

凡纳滨对虾 C-型凝集素基因的原核表达与免疫作用

于金红, 潘鲁青*, 张 辉

(中国海洋大学水产学院,海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要:为研究凡纳滨对虾 C-型凝集素的免疫功能,实验利用原核表达系统对凡纳滨对虾 C-型凝集素基因的开放阅读框进行了重组表达,并通过纯化分离获得重组目的蛋白,采用血细胞悬浮培养的方法,研究了重组 C-型凝集素对凡纳滨对虾血细胞免疫作用的影响。实验梯度设置为对照组和重组 C-型凝集素蛋白(1.0 mg/mL),分别在 0、3、6、9、12、24 h 取培养的血细胞和培养液进行免疫相关指标的测定。结果表明,重组 C-型凝集素经 SDS-PAGE 分析显示在 39 ku 处有显著诱导条带,与预测的分子量大小基本一致,Western-blotting 分析可以与 anti-His 抗体特异性结合,从而证明 C-型凝集素重组蛋白在大肠杆菌中成功表达。重组 C-型凝集素对大肠杆菌具有明显的凝集作用,对凡纳滨对虾血细胞数量、存活率和吞噬率影响显著;培养基酚氧化酶活力在培养 3~12 h 内呈峰值变化,于 9 h 时达到最大值。研究表明,C-型凝集素不仅具有凝集作用,而且还能激活酚氧化酶原系统,具有重要的免疫防御作用。

关键词:凡纳滨对虾; C-型凝集素; 原核表达; 免疫作用

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

甲壳动物的免疫机制以非特异性免疫为主,由存在于血细胞以及从血细胞释放到血淋巴中的免疫活性因子组成^[1],其中凝集素作为可与糖专一性结合并能促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白,在免疫识别和防御系统中起着重要的作用^[2-4]。根据结构和功能,甲壳动物凝集素分为 Calnexin、C-、L-、P-、I-、R-和 S-型凝集素等^[5],其中 C-型凝集素家族是目前研究最多的一类凝集素,主要特征是在蛋白质分子的 C 末端含有糖识别的结构域 CRD,具有保守特征性功能域,其凝集活性具有钙离子依赖性^[6-7],同时作为一种模式识别受体,C-型凝集素在病原菌入侵过程中参与“非己”识别,并能激活一系列免疫防御反应^[8-9]。已有研究表明甲壳动物 C-型凝集素可参与病原的清除过程,还可激活酚氧化酶原系统,通过多种方式参与免疫防御反应^[10-14]。

目前,白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)^[15]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[16]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[17-18]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[19]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[20]等甲壳动物的 C-型凝集素基因已被克隆,并通过重组表达的方式获得 C-型凝集素蛋白,发现重组 C-型凝集素对病原菌具有明显凝集作用,但是目前有关甲壳动物凝集素免疫功能的研究甚少,其免疫防御机制尚不明确。本实验将凡纳滨对虾 C-型凝集素(C-type lectin)基因 cDNA 序列(GenBank 注册号:EF583939.1)在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行了的原核表达,全面检测了重组表达产物的凝集活性,并研究了重组 C-型凝集素对对虾血细胞的免疫作用,探讨了对虾凝集素的免疫防御功能,为甲壳动物凝集素免疫功能研究提供了科学依据。

收稿日期:2013-01-31 修回日期:2013-04-07

资助项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0597)

通信作者:潘鲁青,E-mail:panlq@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾购于青岛市崂山对虾养殖场,体长为 (8.2 ± 0.5) cm,体色正常,健康活泼。表达载体 pET-32a 为本研究室保存;琼脂糖凝胶回收试剂盒和低分子量预染蛋白 Marker 均为 TaKaRa 公司产品;质粒提取试剂盒、Anti-His 抗体(一抗)、羊抗鼠 IgG-HRP(二抗)和 Pro-light HRP 化学发光检测试剂均为天根公司产品;His GraviTrap Ni 亲和层析柱和超滤离心管(10 ku)分别购自美国 GE、Millipore 公司。

1.2 实验方法

凡纳滨对虾 C-型凝集素基因的原核表达

(1) 基因的 RT-PCR 扩增

根据凡纳滨对虾 C-type lectin 基因 cDNA 序列(GenBank 注册号:EF583939.1)的开放阅读框和表达载体 pET-32a(+)的多克隆位点的序列设计 1 对特异性引物。

上游引物 *Lv-Lec-F*:5'-CGGGATCCATGAA-GTTCCTAGCGCCG-3'

下游引物 *Lv-Lec-R*:5'-CGCTCGAGTATAT-TTCTTGAGGCAAAT-3',其中在上游和下游引物 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线标出)。

(2) 目的片段的扩增与回收

抽取健康凡纳滨对虾抗凝血淋巴,于 4℃、800 × g 离心,取沉淀的血细胞提取总 RNA,反转录合成 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:超纯水 16 μL,10 × buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL,dNTP 2 μL,上下游引物各 1 μL,模板 2 μL,*rTaq* 0.5 μL。PCR 扩增产物以 1.0% 琼脂糖电泳检测分离,回收目的条带。扩增后的 *LvLec* 片段连接到克隆载体 pMD18-T 中测序。

(3) 重组质粒 p32a-LvLec 的构建与鉴定

将含有 *LvLec* 片段的质粒 pMD-LvLec 和表达质粒 pET-32a(+)大量培养后用质粒提取试剂盒制备质粒,分别用 *Xho* I 和 *Bam*H I 进行双酶切,得到的目的片段切胶回收,在 T4 DNA 连接酶作用下将 *LvLec* 片段与线性 pET-32a(+)载体连接,构建重组质粒 p32a-LvLec,转化 DH5α 后,利用含 Kan 抗性平板筛选阳性克隆进行菌落 PCR、双酶切和测序验证,以确定开放阅

读框编码正确。

(4) *LvLec* 基因的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

提取测序正确的重组质粒 p32a-LvLec 重新转化 BL21(DE3)感受态细胞,构建重组菌株 BL21/p32a-LvLec,挑取转化平板上的单克隆接种于 LB 液体培养基(含 Kan 50 μg/mL)中 37℃ 震荡培养过夜,然后 1:100 扩培至 OD₆₀₀ 值约为 0.6,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,低温诱导过夜,以不加诱导剂 IPTG 的菌株作为阴性对照。然后在室温下以 4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,重新悬浮在裂解液中(20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA;pH 8.0),在冰浴中超声波破碎后,于 4℃、10 000 r/min 离心 20 min,取上清液得到可溶性蛋白。按照分子克隆常规方法进行 SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

(5) Western-blotting 检测

阳性菌株表达产物经过 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)。电转移完成后,将 NC 膜于 5% 牛奶中封闭 1 h,加 anti-His 抗体(一抗)室温孵育 1~2 h,用 TBST 洗脱 3 次(每次 10 min),再加入用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(二抗)的溶液中,室温孵育 1~2 h,再用 TBST 洗脱 3 次。Pro-light HRP 化学发光检测试剂显色,反应在室温黑暗中进行,经显影和定影后照像。

(6) His 标签纯化

使用 His 标签镍离子亲和层析柱进行蛋白质纯化。先用 10 mL 结合缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4 ,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑;pH 7.4)平衡柱子,然后加入含可溶性蛋白的溶液 10 mL,再用 10 mL 结合缓冲液洗涤,最后加 3 mL 洗脱缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4 ,500 mmol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑;pH 7.4)洗脱,收集洗脱液,添加 4 mL 洗脱液于 Amicon Ultra 的过滤装置中,将内管套入外管,对称放置离心管,14 000 r/min 离心(离心 10 min 浓缩 4 倍)。离心结束后,将内管倒置套在另一个干净的离心管内,3 880 r/min 离心 10 min 收集浓缩后的样品。或者用移液器直接吸出内管中的样品。即得到纯化的目的蛋白。以小牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,按照 Bradford 方法进行蛋白含量测定^[21]。

重组 C-型凝集素免疫活性的测定

(1) 凝集活性的测定

分别在小鼠眼球和兔子耳朵处抽取血液,制成 2% 红细胞悬浮液,参照戴聪杰等^[22]和 Luo 等^[19]的方法,进行血细胞凝集实验。取 96 孔 V 型微量血凝板,每孔分别加入 25 μL TBS- Ca^{2+} (0.14 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.01 mol/L CaCl_2 ; pH 7.4) 溶液,在第一孔中加入 25 μL 重组 C-型凝集素样品,混匀后吸取 25 μL 第一孔中混合液加入第二孔,以此类推倍比稀释,然后在每孔中加入 25 μL 小鼠或兔红细胞悬液,室温孵育 1~2 h,观察红细胞的凝集状态,检测重组 C-型凝集素的凝集活性。如果红细胞不发生凝集,则红细胞沉于孔底形成一界限清晰的红色小点,若发生凝集则红细胞之间形成似网络状扩散的红斑块。以能产生凝集的最大稀释度的倒数作为重组 C-型凝集素的效价。

凝菌实验参照 Yu 等^[11]、Wang 等^[23]和 Zhang 等^[24]的方法,并略作改进。选择革兰氏阴性细菌:大肠杆菌、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*),革兰氏阳性细菌:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 进行凝菌实验。首先用 TBS- Ca^{2+} (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2 ; pH 7.5) 调节细菌终浓度约为 2.5×10^8 个/mL,然后用 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 与 TBS- Ca^{2+} 菌悬液室温孵育染菌。取 10 μL 上述细菌悬液,加入 25 μL 0.91 mg/mL 重组 C-型凝集素,室温孵育 1 h 后,以 BSA 为空白对照,在荧光显微镜下观察细菌的凝集状态。

(2) 免疫作用的测定

选取活力好的凡纳滨对虾,用含有双抗 (1 000 U/mL 青霉素、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素) 的无菌海水暂养 2 d。取凡纳滨对虾用 75% 的酒精棉球消毒体表,用预先吸入已消毒的预冷抗凝剂 (0.45 mol/L NaCl, 0.01 mol/L KCl, 0.01 mol/L EDTA 二钠, 0.01 mol/L HEPES; pH 7.0, 渗透压为 750 mOsm/kg) 的无菌注射器,按 1:1 的比例于头胸甲后缘处心脏内抽取血淋巴,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、300 $\times \text{g}$ 离心 10 min,弃上清液,取沉淀的血细胞,加入本实验室筛选的对虾血细胞免疫活性保存液体培养基 (60% 的 2 $\times$ L-15 培养基,20% 胎牛血清,

20% 的对虾肌肉提取液,青霉素钠 100 IU/mL,硫酸链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$; pH 7.0) 调节血细胞密度为 $5.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/mL。

重组 C-型凝集素对血细胞免疫作用实验梯度设置依据 Yu 等^[11]和 Wang 等^[14]的研究结果,分为对照组、实验组 (1 mg/mL 重组 C-型凝集素),2 个实验梯度均设 3 个平行组。取上述血细胞接种于 5 mL 圆底离心管,每管 400 μL ,加入重组凝集素 (终浓度为 1 mg/mL),在 CO_2 培养箱中 25 $^{\circ}\text{C}$ 密闭培养,取样时间为 0、3、6、12、24 h。按照潘鲁青等^[25]的方法,分别取血细胞培养液测定血细胞数量和吞噬率,将剩余培养液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、300 $\times \text{g}$ 离心 10 min,取上清液,测定培养液的酚氧化酶、抗菌和溶菌活力,其中酚氧化酶活力测定,以 L-DOPA 为底物,参照 Ashida^[26]的方法进行;分别以副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 菌悬液、溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干粉为底物,采用岳峰等^[27]的方法,测定抗菌和溶菌活力。

(3) 数据处理与分析

所有实验数据均以 3 个平行组数据的平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示,并采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 检验法统计分析。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾 C-型凝集素基因原核表达

重组质粒 p32a-LvLec 的构建与验证 对重组质粒 p32a-LvLec 进行菌落 PCR 检验,得到大小约为 718 bp 的片段 (目的基因开放性阅读框长为 471 bp, pET-32a(+) 载体通用引物 T7 与 T7 ter 扩增载体片段长为 247 bp),送样测序证明开放阅读框连接正确 (图 1-a)。重组质粒 p32a-LvLec 双酶切得到大小约为 5 857 bp 和 471 bp 的片段,大片段为 pET-32a 载体酶切后的大小,小片段与基因 LvLec ORF 大小一致 (图 1-b)。菌落 PCR、双酶切和测序验证表明,目的基因与表达载体连接成功,可进行后续实验。

LvLec 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析 BL21/p32a-LvLec 重组菌株诱导后,12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析显示在 39 ku 处出现明显的条带,与预测大小 (38.988 ku) 基本一致,而未加 IPTG 诱导的对照培养物中没有目标条带,说明目的基因实现了在 *E. coli* 中的表达 (图 2)。

Western-blotting 检测 纯化后的重组蛋白可以特异性地与 anti-His 抗体识别,在 39 ku 处有明显的特异性单一条带,与预期大小一致,表明该位置蛋白即是带有 His 标签的重组蛋白,从而证明 C-型凝集素重组蛋白在大肠杆菌中成功表达(图 3)。用 Bradford 法^[21]分析,其中洗脱液的蛋白含量 0.478 992 mg/mL,纯化的目的蛋白含量 0.913 165 mg/mL,超滤离心管浓缩倍数近 2 倍。

2.2 重组 C-型凝集素免疫活性的检测结果

重组 C-型凝集素对小鼠、兔红细胞和细菌的凝集活性 重组 C-型凝集素对小鼠和兔的红细胞没有明显的凝集作用(图 4),而对所选 5 种细菌的凝集作用存在差异,其中对大肠杆菌具有明显的凝集作用(图 5),而对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌和金黄色葡萄球菌均无凝集现象。

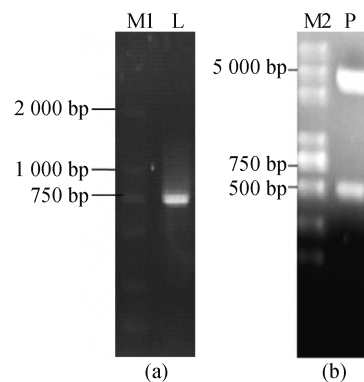


图 1 重组质粒的菌落 PCR 及限制性酶切验证

M1. DNA Marker DL2000; L. 重组质粒 p32a-LvLec 菌落 PCR 检测; M2. DNA Marker DL10000; P. 重组质粒 p32a-LvLec 双酶切。

Fig. 1 PCR analysis of recombinant plasmid in *E. coli* DH5 α

M1. DNA Marker DL2000; L. PCR analysis of recombinant plasmid p32 a-LvLec in *E. coli* DH5 α ; M2. DNA Marker DL10000; P. p32a-LvLec digested with BamHI/XhoI

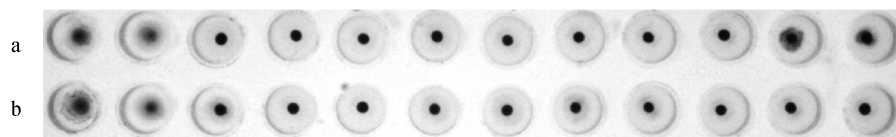


图 4 重组 C-型凝集素对小鼠和兔红细胞的凝集作用

a. 小鼠红细胞; b. 兔红细胞。

Fig. 4 The haemagglutination activity on erythrocyte of mice and rabbit induced by recombinant C-type lectin

a. mice; b. rabbit.

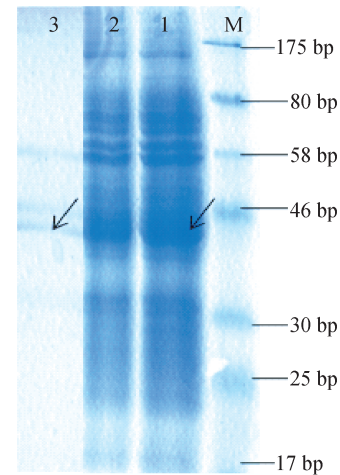


图 2 表达产物的 SDS-PAGE

M - Protein Marker; M. 预染蛋白; 1. 加 IPTG 诱导的 BL21/p32a-LvLec 菌株; 2. 未加 IPTG 诱导的 BL21/p32a-LvLec 菌株; 3. 纯化蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression products

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant LvLec expressed in *E. coli* BL21 (DE3)-LvLec. Lane M: prestained protein Marker. Lane 1. pET-32a-LvLec in BL21, non-induced. Lane 2. pET-32a-LvLec in BL21, IPTG-induced for 4 h. 3. the recombinant C-type lectin. The recombinant protein is indicated by arrowhead.

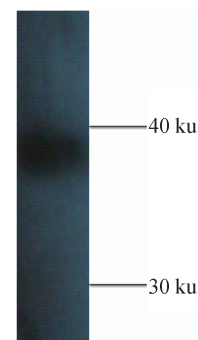


图 3 重组表达产物的 Western-blotting 分析

Fig. 3 Western-blotting analysis of the expression product

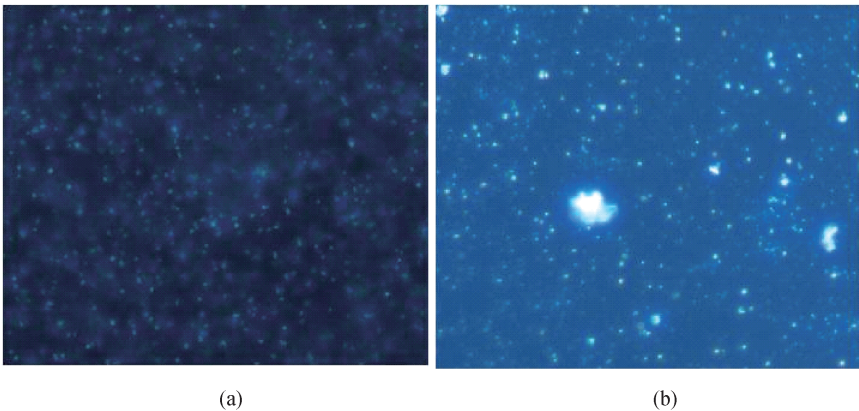


图 5 重组 C-型凝集素对革兰氏阴性菌大肠杆菌的凝集作用

a. 牛血清白蛋白(1 mg/L); b. 重组 C-型凝集素(8 mg/mL)。

Fig. 5 The agglutination of Gram-negative bacteria *E. coli* induced by recombinant C-type lectin

a. BSA(1 mg/L); b. Recombinant C-type lectin(8 mg/mL).

重组 C-型凝集素对凡纳滨对虾血细胞的免疫作用 重组 C-型凝集素对凡纳滨对虾血细胞数量、存活率和吞噬率影响显著 ($P < 0.05$),随着培养时间的延长,对照组血细胞数量、存活率和吞噬率在 3 h 内呈下降趋势,3 h 后保持稳定,而重组 C-型凝集素处理组在 9 h 内逐渐下降,然后趋于稳定,并且对照组血细胞数量、存活率和吞噬率分别高于或低于重组 C-型凝集素处理组(图 6)。

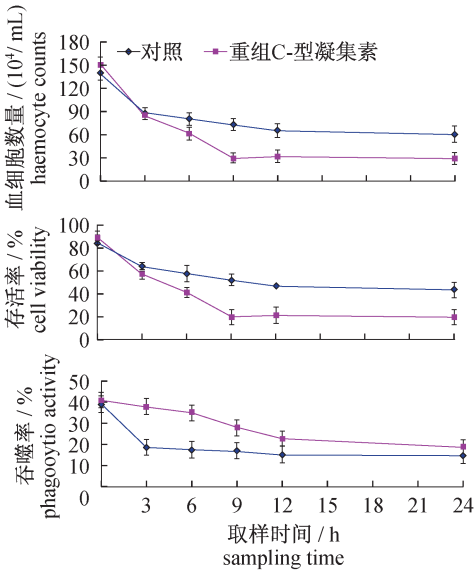


图 6 重组 C-型凝集素对凡纳滨对虾血细胞数量、存活率和吞噬率的影响

Fig. 6 Effect of recombinant C-type lectin on the haemocyte count, cell viability and phagocytic activity of *L. vannamei*

重组 C-型凝集素对凡纳滨对虾血细胞培养基酚氧化酶活力具有显著影响 ($P < 0.05$),而对抗菌、溶菌活力影响不显著 ($P > 0.05$)。在培养 3 ~ 12 h 内培养基酚氧化酶活力呈峰值变化,于 9 h 时达到最大值,然后保持稳定,且与对照组无明显差异(图 7)。

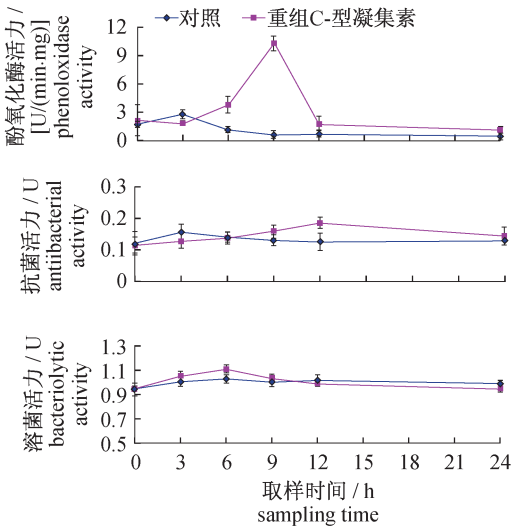


图 7 重组 C-型凝集素对凡纳滨对虾血细胞胞吐酚氧化酶、抗菌和溶菌活力的影响

Fig. 7 Effect of recombinant C-type lectin on the extracellular phenoloxidase activity, antibacterial activity and bacteriolytic activity of *L. vannamei*

3 讨论

在外源蛋白原核表达系统中,选择合适的表达载体、宿主菌株和诱导表达条件至关重要,同时

为了便于纯化表达蛋白,必须能获得大量的可溶性蛋白。pET 系统是在大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白的最强大系统,最初由 Studier 等^[28]设计的 T7 启动子驱动的表达系统,可以由各种基因生产大量的目的蛋白。实验选择 pET-32a(+) 作为原核表达载体,以 BL21(DE3)蛋白酶缺陷型大肠杆菌为宿主菌,构建了重组菌株 BL21/p32a-LvLec,采用 18℃ 诱导 24 h 的条件,实现了 C-型凝集素基因在宿主菌中的表达,并通过 Western-blotting 免疫杂交,进一步验证了 C-型凝集素基因的成功表达。

许多学者通过原核表达的方式获取 C-型凝集素蛋白并研究其凝集效应,Zhang 等^[24]研究表明凡纳滨对虾重组 C-型凝集素对人类、鸡红细胞均无显著的凝集现象;Chai 等^[29]研究发现棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)重组凝集素蛋白在 Ca^{2+} 存在的条件下可凝集兔的红细胞,没有 Ca^{2+} 则不发生凝集。据 Wang 等^[23]报道栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)rCFLec-1 可以结合革兰氏阴性菌大肠杆菌,但对阴性菌鳃弧菌无明显的凝集现象;Yu 等^[30]研究显示从烟草天蛾(*Manduca sexta*)获取的 Immulectin-3 对大肠杆菌具有凝集作用,而不能凝集革兰氏阳性菌 *Staphylococcus aureus*。实验表明凡纳滨对虾重组 C-型凝集素对兔、小鼠的血细胞均无凝集现象,但可以凝集大肠杆菌,而对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌和金黄色葡萄球菌未表现出凝集活性。这说明重组凝集素对哺乳动物血细胞无凝集作用,但在一定条件下可表现出凝集效应,而对不同细菌的凝集作用存在差异。另据梁青龙等^[31]报道凡纳滨对虾血清凝集素对家兔、小鼠、鸡血细胞均有凝集作用,对家兔凝集作用最强(凝集效价为 2^{12});而对大肠杆菌凝集活性较低,对金黄色葡萄球菌无凝集作用。由此认为甲壳动物血清凝集素与重组表达凝集素对哺乳动物血细胞的凝集活性不同,可能是因为重组 C-型凝集素与血清凝集素蛋白空间构象等存在差异,这主要与凝集素 Ca^{2+} 结合位点的激活有关;同时由于凝集素能识别特定的糖基配体,而病原菌细胞壁多糖作为配体可与特定的凝集素碳水结合区域相耦合,因此甲壳动物凝集素对不同细菌的凝集具有一定的选择性。

已有研究表明无脊椎动物的凝集素激活酚氧化酶激活系统类似于甘露糖结合蛋白(MBP)激活

补体系统,甘露糖结合蛋白是来自胶原凝集素家族的 C-型凝集素^[32-33],作为模式识别分子参与宿主防御,MBP 通过与 MBP 相关的丝氨酸蛋白酶(类丝氨酸蛋白 C1r/C1s)激活补体系统,防御和清除病原微生物^[32];Yu 等^[11]和 Chen 等^[34]研究发现烟草天蛾和蟑螂(*Blaberus discoidalis*) C-型凝集素的作用类似于 MBP,作为“哨兵”识别和结合微生物多糖,同时此过程凝集素可能作为丝氨酸蛋白酶的起始因子而激活酚氧化酶原系统,增强细胞的吞噬作用,并伴随着凝集微粒的现象。Wang 等^[14]将重组表达获得克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*) C-型凝集素,通过活体注射和体外与血细胞作用证实 C-型凝集素可作为酚氧化酶系统的上游探测器,激活酚氧化酶原系统,参与免疫防御反应;另有报道指出菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)血清凝集素(MCL)具有调理素的功能,病原菌经 MCL 处理后,血细胞对细菌的吞噬作用明显增强^[35-36]。实验表明凡纳滨对虾血细胞在重组 C-型凝集素作用下血细胞数量、存活率明显下降,吞噬率显著升高,血细胞吐酚氧化酶活力在 3~12 h 内呈峰值变化,于 9 h 时达到最大值,而抗菌、溶菌活力与对照组无显著差异。这说明重组 C-型凝集素能激活凡纳滨对虾血细胞酚氧化酶原系统,增强血细胞的吞噬作用,而对抗菌、溶菌免疫指标无影响,这与上述研究结果基本一致。由此认为甲壳动物凝集素不仅具有免疫识别和凝集作用,而且还能激活酚氧化酶原系统,由于血细胞酚氧化酶原系统可被多种因子(入侵病原、环境胁迫等)激活,但不同方式激活的酚氧化酶免疫作用也不相同^[37-41],如凝集素→酚氧化酶→增强吞噬作用,而与病原入侵→酚氧化酶→增强吞噬、抗菌和溶菌活力表现出不同的免疫作用,因此,甲壳动物凝集素具有重要的免疫防御作用,其免疫作用机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates[J]. Immunological Reviews, 2004, 198(1): 116-126.
- [2] Brown A C, Harrison L M, Kapulkin W, et al. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from *Ancylostoma ceylanicum*; evidence for a role in hookworm reproductive physiology [J].

- Molecular and Biochemical Parasitology, 2007, 151 (2): 141 – 147.
- [3] Pereyra A, Zenteno R, Vazquez L, *et al.* Characterization of lectin aggregates in the hemolymph of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2004, 1673 (3): 122 – 130.
- [4] 朱月. 凝集素的作用与应用 [J]. 水产科学, 2005, 24(12): 48 – 49.
- [5] Janeway C A, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. Annual Review of Immunology, 2002, 20(1): 197 – 216.
- [6] East L, Isacke C M. The mannose receptor family [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2002, 1572(2 – 3): 364 – 386.
- [7] 罗展, 张继泉, 李富花, 等. 凡纳滨对虾 C-型凝集素 *LvLec2* 对不同刺激的免疫应答 [J]. 海洋科学, 2010, 34(11): 103 – 110.
- [8] Dodd R B, Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity [J]. Glycobiology, 2001, 11(5): 71R – 79R.
- [9] Vasta G R, Ahmed H, Quesenberry M S. Invertebrate C-type lectins and pentraxins as non-self recognition molecules [C] // Söderhäll K, Lwanaga S, Vasta G R. New Directions in Invertebrate Immunology. Fair Haven: SOS Publications, 1996: 189 – 227.
- [10] Chen C, Durrant H J, Newton R P, *et al.* A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis* [J]. Biochemical Journal, 1995, 310 (Pt 1): 23 – 31.
- [11] Yu X Q, Gan H, Kanost M R. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenoloxidase [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 29(7): 585 – 597.
- [12] Yu X Q, Kanost M R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(48): 37373 – 37381.
- [13] Ling E, Yu X Q. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(3): 301 – 309.
- [14] Wang X W, Zhang H W, Li X, *et al.* Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 241 – 247.
- [15] Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, *et al.* Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea Decapoda) hemolymph [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005, 1724 (1 – 2): 86 – 93.
- [16] Liu Y C, Li F H, Dong B, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 598 – 607.
- [17] Sun J, Wang L, Wang B J, *et al.* Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(2): 292 – 299.
- [18] Ma T H, Tiu S H, He J G, *et al.* Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(2): 430 – 437.
- [19] Luo T, Yang H J, Li F, *et al.* Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(7): 607 – 617.
- [20] Guo H Z, Zou P F, Fu J P, *et al.* Characterization of two C-type lectin-like domain (C TLD)-containing proteins from the cDNA library of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Fish & Shellfish immunology, 2011, 30(2): 515 – 524.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1 – 2): 248 – 254.
- [22] 戴聪杰, 陈寅山. 日本对虾血清和肌肉提取液凝集活力初步研究 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2002, 18(4): 81 – 85.
- [23] Wang H, Song L S, Li C H, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(5): 722 – 731.
- [24] Zhang Y, Qiu L M, Song L S, *et al.* Cloning and

- characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish immunology, 2009, 26(1): 183 – 192.
- [25] 潘鲁青, 谢鹏, 岳峰, 等. 脂多糖、多巴胺与蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率、胞吐酚氧化酶活力的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(5): 726 – 732.
- [26] Ashida M, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1984, 77(1): 21 – 26.
- [27] 岳峰, 潘鲁青, 谢鹏, 等. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 761 – 770.
- [28] Studier F W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system [J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 219(1): 37 – 44.
- [29] Chai L Q, Tian Y Y, Yang D T, *et al.* Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(1): 71 – 83.
- [30] Yu X Q, Tracy M E, Ling E, *et al.* A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(4): 285 – 295.
- [31] 梁青龙, 戴聪杰, 陈寅山. 南美白对虾血清凝集素的凝集活性及部分性质研究[J]. 水产科学, 2005, 24(1): 13 – 16.
- [32] Sastry K, Ezekowitz R A. Collectins: pattern recognition molecules involves in first line host defense[J]. Current Opinion in Immunology, 1993, 5(1): 59 – 66.
- [33] Thiel S, Reid K B M. Structures and functions associated with the group of mammalian lectins containing collagen-like sequences [J]. FEBS Letters, 1989, 250(1): 78 – 84.
- [34] Chen C L, Rowley A F, Newton R P, *et al.* Identification, purification and properties of β -1, 3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 122(3): 309 – 319.
- [35] Kim Y M, Park K I, Choi K S, *et al.* Lectin from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni* [J]. The Journal of Biology Chemistry, 2006, 281(37): 26854 – 26864.
- [36] Takahashi K G, Kuroda T, Muroga K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(1): 45 – 52.
- [37] Söderhäll K, Unestam T. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1979, 25(3): 406 – 414.
- [38] Hernández-López J, Gollas-Galván T, Vargas-Albore F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1996, 113(1): 61 – 66.
- [39] Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1997, 21(5): 385 – 395.
- [40] 刘慧杰, 潘鲁青, 胡发文. 凡纳滨对虾在盐度变化下免疫机能评价的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2008(2): 159 – 166.
- [41] Pan L Q, Hu F W, Jing F T, *et al.* The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1–2): 137 – 142.

Prokaryotic expression of C-type lectin gene of *Litopenaeus vannamei* and immunologic activity evaluation of recombinant protein

YU Jinhong, PAN Luqing*, ZHANG Hui

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The studies on innate immune responses of *Litopenaeus vannamei* C-type lectin, were conducted by recombinant C-type lectin protein through expression in *Escherichia coli*. We used cell suspension culture to study the effect of C-type lectin on the cellular immune response of *Litopenaeus vannamei*. The experiment was divided into two groups: control group and recombinant protein (1.0 mg/mL). After 0, 3, 6, 9, 12, 24 hours, we harvested the solutions and then assessed parameters respectively. The results showed that SDS-PAGE revealed the molecular weight of LvLec protein was 39 ku, which was consistent with the predicted size. Western-blotting revealed it could bind anti-His antibody, which proved that C-type lectin recombinant protein in *Escherichia coli* succeeded in expression. For the hemagglutination assay, massive agglutination could be observed after *Escherichia coli* was incubated with LvLec for 1 h. At the same time, LvLec protein had a significant effect on haemocyte count, cell viability and phagocytic activity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* ($P < 0.05$). The extracellular phenoloxidase activity of the LvLec protein group showed peak changes during 3 – 12 h, and at 9 h the extracellular phenoloxidase activity was highest, then returned to the control level ($P < 0.05$). Therefore, crustacean C-type lectin not only had the function of hemagglutination, but also activated prophenoloxidase activating system, and probably played an important role in immune response.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; C-type lectin; prokaryocyte expression; immunologic activity

Corresponding author: PAN Luqing. E-mail: panlq@ouc.edu.cn