1. Ctl72是一个重要的菌群调节分子

在哺乳动物中，消化道上皮细胞与共生菌之间由一层厚厚的黏液层分隔开，黏液层及其中定植的共生菌可以保护细胞免受病原感染，维持消化道稳态（37442097）。许多重要的黏液层蛋白也在维持这种稳态平衡中发挥至关重要作用，比如，先前研究中的一个C型凝集素（RegIIIγ）可以促进消化道内细菌与肠上皮的“空间隔离”从而防止免疫过度激活，以帮助维持这种平衡24942678。因此，在哺乳动物中，黏液层及黏液层蛋白与共生菌共同维持了消化道内的一种稳态平衡。

而在对虾等甲壳动物中，缺乏黏液层结构，类似的免疫屏障功能由一层由几丁质和几丁质结合蛋白构成的围食膜（胃中称为几丁质层）所发挥（23026719；37610536）。因此，围食膜及其相关蛋白在消化道稳态维持过程中也扮演着至关重要的角色。C型凝集素（CTL），因其核心功能单元：C型凝集素结构域（CTLD）的存在，可以作为一个潜在“桥梁”参与到宿主-共生菌群互作过程中。在前期基于对日本囊对虾肠道转录组的数据分析中，我们发现至少有38种CTL在消化道中表达，在对其结构域进行预测后，一个命名为Ctl72的分子引起了我们的注意。我们发现，Ctl72除CTLD外还含有四段几丁质结合结构域（Chitin Binding Domain，CBD），并且信号肽的存在使得其能够作为分泌蛋白于细胞外发挥作用（图2-1A）。此外，Ctl72在消化道组织（尤其是胃）中高表达（图2-1B）。基于此，我们推测该分子可能在消化道（胃）的几丁质层处发挥菌群稳态调控的作用。

为对此猜想进行验证，我们首先探究其了其能否影响消化道菌群。在使用RNAi敲低了Ctl72的表达（图2-1C）后，检测了对虾消化道内总的和可培养细菌数量，发现Ctl72敲低组的16SrDNA丰度明显高于对照组（图2-1D），可培养细菌数量也显著增多（图2-1E）。表明Ctl72能够影响消化道内的细菌载量，并且可能作为一个重要的菌群调节分子参与到稳态维持过程。

1. Ctl72影响消化道内菌群结构

既然宏观上，Ctl72能够影响消化道内细菌的载量，那么到底发生了何种变化导致了细菌载量发生显著变化？为对此进行探究，我们首先试图通过16S rDNA测序来揭示Ctl72敲低前后，消化道内菌群结构的变化。多样性是评估微生物群落直接差异性的一个重要指标，其中α-多样性常用于评估单一样本或群落内部的物种多样性，以衡量一个样本中物种的丰富度和均匀度（通常来讲，健康的消化道具有较高的α-多样性）。而β-多样性用于比较不同样本或群落之间的物种多样性差异，即样本之间的异质性（28928718）。通过对菌群多样性的比较分析有助于我们了解消化道的整体健康状态。我们发现，Ctl72敲低后，α-多样性明显降低（图2-2A），而对β-多样性的分析也揭示了Ctl72敲低后两组菌群存在明显差异（图2-2B）。多样性的分析侧面证明了Ctl72敲低会导致消化道菌群处于一种稳态失衡的状态。接下来为进一步探究消化道内菌群结构发生了何种变化导致了这种菌群稳态失衡。我们对消化道内菌群的相对丰度分析发现，在门水平上，两类阳性菌门（厚壁菌门和放线菌门）的相对丰度明显降低，而在属水平上，弧菌属的相对丰度明显增加（图2-2C）。BugBase是一种用于从微生物群落的16S基因测序数据中预测微生物表型特征（如革兰氏阳性/阴性细菌丰度、潜在致病型及氧化应激耐受等）的生物信息学工具37040962。我们进一步通过BugBase预测也证实，Ctl72敲低会导致消化道内革兰氏阳性菌的丰度显著降低，阴性菌的相对丰度明显增加（图2-2D）。为对测序结果进行验证，我们通过RT-qPCR也检测了两类阳性菌门及弧菌属在Ctl72敲低后的相对丰度变化，发现与测序得到的结果一致（图2-2E）。并且，通过荧光标记的探针对消化道内细菌的定位及荧光强度分析也发现，两类阳性菌门的菌群在Ctl72敲低后明显减少，且分布呈相对散乱（图2-2F）。以上结果表明，Ctl72能够影响菌群结构，敲低其表达后会导致消化道菌群“紊乱”。

1. rCtl72具有革兰氏阳性共生菌的结合偏向性

一组完整且平衡的共生菌对于消化道的稳态维持至关重要。Ctl72对于维持菌群平衡发挥重要作用，那么其如何影响共生菌群，先前测序中发现的敲低后导致的革兰氏阳性菌丰度降低的现象如何解释呢？

接下来为对这些疑问进行探究，我们纯化了含不同结构域的rCtl72（图2-4A）以揭示其各个结构域的功能。首先探究了其CTLD结构域的功能，是否赋予了Ctl72与共生菌（选择性）互作的能力。为对此验证，我们从对虾消化道内分离得到一些共生菌，然后通过通过细菌结合实验发现，rCTLD及rCtl72与消化道内一些阳性共生菌结合能力明显更强（图2-4B）。因为区分革兰氏阳性及阴性菌的革兰氏染色法（Gram Staining）主要是基于对细菌细胞壁肽聚糖厚度的不同，革兰氏阳性菌的细胞壁由较厚肽聚糖（PGN）组成，而革兰氏阴性菌细胞壁肽聚糖较薄并且外层是脂多糖（LPS）。所以，接下来我们想要探究是否是因为Ctl72 CTLD结构域与细菌外壁成分（PGN/LPS）结合力的不同而导致其与共生菌的结合偏向性。我们使用了商用化的PGN和LPS进行多糖结合实验，发现，rCtl72与PGN的结合能力明显强于LPS（图2-4C）。为对此结果进一步验证，我们通过将rCtl72、PGN及LPS三者混合赋予以构成PGN与LPS竞争结合rCtl72的关系，通过此竞争结合实验也证实，rCtl72与PGN的结合能力强于LPS。因此，以上结果表明，Ctl72与消化道内共生菌存在直接相互作用，并通过与PGN的强结合形成一种阳性共生菌的结合偏向性。

1. rCtl72帮助共生菌定植于消化道几丁质层上

CTLD结构域的存在使Ctl72具备结合共生菌的能力，那么独特多段CBD结构域的存在又赋予了其怎样的特殊功能？我们知道，在对虾中，类似哺乳动物黏液层的屏障功能主要由几丁质层（围食膜）所实现，这层结构的功能及完整性对消化道稳态的维持至关重要的。在哺乳动物中，一些粘液层蛋白对于稳态的维持也不可获取，如RegIIIγ等。那么，于几丁质层发挥作用的几丁质结合蛋白也可能发挥重要的稳态维持功能。我们为此提出猜想，CBD结构域的存在可能赋予Ctl72在消化道几丁质层发挥菌群调节的功能：CBD和CTLD分别与宿主和菌群相互作用，Ctl72作为一个“枢纽”来调节消化道的稳态。为对我们的猜想进行验证，首先需探究CBD结构域是否能使Ctl72定位于几丁质层。通过免疫荧光实验，我们观察到，rCtl72及rCBD能够与消化道几丁质层共定位，而对照标签蛋白rtag或单独的rCTLD却不能（图2-5A），表明CBD而不是CTLD结构域的存在赋予了其定位于几丁质层的功能。

那么，既然证明了Ctl72能够结合共生菌（阳性菌）并且定位于几丁质层，那么，我们做出一个合理的推测：Ctl72具有介导共生菌定植于消化几丁质层的功能。为对其进行验证，我们使用先前从健康对虾消化道内分离出来的枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）作为外源共生菌并使用FITC标记以模拟共生菌的定植情况。发现，在敲低Ctl72的表达后会导致共生菌在消化道几丁质层的定植率显著降低（图2-6A）。而将共生菌与重组蛋白（rtag、rCTLD、rCBD或rCtl72）共同孵育后再经口喂食，仅有rCtl72的全长蛋白能够显著提高共生菌在消化道内的定植率（图2-6B）。也表明，CBD或CTLD单独结构域的存在不能发挥完整rCtl72的功能。此外，通过平板计数法也验证了rCtl72介导共生菌定植的能力，并且随着CBD结构域的梯度增加，帮助共生菌定植的能力逐渐增加（图2-6C）。并且通过FISH检测了对虾消化道内共生菌（厚壁、放线菌门）的数量、分布，发现rCtl72喂养确实会促进共生菌的定植并且分布更加紧凑（图2-6D）。因此，以上结果表明，Ctl72可以作为一个“桥梁”参与到宿主与菌群互作中，具有介导共生菌（阳性菌）定植于消化道几丁质层的功能。

1. Ctl72增强宿主对于外来致病菌的定植抵抗力

消化道内菌群的平衡对于个体生存而言至关重要，一个“健康”的消化道菌群有助于宿主的营养代谢及抵抗外来病原体等生理过程。先前研究中发现，Ctl72能够调控菌群，帮助共生菌（阳性菌）在消化道内定植。那么，Ctl72是否有助于塑造一个“健康”的消化道菌群呢？

首先，我们探究了在Ctl72敲低后的消化道菌群是否“健康”，我们借助了BugBase预测，发现在Ctl72敲低后，消化道内菌群的潜在致病性显著升高（图2-7A）。并且在电镜下观察消化道内表面的完整性及细菌附着状态发现，Ctl72敲低会导致消化内表面几丁质层部分区域出现凹陷、破碎状态，细菌嵌入其中（图2-7B），以上结果表明此时对虾的消化道处于一种“病态”而非“健康”。那么，这种“病态”的菌群组成是否会影响对虾对于外来病原体的抵抗力呢？为对其验证，我们通过经口喂养致病弧菌以模拟外来病原体感染的情况。发现在Ctl72敲低后，会导致降低对虾对于外来病原的抵抗力，具体表现为：Ctl敲低后，对虾消化道内外源致病菌的数量明显增多（图2-7C），感染后出现更明显的组织损伤（上皮细胞脱落更明显）（图2-7D）以及加剧对虾在感染下的死亡（图2-7E）。这些结果表明，Ctl72对于“健康”的消化道菌群的维持至关重要，有助于塑造对虾对外源致病菌的抵抗力。

那么，Ctl72能否作为一种“稳态维持因子”发挥作用呢？我们在经口喂养rCtl72以模拟过表达，发现，rCtl72喂养增强对虾在外源致病菌侵袭下的抵抗力，表现出较高的外源致病菌清除率（图2-7B），较轻的组织损伤（图2-7C）以及较低的死亡率（图2-7D）。因此，Ctl72能够介导共生菌（阳性菌）在消化道内定植并增强对虾对于外来病原体的定植抵抗力，维持消化道的稳态更不易被打破。

6． Ctl72所介导定植的共生菌可以通过免疫调节来塑造定植抵抗力

至此，Ctl72的分子功能已基本阐明：介导共生菌（尤其是阳性菌如厚壁、放线菌门）定植于消化道几丁质层，有助于维持消化道的稳态，增强宿主对外源致病菌的定植抵抗力，是一个重要的菌群调节分子。但仍有问题尚未明晰：所介导定植的共生菌是否作为核心因素以赋予Ctl72的稳态维持能力；于宿主而言，Ctl72扮演怎样的角色，其是否能够作为一个“桥梁”参与到宿主与共生菌的互作中？

为对这些问题探究，我们首先需明确，Ctl72是否能作为一个“传统”的抗菌肽分子发挥直接杀死外源致病菌（尤其是弧菌）的功能。我们通过将rCtl72与几种典型致病弧菌孵育，发现，rCtl72并不能杀死或抑制这些弧菌的生长（图2-8A），表明其抗菌保护能力是通过某些间接机制。那么，Ctl72所介导定植的共生菌是否在此过程发挥核心功能？我们知道，消化道内共生菌能够塑造宿主对外源致病菌的定植抵抗力，其可能通过直接抑制或间接调节宿主免疫反应参与到此过程36539611。共生菌的多样性对于直接抑制的贡献起决定性作用38096285，在先前的16S多样性分析中发现，敲低Ctl72的表达会导致消化道菌群的α-多样性显著降低，与之对应的是弧菌相对丰度显著增多（图2-2A和图2-2C），表明，通过共生菌群直接抑制外源致病菌的直接机制可能在此过程中发挥一定功能。那么，共生菌群对于宿主的免疫调节又能否及如何在此过程发挥作用？几类抗菌肽是对虾中典型的抗菌分子，其中，Alfs因其高效的抗菌活性而备受关注。因此，我们接下来检测了在rCtl72喂养后对虾相关Alfs的表达，发现它们均被不同程度诱导（图2-8B）。其中，AlfB1及AlfE2因诱导程度最为显著被选为可能的核心效应分子以进行后续更深入研究。此处引申出一个问题：这种Alfs的表达增加是由Ctl72所介导定植的共生菌所诱导的还是通过Ctl72本身来调节的呢？因此，为对此验证，我们在rCtl72喂养的同时叠加抗生素处理以清除对虾消化道内共生菌，发现这种对Alfs的诱导作用消失，表明是其介导定植的共生菌而不是Ctl72本身来增强宿主的免疫反应的。那么，共生菌通过免疫调节所增强的免疫效应分子是否能显著增强对虾对于外源致病菌的抵抗力呢？我们发现，rCtl72能够增强对虾对于外源致病菌的清除率，但在叠加敲低AlfB1后显著降低了这种抵抗力（图2-8D），并且敲低AlfB1也会加剧在rCtl72处理下的对虾死亡（图2-8E）。以上结果表明，Ctl72所介导定植的共生菌可以通过免疫调节来塑造定植抵抗力。

1. 共生菌通过IMD途径维持Ctl72表达

既然Ctl72在影响消化内菌群并调节稳态中发挥如此重要功能，那么该分子是否以及如何响应消化道内菌群变化以维持宿主和共生菌之间稳态呢?首先我们分析了该分子能否响应消化道内菌群变化，通过抗生素清除了消化内细菌（图2-9A）之后，我们检测了Ctl72的表达是否受到影响，结果表明，共生菌清除后，Ctl72表达受抑制（图2-9B和2-9C），表明其能够响应消化道内共生菌群的变化。接下来我们想要探究其通过何种途径来响应菌群变化。结合先前报道以及实验室前期研究，一些抗菌肽或调控蛋白能够通过 IMD/Relish 通路响应消化道内共生菌群变化以维持其表达[69]。结合我们的实验结果，我们推测，Ctl72可能也是通过IMD/Relish通路来响应消化道内共生菌群的变化。接下来为对此猜想进行验证，我们首先对Ctl72的启动子区域进行分析，发现，存在Relish的转录起始位点（图2-9D），因此，IMD通路具有潜在调控Ctl72表达的能力。接下来为了验证IMD通路能否调控Ctl72的表达，我们通过RNAi敲低了IMD/Relish的表达水平（图2-9E）后发现，Ctl72的表达明显受抑制（图2-9F和2-9G）。因此，以上结果表明，消化道内共生菌可以通过IMD途径维持Ctl72表达，Ctl72作为一个“桥梁”参与到宿主与菌群互作中，并有助于维持消化道的稳态。

讨论