

DOI: 10.11758/yykxjz.20161226001

http://www.yykxjz.cn/

刘佳乐, 韦秀梅, 杨顶珑, 童潼, 刘相全. 大竹蛭 β -整合素基因*Sg β Int*的特性分析和重组表达. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 120-127

Liu JL, Wei XM, Yang DL, Tong T, Liu XQ. Recombinant expression and characterization of the β -integrin gene of *Solen grandis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 120-127

大竹蛭 β -整合素基因 *Sg β Int* 的特性分析和重组表达*

刘佳乐^{1,2} 韦秀梅³ 杨顶珑³ 童潼¹ 刘相全^{3①}

(1. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

3. 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 烟台 264006)

摘要 整合素作为一种细胞粘附因子,在细胞粘附、迁移、增殖、凋亡和吞噬等过程中发挥重要作用。本研究利用分子克隆技术获得了大竹蛭(*Solen grandis*) β -整合素基因(*Sg β Int*)的 cDNA 全长,分析了其编码氨基酸序列的进化特点,并以 SWISS-MODEL 预测了氨基酸序列的三级结构。*Sg β Int* 基因序列全长为 1168 bp,5'和 3'非编码区(UTR)分别为 61 bp 和 18 bp,开放阅读框(ORF)为 1089 bp,编码 362 个氨基酸,理论等电点约为 4.98,分子量为 30.0 kDa。通过荧光定量 PCR 法检测了 *Sg β Int* 在健康大竹蛭各组织中以及大竹蛭受到脂多糖、肽聚糖和葡聚糖等微生物多糖刺激后的表达。结果显示, *Sg β Int* 在血细胞、鳃、肝胰腺、性腺、肌肉和外套膜等组织中均可表达,在鳃中的表达量最高;脂多糖、肽聚糖和葡聚糖都可以诱导 *Sg β Int* 表达量上调, *Sg β Int* 的表达量分别在脂多糖和葡聚糖刺激后的 3 h 和 48 h 达到最高;肽聚糖刺激后 *Sg β Int* 表达量上调幅度最大,在 6 h 时达到最高,证实 *Sg β Int* 参与大竹蛭抵御外源微生物的免疫应答。利用基因重组技术构建了 *Sg β Int* 的重组表达载体,为进一步分析软体动物整合素的功能、揭示大竹蛭先天性免疫机制奠定了基础。

关键词 大竹蛭;整合素;免疫应答;荧光定量 PCR

中图分类号 S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0120-08

细胞粘附因子(Cell adhesion molecules)介导细胞与细胞之间以及细胞与细胞外基质之间的相互作用,参与信号传导、细胞间识别、细胞增殖和分化、炎症和伤口愈合等过程(Zhuang *et al*, 2008)。根据结构和功能的不同,细胞粘附因子分为整合素(Integrin)、钙粘素(Cadherin)、选择素(Selectin)、免疫球蛋白超家族(Ig-superfamily)和透明质酸粘素(Hyaladherin)五类。其中,整合素是一种由一个 α 亚单位和一个 β 亚

单位通过非共价键连接而成的异二聚体跨膜糖蛋白。目前,已经确认的有 18 种 α 亚单位和 8 种 β 亚单位,共组成 20 余种整合素(Jia *et al*, 2015)。大部分 α 亚基只结合一种 β 亚基,少数的如 α_v 亚基可以与不同的 β 亚基结合。由于不同的 α 亚基和 β 亚基的氨基酸序列存在不同程度上的同源性,使得它们在结构上有共同的特点。整合素在体内表达广泛,大多数细胞表面都可表达一种以上的整合素,在多种生命活动中发挥关

* 广西海洋生物技术重点实验室开放基金资助课题资助[This work was supported by Open Research Fund Program of Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology (GLMBT-201504)]. 刘佳乐, E-mail: liujlwz@163.com

① 通讯作者: 刘相全, 副研究员, E-mail: lxq6808@163.com

收稿日期: 2016-12-26, 收修改稿日期: 2017-01-14

键作用。脊椎动物的 Integrin 作为一种重要的粘附受体,首先在淋巴细胞表面发现,目前,对于 Integrin 发挥的免疫功能的研究已经比较深入。Integrin 细胞外的“头部”结构域可以结合配体,“颈部”是激活单位,而长度可变的细胞质内结构域形成细胞骨架起到链接信号分子的作用。此外,Integrin 蛋白是双向信号转导分子(Hynes, 2002; Schwartz *et al*, 1995),在调控免疫反应过程中也发挥必不可少的作用(Rose *et al*, 2002; von Andrian *et al*, 2003)。近些年的研究表明,Integrin 还参与肿瘤细胞粘附,比如,Integrin 在口腔癌前病变时,起串联受体的作用(Shahidul *et al*, 2010); Integrin 还被证明是人肠道弧菌病毒(Nelsen-Salz *et al*, 1999)、腺病毒(Wickham *et al*, 1993)、手足口病毒(Jackson *et al*, 2000)、乳头瘤病毒(Coulson *et al*, 1997)等多种病毒的受体。

在无脊椎动物中,果蝇(*Drosophila melanogaster*) Integrin 被研究得较为透彻,现已发现 3 个不同的 α 亚基(α PS1、 α PS2 和 α PS3)和 2 个 β 亚基,3 个位置特殊的 Integrin 异构体(PS1、PS2 和 PS3)与已被发现脊椎动物的 β 1-Integrin 最为相似(Relja *et al*, 2011; Stark *et al*, 1997; Yee *et al*, 1993),有研究表明,果蝇 β -Integrin 参与调控其血细胞吞噬细菌(Mamali *et al*, 2009)。在其他无脊椎动物中也相继发现了 Integrin,例如,在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)中克隆得到的 β -Integrin 基因,推测其参与血细胞介导的对大肠杆菌的包裹作用,相应的结构特征可能使其具有吞噬革兰氏阴性菌的能力(Moita *et al*, 2006);在海洋无脊椎动物中,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) β -Integrin 被认为是细胞膜上的对虾白斑综合征病毒(WSSV)受体(Li *et al*, 2007);中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) β -Integrin 作为细胞受体参与抗菌免疫(Huang *et al*, 2015);仿刺参(*Apostichopus japonicus*) β -Integrin 起到细胞凋亡抑制剂的作用(Wang *et al*, 2016)。与高等动物和模式动物相比,目前海洋无脊椎动物 Integrin 的研究尚处在起步阶段,有关贝类 Integrin 的报道十分有限。

本研究从前期已构建的大竹蛭(*Solen grandis*) cDNA 文库中克隆获得大竹蛭 β -Integrin (*Sg β Int*) 基因的 cDNA 全长,分析了 *Sg β Int* 编码氨基酸的序列特征,通过荧光定量 PCR 法检测了 *Sg β Int* 基因的 mRNA 在健康大竹蛭不同组织中的表达谱,以及在大竹蛭受到脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)和葡聚糖(Glucan) 3 种不同病原相关分子(PAMPs)刺激后,血细胞中 *Sg β Int* 基因的响应规律,旨在了解 *Sg β Int* 基因在大竹蛭防御外源微生物的免疫应答中发挥的功能,为进一步阐释

无脊椎动物 Integrin 的结构和功能、丰富无脊椎动物先天性免疫学研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生大竹蛭捕取自山东省烟台周边海区,体长为 90 mm 左右,共 210 只,实验前在 20~22℃海水中暂养 7 d。取其中 10 只大竹蛭用于解剖获得组织,剩余的 200 只随机均分为 5 组,用于 PAMPs 刺激实验,LPS、PGN 和 Glucan 等 3 种 PAMPs 分别用 PBS(0.14 mol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 8 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, pH=7.4)溶解,终浓度分别为 0.5、0.8 和 1.0 mg/ml;以 50 μ l/只的剂量注射大竹蛭肌肉(Yang *et al*, 2011)。第 1~3 组分别注射 LPS、PGN、Glucan,第 4 组注射 PBS 作为阴性对照,第 5 组未作任何处理作为空白对照。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 模板的合成

解剖大竹蛭,取肌肉、外套膜、血细胞、性腺、胰腺和鳃等,加入 TRIzol (Invitrogen),存于-80℃。

PAMPs 注射后 3、6、12、24 和 48 h 分别从实验组和对照组中随机取 5 只大竹蛭,注射器吸取预冷的抗凝剂(0.1 mol/L 葡萄糖,13 mmol/L 柠檬酸,15 mmol/L 柠檬酸钠,0.45 mol/L NaCl,10 mmol/L EDTA, pH=7.0),抽取血淋巴,4℃ 800 g 条件下离心 5 min,收集血细胞,以 1 ml TRIzol 重悬,存于-80℃。

所有保存于 TRIzol 中的样品,按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 RNA,经 DNase I (Promega)降解 DNA,反应体系:RNA 8 μ l, RQ1 RNase-Free DNase 5 \times Reaction Buffer 2.5 μ l, RQ1 RNase-Free DNase 1 μ l, RNase 抑制剂 0.6 μ l,于 37℃反应 30 min;加入 1 μ l Stop solution,65℃ 10 min 灭活 DNase;加入 2 \times Oligo dT 2.5 μ l,70℃反应 5 min,冰浴 2 min。反应体系:5 \times M-MLV 反应缓冲液 6.5 μ l, RNase-Free dNTP 12.5 μ l, RNase 抑制剂 1.25 μ l, M-MLV 反转录酶 2.5 μ l, RNase-Free 水 1 μ l,42℃反转录 1 h,95℃ 5 min 灭活反转录酶。模板存入-80℃,用于荧光定量 PCR 分析。

1.3 *Sg β Int* 基因 cDNA 全长的克隆

在本研究前期工作构建的大竹蛭 cDNA 文库中,用 BLAST 分析获得 *Sg β Int* 基因的 EST 序列,将对应质粒转入 Trans5 α 感受态细胞(全式金)中,挑取单菌落,以 pBluescript II SK*载体的通用引物 M13F 和

M13R 对其进行重新测序。

1.4 *SgβInt* 基因的序列分析

在 <http://www.expasy.org/> 进行蛋白等电点和分子量预测；用 BLAST 软件进行序列同源性比较和相似性搜索；使用 SignalP 查找信号肽；使用 MEGA 4.1 软件，将 *SgβInt* 基因和家蚕 (*Bombyx mori*)、通讯鳌虾 (*Pacifastacus leniusculus*)、紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*)、双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*)、凡纳滨对虾、中华绒螯蟹、果蝇、冈比亚按蚊、仿刺参、鸭嘴海豆芽 (*Lingula anatina*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、瓜实蝇 (*Bactrocera cucurbitae*)、地中海实蝇 (*Ceratitis capitata*)、意大利蜂 (*Apis mellifer*)、华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)、粘虫 (*Mythimna separata*) 和大乳头水媳 (*Hydra magnipapillata*) 等 20 个物种的 β -Integrin 基因编码的氨基酸序列以邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树；使用 SWISS-MODEL 预测 *SgβInt* 基因编码氨基酸序列的三级结构，利用 pyMOL 软件展示。

1.5 荧光定量 PCR 检测

将 cDNA 模板稀释 100 倍，使用 Mastercycler ep realplex (Eppendorf) 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。反应体系 20 μ l：2 \times SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l、稀释 100 倍后的 cDNA 模板 2 μ l、正反引物各 1 μ l 和 6 μ l 水。*SgβInt* 的正向引物为 5'-AAGCGTGTCCGAGCAAATGTC-3'，反向引物为 5'-TGTGGGGAGGGGTAGGATAAT-3'；内参基因 β -actin 的正反向引物分别为 5'-TGTACGCCAACAC-TGTCCTGTC-3' 和 5'-CATCGTATTCCTGCTTGCT-GATC-3'。反应程序：50 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 10 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，60 $^{\circ}$ C 60 s，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析实验数据，以 *t* 检验分析显著性， $P < 0.05$ 为差异显著， $P < 0.01$ 为差异极显著。

1.6 *SgβInt* 基因重组载体的构建

PCR 反应扩增 *SgβInt* 成熟肽 DNA 序列，反应体系：菌液模板 1 μ l，10 \times Buffer 2.5 μ l，2.5 mmol/L dNTP 2 μ l，正反引物各 1 μ l，Taq 酶 1 μ l，DEPC 水补足至 25 μ l。重组正反引物分别为 5'-AACATGAGGTCCAT-GATAAACGG-3' 和 5'-TCATGTTGTAGTGTATGTC-TCACTGGTC-3'。反应条件：94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，62 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 80 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物 0.5~4.0 μ l；PEASY E1 Expression Vector (全式金) 1 μ l，混合后室温反应 5 min，将连接

产物加入 Trans-T1 (全式金) 感受态细胞中，42 $^{\circ}$ C 水浴热激 60 s；加入 LB 液体培养基，涂布平板，培养过夜。挑选单菌落由北京诺赛基因组研究有限公司测序。

1.7 *SgβInt* 基因重组蛋白的诱导表达

将测序结果正确的菌株使用 EZNA mini plasmid (Omega) 试剂盒按照步骤提取质粒转入 Transetta (全式金) 感受态细胞中，涂布平板，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落，加入含氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 培养基中，200 r/min、37 $^{\circ}$ C 震荡培养至 OD_{600 nm} 约为 0.6；加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达目的蛋白，37 $^{\circ}$ C 200 r/min 诱导培养 4 h；4 $^{\circ}$ C、5000 r/min 离心 10 min，收集菌体沉淀。以 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析诱导表达结果。

2 结果

2.1 *SgβInt* 基因 cDNA 的克隆及序列特点

测序结果拼接获得的 *SgβInt* 基因 cDNA 全长，提交至 GenBank 获得登录号 KX925404，其全长为 1168 bp，5' 和 3' 分别含 61 bp 和 18 bp 的非编码区 (UTR)，开放阅读框 (ORF) 为 1089 bp，共编码 362 个氨基酸，其中，在 42~74 位氨基酸和 103~135 位氨基酸处分别为 EGF like 和 EGF 结构域。同源性分析显示，*SgβInt* 与家山羊 (*Capra hircus*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的相似性最高，分别为 37% 和 36%；利用 SignalP 软件预测发现，*SgβInt* 基因编码区前 22 位氨基酸序列为信号肽序列 (图 1)。ExpASy 预测重组后的 *SgβInt* 基因编码蛋白的理论等电点约为 4.98，分子量为 30.0 kDa。

2.2 *SgβInt* 基因系统进化分析

使用 MEGA 4.1 软件的邻接法构建系统进化树，所用 Integrin 的 GenBank 登录号如下：家蚕 (NP_001161754.1)、通讯鳌虾 (CAA67357.1)、紫海胆 (XP_011679515.1)、双脐螺 (AF060203.1)、凡纳滨对虾 (ADK56123.1)、中华绒螯蟹 (AKJ26284.1)、果蝇 (AAC37169.1)、冈比亚按蚊 (AAM11657)、仿刺参 (AMR60824.1)、鸭嘴海豆芽 (XM_013560388.1)、小菜蛾 (GQ178290.1)、豌豆蚜 (XM_003244399.3)、长牡蛎 (EKC27174.1)、瓜实蝇 (XP_011182368.1)、地中海实蝇 (XP_004521716.1)、意大利蜂 (XP_006564503.1)、华支睾吸虫 (GAA31131.2)、粘虫 (BAJ16205.1)、大乳头水媳 (XP_002159375.2)。

用 MEGA 4.1 软件构建出 *SgβInt* 编码的氨基酸与

```

1  GGCGATACGTTATATACAGCGTTTGTAAAGACATATCACAACTTGAGACTTCGTCAA
1  M A Y E R L E F V L F I L M A F T A L T
61  GATGGCGTATGAGCGTTTGGAGTTTGTGTTTATATAATGGCGTTTACAGCTCTAAC
21  N G T V V S D F N M R S M I N G A L G S
121 GAATGGAAGTGTAGTAAGTGAATTTAACATGAGGTCCATGATAAACGGGCGCTTGGGTC
41  Y M C R G Q N G Q L C S G V G S C Y H G
181 ATACATGTGTCCGGACAGAACGGGAGCTGTGAGTGGGGTCGGGAGTTGTTACCATGG
61  V C T C D I G Y I G R V C E F S T E N T
241 TGTCTGTACTTGTGATATTGGGTATATCGGCCGTGTTGCGAATTAGCACCGAAAATAC
81  H D P T T T R E M T T T T E L V Q P D S
301 CCATGACCCTACAACCACACGGGAGATGACGACAACGACAGAATTGGTTCAGCCTGATAG
101 V I A C I G N N E G V C S G N G V C Q N
361 TGGTATAGCCTGTATCGAAATAATGAAGGGGTGTAGCGGAAATGGTGTGTTGCCAAAA
121 G A C V C M P G W S G I V C E L Y Q A K
421 TGGCGCCTGTGTTGCATGCCGGATGGTCTGGGATCGTATGTGAGCTCTACCAGGCTAA
141 G F C E T Y R A C A E C T A F M E A C P
481 GGGATTCTGCGAGACGTACAGAGCATGCGCAGAATGTACAGCATTGGAAGCGTGTCC
161 S K C Q I M A D F Y L V F D F P S G S S
541 GAGCAAATGTCAAATCATGGCAGACTTTATCTCGTCTTCGATTTCCCGTCCGGAAGTTC
181 T F H R C R G R S A S R R C S F Y Y Q L
601 AACCTCCACCGTTGTCGAGGAAGGAGTGCCAGTCCAGATGTCCTTTTATTACCAGCT
201 E S T S G S G G K Y I M V K T C L N Y P
661 TGAGAGTACATCAGGAAGTGGAGGAAATACATCATGGTCAAGACATGCTTGAATTATCC
221 T P P H M T S T V M S Y P N D G D V T T
721 TACCGCTCCCATGACTAGCACCGTGATGTCATATCCAAATGACGGTGACGTCACCAC
241 T T E V I S T S T R V A M T T Q Q S S E
781 TACCACAGAGTTATATCTACATCCACACGCGTTGCTATGACAACAACAACAAAGCAGTGA
261 I E T A N D H T T T T M T S Y P D G A D
841 AATAGAAATGCAATGATCACAACTACCACCATGACGTATACCCAGATGGCGCTGA
281 F T I A T E S T S S P V T M T T Q R T S
901 CTTACCATGCGACAGAGTCTACATCTCGCCGTTACTATGACAACAACAACGGACCAG
301 E T Y T T T E I D G G R T D S V D I S V
961 TGAGACATACACTACAACAGAGATTGATGGTGGGCGCACTGACAGTGTGGATTTTCTGT
321 Q D K S K G G A D S A S N R P T C S V A
1021 CCAAGATAAATCGAAAGGAGGCGCGATTCTGCTTCCAATAGACCTACATGCAGTGTTC
341 C V I F N S L I G S L F F S R L L K Y I
1081 TTGTGTGATATTAATTCTCTGATTGGATCACTTTTCTTTCTAGACTATTGAAATACAT
361 Q T *
1141 ACAAACTTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 1 *Sg β Int* 基因的核苷酸及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The nudeotide and deduced amino acid squences of *Sg β Int*

黑体加粗表示起始密码子和终止密码子；下划线表示信号肽；阴影部分表示 Integrin 结构域。

The start and stop codons are marked in bold, the signal peptide sequence is underline and the Integrin is shaded.

20 个物种的 β -Integrin 基因编码的氨基酸序列的系统进化树，结果显示，*Sg β Int* 编码氨基酸与长牡蛎 β -Integrin 编码氨基酸的亲缘关系最近，二者构成软体动物分支(图 2)。

2.3 *Sg β Int* 编码氨基酸的三级结构预测

使用 SWISS-MODEL 预测 *Sg β Int* 中 EGF-like、EGF 和 Integrin- β -tail 三个结构域的三级结构，由图 3 可以看出，*Sg β Int* 编码氨基酸的三维结构包括 1 个 α -螺旋和 9 个 β -折叠， α -螺旋靠近其中 3 个 β -折叠，另外 6 个 β -折叠每 2 个形成 1 组。

2.4 *Sg β Int* 基因的 mRNA 在健康大竹蛎各组织中的表达谱

运用荧光定量 PCR 方法检测了 *Sg β Int* 基因在健康大竹蛎不同组织中的表达规律，*Sg β Int* 基因在健康大竹蛎的各个组织中均有表达，在鳃中表达量最高，

是性腺的 487.5 倍；在肌肉、外套膜、血细胞和肝胰腺的表达量分别为性腺表达量的 105.7、28.3、21.0、14.9 倍；在性腺中表达量最低(图 4)。

2.5 *Sg β Int* 基因的 mRNA 在大竹蛎受到 PAMPs 刺激后血细胞的表达规律

荧光定量 PCR 法检测 LPS、PGN 和 Glucan 刺激后大竹蛎血细胞中 *Sg β Int* 基因的表达规律，结果显示，*Sg β Int* 基因的表达量在各种 PAMPs 刺激后均呈现上升趋势，并且都在刺激后 3 h 表现出极显著升高。其中，受到 LPS 刺激后，*Sg β Int* 基因表达量在 3 h 达到最高($P < 0.01$)，为空白对照的 4.8 倍，随后逐渐降低，在 12 h 达到最低($P < 0.01$)，为空白对照的 0.4 倍；PGN 刺激使 *Sg β Int* 基因的表达量上调幅度最大，继在刺激 3 h 时上升为空白组的 10.8 倍后($P < 0.01$)，在 6 h 达到最高，是空白对照的 35.3 倍($P < 0.01$)，随后显著降低；Glucan 刺激也能诱导 *Sg β Int* 基因的表达

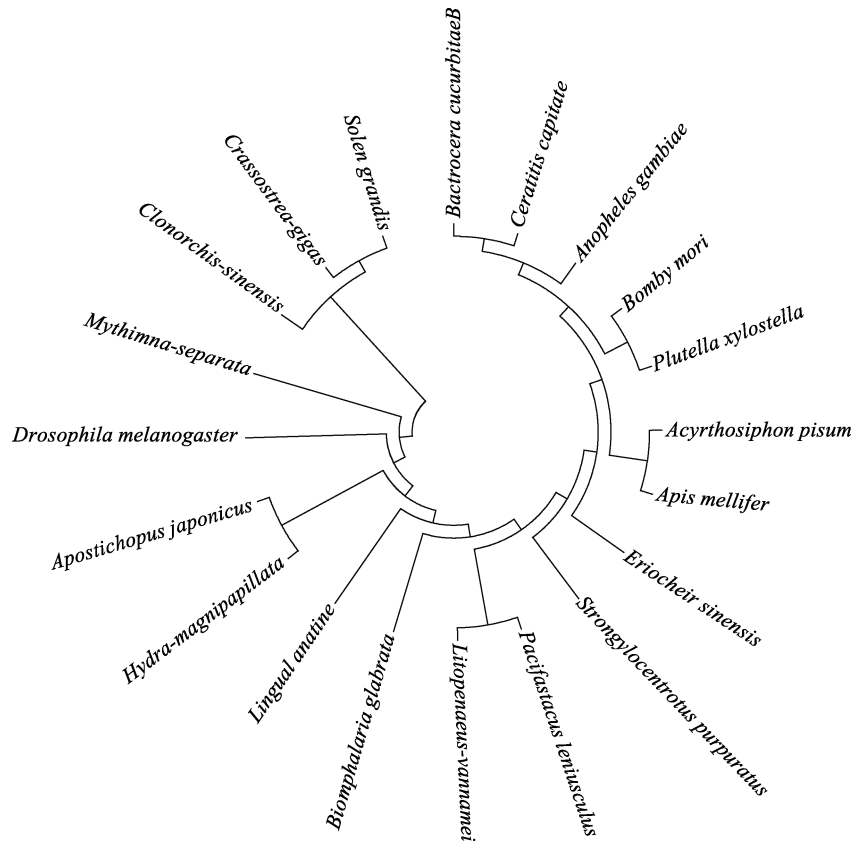


图 2 *SgβInt* 与其他物种 β -Integrin 的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree based on *SgβInt* sequence with β -Integrin of other species

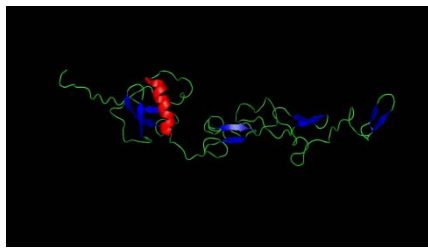


图 3 *SgβInt* 蛋白的三级结构
Fig.3 The predicted spatial structure of *SgβInt*

蓝色: β -折叠; 红色: α -螺旋
Blue: β -sheets; Red: α -helices

量出现上调, 在刺激 3 h 时为空白对照的 3.2 倍 ($P < 0.01$), 随后逐渐降低, 但与 LPS、PGN 刺激后的表达模式不同的是, *SgβInt* 在 24 h 时再次出现显著升高 ($P < 0.05$), 并在 48 h 达到峰值, 为空白对照的 44.1 倍 ($P < 0.01$) (图 5)。

2.6 *SgβInt* 基因在大肠杆菌中的重组表达分析

SDS-PAGE 分析对比诱导前后的 *SgβInt* 蛋白重组菌株, 诱导菌株的泳道明显看到诱导蛋白的条带, 重组蛋白的分子量大小约为 30 kDa, 与预测的结果相一致, 证明 *SgβInt* 基因编码蛋白被诱导表达 (图 6)。

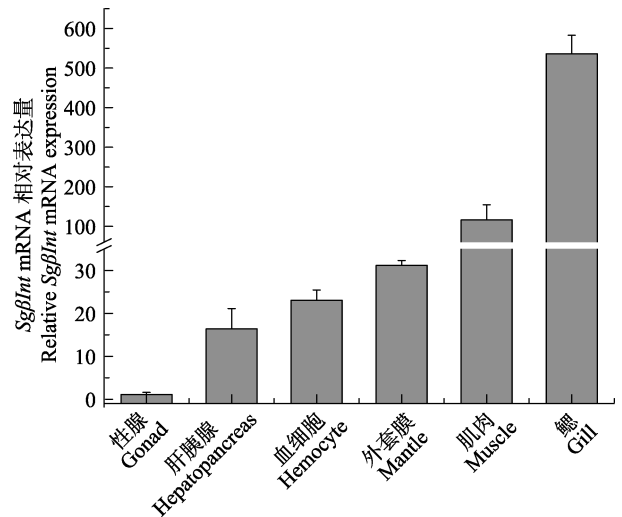


图 4 *SgβInt* mRNA 在不同组织中的表达谱
Fig.4 *SgβInt* mRNA expression level in different tissues

3 讨论

整合素是细胞膜上粘附因子的一种, 属于具有保守 $\alpha\beta$ 异构体的细胞表面受体大家族 (Hagen *et al.*, 2001)。高等动物的整合素 Integrin 已被证明可作为人肠道弧菌病毒、腺病毒、手足口病毒、乳头瘤病毒等多种病

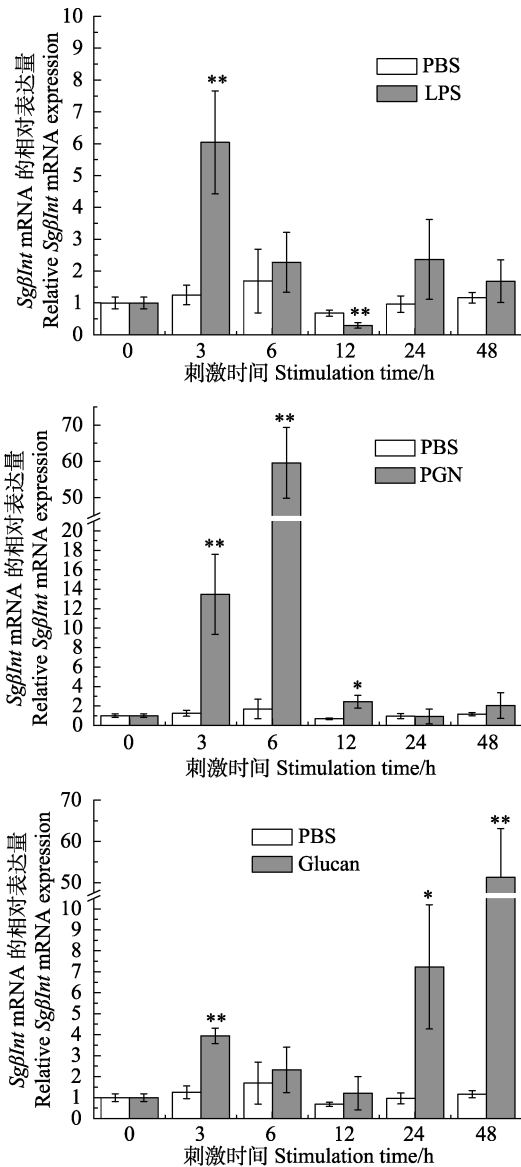


图 5 血细胞中 $Sg\beta Int$ mRNA 在 PAMPs 刺激后的表达水平

Fig.5 The $Sg\beta Int$ mRNA expression level in hemocytes after PAMPs stimulation

毒的受体。近几年,陆续有研究发现,无脊椎动物整合素 Integrin 也参与多种免疫反应。而有关海洋无脊椎动物整合素 Integrin 的研究还相对较少。本研究以大竹蛎为研究对象,克隆得到了 β -Integrin 基因的 cDNA 全长。通过 Blast 分析发现,该基因编码蛋白与家山羊和小鼠等脊椎动物的 β -Integrin 基因编码蛋白相似,而分析 $Sg\beta Int$ 基因编码蛋白的序列特点发现,在以邻接法构建的 $Sg\beta Int$ 与其他物种 β -Integrin 的系统进化树中, $Sg\beta Int$ 与长牡蛎 β -Integrin 构成了软体动物分支;并且其三级结构包括 1 个 α -螺旋和 9 个 β -折叠,与孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)和红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的 β -Integrin 基因编码蛋白三维

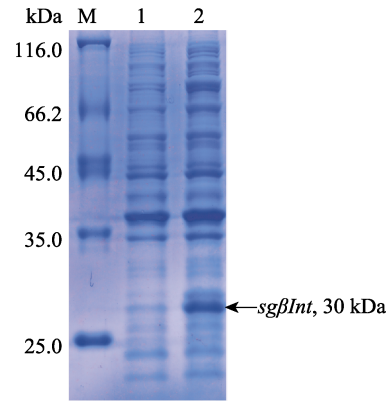


图 6 重组 $Sg\beta Int$ 的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of recombinant $Sg\beta Int$

M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导的重组 $Sg\beta Int$;
2: 诱导的重组 $Sg\beta Int$

M: Protein molecular standard; 1: Negative control for recombinant $Sg\beta Int$ (without induction);
2: IPTG induced recombinant $Sg\beta Int$

结构相似。综合以上分析结果, $Sg\beta Int$ 为 β -Integrin 家族成员。

仿刺参、长牡蛎、凡纳滨对虾等海洋无脊椎动物的 Integrin 基因具有组织分布广泛的特点,与以上报道类似,本研究发现, $Sg\beta Int$ 在所有检测组织中均有表达。组织表达谱广与 β -Integrin 在机体的生命活动中参与多种过程密切相关。但是,这些物种的 β -integrin 基因的组织表达谱存在差异,尤其是它们呈现高表达量的组织部位不同,如仿刺参 β -integrin 在肌肉中的表达量最高(Wang *et al*, 2016),而长牡蛎和凡纳滨对虾 β -integrin 则分别在性腺和血细胞中表达量最高(Lin *et al*, 2013; Jia *et al*, 2015)。 $Sg\beta Int$ 在鳃的表达量最高,由于鳃是大竹蛎用于滤食和气体交换的器官,与水环境直接接触,考虑到水环境中存在多种外源微生物, $Sg\beta Int$ 基因在鳃中的高表达暗示其可能在大竹蛎抵御外源微生物的过程中发挥重要作用。

为分析 $Sg\beta Int$ 是否参与大竹蛎抵御外源微生物的过程,本研究用 LPS、PGN 和 Glucan 等微生物多糖刺激大竹蛎,并检测血细胞中 $Sg\beta Int$ mRNA 的表达规律。微生物多糖 LPS、PGN 和 Glucan 是微生物表面某些共有的高度保守的分子结构,宿主细胞不能自主产生这些多糖,为微生物所特有,是微生物生存或致病必需的。LPS、PGN 和 Glucan 刺激都能诱导 $Sg\beta Int$ 在大竹蛎血细胞中的表达显著上调,揭示 $Sg\beta Int$ 参与大竹蛎抵御多种外源微生物的免疫过程。其中,PGN 和 Glucan 刺激后, $Sg\beta Int$ 的表达量上调最为显著,说明 $Sg\beta Int$ 可能更容易被革兰氏阳性菌和真菌诱导。中华绒螯蟹(Huang *et al*, 2015)和长牡蛎

(Jia *et al.*, 2015)的 β -Integrin 在受到 LPS 刺激后 6 h 时达到最高表达量,而本研究中,一方面 *Sg β Int* 的表达量在 3 h 时达到最高,大竹蛭 *Sg β Int* 对于 LPS 的响应时间早于中华绒螯蟹和长牡蛎 Integrin。另一方面, *Sg β Int* 在大竹蛭受到 PGN 和 Glucan 刺激后达到最高表达量的时间不一致,其对于不同微生物多糖的响应时间不同,推测其清除作用机制存在差异。

重组的基因编码蛋白是研究基因功能的有利工具。利用制备的重组蛋白,已有研究发现,中华绒螯蟹的 β -Integrin 可以包括凝集金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、大肠杆菌在内的多种细菌,并能够协助机体清除副溶血弧菌等致命菌(Huang *et al.*, 2015);而长牡蛎和仿刺参的 β -Integrin 都对 LPS 有较高的亲和力(Lin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016);构建 *Sg β Int* 编码蛋白的重组载体,为获得 *Sg β Int* 重组蛋白,制备抗 Integrin 重组蛋白抗体,进一步分析 *Sg β Int* 编码蛋白的功能提供了必要的实验材料。*Sg β Int* 编码蛋白对于外源微生物的作用方式还不明确,有待于进一步研究。

本研究中 *Sg β Int* 基因的克隆、特性分析及其重组载体的构建,揭示了 *Sg β Int* 基因的序列特点及其对于 PAMPs 的响应规律,为了解大竹蛭对外源微生物的免疫防御机理和进一步分析其作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 5389–5394
- Hagen HE, Kläger SL. Integrin-like RGD-dependent cell adhesion mechanism is involved in the rapid killing of *Onchocerca microfilariae* during early infection of *Simulium damnosum* s.l. *Parasitology*, 2001, 122(4): 433–438
- Huang Y, Zhao LL, Feng JL, *et al.* A novel integrin function in innate immunity from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(2): 155–165
- Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110(6): 673–687
- Jackson T, Sheppard D, Denyer M, *et al.* The epithelial integrin alpha-vbeta 6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2000, 74(11): 4949–4956
- Jia ZH, Zhang T, Jiang S, *et al.* An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 53(1): 253–264
- Li DF, Zhang MC, Yang HJ, *et al.* β -integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 2007, 368(1): 122–132
- Lin YC, Chen JC, Chen YY, *et al.* Characterization of whiteshrimp *Litopenaeus vannamei* integrin β and its role in immunomodulation by dsRNA-mediated gene silencing. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 167–179
- Mamali I, Lamprou I, Karagiannis F, *et al.* A β integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(7): 858–866
- Moita LF, Vriend G, Mahairaki V, *et al.* Integrins of *Anopheles gambiae* and a putative role of a new β integrin, BINT2, in phagocytosis of *E. coli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36(4): 282–290
- Myat MM, Rashmi RN, Manna D, *et al.* *Drosophila* KASH-domain protein Klarsicht regulates microtubule stability and integrin receptor localization during collective cell migration. *Developmental Biology*, 2015, 407(1): 103–114
- Nelsen-Salz B, Eggers HJ, Zimmermann H. Integrin alpha (v) beta3 (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty. *Journal of General Virology*, 1999, 80(9): 2311–2313
- Relja B, Meder F, Wang M, *et al.* Simvastatin modulates the adhesion and growth of hepatocellular carcinoma cells via decrease of integrin expression and ROCK. *International Journal of Oncology*, 2011, 38(3): 879
- Rose DM, Han J, Ginsberg MH. Alpha4 integrins and the immune response. *Immunological Reviews*, 2002, 186(1): 118–124
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 1995, 11: 549–599
- Shahidul A, Yamazaki M, Maruyama S, *et al.* Differential expression of perlecan receptors, α -dystroglycan and integrin β 1, before and after invasion of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2011, 40(7): 552–559
- Stark KA, Yee GH, Roote CE, *et al.* A novel alpha integrin subunit associates with betaPS and functions in tissue morphogenesis and movement during *Drosophila* development. *Development*, 1997, 124(22): 4583–4594
- von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *New England Journal Medicine*, 2003, 348(1): 68–72
- Wang ZH, Shao Y, Li CH. A β -integrin from sea cucumber *Apostichopus japonicus* exhibits LPS binding activity and negatively regulates coelomocyte apoptosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52: 103–110
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, *et al.* Integrins-alpha-v-beta-3 and alpha-v-beta-5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 1993, 73(2): 309–319
- Yang JL, Wang LL, Zhang Huan, *et al.* C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and

opsonization. PLoS One, 2011, 6(2): e17089
Yee GH, Hynes RO. A novel, tissue-specific integrin subunit, beta nu, expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. Development, 1993, 118(3): 845–858

Zhuang SF, Kelo L, Nardi JB, *et al.* Multiple α subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the Manduca immune system. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32(4): 365–379

(编辑 冯小花)

Recombinant Expression and Characterization of the β -Integrin Gene of *Solen grandis*

LIU Jiale^{1,2}, WEI Xiumei³, YANG Dinglong³, TONG Tong¹, LIU Xiangquan^{3①}

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai 536000;

2. College of Fisheries and Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Key Laboratory of Marine Ecological restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006)

Abstract Integrins are heterodimeric cell surface receptors that consist of α and β subunits to regulate cell adhesion, migration, proliferation, apoptosis and phagocytosis. The present study identified the β -integrin gene from *Solen grandis* (*Sg β Int*) and analyzed the characterization of its encoded protein. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method and the three-dimensional structure was predicted with SWISS-MODEL. The full-length cDNA of *Sg β Int* was 1168 bp, containing a 61 bp 5'UTR, 18 bp 3'UTR and an open reading frame (ORF) of 1089 bp that encodes a polypeptide of 362 amino acids with an estimated molecular mass of 30.0 kDa. The encoded protein of *Sg β Int* shared significant similarities with that in *Capra hircus* and *Mus musculus*. The phylogenetic tree indicated that *Sg β Int* had a close genetic relationship with *Crassostrea gigas* to form a mollusk branch. The three-dimensional structure of *Sg β Int* consisted of one α -helix and nine β -sheets as a member of integrin superfamily. *Sg β Int* expressed in all tested tissues, including mantle, gill, hemocyte, gonad, muscle and hepatopancreas, with the highest expression in gill which was 487.5 times higher than gonad. *Sg β Int* was induced by all the three pathogen associated molecular patterns (PAMPs) including LPS, PGN and glucan with the peak level at 3 and 48 h post LPS and glucan stimulation, respectively. *Sg β Int* expression reached the maximal level at 6 h post PGN stimulation with 53.5-fold induction. All the results revealed that *Sg β Int* might regulate the immune response of *S. grandis* to microorganism. This study shed new light on the research of β -integrin in mollusk and immune defense mechanism of *S. grandis*.

Key words *Solen grandis*; Integrin; Immune response; Real-time PCR

① Corresponding author: LIU Xiangquan, E-mail: lxq6808@163.com