

文章编号: 1000-0615(2019)04-0751-12

DOI: 10.11964/jfc.20180511272

罗氏沼虾几丁质酶3B基因的克隆及其在蜕皮周期中的表达

叶成凯^{1,2}, 卢志杰^{1,2}, Sarath Babu V¹, 张晓君³, 刘晓丹³,
赵丽娟², 潘淦^{1*}, 林鑫^{2*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东广州 510631;

2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,

广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225;

3. 扬州大学动物科技学院, 江苏扬州 225000)

摘要: 罗氏沼虾的生长发育及繁殖都与蜕皮紧密相关。几丁质酶是甲壳动物在蜕皮过程中最重要的酶之一。本研究对罗氏沼虾蜕皮周期外观特征和腹肢刚毛进行了观察描述, 克隆并分析了罗氏沼虾几丁质酶III基因(*MrChi3B*), 制备了几丁质酶III蛋白的多克隆抗体, 研究了其在蜕皮周期中的表达。罗氏沼虾几丁质酶基因cDNA的开放阅读框为1 143 bp, 编码380个氨基酸, 大小为41.91 ku。通过氨基酸序列比对发现, *MrChi3B*与日本沼虾几丁质酶基因(*Chi3B*)的同源性最高, 为94%。*MrChi3B*含有一个糖苷键水解酶家族18的催化域。实时定量PCR (qRT-PCR)和蛋白印迹法(WB)检测结果显示, *MrChi3B*在罗氏沼虾多个组织中均有表达, 但是不同组织中的表达有差异。在蜕皮期之后, 其在胃、表皮和肌肉中的表达量显著上升。在胃中其表达量在蜕皮间期达到最高; 在表皮和肌肉中其表达量在蜕皮后期达到最高; 肠中的表达量在蜕皮前期和蜕皮期有所上升; 眼柄期的表达量在所有蜕皮期都偏低。本研究结果为进一步研究几丁质酶的功能提供参考依据。

关键词: 罗氏沼虾; 几丁质酶; 基因克隆; 蜕皮周期; 表达

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

几丁质又称壳多糖, 广泛分布于自然界, 是自然界中第二丰富的多糖^[1]。几丁质是由N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖通过β-(1, 4)糖苷键聚合形成的直链多聚糖^[2]。几丁质不仅是甲壳动物外骨骼的重要组成成分^[3], 还广泛存在于甲壳动物肠道围食膜、节肢动物外骨骼和真菌的胞壁中^[4-6], 起到重要的保护作用。甲壳动物在生长发育过程中都需要经历多个蜕皮周期, 主要分为蜕皮后早期(postmolt A, A期)、蜕皮后晚期(postmolt B, B期)、蜕皮间期(intermolt C, C期)、蜕皮前期(premolt D, D期)、蜕皮期(molt E, E期)。在蜕皮期几丁质消化酶将旧壳中的几丁质降解, 使旧壳变得松软, 促进甲壳动物从旧壳中蜕出^[7-11]。甲壳动物蜕皮周期中的几丁质分解需要几丁质酶

(chitinase)和N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶。首先由几丁质酶将几丁质分解为寡聚N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖, 再由N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶将寡聚N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖水解成寡聚N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖单体^[12]。除此之外几丁质酶还具有消化食物和参与免疫防御的重要功能^[13-15], 探究几丁质酶在甲壳动物蜕皮周期的生理功能具有深远的理论意义和实用生产价值。

甲壳动物几丁质酶基因属于糖苷键水解酶基因家族18(glycoside hydrolase family 18)^[16], 简称为GH18。根据几丁质酶氨基酸序列一级结构和高级结构可将甲壳动物几丁质酶分为6类(Group I - VI)^[13]。目前研究比较多的为Group I、II和III, 其中Group I和II的功能主要为在蜕皮过程中分

收稿日期: 2018-05-06 修回日期: 2018-09-02

资助项目: 广东省高等教育“创新强校工程”专项(KA170500G); 江苏省渔业科技创新项目(D2017-3)

通信作者: 潘淦, E-mail: pg2829@sina.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

解几丁质外壳, Group III 主要有消化几丁质食物的功能, 还可能有分解几丁质外壳、降解围食膜和免疫防御的功能。几丁质酶最重要的结构域为GH18催化结构域, 其次多数几丁质酶还含有S/T富集连接区、几丁质结合域和信号肽。近几年几丁质酶逐渐成为研究热点, 目前在日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[16]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[13]和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[17]等甲壳动物, 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)等昆虫^[18-19]中都已开展几丁质酶基因克隆表达和功能分析等研究。研究表明, 几丁质酶基因是多基因家族, 在甲壳动物和昆虫中发现多种几丁质酶基因, 不同种类的几丁质酶基因在甲壳动物和昆虫的不同组织中的时空表达模式和生理功能存在差异。

罗氏沼虾(*M. rosenbergii*)是我国重要的经济虾类。罗氏沼虾的生长发育和繁殖等都要通过蜕皮来实现。虾从出生到死亡都伴随着蜕皮, 虾每次蜕皮后, 体质量和体长等指标都会明显增加。但目前对于罗氏沼虾几丁质酶基因的研究尚未见报道。因此, 对罗氏沼虾的蜕皮周期进行观察并开展其蜕皮相关功能基因的研究, 对实现罗氏沼虾产业的可持续发展, 培育高产高效、品质优良的养殖品种具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用罗氏沼虾购自广州金洋水产养殖有限公司。罗氏沼虾暂养于室内水族缸, 2周饲养

驯化后再开展实验。24 h持续供氧, 保持水温为23~26 °C。实验中使用体质量为11~15 g, 体长为10~13 cm的健康罗氏沼虾80尾, 平均分在4个水族缸中, 每缸20尾。取健康的罗氏沼虾各蜕皮周期的眼柄、肠、鳃、胃、表皮和肌肉6个组织, 分装于RNAiso Plus试剂(TaKaRa公司, 大连)和PBS中, 冻存于-80 °C中备用。大肠杆菌菌株DH-5α和BL21(DE3)(TaKaRa公司, 大连)。

1.2 罗氏沼虾蜕皮周期不同阶段鉴定方法

选取蜕皮后不同阶段的罗氏沼虾, 观察其外部形态变化, 并用剪刀剪去其腹肢末端少部分, 置于加有水滴的普通载玻片上, 分别使用(10×4)和(10×10)2个倍数的光学显微镜观察腹肢刚毛形态并拍照。

