

# 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) I 型 Crustin 抗菌肽的基因克隆与真核重组表达\*

申望 叶茂 石戈 王日昕

(浙江海洋学院海洋科学学院 海洋生物资源及分子工程实验室 舟山 316004)

**摘要** Crustin 是目前报道广泛存在于甲壳类中的一类具有广谱抗菌活性的抗菌肽, 主要由甲壳类血淋巴细胞合成。本研究采用 RACE 技术和真核表达技术, 进行了三疣梭子蟹 Crustin 基因的克隆和重组表达研究。结果表明, 在三疣梭子蟹血细胞 Crustin 基因 cDNA 全序列中, 开放阅读框编码 110 个氨基酸残基的 Crustin 前体, Crustin 前体由 N 端 21 个氨基酸残基的信号肽、富含 Cys 结构域和 C 端 WAP 结构域三部分组成, 属于 I 型 Crustin, 构建的分泌型真核表达质粒 pVT102U/ $\alpha$ -crustin 转化酿酒酵母 S78, 经 RT-PCR 和 SDS-PAGE 电泳验证, 表明重组 Crustin 表达成功。

**关键词** 三疣梭子蟹, 抗菌肽, I 型 Crustin, cDNA 克隆, 真核表达

**中图分类号** Q956

长期以来, 水产养殖病害的频发使我国水产养殖业遭受巨大的经济损失, 而传统的抗生素和化学药物防治策略由于耐药性病原菌的形成及食品安全问题的提出, 正在世界范围内逐渐被禁用和取缔(农业部渔业局养殖课题组, 2006)。如欧盟自 2006 年 1 月 1 日起, 全面禁止食品动物使用抗生素促生长饲料添加剂, 这对我国养殖产品出口造成巨大负面影响。因此, 寻找抗生素和化学药物的绿色安全替代物成为我国养殖业、饲料行业当前首要解决的课题之一。动物自身来源的抗感染免疫因子基因工程产品, 由于其特殊的作用机制, 不存在食品安全问题与环境问题, 成为替代传统抗生素作为绿色饲料添加剂及抗感染药剂的理想选择, 也是当前饲料添加剂领域的研究热点, 并取得一定的成果(王海静等, 2009)。例如, 王广军等(2005)研究了抗菌蛋白在南美白对虾养殖中的应用效果, 结果表明, 在饲料中添加抗菌蛋白, 养殖对虾在日生长速度、相对增重率、成活率、抗病力等方面均有显著的提高, 且饲料系数下降。

以动物抗感染免疫因子基因工程产品作为饲料

添加剂, 存在一个共同问题, 即抗感染免疫因子属蛋白质或多肽, 易被蛋白酶降解, 影响生物活性及保存期, 限制了产业的发展(张家国, 2009)。Crustin 是目前报道广泛存在于甲壳类中的一类具有广谱抗菌活性的免疫因子, 同时甲壳类 Crustin 的 C 末端为 WAP 结构域, 该结构域在其它动物中是一个结构紧密的蛋白酶抑制剂结构域(Zhang *et al*, 2007), 为解决蛋白酶降解及活性结构稳定性问题提供良好的基础, 同时由于甲壳类 Crustin 存在大量的异构体, 为筛选特殊要求的 Crustin 提供了丰富的空间(Jim é nez-vega *et al*, 2004)。本研究克隆了三疣梭子蟹 I 型 Crustin 基因的 cDNA 全序列, 并构建分泌型表达真核表达载体 pVT102U/ $\alpha$ -crustin, 在酿酒酵母 S78 中成功表达重组 Crustin, 为后续功能研究及开发梭子蟹来源 Crustin 渔用饲料添加剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 分子生物学常规操作技术

细菌质粒的提取、质粒的限制性内切酶分析与片

\* 国家科技支撑计划项目, 2007BAD43B08; 浙江省重大科技专项重大项目, 2007C02001; 浙江省面上项目, 2009C32019 号。

申望, 讲师, E-mail: shenwangzs@163.com

通讯作者: 王日昕, 教授, E-mail: wangrixin1123@126.com

收稿日期: 2009-08-16, 收修改稿日期: 2009-11-28

段的回收, DNA 片段连接与转化, 大肠杆菌感受态细胞制备及转化等方法见分子克隆指南第三版(Sambrook *et al.*, 2001)。

### 1.2 载体和细胞株

酵母菌种 *Saccharomyces cerevisiae* S-78、表达质粒 pVT102U/ $\alpha$  由湖南师范大学梁宋平教授馈赠, pMD 19-T 载体和转化受体菌 *E. coli* DH5 购自大连宝生物公司。

### 1.3 三疣梭子蟹 Crustin 基因 cDNA 的克隆

三疣梭子蟹总 RNA 提取按上海生工 Trizol 试剂盒操作说明进行, 提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖电泳检测。

根据已报道的甲壳类 Crustin 氨基酸序列和核酸序列 ClustalW 结果, 选取靠近 C 末端的比较保守区域设计 3'-RACE 有义链简并引物 Crustin F1: 5'-GTN TGY GCN CAY GAY GG-3' (N = A, G, C, T; Y = C, T)。实验操作按大连宝生物公司 3'-RACE 试剂盒说明进行。3'-RACE PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段割胶回收, 连接入 pMD 19-T Vector(大连宝生物公司)克隆测序。

5'-RACE 所用两个反义链引物根据 3'-RACE 获得的三疣梭子蟹 Crustin 基因片段设计, CrustinR1: 5'-CTG TAA AGT TTG TAA GCA-3' (位于 Crustin 3'-UTR 末端), CrustinR2: 5'-TTA GTA GAA ATC AGG AGT CTT GC-3' (位于 Crustin C 末端), 有义链引物为试剂盒自带。实验操作按大连宝生物 5'-RACE 试剂盒说明进行。5'-RACE PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段割胶回收, 连接入 pMD 19-T Vector(大连宝生物公司)克隆测序。

将 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增得到的基因片段拼接, 得三疣梭子蟹 Crustin 基因全长 cDNA 序列。

### 1.4 Crustin 成熟肽的 RT-PCR

根据酿酒酵母表达载体 pVT102U/ 和克隆的 Crustin 基因 cDNA 序列设计 Crustin 成熟肽 RT-PCR 引物, 上游引物 *Xba* Crustin: 5'-GCT CTA GAC AAA AGA TCC CTA GTA CTT CCA TAC CCA G-3'; 下游引物 *Hind* Crustin: 5'-CG AAGCTT AAAA TCATTA GTA GAA ATC AGG AGT CTT GC-3'。RT-PCR 实验步骤按上海捷瑞生物技术公司 AMV 一步法 RT-PCR 试剂盒操作说明进行, 目的片段割胶回收。

### 1.5 分泌型表达质粒的构建

用限制性内切酶 *Xba* 和 *Hind* 双酶切目的基因和分泌型表达载体质粒 pVT102U/ $\alpha$ , 割胶回收酶

切片段, 回收产物混于一管, T<sub>4</sub> DNA Ligase 连接载体和目的基因, 连接产物 70% 乙醇沉淀后干燥, 重溶于无菌去离子水, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑转化成功单克隆, 过夜培养后提取质粒, 采用 PCR 和 DNA 测序验证。其中 PCR 验证上游引物为 pVT102U/ $\alpha$  载体 MF $\alpha$ L 上游引物: Pvt102F1: 5'-TAAATACTA CTATTGCCAGC-3', 下游引物为 *Hind* Crustin, PCR 验证后的重组表达载体送 invitrogen 公司测序。

### 1.6 重组 Crustin 的酵母表达

按文献方法制备酵母感受态细胞, 重组表达质粒 pVT102U/ $\alpha$ -Crustin 转化酵母感受态细胞(方向东等, 1996), 扩大培养 4 天后, 10000r/min 离心 10min, 收集酵母上清, 透析、浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色鉴定。

Trizol 法提取酵母总 RNA, DNA 酶消化后以上游引物 Pvt102F1 和下游引物 *Hind* Crustin 做 RT-PCR, 验证 RNA 的转录。

### 1.7 序列分析

扩增获得的 cDNA 产物由上海 invitrogen 生物技术有限公司进行 DNA 核苷酸序列测定, 为保证准确都挑三个克隆子正反双向测序。序列同源性比对和相似性搜索用 NCBI BLAST 在线进行(Altschul *et al.*, 1997); 多序列比对用 Clustal W (Thompson *et al.*, 1994); 信号肽预测用 SignalP 3.0 Server 在线分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen *et al.*, 2004); 在线计算成熟 Crustin 理论分子量及等电点([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)) (Bjellqvist *et al.*, 1993, 1994)。

## 2 结果

### 2.1 三疣梭子蟹 Crustin 基因 cDNA 的克隆

根据其它物种已报道 Crustin 基因序列比对结果设计的有义链简并引物 Crustin F1 和试剂盒自带反义链引物, 以梭子蟹血细胞总 RNA 为模板, 通过 3'-RACE 实验, 扩增到约 300bp 的单一一条带, 与预期的扩增基因片段长度一致(图 1a)。将该扩增带回收、克隆测序, BLAST 证实是 Crustin 基因片段。根据 3'-RACE 获得的蟹 Crustin 3'端基因片段, 设计两个反义链引物 CrustinR1 和 CrustinR2, 有义链引物为试剂盒自带引物, 进行 5'-RACE 实验, 扩增到约 450bp 的单一一条带(图 1b), 克隆测序该片段证实是 Crustin 5'端基因片段。

将 3'-RACE 和 5'-RACE 得到的基因片段拼接,

得三疣梭子蟹 Crustin 完整 cDNA 序列, 并推导出编码的氨基酸序列(图 2)。cDNA 全长 565bp, 由 75bp 的 5'端非编码区(5'UTR), 330bp 的编码区和 160bp 的 3'非编码区(3'UTR)组成, 在 3'UTR 末端有加尾信号 AATAAA。完整阅读框编码 110 个氨基酸残基的 Crustin 前体, SignalP 3.0 Server 在线分析显示 N 端 21 个氨基酸是信号肽序列(概率 98.9%), 信号肽剪切位点位于第 21 个残基与第 22 个残基之间(即 TEA—SL, 剪切概率 71.3%), 理论等电点 pI 8.73, 分子量为

10671.33Da。

BLAST 检索 NCBI non-redundant protein sequences 数据库显示前体序列与 Imjongjirak 等(2009)报道的青蟹(*Scylla paramamosain*, Genbank accession: ABY20727)、Burgess 报道的岸蟹(*Carcinus maenas*, Genbank accession: CAH25401) Crustin 前体氨基酸序列同源性分别为 69%和 63%, 且前体中信号肽与成熟肽之间的剪切位点一致, 均为 TEA-S/GL(图 3)。

三疣梭子蟹 Crustin 成熟肽与其它物种报道的 I 型 Crustin 结构一致, 由 N 端包含 3 个 Cys 的富含 Cys 结构域(已报道的 Crustin 中该结构域 Cys 的数量不超过 6 个, 因此不能形成完整的 4DSC 结构域)和 C 端包含 8 个保守 Cys 的完整 4DSC 结构域组成, 因此本研究克隆的是梭子蟹 I 型 Crustin(图 4)。

**2.2 重组表达质粒 pVT102U/α-Crustin 的构建与表达**

目的基因 RT-PCR 产物与载体质粒 DNA 分别双酶切、割胶回收后, 用 T<sub>4</sub> DNA ligase 连接, 转化 *E. coli* DH5α后提取质粒 DNA, 以酵母 -交配因子(MFαL)上游引物 Pvt102F1 为引物测序显示重组载体中有酵母α-交配因子 C 端部分序列、蛋白酶加工信号 KR、正确编码的梭子蟹 Crustin 成熟肽序列及终止密码子, 表明重组表达载体构建成功(图 5)。

采用 LiAc 转化法将重组载体 pVT102U/α-crustin 转化入酿酒酵母 S-78, 涂 YSD 选择培养基平板后 30 培养 4 天, 可见白色菌落长出, 挑取克隆经 YSD 选择

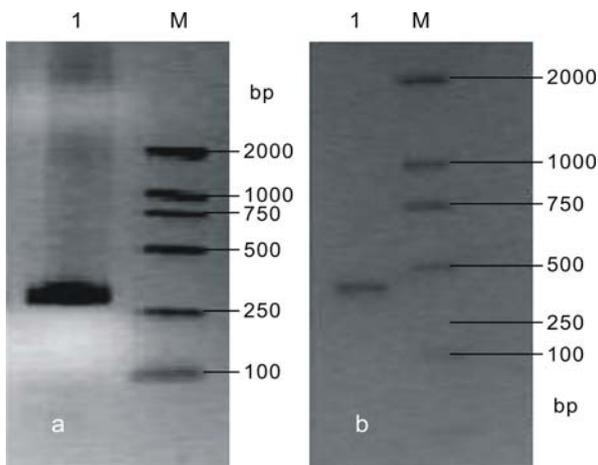


图 1 RACE 实验电泳图  
Fig.1 Electrophoresis of RACE  
a. 3'-RACE; b. 5'-RACE



图 2 梭子蟹 Crustin cDNA 与推导的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of blue crab Crustin  
下划线示成熟肽序列; 阴影区示加尾信号; 方框内为起始密码子和终止密码子

培养液扩大培养后接种 YPD 表达培养液, 培养 4 天后离心收集上清液培养液冻干, 透析后经 SDS-PAGE 电泳检测在大约 10kDa 处有目的产物出现, 表明重组 Crustin 表达成功(图 6a)。同时酵母总 RNA 经 DNA 酶处理后, 以上游引物 Pvt102F1 和下游引物 Hind Crustin 做 RT-PCR, 300bp 单一目的扩增带亦出现, 表明重组 Crustin 基因被转录(图 6b)。

	10	20	30	40	50	60
Scylla	MKVQILAAMVVVATVAMTEASRVPPYLGRDCKHWCKDNNQALYCCGPPGITYPPFIRKH					
Portunus	MKMQTVIAMAVVATVAMTEASLVLPPGLDCKYCKDNYDKHYCRGPPGRTPPYTERS					
Carcinus	MKVQTVAAVVVVAVVVAMTEARLFPP---KDKYCKDNLGINYCCGQPGVTYPPFTKSH					
	**:* : *.:***. :***** . *			***:*****	** * ** *****: .	
	70	80	90	100	110	
Scylla	PGKCPVSRVSTCTGVRSSRPKFCPHDDACEFRSKCCYDACVKKHHVCKTVEFY--					
Portunus	-GKCPPVRATCTGVRSLPKLCPHDGACDFPSKCCYDACVEHHVCKTPDFY--					
Carcinus	LGRCPPVRDTCTGVRTQLPTYCPHDGACQFRSKCCYDTCLKHHVCKTAIEPY					
	*:*.* ** *****: *	****.*:* *****:*	*****:*	*****:*	*****:*	*****:*

图3 三疣梭子蟹、青蟹、岸蟹 Crustin 序列比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of Crustin among *S. paramamosain*, *C. maenas* and *P. trituberculatus*

\* 示一致位点; : 示强相似位点; . 示弱相似位点

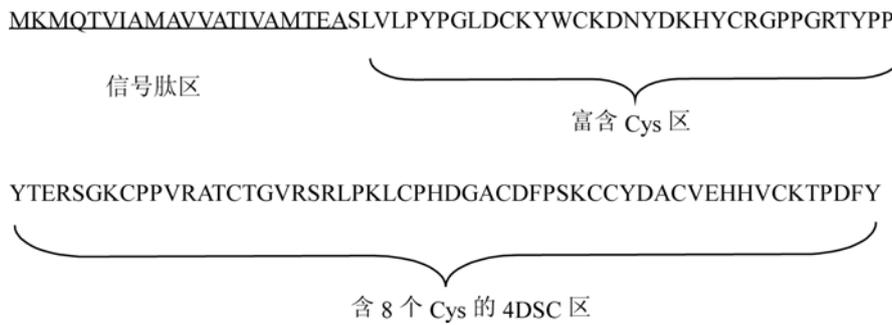


图4 梭子蟹 I 型 Crustin 结构示意图

Fig.4 Structure of blue crab type I Crustin 示 Cys 位点

### 3 讨论

Crustin 是一类具有广谱抗菌活性的抗菌肽,最早由 Relf 等(1999)从青蟹(*Carcinus maenas*)血细胞中分离鉴定。后续研究表明, Crustin 普遍存在于甲壳动物(蟹、对虾、龙虾、螯虾等)血淋巴中,由血淋巴细胞组成型表达,分子量 7—14kDa,对细菌和真菌均有抗菌活性(Relf *et al*, 1999; Smith *et al*, 2008)。已报道的 Crustin 前体均由信号肽和成熟肽两部分组成,信号肽区域长 16—24 氨基酸残基,与其它类型抗菌肽如 cathelicidins、defensins 的保守性相比, Crustin 信号肽保守性较差,而成熟肽区域相对保守(Lehrer *et al*, 1999; Tomasinsig *et al*, 2005)。本研究克隆的三疣梭子蟹 Crustin 基因,开放阅读框编码 110 个氨基酸残基, N 端 21 个氨基酸残基是典型的信号肽序列,

因此与已报道的 Crustin 一致,也是一个分泌型多肽。在已报道的 Crustin 成熟肽 C 末端均有 8 个保守的 Cys 位点, 8 个保守的 Cys 形成四对二硫键, 构成一个紧密结构, 称为 WAP 结构域或 4DSC 结构域, 已有研究表明 WAP 结构域是 Crustin 抗菌活性所必需的结构, 没有 WAP 结构域的 Crustin 可能没有抑菌活性(Zhang *et al*, 2007; Smith *et al*, 2008)。根据 Crustin 信号肽与 WAP 结构域之间结构的差别, 可将 Crustin 分为三个亚型: (1) I 型: 信号肽与 WAP 之间存在一个序列长度多变、富含 Cys 的结构域, 主要存在于蟹、龙虾和螯虾中 (Brockton *et al*, 2007; Christie *et al*, 2007; Jiravanichpaisal *et al*, 2007); (2) II 型: II 型 Crustin 主要发现于对虾中, 不仅有一个富含 Cys 结构域, 而且邻近信号肽区还有一个大约 40—80Aa 的 Gly 富集区(Rosa *et al*, 2007; Amparyup *et al*, 2008); (3) III 型: III 型 Crustin 缺乏 II 型的 Gly 富集区, 而且也没有 I 型和 II 型中的 Cys 富集区, 因此某些文献中不把它归为 Crustin, 而

称之为 SWD (single-whey domain)蛋白、chelonianin-like 蛋白或 antileukoproteinase-like 蛋白(Jiménez-vega *et al*, 2004; Supungul *et al*, 2004; Rojtinakorn *et al*, 2002)。本研究克隆的三疣梭子蟹 Crustin 信号肽与 C 末端 WAP 结构域间有一个富含 Cys 结构域, 但没有 Gly 富集区, 与已报道的 I 型 Crustin 结构相同, 因此属于 I 型 Crustin。

已报道的 Crustin 重组表达研究中, 均采用原核生物大肠杆菌表达系统, 如 Amparyup 等(2008)使用原核表达载体 pET28b 对克隆的斑节对虾(*Penaeus monodon*)的 II 型 Crustin 基因进行重组表达, 重组表达产物 Crus-likePm 对 G<sup>-</sup>和 G<sup>+</sup>均有很强的抑菌活性(Amparyup *et al*, 2008); Zhang 等(2007)使用 pCR<sup>®</sup>T7/NT TOPO<sup>®</sup> TA 载体在 *E. coli* 中表达中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)两种 Crustin: CruFc 和

```

ATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTAGACAAAAGATCCCTAGTACTTCCATACCCAGGTCTGGATTGTAAGTACTGGTGCAAAGA
I A A K E E G V S L D K R S L V L P Y P G L D C K Y W C K D
      ▲ ▲
CAACTACGATAAACACTACTGCTGTGGCCACCAGGACGTACCTATCCACCTTATACCGAGCGCTCTGGTAAATGTCCTCCGGTCCCGTG
N Y D K H Y C C G P P G R T Y P P Y T E R S G K C P P V R A

CTACATGTACTGGTGTGAGGTCACGCCTACCAAAAGTTGTGTCCCATGATGGTGTGACTTTCCAAGCAAGTGCTGTTATGACGCC
T C T G V R S R L P K L C P H D G A C D F P S K C C Y D A

TGTGTGGAGCACCACGTATGCAAGACTCCTGATTCTACTAATGATTTT
C V E H H V C K T P D F Y * *

```

图 5 重组载体 pVT102U/ $\alpha$ -Crustin 测序验证

Fig.5 Partial sequence of the recombination vector pVT102U/ $\alpha$ -Crustin  
下划线示酵母 $\alpha$ -交配因子 C 端部分序列, ▲ 示蛋白酶加工信号, \* 示终止密码子

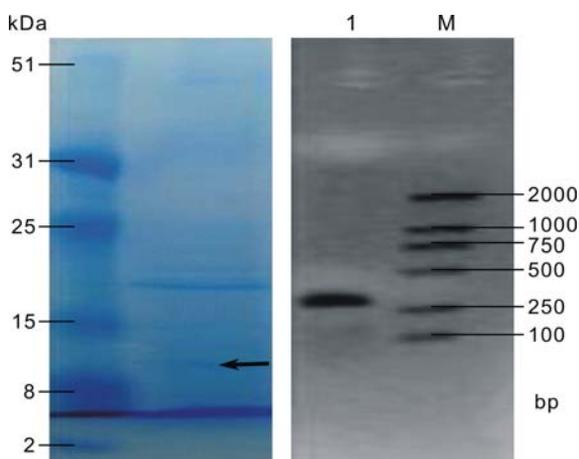


图 6 Crustin 重组表达的检验

Fig.6 Confirmation of the expression of the recombinant Crustin

- a. Crustin 重组表达的 SDS-PAGE 电泳检验, 箭头示目的条带;  
b. RT-PCR 检验重组 Crustin mRNA 转录

CshFc, 其中 CruFc 是典型的 I 型 Crustin, 而 CshFc 与 CruFc 相比, 缺乏 WAP 结构域, 重组 CruFc 对 G<sup>+</sup> 菌有很强的抑菌活性, 而重组 CshFc 几乎没有抑菌活性, 证明 WAP 结构域是 Crustin 抑菌活性必需结构 (Zhang *et al.*, 2007)。然而, 在重组表达真核生物基因产物时, 酵母表达系统比原核表达系统更有优势, 酵母表达系统在糖基化修饰、二硫键形成以及蛋白质折叠等翻译后加工方面具有真核生物特点, 特别是酵母表达系统有一套与高等真核生物类似的分泌系统, 表达的外源基因产物可以正确加工, 经催化形成正确的二硫键分泌到细胞外, 同时酵母本身分泌的蛋白质量很少, 使目的基因表达的蛋白分离纯化工作

大大简化(兰和魁等, 2001)。pVT102U/ 表达载体是一个酵母-大肠杆菌穿梭质粒, 含有 ADH1 强启动子和转录终止子、酵母 $\alpha$ 交配因子前导肽 MF $\alpha$ L、Ura3 标记、氨苄青霉素抗性(Vernet *et al.*, 1987)。MF $\alpha$ L 编码 165 个残基组成的前 $\alpha$ 因子原, 其 N 端信号肽由 13 个氨基酸所组成, 是酵母菌最有效的分泌信号肽, C 端可通过两个碱性氨基酸(Lys、Arg)与其它外源基因融合, 进入酵母菌的分泌途径时, 经各种蛋白酶的后加工, 分别去除信号肽、MF $\alpha$ L 前导肽, 表达出游离的外源基因(方向东等, 1996)。因此本研究选定分泌型表达载体 pVT102U/ 构建表达载体, 在酿酒酵母中表达三疣梭子蟹 Crustin, 结果表明达到预期目的, 重组梭子蟹 Crustin 成功表达并分泌到培养基中, 为后续的功能研究和应用开发奠定了基础, 但表达量还较弱, 发酵条件有待进一步优化。

## 参 考 文 献

- 王广军, 谢 骏, 余德光, 2005. 抗菌蛋白在南美白对虾养殖中的应用试验. 饲料工业, 26: 33—34  
王海静, 王福生, 边艳青等, 2009. 水产动物基因工程抗菌肽及其应用前景的研究. 水生态学杂志, 2: 100—104  
方向东, 黄树其, 陈 淳等, 1996. 牛碱性成纤维细胞生长因子 cDNA 的克隆及其酵母重组表达质粒的构建. 第一军医大学学报, 16: 78—81  
兰和魁, 封志纯, 黄建生等, 2001. 人肺表面活性相关蛋白 A1 在酿酒酵母中表达、纯化及活性分析. 生物工程学报, 17: 410—413  
农业部渔业局养殖课题组, 2006. 我国水产养殖病害防治问题研究. 中国水产, (4): 12—13  
张家国, 2009. 水产动物抗菌肽研究的最新进展. 大连水产学院学报, 24: 130—133

- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A *et al*, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389—3402
- Amparyup P, Kondo H, Hirono I *et al*, 2008. Molecular cloning, genomic organisation and recombinant expression of a Crustin like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol Immunol*, 45: 1085—1093
- Bendtsen J D, Nielsen H, Von Heijne G *et al*, 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340: 783—795
- Bjellqvist B, Basse B, Olsen E *et al*, 1994. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 15: 529—539
- Bjellqvist B, Hughes G J, Pasquali C *et al*, 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14: 1023—1031
- Brockton V, Hammond J A, Smith V J, 2007. Gene characteristics, isoforms and recombinant expression of carcenin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mol Immunol*, 44: 943—949
- Christie A E, Rus S, Goiney C C *et al*, 2007. Identification and characterization of a cDNA encoding a Crustin-like putative antibacterial protein from the American lobster *Homarus americanus*. *Mol Immunol*, 44: 3333—3337
- Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A *et al*, 2009. Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. *Mol Biol Rep*, 36: 841—850
- Jiménez-vega F, Yepiz-plascencia G, Söderhäll K *et al*, 2004. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 681—687
- Jiravanichpaisal P, Lee S Y, Kim Y A *et al*, 2007. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. *Dev Comp Immunol*, 31: 441—455
- Lehrer R I, Ganz T, 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*, 11: 23—27
- Relf J M, Chisholm J R S, Kemp G D *et al*, 1999. Purification and characterisation of a cysteine-rich 11.5kDa antibacterial peptide from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*, 264: 1—9
- Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T *et al*, 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 69—83
- Rosa R D, Bandeira P T, Barracco M A, 2007. Molecular cloning of Crustin from the hemocytes of Brazilian penaeid shrimps. *FEMS Microbiol Lett*, 274: 287—290
- Sambrook J, Russell D, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*. Cold Spring Laboratory Press
- Smith V J, Fernandes J M O, Kemp G D *et al*, 2008. Crustin: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol*, 32: 758—772
- Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R *et al*, 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis Aquat Org*, 6: 123—135
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673—4680
- Tomasinsig L, Zanetti M, 2005. The cathelicidins: structure, function and evolution. *Curr Prot Pept Sci*, 6: 23—34
- Vernet T, Dignard D, Thomas D Y, 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage flintergenic region. *Gene*, 52: 225
- Zhang J Q, Li F H, Wang Z H *et al*, 2007. Cloning and recombinant expression of a Crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J Biotechnol*, 127: 605—614

## cDNA CLONING OF TYPE I CRUSTIN FROM THE BLUE CRAB *PORTUNUS TRITUBERCULATUS* AND CONSTRUCTION OF THE RECOMBINANT EUKARYOTIC EXPRESSION SYSTEM

SHEN Wang, YE Mao, SHI Ge, WANG Ri-Xin

(Laboratory of Marine Biology Resources and Molecular Engineering, Ocean Science College,  
Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

**Abstract** Crustin are a group of antimicrobial peptides (AMPs) ubiquitously found in crustaceans. In this study, a full-length cDNA of type I Crustin had been cloned from blue crab *Portunus trituberculatus* by the RACE technology. This cDNA contains an open reading frame of 330bp encoding a precursor of 110 amino acids; 21 of which consist of the signal peptide, and the remaining 89 amino acids the mature peptide. The putative mature peptides consist of two different domains: a Cys-rich region at the N-terminus and a WAP domain at the C-terminal region. The secretive eukaryotic expression plasmid pVT102U/ $\alpha$ -Crustin was constructed and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* S-78. The recombinant Crustin was expressed successfully in *S. cerevisiae* S-78 as confirmed by RT-PCR and SDS-PAGE analysis.

**Key words** *Portunus trituberculatus*, Antimicrobial peptide, Type I Crustin, cDNA cloning, Eukaryotic expression