脊尾白虾甲壳肽Crustin2基因的克隆、表达与功能研究

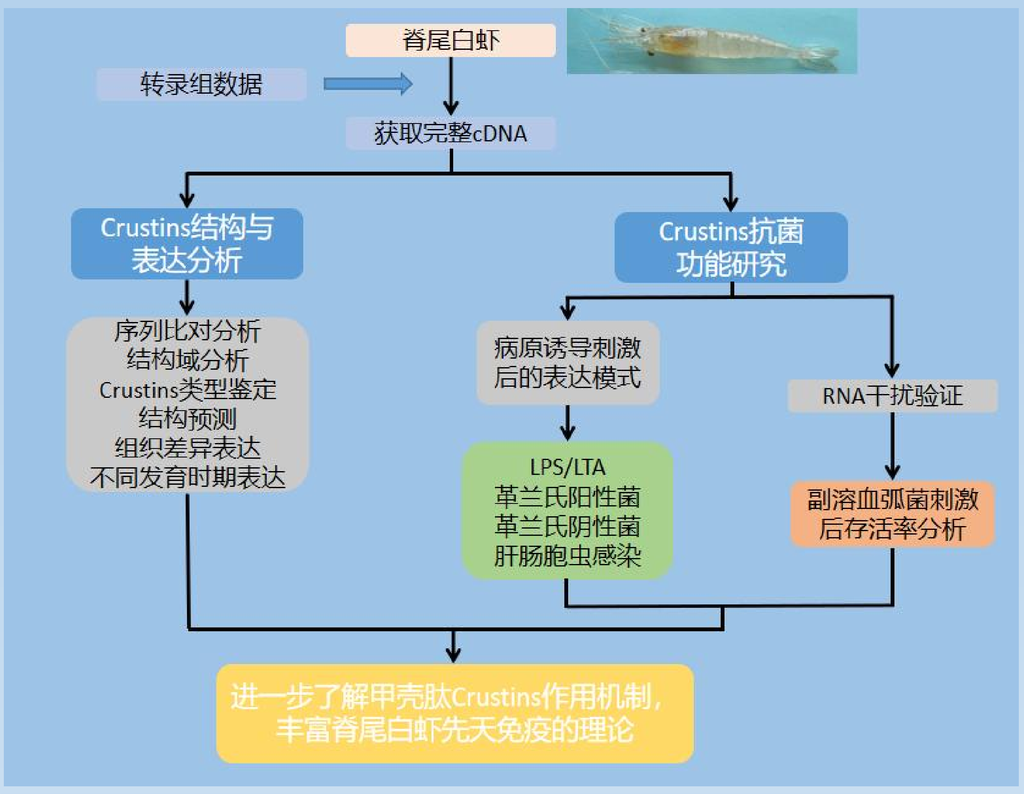
徐凯[1]、王伟丽[1]、刘栋[1]、王超[1]、阎斌伦[1,2]、高焕[1,2]、胡广伟[1,2*]

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室/江苏省海洋生物技术重点实验室，江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心，江苏 连云港 222005)

摘要

为研究脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)甲壳肽Crustin的结构特征和功能，本研究从脊尾白虾中克隆得到一种新型甲壳肽EcCrustin2基因。研究结果表明：EcCrustin2全长为1082bp，开放阅读框378bp，共编码125个氨基酸。EcCrustin2氨基酸序列具有典型的甲壳肽结构特征，包括N端的信号肽和C端的WAP结构域。系统发育分析结果显示EcCrustin2与I型甲壳肽聚集。组织表达结果显示EcCrustin2在血淋巴细胞中表达最高，通过LPS、LTA、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌刺激后，EcCrustin2的表达水平显著上调($p<0.05$)，在虾肝肠胞虫（enterocytozoon hepatopenaei, EHP）感染脊尾白虾后也有诱导EcCrustin2表达的趋势。RNAi结果显示，利用siRNA敲低EcCrustin2后，受副溶血弧菌攻击的虾死亡率上升。这些结果表明 EcCrustin2 参与了针对细菌和 EHP 感染的免疫反应。

技术流程



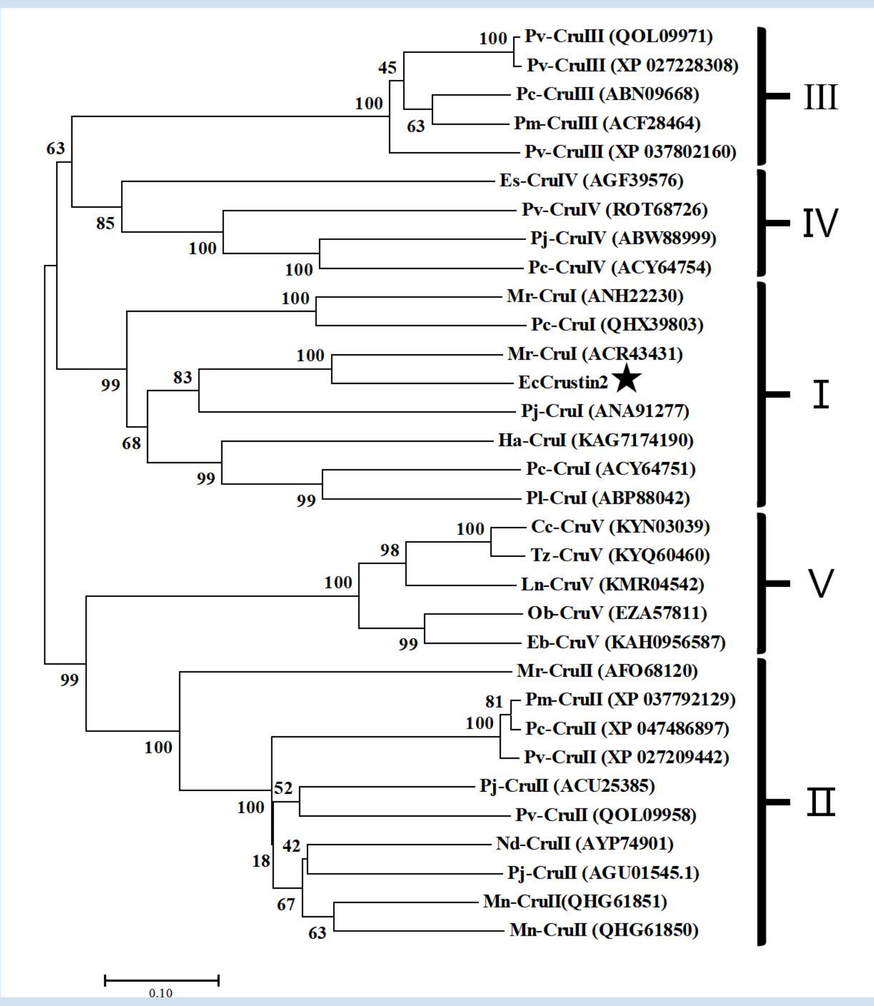
实验结果

（1）EcCrustin2基因cDNA序列分析

```
1    ACTTCCACACCATTTGATCCTTGGACGTCTCTAAACTAGTAGCTGTCTGCTCAATAATAATCAAATTACATGATTCGTCTATGCTTCTTGGCGGTTGGCATCCTGTTTGCCGTTGCACAA 120
1                                                                                                M  I  R  L  C  F  L  A  V  G  I  L  F  A  V  A  Q   17
121  GCGCAGGTAATAGGTGGCCACTTGGGTACCTGTCCCCCTCCAAAGCAACAAGTACAACAGTGTAAAAACTTCTGTAAACTGGAGTTGCCGGGAACCAGTGGACAATACTATTGCTGTGAT 240
18    A  Q  V  I  G  G  H  L  G  T  C  P  P  P  K  Q  Q  V  Q  Q  C  K  N  F  C  K  L  E  L  P  G  T  S  G  Q  Y  Y  C  C  D   57
241  CAACAACTTGCGCCACATGGTCACCAAGGCTCCTGCCCCAGGGTCTCCCTCCTGCCCAACGAGATCGAAGTGATGTGTGACCCCAACGACTCCAACAGACCCTACAGTCTGAACTGCAAG 360
58    Q  Q  L  A  P  H  G  H  Q  G  S  C  P  T  V  S  L  L  P  N  E  I  E  V  M  C  D  P  N  D  S  N  R  P  Y  S  L  N  C  K   97
361  AGTGATGACGATTGCTTCGAGTGGGAGAAGTGTTGCTACACTCCACTCACGCAGCAGCGCATCTGCAGAATAGCGATCTACAATTAGGCCGAGTCGAGGAACTGGCGTCGAAACCTGTTT 480
98    S  D  D  D  C  F  E  W  E  K  C  C  Y  T  P  L  T  Q  Q  R  I  C  R  I  A  I  Y  N  *                                  126
481  GGGAGAGAAGAAAGATGCCTAAACTGAATGTGATGGAGAGAAGAAGAAAGATGCCTAAACTGAATATGATGGAGAGAAGAAGAAAGATGCCTAAACTGAATATGATGGAGAGAAGAAGAA 600
601  AGATGCCTAAACTGAATATGATGGAGAGAAGAAAGATGCCTAGACCGAATATGATGGAGAGAAGAAAAATGCCTTGACCTAATATAATGGAGAGAAGAAAAATGCCTTGACCTAATATAA 720
721  TGGAGAGAAGAAAGATCCGTAGACGGAATATAATGGAGAGAAGAAGAAAGATGCCTAGACCGAATATAATGGAGAGAAGAAAGATGCTTAGACCGAATATAATGGAGAGAAGAGGAAAGA 840
840  AGCCTATAGACCGAATATAATGGAGAGAAGAAAGATGTCTAGACCGAATATAATGGAGAGAAGAAAGATGTCTAGACCGAATATAATGGAGAGAAGAAAGATGTCTAGACCGAATATAAT 960
961  GGAGAGAAGAAGAAAGATGAGTAGACCGAATATAATGGAGAGAAGAGGAAAAATGCATAAACCGAATATATTGGACAGCAGAAGAAAGATACCTACACCGAATATAACAGTAGGGCTACA 1080
1081 AT                                                                                                                          1082
```

单下划线表示信号肽序列，双下划线表示甘氨酸富集区(GRR)，WAP结构域用灰色背景标出，半胱氨酸用红色字体表示，星号表示终止密码子

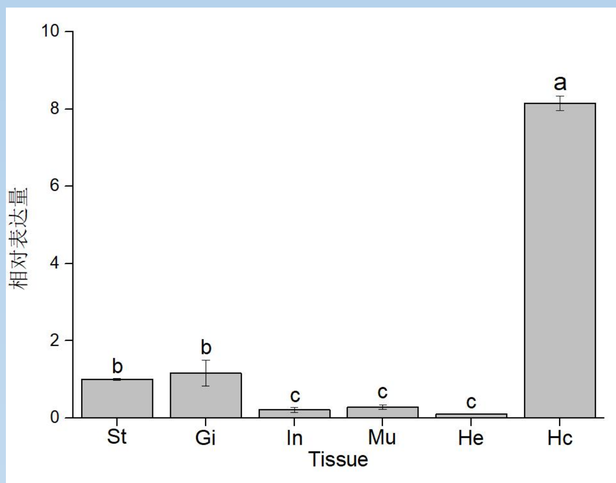
（2）EcCrustin2系统发育分析



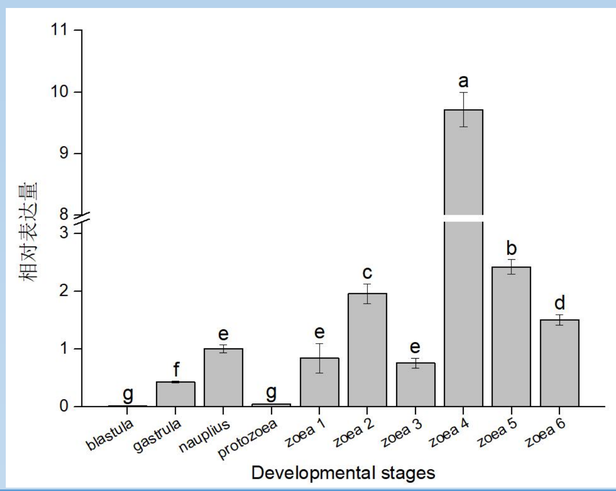
基于EcCrustin2氨基酸序列构建的系统进化树
I：I型Crustin；II：II型Crustin； III：III型Crustin； IV：IV型Crustin。

实验结果

（3）EcCrustin2表达特征分析

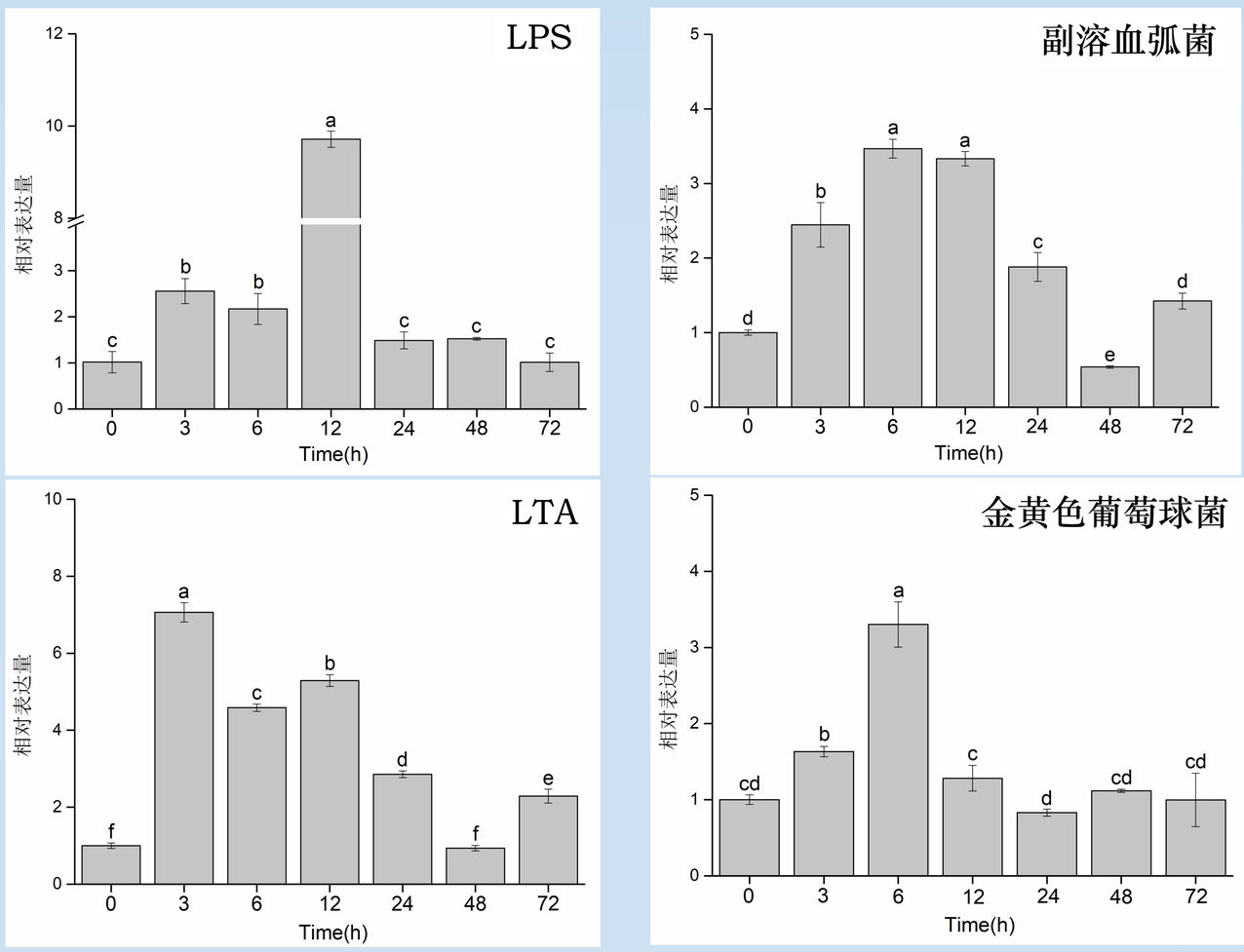


脊尾白虾EcCrustin2基因在不同组织的表达特征
St:胃； Gi:鳃；In:肠道；Mu:肌肉；He:肝胰腺；Hc:血淋巴细胞；（$P<0.05$）



脊尾白虾EcCrustin2基因在不同发育阶段的表达特征
blastula:囊胚期; gastrula:原肠期; nauplius:无节幼体; protozoea:前蚤状幼体期; zoea1-6: 蚤状幼体1-6期（$P<0.05$）

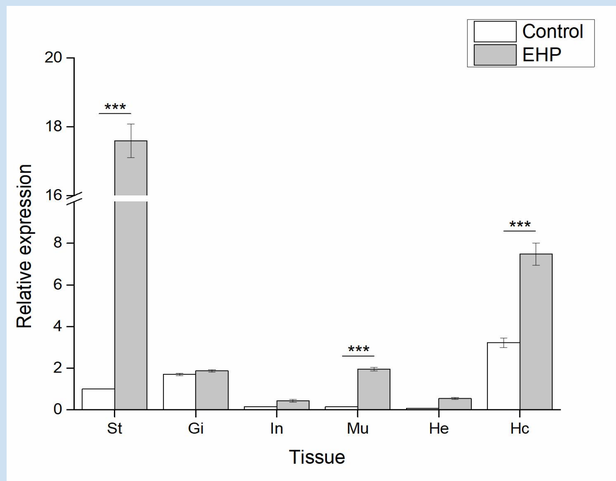
（4）EcCrustin2在不同刺激后的表达模式



EcCrustin2在LPS、副溶血弧菌、LTA和金黄色葡萄球菌刺激后血淋巴细胞中的表达模式

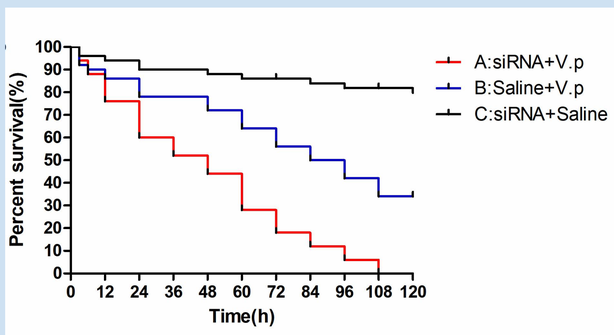
（5）EcCrustin2在虾肝肠胞虫感染后的免疫应答

(A) EHP 感染虾的 PCR 检测。 M：DL2000 ；1-5：对照组对虾的DNA样本； 图6-10：EHP感染组虾的DNA样本。



(B) EHP 感染后不同组织中 EcCrustin2 的表达模式。St：胃； Gi：鳃； In：肠； Mu：肌肉； He：肝胰腺； Hc：血细胞。（***：P < 0.001）

（6）RNA干扰后对脊尾白虾存活率的影响



利用副溶血弧菌攻击siRNA处理过的脊尾白虾存活率

结论

该研究在脊尾白虾中克隆出一种新的甲壳肽基因，命名为EcCrustin2。 EcCrustin2主要分布在各免疫组织中均有表达，在血淋巴中表达量最高，幼体发育阶段在蚤状幼体4期表达量最高。EcCrustin2受到LPS、TLA、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和EHP刺激后其表达量显着上调。 RNA 干扰试验结果显示敲低EcCrustin2后受副溶血弧菌侵染的虾死亡率上升，表明了EcCrustin2 在病原物入侵时在先天免疫中发挥重要作用。