

## 拟穴青蟹卵泡抑素相关蛋白基因的克隆和表达分析

解银洁, 黄辉洋, 叶海辉\*, 巩 杰, 金朱兴, 李少菁

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 卵泡抑素相关蛋白 (follistatin related protein, FRP) 是一种细胞外基质糖蛋白, 该蛋白参与细胞增殖、迁移、组织重塑、胚胎发育、细胞间相互作用等多种生理过程。迄今甲壳动物 FRP 的研究尚未见诸报道。实验采用 RACE 技术首次克隆了拟穴青蟹 FRP 基因部分 cDNA 序列。该序列长度 1 948 bp, FRP 肽段含有 484 个氨基酸残基, 包括 KAZAL-FS 结构域、EFh 结构域和两个 Ig 结构域。系统进化树显示拟穴青蟹 FRP 基因的分子进化地位与其生物学分类地位一致。半定量 PCR 及荧光定量 PCR 结果表明, FRP 基因在拟穴青蟹的胸神经团、脑和卵巢中表达。FRP 基因在卵巢发育各期的表达量各不相同, 卵巢未发育期最高, 据此我们推测 FRP 具有抑制卵巢发育的作用。

**关键词:** 拟穴青蟹; FRP 基因; 卵巢发育; 荧光定量分析

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

细胞外基质蛋白(extracellular protein)是存在于细胞外基质中的一类大分子蛋白, 它们由多种细胞分泌, 环绕于细胞周围, 不构成纤维、基底膜等支持结构, 却具有调控细胞功能的多种作用<sup>[1]</sup>。细胞外基质蛋白包括多个家族, 如富含半胱氨酸的分泌性酸性蛋白家族(secreted protein acid and rich in cysteine, SPARC)和血栓反应素蛋白家族(thromb spondin protein, TSP)<sup>[2]</sup>。卵泡抑素相关蛋白(follistatin related protein, FRP)是 SPARC 家族的新成员, 于 1993 年在小鼠的成骨细胞系中作为转化生长因子(transforming growth factor, TGF- $\beta$ )的应答蛋白而被发现<sup>[3]</sup>。FRP 因具有与卵泡抑素(follistatin, FST)类似的特征结构单元(KAZAL-FS 结构域)而得名。在鸡中, FRP 的同源物也被称为 follistatin-like 蛋白<sup>[4]</sup>。

一般认为, FRP 与 FST 为 TGF- $\beta$  超家族的结构相关蛋白, 它们通过与 TGF- $\beta$  超家族成员如激活素(activin)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、TGF- $\beta$  等蛋白结合来调控细胞生理

过程<sup>[5]</sup>, 包括细胞增殖与分化、新陈代谢、免疫反应及内分泌活动等<sup>[6-9]</sup>。TGF- $\beta$  超家族成员的失活或失调通常发生在病理阶段, 诸如异常细胞分化、增殖及新陈代谢等<sup>[10-11]</sup>。FST 已被公认为是脊椎动物中鉴定的活化素信号拮抗剂<sup>[12]</sup>。最新研究表明, FRP 可以通过结合内源性 Toll 样受体激活先天性免疫反应<sup>[13]</sup>; 另外 RNA 干扰实验表明 FRP 参与长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)的产卵过程<sup>[14]</sup>。FRP 在无脊椎动物中行使的功能尚未完全清楚, 但已明确 FRP 在细胞生长的负调控中起一定作用<sup>[15]</sup>。

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)个体大、生长快、适应性较强, 且肉质鲜美、营养丰富、商品价值高, 是我国东南沿海重要的海水养殖蟹类<sup>[16]</sup>。迄今为止, 甲壳动物 FRP 基因的结构与功能尚未见诸报道。本研究根据 cDNA 文库已知片段设计引物, 采用 RT-PCR 方法分离得到拟穴青蟹 FRP 的 cDNA 序列, 并检测其在各个组织中和卵巢发育过程中的表达情况, 为进一步从分子水平上了解拟穴青蟹卵巢发育机制奠定基础。

收稿日期: 2012-01-07 修回日期: 2012-05-04  
资助项目: 国家自然科学基金项目(40406030, 41076081)  
通讯作者: 叶海辉, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**实验动物** 拟穴青蟹购自厦门市大学路农贸市场, 选用健康、附肢完整的个体。甲壳长度为 6.3 ~ 8.8 cm, 体质量为 150~420 g。

**主要试剂** TRIzol<sup>®</sup> Reagent Total RNA Isolation Reagent, Invitrogen 公司; RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas 公司; DNase I、3' -Full RACE Core Set Ver.2.0、5' -Full RACE Kit、LA Taq<sup>®</sup>、dNTPs、pMD19-T、6×Loading Buffer、

DNA Marker, TaKaRa 公司; E.Z.N.A 胶回收试剂盒, Omega 公司。

### 1.2 实验方法

**引物设计** 参考本实验室差减文库得到的 *FRP* 片段(GenBank 登录号: AEI88103.1)<sup>[17]</sup>, 设计 5'RACE 特异性引物 FRP5'扩增青蟹 *FRP* 基因 5'端的 cDNA; 根据所获序列设计 3'RACE 特异性引物 *FRP3'*, 进行 3'端的 cDNA 扩增, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Oligo nucleotide primers in different experiment

引物的作用 primer function	引物 primer	引物序列(5' → 3') primer sequence
3' RACE 特异引物	FRP3'	TGAGTTCTATACCGCCTTCAG
5' RACE 特异引物	FRP5'	TGCTTGATAACCAGTTCATCTTGCT
RACE 试剂盒 提供的外引物	3' RACE Primer 5' RACE Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
FRP 定量引物	FSR FSF	GAGGTTGAGTTGCCATCGTTG TATCTGGTGAGCCTTATGTTTTCC
$\beta$ -actin 定量引物	$\beta$ -actin-F $\beta$ -actin-R	GAGCGAGAAATCGTTCGTGAC GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG

**总 RNA 提取** 分别取拟穴青蟹卵巢发育期雌蟹各组织(眼柄神经节、脑、胸神经团、鳃、心脏、胃、肝胰腺、卵巢、肌肉、血淋巴、表皮)。并根据上官步敏等<sup>[18]</sup>对卵巢发育的分期方法, 取不同发育时期的卵巢组织(未发育期、发育早期、发育期、将成熟期、成熟期)。参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明提取总 RNA, 用 DNase I 处理去除 DNA 污染。以紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及完整性。各组织取 1  $\mu$ g 总 RNA, 参照 RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明, 反转录成 cDNA 模板, -20 °C 保存备用。

**FRP 基因 cDNA 的克隆** 以拟穴青蟹卵巢总 RNA 为模板, 参照 3' -Full RACE Core Set Ver.2.0、5' -Full RACE Kit(TaKaRa)使用说明, 分别合成带 3'和 5'接头的 cDNA 第一链。

以带 5'接头的 cDNA 第一链为模板, 用 FRP5'引物和试剂盒所带的通用引物 5' RACE Primer 配对, 按照 5' -Full RACE Kit 推荐的反应体系进行 5'端的 cDNA 扩增(设计引物组: FRP5' +ddH<sub>2</sub>O、

ddH<sub>2</sub>O+5'RACE Primer 作为单引物扩增对照), 反应条件: 94 °C 热变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 32 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。同样的方法进行 3'端的 cDNA 扩增。所扩增的 PCR 产物用 1.5 %的琼脂糖凝胶分析, 纯化目的产物, 连接于 pMD19-T 载体中, 挑取阳性菌斑, 用 M13 通用引物进行双向测序, 送往上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果拼接后得到拟穴青蟹 *FRP* 基因的 cDNA 序列。

**序列分析和系统进化树的构建** 将获得的拟穴青蟹 *FRP* 的 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析。应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定正确的编码区并推导其编码的氨基酸序列。PSORT II Prediction 程序(<http://psort.hgc.jp/form2.html>)基于其氨基酸序列预测蛋白质亚细胞定位点。Clustal X 软件对相应 *FRP* 的 ORF 进行比对<sup>[19]</sup>, 然后用 MEGA 3.0 软件<sup>[20]</sup>, 基于邻位相接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树, Bootstrap 设置重复 1 000 次计算

各分支的置信度。

**FRP 基因的表达量分析** 各组织取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 反转录 cDNA 为模板, FSR 和 FSF 为引物, 分析 FRP 在拟穴青蟹各种组织中和卵巢发育各期中的表达情况。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  热变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

**数据统计** 使用拟穴青蟹肌动蛋白基因作为内参基因进行数据分析。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差, 每组 3 个重复。采用 SPSS 软件对不同样本的表达量进行配对  $t$  检验, 差异性显著分析结果以  $P$  值表示。 $P < 0.05$  为差异显著(以\*表示),  $P < 0.01$  为差异极其显著(以\*\*表示)。

## 2 结果

### 2.1 FRP 基因的序列特征分析

将测序结果进行比对拼接, 得到拟穴青蟹 FRP cDNA 序列 1 948 bp, 3' UTR 为 493 bp, 含有 12 bp 的 poly(A) 尾, 在 poly(A) 上游 18 bp 处可见单一的加尾信号序列 AAUAAA。3' UTR 的 AU 含量高达 64.7 %, 包含 2 个 AUUUA, 为 mRNA 不稳定元件(图 1)。

通过 NCBI 的 Blast P 比对分析, 可知该部分 FRP 肽段含有 484 个氨基酸残基, 且该片段结构复杂, 包括 KAZAL-FS 结构域, EFh 结构域和两个 Ig 结构域(图 2)。PSORT II 程序结果显示预测蛋白质亚细胞定位于细胞核。

### 2.2 FRP 序列同源性分析

将拟穴青蟹 FRP cDNA 推导的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 搜索, 结果显示该序列与 follistatin-like 5(FSL5) 蛋白具有较高同源性, 推测拟穴青蟹 FRP 是 FSL5 的同源物。与昆虫纲的拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、意蜂(*Apis mellifera*) 的氨基酸序列相似度都在 50 % 左右。

采用 Mega3.0 软件基于 NJ 法以氨基酸序列为分析对象构建系统进化树。从图 3 中可以看出, FSL-5 与 SPARC 明显不能聚为同一分支。FSL-5 可分为脊椎动物 FSL-5 和无脊椎动物 FSL-5 两大类, 且其系统发育分支与现行的分类地位相同。在无脊椎动物亚类中, 昆虫纲动物聚为一簇, 甲壳纲的拟穴青蟹单独成一簇。

### 2.3 FRP 基因的表达分析

**FRP 在各组织中的表达** 依据实验所得拟穴青蟹 FRP cDNA 序列设计特异性引物 FSF、FSR, 利用半定量 PCR 技术检测 FRP 基因在拟穴青蟹不同组织中的表达情况。电泳结果显示, 在 11 个组织器官中, FRP 仅存在于拟穴青蟹的脑、胸神经团和卵巢中(图 4)。对这 3 个组织的 FRP 表达量进行荧光定量 PCR(qRT-PCR) 分析, 结果显示, FRP 在脑和胸神经团中的表达量相对较高, 而在卵巢中表达量较低, 且差异显著(图 5)。

**FRP 在卵巢发育过程中的表达** 为检测不同卵巢发育时期 FRP 的表达量, 提取拟穴青蟹未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和成熟期的卵巢总 RNA。qRT-PCR 结果显示, FRP 在 I 期卵巢(未发育期)的表达量显著高于其他各期( $P < 0.01$ )。卵巢发育进入 II 期后, FRP 的表达量迅速降低, 并一直以较低水平持续至 V 期(成熟期)(图 6)。

## 3 讨论

### 3.1 FRP 基因的序分析

本研究通过 RACE 技术获得了拟穴青蟹 FRP cDNA 的部分序列, 这是首次在甲壳动物克隆得到 FRP 基因。序列分析发现, FRP 基因与 follistatin like-5(FSL-5) 基因的相似性最高, 与昆虫纲拟谷盗的 FSL-5 序列相似性为 52%, 推测拟穴青蟹的 FRP 基因为 FSL-5 的同源基因。FRP 属于富含半胱氨酸的分泌性酸性蛋白(SPARC) 家族, 具有该家族特异性结构。蛋白的 N 端是一个 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制域<sup>[21-22]</sup> 和一个 EF 手相的钙离子结合域<sup>[23]</sup>, 这两个结构域同样存在于卵泡抑素(FST) 中, FST 通过这两个结构域与 TGF- $\beta$  家族结合从而抑制其活性<sup>[24]</sup>。研究表明, TGF- $\beta$  家族成员与不同的受体结合激活 SMAD 信号通路从而执行不同的生物学功能<sup>[25]</sup>。除了上述这两个结构域, 拟穴青蟹 FRP 还含有两个 Ig 结构域, Ig 结构域可与多种蛋白质结合。这提示 FRP 可能作为一个脚手架蛋白将 TGF- $\beta$  家族蛋白与其它蛋白结合起来从而调节相应的生物学过程。PSORT II 程序预测该蛋白质亚细胞定位于细胞核, 这一结果与 FRP 在人体所有细胞系中的定位一致, 说明 FRP 是一种分泌蛋白也是一种核蛋白, 在细胞内执行相应功能<sup>[26]</sup>。

```

1                                     CCATCAGATCCATGCCA
                                     P S D P C Q 6
18  AGCACATTTTGTGAGCGGGGACGTGTGTGCGCCTGGACCACGTCGGTGAGCCACAGTGTGAGTGCCAGCCCTCTTG
   A H F C E R G R V C R L D H V G E P Q C E C Q P F C 32
96  TTCCCGCCACCGGAAGCTGGTGTGGCAATGACGGGGCGGTACTCTGAATCACTGTGAGCTGCACCGTGCGCCCTG
   S R H R K L V C G N D G R L Y L N H C E L H R A A C 58
174  CTTCAGTGGTGCCAGGATTCACATTGACAGGAGCAGAAAATGTTTCAGAAAAGCCTGATGCCCATCACCTGGGATAA
   F S G A R I H I D R S R K C F R K G L M P I T W D N 84
252  CACCCCATCACCCGCCACACCAGCACCCCGCAGGGAGGAAAACTTGATCTGGAGCCACCACAGATCCGCGACGA
   T P S P A T P A P R T G E E K L D L E P P Q I R D D 110
330  CCTGACACAAGGAGGAGGAGCTGTGTGACAACACGGTCACCCCTGAAGATGATCAGAACAATACAGAATGAAGT
   L T Q G G G A V L T T R S P L E D D Q N K L Q N E V 136
408  CACACATTAGAGGATGGTGAACAGCAAGATGAACGGTATCAAGCAGCAGCAGTAGTAGTGACAGCATCAGCAA
   T H L E D G E Q Q D E L V S S S S S S S S D S I S N 162
486  TAACAGTGGCAGCAGCAGTAGCAGCAGTAGCAGTGCCTCACCCAACAGTCTGTTCATTGCAGCAATATGAAAT
   N S G S S S S S S S S S S A S P N S L C S L Q Q Y E I 188
564  TCTCAAGGACAACCTCCTCTATATCACCATGCACGGCTCATGGCTGAGAATGGACGGGGCTCCGAGCGGGAATATCT
   I K D N I L I L Y H H A R I M A E N G R G S E R E Y I 214
642  GGTGAGCCTTATGTTTCCAAATTGACACCAACAACAATGGGGCACTGGACCGCACAGAGCTGACACAGGTGTACA
   V S L M F S K F D T N N N G A L D R T E L T Q V S Q 240
720  GGAAGAGGAAGTGAAGTCTGGCAGAGGACTGTCACTGGCTGACCTCCTGCACTTTGATGACAAAACAACGATGG
   E E E V S R L A E D C S L A D L L H F D D T N N D G 266
798  ACAACTCAACTCAATGAGTCTATACCGCCTCAGTAAGTTGTACAGTGTGTCAGTGGTGTCCCTGGACAAGCCCT
   Q L N L N E F Y T A F S K L Y S V S V S L D K A L 292
876  GGAAGTGAATCAGGTGTGACGACGAGTAGTGACAACCTGGAGATCAAATGTGACGTCACTGGACCCCAACACCC
   E V N Q V S A R V G D N L E I K C D V T G T P T P P 318
954  CATTGTGTGGCGCGCAATGGACTTGACCTGGCAGCACTCAACTCTGAGGACATTCGTGTGTTTCATGGATGGATCGCT
   I V W R R N G L D L A A L N S E D I R V F M D G S L 344
1032 GTACTGACACCGCTGCGGTTGGTCCATGCTGGGAATTACACATGTCATGCTGACCGGAACAAGGATGTGGTCCAGAC
   Y L T R L Q L V H A G N Y T C H A D R N K D V V Q T 370
1110 ACACATTTGACAGTCCATACTGTGCCACAGTGCAGGTAACACCACACATTCAGAGTCTGCGGCCAGGTGAGGAAGC
   H I L T V H T V P T V Q V T P H I Q S L R P G E E 396
1188 AGTGATGAGCTGCGGGCCACAGGTGAACCTTCCCAAGGTTGACTGGCTCAAGAATGATGAGCCCTGCGGGTGGAA
   V M S C R A T G E P F P K V D W L K N D E P L R V D 422
1266 CATCCCCATAAGTACCAGGTGGTGGCAATGGCACCAGCTCAGGTTGCGCAACATGGCTACGAGACACTGGCGC
   I P H K Y Q V V G N G T Q L R V R N I G Y A D T G A 448
1344 CTACATGTGCAAGCGCCAGTGTGGGGGCATGGCAGGGACATCAGCTCTCTTATTGTACAGGAGAACCCTGCTCC
   Y M C Q A T S V G G M A R D I G S L I V Q E N P A P 474
1422 AAGTACGTCGCTTTGTGCTCTAGAATACTAAATTTATATATAGTATTGCAATAATAAACTCTATCTATCAGACC
   S T S L C V S R I Y * 484
1500 CTGAAAGGAATTATAGTGCATATAGGTATAAAAATGGAAGGATGATAAGAAACTATTATTCAAAATAATGAAAGGAATTA
   TAGTAAATACAGTAAAAATCCCTCTTATCCGGCATCAACGGGACCGCGACATGCTGGATACTTGAATATTGCCGATA
   CTTGAATAGAGGTGAAATATGTCCACAATCACCACCCTACACTCACACATCTTACCATAACAAAGATCAGCTGATCG
   CCGTGCCACGCATTGCCACCCAGCTGCCACCCAGCTGCCACCTCACACTCACAACACACAATACTACTGTACTAA
   CATTTCTTTAATACTTTCCCTCTATAAAAATGATGGATTCAAATAAATGATACATATACACTTATTGTCTTAA
   TTCAATATTAGCCAACATGTATAGCATACAATAAAGATATGAAAATGAAAAA

```

图 1 拟穴青蟹 FRP 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

\*代表终止密码子; 虚框所示为 mRNA 不稳定元件; 实框所示为加尾信号; 实线所示为 KAZAL-FS 结构域; 虚线所示为 EFh 结构域, 灰色突出显示部分为两个 Ig 结构域。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of FRP from *S. paramamosain*

The asterisk (\*) indicates the stop codon; mRNA unstable components were marked by virtual box and tailing signal by solid box. Solid line for KAZAL-FS domain while virtual line for EFh domain; Ig domains highlighted in gray color.

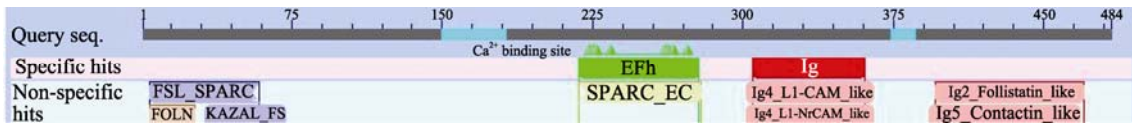


图 2 蛋白序列结构功能域预测  
**Fig. 2 Prediction of the protein structure and function domain**

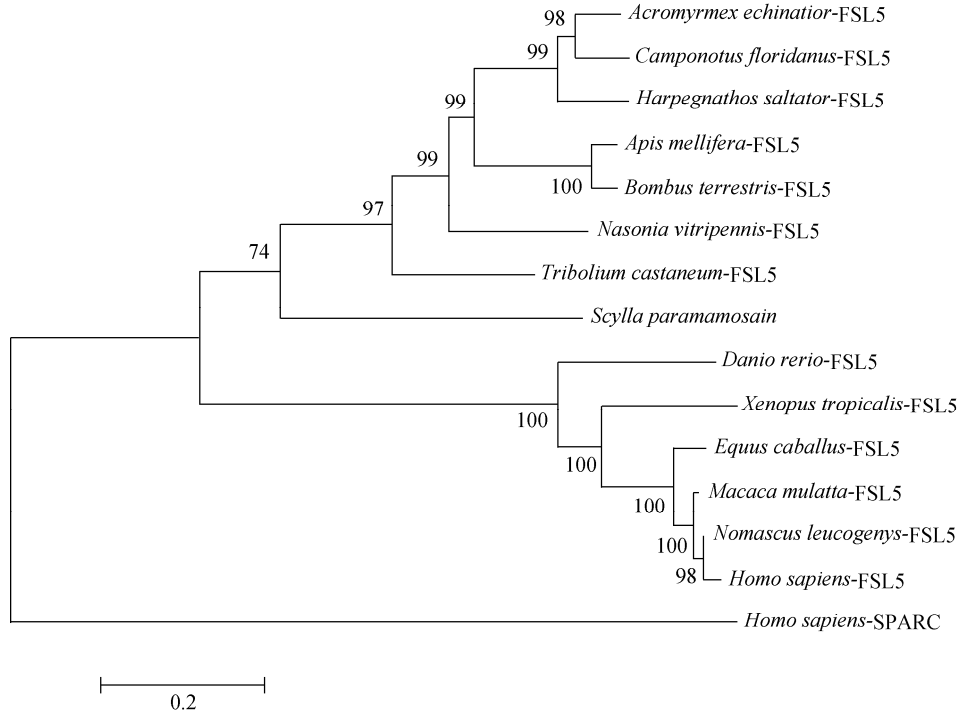


图 3 基于 NJ 法构建的系统发育树

**Fig. 3 Phylogram based on Neighbor-Joining method**

*Acromyrmex echinator*: 切叶蚁(EG164574.1); *Camponotus floridanus*: 佛罗里达弓背蚁(EFN70008.1); *Harpegnathos saltator*: 印度跳蚁(EFN88915.1); *Apis mellifera*: 意蜂(NP\_001027532.1); *Bombus terrestris*: 大黄蜂(XP\_003399524.1); *Nasonia vitripennis*: 丽蝇蛹集金小蜂(XP\_001600134.1); *Tribolium castaneum*: 拟谷盗(XP\_970472.2); *Danio rerio*: 斑马鱼(AAI62613.1); *Xenopus tropicalis*: 非洲蛙(XP\_002934788.1); *Equus caballus*: 马(XP\_003364535.1); *Macaca mulatta*: 恒河猴(XP\_002804293.1); *Nomascus leucogenys*: 长臂猿(XP\_003257963.1); *Homo sapiens*: 人(NP\_001121900.1); *Homo sapiens-SPARC*: 人(CAG33080.1)。节点处数字表示重复 1000 次的 Bootstrap 值。

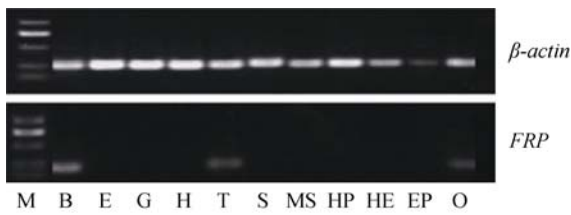


图 4 拟穴青蟹 *FRP* 基因的 RT-PCR 检测

M. Marker; B. 脑; E. 眼柄神经节; G. 鳃; H. 心脏; T. 胸神经团; S. 胃; MS. 肌肉; HP. 肝胰腺; HE. 血淋巴; EP. 表皮; O. 卵巢。

**Fig. 4 Expression of *FRP* mRNA from *S. paramamosain* by RT-PCR**

M.Marker; B. brain; E. eyestalk; G. gill; H. heart; T. thoracic ganglia; S. stomach; MS. muscle; HP. hepatopancreas; HE. hemolymph; EP. epidermis; O. ovary.

**FRP 的表达分析** 迄今为止, *FRP* 基因已经在人、小鼠、非洲爪蟾、鸡和猕猴等物种中得到克

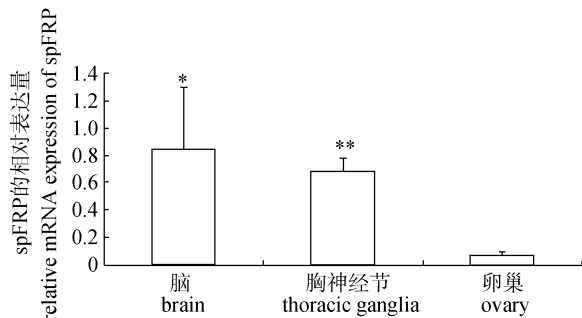


图 5 拟穴青蟹 *FRP* 基因的 qRT-PCR 检测

**Fig. 5 Expression of *FRP* mRNA from *S. paramamosain* by quantitative real-time PCR**

隆和分析<sup>[27]</sup>。研究表明, *FRP* 可以抑制癌细胞的增殖和分化<sup>[28-30]</sup>; 在鸡中, 推测 *FRP* 与中胚层的背部化和神经感应功能有关<sup>[8]</sup>; 而在意蜂中, *FRP* 被证

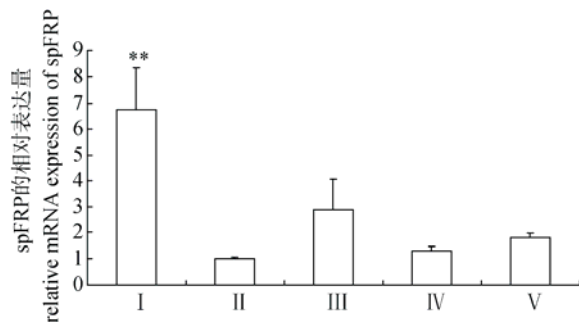


图6 拟穴青蟹 *FRP* 基因在不同时期卵巢中的表达量  
I. 未发育期; II. 发育早期; III. 发育期; IV. 将成熟期; V. 成熟期。

Fig. 6 Expression of *FRP* mRNA of ovarian development stages from *S. paramamosain*

I. undeveloped stage; II. early-developing stage; III. developing stage; IV. nearly-ripe stage; V. ripe stage.

实与学习、记忆功能相关<sup>[31]</sup>。尽管 *FRP* 的具体功能还不是非常清楚,但是可以肯定的是,*FRP* 在细胞生长的过程中起到负反馈调节作用<sup>[5]</sup>。本研究结合半定量 PCR 和 qRT-PCR 技术对拟穴青蟹不同组织器官中的 *FRP* 进行了定量分析,发现 *FRP* 转录本只存在于脑、胸神经团和卵巢中,且在脑和胸神经团中的表达量较高。在小鼠中,*FRP* 转录本存在于多种组织,其中以肺中的表达量最高<sup>[29]</sup>,而在长角血蜱中,RT-PCR 显示 *FRP* 存在于血蜱的整个生活史和多种组织器官,且在卵巢中表达量较高<sup>[14]</sup>。这些结果表明,在不同物种中,*FRP* 存在部位的广泛性与特异性可能与其执行的具体功能不同有关。甲壳动物的脑和胸神经团是重要的中枢神经器官,除神经调节外,还可分泌多种激素进行体液调节,参与感觉、生殖、内分泌等调控过程<sup>[32]</sup>。拟穴青蟹 *FRP* 在神经组织的高表达水平提示其对神经活动具有重要调节作用,但具体功能尚待进一步研究。

为探究 *FRP* 在拟穴青蟹卵巢发育过程中的调节作用,对 *FRP* 在不同卵巢发育阶段卵巢中的表达量进行了分析。结果显示,*FRP* 在 I 期卵巢(未发育期)含量最高。I 期卵巢的卵子发生处于相对静止期,而 *FRP* 在该期高度表达暗示其对卵巢发育具有抑制作用,即该蛋白的存在抑制了卵巢的发育,使其停留在未发育期阶段,不能启动卵黄发生。当拟穴青蟹卵巢发育进入 II 期(发育早期)后,*FRP* 表达量迅速下降。II 期卵巢 *FRP* 表达下调,解除了其对卵巢发育的抑制作用,使得该期卵巢中的卵母细胞得以开启卵黄发生,并在此后的各期

中卵母细胞逐渐生长,最终进入成熟期。

国内外大量研究表明,细胞外基质蛋白 *FRP* 具有多重调控功能,迄今该蛋白分子作用的机制远未阐明。进一步明确该基因在拟穴青蟹的生理功能与调节机制,可为其生物学和养殖学的研究提供理论与应用指导。

#### 参考文献:

- [1] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社,2000: 159-163.
- [2] Sage E H, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interaction. SPARC, tenascin, and thrombospondin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(23): 14831-14834.
- [3] Shibanuma M, Mashimo J, Mita A, *et al.* Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor- $\beta$ 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 217(1): 13-19.
- [4] Patel K, Connolly D J, Amthor H, *et al.* Cloning and early dorsal axial expression of *flik*, a chick follistatin-related gene: evidence for involvement in dorsalization/neural induction [J]. *Developmental Biology*, 1996, 178(2): 327-342.
- [5] Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, *et al.* DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophila*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1 - analysis of their binding with TGF- $\beta$  superfamily proteins [J]. *The FEBS Journal*, 2010, 277(20): 4278-4289.
- [6] Hill J J, Davies M V, Pearson A A, *et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(43): 40735-40741.
- [7] Adams D C, Karolak M J, Barry W, *et al.* Follistatin-like 1 regulates renal IL-1 $\beta$  expression in cisplatin nephrotoxicity [J]. *AJP - Renal Physiology*, 2010, 299 (6): 1320-1327.
- [8] Chan Q K, Ngan H Y, Ip P P, *et al.* Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis- a differential expression and functional analysis [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30 (1): 114-121.
- [9] Miyamae T, Marinov A D, Sowders D, *et al.* Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule [J]. *Journal of Immunology*, 2006, 177(7): 4758-4762.
- [10] Massague J, Blain S W, Lo R S. TGF- $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 295-309.
- [11] Chen Y G, Lui H M, Lin S L, *et al.* Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin

- [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2002, 227(2): 75–87.
- [12] Parker L, Stathakis D G, Arora K. Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila* [J]. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2004, 34(1): 73–101.
- [13] Murakamia K, Tanakab M, Usuia T, *et al.* Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4 [J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(4): 319–324.
- [14] Zhou J L, Liao M, Hatta T, *et al.* Identification of a follistatin-related protein from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its effect on tick oviposition [J]. *Gene*, 2006, 372(2): 191–198.
- [15] Zwijsen A, Blockx H, Arnhem W V, *et al.* Characterization of a rat C<sub>6</sub> glioma-secreted follistatin-related protein (FRP), cloning and sequence of the human homologue [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 225(3): 937–946.
- [16] Ye H H, Tao Y, Wang G Z, *et al.* Experimental nursery culture of the mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador) in China [J]. *Aquaculture International*, 2011, 19(2): 313–321.
- [17] Zeng H, Huang J R, Li W X, *et al.* Identification of differentially expressed genes in thoracic ganglion of the mud crab, *Scylla paramamosain* during ovarian maturation [J]. *Marine Biology Research*, 2010, 7(6): 617–622.
- [18] 上官步敏, 刘正琮, 李少菁. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察 [J]. *水产学报*, 1991, 15(2): 96–103.
- [19] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [20] Kumar S, Nei M, Dudley J, *et al.* MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9(4): 299–306.
- [21] Chlenski A, Liu S, Baker L J, *et al.* Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-likier module of the follistatin domain of SPARC [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(20): 7420–7425.
- [22] Sage E H, Reed M, Funk S E, *et al.* Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(39): 37849–37857.
- [23] Wang H, Fertala A, Ratner B D, *et al.* Identifying the SPARC binding sites on collagen I and procollagen I by atomic force microscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(21): 6765–6771.
- [24] Balemans W, Hul W V. Extracellular regulation of BMP signaling invertebrates: a cock tail of modulators [J]. *Developmental Biology*, 2002, 250(2): 231–250.
- [25] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus [J]. *Cell*, 2003, 113(6): 685–700.
- [26] Tortoriello D V, Sidis Y, Holtzman D A, *et al.* Human follistatin-related protein: A structural homologue of follistatin with nuclear localization [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(8): 3426–3434.
- [27] Hambrock H O, Kaufmann B, Muller S, *et al.* Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(12): 11727–11735.
- [28] Johnston I M P, Spence H J, Winnie J N, *et al.* Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion [J]. *Oncogene*, 2000, 19(47): 5348–5358.
- [29] Mashimo J, Maniwa R, Sugino H, *et al.* Decrease in the expression of a novel TGF beta1-inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 1997, 113(1-2): 213–219.
- [30] Sumitomo K, Kurisaki A, Yamakawa N, *et al.* Expression of a TGF-β1 inducible gene, TSC-36 causes growth inhibition in human lung cancer cell lines [J]. *Cancer Letters*, 2000, 155(1): 37–46.
- [31] Mayumi T, Shinobu Y, Masahiro F, *et al.* Conservation of novel Mahya genes shows the existence of neural functions common between Hymenoptera and Deuterostome [J]. *Development Genes and Evolution*, 2005, 215(11): 564–574.
- [32] 金朱兴, 叶海辉, 李少菁, 等. 锯缘青蟹神经器官对卵巢发育的调节作用: 离体实验[J]. *海洋科学*, 2003, 27(1): 72–74.

## Molecular cloning and expression analysis of the follistatin related protein gene in *Scylla paramamosain*

XIE Yin-jie, HUANG Hui-yang, YE Hai-hui\*, GONG Jie, JIN Zhu-xing, LI Shao-jing

(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Follistatin related protein (FRP) is an extracellular glycoprotein, involved in various physiological processes such as cell proliferation, migration, tissue remodeling, embryonic development, and cell-cell interaction. However, no *FRP* gene has been reported from crustaceans. In this study, we isolated *FRP* gene from mud crab, *Scylla paramamosain* by RACE (rapid amplification of cDNA ends). And we analyzed the expression of *FRP* transcripts in different tissues and ovarian development stages by semi-quantitative and quantitative RT-PCR. The obtained cDNA was 1 948 bp, with the 3'UTR of 493bp. The putative peptide of sp-FRP was composed of 484 amino acids, which was most similar to the red flour beetles *Tribolium castaneum* FRP (50%). Sp-FRP contained a KAZAL-FS domain, an EFh domain, and two immunoglobulin domains, suggesting that FRP may act as a scaffold protein linking the TGF- $\beta$  family and other unknown proteins to modulate their functions. The phylogenetic analysis was consistent with traditional classification. Quantitative PCR showed that the expression of *FRP* was significantly higher in brain and thoracic ganglia than in ovary. In addition, the expression of *FRP* transcript was different during ovarian development, and much higher at undeveloped stage of ovary. FRP may play a suppression role in the ovarian development of the mud crab.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; follistatin related protein; ovarian development; quantitative RT-PCR

**Corresponding author:** YE Hai-hui. E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn