

泥蚶(*Tegillarca granosa*)生长因子受体结合蛋白2(GRB2)基因的克隆与表达分析*

董迎辉¹ 项翔² 姚韩韩¹ 包永波¹ 孙长森³ 林志华¹

(1. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 宁波 315100;
2. 海洋出版社 北京 100081; 3. 台州学院生命科学学院 临海 317000)

摘要 通过已构建的泥蚶(*Tegillarca granosa*)转录组文库,利用 SMART RACE 技术扩增得到泥蚶 Tg-GRB2 基因的全长 cDNA 序列,并对其生物信息学、组织表达及发育阶段表达特征进行了分析。结果表明,泥蚶 Tg-GRB2 cDNA 全长 1283bp,开放阅读框为 708bp,编码 236 个氨基酸;蛋白结构预测显示,Tg-GRB2 蛋白包含 SH3-SH2-SH3 三个功能域,SH2 结构域由两端的 α -螺旋和中间反向平行的 β -折叠片构成,SH3 结构域主要由 β -折叠片组成,具备典型的结构特征;氨基酸序列比对发现,Tg-GRB2 与脊椎动物的同源性为 62.1%—63.8%,而与玻璃海鞘和日本血吸虫同源性较低。qRT-PCR 检测结果显示:Tg-GRB2 mRNA 在泥蚶血液、斧足、鳃、外套膜、闭壳肌、内脏团 6 个组织中都有表达,而在血液中的表达量极显著地高于其它组织;在泥蚶的不同发育阶段中,Tg-GRB2 mRNA 在 2—4 细胞胚胎、原肠胚、担轮幼虫、D 形幼虫中均有较高的表达量,而在 D 形幼虫中表达量最高,表明 Tg-GRB2 基因在泥蚶早期发育中发挥重要调节作用。

关键词 泥蚶;生长因子受体结合蛋白 2(GRB2);基因克隆;荧光定量 PCR
中图分类号 Q789

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国东南沿海传统海水养殖贝类之一,具有良好的养殖产业基础和发展前景。培育高产、抗逆的优良品种是促进水产养殖业健康持续发展的重要途径。通过分子辅助选择育种和基因工程育种培育具有高产、抗逆优良性状的新品种已成为现代水产育种技术发展的必然趋势,不仅可以弥补传统育种精度差、周期长等不足,还能大大拓宽遗传改良可资利用的基因来源。然而,分子育种的实现有赖于坚实的分子遗传基础,而目前开展的泥蚶功能基因研究相对较少,而且主要集中在免疫相关基因的克隆与表达分析上,如金属硫蛋白(Metallothionein, MT)基因(解家松等, 2011)、小热休

克蛋白基因(Bao *et al.*, 2011)、血红蛋白基因(汪青等, 2012)、金属蛋白酶组织抑制因子基因(TIMP)(Wang *et al.*, 2012)、铁结合蛋白基因(Ferritin)(Jin *et al.*, 2011)等,而与生长、繁殖等主要经济性性状相关功能基因的研究尚未见报道。

GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2),即生长因子受体结合蛋白 2,在多个信号通路中发挥着“接力棒”的作用,具有促进细胞增殖、细胞生长、细胞分化等功能,已成为研究最为透彻的“明星”接头蛋白。GRB2 蛋白由 SH3-SH2-SH3 三个结构域,SH2 可结合生长因子受体的磷酸化酪氨酸残基而起到促进细胞增殖的作用,而 SH3 则通过与 Ras 的鸟嘌呤核

* 国家现代贝类产业技术体系项目, CARS-48 号; 浙江省自然科学基金重点项目, LZ12C19001 号; 宁波市科技局农业择优委托项目, 2010C10011 号; 宁波市国际合作项目, 2010D10017 号; 宁波市科技创新团队项目, 2011B82017 号。董迎辉, 博士, 助理研究员, E-mail: dongyinghui118@126.com

通讯作者: 林志华, 博士, 研究员, E-mail: zhihua9988@126.com

收稿日期: 2012-08-15, 收修改稿日期: 2012-10-16

苷酸交换因子形成复合物来启动 Ras-MAPK 通路,促进细胞的增殖和分化(Le *et al*, 2009)。GRB2 基因在哺乳动物中已被证实是调控生长、胚胎发育相关信号通路的重要基因,而在海洋贝类中尚未见到关于该基因的研究报道。本研究首次克隆得到泥蚶 Tg-GRB2 基因的 cDNA 全长,利用生物信息学软件对其基因结构、氨基酸序列进行预测,并用 qRT-PCR 技术研究了它在不同组织、不同发育阶段中的表达特征,初步探讨其在泥蚶生长、发育中的作用,为生长相关基因的筛选及生长性状的调控研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 泥蚶材料及 RNA 提取

实验用泥蚶材料取自浙江省象山县的宁波甬盛水产种业有限公司。泥蚶成贝经活体解剖,迅速取血液、斧足、闭壳肌、内脏团、外套膜和鳃 6 个组织,用液氮速冻,保存于 -80°C 冰箱中。泥蚶的早期胚胎、幼虫和幼贝经人工培育获得,于 2011 年 7—8 月用性腺发育成熟的泥蚶亲贝催产,通过隔离产卵和人工授精技术获得同步发育的 2—4 细胞胚胎、原肠胚、担轮幼虫、D 形幼虫和 2 月龄幼贝,所有样品用液氮速冻, -80°C 冰箱中保存。

利用 Trizol(Invitrogen)法提取泥蚶上述组织及胚胎总 RNA,1%琼脂糖电泳检测完整性,NanoVue 超微量紫外分光光度计检测浓度和纯度, -80°C 冰箱中保存备用。

1.2 Tg-GRB2 基因 cDNA 全长的克隆

根据泥蚶转录组文库的注释信息,检索到 Tg-GRB2 基因的 EST 片段,分别设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异性引物 GSP1 和 GSP2(表 1),用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)和 Advantage 2 Polymerase 试剂盒(Clontech)扩增该基因的 cDNA 全长。具体操

作按试剂盒说明书要求,采用 touch down PCR,分别进行 3'端和 5'端扩增。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒(TIANGEN)割胶纯化。纯化后的产物与 PMD-18T(TaKaRa)载体连接,转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行克隆,将菌液 PCR 检测到的阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。

为保证 GRB2 基因 cDNA 全长序列的正确性,以获得的 cDNA 全长序列为模板,设计两条特异性引物 G-F 和 G-R(表 1),使用 LA *Taq* 聚合酶(TAKARA)进行 cDNA 全长的 PCR 扩增。PCR 产物的纯化、克隆测序步骤同上。

1.3 Tg-GRB2 基因序列的生物信息学分析

利用 DNA Star 软件对获得的 3'-RACE 序列和 5'-RACE 序列进行拼接,获得基因的 cDNA 全长序列;用 NCBI 的 Blast 程序进行基因氨基酸序列同源性比对,ORF Finder 程序进行开放阅读框搜索,MEGA4.0 软件的 NJ 法构建不同物种 GRB2 蛋白的系统进化树。用 DNA MAN 6.0 软件进行氨基酸序列、蛋白质理化性质分析,SignalPV2.0 程序进行蛋白质信号肽分析,ProtScale 程序分析蛋白质疏水性,TMHMM 软件进行蛋白质跨膜分析,PROSITE 和 SMART 软件预测蛋白质结构域和功能域,PHD 软件预测蛋白质结构及特殊结合位点,Phyre 2.0 和 Swiss Model 软件对蛋白质高级结构进行预测。

1.4 Tg-GRB2 基因在泥蚶不同组织和不同发育阶段的表达差异分析

取泥蚶上述 6 个组织和 5 个发育阶段样品的 RNA,按照 Promega 反转录试剂盒说明进行 cDNA 第一链合成。根据已获得的 Tg-GRB2 基因的 cDNA 全长序列,设计荧光定量引物 Real-G-F 和 Real-G-R(表 1),以 18S rRNA(表 1)基因为内参,使用 Bio-Rad IQ TM2 Multicolor Real-Time PCR Detection System 进行

表 1 实验所用的引物及序列

Tab.1 Primers and their sequences used in this experiment

引物	序列(5'—3')	引物信息
GSP1	TCCCAGTAATAGCAGCTTCCCCTCGCC	用于 3'-RACE 扩增
GSP2	ATTGGTGGCGAGGGGAAGCTGCTATTAC	用于 5'-RACE 扩增
Real-G-F	TGCTGTTGTGAAGCCTTGATG	Tg-GRB2 基因荧光定量特异性引物
Real-G-R	TCCTCTTTTCCAGTAATAGCAG	
G-F	GTAGACGGCACTACTTACTTAG	Tg-GRB2 基因 cDNA 全长序列验证引物
G-R	CGAATCAATGCTTTACCAAC	
18S-F	CTTTCAAATGTCTGCCTATCAACT	内参基因 18S RNA 荧光定量特异性引物
18S-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCCT	

荧光定量 PCR 扩增。

荧光定量数据处理采用相对值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。实验数据采用 SPSS 16.0 进行 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 Tg-GRB2 基因 cDNA 全长的克隆

3'-RACE 和 5'-RACE PCR 产物分别经过纯化、克隆、测序、拼接后, 获得了泥蚶 Tg-GRB2 基因的 cDNA 全长 1283bp (GenBank 登录号: JX103497), 开放阅读框为 708bp, 编码 236 个氨基酸, 5'-UTR 长 33bp, 3'-UTR 为 542bp, 包含一个终止密码子 TGA、加尾信号 ATTA 和 29bp 的 polyA 尾巴, 如图 1。

2.2 Tg-GRB2 蛋白的理化性质分析

用 DNAMAN6.0 软件推导出 Tg-GRB2 基因编码蛋白的分子量为 27.38kDa, 理论等电点 $pI=6.52$ 。SignalPV2.0 软件和 TMHMM 软件预测显示, 该蛋白没有明显的信号肽, 也没有跨膜区域。在氨基酸组成上, 极性氨基酸所占比例较高, 表现为亲水性, 这与 ExPasy ProtScale 软件的预测结果一致。

2.3 Tg-GRB2 蛋白的功能域与结构域预测

利用 Prosite 和 Smart 软件对 Tg-GRB2 蛋白进行了功能域预测(图 2 和图 3), 结果均表明 Tg-GRB2 蛋白含有 3 个功能域, 即 SH3(1—58aa, Src homology 3 domain profile)、SH2(60—158aa, Src homology 2 domain profile)和 SH3(184—236aa, Src homology 3 domain profile), 这与脊椎动物 GRB2 的结构十分相似。

PHD 软件结构域预测表明, 在 105(SVK)、197(TFR)和 222(TGK)处各有一个蛋白酶 C 磷酸化位点, 在 12(SQAD)、29(SKDD)、98(SPGE)、134(SINE)、162(SKDD)、192(TEEE)和 205(TLLD)位各有一个酪氨酸激酶磷酸化位点, 在 30(KDDINWY)位有一个酪氨酸激酶磷酸化位点, 在 226(GLFPAA)处有一

```

1 GTAGACGGCACTACTTACTTACTTGTGAAACGCAAATCGAGGCTGTGGCAAAGCAGCAATTC
1 M E A V A K H E F
61 AAAGCAAGTCAAGCCGACGAATTGAGCTTTTGC AAAATGATGTTTTAAAGATACTGAGT
10 K A S Q A D E L S F C K N D V L K I L S
121 AAAGATGATGATATAAATTTGGTACAAAGCTGAATTAATGGAGTTGAAGGATATATACCA
30 K D D D I N W Y K A E L N G V E G Y I P
181 AATAATTACATTGAAATGAAACCTCGTCCGTGTTTGTAGGAAAAATGAGGAGAGAAGAT
50 N N Y I E M K P R P W F V G K M R R E D
241 GCAGTCAAAAATTACTTGC AAAAGGCCAGATGATTCACATATACATCCTGATGTTACA
70 A V K K L L A K R P D D S H I H P D G T
301 TTTTGTAGTCAGAAACAGTGAAGCTCACCAGGAGAATTTCAATCAGTAAAATTTAAA
90 F L V R N S E S S P G E F S I S V K F K
361 GATGATGCACAGCATTTTAAAGTTTTAAGAGATAAAAGTGGTCATTACTTTTTATGGGTT
110 D D A Q H F K V L R D K S G H Y F L W V
421 GTAAAGTTCAATTTCTATAAATGAGTTAGTAGAATACCATAGAAGTTCATCGGTAAATAGA
130 V K F N S I N E L V E Y H R S S S V N R
481 GGTTCAACAGTACTTTAAAGATATGGCTCCGGATAGTAAAGATGATTTCCAAGACAT
150 G S T V L L K D M A P D S K D D F Q R H
541 GAACAGGTACCAATGCATAATATGATGATGTGCTGTTGTGAAGCCTTGTATGATTTCAAT
170 E Q V P M H N M M M C C C E A L Y D F N
601 GCAGAAACAGAGGAAGAATTGACATTTTCGTAGAGGAGAGAAAAAACATTACTTGATGAA
190 A E T E E E L T F R R G E K I T L L D E
661 ATAGACAGCAATTTGGTGGCGAGGGGAAGCTGCTATTACTGGGAAAAGAGGACTATTTCCCT
210 I D S N W W R G E A A I T G K R G L F P
721 GCTGCATATGTGAAAAAATAATGACATAATCATTGCCCAAATTTCTTAAGAAATTTTAAA
230 A A Y V K K I *
781 TTTTATATATGTCATATGGTCTGTTACTATGACCAGAATCAGATAGACTATCATTTC
841 TTCCATTTGTCACTTGTGCTTGTGCAAAAAGCTTTGACAAAACATGTATAAATGCACC
901 ATCATATTTAAAGTAACACAGTAGAAATATGTTGGTCACAGTCGGATTATAAATTCTGTCAA
961 GTCATATGTGACTGTGCTGTCCCTTACAGATTCTAACATTCAAGTCATCAAAAATCATAT
1021 TTGCCAAGAAATGTTGAAGTTTTTACATTTATACTCTGATCAGATTTTGGATTCTTCTAA
1081 TCTGTAGTATATAGTTATGTGGCTATAATCATGCAACTGAAAAGTATGTTTACTTTTGAAC
1201 TTAATTTATATAAATGGGTATTTTAAAATTTGTTTCAAAAATAGAATGGCAAGTCAGTTT
1261 TATGTATTTAGATTTGTAAGCATTGATTCGCTTTTATCTAAATCAAAAATACAAAAA
1321 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 Tg-GRB2 基因的 cDNA 全长序列
Fig.1 The full length cDNA of Tg-GRB2 gene
加框的密码子分别代表 Tg-GRB2 基因的启动子、终止子、加尾信号, *代表蛋白翻译结束; 下划线部分代表 SH3 功能区, 阴影部分为 SH2 功能区

个 N-豆蔻酰化位点, 在 222 位还有一个酰胺位点 (Amidation site)。

2.4 Tg-GRB2 蛋白质高级结构预测

用 Swiss model 软件对泥蚶 Tg-GRB2 蛋白的二级结构进行了预测, 结果 Tg-GRB2 蛋白的二级结构由 4 个 α -螺旋、24 个 β -折叠片和 26 个转角组成。从图 4 可以看出, 该高级结构由三部分组成, 即位于两侧的 SH3 结构域和位于中间的 SH2 结构域, 其中 SH2 结构域的两端分别有 1 个 α -螺旋, 中间由反向平行的 β -折叠片相连, 而 SH3 结构域大多由 β -折叠组成, 呈“桶状”结构。

2.5 Tg-GRB2 蛋白与其它物种 GRB2 的氨基酸序列比对及系统进化分析

利用 MEGA4.0 软件, 对泥蚶和其它 11 个物种的 GRB2 氨基酸序列进行比对并构建系统进化树(图 5, 图 6)。所选物种的名称和 GenBank 号为: 大西洋鲷



图2 用 ExPASy Prosite 软件预测 Tg-GRB2 蛋白的结构域
Fig.2 Prediction of protein domains of Tg-GRB2 using the ExPASy Prosite software

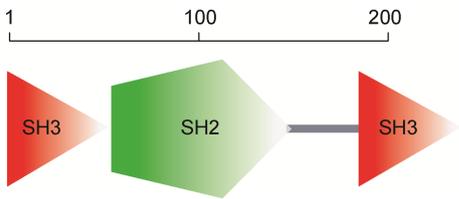


图3 用 Smart 软件预测的 Tg-GRB2 蛋白的功能域
Fig.3 Prediction of protein functional domains of Tg-GRB2 using the Smart software

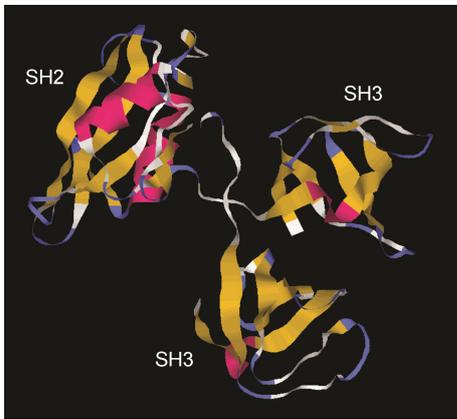


图4 Tg-GRB2 蛋白的二级结构预测

Fig.4 The prediction of protein secondary structure of Tg-GRB2

注: α -螺旋为深红色; β -折叠为黄色; 转角为淡蓝色; 其它残基的颜色为白色

(*Salmo salar*, NP_001158778.1)、鸡(*Gallus gallus*, NP_989742.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_998200.1)、北美绿蜥蜴(*Anolis carolinensis*, XP_003217258.1)、短尾负鼠(*Monodelphis domestica*, XP_001369479.1)、人(*Homo sapiens*, CAG29359.1)、小家鼠(*Mus musculus*, NP_032189.1)、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*, XP_002131475.1)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, CAB59279.1)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP_003443139.1)、日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, CAX70561.1)。

氨基酸序列比对表明, 泥蚶 Tg-GRB2 与尼罗罗非鱼、斑马鱼、大西洋鲑、非洲爪蟾、北美绿蜥蜴、斑马鱼、短尾负鼠、小家鼠、人等脊椎动物的同源性为 62.1%—63.8%, 而与玻璃海鞘和日本血吸虫同源

性较低(54%和 53.1%)。从构建的系统树来看(图 6), 脊椎动物中的哺乳纲、鸟纲、爬行纲、两栖纲、鱼纲动物先聚成一大支, 然后再与泥蚶聚在一起; 而日本血吸虫和玻璃海鞘单独聚成一支, 与泥蚶的亲缘关系更远。

2.6 Tg-GRB2 基因在泥蚶不同组织及不同发育阶段中的表达差异

用 qRT-PCR 技术, 检测了 Tg-GRB2 基因在泥蚶不同组织和不同发育阶段中的表达差异。从图 7 中可以看出, 该基因在泥蚶 6 个组织中均有表达, 其中在血液中的表达量最高, 极显著地高于其它组织($P < 0.01$), 而在其它 5 个组织中表达量相对较少, 差异不显著。

不同发育阶段表达差异结果表明, Tg-GRB2 基因在泥蚶 2—4 细胞期、原肠胚期、担轮幼虫期和 D 形幼虫期都有较高的表达量, 其中在 D 形幼虫期显著高于其它时期, 而幼贝期的表达量则极显著地低于其它时期。见图 8。

3 讨论

GRB2 作为一种信号接头蛋白, 通过联系多个信号传导通路来调控细胞的增殖、生长和分化(Haines *et al*, 2009)。本实验利用泥蚶转录组文库, 在贝类中首次克隆得到 GRB2 基因的 cDNA 全长, 并推测 Tg-GRB2 的开放阅读框为 708bp, 编码 236 个氨基酸, 蛋白分子量为 27.38kDa, 理论等电点为 6.52, 发现其与高等动物的结果基本相似(Fath *et al*, 1994)。GRB2 蛋白的高级结构, 已在高等动物中研究得较为透彻, 如 Maignan 等(1995)利用 X 射线结晶学技术首先发现 GRB2 蛋白由 SH3-SH2-SH3 三个结构域紧凑地结合在一起; Mary 等(1998)发现 SH2 的结构域中含有一个反向平行的 β -折叠, 两端分别有一个 α -螺旋, 通过形成一个磷酸酪氨酸围成的袋状结构与其它蛋白结合来发挥作用; Motohiko 等(2001)证实 SH3 结构域形成 β -折叠桶状结构, 可特异地结合富含脯氨酸的基序, 也可以自身形成二聚体。本研究利用多个软件对泥蚶 Tg-GRB2 蛋白的功能域进行了预测, 发现它也存在 SH3-SH2-SH3 三个保守的功能域, 说明 GRB2 基因在不同动物中是比较保守的; 在预测的 Tg-GRB2 蛋白质二级结构中, SH2 结构域包含 2 个 α -螺旋, 并由反向平行的 β -折叠片相连接, 且 SH3 结构域主要由 β -折叠片组成, 这与高等动物的结构基本一致, 由此表明 GRB2 蛋白在系统进化中具有高度的保守性, 推测其

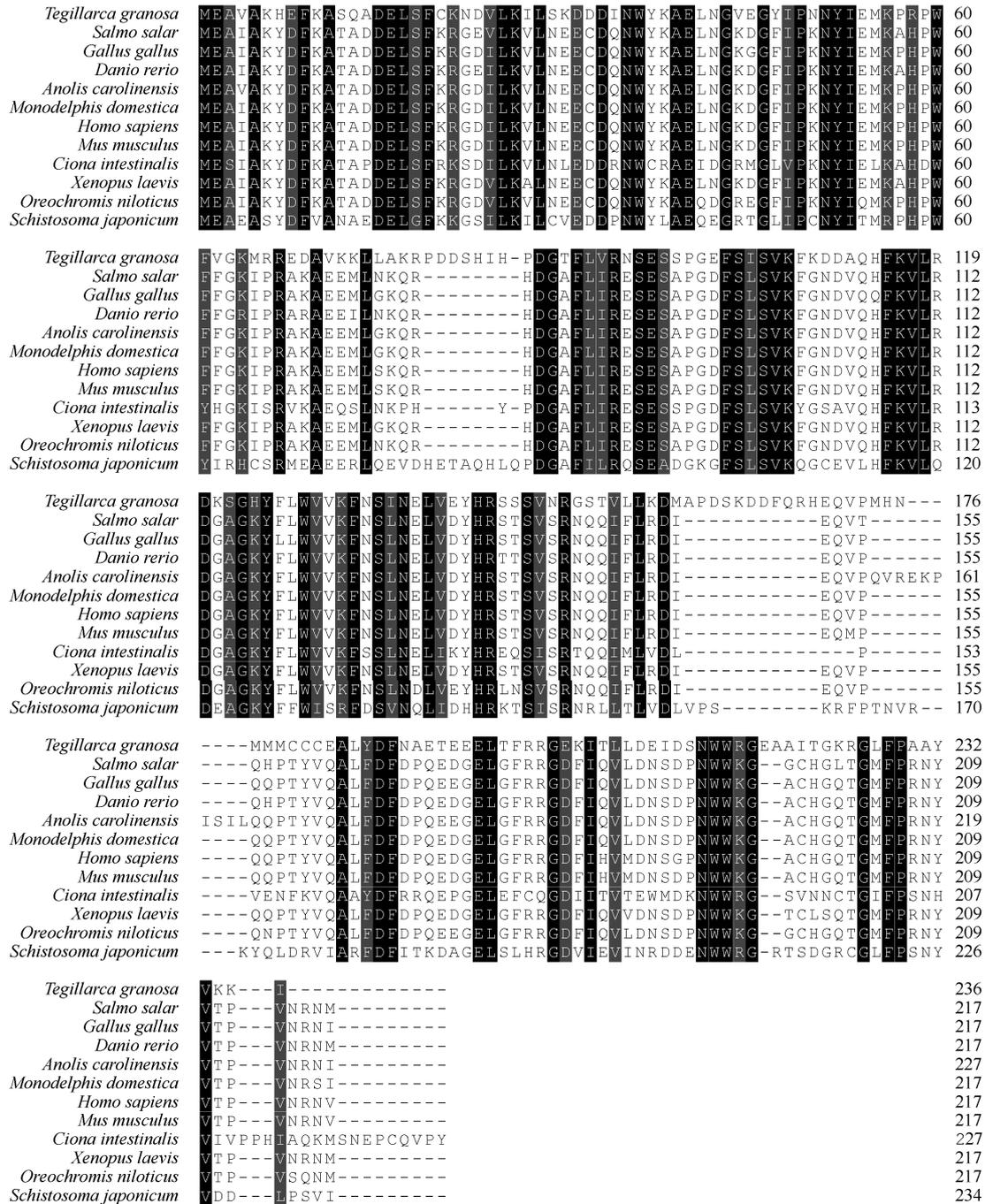


图 5 泥蚶与其它物种 GRB2 进行氨基酸序列比对

Fig.5 Amino acid sequence alignment of GRB2 between *T. granosa* and other species

在泥蚶体内发挥着类似高等动物中的生物功能。

由于 GRB2 蛋白能够参与多种信号通路的转导,所以在高等动物的各个组织中均有表达(Downward, 1994)。Bar-Sagi 等(1993)利用免疫荧光技术研究了 GRB2 蛋白在细胞中的定位,发现其与调节肌动蛋白细胞骨架形成中起重要调节作用的蛋白结合紧密;

Simpson 等(2001)、Korkaya 等(2001)的研究结果表明,GRB2 可与多种调节蛋白发生相互作用,参与细胞内的多种代谢活动。本研究用 qRT-PCR 技术检测了 Tg-GRB2 基因在泥蚶不同组织、不同发育阶段中的表达情况,结果表明 Tg-GRB2 基因在 6 个组织和 5 个发育阶段中均有一定表达,这说明 Tg-GRB2 蛋白

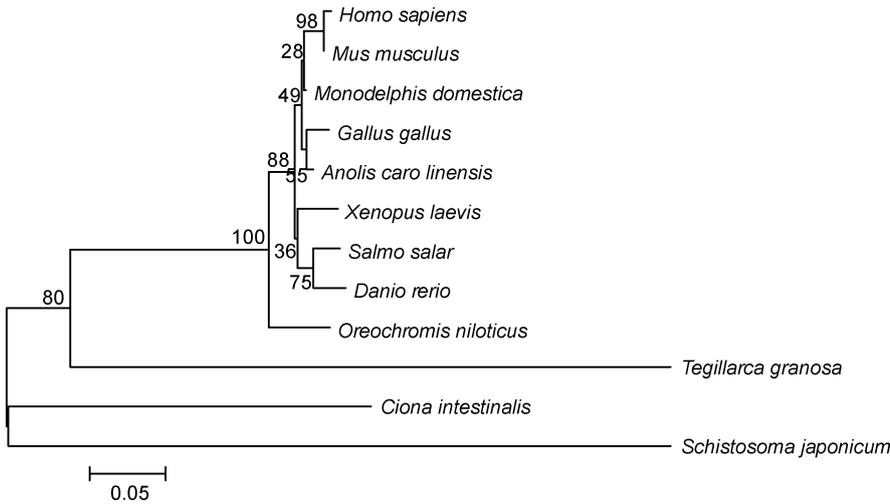


图 6 用 MEGA4.0 软件邻接法构建的泥蚶与其它物种 GRB2 的系统进化树
Fig.6 Neighbor-joining phylogenetic tree of GRB2 using MEGA4.0 software between *T. granosa* and other species

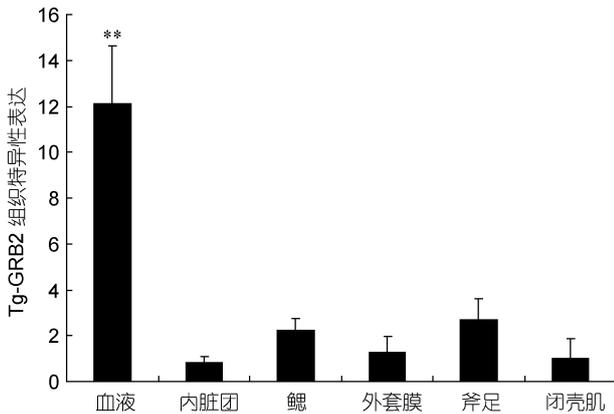


图 7 Tg-GRB2 基因在泥蚶 6 个组织中的表达差异分析 (n=4)
Fig.7 Analysis of expression difference of Tg-GRB2 gene in six tissues of *T. granosa* (n=4)

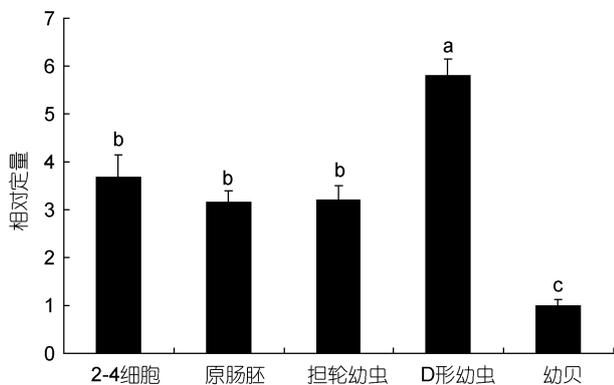


图 8 Tg-GRB2 基因在泥蚶不同发育阶段的表达差异分析
Fig.8 Analysis of expression difference of Tg-GRB2 gene in different developmental stages of *T. granosa*

在泥蚶体内发挥着广泛的生物功能，是维持正常生命活动不可或缺的必需成分。

在泥蚶组织表达差异性分析中，Tg-GRB2 基因在血液中的表达量极显著地高于其它组织，而在内脏团、鳃、外套膜、闭壳肌、斧足 5 个组织中表达无明显差异。血液在泥蚶正常代谢中，发挥着运输营养物质、保持内环境稳态、参与体液调节和免疫防御等重要功能，许多酶、激素、维生素等物质依靠血液传递才能发挥对代谢过程的调节作用。因此，泥蚶 Tg-GRB2 基因要参与多种代谢调节、免疫调节等功能，借助血液这

个载体来完成就不难理解了。

GRB2 基因在正常胚胎发育及成熟稳定的过程中也发挥至关重要的作用。敲除 GRB2 基因的小鼠，可导致早期胚胎致死(Caravatti *et al*, 1999; Puto *et al*, 2003)。采用 GRB2 的 SH2 结构域取代 Ras 激活蛋白 Sos1 的 C 端可使 Ras-MAPK 信号通路恢复后从而达到胚胎挽救的效果(Alec *et al*, 1998)。Puto 等(2003)通过小鼠的亚等位基因实验，证明 GRB2 蛋白在胚胎发育过程中具有维持上皮细胞形成、细胞运动和血管形成等功能。在本实验中，泥蚶 GRB2 基因在 2—4 细胞期、原肠胚、担轮幼虫、D 形幼虫中表达量都较高，其中 D 形幼虫时期显著高于其它时期，原因可能是 D 形幼虫是胚胎组织、器官形成重要时期，细胞分裂速度加快，生命活动旺盛，GRB2 蛋白表现活跃；而在幼贝时期，组织、器官构建已基本完成，则 GRB2 表达量相对较低。

参 考 文 献

汪 青, 包永波, 霍礼辉等, 2012. 泥蚶血红蛋白基因(Tg-HbIIA)克隆、分析及免疫表达研究. 海洋与湖沼, 43(1): 88—94
解家松, 许 婷, 刘 玮等, 2011. 泥蚶金属硫蛋白的鉴定、原核重组表达及其组织细胞分布. 中国水产科学, 18(5): 955—964
Alec M C, Tracy M S, Ryuichi S *et al*, 1998. Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. Cell, 95: 793—903
Bao Y B, Wang Q, Liu H M *et al*, 2011b. A small HSP gene of

- bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 729—733
- Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A *et al*, 1993. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell*, 74(1): 83—91
- Caravatti G, Rahuel J, Brigitte G *et al*, 1999. Structure-based design of a nonpeptidic antagonist of the SH2 domain of Grb2. *Bioorg Med Chem Lett*, 9: 1973—1978
- Downward J, 1994. The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett*, 338(2): 113—117
- Fath I, Schweighoffer F, Rey I *et al*, 1994. Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties. *Science*, 264: 971—974
- Haines E, Minoo P, Feng Z *et al*, 2009. Tyrosine phosphorylation of Grb2: role in prolactin/epidermal growth factor cross talk in mammary epithelial cell growth and differentiation. *Mol Cell Biol*, 29: 2505—2520
- Jin C H, Li C H, Su X R *et al*, 2011. Identification and characterization of a *Tegillarca granosa* ferritin regulated by iron exposure and thermal stress. *Development and Comparative Immunology*, 35: 745—751
- Korkaya H, Jameel S, Gupta D *et al*, 2001. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J Biol Chem*, 276(45): 42389—42400
- Le B T, Hoang A V, Yasuda K *et al*, 2009. Cas-L was over expressed in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Biol Ther*, 8: 683—688
- Maignan S, Guilloteau J P, Fromage N *et al*, 1995. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science*, 268: 291—293
- Mary M S, Anne F F, Stuart B *et al*, 1998. The three-dimensional solution structure of the Src homology domain-2 of the growth factor receptor-bound protein-2. *Journal of Biomolecular NMR*, 11: 153—164
- Motohiko N, Koji N, Yukiko H *et al*, 2001. Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO Journal*, 20: 2995—3007
- Puto L A, Pestonjamas K, King C C *et al*, 2003. p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J Biol Chem*, 278: 9388—9393
- Simpson A, Uitto J, Rodeck U *et al*, 2001. Differential expression and subcellular distribution of the mouse metastasis-associated proteins Mta1 and Mta3. *Gene*, 273(1): 29—39
- Wang Q, Bao Y B, Huo L H *et al*, 2012. A novel tissue inhibitor of metalloproteinase in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 33: 645—651

CLONING AND EXPRESSION OF GRB2 GENE FROM THE BLOOD CLAM *TEGILLARCA GRANOSA*

DONG Ying-Hui¹, XIANG Xiang², YAO Han-Han¹, BAO Yong-Bo¹,
SUN Chang-Sen³, LIN Zhi-Hua¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100;
2. China Ocean Press, Beijing, 100081; 3. College of Life Sciences, Taizhou University, Linhai, 317000)

Abstract On the basis of 454 cDNA library of *Tegillarca granosa*, Tg-GRB2 cDNA was cloned by SMART RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) techniques and then the bioinformatics and expression profiles in different tissues and developmental stages were analyzed. The full length cDNA of Tg-GRB2 gene was 1275bp, containing a complete ORF (Open Reading Frame) encoding 236 amino acids. There were three functional domains of Tg-GRB2 protein (SH3-SH2-SH3). The core structure of the SH2 domain contains an antiparallel β -sheet and two α -helices, and the structure of the SH3 domain was mainly composed by β -sheets, which is similar to known GRB2 structure of mammalian. Homologous analysis showed that the amino acid sequence of Tg-GRB2 shared 62.1%—63.8% similarity with those of vertebrates, and relatively low homology with *Ciona intestinalis* and *Schistosoma japonicum*. The results of tissue-specific expression by real time PCR show that Tg-GRB2 expressed in all six tissues (blood, foot, gill, mantle, adductor muscle, and visceral mass), and the expression of blood was significantly higher than those of other tissues. The results of relative expression in different development stages revealed that the expression of D larvae was higher than those of stages of 2—4 cells, gastrula, trochophore and juvenile clams. Therefore the Tg-GRB2 gene might play an important role in the formation of tissue and organs.

Key words *Tegillarca granosa*; growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2); gene cloning; Real time PCR