

中华绒螯蟹延伸因子 EF-1 δ 基因全长 cDNA 克隆及表达

郭子好, 杨志刚, 刘志伟, 王 瑶, 杨筱珍, 成永旭*

(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: 根据非洲爪蟾延伸因子-1 δ (elongation factor-1 δ , EF-1 δ)基因的保守序列设计引物, 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)以及 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆出中华绒螯蟹 EF-1 δ 基因并进行各组织间的表达分析。序列分析表明, 中华绒螯蟹 EF-1 δ cDNA 全长 933 bp, 编码 263 个氨基酸, 经 BLASTN 和 BLASTX 软件分析表明, 此 EF-1 δ cDNA 核苷酸序列与非洲爪蟾 EF-1 δ 核苷酸序列的同源性最高, 其相似性为 70%; 所编码的氨基酸序列与大红斑蝶 EF-1 δ 的氨基酸序列相似性为 54%。聚类分析表明, 中华绒螯蟹 EF-1 δ 的氨基酸序列与鱼虱 EF-1 δ 聚为一支。荧光定量 PCR 结果显示, EF-1 δ 在正常成熟中华绒螯蟹肌肉中表达量最高, 精巢、肝胰腺中有少量表达, 心脏、卵巢、胃、肠、鳃中有微量表达。不同发育状态的中华绒螯蟹 EF-1 δ 在肌肉组织中表达量均显著高于肝胰腺和鳃组织中表达量($P < 0.05$); 3 个不同发育状态蟹 EF-1 δ 在肌肉中的表达量也呈显著性差异($P < 0.05$), 在早熟蟹肌肉中表达量最高, 正常成熟蟹肌肉中次之, 幼蟹肌肉中最低; 不同发育状态蟹 EF-1 δ 在肝胰腺和鳃组织中的表达没有显著差异($P > 0.05$)。

关键词: 中华绒螯蟹; EF-1 δ ; 基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、绒螯蟹属(*Eriocheir*), 是我国重要的经济蟹类。目前随着育苗技术的革新和发展, 中华绒螯蟹的人工养殖不断扩大。但在实际大规模养殖生产中, 由于环境的恶化以及养殖水体的污染, 中华绒螯蟹的发病率不断升高^[1]。水体中的氧化因子(如 pH、重金属等)可以引起广泛的细胞损伤, 包括 DNA 损害、脂质过氧化作用以及蛋白质氧化等^[2]; 当受到氧化因子破坏时, 生物体会启动自身的防御机制, 合成大量的蛋白质用于细胞的修复^[3-4]。在蛋白质的修复及合成过程中, 延伸因子是必不可少的因素之一^[5]。

延伸因子(elongation factor, EF)是参与蛋白合成过程中肽链延伸的蛋白因子, 在所有多细胞生物体的新陈代谢过程中发挥着非常重要的作用, 包括延伸因子 EF-1 和延伸因子 EF-2^[6-8]。EF-1 由 α 、

β 、 γ 和 δ 4 个亚基组成, 是一种在细胞内普遍存在且大量表达的多聚核糖体蛋白质, 在基因表达和翻译过程中起重要作用^[9]。EF-1 δ 已被证明是一种细胞周期依赖性激酶的底物^[10], 同时也是 G2/M 细胞周期检验点过程中一重要因子^[11]; 另外, EF-1 δ 对病毒感染机体时抗体蛋白翻译过程具有潜在的调节作用^[12]; 也有研究表明 EF-1 δ 是鉴定镉刺激原癌基因的新标识^[13-14]。EF-2 除了具有蛋白质翻译功能外, 在卵巢成熟方面也起着关键性作用^[6]。

目前关于延伸因子的研究多集中在 EF-1 α 、EF-1 β 、EF-1 γ 或 EF-2 等方面, 关于延伸因子 EF-1 δ 的报道较少, 特别是甲壳动物上关于 EF-1 δ 方面的研究还未见报道。本试验通过克隆中华绒螯蟹延伸因子 EF-1 δ 基因及构建组织表达谱, 旨在了解中华绒螯蟹延伸因子 EF-1 δ 基因的结构、

收稿日期: 2011-12-14

修回日期: 2012-03-06

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA100809); 上海市教育委员会科研创新项目(11YZ151)

通讯作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

功能以及各组织间表达情况;同时,本实验比较了延伸因子 EF-1 δ 基因在中华绒螯蟹早熟蟹、正常成熟蟹和幼蟹部分组织中的相对表达含量,目的是了解 EF-1 δ 基因在中华绒螯蟹不同发育状态时相对表达量的变化,并观察该基因的相对表达量变化与中华绒螯蟹性早熟的关联,为进一步研究中华绒螯蟹延伸因子的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹由上海崇明水产技术推广站提供。随机取 3 只正常成熟中华绒螯蟹的肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、精巢以及卵巢组织,同时随机各取 3 只早熟蟹和幼蟹的肝胰腺、鳃和肌肉组织,迅速放入液氮中速冻后置于 -80°C 冰箱中冻存用于总 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 的提取与反转录反应

取冻存的中华绒螯蟹各组织参照 RNAisoTM Plus(TaKaRa)操作说明书进行总 RNA 的提取,提取好的总 RNA 将用于荧光定量 PCR 反应。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整度、微量紫外分光光度计(Q5000)检测 RNA 纯度。

以 1 μg 中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA,用于 RT-PCR 的扩增;利用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)反转录合成 cDNA 第一链,用作基因 3'和 5'端序列快速扩增的模板。其余 RNA 置于 -80°C 冰箱中保存。

1.3 引物设计和 PCR 扩增反应

根据 GenBank 中非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) EF-1 δ 基因(GenBank 登录号: BC088696.1)保守区序列设计上下游引物 HXEF-1(+)/HXEF-2(-),引物由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。以中华绒螯蟹肝胰腺的 cDNA 为模板, HXEF-1(+)/HXEF-2(-)为引物进行 EF-1 δ 基因 cDNA 片段的扩增。PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL , dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , *rTaq* 酶(5 U/ μL) 0.25 μL , 加灭菌超纯水至总体积 25 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

取 PCR 扩增产物 3 μL 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果后,按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Tiangen)操作说明纯化回收 PCR 特异性扩增产物,并连接至 pMD-19T 载体(TaKaRa),重组质粒转化至大肠杆菌 Top 10(Tiangen),阳性克隆经菌液 PCR 初步鉴定后由上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

1.4 EF-1 δ cDNA 的克隆

根据已获得的 EF-1 δ 基因片段设计 3'RACE 上游引物 HXEF-3(+), 5'RACE 下游引物 HXEF-4(-)(表 1),以 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)反转录合成的 cDNA 第一链为模板,分别用 3'RACE 和 5'RACE 引物与 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物(UPM)配对,并按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 EF-1 δ 基因 3'和 5'端序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆和测序与 EF-1 δ 基因片段的克隆所述相同。

1.5 序列的拼接与生物信息学分析

利用 DNAStar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。利用 ORF (open reading frame) finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找开放阅读框;用 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)、ClustalW 及 DNAMAN 等软件进行序列的验证、翻译及蛋白质相似性分析;使用 Compute pI-Mw 软件(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行蛋白质等电点和相对分子质量的计算。用 MEGA 4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.6 EF-1 δ 基因的组织表达分析

以获得的基因全长序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对用于定量 PCR 反应的特异性引物 HXEF-5(+)/HXEF-6(-)(表 1),对不同发育状态中华绒螯蟹各组织中 EF-1 δ 基因 mRNA 的表达水平进行检测,并根据 GenBank 中中华绒螯蟹 β -actin 基因全长序列(GenBank 登录号: HM 053699.1)设计一对内参引物 β -actin-1(+)/ β -actin-2(-)(表 1)。利用 CFX96 序列检测系统(Bio-Rad, USA)进行荧光定量 PCR 反应,反应体系为 20 μL : 10 μL SYBR Premix *Ex Taq*TM (2 \times); 0.4 μL PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$); 0.4 μL PCR Reverse Primer(10

表 1 核苷酸引物序列
Tab. 1 Oligonucleotide primer sequence

引物 primer	引物序列(5'-3')primer sequence	用途 usage
Universal Primer Mix (UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
HXEF-1(+)	CCACCTCCACCTCAACCC	RT-PCR
HXEF-2(-)	AGCACCCAGATAAGCCC	RT-PCR
HXEF-3(+)	ACCCCTGTCCAGAACAACAAGCAAGC	3' RACE
HXEF-4(-)	GCAGGACAGAGGATTTGGCAATGGGA	5' RACE
HXEF-5(+)	GTCCCATTTGCCAAATCCTC	Real-Time PCR
HXEF-6(-)	TCTCTTTCTCCATCACCCC	Real-Time PCR
β -actin-1(+)	ACCTCGGTCTTATTTGTCGG	Real-Time PCR
β -actin-2(-)	ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC	Real-Time PCR

$\mu\text{mol/L}$); 2.0 μL cDNA 模板; 7.2 μL ddH₂O。反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环; 在 65 °C 进行荧光信号采集, 反应结束后对扩增产物进行溶解曲线分析, 以确保特异性扩增。样品和内参分别设 3 个重复, β -actin 为内参。荧光定量 PCR 数据分析采用相对 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 EF-1 δ 基因全长 cDNA 序列分析

以中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为模板扩增获得的 cDNA 序列全长 933 bp (GenBank 登录号: JN 638238), 其中包括 61 bp 的 5' 非编码区(5'UTR), 80 bp 的 3' 非编码区(3'UTR), 开放阅读框(ORF)长 792 bp, 编码 263 个氨基酸, 加尾信号(ATTAAG)以及 Poly-A 尾, 位置如图所示(图 1)。序列编码的蛋白理论等电点为 4.62, 分子量为 28.91 ku。序列分析表明, 该基因编码的氨基酸序列具有一个典型的亮氨酸拉链保守区域, 该保守区域具有 40 个氨基酸, 起始氨基酸位于蛋白质 N 端的第 70 个氨基酸处(图 1)。经 BLASTN、BLASTX 以及多序列比对表明, 此 EF-1 δ cDNA 核苷酸序列与非洲爪蟾 EF-1 δ 核苷酸序列的同源性最高, 其相似性为 70%; 氨基酸序列与非洲爪蟾、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)以及人(*Homo sapiens*)等 EF-1 δ 氨基酸序列具有较高的相似性(图 2), 且具有 EF-1 δ 氨基酸序列典型的保守区域, 确定此序列即为中华绒螯蟹 EF-1 δ 序列。

2.2 同源性分析以及蛋白系统进化树的构建

将中华绒螯蟹 EF-1 δ 全长氨基酸序列与大红斑蝶 (*Danaus plexippus*)、鱼虱 (*Lepeophtheirus*

salmonis)、埃及伊蚊、家蚕(*Bombyx mori*)、非洲爪蟾、小家鼠(*Mus musculus*)、人及斑马鱼(*Danio rerio*)的 EF-1 δ 氨基酸进行对比, 各序列在其成熟肽 C 端区域较为保守(图 2), 其相似性分别为 54%、54%、51%、50%、47%、47%、47%和 46%。利用 MEGA 4.0 软件的 NJ 法将上述相关氨基酸序列构建系统进化树, 结果显示, 中华绒螯蟹 EF-1 δ 的氨基酸与鱼虱 EF-1 δ 聚为一支, 表明其亲缘性最近(图 3)。

2.3 中华绒螯蟹 EF-1 δ 基因的表达

将已提取的正常成熟中华绒螯蟹各组织总 RNA 以 500 ng 的量进行反转录, 以同样的体系和条件对 β -actin 引物进行各组织 PCR 反应, PCR 产物经电泳查看各条带亮度均一致且较清晰; 另外, 在中华绒螯蟹瘦素受体^[15], 脂肪酸结合蛋白^[16], 脂多糖葡聚糖结合蛋白^[17]等研究中均以 β -actin 为内参基因, 并证实过 β -actin 在不同发育状态中华绒螯蟹各组织间表达稳定, 因此本实验选择 β -actin 为内参基因。以 HXEF-5(+)/HXEF-6(-)为荧光定量 PCR 引物, 正常成熟中华绒螯蟹肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、精巢、卵巢 8 个组织的 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因, 利用荧光定量 PCR 方法研究中华绒螯蟹 EF-1 δ mRNA 的组织表达特征, 设定中华绒螯蟹 EF-1 δ 在胃中的表达量为 1, 根据 EF-1 δ 在各个组织中的相对表达量作柱形图, 可以看出, EF-1 δ 在成熟中华绒螯蟹肌肉中表达量最高, 与其它组织的表达量均呈显著差异 ($P < 0.05$); 精巢、肝胰腺中有少量表达; 心脏、卵巢、胃、肠、鳃中有微量表达(图 4)。

取早熟蟹和幼蟹在正常成熟蟹中表达差异较典型的 3 个组织(肌肉、肝胰腺和鳃), 利用荧光定量 PCR 方法检测 EF-1 δ mRNA 在这些组织中的相对

```

1 ACATGGGGCCTTTCCACCCGGCCAGCGCTGCACGAGGTCTGGACGCCTACCACAGTCAC
61 CATGGCGCTAGAACTTGCTCACGAGAACATCTGGTTTGACAAGTGGCGTGTGGACGATGC
I M A L E L A H E N I W F D K W R V D D A
121 TGAGCGCCAGTTTATGAGACCAAGTCTTCGGAAGGCTCGGGCCTGGGATCTGTGGCCAG
21 E R Q F Y E T K S S E G S G L G S V A S
181 TCAGATTGCTAAGGCGCGCAGGAAATAAAGAATTCCCTTCTGCTAGTCATGTGGTGG
41 Q I A K A R Q E I K N S L S A S H A G G
241 CAGCATTGGCAGCAAGGGTCTGCTGATGTCTAAACCGTCTCACAAGCTTGAGTCCCA
61 S I G S Q G S A D V L N R L T K L E S Q
301 GAATTCTGTCTGACCAAACTGTGTCAGCCTTGGAGAAAACAGTCATCCAGCTCACTAA
81 N S V L T K T V S A L E K T V I Q L T K
361 GAGGTTGGACTCTTAGACCATGGAGGCAAGACTACAGTTAGTGCTACCACCTCCACCTC
101 R L D S L D H G G K T T V S A T T S T S
3' RACE Primer
421 AACCCCTGTCCAGAACAACAAGCAAGCAGAGGAAGATGACGACGATGATGAAGTCGACCT
121 T P V Q N N K Q A E E D D D D D E V D L
481 CTTGGCTCTGATGATGATGAGGAGGAAGATGAAGCAGCAGCAAGGTGAGGGAGCAGCG
141 F G S D D D E E E D E A A A K V R E Q R
5' RACE Primer
541 CCTCAAAGCATATGCAGAAAAAAGTCCAAGAAGCCGGGTCCCATGCCAAATCCTCTGT
161 L K A Y A E K K S K K P G P I A K S S V
601 CCTGCTTGACTGCAAACCTTGGGATGATGAGACTGACATGGGGTGATGGAGAAAGAGAT
181 L L D C K P W D D E T D M G V M E K E I
661 CAGAAAGATTGAGATGGATGGGCTTATCTGGGGTGTGCTAAGTTGGTCCCACTAGCATA
201 R K I E M D G L I W G A A K L V P L A Y
721 TGGAATTCAGAAGCTCTCCATCTGTGCACAGTTGAAGATGAGAAAAGTCTCTATAGATGA
221 G I Q K L S I L C T V E D E K V S I D D
781 CCTCTCAGAGAAGATCCAAGAGATTGAAGACTACGTCCAGAGTGTGATATTGCTGCATT
241 L S E K I Q E I E D Y V Q S V D I A A F
841 CAACAAGGCTCTAAAGTTATGCATTCCAGTGCTAAGATAAATTAATTAAATTTCTGTACCA
261 N K V *
901 CAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 中华绒螯蟹 EF-1δ cDNA 核苷酸序列及预测的氨基酸序列

3'RACE PCR 引物用“→”表示, 5'RACE PCR 引物用“←”表示, 荧光定量 PCR 引物用长双下划线表示, 亮氨酸拉链用实线方框表示。Poly(A)具有加尾信号 ATTAAA, 出现在距 Poly(A)尾 14 bp 处。

Fig. 1 cDNA nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. sinensis* EF-1δ gene

“→”stands for 3'RACE PCR primers,and “←”stands for 5' RACE PCR primers; double-underlined stands for real-time PCR primers, and the solid line boxes stand for leucine-zipper.The poly (A) addition signal ATTAAA begins 14 bp from the poly (A) tail.

表达情况。定量 PCR 结果显示, EF-1δ 在不同发育状态中华绒螯蟹肌肉组织中的表达量均显著高于肝胰腺和鳃组织($P<0.05$); EF-1δ 在 3 个不同发育状态, 蟹肌肉中的表达量也呈显著性差异($P<0.05$), 其在早熟蟹肌肉中表达量最高, 成熟蟹肌肉中次之, 幼蟹肌肉中最低; 不同发育状态蟹 EF-1δ 在肝胰腺和鳃组织中的表达差异不显著($P>0.05$)(图 5)。

3 讨论

真核生物的蛋白质生物合成过程包括肽链的起始、延伸和终止。肽链的延伸需要延伸因子的参与, 真核生物普遍存在延伸因子 EF-1 和 EF-2, 在

真菌中还有 EF-3。EF-1 在基因表达和翻译过程中起重要作用^[9], 由 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个亚基组成, 其中 EF-1 α 属于 G 蛋白家族, 负责转运氨酰 tRNA 到 80S 核糖体^[18]; EF-1 β 具有鸟苷酸交换活性; EF-1 γ 常与 EF-1 β 形成复合物, 具有增加鸟苷酸交换的功能^[19]; EF-1 δ 在羧基端与 EF-1 β 具有同源性, 而在氨基端无同源性^[20], EF-1 δ 和 EF-1 β 可同时作为催化剂, 能将 EF-1 α 结合的 GDP 催化为游离的 GDP^[21]。目前尚未发现延长因子 EF-1 δ 在甲壳动物上做的报道, 本实验克隆了中华绒螯蟹延伸因子 EF-1 δ 全长基因并对其结构和部分功能进行分析, 为进一步研究 EF-1 δ 提供理论依据。

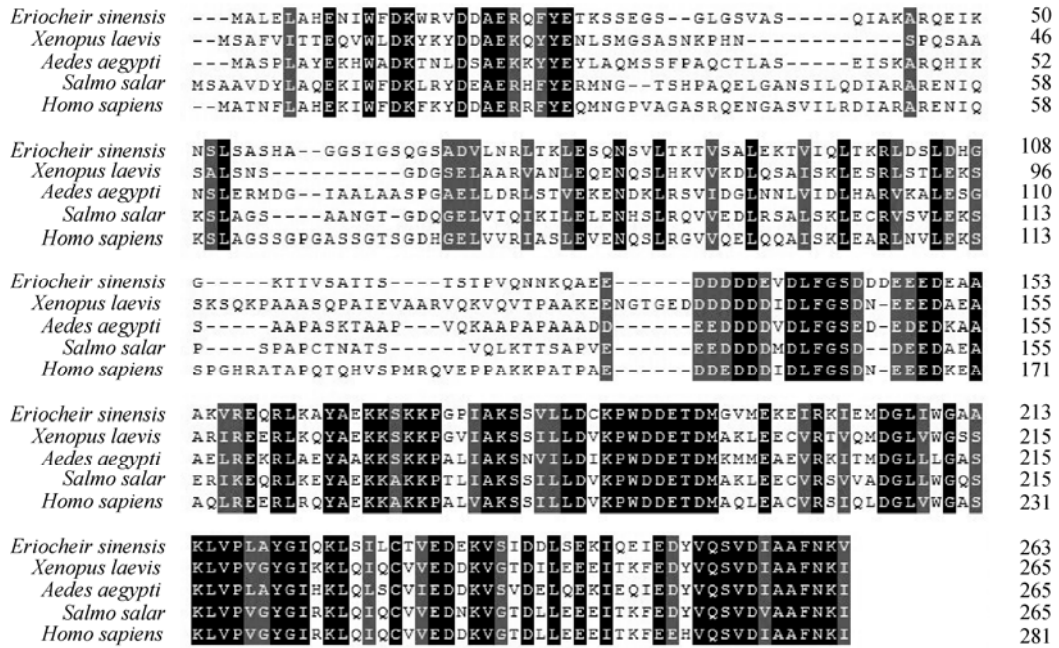


图 2 中华绒螯蟹 EF-1δ 氨基酸序列与其它物种 EF-1δ 氨基酸序列比较

中华绒螯蟹 JN638238; 非洲爪蟾 NP_001081523.1; 埃及伊蚊 XP_001659921.1; 大西洋鲑 ACH70923.1; 人 NP_001951.2.

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *E. sinensis* EF-1δ with different animals' EF-1δ

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis* JN638238; *Xenopus laevis* NP_001081523.1; *Aedes aegypti* XP_001659921.1; *Salmo salar* ACH70923.1; *Homo sapiens* NP_001951.2.

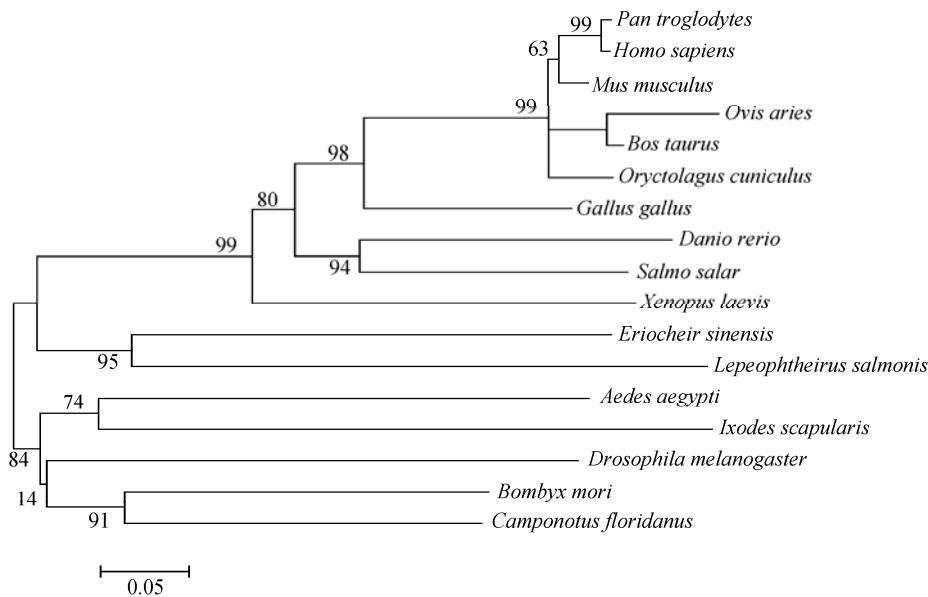


图 3 利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 EF-1δ 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

中华绒螯蟹 JN638238; 埃及伊蚊 XP_001659921.1; 大西洋鲑 ACH70923.1; 鸡 XP_001232628.1; 非洲爪蟾 NP_001081523.1; 黑猩猩 BAK62591.1; 家蚕 NP_001036853.1; 弓背蚁 EFN75040.1; 绵羊 NP_001009449.1; 牛 ABQ12948.1; 人 NP_001951.2; 兔 NP_001075838.1; 小家鼠 NP_075729.2; 鱼虱 ACO12465.1; 肩突硬蜱 XP_002400012.1; 斑马鱼 CAQ15418.1; 果蝇 NP_609361.1.

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on EF-1δ amino acid sequences using MEGA 4.0

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis* JN638238; *Aedes aegypti* XP_001659921.1; *Salmo salar* ACH70923.1; *Gallus gallus* XP_001232628.1; *Xenopus laevis* NP_001081523.1; *Pan troglodytes* BAK62591.1; *Bombyx mori* NP_001036853.1; *Camponotus floridanus* EFN75040.1; *Ovis aries* NP_001009449.1; *Bos Taurus* ABQ12948.1; *Homo sapiens* NP_001951.2; *Oryctolagus cuniculus* NP_001075838.1; *Mus musculus* NP_075729.2; *Lepeophtheirus salmonis* ACO12465.1; *Ixodes scapularis* XP_002400012.1; *Danio rerio* CAQ15418.1; *Drosophila melanogaster* NP_609361.1.

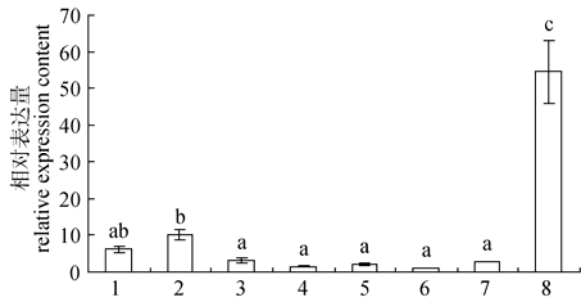


图 4 中华绒螯蟹 EF-1δ 在各组织中的表达情况

1. 肝胰腺, 2. 精巢, 3. 卵巢, 4. 肠道, 5. 鳃, 6. 胃, 7. 心脏, 8. 肌肉。

Fig. 4 The relative expression of *E. sinensis* EF-1δ gene in different tissues

1. hepatopancreas, 2. testis, 3. ovary, 4. intestine, 5. gill, 6. stomach, 7. heart, 8. muscle.

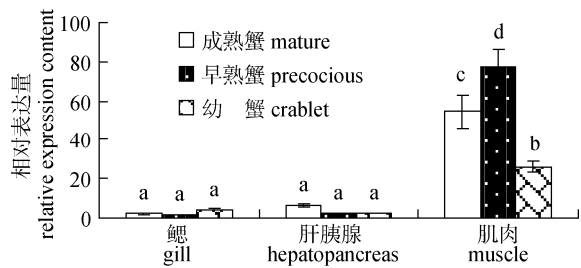


图 5 EF-1δ 在不同发育状态蟹 3 个组织中的表达情况

Fig. 5 The relative expression of EF-1δ gene in three tissues from different stage crabs

EF-1δ 氨基酸序列在 N 端具有典型的 6 个亮氨酸拉链保守序列, 且每隔 7 个氨基酸重复一次。并且观察到在亮氨酸拉链保守序列中每个亮氨酸后的第四个氨基酸位置是疏水性氨基酸, 且重复出现, 这是亮氨酸拉链的一个典型特征^[22]。与大西洋鲑等物种氨基酸序列比对后发现, EF-1δ 氨基酸序列在 N 端保守性较差, 但具有 6 个亮氨酸拉链保守序列, 而在 C 端则具有高度的保守性, 这与该基因在非洲爪蟾^[22]、鼠^[23]、人^[24]的研究结果相一致。

作为蛋白翻译延伸过程中的一个亚基, EF-1δ 在中华绒螯蟹各组织中广泛表达, 且在肌肉组织中表达丰度最高。Damme 等^[25]研究发现 EF-1δ 与 EF-1β 具有一定的同源性, 同时 EF-1β 常与 EF-1γ 形成复合物, Gillen 等^[19]研究表明克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 在蜕皮前期一段时间内 EF-1γ mRNA 在肌肉中的表达量会升高, 而在肝胰腺中的表达量会下降, 并且在蜕皮后 EF-1γ mRNA 在肌肉中的表达量会达到一个较高的值。本研究结果显示 EF-1δ mRNA 在肌肉中的表达量最高, 在肝胰腺中的表达量较低, 说明 EF-1δ 与 EF-1γ 在甲壳动物不同组织中具有相类似的表达情况。Furukawa

等^[26]研究发现 EF-1β 是一种肌动蛋白结合蛋白, 在功能上既能促进蛋白质合成的延伸阶段, 又与细胞质肌动蛋白相互作用, EF-1δ mRNA 在肌肉组织中表达较高或许其功能也与细胞质肌动蛋白作用有关。

基因的表达受时空和环境的调控, Jiang 等^[15]首次研究了瘦素受体 (leptin receptor) 在正常成熟蟹、早熟蟹和幼蟹 3 个不同发育阶段的组织表达情况。结果显示瘦素受体在正常成熟蟹肝胰腺中表达量最高, 在幼蟹中表达量最低; 而在小肠, 幼蟹瘦素受体表达量最高。分析其原因, 瘦素受体可能在蟹消化道营养物质吸收过程中发挥重要作用, 对于幼蟹, 这种作用主要表现在小肠, 而对于正常成熟蟹, 肝胰腺中的作用最为显著。本实验研究了 EF-1δ mRNA 在正常成熟蟹、早熟蟹、幼蟹在肝胰腺、鳃和肌肉组织的相对表达量。结果显示 EF-1δ mRNA 在 3 个不同发育状态蟹肝胰腺和鳃组织的表达量较低, 且差异均不显著, 说明 EF-1δ 基因在这两个组织中表达较为恒定且作用有限。然而 EF-1δ mRNA 在这 3 个不同发育状态蟹的肌肉组织中表达量均显著高于在肝胰腺和鳃组织中表达量 ($P < 0.05$), 说明 EF-1δ 基因在肌肉组织蛋白质合成和修复中起着很重要的作用。EF-1δ 在 3 个不同发育状态蟹肌肉中的表达量之间也呈显著性差异 ($P < 0.05$), 其中早熟蟹肌肉中表达量最高, 成熟蟹肌肉中表达量次之。Jung 等^[11]研究显示, EF-1δ 是一个易受辐射诱导的基因, 当真核细胞受到辐射刺激后会诱发一些应激蛋白激活, 继而引起一些转录因子、细胞周期调节因子以及其他蛋白因子功能上发生改变。王群等^[27]研究表明, 适当减少光照时间可以抑制中华绒螯蟹雄性性腺的发育, 从而避免性早熟。徐建荣等^[28]研究也表明, 长时间的光照不利于中华绒螯蟹 I 期幼蟹到 IV 期幼蟹的蜕壳生长。EF-1δ 在 3 个不同发育状态蟹肌肉中的表达量之间呈现差异或许与不同发育状态蟹受太阳紫外线辐射的程度不一致有关。EF-1δ 在不同发育状态蟹肌肉中表达量不同的具体机理还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 宋学宏, 杨彩根, 程建新, 等. 不同营养供给模式对中华绒螯蟹生长及肝胰腺白化症发病率的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 496-503.

- [2] Figueiredo-Pereira M E, Yakushin S, Cohen G. Accumulation of ubiquitinated proteins in mouse neuronal cells induced by oxidative stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 1997, 24(1-2): 35-38.
- [3] Hegde M L, Hazra T K, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells [J]. *Cell Research*, 2008, 18(1): 27-47.
- [4] Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(4): 318-327.
- [5] Riis B, Rattan S I, Clark B F, *et al.* Eukaryotic protein elongation factors [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1990, 15(11): 420-424.
- [6] Wang L, Liu Y, Wang W N, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of elongation factors 1A and 2 from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(3): 2167-2178.
- [7] Nilsson J, Nissen P. Elongation factors on the ribosome [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(3): 349-354.
- [8] Proud C G. Peptide-chain elongation in eukaryotes [J]. *Molecular Biology Reports*, 1994, 19(3): 161-170.
- [9] Andersen G R, Nissen P, Nyborg J, *et al.* Elongation factors in protein biosynthesis [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(8): 434-440.
- [10] Mulner-Lorillon O, Minella O, Cormier P, *et al.* Elongation factor EF-1 δ , a new target for maturation-promoting factor in *Xenopus oocytes* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(31): 20201-20207.
- [11] Jung M, Kondratyev A, Dritschilo A. Elongation factor 1 δ is enhanced following exposure to ionizing radiation [J]. *Cancer Research*, 1994, 54(10): 2541-2543.
