

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17369

日本沼虾半胱氨酸蛋白酶抑制因子基因的克隆及其组织表达特征

江红霞^{1,2,3}, 李喜莲³, 侯富军², 刘勇杰², 李飞³, 张宇飞³, 郭建林¹, 贾永义³, 顾志敏³, 刘小林²

1. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

3. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江 湖州 313001

摘要: 半胱氨酸蛋白酶抑制因子(CST)是一种能够可逆结合并抑制半胱氨酸蛋白酶类的活性的蛋白, 为了明确日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)CST 基因(*MnCST*)序列及其在日本沼虾卵巢中的作用, 本研究利用 RACE 方法克隆获得日本沼虾 *MnCST* 全长 cDNA 序列, 利用 qRT-PCR 分析了其不同组织和不同发育阶段的卵巢中的表达情况, 并利用 RNA 干扰(RNAi)技术初步分析了 *MnCST* 在日本沼虾卵巢发育中的作用。结果显示, *MnCST* cDNA 序列全长 6199 bp, 包含 1183 bp 5'非编码区、2304 bp 3'非编码区和 2709 bp 开放阅读框, 编码 903 个氨基酸残基, 其氨基酸序列上有 6 个 cystatin-like(半胱氨酸蛋白酶抑制因子样)结构域和 42 个磷酸化位点; *MnCST* 基因在各个组织中均有表达, 肠中表达量最高; 日本沼虾不同发育阶段的卵巢中均有 *MnCST* 基因表达, IV 期卵巢中表达量最高, II 期卵巢中表达量最低; *MnCST* 基因在日本沼虾卵巢中的表达变化与组织蛋白酶 B(*CtsB*)和组织蛋白酶 L(*CtsL*)基因的表达变化基本是一致的, 但对卵黄蛋白原(*Vg*)基因的表达没有直接影响。*MnCST* 在日本沼虾卵巢中的作用可能主要是抑制 *CtsB* 和 *CtsL* 的活性, 在日本沼虾卵巢发育过程中对 *Vg* 的水解起间接的调控作用。

关键词: 日本沼虾; 半胱氨酸蛋白酶抑制因子; 基因克隆; 组织表达; RNA 干扰

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-0915-13

半胱氨酸蛋白酶抑制因子(cystatins, CSTs)是一类能够与半胱氨酸蛋白酶特异性可逆结合并抑制半胱氨酸蛋白酶类活性的家族蛋白^[1]。已知的动物 CSTs 蛋白被分成 3 个家族, 家族 1 的 CSTs 也被称为 stefins, 它们是低分子量的蛋白, 并且只有单个不包含二硫键和碳水化合物侧链的 cystatin 结构域^[2]。家族 2 的 CSTs 包括 cystatin C、D、E、S 和 SN, 它们是分泌性蛋白, 拥有单个 cystatin 结构域, 但结构域至少拥有两个分子内的二硫键。家族 3 的 CSTs 也被称为激肽原(kininogens), 它们的结构非常复杂, 含有多个 cystatin-like 结构域,

每个结构域都具有两个二硫键^[3]。

CSTs 在哺乳动物、鸟类和鱼类等脊椎动物中广泛存在^[4-8], 一些无脊椎动物的 CSTs 也被鉴别出来, 包括肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)^[9]、棘唇线虫(*Acanthocheilonema viteae*)、马来丝虫(*Brugia malayi*)^[10]、旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)^[11]、巴西日圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)^[12]、捻转血矛线虫(*Haemonchus contortus*)^[13]、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[14]、长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)^[15]、中华鲎(*Tachypleus tridentatus*)^[16]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[17]、红

收稿日期: 2017-10-09; 修订日期: 2017-12-11.

基金项目: 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室开放课题(ZJK201506); 浙江省水产育种重大专项(2012C12907); 河南省教育厅科学技术重点研究项目(13A240509); 河南师范大学个人科研项目结余经费资助专项(20180531); 河南师范大学博士科研启动经费项目。

作者简介: 江红霞(1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为水生生物遗传资源. E-mail: jianghongxia2007@126.com

通信作者: 顾志敏, 研究员, E-mail: guzhimin2006@163.com; 刘小林, 教授, E-mail: liuxiaolin@nwsuaf.edu.cn

螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[18]和日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicus*)。CSTs 在许多细胞防御系统中起着防止细胞蛋白遭受半胱氨酸蛋白酶过度水解的作用,它们调控着许多依赖于半胱氨酸的蛋白酶的代谢过程,如人类的 CSTs 与各种病理如炎症、阿尔茨海默症、病毒性疾病和恶性肿瘤有关^[19-21],而无脊椎动物的 CSTs 与免疫调控有关,如棉鼠丝虫(*Litomosoides sigmodontis*)的 CST 会抑制其侵染的宿主的免疫反应^[22],而中华绒螯蟹的 CST 则会提高自身抵抗微生物侵染的能力^[17]。但有关日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) CST 的分子鉴定及其功能的分析目前尚未见研究报道。

日本沼虾隶属于十足目(Decapoda)、长臂虾科(Palaemonidae)、沼虾属,又称河虾、青虾。由于它肉味鲜美,营养丰富,具有很高的经济价值,再加上它食性杂,适应性强,因而在我国得到广泛的养殖。目前,日本沼虾已成为我国淡水养殖的主要种类之一,据《中国渔业统计年鉴 2017》^[23]公布的数据,2016 年全国日本沼虾养殖年产量 27.26 万 t,在虾类养殖产量中位居第 3 位。为了在实际生产中培育和繁殖优良日本沼虾个体及品种,对日本沼虾性腺发育和繁殖生物学进行研究是十分必要的。本实验室在对日本沼虾卵巢转录组的分析中发现一种在卵巢中高表达的 CST 基因片段^[24],命名为 *MnCST* 基因,为了研究 *MnCST* 基因在日本沼虾卵巢中的作用,本研究克隆得到了 *MnCST* 基因的全长 cDNA 序列,同时检测了它在本沼虾不同组织以及在卵巢发育不同阶段中的表达水平。此外,利用 RNA 干扰(RNAi)技术初步研究了 *MnCST* 基因沉默对日本沼虾卵巢中组织蛋白酶 B(cathepsin B, *CtsB*)和组织蛋白酶 L(cathepsin L, *CtsL*)基因,以及卵黄蛋白原(vitellogenin, *Vg*)基因表达的影响,旨在为日本沼虾的繁殖和育种应用提供理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以雌性日本沼虾成虾为实验动物,平均每尾体重约 4.0 g,来源于浙江省淡水水产研究所八里店综合实验基地。冰上解剖 6 尾性成熟的雌虾,

取出卵巢、肝胰腺、鳃、心脏、胃、肠、眼柄、肌肉和腹神经节 9 个组织,并分别解剖 6 尾卵巢发育处于不同时期的日本沼虾,取出 I~VI 期的卵巢,取出的各组织和卵巢均立即置于液氮保存。卵巢分期根据 Wu 等^[25]和 Zhao 等^[26]的方法,分为 I 期(早期卵黄生成前期)、II 期(晚期卵黄生成前期)、III 期(早期卵黄生成期)、IV 期(晚期卵黄生成期)、V 期(成熟期)和 VI 期(排卵后的消退期)卵巢。

1.2 日本沼虾 CST 基因全长的获得

按试剂盒 Total RNA kit II (Omega 公司)的说明书对冻存于液氮的卵巢组织提取总 RNA。NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计(Thermo, 美国)测定 RNA 的浓度和纯度,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。然后按 primeScript™ RT Master Mix 试剂盒(TaKaRa, 大连)的说明书合成第一链 cDNA。根据日本沼虾卵巢转录组测序中得到的 CST 基因片段设计 4 对引物: *MnCST*-F1、*MnCST*-R1、*MnCST*-F2、*MnCST*-R2、*MnCST*-F3、*MnCST*-R3 和 *MnCST*-F4、*MnCST*-R4 (表 1),以日本沼虾卵巢 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,合并得到的 4 段基因片段获得 *MnCST* 基因的 ORF 区序列。在已获得的 ORF 区序列基础上设计 3'-RACE 和 5'-RACE 的特异性引物 *MnCST*-3'-RACE GSP 和 *MnCST*-5'-RACE GSP (表 1),采用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit(Clontech 公司)试剂盒,利用试剂盒中的通用引物(Universal Primer, UMP)和设计的 3'-RACE 和 5'-RACE 特异性引物分别扩增目的基因的 3'和 5'末端序列。PCR 扩增产物回收纯化、连接转化后挑选阳性克隆送于上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3 序列对比分析

使用在线软件对 *MnCST* 进行序列分析,包括开放阅读框的预测(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)、蛋白的理论相对分子质量以及理论等电点的预测(http://web.expasy.org/compute_pi/)、蛋白的磷酸化位点预测(<http://www.dabi.temple.edu/disphos/>)、蛋白的功能结构域预测(<http://smart.embl-heidelberg.de/index2.cgi>)等。应用 ClustalX2 程序进行氨基酸多重序列比对(

表 1 实验中所用的引物
Tab. 1 Primers used in the study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
中间片段克隆 partial sequence PCR	
<i>MnCST</i> -F1	CTTCTTCTCCCGCCTCG
<i>MnCST</i> -R1	TCCACCAACAGCCACAG
<i>MnCST</i> -F2	TTATCCTGCCACAACCTC
<i>MnCST</i> -R2	TCATCCCGCTCATCACA
<i>MnCST</i> -F3	GGATGCTGGTGGAATGA
<i>MnCST</i> -R3	TGGTCTTATCTGCCTGTT
<i>MnCST</i> -F4	CAACAGGCAGATAAGAC
<i>MnCST</i> -R4	GAATTCCACTGAACCTAAG
3'和 5'端扩增 RACE PCR	
<i>MnCST</i> -3'- RACE GSP	<u>GATTACGCCAAGCTT</u> GGCCATACCAAACCTTGTGAAGTGGTCG
<i>MnCST</i> -5'- RACE GSP	<u>GATTACGCCAAGCTT</u> AGAATTACTGGGTCATTAAGAGGTG
UPM	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	
T7- <i>MnCST</i> -f1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> TTATCCTGCCACAACCTC
<i>MnCST</i> -r1	CTTCGCATGACATAGACA
<i>MnCST</i> -f2	TTATCCTGCCACAACCTC
T7- <i>MnCST</i> -r2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> CTTCGCATGACATAGACA
T7- <i>EGFP</i> -f1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> TGCCCATCCTGGTCGAGCT
<i>EGFP</i> -r1	TGCACGCTGCCGTCCTCGAT
<i>EGFP</i> -f2	GTGCCCATCCTGGTCGAGCT
T7- <i>EGFP</i> -r2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> TGCACGCTGCCGTCCTCGAT
荧光定量 PCR qRT-PCR	
<i>MnCST</i> -qf	TGTTGGTGGAAGTTTTGCTGC
<i>MnCST</i> -qr	TCATCCTCACGCCTGTTGTATT
<i>CtsB</i> -qf	GTCAGCAACGGCACAAAGTT
<i>CtsB</i> -qr	CTAAGCCCCTCCAGATACCT
<i>CtsL</i> -qf	CTGTGGTAATGGAGGAGTGGA
<i>CtsL</i> -qr	CAGTATGATAGAGCTTGTGTGGG
<i>Vg</i> -qf	CATCCGCTCTTGGTTTGTG
<i>Vg</i> -qr	TATGTCTGCCCCTACTTTGGT
β -actin-qf	AATGTGTGACGACGAAGTAG
β -actin-qr	GCCTCATCACCGACATAA

注: 单下划线部分为 15 bp 的载体同源序列, 双下划线部分为 T7 启动子序列。
Note: The 15 bp vector homologous sequence was underlined; T7 promoter sequence was double-underlined.

clustalw.ddbj.nig.ac.jp/), 应用 MEGA5.0 软件以邻接法构建系统进化树。

1.4 实时定量 PCR(qRT-PCR)分析 *MnCST* 基因的表达

按试剂盒 Total RNA kit II (Omega 公司)的说明书对冻存于液氮的卵巢、肝胰腺、鳃、心脏、胃、肠、眼柄、肌肉和腹神经节 9 个组织, 以及

I ~ VI 期的卵巢组织提取总 RNA。RNA 的浓度、纯度和完整性的检测同 1.2。使用 PrimeScript[®]RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒对组织的总 RNA 进行反转。依据已克隆的 *MnCST* 全长序列设计荧光定量引物 *MnCST*-qf 和 *MnCST*-qr (表 1), 以 β -actin 为内参基因(表 1)。使用 CFX96 实时荧光 PCR 检测系统(Bio-Rad, USA)和 SYBR[®]

Premix Ex Taq™ II(TaKaRa, 大连)试剂进行 qRT-PCR, 反应体系(25 μ L): SYBR®Premix Ex Taq II 12.5 μ L, 上、下游引物各 1.0 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L; 反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环。每个样本设置 3 个重复, 依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析实验样本 *MnCST* 的相对表达量, SPSS20.0 软件 One-way ANOVA 统计分析所得数据, 进行 LSD 和 Duncan 氏比较, 以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异, 结果用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

1.5 RNA 干扰实验

MnCST 基因和增强型绿色荧光蛋白(*EGFP*)基因的双链 RNA(dsRNA)的合成按照 Qian 等^[27]的体外转录的方法合成, 使用的引物序列见表 1。取健康的卵巢发育处于 I 期的雌性日本沼虾 300 只(平均每尾体重约 4.0 g)分为 3 组, 实验组、阴性对照组和空白对照组各 100 只。按照 Bai 等^[28]的 4 μ g dsRNA/g 体重的注射剂量和实验方法, 实验组肌肉注射 16 μ g *MnCST*-dsRNA/20 μ L 无酶水, 阴性对照组肌肉注射 16 μ g *EGFP*-dsRNA/20 μ L 无酶水, 空白对照组肌肉注射 20 μ L 无酶水, 在首次注射后的第 8 天各实验组再补充进行 1 次等量注射。由于日本沼虾 1 个卵巢发育周期(由 I 期发育到 VI 期)的时间为 18 d 左右, 本实验分别在首次注射后的第 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 天, 从各注射组中随机取 6 尾虾, 冰浴麻醉后立即分离卵巢组织, 进行总 RNA 的提取, 检测卵巢组织中 *MnCST* 基因的沉默效率, 以及卵巢中 *CtsB*、*CtsL* 和 *Vg* 基因表达水平。总 RNA 的提取依然按试剂盒 Total RNA kit II (Omega 公司)的说明书进行, 基因表达水平的检测参照 1.4 的实时定量 PCR 分析实验步骤进行。

2 结果与分析

2.1 *MnCST* 基因 cDNA 全长和氨基酸序列分析

所克隆序列经测序、拼接, 结果显示 *MnCST* 基因 cDNA 序列全长 6199 bp (GenBank 登录号: MG049914), 其中 5'非编码区长 1183 bp, 3'非编码区长 2304 bp, poly(A)尾前有 2 个加尾序列 AATAAA。该基因开放阅读框 2709 bp, 编码 903

个氨基酸, 推导的蛋白分子量为 101.181 kD, 理论等电点为 4.95, 分子式为 C₄₄₀₀H₆₉₁₆N₁₂₄₄O₁₄₁₀S₄₃, 富含缬氨酸(8.9%)、天冬氨酸(8.3%)和谷氨酸(8.3%), 色氨酸含量最低(0.8%)。另外, 在该氨基酸序列上还预测到 42 个磷酸化位点, 包括 24 个 Ser, 7 个 Tyr 和 11 个 Thr。利用在线软件 SMART 分析显示 *MnCST* 氨基酸序列上有 6 个 cystatin-like(半胱氨酸蛋白酶抑制因子样)结构域, 分别位于第 60–171、第 208–315、第 346–455、第 483–592、第 670–779、第 794–903 位氨基酸(图 1)。

2.2 *MnCST* 上的 6 个 cystatin-like 结构域的氨基酸序列多重比对

利用 ClustalX2 软件对 *MnCST* 上的 6 个 cystatin-like 结构域的氨基酸序列进行了多重比对, 发现在 cystatin 结构域内应该具有的 3 个相对保守的与半胱氨酸蛋白酶作用的活性位点——N 末端的 G、序列中间的 Q-X-V-X-G 活性基序和 C 末端的 PW, 在 *MnCST* 的第 1、第 5 和第 6 个 cystatin-like 结构域中全部存在。N 末端的 G 在这 6 个 cystatin-like 结构域内均存在, 且这 6 个 cystatin-like 结构域内均具有两个二硫键(图 2)。

2.3 日本沼虾 *MnCST* 同源性比对及蛋白系统进化树构建

利用 NCBI BLASTP 软件, 将获得的日本沼虾 *CST* 基因编码的氨基酸序列与其他 3 种甲壳动物, 即红螯螯虾、日本虎斑猛水蚤和中华绒螯蟹的 *CST* 蛋白氨基酸序列进行同源比对。结果显示, 日本沼虾的 *CST* 蛋白与红螯螯虾同源性最高(62%), 其次为日本虎斑猛水蚤(32%), 而与中华绒螯蟹相似度最低, 为 30%。利用在线软件 SMART 分析显示, 日本沼虾的 *CST* 蛋白有 6 个 cystatin-like 结构域, 红螯螯虾的 *CST* 蛋白有 3 个 cystatin-like 结构域, 日本虎斑猛水蚤和中华绒螯蟹的 *CST* 蛋白均有 1 个 cystatin-like 结构域(图 3)。将这 4 种甲壳动物的 *CST* 蛋白的第一个 cystatin-like 结构域的氨基酸序列进行多重比对, 发现它们均具有保守的 N 末端的 G 和中间序列的 Q-X-V-X-G 基序, 除了中华绒螯蟹之外, 另外 3 种甲壳动物的第一个 cystatin-like 结构域内还具有 C 末端的 PW 和两个链内二硫键(图 4)。利用 MEGA 5.0 软件进

1 ACATGGGAACACAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGGATTGAGGTGTATGTGGTGTGAGAGGGTCAAATCTCAAAATGGCACTTCGGACAAATGTTGGGCGGTACAGTTT
2 TTGTTGGTTGTGTGGGATGAGTGTGGCAAGTCTTGCTGTAGCTCAAGATGGAGAGGTGCCTGCTGCCCTCCACACAGCAGGACTCGTCAGCGCCAGGACAGGTCGTGACGACATC
319 GCGAGTGGCGGAGAGGAGTGGCTCTCCACCGCTACGATCCGATGTGCTATCTCCGTGTGAAGCATGGGGGTTTCTCTCGGACAGGACCAAGAGCTGTCCCTTGCTCGACAGGA
359 GGAGCGACGCGTGTCCGGTGTGTTCCGTGACGATCCCGTCTTCGTGTGCCCTTAGAACAGCGCTCTGGCGTACCTCTCCCCCTCGGCGGGTGACACGGGACACAGTCGGAATTCCTCTG
479 CCCCCAATTAGCACCACCGCTGGGCTCGGAGCCACAGGTGCCCAACAGCCAGCTTCGATCTCGGAGGTTCCCTCGGAGGATGAGACATGTGCACAGCCCCATGTGTGATGCCACCGTC
599 CAGAGGTTTTCGCGCTGGCAGCTTCAGGAGCACTCCACCTCAGGACAGCTGTGACAAAGCTGTCAAAATAGGAGATGTGCTACGCGCCCAACAAAGCTGTCTCACTGTCAAGCTT
719 GTCTACGCTTCTACAGTGTGGAGAGCAGCTGCCAGTGTGAACTCTGAACGTCTACTAAGCTCGCCCTGGACCAACCGAAGATGATTCGCTGTGTGAAGATCGTCTGTGGGAAGG
839 CCTCGTCTCAACAGCTCTAAAGTCTAAAGAAAGATCAAATGTCTGAAGCTGAGGATGATAACGATCAAACTTTGGGGCTTCTTCCGCCCTGCACCAATCTCCATCTGAGATC
959 CCTCAGCAAAATCTCCCAAGGGCATTTAGTGAACAGCATTTGGATTTGGAGGCTTCAACTTGTAGCGCTGCATCAGAAATCAAATTCAGAGGCGATTTGTGCAACTTCAATCTTGGC
1079 AAGATCACATTTGATCCTTTGTCTAACACAATAAAGTTCAAGTAAATGTGCAATATGGCTTCAAGATGTGCTCAGGTCTCCAGATGAGAAGACTGACTCCAGGATGTGCCACGTGAC

1 M C P R
1199 ACTCAGCGTGACCATTATATCTGGCGTGTTCATGTTGTGCACAAACCCCAACCAAAATGCCACCCTCGAAGTAGTTCCTATCCGAGACTCTAGTGACGAAAAACGAGATTCTACTGTGAAAAA
6 A Q R D H Y I C A V H V V H N P N Q I A T L E V P I R D S S D N E I H C E R
1319 AGGAGAAGTGTGTGAAGAAGAAATAGTTGTTCTGTAGCAGGCCCTTGCTTGGTGTCTTCAGCGCAGCACTCTTAATGACCGAGTAATCTAGATATAGCTCACTTGTCTGTGAAGAG
46 R R S V E E E L V P V A P L C L G C P Q P A P L L N D P V I L D I A D F A L K E
1439 TATGACAGCAGCTGTAGGAGTACCTTCATGTATGTGACTTCAAGGCCACAGACAGGTTGGTGCAGGTTGTAACTACTATGCTGAGTGTGAGCTGTGCAGACAGAGTGC
86 Y D R T A D E D D L H M I L R L V K A Q V V A G V K Y Y L T V E L A E T E C
559 AAGAGACCTTGTATGGTGTGATGTCAACAGGACTTCTGCAGTCAAGATTGAACAGGAAGAACAAATTTGTCAGCTCATATAGTGTGACCAAGCATGGGTACCGACAGAGATCTT
126 K K L L I G V D V N R N T F C S Q D L N E E T N I C D L H I V D P Q W V P A R D L
1679 GTTGCTGCTCAGTGCTATGACAAGGAATAATCTCGCCCAACTCAAGATGAATTTATTGTTCTGTGGCTGTGGTGGAAAGTTTGTGTCAGTGGCCCTCTGCTACTGGTTTCCAGGCA
176 V A A Q C Y D K D N Y P A T T Q D E F I V P V A V G G S F A A V P S A T G F A
1999 AGAATCTCTGCTTTGGAGTCAGGCACCTGTACAGCTTGTAGAAATAGCAGGACATAGCTCAGATGGTTGAGCAGAAATACACAGGCGTGAAGTAGACCGTGAATTTCAACATC
206 R T S V G G G Q A P V Q L D E N S R A I A Q M V V A E Y N R R E D D R E Y V Y K L
1919 ATGAAGTCCATGAAGCAACCCCTGGATGCATCTGGAACGTACCACATTTGTTGAAATGGCTGAGACAAATTTAATAAGTTTGATCCGCTCTACGGAATGTGGAACATGTGATT
246 M K V H E A T P L D A S G A Y H I V E V A E E T N C K F D P S T N G E H C I
2039 GAGAACCCGAGAGAAGAGCTGAAGTTTGCAGTGTCTCAGTCTATGAGCAACAGCTGAAACAGAGAATAATTTGCTATGTCATCGGAAGATCTGTATGATTACCTTCGAGATAGGTTG
286 E N P R E E R E V C S A Q V H E Q A P G S R R I L S M G E D C L D Y L R D R I
2159 ATGCCAACTTTGAAGCTCTTGATATCATGGATCACTCCCTTCTTAAGCTCACAAGGTTCTTCTCTCTGGAAGCTGTCCCTACTAGTGACGGCCGAGTGTGAGGAAGTTGCTGCTTT
326 M P T L N S F D I M D H P L F S Q G S S S S N G P V T S D P R V Q E V A A F
3799 GTCTTGCAGCATACAATTCAGCGGAGGAGAAGTGAAGTCACTTGTCTGACTAATTTGTCAGTCTACACCCAGAGTGTCTGGAATGACCAAGATGATCTTCAGCTGTGAAGCA
386 V L L D Q Y Y N L R G D E D E L Y V L T N I V S A H T Q D A G G M T K Y L E L E A
2399 CGACAGACAGCTGCAAGAAATACCTTCCAGTGCAGATCTTCCCGTGGCAATTTGACCATGGTGAAGAAGAGAAATTCGCAAGAGGAGGTGAATGTACACGAGACACCATCTCAG
406 A E T Q C K K Y L P V T D P S R C H I D H G E E R E I C Q A E V N P A D S Q
2519 CCAAGACACCTCAGCAGCAATTTACTGTGATGAGCGGATGACTTATACCAATAAACTCAAGGTAAATCTTCTCAGGAGCTGCTTCCACCGTCAATGGTTCTGCTTCCACTCTGGGT
446 P K T L T R L Y L C D E R D Y Y T N K L K G I F S G A A L H P D G S A T L G
2639 GGAACATGGGTGCTGCCAGTGAATGAGCTCCAGCATAGAAGAAGCTTGACACCTTATAGTGTGACGAGTTGATTTCAGTGTGAGAGGACCAACCTATCATCTCAGCAAACTATTG
476 G T W V A A T A S T V G N D S S I R C K L G H L I A D E F I R G A D E N D L F I F S K L M
2759 AAAGCAAAAAATGTTACACTGGCCCTAAAATCTCAGCTGGTTGTGCAAGTCTTCGAGACTTTGGCCCAAGTACAGAGGAGAAATGACAAACTGTTGCTGCAGACATTTGGA
526 K A Q K M V T S G L K Y H L V E L L E T V C P K Y K R R I D K T R C V P D I G
2879 GAGGATCTGCTGTGTTGAGGCTAAATGTTGATACAACTTGGCTGAGCAACAGCAAGTTACAAACTCCCGTGTCTGATAGGAGATGCTTCATGAGGCTGATGATTCAGTTGAG
566 E D P V M C E A N I L I Q P W L S K S C P V A N L R C A D R D D F H E G D S V E
2999 GTCTTGTGCTCTGTGTTCAACCTTCAGCTTATGCTGCCAGTCTTCAAGAGCCACTTTGTTGTGCTACTAGTATGAAAGTATAGAGAGCAATGAGGCGATTCATATCCCTCCGCT
606 V L L P L V H P S A H A R P V F K S H F V F V R T S D S I E S I E N E R F Y H P S
3119 GGTGAAGAACCATCATGACATGAAGAAGAGAGTCTTGAAGACTTCTACTCTCCGAGCGAGGAGGAATACTCTGTTGGTTATCAACAGCAGATGAAGCAGGTCCTCAAGTATG
646 G R N H H H D T E E D D S E E L P N F R G R R G I P G G Y Q A A D K T S P K V
3239 AAGAAATAGCAGATTTGCCAATCAGTCTATGATGAGTGTCTCTGAAGTCTCGAGTTAGAAATGCAAGGCTGTGAAAAGCTGAGACTCAGAGCTGGTTCAGCGGCTCAACTATAGA
686 K E I A D G A F A I K S M D E L S E D D P R V I R E V K A E T Q V V A G V N Y R
3359 CTATCTCTTACTGTCTTGAGCAACTGCTTGAAGACAGTGTAGTAGAGGATTGAGTTGTCTGCCGATGCTCAATGAAGTACCAATTACATGCACTGCTATTGTATTGATGTTG
726 L I L T V H W T T C L K A D E V E D L S C S P D N E P V I T C T V I V D Y
3479 CCATGGAACAACCCGCGAGGCTACAGAGGCTGCCGCAACCCCTGAGTGTCTCAGATGCCCTGCAAAAAGATCAGGAGACACTACTTGTGTGTTTAAAGTGGGCTGATGAAAT
766 P W T N T R R V T E A A C A N P V G A S D A P A K R S R R L L L G G F S E A D V N
3599 GATGCAAAAAATCAGGAAATTTGCAATTTTGTGCTACAAGCTAGTCACTGCAAGTAGTGTAGCCACTATAGACGTTGAGAAATCTTAAGTGTCTCCAGAGGAGTGTGCGAGGA
806 D A K I E K E I G N F A V Q A M D S T S S D R H I R I V E E I L S A S K Q V A G
3719 TTTAATTATAGCTGAATATTAAGATATAGTGCAGCAGCTGTTGAAGGAAGATCATTAGAGGATATTAGCGGCTGGAGAGGATCCAGAGGCCATACCAAACTGTGAGAGGTGTC
846 F N Y R L N I K I Y W T T C L K E D H L E D I S G C E R D P S R P Y Q T C E V V
3839 TTTATGAGAAGCCTGGGCAAACTCAGCTAGCTTAACTGCTCTTGTAACTAGGAGGAGGCTTGTGAAAACGTGATTTCTCAGACTTATATATTGAAATGAATTAATGATGACA
886 Y Y E K P W A N H I E L K S A S C N *

3959 TTAACAATTTATTTATCAGTTGTCATTGCATCTTTTATCTGATAGTTGTTTTTATTTATGTAATGAGACTACATACAGTATGGTTGTTAGACAGTGTGACATATCATGTGAGAA
4059 TCTTCATATTTGAAATTTATGATTTCTGATTTATTTGTTGAAAACAAAAATTAATTTCTCTCTGTATATATATCATCAATTTAGTAATCATGTATCAACTTTCTTTTATGTA
4199 CATCTTTAGTCTGCGTGAATTCAGTTTAACTAAGCAACCACTTGTGACAGGAAGAACAAATTCGATATTTAATCAAGTTTATTTAAACAGGAAATTTATGATCATTTCA
4319 GTACGATTTCAAACTCTTACGCGGAATCATCTTAGAGACAGCTGCAGATAGATTTCGAGTCTGTAGTTTCCATAACATCAATGCGCTTACTACAAGCTGGACGTGGGTTTGTAGCAAC
4439 ATAAATGAGGAATTAAGAAATTAATCTGATTTGTTTCACTTGAATAATAAGAAACAGTTAGTTTGAAGCTTTCAGCTTCTTCAAGGATAAATCATATTTAAAAATTTGTCATATCA
4559 AACTATGATATGTACTGATATTTAGTATGCTTAAATGACTTCTTGTGCTGACAGTATTTAGATTGAAAAGAAATTTAGGAACTGTTCAGAGATCTAATTTGCATCAGCTGGT
4679 ATGTTTCAATTTCTCATCTTCAGTTTGTGATTTTGAAGTGTGAAATTTTATTCAGATTTAATAATTTAAAGAGGAGCAAGCTTTCTGCTCTCCCTTTGTGATGTTTCAGATATTT
4799 TTAATCACTAATGAAGTATAAAGTTTAGGATCAGGAGTACATAAATATCTGCTAATTTGACCTTGAAGTTAGTTTACTTATGAGGTATATTTTCCATCATCTTTAGCAAAATTTAGC
4919 CCACTTGGAGCATATAATTTCTTTATTTAAGGAAGAAAGATGACAGCACCAGAAAACGTTGTACCAATGCTACATAAATGTTTTTCAGAAATTTTCCCTTAATCGTATAAAATGAA
5039 TCTGCATATTTCTGCTGCCATCGAAGCTTTTGTATGAGGACAGCTTAACATCACCAGCAAGCTGATGATTCATAGATGTTTGTATTTCTTTGTCATATGTGATGCATAGAGCAGC
5159 ATCAAGAGATCTAAGGACAGTATGATTTAGGAAGAGGAGGAGCTTGTGCTGAGGAAGAGCTGTTTTATTCATAGATTTAGTGGTTTATGTCAGATTTTTCAGCAATTTTGAAGAAAT
5279 TAGTCTGCTGTGACCACTCTTTCATACAGATTTTCGTGAGTGGATTAATTT

图1 日本沼虾 *MnCST* 基因全长 cDNA 序列和氨基酸序列分析

灰色背景部分为 6 个 cystatin-like 结构域序列, 下划线指示 ORF 区的起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG), 星号为氨基酸的终止, 黑色三角(▲)指示预测的磷酸化位点. 双下划线指示 poly A 加尾信号(AATAAA).

Fig. 1 Sequence analysis of the full-length cDNA and amino acid of *MnCST* in *Macrobrachium nipponense*. Six cystatin-like domains are indicated by gray backgrounds. The start (ATG) and stop codon (TAG) of the ORF are underlined. An asterisk denotes the termination codon. The phosphorylation sites are marked by ▲.

Putative polyadenylation sites (AATAAA) are double-underlined.

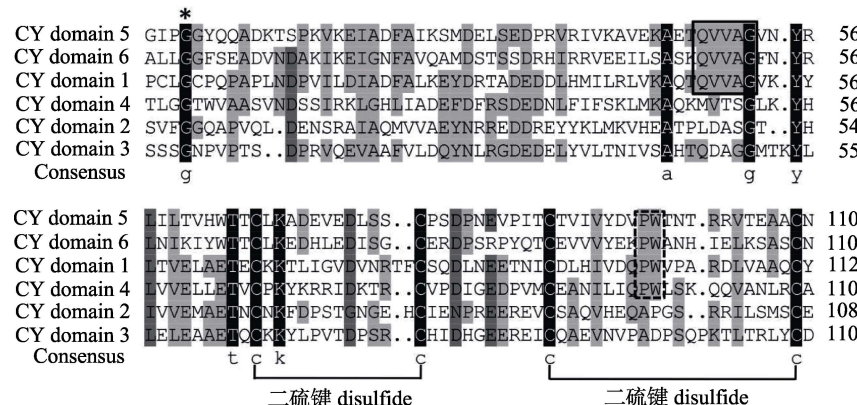


图 2 日本沼虾 MnCST 的 6 个 cystatin-like 结构域的氨基酸序列多重比对

CY domain 为 cystatin-like 结构域, 按照图 1 灰色背景部分的 cystatin-like 结构域的自上而下的顺序分别命名为 CY domain 1-6; cystatin-like 结构域内的 3 个与半胱氨酸蛋白酶作用的活性位点——N 末端的 G、序列中间的 Q-X-V-X-G 活性基序和 C 末端的 PW 分别用星号、实线方框和虚线方框来指示。

Fig. 2 Multiple alignments of amino acid sequence of six cystatin-like domains in MnCST of *Macrobrachium nipponense*

CY domain represents the cystatin-like domain, according to the top-down order of cystatin-like domains in the gray backgrounds in Fig. 1, these domains are named CY domain 1-6. The three active sites interact with the cysteine peptidases in cystatin-like domains: G at the N-terminus, Q-X-V-X-G active motif in the middle of the sequence and PW at the C-terminus are indicated by asterisk, box with full line and box with dash line, respectively.

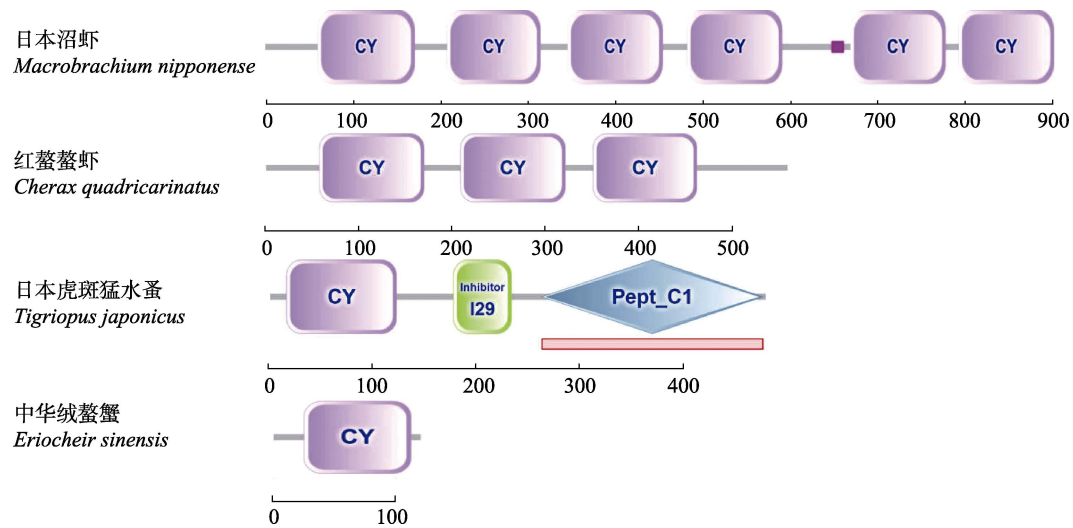


图 3 4 种甲壳动物 CST 蛋白的结构域预测

CY 为 cystatin-like 结构域。

Fig. 3 The predicted structure domains of CST proteins in four crustaceans

CY represents the cystatin-like domain.

行系统进化分析, 发现日本沼虾 CST 与多种无脊椎动物 CST 聚为一支, 其中与甲壳动物红螯螯虾的亲缘关系最近, 其次为日本虎斑猛水蚤(图 5)。

2.4 日本沼虾 MnCST 在不同的组织和不同发育阶段的卵巢中的表达

qRT-PCR 检测结果显示, 日本沼虾 MnCST 几乎在所有组织中都有表达, 其中在肠中的表达量最高, 其次是肌肉和肝胰腺, 在心脏中的表达量

最低。MnCST 基因在肠中的表达量显著高于其他各组织中的表达量($P<0.05$, 图 6a)。在日本沼虾不同发育阶段的卵巢中均检测到 MnCST 基因的表达, MnCST 基因的表达量随着卵巢的发育先升高后下降, 在 IV 期卵巢中达到最大值, 在 II 期卵巢中的表达量最低。III、IV 和 V 期卵巢中 MnCST 基因的表达量无显著差异($P>0.05$), 但显著高于 I、II 和 VI 期卵巢中 MnCST 基因的表达量($P<0.05$, 图 6b)。

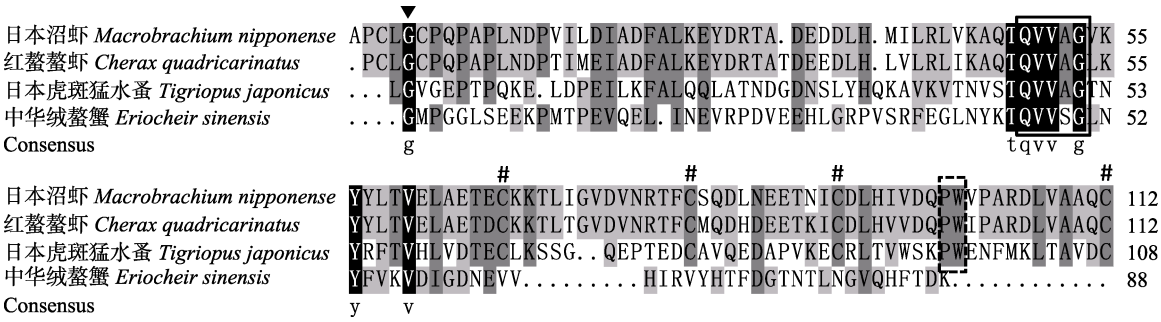


图 4 4 种甲壳动物 CST 蛋白第 1 个 cystatin-like 结构域的氨基酸序列多重比对
实线方框内为 Q-X-V-X-G 基序, ▼指示 N 末端的 G, 虚线方框内为 C 末端的 PW. 组成二硫键的 Cys 残基用#指示.

Fig. 4 Multiple alignments of amino acid sequence of the first cystatin-like domain in four crustacean CST
Q-X-V-X-G motif is shown by box with full line; G at the N-terminus is indicated by ▼; PW at the C-terminus is shown by box with dash line. Cys residues involved in the formation of disulfide bonds are marked by #.

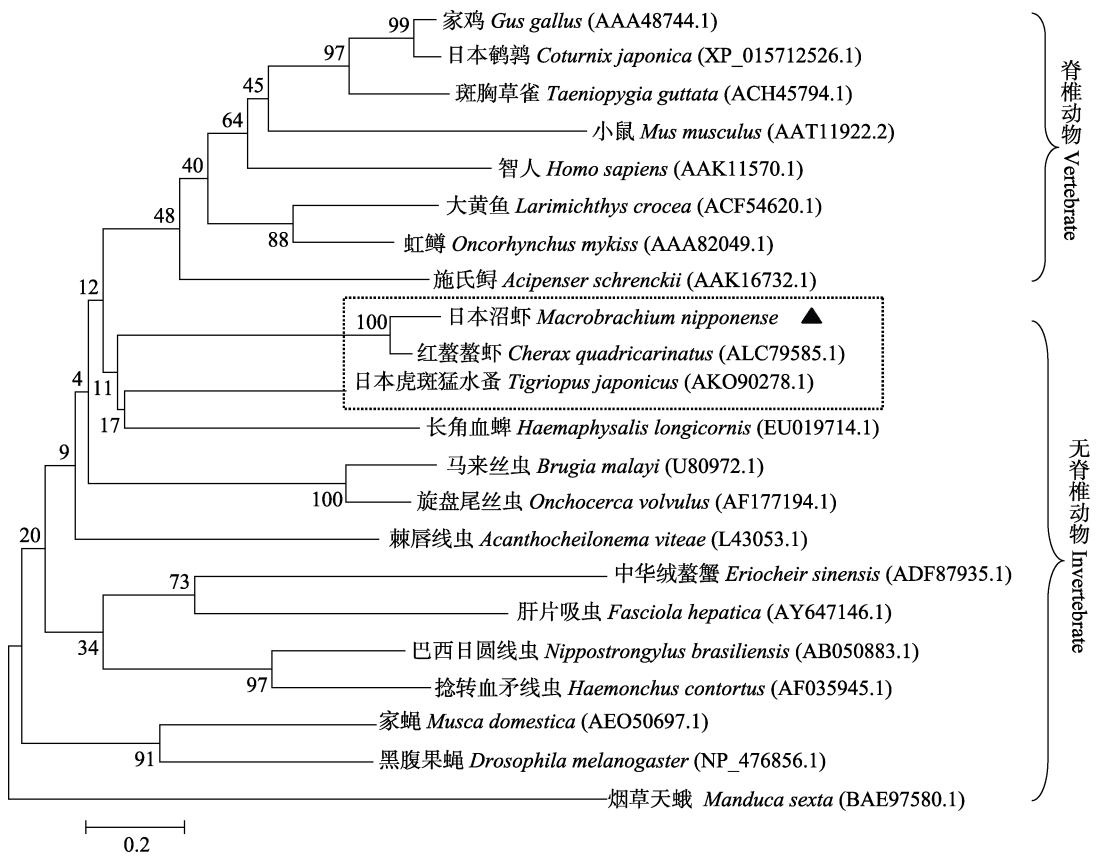


图 5 基于 CST 氨基酸序列的系统进化树(Neighbor-Joining 法)
线的长度与遗传距离成正比, 日本沼虾用“▲”表示.

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CST (Neighbor-Joining method)
The length of the phylogenetic tree identified the genetic distance, and the CST of *Macrobrachium nipponense* was marked by the black triangle.

2.5 RNAi 实验结果

为了进一步研究 *MnCST* 在日本沼虾卵巢中的作用, 本研究进行了 RNAi 实验, 通过向日本沼虾肌肉注射 *MnCST*-dsRNA 来抑制 *MnCST* 基因

的表达, 结果表明 *MnCST*-dsRNA 注射组的卵巢中 *MnCST* 基因表达水平与空白对照组(20 μ L 无酶水注射组, VC)和阴性对照组(EGFP-dsRNA 注射组)相比在 5 个时间点显著下降($P<0.05$), 即在

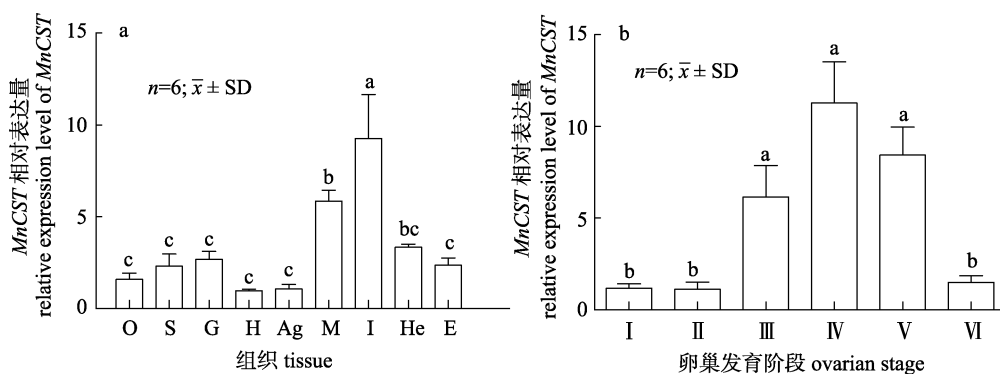


图 6 *MnCST* 在日本沼虾不同组织和不同发育阶段的卵巢中的表达

a. 日本沼虾 *MnCST* 的组织表达分布。O: 卵巢; S: 胃; G: 鳃; H: 心脏; Ag: 腹神经节; M: 肌肉; I: 肠; He: 肝胰腺; E: 眼柄。b. *MnCST* 在日本沼虾不同发育阶段的卵巢中的表达。I: I 期卵巢; II: II 期卵巢; III: III 期卵巢; IV: IV 期卵巢; V: V 期卵巢; VI: VI 期卵巢。不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 The relative expression of *MnCST* mRNA in different tissues and in different stages of ovary in *Macrobrachium nipponense*
a. Tissues expression of *MnCST* in *M. nipponense*. O: ovary; S: stomach; G: gill; H: heart; Ag: abdominal ganglion; M: muscle; I: intestine; He: hepatopancreas; E: eyestalk. b. The relative expression of *MnCST* mRNA in different stages of ovary in *M. nipponense*. I: ovary at stage I; II: ovary at stage II; III: ovary at stage III; IV: ovary at stage IV; V: ovary at stage V; VI: ovary at stage VI. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

首次注射后的第 6、8、10、12 和 14 天与空白对照组相比分别下降了 77%、74%、88%、73%和 75%(图 7a), 这说明 *MnCST*-dsRNA 介导的 *MnCST* 基因表达的沉默是成功的。对 *MnCST* 基因沉默后日本沼虾卵巢中 *CtsB*、*CtsL* 和 *Vg* 基因的表达量进行了分析, 结果显示, *MnCST*-dsRNA 注射组的卵巢中, *CtsB* 基因表达水平与空白对照组和阴性对照组相比在 1 个卵巢发育周期中的 4 个时间点显著下降 ($P < 0.05$), 即在首次注射后的第 6、8、10 和 12 天与空白对照组相比分别下降了 73%、86%、85%和 64%(图 7b)。卵巢中 *CtsL* 基因表达水平与空白对照组和阴性对照组相比也在 1 个卵巢发育周期中的 4 个时间点显著下降 ($P < 0.05$), 即在首次注射后的第 8、10、12 和 14 天与空白对照组相比分别下降了 91%、83%、84%和 82%(图 7c)。卵巢中 *Vg* 基因表达水平与空白对照组和阴性对照组相比在 1 个卵巢发育周期中的任何时间点均无显著差异 ($P > 0.05$, 图 7d)。

3 讨论

本研究从日本沼虾的卵巢中克隆出了一种半胱氨酸蛋白酶抑制因子基因, 命名为 *MnCST* 基因, 其编码的 *MnCST* 蛋白共含有 6 个 cystatin-like 结构域。在以往的研究中, 人们在许多生物中也

鉴别出了具有多个 cystatin-like 结构域的半胱氨酸蛋白酶抑制因子。例如, 在哺乳动物中, 有一种具有成串的 cystatin-like 结构域的半胱氨酸蛋白酶抑制因子, 被称为激肽原, 它是哺乳动物 CST 家族的一员, 具有 3 个 cystatin-like 结构域^[29]; 在马铃薯(*Solanum tuberosum*)根茎中, 一种具有 8 个 cystatin-like 结构域的多重半胱氨酸蛋白酶抑制因子(multicystatin)被鉴别出来, 它能够同时抑制 8 个木瓜蛋白酶分子^[30]; 在向日葵(*Helianthus annuus*)种子中, 一种具有 3 个 cystatin-like 结构域的 multicystatin 也被鉴别出来^[31]; Glazer 等^[32]从红螯螯虾中鉴别出一种 multicystatin, 它也具有 3 个 cystatin-like 结构域; Khaznadji 等^[33]和 Miyaji 等^[34]分别从肝片吸虫和烟草天蛾(*Manduca sexta*)中鉴别出一种 multicystatin, 它们均具有 6 个 cystatin-like 结构域。动物 CST 蛋白的家族 1 和家族 2 的成员均只含有 1 个单一的 cystatin 结构域, 而家族 3 的成员结构复杂, 含有多个 cystatin-like 结构域, 每个结构域都具有两个二硫键^[2-3], 本研究的 *MnCST* 基因所编码的 *MnCST* 蛋白具有 6 个 cystatin-like 结构域, 且每个结构域内均具有两个二硫键, 因此 *MnCST* 基因所编码的 *MnCST* 蛋白应属于 CST 蛋白家族 3 的成员。

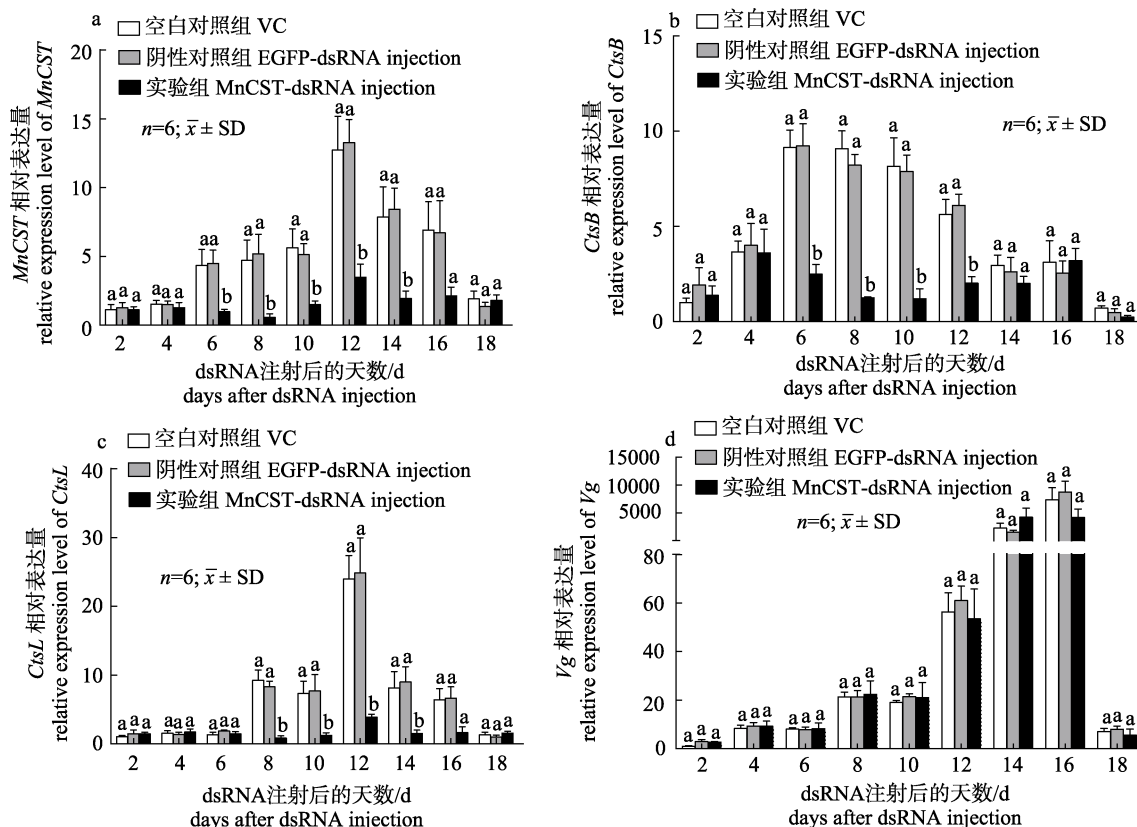


图7 *MnCST*-dsRNA 注射对日本沼虾卵巢中基因表达的影响

a. *MnCST*-dsRNA 注射后日本沼虾卵巢中 *MnCST* 基因沉默效率; b, c, d 分别为 *MnCST*-dsRNA 注射

对日本沼虾卵巢中 *CtsB*、*CtsL* 和 *Vg* 基因表达的影响。不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Effects of *MnCST*-dsRNA injection on gene expression levels in ovary of *Macrobrachium nipponense*

a. Silencing efficiencies of *MnCST* gene in ovary of *M. nipponense* after *MnCST*-dsRNA injection. b, c, d represent the effects of *MnCST*-dsRNA injection on the expression levels of *CtsB*, *CtsL*, *Vg* genes, respectively, in ovary of *M. nipponense*. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

4 种甲壳动物的 CST 氨基酸序列同源比对结果表明, 日本沼虾 CST 的氨基酸序列与红螯螯虾最为相似, 而与中华绒螯蟹相似性最低。4 种甲壳动物的 CST 蛋白均具有 cystatin-like 结构域。研究表明, cystatin 结构域具有 3 个保守的活性部位, 它们对于 CST 蛋白与半胱氨酸蛋白酶的作用是非常重要的, 这 3 个活性部位分别是: N 末端的一个 Gly, 序列中间的 Gln-X-Val-X-Gly 活性基序构成一个 β -发夹环结构的一部分, 以及 C 末端的 Pro-Trp (PW) 构成第二个发夹环结构的一部分^[35-36]。在本研究中, 4 种甲壳动物中除了中华绒螯蟹的 cystatin-like 结构域不具有 C 末端的 PW 外, 其他的活性部位在这 4 种甲壳动物中均具有, 说明这 3 个活性部位在甲壳动物的 CST 蛋白中还是比较保守的。另外, 本研究中 *MnCST* 基因所编码的

MnCST 蛋白含有 6 个 cystatin-like 结构域, 但只有其中 3 个 cystatin-like 结构域具有全部 3 个活性部位, 因此由 *MnCST* 基因所编码的蛋白质是否具有同时抑制 6 个半胱氨酸蛋白酶分子的活性, 还需要进一步研究确定。日本沼虾、红螯螯蟹和日本虎斑猛水蚤的 CST 蛋白的第一个 cystatin-like 结构域内均具有两个二硫键, 而中华绒螯蟹的 cystatin-like 结构域内不具有二硫键, 且中华绒螯蟹只具有一个 cystatin-like 结构域, 因此中华绒螯蟹的 CST 属于 CST 蛋白家族 1 的成员。系统进化树分析结果也显示 *MnCST* 与甲壳动物中的红螯螯蟹的亲缘关系最近, 与中华绒螯蟹的亲缘关系最远, 这与 4 种甲壳动物的 CST 氨基酸序列同源比对结果是一致的。

CST 对属于半胱氨酸蛋白酶的组织蛋白酶

B(CtsB)和组织蛋白酶 L(CtsL)的活性具有抑制作用^[37-38],而 CtsB 和 CtsL 在卵母细胞成熟过程中对卵黄蛋白原(Vg)起重要的水解作用,Vg 经血淋巴运输到卵母细胞表面后,通过受体介导的内吞作用进入卵母细胞,而大分子的 Vg 一旦进入卵母细胞就将被包括 CtsB 和 CtsL 在内的组织蛋白酶水解成各种小分子成分,贮藏在卵母细胞内为将来的胚胎发育提供营养^[39-40]。同时组织蛋白酶 L(CtsL)是存在于所有细胞的溶酶体内的半胱氨酸蛋白酶,它具有很强的蛋白降解作用,与食物的消化也有密切的联系^[41]。本研究 *MnCST* 基因的组织表达分析表明,*MnCST* 基因的 mRNA 在日本沼虾的 9 个组织中均有分布,说明 *MnCST* 基因不是组织特异性基因。但 *MnCST* 基因在肠中的表达量最高,这可能是为了满足生殖腺发育阶段日本沼虾对大量营养的需求,肠中需要大量的 CtsL 对蛋白质进行降解,为了对 CtsL 的水解作用进行调控,对 CtsL 有抑制作用的 *MnCST* 也需要大量的合成,从而使 *MnCST* 基因在日本沼虾的肠中大量表达。

本研究对 *MnCST* 基因在日本沼虾不同发育阶段的卵巢中的表达分析表明,*MnCST* 基因的表达量随着卵巢的发育先升高后下降,在卵黄生成前期的卵巢(I 期和 II 期卵巢)中的表达量最低,在 IV 期卵巢中的表达量则达到最大值,然后又逐渐下降。*MnCST* 基因在日本沼虾不同发育阶段的卵巢中的表达规律与 Zhao 等^[42-43]研究得到的 CtsB 和 CtsL 基因在日本沼虾不同发育阶段的卵巢中的表达规律是一致的,CtsB 和 CtsL 基因表达量也随着日本沼虾卵巢的发育先升高后下降,在 IV 期卵巢中达到最大值,然后再逐渐下降。这可能是因为卵巢发育过程中,卵黄生成前期 Vg 尚未在卵母细胞中累积,但随着卵巢的逐渐发育,Vg 在卵母细胞中逐渐积累,CtsB 和 CtsL 也会随着 Vg 的积累逐渐增加,从而对其进行水解,但为了对 CtsB 和 CtsL 的水解作用进行调控,*MnCST* 蛋白的量也随着卵巢的发育逐渐增加,并都在 IV 期卵巢中达到最大值。对家蚕(*Bombyx mori*)的研究证明卵巢中的半胱氨酸蛋白酶由卵母细胞周围的滤泡细胞产生,并在卵巢发育过程中在卵母细

胞中不断积累^[44]。本研究中 *MnCST* 基因表达量在 V 期卵巢开始下降,这可能是由于 V 期卵巢中的卵母细胞已发育成熟,滤泡细胞在此时逐渐消失,CtsB 和 CtsL 的产生量下降,对 CtsB 和 CtsL 起抑制作用的 *MnCST* 蛋白的需要量也减少,从而 *MnCST* 基因表达量也随之下降。

为了进一步探索 *MnCST* 基因在日本沼虾卵巢中作用,本研究进行了 RNA 干扰实验。结果表明 *MnCST* 基因表达在首次注射后的第 6、8、10、12 和 14 天被沉默,同时在 *MnCST* 基因沉默后,卵巢中 CtsB 基因表达水平与空白对照组和阴性对照组相比在首次注射后的第 6、8、10 和 12 天显著下降($P<0.05$),CtsL 基因表达水平与空白对照组和阴性对照组相比在首次注射后的第 8、10、12 和 14 天显著下降($P<0.05$),这说明 *MnCST* 基因在日本沼虾的卵巢中的表达变化与 CtsB 和 CtsL 基因的表达变化基本是一致的,由此推测 *MnCST* 在日本沼虾卵巢中的作用主要是抑制包括 CtsB 和 CtsL 在内的半胱氨酸蛋白酶的活性,对 Vg 的水解过程进行调控,同时防止过量的半胱氨酸蛋白酶对卵母细胞中的其他蛋白进行水解,从而保护卵母细胞正常的结构和生理功能免遭破坏。*MnCST* 基因沉默后卵巢中 Vg 基因表达水平与空白对照组和阴性对照组相比在一个卵巢发育周期中的任何时间点均无显著差异($P>0.05$),说明 *MnCST* 在日本沼虾卵巢中仅仅是通过对 CtsB 和 CtsL 的抑制作用对 Vg 的水解间接起调控作用,在转录水平上对 Vg 基因的表达没有直接影响。然而,*MnCST* 在日本沼虾卵巢发育过程中对 Vg 水解的具体调控机制,以及对卵巢的整个发育进程的影响还需要进一步在分子生物学和组织学的基础上进行更深入的研究。

总之,本研究克隆得到了日本沼虾 CST (*MnCST*)基因 cDNA 全长序列。该基因所编码的 *MnCST* 蛋白具有 6 个 cystatin-like 结构域,属于 CST 蛋白家族 3 的成员,在进化上与无脊椎动物 CST 形成一支,与甲壳动物红螯螯虾的亲缘关系最近。*MnCST* 基因在日本沼虾各个组织中均有表达,在肠中表达量最高。*MnCST* 基因在日本沼虾 I~VI 期的卵巢中也均有表达,在 IV 期卵巢中表

达量最高, 在Ⅱ期卵巢中表达量最低。*MnCST* 基因在日本沼虾卵巢中的表达变化与 *CtsB* 和 *CtsL* 基因的表达变化基本一致, *MnCST* 在日本沼虾卵巢中的作用可能主要是抑制 *CtsB* 和 *CtsL* 的活性, 在日本沼虾卵巢发育过程中对 *Vg* 的水解起间接的调控作用。

参考文献:

- [1] Sol-Church K, Picerno G N, Stabley D L, et al. Evolution of placentally expressed cathepsins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293: 23-29.
- [2] Turk V, Stoka V, Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13: 5406-5420.
- [3] Magister S, Kos J. Cystatins in immune system[J]. *Journal of Cancer*, 2013, 4: 45-56.
- [4] Chong X, Lu X, Wang Y, et al. Distinct structural changes in wild-type and amyloidogenic chicken cystatin caused by disruption of C95-C115 disulfide bond[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2015, 34(12): 2679-2687.
- [5] Konopska B, Gburek J, Gołab K, et al. Influence of aminoglycoside antibiotics on chicken cystatin binding to renal brush-border membranes[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, 65(7): 988-994.
- [6] Antognoni M T, Siepi D, Porciello F, et al. Serum cystatin-C evaluation in dogs affected by different diseases associated or not with renal insufficiency[J]. *Veterinary Research Communications*, 2007, 31(1): 269-271.
- [7] Prozialeck W C, Vandreele A, Ackerman C D, et al. Evaluation of cystatin C as an early biomarker of cadmium nephrotoxicity in the rat[J]. *BioMetals*, 2016, 29(1): 131-146.
- [8] Xiao P, Hu Y, Sun L. *Scophthalmus maximus* cystatin B enhances head kidney macrophage-mediated bacterial killing[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34: 1237-1241.
- [9] Khaznadj E, Collins P, Dalton J P, et al. A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2005, 35: 1115-1125.
- [10] Maizels R M, Gomez-Escobar N, Gregory W F, et al. Immune evasion genes from filarial nematodes[J]. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31: 889-898.
- [11] Lustigman S, Brotman B, Huima T, et al. Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 17339-17346.
- [12] Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, et al. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(12): 7380-7386.
- [13] Newlands G F J, Skuce P J, Knox D P, et al. Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*[J]. *Parasitology*, 2002, 122: 371-378.
- [14] Delbridge M L, Kelly L E. Sequence analysis, and chromosomal localization of a gene encoding a cystatin-like protein from *Drosophila melanogaster*[J]. *FEBS Letters*, 1990, 274(1-2): 141-145.
- [15] Zhou J, Liao M, Ueda M, et al. Characterization of an intracellular cystatin homolog from the tick *Haemaphysalis longicornis*[J]. *Veterinary Parasitology*, 2009, 160: 180-183.
- [16] Agarwala K L, Kawabata S, Hirata M, et al. A cysteine protease inhibitor stored in the large granules of horseshoe crab hemocytes: purification, characterization, cDNA cloning and tissue localization[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1996, 119(1): 85-94.
- [17] Li F, Gai X, Wang L, et al. Identification and characterization of a Cystatin gene from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29: 521-529.
- [18] Glazer L, Roth Z, Weil S, et al. Proteomic analysis of the crayfish gastrolith chitinous extracellular matrix reveals putative protein complexes and a central role for GAP 65[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 128: 333-343.
- [19] Mussap M, Plebani M. Biochemistry and clinical role of human cystatin C[J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2004, 41: 467-550.
- [20] Shah A, Bano B. Cystatins in health and diseases[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2009, 15: 43-48.
- [21] Xu Y, Ding Y, Li X, et al. Cystatin C is a disease-associated protein subject to multiple regulation[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2015, 93(5): 442.
- [22] Pfaff A W, Schulz-Key H, Soboslay P T, et al. *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis[J]. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32: 171-178.
- [23] Guo Y F, Zhao W W. China Fishery Statistics Yearbook 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 34. [郭云峰, 赵文武. 中国渔业统计年鉴 2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 34.]
- [24] Jiang H, Li X, Sun Y, et al. Insights into sexual precocity of

- female oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* through transcriptome analysis[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157173.
- [25] Wu P, Qi D, Chen L Q, et al. Gene discovery from an ovary cDNA library of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* by ESTs annotation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology D: Genomics and Proteomics, 2009, 4(2): 111-120.
- [26] Zhao W H, Chen L Q, Qin J G, et al. MnHSP90 cDNA characterization and its expression during the ovary development in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38: 1399-1406.
- [27] Qian Z Y, He S L, Liu T, et al. Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 172(6): 10-30.
- [28] Bai H, Qiao H, Li F, et al. Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation[J]. Gene, 2015, 562: 22-31.
- [29] Ohkubo I, Kurachi K, Takasawa T, et al. Isolation of a human cDNA for alpha 2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen[J]. Biochemistry, 1984, 23: 5691-5697.
- [30] Waldron C, Wegrich L M, Merlo P A O, et al. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 23: 801-812.
- [31] Kouzuma Y, Inanaga H, Doi-Kawano K, et al. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor with three cystatin domains from sunflower seeds[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, 128: 161-166.
- [32] Glazer L, Roth Z, Weil S, et al. Proteomic analysis of the crayfish gastrolith chitinous extracellular matrix reveals putative protein complexes and a central role for GAP 65[J]. Journal of Proteomics, 2015, 128: 333-343.
- [33] Khaznadji E, Collins P, Dalton J P, et al. A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*[J]. International Journal for Parasitology, 2005, 35: 1115-1125.
- [34] Miyaji T, Kouzuma Y, Yaguchi J, et al. Purification of a cysteine protease inhibitor from larval hemolymph of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) and functional expression of the recombinant protein[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37: 960-968.
- [35] Nagata K, Kudo N, Abe K, et al. Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica[J]. Biochemistry, 2000, 39: 14753-14760.
- [36] Dickinson D P. Salivary (sd-type) cystatins: Over one billion years in the making—but to what purpose? [J]. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 2002, 13: 485-508.
- [37] Nandy S K, Seal A. Structural dynamics investigation of human family 1 & 2 cystatin-cathepsin L1 interaction: A comparison of binding modes[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164970.
- [38] Rinne R, Saukko P, Järvinen M, et al. Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy[J]. Annals of Medicine, 2002; 34: 380-385.
- [39] 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: 98-106.
- [40] von Schalburg K R, Rise M L, Brown G D, et al. A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary[J]. Biology of Reproduction, 2005, 72: 687-699.
- [41] Soares-Costa A, Dias A B, Dellamano M, et al. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*[J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57: 462-468.
- [42] 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.
- [43] Zhao W H, Chen L Q, Wang Z S, et al. Gene cloning of cathepsin B in *Macrobrachium nipponense* and gene expression in tissues and ovary in different development stages[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 862-869. [赵卫红, 陈立乔, 王资生, 等. 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[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 862-869.]
- [44] Yamamoto Y, Takimoto K, Izumi S, et al. Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Biochemistry, 1994, 116(6): 1330-1335.

Molecular cloning and initial function analysis of cystatin gene in *Macrobrachium nipponense*

JIANG Hongxia^{1,2,3}, LI Xilian³, HOU Fujun², LIU Yongjie², LI Fei³, ZHANG Yufei³, GUO Jianlin¹, JIA Yongyi³, GU Zhimin³, LIU Xiaolin²

1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China;
3. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China

Abstract: Cystatins (CSTs) belong to a protein superfamily the members of which reversibly bind cysteine proteases and inhibit their activity. CSTs are divided into three families: family 1 CSTs are single domain cystatins that do not contain disulfide bridges and carbohydrate side chains; family 2 CSTs possess a single cystatin domain, but their structures have at least two intramolecular disulfide bridges; and family 3 CSTs display a higher degree of structural complexity characterized by the occurrence of multiple cystatin-like domains, each with two disulfide bridges at positions homologous to those in family 2 CSTs. CSTs widely occur in various vertebrates such as mammals, birds, and fishes. CSTs have also been identified in some invertebrates. In many cellular defense systems, the CSTs plays a role in preventing the excessive hydrolysis of cellular proteins by cysteine proteases, and regulate many metabolic processes that depend on cysteine proteases. However, the study of the role of CSTs in the gonads of animals has not yet been reported. *Macrobrachium nipponense* is a member of the Palaemonidae family of decapod crustaceans and is widely farmed in China because of its flavor and high nutritive and economic values. To breed superior variety of *M. nipponense* during actual production, it is necessary to study the characteristics and functions of the gonadal development-related genes of this species. The aims of this study were to identify the sequence information and function of CSTs in the ovary of *M. nipponense*. The full-length *M. nipponense* CST (MnCST) cDNA sequence was cloned using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology; then, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the expression level of *MnCST* in different tissues and different developmental stages of the ovary; and finally, the role of *MnCST* in the ovary of *M. nipponense* was analyzed by RNA interference (RNAi) technology. The results showed that the full-length cDNA of *MnCST* was 6199 bp long, including 1183 bp at the 5'-UTR, 2304 bp at the 3'-UTR, and a 2709 bp open reading frame encoding a peptide of 903 amino acids. The putative peptide contained six cystatin-like domains and 42 phosphorylation sites. Multiple sequence comparison of crustacean CST proteins indicated that *MnCST* has the highest similarity with the corresponding protein in *Cherax quadricarinatus*, while it has the lowest similarity with the corresponding protein in *Eriocheir sinensis*. Real-time quantitative PCR detected *MnCST* mRNA in nine different tissues of *M. nipponense*, and the maximum level was detected in the intestine. Moreover, *MnCST* mRNA was also detected in six developmental stages of the *M. nipponense* ovary; the maximum level was detected in the stage IV ovary, while the minimum level was detected in the stage II ovary. The results of RNAi showed that the expression change of the *MnCST* gene was basically consistent with the expression changes of cathepsin B (*CtsB*) and cathepsin L (*CtsL*) genes in the ovary of *M. nipponense*, while there was no effect on the expression of vitellogenin (*Vg*) gene. The role of *MnCST* in the ovary of *M. nipponense* is likely to inhibit the activities of cathepsins and indirectly regulate the hydrolysis of *Vg* during ovarian development. This study provides new insights into the role of CSTs in the gonads of crustaceans.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; cystatin; gene cloning; tissue expression; RNA interference

Corresponding author: GU Zhimin, E-mail: guzhimin2006@163.com; LIU Xiaolin, E-mail: liuxiaolin@nwsuaf.edu.cn