

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)PP2A 调节亚基 B 的基因克隆与表达分析*

刘学良 金朱兴 黄辉洋 叶海辉 李少菁

(厦门大学海洋与地球学院 厦门 361005)

提要 采用 RT-PCR、RACE 等方法, 获得了拟穴青蟹 PP2A 调节亚基 B(PP2A-B)的 cDNA 全序列, 全长 2040bp, 开放阅读框(ORF)为 1332bp, 可编码 443 个氨基酸残基。同源分析显示, 该基因编码的蛋白与其它一些物种具有很高相似性, 推测 PP2A-B 基因具有很高的保守性。经荧光定量 PCR 检测, PP2A-B 基因在拟穴青蟹多个组织中有表达, 且在脑、卵巢、鳃中表达量较高。在拟穴青蟹卵巢发育过程中, PP2A-B 基因在卵巢未发育期(I 期)表达量最高, 此后各期逐渐下降, 推测 PP2A-B 在卵巢中可能以 PP2A 全酶的形式存在, 抑制卵巢发育。

关键词 PP2A-B, 拟穴青蟹, 基因克隆, 荧光定量 PCR, 卵巢发育
中图分类号 S917.4

蛋白质的磷酸化修饰是真核生物细胞内一种非常重要的控制机制。这种磷酸化过程取决于蛋白激酶和蛋白磷酸酶, 这两种酶活性的平衡对于正常的细胞新陈代谢至关重要(Wera *et al*, 1995)。相对于蛋白激酶而言, 学者对蛋白磷酸酶的研究相对较少。蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A)是细胞生长、分化和凋亡的一个重要的调节者, 通过参与控制众多蛋白质的磷酸化状态, 调节 DNA 复制、转录以及细胞代谢等众多的细胞过程(Virshup, 2000; Hubbard *et al*, 1993)。PP2A 是一个包含了 A、B、C 三个亚基的异源三聚体蛋白磷酸酶。A 亚基和 C 亚基一起形成酶的催化核心, 而 B 亚基调节 PP2A 的亚细胞定位和催化底物特异性, 为调节亚基(Mumby *et al*, 1993)。至今已发现的 26 个 B 族亚基分别属于 B、B'、B''和 B'''四个亚族, 其中 PP2A-B 是 B 亚族中的重要成员(Millward *et al*, 1999)。不同的 B 亚基可指导 PP2A, 使不同蛋白质中的丝/苏氨酸残基脱去磷酸基团。分化后的细胞特有的 PP2A 亚型在很大程度上也依赖于 B 亚基在不同细胞内的差异表达(Tehrani *et al*, 1996; Zolnierowicz *et al*, 1994)。目前, 有关甲壳动物

PP2A-B 基因的报道甚少。

有关 PP2A-B 的功能研究, 在哺乳类、鸟类、鱼类、线虫、昆虫等已有报道, 但在甲壳动物, 目前仅能查到蚤状溞(*Daphnia pulex*)和蜘蛛蟹(*Libinia emarginata*)等少数物种 PP2A-B 基因序列, 迄今未见甲壳动物 PP2A-B 基因功能研究的报道。

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)是中国东南沿海 4 种青蟹中最主要的类群, 是一种重要的海水养殖蟹类(林琪等, 2007), 目前对其分子生物学的研究集中在种质鉴定和分子生态学, 有关功能基因的研究尚少。本文报道了拟穴青蟹 PP2A-B 的分子克隆, 并检测其在各个组织中和卵巢发育过程中的表达情况, 可为拟穴青蟹的生长、发育、生殖等分子机制研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 拟穴青蟹购自厦门市大学路农贸市场, 挑选活性好、附肢健全的雌性个体, 甲壳长度为 6.2—8.8cm, 体重为 150—420g, 实验室暂养 1d。

* 国家自然科学基金资助项目, 40406030 号, 41076081 号。刘学良, E-mail: liuxmu@126.com

通讯作者: 叶海辉, 博士, 教授, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

收稿日期: 2012-06-15, 收修改稿日期: 2012-08-18

1.1.2 主要试剂 TRIzol[®] Reagent Total RNA Isolation Reagent (Invitrogen 公司); RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司); SMART[™] RACE cDNA Application Kit (Clontech 公司); DNase I, RNase, LA *Taq*[®], dNTPs, pMD19-T, DNA Marker (Takara 公司); E.Z.N.A 胶回收试剂盒 (Omega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中已知的昆虫及蚤状溞 PP2A-B 的基因序列和对应的蛋白质序列, 通过 Clustal X 比对, 在 PP2A-B 的保守区域设计了简并引物 PPF 和 PPR, 用于扩增拟穴青蟹 PP2A-B 基因片段。根据已获得的 PP2A-B 基因片段, 设计 RACE 特异性引物(表 1), 以得到该基因全长 cDNA 序列。然后根据得到的全长 cDNA 序列, 设计荧光定量引物 PF 和 PR(表 1)。

1.2.2 总 RNA 的抽提和 cDNA 第一链的合成 取拟穴青蟹胸神经团组织, 参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明提取总 RNA。以紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及纯度。取 1 μ g 总 RNA, 参照 Fermentas 的 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明, 反转录成 cDNA 模板, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 PP2A-B 基因全长 cDNA 的克隆 使用简并引物 PPF/PPR, 以上述 cDNA 为模板, 扩增 PP2A-B 基因片段。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T(TaKaRa) 载体连接, 转化到 DH5 α 感受态细胞, 于含有 AMP 的 LB 平板上培养 14h, 挑取单克隆菌落, 接种于含 AMP 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序。该序列经 BLAST 后, 确定是拟穴

青蟹 PP2A-B 基因。根据设计的 RACE 引物(表 1), 用 Clontech 公司的 SMART[™] RACE cDNA Application Kit, 以拟穴青蟹胸神经团总 RNA 为模板分别扩增该基因 cDNA 的 3' 与 5' 端, 扩增产物经克隆、测序后, 获得 cDNA 3' 端序列与 5' 端序列, 具体步骤参照试剂盒的说明书。

1.2.4 PP2A-B 基因 cDNA 全序列分析 应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 确定正确的开放阅读框并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的物理参数; SignalP 3.0 server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽; ProtScale 程序(<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) 预测蛋白质的疏水性; 采用 Clustal 与 MEGA 软件对序列进行同源性的分析, 并采用邻位相接法 (neighbor-joining, N-J) 构建系统进化树。

1.2.5 PP2A-B 基因的表达量分析 参照 Trizol (Invitrogen) 说明书提取拟穴青蟹各组织(肌肉、胸神经团、卵巢、血淋巴、脑、心脏、肝胰腺、鳃、胃) 的总 RNA, 卵巢发育分期参照上官步敏等(1991), 分为未发育期、发育早期、发育期、将成熟期、成熟期等 5 期。用 PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 试剂盒合成一链 cDNA 用于荧光定量表达分析。qRT-PCR 反应体系为 20 μ l: 2 \times SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 10 μ l, cDNA 模板 2 μ l, 荧光定量引物各 0.8 μ l (10 μ mol/L), 6.4 μ l 双蒸水。每个样品设置 3 个重复, 用 β -actin 基因作内参, 均一化各样品 cDNA 用量的差异, 引物为 β -actin F 和 β -actin R(表 1)。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 热变性 30s; 94 $^{\circ}$ C 变性 10s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 42 个循环。之后进行融解曲线(Melting curve)分析, 以

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物类别	引物名称	引物序列(5' 3')
简并引物	PPF	CWGCWCABTTYTAYTBTC
	PPR	CNGCHGKATNACYTCBGT
3'RACE 特异引物	PP3F	CTTGTCTGCTGATGACCTTCG
5'RACE 特异引物	PP5R	CGTAAAGCAGTAAGTGAAGTTGGGT
RACE 试剂盒提供的外引物	3'RACE Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT
	5'RACE Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
荧光定量引物	PF	ATAGATGGATGTTTGGGCAGTG
	PR	TGGGTGAGGTCATACAGAAGGAA
β -actin 定量引物	β -actinF	GAGCGAGAAATCGTTCGTGAC
	β -actinR	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG

判定 PCR 扩增反应的特异性。

2 结果

2.1 PP2A-B 全长 cDNA

的克隆和序列分析

通过设计的简并

引物 PPF 和 PPR, 以拟

穴青蟹胸神经团 cDNA

为模板扩增得到一个

cDNA 片段, 测序后在

GenBank 数据库中进行

对比, 发现该序列与

其它物种的 PP2A-B 序

列显示了较高的相似

性, 基本确认为拟穴青

蟹 PP2A-B 基因序列。

基于该片段设计 RACE

引物进行 5'和 3'末端扩

增, 得到 5'末端序列和

3'末端序列, 最后拼接

得到一条完整的 cDNA

序列。Blast 比对发现该

序列与其它物种的

PP2A- B 序列同样显示

了较高的同源性, 从而

确定为拟穴青蟹 PP2A-

B cDNA 序列。其全长

为 2040bp, 编码区长度

为 1332bp, 编码 443

个氨基酸。此外还有

157bp 的 5'UTR 和

551bp 的 3'UTR, 其中

3'UTR 区域含有典型的

加尾信号 AATAAA 和

poly A 尾(图 1)。平均分

子量为 51255.8Da, *pI* 为

5.96, 预测其在体外的

不稳定指数 (instability

index)为 40.32, 大于 40,

为不稳定蛋白质。Sin-

gnlaP 3.0 分析拟穴青蟹

PP2A-B 没有发现信

号肽。

	AGCCACAGCAGGACGGTGCCGCATACCTGGTGTATTGTGGACTGTATCGTTATATCCCATGCCATC	67
	CGTGCCGTTTCTAGATGTTGAACGCTAAATACATGACATCGTACCACCTTAAATATCCAACAGTGATTATCAGGGACGAGACTGTTGGG	157
	ATGGCCGGCAATGGAGACATCCAATGGTGCCTTCTCAAGTCAAAGGCACGCTCGACGATGACGTTAGTGAAGCTGACATCATCTCATGT	247
1	M A G N G D I Q W C F S Q V K G T L D D D V S E A D I I S C	
	GTGGAGTTCAACCATGATGGGACTTGCTGGCCACAGGGGACAAGGGCGGCGGTGGTTCATCTCCAGCGGGACCCCTCATCGAAAAAC	337
31	V E F N H D G D L L A T G D K G G R V V I F Q R D P S S K N	
	TGCCACCCCTCGCCGGGGCGAGTACAATGCTACAGCACCTTCAGAGTCATGAGCCTGAGTTGACTACCTTAAATCTTTAGAAAATTGAA	427
61	C H P R R G E Y N V Y S T F Q S H E P E F D Y L K S L E I E	
	GAAAAATCAATAAAATAAGATGGCTCAAGAGGAAAAACCTGCACACTTCTACTCTACTAATGATAAAACCATAAAGCTATGGAAA	517
91	E K I N K I R W L K R K N P A H F L L S T N D K T I K L W K	
	GTGTCAGAACGAGACAAACGAGCAGAAGGCTACAACCTGCGTGTAGTCCGCCAGATCAGGGACCAACTTCACTTACTGCTTTACGG	607
121	V S E R D K R A E G Y N L R D E S G Q I R D P T S L T A L R	
	GTACCTGTATTAACCAATGGAATGATGGTGAAGCTTCCCTTAGGAGAATTTTGCAAATGCACACAGTATCACATCAACTCTATC	697
151	V P V L K P M E L M V E A S P R R I F A N A H T Y H I N S I	
	TCAATCAACTCAGACCAGGAGACTTACTGTCTGCTGATGACCTTCGTATTAACCTGTGGCAGATGGAGTCACTGATCAGTCTTTAAT	787
181	S I N S D Q E T Y L S A D D L R I N L W H M E V T D Q S F N	
	ATAGTAGACATCAAGCCCACTAACATGGAGGAGCTGACGGAGGTGATCAGCGGACGAGAGTTTACCCACAGACTGCAACGTGTTCTGTG	877
211	I V D I K P T N M E E L T E V I T A A E F H P H D C N V F V	
	TACTCTAGCAGTAAAGGAACCAATAAGGCTTGTGACATGCGACAAGCAGCCCTCTGTGATAGTCATTCTAAGTTGTTGAGGAGCCCGAG	967
241	Y S S S K G T I R L C D M R Q A A L C D S H S K L F E E P E	
	GATCCCAACATCGGAGTTTCTCAGTGAATCATCTCCTCCATAAGTGTCAAATTTCAAACAGTGGTCGCTACATGATATCAAGA	1057
271	D P T N R S F F S E I I S S I S D V K F S N S G R Y M I S R	
	GACTATCTCTCAGTTAAAGTGTGGGACTTGACATGGAACATAAACCAATGAGACTTACCCGGTGCATGAATACCTGCGCCCAAACTG	1147
301	D Y L S V K V W D L H M E T K P I E T Y P V H E Y L R P K L	
	TGCTCATTGATGAGAATGATGATTTTGGACAAGTTGAATGCTGCTGGAGTGGCAATGACTCAGCAATTATGACTGGCTCATACAAC	1237
331	C S L Y E N D C I F D K F E C C W S G N D S A I M T G S Y N	
	AACTTCTCCGAATGTTGATAGGACTTCAAAACGTGATGTTACATTAGAGGCTTCAAGGGAAACTGCCAAGCCAGATATTTACTTAAA	1327
361	N F F R M F D R T S K R D V T L E A S R E T A K P R Y L L K	
	CCTAGAAAAGTCTGCACAGCTGGTAAAAAGAAAGAAATGAAATCAGTGTAGACTGCCTTGATTCAATAAGAAGATCCTCACACGGCC	1417
391	P R K V C T A G K R K K D E I S V D C L D F N K K I L H T A	
	TGGACCCACATGAAAATATTATAGCTGTGCTGCCACTAACAACTTTACATATTCCAAGATAAAATTTAGCAGTCTCCTCTGACGAC	1507
421	W H P H E N I I A V A A T N N L Y I F Q D K F *	
	TAGAGCTTAGGCCCTGCCATAGATGGATGTTGGGCAGTGTGCCGGGTGTGGAGGGAAGTCTTAGTGGCCAGTGTCTCTCTGTA	1597
	TGACCTCACCAAGTGTGACATCCACTGCTGGAAGCCATCAACTCATGCTGGCCACTCTGGCATCCATTATCAAGGTGTGGCTCTTG	1687
	TCTTGGGTTGCTTCCAAGACAATGGTGGTCCCAATGTGTGAACGAGTGGCAACCAAAAAGCCAAGGGCAGTAGTGTGGAGTCCCCAA	1777
	TGAATGTCCAGTGGCTGAGGCTTGATTACTTGTGATCTTGTGAAATCCGTTGGTGTCCACCCCTTGTGATCAATTTATCTGTGTTTACC	1867
	CTCAGATCATCTGTTGAGAAGTGAACAATTAGTTGCCTTCTCAAGGCTATTAAGAAATATATAGAGTTATGGCTGACTAGGTGAATCCA	1957
	GTTATGAATGATTAGGAGTTGCCATGTTATATCAATAGATTAGTGGCTTGAATAAATAATTGACTGCAAAAAAAAAA	2040

图 1 拟穴青蟹 PP2A-B cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of PP2A-B from *S. paramamosain*

注: 灰色框所示为简并引物结合位点; 下划线所示为 RACE 引物结合位点; *代表终止密码子;

方框所示为 3'UTR 中的加尾信号

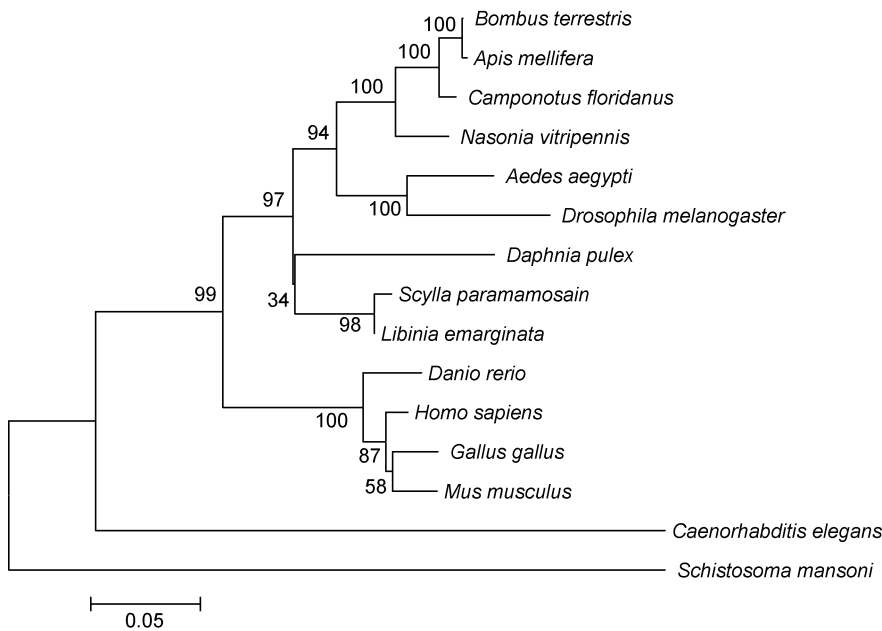


图 2 基于 N-J 法构建的系统发育树

Fig.2 Phylogram based on Neighbor-joining method

Bombus terrestris: 熊蜂(XP_003401091); *Apis mellifera*: 意蜂(XP_394082); *Camponotus floridanus*: 佛罗里达弓背蚁(EFN72063); *Nasonia vitripennis*: 丽蝇蛹集金小蜂(XP_003426482); *Aedes aegypti*: 埃及伊蚊(XP_001657334); *Drosophila melanogaster*: 果蝇(AAA99871); *Daphnia pulex*: 蚤状溞(EFX77026); *Libinia emarginata*: 蜘蛛蟹(GQ887353); *Scylla paramamosain*: 拟穴青蟹(JQ867383); *Danio rerio*: 斑马鱼(NP_998045); *Homo sapiens*: 人(EAW63580); *Gallus gallus*: 鸡(AAN85209); *Mus musculus*: 鼠(NP_080667); *Caenorhabditis elegans*: 秀丽隐杆线虫(AF174643); *Schistosoma mansoni*: 曼氏血吸虫(XM_002580312)

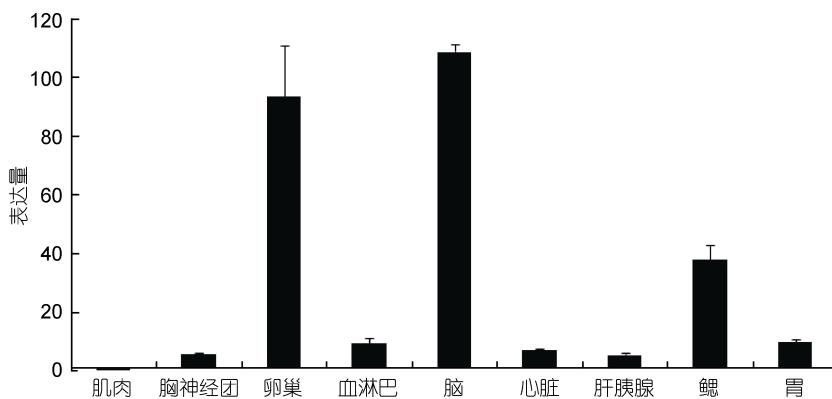


图 3 拟穴青蟹 PP2A-B 基因在成体组织中的表达

Fig.3 Expression of PP2A-B mRNA in adult tissues of *S. paramamosain*

通过 NCBI 的 BlastP 比对分析, 发现 PP2A-B 存在一个高度保守的区域, 属于 WD40 超家族, 与其它物种的 PP2A-B 结构域分析相一致。

2.2 PP2A-B 序列同源性分析

将拟穴青蟹 PP2A-B cDNA 序列推导的氨基酸与其它物种的同源蛋白在 ClustalX 中进行多序列比对分析, 结果显示: 拟穴青蟹 PP2A-B 序列与蜘蛛蟹

(*Libinia emarginata*)、熊蜂(*Bombus terrestris*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的相似率分别为 95%、90%、85%和 84%。图 2 是用 ClustalX 对实验所得拟穴青蟹的氨基酸序列与已有的其它一些物种进行对比后, 以 Mega 软件的邻位相接法(neighbor-joining, N-J)绘制的系统进化树。

2.3 PP2A-B 基因的表达分析

2.3.1 PP2A-B 在各组织中的表达
依据实验所得拟穴青蟹 PP2A-B cDNA 序列设计特异引物 PF、PR, 利用 qRT-PCR 技术检测 PP2A-B 基因在拟穴青蟹不同组织中的表达情况。结果显示, PP2A-B 在所检测的 9 个组织(肌肉、胸神经团、卵巢、血淋巴、脑、心脏、肝胰腺、鳃、胃)中均有表达, 且在脑、卵巢、鳃中表达量较高, 而在肌肉中表达量最低(图 3)。

2.3.2 PP2A-B 在卵巢发育过程中的表达
为检测不同卵巢发育时期 PP2A-B 的表达量, 提取了拟穴青蟹未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和成熟期的卵巢总 RNA。qRT-PCR 结果显示, PP2A-B 在未发育期(期)卵巢表达量最高, 之后随着卵巢发育逐渐下降(图 4)。

3 讨论

本研究通过 RACE 技术获得了拟穴青蟹 PP2A-B cDNA 序列, 全长为 2040bp (GenBank 登陆号:

JQ867383), 包括 1332bp 的 ORF, 编码 443 个氨基酸。序列分析发现, PP2A-B 基因的氨基酸序列在不同物种间具有较高的同源性, 暗示该基因在进化上和功能上的保守性。作者对拟穴青蟹 PP2A-B 的结构进行预测, 发现它含有 7 个 WD40 重复结构。一般认为, WD40 能够调节细胞分裂、基因转录和跨膜信号转导(Eva et al, 1994)。另外推测, 这种 WD40 重复结构作

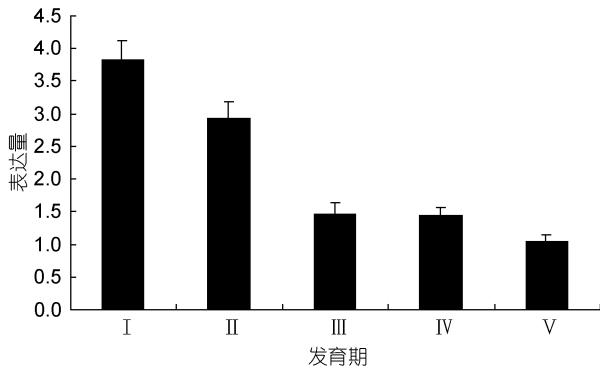


图 4 拟穴青蟹 PP2A-B 基因在各卵巢发育期的表达

Fig.4 Expression of PP2A-B mRNA at different ovarian development stages of *S. paramamosain*

注: (未发育期); (发育早期); (发育期); (将成熟期); (成熟期)

为与 PP2A 结构亚基 A 相结合的区域, 为 B 家族调节亚基参与 PP2A 三聚体的装配提供了支点, 参与了全酶装配(Moreno *et al.*, 2000)。据报道, 其它的调节亚基也都有特殊的一级结构与结构亚基 A 相互作用, 包括 B'/PR61 家族的 HEAT-like 重复结构和 B"家族的 EF-HAND 结构(郑春兵等, 2009; Li *et al.*, 2002)。这些由不同亚基组成的 PP2A 全酶具有不同的组织和亚细胞定位、不同底物的特异性以及不同的生物学调节方式(Janssens *et al.*, 2008)。

迄今为止, PP2A 已经在人、小鼠、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、金鱼(*Carassius auratus*)等物种中得到克隆和分析, 研究表明 PP2A 能够促进细胞凋亡(Alvarado-Kristensson *et al.*, 2005); 可阻滞 G2 期细胞进入 M 期, 从而将细胞周期阻滞在 G2 期(Clarke *et al.*, 1993); 同时, PP2A 在调控细胞信号通路、基因转录、离子通道等方面有重要作用(Janssens *et al.*, 2001; Reinhart *et al.*, 1991)。另外, 越来越多的证据表明, 调节亚基 B 除了参与 PP2A 全酶功能外, 还可能具有独立的发育调控功能, 目前已发现 B 亚基在金鱼脑的发育过程中有重要作用(Zhao *et al.*, 2010)。

本研究利用 qRT-PCR 技术对拟穴青蟹不同器官中的 PP2A-B 进行了定量分析, 发现 PP2A-B 所检测的 9 个组织(肌肉、胸神经团、卵巢、血淋巴、脑、心脏、肝胰腺、鳃、胃)中均有表达, 且在脑中表达量最高, 卵巢和鳃次之, 其它组织的表达量较低。拟穴青蟹 PP2A-B 基因在脑中的高表达, 可能与 B 亚基在脑的发育过程中有重要的调控功能相关。PP2A-B 在拟穴青蟹卵巢中的表达量也很高, 提示其可能在生殖细胞的发育和成熟中具有非常重要的作用(Fu *et al.*,

2009)。而鳃是甲壳类渗透压调节和离子转运的主要器官, 富含各种离子通道(潘鲁青等, 2005), PP2A-B 在拟穴青蟹鳃中的高表达, 可能与 PP2A 参与了离子通道的调控有关, B 亚基可能以 PP2A 全酶的形式行使其调控作用(Reinhart *et al.*, 1991)。迄今, PP2A-B 在甲壳动物卵巢发育过程中的作用尚未见报道。为了探究 PP2A-B 在拟穴青蟹卵巢发育过程中的调节作用, 作者对 PP2A-B 表达量进行了分析。结果显示, PP2A-B 在未发育期(期卵巢)含量最高。期卵巢的卵子发生处于相对静止期, PP2A-B 在该期高表达, 推测与 PP2A 能够抑制细胞分裂有关。此时, PP2A-B 可能与催化亚基 A、C 结合以 PP2A 全酶的形式存在, PP2A 能够将细胞阻滞在 G2 期(Clarke *et al.*, 1993), 从而抑制了卵巢的发育, 使其停留在未发育期阶段, 不能启动卵黄发生。当拟穴青蟹卵巢发育进入期(发育早期)后, PP2A-B 表达量开始下降, 并逐渐降低, 解除了对卵巢发育的抑制作用, 使得卵巢中的卵母细胞得以开启卵黄发生, 并在此后的各期中卵母细胞逐渐生长, 最终进入成熟期。

国内外大量研究表明, PP2A 调节亚基 B 具有多重调控功能, 迄今其分子作用机制远未阐明。为了更加清楚地认识 PP2A-B 基因在拟穴青蟹不同组织和卵巢发育中的作用, 可通过 RNA 干扰等手段, 进一步验证 PP2A-B 基因的功能。

参 考 文 献

- 上官步敏, 刘正琼, 李少菁, 1991. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察. 水产学报, 15(2): 96—103
- 林 琪, 李少菁, 黎中宝等, 2007. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成. 水产学报, 31(2): 211—219
- 郑春兵, 马海立, 付 虎等, 2009. 金鱼 PP2A-B"家族 Alpha 和 Gamma 调节基因的 cDNA 克隆及 mRNA 表达. 自然科学进展, 19: 36—42
- 潘鲁青, 刘泓宇, 2005. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展. 水产学报, 29(1): 109—114
- Alvarado-Kristensson M, Andersson T, 2005. Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. The Journal of Biological Chemistry, 280: 6238—6244
- Clarke P R, Hoffmann I, Draetta G *et al.*, 1993. Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. Molecular Biology of the Cell, 4: 397—411
- Eva J N, Carl J S, Raman N *et al.*, 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature, 371: 297—300

- Fu H, Ma H L, Zheng C B *et al*, 2009. Molecular cloning and differential expression patterns of the regulatory subunit B'gene of PP2A in goldfish, *Carassius auratus*. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(8): 724—732
- Hubbard M J, Cohen P, 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(5): 172—177
- Janssens V, Goris J, 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochemical Journal*, 353: 417—439
- Janssens V, Longin S, Goris J, 2008. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3): 113—121
- Li X H, Virshup D M, 2002. Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *European Journal of Biochemistry*, 269(2): 546—552
- Millward T A, Zolnierowicz S, Hemmings B A, 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 186—191
- Moreno C S, Susan Park, Kasey Nelson *et al*, 2000. WD40 repeat proteins striatin and S/G2 nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 57—63
- Mumby M C, Walter G, 1993. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiological Reviews*, 73(4): 673—699
- Reinhart P H, Chung S, Martin B L *et al*, 1991. Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatase 2A. *The Journal of Neuroscience*, 11(6): 1627—1635
- Tehrani M A, Mumby M C, Kamibayashi C, 1996. Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(9): 5164—5170
- Virshup D M, 2000. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(2): 180—185
- Wera S, Hemmings B A, 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal*, 311(1): 17—29
- Zhao J Q, Xie S S, Liu W B *et al*, 2010. Molecular cloning of the genes encoding the pR55/B / regulatory subunits for pp-2A and analysis of their functions in regulating development of goldfish, *Carassius auratus*. *Gene Regulation and Systems Biology*, 4: 135—148
- Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J *et al*, 1994. Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry*, 33(39): 11858—11867

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE REGULATORY SUBUNIT B GENE OF PP2A IN THE MUD CRAB *SCYLLA PARAMAMOSAIN*

LIU Xue-Liang, JIN Zhu-Xing, HUANG Hui-Yang, YE Hai-Hui, LI Shao-Jing
(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract In this paper, the regulatory subunit B gene of PP2A (PP2A-B) was isolated from the mud crab, *Scylla paramamosain* using RT-PCR and RACE methods. The obtained full-length cDNA of PP2A-B was 2040bp with an open reading frame of 1332bp encoding a putative peptide of 443 amino acid. By alignment, the amino acid sequence of *S. paramamosain* PP2A-B showed high homology with those of some other animals. It suggested PP2A-B was highly conservative. Real-time PCR showed that the PP2A-B gene was expressed in various tissues, and highly expressed in brain, ovary and gill. The PP2A-B mRNA expression during ovarian development indicated that the expression of PP2A-B was obviously high at undeveloped stage and decreased gradually from stage I (undeveloped stage) to stage V (ripe stage). We hypothesized that PP2A-B may exist in the form of PP2A holoenzyme in ovary and play a suppressive role on the ovarian development of the mud crab.

Key words PP2A-B, *Scylla paramamosain*, Gene cloning, Real-time RT-PCR, Ovarian development