

文蛤生长因子受体结合蛋白 2(*GRB2*) 基因克隆、 时空表达及 SNP 位点筛查

高晓艳¹, 董迎辉^{1*}, 施沈佳¹, 姚韩韩¹, 阮文斌², 赵家熙¹, 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, 浙江 宁波 315100;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为探索贝类 *GRB2* 基因的结构、功能特征, 以及在贝类生长发育过程中的作用, 实验通过已构建的文蛤转录组文库, 利用 SMART RACE 技术扩增得到了文蛤 *GRB2* 基因的 cDNA 全长序列, 对其生物信息学、组织及发育阶段表达特征进行了分析, 并利用直接测序方法在外显子中筛选 SNP 位点。结果显示, *GRB2* 基因 cDNA 全长 1 791 bp, 开放阅读框 669 bp, 编码 223 个氨基酸, 蛋白由 SH-SH2-SH3 3 个结构域组成; 氨基酸序列比对发现, 文蛤 *GRB2* 与泥蚶的同源性最高, 达到 65.6%, 与脊椎动物的同源性都在 60% 以上, 说明 *GRB2* 基因在进化过程中比较保守。荧光实时定量 PCR(*qRT-PCR*) 结果表明, *GRB2* 在文蛤 6 个组织和 10 个发育时期中均有表达, 但不同组织间的表达量并没有显著差异; 发育时期中的表达量呈现逐渐升高的趋势, 在壳顶幼虫时期达到最高, 之后表达量又有所降低。SNP 位点的筛选结果表明, 在 *GRB2* 基因的外显子区域共发现 16 个 SNP 位点。

关键词: 文蛤; 生长因子受体结合蛋白 2(*GRB2*); 克隆; SNP

中图分类号: Q 785; S 966.2

文献标志码: A

生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, *GRB2*), 是一种接头蛋白, 参与细胞信号转导过程, 具有促进细胞增殖、细胞生长、细胞分化等功能。*GRB2* 由 1 个位于中央区的 SH2 结构域和 2 个位于两侧的 SH3 结构域构成, SH2 结构域可以特异地识别 pYXNX 基序 (X 为任意氨基酸), 并以很高的亲和力结合这种基序^[1]; SH3 结构域则可以特异地结合富含脯氨酸的基序, 也可以自身形成二聚体^[2]。在受体介导的信号通路中, SH2 结构域可以在很多受体介导的信号通路中发挥作用, 如表皮生长因子受体、T 细胞受体、B 细胞受体等^[3]。受体激活后, SH3 结构域结合鸟苷酸交换因子 (Sos), 催化非活性的 Ras-GDP 转换成有活性的 Ras-GTP, 从而把信号依次传递至胞核, 调控细胞的增殖和分化^[4]。目前, 高等动物中 *GRB2* 基因研究得已经

很透彻了^[5-7], 但在海洋贝类中, 仅在泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 中有相关报道^[8]。

文蛤 (*Meretrix meretrix*) 是我国四大传统养殖贝类之一, 为有效提高养殖产量和效益, 国内一些研究机构已开展了文蛤良种培育研究^[9-10]。目前文蛤分子遗传和功能基因的研究已有报道, 免疫相关方面有血清补体 C1q^[11]、脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 (*LITAF*)^[12]、铜锌超氧化物歧化酶 (*SOB*)^[13]、金属硫蛋白 (*MT*)^[14] 等; 生长相关方面有铁蛋白 (ferritin)^[15]、组织蛋白酶 B (cathepsin B)^[16]、磺基转移酶 (*SULT*)^[17]、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 9 (*FBA*)^[18] 等, 但 *GRB2* 基因却未见报道。本研究克隆了文蛤 *GRB2* 的 cDNA 全长, 研究了其在不同组织、不同发育阶段中的表达差异, 并在基因外显子中筛选 SNP 位点, 以为文蛤基因资源挖掘、遗传育种研究提供基础资料。

收稿日期: 2014-12-03

修回日期: 2015-03-03

资助项目: 国家自然科学基金 (31372527); 国家现代贝类产业技术体系 (CARS-48); 浙江省重大科技专项 (2012C12907-4)

通信作者: 董迎辉, E-mail: dongyinghui118@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用文蛤材料均取自宁波象山县东盛水产养殖有限公司。文蛤成贝经活体解剖,迅速取其外套膜、闭壳肌、内脏团、斧足、水管和鳃 6 个组织,液氮速冻,存于 -80°C 冰箱备用。2014 年 7 月,用性腺发育成熟的文蛤亲贝催产,通过隔离产卵和人工授精技术获得同步发育的未受精卵、受精卵、4 细胞胚胎、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、D 形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫和稚贝 10 个发育时期样品,备用。用于 SNP 位点筛选的文蛤自然群体共 260 枚,随机取样 52 枚,备用。

1.2 实验方法

***GRB2* 基因 cDNA 全长的克隆** 利用 Trizol 法提取文蛤闭壳肌组织总 RNA,SMART RACE 试剂盒(Clontech)合成 cDNA 第一链,用于全长 cDNA 3'和 5'端序列快速扩增(RACE)的模板。根据文蛤转录组文库的注释信息,检索到 *GRB2* 基因的 EST 片段,并以此为依据分别设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异性引物 GSP1 和 GSP2(表 1),用 Advantage 2 Polymerase 试剂盒(Clontech)扩增

GRB2 基因的 cDNA 全长,具体操作参照试剂盒要求。采用 touch down PCR,分别进行 3'-和 5'-RACE 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测,对其中最亮的条带进行割胶回收,纯化后的产物按说明书要求与 PMD-18T(TaKaRa)连接过夜,转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行克隆,经菌液 PCR 检测,选取阳性克隆送公司测序。

为确保文蛤 *GRB2* 基因 cDNA 全长的准确性,以获得 *GRB2* 的 cDNA 全长为模板,GRB2-F 和 GRB2-R(表 1)为引物,进行 PCR 扩增,产物经割胶纯化,连接转化后测序,具体步骤同上。

文蛤 *GRB2* 基因的序列及进化分析 在 GenBank 核酸数据库中将测序结果与已知序列作 Blastx 同源性分析,用 Blast 程序进行 5'和 3'末端序列拼接,获得 *GRB2* 基因的 cDNA 全长;ORF Finder 程序进行开放阅读框搜索;DNAMAN 软件推测其编码的氨基酸序列;用 MEGA 6.0 软件的 NJ 法构建系统进化树;利用 ExPASy 程序推测出蛋白质的理化性质;ExPASy ProtScale 分析其疏水性;SignalP 和 TMHMM 分别进行蛋白质信号肽和跨膜分析;Smart 软件对蛋白质进行功能域预测;Swiss Model 软件对蛋白质高级结构进行预测。

表 1 实验所用引物及其序列
Tab.1 Oligo nucleotide primers used in the experiments

引物 primer	序列(5'→3') sequence from 5' to 3'	引物信息 information of primers
GSP1	CTGAAGGAGGTGGAGGCAATGTATGACT	3'-RACE
GSP2	GCGGGGAGATAAGATAGTGGTGAAGAG	5'-RACE
GRB2-F	ACGATTTTACTGCTACTG	基因 cDNA 全长验证
GRB2-R	ACAATACTTGACCATAACC	基因 cDNA 全长验证
Real-G-F	CGATTTTACTGCTACTGCCGA	qRT-PCR
Real-G-R	ATCCTTCCTTCCCTTGTAACCTCT	qRT-PCR
18S-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	qRT-PCR
18S-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCACT	qRT-PCR
GRB2F1	ACGATTTTACTGCTACTGCCGA	SNP 位点筛选
GRB2R1	AAATAGACAATACTTGACCATACCT	SNP 位点筛选

文蛤 *GRB2* 基因在不同组织和不同发育阶段的表达差异分析 取上述文蛤的 6 个组织和 10 个发育时期,Trizol 法提取其总 RNA,按照 Promega 反转录试剂盒说明进行 cDNA 第一链合成,用于荧光定量 PCR(*qRT-PCR*)的模板,Real-G-F 和 Real-G-R(表 1)为引物,以 18SrRNA(表 1)基因为内参,利用 Bio-Rad IQ TM2 Multicolor Real-Time PCR Detection System 进行 *qRT-PCR*。

数据处理采用相对值 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算,SPSS 19.0 进行统计分析。

文蛤 *GRB2* 基因中 SNP 位点的筛选 提取 52 枚文蛤样品的总 RNA,并将其反转录为 cDNA,方法同上所述。以该 cDNA 为模板,GRB2F1 和 GRB2F2(表 1)为引物,进行 PCR 扩增,产物经割胶纯化,连接转化后测序,具体步骤同上。结果用 MEGA 6.0 进行序列比对分析,查找 SNP 位点。

2 结果

2.1 文蛤 *GRB2* 基因 cDNA 全长克隆

GRB2 基因的 cDNA 全长 1 791 bp, 开放阅读

框 669 bp, 编码 223 个氨基酸, 5'-UTR 长 25 bp, 3'-UTR 为 1 097 bp, 包含 1 个终止密码子 TGA, 加尾信号 ATTAAG 和 27 bp 的 polyA 尾(图 1)。

```

1   ACATGGGGAAGTGCACAAAACCAACATGGAAGCAGTTGCAAAACACGATTTTACTGCTAC
1   M E A V A K H D F T A T
61  TGCCGAGGATGAATTAAGCTTTTCAAAGGGAGATGTTTAAAGGTTTATCAAAAGAAGA
13  A E D E L S F S K G D V L K V L S K E D
121 TGACCAGAACTGGTACAAAGCAGAGTTACAAGGGAAGGAAGGATTTGTGCCAAACAATTA
33  D Q N W Y K A E L Q G K E G F V P N N Y
181 TATAGAAATGAAACACATGAATGGTTTATGGCAGCTTGAACGTCATGAGGCAGAAGA
53  I E M K P H E W F Y G S L K R H E A E D
241 CAAATGTTAGAAAAAGTAAATGGCCAGTATATCCATCCAGATGGCGCATTTTAGTACG
73  K L L E K V N G Q Y I H P D G A F L V R
301 TCGCAGTGAAAGTGTGCCTACAGATTTTCTATGTCAAGTTTCAGAATGGTGTTC
93  R S E S V P T D F S M S V K F Q N G V Q
361 ACATTTTAAATTTCTACGTGAGACTGCAACTGGTAAATATTATCTGTGGGTAGTCCGGTT
113 H F K I L R E T A T G K Y Y L W V V R F
421 TTCATCAATAAATGAGCTGATAGAATACCACCGGAAGGCCTCCGTGAGCCGATCACAAC
133 S S I N E L I E Y H R K A S V S R S Q T
481 TATATGTCTGAAAGATATGGCAGGGAACCTGAAGGAGGTGGAGGCAATGTATGACTTTGA
153 I C L K D M A G N L K E V E A M Y D F E
541 GCCGGATGATCAGAATGAAATAAGACGAAAGCGGGGAGATAAGATAGTGGTGAAGAGGA
173 P D D Q N E I R R K R G D K I V V E E E
601 GGTAGACGTAAACTGGTGGCGAGGAAGAAACCTAAGCACTGGATGTAGTGGACTTTTCC
193 V D V N W W R G R N L S T G C S G L F P
661 TGCAAACTATATTAAGCTGTAGAAAAGGAAAGTGAAGAAATTAAGCTTTGTGAAGTG
213 A N Y I K S C R K G K *
721 TTACATTGAGTTGATAATGATAAGTCTGTAAAGGTATGGTCAAGTATTGTCTATTTCTT
781 CATAATATATCAATATGCCATAATGTGCCGTGAAAGATGACATAATTCTCTATGGAACA
841 ACTGTCTGTTCAGAAAGTAGGTAGATTATGCACCAATATGATAGGACAAGTCTGTGTTT
901 TGTTTCAGAACATTGCAGTGCTAGTTTGTCTCTCTTCATTGCATTAAGTATGTATTG
961 TTACAGAAACCTCCCATGCTTTAATTTTCTACTTAGGAAATATTCTTACAAATGATA
1021 CAAGAGAAAGTAAGTAAGGCTTATGGTGATTGGATGTTTCAAGAAAGTAAAGCTTCCAATAT
1081 GTTGTCCATTTTCACTAATTAATCGTACAACTATTAAGTCAAATTGACATACTGGTACT
1141 CATATTTTCTACATGTGTAGAAATGGTTAAATGGATGAATACAGTGCTTGAAGTAGGAAA
1201 AAATCAGTTCTGTTTAAATATTTAAATGAAAACAGATACAAATGAATCTTATTTGAA
1261 ATTTGAGATAAGGACTTCACCTCTCTAAATTTTGATTTGTTTAAATATTTTATCTGTG
1321 AAACCAAGCATAAGATTGTAGTCAAGTCACTGCTTATGGATATTTAGCATTCTTTGGGTA
1381 TTCTTAAGTATATTACAAAGAACTTCAATTACATCTAAGCTAGTAAATATTG
1441 TCGGCAACATTAATTGCCTTGATGAAAGACATTTTAATCTAGCTGTCTCTGTCTATCAC
1501 CATTTTATTTTGCAGTGGTACGTAATTATCTGTCTGGAACCAACACTTGTGATAATAT
1561 TTTTGTGGTACTTAGTTTATTTTAAATGAGCTCTTATTAAGTATTTGTATGCC
1621 GAGTAAATACATTTGTGAAAGTGTCTTCTGCTTCTCAACTGAAAAAGAGTGTCTATG
1681 TAATGTGTATGAATGTGCTACTTGATTGTAAATGTAAAGAAAAATTTTAAAGACCAGA
1741 TTTAGTAAAAATTCAATTGTTTCAAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 文蛤 *GRB2* 基因全长 cDNA 序列及其氨基酸序列推测

加框部分分别代表起始密码子、终止密码子和加尾信号, * 代表蛋白翻译结束, 双划线部分为 SH3 结构域, 单划线部分代表 SH2 结构域

Fig. 1 The full length of cDNA and deduced amino acid sequence of the *GRB2* from *M. meretrix*

The three letters boxes are the start codon, the stop codon and the polyadenylation signal sequence, the * represents the end of the protein translation, the double underlined bold parts are the functional domains of SH3, the bold underlined parts is the functional domains of SH2

2.2 文蛤 *GRB2* 基因的序列及进化分析

利用 ExPASy Compute 推导出文蛤 *GRB2* 基因编码蛋白质的分子量为 25.89 ku,理论等电点为 6.34。ExPASy ProtScale 软件预测显示,该蛋白质在氨基酸组成上,极性氨基酸所占比例较高,表现为亲水性;SignalP 软件预测显示该蛋白质没有明显的信号肽;TMHMM 软件预测没有跨膜蛋白。

利用 Smart 软件对文蛤 *GRB2* 蛋白进行了功能域预测(图 2)。结果表明,文蛤 *GRB2* 蛋白含有 3 个功能域,即 SH3(1-57aa)、SH2(58-148aa)和 SH3(163-220)。Swiss model 软件预测显示,文蛤 *GRB2* 蛋白的二级结构由 130 个 H 键、4 个 α -螺旋、23 个 β -折叠和 24 个转角组成。*GRB2* 蛋白的 SH 结构域主要由 β -折叠片组成,SH2 的两端各有一个 α -螺旋,2 个 SH3 结构域也各有 1 个 α -螺旋(图 3)。

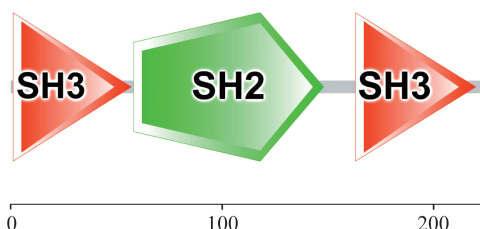


图 2 用 Smart 软件预测的 *GRB2* 蛋白的功能域

Fig.2 Prediction of protein functional domains of *GRB2* using the Smart software



图 3 文蛤 *GRB2* 蛋白的二级结构预测

红色为 α -螺旋;黄色为 β -折叠;蓝色为转角;白色为其他残基

Fig.3 Prediction of protein secondary structure of *GRB2* in *M. meretrix*

the red represents the alpha-helix, yellow represents the beta sheet, blue represents the turn, other residues is white

2.3 文蛤 *GRB2* 基因序列同源性分析

利用 MEGA 6.0 软件,对文蛤和其他 13 个物种进行氨基酸序列比对(图 4)及用 NJ 法构建系统进化树(图 5)。氨基酸序列比对表明,文蛤(*M. meretrix*, KP250878)与泥蚶(*T. granosa*, AFP57675.1)的同源性最高为 65.6%,与大西洋鲑(*Salmo salar*, NP_001158778.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_998200.1)、条纹斑竹鲨(*Chiloscyllium plagiosum*, ADI58829.1)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*, NP_001187313.1)、鸡(*Gallus gallus*, NP_989742.1)、牛(*Bos Taurus*, BC102411.1)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, CAB59279.1)、小鼠(*Mus musculus*, NP_032189.1)、猪(*Sus scrofa*, FJ196595.1)、人(*Homo sapiens*, NP_002077.1)、黑猩猩(*Pan troglodytes*, NM_001246617.1)、食蟹猴(*Macaca fascicularis*, NM_001287635.1)等脊椎动物的同源性为 63.8%~65.1%。从构建的系统进化树中可以看出,脊椎动物中的哺乳纲、鸟纲、两栖纲和鱼纲先聚成一大支,文蛤与泥蚶聚成一支,再与脊椎动物聚在一起。

2.4 *GRB2* 基因在文蛤不同组织和不同发育时期的差异分析

利用 *qRT-PCR* 技术,检测了 *GRB2* 基因在不同组织和不同发育时期的时空表达特征。结果表明,*GRB2* 基因在文蛤不同组织中均有表达,其中水管中的表达量相对较高,但各个组织之间并没有显著差异($P > 0.05$),表明 *GRB2* 基因在成贝中广泛表达(图 6)。

不同发育时期的结果表明,*GRB2* 基因在壳顶幼虫期中表达量最高,显著高于其他发育时期($P < 0.01$),而在幼贝时期的表达量显著高于除壳顶幼虫期以外其他时期的表达量($P < 0.01$),其他时期之间则无显著差异($P > 0.05$)(图 7)。

2.5 文蛤 *GRB2* 基因外显子序列 SNP 位点分析

利用直接测序的方法在文蛤 *GRB2* 基因外显子中筛选 SNP 位点,结果经 MEGA 软件比对分析,共发现了 16 个 SNP 位点,其中 15 个位点在 52 个样本中仅出现了 1 次,390C > T 位点出现 2 次,分别占总样本数的 1.92% 和 3.85%,这些位点都没有在该群体中表现出来显著性差异。

Me-GRB2	MEAVAKHDFITAEDELSESKGDLKVLVLSKDDQNWYKAELQGKEGFVPNNYIEMKPHWFFYGSILKRHEA	70
Tg-GRB2	MEAVAKHEFKASQADELSECKNDVLKILSKDDINWYKAELNGVEGYIPNNYIEMKPHWFFVGMKMRREDA	70
Ss-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Gg-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKGGFIPKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Dr-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGRIIPARA	70
Ip-GRB2	MEATAKYDFNATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELYGKEGFIPKPNYIEMKPHWFFYGSILKRHEA	70
Cp-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Xl-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Mm-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Hs-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Su-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Pt-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Mf-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Bt-GRB2	MEATAKYDFKATADDELSEFKRGEVLKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHWFFGKIPRAKA	70
Me-GRB2	EDKLLLEKV-NGQYIHPDGAFLVRRSESVEITDFSMVSKFQNGVQHFKILREITATGKYFLWVVRFSSINELI	139
Tg-GRB2	VKKLLAKRPDDSHIHPDGTFLVRNSESSEGEFSISVKFKDDAQHFKVLRDGS-GHYFLWVVVFNSINELV	139
Ss-GRB2	EEMLNKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Gg-GRB2	EEMLNKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Dr-GRB2	EEILNKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Ip-GRB2	EEMLNKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Cp-GRB2	EELLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Xl-GRB2	EEMLGKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Mm-GRB2	EEMLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Hs-GRB2	EEMLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Su-GRB2	EEMLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Pt-GRB2	EEMLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Mf-GRB2	EEMLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Bt-GRB2	EEMLSKQR-----HDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGA-GKYFLWVVVFNSINELV	132
Me-GRB2	EYHRKASVSRSQTICLKDMAGNLKE-----VEAMYDFEFDDQNEIRRKRGDKIVVEEE	192
Tg-GRB2	EYHRSSSVNRRGSTVLLKDMAPDSKDDFQRHEQVPMHNMCCCEALYDFNAETEEELTFRRGEKITLLDE	209
Ss-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVTQHP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIQVLDN	188
Gg-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEEGELGFRRGDFIQVLDN	188
Dr-GRB2	DYHRITSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQHP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIQVLDN	188
Ip-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQHA---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIQVLDN	188
Cp-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEEGELGFRRGDFIQVLDN	188
Xl-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIQVVDN	188
Mm-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQMPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDN	188
Hs-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDN	188
Su-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDN	188
Pt-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDN	188
Mf-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDN	188
Bt-GRB2	DYHRSTSVSRNQIIFLRDI-----EQVPQQP---TYVQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDN	188
Me-GRB2	VDVNWWRGRNLSTGCSGLFANYYIKSCRKKGK	223
Tg-GRB2	IDSNWWRGEAAITGKRGLFPAAAYVKKI----	236
Ss-GRB2	SDPNWWKG--GCHGLTGMFPRNYVTPVNRNM	217
Gg-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNI	217
Dr-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNM	217
Ip-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVQHM	217
Cp-GRB2	SDPNWWKG--SCHGQSGMFPRNYVTPVNRNI	217
Xl-GRB2	SDPNWWKG--TCLSGTGMFPRNYVTPVNRNM	217
Mm-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV	217
Hs-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV	217
Su-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV	217
Pt-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV	217
Mf-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV	217
Bt-GRB2	SDPNWWKG--ACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV	217

图4 文蛤与其他物种 GRB2 进行氨基酸序列比对

Me. 文蛤; Tg. 泥蚶; Ss. 大西洋鲑; Gg. 鸡; Dr. 斑马鱼; Ip. 斑点叉尾鲷; Cp. 条纹斑竹鲨; Xl. 非洲爪蟾; Mm. 小鼠; Hs. 人; Su. 猪; Pt. 黑猩猩; Mf. 食蟹猴; Bt. 牛。黑色阴影表示一致序列, 灰色阴影表示相似序列

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of GRB2 between *M. meretrix* and other species

Me. *M. meretrix*; Tg. *T. granosa*; Ss. *S. salar*; Gg. *G. gallus*; Dr. *D. rerio*; Ip. *I. punctatus*; Cp. *C. plagiosum*; Xl. *X. laevis*; Mm. *M. musculus*; Hs. *H. sapiens*; Su. *S. scrofa*; Pt. *P. troglodytes*; Mf. *M. fascicularis*; Bt. *B. taurus*. Identities are shaded dark and similarities are shaded gray

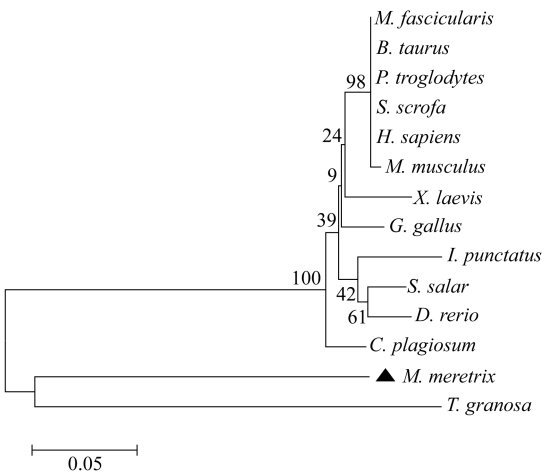


图 5 用 MEGA 6.0 软件邻接法构建的文蛤与其他物种 GRB2 的系统进化树
Fig.5 Neighbor-joining phylogenetic tree of GRB2 between *M. meretrix* and other species using MEGA 6.0 software

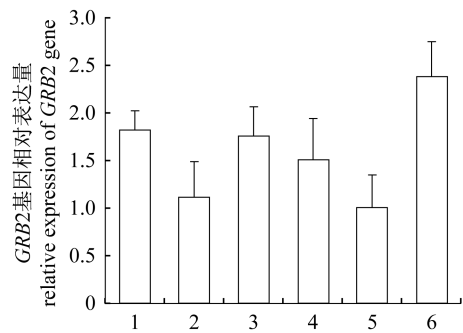


图 6 GRB2 基因在文蛤不同组织中的表达差异分析 (n = 3)
1. 外套膜,2. 闭壳肌,3. 内脏团,4. 足,5. 鳃,6. 水管
Fig.6 Analysis of expression difference of GRB2 gene in different tissues of *M. meretrix* (n = 3)
1. mantle,2. adductor muscle,3. digestive gland,4. foot,5. gill,6. siphon

3 讨论

本实验通过 RACE 技术成功获得了文蛤 GRB2 基因的 cDNA 全长序列。该基因 cDNA 全长 1 791 bp,开放阅读框 669 bp,所推导的氨基酸序列不存在信号肽序列,蛋白质分子量为 25. 89 ku,理论等电点为 6. 34,这与已报道泥蚶的结果基本一致^[8],与人和小鼠的结果也很相似^[19]。GRB2 蛋白是由 SH3-SH2-SH3 3 个结构域紧密结合在一起构成的,其中SH3结构域的β-折叠

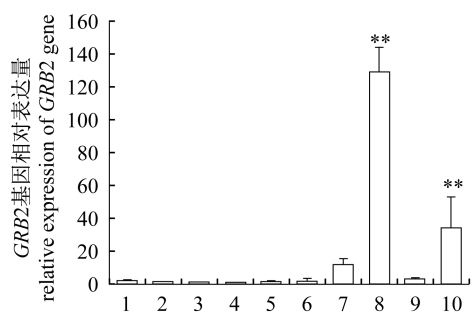


图 7 GRB2 基因在文蛤不同发育时期的表达差异分析 (n > 500)
1. 未受精卵,2. 受精卵,3. 4 细胞,4. 囊胚,5. 原肠胚,6. 担轮幼虫,7. D 形幼虫,8. 壳顶幼虫,9. 眼点幼虫,10. 稚贝, ** 代表极显著差异, P < 0.01

Fig.7 Analysis of expression difference of GRB2 gene in different developmental stages of *M. meretrix* (n > 500)

1. unfertilized mature eggs, 2. fertilized eggs, 3. 4 cells, 4. blastula, 5. gastrulae, 6. trochophore, 7. D-shaped larva, 8. umbo larvae, 9. eyebot larva, 10. juvenile clams, ** represents very significant differences, P < 0.01

表 2 文蛤 GRB2 基因外显子序列 SNP 位点统计
Tab.2 Statistics result of SNPs in exon of GRB2 in *M. meretrix*

位置 site	出现次数/次 number of occurrences	百分比/% percentage
42G > A	1	1.92
168A > G	1	1.92
198A > G	1	1.92
200G > A	1	1.92
215A > G	1	1.92
300T > G	1	1.92
305C > T	1	1.92
390C > T	2	3.85
495G > A	1	1.92
519G > T	1	1.92
522T > C	1	1.92
543A > G	1	1.92
559G > A	1	1.92
624T > C	1	1.92
668A > G	1	1.92
707T > G	1	1.92

片呈“桶状”,可以特异地结合富含 Pro 的序列,SH2 的结构域两端分别有 1 个 α-螺旋,中间主要由反向平行的 β-折叠片构成,SH2 结构域还通过形成一个磷酸酪氨酸围成的“袋状”结构与其他

蛋白结合来发挥作用^[3,20-21]。本研究通过软件对文蛤 *GRB2* 蛋白的结构进行预测,发现其由 2 个 SH3 和一个 SH2 结构域组成,SH2 结构域的两端各有一个 α -螺旋,中间主要由 β -折叠构成;2 个 SH3 结构域也各有一个 α -螺旋, β -折叠片呈“桶状”。这与高等动物中的结构基本一致,说明该基因在进化过程中比较保守,推测该基因在文蛤体内也发挥着类似于高等动物的功能。

GRB2 作为一种信号接头蛋白,通过参与体内多种信号通路的转导来调控细胞的生殖、生长和分化^[22]。Downward 等^[23]发现 *GRB2* 在高等动物的各个组织中均有表达。Simpson 等^[24]、Korkaya 等^[25]的研究结果表明,*GRB2* 可与多种调节蛋白发生相互作用,参与调节胞内的多种代谢活动。本研究结果表明,*GRB2* 基因在文蛤 6 个组织中均有表达,但各个组织之间的表达量并没有显著差异,说明 *GRB2* 在文蛤体内多个生命活动中都发挥着重要功能,是不可或缺的必需成分。

GRB2 在胚胎正常发育过程中也起着非常重要的作用,Cheng 等^[26]用基因敲除实验证明剔除 *GRB2* 基因可导致胚胎致死,用 *GRB2* 的 SH2 的结构域取代 Ras 激活 Sos 蛋白的 C 端可使 Ras-MAPK 信号通路恢复后从而达到胚胎挽救效果。*GRB2* 蛋白在胚胎发育过程中还具有维持上皮细胞形成、细胞运动和血管形成等功能^[27]。本研究发育时期的差异表达分析表明,*GRB2* 在文蛤未受精卵、受精卵、4 细胞胚胎、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、D 形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫和稚贝 10 个发育阶段中均有表达。其中壳顶幼虫时期的表达量显著高于其他时期,原因可能是壳顶幼虫是文蛤幼虫快速生长的时期,细胞分裂加速,生命旺盛,此时需要更多 *GRB2* 蛋白;稚贝时期 *GRB2* 表达量又升高,并且与其他时期的表达量有显著差异,原因可能是由于稚贝时期进出水管逐渐形成,初生足强壮粗大,摄食量增加,生命活动增强造成的^[28]。

SNP 主要指在基因组水平上单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。在海洋贝类中,已开展了一些候选基因 SNP 多态性与生长、抗逆等经济性状的关联性分析,如栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 转化生长因子- $\beta 1$ 型受体基因 (*Tgfb1*) 的 3' UTR 区中发现了与生长相关的

SNP 位点^[29],海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 肌肉生长抑制素基因 (*MSTN*) 的外显子区域发现与生长相关的 SNP 位点^[30],泥蚶血红蛋白基因 (*Hb*) 中发现了与免疫相关的 SNP 位点^[31]等。本研究在文蛤 *GRB2* 外显子区域内查找 SNP 位点,通过直接测序的方法,获得了 16 个 SNP 位点,但是这 16 个 SNP 位点都属于个别个体的碱基突变,在文蛤群体中并没有表现出来显著性,说明 *GRB2* 基因的外显子区域对文蛤的功能性状没有显著的影响。但这并不能表明 *GRB2* 基因中就没有相关的 SNP 位点,其内含子和启动子中是否存在与生长或免疫相关的 SNP 位点,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Jia C Y, Nie J, Wu C, et al. Novel Src homology 3 domain-binding motifs identified from proteomic screen of a Pro-rich region [J]. Molecular Cellular Proteomics, 2005, 4(8): 1155 - 1166.
- [2] Nishida M, Nagata K, Hachimori Y, et al. Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains [J]. EMBO Journal, 2001, 20 (12): 2995 - 3007.
- [3] Garbay C, Liu W Q, Vidal M, et al. Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents [J]. Biochemical Pharmacology. 2000, 60 (8): 1165 - 1169.
- [4] Pan Z. The function study of Grb2 interactions with AMPK and TSC2 [D]. Baoding: Hebei University, 2007. [潘智. Grb2 与 AMPK、TSC2 的相互作用及其在细胞生长调控中的功能研究. 保定, 河北大学, 2007.]
- [5] Li L Y, Zhang K, Jiang H, et al. Quantitative proteomics reveals the downregulation of *GRB2* as a prominent node of F806-targeted cell proliferation network [J]. Journal of Proteomics, 2015, 18 (117): 145 - 155.
- [6] Belov A A, Mohammadi M. Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling [J]. Science Signal, 2013, 5(249): 49.
- [7] Ahmed Z, Lin C C, Suen K M, et al. Grb2 controls phosphorylation of *FGFR2* by inhibiting receptor kinase and *Shp2* phosphatase activity [J]. Journal of Cell Biology, 2013, 200(4): 493 - 504.
- [8] Dong Y H, Xiang X, Yao H H, et al. Cloning and expression of *GRB2* gene from the blood clam

- Tegillarca granosa* [J]. *Oceanology and Limnology*, 2013, 44 (4): 937 - 943. [董迎辉, 项翔, 姚韩韩, 等. 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. 海洋与湖沼, 2013, 44 (4): 937 - 943.]
- [9] Dai P. Genetic test of breeding populations and identification of growth-associated SNPs in the clam *Meretrix meretrix* [D]. Qingdao: University Chinese Academy of Sciences, 2014. [代平. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 选育群体的遗传测定及生长相关 SNP 鉴定. 青岛: 中国科学院大学, 2014.]
- [10] Xiao G Q, Lin Z H, Dong Y H, *et al.* The growth of F1 from matings and crosses of different geographical populations of *Meretrix meretrix* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34 (2): 255 - 263. [肖国强, 林志华, 董迎辉, 等. 文蛤不同地理群体自繁和互交 F1 代的早期生长性状. 水产学报, 2010, 34 (2): 255 - 263.]
- [11] Sui L J, Liu W D, Li Y F, *et al.* Molecular cloning, mRNA expression and bioassay of recombinant proteion of *C1q* gene in hard clam (*Meretrix meretrix*) [J]. *Fisheries Science*, 2012, 31 (6): 321 - 328. [隋立军, 刘卫东, 李云峰, 等. 文蛤 *C1q* 基因的克隆与表达及其重组蛋白活性的研究. 水产科学, 2012, 31 (6): 321 - 328.]
- [12] Li H J, Yang Q, Gao X G, *et al.* Identification and expression of a putative LPS-induced TNF- α factor from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (2): 865 - 871.
- [13] Zhu D. Molecular cloning and mRNA expression and recombinant protein of an Cu/Zn-superoxide dismutase (*Cu/Zn-SOD*) gene from hard clam (*Meretrix meretrix*) [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2011. [朱丹. 文蛤胞内铜锌超氧化物歧化酶的基因克隆与表达及重组蛋白活性的测定. 大连: 辽宁师范大学, 2011.]
- [14] Gao X G, He C B, Li Y F, *et al.* Analysis on cloning and sequence Characteristics of metallothionein gene in hard clam *Meretrix meretrix* [J]. *Chinese Journal Fisheries*, 2009, 22 (4): 8 - 11. [高祥刚, 赫崇波, 李云峰, 等. 文蛤金属硫蛋白基因的克隆与分析. 水产学杂志, 2009, 22 (4): 8 - 11.]
- [15] Wang X M. Molecular cloning and functional analysis of genes involved in larval development in clam *Meretrix meretrix* [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008. [王晓梅. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 幼虫生长发育相关基因的克隆和功能分析. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008.]
- [16] Yao X L, Zhang J Q, Sun J S, *et al.* Recombinant expression, characterization and expressional analysis of clam *Meretrix meretrix* cathepsin B, an enzyme involved in nutrient digestion [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38 (3): 1861 - 1868.
- [17] Wang C, You Y N, Wang H X, *et al.* Genetic diversity of the sulfotransferase-like gene and one nonsynonymous SNP associated with growth traits of clam, *Meretrix meretrix* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (2): 1323 - 1331.
- [18] Wang C, Wang H X, Li Y, *et al.* Identification of a fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene and association of the single nucleotide polymorphisms with growth traits in the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (4): 5017 - 5024.
- [19] Atuoka K M, Shibata M, Yamakawa A, *et al.* Cloning of *ASH*, a ubiquitous protein composed of one Src homology region SH2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (19): 9015 - 9019.
- [20] Maignan S, Guilloteau J P, Fromage N, *et al.* Crystal structure of the mammalian *Grb2* adaptor [J]. *Science*, 1995, 268 (5208): 291 - 293.
- [21] Senior M M, Frederick A F, Black S, *et al.* The three-dimensional solution structure of the Src homology domain-2 of the growth factor receptor-bound protein-2 [J]. *Journal of Biomolecular NMR*, 1998, 11 (2): 153 - 164.
- [22] Haines E, Minoo P, Feng Z, *et al.* Tyrosine phosphorylation of *Grb2*: Role in prolactin/epidermal growth factor cross talk in mammary epithelial cell growth and differentiation [J]. *Molecular And Cellular Biology*, 2009, 29 (10): 2505 - 2520.
- [23] Downward J. The *GRB2/Sem-5* adaptor protein [J]. *FEBS Lett*, 1994, 338 (2): 113 - 117.
- [24] Simpson A, Uitto J, Rodeck U, *et al.* Differential expression and subcellular distribution of the mouse metastasis-associated proteins Mta1 and Mta3 [J]. *Gene*, 2001, 273 (1): 29 - 39.
- [25] Korkaya H, Jameel S, Gupta D, *et al.* The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates *MAPK* [J]. *Journal Of Biological Chemistry*, 2001, 276 (45): 42389 - 42400.

- [26] Cheng A M, Saxton T M, Sakai R, *et al.* Mammalian *Grb2* regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation[J]. *Cell*, 1998, 95(6): 793 – 803.
- [27] Puto L A, Pestonjamasp K, King C C, *et al.* P21-activated kinase 1 (*PAK1*) interacts with the *Grb2* adapter protein to couple to growth factor signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 9388 – 9393.
- [28] Wang R C, Wang Z P. *Science of Marine Shellfish Culture* [M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008. [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.]
- [29] Guo H H, Bao Z M, Li J P, *et al.* Molecular characterization of TGF- β type I receptor gene (*Tgfbr1*) in *Chlamys farreri*, and the association of allelic variants with growth traits [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): 1 – 12.
- [30] Guo L, Li L, Zhang S, *et al.* Novel polymorphisms in the myostatin gene and their association with growth traits in a variety of bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. *Animal Genetics*, 2011, 42(3): 339 – 340.
- [31] Bao Y B, Li P F, Dong Y H, *et al.* Polymorphism of the multiple hemoglobins in blood clam *Tegillarca granosa* and its association with disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1320 – 1324.

Cloning, spatiotemporal expression and SNPs identification of *GRB2* gene in hard clam *Meretrix meretrix*

GAO Xiaoyan¹, DONG Yinghui^{1*}, SHI Shenjia¹, YAO Hanhan¹,
RUAN Wenbin², ZHAO Jiayi¹, LIN Zhinhua¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To explore the molecular structure and biological function of *GRB2* in *Meretrix meretrix*, *GRB2* cDNA was cloned by SMART RACE techniques, then the bioinformatics and expression profiles in different tissues and developmental stages were analyzed and SNPs were screened out in exon. The results indicated that the full length cDNA of *GRB2* gene was 1 791 bp, containing a complete 669 bp ORF encoding 223 amino acids. There were three functional domains of *GRB2* protein (SH3-SH2-SH3). Comparisons of animal acid sequence, the *GRB2* of *M. meretrix* has highly homologous with *Tegillarca granosa* and shares 65.6% similarity. It shares more than 60% similarity with vertebrates and proves that *GRB2* was highly conservative. The result of *qRT-PCR* showed that *GRB2* expressed in all six tissues and ten developmental stages, but the expression of tissues did not have significantly difference. The relative expression in different stages revealed that the expression of *GRB2* gradually increased with the process of the development, and showed the highest in umbo larvae stage. 16 SNPs in the exon of *GRB2* were identified.

Key words: *Meretrix meretrix*; *GRB2*; gene cloning; SNP

Corresponding author: DONG Yinghui. E-mail: dongyinghui118@126.com