

DOI: 10.11758/yykxjz.20161128001

http://www.yykxjz.cn/

王竹青, 任宪云, 高保全, 刘萍, 张小辉, 张杰, 于旋. 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶  $\beta$  亚基(*F-ATPase $\beta$* )基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 97-106

Wang ZQ, Ren XY, Gao BQ, Liu P, Zhang XH, Zhang J, Yu X. cDNA cloning and expression analysis of *F-ATPase $\beta$*  subunit gene in *Portunus trituberculatus* and its variation in family inbreeding. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 97-106

## 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶 $\beta$ 亚基(*F-ATPase $\beta$* )基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化\*

王竹青<sup>1,2</sup> 任宪云<sup>2</sup> 高保全<sup>2</sup> 刘萍<sup>2①</sup>  
张小辉<sup>1,2</sup> 张杰<sup>1,2</sup> 于旋<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 采用 RACE 技术(cDNA 末端快速扩增技术)克隆获得三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) F 型 ATP 酶  $\beta$  亚基(*F-ATPase $\beta$* )基因, 命名为 *ptF-ATPase $\beta$* 。该基因 cDNA 全长为 1965 bp, 5'和 3'非编码区分别为 571 bp 和 341 bp, 开放阅读框为 1053 bp, 推测编码 350 个氨基酸, 预测分子量为 37.9 kDa, 理论等电点为 4.86。*ptF-ATPase $\beta$*  氨基酸序列含有 F1-ATPase $\beta$  标志性蛋白结构域、AAA 结构域和 ATP-synt-ab-C 结构域。同源性及系统分析显示, *ptF-ATPase $\beta$*  氨基酸序列与斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性高达 89%。实时荧光定量 PCR 显示, *ptF-ATPase $\beta$*  基因在肝胰腺、肌肉、心脏、鳃、胃、肠、精巢和卵巢中均有表达, 其中, 在肝胰腺和心脏中表达量最高, 在肠中最少。随着近交系数的增加, 各代 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的表达量在肝胰腺和心脏中均下降且显著低于 F<sub>0</sub>代( $P < 0.05$ )。酶活检测结果显示, 心脏中的 ATP 合酶活性从 F<sub>6</sub>代开始出现下降且显著低于 F<sub>0</sub>代( $P < 0.05$ ), 但肝胰腺中 ATP 合酶活性无显著变化。本研究结果表明, 近交造成了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因表达及 ATP 合酶活力的衰退。

**关键词** 三疣梭子蟹; *F-ATPase $\beta$* ; 基因克隆; 表达分析; 近交

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0097-10

ATP 合酶又称 F 型 ATP 酶(F-ATPase), 广泛分布于线粒体内膜上, 是生物体能量代谢的关键酶, 在生物体内通过氧化磷酸化和光合磷酸化参与到 ATP 的合成过程(王镜岩等, 2002)。ATP 合酶是一个蛋白质复合体, 呈蘑菇状, 分为球形的 F1(头部)和嵌入膜内的 F0(基部)。F1 是由 5 种多肽组成的  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  复合体,

具有 3 个 ATP 合成催化位点, 而只有  $\beta$  亚基可催化 ATP 的合成反应。F0 是由 3 个多肽组成的  $ab_2c_{12}$  复合体, 并嵌入线粒体内膜(倪张林等, 2003)。ATP 合酶  $\beta$  亚基在植物叶绿体和线粒体中的研究较多, 证明其功能与植物体胚发育(赖呈纯等, 2010)、盐度适应(李敏等, 2013)、次生代谢(关蕾, 2013)等有关。在水产动物中

\* 国家自然科学基金面上项目(41576147)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(20603022015016)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41576147), the Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), and the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes (20603022015016)]. 王竹青, E-mail: leon19910215@outlook.com

① 通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-11-28, 收修改稿日期: 2016-12-27

对 ATP 合酶  $\beta$  亚基研究较少。Li 等(2009)发现, ATP 合酶  $\beta$  亚基与无脊椎动物造血激素存在特异性结合作用。徐萌霖(2013)发现, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)ATP 合酶  $\beta$  亚基 BP53 蛋白可作为受体参与对虾白斑综合征病毒(WSSV)的感染, 并证明了凡纳滨对虾造血激素和 WSSV 的粘附蛋白 V37 分别与 ATP 合酶  $\beta$  亚基存在特异性结合作用。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)ATP 酶的研究仅限于 P 型 ATP 酶, 比如  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 酶和  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 酶, 并证明其参与离子转运和渗透压调节等作用(周东等, 2014; 韩晓琳等, 2012; 江山等, 2011)。ATP 合酶在三疣梭子蟹生长发育、能量代谢过程中发挥着重要的作用, 但对三疣梭子蟹 ATP 合酶的研究尚未见报道, 而且目前三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$*  亚基全长 cDNA 序列尚未被克隆。通过对本实验室三疣梭子蟹转录组数据库的分析与筛选, 发现自交 7 代的大个体组相对于小个体组有 2869 个差异表达的基因。通过对差异基因开展进一步生物学进程 KEGG 富集分析, 筛选出的差异基因富集的代谢通路主要有氧化磷酸化通路、细胞凋亡通路和对应外界刺激。因此, 研究三疣梭子蟹 ATP 合酶对于深入研究其氧化磷酸化等代谢通路有着极其重要的作用。已有研究表明, 近交能引起三疣梭子蟹能量代谢相关基因及代谢酶活力的衰退, 但是否也能引起 ATP 合酶基因及酶活力的衰退还有待研究。

本研究利用 RACE 技术首次成功克隆得到三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$*  亚基基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *ptF-ATPase $\beta$* , 并对得到的序列进行生物信息分析。利用实时荧光定量技术分析了该基因在三疣梭子蟹不同组织以及不同近交世代家系的肝胰腺和心脏中的表达情况。旨在明确三疣梭子蟹 ATP 合酶  $\beta$  亚基基因的表达特点, 揭示近交程度对该基因表达及其酶活力的影响, 为深入研究三疣梭子蟹能量代谢机制提供数据支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

自 2005 年, 本实验室每年将从山东莱州湾海区、辽宁鸭绿江口海区、江苏海州湾海区 and 浙江舟山海区获取的 4 个三疣梭子蟹不同地理群体作为基础群体, 在中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地潍坊昌邑海丰水产养殖有限公司利用人工定向交尾技术, 建立了全同胞姐妹交传代家系。良种家系留种传代, 至 2015 年已传至 11 代( $F_{11}$ )。分别选取 80 日龄  $F_0$ 、 $F_2$ 、 $F_4$ 、 $F_6$ 、 $F_8$  和  $F_{10}$  近交世代家系的三疣梭子蟹, 每代各取 6 只

(3 只雌蟹、3 只雄蟹), 暂养于室内水泥池中, 水池底面积为  $20 \text{ m}^2$ , 高度为 1.5 m, 池水深保持在 20~30 cm, 水温为  $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 溶解氧为 5.5 mg/L, 盐度为 31, pH 为 8.2。暂养 7 d, 每日 08:00 定时换掉 1/2 的水, 16:00 投喂新鲜野杂鱼, 投喂量为蟹体重的 1/10。

### 1.2 三疣梭子蟹总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

三疣梭子蟹各组织的总 RNA 采用 Trizol 法提取, 用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其总 RNA 的质量及完整性。取等量所取各组织的总 RNA 混匀, 合成 3' 和 5' RACE 的 cDNA 第一链, 具体方法参照 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 说明书。

### 1.3 三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$* 基因全长 cDNA 的克隆及验证

根据从三疣梭子蟹转录组数据库得到的 *F-ATPase $\beta$*  基因的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3' 和 5' 末端特异性引物。根据克隆出的 *F-ATPase $\beta$*  基因序列设计荧光定量引物。最后在该基因的两端设计正反向引物, 进行全长 cDNA 的验证。实验中用到的末端特异性引物和荧光定量引物分别由青岛擎科梓熙生物技术有限公司和上海生工生物有限公司合成(表 1)。利用 TaKaRa LA *Taq* 进行末端扩增, 3' 端用通用引物 UPM 和 NUP 分别与相应的特异性引物 ATPase-F1 和 ATPase-F2 进行巢式 PCR 扩增, PCR 程序:  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $65^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  3 min, 30 个循环; 5' 末端扩增同上。

表 1 三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$*  克隆和 mRNA 相对表达分析所用引物序列

Tab.1 Primers used for *ptF-ATPase $\beta$*  cloning and relative mRNA expression analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
ATPase-F1	CGAGGCATTGCTGAGTTAGGA
ATPase-F2	AAGACATCATTGCTATTCTGGGC
ATPase-R1	CCTTGGAAGAATCGTCGTTGA
ATPase-R2	TTGCCACACCAGCACCGC
QATPase-F	GGCGAACCAATAGACGAGAG
QATPase-R	TGCCAGTCACCAGGATTTG
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
$\beta$ -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
$\beta$ -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC
YATP-F	GACCACGCCTCCATTTCG
YATP-R	CTGCTGGCTCTGGTGTGTTATT

将 3'和 5' RACE 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up 试剂盒(TaKaRa)切胶纯化并连接到 pMD19-T, 转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在 LB 培养基中 37°C 培养 45 min 后, 再将菌液涂布于含 AMP 的 LB 平板上, 37°C 过夜培养。挑取阳性菌落继续培养, 并进行菌落 PCR 鉴定后送交青岛擎科梓熙生物技术有限公司测序。最后利用在基因的两端设计的正反向引物, 对其全长 cDNA 进行验证。

#### 1.4 三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$* 基因的生物学分析

使用 ORF Finding 在线工具确定 *ptF-ATPase $\beta$*  基因最大开放阅读框和编码区。利用 NCBI 中的 BLAST 主页程序进行三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的核苷酸和氨基酸序列的比对。利用 CExpres 和 Gene Tool 软件拼接比对核苷酸序列、去除冗余序列和翻译氨基酸。蛋白质理化性质预测、功能结构域分析、信号肽分析利用 InterProScan 和 SMART 等在线软件完成。利用 DNAMAN 进行 *ptF-ATPase $\beta$*  与其他物种的相应氨基酸序列的多重序列比对。利用 MEGA 6.0 软件, 以邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育进化树进行聚类分析。

#### 1.5 三疣梭子蟹线粒体的提取及 ATP 合酶活性测定

分别取不同近交世代家系的三疣梭子蟹肝胰腺、心脏, 每 2 只螃蟹(1 雌 1 雄)的组织放入一个冻存管中, 存放于液氮中保存。用研钵将采集的组织样品在液氮中研磨, 每个冻存管单独研磨, 取 100 mg 左右的组织粉末加入 2 ml EP 管中, 分别标记后放入 -80°C 冰箱中保存。

分别利用南京建成线粒体提取试剂盒和蛋白定量试剂盒提取所取组织的线粒体并测定其蛋白浓度。使用 ATP 合成酶活性光谱法定量检测试剂盒在 infinite 200 酶标仪中分别测定不同世代家系三疣梭子蟹各组织 ATP 合酶活力, 具体操作参照该试剂盒说明书进行。ATP 合酶活性单位浓度定义: 在 30°C 温度下, pH=7.5 条件下, 每分钟内能够氧化 1 mol 还原性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)所需的酶量为 1 个活性单位。

#### 1.6 三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$* 基因的表达定量分析

分别取三疣梭子蟹肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、胃、肠、精巢和卵巢及不同近交世代家系的三疣梭子蟹肝胰腺、心脏等组织, 每 2 只螃蟹(1 雌 1 雄)的组织放入一个冻存管中, 存放于液氮中保存。用 Trizol 试剂

提取三疣梭子蟹所取组织的总 RNA, 利用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 使用 PrimeScript RT Reagent Kit 反转录合成 cDNA, 具体方法参照试剂盒说明书。

根据已知的三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因 cDNA 全长序列, 设计 1 对正反特异引物(QATPase-F 和 QATPase-R)(表 1)。使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂(TaKaRa), 在 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪上分析各组织中 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的表达情况。PCR 反应体系为 10  $\mu$ l, 包括 5  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq II、1  $\mu$ l cDNA、0.4  $\mu$ l 浓度为 10 pmol/ $\mu$ l 正反向引物、0.2  $\mu$ l ROX Reference dye II 和 3  $\mu$ l PCR 反应水。反应程序: 95°C 10 min; 95°C 30 s, 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环; 95°C 15 s; 60°C 1 min; 95°C 15 s。以  $\beta$ -actin 基因为内参, 样本和内参均设置 3 个重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法(Livak *et al.*, 2001)计算 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的相对表达量。

#### 1.7 数据分析

实验三疣梭子蟹 ATP 合酶活性及相对定量数据采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示; 结果使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 利用 Duncan's 多重比较进行差异显著性检验,  $P < 0.05$  为差异显著。最后应用 Origin 2016 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$* 基因全长 cDNA 的克隆及验证

三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$*  基因的 EST 序列长 1692 bp, 用 BLAST 对序列进行在线比对, 结果显示, 该序列与其他物种的 *F-ATPase $\beta$*  基因的相似度在 79%以上。3'RACE 扩增结果得到 517 bp 的 cDNA 片段, 5'RACE 扩增结果得到 303 bp 的 cDNA 片段。将这 2 个片段与已知 EST 序列进行拼接得到三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$*  基因的全长 cDNA 序列, 并命名为 *ptF-ATPase $\beta$* 。对该基因 cDNA 序列全长进行测序验证, 结果显示, 扩增出的大小为 1745 bp 的序列完全覆盖 *ptF-ATPase $\beta$*  的开放阅读框(ORF), 表明得到 *ptF-ATPase $\beta$*  的 cDNA 序列准确可靠。三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的 cDNA 序列全长为 1965 bp (GenBank 登录号 KY130458), 其中包含 1053 bp 的 ORF, 571 bp 的 5'端非编码区(UTR)和 341 bp 的 3'端 UTR, 3'端存在多聚腺苷酸 Poly A 尾(图 1)。



InterProScan 软件分析结果显示, *ptF-ATPase $\beta$*  蛋白质存在 5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 SSK、TTK、TSR、TAR 和 TIR, 7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 SLND、TVAE、SMQE、SLQD、SEED、SLQD 和 SFEE, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 RGIAELGIY, 8 个 N 端酰基化位点 GKGIGL、GLFGGA、GAGVVK、GVGKTV、GLTVAE、GSEVSA、GSITSV 和 GIYPAV, 1 个 ATP 合酶  $\alpha$  和  $\beta$  亚基特征位点 PAVDPLDSTS, 1 个 ATP/GTP 结合位点基序 A(P-loop)GGAGVVKT。通过 CLC Main Workbench 5.6 软件分析其蛋白质二级结构含 104 个  $\alpha$ -螺旋(27.91%), 169 个无规则卷曲(48.29%) (图 3)。

### 2.3 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$* 基因序列同源性分析及系统进化树分析

利用 BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的氨基酸序列, 发现其与斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性达到 89%, 与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、豌豆长管蚜(*Acyrtosiphon pisum*)、玉带凤蝶(*Papilio polytes*)的同源性分别为 88%、88%、87%、86%和 86%(图 4)。

利用 MEGA 6.0 软件对三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  氨基酸序列进行系统进化分析, 并构建系统进化树

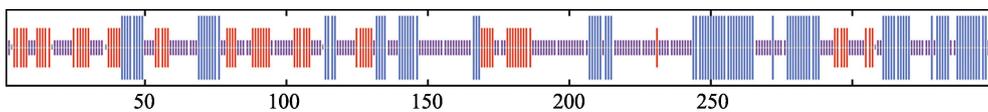


图 3 三疣梭子蟹 F-ATPase $\beta$  蛋白二级结构分析

Fig.3 Secondary structure of F-ATPase $\beta$  amino acid sequence of *P. trituberculatus*

蓝色代表  $\alpha$  螺旋, 红色代表延伸链, 紫色代表无规则卷曲

Alpha helix is indicated by blue, extended strand is indicated by red, random coil is indicated by purple

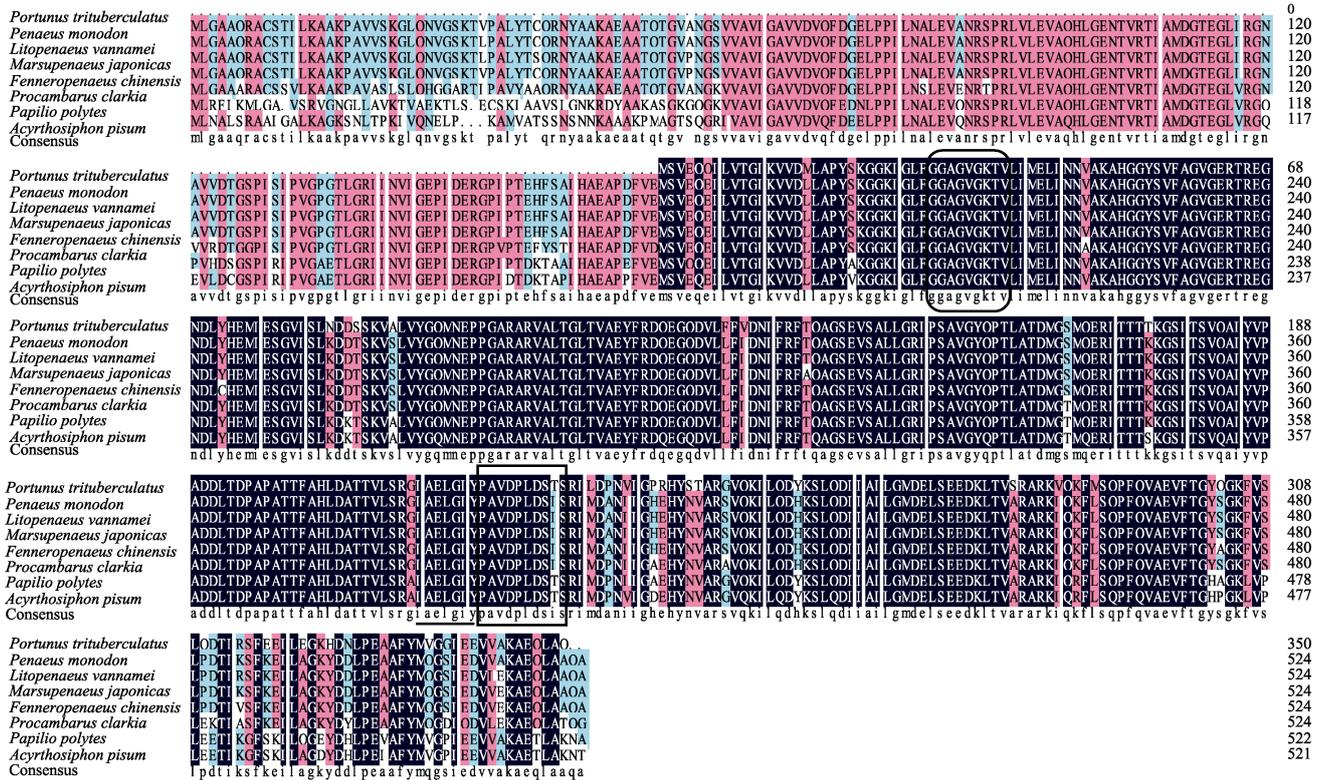


图 4 三疣梭子蟹 F-ATPase $\beta$  氨基酸序列与其他物种的 F-ATPase $\beta$  氨基酸序列比对

Fig.4 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *P. trituberculatus* F-ATPase $\beta$  and other species

方框中为 ATP 合酶  $\alpha$  和  $\beta$  亚基特征位点; 圆方框中为 ATP/GTP 结合位点基序 A(P-loop); 下划线为酪氨酸激酶磷酸化位点

Box: ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  subunits signature; Rounded rectangle: ATP/GTP-binding motif A(P-loop); Underline: Tyrosine kinase phosphorylation site

(图 5)。结果显示, 18 个物种中, 三疣梭子蟹与克氏原螯虾亲缘关系较近, 与鱼类、哺乳类关系较远。在对虾中, 斑节对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾和中国对虾紧密聚为一支, 之后与三疣梭子蟹聚为一支。

#### 2.4 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$* 基因在各个组织中的表达情况

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因在各组织中的表达情况(图 6)。结果显示, 该基因在 8 个组织中均有表达, 在肝胰腺、心脏和精巢中表达量最高, 其次是胃、肌肉、鳃、卵巢, 在肠中的表达量最少。

#### 2.5 近交家系三疣梭子蟹 ATP 合酶活力及 *ptF-ATPase $\beta$* 基因的表达情况

三疣梭子蟹肝胰腺中的 ATP 合酶活性高于心脏中的活性, 约是心脏中活性的 2 倍(图 7)。随着近交系数的增加, 心脏中的 ATP 合酶活性总体呈现显著

下降趋势;  $F_2$  和  $F_4$  代心脏中的 ATP 合酶活性与  $F_0$  代无显著差异, 而从  $F_6$  代开始 ATP 合酶活力出现下降且显著低于  $F_0$  代( $P < 0.05$ ) (图 7b)。而肝胰腺中的 ATP 合酶活性无显著变化(图 7a)。

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析了近交对三疣梭子蟹肝胰腺和心脏中 *ptF-ATPase $\beta$*  基因表达情况的影响。结果显示, 随着近交系数的增加, 肝胰腺和心脏中, *ptF-ATPase $\beta$*  的表达量均呈现显著下降趋势。在肝胰腺中, 除  $F_6$ 、 $F_8$  代外, 各代 *ptF-ATPase $\beta$*  的表达量均呈显著差异且显著低于  $F_0$  代( $P < 0.05$ ) (图 8a); 在心脏中, 各代 *ptF-ATPase $\beta$*  的表达量显著低于  $F_0$  代( $P < 0.05$ ),  $F_2$ 、 $F_4$  代之间差异显著( $P < 0.05$ ), 而  $F_6$ 、 $F_8$ 、 $F_{10}$  代之间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 8b)。

### 3 讨论

ATP 合酶广泛存在于真核生物线粒体内膜、叶绿体类囊体、异养菌和光合细菌的质膜上, 参与生物体

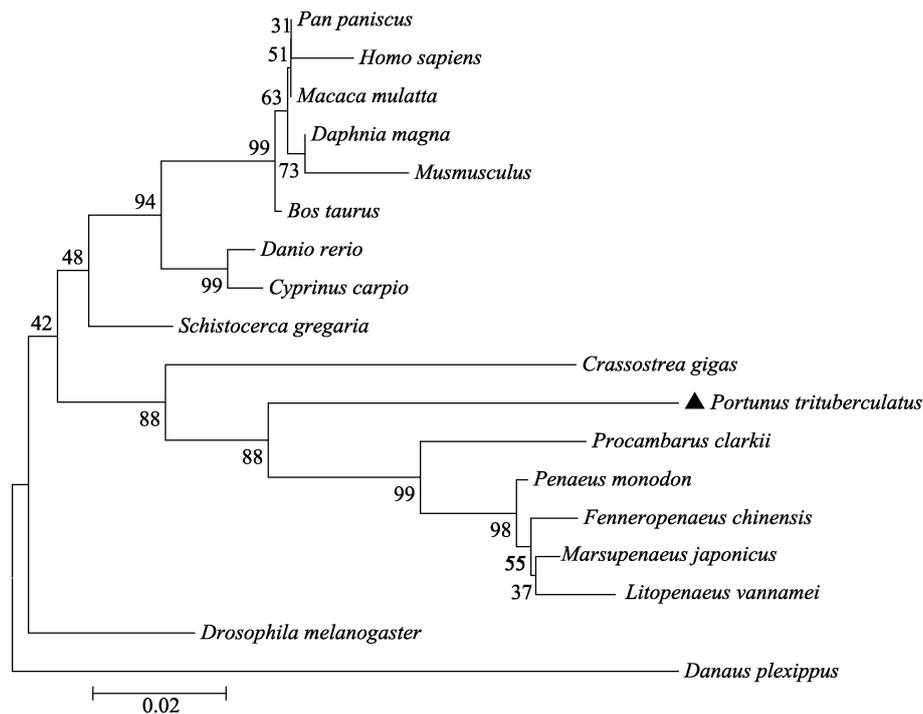


图 5 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建的三疣梭子蟹与其他物种的 F-ATPase $\beta$  氨基酸的系统进化树

Fig.5 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *P. trituberculatus* F-ATPase $\beta$  and other species by MEGA 6.0

各物种基因登录号: 斑节对虾(AEB92164.1), 凡纳滨对虾(ACB36913.1), 日本囊对虾(ACM91676.1), 中国对虾(ACM91675.1), 克氏原螯虾(ACU31053.1), 牡蛎(EKC39411.1), 沙漠蝗(AEV89780.1), 斑马鱼(NP\_001019600.2), 鲤鱼(BAA82837.1), 果蝇(NP\_001259081.1), 大型蚤(JAN00926.1), 黑脉金斑蝶(EHJ67407.1), 牛(NP\_786990.1), 家鼠(AAB86421.1), 黑猩猩(XP\_003824956.1), 人(AAA51808.1)

GenBank accession numbers of different species: *Penaeus monodon* (AEB92164.1), *Litopenaeus vannamei* (ACB36913.1), *Marsupenaeus japonicus* (ACM91676.1), *Fenneropenaeus chinensis* (ACM91675.1), *Procambarus clarkii* (ACU31053.1), *Crassostrea gigas* (EKC39411.1), *Schistocerca gregaria* (AEV89780.1), *Danio rerio* (NP\_001019600.2), *Cyprinus carpio* (BAA82837.1), *Drosophila melanogaster* (NP\_001259081.1), *Daphnia magna* (JAN00926.1), *Danaus plexippus* (EHJ67407.1), *Bos taurus* (NP\_786990.1), *Mus musculus* (AAB86421.1), *Pan paniscus* (XP\_003824956.1), *Homo sapiens* (AAA51808.1)

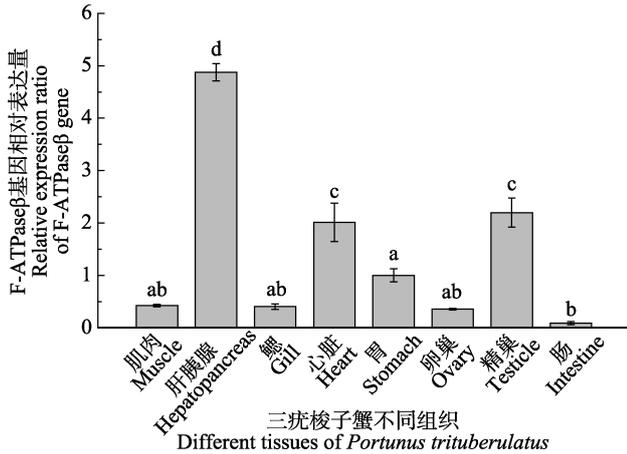


图 6 三疣梭子蟹 *F-ATPase $\beta$*  基因在各组织中的表达情况

Fig.6 The expression of *F-ATPase $\beta$*  in different tissues of *P. trituberculatus*

不同组织表达量均以与胃相比较的倍数表示。

不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

The expression in different tissues was presented as the fold compared to the level in the stomach. Different letters indicated significant differences ( $P < 0.05$ ). The same as below

氧化磷酸化和光合磷酸化作用, 在跨膜质子动力势的推动下合成 ATP, 是生物体能量代谢的关键酶(王镜岩等, 2002)。ATP 合酶主要由  $F_1$  和  $F_0$  组成, 不同物种的 ATP 合酶所含的亚基及数目不尽相同。 $F_1$  由亚基  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  组成, 其中,  $\beta$  亚基是酶的催化核心, 其构象的变化使它能够结合 ADP 和 ATP, 驱动着 ATP 的合成和水解(Boyer, 1989、1997)。 $\beta$  亚基不仅参与催化作用, 它还可位于生物膜表面参与各种生理功能(Champagne *et al*, 2006), 因此, 对三疣梭子蟹 ATP 合酶  $\beta$  亚基的研究对于其能量代谢的研究具有重要作用。目前, ATP 合酶  $\beta$  亚基在植物叶绿体和线粒体中的研究较多, 证明其功能与植物体胚发育、盐度适应、次生代谢等有关, 而三疣梭子蟹 ATP 合酶的研究尚未见报道。

本实验克隆得到的三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的 cDNA 序列全长为 1965 bp。与其他动物 *F-ATPase $\beta$*  编码区序列比对发现, 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因编码区保守性较强。该基因编码一个由 350 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白具有 F-ATPase $\beta$  标志性蛋白结

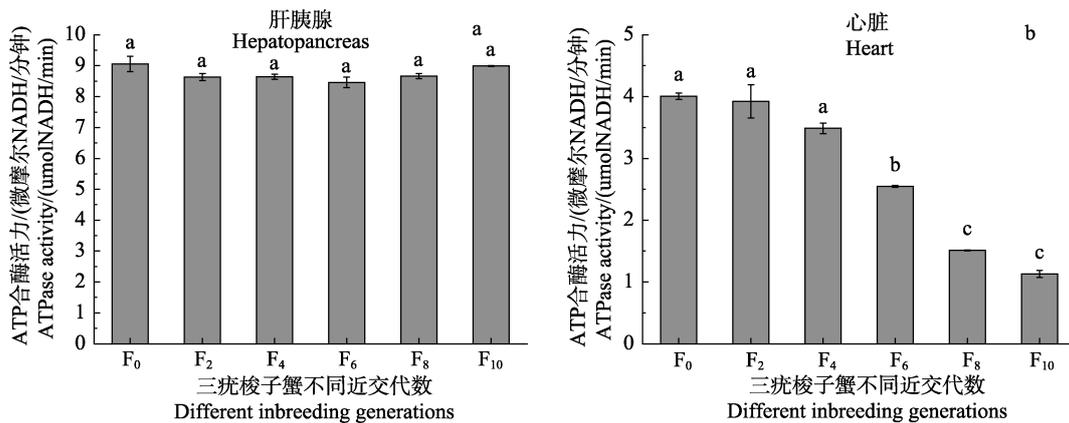


图 7 不同近交世代家系三疣梭子蟹肝胰腺(a)和心脏(b)中 ATP 合酶活力

Fig.7 ATPase activity in the hepatopancreas (a) and heart (b) of *P.trituberculatus* from different inbreeding generations

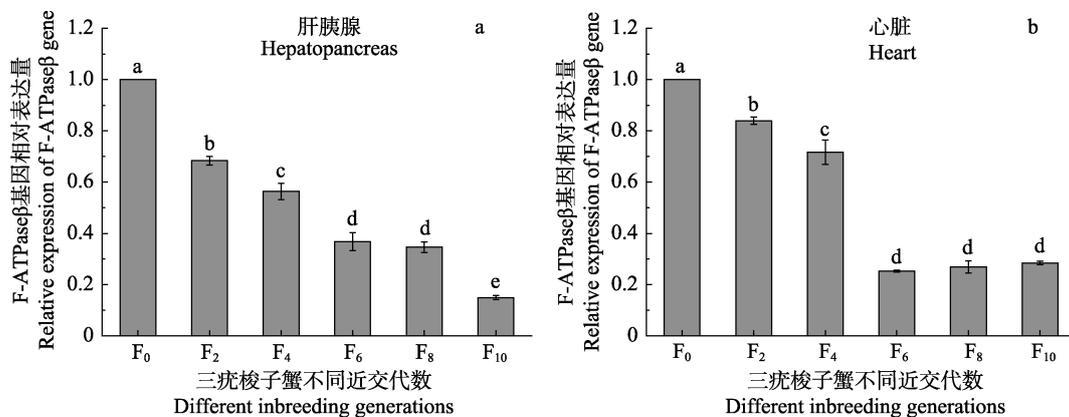


图 8 不同近交世代家系三疣梭子蟹肝胰腺(a)和心脏(b)中 *F-ATPase $\beta$*  基因相对表达量

Fig.8 Relative expression of *F-ATPase $\beta$*  gene in the hepatopancreas (a) and heart (b) of *P.trituberculatus* from different inbreeding generations

构域,无跨膜结构域和信号肽序列。该基因编码的蛋白氨基酸序列与斑节对虾、凡纳滨对虾 F-ATPase $\beta$  蛋白同源性达到 89%,在系统进化中也与对虾科聚为一支,因此,对三疣梭子蟹 F-ATPase $\beta$  基因表达及酶活性的研究可为其他海洋生物相关的研究提供参考。实时荧光定量 PCR 结果显示,三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因在所研究组织中均有表达,在肝胰腺、心脏和精巢中表达量最高,说明三疣梭子蟹肝胰腺、心脏和精巢中的能量代谢比其他组织中旺盛,也证实了肝胰腺、心脏和精巢是三疣梭子蟹生长和发育主要供能中心。

由于三疣梭子蟹野生苗种的日益匮乏,苗种大多依靠人工养殖的亲本提供。然而,在苗种生产过程中不可避免地会造成群体内近交,从而导致了三疣梭子蟹种质资源的退化及遗传多样性的降低(王好锋等, 2013; Gao *et al.*, 2015)。近交通常会使得子代一些与繁殖力或生理机能相关的性状所表现的表型平均值降低(Frankham *et al.*, 2001),其程度可以用近交系数(F, coefficient of inbreeding)来表示。目前的研究已经证明,近交会造水产动物形态学(Luan *et al.*, 2014)、繁殖力(Moss *et al.*, 2008)、存活和抗逆性(Luo *et al.*, 2014)等表型性状方面的衰退,但关于近交对生理机制相关的影响还鲜有报道。Ren 等(2016)证实了近交能够引起三疣梭子蟹酚氧化酶活力及抗氧化机制等生理机能的衰退。但目前有关近交对三疣梭子蟹能量代谢的影响还未见报道。

本研究结果还显示,随着近交系数的增加,心脏中 ATP 合酶活力呈现显著降低的趋势,说明近交引起了三疣梭子蟹心脏 ATP 活力的衰退,而 ATP 合酶  $\beta$  亚基因相对表达量同样是逐代下降。研究表明,激活、过表达或敲降  $\beta$  亚基因等会影响细胞内 ATP 的含量(李晶等, 2009),因此,推测  $\beta$  亚基的下调表达造成了三疣梭子蟹心脏 ATP 合酶活性的下降。肝胰腺是三疣梭子蟹体内重要的器官,也是代谢最为活跃的组织,近交同样造成了三疣梭子蟹肝胰腺中 ATP 合酶  $\beta$  亚基因相对表达量的衰退,但对其 ATP 合酶活力没有显著影响。细胞中某一蛋白在某一时间的表达受到多种因素的影响,如基因的转录、mRNA 的翻译、蛋白质的降解速率等(Gygi *et al.*, 1999)。尽管 mRNA 表达水平在一定程度上反映基因的表达,但近来越来越多的研究表明,mRNA 表达水平并不能完全代表蛋白质的水平,而且蛋白还存在多种多样的翻译后加工修饰等(钱小红等, 2003; Simpson, 2006)。因此,我们预测三疣梭子蟹肝胰腺中的 ATP 合酶  $\beta$  亚基基因的表达与 ATP 合酶活力不一致可能与代偿机

制或酶功效增强有关,还需同工酶和酶动力学研究进一步验证。

## 4 结 论

本研究首次成功克隆三疣梭子蟹 ATP 合酶  $\beta$  亚基基因全长 cDNA 序列,该序列全长 1965 bp,包含 1053 bp 核苷酸的 ORF,编码一个由 350 个氨基酸组成的蛋白质。该基因与其他动物 ATP 合酶  $\beta$  亚基基因的核苷酸序列和预测氨基酸序列均有着比较高的同源性,可为其他海洋生物相关的研究提供参考。同时,利用实时荧光定量 PCR 技术检测了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因的表达情况,表明该基因在组织中均有表达,且在肝胰腺和心脏中相对表达量最高。本研究还证明,近交造成了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase $\beta$*  基因表达和 ATP 酶活力的衰退,可为三疣梭子蟹的遗传育种工作提供参考数据。

## 参 考 文 献

- Boyer PD. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1989, 3(3): 2164–2178
- Boyer PD. The ATP synthase: A splendid molecular machine. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66: 717–749
- Champagne E, Martinez LO, Collet X, *et al.* Ecto-F1F0 ATP synthase/F1 ATPase: Metabolic and immunological functions. Current Opinion in Lipidology, 2006, 17s(3): 279–284
- Frankham R, Gilligan DM, Morris D, *et al.* Inbreeding and extinction: Effects of purging. Conservation Genetics, 2001, 2(3): 279–284
- Gao BQ, Liu P, Li J, *et al.* Effect of inbreeding on growth and genetic diversity of *Portunus trituberculatus* based on the full-sibling inbreeding families. Aquaculture International, 2015, 23(6): 1401–1410
- Guan L. Effects of sodium hydrosulfide on antioxidant system and MSAP analysis of *Dendrobium officinale* under high light stress. Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2013, 5 [关蕾. 强光胁迫下外源硫化氢对石斛抗氧化系统的影响及 MSAP 分析. 安徽农业大学硕士学位论文, 2013, 5]
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, *et al.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular & Cellular Biology, 1999, 19(3): 1720–1730
- Han XL, Liu P, Gao BQ, *et al.* Molecular cloning and salinity-related expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit in *Portunus trituberculatus*. Academic Annual Meeting of China Fisheries Society, 2012 [韩晓琳, 刘萍, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -亚基的克隆与表达. 中国水产学

- 会学术年会, 2012]
- Jiang S, Xu QH. Influence of salinity stress on the activity of gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1475–1480 [江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 酶活的影响. 水产学报, 2011, 35(10): 1475–1480]
- Lai CC, Lai ZX, Fang ZZ, et al. Cloning of mitochondrial F1-ATPase beta subunit gene from *Embryogenic callus* and its expression analysis by qRT-PCR during somatic embryogenesis in Longan. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(16): 3392–3401 [赖呈纯, 赖钟雄, 方智振, 等. 龙眼胚性愈伤组织线粒体 ATP 合酶  $\beta$  亚基基因克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3392–3401]
- Li J, Zhang Y, Guan YF, et al. Effects of ATP synthesis decline on  $\beta$ -cell insulin secretion disorder. Advances in Physiological Sciences, 2009, 40(1): 47–50 [李晶, 张园, 管又飞, 等. ATP 合成下降在  $\beta$  细胞胰岛素分泌障碍中的作用. 生理科学进展, 2009, 40(1): 47–50]
- Li M, Zhang J, Feng LG, et al. Cloning and expression analysis of vacuolar ATPase B subunit gene VHA-B in leaves of salt-stressed willow. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2013, 29(5): 1149–1153 [李敏, 张健, 冯立国, 等. 柳树液泡膜 ATP 酶 B 亚基基因克隆及在盐胁迫下的表达分析. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 1149–1153]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. Methods, 2001, 25(4): 402–408
- Luan S, Yang GL, Wang J, et al. Selection responses in survival of *Macrobrachium rosenbergii* after performing five generations of multi-trait selection for growth and survival. Aquaculture International, 2014, 22(3): 993–1007
- Luo K, Kong J, Luan S, et al. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 2014, 420–421(3): 32–37
- Moss DR, Arce SM, Otoshi CA, et al. Inbreeding effects on hatchery and growout performance of pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society, 2008, 39(4): 467–476
- Ni ZL, Wei JM. The structure and catalytic mechanism of ATP Synthase. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29(5): 367–374 [倪张林, 魏家绵. ATP 合酶的结构与催化机理. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 367–374]
- Qian XH, He FC. Proteomics: Theories and methods. Beijing: Science Press, 2003, 1–18 [钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法. 北京: 科学出版社, 2003]
- Ren X, Gao B, Liu X, et al. Comparison of immune responses and antioxidant status of different generations of growth- selected *Portunus trituberculatus* families. Aquaculture Research, 2016, 2017, 48, 1315–1326
- Simpson RJ. Proteins and Proteomics: A laboratory manual. Journal of Proteome Research, 2003, 3(4): 694
- Wang HF, Liu P, Gao BQ, et al. Inbreeding influence to some economic traits of six inbreeding generations of *Portunus trituberculatus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1157–1165 [王好锋, 刘萍, 高保全, 等. 近交对三疣梭子蟹若干经济性性状衰退的影响. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1157–1165]
- Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry, 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002 [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002]
- Xu ML. The interactive identification among LvAST, WSSV-VP37 and F1F0-ATP synthase  $\beta$  subunit of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 3 [徐萌霖. 凡纳滨对虾造血激素、F1F0-ATP 合酶  $\beta$  亚基和 WSSV-VP37 的相互作用研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 3]
- Zhou D, Mu CK, Song WW, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme and ATPase activities in tissues of swimming crab *Portunus trituberculatus*. Ecological Science, 2014, 33(4): 698–703 [周东, 母昌考, 宋微微, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹组织中抗氧化酶和 ATP 酶活力的影响. 生态科学, 2014, 33(4): 698–703]

(编辑 冯小花)

## cDNA Cloning and Expression Analysis of *F-ATPase $\beta$* Subunit Gene in *Portunus trituberculatus* and Its Variation in Family Inbreeding

WANG Zhuqing<sup>1,2</sup>, REN Xianyun<sup>2</sup>, GAO Baoquan<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>2①</sup>,  
ZHANG Xiaohui<sup>1,2</sup>, ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, YU Xuan<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** A full-length cDNA sequence of F-ATPase  $\beta$  subunit gene from *Portunus trituberculatus* (*ptF-ATPase $\beta$* ) was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The sequence of *ptF-ATPase $\beta$*  was 1965 bp, containing a 571 bp 5' UTR, 341 bp 3' UTR, and a 1053 bp open reading frame (ORF) that encodes 350 amino acids polypeptides. The isoelectric point (pI) was 4.86 and the molecular mass was 37.9 kDa. The amino acid sequence analysis demonstrated that *ptF-ATPase $\beta$*  has an F1-ATPase $\beta$  domain, an AAA domain, and an ATP-synt-ab-C domain. Homology and phylogenetic analysis revealed that the amino acid sequence of *ptF-ATPase $\beta$*  shared a high similarity (89%) with *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *ptF-ATPase $\beta$*  mRNA level was detected in all tested tissues including the hepatopancreas, muscle, heart, gill, stomach, intestine, testis, and ovary. The *ptF-ATPase $\beta$*  had the highest level in the hepatopancreas and heart, and the lowest expression in the intestine. With the increase of inbreeding coefficient, *ptF-ATPase $\beta$*  expression decreased significantly in the hepatopancreas and heart ( $P < 0.05$ ). The ATP synthase activity in the heart began to fall from F<sub>6</sub> generation and was significantly lower than F<sub>0</sub> generation ( $P < 0.05$ ), but there was no significant change in the hepatopancreas. The results illustrate that inbreeding gradually reduces the expression of *ptF-ATPase $\beta$*  and the ATP synthase activity in *P. trituberculatus*.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; *ptF-ATPase $\beta$* ; Gene cloning; Expression analysis; Inbreeding

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn