

拟穴青蟹抗菌肽 *Crustin* 新变体的表达特性与抗菌功能

王晓飞¹, 彭会², 陈芳奕², 张财亮¹, 黄文树^{1,3*}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102; 3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361021)

摘要: *Crustins* 是一类较早发现并广泛分布在甲壳动物中且富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽, 能够参与抗细菌的免疫应答。从拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中克隆获得 *Crustin* 基因, 命名为 *SpCrus1a*, 其 cDNA 序列全长 744 bp, 开放阅读框编码 113 个氨基酸, 成熟肽分子量 10.03 kDa, 等电点 8.30。表达分析结果发现其转录本主要存在于鳃、卵巢、上皮组织中, 脂多糖刺激后 *SpCrus1a* 会上调表达。体外合成 *SpCrus1a* 的第 29~47 位氨基酸进行抗菌活性实验发现, 其对革兰氏阳性菌具有较强的抗菌活性, 对被测的革兰氏阴性菌抗菌活性较弱或无抗菌活性。合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 能够在较短时间内杀死绝大多数的金黄色葡萄球菌, 2 h 内杀死全部的金黄色葡萄球菌。扫描电镜发现合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 可造成金黄色葡萄球菌表面结构崎岖不平, 高浓度 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 造成细菌的大量死亡。上述结果表明, *SpCrus1a* 是抗菌肽 *Crustins* 的新变体。

关键词: 拟穴青蟹; *Crustin*; cDNA 克隆; 抗菌活性; 扫描电镜

中图分类号: Q 789 **文献标志码:** A

抗生素的发现与应用为人类生命的延长带来了福音, 大大提高了人们对疾病的抵抗能力, 延长了人们的寿命, 然而十几年来, 抗生素滥用导致的耐药性使人们一直在需求替代品^[1-2], 而抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 由于天然地抗细菌、真菌、病毒等特性而成为其中最有力的替代者之一^[3]。抗菌肽, 也称为宿主防御肽, 是先天免疫系统的基础组分, 不仅可迅速消除入侵的病原体, 也可启动其他免疫反应。1981 年瑞典科学家 Boman 等^[4]首次从昆虫中分离获得抗菌肽称为天蚕素 (cecropin)。随后在植物^[5]、细菌^[6]中均有抗菌肽的报道, 甲壳动物中的抗菌肽最早是于 1996 年在普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 中发现^[7], 但

收稿日期: 2018-08-12 **录用日期:** 2018-10-24

基金项目: 国家自然科学基金 (U205123, 31172438); 厦门南方海洋研究中心科技项目 (14PY050SF03)

***通信作者:** wshuang@jmu.edu.cn

与其他许多物种相比，发现的种类偏少。

1999年，Relf等^[8]在普通滨蟹的血淋巴中分离得到一个分子量为11.5 kDa，富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽，具有抑制革兰氏阳性菌的活性，后来被确定为Crustins家族成员。Crustins是一类富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽，分子量为7~14 kDa，C端含有该家族蛋白分子高度保守、由四个二硫桥为核心的乳清酸性蛋白结构域(whey acidic protein,WAP)^[9]。斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[10]、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)^[11]等中均有报道。典型的Crustins包括三个部分，即N端的信号肽，多域区(Multi-domain region)和C端的WAP结构域。根据WAP结构域的数量和多域区结构的不同，可细分为五种类型，除IV型有2个WAP结构域外^[12]，其他4种均仅含有1个WAP，不同在于多域区：I型为半胱氨酸富集区，多见于蟹类^[13]、龙虾^[14]等；II型为半胱氨酸和甘氨酸富集区，III型为脯氨酸-精氨酸富集区，II、III型多见于对虾^[15,16]；V型为半胱氨酸富集区和芳香族氨基酸富集区，首次发现于蚁类^[17]。

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)是我国重要的经济蟹类，在我国南方是一种重要的海水养殖品种，但一直存在高死亡率现象，拟穴青蟹主要依靠先天性免疫防御外源微生物的入侵，迄今尚无有效的防治措施。Crustins抗菌肽是甲壳动物先天性免疫中一类重要的效应分子。目前报道，在拟穴青蟹已经发现CrusSp1^[18]、SpCrus2^[19]、SpCrus3 (SpCrus4)^[20]、以及SpCrus5^[21]，本研究从拟穴青蟹中克隆获得一条Crustin新变体，命名为SpCrus1a，并对其序列进行生物信息学分析，进而分析SpCrus1a在脂多糖(LPS)刺激下的免疫响应及体外合成部分肽段的抗菌活性，以期为Crustins家族提供一些新知识。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司；FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)购自 Roche 公司；96 孔细胞培养板购自 Corning 公司；GoScript™ Reverse Transcription System、DNase Kit 购自 Promega 公司；LPS (*Escherichia coli*055:B5) 购自 Sigma 公司；凝胶回收试剂盒购自东盛公司；Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究社；DNA Ligation Kit 购自 TaKaRa 公司；琼脂糖为 Promega 公司产品；胰蛋白胍(Tryptone)、酵母粉 (Yeast Extract) 购自 OXOID；营养肉汤培养基 (Nutrient Broth)、MH 培养基 (Mueller-Hinton Broth) 购自广东环凯微生物公司。

1.2 拟穴青蟹的处理

拟穴青蟹购自福建省厦门市集美区水产品市场，个体质量 (300 ± 10) g，壳宽 (CL) (12 ± 0.5) cm。采样前，暂养池 (3.45 m \times 1.25m) 暂养 2 d，备用。

将拟穴青蟹置于冰上麻醉 5 min。体表消毒后，采集血淋巴细胞（蟹抗凝剂：NaCl, 450 mmol/L；葡萄糖，100 mmol/L；柠檬酸，26 mmol/L；柠檬酸三钠，30 mmol/L；EDTA，10 mmol/L；pH 4.6 并用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌）、心脏、肝胰腺、鳃和卵巢等组织/器官，置于 1 mL Trizol 匀浆，备用。

1.3 合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 和抗菌实验菌株

SpCrus1a 的第 29-47 位氨基酸合成：委托武汉东湖新技术开发区金屋生化试剂经营部和南京金斯瑞生物科技有限公司以固相合成方法合成。抗菌实验所用菌株：施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexner*)、大肠杆菌模式株 (*Escherichia coli*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、和溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 均购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

1.4 *SpCrus1a* 基因的克隆

参考 TRIZOL 说明书提取总 RNA 后，在分光光度计下 (NanoDrop 2000) 检测其浓度和纯度 (A_{260}/A_{280} 的比值范围在 1.8 ~ 2.0)，经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。将处理后的总 RNA 样品采用 PrimerScript™ RT reagent Kit 进行反转录。

反应体系以青蟹血淋巴组织的 cDNA 为模板，PCR 反应体系：*SpCrus1a*-F 和 *SpCrus1a*-R (表 1) 各 1 μ L，2 \times EasyTaq PCR SuperMix 8.5 μ L，cDNA 模板 1 μ L，无菌水补充至 25 μ L。PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，59 $^{\circ}$ C 40 s，72 $^{\circ}$ C 45 s，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，参考东盛凝胶回收试剂盒说明书进行目的片段回收。然后将 PCR 回收产物与 pMD18-T 载体连接，并转化到 DH5 α 感受态细胞，经阳性克隆鉴定后，测序验证。

1.5 *SpCrus1a* 基因在正常组织/器官中的转录表达

采集正常养殖的拟穴青蟹组织/器官，包括血淋巴细胞、心脏、肝胰腺、鳃等。以 β -actin 为内参进行半定量 (RT-PCR) 检测，反应体系如下：*SpCrus1a*-qF 和 *SpCrus1a*-qR (表 1) 各 0.5 μ L，2 \times EasyTaq PCR SuperMix 12.75 μ L，组织 cDNA 模板 1 μ L，无菌 Milli-Q 水补充至

25 μL 。PCR 反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 66 $^{\circ}\text{C}$ (*SpCrus1a*) /64 $^{\circ}\text{C}$ (β -actin) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 其中, *SpCrus1a* 执行 35 个循环, β -actin 执行 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 基因表达模式分析

将拟穴青蟹随机分为两组：对照组（蟹生理盐水: NaCl, 496 mmol/L; KCl, 9.52 mmol/L; MgSO₄, 12.8 mmol/L; CaCl₂, 16.2 mmol/L; MgCl₂, 0.84 mmol/L; NaHCO₃, 5.95 mmol/L; HEPES, 20 mmol/L; pH 7.4, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min）、脂多糖（LPS）组（LPS 溶于蟹生理盐水, 浓度为 2 mg/mL, 按 200 μL /只注射），于第四步足基部注射。在注射后 6, 12, 18 和 24 h 采集拟穴青蟹的鳃样品（每组每个时间点随机挑取 3 只）。分别抽提 RNA, 反转录成 cDNA 后, 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 反应体系如下: *SpCrus1a*-qF 和 *SpCrus1a*-qR (表 1) 各 0.32 μL , cDNA 模板 3 μL , SYBR Green Master 10 μL , 无菌 Milli-Q 水补至 20 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 66 $^{\circ}\text{C}$ (*SpCrus1a*) /64 $^{\circ}\text{C}$ (β -actin) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 荧光采集点 83 $^{\circ}\text{C}$ (*SpCrus1a*) /84 $^{\circ}\text{C}$ (β -actin) 5 s, 执行 40 个循环。

数据处理与统计: *SpCrus1a* 在各时间点的表达量以同一时间点 LPS 组样品的标准化表达量除以对应时间点对照组样品的标准化表达量表示。所有数据均用平均值 \pm 标准误差的方式表示。*表示显著差异 ($P < 0.05$), **表示极显著差异 ($P < 0.01$)。 β -actin 作为内参, 对组织样品的表达量进行标准化处理。

表 1 实验所用序列

Tab.1 Sequences of primers used in this study.

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
<i>SpCrus1a</i> -F	ATGCTTCGCATTGTGACTGT	cDNA cloning
<i>SpCrus1a</i> -R	CTTCCTTCTACTTTCTCGGA	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Sequencing
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	
<i>SpCrus1a</i> -qF	GATGGATGCTGAGGCTGGGAGG	qRT-PCR
<i>SpCrus1a</i> -qR	TGAGCACATACCGTGGGAGCAG	
β -actin-F	GCCCTTCCTCACGCTATCCT	qRT-PCR
β -actin-R	GCGGCAGTGGTCATCTCCT	

1.7 合成肽 *SpCrus1a29-47* 最小抑菌浓度的测定

最小抑菌浓度的测定 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 参照 Bulet 等的方法^[22,23], 合成肽 *SpCrus1a29-47* 根据分子量用无菌的 Milli-Q 水溶解并用过滤除菌, 分别稀释至 96, 48, 24, 12, 6 $\mu\text{mol/L}$, 置于冰上备用; 取被测细菌, 涂布于营养肉汤平板上, 倒置过夜培养 12~16 h; 挑取 3~4 个克隆接种于营养肉汤斜面培养基上, 继续培养 12~16 h; 10 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.2) 冲洗新鲜制备的营养肉汤细菌斜面培养物, 调整菌体 OD_{600} 为 0.003。在无菌 96 孔细胞培养板上进行, 设置阳性对照组 (加 50 μL 磷酸钠盐缓冲液和 50 μL 菌悬液)、空白对照组 (加 50 μL 合成肽样品和 50 μL 磷酸钠盐缓冲液) 和待测实验组 (加 50 μL 合成肽样品和 50 μL 菌悬液), 待测细菌在最适条件下培养 24~48 h 后, 观察 MIC 结果。如上实验重复 3 次, 每次每种被测菌 3 个平行样。

1.8 合成肽 *SpCrus1a29-47* 杀菌动力学曲线

选取金黄色葡萄球菌为待测菌, 调整合成肽 *SpCrus1a29-47* 浓度 (金黄色葡萄球菌: 24 $\mu\text{mol/L}$), 将稀释后的合成肽 *SpCrus1a29-47* 过滤除菌后添加 50 μL 到 96 孔细胞培养板中与 50 μL 细菌混合均匀, 被测菌按照 1.7 小节设置阳性对照组、空白对照组和待测实验组。共孵后的 5, 15, 30, 60, 90 和 120 min, 从 96 孔细胞培养板取阳性对照组、待测实验组、空白对照组混匀, 吸取 6 μL 金黄色葡萄球菌悬液稀释至 600 μL 磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.2) 中, 混匀后吸取 40 μL 涂布至营养肉汤平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 18~24 h, 记录金黄色葡萄球菌单克隆数量, 计算杀菌指数。

1.9 金黄色葡萄球菌与合成肽 *SpCrus1a29-47* 作用后的扫描电子显微镜的观察

调整金黄色葡萄球菌菌体浓度 1×10^7 cfu/mL; 将合成肽 *SpCrus1a29-47* 用无菌的 Milli-Q 水稀释至 48 和 96 $\mu\text{mol/L}$ 。750 μL 菌悬液与 750 μL 合成肽混合, 孵育 1 h 后, 6000 g 离心 5 min, 弃上清。加入 1 mL 2.5% 戊二醛重悬菌液, 冰上静置 2 h 后, 6000 g 离心 5 min, 弃上清。加入 1 mL PBS 重悬菌液, 静置 10 min 后, 6000 g 离心 5 min, 弃上清。将高浓度的菌悬液加在载玻片上, 置于冰上, 静置 30 min 后加入 PBS 浸泡 15 min, 吸去 PBS, 依次用 30%, 50%, 70%, 90% 和无水乙醇梯度脱水, 每次静置 15 min。用叔丁醇脱水 10 次, 每次 10 min, 在干燥杯中加满叔丁醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。待叔丁醇结晶后, 采用临界法干燥样品, 将样品喷金后上机观察。实验重复 3 次, 每次 2 个平行样。

1.10 数据分析网址及软件

引物设计和分析利用 Primer Premier 5.0 ; BLAST 分析在 NCBI 的 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上进行; 开放阅读框的查找与翻译, 利用网址 <http://www.fr33.net/translator.php>; 信号肽预测在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 上进行; 预测功能结构域、分子量和理论等电点在 http://web.expasy.org/compute_pi/ 和 SMART http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi 上进行; 定量数据用 SPSS 软件分析, 由 Origin8 作图; 杀菌动力学曲线利用 GraphPad Prism7 分析并作图。

