

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17155

中华绒螯蟹 *Smad3(EsSmad3)* 的 cDNA 克隆、序列分析及表达特征

田志环^{1,2}, 焦传珍¹, 成永旭²

1. 广东韶关学院 英东生命科学院, 广东 韶关 512005;
2. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 为了研究 *Smad* 基因在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蜕壳前后肌肉生长过程中的功能, 应用 RACE 技术克隆得到编码中华绒螯蟹 *Smad3* (命名为 *EsSmad3*) 的 cDNA 全长序列 2021 bp, 包括 36 bp 的 5' 非翻译区(5'-UTR)、656 bp 的 3'非翻译区(3'-UTR)和编码 442 个氨基酸的开放阅读框。蛋白质结构域分析显示 *EsSmad3* 含有 MH1 和 MH2 两个特征性保守结构域。多序列比对显示, *EsSmad3* 与人、斑马鱼、黑腹果蝇中的同源蛋白序列一致性分别为 0.679、0.691、0.619。应用荧光定量 RT-PCR 技术分析 *EsSmad3* 在性成熟中华绒螯蟹各组织及幼体不同蜕壳时期不同部位肌肉组织中转录水平上表达量的变化。结果显示, *EsSmad3* 在性成熟个体的肝胰腺、眼柄、表皮、卵巢、精巢、心脏、鳌足、鳃、三角膜等组织中均有表达, 其中眼柄和精巢中表达量较高, 心脏和肝胰腺中表达量最低。在幼体不同蜕壳时期的不同部位的肌肉中, *EsSmad3* 表达量变化不同: 步行足肌肉组织中 *EsSmad3* mRNA 表达在蜕壳间期高于蜕壳前 D₃₋₄ 期和蜕壳后 A~B 期, 但无显著的统计学差异($P>0.05$)。鳌足肌肉在蜕壳前晚期 D₃₋₄ 期急剧下调($P<0.05$), 蜕壳后 A~B 期开始表达量显著升高($P<0.05$), 直至蜕皮间期 C 期。腹部肌肉组织中 *EsSmad3* mRNA 水平在蜕皮间期 C 期显著高于蜕壳后 A~B 期, 这种上调一直持续到蜕壳前晚前期 D₃₋₄。上述结果表明, *EsSmad3* 在中华绒螯蟹蜕壳过程中不同部位肌肉组织中的表达模式与蜕皮周期密切相关, 推测 *EsSmad3* 参与了中华绒螯蟹蜕壳诱导的肌肉萎缩、生长及重建过程。

关键词: *Smad3* 基因; 基因克隆; 肌肉生长; 蜕壳; 中华绒螯蟹

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)02-0316-09

TGF-β/BMP/activin 超家族细胞因子结合细胞质膜上的受体, 经 Smad 蛋白质家族的介导, 将细胞外信号传递到细胞核内, 调控一系列基因的表达, 最终决定细胞的命运和行为^[1]。在从线虫到人类广泛的物种范围内, 该信号通路对细胞应答、分化和发育等生物学过程具有重要的调节作用^[2-4]。Smad 家族中受体调节型 Smad (R-Smad) 在细胞因子配体结合细胞膜上的受体后被磷酸化, R-Smad 单体转变为活性的三聚体, 进一步与通用辅助因子 Smad4 交换一个亚基变为更为稳定的

异源三聚体^[5-6]。异源复合体进入细胞核结合到靶基因的启动子上, 与转录共调节因子相互作用调节靶基因的转录水平的表达^[7]。已有的研究表明 Smad2/Smad3(属于 R-Smad)与人的肌肉萎缩有关, Smad2/Smad3 在 myostatin、activin A 及其他转化生长因子家族成员下游介导肌肉组织中蛋白的丢失和萎缩^[8-9]。

对于虾蟹等水产甲壳动物, 目前尚未见到有关于 *Smad* 基因克隆及功能的研究报道。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是中国重要的经济养殖动

收稿日期: 2017-04-18; 修订日期: 2017-06-16.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572635); 科技部港澳台科技合作专项项目(2014DFT30270); 上海市科学技术委员会科研项目(16DZ2281200); 上海高校水产学高峰学科建设项目(2015-62-0908); 上海市科技兴农推广项目[沪农科推字(2015)第 1-7 号]; 韶关学院生态学重点扶持学科(230079030101).

作者简介: 田志环(1971-), 博士, 副教授, 研究方向: 甲壳动物生长发育. E-mail: tianzhihuan@126.com

通信作者: 焦传珍, 教授, 研究方向: 分子生物学与生物化学. E-mail: jiaocz@gmail.com

物, 其肌肉生长和蜕壳周期密切相关, 尤其是肥大的螯足肌肉, 蜕壳前发生可逆性萎缩以顺利蜕出狭小的关节, 蜕壳后再恢复重建^[10]。为了探讨中华绒螯蟹 *Smad* 是否参与了蜕壳过程中肌肉萎缩和生长的生理调节, 本研究克隆了编码中华绒螯蟹全长 *Smad3*(命名为 *EsSmad3*)的 cDNA 序列, 并研究了其在性成熟个体的不同组织及幼体不同蜕壳时期不同部位肌肉组织的转录表达情况。本工作为进一步研究 *Smad3* 可能参与中华绒螯蟹蜕壳过程中肌肉萎缩和生长调节的分子机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹取自上海海洋大学崇明养殖基地, 体重(126 ± 7.41) g, 取其肝胰腺、表皮、眼柄、心肌、精巢、卵巢、螯足、鳃及三角膜等组织, 置于-80℃冰箱保存备用。另取体重(8.24 ± 2.17) g 的一年生幼蟹, 按照文献[11-12]的方法鉴定蜕皮周期, 鉴定出处于蜕皮间期 C 期、蜕皮前晚期 D₃₋₄ 期及蜕皮后 A~B 期个体, 分别取其螯足、第三步行足和腹部第 V 腹节肌肉, 置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 中华绒螯蟹 *EsSmad3* 基因全长克隆 利用 Trizol 法提取中华绒螯蟹肝胰腺组织总 RNA, 同时用寡聚 T 引物和六聚体随机引物将其反转录成 cDNA 第一链作为 PCR 的模板, 根据 NCBI 公共

数据库的转录组序列信息设计引物(表 1), 进行 PCR 反应, 获得 *EsSmad3* cDNA 核心片段。PCR 反应加样体系: cDNA 模板 1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 2×PCR Mix 25 μL, 加无菌去离子水至总体积 50 μL。设置的 PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 56.5℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。

根据得到的 *EsSmad3* cDNA 的核心序列, 采用 Primer Premier 6.0 软件进行 3'(5') RACE 引物设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成(表 1)。3'(5') Race 模板采用 GeneRacer™ Kit (Invitrogen, 货号: L1500-01)进行合成。以 RACE cDNA 第一链为模板, 用 *EsSmad3*-3'(5')Race-F1 和 3'(5') Gene Racer outer primer(试剂盒提供)进行第一轮 PCR, 反应条件: 3'RACE, 94℃预变性 2 min, 94℃ 30 s, 72℃ 1 min、5 循环, 94℃ 30 s, 70℃ 1 min、5 循环, 94℃ 30 s、66℃ 1 min、25 循环; 5'Race, 94℃预变性 2 min, 94℃ 30 s, 72℃ 2 min、5 循环, 94℃ 30 s, 70℃ 2 min、5 循环, 94℃ 30 s, 66℃ 2 min、25 循环。然后, 以第一轮 PCR 产物稀释液为模板, 用 *EsSmad3*-3'(5')Race-F2 和 3'(5') Gene Racer inner primer(试剂盒提供)行第二轮 PCR。反应程序为: 3'RACE 94℃预变性 2 min, 94℃ 30 s, 66℃ 1 min、30 个循环; 5' RACE 94℃预变性 2 min, 94℃ 30 s, 66℃ 1 min, 30 个循环。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖电泳检测, 切胶回收, 克隆至 pUCm-T 载体, 蓝白斑筛选后送上海生工生物有限公司测序。

表 1 中华绒螯蟹 *Smad3* 基因序列扩增引物信息
Tab. 1 The information of the primers for *Smad3* amplification in *Eriocheir sinensis*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	功能 application
EsSmad3-F	CCAATGTCAACCGCAACCCG	<i>Smad3</i> 核心片
EsSmad3-R	GGGCCATTCAAGTGTAGCTCTATC	段克隆
EsSmad3-3'Race-F1	GATGTGCACCACCGCATCTCCTTCGT	3'Race
EsSmad3-3'Race-F2	CAGAAGGCAGACGGCACCTCCACG	3'Race
EsSmad3-5'Race-F1	CCCTTGACGAAGGAGATGCGGATGGT	5'Race
EsSmad3-5'Race-F2	GGCCTCGAAGGCCCTGGCTCACA	5'Race
EsSmad3-RTF	GGCCGTCTACCAACTCACTA	荧光定量 PCR
EsSmad3-RTR	GGGCCATTCAAGTGTAGCTC	荧光定量 PCR
18S-F	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	荧光定量 PCR
18S-R	GAAGAAGCTGCGAATCGGAC	荧光定量 PCR

1.2.2 中华绒螯蟹 *Smad3* 的生物信息学分析 Race 技术获得的两端 cDNA 序列拼接使用 DNASTar 软件; 序列的相似性分析使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 和 Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) 上的 Clustal^[13]; 开放阅读框预测及蛋白质序列的转换使用了 NCBI 网站的 ORF finder^[14] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 和 Expasy 的翻译工具 (<http://web.expasy.org/translate/>), cDNA 序列和氨基酸序列编辑使用 Bioedit; 结构域预测使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 NCBI 网站的 BLAST 搜索工具及 CDD 数据库^[15]; 利用同源建模工具 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 和 Pymol^[16] 软件对蛋白质结构进行建模和分析。多序列比对使用了 Bioedit 上的 Clustal 多序列比对工具; 系统发育树构建使用 MEGA6.0^[17] 上的 Clustal 序列比对工具和最大似然(ML)法发育树构建工具, 进行 1000 次自展检验(bootstrap)评估进化树分支可信度。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 *EsSmad3* 基因表达 以不同组织及不同蜕壳时期不同部位肌肉组织的 cDNA 作为荧光定量 PCR (qRT-PCR) 模板, 荧光定量 PCR 引物和内参根据 *EsSmad3* cDNA 序列和中华绒螯蟹 18S RNA 基因序列设计(表 1)。利用 BIO-RAD CFX Connect™ 荧光定量仪的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测 *EsSmad3* mRNA 的各组织相对表达情况, 反应程序设置为 95℃ 3 min; 95℃ 10 s, 55℃ 20 s, 72℃ 20 s, 75℃ 5 s, 40 个循环; 熔解曲线从 65℃ 上升到 95℃, 0.5℃/s。数据分析利用 SPSS 18.0 软件中的单因子变异数, 差异显著性以 0.05 为标准, 数据结果用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹 *Smad3* 序列分析

本研究克隆到的编码 *EsSmad3* 的 cDNA 全长为 2021 bp(图 1, GenBank 登录号为 KY858966), 包括部分 5'非翻译区(5'-UTR, 36 bp)和 3'非翻译区(3'-UTR, 656 bp); 37~1365 位核苷酸是一个编码 442 个氨基酸的最大开放阅读框(ORF), BLASTP 同源搜索结果表明这些氨基酸形成的蛋白与 NCBI 蛋白非冗余数据库中其他物种的 Smad3 具有最高的相似性。

atcgaagtggagggtgcgcgtccctagccaag
atg tccatgtcgcccttacggcccccgtgttaaaggcgcttcagttcaagaaggcg
M S M L P F T P P V V K R L L S F K K G
gaggcgaggacaagtggagtaaaaggccgtcaagagtctggtaagaaggactgaagaag
E G E D K W S E K A V K S L V K K L K K
tctggccgttgaggagtggaggccgtggctggcaagaaccctcccccgtgc
S G G L E E L E G A V A G Q E P S S R C
atcaccattcccgaggcgtggatggccgtcaagtgccacaagaagggtctaccc
I T I P R S L D G R L Q V S H K K G L P
catgtcatctactgcgggttgccgtggccggagttacagtccaccacgactcggt
H V I Y C R L W R W P E L Q S H E L R
gccctcgaccactgcggcgtggatggccgtcaacctaagaaggaggagggtgcgtcaaccc
A L D H C Q Y A F N L K K C V C V N
taccactacccaagatagaggccccctgcgtccagccatattggccggaggcagc
Y H Y T K I E A P A L P A I L V P R G S
ggc
G S S S G S S S V G G G G G G S G G G G V
gttgggtcaagcccccgtcagaggaggacccgtccctggctgacttacccgtcagac
G G S S P G S E E D L G S L A D F T A D
agtgtgagtgactgcacctcgatggccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
S V S D S T S L D V A P T L E P P P T F
ccccccgcggactcccccacccgggtacatggactgaggacggcgacaccctgcggac
P P T E S P P P G Y M S E D G D T L P D
gtcacccgactaccaggcatgataccacgcgtccatccccccctgtatgcgcgc
V T D Y P G M I P T S P S P P L D A Q P
gtcacctactcgagccggccctctggatgtccatctcactacgagactgaaccagg
V T Y C E P A F W C S I S Y Y E L N T R
gtgggggagacccctccacgcctcgagccctccctacggtgacggcgtactgacccc
V G E T F H A S Q P S L T V D G F T D P
agcaacagtgaaacgggtctgcgtccatgtcaatgcacccgcacccgggtgtt
S N S E R F C L G L L S N V N R N P V V
gaggcagacgcgcgcgtacatggaaagggttgcgcctactacattggggggagggt
E Q T R R Y I G K G V R L Y Y I G G E V
ttcggcggactctcccgatcttcaatttgtccagactcaactgtcaaccaggcg
F A E C L I S D S S I F V Q S P N C N Q R
tacggctggacccggccacccgggtgaagatccggccaggatgtaccaaagatattc
Y G W H P A T V V K I P P G C N L K I T F
acaacccaaggtttgcacccaggctggcccgaggatgtgaggccaggctcgaggccgc
N N Q E F A H Q L A Q S V S Q G F E A V
taccaactactggatgtgcaccatcgcatcttcgtcaaggctgggtcagagg
Y Q L T R M C T I R I S F V K G W G A E
tacagaaggcagacgggtcacccacgcgtgtggatagactacacttgtaaatggcc
Y R R Q T V T S T P C W I E L H L N G P
ctacaatggctggaccgtgtactgacacaaaatggctccccctgcctccctgtct
L Q W L D R V L T Q M G S P C L P C S S
atgtctatgta
M S *

图 1 中华绒螯蟹 *Smad3* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

方框内为起始密码子和终止密码子.

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *EsSmad3*

利用 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) 进行结构域分析显示, EsSmad3 具有两个特征性结构域 DWA(由 22~133 位氨基酸构成)和 DWB(由 247~418 位氨基酸构成)(图 2); 用 BLAST 搜索 NCBI 的 CDD(*conserved domain database*) 数据库显示 EsSmad3 含有 MH1 (7~128 位氨基酸) 和 MH2 (241~431 位氨基酸) 两个结构域。利用 swiss-model 同源建模工具预测分别得到的由 6~126 位氨基酸组成的 MH1 结构域和 240~442 位氨基酸组成的 MH2 结构域三维结构模型(图 2), MH1 结构域由 4 个 α 螺旋、6 个 β 折叠及 5 个 loop 形成紧凑的球状结构, MH2 域的结构特点是含有一个 β 三明治结构, 由多个 β 折叠组成夹芯, 两端由保守的 3 个 α 螺旋和 loop- α 螺旋结构所夹裹。

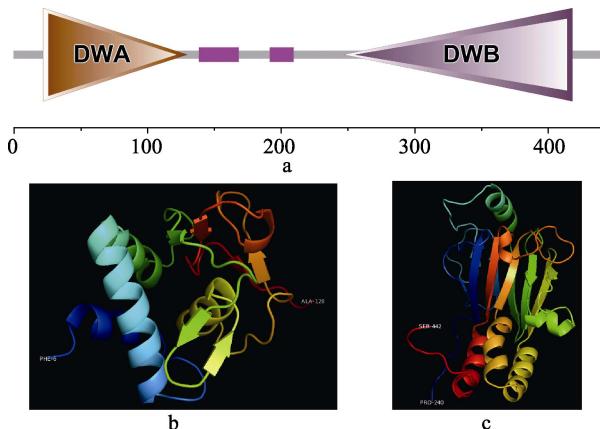


图 2 EsSmad3 功能结构域和三维结构

a. 结构域组成; b. DWA(MH1)结构域三维结构; c. DWB(MH2)结构域三维结构。

Fig. 2 The functional domains and 3-D structure of the EsSmad3
a. Domain architecture; b. 3-D structure of DWA (MH1)
domain; c. 3-D structure of DWB (MH2) domain.

2.2 多序列比对与系统发育树分析

将 EsSmad3 与人(*Homo sapiens*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)中的同源蛋白序列进行比较(序列号分别为 NP_005893.1、NP_778258.1、NP_511079.1), 序列一致性分别为 0.679、0.691、0.619。序列较保守的区域位于 MH1 结构域和 MH2 结构域(图 3 下划线部分), EsSmad3 的 MH1 与上述序列一致性分别为 0.720、0.736、0.626, MH2 的序列一致性分别为 0.927、0.922、0.943。形成三聚体化界面的氨基酸(图 3“#”标注

部分)位于 MH2 结构域, 除 3 个氨基酸位点不同外(图标注), 其他氨基酸在 4 个物种中完全相同。位于 MH1 结构域中参与 DNA 结合的氨基酸除果蝇有较大差异外, 中华绒螯蟹与人和斑马鱼的完全保守, 另外该结构域的 Cys60、Cys105、Cys117、His122 是锌原子结合位点, 在 4 种动物中是完全相同的。根据人、小鼠、黑腹果蝇、原鸡、热带爪蟾、斑马鱼、文昌鱼、美洲鲎、中华绒螯蟹的 Smad3 同源蛋白氨基酸序列重建的系统发育树和这些物种的系统演化关系比较一致(图 4)。

2.3 中华绒螯蟹 Smad3 基因表达分析

2.3.1 中华绒螯蟹 Smad3 基因组织表达特性分析 以基因特异性引物 EsSmad3-RTF/RTR 为引物, 18S RNA 为内参基因, 利用荧光定量 PCR 方法检测 *EsSmad3* mRNA 在中华绒螯蟹性成熟期眼柄、螯足肌肉、卵巢、心脏、肝胰腺、表皮、精巢、鳃和三角膜等 9 种组织的表达情况, 如图 5 所示, *EsSmad3* 在上述所有检测的 9 种组织中均有表达, 在眼柄中表达量最高, 其次为精巢; 在心脏和肝胰腺中表达量最低。

2.3.2 中华绒螯蟹 Smad3 基因在蜕壳不同时期不同部位肌肉组织中的表达 取不同蜕壳时期中华绒螯蟹幼蟹的螯足、步行足和腹部肌肉组织, 以 EsSmad3-RTF/RTR 为引物, 18S RNA 为内参基因, 利用荧光定量 PCR 方法检测各组织 *EsSmad3* mRNA 的表达情况(图 6), 结果显示, 在一个完整的蜕壳周期中, 步行足肌肉组织中 *EsSmad3* mRNA 表达在蜕壳间期高于蜕壳前 D₃₋₄ 期和蜕壳后 A~B 期, 但无显著的统计学差异($P>0.05$)。螯足肌肉在蜕壳前晚期 D₃₋₄ 期急剧下调($P<0.05$), 蜕壳后 A~B 期开始表达量显著升高($P<0.05$), 直至蜕皮间期 C 期。腹部肌肉组织中 *EsSmad3* mRNA 水平在蜕皮间期 C 期显著高于蜕壳后 A~B 期, 这种上调一直持续到蜕壳前晚前期 D₃₋₄。

3 讨论

在脊椎动物中, 包括 Smad3 和 Smad4 在内的 R-Smad 以及 Smad4 具有相同的结构域组成: 包括一个 N 端的 DNA 结合结构域(MH1 结构域)和一个 C 端的效应结构域(MH2 结构域), 二者由不

保守的氨基酸组成的连接子(linker)连接。MH2 结构域是一个功能多样的蛋白质-蛋白质相互作用模块^[7]。利用 Race 技术我们首次克隆得到编码中华绒螯蟹 Smad3 的 cDNA 序列, 最大的开放阅读框编码一个 442 个氨基酸长度的蛋白质, 用 BLAST 搜索 NCBI 的 CDD 数据库显示其两端分别含有 MH1 和 MH2 两个结构域, 以及在不同结构域中的 DNA 结合位点以及蛋白质相互作用界面; SMART 结构域预测得出 DWA (Domain A in dwarfin family proteins) 和 DWB (Domain B in dwarfin family proteins) 两个结构域, 据 SMART 结构域数据库信息这两个结构域在 Smad 蛋白中分别代表 MH1 和 MH2; 三维结构的同源建模得到 MH1 和 MH2 结构域的立体模型, 其立体结构

与人的 MH1 和 MH2 的晶体结构解析结果相近^[1, 18]。BLAST 搜索结果显示 EsSmad3 与脊椎动物的 Smad3 更为相似。多序列比对发现, 4 种动物(人、小鼠、黑腹果蝇、中华绒螯蟹)Smad3 具有非常保守的 MH1 和 MH2 结构域以及锌原子结合位点、三聚体化位点等活性位点; DNA 结合功能所涉及的氨基酸在人、小鼠、中华绒螯蟹 Smad3 中是完全相同; 人和小鼠 Smad3 的 C 末端是 SSVS, 中华绒螯蟹和果蝇的 C 末端是 SSMS, 这种 SSXS 氨基酸基序的最后两个丝氨酸是 R-Smad 发生磷酸化的位点^[19-20]。总之, 从一级序列的比较到结构域预测、三维结构同源模拟的结果看, 本实验获得的 cDNA 序列编码的蛋白质是中华绒螯蟹 Smad3 (EsSmad3)。

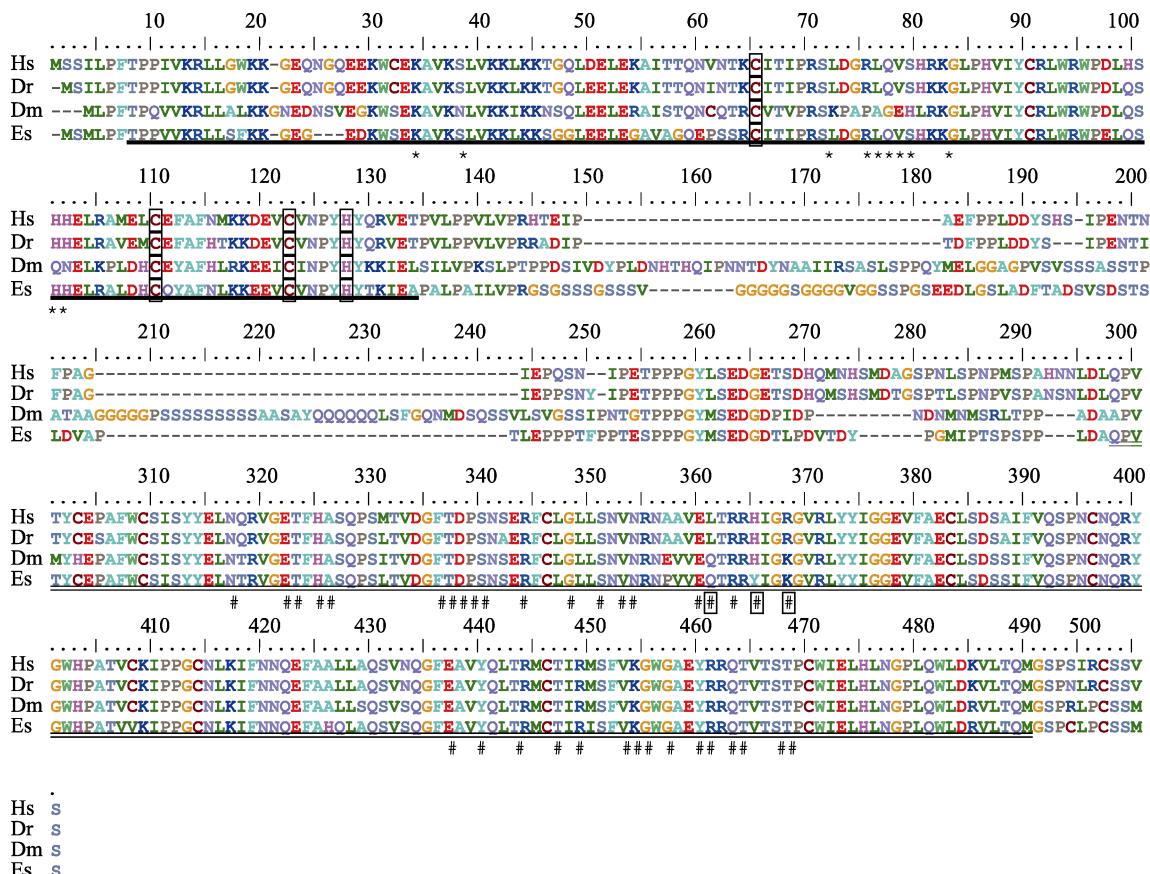


图 3 Smad/Smad3 蛋白序列在 4 种动物中的比较

Es、Dm、Dr、Hs 分别表示中华绒螯蟹、黑腹果蝇、斑马鱼和人的 Smad 蛋白序列。MH1 结构域用粗下划线表示, MH2 结构域用双下划线表示, * 表示的氨基酸为 DNA 结合位点, 方框内的氨基酸为锌原子结合位点, # 标识的氨基酸为蛋白质三聚化相互作用界面, 其中 ■ 标识的是差异氨基酸。

Fig. 3 Multiple alignment of the Smad/Smad3t among 4 different species

Two functional domains were underscored with different lines respectively: * indicates DNA-binding sites; Amino acids in the frame indicate Zn-binding site; # indicates trimer interface; # in the frame indicate different amino acids. Es, *Eriocheir sinensis*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dr, *Danio rerio*; Hs, *Homo sapiens*.

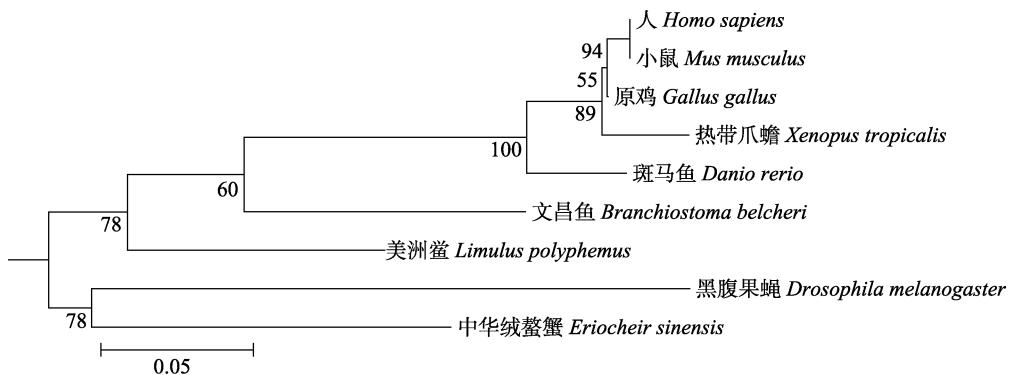


图 4 基于不同物种 Smad/Smad3 氨基酸序列构建的 ML 系统发育树

物种及其 Smad/Smad3 的 GenBank 序列号分别为: *Branchiostoma belcheri*, 文昌鱼, XP_019622748.1; *Drosophila melanogaster*, 黑腹果蝇, NP_511079.1; *Danio rerio*, 斑马鱼, NP_778258.1; *Eriocheir sinensis*, 中华绒螯蟹, KY858966; *Gallus gallus*, 原鸡, NP_989806.1; *Homo sapiens*, 人, NP_005893.1; *Limulus polyphemus*, 美洲鲎, XP_013776260.1; *Mus musculus*, 小鼠, NP_058049.3; *Xenopus tropicalis*, 热带爪蟾, NP_001008436.1。

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from multiple alignments of Smad/Smad3 amino acid sequences from various species. The Accession No. of each Smad/Smad3 are as follows: *Branchiostoma belcheri*, XP_019622748.1; *Drosophila melanogaster*, NP_511079.1; *Danio rerio*, NP_778258.1; *Eriocheir sinensis*, KY858966; *Gallus gallus*, NP_989806.1; *Homo sapiens*, NP_005893.1; *Limulus polyphemus*, XP_013776260.1; *Mus musculus*, NP_058049.3; *Xenopus tropicalis*, NP_001008436.1.

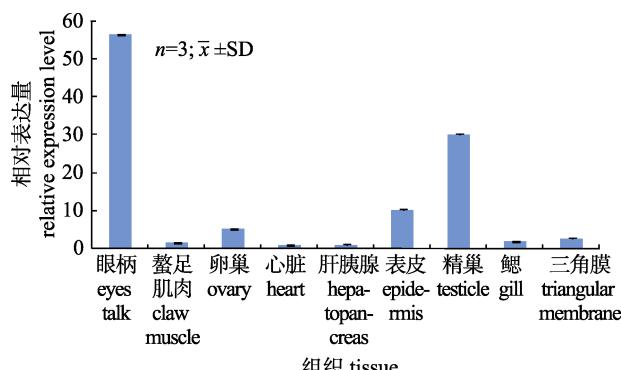


图 5 中华绒螯蟹 Smad3 基因在不同组织中的相对表达量。标准差上方不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 The relative expression level of *EsSmad3* in different tissues

Different letters above the error bars indicate significant differences ($P<0.05$).

最近的研究表明, 人(或模式动物小鼠)Smad 家族多种蛋白参与肌肉生长的控制^[21-22]。转化生长因子 β (TGF β)家族配体如 Myostatin、TGF β 结合到肌细胞活化素 II 型受体 ActRIIA、ActRIIB 及 TGF β RII 上, 进一步募集酪氨酸激酶活化素 I 型受体(ALK4, ALK5, ALK7), 导致 Smad2 和 Smad3 (Smad2/Smad3)磷酸化。Smad2/Smad3 和 Smad4 形成转录调节复合体进入细胞核, 通过影响染色质的结构降低一系列肌肉生长相关基因的表达^[21]。另一方面, 骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic

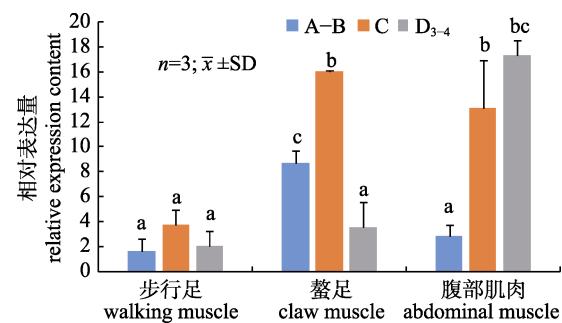


图 6 中华绒螯蟹 Smad3 基因在蜕壳过程中不同部位肌肉组织中的相对表达量

标准差上方不同字母表示差异显著($P<0.05$)。A-B:

蜕壳后期; C: 蜕壳间期; D₃₋₄: 蜕壳前晚期。

Fig. 6 The relative expression content of *EsSmad3* mRNA in different muscle tissues during the molt cycle

Different letters above the error bars indicate significant differences ($P<0.05$)。A-B: post-molt stage; C: inter-molt stage; D₃₋₄: later post-molt stage.

Protein, BMP)结合到其细胞膜受体 BMPRII 或 ActRIIA/ActRIIB 上, 募集和激活另一些活化素 I 型受体(ALK2, ALK3, ALK6), 导致 Smad 家族中的 Smad1/5/8 磷酸化及活化^[23]。活化后的 Smad1/5/8 复合体和活化的 Smad2/3 对肌肉生长的影响相反, 它以与 Smad2/3 类似的方式与 Smad4 结合成 Smad1/5/8-Smad4 转录调控复合体, 提高细胞生长分化相关的基因包括肌肉生长相关基因的表达^[22, 24]。用转基因小鼠模型研究表明, 肌肉萎缩

和肌肉过度生长之间的平衡依赖于 Smad4 被 Myostatin 信号通路还是被 BMP 信号通路所募集之间的平衡^[25]。

利用荧光实时定量 RT-PCR 技术检测性成熟期动物体不同组织中 *EsSmad3* 转录水平, 结果显示其在眼柄、鳌足肌肉、卵巢、心脏、肝胰腺、表皮、精巢、鳃和三角膜都有表达, 而在眼柄和精巢中表达显著。这或许因为性成熟期动物组织器官中细胞增生分化和激素分泌活动较为旺盛, 有待于进一步深入研究。

同时, 荧光实时定量 RT-PCR 技术检测结果显示, 在中华绒螯蟹幼蟹一个完整的蜕壳周期中, 鳌足、步行足和腹部肌肉中 *EsSmad3* 的表达量都表现为蜕皮间期 C 高于蜕壳后 A-B 期, 这和甲壳动物从 A-B 期到 C 期蛋白质合成速度的增加及肌肉总量增加相一致, 而此时正是动物肌肉生长的时期^[26-27]。在蜕壳前晚期 D₃₋₄ 期, 鳌足肌肉中 *EsSmad3* 的 mRNA 水平急剧下降, 此时肌肉在形态上表现为肌纤维横截面积减小, 肌丝降解, 肌肉重量降低以便蜕壳时顺利蜕出狭小的关节^[28]。蜕壳前并不发生明显萎缩的步行足肌肉中, *EsSmad3* 的 mRNA 水平相对于蜕壳间期略有下降, 但无统计学差异。腹部肌肉中 *EsSmad3* 基因的表达在蜕壳前晚期 D₃₋₄ 期则急剧上调。已有研究证实, 此时甲壳动物步行足和腹部肌肉蛋白质合成速率相对于蜕壳间期是增加的, 这有助于蜕壳后肌肉的生长, 如肌纤维长度增加(肌节数目增加或者原有肌节拉长)、肌原纤维(粗肌丝和细肌丝)数目增加等^[29-31]。当然, 肌肉的生长发育受到多种基因和信号通路的调控, 如叉头转录因子 FOXO、核因子 NF-κB 及 PI3K-Akt-mTOR 信号通路等, 肌肉最终的生长发育状况是由各种调节因素共同作用的结果^[31]。本研究表明, 在中华绒螯蟹蜕壳过程中 *EsSmad3* 基因在不同部位的肌肉组织中具有不同的表达模式, 与蜕壳周期密切相关, 也与肌肉组织的形态结构变化紧密相连, 说明 *EsSmad3* 参与了中华绒螯蟹蜕壳诱导的肌肉萎缩、生长及重建过程。

在脊椎动物中的一些经济物种如牛、羊、猪

或者用以进行医学研究的模式物种如小鼠, 肌肉的生长发育及其分子机制已经取得了长足进展; 但是在甲壳动物, 这一领域的研究还很薄弱, 本研究通过 RACE 克隆技术获得编码 *EsSmad3* 全长的 cDNA 序列, 分析了其表达特征, 为进一步研究甲壳动物肌肉生长发育机制打下了基础。

参考文献:

- [1] Shi Y G, Wang Y F, Jayaraman L, et al. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-β signaling[J]. Cell, 1998, 94(5): 585-594.
- [2] Heldin C H, Miyazono K, Ten D P. TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature, 1997, 390(6659): 465-471.
- [3] Deryck R, Zhang Y, Feng X H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses[J]. Cell, 1998, 95(6): 737-740.
- [4] Attisano L, Wrana J L. Smads as transcriptional co-modulators[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2000, 12(2): 235-243.
- [5] Wrana J L. Phosphoserine-dependent regulation of protein-protein interactions in the Smad pathway[J]. Structure, 2002, 10(1): 5-7.
- [6] Wu G, Chen Y G, Ozdamar B, et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation[J]. Science, 2000, 287(5450): 92-97.
- [7] Qin B Y, Lam S S, Correia J J, et al. Smad3 allosteric links TGF-β receptor kinase activation to transcriptional control[J]. Genes & Development, 2002, 16(15): 1950-1963.
- [8] Sartori R, Milan G, Patron M, et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2009, 296(6): C1248-C1257.
- [9] Cohen S, Nathan J A, Goldberg A L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2015, 14(1): 58-74.
- [10] Tian Z H, Jiao C Z. Muscle atrophy and growth induced by molting in Crustacean: a review[J]. Fisheries Science, 2016, 35(5): 603-606. [田志环, 焦传珍. 甲壳动物蜕皮诱导的肌肉萎缩与生长[J]. 水产科学, 2016, 35(5): 603-606.]
- [11] Tian Z H, Kang X J, Mu S M. The molt stages and the hepatopancreas contents of lipids, glycogen and some selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fisheries Science, 2012, 78(1): 67-74.
- [12] Kang X J, Tian Z H, Wu J L, et al. Molt stages and changes

- in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 806-812. [康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性的变化[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 806-812.]
- [13] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [14] Rombel I T, Sykes K F, Rayner S, et al. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification[J]. Gene, 2002, 282(1-2): 33-41.
- [15] Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, et al. CDD: NCBI's conserved domain database[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(D1): D222-D226.
- [16] Rigsby R E, Parker A B. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure[J]. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2016, 44(5): 433- 437.
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [18] Wu J W, Hu M, Chai J J, et al. Crystal structure of a phosphorylated Smad2[J]. Molecular Cell, 2001, 8(6): 1277- 1289.
- [19] Abdollah S, MaciA S Silva M, Tsukazaki T, et al. T β RI phosphorylation of Smad2 on Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling[J]. Journal of Biology Chemistry, 1997, 272(44): 27678-27685.
- [20] Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engström U, et al. Phosphorylation of Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor- β signaling[J]. Journal of Biology Chemistry, 1997, 272(44): 28107-28115.
- [21] Gaarenstroom T, Hill C S. TGF- β signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014, 32: 107-118.
- [22] Rindom E, Vissing K. Mechanosensitive molecular networks involved in transducing resistance exercise-signals into muscle protein accretion[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7: 547.
- [23] Walsh D W, Godson C, Brazil D P, et al. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots[J]. Trends in Cell Biology, 2010, 20(5): 244-256.
- [24] Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling[J]. Science's STKE, 2002, 2002(151): pe40.
- [25] Amthor H, Sartori R, Schirwiss E, et al. O.20 BMP signalling controls muscle mass[J]. Neuromuscular Disorders, 2013, 23(9-10): 850-851.
- [26] 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.
- [27] 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]. Journal of Experimental Biology, 2010, 213(1): 172-183.
- [28] Ismail S Z M, Mykles D L. Differential molt-induced atrophy in the dimorphic claws of male fiddler crabs, *Uca pugnax*[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology, 1992, 263(1): 18-31.
- [29] El Haj A J, Govind C K, Houlihan D F. Growth of lobster leg muscle fibers over intermolt and molt[J]. Journal of Crustacean Biology, 1984, 4(4): 536-545.
- [30] Haj A, Clarke S, Harrison P, et al. In vivo muscle protein synthesis rates in the American lobster *Homarus americanus* during the moult cycle and in response to 20-hydroxyecdysone[J]. Journal of Experimental Biology, 1996, 199: 579-585.
- [31] Tian Z H, Jiao C Z, Wu X G, et al. Changes in histology and main proteins content in claw closer muscle of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* during the molt cycle[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1072-1078. [田志环, 焦传珍, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹蜕壳过程中鳌足肌肉组织学及主要蛋白质含量变化[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1072-1078.]
- [32] Abuhagr A M, MacLea K S, Chang E S, et al. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling genes in decapod crustaceans: cloning and tissue expression of mTOR, Akt, Rheb, and p70 S6 kinase in the green crab, *Carcinus maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 168: 25-39.

Molecular cloning, sequence analysis, and tissue expression of Smad3-like protein from *Eriocheir sinensis*

TIAN Zhihuan^{1,2}, JIAO Chuanzhen¹, CHENG Yongxu²

1. College of Yingdong Life Science, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In the present study, full length cDNA, encoding the *Smad3* from *Eriocheir sinensis* (*EsSmad3*), was cloned using 3' Race and 5' Race techniques, and the sequence and structural analysis of *EsSmad3* was conducted using bioinformatics methods. The results showed that the full-length cDNA encoding *EsSmad3* consisted of 2021 bp nucleic acids in length, including a 5'-UTR of 36 bp, a 3'-UTR of 656 bp and an open reading frame (ORF) which encoded 442 amino acids. Analysis of the protein domain features showed that the deduced polypeptides contained two conservative domains characteristic of MH1 and MH2. Multiple sequence alignment revealed that the amino acid sequences of *EsSmad3* have the 0.679, 0.691, and 0.619 identity with *Homo sapiens*, *Brachydanio rerio*, and *Drosophila melanogaster* respectively. The tissue distribution of *EsSmad3* mRNA in sexually mature individuals and different muscle groups during the molt cycle in juvenile crabs, were analyzed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). In sexually mature crabs, the *EsSmad3* transcript was detected in the eyestalk, claw muscle, ovary, heart, hepatopancreas, epidermis, testicle, gill, and triangular membrane, and the expression level was relatively high in the eyestalk and testicle, and was low in the hepatopancreas and heart. In juvenile crabs, the *EsSmad3* transcript in different muscle groups was different depending on the molt stage. In walking leg muscles, the *EsSmad3* expression level was higher in inter-molt C stage than in the later pre-molt D₃₋₄ and post-molt A-B stages, but there was no statistically significant difference ($P>0.05$). In claw muscles, the *EsSmad3* expression level decreased rapidly in the pre-molt D₃₋₄ stage ($P<0.05$) and increased in the post-molt A-B stage, lasting to the inter-molt C stage ($P<0.05$). In abdominal muscles, the *EsSmad3* expression level was much higher in the inter-molt C stage than in the post-molt A-B stage ($P<0.05$), and this up-regulation continued to the pre-molt D₃₋₄ stage. These results suggest that the expression of *EsSmad3* transcript in different muscle groups was related to the molt stage of *E. sinensis*. It is possible that *EsSmad3* is involved in muscle atrophy, growth, and rebuilding during the molt cycle of *E. sinensis*.

Key words: *Smad3* gene; gene clone; muscle growth; molting; *Eriocheir sinensis*

Corresponding author: JIAO Chuanzhen. E-mail: jiaocz@gmail.com