

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

王 伟^{1,2}, 吴旭干¹, 潘桂平², 侯文杰², 成永旭^{1,4*}

1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,上海 201306;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所,上海 200090;
3. 上海市水产研究所及上海市水产技术推广站,上海 200433;
4. 上海海洋大学上海高校知识服务平台水产动物遗传育种中心,上海 201306)

摘要:为探究几丁质酶基因在三疣梭子蟹蜕皮过程中的生理作用,本研究通过转录组测序和 RACE 技术克隆了三疣梭子蟹几丁质酶基因(*PtChi*) cDNA 全长(登录号:KF914663),并通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术研究了该基因在三疣梭子蟹不同组织及不同蜕皮阶段的表达情况。结果表明:(1)*PtChi* 基因 cDNA 全长 2 200 bp,包括 5'非编码区(5'-UTR)16 bp,3'非编码区(3'-UTR)714 bp 和开放阅读框 1 470 bp,编码 489 个氨基酸,预测蛋白质分子量和等电点为 53.97 ku 和 4.76。(2)BlastP 结果显示,*PtChi* 推导氨基酸序列与已知甲壳动物 Chi-3 的一致性为 61%~96%,系统进化树分析表明 *PtChi* 与其他甲壳动物 Chi-3 聚为一支。(3)qRT-PCR 结果显示 *PtChi* 基因在 C 期三疣梭子蟹肝胰腺中表达水平最高,胃、大颚器、心脏和眼柄中 *PtChi*-mRNA 表达水平依次降低,在其他组织中 *PtChi*-mRNA 表达量最低,且表达水平无显著差异。(4)不同蜕皮阶段,*PtChi* 在肝胰腺、肠、胃和大颚器 4 种组织中的表达变化模式有所不同,肝胰腺中 *PtChi*-mRNA 表达水平在 AB 期最高,C 期最低,暗示 *PtChi* 可能参与三疣梭子蟹蜕皮后期对病原体的免疫防御;肠中的 *PtChi*-mRNA 表达水平在 E 期最高,C 期最低,推测 *PtChi* 参与蜕皮过程中肠道围食膜的分解和免疫功能;胃中 *PtChi* 表达水平在 C 期最高,暗示其参与了食物消化。以上结果表明,本研究克隆的 *PtChi* 可能为甲壳动物 Chi-3 型,其准确生理学功能及其在蜕皮过程中的调控机制有待进一步深入研究。

关键词:三疣梭子蟹;几丁质酶;基因克隆;表达分析;蜕皮周期

中图分类号:Q 785; S 968

文献标志码:A

几丁质又称甲壳素、壳多糖,是由 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖通过 β-1,4 糖苷键连接而成的直链多聚糖^[1],是甲壳动物外骨骼的重要组成部分^[2]。甲壳动物生长发育过程中,经常需要蜕去旧壳以继续生长^[3-4],蜕壳前需要几丁质消化酶将旧壳中的几丁质降解,从而导致旧壳疏松,便于动物中从旧壳中顺利蜕出^[5]。甲壳动物甲壳中的几丁质完全分解需要几丁质酶和 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(也称壳二糖酶)这 2 种几

丁质消化酶的共同参与:首先几丁质酶将几丁质降解为几丁质寡聚糖,随后壳二糖酶将几丁质寡聚糖水解为 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖单体^[6]。水解产生的 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖单体可被部分重新吸收,用于新壳的合成^[5]。对甲壳动物而言,几丁质酶除了直接参与蜕皮调控外,还具有消化食物中几丁质和抵御病原体侵袭等功能^[7-9]。因此,深入研究几丁质酶在甲壳动物生长发育过程中的生理功能具有一定的理论意

收稿日期:2014-12-15 修回日期:2015-05-28

资助项目:国家自然科学基金(41276158);上海市自然科学基金(12ZR1413000);上海市农委青年人才成长计划[沪农青字(2014)第 3-5 号];上海市科技兴农重点攻关专项[农科攻字(2013)第 6-3 号];上海高校水产学一流学科建设专项(沪教科 2012-62)

通信作者:成永旭,E-mail:yxcheng@shou.edu.cn

义和实用价值。

几丁质酶由几丁质酶基因表达生成。现有研究表明,几丁质酶基因是一种基因数量较多的家族基因,在果蝇(*Drosophila melanogaster*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)等昆虫中存在 23~26 个几丁质酶基因^[10-11],在日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[12]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[13]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[1]、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[14]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[5]等甲壳动物中也发现了 3~6 种几丁质酶基因。虽然甲壳动物的几丁质酶基因均具有信号肽、GH18 催化结构域、S/T 富集的连接区和几丁质结合域这 4 个典型的结构域,但这些基因在甲壳动物不同组织中的时空表达模式和生理功能存在差异^[14]。如凡纳滨对虾几丁质酶基因 *LvChi-1*、*LvChi-3* 和 *LvChi-4* 主要在肝胰腺中表达;*LvChi-2* 在眼柄中相对表达水平较高;*LvChi-5* 在肌肉中表达量最高,其次为表皮;而 *LvChi-6* 主要在表皮、鳃和眼柄中表达^[5]。因此,系统研究几丁质酶基因在甲壳动物蜕壳周期中不同组织内的表达情况,可以在了解该基因与蜕皮的关系的同时,初步了解该基因的功能^[15-17]。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的养殖蟹类,人工养殖过程中的蜕皮死亡综合征(molting death syndrome, MDS)和病害问题一直是困扰该产业可持续发展的 2 个重要问题^[18-19]。MDS 是指蟹类不能顺利完成蜕壳,在蜕壳过程中或蜕壳不久便大量死亡的一种综合症状,给经济蟹类养殖生产造成了巨大的经济损失^[18,20]。由于 MDS 形成原因非常复杂,要深入了解其形成机制,首先必需深入研究三疣梭子蟹蜕皮的生理和免疫机制,为 MDS 的控制提供理论参考和实践依据^[21-22]。以往研究表明几丁质酶可能参与了甲壳动物的蜕壳调控和免疫保护,并已有多种甲壳动物的不同几丁质酶基因被克隆和研究,这为深入研究甲壳动物几丁质酶基因的生理功能奠定了基础^[14]。但迄今为止,尚未见有三疣梭子蟹几丁质酶基因方面的研究报道。因此,本研究基于三疣梭子蟹转录组文库获得的几丁质酶基因部分 cDNA 序列(contig 8693),通过反转录 PCR(RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术,得到了三疣梭子蟹一种几丁质酶

基因(*PtChi*)的 cDNA 全长。在对该基因序列进行相关生物信息学分析后,通过荧光定量 PCR 技术研究了该基因在三疣梭子蟹不同组织及不同蜕皮阶段的表达情况,结果可以为进一步研究 *PtChi* 的生理功能提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与采样

三疣梭子蟹幼蟹购自浙江舟山宏福水产养殖场,幼蟹初始体质量 50~80 g,甲宽 7~9 cm,挑选 60 只肢体健全,活力好的雌蟹运输到上海海洋大学营养繁殖研究室,在室内循环水系统中暂养 1 周,暂养水族箱规格(长×宽×高=75 cm×53 cm×47 cm),水族箱底铺 3~5 cm 细沙供其隐蔽,每箱放 8~10 只幼蟹。暂养期间每日 19:00 投喂冷冻真蛸(*Octopus vulgaris*)和冷冻的凡纳滨对虾等饵料,投喂量为蟹总体质量的 5%~10%,次日上午清除残饵和粪便。暂养期间水温 24~26 ℃、盐度 24、溶解氧 > 5 mg/L、氨氮 < 0.5 mg/L、亚硝酸盐氮 < 0.15 mg/L、pH 为 7.0~9.0。

暂养结束后,挑选 32 只处于蜕皮间期(C 期)或前期(D 期)的幼蟹用于正式实验,正式实验期间的日常管理和水质参数同暂养阶段。为避免实验蟹间的相互残杀,每只幼蟹单独饲养于水体体积为 40 L 的小型循环水族箱(长×宽×高=53 cm×18 cm×45 cm)。根据三疣梭子蟹游泳足的形态学变化将其蜕皮周期分为蜕皮期(E 期)、蜕皮后期(AB 期)、蜕皮间期(C 期)和蜕皮前期(D 期)^[23],实验过程中每天检查和记录每只幼蟹所处的蜕皮阶段,对达到一定蜕皮阶段的个体进行解剖,采集肝胰腺、肌肉、心脏、鳃、胃、肠、眼柄、胸神经节、Y 器官、大颚器等组织样品,液氮速冻后 -80 ℃ 保存待用。由于 D 期可分为多个亚期^[23],且每个亚期持续时间相对较短,D 期样品仅采集形态特征较为典型的 D₂ 亚期。每个蜕皮阶段采集 5~8 个个体。

1.2 *PtChi* cDNA 全长的克隆

取冻存的肝胰腺组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整度,紫外分光光度计检测 RNA 纯度。使用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, Cat. 634923)进行第一链 cDNA 合成,Advantage 2 PCR Kit(Clontech, Cat. 639207)进行 RACE 扩增。RACE

用特异性引物根据三疣梭子蟹转录组文库(NCBI 登录号:SRA051608)筛选到的几丁质酶基因序列片段(序列拼接号:contig 8693)设计(表 1)。所得 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后采用 DNA 回收试剂盒(TaKaRa, Cat. 9763)进行回收纯化,纯化产物与 pMD19-T 载体(TaKaRa, Cat. D104A)进行连接后转化至大肠杆菌 Top 10 感受态细胞(天根, Cat. CB104-01)中,37 °C、180 r/min 条件下振荡培养 2 h,离心收集菌体后接种并进行蓝白斑筛选,随机挑选 10 个阳性克隆送上海生工生物工程公司进行测序。

1.3 序列分析

PtChi 片段序列的拼装利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序进行。获得 *PtChi* 全长 cDNA 后采用 Blast 程序分析 *PtChi* 与其他动物 *Chi* 基因序列的同源性和一致性; ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测 *PtChi* 基因开放阅读框(ORF, open reading frame),推导氨基酸序列的物理参数、信号肽和跨膜结构的预测分别采用 ProtParamtool (<http://web.expasy.org/protparam/>)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行。最后通过 MEGA 5.0 软件进行多重序列比对和系统进化树构建。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

采用 Trizol 法提取各期组织样品的总 RNA。分别取 100 ng 总 RNA 作为反转录模板进行 cDNA 合成,总 RNA 提取试剂盒(Cat. D9108A)和反转录试剂盒(Cat. D2639A)均为 TaKaRa 公司生产。根据 *PtChi* 序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计定量 PCR 用特异性引物,以三疣梭子蟹 18S *rRNA* 作为内参基因^[24](表 1)。按照定量 PCR 试剂盒(TaKaRa, Cat. DRR420A)说明,将模板 cDNA 梯度稀释后进行标准曲线扩增。当 PCR 反应满足无非特异性扩增,目标基因和内参基因的扩增效率在 95%~105%,标准曲线 R^2 值大于 0.99 时,确定 qRT-PCR 反应体系与条件。最终采用 Chi-F2/R2 作为定量 PCR 扩增引物,qRT-PCR 的反应体系见表 2,反应条件:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 3 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环。

首先采用 C 期的肌肉、肝胰腺、心脏、胃、肠、鳃、Y 器官、大颚器、眼柄和胸神经节研究 *PtChi*

基因在三疣梭子蟹各个组织中的相对表达情况。在此基础上研究三疣梭子蟹蜕皮过程中, *PtChi* 在肝胰腺、胃、肠和大颚器中的表达变化。每个样品重复测定 4 次,每个蜕壳阶段重复 5 个体。

表 1 实验用 PCR 引物及序列
Tab. 1 Primers and their sequences used in this experiment

引物名称 primer name	核苷酸序列(5' - 3') sequence	用途 purpose
通用引物预混液		
universal primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
mix (UPM)		
Chi 5'-R1	TCGATGGTACCCTTGCCGCAGACA	5'-RACE
Chi 5'-R2	AGGGTCGTGCACAACAGTCCAGCCA	5'-RACE
Chi 3'-F1	CCCCAACGACTGCCCTAGAGAGCC	3'-RACE
Chi 3'-F2	CCAGGACGGTGGCGGAGTGTGGAT	3'-RACE
Chi-F1	ATCCTGGCTGTGGGTGGATG	qRT-PCR
Chi-R1	TTAGCGTGCACTGCCTCCTT	qRT-PCR
Chi-F2	CCCAGCAACTGCCACCACTA	qRT-PCR
Chi-R2	CAAGGGCACAGACGACATGC	qRT-PCR
18S-F	TCCAGTTCGCAGCTTCTCTCTT	qRT-PCR
18S-R	AACATCTAAGGGCATCACAGACC	qRT-PCR

表 2 *PtChi* 与 18S *rRNA* 基因荧光定量 PCR 反应体系中各试剂添加量 (μL)

Tab. 2 The volume of each reagent added to the PCR mixture used for qRT-PCR of *PtChi* and 18S *rRNA*

试剂 reagent	<i>PtChi</i>	18 S <i>rRNA</i>
SYBR 预混 Ex Taq 酶	10	10
SYBR Premix Ex Taq TM (2 ×)		
PCR 上游引物/PCR Forward Primer(10 μM)	0.4	0.3
PCR 下游引物/PCR Reverse Primer(10 μM)	0.4	0.3
cDNA 模板/cDNA template	2.0	2.0
ROX 校正染料 Dye II/ROX Reference Dye II (50 ×)	0.4	0.4
双蒸水 ddH ₂ O	6.8	7.0
总体积 total volume	20	20

1.5 数据分析

以 18S *rRNA* 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *PtChi*-mRNA 的相对表达水平。使用 SPSS 17.0 软件对 qRT-PCR 数据进行统计分析,采用 Levene's 法进行方差齐性检验,ANOVA 对实验结果进行方差分析。当数据满足方差齐性时采用 Duncan 氏法进行多重比较;当不满足方差齐性时对数据进行反正弦或平方根处理,对仍不具备

齐性方差的数据,采用 Games-Howell 法进行多重比较,取 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 *PtChi* 基因全长克隆及比对结果

三疣梭子蟹几丁质酶基因(*PtChi*)cDNA 全长 200 bp,NCBI 登录号为 KF914663。序列分析结果表明,该基因 cDNA 序列包括 5'-非编码区(5'-UTR)16 bp、3'-非编码区(3'-UTR)714 bp 和开放阅读框

(ORF)1 470 bp,ORF 编码 489 个氨基酸,预测蛋白的分子式和分子量分别为 $C_{2405}H_{3621}N_{623}O_{730}S_{32}$ 和 53.97 ku,等电点为 4.76。进一步分析表明,*PtChi* 推导氨基酸序列从 N 端到 C 端包含甲壳动物几丁质酶的 4 个典型结构域:信号肽(1~20 aa)、GH18 催化结构域(22~367 aa)、S/T 富集的连接区和几丁质结合结构域(423~480 aa)(图 1)。其中信号肽的裂解位点位于第 20 个与第 21 个氨基酸之间,推测该蛋白属于分泌蛋白。

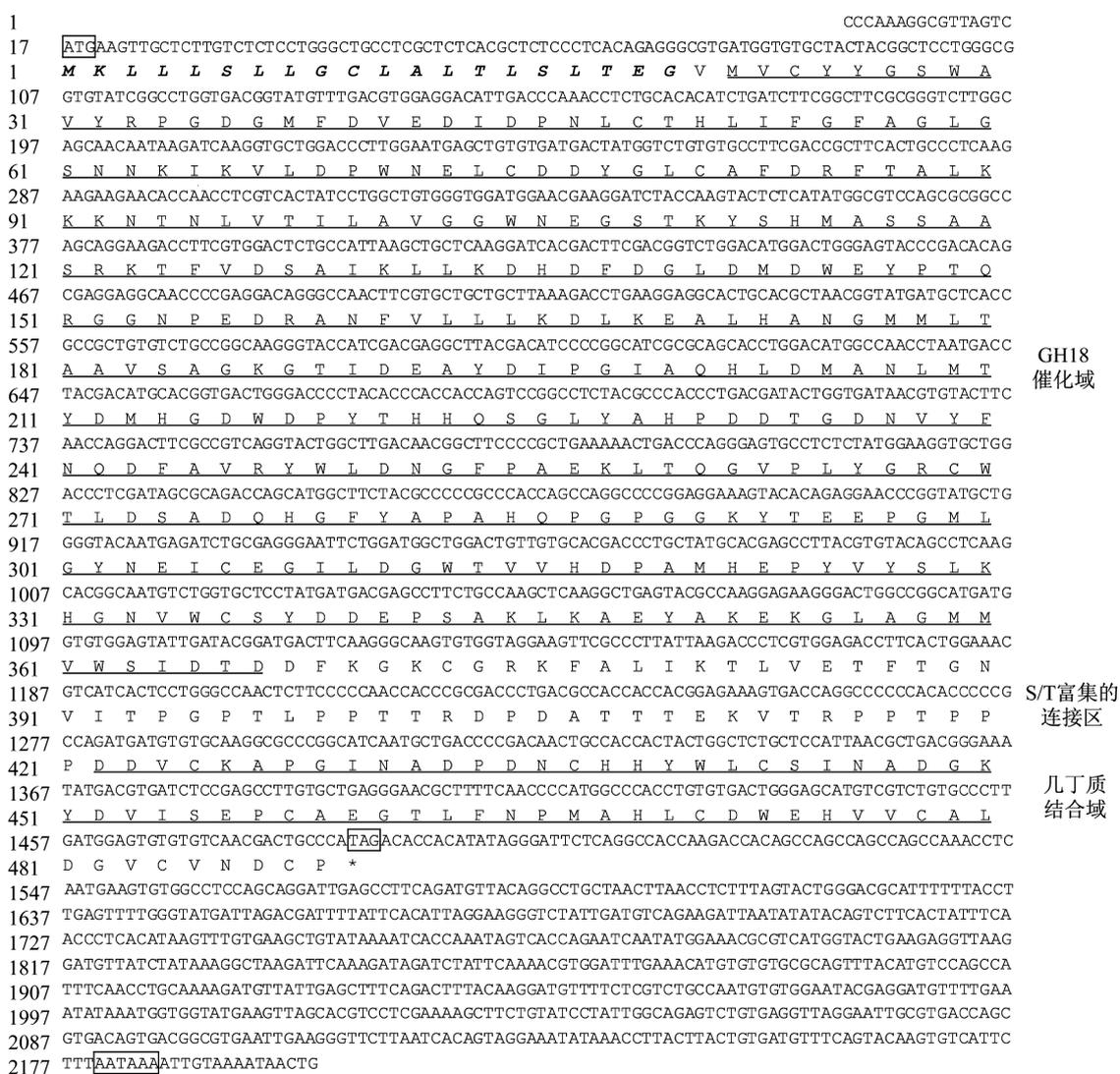


图 1 *PtChi* 基因 cDNA 全长及预测氨基酸序列

斜体加粗显示信号肽序列;下划线区域分别为 GH18 结构域与几丁质结合结构域;启动密码子、终止密码子及加尾信号以方框框出

Fig. 1 Full cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of *PtChi*

The signal peptide sequence is shown in bold italics; GH18 domain and chitin binding domain are underlined; promoter, terminator and polyadenylation signal are presented with a frame, respectively

本研究克隆的 *PtChi* 与锯缘青蟹、日本对虾、凡纳滨对虾、中国明对虾和斑节对虾的几丁质酶

3(Chi-3)氨基酸序列相似度最高(图 2)。这些物种的 Chi-3 氨基酸序列在几丁质结合结构域均含

有 6 个保守的半胱氨酸(图 2 中 * 号标示)和 4 个芳香族氨基酸残基(图 2 中下三角标示)。整体上,蟹类 Chi-3 与虾类 Chi-3 的氨基酸序列存在一定的差异(图 2 中虚线方框)。不同甲壳动物的 3 种几丁质酶(Chi-1、Chi-2 和 Chi-3)氨基酸序列对比结果显示,不同物种间的同种几丁质酶氨基酸

序列相似度也较高,相似度在 78%~97% (图 2)。尽管 Chi-1、Chi-2 和 Chi-3 的氨基酸序列在多个区域存在明显差异(图 2 下划虚线),但这 3 种几丁质酶 GH18 结构域中的催化活性位点(FDGLDLDWEYP)高度保守(图 2)。

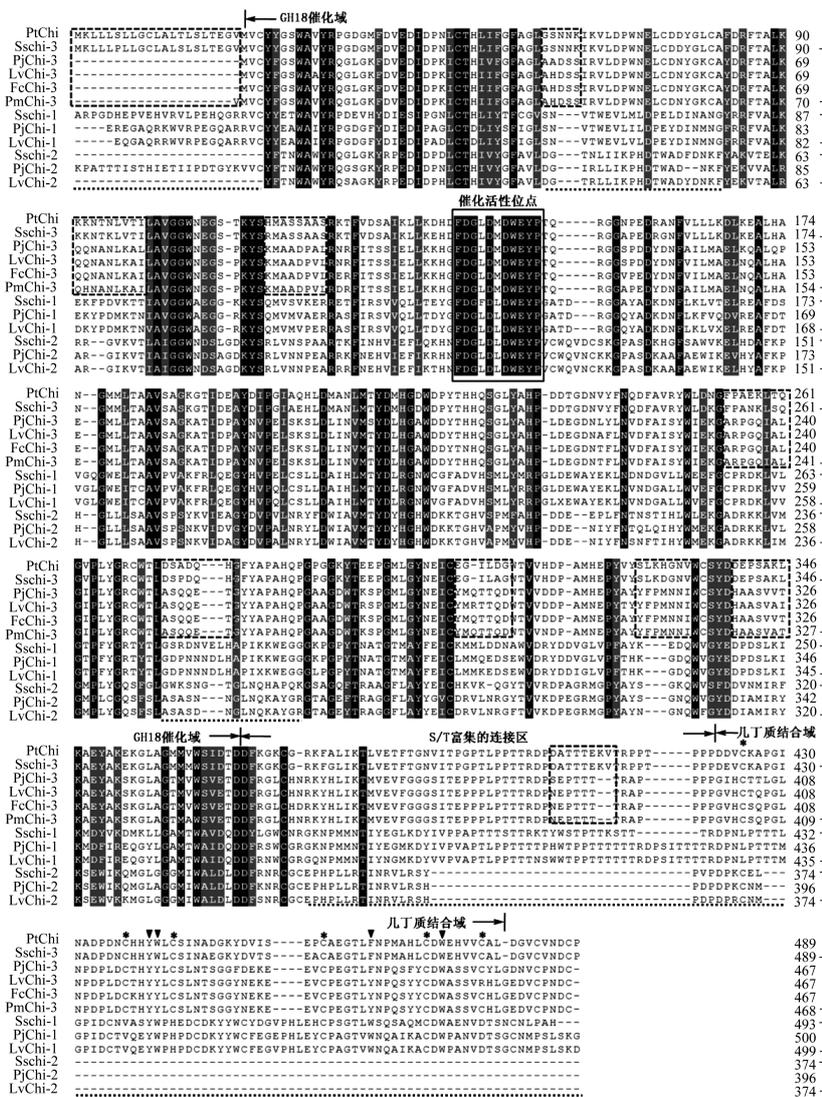


图 2 三疣梭子蟹与其他甲壳动物的 Chi 氨基酸序列比对

(1) 单向箭头指示各功能域分界,序列内实线方框表示催化活性位点,序列内虚线方框为蟹类 Chi-3 氨基酸序列存在差异的部分;(2) 下划虚线标示 3 种几丁质酶氨基酸序列主要存在差异的区域;“*”与“▼”分别标示几丁质结合结构域内的半胱氨酸和芳香族氨基酸位点;(3)PtChi 为三疣梭子蟹几丁质酶,SsChi 为锯缘青蟹几丁质酶,PjChi 为日本对虾几丁质酶,LvChi 凡纳滨对虾几丁质酶,FcChi 为中国明对虾几丁质酶,PmChi 为斑节对虾几丁质酶

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of Chi between *P. trituberculatus* and other crustacean species

(1) The boundaries among different domains are presented by one-way arrows, catalytic active site in the sequences are boxed with solid line, while the dotted boxes indicate the differences among crustacean Chi-3 sequences; (2) The major differences of amino acid sequences from three Chi groups are underlined with dotted line, cysteine and aromatic amino acid residues in chitin binding domain are marked by with “*” and “▼”, respectively; (3) PtChi means *P. trituberculatus* chitinase, SsChi means *S. serrata* chitinase, PjChi means *P. japonicus* chitinase, LvChi means *L. vannamei* chitinase, FcChi means *F. chinensis* chitinase, PmChi means *P. monodon* chitinase

预测蛋白质氨基酸多重序列比对 (BlastP) 结果显示, PtChi 与锯缘青蟹 Chi-3 的序列一致性最

高,为 96%,但与锯缘青蟹 Chi-1 和 Chi-2 的序列一致性仅为 37% 和 40%。PtChi 与虾类 Chi-3 的序列一致性均低于锯缘青蟹 Chi-3,但明显高于其他 2 种几丁质酶。如 PtChi 与日本对虾 Chi-3、Chi-1 和 Chi-2 的序列一致性分别为 61%、35% 和 40%;与凡纳滨对虾 Chi-3、Chi-1 和 Chi-2 的序列一致性分别为 61%、36% 和 41%。

基于 26 条甲壳动物几丁质酶氨基酸序列,通

过 MEGA 5.0 邻接法 (Neighbor-Joining) 构建进化树,结果表明 Chi-1、Chi-2 和 Chi-3 各自聚为一支。参与进化树构建的甲壳动物 Chi-4、Chi-5 和 Chi-6 在进化上与 Chi-3 更为接近,共同聚为一大支。PtChi 与锯缘青蟹 Chi-3 亲缘关系最近,聚为一支,虾类的 Chi-3 聚为另一支(图 3)。因此,本研究中克隆的三疣梭子蟹 Chi 基因建议命名为 PtChi-3。

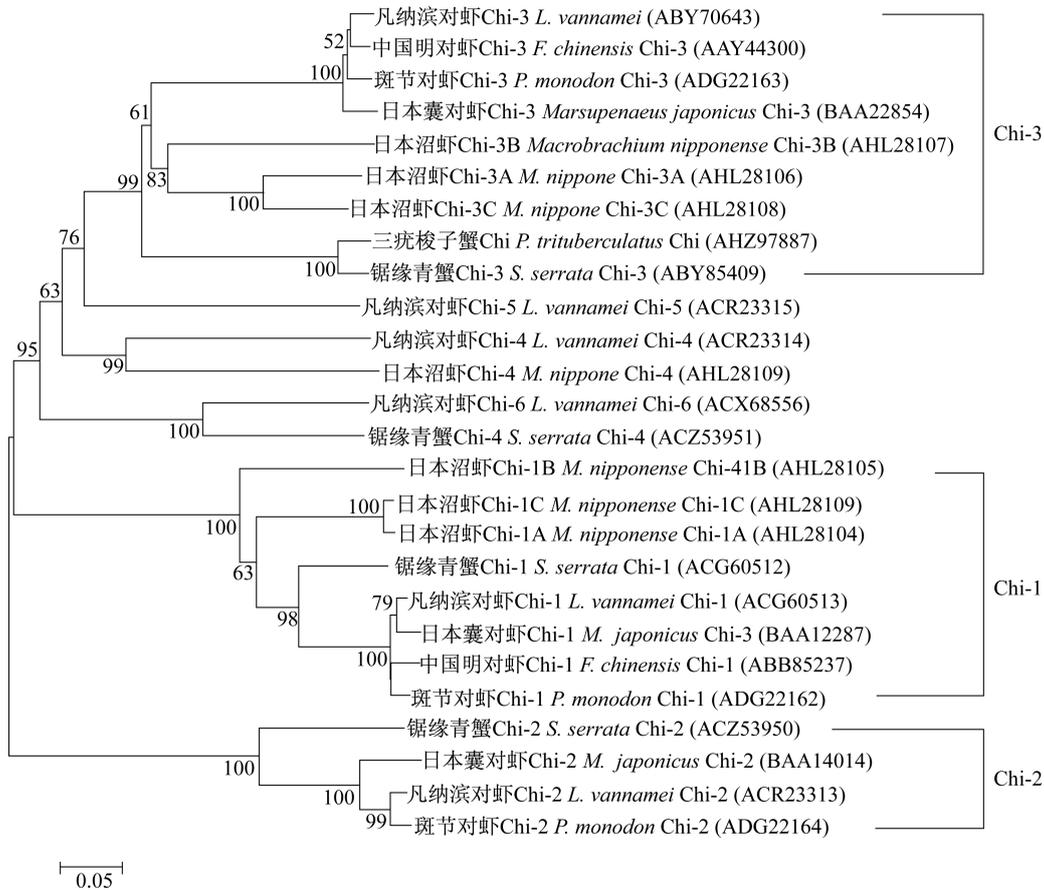


图 3 Chi 氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig. 3 The Neighbor-Joining phylogenetic tree for Chis

2.2 三疣梭子蟹蜕皮间期 PtChi 基因在不同组织中的表达情况

定量 PCR 结果显示, PtChi 在三疣梭子蟹蜕皮间期的多种组织中均有表达,且表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$, 图 4)。其中, PtChi 在肝胰腺中的表达水平显著高于其他 9 种组织,在胃、大颚器、心脏和眼柄中也有较高水平的表达,表达水平高低顺序依次为胃 > 大颚器 > 心脏 > 眼柄;整体上, PtChi 基因在肠、肌肉、鳃、胸神经节、Y 器官中的表达水平较低,且这些组织中的 PtChi-mRNA

相对表达量差异不显著(图 4)。

2.3 PtChi 在不同蜕皮阶段的基因表达情况

根据 PtChi-mRNA 在 C 期不同组织中的表达情况,对整个蜕皮周期中肝胰腺、肠、胃、大颚器 4 种组织内的 PtChi-mRNA 表达变化进行了研究。结果显示,不同蜕皮阶段上述 4 种组织中 PtChi-mRNA 的表达水平均变化显著 ($P < 0.05$),但变化模式有所不同(图 5)。肝胰腺中 PtChi-mRNA

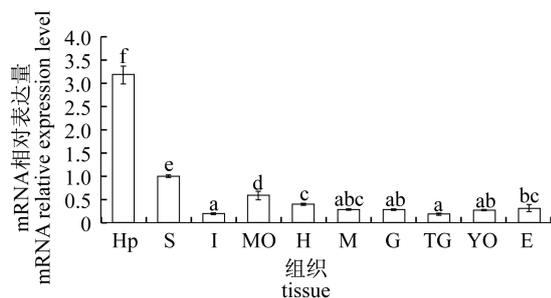


图4 蜕皮间期三疣梭子蟹各组织中 *PtChi*-mRNA 的表达差异分析

Hp. 肝胰腺; S. 胃; I. 肠道; MO. 大颚器; H. 心脏; M. 肌肉; G. 鳃; TG. 胸神经节; YO. Y 器官; E. 眼柄

柱形图上含有不同字母代表不同组织中的 *PtChi*-mRNA 相对表达量差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 4 Analysis of expression differences of *PtChi*-mRNA in various tissues of *P. trituberculatus* at intermolt period

Hp. hepatopancreas; S. stomach; I. intestine; MO. mandibular organ; H. heart; M. muscle; G. gill; TG. thoracic ganglia; YO. Y organ; E. eyestalk

Bars with different letters mean significant differences of *PtChi*-mRNA relative expression level in various tissues ($P < 0.05$), the same as below

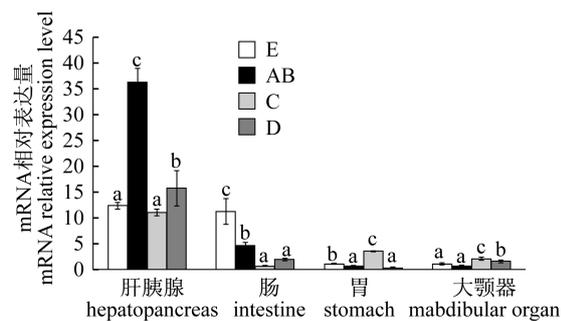


图5 不同蜕皮阶段三疣梭子蟹 4 种组织中 *PtChi*-mRNA 的表达差异分析

E. 蜕皮期; AB. 蜕皮后期; C. 蜕皮间期; D. 蜕皮前期

Fig. 5 Analysis of expression differences of *PtChi*-mRNA in four tissues of *P. trituberculatus* at different molting stages

E. ecdysis; AB. postmolt; C. intermolt; D. premolt

的相对表达水平在 AB 期最高,到 C 期显著下降, D 期又显著升高,但仍显著低于 AB 期, D 期基因表达水平仅为 AB 期的 42% 左右; 肠中 *PtChi*-mRNA 表达水平在 E 期最高,随后呈显著下降趋势,至 C 期达最低值, D 期略有上升,但与 C 期差异不显著; 胃和大颚器中 *PtChi*-mRNA 变化模式

基本一致,均是 C 期最高, AB 期较低,但两个组织中各期 *PtChi* 基因相对表达量大小顺序存在一定的差异,分别为 C 期 > E 期 > AB 期 > D 期和 C 期 > D 期 > E 期 > AB 期(图 5)。

3 讨论

3.1 *PtChi* 序列结构分析

本研究通过转录组测序和 RACE 技术,获得了 *PtChi* 基因的 cDNA 全长序列。序列分析结果表明, *PtChi* 预测氨基酸序列包含甲壳动物几丁质酶的 4 个典型结构域: 信号肽、GH18 催化结构域、S/T 富集的连接区和几丁质结合结构域。几丁质酶是一种分泌蛋白,信号肽通常在分泌蛋白的跨膜转移过程中发挥重要作用^[25]。GH18 催化结构域中的催化活性位点 (FDGLDLWEYP) 在不同甲壳动物几丁质酶间高度保守(图 2),其中谷氨酸(E)为催化活动提供质子^[26]; 第 3 个天冬氨酸(D)可作为正电过渡状态的稳定器^[27],或作为亲核基维持几丁质酶整体的活性^[28]; 而第 2 个天冬氨酸能够影响第 3 个天冬氨酸和谷氨酸的解离常数(pK 值)^[28]; 色氨酸(W)的疏水性对于保持催化状态下氨基酸的异常 pK 值,将其催化活性延伸到碱性范围十分关键^[29]。S/T 富集连接区不仅负责连接几丁质酶的各结构域,同时也可提供 O-糖基化位点,保护几丁质酶在消化系统和体液等富含蛋白酶的环境中不被裂解^[30]。几丁质结合结构域(CBD 结构域)则通过其内部高度保守的 4 个芳香族氨基酸残基(图 2 中下三角)与非可溶性几丁质结合,帮助几丁质酶对其进行降解; 而 *PtChi* CBD 结构域中的 6 个半胱氨酸能够形成 3 个内部二硫键,维持几丁质酶的结构稳定^[31]。

由于不同几丁质酶间存在差异,以上 4 个典型结构域的顺序和组成可作为几丁质酶的分类依据^[14]。以凡纳滨对虾的 6 种几丁质酶为例,从氨基酸的 N 端到 C 端, Chi-1 和 Chi-3 的结构域依次为信号肽、GH18 催化结构域、连接区和 CBD 结构域; Chi-2 的 CBD 结构域位于 GH18 催化结构域之前; Chi-4 在 C 端含有 2 个 CBD 结构域; Chi-5 N 端没有信号肽; 而 Chi-6 中目前只检测到了 GH18 催化结构域^[5]。虽然 Chi-1 和 Chi-3 的结构域模式相同,但 Chi-1 的 CBD 结构域中的芳香族氨基酸和半胱氨酸数目整体上比 Chi-3 要

多^[5]。根据本研究中 *PtChi* 推导氨基酸序列中各结构域的出现顺序及组成,推测 *PtChi* 属于 *Chi-3*,建议命名为 *PtChi-3*。

3.2 *PtChi* 的生理功能及其与蜕皮阶段的关系

几丁质酶是一个多基因家族,在甲壳动物蜕皮活动的调节、食物中几丁质的消化及病原体防御等方面起重要作用。目前甲壳动物中已发现了 6 种几丁质酶基因,研究较多的为 *Chi-1*、*Chi-2* 和 *Chi-3*^[5,12-13,15-16,25,32]。其中 *Chi-1* 和 *Chi-3* 主要在肝胰腺中表达,参与食物中几丁质和肠道围食膜的消化,*Chi-3* 还对病原体具有一定的免疫防御作用^[12,32]; *Chi-2* 主要在表皮中表达,眼柄等其他组织中也有分布,在肝胰腺中微量表达或者不表达,主要参与蜕皮过程中表皮内几丁质的分解重吸收^[15,33]。本研究中 *PtChi* 主要在蜕皮间期的肝胰腺中表达,胃中也有较高的表达水平,这与 *Chi-1* 和 *Chi-3* 的组织特异性相一致,结合 *PtChi* 的 Blast 与多重序列比较结果,初步推断 *PtChi* 应该属于 *Chi-3*。

不同蜕皮阶段,*PtChi* 基因在肝胰腺、胃、肠、大颚器中的表达水平变化显著,但各组织中的表达变化趋势不同。肝胰腺中 *PtChi* 基因的最高表达水平出现在 AB 期,这与南极磷虾 (*Euphausia superba*) 和斑节对虾中的研究结果类似,这些甲壳动物肝胰腺中几丁质酶活性及其基因表达水平均在蜕皮后期上升,但出现这种变化规律的原因不详^[16,34]。笔者分析认为这可能与几丁质酶在免疫防御方面的功能有关。以往研究表明,WSSV 感染能够刺激日本对虾和凡纳滨对虾肝胰腺中 *Chi-3* 基因的表达上调^[35-36]。而三疣梭子蟹在蜕皮后的 AB 期身体各部分柔软,缺乏外骨骼的保护,易受各种病原体的侵染,这可能是造成 *PtChi* 基因在 AB 期表达水平升高的原因,暗示 *PtChi* 在肝胰腺中可能具有一定的免疫防御作用;而在其他蜕皮阶段维持一定的基因表达水平可能与食物中几丁质的消化有关。肠道中 *PtChi* 基因的表达水平变化可能与蜕皮过程中肠道围食膜的消化分解有关。肠道围食膜是节肢动物中肠分泌的非细胞结构,富含几丁质,能够保护中肠不受粗糙食物颗粒和病原体的侵害^[37]。由于甲壳动物蜕皮过程中需要对围食膜进行分解,因此肠道中 *PtChi* 在 E 期 mRNA 表达水平最高,在围食膜完成重新构建的 C 期和 D 期表达水平最低;

在蜕皮后的 AB 期,肠道缺少围食膜的保护,此阶段 *PtChi* 维持在较高水平,参与肠道中的免疫活动。胃中 *PtChi*-mRNA 的最高表达量出现在 C 期,揭示 *PtChi* 在胃中主要参与食物中几丁质的消化。大颚器中 *PtChi* 的整体表达水平较低,但在 C 期和 D 期的表达水平显著升高,其变化原因尚不清楚。

本研究克隆了 *PtChi* 基因的 cDNA 全长,根据其生物学和信息学分析及其在蜕皮过程中表达变化情况,推测该基因属于甲壳动物 *Chi-3*,主要参与免疫调节、食物中几丁质的消化和肠道围食膜的分解等。但由于缺乏相关的功能验证,*PtChi* 的准确生理功能还需要通过构建重组蛋白^[1]、进行攻毒实验^[35]以及 RNAi^[38]等技术手段进行验证,进而深入研究 *PtChi* 基因在三疣梭子蟹蜕皮过程中的确切生理功能及调控机制。

参考文献:

- [1] Proespraiwong P, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2010, 156 (2): 86-96.
- [2] Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(3): 203-226.
- [3] Spindler B M, van Wormhoudt A, Spindler K D. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle [J]. Marine Biology, 1990, 106(1): 49-52.
- [4] Kono M, Wilder M N, Matsui T, et al. Chitinolytic enzyme activities in the hepatopancreas, tail fan and hemolymph of kuruma prawn *Penaeus japonicus* during the molt cycle [J]. Fisheries Science, 1995, 61 (4): 727-728.
- [5] Huang Q S, Yan J H, Tang J Y, et al. Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 75-81.
- [6] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 1998, 27(11): 887-900.
- [7] Duo C L. Review of fungal chitinases [J].

- Mycopathologia,2006,161(6):345-360.
- [8] Mali B, Möhrlen F, Frohme M, *et al.* A putative double role of a chitinase in a cnidarian: pattern formation and immunity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*,2004,28(10):973-981.
- [9] Dahiya N, Tewari R, Hoondal G S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2006,71(6):773-782.
- [10] Zhu Q S, Deng Y P, Vanka P, *et al.* Computational identification of novel chitinase-like proteins in the *Drosophila melanogaster* genome [J]. *Bioinformatics*,2004,20(2):161-169.
- [11] Zhu Q S, Arakane Y, Banerjee D, *et al.* Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,2008,38(4):452-466.
- [12] Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*,1998,1382(2):181-185.
- [13] Zhang J Q, Sun Y Y, Li F H, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of chitinase (Fcchi-3) from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Molecular Biology Reports*,2010,37(4):1913-1921.
- [14] Lü L, Ning Q J. Advances in crustaceans chitinase gene structure and function research [J]. *Progress in Physiological Sciences*,2011,42(6):457-459. [吕黎, 宁黔冀. 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*,2011,42(6):457-459.]
- [15] Watanabe T, Kono M. Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Zoological Science*,1997,14(1):65-68.
- [16] Tan S H, Degnan B M, Lehnert S A. The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle [J]. *Marine Biotechnology*,2000,2(2):126-135.
- [17] Rocha J, Garcia C F L, Muhlia A A, *et al.* Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molting cycle [J]. *Aquaculture*,2012,330-333:111-115.
- [18] Bowser P R, Rosemark R. Mortalities of cultured lobsters, *Homarus*, associated with a molt death syndrome [J]. *Aquaculture*,1981,23(1-4):11-18.
- [19] Lu Y L, Wang F, Zhang Z Y, *et al.* Effects of salinity on growth, molt and energy utilization of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*,2012,19(2):237-245. [路允良, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕壳及能量利用的影响. *中国水产科学*,2012,19(2):237-245.]
- [20] Suprayudi M A, Takeuchi T, Hamasaki K. Effects of Artemia enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of molting failure in megalop larvae of the mud crab *Scylla serrata* [J]. *Fisheries Science*,2004,70(4):650-658.
- [21] Dan S, Hamasaki K. Effects of salinity and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival, development, and morphogenesis of the larvae of laboratory-reared mud crab *Scylla serrata* (Decapoda, Portunidae) [J]. *Aquaculture International*,2011,19(2):323-338.
- [22] Wang W, Wu X G, Lou B, *et al.* Cloning of retinoid X receptor (RXR) and its expression analysis during molting in *Portunus trituberculatus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*,2014,45(5):1105-1114. [王伟, 吴旭干, 楼宝, 等. 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) RXR 基因克隆及其在蜕皮过程中的表达分析. *海洋与湖沼*,2014,45(5):1105-1114.]
- [23] Shen J, Zhu D F, Hu Z H, *et al.* Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*,2011,35(10):1481-1487. [沈洁, 朱冬发, 胡泽辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. *水产学报*,2011,35(10):1481-1487.]
- [24] Yang F, Xu H T, Dai Z M, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*,2005,142(4):456-464.
- [25] Zhang S Y, Jiang S F, Xiong Y W, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*,2014,167(1):30-40.

- [26] Tews I, van Scheltinga A C T, Perrakis A, *et al.* Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(34): 7954 – 7959.
- [27] Synstad B, Gaseidnes S, van Aalten D M F, *et al.* Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(2): 253 – 362.
- [28] Lu Y, Zen K C, Muthukrishnan S, *et al.* Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(11): 1369 – 1382.
- [29] Zhang H, Huang X, Fukamizo T, *et al.* Site-directed mutagenesis and functional analysis of an active site tryptophan of insect chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(11): 1477 – 1488.
- [30] Arakane Y, Zhu Q, Matsumiya M, *et al.* Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(6): 631 – 648.
- [31] Tjoelker L W, Gosting L, Frey S, *et al.* Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(1): 514 – 520.
- [32] Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Isolation of cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(4): 299 – 303.
- [33] Proespraiwong P, Tassanakajona A, Rimphanitchayakit V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biol*, 2010, 156(2): 86 – 96.
- [34] Buchholz F. Moulting cycle and seasonal activities of chitinolytic enzymes in the integument and digestive tract of the Antarctic krill, *Euphausia superba* [J]. *Polar Biology*, 1989, 9(5): 311 – 317.
- [35] Pan D, He N, Yang Z, *et al.* Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29(2): 103 – 112.
- [36] Zhang Z Y, Yin Z X, Wang S P, *et al.* Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus – resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 520 – 534.
- [37] Wang L Y, Li F H, Wang B *et al.* Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(6): 1285 – 1291.
- [38] Zhu Q S, Arakane Y, Beeman R W, *et al.* Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(18): 6650 – 6655.

Cloning of chitinase and its expression analysis during molting in *Portunus trituberculatus*

WANG Wei^{1,3}, WU Xugan¹, PAN Guiping², HOU Wenjie², CHENG Yongxu^{1,4*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,
Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China;

3. Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China;

4. Aquatic Animal Breeding Center of Shanghai University Knowledge Service Platform,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The swimming crab, *Portunus trituberculatus* is a commercially important mariculture species distributed in east coast regions of China, Japan and Korea. Its high nutritional value and increasing market demands have promoted the quick development of pond-culture in east coastal waters of China since the 1990 s. However, the molting death syndrome (MDS) and other disease problems are two limiting factors for the sustainable development of this crab aquaculture. Chitinase has been reported to participate in the molting regulation and immune defence for crustacean species, and the further study of crustacean chitinase will not only enhance our understanding for the mechanism of molting activities, but also provide valuable information for the control of MDS in the aquaculture of *P. trituberculatus*. Unfortunately, to date, no available information could be found on the chitinase of *P. trituberculatus*. The present study was therefore conducted to clone full length cDNA of a chitinase (Genbank accession number: KF914663) for *P. trituberculatus* by transcriptome sequencing and RACE (rapid amplification of cDNA ends). Relative gene expression levels of *PtChi* (*P. trituberculatus Chi*) gene in various tissues were then detected by qRT-PCR (quantitative real-time PCR) during the molting cycle. The results showed that: (1) The full length of *PtChi* cDNA was 2 200 bp, including a 1 470 bp ORF (open reading frame) which encoded 489 amino acid residues, a 16 bp 5'-UTR and a 714 bp 3'-UTR, while its calculated molecular weight and isoelectric point were 53.97 ku and 4.76, respectively. (2) Homologous analysis using Blastp showed that the predicted amino acid sequence of *PtChi* shared 61% – 96% identity with the type of Chi-3 of other crustaceans, and *PtChi* was clustered with crustaceans Chi-3s in phylogenetic tree. (3) *PtChi* had the highest gene expression levels in hepatopancreas, then decreased in the order of stomach > mandibular organ > heart > eyestalk, while the lowest expression levels were found in other tissues. (4) The gene expression patterns of *PtChi* were different among tissues during the molting cycle. *PtChi*-mRNA had the highest expression level at AB stage and the lowest expression level at C stage in hepatopancreas, which suggested *PtChi* may participate in the immunity and pathogen defense after ecdysis. In intestine, the highest *PtChi*-mRNA expression level was found at E stage while the lowest level was detected at C stage. Therefore, it was deduced that intestinal *PtChi* was involved in the degradation of endogenous chitin in gut peritrophic membrane and the participation in immune functions. In addition, the peak value of *PtChi*-mRNA expression level in stomach was found at C stage, due probably to the digestion of food chitin during this stage. These results indicated that *PtChi* may belong to the type of *Chi-3* in crustacean family, and may be involved in the molting process, food digestion and immunity of *P. trituberculatus*. However, its exactly biological function requires further studies.

Key words: *Portunus trituberculatus*; chitinase; gene cloning; expression analysis; molting

Corresponding author: Cheng Yongxu, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn