

文章编号: 1674-5566(2019)01-0020-09

DOI:10.12024/jsou.20180402278

缢蛭 C 型凝集素基因 ScCTL-2 的序列分析及凝菌活性

蓝天一, 牛东红, 刘晓军, 彭茂潇, 李家乐

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为研究缢蛭 C 型凝集素基因 ScCTL-2 的结构和功能特点, 克隆了该基因的全长序列, 并对其 mRNA 的表达模式以及重组蛋白的凝菌活性进行研究。结果显示, ScCTL-2 的 cDNA 全长 2 194 bp, 共编码 630 个氨基酸, 其氨基酸序列拥有 4 个 C 型凝集素糖识别结构域和 1 个 N 端跨膜区, 这一特殊的序列结构不同于任何一种已知的 C 型凝集素。基因 mRNA 在健康缢蛭肝胰腺中的表达量显著高于其他组织, 在鳃中的表达量次之, 而在其余组织中的表达量没有显著性差异; 金黄色葡萄球菌与鳗弧菌感染能够显著上调 ScCTL-2 在缢蛭血细胞中的表达。ScCTL-2 的重组蛋白凝菌实验显示: 在 Ca^{2+} 存在的情况下, rScCTL-2 能够对实验所采用的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、藤黄微球菌和酿酒酵母均产生明显的凝集反应; 当溶液中不存在 Ca^{2+} 时, 凝集反应几乎不能发生, 意味着 rScCTL-2 的凝菌活性是严格 Ca^{2+} 依赖的。研究表明, ScCTL-2 可能是一种新的无脊椎动物 C 型凝集素类型, 它具有无脊椎动物 C 型凝集素普遍具备的免疫活性, 可能在缢蛭的免疫中具有重要作用。

关键词: 缢蛭; C 型凝集素; 凝菌

中图分类号: S 197 **文献标志码:** A

无脊椎动物体内缺乏获得性免疫机制, 主要凭借固有免疫产生免疫应答, 来维持机体的健康以及正常的生命活动。在无脊椎动物的固有免疫中, 一类由宿主本身的胚系基因编码的蛋白, 即模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), 通过与微生物的一类被称为病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP) 的保守型分子结合, 来识别自然界中种类繁多的病原物质^[1]。由于病原生物表面具有种类繁多且分布广泛的糖类抗原, 糖识别被认为是无脊椎动物最常见、最有效的识别“异己”方式^[2]。C 型凝集素 (C-type lectin) 是一类重要的模式识别受体, 能够通过其糖识别结构域 (carbohydrate recognition domain, CRD) 专一性地与微生物表面糖类分子结合, 实现对多种病原微生物的识别, 在无脊椎动物的先天免疫中具有重要的作用。

目前 C 型凝集素的研究主要集中于脊椎动

物。脊椎动物的 C 型凝集素被分为 17 类^[3-5], 它们通过 C 型凝集素特有的 Ca^{2+} 依赖的糖识别结构域, 也被称作 C 型凝集素结构域 (C-type lectin domain, CTLD), 广泛参与脊椎动物的免疫识别、细胞黏附、糖蛋白清除等生命活动。胶原凝集素 (Collectins)^[6]、巨噬细胞甘露糖受体 (macrophage mannose receptors)^[7]、选择素 (selectins)^[8] 以及自然杀伤细胞受体 (NK-cell receptors)^[9] 等 4 类 C 型凝集素主要参与脊椎动物的免疫反应, 其中胶原凝集素和巨噬细胞甘露糖受体参与脊椎动物的固有免疫——胶原凝集素能够通过补体途径清除病原体^[10], 巨噬细胞甘露糖受体能够直接促进巨噬细胞对病原体的吞噬^[11]。

近年来, 在贝类中陆续有 C 型凝集素被发现并报道^[12-13]。通常通过纯化^[14] 或表达重组蛋白^[13] 的方式对贝类 C 型凝集素的免疫功能进行研究。这些贝类 C 型凝集素通常具有不同的免疫功能以及与糖结合专一性, 这预示着贝类 C 型

收稿日期: 2018-04-15 修回日期: 2018-05-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA10A400-3); 国家自然科学基金(31472278); 上海知识服务平台(ZF1206)

作者简介: 蓝天一(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: 736831403@qq.com

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

凝集素可能具有自身独特的免疫活性,不仅仅是与胶原凝集素或巨噬细胞甘露糖受体相似的方式参与贝类免疫。

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 是我国重要的海水养殖贝类。目前为止,尚未有缢蛏 C 型凝集素基因方面的报道。在之前的研究中,本实验室构建了缢蛏的转录组文库^[15],从中发现了一些缢蛏的免疫基因,并对这些基因进行了相应的研究^[16-17]。在本研究中,我们克隆了该转录组内 1 个缢蛏 C 型凝集素基因 (ScCTL-2),并对其 mRNA 表达模式以及重组蛋白的凝菌活性进行研究,以期对 C 型凝集素在缢蛏体内的免疫功能有更为充分的了解。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验缢蛏

实验缢蛏[平均壳长(6.7 ± 0.2) cm,平均体质量(11.6 ± 0.5) g]由浙江省台州市三门县东航水产有限公司提供。缢蛏在水温为 20 °C,盐度为 20 的海水中暂养 1 周后,进行后续实验。

1.1.2 细菌和真菌

本实验所使用的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、大肠杆菌

(*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 均由上海海洋大学国家水生动物病原库 (National Pathogen Collection Centre for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University) 提供。其中,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌使用 LB 培养基,于恒温摇床内 37 °C、220 r/min 培养;鳃弧菌使用 2216E 培养基,于恒温摇床内 28 °C、220 r/min 培养;酿酒酵母使用 YPD 培养基,于恒温摇床内 37 °C、220 r/min 培养。5 种细菌或真菌均扩培到对数期后使用,细菌或真菌的密度测定采用平板计数法进行。

1.2 基因克隆

ScCTL-2 的序列片段来自缢蛏转录组文库。根据该序列片段设计基因特异性引物 P1、P2 (表 1) 对该序列片段进行扩增,PCR 所需的 cDNA 模板采用 PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa, 日本) 反转获得。研究采用 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 技术扩增 ScCTL-2 的 5'、3' 端序列全长,扩增所需的基因特异性引物 P3、P4 (表 1) 根据经验证的 ScCTL-2 序列片段设计。5' RACE-PCR 扩增采用 SMARTer RACE cDNA amplification kit (Clontech, 美国) 进行;3' RACE-PCR 采用 3' Full RACE Core Set with PrimeScript RTase (TaKaRa, 日本) 进行。实验所用的 RNA 均使用 TRIzol 法从缢蛏肝胰腺中提取获得。

表 1 缢蛏 C 型凝集素基因 ScCTL-2 引物表

Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 5'-3' Sequence (5'-3')	作用 Usage
P1 (forward)	CGGACCTCGTCAAGATAGAT	片段序列验证
P2 (reverse)	TCATACATAAAAAGCAGGCAA	片段序列验证
P3 (reverse)	CCCCGCTCGTGATACACTTGGTCC	5' RACE 扩增
P4 (forward)	TGTTGCCTGCTTTTATGTATGA	3' RACE 扩增
P5 (forward)	CCAACACAGTCGGTCATTTC	荧光定量引物
P6 (reverse)	ATACATCACGCCACATGCTT	荧光定量引物
P7 (forward)	CGCGGATCCCATGGTGATCAGG	原核表达片段扩增
P8 (reverse)	CCGCTCGAGACGTGGTGTGGACG	原核表达片段扩增
18s (forward)	TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT	荧光定量内参引物
18s (reverse)	CAGTTGGCATCGTTTATGCTCA	荧光定量内参引物

1.3 序列分析

将序列片段验证及 cDNA 3'、5' 端全长克隆测序结果进行拼接,获得 ScCTL-2 的 cDNA 全长序列,并对两个基因的 cDNA 全长进行序列比对与分析。采用 NCBI 网站 BLAST 工具 (<http://>

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 进行序列比对;采用 BioEdit 软件对测序结果进行拼接;采用 NCBI 网站 ORF Finder 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 进行开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 预测并获得基因的氨

氨基酸序列;采用 SignalP 程序对肽链的信号肽进行预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);采用 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白结构域的预测;采用 ClustalW2 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行序列多重比对分析;采用 MEGA 5.0, 以邻接法 (Neighbor-Joining method, NJ) 构建系统发育树。

1.4 荧光定量 PCR 实验

实验随机挑选了 3 只健康缢蛭, 并对它们的血淋巴、外套膜、斧足、水管、鳃、性腺和肝胰腺进行取样, 用于检测 ScCTL-2 在健康缢蛭各组织中的 mRNA 表达情况。在攻毒实验中, 我们共挑选了 300 只健康缢蛭, 随机分成 3 组, 每组 100 只。3 组缢蛭分别从斧足注射 50 μL 的金黄色葡萄球菌、鳗弧菌和 PBS, 注射 PBS 的缢蛭作为攻毒实验的阴性对照。金黄色葡萄球菌和鳗弧菌在攻毒前用 PBS 清洗 3 次, 并再次重悬为浓度为 1×10^9 CFU/mL 的悬液。取样在攻毒后的 4、8、12、24、48 h 进行: 分别从每组中随机挑选 12 只缢蛭, 从每只缢蛭体内取得 100 μL 的血淋巴; 将每 3 只缢蛭的血淋巴混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 g 离心 5 min, 并弃去上清, 作为 1 个攻毒实验的血细胞样品, 每个时间点每组共有 4 个血细胞样品。

荧光定量 PCR 实验所需的总 RNA 同样采用 TRIzol 提取, 并采用 PrimeScript reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 反转为 cDNA。反转获得的 cDNA 稀释 10 倍用于荧光定量实验。

基因特异性引物 P5、P6 (表 1) 被设计用于荧光定量 PCR 实验。实验的内参采用 18s 基因。荧光定量 PCR 采用 CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, 美国) 进行, PCR 采用 20 μL 反应体系: 10 μL 2 \times SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)、0.8 μL 引物、1.6 μL cDNA、6.8 μL 无酶水。荧光定量 PCR 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 法分析^[18]。

1.5 重组蛋白制备

研究采用 pET-28a 载体进行 ScCTL-2 重组蛋白 (命名为 rScCTL-2) 的原核表达。首先, 根据 ScCTL-2 基因的去疏水结构域片段设计基因的特异性引物 P7、P8 (表 1), 两条引物的 5' 端分别加上酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I。PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 通过割胶回收与纯

化, 与经相同处理的 pET-28a 载体进行连接。将连接后的重组载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行原核表达。原核表达的步骤为: 在扩增到对数期的阳性菌株 (经小剂量诱导检测证明) 内加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下诱导 4 h。诱导结束后, 收集菌液中的大肠杆菌进行超声破碎, 收集破碎沉淀 (预实验证明 rScCTL-2 以包涵体的形式表达), 并用 8 mol/L 尿素溶解沉淀。采用蛋白纯化镍柱对包涵体进行纯化, 并使用 200 mmol/L 浓度的咪唑对挂住的重组蛋白进行洗脱。纯化得到的包涵体采用梯度尿素浓度的 TBS/甘油缓冲液进行复性^[19]。复性后的 rScCTL-2 采用 BCA 法测定蛋白浓度 (Sigma, 美国)。

1.6 凝菌实验

采用金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、鳗弧菌、大肠杆菌和酿酒酵母 5 种细菌或真菌对 rScCTL-2 的凝集活性进行检测。5 种细菌或真菌预先通过 15 min 的沸水浴进行热灭。热灭后的细菌或真菌使用 CB 重悬至 1×10^9 CFU/mL 的浓度, 以 1 mL 菌液加入 50 μL FITC (10 mg/mL 的 DMSO 溶液) 的比例将 FITC 溶液加入到菌液中, 并于室温下在暗处孵育 1 h, 对 5 种细菌或真菌进行标记。孵育结束后, 用 TBS 清洗细菌或真菌 3 次, 并再次重悬至相同浓度。向每毫升菌液中加入 20 μg 的 rScCTL-2, 并在摇床上遮光孵育 1 h 进行凝菌反应。反应结束后, 采用荧光显微镜对凝菌的情况进行检测。凝菌实验中, 菌液内加入与 20 μg 重组蛋白等体积的 TBS 作为空白对照。另外, 为了检测 rScCTL-2 的凝菌作用是否与 Ca^{2+} 相关, 实验设计了 3 种不同的缓冲液进行对照, 缓冲液分别为: TBS、含 CaCl_2 (终浓度为 10 mmol/L) 的 TBS、含 CaCl_2 (终浓度为 10 mmol/L) 与 EDTA (终浓度为 20 mmol/L) 的 TBS。

2 结果与分析

2.1 序列分析

研究通过 RACE-PCR 技术获得缢蛭 C 型凝集素基因 ScCTL-2 的 cDNA 全长序列, 并对其进行序列分析。分析结果表明, ScCTL-2 基因 cDNA 全长 2 194 bp, 其中包含 63 bp 的 5'-UTR、238 bp 的 3'-UTR 以及长度为 1 893 bp 的 ORF。基因的 ORF 共编码 630 个氨基酸, 氨基酸序列从 N 端至

C 端依次为 1 个跨膜结构域和 4 个 CTLD(依次命名为 CTLD2-1、CTLD2-2、CTLD2-3、CTLD2-4)。

BLAST 分析结果表明,ScCTL-2 的 4 个 CTLD 相互间相似度为 24% ~ 32%(图 1)。



对比物种序列来自 NCBI 网站,CTLD 中 6 个保守的半胱氨酸在序列上方用箭头指出;CTLD 的保守基序“WIGL”以及结构域中 Ca²⁺ 结合位点 2 的保守基序“EPN”、“WND”用方框框出,并在序列下方标注,参与糖结合的谷氨酸用“*”在序列下方标出
CTLD of *Danio rerio* illr2 and *Mus musculus* MBP-A were obtained from NCBI GenBank and were used to sequence alignment, Six conservative cysteine are label by arrows above the sequence; “WIGL”, “EPN” and “WND” motif of CTLD are shown in the last line. The glutamic acid involved in carbohydrate binding in Ca²⁺ binding site 2 is labelled with an asterisk

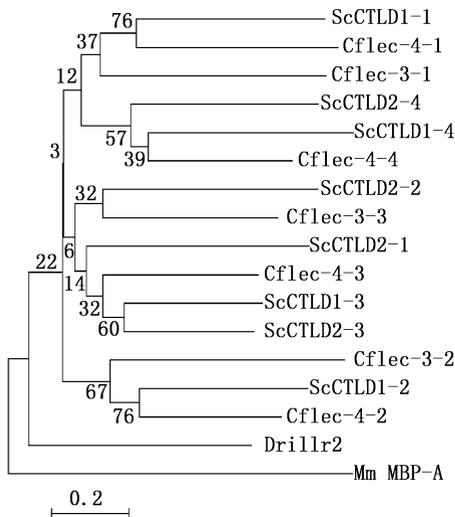
图 1 缢蛏 C 型凝集素基因 ScCTL-2 的 CTLD 多重序列比对
Fig. 1 Multiple sequence alignment of 4 CTLD from ScCTL-2

BLAST 分析结果表明,ScCTL-2 与一些贝类含 4 个 CTLD 的 C 型凝集素相似度最高,如与美洲牡蛎 *macrophage mannose receptor 1-like* (XP_022286296.1) 相似度为 42%,与长牡蛎 *C-type mannose receptor 2* (XP_019926684.1) 相似度为 31%。此外,ScCTL-2 与一些脊椎动物巨噬细胞甘露糖受体的部分 CTLD 具有较高的相似度,如与斑马鱼 *macrophage mannose receptor 1-like*(XP_005173902.3) 第 3 ~ 6 个 CTLD、斑马鱼 *C-type mannose receptor 2* (XP_001344010.4) 第 1 ~ 4 个 CTLD 相似度为 26%。将 ScCTL-2 的 4 个 CTLD 与斑马鱼 *illr2* (NP_002429.1)、小鼠 *MBP-A* (NP_032651.2) 的 CTLD 进行 BLAST 分析(图 1)。分析结果显示,4 个 CTLD 均含有 6 个完全保守的半胱氨酸,意味着它们均为“长型”CTLD。其中,CTLD2-3、CTLD2-4 的“EPN”基序完全保守,CTLD2-1、CTLD2-2 的“EPN”基序均有 1 ~ 2 个氨基酸的突变,但基序中心的脯氨酸完全保守。“WND”基序同样存在于 4 个 CTLD 中,基序中的天冬氨酸完全保守。此外,特征化基序“WIGL”在 4

个 CTLD 中以 1 ~ 2 个氨基酸发生变异的形式存在。

2.2 系统发育分析

将 ScCTL-2 与另一个同样含 4 个 CTLD 的缢蛏 C 型凝集素基因 ScCTL-1 以及栉孔扇贝 *Cflec-4* (ABB71676.1)、栉孔扇贝 *Cflec-3* (ABB71674.2)、斑马鱼 *illr2* (NP_002429.1) 和小鼠 *MBP-A* (NP_032651.2) 的 CTLD 进行系统发育树分析(图 2)。分析结果显示,无脊椎动物 CTLD 形成单独的一个大支。建树选用的 C 型凝集素中,栉孔扇贝 *Cflec-4*、*Cflec-3* 分别包含 4 个 CTLD 和 3 个 CTLD,我们按照给缢蛏 C 型凝集素 CTLD 排序的方式,从肽链的 N 端至 C 端给缢蛏 ScCTL-1 以及栉孔扇贝 *Cflec-4* 的 CTLD 排序命名。有趣的是,在无脊椎动物 C 型凝集素中,含 4 个 CLTD 的 3 种 C 型凝集素的第 4 个 CTLD 聚为一支;含 3 个 CTLD 的 4 种 C 型凝集素的第 3 个 CTLD 聚为一支。另外,除了 ScCTL-2 外,其余 3 个 C 型凝集素的前两个 CTLD 同样按照肽链上排列的顺序分为两支。



在 MEGA5 中使用邻近法对经 Clustal W-generated 多重比对的 CTLD 序列进行系统发育树的构建。拓扑稳定性使用 10 000 次自动重复,图中数值表示置信度(%)

The phylogenetic tree was constructed by Clustal W-generated multiple sequence alignment of the amino acid sequences, using neighbor-joining in the MEGA 5 package. The topological stability of the neighbor-joining trees was evaluated using 10 000 bootstrapping replications. The numbers at branches indicate the bootstrap values (%)

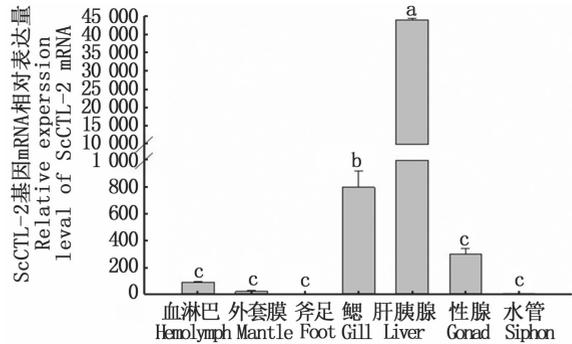
图 2 ScCTL-2 的系统发育树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed to show 4 CTLDs of ScCTL-2 with other CTLDs

2.3 mRNA 表达分析

缢蛏 C 型凝集素基因 ScCTL-2 在健康缢蛏不同组织中的表达表现出组织特异性(图 3)。荧光定量结果显示,ScCTL-2 在健康缢蛏肝胰腺中的表达量显著高于其他组织($P < 0.05$),在鳃中的相对表达量低于肝胰腺但显著高于其余组织($P < 0.05$),在剩余 5 个组织内的相对表达量没有显著性差异($P > 0.05$)。

为确定缢蛏 C 型凝集素基因 ScCTL-2 是否为免疫相关基因,通过 real-time PCR 检测了感染细菌后 48 h 内缢蛏血细胞中两个基因表达量随时间变化的规律。分析结果表明:缢蛏血细胞中 ScCTL-2 的表达量在缢蛏感染金黄色葡萄球菌后的第 4 个小时开始显著上调($P < 0.05$),并于第 24 小时达到最高点;在感染鳃弧菌后,缢蛏血细胞中的 ScCTL-2 在感染的第 8 小时、第 12 小时的表达量显著高于注射前($P < 0.05$);感染两种菌后的第 48 小时,缢蛏血细胞中 ScCTL-2 的表达量均回落至注射前水平($P > 0.05$)。见图 4。

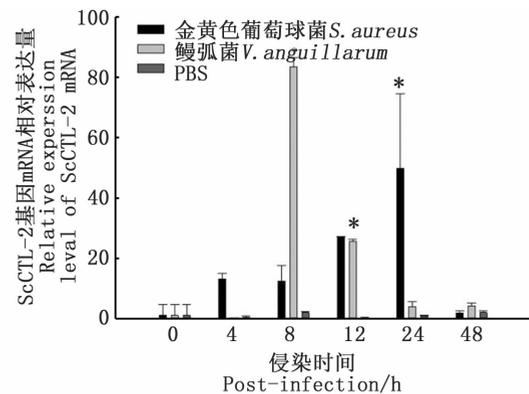


血淋巴、外套膜、斧足、鳃、肝胰腺、性腺和水管等 7 个组织被用于组织相对表达量分析。各组织表达量以 ScCTL-2 在斧足和水管中的表达量为基准进行均一化后呈现,每组数据的值表示该基因在该组织中的表达量是该基因在斧足或水管中的表达量的倍数。数据以平均值 \pm S. E. 的形式呈现($n = 3$)。采用 t 检验与单因素方差分析数据的显著性,并以 $P < 0.05$ 表示差异显著

Relative expression was carried out by real-time PCR in seven healthy tissues. Relative expression level of ScCTL-2 in different tissues are expressed by the multiple of their expression in siphon. Bars represent the mean \pm S. E. ($n = 3$). T-test and one-way ANOVA were used in the significant analysis and the small letter above the bars represent significant difference ($P < 0.05$) between different tissues

图 3 缢蛏 C 型凝集素基因 ScCTL-2 的健康组织 mRNA 相对表达量

Fig. 3 Real-time PCR for healthy tissues of ScCTL-2 gene



各组数据分别以 0 h 作为相对定量的基准。数据以平均值 \pm S. E. 的形式呈现($n = 3$)。采用 t 检验与单因素方差分析数据的显著性,并以 $P < 0.05$ 表示差异显著

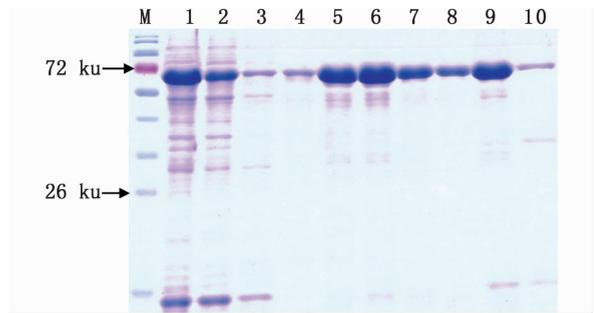
T-test and one-way ANOVA were used in the significant analysis and the small letter above the bars represents significant difference ($P < 0.05$) between different times post-injection

图 4 感染金黄色葡萄球菌与鳃弧菌后 ScCTL-2 基因在缢蛏血细胞中的相对表达量随时间的变化

Fig. 4 Relative expression of ScCTL-2 gene in hemocytes after bacteria challenge

2.4 凝菌实验

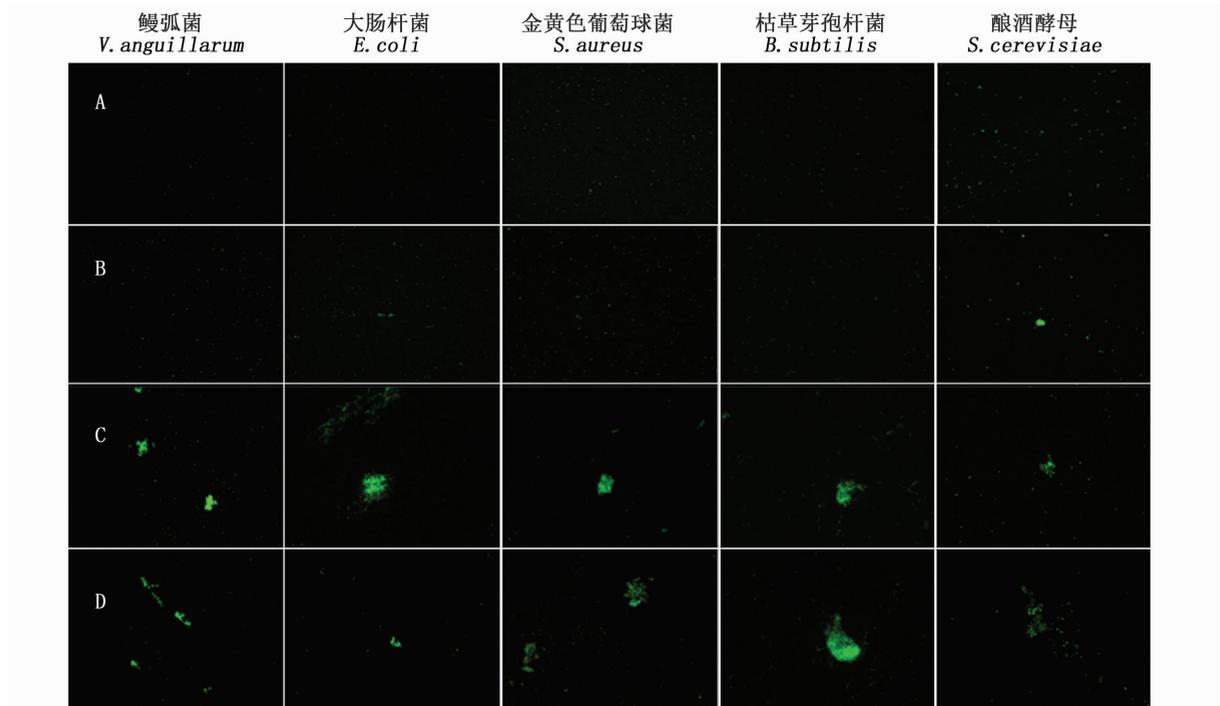
凝菌实验对 rScCTL-2 (图 5) 凝集 5 种细菌 (真菌) 的能力以及凝集活性是否为 Ca^{2+} 依赖进行了测定。研究表明, rScCTL-2 对实验采用的 5 种细菌 (真菌) 的凝集活性以及凝集反应中的 Ca^{2+} 依赖性一致。镜检结果显示: 细菌 (真菌) 在不加入蛋白的情况下不发生凝集 (图 6 A); 细菌 (真菌) 在加入 rScCTL-2, 但缓冲液中不含有 Ca^{2+} 的情况下同样不发生凝集 (图 6 B); 细菌 (真菌) 在加入 rScCTL-2, 并且缓冲液内加入 10 mmol/L CaCl_2 的情况下发生明显的凝集反应 (图 6 C); 在缓冲液内加入 20 mmol/L EDTA 抑制 Ca^{2+} 活性的情况下, 细菌 (真菌) 仍能发生明显的凝集反应, 且肉眼不能分辨出凝集反应是否有减弱的趋势 (图 6 D)。



M. 蛋白分子量 Marker; 1. 超声沉淀; 2. 流穿; 3. 10 mmol/L 咪唑洗脱; 4. 20 mmol/L 咪唑洗脱; 5-8. 50 mmol/L 咪唑洗脱; 9. 200 mmol/L 咪唑洗脱; 10. 500 mmol/L 咪唑洗脱

M. protein marker; 1. sediment of ultrasonication; 2. breakthrough; 3. elution by 10 mmol/L imidazole; 4. elution by 20 mmol/L imidazole; 5-8. elution by 50 mmol/L imidazole; 9. elution by 200 mmol/L imidazole; 10. elution by 500 mmol/L imidazole

图 5 rScCTL-2 纯化 SDS PAGE 电泳图
Fig. 5 SDS-PAGE gel of purified rScCTL-2 dyed with Coomassie blue



每种细菌的凝菌实验分为 4 组: A. TBS; B. rScCTL-2; C. rScCTL-2 + 10 mmol/L CaCl_2 ; D. rScCTL-2 + 10 mmol/L CaCl_2 + 20 mmol/L EDTA

Four groups were designed in agglutination assay for one bacteria or fungus: A. TBS; B. rScCTL-2; C. rScCTL-2 + 10 mmol/L CaCl_2 ; D. rScCTL-2 + 10 mmol/L CaCl_2 + 20 mmol/L EDTA

图 6 rScCTL-2 在不同 Ca^{2+} 浓度下对鳗弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母的凝集能力

Fig. 6 Agglutination activity of rScCTL-2 to *V. anguillarum*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae* at different concentration of Calcium ion

3 讨论

无脊椎动物 C 型凝集素通常被人们认为是一类免疫基因,但也曾有无脊椎动物 C 型凝集素不具有免疫活性的报道^[20],因此,我们首先对 ScCTL-2 是否为免疫相关基因进行确认。荧光定量结果表明,ScCTL-2 在肝胰腺中的表达量显著高于其他组织。在攻毒实验中,缢蛭受金黄色葡萄球菌和鳃弧菌感染后,血细胞中的 ScCTL-2 均出现显著上调的过程。由于贝类肝胰腺被认为是重要的免疫合成器官,合成包括免疫因子在内的多种物质^[21],而血细胞是贝类免疫的主要执行者^[22]。ScCTL-2 在缢蛭体内特殊的时空表达模式意味着它参与缢蛭免疫反应,是一种免疫相关的 C 型凝集素分子。

序列分析结果表明,ScCTL-2 为含 4 个 CTLD 的缢蛭 C 型凝集素,且具有 1 个 N 端跨膜区,这种结构从未在任何脊椎动物或无脊椎动物的 C 型凝集素中被描述^[2,23],属于一个新型的无脊椎动物 C 型凝集素类型。与 C 型凝集素 Ca^{2+} 依赖的糖结合活性密切相关的 Ca^{2+} 结合位点 2 在 ScCTL-2 的 4 个 CTLD 中同时存在。在 CTLD 中,有两个特征化的基序以及一个额外的谷氨酸直接参与糖结合过程中化学键的形成^[24],CTLD2-3、CTLD2-4 的这些氨基酸氨基与脊椎动物甘露糖专一性结合型 CTLD 完全一致,这意味着 ScCTL-2 的这两个 CTLD 同样可能具有甘露糖结合专一性。CTLD2-1 的“EPN”基序变异为“EPD”,这种变化在无脊椎动物中非常常见^[25-26],具有相同基序的海湾扇贝 C 型凝集素 CfLec-2 被鉴定出具有甘露糖结合专一性^[25],这对 CTLD 糖结合专一性的预测可能具有一定的参考意义。综上,我们推测 ScCTL-2 具有甘露糖结合专一性,但其是否具有半乳糖结合专一性仍无法进行预测。

研究表明,C 型凝集素通过结合病原生物细胞表面多糖的方式对其进行识别,继而可以通过自身的多聚或多 CTLD 串联的方式对病原生物产生凝集反应^[27]。在 ScCTL-2 中,4 个 CTLD 形成串联结构,意味着它可能具有对微生物的凝集活性。本研究检测了 ScCTL-2 对 5 种不同微生物的凝集活性。实验结果表明,ScCTL-2 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、鳃弧菌、大肠杆菌和酿酒酵母 5 种不同类型的微生物均产生显著的凝集

反应,这证明了 rScCTL-2 凝菌作用的广谱性。由于病原生物细胞表面 PAMP 单糖组成的多样性,C 型凝集素可以识别多种微生物是可以被预计的,它的这一性质也同样在其他无脊椎动物的 C 型凝集素中得以证明^[26,28],缢蛭 ScCTL-2 的凝菌实验同样验证了这一观点。

凝菌实验的 B、C、D 组被用来证明 rScCTL-2 凝菌的 Ca^{2+} 依赖性。用 EDTA 抑制 Ca^{2+} 活性是 C 型凝集素 Ca^{2+} 依赖性研究中的普遍做法^[20]。实验发现,过量的 EDTA 并不能抑制 rScCTL-2 的凝菌活性,rScCTL-2 在每一种细菌的 D 组中仍能明显地凝集细菌(真菌)。但这一现象并不意味着 rScCTL-2 的凝菌作用是非 Ca^{2+} 依赖的,因为在不加入 10 mmol/L CaCl_2 的 B 组中,我们几乎观测不到 rScCTL-2 能够凝集细菌(真菌)。这一现象产生的根本原因可能是即使向溶液中加入过量的 EDTA,因为化学反应平衡的存在,EDTA 仍然不能完全结合溶液中的 Ca^{2+} 。从分子数量上来看,D 组溶液中的 Ca^{2+} 数量仍然远远高于 rScCTL-2 蛋白的分子数。一些研究在缓冲液中不加入 Ca^{2+} 的情况下观测到凝菌现象的发生^[26],这可能是由于一些细菌(真菌)在孵育过程中死亡破裂,释放出细胞内的 Ca^{2+} ,这些 Ca^{2+} 活化了部分 C 型凝集素,这些 C 型凝集素一方面对细菌产生凝集作用,另一方面可以破坏细菌的细胞壁^[20],导致更多 Ca^{2+} 被释放出来,最终导致凝菌现象的发生。在本实验中,我们提前对细菌(真菌)进行了热灭,经过多次重悬清洗后彻底除去菌液中的 Ca^{2+} 。在这一前提条件下,仅仅向溶液中加入 rScCTL-2 完全不能引起凝菌现象的发生,证明了 rScCTL-2 的凝菌活性是严格 Ca^{2+} 依赖的;而在缓冲液中同时具有 10 mmol/L CaCl_2 和 20 mmol/L EDTA 的情况下,rScCTL-2 仍然具有凝菌活性,证明了过量的 EDTA 无法完全抑制缓冲液中的 Ca^{2+} 活性。

综上所述,本研究克隆鉴定了一个新型的缢蛭 C 型凝集素基因 ScCTL-2,并对它的凝集活性进行了描述。该 C 型凝集素具有 Ca^{2+} 依赖的广谱凝菌活性,从它的 mRNA 表达模式以及凝集活性来看,ScCTL-2 具有贝类 C 型凝集素的普遍特性。但由于其具有独特的序列结构,并且在健康缢蛭的鳃中表达量较高,是否意味着 ScCTL-2 具有其特殊的生物学功能仍有待进一步地研究。

参考文献:

- [1] MEDZHITOV R, JANEWAY C JR. Innate immunity [J]. The New England Journal of Medicine, 2000, 343(5): 338-344.
- [2] ZELENSKY A N, GREASY J E. The C-type lectin-like domain superfamily [J]. FEBS Journal, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [3] DRICKAMER K, FADDEN A J. Genomic analysis of C-type lectins [J]. Biochemical Society symposia, 2002, 69: 59-72.
- [4] ZELENSKY A N, GREASY J E. C-type lectin-like domains in *Fugu rubripes* [J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 51.
- [5] DRICKAMER K. Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins [J]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1993, 45: 207-232.
- [6] DRICKAMER K, TAYLOR M E. Biology of animal lectins [J]. Annual Review of Cell Biology, 1993, 9: 237-264.
- [7] TAYLOR M E. Carbohydrate-recognition proteins of macrophages and related cells [M]//HORTON M A. Macrophages and Related Cells. Boston: Springer, 1993.
- [8] LASKY L A. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response [J]. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64: 113-140.
- [9] BROWN M G, SCALZO A A, MATSUMOTO K, et al. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity [J]. Immunological Reviews, 1997, 155(1): 53-65.
- [10] IKEDA K, SANNOH T, KAWASAKI N, et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(16): 7451-7454.
- [11] SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C, et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [J]. Journal of Experimental Medicine, 1995, 182(2): 389-400.
- [12] ZHANG G F, FANG X D, GUO X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490(7418): 49-54.
- [13] LI H, ZHANG H, JIANG S, et al. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(2): 566-575.
- [14] MINAMIKAWA M, HINE M, RUSSELL S, et al. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(5): 463-476.
- [15] NIU D H, WANG L, SUN F Y, et al. Development of molecular resources for an intertidal clam, *Sinonovacula constricta*, using 454 transcriptome sequencing [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67456.
- [16] PENG M X, NIU D H, WANG F, et al. Complement C3 gene: expression characterization and innate immune response in razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 223-232.
- [17] NIU D H, JIN K, WANG L, et al. Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 581-588.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] YU X Q, TRACY M E, LING E J, et al. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(4): 285-295.
- [20] YU Y H, YU Y C, HUANG H Q, et al. A short-form C-type lectin from amphioxus acts as a direct microbial killing protein via interaction with peptidoglycan and glucan [J]. The Journal of Immunology, 2007, 179(12): 8425-8434.
- [21] GROSS P S, BARTLETT T C, BROWDY C L, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(7): 565-577.
- [22] WOOTTON E C, DYRYNDA E A, RATCLIFFE N A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 15(3): 195-210.
- [23] DRICKAMER K, DODD R B. C-type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: predictions from the complete genome sequence [J]. Glycobiology, 1999, 9(12): 1357-1369.
- [24] WEIS W I, DRICKAMER K, HENDRICKSON W A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide [J]. Nature, 1992, 360(6400): 127-134.
- [25] ZHENG P L, WANG H, ZHAO J M, et al. A lectin (CfLec-2) aggregating *Staphylococcus haemolyticus* from scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(3): 286-293.
- [26] ZHANG H, SONG X Y, WANG L L, et al. AiCTL-6, a novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* with a long C-type lectin-like domain [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 17-26.
- [27] WEIS W I, TAYLOR M E, DRICKAMER K. The C-type lectin superfamily in the immune system [J]. Immunological Reviews, 1998, 163(1): 19-34.

- [28] ZHANG H, WANG H, WANG L L, et al. A novel C-type lectin (Clec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate-recognition domains [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(5) : 707-715.

Sequence analysis and bacterial agglutination of C-type lectin gene ScCTL-2 in *Sinonovacula constricta*

LAN Tianyi, NIU Donghong, LIU Xiaojun, PENG Maoxiao, LI Jiale

(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 superfamily of Ca^{2+} -dependent carbohydrate-binding proteins that play crucial roles in invertebrate immunity. A novel C-type lectin gene (ScCTL-2) was identified in razor clam *Sinonovacula constricta*. Sequence analysis showed that the full length ScCTL-2 contains a 1893 bp ORF encoding 630 amino acid polypeptide with four CTLD (C-type lectin domain) and a N-terminal transmembrane region. The special structure of ScCTL-2 protein revealed that ScCTL-2 is perhaps a new group of invertebrate C-type lectins. The ScCTL-2 was expressed in almost all tissues, with highest expression in hepatopancreas and the second highest expression in gill. Bacterial stimulation up-regulated ScCTL-2 expression in hemocytes. The spatial- and temporal-specific expression patterns of ScCTL-2 suggest it may be an immune-related gene in razor clam. Recombinant protein (rScCTL-2) displayed a broad bacterial agglutination spectrum, and the agglutinate activity was strictly Ca^{2+} -dependent. It could agglutinate all the experimental bacteria only if Ca^{2+} existed. The results suggest ScCTL-2 is a novel gene possessing common immune characteristics of invertebrate C-type lectins.

Key words: *Sinonovacula constricta*; C-type lectin; bacterial agglutination