

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.02.004

企鹅珍珠贝组织蛋白酶 D 的 cDNA 克隆、序列特征分析和应激表达研究

潘俐玲^{1,2}, 黄桂菊¹, 成书莹^{1,2}, 王晓宁^{1,2}, 喻达辉¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 笔者初步研究了企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*) 组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD) 的基因克隆和功能, 通过同源克隆方法和 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 获得了企鹅珍珠贝组织蛋白酶 D 基因 (命名为 *pgCTSD*)。该基因 cDNA 全长 1 767 bp, 其中 5'UTR 为 38 bp, 3'UTR 为 553 bp, ORF 为 1 176 bp, 编码 392 个氨基酸, 包括信号肽 (Met₁-Ala₁₈)、前体域 (Leu₁₉-Lys₄₇) 和成熟域 (Tyr₄₈-Ser₃₉₂) 三部分, 分子量为 42.3 kDa, 等电点为 8.04。pgCTSD 氨基酸序列与大珠母贝 (*Pinctada maxima*) pmCTSD 的相似性最高 (79%), 与其他物种的相似性为 59% ~ 75%。荧光定量分析表明, 空白对照组中 *pgCTSD* mRNA 在闭壳肌、性腺、肝胰脏、外套膜和鳃组织中都有表达, 且在闭壳肌中表达量最少, 肝胰脏中最高。与试验对照组相比, 脂多糖 (LPS) 刺激 6 h 后性腺和肝胰脏显著下降, 闭壳肌的表达量虽不大但增加显著, 外套膜和鳃组织变化不显著; 哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 刺激 6 h 后肝胰脏和外套膜显著下降, 闭壳肌和鳃显著上升, 性腺无显著变化。肝胰脏中 *pgCTSD* 对 LPS 和弧菌刺激的应答反应表明 *pgCTSD* 可能参与了免疫反应。

关键词: 企鹅珍珠贝; 组织蛋白酶 D; LPS 刺激; 弧菌刺激; 组织表达模式

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)02-0022-08

cDNA cloning, characterization and challenge-based expression profiles of cathepsin D in winged pearl oyster *Pteria penguin*

PAN Liling^{1,2}, HUANG Guiju¹, CHENG Shuying^{1,2}, WANG Xiaoning^{1,2}, YU Dahui¹

(1. Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: We cloned the cathepsin D gene of winged pearl oyster (*Pteria penguin*) and conducted preliminary studies on its expression profiles. The cDNA sequence of cathepsin D was obtained from *P. penguin* (named as *pgCTSD*) by using homology cloning method and RACE approach. The full length of the cDNA is 1 767 bp long, with a 5'UTR of 38 bp, an ORF of 1 176 bp, encoding 392 amino acids and a 3'UTR of 553 bp. The predicted amino acid sequence is consisted of a signal peptide of 18 aa, a pro-sequence of 29 aa and a mature protein of 345 aa, with an estimated isoelectric point of 8.04 and molecular mass of 42.3 kDa. The amino acid sequence of its *pgCTSD* is highly similar with that of *Pinctada maxima* (79% similarity), and shares 59% ~ 75% similarity with other organisms. The fluorescent quantitative analysis suggests that *pgCTSD* mRNA expresses in all the tissues tested including adductor muscle, gonad, hepatopancreas, mantle and gill, with higher expression level in hepatopancreas and lower level in adductor muscle. Compared with the control, the expression level of *pgCTSD* in the LPS-challenged test groups

收稿日期: 2011-07-17; 修回日期: 2011-11-29

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48)

作者简介: 潘俐玲 (1986-), 女, 硕士研究生, 从事海洋生物技术研究。E-mail: lingli8611@yahoo.com.cn

通讯作者: 喻达辉, E-mail: pearlydh@163.com

decreases in tissues of gonad and hepatopancreas significantly but increases in adductor muscle in 6 h after injection of LPS, yet no obvious change was observed in mantle or gill tissues. In 6 h after injection of *Vibrio harveyi*, the expression profile of pgCTSD decreases in hepatopancreas and mantle but increases in adductor muscle and gill, yet no significant change is found in gonad. The cDNA expression's response to challenges of LPS and *Vibrio* bacteria in hepatopancrea suggests pgCTSD's participation in immune reaction.

Key words: *Pteria penguin*, cathepsin D, LPS challenge, *Vibrio* challenge, tissue expression profile

组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD) 属于天冬氨酸蛋白酶 (EC 3.4.23.5), 广泛存在于生物界当中, 具有多种生物功能。在哺乳动物中发现 CTSD 与抗原呈递有关并具有抗病抗逆作用^[1], 在鲶鱼 (*Parasilurus asotus*)、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicandatus*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中发现 CTSD 前体与抗菌肽 Parasin I 的形成有关^[2], 在巨噬细胞中具有降解病原体的作用^[3], 还能够降解内涵体中的蛋白质, 如血红蛋白、血清白蛋白和肌红蛋白等^[4]。此外还发现在鱼类中该酶参与性腺发育、饥饿与迁移过程中肌肉内蛋白质的降解^[5]。

到目前为止, 许多物种的组织蛋白酶基因序列已在 GenBank 中登录, 包括哺乳动物、鸟类、鱼类、节肢动物的昆虫和甲壳动物, 但软体动物双壳类中仅报道了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 和大珠母贝 (*Pinctada maxima*) 的组织蛋白酶 D 基因^[6-7], 以及合浦珠母贝 (*P. fucada*) 的组织蛋白酶 L1、L2 基因^[8-9], 其他珍珠贝的组织蛋白酶基因尚未见报道。企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*) 是一种热带、亚热带的大型海产经济双壳类, 主要分布于中国的广东、广西、海南、台湾沿海以及日本九州的南部、琉球群岛直至菲律宾等地, 具有生长快、个体大、生命力强和珍珠质分泌旺盛的特点, 可用于培育附壳珠和大型游离珍珠。该研究克隆了企鹅珍珠贝组织蛋白酶 D 的 cDNA 序列, 并对其在脂多糖 (LPS) 和哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 刺激下的组织应激表达特征进行了初步研究, 以期为进一步探究其抗病抗逆机理奠定基础, 为珍珠贝类抗逆育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

企鹅珍珠贝取自海南三亚, 壳长 5.98 ~ 8.37 cm, 体质量 10.12 ~ 28.44 g, 于 25 ~ 27 °C 充气海水中暂养 1 周后取肝胰脏组织快速保存于 RNA 样

品保存剂 (Takara) 中, 参照 Trizol (Invitrogen) 说明书提取总 RNA。用紫外分光光度计测量光密度 OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm}, 以确定 RNA 的浓度和纯度。然后用 M-MLV 逆转录酶 (Takara) 合成一链 cDNA, 反应体系为 RNA 1 μg, Oligo-dT (50 μmol·L⁻¹) 1 μL, 加 RNase free dH₂O 至 6 μL, 70 °C 保温 10 min 后冰上急冷 2 min 以上; 在上述混合液中加入 5 × M-MLV 缓冲液 2 μL, dNTPs (10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL, RNase Inhibitor 10 U, M-MLV 200 U, 加 RNase free dH₂O 至 10 μL, 42 °C 保温 1 h, 70 °C 保温 15 min 后冰上冷却, -20 °C 保存。

1.2 全长 cDNA 的克隆与测序

基因克隆方法参照黄桂菊等^[10], 所用引物见表 1。用笔者实验室的大珠母贝组织蛋白酶 D 简并引物 pmCTSD F1、pmCTSD F2 扩增企鹅珍珠贝的中间片段, PCR 反应总体积为 20 μL, 包括单链 cDNA 0.5 μL、dNTPs 0.2 mmol·L⁻¹, 引物各 1 μmol·L⁻¹、MgCl₂ 4.0 mmol·L⁻¹、10 × buffer 2 μL 和 Taq 酶 0.5 U。PCR 扩增程序为 94 °C 5 min, 35 个循环; 94 °C 30 s, 48 °C 30 s; 72 °C 1 min, 72 °C 10 min。根据扩增得到的中间片段设计特异性引物 pgCTSD 3' F1、pgCTSD 3' F2 和 pgCTSD 5' R1、pgCTSD 5' R2 (表 1) 用于 RACE PCR。

3'RACE: 用引物 pgCTSD 3' F1 和 Adaptor 进行第一轮扩增, 除引物外反应体系与中间片段克隆的相同, 反应程序为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 将第一轮 PCR 产物稀释 50 倍作为模板, 以 pgCTSD 3' F2 和 Adaptor 为引物进行第二轮扩增, 反应体系同上, 反应程序为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

5'RACE: 采用加尾法, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收 cDNA 第一链, 然后用末端转移酶 TdT 在第一链 cDNA 3' 端加上 poly (C) 尾作为第一轮 PCR 扩增的模板, 用 Oligo dG 和 pgCTSD 5' R1 引

物,反应体系同 3'RACE,反应程序为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。将第一轮 PCR 产物稀释 50 倍作为模板,用 Oligo dG 和 pgCTSD 5' R2 进行第二轮 PCR 扩增,除引物外反应体系同上,反应程序为 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环;最后 72 °C 10 min。

中间片段产物和 RACE 产物经电泳后切胶回收,将回收产物克隆到 pMD-18T 载体中,转化至大肠杆菌 DH5 α ,经菌液鉴定后送往上海生工公司测序。

表 1 企鹅珍珠贝 *pgCTSD* 基因克隆和组织表达所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for cloning and tissue expression of *pgCTSD* in *P. penguin*

引物 primer	序列 sequence(5'→3')
pmCTSD F1	GGMTCMTCYAACYTGTGGGT
pmCTSD R1	CATNCCDAGRATHCCRTCRAAYT
pgCTSD 3' F1	ATTTCTGTAGATGGAGTCGTGCCG
pgCTSD 3' F2	AATGATGAATGGGAAGGCAAGC
pgCTSD 5' R1	GCCTTCCATTCATCATTATCC
pgCTSD 5' R2	GGCTTCAGCAAATGTCTGTCTCT
Oligo-dT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT (30) VN
Adaptor	AAGCAGTGGTATCAACGC
Oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGGGH
β -actin F	CGGTACCACCATGTTCTCAG
β -actin R	GACCCGATTCATCGTATTCC
pgCTSD F	AAGTCATCCACCTACAAAGCCAA
pgCTSD R	ACAGCAATCCCAGCAACAGTTAC

1.3 序列特征分析

将 5'RACE 片段、中间片段和 3'RACE 片段序列进行拼接,然后用 DNASTar 软件预测氨基酸序列;分别用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)、Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite>)、PredictProtein 的 PHD (<http://www.predictprotein.org/>)和 Swiss (<http://swissmodel.expasy.org/>)软件预测信号肽、蛋白结构域和三级结构;用 NCBI 中的 BLASTp 搜索同源蛋白,然后用 ClustalX 进行多序列比对,用 MEGA 3.1 软件重建系统发育进化树。

1.4 LPS 和弧菌刺激试验

试验于 2010 年 5 月在海南三亚南海水产研究所热带水产研究开发中心进行。企鹅珍珠贝经水泥池驯养后用于试验,设空白对照组、处理对照组、LPS 刺激组和哈维弧菌刺激组,各组 3 个重复,每个重复用 3 个贝。空白对照组不做任何处理;处理对照组闭壳肌注射 200 μ L PBS; LPS 刺激组:取 LPS 溶解于 PBS 中,使 LPS 终质量浓度达 10 μ g \cdot mL⁻¹,闭壳肌内注射 LPS 200 μ L;弧菌刺激组:哈维弧菌经 2216E 液体培养基扩大培养后离心收取菌液,平板计数法计数后用 PBS 悬浮哈维弧菌,使 OD_{600 nm} = 0.4,闭壳肌内注射 200 μ L 悬液哈维弧菌。6 h 后取 4 组企鹅珍珠贝的闭壳肌、性腺、肝脏、外套膜和鳃组织保存于 RNA 样品保存剂中,带回实验室用于表达分析。

1.5 组织表达分析

参照 Trizol (Invitrogen)说明书提取闭壳肌、性腺、肝脏、外套膜和鳃组织的总 RNA,并检测其浓度和纯度。用 RQ1 RNase-free DNase 消化总 RNA 样品中的 DNA。用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 试剂盒合成一链 cDNA 用于荧光定量表达分析。根据 *pgCTSD* 的 cDNA 序列设计特异性引物 *pgCTSD* F 和 *pgCTSD* R (表 1)。PCR 反应体系为 20 μ L: 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L, 1 μ L cDNA, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 8.6 μ L 双蒸水,每个样品设置 3 个 PCR 重复, β -actin 基因为内参基因^[11],引物序列见表 1。反应程序为 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 57 °C 15 s, 72 °C 30 s, 40 个循环;之后进行溶解曲线 (melting curve) 分析,以确定 PCR 反应的特异性。采用相对法 CT(2^{- Δ CT} method)分析 *pgCTSD* 的组织表达水平, Δ CT 为目的基因 CT 值与内参基因 CT 值的差值,以空白对照组闭壳肌的 Δ CT 为基准,与其他各组的 Δ CT 的差值为 $\Delta\Delta$ CT,最后用公式 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算相对表达量。用 GraphPad Prism 5.0 软件进行空白对照组和处理对照组间、处理对照组和刺激试验组间的 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 *pgCTSD* 的序列分析

将 5'RACE 片段 (355 bp)、中间片段 (376 bp) 和 3'RACE 片段 (1 347 bp) 进行拼接得到 1 767 bp 的全长 cDNA 序列 (图 1),命名为 *pgCTSD* (*P. penguin*

```

-37          AAGGACAAGCTAAGTAAAGACTAACACGGCGCACGAAG
1  ATGAATAAACTGTGGATTGTAGCTTTGCTTTGTGCAGTAGCATACTGCTCTGCATTACAA
1  M N K L W I V A L L C A V A Y C S A L Q
61  AGAATCAAACCTTCATAAATTC AAGTCTGTAAGACGAACACTGCAAGAAGTAGGAACATCA
21  R I K L H K F K S V R R T L Q E V G T S
121 ATAGAGGCTTTACAAAACAAATATAATGTATACAAAGTTGAAGGACCTGCCCGGAGCCC
41  I E A L Q N K Y N V Y K V E G P A P E P
181 TTGTCTAATTATATGGATGCCCGACTACTATGGAGATATAACGATTGGTACTCCAGGTCAG
61  L S N Y M D A Q Y Y G D I T I G T P G Q
241 AGCTTCAAGGTCATATTTGATACCGGATCGTCCAATCTGTGGGTACCCTCAAAGAAATGC
81  S F K V I F D T G S S N L W V P S K K C
301 AAAGTGTGAGATATAGCTTGTACTTCATAACAAGTATGATTCCAGCAAGTCATCCACC
101  K L S D I A C L L H N K Y D S S K S S T
361 TACAAAGCCAATGGTACAGACTTCGAGATCCGATATGGAACAGGAAGCTTAAGTGGATT
121  Y K A Q G T D F E I R Y G T G S L T G F
421 CTCAGTACAGATACTGTAAGTGTGCTGGGATTGCTGTCAAAGGACAGACATTTGCTGAA
141  L S T D T V T V A G I A V K G Q T F A E
481 GCCACACAGCAACCAGGCATCACATTCGTTGCTGCCAAGTTTGACGGAATTCCTCGGTATG
161  A T Q Q P G I T F V A A K F D G I L G M
541 GGATATCAGACGATTTCTGTAGATGGAGTCGTGCCGGTCTTTATAATATGGTGAAACAG
181  G Y Q T I S V D G V V P V F Y N M V K Q
601 AATCTGGTACCAGCATCTGCTTCTCATTCTACTTGAACAGGGATCCCGGTGCTTCTGAT
201  N L V P A S V F S F Y L N R D P G A S D
661 GGAGGGGAGTTAATCCTTGAGGAGTCTAAGTATTATAAGGGCAACTTCATTAT
221  G G E L I L G G S D S K Y Y K G Q F T Y
721 CTCCCTGTAACCAAGCAGGGATACTGGCGTTCAAGATGGACGGGATAATGATGAATGGG
241  L P V T K Q G Y W R F K M D G I M M N G
781 AAGGCAAGCAAGTATTGTTCCGGAGGCTGTAAGGCTATCGCTGACACTGGCACTTCACTG
261  K A S K Y C S G G C K A I A D T G T S L
841 CTTGCTGGACCCAAGACTGAAGTTGATGCACTTAATAAACAATTGGAGCAACACCACTG
281  L A G P K T E V D A L N K Q I G A T P L
901 GCAGCTGGAGAGTATATGGTAGATTGTAGCAGTGTTC AAGCTTCCAGTAATATCGTTC
301  A A G E Y M V D C S S V S K L P V I S F
961 ATGCTCGGAGGACAACAGTTTGTATCTGCAAGGAAAAGACTATGTCCTAACTGTAACACAG
321  M L G G Q Q F D L Q G K D Y V L T V T Q
1021 CAAGGACAAACAATTTGCTTGAGTGGTTTTACAGGTATAGATGTCCTCCCAATGGA
341  Q G Q T I C L S G F T G I D V P P P N G
1081 CCTTTATGGATTCTAGGCGATGTTTTATTGAAAATTTTACACGGAATTTGACTTGGGA
361  P L W I L G D V F I G K F Y T E F D L G
1141 AATAACCAAGTTGGTTTTGCTACTGTTAATTCCTCGTAAACTTGACTTTAGGGAAACATA
380  N N Q V G F A T V N S S *
1201 GAATGCATGTGGGCGTGTGTAGTGACCATCTGTAATTTGCAGCAATAATATCTGGGAAAA
1261 ATGATAAGCACCCCTTATATCGTAAACTGTGATAATATGCTTATATAATCAAATTAGCTAA
1321 GGTATTTTTTTTATAAATCAAGGCGCGAGTAGTGCTTGTCTATCTATGCATTGTGAAT
1381 CACATAACTAAACATGTATATTTCTTTATATACTGCATTTGCTGCTGTATTTTGTTA
1441 AATTATGCTGTAGCATTAAAGCCATTTAGAAAATCTTAGTTACTATAAAAATGTTCCGCA
1501 TTTTACCAAGTTTAACATAAAAATAATTTGTGAGAAAATTTGTCATTTATGTTTGCTA
1561 CTTTGAAAATTAATCATTGTAGTACTGGAAGGTTATGTATGTATTCTACATTATGAAGA
1621 TCCAACACTCTCTATTGTACATAGCTACTTAGATGTTGATTGTTTGTATGATGTTTTTC
1681 AAATAGAGTCTTATTTCTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 pgCTSD 的 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

信号肽用下划线标出, 前体域切点以箭头表示, 天冬氨酸蛋白酶签名序列用阴影表示, 糖基化位点用方框和阴影表示, 非消化性组织蛋白酶 D 的特征序列用双下划线标出, GenBank 序列号为 HM989012

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of pgCTSD

The signal sequence is underlined. The vertical arrow indicates the putative cleavage position of pro-sequence. The shadowed are aspartyl proteases active sites. The boxed are N-glycosylation sites. The characteristic sequence of non-digestive cathepsin D is double underlined. GenBank accession No. is HM989012.

cathepsin D, GenBank 登录号: HM989013), 其中 5'UTR 为 38 bp, 3'UTR 为 553 bp, ORF 1 176 bp, 编码 392 个氨基酸, 包括信号肽 (Met₁-Ala₁₈)、前体域 (Leu₁₉-Lys₄₇) 和成熟域 (Tyr₄₈-Ser₃₉₂), 分子量为 42.3 kDa, 等电点为 8.04。pgCTSD 一级结构包含 2 段天冬氨酸蛋白酶签名序列 (Val₈₄-Val₉₅ 和 Ala₂₇₂-Gly₂₈₃)、2 个 N-连接的糖基化位点 (Asn₁₂₄ 和 Asn₂₃₇) 和 1 段非消化性组织蛋白酶 D 的特征序列

(DVPPPNGP)。

2.2 pgCTSD 的同源性比较和系统发生分析

pgCTSD 与大珠母贝的 pgCTSD 相似性最高 (79%), 与栉孔扇贝的相似性为 75%, 与其他物种的相似性为 59% ~ 75% (表 2)。非消化性组织蛋白酶 D 的特征序列与其他物种相似, 序列都符合 DxPxPxA/GP 氨基酸排列顺序^[12]。

NJ 树表明, 组织蛋白酶 D 分为 2 支, 一支包

表 2 企鹅珍珠贝 pgCTSD 蛋白与其他动物组织蛋白酶 D 的相似性比对结果

Tab. 2 Similarity of amino acid sequences of pgCTSD with other cathepsin D

物种 species	登录号 accession No.	相似性/% similarity
大珠母贝 <i>Pinctada maxima</i>	HM989013	79
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	ACL13150.1	75
美国龙虾 <i>Homarus americanus</i>	ACV53024.1	68
太平洋褶柔鱼 <i>Todarodes pacificus</i>	BAD15111.1	67
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	XP_001657556.1	66
意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	XP_392857.2	65
桑天牛 <i>Apriona germari</i>	AAL51056.1	65
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	AAY43135.1	62
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	ABV59077.1	59
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAI54316.1	59
人类 <i>Homo sapiens</i>	ABM84473.1	59
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_990508.1	59
野猪 <i>Sus scrofa</i>	AAV90625.1	59
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	ACN43675.1	60

括哺乳动物、鸟类与鱼类; 另一支包括节肢动物和软体动物。其中大珠母贝、企鹅珍珠贝和栉孔扇贝聚成一小支 (图 2)。

2.3 pgCTSD mRNA 组织表达与应激表达特征分析

未进行任何处理的空白对照组中 pgCTSD mRNA 在闭壳肌、性腺、肝胰脏、外套膜和鳃组织中都有表达, 且在闭壳肌中最少, 肝胰脏中表达量最高, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 1 和 197.4 (图 3-a 和图 3-b, 空白组)。处理对照组注射 PBS 6 h 后肝胰脏在各组织中仍保持最高表达量 ($P > 0.5$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 160.8, 与空白对照组相比, 闭壳肌和性腺的表达量显著上升 ($P < 0.1$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 1.9 和 55.3, 肝胰脏有所下降, 外套膜和鳃组织显著下降 ($P < 0.1$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 31.6 和 24.0 (图 3-a 和图 3-b, PBS 组)。试验组注射

LPS 6 h 后, 除性腺外各组织表达量相差不大, 外套膜最高, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 30.6, 与处理对照组相比, 闭壳肌的表达量显著上升 ($P < 0.1$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 19.2, 性腺和肝胰脏显著下降 ($P < 0.1$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0、25.4, 外套膜和鳃组织变化不显著 (图 3-a, LPS 组)。弧菌刺激 6 h 后性腺的表达量在各组中最高, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 56.9, 与对照组相比, 闭壳肌和鳃组织的表达量显著上升 ($P < 0.1$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 13.3 和 42.7, 肝胰脏和外套膜显著下降 ($P < 0.1$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 26.4 和 9.6, 性腺无显著变化 (图 3-b, 弧菌组)。

4 讨论

此研究获得的企鹅珍珠贝 pgCTSD 与其他组织蛋白酶 D 一样是由信号肽、前体域和成熟域三

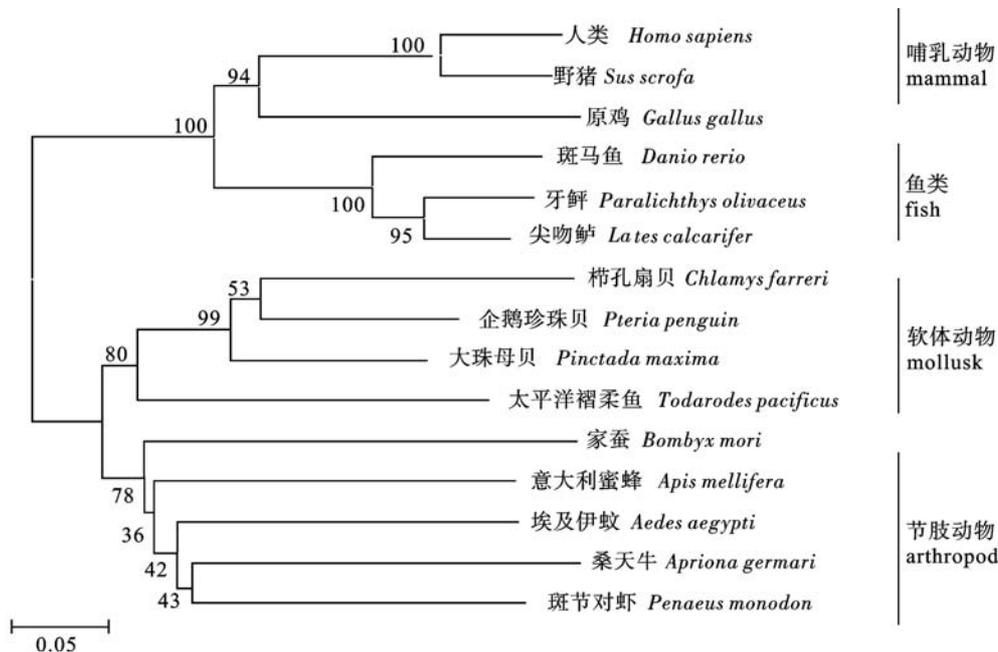


图 2 基于组织蛋白酶 D 的系统发育关系

Fig. 2 Phylogenetic relationship of animals based on cathepsin D by using NJ method

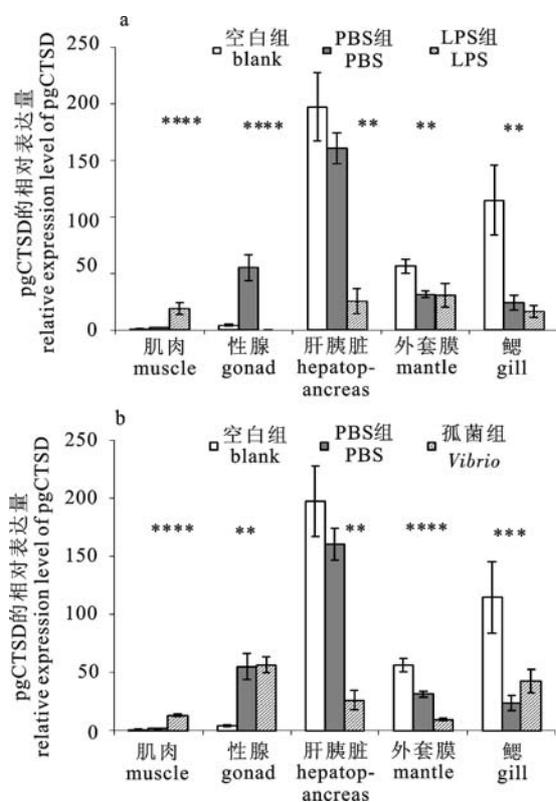


图 3 企鹅珍珠贝 pgCTSD 在 LPS(a) 和弧菌 (b) 刺激下的组织表达特征分析

Fig. 3 Tissue expression profile of pgCTSD challenged by LPS (a) and *Vibrio harveyi* (b)

部分组成，其中信号肽长 18 个氨基酸残基，与大珠母贝相同^[7]，而美国龙虾 (*Homarus americanus*)^[13] 和金鲷 (*Sparus aurata*)^[14] 分别为 16 个和 19 个，人类^[15] 和猪^[16] 均为 20 个，物种间存在较大差异。在 N-糖基化位点数量方面，企鹅珍珠贝 pgCTSD (2 个) 与大珠母贝^[7] 相同，与虹鳟 (1 个)^[17]、美国龙虾 CTSD1 (3 个)^[13]、金鲷^[14] (3 个) 等不同。在所分析的物种中企鹅珍珠贝的 pgCTSD 与大珠母贝 pgCTSD 的一致性最高，亲缘关系最近，与传统分类关系相符。

正常情况下企鹅珍珠贝 pgCTSD 在肝胰脏、鳃和外套膜中的表达量较高，其中在肝胰脏中最高，与栉孔扇贝、大菱鲆一致^[18-19]，但在 LPS 和弧菌刺激后相对表达量的变化情况不同。在肝胰脏中与正常表达量相比，PBS 和 LPS、弧菌刺激都引起表达量下降，但 LPS 和弧菌刺激后的表达量比 PBS 刺激和正常情况的表达量低很多，可能是因为产生了大量应激蛋白^[19]，导致 CTSD 表达的延迟，而 LPS 和弧菌又消耗了大量 CTSD，因此 CTSD 表达量大幅下降。在大菱鲆和栉孔扇贝^[18-19] 中也发现类似情况，表明组织蛋白酶参与了免疫反应，肝胰脏是贝类重要的免疫器官。大菱鲆在弧菌刺激后 CTSD 在肝胰脏的表达水平经历了下降、上升、再下降又上升的过程^[19]，而笔者只检测了企鹅珍珠

贝刺激 6 h 后 pgCTSD 在肝胰脏中的表达变化, 其时空表达模式还有待进一步研究。

LPS 和哈维弧菌刺激企鹅珍珠贝 6 h 后 pgCTSD 表达情况有所不同, 前者性腺表达量显著下降, 外套膜和鳃组织中无显著变化; 后者性腺无明显变化, 外套膜显著下降, 鳃组织显著上升。两者表达情况的差异可能与刺激物成分不同有关。LPS 是革兰氏阴性菌 (Gram-negative bacteria) 的细胞壁成分, 组成比较单一, 而哈维弧菌包含多种致病因子, 如胞外蛋白 (OMP)、LPS 和胞外产物 (ECP) 等。虽然 LPS 能刺激多种细胞因子的表达^[20], 但对大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的研究表明, 单一成分的 LPS 的致病性比哈维弧菌弱^[21]。表明企鹅珍珠贝 CTSD 对不同致病成分的表达反应有所不同。

企鹅珍珠贝性腺 CTSD 表达量很低, 而大珠母贝性腺的正常表达量很高甚至比肝胰脏还高^[7], 它们可能处于不同的性腺发育时期或种间存在差异。在栉孔扇贝中也发现性腺的表达量较高, 而在弧菌刺激后显著下降^[18], 其所用栉孔扇贝也为成熟个体。在虹鳟中 CTSD 在卵巢不同发育时期表达量也不同, 甚至精巢和卵巢的表达量也不同^[17], 表明 CTSD 对性腺发育具有一定作用。

参考文献:

[1] BANKOWSKA A, GACKO M, CHYCZEWSK E, et al. Biological and diagnostic role of cathepsin D[J]. Roczniki Akad Med Białymst, 1997, 42(1): 79-85.

[2] CHO J H, PARK I Y, KIM H S, et al. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish[J]. FASEB J, 2002, 16(3): 429-431.

[3] DIMENT S, MARTIN K J, STAHL P D. Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins[J]. J Biol Chem, 1989, 264(23): 13403-13406.

[4] Van NOORT J M, Van der DRIFT A C. The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes[J]. J Biol Chem, 1989, 264(24): 14159-14164.

[5] MOMMSEN T P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work[J]. Comp Biochem Phys B, 2004, 139(3): 383-400.

[6] LI Chenghua, ZHANG Huan, LI Ling, et al. Identification of a cathepsin D potentially involved in H2A cleavage from scallop *Chlamys farreri*[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(3): 1451-1460.

[7] 潘俐玲, 黄桂菊, 喻达辉, 等. 大珠母贝组织蛋白酶 D 的 cDNA 克隆、序列特征分析及应激表达研究[J]. 广东农业科学,

2011, 38(10): 4-9.

PAN Liling, HUANG Guiju, YU Dahui, et al. Molecular cloning and characterization of cathepsin D in pearl oyster *Pinctada maxima* and its tissue expression profiles under *Vibrio harveyi* challenge[J]. Guangdong Agric Sci, 2011, 38(10): 4-9. (in Chinese)

- [8] MA Jianjun, ZHANG Dianchang, JIANG Jingjing, et al. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L1 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(3): 501-507.
- [9] 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): 701-711.
- MA Jianjun, ZHANG Dianchang, CUI Shuge, et al. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L2 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. J Fish Sci China, 2010, 17(4): 701-711. (in Chinese)
- [10] 黄桂菊, 喻达辉, 曲妮妮, 等. 企鹅珍珠贝热休克蛋白 70 基因的克隆与序列比较分析[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(1): 51-56.
- HUANG Guiju, YU Dahui, QU Nini, et al. Cloning and sequence comparison of heat shock protein 70 gene from penguin pearl oyster *Pteria penguin* [J]. J Trop Oceanogr, 2008, 27(1): 51-56. (in Chinese)
- [11] ZHANG Dianchang, JIANG Shigui, QIU Lihua, et al. Molecular characterization and expression analysis of the *Ikb* gene from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(1): 84-90.
- [12] PADILHA M H, PIMENTEL A C, RIBEIRO A F, et al. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2009, 39(11): 782-791.
- [13] ROJO L, MUHLIA-ALMAZAN A, SABOROWSKI R, et al. Aspartic cathepsin D endopeptidase contributes to extracellular digestion in clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammaurus* [J]. Mar Biotechnol (NY), 2010, 12(6): 696-707.
- [14] CARNEVALI O, CENTONZE F, BROOKS S, et al. Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in seabream, *Sparus aurata* [J]. Biol Reprod, 1999, 61(3): 785-791.
- [15] FAUST P L, KORNFIELD S, CHIRGWIN J M. Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(15): 4910-4914.
- [16] 梅盈洁, 李加琪, 陈瑶生, 等. 猪 CTSD 全长 cDNA 的克隆和表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(5): 432-436.
- MEI Yingjie, LI Jiaqi, CHEN Yaosheng, et al. Cloning and expression of porcine cathepsin D gene full-length cDNA [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2007, 38(5): 432-436. (in Chinese)
- [17] BROOKS S, TYLER C R, CARNEVALI O, et al. Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Gene, 1997, 201(1/2): 45-54.
- [18] LI Chenghua, ZHANG Huan, LI Ling, et al. Identification of a

- cathepsin D potentially involved in H2A cleavage from scallop *Chlamys farreri*[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(3): 1451-1460.
- [19] JIA Airong, ZHANG Xiaohua. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin D gene from turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(4): 606-613.
- [20] ZHANG Dianchang, MA Jianjun, JIANG Jingjing, et al. Molecular characterization and expression analysis of lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(7): 3335-3343.
- [21] 沈锦玉, 李新华, 潘晓艺, 等. 哈维氏弧菌的主要致病因子及其特性分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 37(2): 142-148.
- SHEN Jinyu, LI Xinhua, PAN Xiaoyi, et al. Characterization of major virulent factor produced by pathogenic *Vibrio harveyi* [J]. JZUS: Agric & Life Sci, 2011, 37(2): 142-148. (in Chinese)

《南方水产》首次入编《中文核心期刊要目总览》

日前, 本刊编辑部收到北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会的通知, 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《南方水产》(改名为《南方水产科学》)入编《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)之水产、渔业类的核心期刊。这是《南方水产》自2005年创刊以来首次入选中文核心期刊, 也是继2008年成为中国科技论文统计源期刊、2011年成为RCCSE中国核心学术期刊后的又一个重要里程碑, 标志着期刊的学术质量和影响力又迈上了新台阶, 实现了新的跨越。

由北京大学图书馆牵头编制的《中文核心期刊要目总览》是目前国内较权威的核心期刊工具, 应用相当广泛。2011年版《中文核心期刊要目总览》对核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个定量评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

近年来, 《南方水产》始终坚持以提高学术质量和影响力作为期刊发展的方向, 紧密围绕服务于我国水产科研和学科建设, 突出地方特色和专业优势, 办刊水平不断提升。入选中文核心期刊, 是对《南方水产》学术水平和影响力的极大肯定, 这一成绩的取得与主管部门和主办单位的关心与呵护, 以及广大读者、作者的大力支持与帮助密不可分。编辑部将以此为新的起点, 不断开拓创新, 进一步拓宽学术交流空间, 为实现期刊的更大发展而不懈努力。

希望广大读者、作者和专家学者一如既往地支持和关注本刊的发展!

《南方水产科学》编辑部

2012年2月27日