研究论文 · 1100 ARTICLE

凡纳滨对虾 C-型凝集素 LvLec2 对不同刺激的免疫应答

罗 $\mathbf{R}^{1,2}$, 张继泉¹, 李富花¹, 柳承璋^{1,2}, 相建海¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 克隆获得了与中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis)C-type lectin 3 同源的 C-型凝集素 LvLec2 基 因序列,并通过 Real-time PCR 研究了其在脂多糖(lipopolysaccharide, 简称 LPS)、灭活溶壁微球菌 (Micrococcus lysodeikticus)和白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, 简称 WSSV)刺激后的转录表 达变化。结果表明, LvLec2 编码 157 个氨基酸, 含有 1 个糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, 简称 CRD), 其 CRD 结构域中具有决定糖结合特异性的基序 "EPS" (Glu¹¹⁸-Pro¹¹⁹-Ser¹²⁰)序列。系统进 化树分析表明 LvLec2 与已发表的凡纳滨对虾(Litopenaeus vannamei)C-型凝集素亲缘较远。LPS、灭活 溶壁微球菌和 WSSV 刺激后, LvLec2 基因在肝胰脏中的转录表达有明显的变化但表达模式不同。LvLec2 可能作为模式识别受体参与了对虾对病原的识别或防御。

关键词:凡纳滨对虾(Litopenaeus vannamei); C-型凝集素;基因克隆;不同刺激;免疫应答中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2010)11-0103-08

同其他无脊椎动物一样,甲壳动物以先天性免疫的方式来识别入侵的"异己"物,抵御外界病原体的侵袭。甲壳动物对病原的识别是通过其模式识别受体或模式识别蛋白辨别各类病原体所共有的、固定的病原相关分子模式来完成的^[1]。甲壳动物模式识别受体主要包括肽聚糖识别蛋白、革兰氏阴性菌结合蛋白、含硫酯键蛋白、清道夫受体、硫依赖型凝集素、血素、Toll样受体和 C-型凝集素等^[2],能够识别微生物细胞壁的多糖成分,例如革兰氏阴性菌的细菌 LPS、革兰氏阳性菌的肽聚糖、真菌的 β-1,3-葡聚糖、脂磷壁酸、甘露聚糖等^[3,4]。当模式识别受体识别这些病原相关分子模式后,会激活存在于甲壳动物体液中的蛋白酶或细胞内的信号途径从而引起细胞或体液免疫反应^[5]。

C-型凝集素几乎存在于所有动植物体内,其凝 集活性具有钙离子依赖性。C-型凝集素的主要特征 是在蛋白质分子的 C 末端含有糖识别结构域 CRD。 作为一种模式识别受体, C-型凝集素参与"非己"识 别和对入侵病原的清除过程^[6,7]。据报道,无脊椎动 物 C-型凝集素可参与多种免疫反应:激活前酚氧化 酶原、抗菌、吞噬、包囊、黑化作用以及结节的形 成等,在先天性免疫防御中具有重要作用^[8~12]。近几 年,对虾 C-型凝集素的研究也逐渐开展起来,目前 已在中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis)、凡纳滨 对虾(Litopenaeus vannamei)、日本囊对虾(Marsupenaeus japonicus)、墨吉明对虾(Fenneropenaeus merguiensis)等多种对虾中发现C-型凝集素的存在^[13~18]。

尽管在凡纳滨对虾中已报道了 LvLT^[14]、 LvCTL1^[16]、LvLec^[17]、LVL^[19]等 C-型凝集素,但本 研究所克隆获得的凡纳滨对虾 C-型凝集素基因 *LvLec2*与已报道的凡纳滨对虾 C-型凝集素相似性较 低,进化亲缘较远。LPS 是革兰氏阴性菌的细胞壁成 分,作者将 LPS、灭活溶壁微球菌和 WSSV 作为革 兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和病毒的代表,对凡纳滨 对虾进行免疫刺激。通过研究 *LvLec2* 基因在 LPS、 灭活溶壁微球菌和 WSSV 刺激后的表达特征,期望 能发现 C-型凝集素在对虾防御病原感染中的作用, 为对虾免疫防御机制的研究做出有益补充,并为对 虾疾病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验对虾

凡纳滨对虾(体长 12.5 cm \pm 0.5 cm, 体质量 25.5 g \pm 0.5 g) 购于青岛胶州对虾养殖场, 实验前在水族

Marine Sciences / Vol. 34, No. 11 / 2010

收稿日期: 2010-07-29; 修回日期: 2010-08-15

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973计划) (2006CB101804); 农业科技成果转化资金项目(2010GB24910700) 作者简介: 罗展(1981-), 女, 博士研究生, 主要从事甲壳动物免疫相 关基因及功能研究, 电话: 0532-82898571, E-mail: bluelz_2001@163. com; 相建海, 通信作者, 电话: 0532-82898568, E-mail: jhxiang@ms. qdio.ac.cn

箱中充气暂养 7 d, 使其适应实验室内养殖环境。取 健康对虾血细胞, 并分离不同组织, 提取总 RNA 用 于 cDNA 合成。

1.2 免疫刺激实验

采用腹节注射法分别进行 LPS、灭活溶壁微球 菌和 WSSV 的免疫刺激实验,并设 PBS(phosphate buffer saline, 简称 PBS)对照组, 每组各注射 30 尾对 虾。LPS 组、每尾对虾注射 10 µL 溶于无菌 PBS 的 LPS 溶液(5 mg/mL); 灭活溶壁微球菌组, 每尾对虾 注射 10 µL 经高压灭菌的溶于无菌 PBS 的质量浓度 为 0.2 g/L 的溶壁微球菌溶液; WSSV 感染组, 每尾 对虾注射 10 μL WSSV 组织提取液^[20]; 感染实验的 对照组, 每尾对虾注射 10 μL 无菌 PBS 溶液。免疫 刺激后第0、6、12、24小时分别取虾5尾,解剖取 其肝胰脏组织, 冻存于液氮中, 用于总 RNA 的提取。 注射感染后的第3天,从WSSV 感染组和对照组分 别随机取 5 尾虾, 取部分鳃组织提取 DNA, 用 WSSV 特异性引物进行扩增, 结果在 WSSV 注射组 均扩增出特异性条带、而在对照组中未检测到、证 明感染实验是有效的。

1.3 cDNA 片段的克隆

将 NCBI 中公布的 161075 条凡纳滨对虾 EST 序 列进行拼接、注释和聚类分析(数据未发表),重点对 其中注释为 lectin 的序列进行了分析,发现有 39 个 contigs 或 singletons 被注释为 C-型凝集素片段。选 取其中与中国明对虾 C-type lectin 3 同源的 contig(命 名为 LvLec2)进行深入研究。利用 Primer premier 5.0 设计引物 LvLec2-F1 和 LvLec2-R1(表 1),以头胸部 cDNA 为模板, PCR 扩增凡纳滨对虾 LvLec2 基因片 段。扩增 LvLec2 基因片段所用 PCR 反应程序: 94°C 变性 4 min, 1 个循环; 94°C 变性 50 s, 55 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min, 1 个循 环; 4°C 保温, PCR 体系见表 2。

1.4 生物信息学分析

将所测得序列利用 NCBI 网站(http://www.ncbi. nlm.nih.gov)上的 BLAST 工具进行数据库基因序列 的相似性及同源性查找和比对, cDNA 序列的开放阅 读框(open reading frame, 简称 ORF)分析等用 Bioedit 软件进行。选取部分在 Genbank 中与 *LvLec2* 相似的 其他物种的 C-型凝集素的 CRD 序列,采用 ClustalW 软件进行多序列比对分析。将根据 cDNA 序列推导的氨基酸序列,利用 http://www.expasy.ch 网站提供的蛋白质组和序列分析工具进行分析:用 ProtParam 软件进行蛋白质基本物理化学参数分析, SingalP 程序分析信号肽, Smart 软件预测功能域。利 用 MEGA 4.0 软件,采用邻接法在多序列比对的基础 上构建系统进化树。

表 1 实验中用到的引物及序列

| Tab. 1 Ongoin | icleotide primers used in this study |
|---------------|--------------------------------------|
| 引物 | 序列 (5'-3') |
| LvLec2-F1 | AGGTTAGTAGCCTCGCCGCCA |
| LvLec2-R1 | CGCAGCCTAGTCCTTCCTCATA |
| LvLec2-F2 | AGCGACTGCCTCAACAACA |
| LvLec2-R2 | CCGTTCAGCCACTTCCAAT |
| β-actin-F | AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA |
| β-actin-R | TTCTCCATGTCGTCCCAG |
| LvTPI-F | GAACAGGCACAAGAAGTCCACG |
| LvTPI-R | GCACTGACAGAGCCACCATAGA |
| 计互相互合 | |

注: F 和 R 分别代表正向引物和反向引物

表 2 PCR 反应体系

Tab. 2 Components and reagents for polymerase chain reaction

| 灭菌超纯水 | 18.25 μL |
|-------------------------------|----------|
| cDNA | 1 µL |
| 10×buffer | 2.5 μL |
| MgCl ₂ (25 mmol/L) | 1.5 μL |
| dNTP(10 mmol/L) | 0.5 µL |
| 正向引物(10 µmol/L) | 0.5 µL |
| 反向引物(10 µmol/L) | 0.5µL |
| Taq DNA 聚合酶(5 u/µL) | 0.25 μL |
| 反应体系 | 25 µL |

1.5 基因的组织分布

提取健康的凡纳滨对虾不同组织(肝胰脏、血细胞、胃、肠、表皮、心脏、鳃和肌肉)的 RNA, 合成 cDNA 进行 RT-PCR, 取不同组织 cDNA 各 1 μ L 为模板, β -actin 基因作为内参(表 1), 以 28 个循环扩增 LvLec2 的基因片段, 以 27 个循环扩增 β -actin 的基因 片段来检测对虾不同组织中 LvLec2 mRNA 的表达情况。反应结束后,每管取 10 μ L PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,电泳后用 Quantity one 4.4 软件 分析电泳图片。

1.6 基因转录表达检测

利用六聚体随机引物反转录制备注射 LPS、灭 活溶壁微球菌、WSSV 和 PBS 后第 0、6、12、24 小

海洋科学 / 2010 年 / 第 34 卷 / 第 11 期

时的肝胰脏组织 cDNA, 作为 Real-time PCR 反应的 模板, LvLec2-F2 和 LvLec2-R2(表 1)为 LvLec2 基因 Real-time PCR 反应的引物、扩增产物长度为 173 bp。 根据 Wang^[21]报道的基因芯片数据信息, β -actin 基 因在 WSSV 刺激下的表达会发生变化, 而磷酸丙糖 异构酶基因 TPI(triosephosphate isomerase, 简称 TPI) 的表达水平稳定,因而适合作为 WSSV 刺激下基因 表达分析的内参基因。LvTPI-F 和 LvTPI-R(表 1)为 TPI 基因的特异引物, 扩增产物长度为 107 bp。LPS 刺激组和 PBS 对照组以 β -actin 基因作为内参, β-actin-F 和 β-actin-R 为引物, 扩增产物长度为 240 bp。 Real-time PCR 反应在 Eppendorf 公司 Mastercycler ep realplex 4S PCR 仪上进行,采用 Blend Taq-Plus- PCR 反应体系(表 3), 所用染料为 SYBR Green。每个时间点的 cDNA 样品做两组 PCR、 一组为内参基因,另一组为目的基因 LvLec2, 每组 反应进行 3 次重复。LvLec2 基因的反应条件为: 94°C 变性 2 min, 1 个循环; 94℃ 变性 20 s, 57 ℃ 退火 20 s, 72°C 延伸 20 s, 40 个循环。β-actin 基因和 TPI 基因 的Real-time PCR 反应程序同 LvLec2 基因, 退火温度 分别为 58 和 60°C。

表 3 Real-time PCR 反应体系

 Tab. 3
 Components and reagents for real-time polymerase chain reaction

| 15.73 μL |
|----------|
| 0.5 µL |
| 2.5 μL |
| 2.5 μL |
| 0.5 µL |
| 0.5µL |
| 1.25 μL |
| 1.27 μL |
| 0.25 μL |
| 25 μL |
| |

数据处理采用 2^{-ΔΔCt} 方法^[22], 数据间的显著性 分析使用 SPSS 11.5 软件进行。

2 结果

2.1 cDNA 片段的克隆

LvLec2 基因包含 1 个 474 bp 的开放阅读框 ORF 编码 157 个氨基酸。ORF 核苷酸序列和推导的氨基 酸序列信息见图 1。其推测的蛋白质分子量为 17.96 ku, 理论等电点为 4.35。通过 SMART 软件推测, 该 分子在 N 末端有 1 个 17 个氨基酸的信号肽, C 末端 有 1 个 CRD 结构域。BLAST 同源性检索发现, *LvLec2* 与无脊椎动物 C-型凝集素超家族成员具有较高的相 似性。与 *LvLec2* 一致性最高的为中国明对虾 FcLec3 (ACJ06431.1), 高达 76%。与刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)MeLT(ABV58637.1)的一致性为 47%, 同中 华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)EsLT(ADB10837.1)具有 37%的一致性, 与凡纳滨对虾 C-型凝集素 LvLT (ABI97374.1)一致性为 27%。

2.2 与其他甲壳动物 C-型凝集素 CRD 多 序列比对分析

通过 *LvLec2* 与其他甲壳动物 C-型凝集素 CRD 进行多序列比对发现, *LvLec2* 含有该超家族保守的 氨基酸位点。其 CRD 含有的参与二硫键形成的 4 个 保守的半胱氨酸, 分别位于: Cys²¹, Cys³², Cys⁴⁹ 和 Cys¹⁴⁹, 是典型的短型的 C-型凝集素。*LvLec2* 的 CRD 中决定糖结合特异性的基序为 "EPS"(Glu¹¹⁸-Pro¹¹⁹-Ser¹²⁰)序列(图 2)。

| 1 | ATG | CAGT | ICGT | тсо | TTT | ICGT | TCC | TCO | TGG | CTI | TGC | TTO | CCG | TCO | CC. | GGG | GCGC | CAAG | ATT | AC | 60 |
|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|-------|----------|----------|-----|------|-----|------|-----|------|------|-----|----|-----|
| 1 | M | Q | S | F | V | S | F | V | V | A | L | L | A | V | А | R | A | Q | D | Y | 20 |
| 61 | | | | | | | ~ | | | | | | | | | | | | | ~~ | 120 |
| 01 | IGIC | CAI | CIC | | 106 | ICA | CAA | 110 | GCA | ACG | GGI | GII | ACI | GGI | 111 | CGA | GIG | AGA | AAG | œ | 120 |
| 21 | С | Р | S | Р | F | V | Т | Ι | G | Ν | G | С | Y | W | F | S | S | E | Κ | A | 40 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 121 | ACAT | GGG | GGT | ACO | CGC | GGA | GCG | ACT | GCC | TCA | ACA | ACA | CGA | TCG | GCC | TCG | AGA | CGG | ACC | TG | 180 |
| 41 | Т | W | G | Y | A | R | S | D | С | L | Ν | N | Т | I | G | L | E | Τ | D | L | 60 |
| -11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 181 | CCCA | TGA | тса | | ACT | 000 | 400 | | 100 | ACC | ACT | тст | CC4 | ΔΤΤ | ACC | TCA | ССТ | | | тс | 240 |
| | A | 1107 | т | T | noi | 000 | E | P | u nee | u u | лст и | E | w | N | v | v | T | v | T | 10 | 240 |
| 61 | A | м | 1 | 1 | D | C | E | E | н | н | н | г | W | N | I | V | 1 | 1 | 1 | L | 80 |
| 241 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 200 |
| 241 | GGCC | AGA | ICAG | CGG | AGI | ACT | GGC | TGG | GTG | GCI | ACG | ACG | TCC | TCG | AGG | AGG | GCC | ATT | GGA | AG | 300 |
| 81 | G | Q | Т | А | Е | Y | W | L | G | G | Y | D | V | L | Е | Е | G | Н | W | Κ | 100 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 301 | TGGC | TGA | ACG | GGC | GTG | ACG | TGC | CCA | TGG | GCG | TGC | ССТ | TCT | GGT | ACC | CCG | GCG | AGC | CGA | GC | 360 |
| 101 | W | L | Ν | G | R | D | V | Р | М | G | V | Ρ | F | W | Y | Ρ | G | E | Ρ | S | 120 |
| 101 | | | | | | | | | | | | | | | | | ~ | | | | 120 |
| 361 | 6600 | 400 | CC4 | 400 | 400 | ACT | тсс | тсо | САТ | тса | CGA | 000 | 400 | стт | аст | тсс | | 400 | | АТ | 420 |
| 501 | 0000 | nco | | NUC | nou | D | 100 | 100 | * | TCA P | T | 000 | -100 | 011 | NC1 | P | 0000 | ncc | | | 420 |
| 121 | G | D | A | Ν | E | D | r | L | A | r | 1 | S | E | G | Ŷ | F | G | D | Q | N | 140 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | _ | _ | | | |
| 421 | GAAA | ACG | CCC | TCC | TGT | ACT | ACG | CCI | GCC | AGG | TGG | TGT | ATA | TGA | .GGA | AGG | ACT | AG | 47 | 4 | |
| 141 | E | Ν | A | L | L | Y | Y | A | С | Q | V | V | Y | М | R | Κ | D | * | | | |
| 1.41 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

图 1 凡纳滨对虾 LvLec2 基因的 ORF 核酸序列及推导的 氨基酸序列

Fig. 1 The ORF and deduced amino acid sequence of *LvLec2* from *L. vannamei*

ATG. 起始密码子, TAG. 终止密码子; 氨基酸序列中推导的信号 肽用下划线标出, 阴影部分为 CRD, 下曲线为糖基化位点

ATG: sttrart codon; TAG: stop codon; the signal peptide sequence is underlined; the CRD of *LvLec2* is shaded by gray; and the potential glycosylation sites are indicated by curve

2.3 系统进化树分析

利用 MEGA4.0 软件采用邻接法构建系统进化 树,研究了凡纳滨对虾 C-型凝集素 *LvLec2* 的分类归



图 2 LvLec2 的 CRD 与其他 C-型凝集素的 CRD 进行多序列比对

Fig. 2 Alignment of the CRD sequence of the *LvLec2* from *L. vannamei* with C-type lectin CRD sequences from other crustaceans

序列包括: FcLec3(ACJ06431.1)、MeLT (ABV58637.1)、EsLT(ADB10837.1)、LvLT (ABI97374.1)、PsLT(ABI97372.1)、FmLT(ACR56805.1)、 PmLT(ABI97373.1)、LvLec (ABU62825.1)和 FcLec5(ACJ06428.1);相同的氨基酸残基标为黑色,相似的标为灰色,相似率均设为 50%; 参与 CRD 分子内二硫键形成的 Cvs 由 标记、与糖结合特异性相关的基序由方框标出

Amino acid residues that are conserved in at least 50% sequences are shaded in dark, and similar amino acids are shaded in grey. Conserved cysteine residues are marked with , whereas motifs determining ligand binding specificity are boxed

属以及与其他甲壳动物 C-型凝集素之间的进化关系。 由图 3 可见, *LvLec2* 与来自对虾的 C-型凝集素聚在同 一类群, 与中国明对虾 FcLec3 聚在同一分支上, 在进 化上亲缘关系最近, 同已报道的凡纳滨对虾 C-型凝集 素 LvLT、LvLec、LvCTL1 未聚在同一个分支。

2.4 组织分布

采用半定量 RT-PCR 的方法分析了 *LvLec2* mRNA 在健康凡纳滨对虾不同组织中的表达特征。 *LvLec2* 基因在肝胰脏中表达量最高,其次为胃,在 鳃、肠、心脏和肌肉组织中都有微弱表达(图 4)。

2.5 免疫刺激后 LvLec2 基因在凡纳滨对虾 肝胰腺中的转录表达

利用 Real-time PCR 方法分析了 LPS、灭活溶壁

微球菌和 WSSV 免疫刺激凡纳滨对虾后, LvLec2 基因在对虾肝胰脏组织中的表达变化(图 5)。

2.5.1 LPS 注射组

注射 LPS 实验组中 LvLec2 mRNA 的表达变化 图谱如图 5-A 所示。结果显示, LvLec2 基因的表达 在注射 PBS 的对照组中基本没有变化, 在注射 LPS 第 6 小时时略有上调, 12 h 恢复到接近对照的水平, 而 24 h 时 LvLec2 mRNA 的表达量又显著上调, 且 与对照组差异极显著(P<0.01)。

2.5.2 灭活溶壁微球菌注射组

如图 5-B, 注射灭活溶壁微球菌组, *LvLec2* 基因的表达量在注射后 6、12 h 与对照组相近, 24 h 时略有上升, 与对照组出现了显著性差异 (*P*<0.01)。

研究论文 • Linn → ARTICLE



图 3 不同甲壳动物 C-型凝集素的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of C-type lectins from crustacean

进化树采用 N-J 方法构建,用 MEGA 4.0 软件完成,标尺为 0.2;凡纳 滨对虾的 LvLec2 用 标出;序列包括:FcCLec-1(AAX63905.1)、 FcLec1(ABA54612.1)、FcLec2(ACJ06429.1)、FcLec3(ACJ06431.1)、 FcLec4(ACJ06432.1)、FcLec5(ACJ06428.1)、FcLec6(ACJ06430.1)、 LvLT(ABI97374.1)、LvLec(ABU62825.1)、LvCTL1(DQ8588900.1)、 LvCLec-1(DQ858899.1)、PmLT(ABI97373.1)、PmLec(AAZ29608.1)、 PMAV(AAQ75589.1)、EsLT(ADB10837.1)、MeLT(ABV58637.1)、 PsLT(ABI97372.1)和FmLT(ACR56805.1)

Neighbor-joining trees were generated from multiple sequence alignments using the software of molecular evolution genetic analyses MEGA (version 4.0), LvLec2 was marked with \blacktriangle . The bar (0.2) indicates genetic distance



图 4 RT-PCR 检测凡纳滨对虾不同组织中 LvLec2 基因的 表达情况

Fig. 4 Detection of *LvLec2* transcripts by RT-PCR

1. 表皮; 2. 肝胰脏; 3. 鳃; 4. 胃; 5. 肠; 6. 心脏; 7. 血细胞; 8. 肌肉

1. epidermis; 2. hepatopancreas; 3. gill; 4. stomach; 5. intestine; 6. heart; 7. hemocytes; 8. muscle

2.5.3 WSSV 感染组

注射 WSSV 实验组中 LvLec2 mRNA 的表达变 化图谱如图 5-C 所示。LvLec2 基因的表达在 WSSV 感染初期第 6 小时便呈现显著性上调,后逐渐降低, 12 h 时表达量接近对照组水平,24 h 时与对照组相比 显著下调(P<0.05)。

3 讨论

C-型凝集素是一类具有凝集活性和钙离子依赖

性的蛋白超家族, 其主要特征是在蛋白质分子的 C 末端含有 CRD。目前, 已报道的对虾 C-型凝集素都 有一个或两个 CRD。如斑节对虾 PmAV^[23]、中国明 对虾 FcLec1^[24]都含有一个 CRD, 而中国明对虾 Fclectin^[13]、凡纳滨对虾 LvLT^[14]和斑节对虾 PmLT^[15] 序列中都有 2 个串联的 CRD。本研究中获得 C-型凝 集素 *LvLec2*, C 末端只有 1 个 CRD 结构域。



图 5 LPS 注射组(A)、灭活溶壁微球菌注射组(B)和 WSSV 感染组(C)的不同时间凡纳滨对虾肝胰脏组织 LvLec2 mRNA 的表达变化

Fig.5 Relative *LvLec2* mRNA expression levels in hepatopancreas at different time intervals post LPS (A), *M.lysodeikticus* (B) and WSSV injection (C)

P<0.05,显著性差异用*表示; P<0.01,差异极显著用**表示,3次 重复

* (P < 0.05) or ** (P < 0.01) indicates significant difference between challenged shrimps and unchallenged controls. Data are presented as mean ±SD of three independent PCR amplifications and quantifications

存在于血淋巴中的可溶性凝集素,可以同病原 分子等表面的糖基决定簇结合,从而导致病原或异 物的凝集;存在于细胞膜表面的凝集素,血细胞可 以通过凝集素分子与异物分子表面结合,以便对异 物分子进行吞噬或包围^[2]。根据结构和糖结合活性的 不同,C-型凝集素大致可分为半乳糖结合型凝集素 和甘露糖结合型凝集素。半乳糖结合型凝集素的糖 结合位点有保守的"QPD"(Gln-Pro-Asp)基序,能 与半乳糖和半乳糖的衍生物结合;而甘露糖结合型 凝集素的相应结构域为"EPN"(Glu-Pro-Asn),能够 结合甘露糖及甘露糖的衍生物。在许多无脊椎动物 中,"EPN"也可能被"EPD"(Glu-Pro-Asp)、"EPS" (Glu-Pro-Ser)所替代,如中国明对虾 FcLec3 和来自 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 CfLec-2^[25]。*LvLec2* 的 CRD 结构域中具有"EPS"(Glu¹¹⁸-Pro¹¹⁹-Ser¹²⁰)序列, 推测其可与甘露糖及甘露糖的衍生物相结合。

凡纳滨对虾中克隆获得的 C-型凝集素基因 LvLT^[14]在病毒注射后 2 h 表达下调, 4 h 后表达量升 高。Zhao 等^[16]克隆的 LvCTL1 具有" EPN "位点, 可 与WSSV 囊膜蛋白 VP95、VP28、VP26、VP24、VP19 和 VP14 相互结合。重组 rLvCTL1 可阻断 WSSV 的 感染, 延长对虾的存活时间。另外, Zhang 等^[17]克隆 的 LvLec 具有" EPN "位点,在 Ca²⁺存在的情况下可 凝集大肠杆菌 JM109, 凝集活性可被甘露糖和 EDTA 抑制。通过 SMART 软件预测 LvLec2 的糖识别结构 域含有 C-型凝集素超家族参与二硫键形成的 4 个保 守的半胱氨酸, 是典型的短型的 C-型凝集素。根据 BLAST 序列比对以及系统进化树分析结果, 虽然 LvLec2 与中国明对虾 C-型凝集素 FcLec3 同源性较 高,但其与已知的凡纳滨对虾 C-型凝集素 LvLT、 LvCTL1 和 LvLec 相似性很低, 在进化上距离较远, 是凡纳滨对虾 C-型凝集素家族的新成员。

肝胰脏是对虾重要的消化和免疫器官,它参与 消化、吸收、储存和代谢等生理活动,对环境的变化 和水媒性的污染物非常敏感,并且在启动对虾免疫 反应中起重要作用。目前发现的对虾 C-型凝集素大 部分都在肝胰脏中表达。组织分布结果显示,*LvLec2* 组织分布特点同与其亲缘最近的中国明对虾 FcLec3^[26]相一致,主要在对虾肝胰脏中表达。FcLec3 半定量 PCR 和免疫组织化学分析结果显示,其主要 分布于与消化酶的合成与分泌相关的肝胰脏 F 细胞 中。

当受到免疫刺激时, 肝胰脏中 LvLec2 表达水平 都呈现不同程度的上调趋势。与 LvLec2 同源性较高 的中国明对虾 FcLec3 ^[26], 注射鳗弧菌(Vibrio anguillarum)后第 2 小时, 其表达量开始上升, 并于第 12 小时达到最高值; 在 WSSV 感染后 2~6 h 表达量 增高,并逐渐恢复到正常水平,第 24 小时再次出现 表达上调,推测可能存在二次免疫作用。相对于 LPS 和灭活溶壁微球菌, *LvLec2* 对 WSSV 的感染更为敏 感,在WSSV注射后第6小时出现了明显的上调,这 与 Fclec3 在感染 WSSV 后 2~6 h 的表达趋势一致,但 6~24 h *LvLec2* 表达量逐渐降低至正常水平,未出现 中国明对虾 FcLec3 的二次免疫现象,推测虽然 *LvLec2* 与 FcLec3 同源性较高,但不同的 C-型凝集素 在抗病原感染时发挥不同的作用。另外,体外重组的 FcLec3 已被证实可与重组的 WSSV 囊膜蛋白 VP28 相互结合,这提示 *LvLec2* 也可能参与了对 WSSV 的 识别。为了进一步证实 *LvLec2* 的模式识别功能,我 们将通过体外重组表达 *LvLec2*,检验其凝菌活性和 糖结合活性,并通过蛋白质互作技术验证其与 WSSV 囊膜蛋白的相互作用。

迄今,已从中国明对虾中获得 7 个 C-型凝集素 基因,凡纳滨对虾以及斑节对虾等对虾体内都已克 隆或分离到多种 C-型凝集素。本实验室在分析凡纳 滨对虾 ESTs 拼接数据库的 contigs 时也发现了 39 个 C-型凝集素的基因片段。在与甲壳动物进化相近的 模式动物果蝇基因组中发现了 32 种 C-型凝集素^[6], 结合目前对虾 C-型凝集素的相关报道,作者推测对 虾中可能还有多种 C-型凝集素的存在,也将陆续对 凡纳滨对虾 ESTs 拼接数据库中发现的 C-型凝集素 进行克隆和功能验证。

参考文献:

- Johansson M W, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates[J]. Prog Mol Subcell Biol, 1996, 15: 46-66.
- [2] 王金星,赵小凡.无脊椎动物先天免疫模式识别受体研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2004,31(2):
 112-117.
- [3] Vargas-Albores F, Jimenez-Vega F, Soderhall K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by beta-1,3-glucan[J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20(5): 299-306.
- [4] Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia G M. Purification and comparison of beta-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*)
 [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1997, 116(4): 453-458.
- [5] De G E, Spellman P T, Rubin G M, et al. Genome-wide

海洋科学 / 2010 年 / 第 34 卷 / 第 11 期

analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2001, **98**(22): 12 590-12 595.

- [6] Dodd R B, Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity[J]. Glycobiology, 2001, 11(5): 71-79.
- [7] Vasta G R, Ahmed H, Du S, *et al.* Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity[J]. Glycoconj J, 2004, 21(8-9): 503-521.
- [8] Yu XQ, Gan H, Kanost MR. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1999, 29(7): 585-597.
- [9] Schröder H C, Ushijima H, Krasko A, et al. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge Suberites domuncula[J]. J Biol Chem, 2003, 278(35): 32 810-32 817.
- [10] Luo T, Yang H, Li F, et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus mono*don[J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(7): 607-617.
- [11] Ling E, Yu X Q. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells[J].
 Dev Comp Immunol, 2006, 30(3): 301-309.
- [12] Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, et al. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains[J]. FEBS Lett, 1999, 443(2): 139-143.
- [13] Liu Y C, Li F H, Dong B, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis[J]. Mol Immunol, 2007, 44(4): 598-607.
- [14] Ma T H, Tiu S H, 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 Immunol, 2007, 23(2): 430-437.
- [15] 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]. J Invertebr Pathol, 2008, 99(3): 332-341.

- [16] 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]. J Virol, 2009, 83(1): 347-356.
- [17] Zhang Y, Qiu L, Song L, et al. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp Litopenaeus vannamei[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(1): 183-192.
- [18] 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 Immunol, 2010, 28(4): 596-603.
- [19] Sun J, Wang L, Wang B, et al. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(2): 292-299.
- [20] 王兵. 中国对虾免疫相关基因和性别相关核酸片段 研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2003.
- [21] Wang B, Li F, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray[J]. Mar Biotechnol (NY), 2006, 8(5): 491-500.
- [22] 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.
- [23] Luo T, Li F, Lei K, et al. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeus mono*don[J]. Mol Immunol, 2007, 44(7): 1 516-1 523.
- [24] 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]. Mol Immunol, 2008, 45(2): 348-361.
- [25] Zheng P, Wang H, Zhao J, et al. A lectin (CfLec-2) aggregating Staphylococcus haemolyticus from scallop Chlamys farreri[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(3): 286-293.
- [26] Wang X W, Xu W T, Zhang X W, et al. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(4): 556-562.



Cloning of a novel C-type lectin *LvLec2* from the shrimp *Li-topenaeus vannamei* and its immune response to different challenges

LUO Zhan^{1,2}, ZHANG Ji-quan¹, LI Fu-hua¹, LIU Cheng-zhang^{1,2}, XIANG Jian-hai¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Jul, 29, 2010

Key words: Litopenaeus vannamei; C-type lectin; gene cloning; different challenge; immune response

Abstract: A novel C-type lectin gene LvLec2 was cloned from *Litopenaeus vannamei*. LvLec2 shared high identity with C-type lectin 3 from *Fenneropenaeus chinensis*. The deduced amino acid sequence of LvLec2 contained 157 amino acid residues and a carbohydrate recognition domain (CRD) at the C-terminal. There was a potential carbohydrate-bingding motif "EPS" (Glu¹¹⁸-Pro¹¹⁹-Ser¹²⁰) in the CRD, and it might bind mannose-type sugars. BLAST search and phylogenetic analysis showed LvLec2 shared far evolutionary relationship with other C-type lectins from *L. vannamei*. In healthy shrimp *L. vannamei*, LvLec2 was mainly expressed in hepatopancreas. Real-time PCR analysis indicated that LvLec2 transcripts level showed significant change in hepatopancreas after the shrimp were artificially challenged with LPS, inactived *Micrococcus lysodeikticus*, and white spot syndrome virus (WSSV). The results suggested that LvLec2 might be involved in the immune response against WSSV infection, and might contribute to non-self recognition by functioning as a pattern recognition receptor in the innate immune system of shrimp *L.vannamei*.

(本文编辑:谭雪静)

(上接第 96 页)

Numerical simulation for ocean wave in sea areas by Ryukyu

MAO Ke-feng¹, CHEN Xi¹, LI Yan¹, XIAO Zhong-le²

(1. Institute of Meteorology. PLA University of Science and Technology, Nanjing 211101, China; 2. No.96631 army of PLA, Beijing 102208, China)

Received: Mar., 19, 2009 **Key words:** ocean wave; Ryukyu area; sub-grid; numerical modeling

Abstract: In order to describe complex multi-island terrain and coastlines adequately for modeling ocean wave in sea areas by Ryukyu, an algorithm based on high-resolution bathymetry and coastline data was developed to optimize the design of wave computation grid and introduce sub-grid terrain effect into wave computation. WAVEWATCH-III was used to carry on continuous numerical simulation for a month. It was validated that the impact of complex coastline and multi-island on the wave propagation, computation grid resolution, and sub-grid effect of the multi-island effect was adequately address. Application of this algorithm led to much improved computational results.

(本文编辑: 刘珊珊)

海洋科学 / 2010 年 / 第 34 卷 / 第 11 期