

中国明对虾 C-型凝集素基因 (*Fclectin*) 的 重组表达及活性分析

刘逸尘^{1,2}, 刘丽静^{1,2}, 张亦陈^{1,2}, 耿绪云³, 孙妍³, 孙金生^{1,2,3*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387;

2. 天津市细胞遗传与分子调控重点实验室, 天津 300387;

3. 天津市水产养殖病害防治中心, 天津 300221)

摘要: 研究拟通过分析对虾 C 型凝集素的活性特点, 探讨其在对虾先天免疫应答过程中的潜在功能以及在养殖生产实践中的应用。实验利用原核表达系统对中国明对虾 C-型凝集素基因的两个串联的糖识别结构域 (carbohydrate recognition domain, CRD) 进行了重组表达, 并通过纯化复性获得了重组目的蛋白 (rFclectin-CRD1 和 rFclectin-CRD2)。活性分析结果显示, 重组目的蛋白对多种病原菌有凝集和抑制生长的作用, 并且具有 Ca^{2+} 依赖活性; 其凝集活性可被半乳糖、肽聚糖、脂多糖等多种病原相关分子模式所抑制, 研究结果证实, *Fclectin* 是一种典型的 C-型凝集素, 它可能作为中国明对虾先天免疫中重要的模式识别受体, 在一定程度上参与了机体应答病原微生物的防御过程。

关键词: 中国明对虾; C-型凝集素; 糖识别结构域; 先天免疫; 重组表达; 凝菌; 抑菌活性

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

近年来, 对虾疾病的频发给对虾养殖业带来了巨大的经济损失, 对其免疫机制的深入理解并逐步应用于生产实践是解决病害问题的关键, 到目前为止, 在对虾免疫系统的组成、特点及免疫防御的作用机理等方面还有很多问题亟待深入研究。无脊椎动物缺乏完善的适应性免疫系统, 必须依赖特定的先天免疫防御机制 (如体液免疫和细胞免疫) 来抵御外界各种入侵微生物, 因此甲壳动物免疫系统中首要的一点就是非己识别机制。随着病原体不断地进化突变, 先天性免疫识别的有效性依然强大, 主要是因为无脊椎动物依靠模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别入侵微生物表面存在的高度保守的糖分子结构, 这些微生物所特有而宿主不会产生的分子结构被称为病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP), 它们主要包括脂多糖、肽聚糖、葡聚糖、甘露糖和半乳糖等。

PRR 通过识别 PAMP 来识别“非我”, 识别过程完成后, 通过激活存在于体液中的蛋白酶或细胞内的信号途径而引起细胞或体液免疫反应, 效应细胞不需增殖而是通过免疫信号传导, 激活了吞噬作用、黑化级联反应、凝血级联反应、抗菌肽合成等多种免疫应答反应, 最终达到消灭和清除入侵病原微生物的目的^[1-2], 所以 PRR 是众多免疫过程的起始因子。近年来越来越多的模式识别受体在无脊椎动物中被发现, 主要包括肽聚糖识别蛋白 (PGRPs)、革兰氏阴性菌结合蛋白 (GNBPs)、含硫酯键蛋白 (TEPs)、清除受体 (SCPs)、Toll-like 受体 (TLRs)、硫依赖型凝集素 (GALEs) 和 C-型凝集素 (CTLs)^[3-5]。凝集素在先天免疫中是一类重要的模式识别受体, 其作用类似于脊椎动物的抗体, 主要分为 C 型、S 型和 P 型 3 个家族, 其中 C 型凝集素在免疫系统中起到了关键作用, 该类凝集素主要包括 CRD 结构域、二硫键、钙

收稿日期: 2012-04-11 修回日期: 2012-06-04

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30901094, 30901119); 国家科技支撑计划项目 (2011BAD13B04, 2011BAD13B07); 天津市自然科学基金项目 (10JCZDJC18200, 10JCYBJC09200)

