

杂色鲍一种编码CRAD功能域基因的克隆及其在发育和应激中的表达

张丽莉, 和四梅, 王国栋*, 王艺磊*

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探讨Caspase募集功能域(CRAD)在鲍发育和应激中的作用, 实验通过比对杂色鲍转录组序列和RACE扩增的方法, 获得了杂色鲍一条含CRAD的基因全长cDNA, 命名为*HdCRAD*; 采用实时定量PCR的方法获得了该基因在发育和应激中的表达谱。结果显示, *HdCRAD*的cDNA全长1 371 bp, 开放阅读框735 bp, 编码244个氨基酸。编码蛋白具有保守的CRAD功能域。该基因在各检测组织中均可表达, 在黏液腺中表达量最高; 在发育各阶段也均有表达, 面盘幼虫晚期表达量最高。在细菌感染、高温或缺氧应激处理后, 血细胞的*HdCRAD*表达水平均有显著性变化。在担轮幼虫时期, RNA干扰该基因会显著提高幼虫畸形率; 幼虫的*caspase-8*和*DAD1*的表达水平会显著上升, 而*caspase-3*的表达水平会下降。研究表明, 该基因参与了鲍幼虫发育过程; 在成体免疫、耐高温和抗缺氧中发挥了一定作用。

关键词: 杂色鲍; Caspase募集功能域(CRAD); 基因表达; 发育; 应激; RNAi

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)是我国主要的养殖贝类之一, 生活史需要经历一个内源性营养的幼虫阶段, 该阶段的发育状况对苗种生产影响巨大, 可以作为亲体繁殖性状的一个指标。目前, 杂色鲍的养殖方式以陆基水泥池和浅海多层箱笼为主。在养殖过程中, 常出现高温、缺氧等应激导致大量死亡^[1-2]。杂色鲍的主要病原菌副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)也常会导致杂色鲍的大量死亡^[1, 3]。因此, 培育抗高温、缺氧、弧菌感染等性状的杂色鲍优良品种是鲍养殖业的重要课题, 而解析杂色鲍在幼虫发育和应激中的分子机制则能为育种提供重要的理论数据。

Caspase是一类含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶, 与细胞凋亡密切相关, 并能够参与细胞生长、分化和免疫等多种细胞学过程^[4]。因

此, 在发育和应激过程中Caspase常扮演重要的角色。Caspase家族具有保守的Caspase募集功能域(caspase recruitment domain, CARD), 是蛋白发生相互作用的位点, 在细胞凋亡信号的传递中具有重要作用^[5-7]。本实验在杂色鲍体内克隆到该家族的一个新成员, 只具有一个CARD功能域; 并分析了该基因在副溶血弧菌、高温、缺氧等条件应激下的表达水平, 旨在为深入了解鲍的发育和应激分子机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验对象

杂色鲍成鲍(壳长4.5~5.0 cm)购自厦门大嶝岛养殖场。运输到集美大学海水场后, 挑取性腺发育良好的个体进行育苗。其他健康个体暂养于20 t水泥池的1.2 m×1.2 m的网箱中, 气泵充

收稿日期: 2017-09-09 修回日期: 2017-10-09

资助项目: 国家自然科学基金(41006105, 41176152, 3170130721); 福建省自然科学基金(2015J01142, 2016J01163); 福建省高校新世纪优秀人才支持计划(B15138); 青岛海洋科学与技术国家实验室开放基金(OF2015NO11)

通信作者: 王国栋, E-mail: gdongwang@163.com; 王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

气保持溶解氧6 mg/L以上, 每天投喂1次新鲜的江蓠(*Gracilaria* sp.)和海带(*Laminaria japonica*)。每2 d换水1/2, 暂养期间水温23~25 °C。2周后, 进行成鲍组织取样, 并开始细菌感染、高温和缺氧应激实验。

1.2 成鲍各组织以及发育各时期样品采集

随机选取10只健康杂色鲍, 解剖后分别采集肝胰腺、血细胞、上足、鳃、肾、黏液腺、消化道和外套膜。所取的组织经液氮速冻后, 保存于-80 °C备用。

亲鲍的催产、人工授精和幼虫培育参照文献[8]。分别收集受精卵、2细胞胚、4细胞胚、桑葚胚、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、面盘期幼虫、匍匐幼虫和变态后稚鲍, 将采集样品液氮速冻后, 保存于-80 °C待用。

1.3 副溶血弧菌细菌感染、高温应激处理和缺氧应激处理

副溶血弧菌感染根据Wang等^[9]和Ge等^[10]的方法进行, 高温应激处理和缺氧应激处理根据黄贻涛等^[11]的方法进行。副溶血弧菌感染组注射50 μL浓度为 1.1×10^8 CFU/mL的副溶血弧菌菌液, 对照组注射50 μL灭菌海水。在注射后0、3、6、12、24和48 h 6个时间点。自25 °C开始, 以1 °C/h升温至31 °C作为高温应激处理。当温度升至28 °C时作为第1时相(0 h), 升至28.5 °C时作为第2时相(0.5 h)取样, 以31 °C的持续高温应激分别将4、24、96和192 h时间点依次作为第3~6时相。恒定25 °C高温应激的对照。缺氧应激实验组的溶解氧量设为2 mg/L, 对照组为空气曝气(溶解氧量约为5.5 mg/L), 在处理之后的4、24、96和192 h取样。每个实验组和对照各取10只杂色鲍的血淋巴, 离心后(2 000 r/min、4 °C、10 min)放入液氮速冻后, 保存于-80 °C待用。

1.4 RNA干扰实验

利用体外转录合成dsRNA。首先, 利用表1中ds-F和ds-R引物扩增*HdCARD*部分序列。该段PCR产物回收后作为模板, 用ds-FT7和ds-R或ds-F和ds-RT7再一次PCR扩增, 在DNA序列一端引入T7启动子序列。该DNA片段回收后作为转录模板, 用T7转录酶进行体外转录合成序列的ssRNA。以另外一端具有T7启动子序列的DNA模

板, 可获得互补序列的ssRNA。2条序列互补的ssRNA变性后, 在室温下形成*HdCARD*的dsRNA。以绿色荧光蛋白载体pEGFP-N1部分序列合成的绿色荧光蛋白的dsRNA。具体合成过程参考Wang等^[12]。

当幼虫孵化上浮, 发育至担轮幼虫后期(25 °C, 约受精后8 h)开始进行RNA干扰实验。用300目筛绢收集担轮幼虫, 用0.2 μm滤膜过滤海水冲洗幼虫, 并将密度调整为100个/mL。将20 mL含有幼虫的过滤海水随机分配到6个50 mL烧杯中。RNA干扰组添加*HdCARD*的dsRNA, 使其终浓度为10 μg/mL。阴性对照组添加EGF的dsRNA, 其终浓度为10 μg/mL。空白对照添加100 μL双蒸水。干扰组、阴性对照组和空白对照组各有5个生物学重复。添加dsRNA 2 h后, 将幼虫转移至3 000 mL烧杯, 用过滤海水将幼虫密度调整为10个/mL。25 °C继续培养8 h, 随机取100个以上幼虫在显微镜下观察, 统计死亡率和畸形率。每个烧杯至少随机取样3次进行死亡率和畸形率统计。然后将每个烧杯中的幼虫收集到2 mL离心管中, 液氮速冻后, 保存于-80 °C待用。

1.5 总RNA提取和cDNA的合成

样品从-80 °C取出后, 取50 mg至1 mL Trizol溶液(Roche公司)中, 按照说明书提取样品总RNA, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后, 用微量紫外分光光度计测定浓度和纯度。

取1.5 μg总RNA分别1 μL oligo (dT) (10 μmol/L)或1 μL 5' CDS primer (10 μmol/L)混合, 按照SMART PCR Synthesis Kit (Clontech公司)的说明合成cDNA。

1.6 *HdCRAD*基因的克隆及序列分析

根据杂色鲍转录组筛选得到的*HdCRAD*片段, 用Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>)设计的RACE引物扩增其全长cDNA。扩增片段测序后用bl2seq拼接, 用BlastX和ORF Finder预测, 并用head to toe PCR验证其开放阅读框的正确性。用EMBOSS (<http://imed.med.ucm.es/EMBOSS/>)的prettyseq程序进行核酸序列和蛋白序列翻译。使用ExPASy (<http://www.expasy.org/>)、NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)

表 1 所用引物及其序列

Tab. 1 Primer sequences used in the experiments

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequences	用途 usage
3-out	TCACTGCCGATGACAAGGAACGA	RACE 扩增
3-inner	GGACAGCAAGAAGACAAAGAGCAGGC	RACE 扩增
UPM	Long: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA ACAACGCAGAGT Short: CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 扩增
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	RACE 扩增
5-CDS	(T) 25VN	逆转录
SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	逆转录
Head	CGACTGAACTCCGCAAACAA	验证 ORF
Toe	TTCACACTCCTTCCGTTCCA	验证 ORF
HdCARD-F	AATGGACGAAAGCTCAATGG	定量 PCR
HdCARD-R	AAACCTACAGACACGTCCCG	定量 PCR
ds-F	ACAGGGTCTGCCGTTGGGAATC	合成 dsRNA
ds-FT7	TAATACGACTCACTATAGGG ACAGGGTCTGCCGTTGGGAATC	合成 dsRNA
ds-R	CTTGCTCTCTTTTGCTTGACTGCG	合成 dsRNA
ds-FT7	TAATACGACTCACTATAGGG CTTGCTCTCTTTTGCTTGACTGCG	合成 dsRNA
ds-c-F	CGACGTAAACGGCCACAAGT	合成 dsRNA
ds-c-FT7	TAATACGACTCACTATAGGG CGACGTAAACGGCCACAAGT	合成 dsRNA
ds-c-R	TTCTTGACAGCTCGTCCATGC	合成 dsRNA
ds-c-FT7	TAATACGACTCACTATAGGG TTCTTGACAGCTCGTCCATGC	合成 dsRNA

NetNGlyc)和TMHMM 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分别预测其编码蛋白等电点及分子量、磷酸化位点、糖基化位点和蛋白跨膜结构域。用NCBI的Blastp和PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>)进行功能域预测和分析。

1.7 实时定量PCR

以SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO公司)的说明进行实时定量PCR。定量引物见表1,模板为oligo (dT) 逆转录合成的cDNA。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为RQ值,发育阶段的内参基因为YB1^[13],组织表达和应激实验的内参基因为 β -actin^[3]。检测扩增产物的熔解曲线和扩增曲线,并测序,以验证扩增特异性。基因的表达水平表示为9个生物学重复的RQ均值(mean±SE)。发育阶段和组织表达用ANOVA进行数据方差分析,用Duncan氏进行多重比较分析;应激处理进行t检验分析,显著性差异表示为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 HdCARD基因全长克隆及序列分析

HdCARD cDNA全长为1 371 bp,包括116 bp的5'非编码区(UTR),360 bp 3'UTR和735 bp的开放阅读框(ORF),编码244个氨基酸。预测编码蛋白的分子量为28.20 ku,等电点为8.46,具有14个磷酸化位点,无糖基化位点,1个CARD功能域(1~91 aa)(图1)。

2.2 HdCARD序列比对

序列比对表明,HdCARD与皱纹盘鲍(*H. discus discus*)的caspase 3样蛋白(caspase 3-like protein)具有较高的保守性,一致性为69%,相似性达到78%。但是与其他物种的caspase家族蛋白相似性较低,其原因是HdCARD缺少执行蛋白水解的功能域CASC(Caspase, interleukin-1 beta converting enzyme)(图1,图2)。该功能域一般在250 aa左右,占据了caspase家族成员序列的大部分。因此,

```

1 GGTAGAATGTTCTGACTGAACTCCGCAACAAGATGGCGGCTGTCGGAACACAATTGTGTA 60
61 ATACGAGTACGTAACACTAGATTGTAACCTCTTACAGGGTCTGCCGTTGGGAATCGACGatgc 120
1 M R 2
121 gaggtccgactggaataagattaaggaaaagctgagcgagcttcacaatgacctggagg 180
3 G S D W N K I K E K L S E L H N D L E A 22
181 cgaaagacctggtcgagcacctgtacgagaaacatgttttcaactgccgatgacaaggaac 240
23 K D L V E H L Y E K H V F T A D D K E R 42
241 gaatcatgcatgaggcaactcgcaagataaagcaattaaactcctagacatacttcgga 300
43 I M H E A T R K D K A I K L L D I L R N 62
301 acaaggagctgccagaaggcagatgtttatgaggtctttctgtcccagctgaggcgacacc 360
63 K E L P E G D V Y E V F L S Q L R R T Q 82
361 agcctcacttggcggacatgttgaaaccaccgggacagcaagaagacaaagagcaggcg
83 P H L A D M L K P P G T A R R Q R A G A 102
421 caacgcagtcaagcaaaggagacaagtgggtcatatccagagcttgacacagaccagc 480
103 T Q S S K G R Q V G H I Q S L D T D Q L 122
481 tttgtgagtttctagccccattgctcaagaacaacaaaatcggtgatgatgttctgaaaa 540
123 C E F L A P L L K N N K I G D D V L K T 142
541 caatcaaacaggagaaagttaatggcgtgtatttctgaaaatggatggaagctcaatga 600
143 I K Q E K V N G R V F L K M D G S S M K 162
601 aggaggtattccctttttgaaatacggagaagaactttgatcttaatggaaggatg 660
163 E V F P F L K Y G E R T L I L M E R D E 182
661 aattcatcgagaagactggattaaaggagacatcgtctccgtagagcatagctgcagg 720
183 F I E K T G L K E D I V S V E H S L Q E 202
721 aagagaatgcaagaaagttaactactaaacagcgtgcacagaaaagtacaagaaagg 780
203 E N M Q E S L T L K Q A A Q K S T R K G 222
781 gaacattcttgaaacctacagacacgtcccggcaacatgatcgaccaaccaccactgt 840
223 T F L K P T D T S R Q H D R P N P P L Y 242
841 atcacacttgaTGGTTTAGATGAGGACTCTGCTCTTGAGACAATTGGATGGGAAACCATG 900
243 H T * 244
901 AAATTTGCCTCATCTGTATGAATGACCGACTAATGGGACGATACACTTTGGCGTCTAT 960
961 GATGGCTCGGATACCAATCACTCACATGGAGAGGTATTGGGCATGACGCTGGAACGGAAG 1020
1021 GAGTGTGAAGACACTATTGCCAAATCAATTCAGAAGTGTTCATTTCAGATCAACAAGAC 1080
1081 GTTGCTTCTGCATGCATTCATCTGCCATATATGTAGACGTTATTGACAACAAGGAAATC 1140
1141 TGTGGCTATGTTCTAGAGATAGATGTTGAACCCCAAGAAGCTCTGTTAAGGCTAAAGCA 1200
1201 TTTTTTATAAAAGATCAATATCAGAAACCACGACAAAAAGGATCAGAACAGCAACTGTTC 1260
1261 AGGTTGAAATCGGGTACCCCTCATGACGAGAGTGCAGATAGTGTTTATCAGTACATGAGT 1320
1321 ACACAGTCAACGCTTGATAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA1371

```

图 1 *HdCARD*基因的碱基序列及推导的氨基酸序列

*为终止子, 起始密码子、终止密码子用粗体表示; 方框表示磷酸化位点, 下划线部分为CARD结构域(1-91 aa)

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *HdCARD* gene from *H. diversicolor*

*is terminator. The stop codon (tga) and polyadenylation signal sequence (AATAAA) are characterized in bold. Potential phosphorylation site is in box. CARD domain (1-91 aa) is underlined

*HdCARD*与该家族成员的相似性较低。而*HdCARD*的CARD功能域与caspase家族成员的CARD功能域具有较好的保守性。例如, 与斑马鱼(*Danio rerio*)和鼠(*Mus musculus*)的caspase-9一致性分别为27%和25%(图2)。

2.3 *HdCARD*基因的组织表达

在所取样组织中均能检测到*HdCARD*基因的表达(图3)。但是在外套膜、肝胰腺和肾中表达量极低, 显著低于其他组织($P < 0.05$)。黏液腺中表达量最高, 显著高于其他组织($P < 0.05$)。在鳃、

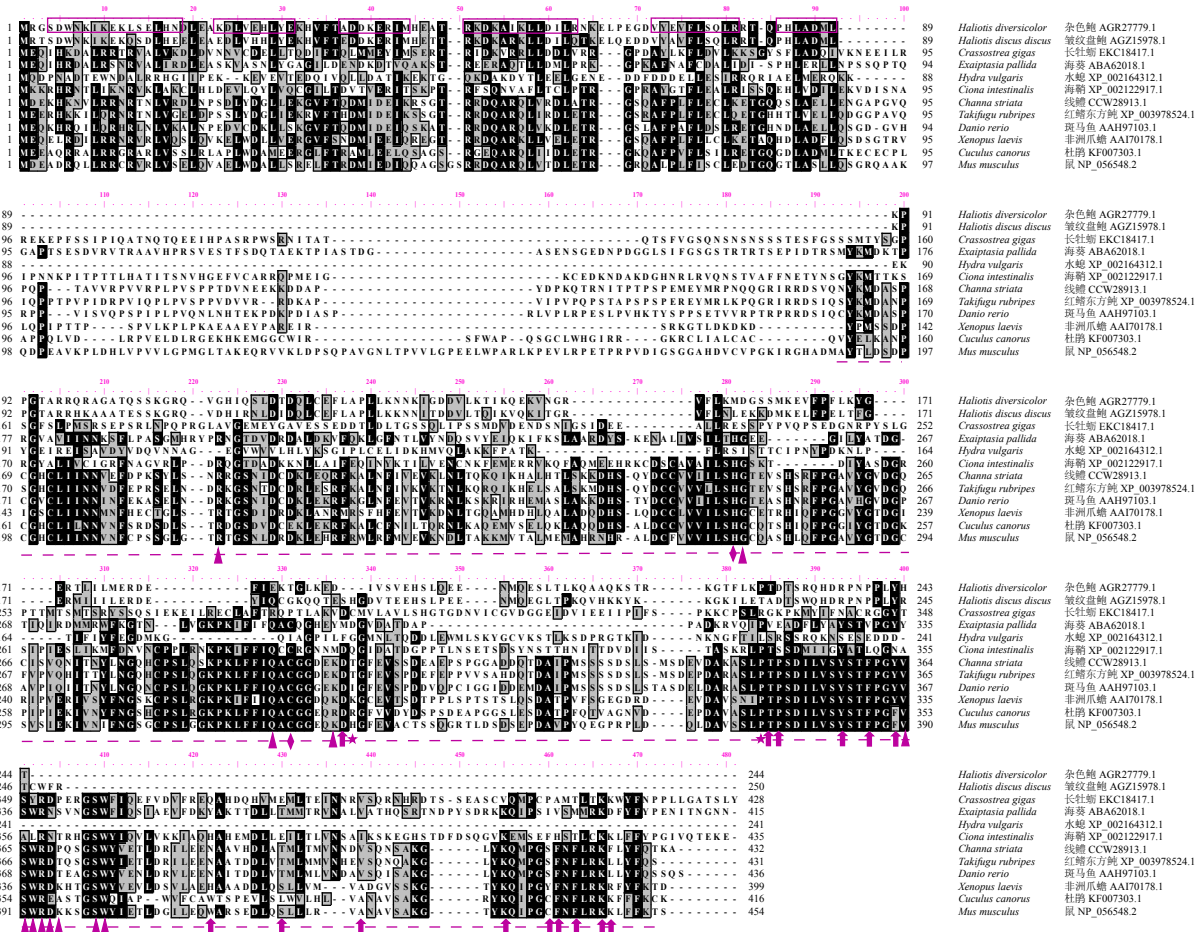


图2 HdCARD和类似蛋白的序列比较分析

长方框表示HdCARD CARD功能域中6个保守的α-螺旋；虚线表示小鼠Caspase-9的CASC功能域，三角形表示CASC的底物结合位点，菱形表示CASC的激活位点，五角星表示蛋白水解位点，箭头表示CASC的二聚体作用位点

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of HdCARD and its homologues

The rectangular boxes mean six α-helices on conserved CRAD domain of HdCARD; the dotted line means CASC domain of *Mus musculus*, triangle means substrate pocket on CASC, diamond means active site on CASC, star means proteolytic cleavage site on CASC, arrow means dimer interface on CASC

消化道和血淋巴中表达没有显著性差异($P>0.05$)。

2.4 HdCARD基因在各发育阶段的表达

自桑葚胚时期开始检测到HdCARD基因的表达(图4)。从原肠胚阶段该基因表达量持续上升,到面盘幼虫中期达到最高。随后又开始下降,变态为稚贝后该基因的表达水平恢复到与桑葚胚相当的水平。除在卵裂阶段不表达外,桑葚胚、囊胚和稚贝阶段的HdCARD基因表达水平最低,显著低于其他发育阶段($P<0.05$)。幼虫阶段该基因的表达量显著高于其他阶段,其中面盘幼虫中期远远高于其他发育阶段($P<0.05$)。

2.5 HdCARD基因在应激处理后的表达

副溶血弧菌注射感染后6和12 h, 实验组血

淋巴HdCARD基因的表达量显著高于对照组($P<0.05$)(图5)。其他取样时相对照组和实验组之间无显著性差异($P>0.05$)。

水温升至31 °C并持续4和24 h时, 高温处理组HdCARD基因的表达量也显著高于对照组($P<0.05$)(图6)。其他取样时相处理组和对照组之间无显著性差异($P>0.05$)。

缺氧处理192 h后, 缺氧组HdCARD基因的表达量显著上升($P<0.05$), 其他取样时相HdDAD1的表达量无显著性变化($P>0.05$)(图7)。

2.6 HdCARD浸泡对幼虫发育和其他基因的影响

用HdCARD的dsRNA浸泡担轮幼虫能够显著

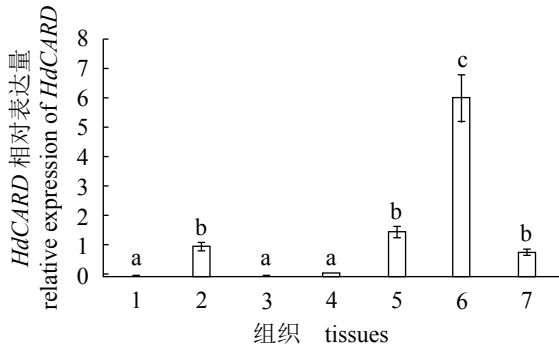


图 3 HdCARD基因各组织相对表达量

1. 肝胰腺; 2. 鳃; 3. 外套膜; 4. 肾; 5. 消化道; 6. 黏液腺; 7. 血淋巴。不同字母表示有显著差异($P<0.05$), 下同

Fig. 3 The expression level of HdCARD in different tissues

1. hepatopancreas; 2. gill; 3. mantle; 4. kidney; 5. digestive tract; 6. mucous gland; 7. hemolymph. Different letters mean significant difference ($P<0.05$), the same below

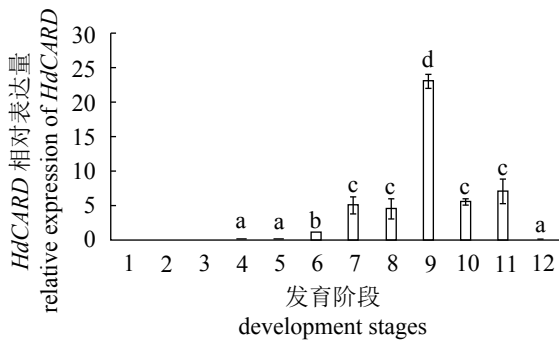


图 4 HdCARD基因在各发育阶段的表达量

1. 受精卵; 2. 2细胞; 3. 4细胞; 4. 桑葚胚; 5. 囊胚; 6. 原肠胚; 7. 担轮幼虫; 8. 早期面盘幼虫; 9. 中期面盘幼虫; 10. 后期面盘幼虫; 11. 匍匐幼虫; 12. 稚鲍

Fig. 4 The expression level of HdCARD in different developmental stages

1. fertilized egg; 2. 2 cleavages; 3. 4 cleavages; 4. morula; 5. blastula; 6. gastrula; 7. trochophore; 8. early veliger; 9. mid veliger; 10. late veliger; 11. creeping larva; 12. juvenile abalone

降低HdCARD的表达水平($P<0.05$)(图8)。与细胞凋亡相关的几个基因, 如HdCASP3、HdCASP8和HdDAD1, 其表达水平也发生显著变化($P<0.05$)。但HdAP1的表达水平与对照组没有显著性差异($P>0.05$)。

HdCARD的dsRNA浸泡能够影响幼虫的发育, 面盘幼虫的畸形率显著高于空白对照和阴性对照($P<0.05$), 但幼虫死亡率没有显著差异($P>0.05$)(图9)。

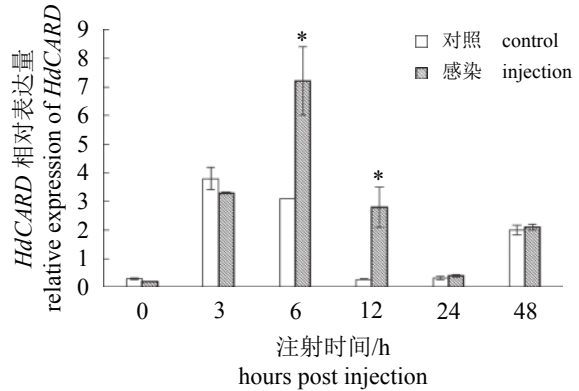


图 5 HdCARD基因在副溶血弧菌感染后表达变化

*表示对照组和弧菌感染组存在显著性差异($P<0.05$), 下同

Fig. 5 The expression of HdCARD after V. parahaemolyticus challenge

* means there is a significant difference between control group and V. parahaemolyticus challenge group ($P<0.05$), the same below

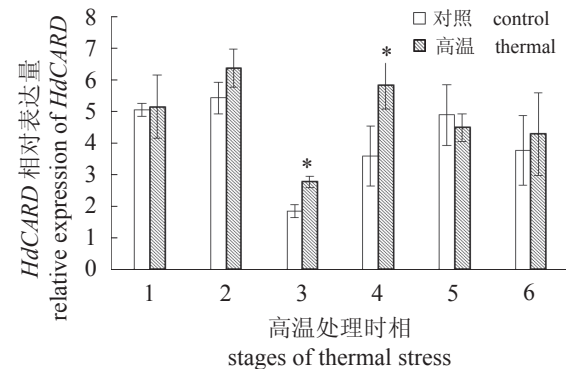


图 6 HdCARD基因在高温应激后表达变化

Fig. 6 The expression of HdCARD after thermal stress

1. 28 °C; 2. 28 °C (0.5 h); 3. 31 °C (4 h); 4. 31 °C (24 h); 5. 31 °C (96 h); 6. 31 °C (192 h)

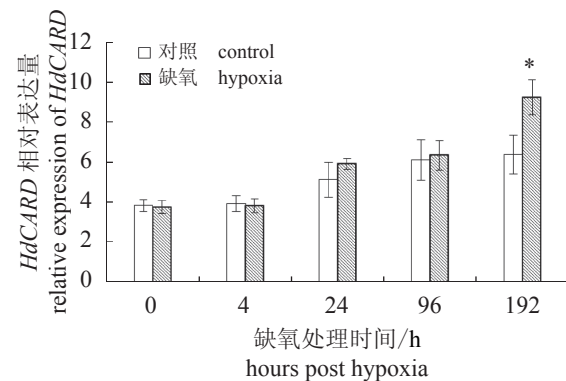


图 7 缺氧处理后HdCARD的表达变化

Fig. 7 The expression of HdCRAD after hypoxia stress

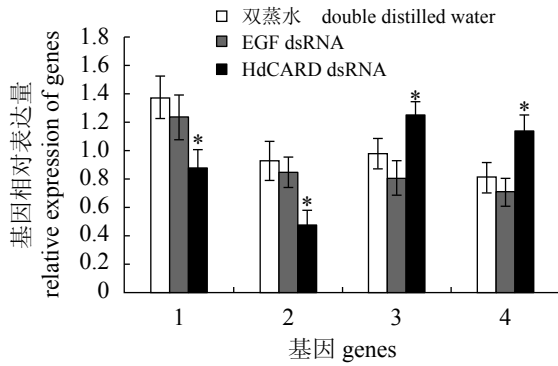


图8 HdCARD dsRNA浸泡对HdCARD及相关基因表达量的影响

Fig. 8 The effect of HdCRAD dsRNA exposure on expression of HdCRAD and its relative genes

1. HdCARD, 2. HdCASP3, 3. HdCASP8, 4. HdDAD1

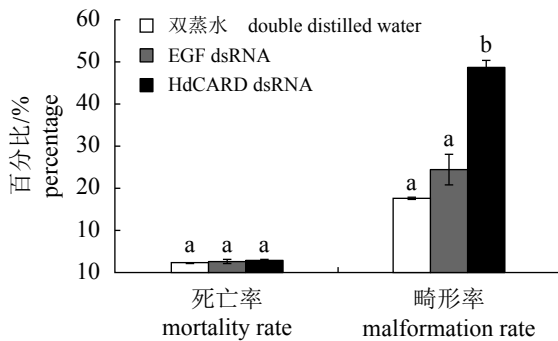


图9 HdCARD dsRNA浸泡对担轮幼虫死亡率和畸形率的影响

Fig. 9 The effect of HdCRAD exposure on mortality and malformation rate of veliger

3 讨论

实验获得了杂色鲍HdCARD的cDNA全长，编码244个氨基酸，具有1个保守的CARD功能域(1~90 aa)。该功能域具有激活和募集Caspase家族成员的作用。但是生物信息学分析没有发现HdCARD第90位氨基酸残基以后的部分具有任何功能域。这一部分序列仅局部可以与caspase进行对比，而且缺少CASC功能域的底物结合保守氨基酸残基、二聚体相互作用位点、CASC功能域激活位点和蛋白水解位点等重要的功能位点^[4]。所以HdCARD不具有Caspase家族成员直接水解蛋白的能力，其功能主要体现在CARD功能域。该功能域与PYD功能域(pyrin domain)、DD功能域(death domain)和DED功能域(death effector domain)共同组成了死亡功能域超家族(death domain su-

perfamily)。该家族所有成员都具有6或7个反向平行的 α -螺旋组成的二级结构^[14]，可以通过死亡功能域发生相互作用，形成各种聚合体，从而允许免疫和死亡受体募集细胞内各种接头分子和效应分子，组配成巨大的蛋白复合体，例如凋亡体^[5]、死亡诱导信号复合体^[6]、炎性体^[7]等。这些复合体能激活Caspase和NF- κ B^[15]。因此，HdCARD很有可能作为一种接头分子，与其他蛋白发生相互作用^[16]，从而发挥其生物学作用。

HdCARD在所检测的组织均可表达，但是各组织的表达水平并不相同，这与Caspase家族成员的组织表达模式类似^[17-19]。HdCARD表达量最高的组织是黏液腺，在鳃、消化道和血液中的表达量也处于较高水平。黏液腺、鳃和消化道具有较高的应激水平，发生细胞凋亡的风险较高^[8]。这可能是HdCARD在也几个组织高表达的原因之一。Caspase家族的成员通常在鳃、消化道等组织中高表达^[17, 19-20]，这与HdCARD的组织表达模式类似。这暗示HdCARD在细胞凋亡过程中发挥了一定作用。贝类的血淋巴具有重要的免疫功能^[21]，鲍很多免疫基因在血淋巴中表达量较高^[3, 9-10]。血淋巴中HdCARD的高水平表达暗示其可能参与了免疫反应，这与具有CARD功能域的接头分子参与免疫反应相符合^[22]。

细胞凋亡是胚胎发育和正常组织稳态所必需的细胞学过程^[23]。Caspase家族成员是细胞凋亡的核心分子^[4]，在发育过程中扮演了重要角色^[24]。HdCARD可以影响Caspase的活性来参与发育过程。鲍幼虫细胞分化频繁而广泛，很多成体的组织器官会在面盘幼虫阶段提前发育^[25]。此时HdCARD的表达水平显著提高。这提示其在鲍幼虫发育具有一定作用。通过dsRNA降低幼虫HdCARD的表达，会显著影响抗细胞凋亡因子(DAD1)基因、Caspase-8和Caspase-3的表达。DAD1和HdCARD都是细胞凋亡的抑制因子^[8]。DAD1的表达量在干扰HdCARD后上调表达，可能是HdCARD抑制凋亡作用的一种补偿。HdCARD表达降低后，Caspase-8表达量升高。这提示HdCARD是Caspase-8的抑制因子。作为细胞凋亡的启动分子，Caspase-8主要参与凋亡信号的激活和传递^[26]。HdCARD能够抑制其活性，是其CARD功能域作用的证据之一。位于凋亡信号末端的效应分子Caspase-3则直接参与细胞凋亡，其激活可以收到多个分子的调控^[26]。可能存在其他

补偿途径^[26]使得Caspase-3的表达水平不但没有上升, 反而下降。Caspase-3表达水平的异常可能是鲍幼虫畸形率上升的直接原因。HdCARD在发育过程的表达谱和其RNA干扰实验, 可能暗示其在幼虫组织的形成、分化和退化中具有重要作用。例如, 果蝇(*Drosophila melanogaster*)的*dronic*基因只含有CARD功能域, 人工突变该基因后大部分幼虫发育到蛹时死亡, 但少量存活个体变态后其复眼和翅膀透明程度会大大下降^[27]。

贝类的Caspase成员在免疫过程中具有重要作用^[19, 26]。此外, 其他具有CARD功能域的分子都可以与其他蛋白形成复合体进而调节诱导免疫和炎症的信号^[22, 28-29]。例如, 凋亡斑点样蛋白(apoptosis speck-like protein, ASC)可以与caspase-1 CARD相互作用, 在炎性体的组装中发挥了核心作用^[30]。这与HdCARD可以响应副溶血弧菌感染的结果一致。在杂色鲍中, 参与免疫信号传递的分子一般在感染3 h时开始差异表达^[10, 31], 而免疫效应分子则要在12 h后才开始差异表达^[32-33]。HdCARD差异表达的时相分别为6和12 h, 位于二者之间, 表明其可能参与了免疫信号的调节。这可能是该基因的CARD功能域功能又一证据。CARD功能域可以负调控免疫信号及其传递^[15]。HdCARD在6和12 h上调表达可能是适当控制免疫信号的强度, 避免对机体造成过多伤害。灵长类的CARD功能域可以抑制炎症相关的Caspase-1的激活来参与免疫反应^[15, 34]。CARD8则抑制NF- κ B的激活对免疫信号进行调节^[35-36]。在水生动物中, 关于CARD功能域免疫作用的报道很少。褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)头肾的ASC基因在迟钝爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)感染4 h后上调表达^[37], 与杂色鲍HdCARD基因的表达模式类似。这可能也同时提示CARD功能域可参与免疫信号的调节。此外, DAD1是通过影响蛋白的糖基化发挥其抗凋亡的作用^[8, 38]。该过程发生在凋亡效应分子发挥作用之后。相应地, 感染副溶血弧菌后杂色鲍DAD1基因在12 h显著上升, 这与本实验的结果也相符。最近的研究表明, CARD可以直接作为细菌的感受器, 从而直接启动炎症Caspase^[39-43]。这个过程同样也发生在免疫信号的调节阶段。在细菌注射后同样会在较早时相体现。这也可以作为杂色鲍HdCARD的注射细菌后表达模式的一种解释。

大部分贝类运动能力有限, 常遭受高温应

激或缺氧应激。这时Caspase常上调表达^[18, 44]。而且, 高温或缺氧会导致杂色鲍血淋巴细胞数量(THC)显著下降^[1-2, 45], 表明血淋巴细胞发生了死亡或凋亡^[46]。为了应对这种情况, 如长牡蛎(*Crassostrea gigas*)等种类在基因组中往往具有众多凋亡蛋白抑制基因(IAP)的拷贝^[47]。在高温应激时, 牡蛎的IAP基因显著上升^[47], 在抗细胞凋亡过程中发挥了非常重要的作用^[48]。HdCARD在杂色鲍受到高温应激或缺氧应激时显著上调表达可能同样发挥了抗凋亡的作用。类似的, 杂色鲍的DAD1基因也在高温应激时上调表达。杂色鲍的这2种基因可能与牡蛎IAP的上调表达具有相同的作用, 可以将高温应激时Caspase的上调控制在适当程度, 防止对机体造成损伤^[49]。鲍的生理活动具有明显的昼夜节律, 其代谢率变化接近2倍^[50]。光照可能是其昼夜节律产生的主要因素。在育苗生产中, 通过控制光照可以将鲍产卵时间由夜间调整为白昼, 以方便生产和实验。在弧菌感染和温度应激试验中, 采用自然光线。鲍具有正常的昼夜节律, 这可能是对照组基因表达水平波动的原因。为了避免昼夜节律对基因表达的影响, 实验每个取样时间点都设置了对照, 缺氧应激的试验组因需控制溶解氧水平, 放在密闭的容器中, 光照强度一直较弱。为了消除光线的差异, 对照组采用同样的光照强度, 这可能是缺氧应激对照组基因表达相对稳定的原因。

参考文献:

- [1] 陈政强, 陈昌生, 战文斌. 低氧胁迫对九孔鲍免疫防御因子的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(11): 1739-1747.
Chen Z Q, Chen C S, Zhan W B. Effect of hypoxia on the immune response of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to pathogen *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11): 1739-1747(in Chinese).
- [2] Cheng W, Hsiao I S, Hsu C H, et al. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(3): 235-243.
- [3] Li N, Zhang Z P, Zhang L L, et al. Insulin-like growth factor binding protein 7, a member of insulin-like growth factor signal pathway, involved in immune response of

- small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 229-242.
- [4] Cohen G M. Caspases: the executioners of apoptosis[J]. The Biochemical Journal, 1997, 326(Pt 1): 1-16.
- [5] Riedl S J, Salvesen G S. The apoptosome: signalling platform of cell death[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(5): 405-413.
- [6] Lavrik I N, Krammer P H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC[J]. Cell Death and Differentiation, 2012, 19(1): 36-41.
- [7] Lamkanfi M, Dixit V M. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. Cell, 2014, 157(5): 1013-1022.
- [8] 王国栋, 和四梅, 张丽莉, 等. 杂色鲍*DAD1*的克隆及在发育、弧菌感染、高温和缺氧下的表达分析[J]. 水产学报, 2016, 40(7): 101-108.
- Wang G D, He S M, Zhang L L, *et al.* Molecular cloning and expression of defender against cell death1 from *Haliotis diversicolor* in development, *Vibrio* infection, thermal stress and hypoxia stress[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(7): 101-108(in Chinese).
- [9] Wang G D, Zhang Z P, Lin S, *et al.* A homologue of dermatopontin from *Haliotis diversicolor* and its response to pathogenic infection[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(7): 1537-1549.
- [10] Ge H, Wang G D, Zhang L L, *et al.* Molecular cloning and expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4, an important mediator of Toll-like receptor signal pathway, from small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4-5): 1138-1146.
- [11] 黄贻涛, 蔡秀红, 张子平, 等. 杂色鲍同种移植炎症因子1的克隆及其在应激下的表达[J]. 水产学报, 2013, 37(6): 830-839.
- Huang Y T, Cai X H, Zhang Z P, *et al.* Molecular cloning and expression of allograft inflammatory factor 1 in *Haliotis diversicolor* under stresses[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 830-839(in Chinese).
- [12] Wang G D, Li N, Zhang L L, *et al.* IGFBP7 is involved in abalone metamorphosis[J]. Aquaculture, 2016, 451: 377-384.
- [13] Chen J, Chen Z S, Huang Z X, *et al.* Stable expression of Y-box protein 1 gene in early development of the abalone *Haliotis diversicolor*[J]. The International Journal of Developmental Biology, 2012, 56(5): 369-375.
- [14] Park H H, Lo Y C, Lin S C, *et al.* The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation[J]. Annual Review of Immunology, 2007, 25: 561-586.
- [15] Matusiak M, Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. CARD - and pyrin-only proteins regulating inflammasome activation and immunity[J]. Immunological Reviews, 2015, 265(1): 217-230.
- [16] Hong G S, Jung Y K. Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF- κ B signals[J]. BMB Reports, 2002, 35(1): 19-23.
- [17] Lee Y, De Zoysa M, Whang I, *et al.* Molluscan death effector domain (DED)-containing caspase-8 gene from disk abalone (*Haliotis discus discus*): molecular characterization and expression analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 480-487.
- [18] Zhang D, Wang H W, Yao C L. Molecular and acute temperature stress response characterizations of caspase-8 gene in two mussels, *Mytilus coruscus* and *Mytilus galloprovincialis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 177-178: 10-20.
- [19] Huang W B, Ren H L, Gopalakrishnan S, *et al.* First molecular cloning of a molluscan caspase from variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) and gene expression analysis with bacterial challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(4): 587-595.
- [20] Chávez-Mardones J, Gallardo-Escárate C. Immune response of apoptosis-related cysteine peptidases from the red abalone *Haliotis rufescens* (*HrCas8* and *HrCas3*): molecular characterization and transcription expression[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(1): 90-98.
- [21] Terahara K, Takahashi K G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs[J]. Current Pharmaceutical Design, 2008, 14(2): 131-137.
- [22] Qiao H, Liu Y, Veach R A, *et al.* The adaptor CRADD/RAIDD controls activation of endothelial cells by proinflammatory stimuli[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(32): 21973-21983.
- [23] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004, 116(2): 205-219.
- [24] Nakajima Y I, Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development[J]. Cell Death and Dif-

- ferentiation, 2017, 24(8): 1422-1430.
- [25] 王国栋, 张丽莉, 王艺磊. 鲍幼虫变态分子机制的研究进展[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2012, 17(2): 101-108.
- Wang G D, Zhang L L, Wang Y L. Progress research on the molecular mechanism of abalone larvae metamorphosis[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2012, 17(2): 101-108(in Chinese).
- [26] Romero A, Novoa B, Figueras A. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: an update[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(1): 79-87.
- [27] Xu D B, Li Y, Arcaro M, *et al.* The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*[J]. Development, 2005, 132(9): 2125-2134.
- [28] Gross O, Gewies A, Finger K, *et al.* Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity[J]. Nature, 2006, 442(7103): 651-656.
- [29] DUEWELL P, STEGER A, LOHR H, *et al.* RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8⁺ T cells[J]. Cell Death and Differentiation, 2014, 21(12): 1825-1837.
- [30] Proell M, Gerlic M, Mace P D, *et al.* The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling[J]. Biochemical Journal, 2013, 449(3): 613-621.
- [31] Ge H, Wang G D, Zhang L L, *et al.* Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1 gene in small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Gene, 2012, 506(2): 417-422.
- [32] Wang G D, Zhang K F, Zhang Z P, *et al.* Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(3): 346-359.
- [33] Wang B Z, Zhang Z P, Wang Y L, *et al.* Molecular cloning and characterization of macrophage migration inhibitory factor from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(1): 57-64.
- [34] Eltoms S, Belvisi M G, Stevenson C S, *et al.* Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD[J]. PLoS ONE, 2014, 9(11): e112829.
- [35] Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, *et al.* CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF- κ B activation pathways[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(47): 44069-44077.
- [36] Razmara M, Srinivasula S M, Wang L, *et al.* CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(16): 13952-13958.
- [37] Li S, Chen X L, Peng W J, *et al.* Cloning and characterization of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC) gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 294-301.
- [38] Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A, *et al.* Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 1993, 13(10): 6367-6374.
- [39] Kayagaki N, Wong M T, Stowe I B, *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4[J]. Science, 2013, 341(6151): 1246-1249.
- [40] Hagar J A, Powell D A, Aachoui Y, *et al.* Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock[J]. Science, 2013, 341(6151): 1250-1253.
- [41] Pilla D M, Hagar J A, Haldar A K, *et al.* Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(16): 6046-6051.
- [42] Shi J J, Zhao Y, Wang Y P, *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS[J]. Nature, 2014, 514(7521): 187-192.
- [43] Hagar J A, Aachoui Y, Miao E A. WildCARDS: inflammatory caspases directly detect LPS[J]. Cell Research, 2015, 25(2): 149-150.
- [44] Romero A, Estévez-Calva N, Dios S, *et al.* New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*[J]. PLoS ONE, 2011, 6(2): e17003.
- [45] Cheng W, Li C H, Chen J C. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta*.

- texta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture, 2004, 232(1-4): 103-115.
- [46] Wang Y J, Hu M H, Cheung S G, *et al.* Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity[J]. Aquaculture, 2012, 356(356-357): 22-29.
- [47] Zhu Q H, Zhang L L, Li L, *et al.* Expression characterization of stress genes under high and low temperature stresses in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Marine Biotechnology, 2016, 18(2): 176-188.
- [48] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. Nature, 2012, 490(7418): 49-54.
- [49] Mittapalli O, Shukle R H. Molecular characterization and responsive expression of a defender against apoptotic cell death homologue from the Hessian fly, *Mayetiola destructor*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 149(3): 517-523.
- [50] Chacon O, Viana MT, Farias A, *et al.* Circadian metabolic rate and short-term response of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi) to three anesthetics[J]. Journal of Shellfish Research, 2003, 22(1): 415-422.

Molecular cloning and expression of a coding CARD gene from *Haliotis diversicolor* in development and under stresses

ZHANG Lili, HE Simei, WANG Guodong*, WANG Yilei*

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to analyze the role of Caspase recruitment domain (CARD) of abalone in development and under stress, the full length cDNA of a coding CARD gene was cloned by RACE according to its partial sequence in transcriptome of *Haliotis diversicolor*. Its expression profile of development and stress was obtained by real time quantitative PCR. The cDNA sequence was named *HdCARD* and was 1371 bp, with a 735 bp open reading frame encoding a protein of 244 aa (HdCARD) and containing a conserved CARD domain. Quantitative real-time PCR results indicated that *HdCARD* could be detected in all examined tissues, with the highest expression level in mucus gland. There was also expression of *HdCARD* in different developmental stages, with highest expression level during late veliger stage. There was a significant difference of *HdCARD* in hemocytes after a bacterial challenge/thermal/hypoxia stress. The RNAi of *HdCARD* could increase larval malformation rate in trochophore stage. Moreover, larval *caspase-8* and *DAD1* significantly rose, but larval *caspase-3* significantly reduced. The results suggested that *HdCARD* might play a role in larval development, immunity, and under thermal stress and hypoxia stress.

Key words: *Haliotis diversicolor*; Caspase recruitment domain (CARD); gene expression; development; stress; RNAi

Corresponding author: WANG Guodong. E-mail:gdongwang@163.com;

WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41006105, 41176152, 3170130721); Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J01142, 2016J01163); Program for New Century Excellent Talents in Fujian Province University (B15138); Open Fund of Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, China (OF2015NO11)