

DOI: 10.12264/JFSC2022-0210

中华绒螯蟹 4E-BP1 基因的克隆、表达特征及其在蜕壳中的作用

冯文荣^{1,2}, 冯伟^{1,2}, 张明胤², 于凡¹, 李建林¹, 苏胜彦^{1,2}, 唐永凯^{1,2}, 徐跑^{1,2}

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (4E-BP1) 是 mTOR 信号通路下游的翻译抑制因子, 调节翻译的起始和蛋白质的合成。为探究中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 4E-BP1 基因特征、时空表达模式及其在蜕壳过程中的潜在作用, 本研究利用 RACE 技术克隆获得中华绒螯蟹 *Es4E-BP1* 全长 cDNA 序列, 利用 qPCR 技术探究其时空表达, 利用 dsRNA 干扰探究其在中华绒螯蟹蜕壳中的作用。测序结果显示, *Es4E-BP1* cDNA 全长 1678 bp, 包括 134 bp 的 5' 非编码区、1193 bp 的 3' 非编码区和 351 bp 的开放阅读框。氨基酸序列分析发现, *Es4E-BP1* 含有 1 个 eIF4E 超级家族的典型保守域, 且包含 1 个超二级结构 TOS 基序和 1 个 YXXXXLΦ 基序。多序列比对和系统进化树分析显示, *Es4E-BP1* 与蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 聚为一支并且具有很高的同源性 (95.69% 和 93.16%)。qPCR 结果显示, *Es4E-BP1* 在成蟹各个组织均有表达, 其中 Y 器官表达量最高, 其次为肌肉, 鳃丝中表达量最低。一个完整蜕壳周期内, 幼蟹不同组织表达模式不同, 但均在蜕壳后期 A-B 期表达量最高, 蜕壳前期表达量较低。注射 ds*Es4E-BP1* 后, 中华绒螯蟹存活率远低于对照组 CG 组; 蜕壳间隔显著高于 CG 组。研究结果表明, *Es4E-BP1* 在中华绒螯蟹各组织中广泛表达, 在调控蜕壳生长中具有重要作用, 为进一步研究甲壳动物 4E-BP1 基因提供了重要参考。

关键词: 中华绒螯蟹; 4E-BP1; 蜕壳; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)12-1714-14

真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 [eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding proteins, 4E-BPs] 是高度保守的小分子蛋白, 属翻译抑制蛋白家族, 是雷帕霉素复合物 1 (mechanistic target of rapamycin complex I, mTORC1) 下游的主要效应器之一^[1], 主要功能是负调控 eIF4E 而抑制 5' 帽子结构依赖性蛋白翻译的起始^[2]。哺乳动物中包含 3 种 4E-BPs, 分别是 4E-BP1、4E-BP2 和 4E-BP3^[3]。其中, 4E-BP1 的研究最为广泛, 4E-BP1 的磷酸化被认为是 mTORC1 激活的标记。低磷酸化的 4E-BP1 特异识别 eIF4E, 抑制翻译的起始^[4-5]; 而

受到生长因子等外界条件刺激时, mTORC1 磷酸化 4E-BP1 的多个位点, 启动 5' 帽依赖性的蛋白质翻译^[6-7]。mTOR 驱动的 4E-BP1 对帽依赖性蛋白翻译具有限速作用, 因此影响蛋白质合成、细胞存活、生长、增殖和代谢^[8]。

鉴于 4E-BP1 的重要作用, 哺乳动物的 4E-BP1 结构、功能及其调控的研究较为普遍^[9-10], 而非哺乳动物的 4E-BP1 关注度较少。水产动物中, 4E-BP1 在鱼类中有一定研究, 主要涉及组织表达、免疫功能、蛋白质合成及生长调控。Lin 等^[11]发现 4E-BP1 在齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*)

收稿日期: 2022-06-04; 修订日期: 2022-07-28.

基金项目: 江苏省农业重大新品种创制项目 (PZCZ201749); 江苏省现代农业产业技术体系项目 (JATS [2019] 385); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (2021JBFM12, 2020TD36).

作者简介: 冯文荣 (1986-), 女, 博士, 研究方向为水产动物分子辅助育种. E-mail: fengwenrong@ffrc.cn

通信作者: 唐永凯, 研究员, 研究方向为水产动物遗传育种, E-mail: tangyk@ffrc.cn; 徐跑, 研究员, 研究方向为水产动物遗传育种, E-mail: xup@ffrc.cn

各组织中广泛表达, 且在中肠、鳃、肝脏、肾脏的表达量相对较高。Li 等^[12]发现尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 淋巴细胞的活化和增殖受 mTORC1/4E-BP1 信号通路调节, 从而参与适应性免疫反应。Cassidy 等^[13]发现, 饥饿和缺氧导致星丽鱼 (*Astronotus ocellatus*) 蛋白质合成减少, 此过程受到 4E-BP1 和 eIF2- α 信号分子控制。Valenzuela 等^[14]发现慢性拥挤胁迫降低了多耙牙鲆 (*Paralichthys adspersus*) 的 mTOR 和 4E-BP1 的磷酸化水平, 进而抑制其生长。然而, *4E-BP1* 基因在甲壳类动物中的研究较少。Fang 等^[15]在南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中对 mTORC1 的组分 *Raptor* 基因进行 RNA 干扰, 引起下游 4E-BP1 的基因表达和蛋白磷酸化水平显著降低; 高蛋白饲料引起克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*) mTOR 和 *4E-BP1* 基因的表达显著增加, 促进了蛋白质的生成和累积^[16]。以上研究初步表明甲壳动物 4E-BP1 是 mTOR 通路下游关键因子, 但其基因特征、时空表达情况及调控蜕壳的研究较为缺乏。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 具有较高的经济价值, 其风味和营养价值备受消费者青睐, 2020 年产量达 80 万 t^[17]。中华绒螯蟹机体生长与蜕壳密切相关, 其生命周期中需经历 18~21 次蜕壳。蜕壳是一个非常复杂的过程, 伴随着形态、生理、生化等方面的变化^[18], 包括外骨骼脱落、硬化, 闭壳肌等肌肉的萎缩、重建生长及渗透压变化等^[19-20]。此过程受 Y 器官分泌的蜕皮类固醇和眼柄产生的抑制性神经肽 (如蜕皮激素抑制激素) 协同调控^[21]。基于甲壳动物蜕壳机制的研究发现, mTOR 信号通路在调节蜕皮类固醇合成中起关键作用^[22], 但 4E-BP1 作为其下游关键的限制性调控蛋白, 是否参与调控中华绒螯蟹蜕壳过程仍未可知。因此, 本研究克隆了中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因的全长 cDNA 序列, 分析了其序列特征, 并研究其在成蟹不同组织、幼蟹不同蜕壳时期不同组织中的表达情况, 进一步利用 dsRNA 基因干扰技术分析其与蜕壳的相关性, 为中华绒螯蟹蜕壳生长调控机制研究提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物及取样

实验幼蟹于 2020 年 4 月取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心苏州阳澄湖虾蟹绿色养殖基地, 选取规格为 10~12 g 的中华绒螯蟹, 暂养于实验室水缸, 保持水温为 (25±3) °C, 溶解氧 > 5 mg/L, 氨氮 < 0.2 mg/L, pH 为 7.0~8.5, 每天定时定量投喂配合饲料, 及时清理残饵和换水, 以保证中华绒螯蟹正常蜕壳生长, 其中一部分幼蟹用于不同蜕壳时期取样, 一部分用于 dsRNA 干扰实验。另于 10 月取中华绒螯蟹成蟹, 雌、雄各 3 只, 雌蟹均重为 (96.25±6.34) g, 雄蟹均重为 (115.23±10.72) g, 取其 Y 器官、眼柄、心脏、肌肉、肝胰腺、肠道、精巢、卵巢和鳃组织, 液氮速冻, 置于 -80 °C 冰箱保存, 用于组织表达分析。

根据焦满静^[23]的描述, 参考 Drach 等^[24]蜕壳周期鉴别方法, 以及本实验室建立的方法确定中华绒螯蟹不同蜕壳时期。分别选取 A-B 期、C 期、D₀、D₁ 和 D₃₋₄ 期的中华绒螯蟹各 6 只, 其中雌、雄各 3 只, 取其 Y 器官、眼柄、肠道, 以及步行足、螯足和腹部 3 个不同部位的肌肉, 并用液氮冷冻, 置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因克隆

中间片段扩增: Trizol 法提取中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA, oligo dT-AP 引物将其反转录成 cDNA, 根据前期获得的转录组序列信息, 利用 Primer Premier 5.0 设计特异引物 (*Es4E-BP1-F* 和 *Es4E-BP1-R*) 进行 PCR 反应, 获得 *Es4E-BP1* cDNA 中间片段。PCR 反应体系: cDNA 模板 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2×PCR Mix 10 μ L, 加 ddH₂O 至总体积 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 使用胶回收试剂盒 (TaKaRa, 大连) 回收, 用 pMD19-T (TaKaRa, 大连) 载体连接, 克隆, 送至上海天霖生物科技有限公司测序。根据测序序列设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物 (表 1), 扩增 *4E-BP1* 基因的 3' 和 5' 端序列。

表 1 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因序列扩增引物信息
Tab. 1 The information of primers for *4E-BP1* amplification in *Eriocheir sinensis*

引物 primer	序列(5'–3') sequence (5'–3')	用途 usage
<i>Es4E-BP1-F</i>	GCTCCCTGACCACCCTAACA	PCR
<i>Es4E-BP1-R</i>	GCACCAAGACCTGATGATGAAC	
<i>Es4E-BP1-3'Race-P1</i>	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T) ₁₆ MN	3'Race
<i>Es4E-BP1-3'Race-P2</i>	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	3'Race
<i>Es4E-BP1-3'Race-P3</i>	GCGGACCTTCCTAATGACTACA	3'Race
<i>Es4E-BP1-5'Race-P4</i>	GCACCAAGACCTGATGATGAAC	5'Race
<i>Es4E-BP1-5'Race-P5</i>	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(G) ₁₂	5'Race
<i>Es4E-BP1-5'Race-P6</i>	CCTGGGGTAGTGGAGAATAGCGTG	5'Race
<i>Es4E-BP1-5'Race-P7</i>	GCCACTGGGGACGCTGACAT	5'Race
<i>Es4E-BP1-5'Race-P8</i>	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	5'Race
<i>Es4E-BP1-RTF</i>	GCGGACCTTCCTAATGACTACA	qPCR
<i>Es4E-BP1-RTR</i>	AGGGCTCTGGCTTTTCTGG	
<i>EF-1α-F</i>	AGGTCGGCTACAACCCAACT	qPCR
<i>EF-1α-R</i>	TGAAGTCGTAGGAGCCACTC	
<i>ds4E-BP1-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGGCGGACCTTCCTAATGACT	双链 RNA 合成 synthesis of dsRNA
<i>ds4E-BP1-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTCTCAAAGTGGTCCAGGTCA	
<i>dsGFP-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAAGGGCGAGGAGCTGTTCA	
<i>dsGFP-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGACTTGTACAGCTCGTCCATGC	

3'RACE 方法: 按照本实验室方法, 用 3 μg 总 RNA 以 P1 引物进行反转录反应(RT-PCR), 然后用 10%的 RT 液, 以 P2 引物和 P3 引物进行 PCR 反应, 退火温度为 58 ℃, 扩增液用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 克隆, 测序。

5'RACE 方法: 用 3 μg 总 RNA, 以 P4 为引物, 根据 AMV 酶(TaKaRa, 大连)使用说明进行 RT 反应, 然后加 RNase H 分解 mRNA, 再用胶回收试剂盒回收 cDNA, 用 TDT 酶(TaKaRa, 大连)在 cDNA 3'端加 Poly(C); 用胶回收试剂盒回收加 Poly(C)的 cDNA, 以此为模板, 用 P5 和 P6 为引物, 进行 PCR。PCR 扩增液稀释 10 倍, 取 2 μL 为模板, 用 P7 和 P8 引物, 进行巢式 PCR, PCR 液用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离回收, 克隆, 测序。

1.3 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因的序列分析

通过 Primer 5.0 软件及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对中华绒螯蟹 *Es4E-BP1* 序列进行验证、翻译及蛋白质分析; 利用 ExPASy Server (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测等电点及分子量; 通过 TMHMM Server v2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋

白质的跨膜结构域; 通过 CDD 在线数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)预测蛋白结构保守域; 使用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线预测信号肽; 利用 PROSITE (<http://au.expasy.org/prosite>)分析 *4E-BP1* 基因的蛋白结构域; 通过 BioEdit 7 软件及 Clustal X 对中华绒螯蟹及其他物种 *4E-BP1* 进行氨基酸序列比对分析; 使用 MEGA7.0 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建不同物种 *4E-BP1* 的系统进化树。

1.4 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因时空表达分析

应用 qPCR 技术测定 *4E-BP1* 基因在成蟹不同组织及幼蟹一个蜕壳周期不同时期的表达情况。分别将保存的成蟹 9 个组织、幼蟹 5 个蜕壳时期的 3 个组织以及 3 个不同部位肌肉组织进行 RNA 提取并反转录为 cDNA, 选用 *EF-1α* 作为内参基因, 引物见表 1, 使用 TB GreenTMPremix Ex TaqTMII (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa, 大连)两步法试剂盒进行实时荧光定量 PCR (qPCR), 反应体系为 20 μL, 反应程序为: 95 ℃预变性 30 s, 95 ℃变性 5 s, 60 ℃退火 30 s, 共进行 40 个循环。每个

样品及内参重复 3 次。qPCR 仪为 CFX96 Touch Real- Time PCR Detection System (Bio-rad, American)。qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.5 *4E-BP1* 基因 dsRNA 干扰实验

根据 *Es4E-BP1* 的 cDNA 序列, 设计含有 T7 启动子 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 的特异性引物 ds*4E-BP1*-F/R (表 1)。dsRNA 按照 T7 RNAi Transcription Kit (Vazyme, 中国)试剂盒步骤制备, dsRNA 经磁珠纯化, 纯度和完整性采用 1.2%~1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。dsRNA 的浓度由紫外分光光度计测定, 储存在-80 °C。ds*GFP* 作为对照, 合成方法同上。注射前使用 0.85%生理盐水将合成好的 ds*4E-BP1* 及 ds*GFP* 稀释到浓度为 1 μg/μL。实验用幼蟹规格为(10.5±0.6) g, 按照 4 μg/g 的比例于第二步行足末端注射 dsRNA。注射实验分为 3 组, CG 组注射生理盐水, ds*GFP* 组注射 ds*GFP*, ds*4E-BP1* 组注射 ds*4E-BP1*, 每个组注射 6 只中华绒螯蟹, 注射后 24 h 和 48 h 取其 Y 器官和肌肉组织置于 RNA 保存液中, 用 qPCR 法检测 *Es4E-BP1* 的表达量, 从而检测 dsRNA 干扰效率。

dsRNA 长期干扰对蜕壳的影响实验。随机选取健康且处于蜕壳后 4 d (外骨骼完全硬化)的幼蟹, 分为 3 组, CG 组注射生理盐水、ds*GFP* 组注射 ds*GFP*, ds*4E-BP1* 组注射 ds*4E-BP1*, 每组 3 个重复, 每个重复 6 只蟹。每 2 d 对不同组别的幼蟹进行加强注射一次, 每天观察记录蜕壳个体和死亡个体情况, 至下一次蜕壳结束后 4 d (外骨骼完全硬化)称量每只蟹体重。统计蜕壳间隔(第 1 次和第 2 次蜕壳间隔天数), 按照公式(1)和(2)计算存活率和增重率。

$$\text{存活率} = \text{存活只数} \div \text{总只数} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{增重率} = (\text{蜕壳后平均体重} - \text{初始平均体重}) \div \text{初始平均体重} \times 100\% \quad (2)$$

1.6 数据分析

应用 SPSS24.0 软件对数据进行统计分析, ANOVA 进行方差分析, GraphPad Prism8 对统计结果进行绘图。数据以平均值±标准误($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示, 差异显著度为 0.05。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 序列分析

中华绒螯蟹 *Es4E-BP1* cDNA 全长为 1678 bp (图 1), 包括 134 bp 的 5'非翻译区(5' UTR), 1193 bp 的 3'非翻译区(3' UTR)和 351 bp 的开放阅读框, 开放阅读框编码 116 个氨基酸(GenBank 登录号: MW687141)。如图 2 所示, 与中华绒螯蟹全基因组(JACDRO010000071.1)比对发现, *4E-BP1* 基因全长 4379 bp, 包含 2 个内含子, 分别为 intron1 (283~2383 bp)和 intron2 (2549~3170 bp)。

ExPASy 分析表明, 中华绒螯蟹 *Es4E-BP1* 分子量为 12.64 kD, 等电点为 4.89, 不稳定指数为 54.99, 为不稳定蛋白。脂溶性指数为 73.97, 总平均亲水性为 -0.489, 说明蛋白具有疏水性; SignalP 分析显示此蛋白不具信号肽; TMHMM 分析显示此蛋白不存在跨膜结构; CDD 数据库分析显示, 第 17 到第 116 个氨基酸为 eIF4E 超级家族的典型保守域, 包含 1 个超二级结构 TOS 基序和 1 个 YXXXXLΦ 结合基序(Φ 代表任何疏水氨基酸残基)(图 3); PROSITE 分析表明, 该蛋白有 4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(casein kinase II phosphorylation site), 1 个 cAMP-或 cGMP-依赖性的蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site), 1 个 N-肉豆蔻酰化位点(N-myristoylation site), 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site), 1 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site)。

2.2 序列比对与系统发育树分析

将 *Es4E-BP1* 与蓝蟹(*Callinectes sapidus*)等甲壳类动物 *4E-BP1* 氨基酸序列对比, 结果发现中华绒螯蟹与蓝蟹同源性最高, 为 95.69%, 与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、南美白对虾和水蚤(*Daphnia pulex*)的同源性分别为 93.16%、86.21%、84.48%和 62.63% (图 3)。

应用 MEGA7.0 软件构建多物种的 *4E-BP1* 氨基酸序列系统发育树, 由图 4 可得, 所有动物的 *4E-BP1* 在系统发育树上聚成 2 支, 分别为哺乳纲(Mammalia)、硬骨鱼类(Teleosts)和甲壳纲(Crustacea)

```

1   CTGTGTGGTGTGTGGCTGAGGACTGAGGACTGAGGAGGCGGCTGCACCACACGAAACCGACTACTGCGCTCCCTGACCACCTAAC 90
91  AGGATTTCCGTGCCGTACAGTCCCTGTGAAGACACGCGTAGCCATGTCAGCGTCCCGAGTGCGTCAGGCGGTGGCTCAGGCCCTGC 180
1   M S A S P V A R Q A V A Q A L 15
181 CGCAGAGCATCCCCCGAGGGTCACTATTGACTCCCCGGCGGACCTTCCTAATGACTACAGCACTACGCCCGGGGACGCTATTCTCCA 270
16  P Q S I P R R V T I D S P A D L P N D Y S T T P G G T L F S 45
271 CTACCCAGGAGGACGAGAATCATATACGAACGAACCTTTCCTGATGCAAAATGCGCAACTCTCCGCTGGCCAAGACTCCCCCAAGAAC 360
46  T T P G G T R I I Y E R T F L M Q M R N S P L A K T P P K N 75
361 TACCTGTGATCCCTGGAGTGACTGCCAAGGACACGAGGTTGTCACCGGAGAATGGCACCATTGTGGAGGAACCAAGAACGACGAGC 450
76  L P V I P G V T A K D T E V V H R E N G T I V E E P E K P E 105
451 CCTCTGACCTGGACAGTTTGAGATGGACCTCTAAGCTCCAGCTCCGCTGCGTGTGTTCCACCGTTCATCATCAGGTCTTGGTGCTCAACACTC 540
106 P S D L D Q F E M D L * 117
541 CCGGCCGCGAGGGGCTCAGTGGCTGGGGTCATGCCGATAATTGATCCTGCTCCGAGTGATTACTTTAGGCAACAGCCAACTAAAC 630
631 TCAGTGGCTCAGTTTAACTCCCGAGTGCCAACTAGTGGTCATTTTATGGTTAGTGGAGGACTGGTGACGGAGCGGTGAGCATTAG 720
721 GGCAGCACTACCCGTCAGCTGCAGCGCTGGTCTTTGCTCAGCGCCAGCACAAGGCTGTCTGCTCCCTCACTTTCTCAGGCAGTTC 810
811 ACTGAGCCACTAGACGACCTTTGCTGCCCTGTGTAGTGGTCTTGTCTTATTACCTTTTCTAAGTGTTAAGTATCTAAGTATGGCA 900
901 TGCAATTCACTGTCTTGAAGCTTAAGAAGCTGACGGGTCTAGTGGACATTAGGTGGTGTGCTAGTGGTGGGGCGGTGTGACGAGG 990
991 ATCTAACTCTTGATCTGTGAGGTAGGTGAGTGGGTCATCAAGGCTGAGCAGGACTTCAGGCGTAGGTGTCTTGGGAAAAATTATAACA 1080
1081 ACTGCTAATTGCAAAAGTCCAAAACTTAACGAACATTTTATAGCTGTTAGGGAAGTGTGTCATGTGTGAGTGTGTGCTG 1170
1171 CTTGTGACCTGGATCAGCTTAGAAAAATCTTCTTACAGGGTGTGAGGATGCTCTTGAAGGCTTGGCAAAACATTACCATTATTTCAA 1260
1261 TAGCATTGGTTGACACAGAAGTATTGAACAGCAGCTGATGCGGTGGTATAGTGTACCAAGTGTGGTCTTAAGAAATGTTAAT 1350
1351 TGATGCATTGTAAACCTAGGAATTAGTTGTGAAGAGGCTTAATACACTTTTACGCTGGTGTGCTCACTTCAGTCTGTGTGATAATCG 1440
1441 AGTGTGTAGGAGACAAATTTGTATTCCATAATTCCGCGAGGTCGGGTGTGACTTGGCGCACTATTATGCAAGGAAGGCTTTTTTAA 1 530
1531 AGTTTGTAAATTGGTGTTAATTTCTATCTTAGAGATGATGGTAGACGTTCACTGTAAAGGCTAAAAACAGACATTATGAAAACCTGAC 1620
1621 AAGAAAAGACAGAAAAAAGATAAACTATCAAGTTCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAA 1678

```

图 1 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

ATG 代表起始密码子, *代表终止密码子, 阴影部分代表 eIF-4EBP 超级家族保守域, AATAAA 为多聚腺苷酸加尾信号。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Es4E-BP1* in *Eriocheir sinensis*

ATG represents the start codon, * represents the stop codon, the shaded part represents the conserved domain of eIF4E superfamily, and AATAA represents the polyadenylation tail signal.

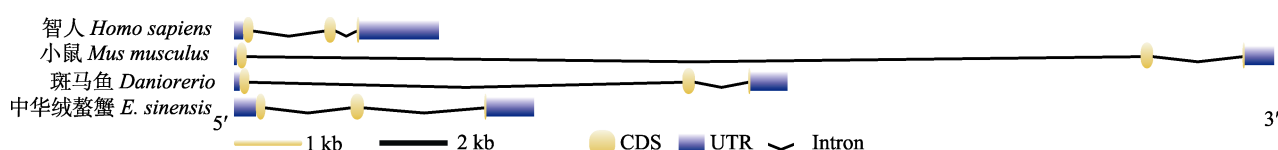


图 2 *4E-BP1* 基因结构示意图

GenBank 序列号: 中华绒螯蟹(JACDRO010000071.1), 智人(NC_000008.11), 小鼠(NC_000074.7)和斑马鱼(NC_007132.7)。

Fig. 2 Schematic diagram of the *4E-BP1* gene structure

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis* (JACDRO010000071.1), *Homo sapiens* (NC_000008.11), *Mus musculus* (NC_000074.7) and *Danio rerio* (NC_007132.7).

1 支, 昆虫纲(Insecta)为 1 支。甲壳纲的 4E-BP1 又分为两个分支, 其中中华绒螯蟹与同属十足目的蓝蟹和三疣梭子蟹的亲缘关系更近。

2.3 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 不同组织的表达分析

以 *Es4E-BP1*-RTF/*Es4E-BP1*-RTR 为引物, *EF-1α* 为内参基因, 利用 qPCR 检测 *Es4E-BP1* mRNA 在中华绒螯蟹成蟹心脏、眼柄、Y 器官、肝胰腺、肠道、鳃、精巢、肌肉和卵巢 9 个组织的表达情况(图 5a), 结果显示 *Es4E-BP1* 在 9 种组织中均有表达, 其中在 Y 器官中表达量最高, 表达水平与其他组织差异显著($P<0.05$); 剩余组织按照从

高到底的顺序, 依次为步足肌肉、心脏、眼柄、肠道、卵巢、精巢、肝胰腺、鳃。另外, Y 器官和步足肌肉表达量呈现雌雄差异, 雄蟹表达量高于雌蟹。

Es4E-BP1 基因在幼蟹不同组织、不同蜕壳时期变化不尽相同(图 5b)。Y 器官和眼柄中, 其表达量在 A-B 期最高($P<0.05$), 其次为 C 期, 蜕壳前期 $D_0\sim D_{3.4}$ 期表达量较低; 肠中, 其表达量在 A-B 期最高, C 期和 D_0 期次之, D_1 和 $D_{3.4}$ 期较低($P<0.05$); 心脏中, 其表达量在 C 期最高, A-B 期次之, 蜕壳前期有所下降。

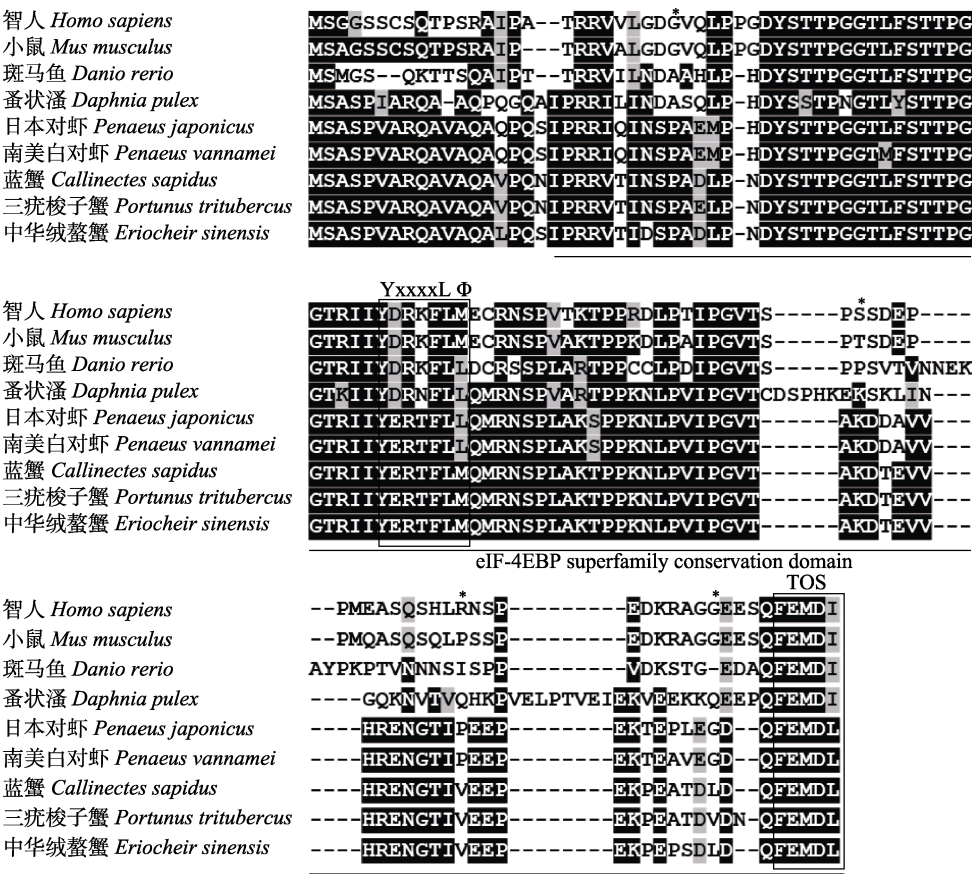


图 3 中华绒螯蟹 *Es4E-BP1* 与其他物种 4E-BP1 的氨基酸序列多重比较
下划线表示 eIF4E 超级家族保守结构域, 方框分别表示超二级结构 TOS 基序和 1 个 YxxxxLΦ 结合基序,
*表示 4 个蛋白激酶 II 磷酸化位点。

Fig. 3 Multiple alignment of the amino acids sequences of 4E-BP1 among *Eriocheir sinensis* and other species
eIF-4EBP superfamily conserved domain was underlined. The common conserved two motifs, the TOS (TOR signaling) motif and
eIF4E binding motif (YxxxxLΦ), were indicated by boxes. * represented four protein kinase phosphorylation sites.

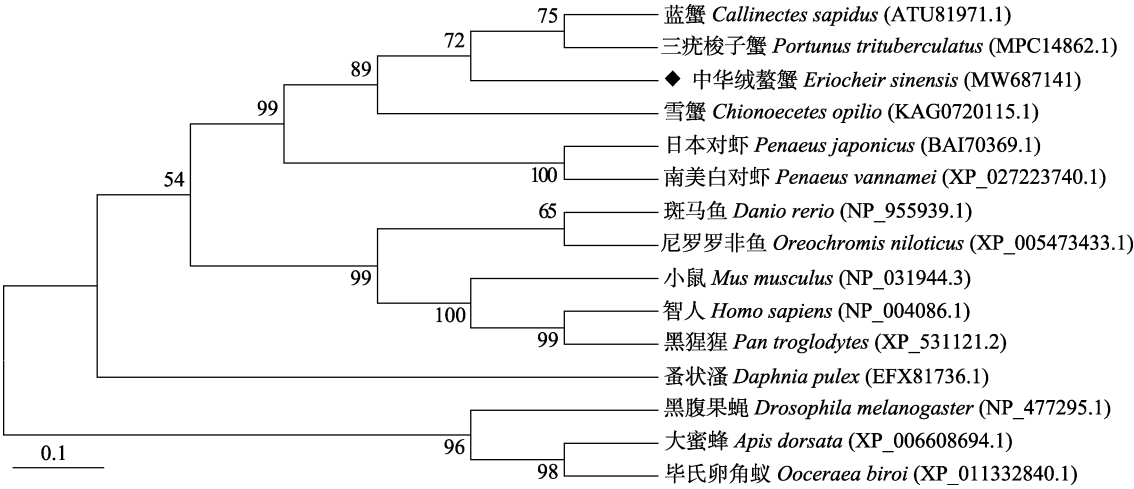


图 4 基于不同物种 4E-BP1 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树
分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度, 标尺长度表示每个位点发生 0.1 次置换。
Fig. 4 Phylogenetic tree derived from multiple alignments of 4E-BP1 amino acid sequences from different species
The bifurcation value represents the confidence obtained by repeating the sampling for 1000 times.
The ruler length represents 0.1 substitutions per site.

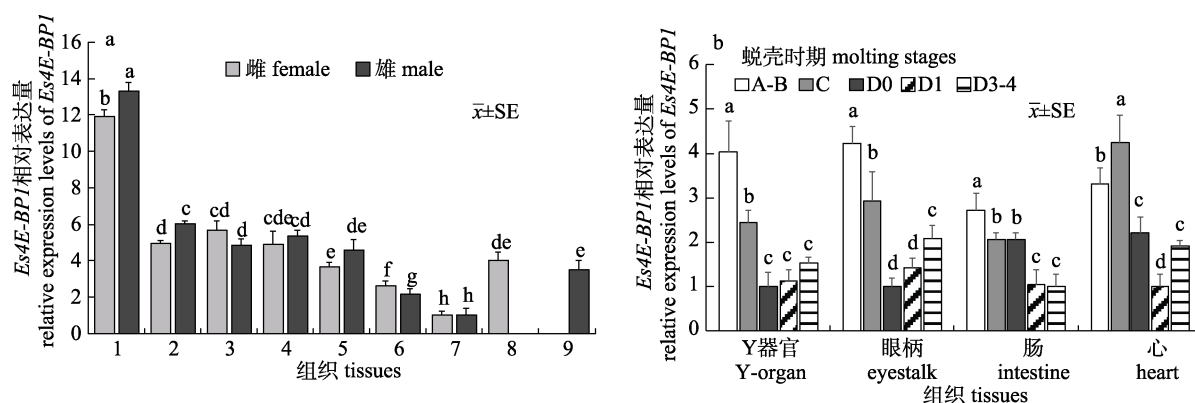


图 5 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因在不同组织中的相对表达

a. *Es4E-BP1* 基因在雌、雄中华绒螯蟹各组织中的表达情况, 1: Y 器官, 2: 步足肌肉, 3: 心脏, 4: 眼柄, 5: 肠, 6: 肝胰腺, 7: 鳃, 8: 卵巢, 9: 精巢. b. *Es4E-BP1* 基因在中华绒螯蟹幼蟹 5 个蜕壳期中 Y 器官、眼柄、肠和心脏中的表达情况. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 The relative expression level of *Es4E-BP1* mRNA in different tissues

a. The expression of *Es4E-BP1* gene in different tissues in male and female crabs, 1: Y-organ, 2: muscle, 3: heart, 4: eyestalk, 5: intestine, 6: Ovary, 7: testis, 8: Hepatopancreas, 9: gill. b. The expression of *Es4E-BP1* gene during the 5 molting stages of crabs in Y-organ, eyestalk, intestine and heart. Different lower case letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.4 中华绒螯蟹 *4E-BP1* 基因在蜕壳周期内肌肉中的表达及螯足特征

不同蜕壳时期中华绒螯蟹的步足、螯足和腹部肌肉组织 *4E-BP1* 基因的 qPCR 结果显示(图 6a), 在一个完整的蜕壳周期中, 中华绒螯蟹步足肌肉组织表达量不断下降, 其中蜕壳前晚期 D_{3-4} 期表达量急剧下调, 显著低于蜕壳后期 A-B 期和蜕壳间期 C 期 ($P < 0.05$); 螯足肌肉组织表达量在 3 个蜕壳周期中先下降升高, 其中 C 期表达量急剧下降, 显著低于 A-B 期和 D_{3-4} 期 ($P < 0.05$); 腹部肌肉相对表达量在 3 个周期内也是先下降再上升, 其中 A-B 期相对表达量显著高于 C 期和 D_{3-4} 期 ($P < 0.05$).

根据第三颚足镜检结果与中华绒螯蟹螯足形态特征比对, 发现在中华绒螯蟹蜕壳周期的 5 个时期中, 螯足长节临近头胸甲一侧的内侧表皮有明显的变化(图 6b-f). 中华绒螯蟹蜕壳刚刚完成的 A-B 期, 螯足刚毛颜色较浅, 螯足长节内侧表皮光滑无凹痕且质地较软; 蜕壳间期 C 期为稳定时期, 螯足刚毛颜色最深且浓密, 螯足长节内侧表皮光滑且坚硬; 蜕壳前期早期 D_0 期, 螯足长节内侧表皮初现摩擦凹痕; 蜕壳前期中期 D_1 期, 螯足内侧表皮摩擦凹痕加深, 逐渐连接成环形; 蜕壳前后期 D_{3-4} 期, 螯足长节内侧表皮环形凹痕磨穿, 中间的表皮形成小片, 脱离表皮, 中华绒螯蟹开

始蜕壳, 雌、雄个体无显著差异。

2.5 *4E-BP1* 基因 dsRNA 干扰对中华绒螯蟹蜕壳的影响

根据 2.3 的结果, *Es4E-BP1* 在 Y 器官表达量最高, 肌肉的表达量次之, 因此选择 Y 器官和肌肉组织, 分别于干扰后 24 h 和 48 h 进行 dsRNA 干扰效率检测。由图 7 所示, ds4E-BP1 组 Y 器官 *Es4E-BP1* 在 24 h 的表达量分别是 CG 组的 53.77%、dsGFP 组的 52.57%; 48 h 时, ds4E-BP1 组的表达量继续下降, 分别为 CG 组的 41.99%、dsGFP 组的 42.40%。ds4E-BP1 组肌肉组织 *Es4E-BP1* 在 24 h 的表达量分别为 CG 组的 44.00%、dsGFP 组的 41.12%; 48 h 时, 分别为 CG 组的 27.49%、dsGFP 组的 27.13%。由此可见, ds4E-BP1 的干扰效果明显。

持续长期注射 dsRNA 发现, 与 CG 组和 dsGFP 组相比, ds4E-BP1 组死亡率增加, 蜕壳周期变长, 增重率有所增加(表 2)。ds4E-BP1 组最终存活率为 38.89%, 远低于 CG 组和 dsGFP 组的 61.11% 和 50.00%。ds4E-BP1 组的蜕壳时间平均为 38.29 d, 显著高于 CG 组(34.45 d)和 dsGFP 组(33.10 d) ($P < 0.05$)。ds4E-BP1 组较 CG 组和 dsGFP 组增重率有所增加, ds4E-BP1 组显著高于 dsGFP 组 ($P < 0.05$), 但是与 CG 组比增加不显著 ($P > 0.05$)。

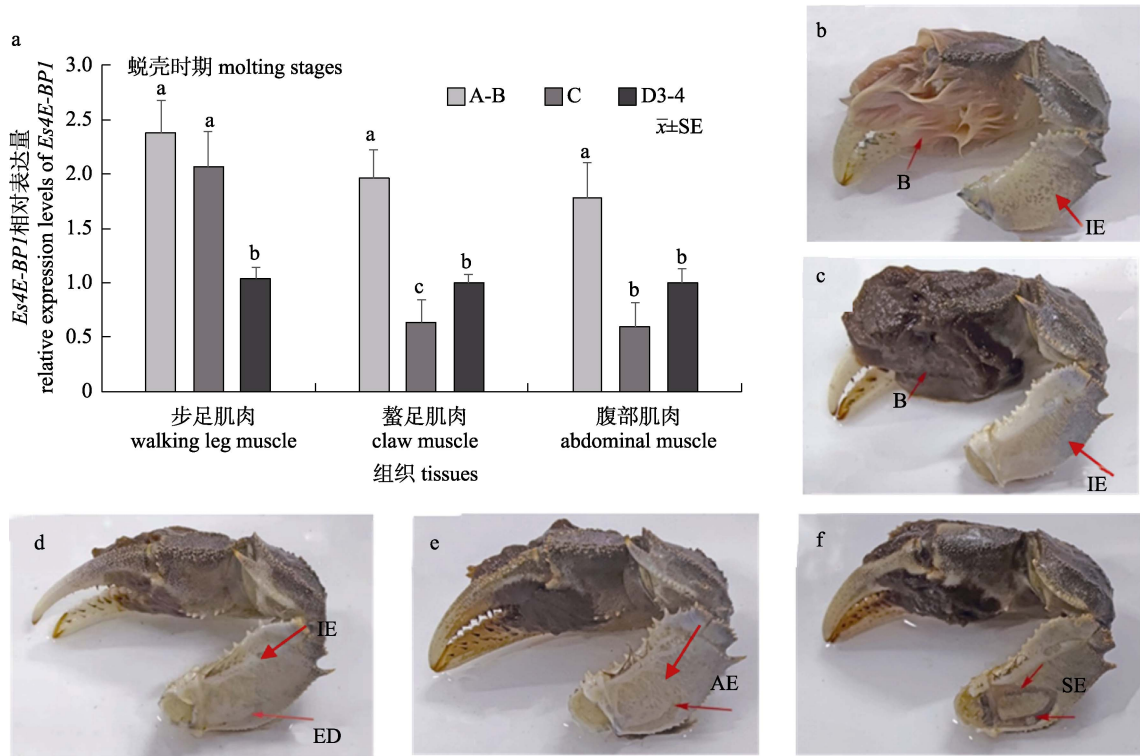


图 6 中华绒螯蟹蜕壳周期内 *4E-BP1* 基因在肌肉组织中的相对表达及螯足特征
a. *4E-BP1* 基因肌肉组织(步足肌肉, 螯足肌肉和腹部肌肉)的相对表达. 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$). b. 蜕壳后期 A-B 期螯足形态, B. 刚毛, IE: 内侧表皮. c. 蜕壳间期 C 期螯足形态. d. 蜕壳前期 D₀ 期螯足形态, ED: 表皮凹痕. e. 蜕壳前期 D₁ 期, AE: 表皮凹痕形成环状. f. 蜕壳前后期 D_{3,4} 期螯足形态, SE: 表皮脱落.

Fig. 6 The relative expression level of *Es4E-BP1* mRNA in muscle tissues and the characteristic changes in the claws of *Eriocheir sinensis* during molting cycles
a. The relative expression level of *Es4E-BP1* mRNA in muscle tissues (walking leg muscle, claw muscle and abdominal muscle). Different lower case letters indicated significant differences ($P < 0.05$). b. Morphology of claw at post-molt stage A-B, B: bristle, IE: inner epidermis. c. Morphology of claw at inter-molt stage C. d. Morphology of claw at post-molt stage D₀, ED: epidermal dent. e. Morphology of claw at post-molt stage D₁, AE: annular epidermis. f. Morphology of claw at later post-molt stage D_{3,4}, SE: shedding epidermis.

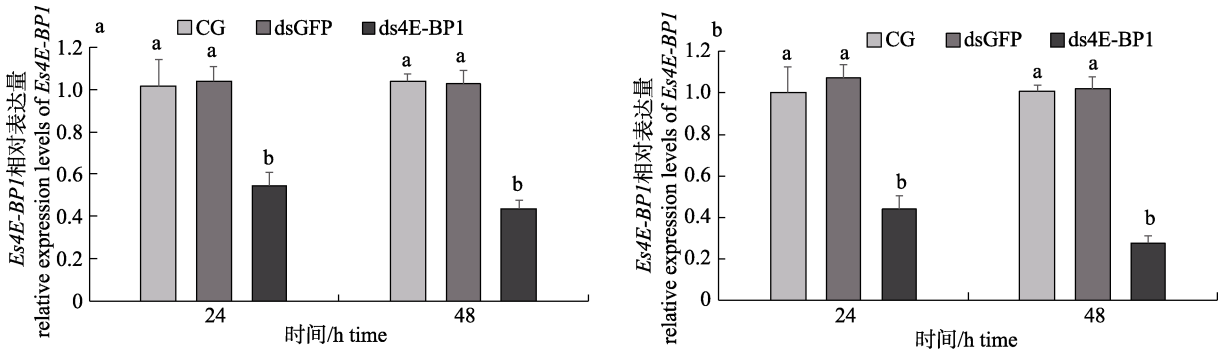


图 7 dsRNA 干扰后 *Es4E-BP1* 在中华绒螯蟹 Y 器官(a)和肌肉(b)中的相对表达量
CG: 注射生理盐水组, dsGFP: 注射 dsGFP 组, ds4E-BP1: 注射 ds4E-BP1 组.
不同小写字母表示同一时间点不同处理组间差异显著($P < 0.05$).
Fig. 7 The relative expression levels of *Es4E-BP1* in Y-organ (a) and muscle (b) of *Eriocheir sinensis* after dsRNA interference
CG: normal saline injection group, dsGFP: dsGFP injection group, ds4E-BP1: ds4E-BP1 injection group.
Different lower case letters indicate significant differences among different groups at the same time point ($P < 0.05$).

表 2 *Es4E-BP1* 基因干扰后中华绒螯蟹蜕壳情况统计
Tab. 2 The statistics of molting of *Eriocheir sinensis* after *Es4E-BP1* dsRNA injection

$\bar{x} \pm SE$

分组 group	数量 number	死亡 个数 number of deaths	存活率 /% survival rate	蜕壳间隔/d molt interval	平均增重率 /% weight gain rate
CG	6	2	61.11	34.45±0.76 ^a	28.69±2.58 ^{ab}
	6	2			
	6	3			
dsGFP	6	3	50.00	33.10±0.97 ^a	26.95±2.43 ^a
	6	2			
	6	4			
ds4E-BP1	6	4	38.89	38.29±1.54 ^b	34.32±2.25 ^b
	6	3			
	6	4			

注: CG 为注射生理盐水组, dsGFP 为注射 dsGFP 组, ds4E-BP1 为注射 ds4E-BP1 组。不同小写字母表示不同组间差异显著($P<0.05$)。
Note: CG represents normal saline injection group, dsGFP represents dsGFP injection group, ds4E-BP1 represents ds4E-BP1 injection group. Different lower case letters indicate significant differences among different groups ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 中华绒螯蟹 4E-BP1 基因的克隆及生物信息学分析

真核起始因子 4E-BPs 是真核生物翻译起始和调控的核心成分,其氨基酸序列、蛋白质结构以及功能均高度保守^[8]。目前,4E-BP1 基因已在大多数脊椎动物中被鉴定,4E-BP1 通过与 eIF4E 结合限制翻译起始复合物形成,阻断 mRNA 5'帽依赖性蛋白质翻译起始^[25],因此其在控制翻译中起着关键作用。本研究运用 RACE 技术从中华绒螯蟹中成功分离和鉴别了 *Es4E-BP1* 的全长 cDNA 序列,编码 116 个氨基酸。其蛋白质包含 2 个功能性基序: 1 个超二级结构 C 端 TOS 基序和 1 个 eIF4E 结合基序,这与家蚕(*Bombyx mori*)^[26]、果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[27]等节肢类动物的结构域相同。另外 *Es4E-BP1* 含有 4 个磷酸化位点,这与硬蜱(*Haemaphysalis longicornis*)^[28]、内蒙古绒山羊(*Capra hircus*)^[29]等生物相同。通过实验得到的 *Es4E-BP1* 基因 cDNA 核苷酸序列和推导的

氨基酸序列经 NCBI Blast 序列比对,与已报道的物种的氨基酸具有高度的同源性,其中与蓝蟹 4E-BP1 的相似性最高,达到了 95.69%,说明所获得的 *Es4E-BP1* 基因序列是准确的。此外,通过 CDD 数据库(NCBI)预测,发现 *Es4E-BP1* 开放阅读框编码的多肽含有 4E-BPs 超家族典型的结构域,说明此蛋白结构与功能相统一。从系统进化树进一步分析,发现 *Es4E-BP1* 与蓝蟹、三疣梭子蟹、南美白对虾和日本对虾聚为一支,且与昆虫纲节肢动物、脊椎动物聚集在不同分支,说明 *Es4E-BP1* 在节肢动物的甲壳纲和昆虫纲以及脊椎动物之间存在着较大的进化差异。

3.2 *Es4E-BP1* 基因在不同组织中的表达

4E-BP1 是研究最成熟的 mTORC1 的底物之一,其在 mTORC1 信号转导中起着关键作用,其控制翻译和细胞增殖,进而影响生物体发育、营养和生长等生理过程^[30-31]。4E-BP1 的表达分布在人、鼠、硬骨鱼中有所报导,但甲壳动物尚未见报道。研究发现 4E-BP1 在人骨骼肌、脂肪组织和胰腺表达较高,与小鼠中的表达模式相同^[32],表明其在营养代谢和生长中的潜在作用。齐口裂腹鱼中,4E-BP1 在组织中广泛分布,包括中肠、鳃、肝脏、脾脏、中肾等组织^[11]。尼罗罗非鱼中,4E-BP1 在鳃中表达最高,头肾、血液和体肾中含量次之,脾脏和肝脏中含量相对较低^[12]。本研究中, *Es4E-BP1* 在成蟹不同组织广泛表达,其中, Y 器官表达量最高,步足肌肉、心脏、眼柄及肠道中表达次之。Y 器官和眼柄是甲壳动物内分泌调控中心,对甲壳动物的蜕壳、生长发育、糖代谢等生理过程起着重要作用, *Es4E-BP1* 在 Y 器官和眼柄中表达较高,可能与激素、生长因子的调节活动有关^[33]。mTORC1/4E-BP 信号调节骨骼肌细胞营养代谢,以促进蛋白质合成和细胞生长^[34]。 *Es4E-BP1* 在步足肌肉中表达较高,步足是中华绒螯蟹主要的运动器官,表明 *Es4E-BP1* 在步足肌肉的蛋白合成调控中较为活跃。mTORC1 通过 4E-BP1 调控核编码的线粒体相关 mRNA 的翻译,而控制线粒体活性和生物发生,进而调控能量代谢^[35],线粒体在维持心脏的正常功能以及各种心

脏病的发病机制中起着关键作用。因此, *Es4E-BP1* 可能在维持心脏正常功能中发挥重要作用。*Es4E-BP1* 在肠道中的表达表明肠道可能通过营养代谢调控蛋白的合成^[36]。另外, *Es4E-BP1* 在 Y 器官和肌肉中表达量雌雄差异显著, 可能与雌雄个体差异有关, 众所周知, 雄蟹较雌蟹生长速度快, 体重更大, 更强壮, 因此 *Es4E-BP1* 可能在生长速率调控上起作用。

3.3 *Es4E-BP1* 在不同蜕壳时期的表达

蜕壳关乎甲壳类动物的生长和体重增加。研究发现, 蜕壳后期 A-B 期是甲壳动物体重快速增长期, 此时蟹体进入迅速膨胀期, 这一过程受生长因子、调控蛋白以及转录因子的综合调控^[33,37], 其中对水分等的吸收可由节肢动物的神经内分泌系统调节^[38]。选取 *Es4E-BP1* 表达量较高的 Y 器官、眼柄、心脏和肠, 对不同蜕壳时期的 *Es4E-BP1* 进行表达量分析, 结果显示, Y 器官、眼柄和肠均在蜕壳后期 A-B 期的表达量最高。王彬等^[39]对中华绒螯蟹眼柄和 Y 器官基因组代谢网络进行分析发现, 这 2 个组织在 A-B 期参与重要氨基酸的合成, 因而此过程蛋白质的代谢速率较高, 蛋白合成调控因子也较为活跃。A-B 期是蜕壳后生长的起始, 蛋白代谢开始进入旺盛时期, 因此各组织中 A-B 期表达丰度较高。A-B 期, 蟹体迅速吸收水分和矿物质, 达到体重快速增长和甲壳的快速硬化, 此过程肠道发挥重要作用^[40], 因此整体蛋白代谢旺盛, *Es4E-BP1* 表达量较高。蜕壳间期 C 期, 蟹体整体处于平稳期, Y 器官、眼柄和肠的表达量都处于较高的水平, 表明 *Es4E-BP1* 在维持蛋白表达稳态中发挥重要作用。心脏中表达量 C 期最高, 其次为 A-B 期, 这也充分说明了, *Es4E-BP1* 在维持正常状态下心脏功能中发挥重要作用。蜕壳前期(D₀、D₁ 和 D_{3,4} 期), 各组织中 *Es4E-BP1* 的表达均有所下降, 可能因为蜕壳前期蟹较为不活跃, 代谢减缓, 为蜕壳做准备。

蜕壳后 10 d 之内是肌肉快速生长的时期^[41], 通过纤维细胞的增殖和肥大达到肌纤维数量、直径和长度的增加, 实现体重的增加, 达到生长的目的, 此过程 mTORC1/4E-BP 信号传导在调节骨骼肌细胞的营养代谢、促进蛋白质合成中发挥重

要作用^[42]。如本文中图 6b 所示, 蜕去旧壳的蟹足表皮干净质软, 为蟹体快速膨大提供条件。本研究中, *Es4E-BP1* 在步足、蟹足和腹部肌肉中的表达结果显示, A-B 期高于 C 期和 D_{3,4} 期, 且蜕壳后期 A-B 期 mRNA 表达量显著高于 D_{3,4} 期, 符合 A-B 期肌肉快速增生的特征。C 期蟹足肌肉和腹部肌肉 *Es4E-BP1* 表达量较低, 此时蟹足表面光滑充实(图 6c), 该时期体重进入平台期, 肌肉合成速率较慢; 而步足肌肉 C 期 *Es4E-BP1* 表达量比蟹足和腹部肌肉高, 可能是由于步足的活动需求使蛋白代谢速率较高^[33], 因而参与蛋白合成的调控转录因子活性也处于较高水平。田志环等^[43-44]的研究表明, D_{3,4} 期中华绒螯蟹肌肉组织结构在肌纤维末端的肌节处于超收缩状态, 肌纤维典型结构消失, 本研究中 *Es4E-BP1* 在 D_{3,4} 期的步足、蟹足和腹部肌肉表达量下降, 也说明了蛋白合成的调控速率降低, 支持以上结果。由此推测 *Es4E-BP1* 参与中华绒螯蟹蜕壳生长过程中蛋白质合成的调节。观察蟹足形态, 长节内侧表皮在 D₁ 期和 D₂ 期出现磨痕, D_{3,4} 期环形凹痕磨穿, 中间小片表皮脱落, 此结构有利于蟹足在蜕壳过程中顺利蜕出蟹足根部狭小的关节, 可用于快速分辨中华绒螯蟹是否处于蜕壳前期。

3.4 *Es4E-BP1* 基因干扰对中华绒螯蟹蜕壳的影响

RNA 干扰技术作为挖掘功能基因的分子工具, 在甲壳类动物中主要应用于蜕壳生长、免疫应答等相关重要基因的鉴定与生物学功能研究^[45-48]。*4E-BP1* mRNA 水平从一定程度上能反映其蛋白水平^[49], 为了进一步探究 *Es4E-BP1* 基因功能, 本研究采用 dsRNA 干扰, 降低了 *Es4E-BP1* 在 mRNA 水平的表达, 注射后 24 h 和 48 h 抑制率均能达到 50% 以上, 证明 dsRNA 干扰效果有效。

对中华绒螯蟹进行长期连续干扰, 与对照相比, ds4E-BP1 组幼蟹蜕壳周期变长, 蜕壳存活率降低, 增重率变大。由此推测, *Es4E-BP1* 基因干扰影响了幼蟹的蜕壳生长。*4E-BP1* 属于翻译抑制蛋白家族, 当 *4E-BP1* 表达受到抑制, 帽依赖蛋白翻译有所增加, 因此 ds*4E-BP1* 组幼蟹体重有所增加, 加之蜕壳周期变长, 体重增长较对照组快。

Le Bacquer 等^[50]的研究也表明, *4E-BP1* 和 *4E-BP2* 双基因敲除(DKO)小鼠体重较野生型(WT)小鼠有所增加, 但造成小鼠骨骼肌脂肪的积累; 骨骼肌代谢组学和复合脂质分析显示, 在氨基酸稳态、碳水化合物丰度和脂质代谢方面 DKO 小鼠和 WT 小鼠间存在显著差异^[51], 表明 4E-BPs 的缺失与骨骼肌能量代谢紊乱相关, 其在维持肌肉内稳态方面发挥重要作用。尽管 ds4E-BP1 组幼蟹体重有所增加, 但死亡率较对照组高, 蜕壳周期较对照组长, 可能是因为 *Es4E-BP1* 表达量降低导致了翻译调控的异常, 因而导致死亡个体增加及蜕壳调控的异常。杨鹤^[52]研究发现, *mTOR* 基因参与中华绒螯蟹的蜕壳与肌肉发育, *mTOR* 基因干扰不仅影响机体的蛋白质合成, 还会影响细胞的存活。除了在翻译起始控制中的作用外, 4E-BPs 还被证明是 mTORC1 依赖性控制线粒体生物发生和功能的重要介质, Morita 等^[35]证明抑制 mTORC1 可能导致线粒体功能受损, MCF7 细胞中几种 TCA 循环中间产物显著减少, 如柠檬酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸^[35]。因此, 中华绒螯蟹 4E-BP1 表达异常可能引起机体蛋白代谢和能量代谢异常, 从而影响个体的生长, 甚至导致死亡。

综上, 本研究获得了中华绒螯蟹 *Es4E-BP1* 基因序列, 其在中华绒螯蟹各组织中均有表达, Y 器官表达量最高, 鳃表达量最低。基因干扰 *Es4E-BP1* 可导致幼蟹蜕壳周期变长、死亡率升高, 因此推测 *Es4E-BP1* 参与调控中华绒螯蟹蜕壳生长。本研究结果能够为中华绒螯蟹蜕壳生长的分子机制研究提供新思路。

参考文献:

- [1] Chi H B. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(5): 325-338.
- [2] Wang X M, Li W, Parra J L, et al. The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(5): 1546-1557.
- [3] Cridge A G, Castelli L M, Smirnova J B, et al. Identifying eIF4E-binding protein translationally-controlled transcripts reveals links to mRNAs bound by specific PUF proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(22): 8039-8050.
- [4] Guhathakurta P, Prochniewicz E, Thomas D D. Actin-myosin interaction: Structure, function and drug discovery[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2628.
- [5] Feng C C, Lin C C, Lai Y P, et al. Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 α -IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP₃ expression[J]. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 2016, 34(3-4): 73-86.
- [6] Kazi A A, Hong-Brown L, Lang S M, et al. Deptor knockdown enhances mTOR Activity and protein synthesis in myocytes and ameliorates disuse muscle atrophy[J]. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass)*, 2011, 17(9-10): 925-936.
- [7] Peter D, Igreja C, Weber R, et al. Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E[J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(6): 1074-1087.
- [8] Qin X Y, Jiang B, Zhang Y J. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein[J]. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)*, 2016, 15(6): 781-786.
- [9] Gingras A C, Gygi S P, Raught B, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: A novel two-step mechanism[J]. *Genes & Development*, 1999, 13(11): 1422-1437.
- [10] Gingras A C, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(7): 807-826.
- [11] Lin F J, Yuan D Y, Chen D F, et al. Eukaryotic initiation factor 4E binding protein family members are widely expressed in fish tissues: Cloning and distribution of 4E-BPs in *Schizothorax prenanti*[J]. *Agri Gene*, 2017, 3: 109-115.
- [12] Li C, Li K, Li K M, et al. Essential role of 4E-BP₁ for lymphocyte activation and proliferation in the adaptive immune response of Nile tilapia[J]. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2021, 2: 100006.
- [13] Cassidy A A, Driedzic W R, Campos D, et al. Protein synthesis is lowered by 4EBP1 and eIF2- α signaling while protein degradation may be maintained in fasting, hypoxic Amazonian cichlids *Astronotus ocellatus*[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2018, 221(Pt 2): jeb167601.
- [14] Valenzuela C A, Zuloaga R, Mercado L, et al. Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different nonoverlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2018, 314(1): R102-R113.
- [15] Fang H, Liu X W, Shao X Q, et al. Molecular and functional

- characterization of *Raptor* in mTOR pathway from *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(6): 2179-2189.
- [16] Wen C, Ma S, Tian H Y, et al. Evaluation of the protein-sparing effects of carbohydrates in the diet of the crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Aquaculture*, 2022, 556: 738275.
- [17] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. China fishery statistics yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020. [中国农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.]
- [18] Tian Z H, Kang X J, Mu S M. The molt stages and the hepatopancreas contents of lipids, glycogen and selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(1): 67-74.
- [19] Mykles D L. Proteolytic processes underlying molt-induced claw muscle atrophy in decapod crustaceans[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2015, 39(3): 541-551.
- [20] Li J J. Study on osmoregulation mechanism during molting stages of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [李晶晶. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蜕皮期间渗透压调节机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [21] Hopkins P M. The eyes have it: A brief history of crustacean neuroendocrinology[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(3): 357-366.
- [22] Mykles D L, Chang E S. Hormonal control of the crustacean molting gland: Insights from transcriptomics and proteomics[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 294: 113493.
- [23] Jiao M J. Study on the mechanisms and influencing factors of the molting in *Eriocheir sinensis*[D]. Baoding: Hebei University, 2013. [焦满静. 中华绒螯蟹蜕皮机制与影响因素的研究[D]. 保定: 河北大学, 2013.]
- [24] Drach P, Tchernigovtzeff C. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés[J]. *Vie et Milieu*, 1967: 595-610.
- [25] Culjkovic B, Topisirovic I, Borden K L B. Controlling gene expression through RNA regulons: The role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(1): 65-69.
- [26] Yu W, Han J Q, Zhang Y Z. Cloning, expression and function analyses of eukaryotic translation initiation factor 4E(Bmelf4E) gene from silkworm Pupa (*Bombyx mori*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(2): 206-213. [于威, 韩剑秋, 张耀洲. 家蚕真核细胞翻译起始因子(Bmelf4E)基因的克隆、表达及功能分析[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(2): 206-213.]
- [27] Lasko P. The *Drosophila melanogaster* genome: Translation factors and RNA binding proteins[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2000, 150(2): F51-F56.
- [28] Kume A, Boldbaatar D, Takazawa Y, et al. RNAi of the translation inhibition gene *4E-BP* identified from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, affects lipid storage during the off-host starvation period of ticks[J]. *Parasitology Research*, 2012, 111(2): 889-896.
- [29] Fu H X, Yang J F, Liang Y, et al. Cloning and tissue-specific expression pattern of 4E-BP1 gene cDNA in inner Mongolia Cashmere goat[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(3): 90-94. [傅海霞, 杨娇馥, 梁燕, 等. 内蒙古白绒山羊 4E-BP1 基因 cDNA 克隆及组织表达特异性分析[J]. 生物技术通报, 2012(3): 90-94.]
- [30] Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(15): 6710-6718.
- [31] Cota D, Proulx K, Smith K A B, et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake[J]. *Science*, 2006, 312(5775): 927-930.
- [32] Tsukiyama-Kohara K, Vidal S M, Gingras A C, et al. Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2[J]. *Genomics*, 1996, 38(3): 353-363.
- [33] Covi J A, Bader B D, Chang E S, et al. Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a myostatin-like factor during atrophy induced by molting or unweighting[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(1): 172-183.
- [34] Dickinson J M, Fry C S, Drummond M J, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids[J]. *The Journal of Nutrition*, 2011, 141(5): 856-862.
- [35] Morita M, Gravel S P, Chénard V, et al. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 18(5): 698-711.
- [36] Suer S, Ampasala D, Walsh M F, et al. Role of ERK/mTOR signaling in TGF β -modulated focal adhesion kinase mRNA stability and protein synthesis in cultured rat IEC-6 intestinal epithelial cells[J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 336(2): 213-223.

- [37] de Oliveira Cesar J R, Zhao B P, Malecha S, et al. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 688-694.
- [38] Gäde G. Regulation of intermediary metabolism and water balance of insects by neuropeptides[J]. Annual Review of Entomology, 2004, 49: 93-113.
- [39] Wang B. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic network model for eyestalk, Y organ and hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2017. [王彬. 中华绒螯蟹眼柄、Y 器官和肝胰腺基因组尺度代谢网络的构建及分析[D]. 新乡: 河南师范大学, 2017.]
- [40] Greenaway P. Calcium balance and moulting in the Crustacea[J]. Biological Reviews, 1985, 60(3): 425-454.
- [41] Chen J. Observation on individual molting, growth and analysis of relative gene expression in Chinese mitten crab[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016. [陈娇. 中华绒螯蟹蜕壳、生长的个体观察和相关基因的表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.]
- [42] Norton L E, Layman D K, Bunpo P, et al. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats[J]. The Journal of Nutrition, 2009, 139(6): 1103-1109.
- [43] Tian Z H, Jiao C Z, Cheng Y X, et al. Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of serine/threonine kinases Akt from *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(4): 485-494. [田志环, 焦传珍, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹 Akt 基因的 cDNA 克隆、序列分析及表达特征[J]. 水产学报, 2018, 42(4): 485-494.]
- [44] Tian Z H, Cheng Y X, Wu X G, et al. Changes of histology, ultrastructure and main protein in muscles of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* during the molt cycle[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(5): 1036-1041. [田志环, 成永旭, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹蜕壳过程中肌肉的组织学、超微结构及主要蛋白质含量的变化[J]. 水生生物学报, 2017, 41(5): 1036-1041.]
- [45] Chen T C, Lyu M, Lu X H, et al. Review on application of RNAi in immunization and growth of shrimp[J]. Journal of Aquaculture, 2018, 39(10): 28-33. [陈田聪, 吕敏, 卢小花, 等. RNAi 技术在虾免疫和生长发育的研究进展[J]. 水产养殖, 2018, 39(10): 28-33.]
- [46] Hou X, Chen X W, Yang H, et al. V-ATPase subunit B plays essential roles in the molting process of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Biology Open, 2020, 9(5): bio048926.
- [47] Li X G, Xu Z Q, Zhou G, et al. Molecular characterization and expression analysis of five chitinases associated with molting in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 187: 110-120.
- [48] Yang W, Liu C, Xu Q S, et al. A novel nuclear factor Akirin regulating the expression of antimicrobial peptides in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 101: 103451.
- [49] Lin T A, Kong X, Saltiel A R, et al. Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes. Synthesis, degradation, and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(31): 18531-18538.
- [50] Le Bacquer O, Combe K, Montaurier C, et al. Muscle metabolic alterations induced by genetic ablation of 4E-BP₁ and 4E-BP₂ in response to diet-induced obesity[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(9): 201700128.
- [51] Le Bacquer O, Combe K, Patrac V, et al. 4E-BP₁ and 4E-BP₂ double knockout mice are protected from aging-associated sarcopenia[J]. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2019, 10(3): 696-709.
- [52] Yang H. Culture of hemocytes and its application in function study of mTOR gene in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [杨鹤. 中华绒螯蟹血细胞体外培养及其对 mTOR 基因功能研究的应用效果[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]

Molecular cloning of the *4E-BP1* gene and its expression pattern during molting stages in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*

FENG Wenrong^{1,2}, FENG Wei^{1,2}, ZHANG Mingyin², YU Fan¹, LI Jianlin¹, SU Shengyan^{1,2}, TANG Yongkai^{1,2}, XU Pao^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: The eukaryotic initiation factor 4E protein (4E-BP1) is the main downstream factor of the mTOR signaling pathway. It is phosphorylated by an activated mTORC1 signal and acts as a translation inhibitor. 4E-BP1 plays a key role in the rate-limiting of cap-dependent translation, thus influencing protein synthesis, cell survival, growth, proliferation, and metabolism. Although the regulatory mechanism of 4E-BP1 has been well elucidated in mammals, the knowledge regarding crustaceans is still limited. In this study, we obtained a full-length cDNA of *Eriocheir sinensis* *4E-BP1* (*Es4E-BP1*) using the RCAE method. Real-time quantitative PCR (qPCR) was applied to detect the temporal and spatial expression patterns of *Es4E-BP1*. The double-stranded RNA (dsRNA) silencing method was used to explore the role of *Es4E-BP1* in the molting cycle of *E. sinensis*. Results showed that the length of *Es4E-BP1* cDNA was 1678 bp, containing a 134 bp 5' non-coding region, 1193 bp 3' non-coding region, and 351 bp open reading frame (ORF). The cDNA sequence is composed of three exons (282 bp, 165 bp, and 1209 bp) and two introns (2101 bp and 622 bp). The ORF encodes a putative polypeptide of 116 amino acids with a molecular weight of 12.64 kD and an isoelectric point (PI) of 4.89. The secondary structure of *Es4E-BP1* contains a typical eIF4E superfamily conserved domain, a TOR signaling motif, and a Y×××LΦ binding motif (Φ denotes any hydrophobic amino acid), which are unique to the 4E-BPs family. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *Es4E-BP1* was clustered with *Callinectes sapidus* and *Portunus trituberculatus*, with high identities of 95.69% and 93.16%, respectively. qPCR results showed that *Es4E-BP1* was expressed in various tissues of adult crabs. The transcript level in Y organs was significantly higher than that in other tissues, such as muscle, heart, eyestalk, intestine, ovary, testis, hepatopancreas, and gill ($P<0.05$). During a complete molting cycle, the expression patterns were distinct among different tissues of juvenile crabs. There is a similar expression pattern in Y-organ and intestine. The highest expression levels were observed in post-molt (stage A-B), followed by intermolt (stage C) and early post-molt (stage D₀ and stage D₁). The expression levels were the lowest in the post-molt (stage D₃₋₄). The expression level in the eye stalks was the highest in stage A-B. It decreased in stages C and D₀ but increased in stage D₁ and stage D₃₋₄. In addition, the expression level of *Es4E-BP1* differed among different muscle tissues. The expression levels of *Es4E-BP1* in the claw muscle and abdominal muscle reached the peak in stage A-B, was the lowest in stage C ($P<0.05$), and increased slightly in stage D₃₋₄ compared with stage C. In the walking foot muscle, the expression levels were high in stages A-B and C but decreased in stage D₃₋₄ ($P<0.05$). The RNA interference test showed that the mRNA levels of *Es4E-BP1* were significantly decreased in the Y-organ and muscle after injection with ds*4E-BP1*. In the Y-organ, the expression level of *Es4E-BP1* in the injected group was 53.77% (24 h post-injection) and 41.99% (48 h post-injection) of that in the control group. Meanwhile, in muscles, the expression level of *Es4E-BP1* in the injection group was 44.00% (24 h post-injection) and 27.49% (48 h post-injection) of that in the control group. Furthermore, during the long-term interference experiment, ds*Es4E-BP1* was injected every 2 days. The survival rate of the ds*4E-BP1* injection group was 38.89%, much lower than 61.11% in the control group and 50.00% in the dsGFP injection group. The average molting interval of the ds*4E-BP1* injection group was 38.29 days, much longer than that of the control group (34.45 days) and dsGFP injection group (33.10 days). The weight gain rate of the ds*4E-BP1* injection group was 34.32%, higher than that in the control group (28.69%) and dsGFP injection group (26.95%). Overall, our results indicated that *Es4E-BP1* might play a crucial role in the molting and growth of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; *4E-BP1*; molting; gene cloning; gene expression

Corresponding author: TANG Yongkai, E-mail: tangyk@ffrc.cn; XU Pao, E-mail: xup@ffrc.cn