

合浦珠母贝 C-型凝集素基因的序列特征和功能分析

胡钰婷^{1,2}, 张殿昌², 崔淑歌^{2,3}, 郭华阳^{1,2}, 陈明强², 江世贵^{2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

3. 暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632)

摘要: 通过 EST 筛选结合重测序法获得合浦珠母贝一种 C-型凝集素 cDNA 的全长序列 (命名为 PoLEC1)。PoLEC1 全长 988 bp, 5'-UTR 为 33 bp, 3'-UTR 为 101 bp, 开放阅读框为 864 bp, 编码 287 个氨基酸, 分子量为 31.68 ku, 理论等电点约 5.83。预测的氨基酸序列中含有信号肽 (Met¹-Ser¹⁹) 和糖结合位点。同源性分析结果表明, PoLEC1 与其它物种 C-型凝集素的糖识别结构域序列的同源性在 18.8% ~ 28.6%, 相似性在 28.9% ~ 50.0% 之间。进化树分析结果表明, PoLEC1 与栉孔扇贝聚为一支。组织表达分析表明, PoLEC1 mRNA 在消化腺、外套膜、性腺、闭壳肌、肠、鳃和血淋巴组织均有表达, 在消化腺中的表达分析表明, 经溶藻弧菌刺激后 2 h 表达显著下调, 而在 4 和 24 h 后表达显著上调。利用 PoLEC1 成熟肽构建原核表达载体, 在大肠杆菌中进行重组表达。制备包涵体后, 用 IDA HisBind 树脂纯化得到单一的重组蛋白, 凝菌试验表明该蛋白对大肠杆菌有明显的凝集作用。

关键词: 合浦珠母贝; C-型凝集素基因; RT-PCR; 原核表达

中图分类号: Q 753; S 917.4

文献标志码: A

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 又称马氏珠母贝, 是我国生产海水珍珠最主要的珍珠贝类, 其生产的珍珠被称为“南珠”。多年来, 由于不注重选育种, 致使养殖合浦珠母贝出现种质混杂、生长缓慢和分泌珍珠质的能力下降等现象, 加上近年来养殖环境恶化以及病害增多等因素使合浦珠母贝在人工养殖过程出现大量死亡现象^[1], 致使其珍珠的质量和产量下降, 严重制约了合浦珠母贝养殖产业的发展。为了解决合浦珠母贝养殖中的病害问题, 促进合浦珠母贝养殖产业的可持续发展, 必须加强合浦珠母贝自身免疫防御机制的研究。克隆和鉴定免疫相关基因, 探索其免疫调控机制, 可以为合浦珠母贝病害免疫防治研究提供新的思路^[2-4]。

C-型凝集素 (C-type lectin) 是一类 Ca²⁺ 依

赖活性的糖蛋白, 包含至少一个保守的糖基识别结构域 (carbohydrate recognition domain, CRD)^[5], 作为一种模式识别受体专一地与异物表面特定的糖基结合, 从而吸附和凝集异物, 促进机体清除和杀灭异物^[6]。凝集素在无脊椎动物免疫防御中发挥了十分重要作用, 主要体现在以下 3 个方面: (1) 识别入侵的异物, 促进机体对异物的识别和吞噬^[7], EAMON 等^[8]研究表明, C-型凝集素中含有病原识别分子, 如甘露糖受体等, 积极参与无脊椎动物的非特异性免疫作用; (2) 激活免疫系统, 起调理素的作用, 当外界病原体刺激贝类时, 凝集素通过识别异己有选择性地结合异物表面的糖基分子, 促进贝类免疫反应的产生; (3) 凝集细菌和寄生虫, 防止病原蔓延, ZHANG 等^[9-10]和 OLAFSEN 等^[11]

收稿日期: 2011-02-20

修回日期: 2011-05-30

资助项目: 中央级公益性科研院所基础科研业务费专项资金项目 (2009TS23)

通讯作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@21cn.com

经试验得出,C-型凝集素有凝集和抑制细菌的作用,CHINTALA 等^[12]也证实了贝类凝集素有能凝集细菌和感染寄生虫的作用。在无脊椎动物中有庞大的凝集素家族基因在免疫防御中起重要作用,近年来已克隆获得了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[13-14]、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[15-16]、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[17]、贻贝 (*Mytilus edulis*)^[18]等多种软体动物的 C-型凝集素基因,然而目前对珍珠贝凝集素家族基因的了解甚少,仅克隆分析了 1 个合浦珠母贝 G-型凝集素基因^[19]。本研究利用 EST 筛选和重测序法筛选获得了 1 个合浦珠母贝 C-型凝集素 (PoLEC1) cDNA 的全长序列,分析了其组织表达特征和重组蛋白的细菌凝集活性,证实了 PoLEC1 参与了合浦珠母贝的先天免疫防御反应。

1 材料与方法

1.1 实验材料

合浦珠母贝 实验所用的合浦珠母贝来自海南省陵水县新村珍珠贝养殖基地,体长 5.5 ~ 7.0 cm,充气海水中暂养 1 周后进行实验。对于组织表达实验,取 3 只闭壳肌活力强的合浦珠母贝分别取消化腺、血淋巴、闭壳肌、性腺、肠、鳃和外套膜于液氮中保存备用。对于溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 刺激实验,分成对照组和细菌刺激组,在对照组的闭壳肌内注射 100 μ L PBS (phosphate buffer saline,磷酸盐缓冲液,pH 6.8),细菌刺激组则注射 100 μ L 溶藻弧菌悬液(取过夜培养的溶藻弧菌悬浮于 PBS,OD_{600 nm} = 0.4)于闭壳肌中,于 0、2、4、8、12、24、48、72 h 8 个时间点分别取 5 只合浦珠母贝的消化腺保存于液氮中备用。

试剂 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit, Cat: no. 74104) 和 RNase-free 的 DNase I (Cat: no. 79254) 购自 QIAGEN 公司; Ex Taq 酶,反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit (DRR037S) 和荧光定量试剂盒 (DRR041A) 购自 TaKaRa 公司; IDA His · Bind 树脂, 购自 Merck 公司; 乙醇、甘油、Tris-base、NaCl、硼酸、氨苄青霉素 (Ampicillin)、IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷) 等均为国产分析纯。

仪器 超声波细胞粉碎机, 新芝生物科技股份有限公司; 高速冷冻离心机, 日立工机商业有限公司; 冰箱, 青岛海尔有限公司; 电子天平, 常熟市双杰测试仪器厂; 微波炉, 美的生活电器制造有限公司; 掌上离心机, TDMY KOGYO CON., LTD; 涡旋振荡器, Scientificindustries; 精密电子天平, Mettler-Toledo Group; 荧光定量 PCR 仪, Eppendorf; PCR 仪, Thermoblock Biometra。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

分别将样品于液氮下研碎, 根据说明书采用 RNeasy Mini Kit 提取 RNA。提取 RNA 后用 RNase-free 的 DNase I 处理, 定量 RNA 的反应终质量浓度为 25 ng/ μ L。利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) 合成 cDNA 第一链, 反应后保存 cDNA 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用, 使用时按比例稀释。

1.3 合浦珠母贝 cDNA 文库构建和 EST 分析

取溶藻弧菌刺激后的合浦珠母贝全组织, 在液氮中研磨碎后, 用 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取总 RNA, 使用 ZAP-cDNA[®] Synthesis kit (Stratagene)、ZAP-cDNA[®] Gigapack III Gold Cloning kit (Stratagene) 和 polyAtract[®] mRNA isolation system III (Promega) 等试剂盒 (购自 Stratagene 公司) 构建 EST 文库。经筛选发现其中一个大小为 580 bp 的 EST 序列与 GenBank 数据库中的栉孔扇贝 (BAD83812, 1.00E-11) 的 C-型凝集素具有较高相似性, 挑取该克隆用 T3 引物进行重新测序, 从而获得了合浦珠母贝 C-型凝集素的 cDNA 全长序列, 命名为 PoLEC1, 在 GenBank 中注册号为 FJ812172。

1.4 PoLEC1 序列分析

利用 DNASTar 软件查找 PoLEC1 的 cDNA 序列的最大开放阅读框 (ORF), 利用 SignalP 3.0^[20] 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽的预测, 利用 SMART 程序^[21-22] (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Scan-Prosites 程序 (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) 进行蛋白质结构预测, 用 MatGAT^[23] 计算 PoLEC1 与其它物种 C-型凝集素序列的同源性和相似性, 经过 Clustal W 程序多序列比对后, 最后采用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树。用 CPHmodels 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) 程序预测

<http://www.sexuebao.cn>

PoLEC1 CRD 的空间结构。

1.5 PoLEC1 mRNA 表达分析

根据 PoLEC1 的全长序列设计引物(表 1),并设计 β -actin 引物作内参照,根据 TaKaRa 的荧光定量试剂盒(嵌合检测法)进行荧光定量 RT-

PCR 反应。反应程序按说明书,退火温度为 60℃,反应后用相对 C_t 值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ method)^[4]和 SPSS 软件分析 PoLEC1 mRNA 在合浦珠母贝中的表达情况。

表 1 实验设计的引物及其作用
Tab.1 The primers of experimental design and their roles

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	产物大小/bp product size	用途 usage
PoLEC1-F	TTGTCCAAAACACCTGCC	272	组织表达 tissue expression
PoLEC1-R	CATTCGTCCACTTATACACTCC		
β -actin-F	GACTGAGGCTCCACTCAACC	275	real-time PCR
β -actin-R	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA		
PoCTL1-F1	CCGCTCGAGTTTTTCCTAGACAGCTTTATCAG	780	原核表达 prokaryotic expression
PoCTL1-R1	CCGGAATTCTCATCCTATAATAATAACACCAACG		

1.6 PoCTL1 的原核表达和重组蛋白的纯化

根据 PoLEC1 成熟肽序列设计引物 PoCTL1-F1 和 PoCTL1-R1,在两端分别添加 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶的酶切位点(表 1 的粗体字母),以 PoLEC1 的质粒 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,退火温度为 57℃,40 个循环。PCR 产物纯化后,用 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶进行双酶切,并与经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pRSET 质粒连接,将 pRSET-LEC1 转化大肠杆菌 BL21,筛选阳性克隆,进行测序验证,构建 BL21(pRSET-LEC1)重组菌。将重组菌在含 100 mg/mL 氨苄青霉素的培养基中培养,37℃,225 r/min,直到 OD_{600 nm} 约 0.6,用 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6 和 2.0 mmol/L 不同浓度的 IPTG 诱导培养 5 h,将诱导后的菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。重组菌破碎后并制备包涵体,之后用 IDA His·Bind 树脂试剂盒进行纯化。纯化后进行复性,并用 BCA 方法定量^[24]。

1.7 PoCTL1 重组蛋白的活性检测

用革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)和革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)进行重组 PoCTL1 蛋白的凝集活性检测。细菌培养到 OD_{600 nm} 约 1.0 后,3 500 r/min,离心 10 min,用 1×PBS 清洗两次,用 10 mmol/L 的 TBS-Ca 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L CaCl₂,pH 7.5)悬浮菌液,至 2.5×

10⁹/mL 的细菌浓度,取 10 μ L 菌液至 40 μ L 质量浓度为 34 μ g/mL 的重组蛋白中,用 BSA(牛血清蛋白)作对照。在室温中孵化 1 h 后,于显微镜中观察。为了确定该蛋白是否有钙离子依赖活性,加入与钙离子浓度相同的 EDTA 缓冲液,室温中再孵化 1 h,于显微镜下观察。

2 结果

2.1 PoLEC1 的序列分析

合浦珠母贝 C-型凝集素基因 PoLEC1 cDNA 的序列全长 998 bp,5'-UTR 为 33 bp,3'-UTR 为 101 bp,ORF 为 864 bp,共编码 287 个氨基酸,分子质量为 31.68 ku,理论等电点约 5.83。前 19 个氨基酸为信号肽(Met¹-Ser¹⁹)序列,成熟肽中包含 1 个糖识别结构域(CRD),其中有 6 个保守的半胱氨酸,还包含了 1 个糖结合位点(Glu¹⁵⁴,Pro¹⁵⁵,Asn¹⁵⁶)结构域(图 1)。

2.2 PoLEC1 CRD 空间结构分析

PoLEC1 和其他物种的 CRD 三级结构如图 2 所示,PoLEC1 CRD 的三级结构中含有 2 个 α 螺旋和 10 个 β 折叠,栉孔扇贝的 C-凝集素 CRD 三级结构含有 3 个 α 螺旋和 10 个 β 折叠,这些结构紧凑结合形成一个球形。图 2 中箭头所示是糖结合位点,其结合作用与 Ca²⁺ 有关,也是 Ca²⁺ 结合位点。

AAATAGATAATTCTTTTCGCCCTATCTGTCAGAAATGGAGTATTGTAATATTTTGTGGCCATTTCGACACATTTA 75

MEYCNILLALISTHL 14

ATTGTATGTGATTCTTTTTCCTAGATAGCTTTATCAGTAATAGAACAACACTACGACCAAGAAACCGTACATCACC 150

IVCDSFFFLDSFISNRTT TTKKPYIT 39

AATTCAAAGATTTTGGATCCCCTCGCCGCTACCATTGTCCAAAACACCTGCCAAGGACCAGAACATTAATGTAC 225

NSKILDP LAA TI C PKHLPRTRTLMY 64

AATACCTTTACTAAGCATTGCTTTCAAATAAATGTTGACAAGAAAGCTGATTGGCCGACTGCAAAGGTAGACTGT 300

NTFTKH C FQINVDKKADWP T AKVD C 89

GAAAGTCTGGGTGGTTACCTAGCTGTATAGAAGGAATCAGTGATAACACCTTCATTGGATTGAGTCACATGCA 375

ESLGGLYLA VIEGISDN TFI GF RSH A 114

GCACTAGCGTTTCATGAAGATGAACACTTGTGGATTGGTCTTTCAGATAACGACACAGAAGGAGTGATAAAGTGG 450

ALAFHEDEHLWIGLSDN DTEGVYKW 139

ACGAATGGTGCCTATGTCCAGTACCTGTGTGGGCAGATGGTGAACCTAACGGTGGTACAAAACAGAACTGTGTA 525

TNGAYVQYPVWADGE P NGGT KQN C V 164

GCCTATAACAGAGAAAGTGACAAGTTTGAAGACTGGGGGTGTTCCCGTTCATATGCTTGGATATGTCAGTATGAT 600

AYNRESDKFEDWG C SRSYAWI C QYD 189

CTGAATGCCAGGCCACCATTAACAGCTCCACCACAATCAACCATCAACAACCTAGTACTCAAAAAACACGCCA 675

LNARPP L TAP P QSTPST TSTQKTTP 214

AGCAAGACAACAACCACGCCACTTCTACAACCAAAATCACGCCTACCGTGGTGCCAACAACACTTCCACCAACC 750

SKTTTTTP TSTTKITP TVVP T TLPPT 239

ACAACAACCGTTACAACCACCAAACTACGATCCCCACAACAACCTGTCCAACAACAACCTGTGCCGACAACACAG 825

TTTTVT T TQT T IPT T TVPT T TVPT T Q 264

CCTCTATCCCCACTACAACAGAGAAAACAACGACAACCAGAGGACGTTGGTGTTATTATTATAGGA TGA ACT 900

PPIPT T TEKT T TTE DVGVI IIG * 287

GCTATATGTATGCGAATCT CAATAA GATACATCATGTATATACCCTGGAGATTATAAATCGACAGACGATAC 998

GACAGAAACACGAAAAAAAAA

图1 PoLEC1 cDNA 全序列及预测的氨基酸序列

在方框内的是起始密码子和终止密码子,圆框内的是典型的多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA),加下划线的是信号肽,双下划线的是糖识别结构域(CRD),带灰色阴影的字母是6个保守的半胱氨酸残基,粗斜体的字母表示为糖结合位点。

Fig.1 The full cDNA sequence and predicted amino acid sequence of PoLEC1 gene

The start codon and stop codons are in the box,a typical poly polyadenylation signal(AATAAA)is in the round box,the signal peptide is underlined,the carbohydrate recognition domain (CRD) is under double underlined,the letters of gray shadow are the six conserved cysteine residues,the sugar binding sites are bold and italic letters.

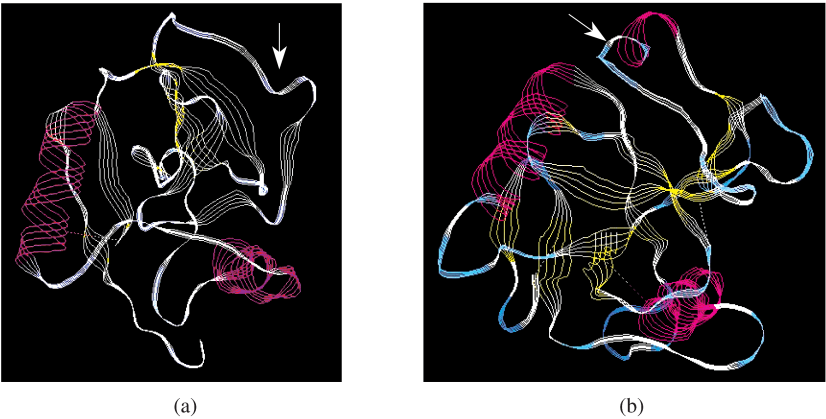


图2 PoLEC1 (a) 与栉孔扇贝 (b) 的 C-型凝集素基因中 CRD 的三级结构

Fig.2 The tertiary structure of CRD in PoLEC1 's (a) and Scallop 's (b) c-type lectin

2.3 PoLEC1 系统进化分析

同源性分析显示,PoLEC1 与其它物种的 C-型凝集素的 CRD 中均有 6 个保守的半胱氨酸,其中后面 4 个半胱氨酸连接成 2 个二硫键,序列中含有保守的一个糖识别位点(EPN)和 2 个钙离子结合位点(D)(图 3)。经 Clustal W 软件比对后,

表 2 PoLEC1 氨基酸序列与其他已知物种 C-型凝集素的氨基酸序列同源性分析
Tab.2 Homology analysis of PoLEC1 amino acid sequence with other known C-type lectin amino acid

物种 species	相似性/% similarity	同源性/% identity	氨基酸数量 amino acids	注册号 accession number
栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	50	26.5	135	ABB71676
文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>	41.9	25.2	99	XP_002603337
海葵 <i>Nematostella vectensis</i>	41.2	22.5	109	XP_001641572
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	39	28.6	97	ACI68807
墨吉对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	39	23.4	134	ACR56805
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	39	21.2	134	ABI97373
囊舌虫 <i>S. kowalevskii</i>	38.2	19.3	120	XP_002735728
棕背蛇鳝 <i>Echidna delicatula</i>	37.5	18.8	93	BAC78902
斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	36	24.7	116	XP_002192626
智人 <i>Homo sapiens</i>	29.9	24.7	211	AAI46839
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	28.9	19.3	211	XP_001091661

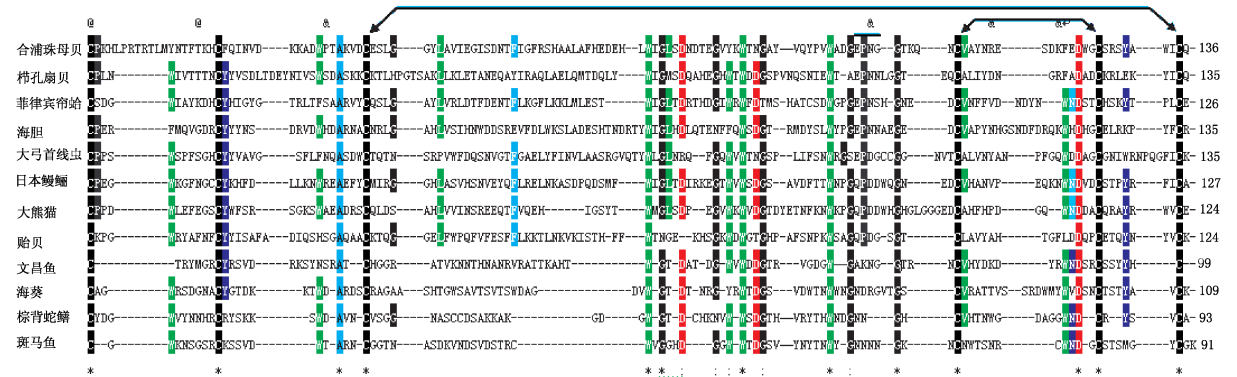


图 3 PoLEC1 与其他物种 C-型凝集素氨基酸的多序列联配

星号代表同源性(*),·或:代表相似性;序列上方@表示糖识别结构域中没有形成二硫键的半胱氨酸,&表示带二硫键的半胱氨酸,横线下的是糖结合位点。其中合浦珠母贝(*Pinctada fucata*, ACO36045),栉孔扇贝(*C. farreri*, ABB71676),菲律宾帘蛤(*Venerupis philippinarum*, ACU83213),海胆(*Strongylocentrotus nudus*, ACO72584),大弓首线虫(*Toxocara canis*, AAD31000),日本海鳗(*Anguilla japonica*, BAC54022),大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*, EFB27762),贻贝(*Mytilus edulis*, CAX33834),文昌鱼(*B. floridae*, XP_002603337),海葵(*N. vectensis*, XP_001641572),棕背蛇鳝(*E. delicatula*, BAC78902),斑马鱼(*Danio rerio*, NP_001104711)。

Fig. 3 Multiple alignments of PoLEC1 with other known C-type lectin sequences

Homology are shown as asterisk “*”, “·” or “:” on behalf of similarity; On the top of the sequences, “@” showed the cysteines without a disulfide bond in the carbohydrate recognition domain, & showed the cysteine with a disulfide bond, under the dashes the sugar binding sites. Including pearl oyster (*Pinctada fucata*, ACO36045), scallop (*C. farreri*, ABB71676), huage (*Venerupis philippinarum*, ACU83213), sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*, ACO72584), *Toxocara canis*, AAD31000, Japanese eel (*Anguilla japonica*, BAC54022), panda (*Ailuropoda melanoleuca*, EFB27762), mussel (*Mytilus edulis*, CAX33834), amphioxus (*B. floridae*, XP_002603337), sea anemone(*N. vectensis*, XP_001641572), clethrionomys snake eel(*E. delicatula*, BAC78902), zebrafish (*Danio rerio*, NP_001104711).

用邻位相联法构建系统进化树(图4),结果表明,系统进化树分为两大支,合浦珠母贝与栉孔扇贝在一分支上,与甲壳动物共一大支,说明系统进化发育上属于无脊椎动物,与软体动物亲缘关系最近,其次是甲壳动物。分析进化树上的CRD的同源性和相似性,结果表明,这些物种的相似性为28.9%~50.0%,同源性为18.8%~28.6%。

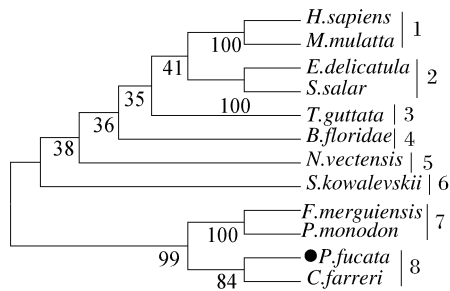


图4 利用 Clustal W 程序和 MEGA 3.0 软件构建的 PoLEC1 系统进化树

1. 哺乳动物, 2. 鱼类, 3. 鸟类, 4. 头索, 5. 腔肠动物, 6. 半索动物, 7. 甲壳动物, 8. 软体动物。

系统进化树所使用物种如表2。

Fig. 4 Phylogenetic tree of the PoLEC1 amino acid sequences in different groups by Clustal W and MEGA 3.0

1. mammal, 2. fish, 3. bird, 4. cephalochorolata, 5. coelenterate, 6. hemichordate, 7. crustacean, 8. mollusc.

The species the phylogenetic tree used are listed in Tab. 2.

2.4 PoLEC1 mRNA 组织表达特征分析

组织表达分析表明 PoLEC1 mRNA 在所有被检测的组织中均有表达, 其中在消化腺中的表达量最高, 且显著高于其他组织, 在血淋巴中表达量最低(图5)。PoLEC1 mRNA 在消化腺中的表达分析结果表明(图6), 经溶藻弧菌刺激2 h后, PoLEC1 mRNA 表达量显著下调; 刺激4和24 h后, 表达量显著上调。

2.5 PoLEC1 重组蛋白表达和活性检测

重组菌 BL21 (pRSET-LEC1) 在 37 °C, 220 r/min, 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 5 h 后进行细胞破碎, SDS-PAGE 电泳检测结果表明, 在约 38 ku 处有一条特异条带, 与预期大小相一致(图7-a), 重组蛋白以包涵体形式存在。包涵体经尿素溶解后用镍离子金属螯合亲和层析法进行蛋白纯化, 纯化得到单一的重组蛋白(图7-b)。蛋白凝集活性检测结果表明, PoLEC1 的重组蛋白对革兰氏阴性菌大肠杆菌有明显的凝集活性(图8),

加 EDTA 后, 凝集活性消失, 对枯草芽孢杆菌没有明显的凝集作用。

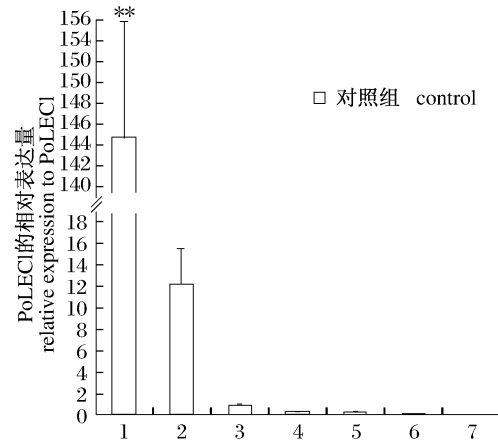


图5 PoLEC1 mRNA 在各组织中的表达水平

1. 消化腺, 2. 性腺, 3. 闭壳肌, 4. 外套膜, 5. 肠, 6. 鳃, 7. 血淋巴。

Fig. 5 Expression level of the PoLEC1 mRNA in tissues

1. digestive gland, 2. gonad, 3. adductor muscle, 4. mantle, 5. intestine, 6. gills, 7. haemocytes.

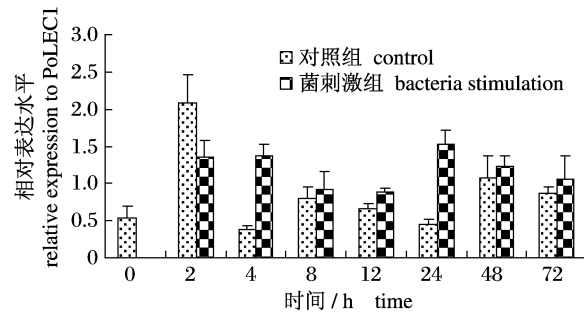


图6 PoLEC1 mRNA 在消化腺中菌刺激后的表达水平

Fig. 6 Expression level of PoLEC1 mRNA in digestive gland after bacteria stimulation

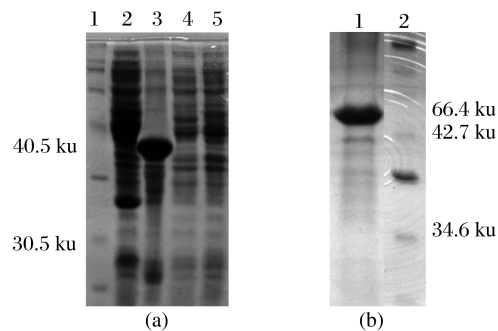


图7 SDS-PAGE 检测结果

(a) 破碎后沉淀和上清, 1. 标准蛋白, 2. 上清, 3. 沉淀, 4. pRSET, 5. BL21; (b) 纯化后的蛋白, 1. 目的蛋白, 2. 标准蛋白。

Fig. 7 SDS-PAGE analysis

(a) supernatant and sediment after breaking, 1. Marker, 2. supernatant, 3. sediment, 4. pRSET, 5. BL21; (b) protein had purified, 1. recombinant protein, 2. Marker.

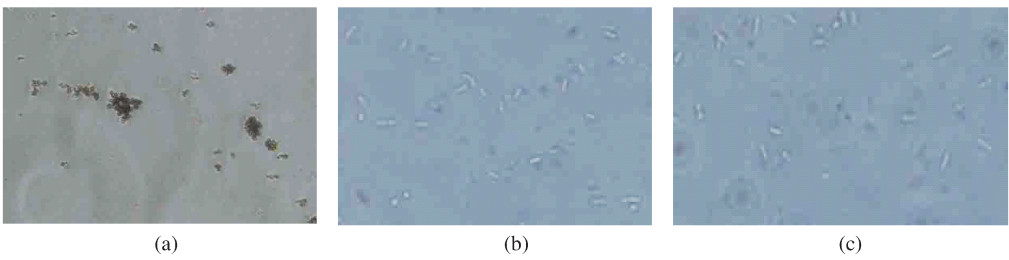


图 8 重组蛋白 PoCTL1 对大肠杆菌的凝集结果

(a) TBS-Ca 缓冲液; (b) EDTA 缓冲液; (c) BSA 溶液。

Fig. 8 *E. coli* agglutination induced by the recombinant PoCTL1

(a) the recombinant PoCTL1 in TBS-Ca buffer; (b) the recombinant PoCTL1 in TBS-EDTA buffer; (c) the recombinant PoCTL1 in BSA solution.

3 讨论

序列分析结果表明, PoLEC1 蛋白序列中含有 cxxxxcxxxxxxxxCx……xCxxxxWxCxxxxC 典型的 C-型凝集素结构域, 在 6 个半胱氨酸中, 前 2 个半胱氨酸没有参与二硫键的形成, 第 3 个和第 6 个、第 4 个和第 5 个半胱氨酸 (Cys⁸⁹、Cys¹⁸⁶ 和 Cys¹⁶³、Cys¹⁷⁸) 形成 2 个二硫键^[15-16], 二硫键的结构对维持其空间的结构有重要意义。PoLEC1 含有一个 C-型凝集素结构域 (CRD), 低等生物的 C-型凝集素基因一般只有一个 CRD, 而其他物种的则有两个或多个 CRD^[15-26]。PoLEC1 的 CRD 中含有一个糖结合位点 PEN, PoLEC1 的 CRD 与栉孔扇贝 C-型凝集素的 CRD 的空间结构比较分析后, 发现它们的结构相似, 整个空间结构紧凑成一个球形, 均有一个糖结合位点。在 C-型凝集素中, 一般有 EPN 基域和 WND 基域与钙离子共同作用完成对糖基分子的结合^[27], EPN 基序仅在胶原凝集素和选凝素中存在^[5], 所以 PoLEC1 有可能是一种胶凝集素或选择凝集素, WND 基序一般只在脊椎动物中有高保守性。而且 EPN 和 EPD 可以对甘露糖进行识别, QPD 则可识别半乳糖, C-型凝集素对不同的糖基进行凝集是有选择性的, PoLEC1 可能对甘露糖进行结合。

同源分析结果表明, 大多物种 C-型凝集素的 CRD 由约 130 个氨基酸残基组成, 并有 18 个保守的氨基酸残基和 6 个恒定保守的半胱氨酸。有关文献表明, C-型凝集素的 CRD 一般为 115 ~ 130 个残基, 其中有 14 个恒定残基 (包括 4 个 C 残基) 和 18 个保守残基^[28], 其中保守的色氨酸 (W) 残基, 对凝集素的凝血活性起着重要的作

用^[25]。在所比对的序列中, 有两个比较保守的糖结合位点, WND 中在脊椎动物序列中存在。进化树分析结果表明, 合浦珠母贝与栉孔扇贝聚为一支, 与一些甲壳动物为邻支, 与其他物种相离较远, 这说明 C-型凝集素基因在贝类上进化是相对一致的, 并与水生动物甲壳动物亲缘较近。对这些物种的 CRD 进行同源性和相似性, 发现它们的同源性与相似性并不是很高, 在有关的研究中^[9-10], 贻贝的 C-型凝集素与其它物种的相似性为 45% ~ 50%, 栉孔扇贝的 5 个 C-型凝集素相似性为 31% ~ 46%, 可见得 C-型凝集素是一个进化比较快的基因, 但它具有高保守性特征序列。

组织表达特征分析结果显示, PoLEC1 mRNA 在合浦珠母贝各组织有不同的表达量, 消化腺最高, 血淋巴最低, 所以在合浦珠母贝的各组织均有 C-型凝集素的分布, 而且在消化腺的分布量较大, 因为消化腺与贝类的免疫有密切的关系。在海湾扇贝和栉孔扇贝中, C-型凝集素在消化腺中表达量最高, 血淋巴的表达量最低^[9,15]。溶藻弧菌刺激 2、4、8、12、24、48 和 72 h 后, PoLEC1 mRNA 在消化腺的表达水平不一致, 在 2 h 的表达量有所下降, 在 4 h 和 24 h 的表达量显著上调, 即表达量在一定时间内达到较大值, 但一定的时间后会恢复, 这说明 C-型凝集素的表达量是可以受微生物刺激诱导的^[13], 也说明合浦珠母贝 C-型凝集素参与免疫响应, 有助于对外界入侵病原的免疫防御能力。

本试验通过构建原核表达载体 pRSET-LEC1, 在大肠杆菌 BL21 中得以表达, 并优化得到 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导浓度。通过制备包涵体, 用镍离子金属螯合亲和层析法进行纯化, 获

得单一的重组蛋白。用该重组蛋白进行凝菌活性试验,结果表明重组蛋白 pRSET-LEC1 能够凝集大肠杆菌,且依赖钙离子,但不能对试验中的其它细菌进行凝集。栉孔扇贝的 C-型凝集素 rCFlec-1 也表现出对大肠杆菌有凝集活性,而且也是依赖钙离子的存在^[14],但 rCFlec-5 没有对大肠杆菌产生凝集作用^[10]。海湾扇贝的 C-型凝集素 AiCTL-6 可以对大肠杆菌、微球菌和金黄色葡萄球菌进行凝集^[9]。C-型凝集素有选择地对细菌进行凝集,这是因为 C-型对异物表面的糖基分子有选择的,即有专一性。PoLEC1 的凝集活性有依赖于钙离子,进一步证明了 C-型凝集素^[29] 的活性特征。

参考文献:

- [1] 邓陈茂,童银洪,符韶. 马氏珠母贝的研究进展[J]. 现代农业科技,2009(2):204-206.
- [2] ZHANG D C, JIANG S G, MA J J, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a clip-domain serine protease from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(4):662-668.
- [3] ZHANG D C, JIANG S G, QIU L H, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of the I κ B gene from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(1):84-90.
- [4] ZHANG D C, JIANG J J, JIANG S G, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF- α factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(3):391-396.
- [5] 陈政良. 哺乳类 C 型凝集素超级家族[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(6):491-496.
- [6] TAMPLIN M L, FOSHER W S. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(11):2882-2887.
- [7] CANESI L, GALLO G, GAVIOLI M, *et al.* Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves [J]. Microscopy Research and Technique, 2002, 57(6):467-476.
- [8] EAMON P, MCGREAL, LUISA M P, *et al.* Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system [J]. Molecular Immunology, 2004, 41(11):1109-1121.
- [9] ZHANG H, SONG X, WANG L, *et al.* AiCTL-6, a novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* with a long C-type lectin-like domain [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 30(1):1-10.
- [10] ZHANG H, KONG P F, ZHOU Z, *et al.* Cflec-5, a pattern recognition receptor in scallop *Chlamys farreri* agglutinating yeast *Pichia pastoris* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2010, 29(1):149-156.
- [11] OLAFSEN J A, FLETCHER T C, GANT P T. Agglutinin activity Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge [J]. Comparative Immunology, 1992, 16(2-3):123-138.
- [12] CHINTALA M M, FISHER W S. Disease incidence and potential mechanisms of defense for MSX-resistant and-susceptible eastern oysters held in Chesapeake Bay [J]. Journal of Shellfish Research, 1991, 10:439-443.
- [13] 胥炜,王昊,宋林生,等. 栉孔扇贝 C 型凝集素基因的克隆与表达研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(1):83-88.
- [14] WANG H, SONG L S, LI C, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Molecular & Immunology, 2007, 44(5):722-731.
- [15] SONG X Y, ZHANG H, WANG L, *et al.* An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(2):326-332.
- [16] ZHU L, SONG L S, XU W, *et al.* Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(3):231-238.
- [17] TARIS N, LANG R P, RENO P W, *et al.* Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display [J]. Immunogenetics Molecular Genetics and Functional Genomics, 2009, 40(5):1365-2052.
- [18] 熊川男,李伟,李丹彤,等. 贻贝凝集素生物活性的研究[J]. 水产科学, 2007, 26(7):400-404.
- [19] ZHANG D C, JIANG S G, HU Y T, *et al.* A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35(1):1-6.
- [20] BENDTSEN J D, NIELSEN H, VON H G, *et al.*

- Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340 (4): 783 – 795.
- [21] SCHULTZ J, MILPENTZ F, BORK P, *et al.* SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95 (11): 5857 – 5864.
- [22] CAMPANELLA J J, BITINCKA L, SMALLEY J. MatGat: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences [J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4: 1 – 4.
- [23] LETUNIC I, COPLEY R P, PILS B, *et al.* SMART 5: domains in the context of genomes and networks [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 257 – 260.
- [24] YU X Q, LING E, Tracy M E, *et al.* Immulectin-4 from the tobacco hornworm *Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid [J]. Insect Molecular Biology, 2006, 15 (2): 119 – 128.
- [25] 徐小超. 蜘蛛抱蛋 (*Aspidistra elatior* Bulme) 凝集素的分离、纯化及性质研究 [D]. 四川: 四川大学, 2007.
- [26] ZHANG H, BAME R, GARY H, *et al.* Cloning, mapping and genomic organization of a fish C-type lectin gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1494 (1 – 2): 14 – 22.
- [27] 王昊. 栉孔扇贝凝集素家族基因研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006.
- [28] DRICKAMER K. Ca^{2+} -dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins [J]. Current Opinion in Structural Biology, 1993, 3 (3): 393 – 400.
- [29] DRICKAMER K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animals lectins [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263: 9557 – 9560.

欢迎订阅 2012 年《海洋渔业》

《海洋渔业》创刊于 1979 年,是中国科学技术协会主管、中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的学术期刊。主要刊载水产生物学、海水养殖与增殖、水产生物病害与防治、水产生物营养与饲料、渔业生态与渔业水域生态环境保护、海洋水产资源开发利用与保护、渔具与渔法、水产品保鲜与综合利用、渔业机械与仪器等方面的水产基础理论研究和水产应用基础研究的论文、综述和简报,读者对象主要为海洋水产科技工作者、水产院校师生和渔业行政管理人员等。

《海洋渔业》于 2006 年被“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)收录,2009 年被中国科学引文数据库(CSCD)(扩展库)(2009 年~2010 年)和《中文核心期刊要目总览》收录,还先后被《中国期刊全文数据库》(CJFD)、《万方数据—数字化期刊群》、《中文科技期刊数据库》、联合国《水科学和渔业文摘》(ASFA)等期刊数据库收录,2009 年被中国科技协会学会学术部评定为“中国科协示范精品科技期刊”。

本刊季刊,大 16 开,120 页,逢季中月 25 日出版,定价:16 元/册。国内外公开发行,国内统一刊号:CN 31 – 1341/S,国际标准刊号:ISSN 1004 – 2490,邮发代号:4 – 630。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 300 号 邮 编:200090

电 话:021 – 65680116, 021 – 65684690 × 8048, 传 真:021 – 65683926

E-mail: haiyangyue@126.com

Website: www.eastfishery.ac.cn

Sequence features and functional analysis of the C-type lectin gene (PoLEC1) from pearl oyster *Pinctada fucata*

HU Yu-ting^{1,2}, ZHANG Dian-chang², CUI Shu-ge^{2,3}, GUO Hua-yang^{1,2},
CHEN Ming-qiang², JIANG Shi-gui^{2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Division of Aquaculture and Biotechnology, South China Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

3. School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: *Pinctada fucata* is one of the main shellfishes which produce sea water pearls, and it has high economic value. Shellfish diseases continuing to occur in recent years, we had to strengthen to study the immune system of shellfish. In this test, through researching the related genes C-type lectin from *P. fucata*, provided some basic theories of molecular assisted selection for *P. fucata*. We identified and cloned the cDNA of the C-type lectin gene (PoLEC1) from *P. fucata* by the cDNA library of *P. fucata*. Sequence analysis showed that *PoLEC1* is 998 bp long, a 5'-UTR is 33 bp, and a 3'-UTR is 101 bp, open reading frame is 864 bp, encoding 287 amino acids, the molecular weight is 31.68 ku and the theoretical isoelectric point is about 5.83. The signal peptide in the predicted amino acid is the Met¹-Ser¹⁹, also contains sugar binding sites. Homology analysis showed that the homology of PoLEC1 and other species. Amino acid sequence is between 18.8% and 28.6%, the similarity is between 28.9% and 50.0%. The phylogenetic analysis showed that the PoLEC1 shared the same branch with *Chlamys farreri*. Tissue expression analysis showed that the PoLEC1 mRNA was expressed in digestive gland, mantle, gonad, adductor muscle, intestine, gills and hemolymph. Digestive gland expression analysis showed that after stimulation by *Vibrio alginolyticus* it was significantly reduced in 2 h, and expression was up-regulated in 4 h and 24 h. The prokaryotic expression vector of PoLEC1 was constructed using the mature peptide, and expressed in *E. coli*. After the preparation of inclusion bodies, purified by IDA HisBind resin and a single protein. And the coagulation test showed that the protein can agglutinate the *E. coli* significantly.

Key words: *Pinctada fucata*; C-type lectin; RT-PCR; prokaryotic expression

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com