1.3 罗氏沼虾几丁质酶基因克隆、生物信息学分析和多克隆抗体制备

罗氏沼虾几丁质酶基因克隆和生物信息学分析 按照RNAiso Plus试剂(TaKaRa公司, 大连)说明书提取罗氏沼虾各组织总RNA, 采用微量分光光度计Nano-200(杭州奥盛仪器有限公司)检测RNA的浓度, 使用反转录试剂盒(Vazyme公司, 南京)按照说明书的实验步骤反转录得到cDNA。通过分析实验室测定的罗氏沼虾的转录组(欧易生物医学科技有限公司, 上海), 发现了罗氏沼虾几丁质酶的基因序列, 并设计引物(表1)克隆几丁质酶基因的开放读码框(ORF)。

PCR反应体系为2×Taq Mix 12.5 μL, 上、下游引物各1 μL (10 μmol/L), cDNA 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。反应程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s,

表1 实验所用引物及其序列

Tab. 1 Primers and sequences

引物 primers	序列(5'-3') sequence(5'-3')	应用 application
MrChi-F1	ATCGTCCAGGTATTCAGAGATG	克隆几丁质酶基因
MrChi-R1	TGCTAGTTGACCCAAAGTGTTTC	
MrChi-F2	CGGGATCCATGAAGTTACTCCTTTTGTCTCGG	亚克隆几丁质酶基因
MrChi-R2	CCCTCGAGTTAAGCTTGCAAGCCCTTTTGTGAG	
qMrChi-F1	GGCTACAAGAAAGACCTTCGTGC	qRT-PCR几丁质酶基因表达
qMrChi-R1	GTTAACGAAATCGTCGGGACTGC	
β-actin-F1	GGTCCAGACTCATCGTACTCTTG	qRT-PCR β-actin基因表达
β-actin-R1	GCACCCTCCACCATGAAGATCAA	

58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)回收条带, 并连接于Pet-32a质粒上(TaKaRa公司, 大连), 转化到*E. coli* DH5 α 中, 涂LB(含Amp)平板培养基。第2天挑取单菌落进行PCR检测, 将阳性克隆置于液体LB培养基中培养。经菌液PCR检测后, 挑取阳性克隆送公司测序。将测序结果于NCBI中比对, 获得几丁质酶的保守区序列, 再以该序列为模板进行扩增, 设计特异性引物, 所用引物见表1。PCR扩增、反应条件、产物纯化、克隆和测序与上述基因片段的克隆相类似。

使用下列软件和工具对罗氏沼虾几丁质酶基因进行生物信息学分析: Clone Manager软件对获得的几丁质酶基因序列进行分析, 确定其开放读码框(ORF); DNAMAN 6.0软件进行氨基酸序列分析; BLAST工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行核苷酸和氨基酸序列相似性分析; 在线软件(<http://www.expasy.org/>)分析蛋白质的特性; 在线软件(<http://pfam.xfam.org/>)预测蛋白质的结构域; MEGA 6.0构建几丁质酶的NJ系统进化树。

罗氏沼虾几丁质酶多克隆抗体制备 根据得到的罗氏沼虾几丁质酶基因序列, 设计引物(表1)扩增开放读码框(ORF)区域(1 143 bp)。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min。将获得的PCR产物按照常规的实验技术连接到Pet-32a质粒(TaKaRa公司), 构建含有His-tag的融合蛋白表达*E. coli* BL21 (DE3), 使用0.2 mmol/L IPTG在37 °C诱导5 h, 收集菌体后, 用PBS按比例稀释, 加入5 \times loading buffer混匀, 沸水煮沸15 min, 上样于12% SDS-PAGE胶, 检测融合蛋白表达。将收集到的Pet-32a载体菌用PBS按比例稀释, 加入5 \times loading buffer混匀, 沸水中煮15 min, 上样于12% SDS-PAGE胶, 2.5 h后进行转膜, 溶解于含5%脱脂牛奶(BD公司, 美国)的TBST溶液中, 室温封闭3 h; 小鼠抗His-tag单抗(1 : 1 000比例稀释)室温孵育膜3 h; TBST洗涤3次, 每次10 min; 再用HRP标记山羊抗小鼠二抗IgG(1 : 10 000比例稀释)(博奥森生物技术有限公司, 北京)孵育膜50 min后, TBST洗涤3次, 每次10 min; ECL显色1 min, 使用ChemiScope 6000获取照片。将收集到的Pet-32a载体菌, 用

PBS按比例稀释进行超声波破碎, 参数为300 W, 10 s超声/10 s间隔, 超声20 min。

将破碎后的菌液进行离心, 取上清液和沉淀用PBS按比例稀释, 加入5 \times loading buffer混匀, 沸水煮沸15 min, 上样于12% SDS-PAGE胶, 检测融合蛋白表达。进行包涵体蛋白的纯化, 复性与溶解。将溶解后的包涵体蛋白加入5 \times loading buffer混匀, 沸水煮沸15 min, 上样于12% SDS-PAGE胶, 对胶进行考马斯亮蓝快速染液(天根生化科技有限公司, 北京)染色, 再进行脱色后, 使用ChemiScope 6000获取照片。

将获得的重组蛋白进行多克隆抗体的制备。实验动物为新西兰大白兔(购自广东省医学实验动物中心); 制备程序: 将蛋白浓度调整为1 mg/mL, 每次免疫使用250 μ g抗原蛋白, 进行4次免疫, 总共使用1 mg抗原蛋白。取250 μ L抗原蛋白溶液, 加入等体积佐剂完全乳化再进行免疫。每次免疫都对新西兰大白兔进行多点注射。首次免疫, 使用弗氏完全佐剂(Sigma公司, 美国), 与抗原蛋白充分混匀后注射; 间隔2周, 二次免疫使用弗氏不完全佐剂(Sigma公司, 美国), 与抗原蛋白充分混匀后注射; 间隔2周, 三次免疫使用弗氏不完全佐剂, 与抗原蛋白充分混匀后注射; 间隔2周, 四次免疫使用弗氏不完全佐剂与抗原蛋白充分混匀后注射; 1周后取血, 室温静置后取上层血清, 分装后置于-80 °C保存。经ELISA检测后, 效价为8 000。可以作为孵育膜的一抗使用的几丁质酶多克隆抗体, 最佳稀释比例为1 : 1 000。

1.4 罗氏沼虾几丁质酶基因mRNA的组织表达分析

以获得的几丁质酶基因序列设计荧光定量PCR的上、下游引物, β -actin作为内参, 引物如表1所示。使用罗氏沼虾眼柄、胃、鳃、肠、表皮和肌肉6个组织总RNA为模板, 按照HiScript[®] Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme公司, 南京)说明书去除总RNA中的基因组DNA, 并反转录合成cDNA, -20 °C保存。实时荧光定量PCR反应使用AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Vazyme公司, 南京)试剂, 反应于Roche LightCycler 480(Roche, 美国)上进行。其中每个组织样品的目的基因和内参基因分别进行3次重复。反应条件: 95 °C预变性5 min;

95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 45个循环。相对表达数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[20]。数据表示方法为平均值±标准差,使用GraphPad Prism 7软件中的单因素和多因素方差分析进行统计分析,并绘制柱状图, $P<0.05$ 代表差异显著(以*表示)。

1.5 罗氏沼虾几丁质酶蛋白的组织表达分析

用RIPA裂解液(碧云天公司)按照说明书提取罗氏沼虾眼柄、胃、鳃、肠、表皮和肌肉6个组织的蛋白样,加入 $5\times$ loading buffer后,于沸水中煮15 min,分装保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。按照几丁质酶多克隆抗体特异性检测的步骤检验罗氏沼虾几丁质酶蛋白的组织表达,使用 β -actin作为内参,参照上述“罗氏沼虾几丁质酶多克隆抗体制备”中的方法进行Western blot,使用ChemiScope 6000(勤翔科学仪器有限公司,上海)对实验结果进行拍照,并使用Clinux ChemiCapture软件分析MrChi3B蛋白和 β -actin蛋白条带的光密度(IOD),通过计算灰度值,得出蛋白的相对表达量,再使用GraphPad Prism 7软件绘制柱状图进行蛋白的组织表达分析。

2 结果

2.1 罗氏沼虾蜕皮周期观察结果

罗氏沼虾蜕皮周期分为蜕皮后早期(A期)、蜕皮后晚期(B期)、蜕皮间期(C期)、蜕皮前期(D期)、蜕皮期(E期)。

A期:外骨骼薄而软,额剑易弯曲,螯足柔软而无法支撑身体,不摄食。常躲避于虾密度小的隐蔽物或缸壁等处。刚毛上的小支清晰可见,刚毛干中充满了半透明的基质(图1-a)。

B期:外骨骼依然薄而软,额剑硬而不易弯曲,螯足开始变硬并可以支撑身体。开始摄食,刚毛干中的基质开始回缩。开始形成刚毛锥(图1-b)。

C期:外骨骼变得厚而硬,色素的收缩开始于腹部的背侧部边缘,刚毛干中形成了明显的刚毛锥,约位于整个刚毛腔的五分之一处(图1-c)。

D期:摄食量减少,外骨骼更加松弛,头胸部的外骨骼与新的表皮分离,明显出现空隙,轻微用力便使旧的外骨骼凹陷,离皮现象更加明显。新的刚毛基部开始发生,新的刚毛干开始发生,新刚毛伸进旧的刚毛腔中,开始出现“管中套管”

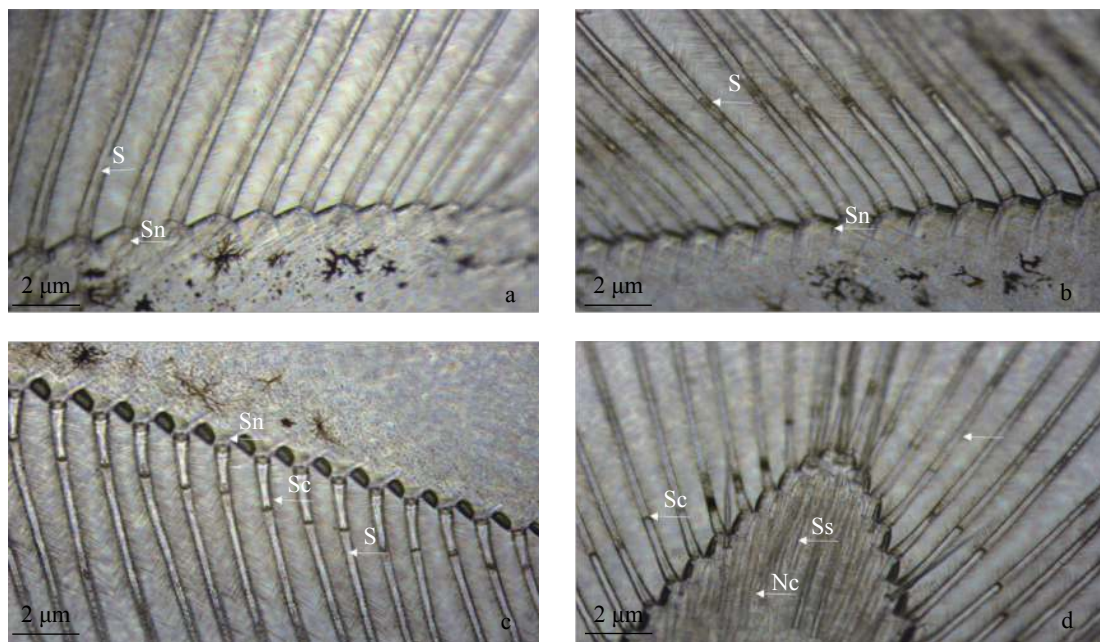


图1 罗氏沼虾的腹肢刚毛在蜕皮周期中的变化

a. A期腹肢(10 \times 40); b. B期腹肢(10 \times 40); c. C期腹肢(10 \times 40); d. D期腹肢(10 \times 10); S.刚毛干; Sn.刚毛瘤(刚毛基部); Sc.刚毛锥; Ss.新刚毛干; Nc.新表皮

Fig. 1 Giant freshwater prawn molting cycle at different stages

a. postmolt (A) pleopod; b. postmolt (B) pleopod; c. intermolt (C) pleopod; d. premolt (D) pleopod; S. setal shaft; Sn. setal node; Sc. setal cone; Ss. new setal shaft; Nc. new cuticle

的现象(图1-d)。

2.2 罗氏沼虾几丁质酶基因cDNA的克隆和分析

罗氏沼虾几丁质酶基因开放读码框(open reading frame, ORF)全长1 143 bp, 编码380个氨基酸(图2)。

使用“材料与方法”中提及的软件预测出该蛋白分子量为41.91 ku, 在线软件预测其理论等电点为4.61, 分子量为42 464.73。预测该蛋白含

信号肽(1~19 AA)。

在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>)分析结果表明罗氏沼虾几丁质酶蛋白属于GH18几丁质酶家族(glycoside hydrolase family 18)。

使用MEGA 6.0和DNAMAN软件, 对罗氏沼虾和其他7个物种进行了基因序列的比对(图3)。结果显示, 罗氏沼虾几丁质酶基因和其他虾类的几丁质酶基因相似度较高。

另外使用MEGA 6.0和DNAMAN软件, 对罗

```

1  ATGAAGTTACTCCTTTTGTCTCGGTCATTGCTTGCCTGTCTACCTTACGGATGCCAAGGCCCTGGTGTGTTAC
1  M K L L L L F S V I A C T V Y L T D A K A L V C Y
76  TTCAGCTCCTGGGCTGTGTACAGAGCGGAGCCTTATACATACGATGTGGAAGACAACGATCCTTTCTCTGCACC
26  F S S W A V Y R A E P Y T Y D V E D N D P F L C T
151 CATTGAATTACGCCCTTGTCTGGACTGGGAGATGATTATGCGATCAAGTCTCGACCCATGGAACGACCTGTGC
51  H L N Y A F A G L G D D Y A I K V L D P W N D L C
226 GACGGAGGGGGCAAATGTGGCTTCGATCGTTTACGAAACTGAAGGAGAAAAATCCCGATCTCAAGACTCTGTCTG
76  D G G G K C G F D R F T K L K E K N P D L K T L L
301 AGCGTTGGTGGCTGGAACGAGGGATCGTCCAGGTATTAGAGATGGCCGACACCCGGCTACAAGAAAGACCTTC
101 S V G G W N E G S S R Y S E M A A D P A T R K T F
376 GTCGATTC AACCATGACGTTACTGAAGGAACATAACTTCGATGGAATTGATCTTGACTGGGAATACCCAACGCAA
126 V D S T M T L L K E H N F D G I D L D W E Y P T Q
451 AGAGGGGGCAGTCCCGACGATTCGTTAACTTCGTACACTCTTGAAGAGCTGGCCGAAGCCCTGCATCCCGAG
151 R G G S P D D F V N F V T L L K E L A E A L H P E
526 GGCATGATACTGACAGCGGCTGTGCGCGCTGGCAAGGACATAATCGACCCTTCTACGACGTCCCAGGCATGTCC
176 G M I L T A A V A A G K D I I D P S Y D V P G M S
601 GAATACCTCGACCTCATCAATCTTATGACCTACGATTTGCACGGCAACTGGGAAAAGTACACACATCACCACCTCA
201 E Y L D L I N L M T Y D L H G N W E K Y T H H H S
676 ATCCTCTATGCGCACCCTAAAGACGAAGGATACGCCCTCACCCCTCAACCAGGACTATGCTGTGAACTACTGGATT
226 I L Y A H P K D E G Y A L T L N Q D Y A V N Y W I
751 GAAAAAGGAGCCCAAAGGAGAAGTTGGTATTGGGCGTTCCTTTCTATGCCACACTTACACTAGACTCTGTCT
251 E K G A P K E K L V L G V P F Y A H T Y T L D S A
826 GCCGAAACGGGCATCTACGCCCCAGCGTCCAACCCTGGTCTACTGAAGGAGGATACAATCAGATCTGTGAATCA
276 A E T G I Y A P A S N P G P T E G G Y N Q I C E S
901 CAAATGACGGAAGACTGGACCATAGTTCACGAGCCTGACATGAATGAACCTTATGGGTACTACGGCCTCAACTGG
301 Q M T E D W T I V H E P D M N E P Y G Y Y G L N W
976 TTCGCCTACGAAGATCCTACTTCACTTGGCATCAAGGCCAAATATGCCGTAGACAAGGGCTTAGCTGGTTGCATG
326 F A Y E D P T S L G I K A K Y A V D K G L A G C M
1 051 GTATGGAGTATTGACACAGACGACTTCCACGGCACATGCCACGGGGAACCTCGTCTCTGCTGACCGCCCTCAA
351 V W S I D T D D F H G T C H G E P R P L L T A L K
1 126 AAGGGCTTGCAGCTTAA
376 K G L Q A *

```

图2 罗氏沼虾*Chi3B*的ORF序列及其氨基酸

粗体ATG和TAA分别代表起始密码子和终止密码子, *代表蛋白翻译结束, 黑色方框区域代表信号肽, 下划线区域代表GH18催化结构域

Fig. 2 The ORF and deduced amino acid sequences of *Chi3B* from *M. rosenbergii*

The start and stop codons are shown in bold, the * represents the end of the protein translation, signal peptide sequence is presented with a black frame, GH18 domain is underlined

