

## 近江牡蛎 C 型凝集素 CRD 结构域 PAMPs 结合谱及抑菌活性

王翠丽<sup>1,2</sup>

(1. 南宁师范大学地理与海洋研究院, 广西南宁 530000; 2. 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室, 广西南宁 530000)

**摘要** [目的]揭示 C 型凝集素(CTL)在近江牡蛎固有免疫防御机制中的重要作用。[方法]采用基因克隆、蛋白表达等技术进行试验。[结果]克隆获得 1 种近江牡蛎 CTL 基因,其 CDS 区 1 350 bp,编码 449 个氨基酸,含 1 个 CRD 结构域,Ca<sup>2+</sup>结合位点 2 关键氨基酸基序为 QPS/WH D;CTL mRNA 相对表达呈组织差异分布,肝胰腺、外套膜、血细胞表达量较高,其次为鳃、肌肉柱、卵巢,唇瓣表达量最少;CTL 的 CRD 结构域体外重组蛋白具有 LPS、PGN 和 glucan 3 种 PAMPs 结合活性,能结合、抑制和杀死革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌、革兰氏阴性菌中的大肠杆菌和鳃弧菌,能结合、抑制但不能杀死毕赤酵母和耶罗维亚酵母。[结论]近江牡蛎 CTL 的 CRD 结构域具有较广泛的 PAMPs 结合谱和抑菌活性,在其固有免疫防御机制中可发挥识别、结合、抑制和杀死多种有害菌的重要作用。

**关键词** 近江牡蛎;C 型凝集素;CRD 结构域;PAMPs 结合谱;抑菌活性

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)16-0068-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.16.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### PAMPs Binding Spectrum and Antibacterial Activity of C-type Lectin CRD Domain from *Crassostrea rivularis*

WANG Cui-li<sup>1,2</sup> (1. Institute of Geography and Oceanography, Nanning Normal University, Nanning, Guangxi 530000; 2. Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Nanning, Guangxi 530000)

**Abstract** [Objective] In order to reveal the important role of CTL in the innate immune defense mechanism of *Crassostrea rivularis*. [Method] Gene cloning and protein expression else techniques were used in the experiment. [Result] The results showed that CTL was cloned by gene cloning. Its CDS region was 1 350 bp, encodes 449 amino acids. CRD domain was found in CTL gene, with QPS/WH D key motif in Ca<sup>2+</sup> binding site 2. Quantitative real-time PCR was employed to analyze CTL mRNA level. Relative mRNA levels of CTL were the highest expression in hepatopancreas, mantle, haemocytes, followed by gill, muscle column, ovary. Relative mRNA levels of CTL was the lowest expression in lip flap. The CRD domain recombinant protein of CTL had the binding activity of LPS, PGN and glucan. The CRD domain recombinant protein of CTL could inhibit and kill *Staphylococcus aureus* which belong to gram positive bacteria, could inhibit *Bacillus coli* and *Vibrio anguillarum* which belong to gram negative bacteria, but could not inhibit and kill *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. [Conclusion] The CRD domain of CTL in *Crassostrea rivularis* has a wide range of PAMPs binding spectrum and antibacterial activity. It can play an important role in identifying, binding, inhibiting and killing a variety of harmful bacteria in its inherent immune defense mechanism.

**Key words** *Crassostrea rivularis*; C-type lectin; CRD domain; PAMPs binding spectrum; Bacteriostatic activity

近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)属无脊椎(*Invertebrate*)双壳纲(*Bivalvia*)贝类,自身缺乏获得性免疫,单纯依靠固有免疫系统防御疫害。C 型凝集素(C-type lectin, CTL)是固有的免疫重要因子<sup>[1]</sup>,可通过糖识别域(carbohydrate recognition domain, CRD)中 Ca<sup>2+</sup>结合位点 2 氨基酸残基的侧链羰基与微生物表面 N-氨基半乳糖或甘露糖等结合形成复合物,激活下游信号传递,促进机体对外来入侵病原微生物清除,因此 Ca<sup>2+</sup>结合位点 2 氨基酸基序可决定 CTL 的糖结合活性和特异性<sup>[2-5]</sup>。

已有研究显示,脊椎动物 CTL 中 Ca<sup>2+</sup>结合位点 2 第 1 位氨基酸基序为 EPN(谷氨酸-脯氨酸-天冬酰胺)或 QPD(谷氨酰胺-脯氨酸-天冬氨酸),而无脊椎动物除了以上 2 种,还可以是 EPD(谷氨酸-脯氨酸-天冬氨酸)<sup>[6]</sup>、QPG(谷氨酰胺-脯氨酸-甘氨酸)<sup>[7]</sup>、QPS(谷氨酰胺-脯氨酸-丝氨酸)<sup>[8]</sup>和 YPD(酪氨酸-脯氨酸-天冬氨酸)<sup>[9]</sup>等;其第 2 位关键氨基酸基序也不局限于脊椎动物的 WND(色氨酸-天冬酰胺-天冬氨酸),而可以是 WHD(色氨酸-组氨酸-天冬氨酸)、WSD(色氨酸-丝氨酸-天冬氨酸)、WID(色氨酸-异亮氨酸-天冬氨酸)和 WRD(色氨酸-精氨酸-天冬氨酸)<sup>[10]</sup>等。推测无脊椎动物 Ca<sup>2+</sup>结合位点 2 氨基酸基序的多样性将赋予其更广泛

和更多样化的糖结合活性。因此,笔者以近江牡蛎为研究对象,开展了 CTL 的 CRD 病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)结合谱及抑菌活性研究,试验首先克隆其 CTL 基因,明确 CRD 结构域及 Ca<sup>2+</sup>结合位点 2 氨基酸基序;其次通过体外重组 CTL 的 CRD 结构域蛋白,揭示其 PAMPs 结合谱及抑菌活性;研究结果将为深入了解 CTL 在无脊椎动物近江牡蛎固有免疫防御机制中的重要作用提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物。**近江牡蛎成贝(约 2 年龄)采自广西钦州湾茅尾海的 2 个养殖区(108°35'08"E, 21°43'00"N 和 108°51'58"E, 21°39'21"N),养殖海水条件:温度分别为 31.5℃和 31.7℃,盐度分别为 17.7‰和 17.9‰,pH 分别为 7.72 和 7.81,电导率分别为 28.86 和 29.17 μs/cm。样品采集完毕立即送回实验室处理。

**1.1.2 主要试剂。**Trizol 试剂,购自 MRC 公司;氯仿、异丙醇、乙醇,购自中国医药集团有限公司;DEPC 水,购自北京索莱宝科技有限公司;QIA quick Gel Extraction 试剂盒,购自 QIAGEN 公司; rTaq E、10×PCR Buffer、2.5 mmol/L dNTP、DNA Marker 2000、PMD19-T Vectors,购自 TaKaRa 公司;DH5α 感受态细胞、X-gal、IPTG、氨苄青霉素,购自北京全式金公司;TIAN Script RT cDNA 第一链合成试剂盒,购自康为试剂公司;SYBR® Select Master Mix 试剂盒,购自 ABI 公司;Anti-6x His

**基金项目** 广西自然科学基金青年基金项目(2018GXNSFBA281137);

广西自然科学基金面上基金项目(2020GXNSFAA159088)。

**作者简介** 王翠丽(1982—),女,内蒙古呼伦贝尔人,助理研究员,博士,从事贝类免疫学研究。

**收稿日期** 2021-10-21

tag antibody 一抗、Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) 二抗, 购自 Abcam 公司; 毕赤酵母、耶罗维亚酵母、金黄色葡萄球菌、鳃弧菌、大肠杆菌及所用扩增引物, 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.3 主要仪器。**涡旋振荡仪(型号为 QL-902), 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 酶标仪(型号为 Bio-Rad iMark)、电泳仪(型号为 Powerpac HV 164-5056)、梯度热循环仪(型号为 T100TM), 购自 Bio-Rad 公司; 高速离心机(型号为 5415D)、离心机(型号为 mini spin plus)、紫外分光光度计(型号为 Bio Photometer), 购自 Eppendorf 公司; 超微量紫外分光光度计(型号为 NanoDrop-1 000), 购自 NanoDrop 公司; 全自动凝胶成像系统(型号为 Syngene Genius), 购自 Syngene 公司; 低温恒温槽(型号为 DC-1006), 购自无锡沃信仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪(型号为 7500 FAST), 购自 IBM 公司; 生物安全柜(型号为 HF Safe 760S), 购自 Heal Force 公司; 电热恒温鼓风干燥箱(型号为 DHG-9070A), 购自上海精宏设备有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因克隆。**依据 GenBank 数据库中已登录的长牡蛎基因组(登录号: CGI\_10009560) 中查询获得其 CTL 基因序列, 利用在线生物信息学软件设计近江牡蛎 CTL 基因 RT-

PCR 引物(表 1)。Trizol 提取近江牡蛎组织样本中总 RNA, 超微量紫外分光光度计测定总 RNA 质量和浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性; TIAN Script RT cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录, 操作按产品说明书进行; PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

**1.2.2 表达谱分析。**运用 Trizol 法分别提取近江牡蛎成贝肝胰腺、外套膜、血细胞、鳃、肌肉柱、卵巢和唇瓣组织样品总 RNA, 分别取 1.0  $\mu\text{g}$  总 RNA 分别进行反转录制备 cDNA 模板, 各组织样品设置 6 个平行样品。根据笔者克隆所得近江牡蛎 CTL 的 CDS 区序列(登录号: MZ411536) 和 GenBank 数据库已登录  $\beta$ -actin(登录号: AF026063) 序列, 设计 Q-PCR 引物(表 1), 采用 7500 FAST 荧光定量 PCR 检测系统(Applied Bio systems) 进行分析,  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算近江牡蛎 CTL mRNA 相对表达结果。

**1.2.3 体外重组 CTL 的 CRD 结构域蛋白。**将 CTL/pMD19-T 和 pET30a 载体用 NdeI 和 HindIII 双酶切, 将近江牡蛎 CTL 的 CRD 结构域目的片段与 pET30a 载体连接并转化至感受态细胞 BL21 中, 重组质粒鉴定阳性表达克隆子(CTL/pET30a); 鉴定完毕将质粒二次转化至感受态细胞 BL21 中, 分时间段 IPTG 诱导表达, 收集菌体, 诱导表达产物 SDS-

表 1 近江牡蛎 CTL 引物

Table 1 Primers for CTL in *C. rivularis*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物长度 Product length//bp	登录号 Gen Bank
CTL RT-PCR	Forward: 5'-AAGGCCAACCGCGAGAA-3' Reverse: 5'-ATGGGGGAGGGCATACC-3'	1 350	CGI_10009560
CTL Q-PCR	Forward: 5'-GCCACCAACCACCACCTCTA-3' Reverse: 5'-CTGCAACAAAGCCTGCCTTT-3'	176	MZ411536
$\beta$ -actin Q-PCR	Forward: 5'-GTGCTACGTTGCCCTGGACTT-3' Reverse: 5'-TCGCTCGTTGCCAATGGTGAT-3'	115	AF026063

PAGE 检测, 考马斯亮蓝染色确定最佳诱导时间; 在最佳诱导时间大量诱导表达, 分离包涵体, 过镍柱, 尿素透析蛋白复性; BSA 标准品加入考马斯亮蓝染色液, 测定不同浓度 BSA 标准品的 595 nm 的光吸收值, 绘制标准曲线; 测定 CTL 的 CRD 结构域重组蛋白在 595 nm 的光吸收值, 依据所建标准曲线计算蛋白浓度。

**1.2.4 CRD 结构域重组蛋白 PAMPs 结合谱。**CRD 结构域重组蛋白 PAMPs 识别谱检测方法参照文献[11]的方法: 将 PGN、LPS 和 glucan 溶解于 pH 9.8  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  中, 酶标仪每孔含 10  $\mu\text{g}$  溶质, 4  $^\circ\text{C}$  包被过夜, PBST 洗板 3 次; 酶标仪每孔加入 3% BSA 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  封闭 30 min, PBST 洗板 1 次; 酶标仪每孔加入不同稀释浓度的 CRD 重组蛋白, 18  $^\circ\text{C}$  孵育 3 h, PBST 洗板 1 次; 酶标仪每孔加入 Anti-6x His tag antibody 一抗(稀释比例 1:1 000), 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h, PBST 洗板 1 次; 酶标仪每孔加入 Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) 二抗(稀释比例 1:2 000), 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h; 酶标仪每孔加入 100  $\mu\text{L}$  HRP 底物 TMB 溶液, 避光 37  $^\circ\text{C}$  反应 10 min, 加入 2 mol/L 硫酸 50  $\mu\text{L}$  终止反应; 读取酶标仪 OD<sub>450</sub> 值。依据 ELISA 试剂盒说明书规定: 样品 OD<sub>450</sub> 吸光度值/阴性对照 OD<sub>450</sub> 吸光度值  $\geq 2.1$  判定为阳性,

该试验中阴性对照 OD<sub>450</sub> 吸光度值平均为 0.04, 则  $0.04 \times 2.1 = 0.084$ , 该值即为阴性和阳性分界点值, 样品值  $\geq 0.084$ , 即判为阳性。

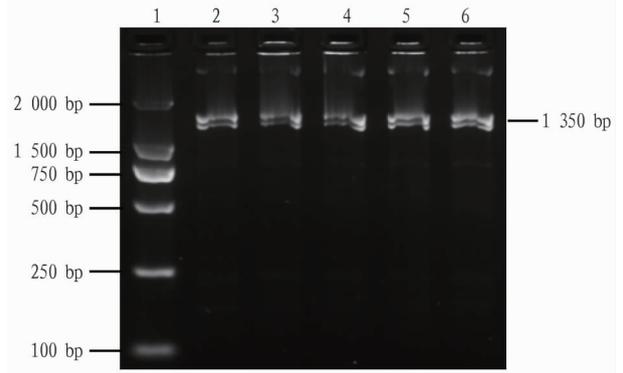
**1.2.5 CRD 结构域重组蛋白菌结合活性。**CRD 结构域重组蛋白菌结合活性检测方法参照 Lee 等<sup>[12]</sup>的方法: 革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌, 革兰氏阴性菌大肠杆菌和鳃弧菌, 毕赤酵母和耶罗维亚酵母, 分别挑菌接种到 LB 液体培养基中, 毕赤酵母和耶罗维亚酵母 28  $^\circ\text{C}$  200 r/min 过夜培养, 金黄色葡萄球菌、鳃弧菌和大肠杆菌 37  $^\circ\text{C}$  200 r/min 过夜培养; 离心收集菌体, PBS 缓冲液调整浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL; 吸取 1 mL 各菌液悬液分别与 100  $\mu\text{g}$  CRD 结构域重组蛋白混合, 室温旋转孵育; 离心收集菌体, PBS 缓冲液洗涤菌体, 无菌水重悬; 各菌体加入蛋白电泳缓冲液, 95  $^\circ\text{C}$  水浴 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳后凝胶转 NC 膜, PBST 缓冲液漂洗 1 次; NC 膜 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, PBST 漂洗 1 次; NC 膜 Anti-6x His tag antibody 一抗(稀释比例 1:1 000) 室温孵育 1 h, PBST 漂洗 1 次; NC 膜 Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) 二抗(稀释比例 1:2 000) 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 1 次; ECL 显影, 拍照记录结果。

**1.2.6 CRD 结构域重组蛋白抑菌活性。**CRD 重组蛋白抑菌活性检测方法参照 Zhou 等<sup>[13]</sup>的方法:10 mmol/L 磷酸钠缓冲液稀释革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、革兰氏阴性菌大肠杆菌和鳗弧菌、毕赤酵母和耶罗维亚酵母,使得光密度达 0.001 8。按照 1:1 比例将细菌稀释液与 CRD 结构域重组蛋白混合在 96 孔培养板中培养。培养 12 h 后,以无菌超纯水代替 CRD 结构域重组蛋白作为空白对照,与等量培养液混合培养基设为阴性对照,测试最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。

## 2 结果与分析

**2.1 基因克隆** 克隆获得 1 种 CTL 基因(图 1),测序分析显示:CTL 基因 CDS 区共 1 350 bp(包括终止密码),编码 449 个氨基酸。Signal IP 软件预测其多肽链 N-端含有 1 段 24 个氨基酸的信号肽;SMART 网站预测其多肽链包含 1 个胞外段 110 个氨基酸 CRD 结构域;CRD 结构域含  $Ca^{2+}$  结合位点 2

氨基酸基序 QPS/WHD 及 3 个保守的半胱氨酸残基(图 2)。



注:泳道 1.DNA Mark;泳道 2~6.目标 DNA

Note:Lane 1.DNA Mark;Lane 2~6.Target DNA

图 1 近江牡蛎 CTL 基因琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of CTL in *C.rivularis*

*MGSLDRCPSVFNRVGEYKTEHGDMCYIFINTEKTWVDARQH***C***WSWGGELIMIKNQEK*  
*MNFVIHTLNSVLRWRNNGVWIGAHDRNGKGWEWTTGKELTRGYWARG***QPS***TIAGI*  
*SIED***C***ALMRRGDGWR***WHD***YHC***D***SSLFYTYKFCQYRKLPTTTSSSTTTTMTPLPS*  
*TTTSTSTTTVSSRIYSYTTTEKIEPELINVKFQKAGFVADKLSQGEGSVSSVVGESGA*  
*NNSNKDTG*

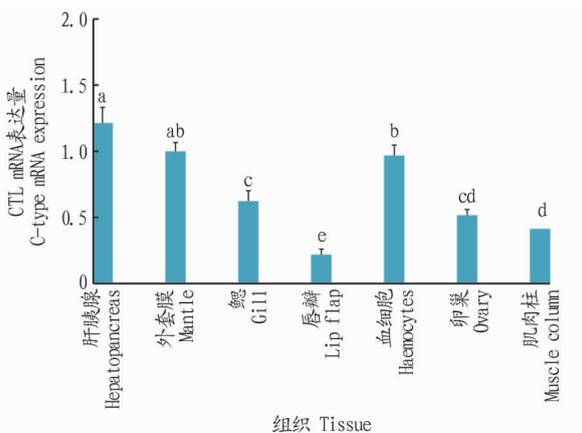
注:信号肽由斜体标识;CRD 结构域用下滑线标识; $Ca^{2+}$  结合位点 2 氨基酸基序用矩形框标识;CRD 结构域内保守 Cys 用斜体红色字母“C”标识

Note:The signal peptide was identified by italics;CRD domain was identified by slide lines;amino acid sequences of  $Ca^{2+}$  binding site 2 were identified by rectangular box;conservative Cys of CRD domain was identified by italic red letter “C”

图 2 近江牡蛎 CTL 基因部分序列

Fig.2 Partial sequences of CTL in *C.rivularis*

**2.2 组织表达谱** 荧光定量 PCR 检测,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算近江牡蛎 CTL mRNA 相对表达谱,结果显示:CTL mRNA 在肝胰腺、外套膜、鳃、唇瓣、血细胞、卵巢、肌肉柱组织中均有表达,并呈组织差异分布。肝胰腺、外套膜和血细胞中表达量多,其次为鳃、肌肉柱和卵巢,唇瓣表达量最少(图 3)。



注:不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )

Note:Different lowercase letters indicate significant difference between groups( $P < 0.05$ )

图 3 近江牡蛎 CTL 基因组织表达谱

Fig.3 CTL relative mRNA levels in tissue of *Crassostrea rivularis*

**2.3 CRD 结构域重组蛋白** 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD

结构域重组蛋白被诱导表达,分子量约为 27.45 kD,利用 Ni-NTA 对重组蛋白进行纯化,结果表明:蛋白纯度较高,尿素浓度梯度对变性蛋白进行复性(图 4,5),保存于  $-80^{\circ}C$  备用。

**2.4 CRD 结构域重组蛋白 PAMPs 结合谱** 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白 PAMPs 识别谱结果如图 6 所示。当 CRD 结构域重组蛋白浓度为  $55 \mu g/mL$  时,具有 LPS、PGN 和 glucan 3 种 PAMPs 结合活性,其中对 LPS 的结合能力最强,差异显著( $P < 0.05$ )。

**2.5 CRD 结构域重组蛋白菌结合谱** 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白能够结合 2 种真菌:毕赤酵母(图 7 泳道 2)和耶罗维亚酵母(图 7 泳道 3);1 种革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌(图 7 泳道 4);2 种革兰氏阴性菌:鳗弧菌(图 7 泳道 5)和大肠杆菌(图 7 泳道 6)。

**2.6 CRD 结构域重组蛋白抑菌活性** 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白抑菌活性结果见表 2。分析表 2 可知,C 型凝集素 CRD 结构域重组蛋白能抑制和杀死革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌、革兰氏阴性菌中的大肠杆菌和鳗弧菌;能抑制但不能杀死毕赤酵母和耶罗维亚酵母。

## 3 讨论

笔者在无脊椎贝类近江牡蛎中克隆获得一种 CTL 分子,其 CRD 结构域  $Ca^{2+}$  结合位点 2 第一氨基酸基序为 QPS,这有别于脊椎动物,但在其他贝类中出现过类似现象。如脊椎动

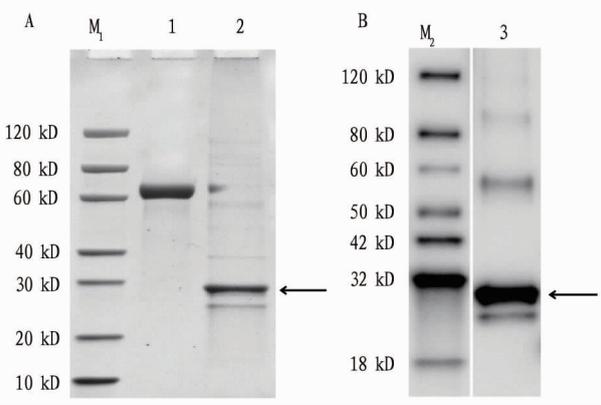
NdeI--ATG--CDS2--His tag--Stop codon--HindIII

Protein Length=242 MW=27450.5 Predicted pI=8.38 vector: pET30a

MGSLDRCPSVFNVRVGEYKTEHGDMCYIFINTEKTWVDARQHCWSWGELIMIKNQEKMFVIHTLNSVLRWRNNGVWIGADRNG  
 KGWEWTTGEKLRGYWARGQPSTIAGISIEDCALMRRGDGWRWHDYHCDSSLFYTYKFCQYRKLPTTSTSTTTTMTVPLPST  
 TTSTSTTVSSRIYSYTTTEKIEPELINVKFQKAGFVADKLSQGEVSSVVGESGANNKNDTGHHHHHH...

图 4 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白氨基酸序列

Fig.4 Amino acid sequences of CRD domain recombinant protein of CTL in *C.rivularis*



注: A. SDS - PAGE; B. Western blot; M<sub>1</sub>. 蛋白 Marker ( Cat. No. M00516); M<sub>2</sub>. 蛋白 Marker ( Cat. No. M00521); 泳道 1. BSA (2 μg); 泳道 2,3.目标蛋白

Note: A. SDS-PAGE; B. Western blot; M<sub>1</sub>. Protein Marker ( Cat. No. M00516); M<sub>2</sub>. Protein Marker ( Cat. No. M00521); Lane 1. BSA (2μg); Lane 2,3.Target protein

图 5 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白

Fig.5 CRD domain recombinant protein of CTL in *C.rivularis*

lis) 中发现过<sup>[8]</sup>。上述氨基酸的直接取代将导致 Ca<sup>2+</sup> 结合位点 2 质子供体和质子受体之间发生变化,可能会影响糖结合活性和抑菌特异性<sup>[16]</sup>。近江牡蛎 CRD 结构域 Ca<sup>2+</sup> 结合位点 2 第二氨基酸基序是 WHD,同样有别于脊椎动物保守的 WND,这一变化同样在其他贝类中有过报道。对于脊椎动物第二氨基酸基序 WND 的研究已证实其作用是当 CRD 与配体结合时起辅助作用<sup>[3,16-17]</sup>,对于无脊椎贝类中多种多样的第二氨基酸基序更多人则认为其可能参与决定糖结合活性和特异性。



注:1.阳性对照;2.毕赤酵母;3.耶罗维亚酵母;4.金黄色葡萄球菌;5.鳗弧菌;6.大肠杆菌

Note: 1. Positive control; 2. *Pichia pastoris*; 3. *Yarrowia lipolytica*; 4. *Staphylococcus aureus*; 5. *Vibrio anguillarum*; 6. *Bacillus coli*

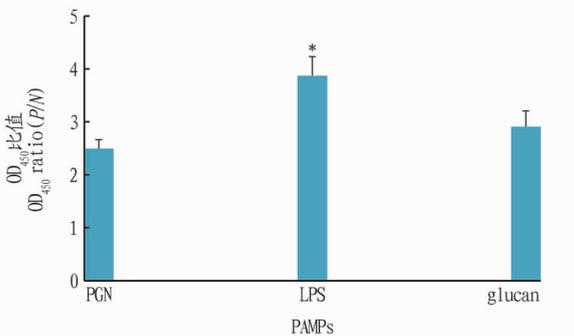
图 7 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白菌结合谱  
 Fig.7 Bacterial binding spectrum of CRD domain recombinant protein of CTL in *C.rivularis*

表 2 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白抑菌活性

Table 2 Antibacterial activities of CRD domain recombinant protein of CTL in *C.rivularis* μmol/L

序号 No.	菌种 Bacteria name	最小抑菌浓度 Minimal inhibitory concentration	最小杀菌浓度 Minimal bactericidal concentration
1	金黄色葡萄球菌	12~24	12~24
2	大肠杆菌	12~24	12~24
3	鳗弧菌	12~24	12~24
4	毕赤酵母	12~24	24~48
5	耶罗维亚酵母	12~24	24~48

利用近江牡蛎 CTL 的 CRD 结构域体外重组蛋白检测其 PAMPs 结合谱,结果显示:其体外重组蛋白浓度为 55 μg/mL 时,具有 LPS、PGN 和 glucan 3 种 PAMPs 结合活性。脊椎动物大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的相关研究发现,第一氨基酸基序为 EPN 或 QPD 时,均表现为 D-mannose 和 D-galactose 结合活性<sup>[17-18]</sup>。而在无脊椎贝类中,不同的氨基酸基序组合可表现出多种多样的糖结合活性。如长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) QPS/WHD 氨基酸基序组合时,表现出了 LPS、PGN、mannan 和 glucan 4 种 PAMPs 结合活性,这与笔者所得结果相近;在栉孔扇贝的研究中发现 EPN/LND 和 EPN/YND 2 类 Ca<sup>2+</sup> 结



注: \* 表示组间差异显著 (P<0.05)

Note: \* indicates significant difference between groups (P<0.05)

图 6 近江牡蛎 CTL 胞外段的 CRD 结构域重组蛋白 PAMPs 识别谱

Fig.6 PAMPs binding spectrum of CRD domain recombinant protein of CTL in *C.rivularis*

物第一氨基酸基序 EPN 的第三位氨基酸天冬酰胺被天冬氨酸所取代时,则成为 EPD 基序,这在栉孔扇贝 (*Chlamys farre-ri*) 和热带蛤 (*Codakia orbicularis*) 中研究发现<sup>[6,14-15]</sup>;脊椎动物另一个第一氨基酸基序 QPD 的第三位氨基酸天冬氨酸被丝氨酸所取代时,则成为 QPS 基序,这在紫贻贝 (*Mytilus edu-*

合位点 2 氨基酸基序组合时,则同时表现出了 LPS、mannan、PGN 和 glucan 4 种 PAMPs 结合活性;而当第一氨基酸基序均为 EPN,第二氨基酸基序分别为 FAD 和 LND 时,则一个表现为 LPS 和 mannan 2 种 PAMPs 结合活性,另一个表现为 LPS、mannan、PGN 和 glucan 4 种 PAMPs 结合活性<sup>[19]</sup>。若按照脊椎动物中已证实的第一氨基酸基序决定糖结合活性和特异性,而第二氨基酸基序为辅助作用的原理定义无脊椎贝类显然是不合适的,推测无脊椎贝类决定糖结合活性和特异性不仅取决于第一氨基酸基序,还取决于第二氨基酸基序。

笔者利用近江牡蛎 CTL 的 CRD 结构域体外重组蛋白检测菌结合谱及抑菌活性,结果显示,其能结合、抑制和杀死革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌、革兰氏阴性菌中的大肠杆菌和鳃弧菌,能结合、抑制但不能杀死毕赤酵母和耶罗维亚酵母。这与前人在海湾扇贝中所得结果较一致,当 CTL 的 CRD 结构域体外重组蛋白表现出 PGN、LPS 和 glucan 3 种 PAMPs 结合活性时,其可结合革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和酵母<sup>[19]</sup>,具有多种抑菌和杀菌活性。

笔者利用荧光定量 PCR 技术检测近江牡蛎 CTL mRNA 相对表达谱,结果显示,其在肝胰腺、外套膜和血细胞中的相对表达量显著高于其他组织中的表达量( $P < 0.05$ )。在无脊椎贝类中,肝胰腺是合成固有免疫相关蛋白的重要器官,血细胞是机体清除入侵病原微生物的直接参与者,而外套膜和鳃是外界环境直接接触最多的器官,这些器官较多分布免疫相关基因 CTL,可帮助机体快速识别、结合和清除入侵外源微生物,符合贝类的生理和生活环境特点<sup>[20]</sup>。

综上,该研究证实 CTL 在无脊椎贝类近江牡蛎固有免疫防御机制中可发挥识别、结合、抑制和杀死多种有害菌的重要作用。

## 参考文献

- [1] ZELENSKY A N, GREADY J E. The C-type lectin-like domain superfamily [J]. *The FEBS journal*, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [2] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [3] WEIS W I, TAYLOR M E, DRICKAMER K. The C-type lectin superfamily in the immune system [J]. *Immunological reviews*, 1998, 163: 19-34.
- [4] DRICKAMER K, TAYLOR M E. Biology of animal lectins [J]. *Annual review of cell biology*, 1993, 9: 237-264.
- [5] TAYLOR M E. Carbohydrate-recognition proteins of macrophages and related cells [M] // HORTON M A. *Blood cell biochemistry*. Volume 5: Macrophages and related cell. New York: Plenum Press, 1993: 347-370.
- [6] GOURDINE J P, MARKIV A, SMITH-RAVIN J. The three-dimensional structure of codakine and related marine C-type lectins [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2007, 23(4): 831-839.
- [7] WANG N, WHANG I, LEE J. A novel C-type lectin from abalone, *Haliotis discus*, agglutinates *Vibrio alginolyticus* [J]. *Developmental and comparative immunology*, 2008, 32(9): 1034-1040.
- [8] ESPINOSA E P, PERRIGAULT M, ALLAM B. Identification and molecular characterization of a mucosal lectin (MeML) from the blue mussel *Mytilus edulis* and its potential role in particle capture [J]. *Comparative biochemistry and physiology part A: Molecular and integrative physiology*, 2010, 156(4): 495-501.
- [9] JING X, ESPINOSA E P, PERRIGAULT M, et al. Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2011, 30(3): 851-858.
- [10] WANG L, WANG L, HUANG M, et al. The immune role of C-type lectins in molluscs [J]. *ISJ*, 2011, 8: 241-246.
- [11] 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 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(中国科学院海洋研究所), 2011.
- [12] LEE S Y, SÖDERHÄLL K. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *The journal of immunology*, 2001, 166(12): 7319-7326.
- [13] ZHOU Q J, WANG J, LIU M, et al. Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea* [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2016, 55: 195-202.
- [14] YANG J L, WANG L L, ZHANG H, et al. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): 1-10.
- [15] YANG J L, QIU L M, WEI X M, et al. An ancient C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-2) that mediate pathogen recognition and cellular adhesion [J]. *Developmental and comparative immunology*, 2010, 34(12): 1274-1282.
- [16] RINI J M. Lectin structure [J]. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 1995, 24: 551-577.
- [17] WEIS W I, KAHN R, FOURME R, et al. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing [J]. *Science*, 1991, 254(5038): 1608-1615.
- [18] ZELENSKY A N, GREADY J E. Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTLD) [J]. *Proteins*, 2003, 52(3): 466-477.
- [19] 黄萌萌. 双壳类 C 型凝集素免疫功能及分子识别机制的研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2015.
- [20] 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 and shellfish immunology*, 2011, 30(1): 17-26.