

# 三疣梭子蟹蜕皮激素受体 *EcR* 基因的 cDNA 克隆及表达分析

张晓燕<sup>1,2</sup> 李健<sup>1\*</sup> 刘萍<sup>1</sup> 陈萍<sup>1</sup> 孙铭<sup>1,3</sup> 葛红星<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 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)

(<sup>2</sup> 上海海洋大学, 201306)

(<sup>3</sup> 中国海洋大学, 青岛 266003)

**摘要** 通过简并引物扩增及 Smart™ Race 技术, 首次克隆了三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 蜕皮激素受体 *EcR* 基因 cDNA 全长序列。该基因全长 2 996bp, 编码一个由 503 个氨基酸组成的多肽, 预测理论等电点 pI 为 7.33, 分子量大小为 55.69kDa。同源性及系统进化分析表明, 三疣梭子蟹 *EcR* 基因与青蟹、拟穴青蟹、大西洋招潮蟹、陆地蟹、美洲螯虾、褐虾、日本对虾的同源性分别为 94%、90%、88%、84%、82%、73%、66%。荧光定量 RT-PCR 结果表明, *EcR* 在肝胰腺、卵巢、肌肉、眼柄、鳃和心脏中均有分布, 在肝胰腺中表达量最高, 在心脏中最低。高盐(45)胁迫下, *EcR* 基因的表达量在 24h 后显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 总体呈下降趋势; 低盐(11)胁迫条件下, *EcR* 转录组的表达量呈现先降低后上升的趋势, 在 12h 达到最低, 之后逐渐上升, 在 48h 之后显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

**关键词** 三疣梭子蟹; 蜕皮激素受体; 基因克隆; 急性盐度胁迫; RT-PCR

**中图分类号** Q785, S917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-7075(2014)01-0096-08

## Cloning and expression analysis of *EcR* gene in *Portunus trituberculatus*

ZHANG Xiao-yan<sup>1,2</sup> LI Jian<sup>1\*</sup> LIU Ping<sup>1</sup> CHEN Ping<sup>1</sup>  
SUN Ming<sup>1,3</sup> GE Hong-xing<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Ocean University of Shanghai, 201306)

(<sup>3</sup> Ocean University of China, Qingdao 266003)

**ABSTRACT** The complete cDNA sequence of *EcR* gene in *Portunus trituberculatus* was first cloned through RT-PCR and Smart™ Race technology. The length of the *EcR* gene is 2,996bp and encodes a 503 amino acid protein with a calculated molecular weight of 55.69 kDa and a theoretical pI of 7.33. Blast analysis revealed that the similarity of *EcR* with *C. maenas*, *Scylla paramamosain*, *U. pugilator*, *Gecarcinus lateralis*, *Homarus americanus*, *Crangon crangon*,

国家 863 计划课题(2012AA10A409)、农业科技成果转化基金项目(2013GB23260589)、山东省自主创新专项(2013CXC80202)和中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(20603022012021)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830183

收稿日期: 2013-01-20; 接受日期: 2013-05-17

作者简介: 张晓燕(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生物功能基因研究。E-mail: yanerzhang2006@163.com

and *Marsupenaeus japonicas* was 94%, 90%, 88%, 84%, 82%, 73%, and 66%, respectively. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to assess the mRNA expression level of EcR after the salinity stress. The results showed that EcR was expressed in all tested tissues of *P. trituberculatus*, including hepatopancreas, muscle, eyes, gills, and heart. The highest expression level was observed in hepatopancreas, while the lowest in heart. Under salinity (45) stress for 24h, the expression level of EcR was significantly lower than the control and declined gradually. At salinity 11, the EcR expression presented a decrease-increase trend and reached the lowest level at 12h, then the expression level increased gradually, and it was significantly higher than the control group after 48h.

**KEY WORDS** *Portunus trituberculatus*; EcR; Gene cloning; Salinity stress; RT-PCR

三疣梭子蟹属于甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、梭子蟹科 Portinidae(戴爱云等 1986),广泛分布于中国近海、日本、朝鲜半岛及马来西亚群岛等海域,是我国重要的海产经济蟹类,也是海水人工养殖的主要种类之一。在人工养殖生产中,由于降雨、换水和蒸发等原因,使其养殖环境经常处于波动状态。盐度作为水产养殖中最重要的环境因素之一,其变化对虾蟹类蜕皮、生长代谢及免疫都有显著的影响(杨其彬等 2008;王冲等 2010;Mu *et al.* 2005)。许多研究发现,适当地降低盐度能够缩短甲壳动物的蜕皮周期、提高蜕皮率以达到促进生长的作用(李英等 2010;Bray *et al.* 1994;Mu *et al.* 2005)。

蜕皮作为甲壳动物生长、发育过程中的一个标志性特征,涉及了一系列酶、激素以及调控因子等的参与,是一个复杂的生理过程,主要由甲壳动物头胸部前端 Y 器所分泌类固醇的蜕皮激素所控制(Lachaise *et al.* 1993;Hopkins *et al.* 1992)。蜕皮激素要发挥其作用,必须通过转录因子作为媒介,启动级联反应以完成整个生理过程(Thummel 1995;Riddiford *et al.* 2001)。在甲壳动物中,蜕皮激素受体(Ecdysteroid receptor, EcR)担任着这一重要角色,它属于核受体超家族(Nuclear receptor super-family)成员,是蜕皮激素的作用靶标,作为甲壳动物体内重要的调控蛋白,处于生长发育、蜕皮等过程的级联调控的关键位置,启动一系列早期转录因子的表达,对于完成个体生长发育具有重要意义(Beckstead *et al.* 2005;赵小凡 2010;李康等 2011)。

海洋无脊椎动物 EcR 的研究相对较少,甲壳动物中仅有大西洋砂招潮蟹 *Uca pugilator*、日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus*、黑背陆地蟹 *Gecarcinus lateralis* 及日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* 等少数物种的 EcR 基因得到克隆(Chung *et al.* 1998;Asazuma *et al.* 2007;Kim *et al.* 2005;陈辉等 2009),EcR 作为生长、蜕皮的重要调控基因,环境因子的急剧变化对其产生影响方面的研究,目前在三疣梭子蟹上尚未见报道。本研究通过克隆获得三疣梭子蟹蜕皮激素受体 EcR 基因全长序列,并对其在急性盐度胁迫下的组织表达特征进行了初步研究,从分子水平探讨盐度与蜕皮之间的相关性,以期为三疣梭子蟹 EcR 与环境盐度适应的相关性研究及其在盐度适应过程中所表现的生理功能研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实 验 动 物

本研究选择三疣梭子蟹体重为(100~120)g 的健康个体,于 2012 年 7 月 6~28 日在山东昌邑市海丰水产养殖有限责任公司室内水泥养殖池进行实验。

#### 1.1.2 实 验 试 剂

Advantage 2 PCR Kitt 和 SMART™ RACE Amplification Kit 购自 Clontech 公司;TaKaRa LA Taq、Oligo(dT)18、M-MLV、PMD18-T、DNase I 和 Top 10 感受态细胞购自 TaKaRa 公司;Trizol Reagent 购自 In-

vitrogen 公司;实验所用引物为上海生物工程有限公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取健康三疣梭子蟹的眼柄于液氮中研磨,Trizol 试剂提取总 RNA,核酸蛋白测定仪(Biodropsis,BO-1000)与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其质量及完整性,DNase I 去除基因组 DNA 后,用 M-MLV Program 产品完成第一链 cDNA 合成,反转录产物于 -20℃ 冰箱保存备用。

## 1.3 三疣梭子蟹 *EcR* 基因 cDNA 片段的克隆

从 NCBI 中搜索招潮蟹 *Celuca pugilator*、黑背陆地蟹、日本囊对虾和美洲螯龙虾 *Homarus americanus* 的 *EcR* 基因 cDNA,利用 ClustalX 对以上序列进行同源性对比以确定其保守区域,并设计兼并引物 EcR-F1 和 EcR-R1(表 1)。以三疣梭子蟹眼柄 cDNA 为模板,EcR-F1 和 EcR-R1 为引物(表 1),进行三疣梭子蟹 *EcR* 基因中间片段的扩增。PCR 扩增体系为 50 $\mu$ l,反应条件:94℃ 预变性 5min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。2.0%琼脂糖凝胶电泳检测所扩增的片段大小。扩增的 PCR 产物使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行回收纯化,与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后,送往上海生物工程有限公司进行测序。

## 1.4 *EcR* 基因全长的获得

测序结果经 NCBI 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)后,其实验所得三疣梭子蟹 *EcR* 基因部分序列与其他物种的 *EcR* 基因同源。以已获得的 *EcR* 基因片段设计 3' 和 5' RACE 特异性引物 EcR-race3' 和 EcR-race5'(表 1),利用 SMART™ RACE Amplification Kit 扩增得到 cDNA 全长。

## 1.5 三疣梭子蟹 *EcR* 基因的序列分析

使用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN 和 BLASTX 软件对 *EcR* 基因的同源性进行分析,在 <http://www.expasy.ch/tools/pi> 上进行蛋白质理化性质的预测。利用 PredictProtein 服务器对 *EcR* 蛋白序列进行功能位点分析(PROSITE motif search),利用 SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)\_tool.html)工具进行蛋白信号肽的预测,采用 Vector NTI Advance 10.3 软件和 ClustalW 软件将克隆的序列和已知的其他物种的氨基酸序列进行比对及同源性分析,用 MEGA 4.1 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树。

使用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN 和 BLASTX 软件对 *EcR* 基因的同源性进行分析,在 <http://www.expasy.ch/tools/pi> 上进行蛋白质理化性质的预测。利用 PredictProtein 服务器对 *EcR* 蛋白序列进行功能位点分析(PROSITE motif search),利用 SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)\_tool.html)工具进行蛋白信号肽的预测,采用 Vector NTI Advance 10.3 软件和 ClustalW 软件将克隆的序列和已知的其他物种的氨基酸序列进行比对及同源性分析,用 MEGA 4.1 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树。

## 1.6 急性盐度胁迫实验

本研究选择 11、30 和 45 共 3 个盐度分别作为低盐、对照和高盐 3 个实验处理组,每个处理组设 3 个平行,各实验组盐度由天然海水加海水晶或 24 h 曝气自来水配制而成。三疣梭子蟹由室外养殖池塘转移到盐度为 30 的海水中暂养 7d 开始试验。每个处理的每个平行分别挑选 30 只健康个体进行实验,分别于胁迫后 0、3、12、24、48、72h 取肝胰腺组织,液氮保存,用于 RNA 的提取,每个时间点取 6 只。另取 3 只健康三疣梭子蟹的肝胰腺、鳃、肌肉、心脏和眼柄组织,液氮保存,用于测定 *EcR* 基因在不同组织中的表达分析。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 The sequence of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
ECR-F1	ACAACCTGTGARATGGAYATGTA
ECR-R1	GCCTTGAGSAGDGTAAATCTGGTC
ECR-race5'	TTTGAGGCGACATTCTTGACACTTGCGT
ECR-race3'	TTCTCCAAGCAACTACCAGGTTTCGGCA
EcR-F	CAGTGCGTGGTGAAGAGAGA
EcR-R	GCAGACATTGGACTTGTGG
18-F	AGGAGGAGGTTGAGAAGATTGT
18-R	GCAGCTTGGTTCCAGGTAG

1.7 EcR 基因 mRNA Real-time PCR 定量检测

取三疣梭子蟹各个组织和经盐度胁迫后的不同时间点的肝胰腺组织的 cDNA,用 DEPC 水稀释 10 倍作为模板,进行 EcR 基因的表达量检测。荧光定量 PCR 扩增体系为 25μl,包括:SYBR Premix Ex Taq™ II(2×)12.5μl, ROX Reference Dye II 0.5μl,cDNA 模板 2μl,PCR 正反引物(10μmol/L)各 1μl,DEPC 水 8μl。三疣梭子蟹 EcR 基因荧光定量引物 EcR-F 和 EcR-R(表 1),以三疣梭子蟹 18S rRNA 为内参基因(表 1)。荧光定量 PCR 反应条件: 95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环。每个样品设 3 个平行。实验使用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 荧光定量 PCR 仪,采用 2^-ΔΔCT 法进行数据分析,用 SPSS 11.0 软件进行显著性分析(P<0.05)。

1.8 数据分析

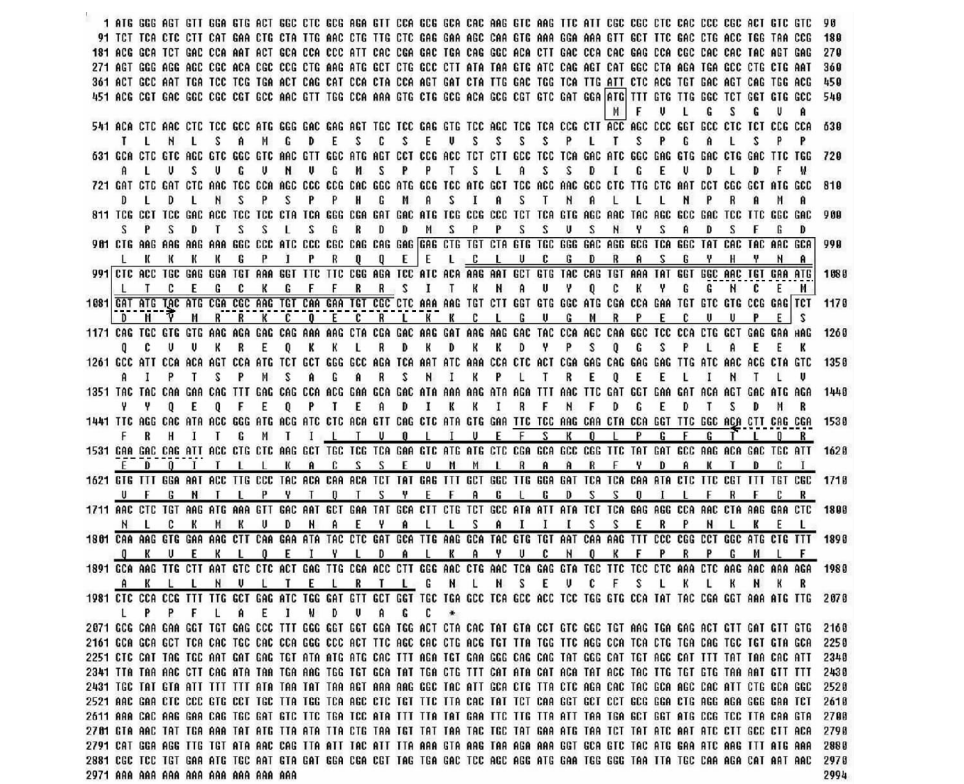
所得数据均表示为平均数±标准误(Mean±SE),采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析,并进行 Duncan's 多重比较(P<0.05)。

2 结果

2.1 EcR 基因全长 cDNA 序列分析

采用 RACE 方法扩增获得三疣梭子蟹 EcR 基因全长 cDNA 序列,GenBank 登录号:JQ250795。EcR 基因全长 2 996bp,其中,开放阅读框(ORF)为 1 512bp,5'和 3'的非编码区分别为 515bp 和 969bp,编码一个由 503 个氨基酸组成的多肽,预测分子量为 55.69kDa,理论等电点为 7.33。用 SignalP 3.0 软件对三疣梭子蟹 EcR 蛋白序列进行信号肽分析,结果显示,EcR 蛋白中不存在信号肽,推测 EcR 蛋白是非分泌型蛋白。

将三疣梭子蟹 EcR 蛋白序列在 NCBI 上进行保守结构区域搜索,预测到核激素受体家族中所特有的两个保守功能结构域(图 1),即位于 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)的锌指结构 ZnF\_C4 和位于配体结合域(Ligand binding domain, LBD)的 HOL1。



注:虚线箭头指示的为简并引物位置,实线指示的为 3'race 引物序列,虚线指示的为 5'race 引物序列,方框内的 ATG 为起始密码子,终止密码子由 \* 表示,双划线区为高度保守的 DNA 结合功能域,实线框内的序列为位于 DNA 结合域的 C4 锌指结构,粗实线指示的序列为位于配体结合域的配体结合区。

Locations of degenerate primers used for RT-PCR to obtain the initial cDNA are indicated with a dashed line with solid arrowhead. Locations of sequence specific forward primers used to obtain 3'race sequence are indicated with solid lines. Dashed lines indicate locations of sequence specific primers used to obtain 5'race sequence. The letter with the box indicate the start codon (ATG) and "\*" indicate the stop codon (TGA). The highly conserved DNA-binding domain is double underlined and the zinc fingers are indicated with real line boxes.

The sequence of ligand pocket is underlined with bold line.

图 1 三疣梭子蟹 EcR 基因的核苷酸序列及其氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and amino acid sequence of EcR in P. trituberculatus

利用 Predictprotein 对三疣梭子蟹 EcR 蛋白序列进行功能位点分析 (PROSITE motif search)。结果如图 1 所示, 该蛋白序列具有多个功能位点, 包括: 两个 N 端糖基化位点 (12~15、121~124), 6 个酪蛋白磷酸化位点 (20~23、100~103、108~111、126~129、289~292、380~383), 7 个肉蔻酰基位点 (5~10、45~50、242~247、259~264、386~391、456~461、473~478), 3 个蛋白激酶 K 磷酸化位点 (108~110、421~423、482~484), 两个酪氨酸激酶磷酸化位点 (231~238、403~411), 1 个核受体 DNA 结合区 (145~171), 1 个配体结合区 (319~472)。

## 2.2 EcR 基因多序列比对及系统进化树分析

使用 ClustalW 1.8 软件对三疣梭子蟹 EcR 氨基酸序列进行同源序列分析, 结果见图 3。三疣梭子蟹 EcR 基因与青蟹 *Carcinus maenas*、拟穴青蟹 *Scylla paramamosain*、大西洋砂招潮蟹 *Uca pugilator*、陆地蟹 *Gecarcinus lateralis*、美洲螯虾 *Homarus americanus*、褐虾 *Crangon crangon*、日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* 的同源性分别为 94%、90%、88%、84%、82%、73%、66%; 与节肢动物的 EcR 基因同源性也较高, 其中与切叶蜂 *Megachile rotundata*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria*、云南小蜜蜂 *Apis florea*、灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的同源性分别为 66%、68%、54% 和 57%。利用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树并分析, 结果表明, EcR 基因分为甲壳动物和节肢动物两支, 三疣梭子蟹 EcR 基因与甲壳动物中的岸蟹、拟穴青蟹聚为一支 (图 2)。

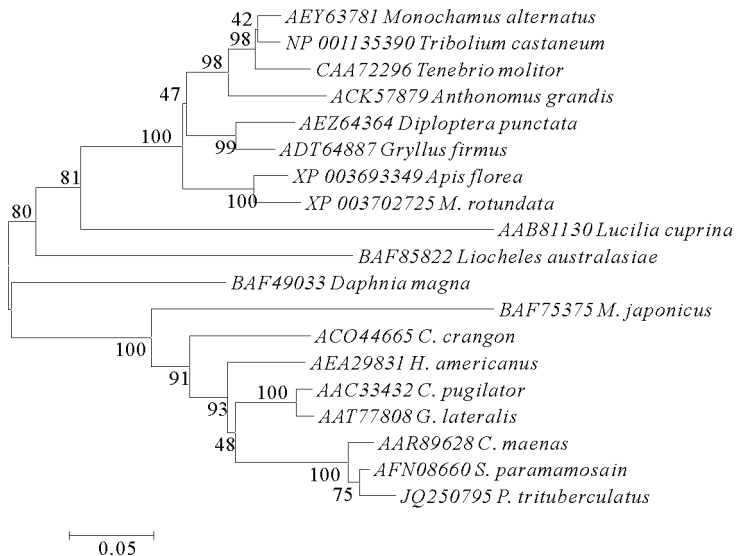


图 2 不同物种的 EcR 基因系统进化树

Fig. 2 EcR phylogenetic tree of different species

通过与招潮蟹、太平洋折翅螯、美洲螯虾、日本囊对虾、黄粉虫等其他动物的蜕皮激素受体氨基酸序列进行对比, 推导出 EcR 也包含典型核受体的 5 个结构域: A、B、C、D、E 和 F (从 N 末端到 C 末端) 5 个区域, 这与那些已知结构的 EcR 是一样的 (图 3)。

## 2.3 EcR 基因在三疣梭子蟹各组织中的表达

Real-time PCR 结果表明, 蜕皮激素受体基因在心脏、肌肉、肝胰腺、卵巢、鳃和眼柄中都有表达。在肝胰腺中表达量最高, 其次是卵巢, 在心脏中表达最少 (图 4)。

Real-time PCR 检测三疣梭子蟹肝胰腺在盐度胁迫 (高盐、低盐) 下的各个时间点 EcR 基因转录表达的变化如图 5 所示。高盐胁迫下, EcR 基因的表达量在 3h 内高于对照组, 之后逐渐下降, 24h 后显著低于对照组, 总体呈下降趋势; 低盐胁迫条件下, EcR 转录组的表达量呈现先降低后上升的趋势, 在 12h 达到最低, 之后逐渐上升, 在 48h 之后显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

<i>C. pugilator</i>	MAKVIATARVDGMFVLGSGVATLNLSTMGDESCSEVSSSSPLTSPGALSFFALVSVGVSVGMSPPTSTASSDIGVVDLDFWDLINSPSPPHGMA	95
<i>D. punctata</i>	...MISITWTFSPYRVKGMRRPILHQQ...MADIPVSSSSFA.....MTASGGELLSPFPSTIGSSDPIGVMDLDFWDLINSGHARSG..	77
<i>H. americanus</i>	..AKVLTTGRVGGIYVLGSGVATLNLSTMGDESCSEVSSSSPHTSPGALSFFALVSVGVSVGMSPPTSTASSDIGVVDLDFWDLINSHSPPHGMA	94
<i>M. japonicus</i>	...MESLSPFPSPNMGAMGGQPSN...AGSTLSSSY...EPSSYFPRVSRNCNWEIDKCEHIS.....	61
<i>P. trituberculatus</i>	.....MFLVLSGVATLNLSTMGDESCSEVSSSSPLTSPGALSFFALVSVGVSVGMSPPTSTASSDIGVVDLDFWDLINSPSPPHGMA	83
<i>T. molitor</i>	.....MKRRRSGLCAVRVTPE...ESSSEVSSST.....TLVMSFANSHASDIDIGVVDLDFWDLINGAQRQRTH	64
Consensus	g sss sp v l d	
<i>C. pugilator</i>	SVASTN...ALLNFRPAVASDSTS...LSGGRDMSHSSLSNFGADSYGLKRRKGFPRQOEELCLVCGDRASGYHNALTCBGCKGFRRSI	185
<i>D. punctata</i>	.....ILRHGGGGPCSDTSGISGGRDLSHSSLSNGHTFDGC...LAKRRKGFPRQOEELCLVCGDRASGYHNALTCBGCKGFRRSI	159
<i>H. americanus</i>	AAASTTT...SLLVNPRSLTALSDTS...LSGGRDMSHSS...LNNYGTDSYSLKRRKGFPRQOEELCLVCGDRASGYHNALTCBGCKGFRRSI	184
<i>M. japonicus</i>	.....QLLISLKP...LSGGRDMSHSSSYNGYGTSS...LAKRRKGFPRQOEELCLVCGDRASGYHNALTCBGCKGFRRSI	133
<i>P. trituberculatus</i>	SIASTN...ALLNFRPAVASDSTS...LSGGRDMSHSSLSNFGADSYGLKRRKGFPRQOEELCLVCGDRASGYHNALTCBGCKGFRRSI	173
<i>T. molitor</i>	YHSKRWIPIGHTIIASNHHLAKSDTS...LSGGRDLSHSSLSNGYSADSC...LAKRRKGFPRQOEELCLVCGDRASGYHNALTCBGCKGFRRSI	156
Consensus	sd gr d s s d kkkkqp prqoeelclvcdrasgyhnaltcegcgkffrrsi	
<i>C. pugilator</i>	TKNAVYQCKYGNCEIDMYMRRKQCCELRKLCISVGMREPCVVPESQCVKREKRRAR...DKDR...TYPSTIGSIAEDKAAIPSPVSKD.....	270
<i>D. punctata</i>	TKNAVYQCKYGNCEIDMYMRRKQCCELRKLCISVGMREPCVVPESQCVKREKRRAR...DKDR...KMDYPSGSHIAEKKAIINFCPKGSPITASM	245
<i>H. americanus</i>	TKNAVYQCKYGNCEIDMYMRRKQCCELRKLCISVGMREPCVVPESQCVKREKRRAR...DKDR...KDYPSGSHIAEKKAIINFCPKGSPITASM	278
<i>M. japonicus</i>	TKNAVYQCKYGNCEIDMYMRRKQCCELRKLCISVGMREPCVVPESQCVKREKRRAR...GKHKKEYFPYGSIAEKKTAIVSPCNTMGPEQRTS	227
<i>P. trituberculatus</i>	TKNAVYQCKYGNCEIDMYMRRKQCCELRKLCISVGMREPCVVPESQCVKREKRRAR...DKDR...KDYPSGSHIAEKKAIPTSP.....	255
<i>T. molitor</i>	TKNAVYQCKYGNCEIDMYMRRKQCCELRKLCISVGMREPCVVPESQCVKREKRRAR...DKDR...PMSSTTSGSDIVKIEP...ELSDS.....	240
Consensus	tknavyqckygnceidmyrrkqcceclrkklcivgmrepcvvpesqcvkrkkkdkdrpmssttsgsdvkiep...elstds.....	
<i>C. pugilator</i>	.....MSAAPRLNVRKELTREQEE...LHNLVYVQGEFECFCHALIKRIRFN...FDGETTSMFRHRTHEMTILTTLVQLIVE	341
<i>D. punctata</i>	.....EKLPSVNGVKVPSFQEE...LHQLVYVQGEFESSEIDIKRINQPCDGEQSLKRFMTTEITTLVQLIVE	317
<i>H. americanus</i>	QKRTL...VGSNITLSMPTMFRNIKELTREQEE...LHNLVYVQGEFECFCHALIKRIRFN...FDGETTSMFRHRTHEMTILTTLVQLIVE	364
<i>M. japonicus</i>	TSYTYNKLAYAGCISLNLSPVQPIKENMPVMTSDQEE...LHNLVYVQGEFECFCHALIKRIRFN...FDGETTSMFRHRTHEMTILTTLVQLIVE	320
<i>P. trituberculatus</i>	.....MSAGARSNIKELTREQEE...LHNLVYVQGEFECFCHALIKRIRFN...FDGETTSMFRHRTHEMTILTTLVQLIVE	326
<i>T. molitor</i>	.....EKT.LTNGRNRISEQEE...LHNLVYVQGEFECFCHALIKRIRFN...FDGETTSMFRHRTHEMTILTTLVQLIVE	313
Consensus	qee li lv q e p d k i d f t tiltvqli e	
<i>C. pugilator</i>	FSKQLPGFDLIREQDQILLKACSSEVMRFRARRYIAKTSIVFGNNPYTCASHALAGIGESAELFRFCRSLCKMKVDNAEYALLAATIF	435
<i>D. punctata</i>	FARRLPGFDLIREQDQILLKACSSEVMRFRARRYVNSDSTLFAANNCPYRISLSIAGGCTTETDMRFRFCRGMVPMKVDNAEYALLAATIF	411
<i>H. americanus</i>	FSKQLPGFDLIREQDQILLKACSSEVMRFRARRYIAKTSIVFGNNPYTCASHALAGIGESAELFRFCRSLCKMKVDNAEYALLAATIF	458
<i>M. japonicus</i>	FSKQLPGFDLIREQDQILLKACSSEVMRFRARRYIAKTSIVFGNSYFYRESEVEAGIGFSAPLFRFCRNLCKMKVDNAEYALLAATIFS	415
<i>P. trituberculatus</i>	FSKQLPGFDLIREQDQILLKACSSEVMRFRARRYIAKTSIVFGNTLPIYQTSVEHAGIGDSSQLFRFCRNLCKMKVDNAEYALLAATIFS	420
<i>T. molitor</i>	FARRLPGFDLIREQDQILLKACSSEVMRFRARRYVQVDSILHVNCPYRISLSIAGGCTTETDMRFRFCRGMVPMKVDNAEYALLAATIF	407
Consensus	f k l q f l edqi llkacssevmmr r ar yd i f n py y ag g fcr mkvdnaeyall a i	
<i>C. pugilator</i>	SRRNSLHGKVKKEICEIYLDAIKAVVNRFRS...MVFAKLLNVLTELRLTGNNSEMCSLILKKNRLELPELIEWDWSGY	518
<i>D. punctata</i>	SRRNSLHGKVKKEICEIYLDAIKAVVNRFRS...GTFKALLSVLTELRLTGNNSEMCSLILKKNRLELPELIEWDWSGY	493
<i>H. americanus</i>	SRRNSLHGKVKKEICEIYLDAIKAVVNRFRS...AMVFAKLLNVLTELRLTGNNSEMCSLILKKNRLELPELIEWDWSGY	541
<i>M. japonicus</i>	ADRRLHGKVKKEICEIYLDAIKAVVNRFRS...GKLLNVLTELRLTGNNSEMCSLILKKNRLELPELIEWDWSGY	499
<i>P. trituberculatus</i>	SRRNSLHGKVKKEICEIYLDAIKAVVNRFRS...GMIFAKLLNVLTELRLTGNNSEMCSLILKKNRLELPELIEWDWSGY	503
<i>T. molitor</i>	SRRNSLHGKVKKEICEIYLDAIKAVVNRFRS...GTFKALLSVLTELRLTGNNSEMCSLILKKNRLELPELIEWDWSGY	490
Consensus	rp l e kv k qeily al yv n kll ltelrltgn nse c l k lp l eiwdv	

相同的氨基酸用暗色背景表示;缺失的氨基酸用“.”表示;所使用 EcR 基因的 GenBank 登录号见图 2

The identical residues are indicated by gray shadow; Missing residues are shown as “.”; GenBank accession numbers are listed in Fig. 2

图 3 三疣梭子蟹 EcR 氨基酸序列与其他动物 EcR 的氨基酸序列对比

Fig. 3 Multiple alignment of EcR amino acid sequence of *P. trituberculatus* with other animals

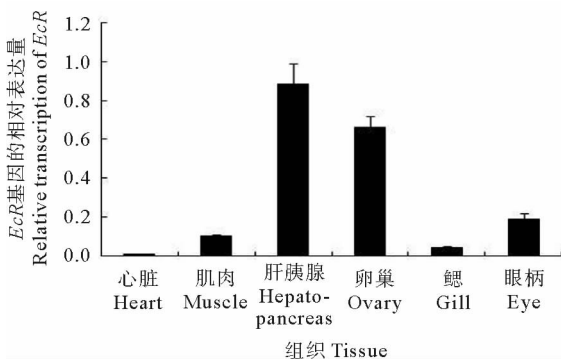


图 4 三疣梭子蟹 EcR 基因在器官/组织中表达量  
Fig. 4 Distribution of EcR transcript in different organs/tissues

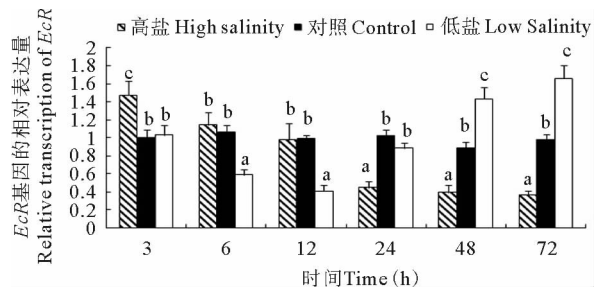


图 5 三疣梭子蟹 EcR 基因盐度胁迫条件下不同时间点的表达量  
Fig. 5 Distribution of EcR transcript of *P. trituberculatus* at different time under the salinity stress

### 3 讨论

本研究首次克隆了三疣梭子蟹蜕皮激素受体 EcR 的 cDNA 序列,全长 2 996bp,编码一个由 503 个氨基酸

组成的多肽,通过与已知的 EcR 氨基酸序列比对发现,该序列具有典型的核受体超家族的特征,包含两个主要结构域:高度保守的 DNA 结合域(DNA-binding domain, DBD)和位于羧基端的配体结合域(Ligand binding domain, LBD)(Reinking *et al.* 2005)。其蛋白序列包含糖基化、磷酸化、酰基化等多个功能位点,有助于进一步研究蛋白质的主要定位、稳定性结构以及功能作用的发现。同源性及系统进化分析发现,三疣梭子蟹 EcR 与甲壳动物的同源性最高,N 端氨基酸序列显著不同,说明 EcR 基因具有较强的特异性。甲壳动物和节肢动物 EcR 基因分别聚为两支,三疣梭子蟹 EcR 基因与甲壳动物中的岸蟹、拟穴青蟹、大西洋砂招潮蟹和陆地蟹亲缘关系最近,推测与物种的差异性和特殊性相关。

EcR 基因的表达具有组织特异性,Real-time PCR 结果显示,三疣梭子蟹 EcR 在肝胰腺、卵巢、肌肉、鳃、眼柄和心脏中均有表达,而在肝胰腺中表达量最高,其次是卵巢,推断三疣梭子蟹的肝胰腺、卵巢是蜕皮激素受体的主要合成场所。

甲壳动物的蜕皮受蜕皮激素的严格调控(Lachaise *et al.* 1993; Hopkins *et al.* 1992; 亓一舟等 2010),目前对其信号转导研究主要集中在蜕皮激素(20E)的核受体信号途径上,整个调控过程是 20E-EcR-RXR 配体-受体复合物引发的 20E 应答基因级联放大反应(Riddiford *et al.* 2001; Durica *et al.* 2002; 李康等 2011; 赵小凡 2010)。蜕皮激素(20E)与核受体 EcR 和类视黄酸 X 受体(RXR)异二聚体复合物在细胞核内形成转录复合体,在分子伴侣等辅助因子的协助下获得 DNA 结合活性并启动下游基因的转录,调控 EcR、RXR 等初级应答基因的表达,这些转录因子再进一步调控蜕皮的下游基因表达,如蛋白酶的表达。另外,通过结合蜕皮激素使蜕皮激素水平下降,还可以达到反馈调节的目的(Tan *et al.* 2008; Spindler *et al.* 2009; 郭恩恩等 2008)。因此, EcR 作为蜕皮激素的作用靶标,处于甲壳动物蜕皮过程的级联反应启动关键位置,在转录水平上传递 20E 信号,是参与蜕皮调控作用的重要因子之一。

甲壳动物的蜕皮活动伴随着整个生命过程,一般认为甲壳动物的生长必须要通过蜕皮来实现个体的阶梯式增长(李康等 2011)。甲壳动物的蜕壳一方面受到体内蜕壳激素的调控,另一方面还受到温度、盐度、光照、营养水平等环境因子的影响(Lachaise *et al.* 1993)。近年来,在育苗和养殖生产中,常常采用添加淡水的方法降低盐度来提高甲壳动物的蜕皮频率,以达到促进生长的目的(黄加琪等 2003)。盐度的变化能够直接影响甲壳动物的蜕皮和生长。有节律地降低盐度可以缩短中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 的蜕皮周期,提高蜕皮率,加快其生长(Mu *et al.* 2005)。青蟹在盐度 15 的蜕壳率明显高于盐度 25 实验组(于忠利等 2010)。罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*、斑节对虾 *Penaeus monodon* 等广盐性物种在低盐环境下蜕壳周期较短,也有低盐环境加快蜕皮的现象(徐桂荣等 1997; 杨其彬等 2008)。鉴于盐度对蜕皮活动的影响以及 EcR 在蜕皮调控过程中发挥的重要作用,本研究探讨了急性盐度胁迫与 EcR 基因的相关性,结果显示,在急性高盐胁迫下, EcR 基因的表达量总体呈下降趋势,在 24 h 后显著低于对照组;低盐条件下, EcR 转录组的表达量呈现先降低后上升的趋势,在 12 h 达到最低,之后逐渐上升,在 48h 之后显著高于对照组,说明水环境盐度的急剧变化能够显著影响 EcR 基因在肝胰腺中的表达量,并且在适应急性盐度变化过程具有一定的时间滞后性。高盐度胁迫下,24 h 后 EcR 的表达量显著降低,其在蜕皮信号传递中的作用也相应减弱;相反,在低盐环境 48 h 之后, EcR 的表达量显著上升,增强其在蜕皮信息传递中的作用,扩大下游基因的转录表达,促进蜕皮。推断盐度通过影响蜕皮激素受体 EcR 在机体内表达量的变化,从而影响其在蜕皮调控信息传递中的作用,进而影响机体的蜕皮活动。

本研究首次成功克隆了三疣梭子蟹 EcR 基因 cDNA 全长,通过分析急性盐度胁迫下的三疣梭子蟹肝胰腺中 EcR 基因的表达特征,确定水环境盐度的急剧变化能够显著影响参与蜕皮调控因子 EcR 在机体的表达量,推断外界环境的变化引起机体内源因子的变化是盐度影响蜕皮的机制之一,甲壳动物的蜕皮过程涉及了一系列激素、酶以及调控因子等的参与,而且受到生长环境盐度、温度等因子的影响,对其调控机理的研究还需要后续大量深入的研究来充实。

## 参 考 文 献

- 元一舟, 朱冬发, 杨济芬, 苏青. 2010. 甲壳动物蜕皮抑制激素调控机制的研究进展. 动物学杂志, 45(2): 165-170
- 王冲, 姜令绪, 王仁杰, 李玉全. 2010. 盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响. 水产科学, 29(9): 510-514
- 李英, 王芳, 董双林, 孙皓. 2010. 盐度突变对凡纳滨对虾稚虾蜕皮和呼吸代谢的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 40(7): 47-52
- 李康, 李胜, 曹阳. 2011. 蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制. 昆虫学报, 54(8): 933-937
- 杨其彬, 叶乐, 温为庚, 王雨, 江世贵. 2008. 盐度对斑节对虾蜕壳、存活、生长和饲料转化率的影响. 南方水产科学, 4(1): 16-21
- 陈辉, 王文清, 朱小玲. 2009. 日本沼虾蜕皮激素受体(EcR)的 cDNA 克隆及其在胚胎发育过程中的表达分析. 海洋渔业, 31(4): 347-356
- 赵小凡. 2010. 昆虫蜕皮激素信号转导途径研究进展. 生命科学, 22(12): 1208-1214
- 郭恩恩, 李胜, 曹阳. 2008. 昆虫蜕皮的激素网络调控. 蚕业科学, 34(2): 370-374
- 徐桂荣, 朱正国, 臧维玲, 戴习林, 江敏, 于万玲, 王为东. 1997. 盐度对罗氏沼虾幼虾生长的影响. 上海水产大学学报, 6(2): 124-127
- 黄加琪, 林琼武. 2003. 影响日本对虾蜕壳因素的探讨. 海洋科学, 27(2): 30-31
- 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝. 1986. 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社, 194-196
- Asazuma H, Nagata S, Kono M, and 1 other. 2007. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. Comp Biochem Physiol, Part B 148(2): 139-150
- Beckstead RB, Lam G, Thummel CS. 2005. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. Genome Biol 6(12): R99
- Bray WA, Lawrence AL, Leung-Trujillo JR. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* with observations on the interaction of IHVN virus and salinity. Aquaculture 122(2-3): 133-146
- Chung ACK, Durica DS, Hopkins PM. 1998. Tissue-specific patterns and steady-state concentrations of ecdysteroid receptor and retinoid-X-receptor mRNA during the molt cycle of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Gen Comp Endocrinol 109(3): 375-389
- Durica DS, Wu X, Anilkumar G and 2 others. 2002. Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol 189(1-2): 59-76
- Hopkins PM. 1992. Hormonal control of the molt cycle in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Am Zool 32(3): 450-458
- Kim HW, Chang ES, Mykles DL. 2005. Three calpains and ecdysone receptor in the land crab *Gecarcinus lateralis*: sequences, expression and effects of elevated ecdysteroid induced by eyestalk ablation. Exp Biol 208(16): 3177-3197
- Lachaise A, Le Roux A, Hubert M and 1 other. 1993. The molting gland of crustaceans: Localization, activity, and endocrine control (a review). Crustacean Biol 13(2): 198-234
- Mu YC, Wang F, Dong SL and 1 other. 2005. The effects of salinity fluctuation in different ranges on intermolt period and growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. Acta Oceanologica Sinica 27(2): 122-126
- Reinking J, Lam MM, Pardee K and 8 others. 2005. The *Drosophila* nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive. Cell 122(2): 195-207
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW. 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. Vitam Horm 60: 1-73
- Spindler KD, Hönl C, Tremmel CH and 3 others. 2009. Ecdysteroid hormone action. Cell Mol Life Sci 66(24): 3837-3850
- Tan A, Palli SR. 2008. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Mol Cell Endocrinol 291(1-2): 42-9
- Thummel CS. 1995. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. Cell 83(6): 871-877