

杂色鲍 *14-3-3 ζ* 基因的克隆及其在应激下的表达

张 鑫, 黄贻涛, 蔡秀红, 张子平, 王国栋, 邹志华, 王淑红, 王艺磊*

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 酪氨酸 3-加单氧酶/色氨酸 5-加单氧酶激活蛋白 ζ (14-3-3 ζ 蛋白) 是 14-3-3 蛋白家族的亚型之一。14-3-3 蛋白是一种高度保守的酸性可溶性蛋白, 它可以与激酶、磷酸酶等多种信号蛋白结合, 并在信号转导和细胞凋亡等过程中发挥相应的作用。本实验通过 SMART-RACE 技术首次获得了杂色鲍 *14-3-3 ζ* 基因的全长, 并命名为 *Hdl4-3-3 ζ* , 其 cDNA 全长为 3 010 bp, ORF 为 819 bp, 共编码 272 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 结果显示, *Hdl4-3-3 ζ* 基因在杂色鲍各组织中均有表达, 其中在肝胰腺和血细胞中的表达量相对较高。当处于缺氧环境下时, 鳃组织中 *Hdl4-3-3 ζ* 的表达在 4 h 时存在显著差异, 血细胞中 *Hdl4-3-3 ζ* 在 24 h 和 96 h 时表达量显著上调。高温应激下, *Hdl4-3-3 ζ* 在血细胞中的表达量无显著变化, 而鳃组织中 *Hdl4-3-3 ζ* 在 96 h 的表达量却显著上调。高温缺氧联合应激实验表明, 鳃组织中 *Hdl4-3-3 ζ* 在 4 h、24 h 和 96 h 均显著上调, 而血细胞中的表达量没有显著性变化。经检测发现, 副溶血弧菌注射后, 鳃组织中 *Hdl4-3-3 ζ* 在 3 h 和 24 h, 血细胞中在 6 h 和 24 h 的表达量显著上调。以上温度、溶氧量等环境因素以及病原菌的刺激均会导致 *Hdl4-3-3 ζ* 在不同组织中表达量的显著变化, 说明 *Hdl4-3-3 ζ* 在杂色鲍的免疫反应中可能扮演着重要的角色。

关键词: 杂色鲍; *14-3-3 ζ* 基因; 高温应激; 缺氧诱导; 高温缺氧联合应激; 副溶血弧菌

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 又称九子螺、九孔鲍, 是一种海生软体动物, 属于腹足纲 (Gastropoda) 鲍科 (Haliotidae) 的单壳海生贝类。由于该品种肉质鲜美, 并且具有生长速度快、对生长条件要求不高等优点, 现已成为我国东南沿海鲍科中最重要的经济养殖种类之一^[1]。近年来, 由于人类在沿海活动的日益频繁, 使得海洋环境发生了很大的变化。尤其到了夏季, 水体温度较高而溶氧量却相对较低, 造成了杂色鲍的大量死亡^[2], 对鲍鱼养殖业的健康发展产生较大的影响。

14-3-3 蛋白家族是一种在所有真核生物细胞中均有表达的, 并且在进化上比较保守的酸性调节蛋白^[3], 分子量约为 28 ~ 33 ku, 等电点为 4 ~ 5^[4]。最早它是在对牛脑神经元蛋白电泳时分离出来, 并根据它们的迁移位置命名^[5]。在哺乳动

物中, 该家族共有 7 个亚型—— $\beta, \gamma, \epsilon, \eta, \sigma, \tau, \zeta$, 它们分别由不同的基因编码^[6]。在通常情况下, 14-3-3 蛋白以同源或异源二聚体的形式存在于细胞质中^[6], 并且可以通过与多种信号蛋白分子, 如: 激酶、磷酸酶、膜转移受体等的结合而起到调节靶蛋白与别的结合蛋白或两个靶蛋白之间的相互作用, 从而增强或抑制靶蛋白的催化活性, 并由此来发挥稳定相邻区的构象、促进底物间的连接以及产物形成的作用^[7-8]。

作为 14-3-3 蛋白家族的亚型之一, 14-3-3 ζ 在软体动物中尚未有相关文献报道, 目前的研究主要集中在高等动物的细胞凋亡方面。通过已有的对 14-3-3 ζ 蛋白的研究, 可以知道该蛋白在细胞的信号转导、细胞的增殖与凋亡、细胞周期调控以及免疫防御等过程中均发挥了重要的调节作用^[9]。

收稿日期: 2014-01-28 修回日期: 2014-03-04

资助项目: 国家自然科学基金(41006105, 41176152); 集美大学创新团队基金(2010A001)

通信作者: 王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

Nomura 等^[10]的研究表明, BAX 作为一种调控细胞凋亡的蛋白, 可以与 14-3-3 ζ 结合来直接抑制细胞的凋亡。Subramanian 等^[11]的研究则表明, 14-3-3 ζ 同样可以与已经被磷酸化的促凋亡因子 BAD 结合, 以阻止 BAD 与 Bcl-2 和 Bcl-XL 的结合, 从而对细胞凋亡发挥间接的抑制作用。另外, Fanger 等^[12]研究发现, 14-3-3 ζ 可以通过与 MEKK1 的结合, 从而参与到 MAPK 信号通路中, 并通过抑制 Caspase-3 的作用来抑制细胞凋亡。不仅如此, 14-3-3 ζ 被证明同样可以参与到 PI3Kinase-Akt 信号通路中, 该通路中, MDM2 由于与 14-3-3 ζ 的结合而磷酸化, 从而使 p53 蛋白在蛋白水平被降解, 并由此导致 p53 诱导的细胞凋亡过程被抑制^[13]。

在本实验室已有的杂色鲍转录组测序结果数据库的基础上, 本实验筛选到了 14-3-3 ζ 的同源片段, 并由此首次克隆到了杂色鲍 14-3-3 ζ 的 cDNA 全序列, 命名为 *Hd14-3-3 ζ* 。同时, 利用生物信息学的方法, 对该序列进行了相关的功能分析以及蛋白质结构的预测。

另外, 为进一步探明 14-3-3 ζ 在杂色鲍应对外界刺激时的作用机制, 本实验不仅利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法对 *Hd14-3-3 ζ* 在各组织中的表达谱进行了分析, 同时也分析了该基因在高温 ($T_m = 31\text{ }^\circ\text{C}$)、缺氧 (DO = 2 mg/L)、高温缺氧联合应激 ($T_m = 30\text{ }^\circ\text{C}$, DO = 4 mg/L) 及副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 注射之后的多个时相在血细胞和鳃中的表达情况, 旨在为进一步

揭示杂色鲍在高温、缺氧、高温缺氧联合应激以及弧菌感染下的机体免疫机制提供一些重要的参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 实验所需杂色鲍均购自福建漳浦市宏运鲍鱼厂, 体长 (6.10 ± 0.50) cm, 体质量 (18.70 ± 2.50) g, 分批暂养于本实验室 (25 ± 1.50) $^\circ\text{C}$ 的海水循环系统中, 每日晚间投喂海带 1 次, 10 d 后用于实验。

菌种 副溶血弧菌菌种以及大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均为本实验室保种。

试剂 提取总 RNA 的 RDP 试剂由本实验室自己配制, 逆转录所用 M-MLV 酶购自 Promega 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物公司, pMD19-T 连接试剂盒购于宝生物 (大连) 公司, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自 Promega 公司。

引物 根据 SMARTII Oligonucleotide, 运用 Primer 5.0 软件设计 UPM 和 NUP 接头引物, 利用从本实验室依托上海众信生物技术有限公司完成的杂色鲍转录组 EST 数据库中获得的 14-3-3 ζ 基因的部分 cDNA 序列, 设计特异性 RACE 引物来获取全长, 随后, 根据 *Hd14-3-3 ζ* 全长 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物和 head to toe 引物。以上引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成 (表 1)。

表 1 主要引物及其序列
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequence
5'-RACE outer Primer	GTCCTAATCTGATGGGATGGGTTGG
5'-RACE inner Primer	GCTCCTCTCCACTTTGGCACGGTA
3'-RACE outer Primer	GGAGAAATGGGTGAACAGCAAG
3'-RACE inner Primer	CCTACAGTCTTCACTCAGCCTTGC
UPM (Universal Primer Mix)	Long: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT Short: CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP (Nested Universal primer)	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
5'CDS primer*	(T)25VN
3'CDS primer*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN
SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
head primer	ATGGGTACTGAAAAACAGAAGT
toe primer	TCAATTCTGTTCTTGTGTTTCAC
<i>Hd14-3-3ζ</i> RT-F	CGTTCTGCATGGAGGGTCAT
<i>Hd14-3-3ζ</i> RT-R	AGTCCAACACTTCCTCGCAG
β -actin-F	CCGTGACCTTACAGACTACCT
β -actin-R	TACCAGCGGATTCCATAC

* N = A, C, G, 或 T; V = A, G, 或 C

1.2 实验方法

杂色鲍高温应激、缺氧应激、副溶血弧菌感染实验 参考文献[14]的方法,实验组与对照组的杂色鲍均各取 8 只,分别取血淋巴和鳃组织,将离心后得到的血细胞保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱;鳃组织部分保存于 RNA later 中,部分保存于液氮中,用于 RNA 的提取。

高温缺氧联合应激实验 依据刘贤德^[15]和游伟伟^[16]等已报道的鲍的生长温度及 Ivanina 等^[17]已经利用太平洋牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 进行的缺氧相关实验方法设计高温缺氧联合应激实验的预实验方案;对照组水温设定在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,正常曝气。实验组预实验方案一:将联合应激实验组的反应条件设定为温度 $T_m = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶氧量 $\text{DO} = 2\text{ mg/L}$ 。结果,在 24 h 之内,投放的 20 只鲍全部死亡;预实验方案二:将溶氧量 DO 调至 4 mg/L ,即反应条件为 $T_m = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{DO} = 4\text{ mg/L}$,到 96 h 时,鲍鱼共死亡 12 只,死亡率已超过 50%;预实验方案三:将温度降至 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{DO} = 4\text{ mg/L}$ 。该阶段起始时,鲍鱼的活力整体上均有所下降,摄食量也随之减少。随着时间的推移,存活的个体活力有所恢复,至 96 h,共死亡 7 只,死亡率约为 35%。综合以上观察结果,最终选定联合应激实验的反应条件为 $T_m = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及 $\text{DO} = 4\text{ mg/L}$ 。联合应激实验开始阶段,实验组先将水体溶氧量调至 4 mg/L ,温度从 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开始,按照 $1\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ 进行升温,当温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时作为第 1 时相(0 h),随后,实验组温度维持在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,并依次在 4、24、96 和 192 h 进行取样,并以此作为第 2 时相、第 3 时相、第 4 时相和第 5 时相。实验组与对照组的杂色鲍各 8 只,分别取血淋巴和鳃组织,将离心后得到的血细胞保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱;鳃组织部分保存于 RNA later 中,部分保存于液氮中,用于 RNA 的提取。

总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 杂色鲍鳃和血细胞的总 RNA 的提取根据本实验室自制的 RDP 试剂的常规使用方法进行^[18]。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的总 RNA 的完整性,并同时使用微量分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的值以及 RNA 的浓度。cDNA 的合成按照逆转录试剂盒的具体说明严格操作。逆转录过程中使用的一些引物:UPM、NUP、5' CDS primer、3' CDS primer 以及 SMART II 见表 1。

***Hd14-3-3ζ* 基因 cDNA 全长的克隆** 利用 Primer 5.0 软件,根据从本实验室的杂色鲍转录组测序所获得的 EST 序列中筛选出的 *Hd14-3-3ζ* 基因片段,设计特异引物。使用 SMART-RACE 的方法扩增得到基因的全长 cDNA 序列,并用 head to toe 引物对其 ORF(open reading frame)的准确性进行验证。

***Hd14-3-3ζ* 的生物信息学分析** 本实验首先使用 NCBI 中的 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscren/>) 对测序结果进行去载体处理,然后分别使用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 等工具验证所得序列是否为目的基因并进行序列的拼接以及开放阅读框的确定。使用 ExpASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测蛋白的等电点及分子量。序列中可能存在的信号肽序列通过 SingalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行查询。磷酸化位点以及糖基化位点分别使用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 以及 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 进行预测。通过 The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 进行蛋白质二级结构的预测,同时使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三级结构的预测。序列的多重比对通过 BioEdit 软件进行,随后使用 MEGA 5.0 软件完成系统进化树的构建。

***Hd14-3-3ζ* 基因在杂色鲍各组织及不同应激条件下的表达** 实时荧光定量 PCR 使用的模板 cDNA 使用随机引物逆转录合成,同时,以 β -actin 作为内参基因(内参基因的引物序列见表 1)。qRT-PCR 采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体系: $10\text{ }\mu\text{L}$ SYBR Green Realtime PCR Master Mix (购自 Promega 公司), $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 *Hd14-3-3ζ* Forward Primer 和 Reverse Primer(表 1)各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,cDNA 模板 $9\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,45 个循环($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min)。每个时相取 5 个样品进行分析,并根据仪器分析得出的 C_t 值计算 RQ 值即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,随后利用 SPSS 20.0 和 Microsoft Office 2010 软件对所得数据进行分析与作图,显

著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *Hdl4-3-3ζ* 基因的克隆与序列分析

通过 RACE 的方法获得了 *Hdl4-3-3ζ* 的 cDNA 全长为 3 010 bp, 其中, 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 为 84 bp, 3' UTR 为

2 107 bp 以及 819 bp 的 ORF。该基因共编码 272 个氨基酸。经预测, 蛋白质的分子量为 30.6 ku, 等电点为 5.06。通过 SingaIP 的分析可知, 该基因不含信号肽序列。通过生物信息学分析可知, 本段序列共含有 8 个丝氨酸磷酸化位点、3 个苏氨酸磷酸化位点、6 个酪氨酸磷酸化位点以及 3 个糖基化位点(图 1)。

```

1 GGGCCCGCCATCCGCCATTTGAAGCAGTTCTGATAATTTCTGCTGCCGAAGTTGAAAC 60
61 TTAACATTGCCAAAGAGTGCAAAatgggtactgaaaacagaagttgtcgaagca 120
1 M G T E K Q K F V E K A 12
121 aaaatagctgaacaagctgaaaggtatgatgacatggcagcagcgatgaacagtgctg 180
13 K I A E Q A E R Y D D M A A A M K Q C V 32
181 gagtctgcacagcaagacatctgacattcttaccacaggaagaaacttgctatcc 240
33 E C C T G K T S D I L T N E E R N L L S 52
241 gtggcatacaaaaatgctggttggtgcacgccgttctgcatggagggtcatttagtagt 300
53 V A Y K N V V G A R R S A W R V I S S I 72
301 gaacagaaagtgatgagcagggagggaaggtgcagaaagaaagcaaggatggctaaa 360
73 E Q K G D M A G G E G A E R K Q G M A K 92
361 aactaccgtgcaaaagtgaagaggagctgagtaaatctgcaggaagtgttgacttg 420
93 N Y R A K V E E E L S K I C E E V L D L 112
421 ctagataaacacttaattcccagacgaaagaagattcttctgacagcaaggctagcaat 480
113 L D K H L I P Q T K E D S S D T K A S N 132
481 gctaaagacaacaagaatgatagtcgagctctctatataaagaaggggattactac 540
133 A K D N K N D S R V F Y M K M K G D Y Y 152
541 cggctacttggtgaagtcagggtaggagaaaaaggcagataatgacaaaagtctgaa 600
153 R Y L A E V R V G E K R A D I V Q K S E 172
601 catgcttatcaggaagcaaacgcagcggctgcagcgaataaggccaaccatccatc 660
173 H A Y Q E A N A T A A A K M E P T H P I 192
661 agattaggactgctctgaacttctctgtattttactatgaaattgccacaatccagaa 720
193 R L G L A L N F S V F Y Y E I A N N P E 212
721 aagcttgtcaattagegaaatctgcatttgatgatgcgattgccatgttagatacatt 780
213 K A C Q L A K S A F D D A I A M L D T L 232
781 tcagaagctcttataagatagcattgataatgcagcttctcagagataaccttacg 840
233 S E E S Y K D S T L I M Q L L R D N L T 252
841 ctgtggacctctgatgcacaaggggacgatggagaaatgggtgaacagcaagaacagaat 900
253 L W T S D A Q G D D G E M G E Q Q E Q N 272
901 tgaGACAGATCCAGCCTAGCTTGTGGCCGCTGCAGCTGCTGCTGCCAGTGGCTTGA 960
*
961 GGAGGGAAGGTGGCTGGGAGGGGAGGTAGTGGTACTGCAGCGCACATACTCTGATGGA 1020
1021 CATTAAGACAAGACATGCAGACAGATAGACAGTTGTTGGTTGCCATCTCAGGCACTGCA 1080
1081 GGATCCATCGCCATTTAGGATTGATTTCGTTGATCATTGCGTTGGTCACTTTTATACAGCA 1140
1141 GACAGTCAAGTCAATGTCAATTTATCCATGTACGCTGATAACTAAGAATATGTCATGG 1200
1201 TTCAATTGAGATAAACTTGAGGTGAAATGATTACTGTGCCAGGCTTTGTGAAACAGAAA 1260
1261 ATGGAACGAAAGTGTATCTGATGTGGAATCTTTTTTATCTCTGCAGCGCTACATCT 1320
1321 CATGTGTCTATTCTTGATGTGAATCCATCGTCAACCGTCACTACTGATCCTACAGTCTTC 1380
1381 ACTCAGCCTTGACATACATACTTACATACATACTTATCTACAATAATTAGTACAACATTGC 1440
1441 AGCTGACAGGTAGAACATGGTCAGATTGCATTGATGATGATGGTGTGATGAAGATAGCC 1500
1501 CAGAAATTATTCATTAATGTATGTAATCTGTATTACCAAGTTGAACTGGCAACTTGTT 1560
1561 AACTTCTCCTTATTTTCCTTTGTTGCTAGAGCTGTTGATAAATGGTCACCTGAGTT 1620
1621 TTGGATTGGAACAAACAGAAAAAGTGTATATATGTTATTGTGTATGTTGTACTCCTT 1680
1681 TTAGTATTCTAGTCTATCGTAGTTATCCACTACTGGCGTAAGTACATAGTAGTTTCCCC 1740
1741 TGTAATCTCAGAATCTTGTGGTGTGATGCATCGTCTATCTTCCAAGTATGCAAGCT 1800
1801 GCTCTGTAAATCTATCATTATTGATATTATTGTGGCACTTAAATAATAATAATGAA 1860
1861 ATTGACAACATGTGTTAAGCATTGTTGAACATAGGGTCAGTTTGTAAATTAGATAGAA 1920
1921 ATTGAAAATACCTTCTAAACAGAAGCATGCTTTACCAAAAATACACTATTAGCCCTACAT 1980

```

```

1981 AACATAGATACATATTCATTGTATGTATTACTTACAAGGATGATGCAGTTATT 2040
2041 ATGCAGACTGCAGCTACTTTTTGTGAACACTATTGGCAGAATCTACTTATTCATGAGT 2100
2101 GGTGGGTATTTGATTACCAATCAGTGAAGTTATTACCAAGTGTGCTCTTCTGATGA 2160
2161 AGTCATTTGTTTGTATGTCAGAGATGCACAGAAGTGTAGTGATCAGCTTAAGTTT 2220
2221 TATACTTTCCCTGTCTCTTCATTTAATGCCAGAAAAGGCAGGTTAAGCTGTTGCCTT 2280
2281 GTGAATTTGATTGTGGTAAATGTGTTGCTACATGTGCTTGACATCTCTGTTATTT 2340
2341 TGTCCCCTCCAATCTGTGACTGCTGGCATATAAAGCAATATGTGTTGGATCCACACAGT 2400
2401 ATGCCCCCTTCTGGTGAGATCAGACAAGACCAATGTTTCATCAGTTTACAGTCAAGGCTGT 2460
2461 TTTGAAAATTTCCCTGAACAAATTAGTAAGGACCAAGAATTTTAGTCCCTCTTCTTG 2520
2521 TTTGTGCCAGCCCTTGATAATAATGTCCAACAAACCAGACCTTGTGTTGCTGTGTGC 2580
2581 ACTTTACTTGTACTATGTCCTAGACATGAGATGAATATCTGCTTGTGTTGCCACCCAAA 2640
2641 TGTAGGACCGAAATCAACTAATAAAATGCTTTAGCCTGTCATATGCTGGGGAACACCA 2700
2701 TCATGGGTACAACCAAGATACTTTCATGACATCACAGCTAAAATGGCTTTGCTTGGATT 2760
2761 GTTATTATCTGTGTAGTCAGTGTGTCATTGCTGTTGCCATTGTTGACTTTATGTTGAT 2820
2821 AACTGTTGTCAGATCGGAAGCTTTGTCATAACTGGAAGCGACTAGCAGATCTATTTAAG 2880
2881 ACTTTATTAATTAAGATGCTGTATGCTGGAGTAGCGAAGTTTGTAGAGGGGTACTCAATA 2940
2941 ATGCTGATACGGTTATACTGTTGGATAAAGCATTGGCATGTACCAATATAAAAAAAA 3000
3001 AAAAAAAAAA 3010

