

## 拟穴青蟹 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆与表达

付春茹, 叶海辉\*, 陈学雷, 黄辉洋, 李少菁

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatede hydrogenase, GAPDH) 是维持生命最基本活动的关键酶之一。采用 RT-PCR、RACE 等技术, 获得了拟穴青蟹 *gapdh* 基因全长 cDNA 序列。该序列全长 1 440 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 008 bp, 编码 335 个氨基酸残基。同源分析显示, 该基因编码的蛋白与其他一些物种具有很高相似性, 推测 *gapdh* 基因具有很高的保守性。经荧光定量 PCR 检测, *gapdh* 基因在拟穴青蟹多个组织中均有表达, 且在胸神经团、眼柄神经节、卵巢、表皮中表达量较高。在拟穴青蟹卵巢发育过程中, *gapdh* 基因在卵巢发育早期 (II 期) 表达量最高, 在卵巢发育成熟期 (V 期) 表达量最低, 由此推测 GAPDH 主要参与了卵巢的细胞分裂增殖过程。

**关键词:** 拟穴青蟹; 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 基因克隆; 荧光定量 PCR; 卵巢发育

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatede hydrogenase, GAPDH) 广泛存在于原核生物和真核生物细胞中, 催化 3-磷酸甘油醛转变成 1,3-二磷酸甘油酸, 后者作为底物在 3-磷酸甘油酸激酶催化下生成 3-磷酸甘油酸, 产生糖酵解过程的第一个 ATP。GAPDH 参与糖酵解、糖原异生以及卡尔文循环等能量代谢, 是维持生命最基本活动的关键酶之一<sup>[1]</sup>。由于 GAPDH 参与了细胞的基本代谢过程, 被认为是一种管家基因 (housekeeping gene)<sup>[2]</sup>。此外, 作为细胞内含量丰富的蛋白质, GAPDH 是研究基因表达控制以及氨基酸序列与蛋白质功能之间关系的一个有用模型<sup>[3]</sup>。

最近的研究表明, GAPDH 除了参与糖酵解的功能外, 还是一个多功能酶, 它在生命系统中有着各种不同的功能。在哺乳类动物中, GAPDH 与胞吞<sup>[4]</sup>, 微管成束<sup>[5]</sup>, 核 RNA 的输出<sup>[6]</sup>, 神经细胞的程序性凋亡<sup>[7]</sup>, DNA 复制和 DNA 的修复有关<sup>[8-9]</sup>, 调节端粒结构<sup>[10]</sup>。在寄生虫中, GAPDH 的含量非常丰富<sup>[11]</sup>, 有研究将曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 的 *gapdh* 基因进行了克

隆并进行了免疫原性鉴定, 证明其具有潜在的疫苗价值<sup>[12]</sup>。有关 GAPDH 的报道多数集中在农作物、哺乳类、昆虫类和寄生虫类。目前仅能在 GenBank 中搜索到甲壳类 *gapdh* 基因序列, 其基因表达与功能研究尚未见诸报道。

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 梭子蟹科 (Portunidae), 青蟹属 (*Scylla*), 其肉质细嫩鲜美, 营养丰富, 商品价值高, 且个体大、生长快、适应性较强, 是我国东南沿海重要的海洋经济蟹类之一<sup>[13]</sup>。本研究采用 RACE 技术首次得到拟穴青蟹 *gapdh* 基因全长 cDNA 序列, 实时荧光定量 PCR 方法检测其在各个组织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。

### 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, 挑选活性好、附肢健全的雌性个体, 甲壳

收稿日期: 2012-08-29

修回日期: 2012-10-22

资助项目: 国家自然科学基金项目 (40406030, 41076081, 31272632)

通信作者: 叶海辉, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

长度为 6.2 ~ 8.8 cm, 体质量为 150 ~ 420 g, 实验室暂养 1 d。

**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); SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Application Kit (Clontech 公司); DNase I、RNase、LA Taq<sup>®</sup>、dNTPs、pMD19-T、DNA Marker、SYBR Green I (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** 根据 GenBank 中已知物种的 *gapdh* 的基因序列和对应的蛋白质序列, 通过 Clustal X 比对, 在 *gapdh* 基因的保守区域设计了简并引物 spF 和 spR, 用于扩增拟穴青蟹 *gapdh* 基因片段。根据已获得的 *gapdh* 基因片段, 设计 RACE 特异性引物 (表 1), 以得到该基因全长 cDNA 序列。然后根据得到的全长 cDNA 序列, 设计荧光定量引物 spQF 和 spQR (表 1)。

表 1 引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers in different experiment

引物的作用 primer function	引物 primer	引物序列(5'→3') primer sequence
简并引物 degenerate primer	spF	GYGTCATTVAYCTBRKCAAR
	spR	TYSWHSRTRYRCRGTGTGGT
3'RACE 特异引物 3'RACE primer	sp3F	ATGCATGGCGGCCTAAATGGGAT
5'RACE 特异引物 3'RACE primer	sp5R	TGTGGTAAGACCTTGTGAACACC
RACE 试剂盒提供的引物 3' and 5' RACE outer primer	3'RACE primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
	5'RACE primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
荧光定量引物 real-time PCR	spQF	AATGCCATCACAATAGAAAAATC
	spQR	GGAACAATCAACTACCACACC
$\beta$ -actin 定量引物 $\beta$ -actin primer	$\beta$ -actin-F	GAGCGAGAAATCGTTCGTGAC
	$\beta$ -actin-R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG

**拟穴青蟹总 RNA 的抽提和 cDNA 第一链的合成** 取拟穴青蟹卵巢组织, 参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明提取总 RNA。以紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及纯度, 取 1  $\mu$ g 总 RNA, 参照 Fermentas 的 RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明, 反转录成 cDNA 模板, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

***gapdh* 基因全长 cDNA 的克隆** 使用简并引物 spF 和 spR, 以上述 cDNA 为模板, 扩增 *gapdh* 基因片段。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T (TaKaRa) 载体连接, 转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 于含有 Amp 的 LB 平板上培养 14 h, 挑取单克隆菌落, 接种于含 Amp 的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序。该序列经 BLAST 比对后, 确定是拟穴青蟹 *gapdh* 基因。根据设计的 RACE 引物 (表 1), 用 Clontech 公司的 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Application Kit, 参照试剂盒的说明书, 获得

cDNA 3' 端序列与 5' 端序列。

***gapdh* 基因 cDNA 全序列分析** 将获得的拟穴青蟹 *gapdh* 基因全长 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>) 寻找开放阅读框并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的物理参数; SignalP 3.0 server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽; 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<sup>[14]</sup> 对相应 *gapdh* 基因的 ORF 进行比对, 然后用 MEGA 5 软件<sup>[15]</sup>, 基于邻位相接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

*gapdh* 基因的表达量分析 参照 Trizol (Invitrogen)说明书提取拟穴青蟹发育早期各组织(肝胰腺、眼柄神经节、脑神经节、胸神经团、卵巢、血淋巴、心脏、肌肉、胃、表皮、鳃)以及不同发育期的卵巢组织的总 RNA,卵巢发育分期参照上官步敏等<sup>[16]</sup>,分为未发育期、发育早期、发育期、将成熟期、成熟期共 5 期。用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)试剂盒合成单链 cDNA 用于荧光定量表达分析。使用荧光定量引物 spQR 和 spQF(表 1),以上述 cDNA 为模板,扩增 *gapdh* 基因片段。荧光定量 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L:2  $\times$  SYBR® Premix Ex Taq™ 10  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 荧光定量引物各 0.8  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 6.4  $\mu$ L 双蒸水。每个样品设置 3 个重复,用  $\beta$ -肌动蛋白基因作内参,均一化各样品 cDNA 用量的差异,引物为  $\beta$ -actinF 和  $\beta$ -actinR (表 1)。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 热变性 30 s;94  $^{\circ}$ C 变性 10 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,45 个循环,之后进行溶解曲线检测。通过标准曲线的制作来检测实时荧光定量 PCR 引物的特异性和实验的可靠性。

数据统计 使用拟穴青蟹  $\beta$ -肌动蛋白基因作为内参基因进行数据分析。采用相对定量的方法,参照公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算 *gapdh* 基因的相对表达量。数据表示为平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD),每组 3 个重复。采用 Excel 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 拟穴青蟹 *gapdh* 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析

通过设计的简并引物 spF 和 spR,以拟穴青蟹卵巢 cDNA 为模板扩增得到一个 cDNA 片段,测序后在 GenBank 数据库中进行对比,发现该序列与其他物种的 *gapdh* 序列显示了较高的相似性,基本确认为拟穴青蟹 *gapdh* 基因序列。基于该片段设计 RACE 引物进行 5'和 3'末端扩增,得到 5'末端序列和 3'末端序列,最后拼接得到一条完整的 cDNA 序列。BLAST 比对发现该序列与其他物种的 *gapdh* 序列同样显示了较高的同源性,从而确定为拟穴青蟹 *gapdh* cDNA 序列,

GenBank 登录号为 JX268543。其全长为 1 440 bp,ORF 长度为 1 008 bp,包含起始密码子 ATG,终止密码子 TAA,5'UTR 为 54 bp,3'UTR 为 378 bp,含有 11 bp 的 poly(A)尾,在 poly(A)上游 16 bp 处可见单一的加尾信号序列 AATAAA(图 1)。3'UTR 含有丰富的 AU 序列,含量为 58.2%。

预测拟穴青蟹 GAPDH 由 335 个氨基酸残基组成,其中带负电荷氨基酸残基(Asp + Glu)39 个,带正电荷氨基酸残基(Arg + Lys)38 个,推测分子量约为 35.817 1 ku,理论等电点 *pI* 为 6.60,预测其在体外的不稳定指数 (instability index) 为 22.53,为较稳定蛋白质。信号肽预测结果显示无信号肽,蛋白质亚细胞定位为细胞质(56.5%)。

通过 NCBI 的 BlastP 比对分析,发现 GAPDH 具有 2 个保守区域(图 2):其中保守区 Gp-dh-C 是行使糖运输和代谢的催化功能域;另一个保守区是 Gp-dh-N,为 NAD<sup>+</sup> 结合功能域。这与其他物种的 GAPDH 结构域分析相一致。

### 2.2 拟穴青蟹 *gapdh* 基因序列同源性分析

将拟穴青蟹 GAPDH cDNA 序列推导的氨基酸与其他物种的同源蛋白在 Clustal X 中进行多序列比对分析,结果显示:拟穴青蟹 *gapdh* 基因序列与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、美洲大蠊 (*Periplaneta americana*)、小峰雄蜂 (*Bombus terrestris*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、人 (*Homo sapiens*) 的相似率分别为 98%、93%、80%、79%、74% 和 74%。图 3 是用 Clustal X 对实验所得拟穴青蟹的氨基酸序列与已有的其他一些物种进行对比后,以 MEGA 的邻位相接法构建的系统进化树。由图 3 可见,7 种甲壳类首先聚成一支,然后再和昆虫类聚成一支。

### 2.3 拟穴青蟹 *gapdh* 基因的表达分析

*gapdh* 基因在各组织中的表达 依据实验所得拟穴青蟹 *gapdh* 基因 cDNA 序列设计特异引物 spQF 和 spQR,利用荧光定量 PCR 技术检测 *gapdh* 基因在拟穴青蟹不同组织中的表达情况。结果显示,*gapdh* 在所检测的 11 个组织(肝胰腺、眼柄神经节、脑神经节、胸神经团、卵巢、血淋巴、心脏、肌肉、胃、表皮、鳃)中均有表达,且在胸神经团、眼柄神经节、卵巢、表皮中表达量较高,而在肝胰腺、血淋巴、肌肉、胃中表达量较低(图 4)。

```

AGACACACCAGAGTGATATTCCTCTTGCATCACCTCACCAACTCCAACACCAACATGTCC 60
                                                                 M S 2
AAGATCGGTATCAACGGATTGGCCGCATCGGTCGTCTGGTACTTCGTGCTGCTGCTG 120
K I G I N G F G R I G R L V L R A A L L 22
AAAGGCGCCGAGGTTGTGGCTGTGAATGATCCTTTCATTGCCCTGGACTACATGGTTAC 180
K G A E V V A V N D P F I A L D Y M V Y 42
ATGTTCAAGTATGACTCCACCCATGGCGTGTACAAGGGTGAGGTGAAGCAGAGGATGGA 240
M F K Y D S T H G V Y K G E V K A E D G 62
GCTCTGGTTGTGATGGCCACAAGATTACTGTATACAATGAGATGAAGCCTGAGAACATT 300
A L V V D G H K I T V Y N E M K P E N I 82
CCATGGAGCAAGGCTGGCGCTGAGTATGTTGTGGAGTCTACTGGCGTGTCCACCACATC 360
P W S K A G A E Y V V E S T G V F T T I 102
GAGAAGGCTCTGCCACTTCACTGGCGGTGCCAAGAAGGTGATCATCTCTGCTCCCTCG 420
E K A S A H F T G G A K K V I I S A P S 122
GCTGATGCACCCATGTTGTGTGTGTGAATTTGGAGAAGTACTCTAAGGACATGAAG 480
A D A P M F V C G V N L E K Y S K D M K 142
GTGGTCTCAATGCCTCCTGCACCACCACTGCCTGGCACCAGTTGCCAAGTACTTCAT 540
V V S N A S C T T N C L A P V A K V L H 162
GACAACTTTGAGATTGTCCAGGCTCATGACCACTATTGATGCTGTTACTGCCACCCAG 600
D N F E I V Q G L M T T I H A V T A T Q 182
AAGACTGTTGATGGGCTCTGCTAAGGACTGGCGTGGTGGCCGTGGTGTGCACAGAAC 660
K T V D G P S A K D W R G G R G A A Q N 202
ATCATCCATCCTCCACTGGTCCGCTAAGGCTGTAGGCAAGGTCACTCTGAGCTGAAC 720
I I P S S T G A A K A V G K V I P E L N 222
GGAAAGCTTACTGGCATGGCCTCCGTGTCCCTACCCCTGATGTGTCGGTGGTGGACCTG 780
G K L T G M A F R V P T P D V S V V D L 242
ACTTGCACTTGGGCAAGGATTGCTCTTATGATGATATCAAGGCTGCCATGAAGGCTGCT 840
T C I L G K D C S Y D D I K A A M K A A 262
GCTGAGGTCCTCAAGGCTGCTGGGCTACACTGAGGATGATGTTGTCTCCTGTGAC 900
A E G P L K G V L G Y T E D D V V S C D 282
TTTACTGGAGATGAGAGGTCTCAATCTTGTGATGCCAAGGCTGGAATTCAGCTGAGCAAG 960
F T G D E R S S I F D A K A G I Q L S K 302
ACTTTTGTCAAGGTAGTTTCTGGTATGATAACGAGTTTGGCTATTCCAACGTGTCATT 1020
T F V K V V S W Y D N E F G Y S N R V I 322
GATCTTATCAAGCAGATCTACGCAAGGTGGATGGCGCTAAGGTGTTCAAGGTCTTA 1080
D L I K H D L R K V D G A * 335
CCACATGGAGGGCTGGGAATGACAGCGGCATGCATGGCGGCCTAAATGGGATTTAAACC 1140
TAAGCCCACTAGATGTGAACAATGTAAGTGCCTTCTGTACATTAAGTTATGCTAAAT 1200
TATAATGCCATCACAATAGAAAAATCACCTTACAGGTGCAGGAAGAACTTGACACAGGAG 1260
TTTAAGGCTGAATGGGTGAGTCCTTGGGTCGCGGTGGTGTAGTGTGATTGTTCTCTGTT 1320
GGTGTCACTTGGTTAGTGAGGCTAGTCTCTGTGGTGAATTTTGTCTTGTAAATGATG 1380
TTTATTTGACTGCAAGAGAAACGATAATGGCCAATAAAAAATGTTACAAAAAAAAAAAA 1440

```

图 1 拟穴青蟹 *gapdh* 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

\* 代表终止密码子; 实线所示为简并引物; 虚线所示为 5' 和 3' 引物; 实框所示为加尾信号。

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

The stop codon is marked by an asterisk; degenerate primer pairs are marked with solid lines; 3' primer and 5' primer are marked with dashed lines; the polyadenylation signal(AATAAA) is enclosed by a black rectangle.

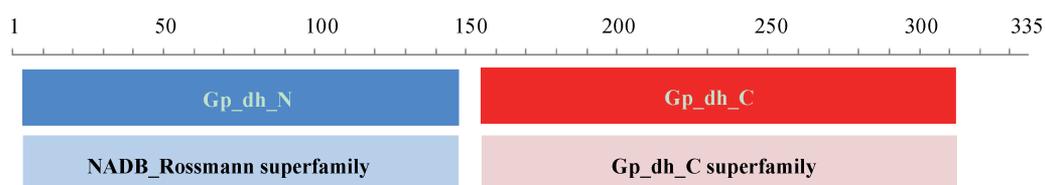


图 2 蛋白序列结构功能域预测

Fig.2 Prediction of the protein structure and function domain

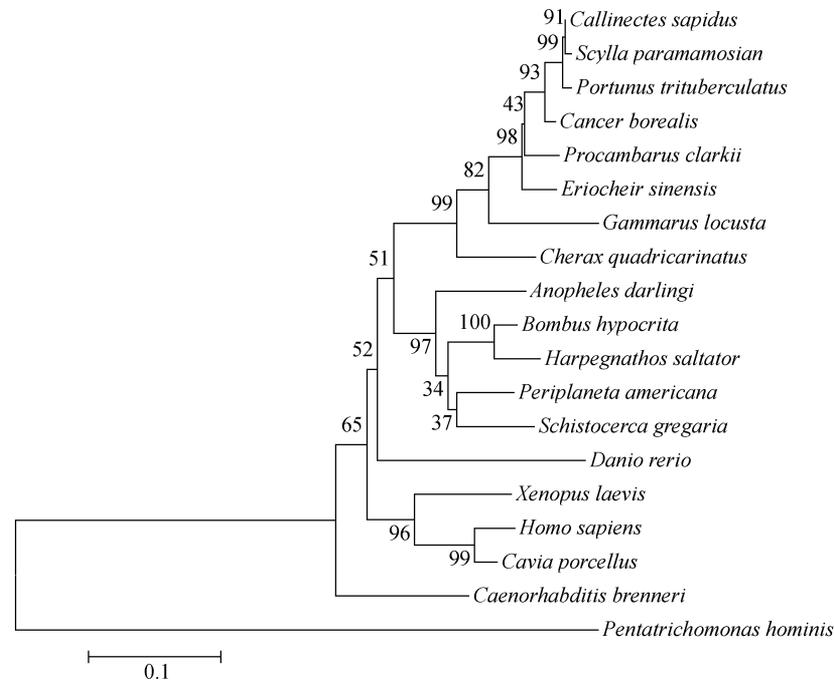


图 3 基于 NJ 法构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogram based on Neighbor-Joining method

*Callinectes sapidus*: 美味优游蟹 (AAS02313); *Scylla paramamosian*: 拟穴青蟹 (JX268543); *Portunus trituberculatus*: 三疣梭子蟹 (ACK56132); *Cancer borealis*: 北方黄道蟹 (ADK25704); *Procambarus clarkii*: 克氏原螯虾 (BAC77082); *Eriocheir sinensis*: 中华绒螯蟹 (ADH43624); *Gammarus locusta*: 湖钩虾 (CAQ60115); *Cherax quadricarinatus*: 红螯螯虾 (AAR96458); *Anopheles darlingi*: 按蚊 (EFR24892); *Bombus hypocrita*: 小峰雄蜂 (AEO51762); *Harpegnathos saltator*: 印度跳蚁 (EFN79503); *Periplaneta americana*: 美洲大蠊 (AEM75021); *Schistocerca gregaria*: 沙漠蝗虫 (AEV89765); *Danio rerio*: 斑马鱼 (AAW28030.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾 (NP-001080567); *Homo sapiens*: 人 (NP-001243728); *Cavia porcellus*: 天竺鼠 (NP-001166422); *Caenorhabditis brenneri*: 秀丽隐杆线虫 (ACE00300.1); *Pentatrachomonas hominis*: 人五鞭毛滴虫 (AEA30122)

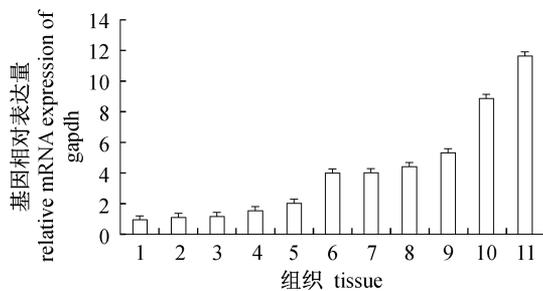


图 4 拟穴青蟹 gapdh 基因在成体组织中的表达

1. 胃; 2. 肌肉; 3. 血淋巴; 4. 肝胰腺; 5. 鳃; 6. 心脏; 7. 脑神经节; 8. 眼柄神经节; 9. 卵巢; 10. 表皮; 11. 胸神经团。

Fig. 4 Expression of gapdh mRNA in adult tissues of *S. paramamosian*

1. stomach; 2. muscle; 3. hemocyte; 4. hepatopancreas; 5. gills; 6. heart; 7. brain; 8. eyestalk ganglia; 9. ovary; 10. epidermis; 11. thoracic ganglia.

*gapdh* 在卵巢发育过程中的表达 为了检测不同卵巢发育时期 *gapdh* 的表达量,提取了拟穴青蟹未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和

成熟期的卵巢总 RNA。荧光定量 PCR 结果显示, *gapdh* 在发育早期( II 期)表达量最高,在成熟期( V 期)表达量最低(图 5)。

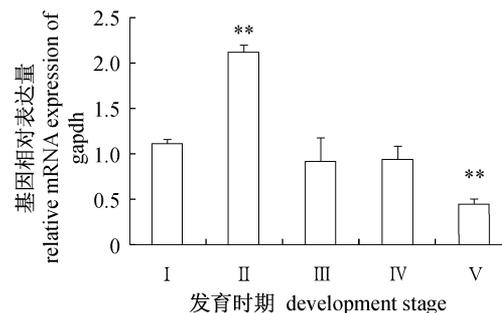


图 5 拟穴青蟹 gapdh 基因在各卵巢发育期的表达

I. 未发育期; II. 发育早期; III. 发育期; IV. 将成熟期; V. 成熟期。

Fig. 5 Expression of gapdh mRNA at different ovarian development stages of *S. paramamosian*

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

### 3 讨论

本研究通过 RACE 技术获得了拟穴青蟹 *gapdh* cDNA 序列,全长为 1 440 bp (GenBank 登录号: JX268543),包括 54 bp 的 5'UTR,78 bp 的 3'UTR 和 1 008 bp 的 ORF,共编码 335 个氨基酸序列,其中 3'UTR 具有丰富的 AU 区域。有研究报告 GAPDH 能结合 mRNA 的 3'末端富含 AU 区域,说明 GAPDH 具有调节 RNA 的作用<sup>[17]</sup>。目前已知 GAPDH 含有 2 个保守结构域:一个是 NAD<sup>+</sup> 结合区,该区与许多 NAD<sup>+</sup> 特异性脱氢酶相应区域的氨基酸序列极为相似;另一个结构域为催化功能区<sup>[18]</sup>。拟穴青蟹 GAPDH 的生物信息学分析表明,拟穴青蟹 GAPDH 蛋白同样具有完整的 N 端 NAD(P)结合功能与和 C 端糖类运输和代谢催化功能区域,与其他物种 GAPDH 结构相似。GAPDH 的 NAD<sup>+</sup> 结合域已被证明也是一个 RNA 识别模序<sup>[19]</sup>。最近发现 GAPDH 还具有剪切 RNA 的作用<sup>[20]</sup>,上述结果表明 GAPDH 的功能还有待更一步的研究。

经 BlastP 分析发现,GAPDH 的氨基酸序列在不同物种间具有较高的同源性,其中拟穴青蟹与三疣梭子蟹、美味优游蟹的 GAPDH 的同源性高达 98%,据此可推断该序列编码的蛋白质即为拟穴青蟹 GAPDH 蛋白。GAPDH 被认为是研究物种进化与分类的分子模型<sup>[21]</sup>,本研究所建系统进化树中,甲壳类和昆虫类聚为一支,可见 GAPDH 能够较好反映节肢动物门各物种间的亲缘关系。

相对定量 PCR 需要采用内参来确定目标基因的相对表达量,目前大多数的内参采用管家基因如  $\beta$ -肌动蛋白、GAPDH、18S rRNA 等<sup>[22-23]</sup>。最近研究表明  $\beta$ -肌动蛋白在拟穴青蟹不同组织器官中的表达基本一致,具有良好的稳定性,适合作为研究组织表达的内参<sup>[24]</sup>。然而,越来越多的研究者发现 *gapdh* 基因的表达水平并不稳定,利用其作为内参来定量并不准确<sup>[25-26]</sup>。本研究利用荧光定量 PCR 技术对拟穴青蟹不同器官中的 *gapdh* 进行了定量分析,发现 *gapdh* 所检测的 11 个组织(肝胰腺、眼柄神经节、卵巢、血淋巴、心脏、肌肉、胃、表皮、鳃、脑神经节、胸神经团)中均有表达,且在胸神经团、眼柄神经节、卵巢、表皮中表达量较高,而在肝胰腺、血淋巴、肌肉、胃中表达量较低。该结果表明,拟穴青蟹 *gapdh* 在各组织之间的表达水平存在

明显差异,不符合作内参的要求。

迄今,有关甲壳类卵巢发育的分子机制了解尚少<sup>[27]</sup>,*gapdh* 基因在甲壳类卵巢发育过程中的表达尚未见诸报道。为了探究 GAPDH 在拟穴青蟹卵巢发育过程中的调控作用,我们对 *gapdh* mRNA 表达量进行了分析。结果显示,*gapdh* mRNA 的表达水平在卵巢发育阶段波动较大并表现出一定的规律性:随着发育逐渐上升,到发育早期(II期卵巢)达到高峰,然后开始有所下降,到了成熟期(V期)表达量降到最低。拟穴青蟹I期卵巢为未发育期,卵原细胞出于相对静息状态;II期卵巢的发育特点为出现大量卵原细胞,处在活跃增殖状态,卵母细胞开始形成并进行减数分裂和卵黄发生前的准备;III和IV期分别主要进行初级卵黄发生和次级卵黄发生;V期卵巢已经完成卵黄发生,卵子达到生理成熟阶段<sup>[16,28]</sup>。已有研究表明,GAPDH 具有参与 DNA 复制、微管形成等与细胞分裂相关的作用<sup>[5,8-9]</sup>。II期卵巢 *gapdh* 基因表达量高,推测其可能参与了拟穴青蟹卵巢中 DNA 复制与卵原细胞的增殖分裂。III期之后卵巢卵母细胞不再进行细胞分裂和增殖活动,因此III、IV期 *gapdh* 基因表达量下降,至第V期降到最低值。拟穴青蟹 *gapdh* 基因的表达特点,提示 GAPDH 的主要功能是参与卵巢内的细胞分裂增殖,而对卵黄发生过程中的营养积累没有显著影响。有关 GAPDH 在拟穴青蟹卵巢发育过程中的作用机制仍需进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学(下册)[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,2002:74-75.
- [2] Viscoqliosi E, Muller M. Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates[J]. Journal of Molecular Evolution, 1998, 47(2): 190-199.
- [3] Berry M D, Boulton A A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis[J]. Journal of Neuroscience Research, 2000, 60(2): 150-154.
- [4] Robbins A B, Oliver C, Ward R D. A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in cho cells[J]. Journal of Cell Biology, 1995, 30(5): 1093-1104.
- [5] Hiromichi K, Hikoichi S. A porcine brain protein (35K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Journal of Biochemistry, 1983, 93

- (5):1259 - 1269.
- [ 6 ] Zang W Q, Fieno A M, Grant R A, *et al.* Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element [ J ]. *Virology*, 1998, 248 ( 1 ): 46 - 52.
- [ 7 ] Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, *et al.* Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture [ J ]. *Journal of Neurochemistry*, 1996, 66 ( 3 ): 928 - 935.
- [ 8 ] Baxi M D, Vishwanatha J K. Uracil DNA-glycosylase/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an Ap4A binding protein [ J ]. *Biochemistry*, 1995, 34 ( 30 ): 9700 - 9707.
- [ 9 ] Vollberg T M, Siegler K M, Cool B L, *et al.* Isolation and characterization of the human uracil DNA glycosylase gene [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86 ( 22 ): 8693 - 8697.
- [ 10 ] Sundararaj K P, Wood R E, Ponnusamy S, *et al.* Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase [ J ]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 ( 7 ): 6152 - 6162.
- [ 11 ] 王琴美, 王鸣杰, 常惠玲. 日本血吸虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶的分离和纯化 [ J ]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1994, 12 ( 4 ): 262 - 264.
- [ 12 ] Yang H W, Yong T S, Lee J H, *et al.* Characterization of two glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase genes in *Giardia lamblia* [ J ]. *Parasitology Research*, 2002, 88 ( 7 ): 646 - 650.
- [ 13 ] 林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成 [ J ]. *水产学报*, 2007, 31 ( 2 ): 211 - 219.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 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.
- [ 17 ] Nagy E, Rigby W F. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD<sup>+</sup>-binding region ( Rossamann fold ) [ J ]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 ( 6 ): 2755 - 2763.
- [ 18 ] 肖川, 刘晓菲, 詹树萱, 等. 水稻甘油醛-3-磷酸脱氢酶 cDNA 结构分析和分子进化 [ J ]. *自然科学进展*, 1998, 8 ( 4 ): 411 - 419.
- [ 19 ] Nagy E, Henics T, Eckert M, *et al.* Identification of the NAD<sup>+</sup>-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA binding domain [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275 ( 2 ): 253 - 260.
- [ 20 ] Evguenieva-Hackenberg E, Schiltz E, Klug G. Dehydrogenases from all three domains of life cleave RNA [ J ]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 ( 48 ): 46145 - 46150.
- [ 21 ] 宋时英, 郭剑, 李军, 等. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶结构的保守性 [ J ]. *生物物理学报*, 1998, 14 ( 3 ): 401 - 406.
- [ 22 ] Saur D, Vanderwinden J M, Seidler B, *et al.* Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 ( 6 ): 1662 - 1667.
- [ 23 ] Deane E E, Kelly S P, Luk J C Y, *et al.* Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream [ J ]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4 ( 2 ): 193 - 205.
- [ 24 ] 黄静茹, 黄辉洋, 叶海辉, 等. 拟穴青蟹  $\beta$ -肌动蛋白基因的克隆与分析 [ J ]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2012, 51 ( 2 ): 274 - 279.
- [ 25 ] Slagboom P E, De Leeuw W J F, Vijg J, *et al.* Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and  $\beta$ -actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging [ J ]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1990, 53 ( 3 ): 243 - 257.
- [ 26 ] Moe T K, Ziliang J, Barathi A, *et al.* Differential expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( GAPDH ),  $\beta$ -actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase ( HPRT ) in postnatal rabbit sclera [ J ]. *Current Eye Research*, 2001, 23 ( 1 ): 44 - 50.
- [ 27 ] 解银洁, 黄辉洋, 叶海辉, 等. 拟穴青蟹卵泡抑素相关蛋白基因的克隆和表达分析 [ J ]. *水产学报*, 2012, 36 ( 8 ): 1201 - 1208.
- [ 28 ] 颜素芬, 李少菁, 上官步敏. 锯缘青蟹卵母细胞的卵黄发生 [ J ]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 1995, 34 ( 3 ): 430 - 436.

## Cloning and expression analysis of the glyceraldehyde-3-phosphatede hydrogenase in the mud crab (*Scylla paramamosain*)

FU Chunru, YE Haihui\*, CHEN Xuelei, HUANG Huiyang, LI Shaojing  
(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Glyceraldehyde-3-phosphatede hydrogenase (GAPDH) is one of the basic enzymes that maintain the life activities. In this paper, *gapdh* gene was isolated from the mud crab, *Scylla paramamosain* using RT-PCR and RACE methods. The obtained full-length cDNA of GAPDH was 1 440 bp with an open reading frame of 1 008 bp encoding a putative peptide of 335 amino acids. By alignment, the amino acid sequence of *S. paramamosain* GAPDH showed high homology with those of some other animals. It suggested *gapdh* was highly conservative. Real-time PCR showed that the *gapdh* gene was expressed in various tissues, and highly expressed in thoracic ganglia, eyestalk ganglia, ovary and epidermis. During the ovarian development, the expression of *gapdh* mRNA was significantly higher at early-developing stage ( II stage) and lowest at ripe stage ( V stage). It indicated that GAPDH might play an important role in cell mitosis in ovary of the mud crab.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; GAPDH; gene cloning; real-time RT-PCR; ovarian development

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