

## 拟穴青蟹 14-3-3 基因全长 cDNA 的克隆及组织表达分析

舒妙安\*, 张龙韬, 徐宾朋, 胡杭娇, 郭晓令

(浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310058)

**摘要:** 采用 RT-PCR 及 RACE 技术, 从拟穴青蟹眼柄组织中克隆获得 14-3-3 基因 cDNA 全序列。序列分析结果表明: 拟穴青蟹 14-3-3 基因全长 1 112 bp, 开放阅读框长 744 bp, 编码由 247 个氨基酸组成的蛋白, 分子量为 28.086 ku, 等电点为 4.675。与其他物种 14-3-3 基因氨基酸序列进行同源性比较分析显示, 拟穴青蟹 14-3-3 基因与斑节对虾 14-3-3 基因同源性最高(95%), 依次为墨吉对虾(93%)、苜蓿切叶蜂(92%)。聚类分析表明, 拟穴青蟹 14-3-3 基因氨基酸序列与斑节对虾、墨吉对虾紧密聚为一支。经荧光定量检测, 拟穴青蟹 14-3-3 基因在肝胰腺和肌肉中的表达量较高, 其次为鳃、眼柄、心脏和肠, 在胃中表达最少。盐度骤变实验结果表明: 盐度胁迫 24 h 后, 盐度的下降(5)或者上升(15、20、25、30)都引起了 14-3-3 基因在鳃中的表达量极显著上升( $P < 0.01$ ), 盐度变化的幅度越大, 14-3-3 基因的表达量越多。实验结果为进一步深入研究 14-3-3 基因的功能及调控机理奠定基础。

**关键词:** 拟穴青蟹; 14-3-3 基因; 克隆; 组织表达

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)俗称青蟹, 属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*), 主要分布于我国的浙江、福建、广东、广西、海南以及台湾等沿海水域, 是我国东南沿海 4 种青蟹(拟穴青蟹 *S. paramamosain*、锯缘青蟹 *S. serrata*、榄绿青蟹 *S. olivacea* 和紫螯青蟹 *S. tranquebarica*)中的主要优势品种<sup>[1]</sup>, 是我国重要的海水养殖蟹类之一。

14-3-3 基因是一种高度保守的基因, 编码一组多功能蛋白, 由 Moore 等<sup>[2]</sup>首次在牛脑细胞中发现。14-3-3 基因广泛分布于所有真核生物中<sup>[3]</sup>, 调控生物细胞的许多重要生理过程, 涉及细胞信号转导、代谢酶合成、囊泡穿梭、细胞凋亡等多方面<sup>[4]</sup>。研究表明, 14-3-3 基因与生物体渗透压调节密切相关。在盐度胁迫下, 14-3-3 基因能够调节植物 H<sup>+</sup>-ATP 酶和 K<sup>+</sup>离子运输<sup>[5-6]</sup>, 转入西红柿(*Solanum*

*lycopersicum*)14-3-3 基因的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)表现出了耐盐的特性<sup>[7]</sup>。在哺乳动物中, 14-3-3 基因已被证实能够调控多个离子通道<sup>[8-9]</sup>, 是 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶调节体系的必要组成部分<sup>[10]</sup>。在水生动物虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[11]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[12]</sup>的研究中发现, 盐度的变化也引起 14-3-3 基因的显著变化。近年来, 14-3-3 基因已从不同的生物体中分离鉴定出来, 哺乳动物中有 7 种亚型( $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\sigma$ 、 $\theta$  和  $\zeta$ ), 植物中至少有 15 种亚型<sup>[13-14]</sup>; 而在鱼类、虾蟹类中, 仅见虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[11]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[15]</sup>、鳞(*Fundulus heteroclitus*)<sup>[16]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[12]</sup>等有报道。

本研究以拟穴青蟹为研究对象, 应用分子生物学方法, 首次克隆得到 14-3-3 基因的全长 cDNA 序列, 并对 14-3-3 基因在不同组织和不同盐度胁迫下鳃中的表达情况进行了研究, 为进一步阐明

收稿日期: 2012-02-22 修回日期: 2012-03-21  
资助项目: 浙江省重大科技专项农业项目(2008C12008)  
通讯作者: 舒妙安, E-mail: shuma@zju.edu.cn

14-3-3 基因的生理功能奠定基础, 为耐低盐青蟹品种培育提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验用拟穴青蟹于 2011 年 9 月取自杭州湾沿海水域, 测量体质量( $200 \pm 20$ ) g、壳长( $10 \pm 1.2$ ) cm、壳宽( $8 \pm 0.8$ ) cm 后, 饲养于  $80 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$  的圆形 PVC 桶中, 并于实验前暂养一周, 养殖水温为 ( $25 \pm 0.4$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 盐度为  $8 \pm 0.2$ ,  $\text{pH}=7.5 \pm 0.3$ , 连续充气, 暂养期间每天换水 1/3, 并投喂缢蛏等贝类。将 18 只暂养的拟穴青蟹随机分成 6 组, 设对照组和盐度骤变组, 每组设 3 个平行。对照组盐度为 10, 骤变组盐度为 5、15、20、25、30, 各组的盐度用速溶海水晶调节。实验期间不投饵不换水, 盐度胁迫 24 h 后, 对照组和盐度骤变组同时取样, 包括眼柄、肝胰腺、鳃、胃、肠、心、肌肉共 7 个组织, 保存于液氮中。

### 1.2 RNA 的提取

分离不同组织, 液氮研磨组织样品, 每 0.05 g 组织中加 1 mL 购于 Invitrogen 公司的 Trizol Reagent, 提取拟穴青蟹鳃中的总 RNA。提取的总 RNA 用微量分光光度计 Nanodrop2000 进行定量测

定, 然后再通过 TBE 琼脂糖凝胶电泳确认其完整性。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第一链, 用于基因 3'和 5'端序列快速扩增和荧光定量的模板。

### 1.3 拟穴青蟹 14-3-3 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

根据 GenBank 中已报道的甲壳类的 14-3-3 基因的 cDNA 序列设计引物, 正向引物为 14-F, 反向引物为 14-R(表 1)。用 TaKaRa Taq<sup>TM</sup> 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 TaKaRa Taq ( $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ ),  $0.2 \mu\text{L}$ ;  $10 \times \text{PCR Buffer (Mg}^{2+} \text{ Plus)}$ ,  $2.5 \mu\text{L}$ ; dNTP Mixture(各  $2.5 \text{ mmol/L}$ ),  $1 \mu\text{L}$ ; 模板 cDNA,  $1 \mu\text{L}$ ; 引物 14-F ( $10 \mu\text{mol/L}$ ),  $1 \mu\text{L}$ ; 引物 14-R ( $10 \mu\text{mol/L}$ ),  $1 \mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O 补足  $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为  $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 最后  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物用 Axygen 胶回收试剂盒纯化, 连接到 pMD-18T 载体(TaKaRa)。连接产物转染 Top10 感受态细胞(Invitrogen)。PCR 筛选获得的阳性克隆, 送至 Invitrogen 公司进行双向测序。获得的序列用 BLASTX 进行比对分析。

表 1 本研究所用的引物  
Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer name	序列(5'→3') Primer sequence	用途 application
14-F	GAACAAGTACAGCGGGCCAAG	gene
14-R	TCGAGGAGACCCAATACATC	cloning
GSP1	GCT ACA GAC AAC AGA TTT CGC TCC	5'Race
GSP2	CCG AGC AGG CAG AGA GAT ACG AT	3'Race
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Race
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Race
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	NestRace
OligoG	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	5'Race
3'- CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) <sub>30</sub> VN	3'Race
RT-F	GGA CAC AAT GGG AGA TAA	RT-PCR
RT-R	GAC AAC AGA TTT CGC TCC	RT-PCR
$\beta$ -actin-F	GCCCTTCCTCACGCTATCCT	
$\beta$ -actin-R	GCGGCAGTGGTCATCTCCT	

根据上述已获得的拟穴青蟹 14-3-3 基因部分序列为模板, 设计 3'和 5'端 RACE 所需的引物(表 1)。用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 扩

增试剂盒(Clontech)反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 分别用引物 GSP1、GSP2 与 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物配对, 并

完全按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 14-3-3 基因 3'和 5'端基因序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与 14-3-3 基因片段的克隆所述相同。

#### 1.4 拟穴青蟹 14-3-3 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化树

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。将所得序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), 利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框(ORF)预测与氨基酸翻译。使用 Interpro Scan 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)进行蛋白质功能结构域分析。使用 DNAMAN<sup>[17]</sup>对拟穴青蟹及其它物种的 14-3-3 基因氨基酸序列进行多重比对, 然后用 MEGA4.0 软件构建 NJ 系统树<sup>[18]</sup>。

#### 1.5 拟穴青蟹 14-3-3 基因在各组织中表达分析

以获得的基因序列为模板, 利用 Primer 5.0 软件设计一对特异引物 RT-F、RT-R(表 1), 对拟穴青蟹各个组织中及不同盐度胁迫下鳃中 14-3-3 基因的表达量进行检测, 并根据 GenBank 中拟穴青蟹的  $\beta$ -actin 基因序列设计一对内参引物  $\beta$ -actin-F、 $\beta$ -actin-R(表 1)。荧光定量 PCR(ddCt 法)扩增体系为 20  $\mu$ L, 包括: SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$ ), 10  $\mu$ L; PCR Forward Primer(10  $\mu$ mol/L), 0.4  $\mu$ L; PCR Reverse Primer(10  $\mu$ mol/L), 0.4  $\mu$ L; ROX Reference Dye II (50 $\times$ )\*3, 0.4  $\mu$ L; cDNA 模板, 2.0  $\mu$ L; dH<sub>2</sub>O, 6.8  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s。将荧光定量 PCR 检测结果导出, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 用 SPSS11.0 软件进行分析。引物 RT-F 和 RT-R 能特异性扩增 14-3-3 基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算得到定量结果。

## 2 结果

### 2.1 拟穴青蟹 14-3-3 基因的克隆及序列分析

通过引物 14-F 和 14-R 扩增获得一条长约 298 bp 的特异条带。引物 GSP1 得到的 5' RACE 产物为 219 bp 的序列, 在上游出现多个“终止密码子”, 获得了 5'端全长。引物 GSP2 得到的 3' RACE 产物为 961 bp 的序列, 包含 poly(A)尾巴, 具有加尾信号 AAACA<sup>[19]</sup>, 得到了 3'端全长。将以上序列拼接

后获得了 1 112 bp 的一条序列, 获得了拟穴青蟹 14-3-3 基因(GenBank 登录号: JQ421464)的 cDNA 全长。序列分析表明, 拟穴青蟹 14-3-3 基因全长 cDNA 序列包括 99 bp 的 5'非编码区(UTR), 744 bp 的开放式阅读框(ORF), 269 bp 的 3'端非编码区(UTR)及 poly(A)尾巴, 编码 247 个氨基酸的蛋白。图 1 中 AAACA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点。

### 2.2 编码蛋白组成和结构分析

利用 DNASTAR 中的 Edisequce 程序将该基因编码序列翻译为相应的氨基酸序列, 发现 14-3-3 基因编码一个由 247 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其分子量为 28.086 ku, 等电点为 4.675。该蛋白包含 32 个碱性氨基酸(K、R)、45 个酸性氨基酸(D、E)、78 个疏水性氨基酸(A、I、L、F、W、V)和 66 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)。

### 2.3 编码蛋白序列比对以及进化树构建

利用 DNAMAN 软件对该基因编码的氨基酸序列与斑节对虾、墨吉对虾、鲑鱼、果蝇、拟南芥和人的氨基酸序列进行比对, 发现所有比对蛋白有高度的氨基酸保守序列, 其序列特征为 EERNLXSVMYKKNVXGRR、KMKGDYXRYLXE、PTHPXRLGLALNFSV、AFDXAIAELDXLNE、TLIMQLLRDNLTLWTS(图 2)。

基于 14-3-3 基因氨基酸序列采用 MEGA4.0 软件以 NJ 法构建了 13 种动物的系统进化树(图 3)。进化树分析表明, 该序列与斑节对虾、墨吉对虾等虾类的物种紧密聚在一起, 然后与鱼类聚在一起。

### 2.4 拟穴青蟹 14-3-3 基因的表达特征

以  $\beta$ -actin 为内参基因, 荧光定量 PCR 检验拟穴青蟹 14-3-3 基因在眼柄、肝胰腺、鳃、胃、肠、心、肌肉 7 个组织中的表达。设定 14-3-3 基因在鳃中的表达量为 1, 根据 14-3-3 基因在各个组织中的相对表达量作柱形图(图 4)。结果显示, 14-3-3 基因在肝胰腺和肌肉中的表达量较高, 其次为鳃、肠、眼柄和心脏, 在胃中表达量最少。在盐度 5~30 的骤变实验中, 盐度胁迫 24 h 后, 以盐度 10 的实验组为对照组, 盐度的下降(5)或者上升(15、20、25、30)都引起了 14-3-3 基因在鳃中的表达量极显著上升( $P < 0.01$ ), 盐度变化的幅度越大, 14-3-3 基因的表达量越多(图 5)。

```

1      TGGGGAGTCGCCAAGAGGGTGTGGTAGTGAGAGGGTCACTCTGCCCCGGATATACTTTA      60
61     TATTTGTGTATATAGCACCTATTTTATAAAAACGGACACAATGGGAGATAAGGAAGAACAG      120
1      M G D K E E Q      7
121    GTACAGAGGGCCAAGCTCGCCGAGCAGGCAGAGAGATACGATGATATGGCCGCCCTATG      180
8      V Q R A K L A E Q A E R Y D D M A A A M      27
181    AAGCAGGTCACAGAAACAGGGGTGGAGCTTTCCAATGAGGAGCGAAATCTGTTGTCTGTA      240
28     K Q V T E T G V E L S N E E R N L L S V      47
241    GCATAACAAGAAATGTGGTTCGGTGCCTCCGAGAAGTTCCTGGCGAGTTATTTCTCCATAGAA      300
48     A Y K N V V G A R R S S W R V I S S I E      67
301    CAGAAGACAGAAGGTTTCAGAACGAAAGCAACAATGGCAAAGGAGTACAGAGAGAAGGTT      360
68     Q K T E G S E R K Q Q M A K E Y R E K V      87
361    GAAACAGAGCTTAGGGAAATTTGCCAGGACGTTTGGGTCTCCTCGACAAGTTCCTTATC      420
88     E T E L R E I C Q D V L G L L D K F L I      107
421    CCCAAGGCCTCAAATCCTGAGTCTAAGGTCTTCTACCTTAAGATGAAGGGCGACTACTAT      480
108    P K A S N P E S K V F Y L K M K G D Y Y      127
481    AGGTACCTGGCTGAGGTGGCCACTGGCGACGTTTCGAGCGGTTGTGGTTGACGACTCCCAG      540
128    R Y L A E V A T G D V R A V V V D D S Q      147
541    AAGTCATATCAGGAGGCTTCGACATCGCCAAGTCAAAGATGCAGCCACGCATCCCATC      600
148    K S Y Q E A F D I A K S K M Q P T H P I      167
601    AGGCTAGGCCCTGGCCCTCAACTTCTCCGTATTCTACTACGAGATTCTCAATTCTCCCGAC      660
168    R L G L A L N F S V F Y Y E I L N S P D      187
661    AGAGCGTGTCACTTAGCTAAACAGGCATTCGACGATGCAATCGCGGAGCTGGATACGCTG      720
188    R A C H L A K Q A F D D A I A E L D T L      207
721    AATGAAGACTCGTACAAAGACTCTACGCTCATAATGCAGCTGTTGCGAGACAACCTGACG      780
208    N E D S Y K D S T L I M Q L L R D N L T      227
781    CTTTGGACGAGTGATACGCAGGGGGAGGGGAAGATGCTAACGAAGGGGGCGACCAAAAC      840
228    L W T S D T Q G E G E D A N E G G D Q N      247
841    TGATGAACGCAACCCCTTTTAGCACGCGTCACTCGACCCTCTACTCCTCGAATGTACGTC      900
248    *
901    ATGATGCCTAAGGGTCGACCATTCTCACAAGTCACTCATCACACCGCCAGCGTGGCTAA      960
961    CTAGTAGTCGAGGCTGCGGCTGGGAGCTCCTCAGTGACGCTACTTCGCCCACCATCTCTGG      1020
1021   TACTCATGGCCGTCACCACCACGGTCACCCACGGCCTCTCTGCTGCCTCAGTTAAAAAC      1080
1081   AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 拟穴青蟹 14-3-3 基因的全长 cDNA 及其预测的氨基酸序列

起始密码子加边框, 终止密码子用星号(\*)标出。多聚腺苷酸加尾信号(AAAACA)虚框表示。

**Fig. 1** cDNA sequence and deduced amino acid sequence of 14-3-3 gene from the mud crab *S. paramamosain*. The start codon is boxed and the stop codon is indicated with an asterisk. Polyadenylation signal (AAAACA) is enclosed by dashed line.

### 3 讨论

实验运用 RT-PCR 和 RACE 扩增技术从拟穴青蟹眼柄组织中扩增得到 1 112 bp 的全长 cDNA 的序列。该序列 ORF 与 GenBank 中已登录的其他生物的 14-3-3 基因的 ORF 比对发现, 与斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 同源性高达 95%, 与墨吉对虾 (*Fenneropenaeus merguensis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、人 (*Homo sapiens*) 等同源性为 72%~93%, 表明本实验成功克隆了拟穴青蟹 14-3-3 基因全长 cDNA 序列。研究发现, 14-3-3 基

因在哺乳动物中至少存在 7 种高度保守的基因亚型, 分别为  $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\sigma$ 、 $\zeta$ 、 $\tau$ (也称  $\theta$ )<sup>[20]</sup>。通过氨基酸比对和 NJ 系统进化树结果推测, 本实验克隆所得的 14-3-3 基因属于  $\zeta$  亚型。

14-3-3 基因广泛分布于真核生物细胞内, 具有高度保守性, 同时又是功能复杂的同源或异源二聚体分子, 在神经细胞分化、系统发育和功能方面起着至关重要的作用<sup>[21]</sup>。Chen 等<sup>[22]</sup>利用细胞培养技术研究 14-3-3 基因在组织中的表达, 发现 14-3-3 基因在脑组织中表达量最高, 在其它组织中也有表达, 如 14-3-3 基因  $\gamma$  亚型在脑中表达最高,

拟穴青蟹	MG..DKEEQVQRAKLAEQAEYDDMAAAMKQVTEITGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE..	71
斑节对虾	MS..DKEEQVQRAKLAEQAEYDDMAAAMRQVTEITGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE..	71
墨吉对虾	MS..DKEEQVQRAKLAEQAEYDDMAAAMKQVTEITGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE..	71
斑马鱼	MD..KSDLVQKAKLAEQAEYDDMAASMKAVTEGGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE..	70
果蝇	MSTVDKEELVQKAKLAEQSERYDDMAQAMKSVTEITGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE..	73
拟南芥	MEN.EREKQVYLAKLSEQTERYDEMVEAMKVAQLDVELTVEERNLVSQYKQVIGARRASWRVSSIEQKEESK	74
人类	ME..KTELIQKAKLAEQAEYDDMATCMKAVTEGGAELSNEERNLLSVAYKNVVGRRSARWRVSSIEQKTD..	70
Consensus	m akl eq e yd m m v el eernl sv yknv g rr wr ssieqk	
拟穴青蟹	GSERKQQMAKEYREKVELTELREICQDVLGLLDKFLIPKASNPESKVFYLMKMGDYRYRLAEVATGDVRAVVVDD	146
斑节对虾	GSERKQQMAKEYREKVELTELREICQDVLGLLDKFLIPKASNPESKVFYLMKMGDYRYRLAEVATGDARAGVVDD	146
墨吉对虾	GSERKQQMAKEYREKVELTELREICQDVLGLLDMFLIPKASNPESKVFYLMKMGDYRYRLAEVATGDARAGVVDD	146
斑马鱼	GNEKQQMAREYREKIEAELQEICNDVLGLLKYLIPNASQAESKVFYLMKMGDYRYRLSEVASGDSKRTTVENS	145
果蝇	ASARKQQLAAREYRERVELTELREICYEVLGLLDKYLIPKASNPESKVFYLMKMGDYRYRLAEVATGDARNTVVDD	148
拟南芥	GNDENVKRLKNYRKRVEDELAKVNDILSVIDKHLIPSSNAVESTVFFYKMGDYRYRLAEVATGAEFSSGAERKEAADQS	149
人类	TSDKKLQLTKDYREKVESELRSICTTVLELLDKYLIANATNPESKVFYLMKMGDYRYRLAEVACGDDRRKQITD	145
Consensus	yr e el c l li es vf kmgdy ryl e g s	
拟穴青蟹	QKSYQAEFDIAKSKMQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDRACHLAKQAFDDATAELDTLNEDSYKDSLIMQL	221
斑节对虾	QKSYQAEFDIAKAEQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDKACQLAKQAFDDATAELDTLNEDSYKDSLIMQL	221
墨吉对虾	QKSYQAEFDIAKAEQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDKACQLAKQAFDDATAELDTLNEDSYKDSLIMQL	221
斑马鱼	QKAYQDAFEISKKEQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNTPAQACSLAKTAFDEATAELDTLNEDSYKDSLIMQL	220
果蝇	KNAYQAEFDIAKTKMQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDKACQLAKQAFDDATAELDTLNEDSYKDSLIMQL	223
拟南芥	LEAYKAAVAAAENGLAPTHPVRGLALNFSVFYIEILNSPESACQLAKQAFDDATAELDSLNEESYKDSLIMQL	224
人类	QGAYQAEFDISKKEQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNPELACTLAKTAFDEATAELDTLNEDSYKDSLIMQL	220
Consensus	y a pthp rlgialnfsv yeiln p ac lak afd aiaeld lne ykd tlimql	
拟穴青蟹	LRDNLTLWTSDTQEGEDANEGGDQN...	247
斑节对虾	LRDNLTLWTSDTQEGEDANEG. DQN...	246
墨吉对虾	LRDNLTLWTSNTQEGEDANEG. DQN...	246
斑马鱼	LRDNLTLWTSNQEGEDAGEGEN....	244
果蝇	LRDNLTLWTSDTQGEAEPQEGGDN....	248
拟南芥	LRDNLTLWTSDLNEEGDERTKGADEPQDE	253
人类	LRDNLTLWTSDSAGEECDAAEGAEN....	245
Consensus	lrdnltlwts g	

图 2 拟穴青蟹 14-3-3 氨基酸序列与 6 种生物 14-3-3 氨基酸序列对比

Fig. 2 Amino-acid sequences alignment of *S. paramamosain* with different animals' 14-3-3 genes

拟穴青蟹 *Scylla paramamosain* (JQ421464); 斑节对虾 *Penaeus monodon* (AAY56092.1); 墨吉对虾 *Fenneropenaeus merguensis* (AEW70348.1); 果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP\_724885.1); 斑马鱼 *Danio rerio* (NP\_001076267.1); 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (AAF87261.1); 人 *Homo sapiens* (NP\_006817.1)。

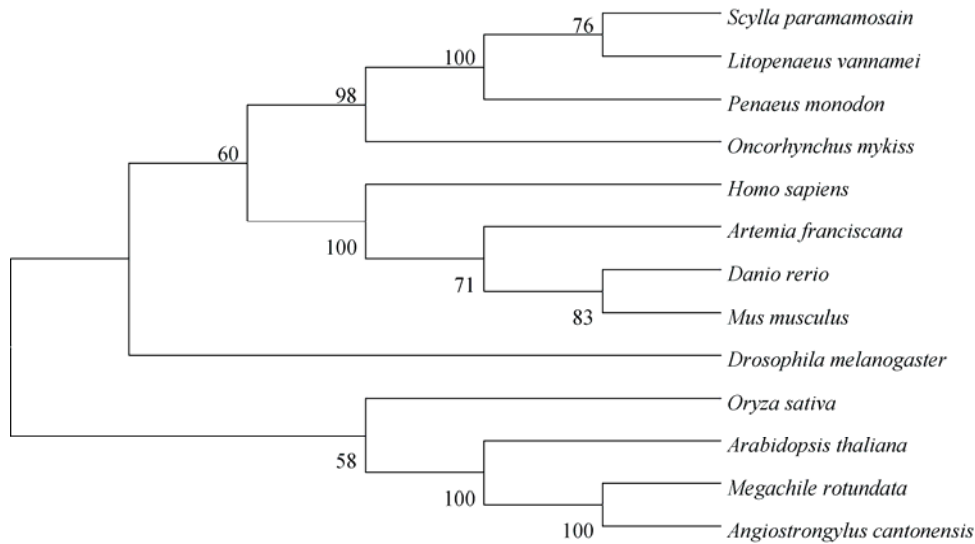


图 3 利用 MEGA4.0 构建的基于 14-3-3 氨基酸序列的 NJ 系统树

Fig. 3 NJ tree based on 14-3-3 gene amino acid sequences using MEGA4.0

*Scylla paramamosain*: 拟穴青蟹 (JQ421464); *Penaeus monodon*: 斑节对虾 (AAY56092.1); *Fenneropenaeus merguensis*: 墨吉对虾 (ADI87601.1); *Megachile rotundata*: 苜蓿切叶蜂 (AEW70348.1); *Artemia franciscana*: 丰年虾 (ABX80390.1); *Litopenaeus vannamei*: 凡纳滨对虾 (ABQ95505.1); *Drosophila melanogaster*: 果蝇 (NP\_724885.1); *Danio rerio*: 斑马鱼 (NP\_001076267.1); *Oncorhynchus mykiss*: 虹鳟 (AAS88432.1); *Homo sapiens*: 人 (NP\_006817.1); *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥 (AAF87261.1); *Angiostrongylus cantonensis*: 管圆线虫 (AEK98129.1); *Mus musculus*: 家鼠 (NP\_035870.1); *Oryza sativa*: 水稻 (CAB77673.1)。

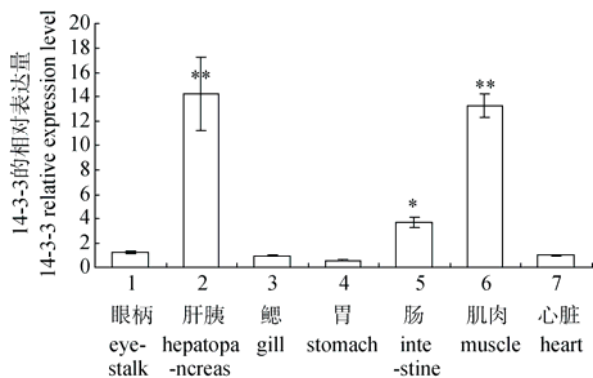


图4 基于荧光定量PCR检测的14-3-3基因在各组织中的表达水平

1. 眼柄, 2. 肝胰, 3. 鳃, 4. 胃, 5. 肠, 6. 肌肉, 7. 心脏 \*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Fig. 4 14-3-3 gene mRNA expression level in different tissues detected by qRT-PCR

1. eye-stalk, 2. hepatopancreas, 3. gill, 4. stomach, 5. intestine, 6. muscle, 7. heart. \*mean significant ( $P < 0.05$ ), \*\* mean greatly significant ( $P < 0.01$ ).

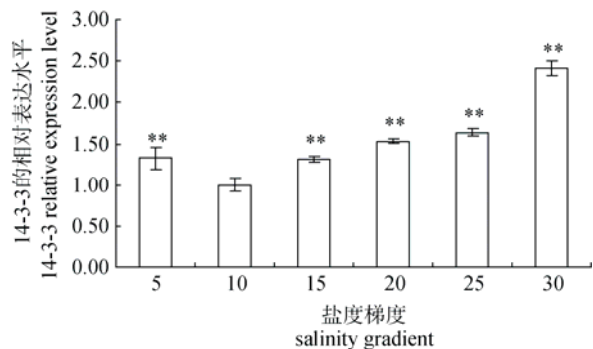


图5 基于荧光定量PCR检测的14-3-3基因在盐度胁迫24h后的表达水平

\*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Fig. 5 14-3-3 gene mRNA expression level after 24 h salinity stress detected by qRT-PCR

\* mean significant ( $P < 0.05$ ), \*\* mean greatly significant ( $P < 0.01$ ).

在心、肝、脾、肺、肾中表达极低, 而14-3-3基因β亚型在淋巴组织, 尤其是胸腺和脾中表达量最高。Kaeodee等<sup>[12]</sup>从斑节对虾中克隆得到14-3-3基因家族序列, 发现14-3-3基因在鳃、心脏、肠、肝胰腺、眼柄、血细胞、淋巴组织中都有表达。Koskinen等<sup>[11]</sup>在研究虹鳟的过程中发现14-3-3基因在表皮、肌肉、肠中都有表达。本研究采用荧光定量RT-PCR方法对拟穴青蟹14-3-3基因mRNA组织表达进行分析结果表明, 14-3-3基因在眼柄、肝胰腺、心脏、肠、鳃、胃和肌肉中都有表达, 其中肝胰腺和肌肉中表达量较高, 肠中次之, 眼柄、鳃、心脏和胃中最少, 与上述研究结果一致。

在甲壳动物中, 很多器官和渗透压的调节相

关, 主要有鳃、触角腺、肝胰腺、肠等<sup>[23-24]</sup>, 鳃是甲壳动物渗透压调解离子运输的主要场所<sup>[25]</sup>, 渗透压的调节方式包括  $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 离子通道、 $\text{Na}^+$ 离子通道、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换、 $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$ 离子运输、 $\text{Ca}^{2+}$ -离子泵、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 离子交换等<sup>[25-28]</sup>。研究发现, 14-3-3基因参与许多生物细胞信号转导, 调控多个离子通道<sup>[4, 8-9]</sup>。在水生动物的  $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的N端存在14-3-3基因的蛋白结合位点<sup>[29]</sup>, 在利尿激素的刺激下, 14-3-3基因能够调控肾小管的  $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性<sup>[10]</sup>, 改变细胞内  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 等离子的浓度, 进而达到调节渗透压的作用。Kültz等<sup>[30]</sup>从广盐性硬骨鱼类鳃中克隆得到了14-3-3基因全序列, 并对该基因在不同盐度下的表达情况进行了研究, 发现广盐性硬骨鱼类鳃从高渗到低渗的适应中, 14-3-3基因大量表达, 并认为14-3-3基因一方面下调  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性, 抑制  $\text{Cl}^-$ 离子通道, 维持细胞内  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 等离子浓度; 另一方面激活鳃上皮细胞中  $\text{H}^+ - \text{ATP}$  酶活性<sup>[30]</sup>, 维持细胞质pH、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度和代谢物稳定<sup>[31]</sup>。由此说明, 14-3-3基因参与体内渗透压的调节。本研究利用荧光定量RT-PCR技术, 对盐度骤变下的拟穴青蟹鳃中14-3-3基因的表达量进行了检测。研究发现, 随着盐度的增加(15、20、25、30)或减少(5), 14-3-3基因在鳃中的表达量极显著上升。结果表明, 本研究从拟穴青蟹中克隆得到的14-3-3基因与渗透压调节密切相关。Kaeodee等<sup>[12]</sup>从斑节对虾中克隆得到14-3-3基因家族序列, 发现14-3-3基因从高渗到低渗的适应中, 14-3-3基因大量表达。Koskinen等<sup>[11]</sup>在研究虹鳟14-3-3基因的过程中也得到了同样的结果。但14-3-3基因ζ亚型和β亚型, 在受到病菌感染后, 表达量都有显著的升高<sup>[32-33]</sup>。本研究得到的结果与Koskinen等<sup>[11]</sup>、Kaeodee等<sup>[12]</sup>得到的研究结果不同, 与14-3-3ζ和14-3-3β的研究结果一致。14-3-3基因家族存在很多亚型, 各亚型的功能和作用机理也各不相同。本研究所得到的14-3-3基因可能参与环境的适应性调节, 包括渗透压调节、细胞周期调节等。

环境骤变是影响拟穴青蟹养殖效益的重要因素。研究拟穴青蟹14-3-3基因的调控机理, 对于提高拟穴青蟹的抗逆性具有重要的意义。本研究首次克隆得到拟穴青蟹14-3-3基因cDNA全长序列, 并

对其结构及表达规律进行了分析, 为进一步揭示 14-3-3 基因的生理功能奠定基础, 同时也为阐明拟穴青蟹耐低盐调控机理提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 林琪, 李少菁, 黎中宝. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*) 的种类组成 [J]. 水产学报, 2007, 31 (2): 211–219.
- [2] Moore B W, Perez V J. Specific acidic proteins of the nervous system[M]// Carlson F D, Ed. Physiological and biochemical aspects of nervous integration. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, 1968: 343–359.
- [3] Chaudhri M, Scarabel M, Aitken A. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers *in vivo* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 300 (3): 679–685.
- [4] Roberts M R. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signaling [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8 (5): 218–223.
- [5] Morsomme P, Boutry M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembrans, 2000, 1465 (1-2): 1–16.
- [6] Very A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants [J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 575–603.
- [7] Xu W F, Shi W M. Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively overexpressing the tomato 14-3-3 protein TFT7 [J]. Plant and Soil, 2007, 301 (1-2): 17–28.
- [8] Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, *et al.* 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel [J]. Circle Research, 2006, 98: 1538–1546.
- [9] Czirjak G, Vuity D, Enyed P. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283 (23): 15672–15680.
- [10] Efendiev R, Chen Z, Krmar R T, *et al.* The 14-3-3 protein translates the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha1-subunit phosphorylation signal into binding and activation of phosphoinositide 3-kinase during endocytosis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280 (16): 16272–16277.
- [11] Koskinen H, Krasnov A, Rexroad C. The 14-3-3 proteins in the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2004, 207 (19): 3361–3368.
- [12] Kaeodee M, Pongsomboon S, Tassanakajon A. Expression analysis and response of *Penaeus monodon* 14-3-3 genes to salinity stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2011, 159 (4): 244–251.
- [13] Aitken, A. 14-3-3 proteins: a historic overview [J]. Seminars in Cancer Biology, 2006, 16 (3): 162–172.
- [14] Gardino A K, Smerdon S J, Yaffe M B. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms [J]. Seminars in Cancer Biology, 2006, 16 (3): 173–182.
- [15] Besser J, Bagowski C P, Salas Vidal E, *et al.* Expression analysis of the family of 14-3-3 proteins in zebra fish development [J]. Gene Expression Patterns, 2007, 7 (4): 511–520.
- [16] Kultz D, Chakravarty D, Adilakshmi T. A novel 14-3-3 gene is osmoregulated in gill epithelium of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus* [J]. The Journal of Experimental Biology, 2001, 204 (17): 2975–2985.
- [17] 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析 [J]. 水产学报, 2011, 35 (8): 1130–1138.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinformatics, 2004, 5 (2): 150–163.
- [19] Tsai K W, Chang S J, Wu H J, *et al.* Molecular cloning and differential expression pattern of two structural variants of the crustacean hyperglycemic hormone family from the mud crab *Scylla olivacea* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 159 (1): 16–25.
- [20] Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection [J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3 (12): 931–943.
- [21] Skoulakis E M, Davis R L. 14-3-3 proteins in neuronal development and function [J]. Molecular Neurobiology, 1998, 16 (3): 269–273.
- [22] Chen X Q, Chen J, Zhang Y, *et al.* 14-3-3 gamma is upregulated by *in vitro* ischemia and binds to protein kinase Raf in primary cultures of astrocytes [J]. Glia, 2003, 42 (4): 315–324.
- [23] Ferraris R P, Parado-Esteva F D, De Jesus E G, *et al.* Osmotic and chloride regulation in the hemolymph of the tiger prawn, *Penaeus monodon*, during molting in various salinities [J]. Marine Biology, 1987, 95 (3): 377–385.
- [24] Buranajitpirom D, Asuvapongpatana S, Weerachatanukul W, *et al.* Adaptation of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, to different salinities through an excretory function of the antennal gland [J]. Cell and Tissue Research, 2010, 340 (3): 481–489.
- [25] Freire C A, Onken H, McNamara J C. Structure-function relationships of ion transport in crustacean gills and antennal glands [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2008, 151 (4): 272–304.
- [26] Böttcher K, Siebers D, Becker W. Carbonic anhydrase in branchial tissues of osmoregulating shore crabs, *Carcinus maenas* [J]. Journal of Experimental Zoology, 1990, 255 (3): 251–261.

- [27] Henry R P, Watts S A. Early carbonic anhydrase induction in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*, during low salinity acclimation is independent of ornithine decarboxylase activity [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 289 (6): 350–358.
- [28] Péqueux A. Osmotic regulation in crustacean [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1995, 15(1): 1–60.
- [29] Jayasundara N, Towle D W, Weihrauch D, *et al.* Gill-specific transcriptional regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2007, 210 (12): 2070–2081.
- [30] Kültz D, Chakravary D, Adilakshmi T. A novel 14-3-3 gene is osmoregulated in gill epithelium of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204 (17): 2975–2985.
- [31] Martfnez-Ballesta M C, Martfnez V, Carvajal M. Aquaporin functionality in relation to H<sup>+</sup>-ATPase activity in root cells of *Capsicum annuum* grown under salinity [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 117 (3): 413–420.
- [32] Chongsatja P O, Bourchookarn A, Thongboonkerd V, *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon Taura syndrome virus infection [J]. *Proteomics*, 2007, 7 (19): 3592–3601.
- [33] Wang H C, Wang H C, Leu J H, *et al.* Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, 31 (7): 672–686.

## The full length cDNA cloning and expression profile of 14-3-3 gene from the mud crab (*Scylla paramamosain*)

SHU Miao-an\*, ZHANG Long-tao, XU Bin-peng, HU Hang-jiao, GUO Xiao-ling

(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Full-length cDNA sequence of 14-3-3 gene was isolated from the eyestalk of mud crab *Scylla paramamosain* through RT-PCR and RACE. Sequence analysis indicated that 14-3-3 gene had an open reading frame of 744 bp encoding 247aa of 28.086 ku and pI at 4.675. The amino acid sequences of 14-3-3 gene possessed 95%, 93%, 92% identity with the 14-3-3 genes of *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Megachile rotundata* respectively. 14-3-3 protein firstly clustered with 14-3-3 proteins of *Penaeus monodon* and *Fenneropenaeus merguensis* in the phylogenetic analysis. The expression of 14-3-3 gene in tissues was analyzed by Real-Time PCR, the result showed that 14-3-3 gene was most expressed in hepatopancreas and muscle, then in eyestalk, intestinal, heart and gill, the lest in stomach. After 24h's stress in salinity, the expression of 14-3-3 gene increased great significantly ( $P < 0.01$ ) whatever the salinity reduced (5) or raise (15, 20, 25, 30). The more the salinity changed, the more the 14-3-3 gene expressed. These results will serve further studies on functions and regulation mechanism of 14-3-3 genes.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; 14-3-3 gene; gene cloning; expression analysis

**Corresponding author:** SHU Miao-an. E-mail: shuma@zju.edu.cn