- [12] Kawaguchi Y, Bruni R, Roizman B. Interaction of herpes simplex virus 1 α regulatory protein ICPO with elongation factor 1 δ : ICPO affects translational machinery [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(2): 1019-1024.
- [13] Joseph P, Lei Y X, Whong W Z, *et al.* Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(8): 6131-6136.
- [14] Lei Y X, Chen J K, Wu Z L. Blocking the translation elongation factor-1 δ with its antisense mRNA results in a significant reversal of its oncogenic potential [J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2002, 22(5): 377-383.
- [15] Jiang H, Ren F, Sun J L, *et al.* Molecular cloning and gene expression analysis of the leptin receptor in the chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Plos One*, 2010, 5(6): 1-9.
- [16] Li W W, Jin X K, He L, *et al.* Molecular cloning and tissue expression of the fatty acid-binding protein (Es-FABP9) gene in the reproduction seasons of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(8): 5169-5177.
- [17] Zhao D X, Chen L Q, Qin C J, *et al.* Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan binding protein in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2009, 154(1): 17-24.
- [18] Zhou S, Zhang J, Fam M D, *et al.* Sequences of elongation factors-1 α and -1 γ and stimulation by juvenile hormone in *Locusta migratoria* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(11): 1567-1576.
- [19] Gillen C M, Gao Y P, Niehaus-Sauter M M, *et al.* Elongation factor 1B γ (eEF1B γ) expression during the molting cycle and cold acclimation in the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2008, 150(2): 170-176.
- [20] Marguttill P, Ortona E, Vaccar S, *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding an elongation factor 1 β / δ protein from *Echinococcus granulosus* with immunogenic activity [J]. *Parasite Immunology*, 1999, 21(9): 485-492.
- [21] Amons R, Guerrucci M A, Karssies R H, *et al.* The leucine-zipper in elongation factor EF-1 δ , a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1218(3): 346-350.
- [22] Hodges R S. Unzipping the secrets of coiled-coils [J]. *Current Biology*, 1992, 2(3): 122-124.
- [23] Joseph P, Lei Y X, Zong W, *et al.* Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 δ , a novel cadmium-responsive proto-oncogene [J]. *Biological Chemistry*, 2002, 277(8): 6131-6136.
- [24] Sanders J, Raggiaschi R, Morales J, *et al.* The human leucine zipper-containing guanine nucleotide exchange protein elongation factor-1 δ [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1174(1): 87-90.
- [25] Damme H T F, Amons R, Karssies R, *et al.* Elongation factor 1 β of artemia: localization of functional sites and homology to elongation factor 1 δ [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1050(1): 241-247.
- [26] Furukawa R, Jinks T M, Tishgarten T, *et al.* Elongation factor 1 β is an actin-binding protein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1527(3): 130-140.
- [27] 王群, 李恺, 陈立桥, 等. 光周期对雄性中华绒螯蟹性腺发育的影响[J]. *华东师范大学学报*, 2004, 4(1): 84-90.
- [28] 徐建荣, 沈颂东, 张加梅, 等. 环境条件对中华绒螯蟹大眼幼体蜕壳生长的影响[J]. *水产科学*, 2006, 10(25): 505-508.

The full length cDNA cloning and expression of elongation factor 1 δ from the Chinese mitten crab(*Eriocheir sinensis*)

GUO Zi-hao, YANG Zhi-gang, LIU Zhi-wei, WANG Yao, YANG Xiao-zhen, CHENG Yong-xu*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Elongation factor (EF) is a protein factor which plays roles in the peptide chain elongation in the process of protein synthesis, including elongation factor 1 (EF-1) and elongation factor 2 (EF-2). Elongation factor 1 consists of four subunits α , β , γ and δ , and plays a key role in protein translation process. In this study, we cloned EF-1 δ gene from *Eriocheir sinensis* using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE), and primers were designed according to the conserved sequence of elongation factor-1 δ from *Xenopus laevis*. The full-length cDNA sequence of EF-1 δ is 933 bp which codes 263 amino acid residues. And comparison results showed that the nucleotide homology of EF-1 δ was 70% similar to *Xenopus laevis* and amino acid homology of EF-1 δ was 54% similar to *Danaus plexippus*, using BLASTN and BLASTX software. The phylogenetic analysis based on amino acid sequence shows that EF-1 δ has highest similarity with EF-1 δ of *Lepeophtheirus salmonis*. The expression of the gene in different tissues and stages of *E. sinensis* was analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. The result showed the EF-1 δ mRNA was mainly detected in muscle and small amount in testis, hepatopancreas and trace in heart, ovary, stomach, intestine, gill. EF-1 δ mRNA was detected with high level in muscles compared to hepatopancreas and gill in different developmental states of the crab, and displays significant difference at $P < 0.05$. It also has significant difference at $P < 0.05$ between muscles in different developmental states, and it was detected the highest expression in precocious crab, followed by mature crab and by a lower expression of crablet; And there is no significant expression difference between hepatopancreas and gill tissues in different developmental states.

Key words: *Eriocheir sinensis*; EF-1 δ ; gene; cloning; expression

Corresponding author: CHENG Yong-xu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn