

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)胞内氯离子通道蛋白基因克隆及其表达分析*

王 渝^{1,2} 吕建建¹ 刘 萍^{1①} 高保全¹ 李 健¹ 陈 萍¹

(1. 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;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

提要 本研究克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)胞内氯离子通道蛋白基因, 命名为 *PtCLIC*。该基因 cDNA 全长 2000bp, 5'和 3'非编码区(UTR)长分别为 76bp 和 1162bp, 开放阅读框长 762bp, 推测编码 253 个氨基酸, 预测分子量为 29.2kDa, 理论等电点为 5.93。生物信息学分析表明, *PtCLIC* 基因中未发现跨膜结构域, 属于不稳定蛋白; 同源性分析表明, *PtCLIC* 基因编码的氨基酸序列与蚤状溞(*Daphnia pulex*)CLIC 基因的同源性高达 83%; 系统进化分析表明, 三疣梭子蟹与拟穴青蟹首先聚为一支; 实时荧光定量 RT-PCR 分析表明, *PtCLIC* 基因在选取的所有组织中均有表达, 在肝胰腺中的相对表达量最高, 且显著高于其它组织($P<0.05$)。低盐度胁迫显著改变了 *PtCLIC* 基因在三疣梭子蟹鳃和肝胰腺中的表达模式, 整体呈先上调后下调的趋势, 并发现该基因在低盐耐受和低盐敏感家系中的表达规律差异显著。研究结果表明 *PtCLIC* 基因在三疣梭子蟹渗透压调节中发挥重要作用, 可辅助三疣梭子蟹耐低盐品系的选育。

关键词 三疣梭子蟹; 胞内氯离子通道蛋白; 克隆; 低盐胁迫; 表达分析

中图分类号 Q955 **doi:** 10.11693/hyhz20140300077

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*), 俗称梭子蟹, 隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*), 是中国沿海的重要经济蟹类, 其可以存活于盐度为 13.7—47.7 的水环境中(隋延鸣等, 2012), 属典型广盐性蟹类(孙颖民等, 1984)。在三疣梭子蟹的育苗过程中, 盐度微小的变化都可能导致变态的推迟、活力变差, 乃至病害的发生(季东升, 2005)。在三疣梭子蟹养成过程盐度也起到了重要作用, 对其存活、摄饵和生长均具有重要影响(吕富等, 2010; 路允良等, 2012)。然而, 在三疣梭子蟹养殖过程中, 降雨会改变水体的盐度, 因此养殖过程中产生的盐度胁迫是不可避免的。一般认为造成盐度胁迫的主要物质是 NaCl, 在其胁迫下三疣

梭子蟹体内的 Cl^- 含量会超出正常需要, 进而对机体产生胁迫作用(康敏华等, 2011)。然而, 目前在三疣梭子蟹中渗透压相关的研究主要集中在酶活、免疫、蜕皮和能量收支等方面(郑萍萍等, 2010; 江山等, 2011), 涉及 Cl^- 的渗透压调节分子机理的研究则相对较少。因此, 从分子水平研究三疣梭子蟹氯离子通道对 Cl^- 运输、吸收和排除显得尤为重要(康敏华等, 2011)。

氯离子通道是分布于细胞膜或细胞器质膜上的一类能够转运氯离子及其它阴离子的通道蛋白(陈丽娥等, 2010)。研究表明, 氯离子通道可调控不同的生理过程和细胞功能, 如: Cl^- 运输、渗透压调节、离子稳态、胞内 pH、细胞容积调节、电兴奋性、金属耐受性和信号识别与转导(Uchida *et al.*, 1993; Adachi *et al.*,

* 科技部农业科技成果转化资金项目, 2013GB23260589 号; 山东省自主创新专项, 2013CXC80202 号; 国家自然科学基金资助项目, 41306177 号; 中国博士后科学基金特别资助, 2014T70668 号。王渝, 硕士研究生, E-mail: wang-yu-yu-hi@163.com

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

收稿日期: 2014-03-12, 收修改稿日期: 2014-05-25

1994; Hechenberger *et al.*, 1996), 甚至在细胞迁移、细胞增殖和分化等过程中也起到一定作用(Jentsch *et al.*, 1999)。氯离子通道分为三种类型: 氯通道(chloride channel, CLC)、囊性纤维化跨膜传导调解因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)和胞内氯离子通道(chloride intracellular channel, CLIC) (戴寒晶, 2006)。CLIC 家族成员大多数为单次跨膜蛋白, 与谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)具有一定的同源性(Dulhunty *et al.*, 2001)。Valenzuela 等(1997)从人类单核细胞中克隆了第一个 CLIC1 基因。现在已经发现了六个 CLIC 家族成员, 包括 CLIC1 (Valenzuela *et al.*, 1997)、CLIC2 (Heiss *et al.*, 1997)、CLIC3 (Qian *et al.*, 1999)、CLIC4 (Edwards, 1999)、CLIC5 (Berryman *et al.*, 2000)和 CLIC6 (Perluigi *et al.*, 2002), 各成员之间高度保守。Berry 等(2003)在线虫中发现了编码一种 CLIC 样蛋白的基因 EXC-4。目前关于氯离子通道蛋白的研究主要集中在哺乳动物、两栖类、昆虫和植物(Cornejo *et al.*, 2001; Shorning *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2013), 在水产动物中研究较少, 而在甲壳动物中更是尚未见报道。

本研究从本实验室构建的三疣梭子蟹转录组文库(Lv *et al.*, 2013)中筛选到胞内氯离子通道蛋白基因 EST 序列; 采用 RACE 技术克隆获得该基因全长 cDNA 序列; 借助相关生物信息学软件分析 *PtCLIC* 基因及其翻译的氨基酸序列的结构; 通过 Blast 程序比对其与其它物种的 CLIC 基因氨基酸序列同源性; 利用实时荧光定量技术研究其组织表达模式、低盐胁迫进程中的表达规律以及低盐胁迫下低盐耐受和低盐敏感家系中表达规律的差异。本研究为 *PtCLIC* 基因的生物学功能研究及其在渗透压调节机理方面的研究奠定理论基础, 同时也为三疣梭子蟹耐盐新品系的选育提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

健康三疣梭子蟹取自昌邑市海丰水产养殖有限公司, 体质量(5.78 ± 1.11)g。暂养于 3m^3 的室内水泥池中, 每池 90 只, 共 6 池, 暂养 3d。养殖水温 26°C , 盐度 33, pH 8.7, 持续充氧, 养殖用水每天更换 1/3, 于 18:00 定时喂食蓝蛤。

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自

Clontech 公司; DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒、PrimeScript RT reagent Kit、PMD18-T 载体和 DH5 α 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司。

表 1 实验所用的引物序列
Tab.1 All sequence of primers for the experiment

引物	序列(5'-3')
CLIC-F	GGAAGGAGGAAGAGTGCTTGTCTG
CLIC-R	TTGTCAATCAGAATGGGAGGAGGAGTG
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC
QCLIC-F	GGAAGGGTGCTTGTCTGTTC
QCLIC-R	AAATCTGGTGGTGGCTTGAG
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCCG
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

Trizol 试剂分别提取鳃、肝胰腺和肌肉组织的总 RNA, 核酸定量仪与 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性; 分别取等量的上述 3 种组织的总 RNA 均匀混合, 按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 说明书上的方法分别合成 3' 和 5' RACE 的 cDNA 第一链。

1.3 *PtCLIC* 基因全长 cDNA 的克隆及测序

3' RACE 和 5' RACE 特异性引物利用从三疣梭子蟹转录组文库中获得的一段胞内氯离子通道蛋白基因 EST 序列和 Primer Premier 5.0 软件设计, 并且委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。3' 和 5' 末端的快速扩增使用试剂 SMARTTM RACE Amplification Kit, Advantage 2 PCR Kit 和两对特异性引物对 CLIC-F 和 UPM、CLIC-R 和 UPM 进行(表 1)。反应程序: 94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 3min, 30 个循环。

利用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分别检测 3' RACE 和 5' RACE 的扩增产物, 使用胶回收试剂盒回收目的片段, 并连接入 PMD18-T 载体, 转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 将含有目的条带的菌液送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.4 *PtCLIC* 基因的生物信息学分析

利用 Vector NTI 11.0 软件去除所测序列中的载体, 并与已知序列拼接。利用 DNASTar 的 EditSeq 程序预测开放阅读框(ORF)并将其翻译为氨基酸序列。使用 BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序分别进行 *PtCLIC* 基因的核苷酸序列和推导

的氨基酸序列同源性比对。利用 ProtParam tool 软件进行蛋白质理化性质预测, 利用 InterproScan 软件进行蛋白质功能结构域分析, 利用 TMHMM 2.0 软件进行蛋白质跨膜结构域分析。使用 Clustal X 软件对三疣梭子蟹 *PtCLIC* 氨基酸序列与其它物种的 CLIC 氨基酸序列进行多序列比对, 然后使用 MEGA 4.0 软件, 采用邻接法构建系统进化树。

1.5 盐度胁迫实验

随机挑取暂养 3d 的三疣梭子蟹分为 2 组, 对照组(33)和低盐组(11), 每个处理组设 3 个平行, 每个平行 90 只蟹。使用地下卤水、自然海水和淡水配制各盐度实验用水, 使用 YSI 盐度仪进行盐度校准, 具体方法见隋延鸣等(2012)。各组分别于胁迫 0、3、6、12、24、48 和 72h 取鳃和肝胰腺, 放置液氮中冷冻保存, 用于后续 RNA 的提取, 每个时间点取 3 只。另取 3 只健康三疣梭子蟹的鳃、肝胰腺、肌肉、心脏、眼柄和血细胞, 放置液氮中冷冻保存, 用于后续 RNA 的提取。

1.6 家系低盐胁迫实验

从本实验室构建的低盐耐受家系和低盐敏感家系中随机选取三疣梭子蟹各 90 只, 胁迫盐度为三疣梭子蟹半致死浓度(11), 每个家系设置 3 个平行, 每个平行 30 只。各组分别于胁迫 0h、12h、72h 取鳃组织, 放置液氮中冷冻保存, 用于后续 RNA 提取。

1.7 *PtCLIC* 基因表达分析

使用 Trizol 提取不同实验组三疣梭子蟹鳃和肝胰腺组织的总 RNA, 使用 PrimeScript RT reagent Kit 反转录合成 cDNA。

根据已获得的三疣梭子蟹内参基因 β -actin 和 *PtCLIC* 基因全长序列, 分别设计两对引物(β -actin-F 和 β -actin-R、QCLIC-F 和 QCLIC-R)(表 1), 对时间点盐度胁迫的三疣梭子蟹鳃和肝胰腺中 *PtCLIC* 基因的相对表达量进行检测。使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂在 ABI 7500 Real Time PCR 仪上利用 Real-time PCR 方法对各个组织中以及胁迫进程中 *PtCLIC* 基因的表达情况进行分析。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 10 μ L SYBR Premix Ex TaqTM II (2 $\times$), 0.8 μ L 10 μ mol/L 的引物 QCLIC-F, 0.8 μ L 10 μ mol/L 的引物 QCLIC-R, 0.4 μ L ROX Reference Dye II (50 $\times$), 2.0 μ L cDNA 模板, 6.0 μ L 无菌 ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环;

95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 *PtCLIC* 基因的相对表达量, 使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 总 RNA 提取

