

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)延伸因子 EF-2 基因全长 cDNA 克隆及表达^{*}

郭子好 杨志刚 刘志伟 纪连元 阙有清 杨筱珍 成永旭

(上海海洋大学水产与生命学院 农业部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306)

提要 采用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了中华绒螯蟹延伸因子 EF-2 全长 cDNA, 序列分析表明 EF-2 全长 2752bp, 编码 846 个氨基酸。经 BLASTX 分析表明, EF-2 核苷酸序列与镶边拟蠹蟹 EF-2 序列的同源性最高, 其相似性为 88%; 所编码的氨基酸序列与甲壳动物 EF-2 的氨基酸序列相似性都在 90%以上。聚类分析显示, 中华绒螯蟹 EF-2 的氨基酸序列与镶边拟蠹蟹 EF-2 聚为一支, 并与其它甲壳动物聚为一体。荧光定量 PCR 结果显示, EF-2 在正常成熟中华绒螯蟹肌肉中表达量最高, 精巢、肝胰腺中有少量表达, 心脏、卵巢、胃、肠、鳃中有微量表达。检测了不同发育状态的幼蟹、早熟蟹和正常成熟蟹 EF-2 在肝胰腺、鳃以及肌肉中的相对表达情况; 同时也检测了在不同 pH 处理下幼蟹 EF-2 在肝胰腺和鳃中随时间变化的相对表达情况, 结果显示 pH 胁迫对幼蟹 EF-2 表达有一定的诱导效果。

关键词 中华绒螯蟹, EF-2, 基因, 克隆, 表达
中图分类号 Q 785

蛋白质是有机生命体不可缺少的物质, 在机体生长、组织代谢与修复等过程中起着非常重要的作用。蛋白质常以酶、蛋白因子、转运蛋白、抗体、激素、电解质等形式参与机体的各种功能, 由于机体缺乏储存蛋白质的场所, 因此自身蛋白质的合成变得尤为重要(Liu *et al*, 2002)。在真核生物体中, 蛋白质的合成包括转录和翻译两个阶段, 传统的翻译过程又分为三个阶段: 起始、延伸和终止, 分别由起始因子、延伸因子和释放因子控制(Andersen *et al*, 2003)。

延伸因子(elongation factor, EF)是参与蛋白合成过程中肽链延伸的蛋白因子, 在所有多细胞生物体的新陈代谢过程中发挥着非常重要的作用, 包括延伸因子 EF-1 和延伸因子 EF-2 (Proud, 1994; Nilsson *et al*, 2005; Wang *et al*, 2011)。EF-1 由 α 、 β 、 γ 和 δ 四个亚基组成, 是一种在细胞内普遍存在且大量表达的多聚核糖体蛋白质, 在基因表达和翻译过程中

起重要作用(Andersen *et al*, 2003)。EF-2 是真核生物蛋白质合成时肽链延伸过程中必不可少的蛋白因子(Weissbach *et al*, 1976), 它能催化 GTP 水解使肽酰-tRNA 从核糖体的氨酰基位点(aminoacyl site, A-site)移到肽基位点(peptidyl site, P-site), 从而使核糖体沿着 mRNA 运动完成转录过程(Kohno *et al*, 1986); EF-2 同时也是一个 GTP 结合蛋白, 能与 GTP 和核糖体一起形成三元复合物(Kohno *et al*, 1986)。有研究表明, 在蛋白质延伸过程中 EF-2 参与两个主要机制的调节作用: 第一, 可逆磷酸化作用可对 EF-2 的表达进行调控(Nairn *et al*, 1987; Redpath *et al*, 1993); 第二, ADP-核糖基化作用可对翻译后的蛋白质进行修饰, 并抑制 EF-2 的活性(Fendrick *et al*, 1992)。

机体细胞的生长及蛋白质的合成需要 EF-2 基因在细胞内正常表达。EF-2 通过不断改变其在细胞内

^{*} 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目, “主要养殖甲壳类良种培育”, 2012AA100809 号; 上海市教育委员会科研创新项目, 11YZ151 号。郭子好, E-mail: guozihao1124@163.com

通讯作者: 成永旭, 教授, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

收稿日期: 2012-03-29, 收修改稿日期: 2012-05-24

的表达量, 调节总蛋白质的合成(Eun *et al.*, 2007), 同时, 在不同机制作用下, EF-2 的活性和表达量也会发生改变(Malave *et al.*, 2004)。有研究表明在甲壳动物养殖生产中, 水体环境中的应激因素(如 pH、重金属等)可以引起广泛的细胞损伤, 包括 DNA 损伤、脂质过氧化作用以及蛋白质氧化等(Figueiredo-Pereira *et al.*, 1997), 最终导致 EF-2 的表达量发生变化。本试验首次克隆了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)延伸因子 EF-2 基因并比较该基因在中华绒螯蟹早熟蟹、正常成熟蟹和幼蟹部分组织中的相对表达含量, 同时研究了在不同 pH 处理下 EF-2 基因在幼蟹部分组织中的相对表达变化, 旨在了解中华绒螯蟹延伸因子 EF-2 基因的结构、功能以及该基因在不同发育状态不同 pH 处理时的相对表达变化, 为今后进一步研究中华绒螯蟹 EF-2 的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)由上海崇明水产技术推广站提供。随机取 3 只正常成熟蟹的肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、精巢以及卵巢组织, 同时随机各取 3 只早熟蟹和幼蟹的肝胰腺、鳃和肌肉组织, 迅速放入液氮中速冻后置于 -80°C 冰箱中冻存用以总 RNA 的提取。另取健康幼蟹 150 只, 体重 $(10\pm 1)\text{g}$, 饲养于 $120\text{cm}\times 60\text{cm}\times 50\text{cm}$ 的玻璃缸中(每缸 50 只幼蟹), pH 8.0, 水温 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 循环水暂养一周。

1.2 pH 试验

将暂养的幼蟹分为 3 组, 用 3 种不同水平 pH (5.5, 8.0, 10.5)处理幼蟹, 每种梯度设 2 个平行。对照组 pH 为 8.0, 处理组 pH 分别为 5.5 和 10.5。处理蟹养殖于 $60\text{cm}\times 25\text{cm}\times 35\text{cm}$ 的水族箱中, 每个水族箱放 25 只蟹, 使用创星 Atman 加热棒维持水温在 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 各 pH 用 1.0mol/L 的 HCl 溶液、1.0mol/L 的 NaOH 溶液、1.0mol/L 的 Na_2CO_3 溶液和 1.0mol/L 的 NaHCO_3 溶液调节, 使用 pH 330i(WTW, Germany)pH 计对实验过程中的各组 pH 进行全程监测, 分别于处理后 0、3、6、12、18、24h 从各水族箱中随机挑选 3 只蟹, 取其肝胰腺和鳃组织, 迅速放入液氮中速冻后置于 -80°C 冰箱中冻存用以总 RNA 的提取。pH 选择参考一般养蟹水体的 pH 以及有关文献(于敏等, 2008; 赵晓红等, 2001)。

1.3 总 RNA 的提取与反转录反应

取冻存的中华绒螯蟹各组织参照 RNAisoTM Plus

(TaKaRa)操作说明书进行总 RNA 的提取, 提取好的总 RNA 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测完整度、微量紫外分光光度计(Q5000)检测纯度后用于荧光定量 PCR 反应。

以 1 μg 中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA, 用于 RT-PCR 的扩增; 利用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成 cDNA 第一链, 用作基因 3' 和 5' 端序列快速扩增的模板; 其余 RNA 置于 -80°C 冰箱中保存。

1.4 引物设计和 PCR 扩增反应

根据 GenBank 中镶边拟螯蟹(*Libinia emarginata*)EF-2 基因(GenBank 登录号: AY305506.1)保守区序列设计上下游引物 EF2-F1/EF2-R1, 引物由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。以中华绒螯蟹肝胰腺的 cDNA 为模板, EF2-F1/EF2-R1 为引物进行 EF-2 基因 cDNA 片段的扩增。PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL , dNTP Mixture (2.5mmol/L) 4 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL , rTaq 酶 (5U/ μL) 0.25 μL , 加灭菌超纯水至总体积 25 μL 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 30 个循环; 72°C 延伸 10min, 4°C 保存。取 PCR 扩增产物 3 μL 在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果后, 按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Tiagen)操作说明纯化回收 PCR 特异性扩增产物, 并连接至 pMD-19T 载体(TaKaRa), 重组质粒转化至大肠杆菌 Top 10 (Tiagen), 阳性克隆经菌液 PCR 初步鉴定后由生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序。

1.5 EF-2 cDNA 的克隆

根据已获得的 EF-2 基因片段设计 3'RACE 上游引物 EF-3R、5'RACE 下游引物 EF-5R(表 1), 以 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 分别用 3'RACE 和 5'RACE 引物与 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物(UPM)配对, 并按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 EF-2 基因 3' 和 5' 端序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆和测序与 EF-2 基因片段的克隆所述相同。

1.6 序列的拼接与生物信息学分析

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。利用 ORF (open reading frame) finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找开放阅读框; 用 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/)

nih.gov/Blast.cgi)、ClustalW 及 DNAMAN 等软件进行序列的验证、翻译及蛋白质相似性分析;使用 Compute pI-Mw 软件(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行蛋白质等电点和相对分子质量的计算;使用 ExPASy PROSITE 软件(<http://prosite.expasy.org/>)进行蛋白质功能结构域分析;使用 MEGA 4.0 软件进行 NJ 系统进化树的构建。

1.7 EF-2 基因的组织表达分析

将已提取的正常成熟中华绒螯蟹各组织总 RNA 以 500ng 的量进行反转录,以同样的体系和条件对 β -actin 进行各组织 PCR 反应,PCR 产物经电泳查看各条带亮度均一致且较清晰,另外,在中华绒螯蟹瘦素受体(Jiang *et al.*, 2010)、脂肪酸结合蛋白(Li *et al.*, 2011)、脂多糖葡聚糖结合蛋白(Zhao *et al.*, 2009)等研究中均以 β -actin 为内参基因,并证实过 β -actin 在不同发育状态中华绒螯蟹各组织间表达稳定,因此本试验选择 β -actin 为内参基因,并根据 GenBank 中的中华绒螯蟹 β -actin 基因全长序列(GenBank 登录号: HM053699.1)设计一对引物 β -actin-F/ β -actin-R (表 1)。以正常成熟中华绒螯蟹肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、精巢、卵巢等 8 个组织的 cDNA 为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对用于定量 PCR 反应的特异性引物 EF2-F2/EF2-R2 (表 1), β -actin 为内参基因,对中华绒螯蟹各组织中 EF-2 基因 mRNA 的表达水平进行检测。利用 CFX96 序列检测系统(Bio-Rad, USA)进行荧光定量 PCR 反应,反应体系为 20 μ l: 10 μ l SYBR Premix Ex TaqTM (2 $\times$); 0.4 μ l PCR Forward Primer (10 μ mol/L); 0.4 μ l PCR Reverse Primer (10 μ mol/L); 2.0 μ l cDNA 模板; 7.2 μ l ddH₂O。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 40 个循环;在 65 $^{\circ}$ C 进行荧光信号采集,反应结束后对扩增产物进行溶解

曲线分析,以确保特异性扩增。样品和内参分别设 3 个重复, β -actin 为内参。荧光定量 PCR 数据分析采用相对 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 EF-2 基因全长 cDNA 序列分析

以中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为模板扩增获得的 cDNA 序列全长 2752bp,其中包括 89bp 的 5'非编码区(5' UTR), 122bp 的 3'非编码区(3' UTR), 开放阅读框(ORF)长 2541bp, 编码 846 个氨基酸(图 1)。序列编码的蛋白理论等电点为 6.25, 分子量为 94.31kDa。序列分析表明,该基因编码的氨基酸序列具有 5 个保守的 GTP 结合结构域, 2 个 GTP-EFTU 保守结构域, 1 个 EFG-IV 保守结构域, 1 个 GTP 酶效应结构域。5 个保守的 GTP 结合结构域分别位于氨基端的第 21—34、65—73、105—115、121—132 和 157—166 位; 2 个 GTP-EFTU 保守结构域分别位于氨基酸序列的第 17—295 和 395—472 位; 保守的 EFG-IV 结构域位于氨基酸序列的第 606—723 位; 保守的 GTP 酶效应结构域位于氨基酸序列的第 57—73 位(图 1)。同时该氨基酸序列还具有 1 个 ADP-核糖基化结构域和 4 个保守的 N-糖基化位点。ADP-核糖基化结构域位于氨基酸序列的第 695—714 位; 4 个保守的 N-糖基化位点分别位于氨基酸序列的第 3—6 (NFTV)、21—24 (NMSV)、257—260 (NKKT)、777—780 (NESF)位。经 BLASTN、BLASTX 以及多序列比对表明,此 EF-2 cDNA 核苷酸序列与镶边拟蠹蟹 EF-2 核苷酸序列的同源性最高,其相似性为 88%;氨基酸序列与美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、家蚕(*Bombyx mori*)以及埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)等 EF-2 氨基酸序列具有高度的相似性,且具有 EF-2 氨基酸序列典型的保守区域,确定此序列即为中华绒螯蟹 EF-2 序列。

2.2 同源性分析以及蛋白系统进化树的构建

将中华绒螯蟹 EF-2 全长氨基酸序列与镶边拟蠹蟹、美洲螯龙虾、凡纳滨对虾、斑节对虾、家蚕、甜菜叶蛾(*Spodoptera exigua*)、埃及伊蚊、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、牛(*Bos taurus*)、小家鼠(*Mus musculus*)以及人(*Homo sapiens*)的 EF-2 氨基酸进行对比,各序列之间具有较高的同源性,其相似性

表 1 核苷酸引物序列
Tab.1 Oligonucleotide primer sequence

引物	序列(5'—3')	用途
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
EF2-F1	GCCTTTGGCCGTGTCTTCT	RT-PCR
EF2-R1	TCAGTCTTCTTCGGTGGGA	RT-PCR
EF2-3R	AGACGGGCACCATCACCACAAGCAAG	3' RACE
EF2-5R	TGGGCAGGTCAGATGGGTTCTTGGGT	5' RACE
EF2-F2	TCCTTGCTTGTTGGTGATGG	Real-Time PCR
EF2-R2	GATGGGTCGCTTTGTTGAG	Real-Time PCR
β -actin-F	ACCTCGGTTCTATTTTGTCGG	Real-Time PCR
β -actin-R	ATGCTTTCGCACTAGTTCGTC	Real-Time PCR

1 ACTCCCGCCAGTCGGTCTCTTCGGCGTCTCCAGCATACGCCGCCACTGTGCTGTTAC
 61 TGTGTACCTTTACCACCAACATCCAAGATGGAAGTTCACAGTGAAGAGATCCGGG
 1 MVNFTEEIRE
 121 AGTTGATGGACAAGAAGAACAATCCGGAATATGTCCGTGATTGCCCATGTGACCATG
 12 LMDKKKNIRNM SVIAHV D H G
 181 GCAAGTCAACTCTGACCGACTCACTCGTGTCTAAAGCGGTATCATTGCCTCTCCCGGG
 32 KSTLTDSLVS KAGIIASSRA
 241 CAGGCGAGACCCGCTTTACAGACACCAGAAAAGATGAACAAGCGTTGCATTACCATCA
 52 GETRF T D T R K D E Q E R C I T I K
 301 AGTCAACTGCCATTTCATGTACTTCAAGCTAGGTGACGAAAACGTAGAACTGATTACCC
 72 S T A I S M Y F K L G D E N V E L I T H
 361 ACCCTGACCAGAGGAAAAGGGCGAGACTGGTTTCTCATCAACCTGATTGACTCCCCGG
 92 PDQREKGETGF L I N L I D S P G
 421 GCCAGTTGACTTCTCTCTGAGGTGACTGCCGCCCTGCGTGTCTGATGGAGCCCTGG
 112 H V D F S S E V T A A L R V T D G A L V
 481 TGGTGGTGGACTGCGTCTCAGGTGTGTGTGTCAGACGAGACTGTGCTGCCAGGCTA
 132 V V D C V S G V C V Q T E T V L R Q A I
 541 TTGCTAGCGCATCAAGCCAGTACTGTTTCATGAACAAGATGGACCGCGCTCTGCTCGAGC
 152 A E R I K P V L F M N K M D R A L L E L
 601 TTCAGCTAGAACAGGAGAGCTCTACCAACCTTCCAACGTATTGTAGAGAATGTAATG
 172 Q L E Q E E L Y Q T F Q R I V E N V N V

图1 中华绒螯蟹 EF-2 cDNA 核苷酸部分序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Part cDNA nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. sinensis* EF-2

注: 单下划线代表保守的 GTP 结合结构域; 阴影表示 GTP 酶效应结构域; 方框内的表示起始密码子

分别为 97%、96%、93%、93%、81%、81%、80%、80%、80%、77%、76%、75%、75%、75%和 75%。利用 MEGA 4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)将上述相关氨基酸序列构建系统进化树, 结果显示中华绒螯蟹 EF-2 的氨基酸与镶边拟蠹蟹 EF-2 聚为一支, 表明其亲缘关系最近(图 2)。

2.3 中华绒螯蟹 EF-2 基因的表达

设定中华绒螯蟹 EF-2 在卵巢中的表达量为 1, 根据 EF-2 在各个组织中的相对表达量作柱形图(图 3)。从图中可以看出, EF-2 在成熟中华绒螯蟹肌肉中表达量最高, 与其它组织的表达量均呈显著差异($P<0.05$); 精巢、肝胰腺中有少量表达, 但显著高于其它组织($P<0.05$); 心脏、卵巢、胃、肠、鳃中有微量表达。

取早熟蟹和幼蟹在正常成熟蟹中表达差异较典型的 3 个组织肌肉、肝胰腺和鳃, 利用荧光定量 PCR 方法检测 EF-2 mRNA 在这些组织中的相对表达情况。定量 PCR 结果显示 EF-2 在不同发育状态中华绒

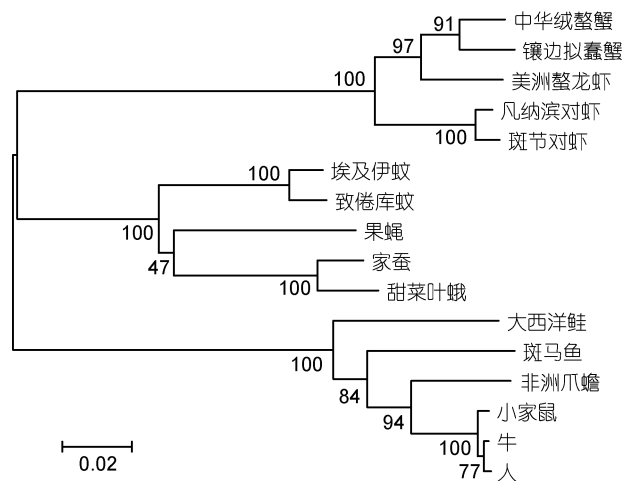


图2 利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 EF-2 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.2 NJ phylogenetic tree based on EF-2 amino acid sequences using MEGA 4.0

GenBank 登录号: 中华绒螯蟹 JQ693684; 镶边拟蠹蟹 AAR01298.1; 美洲螯龙虾 ACS36538.1; 凡纳滨对虾 ADO51769.1; 斑节对虾 ABR01223.1; 家蚕 NP_001163865.1; 甜菜叶蛾 AAL83698.1; 埃及伊蚊 AAL85605.1; 果蝇 NP_525105.2; 致倦库蚊 XP_001842801.1; 斑马鱼 XP_697966.4; 大西洋鲑 ACN58590.1; 非洲爪蟾 NP_001080656.1; 牛 NP_001068589.1; 小家鼠 NP_031933.1; 人 NP_001952.1

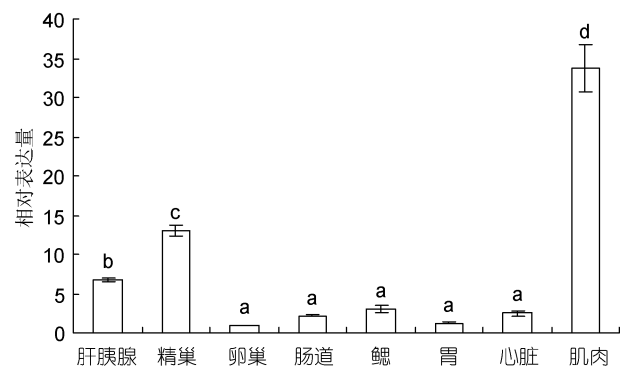


图3 中华绒螯蟹 EF-2 在各组织中的相对表达情况

Fig.3 The relative expression of *E. sinensis* EF-2 gene in different tissues

注: 数据表示为平均数±标准差($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

螯蟹肌肉组织中的表达量均显著高于肝胰腺和鳃组织($P<0.05$), 且 3 个不同发育状态蟹肌肉中的表达量也呈显著性差异($P<0.05$), 早熟蟹肌肉中 EF-2 表达量最高, 成熟蟹肌肉中次之, 幼蟹肌肉中最低; 不同发育状态蟹 EF-2 在肝胰腺和鳃组织中的表达没有显著差异($P>0.05$) (图 4)。

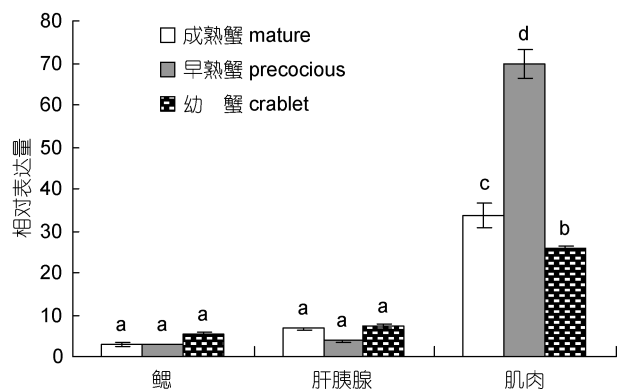


图4 EF-2 在不同发育状态蟹的 3 个组织中的相对表达情况
Fig.4 The relative expression of EF-2 gene in three tissues from different stage crabs

注: 数据表示为平均数±标准差($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

在 pH 处理幼蟹试验中, pH 5.5 组 EF-2 基因在肝胰腺和鳃中较对照组(pH 为 8.0)相比均呈现先增加后降低再增加的表达趋势, 且在处理 3h 和 24h 后显著高于其它组($P<0.05$)。pH 10.5 组 EF-2 基因在肝胰腺和鳃中较对照组相比则呈现先降低后增加并持续稳定的表达趋势。不同的是, 肝胰腺中 EF-2 表达量在处理 12h 后降到最低, 18h 后达到最高随后持续稳定表达, 而鳃中 EF-2 表达量在处理 3h 后降到最低, 12h 后达到最高并持续稳定表达(图 5、图 6)。

3 讨论

中华绒螯蟹是我国重要的养殖经济蟹类, 在我国水产业中占据十分重要的地位(陆剑锋等, 2010; 赵艳民等, 2011)。本试验利用物种基因同源性技术和

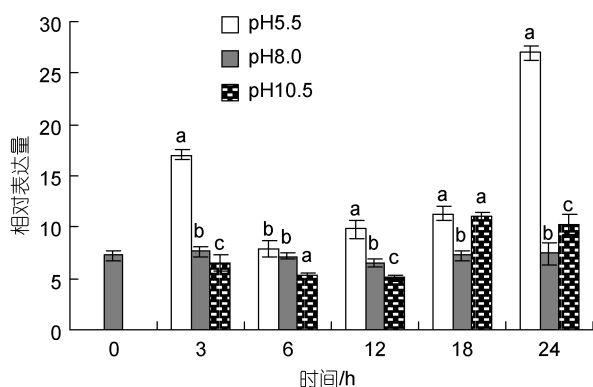


图5 不同 pH 水平处理幼蟹后肝胰腺中 EF-2 表达情况
Fig.5 Expression of EF-2 gene in crablet hepatopancreas after different pH treatments

注: 数据表示为平均数±标准差($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

RACE 技术克隆了延伸因子 EF-2 基因, 该基因序列全长 2752bp (GenBank 登录号: JQ693684), 包括一个长 2541bp 的开放阅读框(ORF), 编码一个分子量为 94.31kDa, 具有 846 个氨基酸的多肽。在 3'非编码区(3'UTR)具有一个唯一的加尾信号(AATAAA)以及 Poly-A 尾, 且加尾信号距离 Poly-A 尾 14bp 处。

EF-2 蛋白的主要结构在进化过程中非常保守, 经 BLASTN、BLASTX 以及多序列比对表明推导的 EF-2 氨基酸序列与其它已知的无脊椎动物和脊椎动物的 EF-2 氨基酸序列有 75%—97%的同源性。

EF-2 基因推导的氨基酸序列中 GTP-EFTU 结构域, 在无脊椎动物和脊椎动物中都非常保守, 这是 GTP 依赖性蛋白的典型结构, 它能够绑定非启动 tRNA 到核糖体上(Qiu *et al*, 2008); EFG-IV 保守结构域在结构转变过程中起着非常重要的作用。天冬酰胺-赖氨酸-其它-天冬氨酸(氨基酸残基第 162—165 位)保守结构在 GTP 和 GDP 绑定方面发挥非常重要的作用, 并通过 X-射线晶体学数据证明此作用的存在(Cour *et al*, 1985; Viarengo *et al*, 1990), 在中华绒螯蟹 EF-2 氨基酸序列中此保守结构的氨基酸残基为天冬酰胺-赖氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸。EF-2 氨基酸序列中的 ADP-核糖基化结构可调节 EF-2 蛋白的活性, 在大部分的脊椎动物和无脊椎动物中都非常保守。在哺乳动物细胞内, 内源性的 ADP-核糖基化活性可以作为灭活 EF-2 蛋白的监管机制(Qiu *et al*, 2008)。在 ADP-核糖基化结构中, 组氨酸(氨基酸残基第 701 位)和甘氨酸(氨基酸残基第 703 位)在脊椎动物和无脊椎动物中都是高度保守的。在氨基末端的 GTP 结合结

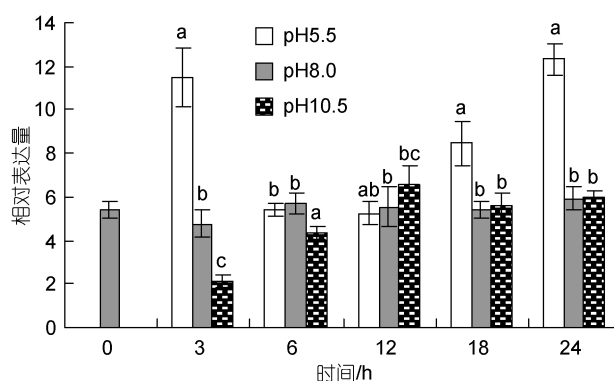


图6 不同 pH 水平处理幼蟹后鳃中 EF-2 表达情况
Fig.6 Expression of EF-2 gene in crablet gill after different pH treatments

注: 数据表示为平均数±标准差($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

构域中,也存在着一个保守的苏氨酸(氨基酸残基第57位),由于这个唯一特异位点的存在,EF-2可以被依赖 Ca^{2+} 的EF-2激酶所磷酸化(Kim *et al.*, 1993)。

本试验检测了EF-2 mRNA在中华绒螯蟹不同组织中的表达情况,结果显示该基因在肌肉中的表达量最高,在精巢和肝胰腺中的表达次之。肌肉组织中不断有大量的蛋白进行合成和修复,EF-2又是蛋白合成过程中必不可少的蛋白因子,这可能是EF-2基因在肌肉中表达较高的原因。在甲壳动物中,肝胰腺是摄入物质消化吸收和储存的主要器官,同时也是重金属解毒的主要器官(Viarengo *et al.*, 1990),肝胰腺中进行着许多反应,包括初级代谢和动态应激反应,在这些反应中,蛋白质的动态合成起着非常重要的作用,这是EF-2基因在肝胰腺中表达的原因之一。基因的表达受时空和环境的调控, Jiang等(2010)首次研究了瘦素受体(leptin receptor)在正常成熟蟹、早熟蟹和幼蟹3个不同发育状态的组织表达情况。结果显示瘦素受体在正常成熟蟹肝胰腺表达量最高,在幼蟹表达量最低,在早熟蟹表达量居中;而在小肠,幼蟹瘦素受体表达量最高。分析其原因,瘦素受体可能在蟹消化道营养物质吸收过程中发挥重要作用,对于幼蟹,这种作用主要表现在小肠,而对于正常成熟蟹,肝胰腺中的作用最为显著。本试验研究了EF-2 mRNA在正常成熟蟹、早熟蟹、幼蟹肝胰腺、鳃和肌肉组织中的表达量。结果显示EF-2 mRNA在3个不同发育状态蟹肝胰腺和鳃组织的表达量较低,且差异均不显著,说明EF-2基因在这两个组织中表达较为恒定且作用有限。然而EF-2 mRNA在这3个不同发育状态蟹的肌肉组织中表达量均显著高于在肝胰腺和鳃组织中表达量($P<0.05$),说明EF-2基因在肌肉组织蛋白质合成和修复中起着很重要的作用。

机体细胞适应环境压力的能力是它们生存的关键,生物体在进化过程中使其对环境和生理压力具有一定的应答能力(Wang *et al.*, 2011),然而许多应答的共同特点是选择性调节基因的转录和翻译,包括允许可逆基因的快速表达(Holcik *et al.*, 2005; Rattan, 1996)。目前有研究表明环境压力可诱导EF-2基因的表达,从而调节蛋白质合成以应对环境条件的变化(Ayala *et al.*, 1996; Sans *et al.*, 2004)。Wang等(2011)研究了凡纳滨对虾在受到不同pH处理后随着时间的延长EF-2基因在肝胰腺中的相对表达量,结果显示EF-2基因在酸性条件处理下随着时间的延长呈现先增加后降低再增加的表达趋势;在碱性条件处理下,

结果同样是呈现先增加后降低再增加的表达趋势。本试验研究了幼蟹在不同pH处理下EF-2基因在肝胰腺和鳃中的相对表达量,结果显示在酸性条件处理下EF-2基因在肝胰腺和鳃中的相对表达情况与Wang等(2011)的研究结果相一致,说明酸性条件可诱导EF-2基因表达量发生变化,且在不同甲壳动物中的变化趋势相类似。但在碱性条件下EF-2基因在幼蟹肝胰腺和鳃中的表达量随着时间的延长呈现先降低后增加并持续稳定的表达趋势,这与Wang等(2011)的研究结果不同,可能是由于氧化损伤,使得肝胰腺和鳃起始的抗氧化能力降低,并随着时间的延长,抗氧化能力逐渐恢复,合成蛋白的能力逐渐增强,从而导致EF-2基因呈现先降低后增加并持续稳定的表达趋势,但具体原因尚不清楚,还需进一步验证。通过不同pH处理幼蟹后EF-2基因在肝胰腺和鳃中表达量发生变化,可能是幼蟹肝胰腺和鳃组织受到环境变化的胁迫,随后合成大量蛋白用于对环境变化的适应,从而导致EF-2基因的表达量变化。

综上所述,EF-2基因在肌肉组织蛋白质合成和修复中起着很重要的作用。水体中的氧化因子pH能诱导EF-2基因的表达进而参与应激反应,但在环境条件变化下EF-2基因的具体功能和作用机制还需进一步研究。

参 考 文 献

- 于 敏,王顺昌,卢 韞,2008. 中华绒螯蟹在不同pH下氮氮排泄和血淋巴含氮成分的变化. 水生生物学报, 32(1): 62—67
- 陆剑锋,常国亮,成永旭等,2010. 两组不同饲料对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵巢发育及卵黄发生的激素调控. 海洋与湖沼, 41(4): 505—512
- 赵艳民,王新华,秦延文等,2011. 水体 Hg^{2+} 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血淋巴抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响. 海洋与湖沼, 42(3): 436—442
- 赵晓红,金送笛,2001. 低温、降盐度及pH对中华绒螯蟹幼体变态的影响. 大连水产学院学报, 16(4): 249—256
- Andersen G R, Nissen P, Nyborg J, 2003. Elongation factors in protein biosynthesis. Trends in Biochemical Sciences, 28(8): 434—441
- Ayala A, Parrado J, Bougria M *et al.*, 1996. Effect of oxidative stress, produced by cumene hydroperoxide, on the various steps of protein synthesis. Modifications of elongation factor-2. Journal of Biological Chemistry, 271(38): 23105—23110
- Cour T F, Nyborg J, Thirup S *et al.*, 1985. Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. The EMBO

- Journal, 4(9): 2385—2388
- Eun J L, Kim C W, 2007. Functional characterization of the promoter region of the chicken elongation factor-2 gene. *Gene*, 386(1): 183—190
- Fendrick J L, Iglewski W J, Moehring J M *et al*, 1992. Characterization of the endogeneous ADP-ribosylation of mutant and wild-type elongation factor 2 in eukaryotic cells. *European Journal of Biochemistry*, 205(1): 25—31
- Figueiredo-Pereira M E, Yakushin S, Cohen G, 1997. Accumulation of ubiquitinated proteins in mouse neuronal cells induced by oxidative stress. *Molecular Biology Reports*, 24(1): 35—38
- Holcik M, Sonenberg N, 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4): 318—327
- Jiang H, Ren F, Sun J L *et al*, 2010. Molecular Cloning and Gene Expression Analysis of the Leptin Receptor in the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*. *Plos One*, 5(6): 1—9
- Kim C W, Jung E J, Kim Y W *et al*, 1993. Molecular cloning of chicken elongation factor 2 (EF-2): sequence comparison with mammalian EF-2 and its expression in the early development stages of the embryos. *Molecules and Cells*, 3(1): 27—33
- Kohn K, Uchida T, Ohkubo H *et al*, 1986. Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: Homology with GTP-binding proteins. *Biochemistry*, 83(14): 4978—4982
- Li W W, Jin X K, He L *et al*, 2011. Molecular cloning and tissue expression of the fatty acid-binding protein (Es-FABP9) gene in the reproduction seasons of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Molecular Biology Reports*, 38(8): 5169—5177
- Liu Z Q, Barrett E J, 2002. Human protein metabolism: its measurement and regulation. *AJP Endocrinology and Metabolism*, 283(6): 1105—1112
- Malave T M, Forney J D, 2004. Identification of a developmentally regulated translation elongation factor 2 in *Tetrahymena thermophila*. *Gene*, 326(1): 97—105
- Nairn A C, Palfrey H C, 1987. Identification of the major Mr 1,000,000 substrate for calmodulin dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 262(36): 17299—17303
- Nilsson J, Nissen P, 2005. Elongation factors on the ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3): 349—354
- Proud C G, 1994. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Molecular Biology Reports*, 19(3): 161—170
- Qiu L, Jiang S, Zhou F *et al*, 2008. Molecular cloning of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) elongation factor 2 (EF-2): sequence analysis and its expression on the ovarian maturation stage. *Molecular Biology Reports*, 35(3): 431—438
- Rattan S, 1996. Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 31(1): 33—47
- Redpath N C, Price N T, Severinov K V *et al*, 1993. Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, 213(2): 689—699
- Sans M D, Xie Q, Williams J A *et al*, 2004. Regulation of translation elongation and phosphorylation of eEF2 in rat pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1): 144—151
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M *et al*, 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97(1): 37—42
- Wang L, Liu Y, Wang W N *et al*, 2011. Molecular characterization and expression analysis of elongation factors 1A and 2 from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Molecular Biology Reports*, 38(3): 2167—2178
- Weissbach H, Ochoa S, 1976. Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 45(1): 191—216
- Zhao D X, Chen L Q, Qin C J *et al*, 2009. Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan binding protein in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 154(1): 17—24

THE FULL LENGTH cDNA CLONING AND EXPRESSION OF ELONGATION FACTOR 2 FROM THE CHINESE MITTEN CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS*

GUO Zi-Hao, YANG Zhi-Gang, LIU Zhi-Wei, JI Lian-Yuan, QUE You-Qing,
YANG Xiao-Zhen, CHENG Yong-Xu

(Fisheries and Life Science College of Shanghai Ocean University, Key laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources Ministry of Agriculture, Shanghai, 201306)

Abstract In this study, we cloned EF-2 gene from *Eriocheir sinensis* using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE), the full-length cDNA sequence of EF-2 was 2752bp which coded 846 amino acid residues. Comparison results which was used by BLASTX software showed that the nucleotide homology of EF-2 was 88% similar to *Libinia emarginata*'s and amino acid homology of EF-2 was higher than 90% similar to others' crustaceans. The phylogenetic analysis based on amino acid sequence showed that EF-2 had highest similarity with EF-2 of *L. emarginata* and clustered with other crustaceans. The expression of EF-2 gene in different tissues and stage of normal mature crab were analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. The result showed that EF-2 mRNA was mainly detected in muscle and small amount in testis, hepatopancreas and trace in heart, ovary, stomach, intestine and gill. We examined the expression of the EF-2 in hepatopancreas, gills and muscles in different developmental status of crablet, precocious crab and normal mature crab; and also examined the expression of EF-2 in hepatopancreas and gills in crablet which were exposed to different pH, the results showed that pH stress can induce the expression of EF-2.

Key words *Eriocheir sinensis*, EF-2, Gene, Cloning, Expression