通讯作者: 孙金生, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

离子和糖的结合位点等一些重要结构。

对 C-型凝集素结构的研究大部分来自脊椎动物,研究发现其主要功能包括:通过调理作用,参与非己免疫识别和对微生物的凝集吞噬作用;介导细胞的粘附、迁移和细胞间相互作用;促进血细胞活化,从而诱导血细胞中各种酶类释放;参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等一系列作用以及引发 lectin 补体途径的激活等^[6-7]。哺乳动物中的大量研究证实,selectin 的主要作用是介导细胞粘附和迁移^[8];collectins 的主要作用是参与先天的、非抗体介导的免疫防御系统^[9-10],在应答感染的一线防御中发挥着重要作用,目前已经在哺乳动物中克隆并鉴定出了 150 种 C 型凝集素^[11]。因为凝集素能够与碳水化合物结合并且促进不同细胞(细菌和其它入侵病原体)的凝集,所以在无脊椎动物非己识别反应中具有非常重要的作用^[12]。在一些无脊椎动物如海胆^[13],海参^[14],被膜动物^[15],藤壶^[16]和昆虫^[17-18]中已有关于 C 型凝集素报道。但无脊椎动物的 C 型凝集素的结构中一般只有一个 CRD,其作用推测可能是取代了脊椎动物免疫系统中免疫球蛋白的作用,这对于缺少免疫球蛋白和补体途径的无脊椎动物来说,在其免疫系统中无疑是至关重要的。近些年,对无脊椎动物 C-型凝集素的研究有了进一步发展,早期对于虾类 lectins 的研究主要集中在分离纯化和特征研究上^[19-21];2003 年,在斑节对虾(*Penaeus monodon*)中报道了一个含有 CRD 结构域的蛋白 PmAV,它具有一定的病毒抗性^[22]。目前,在对虾中围绕 C 型凝集素已陆续有一些报道,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中的 C 型凝集素 LvCTL1 和 LvLec 分别具有抗病毒活力和凝集活性^[23-24];在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinense*)肝胰腺中也获得了多个 C-型凝集素基因,发现其具有一定抗菌活力和病毒结合活性^[25-26]。

本实验室在前期工作中从中国明对虾血细胞中克隆获得一个典型的 C-型凝集素基因(*Flectin*),细菌或病毒(WSSV)刺激后该基因在血细胞中的表达量会显著上调^[27]。本研究在前期工作基础上,对该 C-型凝集素基因的两个 CRD 结构域分别进行了重组表达分析,并研究了其潜在的生物活性和功能,希望对模式识别受体、信号传导通路以及宿主与病原相互识别和作用的免疫应答机制研究提供参考,并为对虾的病害防治和

健康养殖提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物、菌株、质粒 中国明对虾(体长 8~10 cm)购买于天津市神堂水产育苗养殖有限公司,实验前在水族箱中充气暂养 7 d,使其适应实验室内的养殖环境;菌株 TOP10F' 为本实验室保存,表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 感受态细胞购于北京市天根生化科技有限公司;实验中所用到的致病菌(鳃弧菌、哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、酵母菌、白色念珠菌)由天津市水产养殖病害防治中心提供;克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pET-21a(+)由中国科学院海洋研究所宋林生研究员馈赠。

实验试剂 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen);限制性核酸内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA marker(TaKaRa);质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶纯化试剂盒、N-乙酰-D-葡萄糖胺(N-Acetyl-D-glucosamine)、D-甘露糖(D-mannose)、D-果糖(D-fructose)、D-葡萄糖(D-glucose)、D-半乳糖(D-galactose)、蔗糖(sucrose)、海藻糖(trehalose)、DAPI(上海生工);N-乙酰-D-半乳糖胺(N-Acetyl-D-galactosamine)和 N-乙酰-D-葡萄糖胺(N-Acetyl-D-glucosamine)、肽聚糖(peptidoglycan from *Micrococcus luteus*)、脂多糖(Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5)(Sigma);蛋白 marker(Fermentas);其它试剂均为国产或进口分析纯产品。

实验仪器 梯度 PCR 仪(Bio-Rad);微量核酸蛋白测定仪(Bio-Rad);恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);快速蛋白液相系统(BioLogic DuoFlow, Bio-Rad);台式冷冻离心机(Eppendorf);荧光显微镜(Nikon)。

1.2 总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

从健康的中国明对虾第一腹节基部腹血窦抽取血淋巴,经离心获得血细胞,参照 TRIzol 说明书的方法提取血细胞总 RNA,提取的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪进行定性和定量检测,-80℃保存备用。以 2 μL 血细胞总 RNA 为反转录模板,poly(T)引物(AOLP:5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16(A/C/G)-3')为反转录引物,合成第一链 cDNA。

平行实验,室温下孵育 1 h 后,取 10 μL 荧光镜检。

重组目的蛋白的糖结合活性分析 重组蛋白的糖特异性结合性质可以通过分析抑制凝集效果得到。参考 Xu 等^[28]的方法略做修改,具体步骤如下:将 10 μL 重组目的蛋白(终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、10 μL 用 TBS- Ca^{2+} 溶液梯度稀释的不同糖类(单糖终浓度为 50 ~ 400 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 肽聚糖终浓度为 100 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 脂多糖终浓度为 12.5 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别混匀,每个浓度设置 3 个平行实验,室温孵育 45 min,加入 10 μL DAPI 标记的大肠杆菌(2.5×10^9 个/ mL)混匀后孵育 45 min,荧光镜检,通过重组目的蛋白对大肠杆菌的抑凝效果分析其糖结合活性。

重组目的蛋白的抑菌活性分析 采用液体生长方法检测 rFlectin-CRD1 和 rFlectin-CRD2 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)^[29],各菌株在液体培养基中培养过夜,用培养基稀释其浓度至 OD_{600} 为 0.001 左右,在 96 孔板中每孔加入 50 μL 梯度稀释的重组目的蛋白(终浓度 0.625 ~ 160 $\mu\text{mol}/\text{L}$)和 50 μL 的测试菌,总体积为 100 μL ,每个浓度设置 3 个平行实验。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 18 ~ 24 h,酶标仪测定 OD_{595} 来确定 MIC,对照组为 50 μL 菌液与 50 μL Tris-HCl 缓冲液的混合溶液。

2 结果

2.1 重组蛋白的表达与纯化

结构域 Flectin-CRD1 和 Flectin-CRD2 的扩增及其重组表达载体的构建 根据 *Flectin* 的 cDNA 序列设计带有酶切位点的引物,以对虾血细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得含有其 CRDs 的目的片段,回收片段,经测序验证正确后,将其连入表达载体 pet21a 后转化耐受毒物的表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 感受态细胞,重组载体测序结果表明载体构建成功。

重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析

经 IPTG 诱导后,利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达,结果发现:宿主菌的蛋白表达图谱发生了变化,在预期分子量 18.4 ku 和 14.4 ku 的位置分别出现了特异的蛋白谱带,该蛋白的表达量与诱导时间显著相关,伴随诱导时间的延长,蛋白表达量显著增加,诱导到 5 h 后表达量达到平台期,继续培养,目的蛋白表达量相对稳定,不再显著增加,所以可以推断这两条蛋白谱带就是重组目的蛋白。由于重组蛋

白带有一个组氨酸标签(-MRGSHHHHHGM-),所以分子量略大于其预测的理论分子量。通过凝胶扫描系统分析发现,这两条蛋白谱带的表达量分别占到了宿主菌总蛋白含量的 30% 左右。

重组蛋白的纯化与复性 利用 Ni-IDA 技术对超声波破碎菌体中的重组蛋白分别进行分离纯化,电泳检测显示在 14.4 ku 和 18.4 ku 位置各有一条单一主带(图 1),这与预期结果一致。纯化的目的蛋白复性后得率约为 0.4 g/L。

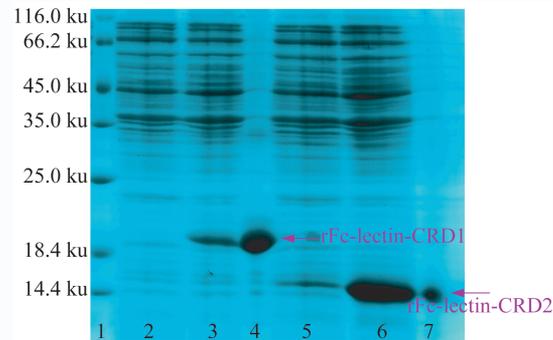


图 1 重组目的蛋白经 IPTG 诱导前后及纯化后的 SDS-PAGE 检测结果

泳道 1. 标准蛋白 Marker; 泳道 2. 未经 IPTG 诱导的含 CRD1 质粒的宿主菌中表达的蛋白; 泳道 3. 经 IPTG 诱导的含 CRD1 质粒的宿主菌中表达的蛋白; 泳道 4. 纯化后的重组 *Flectin*-CRD1 蛋白; 泳道 5. 未经 IPTG 诱导的含 CRD2 质粒的宿主菌中表达的蛋白; 泳道 6. 经 IPTG 诱导的含 CRD2 质粒的宿主菌中表达的蛋白; 泳道 7. 纯化后的重组 *Flectin*-CRD2 蛋白。

Fig. 1 Expression and purification of the target fusion protein

Lane 1. protein molecular weight (ku) marker; Lane 2. crude extract from BL21 (DE3) pLysS (the expression vector uninduced; CRD1); Lane 3. crude extract from BL21 (DE3) pLysS (the expression vector induced with IPTG; CRD1); Lane 4. the purified rFlectin-CRD1; Lane 5. crude extract from BL21 (DE3) pLysS (the expression vector uninduced; CRD2); Lane 6. crude extract from BL21 (DE3) pLysS (the expression vector induced with IPTG; CRD2); Lane 7. the purified rFlectin-CRD2.

质谱鉴定结果 为了验证上述蛋白谱带就是重组目的蛋白,对蛋白谱带进行了胶内酶解和 LC-ESI-MS 质谱分析鉴定,用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对后发现,所切下的两个重组蛋白谱带分别各有一个肽段与中国明对虾 C-型凝集素基因的推导氨基酸序列完全匹配,序列分别为 -AQDWSETQPDDYGGGEDCLEIR- 和 -ECFHLSTTALSWNAAR- (图 2)。由此可以判定,上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白 (rFlectin-CRD1 和 rFlectin-CRD2),中国明对虾

Fclectin 的结构域成功地获得了体外重组表达。

2.2 重组蛋白的活性分析

重组目的蛋白的病原菌凝集活性分析 通过 DAPI 染色发现,在 Ca^{2+} 存在的条件下,

rFclectin-CRD1 和 rFclectin-CRD2 均可以凝集苏云金芽孢杆菌(G⁺)、哈维氏弧菌和大肠杆菌(G⁻)以及酵母菌和白色念珠菌(真菌),此外后者还可以凝集金黄色葡萄球菌(G⁺)(表1和图3)。重

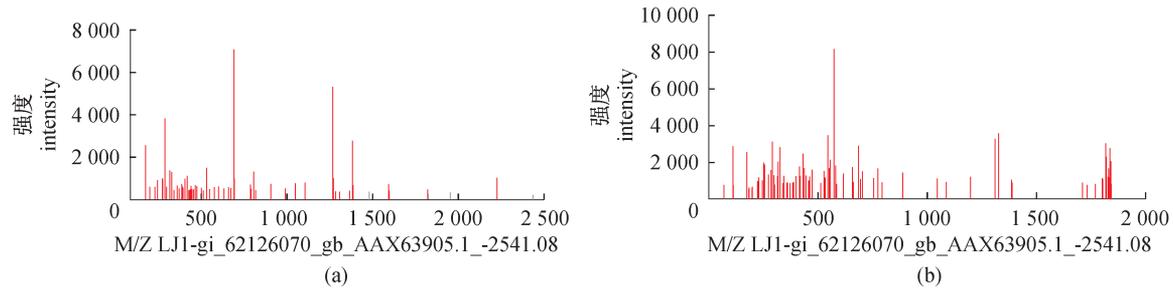


图2 重组目的蛋白(rFclectin-CRD1和rFclectin-CRD2)中与中国明对虾C型凝集素相匹配肽段的二级质谱图(a)和(b)分别为两个肽段-AQDWSETQPDDYGGGEDCLEIR-和-ECFHLSTTALSWNAAR-的匹配分析结果。

Fig. 2 Characteristic spectrum of the matched peptide fragments from rFclectin-CRD1 and rFclectin-CRD2 with C type lectin of *F. chinensis*

(a) and (b) showed the spectrums of matched peptide fragments(-AQDWSETQPDDYGGGEDCLEIR-and-ECFHLSTTALSWNAAR-), respectively. The abscissa represents the nuclear mass ratio; the ordinate axis represents the ionic strength.

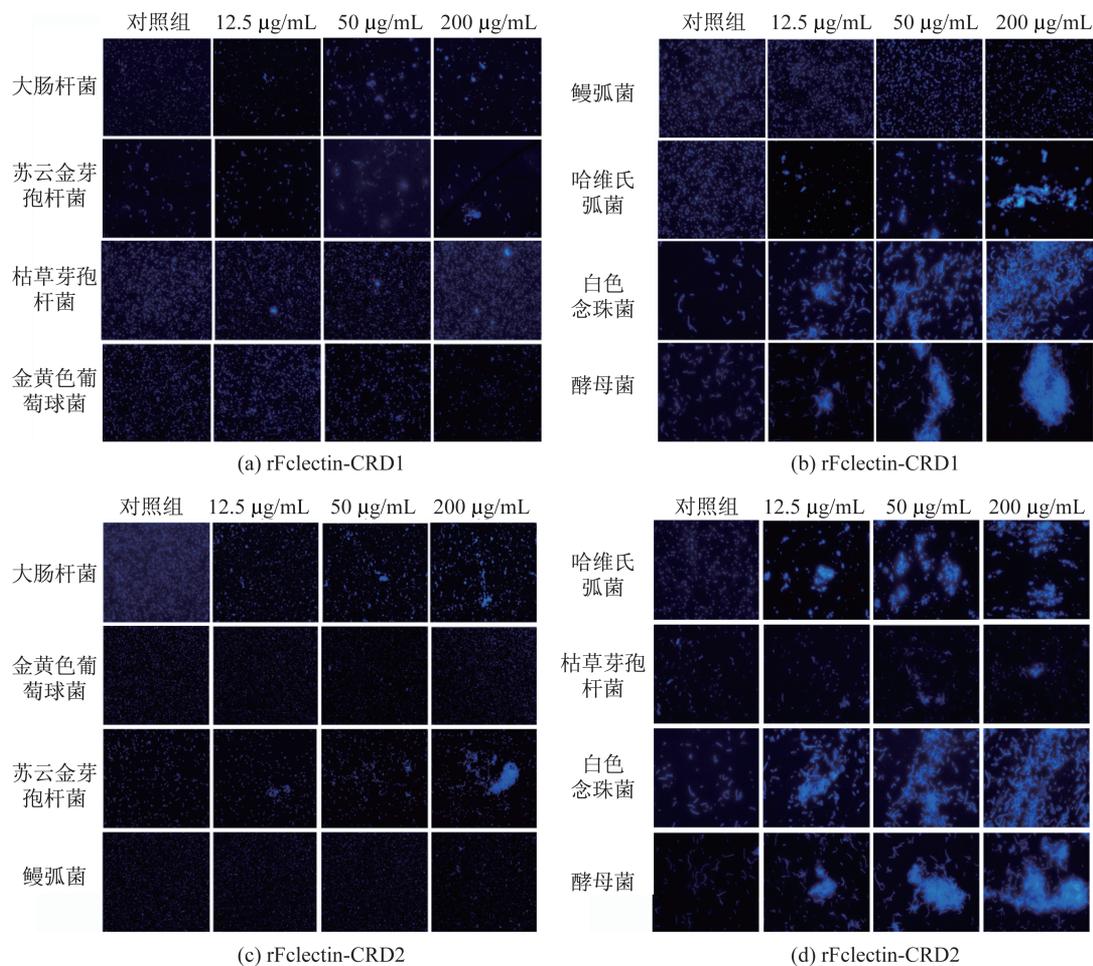


图3 重组目的蛋白对不同病原菌的凝集活性分析

Fig. 3 Pathogens agglutinating activity of rFclectin-CRD1 and rFclectin-CRD2 proteins

表1 重组目的蛋白对不同病原菌的凝集活性及最小凝菌浓度

Tab.1 Pathogens agglutinating activity of rFlectin CRD1 and CRD2 proteins

菌株 microorganism	受试范围内最小凝菌浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	rFlectin-CRD1	rFlectin-CRD2
革兰氏阳性菌 G +		
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	200	12.5
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	NA	100
革兰氏阴性菌 G -		
大肠杆菌 TOP10F' <i>Escherichia coli</i>	12.5	12.5
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	NA	NA
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	12.5	12.5
真菌		
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.5	12.5
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	12.5 L	12.5

注:NA.在重组目的蛋白最大检测浓度条件下(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),仍不发生细菌凝集作用。

Notes:NA. Recombinant protein could not agglutinate bacteria under the maximum detectable concentration(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

组目的蛋白在 Ca^{2+} 不存在的条件下没有凝集活性。对 rFlectin-CRD1 和 rFlectin-CRD2 的凝集活性比较后发现,后者对细菌的凝集活性更强,在较低浓度时即对细菌表现出较强的凝集活性。

重组目的蛋白的糖结合活性分析 通过研究糖结合分析前后,rFlectin-CRD1 和 rFlectin-CRD2 对大肠杆菌凝集活性变化来探讨重组目的蛋白的糖结合活性,分析结果如表2所示。

重组目的蛋白的抑菌活性分析 本研究利用液体生长方法检测 rFlectin-CRD1 和 rFlectin-CRD2 对不同病原菌的最小抑菌浓度(MIC),研究结果发现这两个目的蛋白对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的生长有显著抑制作用($P < 0.05$),同时也抑制大肠杆菌 TOP10F'(*Escherichia coli*)和真菌的生长($P < 0.05$)。rFlectin-CRD2 的抑菌活性比 rFlectin-CRD1 高,特别是对革兰氏阴性菌和真菌的生长有明显抑制效果,最小抑菌浓度为 12.5 ~ 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (表3)。

表2 重组目的蛋白的糖结合活性分析
Tab.2 Carbohydrates recognition activity of rFlectin CRD1 and CRD2 proteins

糖 carbohydrates	受试范围内最小抑制浓度	
	rFlectin-CRD1	rFlectin-CRD2
D-甘露糖 D-mannose	NA	400 mmol/L
D-果糖 D-fructose	NA	>400 mmol/L
D-葡萄糖 D-glucose	>400 mmol/L	>400 mmol/L
D-半乳糖 D-galactose	200 mmol/L	>400 mmol/L
N-乙酰-D-甘露糖 N-Acetyl-D-mannosamine	NA	NA
N-乙酰-D-半乳糖胺 N-Acetyl-D-galactosamine	NA	400 mmol/L
N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-glucosamine	NA	NA
蔗糖 sucrose	NA	NA
麦芽糖 maltose	NA	NA
海藻糖 trehalose	NA	NA
肽聚糖 peptidoglycan	NA	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
脂多糖 LPS	31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

注:NA.在 >400 mmol/L 条件下,仍无法抑制细菌凝集作用。

Notes:NA. Recombinant protein could not inhibit the bacterial agglutination under the maximum detectable concentration (>400 mmol/L).

表3 重组目的蛋白对主要病原菌的抑菌活性及最小抑菌浓度(MIC)

Tab.3 Antimicrobial activity and MIC of rFlectin CRD1 and CRD2 proteins

菌株 microorganism	受试范围内最小抑菌浓度/($\mu\text{mol}/\text{L}$)	
	rFlectin-CRD1	rFlectin-CRD2
革兰氏阳性菌 G +		
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	20	20
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	150	12.5
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	20	40
革兰氏阴性菌 G -		
大肠杆菌 TOP10F' <i>Escherichia coli</i>	2.5	40
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	NA	40
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	NA	40
真菌		
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	12.5
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	12.5	12.5

注:NA.在重组目的蛋白最大检测浓度为 160 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 条件下,仍没有抑菌作用。

Notes:NA. Recombinant proteins have not antimicrobial activity under the maximum detectable concentration(160 $\mu\text{mol}/\text{L}$).

3 讨论

C-型凝集素广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中,对细胞表面的寡糖表现出重要的识别机制,行使了一系列重要的生理功能。作为模式识别受体,可以通过识别微生物细胞壁的糖成分(病原相关分子模式)而启动机体下游的免疫应答途径,因此在先天免疫过程中发挥着重要的作用:包括通过调理作用,参与免疫识别和对微生物的凝集吞噬作用;介导细胞的粘附、迁移和细胞间相互作用;促进血细胞活化,从而诱导血细胞中各种酶类释放;参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等一系列作用;引发 lectin 补体途径的激活等。此外凝集素还参与了针对病原微生物的直接一线防御^[30],细胞运输,免疫调节和自身免疫的预防等过程^[31]。所以 C-型凝集素在先天免疫中是模式识别受体的主要参与者,其作用类似于脊椎动物的抗体。

狭义上的 C 型凝集素指的是一类钙离子依赖型糖识别动物凝集素。但是在随后的生物化学和基因序列结构分析中发现,此类蛋白的凝集活性均来自一类统一的功能结构域,称为糖识别结构域,其活性需要 Ca^{2+} 的存在,该结构域通过识别病原微生物细胞壁表面的多糖成分(病原相关分子模式,PAMP)而达到识别病原的目的。所有 C 型凝集素均含有该结构域,而其他类型的凝集素却没有,并且其在脊椎动物和无脊椎动物中都相当保守,所以本研究单独克隆了 *Fclectin* 的两个结构域进行活性和功能的研究。C-型凝集素可能含有一个或多个功能结构域(CRD),CRD 作为识别碳水化合物的结构域在 Ca^{2+} 的存在下起到了介导糖结合的功能^[32],因此许多含有 CRD 的分子(C-型凝集素,凝结因子结合蛋白,IgE Fc 受体和 NK 细胞受体等)都和免疫相关^[33]。

大多数 C-型凝集素是钙离子依赖性,而且对二价螯合剂十分敏感,来自斑节对虾的 C 型凝集素 PmLec 也是钙离子依赖性的^[34]。细菌凝集实验显示克隆的到得 C 型凝集素的两个 CRD 也是 Ca^{2+} 依赖性的,在一定 Ca^{2+} 存在的条件下,CRD1 和 CRD2 可以凝集多种革兰氏阴性菌、阳性菌和真菌,结果显示和 CRD1 比较,CRD2 可凝集的细菌种类较多,凝结细菌所需最小浓度也较低,说明 CRD2 比 CRD1 有更强的凝集细菌的能力。两个

CRD 结构域凝集细菌的种类和所需最小浓度不同,说明两个结构域在无脊椎动物先天免疫应答过程中所执行的功能不同,可以同时凝集不同的细菌,从而加强机体的免疫反应,这在一定程度上反映了 C 型凝集素基因可能不仅参与调控对虾机体的免疫识别过程,同时还作为终端效应物直接作用于病原菌,从而保护机体免受病原微生物等的侵害。目前已报道的不同物种来源的 C 型凝集素大多含有多个串联的 CRD 结构域,因其序列和结构特征不同,往往执行着不同的功能,多个结构域同时发挥作用赋予了 C 型凝集素多重功能。

本研究通过分析目的蛋白的糖结合活性可推断其可能识别的病原微生物。为了研究可以与重组蛋白特异性结合的糖的种类设计了糖特异性结合实验。糖特异性结合能力与抑制凝集的能力相关,能抑制凝集所需糖的浓度越低,说明重组蛋白与此种糖的结合能力越强。实验结果显示,CRD1 可以特异性的结合半乳糖(200 mmol/L)。此外,较高浓度的 D-葡萄糖与目的蛋白孵育后有抑制细菌凝集的作用,低浓度的脂多糖(LPS)与目的蛋白孵育后就有较明显的抑制细菌凝集效果。与 CRD1 相比 CRD2 显示了更强的与糖类结合的能力,高浓度下可以特异性结合多种单糖,包括 D-甘露糖,D-葡萄糖,D-半乳糖,N-乙酰-D-半乳糖胺,表明重组目的蛋白不仅可以结合半乳糖而且可以特异性结合半乳糖的衍生物。此外,CRD2 对脂多糖和肽聚糖均有结合作用,进一步说明 CRD 作为模式识别受体通过识别细菌表面糖蛋白使细菌发生凝集作用。CRD1 和 CRD2 可以凝集不同的细菌并且特异性结合不同的糖类,这充分说明了两个结构域是相互协作发挥作用。对虾中有许多 C-型凝集素有类似的作用,例如 PmLec 的凝集活性可以被 LPS 所抑制^[34],FcLec2 可以特异性的识别 LPS,肽聚糖和脂磷壁酸^[35]。

C-型凝集素的功能有多种,许多 C-型凝集素有抑菌活性,可以作为一线防御应答效应物发挥作用。蛇毒 C 型凝集素表现出抗革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的活性^[36],本实验中的重组蛋白 CRD1 和 CRD2 有很显著的抗菌活性,CRD1 对革兰氏阳性菌抗性很高,但是可以抑制的革兰氏阴性菌种类较少,同时可以抑制真菌中白色念珠菌的生长。CRD2 比 CRD1 可以抑制的革兰氏阴性

菌种类较多,并可以抑制真菌中的白色念珠菌和酵母菌的生长。实验结果表明,C-型凝集素不仅可以作为识别 PAMP 的模式识别受体,在宿主对病原的免疫识别过程中发挥作用,同时也可以作为先天免疫应答调控通路的终端效应物,直接通过调理作用促进血细胞对病原微生物进行凝集、吞噬和杀灭,这为将该蛋白产物作为抗生素替代物应用于养殖生产实践奠定了理论基础。本实验从中国明对虾血细胞中克隆获得了一个 C-型凝集素基因,并对其两个结构域进行了原核重组表达和活性、功能分析,探讨了其在对虾先天免疫过程中的可能作用,进一步对其在抗病毒免疫应答过程中的作用研究正在进行中,这些工作能为探索对虾 C-型凝集素精确的生物功能提供有用的信息,并为深入了解甲壳动物免疫应答机制和开展对虾病害防治研究提供理论参考。

参考文献:

- [1] Ramet M, Pearson A, Manfrulli P, *et al.* *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria [J]. *Immunity*, 2001, 15 (6) : 1027 - 1038.
- [2] Gottar M, Gobert V, Michel T, *et al.* The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein [J]. *Nature*, 2002, 416 (6881) : 640 - 644.
- [3] Medzhitov R, Janeway C A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1997, 9 (1) : 4 - 9.
- [4] Christophides G K, Zdobnov E, Barillas-Mury C, *et al.* Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae* [J]. *Science*, 2002, 298 (5591) : 159 - 165.
- [5] 王金星, 赵小凡. 无脊椎动物先天免疫模式识别受体研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31 (2) : 112 - 117.
- [6] Weis W I, Taylor M E, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system [J]. *Immunological Reviews*, 1998, 163 (1) : 19 - 34.
- [7] Hetru C, Bulet P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates [J]. *Methods in Molecular Biology*, 1997, 78 : 35 - 50.
- [8] Hayashida K, Kume N, Minami M, *et al.* Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) supports adhesion of mononuclear leukocytes and a monocyte-like cell line THP-1 cells under static and flow conditions [J]. *FEBS Letters*, 2002, 511 (1 - 3) : 133 - 138.
- [9] Holmskov U L. Collectins and collectin receptors in innate immunity [J]. *APMIS Supplementum*, 2000, 100 : 1 - 59.
- [10] Crouch E, Wright J R. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense [J]. *Annual Review of Physiology*, 2001, 63 : 521 - 554.
- [11] Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, *et al.* The collectins in innate immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1996, 8 (1) : 29 - 35.
- [12] Marques M R F, Barracco M A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans [J]. *Aquaculture*, 2000, 191 (1 - 3) : 23 - 44.
- [13] Giga Y, Ikai A, Takahashi K. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocardia crassispina*. Homologies with mammalian and insect lectins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262 (13) : 6197 - 6203.
- [14] Hatakeyama T, Ohuchi K, Kuroki M, *et al.* Amino acid sequence of a C-type lectin CEL-IV from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59 (7) : 1314 - 1317.
- [15] Suzuki T, Takagi T, Furukohri T, *et al.* A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. Isolation, characterization, and amino acid sequence [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265 (3) : 1274 - 1281.
- [16] Muramoto K, Kamiya H. The amino-acid sequence of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1990, 1039 (1) : 42 - 51.
- [17] Jomori T, Natori S. Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Similarity of the protein with animal lectins and its acute phase expression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (20) : 13318 - 13323.
- [18] Takahashi H, Komano H, Kawaguchi N, *et al.* Cloning and sequencing of cDNA of *Sarcophaga peregrina* humoral lectin induced on injury of the body wall [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260 (22) : 12228 - 12233.

- [19] Agundis C, Pereyra A, Zenteno R, *et al.* Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B; Biochemistry Molecular Biology*, 2000, 127(2): 165 – 172.
- [20] Zenteno R, Vazquez L, Sierra C, *et al.* Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B; Biochemistry Molecular Biology*, 2000, 127(2): 243 – 250.
- [21] Cominetti M R, Marques M R, Lorenzini D M, *et al.* Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26(8): 715 – 721.
- [22] Luo T, Zhang X B, Shao Z Z, *et al.* PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon* [J]. *FEBS letters*, 2003, 551(1 – 3): 53 – 57.
- [23] Zhao Z Y, Yin Z X, Xu X P, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(1): 347 – 356.
- [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] Sun Y D, Fu L D, Jia Y P, *et al.* A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(2): 348 – 361.
- [26] Wang X W, Zhang X W, Xu W T, *et al.* A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* *in vivo* in Chinese white shrimp [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(9): 1039 – 1047.
- [27] 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.
- [28] Xu W T, Wang X W, Zhang X W, *et al.* A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Amino Acids*, 2010, 39(5): 1227 – 1239.
- [29] Destoumieux D, Bulet P, Strub J M, *et al.* Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 266(2): 335 – 346.
- [30] Kim M S, Baek M J, Lee M H, *et al.* A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(42): 39999 – 40004.
- [31] Kilpatrick D C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity [J]. *Transfusion Medicine*, 2002, 12(6): 335 – 352.
- [32] Feizi T. Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity [J]. *Immunological Reviews*, 2000, 173(1): 79 – 88.
- [33] Drickamer K. C-type lectin-like domains [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, 9(5): 585 – 590.
- [34] 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 and Comparative Immunology*, 2006, 30(7): 607 – 617.
- [35] Zhang X W, Xu W T, Wang X W, *et al.* A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein [J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(8 – 9): 1626 – 1637.
- [36] Radis-Baptista G, Moreno F B, de Lima N L, *et al.* Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2006, 44(3): 412 – 423.

Recombinant expression and functional characterization of a C-type lectin (*Fclectin*) from the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

LIU Yi-chen^{1,2}, LIU Li-jing^{1,2}, ZHANG Yi-chen^{1,2}, GENG Xu-yun³, SUN Yan³, SUN Jin-sheng^{1,2,3*}

(1. College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Cyto-genetical and Molecular Regulation, Tianjin 300387, China;

3. Tianjin Aquaculture Disease Prevention & Treatment Center, Tianjin 300221, China)

Abstract: Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is distributed mainly along Chinese inshore areas, and is one of the most important farmed shrimp in China. The studies on innate immune responses of shrimps, especially on immune defense against the main crustacean pathogens, will provide more knowledge of shrimp immunity to prevent infectious diseases. Invertebrates do not possess an adaptive immune system based on highly specific antibodies and antigen receptors. They must rely on efficient immune defenses capable of protecting them against invading microorganisms. The chief issue of crustacean immunity should concern non-self-recognition mechanisms. Proteins that specifically bind to certain carbohydrate components on the surface of microorganisms play an important role in non-self-recognition and cleaning up of the invading microorganisms. Such proteins are known as pattern recognition receptors (PRRs). Lectins exist in almost all living organisms. Due to their ability of binding to terminal sugars on glycoproteins and glycolipids, lectins are primary candidates for pattern recognition receptors in innate immunity. C type Lectin is regarded as a potential molecule involved in immune recognition and phagocytosis through opsonization in crustacean. In the preliminary study, a novel C-type lectin was cloned from hemocytes of Chinese shrimp, (*Fenneropenaeus chinensis*). It contains two tandem carbohydrate recognition domains (CRDs)/C-type lectin-like domains. Both of the CRDs contain a QPD (Gln-Pro-Asp) motif that has a predicted binding specificity for galactose-type sugar. In this research, two recombinant target proteins (rFclectin-CRD1 and rFclectin-CRD2) were expressed by prokaryotic expression system. The result showed that fusion protein was expressed in the form of inclusion bodies. The LC-ESI-MS analysis showed that two peptide fragments of rFclectin-CRD1 and rFclectin-CRD2 were identical with the corresponding sequence of *F. chinensis* C-type lectin. Recombinant protein was purified by immobilized-metal affinity chromatography and Ni-NTA technology. The concentrations of purified target proteins were 0.4 g/L. rFclectin-CRD1 and rFclectin-CRD2 had agglutinating and antimicrobial activity against main pathogens in aquaculture in a calcium-dependent manner. The agglutinating activity can be inhibited by multiple carbohydrates, such as galactose, peptidoglycan and lipopolysaccharide. These results suggest that *Fclectin*, as a Ca^{2+} dependent carbohydrate-recognition protein, is one of the important PRRs. It might play a crucial role in the innate immunity of the shrimp and is expected to be applied in disease control.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; C-type lectin; carbohydrate recognition domain (CRD); innate immunity; recombinant expression; agglutinating; bacteriostatic activity

Corresponding author: SUN Jin-sheng. E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn