

# 企鹅珍珠贝 *Creb2* 基因的克隆及表达分析

于非非, 余祥勇, 潘珍妮, 宋娜娜, 王梅芳

(广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088)

**摘要:** CREB(cAMP response element binding protein)是一种真核生物中广泛存在的调控因子。为了探讨企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*) *Creb* 基因的序列和表达特征, 为进一步阐述 *Creb* 的生理功能提供科学依据, 本研究利用 RACE-PCR 技术克隆到企鹅珍珠贝一个 *Creb* 基因的全长序列, 分析其理化性质和进化地位; 利用荧光定量 PCR 分析 *Creb* 基因在各组织中的表达特征。结果表明, 该企鹅珍珠贝 *Creb* 基因的 cDNA 全长为 1484 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 1071 bp, 编码 356 个氨基酸, 5'非编码区为 218 bp, 3'非编码区为 195 bp, C 端包含一个碱性亮氨酸拉链结构(basic region leucine zipper, bZIP)。预测其分子质量为 39.49 kD, 等电点为 4.43。序列比对显示该企鹅珍珠贝 *Creb* 基因与欧洲平牡蛎(*Ostrea edulis*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) 的 *Creb2* 同源性(identity)最高, 分别为 46.3%和 46.1%, 故命名为 *ppCreb2*; 系统进化树分析结果与传统形态学分类结果相吻合。荧光定量 PCR 分析显示, *ppCreb2* 在企鹅珍珠贝的各个组织中组成性表达, 其中在足中表达量最高, 鳃中其次。

**关键词:** 企鹅珍珠贝; *ppCreb2*; 基因克隆; 表达分析; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q341 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)05-0029-07

doi: 10.11759/hyxx20150824001

CREB (cAMP response element binding protein) 即环磷酸腺苷反应元件结合蛋白, 是真核生物中广泛存在的一种细胞核内调控因子, 通过自身磷酸化实现转录功能的调控<sup>[1]</sup>。CREB 家族蛋白的 C 端都包含大量碱性氨基酸和一个亮氨酸拉链, 被称为碱性亮氨酸拉链结构域 (basic region leucine zipper, bZIP)<sup>[2]</sup>, 这一结构域的 DNA 亲和力很高, 能以二聚体的形式与靶基因启动子中的 CRE(cAMP response element)位点结合, 调控下游多个基因的转录活性, 是 CREB 家族蛋白最保守的区域。作为一种重要的转录调控因子, CREB 家族蛋白参与了细胞的增殖<sup>[3]</sup>、分化<sup>[4]</sup>和凋亡<sup>[5]</sup>, 学习记忆<sup>[6]</sup>, 精子发生<sup>[7]</sup>和肤色决定<sup>[8]</sup>等多种复杂的生命活动。根据结构和功能的不同, CREB 家族被划分为 CREB1、CREB2、CREB3 和 CREB3L4(CREB3-like4)四个亚族。近年来, 已在节肢动物<sup>[9]</sup>、腔肠动物<sup>[10]</sup>、鱼类<sup>[11]</sup>、鸟类<sup>[12]</sup>和哺乳动物<sup>[7]</sup>等几十个物种中克隆到 *Creb* 基因, 但在双壳类中研究较少<sup>[13]</sup>。

企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*) 属于软体动物门(Mollusca), 瓣鳃纲(Lamellibranchia), 翼形亚纲(Pteromorpha), 珍珠贝目(Pterioidea), 珍珠贝科(Pteriidae)<sup>[14]</sup>。企鹅珍珠贝个体大、生长快、成活率高, 其突出特点是分泌珍珠质机能旺盛、珠层厚、色泽奇异, 是我国目前唯一能规模养殖的大型珍珠贝, 被认

为是最具有“振兴南珠”潜能的品种<sup>[15]</sup>。作为一种调控因子的 *Creb* 基因是否也存在于企鹅珍珠贝中, 是否参与了企鹅珍珠贝重要生命活动的调控是值得探索的问题。

本研究建立了企鹅珍珠贝全组织的转录组数据库, 利用 RACE-PCR 技术克隆到企鹅珍珠贝 *Creb2* 基因的 cDNA 全长序列, 构建系统进化树分析该基因的进化地位; 利用荧光定量 PCR 技术分析 *Creb2* 基因在企鹅珍珠贝各组织中的表达差异, 旨在为进一步阐述 *Creb2* 在企鹅珍珠贝各种生理过程中的作用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

实验所用企鹅珍珠贝采自广东省湛江市雷州市

收稿日期: 2015-08-22; 修回日期: 2015-10-20

基金项目: 广东海洋大学优秀青年骨干教师培养项目(20140040); 广东海洋大学博士启动基金(E15041); 广东省海洋渔业科技推广专项项目(A201308A11)

[Foundation: the Outstanding Young Teacher Foundation of Guangdong Ocean University, No.20140040; Doctoral research project of Guangdong Ocean University, No.E15041; the Technology Extension Foundation of Marine Fishery in Guangdong Province, No.A201308A11]

作者简介: 于非非(1980-), 女, 山东威海人, 讲师, 博士, 从事贝类分子遗传育种的研究, 电话: 0759-2383504, E-mail: yufeifei2000@163.com; 王梅芳, 通信作者, 教授, E-mail: pearlang@126.com

流沙湾养殖群体, 体重 300~350 g。

## 1.2 主要试剂

实验所用主要试剂包括 SMARTer® RACE 5'/3'Kit (Clontech)、UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo)、E.Z.N.A Gel Extraction Kit 试剂盒 (Omega)、SYBR Select Master Mix(Life technologies)、LA taq(Takara)、PMD18-T(Takara)、琼脂糖(Agarose) 等。DEPC、氨苄青霉素等其他试剂为国产分析纯, DH5 $\alpha$  感受态细胞购自全式金。

## 1.3 企鹅珍珠贝 *Creb* 全长 cDNA 的克隆

分别提取企鹅珍珠贝的外套膜、鳃、闭壳肌、消化盲囊、足、精巢、卵巢的 RNA, 将各组织 RNA 混合后应用 Illumina 测序技术进行转录组测序, 建立了企鹅珍珠贝全组织的转录组数据库, 并进行生物信息学分析。

利用企鹅珍珠贝各组织混合 RNA, 按照 SMARTer® RACE 5'/3'Kit 说明书合成企鹅珍珠贝 *Creb* 的 3'RACE 模板和 5'RACE 模板。根据企鹅珍珠贝转录组数据库中注释为 *Creb* 的 unigene 序列设计企鹅珍珠贝 *Creb* 基因 3'RACE 的特异性引物 Creb-3-F 和 5'RACE 的特异性引物 Creb-5-R (表 1), 3'RACE 和 5'RACE PCR 反应体系为 2 $\times$ SeqAmp Buffer 25  $\mu$ L, SeqAmp DNA Polymerase 1  $\mu$ L, 5'RACE 或 3'RACE cDNA 模板(100 ng/ $\mu$ L)2.5  $\mu$ L, 10 $\times$ UPM (Universal Primer Mix, 0.2  $\mu$ mol/L) 5  $\mu$ L (表 1), Creb-3-F 或 Creb-5-R(10 $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, PCR-Grade H<sub>2</sub>O 15.5  $\mu$ L。使用 touch-down PCR 程序扩增: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 25 个循环。PCR 产物经电泳分离、纯化, 与 RACE 试剂盒中的 Lineareized pRACE vector 连接, 转化进 DH5 $\alpha$  感受态细胞中培养过夜, 筛选阳性克隆进行测序。经测序后 3'RACE 序列和 5'RACE 序列进行拼接, 并利用 VecScreen 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 去除载体序列, 获得企鹅珍珠贝 *Creb* 基因的电子全长。

根据 *Creb* 基因的电子全长, 设计特异引物 Creb-cDNA-F 和 Creb-cDNA-R (表 1), 利用 LA taq 酶克隆 *Creb* 基因全长 cDNA。PCR 产物与 PMD18-T 载体连接、转化、培养, 筛选阳性克隆测序以验证电子全长序列的正确性。

## 1.4 目的基因的生物信息学分析

通过 ORF Finder 工具, 推导企鹅珍珠贝 *Creb* 基因编码的氨基酸序列; 通过 Expasy 网站 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 分析其相对分子质量和等电点; 经 ProtScale 软件分析氨基酸序列的疏水性; 经 SignalP 4.1、TMHMM 和 NetOGlyc 4.0 分别预测其信号肽、跨膜结构及糖基化位点; 经 SMART 对其进行结构预测和功能分析; 利用 Clustal X (1.8) 软件将获得的企鹅珍珠贝 *Creb* 基因与其他物种的 *Creb* 基因编码氨基酸进行同源比对, 用 MEGA6 软件构建系统进化树。

## 1.5 荧光定量 PCR 检测目的基因的组织表达

分别提取企鹅珍珠贝外套膜、鳃、闭壳肌、消化盲囊、足、精巢和卵巢的 RNA, 反转录合成第一链 cDNA, 进行荧光定量 PCR 检测。以  $\beta$ -actin 基因作为内参, 以企鹅珍珠贝的闭壳肌为对照, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>

表 1 企鹅珍珠贝 *Creb* 基因克隆及表达分析所用引物

Tab. 1 Primers used in cloning and expression analysis of *Creb* in *Pteria penguin*

引物	序列(5'→3')	用途
Creb-3-F	GATTACGCCAAGCTTACCTGGTCGCAAAACAACCGCTGTACC	3'RACE 基因特异引物
Creb-5-R	GATTACGCCAAGCTTGGTAGCAACTTCTTCGTTAAGACCCCT	5'RACE 基因特异引物
UPM	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'RACE 和 5'RACE 通用引物
Creb-cDNA-F	ACGATGCGGATATCACATATACCAC	cDNA 全长验证引物
Creb-cDNA-R	CTACAACCTTCCCTGGTATGATCC	cDNA 全长验证引物
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌落 PCR 检测
M13-R	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	菌落 PCR 检测
Creb-qPCR-F	ACCTGGTCGCAAAACAACC	荧光定量目的基因特异引物
Creb-qPCR-R	CAAACCTTCTGTAATCAAATCCTTCAT	荧光定量目的基因特异引物
$\beta$ -actin-F	GTGACTGGTCTTCAGGGGTT	荧光定量内参基因引物
$\beta$ -actin-R	GGGAAGTG GATGCGTGGGTAT	荧光定量内参基因引物

法计算 *Creb* 基因在不同组织中的表达水平, 每组设 3 个重复, 组间重复性和差异显著性用 SPSS16.0 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 企鹅珍珠贝 *Creb* 基因的克隆和序列分析

采用 5'RACE 技术获得了 1169 bp 的 *Creb* 5'序列, 采用 3'RACE 技术获得了 678 bp 的 *Creb* 3'序列, 拼接后获得 1484 bp 的 *Creb* 全长序列。利用 *Creb*-cDNA-F 和 *Creb*-cDNA-R 引物进行 PCR 验证, 获得 1328 bp 序列, 与我们拼接的 *Creb* 基因全长序列相吻合。企鹅珍珠贝 *Creb* 基因 cDNA 全长为 1484 bp, 其

中开放阅读框(ORF)为 1071 bp, 编码 356 个氨基酸, 5'非编码区为 218 bp, 3'非编码区为 195 bp, 包含 30 bp 的 polyA 尾巴, 如图 1 所示。登录号为 KT388104。

### 2.2 CREB 蛋白理化性质预测和分析

经 ExPASy 预测企鹅珍珠贝 CREB 蛋白分子质量为 39.49 kD, 等电点为 4.43。ProtScale 分析疏水性显示, 该蛋白的疏水指数从-3.678 至 2.2, 属于亲水性蛋白, 约在第 164 位表现出最强的疏水性, 第 298 位表现出较强的亲水性(图 2)。经 TMHMM 2.0 进行跨膜结构域预测, 显示没有跨膜区。SignalP4.1 预

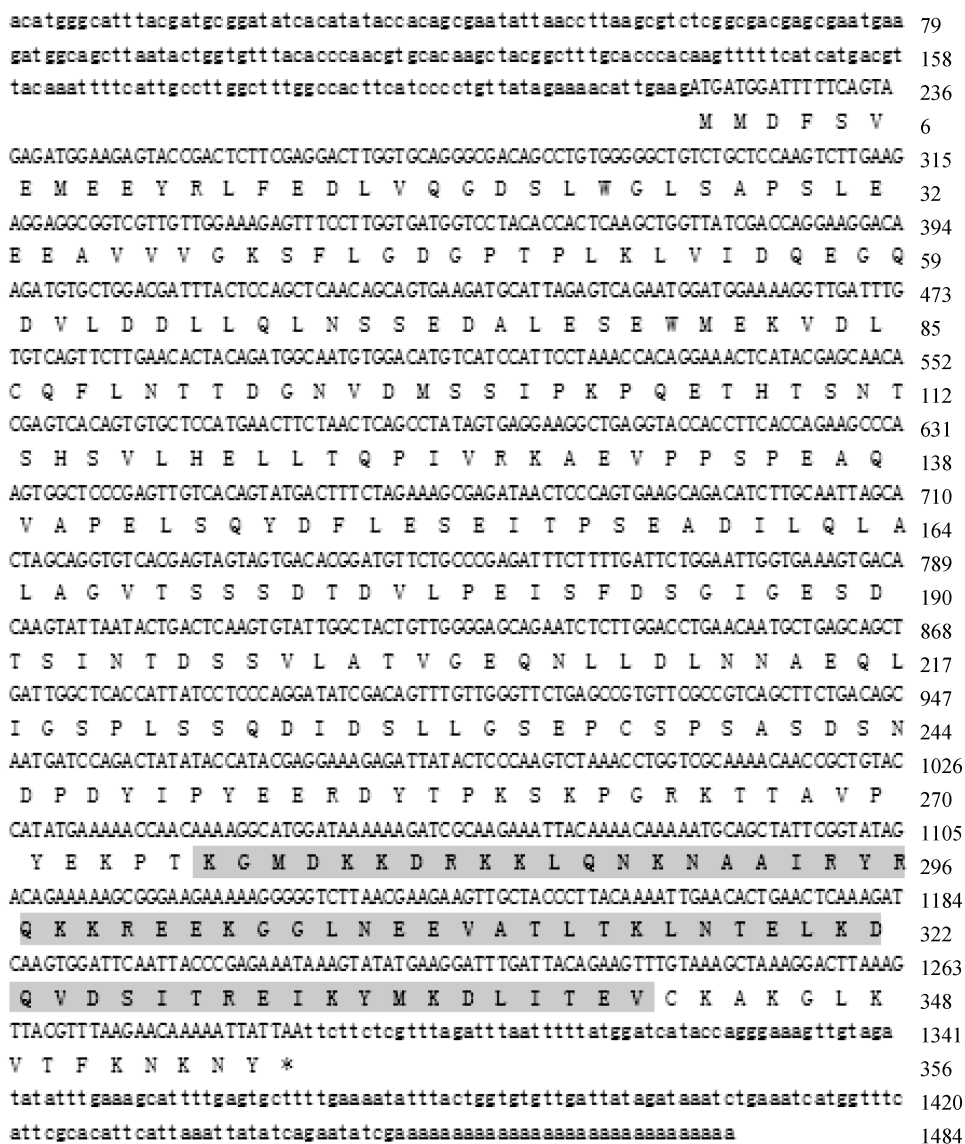


图 1 企鹅珍珠贝 *Creb* 基因序列分析

Fig. 1 *Creb* cDNA and deduced amino acid sequences of *Pteria penguin*

小写字母代表非编码序列(UTR); 大写字母代表开放阅读框(ORF), 灰色框代表碱性亮氨酸拉链结构域(276~341 bp)

5'UTR and 3'UTR regions are shown in small letters; open reading fragment is shown in capital letters; basic region leucine zipper (bZIP) is shown in gray box (276~341 bp)

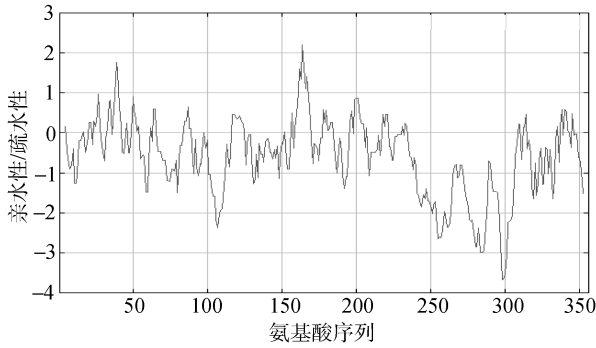


图 2 企鹅珍珠贝 CREB 蛋白的疏水性预测

Fig. 2 Hydrophobicity prediction of CREB in *Pteria penguin*  
 “+”代表疏水值，“-”代表亲水值  
 + hydrophobicity; - hydrophilicity

测其不存在信号肽,属于非分泌型蛋白。NetOGlyc4.0 分析发现其有 3 个糖基化位点,分别是第 22 位、第 26 位和第 108 位。SMART 软件分析发现,企鹅珍珠贝 CREB 蛋白的 N 端富含天冬氨酸(Asp, D)和谷氨酸(Glu, E)等酸性氨基酸, C 端富含赖氨酸(Lys, K)和精氨酸(Arg, R)等碱性氨基酸,包含一个典型的碱性亮氨酸拉链结构域(basic region leucine zipper, bZIP)(图 1 和图 3)。

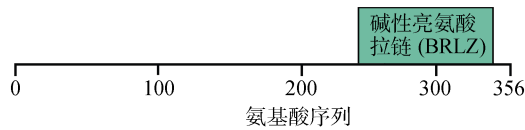


图 3 企鹅珍珠贝 CREB 蛋白质结构预测

Fig. 3 Prediction of CREB structure in *Pteria penguin*

<i>C. ariakensis</i>	MDMDVLEMDQFPFEDLAMLDDGSGLSPEYEDG...VGKYFPGNDPAP.KLVIDQ.....	51
<i>O. edulis</i>	MDMDVLEMEQFPFEDLAMLDDGSSISLEYEDN...AGKYFPGHDSAP.KLVIDQ.....	51
<i>P. penguin</i>	MMDFSVEMEEYRPFEDLVQGDSLWGLSAPSLEEEAVVVGKSLFDGPTPLKLVIDQ.....	56
<i>H. sapiens</i>	MTEMSFLSSEVVLVGDLMSPFDPSGLGAESLGLLDDYLEVAKHFKPHGFSSDKAKAGSS.....	59
<i>M. musculus</i>	MTEMSFLNSSEVLAGDLMSPFDQSGLGAESLGLLDDYLEVAKHLKPHGFSSD...KAGSS.....	57
<i>A. mexicanus</i>	MSLTSQMCMEVDGALLGPSTLMADPPFLLDEDEERALSEGSSPLSFSSYSESYTSSPFSPFAPLGGCKVGSDDLPL	80
<i>C. ariakensis</i>	....AGKEVLDDLLRLSQ.NDPLD.LDWMET.GSLEQFLVGMG....ADRINTPDTQQVLQATEPIVVIKDNTNVNHSV	118
<i>O. edulis</i>	....AGKEVLDDLLRLSQ.DDPLD.LDWMES.GSLEQFLVGMG....ADQDNMPATQEVVTVSDSIVVMKDTNVNHSV	118
<i>P. penguin</i>	....EGQVDLDDLLQLNSESDEALE.SBWMK.VDLCCQLNTTDPGN...VDMSSIPKPKQETHTS.....NTSHSV	116
<i>H. sapiens</i>	.EWLAVD.GLVSPS...NNSKEDAFSGTDWMLEKMDLKEFDLALLG...IDDLETMPDLDLTLDDTCDLFAPLVQETNK	132
<i>M. musculus</i>	.EWPAMDGLASAS...DTGKEDAFSGTDWMLEKMDLKEFDLALLG...MDDLETMPDELLTLDDTCDLFAPLVQETNK	131
<i>A. mexicanus</i>	LPWLSAGEQIDAHVRAQKEGDAFSGMDVMTEKIDLSDFDLDSLIGSCDLDEPPSSPEELLASLESQMDLAPLFPSS	160
<i>C. ariakensis</i>	LHDLTQPTTIKQSPTVKVSPPEVVSHELSQFDLMDDGV...LASLSVIASS.SNDENEVPAEISFDSGY..MDSSLD	191
<i>O. edulis</i>	LHDLTQPTTIKQSPPVKVSPKPVVDFDLSQIDLEDNIQ...LDSLQCFIASP.SGDVLEVPSEISFDS...NSSL	189
<i>P. penguin</i>	LHELLTQPIVRK...AEVPPSPEAQVAPELSQYDFLESEITPSEADILQALAGVTSSSDTDVLPSEISFDSGIGESDTSIN	194
<i>H. sapiens</i>	QPPQTVNPIGHLPESLTKPDQVAPFT.FLQPLPLSPGVLSSSTPDHFSLELGESEVDITEGDRKPDYATYAVM...IPQCI	208
<i>M. musculus</i>	EPPQTVNPIGHLPESLTKVDQVAPFT.FLQPPFCSPGVLSSSTPEHFSLELGESEVDISEGDRKPDYATYAVM...IPPCV	207
<i>A. mexicanus</i>	SPSDPE.ELGLPPLSLDPLPEQADPEVRPEPIPIEIKSEPLSFAFTLELGESEVDISELEKVVSKTSSDQ...TPSIV	236
<i>C. ariakensis</i>	TSSSS....KPDLLDVSSVDNLISSPFAEEIDSLLSGSEPSFSSQSDGNDPDYSPYRSDSEEVKSKSRITGGKQKSKK	266
<i>O. edulis</i>	KSTS....QDGLLDVGNVDQLVTS.LSAEEVESLLSGSEPSFSSRSDGTDPPFSPEQSDDEFTLKSCGGGKQKGRK	262
<i>P. penguin</i>	TDSSVLATVGEQNLDDLNNAEQLIGSPLSSQIDLSLL.GSEPCSE.SASDSNDPDYIPYE..ERDYTPKSKPG...RK	265
<i>H. sapiens</i>	KEED.....TPSDNDSGICMSPESYLGSPPHSPSTRGSPNRSPLSPGVL...CGSARPKPY...DPPGEMVAAK	272
<i>M. musculus</i>	KEED.....TPSDNDSGICMSPESYLGSPPHSPSTRAPDNLSPGGG...RGSARPKPY...DPPG.VSLTAK	270
<i>A. mexicanus</i>	LSSLSP....AHIVVVLAPKEEVSVMPSACADQSDSGIESVSGSEPHNPSPAPSPKPVGTSKTKPKYKPKDPEAGTVVGR	311

### 2.3 CREB 氨基酸序列同源性分析

采用 Clustal X 软件将企鹅珍珠贝的 *Creb* 基因与其他物种的 *Creb* 基因编码氨基酸进行多序列比对,结果显示,该基因与欧洲平牡蛎(*Ostrea edulis*, ADG85255.1)和近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*, BQ59345.1)的 *Creb2* 基因同源性(identity)最高,分别为 46.3%和 46.1%;与人(*Homo sapiens*, AAA52071.1)、小鼠(*Mus musculus*, NP\_033846.2)和墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*, XP\_007231405.1)的 *Creb2* 基因同源性其次,分别为 26.3%、25.7%和 24.6%。其中,保守位点主要集中在碱性亮氨酸拉链结构域(图 4)。因此将该企鹅珍珠贝 *Creb* 基因命名为 *ppCreb2*。

分别选取近江牡蛎、欧洲平牡蛎、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*, ACZ51334.1)creb、静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*, BAC21159.1)、海兔(*Aplysia californica*, NP\_001191630.1)和墨西哥脂鲤等物种的 *Creb2* 基因编码的氨基酸进行聚类分析,如图 5 Neighbor-joining(NJ)树所示:企鹅珍珠贝、太平洋牡蛎和欧洲平牡蛎都属于软体动物瓣鳃纲,其 *Creb2* 编码氨基酸聚为一个小的进化分支;光滑双脐螺、静水椎实螺和海兔属于软体动物腹足纲,聚为一个小的进化分支;以上所有的软体动物聚为一个大的进化分支,而墨西哥脂鲤这一外群物种单独列为一个进化分支。*CREB2* 聚类结果与传统的进化分类学相吻合,印证了双壳类瓣鳃纲和腹足纲动物的亲缘关系。

<i>C. ariakensis</i>	RRSGPYN. . TSTGDRKDRKRDQNKNAATIRYRNKKRBEAEILKQBEDKLAEKNEKLNKVSQLSREINVMKDLISEVCKAK	344
<i>O. edulis</i>	RRSGPYN. . TKPADRKDRKRDQNKNAATIRYRNKKRBEAEHRABEEEKLSRKNKDLHDKVDQLNREIKYMKDLISEVCKAK	340
<i>P. penguin</i>	TTAVPYEKPPTKGMDDKDRKKLQNKNAATIRYRQKKRBEKGGLENEVATITKLNTELDKQVDSITREIKYMKDLITVEVCKAK	345
<i>H. sapiens</i>	VKGEK. . . . . LDKKLLKMEQNKTAATRYRQKKRBEQEAITGECKELEKKNKNEALKERADSLAKEIQYLKDLIEVVKAR	345
<i>M. musculus</i>	VKTEK. . . . . LDKKLLKMEQNKTAATRYRQKKRBEQEAITGECKELEKKNKNEALKERADSLAKEIQYLKDLIEVVKAR	343
<i>A. mexicanus</i>	VKTVTGK. . . . . SVDKLLKMEQNKTAATRYRQKKRBEQESLNEECTELEKRNREISEKADSSISREIQYLKDLIEVRSKAK	387
<i>C. ariakensis</i>	GLKVTFKNKS	354
<i>O. edulis</i>	GLKVTFKTKS	350
<i>P. penguin</i>	GLKVTFKNKN	355
<i>H. sapiens</i>	GKKRVP	351
<i>M. musculus</i>	GKKRVP	349
<i>A. mexicanus</i>	NRKNTKADS	397

图 4 企鹅珍珠贝与其他物种 *Creb2* 基因编码氨基酸比对  
 Fig. 4 Amino acid alignment of *Creb2* in *Pteria penguin* and other homologues  
 相同的氨基酸以涂黑表示

The amino acids showing 100% identity are marked with black box

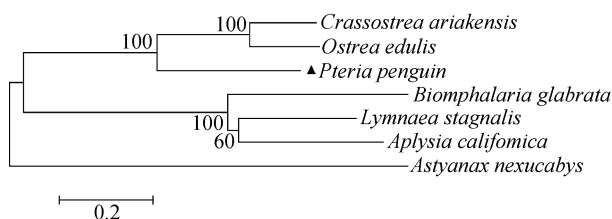


图 5 企鹅珍珠贝与其他物种 *Creb2* 氨基酸序列的系统进化树(NJ)

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Creb2* from *Pteria penguin* and other homologues

### 2.4 *Creb2* 基因的组织定量分析

采用荧光定量 PCR 分析 *Creb2* 基因在企鹅珍珠贝各个组织中的表达水平, 结果显示(图 6), 从 RNA 水平看, *ppCreb2* 基因在企鹅珍珠贝各个组织中都有表达, 但表达量有所差异。在足中表达量最高, 其次是鳃, 在外套膜、闭壳肌、精巢和卵巢中的表达量较低。

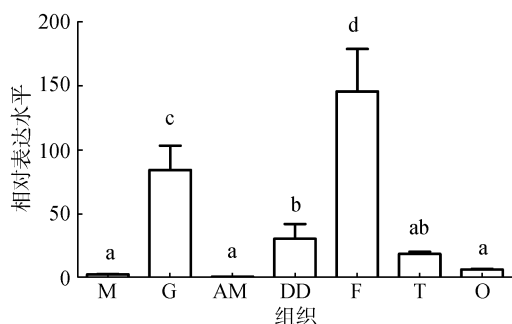


图 6 *ppCreb* 基因在企鹅珍珠贝各组织的表达水平

Fig. 6 Expression of *ppCreb* in different tissues of *Pteria penguin*

M: 外套膜; G: 鳃; AM: 闭壳肌; DD: 消化盲囊; F: 足; T: 精巢; O: 卵巢

M: mantle; G: gill; AM: adductor muscle; DD: digestive diverticulum; F: foot; T: testis; O: ovary

### 3 讨论

1986 年, Montrminy 等<sup>[1]</sup>发现许多基因都受 cAMP 的调控, 这些基因的共同特点是启动子和增强子序列中含有一段高度保守的 5'-TGACGTCA-3' 序列, 并命名为 cAMP 反应元件(cAMP response element, CRE)。随后, 他们又分离纯化到一种特异性结合 CRE 的核蛋白, 命名为 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein)即 CREB 蛋白<sup>[16]</sup>。CREB 蛋白家族主要包括 CREB1、CREB2、CREB3 和 CREB3L4 四个成员。CREB2(cyclic AMP response element binding protein 2), 也称 ATF4(activating transcription factor 4), 是内质网应激通路中的信号转导蛋白, 由 PERK/eIF2 $\alpha$ 通路中磷酸化的 eIF2 $\alpha$ 激活<sup>[17]</sup>。

本研究从企鹅珍珠贝 cDNA 文库中克隆了 *Creb* 基因全长序列。同源性分析显示, 企鹅珍珠贝 *Creb* 基因与欧洲平牡蛎 *Creb2* 基因具有最高的同源性, 为 46.3%。结构分析发现, 企鹅珍珠贝 *Creb* 基因编码氨基酸分为 N 端和 C 端两个结构域, 其 N 端富含酸性氨基酸, 为酸性激活区域; C 端为保守的碱性亮氨酸结构域。不含 KID 区(激酶诱导结构域), 为非跨膜蛋白, 这些特点与大多数动物经典的 CREB2 蛋白结构相似<sup>[18-19]</sup>。其中 N 端主要行使转录激活功能, C 端主要行使 DNA 结合和蛋白二聚体化的功能。因此, 我们将该企鹅珍珠贝 *Creb* 基因鉴定为 *ppCreb2*。这说明 *Creb2* 基因在各个物种中是相对保守的, 也暗示了 *ppCreb2* 基因在贝类的生命活动中起到重要作用。

作为一种重要的转录因子, CREB2 参与了多种生命过程。对海兔和果蝇的研究发现, CREB2 可抑制记忆贮存和突出可塑性, 是一种记忆抑制基因<sup>[20-21]</sup>。CREB2 参与了小鼠造骨细胞早期分化和末期分化,

对维持造骨细胞的分化和功能至关重要, CREB2 缺陷小鼠出现小眼症状表型<sup>[4]</sup>。CREB2 也可参与内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress), 调节内质网内稳态体系<sup>[22]</sup>。还可与多种病毒蛋白相互作用, 调节与之结合的病毒蛋白的表达水平<sup>[23]</sup>。

与 CREB2 广泛的生理功能相一致的, *Creb2* 在各个组织中普遍表达。对猪的研究发现, *Creb2* 在白色脂肪组织、胃、肾脏、小脑、肝脏和淋巴组织中表达量较高, 在心脏和肌肉中表达量较低<sup>[24]</sup>。我们的研究发现, *ppCreb2* 基因在企鹅珍珠贝足中表达量最高, 这可能与 *Creb2* 在神经系统中大量表达相一致<sup>[20]</sup>。作为进化地位比较低的软体动物, 其神经系统主要由 4 对神经节和与之联络的神经构成, 其中重要的一对神经节足神经节 1 就位于足的前部<sup>[25]</sup>。另外, *ppCreb2* 基因在鳃中表达量也很高。贝类通过鳃直接与水环境接触, 营呼吸功能, 接触大量病毒和细菌, 在鳃中大量表达印证了 CREB2 蛋白可与多种病毒蛋白相互作用这一功能。因此, 我们推测 CREB2 在企鹅珍珠贝多种生命活动中起到重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Montminy M R, Sevarino K A, Wagner J A, et al. Identification of a cyclic-AMP responsive element within the rat somatostatin gene[J]. Proceedings of the Natural Academic of Science of the United States of America, 1986, 83(18): 6682- 6686.
- [2] Shanware N P, Zhan L, Hutchinson J A, et al. Conserved and distinct modes of CREB/ATF transcription factor regulation by PP2A/B56 gamma and genotoxic stress[J]. Plos One, 2010, 5(8): e12173.
- [3] Garcia, G E, Nicole A, Bhasharan S, et al. Akt and CREB-mediated prostate cancer cell proliferation inhibition by Nexrutine, a Phellodendron amurense extract[J]. Neoplasia, 2006, 8(6): 523-533.
- [4] Yang X, Karsenty G. ATR4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(45): 47109-47114.
- [5] Persengiev S P, Devireddy L R, Green M R. Inhibition of apoptosis by ATFx: a novel role for a member of the ATF/CREB family of mammalian bZIP transcription factors[J]. Genes & Development, 2002, 16(14): 1806-1814.
- [6] Kida S, Serita T. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory[J]. Brain Research Bulletin, 2014, 105: 17-24.
- [7] Gomez M, Manzano A, Figueras A, et al. Sertoli-secreted FGF-2 induces PFKFB4 isozyme expression in mouse spermatogenic cells by activation of the MEK/ERK/CREB pathway[J]. American journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2012, 303(6): E695-707.
- [8] Wan P, Hu Y Q, Li H. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2011, 354(1-2): 241-246.
- [9] Lijima K, Zhao L, Shenton C, et al. Regulation of energy stores and feeding by neuronal and peripheral CREB activity in Drosophila[J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8498.
- [10] Kaloulis K, Chera S, Hassel M, et al. Reactivation of developmental programs: the cAMP-response element-binding protein pathway is involved in hydra head regeneration [J]. Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America, 2004, 101(8): 2363-2368.
- [11] Rajan K E, Thangaleela S, Balasundaram C. Spatial learning associated with stimulus response in goldfish *Carassius auratus*: relationship to activation of CREB signalling[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(3): 685-694.
- [12] Guo F, Zhang Y, Su L, et al. Breed-dependent transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase, cytosolic form, expression in the liver of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2013, 92(10): 2737-2744.
- [13] Zhang S M, Coultas K A. Identification and characterization of five transcription factors that are associated with evolutionarily conserved immune signaling pathways in the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* [J]. Molecular Immunology, 2011, 48(15-16): 1868-1881.
- [14] 蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 209-210.
- [15] 毛勇, 梁飞龙, 余祥勇, 等. 企鹅珍珠贝游离珠插核效果的初步观察[J]. 海洋科学, 2003, 27(11): 1-4.
- [16] Mao Yong, Liang Feilong, Yu Xiangyong, et al. Preliminary observations on implantation efficiency of cultured round pearls with pearl oyster, *Pteria (Magnavícula) penguin* roding[J]. Marine Sciences, 2003, 27(11): 1-4.
- [17] Montminy M R, Bilezikjan L M. Binding of a nuclear protein to the cyclic c-AMP response element of the somatostatin gene[J]. Nature, 1987, 328(6126): 175-178.

- [17] Ameri K, Harris A L. Activating transcription factor 4[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(1): 14-21.
- [18] Qi M, Lei T, Zhou L, et al. Cloning, characterization, chromosomal mapping and tissue transcription analysis of porcine CREB2 and CREB3 genes[J]. *Folia Biologica*, 2009, 55(4): 137-144.
- [19] Endo M, Su L, Nielsen T O. Activating transcription factor 2 in mesenchymal tumors[J]. *Human Pathology*, 2014, 45(2): 276-284.
- [20] Mohamed, H A, Yao W, Fioravante D, et al. cAMP-response elements in *Aplysia creb1*, *creb2*, and *Ap-uch* promoters: implications for feedback long term memory[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(29): 27035-27043.
- [21] Dubnau J, Tully T. Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory[J]. *Annual review of Neuroscience*, 1998, 21: 407-444.
- [22] Lu P D, Harding H P, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2004, 167(1): 27-33.
- [23] Lim C, Sohn H, Gwack Y, et al. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) binds ATF4/CREB2 and inhibits its transcriptional activation activity[J]. *The Journal of General Virology*, 2000, 81(pt11): 2645-2652.
- [24] 祁艳梅. 猪 CREB 家族基因的克隆及表达研究的初步探讨[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.  
Qi Yanmei. Cloning and preliminary research of porcine CREBs family[D]. Wuhan: HuaZhong Agricultural University, 2009.
- [25] 李霞. 水产动物组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 82-83.  
Li Xia. Aquatic Animal Embryology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 82-83.

## Molecular cloning and expression analysis of *Creb2* gene from *Pteria penguin*

YU Fei-fei, YU Xiang-yong, PAN Zhen-ni, SONG Na-na, WANG Mei-fang  
(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Received:** Aug. 22, 2015

**Key words:** *Pteria penguin*; *ppCreb2*; Gene cloning; expression analysis; real-time PCR

**Abstract:** In this study, in order to analyze the sequence and expression characteristics of the cAMP response element binding protein (*Creb*) gene in the *Pteria penguin*, we characterized the full-length cDNA of the *Creb* gene from the *Pteria penguin* by the rapid amplification of cDNA ends (RACE)-polymerase chain reaction (PCR). We then used real-time PCR to examine the expression of *Creb* in different tissues. The results show that the full-length cDNA of *Creb* was 1484 bp, including a 5'UTR of 218 bp, a 3'UTR of 195 bp, and an open-reading frame of 1071 bp, which encodes a deduced protein of 356 amino acids. The C-terminal region contained a conserved basic region leucin zipper (bZIP). The predicted molecular weight was 39.49 kD, and the isoelectric point was 4.43. The sequence comparison showed that *Creb* in the *Pteria penguin* (*ppCreb2*) shares 46.3% and 46.1% sequence identities with *Creb2* in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*, respectively. The phylogenetic analysis results were consistent with traditional taxonomic analysis. The real-time PCR showed that *ppCreb2* was constitutively expressed in all studied tissues (mantle, gill, adductor muscle, digestive diverticulum, foot, testis, and ovary), with higher levels in the foot and gill.

(本文编辑: 康亦兼)