

## 红螯光壳螯虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及 维生素 C 对其表达的影响

吴东蕾, 左 迪, 黄有辉, 马长安, 赵云龙\*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要:** 为深入了解红螯光壳螯虾组织蛋白酶 L 基因的表达特性及维生素 C 对其表达的影响, 实验利用 RACE-PCR 技术及荧光定量 PCR 技术, 从红螯光壳螯虾肝胰腺中克隆得到组织蛋白酶 L 基因 cDNA 全长序列, 命名为 *CqCatL* (GenBank 登录号: KJ913663), 同时检测了该基因在红螯光壳螯虾各个组织及添加了不同浓度维生素 C 的组别中的表达。结果显示, 该基因全长 1 810 bp, 开放阅读框长度为 1 026 bp, 编码 341 个氨基酸残基, 预测的分子量和等电点 (pI) 分别为 37.63 ku 和 5.17。同源性分析结果显示, 该基因编码的蛋白与其他虾蟹类有较高的相似性, 说明组织蛋白酶 L 基因在甲壳动物具有较高的保守性。组织荧光定量 PCR 结果显示, *CqCatL* 基因在红螯光壳螯虾的多个组织中均有表达, 其中肝胰腺中表达量最高, 其次为血细胞, 在肠及触角腺中也有一定量的表达。在基础饲料中添加不同水平的维生素 C 后, *CqCatL* 基因的表达量也存在明显差异, 其中维生素 C 添加量为 400 mg/kg 的组别中该基因的表达量最高。研究表明, 组织蛋白酶 L 基因在红螯光壳螯虾的生长发育过程中有重要的作用, 且其表达量受维生素 C 的影响。

**关键词:** 红螯光壳螯虾; 维生素 C; 组织蛋白酶 L 基因; 克隆; 组织表达分析

**中图分类号:** Q 786; S 963

**文献标志码:** A

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*), 俗称红螯螯虾, 原产地澳大利亚, 隶属甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、拟螯虾科 (Parastacidae)、光壳虾属, 该虾具个体大, 生长快, 适应性强等养殖优势, 是世界上较名贵的淡水经济虾之一<sup>[1]</sup>。我国于 1992 年引进试养, 并对其形态结构、胚胎发育、人工养殖技术、营养饲料等方面进行相关研究<sup>[2-4]</sup>, 但其分子生物学方面的研究还很少。

组织蛋白酶 L (CatL) 隶属于溶酶体木瓜蛋白酶家族半胱氨酸蛋白酶, 位于溶酶体内, 因其在蛋白质的水解过程中起重要作用而被广泛研究<sup>[5]</sup>。在人和哺乳动物中, 组织蛋白酶参与抗原呈递、组织再生、肿瘤入侵和转移、骨质吸收及细胞凋亡等重要生命活动<sup>[6-8]</sup>。组织蛋白酶

L 在虾蟹类的中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、脊尾白对虾 (*Exopalaemon carinicauda*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 等中, 与食物消化、免疫应答、卵黄的发生等有着一定的联系<sup>[9-12]</sup>。组织蛋白酶 L 在其成熟肽前面有一段前导肽, 主要起着抑制蛋白酶活性和帮助蛋白酶形成正确折叠的作用<sup>[13-14]</sup>, 但其作用机制尚不清楚, 组织蛋白酶 L 基因在红螯光壳螯虾中则无报道。维生素 C 是鱼类和甲壳动物必需的营养成分, 大部分水生动物因缺乏合成维生素 C 的能力或自身合成的维生素 C 不能满足其生长的需要而必须从体外获得, 过量或不足都会影响其生长发育、蜕皮和存活<sup>[15]</sup>。有研究表明, 维生素 C 能促进鱼类的消化能力<sup>[16]</sup>, 而适量的维生素 C 能促

收稿日期: 2014-06-27 修回日期: 2014-07-21

资助项目: 国家自然科学基金(31172043); 上海市科学技术委员会研究项目(12391900700)

通信作者: 赵云龙, E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn

进幼建鲤 (*Cyprinus carpi* var. *jian*) 中胰蛋白酶等消化酶的活性<sup>[17]</sup>。而组织蛋白酶 L 作为一种消化相关的酶,其活性也有可能受到维生素 C 的影响,但关于维生素 C 对组织蛋白酶 L 影响的研究目前尚未见报道。本实验主要应用 RACE-PCR 技术克隆了组织蛋白酶 L 基因的全长 cDNA 序列,并检测了其在红螯光壳螯虾各个组织的表达及不同维生素 C 添加量的实验虾中的表达,以期为进一步研究该基因的重组表达和基因调控等奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**实验动物** 实验用红螯光壳螯虾取自上海市金山区漕泾特种水产养殖场,挑选健康活力强的个体暂养于实验室塑料水族箱内,饲养温度 ( $25 \pm 1$ ) °C, 24 h 连续充气。实验前暂养 7 d, 每天投喂商品饲料 1 次。待其适应后挑选个体均匀、健康的虾正式开始实验, 虾初始体质量 ( $20.01 \pm 0.29$ ) g, 每个养殖缸 (长 × 宽 × 高 = 1 m × 0.5 m × 0.5 m) 放养 6 只, 共 7 个处理组, 基础饲料中分别添加 0、100、200、400、800、1 600、3 200 mg/kg 的维生素 C, 每个处理组 3 个重复, 实验周期 56 d, 取其各组织于 -80 °C 保存备用, 用于检测维生素 C 对组织蛋白酶 L 基因表达的影响。

**主要试剂** RNA 快速提取试剂盒 (原平皓天津生物技术有限公司); 反转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit (TaKaRa); PCR 扩增试剂盒 Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Hot Start Version (TaKaRa); 荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa); Race 反转录试剂盒 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech); DL2000Marker (TaKaRa)。

### 1.2 引物设计

根据 GenBank 中已知虾蟹类的 *CatL* 基因序列和对应的蛋白质序列, 通过 ClustalX 比对, 在 *CatL* 基因的保守区域设计了简并引物 CF1 和 CR1 (表 1) 用于扩增红螯光壳螯虾 *CatL* 基因片段。根据已知 *CatL* 片段设计 RACE 特异性引物 C5' 和 C3' (表 1), 得到该基因的全长 cDNA 序列, 然后根据得到的全长序列, 设计全长验证引物

