

文章编号: 1674-5566(2013)04-0481-07

## 缢蛭丝氨酸蛋白酶基因的序列特征及其表达分析

金 凯<sup>1</sup>, 牛东红<sup>1</sup>, 王 磊<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

**摘 要:** 含有 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶是一类新的丝氨酸蛋白酶家族, 可能参与非特异性免疫防御功能。从缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) cDNA 文库中筛选出一条丝氨酸蛋白酶同源 EST 序列, 然后通过 5'RACE 扩增、测序, 拼接得到全长为 1 228 bp 的 cDNA 序列, 包括 66 bp 的 5'非翻译区和 160 bp 的 3'非翻译区, 以及 1 002 bp 的开放阅读框。阅读框共编码 333 个氨基酸, 含有 17 个氨基酸的信号肽序列, 并含有发卡结构域 (clip domain) 和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域 (Tryp\_SpC domain)。在 clip 结构域中包含 6 个半胱氨酸残基形成的 3 个二硫键, 在 Tryp\_SpC 结构域中包含 His-Asp-Ser 催化三联体 (HDS)。该缢蛭丝氨酸蛋白酶基因被命名为 *ScSP*。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析表明, *ScSP* 在缢蛭的外套膜、水管、鳃、斧足、性腺、肝胰腺 6 个组织中均有表达, 尤其在肝胰腺中表达显著高于其他组织, 其次为性腺组织, 而水管、外套膜和鳃中表达量最低。缢蛭经鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 诱导感染后 4 h 和 8 h, 肝胰腺中的 *ScSP* 基因表达量显著上调。缢蛭丝氨酸蛋白酶的序列特征与表达分析揭示了 *ScSP* 是含有 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶基因, 参与了非特异性免疫防御, 为进一步研究该基因的结构和功能奠定了基础。

**研究亮点:** 丝氨酸蛋白酶基因在双壳贝类中研究较少, 本文获得的序列具有丝氨酸蛋白酶基因所特有的 clip 夹域和胰蛋白酶样结构域, 确定为丝氨酸蛋白酶基因。该基因在肝胰腺中的表达量显著高于其他组织, 而且经鳃弧菌诱导后其表达量出现了显著上调, 可能参与缢蛭的非特异性免疫。

**关键词:** 缢蛭; 丝氨酸蛋白酶; 序列分析; 基因表达  
**中图分类号:** S 917  
**文献标志码:** A

丝氨酸蛋白酶 (serine protease) 是一类以丝氨酸为活性中心的蛋白水解酶<sup>[1]</sup>。大多数丝氨酸蛋白酶基因的 N 端含有一个发夹结构域 (clip domain), C 端是其催化活性结构域, 催化中心是 3 个保守氨基酸残基组成的催化三联体 (catalytic triad residues)<sup>[2]</sup>。与 N 端结构域相比, 丝氨酸蛋白酶 C 端结构域有很好的相似性, 在进化上承受较大的环境压力, 保持稳定的三维结构, 执行相应的催化功能<sup>[3]</sup>。此外, 丝氨酸蛋白酶可激活酚氧化酶原 (prophenoloxidase, PPO), 导致黑化反应以及激活相应蛋白生成抗菌肽等, 还可以通过精确的蛋白质与蛋白质之间的相互作用形成级联反应, 从而快速启动相应的免疫防御系统, 定

时、定量、局部地抵御病原体的感染<sup>[4-6]</sup>。

缢蛭 (*Sinonovacula constricta* Lamarck) 是我国四大养殖贝类之一, 关于缢蛭的研究在过去几年中, 主要集中在其种质资源的评价<sup>[7-10]</sup>, 而对功能基因的研究则起步不久, 我们曾对缢蛭肌动蛋白和热休克蛋白基因有所报道<sup>[11-13]</sup>。丝氨酸蛋白酶基因作为重要的免疫相关基因, 在昆虫和甲壳类动物的非特异性免疫防御机制中具有广泛研究<sup>[6, 14-17]</sup>, 但是在贝类的研究中仅在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)<sup>[18-19]</sup> 和合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)<sup>[20]</sup> 中具有相关报道。本文对缢蛭丝氨酸蛋白酶基因的序列特征, 组织表达以及细菌诱导表达进行了分析, 以期为进一步了解丝氨酸蛋白

收稿日期: 2013-04-11 修回日期: 2013-05-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A400-3); 国家自然科学基金(31101897); 上海知识服务平台项目(ZF1206)

作者简介: 金 凯(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: jackchenmike@126.com

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

酶基因的结构和功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用缢蛏于2012年5月采自浙江省宁波市宁海县。在水箱中18~20℃的充气过滤海水中养殖,实验前暂养两周。

随机挑选健康的缢蛏个体,分别取水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏和性腺组织,将每6个个体的相同组织等量混合作为一个样品,共制成3个样品组。

以每只缢蛏斧足内注射50 μL 鳃弧菌悬液者作为实验组,以注射等量PBS缓冲液者作为对照组。注射完毕后,将缢蛏放回对应的水族箱暂养。在注射后的第4、8、12、24、48和72小时,分别取对照组和实验组的缢蛏个体,将每6个个体的组织等量混合成一个样品,共制成3个对照组和3个实验组。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 缢蛏全长cDNA的扩增

从缢蛏肝胰腺cDNA文库中<sup>[21]</sup>,通过BLAST比对,选取1条与其他生物丝氨酸蛋白酶(serine protease)具有高度相似性的EST序列,以文库质粒为模板,利用通用引物M13F和M13R(表1)对其扩增并测序,得到该基因的部分cDNA序列,包括部分开放阅读框和完整的3'UTR,然后使用SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit与Advantage<sup>®</sup> 2PCR Enzyme System试剂盒进行5'-RACE末端扩增,利用Primer primer 5.0设计下游特异引物SP-F,试剂盒中的UPM为上游引物(表1)。扩增5'端的PCR反应参数:94℃ 3 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 延伸10 min,4℃ 保存。扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离检测,利用TIANGel Midi Purification Kit回收目的片段PCR产物,连入克隆载体pMD19-T,转化到感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α,所获得的目的片段送往上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。序列经比对确定属于丝氨酸蛋白酶基因后,再进行序列拼接,获得丝氨酸蛋白酶基因的cDNA全长。

#### 1.2.2 缢蛏丝氨酸蛋白酶的序列特征分析

将获得的丝氨酸蛋白酶基因的全长cDNA序

列与GenBank核酸数据库及蛋白数据库做BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)分析。应用ORF Finder程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)确定正确的开放阅读框(open reading frame, ORF)并推导其编码的氨基酸序列。用SignalP 3.0 server程序(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>)预测信号肽,在线蛋白分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白酶的结构域。

#### 1.2.3 缢蛏丝氨酸蛋白酶的相似性分析和分子进化分析

采用Cluster W2在线分析软件进行丝氨酸蛋白酶的多重比对,计算相似度。利用MEGA 4.0软件构建丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的NJ系统进化树,进行1000重复自检。

#### 1.2.4 缢蛏丝氨酸蛋白酶的組織表达

提取外套膜、水管、斧足、鳃、性腺、肝胰腺共计6个组织的RNA,总RNA的提取按TaKaRa RNAiso Plus RNA提取试剂说明书进行,利用蛋白核酸分析仪和琼脂糖凝胶电泳检测总RNA纯度和质量。选取28S和18S两条带清晰完整,且OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>在1.8~2.0之间的总RNA进行反转录,按照TaKaRa PrimeScript Reverse Transcriptase(反转录酶)以Oligo(dT)为引物合成cDNA第一链。

根据克隆获得的缢蛏丝氨酸蛋白酶序列全长设计荧光定量PCR引物,SP-F1: 5'-TCTGCCATCAGCCTACGAGACT-3'; SP-R1: 5'-TTGACACTTCCAGGACCGAGGTA-3',扩增片段长度为174 bp(表1)。内参基因18S引物18S-F: 5'-TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT-3'; 18S-R: 5'-CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA-3',扩增片段长度为220 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表1 引物序列表  
Tab.1 Sequences of Primer

引物	序列 (5' - 3')	产物长度/bp	扩增用途
M13F	GTA AAAACGACGCCAGT	1 462	质粒扩增
M13R	AAACAGCTATGACCATGTTCA		
SP-F	GGACCGAGGTAGTAGGAGCAT	368	5'末端扩增
SP-F1	TCTGCCATCAGCCTACGAGACT	174	荧光定量
SP-R1	TTGACACTTCCAGGACCGAGGTA		PCR扩增
18S-F	TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT	220	荧光定量
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA		PCR内参

实时荧光定量 PCR 根据 TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行,采用 20  $\mu$ L 反应体系,SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2  $\times$ ) 10  $\mu$ L,上下游引物 (10  $\mu$ mol /L) 各 0.5  $\mu$ L (表 1),各组织 cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。荧光定量 PCR 扩增条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;之后 55~95  $^{\circ}$ C 10 s 进行熔解曲线检测。

荧光定量数据分析采用 Relative Expression Software Tool 384 v. 1 (REST) 软件计算 Ct 值,同时转换成表达倍数差异,进行基因表达的相对定量分析。

## 2 结果

### 2.1 缙蛭丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列特征分析

从缙蛭 cDNA 文库中筛选出丝氨酸蛋白酶基因相似片段,利用 M13 通用引物对该质粒进行重

新扩增和测序,得到完整的 ORF 序列和 3' UTR,利用 5' RACE 技术扩增得到 5' UTR。该基因 cDNA 序列全长为 1 228 bp,含有 1 002 bp 开放阅读框,1 个 67 bp 的 5'-末端非翻译区,即 5'-UTR,1 个 160 bp 的 3'-末端非翻译区,即 3'-UTR (图 1)。该基因共编码 333 个氨基酸,理论等电位点为 6.72,分子量为 35.9 ku。该肽段含有 1 个糖基位点 (N60)。N 端含有 17 个氨基酸的信号肽序列,成熟肽位于 18~333 个氨基酸之间,共 316 个氨基酸。利用 SMART 分析结构域表明,该基因包含 2 个结构域,分别是位于 20~57 氨基酸之间的发卡结构域 (clip domain) 和位于 93~326 氨基酸的胰蛋白酶样结构域 (Tyrpsin\_SpC domain)。在 clip 结构域中包含 6 个半胱氨酸残基形成的 3 个二硫键。在 Tyrpsin\_SpC 结构域中,具有丝氨酸蛋白酶催化中心典型的 His-Asp-Ser 催化三联体 (HDS,图 1)。该缙蛭丝氨酸蛋白酶基因命名为 ScSP (GenBank 登录号为 JX415242)。

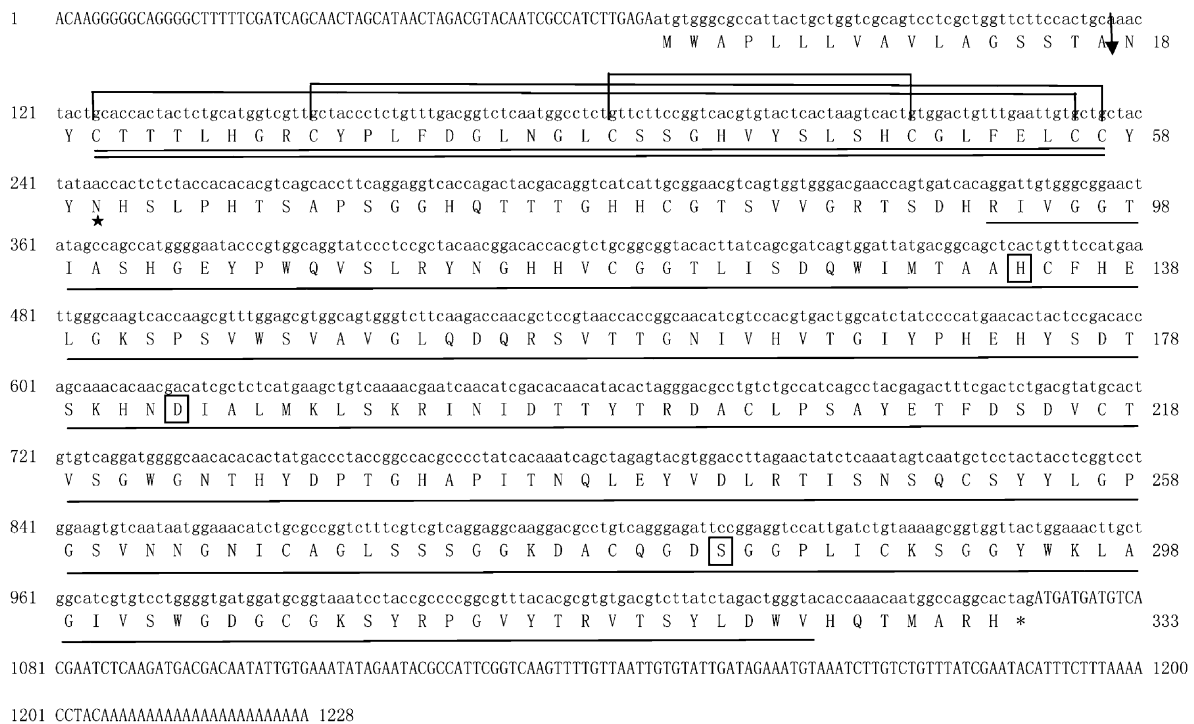


图 1 缙蛭丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列全长及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Full length of cDNA and deduced amino acid sequence of serine protease from *S. constricta*

大写字母分别表示 5' 非翻译区 (67 核苷酸) 和 3' 非翻译区 (160 核苷酸), 小写字母表示开放阅读框 (翻译 333 氨基酸)。左侧数字表示核苷酸数目, 右侧数字表示氨基酸数目。1~17 氨基酸为信号肽序列。箭头表示成熟肽剪切位点, ★表示 N 端糖基位点 (第 60 位氨基酸残基)。双下划线表示发卡结构域 (clip domain, 20~57 氨基酸), 其中环线勾画由 6 个半胱氨酸残基形成的 3 个二硫键。单下划线表示胰蛋白酶样结构域 (Tyrpsin\_SpC domain, 93~326 氨基酸), 其中方框表示了 His-Asp-Ser 催化三联体 (HDS)。

2.2 缢蛭及其他双壳贝类丝氨酸蛋白酶的相似性分析

在 NCBI 上搜索丝氨酸蛋白酶基因,选择双壳贝类的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列,包括栉孔扇贝 (Chlamys farreri) CfSP-1, CfSP-2, CfSP-3, 合浦珠母贝 (Pinctada fucata) PfSP, 三角帆蚌 (Hyriopsis cumingii) HcSP, 以及缢蛭 (S. constricta) ScSP 进行相似性分析,结果表明,缢蛭 ScSP 与 CfSP-2 (ABB89131) 相似度最高 (49%), 其次是 CfSP-1 (ABA63163) (42%) 和 PfSP (ACG60643) (41%), 与 CfSP-3 (ABB8913) (29%) 和 HcSP (ADA61200) (26%) 相似度最低。CfSP-1 和 CfSP-2 相似度为 59%, 而与 CfSP-3 的相似度低于 30% (表 2)。多重比对结果显示, ScSP, CfSP-1, CfSP-2 和 PfSP 均具有 N 端 clip 结构域和 C 端 Tyrp\_SPc 结构域, 而 CfSP-3 和 HcSP 只具有 C 端 Tyrp\_SPc 结构域 (图 2)。说明双壳贝类丝氨酸蛋白酶至少具有两种形式, 含有不同的结构域, 同时相应具备不同的生物学功能。

表 2 4 种双壳贝类的 6 条丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的相似性分析
Tab.2 Amino acid sequence similarity analysis of six serine proteases in four bivalve mollusks

Table with 7 columns: Protease Name, ScSP(333AA), CfSP-1(354AA), VCfSP-2(336AA), CfSP-3(266AA), PfSP(332AA), HcSP(287AA). Rows include ScSP, CfSP-1, CfSP-2, CfSP-3, PfSP, and HcSP with their respective similarity percentages.

注:6 条丝氨酸蛋白酶分别表示缢蛭 (Sinonovacula constricta, ScSP), 栉孔扇贝 3 条序列 (Chlamys farreri, CfSP-1, CfSP-2, CfSP-3), 合浦珠母贝 (Pinctada fucata, PfSP), 三角帆蚌 (Hyriopsis cumingii, HcSP)。

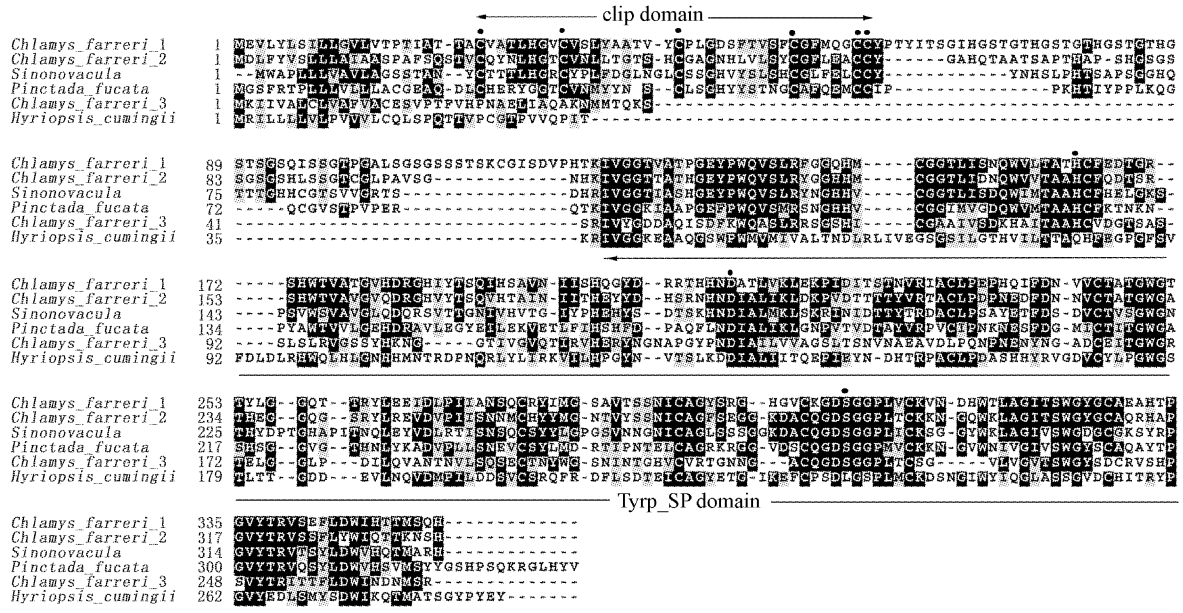


图 2 双壳贝类丝氨酸蛋白酶的多重比对分析

Fig.2 Alignment analysis of serine protease of the bivalve mollusks

箭头分别表示出了 clip 结构域和 Tyrp\_SP 结构域;圆点标明了 clip 结构域中的 6 个半胱氨酸残基和 Tyrp\_SP 结构域中 HDS 催化三联体;黑色背景代表的是保守序列;灰色背景代表的是高度保守序列。

2.3 丝氨酸蛋白酶基因的系统进化分析

在 NCBI 上搜索丝氨酸蛋白酶基因,选择栉孔扇贝 (C. farreri), 合浦珠母贝 (P. fucata), 三角帆蚌 (H. cumingii), 斑节对虾 (Penaeus

monodon), 人 (Homo sapiens), 鼠 (Mus musculus), 蟾蜍 (Xenopus tropicalis), 鸡 (Gallus gallus), 斑马鱼 (Danio rerio), 虹鳟 (Salmo salar) 以及缢蛭 (S. constricta) 的氨基酸序列构建系统进化树。应用

MEGA 4.0 软件将氨基酸序列转化为遗传距离,对 11 物种共计 14 条氨基酸序列采用 NJ 法进行聚类分析。结果显示,缢蛏首先与栉孔扇贝丝氨酸蛋白酶 1 和 2 聚类,然后与合浦珠母贝聚类,再次与栉孔扇贝丝氨酸蛋白酶 3 和三角帆蚌聚类,之后与虾聚类,最后与高等动物聚类,基本符合物种的传统分类进化关系(图 3)。

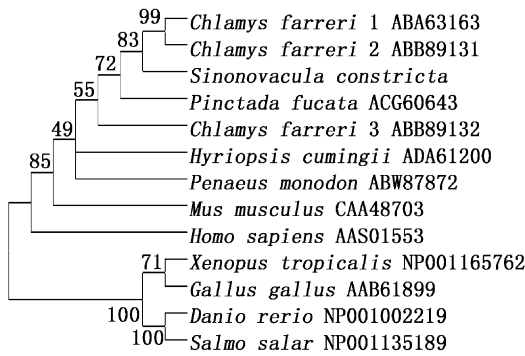


图 3 丝氨酸蛋白酶的 NJ 系统进化树  
Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of serine protease from 11 species

#### 2.4 缢蛏丝氨酸蛋白酶基因的组织表达分析

通过实时荧光定量 PCR 检测缢蛏丝氨酸蛋白酶在 6 个组织中的相对表达量,内参基因为 18S rRNA,其中丝氨酸蛋白酶基因在水管中的表达设定为 1,其他 5 个组织的表达量分别是相对水管组织的表达量。结果表明丝氨酸蛋白酶在缢蛏的鳃、斧足、外套膜、水管、性腺、肝胰腺中均有表达,其中在肝胰腺中的表达特别高,其次是性腺,而在水管,水管和鳃中的表达很低(图 4)。

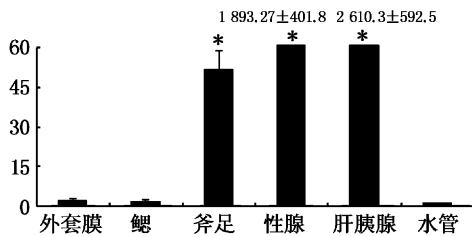


图 4 缢蛏丝氨酸蛋白酶的组织表达分析  
Fig. 4 Tissue expression of Serine protease as determined in six healthy tissues of *S. constricta*

#### 2.5 缢蛏丝氨酸蛋白酶基因在细菌诱导后的表达分析

为了进一步研究丝氨酸蛋白酶的功能,本研究设置了鳃弧菌诱导实验,分别在缢蛏感染后 4, 8, 12, 24, 48 和 72 h 采集对照组和实验组样本,通过实时荧光定量 PCR 检测缢蛏在鳃弧菌诱导后,

丝氨酸蛋白酶基因在肝胰腺组织中的表达情况。结果表明,经鳃弧菌诱导 4 h 和 8 h 后,ScSP 表达出现了显著上调,诱导组分别是对照组的 4.88 倍和 4.60 倍(图 5)。

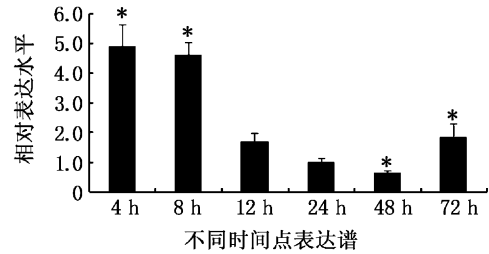


图 5 细菌诱导后丝氨酸蛋白酶在肝胰腺中的相对表达水平  
Fig. 5 Serine protease expression in liver following bacterium induction at different time

### 3 讨论

丝氨酸蛋白酶基因在昆虫和甲壳类动物中具有广泛的研究报道,阐述了该基因可能参与了非特异性免疫防御。然而,贝类丝氨酸蛋白酶的相关研究甚少,其在贝类的非特异性免疫功能的研究仍不是很清楚。为了进一步了解该基因的特性,本文克隆并分析了缢蛏丝氨酸蛋白酶基因的序列特征和基因表达。

具有非特异性免疫功能的丝氨酸蛋白酶具备 2 个结构域,即发卡结构域 (clip domain) 和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域 (Tryp\_SPC domain),并且二者由一段连接序列连接起来<sup>[2]</sup>。在本研究中,克隆的缢蛏丝氨酸蛋白酶同源序列,全长为 1 228 bp,编码 333 个氨基酸,含有 17 个氨基酸的信号肽序列。该序列同样含有 clip 和 Tryp\_SPC 结构域。一般认为,clip 结构域含有 37~55 个氨基酸,其中有 6 个半胱氨酸残基可形成 3 个二硫键,本文中该结构域含有 38 个氨基酸,同样包含 3 个二硫键。在 Tryp\_SPC 结构域包含 His-Asp-Ser 催化三联体 (HDS),为保守的催化中心,并且含有 8 个半胱氨酸残基,可形成 4 个二硫键,从而可以形成更加紧密的结构。这些均为丝氨酸蛋白酶基因的典型结构,同时与已研究的贝类丝氨酸蛋白酶结构具有显著的相似性<sup>[18-20]</sup>。多重比对和系统进化分析显示缢蛏与栉孔扇贝 CfSP1 和 CfSP2 以及合浦珠母贝 PfSP 相似度高于 40%,而且首先聚类,但是缢蛏与栉孔扇贝 CfSP3 以及三角帆蚌 HcSP 的氨基酸相似

度低于 30%,且亲缘关系较远。通过氨基酸结构分析发现前者同时具备 clip 和 Tryp\_SPc 结构域,而后者只具备 Tryp\_SPc 结构域,因此确认本研究中该序列为含有 clip 结构域的缢蛭丝氨酸蛋白酶基因(ScSP)。

在已研究的报道中发现,丝氨酸蛋白酶基因具有组织特异性表达,而且在不同的物种中表达模式也有所不同。在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中,通过实时荧光定量 PCR 检测,表明丝氨酸蛋白酶 EscSP 在所检测组织中均有表达,其中肌肉表达量最高,其次为鳃,性腺和肝胰腺,心脏和血淋巴中表达量最低,推测该基因在调节肌肉活动中可能具有新的生物学功能<sup>[20]</sup>。而在其他虾蟹中(*Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei*, *Scylla serrata*),该基因在血淋巴中为高表达<sup>[14-16]</sup>。在合浦珠母贝(*P. fucata*)中,通过半定量 PCR 检测到丝氨酸蛋白酶基因在血淋巴,性腺和外套膜中表达,而在闭壳肌和鳃中不表达<sup>[20]</sup>。在栉孔扇贝(*C. farreri*)中,通过 Northern 杂交检测到丝氨酸蛋白酶 CfSP1 在血淋巴,外套膜和消化腺中表达,而在性腺,肠,鳃,闭壳肌中不表达<sup>[18]</sup>;丝氨酸蛋白酶 CfSP2 在血淋巴中高表达<sup>[19]</sup>。在血淋巴中的高表达可能与宿主的免疫防御有关<sup>[20]</sup>。本研究中,通过 Real-time PCR 检测发现,缢蛭 ScSP 在检测的组织中均有表达,其中在肝胰腺中表达量最高,而在外套膜,鳃和水管中表达量最低。肝胰腺组织中的高表达可能与其是重要的分泌器官有关。总之,这些研究结果进一步证实该基因的表达具有组织特异性和物种特异性,参与着多种生物学功能。

Clip 结构域被认为是酚氧化酶系统丝氨酸蛋白酶的典型结构域,并通过该系统执行功能,在非特异性免疫防御过程中具有重要作用<sup>[22]</sup>。在本研究中,对缢蛭进行了鳃弧菌诱导实验,结果表明,在感染鳃弧菌 4 h 和 8 h,丝氨酸蛋白酶基因表达量就上调了 4 倍多,这一研究结果与其他物种丝氨酸蛋白酶的诱导表达类似。例如,合浦珠母贝(*P. fucata*)经脂多糖(LPS)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)刺激后 12 h,丝氨酸蛋白酶基因出现了上调,表达量为对照组的 2 倍左右<sup>[20]</sup>。栉孔扇贝(*C. farreri*)丝氨酸蛋白酶在感染细菌后,其表达量同样出现了显著上调<sup>[18-19]</sup>。此外,含有 clip 结构域的甲壳类动物丝氨酸蛋白

酶基因在细菌诱导后,其表达量也出现了上调<sup>[14-16, 20]</sup>。这种表达模式类似于酚氧化酶系统,暗示出丝氨酸蛋白酶基因在抵御外源入侵过程中作为该系统的重要成员之一<sup>[6]</sup>,在细菌感染后表达量的迅速上调可能是这种系统的调节机制之一。

本研究丝氨酸蛋白酶是含有 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶,具有物种和组织表达特异性,并在细菌感染后表达量显著上调表明可能参与了贝类的非特异性免疫防御。这一研究结果为进一步研究该基因的结构与功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 汪世华,王文勇,黄益洲,等. 丝氨酸蛋白酶研究进展[J]. 福建农业学报, 2008, 22(4):453-456.
- [2] JIANG H, KANOST M R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30(2): 95-105.
- [3] 季星来,孙之荣. 基于结构的丝氨酸蛋白酶超家族进化分析[J]. 电子学报, 2001, 29(12A): 1756-1758.
- [4] JIANG H, WANG Y, KANOST M R. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(21):12-20.
- [5] 高坤,邓祥元,郭锡杰. 免疫系统中丝氨酸蛋白酶的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(11):1003-1007.
- [6] GAI Y, QIU L, WANG L, et al. A clip domain serine protease (cSP) from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA characterization and mRNA expression [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(6): 670-677.
- [7] NIU D H, FENG B B, LIU D B, et al. Significant genetic differentiation among ten populations of the razor clam *Sinonovacula constricta* along the coast of china revealed by a microsatellite analysis [J]. *Zoological Studies*, 2012, 51(3): 406-414.
- [8] 牛东红,冯冰冰,刘达博,等. 浙闽沿海缢蛭群体遗传结构的微卫星和线粒体 CO I 序列分析[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1806-1814.
- [9] 刘达博,牛东红,冯冰冰,等. 乐清湾和三沙湾缢蛭群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 350-357.
- [10] 牛东红,李家乐,沈和定,等. 缢蛭六群体线粒体 DNA-CO I 基因序列变异及群体遗传结构分析[J]. 海洋学报, 2008, 30(3):109-116.
- [11] 冯冰冰,牛东红,钟玉民,等. 缢蛭 ScHsc70 cDNA 的分子特性和表达分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1):1-12.
- [12] LI C H, LI H, SU X, et al. Identification and characterization of a clam ferritin from *Sinonovacula constricta* [J]. *Fish &*

- Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 1147 - 1151.
- [13] 冯冰冰, 钟玉民, 牛东红, 等. 缢蛏  $\beta$ -ACTIN1 基因分子特性及其表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 650 - 659.
- [14] JIMÉNEZ-VEGA F, VARGAS-ALBORES F, SÖDERHÄLL K. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(2): 101 - 108.
- [15] LIN C Y, HU K Y, HO S H, et al. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(12): 1132 - 1144.
- [16] VASEEHARAN B, LIN Y C, KO C F, et al. Cloning and characterisation of a serine proteinase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(1): 20 - 31.
- [17] GORMAN M J, PASKEWITZ S M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31(3): 257 - 262.
- [18] ZHU L, SONG L, ZHAO J, et al. Molecular cloning, characterization and expression of a serine protease with clip-domain homologue from scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(5): 556 - 566.
- [19] ZHU L, SONG L, MAO Y, et al. A novel serine protease with clip domain from scallop *Chlamys farreri* [J]. Molecular Biology Reports, 2008, 35(2): 257 - 264.
- [20] ZHANG D, JIANG S, MA J, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a clip-domain serine protease from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(4): 662 - 668.
- [21] FENG B, DONG L, NIU D, et al. Identification of immune genes of the Agamaki clam (*Sinonovacula constricta*) by sequencing and bioinformatic analysis of ESTs [J]. Marine Biotechnology, 2010, 12(3): 282 - 291.
- [22] AMPARYUP P, JITVAROPAS R, PULSOOK N, et al. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(5): 535 - 546.

## Molecular characteristics and expression analysis of serine protease from *Sinonovacula constricta*

JIN Kai<sup>1</sup>, NIU Dong-hong<sup>1</sup>, WANG Lie<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Aquaculture Division E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The serine protease with clip domain is a new serine protease family and plays an important role in innate immunity. One EST sequence with high homology with serine protease gene of other species was found from the cDNA library of *Sinonovacula constricta* and then the complete ORF and 3' UTR sequence were obtained by PCR. The 5' UTR sequence was got by 5' RACE. The cDNA of this gene was 1 228 bp, which consists of a 66 bp 5' untranslated region (UTR), a 1 002 bp open reading frame (ORF) and a 160 bp 3' UTR. The translated protein is composed of 333 amino acids containing a signal peptide. Sequence analysis of the protein revealed that the protein contained a clip domain and a Tryp\_SPc domain. The three disulfide bonds were formed by six conserved cysteines in the clip domain and the catalytic triad (HDS) was contained in the Tryp\_SPc domain. This gene was designated as *ScSP*. The quantitative reverse transcriptase (qRT-PCR) analyses showed that the *ScSP* can be expressed in six tissues. The expression level of *ScSP* gene was highest in liver, then in gonad, but lowest in water pipe, mantle and gill. The expression of *ScSP* gene in liver tissue was up-regulated at 4h and 8h following the challenge with *Vibrio anguillarum*. These results indicated that *ScSP* is a new serine protease with clip domain and might be involved in innate immunity, which contributes to understanding the structure and function of serine protease in the future.

**Key words:** *Sinonovacula constricta*; serine protease; sequence analysis; gene expression