



## 拟穴青蟹 *Cactus* 基因的cDNA克隆、序列及生物学功能

胡 蕾<sup>1,2</sup>, 邓恒为<sup>2</sup>, 李晶晶<sup>2</sup>, 刘姗姗<sup>2</sup>,  
何建国<sup>2</sup>, 李海云<sup>1</sup>, 翁少萍<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642;

2. 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 为获取拟穴青蟹 *Cactus* 基因cDNA全长、分析基本生物学信息, 并初步探索其在病原物刺激下的免疫反应, 实验采用RACE技术获得了拟穴青蟹 *Cactus* (*SpCactus*) 基因的cDNA全长序列, 其cDNA全长为2 035 bp, 开放阅读框(ORF)1 311 bp, 编码436个氨基酸, 分子量为46.01 ku。对蛋白理化性质进行预测发现, *SpCactus* 为亲水性蛋白, 等电点pI为4.91。经预测, *SpCactus* 与其他物种的I $\kappa$ B蛋白具有相似的功能结构域。同源性比对结果显示, *SpCactus* 与凡纳滨对虾和中国明对虾的 *Cactus* 蛋白同源性均高达62%, 相似度为73%。系统进化树分析显示, *SpCactus* 与甲壳动物聚为一支, 与无脊椎动物聚为一大支。实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测发现, *SpCactus* 基因在拟穴青蟹不同组织中均有表达, 肌肉中的表达量最高, 其次为心脏、眼柄、血液和鳃, 肝胰腺中的表达量最低。LPS 和金黄色葡萄球菌刺激均能显著诱导 *SpCactus* 基因的表达。本实验成功扩增了 *SpCactus* 基因全长, 并进行了生物信息学分析、理化性质预测, 初步探讨了其生物学功能, 为进一步研究其在免疫反应中的生物学功能提供参考依据。

**关键词:** 拟穴青蟹; *Cactus*; 基因克隆; 组织分布; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 俗称青蟹, 隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、短尾亚目(Brachyura)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*), 生活在温暖海区, 主要分布于印度洋至西太平洋地区, 在我国主要分布在东南沿海地区<sup>[1]</sup>。由于拟穴青蟹的广盐性并且具有重要的营养价值和经济价值, 因此在我国东南沿海地区广泛养殖, 是我国重要的海洋经济动物。2016年全国的养殖总量为14.9万t<sup>[2]</sup>。但是随着养殖规模与密度的日渐增加, 病害也日益严重, 造成了巨大的经济损失。2004年, 广东珠海市养殖的拟穴青蟹暴发了流行病, 造成了大量的青蟹死亡<sup>[3-4]</sup>。到目前为止, 在蟹类上发现的病原

包括病毒<sup>[4-5]</sup>、细菌<sup>[3, 6]</sup>、类立克次体<sup>[7]</sup>、螺旋体<sup>[8]</sup>、真菌<sup>[9]</sup>和寄生虫<sup>[10]</sup>等。

甲壳类动物被外界病原生物诱导能够产生先天性免疫应答反应<sup>[11]</sup>。NF- $\kappa$ B(nuclear transcription factor)是一种从节肢动物到哺乳动物中都普遍存在, 在进化上非常保守的核转录因子, 且在免疫应答中起关键作用<sup>[12]</sup>。Toll通路是NF- $\kappa$ B信号通路中的一条, 主要对抗真菌和革兰氏阳性菌, 能够激活 *Dorsal* 和 *Dif*, 产生抗菌肽<sup>[13]</sup>。当外界的病原微生物突破宿主的第一道屏障(表皮、肠胃上皮黏膜等)进入机体后, 就会活化Toll等免疫信号通路, 活化后的Toll信号通路, 经由 *Spätzle*、*Toll*、*Tube*、*MyD88*、*Pelle*、*Cactus*、*Dorsal*/DIF

收稿日期: 2018-12-28 修回日期: 2019-03-27

资助项目: 国家自然科学基金(31672677); 现代农业产业技术体系专项(CARS-48)

通信作者: 翁少萍, E-mail: lsswsp@mail.sysu.edu.cn

等信号通路相关基因蛋白的相互作用以及各种信号级联反应,最终促进NF- $\kappa$ B转录因子激活,进入细胞核启动抗菌肽基因,合成抗菌肽<sup>[14-16]</sup>,进而达到有效、快速地清除和消灭入侵病原微生物的作用。在静息细胞中,核转录因子NF- $\kappa$ B与核转录抑制因子(inhibitor of nuclear transcription factor, I $\kappa$ B)结合形成复合体,以无活性状态存在于胞浆中<sup>[17]</sup>。I $\kappa$ B蛋白通过阻止与NF- $\kappa$ B的RHD结构域相互作用,隐匿NF- $\kappa$ B的核定位序列,使其不能向核内移动,从而阻止NF- $\kappa$ B与DNA结合;静息细胞接受刺激信号后,NF- $\kappa$ B与I $\kappa$ B解离,暴露其核定位信号,进入细胞核<sup>[18]</sup>。入核后NF- $\kappa$ B与DNA上含有 $\kappa$ B位点(5'-GGGRNNYYCC-3')的启动子区域结合,激活抗菌肽等免疫相关基因的转录<sup>[19]</sup>。由于I $\kappa$ B基因本身是NF- $\kappa$ B调控的下游基因之一,NF- $\kappa$ B的激活也会引起I $\kappa$ B的表达,新合成的抑制剂I $\kappa$ B与NF- $\kappa$ B重新结合,通过从细胞核中去除NF- $\kappa$ B而使其丧失转录活性<sup>[20]</sup>。

I $\kappa$ B家族包含I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 、I $\kappa$ B $\gamma$ 、I $\kappa$ B $\epsilon$ 、I $\kappa$ B $\zeta$ 、Bcl-3和果蝇Cactus蛋白<sup>[21]</sup>。典型的I $\kappa$ B因子具有5~7个不完全拷贝的33个氨基酸结构基序,与RHR结合并掩盖NF- $\kappa$ B的核定位信号(NLS)所必需的锚蛋白重复序列(ankyrin repeats, ANKs)<sup>[22]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$ 和I $\kappa$ B $\beta$ 还含有富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸(PEST)的羧基末端片段,这种高度酸性PEST区域代表由蛋白激酶CK2(casein kinase II)构成的磷酸化位点<sup>[23]</sup>。在哺乳动物中,IKK促使I $\kappa$ B磷酸化,诱导I $\kappa$ B的降解和NF- $\kappa$ B的核定位<sup>[24]</sup>。I $\kappa$ B蛋白降解对于NF- $\kappa$ B活化和核位移是必需的<sup>[21]</sup>。Cactus蛋白与I $\kappa$ B抑制蛋白同源,是一个I $\kappa$ B-like蛋白,果蝇的Cactus蛋白最接近哺乳动物I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白<sup>[25-26]</sup>。在果蝇中,Toll信号转导的最终作用是NF- $\kappa$ B蛋白从哺乳动物I $\kappa$ B的同源物Cactus中解离出来,这个过程涉及Cactus蛋白磷酸化及随后由蛋白酶体降解<sup>[27]</sup>。在甲壳类动物中也陆续发现了I $\kappa$ B抑制蛋白的同源物。Li等<sup>[28]</sup>通过对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的研究,表明LvCactus和LvDorsal之间的反馈调节途径;通过免疫原刺激实验证明,细菌和免疫刺激物刺激对虾能够激活LvCactus的表达。Wang等<sup>[29]</sup>通过对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的研究,发现FcCactus可以调节不同抗菌肽(AMP)和抗病毒因子(AV)的表达,可能在调节虾的免疫应答中发挥重要作用。孙洁洁<sup>[30]</sup>通过对日本囊对

虾(*Marsupenaeus japonicus*)的研究,表明Cactus的ANK结构域能够与Dorsal的RHD结构域相互作用,介导Dorsal转位入核,激活抗菌肽基因的表达。另有研究表明Cactus-NF- $\kappa$ B复合体在消灭感染疟原虫的过程中也起着关键作用<sup>[31]</sup>。

近来,研究发现拟穴青蟹的Toll/NF- $\kappa$ B信号通路在抗菌过程中发挥一定作用<sup>[32]</sup>,拟穴青蟹Toll/NF- $\kappa$ B信号通路的一些基因已经得到了克隆和研究,如*SpMyD88*<sup>[33]</sup>、*SpTube*、*SpPelle*<sup>[32]</sup>以及下游的一些抗菌肽等,但目前对NF- $\kappa$ B信号通路关键的核转录因子和抑制蛋白Cactus等基因尚未报道。本实验通过RACE技术获得拟穴青蟹的Cactus基因全长序列,并进行生物信息学分析、理化性质预测、组织分布及免疫刺激后基因表达,为进一步研究其生物学功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

本实验所用拟穴青蟹购买于广东广州南沙区。购买后暂养于实验桶中,暂养1周后,选取健康状况良好、进食正常,体质量为80~100 g的青蟹作为实验材料。

### 1.2 实验方法

**总RNA提取及cDNA合成** 取活力较好的拟穴青蟹,直接打开头胸甲,取其鳃组织约0.03 g,使用灭菌后的匀浆器进行充分研磨,根据Total RNA Kit 2(OMEGA, USA)说明书操作方法提取组织总RNA。用分光光度计Nanodrop 2000(Thermo Scientific, USA)测定RNA浓度和纯度,取5  $\mu$ L样品用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。根据TaKaRa公司的PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒的具体操作说明,将提取的总RNA进行去基因组逆转录合成cDNA,20  $\mu$ L逆转录体系中模板RNA为600 ng。

**RACE扩增基因全长** 提取完整性好、质量高的总RNA,根据Clontech公司的SMARTer RACE cDNA Amplification Kit试剂盒的具体操作说明,将提取的总RNA合成RACE所需的cDNA模板。根据从转录组<sup>[34]</sup>获得注释为Cactus的EST序列进行特异性引物设计,3' RACE外侧引物*SpCactus-3'* Race-out和内侧引物*SpCactus-3'* Race-in,5' RACE外侧引物*SpCactus-5'* Race-

out和内侧引物*SpCactus*-5' Race-in(表1)。以RACE cDNA为模板, 用外侧引物*SpCactus*-5'/3' Race-out和通用引物UPM1进行第1轮PCR。然后, 以第一轮PCR产物稀释液为模板, 用内侧引物*SpCactus*-5'/3' Race-in和UPM1进行第2轮PCR。2次PCR反应程序: 94 °C预变性3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min; 4 °C保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收, 克隆至pClone-007载体, 挑取阳性克隆菌送至广州擎科生物工程有限公司测序。

表1 拟穴青蟹*Cactus*基因序列扩增引物信息

引物 primer	序列(5'-3') sequence	功能 usage
<i>SpCactus</i> -3' Race-out	TGCTGACCTGACCAACTAC GACGG	3'RACE
<i>SpCactus</i> -3' Race-in	TGGAGGGAAGAGAGACAA AAGGAGAA	3'RACE
<i>SpCactus</i> -5' Race-out	GGGTGTCTCCATCCTCGTC TCTCTT	5'RACE
<i>SpCactus</i> -5' Race-in	AGGCAGAGGCTCGGAGAA TCTCAT	5'RACE
<i>SpCactus</i> -Q-F	CTCAAAACGACTCGGGCTT TCTCT	定量引物
<i>SpCactus</i> -Q-R	CGAGAGCGTCGCCTTTAGT CTCC	定量引物
18S rRNA-F	AGTCGTAACAAGGTTTCCG TAGGTG	定量内参引物
18S rRNA-R	GCGACCACTACTATTTGT ATTAGC	定量内参引物

生物信息学分析 序列同源性价对比用BLAST软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行; 用NCBI中的ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行开放阅读框确定及序列翻译; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构域; EMBOSS: epestfind软件(<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>)分析其PEST序列; 使用ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)推测蛋白的理化性质; 用ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>)分析蛋白质的疏水性; 用InterProScan software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>)查找基因的保守结构域; 用TMPred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))分析蛋白质的跨膜区; 用SignalP (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析蛋白质的前导肽; 用NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分析其磷酸化位点; 用NetNGly 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)

NetNGly/)分析其糖基化位点; 用MEGA 5.1软件中的Neighbor-Joining (NJ)法构建系统进化树。

基因组织分布 选取健康拟穴青蟹3只, 分别解剖取其心脏、肌肉、鳃、胃、肠、脑、神经组织、肝胰腺、眼柄和血细胞共10种组织, 分别提取每个样品的总RNA, 反转录为cDNA, 以cDNA作为模板, 实时定量PCR检测*SpCactus*基因在各组织中的转录水平。实时定量PCR反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ (2×) 5 μL, *SpCactus*-Q-F/R引物(表1)各0.4 μL, cDNA模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 3.2 μL; 实时定量PCR程序: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 s(信号采集), 40个循环; 95 °C连续。每个样品做3个平行孔, 基因相对表达量以Sp18S rRNA(accession no. KC902763.1)为内参按照2<sup>-ΔΔCt</sup>的方法分析<sup>[35]</sup>, 数据用平均值±标准差(mean±SD)表示。以相对表达量最低的组织为基点作图。

免疫原刺激 分别将副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)接种至新鲜的LB培养基, 37 °C 180 r/min振荡培养至对数生长期, 5 000×g离心10 min, 去上清液收集菌体, PBS洗2次, 用PBS稀释至2.0×10<sup>4</sup> CFU/μL备用。将购买的拟穴青蟹暂养1周, 随机分为4组, 在青蟹的第四步足分别注射纯化后的脂多糖(LPS)(0.4 μg/g)、副溶血弧菌(2.0×10<sup>4</sup> CFU/g)和金黄色葡萄球菌(2.0×10<sup>4</sup> CFU/g), 每组处理100只蟹, 对照组中每只青蟹注射50 μL PBS。分别于注射后0、4、8、12、24、36、48、72和96 h随机取样, 每组每个时间点取3只, 解剖取其鳃组织。将每个样品分别提取总RNA, 去除基因组DNA后反转录合成cDNA, 实时定量PCR检测*SpCactus*转录水平的变化。

数据处理 实验数据用平均值±标准差(mean±SD)表示, 利用SPSS 18.0软件采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)对数据进行统计学检验, *P*<0.05为显著性差异, *P*<0.01为极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 拟穴青蟹*Cactus*基因的全长序列分析及蛋白结构预测

RACE获得*SpCactus*(序列号: MK330178)的cDNA全长为2 035 bp, 包括228 bp的5'非翻译区(5'-UTR)和496 bp的3'非翻译区(3'-UTR); 开放阅读框(ORF)为1 311 bp(图1-a), 编码436个氨基酸, 蛋白分子质量为46.01 ku。经预测, *SpCactus*

蛋白有3个典型的特征结构(图1-b): 一是含降解结构单元DSGFLS, 二是具有PEST功能域(富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的结构域),

三是含有5个ANK锚蛋白重复序列, BLASTP同源比对结果表明它与其他物种的ANK(锚定蛋白)结构域具有较高的相似性。

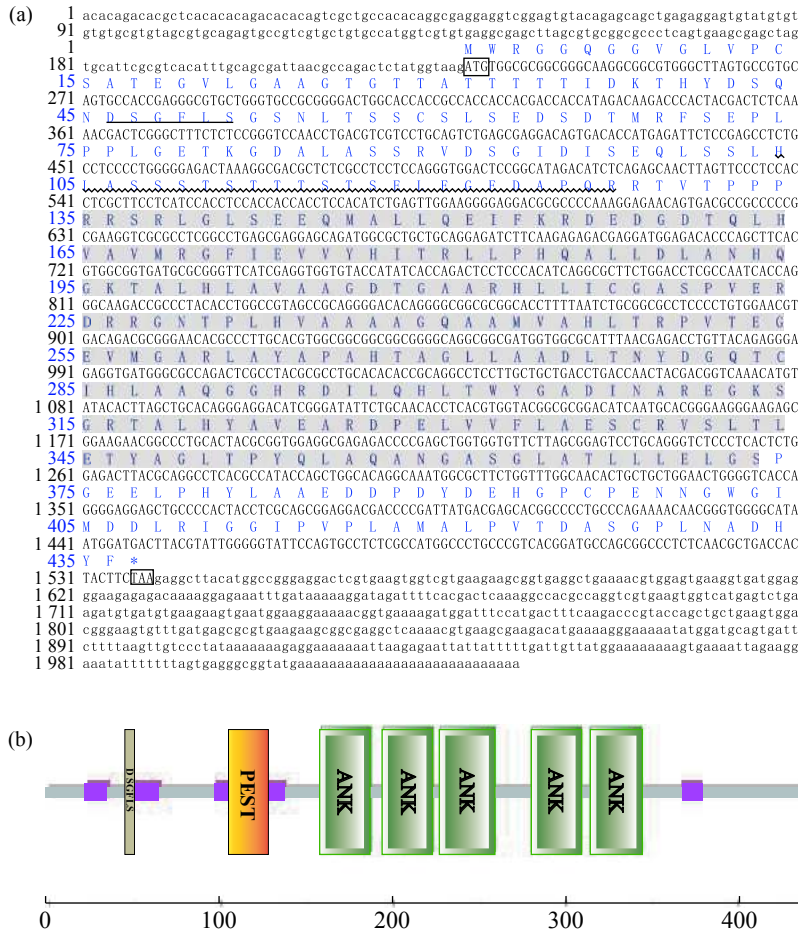


图1 拟穴青蟹Cactus核苷酸序列和氨基酸序列及蛋白功能结构域

(a) SpCactus核苷酸序列和氨基酸序列: 黑色数字代表核苷酸序列, 蓝色数字代表氨基酸序列。黑色方框部分表示起始密码子和终止密码子, 降解结构单元DSGFLS由下划线标出, PEST功能域由波浪线标出, ANK(锚定蛋白)结构域由灰色阴影标出; (b)SpCactus蛋白功能结构域: 包含3个典型的特征结构, 降解结构单元DSGFLS、PEST功能域和5个ANK锚蛋白重复序列

Fig. 1 Nucleotide sequence, amino acid sequence and protein functional domain of Cactus in *S. paramamosa*

(a) nucleotide and deduced amino acid sequences of SpCactus: the black number represents the nucleotide sequence, and the blue number represents the amino acid sequence. The black box part represents the start codon and termination codon, the degradation structure unit DSGFLS is marked by underline, the PEST functional domain is marked by wave line, and the ANK (anchoring protein) domain is marked by grey shadow. (b) the functional domains of the SpCactus. It contains three typical characteristic structures, DSGFLS, PEST functional domain and five ANK anchor protein repeats

2.2 Cactus蛋白理化性质预测

SignalP分析发现SpCactus没有信号肽, TMpred分析其无跨膜区, ProtParam分析其理论等电点pI为4.91。NetPhos 3.1 Server预测显示其含有26个丝氨酸磷酸化位点, 18个苏氨酸磷酸化位点和3个酪氨酸磷酸化位点。NetNGly 1.0 Server预测其有2个糖基化位点。用ProtScale软件分析SpCactus的疏水性/亲水性发现, 多肽SpCactus在325~350位为最高分值, 为2.1左右, 是疏水性最

强位点, 最低分值在380~400位, 为-3.0左右, 是亲水性最强位点(图2)。多肽SpCactus的GRAVY值为-0.227, 整体分析, 亲水性氨基酸残基分布多于亲水性氨基酸残基, 推测多肽SpCactus为亲水性蛋白。

2.3 Cactus的同源性比对

氨基酸序列同源性比对结果显示, 拟穴青蟹Cactus蛋白与甲壳动物亚门动物的Cactus蛋

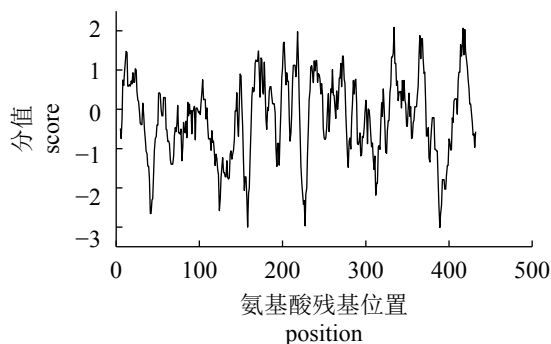


图2 多肽SpCactus氨基酸序列的疏水性/亲水性预测

Fig. 2 Predicted hydrophobicity/hydrophilicity of the amino acid sequence of SpCactus

白同源性较高, 与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、凡纳滨对虾、中国明对虾的Cactus蛋白同源性最高, 一致性达到63%, 相似性为73%; 与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的Cactus蛋白同源性较低, 相似性为36%, 一致性为24%; 与人(*Homo sapiens*)I $\kappa$ B蛋白的同源性最低, 一致性只有9%, 相似性仅18%(图3)。

#### 2.4 Cactus的系统进化树分析

系统进化树结果显示, 拟穴青蟹的SpCactus与同为甲壳动物的罗氏沼虾、凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾的Cactus聚为一支, 之后与黑腹果蝇等其他无脊椎动物聚为一大支, 而脊椎动物I $\kappa$ B聚为另一支(图4)。

#### 2.5 Cactus基因的组织分布

利用Real-time PCR方法分析了SpCactus基因mRNA在拟穴青蟹不同组织中的表达特征。结果表明, SpCactus基因mRNA在所检测的10种组织中均有表达。其中肝胰腺中表达量最低, 以肝胰腺相对表达量为基点作图, SpCactus在肌肉中的表达量最高, 为肝胰腺的12.92倍; 其次为心脏(7.63倍)、眼柄(6.25倍)、血液(5.13倍)和鳃(3.88倍)组织; 在胃(3.03倍)、肠(2.91倍)、神经组织(2.80倍)和脑(2.73倍)中的表达量较低(图5)。

#### 2.6 不同免疫刺激物诱导SpCactus的转录表达

免疫刺激后实时定量PCR检测SpCactus基因表达量变化, 结果如图6所示。注射LPS、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌均能诱导SpCactus基因的表达, 其中注射金黄色葡萄球菌对SpCactus的转录水平影响较大, 刺激4 h, SpCactus转录水平显著上调, 8 h达到峰值, 为3.2倍, 随后开始降

低, 12 h仍高于正常水平, 但在24 h时表达量下降至最低值, 随后又显著升高, 36 h达2.0倍, 随后缓慢降低, 96 h时恢复至正常水平; 副溶血弧菌刺激对SpCactus转录水平的影响较小, 在刺激4 h时SpCactus表达量显著升高, 达到1.5倍, 随后表达量降低至正常水平, 8~72 h变化相对平稳, 接近正常水平, 96 h时显著低于正常水平。LPS刺激4 h后表达量显著上调并达到峰值, 为2.7倍, 随后急剧下降, 8~24 h的表达量显著低于正常水平且变化不大, 随后36~48 h内逐渐升高, 48 h高于正常水平, 随后缓慢下降, 96 h显著低于正常水平。

### 3 讨论

NF- $\kappa$ B信号通路在先天性免疫中发挥重要作用, 激活核转录因子NF- $\kappa$ B、Dorsal和Dif等入核产生抗菌肽, 有效地抵抗革兰氏阳性菌和真菌<sup>[13]</sup>。核转录抑制因子I $\kappa$ B是NF- $\kappa$ B信号通路重要的蛋白, I $\kappa$ B通过与NF- $\kappa$ B结合形成复合体而阻止后者入核<sup>[17]</sup>, 通过从复合体中解离, 暴露NF- $\kappa$ B核定位信号, 使NF- $\kappa$ B进入细胞核产生抗菌肽<sup>[18]</sup>, 参与免疫反应。本研究利用RACE技术, 首次从拟穴青蟹中克隆到I $\kappa$ B的同源基因SpCactus。SpCactus蛋白与黑腹果蝇的Cactus蛋白的同源性一致, 为24%, 与LvCactus的结果相近<sup>[28]</sup>, 且与同为十足目动物中LvCactus和FcCactus的蛋白同源性最高, 一致性高达63%, 相似性高达73%。与LvCactus<sup>[28]</sup>、FcCactus<sup>[36]</sup>和小菜蛾(*Plutella xylostella*)Cactus<sup>[37]</sup>相似, SpCactus蛋白也包含I $\kappa$ B基因家族典型的特征结构(图1-b): DSGFLS单元、PEST功能域和ANK锚蛋白重复序列。在构建的系统进化树中, SpCactus与LvCactus、FcCactus和MrCactus聚为一支, 与物种分类结果一致, 拟穴青蟹和对虾均为十足目动物。

经蛋白结构预测, SpCactus蛋白含有3个典型结构特征: C端ANK锚定结构域(含有5个锚蛋白); N端含有DSGFLS, 为降解结构单元, 以及与I $\kappa$ B的降解、磷酸化有关的PEST序列<sup>[28]</sup>。SpCactus氨基酸序列含有5个锚蛋白重复序列, 与DmCactus和LvCactus等<sup>[28]</sup>一致, 而FcCactus含有6个锚蛋白重复序列<sup>[36]</sup>, ANK数目的不同可能与其结合的NF- $\kappa$ B蛋白的种类有关<sup>[37]</sup>。I $\kappa$ B或Cactus的N端具有保守的降解结构单元DSGFLS, I $\kappa$ B激酶(IKK)介导其中的Ser残基发生磷酸化,

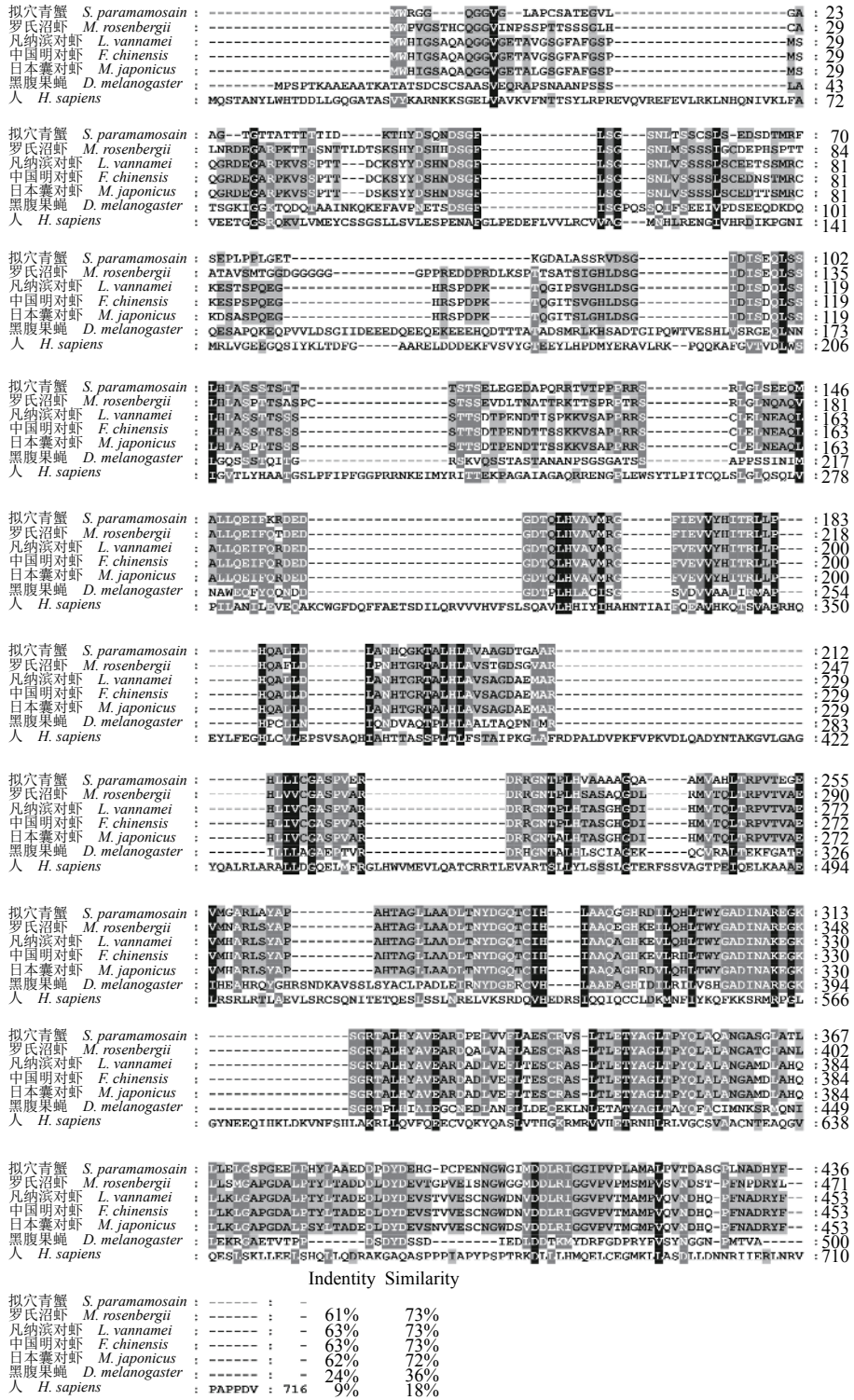


图3 SpCactus氨基酸序列同源性比对

黑色背景表示完全保守氨基酸位点，深灰色背景表示氨基酸相似性大于75%，灰色背景表示氨基酸相似性大于50%。物种及其IcB的GenBank序列号：罗氏沼虾，AET34918.1；中国明对虾，AFU60550.1；凡纳滨对虾，AFO38331.1；日本囊对虾，AYF59250.1；黑腹果蝇，NP\_001260496.1；人，BAA85155.1

Fig. 3 Homology alignment of SpCactus amino acid sequences

In the sequence, the conserved and identical residues are represented by black shading, the amino acids similarity greater than 75% and 50% are represented by dark gery and light grey respectively. The accession no. of each IcB are as follows: *M. rosenbergii*, AET34918.1; *F. chinensis*, AFU60550.1; *L. vannamei*, AFO38331.1; *M. japonicus*, AYF59250.1; *D. melanogaster*, NP\_001260496.1; *H. sapiens*, BAA85155.1

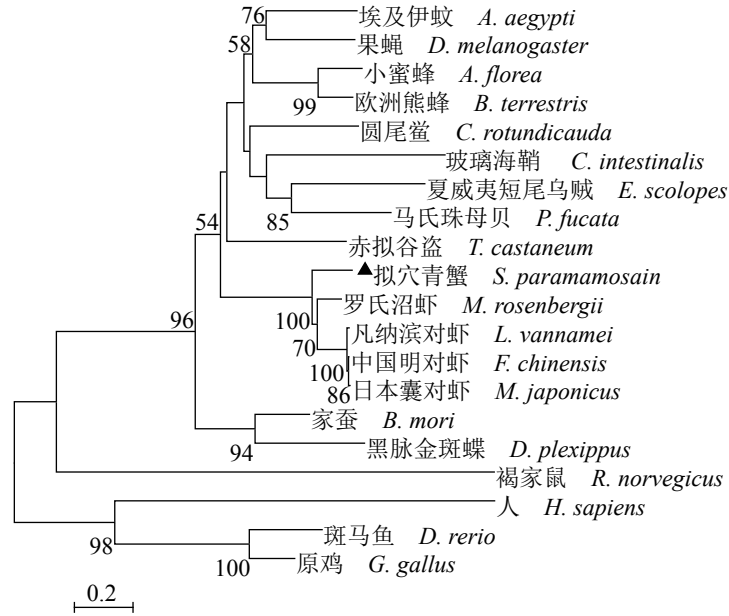


图 4 基于不同物种IκB蛋白质序列构建的NJ系统发育树

物种及其IκB的GenBank序列号: 埃及伊蚊, XP\_001650267.3; 赤拟谷盗, EFA12698.2; 褐家鼠, NP\_997674.1; 马氏珠母贝, ACF93446.1; 夏威夷短尾乌贼, AAY27980.1; 斑马鱼, AAW68010.1; 欧洲熊蜂, XP\_012174111.1; 小蜜蜂, XP\_012342319.1; 黑脉金斑蝶, OWR49225.1; 玻璃海鞘, BAE06505.1; 圆尾鲎, AAZ40334.1; 家蚕, BAI67121.1; 原鸡, NP\_001012922.1

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from multiple alignments of IκB amino acid sequences from various species

The accession no. of each IκB are as follows: *Aedes aegypti*, XP\_001650267.3; *Tribolium castaneum*, EFA12698.2; *Rattus norvegicus*, NP\_997674.1; *Pinctada fucata*, ACF93446.1; *Euprymna scolopes*, AAY27980.1; *Danio rerio*, AAW68010.1; *Bombus terrestris*, XP\_012174111.1; *Apis florea*, XP\_012342319.1; *Danaus plexippus*, OWR49225.1; *Ciona intestinalis*, BAE06505.1; *Carcinoscorpius rotundicauda*, AAZ40334.1; *Bombyx mori*, BAI67121.1; *Gallus gallus*, NP\_001012922.1

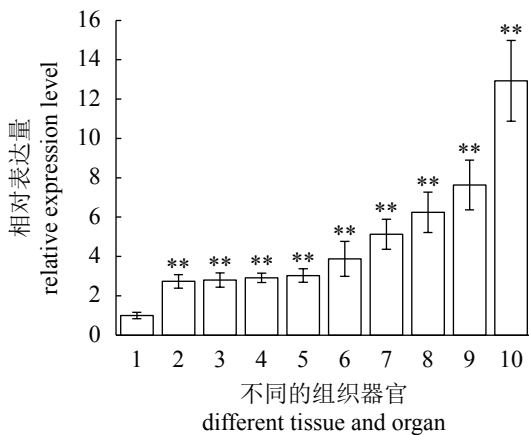


图 5 拟穴青蟹不同组织中*Cactus*基因的特异性表达

1. 肝胰腺, 2. 脑, 3. 神经组织, 4. 肠, 5. 胃, 6. 鳃, 7. 血淋巴, 8. 心脏, 9. 眼柄, 10. 肌肉 \*\**P*<0.01

Fig. 5 Expression of *SpCactus* mRNA in different tissues of *S. paramamosain*

1. hepatopancreas, 2. brain, 3. nerve tissue, 4. intestine, 5. stomach, 6. gill, 7. hemocyte, 8. heart, 9. eyestalk, 10. muscle. \*\**P*<0.01

使得IκB或Cactus从复合物中解离, 释放NF-κB因子到核内, 进而调控抗菌免疫基因的表达<sup>[37]</sup>。

*SpCactus*的N端也具有保守的降解结构单元DSGFLS, 可能与其他IκB或Cactus有相似的功能, 进而调控免疫基因的表达。PEST序列富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基, 哺乳动物IκBβ的PEST结构域中基础磷酸化位点的磷酸化状态决定了IκBβ是否抑制NF-κB与DNA结合, 被认为与蛋白质降解和抑制NF-κB与DNA的结合有关<sup>[38]</sup>。PEST序列的位置和数量在相同的物种中存在差异, 哺乳动物IκBα和IκBβ的PEST序列位于C端; 而IκBε的PEST序列位于N端。在多数节肢动物中如DmCactus、BmCactus和CfCactus等的C端和N端各有一个PEST序列, AaCactus和CrIκB在C端有一个PEST序列, 而*SpCactus*与IκBε、FcCactus和BmCactus相似, 在N端有一个PEST序列<sup>[36]</sup>, 所以*SpCactus*功能可能不同于哺乳动物的IκBα而与哺乳动物的IκBε和Cactus类似。*SpCactus*的PEST序列也富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基, 且经预测显示*SpCactus*含有多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点, 其磷酸化状态也可能发挥类似哺

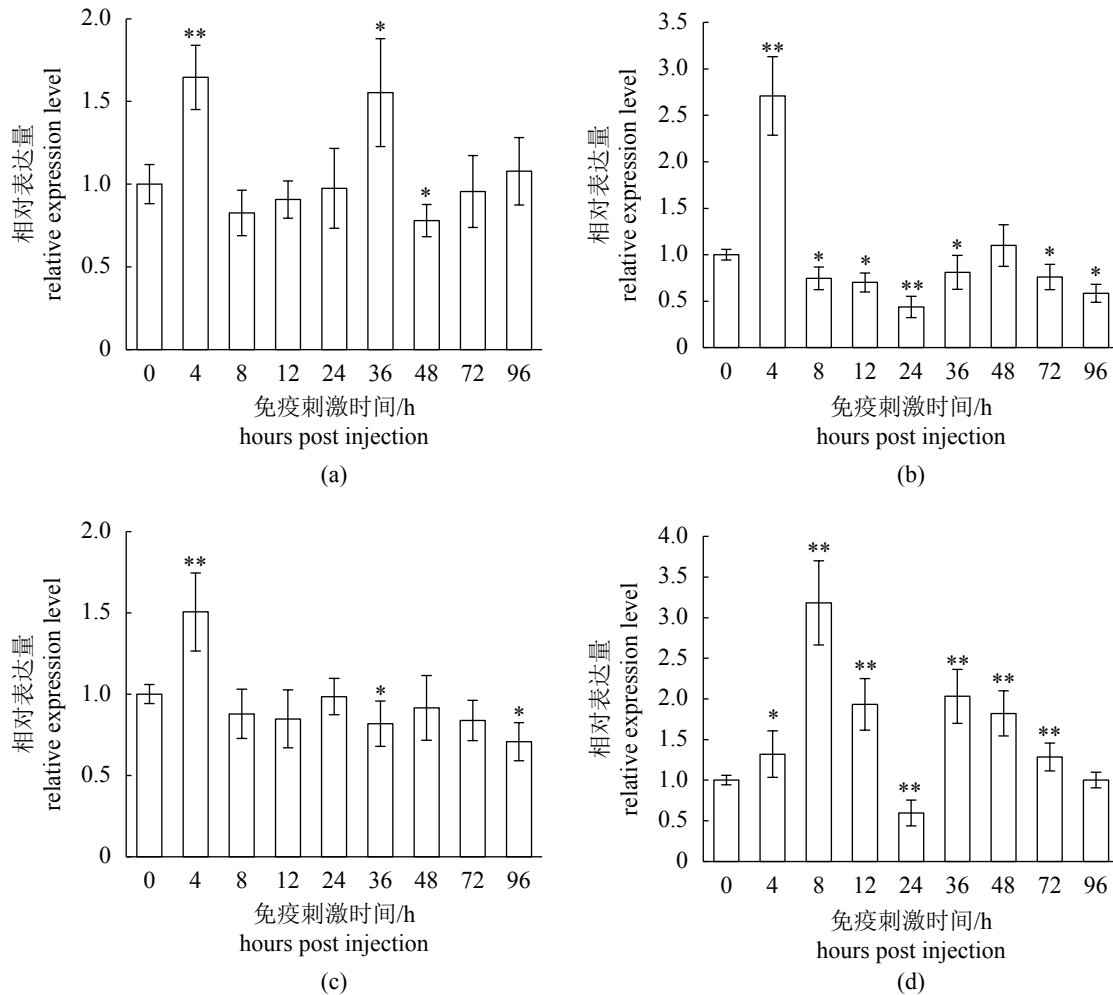


图6 免疫原刺激后 $SpCactus$ 基因mRNA的表达变化

(a) PBS刺激, (b)脂多糖刺激, (c)副溶血弧菌刺激, (d)金黄色葡萄球菌刺激

Fig. 6 Changes of *SpCactus* gene expression after immunogen stimulation

(a) PBS challenge, (b) LPS challenge, (c) *V. parahaemolyticus* challenge, (d) *S. aureus* challenge. \*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$

乳动物I $\kappa$ B $\beta$ 蛋白抑制NF- $\kappa$ B与DNA结合的功能。

*SpCactus*基因mRNA的组织表达分布结果表明, *SpCactus*基因的mRNA在检测的10个组织中都有表达, 在肌肉、眼柄、血淋巴、心脏和鳃等组织中表达量较高, 结果与*FcCactus*及*LvCactus*基因的组织分布结果相近<sup>[28, 36]</sup>, 这些组织多为甲壳动物的免疫相关组织<sup>[39]</sup>。血淋巴具有各类抗菌因子、抗病毒因子、凝血因子、细胞激活因子、识别因子、凝集素、溶血素及各种具有免疫活性的酶类, 对于病原体识别、吞噬、细胞毒性和细胞—细胞通讯至关重要, 是免疫相关的重要组织, 免疫相关的基因在血淋巴中都有很高的转录水平<sup>[40-41]</sup>, *SpCactus*在血淋巴中表达量较高, 暗示*SpCactus*可能参与拟穴青蟹的免疫反应; *SpCactus*与*FcCactus*相似, 在肌肉和心脏

中有很高的表达水平, 可能与*Cactus*具有与调节生肌分化的生肌转录因子相同作用有关<sup>[36, 42]</sup>; 鳃是拟穴青蟹的过滤器官, 也是其免疫反应的第一道防线, 对外来病原和异物具有过滤、贮存和杀灭作用。

诸多研究表明, 对虾在受到细菌感染和其他免疫刺激物刺激后NF- $\kappa$ B途径被激活, Ren等<sup>[43]</sup>通过用WSSV注射日本囊对虾, 发现*Spz-Toll-Dorsal-ALF*信号通路被激活表达; Wang等<sup>[44]</sup>发现WSSV刺激凡纳滨对虾后, *LvDorsal*的表达量明显上调; Li等<sup>[45]</sup>发现副溶血弧菌和WSSV刺激中国明对虾后, *FcDorsal*的表达量明显上调; LPS、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌刺激后, *LvCactus*的表达明显上调<sup>[28]</sup>。分别用LPS、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌免疫刺激拟穴青蟹后, 检测



*SpCactus* 基因 mRNA 的表达变化情况, 发现注射 LPS、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌均能诱导 *SpCactus* 基因的表达, 其中金黄色葡萄球菌和 LPS 刺激后 96 h 内 *SpCactus* 的转录水平发生显著变化, 结果与 *LvCactus* 相近<sup>[28]</sup>。从 *SpCactus* 的整体转录水平趋势分析, 用副溶血弧菌和 PBS 刺激拟穴青蟹后, *SpCactus* 的整体转录水平变化趋势相似, 4 h 时显著高于正常水平, 可能是由于注射副溶血弧菌和 PBS, 青蟹产生应激反应, 导致 *SpCactus* 的转录水平升高, 说明副溶血弧菌对 *SpCactus* 整体转录水平影响不大。该结果与副溶血弧菌刺激凡纳滨对虾后 *LvCactus* 表达量变化结果不一致<sup>[28]</sup>, 可能不同物种之间存在差异, 导致差异的原因有待进一步研究。果蝇 Toll 通路研究表明, 果蝇的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 主要通过识别细菌细胞壁上的 Lys 型肽聚糖来识别革兰氏阳性菌, 进而激活 Toll 通路的免疫反应<sup>[46]</sup>。*SpCactus* 基因在受到金黄色葡萄球菌刺激后表达差异较大, 而对副溶血弧菌的免疫反应较弱, 可能与果蝇相似, 拟穴青蟹的模式识别受体能识别革兰氏阳性菌, 而不能很好地识别革兰氏阴性菌。

本实验通过对拟穴青蟹 *Cactus* 基因进行序列分析、同源性分析及理化信息分析, 发现其结构功能域与其他甲壳动物 *Cactus* 基因高度相似。*SpCactus* 基因在肌肉、眼柄、血淋巴和鳃等免疫器官中表达量较高, 且在 LPS 和金黄色葡萄球菌等免疫原刺激下表达量变化显著。但对其在免疫反应中发挥的功能尚不明确, 需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Ma H Y, Ma C Y, Li S J, *et al.* Transcriptome analysis of the mud crab (*Scylla paramamosain*) by 454 deep sequencing: assembly, annotation, and marker discovery[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102668.
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴-2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 22.
- Fisheries Bureau of the Ministry of agriculture of China. China Fisheries Yearbook 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 22(in Chinese).
- [3] 夏小安, 吴清洋, 李远友, 等. 锯缘青蟹混合感染症致病菌的分离鉴定与感染治疗[J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(5): 103-110.
- Xia X A, Wu Q Y, Li Y Y, *et al.* Isolation and identification of two bacterial pathogens from mixed infection mud crab *Scylla serrata* and drug therapy[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(5): 103-110(in Chinese).
- [4] Weng S P, Guo Z X, Sun J J, *et al.* A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(3): 133-139.
- [5] Bonami J R, Zhang S Y. Viral diseases in commercially exploited crabs: a review[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106(1): 6-17.
- [6] 王海潮, 张兴桃, 廖红艳, 等. 锯缘青蟹黄水病病原菌的分离与鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(33): 20523-20524, 20651.
- Wang H C, Zhang X T, Liao H Y, *et al.* Isolation and identification on the pathogens of Grasserie from *Scylla serrata*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(33): 20523-20524, 20651(in Chinese).
- [7] 王进科, 朱清顺, 周刚, 等. 中华绒螯蟹感染类立克次氏体微生物的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(3): 273-278.
- Wang J K, Zhu Q S, Zhou G, *et al.* Studies on rickettsia-like organisms infecting *Eriocheir sinensis*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2003, 9(3): 273-278(in Chinese).
- [8] 朱宁宁, 王文, 李正荣, 等. 患“颤抖病”中华绒螯蟹血细胞中类立克次体寄生的超微结构观察[J]. *电子显微学报*, 2002, 21(1): 21-24.
- Zhu N N, Wang W, Li Z R, *et al.* Ultrastructural observation on hemocytes parasitized by Rickettsia-like organisms of *Eriocheir sinensis* infected with tremor disease[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2002, 21(1): 21-24(in Chinese).
- [9] Boeger W A, Pie M R, Ostrensky A, *et al.* Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology[J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005, 100(2): 161-167.
- [10] Shukalyuk A I, Golovnina K A, Baiborodin S I, *et al.* *vasa*-related genes and their expression in stem cells of colonial parasitic rhizocephalan barnacle *Polyascus polygenea* (Arthropoda: Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala)[J]. *Cell Biology International*, 2007, 31(2): 97-108.
- [11] 李伟微. 基于中华绒螯蟹 EST 序列的深度发掘-免疫和营养相关基因的克隆与表达研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2010.

- 大学, 2011.
- Li W W. Deep excavation based on the expressed sequence tags in Chinese mitten crab-Immune and nutrition related genes cloning and expression analysis[D]. Shanghai: East China Normal University, 2011(in Chinese).
- [12] Gilmore T D, Wolenski F S. NF- $\kappa$ B: where did it come from and why?[J]. *Immunological Reviews*, 2012, 246(1): 14-35.
- [13] Rutschmann S, Jung A C, Hetru C, *et al.* The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*[J]. *Immunity*, 2000, 12(5): 569-580.
- [14] Kim T, Kim Y J. Overview of innate immunity in *Drosophila*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 38(2): 121-127.
- [15] Buchon N, Poidevin M, Kwon H M, *et al.* A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(30): 12442-12447.
- [16] Sun W W, Zhang X X, Wan W S, *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) participates in anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) gene expression in mud crab[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 67: 361-376.
- [17] 刘苏, 吴乔. NF- $\kappa$ B家族特征及其调控途径和生物学功能[J]. *细胞生物学杂志*, 2002, 24(2): 83-86.
- Liu S, Wu Q. Characteristics of NF- $\kappa$ B family and its regulation pathways and biological functions[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2002, 24(2): 83-86(in Chinese).
- [18] 陈文亮, 王选. NF- $\kappa$ B/Rel蛋白家族的结构和功能[J]. *临床医药实践*, 2002, 11(2): 885-887.
- Chen W L, Wang X. Structure and function of NF- $\kappa$ B/Rel protein family[J]. *Proceeding of Clinical Medicine*, 2002, 11(2): 885-887(in Chinese).
- [19] Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(6): 280-288.
- [20] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B[J]. *Genes & Development*, 2004, 18: 2195-2224.
- [21] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity[J]. *Annual Review of Immunology*, 2000, 18: 621-663.
- [22] Hatada E N, Nieters A, Wulczyn F G, *et al.* The ankyrin repeat domains of the NF- $\kappa$ B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF- $\kappa$ B DNA binding[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(6): 2489-2493.
- [23] Malek S, Chen Y, Huxford T, *et al.* I $\kappa$ B $\beta$ , but Not I $\kappa$ B $\alpha$ , Functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- $\kappa$ B dimers by masking both NF- $\kappa$ B nuclear localization sequences in resting cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(48): 45225-45235.
- [24] Leclerc V, Reichhart J M. The immune response of *Drosophila melanogaster*[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198: 59-71.
- [25] 刘甜, 罗开珺. 果蝇Toll和IMD信号通路中的功能结构域[J]. *环境昆虫学报*, 2011, 33(3): 388-395.
- Liu T, Luo K J. Immunity-related domains of Toll and IMD signaling pathways in *Drosophila*[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 33(3): 388-395(in Chinese).
- [26] Hetru C, Hoffmann J A. NF- $\kappa$ B in the immune response of *Drosophila*[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 2009, 1(6): a000232.
- [27] Hoffmann J A. The immune response of *Drosophila*[J]. *Nature*, 2003, 426(6962): 33-38.
- [28] Li C Z, Chen Y X, Zhang S, *et al.* Identification, characterization, and function analysis of the Cactus gene from *Litopenaeus vannamei*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49711.
- [29] Wang D D, Li F H, Li S H, *et al.* An I $\kappa$ B homologue (*FcCactus*) in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(4): 352-362.
- [30] 孙洁洁. 对虾 $\beta$ 抑制蛋白对Toll和Jak/Stat信号通路的调控及纤维蛋白原相关蛋白在对虾抗细菌免疫中的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- Sun J J. The regulation of  $\beta$ -arrestins in Toll and Jak/Stat signaling pathways and the function of fibrinogen-related proteins in shrimp antibacterial immunity[J]. Jinan: Shandong University, 2017(in Chinese).
- [31] Frolet C, Thoma M, Blandin S, *et al.* Boosting NF- $\kappa$ B-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts

- development of *Plasmodium berghei*[J]. *Immunity*, 2006, 25(4): 677-685.
- [32] Li X C, Zhang X W, Zhou J F, *et al.* Identification, characterization, and functional analysis of tube and Pelle homologs in the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76728.
- [33] Li X C, Zhu L, Li L G, *et al.* A novel myeloid differentiation factor 88 homolog, SpMyD88, exhibiting SpToll-binding activity in the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(4): 313-322.
- [34] Liu S S, Chen G X, Xu H D, *et al.* Transcriptome analysis of mud crab (*Scylla paramamosain*) gills in response to Mud crab reovirus (MCRV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 545-553.
- [35] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [36] 王冬冬. 中国明对虾核转录因子NF- $\kappa$ B家族基因在免疫调控中的功能研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012.
- Wang D D. Cloning and expression of nuclear transcription factors rel/NF- $\kappa$ B family genes in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012(in Chinese).
- [37] 高延富, 李俊俊, 余静, 等. 小菜蛾 *Cactus* 基因的克隆及表达模式研究[J]. *环境昆虫学报*, 2018, 40(1): 161-172.
- Gao Y F, Li J J, Yu J, *et al.* Cloning and expression pattern research of *Cactus* from *Plutella xylostella*[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40(1): 161-172(in Chinese).
- [38] Sue S C, Dyson H J. Interaction of the I $\kappa$ B $\alpha$  C-terminal PEST sequence with NF- $\kappa$ B: insights into the Inhibition of NF- $\kappa$ B DNA binding by I $\kappa$ B $\alpha$ [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 388(4): 824-838.
- [39] Wang Z W, Li S H, Yu Y, *et al.* Identification and characterization of two novel vascular endothelial growth factor genes in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 259-268.
- [40] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, *et al.* Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 45-52.
- [41] 杨昌建. 中国明对虾Toll样受体基因的克隆和表达分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2008.
- Yang C J. Cloning and expression analysis of Toll-like receptor homologue gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008(in Chinese).
- [42] Li D L, Niu Z Y, Yu W S, *et al.* *SMYD1*, the myogenic activator, is a direct target of serum response factor and myogenin[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(21): 7059-7071.
- [43] Ren Q, Huang X, Cui Y L, *et al.* Two white spot syndrome virus MicroRNAs target the Dorsal Gene to promote virus infection in *Marsupenaeus japonicus* Shrimp[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(8): e02261-16.
- [44] Wang P H, Gu Z H, Wan D H, *et al.* The shrimp NF- $\kappa$ B pathway is activated by white spot syndrome virus (WSSV) 449 to facilitate the expression of *WSSV069(ie1)*, *WSSV303* and *WSSV371*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24773.
- [45] Li F H, Wang D D, Li S H, *et al.* A Dorsal homolog (FcDorsal) in the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to both bacteria and WSSV challenge[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(8): 874-883.
- [46] Shmueli A, Shalit T, Okun E, *et al.* The toll pathway in the central nervous system of flies and mammals[J]. *NeuroMolecular Medicine*, 2018, 20(4): 419-436.

## Cloning, expression and biological functional characteristics of *Cactus* from *Scylla paramamosain*

HU Lei<sup>1,2</sup>, DENG Hengwei<sup>2</sup>, LI Jingjing<sup>2</sup>, LIU Shanshan<sup>2</sup>,  
HE Jianguo<sup>2</sup>, LI Haiyun<sup>1</sup>, WENG Shaoping<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** In this study, we obtained the full length of the *SpCactus* gene by RACE technology from *Scylla paramamosain*(*SpCactus*). And we analyzed the biological information of the *SpCactus* and its immune response under pathogen stimulation. The full length of *SpCactus* mRNA contains a 5' untranslated region (UTR) of 228 bp, an open reading frame of 1 311 bp and a 3' UTR of 496 bp. The *SpCactus* protein contains five characteristic ANK homology domains and showed 62% identity (73% similarity), 24% identity (36% similarity), and 9% identity (18% similarity) to the *Litopenaeus vannamei Cactus* (*LvCactus*) protein, the *Drosophila melanogaster Cactus* (*DmCactus*), and the *Homo sapiens* IκB protein, respectively. Prediction of the protein physicochemical properties of *SpCactus* revealed that it is a hydrophilic protein. By physical and chemical properties analysis, *SpCactus* was a hydrophilic protein. And its isoelectric point (pI) is 4.91. The mRNA of *SpCactus* showed high expression in the muscle, eyestalk and heart, but low expression in the hepatopancreas. Moreover, the expression of *SpCactus* were significantly upregulated by stimulation with *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharide. In this study, *SpCactus* gene was successfully cloned and characterized for the first time, and its bioinformatics analysis, physical and chemical properties were predicted. The biological functions of *SpCactus* gene were preliminarily explored, providing a basis for further study of its biological functions in immune response.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; *Cactus*; gene cloning; tissue distribution; expression analysis

**Corresponding author:** WENG Shaoping. E-mail: lsswsp@mail.sysu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China(31672677); China Agriculture Research System(CARS-48)