

三疣梭子蟹B型清道夫受体蛋白的原核表达及 细胞、组织分布

杨宁^{1,2}, 周素明¹, 王国良^{1*}, 刘顺¹, 李猛¹

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211;

2. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要: B型清道夫受体是清道夫受体超家族成员, 可识别多种配体, 在机体脂类转运及免疫防御过程中发挥重要作用。为深入研究三疣梭子蟹B型清道夫受体(*Pt-SRB*)的功能, 本实验在前期工作基础上构建了*Pt-SRB*胞外结构域原核表达载体, 并成功获得了重组蛋白r*Pt-SRB*。利用亲和层析方法获得纯化的r*Pt-SRB*, 并将纯化r*Pt-SRB*蛋白免疫大鼠获得抗r*Pt-SRB*重组蛋白免疫抗血清以用于后续研究。SDS-PAGE检测发现, 体外诱导表达重组r*Pt-SRB*以包涵体的形式出现在大肠杆菌BL21裂解液的沉淀中, 分子量大小约为49.18 ku。Western-Blot分析表明, 大鼠抗r*Pt-SRB*血清能与r*Pt-SRB*特异性结合。本实验还利用免疫荧光技术, 对*Pt-SRB*在三疣梭子蟹血淋巴细胞的定位及不同组织中的分布进行研究。结果显示, *Pt-SRB*在三疣梭子蟹消化道、肝胰腺、鳃、心脏、肌肉组织中均有分布, 但不同组织中*Pt-SRB*的分布不同。免疫荧光结果显示, 绿色荧光信号在消化道及腺体结缔组织中较强, 另外在肝小管上皮、鳃丝上皮细胞中亦有较强的阳性信号, 表明*Pt-SRB*蛋白在上述组织结构中分布较广; 在血淋巴细胞中, 绿色荧光信号主要分布于细胞质和细胞膜, 在细胞核中没有明显荧光信号, 提示*Pt-SRB*在三疣梭子蟹血淋巴细胞的细胞质和细胞膜上表达。本结果将为三疣梭子蟹B型清道夫受体蛋白的生理及免疫学功能的研究奠定基础。

关键词: 三疣梭子蟹; B型清道夫受体; 原核表达; 组织分布

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)俗称白蟹、枪蟹, 隶属于甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 梭子蟹科(Portunidae), 梭子蟹属(*Portunus*), 是一种重要的海产经济蟹类, 广泛分布于中国、日本、朝鲜及马来西亚群岛等海域^[1]。因其养殖产量较高, 利润丰厚, 现已成为中国沿海地区重要的养殖品种。然而, 随着养殖规模的不断扩大以及养殖集约化程度的不断提高, 其病害日趋严重, 特别是由病毒、细菌、真菌、寄生虫等引起的疾病频频暴发, 严重影响了三疣梭子蟹养殖产业的健康发展^[2-4]。

三疣梭子蟹是低等的海洋无脊椎动物, 缺乏后天免疫系统, 抵御病原微生物主要依赖其先天性免疫系统。从三疣梭子蟹机体的免疫系统着手, 深入研究其先天性免疫防御机制, 并探讨提高三疣梭子蟹抗病力的有效途径和方法, 改良种质并培育抗病品系, 是保持三疣梭子蟹养殖业健康可持续发展的必经之路^[5]。

清道夫受体(scavenger receptor)是在20世纪70年代末由Brown等^[6]和Goldstein等^[7]发现的一种以氧化型低密度脂蛋白为配体的受体蛋白, 在机体的脂类代谢和转运过程中发挥重要作用。

收稿日期: 2016-11-07 修回日期: 2017-03-23

资助项目: 宁波市海洋蟹类产业科技创新团队项目(2011B81003); 宁波大学“水产”浙江省重中之重开放基金(xkzsc1404)

通信作者: 王国良, E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

随着研究的深入,研究者发现哺乳动物的清道夫受体超家族蛋白同样行使模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)功能,在先天性免疫系统中发挥重要作用^[8-10]。B型清道夫受体是清道夫受体超家族的重要成员之一。该受体属于III型跨膜蛋白,所有B型清道夫受体均有2个跨膜区、1个含有多个糖基化位点的loop状胞外结构域及2个胞内多肽尾巴组成^[8];其中胞外loop状结构负责结合并识别不同的配体包括脂蛋白、死亡细胞碎片及各种不同的微生物病原模式分子(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)^[8-10],而胞内肽段则负责信号转导^[11-12]。因此,B型清道夫受体是一种多功能的受体蛋白,在机体生理、病理及先天性免疫过程中具有重要作用^[10, 13]。近几年,研究者在无脊椎动物中也发现了B型清道夫受体的存在。在果蝇^[11](*Drosophila melanogaster*)中,至少有5种不同功能的B型清道夫受体被鉴定^[14-15]。然而在海洋无脊椎动物中有关B型清道夫受体研究的报道非常有限,在甲壳动物中的相关研究则更少,仅日本囊对虾(*Marsupénaeus japonicus*)报道了两种类型的B型清道夫受体^[16-17],Yang等^[18]在三疣梭子蟹中克隆获得B型清道夫受体。

本实验在课题组前期研究基础之上,对三疣梭子蟹B型清道夫受体*Pt-SRB*进行了原核表达、蛋白纯化及制备了相应的抗血清,在此基础上作者还利用免疫荧光技术首次在蛋白水平上研究*Pt-SRB*在消化道、肝胰腺、心脏及肌肉组织中的分布及其在血淋巴细胞中的定位,以期探讨三疣梭子蟹B型清道夫受体蛋白的生理及免疫学功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用三疣梭子蟹购自宁波江北路林市场,体质量约150 g左右,健康,活力好。

1.2 *Pt-SRB*细胞外结构域原核表达载体构建

根据三疣梭子蟹清道夫受体基因序列(GenBank),采用在线工具分析跨膜区位置,应用Primer 6.0软件设计基因特异性引物,用于扩增胞外区,扩增产物全长1314 bp。引物序列见表1,引物由生工生物工程有限公司(上海)合成。

表1 胞外区扩增用引物及测序用通用引物序列

引物 primer	序列(5'-3') sequence
SRB F	ATGCTTGCTGGGGGCTAC
SRB R	TTAACTGGGCACACTGGAGTTC
T7 F	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 R	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

抽取健康三疣梭子蟹血细胞,提取RNA, Dnase I处理,以Oligo (dT)引物为反转录引物,用PrimeScript反转录酶合成第一链cDNA,并以此为模板,扩增三疣梭子蟹清道夫受体胞外结构域,反应结束后,1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,并回收。

将回收的PCR产物连接到pEASY-E1载体上,并转化到Trans1-T1感受态细胞中。蓝白斑筛选,挑选阳性克隆并用T7 Promoter Primer鉴定阳性克隆,送交上海华大基因测序验证。测序正确的克隆,抽提质粒记为pEASY-E1-*Pt-SRB*。

1.3 原核表达载体构建及*rPt-SRB*的诱导表达

将pEASY-E1-*Pt-SRB*转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,涂布、氨苄青霉素筛选,挑选重组菌于LB培养基,培养后进行PCR检测,条带正确的菌液内加甘油至浓度为20%, -80°C 保存备用,该菌株命名为BL21-*Pt-SRB*。同时送交上海华大基因测序检验,以确保蛋白的正常诱导表达。

分别将BL21-*Pt-SRB*重组菌株和含空载体pET-32a的BL21菌株接种到LB培养基(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)中, 37°C ,200 r/min振荡培养至细菌悬液OD600 nm值为0.5~0.7,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG, 30°C 、200 r/min继续培养4 h。离心,收集菌体,细菌裂解液重悬,超声破碎细胞,12 000 r/min离心5 min,上清液与沉淀分别进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,确定目的蛋白分布情况。

按上述条件大量诱导目的蛋白,收集沉淀,按照蛋白纯化试剂盒(康为世纪,CW0893)要求,通过镍螯合层析纯化蛋白,纯化蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。蛋白纯化后,经超滤离心浓缩,考马斯亮蓝法测定蛋白样品浓度,终浓度为4 mg/mL。

1.4 抗rPt-SRB多克隆抗体制备

将制备的清道夫受体蛋白分别与完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂等体积混匀,使其充分乳化。

挑选健康活力好的大鼠(3只)暂养后皮下注射蛋白抗原。首次免疫注射弗氏完全佐剂制备的乳化液,免疫剂量约300 µg/只,后,每隔1周注射弗氏不完全佐剂配置的乳化液,免疫2次,免疫剂量约150 µg/只,空白对照组每次注射0.9%的生理盐水。第3次注射后5 d取血,并存放于1.5 mL Eppendorf离心管中,分离血清,−80 °C保存备用。

1.5 Western-Blot

将SDS-PAGE后的蛋白胶于双蒸水中漂洗后,转印至硝酸纤维素膜(NC膜)上。转印后的NC膜用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, TBST漂洗,加入一抗(抗血清)室温孵育1 h, TBST漂洗后加入二抗(碱性磷酸酶标记的羊抗大鼠IgG)室温孵育1 h, TBS漂洗, BCIP/NBT碱性磷酸酶显色液显色, Bio-Rad凝胶成像仪拍照。

1.6 组织切片及免疫荧光前处理

分别取三疣梭子蟹的消化道、肝胰腺、鳃、心脏和肌肉组织, 4%多聚甲醛固定24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、切片, 切片厚度约5 µm, 组织防脱载玻片捞片, 37 °C烘片过夜, 用于免疫荧光实验。

1.7 间接免疫荧光

组织免疫荧光 将白片放入60 °C烘片2 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水, 柠檬酸修复液96 °C抗原修复10 min, PBS洗5 min, 5%BSA室温封闭30 min, 甩去封闭液, 滴加适量一抗(制备的多克隆抗体)4 °C孵育过夜, 结束后PBS洗3次, 每次10 min; 加入FITC标记的羊抗大鼠IgG, 37 °C孵育30 min, PBS洗3次, 每次10 min, 抗荧光淬灭封存液封片, 荧光显微镜下观察拍照。阴性对照一抗为大鼠血清。

细胞免疫荧光 使用2.5 mL一次性注射器抽取三疣梭子蟹血淋巴(注射器中提前吸入少许ACD抗凝剂), 混匀, 滴少许于载玻片上, 制作血涂片, 晾干后, 4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次, 每次5 min, 5% BSA室温封闭30 min, 甩

去封闭液, 滴加适量一抗(制备的多克隆抗体)37 °C孵育1 h, PBS洗3次, 每次5 min; 加入FITC标记的羊抗大鼠IgG, 37 °C孵育30 min, PBS洗3次, 每次5 min, 加入适量DAPI, 室温放置5 min, 抗荧光淬灭封存液封片, 荧光显微镜下观察拍照。阴性对照一抗为大鼠血清。

2 结果

2.1 Pt-SRB的重组表达与纯化

将pEASY-E1-Pt-SRB转化至大肠杆菌BL21后, 重组菌经IPTG诱导后, 其表达产物主要存在于非可溶性包涵体中(图1), 经过Ni²⁺亲和层析后, 可得到高纯度的目的蛋白, 分子量约为49.18 ku (图2)。

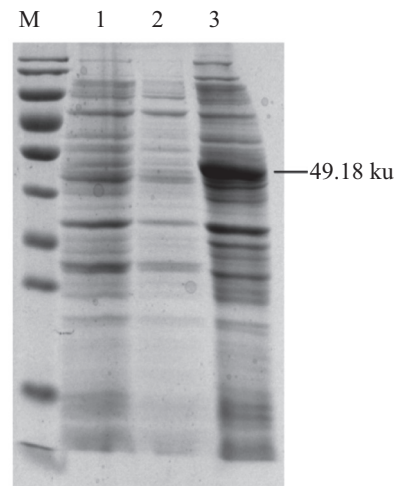


图1 rPt-SRB重组表达结果

M. 蛋白Marker; 1. 空载体对照菌; 2. 上清; 3. 沉淀

Fig. 1 Results of the rPt-SRB expressed in *E. coli*

M. protein molecular mass standards; 1. total protein extracts of BL-21 containing vector before IPTG induction; 2. soluble proteins from the supernatant of IPTG-induced cells after sonication; 3. insoluble proteins from the pellet of IPTG-induced cells after sonication

2.2 抗rPt-SRB多克隆抗体的获得及特异性检测

将免疫大鼠获得的抗血清, 进行Western-Blot检测, 得到单一的条带, 表明免疫大鼠获得的抗血清与目的蛋白能够特异性结合, 制备的抗血清有效, 且质量较好(图3)。

2.3 Pt-SRB在梭子蟹不同组织中的分布

免疫荧光染色结果显示, 在三疣梭子蟹消化道、肝胰腺、鳃、心脏、肌肉组织中均观察

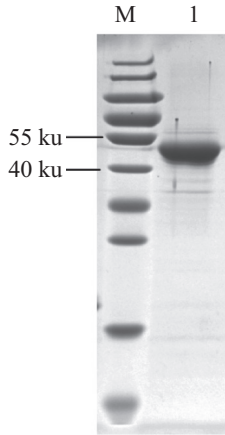


图2 *rPt-SRB*蛋白纯化结果

M. 蛋白Marker; 1. 纯化的重组蛋白

Fig. 2 The recombinant *rPt-SRB* after purification by nickel-nitrilotriacetate acid chromatography

M. protein molecular mass standards; 1. the purified recombinant *rPt-SRB*

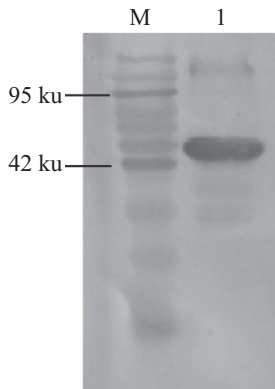


图3 免疫抗血清Western-Blot结果

M. 蛋白Marker; 1. 纯化的重组蛋白

Fig. 3 Western blotting analysis of anti-*rPtSRB* antibodies in the immune rat serum

M. protein molecular mass standards; 1. the purified recombinant *rPt-SRB*

到绿色荧光, 即*Pt-SRB*在各组织中均有分布。但不同组织中*Pt-SRB*的分布不同:

消化道 免疫荧光染色结果显示阳性信号主要位于消化道外膜结缔组织中, 在黏膜层也有少量散在的点状信号(图版I-1)。

肝胰腺 三疣梭子蟹肝胰腺由肝小管组成, 肝小管由基膜及单层柱状细胞构成。荧光染色结果显示, 阳性信号主要位于肝小管上皮表面及结缔组织中(图版I-3)。

鳃 三疣梭子蟹鳃叶由鳃丝和鳃小片构成, 免疫荧光结果显示, 鳃丝上皮细胞和其间结缔组织及鳃小片上皮均有较强的阳性信号(图版I-5)。

心脏 三疣梭子蟹心脏有外层结缔组织和内层肌肉层组成, 免疫荧光结果显示, 此两层均有阳性信号(图版I-7)。

步足肌 三疣梭子蟹步足肌为横纹肌, 免疫荧光结果显示, 肌纤维具有阳性信号, 且主要位于肌膜处(图版I-9)。

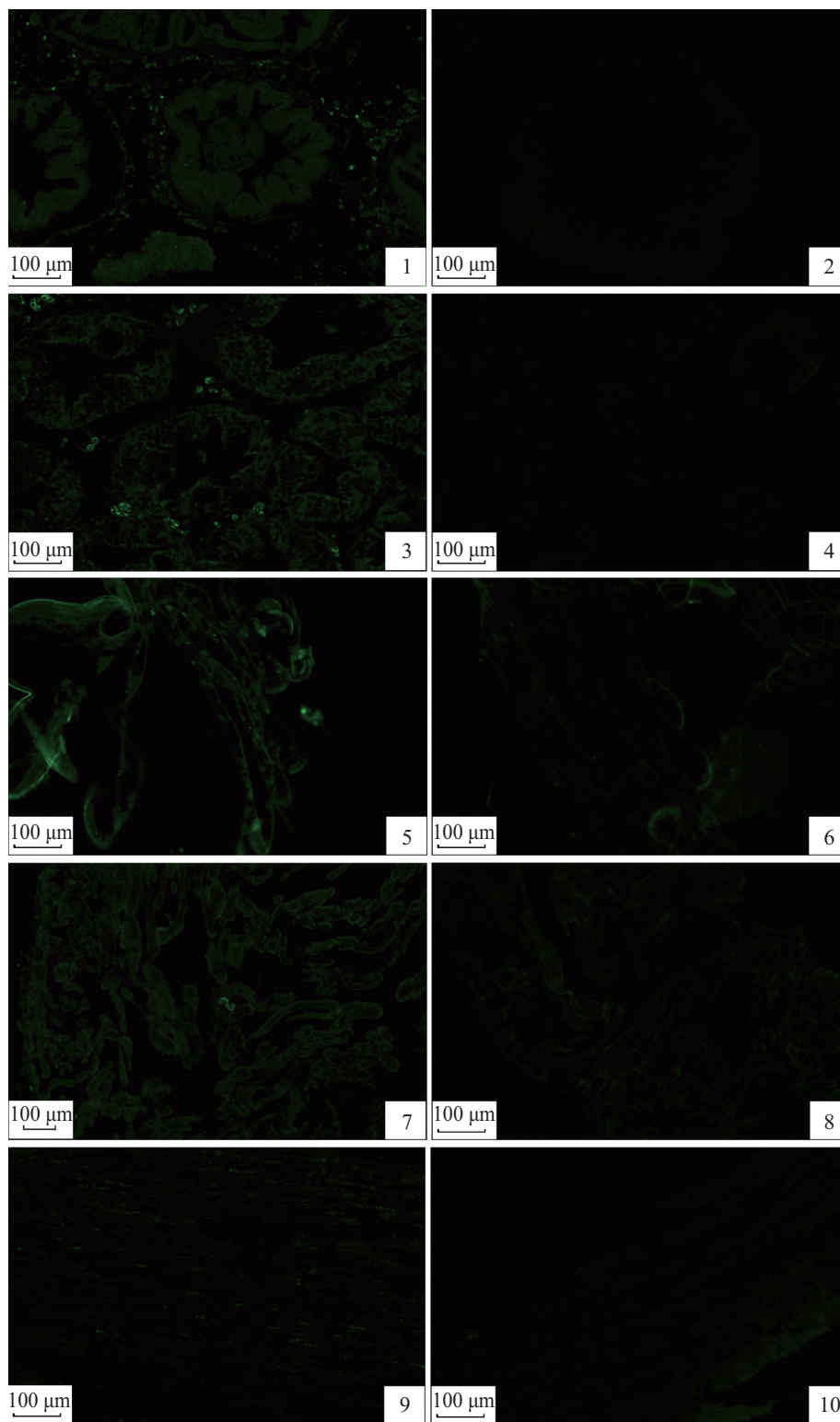
2.4 *Pt-SRB*在梭子蟹血淋巴细胞中的定位

三疣梭子蟹血细胞主要由透明细胞和颗粒细胞组成, 细胞核被DAPI染色后激发蓝色荧光, 而*Pt-SRB*激发绿色荧光。结果显示, 各种类型的血细胞中均有阳性信号, 而细胞核中未见阳性反应。即*Pt-SRB*主要位于细胞膜及细胞质中(图版II)。

3 讨论

所有动物的B型清道夫受体均具有CD36典型结构, 属于III型跨膜蛋白, 包括2个跨膜结构域、1个胞外Loop结构域和2个胞内多肽尾巴^[8]。经过生物信息学分析发现, 三疣梭子蟹*Pt-SRB*蛋白具有典型的B型清道夫受体结构特征, 然而由于跨膜区蛋白结构疏水性强, 而过多的疏水性氨基酸将严重影响目的蛋白的原核表达^[19], 因此, 选择三疣梭子蟹*Pt-SRB*蛋白的胞外Loop结构域进行体外原核重组表达。本研究成功构建了pEASY-E1-*Pt-SRB*原核表达载体, 并在大肠杆菌BL21中高效诱导表达了该蛋白。蛋白质凝胶电泳显示*Pt-SRB*蛋白分子量为49.18 ku, 以包涵体的形式存在于BL21菌体不可溶成分中, 与预期蛋白分子量一致。用高浓度尿素溶解*Pt-SRB*蛋白包涵体并利用镍柱对蛋白进行亲和层析, 获得了高纯度的*Pt-SRB*蛋白。经过进一步脱盐处理后将蛋白与弗氏佐剂充分乳化, 并免疫大鼠获得了特异性抗*Pt-SRB*蛋白的抗血清, 为进一步开展*Pt-SRB*蛋白的研究奠定了基础。

B型清道夫受体是目前研究较为深入的清道夫受体家族成员之一, 哺乳动物B型清道夫受体有3种类型: CD36、SRB-I/II(2个可变剪接体)和溶酶体整合膜蛋白(LIMP II)^[8-10]。不同B型清道夫受体的组织分布不同, 其表达模式与其在组织中的分布及行使的功能密切相关^[20]。SRB-I/II主要分布在肝脏和类固醇合成组织; CD36主要分布在巨噬细胞中, 在血小板、脂肪细胞以及一些上皮和内皮细胞中也有表达^[20-21]。甲壳动物中

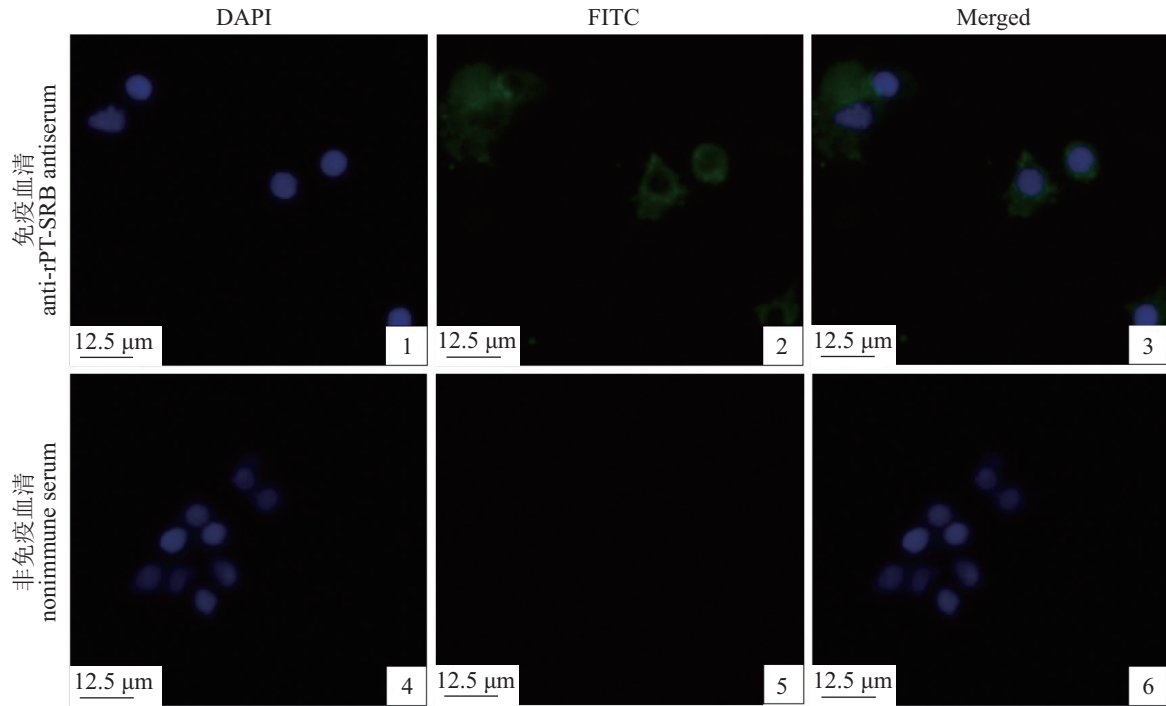


图版 I *Pt-SRB*在消化道、肝胰腺、鳃、心脏及肌肉组织中的分布

图中1、3、5、7、9分别为消化道、肝胰腺、鳃、心脏及步足肌免疫荧光结果, 2、4、6、8、10分别为阴性对照

Plate I The distribution of *Pt-SRB* in the digestive tract, liver, gill, heart and muscle tissue

1, 2 showed the immunofluorescence staining results of the digestive tract and the negative control; 3, 4 showed the immunofluorescence staining results of hepatopancreas and the negative control; 5, 6 showed the immunofluorescence staining results of the gill and the negative control; 7, 8 showed the immunofluorescence staining results of the myocardium and the negative control; 9, 10 showed the immunofluorescence staining results of the muscle and the negative control

图版 II *Pt-SRB*在血淋巴细胞中的分布Plate II The distribution of *Pt-SRB* in haemocytes

B型清道夫受体的组织分布主要是mRNA水平的研究, 日本囊对虾^[13]中*Mj-Croquemort*在多个组织中表达, 在脑和心脏中表达量最高, 而在肝胰腺及血淋巴细胞中相对较低^[16]; *Mj-SRB-1*主要在血细胞、肝脏和心脏中表达, 在鳃和消化道中的表达量极少^[17]; 而三疣梭子蟹*Pt-SRB*在不同组织中呈组成型表达, 但相对表达量在血淋巴细胞中最高, 在肝胰腺、心脏、消化道及鳃中次之, 肌肉中表达量相对较低^[18]。有关甲壳动物B型清道夫受体组织分布情况在蛋白水平上的研究资料极其缺乏, 未见相关报道。本实验对*Pt-SRB*进行了体外原核表达以及抗血清的制备, 在蛋白水平上对*Pt-SRB*的组织分布进行研究。免疫荧光结果显示, *Pt-SRB*在不同组织中均有分布, 但在不同组织中的分布情况不同, *Pt-SRB*在血淋巴细胞中具有很强的荧光信号, 在消化道、肝胰腺和鳃组织中信号也较强, 而在步足肌和心肌中分布相对最少。这同前期qRT-PCR结果一致^[18]。

研究还显示*Pt-SRB*在各组织的上皮细胞及结缔组织如消化道外膜结缔组织, 肝小管上皮表面及结缔组织, 鳃丝上皮细胞和结缔组织以及心脏外层结缔组织中均有较强信号, 而在肌肉组织中信号较弱, 主要集中肌膜上。这种分

布特征可能预示着*Pt-SRB*在不同组织中的功能不同。Aung等^[22]对长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)B型清道夫受体在消化道中的分布进行了免疫荧光定位, 结果发现其在肠道中也有广泛的分布, 并且集中在消化细胞及未分化细胞中表达。消化道、肝胰腺是三疣梭子蟹重要的消化器官, *Pt-SRB*在消化道及肝胰腺上皮组织中的大量分布表明其有可能与三疣梭子蟹脂类代谢有关; 而其在结缔组织中的高效表达可能与其免疫功能相关。

血淋巴细胞是甲壳动物重要的免疫细胞, *Pt-SRB*在血淋巴细胞的高水平表达提示了其极有可能参与梭子蟹的先天性免疫过程。细胞定位研究显示, *Pt-SRB*在血淋巴细胞的细胞膜和细胞质中均有荧光信号, 这与哺乳动物中CD36的细胞定位一致^[21]。在哺乳动物中, 不同类型的B型清道夫受体的细胞定位也不同, 如LIMPII主要存在细胞质溶酶体膜上, SRB-I主要存在细胞膜上, 而CD36在细胞膜和细胞质中都有表达^[21]。而在对家蚕(*Bombyx mori*)^[15]B型清道夫受体的研究显示, 其在家蚕的血细胞和脂肪体中分布较广并主要在细胞膜区域表达^[23]。三疣梭子蟹同为节肢动物, *Pt-SRB*的细胞定位的差异是否预示其

与家蚕中发现的B型清道夫受体具有不同的功能还需更加深入的研究。

本研究对三疣梭子蟹B型清道夫受体 *Pt-SRB* 进行了原核表达, 蛋白纯化及相应抗血清的制备, 首次在蛋白水平上研究 *Pt-SRB* 在消化道、肝胰腺、心脏及肌肉组织中的分布及其在血淋巴细胞中的定位。研究发现 *Pt-SRB* 在三疣梭子蟹消化道及肝胰腺等消化器官以及血淋巴等免疫细胞中均有大量表达。细胞定位显示, *Pt-SRB* 在血淋巴细胞的细胞膜和细胞质中均有表达。该结果为深入研究三疣梭子蟹B型清道夫受体蛋白的生理及免疫学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hamasaki K, Fukunaga K, Kitada S. Batch fecundity of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brochure: Portunidae)[J]. *Aquaculture*, 2006(25): 359-365.
- [2] 陈寅儿, 金珊, 赵青松. 梭子蟹养殖中的发病原因与防治对策[J]. *水利渔业*, 2005, 25(1): 78-79.
Chen Y E, Jin S, Zhao Q S. Cause of diseases and control strategy in the culture of *Portunus trituberculatus*[J]. *Reservoir Fisheries*, 2005, 25(1): 78-79(in Chinese).
- [3] 阎斌伦, 梁利国, 张晓君. 三疣梭子蟹主要病害研究进展[J]. *水产科技情报*, 2010, 37(1): 29-33.
Yan B L, Liang L G, Zhang X J. Prevention and cure of fish disease proceedings on main diseases of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2010, 37(1): 29-33(in Chinese).
- [4] Wang X H, Chi Z M, Yue L X, *et al.* A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production[J]. *Microbiological Research*, 2007, 162(1): 77-85.
- [5] Rowley A F, Powell A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(11): 7209-7214.
- [6] Brown M S, Goldstein J L, Krieger M, *et al.* Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1979, 82(3): 597-613.
- [7] Goldstein J L, Ho Y K, Basu S K, *et al.* Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(1): 333-337.
- [8] Calvo D, Dopazo J, Vega M A. The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: Cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution[J]. *Genomics*, 1995, 25(1): 100-106.
- [9] Areschoug T, Gordon S. Scavenger receptors: Role in innate immunity and microbial pathogenesis[J]. *Cellular Microbiology*, 2009, 11(8): 1160-1169.
- [10] Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(9): 621-634.
- [11] Stuart L M, Deng J S, Sliver J M, *et al.* Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 170(3): 477-485.
- [12] Rahaman S O, Lennon D J, Febbraio M, *et al.* A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation[J]. *Cell Metabolism*, 2006, 4(3): 211-221.
- [13] Stewart C R, Stuart L M, Wilkinson K, *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(2): 155-161.
- [14] Voolstra O, Kiefer C, Hoehne M, *et al.* The *Drosophila* class B scavenger receptor NinaD-I is a cell surface receptor mediating carotenoid transport for visual chromophore synthesis[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(45): 13429-13437.
- [15] Benton R, Vannice K S, Vosshall L B. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*[J]. *Nature*, 2007, 450(7167): 289-293.
- [16] Mekata T, Okugawa S, Inada M, *et al.* Class B scavenger receptor, Croquemort from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Molecular cloning and characterization[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, 25(2-3): 94-100.
- [17] Bi W J, Li D X, Xu Y H, *et al.* Scavenger receptor B protects shrimp from bacteria by enhancing phagocytosis and regulating expression of antimicrobial peptides[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 10-21.

- [18] Yang N, Zhang D F, Tao Z, *et al.* Identification of a novel class B scavenger receptor homologue in *Portunus trituberculatus*: Molecular cloning and microbial ligand binding[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 73-81.
- [19] 徐万祥, 邱德义, 熊艳, 等. 去N端信号肽和C端跨膜区猪卵透明带-3 β 蛋白在原核系统表达的研究[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 16-19.
Xu W X, Qiu D Y, Xiong Y, *et al.* Study on the expression of pig zona pellucida-3 β excluding N-terminus signal peptide and C-terminus transmembrane-like domain in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(1): 16-19(in Chinese).
- [20] Zhang X Q, Fitzsimmons R L, Cleland L G, *et al.* CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1[J]. *Laboratory Investigation*, 2003, 83(3): 317-332.
- [21] Baranova I N, Vishnyakova T G, Bocharov A V, *et al.* Class B scavenger receptor types I and II and CD36 mediate bacterial recognition and proinflammatory signaling induced by *Escherichia coli*, lipopolysaccharide, and cytosolic chaperonin 60[J]. *The Journal of Immunology*, 2012, 188(3): 1371-1380.
- [22] Aung K M, Boldbaatar D, Liao M, *et al.* Identification and characterization of class B scavenger receptor CD36 from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*[J]. *Parasitology Research*, 2011, 108(2): 273-285.
- [23] 董占鹏. 家蚕B型清道夫受体(Class B Scavenger Receptor)基因的克隆鉴定及功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
Dong Z P. Clone, identification and study on the function of class B scavenger receptor genes in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2011 (in Chinese).

Prokaryotic expression, cell and tissue distribution of the class B scavenger receptor in *Portunus trituberculatus*

YANG Ning^{1,2}, ZHOU Suming¹, WANG Guoliang^{1*}, LIU Shun¹, LI Meng¹

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Applied Marine Biotechnology,
School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Marine Science and Engineering College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Class B scavenger receptors are a subclass of scavenger receptors family that can recognize a large repertoire of ligands, and they have been shown to have a wide range of functions in lipids metabolism and immune defence. To better understand the functions of class B scavenger receptors in *Portunus trituberculatus* (*Pt*-SRB), the extracellular loop of *Pt*-SRB was sequenced and subcloned into the expression vector, and the expressed recombinant r*Pt*-SRB protein was obtained in present study. Then the r*Pt*-SRB was purified by nickel-nitrilotriacetic acid chromatography, and the polyclonal antibody against r*Pt*-SRB was obtained from an immunized rat using a conventional method. Results of SDS-PAGE showed that the recombinant protein had a molecular mass of 49.18 ku and was predominantly expressed in the insoluble fraction. Moreover, Western-blot analysis revealed that anti-serum could specifically react with the r*Pt*-SRB. Furthermore, immunofluorescent staining technique was used to determine the tissue distribution and the cellular localization of *Pt*-SRB in this study. The results showed that the *Pt*-SRB were expressed in the tissues including intestine, hepatopancreas, gills, heart and muscle, but the *Pt*-SRB were located in different tissue structures. The results displayed that the green fluorescent signals were mainly located in the connective tissue of digestive tract and gland, epithelial cells of the gill and hepatopancreatic tubules. In the crab hemocytes, the green fluorescent signals were located in the membrane and cytoplasm, but not in the nucleus, which suggested that *Pt*-SRB was localized both in membrane and cytoplasm in the crab hemocytes. Our findings will help us to better understand potential functions of *Pt*-SRB.

Key words: *Portunus trituberculatus*; Class B scavenger receptor; prokaryotic expression; tissue distribution

Corresponding author: WANG Guoliang. E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

Funding projects: Ningbo Municipal Innovative Research Team (2011B81003); Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture of Ningbo University (xkzsc1404)