

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)组织蛋白酶 D 基因的克隆及其表达分析*

段亚飞^{1,2} 刘萍¹ 李吉涛¹ 李健¹ 陈萍¹
高保全¹ 徐文斐^{1,3} 王有昆^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 大连海洋大学 大连 116023)

摘要 采用 RACE 技术获得了总长为 1853bp 的脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)组织蛋白酶 D 基因全长 cDNA 序列。该基因 5'和 3'非编码区分别为 120bp 和 572bp, 开放阅读框为 1161bp, 推测编码 386 个氨基酸, 预测分子量为 42.36kDa, 理论等电点为 7.54, 命名为 *EcCatD* 基因。同源性和系统进化分析表明, *EcCatD* 基因与斑节对虾、美洲螯龙虾的相似性分别为 86%和 80%, 与斑节对虾和美洲螯龙虾紧密聚为一支。荧光定量 RT-PCR 结果表明, *EcCatD* 基因在血细胞中的相对表达量最高, 其次为肝胰腺。该基因在鳃弧菌和 WSSV 感染后的脊尾白虾血细胞和肝胰腺中的表达量显著增加, 并具有不同的时空表达趋势。结果表明 *EcCatD* 基因在脊尾白虾免疫反应中具有重要作用。

关键词 脊尾白虾, 组织蛋白酶 D, 基因克隆, 表达
中图分类号 Q342

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*), 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属(*Exopalaemon*), 是黄、渤海重要的底栖虾类(马朋等, 2012)。因其繁殖能力强、生长速度快及环境适应性强等特点(韩俊英等, 2011b), 其养殖面积得到迅速扩大, 成为我国近海重要的经济虾类。近年来, 随着集约化养殖及生态环境的不断恶化, 虾类疾病频繁发生, 造成了严重的经济损失(许文军等, 2010; Xu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012)。因此, 虾病及免疫机制的研究显得尤为重要。

组织蛋白酶 D (cathepsin D, *CatD*)是天冬氨酸蛋白酶家族的主要成员, 属于酸性溶酶体内切蛋白酶, 广泛存在于各种生物有机体中(杨远萍等, 2006)。组织蛋白酶 D 具有多种生物功能, 如降解细胞内外蛋白质, 激活酶原、激素原与生长因子, 参与细胞凋亡

等(Roberg *et al.*, 2002; Schestkova *et al.*, 2007; 潘俐伶等, 2011)。已发表的研究报道表明, 组织蛋白酶 D 在鲶鱼(*Parasilurus asotus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、大珠母贝(*Pinctada maxima*)、企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)(Cho *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2009; 潘俐伶等, 2011, 2012)等水产动物免疫系统中发挥重要作用。

目前, 许多物种的组织蛋白酶 D 基因已见相关报道, 但其在甲壳类中的研究仅见斑节对虾(*Penaeus monodon*)(GenBank 登录号: EF213114)和美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)(Rojo *et al.*, 2010)。鉴于组织蛋白酶 D 涉及多种生理功能, 为了深入了解组织蛋白酶 D 在脊尾白虾机体中的免疫作用, 本研究利用从本实验室构建的脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库中筛选得到的组织蛋白酶 D 基因 EST 序列, 采用 RACE 技术, 克隆得到该基因全长 cDNA 序列, 并对其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和白斑综合症病毒(white

* 国家高技术研究发展计划课题, 2012AA10A409 号; 国家虾产业技术体系, CARS-47 号; 公益性行业(农业)科研专项课题, 201103034 号; 中国水产科学研究院基本科研业务费资助, 2013A0701 号。段亚飞, E-mail: dxfei87@126.com

通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-02-17, 收修改稿日期: 2012-04-30

spot syndrome virus, WSSV)感染后的脊尾白虾组织中的表达特征进行了初步研究, 以期对脊尾白虾组织蛋白酶 D 生物学功能研究及其对病原的抗病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康脊尾白虾取自青岛胶州, 体长(5.81±0.32)cm, 体重(1.18±0.35)g。暂养于 200L 的 PVC 桶中, 每桶 30 尾, 暂养一周。养殖水温 24℃, 盐度 25, pH 8.2, 持续充氧, 每天换水 1/3, 投喂配合饲料。

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司; PMD18-T 载体和 Top 10 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

Trizol 试剂提取血细胞总 RNA, 紫外分光光度计与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。利用 SMARTTM RACE Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第一链。

1.3 全长 cDNA 的克隆及测序

根据本实验室构建的脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库(Duan *et al.*, 2013), 通过随机测序获得组织蛋白酶 D 基因的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物, 所有引物均由上海生工合成。

3'RACE: 以 SMARTTM RACE Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 使用引物 CatD-F1 (表 1)和通用引物 UPM 配对, 进行 3'端扩增。反应程序: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 72℃ 3min, 5 个循环; 94℃ 30s, 70℃ 30s, 72℃ 3min, 5 个循环; 94℃ 30s, 68℃ 30s, 72℃ 3min, 25 个循环; 72℃ 10min。

5'RACE: 以 SMARTTM RACE Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 使用引物 CatD-R1 (表 1)和通用引物 UPM, 进行 5'端扩增。反应程序同 3'RACE。

RACE 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 与 PMD18-T 载体连接, 转化 Top 10 感受态细胞, 阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后, 送往上海生工公司进行测序。

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果

进载体序列去除和序列拼接, 然后用 EditSeq 程序进行开放阅读框(ORF)的预测和氨基酸翻译。*EcCatD* 基因的核苷酸序列和推导氨基酸序列使用 BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对。利用 ProtParam 软件(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白质理化性质预测, 利用 Interpro Scan 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tool/InterProScan>)进行蛋白质功能结构域分析。使用 Clustal X 软件对脊尾白虾 *EcCatD* 与其它物种的 *CatD* 氨基酸序列进行多序列比对, 在此基础上采用 MEGA 4.0 软件, 以邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树。

1.5 鳃弧菌和 WSSV 感染实验

实验用 WSSV 粗提液为黄海水产研究所病研室所赠, 方法见李美玉等(2012)。实验用鳃弧菌为黄海水产研究所杨爱国实验室惠赠。实验用鳃弧菌于实验前一天进行菌种活化, 经 2611E 液体培养基扩大培养后离心取沉淀, 用无菌生理盐水稀释至 2×10^8 cfu/ml 的菌悬液, 4℃ 保存备用。

实验前随机挑取 10 尾脊尾白虾, 经白斑病毒综合征检测试剂盒检测证实无 WSSV 感染。随机选取暂养 7d 的健康脊尾白虾分为 3 组, 对照组、鳃弧菌感染组和 WSSV 感染组, 每组 50 尾。鳃弧菌感染组每尾在虾第二腹节部位注射鳃弧菌菌悬液 20 μ l, WSSV 感染组每尾在虾第二腹节部位注射 WSSV 粗提液 20 μ l, 对照组注射等体积生理盐水。各组分别于注射后 0、3、6、12、24、48、72h 取血细胞和肝胰腺, 用于 RNA 的提取, 每个时间点取 6 尾。此外, 为了检测脊尾白虾 *EcCatD* 基因在不同组织中的表达水平, 另取 6 尾健康脊尾白虾的血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃和眼柄组织, 用于 RNA 的提取。

1.6 *EcCatD* 的表达分析

Trizol 试剂提取不同实验组脊尾白虾血细胞和肝胰腺组织的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 方法按韩俊英等(2011a)进行。

根据已获得的脊尾白虾内参基因 18S rRNA 和组织蛋白酶 D 基因全长序列, 分别设计一对正反引物(18S rRNA-F 和 18S rRNA-R, CatD-F2 和 CatD-R2)(表 1), 对不同时间中 WSSV 和鳃弧菌感染的脊尾白虾的血细胞和肝胰腺中 *EcCatD* 基因的表达量进行检测。荧光定量 PCR 扩增体系为 20 μ l, 包括 10 μ l SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times), 0.8 μ l 10 μ mol/L 引物 CatD-F2, 0.8 μ l 10 μ mol/L 引物 CatD-R2, 0.4 μ l ROX Reference Dye (50 \times)*3, 2.0 μ l cDNA, 6.0 μ l DEPC 水。反应程

序为: 95°C 30s; 95°C 5s, 60°C 34s, 40 个循环; 95°C 15s, 60°C 1min, 95°C 15s。荧光定量 PCR 检测结果, 采用 2^{-ΔΔCT} 法用 SPSS 11.0 软件进行分析。

表 1 本研究所用引物序列

Tab.1 The sequence of primers in this study

引物	序列
CatD-F1	AGCCGTGAAAGACCAGAC
CatD-R1	GAAGGGGCAGCGATGAGT
CatD-F2	CAGTAGCCGTGAAAGACCAGA
CatD-R2	AAGAATCAACTCGCCACCTTC
18S rRNA-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S rRNA-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

2 结果与分析

2.1 *EcCatD* 基因全长 cDNA 克隆

利用 Trizol 试剂提取获得脊尾白虾血细胞总 RNA, 经紫外分光光度计检测, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.91, 表明总 RNA 纯度较高; 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 18S 和 28S rRNA 条带清晰, 完整性较好, 符合实验要求。以特异性引物 CatD-F1 和 CatD-R1 分别与通用引物 UPM 配对, 进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增, 获得一条长约 587bp 和 936bp 的特异性条带 (图 1)。

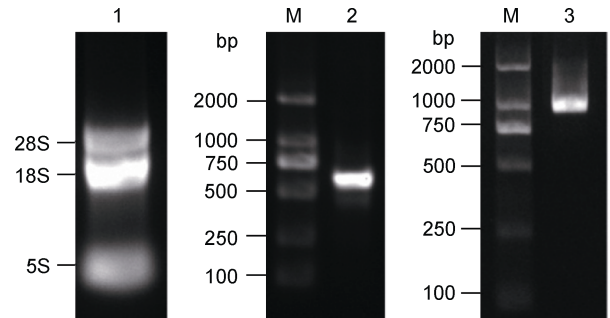


图 1 总 RNA 和 3'RACE、5'RACE 扩增产物的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Analysis of total RNA and amplification products of 3', 5'RACE by 1.0% agarose gel electrophoresis
M: DL 2000 Maker; 1: 总 RNA; 2: 3'RACE 产物; 3: 5'RACE 产物

2.2 *EcCatD* 基因全长 cDNA 序列特征分析

3'RACE 和 5'RACE 扩增产物分别测序后拼接, 获得脊尾白虾 *CatD* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *EcCatD*, GenBank 登录号为 JX508644。该基因全长 1853bp, 包括 120bp 的 5'端非翻译区(UTR), 572bp 的 3'端非编码区和 1161bp 的开放阅读框。3'端含有多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 PolyA 尾(图 2)。

氨基酸序列分析可知, *EcCatD* 基因编码一个由 386 个氨基酸残基组成的蛋白质, 包括信号肽(Met1-Ser16)、前体域(Glu19-Arg45)和成熟域(Arg46-Pro386),

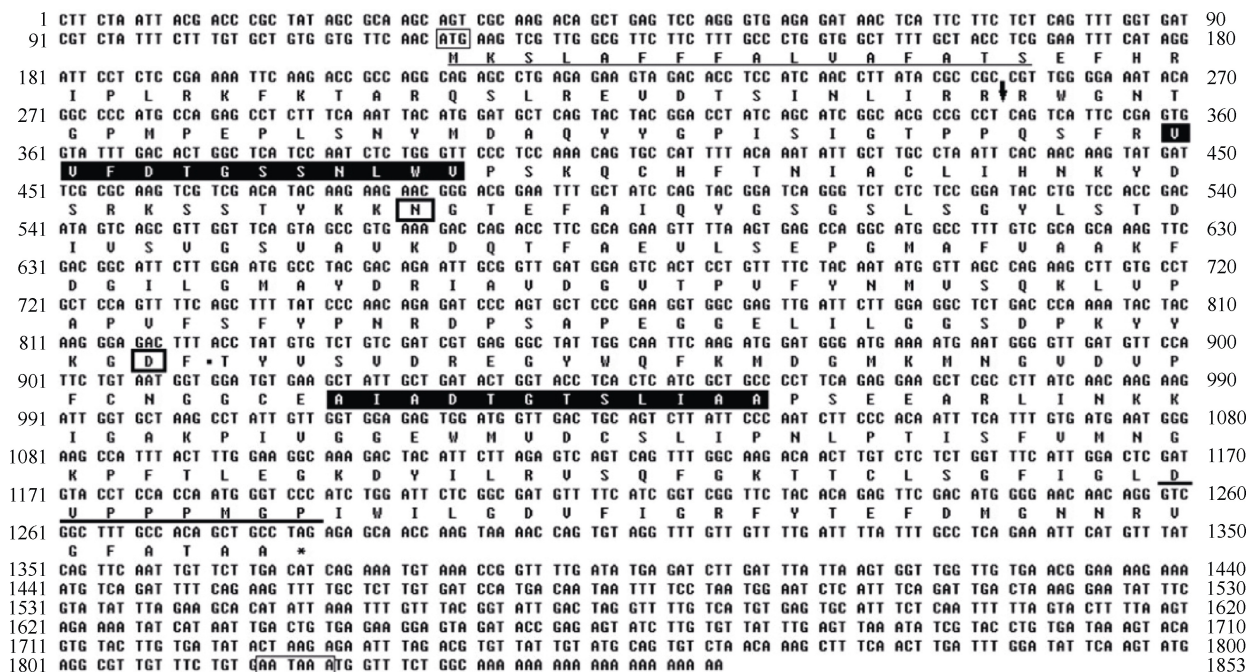


图 2 脊尾白虾 *EcCatD* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. carinicauda EcCatD* gene

注: 细线方框内的 ATG 为起始密码子, AATAAA 为加尾信号; 终止密码子 TAG 由 * 标出; 细下划线表示信号肽, 箭头表示前体域切点, 阴影表示天冬氨酸签名序列; 粗线方框内为 N-糖基化位点

分子量为 42.36 kDa, 理论等电点为 7.54。结构域分析表明, *EcCatD* 属于典型的组织蛋白酶中的天冬氨酸蛋白酶家族。*EcCatD* 一级结构包括 2 段天冬氨酸蛋白酶签名序列(Val80-Val91 和 Ala268-Ala279)、2 个 N-糖基化位点(Asn120 和 Asp233)和一段非消化性组织蛋白酶 D 特征序列 Asp350-Pro357(DVPPPNMGP)。

2.3 *EcCatD* 基因同源性分析

利用 BLASTP 对脊尾白虾 *EcCatD* 基因进行同源性分析, 发现脊尾白虾 *EcCatD* 基因与斑节对虾和美洲螯龙虾(ACV53024.1)的相似性最高, 分别为 86% 和 80%。与其它无脊椎动物如鼎突多刺蚁(*Polyrhachis vicina*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、四纹豆象(*Callosobruchus maculatus*) (ACO56332.1)、欧洲熊蜂(*Bombus terrestris*) (XP_003403066)和意蜂(*Apis mellifera*) (XP_392857)的同源性分别为 75%、72%、72%、70%和 69%; 与脊椎动物斑马鱼(*Danio rerio*)和鸡(*Gallus gallus*)的同源性分别为 59%和 57%。利用 MEGA 4.0 软件进行系统进化分析表明, 所有动物的 CatD 分为无脊椎动物和脊椎动物两支, 脊尾白虾 *EcCatD* 与无脊椎动物的斑节对虾和美洲螯龙虾的 CatD 紧密聚为一支(图 3)。

通过与斑节对虾、美洲螯龙虾、家蚕(*Bombyx mori*)、意蜂等其它动物的 CatD 编码的氨基酸序列进行比对, 发现脊尾白虾组织蛋白酶 D *EcCatD* 也存在与其它无脊椎动物一样的 2 段天冬氨酸蛋白酶标签系列(VFDTGSSNLWV 和 AIADTGTSLIAA)、1 段非消化性组织蛋白酶 D 的特征序列(DVPPPMGP)和 2

个 N-糖基化位点(N 和 D)。

2.4 脊尾白虾 *CatD* 基因组织表达分析

利用 Real-time PCR 分析了脊尾白虾 *EcCatD* 基因在不同组织中的表达水平, 结果表明: *EcCatD* 基因在血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃和眼柄中都有表达。其中, 在血细胞中表达量最高, 其次为肝胰腺、鳃、卵巢、肌肉、胃和肠, 在眼柄中的表达量最少(图 5)。

Real-time PCR 检测脊尾白虾在注射鳃弧菌和 WSSV 后不同时间血细胞中 *EcCatD* 基因的表达情况(图 6)。结果表明: 鳃弧菌和 WSSV 感染后, 血细胞中 *EcCatD* 基因表达量都显著高于对照组($P < 0.05$)。其中, 鳃弧菌感染组在 0—3h 不断上升, 于 6h 达到最高值, 然后表达值先下降后上升, 于 72h 恢复到初始水平。WSSV 感染组在注射 WSSV 早期(0h)先上升, 然后在 0—3h 出现下降, 于 3—6h 又不断上升至初始水平后下降至稳定水平, 总体表现为先降低再升高最后降低的趋势。

脊尾白虾在感染鳃弧菌和 WSSV 后, 肝胰腺中 *EcCatD* 基因的表达情况见图 7。结果表明: 与对照组相比, 鳃弧菌感染组肝胰腺中的 *EcCatD* 基因的表达有一定的滞后性, 具有显著差异的时间依赖性, 在 48h 表达量达到最大值, 且显著高于对照组($P < 0.05$), 然后于 72h 下降至初始水平; 而 WSSV 感染组的 *EcCatD* 表达量在注射早期(0—3h)出现下降, 于 3—6h 开始上升, 并显著高于对照组, 在 6h 到达最大值, 然后表达量于 12—72h 不断上升。

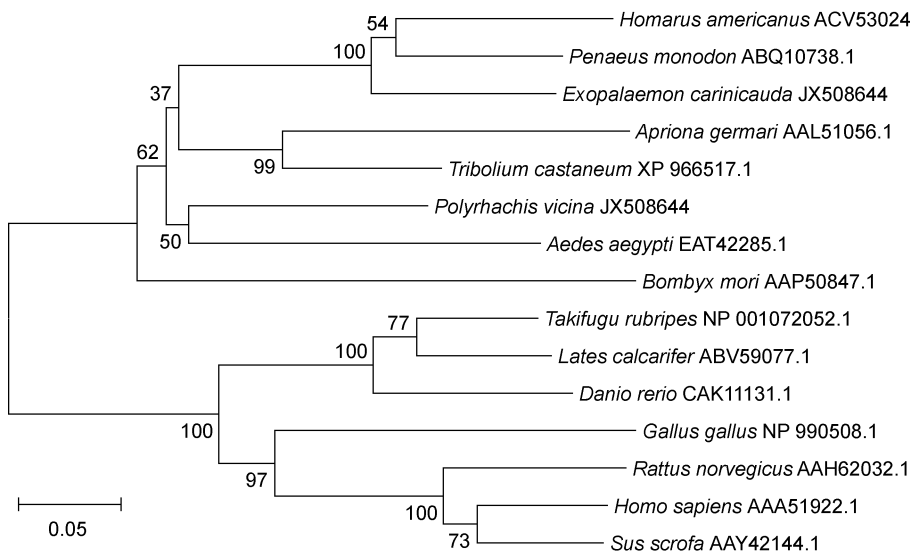


图 3 利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 CatD 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

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

3 讨论

天冬氨酸蛋白酶是广泛分布于生物界的一种内切蛋白酶, 存在于真核生物的分泌颗粒、核内体和溶酶体中(夏亚穆等, 2009)。组织蛋白酶 D 是天冬氨酸蛋白酶家族的重要成员, 属于酸性溶酶体内切酶, 广泛存在于脊椎动物、真菌、反转录病毒和一些植物病毒中(杨远萍等, 2006; 潘俐伶等, 2012)。组织蛋白酶 D 在细胞内发挥蛋白质降解和整合蛋白水解的功能(Lecaille et al, 2002)。组织蛋白酶 D 基因已在许多物种中得到广泛的研

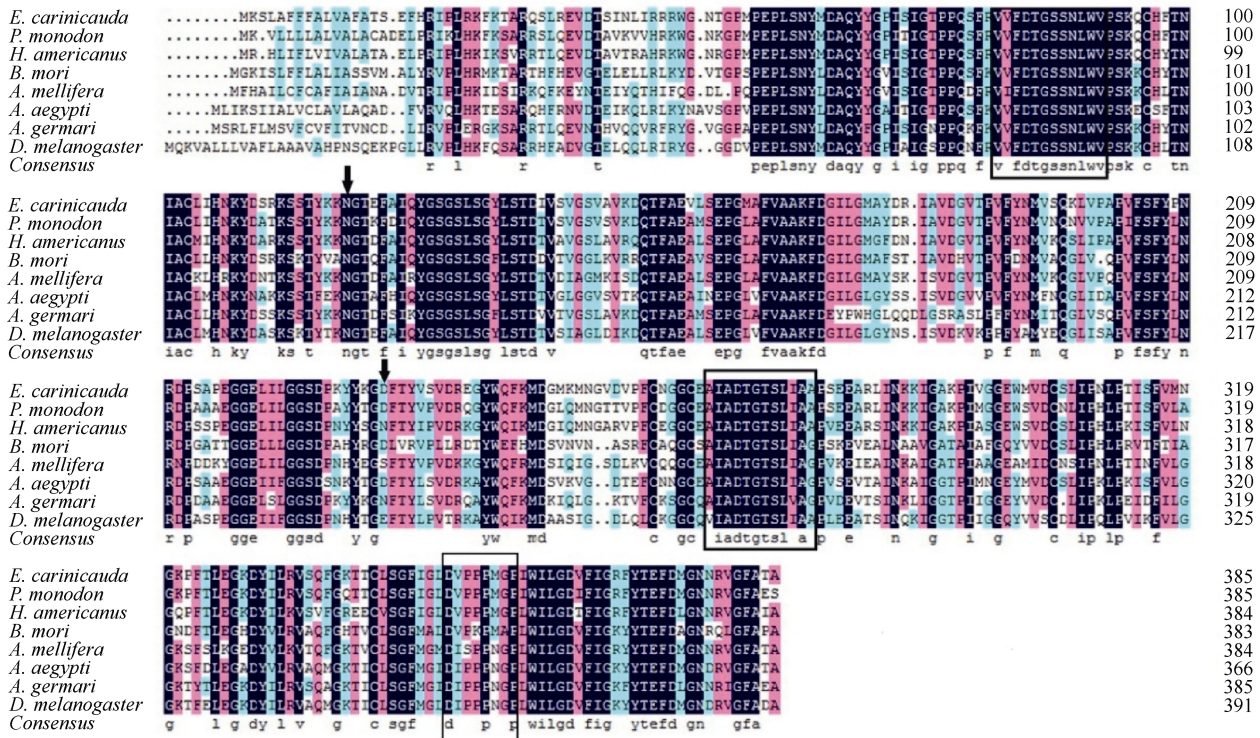


图 4 脊尾白虾 EcCatD 氨基酸序列与其它物种 CatD 氨基酸序列比对

Fig.4 Amino acid sequences alignment of *E. carinicauda* EcCatD with other species' CatD

注: N-糖基化位点用箭头标出, 天冬氨酸蛋白酶签名序列用粗线方框标出, 非消化性组织蛋白酶 D 的特征序列用细线方框标出

究, 而在甲壳动物中的研究则相对比较滞后。本实验克隆得到的组织蛋白酶 D *EcCatD* 基因与其它物种的组织蛋白酶 D 一样, 由信号肽、前体域和成熟域三部分组成。*EcCatD* 氨基酸序列含有 2 个 N-糖基化位点 Asn120 和 Asp233。第 1 个糖基化位点 Asn120 在物种间比较保守, 第 2 个糖基化位点 Asp233 与斑马鱼一

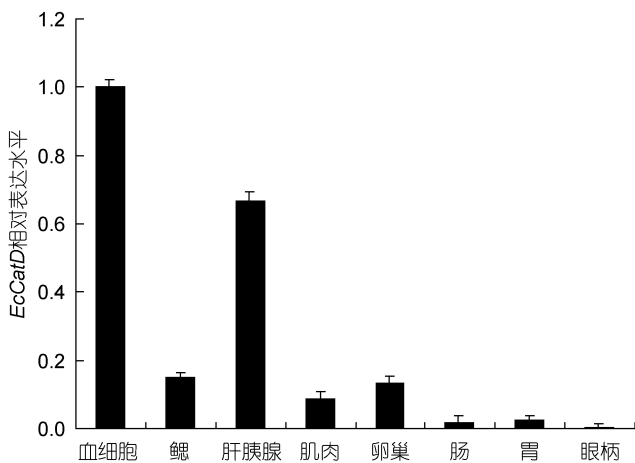


图 5 脊尾白虾组织蛋白酶 D 基因 *EcCatD* 在不同组织中的表达分布

Fig.5 Distribution of *EcCatD* gene expression in different tissues of *E. carinicauda*

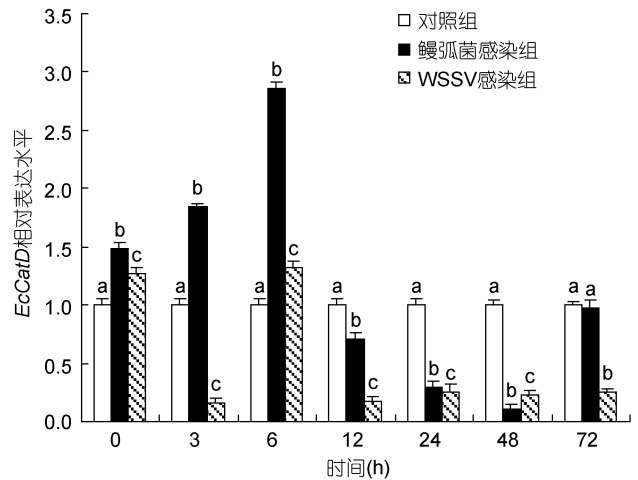


图 6 注射鳃弧菌和 WSSV 后脊尾白虾血细胞中 *EcCat* 基因的表达情况

Fig.6 Expression of *EcCat* gene in *E. carinicauda* hemocytes after *V. anguillarum* and WSSV injection

注: 同一时间内, 与对照组相比, 不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。图 7 同

致, 而在果蝇(*Drosophila melanogaster*)、小家鼠(*Mus musculus*)、日本血吸虫(*Schistosoma mansoni*)和美洲螯龙虾中被 Glu 代替, 在人类(*Homo sapiens*)中被 Ser

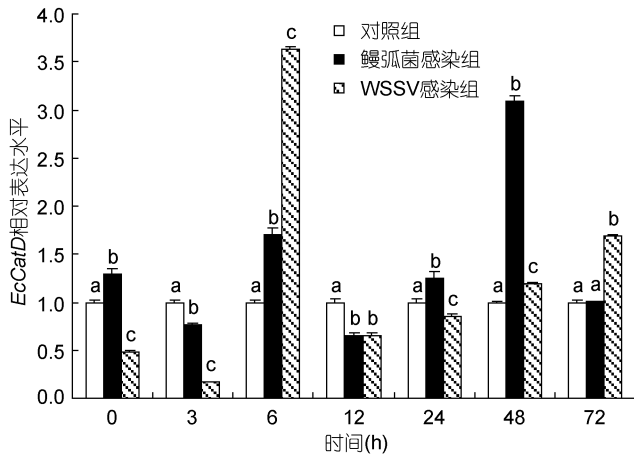


图7 注射鳃弧菌和 WSSV 后脊尾白虾肝胰腺中 *EcCatD* 基因的表达情况

Fig.7 Expression of *EcCatD* gene in *E. carinicauda* hepatopancreas after *V. anguillarum* and WSSV injection

代替,在企鹅珍珠贝和大珠母贝中则为 Asn。EcCatD 蛋白有一段特征序列(DVPPPMGP),该序列作为一个脯氨酸环的空间结构形式存在,且这种特征序列只存在于非消化性的组织蛋白酶 D 中(Padilha *et al.*, 2009; Rojo *et al.*, 2010),如大珠母贝、果蝇、斑马鱼、小家鼠和人等的组织蛋白酶 D。该序列通过与其它动物氨基酸序列比对发现其与已知甲壳动物的相似性最高,均在 80%以上。系统进化分析表明脊尾白虾与斑节对虾和美洲螯龙虾首先聚为一支,且与鸡和斑马鱼等脊椎动物的相似性在 50%以上。综上所述可确定,该序列为脊尾白虾组织蛋白酶 D *EcCatD* 基因。

脊尾白虾 *EcCatD* 基因的表达具有组织特异性,Real time-PCR 结果显示,脊尾白虾 *EcCatD* 在血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃和眼柄中均有表达,其中在血细胞中的表达量最高,其次为肝胰腺,在胃、肠和眼柄中仅有少量表达。

近年来,随着对 *CatD* 基因研究的深入,许多研究报告表明 *CatD* 基因与抗原呈递相关,并具有抗病/抗逆作用。Cho 等(2002)在研究鲶鱼(*Parasilurus asotus*)粘液中的抗菌肽 Parasin 的产生机制时,发现 *CatD* 前体与抗菌肽 Parasin 的形成相关。Jia 等(2009)对大菱鲆 *CatD* 基因的表达分析表明,经哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)刺激 12h 后的 *CatD* 基因在大菱鲆的肝脏、脾脏和头肾组织中的表达量均出现上升趋势,推测大菱鲆 *CatD* 基因在免疫应答过程中发挥重要作用。潘俐伶等(2012)对 *CatD* 基因在企鹅珍珠贝中的表达特征进行了研究,肝胰腺中 *CatD* 基因对哈维弧

菌和 LPS 刺激的应答反应表明, *CatD* 基因可能参与了免疫反应。为了研究脊尾白虾 *EcCatD* 在免疫应答中的作用,本研究设计了细菌和病毒的攻毒实验,采用鳃弧菌和 WSSV 分别注射脊尾白虾,发现脊尾白虾血细胞和肝胰腺中 *EcCatD* 的表达量均有明显的时间差异性。注射鳃弧菌和 WSSV 后血细胞中 *EcCatD* 的表达量均在 6h 时达到最大值,此时与对照组相比都有显著性差异,表明 *EcCatD* 可能参与了免疫反应的应答。刺激后 6—48h *EcCatD* 的表达量是下降的,可能意味着机体处于感染后的恢复期(孙杰等, 2010)。注射鳃弧菌和 WSSV 后,鳃弧菌感染组 *EcCatD* 在肝胰腺中的表达量于 6h 达到最大值,而 WSSV 感染组 *EcCatD* 在肝胰腺中的表达量最大值出现的则相对较滞后,于 48h 达到最大值,可能是因为病毒感染途径不同所致。Jia 等(2009)对大菱鲆在哈维弧菌刺激后 *EcCatD* 在肝胰脏中表达量变化趋势的研究,与本研究结果相同。注射鳃弧菌和 WSSV 后,脊尾白虾血细胞 *EcCatD* 表达水平比肝胰腺先上调,其原因可能是组织器官功能差异性所致(李美玉等, 2012)。血细胞是虾类非特异免疫防御的首要组织,在病原体入侵后担当机体非特异免疫防御的重任,能够比其它组织更迅速地上调 *EcCatD* 基因的表达。

本研究成功克隆了脊尾白虾 *EcCatD* 基因全长 cDNA 序列,通过分析鳃弧菌和 WSSV 感染后脊尾白虾血细胞和肝胰腺中 *EcCatD* 基因的表达特征,可以进一步认定 *EcCatD* 基因参与了脊尾白虾的免疫应答,在清除病原体的防御反应中起着重要作用,为深入研究脊尾白虾 *EcCatD* 基因在病原体刺激下发挥免疫功能的途径和机理奠定了基础。

参 考 文 献

- 马 朋, 刘 萍, 李 健等, 2012. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)3 个野生群体 mtDNA 16S rRNA 序列差异及长臂虾科系统进化分析. 海洋与湖沼, 43(1): 174—179
- 许文军, 谢建军, 施 慧等, 2010. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究. 海洋与湖沼, 41(3): 396—402
- 孙 杰, 王宝杰, 李晓华等, 2010. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征. 水产学报, 34(1): 56—66
- 李美玉, 李 健, 刘 萍等, 2012. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 43(2): 306—312
- 杨远萍, 刘 春, 王子龙等, 2006. 家蚕组织蛋白酶 D 基因的克隆、序列分析及其表达谱研究. 昆虫学报, 49(2): 172—178
- 夏亚穆, 姜 鑫, 王 伟, 2009. 组织蛋白酶 D 生物合成及其

- 功能的研究进展. 氨基酸和生物资源, 31(2): 33—36
- 韩俊英, 李 健, 李吉涛等, 2011a. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 35(8): 1130—1138
- 韩俊英, 李 健, 李吉涛等, 2011b. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定. 渔业科学进展, 32(5): 44—50
- 潘俐伶, 黄桂菊, 成书营等, 2012. 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. 南方水产科学, 8(2): 22—29
- 潘俐伶, 黄桂菊, 喻达辉等, 2011. 大珠母贝组织蛋白酶 D 的 cDNA 克隆、序列特征分析及应急表达研究. 广东农业科学, 10: 4—9
- Cho J H, Park I Y, Kim H S *et al*, 2002. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB J*, 368: 611—620
- Duan Y F, Liu P, Li J T *et al*, 2013. Immune gene discovery by expressed sequence tag (EST) analysis of hemocytes in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fish Shellfish Immunol*, 34: 173—182
- Jia A, Zhang X H, 2009. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin D gene from turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol*, 26(4): 606—613
- Lecaille F, Kaleta J, Brömme D, 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemistry Review*, 102: 4459—4488
- Li J T, Han J Y, Chen P *et al*, 2012. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fish Shellfish Immunol*, 32: 1191—1197
- Padilha M H, Pimentel A C, Ribeiro A F *et al*, 2009. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*, 39(11): 782—791
- Roberg K, Kagedal K, Ollinger K, 2002. Microinjection of cathepsin D induces caspase dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol*, 161: 89—96
- Rojo L, Sotelo-Mundo R, García-Carreño F *et al*, 2010. Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comp Biochem Physiol B*, 157: 394—400
- Schestkova O, Geisel D, Jacob R *et al*, 2007. The catalytically inactive precursor of cathepsin D induces apoptosis in human fibroblasts and HeLa cells. *Cell Biochem*, 101: 1558—1566
- Xu W J, Xie J J, Shi H *et al*, 2010. *Hematodinium* infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture*, 300: 25—31

CLONING AND EXPRESSION OF CATHEPSIN D GENE IN *EXOPALAEEMON CARINICAUDA*

DUAN Ya-Fei^{1,2}, LIU Ping¹, LI Ji-Tao¹, LI Jian¹, CHEN Ping¹,
GAO Bao-Quan¹, XU Wen-Fei^{1,3}, WANG You-Kun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; 2. Ocean University of Shanghai, Shanghai, 201306; 3. Ocean University of Dalian, Dalian, 116023)

Abstract The cathepsin D gene (*CatD*) of *Exopalaemon carinicauda* was first cloned using RACE method, which was named *EcCatD*. The full length cDNA sequence of *CatD* is 1853 bp, which contains a 120 bp 5'-UTR (untranslated region), 572 bp 3'-UTR, and 1161 bp open reading frame (ORF) that encodes 386 amino-acid polypeptides, which has the isoelectric point (pI) of 7.54 and molecular mass of 42.36 kDa. Blast analysis revealed that the identities of *EcCatD* with other crustacean species were over 80%, such as *Penaeus monodon* 86% and *Homarus americanus* 80%, indicating that this protein was one of cathepsin D CatD family members. The phylogenetic analysis using neighbor-joining based on amino acid sequences showed that *E. carinicauda* *EcCatD* was in the same category as *CatD* of *P. monodon* and *H. americanus*. The expression level of *EcCatD* gene in different tissues were analyzed by quantitative Real-time PCR, the results showed that the highest expression level of *EcCatD* gene was in hemocytes, and the hepatopancreas was the second. Real-time PCR analysis showed that the expression level of *EcCatD* was up-regulated distinctly in the hemocytes and hepatopancreas of *E. carinicauda* after challenged by *Vibrio anguillarum* and white spot syndrome virus (WSSV). *EcCatD* showed different expression profiles in the hemocytes and hepatopancreas during *V. anguillarum* or WSSV virus infection. The results implied that *EcCatD* might play an important role in the prawn immune system.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Cathepsin D; Gene cloning; Expression