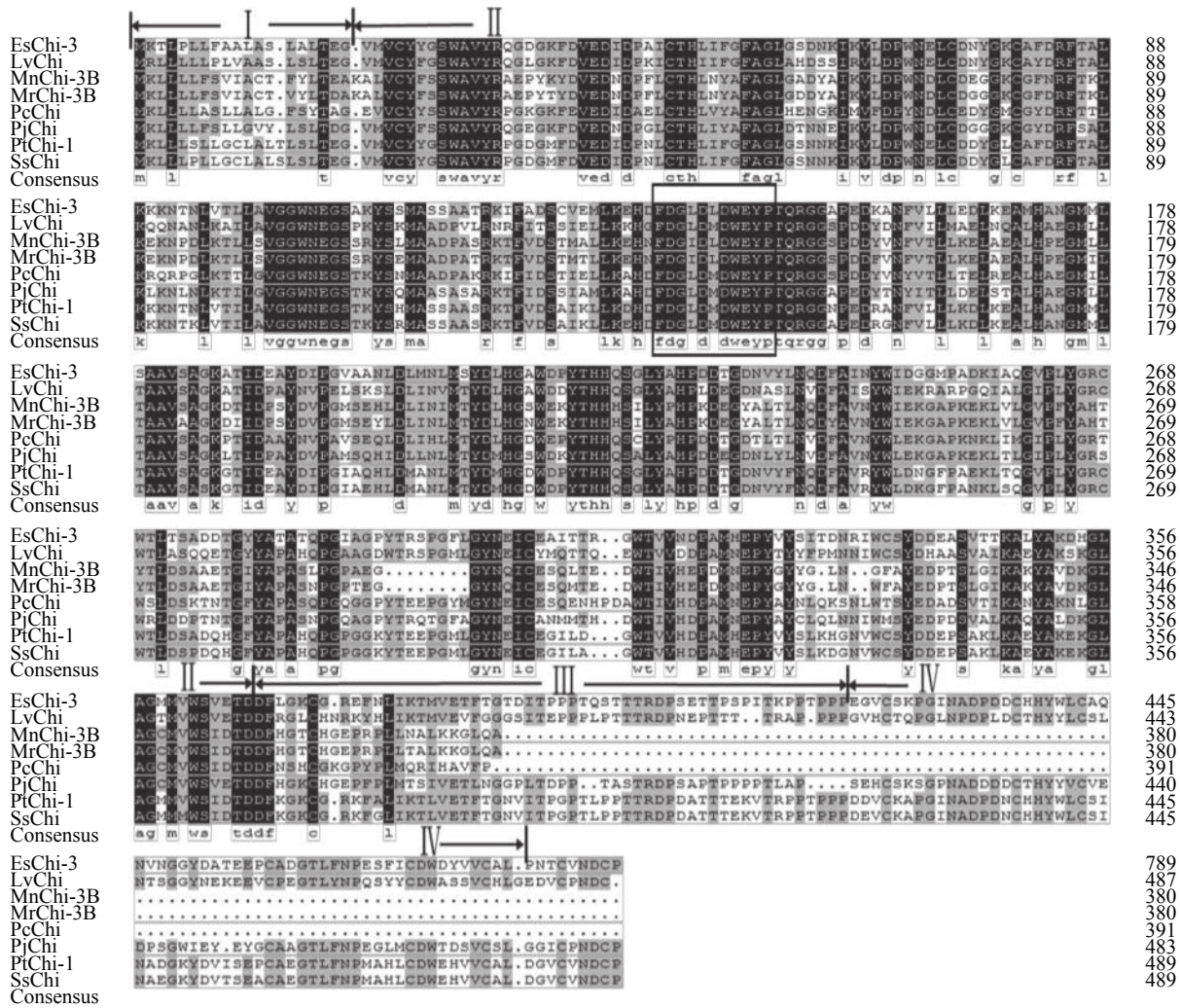


图3 罗氏沼虾与其他物种的几丁质酶氨基酸序列比对

图中黑色代表相同水平100%，灰色代表相同水平≥50%，单向箭头指示各功能域分界，序列内黑色实线方框表示催化活性位点，I区域表示信号肽，II区域表示GH18催化域，III区域代表S/T富集连接区，IV区域代表几丁质结合域；EsChi-3为中华绒螯蟹几丁质酶，LvChi为凡纳滨对虾几丁质酶，MnChi-3B为日本沼虾几丁质酶，MrChi-3B为罗氏沼虾几丁质酶，PcChi为脊尾白虾几丁质酶，PjChi为日本仿长额虾几丁质酶，PtChi-1为三疣梭子蟹几丁质酶，SsChi为锯缘青蟹几丁质酶

Fig. 3 Multiple alignment of chitinase amino acid sequences from *M. rosenbergii* and other animal species

Black denotes the homology level is 100%, gray denotes the homology level is ≥ 50%. The boundaries among different domains are presented by one-way arrows, catalytic active sites in the sequences are boxed with solid line. The I region is signal peptide sequence, II region is GH18 domain, III region is S/T-rich linker region, IV region is chitin-binding domain (CBD). EsChi-3 means *Eriocheir sinensis* chitinase 3, LvChi means *Litopenaeus vannamei* chitinase, MnChi-3B means *Macrobrachium nipponense* chitinase 3B, MrChi-3B means *Macrobrachium rosenbergii* chitinase 3B, PcChi means *Palaemon carinicauda* chitinase, PjChi means *Pandalopsis japonica* chitinase, PtChi-1 means *Portunus trituberculatus* chitinase 1, SsChi means *Scylla serrata* chitinase

氏沼虾和其他14个物种的基因序列构建了系统进化树；在系统进化树上，同是沼虾属的罗氏沼虾和日本沼虾聚为一支，同源性最高。甲壳动物十足目(Decapoda)的虾蟹类聚为一支，同源性较高。蟹(*Limulus polyphemus*)、昆虫类聚为一支。分子进化关系和物种分类关系比较一致(图4)。

SDS-PAGE分析结果显示，重组的几丁质酶蛋白主要表达在包涵体中(图5)，因此按照实验

室的程序进行包涵体蛋白的纯化，从而获得重组蛋白。用His-tag抗体可以检测到重组的His-MrChi3B蛋白只在62 ku左右处有一条带，表明重组蛋白含有His-tag (图5)，而且大小与预测的一致。多克隆抗体进行蛋白免疫印迹检测，结果表明在罗氏沼虾的组织蛋白样中可以清晰检测到一条42 ku左右的特异蛋白，条带大小和预测的几丁质酶蛋白大小较一致(图5)。

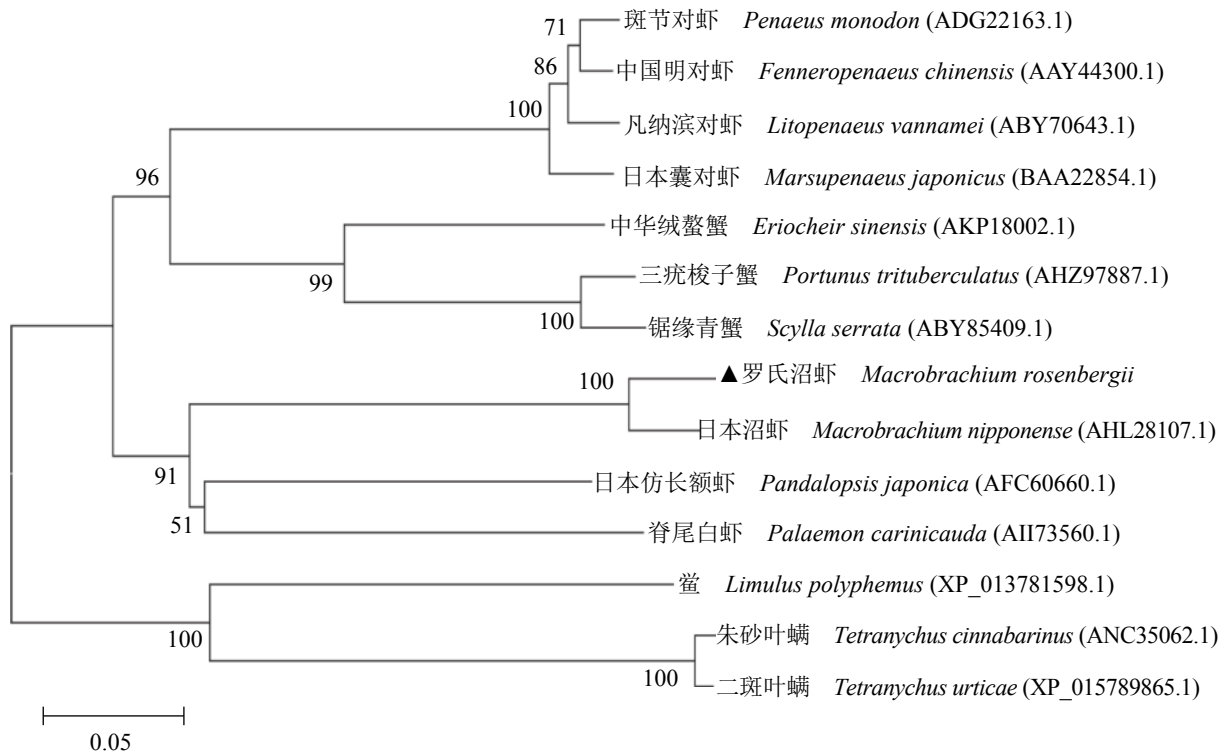


图 4 罗氏沼虾与其他物种几丁质酶的系统进化树

节点处数字代表置信水平, 三角形标记为罗氏沼虾 *MrChi3B*, 括号内文字为基因登录号

Fig. 4 Phylogenetic tree of chitinases from *M. rosenbergii* and other animals

The numbers at the branch nodes represent the bootstrap confidence levels. *MrChi3B* of *M. rosenbergii* is marked with black triangle. Bracketed text indicates accession number

2.3 罗氏沼虾几丁质酶基因在不同蜕皮阶段和不同组织中的表达分析

分别采集不同蜕皮时期的鳃、胃、表皮、肠、眼柄和肌肉6个组织进行几丁质酶基因表达检测。因为鳃组织中的几丁质酶基因在蜕皮周期中表达比较稳定, 受蜕皮周期影响最小, 所以以鳃组织作为对照进行qRT-PCR, 结果显示, *MrChi3B*基因的mRNA表达量在AB期: 胃>表皮>肌肉>肠>眼柄>鳃; 在C期: 胃>表皮>肌肉>鳃>肠>眼柄; 在D期: 胃>肠>肌肉>鳃>眼柄>表皮; 在E期: 胃>肠>肌肉>鳃>眼柄>表皮。在所有组织中, 鳃在所有时期中的表达量稳定, 无显著差异; 胃的表达量在E期最低, AB期开始上升, C期达到最高; 表皮和肌肉中的表达量在AB期最高, 其他时期偏低; 肠的表达量在D期达到最高, 其次为E期; 眼柄表达量在所有时期都偏低(图6)。

在蛋白水平, 由于WB检测灵敏度的限制, 只是选择鳃、胃和肠检测结果, 也是以鳃组织

为对照组进行比较。结果显示, *MrChi3B*蛋白表达量在所有时期都为胃>肠>鳃。在鳃中, 所有时期中的表达量稳定, 无显著差异; 胃的表达量在E期最低, AB期开始上升, 在C期达到最高, 与其mRNA的表达趋势一致; 肠的表达量在AB期最高, 其他各时期之间的表达量都显著高于鳃, 与mRNA的表达略有差异(图7-a, 7-b)。

3 讨论

Peebles^[21]于1977年对罗氏沼虾蜕皮周期进行观察描述, 但是由于形态记录不完整和缺少多个蜕皮周期的刚毛图片, 本研究在Peebles^[21]的研究基础上进行了完善和补充, 详细观察并记录了罗氏沼虾蜕皮各时期的形态特征和腹肢刚毛的变化, 同时也方便后续实验对各个蜕皮时期的准确取样。

本研究克隆得到罗氏沼虾几丁质酶基因长1 143 bp的ORF序列, 共编码380个氨基酸, 预测蛋白大小为41.91 ku, 在罗氏沼虾总蛋白WB结果

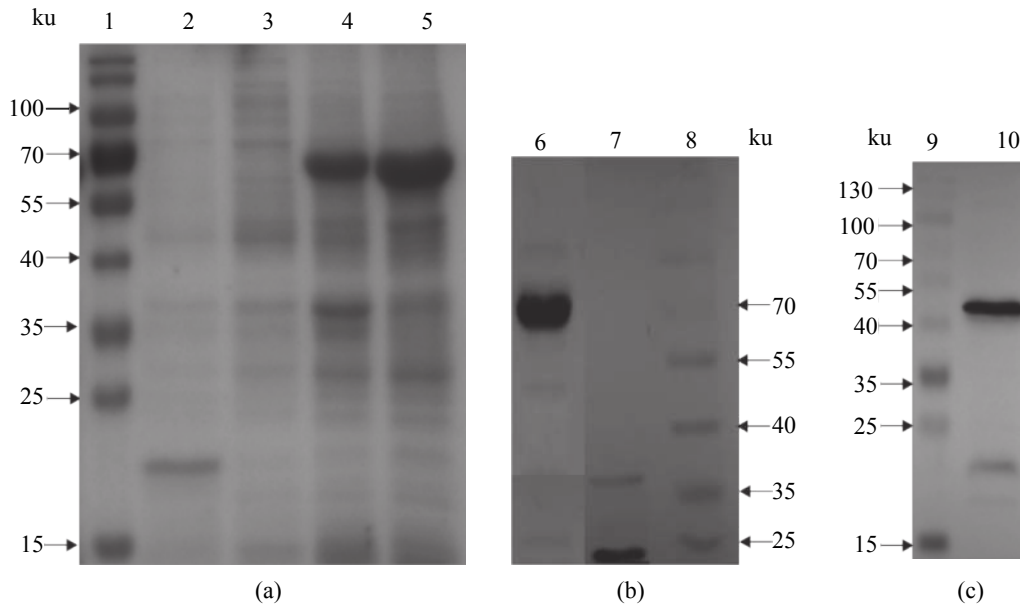


图5 罗氏沼虾MrChi3B多克隆抗体制备

(a) SDS-PAGE鉴定纯化的Chi3B重组蛋白, (b) His标签一抗检测的MrChi3B重组蛋白, (c) 罗氏沼虾Chi3B多克隆抗体特异性检测; 1. 蛋白Marker, 2. 表达的pET-32A空载, 3. 表达的重组蛋白菌液上清液, 4. 表达的重组蛋白菌液沉淀, 5. 纯化的重组蛋白, 6. 含重组蛋白的总菌体, 7. 表达的pET-32A空载总菌体, 8. 蛋白Marker, 9. 蛋白Marker, 10. 组织总蛋白

Fig. 5 Preparation of polyclonal antibody of MrChi3B from *M. rosenbergii*

(a) recombinant MrChi3B protein was purified by SDS-PAGE, (b) verification of recombinant MrChi3B protein using His-tag antibody, (c) verification polyclonal antibody of MrChi3B; 1. protein Marker, 2. *E. coli* with pET-32A vector, 3. supernatant of *E. coli* with pET-32A- MrChi3B, 4. pellet of *E. coli* with pET-32A- MrChi3B, 5. purified pET-32A- MrChi3B, 6. *E. coli* with pET-32A- MrChi3B, 7. verification of recombinant pET-32A vector protein using His-tag antibody, 8. protein Marker, 9. protein Marker, 10. total protein of tissue of giant freshwater prawn

中检测到一条大小约为42 ku的条带, 与预测的几丁质酶蛋白大小一致。通过在线网站还预测到罗氏沼虾几丁质酶的1~19 AA为信号肽序列, 具有GH18催化结构域。这与中国明对虾^[22]、斑节对虾^[2]、锯缘青蟹^[23]和三疣梭子蟹^[17]等甲壳动物的几丁质酶基因结构相似, 表明罗氏沼虾几丁质酶基因属于GH18几丁质酶家族的一员。由多序列比对和NJ系统进化树可知, 罗氏沼虾几丁质酶基因和日本沼虾Chi3B的同源性最高, 达到94%, 聚为同一支; 其次是虾类和蟹类; 与鲎、朱砂叶螨和二斑叶螨的同源性最低, 这表明物种进化关系密切相关。罗氏沼虾与日本沼虾同属沼虾属, 而与其余虾类和蟹类多数同属甲壳动物, 但分属不同科, 因此在同源性上具有一定的差异; 罗氏沼虾与鲎、朱砂叶螨和二斑叶螨分属不同的纲, 进化跨度比较大, 因此同源性较低。

罗氏沼虾几丁质酶蛋白含有信号肽和GH18催化域; 但是缺乏S/T富集连接区和几丁质酶结合域。由对日本沼虾几丁质酶基因的研究中^[16]可知, 虾类几丁质酶基因大多属于GH18几丁质

酶家族, 其家族分为6类(Group I~VI), 其中Group III的大多数几丁质酶基因只含有信号肽和GH18催化域, 缺乏S/T富集连接区和几丁质酶结合域, 这使得几丁质酶失去了对不溶性几丁质的水解作用, 但是不影响对可溶性几丁质(三乙酰壳三糖, triacetylchitotriose)的降解能力^[24-25], 本研究中罗氏沼虾几丁质酶基因与日本沼虾Chi3B的同源性最高。综上所述, 罗氏沼虾几丁质酶基因可能属于Group III, 建议命名为MrChi3B。

通过大量的研究证明, 几丁质酶在甲壳动物的蜕皮活动、食物中的几丁质消化和免疫防御等生理活动中具有重要作用。目前已在甲壳动物多个物种中发现了生理功能不同的几丁质酶基因, 研究比较多的是Group I、Group II和Group III这三类几丁质酶基因^[16, 26-28]。其中甲壳动物Group II的几丁质酶在蜕皮过程起了重要的作用^[2, 13-14], 而根据对日本沼虾的Chi3^[16]的研究表明, Group III的几丁质酶主要功能是消化含有几丁质的食物, 其次是与免疫防御和围食膜的降解有关。

本研究通过qRT-PCR和WB发现罗氏沼虾的

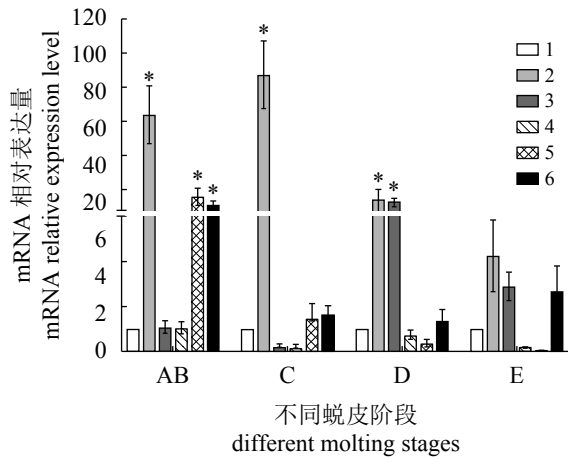


图6 罗氏沼虾 *MrChi3B* 基因在不同蜕皮阶段和不同组织中mRNA的表达

1. 鳃, 2. 胃, 3. 肠, 4. 眼柄, 5. 表皮, 6. 肌肉

Fig. 6 The expression profiles of *MrChi3B* mRNA in different tissues and at different molting stages of *M. rosenbergii*

1. gill, 2. stomach, 3. intestine, 4. eyestalk, 5. cuticle, 6. muscles

MrChi3B 在不同组织的各蜕皮时期均有表达。C期是罗氏沼虾摄食量最高的时期, 从D期开始减少摄食量, 在E期基本不进食, 直到AB期开始摄食。罗氏沼虾的胃中mRNA和蛋白的表达量在C期达到最高, 在D期开始下降, 于AB期开始上升, 这与罗氏沼虾的摄食趋势一致, 证明了 *MrChi3B* 在罗氏沼虾的胃中可能具有参与食物中

几丁质消化的功能。

罗氏沼虾在AB期由于刚蜕皮, 新生的外表皮还没有硬化, 处于非常柔软的阶段, 容易受到各种病原体的感染, 这就造成了在表皮和肌肉中, *MrChi3B* 基因在AB期中表达水平升高的原因, 证明 *MrChi3B* 在表皮和肌肉中可能发挥免疫防御的功能。肠道围食膜是节肢动物保护中肠不受食物颗粒伤害和病菌感染的一个非细胞结构^[29], 而甲壳动物在D期和E期都会对肠道围食膜进行降解。qRT-PCR结果表明肠在D期的表达量最高, 其次为E期, WB结果表明肠的各时期都有表达, 但是差异不显著。对于肠的qRT-PCR和WB的结果, 分析其原因, mRNA在翻译成蛋白质过程中, 不同组织的翻译效率有所差异, 这可能造成了二者的结果稍有差异, 还需要进一步的研究来确定 *MrChi3B* 具有降解肠道围食膜的功能。眼柄整体表达量比较低, 尚不清楚 *MrChi3B* 在其中的功能。

本研究克隆了 *MrChi3B* 基因的ORF序列, 对其进行生物学和信息学分析, 再通过qRT-PCR和WB分析其在蜕皮过程中的表达变化情况, 判断该基因属于甲壳动物几丁质酶的第3类酶(Group III), 可能具有消化、免疫防御和肠道围食膜降解的功能。有待进行免疫荧光和RNAi等^[30]实验, 进一步验证罗氏沼虾蜕皮阶段 *MrChi3B* 的生理功能和相关调控机制。

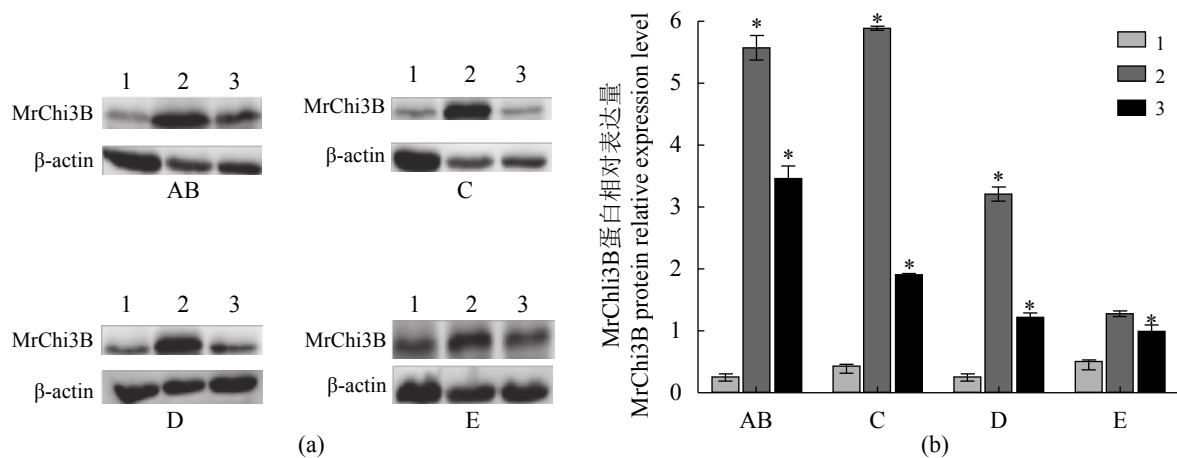


图7 罗氏沼虾 *MrChi3B* 蛋白在不同蜕皮阶段不同组织中的表达

(a) WB检测 *MrChi3B* 蛋白在罗氏沼虾不同蜕皮阶段不同组织中的表达; (b) 柱状图分析(a)图中不同蜕皮阶段不同组织 *MrChi3B* 蛋白相对 β -actin 蛋白条带的灰度值。1. 鳃, 2. 胃, 3. 肠

Fig. 7 The expression profiles of *MrChi3B* protein in different tissues and at different molting stages of *M. rosenbergii*

(a) the protein of *MrChi3B* at the different molting stages and different tissues of *M. rosenbergii* by WB; (b) histogram analysis of *MrChi3B*/ β -actin bands in different tissues and at different molting stages in (a). 1. gill, 2. stomach, 3. intestine

参考文献:

- [1] Daimon T, Hamada K, Mita K, *et al.* A *Bombyx mori* gene, *BmChi-h*, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(8): 749-759.
- [2] 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 and Molecular Biology*, 2010, 156(2): 86-96.
- [3] Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(3): 203-226.
- [4] 钟晓武. 家蚕围食膜的蛋白质组及几丁质去乙酰化酶的功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
Zhong X W. Proteomic analysis on peritrophic membrane and functional characterization of chitin deacetylase in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2012(in Chinese).
- [5] Kramer K J, Hopkins T L, Schaefer J. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(10): 1067-1080.
- [6] Li D C. Review of fungal chitinases[J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(6): 345-360.
- [7] 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.
- [8] Chan S M, Rankin S M, Keeley L L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose[J]. *The Biological Bulletin*, 1988, 175(2): 185-192.
- [9] Guerao G, Rotllant G, Anger K. Characterization of larval moulting cycles in *Maja brachydactyla* (Brachyura, Majidae) reared in the laboratory[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1-2): 106-111.
- [10] Promwikorn W, Kirirat P, Thaweethamseewee P. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, 26(5): 765-772.
- [11] Skinner D M. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle[J]. *The Biological Bulletin*, 1962, 123(3): 635-647.
- [12] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27(11): 887-900.
- [13] 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.
- [14] Salma U, Uddowla M H, Kim M, *et al.* Five hepatopancreatic and one epidermal chitinases from a pandalid shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning and effects of eyestalk ablation on gene expression[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 161(3): 197-207.
- [15] Mali B, Möhrle F, Frohme M, *et al.* A putative double role of a chitinase in a cnidarian: pattern formation and immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2004, 28(10): 973-981.
- [16] 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 and Molecular Biology*, 2014, 167: 30-40.
- [17] 王伟, 吴旭干, 潘桂平, 等. 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[J]. *水产学报*, 2015, 39(9): 1291-1301.
Wang W, Wu X G, Pan G P, *et al.* Cloning of chitinase and its expression analysis during molting in *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1291-1301(in Chinese).
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene

- expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Peebles J B. A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Aquaculture*, 1977, 12(2): 173-180.
- [22] 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.
- [23] 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[J]. *生理科学进展*, 2011, 42(6): 457-459.
- Lu L, Ning Q J. Advances in crustaceans chitinase gene structure and function research[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2011, 42(6): 457-459(in Chinese).
- [24] Boraston A B, Bolam D N, Gilbert H J, *et al.* Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 382(3): 769-781.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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 and expression analysis of chitinase-3B from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during molting cycle

YE Chengkai^{1,2}, LU Zhijie^{1,2}, Sarath Babu V¹, ZHANG Xiaojun³, LIU Xiaodan³,
ZHAO Lijuan², PAN Gan^{1*}, LIN Li^{2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center,
Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding,
College of Animal Science & Technology,

Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract: Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) is an important cultured species in China. Molting is closely related to the growth and breeding of *M. rosenbergii*. Chitinase, a member of the glycoside hydrolase family 18, plays vital physiological roles in crustaceans, including molting, digestion, and immunity. The molting cycle of *M. rosenbergii* consisted of five stages, named postmolt (A), postmolt (B), intermolt (C), premolt (D), and molt (E). To understand the characteristics and molecular dynamics of chitinase in the molting cycle of *M. rosenbergii*, the chitinase gene of *M. rosenbergii* (*MrChi3B*) was cloned. Thereafter, polyclonal antibody against the chitinase was generated in rabbit. The cDNA of *MrChi3B* spans 1 143 bp that encodes a protein of 380 amino acids (aa) with a predicted molecular weight of 41.91 ku. Phylogenetic analysis revealed that chitinase contains the GH18 family catalytic domain, and it was closely related to chitinase of *M. nipponense* with 94% homology at the aa level. The expression profile of *MrChi3B* in six different tissues (eyestalk, gill, stomach, muscles, endocuticle, intestine) and at different stages of the molting of *M. rosenbergii* was investigated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot (WB) analysis. The results showed that the *MrChi3B* was ubiquitously expressed in all the tested tissues, whereas its expression was significantly increased in stomach, skin, and muscle at A, B stages. At the stage C, highest expression of *MrChi3B* was observed in the stomach. At the stages A, B, the expression of *MrChi3B* in the endocuticle and muscle reached the highest. The expression of *MrChi3B* in the intestine has increased during the stage D and E. Relative lower expression of *MrChi3B* was observed in the eyestalk at all the stages. The results will shed a new light on the further study of the function of *MrChi3B* from *M. rosenbergii*.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; chitinase; gene cloning; molting cycle; expression

Corresponding author: PAN Gan. E-mail: pg2829@sina.com; LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: Innovation and Strong Universities Special Funds (KA170500G) from the Department of Education of Guangdong Province; Fisheries Scientific innovation Program of Jiangsu Province (D2017-3)