

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191224004

http://www.yykxjz.cn/

宋柳, 张凤, 吕建建, 刘萍, 高保全, 李健. 三疣梭子蟹几丁质酶基因 1 的克隆及功能鉴定. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 144–153

Song L, Zhang F, Lü JJ, Liu P, Gao BQ, Li J. Cloning and functional identification of chitinase gene 1 in swimming crab *Portunus trituberculatus*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 144–153

三疣梭子蟹几丁质酶基因 1 的克隆及功能鉴定*

宋柳^{1,2} 张凤^{1,2} 吕建建¹ 刘萍^{1①} 高保全¹ 李健¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
青岛海洋科学与技术试点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;

2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

摘要 为丰富三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶基因家族的组成, 进行了几丁质酶基因 1(*PtCht1*)的研究。*PtCht1* 基因 cDNA 全长为 2220 bp, 编码 583 个氨基酸。结构域比对发现, *PtCht1* 含有甲壳动物几丁质酶 GH18 家族基因的基本结构及保守序列, 且进化树显示, 三疣梭子蟹 *Cht1* 与拟穴青蟹(*Scylla serrata*)等物种的 *Cht1* 聚为一类, 同源性最高, 达 92.80%。由此确定, *PtCht1* 为甲壳动物 GH18 家族 Group1 基因, 也是三疣梭子蟹该分类下的首个基因。此外, 全组织表达分析结果显示, *PtCht1* 在肝胰腺中较特异性高表达, 且在蜕皮间期的肝胰腺中的表达量显著高于前期和后期($P<0.05$)。低盐度胁迫处理后, 在肝胰腺中, *PtCht1* 基因的表达量在 3 h 快速升至峰值, 为对照组的 2.72 倍; 在鳃中, 除 12 h 外, *PtCht1* 基因的表达量均呈显著上调表达($P<0.05$), 最高上调 9.96 倍。结果表明, *PtCht1* 基因能够参与机体对几丁质类食物的消化过程, 并且在渗透压的调控等方面发挥重要作用。本研究可为三疣梭子蟹几丁质酶 GH18 家族 Group1 基因的研究奠定基础, 为解析盐度影响三疣梭子蟹生长提供参考。

关键词 三疣梭子蟹; 几丁质酶; 基因克隆; 蜕皮; 低盐胁迫

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)01-0144-10

几丁质(Chitin)是昆虫和甲壳动物外骨骼和围食膜的主要分子成分, 是由 β -1,4 糖苷键连接的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖直链多聚糖, 其含量仅次于纤维素, 为第二大天然多糖(Zhang *et al.*, 2013; Qiang *et al.*, 2018)。几丁质酶(Chitinase)是广泛存在于动物、植物、真菌、细菌和病毒中的一种能够随机催化几丁质聚合

物水解的酶(Adrangi *et al.*, 2013; Umemoto *et al.*, 2013)。在甲壳动物中, 几丁质酶在几丁质类食物的消化、蜕皮和应激反应等生理功能中起关键作用(Zou *et al.*, 2004; Merzendorfer, 2006; Gao *et al.*, 2017)。

几丁质酶基因是一个具有 GH18 和 GH19 两大家族的多基因家族(Gao *et al.*, 2018; Gayathri *et al.*,

* 现代农业产业技术体系(CARS-48)、国家自然科学基金面上项目(41776160)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)、山东省重点研发计划(2018GSF121030)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022018027)和江苏省重点研发计划(面上项目)(BE2017325)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), National Natural Science Foundation of China (41776160), and Efficient Eco Agriculture Innovation Project of Taishan Leading Talent Project (LJNY2015002), Shandong Province Key Development Program for Research (2018GSF121030), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute (20603022018027), and Key Research and Development Plan of Jiangsu Province (BE2017325)]. 宋柳, E-mail: ssongliu@foxmail.com

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

收稿日期: 2019-12-24, 收修改稿日期: 2020-01-13

2018), 目前, 在隶属于 GH18 家族的主要经济甲壳动物中均已开展了几丁质酶基因相关功能的研究, 并且根据基因结构特征将其归为 7 大类(Group1~7, 其所属的基因也大多相应的命名为 *Cht1*~7), 但三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶基因仅发现了其中 3 类, 包括 Group3(张凤等, 2017)、Group5(宋柳等, 2019)和 Group7(张凤等, 2015), 还有很多未知的基因有待发掘。甲壳动物 Group1 几丁质酶基因多在肝胰腺中有较高表达, 而肝胰腺是消化酶分泌的重要器官, 表明其发挥着消化几丁质类食物的功能。Salma 等(2012)在日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*)研究中发现, *Pj-Cht1* 主要在肝胰腺中表达, 可能在几丁质类食物的消化中起作用。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *LvChi1* 基因(Huang *et al*, 2010; Rocha *et al*, 2012)和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) (Zhou *et al*, 2018) *SpCht1* 基因均在肝胰腺中特异性表达, 推测其参与了几丁质类食物的消化。类似结果在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (Li *et al*, 2015)、日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*) (Watanabe *et al*, 1996、1998)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Proespraiwong *et al*, 2010)和中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Priya *et al*, 2009)等物种中也有发现。此外, 也有研究显示, 在尾扇、眼柄、鳃等组织(Watanabe *et al*, 1997; Rocha *et al*, 2012)亦有几丁质酶 Group1 基因的表达, 暗示了其功能的多样性, 可能参与了多种生理学进程。例如, 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) (Zhang *et al*, 2014) *MnCht1A* 和 *MnCht1B* 除了在肝胰腺中高表达外, 在表皮和肠道中亦有少量分布, 表明该基因可能还在肠内围食膜中内源几丁质的降解以及几丁质外骨骼的分解中起作用。然而, Group1 几丁质酶基因的结构及功能虽在其他虾蟹中有较多研究, 但在三疣梭子蟹中相关的内容却鲜有报道。

本研究中, 通过 RACE 克隆、生物信息学分析及 qRT-PCR 等方法对三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因的结构及功能进行探究, 明确基因的分类, 解析 *PtCht1* 在促进消化等方面的功能, 可为三疣梭子蟹几丁质酶 GH18 家族 Group1 基因的研究奠定基础, 为耐低盐新品种的培育提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地—山东潍坊昌邑市海丰水产有限公司养殖的健康三疣梭子蟹, 湿重为(5.78±1.11) g。室内

养蟹池 4 个, 体积均为 20 m³, 每池 150 只蟹, 暂养 7 d。盐度 33、pH 8.7 的自然海水养殖, 水温控制在(25±1)°C, 保持氧气供应充足, 每天定时更换 1/3 水量, 每天 18:00 定时投喂新鲜蓝蛤(*Potamocorbula laevis*)。

1.2 全长 cDNA 的克隆及测序

随机取 8 只(雌雄各 4 只)暂养后四肢健全且充满活力的健康三疣梭子蟹, 解剖取样, 包括心脏、肝胰腺、肠、鳃、胸神经节、肌肉、脑、眼柄、胃、表皮、精巢和卵巢, 液氮冷冻后, 将所有样品的同一组织混合后进行研磨, Trizol 法提取总 RNA, 通过 Thermo 的 NanoDrop 2000 核酸定量仪与 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 选取高质量的总 RNA, 混匀后用 SMARTTM RACE Amplification Kit 合成用于 3'和 5' RACE 的 cDNA 模板。依据三疣梭子蟹高通量测序数据库中 *PtCht1* 的已知表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST), 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5'RACE 特异性引物(*PtCht1* F 和 *PtCht1* R)、通用引物(UPM)和 ORF 验证引物(*PtCht1* Fi 和 *PtCht1* Ri)(表 1)。利用 Advantage 2 PCR Kit 对 3'和 5'末端进行扩增。纯化后的扩增产物与 pMD18-T 载体连接后转入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中扩大培养, 挑取阳性单克隆, 利用 DNA 测序通用引物 M13-47/48 进行菌落 PCR 鉴定, 将目的产物送至睿博生物公司进行测序。利用 Vector NTI 11.0 去掉测序结果中冗余序列后, 拼接获得完整的基因序列。

1.3 序列分析

利用软件 BioEdit 预测 ORF 开放阅读框, 并翻译蛋白序列; 将蛋白序列提交至在线分析软件 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 预测信号肽; 利用 NCBI 的保守结构域(CDD)数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)进行功能结构域的预测和确定; 使用 DNAMAN 分析软件将三疣梭子蟹的氨基酸序列与其他物种进行多重序列比对; 通过软件 MEGA 6.0 以 Neighbor Joining 法构建系统进化树(段亚飞等, 2013)。

1.4 蜕皮周期实验

根据甲壳硬度和游泳足趾节末端新旧表皮的变化(沈洁等, 2011), 将部分暂养 7 d 后的健康三疣梭子蟹分成蜕皮间期(甲壳硬, 无新表皮出现)、蜕皮前期(甲壳硬, 出现新表皮)和蜕皮后期(甲壳柔软), 每个

表 1 三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因克隆和实时荧光定量所用引物序列
Tab.1 Primer sequences for cloning and qRT-PCR of *PtCht1* gene in *P. trituberculatus*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	作用 Purpose
<i>PtCht1</i> F	GTTGGCTACGAGGACCCCGACAG	3' RACE
<i>PtCht1</i> R	GGCCACAAACCGGCGATAACCGT	5' RACE
<i>PtCht1</i> Fi	ATGAGTATTAAGGGTGCCCTG	验证 ORF
<i>PtCht1</i> Ri	CTAGGGGATGTTGTGCAGTG	验证 ORF
<i>PtCht1</i> qF	CCATTGTCATCCAGCATCATC	qRT-PCR
<i>PtCht1</i> qR	CTACACGCTCCCATCAAGAAGT	qRT-PCR
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	qRT-PCR 通用引物
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR 通用引物
M13F-47	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	DNA 测序通用引物
M13R-48	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	DNA 测序通用引物

时期随机取 3 只, 取其血细胞、第 1 对鳃、第 6 对鳃、胃、肝胰腺、心脏、表皮、肌肉、眼柄和肠组织于液氮速冻保存, 实验设置 3 个平行。

1.5 盐度胁迫实验

正式实验前, 随机挑取 240 只暂养 7 d 后充满活力的健康三疣梭子蟹进行低盐胁迫预实验, 实验方法参照隋延鸣等(2012)。设置 4 个盐度梯度, 分别为 33(对照)、13、11 和 9, 每个盐度下放置 20 只蟹, 设置 3 个平行, 统计 24、36、48 和 72 h 三疣梭子蟹死亡数, 计算结果显示, 72 h 半致死盐度为 11, 由此正式实验设置 2 个盐度, 即对照组(33)和低盐组(11)。低盐度海水由自然海水(33)与淡水调配而成, 每组设 3 个平行, 每个平行 50 只蟹。分别在胁迫后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取 3 只梭子蟹的肝胰腺和鳃组织, 液氮速冻保存, 便于后续提取 RNA。

1.6 *PtCht1* 基因 mRNA 的实时定量 PCR 检测

将获得的组织样品利用 Trizol 法提取总 RNA, 检测方法同 1.2。选取高质量的总 RNA 样品, 参照 TOYOBO ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒说明书, 反转录成 cDNA, 用于后续的实时荧光定量 PCR 分析(qRT-PCR)。根据拼接获得的 *PtCht1* 基因 cDNA 序列全长和已知的三疣梭子蟹管家基因 β -actin, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计荧光定量特异性引物(*PtCht1* qF 和 *PtCht1*qR)和内参引物(β -actin-F 和 β -actin-R) (表 1), 通过实时定量 PCR 法对 *PtCht1* 基因在各个组织和各实验组中的相对表达量进行检测分析, 反应体系及程序参照 TOYOBO SYBR® Green Real-time PCR Master Mix 说明书进行, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 借助 SPSS

19.0 对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 利用 Origin Pro 和 Excel 软件将结果整理统计, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 *PtCht1* 基因的 cDNA 全长克隆及序列分析

以三疣梭子蟹各组织的混合 cDNA 为模板进行 RACE 扩增, 获得 3'-981 bp 和 5'-477 bp 的 cDNA 片段。将扩增的片段与已知的 EST 序列拼接, 得到完整的几丁质酶 1 基因的 cDNA, 命名为 *PtCht1* (GenBank No.: KM100752)。基因结构如图 1 所示, 序列全长共 2220 bp, 其中, 3'端及 5'端非编码区分别为 324 bp 和 144 bp, 开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)为 1752 bp, 共编码氨基酸 583 个, 分子量为 65.68 kDa, 理论等电点为 5.84。通过 DNASTAR 7.1.0 (Lasergene)软件包中 EditSeq 蛋白统计程序分析一级结构的基本性质。结果显示, *PtCht1* 基因编码的氨基酸组成中强碱性(R 和 Lys)、强酸性(D 和 E)、疏水性(A、I、L、F、W 和 V)和极性氨基酸(S、C、N、Q、Y 和 T)残基的数目分别为 78、83、266 和 141 个。此外, 图 1 结合图 2 蛋白结构域预测结果显示, N 端存在 22 个氨基酸的信号肽序列, 46~397 个氨基酸为 1 个含 4 个保守基序的糖基水解酶第 18 家族催化结构域(GH18 catalytic domain)和活性位点 ¹⁶¹FDGFDL DWE¹⁶⁹, 在 463~518 个氨基酸处, 含 6 个半胱氨酸(Cys)和几丁质结合结构域(ChtBD2)。

2.2 *PtCht1* 的同源性分析

将三疣梭子蟹 *Cht1* 的氨基酸序列与其他物种进行同源性比对分析(图 3)可知, *PtCht1* 基因与拟穴青

```

1 CCTTGACGATAACAAGGTCCACACACTCACCTATATAAATGGGTGAGTGGATCTGCTCTTCTAAGCACGAGTACGACCTGGTCTGTGT 90
91 GTACACTCTCGACAACCTTTGTTTTCTTACATCGCTCCGGAGGAAGCTTCATC ATGAGT ATT AAG GGT GCC CTG GGC CTG GGG CTG CTG 180
   L A I L V A S V S A E P R Y A R P G D H E P V E H V R A L P
181 CTG GCA ATA CTG GTG GCC TCC GTC AGC GCT GAG CCT CGT TAC GCC AGA CCA GGA GAT CAC GAG CCT GTG GAG CAC GTG CGG GCT TTG CCT 270
   E R Q G R R V C Y Y E T W A L Y R P D E V H Y D I E S I P G
271 GAG CGT CAG GGG CGC CGC GTC TGC TAC TAT GAG ACA TGG GCG TTG TAC AGG CCG GAC GAG GTG CAT TAC GAC ATC GAA AGC ATC CCC GGA 360
   N L C T H L I Y T F C G V S N V T W E V L M L D P E L D I N
361 AAT CTG TGC ACG CAT CTC ATC TAC ACC TTC TGC GGT GTG TCC AAC GTC ACC TGG GAA GTC CTC ATG CTG GAT CCT GAG CTG GAC ATC AAC 450
   A N G Y R R F V A L K E K F P D V K T T I A V G G W A E G G
451 GCT AAC GGT TAT CGC CGG TTT GTG GCC CTG AAG GAG AAG TTC CCT GAC GTG AAG ACC ACA ATT GCC GTG GGT GGG TGG GCC GAG GGA GGC 540
   K K Y S Q M V S V K E R R D T F I R S V V Q L L T E Y G F D
541 AAG AAG TAC TCC CAG ATG GTG AGC GTC AAG GAG CGC CGA GAC ACC TTC ATC AGG AGC GTT GTC CAG CTG CTC ACG GAG TAC GGC TTC GAC 630
   G F D L D W E Y P G A T D R G G A F A D K D N F L K L V T E
631 GGC TTC GAT CTG GAT TGG GAG TAT CCC GGA GCG ACT GAC CGC GGT GGT GCC TTT GCT GAC AAA GAC AAC TTC CTG AAG CTT GTG ACA GAA 720
   L R E A T F D L I Y T F C G W E L N A V P V A K F R L Q E L D Y H
721 CTG CGC GAA GCC TTT GAT TCC GTG GGT CTT GGC TGG GAG CTG ACC GCT GCT GTG CCC GTC GCT AAA TTC AGA CTT CAG GAG GGT TAC CAC 810
   V P Q L C S L L D A I H L M T Y D L R G N W C G F A D V H S
811 GTG CCC CAG CTT TGC AGT CTA CTG GAT GCC ATT CAC CTC ATG ACC TAC GAT CTG CGA GGG AAC TGG TGT GGC TTC GCT GAT GTG CAC TCC 900
   M L Y K R P G L D E W A Y E K L N D N D G V L L W E E F G C
901 ATG CTG TAC AAG CGT CCT GGC CTT GAC GAG TGG GCT TAC GAG AAG CTG AAT GAT AAT GAC GGT GTG CTG CTG TGG GAA GAG TTC GGA TGC 990
   P R D K L V L G T P F Y G R T Y T L G S P D N T D L H A P I
991 CCT CGC GAC AAG GTT CTG GGG ACA CCT TTC TAC GGC CGC ACC TAC ACA CTG GGT AGC CCT GAT AAC ACC GAT CTA CAC GCT CCC ATC 1080
   K K W E G G G K P G P Y T N A T G T M A Y F E I C K M M L D
1081 AAG AAG TGG GAG GGC GGT GGA AAG CCA GGC CCC TAC ACC AAC GCC ACC GGC ACC ATG GCT TAT TTC GAG ATC TGC AAG ATG ATG CTG GAT 1170
   D N G W V D R Y D D V G L V P F T H K E D Q W V G Y E D P D
1171 GAC AAT GGC TGG GTT GAC CGC TAC GAC GAG GTG GGC CTT GTT CCC TTC ACA CAC AAG GAG GAC CAG TGG GTT GGC TAC GAG CAC CCC GAC 1260
   S L K I K M D Y V K D M K L L G A M T W A I D Q D D Y L G W
1261 AGC CTC AAG ATC AAG ATG GAC TAC GTG AAG GAC ATG AAG CTG CTG GGC GCC ATG ACC TGG GCC ATT GAC CAG GAT GAC TAC CTT GGC TGG 1350
   C N R G K N P M M T T M Y E G L K D Y I V P P A P T T T S T
1351 TGC AAC AGA GGC AAG AAC CCC ATG ATG ACT ACC ATG TAC GAG GGA CTG AAG GAC TAC ATT GTG CCC CCA GCC ACC ACC ACC ACC AGC ACT 1440
   T M K T W W T T P T T K S T T T T R D P N L P T T T L G P
1441 ACC ATG AAA ACG TGG TGG ACG ACG CCA ACC ACC AAG TCC ACC ACC ACC ACC ACG CGG GAT CCC AAT CTT CCG ACC ACC ACT CTG GGA CCC 1530
   I D C N V A S Y W P H E D C D K Y Y W C Y D G V P H L E H C
1531 ATT GAC TGT AAT GTC GCC TCC TAC TGG CCC CAT GAG GAC TGT GAC AAG TAC TAC TGG TGC TAT GAT GGC GTT CCA CAC CTT GAG CAC TGC 1620
   P A G T Y W S Q S A Q M C D W A A N V D T S N C N V P A N A
1621 CCA GCA GGC ACC TAC TGG AGC CAG AGT GCC CAA ATG TGT GAC TGG GCC GCA AAT GTT GAC ACT TCC AAC TGC AAC GTG CCT GCC AAC GCT 1710
   P K P K H H S G P P P Q T K H I P P K K A A A K Q V H Q Q A
1711 CCC AAC CCC AAA CAG CAC AGC GGC CCT CCT CCC CAG ACC AAG CAC ATT CCT AAG AAA GCC GCC GCT AAG CAA GCT CAC CAA CAG GCT 1800
   N E I P L P K P K K E V P T A K G A K I P P L M K A L H N I
1801 AAT GAG ATC CCT CTT CCA AAA CCC AAG AAA GAA GTC CCT ACG GCA AAG GGA GCC AAA ATC CCT CCT CTG ATG AAG GCA CTG CAC AAC ATC 1890
   P
1891 CCC TAGATGCCGCGCGCCACATGCTTCTCGCCGACAGCTGGCATGTGGCCACCAGGACCGAATCTAATAACTCATTTCGAATTA 1980
1981 GTCATTTGATTATACGCACTCATTATGTCTAATATGTAGCTATAGTTGTATACAAATATTTGGAATCAGTGAAGTGGAAACCCGGTTGAT 2070
2071 GTATGTACAAGTTTATTATTTTTTTTCAATAATCATGTATTTTGAGAAGTCTATTATTATCTATAGTACTATAAATTCAGCCTTTCAG 2160
2161 TGTACGTGCTCAGTACCCCATCTTACTGAATCAAATATTAATTTCAAAAAAAAAA 2220

```

图 1 三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列
 Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *P. trituberculatus PtCht1*

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)用细线方框标出; 信号肽以细下划线标出;
 几丁质酶第 18 家族保守基序用粗线方框标出; ChtBD2 结构域用粗下划线标出; 6 个半胱氨酸用红色圆圈标出
 The letters in the box indicated the start codon (ATG) and the stop codon (TAG). Signal peptide is underlined
 with thin line, the chitinase family 18 conserved motifs of catalytic domain are framed by black box,
 chitin-binding domain (ChtBD2) with thick line, six cysteines are marked with red circles

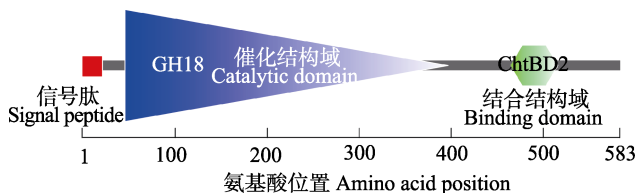


图 2 三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因编码的蛋白结构域位置
 Fig.2 The protein domain architecture of *P. trituberculatus PtCht1*

蟹 *SpCht1* 的同源性最高, 为 92.80%, 与锯缘青蟹 (*Scylla serrata*)、日本蟳 (*Charybdis japonica*)、凡纳滨对虾、日本对虾、日本沼虾和中华绒螯蟹的同源性次

之, 分别为 91.94%、90.85%、80.87%、76.98%、75.70% 和 75.00%。此外, 甲壳动物几丁质酶 GH18 催化结构域的 4 个保守基序 Motif I~IV 和含 6 个 Cys 的几丁质结合结构域 ChtBD2 在上述几个物种中均存在。系统进化树图谱显示(图 4), 甲壳动物第 18 家族几丁质酶主要分为 7 大类, 分别以 Cht1、Cht2、Cht3、Cht4、Cht5、Cht6 和 Cht 聚类于 Group 1~7。三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因与凡纳滨对虾、日本对虾、斑节对虾、锯缘青蟹、中国对虾、日本沼虾和日本仿长额虾的 Cht1 聚为一类, 隶属于 Group1。

2.3 基因 *PtCht1* 的组织分布特征分析

利用 qRT-PCR 技术, 对三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因进行了全组织表达分布分析。结果显示, *PtCht1* 在肝

胰腺、胃、肠、表皮、肌肉、眼柄、心脏、第 6 对鳃、血细胞和第 1 对鳃中均有表达, 其中, 在肝胰腺中的表达量最高, 胃次之, 而在其他组织中少有表达(图 5)。

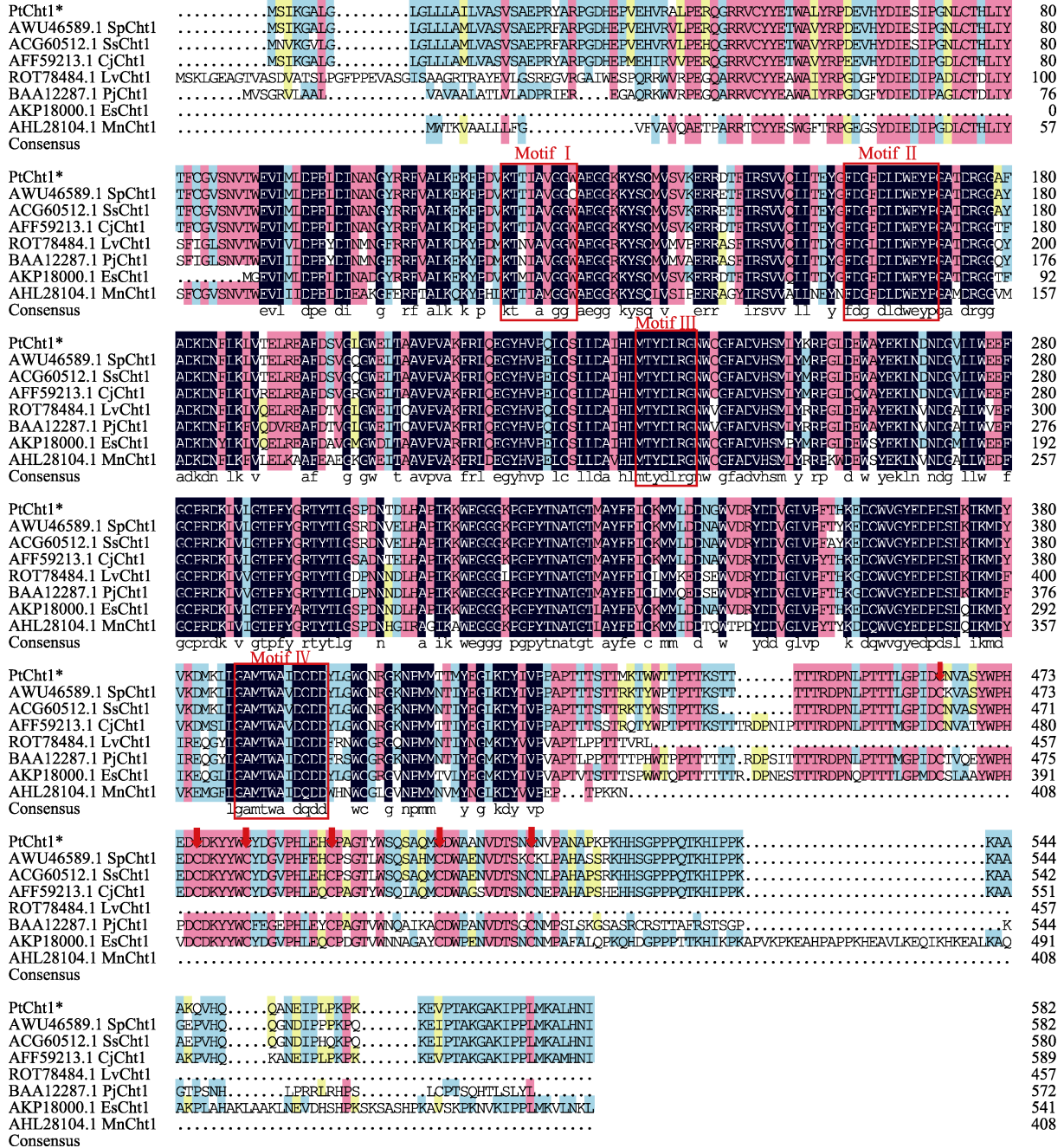


图 3 三疣梭子蟹 *PtCht1* 氨基酸序列的多序列比对

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *P. trituberculatus PtCht1* with others

几丁质酶第 18 家族保守基序以红色方框表示, 几丁质结合结构域(ChtBD2)中的 6 个半胱氨酸(Cys)以红色箭头表示

Sp: 拟穴青蟹; Ss: 锯缘青蟹; Cj: 日本蟳; Lv: 凡纳滨对虾; Pj: 日本对虾; Mn: 日本沼虾; Es: 中华绒螯蟹

The chitinase family 18 conserved motifs are framed by red box, the six cysteines (Cys)

in the chitin binding domain (ChtBD2) are marked by red arrows

Sp: *Scylla paramamosain*; Ss: *Scylla serrata*; Cj: *Charybdis japonica*; Lv: *Litopenaeus vannamei*;

Pj: *Marsupenaeus japonicus*; Mn: *Macrobrachium nipponense*; Es: *Eriocheir sinensis*

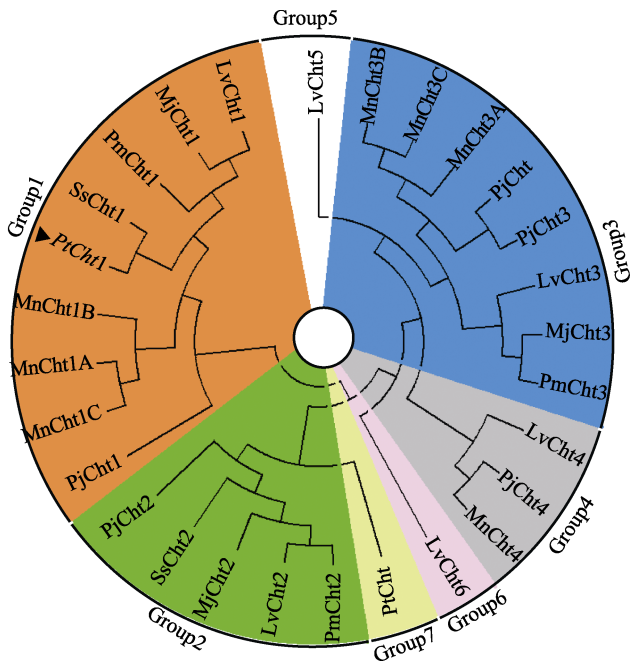


图 4 三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 PtCht1 的系统进化树
Fig.4 Phylogenetic analysis of chitinase PtCht1 from *P. trituberculatus*

▲: 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶蛋白 PtCht1; 各物种几丁质酶 GenBank 登录号: 日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)Cht1(BAA12287)、Cht2 (BAA14014)、Cht3(BAA22854); 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) Cht1A (KF466274.1)、Cht1B (KF466275.1)、Cht1C (AHL24866.1)、Cht3A (KF466276.1)、Cht3B (KF466277.1)、Cht3C (KF466278.1)、Cht4 (KF466279.1); 斑节对虾(*Penaeus monodon*) Cht1 (AAD40313.1)、Cht2 (ADG22164.1)、Cht3 (ADG22163.1); 锯缘青蟹(*Scylla serrata*) Cht (ABY85409.1)、Cht1 (ACG60512.1)、Cht2 (ACZ53950.1); 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)Cht1 (EU883591.1)、Cht2 (EU861222.1)、Cht3 (AAN74647.1)、Cht4 (FJ888480.1)、Cht5 (FJ888481.1)、Cht6 (GQ916594.1); 日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*) Cht (AFC60660.1)、Cht1 (JF694836.1)、Cht2 (JN982965.1)、Cht3 (JF694838.1)、Cht4 (JF694837.1)

2.4 PtCht1 在蜕皮周期中的表达

PtCht1 基因在三疣梭子蟹不同蜕皮时期的肝胰腺中的表达模式显示(图 6), PtCht1 在蜕皮间期的肝胰腺中的表达量最高, 蜕皮后期次之, 在蜕皮前期最低, 不同蜕皮时期之间表达量差异显著($P < 0.05$)。

2.5 PtCht1 在低盐胁迫下的表达

三疣梭子蟹在进行 72 h 低盐度(11)胁迫后, PtCht1 基因在肝胰腺及第 6 对鳃中的相对表达量如图 7 所示。在肝胰腺中, 相比于对照组, 胁迫后的 PtCht1

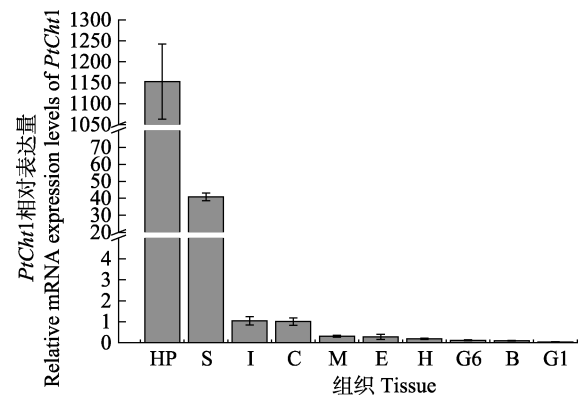


图 5 三疣梭子蟹 PtCht1 基因在不同组织中的表达水平
Fig.5 Relative mRNA expression level of *P. trituberculatus* PtCht1 gene in different tissues

Hp: 肝胰腺; S: 胃; I: 肠; C: 表皮;
M: 肌肉; E: 眼柄; H: 心脏; G6: 第 6 对鳃;
B: 血细胞; G1: 第 1 对鳃
Hp: Hepatopancreas; S: Stomach; I: Intestine;
C: Cuticle; M: Muscle; E: Eyestalk; H: Heart;
G6: Sixth gill; B: Blood cell; G1: First gill

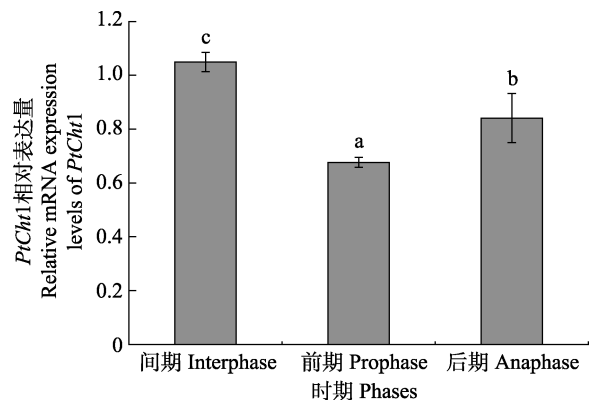


图 6 PtCht1 基因在三疣梭子蟹不同蜕皮时期肝胰腺中的表达水平
Fig.6 Relative mRNA expression level of *P. trituberculatus* PtCht1 gene in hepatopancreas during molting

不同英文字母表示差异显著($P < 0.05$). 下同
Different letters on the column indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as below

基因的相对表达量在 3 h 急剧上升, 达到最大值, 为对照组的 2.72 倍, 呈显著上调表达($P < 0.05$), 6 h 迅速降低, 至 24 h 均为显著下调表达($P < 0.05$), 其中, 12 h 降至最小值, 为对照组的 0.23 倍, 48 h 再次回升至对照组水平, 72 h 增至上调表达($P < 0.05$)。在第 6 对鳃组织中, 相比对照组, 胁迫后的 PtCht1 基因在 3~6 h 呈现显著上调表达($P < 0.05$), 至 6 h 达到第 1 个峰值, 为对照组的 2.67 倍, 12 h 急剧降低至最小值, 为对照组的 0.46 倍, 呈显著下调表达($P < 0.05$), 24 h

后逐渐上升, 至 72 h 达到最大值, 为对照组的 9.96 倍, 呈显著上调表达($P < 0.05$)。

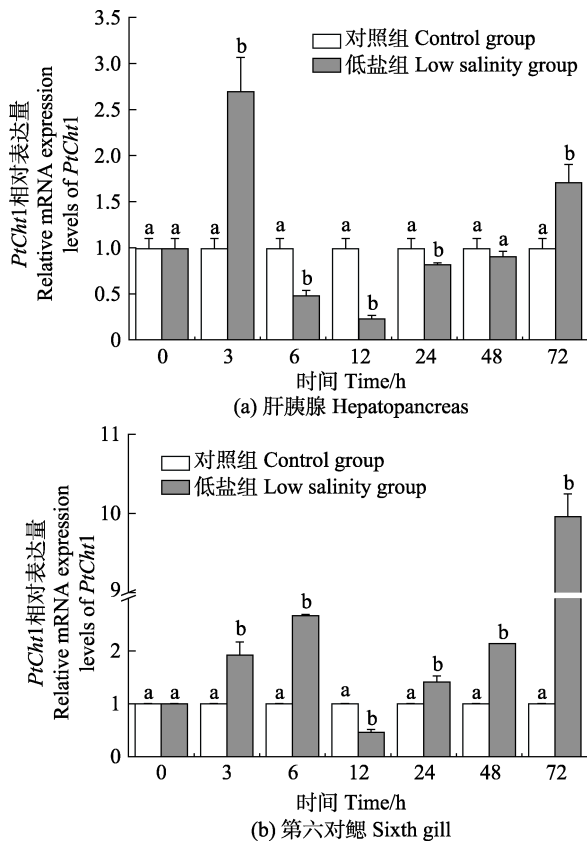


图 7 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCht1* 在肝胰腺和第六对鳃的表达水平

Fig.7 Relative mRNA expression levels of *P. trituberculatus PtCht1* gene in the hepatopancreas and sixth gill under low salinity stress

3 讨论

三疣梭子蟹养殖的不同发育阶段的动物性饵料多以卤虫、杂鱼、蓝蛤等为主, 而这一摄食组成中含有大量的几丁质成分, 需要几丁质酶进行消化分解后才能吸收(Das *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018)。本研究成功克隆三疣梭子蟹几丁质酶基因 1 (*PtCht1*), 其编码的蛋白具有含第 18 家族保守基序的催化结构域、活性位点(FDGLDLDVE)以及几丁质结合结构域 ChtBD2 (Boot *et al.*, 2001), 且 ChtBD2 含 6 个保守的半胱氨酸, 可形成 3 个二硫键, 对稳定几丁质酶的结构及调控几丁质酶的活性十分重要(Zhou *et al.*, 2017)。氨基酸比对及系统进化树分析显示, *PtCht1* 与拟穴青蟹 *SsCht1* 基因的同源性最高, 同时, 与其他甲壳动物几丁质酶 1 紧密聚为一支。由此, 根据结构域和活性位点的高度保守性结合聚类分析, 确定了

PtCht1 基因为三疣梭子蟹第 18 家族几丁质酶基因, 且隶属于 Group1。

甲壳动物几丁质酶 1 基因常高表达于肝胰腺中, 而肝胰腺是分泌消化酶的主要场所, 故几丁质酶 1 基因在肝胰腺中的功能与几丁质类食物的消化相关(Watanabe *et al.*, 1998)。本研究中, 三疣梭子蟹 *PtCht1* 基因在肝胰腺和胃等消化器官中的表达量远高于其他组织, 表明 *PtCht1* 亦可能发挥消化几丁质类食物的功能, 这与 Zhang 等(2010)关于中国对虾的几丁质酶基因 *FcCht1* 和 *FcCht3* 的报道类似。此外, Zhang 等(2014)发现, 日本沼虾 *MnCht1A* 和 *MnCht1B* 基因可能与可溶性几丁质的消化水解有关, 因其具有几丁质结合结构域 ChtBD2, 而 *PtCht1* 同样具有该结构, 所以 *PtCht1* 可能与非可溶性几丁质类食物的消化有关。

斑节对虾几丁质酶 *PmCht1*(Tan, 2000)与日本对虾 *PjCht1*(Watanabe *et al.*, 1996)高度同源, 均在肝胰腺中特异性表达, 被认为主要与几丁质类食物的降解有关, 且在不同的蜕皮阶段, 肝胰腺 mRNA 水平上的表达差异显著。*PtCht1* 在蜕皮间期, 表达量显著升高($P < 0.05$), 但在蜕皮前期和后期有所下降, 可能与三疣梭子蟹的生活习性相关。一般情况下, 梭子蟹在蜕皮前期和后期阶段摄食停滞, 而在蜕皮间期, 处于快速生长阶段, 摄食活跃, 需要更多的几丁质酶消化食物(周凯敏, 2017), 进一步表明 *PtCht1* 在消化中发挥重要作用。

盐度是影响三疣梭子蟹生长的主要环境因素之一(何鹏等, 2019)。本研究探究了低盐胁迫对几丁质酶基因的表达和三疣梭子蟹生长的影响。结果显示, 低盐度会干预 *PtCht1* 基因的正常表达, 使其在肝胰腺中呈先上调后下调再回升的表达规律, 并且 *PtCht1* 基因亦能够对盐度的改变做出快速应答, 在 3 h 即达到峰值, 而已有研究表明, 低盐度条件下, 需要机体提供更多的能量来调节渗透压(Ye *et al.*, 2009), 由此推断, *PtCht1* 可能在促进食物消化, 提供机体所需的能量, 进而调控三疣梭子蟹生长及机体应对低盐胁迫过程中具有重要作用(Nikapitiya *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2019)。三疣梭子蟹主要依靠后鳃进行渗透压的调节, *PtCht1* 基因在低盐度胁迫下第 6 对鳃中的表达具有显著性差异, 除 12 h 外, 整体为上调表达, 暗示了 *PtCht1* 基因可能参与抗低盐胁迫的渗透压调节过程(Lü *et al.*, 2013), 并发挥积极作用, 但详细的调节机制尚需进一步探索。

综上所述, 本研究克隆并分析了三疣梭子蟹几丁质酶基因 GH18 家族 Group1 成员 *PtCht1* 基因的结构特征, 丰富了甲壳动物几丁质酶基因家族。通过分析

PtCht1 基因的组织表达特征, 蜕皮周期及低盐度胁迫下的表达模式, 探究了基因在三疣梭子蟹消化、生长及渗透压调节方面发挥的生理功能, 可为甲壳动物几丁质酶基因的相关调控机理研究提供参考信息, 对快速生长及耐低盐新品种的培育提供新途径。

参 考 文 献

- Adrangi S, Faramarzi MA. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1786–1795
- Boot RG, Blommaert EFC, Swart E, *et al.* Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9): 6770–6778
- Das S, Vraspir L, Zhou W, *et al.* Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the molting gland (Y-organ) of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, during molt-cycle stage transitions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics and Proteomics*, 2018, 28: 37–53
- 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]
- Gao C, Cai X, Zhang Y, *et al.* Characterization and expression analysis of chitinase genes (*CHIT1*, *CHIT2* and *CHIT3*) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 64: 357–366
- Gao L, Sun J, Secundo F, *et al.* Cloning, characterization and substrate degradation mode of a novel chitinase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414. *Food Chemistry*, 2018, 261: 329–336
- Gayathri R, Venkatesh K, Arun M, *et al.* Bactericidal and fungistatic activity of peptide derived from GH18 domain of prawn chitinase 3 and its immunological functions during biological stress. *International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions*, 2018, 106: 1014–1022
- He P, Jiang SG, Li YD, *et al.* Molecular cloning and expression pattern analysis of *GLUT1* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *South China Fisheries Science*, 2019, 15(2): 72–82 [何鹏, 江世贵, 李运东, 等. 斑节对虾 *GLUT1* 基因 cDNA 的克隆与表达分析. *南方水产科学*, 2019, 15(2): 72–82]
- Huang QS, Yan JH, Tang JY, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75–81
- Li X, Xu Z, Zhou G, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of five chitinases associated with molting in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 187: 110–120
- Lü 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
- Lu S, Li R, Zheng W, *et al.* Long-term low-salinity stress affects growth, survival and osmotic related gamma-aminobutyric acid regulation in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture Research*, 2019, 50(10): 2888–2895
- Merzendorfer H. Insect chitin synthases: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2006, 176(1): 1–15
- Nikapitiya C, Kim WS, Park K, *et al.* Chitinase gene responses and tissue sensitivity in an intertidal mud crab (*Macrophthalmus japonicus*) following low or high salinity stress. *Cell Stress and Chaperones*, 2015, 20(3): 517–526
- Priya TAJ, 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): 90–96
- Qiang Y, Stephen SF. Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu_0580 as a thermostable and acidic endochitinase. *Biotechnology Reports*, 2018, 19: e00274
- Rocha J, Garcia-Carreño FL, Muhlia-Almazán A, *et al.* Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molting cycle. *Aquaculture*, 2012, 330–333: 111–115
- Salma U, Uddowla MH, Kim M, *et al.* Five hepatopancreatic and one epidermal chitinases from a pandalid shrimp (*Pandalopsis japonica*): Cloning and effects of eyestalk ablation on gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 161(3): 200–207
- 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]
- Song L, Lü JJ, Wang L, *et al.* Cloning of chitinase gene (*PtCht6*) in *Portunus trituberculatus* and its functional analysis in immunity. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(5): 1080–1090 [宋柳, 吕建建, 王磊, 等. 三疣梭子蟹几丁质

- 酶基因(*PtCh16*)的克隆及其在免疫中的功能分析. 海洋与湖沼, 2019, 50(5): 1080–1090]
- 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. The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. Marine Biotechnology, 2000, 2(2): 126–135
- Umemoto N, Ohnuma T, Mizuhara M, *et al.* Introduction of a tryptophan side chain into subsite +1 enhances transglycosylation activity of a GH-18 chitinase from *Arabidopsis thaliana*, *AtChiC*. Glycobiology, 2013, 23(1): 81–90
- 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: 299–303
- 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
- Watanabe T, Kono M. 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
- Ye L, Jiang SG, Zhu XM, *et al.* Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture, 2009, 290(1–2): 140–144
- Zhang F, Lü JJ, Liu P, *et al.* Cloning and expression analysis of the cDNA of *PtCh13* in *Portunus trituberculatus*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 167–176 [张凤, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCh13* 基因克隆鉴定及表达分析. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 167–176]
- Zhang F, Lü 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, Kopparapu NK, Yan Q, *et al.* Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. Food Chemistry, 2013, 138(2–3): 1225–1232
- 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: 30–40
- Zhou FL, Zhou KM, Huang JH, *et al.* Characterization and expression analysis of a chitinase gene (*PmChi-5*) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogens infection and ambient ammonia-N stress. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 72: 117–123
- Zhou KM, Zhou FL, Huang JH, *et al.* Characterization and expression analysis of a chitinase gene (*PmChi-4*) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogen infection and ambient ammonia nitrogen stress. Fish and Shellfish Immunology, 2017, 62: 31–40
- Zhou KM. Expression analysis of chitinase genes from *Penaeus monodon*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [周凯敏. 斑节对虾几丁质酶基因的克隆与表达. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Zhou ZK, Gu WB, Wang C, *et al.* Seven transcripts from the chitinase gene family of the mud crab *Scylla paramamosain*: Their expression profiles during development and moulting and under environmental stresses. Aquaculture Research, 2018, 93: 223–235
- Zou E, Bonvillain R. Chitinase activity in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as an *in vivo* screen for molt-interfering xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 2004, 139(4): 225–230

(编辑 冯小花)

Cloning and Functional Identification of Chitinase Gene 1 in Swimming Crab *Portunus trituberculatus*

SONG Liu^{1,2}, ZHANG Feng^{1,2}, LÜ Jianjian¹, LIU Ping^{1①}, GAO Baoquan¹, LI Jian¹

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Chitinase plays an important role in the molting, digestion, and pathogen defense of *Portunus trituberculatus*. However, little is known about the *P. trituberculatus* chitinase genes. To understand the *P. trituberculatus* chitinase gene family, we investigated its chitinase gene 1 (*PtCht1*). *PtCht1* has a total cDNA of 2220 bp and encodes for 583 amino acids. We found that *PtCht1* exhibited the basic structure and contained the conserved sequence of the chitinase GH18 family genes of crustaceans. The phylogenetic tree showed that *Cht1* of *P. trituberculatus* was clustered with *Cht1* of other species such as *Scylla serrata*, with 92.80% homology. Therefore, we concluded that *PtCht1* is a Group1 gene of the crustacean GH18 family. Further, it is the first *P. trituberculatus* gene in this classification. Additionally, the results of whole tissue expression analysis showed that *PtCht1* was highly expressed in the hepatopancreas, and the expression level in the hepatopancreas during the inter-molt was significantly higher than in the pre-molt and post-molt ($P < 0.05$). After low salinity stress treatment, the expression level of *PtCht1* gene in hepatopancreas rapidly rose to the peak at 3 h (2.72-fold); in the gill, except for 12 h, the expression level of *PtCht1* gene was significantly up-regulated ($P < 0.05$), up to 9.96-fold. Our results show that the *PtCht1* gene can participate in the digestion of foods containing chitin and plays a significant role in the regulation of osmotic pressure. Thus, our study is a landmark study in Group1 gene research of the chitinase GH18 family of *P. trituberculatus*. To conclude, the gene function studies of *PtCht1* provide new clues for analyzing the effect of salinity on the growth of *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; Chitinase; Gene cloning; Molting; Low salinity stress

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