

日本沼虾C型凝集素结构域家族3的cDNA克隆、 原核表达和定位分析

孙盛明¹, 傅洪拓^{1*}, 宣富君², 戈贤平¹, 朱健¹, 吴旭干³

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与
种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 盐城师范学院, 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 江苏 盐城 224051;

3. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: C型凝集素(C-type lectin)是一类能与糖类结合的非抗体的蛋白质或糖蛋白家族, 为了研究C型凝集素基因在日本沼虾组织分布、细胞定位和细菌感染过程中的表达情况, 本研究应用cDNA末端快速克隆(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术首次克隆了日本沼虾C型凝集素结构域家族3基因(*MnLec3*)的全长序列, 通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析*MnLec3*基因在不同组织、细菌感染后不同时间的表达水平, Western blot和免疫荧光分别分析蛋白的表达水平和细胞定位。结果显示, *MnLec3*基因cDNA全长1 357 bp, 包括125 bp的5'末端非翻译区(UTR)、1 026 bp的开放阅读框(ORF)和206 bp的3'UTR, 其中开放阅读框编码341个氨基酸。氨基酸序列比对显示, 日本沼虾*MnLec3*基因含有保守钙结合点(Met 1-Glu17)和糖识别结构域(CRD)。同源性分析结果显示, *MnLec3*与罗氏沼虾C型凝集素3相似度较高; 邻接法(Neighbor-Joining, NJ)进化树分析结果显示, *MnLec3*与其他甲壳动物C型凝集素聚为一支。通过构建原核表达载体获得体外重组蛋白r*MnLec3*, 并将纯化重组蛋白免疫大鼠获得抗血清, 免疫荧光结果显示, 绿色荧光信号主要在肝胰腺细胞核中表达。qRT-PCR结果显示, *MnLec3*在日本沼虾所检测组织中均表达, 其中肝胰腺中表达量最高, 血细胞次之; 与对照组相比, 在嗜水气单胞菌刺激12~48 h时*MnLec3*表达量显著升高, 48 h表达量最高, Western blot分析结果显示, *MnLec3*蛋白表达丰度与基因表达模式基本相似, 提示克隆得到的*MnLec3*参与日本沼虾抵御细菌入侵的免疫过程。

关键词: 日本沼虾; C型凝集素结构域家族3; 嗜水气单胞菌; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 966.12

文献标志码: A

动物细胞和植物细胞都具有合成并分泌凝集素的能力, 凝集素是一种能与糖结合的蛋白质, 在细胞识别和黏着反应过程中发挥重要作用^[1]。C型凝集素在众多类型凝集素家族(C、P、I、F、M、L、R等)中研究得最为详细。已有学者相继报道了甲壳动物C-型凝集素的功能, 包括细菌的

凝集作用^[2]、细胞吞噬作用^[3]、细胞包被和黑化作用^[4]、抗菌作用以及抗病毒活性等^[5-6], 其中, C型凝集素结构域家族3在甲壳动物病原识别和识别后的下游免疫反应过程中发挥重要作用^[7]。

相关学者已相继克隆了多个虾蟹类C型凝集素, 包括中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、

收稿日期: 2018-06-15 修回日期: 2018-12-04

资助项目: 国家自然科学基金(31402280, 31672633); 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室开放课题(2016KF-02)

通信作者: 傅洪拓, E-mail: fuht@ffrc.cn

墨吉明对虾(*F. merguensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等经济甲壳动物^[8-14]，然而，关于日本沼虾(*M. nipponense*) C型凝集素基因的克隆与表达分析鲜有报道。日本沼虾是我国重要的淡水养殖品种之一，由于其较高的营养价值而受到江浙沪地区消费者青睐^[15-16]。近些年来，本课题组在日本沼虾人工养殖技术和群体遗传多样性方面的研究均取得了一定进展^[17-20]，但针对日本沼虾免疫反应机制的研究鲜有报道。日本沼虾C型凝集素结构域家族3基因(*MnLec3*)的研究将有助于对日本沼虾非特异性免疫系统的了解，为揭示其抗细菌感染分子机制提供有力的理论基础。

本实验率先克隆了日本沼虾肝胰腺中C型凝集素结构域家族3基因的全长cDNA，并分析其序列特征，采用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)刺激后分析*MnLec3*基因转录水平和蛋白表达模式，通过建立*MnLec3*基因原核表达体系来分析其蛋白细胞定位，有助于深入研究甲壳动物的免疫应答机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验日本沼虾来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心大浦基地，在实验室暂养于循环水养殖桶2周后，挑选健康活泼的体质量为(1.28 ± 0.22) g的日本沼虾进行攻毒实验，对照组

与实验组分别设置3个重复，实验组每只日本沼虾分别注射嗜水气单胞菌50 μL，细菌浓度约为2 × 10⁷ CFU/mL(所用剂量依据细菌感染浓度梯度实验设定)，分别在细菌刺激0、6、12、24、48和96 h后取肝胰腺组织保存于液氮中备用。分别取日本沼虾肝胰腺、鳃、肠道、肌肉、精巢、卵巢组织及血细胞保存至-80 °C冰箱。

1.2 实验方法

RNA的提取及cDNA第一链的合成 采用酚氯仿抽提法提取RNA，采用RNA-free DNaseI纯化试剂盒纯化RNA，通过琼脂糖凝胶电泳分析和紫外分光光度计检测总RNA纯度和浓度。总RNA反转录成cDNA后保存于-80 °C冰箱，以备克隆*MnLec3*基因cDNA全长序列^[21]。按照iScript cDNA Synthesis Kit方法获得cDNA模板来检测*MnLec3*基因表达水平。

日本沼虾*MnLec3*的基因克隆 通过日本沼虾肝胰腺cDNA文库验证并获得C型凝集素结构域家族3编码基因序列片段，其中5' RACE和3' RACE的特异性扩增引物通过Primer Premiers 5.0软件设计而成(表1)，然后采用RACE技术对*MnLec3*编码基因5'端和3'端序列片段扩增并克隆测序分析。

序列分析 NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)的ORF Finder程序中获得日本沼虾*MnLec3*的开放阅读框序列，并利用BLASTP进行氨基酸序列比对，采用DNAMAN软件和MEGA 4.0软件构建系统进化树^[22]。

日本沼虾不同组织*MnLec3*基因mRNA的表达分析 采用染料法(SYBR[®] Premix Ex Taq Kit

表1 基因克隆所用的引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物 primer	引物序列 primer sequence	长度/bp length	引物用途 usage
<i>MnLec3</i> -GSP1 forward	GGTCGGAGACCATTGCATCT	20	<i>MnLec3</i> 3'RACE
<i>MnLec3</i> -GSP2 forward	GATCATCGGAAAACCTGCGGC	20	
<i>MnLec3</i> -GSP1 reverse	GGGTGGACAGTCTCTTTGGG	20	<i>MnLec3</i> 5'RACE
<i>MnLec3</i> -GSP2 reverse	TCACCTGGGAATGGTCGTTG	20	
<i>MnLec3</i> forward	AAGAGGTCGGAGACCATTGC	20	<i>MnLec3</i> qRT-PCR
<i>MnLec3</i> reverse	CCCACCCAGTAACTTACGCC	20	
β -actin forward	TATGCACTTCCTCATGCCAT	20	β -actin qRT-PCR
β -actin reverse	AGGAGCGGCAGTGGTCAT	19	

II, TaKaRa)在Applied Biosystems 7500荧光定量PCR仪(ABI, Carlsbad, CA, USA)上进行PCR反应。反应体积20 μL : 2 μL 模版, 上下游引物各0.8 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)(表1), 10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq II, 6 μL dH₂O和0.4 μL ROX Reference Dye or Dye II。反应程序: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共40个循环。通过设置标准品梯度浓度进行定量PCR, 分别得到*MnLec3*基因和内参基因的标准曲线。用双标准曲线法对实验数据进行相对定量分析^[23]。

日本沼虾肝胰腺组织应答免疫刺激后*MnLec3*基因的表达分析 在嗜水气单胞菌攻毒后0、6、12、24、48和96 h时进行采样, 分别从处理组和对照组中随机取3尾日本沼虾, 将其肝胰腺样品保存于-80 °C冰箱, 用于反转录得到cDNA模板, 攻毒后*MnLec3*基因荧光定量分析与组织mRNA的表达分析方法相同, 分别采用SPSS 17.0软件和*t*检验法进行多重比较及显著性分析($P < 0.05$ 为显著水平)。

原核表达载体构建及*MnLec3*的诱导表达纯化 分别在*MnLec3*原核表达扩增的上游和下游引物中添加EcoR I 和Xho I 酶切位点。将扩增回收的PCR产物连接至pET28b载体, 取1 μL 重组的pET28b质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中, 经42 °C热击90 s, 迅速转至冰上静置2 min后涂平板(30 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 37 °C培养过夜后进行PCR检测并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 序列正确的菌液内加甘油-80 °C保存备用。将培养的菌液参照本实验室原核表达反应条件大量诱导目的蛋白^[21]。

多克隆抗体制备和Western blot分析 取3只小鼠(*Mus musculus*), 通过皮下注射蛋白抗原方法获得抗血清[生工生物工程(上海)股份有限公司], -80 °C保存备用。采用Western blot方法分析肝胰腺中凝集素C蛋白表达丰度^[23], 样品经SDS-PAGE后进行凝胶转膜, 一抗为本实验室获得的抗血清(对照组为本实验室制备的 β -actin抗体), 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗大鼠IgG, 通过BCIP/NBT碱性磷酸酶显色液显色后Bio-Rad凝胶成像仪拍照。

免疫荧光定位分析 日本沼虾肝胰腺组织于4%多聚甲醛固定液中固定24 h后, 经过脱水、透明、包埋、切片等步骤, 将获得的约5

μm 厚度切片用于免疫荧光实验。参照已建立的日本沼虾免疫荧光方法^[24], 分别加入适量一抗(制备的抗血清, 阴性对照一抗为未免疫大鼠血清)于4 °C孵育过夜, 用磷酸缓冲液(PBS缓冲液)冲洗3次后加入FITC标记的羊抗大鼠IgG, 37 °C孵育30 min, PBS缓冲液冲洗3次后抗荧光淬灭封存液封片, 荧光显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 日本沼虾*MnLec3*基因全长cDNA克隆

*MnLec3*基因cDNA全长序列为1 357 bp, 其中开放阅读框为1 026 bp, 共编码341个氨基酸。3'端非编码区中带有Poly (A)尾及其加尾信号ATT-AAA。*MnLec3*理论等电点(pI)约为4.40, 蛋白相对分子量为38.35 ku。日本沼虾的*MnLec3*氨基酸序列存在17个氨基酸残基的信号肽, 可确定*MnLec3*为分泌型蛋白。成熟肽中包含1个糖识别结构域(CRD), 其中含有参与二硫键形成的6个保守的半胱氨酸, 并含有2个Ca²⁺结合域, 或称为糖基结合位点, 是典型的C型凝集素。日本沼虾*MnLec3*基因cDNA序列已经提交到GenBank, 登录号为KY-123252。

2.2 日本沼虾*MnLec3*氨基酸序列的同源性分析

分析结果显示, 日本沼虾*MnLec3*的氨基酸序列与罗氏沼虾C型凝集素3同源性最高。日本沼虾*MnLec3*氨基酸序列与凡纳滨对虾、墨吉明对虾和秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*)的C型凝集素氨基酸序列进行比对分析, 结果显示, *MnLec3*氨基酸序列中含有保守的半胱氨酸残基和糖基结合位点, 这2个基序与糖基和Ca²⁺的结合至关重要(图1)。

2.3 日本沼虾*MnLec3*氨基酸系统进化树分析

根据日本沼虾和其他动物的C型凝集素氨基酸序列构建系统进化树(图2), 发现日本沼虾与甲壳动物单独聚为一支, 区别于脊椎动物中鱼类、哺乳动物以及软体动物的分支, 说明C型凝集素基因在进化过程中相对保守。

2.4 *MnLec3*的重组表达与纯化

将pET28b-*MnLec3*转化大肠杆菌BL21, 重组菌经IPTG诱导后, 其表达产物经过Ni²⁺亲和层析得到高纯度的目的蛋白, 分子量约为36 ku (图3), 与理论蛋白相对分子量相近(图4)。

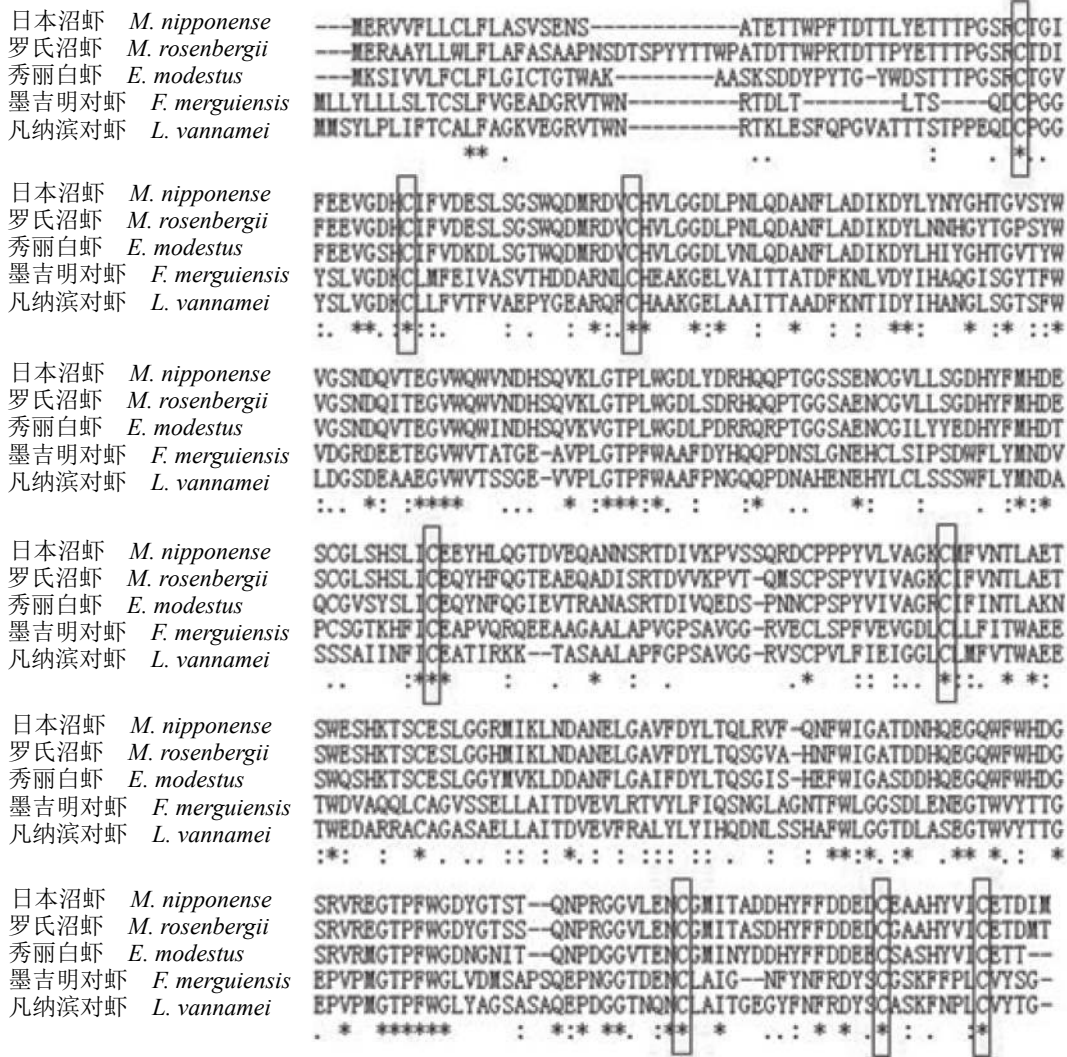


图1 日本沼虾MnLec3氨基酸序列与其他物种C型凝集素氨基酸的多序列比对结果

图中框内为包含6个糖识别结构域内的半胱氨酸

Fig. 1 Multi sequence alignment of *M. nipponense* C-type lectin among five species

Six cysteine residues that are involved in the formation of three disulfide bonds in CRD are shown in box

2.5 日本沼虾MnLec3基因的组织特异性表达分析

MnLec3基因在日本沼虾不同组织中的表达丰度结果显示, 日本沼虾MnLec3基因在所有被检测组织中均有表达, 其中肝胰腺中表达量最高, 其次为血细胞、鳃、肠道、卵巢、精巢、肌肉(图5)。

2.6 攻毒后日本沼虾MnLec3基因转录水平和蛋白表达丰度的时空表达分析

攻毒后不同时间点日本沼虾肝胰腺中MnLec3基因的表达规律显示, 在攻毒后6 h时, MnLec3基因表达量与对照组相比显著升高(P<0.05); 随

后在12和24 h时MnLec3基因表达继续升高, 在48 h时达到峰值, 而在攻毒后96 h时, MnLec3基因表达量降低与对照组无显著差异(P>0.05)(图6-a)。将免疫大鼠获得的抗血清进行Western Blot检测发现, 攻毒后各时间点日本沼虾肝胰腺中MnLec3蛋白的表达规律与基因转录水平基本一致, 在12和48 h时MnLec3蛋白表达丰度较高, 而在96 h降至与对照水平基本一致(图6-b)。

2.7 日本沼虾MnLec3在肝胰腺组织中的定位分析

荧光染色结果显示, 阳性信号主要位于日本沼虾肝胰腺细胞的细胞核中, 细胞核中荧光

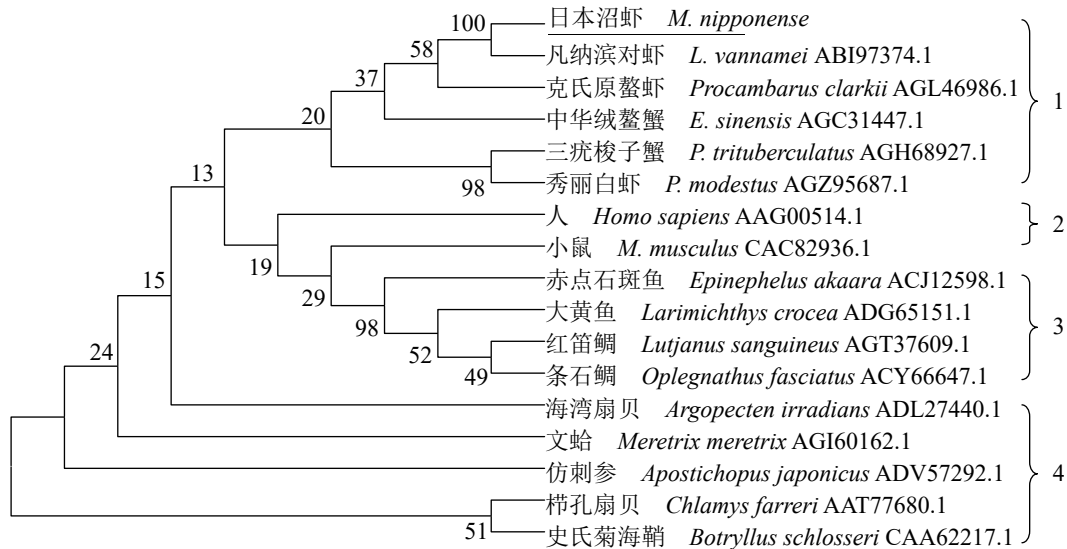


图 2 日本沼虾和其他物种的C型凝集素氨基酸的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on C-type lectin amino acid sequences from other species

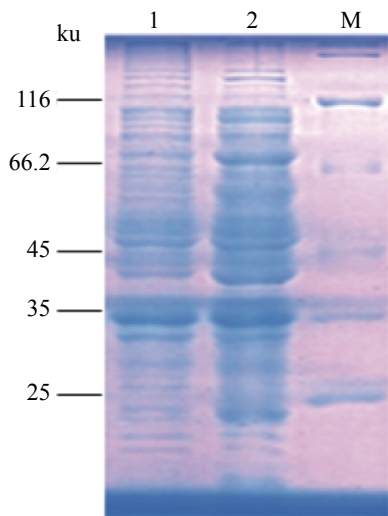


图 3 原核表达结果

M. 蛋白分子量; 1. 诱导前菌液; 2. 诱导后沉淀

Fig. 3 Results of the *MnLec3* prokaryotic expression

M. protein marker; 1. total protein extracts before IPTG induction; 2. induced expression for precipitate

染色较强; 虽然肝胰腺细胞质中荧光染色相对较暗, 但MnLec3蛋白在细胞质中也有少量表达(图版)。

3 讨论

本实验获得日本沼虾*MnLec3*基因cDNA全长 1 357 bp, 包括5'末端非翻译区125 bp、3'末端非翻译区206 bp和开放阅读框1026 bp (编码341个氨基酸)。C型凝集素是一类糖原结合蛋白家族, 并

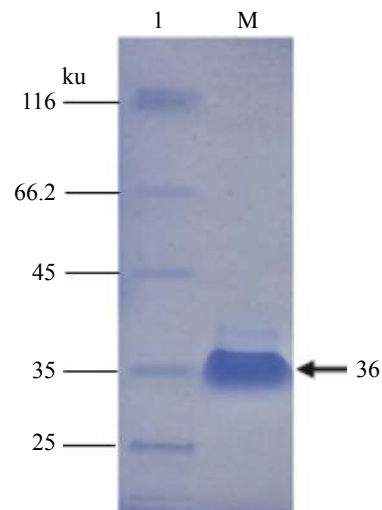


图 4 rMnLec3蛋白纯化结果

M. 蛋白分子量; 1. 纯化重组蛋白

Fig. 4 The results of purified rMnLec3

M. protein marker; 1. the purified rMnLec3

在无脊椎动物中存在多个亚型^[25], 其需要钙离子(Ca^{2+})参与才能够识别碳水化合物配体。序列分析结果显示, 日本沼虾*MnLec3*基因含有2个糖类识别结构域(CRD), 已有研究报道罗氏沼虾体内的4个C型凝集素基因均含有2个CRD结构域^[12], 这与本实验结果一致。进一步比对氨基酸序列发现同属于长臂虾亚科日本沼虾MnLec3与罗氏沼虾C型凝集素3氨基酸序列相似性最高(>96%)。系统发育树分析显示, 日本沼虾与甲壳动物聚为一支, 与其他脊椎动物、软体动物为分支,

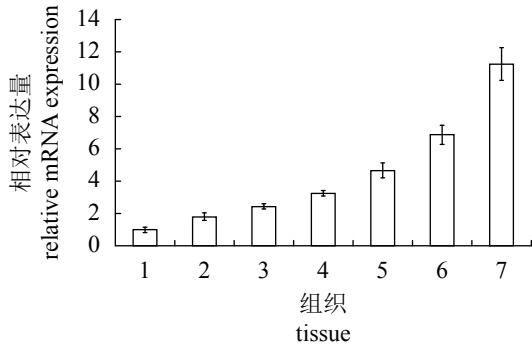


图5 *MnLec3*基因在日本沼虾不同组织内的表达水平
1. 肌肉; 2. 精巢; 3. 卵巢; 4. 肠道; 5. 鳃; 6. 血细胞; 7. 肝胰腺

Fig. 5 qRT-PCR analysis *MnLec3* mRNA expression levels in *M. nipponense* in different tissues

1. muscle; 2. testis; 3. ovary; 4. intestine; 5. gill; 6. haemocytetes; 7. hepatopancreas

这一结果符合传统的动物系统发生分类次序。

在虾类CRD结构域中, 结合糖基分子的行为主要是通过钙离子与2个基序相互作用完成的。迄今, 上述2个基序存在EPN、QPD、EPS、FRD、VND、LND、QPT、FRD等多种形式, 已有学者克隆了日本沼虾C型凝集素结构域家族1基因全序列, 并通过序列分析发现含有WTD和EPL 2种糖基结合位点^[26], 而本研究发现, 日本沼虾*MnLec3*基因糖基结合位点分别为WHD和FDD,

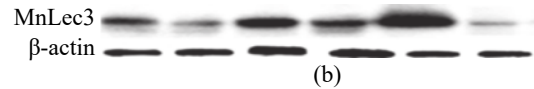
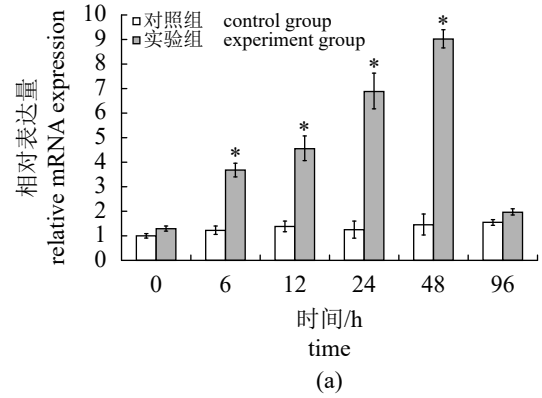


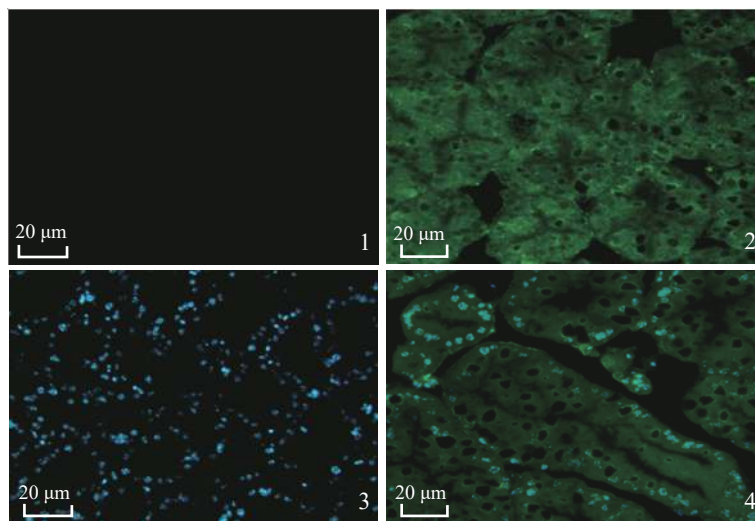
图6 细菌刺激后日本沼虾肝胰腺中*MnLec3*基因转录水平(a)和蛋白丰度(b)的表达量变化

(a)中*表示不同组别之间有显著性差异($P < 0.05$)

Fig. 6 Temporal expression of *MnLec3* mRNA (a) and protein abundance (b) in *M. nipponense* hepatopancreas injected with *A. hydrophilia*

*. significant difference between different groups in (a) ($P < 0.05$)

表明日本沼虾不同种类的C型凝集素可识别不同的糖基分子。本实验经多序列比对发现, 日本沼虾C型凝集素结构域家族3基因中具有保守的半胱氨酸和色氨酸残基, 揭示其具有凝血功



图版 *MnLec3*在肝胰腺组织中的分布

1. 阴性对照; 2. 绿色(异硫氰酸荧光素(FITC, fluorescein isothiocyanate)染色)为*MnLec3*在肝胰腺中的免疫荧光信号; 3. 蓝色荧光(苯基吲哚(DAPI, 6-diamidino-2-phenylindole)染色)为细胞核信号; 4. merge 为二者染色的合成图谱, 表明确定的荧光信号

Plate Distribution of *MnLec3* in hepatopancreas tissue

1. negative control; 2. immunofluorescence detection of *MnLec3* in hepatopancreas (green); 3. nuclei were stained with DAPI (blue); 4. merged images of *MnLec3* in hepatopancreas tissue

能。本实验所克隆得到的日本沼虾MnLec3蛋白具有保守的天冬氨酸残基以及信号肽这两特征, 因此推测, 在结构上日本沼虾MnLec3通过吸附血淋巴中入侵的病原微生物来发挥免疫作用。本实验室成功构建了pET28b-MnLec3原核表达载体, 并高效诱导表达了MnLec3重组蛋白, 免疫大鼠(*Rattus norvegicus*)获得特异性多克隆抗体, 采用制备的抗体进行免疫荧光定位分析表明MnLec3主要在肝细胞的细胞核进行表达, 这与在小鼠和鱼类的研究结果相一致^[27-29]。

本研究表明, 日本沼虾MnLec3基因在多种组织中均有表达, 其中胰腺中表达量最高, 这与罗氏沼虾^[12]和凡纳滨对虾^[30]的研究结果相似。日本沼虾MnLec3基因可在精巢和卵巢中表达, 这与在秀丽白虾^[31]和中华绒螯蟹^[14]的组织表达结果一致, 表明凝集素除了执行免疫功能外, 或许能够在性腺中协助生殖细胞发挥正常生理功能, 但此推测尚需进一步证明。考虑到甲壳动物胰腺是重要物质代谢与免疫防御器官, 需进一步的感染实验来验证其具体功能, 笔者以日本沼虾胰腺为靶组织, 研究其在细菌感染后MnLec3基因的表达规律。在嗜水气单胞菌刺激实验中, 日本沼虾胰腺内MnLec3基因转录水平均出现先显著上调后下降的变化, Western blot分析也验证了这一表达规律。研究表明, 该基因的表达短期内受细菌刺激诱导影响, 而随着细菌在体内的大量增殖其表达反而降低, 证实了凝集素在早期抵抗病菌入侵中起到模式识别受体的作用, 这与日本沼虾C型凝集素结构域家族1的研究结果相一致, 日本沼虾C型凝集素结构域家族1在分别受到嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)刺激后其表达量同样出现显著的上调变化, 日本沼虾C型凝集素结构域家族1重组蛋白已被证实对外源细菌具有凝集作用^[26]。此外, 中华绒螯蟹和凡纳滨对虾凝集素也参与了嗜水气单胞菌和白斑综合征病毒刺激引起的机体免疫防御反应^[6, 32-33]。由此可知, C型凝集素在甲壳动物对病原的免疫识别方面发挥至关重要的作用。

参考文献:

[1] 吴超, 陆承平. 草鱼等8种淡水鱼血清凝集素作用的比较[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(2): 79-82.
Wu C, Lu C P. Comparison of the hemagglutination

activity of serum lectins from grass carp and other seven cultured fishes[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(2): 79-82(in Chinese).

- [2] Sun J, Wang L, Wang B J, *et al.* Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(3): 290-297.
- [3] 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.
- [4] Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(20): 9557-9560.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 王显伟. 十足目甲壳动物C型凝集素功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
Wang X W. Functional study of C-type lectins in decapod crustaceans[D]. Jinan: Shandong University, 2012(in Chinese)
- [8] 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.
- [9] Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, *et al.* Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(5): 487-494.
- [10] 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.
- [11] Rattanaporn O, Utarabhand P. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: early gene up-

- regulation after *Vibrio harveyi* infection[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106(2): 196-204.
- [12] Ren Q, Li M, Du J, *et al.* Immune response of four dual-CRD C-type lectins to microbial challenges in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 155-167.
- [13] Kong H J, Pake E M, Nam B H, *et al.* A C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 311-314.
- [14] Jin X K, Li W W, Cheng L, *et al.* Two novel short C-type lectin from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, are induced in response to LPS challenged[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(5): 1149-1158.
- [15] 张响, 乔慧, 傅洪拓, 等. 青虾(*Macrobrachium nipponense*) Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制因子基因全长cDNA的克隆及表达[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(6): 1292-1298.
- Zhang X, Qiao H, Fu H T, *et al.* The full length cDNA cloning and expression analysis of kazal-type serine proteinase inhibitor gene from *Macrobrachium nipponense*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1292-1298(in Chinese).
- [16] 金舒博, 王宁, 乔慧, 等. 青虾高血糖激素基因全长cDNA序列的克隆及表达分析[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 82-92.
- Jin S B, Wang N, Qiao H, *et al.* Molecular cloning and expression of a full length cDNA encoding crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 82-92(in Chinese).
- [17] Fu H T, Jiang S F, Xiong Y W. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in China[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(7): 993-998.
- [18] 傅洪拓, 乔慧, 李法君, 等. 长江不同江段青虾的遗传多样性[J]. *水产学报*, 2010, 34(2): 204-212.
- Fu H T, Wu Y, Li F J, *et al.* Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* on a regional scale in the Yangtze River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(2): 204-212(in Chinese).
- [19] 乔慧, 吴滢, 傅洪拓, 等. 应用SSR和SRAP标记构建青虾遗传连锁图谱[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 202-210.
- Qiao H, Wu Y, Fu H T, *et al.* Construction of a genetic linkage map for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) using SSR and SRAP markers[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 202-210(in Chinese).
- [20] 傅洪拓, 龚永生, 吴滢, 等. 日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(3): 327-329.
- Fu H T, Gong Y S, Wu Y, *et al.* Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium nipponense* *Macrobrachium hainanense* and their isozyme analysis[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(3): 327-329(in Chinese).
- [21] 孙盛明, 傅洪拓, 戈贤平, 等. 青虾冷休克蛋白Y-box编码基因的cDNA全长克隆与表达分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(19): 1345-1354.
- Sun S M, Fu H T, Ge X P, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of cold shock protein Y-box gene from oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(19): 1345-1354(in Chinese).
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [23] 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.
- [24] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, *et al.* Molecular cloning, mRNA expression and characterization of membrane-bound hemoglobin in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A-Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 207: 36-42.
- [25] Wang X W, Wang J X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(1-2): 27-38.
- [26] Xiu Y J, Wang Y H, Bi J X, *et al.* A novel C-type lectin is involved in the innate immunity of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 50: 117-126.
- [27] 金振晓, 刘维永, 胡军, 等. 人甘露糖结合凝集素在小

- 鼠肝脏细胞内表达[J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(12): 828-831.
- Jin Z X, Liu W Y, Hu J, *et al.* Expression of human mannose-binding lectin in mice liver[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2002, 18(12): 828-831(in Chinese).
- [28] Salerno G, Parisi M G, Parrinello D, *et al.* F-type lectin from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): purification, cDNA cloning, tissue expression and localization, and opsonic activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 143-153.
- [29] Odom E W, Vasta G R. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*)[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(3): 1698-1713.
- [30] Wei X M, Liu X Q, Yang J M, *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.
- [31] 王敏, 吴萍, 叶元土, 等. 秀丽白虾4种C型凝集素基因的克隆、组织表达与进化分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1632-1644.
- Wang M, Wu P, Ye Y T, *et al.* Molecular cloning, expression characterization and phylogenetic analysis of four novel C-type lectin genes in white shrimp (*Exopalaemon modestus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1632-1644(in Chinese).
- [32] Ma T H T, Tiu S H W, 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.
- [33] Zhang H, Chen L Q, Qin J G, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of a C-type lectin cDNA in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(2): 358-363.

Molecular cloning, prokaryotic expression and localization analysis of C-type lectin 3 (*MnLec3*) cDNA from *Macrobrachium nipponense*

SUN Shengming¹, FU Hongtuo^{1*}, XUAN Fujun², GE Xianping¹, ZHU Jian¹, WU Xugan³

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214081, China;

2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China;

3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: C-type lectins are a large family of proteins that exist in all deuterostomia. C-type lectins can bind to carbohydrate moieties normally in a calcium-dependent manner and play important roles in immune defense. This study aims to explore the expression patterns of C-type lectin gene in different tissues, cellular localization and bacteria challenge in *Macrobrachium nipponense*. The cDNA sequence of *M. nipponense* (*MnLec3*) was obtained using rapid amplification of cDNA ends method (RACE) and RT-PCR. The expression levels of *MnLec3* in different tissues and at different time of artificially challenged with *Aeromonas hydrophilia* were analyzed by qRT-PCR. The full-length cDNA sequence of *MnLec3* was 1 357 bp, which contained a 5' untranslated region of 125 bp, a 3' untranslated region of 206 bp, a 1 026 bp open reading frame (ORF) encoding 341 amino acids. The deduced amino acid sequence of *MnLec3* had a signal peptide containing 17 amino acid residues and a carbohydrate recognition domain (CRD). Phylogenetic tree analysis stated that Oriental river prawn has the closest relationship with other crustacean. The expressed recombinant MnLec3 protein and polyclonal antibody were obtained in present study using a conventional method. Furthermore, immunofluorescent staining technique was used to determine cellular localization of *MnLec3* in hepatopancreas of prawns. Quantitative real-time RT-PCR analysis showed that the *MnLec3* gene was expressed in haemocytes, hepatopancreas, muscles, gill, testis, ovary and intestines with the highest level of expression in the hepatopancreas. Real-time PCR analysis indicated that *MnLec3* transcripts level showed significant change in hepatopancreas after the prawn was artificially challenged with *A. hydrophilia*, followed by return to control levels at 96 h post-injection, which were similar to MnLec3 protein expression abundance using Western Blot. The results suggested that *MnLec3* might be involved in the immune response against bacteria.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; C-type lectins 3; *Aeromonas hydrophilia*; gene expression

Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402280, 31672633); Open Funding Project of the Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources (2016KF-02)