```

图 1 杂色鲍 *Hd14-3-3ζ* 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

5'和3'非编码区序列分别用大写英文字母表示,编码区序列用小写字母代表;编码区内,上方所示为核苷酸序列,下面对应的是所编码的氨基酸序列;起始密码子(atg)用波浪线标出,终止密码子(tga)作加粗处理;灰色底纹部分标示的是11个 α -螺旋;双下划线标注的为3个糖基化位点;8个丝氨酸磷酸化位点用方框标示;3个苏氨酸磷酸化位点用箭头指出;6个酪氨酸磷酸化位点用圆圈标示;加尾信号用单下划线来标示

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Hd14-3-3ζ* gene from *H. diversicolor*

The sequence of 5' and 3' untranslated region are represented by capital letters separately. The coding sequence are represented by lowercase letters, with nucleotide sequence above and coded amino sequence below. The initiation codon (atg) and the stop codon (tga) are all characterized in bold. 11 α -helix are colored in gray. 3 glycosylation sites are double underlined. 8 serine phosphorylation site are marked by box. 3 phosphorylation site of threonine are marked by arrow. 6 tyrosine phosphorylation site are marked by circle. The polyadenylation signal sequence (AATAA) is underlined

2.2 *Hd14-3-3ζ* 空间结构模拟

采用 The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench 中的 PSIPRED v3.3 对 *Hd14-3-3ζ* 的二级结构进行预测,结果显示,该蛋白共含有 11 个 α -螺旋(图 1)。通过 SWISS-MODEL 软件的同源建模,将 *Hd14-3-3ζ* 蛋白序列与软件搜索得到的模板(PDB code: 1qjbB)进行人工配联,以 *Hd14-3-3ζ* 推导的氨基酸序列构建其三维结构(图 2)。

2.3 编码 *14-3-3ζ* 蛋白序列的多重比对以及系统进化树的构建

将推导得到的 *Hd14-3-3ζ* 的氨基酸序列与别的物种的 *14-3-3ζ* 蛋白进行多重序列比对,结果表明,*14-3-3ζ* 编码的蛋白虽然具有很高的保守性,但编码的氨基酸的长度却存在一定差异(图 3)。另外,通过 Blast 分析可知,杂色鲍 *14-3-3ζ* 蛋白与昆虫纲(Insecta)的家蚕(*Bombyx mori*)的 *14-3-3ζ* 蛋白相似性最高,达到了 68%。

根据已在 NCBI 上注册的 *14-3-3ζ* 基因的氨

基酸序列,采用 MEGA 5.0 软件,以 NJ 法构建了 16 种生物的系统进化树(图 4)。NJ 系统进化树结果显示:爬行类、哺乳类、鸟类、鱼类等与线虫和节肢动物具为一大支,而杂色鲍和同为软体动物的海蜗牛(*Aplysia californica*)单独聚为一大支。

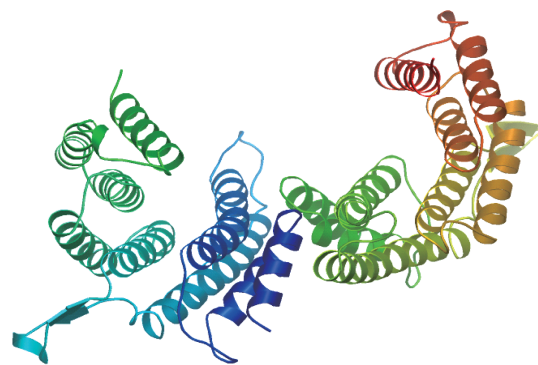
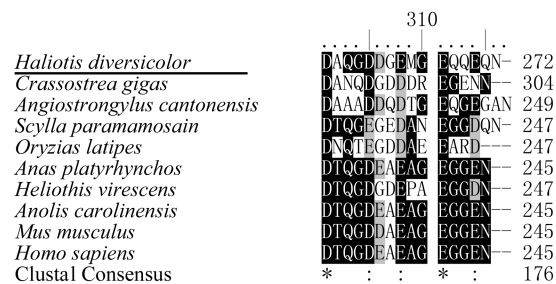
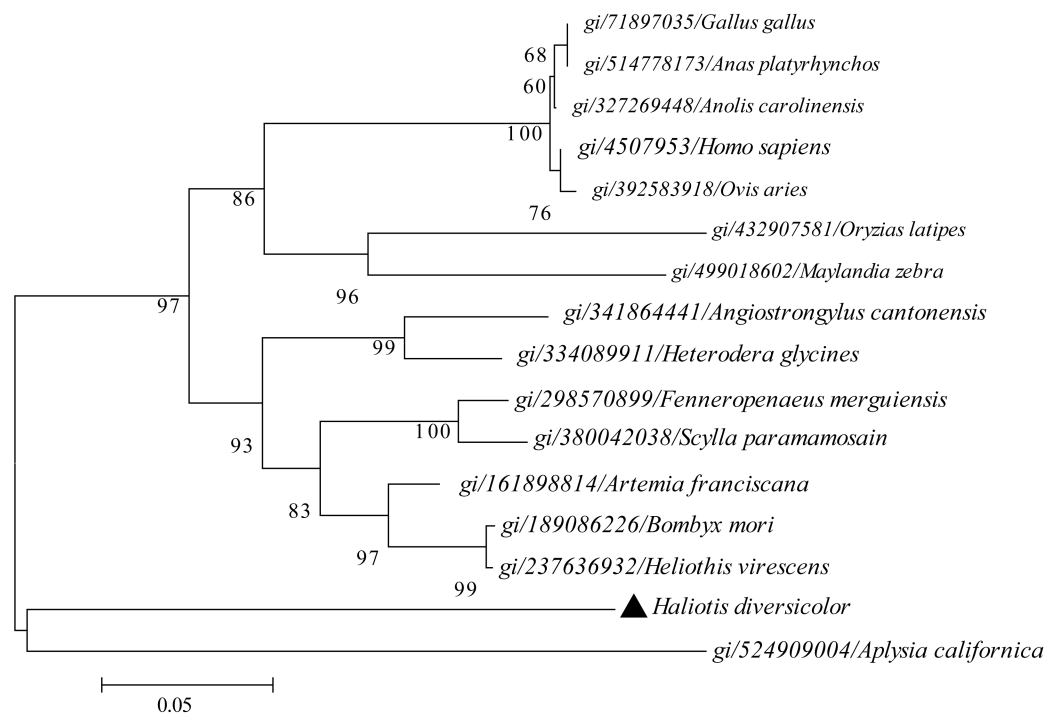


图 2 *Hd14-3-3ζ* 空间结构模拟

Fig. 2 The predicted three-dimensional structure of *Hd14-3-3ζ*

	10	20	30	40	50	
<i>Haliotis diversicolor</i>	-MGTEKQKQV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAAWK	QCVECCCTGKT	SDILTNEERN	49
<i>Crassostrea gigas</i>	-MSLSRBEFA	NKAKLAEQAE	RYDDMADAMK	KLVE---N	YKPLTNEERN	44
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	-MTDNRGELV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAQMVK	KVTE---L	GAELSNEERN	44
<i>Scylla paramamosain</i>	-MGDKBEQV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAAWK	QVTE---T	GVELSNEERN	43
<i>Oryzias latipes</i>	MSEAPQKDLV	QKAKLAEQAE	RYDDMATAMK	TVTE---D	SEQLSNEERN	45
<i>Anas platyrhynchos</i>	-MDKNELV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAQMVK	SVTE---Q	GAELSNEERN	42
<i>Heliothis virescens</i>	-MSVDEBELV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAAWK	EVTE---T	GVELSNEERN	44
<i>Anolis carolinensis</i>	-MDKNELV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAQMVK	SVTE---Q	GAELSNEERN	42
<i>Mus musculus</i>	-MDKNELV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAQMVK	SVTE---Q	GAELSNEERN	42
<i>Homo sapiens</i>	-MDKNELV	QKAKLAEQAE	RYDDMAAQMVK	SVTE---Q	GAELSNEERN	42
Clustal Consensus	27
	60	70	80	90	100	
<i>Haliotis diversicolor</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVI	SSIEQKGDMA	GGEGAEKQKQ	MAKNYRAKVF	99
<i>Crassostrea gigas</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVI	SSIEQK	DSSEKKQV	TASAYRRTKIT	89
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVI	SSIEQKT	EGSEKKQQ	MAKEYREKVF	89
<i>Scylla paramamosain</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVI	SSIEQKT	EGSEKQKQ	MAKEYREKVF	88
<i>Oryzias latipes</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVV	SSIEQKA	EGSDRKRK	MAQYREKTE	90
<i>Anas platyrhynchos</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVV	SSIEQKT	EGAEEKQQ	MAREYREKTE	87
<i>Heliothis virescens</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVI	SSIEQKT	EGSEKQKQ	MAKEYRQKVF	89
<i>Anolis carolinensis</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVV	SSIEQKT	EGAEEKQQ	MAREYREKTE	87
<i>Mus musculus</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVV	SSIEQKT	EGAEEKQQ	MAREYREKTE	87
<i>Homo sapiens</i>	LLSVAYKNVV	GARRSSWRVV	SSIEQKT	EGAEEKQQ	MAREYREKTE	87
Clustal Consensus	*****	*****	*****	64
	110	120	130	140	150	
<i>Haliotis diversicolor</i>	BELSKTCEEV	LGLLDKHLIP	QTKEDSSDTK	ASNAK		134
<i>Crassostrea gigas</i>	BELKNIENDV	LGLLEKYLID	EETMKKYKDA	AANNENTDMK	DSLVFYLMKM	139
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	KELRDIQDQV	LGLLDKFLIP	K	ACNP		114
<i>Scylla paramamosain</i>	TELRETIQDQV	LGLLDKFLIP	K	ASNP		113
<i>Oryzias latipes</i>	QELRDIQDQV	LGLLDKFLIP	K	ASTA		115
<i>Anas platyrhynchos</i>	TELRDIQDQV	LGLLEKFLIP	N	ASQA		112
<i>Heliothis virescens</i>	KELRETIQDQV	LGLLDKHLIP	K	ASNP		114
<i>Anolis carolinensis</i>	TELRDIQDQV	LGLLEKFLIP	N	ASQA		112
<i>Mus musculus</i>	TELRDIQDQV	LGLLEKFLIP	N	ASQP		112
<i>Homo sapiens</i>	TELRDIQDQV	LGLLEKFLIP	N	ASQA		112
Clustal Consensus	**..**.*	**..**.*	*	*	*	78
	160	170	180	190	200	
<i>Haliotis diversicolor</i>			DN	KNDSRVFYMK	MKGDYRYLA	156
<i>Crassostrea gigas</i>	GDYRYLAEV	STDEEKNSI	IKNDDNEKEK	DNESRVFYLK	MKGDYRYLA	189
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	132
<i>Scylla paramamosain</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	131
<i>Oryzias latipes</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	133
<i>Anas platyrhynchos</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	130
<i>Heliothis virescens</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	132
<i>Anolis carolinensis</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	130
<i>Mus musculus</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	130
<i>Homo sapiens</i>				ESKVFYLK	MKGDYRYLA	130
Clustal Consensus				*****	*****	96
	210	220	230	240	250	
<i>Haliotis diversicolor</i>	EVRYVEKRAD	LVQKSEHAYQ	EANATAAAKM	EPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	206
<i>Crassostrea gigas</i>	EVSDGEQYQA	VVKRSSEDAYK	EAVKNANDSM	APTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	239
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	EVACGEDRSS	VVEKRSQQSYQ	EAFDTAKDKM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	182
<i>Scylla paramamosain</i>	EVATGCVRAV	VYDSSQKSYQ	EAFDTAKSKM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	181
<i>Oryzias latipes</i>	EVASKEDKKG	ITGDSQAAYK	EAFEISKMEM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	183
<i>Anas platyrhynchos</i>	EVAAGDDKKG	IVEDSQQAYQ	EAFEISKKEM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	180
<i>Heliothis virescens</i>	EVATGETRNS	VVEDSQKAYQ	EAFEISKAKM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	182
<i>Anolis carolinensis</i>	EVAAGDDKKG	IVEDSQQAYQ	EAFEISKKEM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	180
<i>Mus musculus</i>	EVAAGDDKKG	IVEDSQQAYQ	EAFEISKKEM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	180
<i>Homo sapiens</i>	EVAAGDDKKG	IVEDSQQAYQ	EAFEISKKEM	QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	180
Clustal Consensus	**	..*	..*	*****	*****	128
	260	270	280	290	300	
<i>Haliotis diversicolor</i>	TANNPEKACQ	LAKSAFDDAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	256
<i>Crassostrea gigas</i>	IMNKPDEACK	LAKRAFDDAI	AELDTLNEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	289
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	ILNMPDKACQ	LAKQAFDDAI	AELDTLNEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	232
<i>Scylla paramamosain</i>	ILNSPDRACH	LAKQAFDDAI	AELDTLNEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	231
<i>Oryzias latipes</i>	ILNSPEKACQ	LAKQAFDDAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	233
<i>Anas platyrhynchos</i>	ILNSPEKACS	LAKTAFDDAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	230
<i>Heliothis virescens</i>	ILNSPDKACQ	LAKQAFDDAI	AELDTLNEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	232
<i>Anolis carolinensis</i>	ILNSPEKACS	LAKTAFDDAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	230
<i>Mus musculus</i>	ILNSPEKACS	LAKTAFDDAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	230
<i>Homo sapiens</i>	ILNSPEKACS	LAKTAFDDAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	230
Clustal Consensus	* * . * . *	*** ** . *	* * * * . *	*****	*****	171

图 3 *Hd14-3-3 ζ* 和其他物种 14-3-3 ζ 氨基酸序列的多重比较Fig. 3 Multiple alignment of the 14-3-3 ζ amino acid sequence between *H. diversicolor* and other species图 4 *Hd14-3-3 ζ* 和其他物种 14-3-3 ζ 氨基酸序列系统发育树Fig. 4 Phylogenetic tree of the 14-3-3 ζ amino acid sequences between *H. diversicolor* and other species

Gallus gallus 原鸡; *Anas platyrhynchos* 绿头鸭; *Anolis carolinensis* 安乐蜥; *Homo sapiens* 人类; *Ovis aries* 家绵羊; *Oryzias latipes* 青鳉; *Maylandia zebra* 斑马宫丽鱼; *Angiostrongylus cantonensis* 管圆线虫; *Heterodera glycines* 孢囊线虫; *Fenneropenaeus merguensis* 墨吉对虾; *Scylla paramamosain* 拟穴青蟹; *Artemia franciscana* 丰年虾; *Bombyx mori* 家蚕; *Heliothis virescens* 棉铃虫; *Haliotis diversicolor* 杂色鲍; *Aplysia californica* 海蜗牛

2.4 *Hd14-3-3 ζ* 基因在杂色鲍不同组织中的表达

以 β -actin 为内参基因,实时荧光定量 PCR 结果显示(图 5),*Hd14-3-3 ζ* 基因在杂色鲍各组织中均有表达,并且,在肝胰腺中的表达量显著高于除血细胞以外的其他各组织 ($P < 0.05$)。

2.5 杂色鲍 *Hd14-3-3 ζ* 基因在高温应激、缺氧诱导、高温缺氧联合应激以及弧菌感染后的表达

缺氧诱导条件下 *Hd14-3-3 ζ* 基因在杂色鲍血

细胞和鳃组织中的表达 在缺氧诱导条件下,鳃中 *Hd14-3-3 ζ* 的表达量在 4 h 时显著上调,在 24 h 时,表达量继续上升达到顶峰,随后,表达量下调,并在 192 h 时达到与对照组相同的水平(图 6-a)。在缺氧诱导的起始阶段,*Hd14-3-3 ζ* 在杂色鲍血细胞中的表达量虽有所上升,但与对照组相比不存在显著性差异,在 24 h 时,实验组的表达量显著上调,在 96 h 时,差异显著(图 6-b) ($P < 0.05$)。

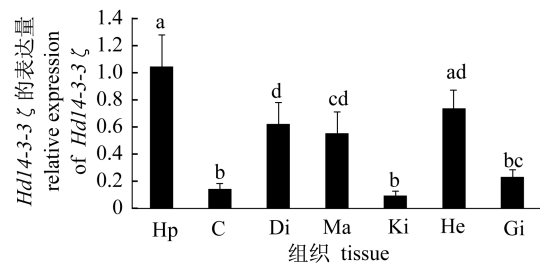


图5 *Hd14-3-3ζ* 基因在各组织器官的表达情况

Gi. 鳃; Hp. 肝胰腺; Ma. 外套膜; Ki. 肾; Di. 消化道; C. 黏液腺; He. 血淋巴

Fig. 5 Distribution pattern of *Hd14-3-3ζ* in different tissues of *H. diversicolor*

Gi. gill; Hp. hepatopancreas; Ma. mantle; Ki. kidney; Di. digestive tract; C. colleterial gland; He. haemocytes

高温应激条件下 *Hd14-3-3ζ* 基因在杂色鲍血细胞和鳃组织中的表达 高温应激开始阶段, *Hd14-3-3ζ* 在鳃中的表达量不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。直到 96 h 时, 表达量出现了显著性上调 (图 7-a)。在血细胞中, 整个应激阶段,

Hd14-3-3ζ 的表达量均不存在显著性差异 ($P > 0.05$) (图 7-b)。

高温缺氧联合应激条件下 *Hd14-3-3ζ* 基因在杂色鲍血细胞和鳃组织中的表达 高温缺氧联合应激条件下, 各时期内 *Hd14-3-3ζ* 在实验组鳃中的表达量均高于对照组, 并且在 4 h、24 h 和 96 h 时呈现出显著水平 (图 8-a) ($P < 0.05$)。在血细胞中, 各时期均未检测到显著性差异 ($P > 0.05$) (图 8-b)。

副溶血弧菌感染后 *Hd14-3-3ζ* 基因在杂色鲍血细胞和鳃组织中的表达 弧菌感染后, 杂色鲍鳃组织中 *Hd14-3-3ζ* 的表达量在 3 h 时达到最高, 并与对照组存在显著性差异。6 h 时恢复到与对照组相同的水平。随后, 在对照组中的表达量又开始上调, 到 24 h 时, 实验组中的表达量与对照组相比又再次达到了显著水平 (图 9-a) ($P < 0.05$)。在血细胞中, 6 h 时 *Hd14-3-3ζ* 的表达量显著上调。在 12 h 时, 表达量有所下调, 并恢复到正常水平。当达到 24 h 时, 表达量达到最高, 并表现出显著性差异 (图 9-b) ($P < 0.05$)。

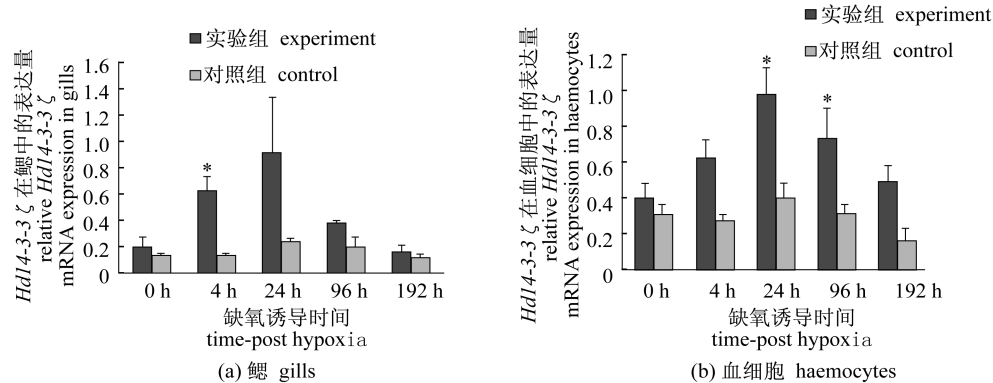


图6 缺氧诱导处理后各时期 *Hd14-3-3ζ* 在鳃及血细胞中的表达

* 表示与对照组差异显著 ($P < 0.05$), 以下注释同此

Fig. 6 The change of *Hd14-3-3ζ* after hypoxia stress in gill and haemocytes

* donates significant difference compared with control ($P < 0.05$), the same as the following

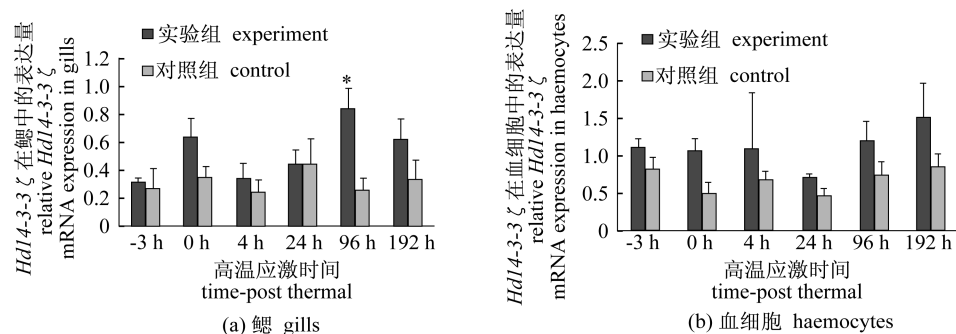
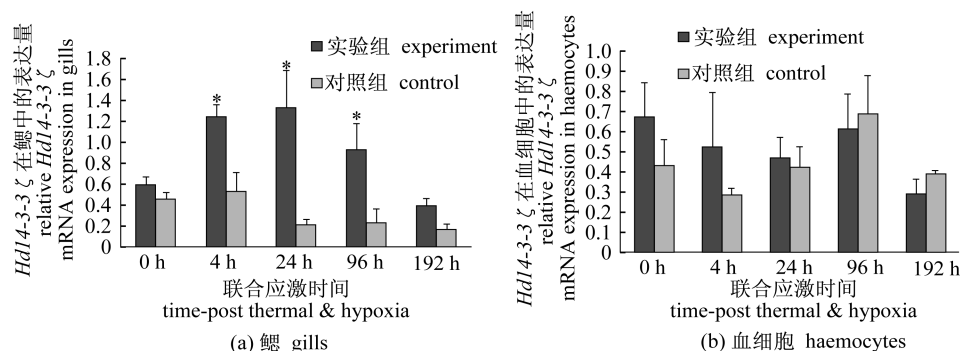
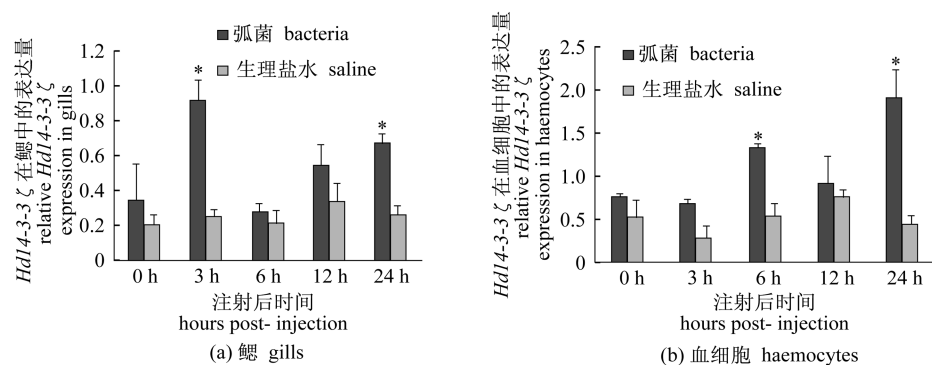


图7 高温应激处理后各时期 *Hd14-3-3ζ* 在鳃及血细胞中的表达

Fig. 7 The change of *Hd14-3-3ζ* after thermal stress in gill and haemocytes

图 8 联合应激处理后各时期 *Hd14-3-3 ζ* 在鳃及血细胞中的表达Fig. 8 The change of *Hd14-3-3 ζ* after thermal & hypoxia stress in gill and haemocytes图 9 副溶血弧菌感染后 *Hd14-3-3 ζ* 在鳃及血细胞中的表达Fig. 9 The change of *Hd14-3-3 ζ* after *V. parahaemolyticus* challenge in gill and haemocytes

3 讨论

14-3-3 蛋白是一种在进化上比较保守的酸性调节蛋白,分子量约为 28 ~ 33 ku,可以作为一种重要的调节因子参与到信号通路中。本实验首次成功克隆了杂色鲍 *Hd14-3-3 ζ* 基因的全序列,共编码 272 个氨基酸,二级结构预测结果显示其结构以 α -螺旋为主,未见 β -折叠。多重比对结果显示,不同物种中的 14-3-3 ζ 具有很高的相似性。杂色鲍 14-3-3 ζ 蛋白与家蚕的 14-3-3 ζ 蛋白相似性最高,达到了 68%,这也说明 14-3-3 ζ 蛋白在进化上是比较保守的。

大量研究表明,14-3-3 ζ 基因在生物体各组织中均有表达,Kaeodee 等^[19]和 Koskinen 等^[20]分别证明了 14-3-3 ζ 在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的各组织中均有表达。舒妙安等^[21]关于拟穴青蟹 14-3-3 ζ 基因的研究结果也表明,该基因在眼柄、肝胰腺、鳃、胃、肠、肌肉和心脏中均有表达,并且在肝胰腺中的表达量最高。在本实验中所检测的杂色鲍各组织

中,同样均有 14-3-3 ζ 基因的表达,并且同样在肝胰腺中的表达最高,血细胞其次。针对这一相似的结果,推测可能的原因是由于在软体动物和甲壳动物中均不含有免疫球蛋白,所以,血细胞就承担了保护机体的作用。血液循环将血细胞运输到身体各处,并借此来发挥免疫防御的功能。但由于血细胞自身不能进行有丝分裂,所以它们的更新和补充就必须由造血器官来完成。肝胰腺作为造血器官,无疑将在机体的免疫反应中扮演重要的角色。

通过实时荧光定量 PCR 技术,本实验首次报道了在应对不同环境因子的应激条件下 *Hd14-3-3 ζ* 的表达情况。结果表明,在缺氧诱导环境下杂色鲍鳃组织中的 *Hd14-3-3 ζ* 表达在开始阶段就显著上调,随后表达量虽有所下降但实验组中的表达量均要高于对照组。在血细胞中,24 h 时实验组才表现出显著性差异,到 96 h 时,这种差异依然存在。鳃是水生生物的主要呼吸器官,作为免疫第一道防线,当缺氧对机体产生刺激时, *Hd14-3-3 ζ* 在鳃中的迅速表达可能开启了机体对外界刺

激的免疫调控机制,之后,*Hd14-3-3 ζ* 在血细胞中的表达也被开启,从而引发整个机体对缺氧环境的应激机制。高温应激下,鳃组织中*Hd14-3-3 ζ* 的表达呈起伏状态,在96 h时才检测到显著性变化。产生这一现象的原因可能是在高温初始阶段,机体的免疫调节机制受到抑制,以使机体对外界温度的变化产生短暂的适应,随着持续高温环境的应激,这种抑制被解除,从而使*Hd14-3-3 ζ* 的表达在96 h显著上调以阻止细胞凋亡。在血细胞中,整个应激过程中*Hd14-3-3 ζ* 的表达都处于相对稳定状态,表明了血细胞中的*Hd14-3-3 ζ* 对温度的变化不敏感。高温缺氧联合应激实验结果显示,在鳃组织中,应激4 h、24 h和96 h时均检测到*Hd14-3-3 ζ* 的显著性变化,由此也可说明,该组织在高温和缺氧双重因子联合作用时*Hd14-3-3 ζ* 的免疫调节机能得到了更进一步的加强,从而使机体可以应对更加复杂的外界环境变化。在血细胞中,整个过程中双重环境因素的影响并未改变*Hd14-3-3 ζ* 的表达,表明*Hd14-3-3 ζ* 在血细胞中的表达对环境因子的依赖性相对较低。另外,副溶血弧菌注射后,*Hd14-3-3 ζ* 在血细胞和鳃组织中不同时期所表现出的显著上调现象,也充分表明了该基因在杂色鲍的机体免疫反应中扮演了重要的角色。但是,在以上环境因素的应激以及病菌感染后*Hd14-3-3 ζ* 的具体作用还不清楚,仍需更进一步研究。

参考文献:

- [1] Su T F. Research progress on germplasm resources in *Haliotis diversicolor* and *H. diversicolor aquatilis* [J]. South China Fisheries Science, 2006, 2 (2): 64 - 67. [苏天凤. 杂色鲍与九孔鲍种质资源研究进展. 南方水产, 2006, 2 (2): 64 - 67.]
- [2] Zhou J, Cai J P, Yang H Z. Isolation and characterization of vibrio alginolyticus as a pathogen to the massive mortality of abalone (*Haliotis diversicolor*) postlarve [J]. Transaction of Oceanology and Limnology, 2006 (3): 54 - 59. [周晶, 蔡俊鹏, 杨洪志. 南方杂色鲍苗大规模死亡病原菌的分离鉴定及其回归感染试验. 海洋湖沼通报, 2006 (3): 54 - 59.]
- [3] Shikano S, Coblitz B, Wu M, et al. 14-3-3 proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins [J]. Trends in Cell Biology, 2006, 16 (7): 370 - 375.
- [4] Zeng Y, Zheng Z H, Yang L. Advance in 14-3-3 proteins function [J]. Journal of Modern Oncology, 2008, 16 (7): 1236 - 1238. [曾妍, 郑志红, 杨磊. 14-3-3 蛋白功能研究进展. 现代肿瘤医学, 2008, 16 (7): 1236 - 1238.]
- [5] Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4 (9): 752 - 762.
- [6] Chaudhri M, Scarabel M, Aitken A. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 300 (3): 679 - 685.
- [7] Gardino A K, Yaffe M B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011, 22 (7): 688 - 695.
- [8] van Hemert M J, Steensma H Y, van Heusden G P H. 14-3-3 proteins; key regulators of cell division, signalling and apoptosis [J]. Bioessays, 2001, 23 (10): 936 - 946.
- [9] Fu H, Subramanian R R, Masters S C. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation [J]. Science Signaling, 2000, 40 (1): 617.
- [10] Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, et al. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (3): 2058 - 2065.
- [11] Subramanian R R, Masters S C, Zhang H, et al. Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis [J]. Experimental Cell Research, 2001, 271 (1): 142 - 151.
- [12] Fanger G R. 14-3-3 Proteins Interact with Specific MEK Kinases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (6): 3476 - 3483.
- [13] Danes C G, Wyszomierski S L, Lu J, et al. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling [J]. Cancer Research, 2008, 68 (6): 1760 - 1767.
- [14] Huang Y T, Cai X P, Zhang Z P, et al. Molecular cloning and expression of allograft inflammatory factor in *Haliotis diversicolor* under stresses [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37 (6): 830 - 839. [黄贻涛, 蔡秀红, 张子平, 等. 杂色鲍同种移植炎症因子1的克隆及其在应激下的表达. 水产学报, 2013, 37 (6): 830 - 839.]
- [15] Liu X D, Yan Y H, Wang Z Y, et al. A preliminary study on tolerance to high temperature and low salinity of *Haliotis diversicolor* Reeve [J]. Journal of

- Jimei University; Natural Science, 2008, 13(4): 13 - 15. [刘贤德, 闫玉华, 王志勇, 等. 杂色鲍对高温和低盐耐受力的初步研究. 集美大学学报: 自然科学版, 2008, 13(4): 13 - 15.]
- [16] You W W, Lin H Y, Luo X, *et al.* Effects of temperature on the growth rates and survival rates of *Haliotis diversicolor* among different populations [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2011, 30(4): 583 - 588. [游伟伟, 林焕阳, 骆轩, 等. 温度对杂色鲍不同群体生长率与存活率的影响. 台湾海峡, 2011, 30(4): 583 - 588.]
- [17] Ivanina A V, Kurochkin I O, Leamy L, *et al.* Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation [J]. Journal of Experimental Biology, 2012, 215(18): 3142 - 3154.
- [18] Wang Y L, Zhang Z P. The construction of full-length testis and ovary cDNA libraries of *Marsupenaeus japonicas* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2003, 28(2): 9 - 13. [王艺磊, 张子平. 日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建. 动物学杂志, 2003, 28(2): 9 - 13.]
- [19] Kaeodee M, Pongsomboon S, Tassanakajon A. Expression analysis and response of *Penaeus monodon* 14-3-3 genes to salinity stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 159(4): 244 - 251.
- [20] Koskinen H, Krasnov A, Rexroad C, *et al.* The 14-3-3 proteins in the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(19): 3361 - 3368.
- [21] 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. 水产学报, 2012, 36(8): 1193 - 1200.]

Molecular cloning and expression of *14-3-3 ζ* in *Haliotis diversicolor* under stresses

ZHANG Xin, HUANG Yitao, CAI Xiuhong, ZHANG Ziping,
WANG Guodong, ZOU Zhihua, WANG Shuhong, WANG Yilei*
(Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture,
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Tyrosine-3-monooxygenase/Tryp-tophane-5-monooxygenase activator protein (14-3-3 ζ protein) is one of the isoform of 14-3-3 proteins which are highly conserved small acidic proteins. Several studies have shown that 14-3-3 proteins can bind many signal proteins, such as kinase and phosphatase, and play crucial roles in many biological processes including regulation of signaling and cell apoptosis. In this study, the full length cDNA of *14-3-3 ζ* from *Haliotis diversicolor* was cloned for the first time by SMART-RACE and named *Hd14-3-3 ζ* . Its full-length cDNA sequence was 3 010 bp, with an open reading frame of 819 bp encoding a protein of 272 amino acids. The Real-time Quantitative PCR results showed that *Hd14-3-3 ζ* was detected in all examined tissues and with the highest expression level in hepatopancreas and haemocytes. When under the stress of hypoxia, the expression level of *Hd14-3-3 ζ* in haemocytes of exposed groups showed a significant up-regulation at 4 h, but in gill it happened at 24 h and 96 h. Under thermal stress, in haemocytes, it showed no significant difference between control and thermal groups but it was up-regulated significantly at 96 h in gill. Under thermal & hypoxia stresses, it showed no significant difference between control and exposed groups in haemocytes. However, in gill, it was up-regulated significantly at 4 h, 24 h and 96 h. After *Vibrio parahaemolyticus* challenge, the expression of *Hd14-3-3 ζ* reached a significant level at 6 h in haemocytes and reduced to the normal level at 12 h, and then reached the highest significant level at 24 h. In gill, the significant expression level appeared at 3 h and 24 h and there was no difference between other time phases. All these results indicate that *Hd14-3-3 ζ* may play important roles in immunoreaction of *H. diversicolor*.

Key words: *Haliotis diversicolor*; *14-3-3 ζ* gene; thermal stress; hypoxia stress; thermal & hypoxia stress; *Vibrio parahaemolyticus*

Corresponding author: WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn