

文章编号: 1674-5566(2013)04-0531-07

中华绒螯蟹卵黄蛋白原基因 cDNA 序列的克隆与结构分析

邱凉, 刘红, 蔡生力

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 通过 RT-PCR, RACE 等技术克隆得到中华绒螯蟹卵黄蛋白原的 cDNA 序列全长, 其长度为 7 921 bp, 软件分析后知其含有一个 7 689 bp 的开放阅读框, 其 5' 和 3' 的非翻译区分别为 28 bp 和 204 bp; 预测该序列编码一个含 2 562 个氨基酸残基的蛋白质, 和其它已知卵黄蛋白原序列的蟹类相比, 理化性质、空间构型相似, 且含有 2 个结构域: 参与脂质转运的卵黄蛋白原 N 端结构域 (Vitellogenin_N), 以及血管性血友病因子 (von Willebrand factor) D 型结构域 (VWD)。将其开放阅读框翻译为氨基酸序列后进行数据库对比 (BLASTP), 与其他已知的甲壳类卵黄蛋白原序列间存在 33% ~ 77% 的相似性。

卵黄蛋白 (vitellin, Vn) 由卵黄蛋白原^[1] (Vitellogenin^[2], Vg) 修饰而来, 它为胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素、磷和硫等物质, 并能转运脂肪^[3-4]、甲状腺素、核黄素、维生素 A、类胡萝卜素以及多种金属至卵母细胞^[5-7], Vg 在线虫和小龙虾的胚胎发育中发挥免疫防御作用^[8]; 还可降低蜜蜂体内自由基引发的氧化从而延长寿命^[9]。

经济类甲壳动物 Vg 的结构和功能被学者广泛重视, 而 cDNA 编码区序列是基础。但迄今为止, 经济类甲壳动物中已知卵黄蛋白原全长的蟹类只有蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)^[10]、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[11]、锈斑蜉 (*Charybdis feriatu*)^[12]。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 分布在我国北起辽河南至珠江的广大水域中, 味道鲜美, 营养丰富。关于其卵黄蛋白的相关报道多停留在卵黄的形成^[13-14] 和发生的形态学观察^[15],

研究亮点: 参考 4 种已知的蟹类卵黄蛋白原 (Vg) 基因的 cDNA 序列设计简并引物, 通过经典的 RACE 与 RT-PCR 技术首次克隆得到我国重要的经济蟹中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 序列全长, 并用软件在分子和蛋白水平上对 5 种蟹 Vg 结构、理化性质和功能加以预测、分析、比较, 为进一步阐述它在中华绒螯蟹生长发育中的作用机理提供参考。

关键词: 中华绒螯蟹; 卵黄蛋白原; cDNA; 克隆

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

对于 cDNA 序列及其结构预测和功能分析很少, 本研究首次克隆了中华绒螯蟹 Vg cDNA 全长, 并进行序列分析比较, 希望能为进一步阐述 Vg 在中华绒螯蟹生长发育中的作用机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的中华绒螯蟹购买自上海市浦东新区临港新城古棕路菜市场。

1.2 实验试剂

总 RNA 提取试剂 (Trizol Reagent) 购自 Invitrogen 公司; PrimeScript[®] RTase、Taq DNA 聚合酶、PMD19-T 载体、3'RACE 和 5'RACE 试剂盒均购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司; DNA Marker、琼脂糖、普通 DNA 纯化试剂盒、大肠杆菌 TOP10 购自天根生化有限公司, 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, DNA 测序在上海杰里有限公司进行。

收稿日期: 2013-03-21 修回日期: 2013-04-27

基金项目: 上海市教育委员会创新项目 (12YZ125); 上海市教育委员会重点学科建设项目 (海洋生物学 J50701)

作者简介: 邱凉 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋动物的繁殖与发育生物学。E-mail: dyqiuqiul23@126.com

通信作者: 刘红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

1.3 中华绒螯蟹总 RNA 的提取和鉴定

取成熟的中华绒螯蟹,用灭菌的镊子取肝胰腺,置于无 RNase 的离心管内,迅速置于液氮冷冻。取部分样品供随后抽提总 RNA 之用,其余样品转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。总 RNA 的提取按照 Trizol 提取法。取少量提取的 RNA 用于浓度测定、质量和电泳检测,其余置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 中华绒螯蟹 cDNA 第一链的合成及中华绒螯蟹卵黄蛋白原全长 cDNA 的克隆