CF2、CR2 和荧光定量引物 CQF 和 CQR。

表 1 本研究所用的引物序列  
Tab. 1 Oligonucleotide primers used in the study

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence
CF1	GTBACHSMHRTMAAGGAYCAG
CR1	CTTBAYVAKCCAGTASTC
C5'	GGGTATGCTCCTTCGGTGTCAATTCC
C3'	ATTCTGTGAGGGAAGTGAAGGGGCTT
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCA GAGT CTAATACGACTCACTATAGGGC
CF2	AGAAAGGTTGGGTACGCTCG
CR2	CAACTGCACATACTGCTTGCT
CQF	CGTCCTCTGGTGCATCACTT
CQR	GCTGCCAAGACCCTCATCTT
18s F	CATGCCCGTTCTTAGTTGGT
18s R	GTGCGGCCAGAAATATAAA

### 1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

取红螯光壳螯虾肝胰腺, 采用组织 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA。分别用紫外分光光度法 ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) 和琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的纯度和质量, 取 1 μL 肝胰腺总 RNA, 用 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit (TaKaRa) 反转录成第一链 cDNA, 所有操作严格按试剂盒说明书步骤完成。转录好的 cDNA 放入 -20 °C 保存。

### 1.4 *CatL* 基因 cDNA 的克隆

根据已知物种的 *CatL* 基因的氨基酸序列, 通过 ClustalX 进行同源性比对后, 根据相对保守的氨基酸位点设计简并引物。用 Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Hot Start Version (TaKaRa) 试剂盒进行 PCR 扩增, 扩增出条带后送生物公司进行测序。该序列经 Blast 比对后, 确定是红螯光壳螯虾的 *CatL* 基因。根据获得的 *CqCatL* cDNA 片段设计 5'-RACE 和 3'-RACE 引物 (表 1), 用于 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增。采用 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 合成红螯光壳螯虾 5' 和 3'-RACE-Ready cDNA 模板, 用于克隆目标基因的 cDNA 全长, 具体步骤见试剂盒说明书。拼接获得全长序列后, 通过全长验证引物克隆测序对全长序列进行验证。

### 1.5 *CatL* 基因 cDNA 序列分析

应用 BlastX 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行核酸和蛋白序列的同源性查找和比较; ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 进行开放阅读框分析并预测氨基酸序列; ExPASy-Compute 软件 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi)) 预测蛋白质的理论等电点 pI 和分子量; SignalP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析信号肽; ExPASy-PROSITE 网站 (<http://prosite.expasy.org/>) 预测氨基酸功能域; 运用 ClustalX 软件进行序列的多重比对; 用 Mega 4.0 软件中的 NJ 法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树。

### 1.6 *CatL* 基因的表达量分析

红螯光壳螯虾各组织总 RNA 的提取, 采用组织 RNA 快速提取试剂盒完成, 以上样本均为 3 个, 具体操作步骤严格按说明书进行。分别用紫外分光光度法 (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) 和琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的纯度和质量。用 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit (TaKaRa) 分别将 450 ng 各组织总 RNA 转录成第一链 cDNA, 用于荧光定量 PCR 的反应。根据已克隆出的 *CqCatL* cDNA 序列设计 1 对 120 bp 的 qRT-PCR 的基因特异性引物 (表 1), 以红螯光壳螯虾 18S rRNA (AF235966) 作为内参基因, 设计的内参引物 176 bp (表 1)。在 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, 美国) 仪器上采用荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa) 的操作步骤进行实时荧光定量 PCR 反应。反应体系如下: 2 × SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL, cDNA 模板 (450 ng RNA) 1.0 μL, PCR Forward Primer (20 μmol/L) 0.5 μL, PCR Reverse Prime (20 μmol/L) 0.5 μL, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。将上述反应体系轻轻混匀, 稍离心, 放入实时荧光定量 PCR 仪中, 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 30 s, 40 个循环, 每个样品设 3 次重复。反应结束后确定 PCR 扩增曲线和溶解曲线。

红螯光壳螯虾 *CatL* 基因表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 (Livak 和 Schmittgen, 2001)。 $\Delta C_t$  定义为内参 (18S rRNA)  $C_t$  值与目的基因 (*CqCatL*)  $C_t$  值的差值, 数据采集和处理在

CFX Manager™ 软件 (Version 1.0) 上进行。实验结果用 mean ± SE 表示。应用 Statistica 8.0 (Statsoft, 塔尔萨, 美国) 软件包对数据进行单因子方差分析 (One-Way ANOVA), 差异显著再进行 Duncan 多重比较,  $P < 0.05$  为显著,  $P < 0.01$  为极显著。

## 2 结果

### 2.1 *CatL* 基因 cDNA 克隆及序列分析

以红螯光壳螯虾肝胰腺 cDNA 为模板, 用简并引物进行 PCR 扩增, 获得 519 bp 的 *CqCatL* 基因 cDNA 片段序列, 经 Blast 同源比对分析, 发现所得序列确为 *CatL* 基因同源序列。以该序列设计 5' 和 3' RACE 引物分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE PCR 扩增, 5' 和 3' 序列拼接后得到全长 1 810 bp 的红螯光壳螯虾 *CatL* cDNA 序列 (GenBank 登录号: KJ913663), 开放阅读框 (ORF) 1026 bp, 编码 341 个氨基酸残基, 5' 和 3' UTRs (非编码区域) 分别为 139 bp 和 645 bp。3' 端含有多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 PolyA 尾, 确定为完整的全长结构 (图 1)。预测的 *CqCatL* 蛋白的分子量和等电点 (pI) 分别为 37.63 ku 和 5.17。

结构域分析表明, 其 N 端含有 18 个氨基酸组成的信号肽, 成熟肽位于第 19 ~ 341 个氨基酸之间, 含有一个 N 糖基化位点, 3 ~ 25 位置处有一个跨膜螺旋区, 29 ~ 89 位置有一个组织蛋白酶前肽抑制剂域, 124 ~ 340 位置为木瓜蛋白酶家族半胱氨酸蛋白酶酶的活动域, 还发现了 ERFNIN、GNFD 和 GCXGG 等 3 个组织蛋白酶 L 特有的结构, 与其他虾蟹类相似 (图 2)。

### 2.2 *CatL* 基因序列同源性分析

利用 Blast 对红螯光壳螯虾 *CatL* (*CqCatL*) 基因进行同源性分析, 发现 *CqCatL* 基因与斑节对虾及日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 同源性最高, 分别为 79% 和 74%, 与其他虾蟹类如中华绒螯蟹、刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*)、阿拉斯加帝王蟹 (*Paralithodes camtschaticus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和脊尾白对虾等的同源性分别为 59%、59%、58%、58% 和 46%, 与其他无脊椎动物如埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、棉蚜 (*Aphis gossypii*) 的同源性分别为 69% 和 65%。利用 Mega 4.0 软件进行系统进化分析, 发现红螯

光壳螯虾组织蛋白酶 L 先与斑节对虾和日本沼虾聚类,之后又与中华绒螯蟹、阿拉斯加帝王蟹、新刀额对虾和凡纳滨对虾聚为一支,而美洲螯龙

虾(*Homarus americanus*)、挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)、北极甜虾(*Pandalus borealis*)和脊尾白对虾聚为一支。

```

1 atggggagtgttgacgcagctgtcgcgaagaagggtgggtacgctcgtcctctgtgtgca
61 tcacttctgctctccattgtttatttattcttaaaatcgaactacagtacttctgtgtt
121 tattgacgtgaacactaag
140 atgagggtcttggcagcatcagtgtagtggccattctggcttcagcatctgcagtgct
M R V L A A S V L V A I L A S A S A V S
200 ttcttctgtgtgttggaaagtggaagcctttaagcttgagcatggcaagaataat
F F S V V L E E W E A F K L E H G K K Y
260 gagacagatgtggaagaatcttccgtatgaaaatctatactgaaaataacgatgcgatt
E T D V E E S F R M K I Y T E N K H A I
320 gcagcacacaataagttgtatgctacagggcagaagtcatacaagcttggcatgaacaaa
A A H N K L Y A T G Q K S Y K L G M N K
380 tatggtgacatgcttctcatgaattgtgtcgacaatgaatggcttccagtggaaccac
Y G D M L P H E F V S T M N G F Q W {N} H
440 acaggcaactacaggtctggccgctctacactggtgcaacattcattgaccagatgat
T G N Y R S G R L Y T G A T F I E P D D
500 gatgttatcctccacagagtgtgactggaggataaaggagctgtgacaccagtcaag
D V I L P Q S V D W R D K G A V T P V K
560 gaccagggtcaatgtgctcctgttggtcattctcagctactggatcactggaaggtcaa
D Q G Q C G S C W S F S A T G S L E G Q
620 cacttccgacagctgtaactggtgagcctctcagcagaacctgattgactgttct
H F R Q T G K L V S L S E Q N L I D C S
680 accaagtatggcaataatggctgcaatggtgacttatggactatgccttccagtacatt
T K Y G N N G C N G G L M D Y A F Q Y I
740 aagaaaaatggtggaattgacaccgaaggagcataccatataaagctgaggatgacaaa
K E N G G I D T E G A Y P Y E A E D D K
800 tgcggataaaccacgaagtctggctgctgaagacactggctttgtgatattcgtgag
C R Y N P R K S G A E D T G F V D I R E
860 ggaagtgaagggcttgaagaagctgtgctactgttgacctgttctgttgccatt
G S E G A L K K A V A T V G P V S V A I
920 gatgcttcacatagttcattccagttttacagtcagtggtttatgatgaaccagaatgt
D A S H S S F Q F Y S H G V Y D E P E C
980 aactcagacagctggaccacggtgtcctggctgtgggttacggcactaccgaggacggc
N S E Q L D H G V L A V G Y G T T E D G
1040 actgactactggctggtcaagaattcttggggcaccacttgggtgatgaaggctacatc
T D Y W L V K N S W G T T W G D E G Y I
1100 aagatgagtcgaacaagcataaccagtggtgactgtgactgctgaccttaccctctt
K M S R N K H N Q C G I A T A A S Y P I
1160 gtatag 1165
M *
1166 ggaacaaaatgttaaagccttactcgcactccatataatattgaagtgttcacaaaat
1226 ttgtatagtttctgaagcatgatcattttaaagaacttgggtgcatgttccatag
1286 ttggcagatgtaactctgtgaggaatagtagcaatataaacctaatgaaatgtt
1346 tttcatttctgctgagtgagacactgctaaaaacttaaatTTTTTaaagggtgcata
1406 cttaaatagcttaatttttctgcatactggagtaccatgttttaatttgacatacaga
1466 attggagcattgtaatttatgttttctgctctgtagccgaagttttacataaattgg
1526 ttagttagtagataattaacttgtgaatgttatacaaatgtttgttagtatatacaata
1586 taaggatcatgacatgctgtaataatttcttttggacttggactgaacataattttta
1646 tccaggattattaccatcatttcatgctttgaatgagaggtgtaaatggttcatttgg
1706 agctgtctgtgaatattagcaagcagatgtgcaagttgttttcttaattttctaat
1766 aaacttgtactgttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 红螯光壳螯虾 *CatL* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

细方框内分别为起始密码子 atg、加尾信号 aataaa; 大括号内为氮糖基化位点; \* 代表终止密码子; 细下划线代表信号肽; ERFNIN、GNFD、GCXGG 结构用阴影表示; 分泌信号用方框加阴影表示

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *CatL C. quadricarinatus*

The start codon(atg) and the polyadenylation signal sequence(aataaa) are indicated with boxes; N-glycosylation site is indicated by brace; the stop codon is marked by an asterisk; signal peptide sequence is marked with thin line(1-18); signature sequences(ERFNIN) and (GNFD) and (GCXGG) are shown in shadow; secretion signal(ASYPLV) is shown with box and shadow

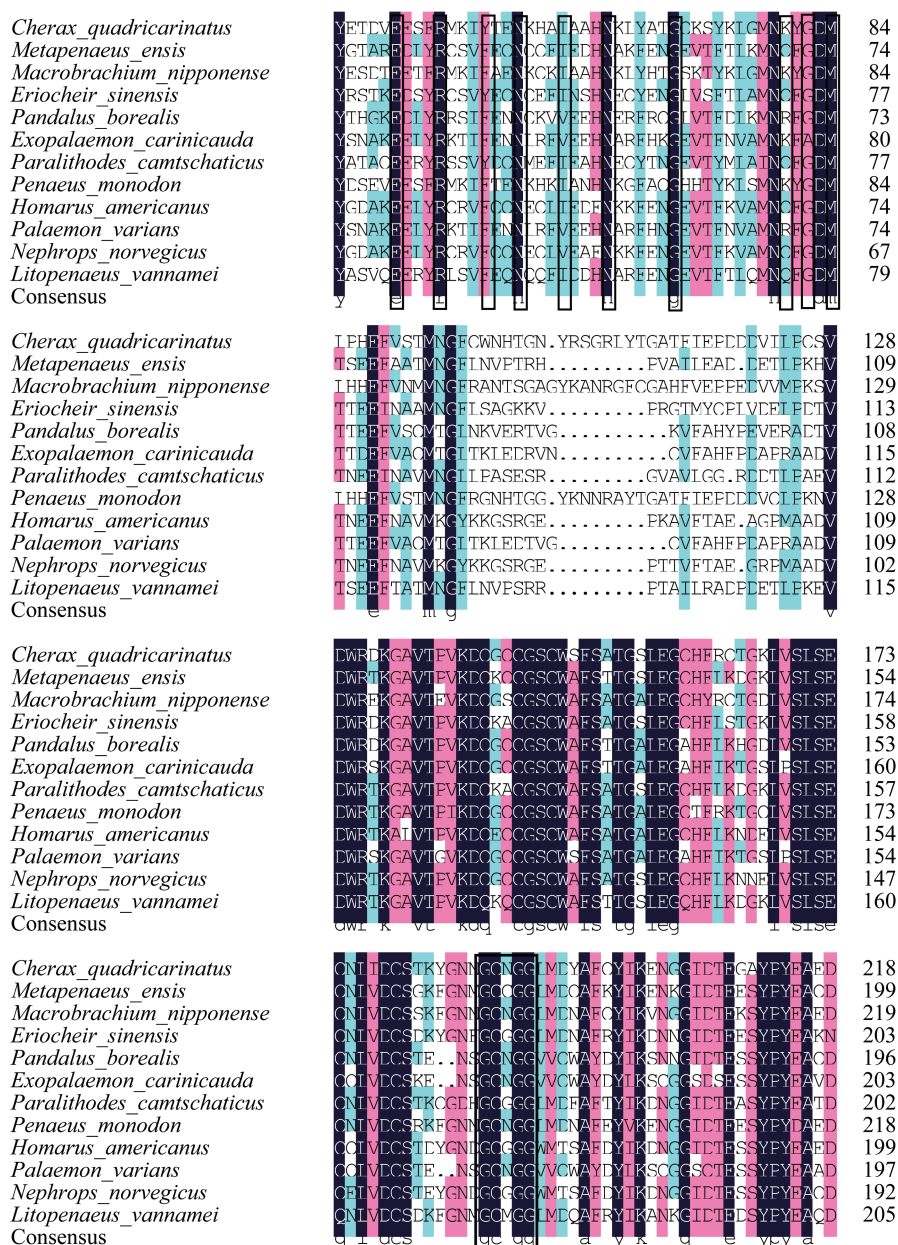


图2 红螯光壳螯虾 *CqCatL* 氨基酸序列与其他物种 *CatL* 氨基酸序列比对

ERFNIN 和 GNFD 序列用细线方框标出; GCXGG 序列用粗线方框标出。各物种 *CatL* 序列登录号为: 北极甜虾 (BAC65418)、凡纳滨对虾 (CAA68066)、斑节对虾 (ABQ10739)、日本沼虾 (AEC22811)、刀额新对虾 (AAM96000)、中华绒螯蟹 (ADO65978)、阿拉斯加帝王蟹 (ADQ73946)、美洲螯龙虾 (CAA45129)、挪威海螯虾 (CAA56915)、脊尾白对虾 (AGJ03550)、变色小长臂虾 (ACR54126)

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of *C. quadricarinatus* *CqCatL* with other species

“ERFNIN” and “GNFD” are signed with thin box; and “GCXGG” is signed with thick boxes. GenBank accession numbers of *CatL* used are: *P. borealis*, BAC65418; *L. vannamei*, CAA68066; *P. monodon*, ABQ10739; *M. nipponense*, AEC22811; *M. ensis*, AAM96000; *E. sinensis*, ADO65978; *P. camtschaticus*, ADQ73946; *H. americanus*, CAA45129; *N. norvegicus*, CAA56915; *E. carinicauda*, AGJ03550; *P. varians*, ACR54126

### 2.3 *CqCatL* 基因的表达分析

*CatL* 基因在各组织中的表达 利用 Real-time PCR 分析了红螯光壳螯虾 *CqCatL* 基因在不同组织中的表达水平, 以肝胰腺 *CqCatL* 基因的表达量为对照 (设其表达量为 1.00), 结果表明: *CqCatL* 基因在血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、

肠、胃、心脏、脑及触角腺中都有表达。其中, 在肝胰腺中的表达量最高, 显著高于其他各组织 ( $P < 0.01$ ), 其次为血细胞、肠、触角腺和卵巢组织, 在脑、心脏和胃组织中也有一定量的表达, 在肌肉和鳃组织中的表达量最少 (图 4)。

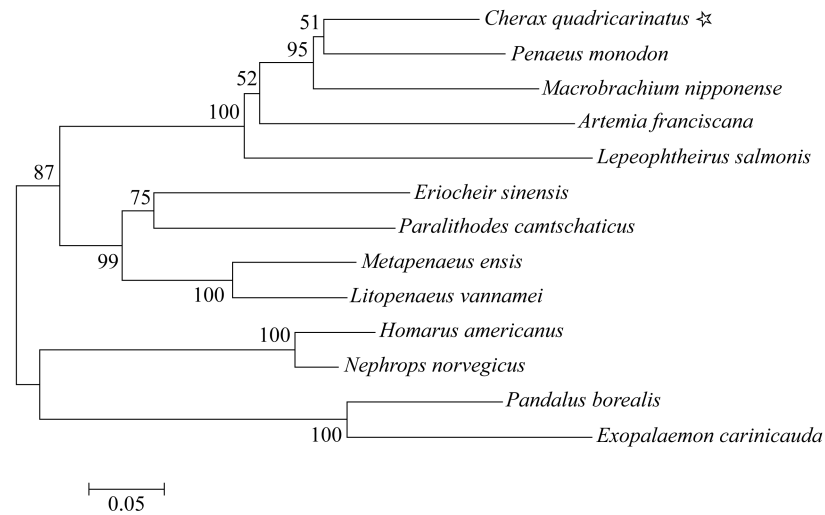


图3 根据 NJ 法构建的 13 种节肢动物的 CatL 氨基酸序列的系统进化树

分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度,只显示置信度 >80% 的数值;标尺长度表明每个位点发生 0.05 次置换。各物种 CatL 序列登录号为:斑节对虾 (ABQ10739)、日本沼虾 (AEC22811)、卤虫 (AAV63977)、鲑疮痂鱼虱 (ADD24160)、中华绒螯蟹 (ADO65978)、阿拉斯加帝王蟹 (ADQ73946)、刀额新对虾 (AAM96000)、凡纳滨对虾 (CAA68066)、美洲螯龙虾 (CAA45129)、挪威海螯虾 (CAA56915)、北极甜虾 (BAC65418)、脊尾白对虾 (AGJ03550)

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on CatL amino acid sequences of 13 kind of arthropoda

The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >80%). GenBank accession numbers of CatL used are: *P. monodon*, ABQ10739; *M. nipponense*, AEC22811; *A. franciscana*, AAV63977; *L. salmonis*, ADD24160; *E. sinensis*, ADO65978; *P. camtschaticus*, ADQ73946; *M. ensis*, AAM96000; *L. vannamei*, CAA68066; *H. americanus*, CAA45129; *N. norvegicus*, CAA56915; *P. borealis*, BAC65418; *P. varians*, AGJ03550

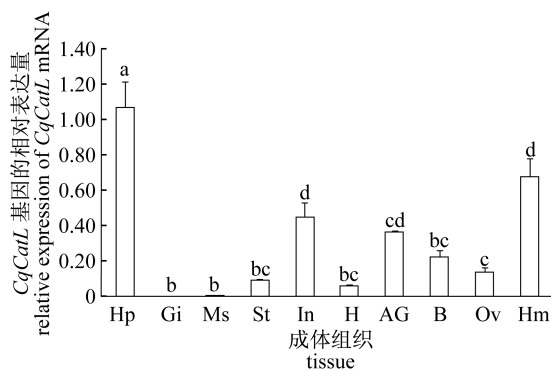


图4 红螯光壳螯虾不同组织中 *CqCatL* 的相对表达量  
Hp. 肝胰腺, Gi. 鳃, Ms. 肌肉, St. 胃, In. 肠, H. 心脏, AG. 触角腺, B. 脑, Ov. 卵巢, Hm. 血细胞。相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig. 4 qRT-PCR analysis of *CqCatL* gene expression from different tissues of *C. quadricarinatus*

Hp. hepatopancreas, Gi. gill, Ms. muscle, St. stomach, In. intestine, H. heart, AG. antennal gland, B. brain, Ov. ovary, Hm. hemocytes. Same letters indicate no significant differences ( $P > 0.05$ ), Statistical significance is represented by different letters ( $P < 0.05$ )

*CqCatL* 基因在添加不同水平维生素 C 后的表达 利用 Real-time PCR 分析了 *CqCatL* 基因在添加不同维生素 C 的实验组的红螯光壳螯虾肝胰

腺中的表达水平,以未添加维生素 C 的实验组 1 的 *CqCatL* 基因的表达量为对照 (设其表达量为 1.00),结果表明:*CqCatL* 基因在不同组中有不同

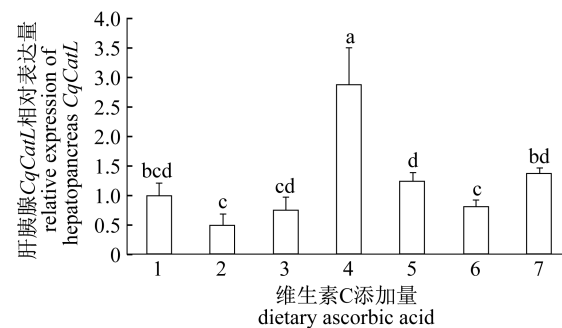


图5 饲料中添加不同水平维生素 C 后红螯光壳螯虾肝胰腺中 *CqCatL* 相对表达量

1~7 代表维生素 C 的添加量为 0、100、200、400、800、1 600、3 200 mg/kg。相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig. 5 *CqCatL* mRNA expression in the hepatopancreas of *C. quadricarinatus* fed with the seven experimental diets

1-7 representative different level of vitamin C of 0, 100, 200, 400, 800, 1 600 and 3 200 mg/kg. Same letters indicate no significant differences ( $P > 0.05$ ), Statistical significance is represented by different letters ( $P < 0.05$ )

的表达,当维生素 C 的添加量为 400 mg/kg(实验组 4)时,*CqCatL* 基因的表达量最高( $P < 0.05$ ),添加量过高或过低表达量都很低(图 5),其中,未添加维生素 C 的对照组 1 中 *CqCatL* 基因的表达量与第 2、3、5、6、7 组均无显著差异( $P > 0.05$ ),但极显著低于第 4 组( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

本研究首次克隆得到红螯光壳螯虾组织蛋白酶 L 基因 cDNA 序列,全长 1 810 bp,包含 1 026 bp 的开放阅读框,编码一个 341 个氨基酸组成的多肽。序列分析发现,与其他甲壳动物的组织蛋白酶 L 一样,其 N 端含有 18 个氨基酸组成的信号肽,成熟肽位于第 19 ~ 341 位氨基酸,属于典型的半胱氨酸蛋白酶家族。红螯光壳螯虾组织蛋白酶 L 基因第 142 ~ 153 位氨基酸残基、第 285 ~ 295 位氨基酸残基及第 303 ~ 322 位氨基酸残基分别为半胱氨酸蛋白酶半胱氨酸、组氨酸及天冬氨酸活性位点,并含有一个组织蛋白酶前体抑制功能域 I29,该前体域中具有组织蛋白酶 L 特有的保守结构 ERFNIN [E-X3-R-X2-(L/V)-F-X3-N-X3-I-X3-N],其中 5 个氨基酸是最保守的,而苯丙氨酸 F 在不同物种中有所变化<sup>[18]</sup>,在红螯光壳螯虾中苯丙氨酸 F 则被酪氨酸 Y 所替代,这与中华绒螯蟹和阿拉斯加帝王蟹相一致,该结构存在于除了组织蛋白酶 B 的几乎所有半胱氨酸蛋白酶家族中<sup>[19]</sup>。本实验还发现另外两个保守的结构基序 GNFD 的类似序列(GNYD)以及 GCXGG 基序。在 *CqCatL* 氨基酸的 C-末端还含有信号肽 ASYPTV,研究已表明该结构是促使哺乳动物细胞分泌的信号序列<sup>[20-22]</sup>。

与其他动物氨基酸序列的比对,发现该序列与已知甲壳动物的同源性较高。系统进化分析表明,红螯光壳螯虾与斑节对虾、日本沼虾的组织蛋白酶 L 在进化上亲缘关系最近,其次与中华绒螯蟹、凡纳滨对虾等虾蟹类的亲缘关系相近,而与美洲螯龙虾以及脊尾白对虾等的亲缘关系较远,但同源性几乎都大于 50%,以上结果表明,该序列为红螯光壳螯虾组织蛋白酶 L 基因。

有关组织蛋白酶的研究始于 20 世纪 20 年代<sup>[14]</sup>,在人和哺乳动物中的研究较多,研究发现组织蛋白酶 L 与人类许多疾病有关<sup>[23-26]</sup>。在寄生虫体内组织蛋白酶 L 基因与宿主体内血红蛋白的降解有关<sup>[27]</sup>。在象鼻虫 (*Sitophilus zeamais*) 体内的多个组织中也发现了组织蛋白酶 L,其主要作用在

幼虫消化道内分解食物而提供生长发育所需要的营养<sup>[28]</sup>。斑节对虾和凡纳滨对虾的组织蛋白酶 L 基因可能与蜕皮相关,并认为该基因为生长相关基因,相似的研究在棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 中也有报道<sup>[11,29]</sup>。在美洲螯龙虾中,该基因编码的蛋白酶有消化功能<sup>[30]</sup>,随后又在刀额新对虾中进一步证明了组织蛋白酶 L 具有消化功能<sup>[31-32]</sup>。

本实验进一步探讨了红螯光壳螯虾的组织蛋白酶 L 基因的功能。荧光定量 PCR 结果显示,组织蛋白酶 L 基因在红螯光壳螯虾的肝胰腺中表达量最高,这与中华绒螯蟹等 *CatL* 基因组织表达情况相似<sup>[9]</sup>,在肠和胃中也有一定量的表达,这与刀额新对虾和中国明对虾等的研究结果相似<sup>[31,33]</sup>,研究表明,*CqCatL* 基因可能在红螯光壳螯虾的食物消化过程中具有一定的作用。

诸多研究都表明,维生素 C 对水生动物的生长发育具有重要的作用。有研究发现,维生素 C 能保护肠上皮细胞,促进上皮组织的消化和吸收,提高鱼类的消化和吸收能力<sup>[16]</sup>。还有研究表明,维生素 C 能提高胰蛋白酶等消化酶的活性<sup>[17]</sup>,而组织蛋白酶 L 同样具有消化功能,因此推测,适量的维生素 C 能够提高组织蛋白酶 L 的活性。本实验也发现,添加了不同水平的维生素 C 后,*CqCatL* 基因在不同实验组间的表达量呈现了一定的差异。其中,当维生素 C 的添加量为 400 mg/kg 时,*CqCatL* 基因的表达量最高,显著高于其他各组 ( $P < 0.01$ ),而低于或高于此添加量时,*CqCatL* 基因的表达量与对照组均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。至于维生素 C 的添加量为 100 mg/kg 的实验组与对照组相比,表达量要低于对照组,但两者统计分析差异不显著,原因可能是饲养的时间较短,相似的研究结果在维生素 D3 对黄鳝的影响中也有发现<sup>[34]</sup>。另外,在前期的饲养实验中也发现了实验组 4 的红螯光壳螯虾无论是增重率还是消化酶(胰蛋白酶和淀粉酶)活性都优于其他组,这说明该基因的高表达可能是由于适宜的维生素 C 含量增强了组织蛋白酶 L 的活性,进而提高了该基因的表达量,并促进了红螯光壳螯虾的消化吸收和生长,但具体的作用机制还需深入研究。

### 参考文献:

- [1] Luo W, Zhou Z L, Zhao Y L, et al. Analysis on the contents of protein and amino acid in *Cherax quadricarinatus* during different embryonic



- development stages [ J ]. Journal of East China Normal University: Natural Science, 2004 ( 1 ): 88 - 92. [ 罗文,周忠良,赵云龙,等.红螯螯虾胚胎发育过程中蛋白质含量及氨基酸组成的分析.华东师范大学学报:自然科学版,2004(1):88-92. ]
- [ 2 ] Meng F L, Zhao Y L, Chen L Q, *et al.* The study on the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* I. morphogenesis of external structures of embryo [ J ]. Zoological Research, 2000, 21(6):468-472. [ 孟凡丽,赵云龙,陈立侨,等.红螯螯虾胚胎发育研究 I. 胚胎外部结构的形态发生.动物学研究,2000,21(6):468-472. ]
- [ 3 ] Gu Z M, Xu G X, Huang X M, *et al.* Indoor artificial breeding and juvenile nursing of *Cherax quadricarinatus* [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(1):32-37. [ 顾志敏,许谷星,黄鲜明,等.红螯螯虾的室内人工育苗.水产学报,2003,27(1):32-37. ]
- [ 4 ] Wu Z X, Chen X X, Luo Y L, *et al.* The effect of different protein to the group of the *Cherax quadricarinatus* [ J ]. Reservoir Fisheries, 1998 ( 4 ): 22 - 23. [ 吴志新,陈孝焯,罗宇良,等.不同饵料蛋白质含量对红螯螯虾生长的影响.水利渔业,1998(4):22-23. ]
- [ 5 ] Wang Z L, Jian J C, Lu Y S, *et al.* Cloning and expression analysis of the *cathepsin L* gene from pearl oyster *Pinctada fucata* [ J ]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(6):1604-1611. [ 王忠良,简纪常,鲁义善,等.马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*) 组织蛋白酶 L 基因的克隆与表达分析.海洋与湖沼,2013,44(6):1604-1611. ]
- [ 6 ] Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, *et al.* Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases [ J ]. Neuroscience, 1999, 91(1):233-349.
- [ 7 ] Furuyama N, Fujisawa Y. Distinct roles of cathepsin K and *cathepsin L* in osteoclastic bone resorption [ J ]. Endocrine Research, 2000, 26(2):189-204.
- [ 8 ] Dohchin A, Suzuki J I, Seki H, *et al.* Immunostained *cathepsins B* and *L* correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma [ J ]. Cancer, 2000, 89(3):482-487.
- [ 9 ] Li W W, Jin X K, He L, *et al.* Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of *cathepsin L* in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29 ( 6 ): 1010 - 1018.
- [ 10 ] Duan Y F, Liu P, Li J T, *et al.* Cloning and expression analysis of *cathepsin L* cDNA of *Exopalaemon carinicauda* [ J ]. Zoological Research, 2013, 34(1):39-46. [ 段亚飞,刘萍,李吉涛,等.脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析.动物学研究,2013,34(1):39-46. ]
- [ 11 ] Glenn K L, Grapes L, Suwanasopee T, *et al.* SNP analysis of *AMY2* and *CTSL* genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp [ J ]. International Society for Animal Genetics, 2005, 36 ( 3 ): 235 - 236.
- [ 12 ] Zhao W, Chen L, Zhang F, *et al.* Molecular characterization of *cathepsin L* cDNA and its expression during oogenesis and embryogenesis in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* ( Palaemonidae ) [ J ]. Genetics and Molecular Research, 2013, 12(4):5215-5225.
- [ 13 ] Carmona E, Dufour E, Plouffe C, *et al.* Potency and selectivity of the *cathepsin L* propeptide as an inhibitor of cysteine proteases [ J ]. Biochemistry, 1996, 35(25):8149-8157.
- [ 14 ] Yang D H, Liu Y, Xiao R, *et al.* The study and function of cathepsin L [ J ]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(12):1093-1099. [ 杨东辉,刘宇,肖蓉,等.组织蛋白酶 L 的结构与功能.中国生物化学与分子生物学报,2012,28(12):1093-1099. ]
- [ 15 ] Hu J R, Wang A L, Cao J M, *et al.* A review: Regulation of vitamin C in growth, reproduction and immune in aquatic animals [ J ]. Fisheries Science, 2009, 28(1):40-46. [ 胡俊茹,王安利,曹俊明,等.维生素 C 对水生动物生长、繁殖及免疫的调节作用.水产科学,2009,28(1):40-46. ]
- [ 16 ] Xu Y Q, Yi B, Ding Z K, *et al.* Cooperating-antioxidation of VE and its effect on aquatic animals [ J ]. Feed Industry Magazine, 2011, 32 ( 14 ): 59 - 62. [ 许友卿,易波,丁兆坤.维生素 E 和维生素 C 的协同抗氧化作用及对水产动物的影响.饲料工业,2011,32(14):59-62. ]
- [ 17 ] Liu Y. Study on the antioxidant relationship between vitamin C and absorption capacity of juvenile jian carp [ D ]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010. [ 刘扬.维生素 C 与幼建鲤消化吸收能力及其抗氧化作用关系研究.雅安:四川农业大学,2010. ]
- [ 18 ] Bai Z Y, Wang G L, Li J L, *et al.* Cloning and characterization of *cathepsin L* gene and evolution analysis in *Hyriopsis cumingii* [ J ]. Biotechnology Bulletin, 2011(6):104-111. [ 白志毅,汪桂玲,李家



- 乐. 三角帆蚌组织蛋白酶 L 基因的克隆和序列特征与进化分析. 生物技术通报, 2011(6):104-111. ]
- [19] Karrer K M, Peiffer S L, DiTomas M E. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90(7):3063-3067.
- [20] Chauhan S S, Ray D, Kane S E, *et al.* Involvement of carboxy-terminal amino acids in secretion of human lysosomal protease *cathepsin L* [ J ]. Biochemistry, 1998, 37(23):8584-8594.
- [21] Li J, Li L, Zhang G Y. Cloning and sequence analysis of *cathepsin L* gene from bay scallop *Argopecten irradians* [ J ]. Marine Science Bulletin, 2011, 30(3):338-343. [李娟, 李莉, 张国范. 海湾扇贝组织蛋白酶 L 基因编码区的克隆和分析. 海洋通报, 2011, 30(3):338-343. ]
- [22] Yan R X, Xu S T, Cong L N, *et al.* Cloning, expression and assay of *cathepsin L* from the sea cucumber *Stichopus japonicus* [ J ]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2009, 20(6):391-396. [鄢荣歆, 徐赛涛, 丛丽娜, 等. 海刺参组织蛋白酶 L 基因的克隆、重组表达及活性鉴定. 大连工业大学学报, 2009, 20(6):391-396. ]
- [23] Wang J, Liu Y X, Li X P, *et al.* Association of *cathepsin L* with coronary heart disease and its risk factors [ J ]. Journal of Central South University of Technology: Medical Sciences, 2009, 32(2):130-134. [王峻, 刘颖娴, 李向平, 等. 组织蛋白酶 L 与冠心病及其危险因素的相关性. 中南大学学报: 医学版, 2009, 32(2):130-134. ]
- [24] Wang S M, Li L, Zhang W, *et al.* The clinical significance of the serum *cathepsin L* in the diagnosis and detection of the ovarian cancer [ J ]. Chinese Journal of Clinical, 2008, 35(3):167-168. [王素梅, 李力, 张玮, 等. 血清组织蛋白酶 L 在卵巢癌诊断及检测中的临床意义 [ J ]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(3):167-168. ]
- [25] Yang J, Liu B, Zhang Y Q. A novel model for screening new drug of osteoporosis targeting on *cathepsin L* [ J ]. Chinese Journal of Antibiotics, 2002, 27(5):264-266. [杨隽, 刘斌, 张月琴. 以组织蛋白酶 L 为靶位的骨质疏松新药筛选模型的研究. 中国抗生素杂志, 2002, 27(5):264-266. ]
- [26] Xia M, Tian G P, Wei D H. Research progress of the function of *cathepsin L* on the cardiovascular disease [ J ]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2009, 17(7):558-560. [夏敏, 田国平, 危当恒. 组织蛋白酶 L 在心血管疾病中的作用研究进展. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(7):558-560. ]
- [27] Lecaille F, Kaleta J, Broemme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases; Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design [ J ]. Chemical Reviews, 2002, 102(12):4459-4488.
- [28] Ichiro M, Yasufumi E, Keiko A, *et al.* Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (Maize Weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells [ J ]. Journal of Biochemistry, 1997, 121(3):464-476.
- [29] Liu J, Shi J P, Zhang W Q, *et al.* *Cathepsin L* function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [ J ]. Insect Molecular Biology, 2006, 15(6):823-834.
- [30] Laycock M V, Mackay R M, Gallant J W, *et al.* Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*) [ J ]. FEBS Letters, 1991, 292(1,2):115-120.
- [31] Hu K J, Leung P C. Shrimp *cathepsin L* encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 137(1):21-33.
- [32] Hu K J, Leung P C. Food digestion by *cathepsin L* and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2007, 146(1):69-80.
- [33] Bu X J, Zhang X W, Sun Y D, *et al.* Recombinant expression and tissue distribution of *cathepsin L* from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [ J ]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6):910-916. [卜兴江, 仇晓文, 孙允东, 等. 中国明对虾组织蛋白酶 L 的原核重组表达及其组织分布. 中国水产科学, 2008, 15(6):910-916. ]
- [34] Li D B, Li C, Zhang G W, *et al.* Effects of dietary vitamin D3 level on expression of antimicrobial peptide *hepcidin* gene in *Monopterus albus* [ J ]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(8):1520-1526. [黎德兵, 李超, 张龚炜, 等. 饲料中维生素 D3 水平对黄鳝抗菌肽 *hepcidin* 基因表达的影响. 动物营养学报, 2012, 24(8):1520-1526. ]

## Cloning and expression of *cathepsin L* in *Cherax quadricarinatus* and its regulation by dietary vitamin C

WU Donglei, ZUO Di, HUANG Youhui, MA Changan, ZHAO Yunlong\*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, belongs to Decapoda order, and Parastacidae family. Because it grows rapidly and can reach commercial size in a few months at optimal conditions, it has been one of the most important economy shrimps in China. However, the physiological mechanisms of redclaw crayfish have not been well studied, especially the basic information of key nutrients and the related enzymes or proteins are missing. *Cathepsin L* (*CatL*) is an important enzyme related to digesting process in crustaceans, however, its molecular structure and correlation with dietary nutrients have not been investigated. In the present study, in order to obtain insights into the regulatory effects of key dietary nutrients on expression of *CatL* gene, the *CatL* gene of *C. quadricarinatus* was cloned first using RACE-PCR methods. The tissue-specific *CatL* gene expression was also performed, and the *C. quadricarinatus* were fed with artificial diets containing different levels of vitamin C (0, 100, 200, 400, 800, 1 600, 3 200 mg/kg) for 8 weeks, and the expression of *CqCatL* mRNA in different tissues and different groups were examined. The *CatL* cDNA was isolated from the hepatopancreas of *C. quadricarinatus* using RACE-PCR methods, which was designated *CqCatL* (Genbank accession number: KJ913663). The full-length cDNA of *CqCatL* obtained from the present study was 1 810 bp in length with an open reading frame of 1 026 bp, encoding a putative peptide of 341 amino acids, and the predicted molecular mass and isoelectric point were 37.63 ku and 5.17. By alignment, the amino acid sequence of *CqCatL* of *C. quadricarinatus* showed high homology with those of other animals. For example, the deduced amino acids sequence of *C. quadricarinatus CqCatL* shared 79% homology with *Penaeus monodon*, and 74%, 59%, 59%, 58% and 58% with *Macrobrachium nipponense*, *Eriocheir sinensis*, *Metapenaeus ensis*, *Metapenaeus ensis* and *Litopenaeus vannamei*, respectively. This suggested that *CqCatL* was highly conservative. The tissue-specific expression pattern study indicated that *CqCatL* mRNA was widely expressed in hemocytes, gill, hepatopancreas, muscle, ovary, intestine, stomach, heart, brain and antennal gland, indicating *CqCatL* may play important roles in many tissues of the *C. quadricarinatus*. The highest expression was observed in hepatopancreas, and the second was seen in hemocytes, while only very low expressions of *CqCatL* mRNA were found in intestine and antennal gland. After feeding with seven levels of vitamin C, the mRNA expression of *CqCatL* was the highest in the 400 mg/kg dietary vitamin C group and significantly higher than the other groups. The results showed that *CqCatL* might play an important role in the physiological process of *C. quadricarinatus*, and its gene expression and functions were likely regulated by nutrients, such as vitamin C.

**Key words:** *Cherax quadricarinatus*; *cathepsin L* (*CatL*); gene cloning; gene expression; vitamin C

**Corresponding author:** ZHAO Yunlong. E-mail: ylzha@bio.ecnu.edu.cn