

文章编号: 1674-5566(2013)04-0496-06

## 拟穴青蟹 *14-3-3ζ* 基因 cDNA 的克隆和表达分析

王晓伟, 高洁, 张子平, 邹志华, 贾锡伟, 林鹏, 王艺磊

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 利用 SMART RACE 技术克隆得到拟穴青蟹 ERK 信号通路的酪氨酸 3-加单氧酶/色氨酸 5-加单氧酶激活蛋白  $\zeta$  (*14-3-3ζ* 蛋白) 基因。其 cDNA 全长 1 092 bp, 编码 248 个氨基酸。实时定量 PCR 结果显示 *14-3-3ζ* 基因在各组织器官均有表达, 但在卵巢中的表达量显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ ), 在卵黄发生中期 *14-3-3ζ* 的表达量显著高于增殖期 ( $P < 0.05$ ), 推测其在青蟹卵巢中发挥重要作用。

**研究亮点:** 目前尚未有 *14-3-3* 蛋白参与甲壳动物卵巢发育的相关研究。本文首次在拟穴青蟹中获得 *14-3-3ζ* 基因 cDNA 全长, 发现其在卵巢中的表达量最高, 且在卵黄发生中期的表达量显著高于增殖期, 推测 *14-3-3ζ* 蛋白可能参与青蟹卵巢发育过程信号途径的传导。

**关键词:** 拟穴青蟹; *14-3-3ζ* 基因; ERK 信号途径; 组织表达; 卵巢发育

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 是我国重要的养殖经济蟹类, 养殖的蟹苗来源主要是海水捕捞<sup>[1]</sup>。人工培育的亲蟹性腺发育、抱卵率、孵化率, 幼体的育成率和出苗率均不如野生的亲蟹。其生殖调控机理的研究受到越来越多的关注<sup>[2-4]</sup>。

*14-3-3* 蛋白是广泛分布在真核生物中的一类酸性可溶的调节蛋白家族。*14-3-3* 蛋白能与 Raf-1, PKC, Cdc25C, KSR 和跨膜蛋白受体等多种信号蛋白结合, 通过调节靶蛋白与其他结合蛋白之间或 2 个靶蛋白之间的相互作用, 增强或抑制靶蛋白的催化活性, 调节靶蛋白的核浆转运与亚细胞定位等, 从而发挥稳定相邻区构象、促进底物连接和产物形成的作用<sup>[5-6]</sup>。在细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 途径中, *14-3-3* 蛋白调节 KSR 和 Raf 与 ERK 和 Ras 的结合, 最终使 MEK 和 ERK 都定位于膜结合的 Raf 上, 促进 MEK 对 ERK 的磷酸化<sup>[7]</sup>。

*14-3-3* 蛋白在植物和哺乳动物中有广泛的研究, 在植物中 *14-3-3* 蛋白的表达具有组织、细胞

特异性, 且受一些逆境条件 (低温、低氧、高盐、病原菌侵染等) 诱导<sup>[8-9]</sup>。*14-3-3* 蛋白在许多领域发挥重要作用, 如细胞内信号转导<sup>[10]</sup>、环境应答、细胞凋亡、细胞周期调控等。目前尚未发现 *14-3-3* 蛋白在甲壳动物中参与性腺发育相关的功能研究, 本研究可为 *14-3-3* 蛋白参与拟穴青蟹卵巢发育调控的研究提供参考数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

拟穴青蟹购买于福建省漳州市漳浦前亭镇后蔡村。在测量青蟹体长度、宽度、体重和卵巢重之后, 分别取卵巢、鳃、肝胰腺、肌肉、心、胃、肠、眼柄, 并立即放入液氮冻存, 后转置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。用于 HE 染色的样品用 4% 多聚甲醛处理过夜, 后经梯度甲醇脱水, 最后在 100% 甲醇中  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。本研究依据 ISLAM 等<sup>[11]</sup> 对拟穴青蟹的分期将拟穴青蟹卵巢发育分为 5 个阶段, 分别为: 增殖期 (I 期), 卵黄生成前期 (II 期), 卵黄生成早期 (III 期), 卵黄生成中期

收稿日期: 2013-02-23 修回日期: 2013-04-20

基金项目: 国家自然科学基金 (31072200, 41006104); 集美大学创新团队基金 (2010A001)

作者简介: 王晓伟 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物功能基因组学。E-mail: xwwang1988@163.com

通信作者: 王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

(IV期)和卵黄生成晚期(V期)。每个组织或发育阶段各取 12 个样品用于定量实验。

## 1.2 方法

### 1.2.1 cDNA 全长克隆

本研究中使用的引物均由 Primer 5.0 根据

SMART II Oligonucleotide 的接头引物 (UPM 和 NUP) 和 EST 文库中获得的基因的部分 cDNA 序列设计得到,并由上海捷瑞生物工程有限公司合成。主要 RACE 引物和全长 cDNA 扩增引物见表 1。

表 1 实验中使用到的引物列表  
Tab.1 The list of primers used in this study

引物名称	引物用途	引物序列
5'GPS1	5'RACE	5'CGGGCACCCGACCACATTCCTG 3'
5'GPS2	5'RACE	5'TCCACCCCTGTTTCTGTGACCC 3'
head to toe_F	cDNA 全长验证	5'GATGGTGGCGCAACTAGCCT 3'
head to toe_R	cDNA 全长验证	5'CGCCAAGAGGCTGTGCTACTGAGAG 3'
RT_F	目的基因定量	5'-CGAGCGGCTCTACTGGATG-3'
RT_R	目的基因定量	5'-CCGTGCTAAAAGGGGTTGC-3'
18S_F	内参基因定量	5'-ATGATAGGGATTGGGCTTTGC-3'
18S_R	内参基因定量	5'-ACTAGCCACGGGCGCTGT-3'

### 1.2.2 RACE 技术获得基因 cDNA 全长

本研究使用实验室配制的 RDP 试剂裂解样品,分离提取 RNA。经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,使用分光光度计测定 RNA 的浓度。取 2 μg RNA 进行 5'的第一条链的逆转录,用于 RACE 技术克隆基因 cDNA 全长的模板。

根据 RACE 引物的退火温度进行巢式 PCR,琼脂糖凝胶电泳后割胶回收,将回收得到的 DNA 片段连接进入 pMD19-T 载体,然后转化进入大肠杆菌,将恢复生长后的菌液涂平板,挑选出单克隆菌落进行扩大培养用于测序。将测序结果用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 去除载体后与已知序列拼接,获得基因 cDNA 全长,而后设计并使用从头到趾引物(表 1)对拼接结果进行测序验证。

### 1.2.3 序列分析

本研究应用 NCBI 的 ORF finder 确定 *14-3-3ζ* 基因的开放阅读框,用 BLASTx 进行同源性比对及序列一致性分析;使用 Compute pI/Mw tool 预测等电点和分子量;用 NetNGlyc1.0 Server 预测糖基化位点(N-X-S/T);运用 NetPhos 2.0 Server 查找磷酸化位点;用 MEGA 5.0 软件中的邻接法构建系统进化树;使用 BioEdit 软件进行多重比较。

### 1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测各基因在各组织和卵巢发育阶段的表达

本研究所用的定量引物均通过 Primer Premier 5.0 软件设计,并由上海捷瑞生物工程有

限公司合成。荧光定量使用的引物见表 1。本研究所使用的定量样品来自 12 个不同的个体,每个个体单独进行提取 RNA 并取 3 μg RNA 进行逆转录。将得到的 12 个第一链 cDNA 分为 4 组,每组 3 个,并将每组的 3 个样品等体积混合,共得到 4 个样品作为每个组织或发育阶段的不同重复。根据 ABI 7500 系统分析得出各个样品的 RQ 值即  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,其中  $\Delta CT =$  各样品目的基因的 CT 值 - 内参基因 18S rRNA 的 CT 值,  $\Delta\Delta CT =$  每一个样品的  $\Delta CT$  值 - 基准样品的  $\Delta CT$  值,基因表达水平由 RQ 平均值  $\pm$  标准误差的平均值 (mean  $\pm$  mean of standard error, M  $\pm$  SEM) 来表示,使用 SPSS 20.0 和 Microsoft office 2010 进行统计分析和作图。显著性差异表示为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列分析

#### 2.1.1 序列特征

通过 RACE 技术获得的 *14-3-3ζ* 基因 cDNA 序列全长为 1 092 bp (GenBank 登录号 JQ218935, 命名为 *Sp-14-3-3ζ*)。该序列包括 91 bp 的 5' 非编码区 (untranslated region, UTR)、237 bp 的 3' UTR 和 747 bp (含终止密码子) 的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。 *Sp-14-3-3ζ* 基因 cDNA 可以编码 248 个氨基酸,编码的蛋白约 28.0 ku,等电点约为 4.78,预测的该蛋白三级结构有 9 个  $\alpha$  螺旋(图 1)形成 14-3-3 蛋白家族典型的 L 形结构(图 2)。多重比对分析显示,14-3-3ζ

蛋白序列的  $\alpha$  螺旋区域在物种间非常保守(图 3)。

```

1  CGCCAAGAGGGTGTGGTAGTGAGAGGGTCACTCTGCCCGGGA TATAC TTTATATTTGTG 60
61 TATATAGCACCTATTTTATAAAACGGACACAatgggagataaggaagaacaggtacagag 120
1  M G D K E E Q V Q R 10
121 ggccaagctcgc cgagcaggcagagagatacgaatgata tggccgccgc tatgaagcaggt 180
11  A K L A E Q A E R Y D D M A A A M K Q V 30
181 cacagaaacaggggtggagctttccaatgaggagcgaatctgttgtc tgtagcatacaa 240
31  T E T G V E L S N E E R N L L S V A Y K 50
241 gaatgtggctcgg tggccggagaagttcc tggcgagttatttcc tccatagaacagaagac 300
51  N V V G A R R S S W R V I S S I E Q K T 70
301 agaaggttcagaacgaaagcaacaaatggcaaggagtagacagagagaa ggttgaaacaga 360
71  E G S E R K Q Q M A K E Y R E K V E T E 90
361 gcttagggaaattg ccaggacgtttgggtctcctcgacaagttcct tatccccaaggc 420
91  L R E I C Q D V L G L L D K F L I P K A 110
421 ctcaaatcctgagtctaaggtcttctacctaagatgaaggcgactactataggtacct 480
111 S N P E S K V F Y L K M K G D Y Y R Y L 130
481 ggctgaggtggc cactggcgacgttcgagcgggtgtagtggatgactc ccagaagtccta 540
131 A E V A T G D V R A G V V D D S Q K S Y 150
541 ccaggaggtttcgata tgcgcaagcagagatgcagccaccatcc catcaggctggg 600
151 Q E A F D I A K A E M Q P T H P I R L G 170
601 cctggcactcaacttctcagttttcttcttaeagatcctcaac tggccgataagcagtg 660
171 L A L N F S V F F Y E I L N S P D K A C 190
661 ccagctagctaaacaggcattc gacgatgcaatcgcggagctggatac gctgaatgaaga 720
191 Q L A K Q A F D D A I A E L D T L N E D 210
721 ctgtagcaaaactctacgctcataatgcagctgttgcgagacaacct gacgctttggac 780
211 S Y K D S T L I M Q L L R D N L T L W T 230
781 gtagtgatagc aggggggaggggggaaatgctaaaggggggca ccaaaactgaTG 840
231 S G Y A G G R G E D A N E G G D Q N * 248
841 AACGCAACCCCTTTTAGCACGCGTCACTCGACCCTCTACTCCGAATGTACGTCATGAT 900
901 GCCTAAGGGTCGACCATTCCTCACAAAGTCACTCATCACACCGCCAGCGTGGCGACCTAGT 960
961 AGTCGAGGCTCGGGCTGGAGCTCCTCAGTGACGCTACTTCGCCACCATCCTGGTACTC 1020
1021 ATGGCGTCACCACCAACCGGTCACCCCAACGGCCCTCTCTGCTGCTCAGTAAACGAAAAA 1080
1081 AAAAAAAAAAAAA 1092

```

图 1 *Sp-14-3-3 $\zeta$*  基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Sp-14-3-3 $\zeta$*  gene

—表示 9 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha A$ - $\alpha I$ ); □表示 6 个 PKC(protein kinase C)磷酸化位点;■表示 2 个 cdc2 磷酸化位点; \* 表示终止密码子。

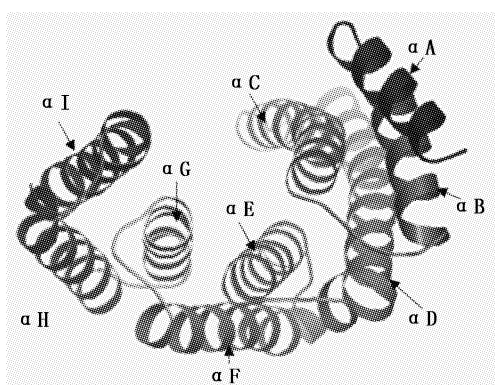


图 2 *Sp-14-3-3 $\zeta$*  蛋白的三级结构,呈“L”形  
Fig. 2 The “L” shape of predicted three-dimensional structure of *Sp-14-3-3 $\zeta$*

### 2.1.2 系统发育分析

采用 MEGA 5.0 软件,以邻位相连法构建系统进化树(图 4)。该进化树根据 GenBank 上已

注册的 *14-3-3 $\zeta$*  基因的氨基酸全长序列构建。进化树结果显示,拟穴青蟹与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)亲缘关系最近,与甲壳动物的斑节对虾(*Penaeus monodon*)和墨吉对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)聚为一小支,与节肢动物的遗传距离较近,而与鱼类及鱼类以上的高等动物的遗传距离相对较远。

### 2.2 *Sp-14-3-3 $\zeta$* 基因在各组织和卵巢发育过程中的表达

成熟期雌性拟穴青蟹各组织的实时荧光定量 PCR 结果显示 *Sp-14-3-3 $\zeta$*  基因在卵巢中的表达量显著高于其他各组织( $P < 0.05$ ),如图 5 所示,其中该基因在卵巢中的表达量是心脏的 8 倍,是肝胰腺的 12 倍,其他组织中该基因的表达量与心脏和肝胰腺没有显著差异。而在卵巢发育各时期的表达总体呈先增高后降低的趋势。I

期(增殖期)表达量最低,IV期(卵黄生成中期)表达量最高,两者存在显著性差异( $P < 0.05$ ,图6)。

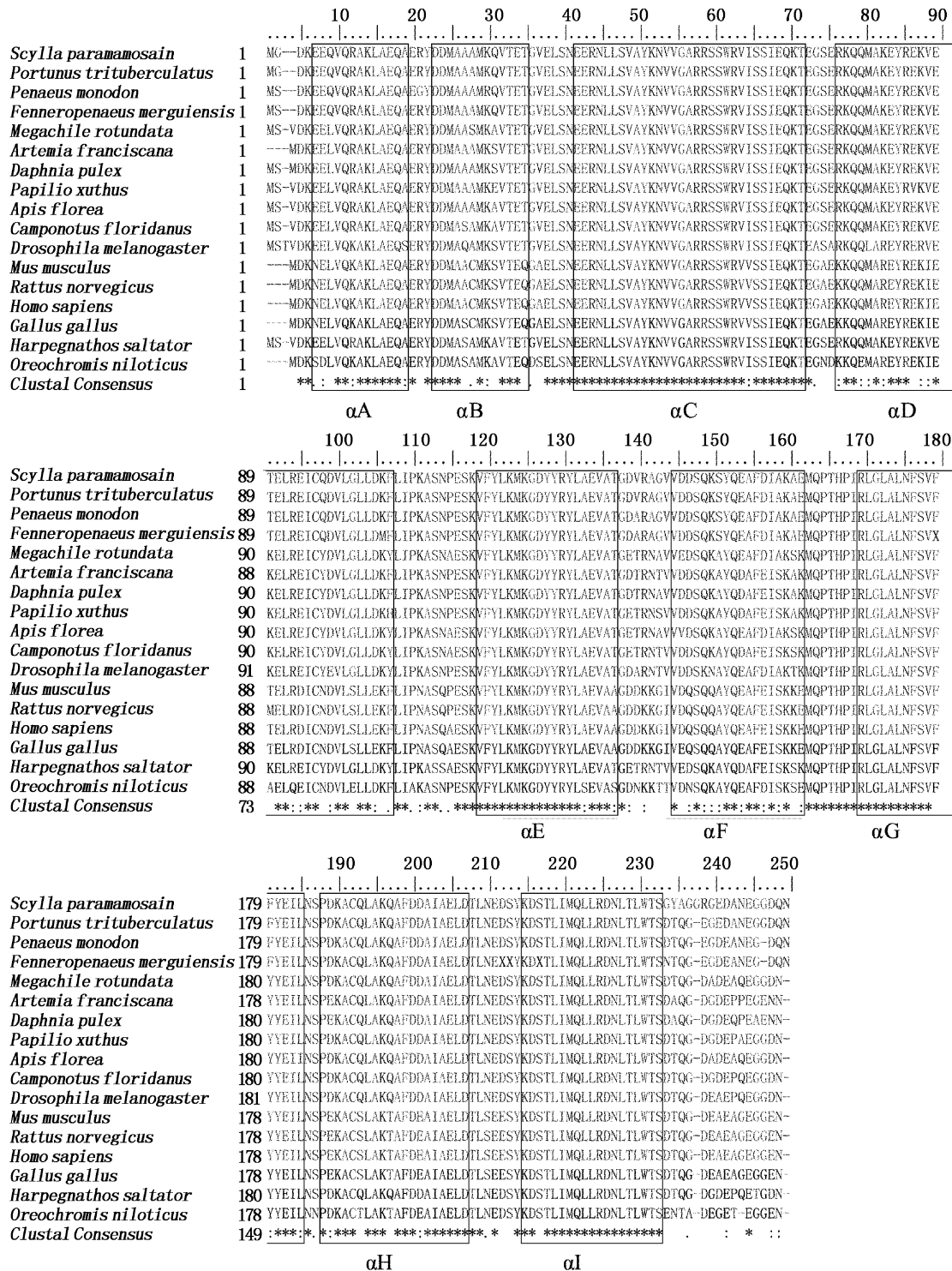


图 3 Sp-14-3-3ζ 和其他物种 14-3-3ζ 氨基酸序列的多重比较

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of among different 14-3-3ζ proteins

方框表示了 14-3-3ζ 9 个 α 螺旋的保守区域;相应的物种登录号如下:拟穴青蟹. AFD33362.1; 三疣梭子蟹. AFQ20813.1; 斑节对虾. AAY56092.1; 墨吉对虾. ADI87601.1; 切叶蜂. AEW70348.1; 丰年虾. ABX80390.1; 水蚤. EFX74245.1; 柑橘凤蝶. BAM17746.1; 小蜜蜂. AEW70339.1; 佛罗里达弓背蚁. AEW70330.1; 黑腹果蝇. NP\_724885.1; 小家鼠. NP\_035870.1; 褐家鼠. AAA80544.1; 人类. NP\_003397.1; 原鸡. NP\_001026514.1; 欧洲熊蜂. AEW70333.1; 印度跳蚁. AEW70352.1; 罗非鱼. XP\_003439057.1。

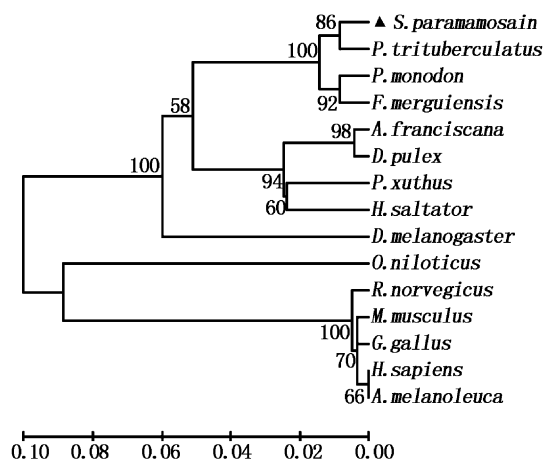


图4 拟穴青蟹和其他物种14-3-3ζ氨基酸系列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the 14-3-3ζ amino acid sequences between *S. paramamosain* and other species

▲表示的物种为拟穴青蟹。物种名见图3。

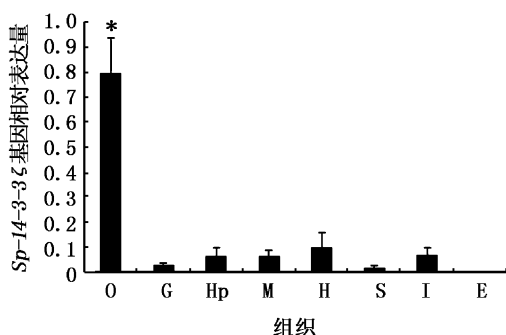


图5 *Sp-14-3-3ζ* 基因在成熟雌蟹各组织的表达

Fig. 5 The expression pattern of *Sp-14-3-3ζ* gene in various tissues of female *S. paramamosain*

O. 卵巢; G. 鳃; Hp. 肝胰腺; M. 肌肉; H. 心; S. 胃; I. 肠; E. 眼柄。柱上\*号表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

14-3-3 蛋白是信号转导过程的重要调控因子。在甲壳动物的三疣梭子蟹、斑节对虾和墨吉对虾等物种中已获得 14-3-3ζ 基因的全长。本研究基于拟穴青蟹转录组文库编码 14-3-3ζ 的 EST 序列,通过 RACE 技术克隆获得了拟穴青蟹 14-3-3ζ 基因 cDNA 全长,并命名为 *Sp-14-3-3ζ*。该序列不具有 N 端信号肽序列,可能在胞质中表达。其三维结构包含 N 端和 C 端 2 个结构域,其中 N 端结构域包含 4 个 α 螺旋(αA-αD),C 端结构域由 5 个 α 螺旋(αE-αI)组成,2 个结构域之间存在明显的凹陷区,为 14-3-3 靶蛋白结合区<sup>[7]</sup>。

14-3-3 是一个调节蛋白家族,能与 Raf-1、

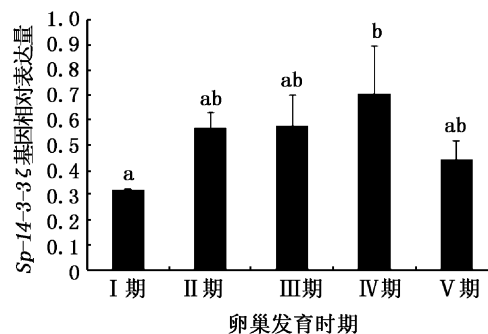


图6 *Sp-14-3-3ζ* 基因在卵巢不同发育阶段的表达谱

Fig. 6 The expression pattern of *Sp-14-3-3ζ* in ovarian development stages

柱上不同字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

PKC、Cdc25、KSR 等多种信号蛋白结合,在信号转导过程中发挥重要作用。14-3-3 与 PKC 结合后能促进 PKC 和 Raf 之间的相互作用,使得 MEK 和 ERK 定位于膜的 Raf 上,激活的 Raf 作用于 MEK,MEK 作用于 ERK,从而促进细胞增殖<sup>[7, 11-12]</sup>。Sp-14-3-3ζ 序列中有 6 个 PKC 磷酸化位点和 2 个 cdc2 磷酸化位点,推测其参与细胞分裂过程中 ERK 信号的传导,在拟穴青蟹的性腺发育过程中起重要作用。

多重序列比对结果显示,不同物种的 14-3-3ζ 蛋白的 9 个 α 螺旋区域高度保守,表明 14-3-3 蛋白在进化上高度保守。但在 C-末端和 N-末端同源性较差(图3),C-末端区域可与碱性簇相互作用发挥稳定 14-3-3ζ 结构的作用;N 末端参与二聚体的形成,14-3-3ζ 二聚体的形成是通过一个 14-3-3 单体的 αA 与对应的另一个 14-3-3 蛋白单体的 αC 和 αD 相互作用形成的<sup>[13]</sup>。

本研究的实时定量 PCR 结果显示 *Sp-14-3-3ζ* 基因在各组织器官均有表达,但在卵巢中的表达量显著高于其他组织,说明 14-3-3ζ 蛋白的表达有组织差异,且可能在卵巢中发挥重要作用。其在卵黄发生过程中表达量不断升高,在卵黄发生中期达到最大值,而后降低。14-3-3 蛋白是信号转导通路的重要分子,参与免疫、应激及细胞周期等多种生物学过程<sup>[7, 11, 13]</sup>。目前尚未有 14-3-3 蛋白参与卵巢发育的相关研究。而在卵巢的发育过程中,I 期~IV 期主要经历了卵原细胞活跃增殖期,卵母细胞形成并进行减数分裂,卵母细胞分裂旺盛,卵母细胞迅速增长和卵黄发生的旺盛期;而到了 V 期主要卵母细胞生长和卵黄发生

基本结束,这与 14-3-3 $\zeta$  基因在卵巢发育过程中的表达量变化基本相符,因此推测其参与卵巢发育过程信号途径的传导,特别是参与卵母细胞的增大和卵黄的发生。

目前,14-3-3 蛋白的功能在植物和哺乳动物中报道较多,在甲壳类动物中的研究较少,功能涉及细胞生长分化、细胞周期调控、参与信号转导、逆境胁迫的应答等。本研究克隆得到 *Sp-14-3-3 $\zeta$*  基因 cDNA 全长,并进行了生物信息学分析以及青蟹各组织和卵巢发育过程中的表达分析,为进一步研究拟穴青蟹 14-3-3 蛋白在卵巢发育过程中的生理功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李丹. 锯缘青蟹人工育苗技术的研究[D]. 厦门:集美大学,2009.
- [2] 管卫兵. 锯缘青蟹苗种生产技术及其产业化途径探讨[D]. 厦门:厦门大学,2003.
- [3] 乔振国,于忠利,陈凯. 锯缘青蟹苗种生产技术及其产业化途径探讨[J]. 水产科技情报,2003,30(1):10-12.
- [4] 乔振国. 锯缘青蟹苗种培育的科技进展[J]. 海洋渔业,2005,27(2):159-163.
- [5] VAN HEMERT M J, STEENSMA H Y, VAN HEUSDEN G P H. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis[J]. Bioessays, 2001, 23 (10): 936-946.
- [6] GARDINO A K, YAFFE M B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011, 22 688-695.
- [7] AITKEN A. 14-3-3 Proteins: a Historic Overview[J]. Seminars in Cancer Biology, 2006, 16:162-172.
- [8] DAUGHERTY C J, ROONEY M F, MILLER P W, et al. Molecular organization and tissue-specific expression of an arabidopsis 14-3-3 gene[J]. The Plant Cell, 1996, 8 (8): 1239-1248.
- [9] 陈铮,唐咏. 信号蛋白 14-3-3 分子结构及功能研究现状[J]. 安徽农业科学,2008,36(16):6655-6656.
- [10] FERL R J. 14-3-3 Proteins and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 1996, 47 (1): 49-73.
- [11] ISLAM M, KODAMA K, KUOROKORA H. Ovarian development of the mud crab *Scylla paramamosain* in a tropical mangrove swamps, Thailand [J]. Journal of Scientific Research, 2010, 2 (2): 380-389.
- [12] 杨雪琴,周清华. MAPK 通路支架蛋白 KSR 的研究进展[J]. 中国肺癌杂志,2008,11(4):587-590.
- [13] 潘伟男,陈锋,封芬,等. 14-3-3 蛋白的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2007,27(3):262-265.

## The full length cDNA cloning and expression of 14-3-3 $\zeta$ gene in green mud crab (*Scylla paramamosain*)

WANG Xiao-wei, GAO Jie, ZHANG Zi-ping, ZOU Zhi-hua, JIA Xi-wei, LIN Peng, WANG Yi-lei  
(Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China)

**Abstract:** Green mud crab, *Scylla paramamosain*, is an important commercial species in aquaculture. Therefore, more and more researches focus on its molecular mechanism of reproduction. ERK pathway is essential for the regulation of gonad development. The 14-3-3 was proved to be bonded to phosphorylated protein and involved in transmission of ERK pathway. The full length cDNA of tyrosine-3-monooxygenase/tryptophan-5-monooxygenase activator protein (14-3-3 $\zeta$ ) from green mud crab were obtained by SMART RACE in this study. The full length cDNA of 14-3-3 $\zeta$  gene is 1 092 bp encoding a polypeptide of 248 amino acids. The results of real time quantitative PCR revealed that 14-3-3 $\zeta$  gene was constitutively expressed in examined tissues, and its expression level in ovary was higher than that in the other tissues ( $P < 0.05$ ), while the expression level of 14-3-3 $\zeta$  gene in secondary vitellogenesis stage was higher than that in proliferation stage ( $P < 0.05$ ). Consequently, we may infer that 14-3-3 $\zeta$  plays a key role in ovarian development of the crab.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; 14-3-3 $\zeta$  gene; ERK pathway; tissue expression; ovarian development