

## 拟穴青蟹丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK) 基因的克隆与表达分析

郑碧琪, 刘学良, 黄辉洋, 巩 杰, 叶海辉\*

(厦门大学海洋与地球学院 福建 厦门 361100)

**摘要:** 采用 qRT-PCR、RACE 等方法, 获得了拟穴青蟹丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK) 基因 cDNA 全长序列。该基因全长 1 558 bp, 开放阅读框长度为 1 224 bp, 编码 407 个氨基酸残基。同源分析显示, 该基因编码的蛋白与昆虫的相似性高达 70%, 推测 MAPKK 基因在节肢动物具有较高的保守性。经荧光定量 PCR 检测, MAPKK 基因在拟穴青蟹多个组织中有表达, 且在脑神经节和卵巢中表达量较高。在拟穴青蟹卵巢发育过程中, MAPKK 基因在卵巢发育期(Ⅲ期)表达量最高, 发育期为卵母细胞快速生长期, 推测 MAPKK 具有促进卵母细胞快速生长的作用。

**关键词:** 拟穴青蟹; 丝裂原活化蛋白激酶激酶; 基因克隆; 组织表达分析

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

细胞信号转导指靶细胞依靠受体识别专一的细胞外信号分子, 并把细胞外细胞信号转变为细胞内信号的过程<sup>[1]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应途径是细胞内的主要信息传递系统, 可将细胞外信息传递至细胞核中, 从而介导细胞产生各种反应, 在细胞的增殖、分化和凋亡过程中发挥重要作用, 并在所有真核生物细胞中表达, 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[2]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK) 又称为丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶激酶(MAPK/ERK Kinase, MEK), 为 MAPK 信号通路中重要的一员, 其作用是磷酸化并激活 MAPK。活化的 MAPK 可磷酸化多种底物, 包括转录因子、蛋白激酶和细胞骨架蛋白等<sup>[3]</sup>。

有关 MAPKK 的研究, 目前在哺乳类、鱼类、昆虫等已有报道, 但在甲壳动物迄今未见 MAPKK 基因序列与功能研究的报道。拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) 是中国东南沿海 4 种青蟹中最主

要的类群, 是一种重要的海水养殖蟹类<sup>[4]</sup>。目前拟穴青蟹分子生物学的研究集中在种质鉴定和分子生态学, 有关功能基因的研究尚少<sup>[5]</sup>。本研究报告了拟穴青蟹 MAPKK 的基因序列, 并检测其在各个组织中和卵巢发育过程中的表达情况, 可为拟穴青蟹的生长、发育、生殖等分子机制研究奠定理论基础。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料

**实验动物** 拟穴青蟹来源于漳州市同一个养殖场同一批次的人工养殖青蟹。挑选活性好、附肢健全的雌性个体, 个体质量为 100~400 g, 实验室暂养 1 d。

拟穴青蟹卵巢发育分期参照上官步敏等<sup>[6]</sup>, 分为未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和成熟期 5 期。

**主要试剂** TRIzol<sup>®</sup> Reagent Total RNA Isolation Reagent (Invitrogen 公司); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo 公司);

收稿日期: 2013-08-28 修回日期: 2013-12-30

资助项目: 国家自然科学基金项目(41076081, 31272632)

通信作者: 叶海辉, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

3'-Full RACE Kit、5'-Full RACE Kit ( TaKaRa 公司) ; DNase I、RNase、LA *Taq*<sup>®</sup>、dNTPs、pMD19-T 载体、DNA Marker ( TaKaRa 公司) ; E. Z. N. A 胶回收试剂盒 ( Omega 公司) 。

## 1.2 实验方法

**引物设计** 根据 GenBank 中已知昆虫的 *MAPKK* 基因序列和对应的蛋白质序列,通过 ClustalX 比对,在 *MAPKK* 的保守区域设计了简

并引物 MF1 和 MR1 ( 表 1) ,用于扩增拟穴青蟹 *MAPKK* 基因片段。根据已知 *MAPKK* 基因片段,设计 RACE 特异性引物 ( 表 1) ,其中 3' RACE 采取半巢式 PCR,得到该基因的全长 cDNA 序列。然后根据得到的全长序列,设计全长验证引物 MF2、MR2 和荧光定量引物 MQF、MQR。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物类别 primer type	引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequence
简并引物	MF1	GADGBBGARGAVGTGGAYTTB
degenerate primer	MR1	YTCCACCAGDGASAGVCCMA
5'RACE 特异性引物	M5R	ACAGAATAGTGATCGCCGTTGAG
5'RACE specific primer	M3F1	AGGTCAAGCCAGCGATCAGA
3'RACE 特异性引物	M3F2	CTGGACTACATAGTGAATGAGCCTC
3'RACE specific primer	5'RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
RACE 外引物	3'RACE outer primer	AAGCACTGGTATCAACGCAGAGT
RACE outer primer	MF2	TGCGGGAACCTCGTAATCAA
全长验证引物	MR2	CTATCCACAACCTAAGGGGGG
validation primer of full length cDNA	MQF	CTCTGCGGGAACCTCGTAATC
荧光定量引物	MQR	GTGGTTCTCATGGTCGTTGGTC
real-time quantitative primer	<i>β-actin</i> F	GAGCGAGAAATCGTTCGTGAC
<i>β-actin</i> 定量引物	<i>β-actin</i> R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG
<i>β-actin</i> quantitative primer		

总 RNA 的抽提和 cDNA 第一链的合成 取拟穴青蟹卵巢组织,参照 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂使用说明提取总 RNA。以 Thermo 公司的 NanoDrop2000 超微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及纯度。取 1 μg 总 RNA,参照 Thermo 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明,反转录成 cDNA 模板,-20 °C 保存备用。

**MAPKK 基因 cDNA 的克隆** 使用简并引物 MF1 和 MR1,以上述 cDNA 为模板,扩增 *MAPKK* 基因片段。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T 载体连接,转化到 DH5α 感受态细胞,于含 Amp 抗性的 LB 平板上培养 14 h,挑取单克隆菌落,接种于含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 过夜培养,菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测

序。该序列经 Blast 比对后,确定是拟穴青蟹 *MAPKK* 基因。根据设计的 RACE 引物 ( 表 1) ,用 TaKaRa 公司的 3'-Full RACE Kit 及 5'-Full RACE Kit,以拟穴青蟹卵巢总 RNA 为模板扩增该基因 cDNA 的 3'端和 5'端,扩增产物经克隆、测序后,获得拟穴青蟹 *MAPKK* 基因的 cDNA 3'端与 5'端序列,具体步骤参照试剂盒的说明书。拼接获得全长序列后,通过全长验证引物克隆测序对全长序列进行验证。

**MAPKK 基因 cDNA 序列分析** 应用 ORF Finder 程序 ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 确定正确的编码区并推导其编码的氨基酸序列; Protparam 程序 ( <http://web.expasy.org/protparam/>) 预测氨基酸序列的物理参数; SignalP 4.1 程序 ( <http://www.cbs>

<http://www.scxuebao.cn>

dtu.dk/services/SignalP/) 预测信号肽; InterProScan 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 预测蛋白结构域; 采用 ClustalX 与 Mega 软件对序列进行同源性的分析, 并采用邻位相接法(Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树。

**MAPKK 基因的表达量分析** 参照 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂使用说明书, 分别提取拟穴青蟹各组织(脑神经节、胸神经团、卵巢、表皮、心脏、肝胰腺、鳃、胃)总 RNA, 及各卵巢发育期(未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和成熟期)的卵巢总 RNA, 以上实验样本均为 3 个。所获得的 RNA 用 Thermo 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成第一链 cDNA, 用于荧光定量表达分析。qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: 2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 10  $\mu$ L cDNA 模板 2  $\mu$ L 荧光定量引物各 0.8  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L) 6.4  $\mu$ L 双蒸水。每个样品设置 3 个重复, 用  $\beta$ -actin 基因作内参, 均一化各样品 cDNA 用量的差异, 引物为  $\beta$ -actin F 和  $\beta$ -actin R (表 1)。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 热变性 10 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s 42 个循环。之后进行熔解曲线(melting curve)分析, 以判定 PCR 扩增反应的特异性。

**数据处理与分析** 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[7]</sup> 对目的基因的相对表达量进行分析, 以内参基因  $\beta$ -actin 均一化样品。采用  $t$ -检验法分析各组数据的差异显著。显著性检验水平  $P < 0.05$  为显著,  $P < 0.01$  为极显著。

## 2 结果

### 2.1 MAPKK 基因 cDNA 的克隆和序列分析

通过设计的简并引物 MF1 和 MR1, 以拟穴青蟹卵巢 cDNA 为模板扩增得到一个 cDNA 片段, 测序后在 GenBank 数据库中进行比对, 发现该序列与其他物种的 MAPKK 序列显示了较高的相似性, 基本确认为拟穴青蟹 MAPKK 基因序列。基于该片段设计 RACE 引物进行 5' 与 3' 末端扩增, 得到其完整的 cDNA 序列。Blast 比对发现该序列与其他物种的 MAPKK 序列同样显示了较高的同源性, 从而确定为拟穴青蟹

MAPKK cDNA 序列。其全长为 1 558 bp, 开放阅读框长度为 1 224 bp, 编码 407 个氨基酸。5' UTR 长度为 105 bp, 3' UTR 长度为 229 bp。无加尾信号 AATAAA 或 ATTAA, 但具有典型的 poly A 尾(图 1)。

ProtParam 计算拟穴青蟹 MAPKK 蛋白的理论分子量为 44 850.45 u,  $pI$  为 6.19, 其中带负电荷氨基酸残基(Asp + Glu) 52 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg + Lys) 48 个, 预测其在体外的不稳定指数(instability index) 为 48.67, 大于 40, 为不稳定蛋白质。SignalP 4.1 分析拟穴青蟹 MAPKK, 没有发现信号肽。

InterProScan 预测拟穴青蟹 MAPKK 的结构域, 结果显示第 85 ~ 373 位置的氨基酸为蛋白激酶结构域(protein kinase domain) (图 2), 与其他物种的 MAPKK 结构域分析相一致。

### 2.2 MAPKK 基因序列同源性分析

拟穴青蟹 MAPKK cDNA 序列推导的氨基酸序列与其他物种的同源蛋白在 ClustalX 中进行多序列比对分析, 结果显示: 拟穴青蟹 MAPKK 氨基酸序列与家蚕(*Bombyx mori*)、大红斑蝶(*Danaus plexippus*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) 的相似率分别为 72%、70% 和 67%。用 ClustalX 将推导的拟穴青蟹 MAPKK 氨基酸序列与其他一些物种进行比对后, 以 Mega 软件的邻位相接法绘制系统进化树, 结果显示拟穴青蟹与昆虫类聚为一支(图 3)。

### 2.3 MAPKK 基因的表达分析

**MAPKK 基因在各组织中的表达** 依据实验所得拟穴青蟹 MAPKK cDNA 序列设计特异引物 MQF 和 MQR, 利用 qRT-PCR 技术检测 MAPKK 基因在拟穴青蟹不同组织中的表达情况。研究发现, MAPKK 主要在脑神经节和卵巢中表达, 而在其他组织表达量很低(图 4)。

**MAPKK 基因在卵巢发育过程中的表达** 为了检测不同卵巢发育时期 MAPKK 基因的表达量, 分别提取了拟穴青蟹未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和成熟期的卵巢总 RNA。qRT-PCR 结果显示, MAPKK 基因在发育期(III期)卵巢表达量最高, 且极显著高于其他各期( $P < 0.01$ ), 而其他 4 期无显著差异(图 5)。

	AGTGCTCTGAGGGCGGCCGGGGAGAGAGAGAGAGAGTTGCTCTGCG	45
	GGAACTCCTGTAATCAATACAGTATTTTGTGTGTGTGCTGCCTCGCTGGGCCTCCCTCGCC	105
	<span style="border: 1px solid black;">ATG</span> TCCAAGAATAAACTCAACCTCAAGCTGCCGCCGGGATCCATTGAGCAGACCAACGAC	165
1	M S K N K L N L K L P P G S I E Q T N D	
	CATGAGAACCACAGCGGCAGCGACACGCCTCAGAGGAAGGCCAGCACAGGGGCCACTGGC	225
21	H E N H S G S D T P Q R K A S T G A T G	
	AGTTTGGGTCCGTGTCCCTGGAGTCACTGTCAAGTGCATCCAGGAGTTGGACATGGAT	285
41	S F G S V S L E S L L K C I Q E L D M D	
	GACTCAGCGACGCCGCATGGAGATATTCCTCAACCAGAAGCAGAAAAGTTGGTGAAGT	345
61	D T Q R R R M E I F L N Q K Q K V G E L	
	AATGCAGATGACTTTGAGAAGCTGGGTGAGCTAGGTGCTGGCAATGGTGGTGTGGTGAAC	405
81	N A D D <span style="background-color: #cccccc;">F E K L G E L G A G N G G V V N</span>	
	AAGGAACGGCACAAAACCTCAGGACTCATCATGGCACGCAAGCTTATCCATCTGGAGGTC	465
101	<span style="background-color: #cccccc;">K E R H K P S G L I M A R K L I H L E V</span>	
	AAGCCAGCGATCAGAAAACAGATTATCCGAGAGTTGAAGGTCTACACGAGTGCAATTCA	525
121	<span style="background-color: #cccccc;">K P A I R N Q I I R E L K V L H E C N S</span>	
	CCCTTCATTGTGGGCCTCTACGGCGCCTTCTACAGTGAGGGTGAGATCTCTATTTGTATG	585
141	<span style="background-color: #cccccc;">P F I V G L Y G A F Y S E G E I S I C M</span>	
	GAGTACATGGATGGAGGATCATTGGATCTGTGCCTCAAGAAAGCCATTGCATCCCAGAA	645
161	<span style="background-color: #cccccc;">E Y M D G G S L D L C L K K A I R I P E</span>	
	CCAATACTTGCCAAAATATGCTCTACAGTCTTGAAGGGGCTGGCCTACCTGCGTGAGAAAG	705
181	<span style="background-color: #cccccc;">P I L A K I C S T V L K G L A Y L R E K</span>	
	CACCAGATCATCCACCGTGATGCCAAGCCATCCAACATCCTTGTCAACTCTCGAGGTGAA	765
201	<span style="background-color: #cccccc;">H Q I I H R D A K P S N I L V N S R G E</span>	
	ATCAAGATATGTGACTTTGGCGTCTCTGGTCAGCTGATTGACAGCATGGCCAACACCTTT	825
221	<span style="background-color: #cccccc;">I K I C D F G V S G Q L I D S M A N T F</span>	
	GTGGGTACCCGACGTATATGTCACCTGAGCGACTCAACGGCGATCACTATTCTGTGGCC	885
241	<span style="background-color: #cccccc;">V G T R S Y M S P E R L N G D H Y S V A</span>	
	AGTGACATCTGGAGTCTTGGCCTGTCCTGGTGGAGATGGCCATTGGCATGTACCCTATT	945
261	<span style="background-color: #cccccc;">S D I W S L G L S L V E M A I G M Y P I</span>	
	CCACCTCCAGACCCAAGCACCCCTAAGAAGATATTTGGGTCCAAAGTGAGAGTGTCCAGC	1005
281	<span style="background-color: #cccccc;">P P P D P S T L K K I F G S K V E S V S</span>	
	CCCTCTCCACCTCACGCTCCCCAAGATCAGCTGGCCTGCCTGGGGAGCCAAGACCCATG	1065
301	<span style="background-color: #cccccc;">P S P T S R S P R S A G L P G E P R P M</span>	
	GCCATCTTTGAGCTGCTGGACTACATAGTGAATGAGCCCTCCACCTCGGCTGCCTCTGGG	1125
321	<span style="background-color: #cccccc;">A I F E L L D Y I V N E P P P R L P P G</span>	
	GTGTTCTCACCAGATTTCATTGACTTGGTGGACCGGTGCCTAAGAAGAGTCCCAGTGAA	1185
341	<span style="background-color: #cccccc;">V F S P E F I D L V D R C L K K S P S E</span>	
	CGGGCAGATCTCACCACACTGCAGAACCATGAATGGATAAAGAATGCTGAGCAGGAGGAC	1245
361	<span style="background-color: #cccccc;">R A D L T T L Q N H E W I K N A E Q E D</span>	
	GTGGACATAGCTGGCTGGGTTTGAAGACCATGGACATCACTCCATCCACTCCCCTAAA	1305
381	V D I A G W V C K T M D I T P S T P T K	
	CCATCAGCGAGGAAAAGTGTGATCATCCAATCTTCGCCCTGAGCAGTGGTGGAGCTCCT	1365
401	P S A E G N C *	
	GTTGCTGTACACACCTTTCTCCCCCTTAGGTTGTGGATAGAACAACATGACCTTCTTGA	1425
	TGGCATAATGAAGTAAAGCTTTAGTTAGGTACCCACAGGGAGACTATTGTTACTAGTAGA	1485
	ACATGATCTTTTTTTTTGAGGGAATAATGAAGTAAAGATTTAGTTTCAGTACACAAAAAAA	1545
	AAAAAAAAAAAAA	1558

图1 拟穴青蟹 *MAPKK* cDNA 及其推导的氨基酸序列

方框代表起始密码子; \* 代表终止密码子; 灰色阴影所示为蛋白激酶结构域

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *MAPKK* from *S. paramamosain*

The initiation codon is enclosed by a black rectangle; the stop codon is marked by an asterisk; the shadow indicates the protein kinase domain

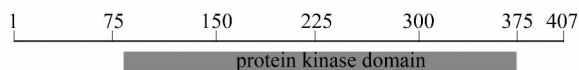


图2 蛋白序列结构功能域预测

Fig.2 Prediction of the protein structure and function domain

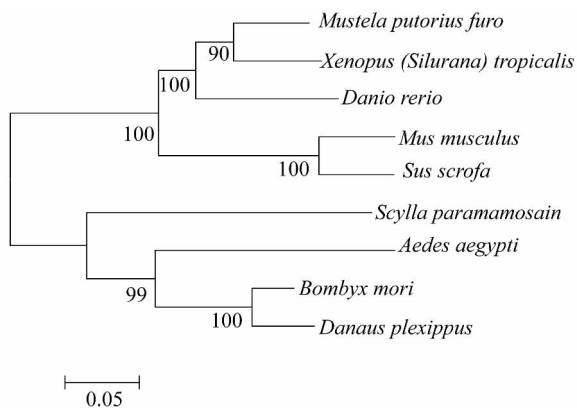


图3 基于 NJ 法构建的系统发育树

Fig.3 Phylogram based on Neighbor-Joining method

*Mustela putorius furo*: 蒙眼貂 (AES01532); *Xenopus (Silurana) tropicalis*: 非洲蟾蜍 (NP\_001008058); *Danio rerio*: 斑马鱼 (ADI48167); *Mus musculus*: 小鼠 (AAH14830); *Sus scrofa*: 野猪 (NP\_001231479); *Scylla paramamosain*: 拟穴青蟹 (KF569901); *Aedes aegypti*: 埃及伊蚊 (XP\_001662837); *Bombyx mori*: 家蚕 (NP\_001036922); *Danaus plexippus*: 大白斑蝶 (EHJ76872)

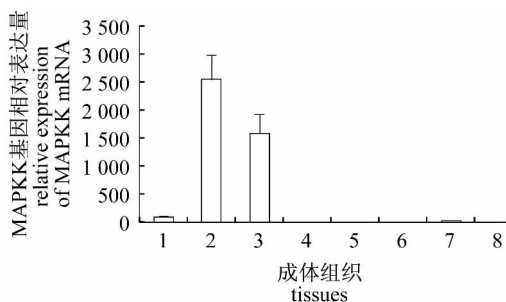


图4 拟穴青蟹 MAPKK 基因在成体组织中的表达

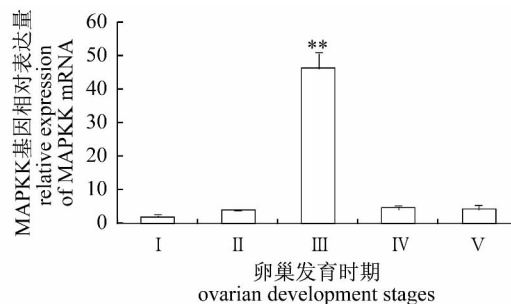
1. 表皮; 2. 脑神经节; 3. 卵巢; 4. 胸神经团; 5. 心脏; 6. 肝胰腺; 7. 胃; 8. 鳃

Fig.4 Expression of MAPKK mRNA in adult tissues of *S. paramamosain*

1. epidermis; 2. brain ganglion; 3. ovary; 4. thoracic ganglion mass; 5. heart; 6. hepatopancreas; 7. stomach; 8. gill

### 3 讨论

本研究首次在甲壳动物中获得 MAPKK 基因的全长 cDNA 序列。拟穴青蟹 MAPKK 基因的

图5 拟穴青蟹 MAPKK 基因在各卵巢发育期的表达  
I. 未发育期; II. 发育早期; III. 发育期; IV. 将成熟期; V. 成熟期Fig.5 Expression of MAPKK mRNA at different ovarian development stages of *S. paramamosain*

I. undeveloped stage; II. early-developing stage; III. developing stage; IV. nearly-ripe stage; V. ripe stage

cDNA 序列, 全长为 1 558 bp, 开放阅读框长度为 1 224 bp, 编码 407 个氨基酸。序列分析发现, MAPKK 基因的氨基酸序列在不同物种间具有较高的同源性, 提示该基因在进化上和功能上的保守性。InterProScan 预测拟穴青蟹 MAPKK 的结构域, 发现它含有蛋白激酶结构域。蛋白激酶是细胞信号通道中起化学修饰作用的成员, 催化 ATP 或 GTP 的  $\gamma$ -磷酸基团转移至受体丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的羟基上, 参与多种细胞功能诸如细胞生长、分裂、分化、细胞间相互作用以及细胞与细胞外基质相互作用等调控<sup>[8]</sup>。

迄今为止, MAPKK 基因已经在猪、鸡、小鼠等物种中得到克隆和分析。在猪中, MAPKK 对于卵母细胞恢复减数分裂是必需的<sup>[9]</sup>; 在鸡中 MAPKK 被证实与视网膜神经细胞的生长相关<sup>[10]</sup>; MAPKK 还可以调控哺乳动物的细胞增殖<sup>[11]</sup>。本研究利用 qRT-PCR 技术对拟穴青蟹不同组织中的 MAPKK 进行了定量分析, 发现 MAPKK 基因主要在脑神经节和卵巢中表达, 而在其他组织表达量很低。脑神经节是甲壳动物重要的神经器官, 富含神经细胞和神经胶质细胞。拟穴青蟹 MAPKK 基因在脑神经节中的高表达, 可能与 MAPKK 在突触传递、神经元重塑等方面的重要作用有关<sup>[12]</sup>。MAPKK 基因在拟穴青蟹卵巢中的表达量也很高, 提示其可能在生殖细胞的发育和成熟中具有非常重要的作用<sup>[13]</sup>。

开展拟穴青蟹卵巢发育机制和调控技术的研究, 对于青蟹养殖产业健康发展具有重要意义。最近, 已经从拟穴青蟹克隆获得一些卵巢发育相

<http://www.scxuebao.cn>

关的基因,例如 *cyclin*、*Erk2*、*SUMO-1*、*vasa* 等<sup>[14-18]</sup>。有关 MAPKK 在甲壳动物卵巢发育过程中的作用尚未见报道。为了探究 MAPKK 在拟穴青蟹卵巢发育过程中的调节作用,我们对 MAPKK 表达量进行了分析。结果显示,MAPKK 在拟穴青蟹发育期卵巢的含量显著高于其他各期。发育期卵巢为卵母细胞迅速生长和卵黄发生旺盛期,MAPKK 在该期高表达推测其与卵巢发育有关。

MAPKK 是 MAPK 信号通路的主要成员之一,在该信号通路中的作用是磷酸化其唯一的底物 MAPK 的苏氨酸和酪氨酸残基使之激活,活化的 MAPK 进入细胞核,磷酸化激活其底物蛋白,包括调节细胞周期和细胞分化的特异性蛋白表达的转录因子<sup>[3]</sup>。据报道,斑节对虾 (*Penaeus monodon*) MAPK 基因在将成熟期卵巢表达量为最高,之后水平逐渐降低<sup>[19]</sup>,此表达模式正好稍滞后于拟穴青蟹 MAPKK 基因。由此,我们推测 MAPKK 在卵巢中的作用主要是通过激活下游底物 MAPK,而 MAPK 又再活化与细胞周期相关的转录因子等物质,从而促进卵母细胞的生长,协助卵巢从发育期进入将成熟期。当拟穴青蟹卵巢发育进入将成熟期后,MAPKK 表达量迅速下降,该变化影响 MAPK 的激活,从而对卵母细胞生长的促进作用有所减弱。但拟穴青蟹卵巢发育接受多个基因共同调控,例如 *cyclinA*<sup>[20]</sup>、*cyclinB*<sup>[14]</sup> 基因在卵巢将成熟期和成熟期高表达,因此可能在若干基因的共同调控下,卵巢发育最终进入成熟期。

国内外大量研究表明,MAPKK 具有多重调控功能,迄今其分子作用机制远未阐明。为了更加清楚地认识 MAPKK 基因在拟穴青蟹不同组织和卵巢发育中的作用,今后可通过 RNA 干扰等手段,进一步验证 MAPKK 基因的功能。

#### 参考文献:

- [1] 韩贻仁. 分子细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 378.
- [2] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade [J]. The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology, 1995, 9(9): 726-735.
- [3] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 248.
- [4] 林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 211-219.
- [5] 解银洁, 黄辉洋, 叶海辉, 等. 拟穴青蟹卵母细胞抑制素相关蛋白基因的克隆和表达分析[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1201-1208.
- [6] 上官步敏, 刘正琮, 李少菁. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 96-103.
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] 杨新平, 夏家辉. 蛋白激酶研究进展 I. 结构和分类[J]. 生命科学研究, 1998, 2(4): 235-242.
- [9] Meinecke B, Krischek C. MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus-enclosed pig oocytes [J]. Zygote, 2003, 11(1): 7-16.
- [10] Dimitropoulou A, Bixby J L. Regulation of retinal neurite growth by alterations in MAPK/ERK kinase (MEK) activity [J]. Brain Research, 2000, 858(1): 205-214.
- [11] Zhang W, Liu H T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells [J]. Cell Research, 2002, 12(1): 9-18.
- [12] Thomas G M, Huganir R L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2004, 5(3): 173-183.
- [13] Liang C G, Su Y Q, Fan H Y, et al. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase [J]. Molecular Endocrinology, 2007, 21(9): 2037-2055.
- [14] Li W X, Huang H Y, Huang J R, et al. Molecular cloning, expression profiles and subcellular localization of cyclin B during the ovarian maturation of the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. Genes & Genomics, 2013, 35(2): 185-195.
- [15] Han K H, Dai Y B, Zou Z H, et al. Molecular characterization and expression profiles of cdc2 and cyclin B during oogenesis and spermatogenesis in green mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 163(3-4): 292-302.
- [16] Dai Y B, Han K H, Zou Z H, et al. SUMO-1 of mud crab (*Scylla paramamosain*) in gametogenesis [J]. Gene, 2012, 503(2): 260-268.
- [17] Ma A, Wang Y L, Zou Z H, et al. Erk2 in ovarian development of green mud crab *Scylla paramamosain* [J]. DNA and Cell Biology, 2012, 31(7):

<http://www.scxuebao.cn>

- 1233 – 1244.
- [18] Wang Y L ,Chen Y D ,Han K H , *et al.* A vasa gene from green mud crab *Scylla paramamosain* and its expression during gonadal development and gametogenesis [J]. *Molecular Biology Reports* , 2012 ,39( 4) : 4327 – 4335.
- [19] Ponza P , Yocawibun P , Sittikankaew K , *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the mitogen-activating protein kinase 1 ( MAPK1) gene and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Molecular Reproduction & Development* , 2011 , 78 ( 5 ) : 347 – 360.
- [20] Huang H Y , Li W X , Huang J R , *et al.* Two transcripts and the expression profiles of cyclin A in ovary of the mud crab ,*Scylla paramamosain* [J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* , 2013 ,46( 1) : 45 – 58.

## Cloning and expression analysis of the *MAPKK* gene in the mud crab( *Scylla paramamosain*)

ZHENG Biqi , LIU Xueliang , HUANG Huiyang , GONG Jie , YE Haihui\*

( College of Ocean and Earth Sciences , Xiamen University , Xiamen 361100 , China)

**Abstract:** In this paper ,the MAPKK( mitogen-activated protein kinase kinase) was isolated from the mud crab *Scylla paramamosain* using RT-PCR and RACE methods. The obtained full-length cDNA of MAPKK was 1 558 bp with an open reading frame of 1 224 bp encoding a putative peptide of 407 amino acids. By alignment ,the amino acid sequence of *S. paramamosain* MAPKK showed high homology with those of some other animals. It suggested MAPKK was highly conservative. Real-time PCR showed that the *MAPKK* gene was expressed in various tissues ,and highly expressed in brain ganglion and ovary. The *MAPKK* mRNA profiles during ovarian development indicated that the expression of *MAPKK* was significantly high at developing stage. We inferred that MAPKK might play a stimulative role in the ovarian development of the mud crab.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; *MAPKK*; gene cloning; tissue expression analysis

**Corresponding author:** YE Haihui. E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn