

紫外线诱导海参体壁基因表达的研究

杨洋, 孙进健, 朱祉默, 李双月, 吴海涛

(大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034)

摘要: 本论文对紫外线 (58 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 30 min) 诱导的海参体壁自溶进行了基因表达的研究。采用 TRIzol 法提取海参体壁中的总 RNA, 以细胞色素 B (CytB) 为内标, 采用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 对组织蛋白酶 C (CC)、纤维蛋白原 A (FGL)、衰老相关蛋白 (SAP) 和主要卵黄蛋白 2 (MYP2)、组织蛋白酶 L (CL)、钙网蛋白 (Calreticulin)、基质金属蛋白酶 14 (MMP14)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 等 29 种分子进行基因扩增。结果显示, 紫外线照射 30 min 后, 海参体壁组织蛋白酶 C、纤维蛋白原 A、衰老相关蛋白和主要卵黄蛋白 2 的基因表达水平显著上调 ($p < 0.05$), 上调水平分别较对照组提高了 $71.4 \pm 44.8\%$ 、 $27.1 \pm 18.4\%$ 、 $43.7 \pm 21.6\%$ 和 $165.5 \pm 122.7\%$, 而组织蛋白酶 L、钙网蛋白、基质金属蛋白酶 14、乙酰胆碱酯酶等基因表达没有显著变化。这些结果表明组织蛋白酶 C、纤维蛋白原 A、衰老相关蛋白和主要卵黄蛋白 2 可能参与海参体壁的自溶过程。

关键词: 海参; 体壁; 自溶; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2015)1-48-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.010

UV-Induced Gene Expressions in Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*)

Body Wall

YANG Yang, SUN Jin-jian, ZHU Zhi-mo, LI Shuang-yue, WU Hai-tao

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China)

Abstract: In this study, gene expressions for UV-induced (58 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 30 min) body wall autolysis of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) were investigated. Total RNA was extracted using the TRIzol method from sea cucumber body wall. Twenty-nine genes, including cathepsin C (CC), fibrinogen-like protein A (FGL), senescence-associated protein (SAP), major yolk protein 2 (MYP2), cathepsin L (CL), calreticulin, matrix metalloproteinases 14 (MMP14), and acetylcholinesterase (AChE), were amplified using reverse transcription-polymerase chain reaction with cytochrome B (CytB) as an internal control. The results indicated that the gene expressions of CC, FGL, SAP, and MYP2 were significantly enhanced by $71.4 \pm 44.8\%$, $27.1 \pm 18.4\%$, $43.7 \pm 21.6\%$, and $165.5 \pm 122.7\%$, respectively, after UV irradiation for 30 min ($p < 0.05$). However, the gene expressions of CL, calreticulin, MMP14, and AChE did not change significantly. These results suggest that CC, FGL, SAP, and MYP 2 may be involved in the autolysis of sea cucumber body wall.

Key words: sea cucumber (*Stichopus japonicus*); body wall; autolysis; gene expression

海参属棘皮动物门 (*Echinodermata*)、海参纲 (*Holothuroidea*), 是重要的海洋无脊椎动物^[1]。海参具有极强的自溶能力, 这种独特的生理现象给海参的加工、贮藏和运输带来了极大的不便。目前, 我国海参年产量已超过 17 万 t, 对海参自溶过程进行深入研究, 将为丰富海参自溶机理奠定研究基础。

收稿日期: 2014-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370037, 31000754); 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (L2013217)

作者简介: 杨洋 (1989), 女, 硕士研究生, 研究方向水产品加工理论与技术

通讯作者: 吴海涛 (1980), 女, 博士, 副教授, 研究方向水产品加工理论与技术

海参对紫外线照射非常敏感, 前期研究结果表明, 经紫外线照射后, 海参体壁部位的组织形态和细胞形态均发生明显的变化, 表皮层内侧的结缔组织层变得疏松, 出现许多空洞; 表皮部位细胞出现细胞核浓缩、染色质聚集化、边缘化; 细胞超微结构出现变化, 自吞噬囊泡明显增多, 说明海参自溶过程中发生了组织降解^[2]。因此, 研究人员从海参中分离、纯化并鉴定出多种内源酶, 包括组织蛋白酶 L^[3]、组织蛋白酶 B^[4]、乙酰胆碱酯酶^[5]、碱性磷酸酶^[6]等。此外, 针对海参体壁自溶过程中蛋白质降解途径, 证明了半胱氨酸蛋白酶参与非胶原蛋白的降解过程^[7]。这些研究为深入探讨海参自溶机理奠定了基础。

近年来, 分子生物学方法越来越多的应用于食品

科学领域。关于海参基因表达的研究多集中在海参的再生^[8]及免疫^[9]方面。Zhang等^[10]考察了热应激前后海参相关基因的变化,发现基因ATP合成酶和主要卵黄蛋白与海参与热应激密切相关。然而,紫外线诱导海参自溶过程中,关键分子的基因表达情况目前尚未见报道。

本研究以鲜活海参为原料,采用紫外线照射诱导海参自溶,对新鲜和经诱导自溶后海参体壁中的总RNA进行提取,采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)对各基因进行扩增,分析29种分子(见表1)的基因相对表达量,以考察海参体壁中基因在自溶前后的变化,为从基因表达水平上揭示海参自溶机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料及主要试剂

海参来自大连王家岛海域,由大连乾日海洋食品有限公司提供。在已构建的仿刺参cDNA文库的基础上,结合现有海参再生及免疫相关分子的mRNA序列,设计62种分子的引物,通过验证有29种分子引物有效(见表1)。TRIzol购自Life technologies, Rnase-free water、Oligo d(T) 15 Primers、5×M-MLV buffer、2.5 mM dNTP、0.1M DTT、RNase-out、Rnase M-MLV(Rnase H-)、10×ExTaq Buffer、Ex Taq、DL1000 DNA Maker、6×loading buffer购自宝生物工程(大连)有限公司, GelRed购自上海开放生物科技有限公司,其他试剂均为生化试剂或分析纯。

1.2 主要仪器设备

Micro 17R 台式冷冻离心机, Thermo Scientific 公司; Infinite 200 NANO 酶标定量测定仪, TECAN 公司; Mupid-2plus 平行电泳仪, 日本 Advance 公司; MF-ChemiBIS 2.0 凝胶成像仪, DNR Bio-imaging 公司; TOMY MICRO-ONE 掌上离心机, TOMY 公司; TS.B-108 往复式脱色摇床, QILINBEIER 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料处理

挑选大小相当的鲜活海参,每三只为一组,置于强度为 58 μW/cm² 紫外线下照射 30 min 后,去肠,液氮处理,置于-80 °C 冰箱保存。对照组避光放置 30 min,去肠,液氮处理,置于-80 °C 冰箱保存。

1.3.2 总 RNA 的提取

采用 TRIzol 法提取海参体壁总 RNA,按照说明书的要求操作,其中在沉降 RNA 步骤中,用高盐溶液(1.2 M NaCl~0.8 M 柠檬酸钠溶液)替换 1/2 的异丙醇,以提高 RNA 的沉降率。

1.3.3 反转录

以 1 μg 总 RNA 为模板,加入 2 μL Oligo d(T),加无菌水使总体积为 11 μL。65 °C 变性 15 min, 4 °C 冰浴 1 min, 12 °C 终止反应。迅速加入 6 μL 5×M-MLV buffer, 10 μL 2.5 mM dNTP, 2 μL 0.1M DTT, 0.5 μL RNase-out, 1 μL Rnase M-MLV(Rnase H-),共 30.5 μL 体系。反应条件为 42 °C 60 min, 70 °C 10 min, 4 °C 1min, 12 °C 终止反应。终产物 cDNA-20 °C 储存备用。

1.3.4 聚合酶链反应(PCR)

PCR 反应体系为 25 μL,含有 10×ExTaq Buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, Ex Taq 0.125 μL, 灭菌水 19.375 μL, cDNA 0.5 μL, 上游引物和下游引物(见表1)各 0.25 μL。反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环,再 72 °C 补延伸 10 min, 4 °C 终止反应。PCR 产物-20 °C 储存。

1.3.5 电泳检测

取 5 μL PCR 产物,混合 1 μL 6×Loading Buffer 进行电泳检测。采用 3% 琼脂糖凝胶进行电泳, GelRed 染色后,进行成像。根据杨爱馥等^[11]对海参不同发育阶段、不同组织及刺激条件下细胞色素 B (CytB) 和肌动蛋白 (Actin) 的基因表达的变化情况研究,选择 CytB 作为本研究的内参基因,利用 Image J 进行灰度分析,相对表达量以待测基因的灰度除以 CytB 的灰度计算。

1.3.6 统计分析

试验数据以平均值 ± 标准差表示。采用 http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_bulk_form.html 在线软件进行 student's t 检验, p<0.05 具有显著性差异。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequences

序号	引物名称	引物缩写	序列	大小/bp
1	组织蛋白酶 L	CL-F	5'- CCGCATTGTTTCTGATCTTTG-3'	178
	(Cathpsin L)	CL-R	5'- AATATGGCGACTTGACTACCG-3'	

转下页

接上页

2	层连交联蛋白 (Laminin binding protein)	LBP-F LBP-R	5'-CTCTACTTCTATC GTGACCCACAGG-3' 5'-GGGACGGCAGTTGGTACTAATC-3'	212
3	微管蛋白 (β -tubulin)	β -tubulin -F β -tubulin -R	5'-AGAAAGCCTTACGACGGAACATAG-3' 5'-GACCGCTGTTTGTGACATCCC-3'	134
4	伴侣蛋白 (Chaperonin containing TCP1, subunit 4)	CCT4-F CCT4-R	5'-GGATGACTGAAATCCTTGTCG-3' 5'-AATGGCAGAGATCGCTGTAGA-3'	159
5	细胞色素 C (Cytochrome C)	CytC-F CytC-R	5'-TAGACGACTCTGGCAAGCACA-3' 5'-ATCTTGTTCCAGGGATGTAG-3'	181
6	组蛋白 HH2 (Histone H2)	HH2-F HH2-R	5'-CCAGTTTCCAGTGGGTGAT-3' 5'-GCCAACTCAAGAACCTCAGCA-3'	132
7	钙网蛋白 (Calreticulin)	Calreticulin -F Calreticulin -R	5'-GAGAATGGAAACCCAAACAAA-3' 5'-GCCATAGGTGCAATCCAATAA-3'	141
8	促血管新生蛋白因子(Angiopoietin-like 7)	AL7-F AL7-R	5'-ATTCCCTTCTTTCCATCGCTAC-3' 5'-TCCTTGGGCGTACCTTCATC-3'	247
9	室管膜蛋白相关前体 (Ependy min-related protein precursor)	ERPP-F ERPP-R	5'-AGTTCACCCCTTTTTGAAG-3' 5'-CGGAACTGGAATTTGATCCT-3'	102
10	MGC81823 蛋白异形体 (MGC81823 protein isoform)	MGC-F MGC-R	5'-GAGGTCTTGACACCGAGGATT-3' 5'-TGAGTCATCGTAAACACCGCTA-3'	224
11	ELAV 蛋白 (ELAV-like protein)	ELAVP-F ELAVP-R	5'-GCACCGTGGAAAGATTGGA-3' 5'-ATGATGGGCAGCGAGTTG-3'	187
12	胶原蛋白 α 1 (Collagen α 1)	Collagen α 1-F Collagen α 1-R	5'-CTCTGCTACTTGGTGCTA-3' 5'-GATGATATGATTGGTGGG-3'	118
13	基质金属蛋白酶 14 (Matrix metalloproteinases 14)	MMP-14F MMP-14R	5'-TGACAGCGACAGCACAGA-3' 5'-GACATCCCAACCATTCT-3'	206
14	乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase)	AChE-F AChE-R	5'-ATAACTGGGATAATCGTCA-3' 5'-ACACCTTTAGTGGTAGCG-3'	338
15	粘结蛋白聚糖 (Syndecan)	SYN-F SYN-R	5'-ACAACAATATCAACCCATAC-3' 5'-AACTACCTCGTCCTTCT-3'	210
16	短缩素核心蛋白 (Brevican coer protein)	SYN-F SYN-R	5'-AACTGGGATAAATGGTGAG-3' 5'-GTAAGCCTACAACGTCTGT-3'	215
17	纤连蛋白 (Fibropellin-1)	Fib-F Fib-R	5'-ACAATCAAAGAGGGTCA-3' 5'-CATAAAGTCGTCAGGGTG-3'	253
18	主要卵黄蛋白 1 (Major yolk protein 1)	MYP1 -F MYP1 -R	5'-CATGTTAAGGAAACCGACCCTAAC-3' 5'-ACGAGACCAAGTGGAGTGACAATA -3'	596
19	肌动蛋白 (Actin)	Actin1-F Actin1-R	5'-AGGGAAAAGATGACACAGATCATG-3' 5'-AGGGAGTTCATAGCTCTTCTCCAAT-3'	414
20	癌蛋白 (Oncoprotein)	OP-F OP-R	5'-GAAGCCTCCACTTAGCAC-3' 5'-TTCAACGGGTCTGTCTCA-3'	375
21	含 TCP 的伴侣蛋白亚基 (Chaperonin containing TCP 1)	Chap-F Chap-R	5'-GGTGGTCACAGAACTCAG-3' 5'-AAGACTACAGGCAGGAAA-3'	440
22	Krueppel 样因子 (Krueppel like factor)	KLF-F KLF-R	5'-ATTCTGGTAGCGAGGGTG-3' 5'-ATGGTGAGTGAGCGAAGC-3'	129

转下页

接上页

23	层粘连蛋白亚基 $\alpha 2$	LS2-F	5'-AACCCAGCCTCTAATGAA-3'	175
	(Laminin subunit alpha -2)	LS2-R	5'-CGACATCTCCGACAAATC-3'	
24	层粘连蛋白亚基 $\alpha 4$	LS4-F	5'-CCTCCCTCTATTTGTCTGG-3'	432
	(Laminin subunit alpha -4)	LS4-R	5'-CAACCCTAAAGGTAGCATCT-3'	
25	组织蛋白酶 C	CC-F	5'-GATCTCATGAAAGTACAACCTGGTC-3'	157
	(Cathepsin C)	CC-R	5'-TGCGTGATTGGTCAACTGGAA-3'	
26	纤维蛋白原 A	FGL-F	5'-CCTACCTCACCGCTCAGAAGA-3'	105
	(Fibrinogen-like protein A)	FGL-R	5'-CCGAGTCACCAACACGAAAGT-3'	
27	衰老相关蛋白 (Senescence-associated protein)	SAP-F	5'-TAACCTGTCTCAGACGGTCTAAAC-3'	165
		SAP-R	5'-CAGGGATAACTGGCTTGTGGC-3'	
28	主要卵黄蛋白 2	MYP2-F	5'-CGTATTGGATCAGTCTTTGAATCG-3'	450
	(Major yolk protein 2)	MYP2-R	5'-TTCCTGAATTCTCTTTCCTGTC-3'	
29	细胞色素 B	CytB-F	5'-TGAGCCGCAACAGTAATC-3'	139
	(Cytochrome B)	CytB-R	5'-AAGGGAAAAGGAAGTGAAAG-3'	

2 结果与讨论

2.1 经紫外线照射后海参体壁中表达量显著变化的基因

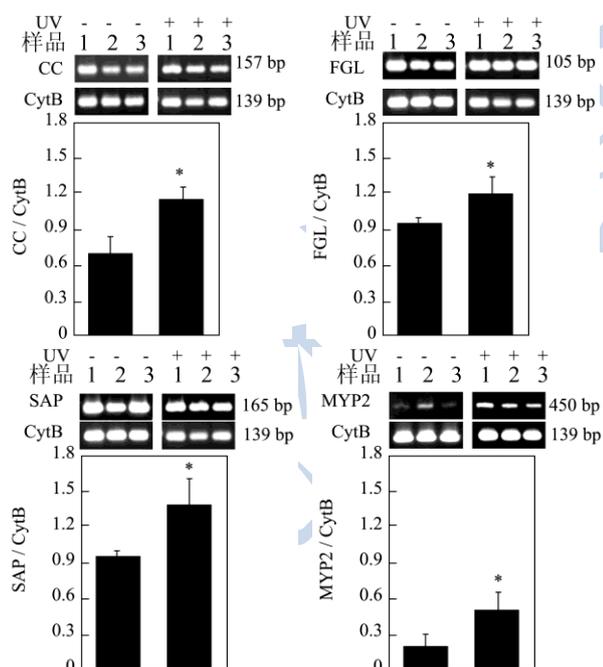


图1 海参体壁紫外线照射前后 CC、FGL、SAP 和 MYP2 四种基因表达分析

Fig.1 Gene expression analysis of CC, FGL, SAP, and MYP2 in the body wall of sea cucumber before and after UV irradiation

注: * $p < 0.05$, 与对照组相比具有显著差异。

通过对比紫外线照射前后海参体壁 29 种基因表达情况, 发现四种分子-组织蛋白酶 C (CC)、纤维蛋

白原 A (FGL)、衰老相关蛋白 (SAP) 和主要卵黄蛋白 2 (MYP2) 的基因表达量发生了显著变化 (见图 1)。与对照组相比, 表达量分别提高了 $71.4 \pm 44.8\%$ 、 $27.1 \pm 18.4\%$ 、 $43.7 \pm 21.6\%$ 和 $165.5 \pm 122.7\%$ 。组织蛋白酶 C 可以降解多种蛋白, 其功能与多种特定的免疫、炎症细胞密切相关, 并可能参与细胞的增殖分化过程^[9], 紫外线照射 30 min 诱导海参自溶后, 由 CC 基因表达量的增加可见, CC 基因很可能参与海参的自溶。另外, 细胞衰老是一个主动的、受细胞内部遗传程序控制的程序性死亡过程^[10], SAP 和 FGL 基因表达的显著增强也可以被认为是海参经紫外线照射 30min 后, 衰老速度加快, 并促使海参合成更多的纤维蛋白原的 mRNA。但在细胞凋亡的过程中起到重要作用的细胞色素 C 即 CytC 在紫外线照射 30 min 前后并没有明显的变化 (见图 2), 这可能是由于本研究中所选择的紫外线照射强度为日光照射强度的 2 倍左右, 照射时间短暂, 并未引起海参细胞发生凋亡。主要卵黄蛋白 (MYP) 是海参体壁非胶原蛋白中的主要组成成分, 在海参体壁自溶过程中, MYP 也随之逐渐降解^[7]。在本研究中, 发现海参体壁在紫外线照射 30 min 后 MYP2 基因表达量明显增加, 这可能是因为机体为维持 MYP 平衡而合成更多的 MYP。海参体壁非胶原蛋白中另一种重要的组成成分肌动蛋白 (Actin) 的基因可以在海参体壁中稳定表达, 在紫外线照射前后并没有发生显著的变化 (图 3)。

2.2 经紫外线照射后海参体壁中其他基因的表达情况

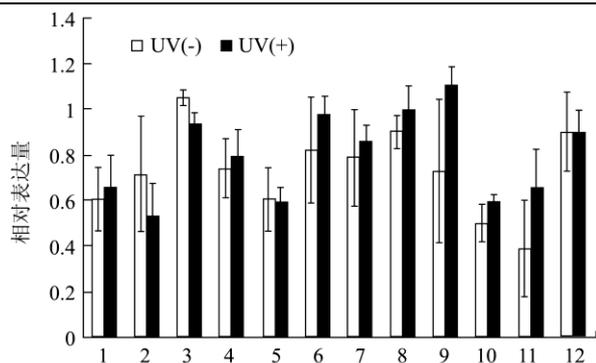


图2 紫外线照射前后海参体壁部分基因的表达 1

Fig.2 Gene expressions in the body wall of sea cucumber before and after UV irradiation 1

注: 1: CL; 2: LBP; 3: β -tubulin; 4: CCT4; 5: CytC; 6: HH2;

7: Calreticulin; 8: AL7; 9: ERPP; 10: MGC; 11: ELAVP; 12:

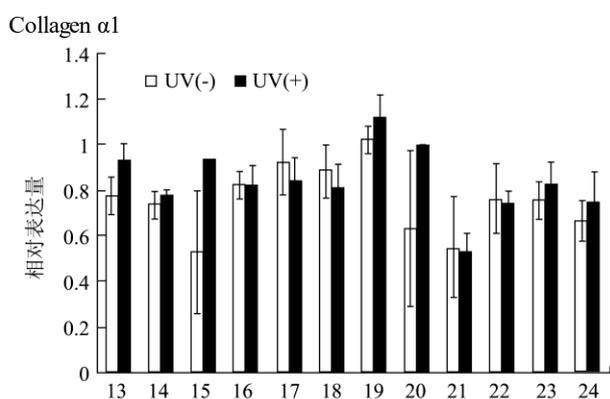


图3 紫外线照射后海参体壁部分基因的表达 2

Fig.3 Gene expressions in the body wall of sea cucumber before and after UV irradiation 2

注: 13: MMP-14; 14: AChE; 15: SYN; 16: BCP; 17: Fib;

18: MYP1; 19: Actin; 20: OP; 21: Chap; 22: KLF; 23: LS2;

24: LS4.

经电泳检测和灰度计算,除上述四种基因外,其他基因能够在海参体壁中得到表达,表达量各异,且在本研究中所采用的紫外线诱导条件下未发生显著的变化,如组织蛋白酶L(CL)、钙网蛋白(Calreticulin)、基质金属蛋白酶14(MMP14)、乙酰胆碱酯酶(AchE)等。组织蛋白酶L作为生物体中重要的肽链内切酶,属于木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白水解酶,在水产品的自溶过程中发挥重要作用^[12],组织蛋白酶L不仅可以参与生物体内各种蛋白水解,还与许多重要的生命活动密切相关,如抗原呈递、肿瘤入侵和转移、骨质吸收、细胞凋亡等。钙网蛋白是一种一级结构高度保守的、主要存在于内质网内的分子伴侣和钙离子结合蛋白,主要发挥协助蛋白质正确折叠、调节细胞内钙离子稳态等重要作用,电压依赖性钙离子通道是细胞膜上控制Ca²⁺进入胞内的特殊蛋白质,电压依赖

性钙离子通道 β 亚基具有调节其通道活性的作用,控制着离子的转运与细胞的功能^[13]。基质金属蛋白酶是在动物体内普遍存在的钙依赖性肽链内切酶,主要参与组织的重构和细胞外基质的降解^[14]。乙酰胆碱酯酶在生物体内起神经传导作用,其生物活性是监测水生动物环境照射量最普遍的一种标记物,有研究表明,经紫外照射后,海参肠乙酰胆碱酯酶基因表达有所下调^[5]。

3 结论

3.1 海参体壁经58 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 紫外线照射30 min后,组织蛋白酶C、衰老相关蛋白、纤维蛋白原A和主要卵黄蛋白2这四种基因表达量显著增加($p < 0.05$),分别提高了71.4 \pm 44.8%、27.1 \pm 18.4%、43.7 \pm 21.6%和165.5 \pm 22.7%。这些结果说明组织蛋白酶C、纤维蛋白原A、衰老相关蛋白和主要卵黄蛋白2可能参与紫外线诱导的海参体壁自溶。

3.2 在上述紫外线照射条件下,海参体壁组织蛋白酶L(CL)、层连交联蛋白(LBP)、微管蛋白(β -tubulin)、伴侣蛋白(CCT4)、细胞色素C(CytC)、组蛋白HH2(HH)、钙网蛋白(Calreticulin)、促血管新生蛋白因子(AL7)、室管膜蛋白相关前体(ERPP)、MGC81823(MGC)、ELAV蛋白(ELAVP)、胶原蛋白 α 1(CollaGen α 1)、基质金属蛋白酶14(MMP14)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、粘蛋白聚糖(SYN)、短缩素核心蛋白(BCP)、纤连蛋白(Fib)、主要卵黄蛋白1(MYP1)、肌动蛋白(Actin1)、癌蛋白(OP)、真核细胞伴侣素(Chap)、Krueppel样因子(KLF)、层粘连蛋白亚基 α 2(LS2)及层粘连蛋白亚基 α 4(LS4)基因未发生显著变化。

参考文献

[1] 朱蓓薇.海珍品加工理论与技术的研究[M].北京:科学出版社,2010
ZHU Bei-wei. Reserch on theory and technology of precious seafood processing [M]. Beijing: Science Press, 2010

[2] ZHU Bei-wei, ZHENG Jie, ZHANG Zong-shen, et al. Autophagy plays a potential role in the process of sea cucumber body wall "melting" induced by UV irradiation [J]. Journal of Wuhan University, 2008, 13: 232-238

[3] ZHU Bei-wei, ZHAO Lu-lu, SUN Li-ming, et al. Purification and characterization of a cathepsin I-like enzyme from the body wall of the sea cucumber stichopus japonicus [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2008, 72(6): 1430-1437

- [4] SUN Li-ming, ZHU Bei-wei, WU Hai-tao, et al. Purification and characterization of cathepsin b from the gut of the sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20: 919-925
- [5] WU Hai-tao, LI Dong-mei, ZHU Bei-wei, et al. Characterization of acetylcholinesterase from the gut of sea cucumber *stichopus japonicus* [J]. Chemistry and Biochemistry, 2013, 79: 303-311
- [6] WU Hai-tao, LI Dong-mei, ZHU Bei-wei, et al. Purification and characterization of alkaline phosphatase from the gut of sea cucumber *stichopus japonicus* [J]. Chemistry and Biochemistry, 2013, 79: 477-489
- [7] WU Hai-tao, LI Dong-mei, ZHU Bei-wei, et al. Proteolysis of noncollagenous proteins in sea cucumber, *stichopus japonicus*, body wall: characterisation and the effects of cysteine protease inhibitors [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 1287-1294
- [8] Pablo A Ortiz-Pineda, Francisco Ramírez-Gómez, Judit Pérez-Ortiz, et al. Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 262-282
- [9] Francisco Ramirez-Go mez, Pablo A. Ortiz-Pineda, Gabriela Rivera-Cardona, et al. LPS-induced genes in intestinal tissue of the sea cucumber *holothuria glaberrima* [J]. PLOS ONE, 2009, 4(7): e6178-e6191
- [10] ZHANG Peng, LU Ya-li, LI Cheng-hua, et al. Identification of differential expressed proteins and characterization their mrna expression in thermally stressed *apostichopus japonicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D, 2013, 8: 194-200
- [11] 杨爱馥,周遵春,董颖,等.仿刺参 *cytb* 和 β -actin 基因表达稳定性比较[J].中国农业科技导报,2010,12(1):79-84
- YANG Ai-fu, ZHOU Zun-chun, DONG Ying, et al. Stability comparison of *cytb* and β -actin genes expression in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(1): 79-84
- [12] Visessanguan W, Benjakul S, An H, et al. Shrimp cathepsin L Encoded by an Intronless Gene has Predominant Expression in Hepatopancreas and Occurs in the Nucleus of Oocyte [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, 13(4): 477-487
- [13] 杨冠科,丛丽娜,谢三群,等.海刺参(*Stichopus japonicus*)电压依赖性钙离子通道 β 亚基基因及其编码产物的结构特点 [J].中国生物化学与分子生物学报,2009,25(2):137-145
- YANG Guan-ke, CONG Li-na, XIE San-qun, et al. Characterization and structure analysis of a gene encoding voltage-dependent calcium channel β subunit from sea cucumber *stichopus japonicus* [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(2): 137-145
- [14] SUN Li-ming, WANG Ting-ting, ZHU Bei-wei, et al. Effect of matrix metalloproteinase on autolysis of sea cucumber *stichopus japonicus* [J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(5): 1259-1261