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)

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 摘要 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 O78 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±6g 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 20m³的室内水泥池中暂养7天,暂养期间,维持水温 25±3°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 校子蟹, 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 μ L 无菌的海洋甲壳动物生理盐水, 实验 组分别注射 100 μ L 的 3.7×10⁷ copy/mL WSSV 和 10⁷CFU/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 1082

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。

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
PtCht6-3' F1	AGCGAAGAAGGAGACGAAGGG	3'-RACE
<i>PtCht6-3'</i> F2	GCCCACAGCGGCACCTATTTCA	3'-RACE
PtCht6-5' R1	GGTGCCTGTGGACGCTTGGAG	5'-RACE
PtCht6-5' R2	CACGCCATCACGGGCTCCT	5'-RACE
PtCht6-vcf	ATGTATAGCCCAAAGTCTTCATCTT	ORF 验证
PtCht6-vcr	TCAGTAGGAGTAATTGGAAGGGGAT	ORF 验证
PtCht6-F	CTTCGTCTCCTTCTTCGC	qRT-PCR
PtCht6-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)	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	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 -actin(表 1)。使用 Applied BiosystemsTM 7500 Real Time PCR instrument 定量仪, 采用 2^{-ΔΔCt} 的计算方法 进行样品的相对荧光定量分析, 10µL 反应体系: 5µL 2×ChamQ Universal SYBR Qpcr Master Mix, 0.2µL Primer F (10µmol/L), 0.2µL Primer R (10µmol/L), 2µL Template cDNA、2.6µL ddH₂O,程序:95 10min; 95 34s, 40个循环; 95 30s, 95 5s, 60 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 ²⁷¹FDGLDLDWE²⁷⁹, AMCA 预测此氨基酸存在 13 个抗菌肽残基(图 3)。

1	ACATGGGATGGGGACGTAGTTCCCCTGAGGCAGCGAGGGAGG
106	ACATGTGTCTGGCTGGTTAGGTGACTGACTGGCTCAGGGCTGGCT
211	AAGCAACCCATCACAACAACAAGAACTCTAAAGAGAAGACACCCACTGCAGGAAGGA
316	CCACCACCGCCACCACACACACTATACTATAACATGTATAGCCCAAAGTCTTCATCTTCACCTTCTCTCTC
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	CATGTCTTAATTTTCCTCAGTCTAATTTCTCCCCTGCCAAGGTCGTGTTGCTACTAAGGCTGACCAGAACTCTTTGCCTTCCCCATTTTCGTCTTCCTTC
25	HVLIFLSLISPCQGRVATKADQNSLPSPFSSSFSE
526	TACAATGCATCATCTTCCTCCTCTGCCACCGACTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCATCAAAGGCAACATCATCCTCCTCTCCTCGTCT
60	Y N A S S S S A T D S S S S S S S S S S S S K A T S S S P L S S
631	TCTTACGTCTTCTCTCATCATCTTTTTCCACCTCTTCTCCTCCTCCT
95	SYVFSSSFSTSSPLSSSSSSSSYNHTTYSQDVT
736	CGAAGAGCCCAAAGGGAGAAGGAAGCTTGCCACGCCAGCCA
130	R 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	AGACCCGGCCTTGGTAAATTTGACGTAGAGGATATTGACCCTTTCCTCTGCACCCCACGGCCCTCTACGCCTTTGCCGGTCTCCAAGCGTCCACAGGCACCATCGTT
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	AGCCTAGACCCGTACAACGATCTCTATGACAACTACGGCAAAGGCGGGTACATTCGCTTCACCCCCTTAAGAAGATTAACCCAGACCTCA <u>AGACCCTGCTTTCC</u>
200	SLDPYNDLYDNYGKGGYIRFTSLKKINPDL <mark>KTLLS</mark>
1051	ATTGGTGGCTGGAACGAGGGATCCATCAAGTATTCCAAGATGGTGTCGAGTGCCACTTCAAGGTCGACCTTCATCACCAGCTGCGTTAAGTTCCTCCTCAAGTAT
235	<u>IGGWNEG</u> SIKYSKMVSSATSRSTFITSCVKFLLKY
1156	GGCTTTGACGGCCTCGACCTCGACTGGGAGTATCCAGCAATGCGAGGAGGACAGCCCAAGGACAAGGAAAACTTTGCTCTCCTGCTGCAAGAGATGAAGGCGAGT
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 Q E M K A S
1261	TTCAAGCAGCATAAGTTACTGCTGACCTCGGCGGTGTCAGCAGGGAAGGCAACGATAGATCTGTCCTACAATATCACAGCCCTAGCCAGCTACCTGGACTACGTG
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	TECTCATGTCCTACGCCTTCCATGGCACGTGGGAAAAGTACGCCCATCACCACTCGCCCCTTACGCCTACAAAAGAGGGCACAAGGGCGCCACGAAGACCCTCAAT
340	FLUENSYDFHGIWJEKYAHHHSPLYAYKEDKGAIKILN
14/1	
3/3 1576	
1070	
410	
1001	
44J 1786	
480	
1891	TTADDOBDODDDDDDDDADDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
515	E E G D E G R E E D E I T E D K K N F P L I T T I R E V L R D G R P I
1996	33373A5335353A686A533A63A535A53A53A53A53A53A53A53A53A53A53A53A685A635A535353535353535A5358635353535353535353535
550	P R P T P T A A P I S T P T T T N T T T T T T T T T S T T T Q G P P T P
2101	DETTOBOTOBOTOBOBOTOBOSCACACOCTOTTTOTACACTORACOCACACTOCTACOCACACOCACACOCOCACACOCACACOCACACOCACACOCACACOCACACOCAC
585	<u>P, P, Ş, T V C H M E G L N A D P Q G D C T I F Y I C H Q V G L R W L A W</u>
2206	CTGTTCCACTGTCCCCAGGCACCAGGTTTGTGGAGGAGATGCAAGCTTGTGACTTTCCAGATGGACACCCGCCCTGTCCTCTTCCCCCCTTTCACCAACCCC
620	<u>LFHCPPGTRFVEEMQACDFPDGHPPCPL</u> LPPFTNP
2311	ACCACCACCACTACTACTACCACCACTACCACCACCACCA
655	ТТТТТТТТОТТ <u>Т</u> ТТТОТТSТТОТТТІТТТТSРРТ
2416	АСААСТТСААСАТССССТТССААТТАСТССТАС <mark>ТСА</mark> ТGTTCCCTCCACAATAACACCACCATCACCATCACCACCACC
690	$T T S T S P S N Y S Y \overline{*}$
2521	CCAATCCAGCTGCCACTTCTACTACGGATATTGCCGCTAGAGTTACTCCACCGTCCATCTCTGCCCTCTTATCAATCTCTCCCCTTGGCCTAGTGAGTCCCGCC
2626	ATCGACCGCCGCTCAGGTAATGGCATCAATTATTCCCCCAAACTTTGTTACTCCATTGAGGGGATTTCAAGAGGCGACAACAGATAAAAAAAA

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

2731

AAAAAA



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 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

三疣梭子蟹在处理后 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鳗弧 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, Oingdao 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