

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170307001

http://www.yykxjz.cn/

张杰, 吕建建, 刘萍, 李健, 王竹青, 张小辉. 三疣梭子蟹 *Toll4* 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 146–155

Zhang J, Lü JJ, Liu P, Li J, Wang ZQ, Zhang XH. Cloning of *Toll4* in *Portunus trituberculatus* and its expression in responding to pathogenic infection and low salinity stress. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 146–155

三疣梭子蟹 *Toll4* 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析*

张 杰^{1,2} 吕建建^{2,3} 刘 萍^{2,3}① 李 健^{2,3} 王竹青^{1,2} 张小辉^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术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; 3. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用 RACE 技术克隆得到三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)TLRs 家族的一个新基因, 将其命名为 *PtToll4*。该基因 cDNA 全长为 4276 bp, 5'和 3'非编码区分别为 339 bp 和 1252 bp, 编码一个含有 895 个氨基酸、分子量为 102.5 kDa、理论等电点为 6.03 的蛋白质。*PtToll4* 蛋白是一个跨膜蛋白, 存在胞外区 LRR、LRRCT 结构域及保守的胞内区 TIR 结构域。同源性及系统进化分析显示, *PtToll4* 氨基酸序列与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) *EsToll2* 的同源性最高, 为 61%。实时荧光定量 PCR 结果显示, *PtToll4* 基因在血细胞中的表达量最高, 在肝胰腺中的表达量最低。利用副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和对虾白斑综合征病毒(WSSV)对三疣梭子蟹进行注射感染, 结果显示, 经 WSSV 感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中的表达量显著提高, 在 6 h 时出现峰值, 为对照组的 5.03 倍($P < 0.01$)。经副溶血弧菌感染后, *PtToll4* 基因仅在 48 h 略微出现上调, 其余时间点与对照组无显著差异。由此推测, *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹应答 WSSV 的免疫过程中发挥了重要功能。此外发现, 低盐胁迫显著抑制了 *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹血细胞中的表达, 这可能是导致低盐环境下三疣梭子蟹等甲壳类动物免疫力下降的原因之一。由此推测, *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹先天免疫过程中发挥了重要功能, 本研究为深入开展三疣梭子蟹和其他甲壳动物的免疫调控机理研究提供了数据支持。

关键词 三疣梭子蟹; *PtToll4*; 基因克隆; 先天免疫; 表达分析

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0146-10

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是一种重要的海洋经济动物, 在中国、朝鲜、日本等海域均有分布, 在我国黄渤海及东海分布尤为广泛(薛俊增等,

1997)。由于养殖规模的不断扩大、水体环境污染加重、累代养殖造成的种质退化, 三疣梭子蟹的病害也日趋严重, 给养殖业带来了巨大的经济损失(高保全

* 国家自然科学基金面上项目(41576147; 41306177)、国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)和泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 41576147 and 41306177), the National shrimp and crab industry technology system (CARS-48), and Project of Taishan Scholars Leading Talent (LJNY2015002)]. 张 杰, E-mail: wfire1991@163.com

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

收稿日期: 2017-03-07, 收修改稿日期: 2017-03-21

等, 2015)。研究表明, 对虾白斑综合征病毒(WSSV)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)均会造成三疣梭子蟹组织病变乃至死亡(王忠发等, 2008; 阎斌伦等, 2010)。此外, 盐度作为一种重要的水体环境因子, 也对三疣梭子蟹的免疫功能产生较大影响。三疣梭子蟹等甲壳动物在水体盐度发生急剧变化时, 可能会产生应激反应和生理代谢紊乱, 导致其免疫力下降, 从而促使病害暴发并造成大量死亡(王林等, 2016; 付萍等, 2016)。然而, 三疣梭子蟹等无脊椎动物没有类似于哺乳动物的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 因此, 其不具有获得性免疫系统(Uematsus *et al*, 2008), 但可以依赖独特的先天性免疫系统通过免疫信号通路级联反应清除入侵机体的病原微生物。

三疣梭子蟹等甲壳动物的先天免疫是由 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 等模式识别受体 (Pathogen recognize receptors, PRRs) 所介导(Carty *et al*, 2010), 通过识别保守的病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 启动先天性免疫应答(Aderem *et al*, 2000)。Toll 受体蛋白于 1980 年首次在果蝇(*Drosophila*)中发现, 参与果蝇背腹侧轴形成, 缺失 Toll 受体蛋白会引起果蝇成体不对称(Nusslein-Volhard *et al*, 1980)。Hoffmann 等(1996)发现并证实 Toll 受体蛋白在先天免疫中起到了重要作用。各物种的 Toll 样受体都具有多名成员, 目前, 已在果蝇中发现了 9 种类型的 Toll 受体蛋白, 而在哺乳动物中也有 13 种 Toll 样受体被陆续发现(Iwasaki *et al*, 2004; Bilak *et al*, 2003)。

目前, TLRs 家族基因在哺乳动物和果蝇中已有较为深入的研究, 但在甲壳动物中, TLRs 家族基因的研究还处于起步阶段。Yang 等(2007)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中发现了一个 Toll 样受体, 命名为 *LvToll*, 这是在甲壳动物中发现的首个 TLRs 家族基因。目前, 在三疣梭子蟹中仅发现了 3 种 Toll 样受体(Zhou *et al*, 2015)。

为进一步完善 TLRs 基因家族在三疣梭子蟹先天

免疫中发挥的功能, 本研究利用 RACE 技术克隆了一个新的三疣梭子蟹 TLRs 家族基因, 命名为 *PtToll4*, 并对其序列进行分析, 阐明了其系统进化关系。利用实时荧光定量 PCR 检测了经副溶血弧菌和 WSSV 感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中的表达变化。此外, 初步探究了低盐胁迫对 *PtToll4* 基因表达量的影响。旨在为进一步研究 *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹先天免疫中发挥的功能提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用三疣梭子蟹取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司, 体重为(35±5) g, 置于整理箱(560 mm×360 mm×280 mm)中暂养 7 d, 暂养期间保持水温为(20±2)°C, 盐度为 31, pH=8.2。期间持续充氧, 定时换水清污, 换水量为原水量的 1/3, 定时投喂饵料并对暂养个体进行筛选, 保留活力形态均较好的个体。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 的提取及 RACE 第一链合成 用 TRIzol 法分别提取三疣梭子蟹各组织总 RNA, 利用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)与琼脂糖凝胶电泳等方法, 检测所提总 RNA 的质量和完整性。按照 SMART™ RACE Amplification Kit(Clontech)说明书, 取等量所取各组织总 RNA 混匀, 用来合成 3'和 5'RACE 第一链, 用于后续实验。

1.2.2 *PtToll4* 基因 cDNA 序列全长的克隆 根据本实验室三疣梭子蟹转录组库中所得到的 *PtToll4* 基因 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 3'和 5'末端特异性引物(表 1), 由擎科梓熙生物技术有限公司合成。参照 SMART RACE 说明书, 利用 Advantage 2 PCR Kit(Clontech)使 UPM 与相应的特异性引物分别结合, 进行 *PtToll4* 基因 cDNA 3'和 5'

表 1 *PtToll4* 克隆和 mRNA 表达分析所用引物序列

Tab.1 Primers used for *PtToll4* cloning and mRNA expression analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
<i>PtToll4</i> -3'	TTGATGGGAGGATAGTCATTGATTGC
<i>PtToll4</i> -5'	TGAGTAGTCAGCCTCTGTGGA
<i>PtToll4</i> -F	ATGGGTTGTGGGATGTGTG
<i>PtToll4</i> -R	AGTCAGCCTCTGTGGAGTGC
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC

末端扩增。PCR 程序: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环。扩增产物使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up 试剂盒(TaKaRa)切胶回收得到目的片段。将目的片段和 pMD19-T 进行载体连接, 16℃ 反应 3 h, 将连接产物转入到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 37℃ 平板培养 12 h。挑取阳性菌落在 LB 液体培养基(含 AMP)中培养 5 h, 随后进行菌液 PCR 检测, 由擎科梓熙生物技术有限公司完成测序。

1.2.3 *PtToll4* 基因的生物学分析 利用 Contig Express Project 软件去除载体序列, 并保留目的片段, 将所得到的目的片段序列与 *PtToll4* 基因 EST 序列进行比对, 通过拼接得到 *PtToll4* 基因 cDNA 序列全长。将得到的 *PtToll4* 基因的 cDNA 序列利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对。利用 EditSeq 和 Gene Tool 预测开放阅读框(ORF)并翻译得到其氨基酸序列。氨基酸序列分子量及等电点使用在线 ExPASy 进行预测, 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进行蛋白质功能结构域预测与分析。利用 DNAMAN 将 *PtToll4* 氨基酸序列和其他物种相应氨基酸序列进行多重序列比对, 使用 MEGA 5.0 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树, 对 *PtToll4* 基因的亲缘关系分析。

1.2.4 病原感染实验 将实验所用三疣梭子蟹暂养 7 d 后分为 2 个实验组和 1 个对照组, 即副溶血弧菌感染组、WSSV 感染组、PBS 对照组, 每组 80 只。通过预实验, 三疣梭子蟹注射感染副溶血弧菌和 WSSV 后, 72 h 三疣梭子蟹的半致死浓度分别为 2.6×10^7 CFU/ml、 3.2×10^7 拷贝/ml, 分别以此浓度进行感染实验。将 3 组三疣梭子蟹分别注射 100 μ l 副溶血弧菌、WSSV 和 PBS, 实验期间的饲养与管理与暂养期保持一致。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 进行取样, 每个时间点各取 3 只三疣梭子蟹, 取其血淋巴, 4000 r/min 离心 15 min, 弃血清, 保留血细胞并立即加入 300 ml TRIzol, 置于液氮中保存。

1.2.5 低盐胁迫实验 选取暂养后的三疣梭子蟹 120 只, 均分为 2 组, 即盐度胁迫组和正常对照组。通过预实验, 得到三疣梭子蟹低盐胁迫 72 h 半致死盐度为 11, 以此盐度进行低盐胁迫实验。实验水体由自然海水和自来水调配所得并充分曝气, 正常对照组所用实验水体为正常海水(盐度为 31)。实验期间的饲养与管理与暂养期保持一致。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取样, 每个时间点各取 3 只, 取其血淋巴, 4000 r/min 离心 15 min, 弃血清, 保留血细胞并立即加入 300 ml TRIzol, 置于液氮中保存, 以便用于后续实验。

1.2.6 *PtToll4* 基因的定量表达分析 将经过暂养的正常状态下的三疣梭子蟹的血细胞、肝胰腺、鳃、肌肉、心脏、眼柄、表皮、胃和肠等组织以及不同实验组所取组织分别提取 RNA, 用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 确保 RNA 质量与完整性均好, 随后用 PrimeScript RT reagent kit 进行反转录合成 cDNA, 具体方法按照说明书进行。

根据本实验中已经得到的 *PtToll4* 基因的开放阅读框 cDNA 序列, 设计合成一对正反向特异荧光定量引物, 并且以内参基因 β -actin 作为对照(β -actin-F 和 β -actin-R; *PtToll4*-F 和 *PtToll4*-R)(表 1)。参照 SYBR Premix Ex TaqTM II 说明书, 利用 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪分析所提三疣梭子蟹各组织中 *PtToll4* 基因的相对表达量。反应体系 10 μ l: 5 μ l SYBR Premix Ex TaqTM II, 0.4 μ l 10 μ mol/L 的正反向引物, 0.2 μ l ROX Reference Dye II, 1.0 μ l cDNA, 3.0 μ l 灭菌双蒸水。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。各样本均设 3 个重复, 实验结果采用相对标准曲线法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001) 进行相对定量计算, 并利用 SPSS 19.0 软件对结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 并对其显著性进行检验。

2 结果

2.1 *PtToll4* 基因 cDNA 的克隆及其序列分析

将提取得到的三疣梭子蟹各组织总 RNA 用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳对其质量和完整性进行检测, 结果显示, 其 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 均在 1.9~2.0 之间, 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰, 表明所提总 RNA 质量较好, 可用于合成 RACE 模板。利用合成的 cDNA 第一链作为模板, 进行 5'和 3'末端 RACE 扩增。PCR 产物经公司测序后与已知的 EST 序列分析比较测序结果, 拼接得到 *PtToll4* 基因 cDNA 全长序列。利用 EditSeq 软件以及 BLAST 对序列分析, 发现已知序列包含完整的开放阅读框(ORF), 表明所得到的基因序列完整可靠。*PtToll4* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号: KY432366)全长 4276 个核苷酸, 包含 2685 bp 的开放阅读框(ORF)、339 bp 的 5'端非编码区(UTR)和 1252 bp 的 3'端非编码区(UTR), 3'末端具有由 28 个腺嘌呤核苷酸组成的 poly(A)尾(图 1)。

2.2 *PtToll4* 基因序列的生物信息学分析

使用 EditSeq 软件以及 ExPASy 预测得到 *PtToll4* 基因 cDNA 序列开放阅读框(ORF)的长度为 2685 bp,

```

1 AACGCAACGAAAGTGAAGTGGTGGTGTCTGGCTCACTACCTCCCATTTACTTTTGTGGTGTGCTGCGGGAACAGAAGTGACATCGTTTGTGTTTATAGATGAGTGTGACAACCGGA 120
121 CTGTGAGAGGAGGGAGGAGAAAGAACTGCGTTGGAATGGAGGCATAGAGTGAAGGCTGCTGTTGGTCCCAAGACTGAGGATTCCCTGCTACTCTGCTCAACTCTCTCCCAAGTAG 240
241 TTCCCTGGCCACTCACAGGAGGTCTGGATGATGCAAGTACTGAGGCGCACTAACTGAAGACAGCATATCTTTGTGCCACC   ATG TTG CAG CAG ATA TTC TAT TTC ACA 349
                                     M L Q Q I F Y F T
350 GTC CTG GCG TGG ATG TGG ATT GCT GTT GAG GCA ATG GGT TGT GGG ATG TGT GAA GAG ACT GTT CAG AAT TCT ATG ACT TGC TCC AGT ACA 439
      V L A W M W I A V E A M G C G M C E E T V Q N S M T C S S T
440 GCA GAC CAA AAA GTA AAA TTT TCT GTG GAT GTG TCC TTG AAG GGA AAG ATT CGC TTG CAG TGT TTG CAC TCC ACA GAG GGT GAC TAC TCA 529
      A D Q K V K F S V D V S L K G K I R L Q C L H S T E A D Y S
530 CTT ATG GAA GGT TGT GAC TTC TCT TCA GTT ACT CAT GCA GAA TTT CTT GGA TGT GCT CTT CCT AAT GTT TCA TAT AAG GAA GTC CTT TAC 619
      L M E G C D F S S V T H A E F L G C A L P N V S Y K E V L Y
620 AAA ATT GGT GTG AAT CCA GAA AGT GTT AGG TCC TTG GCT TTT TTG AAT GTG AGC AAG AAT GGC ACA TTG TTG CAG CAG CAT CTG GAA GGA 709
      K I G V N P E S V R S L A F L N V S K N G T L L Q Q H L E G
710 CTG AAT GAT TTA AAG ATG TTG CAG GTG ACG GGC ATA CAT TCT GTA GCA AGT GAT GTA TTT AGA AGC ACA CTT ATG CTG GAG GCT ATA GAA 799
      L N D L K M L Q V T G I H S V A S D V F R S T L M L E A I E
800 ATT TCT GAT AGC ACA TTG AAG CAA CTT GGT GCA GAC CTT TTC CAT AAC ATG ACA AAG CTT CAG ATA GTA ATG CTG CAA CAT CTG GAA GGA 889
      I S D S T M N Q L G A D L F H N M T K L Q I V M L Q H N M L
890 GAA GAG CTT CCA GAT AAG CTT TTC TCT GGC ACT CCC AGT ATT CGT ACT ATT CAA CTC CAT AAC AAT CAA ATC AGA ACC CTC CAG GAC AGT 979
      E E L P D K L F S E N L I S E I R T I Q L H N N Q I R T L Q D S
980 CTG TTC AAG GAC TTG AAA TTT CTT ACT ACC TTG AAT GTT AGC AAG AAC AAA TTG GAA AAA TTA TCT GGT GAT GTG TTT TCT GAA AAC CAT 1069
      L F K D L K F L T T L N V S K N K L E K L S G D V F S E N H
1070 ATA ATG GAA TAC ATA GAT ATG AGT GAA AAT CTT ATA TCA GAG ATA CAT ACT GGA ACT TTC ACA AAT CTG CAG AAA CTG AAG GTG CTC AAC 1159
      I M E Y I D M S E N L I S E I R T I G T F T N L Q K L K V L N
1160 TTA GGC CAC AAC AGA CTG AAG ACA TTG CCT TGG GGT ACA CTG AAA GAA TGT CTG GAT CTG CAA AAA CTT TGG CTC AAC AAC AAC TTT CTG 1249
      L G H N R L K T L P W G T L K E C L D L Q K L W L N N N F L
1250 ACC CAT CGT GGC ATC AGA AAT GCC TTC CCA CGC ATG TCT TCA CTA AGA TAT GAC CTC GGT TAC AAT AAT ATC AGC ATA CGC AGC ATG 1339
      T H R G I R N A F P R M S S L R Y L D L G Y N N I S I C R S M
1340 AGT AAG TTT GCA CTG CAT AAC GAA ACT AAG CTG CAG TAT CTC TTC TTG AAT AAT AAT AAT ATA AGT ATA ATA CCA GAC AGT TTG AAT AAT 1429
      S N F A L C L H N Q T K L Q Y L F L N N N N I S I I P D S L N N
1430 GTC TAT GTG GAC CTC GTG AGA GTT GAC TTC TCA TGG AAT TCA TTT GAG GTT TTA AAT TAT ACT TCC CTT ATG TTT CAA TCA AAT GTG GTG 1519
      V Y V D L V R V D F S W N S F E V L N Y T S L I F Q S N V V
1520 GAA TTA GAT TTC AAG TTT AAT AAT ATA GAG ACT GTT GAT TTT ACT TTT AGT TTT TCA TTG CAT AAA AAG AAA ACA ATG ACC CTA GCC TTG 1609
      E L D F K F T N N I E T V D F T F S F S L H K K K T M T L A L
1610 GAA GGA AAC CCA TTA TTG TGT CAT TGC CGC ACT TAT GGC TTT CTG AAG GTT CCA GGT TTG CCA TTT GTG AGA GTA AAC AAT ACA ATG 1699
      E G N P L L C H C R T Y G F L R M L Q G L P F V R V N N T M
1700 GAA ATC ACT GTA AAA GAC ATT GAA GAA GCA TTC TGT CAA TTG CCC AGT GGT GAG CTT GTG AAC TTG ATG GAG ATG CAG ACA GAA ACC ATC 1789
      E I T V K F I E E A F C Q L P S G E L V N L M E M Q C T I
1790 ACA TGT CGG TTA ACT GCT GAT GAT GTT TGT TGC TAT GAT TTT AGA CTC TTT GAT GGG AGG ATA GTC ATT GAT TGC TCC TAT CAG AAC CTT 1879
      T C R L T A D D V C S Y D F R L F D G R I V I D C S Y Q N L
1880 AAG TCA ATA GGG TTC CTC AAT CTT TCC AAG TCA ATA GAT TTC CTT AAT CTT TCC AAC TAC AAT AAC AAA CCT AAC TAC ACT CTG ATC 1969
      K S I G F L N L S K S I E F L N L S K Y N N N K P N N T L I
1970 CTG GCA AAC AAC AGA CTT ACA AGC CTC GCT GGC TTG CAG ATC TAT ACC AAT TTG CTC AAC CTT GTA GTG CCA TAT AAC GAA CTA TCC AGC 2059
      L A N N R L T S L A G L Q I Y T N L L N L V V P Y N E L S S
2060 ATC AAT ACG TCT CAT CTT CCA ACC TTG AAG GCC CTG GAT GTG CGA GGT AAT AAT CTC ACT AAC TTG TCA CCA GCC ATC CTC GAC TAT 2149
      I N T S H L P P N L K A L D V R G N N L T N L S P A I L D Y
2150 CTA AAT GCA ACT GAC ATG AGC CTC AAG CTG GGA AGT AAT CCA TGG CAC TGC AGC TGT GAC ATG CTA GAT CTG TTT CAA TTC CTC CAC GTC 2239
      L N A T D M S L K L G S N P W H G C S C D M L D L F Q C T L H V
2240 CCA TCT CGT AAG GTT AAT GAC TTC ACG GAA CTG CAG TGT GAG GGA CAG CTG GTG ATG GAC CTG AGC GAA CAT GAC CTT TGC CCG TTC 2329
      P S R K V N D F T E L Q C E S G E L V M D L S E H D L C P F
2330 TTC ATG CAG CCA ATG GTC ATT GTC ACC ATA GTG GTC ATC CTC ATC CTT CTC ACC ATC TTC AGT ATT CTT GGG ACT VTG AGC TTC TAC AAG 2419
      F M Q P M V I V T I V I L I L L T I F S I L G T S F Y K
2420 TAC AAG CAA GGC ATA AAG GTT TGG TTG TAT GCC CAC CAC ATG TGT CTC TGT GCC ATC ACT GAA GAT GAA CTG GAT GCA GAC AAG AAG TAT 2509
      Y K Q G I K V W L Y A H M C L C A I T E D E L D A D K K Y
2510 GAT GCA TTC ATG TAC TCT CAC ATG GAT GAG GAG TTT GTT ATG AAG GAG CTG GTG CTA GTC CTT GGC CTG GAG TGC GGG GAG CDT AAG TAC CGT 2599
      D A F I S Y S H M D E E F V M K E L V P G L E C G E P K Y R
2600 GTG TGC CTC CAC TAC CGG GAC TGG GTG CCC GGG GAG TAC ATC CAG AAC CAG ATC ATG CAA AGT GTG GAG GCA AGC CGG CGC ACC ATT GTG 2689
      V C L H Y R D W V P G E Y I Q N Q I M Q S V E A S R R T I V
2690 GTC CTT TCA TCA AGC TTT ATG GAG GTT TGG GGG CAA CTG GAG TTC CGT GCA GCT CAC TCC CAG GCC CTG GAC GCG ACC ATT AAG 2779
      V L S S S F I E S V W G Q L E F R A A H S Q A L Q D R T N R
2780 CTC ATC ATC ATT GTC TAT GGC AAG ATC CCA GGA GAG TCT GAT GAG CTG GAT GAA AAG TTG AAG TTG TAC ATC ACC ACA AAG ACT TAT GTG CGC 2869
      L I I I V Y G K I P A E S E L D E K L K L Y I T T K T Y V R
2870 TGG GGT GAT AGC AAG TTT TGG GAT AAA CTT AGG TAC ATC ATG CCC CAT CCA CCA GAT CTT GTG CAG AAA AAA CGT AAC AAG AAT ATC GAT 2959
      W G D S K F W D K L R Y I M P H P P D L V Q K K R N K N I D
2960 AAT AAA CTA GAA CTT AGT AAA TCA CCC CCA AAG CAG AGC ATG TGT TGA GAAAAGTGGTTTGAACAAGTATAAATAATATGCAAAATATTTTGCCAAATTTCA 3063
      N K L E L S K S P P K Q S M C *
3064 TCACTCATAAGTTCATGATGCAACCAACCGTTAGTCTGGAATTGAACCAGACTTGAGTCAGAGCAGGTTTGGCTTCTTGA AAAAGGGTTTGCCTCTGCTGGTGAACCTCCCAACTTTT 3183
3184 TGTTCCAGCAGAGTCAGCTGTGGAAGCTCACTTTGGGTGCTGTGGTACATGATTAACAACACCATGATTCATATATGATGAGACAGCAGGCCCTTAAATATCAGATAGTAACATCTGA 3303
3304 TGTCAGTAATATTTGTTGCAATAATGTCTAATTTGATTCATCTCTATTAGAATTTGCTCAGTAATCATGATTAATCAAGAATTTACTATTTTGGCTCAGTAATCATGATTCATCACT 3423
3424 CTTAAGATGTTTATGCTAAGATAGTGAAGCTGAATATGGATATGGTGTTTAAGGCCAGAGACTGTGATGGCGATGGAGCTGAATATGGATATGGTGTTTAAGGCCAGAGACTGT 3543
3544 GCTGCCATCAGCTCTTCAAATGTTGACCATGTTGGACAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3609

```

图 1 *PtToll4* 基因序列全长及编码的氨基酸序列

Fig.1 *PtToll4* nucleotide sequence and deduced amino acids sequence

单下划线和双下划线分别代表信号肽和跨膜区；方框表示潜在的糖基化位点；

阴影部分代表 TIR 结构域；起始密码子(ATG)、终止密码子(TAG)用黑体表示

The single and double underlined letters represent the signal peptide and the TM region, respectively.

The potential N-linked glycosylation sites are boxed. The TIR domain is shaded, the letters of the start codon (ATG) and the stop codon (TAG) are bolded

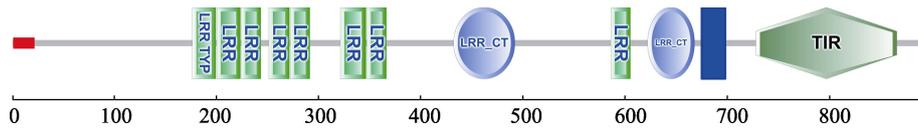


图 2 利用 SMART 在线软件预测的 *PtToll4* 的蛋白结构
Fig.2 The predicted domain architecture of *PtToll4* by SMART

信号肽用红色框表示, 跨膜区用深蓝色框表示, 其他的结构域, 包括 LRR 结构域和 TIR 结构域则分别用相应的框架加上符号表示(图中所用颜色和符号均参考网络版显示格式)

Signal peptides are shown in red, TM domains in dark blue. Other domains, including LRR domains and TIR domains, are labeled accordingly (For the interpretation of the color and symbols in this figure refer to the web version of the article)

编码一个由 895 个氨基酸组成的分子量为 102.5 kDa、理论等电点为 6.03 的蛋白。利用 SMART 和 InterproScan 对 *PtToll4* 基因编码的氨基酸序列进行在线蛋白质功能结构域分析, 结果表明, *PtToll4* 推导的氨基酸序列主要包括一个由 21 个氨基酸组成的信号肽 (Signal peptide)、8 个 LRR 或 LRR-TYP 结构域、2 个 LRRCT 结构域(C-端 LRR)、1 个跨膜结构域(TM)以及 1 个 TIR 结构域组成(图 2)。

2.3 *PtToll4* 基因序列同源性分析及系统进化树分析

通过 BLAST 同源性比对分析发现, *PtToll4* 氨基酸序列与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) *EsToll2*、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) *FcToll*、斑节对虾(*Penaeus monodon*) *PmToll*、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) *MjToll2*、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *LvToll*、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) *PcToll2* 等具有较高的同源性, 同源性为 41%~61%, 其中, 与中华绒螯蟹 *EsToll2* 同源性最高, 为 61%(图 3)。

利用 MEGA 5.0 软件对 *PtToll4* 基因进行系统进化分析, 结果显示, *PtToll4* 首先与亲缘关系最近的中华绒螯蟹 *EsToll2* 聚为一支, 其次与中国明对虾 *FcToll*、凡纳滨对虾 *LvToll*、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) *SpToll* 等亲缘关系较近的甲壳动物聚为一支, 然后与果蝇(*Drosophila melanogaster*) *DmToll* 等无脊椎动物聚为一支(图 4)。

2.4 *PtToll4* 基因的组织表达分布

对 *PtToll4* 基因在不同组织的表达差异情况进行分析, 结果显示, *PtToll4* 基因在各组织中均有一定表达, 在血细胞中的表达量最高, 在表皮和胃中也有较高表达量, 而在胰腺中的表达量最低(图 5)。

2.5 不同病原感染对三疣梭子蟹血细胞 *PtToll4* 基因 mRNA 表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 分别分析副溶血弧菌和 WSSV 感染后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h

三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因 mRNA 表达量的变化, 经分析发现: 与 PBS 对照组相比, 经副溶血弧菌感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中仅在 48 h 出现显著上调($P < 0.05$), 为对照组的 1.41 倍, 在其他时间点无显著变化(图 6)。然而, 经 WSSV 感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中均出现了显著上调($P < 0.05$)并且在 6 h 达到了表达量的峰值, 为对照组的 5.03 倍($P < 0.01$)。经 WSSV 感染后, 三疣梭子蟹血细胞中的 *PtToll4* 基因被诱导表达更为显著(图 7)。

2.6 低盐胁迫对三疣梭子蟹血细胞 *PtToll4* 基因 mRNA 表达的影响

经盐度为 11 的水体环境对三疣梭子蟹进行低盐胁迫后, 对三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因表达情况进行分析表明, 与正常对照组相比, 在 0~72 h 均出现了显著下调($P < 0.01$), 其中, 在 48 h 下调达到最低值, 为正常对照组的 0.1 倍, 在 72 h 表达量有所回升, 为正常对照组的 0.5 倍($P < 0.01$) (图 8)。

3 讨论

三疣梭子蟹等无脊椎动物由于不具有获得性免疫, 因此, 先天免疫是其抵抗外界病原入侵的重要防御机制(Liu *et al.*, 2014)。先天免疫主要是由胚系基因所编码的模式识别受体所介导, Toll 样受体便是一种重要的模式识别受体(Carty *et al.*, 2010)。本研究通过 RACE 技术获得 *PtToll4* 基因 cDNA 序列全长(GenBank 登录号: KY432366)。通过与其他无脊椎动物进行同源性比对发现, *PtToll4* 的蛋白序列与中华绒螯蟹 *EsToll2* 的蛋白序列相似度最高, 为 61% (Yu *et al.*, 2013), 与其他甲壳类动物如克氏原螯虾 *PcToll2*、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) *MrToll*、斑节对虾 *PmToll* 也具有较高的同源性(Lan *et al.*, 2016; Srisuk *et al.*, 2014; Assavalapsakul *et al.*, 2012)。

根据 SMART 预测得到的结构域可知, *PtToll4* 具有 TLRs 家族的典型特征, 归属 I 型跨膜蛋白, 胞

内有保守的 TIR 结构域, 胞外含有多个亮氨酸重复 (LRRs)。TIR 结构域是一种进化十分保守的蛋白互作结构域, 对于诱导 Toll 信号通路下游信号级联反应具有重要作用。TLRs 家族基因胞外区的进化速度比胞

内区要快, 正是基于胞外结构的多样性, 使得 TLRs 家族基因具有特异性识别病原相关分子模式的功能 (Johnson *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2011)。比如在哺乳动物中, TLR1、TLR2 和 TLR6 能够直接与脂肽结合

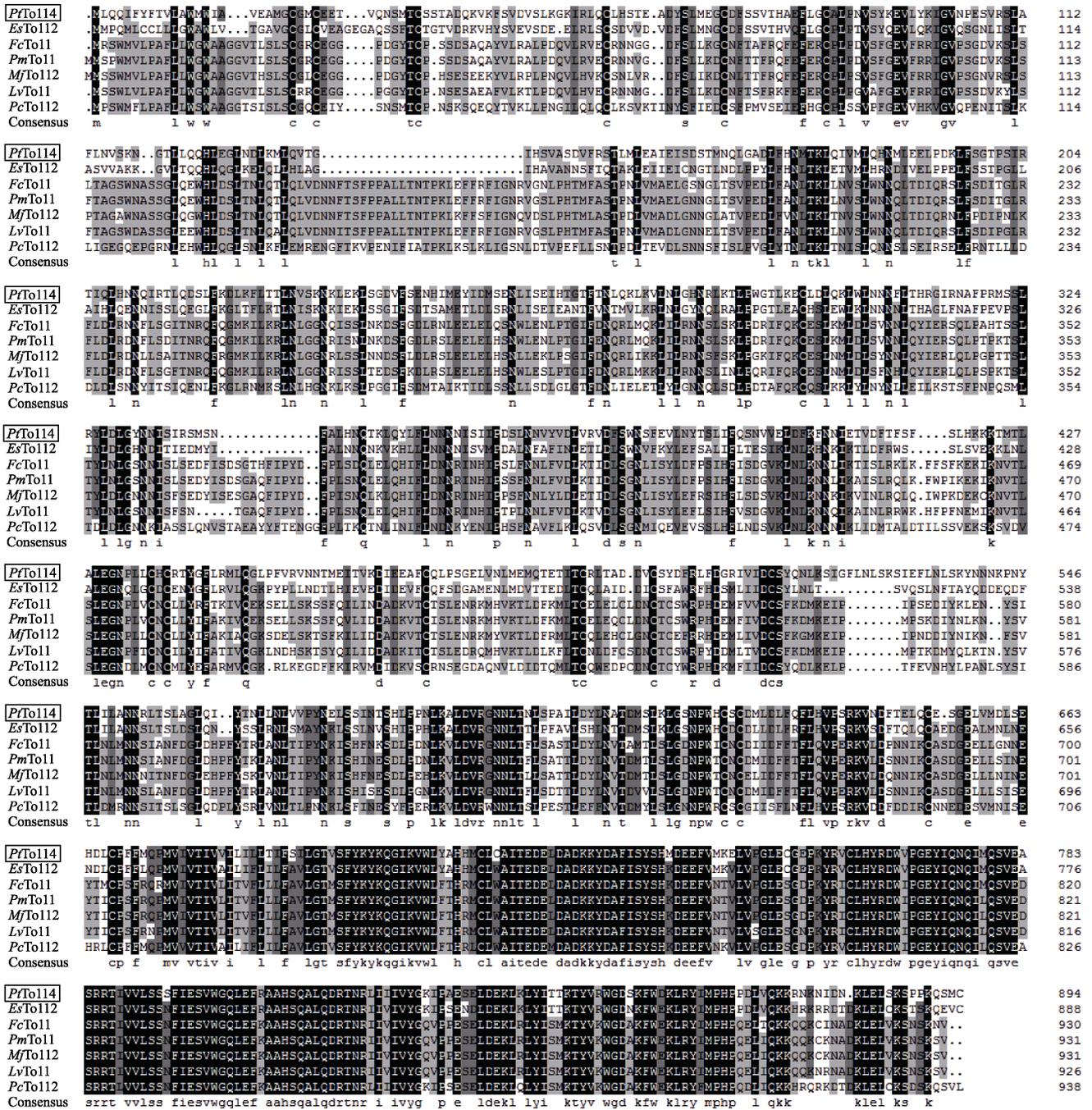


图 3 *PtToll4* 基因编码的氨基酸序列与其他无脊椎动物 Tolls 氨基酸序列比对
Fig.3 Multiple amino acid sequence alignment of *PtToll4* with other invertebrate Tolls

各物种 GenBank 登录号: 三疣梭子蟹 *Toll4*(KY432366)、中华绒螯蟹 *Toll2*(AGT21374.1)、中国明对虾 *Toll* (ACC68670.1)、斑节对虾 *Toll*(ABO38434.1)、日本囊对虾 *Toll2*(BAG68890.1)、凡纳滨对虾 *Toll*(ABK58729.1)、克氏原螯虾 *Toll2*(AOP12928.1)

GenBank accession number of different species: *PtToll4*, *P. trituberculatus* *Toll4* (KY432366); *EsToll2*, *E. sinensis* *Toll2* (AGT21374.1); *FcToll*, *F. chinensis* *Toll* (ACC68670.1); *PmToll*, *P. monodon* *Toll* (ABO38434.1); *MjToll2*, *M. japonicas* *Toll2* (BAG68890.1); *LvToll*, *L. vannamei* *Toll* (ABK58729.1); *PcToll2* *P. clarkia* *Toll2* (AOP12928.1)

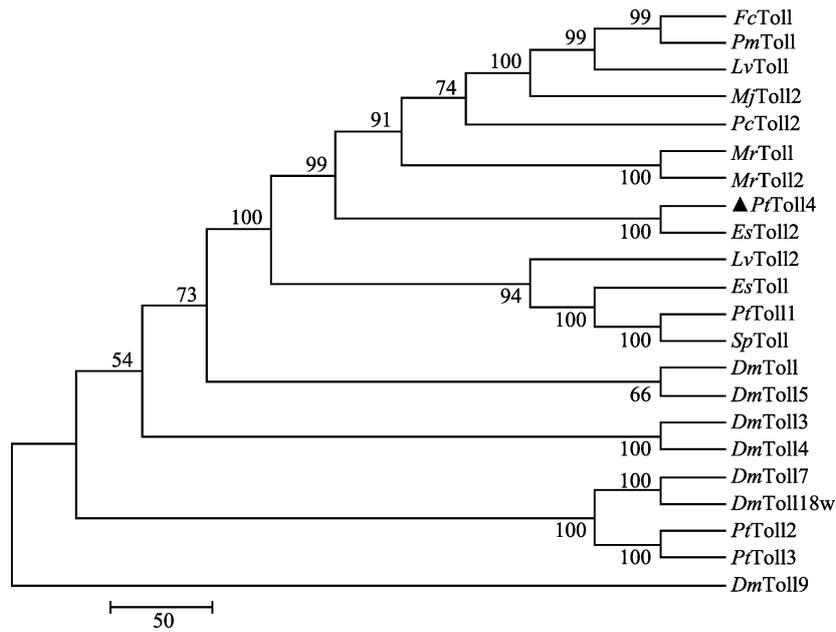


图 4 基于 Toll4 氨基酸序列构建的 NJ 进化树
Fig.4 NJ tree based on Toll4 amino acids

各物种基因 GenBank 登录号：三疣梭子蟹 Toll4 (KY432366)、中华绒螯蟹 Toll (AGK90305.1)、中华绒螯蟹 Toll2 (AGT21374.1)、中国明对虾 Toll (ACC68670.1)、斑节对虾 Toll (ABO38434.1)、日本囊对虾 Toll2 (BAG68890.1)、凡纳滨对虾 Toll (ABK58729.1)、凡纳滨对虾 Toll2 (AEK86516.1)、克氏原螯虾 Toll2 (AOP12928.1)、罗氏沼虾 Toll (AEI25533.1)、罗氏沼虾 Toll2 (AHL39101.1)、拟穴青蟹 Toll (AEX20238.1)、三疣梭子蟹 Toll1 (AIZ66853.1)、三疣梭子蟹 Toll2 (AKV62616.1)、三疣梭子蟹 Toll3 (AKV62617.1)、果蝇 Toll (AAQ64936.1)、果蝇 Toll18w (AAF57509.1)、果蝇 Toll3 (AAF86229.1)、果蝇 Toll4 (AAF52747.3)、果蝇 Toll5 (AAF86227.1)、果蝇 Toll7 (AAF86225.1)、果蝇 Toll9 (AAF51581.1)

GenBank accession number of different species: *PfToll4*, *P. trituberculatus* Toll4 (KY432366); *EsToll2*, *E. sinensis* Toll (AGK90305.1); *EsToll2*, *E. sinensis* Toll2 (AGT21374.1); *FcToll*, *F. chinensis* (ACC68670.1); *PmToll*, *P. monodon* (ABO38434.1); *MjToll2*, *M. japonicas* (BAG68890.1); *LvToll*, *L. vannamei* (ABK58729.1); *LvToll2*, *L. vannamei* (ABK58729.1); *PcToll2*, *P. clarkia* (AOP12928.1); *MrToll*, *M. rosenbergii* Toll (AEI25533.1); *MrToll2*, *M. rosenbergii* Toll2 (AHL39101.1); *SpToll* *S. paramamosain* (AEX20238.1); *PfToll1*, *P. trituberculatus* Toll1 (AIZ66853.1); *PfToll2*, *P. trituberculatus* Toll2 (AKV62616.1); *PfToll3*, *P. trituberculatus* Toll3 (AKV62617.1); *DmToll*, *D. melanogaster* Toll (AAQ64936.1); *DmToll18*, *D. melanogaster* Toll18 (AAF57509.1); *DmToll3*, *D. melanogaster* Toll (AAF86229.1); *DmToll4*, *D. melanogaster* Toll4 (AAF52747.3); *DmToll5*, *D. melanogaster* Toll5 (AAF86227.1); *DmToll7*, *D. melanogaster* Toll7 (AAF86225.1); *DmToll9*, *D. melanogaster* Toll9 (AAF51581.1)

(Schneider *et al.*, 2011), TLR2 能够直接识别脂蛋白和肽聚糖(Takeuchi *et al.*, 1999), TLR5 可直接识别细菌鞭毛(Ramos *et al.*, 2004), TLR9 可直接与未甲基化的细菌 CpG DNA 结合(Hemmi *et al.*, 2000)。 *PfToll4* 的 LRR 结构域含有 8 个 LRR 基序以及 2 个 LRRCT 帽子结构, 这种结构有利于包埋暴露的疏水性氨基酸残基, 从而使胞外结构更为稳定(Gay *et al.*, 2006; Bell *et al.*, 2005), 在分子相互作用中具有重要作用(Leulier *et al.*, 2008)。此外, *PfToll4* 的胞外区有 13 个潜在的糖基化位点, 这些位点在 TLRs 家族基因识别、结合病原相关分子模式中也起着重要作用(Zhang *et al.*, 2011)。

组织表达分布结果显示, *PfToll4* 基因在三疣梭子蟹各组织中均有不同程度的表达, 其中, 在血细胞中的表达量最高, 而血细胞在甲壳动物的免疫系统中具有重要作用(姚翠鸾等, 2006)。在本研究中, 选取

了副溶血弧菌和 WSSV 两种病原对三疣梭子蟹分别进行感染, 在感染的过程中发现, 伴随着感染时间的延长, 三疣梭子蟹出现了行动迟缓、不进食等现象。定量结果表明, 经副溶血弧菌感染后, *PfToll4* 基因在血细胞中表达上调并不显著, 而经 WSSV 感染后, *PfToll4* 在血细胞中被显著诱导表达, 其中, 在 6 h 的表达量最高, 约为对照组的 5 倍。而 Arts 等(2007)发现, 经 WSSV 感染后, 斑节对虾 *PmToll* 基因在组织中的表达量并无变化, 这也说明 TLRs 家族不同成员可能具有受体识别特异性。由此, 推断 *PfToll4* 基因作为模式识别受体可能参与了 WSSV 的特异识别。

已有研究表明, 盐度的变化可以影响甲壳动物的免疫能力, 如郑萍萍等(2010)发现, 盐度的变化会造成三疣梭子蟹中免疫因子的活性发生变化; Joseph 等(2007)发现, 低盐胁迫会使斑节对虾更容易被 WSSV

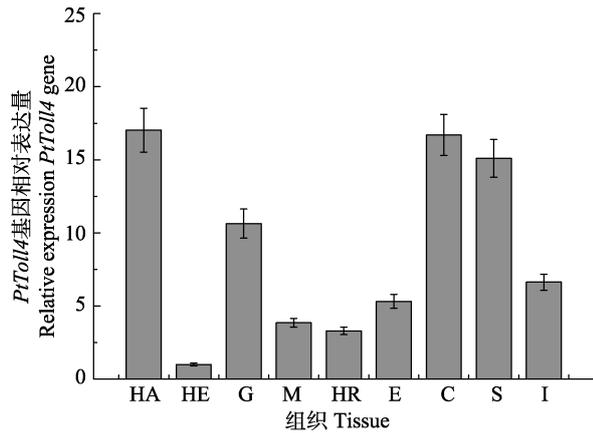


图 5 三疣梭子蟹 *PtToll4* 基因在不同组织中的表达分布
Fig.5 The expression of *PtToll4* in different tissues of *P. trituberculatus*

HA: 血细胞; HE: 肝胰腺; G: 鳃; M: 肌肉;
HR: 心脏; E: 眼柄; C: 表皮; S: 胃; I: 肠
HA: Haemocytes; HE: Hepatopancreas; G: Gill; M: Muscle;
HR: Heart; E: Eyestalk; C: Cuticle; S: Stomach; I: Intestines

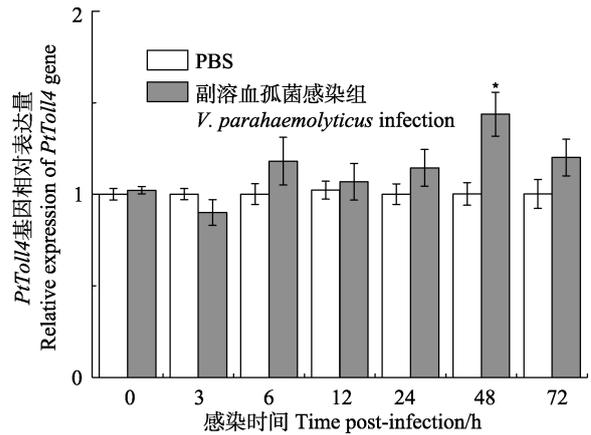


图 6 副溶血弧菌感染后三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因的表达
Fig.6 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes after *V. parahaemolyticus* infection

*代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$; 下同
* at $P < 0.05$, and ** at $P < 0.01$; the same applies below

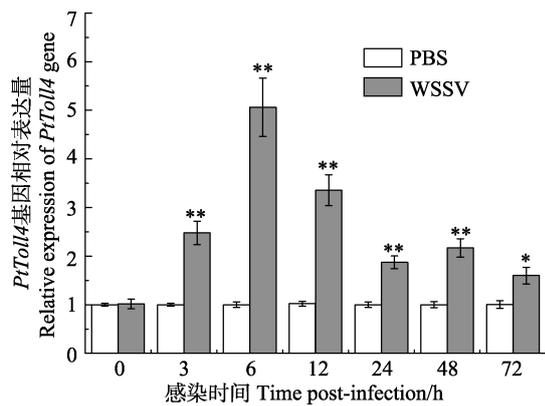


图 7 WSSV 感染后三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因的表达
Fig.7 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes after WSSV infection

感染。为了探究低盐环境对 *PtToll4* 基因表达的影响, 本研究选择盐度为 11 的水体环境对三疣梭子蟹进行低盐胁迫。定量结果显示, 整个低盐胁迫的过程中, *PtToll4* 在血细胞中的表达量均为显著下降($P < 0.01$), 但在 72 h 出现了较为明显的回升, 但仍显著低于对照组。在低盐状态下, 推测三疣梭子蟹 TLRs 等免疫相关基因的表达可能也会受到抑制, 从而影响识别外来病原的能力, 使得自身免疫能力下降, 导致死亡率增加。

综上所述, 可以确定 *PtToll4* 基因是三疣梭子蟹 TLRs 基因家族中的一位新成员。*PtToll4* 在三疣梭子蟹的各个组织中均能被检测到且在血细胞中的表达量最高。通过不同病原刺激后发现, *PtToll4* 可被 WSSV 显著诱导表达, 从而在宿主抵抗 WSSV 入侵感染的

过程中发挥一定的功能。此外, 低盐胁迫状态下, *PtToll4* 基因的表达受到了显著抑制, 可能间接影响了三疣梭子蟹的机体免疫能力, 这或许是低盐环境导致三疣梭子蟹等甲壳动物死亡率升高的一个重要因素。*PtToll4* 基因在抵御不同病原入侵时出现的表达量的差异还需要进一步的研究, 这些结果为进一步探究三疣梭子蟹 TLRs 家族基因对其先天免疫的影响提供了数据支持。

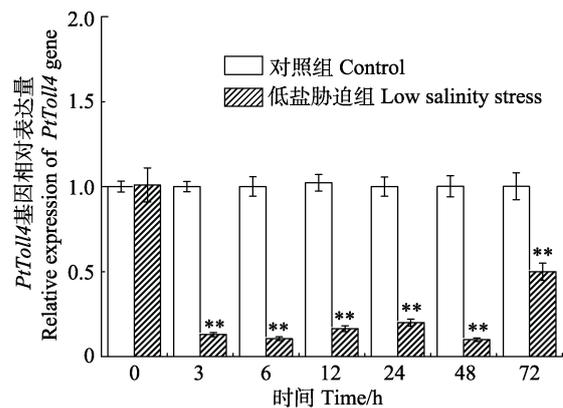


图 8 低盐胁迫后三疣梭子蟹 *PtToll4* 基因在血细胞中的表达
Fig.8 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes under low salinity stress

过程中发挥一定的功能。此外, 低盐胁迫状态下, *PtToll4* 基因的表达受到了显著抑制, 可能间接影响了三疣梭子蟹的机体免疫能力, 这或许是低盐环境导致三疣梭子蟹等甲壳动物死亡率升高的一个重要因素。*PtToll4* 基因在抵御不同病原入侵时出现的表达量的差异还需要进一步的研究, 这些结果为进一步探究三疣梭子蟹 TLRs 家族基因对其先天免疫的影响提供了数据支持。

综上所述, 可以确定 *PtToll4* 基因是三疣梭子蟹 TLRs 基因家族中的一位新成员。*PtToll4* 在三疣梭子蟹的各个组织中均能被检测到且在血细胞中的表达量最高。通过不同病原刺激后发现, *PtToll4* 可被 WSSV 显著诱导表达, 从而在宿主抵抗 WSSV 入侵感染的

参 考 文 献

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, 406(6797): 782-787

- Arts JA, Cornelissen FH, Cijssouw T, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 504–513
- Assavalapsakul W, Panyim S. Molecular cloning and tissue distribution of the Toll receptor in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Genetics & Molecular Research*, 2012, 11(1): 484–493
- Bell JK, Botos I, Hall PR, *et al.* The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102(31): 181–200
- Bilak H, Tauszig-Delamasure S, Imler JL. Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31(3): 648–651
- Carty M, Bowie AG. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 2010, 161(3): 397–406
- Fu P, Lü JJ, Liu P, *et al.* Effects of different salinities on the free amino acids composition in the gill of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 122–126 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃中游离氨基酸含量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 122–126]
- Gao BQ, Liu P, Li J. Analysis of the growth and breeding value of *Portunus trituberculatus* ‘Huangxuan No.1’. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(1): 44–50 [高保全, 刘萍, 李健. 三疣梭子蟹‘黄选 1 号’生长和育种性能分析. *中国水产科学*, 2015, 22(1): 44–50]
- Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 76(1): 141–165
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408(6813): 740–745
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway Jr CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1997(284): 1313–1318
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 987–995
- Johnson GB, Brunn GJ. Evolutionary clues to the function of the toll-like family as surveillance receptors. *Trends in Immunology*, 2003, 24(1): 19–24
- Joseph A, Philip R. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*, 2007, 272(1–4): 87–97
- Lan JF, Zhao LJ, Wei S, *et al.* *PcToll2* positively regulates the expression of antimicrobial peptides by promoting *PcATF4* translocation into the nucleus. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 59–66
- Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors: Taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(3): 165–178
- Liu Y, Shi G, Cui Z, *et al.* *PtSerpin* from the swimming crab *Portunus trituberculatus*, a putative regulator of prophenoloxidase activation with antibacterial activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 365–371
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Ng A, Xavier RJ. Leucine-rich repeat (LRR) proteins: Integrators of pattern recognition and signaling in immunity. *Autophagy*, 2011, 7(9): 1082–1084
- Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, *et al.* A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*, 1980(283): 474–476
- Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(11): 509–517
- Schneider DS, Hudson KL, Lin TY, *et al.* Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development*, 1991, 5(5): 797–807
- Srisuk C, Longyant S, Senapin S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a Toll receptor gene from *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(2): 552–562
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999, 11(4): 443–451
- Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008, 183(183): 1–20
- Wang L, Pan LQ. A study on penetration physiological adaptation of *P. trituberculatus* under low salinity. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(3): 106–112 [王林, 潘鲁青. 三疣梭子蟹在低盐胁迫下渗透生理适应性的研究. *海洋湖沼通报*, 2016(3): 106–112]
- Wang ZF, Wang ZZ, Xu WJ, *et al.* Quantitative study of lethal effect of WSSV on *Portunus trituberculatus* from mixture ponds of prawns and crabs. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2008, 39(2): 184–189 [王忠发, 王志铮, 许文军, 等. 虾蟹混养塘中 WSSV 对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)致死效应的定量研究. *海洋与湖沼*, 2008, 39(2): 184–189]
- Xue JZ, Du NS, Lai W, *et al.* A review of studies on *Portunus trituberculatus* in China. *Donghai Marine Science*, 1997, 15(4): 60–65 [薛俊增, 堵南山, 赖伟, 等. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究. *东海海洋*, 1997, 15(4): 60–65]
- Yan BL, Qing GM, Bao ZH, *et al.* Isolation and identification of

- Vibrio parahaemolyticus* from diseased *Portunus trituberculatus* L. Marine Science Bulletin, 2010, 29(5): 560–566 [阎斌伦, 秦国民, 暴增海, 等. 三疣梭子蟹病原副溶血弧菌的分离与鉴定. 海洋通报, 2010, 29(5): 560–566]
- Yang LS, Yin ZX, Liao JX, *et al.* A Toll receptor in shrimp. Molecular Immunology, 2007, 44(8): 1999–2008
- Yao CL, Wang ZY, Xiang JH. Crustacean haemocytes and their function in immune responses. Zoological Research, 2006, 27(5): 549–557 [姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能. 动物学研究, 2006, 27(5): 549–557]
- Yu AQ, Jin XK, Guo XN, *et al.* Two novel Toll genes (*EsToll1* and *EsToll2*) from *Eriocheir sinensis* are differentially induced by lipopolysaccharide, peptidoglycan and zymosan. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(4): 1282–1292
- Zhang L, Li L, Zhang G. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 653–660
- Zheng PP, Wang CL, Song WW, *et al.* Effect of salinity stress on serum nonspecific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fisheries Science, 2010, 29(11): 634–638 [郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响. 水产科学, 2010, 29(11): 634–638]
- Zhou SM, Yuan XM, Liu S, *et al.* Three novel Toll genes (*PtToll1-3*) identified from a marine crab, *Portunus trituberculatus*: Different tissue expression and response to pathogens. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 737–744

(编辑 冯小花)

Cloning of *Toll4* in *Portunus trituberculatus* and Its Expression in Responding to Pathogenic Infection and Low Salinity Stress

ZHANG Jie^{1,2}, LÜ Jianjian^{2,3}, LIU Ping^{2,3}①, LI Jian^{2,3}, WANG Zhuqing^{1,2}, ZHANG Xiaohui^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract *Portunus trituberculatus*, an economically important food species in China, lacks adaptive immunity and can induce effective immune responses to resist pathogen via innate immunity. Toll-like receptors as pattern recognition receptors (PRRs) play crucial role in innate immune responses. The current study found a novel Toll gene named as *PtToll4* from *P. trituberculatus* by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The full-length cDNA of *PtToll4* was 4276 bp, which contains an open reading frame (ORF) of 2685 bp, a 3' untranslated region (UTR) of 1252 bp, and a 5' UTR of 339 bp. The ORF encoded a polypeptide of 895 amino acids with a predicted molecular weight of 102.5 kDa. *PtToll4* is a transmembrane protein that contains several common structural domains of TLRs, such as LRR, LRRCT motif in the extracellular domain and a TIR domain in the intracellular region. The BLAST analysis showed that *PtToll4* shared the highest homology with *Eriocheir sinensis* Toll2. *PtToll4* was widely expressed in hemocyte, heart, gill, hepatopancreas, stomach, intestine, muscle, cuticle, and eyestalk, and mainly distributed in the hemocyte and cuticle. A weak expression level was detected in the hepatopancreas. WSSV inflection significantly induced *PtToll4* expression in hemocyte at 6 h, and *V. parahemolyticus* inflection had a little effect on it only at 48 h. Low salinity reduced *PtToll4* expression. Our results suggested that *PtToll4* may play an important role in innate immune of *P. trituberculatus* and would provide useful information for the research of immunity regulation in crustaceans.

Key words *Portunus trituberculatus*; *PtToll4*; Gene cloning; Innate immune; Expression analysis

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