

## 凡纳滨对虾C型凝集素(LvLc1)的特征和活性分析

李俊焯<sup>1</sup>, 宋巧珍<sup>1</sup>, 张亦陈<sup>1</sup>, 刘逸尘<sup>1\*</sup>, 耿绪云<sup>2</sup>, 孙金生<sup>1</sup>

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

**摘要:** C型凝集素是一种依赖于Ca<sup>2+</sup>而发挥功能的糖蛋白, 在一线的固有免疫防御过程中发挥着重要作用。围绕对虾C型凝集素开展深入研究, 不仅可以丰富无脊椎动物固有免疫学内容, 还有望将其开发为具有免疫增强效果的活性饵料, 应用于对虾的健康养殖。本实验根据实验室前期转录组信息提示克隆获得了凡纳滨对虾一种新的C型凝集素基因(*LvLc1*, GenBank注册号: KY937940)。生物信息学分析显示*LvLc1*基因的开放阅读框全长891 bp, 编码296个氨基酸, 该基因编码的蛋白质含有一个保守的糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD), 该结构域中具有潜在的半乳糖结合位点(QPD motif), 进化发生分析显示*LvLc1*与来自节肢动物的甘露糖结合凝集素家族成员聚类在一起。对*LvLc1*基因的CRD结构域进行了原核重组表达与蛋白活性分析研究, 结果显示: 重组目的蛋白(rLvLc1)在Ca<sup>2+</sup>存在的条件下, 对多种病原菌(G<sup>+</sup>、G<sup>-</sup>和真菌)具有凝集作用, 其凝集活性可被半乳糖、甘露糖、脂多糖等多种病原相关分子模式所抑制。研究表明, *LvLc1*作为C-型凝集素家族一个新成员, 可能通过重要的模式识别受体作用, 参与机体应答病原微生物侵染的防御过程。

**关键词:** 凡纳滨对虾; C型凝集素; 糖识别结构域; 重组表达; 凝集; 糖识别活性

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda), 是最具有经济价值的水产动物之一。然而对虾病害感染导致大规模疾病爆发, 严重阻碍了对虾养殖业的发展, 造成了巨大的经济损失。因此深入研究和重要免疫应答因子的作用, 并探讨将其应用于对虾的养殖实践显得尤为重要。无脊椎动物缺乏获得性免疫, 主要依靠固有免疫来抵御入侵的病原微生物, 宿主对外源微生物的“非己”识别在宿主免疫防御过程中发挥着首要的关键作用<sup>[1]</sup>。甲壳动物通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原体共有的高度保守结构——病原相关分子模式(pathogen associated mole-

cular patterns, PAMPs)来辨别外来病原微生物<sup>[2]</sup>。固有免疫对病原微生物的识别由作为PRRs的几组蛋白质介导<sup>[3]</sup>, 目前在无脊椎动物中已鉴定了7组PRR, 包括C型凝集素(CTL)、半乳糖苷结合蛋白(galectins)、肽聚糖识别蛋白(PGRP)、革兰氏阴性结合蛋白(GNBP)、含硫酯蛋白(TEP)、多结构域清除受体(SCR)和纤维蛋白原样结构域免疫凝集素<sup>[4]</sup>。常见的PAMP包括细菌细胞壁组分脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、真菌细胞壁的 $\beta$ -1,3-葡聚糖以及病毒的表面糖蛋白等。入侵的病原微生物被PRRs识别后, 依靠其PAMPs启动机体多种免疫防御机制, 从而迅速引起细胞免疫或体液免疫反应<sup>[5-8]</sup>。C型凝集素作为含有至少一个糖基识别结构域(CRD)的蛋白质, 在无脊椎动

收稿日期: 2017-04-20 修回日期: 2017-07-20

资助项目: 国家自然科学基金(31472299); 天津市应用基础与前沿技术研究计划(15JCZDJC33800); 天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金(TJAE2015005), “十二五”农村领域国家科技支撑计划(2011BAD13B04)

通信作者: 刘逸尘, E-mail: liuychn@outlook.com

物的免疫应答过程中发挥着非己识别和病原清除的关键作用。

近年来,关于CTL参与固有免疫应答反应的研究在甲壳动物和软体动物中已陆续有相关报道。斑节对虾(*Penaeus monodon*)的凝集素PmLT可以应答WSSV的侵染,同时可以促进血细胞的包裹作用<sup>[9]</sup>;中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的CTL有凝集细菌病原体的功能和抗菌活力<sup>[10-11]</sup>;凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)种CTLs在细菌和病毒感染的免疫应答中起作用<sup>[12]</sup>;克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中的PcLT可以结合溶藻弧菌和WSSV<sup>[13]</sup>,PcLec3<sup>[14]</sup>可通过结合多种细菌与多糖参与宿主防御反应;栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的CfLec-2则可以结合LPS、PGN、甘露糖和酵母聚糖<sup>[15]</sup>。本实验从凡纳滨对虾血细胞中克隆获得了一个C型凝集素基因家族新成员(LvLc1),对其进行了序列的生物信息学分析及重组蛋白的生物活性分析,结果显示其可以凝集包括G<sup>+</sup>、G<sup>-</sup>和真菌在内的多种病原菌,此外rLvLc1不仅能与半乳糖结合,还能与甘露糖、脂多糖等多种病原表面多糖成分结合,上述研究结果表明LvLc1可能作为一种新的模式识别受体,在对虾应答病原侵染过程中发挥着免疫调节因子的重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂、仪器

