

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210427001

http://www.yykxjz.cn/

陈钰莹, 韩怡静, 刘相全, 何金霞, 杨顶珑. 皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白在免疫防御中的作用. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 234-242

CHEN Y Y, HAN Y J, LIU X Q, HE J X, YANG D L. A peptidoglycan recognition protein (PGRP) from *Haliotis discus hannai*: Possible roles in antibacterial properties. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 234-242

## 皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白在免疫防御中的作用\*

陈钰莹<sup>1,2,3</sup> 韩怡静<sup>3</sup> 刘相全<sup>2</sup> 何金霞<sup>2</sup> 杨顶珑<sup>3①</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006; 3. 中国科学院烟台海岸带研究所 山东 烟台 264003)

**摘要** 本研究从皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)中鉴定并克隆了一种肽聚糖识别蛋白(PGRP), 命名为 HdPGRP。HdPGRP 的 cDNA 全长为 1467 bp, 共编码 354 个氨基酸, 其中含有 1 个信号肽(1~18 氨基酸)、1 个 SH3b 结构域(93~160 氨基酸)、1 个 PGRP 结构域(179~322 氨基酸)和 1 个 Ami\_2 结构域(191~332 氨基酸)。此外, 在 HdPGRP 序列中发现了 4 个保守的 Zn<sup>2+</sup>结合位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup> 和 C<sup>330</sup>)以及 5 个保守的酰胺酶催化位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup>、T<sup>328</sup> 和 C<sup>330</sup>)。经多序列比对和系统发育树分析, 表明 HdPGRP 属于短型 PGRP 家族成员。在健康鲍鱼中, *hdpgpr* 主要在肝胰腺中表达, 其次依次在血细胞、外套膜和鳃中。在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后, 血细胞中的 *hdpgpr* 表达量在 72 h 内呈现先上升后下降的趋势, 在 24 h 表达量达到最高。SDS-PAGE 结果显示, 重组 HdPGRP (rHdPGRP)的分子量为 30 kDa。rHdPGRP 表现为 Zn<sup>2+</sup>依赖酰胺酶活性, 可催化降解不溶性肽聚糖。此外, rHdPGRP 对革兰氏阳性菌藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)具有显著的抑制作用, 且这种抑制作用可能与其酰胺酶活性有关。本研究表明, HdPGRP 在机体抵御入侵细菌等免疫防御中起重要作用。

**关键词** 皱纹盘鲍; 肽聚糖识别蛋白; 免疫防御

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0234-09

免疫识别是先天免疫的第一道防线, 通过模式识别蛋白(pattern recognition proteins, PRPs)结合微生物表面高度保守的病原相关分子结构, 如细菌中的脂多糖、肽聚糖, 真菌中的  $\beta$ -1,3-葡聚糖以及病毒双链 RNA 等(Huang *et al*, 2019; Li *et al*, 2020; Rout *et al*, 2020)。目前, 已在无脊椎动物中鉴定出肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)、C1q 结构域蛋白、NOD2、革兰氏阴性菌结合蛋白、含硫酯键蛋白、Toll 样受体、脂多糖和(或) $\beta$ -1,3 葡聚糖结

合蛋白和清道夫受体等多种 PRPs, 它们对入侵病原微生物的免疫识别及应答起重要作用(曹丹丹等, 2018; Wang *et al*, 2013; Gerdol *et al*, 2015)。

PGRPs 首次在家蚕(*Bombyx mori*)的血淋巴和角质层中被鉴定, 它能特异性结合肽聚糖, 并触发酚氧化酶级联反应(Li *et al*, 2020)。随后, 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中成功克隆出 PGRP 后, 其他无脊椎动物的 PGRPs 也相继被鉴定克隆(Hu *et al*, 2020)。在结构上, PGRP 包含一个保守的肽聚糖结合

\* 国家自然科学基金(41806196)、山东省自然科学基金(ZR2019BD022)和烟台市科技发展计划(2020MSGY066)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41806196), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019BD022), Yantai Science and Technology Development Project (2020MSGY066)]. 陈钰莹, E-mail: c19121695907@163.com

① 通信作者: 杨顶珑, 副研究员, E-mail: dlyang@yic.ac.cn

收稿日期: 2021-04-27, 收修改稿日期: 2021-06-15

2型酰胺酶结构域,也被称为PGRP结构域,它能够水解N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic)和L-丙氨酸(L-alanine)之间的酰胺键,以达到抗菌目的(Zaidman-Rémy *et al*, 2006; Mellroth *et al*, 2006)。根据PGRPs分子量及结构的不同,可将其分为短型(PGRP-S)、中间型(PGRP-I)和长型(PGRP-L)3类(Dziarski, 2004)。PGRPs在抵御病原菌的先天免疫中具有多种功能,其中,识别并结合细菌肽聚糖是其最基本的功能(Yang *et al*, 2010)。另外,PGRPs可作为免疫识别蛋白激活免疫通路(Wei *et al*, 2018),通过诱导细菌的氧化应激、硫醇应激和金属应激等作为直接杀菌剂(Kashyap *et al*, 2014; Hu *et al*, 2020),此外,PGRPs可作为调理素来诱导凝集或吞噬作用(Coteur *et al*, 2007; Yang *et al*, 2019)。

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是我国重要的海水养殖经济贝类,主要分布在辽东半岛和山东半岛(姜向阳等, 2021)。自20世纪80年代以来,由于病原菌入侵,尤其是弧菌的感染造成人工养殖和野生鲍鱼出现大规模死亡,其中鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)通过产生热稳定和热不稳定的毒素使宿主发病,导致全球鲍鱼产量大幅下降(王瑞旋等, 2006; 何婷婷, 2018; 吴富村等, 2020)。因此,研究免疫相关分子的特性对鲍鱼养殖业的疾病控制和健康管理具有重要意义。迄今为止,已在软体动物中鉴定出100多种PGRPs,如大竹蛭(*Solen grandis*)中的SgPGRP-S1(Wei *et al*, 2018),仿刺参(*Apostichopus japonicus*)中的AjPGRP-S(Hu *et al*, 2020)。然而,目前对鲍鱼中PGRP功能的认识还很有限。本研究从皱纹盘鲍中鉴定了一种PGRP(命名为HdPGRP),并对其组织分布、入侵病原菌时的转录表达模式、抗菌活性等进行研究,以更好地了解鲍鱼对病原体入侵的免疫应答反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 鲍鱼选取及细菌刺激

选取平均壳长为60 mm的皱纹盘鲍,在海水中驯养1周(20℃~22℃),将300只鲍鱼平均分为6组。其中3组分别用鳃弧菌( $1 \times 10^7$  CFU/mL)进行浸泡刺激,每组分别在0、3、6、12、24、48和72 h时随机选6个个体的血淋巴,2600 r/min离心10 min,获得血细胞。另外3组为对照组,每组随机选取6个个体的血细胞、外套膜、鳃、肝胰腺和肌肉进行hdpgpr的组织特异性表达分析。

### 1.2 总RNA的提取及cDNA的合成

使用TRIzol (Invitrogen, 美国)从鲍鱼血细胞、外套膜、鳃、肝胰腺和肌肉中提取总RNA,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量后,用2 μg总RNA和0.5 mmol/L Oligo (dT) 70℃热变性5 min后逆转录合成cDNA。反应体系(25 μL):已完成变性的RNA,5 μL dNTPs,1 μL RNase抑制剂(Promega, 美国),1 μL M-MLV逆转录酶(Promega, 美国)以及5 μL 5×M-MLV反应缓冲液,加无RNA酶水至25 μL。

### 1.3 hdpgpr基因的克隆

通过对本实验室构建的皱纹盘鲍cDNA文库中EST序列进行BLAST分析,得到皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白的EST序列。以P1、P2为正向引物(表1),Oligo (dT)为反向引物,进行巢式PCR扩增hdpgpr的3'端。步骤如下:加入聚合酶延长变性(94℃ 5 min);94℃ 50 s,58℃ 45 s,72℃ 30 s,35次循环扩增;PCR产物经凝胶纯化后,连接到pMD18-T载体(TaKaRa, 大连)进行测序。将原始EST序列与扩增片段重叠得到hdpgpr的全长cDNA。

表1 实验所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
P1	AAGCCCCTTCTTCCATTGTT	3' RACE
P2	CTACGCATTCATCCACCACG	3' RACE
P3	CGTGAAACTCGCCCATACTCCG	Real-time PCR
P4	CGCCGATGACGAAACTGTAGCC	Real-time PCR
P5	CACGGGTATTGTTCTGGACTCTG	$\beta$ -actin
P6	ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCACGTC	$\beta$ -actin
P7	ACATTCGACTGTGTCTGCGCCAC	基因重组
P8	TCACTATTTTGTGCTTGGGATGACAGG	基因重组
dT	GGCCACGCGTCGACTAGTACT <sup>17</sup>	Oligo (dT)

## 1.4 生物信息学分析

用 BLAST 算法对 *hdpgpr* 的 cDNA 序列进行分析, 并通过 ExPASy (expert protein analysis system) 推导出蛋白序列进行分析。使用 SMART (simple modular architecture research tool) 预测蛋白结构域。采用 ClustalW 软件进行多序列比对。利用 MEGA 4.0 软件的邻位连接(neighbor-joining, NJ)算法构建系统发育树(重复 1000 次)。

## 1.5 *hdpgpr* mRNA 的转录表达

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析 *hdpgpr* mRNA 的转录表达。用基因特异性引物(P3、P4, 表 1) 扩增 *hdpgpr* 片段,  $\beta$ -actin 作为内参基因, 以 1.2 所合成的 cDNA 为模板, 使用 7500 Fast Real-time PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)进行 qRT-PCR。反应程序: 94°C, 5 min 变性; 94°C 50 s, 60°C 60 s, 72°C 50 s 循环 40 次, 72°C 延伸 10 min。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 *hdpgpr* mRNA 的相对表达水平(Livak *et al.*, 2001)。所有数据以 mRNA 相对表达量的平均值  $\pm$  标准差(Mean  $\pm$  SD,  $n=6$ ) 表示, 采用 SPSS 16.0 软件对所得数据进行统计学分析,  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 1.6 HdPGRP 的重组表达

用一对特异性引物(P7 和 P8, 表 1) 扩增 *hdpgpr*, 然后将 PCR 产物克隆到 pEASY-blunt E1 表达载体(Transgen Biotech, 中国)。在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中表达重组质粒, 经 IPTG 诱导后, 用 15% SDS-PAGE 检测蛋白表达结果。重组蛋白 HdPGRP (rHdPGRP) 用  $\text{Ni}^{2+}$  螯合 Sepharose 柱纯化, 然后用梯度尿素-TBS 甘油缓冲液(10% 甘油, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 透析复性。用 BCA 法测定重组蛋白的浓度(Smith *et al.*, 1985)。

## 1.7 酰胺酶活性

参照 Mellroth 等(2003)的方法测定 rHdPGRP 对肽聚糖的相对酶活性。将不溶于水的肽聚糖(来自金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 1 mg/mL) 分别溶解于 HEPES 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl), HEPES-ZnCl<sub>2</sub> 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>) 和 HEPES-ZnCl<sub>2</sub> EDTA 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L EDTA) 并加入 rHdPGRP (50  $\mu\text{g/mL}$ ),

其中以 PBS 缓冲液作为阴性对照。在 120 min 内每隔 15 min 检测 OD<sub>540 nm</sub> 值。

## 1.8 rHdPGRP 的抑菌活性

将藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) 培养至对数期, 用培养基稀释至  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL。在 100  $\mu\text{L}$  的细菌悬液中加入 rHdPGRP (终浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 设含 10 mmol/L ZnCl<sub>2</sub> 和不含 ZnCl<sub>2</sub> 2 组。无 rHdPGRP 的细胞悬液作为阴性对照。220 r/min, 37°C 振荡培养, 每隔 1 h 测定 OD<sub>600 nm</sub> 值。

## 2 结果

### 2.1 *hdpgpr* 的 cDNA 克隆及序列分析

*hdpgpr* 的 cDNA 全长为 1467 bp, 共编码 354 个氨基酸, 在 GenBank 数据库中编号为 MZ150581。通过 ExPASy 分析, HdPGRP 含有 1 个糖基化位点(N<sup>133</sup>), 用 SMART 软件预测, HdPGRP 含有 1 个信号肽(1~18 氨基酸)、1 个 SH3b 结构域(93~160 氨基酸)、1 个 PGRP 结构域(179~322 氨基酸) 和 1 个 Ami<sub>2</sub> 结构域(191~332 氨基酸) (图 1), 说明 HdPGRP 可能分泌到细胞外识别并结合肽聚糖。多序列比对分析结果表明, HdPGRP 与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) (58%, XP\_034310518) 和光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*) (55%, NP\_001298227) 的 PGRPs 之间具有高度相似性, 且 HdPGRP 有 4 个保守的  $\text{Zn}^{2+}$  结合位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup> 和 C<sup>330</sup>) 以及 5 个保守的酰胺酶催化位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup>、T<sup>328</sup> 和 C<sup>330</sup>) (图 2)。采用 MEGA 4.0 软件的邻接法构建的系统发育树显示, PGRPs 分为 3 个分支: 短型 PGRPs (PGRP-S)、中长型 PGRPs (PGRP-I) 和长型 PGRPs (PGRP-L), HdPGRP 与太平洋牡蛎等其他海洋无脊椎动物的 PGRPs 聚于短型 PGRPs (图 3)。

### 2.2 *hdpgpr* 的组织表达及在鳗弧菌刺激后血细胞中的表达

利用 qRT-PCR 技术对鲍鱼各组织中 *hdpgpr* 转录表达进行分析。*hdpgpr* 在所有被检测的组织中均有表达, 其中, *hdpgpr* 主要分布于肝胰腺, 其次为血细胞、外套膜和鳃, 在肌肉中表达量最低(图 4)。在鳗弧菌刺激后, 血细胞中 *hdpgpr* 表达量在 3—48 h 内显著升高 ( $P < 0.01$ ), 并在 24 h 时达到最大值, 是对照组的 9.4 倍 ( $P < 0.01$ ), 随后, *hdpgpr* 表达量下降, 在 72 h 时, *hdpgpr* 水平与对照组相比无显著差异, 说明 *hdpgpr* 表达恢复至正常水平(图 5)。

```

1 CTTCAATTGAGCTGGGACTCGCTGAAGATGTCCTAGTTATTGTCTCCCTTGTCTGGCACTCAGCAGTCCGGCA
      M S L V I V S L V L A L S S P A
76 TGGACAGCTCCAGCTAGCCAGTGCATGTGCGTCTGTAGACTGTGATTGAGCGGTATTCCGGTCCCAGGAC
17 W T A P A S Q C A C A S V D T V I E R V F G S Q D
151 AACAGTTTTGGGACTCAGTTCGCCGAGTTGTCTCCCGTATCAAGGAGACCAGAAGGCCATCAATGACGGTCCG
42 N S F G T L S S P S C L P Y Q G D Q K A I N D G R
226 ATATACGCCCATGTGTTGATCAGGACAGAGTGCCTGGTGTGACGTCTGATATCTACATCAAGAATTGTCAT
67 I Y A H V L Y Q G Q S A W L L T S D I Y I K N C H
301 GAAACATTCGACTGTGTCTGCCACGGCTGCGGTAGATGTCTTGACTGGATATGAAACCGGAAGTACTACAATG
92 E T F D C V C A T A A V D V L T G Y G T G S T T M
376 ACGACCTTGACCTCCGGTCAAGTGTGACCTTCAGGGGAAGACGTACAACCTCACTGCAGGGACTGGATACAA
117 T T L T S G Q C V T L Q G K T Y N S T A G T W I Q
451 GTCACGCCAACAACAAGTCCGGATGATTAAGAAAGGGAATGTTGTTCCATGAGAATTGTGGAGGCCATTCA
142 V N A N N K V G W I K K G N V V F H E N C G G H S
526 CAAGCCCTTCTCCATTGTTCAACTGCCCGGATGTCTAAAATCATAACACGTGCAGAGTGGGGAGCACGTGCA
167 Q A P S S I V Q L P G C P K I I T R A E W G A R A
601 CCAAGCACTTACACGTGAACTCGCCATACTCCGTACTACGCATTCATCCACCACGGTGCAGACAGCAGGTGT
192 P S T S H V K L A H T P Y Y A F I H H G A T A G C
676 TATACACGAGAAGAATGTGTCAGGATGATACAGAGCTATCAGAACTTTCATGGACGGACACGGCTGGTCCGAC
217 Y T R E E C V R M I Q S Y Q N F H M D G H G W S D
751 ATCGGCTACAGTTTCGTATCGGCGAGGACGGCAACGTGTACGAGGGCGTGGCTGGGATGCTGTGGGGCACAC
242 I G Y S E V I G E D G N V Y E G R G W D A V G A H
826 ACCTACAACACACAGTAGAGGACTTGGGTCTGCGTCACTGGGAACCTCATGCAGCGTCTCCACGCCAGGGC
267 T Y N Y N S R G I G F C V I G N F M Q R L P R Q A
901 GCACGGGATGTCTCCAGAAGATTATAGCTGCGGGGTCAGCAACGGCAAACTGACGTCCACGTACACGATGCTT
292 A R D V L Q K I I A C G V S N G K L T S T Y T M L
976 GGCCACGGGACGTGGTGTGTCATCAGGTCTACGTCTGTCCAGGGATATGTTCTATGCCCTCATAACAAC
317 G H R D V G A A S G S T S C P G D M F Y A L I Q N
1051 TGGCCCCATTATAACGCGCTGTATCCCAAGCACAAAAAGAAACAATCAAGATATTAGCAATAAAACATATC
342 W P H Y N A P V I P S T K *
1126 TGATATATATTACATATTTAAAGAATGTCGACTTTTTAAATCTTTTCATCCCATTTGGCTTATGCATCAT
1201 AATTATTCTAAATGATTTAAGGCAGCATGGACTATTAATAGCAGCATGTATCAACTATTTCTTATTAATCTTTC
1276 TTGATCCCAATCACATGATTTACAAAACATATAAAATATATATCTTTATCATTATCTGCGTTTTCATGTTATT
1351 TTACCATATTTCAATCAGTACATCAGTACATCCAAAATGTATACATATGTCAATATGTCCGTACAACGTTTATTCAT
1426 CACTACATCAACTACTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 HdPGRP 核酸及推导的氨基酸序列

Fig.1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of HdPGRP

加粗: 起始密码子和终止密码子; 方框: 糖基化位点; 下划线: 信号肽; 深灰色阴影: SH3b 结构域; 波浪线: PRGP 结构域; 浅灰色阴影: Ami\_2 结构域。

Bold: Initial codon and termination codon; Box: Glycosylation sites; Underline: Signal peptide; Dark grey shadow: SH3b domain; Wave line: PRGP domain; Light gray shadow: Ami\_2 domain.

### 2.3 rHdPGRP 蛋白的制备

用 IPTG 对含 HdPGRP 重组质粒的表达菌株 BL21(DE3)进行诱导表达, SDS-PAGE 显示, 位于 30 kDa 处出现 1 条与预期重组蛋白大小一致的条带。经 Ni<sup>2+</sup>螯合琼脂糖柱纯化并复性后的 rHdPGRP 蛋白条带单一, 约 30 kDa (图 6)。

### 2.4 酰胺酶和抗菌活性测定

酰胺酶活性是 PGRP 水解不溶性肽聚糖的 N-乙酰胞壁酸和 L-丙氨酸之间肽键, 从而降解肽聚糖的一种活性。结果显示, 在 Zn<sup>2+</sup>存在的情况下, rHdPGRP 对肽聚糖显示出较高的降解活性, 在 120 min 内 OD<sub>540 nm</sub> 从 0.268 降到 0.142。与含 Zn<sup>2+</sup>组相比, 不含 Zn<sup>2+</sup>组

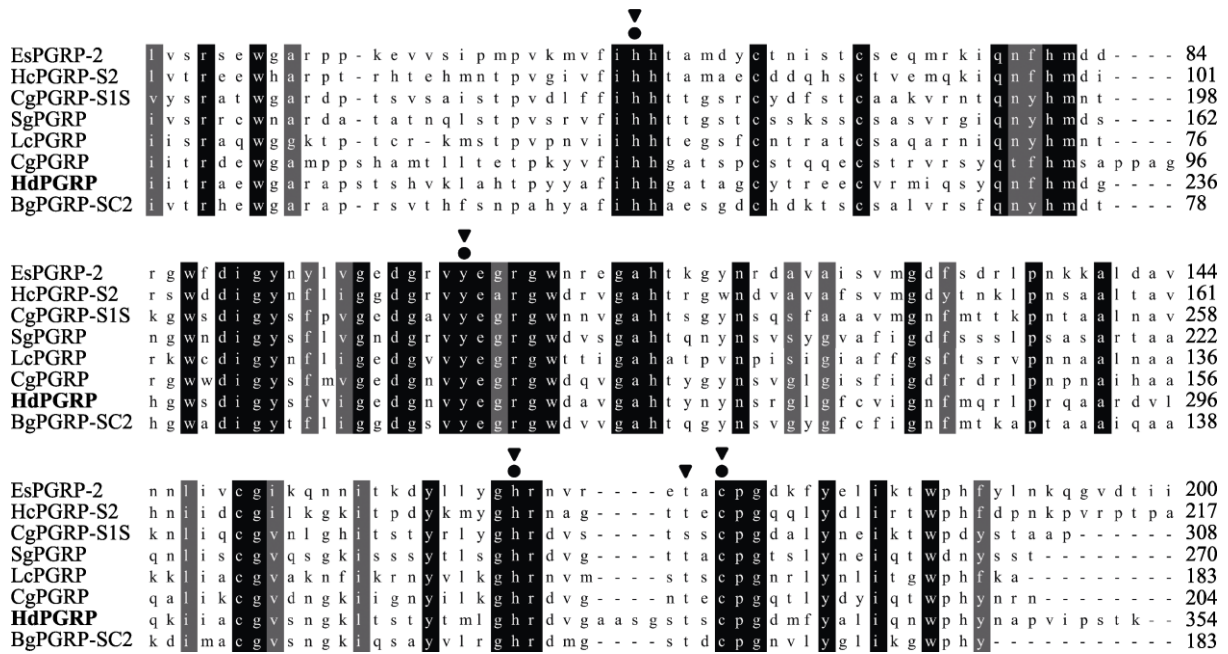


图 2 HdPGRP 与其他物种中 PGRPs 的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignments of HdPGRP with PGRPs in other animals

PGRPs 来源及 GenBank 登录号如下：夏威夷短尾鲉(EsPGRP-2, AAY27974)、三角帆蚌(HcPGRP-S2, AHK22786)、太平洋牡蛎(CgPGRP-S1S, BAG31896; CgPGRP, XP\_034310518)、大竹蛭(SgPGRP, AEW43446)、豹蛙(LcPGRP, PIO34231)、光滑双脐螺(BgPGRP, NP\_001298227)。圆形：Zn<sup>2+</sup>结合位点；三角形：酰胺酶催化位点。

The PGRPs source and GenBank number are as follows: *Euprymna scolopes* (EsPGRP-2, AAY27974), *Hyriopsis cumingii* (HcPGRP-S2, AHK22786), *Crassostrea gigas* (CgPGRP-S1S, BAG31896; CgPGRP, XP\_034310518), *Solen grandis* (SgPGRP, AEW43446), *Lithobates catesbeianus* (LcPGRP, PIO34231), *Biomphalaria glabrata* (BgPGRP, NP\_001298227). Round: Zn<sup>2+</sup> binding site; Triangle: Amidase catalytic site.

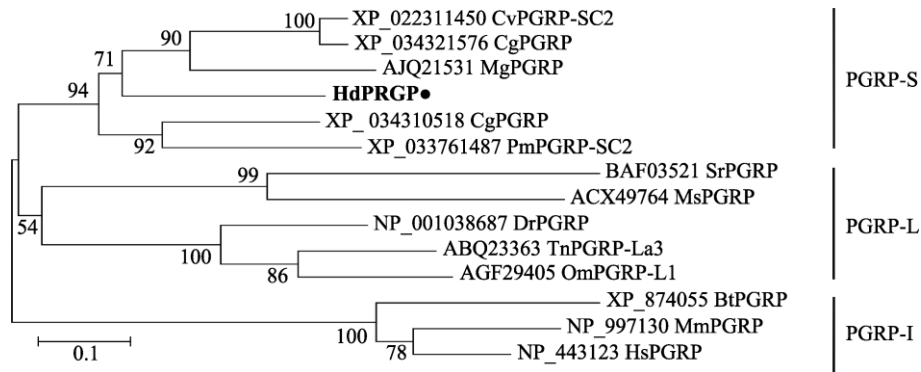


图 3 HdPGRP 的 N-J 进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of HdPGRP

利用 MEGA 4.0 软件，采用邻接法构建系统发育树，重复 1000 次。PGRPs 来源及 GenBank 登录号如下：美洲牡蛎(CvPGRP-SC2, XP\_022311450)、太平洋牡蛎(CgPGRP-SC2, XP\_034321576; CgPGRP, XP\_034310518)、紫贻贝(MgPGRP-C, AJQ2153)、欧洲扇贝(PmPGRP-SC2, XP\_033761487)、印度蚕(SrPGRP, BAF03521)、烟草天蛾(MsPGRP, ACX49764)、斑马鱼(DrPGRP, NP\_001038687)、黑斑鲷(TnPGRP-La3, ABQ23363)、虹鳟(OmPGRP-L1, AGF29405)、牛(BtPGRP-4, XP\_874055)、鼠(MmPGRP-3, NP\_997130)、人(HsPGRP-3, NP\_443123)。

Using MEGA 4.0 software, the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method and repeated 1000 times. The PGRPs source and GenBank number are as follows: *Crassostrea virginica* (CvPGRP-SC2, XP\_022311450), *Crassostrea gigas* (CgPGRP-SC2, XP\_034321576; CgPGRP, XP\_034310518), *Mytilus galloprovincialis* (MgPGRP-C, AJQ2153), *Pecten maximus* (PmPGRP-SC2, XP\_033761487), *Samia ricini* (SrPGRP, BAF03521), *Manduca sexta* (MsPGRP, ACX49764), *Danio rerio* (DrPGRP, NP\_001038687), *Tetraodon nigroviridis* (TnPGRP-La3, ABQ23363), *Oncorhynchus mykiss* (OmPGRP-L1, AGF29405), *Bos taurus* (BtPGRP-4, XP\_874055), *Mus muscu* (MmPGRP-3, NP\_997130), *Homo sapiens* (HsPGRP-3, NP\_443123).



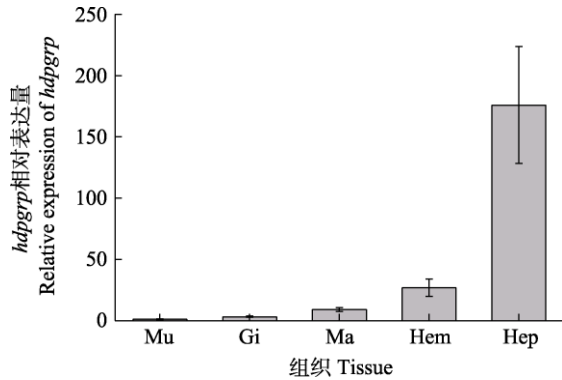


图 4 不同组织中 *hdpgrp* 的相对表达量(平均值±标准差, n=6)

Fig.4 Relative expression levels of *hdpgrp* in different tissues (Mean±SD, n=6)

Mu: 肌肉; Gi: 鳃; Ma: 外套膜; Hem: 血细胞; Hep: 肝胰腺。  
 Mu: Muscle; Gi: Gills; Ma: Mantle;  
 Hem: Hemocytes; Hep: Hepatopancreas.

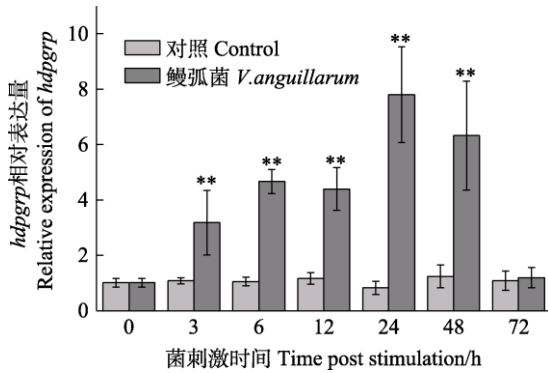


图 5 鳃弧菌刺激后血细胞中 *hdpgrp* 的相对表达量(平均值±标准差, n=6)

Fig.5 Relative expression levels of *hdpgrp* in hemocytes after *V. anguillarum* stimulation (Mean±SD, n=6)

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

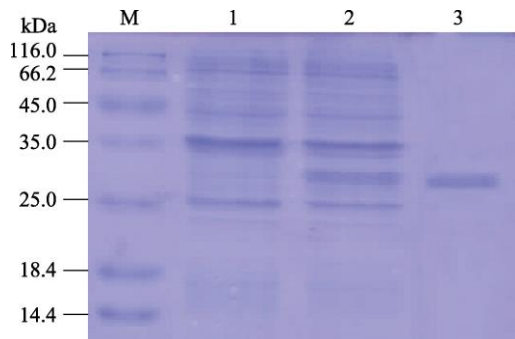


图 6 rHdPGRP 的 SDS-PAGE 分析  
 Fig.6 SDS-PAGE analysis of rHdPGRP

泳道 M: 标准蛋白分子量标记物; 泳道 1: 阴性对照(未诱导); 泳道 2: 诱导大肠杆菌表达 rHdPGRP; 泳道 3: 纯化的 rHdPGRP。

Lane M: Marker; Lane 1: rHdPGRP in *E. coli* without induction; Lane 2: Induced rHdPGRP in *E. coli*; Lane 3: Purified rHdPGRP.

和  $Zn^{2+}$ -EDTA 组的 rHdPGRP 对肽聚糖的降解活性明显降低(图 7)。表明 rHdPGRP 的酰胺酶活性是  $Zn^{2+}$  依赖型。rHdPGRP 对革兰氏阳性菌藤黄微球菌的抑制实验显示, 在  $Zn^{2+}$  存在情况下, 经 rHdPGRP 孵育后, 藤黄微球菌的生长被强烈抑制(图 8), 然而, 在无  $Zn^{2+}$  的情况下, rHdPGRP 对其生长的抑制作用减弱(图 8)。

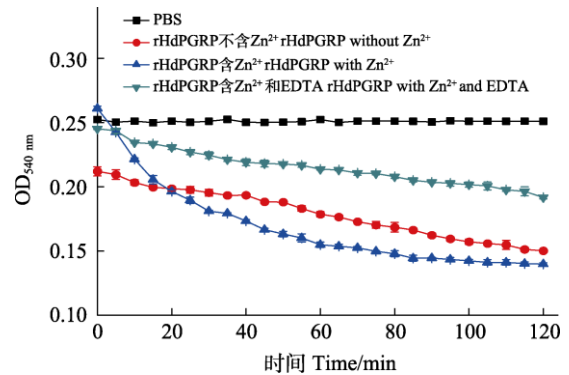


图 7 rHdPGRP 的酰胺酶活性  
 Fig.7 Amidase activity of rHdPGRP

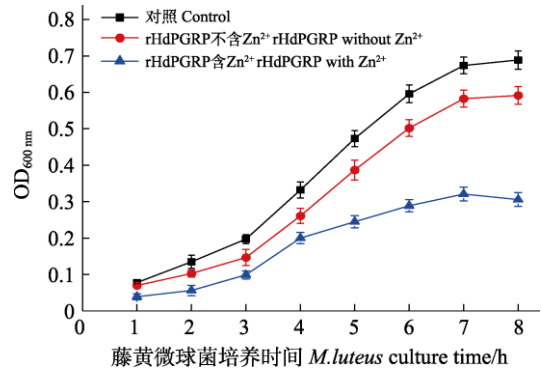


图 8 rHdPGRP 的抗菌活性(平均值±标准差, n=3)  
 Fig.8 Antibacterial activity of rHdPGRP (Mean±SD, n=3)

### 3 讨论

皱纹盘鲍作为一种海洋无脊椎动物, 被认为缺乏复杂的适应性免疫, 它们主要由先天免疫发挥机体防御, 需要通过一些模式识别蛋白来识别异己, 进而抵御外界病原菌的入侵。PGRP 作为特异性识别肽聚糖的模式识别蛋白, 在抵御以肽聚糖为细胞壁主要成分的微生物的免疫反应中发挥重要作用(Wei *et al*, 2018; Yang *et al*, 2019; 杨嘉龙, 2011)。本研究从皱纹盘鲍中鉴定了一种 PGRP, 并对其在组织中的分布情况、病原菌入侵时转录表达模式以及抗菌活性进行了研究。

多序列比对结果显示, HdPGRP 与其他软体动物的 PGRPs 具有高度的相似性, PGRP 结构域与噬菌体

的 T3 溶菌酶同源, 表明 HdPGRP 具有抗菌和凝集作用。此外, HdPGRP 中还发现了 SH3b 结构域, 在细菌蛋白中发现的 SH3 结构域同源物能介导不同的生理过程, 如增加局部蛋白浓度, 改变其亚细胞位置, 并介导大型多蛋白复合物的组装(Huang *et al.*, 2019; Morton *et al.*, 1994)。这些结构特征表明, HdPGRP 可能具有细菌识别和清除的效应功能。值得注意的是, 在软体动物中发现的 PGRPs 均为短型, 说明软体动物 PGRPs 介导的免疫防御机制可能与非软体动物不同。

鲍鱼属于半开放循环系统, 易受到多种微生物的侵入。在本研究中, 尽管 *hdpgpr* 在所测组织中均有表达, 但在不同组织其表达量完全不同, 表现出一定的组织特异性。与三角帆蚌的 *pgrps* 类似(Huang *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2014), *hdpgpr* 主要在皱纹盘鲍肝胰腺中表达, 而在日本盘鲍(*Haliotis discus discus*)中发现的另一种短型 *pgrp* 主要在血淋巴中表达(Premachandra *et al.*, 2014)。类似地, 在太平洋牡蛎中, *cgpgpr-s11* 和 *cgpgpr-s3* 分别在外套膜和消化盲囊中的表达量最高(Itoh *et al.*, 2008)。在大竹蛭中, *sgpgpr-s1* 主要在肌肉和肝胰腺中表达, 而 *sgpgpr-s2* 主要在鳃和外套膜中表达(杨顶珑, 2014)。不同病原菌引发的病害不同, *pgrps* 在不同的组织中选择性表达, 表明 PGRPs 有可能针对不同病原菌进行特异性识别。鳃弧菌作为皱纹盘鲍的一种重要致病菌, 通过产生热稳定和热不稳定的毒素使宿主发病(王瑞旋等, 2006), 在鳃弧菌刺激后, 血细胞中 *hdpgpr* 的表达显著升高, 并在 24 h 时达到最高, 可能是鳃弧菌细胞壁中的肽聚糖被 PGRP 识别, 进行信号传递并触发免疫反应(Hu *et al.*, 2020)。

PGRPs 具有酰胺酶活性, 通过水解连接 L-丙氨酸和 N-乙酰胞壁酸之间的酰胺键降解肽聚糖, 防止细菌过度激活免疫系统(Zaidman-Rémy *et al.*, 2006; Premachandra *et al.*, 2014; 杨嘉龙, 2011)。前期研究表明, 存在 4 个保守的  $Zn^{2+}$  结合残基是 PGRP 酰胺酶活性能够被激活的前提(Hu *et al.*, 2020), 与此相一致的是, HdPGRP 也鉴定出 4 个保守的  $Zn^{2+}$  结合位点(H<sup>210</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup> 和 C<sup>330</sup>)。在  $Zn^{2+}$  存在的情况下, 肽聚糖被 rHdPGRP 显著降解, 这与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (Yang *et al.*, 2010) 和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的酰胺酶活性一致(Yang *et al.*, 2019)。研究表明, PGRPs 通过酰胺酶活性降解细胞壁上的肽聚糖, 细胞壁的损伤抑制细菌的生长, 从而发挥一定的抗菌作用(Hu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2003)。藤黄微球菌作为革兰氏阳性菌, 其细胞壁成分主要为肽聚糖, 本研究发现, rHdPGRP 在  $Zn^{2+}$  的作用下显著抑制藤黄微球菌的生长, 这表明 HdPGRP 对藤黄微球

菌的抑菌活性是通过酰胺酶活性实现的。

## 4 结论

本研究在皱纹盘鲍中鉴定了一种新的模式识别蛋白(HdPGRP), 对其在免疫防御中的作用进行了初步研究。HdPGRP 在进化及结构上较为保守, 具有保守的  $Zn^{2+}$  结合位点和酰胺酶催化位点。*hdpgpr* 在血细胞及各组织中均有表达, 血细胞中的 *hdpgpr* 能够响应鳃弧菌刺激显著上调, 表明其可能参与皱纹盘鲍抗细菌免疫防御。此外, 证实了 HdPGRP 具有酰胺酶活性, 对微生物病原菌具有一定的抗菌活性。这些结果为了解 HdPGRP 的功能特性及其在皱纹盘鲍免疫防御机制中的作用提供了基础依据。

## 参 考 文 献

- CAO D D, LIU J X, WANG Z G, *et al.* Expression analysis and functional characterization of *NOD2* in the resistance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 53–64 [曹丹丹, 刘金相, 王志刚, 等. 牙鲆 *NOD2* 基因的表达分析及在抗迟缓爱德华氏菌感染过程中的功能. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 53–64]
- COTEUR G, MELLROTH P, LEFORTERY C D, *et al.* Peptidoglycan recognition proteins with amidase activity in early deuterostomes (Echinodermata). *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, 31(8): 790–804
- DZIARSKI R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology*, 2004, 40(12): 877–886
- GERDOL M, VENIER P. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 17–38
- HE T T. Comparative study on immunological responses of Pacific abalone and its hybrids with green abalone under *Vibrio harveyi* stress. Master's Thesis of Xiamen University, 2018 [何婷婷. 哈维氏弧菌胁迫下不同规格皱纹盘鲍和绿盘鲍免疫应答研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2018]
- HU Z G, CAO X B, GUO M, *et al.* Identification and characterization of a novel short-type peptidoglycan recognition protein in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 99: 257–266
- HUANG Y, PAN J L, LI X G, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a short peptidoglycan recognition protein from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 86: 571–580
- ITOH N, TAKAHASHI K G. Distribution of multiple

- peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(4): 409–417
- JIANG X Y, YU G L, SONG X K, *et al.* Survey and evaluation of the Qianliyan national aquatic germplasm reserve. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 1–7 [姜向阳, 于广磊, 宋秀凯, 等. 千里岩海域国家级水产种质资源保护区现状调查与评价. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 1–7]
- KASHYAP D R, ROMPCA A, GABALLA A, *et al.* Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress. PLOS Pathogens, 2014, 10(7): e1004280
- LI X, YUAN S, SUN Z S, *et al.* Gene identification and functional analysis of peptidoglycan recognition protein from the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Fish and Shellfish Immunology, 2020, 106: 1014–1024
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Methods, 2001, 25(4): 402–408
- MELLROTH P, KARLSSON J, STEINER H. A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(9): 7059–7064
- MELLROTH P, STEINER H. PGRP-SB1: An *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase with antibacterial activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 350(4): 994–999
- MORTON C J, CAMPBELL I D. SH3 Domains: Molecular 'Velcro'. Current Biology, 1994, 4(7): 615–617
- PREMACHANDRA H K A, ELVITIGALA D A S, WHANG I, *et al.* Identification of a novel molluscan short-type peptidoglycan recognition protein in disk abalone (*Haliotis discus discus*) involved in host antibacterial defense. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 39(1): 99–107
- ROUT A K, PARAMANIK S, DEHURY B, *et al.* Elucidating the molecular interaction of zebrafish (*Danio rerio*) peptidoglycan recognition protein 2 with diaminopimelic acid and lysine type peptidoglycans using in silico approaches. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020, 38(12): 3687–3699
- SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 1985, 150(1): 76–85
- TAO Y, YANG Z Y, ZHANG X, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression of the peptidoglycan recognition protein gene HcPGRP1 and its isoform HcPGRP1a from the freshwater mussel *Hyriopsis cumingi*. Genetics and Molecular Biology, 2014, 37(3): 508–517
- WANG R X, XU L W, FENG J, *et al.* Advances in studies on diseases caused by microorganisms of abalone. Transactions of Oceanology and Limnology, 2006, 90(2): 117–124 [王瑞旋, 徐力文, 冯娟, 等. 鲍类微生物性疾病研究进展. 海洋湖沼通报, 2006, 90(2): 117–124]
- WANG X W, WANG J X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 981–989
- WANG Z M, LI X N, COCKLIN R R, *et al.* Human peptidoglycan recognition protein-L is an *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(49): 49044–49052
- WEI X M, YANG D L, LI H Y, *et al.* Peptidoglycan recognition protein of *Solen grandis* (SgPGRP-S1) mediates immune recognition and bacteria clearance. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 73: 30–36
- WU F C, QUE H Y, ZHANG G F. History, current status, and future development of the Pacific abalone seed release and sea ranching in China. Marine Sciences, 2020, 44(8): 56–68 [吴富村, 阙华勇, 张国范. 我国皱纹盘鲍底播增殖历史、现状及未来发展趋势. 海洋科学, 2020, 44(8): 56–68]
- YANG D L, HAN Y J, LIU Y L, *et al.* A peptidoglycan recognition protein involved in immune recognition and immune defenses in *Ruditapes philippinarum*. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 88: 441–448
- YANG D L. Study on the immune defense functions of peptidoglycan recognition protein in razor clam (*Solen grandis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [杨顶珑. 大竹蛏肽聚糖识别蛋白的免疫防御功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- YANG J L, WANG W, WEI X M, *et al.* Peptidoglycan recognition protein of *Chlamys farreri* (CfPGRP-S1) mediates immune defenses against bacterial infection. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(12): 1300–1307
- YANG J L. Study on the mechanism of immune response mediated by key pattern recognition receptors in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011 [杨嘉龙. 栉孔扇贝关键模式识别受体介导的免疫应答机制研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011]
- ZAIDMAN-RÉMY A, HERVÉ M, POIDEVIN M, *et al.* The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. Immunity, 2006, 24(4): 463–473



## A Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) from *Haliotis discus hannai*: Possible Roles in Antibacterial Properties

CHEN Yuying<sup>1,2,3</sup>, HAN Yijin<sup>3</sup>, LIU Xiangquan<sup>2</sup>, HE Jinxia<sup>2</sup>, YANG Dinglong<sup>3①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai, Shandong 264006, China; 3. Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

**Abstract** In this study, peptide PGRP (designated HdPGRP) was identified and characterized from the abalone *Haliotis discus hannai*. Multiple alignments and phylogenetic analyses strongly suggested that HdPGRP is a new member of the PGRP superfamily and belongs to the short PGRP family, similar to peptides from other marine mollusks. The full length of HdPGRP is 1467 bp, encoding a polypeptide of 354 amino acids (aa) with a signal peptide (1~18 aa), an SH3b domain (93~160 aa), a typical PGRP domain (179~322 aa), and an Ami\_2 domain (191~322 aa). In addition, four conserved Zn<sup>2+</sup>-binding sites (H<sup>209</sup>, Y<sup>255</sup>, H<sup>318</sup>, and C<sup>330</sup>) and five conserved amide-catalysis sites (H<sup>209</sup>, Y<sup>255</sup>, H<sup>318</sup>, T<sup>328</sup>, and C<sup>330</sup>) were found in the HdPGRP sequence. In abalone, *hdprp* exhibited different tissue expression patterns, and was strongly expressed in the hepatopancreas, moderately expressed in hemocytes, mantle, and gills, and slightly expressed in muscle. *Vibrio anguillarum* is one of the main pathogens of *H. discus hannai*; after *V. anguillarum* infection, expression of *hdprp* in hemocytes showed a trend of first increasing and then decreasing, reaching a maximum at 24 h. Subsequently, expression of HdPGRP decreased, and there was no significant difference compared with the control group at 72 h, demonstrating that expression of HdPGRP had returned to normal levels. SDS-PAGE results showed that recombinant HdPGRP (rHdPGRP) has a molecular mass of 30 kDa, which is in line with the value predicted for HdPGRP. PGRPs usually have amidase activity, degrading peptidoglycan by hydrolyzing the amide bond that links peptide units to muramic acid residues of glycan strands. rHdPGRP exhibited Zn<sup>2+</sup>-dependent amidase activity and catalyzed the degradation of insoluble peptidoglycan. In addition, rHdPGRP exhibited significant antibacterial activity against the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* in the logarithmic phase in the presence of Zn<sup>2+</sup>, indicating that the antibacterial activity of HdPGRP might be dependent on amidase activity. In summary, HdPGRP plays an important role in PGRP-mediated antibacterial mechanisms, especially for eliminating invading bacteria.

**Key words** *Haliotis discus hannai*; Peptidoglycan recognition protein; Immune response

① Corresponding author: YANG Dinglong, E-mail: dlyang@yic.ac.cn