),24h 达到最大值,为对照组的 25.38 倍。在血液中,其表达在感染 WSSV 后 24h 内(含 24h)呈先下降再上升的趋势,但与对照相比,均为显著下调表达($P<0.05$),24h 后,*PtCht6* 的表达量呈直线上升至 72h 达到峰值,为对照组的 6.74 倍,均为显著上调表达($P<0.05$)。注射副溶血弧菌后,三疣梭子蟹于 12h 即全部死亡,*PtCht6* 在肝胰腺及血细胞中的表达具有相同的趋势(先下降再上升再下降),与对照相比,感染 3h 后均为显著下调表达($P<0.05$),之后上升至 6h 达到峰值,分别为对照的 2.41 倍和 2.17 倍,为显著上调表达($P<0.05$),随之再下降至最低值(12h),分别为对照的 0.96 倍和 0.85 倍。

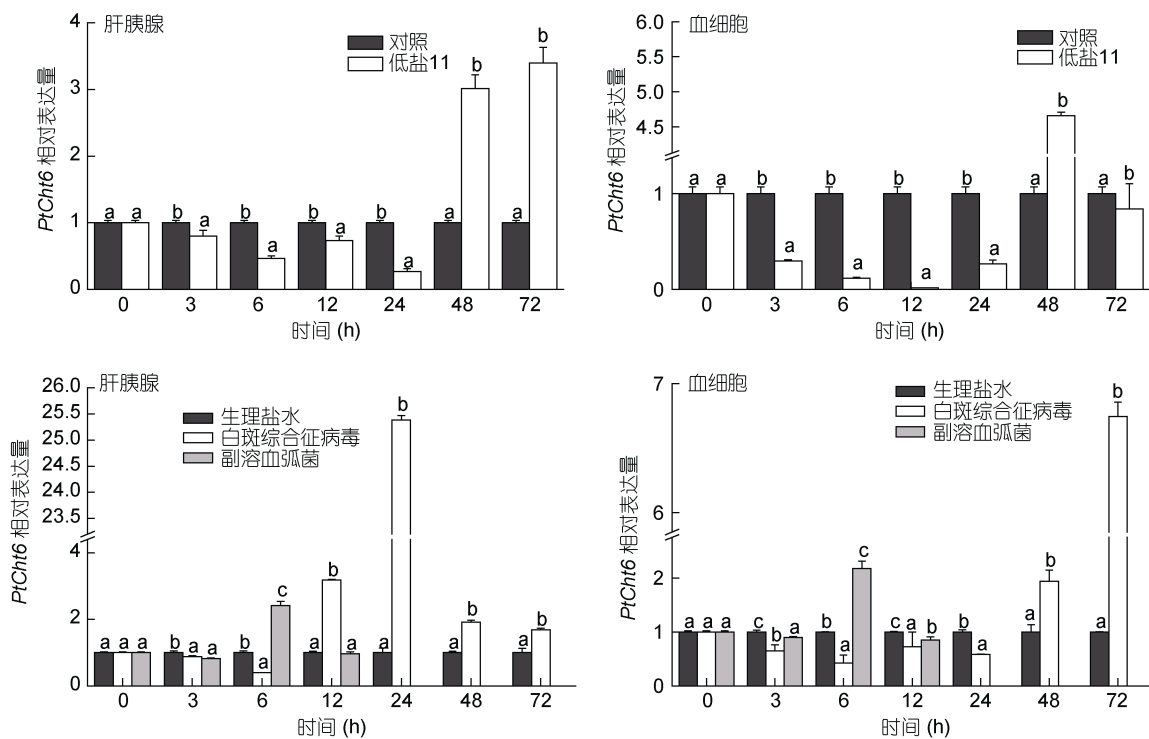


图 9 *PtCht6* 在低盐胁迫及胁迫下感染不同病原的三疣梭子蟹的肝胰腺和血细胞中的表达

Fig.9 Relative expression of *PtCht6* gene in hepatopancreas and blood cell of *P. trituberculatus* under ambient low salinity stress in which different pathogens are infected

注:不同小写字母代表表达量的差异显著性($P<0.05$)

3 讨论

本研究中成功克隆了三疣梭子蟹 *PtCht6* cDNA 全长,该基因与南美白对虾的 *LvCht5*、斑节对虾的

PvCht5 聚为甲壳动物几丁质酶 Group 5,这也是三疣梭子蟹几丁质酶基因 Group 5 的首个克隆。*PtCht6* 基因具有 GH18 几丁质酶家族基因的典型结构(王伟等, 2015),其中,根据 Merzendorfer(2003)的研究表明,

ChtBD2 结合结构域和 T/P 连接区域是几丁质酶结合不溶性几丁质的主要结构, 本研究中的三疣梭子蟹几丁质酶基因 *PtCht6* 具有一个内含 3 个由 6 个半胱氨酸形成的二硫键和 7 个芳香族残基(FYWWFFF)的 ChtBD2 结合结构域, 及富含苏氨酸(T)和脯氨酸(P)的 T/P 连接区域, 这保证了基因对不溶性几丁质的水解能力(Tjoelker *et al.*, 2000), 为其参与机体的免疫防御提供了结构基础。

序列分析表明 *PtCht6* 基因存在 13 个抗菌肽位点(阈值 0.249), 推测其具有一定的免疫功能, 且该基因在肝胰腺中的表达量显著高于其他组织($P < 0.05$), 而肝胰腺是参与机体免疫防御的重要组织(Zhou *et al.*, 2017, 2018a), 这也部分支持了我们的推测。为深入研究 *PtCht6* 是否具有免疫功能, 我们设计了人工病原感染实验。发现注射 WSSV 和副溶血弧菌后, *PtCht6* 的表达量相较于对照组, 整体呈上调表达, 在肝胰腺中分别于 12h、72h 达到最大值, 在血细胞中分别于 12h、24h 达到最大值, 结果进一步证明了 *PtCht6* 基因可能作为重要免疫因子参与三疣梭子蟹的免疫防御(郭志勋等, 2006)。

盐度是三疣梭子蟹养殖中重要的环境因子, 为了研究 *PtCht6* 基因是否在低盐影响三疣梭子蟹免疫力中具有一定的作用, 我们设置了低盐胁迫以及低盐胁迫下的病原感染实验。发现在低盐胁迫条件下, *PtCht6* 的表达量在 48h 前的肝胰腺和血液中均为显著下调($P < 0.05$)。在低盐胁迫下注射 WSSV 后, *PtCht6* 在肝胰腺和血液中的表达量分别在 24h 和 72h 达到峰值, 比正常情况下感染 WSSV 达到峰值的时间出现明显延迟。在低盐胁迫下注射副溶血弧菌后, 由于其对三疣梭子蟹的强致死性, 使得与正常情况下感染同样浓度的副溶血弧菌的病蟹(72h 全部死亡)相比, 单位时间内死亡率显著提高($P < 0.05$), 且 12h 病蟹死亡率达到最大值时 *PtCht6* 的表达量降至最小值。研究结果预示着低盐胁迫可能抑制或延后几丁质酶等免疫基因的正常表达, 从而导致机体免疫力下降。

本研究中同时检测了该基因在不同蜕皮时期的肝胰腺中的表达模式, 发现 *PtCht6* 在肝胰腺中的表达量由蜕皮后期(A/B)、蜕皮间期(C)、蜕皮前期(D)依次递减($P < 0.05$), 与南美白对虾(Rocha *et al.*, 2012)中的研究结果类似, 这可能与三疣梭子蟹在蜕皮过程中的形态特征有关, 蜕皮后期蟹体各部位充水柔软, 极易受到病原的侵袭, 此时 *PtCht6* 的表达量为最大值, 随着蜕皮时期的变化, 蟹背甲及身体各部逐渐

变硬, 角质层显著增加(Guerao *et al.*, 2010), 形成天然保护屏障, 受到外界环境波动的影响随之减小, 而 *PtCht6* 的表达也逐渐降低, 由此推测 *PtCht6* 参与三疣梭子蟹蜕皮时期的免疫防御, 与王伟等(2015)关于三疣梭子蟹 *PtChi* 基因的报道相一致。这一结果也印证了 *PtCht6* 可能作为免疫因子参与机体免疫应答的结论。

4 结论

本研究首次克隆三疣梭子蟹 Group 5 的几丁质酶基因 *PtCht6* 并获得 cDNA 全长, 分析 *PtCht6* 在不同组织、不同蜕皮阶段、不同病原感染和低盐胁迫下的免疫响应模式, 所有结果均表明, *PtCht6* 基因可能作为免疫基因参与三疣梭子蟹的病原免疫防御机制。本实验的研究结果为更加深入地探索甲壳动物几丁质酶的免疫功能提供了更多参考数据。

参 考 文 献

- 王伟, 吴旭干, 潘桂平等, 2015. 三疣梭子蟹几丁质酶基因的克隆及其在蜕皮过程中的表达分析. 水产学报, 39(9): 1291—1301
- 吕黎, 宁黔冀, 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
- 任海波, 李燕波, 张肖荣等, 2018. 三疣梭子蟹抗菌肽 *Scygonadin* 基因的克隆与序列分析. 生物学杂志, 35(4): 21—24
- 李旭光, 周刚, 周军等, 2017. 水生甲壳类几丁质酶类基因家族功能与表达调控的研究进展. 水产养殖, 38(4): 26—30
- 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
- 张凤, 吕建建, 刘萍等, 2015. 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. 海洋与湖沼, 46(4): 948—957
- 张凤, 吕建建, 刘萍等, 2017. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCht3* 基因克隆鉴定及表达分析. 渔业科学进展, 38(2): 167—176
- 张杰, 吕建建, 刘萍等, 2017. 三疣梭子蟹 *HMGBa* 基因克隆及其应答不同病原入侵的表达特征. 水生生物学报, 41(6): 1193—1199
- 张文宜, 张世勇, 陈校辉等, 2018. 日本沼虾几丁质酶 1C(*MnCht1C*)基因的克隆及表达分析. 基因组学与应用生物学, 37(2): 723—732
- 郭志勋, 冯娟, 王江勇, 2006. 斑节对虾血淋巴细胞对鳃弧菌的清除作用. 中国水产科学, 13(1): 28—32
- 隋延鸣, 高保全, 刘萍等, 2012a. 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
- 隋延鸣, 高保全, 刘萍等, 2012b. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性分析. 渔业科学进展, 33(2): 63—68
- 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
- 谢建军, 许文军, 施 慧等, 2011. 溶藻弧菌诱导对三疣梭子蟹血淋巴非特异性免疫水平的影响. 水产学报, 35(9): 1392—1398
- 窦全伟, 李吉涛, 刘 萍等, 2018. 脊尾白虾血蓝蛋白大亚基基因的克隆及表达分析. 水生生物学报, 42(1): 86—93
- Guerao G, Rotllant G, Anger K, 2010. Characterization of larval moulting cycles in *Maja brachydactyla* (Brachyura, Majidae) reared in the laboratory. Aquaculture, 302(1—2): 106—111
- Huang Q S, Xie X L, Liang G *et al*, 2012. The GH18 family of chitinases: their domain architectures, functions and evolutions. Glycobiology, 22(1): 23—34
- 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
- Marques J S, Müller I C, Moser J R *et al*, 2011. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host for white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 318(1—2): 20—24
- Merzendorfer H, 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. Journal of Experimental Biology, 206(24): 4393—4412
- Niu S W, Yang L W, Zuo H L *et al*, 2018. A chitinase from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* involved in immune regulation. Developmental & Comparative Immunology, 85: 161—169
- Ravichandran G, Kumaresan V, Mahesh A *et al*, 2018. Bactericidal and fungistatic activity of peptide derived from GH18 domain of prawn chitinase 3 and its immunological functions during biological stress. International Journal of Biological Macromolecules, 106: 1014—1022
- Ren X Y, Wang Z Q, Gao B Q *et al*, 2017. Effects of florfenicol on the antioxidant status, detoxification system and biomolecule damage in the swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 143: 6—11
- 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
- Salma U, Uddowla M H, Kim M *et al*, 2012. Five hepatopancreatic and one epidermal chitinases from a pandalid shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning and effects of eyestalk ablation on gene expression. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 161(3): 197—207
- Sullivan T J, Neigel J E, 2018. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. Journal of Invertebrate Pathology, 151: 82—90
- Tjoelker L W, Gosting L, Frey S *et al*, 2000. Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. Journal of Biological Chemistry, 275(1): 514—520
- Yue F, Pan L Q, Xie P *et al*, 2010. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 157(3): 246—251
- Zhou K M, Zhou F L, Huang J H *et al*, 2017. Characterization and expression analysis of a chitinase gene (*PmChi-4*) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogen infection and ambient ammonia nitrogen stress. Fish & Shellfish Immunology, 62: 31—40
- Zhou F L, Zhou K M, Huang J H *et al*, 2018a. Characterization and expression analysis of a chitinase gene (*PmChi-5*) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogens infection and ambient ammonia-N stress. Fish & Shellfish Immunology, 72: 117—123
- Zhou Z K, Gu W B, Wang C *et al*, 2018b. Seven transcripts from the chitinase gene family of the mud crab *Scylla paramamosain*: their expression profiles during development and moulting and under environmental stresses. Aquaculture Research, 49(10): 3296—3308

CLONING OF CHITINASE GENE (*PTCHT6*) IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS* AND ITS FUNCTIONAL ANALYSIS IN IMMUNITY

SONG Liu^{1,3}, LÜ Jian-Jian^{2,3}, WANG Lei^{1,3}, SUN Dong-Fang³, LIU Ping^{2,3}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Qingdao National Laboratory of Marine Science and Technology, Functional Laboratory of Marine Fishery Science and Food Production Process, Qingdao 266235, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Key laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)

Abstract Chitinase plays an important role in many biological processes in crustaceans, including molting, digestion, and immunity. To understand the immune defense mechanism of chitinase in *Portunus trituberculatus*, we successfully cloned a *PtCht6* gene by RACE (rapid-amplification of cDNA ends). The property of the *PtCht6* gene includes cDNA 2736bp, ORF 2103bp, encoding 700 amino acid residues of unstable protein, and features typical structural characteristics of GH18 chitinase family. We analyzed the expression characteristics of *PtCht6* in different tissues, molting stages, pathogen infections, and low salt stress (11) of *P. trituberculatus* using real-time fluorescence quantitative technique. The results show that *PtCht6* was expressed in all tissues of *P. trituberculatus* with the highest one in hepatopancreas. In the hepatopancreas of a different molting stage, the expression level decreased successively in the post-molt stage, inter-molting stage, and pre-molt stage ($P<0.05$). Under a normal circumstance, after artificial infection with WSSV (white spot syndrome virus) and *Vibrio parahaemolyticus*, the expression of *PtCht6* in reached the maximum in hepatopancreas in 12h and 72h, and in blood cell in 12h and 12h, respectively. The expression was up-regulated except for a few time points ($P<0.05$). In addition, the low salt stress could inhibit significantly the expression of *PtCht6* for up to 73 times ($P<0.05$), and the time when WSSV infection reached the peak was delayed significantly for at least 12h ($P<0.05$). Therefore, *PtCht6* is an important immune factor of protecting *P. trituberculatus* from pathogen infection and a low salt stress could inhibit the immune function of the gene to some extents.

Key words *Portunus trituberculatus*; chitinase; white spot syndrome virus (WSSV); *Vibrio parahaemolyticus*; low salinity stress