在无 RNase 的离心管中构建 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体系,以 $2\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, Oligo (dT) 为引物按照试剂盒说明书进行反应,得到的 cDNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

参考其它蟹类和虾类的卵黄蛋白原 cDNA

(以后简称为 Vg cDNA) 序列全长,预计中华绒螯蟹的 Vg cDNA 序列长度应该在 8 kb 左右,实验中采用分段扩增的方法,参考蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)^[13]、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[14]、锈斑蜆 (*Charybdis feriatus*)^[15] 等的 Vg cDNA 序列设计简并引物并进行 RT-PCR 扩增,具体扩增片段及其相对应引物见表 1 和图 1。表中引物对 1 对应图中扩增片段 1,以此类推。图 1 中灰色片段为中华绒螯蟹 Vg cDNA 已知片段,以此设计引物对 2 中的上游引物作为扩增起点,下游引物来自其他蟹类的保守区域,扩增产物为图 1 中的片段 2,再以片段 2 开始依次向上游和下游分别进行 RT-PCR 扩增,片段 8 和 9 为 3' 和 5' 的 RACE 产物。

表 1 中华绒螯蟹 Vg cDNA 序列克隆中所用的引物
Tab.1 Primers used in the cloning of Vg cDNA of *Eriocheir sinensis*

引物	对应序列	预计扩增产物大小/bp
1 Esi-F-1971 Esi-R-3061	5'-GGTGCCGAAGTAGAGTCCAAC-3' 5'-TTTATGGAGGACTCARTCTTGTGA-3'	1091
2 Esi-F-45nt Esi-R-2006nt	5'-GCTGAGCGYGGGCCAYC-3' 5'-GGGAGCGTAGATAAGGTTGG-3'	1962
3 Esi-F-2753 Esi-R-4464	5'-CAAGGTGAATGGCCGTAGAGA-3' 5'-MWTCTTTTTIRGAATTCATGA-3'	1711
4 Esi-F-3761 Esi-R-5328	5'-CACGCCAGCACCCACCTTC-3' 5'-CGCCTGCAGCCCTGTTCCGGGTAGA-3'	1567
5 Esi-F-5005 Esi-R-7103	5'-GGCGGAGTTAAGACCTGGGA-3' 5'-GTCRAADGTRARAATYTCAGTGTTC-3'	2051
6 Esi-F-6764nt Esi-R-7624nt	5'-CAAGGAGGAAAACCGCTGAAGTC-3' 5'-CGGCACGGTCTCATAAGGTAG-3'	861
7 Esi-F-7272 Esi-R-7715	5'-GGSAGRCAGACTGTKGGTGA-3' 5'-NAGGCASAAAACWMTGCTAGGA-3'	444
8 3'RACE-outer-1 3'RACE-inner-2	5'-CTTCAGAGTGACCTCAGGCTACA-3' 5'-ACGGCAGGAACGCCACAAAAC-3'	658
9 5'RACE-outer-1 5'RACE-inner-2	5'-GATCGGGAAAACGATGTCTGGA- 5'-TGTTGATTGCCAGGTGTCGTCGT-3'	554

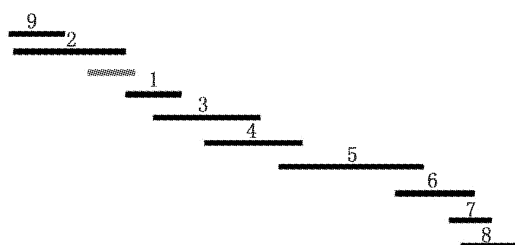


图 1 中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 序列
全长扩增示意图

Fig.1 The schematic diagram for the amplification of the full-length cDNA of vitellogenin of *Eriocheir sinensis*

取中华绒螯蟹卵巢组织 cDNA 进行 RT-PCR 扩增及 RACE 反应, RT-PCR 反应退火温度为 $50.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。所得 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并用胶回收试剂盒(天根)纯化目的片段,然后连入 pMD19-T 载体并转化 TOP10 感受态细胞。所得菌落经过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后,送至上海杰里生物技术有限公司进行序列测定。将所有 RT-PCR 及 RACE 反应所得到的测序结果运用 BioEdit 软件进行分析拼接,最终得到中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 的全长序列并进行随后的分析。

1.5 中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 序列分析

1.5.1 系统进化分析

根据所得到的中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 的全长序列结合已经发表的其他部分十足目甲壳动物卵黄蛋白原 cDNA 全长序列,运用 MEGA 4.0 软件的 NJ (Neighbor -Joining) 法构建十足目甲壳动物的系统进化树,选择欧洲大扇贝 (*Pecten maximus*) 作为外延物种。所选的其他十足目甲壳动物的卵黄蛋白原氨基酸序列均从 NCBI 中的 GeneBank 下载,具体物种及其 GenBank 中的序列号分别为: 墨吉明对虾 (*Fenneropenaeus merguensis*) ACV32381. 1、中国明对虾 (*F. chinensis*) ABC86571. 1、短沟对虾 (*Penaeus semisulcatus*) AAL12620. 3、斑节对虾 (*P. monodon*) ABB89953. 1、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) AAP76571. 2、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) BAD98732. 1、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) BAB69831. 1、高背长额虾 (*Pandalus hypsinotus*) BAD11098. 1、红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) AAG17936. 1; 美洲龙虾 (*Homarus americanus*) ABO09863. 1; 大螯蛄虾 (*Upogebia major*) BAF91417. 1、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) ACO36035. 1、锈斑蜆 (*Charybdis feriatius*) AAU93694. 1、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) AAX94762. 1、蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) ABC41925. 1 和欧洲大扇贝 (*Pecten maximus*) CAQ06469. 2。

1.5.2 生物信息学分析

将上面所获得中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 的全长序列运用 ProtParam 程序 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 进行蛋白质的一级结构预测,用 TMPRED 在线软件进行 5 种蟹类该蛋白的跨膜结构预测,通过 NCBI 网站以及 ScanProsite 软件 (<http://prosite.expasy.org/>) 两种方法分别预测分析结构域;通过 Esypred (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) 和 RasMol 软件进行三级结构预测分析。

2 结果

2.1 卵黄蛋白原全长 cDNA 的克隆及结构分析

以中华绒螯蟹卵巢总 RNA 为模板,首先进行 Vg cDNA 中间部分片段的 PCR 扩增(图 2 中的 1-7),将扩增片段进行拼接,得到一段 7 671

bp 序列;在此基础上,通过 3'-RACE 和 5'-RACE 分别得到长度为 658 bp 和 468 bp 的两段序列(图 2 中的 8 和 9)。经 BioEdit 软件拼接,得到中华绒螯蟹 Vg cDNA 全长序列(图 3)。该 cDNA 全长为 7 921 bp,软件分析后推测其包括一段编码 2 562 个氨基酸残基的 7 689 bp 的开放性阅读框(ORF),一段 28 bp 的 5'非翻译区(UTR)和一段 204 bp 的 3'非翻译区(UTR)。将其开放阅读框翻译为氨基酸序列后进行 BLASTP,发现与其它已知的十足目甲壳动物 Vg cDNA 序列间存在 63% ~ 74% 的片段相似性,氨基酸序列存在 36% ~ 60% 的相似性(表 3)。该序列已获得 GenBank 登录号:KC699915。

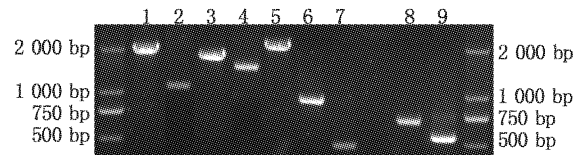


图 2 RT-PCR 及 RACE 法克隆中华绒螯蟹卵黄蛋白原基因 cDNA 全长中所获得的扩增产物

Fig. 2 The amplification product of the full-length cDNA cloning of vitellogenin gene by the method of RACE

M. Marker; 1. 45 ~ 2 006 bp; 2. 1 971 ~ 3 061 bp; 3. 2 753 ~ 4 464 bp; 4. 3 761 ~ 5 328 bp; 5. 3 761 ~ 5 328 bp; 6. 5 005 ~ 7 103 bp; 7. 6 764 ~ 7 624 bp; 8. 3'RACE(658 bp); 9. 5'RACE(554 bp)。

2.2 卵黄蛋白原进化树构建

NJ 系统进化树分析(图 3)从分子水平上表明了中华绒螯蟹在进化中所占据的位置:十足目甲壳动物基本聚为两簇,大螯蛄虾与所有蟹类聚在一起,其他对虾、真虾、螯虾等聚为一簇。在对虾类中,墨吉明对虾和中国明对虾聚为一簇,呈现最近的亲缘关系,接下来亲缘关系由近到远依次为短沟对虾、凡纳滨对虾、斑节对虾、日本囊对虾和刀额新对虾。在螯虾类中,红螯螯虾和美洲龙虾聚为一簇;在真虾类中,高背长额虾和罗氏沼虾聚为一簇,呈现较近的亲缘关系;大螯蛄虾与蟹类聚为十足目甲壳动物的另外一簇,在蟹类中,中华绒螯蟹在 5 种蟹中更为独立成簇,与其它 4 种蟹类间呈现较远的亲缘关系。欧洲大扇贝作为双壳类软体动物的代表物种,独立成簇,显示了与甲壳动物间距离较远,正是其作为外延物种的特征。

表 2 中华绒螯蟹卵黄蛋白原 cDNA 序列与其他十足目甲壳动物 Vg cDNA 的比较

Tab. 2 The results of similarity comparison between vitellogenin of *Eriocheir sinensis* and other crustaceans

物种名称	cDNA 全长/bp	DNA 序列相似性/%	编码的氨基酸数/个	氨基酸序列相似性/%
拟穴青蟹 (<i>Scylla paramamosain</i>)	7 816	74(2 338/3 179)	2 560	60(1 524/2 549)
三疣梭子蟹 (<i>Portunus trituberculatus</i>)	7 846	72(2 301/3 188)	2 560	58(1 490/2 555)
蓝蟹 (<i>Callinectes sapidus</i>)	7 833	72(2 360/3 273)	2 563	58(1 497/2 570)
锈斑蜉 (<i>Charybdis feriata</i>)	8 032	68(4 851/7 138)	2 579	57(1 475/2 573)
红螯螯虾 (<i>Cherax quadricarinatus</i>)	7 944	64(1 369/2 152)	2 584	40(1 052/2 608)
美洲龙虾 (<i>Homarus americanus</i>)	8 518	65(1 407/2 150)	2 583	40(1 041/2 599)
墨吉明对虾 (<i>Fenneropenaeus merguensis</i>)	7 961	66(508/770)	2 587	36(934/2 595)
刀额新对虾 (<i>Metapenaeus ensis</i>)	7 898	63(1 191/1 881)	2 592	36(924/2 601)
斑节对虾 (<i>Penaeus monodon</i>)	7 948	67(495/741)	2 584	36(933/2 612)
中国明对虾 (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	7 956	66(528/794)	2 587	36(933/2 602)
凡纳滨对虾 (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	7 970	66(543/819)	2 587	36(948/2 604)
日本囊对虾 (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	7 931	66(539/812)	2 587	36(931/2 597)
大螯蛄虾 (<i>Upogebia major</i>)	7 799	66(1 190/1 807)	2 568	39(998/2 575)

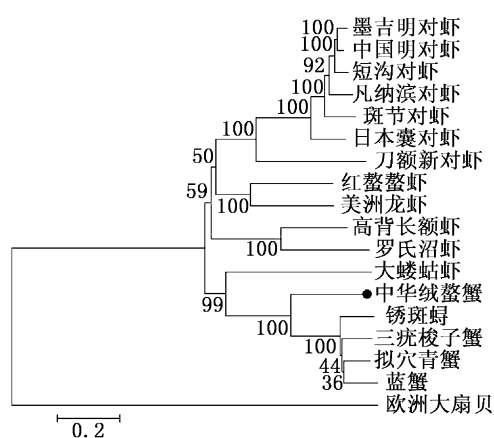


图 3 十足目甲壳动物代表性物种的卵黄蛋白原基因系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of Vg of the representative species among decapod crustaceans

2.3 卵黄蛋白原理化性质分析

为了分析卵黄蛋白原基因的蛋白质一级结构,我们利用 ProtParam 程序 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>),选取另外 4 种蟹包括蓝蟹 (CS)、锈斑蜉 (CF)、三疣梭子蟹 (PT) 和拟穴青蟹 (SP) 与中华绒螯蟹 (ES) 卵黄蛋白原的氨基酸序列进行了理化性质的比较分析。其结果显示

(表 3),5 种蟹的卵黄蛋白原氨基酸残基数、分子量、理论等电点、非极性氨基酸和极性氨基酸数、不稳定系数、总平均亲水性数值无大差异。

2.4 跨膜结构预测

通过 TMPRED 在线软件预测 5 种蟹类卵黄蛋白原的跨膜结构,结果显示(表 4),中华绒螯蟹和蓝蟹均含有两种跨膜结构,即膜内到膜外结构和膜外到膜内结构;另外三种蟹都仅有一个由膜内到膜外的跨膜结构。以 ES-Vg 为例,Vg 在 2 542~2 562 和 6~25 处是它的两个跨膜区域^[16]。

2.5 结构域预测

根据 NCBI 结构域预测结果分析中华绒螯蟹 Vg 蛋白含有 6 种结构域(表 5)。其中 4 种与已知结构域相似,其余 2 个分别为由 β 折叠形成的 DUF1943 未知功能结构域和与家蚕载脂蛋白 (Apolipoprotein) 同源的 DUF1081 未知功能结构域;4 个已知结构域分别为:脂蛋白 (Lipoprotein) N 端结构域 (LPD_N) 和卵黄蛋白原 N 端结构域 (Vitellogenin_N);以及两个血管性血友病因子 (von Willebrand factor) D 型结构域 (VWFD)。

表 3 5 种蟹类卵黄蛋白原的理化性质比较

Tab. 3 Comparisons of physical and chemical properties of Vg among 5 crab species

	ES-Vg	CS-Vg	CF-Vg	PT-Vg	SP-Vg
氨基酸残基数	2 562	2 563	2 579	2 560	2 560
分子量	287 393.0	288 113.8	289 984.4	287 196.2	287 743.9
等电点	8.03	6.71	7.88	6.81	6.62
非极性氨基酸(个数/比例)	1 089/42.5%	1 089/42.5%	1 087/42.1%	1 095/42.8%	1 093/42.7%
极性负电氨基酸(个数/比例)	301/11.7%	276/10.8%	270/10.5%	274/10.7%	272/10.6%
极性正电氨基酸(个数/比例)	347/13.5%	321/12.5%	336/13.0%	320/12.5%	324/12.7%
极性不带电氨基酸(个数/比例)	825/32.2%	877/34.2%	886/34.4%	871/34.0%	871/34.0%
不稳定系数	41.94	42.48	45.37	46.55	47.58
总平均亲水性	-0.300	-0.230	-0.246	-0.205	-0.224

注: ES-Vg 为中华绒螯蟹卵黄蛋白原; SP-Vg 为拟穴青蟹卵黄蛋白原; PT-Vg 为三疣梭子蟹卵黄蛋白原; CF-Vg 为锈斑蜉卵黄蛋白原; CS-Vg 为蓝蟹卵黄蛋白原。

表 4 5 种蟹类卵黄蛋白原的跨膜结构预测结果
Tab.4 Transmembrane helices prediction of Vg of 5 crab species

	ES-Vg	SP-Vg	PT-Vg	CF-Vg	CS-Vg
由膜内到膜外	2 542 ~ 2 562	1 ~ 21	6 ~ 22	1 ~ 21	6 ~ 22 1 674 ~ 1 693
由膜外到膜内	6 ~ 25				383 ~ 403 2 440 ~ 2 458

注: ES-Vg 为中华绒螯蟹卵黄蛋白原; SP-Vg 为拟穴青蟹卵黄蛋白原; PT-Vg 为三疣梭子蟹卵黄蛋白原; CF-Vg 为锈斑蜆卵黄蛋白原; CS-Vg 为蓝蟹卵黄蛋白原。

表 5 中华绒螯蟹 Vg 结构域预测
Tab.5 Prediction of *Eriocheir sinensis*'s vitellogenin's domain

结构域名称	在氨基酸序列中 所处氨基酸位数
脂蛋白 N 端结构域 LPD_N	41 ~ 588
卵黄蛋白原 N 端结构域 Vitellogenin_N	41 ~ 588
DUF1943 未知功能结构域	620 ~ 927
DUF1081 未知功能结构域	947 ~ 1 059
血管性血友病因子(von Willebrand factor) D 型结构域(VWFD)1	2 304 ~ 2 471
血管性血友病因子(von Willebrand factor) D 型结构域(VWFD)2	2 323 ~ 2 470

通过 Esypred (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) 软件在线生成卵黄蛋白原蛋白的 pdb 文件,再利用 Rasmol 软件对 pdb 文件进行分析处理,5 种蟹类卵黄蛋白原所含氢键(H - bond)、 α 螺旋(Helices)、 β 折叠链(strands)和 β 转角(Turns)的预测结果如表 6 所示。预测所得的 5 种蟹类卵黄蛋白原基本具有相似的三级结构。

表 6 5 种蛋白三级结构预测结果
Tab.6 Prediction of five proteins' tertiary structure

	CF/个	CS/个	ES/个	PT/个	SP/个
H-Bonds	431	524	374	430	546
Helices	21	22	23	22	23
Strands	51	56	40	52	48
Turns	92	84	90	76	80

注:CF 为锈斑蜆; CS 为蓝蟹; ES 为中华绒螯蟹; PT 为三疣梭子蟹; SP 为拟穴青蟹。

3 讨论

3.1 卵黄蛋白原基因 cDNA 序列及氨基酸序列的比较

本研究采用 RT-PCR 结合 RACE 法成功地克隆得到中华绒螯蟹卵黄蛋白原基因的 cDNA 全长序列,多聚丝氨酸区域是前后串连在一起的多个丝氨酸残基的特殊结构,可能是酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点^[17],在脊椎动物中可能参与骨的形成^[18],该区域在鱼类中较为常见^[19],中华绒螯蟹

和已知序列的四种蟹 Vg cDNA 均无该结构。而分析由 Vg 蛋白的 cDNA 序列所得的系统进化树(图 4)发现:所选的十足目甲壳动物分别聚为两支,一支是大螯蛄虾与 5 种蟹类,另一支是对虾、螯虾、龙虾和沼虾(真虾)。由此推断螯蛄虾类与蟹类在进化上有更近的亲缘关系,真虾类相比于螯虾和龙虾,与对虾类的亲缘关系要更远一些;该结果与动物分类学基本一致。中华绒螯蟹属于方蟹科,独立成簇,其它四种蟹类均属于梭子蟹科。本实验结果初步证明了十足目甲壳动物之间的 Vg 蛋白具有较高的同源性。

3.2 卵黄蛋白原的理化特性分析及空间结构

各种氨基酸在其等电点时,溶解度最小^[20],迄今已有不少关于卵黄蛋白分离纯化的报道^[21-22]。因此,以后的研究中我们或者可以从 Vg 蛋白质等电点的角度来鉴定这五种蟹。5 种蟹中,含有两种膜内外结构的 Vg 可能更有利于其膜内外运输^[16],可能与其繁殖发育的生物学功能有关。已知的卵黄蛋白原含有脂蛋白(Lipoprotein)N 端结构域(LPD_N),卵黄蛋白原 N 端结构域(Vitellogenin_N)和 VWFD 结构域,LPD_N 和 Vitellogenin_N 参与脂质转运^[23]。VWFD 结构域是血液凝集因子 VIII 结合到 VWF 的必需^[24],推断该结构域在中华绒螯蟹中可能参与血液的形成。

氢键(H-bonds)是形成 α 螺旋(helix)和 β 片层(sheet)的重要作用力^[25-29]。 α 螺旋结构证实蛋白质的结构与其功能特性有密切联系^[29]。 β -转角(turns)在蛋白质折叠、稳定性和分子识别过程方面起重要作用^[30]。根据软件预测分析,这 5 种蟹的三级结构均含有螺旋、转角、折叠这三种要素,且在数量上相差不大,推断在胚胎发育及早期幼体发育时期,它们对于个体的生长发育繁殖均有类似的功能和作用。

3.3 卵黄蛋白原表达部位的研究

本文证实在中华绒螯蟹肝胰腺中存在 Vg 表

达,证实肝胰腺作为卵巢外组织合成 Vg。而中华绒螯蟹在其他组织中是否表达 Vg,有待于进一步研究。三疣梭子蟹^[31]、美洲蓝蟹^[32]、中国明对虾^[33]、印度明对虾^[34]肝胰腺和卵巢中均存在 Vg 的表达,而 KANG 等^[35]研究发现在刀额新对虾的一种卵黄蛋白原(MgVg2)仅在其成年虾的肝胰腺中表达。因此,今后的实验可以就 Vg 的表达部位、表达量在定量水平上进行研究,以及 Vg 在各个部位合成后如何通过血液循环转运至卵巢展开进一步研究。

中华绒螯蟹卵黄蛋白 cDNA 序列的克隆与蟹类结构预测分析,证实 Vg 在蟹类中功能的一致性和个体的差异性,表明 Vg 不只是作为卵黄提供胚胎发育的营养而是具有较复杂的生物学功能^[36]。为 Vg 蛋白的组分、多寡、集聚、分布等方面提供丰富和扎实的理论基础,从而使得我们对蟹类以及甲壳动物的生长发育研究更加深入,进而更加合理地运用于生产指导,创造出更大的经济价值。

参考文献:

- [1] 马杰,张士瑾,卵黄蛋白的结构和功能[J]. 鲁东大学学报,2012(28): 252-260.
- [2] PAN M L, BELL W J, TELFER W H. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body[J]. Science, 1969, 165 (3891): 393-394.
- [3] QUACKENBUSH L S. Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: in vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1989, 94: 253-261.
- [4] QUACKENBUSH L S. Yolk Protein Production in the Marine Shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Crustacean Biology, 1989, 9(4): 509-516.
- [5] AZUMA M, IRIE T. Seki TRetinals and retinols induced by estrogen in the blood plasma of *Xenopus laevis*[J]. Journal of Experimental Biology, 1993, 178: 89-96.
- [6] ANDO S, HATANO M. Distribution of carotenoids in the eggs from four species of salmonids [J]. Comp Biochem Physiol B, 1991, 99: 341-344.
- [7] MONTORZI M, FALCHUK K H, VALLEE B L. *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein [J]. Biochemical and biophysical research, 1994, 200(2): 1407-1413.
- [8] SODERHALL K. Defence reactions in a crustacean [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1997, 21(2): 137.
- [9] SEEHUUS S C, NORBERG K, GIMSA U, et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(4): 962-967.
- [10] ZMORA N, TRANT J, CHAN SM, et al. Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: gene expression, synthesis, transport, and cleavage[J]. Biology of reproduction, 2007, 77 (1): 138-146.
- [11] YANG F, XU H T, DAI Z M, et al. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 142(4): 456-464.
- [12] MAK A S C, CHOI C L, TIU S H K, et al. Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatius*: Hepatopancreas-specific expression and farnesic acid stimulation of vitellogenin gene expression [J]. Molecular reproduction and development, 2005, 70(3): 288-300.
- [13] 堵南山,赖伟. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究[J]. 动物学报, 1999, 45(1): 88-92.
- [14] 张年国,张颖,大江,曲秋芝. 卵黄蛋白原的发生、结构及功能研究现状[J]. 水产学杂志, 2007, 20(1): 97-106.
- [15] 邱高峰,陶铜静. 中华绒螯蟹卵黄发生的超微结构研究[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 8-14.
- [16] 云马,骆莹莹,芬李,等. 牛 ANGPTL4 基因结构和功能的生物信息学分析[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(1): 135-140.
- [17] MEGGIO F, PINNA L A. Phosphorylation of phosphofin by casein kinase—2 provides the evidence that phosphoserines can replace carboxylic amino acids as specificity determinants [J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 971(2): 227-231.
- [18] NARDELLI D, GERBERR-HUBER S, van het SCHIP F D, et al. Vertebrate and nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor Eli [J]. Biochemistry, 1987, 26: 6397-6402.
- [19] 朱劭,董文杰,刘佳. 超声波协同等电点沉淀法提取螺旋藻藻胆蛋白工艺的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 146-150.
- [20] GARCÍA-OROZCO K D, VARGAS-ALBORES F, ROGERIO R S M, et al. Molecular characterization of vitellin from the ovaries of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2002, 133(3): 361-369.
- [21] CHANG C F, LEE F Y, HUANG Y S. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1993, 105(3/4): 609-615.
- [22] ANDERSON T A, LEVITT D G, BANASZAK L J. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein [J]. Structure, 1998, 6(7): 895-909.
- [23] JORISUX S, FRESSINAUD E, GOUEMAND J, et al. Conformational changes in the D' domain of von Willebrand factor induced by CYS 25 and CYS 95 mutations lead to factor VIII binding defect and multimeric impairment [J].

- Blood,2000,95(10):3139-3145.
- [24] PAULING L, COREY R B, BRANSON H R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1951, 37(4):251-256.
- [25] PAULING L, COREY R B. The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1951, 37(5):251-256.
- [26] PAULING L, COREY R B. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1951, 37(5):729-740.
- [27] PAULING L, COREY R B. Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1951, 37(5):235-240.
- [28] 孙卫涛,蛋白质折叠的统计热力学基础——非共价作用的统计热力学原理[J].力学进展,2011,41(4):427-446.
- [29] 向义和. 蛋白质分子 α 螺旋结构的发现 [J]. 自然杂志, 2010,32(1):46-53.
- [30] 钱刚,王海燕,袁哲明. 运用 PDB 中的同源信息提高 NefTumP 的蛋白质 β 转角预测精度 [J]. 生物化学与生物物理进展,2012,39(5):472-482.
- [31] FAN Y, XU H T, DAI Z M, et al. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005 142: 456-464.
- [32] ZMORA N, TRANT3 J, CHAN S M. Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: Gene Expression, Synthesis, Transport, and Cleavage [J]. Biology of Reproduction, 2007 77, : 138-146.
- [33] 程翔,蔡生力,刘红,等 中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的表达量的实时荧光定量 PCR 检测 [J]. 上海海洋大学学报, 2012,21(1): 1-6.
- [34] BOUCARD C G V, LEVY P, CECCALDI H J, et al. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002,281: 63-75.
- [35] YANG W J, OHIRA T, TSUTSUI N. Determination of amino acid sequence and site of mRNA expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Experimental Zoolol, 2000,287:413-422.
- [36] 张士瑾,孙旭彤,李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展 [J]. 海洋科学,2002,26(7):32-35.

Cloning and structural analysis of the vitellogenin cDNA of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

QIU Liang, LIU Hong, CAI Sheng-li

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The present study was focused on the cloning of vitellogenin cDNA sequence of *E. sinensis* by the methods of RT-PCR and RACE. The structure of the sequence was also analyzed. It was found that the vitellogenin cDNA of *E. sinensis* is of 7 955 bp, which contained 7 689 bp of an open reading frame (ORF), 62 bp of the 5'UTR and 204 bp of the 3'UTR, respectively. The further analysis showed that this gene maybe encode a kind of protein of 2 562 amino acid residues, compared with other crabs whose Vg sequences are known, their physicochemical properties and spatial structure are similar, and all contain 2 kinds of structural domains: the N-terminal domain of vitellogenin with the function of lipid-traffic, and the von Willebrand factor D-type domain. The identities of the amino acid sequence of vitellogenin were about 33% - 77% compared with other known crustacean species. This confirmed the functional consistency in crabs and individual differences, and makes our research about growth more in-depth. It can be applied in more rational production guidance and can create greater economic values.

Key words: vitellogenin; *Eriocheir sinensis*; cDNA; cloning