

# 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)CTL 基因 SNP 位点 E4-205 C/T 与抗溶藻弧菌相关性分析\*

郝贵杰<sup>1,2</sup> 林 锋<sup>2</sup> 母昌考<sup>3</sup> 雷 宁<sup>2</sup> 黄爱霞<sup>2</sup> 崔雁娜<sup>2</sup>  
沈亚芳<sup>2</sup> 张海琪<sup>2</sup> 文 菁<sup>1</sup>

(1. 岭南师范学院生命科学与技术学院 广东湛江 524048; 2. 农业农村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 湖州市水产品品质提升与加工技术重点实验室 浙江省淡水水产研究所 浙江湖州 313001; 3. 宁波大学应用海洋生物学教育部重点实验室 浙江宁波 315211)

**摘要** C-型凝集素(C-type lectin, CTL)是甲壳类动物体液免疫中重要的免疫因子之一。但 CTL 基因在溶藻弧菌对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)感染的过程中的表达及抗病机制尚有待进一步研究。为初步阐明 CTL 基因 SNP E4-205 C/T 位点与抗溶藻弧菌感染相关的分子机制,对不同基因型梭子蟹进行溶藻弧菌感染,通过绝对定量方法分析不同基因型梭子蟹肝胰腺、肌肉组织中溶藻弧菌的复制情况。发现溶藻弧菌感染后 12 h 内梭子蟹肝胰腺、肌肉组织中 C/C 组细菌数量显著高于 T/T 组,结果表明 T/T 组梭子蟹抗感染能力显著高于 C/C 组。进一步对该位点非同义突变(ACT-ATT)导致的一个氨基酸改变(Thr-Ile)的两种蛋白进行体外重组表达,并对两种重组蛋白 CTL-ATT 及 CTL-ACT 进行活性分析。发现两种重组蛋白对溶藻弧菌生长均具有一定的抑制作用,CTL-ATT 的抑菌活性显著高于 CTL-ACT。重组蛋白 CTL-ATT 与 PAMPs 的结合活性高于 CTL-ACT 与 PAMPs 的结合活性,同时两种蛋白与 PAMPs 和溶藻弧菌的结合活性具有浓度依赖性。结果表明三疣梭子蟹 CTL 基因参与机体感染溶藻弧菌后的免疫应答过程,其单核苷酸多态性与抗溶藻弧菌感染存在一定的关联性,三疣梭子蟹 CTL 基因 SNP E4-205 C/T 位点为 T/T 基因型时的抗溶藻弧菌感染能力强于 C/C 型。

**关键词** 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*); 溶藻弧菌; 单核苷酸多态性; 凝集素; 高分辨率溶解曲线

中图分类号 S917.1 doi: 10.11693/hyhz20230100019

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),梭子蟹科(Portunidae),梭子蟹属(*Portunus*),广泛分布于中国、日本等海域,因生长速度快、味道鲜美而深受消费者青睐。早在 20 世纪 80 年代被列为我国海洋水产养殖对象,是我国重要的一种海洋渔业资源。随着育苗和养殖技术的日臻成熟,梭子蟹养殖面积与产量逐年增加,目前已成为沿海各省海水养殖的主导产品。随着养殖规模的

扩大及集约化发展,对三疣梭子蟹的生存环境产生较大的影响,与此同时养殖环境的污染等因素也对其免疫防御系统产生了一定程度的损害,导致其自身的抗病力下降,对病害的易感性增加,病害频发,例如弧菌引起的“乳化病”。由溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)引起的“乳化病”给三疣梭子蟹养殖业带来了重大的经济损失。因此,研究三疣梭子蟹的免疫机制,筛选与抗病相关的分子标记进行人工辅助育

\* 国家自然科学基金项目,42076087 号。郝贵杰,博士,研究员,E-mail: 391601350@qq.com

通信作者: 张海琪,正高级工程师,E-mail: 447965345@qq.com; 文菁,教授,E-mail: jw82123@126.com

收稿日期: 2023-01-30, 收修改稿日期: 2023-05-07

种, 选育优良抗病品系具有重要意义。

分子标记辅助选择(molecular marker assisted selection, MAS)育种是利用分子标记与决定目标性状的基因紧密连锁的特点, 通过检测所筛选的分子标记, 判定目的基因的存在, 从而进行目标性状的选择, 与传统的选育费时费力相比, 具有时间短、准确性高、而且受环境干扰较小等优点(Dekkers *et al*, 2002; Collard *et al*, 2005; Masoudi *et al*, 2007)。而 C-型凝集素(C-type lectin, CTL)是甲壳类动物体液免疫中重要的免疫因子之一(McGreal *et al*, 2004), 是重要的模式识别受体之一(Wang *et al*, 2013a), 其对外来病原菌以及复杂的碳水化合物具有选择性凝集作用, 同时具有调理素的作用, 介导血细胞对外来物质的吞噬, 和机体其他免疫因子一起抵御外来病原的入侵(Wang *et al*, 2009a; Wei *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013b)。课题组前期通过克隆 CTL 基因的 DNA 全长, 并在其四个外显子和三个内含子上共筛选到 4 个 SNP 位点及一个三碱基的缺失, 通过制备三疣梭子蟹易感群体及抗性群体, 分析了各多态性位点的基因型与抗溶藻弧菌的相关性, 结果发现 CTL 第四外显子 SNP E4-205 C/T 具有三种基因型 C/C、C/T 和 T/T, 其 T 等位基因在抗病群体中出现的频率(53%)显著高于敏感群体(33.3%), T/T 基因型在易感群体中频率为 6.1%, 在抗性群体中频率为 21.2%, 具有显著性差异( $P=0.022$ ) (Hao *et al*, 2015)。为初步阐明 SNP E4-205 C/T 位点 T/T 基因型三疣梭子蟹抗溶藻弧菌的分子机理, 本文对该位点非同义突变(ACT-ATT)导致的一个氨基酸改变(Thr-Ile)的两种蛋白进行了体外重组表达与纯化, 并从体内外研究了 CTL 的 T/T 基因型梭子蟹在抗溶藻弧菌感染中的作用。以期三疣梭子蟹免疫防御机制研究及抗病品系的选育提供基础数据和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 耗材与试剂 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (45~60 g)购自宁波鑫亿鲜活水产有限公司, 正常投喂冰鲜小杂鱼。基因分型后转至小池塘中的塑料筐内饲养备用。

溶藻弧菌由宁波大学海洋学院王国良教授惠赠; 副溶血弧菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌由本实验室保存。

TIANamp Genomic DNA Kit、TIANamp Blood DNA Kit、RNAsimple Total RNA kit、FastQuant cDNA RT Kit (with gDNA)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)购自天根生化科技(北京)有限公司; SsoFast EvaGreen supermix 购自 Bio-rad 公司; T-vector pMD19 (Simple)、TaKaRa LA Taq、质粒提取试剂盒、*Bam*HI、*Xho*I、T<sub>4</sub> DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司; 卡那霉素、Trans1-T1、pET-30a(+)、BL21(DE3)购自北京全式金公司; Agarose Gel DNA Purification Kit 购自 Axygen 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; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究; 其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 仪器设备 Mx3005P 荧光定量 PCR 仪 (Stratagene 公司); Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪 (德国 Qiagen 公司); Biometra TGradient PCR 仪(华粤行仪器有限公司); JY920-IIN 超声波裂解器(宁波新芝); 全波长酶标仪 SpectraMax 190 (美国 MD 公司); Smart Spec 3000 核酸蛋白测定仪(美国 Bio-Rad 公司); Q-Exactive 质谱仪(Thermo Scientific 公司)。

### 1.2 活体三疣梭子蟹 SNP 基因分型

随机选取 300 只健康三疣梭子蟹, 抽取少量血淋巴后继续喂养。血淋巴样品 DNA 提取按照 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒说明书进行, 核酸浓度统一稀释至 20~30 ng/ $\mu$ L 备用。采用小片段扩增法进行 HRM 分型(Liew *et al*, 2004), 并以标准基因型样品为对照。根据实验室前期筛选到的 CTL 基因 SNP E4-205 C/T 位点序列, 设计并筛选 1 对特异性、灵敏性均优的引物, HRM-124 F: 5'-AAATGCCTACT GGAGGAGAGAAACA-3'和 HRM-124 R: 5'-TTTCTT CGTTACTTC TCACAAATCG-3', 片段大小为 124 bp。PCR 反应体系: 10  $\mu$ L SsoFast EvaGreen supermix、0.8  $\mu$ L HRM-124F (10  $\mu$ mol/L)、0.8  $\mu$ L HRM-124R (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L DNA 模板(20 ng/ $\mu$ L)、双蒸水补足 20  $\mu$ L。采用带有 HRM 分析功能的 Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 98  $^{\circ}$ C 2 min, 40 个循环(98  $^{\circ}$ C 5 s, 58  $^{\circ}$ C 20 s)。利用仪器自带的 HRM 分析软件进行结果分析, 分析阈值设为 90%, 比较已知基因型样品和待测样品的标准视图和差异视图, 对待测样品进行 SNP 分型, 每个样品 4 个平行。引物合成及 PCR 扩增产物测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.3 T/T 和 C/C 基因型 CTL 编码蛋白的原核表达及纯化

根据实验室前期获得的 CTL 基因序列(GenBank: JX195096.1), 设计 PCR 扩增引物: CTL-BD-F: 5'-CC CATATGACTGGCTTCAGGCTGCTGT-3'(含 Nde I 酶切位点), CTL-BD-R: 5'-CGGATTCCCTCACAAATCG GACTTACA-3'(含 BamH I 酶切位点), 预计产物大小为 438 bp, 引物由南京金斯瑞生物公司进行合成。以 SNP E4-205 T/T 和 C/C 基因型的梭子蟹 cDNA 样品为模板进行扩增, 目的片段分别命名为 CTL-ACT 及 CTL-ATT, 代表密码子变异(ACT-ATT)导致所编码氨基酸改变(Thr-Ile)。PCR 扩增体系: 5  $\mu$ L 10 $\times$ Ex Taq buffer、0.5  $\mu$ L Ex Taq 酶、4  $\mu$ L dNTP Mixture、1  $\mu$ L CTL-BD-F、1  $\mu$ L CTL-BD-R、1  $\mu$ L cDNA、ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 50 s, 54  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 33 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 10 min, 1%琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物鉴定。

采用购自 Axygen 公司的柱式 DNA 胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物。将目的片段克隆至 T 载体, 进行 PCR、酶切及测序鉴定, 将构建原核表达质粒 PET-CTL-ATT 及 PET-CTL-ACT, 并转化 BL21 感受态细胞, 挑取单克隆进行鉴定、保存。将含 CTL-ATT 及 CTL-ACT 的重组表达菌转接到 LB 培养基中过夜培养。次日, 按 1:100 比例接种到新鲜 LB 液体培养基(含 Kan 50  $\mu$ g/mL), 37  $^{\circ}$ C, 250 r/min 恒温摇至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 同时设置未诱导组。低温离心收集菌体沉淀, 对菌体进行超声破碎后采用咪唑梯度洗脱法进行蛋白纯化, 经透析浓缩后再测定浓度, 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测, 纯化产物保存于-20  $^{\circ}$ C 备用。

### 1.4 重组蛋白 CTL-ACT 及 CTL-ATT 的质谱鉴定

将胶块剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 大小, 纯水漂洗两次, 依次进行脱色(25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 50%乙腈水溶液)、脱水(先 50%乙腈溶液, 后 100%乙腈溶液)、还原(含 10 mmol/L DTT 和 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 的水溶液)、烷基化(含 50 mmol/L IAM 和 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 的水溶液)处理; 加入 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 清洗 10 min, 后依次用 50%乙腈溶液、100%乙腈溶液脱水处理 30 min; 吸出多余液体, 加入 10  $\mu$ L 酶解工作液(含 0.02  $\mu$ g/ $\mu$ L 胰蛋白酶的酶解覆盖液)吸胀 30 min, 再加入 20  $\mu$ L 酶解覆盖液, 37  $^{\circ}$ C 水浴酶解 16 h, 将上清转至新离心管; 加入 50  $\mu$ L 肽段萃取液(含 5%甲酸, 67%乙腈的水溶液)于剩下的胶中, 37  $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后低

速离心, 合并上清, 挥干后脱盐。将挥干的多肽样品溶解 Buffer A (含 0.1%甲酸-水溶液)中, 后进行液相分离, 液相 A 液为 0.1%甲酸-水溶液, B 液为 0.1%甲酸-乙腈溶液; 色谱柱 Trap column 以 100%的 A 液平衡, 样品由自动进样器上样, 并吸附到 Trap column 柱上, 再经 Analysis column 色谱柱分离, 流速为 300 nL/min; 样本间用空白溶剂 30 min 流动相梯度清洗一次; 酶解产物经毛细管高效液相色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪(Thermo Scientific)进行质谱分析。

### 1.5 不同基因型三疣梭子蟹的溶藻弧菌感染实验

将 T/T、C/T 及 C/C 三种基因型梭子蟹分为三个组, 各组均设有感染组 and 对照组, 溶藻弧菌 7.8 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU/mL (预实验结果)注射量为 0.2 mL/只。感染后不同时间(0、3、6、12、24、48、72、96 h)进行血淋巴及肝胰腺细菌分离, 冰上采取梭子蟹的肝胰腺和肌肉组织并迅速置于液氮罐中, 后转入-80  $^{\circ}$ C 保存待用。

### 1.6 溶藻弧菌在三疣梭子蟹组织中的复制

根据溶藻弧菌的胶原蛋白酶基因序列, 设计特异性扩增引物: JY142-F: 5'-TTTGGCAAGGTCTGT TTGGTTAC-3', JY142-R: 5'-GTGGCTTACACGTT GGAATGATC-3', 并构建含溶藻弧菌胶原蛋白酶基因片段的重组质粒 pMD19-JY142。根据质粒提取试剂盒抽提 pMD19-JY142 质粒 DNA, 并测定其浓度和纯度, 根据公式: 质粒拷贝数(单位: copies/ $\mu$ L) = (6.02 $\times$ 10<sup>14</sup> $\times$ 质粒浓度) / [(T 载体 DNA 长度+目的基因片段长度) $\times$ 660], 计算质粒拷贝数。利用双蒸水将标准质粒稀释成 10<sup>2</sup>~10<sup>9</sup> 8 个梯度备用, 提取感染后不同时间点的组织样品 DNA, 定量后作为待测样品模板, 与质粒标准品一起进行 AQ-PCR (absolute quantitative PCR)反应, 每个样品测定 3 次。根据 SuperReal Premix Plus (SYBR Green)说明书配制 PCR 反应体系, 荧光定量 PCR 仪 Mx3005P 进行扩增, 反应结束后系统自动生成标准曲线。

### 1.7 两种重组蛋白的凝集活性检测

**1.7.1 小鼠红细胞凝集活性** 健康小鼠进行心脏采血, 保存于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中, 临用前 3 000 r/min 离心 3 min, 取血细胞以 0.85%生理盐水洗三次后, 配成 2% (V/V)血细胞悬液备用。于 96 孔微量血凝板中进行凝集实验, 每孔加入 25  $\mu$ L 的 TBS-I, 取 25  $\mu$ L 两种重组蛋白各做连续 2 倍稀释, 再加入 25  $\mu$ L 的 2%血细胞, 室温静置 1~2 h, 按文献观察并记录红细胞凝集情况(戴华生, 1983)。

**1.7.2 细菌凝集活性** 所用菌株为金黄色葡萄球

菌、溶藻弧菌以及酵母菌为代表。具体步骤如下: 各菌经过夜培养后, 8 000 r/min 离心 5 min; 弃去培养基后, 加入 TBS 缓冲液, 重新悬起菌体再次离心, 按此重复清洗菌体三次, 彻底去除培养基成分。使用 TBS-I 重悬菌体, 并通过测定菌液浓度将其稀释至  $1.5 \times 10^9$  cell/mL; 取 20  $\mu$ L 重组蛋白至酶标板孔中, 20  $\mu$ L BSA (1 mg/mL) 溶液作为对照组, 再取 10  $\mu$ L 菌悬液加入并混匀, 室温下孵育 45 min 后, 取 10  $\mu$ L 至载玻片上, 在显微镜下观察。

### 1.8 两种重组蛋白对溶藻弧菌的抑菌活性

采用液体生长方法检测重组蛋白 CTL-ACT 及 CTL-ATT 对溶藻弧菌的抑制作用。将溶藻弧菌在 TSB 液体培养基中培养过夜, 将菌液用 TSB 稀释浓度至 OD<sub>550</sub> 为 0.001 左右, 在 96 孔细胞培养板中分别加入 50  $\mu$ L 菌液和 50  $\mu$ L 梯度稀释的重组目的蛋白 (64  $\mu$ g/mL 倍比稀释至 2  $\mu$ g/mL); 阴性对照组为 50  $\mu$ L 菌液和 50  $\mu$ L BSA (64  $\mu$ g/mL) 的混合溶液; 阳性对照组为 50  $\mu$ L 菌液和 50  $\mu$ L Kana (64  $\mu$ g/mL) 的混合溶液。总体积为 100  $\mu$ L, 每个浓度设置 3 个重复; 将培养板置 30 °C、100 r/min 的摇床培养, 分别在 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h, 将细胞板置酶标仪测定 OD<sub>550</sub> 值。

### 1.9 两种重组蛋白与溶藻弧菌的结合活性

本实验以筛选 CTL SNP 的溶藻弧菌作为所用的包被菌, 将菌株培养到 OD<sub>600</sub> 为 1.0 左右, 并用包被液重悬使其终浓度为  $5 \times 10^8$  个/mL。按 100  $\mu$ L/孔将菌液加入 96 孔酶标板, 4 °C 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 3~5 min/次; 然后每孔加入 200  $\mu$ L 含 3% BSA 的 PBS, 37 °C 封闭 3 h, 同上洗涤; 各孔加入不同浓度的重组蛋白 CTL-ACT 及 CTL-ATT (16  $\mu$ g/mL 倍比稀释至 0.5  $\mu$ g/mL) 100  $\mu$ L, PBS 作为阴性对照, 30 °C 孵育 2 h, 同上洗涤; 每孔加入 100  $\mu$ L 一抗 His-tag 抗体 (1 : 1 000, V/V), 37 °C 温育 1 h, 同上洗涤; 再加入 100  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) (1 : 250, V/V), 37 °C 温育 1 h, 同上洗涤; 每孔加入 200  $\mu$ L TMB 显色液, 避光孵育 10~30 min, 然后每孔加入 50  $\mu$ L 2 mol/L 硫酸溶液中止反应, 于 450 nm 测定吸

光度, 当样品 OD<sub>450</sub> 值/阴性对照 OD<sub>450</sub> 值  $\geq 2$  时判定为阳性。

### 1.10 两种重组蛋白与细菌 PAMP 的结合活性研究

参考 Wang 等(2016)的方法略作修改, 目的是用 ELISA 方法测定两种重组蛋白与病原相关分子模式 PAMPs 结合活性的差异。所用的 PAMPs 有脂多糖、菌肽聚糖、葡聚糖 G 及脂磷壁酸。用包被液将各 PAMP 稀释至 200  $\mu$ g/mL, 按 100  $\mu$ L/孔将菌液加入 96 孔酶标板, 4 °C 孵育过夜; 配制含 0.5 mL/L Tween20 的 PBS 即 PBST 洗液, 满孔加液洗涤, 每次 3~5 min, 共洗涤 3 次; 然后每孔加入 200  $\mu$ L 含 3% BSA 的 PBS, 置于 37 °C 水浴锅封闭 3 h, 同上洗涤; 加入不同浓度的重组蛋白 CTL-ACT 和 CTL-ATT (64  $\mu$ g/mL 倍比稀释至 2  $\mu$ g/mL) 100  $\mu$ L, PBS 作为阴性对照, 30 °C 孵育 2 h, 同上洗涤; 后续步骤同 1.8。

## 2 结果与分析

### 2.1 溶藻弧菌感染后不同基因型三疣梭子蟹的死亡率

通过 HRM 分析对 300 只三疣梭子蟹进行了基因分型(表 1), 结果显示 C/T 基因型共 140 只, 占 46.7%; T/T 基因型共 49 只, 占 16.3%; C/C 基因型共 111 只, 占 37%。不同基因型梭子蟹感染溶藻弧菌后的死亡情况(表 1, 图 1), C/T、T/T 和 C/C 基因型梭子蟹的累积死亡率分别为 81.4%、57.1%和 82%, 结果表明 T/T 基因型三疣梭子蟹的累积死亡率极显著低于其他基因型( $P=0.001$ )。

### 2.2 溶藻弧菌在不同基因型三疣梭子蟹体内的拷贝情况

根据各模板的荧光值变化规律自动生成溶藻弧菌的标准曲线, 标准曲线为  $Y = -3.691 \times \lg(X) + 41.36$ , 其中  $Y$  为 CT 值,  $X$  为起始模板的拷贝数, 相关系数为 0.999, 说明在质粒模板浓度范围内其线性关系较好, 可以用于检测分析溶藻弧菌的拷贝。按照建立的溶藻弧菌 AQ-PCR 方法, 测定不同基因型三疣梭子蟹感染溶藻弧菌后不同时间肝胰腺和肌肉中溶藻弧菌的拷贝情况(见图 2)。发现肝胰腺中 12 h 前 T/T 组细菌拷贝数极显著低于 C/C 和 C/T 组( $P < 0.01$ ), 之后的时间

表 1 三种基因型在 E4-205 位点的分布及感染溶藻弧菌后的死亡率

Tab.1 Distribution of the three genotypes at the E4-205 locus, and its mortality after infected with *V. alginolyticus*

位点	基因型	死亡数(%)	存活数(%)	总数(%)	$\chi^2$	$P$
E4-205	C/T	114(81.4)	26(18.6)	140(46.7)	14.233	0.001
	T/T	28(57.1)	21(42.9)	49(16.3)		
	C/C	91(82.0)	20(18.0)	111(37)		

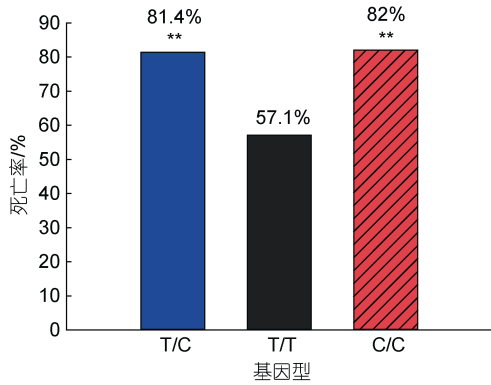
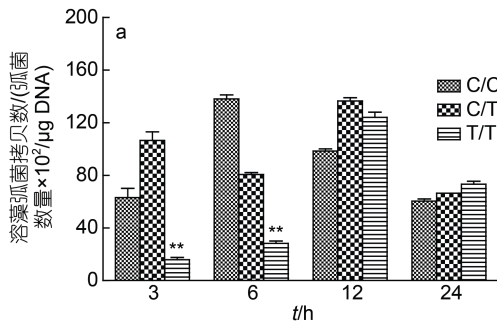


图1 CTL SNP E4-205 C/T 位点不同基因型梭子蟹感染溶藻弧菌的死亡率

Fig.1 Cumulative mortality of swimming crabs expressing SNP genotypes at the CTL E4-205 locus upon *V. alginolyticus* infection

注: \*\*表示不同 SNP 基因型的梭子蟹之间的累积死亡率具有高度显著的统计学差异( $P=0.001$ )

内细菌拷贝数差异不明显; 肌肉中 3 h 时 T/T 组细菌拷贝数极显著低于 C/C 和 C/T 组( $P<0.01$ ), 6 h 时 T/T



组显著低于 C/C 和 C/T 组( $P<0.05$ ), 12 h 时各组细菌拷贝数无显著差异, 而 24 h 时 T/T 组细菌拷贝数极显著低于 C/C 和 C/T 组( $P<0.01$ ), 且感染 12 h 之后肌肉中的细菌拷贝数明显高于肝胰腺。结果表明三疣梭子蟹 CTL 基因 SNP 位点 E4-205 C/T 的变异与其体内溶藻弧菌的复制存在相关性, 存在于 T/T 基因型梭子蟹肌肉组织或肝胰腺组织中的细菌拷贝数在一定时间内均显著低于其他基因型。

### 2.3 重组蛋白 CTL-ACT 及 CTL-ATT 的表达、纯化及鉴定

成功构建原核表达质粒 PET-30a/CTL-ACT、PET-30a/CTL-ATT 并进行重组表达。阳性重组菌经 IPTG 诱导表达后, 利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白 CTL-ACT 和 CTL-ATT 的表达。结果表明, 两个蛋白在 37 °C 诱导 4 h 时以包涵体形式存在, 蛋白分子量约为 17.6 kDa (如图 3)。以 BSA 为标准的 Bradford 法测定纯化的目的蛋白得率约为 CTL-ACT 0.8 mg/L, CTL-ATT 0.6 mg/L。

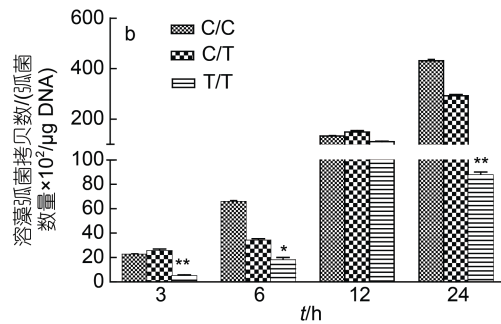


图2 三疣梭子蟹不同基因型肝胰腺、肌肉组织中的溶藻弧菌拷贝数

Fig.2 Copies of *V. alginolyticus* in different genotype *P. trituberculatus* infected by *V. alginolyticus*  
注: a. 肝胰腺组织; b. 肌肉组织。 \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ); \*表示差异显著( $P<0.05$ )

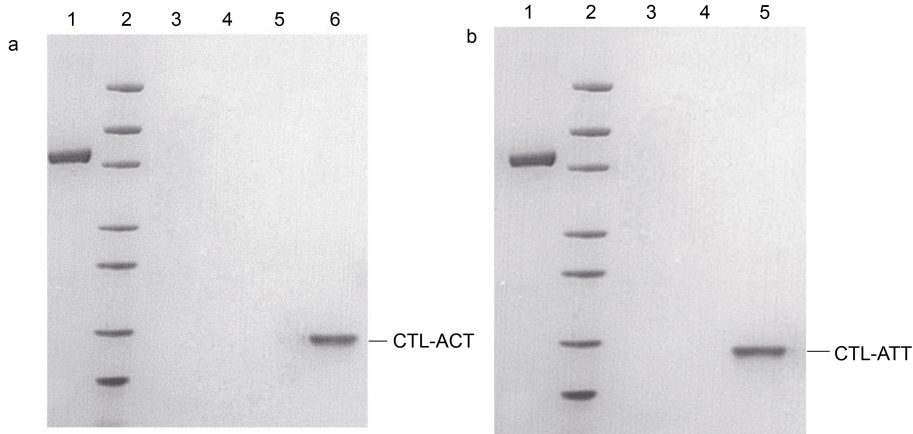


图3 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白纯化

Fig.3 Purification of the target fusion protein

注: a. 重组蛋白 CTL-ACT 的表达; b. 重组蛋白 CTL-ATT 的表达

对纯化蛋白谱带进行胶内酶解及 MALDI-TOF/TOF 质谱分析鉴定(见图 4), 结果表明所切下的两种重组蛋白有多个肽段与三疣梭子蟹 C 型凝集素 PtLP 的氨基酸序列完全匹配(GenBank 登录号 ACC86854.1), 由此可以判定, 上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白, 两个差异蛋白成功获得了体外重组包涵体表达, 可用于后续实验研究。

#### 2.4 重组蛋白的凝集活性分析

按照常规方法分别测定了两种重组蛋白对小鼠红细胞及相关细菌的凝集活性, 结果表明两者均有凝集小鼠红细胞的活性, 且 CTL-ATT 比 CTL-ACT 活性稍强, 但两者凝集效价均较低, 仅为  $2^1$  (见图 5)。检测两种重组蛋白对金黄色葡萄球菌、溶藻弧菌以及酵母菌的凝集作用, 结果表明即使在一定  $Ca^{2+}$  存在的条件下, 两种重组蛋白均不能凝集任何一种细菌, 呈

现的溶藻弧菌凝集见图 6。

#### 2.5 重组蛋白的抑菌活性结果

利用酶标仪测定经作用的溶藻弧菌最佳吸光度  $OD_{550}$  的吸光值, 绘制两种重组蛋白以及 Kana 与 BSA 对照均在  $64 \mu\text{g/mL}$  浓度作用不同时间, 对溶藻弧菌生长抑制的作用曲线。结果如图 7, Kana 具有强烈的抑菌作用, 细菌吸光度保持在 0.2 以下; 两种重组蛋白和 BSA 组在前 4 h 内未见明显的细菌吸光度增加, 从 6 h 开始, 随着细菌繁殖的增加吸光度逐渐增加; 与 BSA 对照组相比较, 两种重组蛋白对细菌生长均具有一定的抑制作用, 且 CTL-ATT 蛋白比 CTL-ACT 蛋白具有更强的抑菌活性。应用 SPSS 19.0 单因素方差分析各组在培养 24 h 时的吸光值, 结果表明各组吸光值差异极显著( $P < 0.01$ ), 说明 24 h 时 CTL-ATT 蛋白的抗溶藻弧菌活性显著高于 CTL-ACT 蛋白。

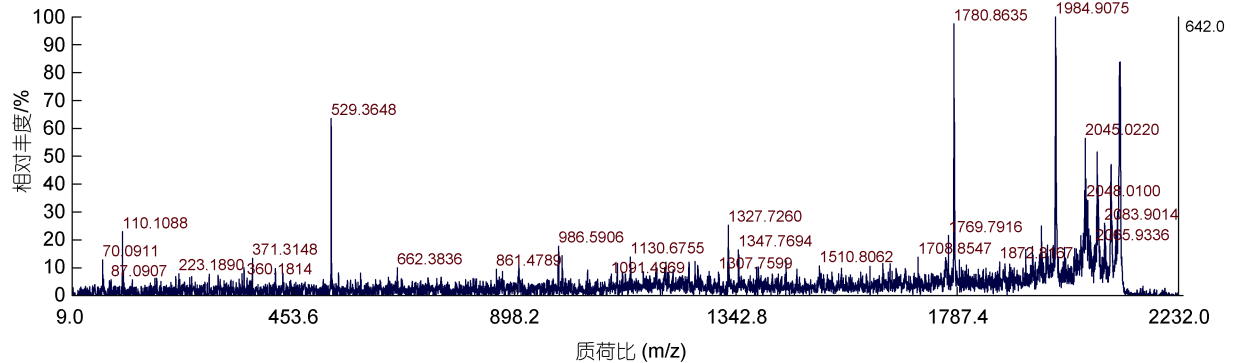


图 4 重组目的蛋白中与 PtLP 相匹配肽段的二级质谱图

Fig.4 Characteristic spectrum of the matched peptide fragments recombinant protein with PtLP

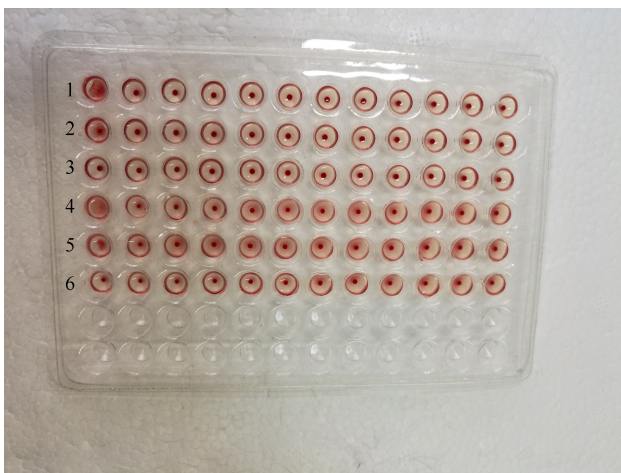


图 5 两种重组蛋白小鼠红细胞凝集活性

Fig.5 Hemagglutinating activity of two kinds of recombinant proteins

注: 1 和 4 为 CTL-ATT; 2 和 5 为 CTL-ACT; 3 和 6 为空白对照

#### 2.6 重组蛋白的溶藻弧菌结合活性

用 ELISA 方法检测两种重组蛋白与溶藻弧菌的结合活性(图 8), 发现随着重组蛋白浓度的增加, 各组吸光值也随之升高, 说明两种重组蛋白与溶藻弧菌的结合也是浓度依赖性模式; 而在同样浓度下, CTL-ATT 与溶藻弧菌的结合活性要高于 CTL-ACT 与溶藻弧菌的结合活性。

#### 2.7 重组蛋白的 PAMPs 结合活性

为了检测两种重组蛋白与病原相关分子模式 PAMPs 的相互作用, 我们利用不同浓度的重组蛋白与脂多糖、肽聚糖、葡聚糖及脂磷壁酸进行孵育, 后进行 ELISA 检测。检测结果见图 9, 发现 CTL-ATT 蛋白与四种 PAMPs 的结合活性均高于 CTL-ACT 蛋白, 两个重组蛋白与四种 PAMPs 结合强弱依次为 LPS>GLU>LTA>PGN; 两种重组蛋白与四种 PAMPs 的结合均具有浓度依赖性, 即随着蛋白浓度的升高

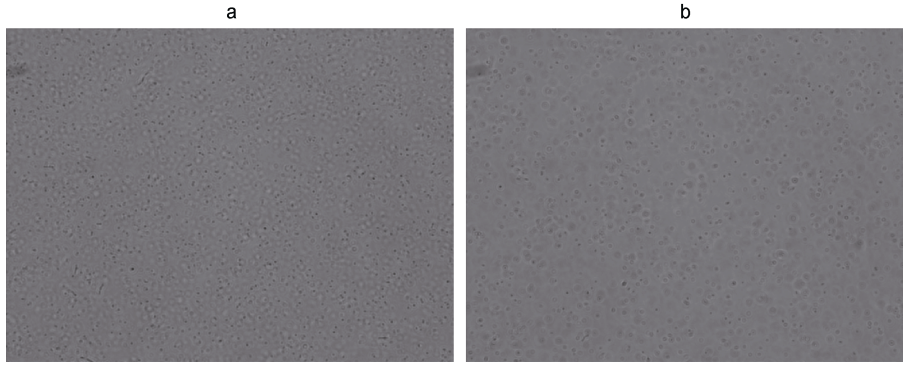


图 6 两种重组蛋白对溶藻弧菌的凝集活性(400×)

Fig.6 The agglutination activity of *V. alginolyticus* induced by two kinds of recombinant proteins  
注: a. CTL-ATT; b. CTL-ACT

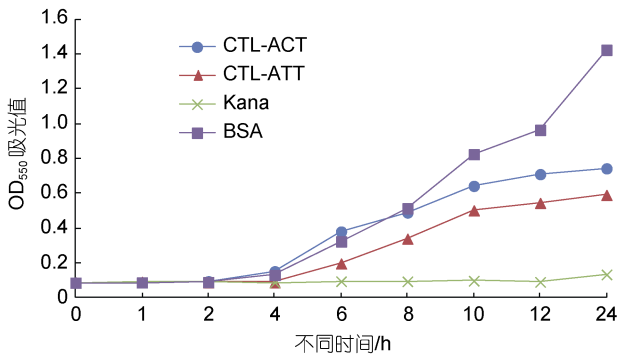


图 7 两种重组蛋白不同时间的抑菌活性

Fig.7 Antibacterial activity of two kinds of recombinant proteins in different hours

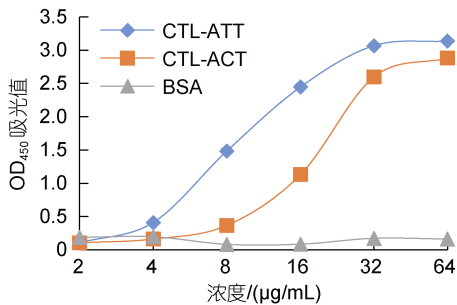


图 8 两种重组蛋白与溶藻弧菌的结合活性

Fig.8 ELISA analysis of the binding activity between two kinds of recombinant proteins and *V. alginolyticus*

与 PAMPs 结合活性更强。应用 SPSS 19.0 中单样本 T 检验分析两种重组蛋白分别与各 PAMP 结合的差异性, 结果表明均为差异极显著( $P < 0.01$ ), 说明 CTL-ATT 蛋白与四种 PAMPs 的结合活性显著高于 CTL-ACT 蛋白。

### 3 讨论

分子标记辅助选择育种相较于与传统选育, 具

有准确、快速、不受环境条件干扰的优点(Dekkers *et al*, 2002; Masoudi *et al*, 2007)。但目前众多的研究报道仍局限于分子标记的筛选, 而真正将其应用于标记辅助选择育种并取得成功的例子仍较少, 主要原因是尚未弄清楚分子标记的作用机制。根据实验室前期从三疣梭子蟹免疫基因 C-型凝集素中筛选到的 SNP E4-205 C/T 位点, 本研究利用 PCR-HRM 方法对三疣梭子蟹进行基因分型, 后以溶藻弧菌感染不同基因型的三疣梭子蟹, 探究不同基因型梭子蟹体内细菌复制的差异性, 以期初步阐明该抗病分子标记抗溶藻弧菌的作用机理。根据实验结果, 溶藻弧菌感染后 T/T 基因型组的三疣梭子蟹死亡率显著低于 C/T 和 C/C 基因型组; 可初步表明筛选的 SNP E4-205 C/T 位点与三疣梭子蟹抗病性存在一定关联。进一步的 AQ-PCR 分析结果表明, 溶藻弧菌感染后 12 h 前 T/T

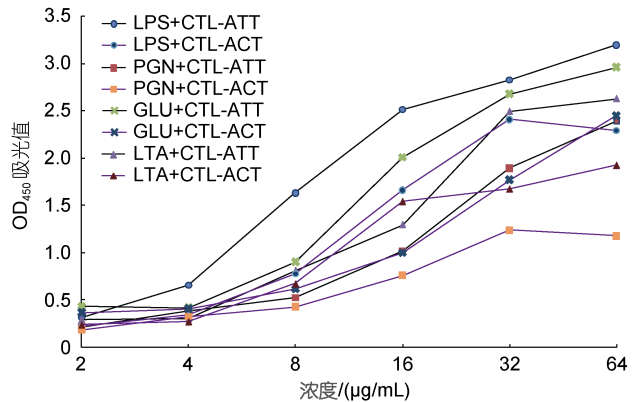


图 9 两种重组蛋白与四种 PAMPs 的结合活性

Fig.9 ELISA analysis of the binding activity of two kinds of recombinant proteins and four kinds of PAMPs

注: 黑色线条表示 CTL-ATT 与四种 PAMPs 结合结果, 紫色线条表示 CTL-ACT 与四种 PAMPs 结合结果, 相同端点符号代表同一种 PAMP

组三疣梭子蟹肝胰腺、肌肉中的细菌拷贝数显著低于 C/C 和 C/T 组, 12 h 之后肌肉中的细菌拷贝数明显高于肝胰腺, 说明细菌已突破肝胰腺的免疫防线, 在肌肉中大量复制, 进而产生“肌肉乳化病”的症状(王国良等, 2006; 刘淇等, 2007)。同时也说明 T/T 基因型梭子蟹抗溶藻弧菌的能力明显高于另外两个基因型, 可与三疣梭子蟹死亡情况相佐证。以上研究表明从三疣梭子蟹 CTL 基因中筛选出的 SNP E4-205 C/T 位点与抗溶藻弧菌相关, 初步说明可应用于三疣梭子蟹分子标记辅助选择育种工作。

为了进一步阐明易感及抗性基因型梭子蟹抗溶藻弧菌的差异性, 对该位点非同义突变(ACT-ATT)导致的一个氨基酸改变(Thr-Ile)的两种蛋白进行了体外重组表达与纯化, 并对两种重组蛋白进行活性分析。凝集活性结果表明, 两者均有较弱的凝集小鼠红细胞的活性, 且 CTL-ATT 比 CTL-ACT 活性稍强, 但不能凝集所测定的任何一种细菌。这与已报道的一些 C-型凝集素不同, 例如中华绒螯蟹重组 C-型凝集素 EsCTLD<sub>ep</sub>、EsCTL1、EsCTL2 能够凝集 G<sup>+</sup>菌金黄色葡萄球菌 *S. aureus*, G<sup>-</sup>菌嗜水气单胞菌 *A. hydrophila* 以及副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* (Huang *et al.*, 2014a); 中国对虾的 FcLec2、FcLec4, 日本对虾的 PjLec, 南美白对虾的 LvLec 等均能够凝集一种或多种细菌(Wang *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2009)。这可能与该包涵体表达蛋白纯化复性时活性丢失, 或者该蛋白本身就不具有体外凝集细菌的活性有关。此外, 两种重组蛋白对溶藻弧菌的生长均具有一定抑制作用, 其具有浓度依赖性, CTL-ATT 蛋白比 CTL-ACT 蛋白的抑菌活性更强。这一结果从体外证明了三疣梭子蟹 CTL 抗感染能力及 T/T 基因型可作为抗病品系筛选的分子标记。

C-型凝集素作为一类模式识别受体, 主要是通过微生物表面糖类的识别即病原相关分子模式 PAMP 而参与先天免疫, 有关的研究在虾蟹 C-型凝集素已有许多报道(Guo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014b)。本研究中, 我们分别使用不同浓度的两种重组蛋白与 LPS、PGN、GLU 及 LTA 进行孵育, 然后进行 ELISA 检测, 结果表明, 两种重组蛋白均能够结合不同的 PAMPs, 结合强弱依次为 LPS>GLU>LTA>PGN, 这种广谱的结合活性说明三疣梭子蟹 CTL 在抵抗多种病原微生物中发挥重要的免疫作用。就浓度依赖性来看, 两种重组蛋白与四种 PAMPs 的结合均具有浓度依赖性, 即它们与 PAMPs

的结合活性随着蛋白浓度的升高而更强。但同浓度的 CTL-ATT 与四种 PAMPs 的结合活性均高于 CTL-ACT 与相应 PAMPs 的结合。进而 ELISA 方法测定了两种重组蛋白与溶藻弧菌的结合活性, 结果表明两者的结合活性同样具有浓度依赖性, 且同浓度下 CTL-ATT 的结合活性要高于 CTL-ACT, 该结果表明 SNP E4-205 C/T 位点非同义突变改变了编码蛋白的生物学功能, 增强了机体抗感染的能力, 因此更进一步证明了 T/T 基因型与抗溶藻弧菌的相关性。上述研究结果将为 SNP E4-205 C/T 标记的辅助选择应用, 加速三疣梭子蟹抗病品系育种进程提供有力的科学依据, 同时将对其他水产动物抗病分子标记的机制研究提供有用的借鉴手段。

#### 4 结论

本研究对三疣梭子蟹 C-型凝集素即 CTL 基因 SNP E4-205 C/T 位点非同义突变(ACT-ATT)导致的一个氨基酸改变(Thr-Ile)的两种蛋白进行了体外重组表达与纯化, 并从体内外研究了 CTL 的 T/T 基因型梭子蟹在抗溶藻弧菌感染中的作用, 结果表明 T/T 基因型三疣梭子蟹抗感染能力明显优于 C/C 基因型, 该结果为选择 T/T 基因型作为抗溶藻弧菌的分子标记培育三疣梭子蟹抗病品系提供了科学依据。

#### 参 考 文 献

- 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[J]. 海洋与湖沼, 37(4): 297-303.
- 刘淇, 王学忠, 戴芳钰, 等, 2007. 梭子蟹溶藻弧菌病的初步研究[J]. 齐鲁渔业(9): 1-3.
- 戴华生, 1983. 新实验病毒学[M]. 北京: 中国学术出版社.
- COLLARD B C Y, JAHUFER M Z Z, BROUWER J B, *et al.*, 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts [J]. Euphytica, 142(1): 169-196.
- DEKKERS J C M, HOSPITAL F, 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations [J]. Nature Reviews Genetics, 3(1): 22-32.
- GUO H Z, ZOU P F, FU J P, *et al.*, 2011. Characterization of two C-type lectin-like domain (CTLD)-containing proteins from the cDNA library of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 30(2): 515-524.
- 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 [J]. Aquaculture, 442: 125-131.
- HUANG Y, AN L, HUI K M, *et al.*, 2014a. An LDLa domain-containing C-type lectin is involved in the innate



- immunity of *Eriocheir sinensis* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(2): 333-344.
- HUANG Y, HUANG X, WANG Z, *et al*, 2014b. Function of two novel single-CRD containing C-type lectins in innate immunity from *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 37(2): 313-321.
- LIEW M, PRYOR R, PALAIS R, *et al*, 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons [J]. *Clinical Chemistry*, 50(7): 1156-1164.
- MASOUDI A A, UCHIDA K, YOKOUCHI K, *et al*, 2007. Marker-assisted selection for forelimb-girdle muscular anomaly of Japanese Black cattle [J]. *Animal Science Journal*, 78(6): 672-675.
- MCGREAL E P, MARTINEZ-POMARES L, GORDON S, 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system [J]. *Molecular Immunology*, 41(11): 1109-1121.
- WANG L L, WANG L L, ZHANG D X, *et al*, 2013a. A novel C-type lectin from crab *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing cellular encapsulation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3): 832-842.
- 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 [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 55: 10-20.
- WANG X W, WANG J X, 2013b. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1/2): 27-38.
- WANG X W, XU W T, ZHANG X W, *et al*, 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(4): 556-562.
- WANG X W, ZHANG X W, XU W T, *et al*, 2009b. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* *in vivo* in Chinese white shrimp [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(9): 1039-1047.
- 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* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(2): 204-212.
- ZHANG X W, LIU Y Y, MU Y, *et al*, 2013. Overexpression of a C-type lectin enhances bacterial resistance in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5): 1112-1118.
- ZHANG Y, QIU L M, SONG L S, *et al*, 2009. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1): 183-192.

## SNP SITE E4-205 C/T OF *CTL* GENE AND ITS ASSOCIATION WITH *VIBRIO ALGINOLYTICUS* RESISTANCE IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

HAO Gui-Jie<sup>1,2</sup>, LIN Feng<sup>2</sup>, MU Chang-Kao<sup>3</sup>, LEI Ning<sup>2</sup>, HUANG Ai-Xia<sup>2</sup>, CUI Yan-Na<sup>2</sup>,  
SHEN Ya-Fang<sup>2</sup>, ZHANG Hai-Qi<sup>2</sup>, WEN Jing<sup>1</sup>

(1. Life Science and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China; 2. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Huzhou Key Laboratory of Aquatic Product Quality Improvement and Processing Technology, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** C-type lectin (CTL) is one of the important immune factors in humoral immunity of crustaceans. However, the expression of the *CTL* gene and its anti-disease mechanism in *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus* are not clear. To understand the molecular mechanism against *V. alginolyticus* infection at the site of *CTL* gene SNP E4-205 C/T, different genotypes of *P. trituberculatus* were infected with *V. alginolyticus* and the replication of *V. alginolyticus* in hepatopancreas and muscle tissues of *P. trituberculatus* were analyzed by absolute quantitative method. Results show that the number of bacteria in group C/C in hepatopancreas and muscle tissues in 12 h after infection was significantly greater than that in group T/T. The anti-infection ability of *P. trituberculatus* in group T/T was significantly higher than that in group C/C. Furthermore, the two proteins of one amino acid change (Thr-Ile) caused by non-synonymous mutation (ACT-ATT) at this site were recombinantly expressed and purified *in vitro*, and the activities of the two recombinant proteins CTL-ATT and CTL-ACT were analyzed. Results show that the two recombinant proteins inhibited the growth of *V. alginolyticus*, and the antibacterial activity of CTL-ATT was significantly higher than that of CTL-ACT. The binding activities of PAMPs and *V. alginolyticus* of recombinant protein CTL-ATT were higher than those of CTL-ACT, and those of two proteins to PAMPs and *V. alginolyticus* were concentration-dependent. This study indicate that the *CTL* gene of *P. trituberculatus* was involved in the immune response process after being infected by *V. alginolyticus*, and its polymorphism had a certain correlation with anti-*V. alginolyticus* infection. When the site of SNP E4-205 of the *CTL* gene was the T/T genotype, the anti-*V. alginolyticus* infection ability of *P. trituberculatus* was higher than that of C/C type.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; *Vibrio alginolyticus*; single nucleotide polymorphism; lectins; high-resolution dissolution curve