

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)组蛋白酶 B 基因克隆及其在组织和卵巢发育过程中的表达*

赵卫红^{1,2} 陈立侨² 王资生¹ 张凤英^{2,3} 齐志涛¹

(1. 盐城工学院海洋与生物工程学院 盐城 224051; 2. 华东师范大学生命科学学院 上海 200062;
3. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 组蛋白酶 B 广泛存在于生物体内, 与免疫、消化和繁殖等生理功能息息相关。为了研究组蛋白酶 B 在甲壳动物体内的作用尤其在卵巢发育过程中的作用, 本研究采用 3'RACE 和 5'RACE 技术, 首次克隆获得日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)组蛋白酶 B(简称 MnCB)基因 cDNA 全长, 并采用实时荧光定量(qPCR)测定了 MnCB 在日本沼虾不同组织中和卵巢发育过程中 mRNA 的表达量。序列结果分析表明: MnCB 序列含有 12 bp 的 5'-UTR, 996 bp 的 ORF 和 702 bp 的 3'-UTR。ORF 共编码 331 个氨基酸的多肽, 此多肽由 16 个氨基酸的信号肽、63 个氨基酸的前导肽和 252 个氨基酸的成熟肽组成, 其理论 pI 为 6.36, 分子量为 36.5KDa。qPCR 的结果表明: MnCB 在测定的所有组织中均有表达, 在心脏中表达量最高, 肌肉、肝胰腺和胸神经节中表达量中等, 肠、鳃和血细胞中的表达量较低。MnCB 的表达量在卵巢的发育过程中逐步升高, 卵巢发育至初级卵黄发生期(I 期)MnCB 的表达量显著增加($P<0.05$), 次级卵黄发生期(II 期)表达量继续增加, 并增至最大值, III 期与 IV 期表达量差异不显著($P>0.05$), 成熟期(V 期)表达量显著下降($P<0.05$)。上述研究结果表明 MnCB 广泛存在于日本沼虾的组织中, 并且参与卵黄蛋白原或卵黄蛋白的水解。

关键词 日本沼虾; 组蛋白酶 B; RACE; 基因表达

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20141000283

溶酶体半胱氨酸组蛋白酶具有广谱的蛋白水解活性, 能水解多种动物蛋白和植物蛋白(卢士英等, 2004)。人体内目前发现了 11 种半胱氨酸组蛋白酶: 组蛋白酶 B、C、F、H、K、L、O、S、V、X 和 W(Turk *et al*, 2012)。由于组蛋白酶 B(CB)和组蛋白酶 L(CL)与哺乳动物和人类癌细胞转移过程有关, 因此备受关注。CB 和 CL 能直接溶解或者间接激活细胞外基质如胶原蛋白、层粘连蛋白、基底膜等成分的溶解, 从而促进肿瘤细胞向深部组织浸润, 为癌细胞的转移打开通道(卢士英等, 2004)。CB 和 CL 在鱼类卵黄蛋白的水解过程中的作用亦得到广泛的研究与认可(Sire *et al*, 1994; Carnevali *et al*, 1999; LaFleur *et al*,

2005; Carnevali *et al*, 2006)。甲壳动物等节肢动物的卵子与鱼类卵子一样, 含有大量的卵黄蛋白, 该蛋白在酶的水解作用后方可为后续胚胎的发育提供营养。越来越多的研究报道表明 CB 和 CL 同样参与节肢动物卵黄蛋白的水解, 如桑蚕 *Bombyx mori* (Kageyama *et al*, 1990)和软蜱 *Orithodors moubata* (Fagotto, 1990a, b)卵巢中发现了卵黄蛋白具有水解作用的 CL 类似蛋白的存在, 同样蚊子 *Aedes aegypti* 体内的 CB 类似蛋白酶亦参与卵黄蛋白的降解(Cho *et al*, 1999)。有关经济虾类 CL 基因克隆及其表达研究报道较多。目前 CL 及其类似物 cDNA 全长已经从美国龙虾 *Homarus americanus* (Laycock *et al*, 1992)、挪威龙虾 *Nephrops*

* 国家自然科学基金资助项目, 31101887 号; 江苏省自然科学基金资助项目, BK2011419 号, BK2012675 号。赵卫红, 博士, 副教授, E-mail: misszwh@163.com

通讯作者: 陈立侨, 教授, 博士生导师, E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2014-10-23, 收修改稿日期: 2015-02-29

norvegicus (Le Boulay *et al.*, 1995)、凡纳滨对虾 *Penaeus vannamei* (Le Boulay *et al.*, 1996)、刀额新对虾 *Metapenaeus ensis* (Hu *et al.*, 2004)、盐水虾 *Artemia franciscana* (Warner *et al.*, 2004) 和日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* (Zhao *et al.*, 2013) 体内分离获得。但是经济虾类 CB 基因目前仅有北极甜虾 *Pandalus borealis* (Aoki *et al.*, 2003) 和斑节对虾 *Penaeus monodon* (EF213113.1, 未发表) 的相关报道。日本沼虾 (*M. nipponense*) 肉味鲜嫩, 营养丰富, 分布广泛, 是我国重要的经济淡水养殖虾。本研究首次克隆了日本沼虾 CB(MnCB) 基因 cDNA 全长, 并分析其蛋白结构, 寻找其活性位点, 预测其具有催化活性的结构; 并对其蛋白序列进行同源性和系统进化树的分析, 显示 MnCB 序列和其它物种的关系; 采用荧光定量 PCR(qPCR) 的方法测定其在各组织及卵巢发育过程中的表达量, 初步探讨其在本沼虾体内的作用及与卵巢发育的关系, 为日本沼虾体内该基因的功能研究提供一些基础知识。

1 材料与方法

1.1 组织取样

日本沼虾(1.3—2.1 g)购自上海市铜川路水产市场。试验虾从市场购回后, 于实验室水族箱中充气暂养一周后解剖, 分别取卵巢、肝胰腺、鳃、肌肉、胸神经节、心脏、肠和血细胞等组织和细胞液氮中速冻, -80°C 保存用于后续 RNA 抽提。其中卵巢不同发育阶段分别取样, 其它组织均取自卵巢发育期的雌虾。每个组织均取 8—12 尾虾。卵巢发育分期采用 6 期法(Wu *et al.*, 2009)。

1.2 RNA 的抽提和 cDNA 的反转

RNA 采用 Unizol 试剂按照试剂说明书抽提。取抽提获得的 1 μ L RNA 用于凝胶电泳, 检测 RNA 的完整性。取 1 μ L RNA 进行紫外分光光度测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值, 检测 RNA 纯度。取 0.5 μ g RNA 采用 cDNA TaKaRa PrimerScript™ 第一链 cDNA 合成试剂盒(大连宝生物)合成 cDNA。

1.3 采用 3'RACE 和 5'RACE 获得基因全长

用于 5'RACE 和 3'RACE 的 cDNA 分别采用 Smart Race 试剂盒(Clontech, Palo Alto, CA, USA) 和 3'-RACE 合成试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 按照说明书操作步骤合成。引物 AP、AUAP、5'-CDS primer A、SMART II A Oligonucleotide 和 UPM 均由 RACE 试剂盒提供。3'RACE 和 5'RACE 特异性引物

均按照日本沼虾卵巢 EST 文库中 MnCB 片段采用 primer 5.0 软件设计获得。MnCB 3'RACE 特异性引物 3'MnCBP1, 3'RACE 巢式引物 3'MnCBP2。根据上述获得的 3'端片断设定引物 3'MnCBP3 作为 3'RACE 特异性引物进行新一轮 3'RACE 扩增, 获得 MnCB 的 polyA 尾巴。MnCB 5'-RACE 特异性引物为 5'MnCBP1。上述所有特异性引物的序列及其 T_m 值见表 1。

表 1 引物序列及其 T_m 值
Tab.1 Sequences of primers and their T_m

引物	序列	T _m 值
3'MnCBP1	5'-ACTGCCCCACCATCAGTGA AAAAG-3'	61°C
3'MnCBP2	5'-CCAGGTTTCCCAGGTGCTGCTAA-3'	62°C
3'MnCBP3	5'-GGCTTGGTGACATGCCATTCCA-3'	61°C
5'MnCBP1	5'-CTAAGCCCCTCC AGATACGATAGG-3'	62°C
qCBF	5'-GTCAGCAACGGCACAAGTT-3'	60°C
qCBR	5'-CTAAGCCCCTCCAGATACCT-3'	

1.4 基因全长的分子生物学信息分析

核酸和蛋白序列相似性比较采用 NCBI BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析, 蛋白特性分析采用专业蛋白分析系统 Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/>), 信号肽和结构域分析分别采用 SignalP 3.0 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和结构域扫描程序 Motif scan program (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) 分析, 同源性分析采用 ClusterW 多序列比较软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)和 Boxshade 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) 进行阴影分析, 系统进化树采用 Mega 软件包中的邻接法(NJ)构建。用于阴影分析和系统进化树构建的基因序列号见表 2。

1.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)

MnCB qPCR 引物序列为 qCBF 和 qCBR(表 1), 内参基因为 β -actin, 引物序列来自文献(Zhao *et al.*, 2011)。qPCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10.0 μ L, ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ L, cDNA 2.0 μ L, 10 μ mol/L 的引物各 0.4 μ L, ddH₂O 6.8 μ L。反应程序: 95°C 预变性 1 min, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 40 s, 40 个循环。

1.6 数据分析

MnCB 和 β -actin 的表达量采用标准曲线法计算。标准曲线的制备: 将已知浓度的 cDNA 稀释成不同浓

表 2 用于 MnCB 同源比对的分析和构建系统进化树的物种名及其登录号

Tab.2 Accession numbers, scientific name, and source of the members of cathepsin B amino sequences used to homologues alignment and construct the phylogenetic tree

物种	俗名	分类地位	登录号
<i>Schistosoma japonicum</i>	日本血吸虫	线虫动物门	CAA50305.1
<i>Pandalus borealis</i>	北极甜虾	节肢动物门	BAC65419.1
<i>Penaeus monodon</i>	斑节对虾	节肢动物门	ABQ10737.1
<i>Meretrix meretrix</i>	文蛤	软体动物门	ACB38229.1
<i>Paralichthys olivaceus</i>	牙鲆	脊椎动物门鱼纲	ABM47001.1
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	大西洋庸鲽	脊椎动物门鱼纲	ABJ80691.1
<i>Danio rerio</i>	斑马鱼	脊椎动物门鱼纲	AAQ97764.1
<i>Salmo salar</i>	鲑鱼	脊椎动物门鱼纲	NP_001133994.1

度(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5}), 测定不同浓度 cDNA 的 CT 值, 横坐标为 cDNA 浓度对数, 纵坐标为 CT 值作图, 获得 cDNA 浓度对数与 CT 值之间的标准曲线。将未知样品的 CT 值代入标准曲线, 计算出样品的 cDNA 浓度。MnCB 的相对表达量采用 MnCB 和 β -actin 表达量的比值表示, 最终表示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 采用 One-way ANOVA 对日本沼虾各组织中 MnCB 基因表达量进行统计分析, 用 Duncan 氏多重比较法分析组间差异显著程度, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 MnCB 基因 cDNA 序列结构分析

3'RACE 和 5'RACE 测序结果通过 Bioedit 软件拼接后获得全长为 1643 bp 的 MnCB, cDNA 序列和推导的氨基酸序列见图 1。该序列含有 12 bp 的 5'-UTR, 996 bp 的 ORF 和 702bp 的 3'-UTR(序列号: HM134079)。ORF 区共编码 331 个氨基酸, 此多肽包含 16 个氨基酸组成的信号肽、63 氨基酸组成的前导肽和 252 个氨基酸组成的成熟肽三个部分, 其理论 pI 为 6.36, 分子量为 36.5 kDa。

2.2 MnCB cDNA 序列与其它物种组蛋白酶 B 的比较分析

经多重比较后发现, MnCB 与其它不同甲壳动物组蛋白酶 B(CB)一样都存在一些保守的结构域(图 2), 且一般位于非信号肽序列部分。系统进化树的分析结果(图 3)显示: 牙鲆 *Paralichthys olivaceus*、大西洋庸鲽 *Hippoglossus hippoglossus*、斑马鱼 *Danio rerio* 和 鲑鱼 *Salmo salar* 四种鱼类聚在一起, 同为甲壳类的

北极甜虾、斑节对虾和日本沼虾聚成一支, 软体动物的文蛤 *Meretrix meretrix* 和环节动物的日本血吸虫 *Schistosoma japonicum* 分别自成一支。

2.3 MnCB 组织表达特性

内标基因 β -actin 在各组织的表达量较一致, MnCB 基因在测定的各组织中也均有表达, 其中在心脏中表达量最高, 肌肉、肝胰腺和胸神经节中表达量中等, 肠、鳃和血细胞中的表达量较低(图 4)。

2.4 卵巢发育过程中 MnCB 基因的表达

不同发育阶段卵巢中 MnCB 基因表达变化过程见图 5。在卵巢的发育过程中, MnCB 的表达量先增后降。从卵原细胞增殖期(I 期)发育至卵黄发生前期(II 期), MnCB 表达量显著增加, 增至 II 期 2 倍左右, 至初级卵黄发生期(III 期)MnCB 的表达量急剧增加, 分别为 III 期和 IV 期表达量的 5 倍和 10 倍左右, 差异显著($P < 0.05$), 次级卵黄发生期(V 期)表达量继续增加, 但是 V 期和 VI 期的表达量差异不显著($P > 0.05$), 成熟期(VI 期)下降。产卵后(VI 期)、V 期和 IV 期两两差异均不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

多重比较结果显示 CB 蛋白在进化过程中保守性较强, 且这些保守序列主要位于非信号肽部位。通过 CB 保守序列建立的 N-J 系统树显示几种鱼类聚为一支、几种甲壳类聚为一支, 该结果和传统的分类结果一致。

MnCB 氨基酸序列中具有 4 个活性位点: Gln¹⁴³、Cys¹⁴⁹、Asn²⁸⁸ 和 His³⁰⁹。CB 属于 C1 家族多肽酶, 该家族酶的催化残基为 Cys 和 His 形成的二聚体。另外朝向 His 咪唑环的 Asn 和位于 Cys 残基前面的 Gln 在催化过程中也起非常重要的作用, Gln 具有帮助 Cys 残基在催化过程中形成氧阴离子洞的作用。另外 MnCB 氨基酸序列中具有 6 个 S2 亚位点: Phe152、Pro153、Ala170、Gly274、Ala277 和 Glu322。S2 亚位点是木瓜蛋白酶半胱氨酸蛋白酶的口袋结构, 这一结构有利于与大疏水残基或芳香残基结合, 而且 CB 基因口袋结构的底部还具有可以与 Arg 结合的 Glu。

文献报道显示组蛋白酶通常由 16—18 个氨基酸的信号肽、62—100 个氨基酸的前导肽和 220—230 个氨基酸的成熟肽组成(Berti *et al*, 1995; Lecaille *et al*, 2002)。本研究克隆得到的 MnCB 亦由信号肽、前导肽和成熟肽三个部分组成, 其氨基酸数目分别为 16、

gaattcgtcagg

13 atgcagggttgttactgttgttgggattggtgtgtgcagcatcagctgcaattcatcca
M Q G L L L L L G L V C A A S A A I H P

73 ttatcggataaattcattcagttgctgcagaatgagaaaacgacatggaaggcaggagg
L S D K F I Q L L Q N E K T T W K A G R

133 aacttcaacaagaatctcccgatgcgctacttgaagagtttgatgggcgttcatgcagac
N F N K N L P M R Y L K S L M G V H A D

193 tcaaagttccacatgtcggcagttcacaacacaaaaatccccgaaggcttcaaatcccc
S K F H M S P V H K H K I P E G F K I P

253 aaggagtttgactcgcgcaactgcttggtecatgtgccccacatcagtgaaatcagagac
K E F D S R T A W S M C P T I S E I R D

313 caagatccttggatcatgttggccttggagcagtgaggatgaccgacagagac
Q G S C G S C W A F G A V E V M T D R D

373 tgcattcacagcaacggcacaagaacttccattattctgctgaaaacctggttctctgt
C I H S N G T K N F H Y S A E N L V S C

433 tgccatcttgggttggatgcaacggaggttccccaggtgctgctttccagttatgg
C H L C G F G C N G G F P G A A F Q Y W

493 gtcacagtggtatcgtatctggagggttccaattccaccagggttccaaccat
V H S G I V S G G A F N S T Q G C Q P Y

553 gagattgctccatgcgaacatcatgtcagtggtcctcgccccaaagtgtcagaaggtggc
E I A P C E H H V S G P R P K C A E G G

513 tcgactcctaatgccacaaaaactgtgagagcaactatgttggattatgagagtgat
S T P K C H K N C E S N Y V V D Y E S D

673 ttgaccatggcagcaagcattacagcgttgacaaaagatgaaaccagattaagtacgac
L H H G S K H Y S V D K D E T Q I K Y D

733 atcatgacaaatgggccgttgaaggagcgttactgtttatgtagatcttctgactac
I M T N G P V E G A F T V Y V D F L H Y

793 aagtctggtgtttatcagcactacaggttggcccttgggtggacatgccattcgtgtt
K S G V Y Q H T H G L P L G G H A I R V

853 ttgggttggggtgaggaggacggaacaccttactggtgtgcccactcctggaacact
L G W G E E D G T P Y W L C A N S W N T

913 gactggggtgacaacggctacttcaagattctccaggatctgaccactgtggtattgaa
D W G D N G Y F K I L R G S D H C G I E

973 agtgaaatcagcagggtcccaaaaggagtagtaagacaagattaccttagcaa
*S E I S A G L P K V E **

1033 tatactatgaagcagttatgttgcactaaatccagaaaatgtccttataagcacttcat

1093 aattcaacaggaattggaactatgctattgattagtggtgttatagtttcatgtaa

1153 atgtccaagtttatcttcagataaaatagaaggatattttaatgaaggtgtcttata

1213 aaggatgaagatactatttatactcagtgctaatgttggctgtgtttaatgtgat

1273 tgatcaaaattgaaagtattcttttagataattgcttttggtagtagctttatccaac

1333 catgaaagtattttttgtttattttaatactagttgaaagtactatacagcaacatt

1393 ttaatcattcatagtagtagtttacttttttccatgactaaataaacttgacat

1453 ttttaagtgatgtcaccacacaattgttcattagtagtagttttacttttttccat

1513 gactaaataaagttttttgctttttatgtgtcaccacacaactatatactctca

1573 ***gatat******taattag***tttcccaaatgaggtacattccagattttgtctttgctttttgta

1633 ttttttaaccaagttatataaattttataaatc aaaaaaaaaaaaaaaaactagtc

1693 gccccgggggcacaaaa

图 1 MnCB cDNA 及翻译的氨基酸全长

Fig.1 Complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of MnCB

斜体表示信号肽序列, 下划线为前导肽, 波浪线为成熟肽, 方框为活性位点, 下划线加粗斜体为加尾信号, 双下划线为 polyA, 星号(*)为终止密码子

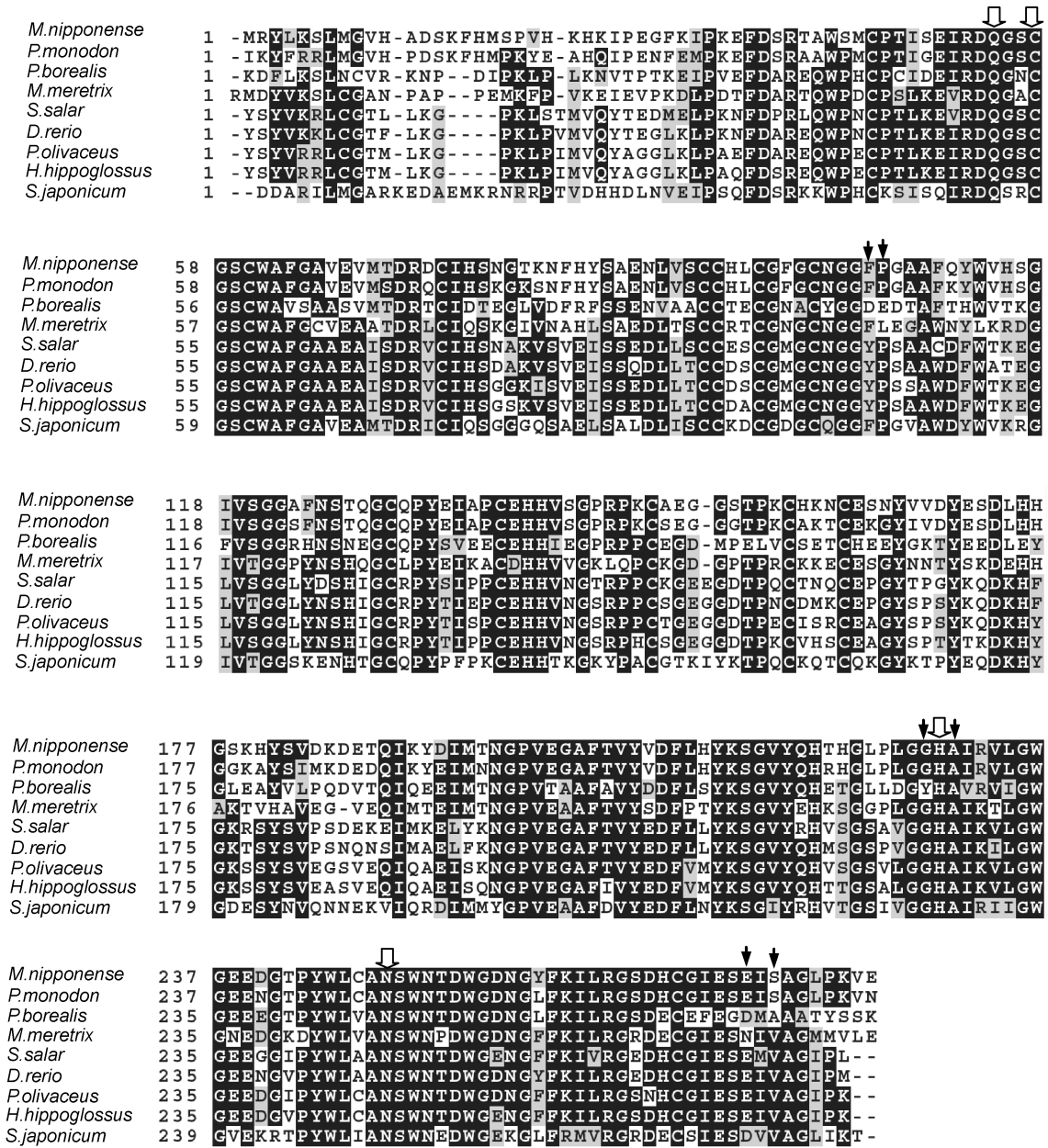


图 2 MnCB 序列与其它物种组蛋白酶 B 序列的多重比较

Fig.2 Alignment of MnCB with other aquatic organisms homologues

阴影部分表示相同的序列, 灰色表示保守但不完全相同的序列, 空心箭头为活性位点, 实心箭头为 S2 亚位点

63 和 252, 信号肽和前导肽的数量介于上述报道范围之内, 成熟肽超过上述范围。这一结果与北极甜虾 *P. borealis* 中的报道一致, 北极甜虾组 CB 的成熟肽为 253 个氨基酸(Aoki *et al*, 2003)。组蛋白酶合成之初没有活性, 以酶原的形式存在, 随着 pH 值的改变, 溶酶体减弱前导肽和催化位点之间的连接, 改变酶原的构象, 使之变成具有活性的酶, H⁺-ATP 酶使卵巢中 pH 值降低, 促进酶原的激活(Fagotto, 1995; Kwon *et al*, 2001; Selman *et al*, 2001; Turk *et al*, 2001;

Raldúa *et al*, 2006)。

本研究测定日本沼虾 MnCB 广泛存在于各组织中, 其中心脏中表达量最高, 胸神经节、肝胰腺和肌肉中的表达量均较高。MnCB 在心脏和肌肉中的高表达可能与 CB 能降解肌球蛋白、肌钙蛋白、原肌蛋白和肌动蛋白的作用有关(陈磊等, 2008)。肝胰腺在甲壳动物体内扮演着极其重要的角色, 不仅具有消化吸收的作用, 而且具有重要的免疫功能, 另外日本沼虾肝胰腺还是卵巢发育的重要营养来源(Zhao *et al*,

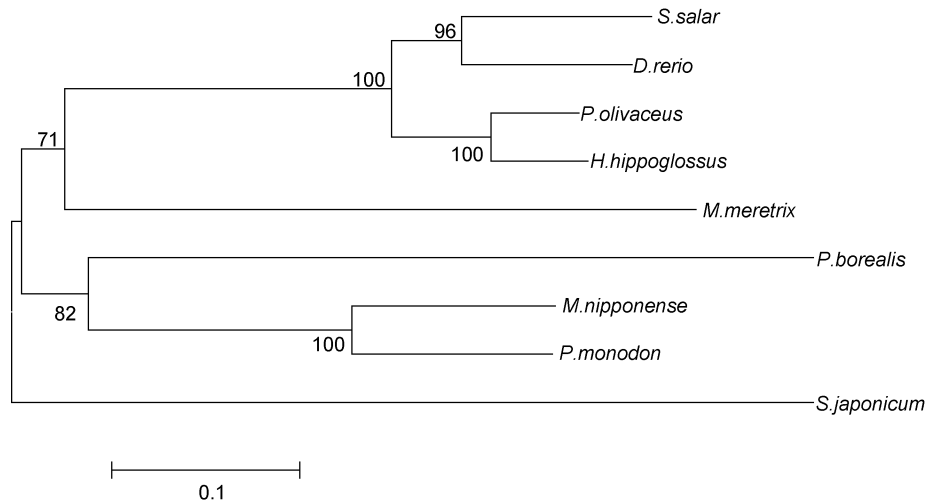


图3 MnCB 与其它物种的组蛋白酶 B 的 N-J 系统发育树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of MnCB amino acid sequences from other animals

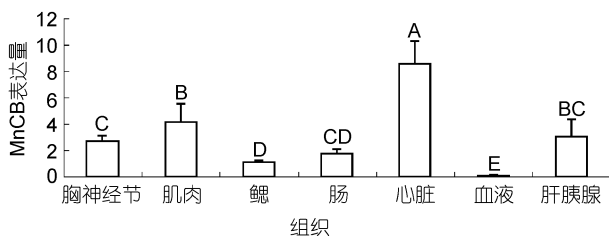


图4 日本沼虾不同组织中 MnCB 基因的相对表达量

Fig.4 Relative expression level of MnCB mRNA in different tissues of *M. nipponense*

图中字母相同表示表达量差异不显著($P>0.05$), 不相同表示表达量差异显著($P<0.05$), 下同

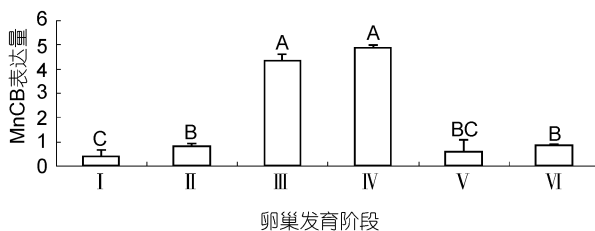


图5 日本沼虾卵巢不同发育阶段 MnCB mRNA 的相对表达量

Fig.5 Temporal expression profile of the MnCB transcript in the ovary of *M. nipponense* during ovarian development
柱状图上字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 不同表示差异显著($P<0.05$)

2013)。所以肝胰腺中 MnCB 高表达可能与 CB 兼有胞内消化和抗原加工的功能有关(卢士英等, 2004)。肝胰腺中 CB 高表达在北极甜虾中也有类似的研究报道(Aoki *et al*, 2003)。另外, 同样具有胞内消化作用的 CL 在美洲龙虾(Laycock *et al*, 1992)和挪威龙虾(Le Boulay *et al*, 1995)肝胰腺中亦高度表达。甲壳动物的

胸神经节是重要的神经内分泌器官, 可以分泌 GSH 等性腺刺激激素从而促进卵巢发育(穆淑梅等, 2004), 而 CB 具有激素活化的作用(卢士英等, 2004), 所以日本沼虾胸神经节中 MnCB 的高表达可能与 MnCB 活跃激素分泌的功能有关。

甲壳动物的卵黄蛋白原(Vg)按照合成来源可以分为内源性和外源性。卵巢自身合成的为内源性, 卵巢以外的组织, 如肝胰腺、脂肪体或滤泡细胞中合成的为外源性。外源合成的 Vg, 通过血液循环运送至卵母细胞, 通过膜受体结合后进入卵母细胞中(张士瑾等, 2002)。Vg 在卵母细胞的成熟过程中被分解为脂磷蛋白、高磷蛋白和 β' 组分等卵黄蛋白(Vn), 储存于卵黄颗粒中, Vn 进一步水解为氨基酸为胚胎发育提供营养(Finn, 2007)。Vg 水解为 Vn 进而水解为氨基酸均需要水解酶的参与。有研究表明 CB 和 CL 在甲壳动物该水解过程中发挥着重要的作用(Fagotto, 1990a, b; Kageyama *et al*, 1990; Cho *et al*, 1999)。本试验 qPCR 测定结果显示日本沼虾卵巢中 MnCB 的表达量与卵巢的发育程度有关, 随着卵巢的发育, MnCB 表达量逐渐增加, 卵巢发育至初级卵黄发生期表达量急剧增加, 次级卵黄发生期表达量继续增加, 并达到最大值, 成熟期下降。这表明 MnCB 与日本沼虾的 Vg 或者 Vn 的水解有关。有研究表明组蛋白酶 D(CD)和 CB 蛋白活性在海鲷 *Sparus aurata* 卵黄发生早期最高, 且进一步的研究表明 CD 可以水解 Vg, 而 CB 对 Vg 没有水解作用, 另外 CL 在卵黄发生后期活性最高, 为 Vn 的水解酶(Carnevali *et al*, 1999)。本课题组发现

日本沼虾组蛋白酶 L(MnCL)在卵巢发育至次级卵黄发生期,表达量急剧增加并达到最大值(Zhao *et al*, 2013),也就是说,在卵巢发育过程中 MnCB 基因表达量增加比 MnCL 早,这和海鲷的研究结果一致(Carnevali *et al*, 1999)。斑马鱼中 CB 不仅可以直接水解 Vn,而且还可以激活 CL 的活性,促进 CL 对 Vn 进行水解(Carnevali *et al*, 2006)。日本沼虾卵巢发育至中期 MnCB 基因表达急剧增加,后期 MnCL 基因急剧增加,这种先后关系也许暗示着 MnCB 和 MnCL 之间的某种关联,也许如斑马鱼中 MnCB 可以激活 MnCL 的活性具有某种的激活作用。

参 考 文 献

- 卢士英,任洪林,柳增善等,2004. 组织蛋白酶 B 研究进展. 河北师范大学学报(自然科学版),28(3): 306—309
- 张士瑾,孙旭彤,李红岩,2002. 卵黄蛋白原研究及其进展. 海洋科学,26(7): 32—35
- 陈磊,李学伟,朱砺等,2008. 猪 Cathepsin B 基因 cDNA 分子克隆、序列分析及遗传多态性分析. 畜牧兽医学报,39(4): 385—392
- 穆淑梅,康现江,牛建章等,2004. 甲壳动物卵黄发生及其激素调控研究进展. 海洋科学,28(6): 66—70
- Aoki H, Ahsan M N, Watabe S, 2003. Molecular cloning and characterization of cathepsin B from the hepatopancreas of northern shrimp *Pandalus borealis*. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 134(4): 681—694
- Berti P J, Storer A C, 1995. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. J Mol Biol, 246(2): 273—283
- Carnevali O, Carletta R, Cambi A *et al*, 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. Biol Reprod, 60(1): 140—146
- Carnevali O, Cionna C, Tosti L *et al*, 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. Gen Comp Endocr, 146(3): 195—203
- Carnevali O, Sabbieti M G, Mosconi G *et al*, 1995. Multihormonal control of vitellogenin mRNA expression in the liver of frog, *Rana esculenta*. Mol Cell Endocrinol, 114(1—2), 19—25
- Cho W-L, Tsao S-S, Hays A R *et al*, 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. J Bio Chem, 274(19): 13311—13321
- Fagotto F, 1990a. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. Arch Insect Biochem Physiol, 14(4): 217—235
- Fagotto F, 1990b. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. Arch Insect Biochem Physiol, 14(4): 237—252
- Fagotto F, 1995. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. J Cell Sci, 108: 3645—3647
- Finn R N, 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. Biol Reprod, 76(6): 926—935
- Hu K J, Leung P-C, 2004. Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 137(1): 21—33
- Kageyama T, Takahashi S Y, 1990. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. Eur J Biochem, 193(1): 203—210
- Kwon J Y, Prat F, Randall C *et al*, 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biol Reprod, 65(6): 1701—1709
- LaFleur G J Jr, Raldúa D, Fabra M *et al*, 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. Biol Reprod, 73(4): 815—824
- Laycock M V, Mackay R M, Di Fruscio M *et al*, 1992. Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*). FEBS Lett, 292(1—2): 115—120
- Le Boulay C, Van Wormhoudt A, Sellos D, 1995. Molecular cloning and sequencing of two cDNAs encoding cathepsin L-related cysteine proteinases in the nervous system and in the stomach of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 111(3): 353—359
- Le Boulay C, Van Wormhoudt A, Sellos D, 1996. Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. J Comp Physiol B, 166(5): 310—318
- 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. Chem Rev, 102(12): 4459—4488
- Raldúa D, Fabra M, Bozzo M G *et al*, 2006. Cathepsin B-mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked by an H⁺-ATPase inhibitor: effects on the hydration mechanism. Am J Physiol, Regul Integr Comp Physiol, 290(2): R456—R466
- Selman K, Wallace R A, Cerdà J, 2001. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes. J Exp Zool, 290(3): 265—278
- Sire M-F, Babin P J, Vernier J-M, 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. J Exp Zool, 269(1): 69—83
- Turk V, Stoka V, Vasiljeva O *et al*, 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. BBA-Proteins Proteom, 1824(1): 68—88
- Turk V, Turk B, Turk D, 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. Embo J, 20(17): 4629—4633
- Warner A H, Pullumbi E, Amons R *et al*, 2004. Characterization of a cathepsin L-associated protein in *Artemia* and its relationship to the FAS-I family of cell adhesion proteins. Eur J Biochem, 271(20): 4014—4025
- Wu P, Qi D, Chen L Q *et al*, 2009. Gene discovery from an ovary cDNA library of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* by ESTs annotation. Comp Biochem Physiol D, 4(2): 111—120
- Zhao W H, Chen L Q, Qin J G *et al*, 2011. MnHSP90 cDNA

characterization and its expression during the ovary development in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. Mol Bio Rep, 38(2): 1399—1406

Zhao W, Chen L, Zhang F *et al*, 2013. Molecular characterization

of cathepsin L cDNA and its expression during oogenesis and embryogenesis in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (Palaemonidae). Genet Mol Res, 12(4): 5215—5225

GENE CLONE OF CATHEPSIN B IN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE* AND GENE EXPRESSION IN TISSUES AND OVARY IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES

ZHAO Wei-Hong^{1,2}, CHEN Li-Qiao², WANG Zi-Sheng¹, ZHANG Feng-Ying^{2,3}, QI Zhi-Tao¹

(1. School of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China; 2. College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 3. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China)

Abstract Cathepsin B is involved in immunity, digestion and reproduction and distributed widely in many organisms. To understand its ovary development in crustacean, we cloned cathepsin B in *Macrobrachium nipponense*, named MnCB for the first time, and detected its gene expression. The full sequence of MnCB was obtained by RACE method based on MnCB fragment obtained in EST library. MnCB gene is comprised of 1710 bp, containing a 12 bp 5'-UTR, a 993 bp ORF and a 702 bp 3'-UTR. The ORF encodes a polypeptide of 331 amino acids including a 16-amino acid signal peptide, a 63-amino acid propeptide and a 252-amino acid mature peptide. MnCB mRNA was detected in all the tested tissues including haemocyte, hepatopancreas, muscle gill, intestine, heart, and thoracic ganglia. Real-time quantitative PCR (qPCR) results show that MnCB was expressed highest in heart, intermediate in muscle, hepatopancreas, and thoracic ganglia, and lowest in gill, intestine, and haemocyte. The level of MnCB mRNA in ovary increased significantly at the oil globule ovary stage (stage) ($P<0.05$) and reached a maximum value at the yolk granule ovary stage (stage), then decreased with further ovarian development. moreover, there was no significantly difference in the MnCB expression in ovary between stages and ($P>0.05$). Therefore, MnCB plays ubiquitously an important role in hydration of vitellogenin or yolk protein in the ovary of *M. nipponense*.

Key words *Macrobrachium nipponense*; cathepsin B; RACE; gene expression