

三疣梭子蟹 *PtToll6* 基因克隆及其在免疫中的功能研究*

张伟伟^{1,2} 吕建建² 李玉坤^{1,2} 初凡智^{1,2} 高保全² 刘萍²

(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. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 山东青岛 266071)

摘要 克隆了三疣梭子蟹 TLR 家族的一个新基因, 将其命名为 *PtToll6*。该基因全长为 4 034 bp, 预测分子量为 109.078 kDa, 理论等电点为 6.06, 共编码 977 个氨基酸。SMART 预测显示, *PtToll6* 具有 Toll 样受体典型的结构域, 包括前端的序列区(LRR)、跨膜区(TM)和胞内(TIR)区, 进化树分析表明其与同属节肢动物门的果蝇 *Dm toll9* 聚为一支。组织表达分布结果显示, *PtToll6* 在肝胰腺中特异性地高表达, 其次表达于肠道, 在鳃中的表达量最低。采用 3 种 PAMPs 进行注射刺激, 发现 *PtToll6* 对脂多糖的响应最为强烈, 在感染 48 h 后的表达量为对照组的上千倍, 推测其可能为 *PtToll6* 基因主要识别的病原相关分子模式。*PtToll6* 在人工感染副溶血弧菌后的 12 h 开始上调表达, 至 24 h 达到峰值(上调 9.02 倍)。采用 RNAi 敲降 *PtToll6* 后, MyD88 的表达量相应下调, 同时发现感染副溶血弧菌后的死亡率显著提高, 为阴性对照组的 1.8 倍。实验结果表明: *PtToll6* 基因在抗副溶血弧菌中发挥重要功能。本实验对解析三疣梭子蟹抵御病原入侵的分子机制具有重要指导作用。

关键词 三疣梭子蟹; Toll 样受体; 模式识别受体; 病原相关分子模式

中图分类号 S917 doi: 10.11693/hyh20221100285

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*)。地理分布集中在我国渤海、黄海, 以及日本等海域, 肉多且脂膏肥美, 具有十分重要的经济价值(戴爱云等, 1977; 薛俊增等, 1997)。随着人工养殖的规模逐渐扩大, 苗种参差不齐, 导致病害严重, 给养殖业带来了巨大的经济损失。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是三疣梭子蟹主要的致病菌之一, 可以诱导肝胰腺坏死病等多种病症, 该病原可引发梭子蟹生长缓慢、嗜睡、空腹、空肠, 最终致其死亡(郝景伟等, 2019; 霍诗天等, 2022)。与哺乳类动物不同的是, 三疣梭子蟹没有 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 缺少获得性免疫系统。在应对病原入侵时, 只能依赖于与生俱来的先天性免疫系统, 通过免疫

信号通路级联反应来实现识别清除病原的作用(Uematsu *et al*, 2008)。因此, 研究其先天性免疫机理对三疣梭子蟹抗病以及新品种培育有着重要意义。

Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)等模式识别受体(Pathogen recognize receptor, PRR)能够在病原刺激中介导三疣梭子蟹等甲壳动物的先天免疫, 各类 PRR 都能通过识别病原中某种保守的病原相关分子模式(Pathogen associated molecular pattern, PAMPs), 启动先天性免疫应答(Carty *et al*, 2010)。TLR 家族基因具有高度的保守性, 在漫长的生物进化历程中末端的 TIR 结构域都高度同源, 且 Toll 蛋白均属于 I 型跨膜结构蛋白。其结构包括胞外在免疫中起到关键识别作用的序列区(LRR)、跨膜区(TM)和与白介素受体高度同源的胞内区(TIR) (Slack *et al*, 2000; 章晓联等,

* 国家虾蟹产业技术体系, CARS-48 号; 国家自然科学基金项目, 42076116 号; 中国水产科学研究院基本科研业务费, 2020TD46 号。张伟伟, 硕士研究生, E-mail: 1362326629@qq.com

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

收稿日期: 2022-11-01, 收修改稿日期: 2023-01-14

2002; Uribe *et al.*, 2011)。TLR 家族下信号通路主要有两种依赖途径, 一条是 MyD88 (髓样分化因子 88) 依赖途径, 另一条是非依赖 MyD88 途径, 通过 TRIF 进行信号转导, MyD88 与 TRIF 都属于 TLR 的下游接头分子(Yamamoto *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2012)。目前在甲壳动物中, TLRs 家族基因都只进行了一些基础性的研究, 如 Yang 等(2007)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中发现了一个 Toll 样受体, 命名为 *LvToll*, 这是在甲壳动物中发现的首个 TLR 家族基因。另外, 在三疣梭子蟹中已克隆了 5 个 TLR 基因并初步分析其在病原胁迫后的表达模式(Zhou *et al.*, 2015; 张杰, 2017)。然而, 相比哺乳类(王有琴等, 2021; 章琳俐等, 2021)和昆虫类(Yagi *et al.*, 2010), 甲壳动物 TLR 基因的研究基础相对薄弱, 主要体现在: (1) 尚不明确其识别的 PAMPs, (2) 缺乏必要的功能验证研究, (3) 对其分子调控通路解析不足。

本实验克隆了三疣梭子蟹 *PtToll6* 基因, 分析了该基因的组织表达分布特征, 明确了其主要识别的 PAMPs。初步验证了 *PtToll6* 基因在抗副溶血弧菌感染中具有一定作用, 可能依赖 MyD88 途径发挥免疫功能。研究结果为深入解析甲壳动物 TLR 基因的功能提供依据, 同时可为三疣梭子蟹抗病良种培育提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 实验样品的采集

实验所用的三疣梭子蟹取自于山东省昌邑市海丰水产公司。在饲养至 80 日龄时, 选取健康有活力的三疣梭子蟹[体重为(30±5) g], 将其置于一个 20 m³ 的混凝土池塘中暂养 7 d, 用于后续实验。实验条件保持昼夜水温(25±3) °C, 盐度 35, pH 8.7。每天对水体进行换水, 换水量为 1/3, 并定时喂食新鲜杂鱼, 实验全程于此公司实验车间进行。

在室内水泥池暂养 7 d 后, 随机选取 9 只暂养的健康三疣梭子蟹, 分别采集心脏、表皮、胃、肠、脑、肝胰腺、鳃、眼柄、血淋巴、肌肉共 10 个不同的组织, 置于液氮中保存, 用于合成 RACE 模板和 *PtToll6* 的组织表达分析。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取、cDNA 和 RACE 模板合成 取上述三疣梭子蟹 10 个不同的组织各 50 mg, 按照 TRIzol[®] Reagent (Roche 公司)方法进行总 RNA 提取, 并利用紫外分光光度计(NanoDrop2000, Thermo)和 1%

琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的质量和浓度。

选取不同组织高质量的 RNA, 使用 HiScript II Q RT Super Mix for qPCR (+gDNA wiper) kit (诺维赞, 南京)合成 cDNA。将各组织中高质量的总 RNA 均匀混合, 使用 SMARTer[®] RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa, 日本)合成 3'和 5' RACE cDNA 模板。

1.2.2 三疣梭子蟹 *Pt-Toll6* 的 cDNA 全长的克隆、序列及进化分析 根据从本实验室构建的三疣梭子蟹基因组数据库中筛选验证得到的 *PtToll6* 基因 EST 序列, 利用 PrimerPremier5.0 软件设计 *PtToll6* 的 3'和 5' RACE 特异性引物及通用引物并由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。使用 TransTaq[®] DNA Polymerase High Fidelity (HiFi)高保真聚合酶(全式金生物, 北京)参照说明书进行 RACE 3'和 5'末端巢式 PCR 扩增, 将 PCR 产物回收纯化并进行连接转化, 挑取单克隆, 经菌落 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, 参照宋柳等(2019)。

通过 ContigExpress 软件将克隆序列与 EST 序列进行拼接、验证, 得到 *PtToll6* 基因的 cDNA 全长, 分别采用 NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、ORFFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线网站对序列进行比对分析及开放阅读框(ORF)的预测。蛋白质功能结构域利用 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)网站进行预测。利用 DNAMAN 软件将 *PtToll6* 与甲壳动物中的 TLR 基因进行蛋白质序列比对, 并通过 MEGA 软件对 *PtToll6* 进行构建系统进化树分析。

1.2.3 三疣梭子蟹 *PtToll6* 的组织表达分析 将不同个体相同组织的 cDNA 等浓度混合, 用于组织表达分析。根据已获得的 *PtToll6* cDNA 全长序列, 通过 PrimerPremier5.0 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), 具体 PCR 实验体系及方法参考宋柳等(2019)。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 将统计结果整理形成图表, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

1.2.4 病原相关分子模式刺激 随机选择 120 只经过室内暂养后大小一致、健康有活力的三疣梭子蟹, 平均分成 4 组, 各组分别注射 1×PBS 缓冲液 100 μ L、1 mg/mL 脂多糖 100 μ L、1 mg/mL 肽聚糖 100 μ L 以及 1 mg/mL Poly IC 100 μ L。在注射后 0、12、24、48、72 h, 每组分别随机选取 3 只三疣梭子蟹, 取肝胰腺组织置于液氮中保存, 用于 RNA 提取。

表 1 实验所用的引物序列
Tab.1 The sequence of primers used in the experiment

引物	序列	用途
<i>PtToll6</i> -5'R1	ACTGTATGCCTGACACGGGTTT	5'RACE
<i>PtToll6</i> -5'R2	CTGCAATGCGACAGTACATAAGGT	5'RACE
<i>PtToll6</i> -3'F1	AGGACGCCGACCACTACCTGTACGA	3'RACE
<i>PtToll6</i> -3'F2	CATCAACTCAGTAGATCGCTCCA	3'RACE
β -actin-F	CGAAACCTTCAACTCCCG	qRT-PCR 内参
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR 内参
<i>PtToll6</i> -F5	GTAATCCGTTCTGTGCGAC	荧光定量引物
<i>PtToll6</i> -R5	CCGAGTAGCACTTGATGTCTT	荧光定量引物

1.2.5 副溶血弧菌感染 随机将 60 只室内暂养后大小一致、健康有活力的三疣梭子蟹, 平均分成 2 组(攻毒组和对照组)进行预实验。对照组为注射无菌的海洋甲壳动物生理盐水, 攻毒组为注射副溶血弧菌, 浓度依据张杰等(2017)报道注射副溶血弧菌的浓度(2.6×10^7 CFU/mL)进行预实验。剂量均为 $1 \mu\text{L/g}$ (体重)。在自然海水以及最适温度下, 72 h 半致死, 而对照组没有死亡情况出现, 此剂量浓度作为正式实验使用。

选取 180 只三疣梭子蟹进行正式实验, 平均分为两组即实验组与对照组, 在梭子蟹游泳足的第一关节基部处进行注射(谢建军等, 2011; Ren *et al.*, 2017)。实验组注射 2.6×10^7 CFU/mL 的副溶血弧菌, 对照组注射海洋甲壳动物生理盐水, 剂量均为 $1 \mu\text{L/g}$ 。副溶血弧菌悬液参照奚全伟等(2018)的方法提取制备。分别在注射后 0、12、24、48、72 h, 每组各随机取 3 只三疣梭子蟹的肝胰腺组织于液氮中保存, 用于 RNA 提取。

1.2.6 *PtToll6* 基因 RNAi 实验 本实验通过生工生物工程(上海)股份有限公司设计的干扰序列进行位点筛选, 最后确定具有干扰效果的一对序列由公司合成(表 2)。

RNAi 实验共分为 4 组各 60 个个体: 实验组(注射 *PtToll6* siRNA)、阴性对照组(注射 NC siRNA)、空白对照组(注射生理盐水)、阳性对照组(注射生理盐水)。将 siRNA 浓度稀释为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 阴性对照组和实验组根据三疣梭子蟹个体的体重进行注射(注射量为 $1 \mu\text{g/g}$); 空白对照组和阳性对照组根据三疣梭子蟹个体的体重进行注射生理盐水(注射量为 $1 \mu\text{L/g}$)。在注射后 0、24、48、72 h, 分别取空白对照组、阴性对照组和实验组 3 只三疣梭子蟹的肝胰腺组织于液氮中保存, 用于干扰效率检测。

在 RNAi 实验 24 h 后, 4 组各取 30 个个体进行攻

毒实验, 按体重注射(注射量为 $1 \mu\text{L/g}$): 空白对照组注射 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液; 其他 3 个组注射 2.6×10^7 CFU/mL 副溶血弧菌。实验每 3 h 统计一次死亡数。在 0、12、24、48、72 h, 每组分别选取 3 只依然存活的三疣梭子蟹解剖取肝胰腺组织存于液氮中保存。

1.2.7 接头分子的实时荧光定量分析 利用材料 1.2.2 方法, 得到了 MyD88 与 TRIF 的 cDNA 序列, 并设计了 qRT-PCR 引物, 所用引物如表 3, 使用 1.2.6 中 *PtToll6* RNAi 材料, 对其下游接头分子进行实时荧光定量分析。

表 2 本研究所用双链 RNA
Tab.2 The double-stranded RNA used in the experiment

双链 RNA	序列(5'~3')
<i>PtToll6</i>	GCA ACU CGC UCA UCA CCA UTT AUG GUG AUG AGC GAG UUG CTT
NC	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

表 3 实验所用的引物序列
Tab.3 The sequence of primers used in the experiment

引物	序列	用途
β -actin-F	CGAAACCTTCAACTCCCG	qRT-PCR 内参
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR 内参
MyD88-F1	CAGATGAGAAAGACCCCGTT	荧光定量引物
MyD88-R1	ATTCCCAGAAAGTGGACGAC	荧光定量引物
TRIF-F1	TCTGCCTACGACTGAACCTAA	荧光定量引物
TRIF-R1	CCAGTAAGGCAAAGGTGATGAC	荧光定量引物

2 结果与分析

2.1 *PtToll6* 基因 cDNA 全长及序列结构特征

PtToll6 的 cDNA 全长为 4 034 bp, 其中包括 129 bp 的 5' UTR, 2 934 bp 的 ORF 区域, 和 1 100 bp 的 3' UTR, 预测分子量为 109.078 kDa, 理论等电点为 6.06, 共编码 977 个氨基酸(图 1)。利用 SMART 在线预测分析网站以及 DNAMAN 软件对 *PtToll6* 进行

```

1  CTGTGATGCCTGACACCGGTTCCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAGTGGCAGCGGGGTTGACGCCGCCCGGGCGGCGCTGAATGGAGGACGCCGCCAGCCGCCCTGCCA
    M G T D A R R L T P C S G G S V S A L L G L L L L A A
121  GGCCCTGGACAC ATG GGG ACT GAT GCG AGG CGC CTC ACG CCC TGC TCC GGC GGG AGT GTC TCC GCC CTC CTC GGC CTT CTG CTC CTG GCG GCG
    A A T S Q A A A I R D P T S P A A T Q D A P R P A I T A A S
211  GCG GCC ACC TCT CAG GCC GCC GCC ATC CGT GAC CCA ACG TCC CCG GCC GCC ACC CAG GAC GCG CCG CGC CCT GCC ATT ACC GCG GCC AGT
    V H H A A P L N S S A H P V P L A R D D V S Y R Q L C I T K
301  GTG CAT CAC GCG GCG CCC CTC AAC AGC TCC GCG CAC CCA GTC CCT CTG GCC AGG GAC GAC GTT TCC TAC CGC CAA CTG TGC ATC ACC AAG
    V R W A P P P P H V D R D L D P L H K Y L P P A W S T P T A
391  GTG AGA TGG GCG CCG CCC CCG CAC GTG GAC CGT GAC CTG GAC CCC CTG CAT AAA TAC TTG CCT CCG GCG TGG TCC ACT CCT ACC GCG
    D E G A A P A T R V G S S L P D G C H D V G R V G H K T L R
481  GAT GAG GGT GCG GCG CCC GCC ACT CGG GTG GGG TCT TCG CTA CCC GAT GGA TGC CAC GAC GTG GGA CGC GTG GGC CAC AAG ACG CTG CCG
    C T G A H M T Q V P D L S L E R N V D S L V F V E T G I Q V
571  TGC ACG GGC GCG CAC ATG ACG CAA GTC CCG GAC TTG TCG CTG GAG CGC AAT GTG GAC TCG CTG GTG TTC GTG GAG ACG GGC ATC CAG GTG
    V S D V H H L P R S V R D L T F S R G P L V T F N G L R F Y
661  GTG AGT GAC GTA CAC CAC CTG CCG CGG TCC GTG CGT GAC CTC ACC TTC TCC CGC GGC CCC CTC GTC ACC TTC AAC GGC CTC AGG TTC TAC
    Q I S G L D S L T L E H N T L S T W S F V T A F Y S P D A C P
751  CAG ATT TCT GGC CTG GAC TCC CTC ACG CTG GAC CAC AAC ACG CTC AGC AAT TGG AGC TTC GTC ACC GCT TCC TCC CCG GAC GCA CCC
    K N A T I R T L R L Q H N L I T Y P P E P M G S N E S V L P
841  AAG AAC GCC ACC ATC AGG ACC CTG CGC CTG CAG CAC AAC CTC ATT ACC TAC CCG CCA GAG CCC ATG GGA AGC AAC GAG TCA GTA CTG CCG
    L L E T L V M S N N P M S N L P Q N L F L P L W A S N L T T
931  CTG CTG GAA ACC CTC GTC ATG AGC AAC AAC CCT ATG AGT AAC CTG CCA GGC AAC TTG TTC CTG CCA CTC TGG GCT AGC AAC CTC ACC ACG
    L L L R D C S L S Q F Y G S P L E P V S G I Q V L D L S N N
1021  CTG CTC CTC AGA GAC TCC CTA TCC GAT TFC GGA TCA CCA CTG GAA CCC GTG TCA GGC ATA CAA GTG CTG GAC CTG AGC AAC AAC
    P G L S N E E L H E L F E P L S Q G R L R E L Y L A N N N Y
1111  CCT GGT CTG TCC AAC GAG GAG CTG CAC GAG TTG TTT GAG CCG CTG AGC CAA GGC CGC CTG AGG GAG CTG TAC CTG GCC AAC AAC AAC TAC
    V T V P T E A L R V V S G G L E K L D L H G A A F Q C L D N
1201  GTC ACT GTA CCG ACT GAG GCG CTG AGA GTG GTA AGT GGC GGC CTG GAA AAG CTG GAT CTT CAC GGA GGC GGC TTC CAG TC CAG CTC GAC AAC
    T S F P L L P R L K E L N L M Y C R I A A I R P H S F E V F
1291  ACC TCC TTC CCG CTC CTG CCG CGC CTC AAG GAA CTC AAC CTT ATG TAC TGT CGC ATT GCA GCG ATC CGT CCA CAT TCC TTC GAG GTC TTC
    P V L E I L H L D G N S L I T I P T E I L L P T L K V L T M
1381  CCA GTT CTC GAA ATT CTT CAT CTG GAC GGC AAC TCG CTC ATC ACC ATT CCA ACT GAG ATC CTG CTA CCC ACA CTC AAG GTG CTG ACG ATG
    N D N P R S T G D D S V E A F S M D Y V D F G H M E K L T N
1471  AAC GAT AAC CCG AGG AGC ACA GGT GAC GAT AGC GTG GAG GCC TTC AGC ATG GAC TAC GTG GAC TTC GGG CAC ATG GAG AAG CTC ACC AAC
    V T F N G V P L G Y V E K Q Y F N D L R G L L D F R L T S C
1561  GTC ACT TTC AAC GGG GTC CCG CTC GGC TAC GTG GAG AAA CAG TAC TTC AAT GAC CTG CGC GGC CTG CTG GAC TTC AGA CTG ACC TCG TGC
    K I K Y I E A F S F V N L T R L Y I N N E L E V L L G
1651  AAG ATT AAA TAC ATC GAG GCT TTC AGT TTC GTG AAC CTG ACG CGG CTG CAG CGC CTC TAC ATC AAC AAC AAC GAG CTG GAG GTG TTG CTC
    N D T F A G L V S L T H L D L S G N K I T F R A T F D I S R
1741  AAC GAC ACC TTC GCA GGA CTG GTG TCA CTC ACC CAC CTG GAC CTC TCT GGC AAT AAG ATA ACC TTC CGG GCC ACC TTC GAC ATC TCG CCG
    S P G M P A P T G G K E S R A L S L L D L P M V A A S W V Q
1831  TCG CCT GGG ATG CCT GCC CCC ACC GGC GGG AAG GAG TCG CGC GCC TTG TCG CTT CTA GAC CTA CCC ATG GTG GCG GCA TCG TGG GTA CAA
    S G G G E R S V H T G R E T A V R R E P H S Q L P C L P F E G
1921  AGT GGC GGC GGG GAA CGT AGT GTC CAC ACT GGA AGG GAA ACA GCT GTG AGG GAG CCA CAC TCA CAA CTA CCG TGC CTT CCC TT FAG GGC
    L S A L R H L D L S N N G I R Y M T E S H W R N L Q Q L V T
2011  CTG TCT GCA CTG CCG CAC CTT GAT TTA TCC AAC AAT GGG ATC CGT TAC ATG ACA GAG AGT CAC TGG AGG AAC CTG CAG CAG CTG GTG ACG
    L S L M N N V Q E W Y P V F H N L S R L S Q L P T L K V L T M
2101  CTG TCG CTG ATG AAC AAC AAT GTG CAG GAG TGG TAC TAC CCG GTG TTC CAC AAC CTG AGC CGC CTC AGC CAG CTG GTG CTG TCC TAC AAC
    S L S L I T E A M L E D F S L A G L T V V D L K H N P F Q C
2191  TCG CTG AGC CTG ATC ACT GAG GCA ATG CTG GAG CAC TTC TCG CTG GCT GCG CTG ACT GTG GTG GAT TTG AAG CAC AAC CCC TTC CAG TGC
    G C S L A S L N G S I N T S I F L D F S S Y S C S Q E G H D
2281  GGC TGC TCC CTC GCC AGT CTC AAC GGC AGC ATC AAC CCA TCC ATC TTC CTG GAC TTC TCC TCA TAC AGC TGC TCG GAG GAA GGC CAC GAC
    L S F E F I S T A V C P S H A Q G D E N V V D K P A T G K T
2371  TTG TCT TTT GAA GAA TTT ATT TCC ACC GCT GTC TGT CCG TCA CAC GCC CAG GAC GAG AAC GTG GTG GAC AAA CCA GCC ACT GGA AAG ACC
    E I I L I S V S I L F S V I T S V T L Y R K R W Y L R Y L V
2461  GAA ATT ATT CTC ATT TCT GTC TCC ATA CTG TTC TCT GTC ATT ACC TCC CTC ACC CTG TAC CGC AAG CGA TGG TAC CTG CGT TAC TTG GTG
    Y K V K M K T D Q H K E D A D H Y L Y D I F V C Y S Q A D R
2551  TAC AAA GTG AAG ATG AAG ACT GAC CAG CAC AAG GAG GAC GCC GAC CAC TAC CTG TAC GAC ATC TTC GTC TGC TAC TCC CAG GCG GAC CCG
    Q W V F E H L V A R L E D G G R Y R V C V H E R D F T V G Q
2641  CAG TGG GTC TTT GAG CAC CTG GTT GCC AGA CTG GAG GAC GGC GGC AGG TAC CGC GTG TGT GTG CAG GAG CCG GAG GTC CAG GGC CAA
    E I T E N I I N S V D R S R K V L V V L S P A F V D S S W C
2731  GAG ATA ACG GAA AAC ATC ATC AAC TCA GTA GAT CGC TCC AGG AAG GTG TTG GTG GTG CTG TCC CCG GCC TTC GTG GAC AGC AGC TGG TGC
    M L E L Q L A S H K I L D E R R N K L I L V L L E A L P S H
2821  ATG CTT GAG CTG CAG TTG GCC AGC CAC AAG ATT CTA GAT GAA AGA AGG AAC AAG CTG ATC CTG GTG CTC CTT GAG GCC CTG CCG TCC CAC
    S Q P K K L R F L L R S R T Y L A W H G D P E G Q R L F W V
2911  AGC CAG CCA AAG AAA CTG CGT TTC CTT CTC AGG AGC CGC ACT TAC CTC GCC TGG CAC GGA GAT CCC GAG GGT CAG CGG CTT TTC TGG GTA
    R L Q R A V T K P T A S E I L E F T H M *
3001  CGG CTG CAG CGA GCG GTG ACC AAG CCT ACG GCA AGT GAG ATC CTT GAG TTC ACC CAC ATG TAG CTGTACAAG GGAACAAGGC CTCTGACGC
3094  TCCACGAAC CATGCTGTG GTGTGTCAC TTCTCTGTA GGCAGAGTGA TCGACAAGCT TTTTGTGTT GGTTCATGA ATTCAAAGCT TCCGCACATA GAECTACATA
3204  TTATGTCCTT TAGGAGCAGT GGAAGCTAC ACTTCTCTAT CTAGTCTTAT CTTCGGGGTT TTTAAATCA AGGTGCAAAA TAATGAATCT CAGTAATTAG AGCACCGGC
3314  CGTTGCCAG CCAGCGGAGA ACTGCGCAGG GTCCGCCCTC CGCGCGGCTC ATTACTCGAC TACTCGGCA GGTCTACACG TCATGTCAGC ATGAATCCTT TCCTGAAACT
3424  ATGAGACTCA TAACGTTAAG GATTGTGTGC TGATACATCG CCTGTGTCTG TCCATTGTGT TGTCGTGCCA TGAGGCAGCT TTGTAATGAG GCCTCGTACC AAGCACATC
3534  TGGTCAGTCG GTCTGGTTAA CCCAACACTG TCACAACCGG TGCCAGGACA GGTTCAGGGA CTCGAGGTGG CCAGCCGTCA GCCTCTCTCG TTCTGCCATA AAATGCTTT
3644  GTATGTACTA TACTCATTAT TGGTGACTTA AGTTTGACCG GCAGGTGAGG AGGCAGGACT AGCAGGAGCC TTCTCGGCC ACTGACAGTG TCCACTGCGC GCGCCATTCC
3754  CATGAGTCGG GCGCCGCCCT CCTGTGCCTT TCCTCTGAG CGTATTCGCG AACTTGGCTT TCCTGTAACC TGCAGCCAAA CTTAGACACA ACGTGAAGGA GGCCGCGCC
3864  GTGTGGGCTG TGTGAGCAG CATGTCCACG CGTCATGAT GTTGTGCACT GCCACTTGTG TGGCAAGGA AACTAAGTIT TACCTGACAA TACTTATAIT ATTCTATGAT
3974  AGGTGTAICT AAATAAAGT TTAICTGCAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *PtToll6* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列
 Fig.1 Full-length cDNA and amino acid sequence of *PtToll6* gene

蛋白结构、序列比对分析。结果显示, *PtToll6* 具有 Toll 样受体蛋白的重要结构域: LRR、TIR (图 2), 且 *PtToll6* 与其他甲壳动物 Toll 具有高度同源的 TIR 保守区, 而胞外的 LRR 较为复杂多样(图 3)。三疣梭子蟹 *PtToll6* 与其他 Toll 的序列同源性较低, 同源性为 8.42%~17.92%, 其中同源性最高的是克氏原螯蟹(*Procambarus clarkii*), 同源性为 17.92%。利用 MEGA 5.0 软件对 *PtToll6* 基因进行系统进化分析, 图 4 结果显示, *PtToll6* 没有与亲缘关系近的甲壳动物聚在一起, 反而是与同属节肢动物门的果蝇 *Dm Toll 9* 单独聚为一支(*PtToll6* 以红色圆点表示)。在已发表的三疣梭子蟹中, 有两个分别与亲缘关系

最近的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) *EsToll2*、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) *SpToll* 聚在一起, 而其他三疣梭子蟹 Toll 都是与果蝇 Toll 聚在一起(已发表的三疣梭子蟹 Toll 以红色圆圈表示)。

2.2 *PtToll6* 的组织表达分布

利用实时荧光定量 PCR 技术, 分析了 *PtToll6* 在不同组织中的相对表达情况。如图 5 所示, *PtToll6* 在心脏、表皮、胃、肠、脑、肝胰腺、鳃、眼柄、血淋巴、肌肉这 10 个组织中均有表达。其中, *PtToll6* 在肝胰腺中特异性地高表达, 其次在肠以及脑中的表达量相对较高, 在鳃组织中的表达量最低。

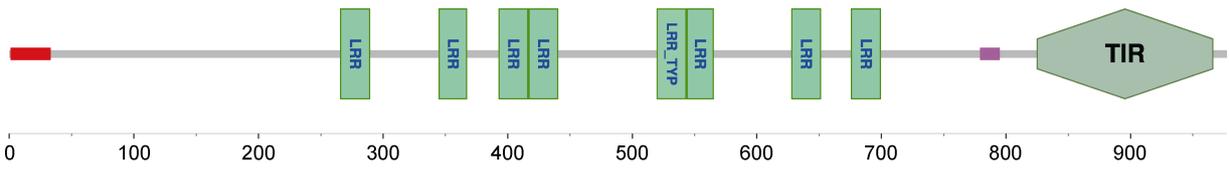


图 2 *PtToll6* 基因编码蛋白结构域位置

Fig.2 The location of the protein domain encoded by the *PtToll6* gene

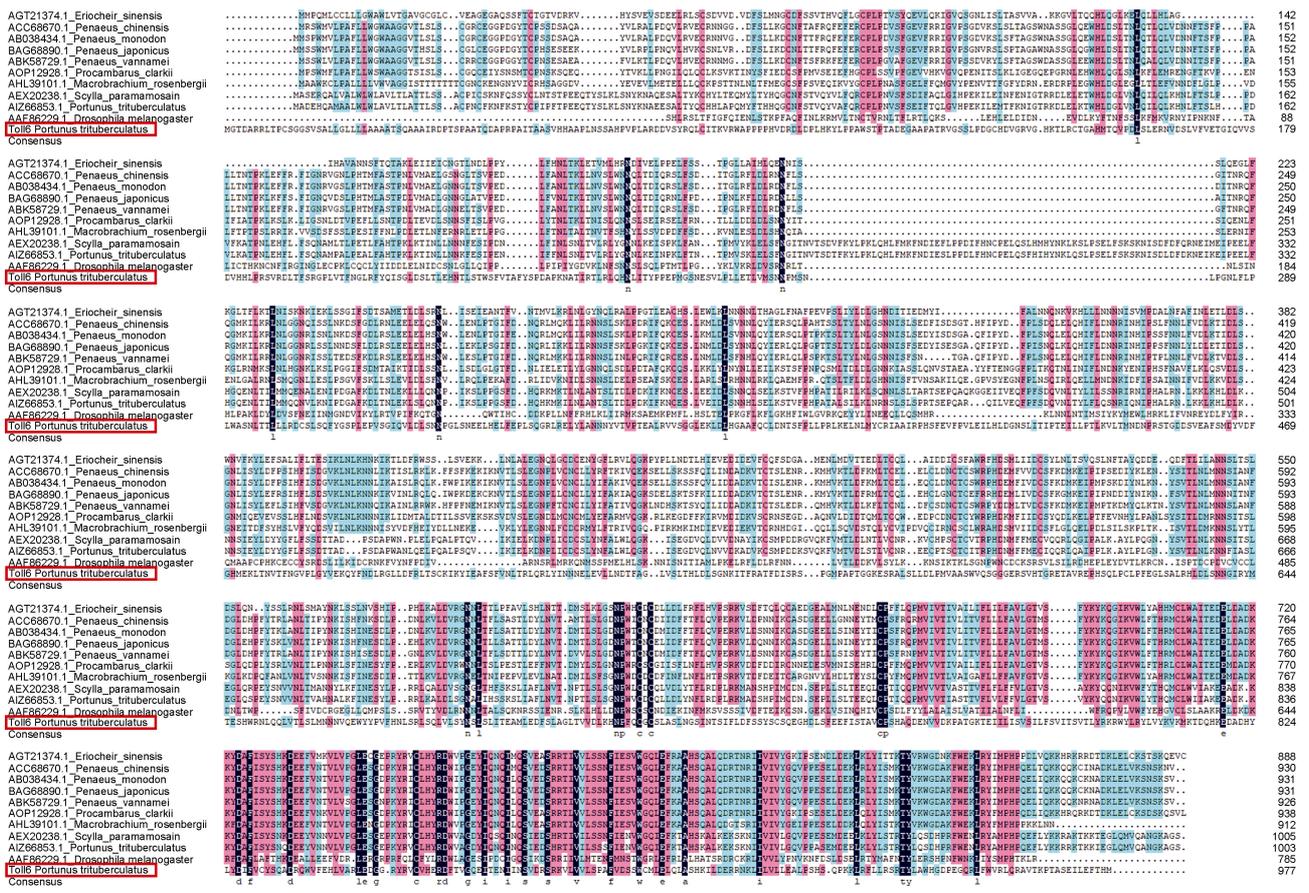


图 3 *PtToll6* 氨基酸序列的多序列比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of the *PtToll6* amino acid sequence



图 4 *PtToll6* 的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic analysis of *PtToll6*

注: *PtToll6* 以红色圆点表示; 已发表的三疣梭子蟹 Toll 以红色圆圈表示

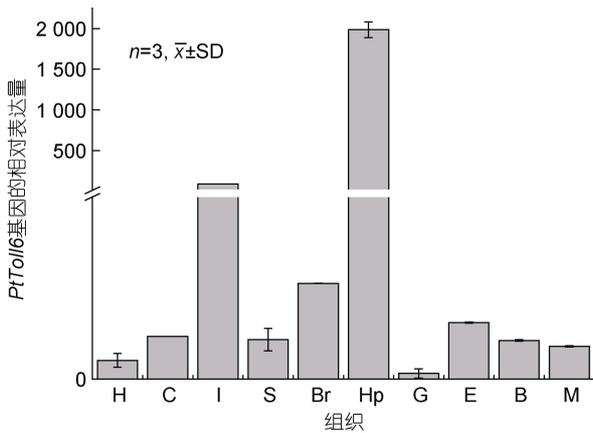


图 5 *PtToll6* 基因在不同组织中的表达分析

Fig.5 Relative mRNA expression level of *PtToll6* gene in different tissues

注: H: 心脏; Hp: 肝胰腺; E: 眼柄; M: 肌肉; B: 血细胞; G: 鳃; S: 胃; C: 表皮; I: 肠; Br: 脑

2.3 病原相关分子刺激后 *PtToll6* 的表达规律

利用荧光实时定量 PCR 对 PAMPs 刺激的 3 个实验组和对照组进行分析。从图 6 中可以发现, 在肝胰腺组织中, 脂多糖以及 Poly IC 的刺激均使 *PtToll6* 基因的表达显著上调($P < 0.05$), 且都在 48 h 达到峰值, 72 h 开始回落, 但对脂多糖的响应更加强烈(对照组的上千倍)。在肽聚糖的刺激下, *PtToll6* 基因在 12 h、

24 h 下调, 但在 48 h 出现上调现象($P < 0.05$)。

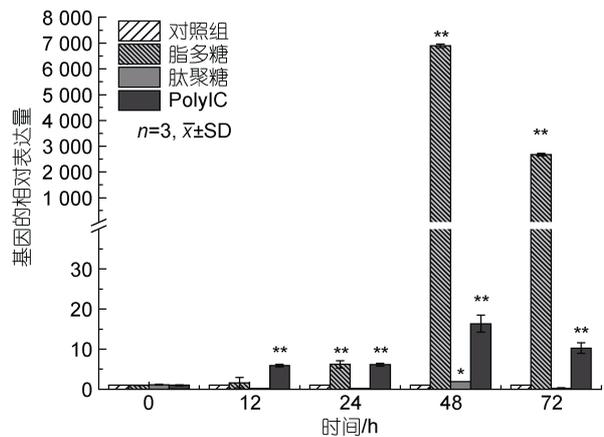


图 6 不同 PAMPs 刺激下 *PtToll6* 基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *PtToll6* gene stimulated with different PAMPs

注: *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。下同

2.4 副溶血弧菌感染后 *PtToll6* 及其接头分子的表达特征

在副溶血弧菌的感染下, *PtToll6* 在三疣梭子蟹的肝胰腺中呈显著上调表达($P < 0.05$), 12 h 显著上调至 0 h 的 2.74 倍, 于 24 h 上调至 9.02 倍达到峰值, 后有回落又小幅上调(图 7)。MyD88 也在感染下呈上调

表达($P<0.05$), 在 72 h 达到峰值为 0 h 的 11.4 倍。而 TRIF 在感染后则是下调趋势(图 8)。

而 TRIF 在 24 h 与 72 h 都呈上调趋势(图 11)。

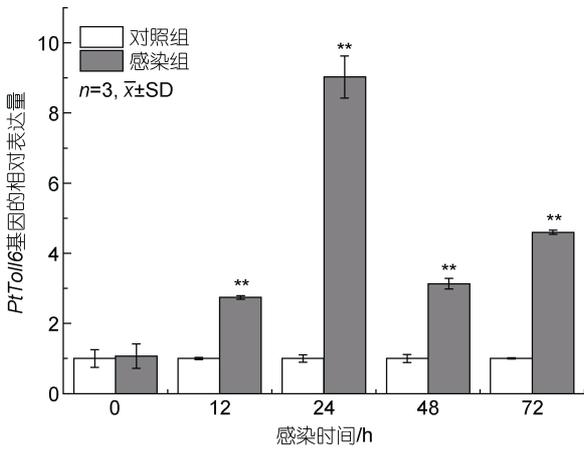


图 7 副溶血弧菌刺激后 *PtToll6* 基因的表达变化情况
Fig.7 Expression of *PtToll6* gene after infection with *V. parahaemolyticus*

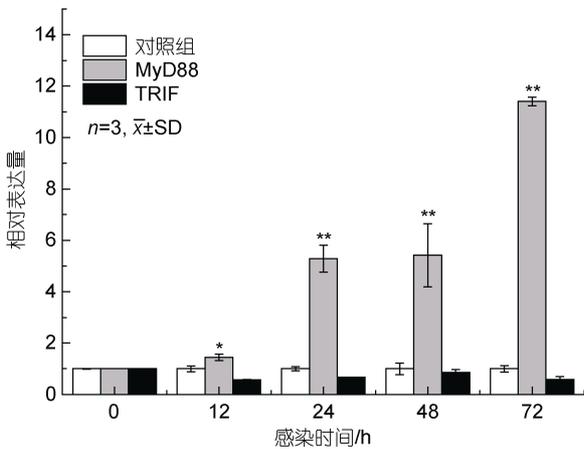


图 8 副溶血弧菌刺激后 *PtToll6* 接头分子的表达变化情况
Fig.8 Expression of the linker molecule of *PtToll6* gene after infection with *V. parahaemolyticus*

2.5 功能验证

RNAi 实验结果显示, 注射双链 RNA 后, 三疣梭子蟹 *PtToll6* 基因在 24 h、48 h 都呈现下调表达, 差异显著($P<0.05$), 产生敲降效果, 24 h 的干扰效率大于 99% (图 9)。RNAi 试验后死亡率统计实验结果显示(图 10), 阳性对照组的死亡率为 50%, NC 阴性对照组的死亡率为 53.34%, 而实验组的死亡率为 93.34%, 结果表明实验组死亡率显著升高, 为阴性对照组的 1.8 倍($P<0.05$)。

2.6 *PtToll6* 的下游接头分子验证

在 *PtToll6* 敲降后, MyD88 的表达也受到了抑制, 24 h 至 72 h 之间几乎不表达, 具有明显的干扰效果,

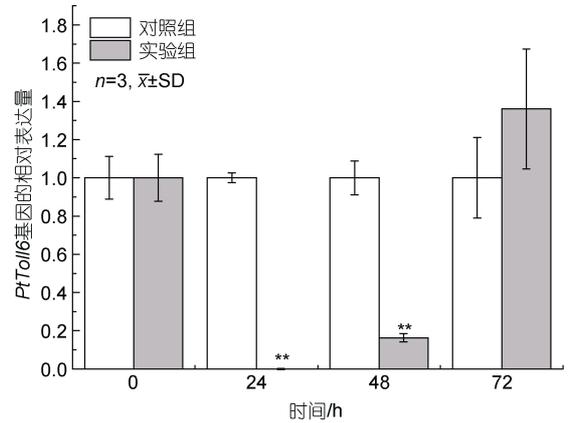


图 9 *PtToll6* 基因干扰后的表达分析

Fig.9 Relative mRNA expression level of *PtToll6* after interference
注: 对照组为注射的序列打乱的双链 RNA, 实验组为注射的 *PtToll6* 干扰序列。下同

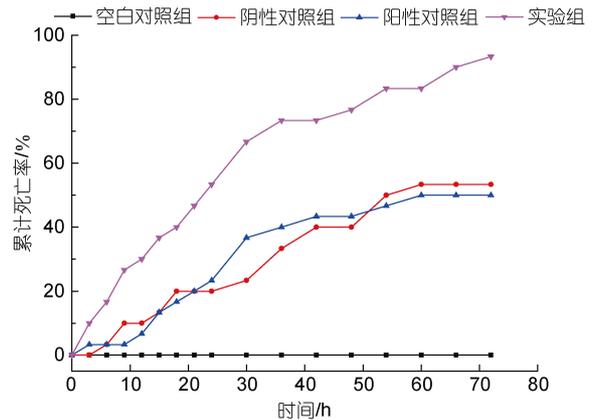


图 10 干扰后三疣梭子蟹在感染下的死亡率
Fig.10 The mortality of the infected *P. trituberculatus* after interference

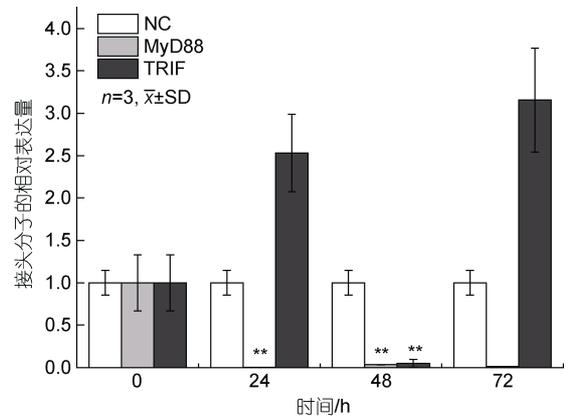


图 11 接头分子干扰后的相对表达量
Fig.11 Relative expression levels after interference of linker molecules

3 讨论

先天免疫是三疣梭子蟹等无脊椎动物抵抗外界病原入侵的重要防御机制, 主要由胚系基因所编码的 PRR 所介导, 其中 TLR 是一种在病原入侵后发挥识别和清除功能的重要 PRR (Carty *et al*, 2010)。本实验克隆了三疣梭子蟹 *PtToll6* 基因的 cDNA 全长序列, 并预测了其编码蛋白结构域。与已发表的 5 个三疣梭子蟹 TLR 基因相比, *PtToll6* 没有 LRR-CT (C 端-LRR), LRR 仅有 8 个, 是该物种中已知 LRR 数量最少的 TLR 基因(Zhou *et al*, 2015; 张杰, 2017)。LRR 结构域发挥着 TLR 基因识别 PAMPs 的功能, 不同的 LRR 结构域赋予了 TLR 基因能特异性识别病原相关分子模式的能力(Johnson *et al*, 2003)。*PtToll6* 具有较少的 LRR 的特征可能与其识别特定的 PAMPs 相关。

三疣梭子蟹 *PtToll6* 在肝胰腺中特异性地高表达, 这与已发表的其他三疣梭子蟹 TLR 基因主要在血淋巴、鳃组织等组织高表达不同(Zhou *et al*, 2015; 张杰, 2017)。肝胰腺是甲壳动物解毒代谢和免疫调节的主要组织(Röszer *et al*, 2014; Xu *et al*, 2020), 推测 *PtToll6* 可能在该组织中发挥重要的免疫功能。为了明确 *PtToll6* 所识别的 PAMPs, 我们采用脂多糖、肽聚糖、Poly IC 进行注射刺激, 发现 3 种 PAMPs 均能诱导 *PtToll6* 显著上调表达。值得注意的是 *PtToll6* 对脂多糖的响应最为强烈, 在感染 48 h 后肝胰腺中的表达量上调上千倍, 表明脂多糖是 *PtToll6* 主要识别的 PAMPs。

副溶血弧菌属于典型的革兰氏阴性菌, 而脂多糖(又称内毒素)是革兰氏阴性菌细胞壁外膜中的主要成分(于耕红等, 2011; 霍诗天等, 2022)。为了探究 TLR 6 是否能够识别含有脂多糖的副溶血弧菌, 本研究进行了梭子蟹人工感染副溶血弧菌的实验。qPCR 结果显示 *PtToll6* 在副溶血弧菌感染 12 h 后开始上调表达, 至 24 h 达到峰值, 表明其可以识别并响应该病原的入侵。为了进一步验证其在抗副溶血弧菌中的功能, 我们采用 RNAi 技术成功敲降了 *PtToll6* 的表达。对比不同组别人工感染副溶血弧菌的死亡率, 发现实验组的死亡率显著高于阴性对照组(1.8 倍), 表明 *PtToll6* 基因的确在抗副溶血弧菌中发挥了重要的免疫作用。

我们分析了 *PtToll6* 敲降后下游两种接头分子的表达情况, 实验发现 MyD88 与 *PtToll6* 趋势相同, 在 24 h、48 h 被抑制表达, 而 TRIF 的表达没有被抑制。

在副溶血弧菌感染实验中, MyD88 也与 *PtToll6* 趋势相同, 呈上调表达, 而 TRIF 则是下调趋势。实验结果说明, *PtToll6* 主要依赖 MyD88 途径, MyD88 是其下游通路的接头分子。有研究表明, MyD88 在副溶血弧菌感染中发挥了重要免疫功能, 如南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 在用脂多糖、金黄色葡萄菌和 WSSV 等刺激后, LvMyD88 上调表达, 在天然免疫中可能发挥了作用(Zhang *et al*, 2012)。在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*), 经过脂多糖、肽聚糖处理后, MyD88 在原生代培养的血细胞中也上调表达(Qiu *et al*, 2007)。本实验中, MyD88 同样在副溶血弧菌感染下呈上调表达, 一定程度地参与了天然免疫进程。

4 结论

本实验成功克隆了三疣梭子蟹 *PtToll6* 基因 cDNA 全长序列并分析了该基因的功能结构域和物种进化关系。通过分析 *PtToll6* 基因的组织表达、不同 PAMPs 刺激后的表达、病原感染下的表达特征以及 RNAi 后的死亡率, 探究了该基因在三疣梭子蟹天然免疫中的功能以及初步明确了其下游接头分子。研究结果有助于全面解析三疣梭子蟹中 TLR 家族的免疫机制。

参 考 文 献

- 于耕红, 范昕, 冯咏梅, 2011. 溃疡性结肠炎患者 CA125 及内毒素检测价值的探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 10(11): 827-829.
- 王有琴, 黄飞, 张睿, 等, 2021. 柯里拉京对小鼠单纯疱疹病毒性脑炎 Toll 样受体 3-干扰素诱导链接蛋白通路的调控机制研究[J]. 儿科药理学杂志, 27(5): 1-5.
- 宋柳, 吕建建, 王磊, 等, 2019. 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[J]. 海洋与湖泊, 50(5): 1080-1090.
- 张杰, 2017. 三疣梭子蟹 Toll、HMGB 家族基因在先天免疫中的功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学: 35-36.
- 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[J]. 水生生物学报, 41(6): 1193-1199.
- 郝景伟, 高保全, 王崇, 等, 2019. 致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌 (*Vp_{AHPND}*) 自然感染三疣梭子蟹[J]. 水产学报, 43(7): 1647-1660.
- 章晓联, 潘勤, 2002. Toll 样受体在免疫学方面的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 18(5): 670-672.
- 章琳俐, 辛清武, 李丽, 等, 2021. TLRs 在雄性动物生殖中的生物学功能[J]. 福建畜牧兽医, 43(2): 22-24.
- 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[J]. 水产学报, 35(9): 1392-1398.

- 奚全伟, 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[J]. 水生生物学报, 42(1): 86-93.
- 薛俊增, 堵南山, 赖伟, 等, 1997. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究[J]. 东海海洋, 15(4): 61-66.
- 霍诗天, 焦厚琪, 李清, 等, 2022. 克氏原螯虾副溶血弧菌的分离鉴定及药敏特性[J]. 水生态学杂志, 43(1): 124-129.
- 戴爱云, 冯钟琪, 宋玉枝, 等, 1977. 三疣梭子蟹渔业生物学的初步调查[J]. 动物学杂志, (2): 30-39.
- CARTY M, BOWIE A G, 2010. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection [J]. Clinical and Experimental Immunology, 161(3): 397-406.
- JOHNSON G B, BRUNN G J, TANG A H, *et al*, 2003. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors [J]. Trends in Immunology, 24(1): 19-24.
- QIU L M, SONG L S, YU Y D, *et al*, 2007. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 23(3): 614-623.
- 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*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 143: 6-11.
- RŐSZER T, 2014. The invertebrate midintestinal gland ("hepatopancreas") is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism [J]. Cell and Tissue Research, 358(3): 685-695.
- SLACK J L, SCHOOLEY K, BONNERT T P, *et al*, 2000. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways [J]. Journal of Biological Chemistry, 275(7): 4670-4678.
- TANG D, GAO Y H, WANG R X, *et al*, 2012. Characterization, genomic organization, and expression profiles of MyD88, a key adaptor molecule in the TLR signaling pathways in miyu croaker (*Miichthys miyu*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 38(6): 1667-1677.
- UEMATSU S, AKIRA S, 2008. Toll-Like Receptors (TLRs) and their ligands [M] // BAUER S, HARTMANN G. Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Berlin: Springer: 1-20.
- URIBE C, FOLCH H, ENRIQUEZ R, *et al*, 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review [J]. Veterinária Medicina, 56(10): 486-503.
- XU Z N, WEI Y J, GUO S L, *et al*, 2020. Short neuropeptide F enhances the immune response in the hepatopancreas of mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 101: 244-251.
- YAGI Y, NISHIDA Y, IP Y T, 2010. Functional analysis of Toll-related genes in *Drosophila* [J]. Development, Growth & Differentiation, 52(9): 771-783.
- YAMAMOTO M, SATO S, MORI K, *et al*, 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling [J]. The Journal of Immunology, 169(12): 6668-6672.
- YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, *et al*, 2007. A Toll receptor in shrimp [J]. Molecular Immunology, 44(8): 1999-2008.
- ZHANG S, LI C Z, YAN H, *et al*, 2012. Identification and function of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in *Litopenaeus vannamei* [J]. PLoS One, 7(10): e47038.
- ZHOU S M, YUAN X M, LIU S, *et al*, 2015. Three novel Toll genes (PtToll1-3) identified from a marine crab, *Portunus trituberculatus*: different tissue expression and response to pathogens [J]. Fish & Shellfish Immunology, 46(2): 737-744.

CLONING OF *PtToll6* GENE IN *PORTUNUS TRITURATUS* AND ITS FUNCTION IN IMMUNITY

ZHANG Wei-Wei^{1,2}, LYU Jian-Jian², LI Yu-Kun^{1,2}, CHU Fan-Zhi^{1,2}, GAO Bao-Quan², LIU Ping²

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

2. National Key Laboratory of Marine Breeding and Sustainable Production, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract we cloned a new gene from the *Portunus trituberculatus* TLRs family and named it *PtToll6*. The gene is 4 034 bp in length and encodes 977 amino acids. *PtToll6* has a typical domain of Toll-like receptor, including LRR, transmembrane region, and intracellular TIR region. Phylogenetic tree analysis showed that *PtToll6* is clustered with *Dm toll9* of the same phylum Arthropoda. The tissue expression distribution show that *PtToll6* was specifically over-expressed in hepatopancreas, followed by the intestinal tract, and then the heart. Using three types of PAMPs for injection stimulation, it was found that *PtToll6* had the strongest response to lipopolysaccharides, and the expression amount after 48 h of infection was thousands of times that of the control group, and it was speculated that it may be the pathogen-related molecular pattern mainly recognized by *PtToll6* gene. The expression of *PtToll6* was up-regulated at 12 h after *Vibrio parahaemolyticus* infection and peaked at 24 h (up-regulated 9.02-fold). After RNAi knocked down *PtToll6*, the expression of MyD88 was lowered, and the mortality rate of *V. parahaemolyticus* was significantly increased by 1.8 times that of negative control. This study showed that *PtToll6* gene could play an important role in resisting *V. parahaemolyticus*, and provided an important reference for the understanding the molecular mechanism of *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; toll-like receptors (TLRs); pattern recognition receptors (PRR); pathogen associated molecular patterns (PAMPs)