

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17293

三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢在家系近交中的变化

王竹青^{1,2}, 任宪云^{1,2}, 高保全^{1,2}, 刘萍^{1,2}, 李健^{1,2}, 王磊^{1,2}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200;

摘要: 为探究近交对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)氧化磷酸化代谢的影响, 首先克隆了三疣梭子蟹线粒体呼吸链 4 个复合体关键亚基基因的 cDNA 全长, 分别命名为 *ptNdufv2*、*ptSDHC*、*ptCytochrome c1* 与 *ptCOX6B*。*ptNdufv2* 基因 cDNA 全长 1005 bp, 编码 234 个氨基酸, 该蛋白是复合体 I 的核心亚基 Ndufv2; *ptSDHC* 基因全长 915 bp, 编码由 179 个氨基酸组成的复合体 II 关键亚基 SDHC; *ptCytochrome c1* 基因全长 2371 bp, 编码由 313 个氨基酸组成的亚基 Cyt c1; *ptCOX6B* 基因全长 1171 bp, 编码由 105 个氨基酸组成的 COX6B 亚基。生物信息学分析显示, 这些复合体亚基基因进化上比较保守。酶活检测及 RT-PCR 结果表明, 随着近交系数的增加, 三疣梭子蟹肝胰腺中复合体 I、复合体 III 活力分别从 F4、F2 开始呈现显著下降趋势($P < 0.05$); F10 复合体 IV 酶活力显著低于其余各代($P < 0.05$); 4 个复合体基因表达量均显著下降, 且各代表达量显著低于 F0($P < 0.05$)。在心脏中, 复合体 I、III、IV 活力分别从 F2、F2、F6 开始显著下降($P < 0.05$); *ptNdufv2* 与 *ptCytochrome c1* 基因表达量分别从 F2、F4 开始显著下降($P < 0.05$), 这一结果证实近交衰退已出现在三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢通路。

关键词: 三疣梭子蟹; 氧化磷酸化代谢; 基因克隆; 复合体; 近交衰退

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)03-0520-16

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是中国重要的大型海洋经济蟹类, 主要分布于中国沿海、朝鲜半岛和日本等沿海水域^[1], 是世界重要的海洋捕捞和养殖对象。三疣梭子蟹肉多, 脂膏饱满, 蛋白质含量丰富, 具有重要的经济价值。

氧化磷酸化是生物能量代谢的重要组成部分, 是在线粒体内 ADP 利用体内物质氧化释放的能量与无机磷进行偶联反应合成 ATP 的过程, 生物体内 95% 的 ATP 来自氧化磷酸化代谢^[2], 对于生物生长、代谢及环境适应能力有着非常重要的作用。氧化磷酸化的作用是通过电子传递链(electron transfer chain, ETC)来完成。电子传递链又称呼吸链, 是由一系列氢和电子反应组成的连续反应系统, 代谢物除去的氢原子被传递到氧中产生水,

同时生成 ATP。电子传递链主要是由 4 个蛋白质复合体组成, 分别是复合体 I (NADH-辅酶 Q 氧化还原酶)、复合体 II (琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶)、复合体 III (辅酶 Q-细胞色素 c 氧化还原酶)和复合体 IV (细胞色素 c 氧化酶)。甲壳动物能量代谢的研究主要集中在非生物因素, 如光照、温度、盐度等^[3-7], 以及生物因素^[8]的影响, 而对于其机理、过程、水平等方面的报道较少, 因此研究三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢通路可为了解其能量代谢机理、水平等提供重要的研究基础。

近交通常会使得子代一些与繁殖力或生理机能相关的表型平均值降低从而引起近交衰退。研究证明近交能够造成甲壳动物形态学^[9]、孵化率^[10]、存活^[11]及与生长相关的产量和生理状态的衰退,

收稿日期: 2017-08-23; 修订日期: 2017-10-11.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41576147, 41506186); 泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002); 国家虾蟹产业技术体系项目(CARS-48).

作者简介: 王竹青(1991-), 男, 硕士研究生, 从事甲壳动物遗传育种与繁殖研究. E-mail: leon19910215@outlook.com

通信作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

而关于近交对甲壳动物代谢功能的影响鲜有报道。通过对本实验室三疣梭子蟹自交 7 代的大个体组 vs 小个体组转录组数据库的分析与筛选,对发现的差异基因进行了 KEGG 富集分析,差异基因富集的代谢通路主要有氧化磷酸化通路、细胞凋亡通路和对应外界刺激等。研究近交对三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢的影响,可为深入研究近交对三疣梭子蟹生理功能的影响提供数据支持。

本实验采用 RACE 技术克隆获得三疣梭子蟹线粒体呼吸链 4 个复合体亚基基因的 cDNA 全长序列,并对复合体基因序列进行了初步的生物信息学分析,同时利用实时荧光定量 PCR 分析了复合体基因在三疣梭子蟹组织中的表达情况。旨在明确三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体基因的表达特点,为深入探究三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢机制奠定基础。测定不同近交世代家系三疣梭子蟹肝胰腺和心脏中线粒体呼吸链复合体活力,并采用 RT-PCR 技术分析复合体基因的表达情况,旨在揭示近交程度对三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢的影响,为三疣梭子蟹育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

自 2005 年,本实验室每年将从莱州湾海区、鸭绿江口海区、海州湾海区和舟山海区获取的 4 个三疣梭子蟹不同地理群体作为基础群体(F0),利用人工定向交尾技术,建立了全同胞兄妹交传代家系^[9]。良种家系留种传代,至 2017 年已传至 13 代(F13)。分别选取 80 日龄[体重(25.3±6.4) g] F0、F2、F4、F6、F8 和 F10 近交世代家系的三疣梭子蟹,每一代各取处于蜕皮间期的三疣梭子蟹 18 只(3 只雌蟹、3 只雄蟹为一个平行,共 3 个平行),暂养于室内水泥池中 1 周,水温(25±0.5)℃,每日 8 时换掉 50% 的水,16 时投喂新鲜蓝蛤,投喂量为蟹体重的 10%。

实验所用 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; SMART™ RACE Amplification Kit 购自 Clontech 公司; NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit、PMD19-T、PrimerScript™ RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq™ II 和 DH5α 感

受态细胞等均购自 TaKaRa 公司;线粒体提取试剂盒、蛋白定量测试盒(A045-2)、线粒体呼吸链复合体 I 活性比色法定量检测试剂盒(S50007)、复合体 II 活性比色法定量检测试剂盒(S50008)、复合体 III 活性比色法定量检测试剂盒(S50009)、复合体 IV 活性比色法定量检测试剂盒(S50010)、复合体 V 活性光谱法定量检测试剂盒(S50083)均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 三疣梭子蟹总 RNA 的提取及复合体亚基基因全长 cDNA 的克隆及验证

三疣梭子蟹各组织的总 RNA 采用 Trizol 法提取,用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其总 RNA 的质量及完整性。取等量所取各组织的总 RNA 混匀,参照 SMART™ RACE Amplification Kit 说明书合成 3' 和 5'RACE 的 cDNA 第一链。

根据从三疣梭子蟹转录组数据库得到的复合体亚基基因的 EST 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3' 和 5' 末端特异性引物。根据克隆出的复合体基因序列设计荧光定量引物。最后在该基因的两端设计正反向引物,进行全长 cDNA 的验证。实验中用到的引物由上海生工生物有限公司合成(表 1)。利用 TaKaRa LA Taq 进行末端扩增,3' 端用通用引物 UPM 和 NUP 分别与相应的特异性引物进行巢式 PCR 扩增,PCR 程序设为: 94℃ 30 s, 65℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环; 5' 末端扩增同上。将 3' 和 5'RACE 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶纯化并连接到 PMD19-T,转化入感受态细胞中,在 LB 培养基中 37℃ 培养 45 min 后,再将菌液涂布于含 AMP 的 LB 平板上 37℃ 过夜培养。挑取阳性菌落继续培养,并进行菌落 PCR 鉴定后送交青岛擎科梓熙生物技术有限公司测序。最后利用特异性正反向引物,对其全长 cDNA 进行验证。

1.3 三疣梭子蟹复合体亚基基因的生物信息学分析

使用 ORF Finding 在线工具确定各复合体基因最大开放阅读框和编码区。利用 NCBI 中的 BLAST 主页程序进行三疣梭子蟹基因的核苷酸和氨基酸序列的比对。利用 CExpres 和 Gene Tool

表 1 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体基因克隆和 mRNA 相对表达分析所用引物序列
Tab. 1 Sequences of primers used for genes cloning and relative mRNA expression analysis

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
NADH-F1	CTCATACACTCTCATTCTGGGCAT	RACE 特异引物 RACE primers
NADH-F2	TCAAGTAATGGGATGACCGCA	
NADH-R1	GAAGTAGAGTGTCTTGGTGCCTGTG	
NADH-R2	GGACTCACCAGCCTCACCACC	
SDHC-F1	TGATGATGCCTCCACCAAACCT	RACE 通用引物 RACE universal primers
SDHC-F2	GCACGGAGAGAGCCAGACCT	
SDHC-R1	GCTATGGCTTCACCCTGCG	
SDHC-R2	TGCTGGACACACCCTTATCACA	
Cyte1-F1	CACCAAGTTACGGAAGGCAATG	
Cyte1-F2	CGGACGCCTTCACGGACTG	
Cyte1-R1	TCCCATAGTATCACCTTTTCATTCA	
Cyte1-R2	CTGGGGGGCTGCTGGTGACT	
COX6B-F1	ACACACGGAGCGGAACACC	
COX6B -F2	TCTGGCAGCGGTGGAAGTC	
COX6B -R1	GTTGTTGTGTCATCCACTTGTCAAT	
COX6B -R2	CCAAGAACAAAAAGCAGCCCA	
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
QNADH-F	TGCCCAGAATGAGAGTGATG	荧光定量引物 real-time PCR primers
QNADH-R	AGTGAAGAGTCCGTCCTTGG	
QSDHC-F	CGGCTCCTACCCACACTACT	
QSDHC-R	CCCAAATCCCACACCAAG	
QCyte1-F	GGCGTCTTCTCATCTCTGGA	
QCyte1-R	GGGACACACCCACCAAGTTA	
QCOX6B-F	ATGCGGTCAAACCTCCTTCTG	
QCOX6B-R	ATCAGTGTCTTCGCCTGGAA	
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	

软件拼接比对核苷酸序列、去除冗余序列和翻译氨基酸。蛋白质理化性质预测、功能结构域分析、信号肽分析利用 InterProScan 和 SMART 等在线软件完成。利用 DNAMAN 进行与其他物种的相应氨基酸序列的多重序列比对。应用 MEGA6.0 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育进化树并进行聚类分析。

1.4 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体活力检测

分别取不同近交世代家系的三疣梭子蟹肝胰腺、心脏组织放入液氮中研磨, 分别取 100 mg 左右的组织粉末加入 2 mL EP 管中, 标记后放入 -80℃ 冰箱中保存。提取所取组织的线粒体并测定

其蛋白浓度, 使用线粒体复合体定量检测试剂盒在 Infinite 200 酶标仪中分别测定不同世代家系三疣梭子蟹各组织各复合体活力, 具体操作参照试剂盒说明书进行。

线粒体呼吸链复合体 I 酶活性定义: 在 30℃, pH7.5 条件下, 每分钟内能够氧化 1 μ mol 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)所需的酶量作为 1 个活性单位。线粒体呼吸链复合体 II 酶活性定义: 在 30℃, pH7.5 条件下, 每分钟内能够还原 1 μ mol 合成辅酶 Q 同功类似物二氯酚靛酚(DCPIP)所需的酶量作为 1 个活性单位。线粒体呼吸链复合体 III 酶活性定义: 在 30℃ 温度下, pH7.5 条件下,

每分钟内能够氧化 1 μmol 还原型泛醌(CoQH₂)所需的酶量作为 1 个活性单位。线粒体呼吸链复合体IV酶活性定义: 在 25℃温度下, pH7.0 条件下, 每单位酶在每分钟氧化 1 μmol 的细胞色素 c(Cyt c)的量作为 1 个活性单位。

1.5 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体基因的表达分析

分别取三疣梭子蟹肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、卵巢、精巢、脑神经节、眼柄及胸神经节等组织, 放入液氮中保存。分别提取各组织的总 RNA, 使用 PrimeScript RT reagent Kit 反转录合成 cDNA, 具体方法参照试剂盒说明书。根据已知的三疣梭子蟹复合体亚基基因 cDNA 全长序列, 设计特异引物(表 1)。使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂(TaKaRa), 在 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪上分析各组织中复合体基因的表达情况。PCR 反应体系为 10 μL, 包括: 5 μL SYBR Premix Ex Taq II、1 μL cDNA、0.4 μL 浓度为 10 pmol/μL 正反向引物、0.2 μL ROX Reference dye II 和 3 μL PCR 反应水。反应程序为: 95℃ 10 min; 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s 40 个循环; 95℃ 15 s; 60℃ 1 min; 95℃ 15 s。以 β-actin 基因作为内参, 样本和内参均设置 3 个重复, 采用 2^{-ΔΔCT} 方法^[12]计算基因的相对表达量。

1.6 数据处理与分析

实验数据采用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示; 结果使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way, ANOVA), 利用 Duncan's 多重比较进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基基因的克隆及序列分析

三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基基因序列及氨基酸信息如图 1 和表 2 所示: 4 个复合体关键亚基基因分别命名为 *ptNdufv2*、*ptSDHC*、*ptCytochrome* 和 *ptCOX6B*, 分别编码 234、179、313 和 105 个氨基酸。其中 *ptNdufv2* 编码的蛋白为不稳定蛋白, 其余均为稳定蛋白; *ptSDHC* 编码的氨基酸为疏水性蛋白, 其余均为亲水性蛋白。

分析结果表明, 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 I 亚基基因编码的氨基酸结构中无跨膜结构域和信号肽序列, 第 39 至 193 位是其标志性蛋白结构域 NADH 脱氢酶亚基 E (IPR002023)。利用 BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *ptNdufv2* 基因的氨基酸序列, 发现其与致乏库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)和蚤状溞(*Daphnia pulex*)同源性达到 70% (图 2)。利用 MEGA 6.0 软件对三疣梭子蟹 *ptNdufv2* 基因氨基酸序列进行系统进化分析, 并构建系统进化树(图 3)。结果显示三疣梭子蟹与肩突硬蜱、美洲蜚(*Limulus polyphemus*)和蚤状溞亲缘关系较近, 与鱼类、哺乳类关系较远。

如图 4 所示, 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 II 亚基基因编码的结构中含有 3 个跨膜结构域, 分别为第 83~105 位(GTGLALSVLVSGLGIGTVMLPGS), 119~141 位(GGGIIMGAKFLIALPFMFHLCNG), 158~179 位(LYKSGYLVVAVSVILAAIAAAM), 无信号肽序列, 第 60~178 位为

表 2 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基基因序列信息及编码氨基酸信息
Tab. 2 Gene sequence and amino acid information of mitochondrial respiratory chain complexes of *Portunus trituberculatus*

复合体 complex	命名 name	GenBank 登录号 GenBank number	cDNA 序列 全长/bp full length of cDNA sequence	ORF 全长/bp full length of ORF	编码氨 基酸 amino acid	理论等 电点 pI	分子式 molecular formula	亲水性 平均数 average of hydro- philicity	不稳定 系数 coefficient of insta- bility
I	<i>ptNdufv2</i>	KY682717	1005	705	234	7.01	C ₁₁₈₄ H ₁₈₉₀ N ₃₃₂ O ₃₅₂ S ₁₄	-0.297	40.53
II	<i>ptSDHC</i>	KY406169	915	540	179	10.38	C ₈₈₂ H ₁₄₀₁ N ₂₃₅ O ₂₂₃ S ₁₀	0.528	37.70
III	<i>ptCytochrome c1</i>	KY406171	2371	942	313	8.83	C ₁₅₁₇ H ₂₃₅₉ N ₄₁₃ O ₄₄₃ S ₁₉	-0.176	33.15
IV	<i>ptCOX6B</i>	KY406170	1171	318	105	5.81	C ₅₄₄ H ₈₃₀ N ₁₄₂ O ₁₆₂ S ₈	-0.633	36.56

```

1   GCTGATCTGAAGCCAAGATCAGGATTAAGACAGCACTGGTTAACTGCTGACTTACCCAACCGAGGCTGACCTTAGTGCTGACCTATTGTGACCTACC 100
1   M L T R R E G V R G L H R T A P T A S D S L F V H 25
101 ATG CTG ACC AGG AGG GAA GGG GTG AGG GGC CTA CAG AGA ACA GCC CCC ACT GCC AGC GAC TCC CTC TTT GTG CAC 175
26  R D T V Q N N P D T A F E F T P E N K K R A E A I 50
176 CGG GAC ACA GTA CAG AAC AAT CCG GAC ACA CCG TTT GAG TTT ACA CCA GAG AAC AAG AAG CGC GCA GAG GCC ATC 250
51  I S I Y P D G H K K A A V I P L L D L A Q R Q V G 75
251 ATC TCA ATC TAC CCT GAT GGC CAC AAG AAG GCT GCG GTC ATC CCA TTA CTT GAC CTG GCC CAG CGG CAG GTC GGA 325
76  N W L P I T A M H A V A K M L D M P R M R V Y E V 100
326 AAC TGG CTC CCC ATC ACG GCC ATG CAC GCT GTG GCC AAG ATG CTC GAC ATG CCC AGA ATG AGA GTG TAT GAG GTG 400
101 A T F Y T M Y M R N P V G K Y H I Q V C T T T P C 125
401 GCC ACA TTC TAC ACC ATG TAT ATG AGG AAT CCA GTT GGC AAC TAC CAC ATC CAG GTG TGC ACC ACC ACC CCC TGC 475
126 W L R G S D Q V M A V I K D K L G L T P G H S T K 150
476 TGG CTG CGG GGG TCG GAC CAG GTC ATG GCG GTG ATC AAG GAC AAA CTG GGC CTT ACT CCC GGC CAC TCC ACC AAG 550
151 D G L F T L S E V E C L G A C V N A P M M Q I N D 175
551 GAC GGA CTC TTC ACT CTC TCG GAA GTA GAG TGT CTT GGT GCC TGT GTC AAC GCG CCC ATG ATG CAG ATT AAT GAT 625
176 D Y Y E S D V V E I L D T L T A G K K P K 200
626 GAT TAT TAT GAA GAC CTC GCT GAG TCT GAC GTA GTG GAG ATC CTG GAC ACC CTG ACG GCC GGC AAG AAA CCC AAG 700
201 A G P R N G R F A A E P A G G L T S L T T P P P G 225
701 GCC GGC CCT CGC AAT GGC CGG TTC GCT GCT GAG CCG GCA GGG GGA CTC ACC AGC CTC ACC ACC CCA CCC CCC GGC 775
226 P G F R V R D D L * 234
776 CCA GGC TTC AGG GTA CGC GAC GAC CTT TAA TGACCCAGCTTGACCCGTCGGAGGTGAGGTGAGGGCGGCAGTGACCCGGGATGGACCA 865
866 GTGTACATACAACAGAAAACGGTGACCTGACCTCCCTGCCGTTTCTATGCGTTTGGTGGATTATTGGGGGAAAAATGTAATAATGTAATTTTG 965
966 TGTAAATAATGGAGTTGTAATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1005

```

图 1 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 I (*ptNdufv2*) 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 阴影为 NADH dehydrogenase subunit E 结构域。

Fig. 1 *Ndufv2* nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Portunus trituberculatus*

ATG: start codon; *: stop codon; Shadow: NADH dehydrogenase subunit E.

三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MLTRREG. VRGLHRTAPTASDSLFVHRDTVONNPDTAFETPTENKKRAEAIISUYPDGHKKAAMIPLDLAOROVGNWL	78
隆头蛛 <i>Stegodyphus mimosarum</i>	LOKGLOONTGCLFTTSSARKSDKLFVHRDTEONNPDPFETAEENLKRAESIISUYPDGHESAAVPLDLAOROVGNWL	79
致乏库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	LOSTLRNFRG. ICSTSI RMSDNLFVHRDTPEDNPSPFETENKKRVSALINUYPDGHKRGAMIPDLAOROVGNWL	77
肩突硬蜱 <i>Ixodes scapularis</i>	AALRCPTPRSRALGTSTSLRSALFVHRDTPDONANVKFEFTPENLKRAESLTSUYPDGHRAAAVPLDLAOROVGNWL	79
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	KI GRALSSOVRSEFTVSSASLSLFVHRDTPKNNPDPVFAETKENVERANAIINUYPDGHKRAAAMIPLDLAOROVGNWL	80
白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>	GQIFLRNSNTRNLQSTCCALSDTLFVHRDTPQNNPDPVHFEFTSENKRAEAIISUYPDGHKKAAMIPLDLAOROVGNWL	79
Consensus	q r l r l s s s d l f v h r d t q n n p d v h f e f t s e n l k r a e a i i s i y p d g h k a a m i p l d l a o r o v g n w l	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	PI TAMHVAKMDMPRMRYVEVATFYTMNRNPVGKYHI OVCTTTPCWLRSDOVMAMIKDLGLTPGHSTKDGLEFTLSV	158
隆头蛛 <i>Stegodyphus mimosarum</i>	PI SAMHYVADMLKMPRMRYVEVATFYTMNRNPVGKYHVOVCTTTPCWLRSADVDLDRCKKNLGI DVGGTTKDGLEFTLSV	159
致乏库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	PI SAMHKVADI LGLPNRMRYVEVATFYTMNRNPVGKYHI OVCTTTPCWLRSDEVMNVCKKKLGI SPGETTKDGKFTISE	157
肩突硬蜱 <i>Ixodes scapularis</i>	PI TAMHYVADYLGMPPRMRYVEVATFYTMNRNPVGKYHVOVCTTTPCWLRSADVI OAVI EKKLGI GPGETSKDGLEFTLSV	159
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	PI SAMHVAADMLSMPPRMRYVEVATFYTMNRNPVGKYHVOVCTTTPCWLRSDEKI MNCLKKKLNNGNETTPNGEBSLLE	160
白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>	PI TAMHKVABE LNMPRMRYVEVATFYTMNRNPVGKYHVOVCTTTPCWLRSDDI LNCL KKKLNI KPGEASADGRBSLSE	159
Consensus	p i s a m h v a d m l m p r m r y v e v a t f y t m n r n p v g k y h v o v c t t t p c w l r s d d i m m v i k k l g i p g e t t k d g l e f t l s v	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	VECLGACVNAPMVOVNDYDEDLAESEIVVEI LDTLTAGKKPKAGPRNGRFAAEPAAGGLTSLTTPPPGPGFVRDD	233
隆头蛛 <i>Stegodyphus mimosarum</i>	VECLGACVNAPMVOVNDYDEDLAESEIVVEI LNDLKS GNVPKAGPRSGRLACEPAAGGLTSLTEPPPGPGFVGRSD	234
致乏库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	VECLGACVNAPMVOVNDYDEDLAESEIVVEI LDDLKOGKVRPPGPRNGRFAAEPAAGGLTSLTEDPKPGFGLOAG	232
肩突硬蜱 <i>Ixodes scapularis</i>	VECLGACVNAPMVOVNDYDEDLAESEIVVEI LDSLKOGKVRPPGPRNGRFAAEPAAGGLTSLTSPPKPGFGKLRPD	234
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	VECLGACVNAPMVOVNDYDEDLAESEIVVEI LDDLKAGREPKAGPRNGRFAAEPRDGLTSLTEPPPGPGFGKIOPG	235
白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>	VECLGACVNAPMVOVNDYDEDLAESEIVVEI LEDLKKDQIPKAGPRNGRFAAEPI BELTSLKGEPPPGPGFVGRSD	234
Consensus	veclgacvnampvo vnddyeddl t k d t e e i l d d l k g k p k a g p r n g r f a a e p a a g g l t s l t e p p p g p g f v r d	

图 2 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 I (*ptNdufv2*) 氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* *Ndufv2*

琥珀酸脱氢酶/富马酸还原酶跨膜亚基(succinate dehydrogenase/fumarate reductase, transmembrane subunit 蛋白结构域(IPR000701)。同源性分析发现三疣梭子蟹 *ptSDHC* 基因与美洲鲎、鲑疮痂鱼虱(*Lepeophtheirus salmonis*)、火腿伪镖水蚤(*Pseudodiaptomus poplesia*)、玉带凤蝶(*Papilio polytes*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的同源性分别为 47%、50%、41%、51%、54%(图 5)。系统进化分析结果显示, 三疣梭子蟹与美洲鲎亲缘关系较近, 后与鲑疮痂鱼虱、中华蜜蜂(*Apis cerana*)等节肢动物

聚为一支, 与鱼类、哺乳类亲缘关系较远(图 6)。

三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 III 亚基基因编码的蛋白质结构中无跨膜结构域, 无信号肽序列, 第 83~302 位为细胞色素 c1 家族蛋白结构域(IPR002326)(图 7)。利用 BLAST 同源性分析发现其与鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)及非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)同源性达到 74%, 与亚洲龙鱼(*Scleropages formosus*)、金头鲷(*Sparus aurata*)的同源性分别为 72%、73%(图 8)。对其氨基酸序列进行系统进化分析, 并构建系统进化树(图 9)。结果

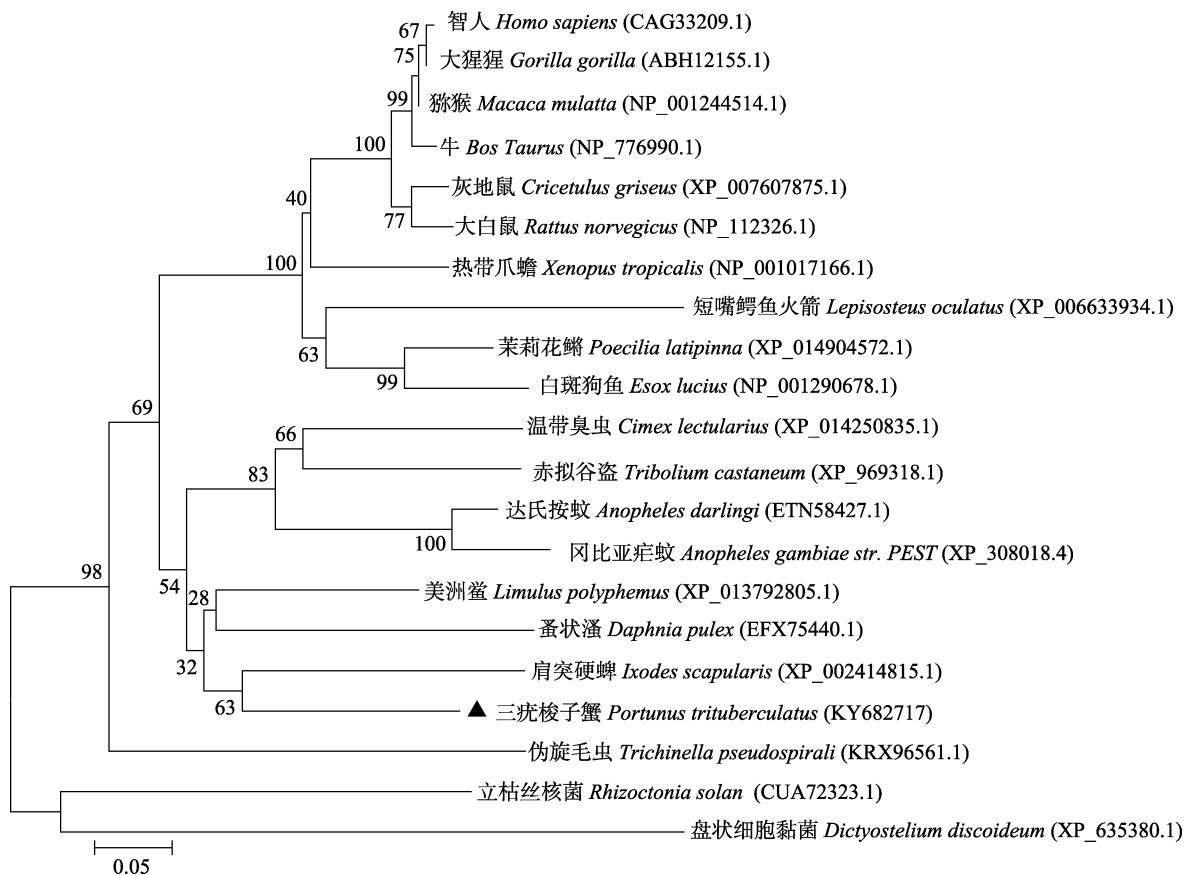


图 3 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 I (*ptNdufv2*)氨基酸的系统进化树
Fig. 3 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* Ndufv2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	52
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

图 4 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 II(*ptSDHC*)基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列
ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 阴影为跨膜结构域.

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *ptSDHC* in *Portunus trituberculatus*
ATG: start codon; *: stop codon; Shadow: transmembrane domain.

三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MATVLR. LAAGKCWAGGPRPAVLOGPLVTQWTRAVFTSP	SAAALKSO. SA	48
美洲蜆 <i>Limulus polyphemus</i>	MAYAVRFAAREMLWKPRLLTTLSLK.	CI QP MATAPAKLRPN	40
鲱鱼虱 <i>Caligus clemensi</i>		 VSPEAVAPK	9
鲑疮痂鱼虱 <i>Lepeophtheirus salmonis</i>		 SLSLKSMTOEVEAPK	15
火腿伪镖水蚤 <i>Pseudodiaptomus poplesia</i>		 PMSAEEHKI. SR	11
玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i>	RLS AKPVLAS LGRFPLTLKSAHYAO.	AAVVPKVNFKKFEAPKL	42
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	MALLRLTLARQGVCI SRPHCSVLRYR.	HAAPMG. TAKE. EM	38
Consensus	a	p	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	EDYWAKNKRRLRRPVSPHLTIYKPOITSMLSITHRGTGLALS	VLVSGLGI G	98
美洲蜆 <i>Limulus polyphemus</i>	EDFVWKNKRLERPLSPHLSIYKPOLTSMLSI	THRGS GAAMASVLWGFSIG	90
鲱鱼虱 <i>Caligus clemensi</i>	ESFWDKNKRLNRPMSPHLTIYKPOLTSMLSI	SHRI SGMYLTAL LYS GGFL	59
鲑疮痂鱼虱 <i>Lepeophtheirus salmonis</i>	ESYWDKNKRLNRPMSPHLTIYKPOLTSMLSI	THRGTGI FLTGVVYAGGLI	65
火腿伪镖水蚤 <i>Pseudodiaptomus poplesia</i>	TEFWTKNKNLGRPI SPHLTIYKFEMPALMSI	THRATGLFOS ALLTGS AI G	61
玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i>	EHYDDKNARLKRPLSPHLTIYAPOLTSMLSI	THRTAGI ILSGYASVLGI G	92
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	NKFWSKNEKLNRPMSPHLTIYKWSVPMMSI	THRGTGVGLSGAISAFALA	88
Consensus	e f w k n k r l r p s p h l t i y k p q l t s m l s i t h r g t g l s	g i g	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	TVMLPGSYPHYLAMVOAMOFGGGIIMGAKFLIALPFMFHLCN	GVRLVWD	148
美洲蜆 <i>Limulus polyphemus</i>	MLVLPGSFPHYLTMOVSLHLWPSFIFTVKYGLAWLFFFHMCN	AVRHLAWD	140
鲱鱼虱 <i>Caligus clemensi</i>	PFVLPNNFP. . . TFIOSIEIAPLLVTAGKFAI	AFPPAFHTYNGLRHLWD	106
鲑疮痂鱼虱 <i>Lepeophtheirus salmonis</i>	PFLLPNNFP. . . TFLOSLEVAPSLILLFKFGI	AFPPAFHWSNGIRHLFWD	112
火腿伪镖水蚤 <i>Pseudodiaptomus poplesia</i>	VMTMSGTFPALLGSI OAAOFAPLI FLAKFALAWPFSYHLLNGI	RHLSWD	111
玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i>	ALVLP HDVSHYIMMI EGLNLSPATI FLAKFLI	AAPEGYHFANGLRHL YWD	142
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ALVLP GNYPYLLDML HSLSVGPYLI GLAKFGI	AF PVSFHTLNGI RHLWWD	138
Consensus	v l p g f p y l m i q s l p l i l a k f i a p f f h n g r h l w d		
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	LGYGFTLRALYKSGYL VVAVS VI LA AI AAA		178
美洲蜆 <i>Limulus polyphemus</i>	LGHGFBI KTL YKTGW.		155
鲱鱼虱 <i>Caligus clemensi</i>	MGYGFKI SEVYSSG.		120
鲑疮痂鱼虱 <i>Lepeophtheirus salmonis</i>	MGI GLKI REVYSSG.		126
火腿伪镖水蚤 <i>Pseudodiaptomus poplesia</i>	MGYGFKMODLYKTGW.		126
玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i>	TAKGLTI KEVYSTGY.		157
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	LKKGRI PEVYRTGY.		153
Consensus	g g f i e v y t g		

图 5 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 II (ptSDHC)氨基酸序列比对

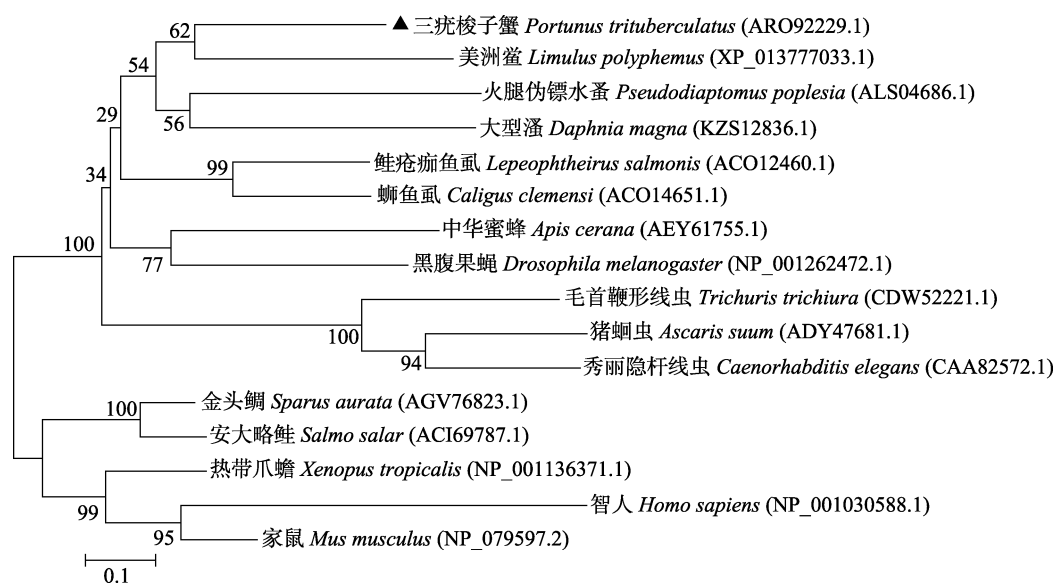
Fig. 5 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* SDHC

图 6 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 II (ptSDHC)氨基酸的系统进化树

Fig. 6 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* SDHC

显示三疣梭子蟹与白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、达氏按蚊(*Anopheles darlingi*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)等节肢动物亲缘关系较近,与鱼类关系较远,与哺乳类亲缘关系最远。

三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体IV亚基基因编码的蛋白质结构中无跨膜结构域,第1~26位有

一个信号肽序列,第30~104位为细胞色素c氧化酶亚基6b(cytochrome c oxidase, subunit VIb)标志性蛋白结构域(IPR003213)(图10)。BLAST分析发现其与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性达到74%,与拟果蝇(*Drosophila simulans*)、点蜂缘蝽(*Riptortus pedestris*)、桔小实蝇(*Bactrocera*

Fig. 8 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* cytochrome c1

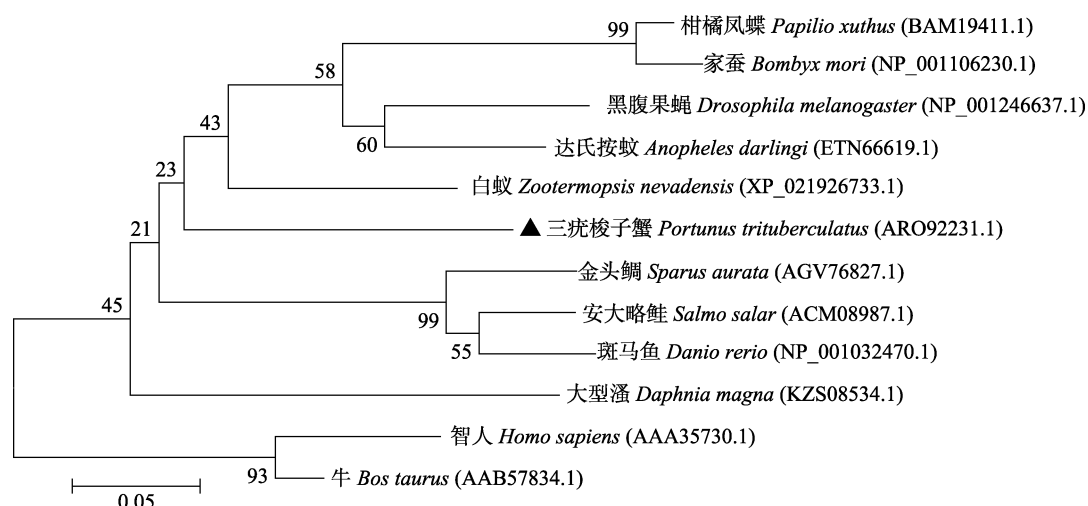


图 9 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体III(*ptCytochrome c1*)氨基酸的系统进化树

Fig. 9 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* cytochrome c1

1	M N A E S G G T Q L L L L L L L A R K G																				20					
1	ACTAATTTAAATAAGGGT					ATG	AAC	GCA	GAA	TCG	GGA	GGC	ACT	CAG	CTG	CTG	CTG	CTA	CTG	CTG	CTC	GCC	AGG	AAA	GGT	78
21	E V P T M S					E	A	I	M	S	S	Q	M	E	T	A	P	F	D	P	R	F	P	N	45	
79	GAA GTA CCT ACT ATG TCT					GAA	GCC	ATC	ATG	TCT	TCT	CAA	ATG	GAA	ACT	GCT	CCC	TTT	GAT	CCT	CGC	TTC	CCC	AAC	153	
46	Q	N	Q	T	K	Y	C	Y	Q	S	Y	V	D	F	H	R	C	Q	K	L	K	G	E	E	Y	70
154	CAG AAC CAG ACC AAG TAC TGT TAC					CAG	AGC	TAC	GTT	GAC	TTC	CAC	CGC	TGC	CAG	AAG	CTG	AAG	GGT	GAG	GAG	TAC	228			
71	E	P	C	Q	Y	F	K	K	V	F	R	S	V	C	P	N	A	W	V	E	K	W	D	E	Q	95
229	GAG CCA TGC CAG TAC TTC AAG AAG GTG TTC					CGC	TCC	GTG	TGT	CCC	AAC	GCT	TGG	GTG	GAG	AAG	TGG	GAT	GAG	CAG	303					
96	L	E	N	G	S	F	P	S	K	I	*													105		
304	CTG GAG AAT GGC AGT TTT CCC AGC AAG ATC					TAG	ATCAGCTTTTCCCTTTCTTCTCTTCTGTAATGTCCGGGCTTAGGAAATAAAAGT																	392		
393	GAGAGAGAAAGAGAGAGAGAACGAGTGAGAGATGGTTAGCAGAGTTTATTGTATTGTGGGTCTTGCAATTTGCTCCTTGTCACACCCCAACACACGTG																									492
493	TGCACACATTTGCATCTGTCTTACTAATGTACATCTCATGTAGAGTTGTTGTGTCATCCACTTGTCAATTTGATCCGGGAACAGTAAAGATGGAGCATAGT																									592
593	ATCTGTTGCTGGCCAAGTGGTGAACAGTCGGCCATTTCTTCACTAGCCACTCTTGTCTCCTTCAACACTCTGTGGAGAGCACCATGCCTCTCCTGTCTGT																									692
693	AGATATTTGTACAGGGAGTTGCAGCACCAGCAGGATAGCCTAAGTGGCGCCTCAGGCCGACTCTTTCATCTGCTGTGATGCAATTAAGGTCCCCATCAG																									792
793	GCTCTTTGTTTGTCTTTACCCCAAGAACAAAAAGCAGCCCAACAAATAGGTGTGTGTATGTGTGAATGAATGAACTAGTCTGGTTTATGTTTATTTA																									892
893	GCACTTTATTTATTTCTTTTATCTCTGGAATGTAACCTGATTATTTTGTGCTAGGGAAGATTGATTGTGGAATTTATACTTGTATGGTCTGGAACAAGG																									992
993	ACAAAAATGGAAGATATTTTATGTTGTTGAAGAGAGGCAGGCAAGACTTGGACAGACTGTAATGTTGGAACCTAATTGTAATAGTATCTGTTTCCAGT																									1092
1093	CAATGTAATATTTAGTAAATGATCAAGATGCTGATCAGCTTTTACTATTACCATACATTGTTGTTACATGGGAAGA																									1170

图 10 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体IV(*ptCOX6B*)基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 阴影为信号肽序列。

Fig. 10 *ptCOX6B* nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Portunus trituberculatus*

ATG: start codon; *: stop codon; Shadow: signal peptide sequence.

dorsalis)、大型蚤(*Daphnia magna*)的同源性分别为 68%、71%、69%和 70%(图 11)。系统进化树结果显示, 三疣梭子蟹与凡纳滨对虾亲缘关系较近, 后与大型蚤等节肢动物聚为一支(图 12)。

2.2 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基基因的组织表达分析

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析了三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基基因在肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、卵巢、脑神经节、眼柄及胸神经节组织表达情况, 结果显示三疣梭子蟹线粒体呼

吸链复合体亚基基因在所测组织中均有表达。*ptNdufv2* 基因在肝胰腺和肌肉中表达量最高, 鳃和心脏中次之, 在脑神经节和胸神经节中表达量最低; 三疣梭子蟹 *ptSDHC* 基因在肝胰腺中表达量最高, 其次是肌肉、鳃、心脏和精巢, 其余组织中表达量较少; 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 III *ptCytochrome c1* 基因在肝胰腺、心脏和肌肉中表达量最高, 鳃和卵巢中次之; 三疣梭子蟹 *ptCOX6B* 基因在肝胰腺和鳃中表达量最高, 其次是心脏和眼柄中, 卵巢和脑神经节中表达量最低(图 13)。

三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MNAESGGTQ...LLLLLLLARKGEVPTMSEAI NSSQ...NET	36
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	NSAAI NSDETKMET	14
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	MPAAI NAAKQKQG...LDT	16
桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsali</i>	LKQPHWI VTSSYI ESNKFSQLFRRPQCGKEKNTYK...NET	38
东方果蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	MP...EI HI PET...LGT	12
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	LI RESGI HRGCNKFFGGRSDHQKTNLMSAI NSSE. ELVT	39
拟果蝇 <i>Drosophila simulans</i>	KSSDSSNMSAYK...LET	15
Consensus	a m l et	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	APFDPRFPNCNCTRYCYCSYVDFHRCCKLKGEYEPCCYF	76
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	APFDPRFPNCNCTRYCYCSFVDFNRCCKIKGEDYEPCEYF	54
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	APFDPRFPNCNCTRYCYCSYLDYHRCCKVKGTNYEPCHYF	56
桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsali</i>	APFDPRFPNCNCTRYCYCSYIDYHRCCKVRGEKYEPCCNYF	78
东方果蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	APFDPRFPNCNCTRYCYCSYLDYHRCCKLRGDKYEPCCNYF	52
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	APVDPFRFPNCNCTRYCYCSFVDFHRCCKIKGEDYTPCCYF	79
拟果蝇 <i>Drosophila simulans</i>	APFDPRFPNCNCTRYCYCSYIDYHRCCKIKGEDFAPCCNYF	55
Consensus	apfdprfnpnqnqtrycyqsy dfhrcck kge yepc yf	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	KKVFRSVCNPAWVEKWDLEQLNGSFPSK	104
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	KKVYTTICPNSWIEKVIDQIENGIFPGK	82
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	ERVFKSVCNPGWVEKWDSCREECAFP GK	84
桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsali</i>	KKVFSSNCPNAWVERVNDQRDECTFPGR	106
东方果蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	KKVFSSICPNAWVEKWDQRDECTFPGR	80
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	QKVYKSVCPNSWIEKVTQLLEEGSFPPK	107
拟果蝇 <i>Drosophila simulans</i>	QKVYKSNCPNAWVEKWDQRDESC....	78
Consensus	kkvf s cpnawvekwd qreeg fpgk	

图 11 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体IV(*pt*COX6B)氨基酸序列与其他物种的 COX6B 氨基酸序列比对
Fig. 11 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* COX6B with other species

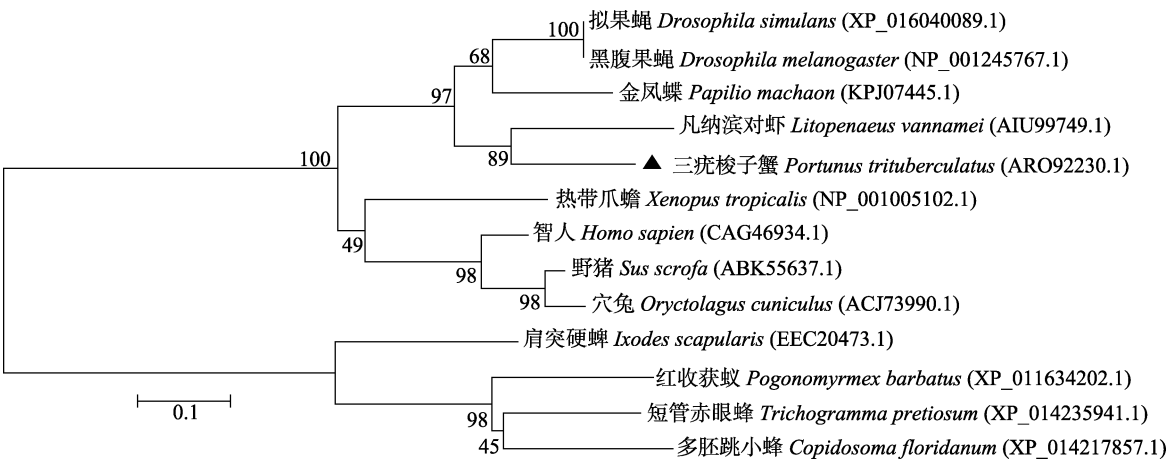


图 12 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体IV(*pt*COX6B)氨基酸的系统进化树
Fig. 12 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* COX6B

2.3 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体活力在家系近交中的变化

三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体活力如图 14 所示。除复合体 I 外, 其余复合体在心脏中的活力均高于肝胰腺中的活力。随着近交系数的增加, 三疣梭子蟹肝胰腺中复合体 I 活力从 F4 开始呈现显著下降趋势($P<0.05$), F0 和 F2、F4 和 F6、F8 和 F10 之间分别差异不显著($P>0.05$); 复合体III酶活力显著下降, 且各代显著低于 F0($P<0.05$); F10 复合体IV酶活力显著低于其余各代($P<0.05$),

且其余各代之间酶活无显著差异($P>0.05$); 复合体 II 酶活力随近交代数的增加无显著变化($P>0.05$)。随着近交系数的增加, 三疣梭子蟹心脏中复合体 I 活力显著下降($P<0.05$), F6、F8 和 F10 之间无显著差异($P>0.05$); 复合体 II 酶活力呈现显著升高($P<0.05$), 且 F2、F4 和 F6 之间酶活无显著差异($P>0.05$); 复合体III酶活力随近交代数增加显著下降, 且 F4 和 F6、F8 之间酶活无显著差异($P>0.05$); 复合体IV从 F6 开始呈现显著下降趋势($P<0.05$)。

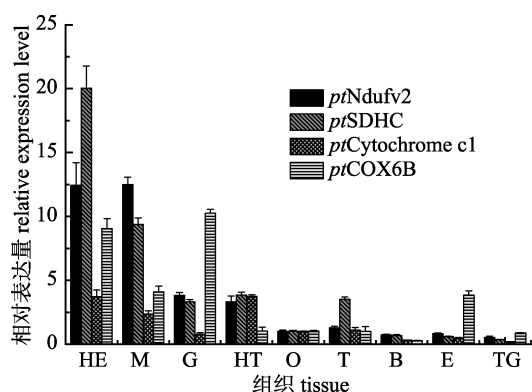


图 13 三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢关键基因组织表达分布情况

HE: 肝胰腺; M: 肌肉; G: 鳃; HT: 心脏; O: 卵巢; T: 精巢;
B: 脑神经节; E: 眼柄; TG: 胸神经节。

不同组织表达量均以与卵巢相比较的倍数表示。

Fig. 13 Distribution of the expression of oxidative phosphorylation metabolism key genes in different tissues of *Portunus trituberculatus*

HE: hepatopancreas; M: muscle; G: gill; HT: heart; O: ovary;
T: testis; B: brain ganglion; E: eyestalk; TG: thoracic ganglion.
The expression levels of different tissues were expressed as multiples in comparison with the ovaries.

2.4 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基因表达在家系近交中的变化

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析了近交对三疣梭子蟹肝胰腺和心脏中线粒体呼吸链复合体亚基因表达情况的影响(图 15)。结果表明, 随着近交系数的增加, 4 个复合体基因表达量在肝胰腺中均显著下降, 且各代表达量显著低于 F0 ($P<0.05$); *ptNdufv2* 基因在 F4、F6、F8 中无显著差异($P>0.05$)(图 15a); *ptSDHC*(图 15c)、*ptCOX6B*(图 15g)、*ptF-ATPβ*(图 2-32a)基因在 F6、F8 中无显著差异($P>0.05$); *ptCytochrome c1* 在 F6、F8 和 F10 中无显著差异($P>0.05$)(图 15e)。在心脏中, 随着近交系数的增加 *ptNdufv2* 基因表达量呈现出下降趋势($P<0.05$)(图 15b), 其中 F2 和 F4、F8 和 F10 之间分别无显著差异($P>0.05$)。F2-F10 中 *ptSDHC*(图 15d)表达量均显著高于 F0 ($P<0.05$), 且各代之间无显著差异($P>0.05$)。 *ptCytochrome c1* 基因表达量从 F4 开始显著下降($P<0.05$), F8 和 F10

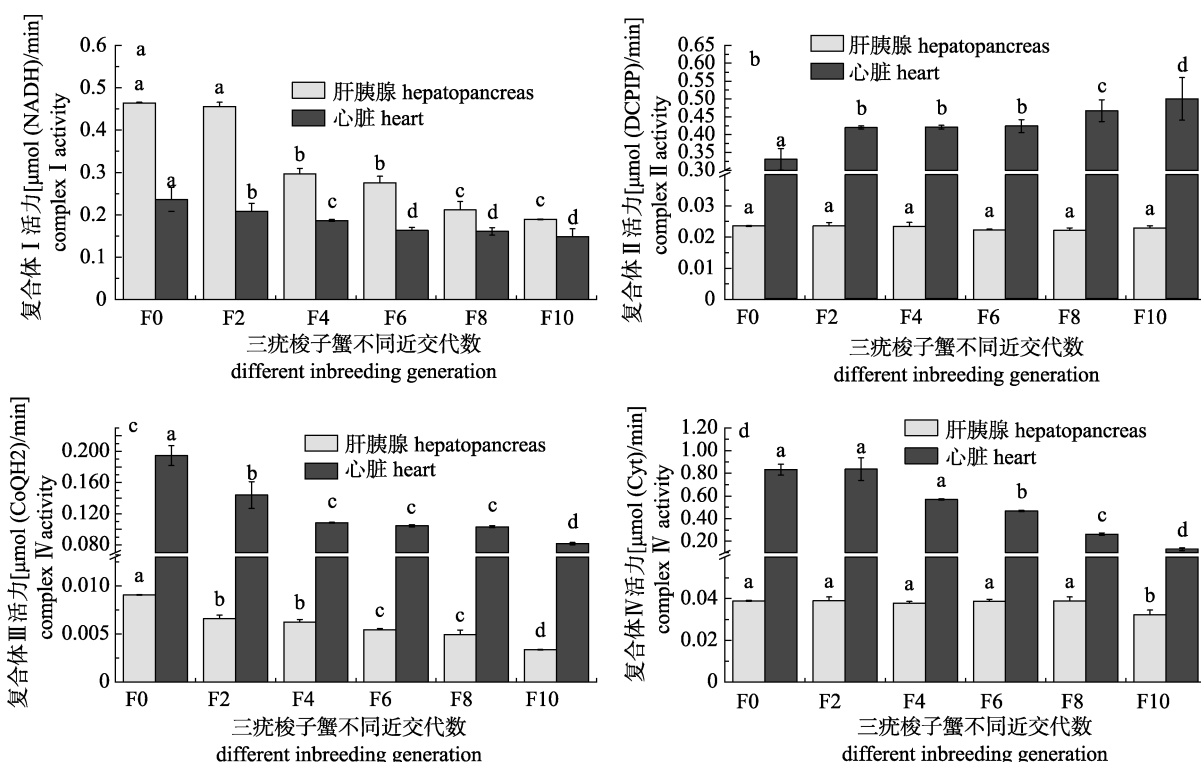


图 14 不同近交世代家系三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体酶 I、II、III、IV 活力

不同字母表示不同世代间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 14 The activity of complexes I、II、III、IV in different inbreeding generations of *Portunus trituberculatus*
The different letters represent significant difference among different generations ($P<0.05$).

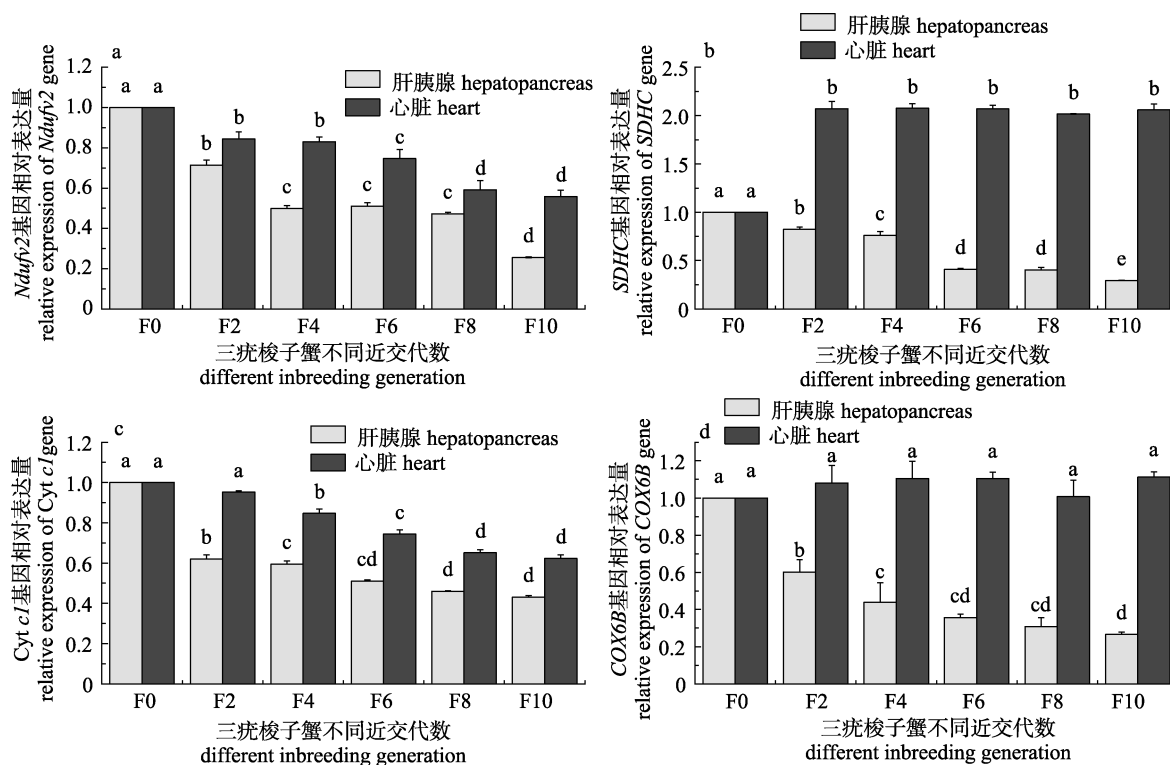


图 15 不同近交世代家系三疣梭子蟹氧化磷酸化关键基因相对表达量

不同字母表示不同世代间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 15 Relative expression of oxidative phosphorylation metabolism key genes in different inbreeding generations of *Portunus trituberculatus*

The different letters represent significant difference in the different generations ($P < 0.05$).

之间无显著差异(图 15f, $P > 0.05$); *ptCOX6B* 基因表达量随近交系数的增加无显著变化(图 15h, $P > 0.05$).

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体亚基基因序列特征

线粒体呼吸链复合体 I, 又称为 NADH-辅酶 Q 氧化还原酶, 是电子传递链中的第一个蛋白复合体^[13], 位于线粒体内膜上。单个蛋白质是同时由细胞核和线粒体两个基因组编码的。本研究克隆得到的三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 I 亚基(*Ndufv2*) cDNA 序列全长为 1005 bp, 其中包含 705 bp 的 ORF, 编码 234 个氨基酸, 该蛋白是复合体 I 的核心亚基, 被认为属于催化所需的最小组件^[14]。该蛋白无跨膜结构域和信号肽序列, 具有标志性蛋白结构域 NADH 脱氢酶亚基 E。该蛋白与致乏库蚊、肩突硬蜱和蚤状蚤等节肢动物同

源性较高, 在进化上也相对保守。

线粒体呼吸链复合体 II, 又称琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶(succinate dehydrogenase), 是镶嵌在线粒体内膜上的膜蛋白, 是电子传递链中的第二个蛋白复合体, 是唯一一个同时参与三羧酸循环和氧化磷酸化的酶^[15]。本研究克隆得到的三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 II 亚基(*SDHC*)cDNA 序列全长为 915 bp, 其中包含 540 bp 的 ORF, 编码 179 个氨基酸, 称为琥珀酸脱氢酶复合体亚基 C (Succinate dehydrogenase complex subunit C)。该基因编码的蛋白质结构中含有 3 个跨膜结构域, 无信号肽序列, 具有琥珀酸脱氢酶跨膜亚基标志性蛋白结构域。该蛋白质是两个完整的膜蛋白之一, 可锚定复合物的其他亚基, 在线粒体内膜上形成催化核心^[16]。三疣梭子蟹 *ptSDHC* 基因编码的氨基酸序列与美洲蜚、鲑疮痂鱼虱等节肢动物同源性较高, 其进化树分析也表明其与节肢动物亲缘关系较近。该基因是首次在虾蟹类动物被

克隆出来,具有重要的研究意义。

线粒体呼吸链复合体III, 又称 Q-细胞色素 c 氧化还原酶(Q-cytochrome c oxidoreductase), 是电子传递链中的第三个蛋白复合体, 含有血红素的细胞色素, 在 ATP 的生化生成中起关键作用^[17]。复合物III是一种跨膜蛋白, 由线粒体(细胞色素 b 和细胞色素 c)和核基因组(所有其他亚基)共同编码。本研究克隆得到的三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体III亚基基因(Cyt c1) cDNA 序列全长为 2371 bp, 其中包含 942 bp 的 ORF, 编码由 313 个氨基酸组成的复合物 III 亚基 4。该蛋白属于细胞色素 c 蛋白家族。它的作用是从 Rieske 蛋白接受电子并传递给线粒体呼吸链的细胞色素 c(复合体 IV)^[18]。该基因编码的蛋白质结构中无信号肽序列, 具有细胞色素 c1 家族蛋白结构域。该蛋白未检测到含有跨膜结构域, 这可能由于它的作用是从复合体III携带着电子去复合体IV, 此过程是在膜内进行的。三疣梭子蟹 *ptCytochrome c1* 基因的氨基酸序列与鲤、斑马鱼及非洲爪蟾同源性达到 74%, 系统进化树显示其与具尾扇头蜉、白蚁等亲缘关系较近, 说明其在进化上比较保守。

线粒体呼吸链复合体IV, 又称细胞色素 c 氧化酶, 是电子传递链的最后一个蛋白复合体, 是线粒体上一个大型的跨膜蛋白复合物^[19]。该复合体由 3 个不同的催化亚基组成, 分别由线粒体基因和核基因编码。它从 4 个细胞色素 c 分子中接收 1 个电子, 并将它们转移到 1 个氧分子上, 将分子氧转化为两个水分子^[2]。本研究克隆得到的三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体IV亚基基因(COX6B) cDNA 序列全长为 1171 bp, 其中包含 318 bp 的 ORF, 编码 105 个氨基酸。该基因编码的蛋白是复合体IV的一个亚基, 由核基因编码的, 可能参与复合体的调控和装配。三疣梭子蟹 COX6B 编码的蛋白结构中无跨膜结构域, 具有细胞色素 c 氧化酶 6b(Cytochrome c oxidase, subunit VIb)标志性蛋白结构域。有一个信号肽序列, 其作用可能是从复合体III传递电子到复合体IV的过程中识别电子供体和受体。三疣梭子蟹 *ptCOX6B* 基因的氨基酸序列与凡纳滨对虾同源性较高。系统进化分析也显示与凡纳滨对虾亲缘关系较近, 说明其在进化上

比较保守, 可为其他海洋生物相关的研究提供参考。

实时荧光定量 PCR 结果显示, 三疣梭子蟹 4 个呼吸链复合体亚基基因在所研究组织中均有表达, 在肝胰腺、肌肉和心脏等代谢旺盛的组织中表达量最高, 而肝胰腺、肌肉和心脏是三疣梭子蟹生长发育主要的供能中心, 这些基因的高表达也印证了这一点。

3.2 三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢在家系近交中的变化

由于三疣梭子蟹野生苗种的日益匮乏, 越来越多的苗种依靠人工养殖的亲本提供, 然而在苗种生产过程中不可避免地会造成群体内近交, 从而导致了三疣梭子蟹种质资源的退化及遗传多样性的降低^[9, 20]。目前已有研究证明近交会造成本产动物形态学^[20]、繁殖力^[21]、存活、抗逆性^[22]等表型性状方面的衰退, 但关于近交对生理机制相关的影响还鲜有报道。Ren 等^[23]证实了近交能够引起三疣梭子蟹酚氧化酶活力及抗氧化机制等生理机能的衰退。但目前有关近交对三疣梭子蟹能量代谢的影响还未见报道。

本实验结果表明, 无论在肝胰腺还是在心脏中, 三疣梭子蟹线粒体复合体 I 和 III 的活力均随着近交系数的增加而显著降低, 这表明近交降低了复合体I氧化DANH的能力, 在电子传递链的第一步就造成了抑制, 从而影响质子梯度的形成^[24]; 复合体 III 的催化能力也出现了衰退, 从而使得 Q 循环受到抑制, 影响电子从 QH2 供体转移到细胞色素 c 受体的过程^[25-26]。同时复合体 I 和 III 亚基基因 *ptNdufv2* 和 *ptCytochrome c1* 的相对表达量出现了和酶活力一致的趋势, 而它们是复合体 I 和 III 其关键作用的亚基^[14, 18], 因此推测亚基基因 *ptNdufv2* 和 *ptCytochrome c1* 表达的衰退分别造成了三疣梭子蟹线粒体呼吸链复合体 I 和 III 活力的下降。同样地, 心脏中的复合体 IV 活力呈现显著降低的趋势, 说明近交也引起了三疣梭子蟹心脏复合体 IV 活力的衰退, 降低了其驱动 ATP 生成的能力^[27], 最终造成体内能量代谢水平的降低。肝胰腺和心脏是三疣梭子蟹体内重要的器官, 也是代谢最为活跃的组织。从本实验结果可以看

出,近交造成了肝胰腺中全部4个复合体活力及其亚基基因的衰退,心脏中除复合体II之外3个复合体活力及其亚基基因的衰退,这表明近交衰退出现在了三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢通路之中,可以推测这可能是三疣梭子蟹生长、存活和生理状态的衰退的原因之一。

结果发现,三疣梭子蟹心脏中复合体II的活力及其亚基基因 $ptSDHC$ 的表达量均随着近交系数的增加而显著增强和升高,说明近交使其氧化琥珀酸的能力增强,加强了氧化磷酸化第二步过程^[25]。而由于复合体II同时参与氧化磷酸化和三羧酸循环两个代谢通路^[15],在一定程度上能够反映有氧代谢的水平^[2],故推测复合体II的活力的增强可能也引起了三羧酸循环等有氧代谢途径的增强,这可能是由于三疣梭子蟹育种过程中优良基因得到了累积^[9]。

本研究还发现,复合体II和IV的活力与其亚基基因相对表达量趋势不一致,分析其原因可能是由于蛋白的表达特性决定的。细胞中某一蛋白在某一时间的表达受到多种因素的影响,如基因的转录、mRNA的翻译、蛋白质的降解速率等^[28]。尽管mRNA表达水平在一定程度上反映基因的表达,但近来越来越多的研究表明,mRNA表达水平并不能完全代表蛋白质的水平,而且蛋白还存在多种多样的翻译后加工修饰等^[29]。

4 结论

采用RACE技术首次克隆获得三疣梭子蟹线粒体呼吸链4个复合体亚基基因的cDNA全长序列,并对这些基因序列进行了生物信息学分析。这些基因虽是各复合体的亚基,但在各自的复合体中发挥着重要的作用。这些基因与相近的物种同源性较高,在进化上也表现出较高的保守性,主要在三疣梭子蟹肝胰腺、心脏、肌肉和鳃等代谢旺盛的组织中表达,可为其他海洋生物相关的研究提供参考,为深入探究三疣梭子蟹氧化磷酸化等代谢机制提供研究基础。本实验结果表明,近交造成了三疣梭子蟹肝胰腺中全部4个复合体活力及其亚基基因的衰退,心脏中除复合体II之外3个复合体活力及其亚基基因的衰退,证实了

近交衰退出现在了三疣梭子蟹氧化磷酸化代谢通路之中,为研究三疣梭子蟹近交衰退机制提供了数据支持。随着近交系数的增加,三疣梭子蟹心脏中复合体II的活力及其亚基基因的表达量均显著增强和升高,证明优良基因在传代过程中得到了累积。本实验数据可为三疣梭子蟹家系良种选育工作提供参考。

参考文献:

- [1] Dai A Y, Yang S L, Song Y Z. Marine Crabs in China Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 1986. [戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝. 中国海洋蟹类[M]. 北京: 海洋出版社, 1986.]
- [2] Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002: 114-146. [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 114-146.]
- [3] Dai C, Wang F, Fang Z H, et al. Effects of temperature on energy metabolic enzymes of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) in the post-molt stage[J]. Journal of Fisheries of China. 2013, 37(9): 1334-1341. [戴超, 王芳, 房子恒, 等. 温度对蜕壳后期三疣梭子蟹能量代谢酶活力的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(9): 1334-1341.]
- [4] Chen J C, Lai S H. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1993, 165(2): 161-170.
- [5] Jiang Q C, Pan D M, Tian J, et al. Effect of nitrite stress on gene expression of antioxidant enzymes, heat shock protein 70, and metabolic enzymes in gill tissue of adult red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Crustacean Biology, 2014, 34(6): 754-759.
- [6] Ding S, Wang F, Dong S L, et al. Comparison of the respiratory metabolism of juvenile *Litopenaeus vannamei* cultured in seawater and freshwater[J]. Journal of Ocean University of China, 2014, 13(2): 331-337.
- [7] González-Ortegón E, Pascual E, Drake P. Respiratory responses to salinity, temperature and hypoxia of six caridean shrimps from different aquatic habitats[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2013, 445: 108-115.
- [8] Vinagre A S, Chung J S. Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata*, (Fabricius,

- 1787[J]. Marine Biology, 2016, 163: 3.
- [9] Gao B Q, Liu P, Li J, et al. Effect of inbreeding on growth and genetic diversity of *Portunus trituberculatus*, based on the full-sibling inbreeding families[J]. Aquaculture International, 2015, 23(6): 1401-1410.
- [10] Moss D R, Arce S M, Otoshi C A, et al. Inbreeding effects on hatchery and growout performance of Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2008, 39(4): 467-476.
- [11] Luo K, Kong J, Luan S, et al. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Aquaculture, 2014, 420-421: 32-37.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Hirst J. Energy transduction by respiratory complex I—an evaluation of current knowledge[J]. Biochemical Society Transactions, 2005, 33(3): 525-529.
- [14] Liu H Y, Liao P C, Chuang K T, et al. Mitochondrial targeting of human NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) and its association with early-onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy[J]. Journal of Biomedical Science, 2011, 18(1): 29.
- [15] Oyedotun K S, Lemire B D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase — Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 279: 9424-9431.
- [16] Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, et al. Cytochrome b in human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the components in liver mitochondria and chromosome assignment of the genes for the large (SDHC) and small (SDHD) subunits to 1q21 and 11q23[J]. Cytogenetics and Genome Research, 1997, 79(1-2): 132-138.
- [17] Gao X G, Wen X L, Esser L, et al. Structural basis for the quinone reduction in the bc_1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc_1 with bound substrate and inhibitors at the Q_i site[J]. Biochemistry, 2003, 42(30): 9067-9080.
- [18] Bosshard H R, Zürrer M, Schägger H, et al. Binding of cytochrome c to the cytochrome bc_1 complex (complex III) and its subunits cytochrome c_1 and b[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1979, 89(1): 250-258.
- [19] Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, et al. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain[J]. Cell Metabolism, 2012, 16(3): 378-386.
- [20] Wang H F, Liu P, Gao B Q, et al. Inbreeding influence to some economic traits of six inbreeding generations of *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1157-1165. [王好锋, 刘萍, 高保全, 等. 近交对三疣梭子蟹若干经济性状衰退的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1157-1165.]
- [21] Frankham R, Gilligan D M, Morris D, et al. Inbreeding and extinction: Effects of purging[J]. Conservation Genetics, 2001, 2(3): 279-284.
- [22] Luan S, Yang G L, Wang J Y, et al. Selection responses in survival of *Macrobrachium rosenbergii* after performing five generations of multi-trait selection for growth and survival[J]. Aquaculture International, 2014, 22(3): 993-1007.
- [23] Ren X Y, Gao B Q, Liu X X, et al. Comparison of immune responses and antioxidant status of different generations of growth-selected *Portunus trituberculatus* families[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 1315-1326.
- [24] Sazanov L A, Hinchliffe P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*[J]. Science, 2006, 311(5766): 1430-1436.
- [25] Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain[J]. Annual Review of Biochemistry, 2003, 72: 77-109.
- [26] Trumpower B L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc_1 complex[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(20): 11409-11412.
- [27] Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K, et al. Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2006, 1757(9-10): 1110-1116.
- [28] Gygi S P, Rochon Y, Franza B R, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast[J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(3): 1720-1730.
- [29] Ji C L, Wu H F, Wei L, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analyses on the gender-specific responses in mussel *Mytilus galloprovincialis* to tetrabromobisphenol A[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 157: 30-40.

Effects of inbreeding on the oxidative phosphorylation of the swimming crab *Portunus trituberculatus*

WANG Zhuqing^{1,2}, REN Xianyun^{1,2}, GAO Baoquan^{1,2}, LIU Ping^{1,2}, LI Jian^{1,2}, WANG Lei^{1,2}

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Functional Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China

Abstract: The swimming crab *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) is a dominant species of portunid crab fisheries and an important economic species worldwide. The key performance traits of crustaceans and other aquaculture species are often depressed by inbreeding, especially if inbreeding effects accumulate too rapidly. Although previous studies have investigated the effects of inbreeding on the morphology, hatchability, and survival of crustaceans, little evidence is available that demonstrates that inbreeding affects crustacean physiology. Therefore, in order to investigate the effects of inbreeding on the oxidative phosphorylation of *P. trituberculatus*, cDNAs of the key subunit genes of the four mitochondrial respiratory chain complexes were cloned, sequenced using rapid amplification of cDNA ends (RACE), and then analyzed using bioinformatics technology. The full-length cDNA sequence of the Complex I core subunit genes was 1005 bp in length and contained a 705-bp open reading frame (ORF) that encoded a 234-amino acid polypeptide (GenBank: KY682717). The full-length cDNA sequence of Complex II was 915 bp in length and contained a 540-bp ORF that encoded a 179-amino acid polypeptide (GenBank: KY406169). The full-length cDNA sequence of the Complex III subunit (Cyt c1) gene was 2371 bp in length and contained a 942-bp ORF that encoded a 313-amino acid polypeptide (GenBank: KY406171), and the full-length cDNA for the key subunit of Complex IV was 1171 bp in length and encoded 105 amino acids (GenBank: KY406170). In addition, homology and phylogenetic analyses revealed that the amino acid sequences of the four complexes were highly similar to those of closely related species and had higher conservation in evolution, and could be used as a reference for other marine organisms. The activities and mRNA expression of the four complexes in the hepatopancreas and heart mitochondria of *P. trituberculatus* were investigated. Results show that inbreeding reduced the activity of all four complexes and their respective subunit gene in the hepatopancreas ($P < 0.05$). Besides, Complex I, III and IV activities and their subunit genes in heart were declined by inbreeding ($P < 0.05$). Furthermore, the elevated activity and expression of Complex II in the heart may indicate that the ability to oxidize succinic acid and the level of aerobic metabolism in the crabs rose by breeding might because the dominant homozygous genes were accumulated during the family-based selective breeding programs. Therefore, it is clear that inbreeding gradually reduces the oxidative phosphorylation pathway and provides a reference for family-based selective breeding programs for *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; phosphorylation; gene clone; complex; inbreeding depression

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn