

三疣梭子蟹 *AACT* 基因克隆及其在卵巢发育中的表达分析

王凤皎, 朱冬发*, 邱锡尔, 谭义川, 周彦琦, 柳志业, 谢 熙

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 乙酰 CoA 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 是甲羟戊酸途径的初始酶, 为了研究该酶在甲壳动物卵巢发育调控中的作用, 用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术, 克隆得到三疣梭子蟹 *AACT* (*Pt-AACT*) 的 cDNA 全长 (GenBank 登录号: KM033231)。这段序列全长 1 630 bp, 包括 1 个 101 bp 的 5' 端非编码区, 1 个 395 bp 的 3' 端非编码区和 1 个 1 134 bp 的开放阅读框, 编码 377 个氨基酸。对其氨基酸序列进行生物信息学预测, 发现 *Pt-AACT* 属于疏水性蛋白, 无跨膜结构域, 存在 2 个硫解酶特异性保守区。与其他已公布物种的 *AACT* 氨基酸序列进行比对, 发现与金小蜂、埃及伊蚊等同源性最高 (均为 72%)。系统进化树结果显示, *Pt-AACT* 与昆虫 *AACT* 聚为一支, 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 分析三疣梭子蟹 *AACT* 的组织表达差异及在卵巢发育中的表达变化, 结果表明 *AACT* 在大颚器中表达量最高, 在其余组织中表达量较低, 差异显著; 在卵巢发育 I 期表达量最高, 与其他期存在极显著差异。表明 *AACT* 可能在三疣梭子蟹卵巢发育中具有一定调控作用。

关键词: 三疣梭子蟹; 乙酰 CoA 酰基转移酶; 基因克隆; 卵巢发育; 表达水平

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*), 俗称白蟹, 隶属于软甲纲 (Malacostraca)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae)、梭子蟹属 (*Portunus*), 是我国重要的海产经济蟹类。与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[1] 类似, 三疣梭子蟹在人工养殖环境下也存在性早熟、卵巢发育不良等问题, 影响经济产值, 对三疣梭子蟹生长、发育和繁殖过程中内分泌调控机制的研究有利于此类问题的解决。

乙酰 CoA 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 是甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVD) 最初始步骤的起始酶, 其功能为催化 2 个乙酰 CoA 缩合成乙酰乙酰 CoA, 属于硫解酶 (thiolase) 家族^[2]。甲羟戊酸途径以乙酰辅酶 A 为原料合成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 和二甲烯丙基焦磷

酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP), 该产物可以看作是活化的异戊二烯单位, 作为前体物质参与萜类化合物、类固醇等的合成中, 几乎存在于所有高等真核生物中。在哺乳动物体内, 由甲羟戊酸途径生成的重要萜类产物是胆固醇^[3]; 在植物细胞质中, 主要依靠甲羟戊酸途径合成多种具有药理活性的萜类次生代谢物; 昆虫通过甲羟戊酸途径合成保幼激素 (juvenile hormone, JH) 等萜类物质^[4]。对于 AACT 的研究, 目前多见于植物、昆虫和哺乳动物等, 在甲壳动物方面还未见报道。

甲壳动物通过甲羟戊酸途径最终合成甲基法尼酯 (methyl farnesoate, MF)。MF 是一种类倍半萜激素, 与昆虫保幼激素 III (JH III) 在结构和功能上相似^[5]。根据现有报道, MF 很可能参与到甲壳动物的卵巢发育、蜕皮、幼体生长等生理活动的

收稿日期: 2014-12-31 修回日期: 2015-04-09

资助项目: 国家自然科学基金 (41376152); 浙江省自然科学基金 (LY13C190006)

通信作者: 朱冬发, E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn

调控中,是甲壳动物体内重要的内分泌调控因子^[6-8]。考虑到 *AACT* 是甲羟戊酸途径的起始酶,本研究以三疣梭子蟹为材料,进行 *AACT* 全长 cDNA 的克隆、组织差异性表达以及在卵巢发育周期中表达水平变化的分析。研究结果将有助于阐明 MF 在甲壳动物卵巢发育中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取处于蜕皮间期的雌性野生三疣梭子蟹(头胸甲宽:14.8~16.3 cm;体质量:166~254 g),暂养于宁波市宁海县得水育苗场,活体解剖取眼柄、胸神经节、卵巢、肝胰腺、大颚器、表皮和 Y-器用于组织表达差异分析。每种组织取 3 只蟹做平行,新鲜组织暂放于 RNA 保护液中,于 -20 °C 下保存。

从宁波镇海水产品市场购得雌性三疣梭子蟹,头胸甲宽(CW)12~18 cm;体质量(BW)90~335 g。根据吴旭干等^[9]的研究结果将三疣梭子蟹卵巢发育分为 6 期:发育初期(I 期)、发育加速期(II 期)、发育快速期(III 期)、发育旺盛期(IV 期)、发育成熟期(V 期)和抱卵期(VI 期)。取 I 至 V 期各期 MO 用于周期表达分析,每期各取 3 只雌蟹 MO 做平行。组织保存方法同上。

1.2 总 RNA 提取

将暂放于 RNA 保护液中的样品转移至 Trizol 溶液[生工生物工程(上海)有限公司]中,按说明书步骤分别提取总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用微量紫外分光光度计测量浓度和纯度。

1.3 三疣梭子蟹 *AACT* 的克隆及序列分析

cDNA 的合成 取 1 μg 总 RNA,按照 PrimeScript RT reagent Kit (perfect real time, TaKaRa) 试剂盒说明书反转录得到 cDNA;以 AP (表 1) 为接头引物,用上述相同的方法反转录得到用于 3'-RACE 扩增的 3'-cDNA;按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒方法步骤合成用于 5'-RACE 扩增的 5'-cDNA。所有 cDNA 均放置于 -20 °C 下保存。

RT-PCR 进行核心序列验证 根据转录组测序获得的三疣梭子蟹 *AACT* 的 EST 片段,用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 *AACT*-F 和 *AACT*-R(表 1)。以上一小节中制备的 cDNA 为模板,*AACT*-F 和 *AACT*-R 为上下游引物进行 PCR 扩增,总体系为 25 μL。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,34 个循环;72 °C 充分延伸 10 min,反应结束。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 Nucleotide sequences of primers used for PCR

| 引物 primer | 序列 sequence (5'→3') | 用途 usage |
|------------------|---|-------------|
| <i>AACT</i> -F | CGTCAGGGATGAAGTCGGT | RT-PCR |
| <i>AACT</i> -R | ATGGGGTCAGTAGCAGCGTC | RT-PCR |
| AP | TACCGTCGTTCCACTAGTGATTTCACTATAGG(T) ₁₇ | 3'-RACE |
| <i>AACT</i> 3-F1 | GGCACGCATTGTGGTTCA | 3'-RACE |
| <i>AACT</i> 3-F2 | ACTGACCCCATGACTTCCC | 3'-RACE |
| outer primer-3' | TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT | 3'-RACE |
| inner primer-3' | TCCACTAGTGATTTCACTATAGG | 3'-RACE |
| <i>AACT</i> 5-R1 | GCTGTTCCCGAGTAATGCC | 5'-RACE |
| <i>AACT</i> 5-R2 | CACTTCTTGATTCCTCGTCC | 5'-RACE |
| outer primer-5' | CTAATACGACTCACTATAGGGC | 5'-RACE |
| inner primer-5' | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | 5'-RACE |
| <i>AACT</i> -qF | CTCGCTACAGTGTCTGTAAGAA | qRT-PCR |
| <i>AACT</i> -qR | TCAGTACACCCAAGTAATGCC | qRT-PCR |
| actin-F | CGAAACCTTCAACTCCCG | qRT-PCR |
| actin-R | GATAGCGTGAGGAAGGGCATA | qRT-PCR |

三疣梭子蟹 *AACT* 的 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增 根据首轮 RT-PCR 的测序验证结果,设计特异性上游引物 AACT3-F1 和 AACT3-F2(表 1)用于 3'-RACE。以 3'-cDNA 为模板,以 AACT3-F1 和 AACT3-F2 为上游引物,以 outer primer-3'和 inner primer-3'为下游引物(表 1)进行巢氏 PCR,总体积为 25 μ L。第一轮 PCR 扩增以 3'-cDNA 为模板,以 AACT3-F1 和 outer primer-3'为上下游引物(表 1)进行 PCR,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第二轮 3'-RACE 扩增以第一轮产物为模板,AACT3-F2 和 inner primer-3'为一对引物,体系同上。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

设计特异性下游引物 AACT5-R1 和 AACT5-R2(表 1)用于 5'-RACE 扩增。以 5'-cDNA 为模板,以 outer primer-5'和 inner primer-5'为上游引物,AACT5-R1 和 AACT5-R2 为下游引物(表 1)进行巢氏 PCR。第一轮 PCR 扩增以 5'-cDNA 为模板,以 AACT5-R1 和 outer primer-5'为上下游引物(表 1)进行 PCR,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第二轮 5'-RACE 扩增以第一轮产物为模板,AACT5-R2 和 inner primer-5'为一对引物,体系同上。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物的克隆与测序 PCR 产物经琼脂糖电泳后,进行切胶回收,连接到 pMD18-T 载体,转化至 *E. coli* DH5 α 进行扩大培养,选取阳性克隆菌液送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

序列分析 测序结果均用 Vector NTI 10.0 软件进行分析与拼接,获得三疣梭子蟹 *AACT* 的 cDNA 全长序列。利用在线 ORF Finder 确定其开放阅读框(ORF)序列,使用生物软件网在线翻译成氨基酸序列,利用 ProtParam tool 在线分析软件对氨基酸序列进行蛋白预测;用 Signal 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测氨基酸信号肽序列;利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测氨基酸跨膜区域;利用 ClustalX 软件进行多

