



缢蛭 2-CRD 型半乳糖凝集素 (Galectin) 基因的克隆和表达分析

徐晓荣, 施鹏, 徐继林*, 廖凯, 冉照收, 严小军

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315000)

摘要: 利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得了缢蛭半乳糖凝集素基因 (*ScGL*)。 *ScGL* 全长为 1 282 bp, 5'非编码区 35 bp, 3'非编码区 329 bp, 开放阅读框 (ORF) 918 bp, 编码 305 个氨基酸。氨基酸序列分析显示, *ScGL* 无跨膜结构域, 与已报道的缢蛭半乳糖凝集素含 1 个糖识别结构域 (CRD) 不同, *ScGL* 具有 2 个 CRD。相似性分析显示, *ScGL* 与其他软体动物的半乳糖凝集素具有较高的相似性, 与菲律宾蛤仔相似性最高, 达 65%; 与已报道的 2 个缢蛭半乳糖凝集素相似性分别为 39.74% 和 44.76%。系统进化上 *ScGL* 与菲律宾蛤仔半乳糖凝集素聚为一支。重组表达发现 *ScGL* 在包涵体表达, 分子量约 34.4 ku。荧光定量 PCR 分析显示, *ScGL* 在缢蛭鳃、肠、唇瓣、外套膜、出水管、入水管、足和内脏团中均表达; 其中肠、内脏团、唇瓣和足中表达量较高, 出水管和入水管中表达量最低。消化腺 *ScGL* 表达量分别在金黄色葡萄球菌感染后 3 h 和 48 h 显著高于对照组; 鳃 *ScGL* 表达量分别在鳃弧菌和金黄色葡萄球菌感染后 6 h 和 48 h 显著高于对照组, 说明 *ScGL* 参与了病原体诱导的缢蛭免疫应答。本研究为深入探索 *ScGL* 在缢蛭免疫中的作用奠定基础。

关键词: 缢蛭; 半乳糖凝集素; 免疫; 表达特征; 原核表达

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) 隶属于软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、帘蛤目 (Veneroida)、竹蛭科 (Solenidae)、缢蛭属 (*Sinonovacula*), 是浙江、福建和广东等地区的重要滩涂养殖贝类, 2016 年我国缢蛭养殖产量约 82 万 t^[1]。近年来, 缢蛭养殖过程种病害频发, 严重制约产业的健康发展。由于缺乏后天免疫, 缢蛭依赖先天免疫反应保护自身免受病原体感染^[2]。因此, 研究缢蛭先天性免疫机制可为缢蛭分子育种和抗病选育提供重要参考。

凝集素是一类糖蛋白, 通过特异性识别并结合糖分子, 凝集素在生物防御、细胞识别

和黏着等方面发挥着重要作用^[3]。动物凝集素含特异性的糖识别结构域 (carbohydrate-recognition domain, CRD), 而半乳糖凝集素至少包含 1 个 CRD, 长度约为 130 个氨基酸^[4]。在哺乳动物中, 半乳糖凝集素分为 3 种类型: 原型、嵌合型和串联重复型。在水生软体动物中, 半乳糖凝集素分为 4 种类型: 1-CRD、2-CRD、4-CRD 和嵌合半乳糖凝集素相关蛋白 (galectin-related protein, GREP)^[5]。半乳糖凝集素是模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), 能特异性识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)^[6-7]。此外, 半乳糖凝集素还被广泛认为

收稿日期: 2019-06-23 修回日期: 2020-02-03

资助项目: 浙江省重大科技专项 (2019C02057); 宁波市重大科技专项 (2019B10006); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49)

通信作者: 徐继林, xujilin@nbu.edu.cn

参与了 T 细胞和肿瘤细胞凋亡、中性粒细胞同源异形和 mRNA 剪接等生物学过程^[8-11]。

半乳糖凝集素广泛存在于水生生物中。最近的研究表明, 水生生物半乳糖凝集素与细胞黏附、颗粒捕获^[12]及黏膜免疫有关^[13], 参与了对多种病原微生物和浮游植物的识别结合^[14]。关于半乳糖凝集素在水生生物免疫中的作用已有较多报道, 如在大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*)^[15]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[16]、大竹蛭 (*Solen grandis*)^[17]、美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)^[18] 和三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)^[19] 等中均发现了对细菌有凝集作用的半乳糖凝集素。在缢蛭中, 目前已发现 2 个半乳糖凝集素, 其中一个 (ScGal2) 能激活免疫反应, 通过与细菌表面的脂多糖结合而优先凝集革兰氏阴性菌^[20]; 而另一个 (ScGal) 参与急性免疫应答, 凝集细菌并刺激血细胞的吞噬作用, 在免疫识别过程中充当 PRR^[21]。

软体动物中存在不同类型的半乳糖凝集素。在牡蛎中发现 1-CRD 和 4-CRD 型半乳糖凝集素^[12, 18]; 在合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 中发现 2-CRD 和 4-CRD 型半乳糖凝集素^[22-23]。此外, 同一物种中相同类型的半乳糖凝集素也可能不止一个^[14, 18]。在缢蛭中, 目前已发现 2 个半乳糖凝集素, 且都只含 1 个 CRD^[20-21]。关于缢蛭是否存在其他类型半乳糖凝集素尚未见报道; 缢蛭半乳糖凝集素的分子特性和功能尚未阐明。本研究从缢蛭中克隆得到一个 2-CRD 型半乳糖凝集素, 并对其分子结构、组织分布以及病原菌感染后的表达变化模式进行了分析, 为进一步研究缢蛭半乳糖凝集素的免疫功能提供了实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用缢蛭采自宁波市鄞州瞻岐椿霖水产养殖场, 实验前在海水中暂养, 期间水温 20 °C, 盐度 18, pH 7.4。选择活力旺盛、壳长均匀 (5.0~6.0 cm) 的缢蛭进行实验。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 由宁波大学微生物室提供。

RNA 提取试剂 (TRIzol)、质粒提取试剂盒 (Plasmid DNA Mini Kit) 购自 OMEGA 公司; 5'和 3'扩全长试剂盒 (SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit User

Manual)、反转录试剂盒 (PrimeScript RT-PCR Kit、PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser)、荧光定量试剂盒 (SYBR[®] Premix Ex Taq[™]、Tli RNaseH Plus)、pMD18-T 载体、pET-28a 载体和限制性内切酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit)、DH5 α 感受态细胞和表达宿主菌 BL21(DE3) 感受态细胞购于北京康为世纪生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

选取 3 只健康缢蛭, 各取鳃、唇瓣、足和肠共 4 个组织分别混合, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性和纯度, 使用反转录试剂盒 (PrimeScript RT-PCR kit) 将其反转录成 cDNA, 保存于 -80 °C 备用。

1.3 ScGL 基因全长克隆

根据实验室前期转录组数据, 筛选获得缢蛭凝集素 ScGL 部分序列, 并设计一对引物 ScGL-F1 和 ScGL-R1 (表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增验证。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环。PCR 扩增产物经纯化回收后连接至 pMD18-T 载体, 质粒转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 将阳性克隆进行测序 (深圳华大基因科技有限公司)。

在已获得序列的基础上设计 3'RACE 和 5'RACE 引物 (表 1), 按照 5'和 3'扩全长试剂盒说明书进行扩增。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库中的 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 确定开放阅读框 (ORF), 并预测编码氨基酸的序列。用 ExPASy 数据库中的在线工具 Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/) 分析该蛋白的分子量和等电点, 通过 SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, 利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜区分析, 用 ExPASy 中的 PROSITE (https://prosite.expasy.org/#_NO_LINK_PROXY_) 分析 ScGL 蛋白结构域。用 Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 预测与 ScGL 基因同源的凝集素序列, 使用 ClustalX (1.83) 进行氨基酸同源性分析, 用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage
ScGL-F1	AGCGATTGTGCTTTTGTTC	部分片段扩增 partial sequence PCR
ScGL-R1	CAATGGTATGGCACAAGAAGACT	
3'-ScGL-F1	CGTCATTCGCCCTTCTCCCTTTT	3'RACE
3'-ScGL-F2	GGAGCATAATCAGTCAAGGTGGCG	
5'-ScGL-R1	CCCCACGAACCGCTCATCAGACT	5'RACE
5'-ScGL-R2	CGGATTACCTGGTTGTCGCTGAA	
ScGL-EcoR I-F	<u>CCGGAATTC</u> ATGTCAACAGTCCATAATCCACCCA	开放阅读框扩增 ORF amplification
ScGL-Hind III-R	<u>CCCAAGCTT</u> CTACTGGAAGCGCACCTGCG	
Beta-F1	CCATCTACGAAGGTTACGCC	荧光定量PCR qRT-PCR
Beta-R1	TCGTAGTGAAGGAGTAGCCTCTTTC	
RT-ScGL-F	CAAGATTCAGCGACAACCAGG	
RT-ScGL-R	GATGGTTGTAGTCGCTGTGGTG	

注：下划线表示酶切位点

Notes: The underline indicates the restriction on site

1.5 ScGL 组织分布表达

提取鳃、肠、内脏团(肠除外)、唇瓣、出水管、入水管、足和外套膜组织的 RNA 并用反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)反转录成 cDNA。利用 Primer premier 5.0 软件设计 ScGL 和内参基因(β -actin)的特异性引物(表 1), 依照荧光定量试剂盒(SYBR® Premix Ex TAQ™、Tli RNaseH Plus)要求, 分别以上述所制备的 cDNA 为模板, 进行 ScGL 和 β -actin 的荧光定量 PCR(qRT-PCR)。扩增条件为 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 68 °C 20 s, 40 个循环。以 β -actin 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 ScGL 基因的相对表达量, 利用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析和 Tukey 多重比较分析, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

1.6 细菌刺激实验

以磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)为空白对照, 足部分别注射 100 μ L PBS 稀释的金黄色葡萄球菌、哈维氏弧菌和鳃弧菌(1×10^9 个/mL)^[20, 23]。分别在注射后 3、6、12、24 和 48 h 从对照组和处理组中各取 3 个个体, 分离消化腺和鳃组织, 并于 -80 °C 保存。

1.7 ScGL 原核表达和 Western blot 检测

根据 ScGL 基因 ORF 序列设计含有酶切位

点的引物 ScGL-EcoR I-F 和 ScGL-Hind III-R(表 1), 以 cDNA 为模板扩增 ORF 序列。用质粒提取试剂盒提取 pMD-18T-ScGL 重组质粒和 pET-28a 空白质粒, 用 EcoR I 和 Hind III 进行双酶切, 回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和 pET-28a 载体, 构建 pET-28a-ScGL 重组质粒。将重组质粒转化至 DH5 α , 筛选阳性克隆并测序验证。根据测序结果, 再提取重组质粒转化入 BL21 (DE3) 感受态细胞, 构建重组表达菌株 BL21/pET-28a-ScGL, 然后接种于 LB 液体培养基(卡那霉素 50 μ g/mL) 扩大培养, 37 °C 培养至 OD 值为 0.4~0.6, 加入诱导剂 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L), 28 °C 诱导过夜, 对照组为不加诱导剂的重组菌液。将菌液在 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 Binding buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl) 后超声破碎, 用包涵体洗涤液洗涤杂蛋白 2 次, 再用包涵体溶解液溶解包涵体, 按照 His60 Ni Superflow Resin 纯化柱 (TaKaRa 公司) 使用说明纯化重组蛋白质。用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 检测纯化后的蛋白质。

将重组菌株表达产物经过 SDS-PAGE 电泳后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)。转膜完成后, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h, 封闭后用 TBST 缓冲液洗涤 1 次。然后加入兔抗 6 \times His 抗体, 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 再加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔

IgG, 室温孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液洗涤 5 次。ECL 显色剂显色 2 min, 置于显影液中约 30 s, 放于定影液中定影后观察结果。

2 结果

2.1 ScGL 克隆和生物信息学分析

缢蛭半乳糖凝集素 ScGL 基因的全长 1 282 bp, 5'非编码区 35 bp, 3'非编码区 329 bp, ORF 918 bp, 编码 305 个氨基酸, 其包含 2 个 CRD, 属于 2-CRD 型半乳糖凝集素 (图 1)。ScGL 分子量为 34.4 ku, 等电点为 8.8。对 ScGL 结构分析显示, ScGL 蛋白的 1~305 个氨基酸都位于细胞膜表面, 无跨膜

结构区域, 也不含信号肽。同源性序列比对结果显示, ScGL 与其他软体动物的 2-CRD 型半乳糖凝集素序列具有较高的相似性, 与菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、三角帆蚌、长牡蛎 (*C. gigas*)、欧洲平牡蛎 (*Ostrea edulis*)、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)、合浦珠母贝、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 和欧洲玉黍螺 (*Littorina littorea*) 的半乳糖凝集素序列相似性分别为 65%、58%、50.3%、50.3%、48%、47.6%、44.2% 和 40.7%; 与大竹蛭半乳糖凝集素相似性较低 (23.53%)。与在缢蛭中已报道的 1-CRD 型半乳糖凝集素的相似性为 39.74% 和 44.76%(图 2)。进化树结果显示, ScGL 首先与菲律宾蛤仔半乳糖凝

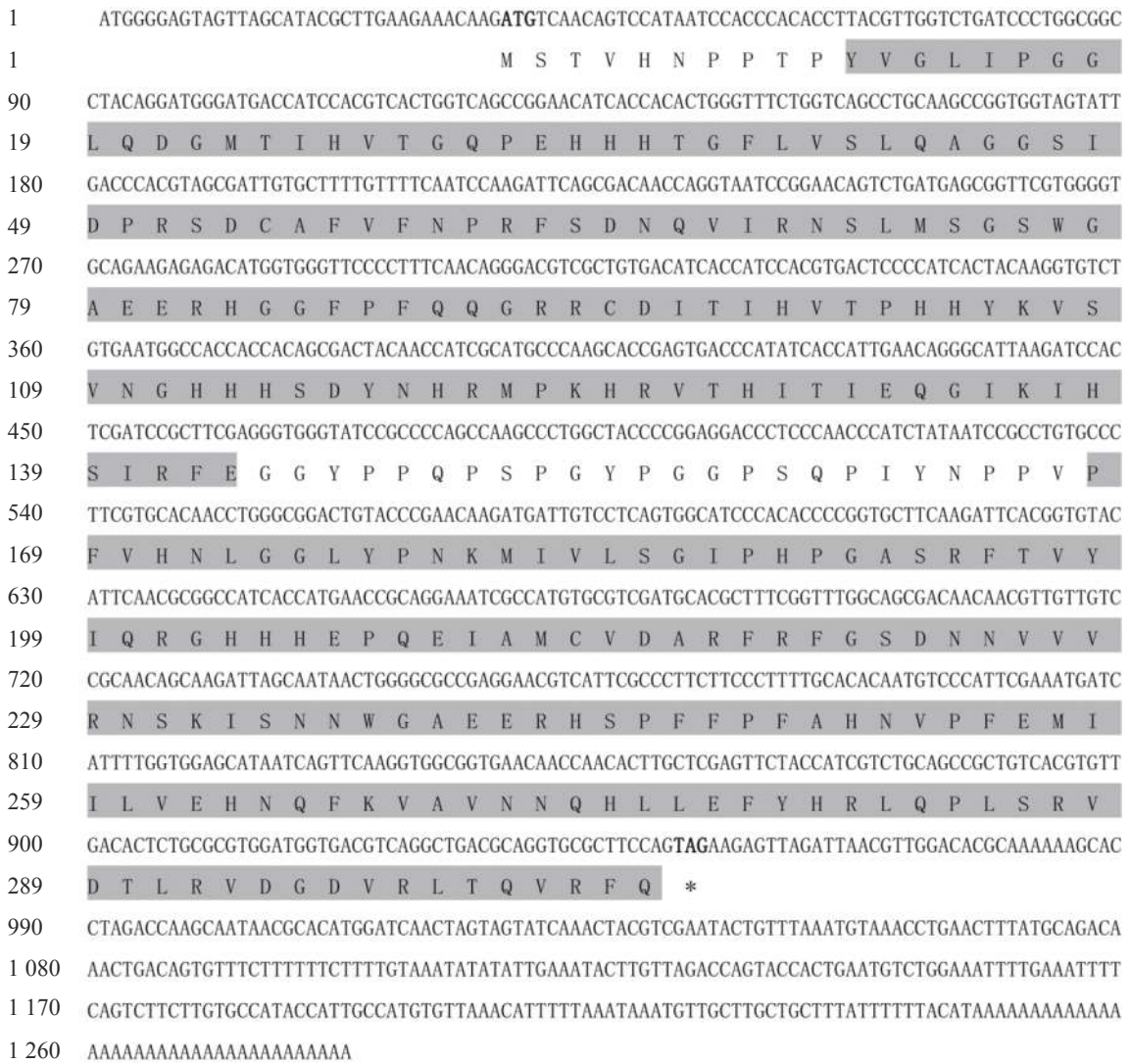


图 1 ScGL 基因的核苷酸序列和氨基酸序列

加粗字体分别表示起始密码子和终止密码子; * 表示终止密码子; 灰色部分表示 2 个碳水化合物 CRD 序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of ScGL

Bold fonts indicate the start codon and stop codon, respectively; * indicates the stop codon; gray portions indicate the 2 carbohydrate CRD sequences

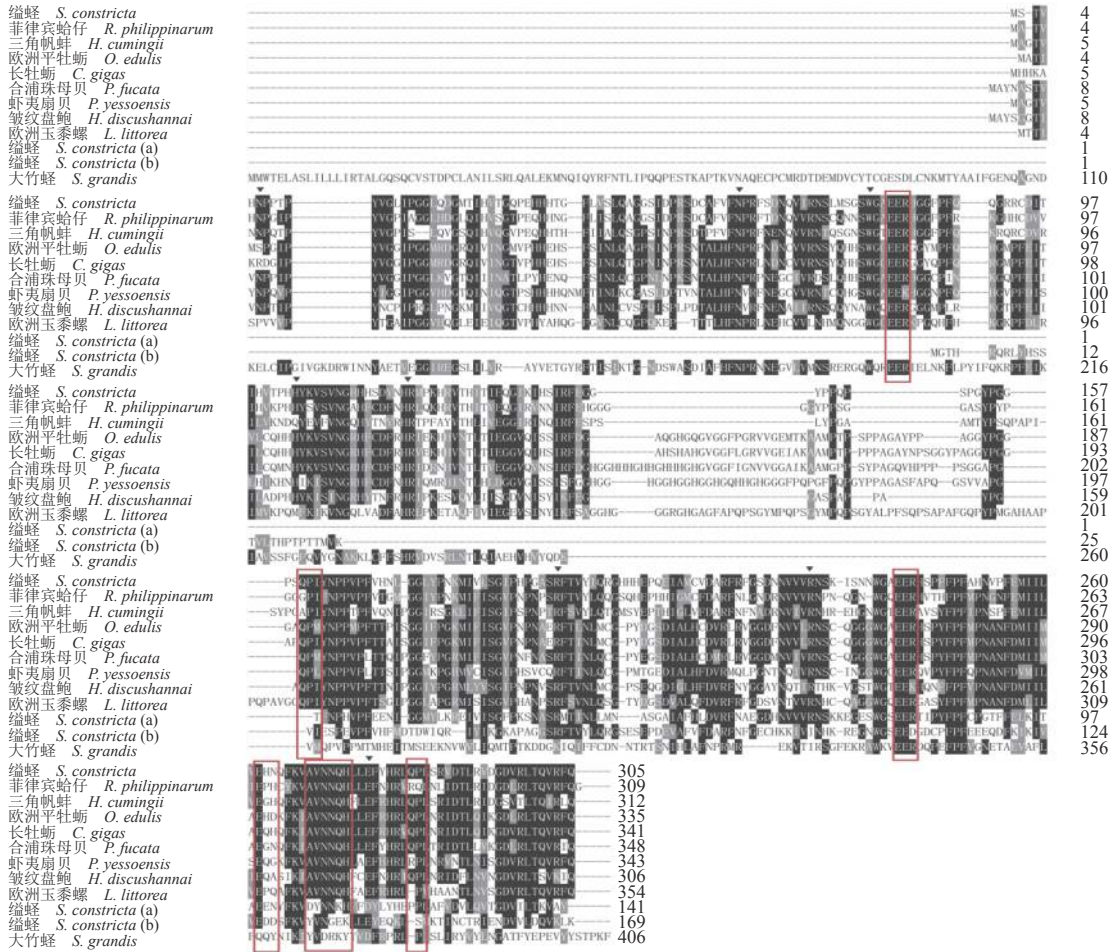


图2 缢蛭半乳糖凝集素 ScGL 和其他软体动物半乳糖凝集素氨基酸序列的多重对比

构成碳水化合物结合基序用▼表示，保守结构用红色方框表示；各物种 ScGL 蛋白质 GenBank 登录号：菲律宾蛤仔 (EU437401.1)，欧洲玉黍螺 (AJA37867.1)，三角帆蚌 (ANQ89716.1)，皱纹盘鲍 (ABN54798.1)，欧洲平牡蛎 (ADF80416.1)，合浦珠母贝 (ACO53607.1)，虾夷扇贝 (OWF53975.1)，长牡蛎 (EKC40501.1)，大竹蛭 (JN642121)，缢蛭 (MN037956)，缢蛭 (a)(参考 Bai 等^[21])，缢蛭 (b) (MH046789)；其中缢蛭 (a) 和 (b) 为 1-CRD 型半乳糖凝集素，其余为 2-CRD 型半乳糖凝集素

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of ScGL from *S. constricta* with galectin from other mollusks

The binding motifs that constitute carbohydrates are indicated by ▼, conservative structure are represented by red squares; the protein accession numbers from GenBank: *R. philippinarum* (EU437401.1), *L. littorea* (AJA37867.1), *H. cumingii* (ANQ89716.1), *H. discus hannai* (ABN54798.1), *O. edulis* (ADF80416.1), *P. fucata* (ACO53607.1), *P. yessoensis* (OWF53975.1), *C. gigas* (EKC40501.1), *S. grandis* (JN642121), *S. constricta* (MN037956), *S. constricta* (a) (reference Bai et al^[21]), *S. constricta* (b) (MH046789); *S. constricta* (a) and (b) are 1-CRD galectin, and others are 2-CRD galectin

集素聚为一支，进一步与三角帆蚌半乳糖凝集素聚为一大支(图3)。

2.2 ScGL 组织表达

qRT-PCR 结果表明，半乳糖凝集素 ScGL 基因在所检测的组织中均有表达。ScGL 在肠中的表达量显著高于鳃、外套膜、出水管和入水管 (P<0.05)；内脏团、唇瓣和足与其他组织的 ScGL 表达量无显著差异 (P>0.05)(图4)。

2.3 病原菌感染后 ScGL 表达变化

哈维氏弧菌和鳃弧菌注射处理 24 h 后，死

亡率分别为 85.8% 和 95.2%；金黄色葡萄球菌处理 48 h 后死亡率为 96.8%。缢蛭消化腺中 ScGL 表达量在注射金黄色葡萄球菌后 3 h 和 48 h 均显著高于对照组 (P<0.05)，在 6、12 和 24 h 与对照组无差异 (P>0.05)。哈维氏弧菌和鳃弧菌处理对消化腺 ScGL 表达量无显著影响 (P>0.05)(图 5-a)。鳃 ScGL 表达量分别在注射鳃弧菌和金黄色葡萄球菌后 6 和 48 h 显著高于对照组 (P<0.05)。哈维氏弧菌处理对鳃 ScGL 的表达量无显著影响 (P>0.05)(图 5-b)。

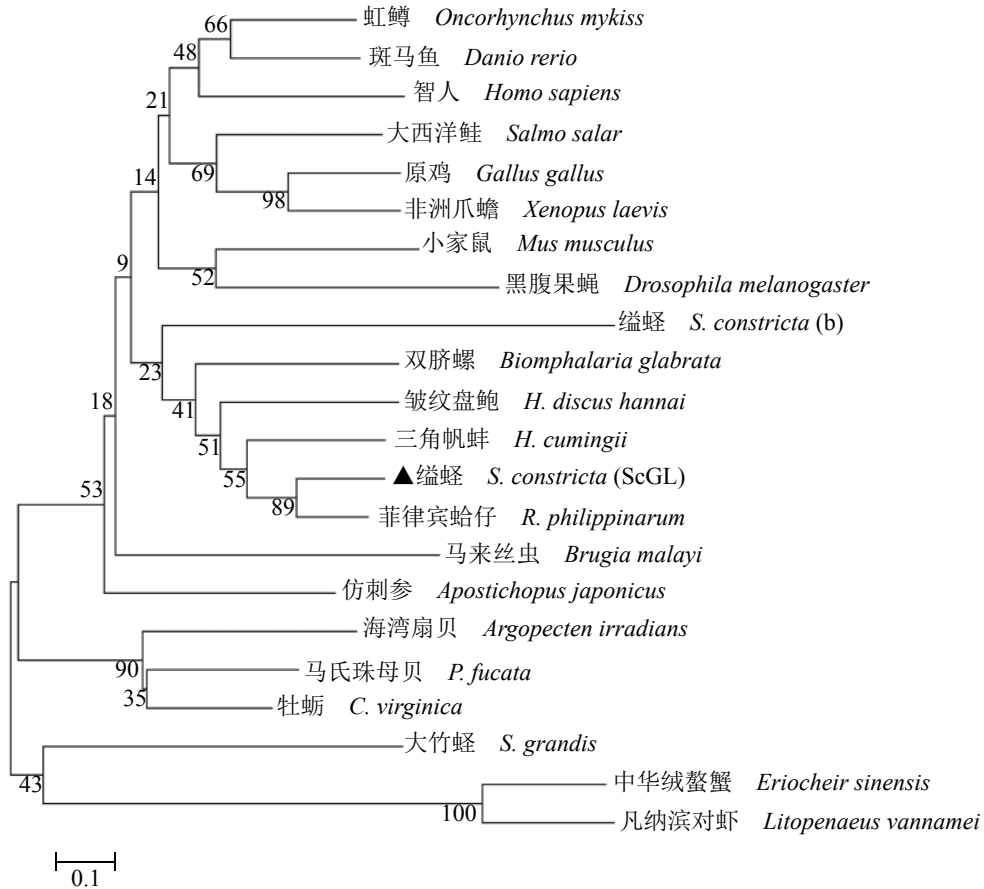


图 3 ScGL 与其他物种半乳糖凝集素的系统进化树

虹鳟 (BAA88670.1), 斑马鱼 (NP_956366.1), 智人 (BAB83623.1), 大西洋鲑 (NP_001133778.1), 原鸡 (NP_001010843.1), 非洲爪蟾 (BAC55887.1), 小家鼠 (NP_034836.1), 黑腹果蝇 (AF338142.1), 双脐螺 (XP_013089806.1), 马来丝虫 (AF237486.1), 仿刺参 (PIK56913.1), 海湾扇贝 (ACS72240.1), 马氏珠母贝 (ACO36044.1), 牡蛎 (ABG75998.1), 中华绒螯蟹 (ADF32023.1), 凡纳滨对虾 (ROT76911.1), 菲律宾蛤仔 (EU437401.1), 缢蛭 (b) (MH046789), 缢蛭 (MN037956), 三角帆蚌 (ANQ89716.1), 皱纹盘鲍 (ABN54798.1), 大竹蛭 (JN642121)

Fig. 3 Phylogenetic tree of ScGL with other galectins

O. mykiss (BAA88670.1), *D. rerio* (NP_956366.1), *H. sapiens* (BAB83623.1), *S. salar* (NP_001133778.1), *G. gallus* (NP_001010843.1), *X. laevis* (BAC55887.1), *M. musculus* (NP_034836.1), *D. melanogaster* (AF338142.1), *B. glabrata* (XP_013089806.1), *B. malayi* (AF237486.1), *A. japonicus* (PIK56913.1), *A. irradians* (ACS72240.1), *P. fucata* (ACO36044.1), *C. virginica* (ABG75998.1), *E. sinensis* (ADF32023.1), *L. vannamei* (ROT76911.1), *R. philippinarum* (EU437401.1), *S. constricta* (b) (MH046789), *S. constricta* (MN037956), *H. cumingii* (ANQ89716.1), *H. discus hannai* (ABN54798.1), *S. grandis* (JN642121)

2.4 ScGL 原核表达

本研究以含有 6 个组氨酸 (His) 标签的 pET-28a 表达载体, 重组蛋白经镍柱分离和纯化。12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析显示, 在 35 ku 处出现条带, 与预测的目的条带大小基本一致 (图 6)。阴性对照和上清液中均未发现目的蛋白条带, 说明构建的重组菌株可表达目的蛋白, 且在包涵体表达。采用梯度透析的方法, 逐步降低透析液中尿素的含量, 使蛋白质缓慢折叠恢复正确结构。Western blot 检测表明, 重组蛋白能与抗体特异性结合, 在 35 ku 处有明显条带, 进一步证实重组蛋白在大肠杆菌中成功表达。

3 讨论

凝集素对甘露糖和半乳糖等的特异性识别和结合依赖于 CRD 结构域, 而 CRD 结构域含多个保守的氨基酸基序, 如 EPN 和 QPD 等 [24-25]。与其他软体动物半乳糖凝集素类似, 本研究获得的 ScGL 含有多个保守结构 (图 2), 且具有保守的参与糖结合的氨基酸残基 [组氨酸 (His)、天冬酰胺 (Asn)、精氨酸 (Arg)、缬氨酸 (Val) 和谷氨酸 (Glu)]。脊椎动物凝集素 CRD 中 EPN 和 QPD 基序十分保守, 但在软体动物中具有多样性, 存在 QPS [26]、YPD [13]、EPD [27] 和 QPN [28] 等多种形式。本研究克隆的 ScGL 中的 EPN 和 QPD 基序也

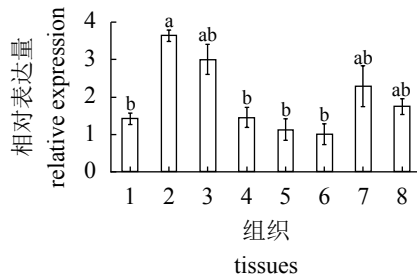


图4 *ScGL* 基因在不同组织中的表达分布

1. 鳃, 2. 肠, 3. 内脏团, 4. 外套膜, 5. 出水管, 6. 入水管, 7. 唇瓣, 8. 足; 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Fig. 4 Distribution of *ScGL* gene in different tissues of *S. consticta* measured by qRT-PCR

1. gill, 2. intestine, 3. purtenance, 4. mantle, 5. exhalent siphon, 6. inhalent siphon, 7. labial palp, 8. foot; different letters mean significant differences ($P<0.05$)

发生改变, 为 QPL、QPI、EHN 和 EPQ。ScGL 与其他软体动物的序列相似性较高, 含有相同的 QPL 和 QPI 等基序, 但与已报道的 2 个缢蛭半乳糖凝集素基因的序列相似性较低。在软体动物中, 仅少数半乳糖凝集素具有信号肽, 可通过经典的分泌途径进行分泌^[17]; 而其他大多数软体动物半乳糖凝集素不具有信号肽, 一般认为通过促进囊泡穿过质膜的非经典机制进行分泌^[29-30]。本研究中 ScGL 无信号肽, 因此其可能通过非经典的分泌途径分泌。

半乳糖凝集素一般含有 1 个或多个能特异性结合 β -半乳糖苷残基的 CRD。半乳糖凝集素

的 CRD 约 135 个氨基酸, 呈 β 三明治结构。目前在缢蛭中发现的 ScGal2 和 ScGal 均为含 1 个 CRD 的 1-CRD 型半乳糖凝集素, 而本研究中 ScGL 含 2 个 CRD。在哺乳动物中, 根据分子结构不同将半乳糖凝集素分成三类, 而在软体动物中暂无根据分子构型分类的方法和依据^[31]。软体动物中 1-CRD 和 2-CRD 型半乳糖凝集素目前分类依据仍然是 CRD 个数。1-CRD 半乳糖凝集素氨基酸序列较短, 只含 1 个 CRD, 且仅含有少量额外的氨基酸。2-CRD 半乳糖凝集素由 280~300 个氨基酸组成, 2 个相似但不完全相同的 CRD 之间被长约 10~15 个氨基酸的连接肽连接。研究发现, 水生软体动物中具有 1 个以上 CRD 的半乳糖凝集素可能具有协同、高亲和力结合的潜力^[5]。同一物种中不同类型的半乳糖凝集素可能发挥不同的功能。例如, 牡蛎 4-CRD 型半乳糖凝集素能促进吞噬作用, 参与免疫防御^[18]; 而 1-CRD 型半乳糖凝集素可能与细胞黏附有关, 不参与急性免疫应答^[12]。目前, 在软体动物中仅发现少数半乳糖凝集素与细胞黏附有关, 大多数半乳糖凝集素都参与机体的免疫反应^[32]。

本研究发现, 金黄色葡萄球菌刺激 3 和 48 h 后, 缢蛭消化腺和鳃中 ScGL 表达量显著上调; 同时, 鳃弧菌刺激 6 h 后, 鳃中 ScGL 表达量也显著上调。在海湾扇贝中, 鳃弧菌刺激 9 h 和藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 刺激 9 和 18 h 后血细胞中半乳糖凝集素基因 (*AiGal1*) 表达量显著升

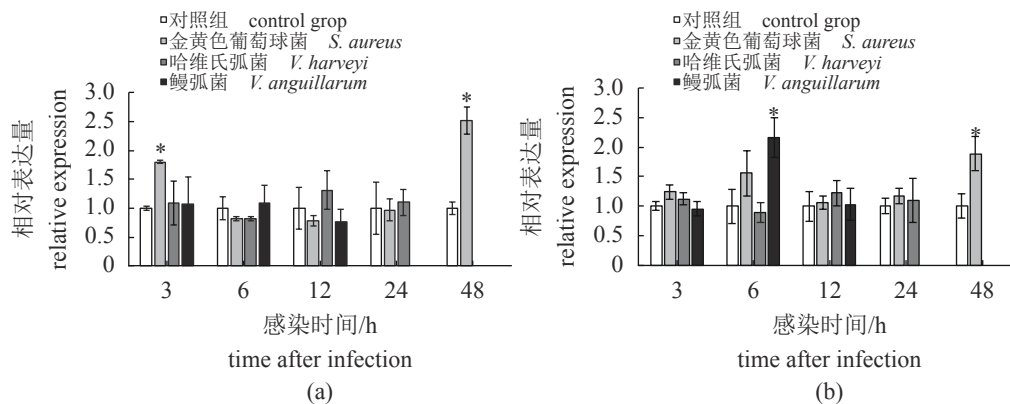


图5 金黄色葡萄球菌、哈维氏弧菌和鳃弧菌感染后消化腺 (a) 和鳃 (b) 中 ScGL 基因的表达水平

在实验中进行 3 次生物学重复, 数据显示为平均值 \pm SD ($n=3$), 每个时间点细菌注射组与 PBS 注射组间基因表达量差异显著性用 t 检验进行分析, * 表示差异显著 ($P<0.05$)

Fig. 5 Expression levels of *ScGL* gene in digestive gland (a) and gill (b) after infection with *S. aureus*, *V. harveyi* and *V. anguillarum*

Three biological replicates were performed in the experiment and the data were shown as mean \pm S.D ($n=3$), the t test was used to analyze the significance of differences between the gene expression levels of bacteria and PBS injection groups, single asterisk denotes significant difference ($P<0.05$)

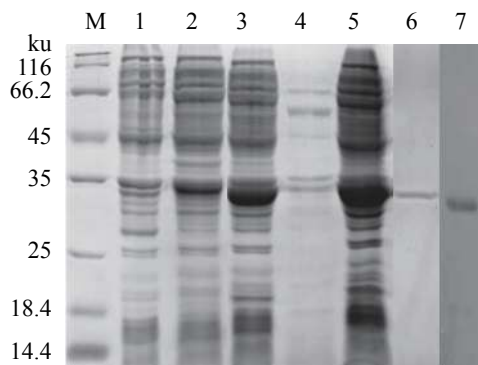


图 6 ScGL 蛋白的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

M. 蛋白质 marker, 1. 加入 IPTG 后的 pET-28a, 2. 未诱导的总细胞, 3. 诱导后的总细胞, 4. 超声后的上清, 5. 超声后的沉淀, 6. 纯化后的 ScGL 蛋白, 7. 纯化后 ScGL 的 Western blot 分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blot analysis of ScGL protein

M. protein marker, 1. pET-28a after IPTG addition, 2. uninduced total cells, 3. total cells after induction, 4. supernatant after ultrasound, 5. precipitation after ultrasound, 6. purified ScGL protein, 7. Western blot analysis of purified ScGL protein

高^[33]; 鳗弧菌感染后 4 h 后, 魁蚶 (*Scapharca brougtonii*) 肝胰腺和鳃半乳糖凝集素基因 (*SbGal*) 的表达量显著上调^[34]; 溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 刺激 4 h 后, 合浦珠母贝消化腺中半乳糖凝集素基因 (*PoGal*) 和肝胰腺中 C 型凝集素基因 (*PoLEC1*) 表达量显著升高^[23, 35]。鳃和消化腺是软体动物重要的免疫防御器官^[36]。因此, 病原菌刺激后鳃和消化腺中 *ScGL* 表达上调, 暗示 *ScGL* 可能是一种重要的免疫因子, 并参与了致病菌诱导的缢蛏免疫应答。

哈维氏弧菌刺激对消化腺和鳃 *ScGL* 表达无显著影响。同样有研究法西安, 金黄色葡萄球菌刺激缢蛏后, 血细胞中半乳糖凝集素基因 (*ScGal2*) 的表达量无显著变化^[20]; 溶壁微球菌 (*M. lysoleiکتicus*) 刺激对凡纳滨对虾血细胞中半乳糖凝集素基因 (*LvGal*) 的表达无显著影响^[7]。凝集素主要通过识别质膜糖结构域而凝集细菌, 细菌表面糖结构的差异可能导致凝集素的差异性识别, 例如: 海湾扇贝 C 型凝集素 (AiCTL-3) 仅与革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌结合, 而不与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和藤黄微球菌结合^[37]; 海湾扇贝 C 型凝集素 (AiCTL5) 和已报道的缢蛏半乳糖凝集素 (*ScGal2*) 对革兰氏阴性菌的凝集活性强于革兰氏阳性菌^[38, 20]。本研究中, 金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性菌) 能显著提高消化腺和鳃 *ScGL* 表达; 而在哈维氏弧菌或

鳗弧菌 (革兰氏阴性菌) 刺激后, 仅发现鳗弧菌能诱导鳃 *ScGL* 表达上调, 说明 *ScGL* 可能主要识别革兰氏阳性菌细胞壁糖结构域, 参与革兰氏阳性菌诱导的免疫应答。缢蛏中不同类型的半乳糖凝集素可能相互协同介导细菌诱导的免疫应答。此外, 本研究发现致病菌刺激后 *ScGL* 在消化腺和鳃组织中的表达模式存在差异, 与缢蛏 C 型凝集素基因类似^[2], *ScGL* 的功能和表达调控可能存在组织差异。

综上所述, 本研究克隆得到了缢蛏 2-CRD 型半乳糖凝集素基因 *ScGL*; *ScGL* 与已报道的缢蛏半乳糖凝集素具有不同的结构; 致病菌能诱导 *ScGL* 表达。以上结果表明, *ScGL* 可能参与了缢蛏对病原菌的免疫应答并在机体对病原菌的识别和清除中发挥重要作用, 为进一步探究半乳糖凝集素在缢蛏先天免疫中的作用奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017. Fisheries and fisheries administration of the ministry of agriculture. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [2] Shen Y Y, Shao Y N, Cui Y, et al. Novel C-type lectin from razor clam *Sinonovacula constricta* agglutinates bacteria and erythrocytes in a Ca^{2+} -dependent manner [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 86: 9-16.
- [3] Kim J Y, Kim Y M, Cho S K, et al. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(10): 1131-1141.
- [4] Leffler H. Galectin history, some stories, and some outstanding questions [J]. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2018, 30(172): SE129-SE135.
- [5] Vasta G R, Feng C, Bianchet M A, et al. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: from a sweet tooth to the Trojan horse [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 94-106.
- [6] Song L S, Wang L L, Zhang H, et al. The immune system and its modulation mechanism in scallop [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 65-78.

- [7] Hou F J, Liu Y J, He S L, *et al.* A galectin from shrimp *Litopenaeus vannamei* is involved in immune recognition and bacteria phagocytosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 584-591.
- [8] Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, *et al.* CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(23): 8302-8311.
- [9] 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.
- [10] Hadari Y R, Arbel-Goren R, Levy Y, *et al.* Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis[J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(13): 2385-2397.
- [11] Rabinovich G A, Rubinstein N, Toscano M A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2002, 1572(2-3): 274-284.
- [12] Yamaura K, Takahashi K G, Suzuki T. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(1): 168-175.
- [13] Jing X, Espinosa E P, Perrigault M, *et al.* Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 851-858.
- [14] Tasumi S, Vasta G R. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(5): 3086-3098.
- [15] 梁亚芳, 史雨红, 苗亮, 等. 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)Gal-8L基因序列及其细菌凝集活性的鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(2): 413-421.
Liang Y F, Shi Y H, Miao L, *et al.* Gal-8L of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: characterization of the sequence and bacterial agglutination activity[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(2): 413-421(in Chinese).
- [16] 郝贵杰, 林锋, 母昌考, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)半乳糖凝集素PtGAL的基因克隆与原核重组表达[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(6): 1241-1249.
Hao G J, Lin F, Mu C K, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of galectin from *Portunus trituberculatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(6): 1241-1249(in Chinese).
- [17] Wei X M, Yang J M, Liu X Q, *et al.* Identification and transcriptional analysis of two types of lectins (SgCTL-1 and SgGal-1) from mollusk *Solen grandis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 204-212.
- [18] Feng C G, Ghosh A, Amin M N, *et al.* The galectin CvGal1 from the eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) binds to blood group a oligosaccharides on the hemocyte surface[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(34): 24394-24409.
- [19] Bai Z Y, Zhao L T, Chen X J, *et al.* A galectin contributes to the innate immune recognition and elimination of pathogens in the freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 73: 36-45.
- [20] Bai Y Q, Niu D H, Bai Y L, *et al.* Identification of a novel galectin in *Sinonovacula constricta* and its role in recognition of Gram-negative bacteria[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 1-9.
- [21] Bai Y Q, Niu D H, Li Y, *et al.* Identification and characterization of a novel small galectin in razor clam (*Sinonovacula constricta*) with multiple innate immune functions[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 93: 11-17.
- [22] Wang Z L, Jian J C, Lu Y S, *et al.* A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Marine Genomics*, 2011, 4(3): 229-236.
- [23] Zhang D C, Jiang S G, Hu Y T, *et al.* A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(1): 1-6.
- [24] Zelensky A N, Gready J E. The C-type lectin-like domain superfamily[J]. *FEBS Journal*, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [25] Zhou Z J, Sun L. CsCTL1, a teleost C-type lectin that promotes antibacterial and antiviral immune defense in a manner that depends on the conserved EPN motif[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 50(2): 69-77.
- [26] Espinosa E P, Perrigault M, Allam B. Identification and

- molecular characterization of a mucosal lectin (MeML) from the blue mussel *Mytilus edulis* and its potential role in particle capture[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 156(4): 495-501.
- [27] Huang M M, Zhang H, Jiang S, *et al.* An EPD/WSD motifs containing C-type lectin from *Argopectens irradians* recognizes and binds microbes with broad spectrum[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 287-293.
- [28] Espinosa E P, Allam B. Reverse genetics demonstrate the role of mucosal C-type lectins in food particle selection in the oyster *Crassostrea virginica*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2018, 221(6): jeb174094.
- [29] Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(10): 2109-2119.
- [30] Ruvolo P P. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2016, 1863(3): 427-437.
- [31] Vasta G R. Roles of galectins in infection[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(6): 424-438.
- [32] Huang M M, Zhou T, Wu Y H, *et al.* Characterisation and functional comparison of single-CRD and multidomain containing galectins CgGal-2 and CgGal-3 from oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 238-247.
- [33] Song X Y, Zhang H, Zhao J M, *et al.* An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(2): 326-332.
- [34] 郑利兵, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*) 半乳糖凝集素(*SbGal*)基因 cDNA 的克隆及表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(5): 1061-1070.
- Zheng L B, Wu B, Liu Z H, *et al.* Cloning and expression analysis of galectin from *Scapharca broughtonii* (*SbGal*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1061-1070(in Chinese).
- [35] 胡钰婷, 张殿昌, 崔淑歌, 等. 合浦珠母贝 C—型凝集素基因的序列特征和功能分析[J]. *水产学报*, 2011, 25(9): 1327-1336.
- Hu Y T, Zhang D C, Cui S G, *et al.* Sequence features and functional analysis of the C-type lectin gene (PoLEC1) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 25(9): 1327-1336(in Chinese).
- [36] 张晶晶, 李宏俊, 秦艳杰, 等. 文蛤 C 型凝集素基因(*Mm-Lec1*)的克隆与表达分析[J]. *海洋学报*, 2016, 38(6): 111-118.
- Zhang J J, Li H J, Qin Y J, *et al.* Cloning and expression analysis of a C-type lectin gene (*Mm-Lec1*) in hard clam *Meretrix meretrix*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2016, 38(6): 111-118(in Chinese).
- [37] Huang M M, Song X Y, Zhao J M, *et al.* A C-type lectin (AiCTL-3) from bay scallop *Argopecten irradians* with mannose/galactose binding ability to bind various bacteria[J]. *Gene*, 2013, 531(1): 31-38.
- [38] Mu C K, Song X Y, Zhao J M, *et al.* A scallop C-type lectin from *Argopecten irradians* (AiCTL5) with activities of lipopolysaccharide binding and gram-negative bacteria agglutination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 716-723.

Cloning and expression analysis of the 2-CRD galectin gene (*ScGL*) from *Sinonovacula constricta*

XU Xiaorong, SHI Peng, XU Jilin*, LIAO Kai, RAN Zhaoshou, YAN Xiaojun

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315000, China)

Abstract: The galectin gene from *Sinonovacula constricta* (named *ScGL*) was cloned using RACE method. The full length cDNA sequence of *ScGL* was 1 282 bp, which contains 35 bp 5'UTR, 329 bp 3'UTR and 918 bp open reading frame (ORF) that encoded 305 amino acid residues. Analysis of amino acid sequences showed that *ScGL* lacks a transmembrane domain and contains 2 CRD unlike the galectin containing one CRD that has been identified in *S. constricta*. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *ScGL* shared a high degree of conservation with galectin of other species and had the similarity identity with *Ruditapes philippinesis* (65%), 39.74% and 44.76% identical with two galectins reported in *S. constricta*. *ScGL* was expressed in inclusion bodies with a calculated molecular mass of 34.4 ku. Quantitative real-time PCR detection results indicated that the *ScGL* gene was expressed widely in gill, intestine, labial palpus, mantle, exhalent siphon, inhalent siphon, foot and visceral mass, and high expression level was observed in the intestinal, visceral mass, labial palpus and foot, and the lowest expression in the exhalent siphon, and inhalent siphon. After *Staphylococcus aureus* challenge, the expression of *ScGL* in the digestive gland was significantly up-regulated at 3 and 48 hpi (hours past infection). Upon *Vibrio anguillarum* and *S. aureus* challenge, the expression of *ScGL* was significantly up-regulated in the gill respectively at 6 and 48 hpi. The result suggests that *ScGL* might participate in the innate immune response of *S. constricta* triggered by pathogens. The study provides the basis for further research of the *ScGL* in *S. constricta* immunity.

Key words: *Sinonovacula constricta*; galectin; immunization; expression characteristics; prokaryotic expression

Corresponding author: XU Jilin. E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

Funding projects: Major Scientific and Technological Special Projects of Zhejiang Province (2019C02057); Special Funds for Key Project of Science and Technology of Ningbo (2019B10006); China Agriculture Research System (CARS-49)