

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2021.04.009

中华绒螯蟹 *14-3-3 ζ* 基因 cDNA 全长 克隆与序列分析

肖 麒¹, 吴彦兵¹, 陈 炼², 李 鹏¹

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)

(2.南京林业大学生物与环境学院,江苏 南京 210037)

[摘要] 14-3-3 蛋白可以与不同蛋白质结合从而参与多种磷酸化调节的信号通路,并在生物代谢、信号转导、细胞周期控制、凋亡、蛋白质运输、转录、应激反应等方面发挥重要作用. 本文用 SMART RACE 技术克隆获得了中华绒螯蟹 *14-3-3 ζ* 基因的全长 cDNA 序列, *14-3-3 ζ* 基因 cDNA 全长为 1 081 bp, 包含一个 744 bp 的开放阅读框, 其编码一个 28.0 kDa 的含 247 个氨基酸的多肽, 编码的氨基酸序列包含保守的 14-3-3 结构域. 多序列比对、系统发生关系重建和其他生物信息学分析表明中华绒螯蟹 *14-3-3 ζ* 为非分泌型蛋白, 不具有跨膜区域, 定位于细胞质中, 其分子量与已知的其他物种的 *14-3-3 ζ* 蛋白分子量相近. 中华绒螯蟹的 *14-3-3 ζ* 序列与南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 等甲壳类动物的 *14-3-3 ζ* 基因高度同源. 选择压力分析表明中华绒螯蟹 *14-3-3 ζ* 受到纯化选择, 其功能可能高度保守.

[关键词] 中华绒螯蟹, *14-3-3 ζ* , cDNA, 序列分析

[中图分类号] Q958 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2021)04-0069-07

cDNA Cloning, Characterization and Sequence Analyses of *14-3-3 ζ* Gene in *Eriocheir sinensis*

Xiao Qi¹, Wu Yanbing¹, Chen Lian², Li Peng¹

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210023, China)

(2.College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: 14-3-3 proteins can bind to different proteins to participate in a variety of phosphorylation regulatory signaling pathways, and play an important role in biological metabolism, signal transduction, cell cycle control, apoptosis, protein transport, transcription, stress response and other aspects. The full-length cDNA of *14-3-3 ζ* gene from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* was cloned and identified using SMART RACE technique. It is consisted of 1 081 nucleotides with an open-reading frame of 744 bp, which encoding 247 amino acids (28.0 kDa) and containing 14-3-3 domain. Sequence alignment, phylogenetic tree construction and some bioinformatics analyses revealed that *14-3-3 ζ* is non-secretory and no-transmembrane protein, which is probable located in cytoplasm. The molecular weight of *14-3-3 ζ* is similar than that of others *14-3-3 ζ* isoforms. The sequence of *14-3-3 ζ* in *E. sinensis* is highly homologous to that in the reported crustaceans such as *Penaeus vannamei* and *Scylla paramamosain*. Moreover, we observed a strong signature of purifying selection between the comparison of orthologous *14-3-3 ζ* gene pairs of *E. sinensis*. The results suggest a conservative function across crustaceans.

Key words: *Eriocheir sinensis*, *14-3-3 ζ* , cDNA, sequence analyses

14-3-3 蛋白质最早由 Moore 和 Perez 于 1967 年在牛脑组织提取物中发现, 根据蛋白经过 DEAE cellulose (二乙氨基纤维素柱) 层析中的片段数目以及其在凝胶电泳中的迁移率, 将其命名为 14-3-3 蛋白^[1]. 14-3-3 蛋白是一类广泛存在于真核生物中分子量较小 (27 kDa~32 kDa) 的酸性调控蛋白家族^[2], 主要以稳定的同源或异源二聚体形式存在于细胞质中, 其单体由 9 个反向平行的 α -螺旋组成, 哺乳动物

收稿日期: 2021-01-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770402, 31000954).

通讯作者: 李鹏, 博士, 副教授, 研究方向: 动物生态与进化生物学. E-mail: lipeng@njnu.edu.cn

14-3-3 蛋白二聚体的 X 射线结构为 U 形,具有一个高度保守内部凹槽^[3]. 这个内部凹槽是 14-3-3 与配体相互作用的结构域,能容纳来自单一蛋白质结合伴侣的两个区域或来自两个蛋白质结合伴侣的一个区域,用于调节 14-3-3 蛋白与靶蛋白结合^[4]. 14-3-3 蛋白分子有 3 个保守的碱性氨基酸组成,一个能与磷酸化磷酸基团形成离子键和氢键的口袋,这就解释了 14-3-3 蛋白能够与到含有磷酸化苏氨酸和磷酸化丝氨酸的蛋白质特异性结合的原因^[5]. Ichimura 等^[6]首次对 14-3-3 蛋白家族的作用进行阐述,认为 14-3-3 蛋白与酪氨酸羟化酶激活物有关. 在有关酿酒酵母的蛋白质互作研究中证明 14-3-3 蛋白可以与 271 种不同的磷酸化的蛋白质相互作用,14-3-3 蛋白与不同分子会产生不同的功能,比如:稳定蛋白质的活性或非活性磷酸化形式、改变构象、亚细胞定位以及蛋白的相互作用关系^[7]. 因此,14-3-3 蛋白可以与不同蛋白质结合从而参与多种磷酸化调节的信号通路,并在生物代谢^[8]、信号转导^[9]、细胞周期控制^[10]、凋亡^[11]、蛋白质运输、转录^[12]、应激反应^[13]等方面发挥着重要作用.

14-3-3 蛋白是由不同基因编码产生,目前已知哺乳动物 14-3-3 蛋白有 7 个亚型,根据其在高效液相色谱(HPLC)的洗脱顺序,用希腊字母(β 、 ϵ 、 γ 、 η 、 σ 、 τ 、 ζ /zeta)进行命名,并且这些亚型的表达量在不同类型的组织中存在差异^[14]. 其中,14-3-3 ζ 蛋白因其在人类癌症的形成和发展中所起的作用而广为人知^[15]. 14-3-3 ζ 作为一个重要的原癌基因,可与细胞内多种分子相互作用,改变细胞信号传导、调控细胞周期和抑制细胞凋亡,在恶性肿瘤的形成、生长、侵袭及转移的过程中发挥了重要的生物学功能^[16]. 大量研究也证实 14-3-3 ζ 在人类多种常见恶性肿瘤中呈高表达,且其高表达水平不仅与肿瘤的转移存在一定相关性,也与肿瘤耐药、预后等方面存在一定相关性^[17]. 此外,14-3-3 ζ 可能在免疫响应中发挥着重要作用. 用脂多糖和肽聚糖等刺激三角涡虫(*Dugesia japonica*)时,14-3-3 ζ 表达显著上调^[18]. 通过 RNA 干扰技术证明 14-3-3 ζ 可通过调节细胞骨架重塑参与埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和白纹伊蚊(*A. albopictus*)革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的吞噬作用^[19]. 实时定量 PCR 结果显示,14-3-3 ζ 基因在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)各组织器官均有表达,但在卵巢中的表达量显著高于其他组织,在卵黄发生中期 14-3-3 ζ 的表达量显著高于增殖期,推测其在卵巢中发挥重要作用^[20]. 但还未见关于中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 14-3-3 ζ 基因的相关研究报道. 本研究采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术从中华绒螯蟹体内克隆 14-3-3 ζ 基因的 cDNA 全长序列,用生物信息学的方法对该基因的结构与功能进行了初步分析,并对中华绒螯蟹的 14-3-3 ζ 基因进行了选择压力分析,研究结果可为后续深入研究该基因的作用提供资料.

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用中华绒螯蟹均采自江苏泰州兴化中堡镇,壳长(30±5) mm. 实验前在曝气水中暂养,水温为(20±2)℃,期间用虾蟹饲料喂养,每天换一次水,使其适应实验室的养殖环境. 取第三步足肌肉组织 100 mg 转移至含有 1 mL Trizol 冻存管中,迅速用液氮冻存,用于提取总 RNA.

1.2 总 RNA 抽提与逆转录

提取总 RNA 按 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Germany)说明书于生物安全柜上操作,提取的 RNA 分装后于-80℃保存. 取 1 μL 总 RNA 样本稀释 50 倍(即 1 μL RNA 样品加入 49 μL RNase-free water)于 BioPhotometer 核酸和蛋白质定量仪(Eppendorf, Germany)上检测 RNA 的浓度和纯度(OD260/OD280),总 RNA 检验合格后用于后续实验. 采用 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech, Palo Alto, USA)进行 cDNA 的合成,操作按试剂盒说明书进行.

1.3 引物设计

从 GenBank 下载中华绒螯蟹近缘物种的 14-3-3 ζ 的氨基酸序列后进行比对,找出上下游连续的保守位点,用 Primer Premier 5.0 设计 cDNA 末端快速克隆(RACE)反应的特异引物(见表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成.

1.4 14-3-3 ζ 基因 cDNA 全长扩增

按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage® 2 PCR Enzyme System(Clontech, Palo Alto, USA)试剂盒说明书,采用巢式 PCR 扩增中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 基因的 5'末端序列. 以 Primer primer 5.0 设计

下游特异性引物 GSP1- ζ 5',上游引物为试剂盒中的通用引物(universal primer, UPM)进行 5' RACE. 以第一次 PCR 产物为模板,用设计的下游引物 GSP2- ζ 3'和 UPM 进行第二次 PCR. RACE 反应(50.0 μ L)体系为:10 \times Advantage 2 PCR buffer 5.0 μ L,50 \times dNTP Mix(2.5 mmol/L) 1.0 μ L,Milli-Q water(Toyobo, Japan)34.5 μ L,10 \times Universal Primer A Mix(10 μ mol/L)5.0 μ L,5'RACE/3'RACE 特异引物(10 μ mol/L)1.0 μ L,RACE-Ready cDNA 2.5 μ L,50 \times Advantage 2 polymerase(Clontech, USA)1.0 μ L. PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存. 扩增产物通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物中的目的片段. 将目的片段连入 pMD19-T 载体,转化到 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞后 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,通过蓝白斑检测挑选出阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定.

表 1 14-3-3 ζ 基因 cDNA 片段扩增所用引物与扩增片段大小Table 1 Nucleotide sequences of primers used in cDNA fragments amplified of 14-3-3 ζ gene and amplicon length size

	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增长度
5'RACE	接头引物 GSP1- ζ 5'	5'-GGCCACGCGTCTGACTACTACGGGGGGG-3' 5'-CCCAGAAGTCTTACCAGGAGG-3'	583 bp
3'RACE	接头引物 GSP2- ζ 3'	5'-ACTCTGCGTTGATACCCTGCTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3' 5'-TGCAATCGCGGAGCTGGATACGCTGAAT-3'	433 bp
ORF 验证	14-3-3 ζ -ORFf 14-3-3 ζ -ORFr	5'-ATGGGAGATAAGGAGGAACAAG-3' 5'-CTTGGCATTATCATTGAGCATCCTC-3'	744 bp

1.5 14-3-3 ζ 基因序列的生物信息学分析

分别使用在线工具 protparam(<https://web.expasy.org/protparam/>)、NetNGlyc(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、NetPhos(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 蛋白质序列的理化性质、糖基化位点和磷酸化位点进行分析和预测. 利用线上工具 TMHM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和 TMPRED(https://embnet.vitalit.ch/software/TMPRED_form.html)预测中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 蛋白质序列的跨膜结构区,SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)用于预测信号肽,14-3-3 ζ 蛋白质的亚细胞定位用 PSORT II 软件(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)预测.

从 NCBI 蛋白质数据库中下载节肢动物,软体动物,扁盘动物和哺乳动物的 14-3-3 ζ 蛋白质序列,利用 MAFFT^[21]软件的默认参数将这些蛋白质序列与中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 蛋白质序列进行比对. 使用 MEGA 7^[22]软件的邻接法构建无根的系统发生树,设置自展重复 1000 次. 利用 SMART(<http://smart.emblheidelberg.de/>)鉴定网上下载的 14-3-3 ζ 蛋白质序列与中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 蛋白质序列的结构域. 使用线上工具 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 蛋白质的三维结构. 根据三维结构信息使用在线工具 ESPript 3.0(<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/cgi-bin/ESPr-ipt.cgi>)绘制序列二级结构图. 从 NCBI 分别下载编码南美对虾(*Penaeus vannamei*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)、端足虫(*Hyalella azteca*)和球鼠妇 *Armadillidium nasatum* 14-3-3 ζ 蛋白的 mRNA CDS 序列,经过上述相同的比对和构树方法分析后,利用 CodeML 中的分支模型(Branch model)检测中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 基因是否受到选择压力^[23].

2 结果与讨论

2.1 中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 基因 cDNA 全长序列的克隆与分析

在 RACE 反应中,进行 5'RACE 和 3'RACE PCR 反应,通过测序分别获得 583 bp 和 433 bp 的基因片段. 经 DNASTar Lasergene 7.1 软件^[24]对位拼接后获得 1 081 bp 的 cDNA 片段,经 BLAST 比对验证其为 14-3-3 ζ 基因的 cDNA 全长序列(图 1). 14-3-3 ζ 基因的全长 cDNA 序列具有一个 98 bp 的 5'-端非翻译区(terminal untranslated region, UTR)和一个 239 bp 的 3'-端非翻译区. 它具有一个 744 bp 的开放阅读框,编码一个具有 247 个氨基酸的多肽. 结构域分析结果显示该开放阅读框编码的氨基酸序列包含 14-3-3 保守结构域,这个保守区域是 14-3-3 蛋白的典型的功能域. 翻译的起始密码子为 ATG(位于 99-101),终止密码子为 TGA(位于 840~842 位),其后没有加尾信号 AATAAA. 序列中 A+T 和 C+G 的百分比分别为

47.92% 和 52.08%。测定的序列经比对、装配后获得全长 cDNA 序列并提交美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)保存(GenBank 登录号:MW473724)。将核苷酸序列推导的氨基酸序列在公共数据库(NCBI 的 NR 数据库)进行同源性搜索比对后分析发现,本实验克隆的 14-3-3 ζ 基因在氨基酸水平与拟穴青蟹(NCBI 编号:AFD28274.1)的 14-3-3 蛋白一致度为 97.58%,与南美白对虾(NCBI 编号:XP_027210306.1)的 14-3-3 蛋白一致度为 97.57%,与斑节对虾(*Penaeus monodon*, 登录号 XP_037791730.1)的 14-3-3 ζ 蛋白一致度为 95.14%;在核苷酸水平与拟穴青蟹(NCBI 编号:JQ218935.1)14-3-3 ζ 基因的一致度达 94.19%,与南美白对虾(NCBI 编号:XM_027354505.1)和斑节对虾(NCBI 编号:XM_037935801.1)14-3-3 ζ 基因的一致度分别为 87.64% 和 87.45%。上述序列之间较高的一致度进一步印证 14-3-3 蛋白在结构和进化上的保守性。进化树结果显示,中华绒螯蟹与拟穴青蟹亲缘关系最近,与甲壳动物的斑节对虾和墨吉对虾聚为一小支,与节肢动物的遗传距离较近,而与鱼类及鱼类以上的高等动物的遗传距离相对较远(图 1)。选择压力分析表明中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 基因没有受到正选择压力($P=0.69$),其非同义替换与同义替换比值为 0.016。因此,14-3-3 ζ 受到纯化选择,该蛋白的功能可能是保守的。

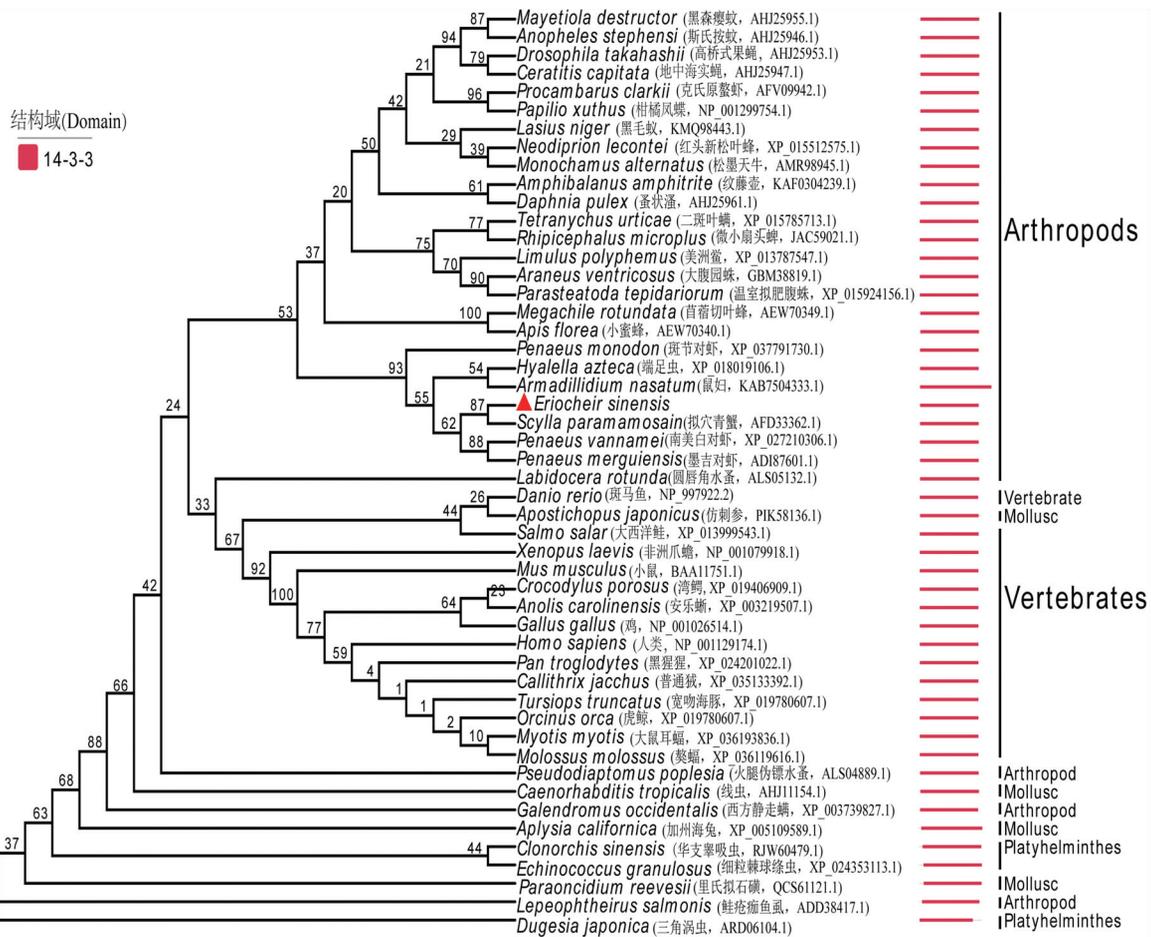


图 1 基于邻接法构建的中华绒螯蟹和其他物种 14-3-3 ζ 蛋白系统发生树
Fig. 1 Phylogenetic tree of the 14-3-3 ζ amino acid sequences between *E. sinensis* and other species using Neighbor-joining method

2.2 14-3-3 ζ 蛋白结构分析

采用 ProtParam 工具进行 14-3-3 ζ 蛋白理化性质分析,结果表明 14-3-3 ζ 蛋白的分子量约为 28.0 kDa,理论等电点 pI 为 4.70,原子总数 3 899 个,分子式为 $C_{1218}H_{1934}N_{336}O_{402}S_9$;在组成 14-3-3 ζ 蛋白的 20 种氨基酸中,谷氨酸(Glu)所占的比例最高,达到 10.5%,其次是丙氨酸(Ala),占比达到 9.30%,组氨酸(His)所占的比例最低,为 0.4%;脂肪指数为 77.45;14-3-3 ζ 蛋白质的不稳定指数为 52.08,根据 GRP(Guruprasad-Reedy-Pandit)法的分类,14-3-3 ζ 蛋白不稳定。亲水平均系数为 -0.66,表明该蛋白质可能为亲水蛋白。基

于 TMHMM 和 TMPRED 的分析结果 14-3-3ζ 蛋白不存在跨膜区。14-3-3ζ 蛋白的信号肽预测使用 SignalP 程序,通过 S-平均值(mean S value)来判断是否为分泌蛋白,若 S-平均值大于 0.5,则预测为分泌蛋白,存在信号肽;基于这种算法的结果表明,14-3-3ζ 蛋白不含有信号肽序列,它为非分泌型蛋白。PSORT II server 分析 14-3-3 ζ 蛋白的亚细胞定位结果表明 14-3-3 ζ 蛋白定位于细胞质中的可能性有 43.5%,定位于细胞核和线粒体中的可能性均为 17.4%。14-3-3 ζ 蛋白多肽链上含有 5 个蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 磷酸化位点,4 个酪蛋白激酶 II (casein kinase II, CK2) 磷酸化位点,3 个蛋白激酶 A (cyclic-AMP dependent protein kinase A, PKA) 磷酸化位点,2 个酪蛋白激酶 I (casein kinase I, CK1) 磷酸化位点,2 个重组链激酶 (recombinant streptokinase, RSK) 磷酸化位点,2 个细胞周期依赖激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, cdc2), 1 个蛋白激酶 G (protein kinase G), 1 个 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNAPK), 1 个丝氨酸蛋白激酶 (Serine-protein kinase, ATM) 磷酸化位点,促分裂素原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK), 原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase, SRC) 和 2 个 N 端糖基化 (Asn 糖基化) 位点 (图 2)。14-3-3 蛋白是一种重要的调控蛋白,该蛋白可以通过自身序列上的磷酸化位点调节许多蛋白质的活性^[25]。比如,胰腺导管腺癌在缺氧条件下胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 可以引起 14-3-3ζ 蛋白第 37 位丝氨酸发生磷酸化,促进 YAP (Yes-associated protein) 与 14-3-3ζ 蛋白复合体分离,并帮助 YAP 定位到细胞核从而增强低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 依赖的 PKM2 (糖酵解丙酮酸激酶) 转录和糖酵解^[26]。因此,上述磷酸化位点可能在 14-3-3ζ 蛋白发挥生物学功能中起到重要作用。

```

TT1 TTGCAGTCGCCAAGAGGGTGTGGTAGTGCGAGGGTCAGTGCCTCCGGGATATACTTTATATTTGTGTATATAGCACCTATTTTATAACA
C91 CAGACACAATGGGAGATAAGGAGGAACAAGTACAGCGGGCAAGCTTGCTGAGCGGGCAGAGAGATATGATGACATGGCCGCCGCTATG
      M G D K E E Q V Q R A K L A E R A E R Y D D M A A A M
180 AAGCAGGTCACAGAAACAGGAGTGGAGCTCTCCAACGAAGAGCGTAACTGTTGTCAGTAGCATAAAGAATGTGTGCGGGCCCGAAGA
      K Q V T E T G V E L § N E E R N L L S V A Y K N V V G A R R
270 AGTTCCTGGCGGTTATTTCTCCATAGAACAGAAGACAGAGGGCTCAGAACGAAAACAACAATGGCAAAGGAGTACAGAGAGAAGGTC
      § § W R V I § § I E Q K T E G § E R K Q Q M A K E Y R E K V
360 GAAACAGAGCTTAGGGAATTTGCCAGGATGTTTTGGTCTCCTCGACAAGTTCCTATCCCCAAGGCCTCAAACCCGGAGTCTAAGGTG
      E T E L R E I C Q D V L G L L D K F L I P K A S N P E S K V
450 TTCTACCTTAAGATGAAGGGCGACTACTATAGTACCTGGCTGAGGTGGCCACCGCGCAGCTTCGAGCGGGTGTGGTGGACGACTCCCAG
      F Y L K M K G D Y Y R Y L A E V A T G D V R A G V V D D S Q
540 AAGTCTTACCAGGAGGCTTTCGATATCGCCAAGGCAGAGATGCAGCCACCCACCCATCAGGCTGGGGTGGCACTCAACTTCTCTGTT
      K § Y Q E A F D I A K A E M Q P T H P I R L G L A L § F § V
630 TTCTTCTACGAGATCCTCAACTCGCCTGATAAGGCATGCCAGTAGCTAAACAGGCATTCGACGATGCAATCGCGGAGCTGGATACGCTG
      F F Y E I L N § P D K A C Q L A K Q A F D D A I A E L D T L
720 AATGAAGACTCGTACAAAGACTCCACACTCATAATGCAGCTGTACGAGACAACCTGACGCTTTGGACGAGTGACACGCAGGGCGAAGGG
      N E D S Y K D § T L I M Q L L R D § L T L W T S D T Q G E G
810 GAAGATGCTAATGAAGCGGGGACCAAACTGATGAACGCAACCCATTTAGCACGCGCCACTCGACCTTCTACTCTTAATCTACTGTC
      E D A N E G G D Q N *
900 ATGATGCCTAAGGGTGCACCAATCCTCAAGTCACTCATCACACCGCCAGCGTGGCTAACTAGTAGTCGAGGCTGCGGCTGGGAGCTCC
990 TCAGTGACACTACTACTCCAGGCCGCTCACCACCAGCAGCGTGCCTCGGCTCTCTGCTGCTCTTTATATAAAAAAAAAAAAA
1 080 AA
    
```

灰色标记为预测磷酸化位点,波浪线标记为预测糖基化位点,黑体为起始/终止密码子,下划线标记 ORF 验证引物

图 2 中华绒螯蟹 14-3-3ζ 基因的全长 cDNA 序列和推导的氨基酸序列结构

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of 14-3-3ζ gene from *E. sinensis*

使用 Phyre2 (protein homology/analog Y recognition engine) 服务器对中华绒螯蟹 14-3-3ζ 蛋白的三级结构建模,结果表明单项最高分模板 (single highest scoring template) 为隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 14-3-3 蛋白的晶体结构,230 (93%) 个中华绒螯蟹 14-3-3ζ 蛋白的氨基酸可以与该模板匹配,置信度为 100%。14-3-3ζ 蛋白的二级结构组分中存在 9 个 α 螺旋结构,不存在 β 折叠等结构,这一结果与拟穴青蟹 14-3-3ζ 蛋白结构类似^[20]。多重序列比对结果显示,不同物种的 14-3-3ζ 蛋白的 9 个 α 螺旋区域高度保守,表明 14-3-3ζ 蛋白在进化上高度保守。14-3-3 蛋白以同源或异源二聚体形式存在,由同源二聚体和异源二聚体形成的 U 型槽可以与单个或不同蛋白上的两个模体 (motifs) 相互作用,从而调节不同 14-3-3 目标

蛋白互作,或改变单个目标蛋白的构象和活性^[27]. 14-3-3 ζ 蛋白 N 末端的 4 个 α 螺旋参与二聚体的形成, 14-3-3 二聚体的形成是通过一个 14-3-3 单体的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 对应的另一个 14-3-3 蛋白单体的 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 相互作用形成^[28]. 14-3-3 ζ 在 C-末端序列一致度较低较差(图 3)可能是由于 14-3-3 ζ 在与配体结合时, C 端被抛出,暴露高度保守内部凹槽,从而使 14-3-3 ζ 与目标蛋白结合^[29].

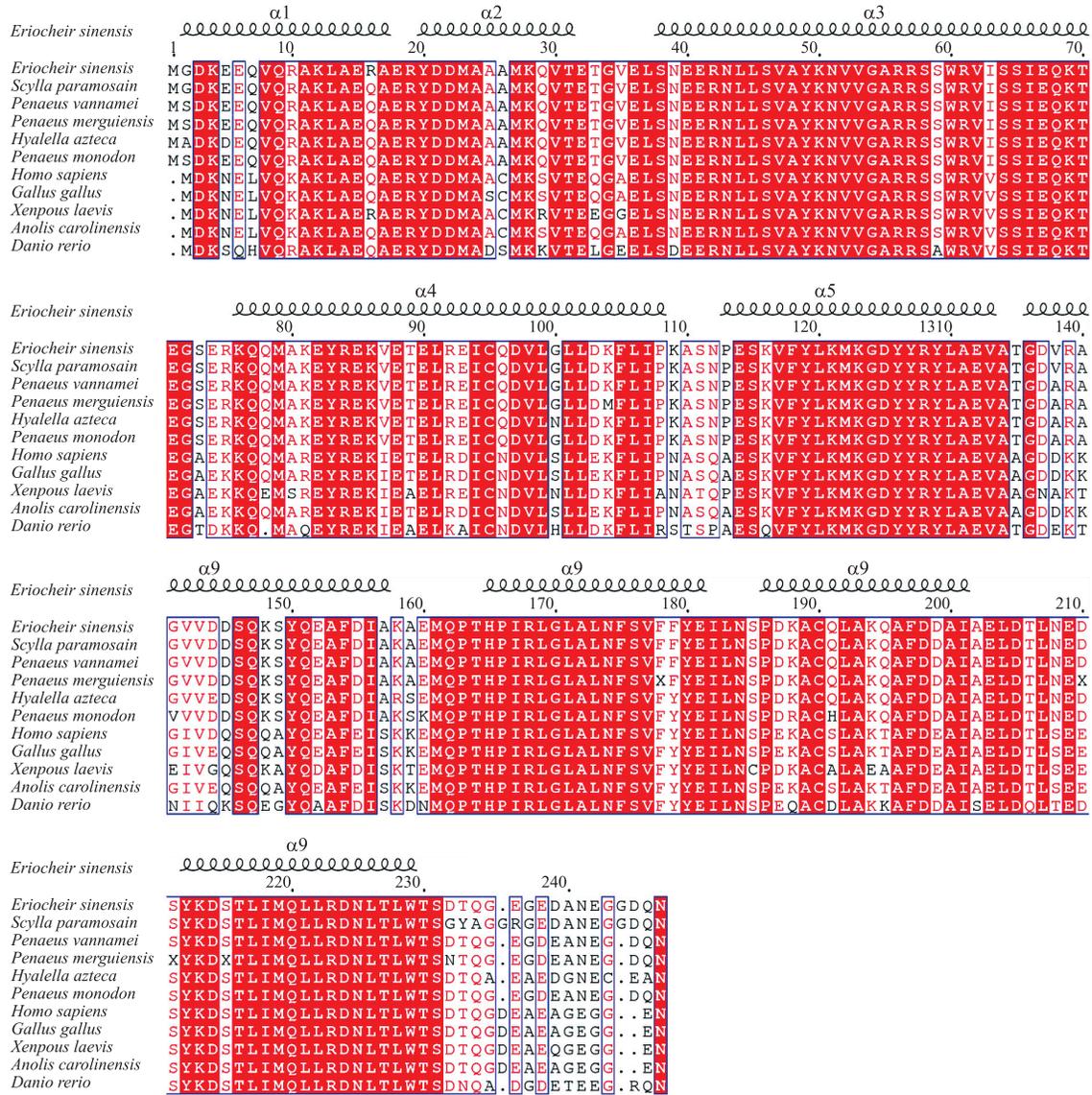


图 3 代表性物种 14-3-3 ζ 蛋白的氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of among different 14-3-3 ζ proteins

3 结论

本文克隆获得了中华绒螯蟹 14-3-3 基因的全长 cDNA 序列,并对其蛋白结构与理化性质等进行了深入的生物信息学分析,通过序列同源性比对、序列结构比较和一些生物信息学预测分析,结果表明 14-3-3 蛋白是 14-3-3 ζ 家族成员,且在进化上较为保守,该蛋白为非分泌型蛋白,不具有跨膜区域,定位于细胞质中,其分子量与已报道的 14-3-3 ζ 蛋白分子量相近;14-3-3 ζ 蛋白具有家族保守的 14-3-3 结构域,该蛋白结构域上包含多个磷酸化位点可能在 14-3-3 ζ 发挥生物学功能中起到重要作用. 选择压力分析表明中华绒螯蟹 14-3-3 ζ 受到纯化选择,其功能可能高度保守.

[参考文献]

[1] MOORE B W, PEREZ V J, GEHRING M. Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous

- system[J]. *Journal of neurochemistry*, 1968, 15(4):265-272.
- [2] 周颖,李冰樱,李学宝. 14-3-3 蛋白对植物发育的调控作用[J]. *植物学报*, 2012, 47(1):55-64.
- [3] 刘漫,王月华,杜冠华. 14-3-3 蛋白生物学特征及相关药物发现[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(14):1591-1595.
- [4] YAFFE M B. How do 14-3-3 proteins work? — Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis[J]. *FEBS letters*, 2002, 513(1):53-57.
- [5] MUSLIN A J. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine[J]. *Cell*, 1996, 84(6):889-897.
- [6] ICHIMURA T, ISOBE T, OKUYAMA T, et al. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monoxygenase and tyrosine 3-monoxygenase in the presence of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II[J]. *FEBS letters*, 1987, 219(1):79-82.
- [7] HEUSDEN G P H V. 14-3-3 proteins: Insights from genome-wide studies in yeast[J]. *Genomics*, 2009, 94(5):287-293.
- [8] AITKEN A. 14-3-3 proteins: a historic overview[J]. *Seminars in cancer biology*, 2006, 16(3):162-172.
- [9] DARLING D L, YINGLING J, WYNshaw B A. Role of 14-3-3 proteins in Eukaryotic signaling and development[J]. *Current topics in developmental biology*, 2005, 68(4):281-315.
- [10] DALAL S N, YAFFE M B, DECAPRIO J A. 14-3-3 Family members act coordinately to regulate mitotic progression[J]. *Cell cycle*, 2004, 3(5):670-675.
- [11] LEE I N, CHEN C H, SHEU J C, et al. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Journal of proteome research*, 2005, 4(6):2062-2069.
- [12] TELLES E, HOSING A S, KUNDU S T, et al. A novel pocket in 14-3-3ε is required to mediate specific complex formation with cdc25C and to inhibit cell cycle progression upon activation of checkpoint pathways[J]. *Experimental cell research*, 2009, 315(8):1448-1457.
- [13] LI M, REN L, XU B, et al. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analyses of the 14-3-3 family reveal their involvement in the development, ripening, and abiotic stress response in banana[J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7:1442.
- [14] KILANI R T, MEDINA A, AITKEN A, et al. Identification of different isoforms of 14-3-3 protein family in human dermal and epidermal layers[J]. *Molecular & cellular biochemistry*, 2008, 314(1-2):161-169.
- [15] LI J, XU H, WANG Q, et al. 14-3-3ζ promotes gliomas cells invasion by regulating Snail through the PI3K/AKT signaling[J]. *Cancer medicine*, 2019, 8(2):783-794.
- [16] 唐裕福,张怡冰,冯晓东,等. 14-3-3 蛋白在人类疾病中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(6):509-520.
- [17] 褚明辉,汪发九,赵国芳. 14-3-3zeta 在人类常见恶性肿瘤中的研究进展[J]. *现代实用医学*, 2020, 32(11):1433-1436.
- [18] LU Q, WU S, ZHEN H, et al. 14-3-3 α and 14-3-3 ζ contribute to immune responses in planarian *Dugesia japonica*[J]. *Gene*, 2017, 615:25-34.
- [19] TRUJILLO O A, CÁZARES R F E, DEL ANGEL R M, et al. Participation of 14-3-3ε and 14-3-3ζ proteins in the phagocytosis, component of cellular immune response, in *Aedes mosquito* cell lines[J]. *Parasites & vectors*, 2017, 10(1):362.
- [20] 王晓伟,高洁,张子平,等. 拟穴青蟹 14-3-3ζ 基因 cDNA 的克隆和表达分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(4):496-501.
- [21] KATO H, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7; improvements in performance and usability[J]. *Molecular biology & evolution*, 2013, 30(4):772-780.
- [22] SUDHIR K, GLEN S, KOICHIRO T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for gigger datasets[J]. *Molecular biology & evolution*, 2016, 33(7):1870-1874.
- [23] YANG Z. PAML4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Molecular biology & evolution*, 2007, 24(8):1586-1591.
- [24] BURLAND T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software[J]. *Methods of molecular biology*, 2000, 132:71-91.
- [25] FUKAI M, KOBAYASHI N, ISHIKAWA T, et al. 14-3-3ζ-mediated stimulation of oxidative phosphorylation exacerbates oxidative damage under hypothermic oxygenated conditions in human renal tubular cells(HK-2)[J]. *Transplantation proceedings*, 2016, 48(4):1288-1291.
- [26] JIA Y, LI H Y, WANG J, et al. Phosphorylation of 14-3-3ζ links YAP transcriptional activation to hypoxic glycolysis for tumorigenesis[J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(5):31.
- [27] MESSARITOU G, GRAMMENOUDI S, SKOULAKIS E M. Dimerization is essential for 14-3-3zeta stability and function in vivo[J]. *Journal of biological chemistry*, 2010, 285(3):1692-700.
- [28] 潘伟男,陈锋,封芬,等. 14-3-3 蛋白的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27(3):262-265.
- [29] LIU D, BIENKOWSKA J, PETOSA C, et al. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein[J]. *Nature*, 1995, 376(6536):191-194.

[责任编辑:黄 敏]