

杨兵兵, 魏哲, 蔺思函, 等. 克氏原螯虾受鲶爱德华氏菌刺激后 *Pc-crustin 6* 基因的表达分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (9): 1048–1053.

YANG B B, WEI Z, LIN S H, et al. Gene Cloning and Expression of *Crustin 6* in *Procambarus clarkii* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (9): 1048–1053.

克氏原螯虾受鲶爱德华氏菌刺激后 *Pc-crustin 6* 基因的表达分析

杨兵兵¹, 魏 哲¹, 蔺思函¹, 李倩倩¹, 李 博¹, 王春丹¹, 沈秀丽², 杜志强^{1*}

(1. 内蒙古科技大学生命科学与技术学院, 内蒙古自治区 包头 014010;

2. 内蒙古科技大学图书馆, 内蒙古自治区 包头 014010)

摘 要:【目的】为了后续深入研究克氏原螯虾甲壳肽基因的功能。【方法】以 *Pc-crustin 6* 甲壳肽基因作为研究对象, 通过设计特异性引物进行 PCR 扩增, 利用生物信息学软件进行氨基酸序列比对与系统进化树分析, 探讨 *Pc-Crustin 6* 的分子特性; 并利用 qRT-PCR 技术分析目的基因在不同组织中的表达水平, 检测鲶爱德华氏菌刺激后基因的表达模式。【结果】*Pc-crustin 6* 的 cDNA 序列全长为 465 bp, 开放阅读框包括 384 bp, 编码 127 个氨基酸残基; 在分子的 N 端包含一个由 25 个氨基酸残基组成的信号肽序列, C 端包含一个由 8 个保守的半胱氨酸残基构成的 WAP 结构域。*Pc-crustin 6* 在被检测的 5 个组织中均存在一定的表达, 其中, 鳃组织的相对表达量最高。鲶爱德华氏菌刺激后, *Pc-crustin 6* 在血细胞、肝胰腺、鳃、肠组织中均表现出了明显的上调趋势。【结论】机体在受到鲶爱德华氏菌刺激后, *Pc-crustin 6* 相对表达量发生改变, 推测其在小龙虾抗鲶爱德华氏菌过程中发挥了作用。

关键词: 克氏原螯虾; 抗菌肽; 基因克隆; 先天免疫; 生物信息学分析

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 09-1048-06

Gene Cloning and Expression of *Crustin 6* in *Procambarus clarkii*

YANG Bingbing¹, WEI Zhe¹, LIN Sihan¹, LI Qianqian¹, LI Bo¹, WANG Chundan¹, SHEN Xiuli², DU Zhiqiang^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 2. Library, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: 【Objective】Functions of crustacean gene of *Procambarus clarkia* were studied. 【Method】*Pc-crustin6* was targeted for this study with specifically designed primers for PCR. Amino acids alignment and phylogenetic tree analysis were performed with bioinformatics software to decipher the molecular properties of *Pc-crustin 6*. Expressions and distributions of *Pc-crustin 6* in different tissues were analyzed by qRT-PCR. The expression after an *Edwardsiella ictaluri* challenge was used to determine the disease resistance associated with the gene. 【Result】The full length *Pc-crustin 6* cDNA was 465 bp with an open reading frame of 384 bp and encoding 127 amino acids. The N terminal of the molecule contained a signal peptide of 25 amino acids, and the C terminal a WAP domain of 8 conserved cysteine residues. *Pc-crustin 6* was expressed to varied extents in 5 organs including the gills, which was the highest among them. After an artificial exposure to *E. ictaluri*, the expressions of *Pc-crustin 6* in the hemocytes, hepatopancreas, gills, and intestines of *P. clarkia* were significantly up-regulated.

【Conclusion】The *Pc-crustin 6* expression in organs of *P. clarkia* was significantly altered after being stimulated by the induction of *E. ictaluri*. It indicated that the gene was involved in the pathogenic resistance of *P. clarkia*.

Key words: *Procambarus clarkii*; antimicrobial peptides; gene cloning; innate immunity; bioinformatic analysis

收稿日期: 2021-04-12 初稿; 2021-06-24 修改稿

作者简介: 杨兵兵 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 无脊椎动物的先天免疫 (E-mail: 2633159278@qq.com)

* 通信作者: 杜志强 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 无脊椎动物的先天免疫 (E-mail: nmdzq1981@163.com)

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (2020JQ03); 国家自然科学基金 (32060834、31660260)

0 引言

【研究意义】小龙虾是一种淡水甲壳类无脊椎动物, 学名克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*), 原产于墨西哥北部与美国南部。目前, 它在我国已经成为了一种重要的经济水产养殖动物。养殖过程中, 由于养殖密度的增加、病原菌引起的虾病频繁爆发, 给小龙虾养殖业造成了严重损失。因此, 研究小龙虾抗细菌先天免疫, 对于虾病防治策略的制定具有重要意义。【前人研究进展】无脊椎动物为了保护机体免受外界病原侵染, 进化出了一套先天免疫防御机制^[1]。作为甲壳类模式动物, 小龙虾主要依靠自身的先天免疫系统抵御病原微生物的入侵^[2], 该系统包括物理屏障、体液免疫与细胞免疫三部分^[3]。对于体液免疫而言, 主要的效应分子是抗菌肽, 包括对虾素、溶菌酶、甲壳肽、抗脂多糖因子等, 相关研究结果显示: 此类分子对细菌、真菌具有广泛的抑菌活性, 因而在分子生物学研究领域被广泛关注^[4, 5]。近些年, 在红螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中华绒螯虾 (*Eriocheir sinensis*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 的抗菌先天免疫相关研究中, 相继发现了具有抗菌活性的甲壳肽分子^[6-9]。在分子结构方面, 抗菌肽分子的 N 末端极性氨基酸的残基促使其分子具有活化剂的活性性质^[10]。在作用机理方面, 抗菌肽分子能够与病原菌细胞壁表面的正负电荷进行结合, 使其表面产生穿孔, 内容物释放, 从而造成病原菌的死亡^[11, 12], 发挥抑菌活性。张财亮等利用 LPS、Poly I:C 刺激拟穴青蟹, 并且通过对鳃组织中 *crustin* 基因进行抗细菌的研究^[13]。【本研究的切入点】小龙虾在鲶爱德华氏菌刺激后组织甲壳肽基因表达模式有待深入研究。【拟解决的关键问题】本研究通过 qRT-PCR 技术分析小龙虾在鲶爱德华氏菌刺激后的血细胞、肝胰腺、鳃、肠组织基因相对表达量。通过对小龙虾 *crustin* 6 甲壳肽基因的研究以及初步解决后续基因重组表达、抗体制备、功能研究的技术问题, 为深入无脊椎动物抗细菌先天免疫基础理论研究提供理论依据, 同时也为水生生物养殖实践环节中免疫策略的制定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

健康的小龙虾 (15~20 g), 购买自包头市友谊

瑞福海鲜市场; PCR 产物回收试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、T 载体 PCR 产物克隆试剂盒, 赛默飞世尔科技公司; 动物总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol)、cDNA 第一链合成试剂盒、荧光染料 TB Green Premix, 宝生物 (大连) 有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 无菌条件下采集小龙虾的血细胞、肝胰腺、鳃、肠组织、肌肉 50~100 mg 置于玻璃匀浆器中, 加入 1 mL 预冷的 TRIzol 试剂进行匀浆, 使用动物总 RNA 提取试剂盒提取上述各组织的总 RNA, 利用 NANO Drop2000 仪进行浓度测定, 利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行质量鉴定。

1.2.2 cDNA 合成 提取的总 RNA 按照反转录试剂盒的使用说明进行 cDNA 合成, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量验证并且 -80 °C 保存备用。

1.2.3 基因序列的 PCR 扩增 根据前期转录组测序结果分析而获得的一段小龙虾甲壳肽基因的中心序列, 设计目的基因序列扩增引物 *Pc-crustin*-F (5'-GCT CCA GCG TAC ACG CAA-3') 与 *Pc-crustin*-R (5'-ATG GCT CCC GGT GAT GGC-3'), 以制备的小龙虾肝胰腺 cDNA 作为模板进行 PCR 反应, 扩增目的基因序列片段。PCR 反应条件: ① 95 °C, 预变性 3 min; ② 95 °C, 变性 30 s; ③ 55 °C, 退火 30 s; ④ 72 °C, 延伸 45 s (35 个循环); ⑤ 72 °C, 后延伸 5 min。

1.2.4 重组载体的构建与序列测定 以制备的小龙虾肝胰腺 cDNA 为模板, 以上述 *Pc-crustin*-F、*Pc-crustin*-R 为引物进行 PCR 扩增, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒分离、纯化目的基因扩增片段, 根据 T 载体 PCR 产物克隆试剂盒的使用方法, 将目的基因扩增片段与 pUCm-T 载体连接, 构建重组载体并进行阳性重组子筛选, 之后委托上海生工生物工程股份有限公司进行测序分析。

1.3 生物信息学分析

1.3.1 氨基酸序列比对 将测序获得的目的基因序列在 NCBI 在线网站的 BLASTx 模块中进行序列比对, 选择相似度较高的 *crustin* 基因序列, 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对分析。

1.3.2 系统进化树分析 根据 BLASTx 序列比对结果, 将物种亲缘关系较近、基因序列相似度较高的 *crustin* 基因核苷酸序列翻译为氨基酸序列, 利用 MEGA 7.0 软件进行系统进化树分析。

1.4 多组织表达谱分析

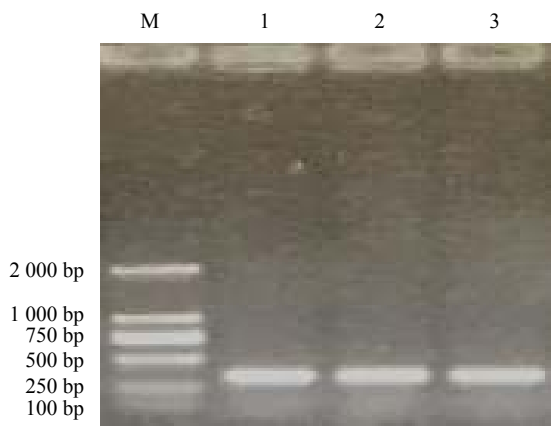
在小龙虾第二腹节处注射鲶爱德华氏菌 (2×10^7

CFU) 进行刺激 (鲶爱德华氏菌本实验室-80 ℃ 冰箱保存), 对照组注射 PBS, 并在 0、2、6、12、24、36、48 h 解剖取样 (血细胞、肝胰腺、鳃、肠), 每个时间点平均取 3 只样, 提总 RNA, 反转录成 cDNA。然后利用实时荧光定量 PCR 技术检测小龙虾 *crustin* 基因 mRNA 的正常组织分布与鲶爱德华氏菌刺激后的基因表达模式。其中, 目的基因特异性扩增引物为 *Pc-crustin*-RT-F (5'-CAC TAT GGC TTC TAC GGTC-3') 与 *Pc-crustin*-RT-R (5'-CTG GAG GCT GTG CAG GAA G-3'), *18S RNA* 内参基因的扩增引物为 *18S RNA*-RT-F (5'-TCT TCT TAG AGG GAT TAG CGG-3') 和 *18S RNA*-RT-R (5'-AAG GGG ATT GAA CGG GTTA-3')。PCR 扩增程序如下: 95 ℃, 30 s 循环 1 次; 95 ℃, 5 s, 60 ℃, 34 s 循环 40 次。从刺激开始进行 3 次重复之后, 采用 $2^{-\Delta CT}$ 算法统计分析目的基因的正常组织分布, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法统计分析鲶爱德华氏菌刺激后的基因表达模式。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增结果

PCR 扩增之后, 通过琼脂糖凝胶电泳进行验证。结果显示: 在 DNA 标准分子量 250-500 bp 之间有一条明亮的条带, 与理论值 465 bp 相符合, 表明 PCR 扩增结果正确 (图 1)。



注: M: 标准 DNA 分子量; 1~3: 目的基因的 PCR 扩增条带。

Note: M: standard DNA marker; 1-3: target gene PCR amplification bands.

图 1 *Pc-crustin 6* 基因 PCR 扩增后的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of *Pc-crustin 6* after PCR amplification

2.2 序列分析结果

测序结果经过 BLASTx 比对, 并且根据已有小龙虾 *crustin* 甲壳肽基因的同源序列数目, 将其命名为 *Pc-crustin 6* 甲壳肽基因。序列分析结果显示: *Pc-crustin 6* 的 cDNA 序列全长为 465 bp, 开放阅读框 (ORF) 包括 384 bp, 编码 127 个氨基酸残基; 其中, N 末端 25 个氨基酸是信号肽序列, C 末端的

47 个氨基酸形成了一个抗菌肽分子特有的 WAP 结构域, 其中存在 8 个保守的 Cys 残基 (图 2)。

gtctcagcgtagacagcaaaagtcataatgtctgtgatgaattatcaacatctegccctcgtc	60
<u>M S V M N Y Q H L A L V</u>	12
tlagccclgggllgllccclcgagcagggagggllggclggacacatagcclctacggllcag	120
<u>L T L G V L L S T E V A G</u> H Y G F Y G H	32
caaggccagtagccgaccattcgggtcactttggaggaggaggagcagattccaaggaggt	180
Q G Q Y R P F G H F G G G G R F Q G G	52
cgtggctttcctgggaatcattcggaggcgggaagaatccaggtgggtgggtgggtgggt	240
R G F P G N T F G G G R I P G G G G G	72
accacagllaacagggccggaggaggagggagggagggagggagggagggagggagggag	300
T T V N R P V G G T C P P V R P S C T A	92
tccaggtccagccggctacgtgtacgtcggacagacaggtgttcaggggggttcaagtc	360
<u>S R S Q P A T C T S D R Q C S G G F K C</u>	112
tgcttcagaccctgtgtccagaccgaagtgtgcaaggcccccgtctagcgggtccaccggg	420
<u>C F D A C V Q T E V C K A P V</u>	127
agccatcaccggggggccatcaccggggggccatcaccggggggccatcaccggggggccat	465

注: 下划线为信号肽序列, 灰色底纹区域为 WAP 结构域, 右侧数字分别代表核苷酸与氨基酸残基的数目。

Note: Signal peptide sequence is underlined; grey area represents WAP domain; numbers on the right represent nucleotide and corresponding amino acids sequences.

图 2 *Pc-crustin 6* 的 cDNA 序列以及编码的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA and encoded amino acids sequences of *Pc-crustin 6*

2.3 氨基酸序列比对结果

利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对, 结果显示: 小龙虾 *Pc-Crustin 6* 甲壳肽分子与巴西美对虾 *Fb-Crustin* 分子的同源性为 28.49%, 与圣保罗对虾 *Fp-Crustin* 分子的同源性为 28.33%, 与南美蓝对虾 *Ls-Crustin* 分子的同源性为 28.81%, 与日本对虾 *Pj-Crustin 3* 分子的同源性为 26.53%, 与小褐美对虾 *Fs-Crustin* 分子具有最高同源性, 为 29.19% (图 3)。

2.4 系统进化树分析

利用 MEGA 7.0 软件进行系统进化树分析, 结果显示: 小龙虾 *Pc-Crustin 6* 分子与小褐美对虾 *Fs-Crustin* 分子、南美蓝对虾 *Ls-Crustin* 分子、巴西美对虾 *Fb-Crustin* 分子、圣保罗对虾 *Fp-Crustin* 分子、斑节对虾 *Pm-Crustin 1* 分子分布在进化树的同一分支 (图 4), 表明它们之间的亲缘关系较近。

2.5 分子结构预测的结果

利用 EXPASY 软件预测目的蛋白质分子的初级结构, 结果显示: 该分子中包括一个完整的 WAP 结构域, 是一个典型的 *Crustin* 甲壳肽分子。

2.6 目的基因的组织分布分析

利用 qRT-PCR 技术检测 *Pc-crustin 6* 在小龙虾 5 个组织中的表达水平, 并且以 *18S RNA* 作为内参基因。图 5 结果显示: *Pc-crustin 6* 在血细胞、肝胰腺、鳃、肠和肌肉中均有表达, 并且, 在鳃组织中的表达量最高, 其次是血细胞与肠组织, 其他组织中的表达量较低。

2.7 细菌刺激后 *Pc-crustin 6* 的表达模式

利用 qRT-PCR 技术检测 *Pc-crustin 6* 在鲶爱德华

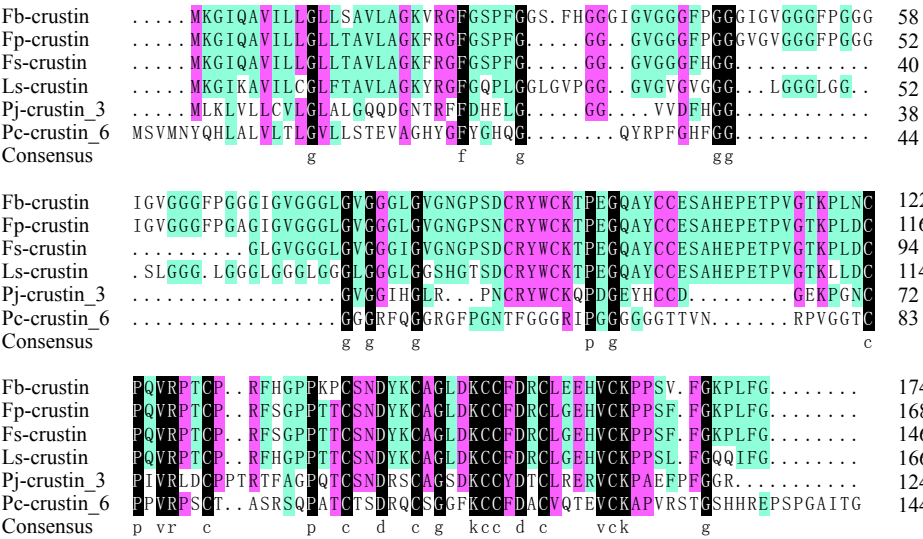


图 3 *Pc-crustin 6* 与其他物种 *crustin* 基因的氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Amino acids sequence alignment between *Pc-crustin 6* and other *crustins*

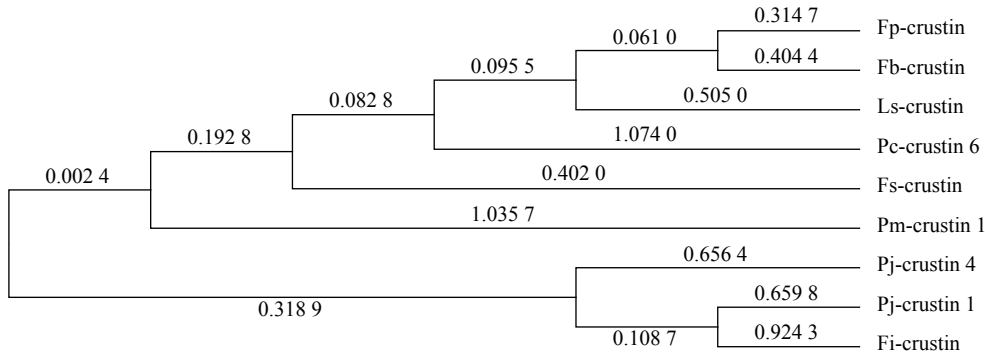


图 4 *Pc-Crustin 6* 分子与其他 *Crustin* 分子亲缘关系的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis on relationships between *Pc-Crustin 6* and other *Crustins*

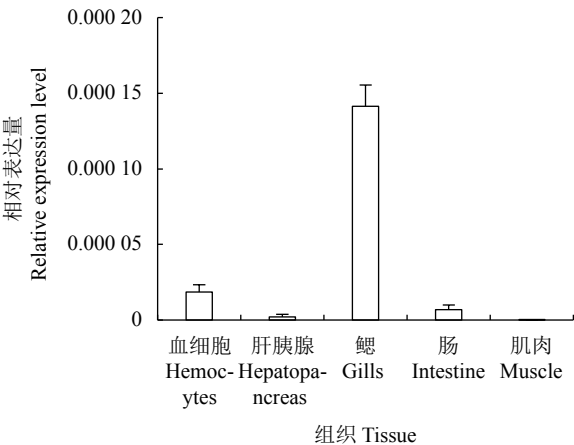


图 5 *Pc-crustin 6* 基因的多组织表达谱分析

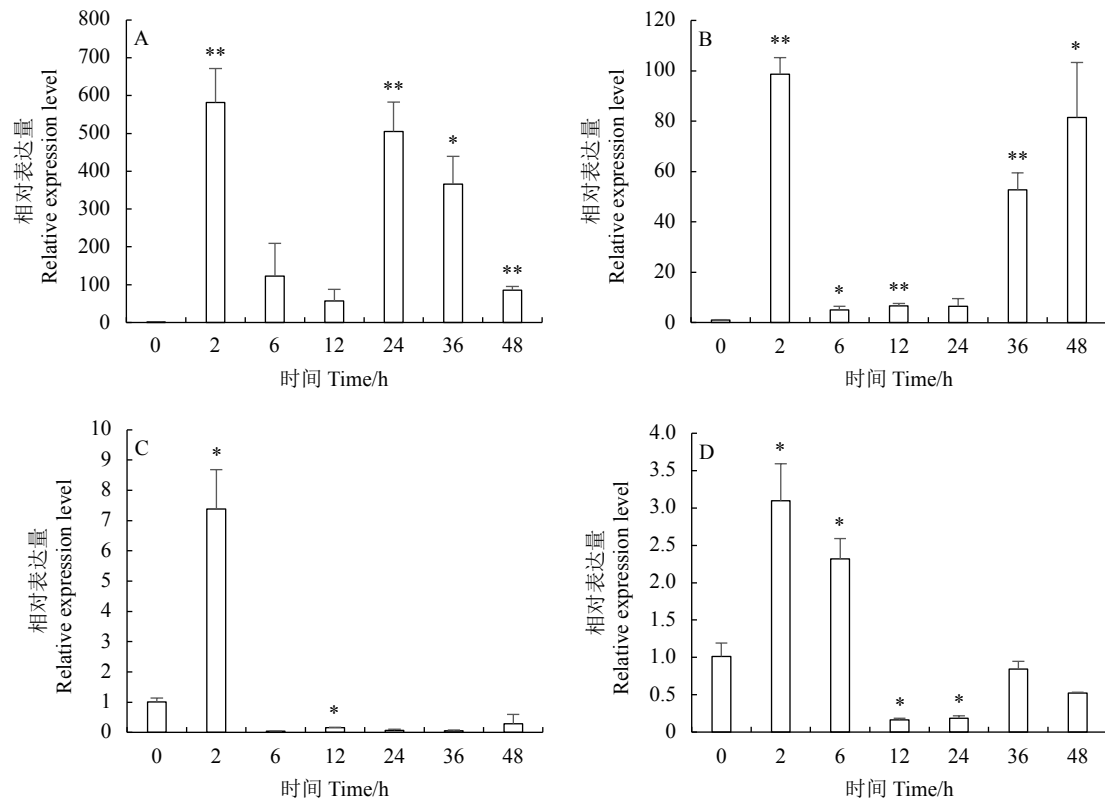
Fig. 5 Expressions of *Pc-crustin 6* in various tissues of *P. clarkia*

氏菌刺激后的表达模式，以 18S RNA 作为内参基因。结果显示：图 6 中 A、B、C、D 分别代表血细胞、肝胰腺、鳃和肠组织中 *Pc-crustin 6* 在鲈爱德华氏菌刺激后的表达模式，可以看出：细菌刺激后，*Pc-crustin 6* 在上述 4 个组织中的表达量均呈现出了

明显的上调趋势，说明其与对抗细菌刺激有关。

3 讨论

近几年的相关研究结果表明抗菌肽是甲壳类动物先天免疫系统中的重要效应分子。例如，贾文明对获得的 Crustin 1-4 甲壳肽分子的序列进行分析，发现其 N 端均具有一个信号肽序列^[14]，这是此类分子的典型特征之一。王一丽对日本沼虾中的 Crustin 1-13 甲壳肽分子进行序列分析，发现这 13 个甲壳肽分子也具有典型的 Crustins 家族的分子结构特征^[15]，在分子 C 末端存在至少 8 个保守的 Cys 残基。孙晨^[16]对中国明对虾的 Crustin 2 与 Crustin 3 分子的研究发现 WAP 结构域是甲壳肽分子的功能结构域。王慧^[17]从拟穴青蟹中克隆得到的 Crustin 2 分子的 N 端含有信号肽序列，C 端具有 Cys 残基富集区形成的结构域，并且是典型的 II 型甲壳肽分子。因此，N 末端的信号肽序列与 C 末端的 WAP 结构域是 Crustin 家族分子的基本结构特征。



注: ①鲢爱德华氏菌刺激后 *Pc-crustin 6* 在四种组织中的相对表达模式, A 血细胞的相对表达模式, B 肝胰腺的相对表达模式, C 鳃组织的相对表达模式, D 肠组织的相对表达模式。②*表示显著差异 ($P<0.05$), **表示极显著差异 ($P<0.01$)。

Note: ①Relative expressions of *Pc-Crustin 6* in tissues of *P. clarkia* after *Edwardsiella cataphyllis* cataphyllis; A: blood cells; B: hepatopancreas; C: gills; D: intestines. ②* represents significant difference ($P<0.05$), ** represents extremely significant difference ($P<0.01$).

图 6 鲢爱德华氏菌刺激后 *Pc-crustin 6* 的表达模式

Fig. 6 *Pc-crustin 6* expressions after *E. ictaluri* stimulation

本研究克隆得到了克氏原螯虾一个新的 *crustin* 基因, 根据目前同源基因的发现顺序, 将其命名为 *Pc-crustin 6* 基因。生物信息学分析结果显示 *Pc-Crustin 6* 分子具有甲壳肽家族分子的典型特征, 包括 N 端的信号肽序列, C 端的 WAP 结构域, 并且与 Smith 等^[18] 关于 *Crustin* 分子结构特征的描述相一致。现有结果显示, *crustin* 基因会在无脊椎动物的鳃组织中高表达, 例如, 孙保贞^[19] 通过实时荧光定量 PCR 发现日本对虾 *crustin-like* 基因在鳃组织中高表达; 王慧^[17] 在拟穴青蟹中发现 *crustin 2* 主要在鳃组织中表达。同样, 本研究中的 *Pc-crustin 6* 基因在鳃组织中表达量最高, 与以上结论一致, 推测其可能与鳃组织的抗细菌作用相关。此外, SUN 等^[20] 利用白斑病毒与弧菌分别刺激日本囊对虾, 在血细胞中检测到 *crustin-like* 基因的上调表达, 揭示了其在对虾先天免疫中的潜在免疫作用。同时, 李朝政利用 LPS 和副溶血性弧菌以及白斑病毒分别对凡纳滨对虾进行刺激之后, 发现 *crustin* 基因在血细胞中的相对表达量显著上调, 说明 *Lv-Crustin* 在凡纳滨对虾的先天免疫中发挥着重要作用, 可能作为一种抗菌效应分子在体内发挥作用^[21]。本研究利用鲢爱德华氏菌刺

激小龙虾之后, *Pc-crustin 6* 的表达量在 2 h 呈现急剧上升趋势, 表明鲢爱德华氏菌刺激后, *crustin 6* 表达发生改变, 推测其在虾抗鲢爱德华氏菌过程中发挥了作用。在小龙虾鳃组织中, *Pc-crustin 6* 的表达量在 2 h 后出现持续降低趋势, 因为鳃组织是虾类重要的呼吸器官, 起着过滤水体的作用, 而本试验采用小龙虾第二腹节注射细菌的方式模拟细菌感染时的情况, 并非在水体中掺入细菌, 因此鳃组织受到的细菌刺激就相对弱一些, 激发起的免疫反应随之较弱。根据细菌刺激后表达模式的分析结果可以得出: 细菌刺激早期, 血细胞、肝胰腺、鳃、肠组织中 *Pc-crustin 6* 表达上调; 细菌刺激后期, 鳃组织除外, 其他组织中 *Pc-crustin 6* 又被高表达对细菌入侵作出应答。

4 结论

在前期转录组测序的基础上, 通过对目的基因的克隆与功能分析, 发现了一个小龙虾新的 *crustin* 基因, 命名为 *Pc-crustin 6*, 利用实时荧光定量 PCR 检测 *Pc-crustin 6* 在不同组织中的 mRNA 表达量, 以及细菌刺激后的血细胞、肝胰腺、鳃和肠组织中的

表达情况。为后续基因重组表达、抗体制备、功能研究提供一定的理论依据, 对抗菌肽家族分子的进一步完善做出重要补充。近些年, 针对小龙虾等甲壳类动物的抗细菌先天免疫的相关研究结果较为丰富, 先天免疫的基础理论得到逐步完善; 其中, 甲壳肽作为重要的免疫效应分子在小龙虾中发挥着一系列抗菌作用, 针对 *Pc-crustin* 6 基因的深入研究对无脊椎动物抗细菌先天免疫基础理论的进一步完善以及水生生物养殖实践环节免疫策略的制定都有重要意义。

参考文献:

- [1] WU Z Q, JIANG C, LING F, et al. Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate immunity and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Aquaculture*, 2015, 438: 105–114.
- [2] SODERHALL K, CERENIUS L. Crustacean immunity [J]. *Annual Review Fish Diseases*, 1992 (2): 2–23.
- [3] SÖDERHÄLL K, THÖRNQVIST P O. Crustacean immunity: A short review [J]. *Developments in Biological Standardization*, 1997, 90: 45–51.
- [4] 刘文杰, 章跃陵. 无脊椎动物先天免疫分子研究概述 [J]. *生物学教学*, 2017, 42 (7): 71–73.
LIU W J, ZHANG Y L. Research overview of innate immune molecules in invertebrates [J]. *Biology teaching*, 2017, 42 (7): 71–73. (in Chinese)
- [5] 方玉航, 陈树溢, 耿倩, 等. 抗菌肽的研究及其应用进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017 (17): 9–12.
FANG Y H, CHEN S Y, GENG Q, et al. Research and application progress of antimicrobial peptides [J]. *Heilongjiang animal husbandry and veterinary medicine*, 2017 (17): 9–12. (in Chinese)
- [6] JIRAVANICHPAISAL P, LEE S Y, KIM Y A, et al. Soderhall I. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern [J]. *Developmental and comparative immunology*, 2007, 31 (5): 441–455.
- [7] VARGAS-ALORES F, YEPIZ-PLASCENCIA G, JIMENEZ-VEGA F, et al. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. Comparative biochemistry and physiology Part B [J]. *Biochemistry & molecular biology*, 2004, 138 (4): 415–422.
- [8] MU C K, ZHENG P L, ZHAO J M, et al. A novel type III crustin (CrusEs₂) identified from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31 (1): 142–147.
- [9] 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.
- [10] GE H, WANG Y, LI C J, et al. Molecular dynamics-based virtual screening: accelerating the drug discovery process by high-performance computing [J]. *Journal of chemical information and modeling*, 2013, 53 (10): 2757–64.
- [11] RAGHU R, DEVARAJI V, LEENA K, et al. Virtual screening and discovery of novel aurora kinase inhibitors [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14 (17): 2006–2019.
- [12] LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M, et al. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62 (22): 2549–2559.
- [13] 张财亮, 黄贝, 熊静, 等. 拟穴青蟹两个Crustin新变体的克隆与表达分析 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2019, 58 (4): 505–515.
ZHANG C L, HUANG B, XIONG J, et al. Cloning and expression analysis of two new variants of Crustin in the *Crustin crab* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 2019, 58 (4): 505–515. (in Chinese)
- [14] 贾文明. 日本囊对虾中参与抗菌反应的四种甲壳肽的研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.
JIA W M. Study on four kinds of carapace peptides involved in antimicrobial reactions in *Japanese penaeus*[D]. Jinan: Shandong University, 2014.
- [15] 王一丽. 日本沼虾抗菌肽基因的筛选和生物信息学分析[D]. 保定: 河北大学, 2016.
WANG Y L. Screening and bioinformatics analysis of antimicrobial peptide genes in *Macrobrachium nippon*[D]. Baoding: Hebei University, 2016.
- [16] 孙晨. 甲壳动物抗菌肽及信号转导和转录激活因子(STAT)的基因克隆与功能分析[D]. 济南: 山东大学, 2011.
SUN C. Gene cloning and functional analysis of antimicrobial peptides and signal transduction and transcriptional activator (STAT) in crustaceans[D]. Jinan: Shandong University, 2011.
- [17] 王慧. 拟穴青蟹*SpCrus2*的免疫功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
WANG H. Study on immune function of *SpCrus2*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [18] SMITH V J, FERNANDES J M O, KEMP G D, et al. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32 (7): 758–772.
- [19] 孙保贞. 日本对虾类甲壳肽(*crustin-like*)基因在溶藻弧菌和白斑综合征病毒感染过程中的作用机制研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
SUN B Z. Research on the mechanism of *crustin-like* gene in vibrio alginolyticus and leukopora syndrome virus infection in *Penaeus japonicus*[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2017.
- [20] SUN B Z, WANG Z, ZHU F. The crustin-like peptide plays opposite role in shrimp immune response to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 487–496.
- [21] LI M, MA C X, ZHU P, et al. A new crustin is involved in the innate immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 398–406.

(责任编辑: 林海清)