

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.14365

脊尾白虾 14-3-3 基因 cDNA 全长的克隆和表达分析

王有昆^{1,2}, 刘萍^{2,3}, 李吉涛², 李健^{2,3}

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 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 266235

摘要: 利用本实验室构建的脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)血细胞 cDNA 文库中脊尾白虾 14-3-3 巨球蛋白基因 EST 序列, 采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术, 克隆获得脊尾白虾 14-3-3 基因 cDNA 全长, 命名为 *Ec14-3-3*。该基因全长 2905 bp, 包含 744 bp 的开放阅读框, 编码 247 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 27.95 kD, 理论等电点为 4.65。同源性分析表明, 脊尾白虾 *Ec14-3-3* 氨基酸序列与斑节对虾(*Penaeus monodon*) 14-3-3 的同源性最高, 达到 98%。荧光定量 PCR 分析结果表明, *Ec14-3-3* 基因在血细胞、卵巢、肝胰腺等组织中均有表达, 其中血细胞中 *Ec14-3-3* 相对表达量最高。感染鳃弧菌和 WSSV 后 6 h, 脊尾白虾血细胞和肝胰腺中 *Ec14-3-3* 基因的表达量较对照组均显著增加($P<0.05$), 且具有明显的时间差异性。本研究结果表明, *Ec14-3-3* 基因在脊尾白虾免疫反应中发挥重要作用。

关键词: 脊尾白虾; 14-3-3; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0044-09

14-3-3 蛋白是一类高度保守的蛋白质, 普遍存在于所有真核生物细胞当中。14-3-3 蛋白的研究最早始于 1967 年, Moore 等^[1]从牛脑组织中分离出一些酸性可溶性蛋白, 根据这些蛋白在淀粉凝胶电泳后的迁移率以及经二乙氨基纤维素柱(DEAE-cellulose)后组分分离的情况将其命名为 14-3-3 蛋白。最初研究者们认为 14-3-3 蛋白只存在于动物组织当中, 但随着研究的深入, 在植物、真菌中也发现有它的存在。目前已经发现有超过 30 种 14-3-3 的组织特异性家族成员^[2]。大量研究表明, 14-3-3 蛋白是通过与转录因子的结合形成复合物来调节相关基因的表达^[3-8]。近几年的研究结果发现 14-3-3 蛋白不仅可以参与蛋白激酶(PK)的活化以及蛋白激酶介导的信号通路, 还可以调控基因转录、前体蛋白运输以及细胞周期调控^[9];

同时 14-3-3 蛋白高度保守的疏水表面可以识别外源蛋白质, 当外源蛋白质影响到正常的细胞进程时, 机体将产生 14-3-3 蛋白与其结合以保证机体不受毒害^[10]。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)具有繁殖能力强、生长季节长、环境适应性广的特点^[11-12], 是我国重要的底栖虾类^[13]。近年来随着我国沿海滩涂地区的开发, 脊尾白虾已经成为我国重要的经济养殖品种, 但随着养殖面积的扩大, 病害问题也日益严重, 给养殖户造成了严重的经济损失^[14]。脊尾白虾作为甲壳动物具有先天性免疫防御功能, 深入研究其免疫相关基因及其作用机制, 可为其养殖病害防治提供理论依据。目前水产动物的 14-3-3 基因的研究大多集中于硬骨鱼类中, 甲壳类也有相关研究, 如底栖 (*Fundulus heterocli-*

收稿日期: 2014-09-01; 修订日期: 2015-06-06.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A409); 国家虾产业技术体系项目(CARS-47); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新项目(2015ASKJ02).

作者简介: 王有昆(1989-), 硕士, 主要从事甲壳类分子辅助育种研究. E-mail: wangyoukun1989@sina.com

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

tus)^[15-16]、虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)^[17]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[18]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[19]以及拟穴青蟹(*Scylla Paramamosain*)^[20]。

尽管 14-3-3 基因在其他物种中已有研究, 但脊尾白虾中尚未见报道。本研究采用 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA end, RACE)技术成功克隆了脊尾白虾 14-3-3 基因 cDNA 全长, 分析了该基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)以及白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染后 72 h 内在血细胞和肝胰腺中的表达变化, 以期探讨 14-3-3 基因在脊尾白虾受病原的刺激下发挥免疫功能的途径和抗病机理, 同时也为脊尾白虾的抗病品系的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用健康脊尾白虾取自昌邑市海丰水产养殖有限责任公司, 体长(4.13±0.27) cm, 体重(1.15±0.28) g。每 30 尾脊尾白虾一组, 于 200 L PVC 桶中暂养 1 周。养殖水温(24±1)℃, 盐度 25, pH 8.0, 每日换水 1/3, 投喂配合饲料。

SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购买于 Clontech 公司; TRIzol Reagent 购买于 Invitrogen 公司; DNA 胶回收试剂盒购买于生工生物工程(上海)股份有限公司; 大肠杆菌 Top 10 感受态细胞和 PMD18-T 载体均购买于北京天根生化科技有限公司; SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2×)购买于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 脊尾白虾总 RNA 提取及 cDNA 的合成

用 Trizol 试剂按照 Invitrogen 说明书的方法提取脊尾白虾血细胞总 RNA, 其质量和完整性利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计检测。

1.3 脊尾白虾 Ec14-3-3 基因全长 cDNA 的克隆

根据本实验室前期获得的脊尾白虾 14-3-3 基因的 EST 序列设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物, 并送由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。将引物 14F1(表 1)和通用引物 UPM 配对, 进

表 1 实验所用引物名称及序列
Tab. 1 Names and sequences of the primers used in the investigation

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')
14F1	GGGCGAGTAAGTCAATCT
14R1	TCTTGGAATGCCCGGAGTGTG
14F2	CCATGGATGGCAGACAAAGAGG
14R2	AAGCTTGTTTTGATCGCTCCATC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC
18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

行 3'端扩增; 引物 14R1(表 1)和通用引物 UPM 配对, 进行 5'端扩增。反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25 个循环; 72℃ 10 min。

3'RACE 和 5'RACE 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 DNA 胶回收试剂盒回收纯化目的片段, 纯化产物连接 PMD18-T Vector 后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞; 将经菌落 PCR 鉴定的阳性克隆菌液送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.4 序列分析

利用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>)去除载体序列, 然后用 DNASTar 软件进行序列拼接、开放阅读框(ORF)的预测和氨基酸翻译。使用 BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对获得的 Ec14-3-3 基因序列进行同源性比对。使用 ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>)进行蛋白质功能结构域分析, 理化性质预测, 以及信号肽序列分析。使用 DNAMAN 软件对脊尾白虾 Ec14-3-3 与其他物种的 14-3-3 氨基酸序列进行多序列比对, 采用 MEGA 4.0 软件构建 NJ 系统进化树。

1.5 鳃弧菌和 WSSV 感染实验

实验前用白斑病毒综合症检测试剂盒对随机挑取的 10 尾脊尾白虾进行检测, 证实其均未感染 WSSV。暂养 1 周后将健康脊尾白虾每 50 尾一组随机分为 3 组: 鳃弧菌感染组、WSSV 感染组和对照组。鳃弧菌感染组每尾虾注射 20 μL 鳃弧菌

菌悬液,实验用鳃弧菌为本实验室保存,于实验前一天进行菌种活化,以磷酸缓冲液(PBS)稀释至终浓度为 2×10^8 CFU/mL; WSSV 感染组每尾虾注射 20 μ L WSSV 粗提液,方法参照李美玉等^[12],对照组每尾虾注射 20 μ L PBS,注射部位均为第二腹节基部。于注射后 0h、3h、6h、12h、24h、48h 以及 72 h 每组分别随机取 6 尾虾的血细胞和肝胰腺,用于 RNA 提取。另取 6 尾健康脊尾白虾的血细胞、肝胰腺、肌肉、鳃、卵巢、眼柄、胃和肠分别提取 RNA,检测脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因在不同组织中的表达水平。

1.6 *Ec14-3-3* 基因的组织表达分析

根据脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因 cDNA 全长和内参基因 18S rRNA 的全长序列,分别设计 1 对正反引物(14F2/R2 及 18S F/R)(表 1),利用 Real-time PCR 检测鳃弧菌和 WSSV 感染后的脊尾白虾血细胞和肝胰腺中不同时间点 *Ec14-3-3* 基因的相对表达量。反应体系和程序参考 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 说明书,采用 20 μ L 反应体系,包括 10 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 $\times$), 0.4 μ L ROX Reference Dye (50 $\times$)*3, 0.8 μ L 10 μ mol/L 引物 14F2, 0.8 μ L 10 μ mol/L 引物 14R2, 6.0 μ L DEPC 水, 2.0 μ L cDNA。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。*Ec14-3-3* 基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算得到,使用 SPSS 17.0 软件对结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *Ec14-3-3* 基因 cDNA 全长的克隆及序列分析

经紫外分光光度计和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,脊尾白虾血细胞提取获得的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.88, 18S 和 28S rRNA 条带清晰且完整,表明所提取的总 RNA 质量和纯度较高,能够满足后续实验的要求。用特异性引物 14F1 和 14R1 与 UPM 配对进行 RACE 扩增后,分别获得 400 bp 和 2490 bp 的 PCR 产物。将 PCR 扩增产物分别测序,测序结果与已有的 EST 序列拼接,获得脊尾白虾 *14-3-3* 基因 cDNA 全长序列(GenBank

登录号为 KF791034)并将其命名为 *Ec14-3-3*。该基因全长 2905 bp, 包含 744 bp 的开放阅读框, 127 bp 的 5'端非编码区(UTR)以及 2033 bp 的 3'端非编码区(图 1)。

氨基酸序列分析可知, *Ec14-3-3* 基因编码一个由 247 个氨基酸残基组成的蛋白质, 分子量为 27.95 kD, 理论等电点为 4.65。

2.2 *Ec14-3-3* 基因的相似性分析

利用 BLAST 对脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因编码的氨基酸序列进行相似分析,发现脊尾白虾 *Ec14-3-3* 氨基酸序列与斑节对虾和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的同源性最高,为 98%; 与其他节肢动物如拟穴青蟹、墨吉对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)、意蜂(*Apis mellifera*)和切叶蜂(*Megachile rotundata*)的 *14-3-3* 的同源性分别为 96%、96%、92%和 92%; 而 *Ec14-3-3* 氨基酸序列与人的 *14-3-3* 蛋白氨基酸序列同源性也达到了 81%。将脊尾白虾 *Ec14-3-3* 与斑节对虾、中华绒螯蟹、拟穴青蟹、人(*Homo sapiens*)等动物的 *14-3-3* 氨基酸序列进行比对发现, *Ec14-3-3* 具有高度的保守性(图 2)。利用 MEGA 4.0 软件进行系统进化分析表明,脊尾白虾 *Ec14-3-3* 与斑节对虾 *14-3-3* 紧密聚为一支,之后与中华绒螯蟹、拟穴青蟹等节肢类 *14-3-3* 聚为一支(图 3)。

2.3 *Ec14-3-3* 基因的组织表达分析

利用 Real-time PCR 分析了脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因在不同组织中的表达情况,发现 *Ec14-3-3* 基因在多种组织均有表达,其中,在血细胞中的表达量最高,卵巢次之,在眼柄中的表达量最少(图 4)。

注射鳃弧菌和 WSSV 后不同时间点脊尾白虾血细胞中 *Ec14-3-3* 基因的表达情况如图 5 所测。结果表明,鳃弧菌感染组 *Ec14-3-3* 基因表达量于注射后 0~3 h 出现下降, 3~6 h 表达量不断上升,并于 6 h 达到最高值; 然后于 12 h 表达量开始下降,并于 24 h 显著低于对照组($P < 0.05$), 48 h 到达最低值; 随后于 72 h 表达量略有回升。而 WSSV 感染组血细胞中 *Ec14-3-3* 基因表达量于注射后 0~3 h 也有下降, 随后于 3~6 h 开始上升, 6 h 时表达量达到最高值; 然后于 12 h 表达量开始下降,

```

1 AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CAT GGG GAG TCT TCA AGA GGG TTT GGT AGT GAG TGG GTC GAA CTA CCC TGG GAT ATT ATA TAC TTT 90
91 ATA TTT GTG TAA ATA GCT CCT ATT TTA TAA AAC ATG GCA GAC AAA GAG GAA CAA GTA CAG CGG GCA AAA CTC GCA GAA CAA GCC GAG 180
181 AGG TAT GAT GAT ATG GCC GCT GCC ATG AAA CAG GTC ACA GAA ACC GGG GTC GAA TTA TCA AAT GAA GAA CGA AAC CTT CTG TCA GTC GCC 270
271 TAC AAA AAT GTT GTA GGT GCC CGA AGA AGT TCG TGG CGA GTC ATA TCA TCA ATA GAA CAG AAA ACA GAG GGG TCA GAG AGG AAG CAA CAA 360
361 ATG GCA AAA GAA TAC AGA GAA AAG GTC GAA ACA GAA TTA AGA GAA ATA TGC CAG GAT GTT TTG GGT CTA CTT GAC AAG TTC CTC ATC CCA 450
451 AAG GCC TCC AAC CCA GAA TCT AAG GTC TTT TAC TTG AAG ATG GGA GAT TAC TAT AGG TAC CTG GCT GAA GTA GCT ACA GGA GAT GCA 540
541 CGA GCG GGT GTT GTT GAT GAC TCC CAG AAG TCA TAT CAG GAA GCA TTC GAT ATT GCC AAG GCT GAA ATG CAG CCT ACT CAT CCA ATT CGA 630
631 TTG GCG CTG GCG CTA AAC TTC TCC GTA TTC TTC TAT GAG ATC CTC AAT TCA CCT GAC AAG GCC TGC CAG TTA GCT AAA CAG GCG TTT GAT 720
721 GAC GCA ATA GCG GAA TTA GAT ACG TTG AAT GAA GAT TCC TAC AAG GAT TCT ACG CTC ATA ATG CAG CTA TTG CGA GAC AAC TTA ACG CTG 810
811 TGG ACG AGT GAT ACA CAG GGC GAA GGG GAC GAG GCT AAT GAT GGA GGC GAT CAA AAC TGA TGA ACG CAA CCC CTA ATA GCA GGC TCT ACT 900
901 CGA CCC TCT TCA CTC GTA CCT ACA AGT GCT GAT GCT GCC GCC TAA GGG TCG ATC ATT CCT CAC AGC TOC TOC CTC TAG ACA CCA CCT ATG 990
991 TCG CTG AAT ATT GTA GTC GGA GTA CTG CCC TAC GGC GGC TGG GCG GCT CGC TOC TCT ATG ACG CTA CGC TCA CCA GCT CTC GAT ACT CAC 1080
1081 CCA TAG AAG GGC CTC GTC GAT AAA CCA CCA ACA TOC ACC CTT CGA CGG CCA CAG CCT TCT TTT CCT CTC GGC CTT TGC TGG CTG TAC TAA 1170
1171 CAG ACC CCC CTT AAT TGA AAA TGC CTG AGG GGT CTA TTT TGT CTT CAT AGT TCA ATT AGA AAG GAA AAT TCT CCC AGT GCG TTT GTG ACT 1260
1261 CAC CGT GGA GGA GCA CGT TCC CCC AGC TGT TGT AAT AAC AAT CGT GTG CAG AGA CTA CAG TTA AAG GCG TGA TGT GTG TGT CAC AGC TCT 1350
1351 TCA CTT TTT GCC ATC TTA GAT AGA AAG AAA GCA ATT GCG AGA GAG AGA CTG TGA AGT GAT TGA AAG ACA GTG GGA CCT ATT TCT TGT TTA 1440
1441 GAG CTC TCT GGG CCA ACG TGG AGA GAC AAT TAA ATC ATT TTT GAT AGT GTG AAA ACA ACG CTT GGG TCG GCT GGC GCG TGC TCT TCC CAG 1530
1531 GGC CGG TCA GCC AGA CTG CAT TAC TTA CAT TGC TAA ATA TGA ACC ACT TAG CAT TTT GTA CTT CCC AAT GGG GTC GGG CTC CCT CGG TCC 1620
1621 CAC CTC TTT GTA TGT AAC ATT CCG TAA CGA CAG TCA GAG GAC AAA CCA ACA AGT ATG AGA CTG TTC TGT ATT CAT TCG TCA GTG CAT TCG 1710
1711 TGT GGT TGT AGC AAA AGG TAA ATT GTA ATA AGT GTA ATT GTT ATA GAA TCC CTG GCT TCT TGA CTA TCT AAA TTT CGT ATA CAA AAG TCT 1800
1801 TCA TTG AGC ATT AAA GAT GGC CAG GAA GAA ATT CAC TCA ATG TTA CAG CCC ATG AGC ACT GTA CAT TTA AGA TTA ATA CTG TAT TAT TGG 1890
1891 TTT CTT AGA TGT GAC CCC TTC GAA ATT GAG CTG ATT TCT GTT TTG TCG TGG CCA GTT GGT GTC TAC AAG ATC AAT AAA TAA ACT TAA ATG 1980
1981 CGG TAG AAG CAG TAA TTG ACT TTG TTG GAT GTA ATA AGC ATG GAG TAT GTG AAT GGA AGT TGA TTA TAA TTT TTT TAT TTT ATT ATA ATT 2070
2071 TTT TAT GTA CTG AAA ATT ATT TGC GTC GCT CTT GAG GAT GTT CGG CGT CAA GGG GAG CTT ATA AGT AAT AGG CTT GGG AAG CAA TTT CAT 2160
2161 ATC ACC ATC AAA AGG GCA AAG TTT AAT TGG TGT ATT ACC ATC CGA AAT TTA TGC TTG ATC TGG AGT TGT AAT GCC ACT TGA GCA CGG GAG 2250
2251 CAA ATT GTA CAT GTC ACT CAT CAT AAT CTT AAT TTG ATT CAT TTT GAT CAT TTC GCT TAA TTG TAT AAT CAT CAG TGT AAA TAT TCC CTT 2340
2341 TCA AGC TCT CCT GAC GCC GGG AGT TCT CAA TGT GCT TTT TTT TTG GTT TTT GTT TCA TGA AGA ACC AGT GAA CTG AGG AGC TTT GTT TTT 2430
2431 CTC TGG GTT TGT ACT TAT TCA CGA TGA TTG TAA TAG GCC AAG CAC ACT CGG GGG CAT TCC AAG AGG AAC AGG GGG GCG AGT AAG TCA ATC 2520
2521 TGC CCT TCG CAG TTC CTC CCT TTA TTC CTG GGG CTC GTG AAA AAT CTG CCC ACC CCC GAA GTT ATA TTT AAC ATG AAC GTA AAA GAA ATT 2610
2611 TTA TTA GAA CAT GTA ATT TTA TTT TTA ATC AGC ATT GTA AAG ATC CTC CCC GTA ATT ACA CAT TGG TAT TAA TTA AAA AGA TAT ATA AAT 2700
2701 ATA TTA TAT TAG CAA GTG GCC GGC GCA TCA GAT CGA CTG CCA AAT GAG ATG TTT AAG AAA GCA TAA AAA ATG TTT TGG TGG TAG TTT AGG 2790
2791 TCT TTC CAA ATT TAA CTT TGA AAA ATT CTT GCC CCG TTG TCA AAA TTG CTT TCC TAA ATC AAC GTA ATA AAC GTT TCA TAT GTA AAA AAA 2880
2881 AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA 2903

```

图 1 脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因 cDNA 序列及开放阅读框推导氨基酸序列

细实线框标注的 ATG 是起始密码子, 细下划线标注的 AATAAA 代表加尾信号; *表示终止密码子。

Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the open reading frame of *Exopalaemon varianicauda Ec14-3-3* cDNA. Start codon (ATG) is marked with thin box. Plus tail signal (AATAAA) is marked with thin underline. Stop codon is marked with *.

并于 48 h 达到最低值且显著低于对照组($P<0.05$); 72 h 后表达量缓慢回升(图 5)。

脊尾白虾感染鳃弧菌和 WSSV 后, 肝胰腺中 *Ec14-3-3* 基因的表达情况如图 6 所示。结果表明, 鳃弧菌感染组 *Ec14-3-3* 基因表达量于注射后 0~3 h 出现下降现象, 3~6 h 表达量不断上升, 并于 6 h 达到最高值; 然后于 12 h 表达量开始下降, 并于 24 h 显著低于对照组($P<0.05$), 48 h 到达最低值;

随后于 72 h 表达量略有回升。而 WSSV 感染组血细胞中 *Ec14-3-3* 基因表达量于注射后 0~3 h 也有下降, 随后于 3~6 h 开始上升, 6 h 时表达量达到最高值, 显著高于对照组($P<0.05$); 然后于 6~12 h 表达量开始下降, 12 h 表达量显著低于对照组($P<0.05$); 12~24 h 表达量回升, 24 h 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 24~48 h 表达量再次下降, 48~72 h 后表达量缓慢回升(图 6)。

BT14-3-3.pro	MSVDEEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	85
EC14-3-3.pro	MADEEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	84
ES14-3-3.pro	MGDEEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	84
FM14-3-3.pro	MSDEEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	84
HS14-3-3.pro	MOKNEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	83
MM14-3-3.pro	MOKNEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	83
PM14-3-3.pro	MSDEEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	84
SP14-3-3.pro	MGDEEIVQRAKLAQAEQRYDDMAAMKQVTEGVELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGSEKQQAKEYR	84
consensus	dk e vq aklaeqae yddmaa m vte g elsneernllsvayknvvgarrsswrv ssieqkteg e kqq a eyr	
BT14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	170
EC14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	169
ES14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	169
FM14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	169
HS14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	168
MM14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	168
PM14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	169
SP14-3-3.pro	EKVEKELREICQDVLGLLDKFLIPKASNEESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGDRAGVVDSSQKSYQEAFTIAKAEQMOPHTPIRL	169
consensus	ek e elr ic dvl ll lip as eskvfylmkmkgdyrylaeva g v sq yqeaft i k mqpthpir l	
BT14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	247
EC14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	246
ES14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	246
FM14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	245
HS14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	245
MM14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	245
PM14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	245
SP14-3-3.pro	GLALNFSVFYYEILNSPDKACQAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSQTQGGDANEGGDN	246
consensus	glalnfsfv yei nsp ac lak afd aiaeldtl e ykd tlimqlrrdnltlwts tqg a g	

图 2 脊尾白虾 Ec14-3-3 推导氨基酸序列与其他物种 14-3-3 氨基酸序列的比对

BT14-3-3: 欧洲熊蜂(AEW70333); EC14-3-3: 脊尾白虾(KF791034); ES14-3-3: 中华绒螯蟹(AFD28290); FM14-3-3: 墨吉对虾(ADI87601); HS14-3-3: 人(NP663723); MM14-3-3: 小鼠(BAF80313); PM14-3-3: 斑节对虾(AAY56092); SP14-3-3: 拟穴青蟹(AFD28274).

Fig.2 Multiple alignments of *Exopalaemon carinicauda* Ec14-3-3 with other species' 14-3-3

BT14-3-3: *Bombus terrestris* (AEW70333); EC14-3-3: *Exopalaemon carinicauda* (KF791034); ES14-3-3: *Eriocheir sinensis* (AFD28290); FM14-3-3: *Fenneropenaeus merguensis* (ADI87601); HS14-3-3: *Homo sapiens* (NP663723); MM14-3-3: *Mus musculus* (BAF80313); PM14-3-3: *Penaeus monodon* (AAY56092); SP14-3-3: *Scylla paramamosain* (AFD28274).

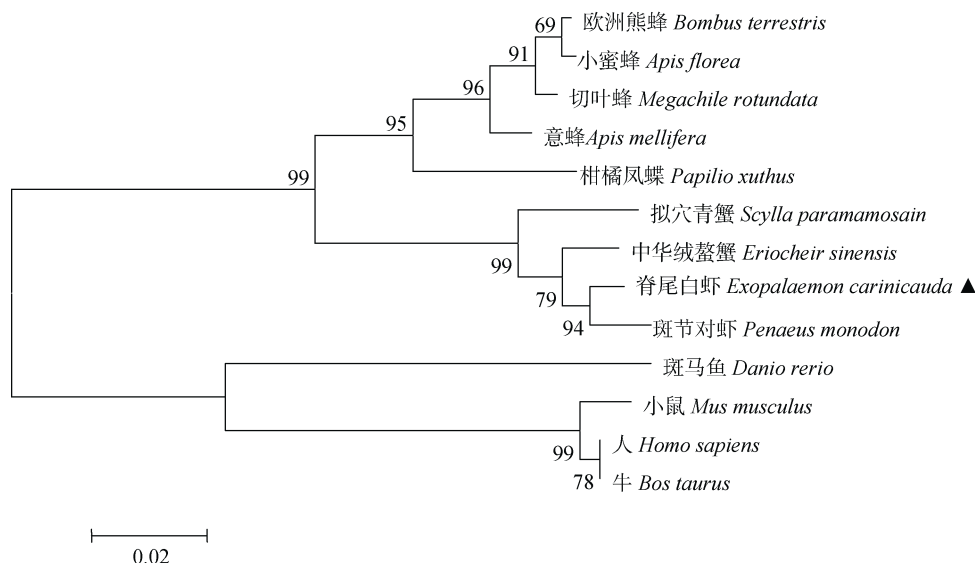


图 3 基于 14-3-3 氨基酸序列的 NJ 进化树

脊尾白虾 14-3-3 蛋白用▲标注。各物种 14-3-3 序列登录号为斑节对虾(AAY56092), 中华绒螯蟹(AFD28290), 拟穴青蟹(AFD28274), 欧洲熊蜂(AEW70333), 切叶蜂(AEW70348), 柑橘凤蝶(BAM17746), 小蜜蜂 (AEW70340), 意蜂(XP006566156), 人(NP663723), 小鼠(BAF80313), 牛(NP777239), 斑马鱼(NP00107626).

Fig.3 NJ tree based on 14-3-3 amino acids of different species

Exopalaemon carinicauda Ec14-3-3 is marked with ▲. The GenBank accession numbers of 14-3-3 were as follows: *Penaeus monodon* (AAY56092), *Eriocheir sinensis* (AFD28290), *Scylla paramamosain* (AFD28274), *Bombus terrestris* (AEW70333), *Megachile rotundata* (AEW70348), *Papilio xuthus* (BAM17746), *Apis florea* (AEW70340), *Apis mellifera* (XP006566156), *Homo sapiens* (NP663723), *Mus musculus* (BAF80313), *Bos Taurus* (NP777239), *Danio rerio* (NP00107626).

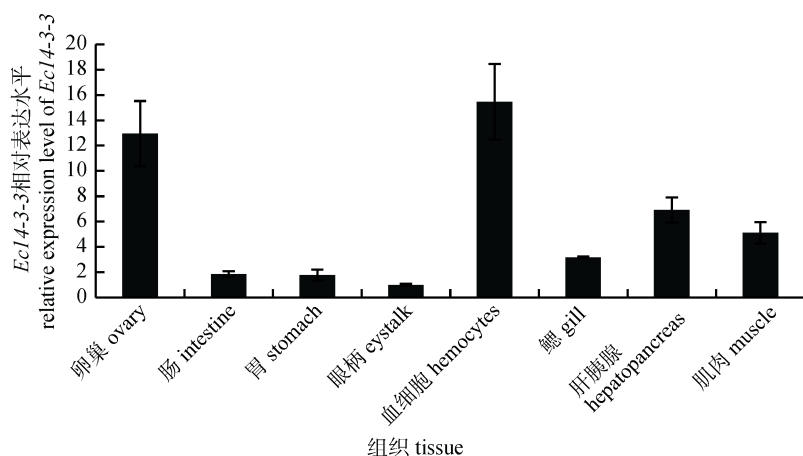
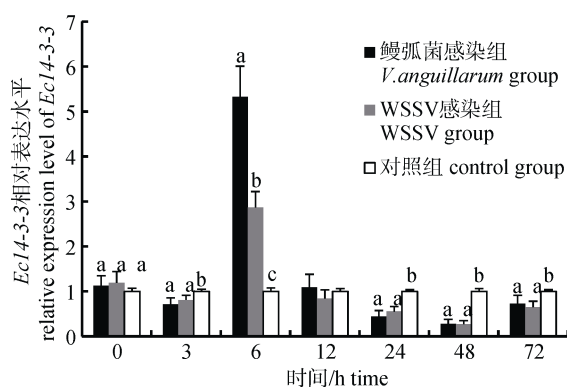
图 4 *Ec14-3-3* 基因在脊尾白虾不同组织中的表达分布Fig. 4 Tissues distribution of *Ec14-3-3* gene expression in *Exopalaemon carinicauda*

图 5 鳃弧菌和 WSSV 感染后脊尾白虾血细胞中

Ec14-3-3 基因的表达情况不同字母表示在同一时间点组间差异显著 ($P<0.05$).Fig.5 The *Ec14-3-3* gene expression in *Exopalaemon carinicauda* hemocytes after *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. Different letters denote significant differences between different groups in the same observed period ($P<0.05$).

3 讨论

14-3-3 蛋白是一类广泛存在于真核细胞当中的蛋白质, 可以参与细胞的多种生理反应, 起到调控的作用, 也参与调控细胞周期、细胞凋亡、恶性肿瘤的形成、细胞信号转导等生理过程^[21]。本研究克隆得到脊尾白虾 14-3-3 基因 cDNA 全长序列, 编码 1 个由 247 个氨基酸残基组成的蛋白质。14-3-3 基因具有高度的保守性, 将本研究克隆获得的脊尾白虾 14-3-3 基因与其他物种相比对发现, 其与斑节对虾和中华绒螯蟹的同源性最高,

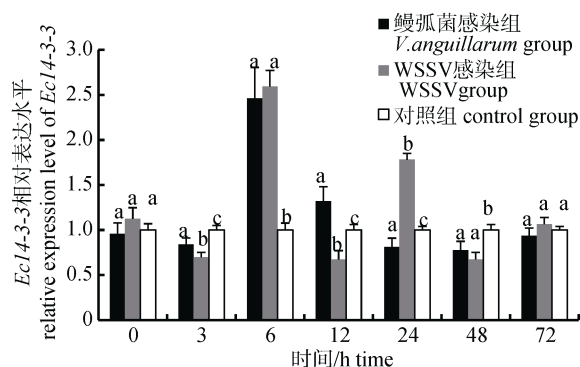


图 6 鳃弧菌和 WSSV 感染后脊尾白虾肝胰腺中

Ec14-3-3 基因的表达情况不同字母表示在同一时间点组间差异显著 ($P<0.05$).Fig.6 The *Ec14-3-3* gene expression in *Exopalaemon carinicauda* hepatopancreas after *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. Different letters denote significant differences between different groups in the same observed period ($P<0.05$).

高达 98%。通过构建系统进化树发现, 脊尾白虾先与中华绒螯蟹聚为一支, 再与其他虾蟹类聚在一起, 且同源性高于 80%, 以上结果证明该序列为脊尾白虾 14-3-3 基因。

有研究报道, 哺乳动物中发现 9 种 14-3-3 蛋白同工型, 分别是 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 σ 以及 τ , α 和 σ 是 β 和 ζ 的磷酸化形式^[21], 而本研究仅发现脊尾白虾 14-3-3 蛋白的一种亚型, 根据 NJ 系统进化树及功能分析推测该亚型应该为 ζ 亚型, 而脊尾白虾中是否存在其他亚型还有待进一步研究。脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因表达具有组织特异性,

在多种组织中均有表达。其中,在血细胞中的表达量最高,这与斑节对虾当中的研究结果类似^[22];而底鳃^[15]肠中的 14-3-3 的表达量最高,肌肉中的表达量最低;拟穴青蟹中肝胰腺当中的表达量最高,肌肉次之,胃中最少^[20]。

无脊椎动物主要依靠先天非特异性免疫来发挥免疫防御的作用。14-3-3 蛋白高度保守的疏水表面可以与多种细胞蛋白结合,也可以识别错误折叠的蛋白质或者外源蛋白质。当外源蛋白质影响到正常的细胞时,机体将产生 14-3-3 蛋白与其结合,以保证机体不受其影响^[10]。研究发现,健康凡纳滨对虾注射桃拉病毒(Taura syndrome virus)后,14-3-3 基因表达量及 14-3-3 蛋白的表达量都明显上升^[19]。注射 WSSV 后,凡纳滨对虾 14-3-3 表达量也有明显上调^[23]。因此 14-3-3 可能在细菌和病毒的防御过程中起到了重要作用。为了研究 14-3-3 在脊尾白虾非特异性免疫中的作用,本研究分别使用鳃弧菌和 WSSV 对脊尾白虾进行了细菌和病毒感染实验,通过实验发现, *Ec14-3-3* 在细菌和病毒感染后的脊尾白虾血细胞和肝胰腺中的表达均有明显时间差异性。注射鳃弧菌和 WSSV 后,血细胞中的 *Ec14-3-3* 基因表达量在 6 h 达到峰值,与对照组差异显著 ($P<0.05$),这可能是因为 *Ec14-3-3* 参与到免疫反应的应答过程。感染后 6~48 h, *Ec14-3-3* 表达量下降,这可能是因为脊尾白虾机体处于感染后的恢复期^[24]。注射鳃弧菌和 WSSV 后,肝胰腺当中的 *Ec14-3-3* 基因表达量在 6 h 达到峰值,与对照组差异显著,而 WSSV 组在注射 24 h 后达到第二个高峰,可能是脊尾白虾在恢复期后继续清除残余 WSSV 病毒的表现^[25]。脊尾白虾血细胞中 14-3-3 基因表达量呈先下降再上升再下降的趋势,这与凡纳滨对虾感染桃拉病毒后 14-3-3 蛋白的变化趋势一致^[19],证明其参与了脊尾白虾的免疫应答过程。

本研究成功克隆获得了脊尾白虾 *Ec14-3-3* 基因 cDNA 序列全长,初步探究了该基因在脊尾白虾受到鳃弧菌和 WSSV 感染后在血细胞和肝胰腺中的表达变化,证明其参与了脊尾白虾的免疫应答,为脊尾白虾免疫机制研究和病害防治提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Moore B W, Perez V J, Carlson F D. Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration[M]//Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1967: 343-359.
- [2] Aitken A, Collinge D B, Van Heusden B P, et al. 14-3-3proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins[J]. Trends Biochem Sci, 1992, 17(12): 498-501.
- [3] Finnie C, Borch J, Collinge D B. 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions[J]. Plant Mol Biol, 1999, 40(4): 545-554.
- [4] Simser J A, Palmer A T, Munderloh U G, et al. Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 546-552.
- [5] Ye S, Goldsmith E J. Serpins and other covalent protease inhibitors[J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11(6): 740-745.
- [6] Gettings P G. Serpin structure, mechanism and function[J]. Chem Rev, 2002, 102: 4751-4803.
- [7] Van Gent D, Sharp P, Morgan K, et al. Serpins: structure, function and molecular evolution[J]. Int J Biochem Cell B, 2003, 35: 1536-1547.
- [8] Kanost M R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23: 291-230.
- [9] Yaffe M B. How do 14-3-3 proteins work-gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis[J]. FEBS Lett, 2002, 513(1): 53-57.
- [10] Kaneko K, Hachiya N S. The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions[J]. Med Hypotheses, 2006, 67(1): 169-171.
- [11] Wang X Q, Yan B L, Ma S, et al. Study on the biology and cultural ecology of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Shandong Fisheries, 2005, 22(8): 21-24.[王兴强, 阎斌伦, 马甦, 等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(8): 21-24.]
- [12] Li M Y, Li J, Liu P, et al. Cloning and expression analysis of ferritin gene in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 306-312.[李美玉, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 306-312.]
- [13] Liu R Y. Economic Shrimp in North China[M]. Beijing: Science Press, 1955.[刘瑞玉. 中国北部的经济虾类[M]. 北京: 科学出版社, 1955.]
- [14] Xu W J, Xie J J, Shi H, et al. Infection of *Hematodinium* sp. in farmed ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(3): 396-402.[许

- 文军, 谢建军, 施慧, 等. 池塘养殖脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicaud a*) 感染血卵涡鞭虫的研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 396–402.]
- [15] Kùltz D, Chakravarty D, Adilakshmi T. A novel 14-3-3 gene is osmoregulated in gill epithelium of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*[J]. J Exp Biol, 2001, 204: 2975–2985.
- [16] Warapond W, Caird E R, Yao J B. Identification of a functional splice variant of 14-3-3 E1 in rainbow trout[J]. Mar Biotechnol, 2010, 12: 70–80.
- [17] Koskinen H, Krasnov A, Rexroad C, et al. The 14-3-3 proteins in the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. J Exp Biol, 2004, 207: 3361–3368.
- [18] Besser J, Bagowski C P, Salas-Vidal E, et al. Expression analysis of the family of 14-3-3 proteins in zebrafish development[J]. Gene Expr Patterns, 2007, 7(4): 511–520.
- [19] Chongsatja P, Bourchookarn A, Lo C F, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon Taura syndrome virus infection[J]. Proteomics, 2007, 7(19): 3592–3601.
- [20] Shu M A, Zhang L T, Xu B P, et al. The full length cDNA cloning and expression profile of 14-3-3 gene from the mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(8): 1193–1200.[舒妙安, 张龙韬, 徐宾朋, 等. 拟穴青蟹 14-3-3 基因全长 cDNA 的克隆及组织表达分析[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1193–1200.]
- [21] Wen B, Wang X J. Advance in 14-3-3 proteins[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2004, 16(4): 226–230.[文彬, 王小菁. 14-3-3 蛋白研究进展[J]. 生命科学, 2004, 16(4): 226–230.]
- [22] Kaeodee M, Pongsomboon S, Tassanakajon A. Expression analysis and response of *Penaeus monodon* 14-3-3 genes to salinity stress[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2011, 159(4): 244–251.
- [23] Wang H C, Wang H C, Leu J H, et al. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection[J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31(7): 672–686.
- [24] Sun J, Wang B J, Li X H, et al. The full length cDNA cloning and expression profile of prophenoloxidase of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(1): 56–66.[孙杰, 王宝杰, 李晓华, 等. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 56–66.]
- [25] Xu W F. Cloning and expression analysis of ALF gene and vasa gene in *Exopalaemon carinicauda*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2013.[徐文斐. 脊尾白虾抗脂多糖因子基因和 vasa 基因的克隆与表达[D]. 大连: 大连海洋大学, 2013.]

Cloning and expression analysis of *14-3-3* gene from *Exopalaemon carinicauda*

WANG Youkun^{1,2}, LIU Ping^{2,3}, LI Jitao², LI Jian^{2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China

Abstract: *Exopalaemon carinicauda* is the most commercially important shrimp in China based on reproduction, a long growing season, and ecological flexibility. However, the frequency of disease outbreaks has increased as production has increased, resulting in huge economic losses. *E. carinicauda* relies on the innate immune response to defend against invading pathogens. The 14-3-3 family of proteins is highly conserved and present in all eukaryotic cells. The 14-3-3 proteins are involved in many cellular pathways, including those for metabolism, the cell cycle, differentiation, signaling, apoptosis, and neoplastic transformation. Based on the *14-3-3* expressed sequence tag from a hemocyte cDNA library of *E. carinicauda*, the full-length cDNA of *14-3-3* from *E. carinicauda* (named *Ec14-3-3*) was cloned using the rapid amplification of cDNA ends technique. The *Ec14-3-3* cDNA was 2 905 bp in length and contained an open reading frame of 744 bp, encoding a mature protein of 247 amino acids, with a molecular mass of 27.95 kD and an estimated pI of 4.65. Homology analysis revealed that the *Ec14-3-3* amino acid sequence was highly conserved with homologs from other crustaceans, and amino acid sequence similarity was 98% with the 14-3-3 from *Penaeus monodon*. *Ec14-3-3* expression levels were measured in different tissues by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Ec14-3-3* expression was detected in hemocytes, gill, hepatopancreas, muscle, ovary, intestine, stomach, and the eyestalk of *E. carinicauda*, with the highest expression level in hemocytes. *Ec14-3-3* expression was upregulated in hemocytes and the hepatopancreas after challenges with *Vibrio anguillarum* and white spot syndrome virus. These results suggest that *Ec14-3-3* may play an important role in the prawn immune response.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; *14-3-3* gene; gene cloning; gene expression

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