利用 Trizol 试剂提取获得三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织的总 RNA, 经核酸定量仪检测, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.9—2.0 之间, 表明总 RNA 纯度较高; 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 28S、18S、5S rRNA 条带清晰, 表明总 RNA 完整性较好, 质量较高。

2.2 *PtCLIC* 基因的全长 cDNA 克隆

以三疣梭子蟹的鳃、肝胰腺和肌肉组织的等量总 RNA 混合物为模板, 反转录得到 3'RACE 和 5'RACE 的 cDNA 第一链。以特异引物 CLIC-F 和 CLIC-R 分别与通用引物 UPM 配对, 进行 3'和 5'RACE 扩增。将测序获得的 3'和 5'片段与已知 EST 序列进行拼接, 得到三疣梭子蟹 CLIC 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *PtCLIC*。该基因全长为 2000 bp (GenBank 登录号为 KJ186099), 包括 76 bp 的 5'端非编码区(UTR), 1162 bp 的 3'端非编码区和 762 bp 的开放阅读框(ORF)。3'端含有一个 PolyA 尾和一个多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA)(图 1)。

2.3 *PtCLIC* 基因序列分析及结构域预测

DNAstar 软件分析表明, *PtCLIC* 基因编码一个由 253 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 29.2kDa, 理论等电点为 5.93。ProtParam tool 软件分析表明, *PtCLIC* 蛋白带有负电的氨基酸残基为 36 个(Asp 和 Glu), 带有正电的氨基酸残基为 31 个(Arg 和 Lys), 不稳定系数为 46.34, 亲水性平均数为 -0.449, 属于不稳定蛋白。InterProScan 和 TMHMM 2.0 软件分析表明, *PtCLIC* 基因翻译的蛋白质结构中无跨膜结构域。

2.4 *PtCLIC* 基因的同源性分析

利用 BLAST 程序对三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因的氨基酸序列进行同源性比对, 发现三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因与蚤状溞(*Daphnia pulex*)、点蜂缘蝽(*Riptortus pedestris*)、地中海实蝇(*Ceratitis capitata*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和果蝇(*Drosophila virilis*)的同源性分别为 83%、84%、82%、83%和 82%。通过与上述物种的 CLIC 氨基酸序列比对发现, *PtCLIC* 氨基酸序列保守性较高(图 2)。

2	TGG	GGA	GTG	TCA	CGT	TGG	CGC	TTG	TTG	CAG	GAG	GAT	TGT	ACG	CGA	CTC	CTA	CCG	GTT	CTA	AAT	CCT	TCA	GAA	AGC	76
77	ATG	TCT	GAA	GAA	ACC	AAT	GGT	CAG	GCG	AAT	GGG	TCC	GTG	CCT	GAG	GTG	GAG	CTT	ATC	ATC	AAG	GCA	TCT	ACT	ATA	151
	M	S	E	E	T	N	G	Q	A	N	G	S	U	P	E	V	E	L	I	I	K	A	S	T	I	
152	GAT	GGA	AGG	AGG	AAG	GGT	GCT	TGT	CTG	TTC	TGC	CAA	GAA	TAC	TTC	ATG	GAC	CTT	TAT	CTT	CTG	GCT	GAA	CTA	AAG	226
	D	G	R	R	K	G	A	C	L	F	C	Q	E	Y	F	M	D	L	Y	L	L	A	E	L	K	
227	ACA	ATT	TCA	CTC	AAA	GTG	ACT	ACA	GTG	GAC	ATG	CTC	AAG	CCA	CCA	CCA	GAT	TTC	AAG	TCA	AAT	TTT	GAG	GCC	ACT	301
	T	I	S	L	K	U	T	T	U	D	M	L	K	P	P	P	D	F	K	S	N	F	E	A	T	
302	CCT	CCT	CCC	ATC	CTG	ATT	GAC	AAT	GGC	CTG	GCA	GTT	TTG	GAG	AAT	GAC	AAG	ATT	GAG	AGA	CAC	ATC	ATG	AAG	AAT	376
	P	P	P	I	L	I	D	N	G	L	A	U	L	E	N	D	K	I	E	R	H	I	M	K	N	
377	ATC	CCA	GGA	GGT	CAT	AAT	CTT	TTT	GTA	CAA	GAC	AAG	GAT	GTT	GCA	CAG	CGA	ACA	GAA	AAT	GTG	TAC	AGT	AAA	TTC	451
	I	P	G	G	H	N	L	F	U	Q	D	K	D	U	A	Q	R	T	E	N	U	Y	S	K	F	
452	AAG	CTG	ATG	CTT	TTA	AAG	CGT	GAT	GAC	AAC	TCC	AAG	AAC	ATC	CTG	TTG	AAC	TAC	CTT	CGC	AAG	ATC	AAT	GAC	CAT	526
	K	L	M	L	L	K	R	D	D	N	S	K	N	I	L	L	N	Y	L	R	K	I	N	D	H	
527	CTT	GGG	GAG	AGA	GGG	ACA	AGG	TTC	CTT	ACT	GGA	GAT	ACA	ATG	TGT	TGT	TTT	GAC	TGT	GAG	CTT	ATG	CCT	AAG	TTA	601
	L	G	E	R	G	T	R	F	L	T	G	D	T	M	C	C	F	D	C	E	L	M	P	K	L	
602	CAG	CAC	ATT	AGG	GTG	GCT	GGG	AAG	TAT	TTT	GCT	GAC	TTT	GAA	ATT	CCG	GAG	GAG	CTG	GAA	CAC	CTG	TGG	CGG	TAC	676
	Q	H	I	R	V	A	G	K	Y	F	A	D	F	E	I	P	E	E	L	E	H	L	W	R	Y	
677	ATG	TTC	CAT	ATG	TAC	CAG	CTT	GAT	GCC	TTC	ACC	CAG	TCC	TGT	CCA	GCT	GAT	CAA	GAC	ATC	ATC	AAT	CAT	TAT	AAG	751
	M	F	H	M	Y	Q	L	D	A	F	T	Q	S	C	P	A	D	Q	D	I	I	N	H	Y	K	
752	CAG	CAG	CAG	GGT	ACC	CGA	ATG	AAG	AAA	CAT	GAG	GAG	CTT	GAA	ACG	CCA	ACC	TTC	ACC	ACC	TCC	ATA	CCA	GCT	GCC	826
	Q	Q	Q	G	T	R	M	K	K	H	E	E	L	E	T	P	T	F	T	T	S	I	P	A	A	
827	ATC	CGC	CCT	TGA	GCC	TTC	TGT	GCC	ATC	CTC	AGC	AAT	CAA	CTC	CAG	TAA	ACT	CTA	CTG	TAG	CAT	TGC	AAG	ATA	TTT	901
	I	R	P	*																						
902	TAT	TTG	GTG	AAA	GGT	TGT	AAT	TGA	TAG	GTT	TCA	TGC	TAC	ATT	ATT	TTG	TTA	TAA	TAG	TCA	AGA	TAA	TTT	GCT	TTG	976
977	ATC	ATA	TTT	GTA	CTA	TCA	TGT	ATG	TCT	AAC	CAT	GAT	ATA	TGC	CCT	AGA	CAT	GTA	TGT	TGT	TTT	TGA	ACA	ATT	CAG	1051
1052	TTG	TAA	ATA	AAT	TCT	CAT	TAC	TCC	CTT	TTG	CCA	GTT	AAA	GTA	ACA	AAA	ATA	TCT	TGA	CTG	CAC	TTG	TAA	TAT	TCA	1126
1127	TTA	AGA	CAG	TAG	GTA	TTA	ACA	AGA	TTG	CTA	AGC	ATT	TGT	GAT	GCA	AGT	CAC	AAA	TTA	TCA	CAG	AAG	AAA	TTT	ATG	1201
1202	ATT	ACA	TTT	GAA	ACC	ACT	TCT	ATA	CCC	ATT	TAA	GTG	GTG	ACA	AGG	GAA	CTA	AAT	GTT	TAG	CTT	GTG	CCT	TGT	TTA	1276
1277	GTC	ATT	ACT	GTT	TTT	AAT	GTA	TTG	TTA	CAA	TTT	ATT	TGT	CAT	TAC	CTA	ATG	TAG	ATT	TTT	TTT	TAA	AAG	CTG	TAT	1351
1352	ACA	TAA	GAT	ACA	ATG	TGT	GGA	TCA	TTG	GAT	TCA	GAT	CAG	AAA	TCA	CAT	TAT	TAC	ATA	AAA	TGT	TGG	GAG	GAA	AGG	1426
1427	ATT	GCA	TTA	TTT	TTG	TTA	CTG	GCA	TTG	CAA	ATC	TCT	GCT	GAA	TAA	TTA	ATG	TAC	ATT	TCT	TTT	TTA	ATT	TGT	CAG	1501
1502	GGA	ACT	TGC	CTG	CTG	TTA	AAA	AAA	AAA	TGG	CAA	AAT	TAC	ACT	AGA	TAT	CAT	TTA	TTA	TTA	TAA	TAA	TTT	TTA		1576
1577	TTC	ATT	TTT	GGT	ATT	GTT	ATT	TTC	ATT	ATT	ACT	GGA	ATT	GCA	ATC	ATC	ATT	ATT	TCC	ATT	GTC	ATC	ATT	ATT	TTT	1651
1652	ATA	ATT	GTT	GTA	AGC	AAT	TTT	TAT	TAT	TTT	CAT	AAT	ATT	TAG	GAC	CAT	TCT	TAG	TTA	TCA	TGT	AAC	TAT	TTG	GGA	1726
1727	GAT	TTT	TAT	TAA	TCT	TAT	TAG	GTG	CAT	TAT	CTT	GTG	ATA	ATT	AAC	TTC	AAA	TGC	AAT	CAG	AGT	AAT	TTT	TCT	AAG	1801
1802	TGT	TTC	ACT	GTA	CAT	TGT	TTG	ATC	ATT	TCC	ATG	TTA	AGA	TGA	AAC	TTG	AAT	AGG	TGT	CGA	TAA	GAT	GAA	CTT	TTT	1876
1877	TTT	AAG	TTG	CAT	TTT	GTA	TAT	GTG	CCC	TTA	TAA	TGT	GCT	TTA	GTT	CAT	TTG	AAT	TGA	AGT	TTA	TTG	CAA	ATG	TGT	1951
1952	TTT	GTT	ACA	GAT	AAT	TAG	AAT	AAA	TGG	TGT	TGC	ACA	AAA	AAA	AAA	AAA	A									2000

图 1 三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Complete cDNA sequence and deduced amino acids sequence of *P. trituberculatus* *PtCLIC* gene
起始密码子用横线标出; *表示终止密码子; 加尾信号(AATAAA)用方框标出

利用 MEGA 4.0 软件进行系统进化分析表明, 所有物种的 CLIC 共聚为两大类群: 脊椎动物和无脊椎动物。在无脊椎动物中, 三疣梭子蟹与拟穴青蟹紧密聚为一支, 然后与埃及伊蚊、蚤状蚤、捕食螨聚为一大支; 在脊椎动物中, 野猪与白眉翁聚为一支(图 3)。

2.5 *PtCLIC* 基因表达分析

2.5.1 *PtCLIC* 基因的组织表达分析 采用实时荧光 RT-PCR 分析了三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因在不同组织中的表达分布特征。结果显示, *PtCLIC* 基因在鳃、肝胰腺、肌肉、眼柄、血液和心脏中均有表达。其中, 在肝胰腺中的表达量最高, 且显著高于其它组织 ($P < 0.05$)(图 4)。

2.5.2 *PtCLIC* 基因在低盐胁迫进程中的表达分析 低盐胁迫后 *PtCLIC* 在鳃和肝胰腺中的相对表达量分别如图 5、图 6 所示。在鳃中, 与对照组相比, 低盐

胁迫 0—6h 后, *PtCLIC* 出现显著下调现象, 6h 的相对表达量为对照组的 0.61 倍 ($P < 0.05$), 12—48h *PtCLIC* 的相对表达量出现显著上调, 并于 48h 达到最大值, 相对表达量为对照组的 4.18 倍 ($P < 0.05$), 48—72h 又出现显著下调趋势(图 5)。在肝胰腺中, 与对照组相比, 低盐胁迫 0—6h 后, *PtCLIC* 的相对表达量组间差异不显著, 6—24h *PtCLIC* 的相对表达量出现显著上调, 并于 24h 达到最大值, 相对表达量为对照组的 4.48 倍 ($P < 0.05$), 24—72h 又出现显著下调(图 6)。

2.5.3 *PtCLIC* 基因在低盐耐受与低盐敏感家系中的表达分析 实时荧光定量 RT-PCR 结果显示, 在低盐耐受家系中, 0—12h *PtCLIC* 基因相对表达量出现上调, 随后 12—72h 显著下调, 三个时间点低盐耐受家系的表达量分别为低盐敏感家系的 2.31、2.53 和 1.90 倍。低盐敏感家系 0—72h 之间 *PtCLIC* 基因相

三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MSEETNGCANGSTPEVELIIKASTIDGRRKGACLECCQYFMDLYLLAELKTIISLKVTTVD	60
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	MSDSANGNSGSDTPEVELIIKASTIDGRRKGACLECCQYFMDLYLLAELKTIISLKVTTVD	60
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	MSDETNNHNGTENGVDPEVELIIKASTIDGRRKGACLECCQYFMDLYLLAELKTIISLKVTTVD	63
地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	MSEVENNNGTENGVDPEVELIIKASTIDGRRKGACLECCQYFMDLYLLAELKTIISLKVTTVD	65
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	MSDENNGTENGVDPEVELIIKASTIDGRRKGACLECCQYFMDLYLLAELKTIISLKVTTVD	62
果蝇 <i>Drosophila virilis</i>	MSAADVETSCQCESNGTSKEDVPEVELIIKASTIDGRRKGACLECCQYFMDLYLLAELKTIISLKVTTVD	70
Consensus	ng pe ellikastidgrrkgaclefccqeyfmdlyllaeltisikvttvd	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MKPPPDFRNFEATPPILIDNGLAWLENKIERHIMKNPPGGNLFVQDKVATLIENLYSKKRLML	130
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	MKPPPDFRNFEATPPILIDNGLAWLENKIERHIMKNPPGGNLFVQDKVATLIENLYSKKRLML	130
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	MKPPPDFRNFEATPPILIDNGLAWLENKIERHIMKNPPGGNLFVQDKVATLIENLYSKKRLML	133
地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	MKPPPDFRNFEATPPILIDNGLAWLENKIERHIMKNPPGGNLFVQDKVATLIENLYSKKRLML	135
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	MKPPPDFRNFEATPPILIDNGLAWLENKIERHIMKNPPGGNLFVQDKVATLIENLYSKKRLML	132
果蝇 <i>Drosophila virilis</i>	MKPPPDFRNFEATPPILIDNGLAWLENKIERHIMKNPPGGNLFVQDKVATLIENLYSKKRLML	140
Consensus	m kpppdf rnf eat ppilidngla len kierhirkn pgg nlfvqdk v en y klml	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	KRDENKNNALLSHLRKINDHLAARGRFLTGDTMCCFDCELMPRLQHIRVAGKYFVDFIHTLWRY	200
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	KKEEAKNNALLSHLRKINDHLAARGRFLTGDTMCCFDCELMPRLQHIRVAGKYFVDFIHTLWRY	200
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	KKDDVSTNALLSHLRKINDHLAARGRFLTGDTMCCFDCELMPRLQHIRVAGKYFVDFIHTLWRY	203
地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	KKDEAKNNALLSHLRKINDHLAARGRFLTGDTMCCFDCELMPRLQHIRVAGKYFVDFIHTLWRY	205
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	KKDEAKNNALLSHLRKINDHLAARGRFLTGDTMCCFDCELMPRLQHIRVAGKYFVDFIHTLWRY	202
果蝇 <i>Drosophila virilis</i>	KKDDAKNNALLSHLRKINDHLAARGRFLTGDTMCCFDCELMPRLQHIRVAGKYFVDFIHTLWRY	210
Consensus	k n ll l ki hl rfltgdt ccfdcelp lqh irvagkyf f ip lwry	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MYHMYCLDAFTQSCPADQDIINHYKCCGMMKKHHEELETPTTTSIEDIRP	253
蚤状蚤 <i>Daphnia pulex</i>	MYHMYCLDAFTQSCPADQDIINHYKCCGMMKKHHEELETPTTTSIEDIRP	253
点蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	MYHMYCLDAFTQSCPADQDIINHYKCCGMMKKHHEELETPTTTSIEDIRP	257
地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	MYHMYCLDAFTQSCPADQDIINHYKCCGMMKKHHEELETPTTTSIEDIRP	258
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	MYHMYCLDAFTQSCPADQDIINHYKCCGMMKKHHEELETPTTTSIEDIRP	256
果蝇 <i>Drosophila virilis</i>	MYHMYCLDAFTQSCPADQDIINHYKCCGMMKKHHEELETPTTTSIEDIRP	263
Consensus	m my ldaftqscpadqdiinhyk qq mkkheeletpt ttsip	

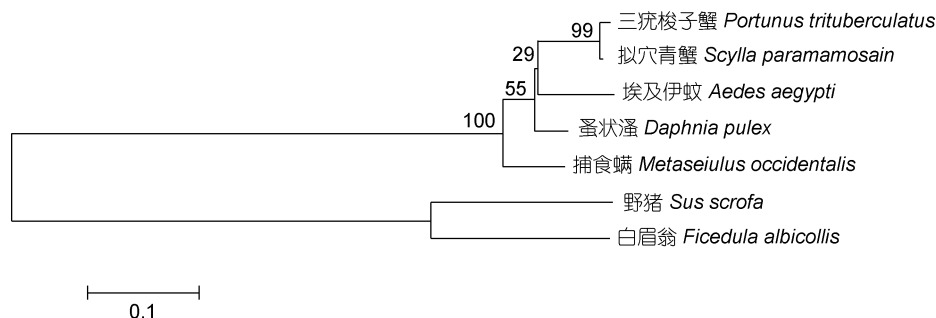
图2 三疣梭子蟹 *PtCLIC* 氨基酸序列与其它物种的 CLIC 氨基酸序列比对Fig.2 The amino acid sequence of *P. trituberculatus* *PtCLIC* alignment with other species' CLIC

图3 利用 MEGA 4.0 软件 NJ 法构建的系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree made by MEGA 4.0

各物种 CLIC 登录号: 拟穴青蟹(ACY66426)、埃及伊蚊(ABF18454)、蚤状蚤(EFX90323)、捕食螨(XP_003742444)、野猪(NP_001231357)、白眉翁(XP_005044363)

对表达量差异不显著, 保持初始水平几乎没有变化, 且显著低于低盐耐受家系各时间点的相对表达量。见图 7。

3 讨论

CLIC 家族成员在体内分布非常广泛, 主要存在于真核细胞质膜和各种细胞器上。研究发现(Heiss *et al*, 1997; Warton *et al*, 2002), 人类 CLIC1 和 CLIC2 分别编码 241 和 243 个氨基酸, 随后 Qian 等(1999)发现小鼠 CLIC3 编码 208 个氨基酸, Berryman 等(2000)发现人类 CLIC5 编码 251 个氨基酸。本研究采用 RACE 技术首次克隆得到 762 bp 的 *PtCLIC* 基因 cDNA 开放

阅读框, 预测蛋白质由 253 个氨基酸组成。蛋白质结构域分析表明, 在 *PtCLIC* 基因编码的氨基酸中不存在跨膜结构域, 且分子量较小, 推测该蛋白本身并不是氯通道, 而仅仅起到氯通道活化蛋白的功能 (Valenzuela *et al*, 1997)。另外, 在与 *PtCLIC* 同源关系较近的蚤状蚤(*Daphnia pulex*)和地中海实蝇(*Ceratitis capitata*)等物种的 CLIC 氨基酸序列上亦不存在跨膜结构域, 这与本实验结果一致。同源性分析表明, *PtCLIC* 与蚤状蚤等物种 CLIC 的同源性均高于 80%, 确认该基因为三疣梭子蟹 CLIC 基因。多氨基酸序列比对分析表明, *PtCLIC* 氨基酸序列保守性较高, 与 NCBI 数据库中氨基酸序列比对结果未能确认本研究

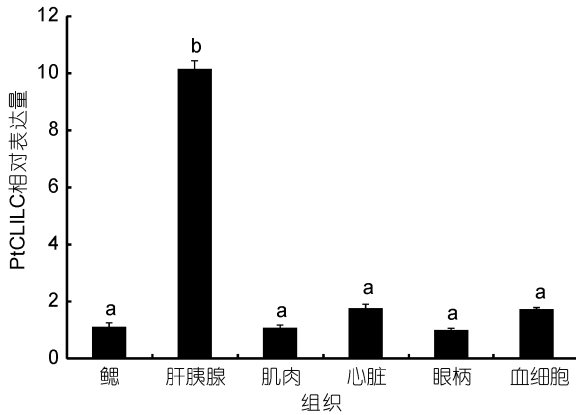


图4 三疣梭子蟹不同组织中 *PtCLIC* 基因的表达

Fig.4 Expression of *PtCLIC* gene in different tissues of *P. trituberculatus*

字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)

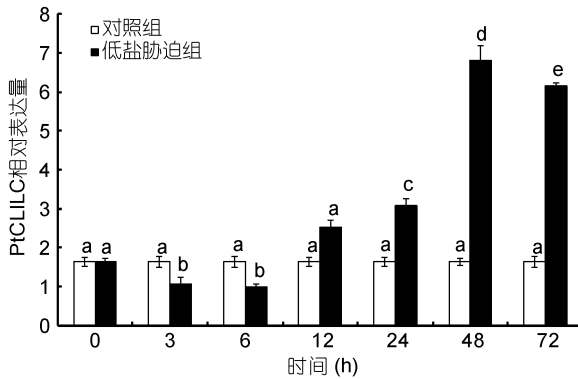


图5 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因在鳃中的表达情况

Fig.5 Expression of *PtCLIC* gene in *P. trituberculatus* gill tissue under low salinity stress

字母不同表示不同时间点差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示不同时间点差异不显著 ($P > 0.05$)

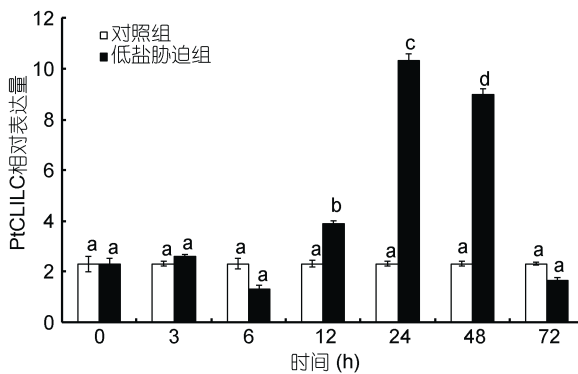


图6 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因在肝胰腺中的表达情况

Fig.6 Expression of *PtCLIC* gene in *P. trituberculatus* hepatopancreas tissue under low salinity stress

字母不同表示不同时间点差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示不同时间点差异不显著 ($P > 0.05$)

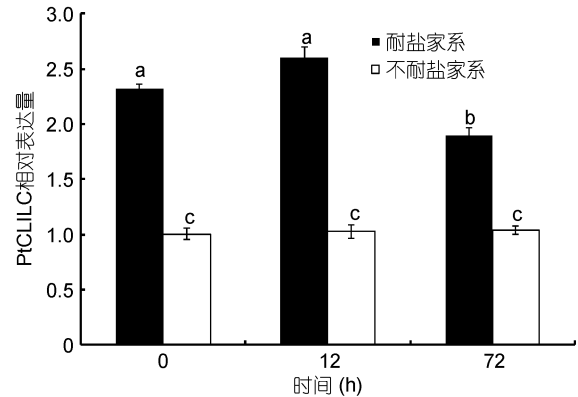


图7 低盐胁迫下低盐耐受家系和低盐敏感家系中 *PtCLIC* 基因在鳃中的表达情况

Fig.7 Expression of *PtCLIC* gene in low salinity tolerant family and low salinity susceptible family in *P. trituberculatus* gill tissue under low salinity stress

字母不同表示不同家系之间差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示不同家系之间差异不显著 ($P > 0.05$)

所得 *PtCLIC* 基因具体亚型, 因此 *PtCLIC* 基因的分型工作有待于深入研究。系统进化分析表明, *PtCLIC* 与同属的拟穴青蟹亲缘关系较近与野猪等脊椎动物的亲缘关系较远。验证了亲缘关系近的同源性高, 亲缘关系远的同源性低的规律, 符合遗传进化规律。

实时荧光 RT-PCR 证实 *PtCLIC* 基因在检测的所有组织中均有表达。在肝胰腺中的表达量最高, 且显著高于其它组织中的表达量。这表明三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因的表达具有组织特异性。Liu 等(2011)的研究表明, 肝脏是甲壳动物离子储存和代谢的中心, 由此推测三疣梭子蟹的肝胰腺在氯离子转运中起到了重要作用。

目前关于甲壳类动物胞内氯离子通道蛋白对盐度胁迫的应答机制还未见报道。鳃是甲壳动物与外界环境进行气体和离子交换的介质(Freire *et al*, 2008), 而肝脏又是离子储存和代谢的中心(Liu *et al*, 2011), 因此研究低盐胁迫进程中 *PtCLIC* 在鳃和肝胰腺中的表达规律十分必要。Freire 等(2008)研究了甲壳动物中 NaCl 的吸收和排出过程, 证实了 Cl^- 的平衡是甲壳动物渗透压调节的关键。在 Cl^- 的吸收过程中, 首先 Cl^- 与 HCO_3^- 交换通过鳃上皮顶部质膜, 继而在基底侧质膜上通过 Cl^- 通道进入血淋巴中。而在 Cl^- 的排出过程中, Cl^- 首先以 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 形式协同转运通过基底侧质膜, 继而在鳃上皮顶部质膜上通过 Cl^- 通道排到水环境中。本实验结果显示低盐胁迫下 *PtCLIC* 基因在鳃和肝胰腺中的表达总体呈现先上调然后下调的规律。低盐胁迫下 *PtCLIC* 基因的表

达量上升,可增强基底侧质膜上 Cl^- 通道蛋白的活性(Valenzuela *et al*, 1997), 进而增强三疣梭子蟹对 Cl^- 的吸收能力。然而当体内的 Cl^- 水平被调节到正常水平时, *PtCLIC* 基因又基本恢复到初始水平, 出现下调表达。

低盐胁迫下低盐耐受家系和低盐敏感家系差异显著, 低盐耐受家系中 *PtCLIC* 的相对表达量存在上调和下调的过程, 表达量最大值为低盐敏感家系的 2.53 倍, 而低盐敏感家系中 *PtCLIC* 的相对表达量基本不变且维持在较低水平。此差异证明在低盐耐受家系中 *PtCLIC* 存在一个积极的渗透压调节过程, 而低盐敏感家系几乎被动接受应激。该研究结果可辅助选育三疣梭子蟹耐低盐品系。

本研究首次成功克隆了三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因全长 cDNA 序列, 通过分析低盐度胁迫下三疣梭子蟹鳃和肝胰腺中 *PtCLIC* 基因的表达规律以及低盐耐受和低盐敏感家系中表达规律的差异, 进一步认定 *PtCLIC* 基因在渗透压调节中发挥了重要作用, 为三疣梭子蟹耐盐新品系的选育提供了理论指导。在后续的研究工作中, 关于三疣梭子蟹 *PtCLIC* 基因在渗透压调控方面的功能研究以及相关 SNP 位点筛选等将重点进行展开。

参 考 文 献

- 吕 富, 黄金田, 於叶兵, 2010. 盐度对三疣梭子蟹生长、肌肉组成及蛋白酶活性的影响. 海洋湖沼通报, 4: 137—142
- 江 山, 许强华, 2011. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 酶活的影响. 水产学报, 35(10): 1475—1480
- 孙颖民, 闫 愚, 孙进杰, 1984. 三疣梭子蟹幼体发育. 水产学报, 8(3): 219—226
- 陈丽娥, 谢 浩, 2010. CIC 型氯离子通道的研究. 生命的化学, 30(4): 545—549
- 季东升, 2005. 三疣梭子蟹池塘养殖技术. 特种经济动植物, 3: 12—13
- 郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 2010. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响. 水产科学, 29(11): 634—638
- 康敏华, 陈 暖, 杜喜玲等, 2011. 水稻氯离子通道蛋白基因的克隆及表达分析. 西北植物学报, 31(4): 0647—0653
- 隋延鸣, 高保全, 刘 萍, 2012. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析. 大连海洋大学学报, 27(5): 398—401
- 路允良, 王 芳, 赵卓英, 2012. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕壳及能量利用的影响. 中国水产科学, 19(2): 237—245
- 戴寒晶, 2006. 胞内氯离子通道蛋白功能的初步研究. 合肥: 安徽医科大学硕士学位论文, 49—50
- Adachi S, Uchida S, Ito H *et al*, 1994. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. Journal of Biological Chemistry, 269: 17677—17683
- Berry K L, Bulow H E, Hall D H *et al*, 2003. A *C. elegans* CLIC-like protein required for intracellular tube formation and maintenance. Science, 302(5653): 2134—2137
- Berryman M, Bretscher A, 2000. Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli. Molecular Biology of the Cell, 11(5): 1509—1521
- Cornejo I, Niemeyer M I, Sepulveda F V, 2001. Cloning cellular distribution and functional expression of small intestinal epithelium guinea pig ClC-5 chloride channel. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1512(2): 367—374
- Dong Y X, Chen Y, Wei Q *et al*, 2013. Cloning and polymorphism analysis of glutamate-gated chloride channel gene of *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). Florida Entomologist, 96(3): 1168—1174
- Dulhunty A F, Gage P W, Curtis S *et al*, 2001. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. Journal of Biological Chemistry, 276(5): 3319—3323
- Edwards J C, 1999. A novel p64-related Cl^- channel: subcellular distribution and nephron segment-specific expression. American Journal of Physiology, 276(3): 398—408
- Freire C A, Onken H, McNamara J C, 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 151: 272—304
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer W N *et al*, 1996. A family of putative chloride channels from A rabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. Journal of Biological Chemistry, 271(52): 33632—33638
- Heiss N S, Poustka A, 1997. Genomic structure of a novel chloride channel gene, CLIC2, in Xq28. Genomics, 45(1): 224—228
- Jentsch T J, Friedrich T, Schriever A, 1999. The CLC chloride channel family. European Journal of Applied Physiology, 437: 783—795
- Liu H, Peatman E, Wang W Q *et al*, 2011. Molecular responses of calreticulin genes to iron overload and bacterial challenge in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Developmental and Comparative Immunology, 35: 267—272
- Lv J J, Liu P, Wang Y *et al*, 2013. Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation. PloS One, 8(12): 1—15
- Perluigi S, Addabbo D, Luca P L *et al*, 2002. Segmental paralogy in the human genome: a large-scale triplication on lp, 6p and 21q. Mammalian Genome, 13(8): 456—462
- Qian Z, Okuhara D, Abe M K *et al*, 1999. Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. Journal of Biological Chemistry, 274(3): 1621—1627
- Shorning B Y, Wilson D B, Meehan R R, 2003. Molecular

- cloning and developmental expression of two Chloride Intracellular Channel (CLIC) genes in *Xenopus laevis*. Development Genes and Evolution, 213: 514—518
- Uchida S, Sasaki S, Furukawa T *et al*, 1993. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. Journal of Biological Chemistry, 268: 3821—3824
- Valenzuela S M, Artin D K, Por S B *et al*, 1997. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nucleus. Journal of Biological Chemistry, 272(19): 12575—12582
- Warton K, Tonini R, Fairlie W D *et al*, 2002. Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1. Journal of Biological Chemistry, 277(29): 26003—26011

CLONING AND CHARACTERIZATION OF CHLORIDE INTRACELLULAR CHANNEL GENE AND ITS EXPRESSION UNDER LOW SALINITY STRESS IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

WANG Yu^{1,2}, LV Jian-Jian¹, LIU Ping¹, GAO Bao-Quan¹, LI Jian¹, CHEN Ping¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Swimming crab *Portunus trituberculatus* is a commercially important species in China. It is a euryhaline species and survives a wide-range salinity. However, salinity could influence its propagation significantly in an artificial environment. Chloride channels were found on the plasma membrane of virtually all eukaryotic cells and play important roles in maintenance of water and electrolyte balance, in the regulation of cell volume, and in the control of membrane potential. Chloride intracellular channel (CLIC) gene is a type of chloride channels gene important in salinity stress response. In this study, we cloned the chloride intracellular channel cDNA of *P. trituberculatus* by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and named *PtCLIC*. The full-length of *PtCLIC* cDNA is 2 000 bp, including an open reading frame (ORF) of 762 bp encoding a 253-amino-acid polypeptide. *PtCLIC* gene had no transmembrane domains as an instability protein as revealed by bioinformatics software. *PtCLIC* of *P. trituberculatus* shared highest homology of 83% with CLIC of *Daphnia pulex* as indicated in homologous analysis. Shown in phylogenetic tree, *P. trituberculatus* cluster to *Scylla paramamosian*. *PtCLIC* gene could be detected in all tested tissues of *P. trituberculatus*, with the highest expression level in hepatopancreas as depicted in quantitative real-time RT-PCR analysis. After challenged by low salinity, the expression of *PtCLIC* gene in gill and hepatopancreas of *P. trituberculatus* up-regulated first and then down-regulated; and the expression of *PtCLIC* gene in low salinity tolerant and susceptible family showed significant difference. Therefore, *PtCLIC* gene was confirmed having osmotic regulation function, which may help breed low-salinity tolerant strain of *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; chloride intracellular channel; gene cloning; low salinity stress; gene expression