**实验材料、菌株、质粒** 实验用凡纳滨对虾取自天津市西青区对虾养殖基地,体长约12-15 cm。*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞和表达宿主菌Transetta (DE3)感受态细胞均购自南京诺唯赞生物有限公司。克隆载体pMD18-T购自宝生物工程(大连)有限公司;表达载体pET-28a (+)为本实验室保存。

**主要试剂和仪器** 试剂: TRIzol试剂购自Invitrogen, M-MLV反转录酶购自Promega, 实验所用DNA聚合酶、连接酶、限制性内切酶、DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司;实验所需各种单糖、双糖、多糖购自Sigma公司。

**主要仪器:** PCR仪(Applied Biosystems)、Gel Doc<sup>TM</sup> XR成像系统(Bio-Rad)、Nano Drop 2000分光光度计(Thermo)、蛋白纯化仪(GE)、电泳仪(BIO-RAD)、台式冷冻离心机(Thermo)和荧光显微镜(Nikon)。

### 1.2 总RNA制备和cDNA合成

根据TRIzol总RNA提取试剂盒说明书提取凡纳滨对虾血细胞的总RNA。在1%MOPs琼脂糖凝胶上电泳检查RNA完整性,并通过Gel Doc<sup>TM</sup> XR成像系统观察记录,使用Nano Drop 2000分光光度计测量RNA浓度,用DNase I处理消化可能的基因组DNA污染。依据M-MLV逆转录酶使用说明书和衔接引物AOLP (5'-GGCCACGCGTCGAC TAGTAC(T)16(A/C/G)-3')合成第一链cDNA。

### 1.3 LvLc1基因的克隆

为了获得LvLc1全长cDNA序列,根据本实验室转录组测序结果提示,设计该序列特异性引物LvLc1F (5'-ATGAAGCCCGTGCTTGTGCTC-3')和LvLc1R (5'-TCACTAGAGGTGTTGTTCA CA-3'),以凡纳滨对虾血细胞cDNA为模板,利用PCR方法进行扩增,克隆得到凡纳滨对虾LvLc1 cDNA的完整开放阅读框(ORF),与克隆载体pMD18-T连接,挑取阳性克隆进行测序验证。

### 1.4 生物信息学分析

应用在线软件BLAST将LvLc1与GenBank中的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行比对分析;使用ExPASy在线工具计算LvLc1蛋白预测的分子量和计算的等电点,Signalp 4.1 Server进行信号肽分析,SMART在线软件分析蛋白质的结构域和功能位点;利用Clustal-X和MEGA 5.0软件进行多序列比对和聚类分析,系统发生树采用Neighbour-Joining方法构建。

### 1.5 目的蛋白rLvLc1的原核重组表达

**表达载体构建** 分别根据LvLc1和表达载体pET-28a(+)的序列设计原核表达引物LvCRD-F (5'-GGAATTCCATATGTGCTCCCCGGGCGTG G-3')和LvCRD-R (5'-CGGAATTCTCAGTGGTGGT GGTGGTGGTGTTCACAAACAATAGGT-3')。上下游引物的5'端分别含有Nde I和EcoR I限制性酶切位点,利用PCR反应扩增成熟肽区域的CRD结构域,进行常规纯化连接和测序。用限制性内切酶Nde I和EcoR I双酶切含有克隆片段的重组质粒和质粒pET-28a (+),然后用T4 DNA连接酶连接。将构建好的重组表达质粒pET-28a (+)-LvLc1转化到大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,经过PCR验证正确的阳性克隆送公司测序。

**重组蛋白的诱导表达与质谱鉴定** 将重组质粒pET-28a(+)-LvLc1转化大肠杆菌Transetta (DE3)感受态细胞,挑选阳性克隆接种于含有氨苄青霉素的LB培养基中,37℃孵育至细胞密度达到 $OD_{600\text{ nm}}=0.6\sim 0.8$ 。再加入异丙基- $\beta$ -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导6 h,离心收集菌体,参照说明书加入破碎缓冲液,在冰浴条件下超声波破碎菌体,然后使用洗涤缓冲液洗涤杂蛋白,最后将包涵体溶解在Wash I溶液中,按照His Trap FF纯化柱和蛋白纯化仪使用说明纯化重组蛋白质。通过使用12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测纯化后的蛋白质,将目的条带切下,送深圳华大基因有限公司进行质谱鉴定。

**重组蛋白的复性与冻干** 采用透析复性的方法,通过逐级降低透析液中尿素的浓度,使蛋白恢复正确构型。将复性后的蛋白置于冻存管中冻干、称重,于-80℃保存用于后续实验。

## 1.6 重组目的蛋白的活性分析

**重组目的蛋白的病原菌凝集活性分析** 实验方法参照刘逸尘等<sup>[16]</sup>的方法,实验过程中重组蛋白浓度:50~500  $\mu\text{g/mL}$ 。

**重组目的蛋白的糖结合活性分析** 实验方法参照刘逸尘等<sup>[16]</sup>的方法,实验中所用的糖类为D-半乳糖、D-甘露糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-葡萄糖、D-果糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、肽聚糖、脂多糖和 $\beta$ -1,3-葡聚糖。

