

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19189

斑节对虾胸腺素 $\beta 5$ 的克隆、表达与功能分析

陈鸣^{1,2}, 赵超², 范嗣刚², 王鹏飞², 闫路路², 王芳^{2,3}, 邱丽华^{1,2}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 水产科学国家级实验教学示范中心, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
3. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: β -胸腺素(β -thymosin)是一类高度保守的功能多肽, 在伤口愈合、血管生成、抗菌和抗病毒免疫等生理活动中起重要的调控作用。本研究从斑节对虾(*Penaeus monodon*)中成功克隆了一种 β -thymosin cDNA 序列(β -thymosin 5), 其全长为 1495 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF)为 615 bp, 编码 204 个氨基酸。多重序列比对和系统进化树分析结果表明 $Pm\beta 5$ 与对虾属的日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)的胸腺素 $\beta 5$ 聚为一支, 其中与日本囊对虾的胸腺素 $\beta 5$ 同源性最高, 相似性高达 77%。组织分布研究显示 $Pm\beta 5$ mRNA 在肝胰腺和淋巴等免疫相关组织中的表达量明显高于其他组织。在灭活的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)刺激下, $Pm\beta 5$ 基因的表达量显著升高($P<0.05$), 这说明 $Pm\beta 5$ 参与了对虾的抗菌免疫反应。此外, 用原核表达技术获得了 $Pm\beta 5$ 的体外重组蛋白, 抗菌实验(牛津杯法)检测证明, $Pm\beta 5$ 对哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和枯草芽孢杆菌均有抗菌活性。

关键词: 斑节对虾; β -thymosin; 基因表达; 原核表达; 抗菌活性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)04-0383-10

胸腺素是一种能够快速结合病原体、启动下游模式识别受体或分子从而促进机体进行免疫防御的多肽。胸腺素是由胸腺产生的一种淋巴生长因子, 最早由 Goldstein 等^[1]从小牛胸腺蛋白提取液中发现。根据等电点(pI)的不同, 胸腺素家族可分为 α -胸腺素、 β -胸腺素和 γ -胸腺素三类, 其中 β -胸腺素的 pI 值为 5.0~7.0^[2]。 β -胸腺素广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中, 至今为止一共发现了 15 种 β -胸腺素^[3]。在脊椎动物中, β -胸腺素的功能非常广泛^[4], 具有创伤愈合^[5]、参与炎症反应^[6]、肿瘤发生与转移^[7]、内皮细胞再生、血管生成^[8]和细胞凋亡^[7]等重要作用。在无脊椎动物中, 许多研究表明 β -胸腺素能够参与无脊椎动物机体免疫反应, 例如, 研究发现胸腺素 $\beta 4$ 在香港牡蛎

(*Crassostrea gigas*)的免疫反应中起作用, 胸腺素 $\beta 4$ 的重组蛋白可以抑制革兰氏阳性枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)的生长, 并且这种抑制作用会随着重组蛋白浓度的升高而升高^[9]。在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中, 胸腺素 $\beta 4$ 可以减少白斑综合征病毒复制, 增强血细胞中对白斑综合征病毒的吞噬作用^[10]。在日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)中, 胸腺素 $\beta 3$ 能通过血淋巴促进对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的清除^[11], 这证明了 β -胸腺素在宿主防御及病毒入侵中起重要作用。 β -胸腺素在脊椎动物和无脊椎动物免疫过程的作用已经被广泛研究, 然而在

收稿日期: 2019-07-05; 修订日期: 2019-08-01.

基金项目: 国家重点研发计划专项(2018YFD0900303); 海南省自然科学基金项目(319QN335); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2018HY-ZD0204); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2018163); 广东省促进经济发展专项(GDOE[2019]A24).

作者简介: 陈鸣(1995-), 女, 硕士研究生, 从事水产养殖研究. E-mail: 842972871@qq.com

通信作者: 邱丽华, 女, 博士, 研究员. E-mail: qiugroup_bio@outlook.com

脊椎动物中却没有发现胸腺素 $\beta 5$ 的存在。目前, 胸腺素 $\beta 5$ 仅仅只在少数几种十足目动物中发现, 例如日本囊对虾、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)和克原氏螯虾(*Pacifastacus clarkii*)。但是这些文献仅仅只是描述胸腺素 $\beta 5$ 的分子信息特征, 而没有进一步研究胸腺素 $\beta 5$ 的免疫功能。

弧菌病是由弧菌属细菌引起的一类细菌性疾病^[12]。目前已报道的致病性弧菌有十几种, 包括鳃弧菌、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)等^[13]。其中副溶血弧菌是最具代表性且毒性较强的致病菌, 被副溶血弧菌感染后的虾主要症状有红腿、黄鳃、断须等^[14]。

斑节对虾(*Pacifastacus monodon*)俗称黑虎虾, 对虾属中最大型种, 世界上三大养殖虾类之一。因为生长快, 成虾产量高, 并且有食性杂、养殖周期短、个体大、肉味鲜美、营养丰富等特点, 给水产养殖这个行业带来极高的经济价值^[15]。然而, 由病毒和细菌引起的病害经常发生, 给对虾养殖产业造成巨大的经济损失^[16]。据报道, 如同其他无脊椎动物一样, 对虾只能依靠固有的免疫系统来保护免受病原体入侵^[17]。因此通过研究斑节对虾免疫相关分子来深入了解先天免疫系统, 对于预防和治疗虾的病害至关重要。

在本研究采用基因克隆技术获得了 *Pm $\beta 5$* 基因 cDNA 的全长序列。利用 qRT-PCR 研究了 *Pm $\beta 5$* 基因在不同组织的分布情况和 *Pm $\beta 5$* 在副溶血弧菌刺激下的表达情况。通过原核表达技术获得了 *Pm $\beta 5$* 的体外重组蛋白, 抗菌实验(牛津杯法)进一步确定了该重组蛋白的体外抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的斑节对虾取自中国水产科学研究院南海水产研究所珠海基地, 体重(9 ± 1) g, 于充氧海水中暂养 3 d。实验全程保持充气维持水体含氧量, 水温维持在(25 ± 1) °C, 每天换水清污 1 次, 日换水量为 1/3; 暂养期间, 早晚喂食常规颗粒饲料各 1 次。

对于菌刺激试验, 将副溶血弧菌接种到高盐 LB 培养基中(盐度 20), 37 °C, 220 r/min 过夜培养, 然后按照 1 : 100 的比例转接培养至对数期, 离心去上清, 用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)稀释, 洗涤两次并重悬, 调整浓度 1×10^7 cfu/mL, 4 °C, 5000 g, 5 min 离心, 加入等体积的 0.3% 的甲醛溶液, 4 °C 下灭活 24 h, 取部分已灭活的菌液涂布到无菌的高盐 LB 平板验证菌液灭活情况, 灭活完成后 4 °C, 6000 g, 15 min 离心去除甲醛溶液, 用 PBS 洗涤 2~3 次, 等体积 PBS 重悬, 4 °C 储存备用。将 40 尾虾分成两组, 第一组注射 PBS; 第二组注射 20 μ L 灭活的副溶血性弧菌, 于注射后的 0 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 收集 3 只虾的鳃和肝胰腺, 在液氮中快速冷冻并储存在 -80 °C。

对于组织分布实验, 随机挑选 4 只健康的虾, 取肝胰腺、鳃、肠、淋巴、胃、肌肉共计 6 种组织, 并保存在液氮中。

1.2 总 RNA 提取与逆转录

通过使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 上海)从所有取样的组织中提取总 RNA 样品。然后通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性, 紫外分光光度法测定浓度。按照 PrimeScript™ 逆转录酶试剂盒的要求, 以 2 μ g 总 RNA 为模板合成第一链 cDNA。

1.3 基因的克隆及测序

根据本实验室斑节对虾转录组的测序结果, 筛选得到 *Pmthymosin* 序列。为了获得并验证全长 cDNA 序列, 设计了引物 ThyF 和 ThyR(表 1)。扩增 3'端未知序列时, 设计特异性引物 3'T β 5-F1/F2 并使用 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒(TaKaRa, 大连), 具体方法参照戴文婷等^[18]实验步骤。用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒(Sangon Biotech)纯化 PCR 产物, 连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连)并测序(Invitrogen, 广州)。

1.4 序列分析

使用 Basic Local Alignment Search Tool 对 *Pm $\beta 5$* 的全长 cDNA 序列进行同源鉴定, 并与 NCBI 中的其他已知序列进行比较(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)。使用生物信息学网络工具

(<http://emboss.bioinformatics.nl/>)确定推导的氨基酸序列, 并使用 ExPaSy 计算工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)计算理论等电点和分子量。通过 SignalP 4.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测 Pm $\beta 5$ 氨基酸的信号肽。功能域由

SMART 预测(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。来自其他物种的胸腺素的氨基酸序列从 NCBI GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)下载并用于 ClustalW 软件的多序列比对, 用 Mega 7.0 软件构建系统发育树。

表 1 引物设计列表
Tab. 1 List of primers

引物 primer	序列(5'-3') sequence	用途 usage
ThyF	ATGAGCGCTGAAACTCCCCT	片段验证
ThyR	TTAGGCCTTCTTCTTCTCCTCAA	片段验证
3' T $\beta 5$ F1	TTAAGGGACAGCTCGAGGGATTCT	3'-RACE
3' T $\beta 5$ F2	TAGCAAGGCGATGGCAAGAAG	3'-RACE
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'-RACE
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	3'-RACE
UPM(short)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'-RACE
qT $\beta 5$ F	GATATCGAGACCGAGAAGACACA	实时荧光定量 PCR
qT $\beta 5$ R	TTCTTCAGTCTCGGCATGTCGC	实时荧光定量 PCR
qEF-1 α -F	AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT	实时荧光定量 PCR
qEF-1 α -R	GCTTCGTGGTGCATCTCCACAGAC	实时荧光定量 PCR
rT $\beta 5$ F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGAGCGCTGAAACTCCCCT	原核表达
rT $\beta 5$ R	GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTGGCCTTCTTCTTCTCCTCAATC	原核表达

1.5 实时荧光定量 PCR

设计定量引物 qT $\beta 5$ F/R 和内参基因引物 qEF-1 α -F/R (表 1), 每组设置 3 个重复。使用 ABI 7500 Real Time PCR 仪和 TaKaRa 的 SYBR[®] Premix Ex Taq II 试剂对 Pm $\beta 5$ 的相对表达量进行分析。反应体系采用说明书中 20 μ L 体系标准, PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 熔解曲线分析。使用 LC480 定量仪器, 计算方法采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法。最后数据处理使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 检验, 利用 Sigma Plot 12.5 对统计结果进行作图, $P<0.05$ 表示具有显著差异性。

1.6 Pm $\beta 5$ 的原核表达

选择 BamH I 和 Xho I 两个限制性酶位点, 设计原核表达引物 rT $\beta 5$ F/R。将重组质粒 pET32a- $\beta 5$ 和空质粒 pET32a 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中, 在 28 $^{\circ}$ C, 220 r/min 的条件下振荡 3~4 h, 直到细菌 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6。然后, 将异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)以 0.6 mmol/L 的最终浓度加入到两种培养

基中, 并将培养物在相同条件下过夜培养。根据 His-Tagged Protein Purification Kit (Soluble Protein)的说明书, 将重组蛋白 Pm $\beta 5$ 纯化并重新折叠在具有螯合镍离子的 Ni-NTAaffity 色谱柱的树脂上。通过 SDS-PAGE 分离所得蛋白质。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量纯化的 Pm $\beta 5$ 蛋白浓度。

1.7 免疫印迹

将 SDS-PAGE 胶进行转膜; 5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 1 $\times$ PBST 洗膜 3 次, 各 5 min; 6 $\times$ His Tag HRP 抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 1 $\times$ PBST 洗膜 3 次, 各 5 min; 用 HRP/DAB 增强型试剂盒显色; 拍照。

1.8 牛津杯抗菌试验

使用牛津杯法在体外测试 Pm $\beta 5$ 蛋白的抗菌活性。选择 4 种细菌(哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*, 溶藻弧菌 *V. alginolyticus*, 副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*), 按 1 : 100 (数量比)接种到液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 振荡培养 16 h, 取 200 μ L 均匀涂布在高盐 LB 琼脂平板上(盐度 20)。

将 50 μ L 的重组 Pm $\beta 5$ 融合蛋白, 纯化的

pET32a 蛋白(1 mg/mL)和 PBS 垂直加入到牛津杯中[外径: (7.8±0.1) mm; 内径: (6.0±0.1) mm; 高度: (10.0±0.1) mm], 置于琼脂表面并于 28 °C 的培养箱中 16 h。测量在牛津杯周围形成的透明区的大小以检测抗菌能力。所有的实验做 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

通过实验室斑节对虾转录组数据设计特异性引物成功扩增 *Pmβ5* 基因(GenBank 号: MN068274)的全长 cDNA。*Pmβ5* 基因 cDNA 序列全长为 1495 bp, 包含 229 bp 的 5'-untranslated region (UTR)、651 bp 的 3' UTR, 615 bp 的开放阅读框编码 204 个氨基酸, 预测分子量为 23.01 kD, 等电

点为 5.58(图 1)。序列分析表明, *Pmβ5* 与无脊椎动物中已知的 β-胸腺素成员具有很高的相似性。同时根据 pI 值, 判断 *Pmβ5* 是 β-胸腺素家族的成员。因为具有 5 个胸腺素 β 肌动蛋白结合基序(thymosin beta actin-binding motif, THY), 被命名为 *Pmβ5*(图 2)。除了“THY”特征基序未发现其他结构域且无信号肽。

2.2 多重序列比对和进化树分析

从 NCBI 中选择其他物种的胸腺素 β5 氨基酸序列, 与斑节对虾 *Pmβ5* 氨基酸序列进行多重比对结果显示, *Pmβ5* 与日本囊对虾(*Penaeus japonicas*)、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)的 β-thymosins 相似性分别为 77%、59%、55%(图 3)。氨基酸序列多

```

1 GCTTAGGAACCTCTGACTATGGTGTAAATTATCATGGTGTGCGCTATGACTCATTCTGGTTCG 60
61 CTAGGTTTGAATTGGTGAAAAATATTGTGAGGTGGCGAGTCTGGCAACACCCGGATCGTT 120
121 GAGTCATCAGTTAGGGAGTTTCTATGCGGCTACGCGGCTCGCCAGTTGAGCATTGGACTT 180
181 CAACGAGTTAGCCTTCGAACCAAGAATCACCACCACCCACCACCACCATCcatgagcgtga 240
1 M S A E 4
241 aactccccctcaaggacttgcccaagggttgacccacccttaaggagacagctcgagggtatt 300
5 T P L K D L P K V D P T L K G Q L E G F 24
301 ctccgcccgtaaaccttaagaagaccgagacggaggagaagattcacctgccaacaggga 360
25 S A V N L K K T E T E E K I H L P N R E 44
361 ggacgtggcacaagagaagcaacacgttgaaatctacagaacatcagcaggtttcgcag 420
45 D V A Q E K Q H V E H L Q N I S E F R S 64
421 cgaagactcaaacgaacgtccaccttgagaaagttggtccctcccagtagtcaagacgt 480
65 E R L K R T S T S E K L V L P S S Q D V 84
481 ggaagcagagaagaaagtacaggcccatctgcaggccgtcgaaggcttcaatactgcaca 540
85 E A E K K V Q A H L Q A V E G F N T A Q 104
541 actcaagcatgccaataccgaagaaaaattgttttacctgctcaggaagatatcgagac 600
105 L K H A N T Q E K I V L P A Q E D I E T 124
601 cgagaagacacaccagagacattttccaagggtgtaacaggatttgacaagtcccaaatgcg 660
125 E K T H Q S I F Q G V T G F D K S Q M R 144
661 acatgccgagactgaagaaaagggttgccctacctgccaagaagatataggactgagaa 720
145 H A E T E E K V A L P A K E D I E T E K 164
721 gggtcagcaggcactccgcccagggtattgagggctttgaccatgctgctttgagaaagc 780
165 G Q Q A L R Q G I E G F D H A A L K K A 184
781 tcagacgacagagaagaatacccttccaactaaggaaatgattgaggaagagaagaagc 840
185 Q T T E K N T L P T K E M I E E E K K A 204
841 ctaaCAAGGTTTGCCAGGAACACATCTATGTTCACTGTGCATCCCAGTGATATCCTCCCT 900
*
901 GCTCTCCCTAGAACTTCTAATAGTTCTGCAAGCCAAAATGTTTGTACTGTACTTTGATA 960
961 ATCTAAGTGATAGGTAAACCAACTGATTTTGTAACCGGATATCATATGCTATTCTTTGA 1020
1021 GTCATTATTATTTGCTTTAGTGATAAGATCAAGGTGCTCACCAATAGCAAGGCGATGGCA 1080
1081 AGAAGTGCAAAAGGGACATTTAGAACTGCATGATAATTTTCATTGCTTTTGTGCACCT 1140
1141 CCTAGTAATTTATCAGCAATGCTAGTGGACCAAAATTTACCTTGCTTCCGCCTTGTTCA 1200
1201 ATAGAAGGTAAAGGTCTCCCATGCAGGTAATGGAAAAGTACCAATGAATTT 1260
1261 GTAATTTGCCAGGATTGTAATGTGTGAGTCTCAATTTTACCCATTAAATTTGCATTTA 1320
1321 ATTGTTAGCATTTACATGAATTTTAAAGTGTATATAAAGAAATTTATCATTGCCTTGTTT 1380
1381 AAAATTAATTTGCTTTTGGGGCATCCAAGTAAATGTGATTTTGGGAGCCAATAAAGTGC 1440
1441 TTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1495

```

图 1 *Pmβ5* cDNA 及氨基酸序列展示

方框中的字母表示起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA), 阴影部分代表胸腺素结构域(胸腺素 β 肌动蛋白结合基序)。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Pmβ5*

The letters in the boxes indicate the start codon (ATG) and the stop codon (TAA); the shadow part represents thymosin domains (thymosin β actin-binding motif).

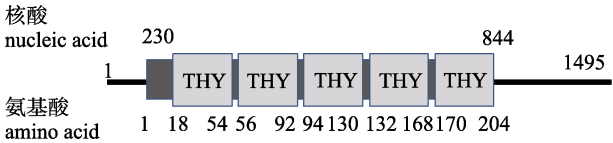


图 2 $Pm\beta 5$ cDNA 全长示意图

功能域是胸腺素 β 肌动蛋白结合基序。

Fig. 2 Schematic diagram representing the full-length cDNA of $Pm\beta 5$

Functional domain is thymosin beta actin-binding motif.

重比对结果表明, $Pm\beta 5$ 基因在 β 肌动蛋白结合基序中保守性较高。系统进化分析表明, $Pm\beta 5$ 与其他虾的胸腺素 $\beta 5$ 各自形成分支聚拢成一支, 与日本囊对虾和凡纳滨对虾亲缘关系很近(图 4)。

2.3 组织分布

为了探索 $Pm\beta 5$ 在斑节对虾不同组织中的表达模式, 本研究选取肝胰腺、鳃、肠、淋巴、胃

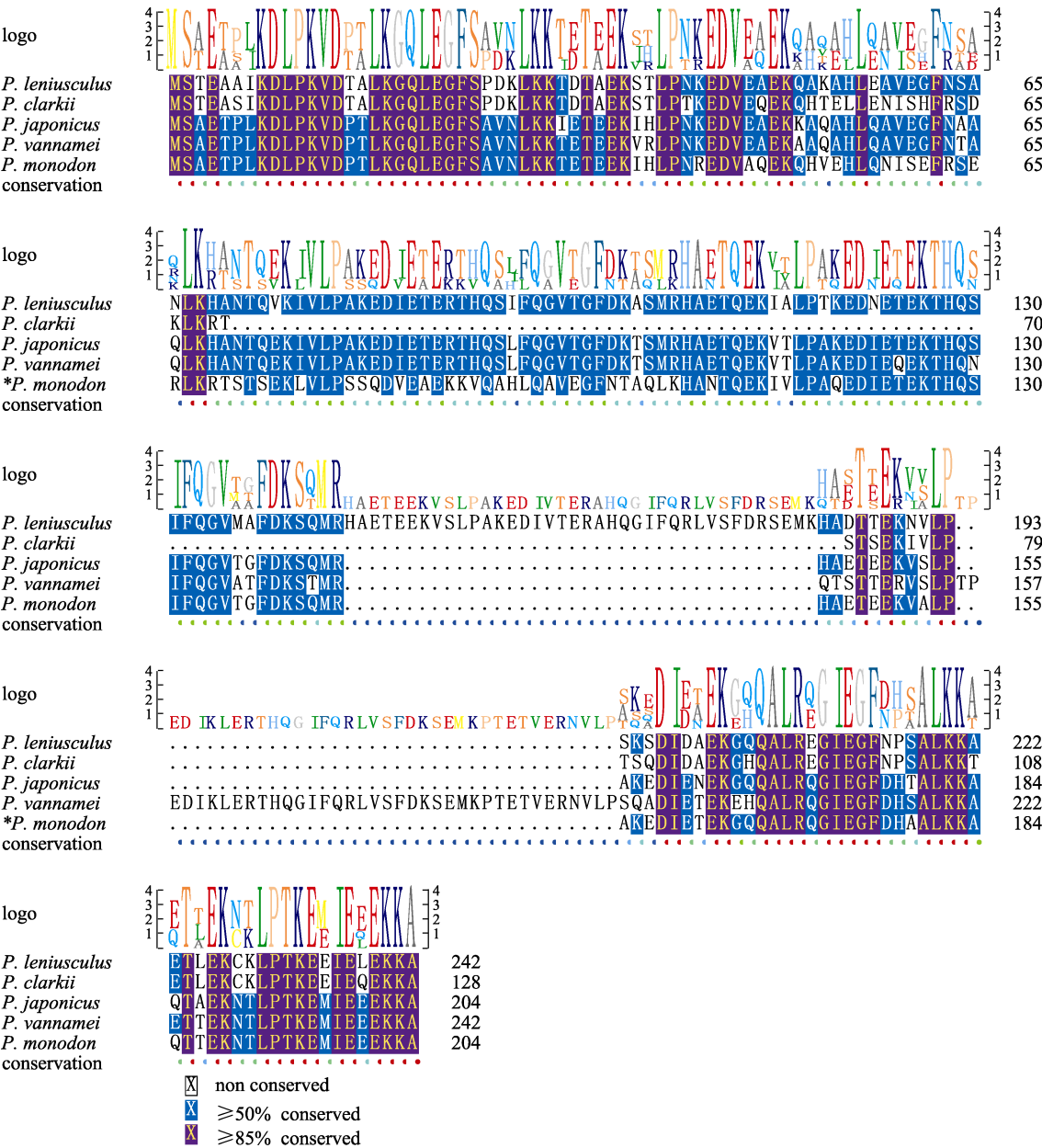


图 3 斑节对虾 $Pm\beta 5$ 与其他物种 thymosins 的氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of the amino acid sequences of $Pm\beta 5$ in *Penaeus monodon* and thymosins in other species
多重序列比对采用 GenBank 上的 thymosins 序列登录号: 日本囊对虾(*P. japonicus*): MH492363.1; 凡纳滨对虾(*P. vannamei*): XM_027380455.1; 通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*): AGI98173; 克原氏螯虾(*Pacifastacus clarkii*): ADY80039.1.

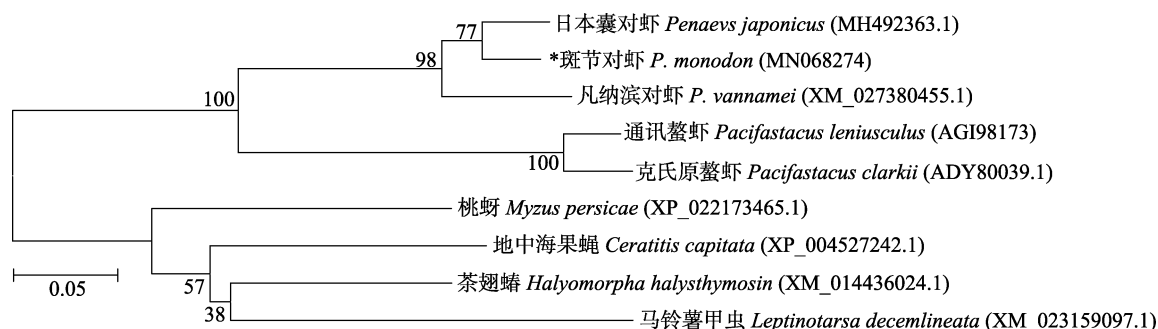


图 4 利用 MEGA 7.0 软件基于 *Pmthymosins* 基因编码的氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度百分比。

Fig. 4 Building NJ phylogenetic tree based on amino acid sequences encoded by *Pmthymosins* via MEGA 7.0 software
The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data 1000 replicates.

和肌肉共 6 种组织, 利用 qPCR 技术检测其表达情况。如图 5 所示, *Pmβ5* 则在淋巴中表达量最高, 肝胰腺、鳃和胃次之, 在肌肉中表达量最低。

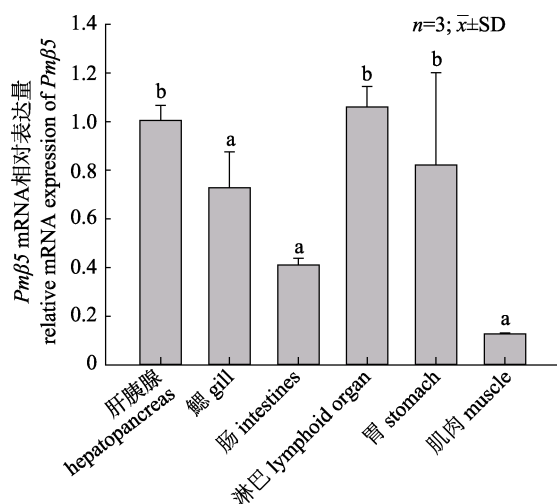


图 5 *Pmβ5* 在斑节对虾各个组织中的相对表达
不同柱上字母表示不同组织间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Relative expressions of *Pmβ5* transcripts in different tissues of *Penaeus monodon*

Different letters on the columns mean significant difference between different tissues ($P < 0.05$).

2.4 免疫刺激下 *Pmβ5* 的定量表达分析

在灭活的副溶血弧菌刺激后, *Pmβ5* 在肝胰腺和鳃中的表达量与对照组相比均出现上调, 但表达模式存在差异(图 6)。在肝胰腺中, *Pmβ5* 的表达量缓慢上升并在 12 h 后显著提高, 随后的 12 h 内保持着较高的表达水平。而在鳃中, 细菌感染 6 h 后显著上调, 在 12 h 时达到最大值, 随后表达量虽然下降但一直高于 PBS 组。

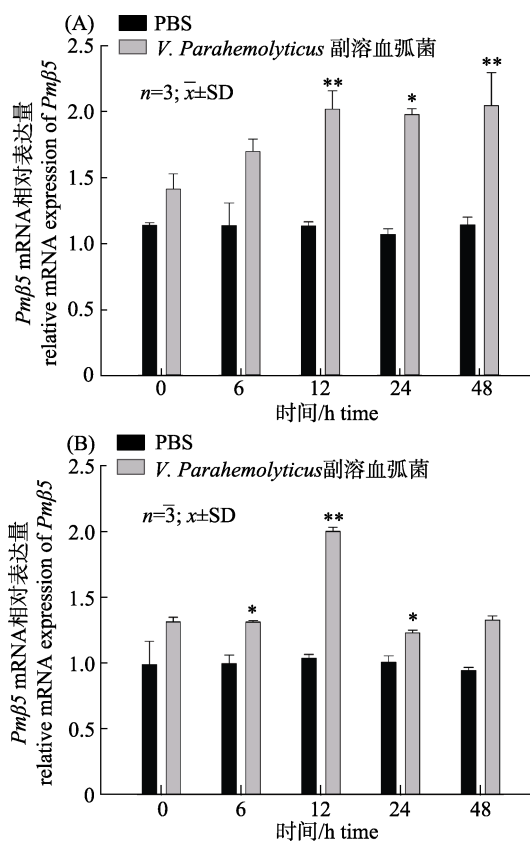


图 6 注射副溶血弧菌后斑节对虾的肝胰腺和鳃中相对表达水平

(A) 肝胰腺中 *Pmβ5* 的相对表达水平; (B) 鳃中 *Pmβ5* 的相对表达水平; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Fig. 6 Relative expression levels of *Pmβ5* in hepatopancreas and gill of *Penaeus monodon* after treated by *Vibrio parahaemolyticus*

(A) relative expression level of *Pmβ5* in the hepatopancreas; (B) relative expression level of *Pmβ5* in the gill; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

2.5 *Pmβ5* 的原核表达及免疫印迹

含重组质粒的表达菌株经 0.6 mmol/L IPTG

诱导在 28 ℃ 过夜培养, 菌体破碎液的上清液和沉淀中均含有融合蛋白且主要分布在上清中, 与预测的重组蛋白分子量大小一致。

为了进一步确认诱导表达出的蛋白条带是目的重组蛋白, 分别以 His 蛋白标签的抗体对诱导出的蛋白进行免疫印迹检测, 结果发现在预测的蛋白分子量处出现特异性条带(图 7), 表明诱导出的蛋白条带能被 His 标签抗体识别, 证明成功诱导出 Pm $\beta 5$ 的重组蛋白。

2.6 体外抑菌实验

为了排除其他因素的潜在影响, 使用空白载体 pET32a 蛋白和 PBS 做空白对照。观察发现牛津杯周围均有明显的抑菌圈, 说明重组胸腺素 $\beta 5$ 对 4 种细菌均有一定的抑制作用(图 8)。根据测量结果(表 2)发现哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和枯草芽孢杆菌的平均抑菌圈直径依次为 1.22 cm、0.83 cm、1.16 cm 和 1.27 cm。说明重组

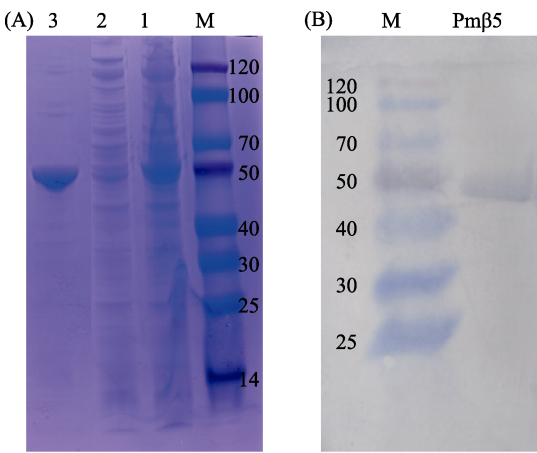


图 7 Pm $\beta 5$ 在大肠杆菌中的表达
(A) SDS-PAGE 分析的重组蛋白情况;
(B) Western blot 分析的重组蛋白情况。
M: marker; 1: 上清; 2: 沉淀; 3: 纯化的上清蛋白。
Fig. 7 Expression of Pm $\beta 5$ in *Escherichia coli*
(A) recombinant protein by SDS-PAGE analysis;
(B) recombinant protein by Western blot analysis.
M: marker; 1: supernatant; 2: precipitate;
3: supernatant protein after purified.

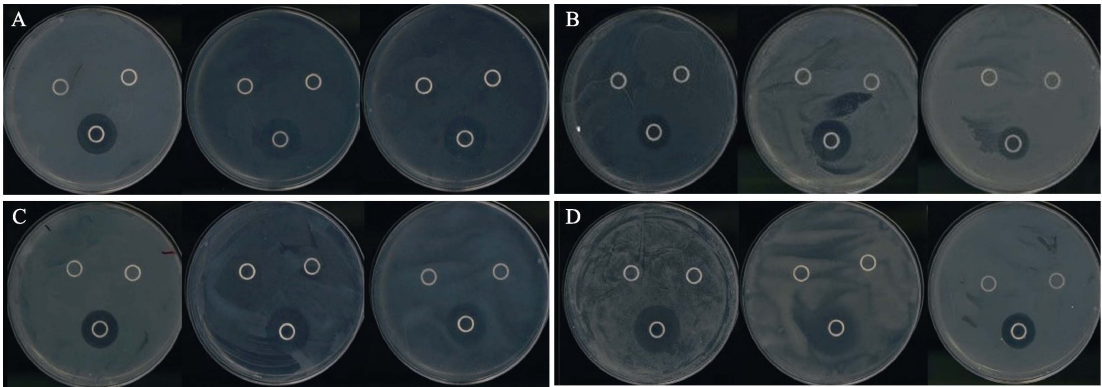


图 8 体外 Pm $\beta 5$ 蛋白对细菌的抗菌效果
空 pET32a 载体蛋白和 PBS 作为对照组, 每组 3 个平行。
(A) 哈维氏弧菌; (B) 溶藻弧菌; (C) 副溶血弧菌; (D) 枯草芽孢杆菌。
Fig. 8 Antibacterial effect of Pm $\beta 5$ protein against bacteria *in vitro*
The purified pET32a proteins and PBS was used as a control group. Each group completed three sets of parallel tests.
(A) *Vibrio harveyi*; (B) *Vibrio alginolyticus*; (C) *Vibrio parahaemolyticus*; (D) *Bacillus subtilis*.

表 2 抑菌圈直径
Tab. 2 Inhibition zone diameter

编号 code	哈维氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>)	溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	副溶血弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
1	1.15	0.85	1.03	1.48
2	1.24	1.01	1.24	1.41
3	1.27	0.63	1.2	0.91
平均值 mean	1.22	0.83	1.16	1.27

胸腺素对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有广谱抗菌活性。因此, 猜测 $Pm\beta 5$ 可能通过抑制外部细菌的生长从而参与斑节对虾的抗菌免疫过程。

3 讨论

β 胸腺素在淋巴系统的发育、维持免疫系统的平衡以及在中枢神经系统的发育过程中起重要作用^[19]。为了研究斑节对虾胸腺素 $\beta 5$ 在抗菌免疫方面的作用, 本文克隆了斑节对虾的 $Pm\beta 5$ cDNA 序列全长, 初步研究了 $Pm\beta 5$ 基因和其重组蛋白在抗菌免疫过程中发挥的作用。由于胸腺素 $\beta 5$ 仅仅只在少数几种十足目动物中发现, 例如日本囊对虾、凡纳滨对虾、通讯螯虾和克原氏螯虾, 目前没有关于胸腺素 $\beta 5$ 免疫功能方面的研究。因此本文是首次关于甲壳类胸腺素 $\beta 5$ 抗菌免疫方面的研究。

$Pm\beta 5$ 基因 cDNA 序列全长为 1495 bp, 包含 229 bp 的 5'-untranslated region (UTR)、651 bp 的 3' UTR, 615 bp 的开放阅读框编码 204 个氨基酸, 预测分子量为 23.01 kD, 等电点为 5.58。根据 pI 值, 判断 $Pm\beta 5$ 是 β -胸腺素家族的成员。在脊椎动物中, β 胸腺素通常由单个 β -胸腺素肌动蛋白结合基序(thymosin beta actin-binding motif, THY)构成, 而无脊椎动物通常具有一种以上的 THY^[10]。例如通讯螯虾有 5 种不同的 β -胸腺素, 依次为 $Pl\text{-}\beta\text{-thymosin1}$ 、 $Pl\text{-}\beta\text{-thymosin2}$ 、 $Pl\text{-}\beta\text{-thymosin3}$ 、 $Pl\text{-}\beta\text{-thymosin4}$ 和 $Pl\text{-}\beta\text{-thymosin5}$, 分别含有 1~5 个 THY^[20]。在日本囊对虾中有 4 种 β -胸腺素, 依次为 $Mj\text{-thymosin2}$ 、 $Mj\text{-thymosin3}$ 、 $Mj\text{-thymosin4}$ 和 $Mj\text{-thymosin5}$, 分别含有 2~5 个 THY^[21]。本文中斑节对虾 $Pm\beta 5$ 包含有 5 个 THY, 因此命名为 $Pm\beta 5$ 。THY 有保守的 G-action 螯合序列(LKKT/LKHV)^[19], β -胸腺素能通过 LKKT/LKHV 在体内发挥不同的生理功能^[22]。这说明与脊椎动物 β -胸腺素一样, $Pm\beta 5$ 通过调节与 actin 的聚合与解聚作用来实验其生理功能。系统发育树分析表明, 斑节对虾的 $Pm\beta 5$ 与日本囊对虾、凡纳滨对虾、克氏原螯虾、通讯螯虾聚集在一起, 这表明斑节对虾的胸腺素 $Pm\beta 5$ 可能与其他虾具有相同的功能。

组织分布测定显示 $Pm\beta 5$ 在不同组织中具有

不同的表达水平, 这说明 $Pm\beta 5$ 在斑节对虾不同组织中所发挥的作用不同。在日本囊对虾中胸腺素 $\beta 3$ 在血细胞和心脏中高度表达^[21]; 在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)中, 胸腺素 $\beta 4$ 在外套膜中表达量最高^[24]; 而在卵形鲳鲅(*Trachinotus ovatus*)中的胸腺素 $\beta 4$ 则在鳃、脾和头肾中有较高的表达量^[25]。本研究中, $Pm\beta 5$ 在肝胰腺、鳃和淋巴中的相对表达量都较高, 而肝胰腺、鳃和淋巴是无脊椎动物的免疫器官^[23], 因此推测 $Pm\beta 5$ 可能具有免疫活性。

β 型胸腺素在宿主防御、炎症调节和抗菌活性方面具有多种功能^[25]。之前的研究发现许多微生物能够刺激 β -胸腺素上调表达。在昆虫中, 20-羟基脱皮激素(20-hydroxyecdysone)和微生物可刺激 β -胸腺素上调^[17]。在鲤(*Cyprinus carpio* L.)中, 胸腺素可以上调感染鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)后 T 淋巴细胞相关基因的表达^[26]。在斑马鱼(*Danio rerio*)中, 嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)刺激后几种组织的表达量上调^[27]。本研究中, 在灭活的副溶血弧菌(*V. parahemolyticus*)刺激后, 肝胰腺和鳃中的 $Pm\beta 5$ 相对表达水平显著上调, 推测 $Pm\beta 5$ 参与对虾细菌感染过程。

人类胸腺素 $\beta 4$ 基因片段 EIEKFDKSKLK 显示出对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)抗菌活性^[28]。海胆的 β -胸腺素对所有测试的浮游菌株具有一定的广谱抗性, 且显对葡萄球菌(*Staphylococcus*)的抗性最为显著^[29]。卵形鲳鲅的胸腺素 $\beta 4$ 能显著抑制钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)和无乳链球菌(*S. agalactiae*)等细菌的生长^[25]。本研究中, 通过牛津杯实验结果表明重组蛋白 $Pm\beta 5$ 同样具有抗菌能力。根据测量抑菌圈直径的大小发现重组蛋白 $Pm\beta 5$ 抑菌效果依次是芽孢杆菌>哈维氏弧菌>副溶血弧菌>溶藻弧菌(表 2), 表明 $Pm\beta 5$ 针对不同的细菌表现出不一样的体外抗菌敏感度。我们认为 $Pm\beta 5$ 具有抗菌活性并通过抑制细菌的生长从而参与对虾的抗菌免疫。

综上所述, 从斑节对虾中成功克隆并鉴定出胸腺素 $Pm\beta 5$ 基因, 经灭活的副溶血弧菌刺激后

在鳃和肝胰腺中表达量上调。此外对革兰氏阴性菌和阳性菌具有抗菌活性,说明其在斑节对虾的抗菌免疫反应中起重要作用。但是,斑节对虾 $Pm\beta 5$ 基因参与到抗菌免疫中的具体分子机制还不很清楚,需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Goldstein A L, Slater F D, White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1966, 56(3): 1010-1017.
- [2] Huff T, Müller C S G, Otto A M, et al. β -thymosins, small acidic peptides with multiple functions[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2001, 33(3): 205-220.
- [3] Wang C H, Song H F, Liu X W. Advances of β -thymosins[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2006, 15(8): 580-584. [王春卉, 宋海峰, 刘秀文. β 族胸腺素研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(8): 580-584.]
- [4] Kuzan A. Thymosin β as an actin-binding protein with a variety of functions[J]. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 2016, 25(6): 1331-1336.
- [5] Malinda K M, Kleinman H K, Sidhu G S, et al. Thymosin $\beta 4$ accelerates wound healing[J]. Journal of Investigative Dermatology, 1999, 113(3): 364-368.
- [6] Sosne G, Chan C C, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators *in vivo*[J]. Experimental Eye Research, 2001, 72(5): 605-608.
- [7] Huff T, Zerkaw D, Hannappel E. Interactions of beta-thymosins, thymosin beta 4-sulfoxide, and N-terminally truncated thymosin beta 4 with actin studied by equilibrium centrifugation, chemical cross-linking and viscometry[J]. European Journal of Biochemistry, 2010, 230(2): 650-657.
- [8] Philp D, Huff T, Gho Y S, et al. The actin binding site on thymosin $\beta 4$ promotes angiogenesis[J]. The FASEB Journal, 2003, 17(14): 2103-2015.
- [9] Li J, Zhang Y H, Liu Y, et al. A thymosin beta-4 is involved in production of hemocytes and immune defense of Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 57: 1-9.
- [10] Shi X Z, Shi L J, Zhao Y R, et al. β -thymosins participate in antiviral immunity of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 51(2): 213-225.
- [11] Ma J Y, Ruan L W, Xu X, et al. Molecular characteristics of three thymosin-repeat proteins from *Marsupenaeus japonicus* and their responses to WSSV infection[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2016, 35(4): 44-50.
- [12] Wu H B, Pan J P. Progress in studies of vibriosis in aquaculture[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(1): 89-93. [吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.]
- [13] Hu C Q, Tao B H. Penaeid shrimp vibriosis and immune prevention: A review[J]. Tropical Oceanography, 2000, 19(3): 84-94. [胡超群, 陶保华. 综述:对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展[J]. 热带海洋, 2000, 19(3): 84-94.]
- [14] Wang N, Wang H L, Bai N, et al. Isolation of lysogenic phage in *Vibrio parahaemolyticus* and its relationship with the pathogenicity of the host bacteria[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 105-110. [王娜, 王海亮, 白楠, 等. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 105-110.]
- [15] Wang Z W. The correlation among growth, disease-resistant, stress-resistance and enzymatic activity of immunity of *Penaeus monodon*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011. [王专伟. 斑节对虾家系生长、抗病、抗逆性状与免疫酶活性的相关分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.]
- [16] de la Peña L D, Cabillon N, Catedral D D, et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2015, 116(3): 251-254.
- [17] Wang P H, Huang T Z, Zhang X B, et al. Antiviral defense in shrimp: From innate immunity to viral infection[J]. Antiviral Research, 2014, 108: 129-141.
- [18] Dai W T, Fu M J, Zhao C, et al. Molecular cloning and expression analysis of CDK2 gene from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*)[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 1-11. [戴文婷, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 CDK2 基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 1-11.]
- [19] Kang Z Q, Hao L J, Ma S S, et al. Research progress on functions of invertebrate β -thymosin[J]. Journal of Biology, 2015, 32(2): 76-79. [康志琼, 郝丽娟, 马上下, 等. 无脊椎动物 β -胸腺素的功能研究进展[J]. 生物学杂志, 2015, 32(2): 76-79.]
- [20] Saelee N, Noonin C, Nupan B, et al. β -thymosins and hemocyte homeostasis in a crustacean[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e60974.
- [21] Feng X W, Huo L J, Yang M C, et al. Thymosins participate in antibacterial immunity of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 84: 244-251.
- [22] Mannherz H G, Hannappel E. The β -thymosins: Intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family[J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2009, 66(10): 839-851.
- [23] Chen Z. The immune system and immune mechanism of shrimp[J]. Ocean and Fisheries, 2011(8): 49-50. [陈翌. 对虾的免疫系统及免疫机制[J]. 海洋与渔业, 2011(8): 49-50.]
- [24] Nam B H, Seo J K, Lee M J, et al. Functional analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) β -thymosin: Focus on antimicrobial activity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(1): 167-174.
- [25] Sun Y, Chen X J, Xu Y, et al. Thymosin $\beta 4$ is involved in the antimicrobial immune response of golden pompano, *Trachinotus*

- notus ovatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 69: 90-98.
- [26] Xiao Z G, Shen J, Feng H, et al. Characterization of two thymosins as immune-related genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 50(1): 29-37.
- [27] Zou S S, Wang J, Li B X, et al. Thymosin participates in antimicrobial immunity in zebrafish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 371-378.
- [28] Schillaci D, Spinello A, Cusimano M G, et al. A peptide from human β thymosin as a platform for the development of new anti-biofilm agents for *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(8): 124.
- [29] Carlier M F, Hertzog M, Didry D, et al. Structure, function, and evolution of the β -thymosin/WH2 (WASP-Homology2) actin-binding module[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, 1112(1): 67-75.

Cloning, expression and functional analysis of $\beta 5$ of *Penaeus monodon*

CHEN Ming^{1,2}, ZHAO Chao², FAN Sigang², WANG Pengfei², YAN Lulu², WANG Fang^{2,3}, QIU Lihua^{1,2}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Resources, Ministry of Education; National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education; College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: *Penaeus monodon* is the largest-culturing species of shrimp, which lends to its high economic and natural nutritional value. However, diseases caused by viruses and bacteria often occur in this species, causing huge economic losses to the shrimp farming industry. Since shrimp can only rely on their innate immune system to protect against pathogen invasions, it is important to understand this innate immune system by studying the immune related molecules of shrimp species, such as *P. monodon*. This understanding is essential for the prevention and treatment of shrimp diseases. It has been reported that β -thymosins are a class of highly conserved functional peptides that play important regulatory roles in physiological activities such as wound healing, angiogenesis, and antibacterial and antiviral immunity. In this experiment, one β -thymosin gene sequence was successfully cloned from *Penaeus monodon*. The full-length cDNA was 1495 bp and the open reading frame (ORF) was 615 bp, which encoded 204 amino acids. It was named *Pm $\beta 5$* because it contained 5 thymosin beta actin-binding motifs (THY). Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *Pm $\beta 5$* was clustered with thymosin $\beta 5$ of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei*, and had the highest homology with thymosin $\beta 5$ of *Penaeus japonicus*, with a similarity of 77%. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) showed that the *Pm $\beta 5$* gene was expressed in the hepatopancreas, gills, intestine, stomach, muscle and lymphoid organ, and was significantly higher in immune related tissues such as the hepatopancreas and lymphoid organ. The in vitro recombinant protein of *Pm $\beta 5$* was obtained by a prokaryotic expression technique and the recombinant protein was confirmed to be a *Pm $\beta 5$* protein by Western Blot analysis. The antibacterial activity of the recombinant protein was further confirmed by the antibacterial experiment (Oxford Cup method). It was found that the recombinant protein had certain antibacterial activity against four bacteria. After 12 hours of inactivation by inactivated *Vibrio parahaemolyticus*, the expression level of *Pm $\beta 5$* was significantly increased, indicating that *Pm $\beta 5$* may be involved in shrimp resistance to bacterial immunity. In summary, we have found the expression and distribution of *Pm $\beta 5$* in different tissues of *P. monodon* and conducted a preliminary study on the function of *Pm $\beta 5$* in immunity.

Key words: *Penaeus monodon*; β -thymosin; gene expression; prokaryotic expression; antibacterial activity

Corresponding author: QIU Lihua. E-mail: qiugroup_bio@outlook.com