

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCht3* 基因克隆鉴定及表达分析*

张 凤^{1,2,3} 吕建建^{1,2} 刘 萍^{1,2①} 高保全^{1,2} 李 健^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;

3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为初步研究三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCht3* 的生物学功能,利用特异性引物扩增和 SMARTTM RACE 技术克隆获得三疣梭子蟹 *PtCht3* 基因全长 cDNA 序列,并对该序列进行分析。结果显示,三疣梭子蟹 *PtCht3* 基因全长为 1409 bp,对 *PtCht3* 基因序列推导出的氨基酸序列进行分析可知,该基因编码由 394 个氨基酸组成的蛋白质,预测分子量为 43.67 kDa,理论等电点为 4.80。*PtCht3* 蛋白亲水性总平均数为-0.097,属于稳定蛋白。同源性和系统进化分析发现,*PtCht3* 与日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几丁质酶 3 的同源性分别为 54%和 53%,与其他甲壳动物几丁质酶 3 聚为一支。RT-PCR 显示,*PtCht3* 基因具有较强的组织表达特异性,在肝胰腺中的相对表达量最高,在三疣梭子蟹蜕皮前期表达上调,低盐胁迫后在鳃和肝胰腺中表达量出现了波动,总体呈先上升后下降的表达趋势。推测 *PtCht3* 可能在三疣梭子蟹消化和蜕皮过程中发挥重要作用,参与三疣梭子蟹渗透压调节进程。本研究为三疣梭子蟹几丁质酶的功能研究提供了重要信息。

关键词 三疣梭子蟹; 几丁质酶; 蜕皮; 低盐胁迫; 基因克隆; 组织表达

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0167-10

几丁质酶在甲壳动物的蜕皮过程中发挥着重要的生理作用,将旧的外骨骼消化成可溶性物质,被甲壳动物部分重新吸收后,再用于新的外骨骼的合成(Huang *et al.*, 2010)。几丁质是甲壳动物外壳的主要成分,其合成和降解在该类动物蜕皮生长过程中起着非常重要的作用。按照几丁质酶的氨基酸序列,几丁质酶可分成 6 类(陈少波等, 2004), I、II、III、IV、V 型和 N-乙酰葡萄糖胺酶。糖基化水解酶第 19 族包括 I、II、IV 型,主要存在于植物中。第 18 族包括 III 型和 V

型,在节肢动物和昆虫中广泛存在,节肢动物门下的甲壳动物三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的几丁质酶属于几丁质酶第 18 族 III 型,第 20 族则包括 N-乙酰葡萄糖胺酶(Techkarnjanaruk *et al.*, 1999)。三疣梭子蟹主要摄取含几丁质外壳的动物,只有几丁质酶才有助于消化几丁质。甲壳动物几丁质酶的活力与蜕皮存在密切的关系,与蜕皮激素含量亦有一定相关性(吕黎等, 2011),因此,自身的几丁质分解是受调控的,只有在相应的蜕皮周期才会被消化分解。Watanabe 等

* 国家自然科学基金(41576147 号)、泰山产业领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41576147), Efficient Eco Agriculture Innovation Project of Taishan Leading Talent Project (LJNY2015002), and Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 张 凤, E-mail: fenger8709@126.com

① 通讯作者: 刘 萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-11, 收修改稿日期: 2016-03-31

(1998)分离出了日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)的几丁质酶 *Pjchi-3*, 发现在其肝胰腺中高表达, 与日本囊对虾对几丁质类食物的消化相关。斑节对虾(*Penaeus mondon*) *PmChi3* 也主要在肝胰腺中表达, 可能在几丁质类食物的消化中发挥作用(Proespraiwong *et al*, 2010)。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) *Fcchi-3* (Zhang *et al*, 2010)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *LvCHT3* (Qian *et al*, 2010)也是肝胰腺特异性基因, 与消化相关。

本实验室对三疣梭子蟹主要组织进行了高通量转录组测序, 从中筛选获得 *PtCht3* 基因的部分序列, 采用 RACE 技术, 克隆得到该基因的全长 cDNA 序列, 并对其在不同蜕皮周期和低盐胁迫后的三疣梭子蟹组织中的表达特征进行初步研究, 以期在三疣梭子蟹 *PtCht3* 的生物学功能和渗透压调节机理的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为来自山东潍坊昌邑海丰公司养殖的健康状态良好的三疣梭子蟹 1200 只, 体重为 4.67–6.89 g。蟹池 20 m³, 每池养殖 200 只三疣梭子蟹, 共 6 池, 暂养 3 d。自然海水养殖(盐度为 33), 水温控制在 24–26℃ 左右, pH=8.7, 保持供氧充足, 每天更换 1/3 的水量, 暂养期间, 每天 18:00 定时投喂蓝蛤(*Potamocorbula*), 投喂量为总体重的 5%–8%。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

参照王渝(2014)¹⁾, Trizol 法提取所取组织的总

RNA, 其质量及完整性用核酸定量仪(Biodropsis, BO-1000)与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测; 各取相同质量的肝胰腺和第 6 对鳃的总 RNA 混匀, 按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 说明书合成 3' RACE 和 5' RACE 的 cDNA。

1.2.2 全长 cDNA 的克隆及测序 利用软件 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 依据三疣梭子蟹反转录数据库中几丁质酶基因 3 的已知表达序列标签(EST), 进行 3' 和 5' RACE 特异性引物的设计。用 Advantage 2 PCR Kit 扩增 3' 和 5' 末端。分别用特异性引物 PtCht3F 和 PtCht3R 与通用引物 UPM 扩增 3' 和 5' 末端(表 1), 方法参照王渝(2014)¹⁾。

1.2.3 序列分析 参照王渝(2014)¹⁾, 用 Vector NTI 11.0 软件去除所测序列中的冗余序列, 并拼接; 用软件 DNASTar 的 EditSeq 预测开放阅读框, 翻译氨基酸; 对 *PtCht3* 基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行同源性比对; 蛋白质理化性质预测、蛋白质跨膜区分析及蛋白质功能结构域分析参照徐文斐等(2014); 与其他物种几丁质酶 3 的序列进行多序列比对, 然后以邻接法进行系统进化树的构建, 具体方法参照段亚飞等(2013)。

1.2.4 三疣梭子蟹蜕皮周期实验 选取处在蜕皮间期、前期、后期的三疣梭子蟹各 3 只。参照沈洁等(2011), 各取三疣梭子蟹的第 1 对鳃、肌肉、肝胰腺、第 6 对鳃、肠、胃、心脏、表皮、眼柄、血细胞, 于液氮中冻存, 待提取 RNA。

1.2.5 盐度胁迫实验 随机挑取暂养 3 d 的三疣梭子蟹 600 只, 实验设置 2 个盐度组, 分别为低盐组(盐度为 11)和正常组(自然海水, 盐度为 33), 每组设 3 个平行, 每个平行 100 只, 于 3 m³ 蟹池中进行实验。

表 1 三疣梭子蟹 *PtCht3* 克隆所用引物序列

Tab.1 Sequences of primers used in the cloning of *P. trituberculatus PtCht3*

引物 Primers	序列 Sequences (5'–3')	作用 Purpose
PtCht3F	GCCGAGGAGGGGTGGACGATAGC	3' RACE 引物
PtCht3R	ACCGTCAGCACCATACTTCAGC	5' RACE 引物
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5' RACE 引物
PtCht3RCf	ATGATGTGGAAGGCGCTG	验证 ORF 正向引物
PtCht3RCr	TCAGCGTTTGGCCTTGTT	验证 ORF 反向引物
M13F (–47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	DNA 测序通用正向引物
M13R (–48)	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	DNA 测序通用反向引物

1) Wang Y. Expression analysis of salinity-related genes and development of SNP in *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 11–12 [王渝. 三疣梭子蟹盐度相关基因克隆、表达分析及盐度关联 SNP 的开发. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 11–12]

低盐组盐度配制方法: 参照隋延鸣等(2012)向自然海水中注入淡水, 混匀, 使其盐度降至 11, 利用 YSI 盐度仪校准盐度。实验分 2 组, 每组 3 个平行, 分别于胁迫 0、3、6、12、24、48 和 72 h 时间点取 3 只三疣梭子蟹的鳃和肝胰腺, 于液氮中冷冻, 3 只蟹子组织样品混合研磨, 用于后续 RNA 的提取。

1.2.6 几丁质酶基因 *PtCht3* mRNA 的 Real-time PCR 定量检测 对照组和实验组三疣梭子蟹所取组织的总 RNA 提取和 cDNA 的反转录合成分别利用 Trizol 试剂和 PrimeScript RT Reagent Kit 完成。

根据拼接获得的 *PtCht3* cDNA 序列全长和已知的三疣梭子蟹管家基因 β -actin, 分别设计 1 对正反特异引物(β -actin-F 和 β -actin-R、*PtCht3*qF 和 *PtCht3*qR) (表 2), 对三疣梭子蟹肝胰腺和鳃中各个基因在不同时间点盐度胁迫的相对表达量进行检测。利用 Real-time PCR 对各个组织中和胁迫进程中 *PtCht3* 基因的表达情况进行统计分析。*PtCht3* 基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 总 RNA 质量检测

利用核酸定量仪对所取各个组织提取获得的总 RNA 进行检测, 其 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值均在 1.8–2.0 之间; 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测呈现 3 条清晰的条带, 分别是 28S、18S 和 5S rRNA。检测结果显示, 所提取的总 RNA 纯度较高且完整性较好。

2.2 几丁质酶基因 *PtCht3* 的 cDNA 全长克隆

取三疣梭子蟹眼柄、第 6 对鳃和肝胰腺的总 RNA 的混合物作为模板, 分别反转录为 3' 和 5' RACE 的第一链 cDNA。分别用特异引物 *PtCht3*F 和 *PtCht3*R 与通用引物 UPM 配对, 进行 3' 和 5' RACE 的扩增, 得到大小分别为 457 bp 和 567 bp 的 cDNA 片段。与已知表达序列标签拼接, 获得三疣梭子蟹几丁质酶 3 基因的 cDNA 序列全长, 将其命名为 *PtCht3*。GenBank

登录号为 KM100754。*PtCht3* 的 cDNA 序列全长为 1409 bp, 包括开放阅读框(ORF)1185 bp, 3' 非编码区(3'-UTR)199 bp, 5' 端非编码区(5'-UTR) 25 bp。3' 端具有多聚腺苷酸 Poly A 尾和加尾信号 AATAAA (图 1)。

2.3 几丁质酶基因 *PtCht3* 的序列分析及结构域预测

根据 *PtCht3* 基因序列推导出的氨基酸序列进行分析可知, 它编码含有 394 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 43.67 kDa, 理论等电点 pI 为 4.80。氨基酸组成分析结果显示, *PtCht3* 蛋白含有碱性氨基酸残基 27 个(Arg 和 Lys), 酸性氨基酸残基 51 个(Asp 和 Glu), 疏水性氨基酸残基 144 个(Ala、Ile、Leu、Phe、Trp 和 Val), 极性氨基酸 98 个(Ser、Cys、Asn、Gln、Tyr 和 Thr), *PtCht3* 蛋白亲水性总平均数为 -0.097, 属于稳定蛋白。结构域分析结果显示, 其 N 端 1–20 氨基酸处存在信号肽, *PtCht3* 序列存在 1 个几丁质酶第 18 家族活性位点 $^{138}\text{FDGLDLAWT}^{146}$ 。在 22–368 氨基酸处存在几丁质酶第 18 家族催化结构域, 含 4 个保守基序。

2.4 几丁质酶基因 *PtCht3* 的同源性分析

BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *PtCht3* 序列, 显示 *PtCht3* 基因与日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*) *Cht3* 的同源性最高, 为 54%。与其他物种如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、中国明对虾和日本囊对虾的同源性分别为 53%、52%、51%、50% 和 49%。与日本仿长额虾、中华绒螯蟹和锯缘青蟹等动物的 *Cht3* 氨基酸序列比对得知, 几丁质酶第 18 家族催化结构域的保守基序 Motif I、Motif II、Motif III 和 Motif IV 在以上几个物种中都存在(图 2)。

利用软件 MEGA 5.0 进行系统进化(NJ 法)分析显示, 几丁质酶第 18 家族 III 型主要聚为 2 大类群: 甲壳类和昆虫类, 三疣梭子蟹 *PtCht3* 聚类顺序依次与中华绒螯蟹、锯缘青蟹、日本仿长额虾、日本囊对虾、日本沼虾、斑节对虾、凡纳滨对虾和中国明对虾等(图 3)。

表 2 三疣梭子蟹 *PtCht3* mRNA 相对表达分析所用引物序列

Tab.2 Sequences of primers used in the analysis of relative mRNA expression of *P. trituberculatus PtCht3*

引物 Primers	序列 Sequences (5'-3')	作用 Purpose
<i>PtCht3</i> qF	CTCTGGTCTCGGCAGTCTCT	<i>PtCht3</i> 定量正向引物
<i>PtCht3</i> qR	GGTGCGGCTTTGATAAGTTC	<i>PtCht3</i> 定量反向引物
β -actinF	CGAAACCTTCAACACTCCCG	β -actin 定量正向引物
β -actinR	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	β -actin 定量正向引物

```

1  ATGG GGA GTG CTG ACA ATC TCC GGC ATG ATG TGG AAG GCG CTG CTC CTG CTC TCC GTC TCC ACC CTC CCT CTT ATT GAG GGC GCC 88
      M M W K A L L L L L S V S T L P L I E G A
89  GTG CTG TGC TAC TTC GAG TCC TGG GCG GTA TAC AGG CTC GGC GAT GGC AAG GTG GAA ATA TCC GAC CTC GAA CCG GCA CTC TGC TCC CAC 178
      V L C Y F E S W A V Y R L G D G K V E I S D L E P A L C S H
179 TAC ATC TAT GCT TTT GCT GGC ATC AAC ACC GAT TAT ACC ATC AGG GTG TTG GAC CCG TGG GCA GAC CTG TGT GAT GGA GGC GGA AGG TGC 268
      Y I Y A F A G I N T D Y T I R V L D P W A D L C D G G G R C
269 GGC TTT GAT AAG TTC ACA GCC ATG AAG AAC GTC GAG CCG CAT CTG TTG ACC CTG CTG GCC GTG GGT GGC TGG AAC GAC GGC TCT GCT CTT 358
      G F D K F T A M K N V E P H L L T L L A V G G W N D G S A L
359 TAC TCT CAG ATG GCA GAG ACT GCC GAG ACC AGA GCA GTG TTC ATC AAG TCA TCC ATA CAG CTT CTG AAG ATT CAC AAT TTT GAC GGC CTC 448
      Y S Q M A E T A E T R A V F I K S S I Q L L K I H N F D G L
449 GAT TTG GCC TGG ACG TAT CCC ACA CAG AAT GGA GGC GCC CCT CAT GAC CCG GAG AAC TAT GTG CAT CTG CTG CCG GAA CTG AAA GAG GCG 538
      D L A W T Y P T Q N G G A P H D R E N Y V H L L R E L K E A
539 CTG GAA GCT GAA GGT ATG GTG CTG ACG GTA ACA GTT TCT CCA ACC AAG AGT GTC ATA GAC GAG GCT TAT GAC ATC CCA GGC ATT GCA CAA 628
      L E A E G M V L T V T V S P T K S V I D E A Y D I P G I A Q
629 CAC GCG GAC CTC GTC ACC GTG ACA ACC TAC GAC TTG CAC GGC TCG TGG GAG CAC CAC ACT AAC CAT CAT TCA GGC CTG TAC GCC TTC TCC 718
      H A D L V T V T T Y D L H G S W E H H T N H H S G L Y A F S
719 GAG GAT GTT GGC AGC GAT TTG TTC CTG AAC GTG GAC TAC ATA ATA AAT TAC TGG GTG GCA GGA GGG ATG CCG GAA AAA AAG CTG GTA ATG 808
      E D V G S D L F L N V D Y I I N Y W V A G G M P E K K L V M
809 GGG GTG CCC GCC TTT GGT CGC ACT TGG ACG CTG GAC TCA ATC GAG GAG CAC GGA TAC TAC GCC CCT GCC TAT TTG CCT GGG ATG ACG GGG 898
      G V P A F G R T W T L D S I E E H G Y Y A P A Y L P G M T G
899 CCT TGG ACG AAG ACG GAG GGT TTC ATG GCG TAC GCT GAG ATC TGC GTG AAG CAG GCC GAG GAG GGG TGG ACG ATA GCA GTG GAG AAA GGC 988
      P W T K T E G F M A Y A E I C V K Q A E E G W T I A V E K G
989 TGC AAC GAA CCT TAC ACT TAC CAA CTG TCC TCC AGC AAG ATC TGG TGC GCG TAC GAG AAC CAC GAC TCT GTC ACT CTC AAG GCC CAA TAC 1078
      C N E P Y T Y Q L S S S K I W C A Y E N H D S V T L K A Q Y
1079 GCA GCT GAC CAC GGC CTT GGA GGA GTT ATG ATC TGG TCC ATA AAT GAC GAT GAT GCG CAC GGC GTC TGC GGT GGT CGC AAG TTT GAT CTG 1168
      A A D H G L G G V M I W S I N D D D A H G V C G G R K F D L
1169 ACA TCT ACG TTG GCA GAC ACC TTC AAC AAG GCC AAA CGC TGA TGT GTC TAC AGA GTG CAA GAG TTC CCG TAC CCA CTT TTG CCA TCT TCC 1258
      T S T L A D T F N K A K R *
1259 CAA CAC TAT CCG TTC TTT CCT CGA GGC ATC TCA CCA ATC ACA ATA TTT GTA ACA TTA TCG GCG GTG GTG CCA CAC AAA ACA GTT CGT ATG 1348
1349 ATC ATA ATT CCA TAT ACA CAA TTT CGC GTA CAA AAT AAA TTA TAC ACA ACT AAA AAAAAA A 1409

```

图 1 三疣梭子蟹 *PtCht3* 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence encoded by *P. trituberculatus PtCht3*

起始密码子(ATG)、加尾信号(AATAAA)和终止密码子(TGA)用细线方框标出;

粗线方框内为几丁质酶第 18 家族保守基序; 信号肽以细下划线标出

The letters in the box indicated the start codon (ATG), the polyadenylation signal sequence (AATAAA), and the stop codon (TGA). The conserved motifs of the catalytic domain of the 18th chitinase family were framed in black boxes. The signal peptide was underlined with a thin line

2.5 基因 *PtCht3* 的表达分析

2.5.1 *PtCht3* 基因的组织表达分布 实时荧光定量 PCR 分析可知, *PtCht3* 在表皮、胃、第 6 对鳃、肠血细胞、心脏、第 1 对鳃、肌肉、眼柄和肝胰腺中均有表达。*PtCht3* 在肝胰腺表达量最高, 与其他组织相比, 差异显著($P < 0.05$), 其次是胃, 在其他组织中的表达量均很低(图 4)。

2.5.2 *PtCht3* 在蜕皮周期中的表达 *PtCht3* 在蜕皮周期实验肝胰腺中的表达情况见图 5。后期期间期至前期, 肝胰腺中 *PtCht3* 的相对表达量一直呈上升趋势, 后期至间期出现显著性上调($P < 0.05$), 间期至前期亦是明显上调表达, 表达量在前期达到相对最大值。

2.5.3 *PtCht3* 在低盐胁迫下的表达 低盐胁迫下, 三疣梭子蟹 *PtCht3* 在第 6 对鳃中的相对表达情况见图 6。与对照组相比, 胁迫组 *PtCht3* 的表达量于 3、12、48 h 出现轻微下调, 于 48 h 达到最小值, 在 24、72 h 出现显著性上调($P < 0.05$), 72 h 达到最大值, 为对照组的 4.97 倍, 整体呈现上调表达趋势。

三疣梭子蟹 *PtCht3* 在低盐胁迫下肝胰腺中的相对表达情况见图 7。与对照组相比, 胁迫组 *PtCht3* 基因的相对表达量于 3 h 轻微下调, 3–6 h 时间段内出现显著性上调($P < 0.05$); 于 12 h 显著下调后, 表达量迅速回升, 24 h 上调极显著($P < 0.01$), 达到最大值, 相对表达量为对照组的 4.32 倍, 整体呈现波动式表达趋势。

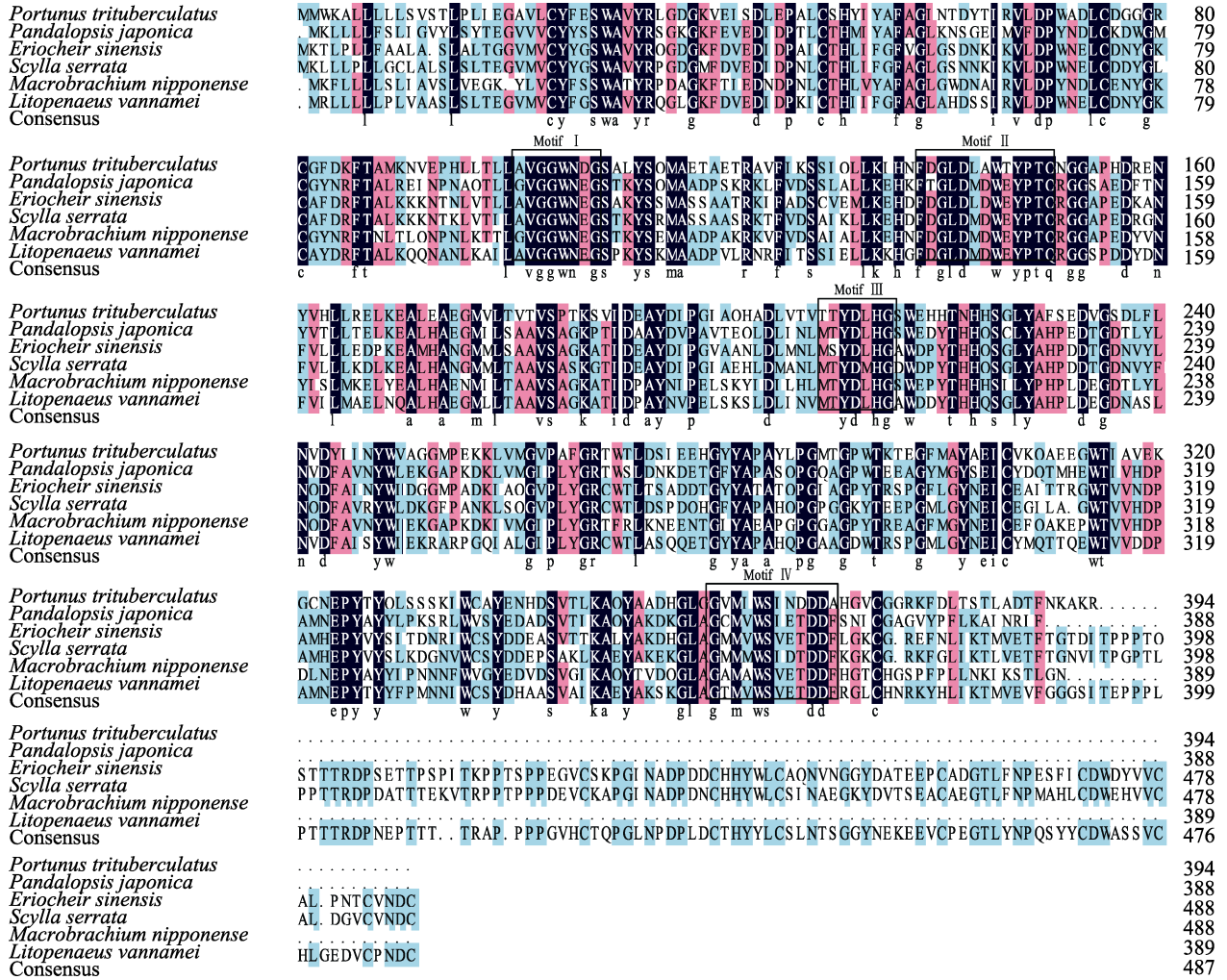


图 2 三疣梭子蟹 PtCht3 氨基酸序列的多序列比对

Fig.2 The multiple alignment of the deduced amino acid sequences encoded by *P. trituberculatus* PtCht3 and other species

几丁质酶第 18 家族保守基序以方框表示

The conserved motifs of the 18th chitinase family were framed in black boxes

3 讨论

本研究成功克隆三疣梭子蟹几丁质酶基因 *PtCht3* cDNA 序列, 全长为 1409 bp, 编码 394 个氨基酸, 分子量为 43.67 kDa, 理论等电点 *pI* 为 4.80, 其 N 端 1-20 氨基酸处存在信号肽, 存在 1 个几丁质酶第 18 家族活性位点 ¹³⁸FDGLDLAWT¹⁴⁶, 并存在几丁质酶第 18 家族催化结构域, 含 4 个保守基序 Motif I、Motif II、Motif III 和 Motif IV。该基因与日本仿长额虾 *Cht3* 的同源性最高, 为 54%。根据 cDNA 序列推导出氨基酸序列分析发现, 几丁质酶 *PtCht3* 具备典型的几丁质酶基因第 18 家族的序列特征, 包括 glyco-18 催化结构域、活性位点(FDGLDLAWT) (Boot *et al*, 2001)。PtCht3 催化结构域具有几丁质酶第 18 家族的保守基序, 分别为 Motif I、II、III、IV

(Bleau *et al*, 1999)。几丁质酶第 18 家族催化结构域的保守基序 Motif I、Motif II、Motif III 和 Motif IV 在日本仿长额虾、中华绒螯蟹和锯缘青蟹等动物的 *Cht3* 氨基酸序列中都存在。进化树分析显示, 几丁质酶第 18 家族 III 型主要聚为 2 大类群: 甲壳类和昆虫类, 三疣梭子蟹 *PtCht3* 能够很好地与甲壳类几丁质酶 Group 3 的其他成员聚为一类, 聚类顺序依次为中华绒螯蟹、锯缘青蟹、日本仿长额虾、日本囊对虾、日本沼虾、斑节对虾、凡纳滨对虾和中国明对虾等。这些高度保守的结构域和活性位点及进化分析表明, 三疣梭子蟹几丁质酶 *PtCht3* 确实是几丁质酶第 18 家族甲壳类几丁质酶 Group 3 的一员, 具有几丁质酶第 18 家族的一些功能, 如几丁质类食物的消化, 参与蜕皮过程(Coulson, 1994)。

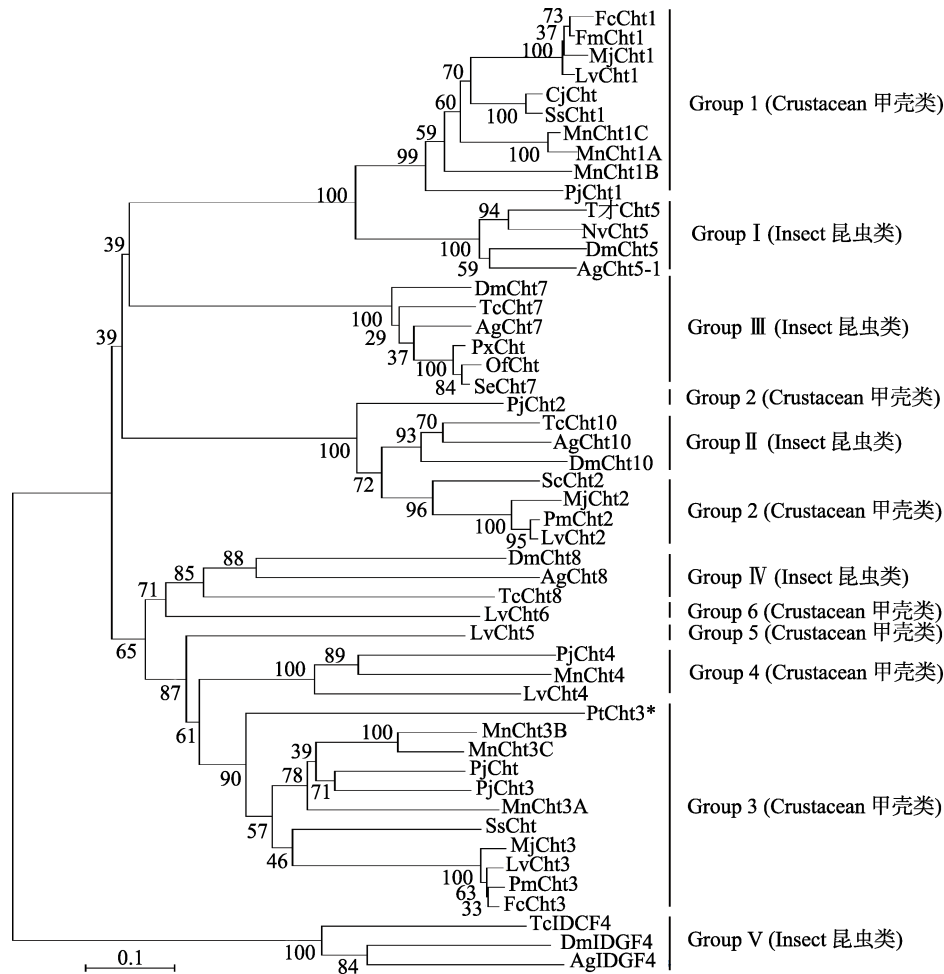


图 3 三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 PtCht3 的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic analysis of chitinase PtCht3 of *P. trituberculatus*

*: 三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 PtCht3; 各物种几丁质酶蛋白 Cht GenBank 登录号: 日本沼虾 Cht1A (KF466274.1)、Cht1B (KF466275.1)、Cht1C (AHL24866.1)、Cht3A (KF466276.1)、Cht3B (KF466277.1)、Cht3C (KF466278.1)、Cht4 (KF466279.1);

中国明对虾 Cht1 (ABB85237.1)、Cht3 (DQ000159.1); 斑节对虾 Cht1 (AAD40313.1)、Cht2 (ADG22164.1)、Cht3 (ADG22163.1); 锯缘青蟹 Cht (ABY85409.1)、Cht1 (ACG60512.1)、Cht2 (ACZ53950.1); 日本蟬 Cht (AFF59213.1)、Cht1 (BAA12287)、Cht2 (BAA14014)、Cht3 (BAA22854); 凡纳滨对虾 Cht1 (EU883591.1)、Cht2 (EU861222.1)、Cht3 (AAN74647.1)、Cht4 (FJ888480.1)、Cht5 (FJ888481.1)、Cht6 (GQ916594.1); 日本仿长额虾 Cht (AFC60660.1)、Cht1 (JF694836.1)、Cht2 (JN982965.1)、Cht3 (JF694838.1)、Cht4 (JF694837.1); 黑腹果蝇 Cht5 (NP_650314.1)、Cht7 (NP_647768.2)、Cht8 (NP_611542.1)、Cht10 (EAA46011.1); 赤拟谷盗 Cht5 (NP_001034524.1)、Cht7 (NP_001036035.1); 赤拟谷盗 Cht8 (NP_001036067.1)、Cht10 (NP_001038091.1); 冈比亚按蚊 Cht5-1 (HQ456129)、Cht7 (XP_308858.4)、Cht8 (XP_316448.2)、Cht10 (XP_317398.3); 丽蝇蛹集金小蜂 Cht5 (NP_001155084.1); 亚洲玉米螟 Cht (AGX32025.1); 小菜蛾 Cht (AFI55112.1); 甜菜夜蛾 Cht7 (AFM38213.1)

*: PtCht3 from *Portunus trituberculatus*. GenBank Accession Number of Cht: *Macrobrachium nipponense* Cht1A (KF466274.1), Cht1B (KF466275.1), Cht1C (AHL24866.1), Cht3A (KF466276.1), Cht3B (KF466277.1), Cht3C (KF466278.1), and Cht4 (KF466279.1); *Fenneropenaeus chinensis* Cht1 (ABB85237.1), and Cht3 (DQ000159.1); *Penaeus monodon* Cht1 (AAD40313.1), Cht2 (ADG22164.1), and Cht3 (ADG22163.1); *Scylla serrata* Cht (ABY85409.1), Cht1 (ACG60512.1), and Cht2 (ACZ53950.1); *Charybdis japonica* Cht (AFF59213.1), Cht1 (BAA12287), Cht2 (BAA14014), and Cht3 (BAA22854); *Litopenaeus vannamei* Cht1 (EU883591.1), Cht2 (EU861222.1), Cht3 (AAN74647.1), Cht4 (FJ888480.1), Cht5 (FJ888481.1), and Cht6 (GQ916594.1); *Pandalopsis japonica* Cht (AFC60660.1), Cht1 (JF694836.1), Cht2 (JN982965.1), Cht3 (JF694838.1), and Cht4 (JF694837.1); *Drosophila melanogaster* Cht5 (NP_650314.1), Cht7 (NP_647768.2), Cht8 (NP_611542.1), and Cht10 (EAA46011.1); *Tribolium castaneum* Cht5 (NP_001034524.1), Cht7 (NP_001036035.1), Cht8 (NP_001036067.1), and Cht10 (NP_001038091.1); *Anopheles gambiae* str. Cht5-1 (HQ456129), Cht7 (XP_308858.4), Cht8 (XP_316448.2), and Cht10 (XP_317398.3); *Nasonia vitripennis* Cht5 (NP_001155084.1); *Ostrinia furnacalis* Cht (AGX32025.1); *Plutella xylostella* Cht (AFI55112.1); *Spodoptera exigua* Cht7 (AFM38213.1)

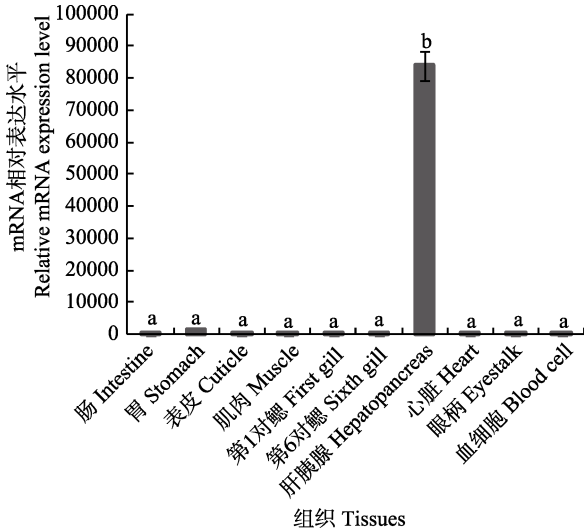


图 4 三疣梭子蟹 *PtCht3* 在不同组织中的表达分布
Fig.4 The distribution and relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in different tissues

不同组织表达量均以与血细胞相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different tissues in *P. trituberculatus* expression compared with blood cell

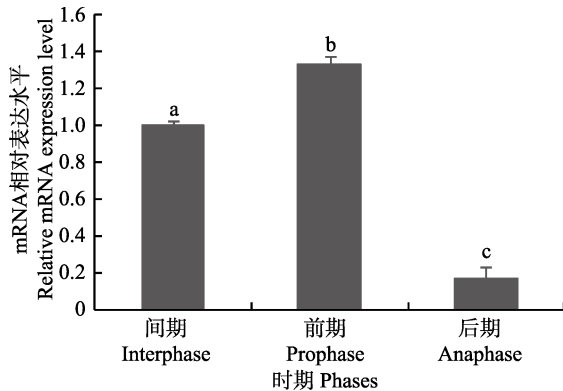


图 5 三疣梭子蟹蜕皮周期中 *PtCht3* 在肝胰腺中的表达
Fig.5 The relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in hepatopancreas during molting

肝胰腺各蜕皮时期表达量均以与肝胰腺间期相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different molting phases in *P. trituberculatus* expression compared with interphase in hepatopancreas

甲壳动物几丁质酶基因家族的不同成员在其蜕皮过程中发挥的作用也可能会不同(Broadway *et al.*, 1995)。中国明对虾几丁质酶基因 *FcCht1* 和 *FcCht3* 在中国明对虾蜕皮的不同阶段中呈现一定的波动变化(Priya *et al.*, 2009)。Zhang 等(2014)研究发现, 日本沼虾几丁质酶基因 *MnCht1A*、*MnCht1B* 和 *MnCht3B*

在蜕皮周期中发挥关键作用, *MnCht4* 在蜕皮过程中只起辅助作用。Zou(2009)研究发现, 中国明对虾的几丁质酶基因 *FcChi3* 在其整个蜕皮周期中都有表达, 并伴随着一定的波动性, 在蜕皮前期表达量较高。

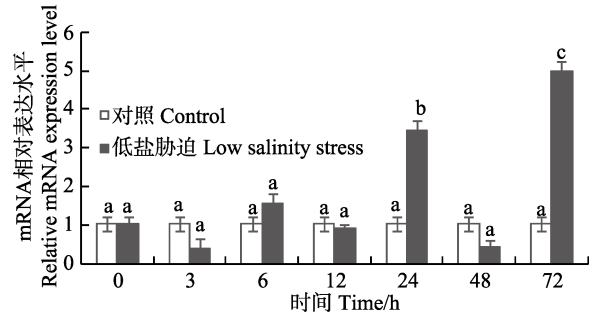


图 6 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCht3* 在第 6 对鳃中的表达
Fig.6 The relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in the sixth gill in response to the low salinity stress

低盐胁迫下各个时间点表达量均以与各时间点对照相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different points of time in *P. trituberculatus* expression compared with the control group under low salinity stress

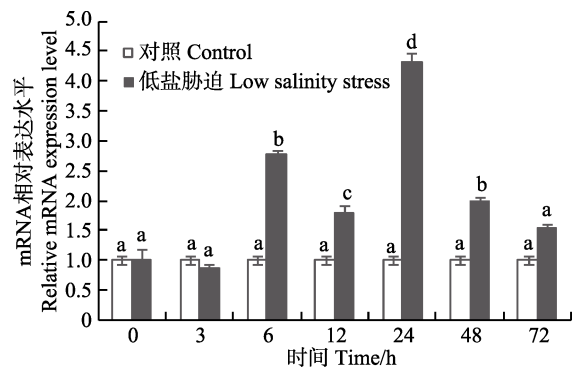


图 7 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCht3* 在肝胰腺中的表达
Fig.7 The relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in hepatopancreas in response to the low salinity stress

低盐胁迫下不同时间点的相对表达量均以与各时间点对照相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different time points in *P. trituberculatus* expression compared with the control group under low salinity stress

本研究组织表达分析显示, *PtCht3* 在各个组织中均有表达, 在肝胰腺中表达量最高, 具有较强的组织特异性, 差异显著($P<0.05$), 说明其主要功能很可能与三疣梭子蟹对几丁质类食物的消化相关。在肝胰腺中, *PtCht3* 在蜕皮后期表达量较低, 在间期表达量出现显著性提高, 到蜕皮前期表达量达到最大。在整个

蜕皮周期中, *PtCht3* 表达量整体呈上升趋势, 表明 *PtCht3* mRNA 的表达可能受到三疣梭子蟹蜕皮激素的调控, 进而辅助蜕皮作用的顺利进行。以上研究表明, *PtCht3* 在肝胰腺中的高表达量, 肝胰腺 *PtCht3* 在不同蜕皮阶段的表达量的显著变化, 进一步说明 *PtCht3* 可能与几丁质的消化相关, 作为几丁质类食物的消化酶基因, 参与了三疣梭子蟹的消化进程。与本研究结果相似的是, 日本对虾 (*Penaeus japonicus*) *PjChi-1* 和 *PjChi-2* (Watanabe *et al.*, 1996、1997)、斑节对虾 *PmCht1* (Tan *et al.*, 2000) 和 *PmCht2* (Enmin, 2009)、中国明对虾 (Priya *et al.*, 2009) *FcCht1* 和 *FcCht3*、日本沼虾 (Zhang *et al.*, 2014) *MnCht1A*、*MnCht1B* 和 *MnCht3B* 等几丁质酶基因在不同蜕皮阶段的表达量也表现出一定的波动变化, 与血淋巴中的蜕皮激素含量存在一定的相关性 (吕黎等, 2011)。几丁质酶亦存在于日本对虾肝胰腺中, 涉及到日本对虾几丁质酶类食物的消化 (Watanabe *et al.*, 1996、1998)。斑节对虾 *PmChi1* (Siok *et al.*, 2000) 与日本对虾 *PjChi-1* (Watanabe *et al.*, 1996) 高度同源, 亦是在肝胰腺中具有组织特异性, 被认为主要与几丁质类食物的降解有关。

盐度改变会启动甲壳动物的渗透压调节, 盐度的适度降低会导致其蜕皮周期缩短, 从而使蜕皮率增高, 进而促进其生长发育 (Mu *et al.*, 2005; Bray *et al.*, 1994; 王冲等, 2010), 而鳃是三疣梭子蟹进行呼吸和调节渗透压的主要作用器官 (韩晓琳等, 2014)。本实验室 Lv 等 (2013) 开展了三疣梭子蟹转录组的研究, 结果发现, 在低盐和高盐胁迫下, 三疣梭子蟹鳃中几丁质酶家族基因的表达量有显著差异。张凤等 (2015) 研究发现, 低盐胁迫下, 三疣梭子蟹几丁质酶 *PtCht* 在第 6 对鳃中的表达量出现了显著变化, 这些结果均暗示第 6 对鳃可能参与三疣梭子蟹渗透压调节进程。低盐胁迫下, *PtCht3* 基因的表达在第 6 对鳃中总体呈上升的趋势, 在 3、12、48 h 出现轻微的波动下调, 在肝胰腺中总体呈先上调后下调, 12 h 出现轻微波动的表达规律。综合分析第 6 对鳃和肝胰腺 *PtCht3* 基因表达情况, *PtCht3* 对低盐胁迫的应答快且敏感, 这表明了盐度影响了 *PtCht3* 的表达, 不管是第 6 对鳃还是肝胰腺, 可能参与了三疣梭子蟹抵抗低盐胁迫的渗透压调节进程。低盐胁迫下, *PtCht3* 在第 6 对鳃和肝胰腺中呈现出不同的表达趋势, 这可能表明 *PtCht3* 可能参与多种生理功能, 如渗透调节、内环境稳定、消化和发育, 并且在盐度变化时其表达可能会受到影响。

组织表达分布、蜕皮周期以及低盐胁迫实验表明, *PtCht3* 是一个很重要的几丁质酶, 既与几丁质类食物的消化相关, 又参与了三疣梭子蟹渗透压调节进

程, 其详细的作用机制尚需进一步探索。

参 考 文 献

- Bleau G, Massicotte F, Merlen Y, *et al.* Mammalian chitinase-like proteins. *EXS*, 1999, 87: 211–221
- Boot RG, Blommaert EF, Swart E, *et al.* Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9): 6770–6778
- Bray WA, Lawrence AL, Leung-Trujillo JR. The effect of salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, 1994, 122(2–3): 133–146
- Broadway RM, Williams DL, Kain WC, *et al.* Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 20(5): 271–276
- Chen SB, Wu GF. Recent progress on chitinase. *Bulletin of Science and Technology*, 2004, 20(3): 258–262 [陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展. 科技通报, 2004, 20(3): 258–262]
- Coulson AF. A proposed structure for ‘family 18’ chitinase: A possible function for narhonnin. *FEBS Letters*, 1994, 354(1): 41–44
- Duan YF, Liu P, Li JT, *et al.* Cloning and expression analysis of cathepsin L cDNA of *Exopalaemon carinicauda*. *Zoological Research*, 2013, 34(1): 39–46 [段亚飞, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析. 动物学研究, 2013, 34(1): 39–46]
- Han XL, Gao BQ, Wang HF, *et al.* Effects of low salinity stress on microstructure of gill and hepatopancreas and family survival rate of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 104–110 [韩晓琳, 高保全, 王好锋, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和肝胰腺显微结构及家系存活的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 104–110]
- Huang QS, Yan JH, Tang JY, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75–81
- Lv JJ, Liu P, Wang Y, *et al.* Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82155
- Lv L, Ning QJ. Recent progress on gene structure and functions of crustacean chitinase. *Progress in Physiological Sciences*, 2011, 42(6): 457–459 [吕黎, 宁黔冀. 甲壳动物几丁质酶基因结构与功能的研究进展. 生理科学进展, 2011, 42(6): 457–459]

- Mu YC, Wang F, Dong SL, *et al.* The effects of salinity fluctuation in different ranges on intermolt period and growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(2): 122–126
- Priya TA, Li F, Zhang J, *et al.* Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on E75 and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 121–129
- Proespraiwong P, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 156(2): 86–96
- Qian SH, Jiang HY, Jian YT, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75–81
- Shen J, Zhu DF, Hu ZH, *et al.* Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1481–1487 [沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. *水产学报*, 2011, 35(10): 1481–1487]
- Siok HT, Bernard MD, Sigrid AL. The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(2): 126–135
- Sui YM, Gao BQ, Liu P, *et al.* The tolerance to and optimal salinity for growth in swimming crab *Portunus trituberculatus* “Huangxuan No.1”. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(5): 398–401 [隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选1号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(5): 398–401]
- Tan SH, Degnan BM, Lehnert SA, *et al.* The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. *Marine Biotechnology*, 2000, 2: 126–135
- Techkarnjanaruk S, Goodman AE. Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S9. *Microbiology*, 1999, 145(4): 925–934
- Wang C, Jiang LX, Wang RJ, *et al.* Effect of abrupt and gradual changes in salinity on development and feeding in juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Fisheries Science*, 2010, 29(9): 510–514 [王冲, 姜令绪, 王仁杰, 等. 盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响. *水产科学*, 2010, 29(9): 510–514]
- Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Isolation of cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(4): 299–303
- Watanabe T, Kono M, *et al.* Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zoological Science*, 1997, 14(1): 65–68
- Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1382(2): 181–185
- Xu WF, Liu P, Li JT, *et al.* Cloning and expression of gene vasa during ovarian development cycle in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 574–582 [徐文斐, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) vasa 基因 cDNA 克隆及其在卵巢发育中的表达分析. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 574–582]
- Zhang F, Lv JJ, Liu P, *et al.* Cloning and expression of chitinase under low salinity stress during molting in *Portunus trituberculatus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 948–957 [张凤, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹几丁质酶基因克隆鉴定及在低盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 948–957]
- Zhang J, Sun Y, Li F, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of chitinase (Fcchi-3) from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 1913–1921
- Zhang SY, Jiang SF, Xiong YW, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167(1): 30–40
- Zou E. Effects of hypoxia and sedimentary naphthalene on the activity of N-acetyl- β -glucosaminidase in the epidermis of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 2009, 82(5): 579–582

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of the cDNA of *PtCht3* in *Portunus trituberculatus*

ZHANG Feng^{1,2,3}, LÜ Jianjian^{1,2}, LIU Ping^{1,2①}, GAO Baoquan^{1,2}, LI Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Portunus trituberculatus*, aka the swimming crab, is an important fishery species with high commercial value in China. They mainly inhabit the sandy and muddy bottom underneath the seawater in the coast of countries such as China, Japan and Korea. The growth and development of *P. trituberculatus* was characterized by periodic molting activities in which the new ectoskeleton grows while the old one molting. Previous studies reported that chitinase was an essential enzyme involved in the molting of crustaceans, and that it was required in chitin digestion and the immunity to the pathogen infection. However, little has been known about the effect of chitinase on molting activities, and the expression of the enzyme during rapid salinity stress is also obscure. To understand the biological function of *PtCht3* gene in *P. trituberculatus*, we cloned and analyzed the full-length cDNA sequence of *PtCht3* gene using SMARTTM RACE amplification kit. The cDNA sequence had 1409 bp encoding 394 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of the putative peptide was 4.80, and the predicted molecular mass was 43.67 kDa. PtCht3 could be a stable protein with the hydrophilic coefficient total average of -0.097. The homology and systematic evolution analysis revealed that PtCht3 of *P. trituberculatus* was highly homologous with the protein in other species; for example, it shared 54% similarity with *Pandalopsis japonica* and 53% similarity with *Eriocheir sinensis*. The phylogenetic analysis showed that *P. trituberculatus PtCht3* was in the same class as other arthropods' *PtCht3*. The expression of *PtCht3* in different tissues was analyzed with quantitative real-time PCR. We found that the highest expression level appeared in hepatopancreas, and that the expression was significantly up-regulated in the prophase of the molting cycle. In response to the low salinity stress the expression level fluctuated in gills and hepatopancreas, showing a general up-and-down pattern. Our results suggested that PtCht3 might play an important role in digestion and molting activities, and it could be involved in the regulation of osmotic pressure in *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; Chitinase; Moulting; Low salinity stress; Gene cloning; Tissue expression

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn