

欧阳号锋,易少奎,张龙,等.克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因功能初步研究[J].华中农业大学学报,2022,41(4):233-239.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.029

## 克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因功能初步研究

欧阳号锋<sup>1</sup>,易少奎<sup>2</sup>,张龙<sup>1</sup>,杨思琦<sup>1</sup>,李艳和<sup>1,3</sup>

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水动物育种重点实验室,武汉 430070;
2. 湖州师范学院生命科学学院,湖州 313000;
3. 教育部长江经济带大宗水生生物产业绿色发展工程研究中心,武汉 430070

**摘要** 为探究硫酸软骨素 N-乙酰半乳糖胺基转移酶-1(chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1, *CSGalNAcT-1*) 在克氏原螯虾免疫反应中的作用,利用 RACE 技术成功获得克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因完整 cDNA 序列,并通过荧光定量 PCR 分析该基因在各组织中的表达模式以及在 CpG 寡脱氧核苷酸(ODN)、嗜水气单胞菌和白斑综合征病毒(WSSV)刺激后的表达情况。结果显示,克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因在中肠的相对表达量最高,其次是近胃段肠,在心脏、胃、肌肉和围食道神经中的相对表达量较低。克氏原螯虾肝胰腺、血细胞中 *CSGalNAcT-1* 基因表达量在嗜水气单胞菌和 WSSV 刺激下呈现出下调及上调,而在注射免疫刺激剂 CpG ODN 后, *CSGalNAcT-1* 基因表达水平在大部分组织中呈现上调。表明克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因可能在抵御外界病原侵染以及增强自身免疫反应的过程中发挥重要作用。

**关键词** 克氏原螯虾; *CSGalNAcT-1* 基因; 相对表达; 白斑综合征病毒(WSSV); CpG ODN; 嗜水气单胞菌

**中图分类号** Q78; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0233-07

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)作为一种天然的酸性粘多糖,参与多种生理过程的调控,在细胞黏附、形态发生、神经网络形成和细胞分裂方面能够发挥特定的生物学功能<sup>[1]</sup>。此外,CS具有一定抗炎活性<sup>[2]</sup>。硫酸软骨素 N-乙酰半乳糖胺基转移酶-1(*CSGalNAcT-1*)是硫酸软骨素生物合成中的关键糖基转移酶,该酶被认为在硫酸软骨素生物合成中发挥重要作用,并且在软骨细胞外基质退化中同样发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>,在抑制丙型肝炎病毒复制方面也发挥着关键作用<sup>[5]</sup>。*CSGalNAcT-1* 不仅对于软管的正常发育至关重要,在免疫系统中亦可能发挥着重要的作用。到目前为止, *CSGalNAcT-1* 在甲壳动物的免疫功能方面的研究很少。本研究以无脊椎动物先天免疫分子机制的模型生物克氏原螯虾作为研究对象,利用 RACE 技术成功克隆得到克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因 cDNA 全长序列,并进一步研究了

*CSGalNAcT-1* 基因在克氏原螯虾组织中的差异性表达,同时探究了克氏原螯虾在受到 CpG 寡脱氧核苷酸(ODN)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)刺激后,肝胰腺、鳃、皮肤、胃、肌肉、肠道和血细胞 7 个组织中 *CSGalNAcT-1* 基因的相对表达量变化,旨在为探索 *CSGalNAcT-1* 在克氏原螯虾以及其他甲壳动物免疫反应中的作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用克氏原螯虾采集于湖北省潜江市某人工养殖基地,体质量 15~25 g,暂养于室内的塑料盒中,水温控制在 25~28 °C,充氧,投喂小龙虾人工配合饲料,每天早晚各 1 次。选取健康活力强的克氏原螯虾个体 120 尾,均分为 4 组,养殖在 4 个塑料盒

收稿日期:2022-04-02

基金项目:湖北省重点研发计划项目(2021BBA232);中央高校基本科研业务费专项(2662020SCP004);国家自然科学基金青年基金项目(31501858)

欧阳号锋, E-mail: oyhf9858@hotmail.com

通信作者:李艳和, E-mail: liyanhe@mail.hzau.edu.cn

中至少7 d以适应试验环境。试验期间每天投喂1次。

另采集3尾健康虾的中肠、近胃段肠、卵巢、鳃、后肠、食道下神经节、脑、腹部腹神经索、胸部腹神经索、皮下组织、血细胞、肝胰脏、输精管、促雄性腺、眼柄、心脏、胃、肌肉和围食道神经节等19个组织的样品,迅速置于液氮速冻,存放于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

## 1.2 克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因全长 cDNA 克隆

取肠道组织进行研磨,采用 TRIzol Reagent (Thermo Scientific, USA)法根据说明书进行总RNA的提取。使用紫外分光光度计(Thermo Scientific, USA)检测其质量与浓度。使用 ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA)根据说明书进行反转录以获得cDNA第一链。

基于NCBI中已知无脊椎动物的 *CSGalNAcT-1* 基因序列的保守区域,设计简并引物(CSG-J-F/R),采用PCR扩增获得克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因的cDNA部分片段(表1)。PCR反应体系为:0.5  $\mu\text{L}$  cDNA模板、1  $\mu\text{L}$   $10\times$ 反应缓冲液、0.2  $\mu\text{L}$  dNTP(10 mmol/L)、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各0.1  $\mu\text{L}$ 、0.1  $\mu\text{L}$  *Taq*DNA聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )、8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O;PCR反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;95  $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,57.2  $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,35个循环,最后72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

根据获得的 *CSGalNAcT-1* 基因的部分cDNA序列来设计5' RACE引物(B695-1(GSP1)、B695-2(GSP2)、B695-3(GSP3))和3' RACE引物(C468-1、C468-2)(表1)。使用 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA

表1 所用引物序列

Table 1 The sequences of the primers used

引物 Primer	引物序列 Sequence
CSG-J-F	YTGGGCAAGCGGGTGGTGGAGAA
CSG-J-R	CCRTARCCRAAGTCMCGCCAGAA
B695-1(GSP1)	CGACACTAAATCTGGC
B695-2(GSP2)	AGGTGATCAAGAGCTGCA
B695-3(GSP3)	CGGCGTTTGAAACCTATT
C468-1	TGGACATTGTGTTTCAGCACTCGTT
C468-2	TGCTTCCCAGGTCATTCTGTGTA
CSG-q-F	ATGAAGGCTTACAACAAGTCCGA
CSG-q-R	GTAGTACACAGAATGACCTGGGG
ODN-1670	ACCGATAACGTTGCCGGTGACG

Amplification Kit(Clontech, China)试剂盒,按照说明书以获取5'末端以及3'末端序列。

## 1.3 克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因组织表达分析

克氏原螯虾19个组织样品采用本文材料与方法“1.2”中的方法获得cDNA第一链。在 QuantStudio Realtime Lightcycler 仪器上进行荧光定量PCR(qRT-PCR),采用20  $\mu\text{L}$  qRT-PCR体系:TB Green Premix ExTaq II (TaKaRa, China)10  $\mu\text{L}$ ,正/反向引物(CSG-q-F/R)各0.2  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol/L}$ ),cDNA模板1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.6  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增条件为:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,然后95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,最适温度(64.5  $^{\circ}\text{C}$ )30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,循环40次。管家基因 *18s-RNA* 用作内参基因,并在相同的条件下进行扩增。每个样品设置3个重复,并通过熔解曲线以及比较阈值(Ct)法来确定PCR反应的特异性。

## 1.4 不同刺激物刺激后克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因表达变化

1) 不同刺激物刺激实验。向3个试验组的克氏原螯虾个体分别注射免疫增强剂 CpG ODN、WSSV 和嗜水气单胞菌,对照组克氏原螯虾个体注射生理盐水。注射实验所用的ODN由擎科生物科技有限公司合成,直接用蒸馏水稀释后使用,质量浓度为0.5 mg/mL;WSSV浓度为 $9.7\times 10^8$  拷贝数/mL;嗜水气单胞菌浓度为 $10^7$  CFU/mL。采用肌肉注射,注射量为0.1 mL。

2) 不同刺激物刺激后 *CSGalNAcT-1* 基因在克氏原螯虾各组织中的表达检测。在注射后6、12、24、48、96 h,每组分别取3尾虾,取其肝胰腺、鳃、皮肤、胃、肌肉、肠道组织放置于冻存管内,迅速置于液氮冷冻后放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。使用装有抗凝剂的1 mL注射器从虾体的围心腔内采集血液,4 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min,去上清液,保留血细胞,并迅速置于液氮中冷冻后放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。按照本文材料与方法“1.2”所述方法进行总RNA的提取、cDNA模板的合成,以及采用荧光定量PCR检测克氏原螯虾受到不同刺激物刺激后 *CSGalNAcT-1* 基因在各组织中的表达变化情况。

## 1.5 序列分析与数据处理

利用DNAMAN软件将3'末端和5'末端序列与已获得的中间序列进行拼接、验证,得到 *CSGalNAcT-1* 基因的cDNA序列全长。利用NCBI中的

BLASTX 与 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线搜索工具对该基因的 cDNA 序列进行比对;使用 ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)在线软件预测 *CSGalNacT-1* 基因序列的开放阅读框;利用 SignalP5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测 *CSGalNacT-1* 基因编码氨基酸的信号肽;利用 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam>)及 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)分别预测氨基酸的理化性质和保守结构域。使用 DNAMAN 软件中多序列比对方法,对不同鱼类的 *CSGalNacT-1* 氨基酸序列进行同源性分析;使用 MEGA 5.1 软件中邻接法 (neighbor-joining) 对不同鱼类 *CSGalNacT-1* 氨基酸序列进行系统发育分析,构建克氏原螯虾 *CSGalNacT-1* 基因系统发育树,自展值设为 1 000。

采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 *CSGalNacT-1* 基因的相对表达量,试验数据通过 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并选择 Duncan's 多重检验,进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  则表示差异显著。所得数据结果用“平均值 ± 标准差”(Mean ± SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CSGalNacT-1* 基因全长及序列分析

通过 RACE 技术获得了克氏原螯虾 1 956 bp 的 *CSGalNacT-1* 基因序列全长 (GenBank 登录号: MT311699)。该基因序列包含 1 个长为 1 608 bp 的开放阅读框 (ORF), 1 个长度为 104 bp 的 5' 非翻译区 (UTR) 和 1 个长度为 244 bp 的 3' 非翻译区;共编码 535 个氨基酸,预测分子质量为 60 186.46 u,理论等电点为 6.73,不存在跨膜位点 (图 1)。CSGalNacT-1 中存在 GT-A 家族 2 个保守的典型结构域 (CHGN 和 glyco\_trans\_7c)。CSGalNacT-1 中存在 1 个 DXD 基序,在许多糖基转移酶中保守,是二价阳离子结合的关键序列,CSGalNacT-1 中也存在 1 个 GWGGED 基序,在部分  $\beta$ 4GalT 家族中高度保守 (图 1)。氨基酸序列同源性分析显示,克氏原螯虾 *CSGalNacT-1* 氨基酸序列与南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 相似性最高 (87.64%) (图 2A)。系统进化树结果显示,克氏原螯虾与南美白对虾聚为一支 (图 2B),亲缘关系最近,与传统分类基本一致。

```

1 TGGTGTTCGGCGTAGCCCTAAGTTAGTTTACTACACATCAGCCTCGGTTACCTTGA
61 CTCTCACCAGCATATCCTTGGCTTCTATGATAAGAAGCGGTG
105
21 ATGGTGTGTGATGAGG
121 GTGAGGGAGGTCCTGCTCCCTTACCCTCTCACTCTCTCTGCTGCTCAACACTGCC
41 G E G R S L L S L T T L T L L L L Q H C
181 GCCTCTCACCACCTCAACCGTGAGGATGAAGCGCGAGCTACGAGCGTCAGCTGGCGT
51 R L S H H L N G E D E G A S Y E R Q L A
241 GGAGGGAGGAGGATACAGAGGACACACTCGAGCGCTCTCTCCAGATAGCACAACTCA
81 W R E E E Y R G H T R R L L L Q I A Q L
301 AGGAGGAGCTCGCCAGAGTTAACGGCAACAGAGCCGATTGAGATCTTTGAGAGCTCTG
101 K E E L A R V N G N R A D S E S F E S P
361 GTTTGGGTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
121 G L G G V G G G P G V V G S S I E A K T
421 AGATTAATGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
141 E S N V V V V D E P C G A V I Q H Q V A
481 AGTCAGAGATCACCAGGCGATCCGCTGAACAATGAATACGAGGTTGTGACCTTCTCC
161 Q S E I T Q G I P L N N E Y E V V T F S
541 ACTTCAGTGGTCTCGAGTATACCCCTCTGAGCTTGGCTTGGAAAGAGGGTAGTGGAGA
181 H F T W S R V Y P S E L G L G K R V V E
601 AGCCAATAGTTTCAAACGCCGAGATACCTTGGCTGCTCACTGAGCTCTTGATCACC
201 K P I G F K R R D I L A A L T A A L D H
661 TTAATACACCAGTACCTGCCAGATTAGTGTGATGATTTTGGAGGAATGTACCGCA
221 L N T P V P A R F S V D D F V E G M Y R
721 CAGTCCCTACAAGTGAACCCAGTACGAATGCTTTCATGAGCCGCGCCCAACCA
241 T V P T S G T Q Y E L L F H D R A N H
781 CCTCTCATGACCTGCTGTCACACTTCTAAGTCTTGGACCAATTAAGTGTACTCA
261 T S H Q Y R S V T L L R S F A P L T V V
841 CTAAGTGCGACACAACATAACAGTTGATCAACATCTCTGCCACTCTCGGGAAGAA
281 T K V Q H N T K Q L I N I L P L S G R
901 CAGACACATTCGGAGGTTTATGGCAAGCTCGTTACCATCATCTCCGGCATAGCCGCC
301 T D T F R G F M D K L V T I L R H D R
961 GAATCTCTCAACAGTTGTTATTTGGTCATGAAGCTTACAACAAGTCCGAATATA
321 R I F L T V V Y F G H E G L Q V G S R N I
1021 TAATTAATGCCTCAAAGGAGTAAAGTTAGACACATCAATGCTCACTCTCAATGAAA
341 I T N A S K E A K F R H I K L L T L N E
1081 CATTTCTAGAGAAAAGCACTACAGTTGGTCCACCACTGCTCAAAGGTGATGATC
361 T F S R G K A L Q V G A T H W S K G D V
1141 TTTTGTTCATGTGTGATGGACATTGTTGTCAGCCTCGTTCCTTGGACAGTATCGTC
381 L L F M C D V D I V F S T R F L E R C
1201 TGAATGCTTCCCGAGTCAATCTGTACTACCCCGTTGTGTTTCCCTGTACAATCCCA
401 L N A S P C G H S V Y Y P V V F S L Y N P
1261 ATATGGTTTATCCTCTCCAGGGCAACCTGTACCTCAGGAATGGACCAATAGTAGTCT
421 N M V Y P L Q G K P V P Q E L D Q L V I
1321 CTAGAGACACAGGTTCTGGCGTGAATTTGGCTATGGATAGCCTGCAATATAGATCAG
441 S R D T G F W R D E F G Y G M T C Q Y R S
1381 ACTTTTGAAGTCCCAAGGCTTTGATGAGGATATATAGCTGGCTGGTGAAGATGCT
461 D F L S V Q G E D E D I I G W G G E D V
1441 TACTCTACGCAATATGTTAAGTCTAGACTTCACTGATCCGTTCTACGACCCAGGAA
481 L L Y R K Y V K S R L S V R S T D P G
1501 TATCCACTTGTGGCATCAAAGGAATGTTCCACCTCTCTCTCTGTGACCAATACCGT
501 I F H L W H P K E C S T S L S A D Q Y R
1561 CCTGCATACCTCAGCGCCCTTAATGAGGCTCACATGCTACCTTGGCCTATTGCT
521 A C I T S R A L N E A S H A H L G L I A
1621 TTAAGATGATAGTAAAGCCCTCTCGAGCTGAAGTCCCAACAGGCAAGTACTGCT
541 F K D D L G K H P L G A E V P T G S N A
1681 TTGAAGAGCAGCAACTCAAAGCCGAGATGAA
561 L E E Q Q L K A E M
1713
1741 AGATGAAGTGGAGTGCCTGATGATTGCAATTAAGTATCGACGAGCTCCAACCCCTAA
1801 AAATAGTAATCCTAGTTCGGCTCAATGATGTTATACAAACAATTAATGGGAATA
1861 AAATCAAAGACTTCAAAGTGAAGTATGATGCTGCTTCCATTAATATTTAAACTA
1921 GTTACGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

```

“[]”内为信号肽;DXD基序序列以加粗字体标出; $\beta$ 4GalT基序序列用方框标出;起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)以箭头指出;阴影部分为CHGN保守结构域;Glyco\_transf\_7C保守结构域以下划线标出。The signal peptide region is in square bracket.DXD motifs are written in bold.The  $\beta$ 4Gal-T motif is boxed.The start code and stop code are indicated by arrowheads.The shadow indicates the CHGN conserved domain.The Glyco\_transf\_7C conserved domain is underlined.

图1 *CSGalNacT-1* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列  
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *CSGalNacT-1*

### 2.2 不同组织 *CSGalNacT-1* 基因的相对表达分析

*CSGalNacT-1* 基因在克氏原螯虾各组织中的表达分析结果显示,在各个组织中都能够广泛检测到 *CSGalNacT-1* 表达。其中,在中肠(MG)中 *CSGalNacT-1* 的表达量最高,其次是近胃段肠(FG)、卵巢(Ov)、鳃(Gi)和后肠(HG)。而 *CSGalNacT-1* 在食道下神经节(SG)的表达量比较低;在脑(Br)、腹部腹

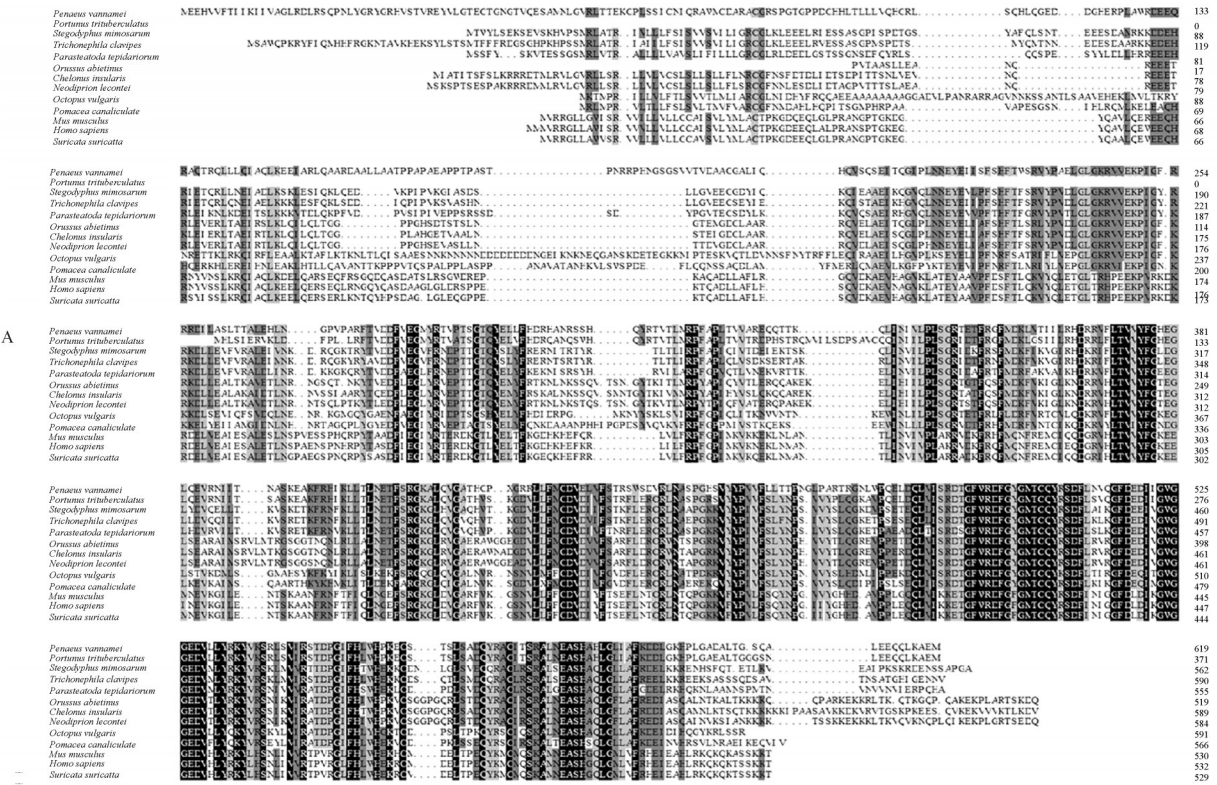


图2 CSGalNAct-1的多重氨基酸序列比对(A)以及系统发育树(B)

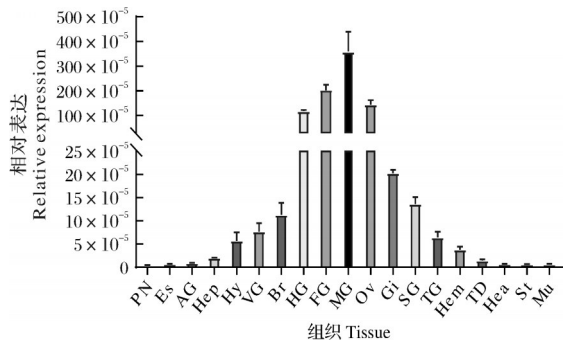
Fig.2 Multiple amino acid sequence alignment of CSGalNAct-1(A) and the neighbor-joining tree constructed (B)

神经索(VG)、胸部腹神经索(TG)、皮下组织(Hy)、血细胞(Hem)、肝胰脏(Hep)和输精管(TD)的表达量更低;在促雄性腺(AG)、眼柄(Es)、心脏(Hea)、胃(St)、肌肉(Mu)和围食道神经节(PN)等组织,CSGalNAct-1几乎没有表达(图3)。

### 2.3 不同刺激物刺激后 CSGalNAct-1 基因的表达变化

检测克氏原螯虾在不同刺激物刺激后 CSGalNAct-1 基因的表达变化如图4所示。图4A显示,感染 WSSV 病毒后,克氏原螯虾肝胰腺中 CSGalN-

Act-1 的表达水平下调,表达量在感染 96 h 后达到峰值;而感染嗜水气单胞菌后 12 h 肝胰腺中 CSGalNAct-1 的表达水平显著上调,表达量在 12 h 达到最高,为对照组的 9.71 倍。与对照组相比,注射免疫增强剂 CpG ODN 后,肝胰腺中 CSGalNAct-1 的表达显著上调(图 4A)。经 WSSV 注射感染后,肠道组织中的 CSGalNAct-1 基因表达上调,在感染后 6 h 达到最高水平,为对照组的 11.49 倍,在感染后 96 h 恢复到与对照组相同水平。在感染嗜水气单胞菌后,CSGalNAct-1 基因在肠道中的表达水平显著上调,



MG: 中肠 Midgut; FG: 近胃段肠 Foregut; Ov: 卵巢 Ovary; Gi: 鳃 Gill; HG: 后肠 Hindgut; SG: 食道下神经节 Subesophageal ganglia; Br: 脑 Brain; VG: 腹部腹神经索 Ventral ganglia; TG: 胸部腹神经索 Thoracic ganglia; Hy: 皮下组织 Hypodermis; Hem: 血细胞 Hemocytes; Hep: 肝胰脏 Hepatopancreas; TD: 输精管 Testicular ducts; AG: 促雄性腺 Androgenic gland; Es: 眼柄 Eyestalk; Hea: 心脏 Heart; St: 胃 Stomach; Mu: 肌肉 Muscle; PN: 围食道神经节 Periesophageal nerve.

图3 克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因在各组织中的表达情况

Fig.3 The expression profile of *CSGalNAcT-1* in different tissues of *Procambarus clarkii*

在感染后 6 h 达到峰值,为对照组的 5.54 倍(图 4F)。注射感染嗜水气单胞菌以及 WSSV 后, *CSGalNAcT-1* 基因在克氏原螯虾鳃和皮肤组织以及血细胞中的表达量均呈现出上调,在注射免疫增强剂 CpG ODN 后, *CSGalNAcT-1* 基因的表达量在 3 个组织中均呈现出增加的趋势,尤其是在血细胞中(图 4B、C、G)。

### 3 讨论

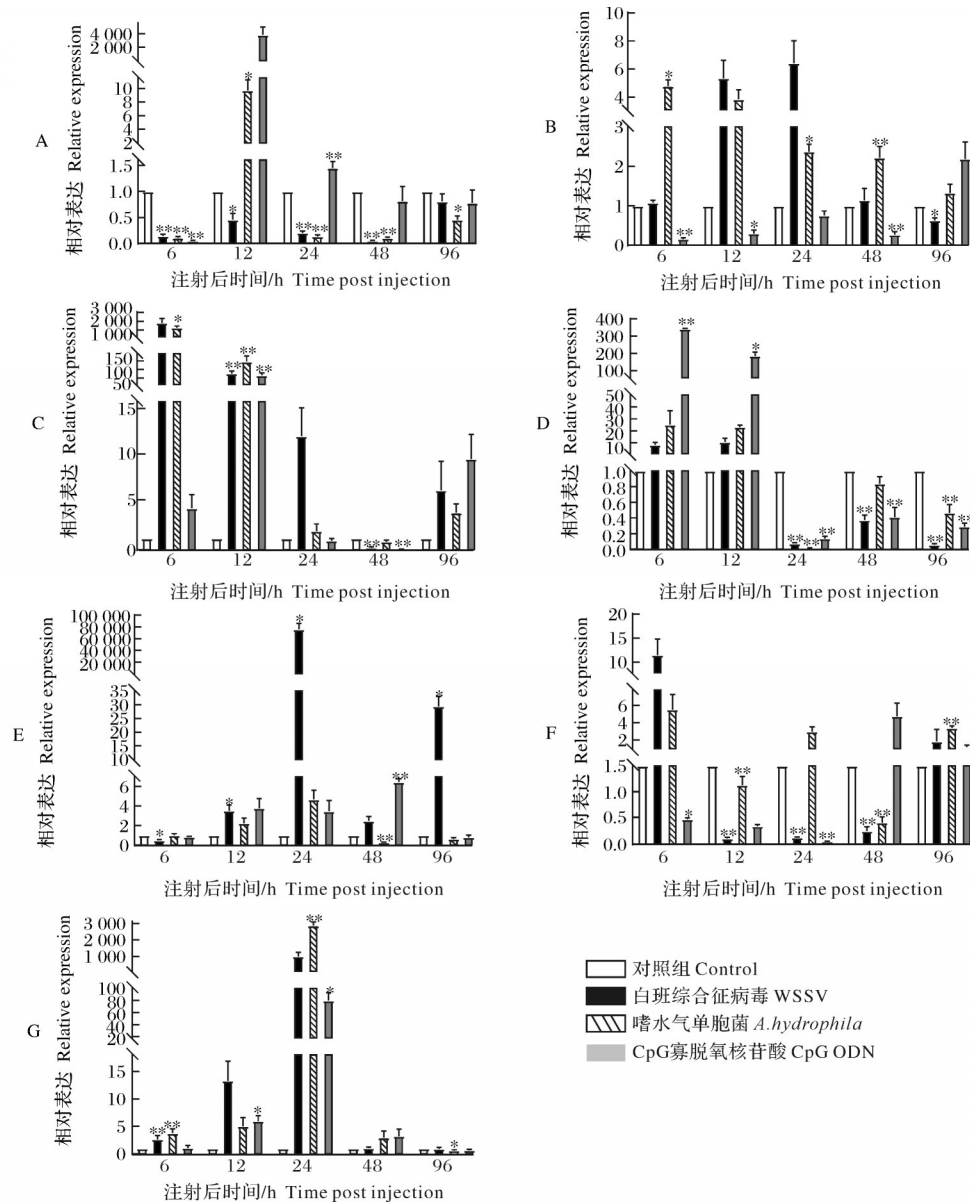
本研究克隆获得了克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因全长序列,通过生物信息学分析发现氨基酸序列含有 DXD 和 GWGGED 2 个基序序列,这与之前研究中对于 *CSGalNAcT-1* 的描述一致<sup>[6]</sup>。氨基酸序列比对分析显示, *CSGalNAcT-1* 氨基酸序列在不同物种间具有高度保守性,与南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) (77.24%) 和三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) (87.64%) 的氨基酸序列同源性最高。系统发育分析结果表明克氏原螯虾与南美白对虾亲缘关系最近,聚为一支。因此,我们可以确定该序列为克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因。

CS 在各组织和细胞中都能够广泛合成, *CSGalNAcT-1* 基因同样在各组织中都有广泛表达。CS-*GalNAcT-1* 在 CS 的合成过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。与其他 CS 合成相关的转移酶相比, *CSGalNAcT-1* 基因在鼠软骨的表达量最高,在其他组织中的表达

情况与人基本相似<sup>[8]</sup>。之前研究发现 *CSGalNAcT-1* 基因可能参与了克氏原螯虾对 WSSV 病毒侵染的免疫抵抗<sup>[9]</sup>。本研究发现 *CSGalNAcT-1* 基因在克氏原螯虾的中肠、近胃段肠与卵巢中的表达量高。此外,在哺乳动物(人)中, *CSGalNAcT-1* 基因在甲状腺和胎盘组织中的表达量最高<sup>[4,6]</sup>。卵巢是重要的生殖相关组织,卵巢内 *CSGalNAcT-1* 基因表达量高是否说明该基因在克氏原螯虾的生殖过程中亦发挥了关键作用,有待进一步研究。

与其他甲壳类动物一样,克氏原螯虾不具备获得性免疫,完全依赖先天性免疫来抵抗外界病原入侵<sup>[10]</sup>。无脊椎动物中,肝胰腺和血细胞<sup>[11]</sup>是重要免疫器官,本研究中,感染 WSSV 和嗜水气单胞菌后, *CSGalNAcT-1* 基因在鳃、皮肤和血细胞中的表达呈上调,在肝胰腺中的表达呈下调。推测克氏原螯虾能够通过上调血细胞中 *CSGalNAcT-1* 基因的表达以及下调肝胰腺中 *CSGalNAcT-1* 基因的表达来抵抗病原入侵,这与人体能够通过下调肝脏中 *CSGalNAcT-1* 基因的表达来抑制丙型肝炎病毒(HCV)的复制的结果类似<sup>[5]</sup>。CpG ODN 是一种免疫刺激剂,能够通过增强 B 细胞的活性来增强机体的免疫力。本研究中注射 CpG ODN 后 *CSGalNAcT-1* 在克氏原螯虾大部分组织中均表达上调,尤其是在血细胞中,进一步表明了 *CSGalNAcT-1* 可能是克氏原螯虾的免疫相关基因。

WSSV 病毒侵染会使得克氏原螯虾肠道稳态遭到破坏并导致疾病的发生<sup>[12]</sup>,有研究显示,在感染 WSSV 后,南美白对虾肠道内气单胞菌属的丰度显著增加<sup>[13]</sup>。在本研究中,经 WSSV 与嗜水气单胞菌感染后, *CSGalNAcT-1* 基因在肠道中的表达量在 6 h 迅速升高,在 12 h 到 48 h 均低于对照组,呈现出明显的下调表达。猜测克氏原螯虾可能通过调节肠道中 *CSGalNAcT-1* 基因的表达来维持肠道稳态,从而防止虾体患病。CS 能够激活 JNK 通路来调节纤维肉瘤细胞的黏附和迁移<sup>[14]</sup>, JNK 通路激活又可以增强抗菌肽产生<sup>[15]</sup>。有研究显示,病毒侵染后, JNK 信号通路参与调节特定病毒蛋白的表达以及能够参与病毒的复制<sup>[16]</sup>。 *CSGalNAcT-1* 作为 CS 生物合成过程中的关键转移酶是否能够参与 JNK 信号通路的激活,进而在甲壳类动物免疫防御过程中发挥重要作用,有待进一步研究。 *CSGalNAcT-1* 作为硫酸软骨素生物合成的关键糖基转移酶,其在甲壳形成中的作用尚不清楚,探索其在蜕皮过程中的相关作用也将是该基因的研究方向之一。



A: 肝胰脏 Hepatopancreas; B: 鳃 Gill; C: 表皮 Cuticular epidermis; D: 胃 Stomach; E: 肌肉 Muscle; F: 肠道 Intestine; G: 血细胞 Haemocytes; \*表示显著性差异 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。An asterisk represents the significant difference ( $P < 0.05$ ), and two asterisks represent the extremely significant difference ( $P < 0.01$ ).

图4 不同刺激物刺激后克氏原螯虾 *CSGalNAcT-1* 基因在不同时间点不同组织中的表达情况

Fig.4 Expression levels of *CSGalNAcT-1* after different pathogen infection in different tissues at different time

## 参考文献 References

- [1] OGAWA H, HATANO S, SUGIURA N, et al. Chondroitin sulfate synthase-2 is necessary for chain extension of chondroitin sulfate but not critical for skeletal development[J/OL]. PLoS One, 2012, 7 (8) : e43806 [2022-04-02]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043806>.
- [2] BISHNOI M, JAIN A, HURKAT P, et al. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis[J]. Glycoconjugate journal, 2016, 33(5): 693-705.
- [3] ZHENG J, WU C, MA W, et al. Abnormal expression of chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 and Hapln-1 in cartilage with Kashin - beck disease and primary osteoarthritis [J]. International orthopaedics, 2013, 37(10): 2051-2059.
- [4] GOTOH M, YADA T, SATO T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to N-acetylgalactosamine [J]. The journal of biological chemistry, 2002, 277(41): 38179-38188.
- [5] JI X Y, CHEN J H, ZHENG G H, et al. Design and synthesis of cajanine analogues against hepatitis C virus through down-regulating host chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1[J]. Journal of medicinal chemistry, 2016, 59(22): 10268-10284.
- [6] UYAMA T, KITAGAWA H, TAMURA J, et al. Molecular cloning and expression of human chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase: the key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate [J]. The journal

- of biological chemistry, 2002, 277(11):8841-8846.
- [7] WATANABE Y, TAKEUCHI K, ONAGA S H, et al. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development[J]. The journal of biological chemistry, 2010, 432(1):47-55.
- [8] SAKAI K, KIMATA K, SATO T, et al. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 plays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage[J]. The journal of biological chemistry, 2007, 282(6):4152-4161.
- [9] YI S, LI Y, SHI L, et al. Novel insights into antiviral gene regulation of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, infected with white spot syndrome virus [J/OL]. Genes, 2017, 8(11):320 [2022-04-02]. <http://doi.org/10.3390/genes8110320>.
- [10] LIU Y, SHI G, CUI Z, et al. Ptserpin from the swimming crab *Portunus trituberculatus*, a putative regulator of prophenoloxidase activation with antibacterial activity[J]. Fish & shellfish immunology, 2014, 39(2):365-371.
- [11] 宋光年, 金松君, 张继泉, 等. 中国明对虾 caspase 基因的克隆与表达分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(12):1-7. SONG G N, JIN S J, ZHANG J Q, et al. Cloning and expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Marine sciences, 2010, 34(12):1-7(in Chinese with English abstract).
- [12] 陈一铭, 顾泽茂, 李莉娟, 等. 白斑综合征病毒感染对克氏原螯虾肠道菌群的影响[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2):40-46. CHEN Y M, GU Z M, LI L J, et al. Effect of white spot syndrome virus (WSSV) infection on intestinal flora composition of *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(2):40-46(in Chinese with English abstract).
- [13] 李继秋, 谭北平, 麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1):109-113. LI J Q, TAN B P, MAI K S. Study on the relationships between white spot syndrome virus outbreak in cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) and the composition of aerobic heterotrophic bacterium communities in shrimp intestine [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1):109-113(in Chinese with English abstract).
- [14] FTHENOU E, ZONG F, ZAFIROPOULOS A, et al. Chondroitin sulfate A regulates fibrosarcoma cell adhesion, motility and migration through JNK and tyrosine kinase signaling pathways [J]. Vivo, 2009, 23(1):69-76.
- [15] LI C, LI H, WANG S, et al. The c-Fos and c-Jun from *Litopenaeus vannamei* play opposite roles in *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus infection [J]. Developmental and comparative immunology, 2015, 52(1):26-36.
- [16] SUN J, LI Y, LI M, et al. A novel JNK is involved in immune response by regulating IL expression in oyster *Crassostrea gigas* [J]. Fish & shellfish immunology, 2018, 79:93-101.

## Preliminary study on function of *CSGalNAcT-1* gene in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*

OUYANG Haofeng<sup>1</sup>, YI Shaokui<sup>2</sup>, ZHANG Long<sup>1</sup>, YANG Siqi<sup>1</sup>, LI Yanhe<sup>1,3</sup>

1. College of Fisheries/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China;

3. Engineering Research Center of Green development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

**Abstract** To investigate the role of chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (*CSGalNAcT-1*) played in the immune response of *Procambarus clarkii*, in this study, the complete cDNA sequence of the *P. clarkii CSGalNAcT-1* was obtained by RACE, and its expression patterns in response to stimulation of CpG oligodeoxynucleotide (ODN), *Aeromonas hydrophila* and white spot syndrome virus (WSSV) were investigated by real-time PCR. The results indicated that the relative expression of *CSGalNAcT-1* was highest in the midgut, followed by the foregut, and less in the heart, stomach, muscle and periesophageal nerve in *P. clarkii*. Besides, the expression of *CSGalNAcT-1* in the hepatopancreas and haemocytes which were considered as immune organs of crustacean, could be down-regulated and up-regulated by challenges of *A. hydrophila* and WSSV, respectively, and the expression was up-regulated in most of the tissues after injected with CpG ODN, indicating that the *CSGalNAcT-1* gene may play an important role in resisting the pathogenic infection and enhancing the autoimmune response in *P. clarkii*.

**Keywords** *Procambarus clarkii*; *CSGalNAcT-1*; relative expression; white spot syndrome virus; CpG ODN; *Aeromonas hydrophila*

(责任编辑:边书京)