

池蝶蚌组织蛋白酶L1-like基因的克隆及表达特征分析

彭扣, 胡蓓娟, 赵大显, 王军花, 盛军庆,
吴娣, 史建伍, 洪一江*

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要: 为了解淡水贝类是否存在组织蛋白酶L的亚型及其亚型的免疫相关作用, 本实验利用已构建的池蝶蚌血细胞全长cDNA文库, 筛选获得与之同源的EST序列, 结合RACE技术进一步克隆了池蝶蚌一个新的组织蛋白酶L基因的cDNA全长, 命名为*HsCtsL1-like*基因(GenBank登录号为KF015273)。该序列全长为1280 bp, 5'-非翻译区(5'UTR)为31 bp, 3'-非翻译区(3'UTR)为256 bp, 开放阅读框区(ORF)为993 bp, 编码330个氨基酸, 预测蛋白相对分子量为36.86 ku, 理论等电点为6.23。序列分析结果显示, *HsCtsL1-like*与其他软体动物相对应序列具有共同结构特征, 包含信号肽、前肽抑制域和成熟肽三部分, 在其他物种中已鉴定的CtsL签名序列标签(ERF/WNIN、GNFD、GCXGG和QCHN等)在*HsCtsL1-like*中均可找到。其氨基酸序列同缢蛏CtsL1(AGL33704.1)同源性最高, 达67%; 与报道的三角帆蚌CtsL(ADV03094)和池蝶蚌中另一个CtsL(AEX88474)仅均为52.91%; 系统进化分析表明, *HsCtsL1-like*与缢蛏、长牡蛎和合浦珠母贝的CtsL1聚为一分支, 推测*HsCtsL1-like*属于CtsL家族中的亚型1。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测显示, *HsCtsL1-like* mRNA在肝脏中表达量最高, 其次是卵巢和精巢。注射鳃弧菌后, 血细胞和肝脏*HsCtsL1-like* mRNA转录水平显著升高, 暗示其是一个免疫有关的基因, 参与了池蝶蚌的先天免疫应答反应。

关键词: 池蝶蚌; 组织蛋白酶L1-like; 组织表达; 克隆; 序列分析; qRT-PCR

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

组织蛋白酶(Cathepsin, Cts)是一种存在于各种动物溶酶体中的蛋白水解酶, 依据其氨基酸序列的活性位点可分为三大类: 半胱氨酸蛋白酶(包括组织蛋白酶B、C、F、H、K、L、O、S、W、Z)、丝氨酸蛋白酶(组织蛋白酶A和G)和天冬氨酸蛋白酶(组织蛋白酶D和E)^[1]。组织蛋白酶L(CtsL)是半胱氨酸蛋白酶中的一种, 其主要功能是降解和更新细胞内的蛋白, 它不仅参与生物体内各种蛋白的水解, 还参与抗原呈递、组织再生、肿瘤入侵和转移、骨质吸收、细胞凋亡、免疫逃避和寄生虫感染等过程^[2-7]。目

前, 关于CtsL基因在水产动物中的研究报道也较多, 在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[8]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[9]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[10]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[11]、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)^[11]、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[12-13]、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[14]、褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)^[15]以及池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)^[16]中均发现CtsL参与免疫相关反应。有趣的是, 在合浦珠母贝中存在有3个CtsL的亚型报道, 即CtsL1^[12]、CtsL2^[13]和CtsL(Genbank accession NO., FJ501258.1)。除此,

收稿日期: 2015-05-20 修回日期: 2016-05-17

资助项目: 江西省科技支撑项目(20121BBF60036); 江西省自然科学基金(20151BAB204035); 江西省教育厅自然科学基金项目(GJJ14219); 江西省科技落地项目(KJLD12001); 国家自然科学基金(31260282; 31260642; 31160534)

通信作者: 洪一江, E-mail: yjjianghong@126.com

Niu等^[1]在缢蛏中还克隆到*CtsL*的4个亚型。但目前淡水贝类中仍未见有其亚型被克隆和相关研究。在我们之前的研究中,已经从池蝶蚌中克隆并鉴定出一个*HsCtsL*基因,并证明其参与免疫应激反应^[16],我们推测池蝶蚌可能类似海水贝类,其中也存在着*CtsL*的其他亚型。假若存在其不同亚型,那么它又是发挥何种功能,即是本文研究目的。

池蝶蚌原产于日本滋贺县琵琶湖,隶属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、帆蚌属(*Hyriopsis*),与我国三角帆蚌为同属不同种。1997年由江西抚州市洪门水库开发公司从日本引进,1998年人工繁殖成功,因其育珠性能佳、抗病及环境适应能力强等特点,养殖面积得到迅速扩大,成为我国育珠生产的又一重要淡水经济贝类^[16-20]。为证实上述推测,本研究从构建的池蝶蚌血细胞cDNA文库中^[17],通过对文库进行大规模筛查获得*CtsL*的另一个亚型EST序列,采用RACE技术获得该基因全长cDNA序列,并对其推导的氨基酸序列进行聚类分析,同时采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测该亚型在不同组织和应对鳃弧菌感染后不同时间点的表达情况,以期为进一步深入研究该基因的功能及其对病原菌的抗病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

池蝶蚌采自江西省抚州市洪门水库开发公司池蝶蚌良种养殖基地,为三龄健康育珠蚌,经测量壳长(120±4.5) mm、壳宽(69.21±1.6) mm、壳高(324±0.5) mm。样品取回实验室后置水族箱(800 mm×400 mm)中暂养一周。暂养期间,水源采用充分曝气后的自来水,保持水温22~25 °C, pH(7.5±0.1),连续充气,每2 d换水1/3,并投喂适量小球藻。暂养结束后,随机选取3只蚌,取其血细胞、外套膜、肝脏、鳃、肠、肾脏、闭壳肌、腹足、精巢和卵巢,经液氮速冻后保存于-80 °C超低温冰箱备用。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激实验中,鳃弧菌购自山东大学威海分校,菌种编号VIB2(ATCC 43306),本实验室永久保存,备用。

1.2 方法

cDNA文库PCR筛查 利用本实验室已构

建的池蝶蚌血细胞cDNA文库^[17],并参照彭扣^[16]的方法,将文库菌液稀释至合适浓度后涂布至含有氯霉素(终浓度:30 µg/mL)的LB平板,37 °C倒置培养过夜,次日挑取单克隆至含氯霉素(终浓度:30 µg/mL)的LB液体培养基中于37 °C,220 r/min摇菌过夜培养,此菌液作模板进行PCR扩增。PCR反应体系:10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 µL, dNTP Mixture 1.0 µL, 菌液1.0 µL, 上、下游引物M13F和M13R各1.0 µL(均10 µmol/L), TaKaRa Ex Taq (5 U/µL) 0.2 µL, ddH₂O补足至25 µL。PCR反应程序:94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,45 °C退火30 s,72 °C延伸2 min,34个循环;72 °C终延伸7 min;10 °C终止反应并保温。扩增产物采用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测,选取扩增产物片段大于750 bp与之相对应的菌液送上海生工测序。测序得到序列经BLAST分析确定有一条序列为不同于*HsCtsL*(JN604558.1)的另一同源序列。

RNA的提取和cDNA的合成 经液氮研磨后的池蝶蚌组织利用Trizol试剂(Invitrogen, USA)一步法提取总RNA, RNA浓度和纯度用核酸测定仪(Nanodrop 2000)测定,并用DNase I (TaKaRa, Japan)消化处理总RNA以消除基因组DNA的残留,最后采用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用SMARTTM-RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)合成3'-RACE-Ready cDNA,备用。另外,以Oligo(dT)18作为反转录引物,用反转录酶M-MLV (Promega, USA)按试剂盒方法将总RNA反转录成cDNA,反转录的cDNA用于组织表达分析。

cDNA全长克隆和序列分析 文库筛查获得的*HsCtsL*的同源片段仅包含5'端非翻译区序列(5'UTR)、完整开放阅读框(ORF)和3'端部分序列(未找到加A尾信号“AATAAA”)。3'端完整序列则是根据以上获得的*HsCtsL*的同源片段cDNA部分序列,设计3'端RACE引物(*HsCtsL1-like-3'GSP*),按照SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit说明书,以3'-RACE-Ready cDNA作为模板,使用Advantage[®] 2 PCR Enzyme System进行PCR扩增。所有引物均由上海生工公司合成(表1)。PCR反应体系:10×Advantage 2 PCR buffer 5.0 µL, UPM 5.0 µL, *HsCtsL1-like-3'GSP* 1.0 µL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 1.0 µL, 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 µL, Advantage[®] 2

表1 本研究中所用引物信息

Tab. 1 Information of primers used in this study

引物名称 primers	引物序列(5'→3') sequences
M13 F	TGTA AACGACGGCCAGT
M13 R	CAGCAACAGCTATGAC
SMART II TM A Oligonucleotide (12 μmol/L) 3'-RACE CDS Primer A(3'-CDS; 12 μmol/L)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGA GTACGCG (T) ₂₅ V N (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)
10×Universal Primer A Mix (UPM) (0.4 μmol/L)	CTAATACGACTCACTATAGGG CAAGCAGTGGTATCAACGCAG
Short Primer(2μmol/L)	AGT CTAATACGACTCACTATAGGG C
<i>CtsL1-like</i> -3GSP(<i>HsCtsL1-like</i> - 3RACE)	GTAGGATATGGAACCTCAAGAT GGCAAGG
<i>CtsL1-like</i> ORF-F2	CGGAATTCATGCTACGTGTTTT TCTATGG
<i>CtsL1-like</i> ORF-R2	CCCTCGAGCTACACTGTGGGG AAACTGGAT
<i>CtsL1-like</i> qPCR-F3	CGACGAGTGGGAGCTTTACA
<i>CtsL1-like</i> qPCR-R3	AGCCAGTAAGTGTGTACGCC
<i>β-actin</i> qPCR-F	AAGGTTACGCCCTTCCTCAT
<i>β-actin</i> qPCR-R	GCCATTCCTGCTCAAAGTC

Polymerase Mix 1.0 μL, PCR-Grade Water补足至50 μL。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 72 °C延伸3 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 70 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 68 °C退火3 s, 72 °C延伸3 min, 25个循环; 72 °C终延伸10 min。PCR扩增产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离检测后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega, USA)回收、纯化, 并连接于pMD19-T载体, 转入感受态细胞*E. coli* DH 5α, 于LB平板(含Amp⁺)培养, 阳性克隆经PCR鉴定后送至上海生工测序。获得序列经Blastn比对分析后确定为*CtsL*部分同源序列, 最后应用DNAMAN软件与前者序列拼接成池蝶蚌中一个新的*CtsL*完整的cDNA序列。应用引物*CtsL1-like*-ORF-F2和*CtsL1-like*-ORF-R2以上述反转录的3'-RACE-Ready cDNA为模板进行RT-PCR扩增及测序确认。利用DNASar软件查找此cDNA序列的最大ORF, 翻译所得氨基酸序列在NCBI数据库中进行BLASTP比对, 通过SignalP 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、BioEdit、DNAMAN、DNASTAR、Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)等软件分别预测该氨基酸序列的理化性质、信号肽、二级结构和蛋白

结构域等。采用Clustal X1.83软件对相应氨基酸序列进行多序列比对, 应用Mega4.0软件相邻结合(Neighbor-Joining, NJ)法构建分子聚类树。

qRT-PCR分析 采用qRT-PCR技术检测新克隆基因的组织转录差异性及鳃弧菌刺激后的免疫应答水平。根据得到的新基因cDNA全长序列以及NCBI上公布的*β-actin*(EU047596), 分别设计一对表达分析引物(表1)进行qRT-PCR。对于组织表达实验, 随机取3只健康三龄池蝶蚌, 采用相同组织混合法分别提取血细胞、鳃、外套膜、肠、肝脏、闭壳肌、腹足、卵巢、精巢、肾脏和心脏的mRNA, 并按上述方法获得cDNA模板; 菌诱导胁迫实验方案: 取50只蚌随机分成两组, 分别放入两个水族箱中, 实验组在蚌闭壳肌内注射50 μL鳃弧菌悬液(过夜培养的鳃弧菌重悬于pH 7.5的PBS(phosphate buffer saline)中, 体视镜下血细胞计数板上计数为 4.2×10^9 bacteria/mL), 对照组注射50 μL PBS, 分别在注射后0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h和12 h取实验组和对照组的血细胞及肝组织, 据上述方法获得cDNA模板。根据荧光定量试剂盒(嵌合检测法)(Takara)进行qRT-PCR检测。PCR反应体系为20 μL: 10 μL 2×SYBR Green Real-Time PCR Master Mix, 1.0 μL模板(10 μmol/L), PCR Forward和Reverse Primer (10 μmol/L)各0.4 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, ddH₂O补足至20 μL, 每个样品设置3个平行, 以蒸馏水代替模板作为阴性对照。PCR反应程序: 95 °C预变性60 s; 94 °C变性15 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环; 72 °C终延伸10 min。应用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析相对表达值^[21]。以上实验均重复3次, SPSS软件分析新克隆基因mRNA在池蝶蚌中的表达情况, 组织表达和菌刺激表达均进行单因素方差统计分析, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 极显著差异。

2 结果

2.1 池蝶蚌*HsCtsL1-like*序列及其分析

池蝶蚌血细胞cDNA文库涂板后挑取单克隆测序, 去除载体序列得到一个长1015 bp的片段, 应用DNASar软件查找此序列对应的最大ORF, 翻译所得氨基酸序列在NCBI数据库中进行BLASTP比对, 确定其为池蝶蚌*HsCtsL*的另一个同源基因, 为将二者加以区分, 暂命名为*HsCtsL1-*

like, 其包含5'-UTR、开放阅读框(ORF)和3'-UTR部分序列(因在该序列中未找到加A尾信号“AATAAA”及mRNA不稳定基序“ATTTA”), 序列提交GenBank, 登陆号为KF015273。为进一步获得*HsCtsL1-like*完整的3'-UTR序列, 在此基础上, 设计特异性引物(*CtsL1-like*-3GSP)进行3'-RACE扩增。3'-RACE获得一个大小为399 bp cDNA片段, 该序列中含有1个mRNA不稳定信号“ATTTA”、1个多聚腺苷酸加A尾信号“AATAAA”及1个PolyA尾。同上, 将前者序列

进一步拼接和验证, 确定*HsCtsL1-like*的cDNA序列全长为1280 bp。*HsCtsL1-like* cDNA包括31 bp的5'-UTR、993 bp的ORF和256 bp的3'-UTR (图1)。氨基酸序列分析可知, *HsCtsL1-like*基因编码一个由330个氨基酸组成的蛋白质, 预测蛋白分子量约为36.86 ku, 理论等电点为6.23。参照已有文献^[1, 10, 12, 15]并结合SignalP 4.0、SMART等对*HsCtsL1-like*蛋白结构域分析表明, 其N端含有16个氨基酸组成的信号肽, 前肽抑制结构域位于第25~84位氨基酸之间, 成熟肽结构域位于第

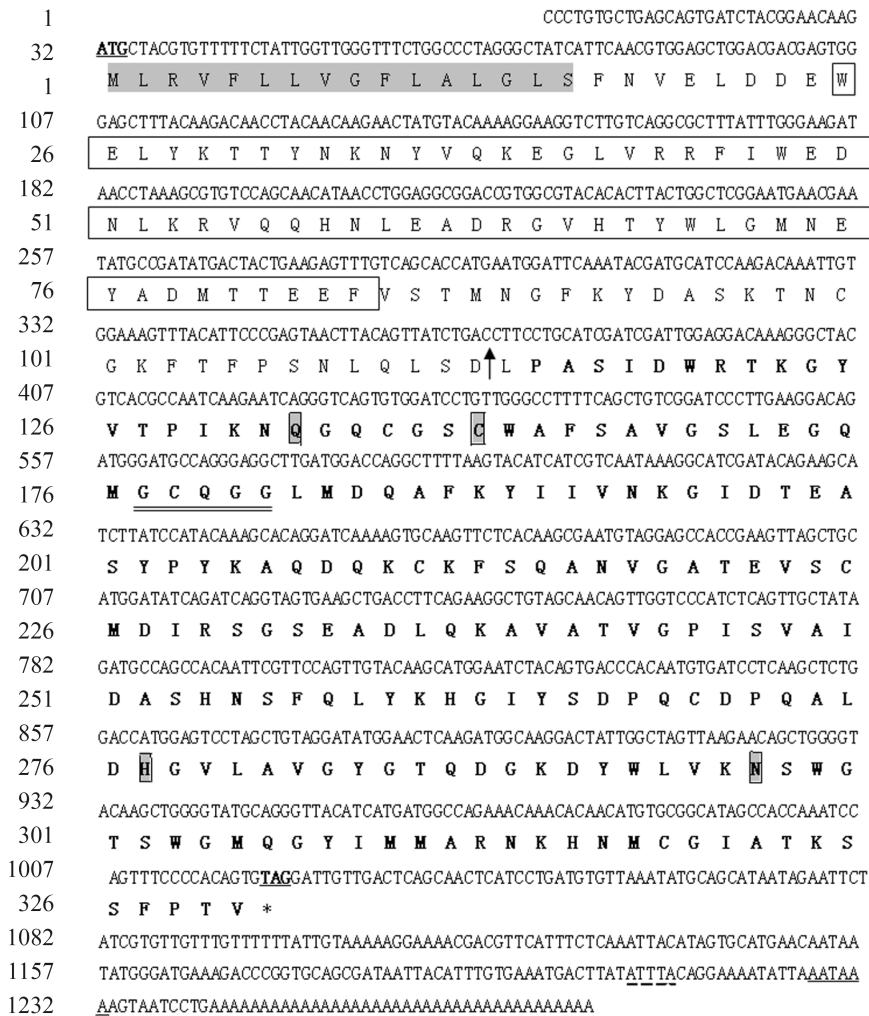


图 1 *HsCtsL1-like* cDNA全序列及推导的氨基酸序列

起始和终止密码子被加粗并下划线; 信号肽以阴影部分标示; 前肽抑制序列用方框标示; 成熟肽序列用字体加粗; 推导的前肽裂解位点以箭头标示; 组织蛋白酶L签名序列GCXGG以双下划线表示; 保守的酶催化活性位点(Cys138, His277和Asn297)和氧离子洞(Gln132)用阴影加方框标出; 典型的polyA加尾信号AATAAA下划线标出, RNA不稳定信号ATTTA用下划虚线标出。

Fig. 1 Full cDNA sequence and predicted amino acid sequence of *HsCtsL1-like* gene

The start (ATG) and stop (TAG) codes are in bold and underlined. Putative signal peptide sequence is showed in shadow. The predicted propeptide inhibitor domain is in box. The mature peptide domain is bold. The putative cleavage site for propeptide is indicated by vertical arrow. The cathepsin L signature sequence GCXGG is double underlined. The conserved catalytic triad residues (Cys¹³⁸, His²⁷⁷ and Asn²⁹⁷) are bold, boxed and shaded. The classical polyadenylation signal (AATAAA) is underlined. One RNA instability motif (ATTTA) is underlined with dotted line.

114~330位氨基酸之间,且存在于组织蛋白酶L特有的保守基序GCXGG(位于第177~181位),以及由高度保守的氨基酸残基Cys¹³⁸(C)、His²⁷⁷(H)和Asn²⁹⁷(N)组成的酶活性催化位点和一个由Gln¹³²(Q)组成的保守氧阴离子穴(oxyanion hole)。

2.2 HsCtsL1-like同源性分析

利用BLASTP对HsCtsL1-like进行同源性分析,发现推导的HsCtsL1-like蛋白与缢蛭(AGL33704.1)和长牡蛎(XP_011432381.1) CtsL1的相似性最高,均达67%。与缢蛭CtsL2(AGL33705.1)、巨螺(*Lottia gigantea*)CtsL(XP_009064230.1)、合浦珠母贝CtsL2(ADC52431.1)、合浦珠母贝CtsL1(ADC52430.1)、和皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)CtsL(AFV73398.1)的同源性分别为63%、63%、62%、62%和61%。应用Clustal W将HsCtsL1-like预测的氨基酸序列与HsCtsL(AEX88474)、三角帆蚌CtsL(ADV03094)、长牡蛎CtsL1(EKC31777)、合浦珠母贝CtsL1(ADC52430)和CtsL2(ADC52431)、斑马鱼(*Danio rerio*)CtsL1(NP_997749)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)CtsL2(NP_001087489)、原鸡(*Gallus gallus*)CtsL1(NP_001168481)、小鼠(*Mus musculus*)CtsL(EDL16242)和人(*Homo sapiens*)CtsL2(CAA75029)进行同源比对分析,并参考已有文献^[1, 10, 12],推测HsCtsL1-like在形成成熟蛋白前的前体肽切割位点在Asp(D)¹¹³和Leu(L)¹¹⁴残基之间(图2);HsCtsL1-like也存在着其他物种CtsL的4个活性位点保守氨基酸:Q¹³²、C¹³⁸、H²⁷⁷、N²⁹⁷;此外,CtsL的保守基序或标签序列ERF/WNIN、GNFD和GCXGG在HsCtsL1-like均可找到(图2)。采用Clustal X1.83和MEGA 4.0软件,基于相邻结合法构建HsCtsL1-like同其他物种CtsL的系统进化树(图3),以CtsS、CtsH和CtsB作为外群,HsCtsL1-like同缢蛭CtsL1紧密聚为一小支,之后再同长牡蛎和合浦珠母贝的CtsL1落在相同分支上,而以前已鉴定的HsCtsL仅同三角帆蚌和褶纹冠蚌的CtsL聚在另一支上,缢蛭、合浦珠母贝和长牡蛎的CtsL2与巨螺CtsL聚为一支,脊椎动物CtsL聚为另外一大支,选择的部分代表性物种CtsS、CtsH和CtsB均各为单独一支。

2.3 HsCtsL1-like mRNA组织表达特征

qRT-PCR分析HsCtsL1-like基因在池蝶蚌不

同组织中的表达水平。结果发现HsCtsL1-like mRNA在肝脏、鳃、腹足、心脏、卵巢、精巢、肾脏、血细胞、肠和外套膜中都有表达,其中,在肝脏中表达量最高,其次为卵巢、精巢、肠和血细胞,在肾脏中的表达量最少(图4)。

2.4 池蝶蚌HsCtsL1-like mRNA在响应鳃弧菌刺激下的表达特征分析

鳃弧菌感染后,采用qRT-PCR方法检测池蝶蚌血细胞和肝脏中的HsCtsL1-like mRNA相对于感染初始(0 h)的表达量变化。结果发现,对照组中的HsCtsL1-like mRNA在注射前和注射后的相对表达量没有明显变化($P > 0.05$);鳃弧菌注射实验中HsCtsL1-like mRNA在肝脏中表达量变化则是在刺激后2 h显著升高($P < 0.05$),在2~6 h出现下降,于8 h急剧上升并达到最高值($P < 0.05$),然后又开始下降后再轻微上升(图5-a);感染组血细胞中HsCtsL1-like mRNA在注射鳃弧菌早期0~2 h也是先上升($P < 0.05$),并于2~6 h出现下降,在8 h出现极显著上升($P < 0.01$),然后又出现明显降低(图5-b)。在响应鳃弧菌胁迫下的早期阶段(0~12 h),HsCtsL1-like在肝脏和血细胞中表达的总体变化趋势一致,均为先升高再降低紧接又升高后再降低的波动变化(图5)。

3 讨论

本研究采用cDNA文库筛查和RACE技术,获得HsCtsL1-like cDNA全长序列,与已知其他物种的CtsL同源。CtsL作为溶酶体半胱氨酸蛋白酶中木瓜蛋白酶C1家族的主要成员,具有特定的酶结构以及保守位点和催化位点^[13-14]。CtsL在细胞内首先以无活性的前体酶原形式存在,由信号肽(signal peptide)、前体抑制域(propeptide)和成熟肽(mature peptide)三部分组成^[22]。其前体抑制域含有两个典型的CtsL保守签名序列标签ERF/WNIN和GNFD^[22];成熟肽存在有结构保守基序GCXGG^[14]及Cys(C)、His(H)、Asn(N)和Gln(Q)等高度保守位点^[1, 8-10, 12]。本研究克隆的HsCtsL1-like,推导的其蛋白序列具有CtsL的结构特征、签名序列标签和保守基序位点(图1, 2),自N端到C端由信号肽(1~16)、前肽抑制域(25~84)和成熟肽(114~330)三部分组成,具有签名序列标签: E⁴⁰R⁴⁴W⁴⁸N⁵¹V⁵⁵N⁵⁹、G⁷²N⁷⁴Y⁷⁶D⁷⁸、G¹⁷⁷C¹⁷⁸Q¹⁷⁹G¹⁸⁰G¹⁸¹和保守基序如Q¹³²、C¹³⁸、H²⁷⁷、

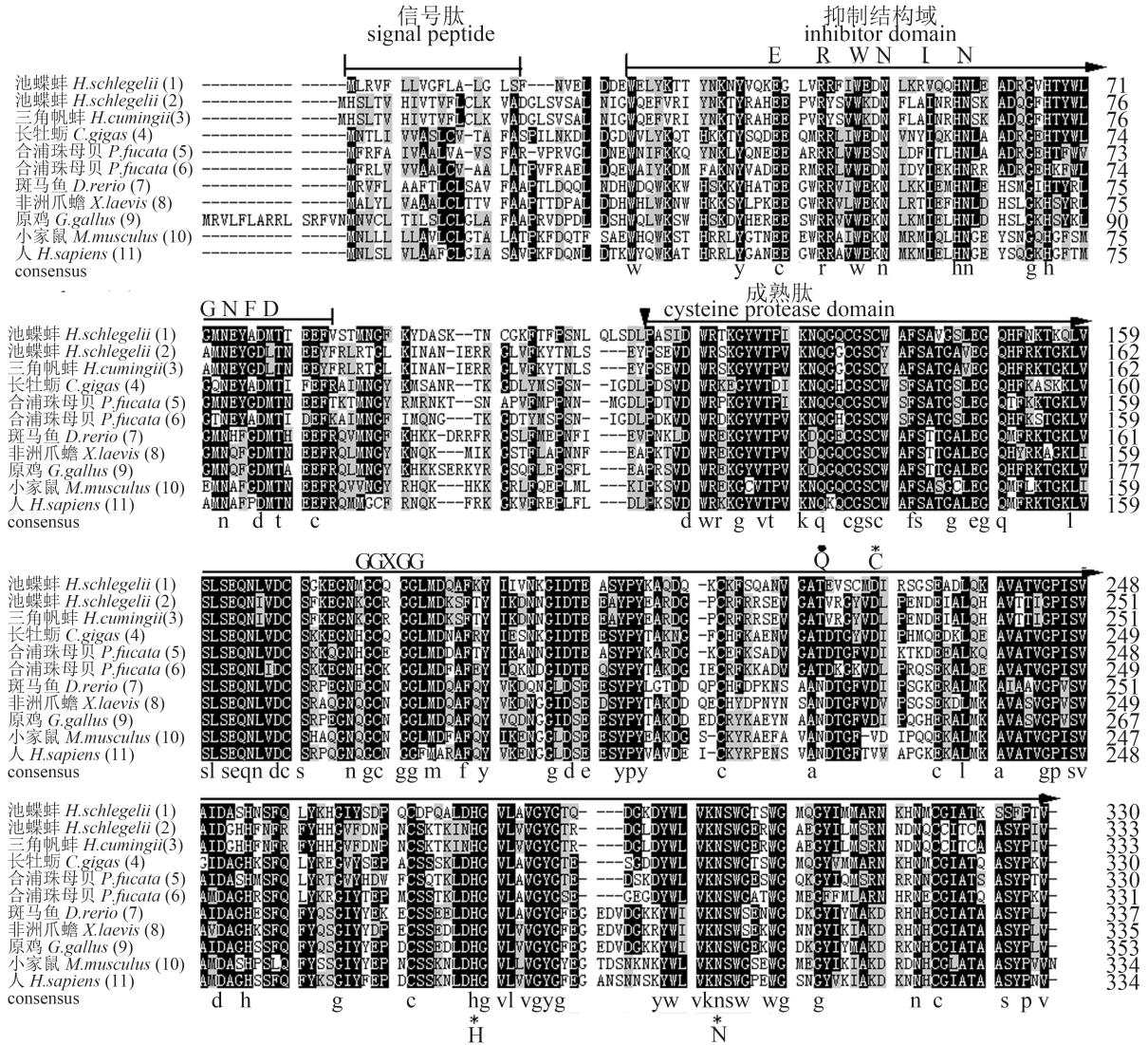


图 2 池蝶蚌HsCtsL1-like同其他物种的CtsL的氨基酸序列比对

一致性或相似度高的部分以阴影或黑色表示; 信号肽、前肽抑制结构域和成熟肽分别上划线标示; 箭头表示前肽转变为成熟肽的切割位点; 组织蛋白酶L标签序列ERWNIN、GNFD和GCXGG相应字母上标出; 氧离子洞的Gln(Q)、催化活性位点Cys(C)、His(H)和Asn(N)星号标出。(1)池蝶蚌HsCtsL-like; (2)池蝶蚌HsCtsL(AEX88474); (3)三角帆蚌CtsL(ADV03094); (4)长牡蛎CtsL1(EKC24845); (5)合浦珠母贝CtsL2(ADC52431); (6)合浦珠母贝CtsL1(ADC52430); (7)斑马鱼CtsL1(NP_997749); (8)非洲爪蟾CtsL2(NP_001087489); (9)原鸡CtsL1(NP_001161481); (10)小家鼠CtsL(EDL16242); (11)人CtsL2(CAA75029)

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *H. schlegelii* HsCtsL1-like with other species' CtsLs

The portion of consensuses or high similarities among sequence are marked by black or shadow. The signal peptide, propeptide inhibitor domain and mature peptide domain are indicated with over-lines. The arrow indicates the cleavage site of the propeptide. Cathepsin L signature sequences such as ERWNIN, GNFD and GCXGG are marked with corresponding letters in picture. The oxyanion hole, glutamine (Q) is denoted with dark spot. The conserved catalytic triad residues (Cys, His and Asn) are indicated by stars.(1): *H. schlegelii* HsCtsL1-like; (2): *H. schlegelii* HsCtsL(AEX88474); (3): *Hyriopsis cumingii* CtsL(ADV03094); (4): *Crassostrea gigas* CtsL1(EKC24845); (5): *Pinctada fucata* CtsL2(ADC52431); (6): *P. fucata* CtsL1(ADC52430); (7): *Danio rerio* CtsL1(NP_997749); (8): *Xenopus laevis* CtsL2(NP_001087489); (9): *Gallus gallus* CtsL1(NP_001161481); (10): *Mus musculus* CtsL(EDL16242); (11): *Homo sapiens* CtsL2(CAA75029)

N²⁹⁷位点。相关文献报道, CtsL成熟肽保守位点C、H、N可构成催化三联体结构, 是酶催化活性位点, Q能帮助形成氧离子洞作用^[1, 8-10, 12]。CtsL在溶酶体的酸性环境下, 或其他蛋白酶作用下, 被水解成具有活性的成熟组织蛋白酶^[16], 根

据序列同源比我们推测HsCtsL1-like前肽的加工切割位点在D¹¹³和L¹¹⁴之间, 其第115位为脯氨酸Pro(P), 这也与其他物种CtsL成熟肽N端所具有高度保守的P特征相符^[11, 12-13], 推导位于切割位点周围的P可预防成熟肽N端被进一步水解^[23]。

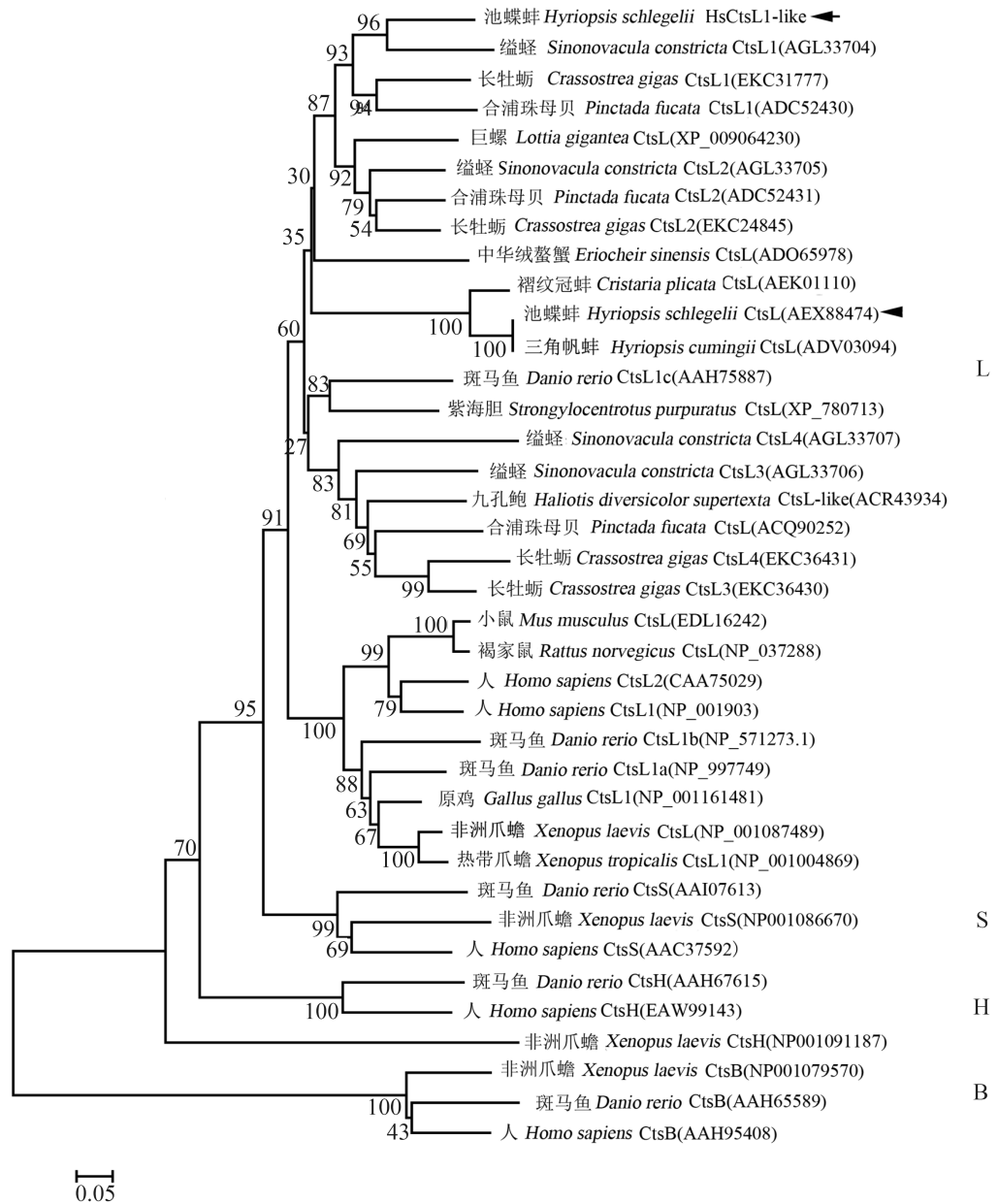


图 3 利用MEGA 4.0软件构建的基于CtsL氨基酸序列的NJ系统进化树

池蝶蚌HsCtsL1-like的位置用箭头标示；分叉处数值表示1000次重复抽样所得到的置信度；标尺长度表明每个位点发生0.05次置换

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on CtsL amino acid sequences by MEGA 4.0

HsCtsL1-like is emphasized by an arrow. The branches were validated by bootstrap analysis from 1000 replications, which were represented by percentage in branch nodes

综上所述表明，HsCtsL1-like是属于典型的半胱氨酸蛋白水解酶。

在一些物种中，存在多个CtsL的亚型。如人基因组中，发现3个CtsL基因亚型序列，经检测只有2个会发生转录和表达^[24]。在斑马鱼中，也发现有3个CtsL基因亚型，其中的2个亚型序列相似性较高，亲缘关系较近，被认为是基因重复的结果，而第3个则认为可能是由其祖先CtsL进

化而来^[25]。近年来，发现双壳类的一些物种如长牡蛎^[11]、合浦珠母贝^[12-13]和缢蛏^[1]也存在CtsL的多个亚型，如牡蛎和缢蛏中甚至可检测到CtsL的4个亚型的转录子^[1]，合浦珠母贝也发现有3个CtsL亚型^[12-13]，并且这些亚型有着胚胎发育阶段和不同组织的表达特异性和差异性，暗示着它们参与了不同的生物学功能。本研究中，我们从池蝶蚌中克隆并鉴定了一个新的CtsL(HsCtsL1-like)基

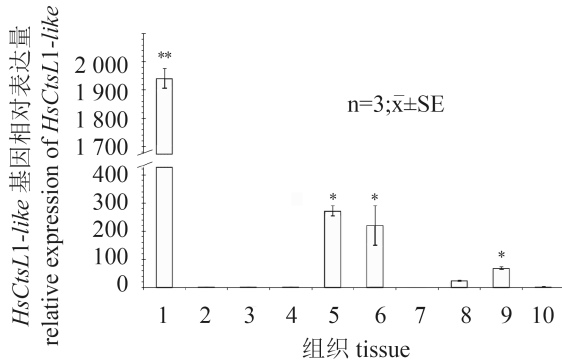


图 4 HsCtsL1-like 基因在池蝶蚌不同组织中的相对表达分析

以β-actin为内参基因, 所显示的相对定量数据为平均值±标准误差, “*”表示该组织相对其他组织转录差异显著(P<0.05), “**”表示该组织相对其他组织转录差异极显著(P<0.01)。其中, 1. 肝脏, 2. 鳃, 3. 腹足, 4. 心脏, 5. 卵巢, 6. 精巢, 7. 肾脏, 8. 血细胞, 9. 肠, 10. 外套膜

Fig. 4 Analysis of relative expression of HsCtsL1-like in different tissues of H. schlegelii

The relative expression of gene transcript from qRT-PCR analysis was calculated to the β-actin mRNA level. Data are given as plus or minus the standard error of the means(means±SE), “*” indicates P<0.05, “**” indicates P<0.01. 1. Liver, 2. Gill, 3. Foot, 4. Heart, 5. Ovary, 6. Testis, 7. Kidney, 8. Blood, 9. Intestines, 10. Mantle

因, 与之前鉴定的HsCtsL^[16]相比, 两者核苷酸序列中ORF区相似性仅为60.33%, 推导的蛋白序列相似性为52.91%。BLASTP结果显示, 推导的HsCtsL1-like蛋白同缢蛭(AGL33704.1) CtsL1的相似性最高, 达到67%。从构建的蛋白序列进化树也发现, HsCtsL1-like同缢蛭CtsL1也是聚在同一小支上, 然后再同长牡蛎、合浦珠母贝的CtsL1聚在稍大一支上, 而我们之前鉴定的HsCtsL和已报道的三角帆蚌、褶纹冠蚌CtsL则单独聚在另一支上。我们构建的系统进化树和Niu等^[1]所构建的该类基因的蛋白进化树有较大的聚类相类似, 由此推测, 在池蝶蚌中, HsCtsL1-like可能是隶属于CtsL家族中亚型1, 且HsCtsL1-like和HsCtsL基因重复发生较早, HsCtsL1-like可能是由其祖先CtsL-like进化而来, 它们这种在进化过程中产生较大的序列差异也许会造成功能上分工不完全相同。

通常情况下, 基因组织表达分析可为研究该基因的体内生物学功能提供一定的信息^[1, 8, 18]。HsCtsL1-like在肝脏表达量最高, 其次是卵巢和精巢, 这与缢蛭CtsL^[1]和斑马鱼CtsL1a^[25]的组织表达结果一致; 此外, 合浦珠母贝CtsL^[12]、脊

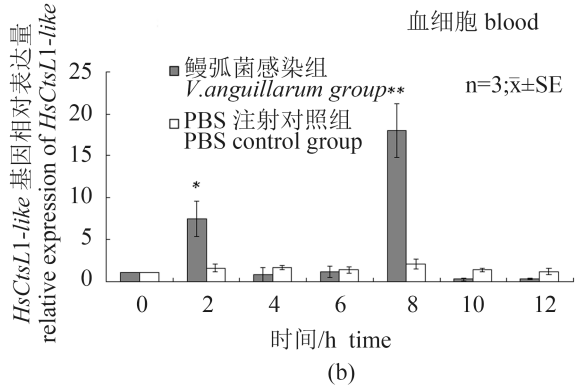
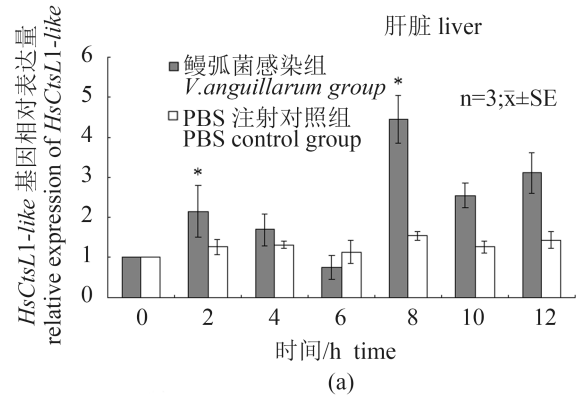


图 5 池蝶蚌HsCtsL1-like mRNA在鳃弧菌刺激下肝脏(a)和血细胞(b)中的表达特征

“*”表示对应时间点相对于其他时间点差异显著(P<0.05); “**”表示对应时间点相对于其他时间点差异极显著(P<0.01)

Fig. 5 Expression level of the HsCtsL1-like mRNA in liver (a) and blood (b) after Vibrio anguillarum stimulation.

“*”indicates a significant difference (P<0.05) at this point compared with other time points; “**”indicates a vety significant difference (P<0.01) at this time compared with other points

尾白虾CtsL^[10]、中华绒螯蟹CtsL^[8]、半滑舌鳎(Cynoglossus semilaevis) CtsL^[26]等也发现在肝脏中表达量最高。结果分析表明, 其一, 肝脏是参与HsCtsL1-like转录储存和释放的主要器官; 其二, HsCtsL1-like可能参与了肝脏所承担的消化功能和免疫反应。另外, HsCtsL1-like的组织表达情况不同于我们以前鉴定HsCtsL^[16], 其转录子在卵巢和精巢中的表达量非常高, 这暗示该亚型有可能参与池蝶蚌性腺发育或功能维持等多种功能。正如在斑马鱼中, CtsL1a在卵巢组织和发育阶段胚胎卵黄囊细胞也具较高丰度的转录, 推测其参与卵黄蛋白水解, 可提供胚胎发育需要的营养^[25]。

CtsL作为一种溶酶体蛋白, 近年来在无脊椎动物的先天免疫调控方面取得了较大进展。

De Gregorio^[27]对黑腹果蝇的研究表明, *CtsL* 表达量在细菌刺激后显著上调, 认为*CtsL* 是一种参与机体免疫反应的重要因子; 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在被白斑综合征病毒感染后, *CtsL* 在肝胰腺中的表达量显著上调, 表明其参与了病毒防御过程^[28]; 鳃弧菌胁迫下, 脊尾白虾*CtsL* 基因也参与了其免疫应答反应^[10]。被鳃弧菌感染后的中华绒螯蟹*CtsL* 在血细胞中的表达量发生显著性变化^[8]; 双壳类中, 在被溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染后, 合浦珠母贝*CtsL1* 和*CtsL2* 的表达量出现了急剧变化^[12-13]。缢蛏中4个*CtsL* 亚型在被鳃弧菌刺激后均被诱导上调表达^[1]。在淡水贝类中, 我们以前鉴定的*HsCtsL*, 在被嗜水气单胞菌感染后, 其表达量也被诱导上调^[16], 类似的基因表达情况也见于嗜水气单胞菌刺激后的褶纹冠蚌^[15]。由此可见, *CtsL* 可能对于无脊椎动物在清除病原体的防御反应中发挥着重要的作用。为了研究新鉴定*HsCtsL1-like* 在池蝶蚌中是否也参与类似的功能, 本研究设计了同样为革兰氏阴性菌的鳃弧菌感染实验, 发现注射鳃弧菌后的池蝶蚌肝脏和血细胞中*HsCtsL1-like* 表达量均发生了明显变化, 且以一种时间依赖方式被不同程度地表达上调, 变化趋势基本一致。贝类肝脏能够分泌多种不同的酶来水解病原微生物, 参与消化和防御功能。此外, *HsCtsL1-like* 在健康池蝶蚌血细胞中相对表达量并不高, 然而, 当受到鳃弧菌注射后, 血细胞中*HsCtsL1-like* 较其感染前发生了极其明显的表达变化, 且变化幅度明显高于肝脏, 说明*HsCtsL1-like* 可能较大程度上是通过血淋巴发挥对病原菌入侵的防御作用, 其在池蝶蚌血细胞中是一种诱导型的表达调控机制。血细胞是贝类非特异性免疫防御的首要组织, 在病原菌入侵后担当机体非特异性免疫防御重任, 能够比其他组织更迅速地上调*HsCtsL1-like* 基因的表达。

本研究成功克隆了池蝶蚌*HsCtsL1-like* 基因全长cDNA序列, 通过分析鳃弧菌感染后池蝶蚌肝脏和血细胞中*HsCtsL1-like* 基因表达特征, 可以进一步认定*HsCtsL1-like* 基因也参与了池蝶蚌的免疫应答反应, 在清除病原体的防御反应中起着重要作用, 此为将来深入研究池蝶蚌*HsCtsL1-like* 和*HsCtsL* 的功能关系以及它们在病原体刺激下发挥免疫功能的途径和机理奠定了基础; 同时也为指导池蝶蚌的遗传改良和抗病品

系的培育提供理论参考依据。

参考文献:

- [1] Niu D H, Jin K, Wang L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 581-588.
 - [2] 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.
 - [3] Furuyama N, Fujisawa Y. Distinct roles of cathepsin K and cathepsin L in osteoclastic bone resorption[J]. *Endocrine research*, 2000, 26(2): 189-204.
 - [4] Kos J, Werle B, Lah T, *et al.* Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer[J]. *International Journal of Biological Markers*, 2000, 15(1): 84-89.
 - [5] Lindeman J H N, Hanemaaijer R, Mulder A, *et al.* Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone[J]. *The American Journal of Pathology*, 2004, 165(2): 593-600.
 - [6] Stahl S, Reinders Y, Asan E, *et al.* Proteomic analysis of cathepsin B and L-deficient mouse brain lysosomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics*, 2007, 1774(10): 1237-1246.
 - [7] Sansri V, Meemon K, Changklungmoa N, *et al.* Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L[J]. *Vaccine*, 2015, 33(13): 1596-1601.
 - [8] 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.
 - [9] Arockiaraj J, Gnanam A J, Muthukrishnan D, *et al.* *Macrobrachium rosenbergii* cathepsin L: molecular characterization and gene expression in response to viral and bacterial infections[J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(9): 569-579.
 - [10] 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[J]. *动物学研究*, 2013, 34(1): 39-46.
- 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(in Chinese).
- [11] Gueguen Y, Cadoret J P, Flament D, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Gene, 2003, 303: 139-145.
- [12] Ma J J, Zhang D C, Jiang J J, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L1 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(3): 501-507.
- [13] 麻建军, 张殿昌, 崔淑歌, 等. 合浦珠母贝组织蛋白酶L2基因的特征与组织表达分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 701-712.
- Ma J J, Zhang D C, Cui S G, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L2 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China,2010, 17(4): 701-712(in Chinese).
- [14] 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[J]. 生物技术通报, 2011(6): 104-111.
- Bai Z Y, Wang G L, Li J L. Cloning and characterization of Cathepsin L gene and evolution analysis in *Hyriopsis cumingii*[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(6): 104-111(in Chinese).
- [15] Hu X J, Hu X P, Hu B Q, *et al.* Molecular cloning and characterization of cathepsin L from freshwater mussel, *Cristaria plicata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(2): 446-454.
- [16] 彭扣, 王军花, 刘彤彤, 等. 池蝶蚌组织蛋白酶L基因的组织表达及免疫应激分析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(6): 1128-1134.
- Peng K, Wang J H, Liu T T, *et al.* Expression analysis and immune response of the cathepsin L from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(6): 1128-1134(in Chinese).
- [17] 谢凯, 徐灵, 盛军庆, 等. 嗜水气单胞菌诱导的池蝶蚌血细胞cDNA文库的构建和亲环蛋白基因序列的初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 783-789.
- Xie K, Xu L, Sheng J Q, *et al.* The full-length cDNA library of hemocyte induced by *Aeromonas hydrophila* and molecular characteristics of *Cyclophilin A* from *Hyriopsis schlegelii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 783-789(in Chinese).
- [18] Peng K, Wang C Y, Wang J H, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis, and cadmium stress-rated expression changes of BTG1 in freshwater pearl mussel (*Hyriopsis schlegelii*)[J]. Zoological Research, 2014, 35(5): 389-397.
- [19] Peng K, Wang J H, Sheng J Q, *et al.* Molecular characterization and immune analysis of a defensin from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*[J]. Aquaculture, 2012, 334-337: 45-50.
- [20] He S H, Peng K, Hong Y J, *et al.* Molecular properties and immune defense of two ferritin subunits from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3): 865-874.
- [21] 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.
- [22] 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 of the United States of America, 1993, 90(7): 3063-3067.
- [23] Wang B, Shi G P, Yao P M, *et al.* Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(48): 32000-32008.
- [24] Bryce S D, Lindsay S, Gladstone A J, *et al.* A novel family of cathepsin L-like (CTSLL) sequences on human chromosome 10q and related transcripts[J]. Genomics, 1994, 24(3):568-576.
- [25] Tingaud-Sequeira A, Cerdà J. Phylogenetic relationships and gene expression pattern of three different cathepsin L (CtSl) isoforms in zebrafish: CtSl is the putative yolk processing enzyme[J]. Gene, 2007, 386(1-2):98-106.
- [26] Chen L, Zhang M, Sun L. Identification and expressional analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(6):1270-1277.
- [27] De Gregorio E, Spellman P T, Rubin G M, *et al.* Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the

- United States of America, 2001, 98(22): 12590-12595
- [28] Zhao Z Y, Yin Z X, Wang S P, *et al.* Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(5): 520-534.

Molecular characterization and expression analysis of Cathepsin L1-like from *Hyriopsis schlegelii*

PENG Kou, HU Beijuan, ZHAO Daxian, WANG Junhua, SHENG Junqing,
WU Di, SHI Jianwu, HONG Yijiang*

(School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: In order to study the role of another Cathepsin L (*CtsL*) isoform from *Hyriopsis schlegelii* in immune responses, we isolated and characterized a novel *CtsL* gene from the freshwater pearl mussel *Hyriopsis schlegelii* using cDNA library screening and rapid amplification of cDNA ends (RACE), and it was named *HsCtsL1-like* (GenBank accession No. KF015273). The *HsCtsL1-like* cDNA was 1280 bp long, and consisted of a 5'-untranslated region (UTR) of 31 bp, a 3'-UTR of 256 bp with a polyadenylation signals (AATAAA) at 11 nucleotides upstream of the poly(A) tail, and an open reading frame (ORF) of 993 bp encoding a polypeptide of 330 amino acids with 36.86 ku predicted molecular weight. The theoretical isoelectric point was 6.23. Sequence analysis showed that the putative *HsCtsL1-like* protein sequence sharing similar structural features with other reported *CtsL*s containing a typical signal peptide sequence with 16 amino acids (Met¹~Ser¹⁶), a propeptide inhibitor domain (Try²⁵~Phe⁸⁴) and a mature domain (Leu¹¹⁴~Val³³⁰). And some signature sequence tags were identified for *CtsL* family proteins in other species including the oxyanion hole (Gln), the active triad formed by Cys, His and Asn, and the conserved ERF/WNIN, GNFD, GCXGG and OCHN motifs can all be found in the *HsCtsL1-like* protein sequence. Moreover, homology analysis revealed that *HsCtsL1-like* shared the highest identity (67%) with *CtsL1* (AGL33704.1) from the razor clam, *Sinonovacula constricta*, while the similarities of *HsCtsL1-like* with the reported *Hyriopsis cumingii* (ADV03094) and *H. schlegelii* *CtsL* (AEX88474) were both 52.91%. The phylogenetic tree revealed that the *HsCtsL1-like* clustered with the invertebrate *CtsL* cysteine proteases and was also closely related to *S. constricta*, *Crassostrea gigas* and *Pinctada fucata* *CtsL1*. Real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) showed that *HsCtsL1-like* is expressed in a wide range of tissues including the liver, gills, foot, heart, ovary, testis, kidney, blood, intestines and mantle, with the highest level of transcripts in liver, followed by ovary, testis, intestines and blood, while there is rare expression in other tissues. After *Vibrio anguillarum* stimulation, the expression level of *HsCtsL1-like* mRNA was significantly up-regulated at 2 h and 8 h in liver and blood. These results suggested that *HsCtsL1-like* belongs to subtype 1 of the *CtsL* subfamily, and it might play an important role in the freshwater mussel, *H. schlegelii* immune response.

Key words: *Hyriopsis schlegelii*; cathepsin L1-like (*CtsL1-like*); tissues expression; cloning; sequence analysis; qRT-PCR

Corresponding author: HONG Yijiang. E-mail: yijianghong@126.com

Funding projects: Key Scientific and Technological Program of Jiangxi Province, China (20121BBF60036); Natural Science Foundation of Jiangxi Province, China (20151BAB204035); Youth Fund of the Education Department of Jiangxi Province, China (GJJ14219); Science and Technology Landing Project of Jiangxi Province, China (KJLD12001); National Natural Science Foundation of China (31260282; 31260642; 31160534)