序列同源性比对,最后用 MEGA 4.0 软件的邻位法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

1.4 实时荧光定量 PCR

提取三疣梭子蟹各组织和卵巢发育周期样品中的总 RNA,反转录合成 cDNA。根据 *AACT* 的 cDNA 序列设计特异性荧光定量引物 AACT-qF 和 AACT-qR(表 1),以 β -actin 作为内参,内参基因表达稳定。运用实时荧光定量技术分析 *AACT* 在三疣梭子蟹不同组织和卵巢发育周期各期的时空表达差异。荧光定量 PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 5 s,57 $^{\circ}$ C 20 s,68 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,95 $^{\circ}$ C 15 s。用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析和处理。

2 结果

2.1 三疣梭子蟹 *AACT* 的 cDNA 全长与序列分析

将测序结果进行分析和拼接后获得总长为 1 630 bp 的 *AACT* 全长 cDNA 序列(图 1),GenBank 登录号:KM033231。5'端非编码区为 101 bp,3'端非编码区为 395 bp,开放阅读框(ORF)长度为 1 134 bp,编码 377 个氨基酸。采用 ProtParam tool 软件预测 *AACT* 分子式为 $C_{1717}H_{2788}N_{478}O_{530}S_{24}$,分子量大小约为 3.94 ku,理论等电点为 6.55,富含 Ala(13.5%)、Gly(10.6%)和 Val(10.3%)等。利用 SignalP 软件对编码区进行分析,未发现有信号肽,说明三疣梭子蟹 *AACT* 可能不属于分泌蛋白;其氨基酸疏水性总和(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 0.064,属于疏水性蛋白。在线 TMHMM 工具分析发现该氨基酸序列没有跨膜结构。

2.2 三疣梭子蟹 *AACT* 氨基酸多序列比对和系统进化树分析

在 NCBI 上将 *AACT* 编码区氨基酸序列进行 BLAST 搜索比对,未发现甲壳动物 *AACT* 基因的相关研究,与已公布的其他物种相比:与金小蜂(*Nasonia vitripennis*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和柑橘凤蝶(*Papilio xuthus*)*AACT* 氨基酸序列一致性最高,均为 72%;与部分昆虫和脊椎动物的 *AACT* 氨基酸序列进行比对发现:与山松甲虫(*Dendroctonus ponderosae*)、佛罗里达弓背蚁(*Camponotus floridanus*)、非洲蟾蜍(*Xenopus (Silurana) tropicalis*)和原鸡(*Gallus gallus*)等一致性分别为 71%、71%、71% 和 68%。

```

1      tggcggctgtgaggttaatccggcaagcacagagcggcgcggcggcgtactccacgggcc
61     ccctcaaggatgtggtcattgccagcgtgtcaggacgcc(ATGGGATCCTTCAGGTCTT
      1      M G S F R S S
121    CCCTGGCGTCCCTGCGTGCCCCTGAGCTTGGGGCTGTGGCAGTGAAGGCGCGGTGGAGA
      8      L A S L R A P E L G A V A V K A A V E R
181    GGGCCGGCATTGACCCAAGGCTGTGCAGGAGGTATACATGGGCAACGTGGTGACAGCTG
      28     A G I D P K A V Q E V Y M G N V V T A G
241    GGTCAGGTCAGGCCCCACCAGGCAGGTACCCTCTTGCCGGCCTTGACAAGTCCACCC
      48     S G Q A P T R Q V T L F A G L D K S T P
301    CGTGCACCACTATCAACAAGGTGTGTGCGTCAGGGATGAAGTCGGTGTATGATGGCATCGC
      68     C T T I N K V C A S G M K S V M M A S Q
361    AGGCCATCATGTGTGGCAGCCAGGAGGTGATGGTGGCGGGGGCATGGAGAGCATGAGTC
      88     A I M C G S Q E V M V A G G M E S M S Q
421    AGGTGCCATACTACATGCCAGGGGTGACACAGCATATGGCGGGTGAAGCTGCTGGACG
      108    V P Y Y M P R G D T A Y G G V K L L D G
481    GCATAGTGTGTTGACGGACTGACAGACGTGTACAACAAGATCCACATGGGCAACTGTGGAG
      128    I V F D G L T D V Y N K I H M G N C G E
541    AGAACACTGCAAAGAACTCGGCATTACTCGGGAACAGCAGGATGAGTATGCATTGGAGA
      148    N T A K K L G I T R E Q Q D E Y A L E S
601    GCTACAGGAGGTCAGCGGAGGCGTGAAGAGTGGAGCGATAAAGGAGGAGATAGTGGAGG
      168    Y R R S A E A W K S G A I K E E I V E V
661    TGACGATAAAGGGGAAGAGAGGGAAGCCAGACACAGCAGTAGTGGAGGACGAGGAATACA
      188    T I K G K R G K P D T A V V E D E E Y K
721    AGAAAGTGAATTTTGAGAAGTTTAAAGGTTGGCCACAGTTTTTCAGCGCGAGGGTGGCA
      208    K V N F E K F K K L A T V F Q R E G G T
781    CAGTGACAGCCGGCAACGCATCCACACTGAATGACGGAGCTGCAGCGTGTGTGTTGATGA
      228    V T A G N A S T L N D G A A A C V L M S
841    GTGCGGCGCAGCGGCGCACAGGGTGTCACTCCACTGGCCAGGGTGGTGGGGTTCTGTG
      248    A A A A A A Q G V T P L A R V V G F C D
901    ACGTGCTACTGACCCATTGACTTCCCATCGCTCCAGCCCTTGCTACGCCCTAAGCTGC
      268    A A T D P I D F P I A P A L A T P K L L
961    TGGAGATGACAGGGTTCGGGCAGAGGATGTGGCGCTGTGGGAGGTGAACGAGGCCTTCA
      288    E M T G V R A E D V A L W E V N E A F S
1021   GTGTGGTGGTGTGCGCAACATGAAGCTGTGTGACCTCGACCCAGCCAAGGTCAATGTGC
      308    V V V L A N M K L C D L D P A K V N V H
1081   ATGGTGGCGCTGTGCCCTCGCCATCTATTGGCATGTCCGGGACGCATTGTGGTTC
      328    G G A V S L G H P I G M S G A R I V V H
1141   ATCTGGCCACTCCCTCAAGCCTGGCCAGAAAGGGTGGCTCCATCTGCAACGGGGGAG
      348    L A H S L K P G Q K G V A S I C N G G G
1201   GAGGAGCGTCTGCCATCATGATAGAGAGGCTGTGAgtcttttggtagtgtctgagagaaag
      368    G A S A I M I E R L *
1261   agagagagagagaaggggtgagttagtgtgtgtatgtgtgcgtgatagatgagtggatag
1321   agagaggttactaaatgtgcaagacttactttacttcagtcacagtgccattagttagtc
1381   agtcaggtagcagagtgaacaaaagtattcgtatttgtattcataagtcacctcgtaca
1441   gtgtcgtaaagaagtattagtgtgagagagagagagaaagagagtgtgttatctgta
1501   gcagggtgtagtggcattacttgggtgtactgaaggtgtagctactaataagttaatctca
1561   cctgtatgacttgtattatggtgtattagattaataaaagttgtatTTTTTcaaaaaaaa
1621   aaaaaaaaaa

```

图 1 三疣梭子蟹 *AACT* 全长 cDNA 核苷酸序列和编码区氨基酸序列

下划线:加尾信号;方框部分:硫解酶结构域;椭圆部分:起始密码子; *号:终止密码子

Fig. 1 The cDNA and amino acid sequences of gene encoding *AACT* from *P. trituberculatus*

Single underlines indicate the polyadenylation signals in the UTR; two special conserved sequences of thiolase are labeled in boxes; the translation start codon is indicated by ellipses; the stop codon is showed by the asterisk

用 ClustalX 软件将金小蜂、山松甲虫、埃及伊蚊的 AACT 氨基酸序列与本研究获得的三疣梭子蟹 AACT 氨基酸序列 (PtAACT) 进行比对 (图 2), 发现

在重要结构域方面, 均具有两个硫解酶结构域 NVHGGAVSLGHPIGMSG 和 GVASICNGGGGASA。

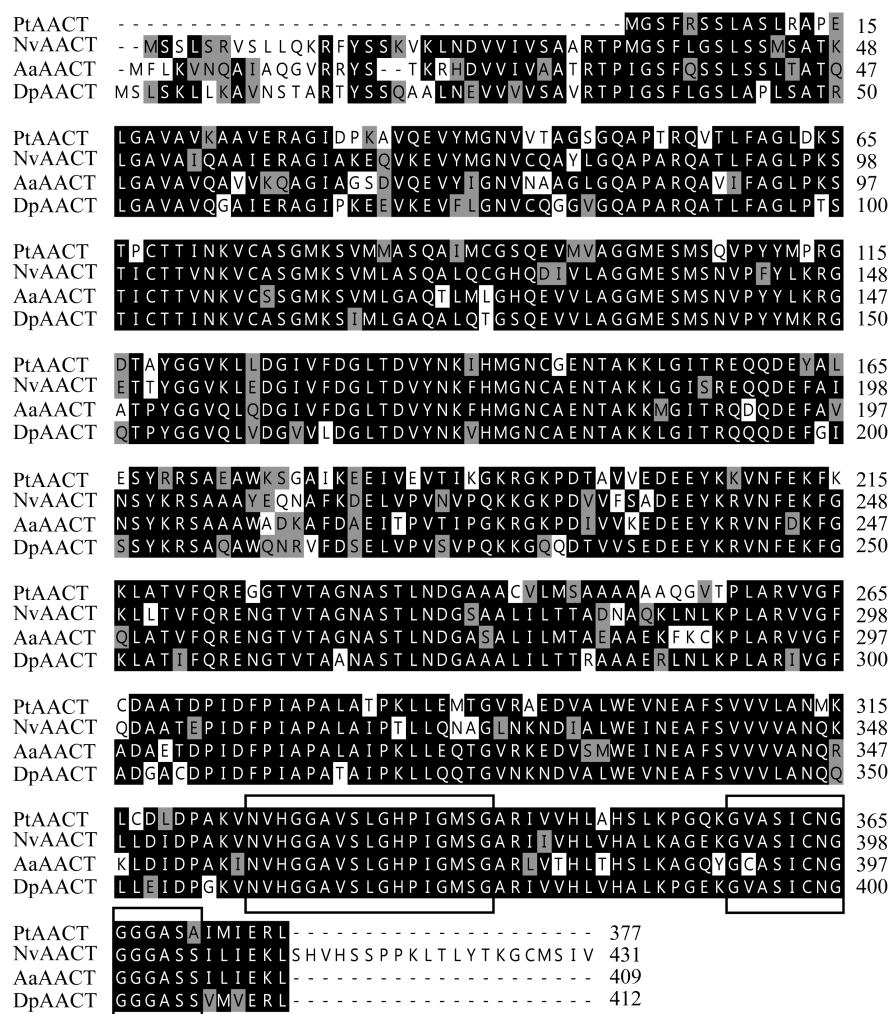


图 2 多种 AACT 氨基酸序列比对结果

黑色阴影: 相同序列; 灰色阴影: 相似序列; 黑框: 两个硫解酶结构域

Fig. 2 Multiple alignment of the AACT amino acid sequences

Black shading indicates the same sequence; gray shading indicates similar sequences; two special conserved sequences of thiolase are displayed in boxes

从 NCBI 蛋白序列数据库中选取具有代表性的物种 (昆虫、脊椎动物) AACT 氨基酸序列, 用 MEGA 4.0 软件的邻位法构建系统进化树, 设置重复次数 (replications) 为 1 000 (图 3)。从进化树分析结果来看, AACT 氨基酸序列被划分为昆虫和脊椎动物两大类, 三疣梭子蟹 AACT 氨基酸序列与昆虫聚为一支, 再与脊椎动物聚为一支, 符合生物在进化上的地位关系。

2.3 AACT 在三疣梭子蟹不同组织中的表达差异

qRT-PCR 分析结果表明, AACT 在雌性三疣梭子蟹多个组织中均有表达。在 MO 中表达量最

高, 在 Es 和 YO 中表达量次之, 其余组织中表达量较低 (图 4)。

2.4 AACT 在三疣梭子蟹一次卵巢发育中的表达差异

组织差异表达结果显示, AACT 在三疣梭子蟹 MO 中表达量最高, 所以选择 MO 为实验材料进行 AACT 在卵巢发育周期中的表达水平变化分析。qRT-PCR 结果表明三疣梭子蟹 MO 中的 AACT 在整个卵巢发育中均有表达; 在卵巢发育 I 期表达量最高, 且与其他期相比较具极显著差异 ($P < 0.01$) (图 5)。

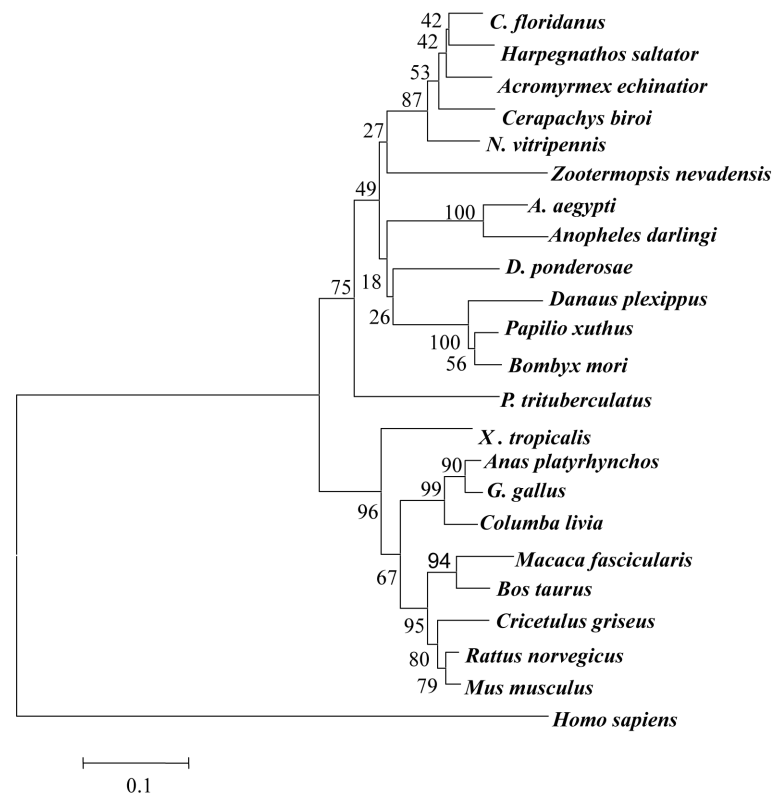


图3 三疣梭子蟹 AACT 氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of AACTs from *P. trituberculatus* and other species

C. floridanus AACT (EFN70601.1, 佛罗里达弓背蚁); *Harpegnathos saltator* AACT (EFN85668.1, 印度跳蚁); *Acromyrmex echinator* AACT (EG163455.1, 切叶蚁); *Cerapachys biroir* AACT (EZA52249.1, 毕氏粗角蚁); *N. vitripennis* AACT (XP_001607694.2, 金小蜂); *Zootermopsis nevadensis* AACT (KDR09162.1, 内华达古白蚁); *A. aegypti* AACT (EAT41757.1, 埃及伊蚊); *Anopheles darlingi* AACT (ETN62505.1, 达氏按蚊); *D. ponderosae* AACT (AFI45001.1, 山松甲虫); *Danaus plexippus* AACT (EHJ68573.1, 大红斑蝶); *P. xuthus* AACT (BAM19639.1, 柑橘凤蝶); *Bombyx mori* AACT (BAF62106.1, 家蚕); *X. tropicalis* AACT (AAH91004.1, 非洲蟾蜍); *Anas platyrhynchos* AACT (EOA96764.1, 绿头鸭); *G. gallus* AACT (NP_001264708.1, 原鸡); *Columba livia* AACT (EMC80495.1, 原鸽); *Macaca fascicularis* AACT (BAC20582.1, 食蟹猴); *P. trituberculatus* AACT (KM033231, 三疣梭子蟹); *Bos Taurus* AACT (Q29RZ0.1, 家牛); *Cricetulus griseus* AACT (ERE76124, 灰仓鼠); *Rattus norvegicus* AACT (NP_058771.2, 褐家鼠); *Mus musculus* AACT (Q8QZT1.1, 小家鼠); *Homo sapiens* AACT (Q9BWD1.2, 智人)

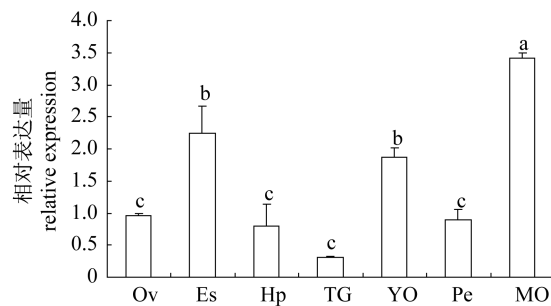


图4 AACT 在不同组织中的相对表达水平

Ov. 卵巢; Es. 眼柄; Hp. 肝胰腺; TG. 胸神经节; YO. Y 器; Pe. 表皮; MO. 大颚器

不同字母表示不同组织间有显著差异 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 4 The relative expression of AACT gene in various tissues in *P. Trituberculatus*

Ov. ovary; Es. eyestalk; Hp. hepatopancreas; TG. thoracic ganglia; YO. Y-organ; Pe. perider; MO. mandibular organ

Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$), the same as below

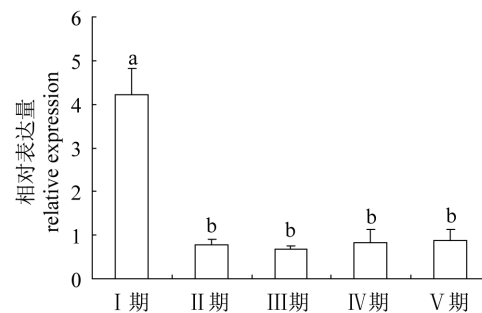


图5 AACT 在一次卵巢发育周期中的差异性表达

Fig. 5 The relative expression of AACT gene in ovarian development

3 讨论

目前对于 AACT 的研究多见于植物、昆虫和哺乳动物等, 在甲壳动物方面还未见报道。

AACT 属于硫解酶家族,具有催化蛋白质酰基化、去酰基化,调节蛋白质活性、基因表达等功能^[2]。生物体内萜类化合物由异戊二烯衍生而来,但是异戊二烯只有转化为活化形式,即 IPP 和 DMAPP 后才能作为前体物质参与到萜类化合物的合成路径中,而 IPP 的生物合成主要来自于甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway)^[2]。作为甲羟戊酸途径初始步骤的起始酶,AACT 催化两个乙酰 CoA 缩合成 1 个乙酰乙酰 CoA^[10-11],可能在 MF 的合成调控中具有一定作用。本研究通过分子克隆技术获得三疣梭子蟹 AACT 的 cDNA 全长,其编码区氨基酸序列与金小蜂、埃及伊蚊和柑橘凤蝶等物种的 AACT 氨基酸序列具有较高相似性。对其特异性功能结构位点进行分析,发现该氨基酸序列具有两个硫解酶结构域 (NVHGGAVSLGHPIGMSG 和 GVASICNGGGGASA^[12]),分别位于 325 (N)—341 (G) 和 358 (G)—371 (A),是硫解酶起催化作用的功能性位点。说明本次研究得到的序列是 AACT 基因,属于硫解酶基因家族。甲壳动物与昆虫亲缘关系较近,从进化树结果分析发现三疣梭子蟹 AACT 先与昆虫 AACT 聚为一支,再与脊椎动物 AACT 聚为一支,这一结果符合生物在进化上的地位。

MF 与甲壳动物体内多种生理生殖过程的调控密切相关,近几十年来逐渐成为甲壳动物神经内分泌学的研究热点。在合成 MF 的过程中,AACT 在最初催化生成乙酰乙酰 CoA,是合成 MF 必需路径 MVA 途径的初始酶,可能对甲壳动物的多种生理过程具有一定调控作用。组织表达差异结果显示,三疣梭子蟹 AACT 在 MO 中表达量最高,而 MO 是分泌与合成 MF 的唯一组织,说明 AACT 的主要生理功能很可能是在 MO 中起始,并催化甲羟戊酸途径合成萜类物质 (包括 MF) 的生成。作为 MF 合成路径中的两个关键限速酶^[13],3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 和法尼酸甲基转移酶 (farnesoic acid O-methyl transferase, FAMEt) 的作用位点均在 AACT 之后,据研究报道,美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) MO 中 HMGR 酶活极高^[14],三疣梭子蟹 FAMEt 在 MO 中也有一定表达^[15],再次证明 MO 是合成与分泌 MF 的唯一内分泌器官。AACT 在 Es 和 YO 中表达较 MO 中稍低,甲壳动

物眼柄中存在 X-窦腺内分泌系统,YO 可以分泌蜕皮类固醇激素等,说明在这两个生理功能活跃的组织内也可能存在 AACT 合成位点或需要 AACT 的生理途径,有待进一步实验证明。

大量在甲壳动物性腺发育和繁殖方面的研究表明,MF 能够刺激卵巢发育成熟,促进繁殖的进行,例如,Paran 等^[16]发现体外注射 MF 能明显促进锐脊单肢虾 (*Sicyonia ingentis*) 卵巢的生长,MF 能提高离体培养的罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 卵黄发生前的卵巢中卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vg) 基因的表达水平,并促进卵巢总蛋白的合成^[17]。谢熙^[18]的研究说明三疣梭子蟹 FAMEt 在卵巢发育的各个阶段均有表达,在 II 期的表达量最高,显著高于其他各期。Yang 等^[19]在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 卵巢发育过程胸神经节中 FAMEt 表达也有类似变化趋势。在本研究中,AACT 在三疣梭子蟹一次卵巢发育 I 期高效表达,比 FAMEt 提前达到高峰,这可能与 AACT 处于甲羟戊酸途径起始位置有关。由此推断,AACT 在三疣梭子蟹卵巢发育早期高效表达,起始 MF 合成路径中前体物质积累,从而促进卵巢发育的进行。色拉淡水蟹 (*Oziotelphusa senex senex*) 卵黄发生前及早期血淋巴中 MF 水平最高^[20],与本研究结果基本一致,说明 AACT 可能通过调节三疣梭子蟹血淋巴中 MF 浓度,从而在一定程度上调控卵巢发育的进行。

参考文献:

- [1] Li X, Li Z, Liu J, et al. Advances in precocity research of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Aquaculture International*, 2011, 19 (2): 251 - 267.
- [2] Zhang L, Tan X F, H J, et al. Cloning and sequence characterization of cDNA encoding acetyl-CoA C-acetyltransferase in *Camellia oleifera* [J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology: Natural Science*, 2011, 31 (8): 108 - 112. [张琳, 谭晓风, 胡姣, 等. 油茶乙酰 CoA 酰基转移酶基因 cDNA 克隆及序列特征分析. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 2011, 31 (8): 108 - 112.]
- [3] Chen X, Wang X F, Li Z J, et al. Molecular cloning, tissue expression and protein structure prediction of the porcine 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR) gene [J]. *Gene*, 2012, 495 (2): 170 - 177.

- [4] Li J, Zhou J, Luo Y Q, *et al.* Advances in studies on insect juvenile hormone and vitellogenesis regulated by juvenile hormone [J]. *Medical Innovation of China*, 2012, 9(3):154 - 157. [李娟, 周娇, 骆有庆, 等. 保幼激素及其生理学作用的研究进展. *中国医学创新*, 2012, 9(3):154 - 157.]
- [5] Li S, Zhao W X. Mandibular organ and methyl farnesoate in crustacean [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, 9(3):240 - 246. [李胜, 赵维信. 甲壳动物的大颚器和甲基法尼酯. *上海水产大学学报*, 2000, 9(3):240 - 244.]
- [6] Davies K A, Kou K G M, Wulff J E. Oxygen-containing analogues of juvenile hormone III [J]. *Tetrahedron Letters*, 2011, 52(18):2302 - 2305.
- [7] Lovett D L, Verzi M P, Clifford P D, *et al.* Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab *Carcinus maenas* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 128(2):299 - 306.
- [8] Laufer H, Demir N, Pan X, *et al.* Methyl farnesoate controls adult male morphogenesis in the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(4):379 - 384.
- [9] Wu X G, Yao G G, Yang X Z, *et al.* A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(4):120 - 127. [吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究. *海洋学报*, 2007, 29(4):120 - 127.]
- [10] Wuytmtna, Wang L, Ye S J. Identification and bioinformatics analysis of EuACOTS gene family in *Eucommia ulmoides* [J]. *Economic Forest Research*, 2013, 31(4):1 - 8. [乌云塔娜, 王淋, 叶生晶. 杜仲 EuACOTS 基因家族的鉴定及生物信息学分析. *经济林研究*, 2013, 31(4):1 - 8.]
- [11] Liu J, Xu Y H, Yang Y. Cloning and gene expression of acetyl-CoA C-acetyl transferase gene (AsAACT) from *Aquilaria sinensis* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(6):972 - 980. [刘娟, 徐艳红, 杨勇, 等. 白木香乙酰乙酰基辅酶 A 硫解酶基因 (AsAACT) 的克隆与表达分析. *中国中药杂志*, 2014, 39(6):972 - 980.]
- [12] Cui G H, Wang X Y, Feng H, *et al.* Molecular cloning and SNP analysis of a acetyl-CoA C-acetyltransferase gene (SmaACT) from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(6):785 - 790. [崔光红, 王学勇, 冯华, 等. 丹参乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长克隆和 SNP 分析. *药学学报*, 2010, 45(6):785 - 790.]
- [13] Li S, Friesen J A, Holford K C, *et al.* Methyl farnesoate synthesis in the lobster mandibular organ: The roles of HMG-CoA reductase and farnesoic acid O-methyltransferase [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2010, 155(1):49 - 55.
- [14] Li S, Wagner C A, Friesen J A, *et al.* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the lobster mandibular organ: Regulation by the eyestalk [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 134(2):147 - 155.
- [15] Xie X, Zhu D F, Cui X Y, *et al.* Cloning and expression analysis of farnesoic acid O-methyl transferase (FAMeT) gene during molting in *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7):994 - 1001. [谢熙, 朱冬发, 崔晓雨, 等. 三疣梭子蟹 FAMeT 基因克隆及其在蜕皮周期中的表达水平. *水产学报*, 2013, 37(7):994 - 1001.]
- [16] Paran B C, Fierro I J, Tsukimura B. Stimulation of ovarian growth by methyl farnesoate and eyestalk ablation in penaeoidean model shrimp, *Sicyonia ingentis* Burkenroad, 1938 [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(12):1887 - 1897.
- [17] Soroka Y, Milner Y, Laufer H, *et al.* A protein synthesis in the ovary of *Macrobrachium rosenbergii* during the reproduction cycle: Effects of methyl farnesoate (MF) [J]. *American Zoologist*, 1993, 33(5):123.
- [18] Xie X. The gene expression of MIH and FAMeT in the ovarian development of *Portunus trituberculatus* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2013. [谢熙. 三疣梭子蟹卵巢发育过程中 FAMeT 和 MIH 基因表达变化. 宁波: 宁波大学, 2013.]
- [19] Yang Y, Ye H, Huang H Y, *et al.* Cloning, expression and functional analysis of farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) in the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 2012, 45(3):209 - 222.
- [20] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S, *et al.* Mandibular organ, its relation to body weight sex molt and reproduction in the crab *Ozietelphusa senex senex* Fabricius (1791) [J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4):603 - 612.

Cloning and expression analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase (*AACT*) in *Portunus trituberculatus*

WANG Fengjiao, ZHU Dongfa*, QIU Xi'er, TAN Yichuan, ZHOU Yanqi, LIU Zhiye, XIE Xi
(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Acetyl-CoA C-acetyltransferase (*AACT*) is the starting enzymes in mevalonate pathway of terpenoids biosynthesis. To reveal the function of this enzyme during the ovarian development of the crustaceans, we used reversed transcript PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques to clone the *AACT* (GeneBank accession number: KM033231). The full length of Pt-*AACT* is 1 630 bp, including a 5'-untranslated region (UTR) of 101 bp, a 3'-UTR of 395 bp and an opening reading frame (ORF) of 1 134 bp encoding 377 amino acid protein. The structures of *AACT* proteins have two special conserved sequences of thiolase, belonging to stable hydrophobic proteins without an obvious transmembrane region. The deduced amino acid sequence of Pt-*AACT* exhibited the highest identity (72%) with *AACT* of *Nasonia vitripennis* and *Aedes aegypti*. The phylogenetic tree analysis showed that Pt-*AACT* was clustered in insect *AACT*s. Tissue distribution by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) illustrated that the Pt-*AACT* was most highly expressed in the MOs. During the ovarian development, expression of Pt-*AACT* in MOs significantly remained the highest level at stage I. Therefore, *AACT* plays an important role in ovarian development regulation of *P. Trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; acetyl-CoA C-acetyltransferase; gene cloning; ovarian development; expressing

Corresponding author: ZHU Dongfa. E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn