

文章编号: 1000-0615(2018)04-0485-10

DOI: 10.11964/jfc.20170110681

## 中华绒螯蟹*Akt*基因的cDNA克隆、序列分析及表达特征

田志环<sup>1,2</sup>, 焦传珍<sup>1</sup>, 成永旭<sup>2\*</sup>, 吴旭干<sup>2</sup>

(1. 广东韶关学院英东生命科学学院, 广东 韶关 512005;

2. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为研究*Akt*基因在中华绒螯蟹蜕壳前后肌肉生长过程中的功能, 应用RACE技术克隆得到编码中华绒螯蟹*Akt*(命名为Es*Akt*)的全长为2 200 bp的cDNA序列, 包括159 bp的5'非翻译区(5'-UTR)、496 bp的3'非翻译区(3'-UTR)和长度为1545 bp编码514个氨基酸的编码序列。蛋白质结构域分析显示Es*Akt*含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的3个特征性保守结构域。多序列比对和系统发育分析显示, Es*Akt*与中国明对虾、凡纳滨对虾的*Akt*序列一致性都为0.889, 在系统发育树中节肢动物*Akt*形成一个分支。应用荧光定量RT-PCR技术分析Es*Akt*在性成熟中华绒螯蟹各组织及幼体不同蜕壳时期不同部位肌肉组织中转录水平上表达量的变化。结果显示, Es*Akt*在性成熟个体的肝胰腺、眼柄、表皮、卵巢、精巢、心脏、螯足、鳃、三角膜等组织中均有表达, 其中卵巢、眼柄和精巢中表达量较高, 肝胰腺中表达量最低。在幼体不同蜕壳时期不同部位的肌肉中, Es*Akt*表达量变化不同, 步行足肌肉组织中Es*Akt* mRNA无显著的统计学差异。腹部肌肉组织中Es*Akt* mRNA水平在蜕壳前晚期D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub>期表达量显著高于蜕壳后A~B期和蜕皮间期C期。螯足肌肉在蜕壳前晚期D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub>期急剧下调, 蜕壳后A~B期开始表达量显著升高, 直至蜕皮间期C期。研究表明, Es*Akt*在中华绒螯蟹蜕壳过程中不同部位肌肉组织中的表达量变化与蜕壳周期密切相关, 说明Es*Akt*参与中华绒螯蟹蜕壳诱导的肌肉萎缩、生长及重建过程。

**关键词:** 中华绒螯蟹; *Akt*基因; 基因克隆; 肌肉生长; 蜕壳

**中图分类号:** Q 785; S 966.16

**文献标志码:** A

*Akt*又称PKB (protein kinase B), 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它通过磷酸化其他蛋白质进行信号传导, 对生长因子作用下的细胞蛋白质合成及细胞存活起着重要的调节作用<sup>[1-2]</sup>。*Akt*是胰岛素样生长因子1(IGF1)-PI3K-AKT信号通路的重要蛋白, 脊椎动物肌肉的生长、维持及一些病理改变(如肌肉萎缩)与该信号通路的活动密切相关<sup>[3-4]</sup>。有关此基因在脊椎动物中的功能已进行了较为深入的研究, 已有实验证实, 小鼠IGF1或*Akt*基因过量表达时, 可出现全身性肌肉肥大和体力增加<sup>[5-6]</sup>。对于虾蟹等水产甲壳动物,

关于PI3K-AKT信号通路的研究报道非常有限。目前, NCBI数据库中只发现中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *Akt*的完整编码序列(GenBank序列号分别为AFU61121.1、AHY28871.1), 另外还有地蟹(*Gecarcinus lateralis*) (GenBank序列号ADM87425.3)和普通滨蟹(*Carcinus maenas*)(GenBank序列号AGB51121.1)的部分序列。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的经济养殖动物, 其肌肉生长和蜕壳周期密切相关, 尤其是肥大的螯足肌肉, 蜕壳前发生可逆性萎缩以顺

收稿日期: 2017-01-08 修回日期: 2017-04-04

资助项目: 国家自然科学基金(31572635); 科技部港澳台科技合作专项(2014DFT30270); 上海市科学技术委员会科研项目(16DZ2281200); 上海高校水产学高峰学科建设项目(2015-62-0908); 上海市科技兴农推广项目[沪农科推字(2015)第1-7号]; 韶关学院生态学重点扶持学科(230079030101)

通信作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

利蜕出狭小的关节, 蜕壳后再恢复重建<sup>[7]</sup>。为探讨中华绒螯蟹蜕壳过程中, *Akt*是否参与其肌肉萎缩和生长的生理调节过程, 本研究克隆编码中华绒螯蟹*Akt*基因(命名为*EsAkt*)的cDNA全长序列, 并研究其在性成熟个体的不同组织及幼体不同蜕壳时期不同部位肌肉组织的转录表达情况, 为进一步探讨中华绒螯蟹蜕壳过程中肌肉萎缩和生长机制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

中华绒螯蟹成体6只取自上海海洋大学崇明养殖基地, 雌雄各半, 体质量(126.00±7.41) g, 取其肝胰腺、表皮、眼柄、心肌、精巢、卵巢、螯足、鳃、三角膜等组织, 置于-80 °C冰箱保存备用。另取体质量(8.24±2.17) g的1龄幼蟹, 按照文献<sup>[8-9]</sup>的方法鉴定蜕皮周期, 鉴定出处于蜕皮间期C期、蜕皮前晚期D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub>期及蜕皮后A~B期个体各3只, 分别取其螯足、第三步行足和腹部第V腹节肌肉, 置于-80 °C冰箱保存备用。

### 1.2 实验方法

中华绒螯蟹*Akt*基因全长克隆 利用Tri-

zol法提取中华绒螯蟹肝胰腺组织总RNA, 同时用引物Akt-3'Race-P1(表1)和6聚体随机引物将其反转录成cDNA第一链作为PCR的模板, 根据NCBI公共数据库的转录组序列信息设计引物(表1), 进行PCR反应, 获得*EsAkt* cDNA核心片段。PCR反应加样体系: cDNA模板1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各2 μL, 2×PCR Mix 25 μL, 加无菌去离子水至总体积50 μL。设置的PCR反应条件: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 56.5 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min。

根据得到的*EsAkt* cDNA的核心序列设计3'RACE外侧引物Akt-3'Race-out和内侧引物Akt-3'Race-in, 5'RACE外侧引物Akt-5'Race-out和内侧引物Akt-5'Race-in(表1)。以RACE cDNA第一链为模板, 用Akt外侧引物和3'/5'RACE-P1进行第1轮PCR。然后, 以第一轮PCR产物稀释液为模板, 用Akt内侧引物和3'/5'RACE-P2进行第2轮PCR。2次PCR反应程序: 94 °C预变性3 min, 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 20~35个循环; 72 °C再延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收, 克隆至pUCm-T载体, 蓝白斑筛选后送上海生工生物工程有限公司测序。

表1 中华绒螯蟹*Akt*基因序列扩增引物信息

Tab. 1 The information of the primers for *Akt* amplification in *E. sinensis*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	功能 application
EsAKt-F	TTCACGTGACCACTGTCATCG	<i>Akt</i> 中间片段克隆
EsAKt-R	CACCTCGCCCGTAGTCGTTT	
EsAKt-3'Race-out	TCATCTACCGGACTTGAAGC	3'Race
EsAKt-3'Race-in	GCTCGAAAACCTATTACTGGATGC	3'Race
EsAKt-3'Race-P1	GACATGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	3'接头
EsAKt-3'Race-P2	GCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC	3'接头
EsAKt-5'Race-out	CCCGAGAACCCTGTGAGGTG	5'Race
EsAKt-5'Race-in	CATCGCTGGAGTACTTCAGTTGG	5'Race
EsAKt-5'Race-P1	GGCCACGCGTCTCGACTAGTACCCCCCCCCCCCC	5'接头
EsAKt-5'Race-P2	GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC	5'接头
EsAKt-RTF	GGCAAAGTTATCCTCTGCCG	荧光定量PCR
EsAKt-RTR	ATCGACTACTTGCAGGACCC	荧光定量PCR
18S-F	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	荧光定量PCR
18S-R	GAAGAAGCTGCGAATCGGAC	荧光定量PCR

### 中华绒螯蟹*EsAkt*的生物信息学分析

RACE技术获得的两端cDNA序列拼接使用DNASTar软件;序列的相似性分析使用BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和Bioedit(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)上的Clustal<sup>[10]</sup>;开放阅读框预测及蛋白质序列的转换使用NCBI网站的ORF finder<sup>[11]</sup>(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)和ExPasy的翻译工具(<http://web.expasy.org/translate/>);cDNA序列和氨基酸序列编辑使用Bioedit;结构域预测使用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>);利用Swiss-model(<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>)和Rasmol软件对蛋白质结构进行建模和分析。使用Bioedit上的Clustal进行多序列比对;系统发育树构建使用MEGA 6.0<sup>[12]</sup>上的Clustal序列比对工具和邻接法发育树构建工具,进行1000次自展检验(Bootstrap)评估进化树分支可信度。

实时荧光定量PCR检测*EsAkt*基因mRNA在不同组织及蜕壳不同时期的表达情况。以不同组织及不同蜕壳时期不同部位肌肉组织的cDNA作为荧光定量PCR(qRT-PCR)模板,荧光定量PCR引物和内参根据*EsAkt*全长和中华绒螯蟹18S RNA基因设计(表1)。利用BIO-RAD CFX Connect<sup>TM</sup>荧光定量仪的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测*EsAkt* mRNA的各组织相对表达情况,反应程序设置为95 °C 3 min, 95 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 75 °C 5 s, 40个循环;熔解曲线从65 °C上升至95 °C, 0.5 °C/s。用于检测不同组织及不同蜕壳时期不同部位肌肉组织*EsAkt*基因表达的样本均为3只,实时定量PCR均进行3次重复。数据分析利用SPSS 18.0软件中的单因子变异数,差异显著性以0.05为标准,数据结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 中华绒螯蟹*Akt*序列分析

实验克隆到的编码*EsAkt*的cDNA全长为2 200 bp(图1, GenBank登录号为KY412800),包括159 bp的5'非翻译区(5'-UTR)和496 bp的3'非翻译区(3'-UTR);160~1 704位核苷酸形成一个最大的开放阅读框(ORF),编码514个氨基酸,BLASTP同源搜索结果表明它与NCBI蛋白数据库中其他物种的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶*Akt*具有最高的相似性。

利用SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)进行结构域分析,*EsAkt*具有3个保守丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域:PH(pleckstrin homology domain, 16~118位氨基酸)、S\_TKc(serine/threonine protein kinases, catalytic domain, 167~424位氨基酸)和S\_TK\_X(extension to Ser/Threonine protein kinases, 425~493位氨基酸)(图2)。利用Swiss-model同源建模工具预测得到的由15~454位氨基酸组成的三维结构模型如图2所示,整体结构主要由3个结构单位组成,N端结构部分主要由7个β折叠片和1个α螺旋连接子组成,属于PH结构域;第2个结构单位由多个β折叠片构成,第3个结构单位主要由α螺旋构成,这2个结构单元构成了激酶催化结构域(S\_TKc)。

### 2.2 多序列比对与系统发育树分析

将*EsAkt*与果蝇(*Drosophila melanogaster*)、蚤状溞(*Daphnia pulex*)、中国明对虾、凡纳滨对虾的*Akt*序列进行比较(序列号分别为NP\_732114.1、EFX86288.1、AFU61121.1、AHY28871.1),序列一致性分别为0.590、0.618、0.889、0.889。磷脂酰肌醇结合位点(K24, GEHI/26~29位氨基酸, RQR/33~35位氨基酸, LN/60~61位氨基酸, F93, R94)的氨基酸在5种*Akt*中完全保守。*EsAkt*激酶活化结构域(S\_TKc)有1个活化环(activation loop, 303~326位氨基酸),序列为ADFGLCKEDISYG-STTRTFCGTPE,和中国明对虾与凡纳滨对虾的相同,而蚤状溞和果蝇的相应序列均为**AD-FGLCKEDITYGR**TTKTFCTGPE(加粗为差异氨基酸),有3个氨基酸的差异,但其中的关键磷酸化位点Thr324在5种动物中完全保守。C末端调节结构域有1个疏水基序(HM, hydrophobic motif), 3种十足目(Decapoda)甲壳动物*Akt*序列相同(FNQFSY),而蚤状溞*Akt*为FEKFSY,果蝇*Akt*为FPQFSY(图3);*Akt*的另一个关键磷酸化位点Ser490位于此疏水基序,同样在5种动物中完全保守。根据*Akt*序列重建的系统发育树显示,中华绒螯蟹*Akt*与其他甲壳纲(Crustacea)、昆虫纲(Insecta)*Akt*属于一个分支,与同属十足目的凡纳滨对虾、中国明对虾更相似(图4)。

### 2.3 中华绒螯蟹*Akt*基因表达分析

中华绒螯蟹*Akt*基因组织表达特性以*EsAkt*-RTF F/*EsAkt*-RTF R为引物,18S RNA为

```

gcctggaacagctgaggaagaagaaggtggacgagcggatcttcatgcagatTTTTT
ttctatTTTTTTtagTTTTgagacgatgttgacctaaacctgaagtaagcggtgaaa
cctgagaccttaatgcccttgtggccgagctgaagggcgaa
atgagcggcaccatggatgagcagcgcgacccgccccggccatcgtcaaggagggc
M S G T M D E A A I P P R P A I V K E G
tgctcaacaagcaggggagcacatcaagaactggcgacagcgtacttcttctgcag
W L N K R G E H I K N W R Q R Y F F L Q
gaggacggcacactcctggggttcaagaccaagcctgagcagcggcctggaggaccactc
E D G T L L G F K T K P E H G L E D P L
aacaatttcacagtaagcgtatgtagctcctgaagacagagcggccgcccgaacacg
N N F T V K R C Q I L K T E R P R P N T
ttcatcatccggccttactggaccactgtcatcgagagaacattcaatgccagctca
F I I R G L H W T T V I E R T F N A Q S
gcgagtgataggaagcatggatggaggccatcaagcaggtgtccgagagaatcctggac
A S D R E A W M E A I K Q V S E R I S D
aacagtcgggcccgtgtgtgtgatccaggaggctgactcctggagcagatccaactg
N T S G R C V V I Q E A D S V E Q I Q L
aagtactccagcgtatgacgacacacctcacagggttctcggggcaccagaagaagagg
K Y S S D D D D T S Q G S R G T K K K R
aaaaatcacactggacaactttgagttccttaaaggttagggaaggaaccttcggcaaa
K I T L D N F E F L K V L G K G T F G K
gttatcctctgcccgtgaaaagagcagcaaccatttctacgccatcaagatcctgcgcaa
V I L C R E K S S N H F Y A I K I L R K
gacgtgatcatcaagcgggacgaggtggctcacacactcacgaaaaccgggtcctgcaa
D V I I K R D E V A H T L T E N R V L Q
gtagtcgatcacccttcttacttacctcaagtattccttccaaccaacgaccgtctc
V V D H P F L T Y L K Y S F Q T N D R L
tgcttctgatggagtagctcaacggcgggagctgttcttccacctcaaccaggagcgg
C F V M E Y V N G G E L F F H L N Q E R
atcttcccgaggagcgcgccaagttctacggggcggagatctccttgcactggggtag
I F P E E R A K F Y G A E I C L A L G Y
ttgcatgagagaatcatctaccgggacttgaagctgaaaacctattactggatgcc
L H E R N I I Y R D L K L E N L L L D A
gacggtcacataaagatcgccgactttgggctgtgcaaggaagacatctcgtacggctcc
D G H I K I A D F G L C K E D I S Y G S
accaccaggacgttctgcccacaccagaatacttggccccagaggtgctagaagaaaac
T T R T F C G T P E Y L A P E V L E E N
gactacggcgctgtgttactggtgggctacggagctcgcctgtacgagatgatggctc
D Y G R G V D W W G Y G V C L Y E M M V
gggcccctccccttctacgacaaggaccagacaagttgttccagctcatcgtgtgtgag
G R L P F Y D K D H D K L F Q L I V C E
gacgtccgcttccccagaccatctcccaggaggcagcgcacctcctcaaggcctgta
D V R F P K T I S Q E A R D L L K G L L
cataaggacccaacaagcggctgggagggggcgggtgacccaaggaggtccagagt
H K D P N K R L G G G P G D A K E V Q S
cacccttctatatacaccattaactggaagctcctggaagagaagaagctcaccctccct
H P F Y I T I N W K L L E E K K L T P P
ttcaaacccaagtgacaagtgagacggacactcgtactttgaccgagagtttactgga
F K P Q V T S E T D T R Y F D R E F T G
gagctctgtcagctcacgccactgaccaagtggagccccctggacctattgtgaggag
E S V Q L T P P D Q V E P L G P I A E E
tetgaagcggctgtttcaatcagttttcatatcaagataactcaacttaggcagctcc
S E A A A F N Q F S Y Q D N S T L G S S
ctcgcctcaagcctcaactcccctgggcatggctgaagagggtga
L A S S L N S L G M A E E G *
gtcctggcctggctagggatcagattaaagtagggaacaaaagtaactcaatgtgactttca
tcactctgtgtgagacgagacaagtcctgtgaaggtgtgcccatttccaaccttggtaggc
ttctctgccccctgtcacactgcaagcagggcaggggggagcaccccaagctgcagctat
gtgtccagacctcagctccggctgggtgctgcaagactatagaggtgtgggagccagctt
ccttattgcaagaatgaataggccaatggcttcttgacacagtgtaatttatacattcgt
acttcatttagtgcgcaatagctttttaggttaggtgagaatcaggtgttggcattgaattgt
tgttctgtatctgtgaccttctgcatagataaactctacataatccaagtttcaaatttgt
gttccttaaaatgatataaagctttttatgaatgctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 中华绒螯蟹Akt基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

atg为起始密码子，tga为终止密码子

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *EsAkt*

atg is the start codon and tga is the stop codon

内参基因，利用荧光定量PCR方法检测EsAkt mRNA在中华绒螯蟹性成熟期9种组织中的表达情况显示，EsAkt在9种组织中均有表达，但表达水平各不相同。其中在卵巢中表达量最高，表

达水平与其他组织差异显著(P<0.05)；在肝胰腺中表达量最低(图5)。

中华绒螯蟹Akt基因在蜕壳不同时期不同部位肌肉组织中的表达 取不同蜕壳时期中华绒



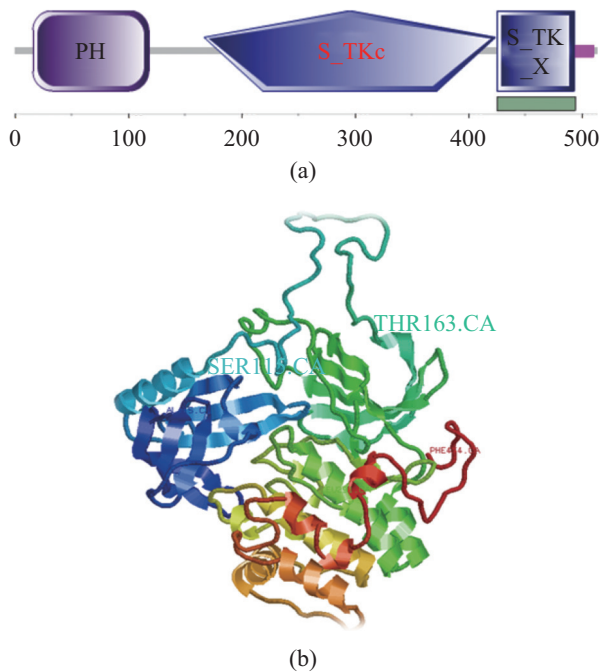


图 2 EsAkt 功能结构域(a)和三维结构(b)

PH. PH 结构域; S\_TKc. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域; S\_TK\_X. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶扩展区域/C 末端调节结构域

Fig. 2 The functional domains and 3-D structure of the EsAkt

PH. pleckstrin homology domain; S\_TKc. serine/threonine protein kinases, catalytic domain; S\_TK\_X. extension to Ser/Thr-type protein kinases

蟹童幼蟹的蟹足、步行足和腹部肌肉组织, 以 EsAkt-RTF F/EsAkt-RTF R 为引物, 18S RNA 为内参基因, 利用荧光定量 PCR 方法检测各组织 EsAkt mRNA 的表达情况, 结果显示, 在一个完整的蜕壳周期中, 步行足肌肉组织中 EsAkt mRNA 无显著的统计学差异。腹部肌肉组织中 EsAkt mRNA 水平在蜕壳前晚期 D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub> 期表达量急剧上调, 显著高于蜕壳后 A~B 期和蜕皮间期 C 期 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。蟹足肌肉在蜕壳前晚期 D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub> 期急剧下调 ( $P < 0.05$ ), 蜕壳后 A~B 期开始表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 直至蜕皮间期 C 期。

### 3 讨论

本研究利用 RACE 技术, 首次得到编码 *EsAkt* 的全长 cDNA 序列。cDNA 最大的开放阅读框编码 1 个 514 氨基酸长度的蛋白质, 结构域预测显示它包含 1 个 N 末端的 PH 结构域, 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域 (S\_TKc) 和 1 个 C 末端的调节结构域 (S\_TK\_X), 这符合 Akt 的结构框架

组成特征<sup>[1]</sup>。用于同源模建的模板为人 AKT1 (SWISS-MODEL 模板号 4ejn.1.A), 与 EsAkt 序列一致性为 64.37%, 给出的模拟三维结构与 12j 结合态人 AKT1 晶体结构 (PDB 数据库查询号 4EJN) 高度相似, 说明 AKT 从一级序列到立体结构在中华绒螯蟹这类甲壳动物中也是高度保守的。通过多序列比对发现, 5 种动物 (凡纳滨对虾、中国明对虾、蚤状溞、黑腹果蝇、中华绒螯蟹) 中的 Akt 磷脂酰肌醇结合位点完全保守, 它的作用是通过结合 PIP3 将 Akt 募集到质膜上<sup>[13]</sup>。同其他 Akt 一样, EsAkt 具有 2 个保守的关键磷酸化位点 Thr324 和 Ser490, 分别位于激酶催化结构域的活化环内和 C 末端调节结构域的疏水基序中。这 2 个关键磷酸化位点在哺乳动物和甲壳动物 Akt 中的高度保守性也进一步说明该蛋白在这两类动物中行使相似或相同的生物学功能<sup>[14]</sup>。

EsAkt 与当前数据库现有的中国明对虾和凡纳滨对虾的序列一致性皆为 88.9%, 其 514 个氨基酸的长度大于 2 种对虾 511 个氨基酸长度。编码 EsAkt 的 cDNA 最大 ORF 的 5' 端有 2 个邻近的起始密码子, 第 2 个起始密码子周围序列更符合 kozak 序列规则 (ANNAUGG), 如果从这个密码子开始翻译, 获得的多肽具有 510 个氨基酸, 需要进一步的工作来确认该蛋白在活体细胞内的翻译起始位点。另外, EsAkt 没有发现 cDNA 的 AATAAA 的 3' 端加尾信号, 在 GenBank 上已公布的凡纳滨对虾 mRNA (KF163129.1) 和中国明对虾 mRNA (JX853771.1) 也没有加尾信号。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 最初被发现是一种原癌基因, 是 PI3K 信号通路下游的主要效应分子, 对细胞周期进程、细胞增殖和存活起着重要的调节作用, 它的活动也与细胞代谢调控、癌细胞转移和浸润有关<sup>[1]</sup>。对人类 (或小鼠等模式生物) 肌肉生长或萎缩的分子机制研究表明, PI3K-Akt-mTOR 信号的活性也决定了肌肉生长或萎缩<sup>[15]</sup>。该信号通路控制大部分细胞的分裂, 但在肌肉细胞这种不再分裂的细胞中, 增强的 PI3K-Akt 信号能抑制 FOXO 转录因子的活性, 从而使 FOXO 转录因子所控制的一系列与肌肉萎缩相关的基因表达受到抑制, 同时 Akt 活化 mTOR, 活化的 mTOR 抑制蛋白质水解, 促进蛋白质的合成, 最终导致肌肉细胞蛋白总量增加<sup>[3]</sup>。

利用荧光实时定量 RT-PCR 技术检测性成熟期动物体不同组织中 *EsAkt* 转录水平, 结果显示

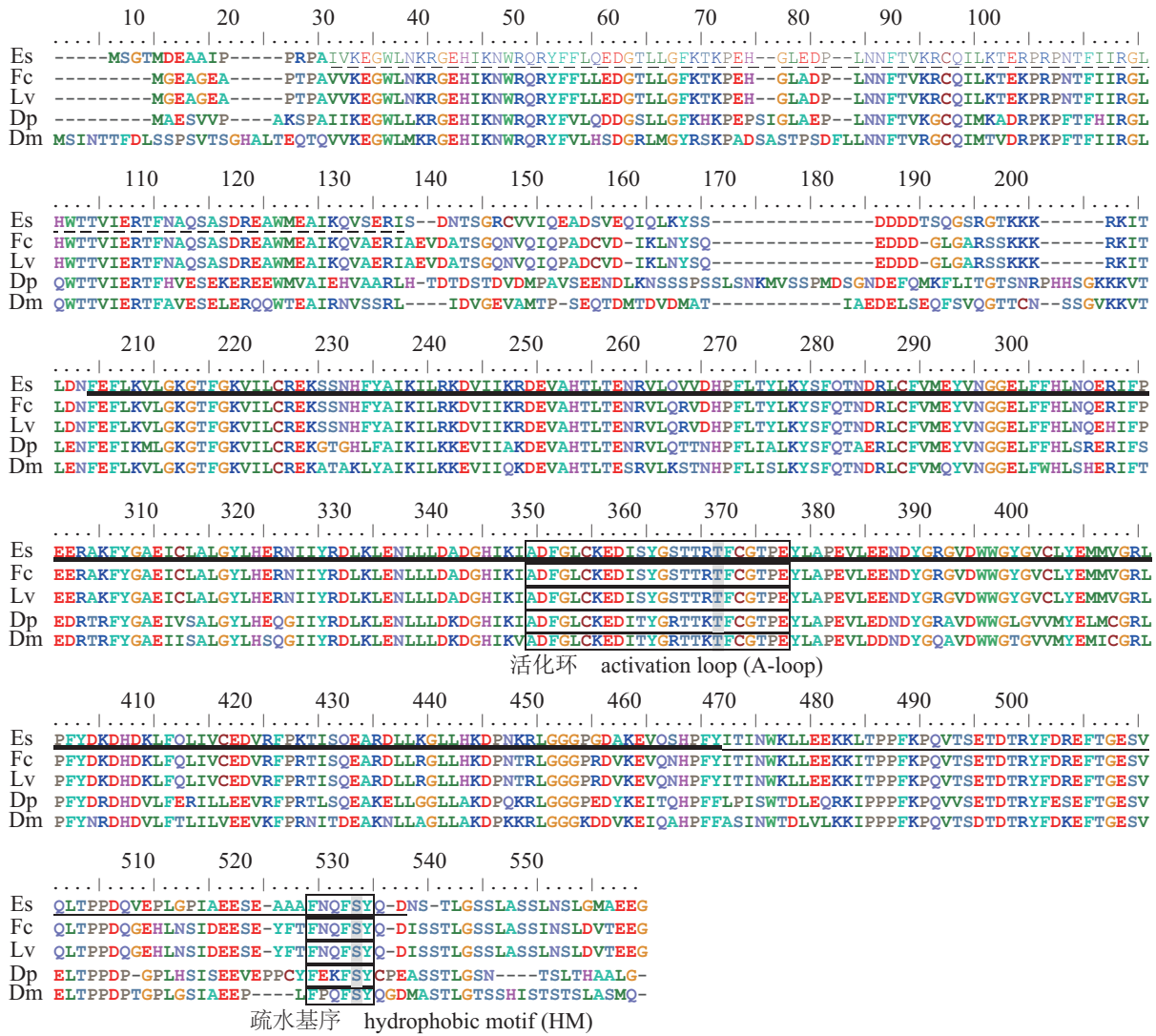


图3 五种动物中的Akt序列比较

3个结构域分别用虚线、粗线和细线标识；A-loop和HM位点由方框标识，2个关键磷酸化位点的氨基酸(分别位于A-loop和HM基序内)由阴影标识；Es、Fc、Lv、Dp、Dm分别为中华绒螯蟹、中国明对虾、凡纳滨对虾、蚤状蚤和果蝇

Fig. 3 Multiple alignment of the Akt from five different species

Three functional domains were underscored with different lines respectively; A-loop and HM sequences were designated in square frame; the two key phosphorylation sites were shaded in the A-loop and the HM frame; Es, Fc, Lv, Dp and Dm represent *E. sinensis*, *F. chinensis*, *L. vannamei*, *D. pulex* and *D. melanogaster* respectively

其在眼柄、螯足肌肉、卵巢、心脏、肝胰腺、表皮、精巢、鳃和三角膜中都有表达，而在卵巢、眼柄和精巢中表达显著。这或许与性成熟期的动物体组织器官具有旺盛的细胞增殖分化活动或激素调节活动有关，值得进一步研究。

同时，荧光实时定量RT-PCR技术检测结果显示，在中华绒螯蟹幼蟹一个完整的蜕壳周期中，螯足、步足和腹部肌肉中EsAkt的表达量都表现为蜕皮间期C期高于蜕壳后A~B期，这与甲壳动物从A~B期到C期蛋白质合成速率的增加及

肌肉总量增加相一致，而此时正是动物肌肉生长的时期<sup>[16-17]</sup>。在蜕壳前晚期D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub>期，螯足肌肉中EsAkt的mRNA水平急剧下降，此时肌肉在形态上表现为肌纤维横截面积减小，肌丝降解，肌肉重量降低以便蜕壳时顺利蜕出狭小的关节<sup>[18-19]</sup>(图7)。蜕壳前并不发生明显萎缩的步行足肌肉中，EsAkt的mRNA水平则相对于蜕壳间期无显著变化；腹部肌肉中EsAkt基因的表达在此时急剧上调。已有研究证实，此时甲壳动物步行足和腹部肌肉蛋白质合成速率相对于蜕壳

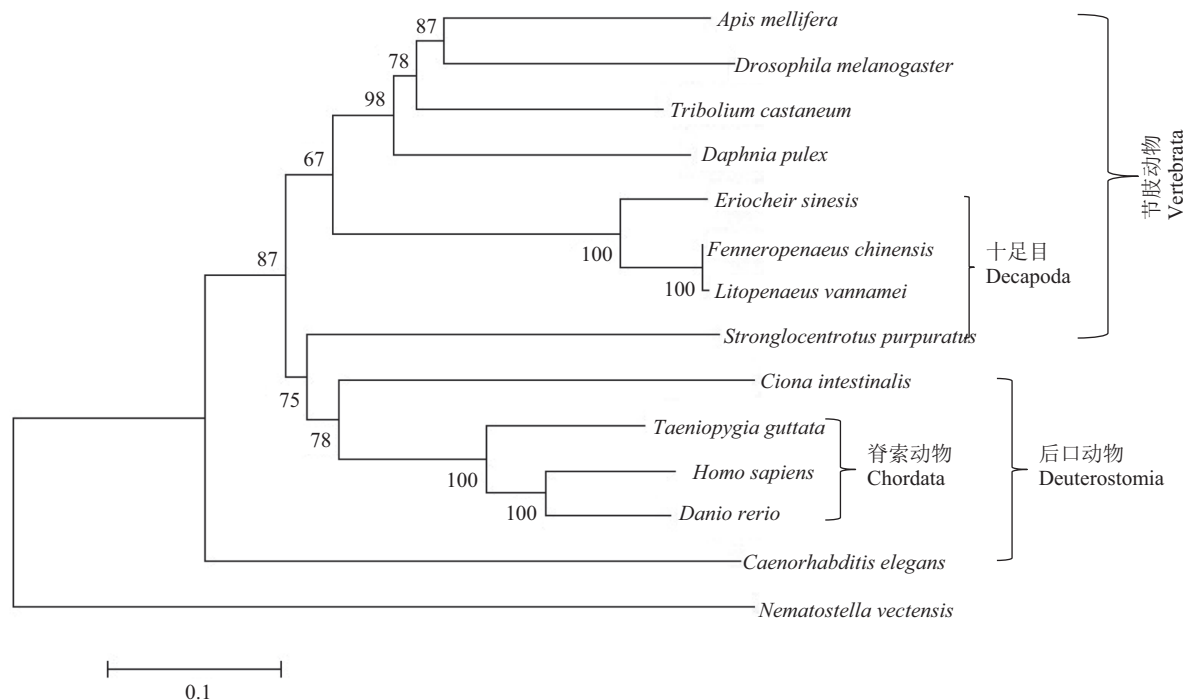


图 4 基于不同物种 *Akt* 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树

物种及其 *Akt* 的 GenBank 序列号分别为秀丽小杆线虫, NP\_001023646; 丝盘虫, XP\_002117864.1; 海葵, XP\_001629863.1; 赤拟谷盗, XP\_008191524.1; 西方蜜蜂, XP\_396874.4; 黑腹果蝇, NP\_732114.1; 紫色球海胆, XP\_787246.2; 玻璃海鞘, XP\_002129363.2; 斑胸草雀, XP\_002200623.3; 智人, NP\_001617.1; 蚤状蚤, EFX86288.1; 中国明对虾, AFU61121.1; 凡纳滨对虾, AHY28871.1; 中华绒螯蟹, KY412800

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from multiple alignments of *Akt* amino acid sequences from various species

The accession no. of each *Akt* are as follows: *Caenorhabditis elegans*, NP\_001023646; *Trichoplax adhaerens*, XP\_002117864.1; *Actiniaria*, XP\_001629863.1; *Tribolium castaneum*, XP\_008191524.1; *Apis mellifera*, XP\_396874.4; *Drosophila melanogaster*, NP\_732114.1; *Strongylocentrotus purpuratus*, XP\_787246.2; *Ciona intestinalis*, XP\_002129363.2; *Taeniopygia guttata*, XP\_002200623.3; *Homo sapiens*, NP\_001617.1; *Daphnia pulex*, EFX86288.1; *F. chinensis*, AFU61121.1; *L. vannamei*, AHY28871.1; *E. sinensis*, KY412800

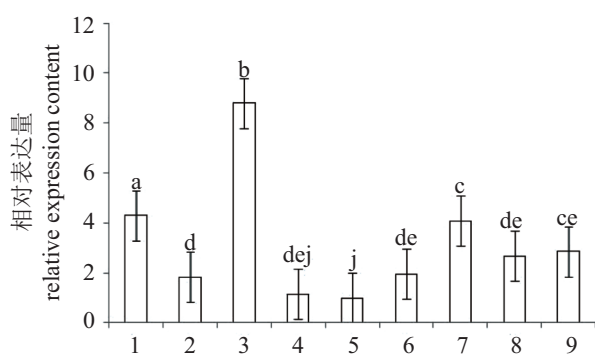


图 5 中华绒螯蟹 *Akt* 基因在不同组织中的相对表达

1. 眼柄; 2. 螯足肌肉; 3. 卵巢; 4. 心脏; 5. 肝胰腺; 6. 表皮; 7. 精巢; 8. 鳃; 9. 三角膜。误差棒上方不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 5 The relative expression content of *EsAkt* mRNA in different tissues

1. eye stalk; 2. claw muscle; 3. ovary; 4. heart; 5. hepatopancreas; 6. epidermis; 7. testicle; 8. gill; 9. triangular membrane. Different letters above the error bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), the same below

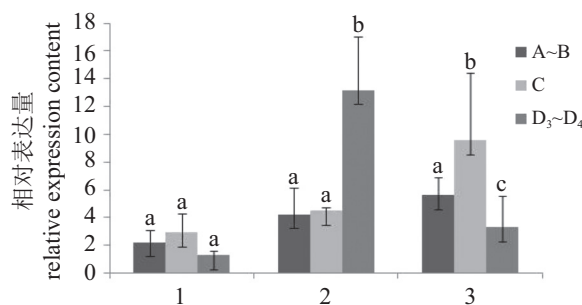


图 6 中华绒螯蟹 *Akt* 基因在蜕壳过程中不同部位肌肉组织中的相对表达

1. 步行足; 2. 腹部肌肉; 3. 螯足肌肉。A~B. 蜕壳后期; C. 蜕壳间期; D<sub>3</sub>-D<sub>4</sub>. 蜕壳前晚期

Fig. 6 The relative expression content of *EsAkt* mRNA in different muscle tissues during the molt cycle

1. walking leg muscle; 2. abdominal muscle; 3. claw muscle. A-B. post-molt stage; C. inter-molt stage; D<sub>3</sub>-D<sub>4</sub>. later post-molt stage



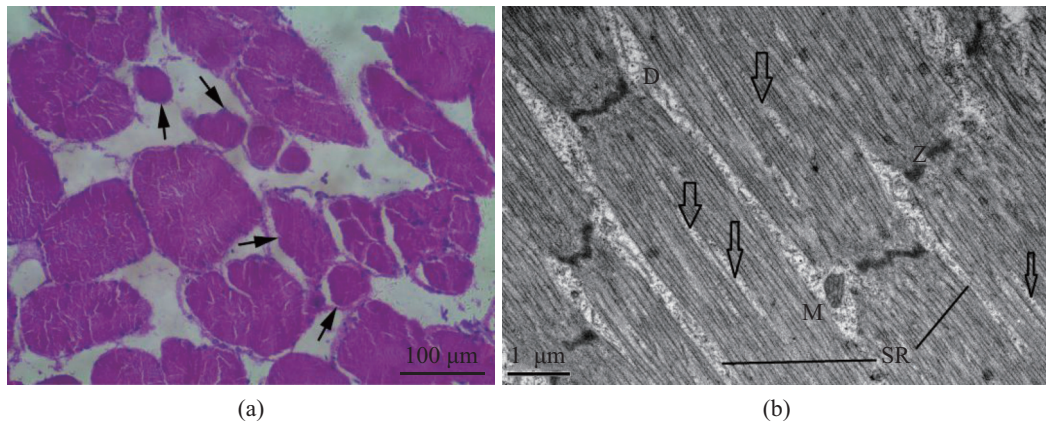


图7 中华绒螯蟹蜕皮前萎缩的蟹足肌纤维

(a) 光镜横切, 箭头示一系列横截面大小不一的肌纤维; (b) 电镜纵切, 箭头示肌原纤维内部粗肌丝降解形成的空洞, 线粒体(M), Z线(Z), 二联体(D)和肌质网(SR)完好

**Fig. 7 Atrophied claw muscle of *E. sinensis* in later pre-molt stage**

(a) light micrograph of the muscle cross section, the cross-sectional area of muscle fibers shows a variety of inequality in size due to proecdysial muscle atrophy (arrowheads); (b) longitudinal section of a fiber showing areas of erosion (arrowheads), the mitochondrion (M), Z line (Z), dyad (D) and sarcoplasmic reticulum (SR) are normal

间期是增加的, 有助于蜕壳后肌肉的生长, 如肌纤维长度增加(肌节数目增加或者原有肌节拉长)、肌原纤维(粗肌丝和细肌丝)数目增加等<sup>[20-21]</sup>。肌肉的生长受到多种基因的调控, 而*EsAkt*基因的上调或者下调, 也会影响PI3K-Akt-mTOR信号通路中其他基因的变化, 肌肉最终的生长状况是由各种调节因素共同作用的结果<sup>[22]</sup>。本研究清楚地表明, 在中华绒螯蟹蜕壳过程中, *EsAkt*基因在不同部位的肌肉组织中具有不同的表达模式, 与肌肉组织的形态结构变化密切相关, 推测*EsAkt*参与中华绒螯蟹蜕壳诱导的肌肉萎缩、生长及重建过程。

对于人体和小鼠等模式生物肌肉生长、维持和萎缩等疾病的分子机制的研究迄今不足20年, 而对水产甲壳动物肌肉发育调节的机制研究才刚刚引起重视<sup>[7]</sup>, 本研究通过RACE克隆技术获得编码*EsAkt*全长的cDNA序列, 分析了其表达特征, 丰富了十足目甲壳动物PI3K-Akt-mTOR信号通路研究的基本资料, 为进一步研究甲壳动物肌肉生长机制奠定了基础。

**参考文献:**

[1] Fayard E, Xue G, Parcellier A, *et al.* Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2010, 346: 31-56.

[2] Vasudevan K M, Garraway L A. AKT signaling in physiology and disease[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2010, 347: 105-133.

[3] Cohen S, Nathan J A, Goldberg A L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 14(1): 58-74.

[4] Egerman M A, Glass D J. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 49(1): 59-68.

[5] Sacheck J M, Ohtsuka A, McLary S C, *et al.* IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogen-1 and MuRF1[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism*, 2004, 287(4): E591-E601.

[6] Lai K M V, Gonzalez M, Poueymirou W T, *et al.* Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(21): 9295-9304.

[7] 田志环, 焦传珍. 甲壳动物蜕皮诱导的肌肉萎缩与生长[J]. *水产科学*, 2016, 35(5): 603-606.

Tian Z H, Jiao C Z. Muscle atrophy and growth induced by molting in crustacean: a review[J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 603-606(in Chinese).

[8] Tian Z H, Kang X J, Mu S M. The molt stages and the



- hepatopancreas contents of lipids, glycogen and selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fisheries Science, 2012, 78(1): 67-74.
- [9] 康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性的变化[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 806-812.
- Kang X J, Tian Z H, Wu J L, *et al.* Molt stages and changes in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 806-812(in Chinese).
- [10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [11] Rombel I T, Sykes K F, Rayner S, *et al.* ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification[J]. Gene, 2002, 282(1-2): 33-41.
- [12] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [13] 周颖, 王建, 贺福初. 蛋白激酶B(PKB/Akt)的结构、调控与功能[J]. 生命的化学, 2006, 26(3): 226-228.
- Zhou Y, Wang J, He F C. Structure, regulation and function of PKB/Akt[J]. Chemistry of Life, 2006, 26(3): 226-228(in Chinese).
- [14] Ruan L W, Liu R D, Xu X, *et al.* Molecular cloning and characterization of a threonine/serine protein kinase lvakt from *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(4): 792-798.
- [15] Latres E, Amini A R, Amini A A, *et al.* Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(4): 2737-2744.
- [16] de Oliveira Cesar J R, Zhao B Q, Malecha S, *et al.* Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 688-694.
- [17] Covi J A, Bader B D, Chang E S, *et al.* Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a myostatin-like factor during atrophy induced by molting or unweighting[J]. Journal of Experimental Biology, 2010, 213(1): 172-183.
- [18] Ismail S Z M, Mykles D L. Differential molt-induced atrophy in the dimorphic claws of male fiddler crabs, *Uca pugnax*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 263(1): 18-31.
- [19] 田志环, 焦传珍, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹蜕壳过程中螯足肌肉组织学及主要蛋白质含量变化[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1072-1078.
- Tian Z H, Jiao C Z, Cheng Y X, *et al.* Changes in histology and protein content in claw closer muscle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* during the molt cycle[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1072-1078(in Chinese).
- [20] El Haj A J, Clarke S R, Harrison P, *et al.* *In vivo* muscle protein synthesis rates in the American lobster *Homarus americanus* during the moult cycle and in response to 20-hydroxyecdysone[J]. Journal of Experimental Biology, 1996, 199(Pt 3): 579-585.
- [21] El Haj A J, Govind C K, Houlihan D F. Growth of lobster leg muscle fibers over intermolt and molt[J]. Journal of Crustacean Biology, 1984, 4(4): 536-545.
- [22] Abuhagr A M, MacLea K S, Chang E S, *et al.* Mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling genes in decapod crustaceans: cloning and tissue expression of mTOR, Akt, Rheb, and p70 S6 kinase in the green crab, *Carcinus maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 168: 25-39.

## Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of serine/threonine kinases *Akt* from *Eriocheir sinensis*

TIAN Zhihuan<sup>1,2</sup>, JIAO Chuanzhen<sup>1</sup>, CHENG Yongxu<sup>2\*</sup>, WU Xugan<sup>2</sup>

(1. College of Yingdong Life Science, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In the present study, full length cDNA encoding the serine/threonine kinases *Akt* from *Eriocheir sinensis* (*EsAkt*) was cloned by using 3'RACE and 5'RACE techniques, and the sequence and structural analysis of the *EsAkt* was conducted with bioinformatics methods. The results showed that the full length cDNA encoding *EsAkt* consisted of 2 200 bp nucleic acids in length, including a 5'-UTR of 159 bp, a 3'-UTR of 496 bp and an open reading frame (ORF) of 1 545 bp encoding 514 amino acids. Analysis of the protein domain features showed that the deduced polypeptides contained three conservative domains characteristic of Serine/Threonine protein kinases family. Multiple sequence alignment revealed that the amino acids sequences of *EsAkt* have the 0.889 identity with *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei*. The phylogenetic analysis showed that the *EsAkt* was arranged in the same clade with *Akts* from other arthropods. The tissue distribution of *EsAkt* mRNA in sexual maturity individuals and different muscle groups during molt cycle in juvenile crabs were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). In sexual maturity crabs, the *EsAkt* transcript was detected in eyestalk, claw muscle, ovary, heart, hepatopancreas, epidermis, testis, gill and triangular membrane, and the expression level was relatively high in ovary, eyestalk and testis, and was low in hepatopancreas. In juvenile crabs, the *EsAkt* transcript in different muscle groups was different depending on the molt stages. In walking leg muscles, the *EsAkt* expression level has no obvious change. In abdominal muscles, the *EsAkt* expression level was much higher in later pre-molt D<sub>3</sub>-D<sub>4</sub> stage than post-molt A-B stage and inter-molt C stage. In claw muscles, the *EsAkt* expression level was decreased rapidly in pre-molt D<sub>3</sub>-D<sub>4</sub> stage and increased in post-molt A-B stage, and lasted to inter-molt C stage. These results suggested that the expression of *EsAkt* transcript was related with the molt stage of *E. sinensis*, and it is possible that the *EsAkt* is involved in the muscle atrophy, growth and rebuilding during the molt cycle of *E. sinensis*.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; *Akt* gene; gene clone; muscle growth; molting

**Corresponding author:** CHENG Yongxu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31572635); Hongkong, Macao and Taiwan Science and Technology Cooperation Projects (2014DFT30270); Projects from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (16DZ2281200); Shanghai Universities First-class Disciplines Project of Fisheries from Shanghai Municipal Education Committee (2015-62-0908); Agricultural and Technology Promotion Shanghai Municipal Agriculture Commission (2015D1-7); Key Support Project of Ecology from Shaoguan University (230079030101)