2 结果与分析

2.1 *SpCrus1a* 基因的克隆与序列分析

本研究新获得一条 *Crustin* 基因, 命名为 *SpCrus1a*。其中, cDNA 序列长度为 744 bp, 其中 5'非编码区 (5'-untranslated Region, 5'-UTR) 为 186 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 342 bp, 编码 113 个氨基酸, 3'非编码区 (3'-untranslated Region, 3'-UTR) 为 216 bp (图 1)。SignalP 分析显示, N 端存在由 20 个氨基酸组成的信号肽, 预测其成熟肽分子量为 10030.47 Da, 理论等电点为 8.30。SMART 软件预测表明, C 端拥有一个由 8 个保守半胱氨酸为主构成的 WAP 结构域。此外, 在信号肽和 WAP 结构域之间存在着半胱氨酸富集区, 符合典型的 I 型 Crustins 结构特征 (图 2)。

```
1 AAAGGAATAAGTTAAAAGAAAAA AAAGTAGGAAAACCGCTCTTCGCACGGGAATCACAGAGCCATCCCCCAAGCCGTCCTCCTTGG
91 TTGCCAGTCGCTTTAAAAACGAGCGCGACCATCTCCACACCACAAACCCTGCTGCACTCCAGGTTGCATCGCTCTCCTCAGCTTTGT
181 TCCAGCATGCTTCGCATTGTGACTGTCGCCGTCGTGGTGTGTTGTGGTGGTGATGGATGCTGAGGCTGGGAGGCTAGTCCTTCTCCAAGC
1 M I K L Y T V A V V L V V V M D A E A G R P S P S P S
271 TGCAGGAGCTGGTGC AAAAGCCTGGACACCCTGAAAAGAACGCTTTTACTGCTGTGACTTCGGGATTGGTACTGTGGAAACCTTTC
29 C R S W C K R P G H P E K N A F Y C C D F G I G T V G K P F
361 GCAACACACCCTGGCAAGTGTCACCACGTCCTATCTGTCCCAGGGTCTGTATACCAGGGGACCTGCTCCACGGTATGTGCTCAGAC
59 A T H P G K C P H R P I C P E G L Y T R G P A P T V C A H D
451 GGCCAGTGCTCCAAGCAGAGAAGTGCTGTGCTGATGCCTTGAACACCACCTGTCTGCTTGCTGACCCATAGTGACCTGGCCCT
89 G Q C S K H E K C C A D A C L E H H T C L L A D P *
541 CAAAACCTTCACGTCCTGTCTTCTTAATCCGAGAAAAGTAGAAGGAAGAGAGAAATCTGAGAAATTAAGATGAATTTGTTATTGTTGTT
631 GCTCGTTAATATTTTCTCATGTTTTGAGTTTTGAAAAAGCTCTTTTGATGTAACGAATGTTTTCCCTCAAAATTAATCAATAATGGCT
721 TTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

*为终止密码子; ATG为起始密码子; AATAA为加尾信号; 下划线为信号肽; 阴影部分为WAP结构域。

图1 *SpCrus1a*基因的cDNA序列及预测氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequences and deduced amino acid sequences for *SpCrus1a* gene

SpCrus1a	MLRIVT...VAVVVLVVVMDAEEAGRPSFSPSCRSWCKRPGHPEKNAFYCCDFGIGTVGKPFATHPGKCPHR.PICPEGLY	76
CrusSP	MKVQILAAAMVVVATVVMATEASRVPPYLGRDCKHWCARDN...NQALYCCGPPGITYPPFIRKHPGKCPSVRSTCTGVRS	76
SpCrus3	MVKQTDRQNRVVCLMVVMVAALSVASPSPCNTHCPDPYLNLPGHYVCCDQ.....HPGKCPPV.PHCPAYP.	67
SpCrus4	MVKQTDRQNRVVCLMVVMVAALSVASPSRSCNTHCPDPYLNLPGHYVCCDQ.....HPGKCFRR.DKCPPEL	68
Consensus	m v v a c c cc hpgkc c	
SpCrus1a	TRG..PAPTVCADGQCSKHEKCCADAGLEHHTCLLADP..	113
CrusSP	SR.....PKFCPHDDACEFRSKCCYDAQVKHHVCKTVEFY.	111
SpCrus3RKCFYDPECGLNEKCCNTBGGGKR.CISIPYSG	99
SpCrus4	NKGLRQTIKYCHYDPECALHEKCCYDVCIEAKVCKLPE...	106
Consensus	c d c kcc c c	

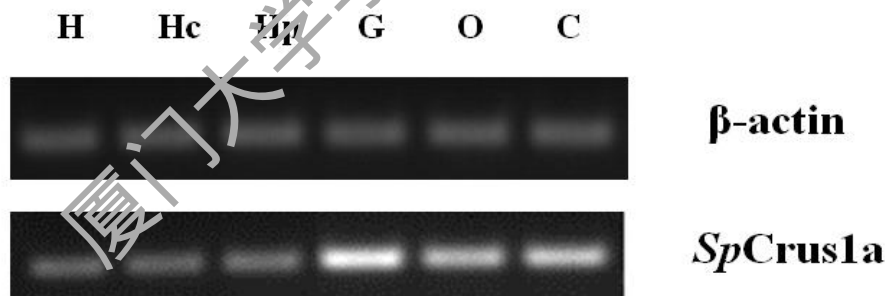
CrusSp, 拟穴青蟹 (No.ABY20728.1); SpCrus3, 拟穴青蟹 (No.AUV47160.1); SpCrus4, 拟穴青蟹 (No.AUV47161.2)。

图2 SpCrus1a与同型Crustins的氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple amino acid sequences alignments of SpCrus1a with three other homologous Crustins sequences from *Scylla paramamosain*.

2.2 SpCrus1a 在正常组织/器官中的转录表达

以 β -actin 为内参基因, 采用半定量 PCR 的方法, 检测 SpCrus1a 基因在正常养殖的拟穴青蟹不同组织/器官中的转录表达情况, 结果显示, SpCrus1a 在所有检测的组织/器官中均有不同程度的表达。其中在鳃中表达量最高, 上皮、卵巢次之 (图 3), 而血淋巴细胞、肝胰腺和心脏的转录表达量较低, 与 β -actin 水平相当。



H: 心脏; Hc: 血细胞; Hp: 肝胰腺; G: 鳃; O: 卵巢; C: 上皮。

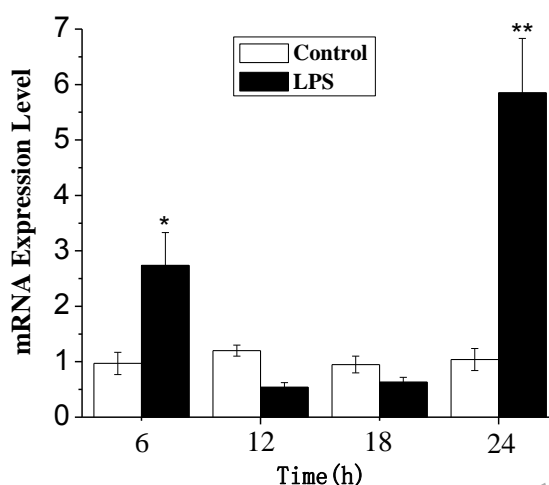
图 3 SpCrus1a 基因在不同组织/器官的转录表达

Fig.3 Expression profile of SpCrus1a gene in different tissues/organs

2.3 LPS 刺激下 SpCrus1a 在鳃中的转录表达

LPS 对拟穴青蟹进行活体刺激, 并对刺激后不同时间点 (6, 12, 18, 24 h) 的鳃组织进行样品采集, qRT-PCR 检测发现: LPS 诱导后 24 h, 鳃中 SpCrus1a 基因表达量呈现极显

著 ($P < 0.01$) 上调, 且上调幅度最大, 为对照组的 5.63 倍。此外, *SpCrus1a* 在 6 h 表达水平也有显著上调 ($P < 0.05$) (图 4)。



* 表示显著差异 ($P < 0.05$), ** 表示极显著差异 ($P < 0.01$)。

图 4 LPS 刺激 *SpCrus1a* 在鳃中的转录表达

Fig.4 Expression profile of *SpCrus1a* in gill after LPS challenge

2.4 合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 的抗菌活性

经过软件预测并设计合成 *SpCrus1a* 的第 29~47 位氨基酸, 命名为 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇, 理化性质如下: 合成肽序列 CRSWCKSPGHPEKNAFYCC; 预测分子量 2.28 kDa; 预测等电点 8.92; 合成肽纯度 >95%。最小抑菌浓度的测定参照 Bulet 等的方法^[22,23], 将合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 倍比稀释至 6~96 $\mu\text{mol/L}$, 与等体积的菌悬液共同孵育 24, 48 h 后观察最小抑菌浓度 (MIC)。MIC 结果显示 (表 2), 其中 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 对被测的革兰氏阳性菌如谷氨酸棒杆菌 (MIC 6~12 $\mu\text{mol/L}$) 和藤黄微球菌 (MIC 6~12 $\mu\text{mol/L}$) 具有较强的抗菌活性, 对溶壁微球菌 (MIC 12~24 $\mu\text{mol/L}$) 和金黄色葡萄球菌 (MIC 12~24 $\mu\text{mol/L}$) 具有一定的抗菌活性; 被测的革兰氏阴性菌中, 荧光假单胞菌 (MIC 12~24 $\mu\text{mol/L}$) 和施氏假单胞菌 (MIC 24~48 $\mu\text{mol/L}$) 有一定的抗菌活性, 大肠杆菌模式株及弗氏志贺氏菌无抗菌活性 (MIC > 48 $\mu\text{mol/L}$)。

表 2 合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 的抗菌活性

Tab.2 Antimicrobial activities of the synthetic *SpCrus1a*₂₉₋₄₇

菌株	拉丁名	中国微生物菌种保藏	MIC
----	-----	-----------	-----

		编号 (CGMCC No.)	($\mu\text{mol/L}$)
革兰氏阳性菌			
谷氨酸棒杆菌	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.1886	6~12
藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	1.290	6~12
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.363	12~24
溶壁微球菌	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	1.634	12~24
革兰氏阴性菌			
荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.0032	12~24
施氏假单胞菌	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.1803	24~48
大肠杆菌模式株	<i>Escherichia coli</i>	1.2389	>48
弗氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	1.1868	>48

2.5 合成肽 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 的杀菌动力学曲线

金黄色葡萄球菌是水产养殖中的致病菌，属于革兰氏阳性菌，拟穴青蟹物种中的多条 *Crutins*^[19,20] 对其有抗菌活性。合成肽 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 与金黄色葡萄球菌孵育一段时间后，测定其对细菌的杀菌动力学。杀菌动力学结果如图所示，随着孵育时间的延长，金黄色葡萄球菌的存活率不断降低，*SpCrus1a₂₉₋₄₇* 与金黄色葡萄球菌孵育 5 min 时杀菌指数达 50%，共孵育 90 min 时杀菌指数达到 90%，共孵育 120 min 时杀菌指数达到 100%（图 5）。可见 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 能够短时间内杀死绝大多数的金黄色葡萄球菌，2 h 内杀死全部的金黄色葡萄球菌。

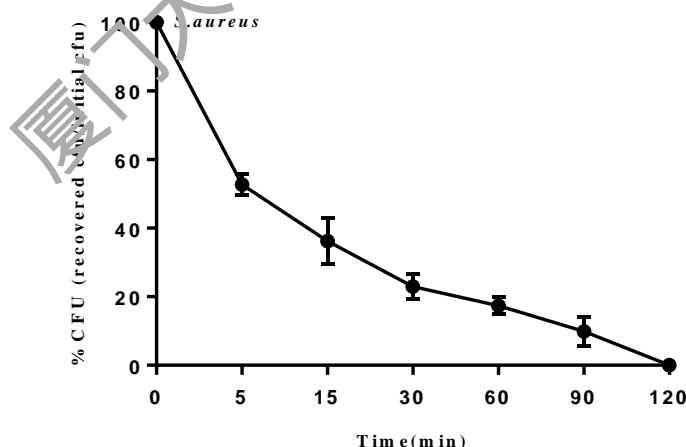


图 5 合成肽 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 对金黄色葡萄球菌的杀菌动力学曲线

Fig.5 Kinetics curve of killing *S.aureus* by the synthetic *SpCrus1a₂₉₋₄₇*

2.6 合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 对金黄色葡萄球菌超微结构的影响

将金黄色葡萄球菌与合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ (48, 96 $\mu\text{mol/L}$) 共孵育 45 min, 经过固定、脱水、干燥和喷金等步骤后使用扫描电子显微镜观察其超微结构的变化 (图 6)。结果显示: 在与无菌 Milli-Q 水共孵育的对照组中, 正常的金黄色葡萄球菌细胞表面完整、光滑, 细胞形态未发生改变 (图 6A); 而在与合成肽共孵育的实验组中 (48 $\mu\text{mol/L}$), 金黄色葡萄球菌的表面变的粗糙, 表面结构崎岖不平 (图 6B); 更高的合成肽浓度下 (96 $\mu\text{mol/L}$) 出现大量细胞碎片, 细菌死亡 (图 6C)。

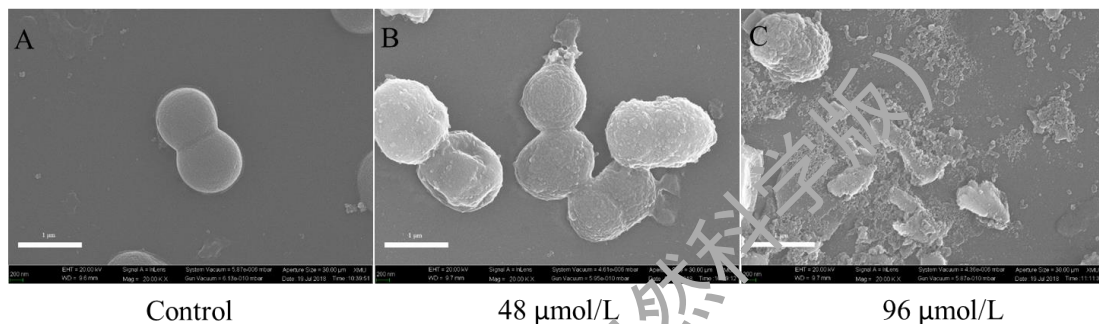


图 6 扫描电镜观察金黄色葡萄球菌与合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 孵育后的形态

Fig.6 Effects of the synthetic *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ on membrane morphology of *S.aureus* by scanning electron microscopy

3 讨论

本研究从拟穴青蟹中成功获得一条新的 *Crustin* 编码序列, 命名为 *SpCrus1a*。预测其成熟肽分子量为 10039.47 Da, 理论等电点为 8.30。序列分析显示具有 *Crustins* 家族的特征性结构, 包括 N 端的信号肽, C 端的 WAP 结构域, 以及两者中间的半胱氨酸富集区, 符合典型 I 型 *Crustin* 结构特征。

大多数 *Crustins* 能够在血淋巴细胞中持续高表达, 如日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)^[24] 和蜘蛛蟹 (*Paralithodes camtschaticus*)^[25] 等研究。对该抗菌肽 *SpCrus1a* 在体内组织分布进行了研究, PCR 分析发现, 该抗菌肽转录本主要分布于鳃、卵巢、和上皮中。已报道拟穴青蟹的 I 型 *Crustins* 中, *CrusSp* 主要分布在血淋巴、鳃、肠、肌肉, *SpCrus3* 和 *SpCrus4*^[20] 主要在鳃中表达; 已报道的拟穴青蟹 II 型 *Crustins* 中, *SpCrus2*^[19] 和 *SpCrus5*^[21] 均在鳃中高表达。综上所述, *Crustins* 在表达模式上多样, 拟穴青蟹 *Crustin* 基因在鳃中的表达量要显著高于其他组织, 与本研究获得的 *SpCrus1a* 基因表达一致, 认为鳃可能是

生成或释放 *SpCrust1a* 的主要场所之一。

LPS, 是存在于革兰氏阴性细菌细胞壁表面的一层类脂多糖类物质, 是一种与细菌感染相关的分子模式。在 I 型 Crustins 的细菌诱导实验中, 三疣梭子蟹 *PtCrustin* 和 *PtCrustin2* 在受到溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 感染后 24h 能够显著上调, 分别上调 3.5 倍 ($P < 0.01$) 和 13.8 倍 ($P < 0.05$), 而 *PtCrustin3* 的响应更早, 在 8h 时就有明显上调 ($P < 0.05$)^[13,26]; 推测 *SpCrus1a* 可能和上述 Crustins 一样, 参与拟穴青蟹的抗细菌免疫过程; WSSV 感染的日本囊对虾鳃组织转录分析发现, 抗菌肽 *MjSWD* 在 6, 12 h 上调表达, 24 h 表达水平下降, 而 48h 表达量显著上升, 达到新的峰值^[27]。*SpCrus1a* 表达变化情况与 *MjSWD* 类似, 推测刺激的拟穴青蟹体内细菌增殖从而引发 *SpCrus1a* 二次反应。

由于抗菌肽在体内含量甚微, 直接从体内提取并分离纯化蛋白费时又费力, 目前常用转基因表达技术和采用固相合成方法来获得高产量的抗菌肽, 且化学合成方法用于生产低于 30 氨基酸的多肽具有较高的效益成本比^[28]。本研究中 *SpCrus1a* 的合成肽段 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 的抗菌实验结果表明, 合成肽对革兰氏阳性菌如谷氨酸棒杆菌、藤黄微球菌具有较强的抗菌活性 (MIC 6~12 $\mu\text{mol/L}$), 对金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌也具有一定的抗菌活性 (MIC 12~24 $\mu\text{mol/L}$), 而革兰氏阴性菌中, 对荧光假单胞菌 (MIC 12~24 $\mu\text{mol/L}$) 和施氏假单胞菌 (MIC 24~48 $\mu\text{mol/L}$) 有一定的抗菌活性, 对大肠杆菌模式株及弗氏志贺氏菌无抗菌活性 (MIC>48 $\mu\text{mol/L}$)。已报道拟穴青蟹的 I 型 Crustins 中, *CrusSp*^[18]对革兰氏阳性菌的藤黄微球菌 (MIC 0.156~0.312 $\mu\text{mol/L}$) 有一定的抗菌活性, 大肠杆菌、肺炎克雷伯菌等革兰氏阴性菌无活性; *SpCrus3*^[20]对金黄色葡萄球菌 (MIC 3.125~6.25 $\mu\text{mol/L}$) 和枯草芽孢杆菌 (MIC 6.25~12.5 $\mu\text{mol/L}$) 有较好的抗菌活性, 对大肠杆菌及哈维氏弧菌无活性 (MIC>25 $\mu\text{mol/L}$)。比较 *SpCrustin1a* 的合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 的抗菌活性, 该肽段和 *CrusSp*、*SpCrus3* 相似, 对革兰氏阳性菌具有较强的抗菌活性, 对被测的革兰氏阴性菌无活性或活性较弱, 符合之前 Crustins 家族抗菌肽更易对革兰氏阳性菌产生抗菌活性的说法。但合成肽段的 MIC 高于 *CrusSp* 和 *SpCrus3*, 因本研究仅对 *SpCrus1a* 的第 29 位到第 47 位氨基酸设计合成并检测其功能, *SpCrus1a* 整个编码序列的抗菌活性, 有待进一步研究。

扫描电子显微镜结果表明, 合成肽 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 在分别用 2 倍 MIC (48 $\mu\text{mol/L}$) 和 4 倍 MIC (96 $\mu\text{mol/L}$) 对金黄色葡萄球菌的处理下, 可以使金黄色葡萄球菌表面形态发生改变, 出现凹陷甚至导致金黄色葡萄球菌的裂解。斑节对虾^[29]两条变体 *crustinPm1* 和 *crustinPm7* 用 10 倍 MIC 来处理金黄色葡萄球菌, 造成了菌体细胞表面变得粗糙, 并被碎片覆盖。推测合成肽段 *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ 可能是通过与金黄色葡萄球菌的细胞膜相互作用来杀死细

菌，为后续研究合成肽对细菌的抗菌机制提供证据。

4 结论

本研究克隆获得一条 *Crustin* 新变体，命名为 *SpCrus1a*。RT-PCR 结果表明 *SpCrus1a* 在鳃中的表达量最高，且 LPS 刺激后会有上调表达。设计并合成部分肽段，命名为 *SpCrus1a₂₉₋₄₇*，抗菌实验表明其对革兰氏阳性菌有较强的抗菌活性，对所选的革兰氏阴性菌无活性或活性较弱，杀菌动力学曲线结果表明合成肽 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 能在短时间内杀死大部分金黄色葡萄球菌，扫描电镜发现在合成肽 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 的处理下，金黄色葡萄球菌表面变的粗糙甚至细菌裂解死亡，为后续研究合成肽 *SpCrus1a₂₉₋₄₇* 的抗菌机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] WALSH C. Where will new antibiotics come from [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1(1): 65-70.
- [2] COATES A, HU Y, BAX R, et al. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(11): 895-910.
- [3] SORENSEN O E, BORREGAARD N, Cole A M. Antimicrobial peptides in innate immune responses[J]. *Contributions to Microbiology*, 2008, 15:61-77.
- [4] BOMAN H G, STEINER H. Humoral immunity in *Cecropia pupae*[J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 1981, 95(4):75-91.
- [5] AVITABILE C, CAPPARELLI R, RIGANO M M, et al. Antimicrobial peptides from plants: stabilization of the γ core of a tomato defensin by intramolecular disulfide bond [J]. *Journal of Peptide Science*, 2013, 19(4): 240-245.
- [6] HASSAN M, KJOS M, NES I F, et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4): 723-736.
- [7] SCHNAPP D, KEMP G D, SMITH V J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial Peptide, with sequence similarity to Bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus Maenas*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 240(3):532-9.
- [8] RELF J M, CHISHOLM J R, KEMP G D, et al. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 264(2):350-357.

- [9] SMITH V J, FEMANDES J M O, KEMP G D, et al. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(7):758-772.
- [10] CHEN J Y, CHUANG H, PAN C Y, et al. cDNA sequence encoding an antimicrobial peptide of chelonianin from the tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(2):179-183.
- [11] CHEN D, HE N, XU X. Mj-DWD, a double WAP domain-containing protein with antiviral relevance in *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6):775-781.
- [12] Du Z Q, Ren Q, Zhao X F, et al. A double WAP domain (DWD)-containing protein with proteinase inhibitory activity in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B*, 2009, 154(2):203-210.
- [13] CUI Z, SONG C, LIU Y, et al. Crustins from eyestalk cDNA library of swimming crab *Portunus trituberculatus*: molecular characterization, genomic organization and expression analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4):937-945.
- [14] JIRAVANICHPAISAL P, LEE S Y, KIM Y A, et al. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(5):441-455.
- [15] CHRISTIE A E, RUS S, GOINEY C C, et al. Identification and characterization of a cDNA encoding a crustin-like, putative antibacterial protein from the American lobster *Homarus americanus*[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(13):3333-3337.
- [16] JIA Y P, SUN Y D, WANG Z H, et al. A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities[J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1-4):246-259.
- [17] ZHANG Z, ZHU S. Comparative genomics analysis of five families of antimicrobial peptide-like genes in seven ant species[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 38(2):262-274.
- [18] IMJONGJIRAK C, AMPARYUP P, TASSANAKAJON A, et al. Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(5):841-850.
- [19] WANG H, ZHANG J X, WANG Y, et al. Newly identified type II crustin (*SpCrus2*) in *Scylla paramamosain* contains a distinct cysteine distribution pattern exhibiting broad antimicrobial activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 84:1-13.
- [20] WANG Y, ZHANG X W, WANG H, et al. *SpCrus3* and *SpCrus4* share high similarity in mud crab (*Scylla paramamosain*) exhibiting different antibacterial activities[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 82:139-151.

- [21] WANG Y, ZHANG C, WANG H, et al. Involvement of a newly identified atypical type II crustin (*SpCrus5*) in the antibacterial immunity of mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 75:346-356.
- [22] BELEN L G, WIMAL U, RICHARD L G, et al. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 356: 107-113.
- [23] BULET P, DIMARCQ J L, HETRU C, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268: 14893-14897.
- [24] RATTANACHAI A, HIRONO I, OHIRA T, et al. Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression[J]. Fisheries Science, 2004, 70(5):765-771.
- [25] SPERSTAD S, HAUG T, PAULSEN V, et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(4):583-591.
- [26] FENG Y, PAN L Q, MIAO J J, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of two antibacterial peptides: crustin and anti-lipopolysaccharide factor in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 156(2):77-85.
- [27] Jiang H S, Sun C, Wang T, et al. A single whey acidic protein domain containing protein (SWD) inhibits bacteria invasion and dissemination in shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2):310-318.
- [28] LATHAM P W. Therapeutic peptides revisited[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(8):755-757.
- [29] KRUSONG K, POLPIPAT P, SUPUN P, et al. A comparative study of antimicrobial properties of crustinPm1 and crustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2012, 36(1):208-215.

Characterization of expression and antimicrobial activity of a novel crustin isoform from *Scylla paramamosain*

WANG Xiaofei¹, PENG Hui², CHEN Fangyi², ZHANG Cailiang¹,

HUANG Wenshu^{1, 3*}

(1. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 3. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361021, China)

Abstract: Crustins are cationic cysteine-rich AMPs discovered earlier and widely distributed across the crustaceans, and involved in the antimicrobial immune responses. In this study, a novel Crustin isoform was cloned from *Scylla paramamosain*, namely *SpCrus1a*. The full-length cDNA of *SpCrus1a* was 744 bp, with an open reading frame (ORF) encoding a peptide of 113 amino acids. The predicted molecular mass of the mature protein (93 amino acids) was 10.03 kDa with an estimated pI of 8.30. The transcriptional transcript of *SpCrus1a* was highly expressed in gills, ovary and carapace by RT-PCR analysis, and was up-regulated in gills after lipopolysaccharide (LPS) challenge. The antimicrobial activity experiment was performed by the synthetic peptide from twenty-ninth to forty-seventh amino acid of *SpCrus1a*. It was found that the synthetic peptide potent more strong anti-bacterial activity against Gram-positive bacteria, but had no or little antimicrobial activity for selected Gram-negative bacteria. Most of *Staphylococcus aureus* were killed by the synthetic peptide *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ within 5 min and all of bacteria were killed within 2 h. Scanning electron microscopy (SEM) revealed the surface of *Staphylococcus aureus* cells treated with the synthetic peptide *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ appear to be rough and distorted. Higher concentration of *SpCrus1a*₂₉₋₄₇ can caused cells death. The above results determined that *SpCrus1a* is a novel isoform of crustins.

Keywords: *Scylla paramamosain*; Crustin; cDNA cloning; antimicrobial activity; scanning electron microscopy