

文章编号: 1000-0615(2017)09-1345-10

DOI: 10.11964/jfc.20160910555

青虾冷休克蛋白Y-box编码基因的cDNA全长克隆与表达分析

孙盛明¹, 傅洪拓^{1,2*}, 戈贤平^{1,2}, 朱健¹,
乔慧¹, 金舒博¹, 张文宜¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为研究冷休克蛋白Y-box基因在青虾应答环境胁迫过程中所起的调控作用, 实验应用RACE PCR技术首次克隆了青虾的冷休克蛋白Y-box基因全长cDNA序列, 并利用在线软件对其序列特征进行生物信息学分析; 采用实时荧光定量PCR技术对其在青虾不同组织及环境胁迫过程中的表达变化特征进行分析。青虾冷休克蛋白Y-box基因cDNA全长1501 bp, 包括84 bp的5'末端非翻译区(UTR), 876 bp的开放阅读框(ORF), 541 bp的3'UTR, 开放阅读框编码291个氨基酸。氨基酸相似度比对显示, 青虾冷休克蛋白Y-box基因富含高度保守的冷休克结构域。系统进化树分析显示, 青虾冷休克蛋白Y-box基因与水蚤等节肢动物冷休克Y-box聚类一支, 具有最近的亲缘关系。荧光定量PCR检测显示, 冷休克蛋白Y-box基因在青虾不同组织中均有表达, 其表达量在肝胰腺组织中最, 使用荧光定量PCR检测青虾冷休克蛋白Y-box基因在低温胁迫和恢复条件下在肝胰腺中的mRNA时空表达情况, 结果显示, 与对照组相比冷休克蛋白Y-box在肝胰腺中的表达量分别在低温和低氧胁迫3, 6和12 h出现了显著上调, 而在恢复刺激后其表达量与对照组差异不显著。此外, 本实验对Y-box进行了原核表达, 为进一步研究Y-box基因的功能奠定了基础。

关键词: 青虾; 冷休克蛋白; 低温; 低氧; 原核表达

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

冷休克蛋白是进化上保守的核苷酸结合蛋白, 其同源染色体作为冷休克蛋白结构域存在Y-box结合蛋白中。无论是从细菌还是到人类, Y-box结合蛋白都是一类在进化上高度保守的多功能蛋白, 主要包括3个区域的典型结构: 高度保守的冷休克结构域、能够识别特殊RNA发卡结构、完成基因表达调控C-端尾域以及富含丙氨酸和脯氨酸的N末端结构域^[1]。它主要负责转录调节、选择性剪接、DNA修复、翻译调控、细胞增殖和再生等方面^[2-6]。Y-box结合蛋白在真核生物体内还能起到增加mRNA稳定性的作用^[7], 并参与到适应低温的细胞过程^[8]。

利用分子生物学技术已相继克隆了多个水生动物Y-box基因家族的成员, 如加州海兔(*Aplysia californica*)^[9]、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)^[10]、日本青鳞(*Oryzias latipes*)^[10]、日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)^[11]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[12]、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[13]。然而, 关于淡水虾类Y-box基因的克隆与表达分析尚未见相关报道。青虾(*Macrobrachium nipponense*)是我国淡水养殖虾蟹品种之一, 具有重要的经济价值^[14-15], 青虾对环境应激的耐受程度较弱, 导致其无法实现高密度养殖, 而温度和溶解氧是直接影响水生动物生长的重要生态因子, 故研究青虾休

收稿日期: 2016-08-31 修回日期: 2017-03-19

资助项目: 国家自然科学基金(31402280, 31672633); 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD25B07)

通信作者: 傅洪拓, E-mail: fuht@ffrc.cn

克蛋白Y-box编码基因在低温和低氧条件下的响应机制具有重要意义。

本实验采用RACE (rapid amplification of cDNA ends)方法克隆了青虾肝胰腺中Y-box编码基因的全长cDNA, 并通过研究序列特征、低温和低氧以及恢复刺激后时空表达模式, 不仅有利于更深入地探讨甲壳动物的环境应激响应机制, 而且为青虾抗逆育种提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验青虾来自太湖无锡湖区, 为野生青虾, 在实验室暂养2周后, 实验组和对照组各设3个平行重复, 养殖水槽规格为80 cm×50 cm×50 cm, 每个水槽养殖20尾健康青虾平均体质量为(1.28±0.22) g, 参照陈超等^[16]文献方法, 实验组与对照组温度分别设置为10 °C和25 °C; 参照孙盛明等^[17]文献方法, 实验组与对照组溶解氧分别设置为2.0和6.5 mg/L。两个胁迫实验取样时间均为0, 3, 6, 12和12h, 前4个取样时刻为胁迫阶段, 后1个时刻为恢复阶段。挑选健康活泼的青虾个体且性腺发育良好, 用于血细胞、脑、肝胰腺、鳃、肠道、肌肉、精巢及卵巢的RNA提取。

1.2 方法

总RNA的提取及cDNA第一链的合成 各取100 mg青虾血细胞、脑、肝胰腺、鳃、肠道、肌肉、精巢和卵巢组织用于提取总RNA, 通过液氮研磨后用酚仿抽提法提取总RNA, 然后使用RNA-free DNaseI纯化试剂盒进行纯化, RNA浓度及纯度通过紫外分光光度计测定, 并使用琼脂糖凝胶电泳进行总RNA的完整性鉴定。参照TaKaRa cDNA第一链合成试剂盒说明书进行肝胰腺总RNA反转录, 保存在-80 °C冰箱, 以备克隆Y-box基因cDNA全长序列。参照BIO-RAD的iScript cDNA Synthesis Kit第一链合成试剂盒说明书进行荧光定量PCR反应的cDNA反转录, 以备检测Y-box基因在各组织的表达分布。

青虾Y-box的基因克隆 根据本实验室已构建的青虾肝胰腺cDNA文库, 通过组装拼接和比对分析, 获得一个冷休克蛋白Y-box编码基因序列片段。参照现有cDNA序列片段, 应用Primer 5.0软件分别设计5'RACE和3'RACE的特

异性扩增引物(表1), 以青虾肝胰腺cDNA为模板, 结合套式PCR技术对冷休克蛋白Y-box编码基因5'端和3'端序列片段扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后采取克隆测序分析。

序列分析 应用Contig Express软件将中间序列、3'端序列、5'端序列拼接成全长cDNA序列。分别采用BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和蛋白质性质分析软件(<http://www.expasy.org/>)分析Y-box编码基因序列及其推断的氨基酸序列; 在NCBI中用BLASTP程序检索氨基酸同源序列; 应用Clustal X1.83软件进行多序列比对, 然后应用MAGE4.0软件以邻接法(Neighbour-Joining)通过不同物种的Y-box编码基因氨基酸序列构建系统进化树。

青虾不同组织Y-box编码基因mRNA的表达分析 应用BIO-RAD的iScript cDNA Synthesis Kit利用青虾不同组织的总RNA合成cDNA, 在qRT-PCR反应中作为模板。根据获得的Y-box和 β -actin基因全长cDNA序列分别设计2对荧光定量特异引物(表1)。参照BIO-RAD SsoFast EvaGreen Supermix推荐反应条件, 进行两步PCR扩增, 即先进行1 min 95 °C预变性, 接着连续进行40个循环, 其中包括95 °C下10 s变性, 60 °C下30 s延伸, 最后温度从55 °C慢慢提升到95 °C, 并绘制溶解曲线。样品每份进行3次重复, 溶解曲线使用BIO-RAD iQ5自带实时分析软件分析, 实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析, 计量数据资料均用平均值±标准误表示^[18], 并使用SPSS 13.0软件进行显著性分析, 用Turkey法进行多重比较分析($P < 0.05$ 为显著水平)。

青虾肝胰腺组织应答低温和低氧胁迫以及分别恢复刺激后Y-box编码基因的表达分析 在低温和低氧0、3、6和12 h以及恢复刺激后12 h, 处理组和对照组在各个取样时刻分别随机取3只青虾, 取肝胰腺保存于-80 °C用于提取RNA, 再通过反转录获得cDNA模板, 进行RT-PCR分析。在BIO-RAD iQ5中进行反应, 获得的肝胰腺组织cDNA样品在每个取样时刻做3个荧光定量特异引物和内参基因 β -actin基因重复。实验数据进行t检验显著性分析, 若 $P < 0.05$ 则具有显著性差异。

1.3 原核表达体系构建

以成熟肽序列为模板设计Y-box的原核表达扩增引物, 在上游引物添加EcoR I酶切位点, 下游引物添加Xho I酶切位点。普通PCR扩增

表 1 基因克隆所用的引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物 primer	引物序列 primer sequence	长度/bp length	引物用途 usage
Y-box-GSP1 forward	5'-ACGTATTCGTCCACCAGAGC-3'	20	Y-box 3'RACE
Y-box-GSP2 forward	5'-GGCCGTGGTCCAAGAAGATT-3'	20	
Y-box-GSP1 reverse	5'-GAAGGTCCTCCCATCATGCC-3'	20	Y-box 5'RACE
Y-box-GSP2 reverse	5'-CAAAGAAGCGGCCACGATAG-3'	20	
QY-box forward	5'-TCGGTATTATCGCCGTGCTG-3'	20	Y-box qPCR
QY-box reverse	5'-CAAAGAAGCGGCCACGATAG-3'	20	
β -actin forward	5'-TATGCACTTCTCATGCCAT-3'	20	β -actin qPCR
β -actin reverse	5'-AGGAGGCGGCAGTGGTCAT-3'	19	

后, 液体回收DNA片段, 将产物和pGEX-4T-1载体同时用*EcoR* I 和*Xho* I 双酶切12 h, 琼脂糖凝胶电泳检测双酶切成功后, 将其纯化回收, 按照基因与载体体积比为5:1的比例, 在T4连接酶作用下, 23 °C快速连接30 min后转化到大肠杆菌BL21(DE3)中, 挑选阳性克隆测序验证。载体构建成功后, 进行原核表达诱导, 以菌液与LB培养基体积比为1:50的比例, 在180 r/min摇床中培养, 当OD₆₀₀值为0.6时, 加入IPTG诱导剂诱导4 h后取出菌液, 超声波破碎, 4 °C、10 000 r/min离心10 min, 分离上清液和沉淀, SDS-PAGE检测其融合蛋白表达情况。

2 结果与分析

2.1 青虾冷休克Y-box基因全长cDNA克隆

根据Contig Express软件拼接结果可得, Y-box基因cDNA全长序列为1501 bp, 其中5'末端非翻译区为84 bp, 开放阅读框为876 bp, 3'UTR为541 bp, 3'UTR中带有加尾信号AATAAA和Poly(A)尾(图1), 共编码291个氨基酸(图1)。理论蛋白相对分子量为31.48 ku, 等电点(pI)约为10.55。通过Signal P软件对青虾的Y-box氨基酸序列进行预测, 发现其信号肽不存在, 因此推测Y-box不是分泌性蛋白类。Y-box结合蛋白含有氨基酸C末端结构域、N末端结构域和冷休克结构域(cold shock domain, CSD), 其中CSD是高度保守结合域并含有68个氨基酸, 具体功能是与损伤DNA和非特异性DNA结合。冷休克Y-box基因cDNA序列已经提交到GenBank, 登录号为KF431830。

2.2 冷休克Y-box基因的同源性分析

分析结果显示, 青虾Y-box基因的氨基酸序列与红螯螯虾(AFI74356)同源性最高。应用在线分析软件ClustalW 1.83比对青虾Y-box基因编码的氨基酸序列与水蚤(EFX88831)、虹鳟(ACL31579)和果蝇(AAC06034)的氨基酸序列, 结果显示Y-box基因氨基酸序列中含有保守的冷休克区, 该区域中有RNP-1(GYGFNR)和RNP-2(EDVVFVHQS)两个RNA结合基序, 这两个基序与其转录调控功能联系密切(图2)。

2.3 冷休克Y-box基因的系统进化树分析

根据青虾冷休克Y-box基因和其他甲壳动物Y-box基因的氨基酸序列进行系统进化树构建(图3), 发现青虾Y-box基因与水蚤的该基因蛋白亲缘关系最近, 同时与其他无脊椎类聚为一支, 说明冷休克Y-box基因在进化过程中相对保守。

2.4 青虾冷休克Y-box基因在不同组织内的表达分析

应用荧光定量PCR技术分析青虾体内不同组织中Y-box基因的表达情况。结果发现, 青虾Y-box基因在所有被检测组织中均有表达, 其中在肝胰腺中表达量最高, 其次为脑、血细胞、鳃、肠道、卵巢、精巢、肌肉(图4)。

2.5 青虾冷休克Y-box基因应答环境胁迫和分别恢复刺激后不同时刻的表达规律

应用实时荧光定量PCR方法分析环境胁迫和恢复刺激后各个时刻青虾肝胰腺中Y-box基因的表达规律。在低温胁迫后3 h, Y-box基因表达量



图 1 青虾Y-box基因cDNA全长序列及推导的氨基酸序列

黑色方框内为起始密码子ATG，终止密码子TAA，灰色阴影区域为冷休克区(CSD区)，下划线标出的为polyA加尾信号AATAA

Fig. 1 Full-length cDNA of *M. nipponense* Y-box and the deduced amino acid sequence

Black panes indicate the start codon (ATG) and the stop codon (TAA), CSD is shaded by gray. The polyA special sequences AATAA is underlined

显著升高($P<0.05$)；随后在6和12 h时Y-box基因表达迅速达到峰值。在低温胁迫恢复后12 h，Y-box基因表达量与对照组基本一致($P<0.05$)(图5)。

在低氧胁迫后12 h，Y-box基因表达量与对照组相比显著升高($P<0.05$)，在低氧胁迫恢复后12 h，Y-box基因表达量与对照组基本一致($P<0.05$)(图6)。

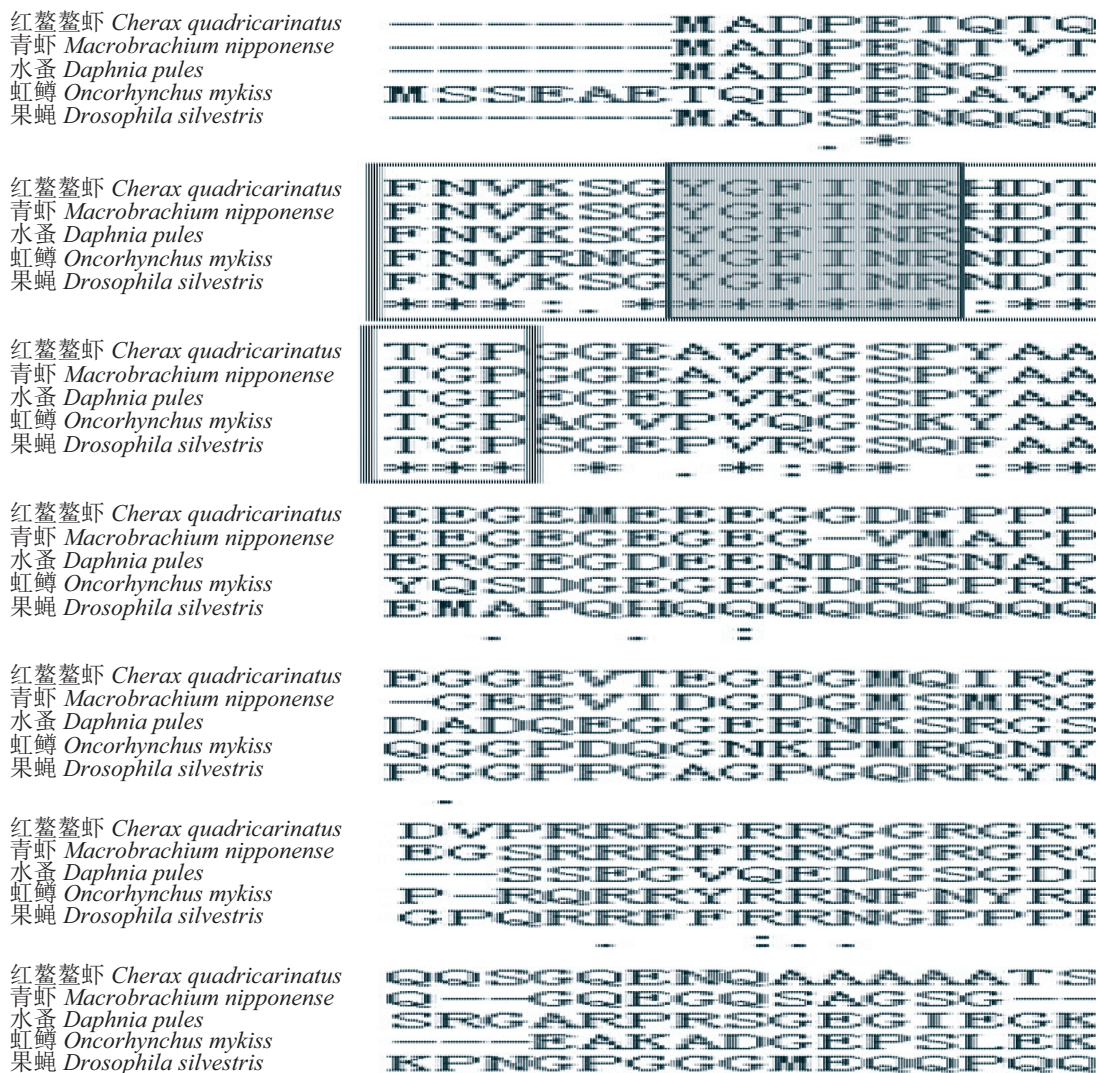


图 2 青虾Y-box基因与其他物种Y-box基因的多序列比对结果

红色框内为包含68个氨基酸残基的保守的CSD, 基序RNP-1(GYGFINR)和RNP-2(EDVVFVHQT)用阴影标出

Fig. 2 Multi-sequence alignment of *M. nipponense* Y-box with Y-box from other species

The 68 amino acid residues of the cold-shock domain are red boxed, the motifs of RNP-1 and RNP-2 are marked by shadow

2.6 青虾冷休克Y-box的纯化

冷休克Y-box基因的原核表达用EcoR I 和 Xho I 同时双酶切pET28 b载体质粒和目的片段, 琼脂糖凝胶可检测是否酶切完全。在T4连接酶作用下, 将目的片段连接并转化到大肠杆菌BL21(DE3)表达载体中, 测序结果显示正确构建了重组质粒Y-box-pET28 b。在20 °C和37 °C、180 r/min的条件下, 当菌液OD₆₀₀值达到0.6时, 加入0.5 mmol /L IPTG诱导剂诱导4 h。离心收集菌体, 并用超声波破碎, 分离上清液和沉淀, 用12% SDS-PAGE检测融合蛋白表达情况。冷休克Y-box成熟肽大小为31 ku, GST标签蛋白大小约

13 ku, 因此Y-box融合蛋白大小约为44 ku, 与图中条带位置基本一致。不同温度对融合蛋白的表达影响较大, 融合蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中(图7)。

3 讨论

甲壳动物Y-box基因的相关研究还十分缺乏, 也很少从Y-box基因在应答环境胁迫过程中发挥的功能方面进行探讨。本实验获得青虾Y-box基因cDNA全长1, 501 bp, 其中5'非编码区为84 bp, 3'非编码区为76 bp, 开放阅读框为541 bp, 可编码291个氨基酸。氨基酸序列比对发现, 本

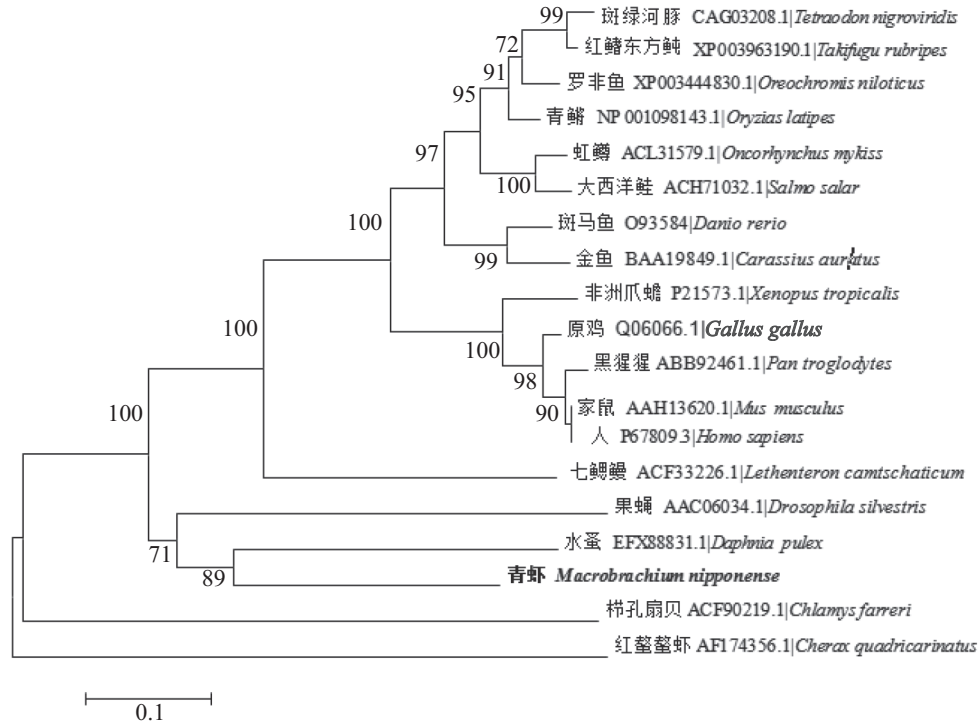


图3 青虾Y-box基因与其他物种Y-box基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on Y-box amino acid sequences from other species

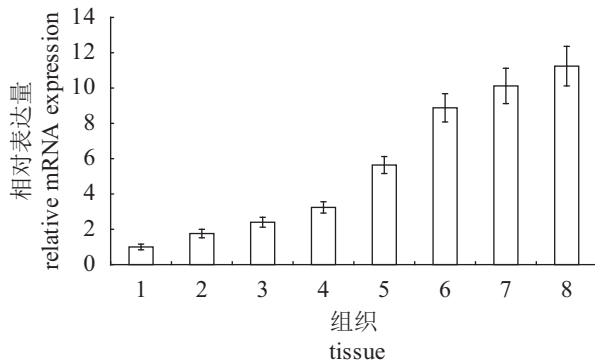


图4 qRT-PCR方法检测冷休克Y-box基因在青虾不同组织内的表达

- 1. 肌肉; 2. 精巢; 3. 卵巢; 4. 肠道; 5. 鳃; 6. 血细胞; 7. 脑;
- 8. 肝胰腺

Fig. 4 Expression of Y-box mRNA in *M. nipponense* among different tissues by qRT-PCR

- 1. muscle; 2. testis; 3. ovary; 4. intestine; 5. gill; 6. haemocytetes;
- 7. brain; 8. hepatopancreas

实验中获得青虾Y-box基因含有CSD区域, 此区域与其他动物的氨基酸序列相似性都在90%以上, 说明青虾冷休克结构域在进化上相对保守。冷休克Y-box系统发育树分析表明青虾与甲壳动物水蚤聚为一支, 且与昆虫等节肢动物聚为一支, 这也基本上与传统的动物系统发生分

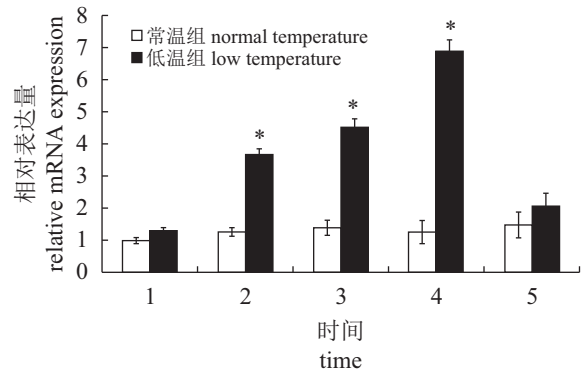


图5 低温和恢复刺激后青虾肝胰腺中Y-box基因mRNA的表达量变化

- 1. 低温0 h; 2. 低温3 h; 3. 低温6 h; 4. 低温12 h; 5. 低温恢复12 h

Fig. 5 Temporal expression of Y-box mRNA in *M. nipponense* hepatopancreas in response to environmental low temperature and recovery

- 1. low temperature 0 h; 2. low temperature 3 h; 3. low temperature 6 h;
- 4. low temperature 12 h; 5. low temperature recovery 12 h

类次序相吻合。本实验结果表明, 青虾Y-box基因的表达具有组织特异性, 肝胰腺和脑表达量较高, 与红螯螯虾的研究结果类似^[13]。此外, 与内分泌相关的组织如青虾脑、卵巢和精巢中Y-box蛋白均有较高表达, 结果表明在冷休克蛋白

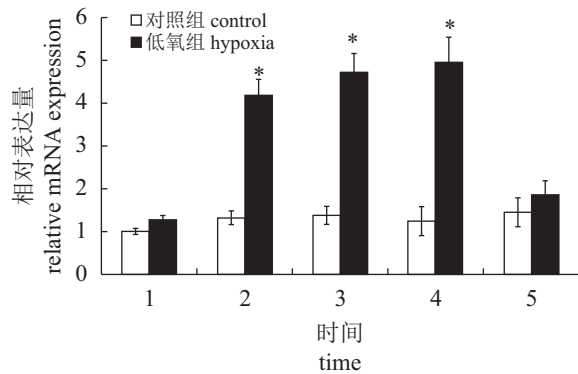


图6 低氧和恢复刺激后青虾肝胰腺中Y-box基因mRNA的表达量变化

1. 低氧0 h; 2. 低氧3 h; 3. 低氧6 h; 4. 低氧12 h; 5. 低氧恢复12 h

Fig. 6 Temporal expression of Y-box mRNA in *M. nipponense* hepatopancreas in response to environmental hypoxia and recovery

1. hypoxia 0 h; 2. hypoxia 3 h; 3. hypoxia 6 h; 4. hypoxia 12 h; 5. recovery 12 h

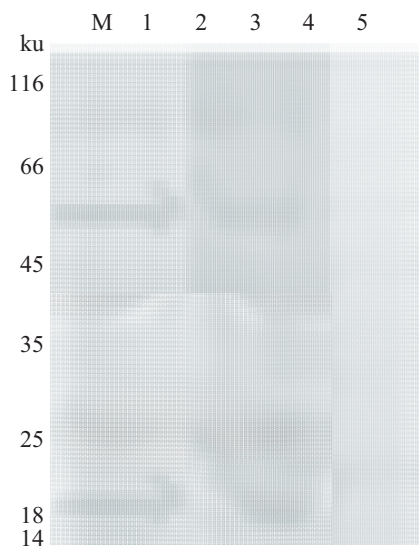


图7 SDS-PAGE检测不同温度对Y-box重组蛋白表达的影响

M. 分子量, 1. 诱导前菌液, 2. 20 °C诱导表达菌液, 3. 37 °C诱导表达菌液, 4. 20 °C诱导表达沉淀, 5. 37 °C诱导表达沉淀

Fig. 7 Effects of temperature on expression of Y-box recombinant proteins

M represent protein molecular standard. 1 represent without induction, 2 represent induced expression for supernatant at 20 °C, 3 represent induced expression supernatant at 37 °C, 4 represent induced expression for precipitate at 20 °C, 5 represent induced expression for precipitate at 37 °C

的功能表达和信息传递过程中内分泌系统可能扮演着重要角色。考虑到甲壳动物具有开放性

循环系统, 本实验推测血淋巴是负责运输Y-box蛋白到其他组织的重要器官。

已有研究表明, 多种环境压力能够诱导Y-box基因表达量升高, 如免疫刺激^[19]、DNA损伤^[20]和低氧^[21]等。在膜受体信号向细胞内转导过程中Ras/MAPK通路和PI3K/丝苏氨酸蛋白激酶(Akt)通路尤为重要, 它们调控着细胞包括生长、凋亡及一些重要基因的表达, 而Y-box基因具有丝氨酸磷酸化位点并在上述通路中发挥重要作用^[22], 因此, 无脊椎动物的Y-box并不像细菌中的冷应激蛋白那样只在冷应激下大量表达^[23]。本研究表明低温胁迫下青虾Y-box基因显著升高, 这与在脊椎动物民猪的研究结果不一致^[24], 其原因可能是当民猪长期处在低温应激环境中时, 低温抑制了Y-box基因的转录和翻译调控反应, 因此自身的转录水平有所下降, 据此推测青虾在短期低温胁迫时, Y-box基因类似于热休克蛋白分子的分子伴侣, 能提高生物体应对恶劣环境的耐受性, 及时修正mRNA的折叠错误, 使得处于低温应激下的细胞能够正常翻译, 然而其在细胞中的具体功能及作用机制尚不清楚。本研究也发现青虾在低氧胁迫下, 其肝胰腺中Y-box基因显著升高, 这与本实验室前期急性与慢性低氧胁迫下青虾肝胰腺组织高通量测序结果相吻合^[25-26], 此前已经在哺乳动物Y-box基因启动子序列中发现含有缺氧反应元件^[21], 推测缺氧诱导因子通过激活Y-box基因来促使机体产生一系列缺氧适应性反应, 本课题组后续的研究将克隆Y-box基因启动子序列并分析其转录活性。

本实验还构建了Y-box的原核表达系统, 因为生物体内的天然抗冻蛋白含量低, 提纯过程繁琐、得率低, 人工合成的成本高且效果差, 因此, 近年来主要通过基因工程技术在宿主细胞内进行抗冻基因表达, 以期获得相应蛋白, 为实现大规模生产提供理论基础。本实验表明大肠杆菌表达系统则成为表达Y-box蛋白的首选, 且操作简单。本实验构建了冷休克Y-box的原核表达体系, 为进一步制备冷休克Y-box多克隆抗体, 在蛋白水平验证Y-box基因环境胁迫响应的表达模式奠定了基础。

综上所述, 本实验系统分析了Y-box基因的结构特点、组织表达特征以及低氧和低温胁迫后该基因的表达量变化模式; 并构建了Y-box的原核表达系统, 为研究其应答环境胁迫的调控机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Graumann P L, Marahiel M A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1998, 23(8): 286-290.
- [2] Matsumoto K, Wolffe A P. Gene regulation by Y-box proteins: Coupling control of transcription and translation[J]. Trends in Cell Biology, 1998, 8(8): 318-323.
- [3] Bouvet P, Wolffe A P. A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus oocytes*[J]. Cell, 1994, 77(6): 931-941.
- [4] Chang B E, Lin C Y, Kuo C M. Molecular cloning of a cold-shock domain protein, zfY1, in zebrafish embryo[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999, 1433(1-2): 343-349.
- [5] Karlson D, Nakaminami K, Toyomasu T, et al. A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(38): 35248-35256.
- [6] Valadão A F, Fantappie M R, LoVerde P T, et al. Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: Interaction with DNA and RNA[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2002, 125(1-2): 47-57.
- [7] Philippe B, Matsumoto K, Wolffe A P. Sequence-Specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box Proteins: An essential role for the cold shock domain[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(47): 28297-28303.
- [8] Moss E G, Lee R C, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA[J]. Cell, 1997, 88(5): 637-646.
- [9] Skehel P A, Bartsch D. Characterization of a Y-box factor from *Aplysia californica*[J]. Gene, 1994, 145(2): 231-235.
- [10] Zend-Ajusch E, Hornung U, Burgtorf C. Isolation and characterization of cold-shock domain protein genes, *Oryzias latipes* Y-box protein 2 (*OlaYP2*) and *Fugu rubripes* Y-box protein 1 (*FruYP1*), in medakafish and pufferfish[J]. Gene, 2002, 296(1-2): 111-119.
- [11] 金萍, 张玮玮, 黄惠芳, 等. 日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)*Lyb*基因的克隆与分析[J]. 遗传, 2008, 30(12): 1597-1602.
- [12] 王家庆, 张丽丽, 马爽, 等. 虹鳟冷休克蛋白*Y-box*基因的cDNA全长克隆与序列分析[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(2): 153-159.
- Wang J Q, Zhang L L, Ma S, et al. The cloning and sequence analysis of *Y-box* gene full-length cDNA derived from *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(2): 153-159(in Chinese).
- [13] 孟庆国, 陈静, 黄艳青, 等. 红螯螯虾冷休克蛋白*Y-box*编码基因的克隆及表达分析[J]. 淡水渔业, 2012, 42(6): 14-20.
- Meng Q G, Chen J, Huang Y Q, et al. Molecular cloning and expression analysis of the cold shock protein *Y-box* coding gene of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(6): 14-20(in Chinese).
- [14] 张响, 乔慧, 傅洪拓, 等. 青虾(*Macrobrachium nipponense*)Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制因子基因全长cDNA的克隆及表达[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1292-1298.
- Zhang X, Qiao H, Fu H T, et al. The full length cDNA cloning and expression analysis of kazal-type serine proteinase inhibitor gene from *Macrobrachium nipponense*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1292-1298(in Chinese).
- [15] 金舒博, 王宁, 乔慧, 等. 青虾高血糖激素基因全长cDNA序列的克隆及表达分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 82-92.
- Jin S B, Wang N, Qiao H, et al. Molecular cloning and expression of a full length cDNA encoding crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in oriental river pawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 82-92(in Chinese).
- [16] 陈超, 施兆鸿, 薛宝贵, 等. 低温胁迫对七带石斑鱼幼鱼血清生化指标的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1249-1255.
- Chen C, Shi Z H, Xue B G, et al. Influence of low-temperature stress on serum biochemical parameters in juvenile *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(8): 1249-1255(in Chinese).

- [17] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, *et al.* Molecular characterization and mRNA expression of hypoxia inducible factor-1 and cognate inhibiting factor in *Macrobrachium nipponense* in response to hypoxia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 196-197: 48-56.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Wang X L, Zhang Y X, Yang C G, *et al.* Cloning, characterization and expression analysis of a cold shock domain family member YB-1 in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(5): 1215-1221.
- [20] Ise T, Nagatani G, Imamura T, *et al.* Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen[J]. *Cancer Research*, 1999, 59: 342-346.
- [21] Rauen T, Frye B C, Wang J L, *et al.* Cold shock protein YB-1 is involved in hypoxia-dependent gene transcription[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(2): 982-987.
- [22] To K, Fotovati A, Reipas K M, *et al.* YB-1 induces expression of *CD44* and *CD49f* leading to enhanced self-renewal, mammosphere growth, and drug resistance[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(7): 2840-2851.
- [23] 王振雄, 周培瑾. 冷激蛋白CspA家族[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(2): 131-134.
- Wang Z X, Zhou P J. Cold shock protein-CspA family[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1999, 15(2): 131-134(in Chinese).
- [24] 张冬杰, 刘娣, 汪亮, 等. 民猪Y-box结合蛋白基因的克隆、表达以及冷刺激对其表达方式的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(9): 1207-1212.
- Zhang D J, Liu D, Wang L, *et al.* Cloning, expression and cold-stimulation expression of Y-box binding protein gene in min pig[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(9): 1207-1212(in Chinese).
- [25] Sun S M, Xuan F J, Ge X P, *et al.* Identification of differentially expressed genes in hepatopancreas of oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* exposed to environmental hypoxia[J]. *Gene*, 2014, 534(2): 298-306.
- [26] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, *et al.* Transcriptomic and histological analysis of hepatopancreas, muscle and gill tissues of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to chronic hypoxia[J]. *BMC Genomic*, 2015, 16: 491.

Molecular cloning and expression analysis of cold shock protein Y-box gene from oriental river pawn (*Macrobrachium nipponense*)

SUN Shengming¹, FU Hongtuo^{1,2*}, GE Xianping^{1,2}, ZHU Jian¹,
QIAO Hui¹, JIN Shubo¹, ZHANG Wenyi¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The Y-box protein family is highly conserved nucleic acid binding proteins which are conserved from bacteria to human. In this study, the cDNA encoding cold shock protein Y-box from oriental river pawn *Macrobrachium nipponense* (MnY-box) was cloned by using EST analysis and rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach. The full length cDNA of MnY-box was 1501 bp, consisting of a 5' untranslated region of 84 bp, a 3' untranslated region of 541 bp, and an open reading frame of 876 bp. The deduced protein had 291 amino acid residues with molecular mass of 31.48 kDa. Based on the protein similarity comparison, the Y-box protein family was very conservative in CSD domain. Phylogenetic tree analysis stated that oriental river prawn has the closest relationship with *Daphnia pulex*. Quantitative real-time RT-PCR analysis showed that the MnY-box gene was expressed in haemocytes, hepatopancreas, muscles, gill, brain, testis, ovary and intestines with the highest level of expression in the hepatopancreas. After environmental low temperature and recovery challenge, the relative expression level of MnY-box in hepatopancreas was significantly higher compared to the control group at 3 h to 12 h post-low temperature, followed by return to control levels at recovery 12 h. What's more, we constructed prokaryotic expression system and obtained the recombinant proteins of *M. nipponense* Y-box, which may provide information for further functional study.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; cold shock protein; low temperature; hypoxia; prokaryotic expression

Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402280, 31672633); National "Twelfth Five-Year" Plan for Science & Technology Support (2012BAD25B07)