## 2 结果

### 2.1 序列及生物信息学分析

**LvLc1基因序列分析** 以凡纳滨对虾血细胞cDNA为模板,克隆获得了LvLc1的全长cDNA序列(GenBank注册号:KY937940),该基因的开放阅读框(ORF)序列为891 bp,编码296个氨基酸,其预测的分子量为30.48 ku,计算的等电点为8.23。N-末端含有16个氨基酸的信号肽,没有跨膜区。ExPASy的SMART分析显示氨基酸序列的羧基末端包含一个C型凝集素家族成员保守的CRD结构域,该结构域中具有一个特征性半乳糖结合基序QPD,其中4个保守的半胱氨酸残基(Cys<sup>182</sup>-Cys<sup>292</sup>和Cys<sup>265</sup>-Cys<sup>284</sup>)形成了两对二硫键。

LvLc1基因的多重序列比对及系统发生分析

将LvLc1推导的氨基酸序列进行BlastP比对,结果发现:该蛋白与甲壳纲其他物种的C型凝集素蛋白大致有38%~55%的相似度,与克氏原螯虾相似度最高,达到55%,其次与信号小龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)的相似度达到54%、与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)、中国明对虾等也有较高的相似度。比对结果表明:LvLc1与大多数无脊椎动物CTL蛋白的相似度较高,尤其在虾类中相似度都达到45%以上,糖识别序列QPD也高度保守(图1)。对LvLc1进行系统发生分析显示:LvLc1与无脊椎动物节肢动物门的CTL蛋白聚为一支,亲缘关系较近(图2)。

### 2.2 目的蛋白rLvLc1诱导表达与质谱鉴定

IPTG诱导LvLc1原核重组表达结果表明:宿主菌株的蛋白质表达谱发生了改变,出现了与预期分子量19.7 ku大小相近的蛋白条带(图3),将蛋白纯化后再次通过SDS-PAGE检测后发现目的条带单一,质谱鉴定结果证实重组目的蛋白即为凡纳滨对虾C型凝集素LvLc1。

### 2.3 重组目的蛋白的活性分析

**重组目的蛋白(rLvLc1)对病原菌的凝集活性分析** 通过DAPI染色发现:在 $\text{Ca}^{2+}$ 存在的条件下,rLvLc1可以凝集全部8种实验用菌株(表1):其中包括G+(苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌)、G-(鳗弧菌、哈维氏弧菌和大肠杆菌)及真菌(酿酒酵母菌和白色念珠菌);同时发现重组目的蛋白在 $\text{Ca}^{2+}$ 不存在的条件下不具有凝集活性。

**重组目的蛋白的糖结合活性分析**

rLvLc1蛋白对大肠杆菌凝集活性可被与其结合的多糖成分抑制,进而可分析rLvLc1与多糖的结合活性。研究结果发现rLvLc1的凝集活性能被D-半乳糖、D-果糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、D-甘露糖、D-葡萄糖、脂多糖等进行不同程度的抑制。表2显示了各种受试糖类对rLvLc1凝集活性的最小抑制浓度。

## 3 讨论

由于甲壳动物缺乏特异性免疫系统,所以在遇到外界刺激或病原攻击时,主要由固有免疫系统发挥免疫防御作用,其中C型凝集素在机体抵御病原感染的过程中发挥着重要作用。C型



<i>Litopenaeus vannamei</i>	1	-MKPVLVLLAVAATARAQYGGSVGAASFSSASAGFGSSVVALGVSNGFGSSAGVGFGRPVGVG-AFGSSSLGGSAASAAAYSGSGGFGSG
<i>Procambarus clarkii</i>	1	-MKGVLAFLSVVV-----GVSQCQLPYGSIYGGGGGFPQRHNNFPRGPIFPGRPGGGVGGGPIKFPSSVAGSVHGKPG-GVG
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	1	-MKCVLLVLSVVV-----AVAQSQVPYGSDFGGGGFP-----GRPGIHPGRHGGG-----GQIQFPGSRPG-LHGKPG-GIS
<i>Panulirus homarus</i>	1	MIRNLIIFAVLS-----ATYQGVFNRYIHQG-----PVILQRPTQPVFNIPAPQPIFNIPAPQPVFTIPSPQPVFA
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	1	-----MVKIVIAFLVLCVSNLSHGVRVRTLIRNQNAEINVLVGGNDNQIRQTSGNSINRNNNNVQR
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	1	-----MAKIVITLLLLCIGNLGNVAVKVTLLRNQNSNTQVFLVGGNDQTDQRTSSNNINRNDGRVSS
<i>Scylla paramamosain</i>	1	-MR--FSYDQTP-----LAEGVVVGGAVSPR-----ISVVG-NAPQVAVQLSGPVVVPVTSVPTFQQPFPAITT
<i>Lasius niger</i>	1	-----MRAICLLLVGIVAV
<i>Danaus plexippus</i>	1	-----MNLGGLIREDACACASSSETTAVDTRFLRTRRRLTSSNARNQLHFKLPEMSRHCLAALAAV
<i>Papilio xuthus</i>	1	-----MSRKVCLAAA--LLAL
<i>Portunus pelagicus</i>	1	-----MGLTVCLAQFGG-----QNFSSNQFRFRGPPSR
<i>Danio rerio</i>	1	-----THSSSEASLKVIICR
<i>Homo sapiens</i>	1	-----MHDSNNVEKDIPTSELNANPGLSHKSFISKATLIW
<i>Mus musculus</i>	1	-----MWLEESQMKSGTRHPQLIPCFAVVSISFLSACESTICTLVTH
<i>Litopenaeus vannamei</i>	89	SFGSGGPIIFPTAGRPVNLVPRPGRGPRGLPVGRPAGFPFVRPAPALASQYPICSFGVVDHQAQVSRVHFSWCHDGFKNYTGQDA
<i>Procambarus clarkii</i>	78	GFGNAG--GIG--GAGIIG--GFGGA--VG-----GGVQERPLSTQFCPAYISPLVHVSVSGSNVHFSWCADGGQKYVWEQA
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	65	GFGGAG--GVGGFGGAGGVGGAGGFGGAGVGLVGTGGGGQAQEQPLSTKFPYIPAYISPVHVSLLGGSNVHFSWCVDGQKQYVWQA
<i>Panulirus homarus</i>	68	QTNPRS-----FPASIS-----RPSATTPIPQICDPINKPLVDEIHNGRAVHFSWCRNRYGQRYTWHDA
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	64	TRNQ-----DAGAVQPTG-----NQNAVVIQPIITDNRRTQGNPQVQQQFQGSDDVHATT--LGSDFHFSWRRDRNGKYRH--G
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	64	NRQQSN-----NNANVQTPQNLIRPSQNVNRQAITVNSRGNQDQPRQQSAGTSFIHDTT--SGSNVHFSWRRDRKRFHS--T
<i>Scylla paramamosain</i>	64	PFSQTS-----PLSPLA-----STPPSPDGPRRCSYPPQGFVVHETLNGREHFSWCSQPGRFTSYQQA
<i>Lasius niger</i>	15	N-----AQRRLALPDRSCANVRHSSYRDGRGVHSHVHFSWEHQPTRSLEVDWL
<i>Danaus plexippus</i>	66	LCVA-----DAQRRALPDRSCANVRHSTYRDGRVLHSHVHFSWEHAPTRSEVDWL
<i>Papilio xuthus</i>	15	FCYA-----DAQRRALPDRSCANVRHATYRDGRGVHSHVHFSWEHPTRNLEVDWL
<i>Portunus pelagicus</i>	30	SRGR-----NSFRSFRPQSQRSGGTGAHHSD--NEYDHYSLWLN--ERSLDG--G
<i>Danio rerio</i>	16	P-----RFMMFLRLSLLLLSIVFMEGAPEERLCERGVSRSGSRCFRFFSR
<i>Homo sapiens</i>	37	RLFFLIMF-----LTIIVCGMVAALSAIRANCHQEPSVCLAQAACPSSWIGFGRKCFYFSD
<i>Mus musculus</i>	44	HYFLRWTR-----GSVKLSDYHTRVTCIREEPQPGATGTTCCPYSWRAFGSNCFPLND
<i>Litopenaeus vannamei</i>	179	ILYCTSLGP--GWDGVSLETPQEDQLLSQIVGGHNLAWLWTAETDING-----AFLPSPRTYGTVPVLYNN--WSHT
<i>Procambarus clarkii</i>	148	KNYCKKLG--GWSSVSETPTEHQFSSIDKIHGLPYIWTSGNRLGG-----PKGKWTATG--QPLTYNN--WALT
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	150	NSYCKQLGP--GWGAVSEPTENQFISTIIDKHSLLPYIWTSGNRLSGG-----LNDRTGTG--QPLKYEN--WART
<i>Panulirus homarus</i>	127	VHYCNLGN--GFQAVSLEDKPEDDFIKYVLSTIENIPHWTSNRLHS-----YYTWTQSN--VNTGYTN--WSHT
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	134	DAVN--YCRNLG--SRWNAISLETRSDYINRVIDSNDVSYIWTSGTRV-----GNSWRNNGPGAGAFQGLN--WGLT
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	142	DAVN--YCRNLG--DRWNAISLETRSDYINGVIDSDNVPIYIWTSGSKV-----GNDWRNNGPGAGAFQGLN--WSSI
<i>Scylla paramamosain</i>	123	EDYCRSLDTNGHPVGFHLSLETPVEDSFTISIRHYEVVPIYIWTSGYKVP-----YLKWKQSC--VASQYSR--WSFT
<i>Lasius niger</i>	65	DARN--ICRR--HCMDAVSLETPQENEFIKQKILARGNRYIWTSGRKNCFNGCDRADLPQNIINGVHFSGSGAKIGPTTQRNSGDHSTN
<i>Danaus plexippus</i>	120	DARN--ICRR--HCMDAVSLETPQENEFIKQKILARGNRYIWTSGRKNCFNGCDRPLQPPNVNGVHFSGSGAKIGPTQQRNTGDWSYI
<i>Papilio xuthus</i>	69	DARN--ICRR--HCMDTVSLETPQENEFIKQKILARGNRYIWTSGRKNCFNGCDRPLQPPNVNGVHFSGSGAKIGPTTQRNTGDWSYI
<i>Portunus pelagicus</i>	78	DAVNSYCRSQ--DGWTVSLESRSRNSFTIQLIGG--NVPIYIWTGAKRR-----GNFVWSNGLVGTATFSS--WSHT
<i>Danio rerio</i>	63	SVNWTVAERNCSLGGNLASVHDQVENDFLSLVPGSTRCWIGGHGEGNG-----QLLWSDG--SVYGYTN--WCSG
<i>Homo sapiens</i>	93	TKNWTSSQRFCDSQADLAQVSEFQENLFLLR--YKGPSDHWIIGLSREQQP-----MKWING--TEWTR--QFPII
<i>Mus musculus</i>	101	NQTHESERNCSGMSHLVTLNTEAENQNVTLQDKRFSYELGLADENVEG-----QLLQVWDTKTPFNPTVF--WEKG
<i>Litopenaeus vannamei</i>	248	GFD--GQRPQDNR--ENNDRCLAI--LNNFY--NDGIKWHDIGCHHQKPIVCEQHL-----
<i>Procambarus clarkii</i>	215	GFTPGKQPQDNR--EDNNEQCLSVLNRFPYNDGITWHDVGCHEHVKPTICEYTNVQSYVG-----
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	217	GFIPGNPQDNR--EDNNEQCLSVLNRFPYNDGITWHDVGCHEHVKPTICEYSKVQSYAG-----
<i>Panulirus homarus</i>	192	GRR--GLPQPDNR--EQN--ENCLAVLNHY--NDGITWHDVSRDALKHVICBARQFYH-----
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	202	GGE--GQPQDNR--AGDENCLGILNRFYVNDGITWHDVACHTLKPVACBRHL-----
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	210	GGE--GQPQDNR--FGDENCLGILNRFYVNDGITWHDVACHTLKPVACBQRL-----
<i>Scylla paramamosain</i>	193	GFR--GRSQPDNR--DMN--ENCLAI--LNNFY--GDGITWHDVDCSLBRYVICRPRTHDS-----
<i>Lasius niger</i>	150	GGY--GQPQDNR--REAAQGNDESLSLN--NFYNDGIKWHDVACHHVKPFVCDSDDELLNFVASRNP-----
<i>Danaus plexippus</i>	205	GGY--GQPQDNR--REAAQGNDESLSLN--NFYNDGIKWHDVACHHVKPFVCDSDDELINFVRSRNPGLRL-----
<i>Papilio xuthus</i>	154	GGY--GQPQDNR--REAAQGNDESLSLN--NFYNDGIKWHDVACHHVKPFVCDSDDELINFVRSRNPGLRL-----
<i>Portunus pelagicus</i>	146	GGE--GQPQDNR--DPPENCLAVLGRQVYHDGITWHDVCKTHKVPVCEBRKF-----
<i>Danio rerio</i>	132	EPS-----SGSEHCLFENW--TSDRCLNNGQSTRMGYLCAKRRV-----
<i>Homo sapiens</i>	159	GAG-----ECAYLND--KGASSARHYTERKWIICKSDIHW-----
<i>Mus musculus</i>	172	ESN-----DFMEEQCVVLVH--VHEKWNDFPCHFEVRRICKLPGITFNWPKPSK-----

图 1 LvLc1与其他物种C型凝集素蛋白的多序列比对结果

GenBank注册号: 克氏原螯虾(ACR20475.1), 信号小龙虾(AAX55747.1), 波纹龙虾(ANV21369.1), 日本囊对虾(AHA83582.1), 中国明对虾(ACJ06430.1), 拟穴青蟹(ADF27340.1), 黑蚁(KMQ90232.1), 黑脉金斑蝶(EHJ70690.1), 柑橘凤蝶(BAG30713.1), 远海梭子蟹(ABM65756.1), 斑马鱼(DQ372603.1), 人(AF285087.1), 小鼠(AF061272.1)

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of LvLc1 with C-type lectins from other species

GenBank accession number: *Procambarus clarkii* (ACR20475.1), *Pacifastacus leniusculus* (AAX55747.1), *Panulirus homarus* (ANV21369.1), *Marsupenaeus japonicas* (AHA83582.1), *Fenneropenaeus chinensis* (ACJ06430.1), *Scylla paramamosain* (ADF27340.1), *Lasius niger* (KMQ90232.1), *Danaus plexippus* (EHJ70690.1), *Papilio xuthus* (BAG30713.1), *Portunus pelagicus* (ABM65756.1), *Danio rerio* (DQ372603.1), *Homo sapiens* (AF285087.1), *Mus musculus* (AF061272.1)

凝集素属于一大类具有多功能的基因家族, 参与细胞黏附、调理吞噬、促进血细胞活化、创伤修复等多种作用过程。在无脊椎动物中, 已报道凝集素分子在固有免疫反应中发挥着多重重要功能, 如酚氧化酶活化、凝集活性、细胞粘附、细菌清除、吞噬调理作用等<sup>[17-19]</sup>, 同时CTLs也被报道参与抗真菌和抗病毒防御<sup>[20-22]</sup>。与脊椎动物凝集素相比, 甲壳类动物凝集素的分

子特征和功能在近年来刚刚开始被人们所了解, 研究主要集中在基因克隆、组织表达、应答病原感染的表达变化模式分析和活性初步分析等基础研究方面。本研究中, 根据实验室前期转录组信息的提示, 从凡纳滨对虾血细胞中克隆获得了一种新的C型凝集素分子LvLc1。生物信息学分析显示LvLc1与无脊椎动物节肢动物凝集素家族成员聚在一支, 亲缘关系较近, BLAST

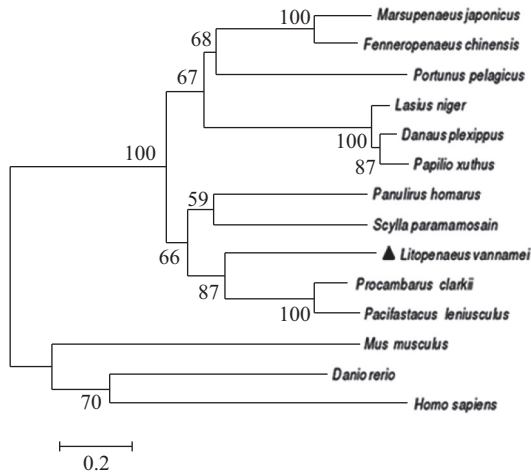


图2 LvLc1与其他物种C型凝集素之间的进化发生分析

GenBank注册号: 克氏原螯虾(ACR20475.1), 信号小龙虾(AAX55747.1), 波纹龙虾(ANV21369.1), 日本囊对虾(AHA83582.1), 中国明对虾(ACJ06430.1), 拟穴青蟹(ADF27340.1), 黑蚁(KMQ90232.1), 黑脉金斑蝶(EHJ70690.1), 柑橘凤蝶(BAG30713.1), 远海梭子蟹(ABM65756.1), 斑马鱼(DQ372603.1), 人(AF285087.1), 小鼠(AF061272.1)

Fig. 2 Phylogenetic analysis of LvLc1 and C-type lectins from other species

GenBank accession number: *Procambarus clarkii* (ACR20475.1), *Pacifastacus leniusculus* (AAX55747.1), *Panulirus homarus* (ANV21369.1), *Marsupenaeus japonicas* (AHA83582.1), *Fenneropenaeus chinensis* (ACJ06430.1), *Scylla paramamosain* (ADF27340.1), *Lasius niger* (KMQ90232.1), *Danaus plexippus* (EHJ70690.1), *Papilio xuthus* (BAG30713.1), *Portunus pelagicus* (ABM65756.1), *Danio rerio* (DQ372603.1), *Homo sapiens* (AF285087.1), *Mus musculus* (AF061272.1)

结果、系统发生分析以及后续的活性验证所显示的结构关系和功能特征均表明LvLc1应为对虾CTL超家族的一个新成员。

CRD结构域作为C型凝集素家族成员共有的特征性功能结构域, 在凝集素分子中往往是一个或多个呈串联结构排列, 本研究中的LvLc1基因预测的蛋白分子中仅含有一个CRD结构域, 该结构域中具有4个保守的半胱氨酸; LvLc1中有一个推断的信号肽序列, 表明它可能定位于细胞表面或者作为一个分泌蛋白发挥功能。目前在对虾中报道的含有单一CRD的C型凝集素有来自凡纳滨对虾的LvAV、LvCTL4<sup>[23-24]</sup>和来自中国明对虾的FcLec4<sup>[10]</sup>, 这些凝集素通常在CRD中有一个保守的糖基识别基序, 其中QPD motif (Gln-Pro-Asp)对结合半乳糖和半乳糖衍生物的亲和性较高, EPN motif (Glu-Pro-Asn)对结合甘露糖的亲和性较高<sup>[6-8]</sup>。在LvLc1的CRD中具有QPD保守基

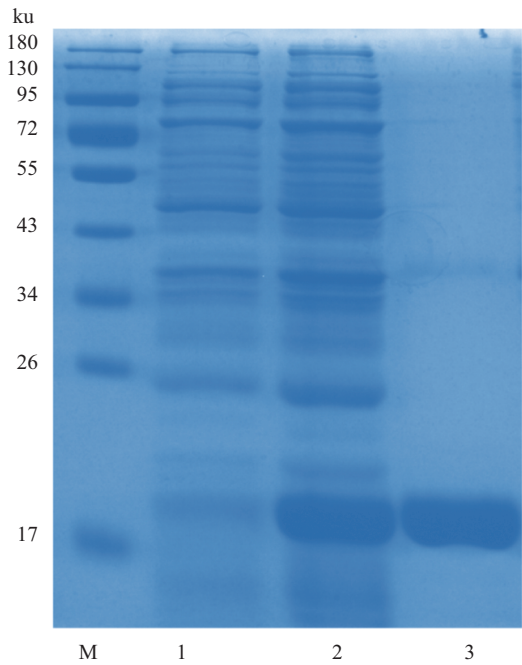


图3 目的蛋白rLvLc1重组表达与纯化后电泳检测图

M. 蛋白质分子量标准, 1. 未诱导的工程菌蛋白粗提物, 2. IPTG诱导后的工程菌蛋白粗提物, 3. 纯化后的目的蛋白rLvLc1

Fig. 3 Recombination, identification and purification of rLvLc1

M. protein molecular weight (kDa) marker; Lane 1. crude extract from *Transetta* (DE3) (the expression vector uninduced); Lane 2. crude extract from *Transetta* (DE3) (the expression vector induced with IPTG); Lane 3. the purified rLvLc1

表1 重组目的蛋白rLvLc1对不同病原菌的凝集活性及最小凝菌浓度

Tab. 1 Pathogens agglutinating activity of rLvLc1 protein

菌株 microorganism	受试范围内最小凝菌浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	
	rLvLc1	
革兰氏阳性菌		
Gram-positive bacterium, G <sup>+</sup>		
苏云金芽孢杆菌	100	
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
金黄色葡萄球菌	100	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
枯草芽孢杆菌	100	
<i>Bacillus subtilis</i>		
革兰氏阴性菌		
Gram-negative bacterium, G <sup>-</sup>		
大肠杆菌	100	
<i>Escherichia coli</i>		
鳃弧菌	100	
<i>Vibrio anguillarum</i>		
哈维氏弧菌	100	
<i>Vibrio harveyi</i>		
真菌 Fungi		
巴斯德毕赤酵母菌	500	
<i>Pichia pastoris</i>		
白色念珠菌	100	
<i>Candida albicans</i>		



表 2 重组目的蛋白rLvLc1的糖结合活性分析及  
最小抑制浓度

Tab. 2 Carbohydrates recognition activity of  
rLvLc1 protein

糖 saccharides	rLvLc1
D-甘露糖 D-mannose	100 mmol/L
D-果糖 D-fructose	50 mmol/L
D-葡萄糖 D-glucose	100 mmol/L
D-半乳糖 D-galactose	25 mmol/L
N-乙酰-D-半乳糖胺 N-Acetyl-D-galactosamine	50 mmol/L
N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-glucosamine	NA
乳糖 lactose	NA
蔗糖 suerose	NA
麦芽糖 maltose	NA
海藻糖 rehalose	NA
肽聚糖 peptidoglycan	NA
脂多糖 LPS	50 μg/mL
β-1,3-葡聚糖 β-1,3-glucan	NA

注: NA. 在重组目的蛋白rLvLc1>500 mmol/L或>1 mg/mL条件下, 仍无法抑制细菌凝集作用

Notes: NA. The bacterial agglutination still cannot be inhibited under the concentration of rLvLc1 >500 mmol/L or >1 mg/mL

序, 它是否具有半乳糖结合活性以及对其他多糖是否也具有结合活性是我们本研究的重点。多序列比对分析显示LvLc1与已报道的凡纳滨对虾CTL并无显著相似性, 但与克式原螯虾的甘露糖结合凝集素相似性最高, 达到了55%, 进化分析显示其也与克式原螯虾和信号小龙虾来源的甘露糖结合凝集素分子聚类在一个分支, 有较近的亲缘关系, 序列上的相似性在一定程度上也反映了功能的相似性。

为了进一步证实LvLc1在对虾免疫应答中的重要作用, 我们利用原核重组表达技术获得了有活性的重组LvLc1蛋白(rLvLc1), 并进一步分析了其对病原微生物的凝集活性和对微生物表面多糖的识别结合活性。研究发现: 在Ca<sup>2+</sup>存在的条件下, rLvLc1可以凝集所有受试病原菌, 包括G<sup>+</sup>(苏云金芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)、G<sup>-</sup>(鳃弧菌、大肠杆菌和哈维氏弧菌)以及部分真菌(巴斯德毕赤酵母菌和白色念珠菌)。对微生物的凝集活性是CTL的重要特征之

一, 已有研究发现不同来源的CTL可以凝集不同类型的病原菌, 在对虾中报道的CTL也可以与不同种类的微生物结合, 例如, 在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中发现其CTL可以结合G<sup>+</sup>(金黄色葡萄球菌、藤黄链霉菌、枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌)和G<sup>-</sup>(嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、鳃弧菌和大肠杆菌)<sup>[25]</sup>。斑节对虾的PmLec可凝集G<sup>-</sup>(大肠杆菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌和溶藻弧菌)和酵母<sup>[19]</sup>。与已报道的对虾CTL相比, LvLc1显示了更广谱的病原菌凝集活性, 这为将其开发为具有免疫增强效果的活性饵料奠定了基础。

目前已知CTL的EPN或QPD基序对于其结合甘露糖或半乳糖很重要。在本研究中, LvLc1具有高度保守的半乳糖特异识别基序QPD。通过糖结合实验发现, LvLc1不仅能特异的结合D-半乳糖, 还能结合其他多种单糖, 如: D-果糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、D-甘露糖、D-葡萄糖, 此外还能与G<sup>-</sup>的表面多糖成分脂多糖结合。rLvLc1通过其CRD结构域与单糖或多糖分子结合, 糖类分子作为竞争者与细菌竞争, 结合到rLvLc1分子上, 从而抑制了rLvLc1对受试菌(大肠杆菌)的凝集。Ca<sup>2+</sup>作为CRD保持其空间结构所必需的因素, 是CTL发挥识别和凝集功能的关键, 在本研究中也同样如此, 未添加Ca<sup>2+</sup>的对照组中, rLvLc1失去了对糖类分子的识别活性和对病原菌的凝集活性, 这与其他CTL分子的识别结合活性研究结果相一致<sup>[25-27]</sup>。考虑到对微生物表面上的PAMP的鉴定和结合是第一道防线, LvLc1对PAMP广泛的结合谱也表明其对于多种病原微生物具有重要的免疫识别防御作用。本研究中, 我们克隆并鉴定了来自凡纳滨对虾的一种新的C型凝集素(LvLc1), 发现其可以结合单糖和多糖, 如D-半乳糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、D-甘露糖、LPS等, 并且对包括G<sup>+</sup>、G<sup>-</sup>以及部分真菌在内的多种病原菌具有结合和凝集活性, 上述研究结果表明LvLc1作为C-型凝集素家族一个新成员, 可能作为对虾固有免疫中重要的模式识别受体之一, 参与了机体应答病原微生物侵染的防御过程。后续关于LvLc1与对虾白斑杆状病毒(WSSV)相互作用的研究正在进行中, 对CTL与多种病原相关分子模式作用特征和机理的探讨将有助于更好地了解对虾免疫防御功能和机制。

## 参考文献:

- [1] Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway C A, *et al.* Phylogenetic perspectives in innate immunity[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1313-1318.
- [2] Janeway C A Jr, Medzhitov R. Innate immunity recognition[J]. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20: 197-216.
- [3] Medzhitov R, Janeway C A Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system[J]. *Science*, 2002, 296(5566): 298-300.
- [4] Christophides G K, Vlachou D, Kafatos F C. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198: 127-148.
- [5] Medzhitov R, Janeway C A Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1997, 9(1): 4-9.
- [6] Wang X W, Wang J X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity[J]. *Developmental and comparative immunology*, 2013, 39(1-2): 27-38.
- [7] 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.
- [8] Zelensky A M, Gready J E. The C-type lectin-like domain superfamily[J]. *The FEBS journal*, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [9] Ma T H, Benzie J A, He J G, *et al.* PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 99(3): 332-341.
- [10] 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.
- [11] Lai X F, Kong J, Wang Q Y, *et al.* Identification and molecular characterization of a C-type lectin-like protein from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(3): 2223-2230.
- [12] Wei X, Liu X, Yang J, *et al.* Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 132-140.
- [13] Chen D D, Meng X L, Xu J P, *et al.* PcLT, a novel C-type lectin from *Procambarus clarkii*, is involved in the innate defense against *Vibrio alginolyticus* and WSSV[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 255-264.
- [14] Zhang X W, Wang Y, Wang X W, *et al.* A C-type lectin with an immunoglobulin-like domain promotes phagocytosis of hemocytes in crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 29924.
- [15] Yang J L, Qiu L M, Wei X M, *et al.* An ancient C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-2) that mediate pathogen recognition and cellular adhesion[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34(12): 1274-1282.
- [16] 刘逸尘,刘丽静,张亦陈,等. 中国明对虾C-型凝集素基因(Fclectin)的重组表达及活性分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1493-1502.
- Liu Y C, Liu L J, Zhang Y C, *et al.* Recombinant expression and functional characterization of a C-type lectin (Fclectin) from the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1493-1502(in Chinese).
- [17] 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*, 2005, 1724: 86-93.
- [18] Junkunlo K, Prachumwat A, Tangprasittipap A, *et al.* A novel lectin domain-containing protein (LvCTLD) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*) to yellow head virus (YHV)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 37(3-4): 334-341.
- [19] Luo T, Yang H, 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.
- [20] Song K K, Li D F, Zhang M C, *et al.* Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(4): 596-603.
- [21] 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.
- [22] Willment J A, Brown G D. C-type lectin receptors in antifungal immunity[J]. *Trends in microbiology*, 2008, 16(1): 27-32.
- [23] Li H, Chen Y, Li M, *et al.* A C-type lectin (LvCTL4) from *Litopenaeus vannamei* is a downstream molecule of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and participates in antibacterial immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 257-263.
- [24] He S, Song L, Qian Z, *et al.* Molecular characterization of LvAV in response to white spot syndrome virus infection in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 48-55.
- [25] Huang X, Huang Y, Shi Y R, *et al.* Function of a novel C-type lectin with two CRD domains from *Macrobrachium rosenbergii* in innate immunity[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 49(1): 121-126.
- [26] Wongpanya R, Sengprasert P, Amparyup P, *et al.* A novel C-type lectin in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* functions as a pattern recognition receptor by binding and causing bacterial agglutination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 103-113.
- [27] Li M, Li C, Ma C, *et al.* Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 231-240.



## Characterization and bioactivity analysis of a novel c-type lectin (LvLc1) from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

LI Junye<sup>1</sup>, SONG Qiaozhen<sup>1</sup>, ZHANG Yichen<sup>1</sup>, LIU Yichen<sup>1\*</sup>, GENG Xuyun<sup>2</sup>, SUN Jinsheng<sup>1</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance/College of Life Science,  
Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Aquatic Animal Infectious Disease Control and Prevention Center, Tianjin 300221, China)

**Abstract:** As a family of carbohydrate binding proteins with Ca<sup>2+</sup>, C-type lectins play important roles in the first line of innate immune defense. In this research, a novel C-type lectin gene (*LvLc1*, GenBank Accession Number: KY937940) was cloned from *Litopenaeus vannamei* according to the data of shrimp transcriptome in our lab. The full-length cDNA consists of 1251 bp with an 891 bp open reading frame, encoding 296 amino acids. The deduced amino acid sequence contains a putative signal peptide of 19 amino acids. It also contains one carbohydrate recognition domains/C-type lectin-like domains (CRD). The potential carbohydrate-binding motif (QPD) presented in the CRD of *LvLc1* may support its ability to bind galactose-type sugars. The deduced amino acid sequence of *LvLc1* showed high identity with mannose-binding lectins of arthropod *Procambarus clarkii* and *Pacifastacus leniusculus*. It could be deduced that *LvLc1* is a novel member of C-type lectin superfamily. The recombinant target protein (rLvLc1) was expressed by prokaryotic expression system. The LC-ESI-MS analysis showed that the peptide fragments of rLvLc1 were identical with the corresponding sequence of *L. vannamei* C-type lectin. rLvLc1 had agglutinating activity against main pathogens (G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> and fungi) in aquaculture in a calcium-dependent manner. The agglutinating activity can be inhibited by multiple carbohydrates, such as galactose, mannose and lipopolysaccharide. These results suggest that *LvLc1*, as a Ca<sup>2+</sup> dependent carbohydrate-recognition protein, is one of the important PRRs. It might play a crucial role in the innate immunity of the shrimp and it is expected to be applied to disease control.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; C-type lectin; carbohydrate recognition domain (CRD); recombinant expression; agglutinating; carbohydrate binding activity

**Corresponding author:** LIU Yichen. E-mail: liuychn@outlook.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31472299); Natural Science Foundation of Tianjin (15JCZDJC33800); Open Research Funding of Tianjin Key Lab. of Aqua-Ecology and Aquaculture (TJAE2015005); National Key Technology R&D Program (2011BAD13B04)