

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170328001

http://www.yykxjz.cn/

许杨, 王佳佳, 葛倩倩, 崔彦婷, 马骊, 李健. 脊尾白虾 *E75* 基因克隆及 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 在不同蜕皮分期的表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 110–118

Xu Y, Wang JJ, Ge QQ, Cui YT, Ma L, Li J. Cloning of *E75* gene and expression analysis of *E75*, *ECR* and *RXR* during different molting stages of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 110–118

## 脊尾白虾 *E75* 基因克隆及 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 在不同蜕皮分期的表达分析\*

许 杨<sup>1</sup> 王佳佳<sup>1</sup> 葛倩倩<sup>1</sup> 崔彦婷<sup>1</sup> 马 骊<sup>1</sup> 李 健<sup>1,2①</sup>

- (1. 农业农村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;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究在克隆脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) *E75* 基因 (*EcE75*, GenBank No. KY471317) 的基础上, 探讨了其在蜕皮过程中的作用, 同时也探讨了克隆脊尾白虾的蜕皮激素受体基因 (*EcECR*) 和维甲酸 X 受体基因 (*EcRXR*) 在不同蜕皮分期的表达特征。克隆的 *EcE75* 基因全长为 3944 bp, 包括 2520 bp 的开放阅读框 (ORF)。该开放阅读框编码一个由 839 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 92.307 kDa, 理论等电点为 7.48。EcE75 蛋白包含 1 个 C4 锌指结构, 1 个配体结合结构域, 并且有 1 个明显的跨膜螺旋。*EcE75* 基因在进化上具有一定的保守性, 与甲壳动物聚为一支, 与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、黑背地蟹 (*Gecarcinus lateralis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 等亲缘关系最近。*EcE75* 基因在脊尾白虾的各组织中均有表达, 其中, 眼柄中的表达量最高, 卵巢次之。在不同蜕皮分期中, *EcRXR* 与 *EcECR*、*EcE75* 的表达规律基本一致, 生殖蜕皮前期和后期表达量都比生长蜕皮高。生长蜕皮和生殖蜕皮因为卵巢发育而存在明显不同, 蜕皮激素对卵巢发育的刺激作用, 通过 *EcECR*、*EcRXR* 和 *EcE75* 基因的表达上调可以体现出来。对 *EcECR*、*EcRXR* 和 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的表达研究, 为了解虾蟹类蜕皮机制提供了参考信息。

**关键词** 脊尾白虾; *EcECR*; *EcRXR*; *EcE75*; 蜕皮期

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0110-09

蜕皮贯穿甲壳动物的整个生活史, 与其生长、发育和繁殖息息相关。蜕皮主要受互为拮抗的 Y-器官分泌蜕皮激素 (MH, 蜕皮甾类) 和眼柄内 X-器官窦腺复合体分泌蜕皮抑制激素 (MIH) 影响。蜕皮激素是调控甲壳动物蜕皮及变态发育的重要激素, 它的活性形

式是 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E)。在昆虫体内, 蜕皮激素受体 (Ecdysteroid receptor, ECR) 与超气门蛋白 (Ultraspiracle, USP) 形成异源二聚体, 在甲壳动物体内, ECR 与维甲酸 X 受体 (Retinoid X receptor, RXR) 形成异源二聚体 (Yao *et al.*, 1994;

\* 现代农业产业技术体系专项 (CARS-48)、泰山产业领军人才工程项目 (LJNY2015002) 和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目 (2015ASKJ02) 共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), and Science and Technology Innovation Project of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 许 杨, E-mail: aspenxy@163.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-03-28, 收修改稿日期: 2017-04-28

Verhaegen *et al.*, 2011)。这些二聚体与 20E 结合后形成的受体复合物直接激活 *E75* 等蜕皮激素早期应答因子, 形成初级应答反应(Riddiford *et al.*, 2003; Thummel *et al.*, 2002)。早期应答因子诱导表达的蜕皮激素次级应答基因级联放大蜕皮激素信号, 对蜕皮、变态、生殖等生理过程起调控作用(Dubrovsky *et al.*, 2005)。在昆虫中, *E75* 基因首先在果蝇(*Drosophilidae*)中分离得到, Crossgrove 等(2008)研究表明, *E75* 对果蝇的蜕皮、变态及成虫雌蝇的卵室发育有重要作用。果蝇存在 *E75A*、*E75B* 和 *E75C* 三种亚型, *E75A* 突变使幼体发育过程中蜕皮激素水平降低, 导致发育迟缓、蜕皮缺陷等现象(Bialecki *et al.*, 2002)。*E75B* 突变对生长发育和繁殖无明显影响, *E75C* 突变导致果蝇在成虫期死亡。在甲壳动物中, *E75* 首先在刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)中分离鉴定, 而后又在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、黑背陆地蟹(*Gecarcinus lateralis*)和大型蚤(*Daphnia magna*)等物种中被分离鉴定(Chan, 1998; Priya *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2005; Hannas *et al.*, 2010; Litoff *et al.*, 2014)。对 *E75* 在甲壳动物蜕皮激素信号转导中的作用研究较少。

学者们对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的蜕皮相关基因进行了研究, 梁俊平等(2015)克隆了 *ECR* 基因, 并分析其在卵巢和胚胎发育过程中的表达情况。柳飞等(2016)克隆了 *RXR* 基因, 并分析其在温度、盐度胁迫和蜕皮周期中的表达情况。张美等(2016)克隆了 *MIH* 基因, 并分析其在 pH 和氨氮胁迫中的表达规律。而关于脊尾白虾的 *E75* 基因的研究至今尚未见报道。因此, 本研究结合脊尾白虾转录组数据库, 运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆 *EcE75* 基因 cDNA 全长, 通过荧光定量 PCR 分析了该基因在脊尾白虾的组织表达分布及在不同蜕皮分期 *EcRXR*、*EcECR* 和 *EcE75* 的表达规律, 以比较生长蜕皮和生殖蜕皮的不同, 为了解虾蟹类蜕皮机制提供参考信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

脊尾白虾取自山东省日照海辰水产有限公司, 均为活力好、大小均匀的健康个体, 体长为(5.42±0.34) cm, 体重为(1.58±0.22) g。将实验用虾暂养于 200 L 的 PVC 桶中, 每桶 50 尾, 暂养海水盐度为 31, pH 为 8.2, 水温为 24℃, 24 h 持续通气充氧。每天早晚 2 次饲喂蛤蜊肉, 吸污换水 1/3, 连续养殖 7 d

后开始实验。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 2 种蜕皮的区分及样品处理** 未性成熟的脊尾白虾处于生长期, 该组实验虾的蜕皮为生长蜕皮。性成熟的实验虾分为卵巢发育虾和抱卵虾, 其中, 卵巢发育且带有腹蓝者的蜕皮为生殖蜕皮。根据中华锯齿米虾(*Neocaridina denticulata sinensis*)(王战芳, 2014)和凡纳滨对虾(Gao *et al.*, 2015)的方法进行蜕皮分期, 分为蜕皮间期(C 期)、蜕皮后期(软皮期, AB 期)、蜕皮前期(D 期, 取自特征明显的 D2 亚期)。实验用虾暂养 1 周后, 挑选活力好、无残缺的个体, 用解剖剪剪取尾节末端, 置于倒置显微镜, 观察分期并拍照。将确定分期的脊尾白虾每尾虾取 0.1 ml 血与 0.1 ml 预冷的抗凝剂混合, 于 4℃ 下 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后加入 1 ml Trizol, 然后, 再采集肝胰腺、鳃、肌肉、肠、胃、眼柄、大颚器、表皮、外壳、腹神经节、卵巢和心共 12 种组织。液氮研磨后, 称取 50 mg 样品, 置于无 RNA 酶离心管中, 并加入 1 ml Trizol, 震荡混匀后, 置于-80℃ 冰箱保存。每个平行取 3 尾, 每个蜕皮分期共 3 个平行。

**1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成** 采用 Trizol 试剂法提取各组织的总 RNA, 核酸定量仪(NanoDrop 2000, Thermo)测定纯度, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测浓度及完整性。利用 SMART™ RACE Amplification Kit (Clontech)合成 cDNA 模板。

**1.2.3 *EcE75* 基因 cDNA 全长的克隆** 根据实验室脊尾白虾转录组数据和 NCBI 上 Blast 的比对结果, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 *E75-F* 和 *E75-R*(表 1), 以 1.2.2 中合成的 cDNA 为模板, 使用 HiFi 酶进行 *EcE75* 基因中间片段的扩增。扩增体系: cDNA 模板 1 μl, HiFi Buffer 2 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μl, 引物(上、下游)各 1 μl, HiFi 酶 (5 U/ml) 0.2 μl, 灭菌水补至 20 μl。

PCR 反应程序: 95℃ 5 min; 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保温。PCR 产物经 1.0% 的 TAE 琼脂糖凝胶电泳初步检测后, 使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (TaKaRa)切胶回收, 并纯化检测。切胶回收产物与 pEASY-T1 载体连接后, 将 5 μl 连接产物转化到 50 μl Trans1-T1 感受态细胞中。在含 AMP、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基中, 37℃ 培养过夜, 挑取单一白斑菌落继续培养 6 h。菌落 PCR 鉴定后, 将含有目的条带的菌液送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果经 NCBI 比对, 此序列片段与其他物

种的 *E75* 基因同源性较高,确定为脊尾白虾的 *E75* 基因序列片段。

根据上述扩增得到的中间片段利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5'RACE 引物 *E75* 3'RACE 和 *E75* 5'RACE(表 1),用于 RACE 扩增 *E75* 基因 cDNA 全长序列。使用 Smart Race 试剂盒(TaKaRa)进行 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增,扩增体系为 3'/5'RACE cDNA 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$ Advantage 2 PCR Buffer 2.0  $\mu$ l, dNTP(10 mmol/L) 0.2  $\mu$ l, 3'/5'引物格 0.2  $\mu$ l, 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase 0.2  $\mu$ l, UPM(10 $\times$ ) 1  $\mu$ l, PCR 级 H<sub>2</sub>O 6.9  $\mu$ l。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 10 个循环,每个循环退火温度降 0.5 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与基因中间片段的克隆方法相同。

### 1.3 *EcE75* 基因的生物信息学分析

使用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序将测序所得的中间片段和 3'、5'末端序列进行拼接,得到 *EcE75* 基因全长。利用 ExPASy(<http://www.expasy.ch/tools/>)和 Gene Tool 软件预测开放阅读框(ORF)和蛋白质序列。使用 Predict Protein 和 SMART 服务器进行蛋白质理化性质预测和功能结构域分析。使用 TMpred 进行跨膜结构域预测。使用 ClustalX 和 DNAMAN 软件对脊尾白虾和其他物种的 *E75* 氨基酸序列进行比对分析,并用 MEGA 6.07 软件以邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树,1000 次 Bootstrap 重复检验进化树的置信度。

### 1.4 *EcE75* 基因组织表达分析

根据已获得的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异引物 *E75RT-F* 和 *E75RT-R*,并以脊尾白虾 18S rRNA 为内参基因设计引物 18sF 与 18sR(表 1)。利用 Real-time PCR 检测脊尾白虾不同组织 *E75* 基因的相对表达量。反应体系和程序参考 FS Universal SYBR Green Master(ROX)说明书,采用 10  $\mu$ l 反应体系。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s。实验中每 3 尾混合作为 1 个样品,每个样品进行 3 次重复,数据为 3 个重复的平均值 $\pm$ 标准差,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算脊尾白虾 *E75* 基因在各组织中的相对表达量。

### 1.5 *EcRXR*、*EcECR* 和 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的组织表达分析

根据 GenBank 的基因序列 *EcRXR* (GenBank No.

表 1 研究所用的引物序列

Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence
<i>E75-F</i>	GTGACAGAATTTGATGGGACT
<i>E75-R</i>	GGTTGATGCGAAGAATAGAAC
<i>E75 5'RACE</i>	ATCGGTTGCGGTTGATGCGAAGAATAGA
<i>E75 3'RACE</i>	ATCCAGCAGAAGATTCAGTATCGCCCC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
18sF	TATACGCTAGTGAGCTGGAA
18sR	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
RXRRT-F	GGAACGCCAACGAACGAAAG
RXRRT-R	CCTTTCGTTTCGTTGGCGTTC
<i>EcRRT-F</i>	GTCGTCTCTCAACGGCTACAG
<i>EcRRT-R</i>	TCTCCACACACCAGGCATAAT
<i>E75RT-F</i>	CGACAAAGCATCTGGTTCC
<i>E75RT-R</i>	ACTGCTGGTCTTGGTGCAG

KU647675), *EcECR* (GenBank No. KC506600), *EcE75* (GenBank No. KY471317), 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计特异引物 *RXRRT-F*、*RXRRT-R*;*EcRRT-F*、*EcRRT-R*; *E75RT-F*、*E75RT-R*, 并以脊尾白虾 18S rRNA 为内参基因设计引物 18sF 与 18sR, 对生长蜕皮和生殖蜕皮不同分期眼柄中基因的表达进行检测。

### 1.6 数据处理

实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), Duncan 多重比较进行差异显著性检验,  $P < 0.05$  认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *EcE75* 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

通过 RACE 技术成功获得 *EcE75* 基因 cDNA 序列全长。该基因全长为 3944 bp, 包括 2520 bp 的开放阅读框(ORF), 450 bp 的 5'非编码区(5'UTR)和 974 bp 的 3'非编码区(3'UTR)。经 PredictProtein 软件预测, *EcE75* 基因编码一个由 839 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 92.307 kDa, 理论等电点为 7.48, 脂溶系数为 77.07, 亲水指数(GRAVY)为 -0.417。经 SMART 服务器预测, *EcE75* 蛋白包含 1 个 C4 锌指结构(位于第 32~104 个氨基酸之间)、1 个配体结合结构域(位于第 207~366 个氨基酸之间)及 6 个低组分复杂区域(分别位于第 396~408 个氨基酸、第 419~443 个氨基酸之间、第 499~514 个氨基酸之间、第 574~627 个氨基酸之间、第 685~691 个氨基酸之间以及第

716~736 个氨基酸之间), 具体位置见图 1。经 TMpred 软件预测, *EcE75* 基因有 1 个明显的跨膜螺旋, 跨膜

方向为由内向外, 由第 297~313 个氨基酸构成, 得分为 580, 预测结果见图 2。

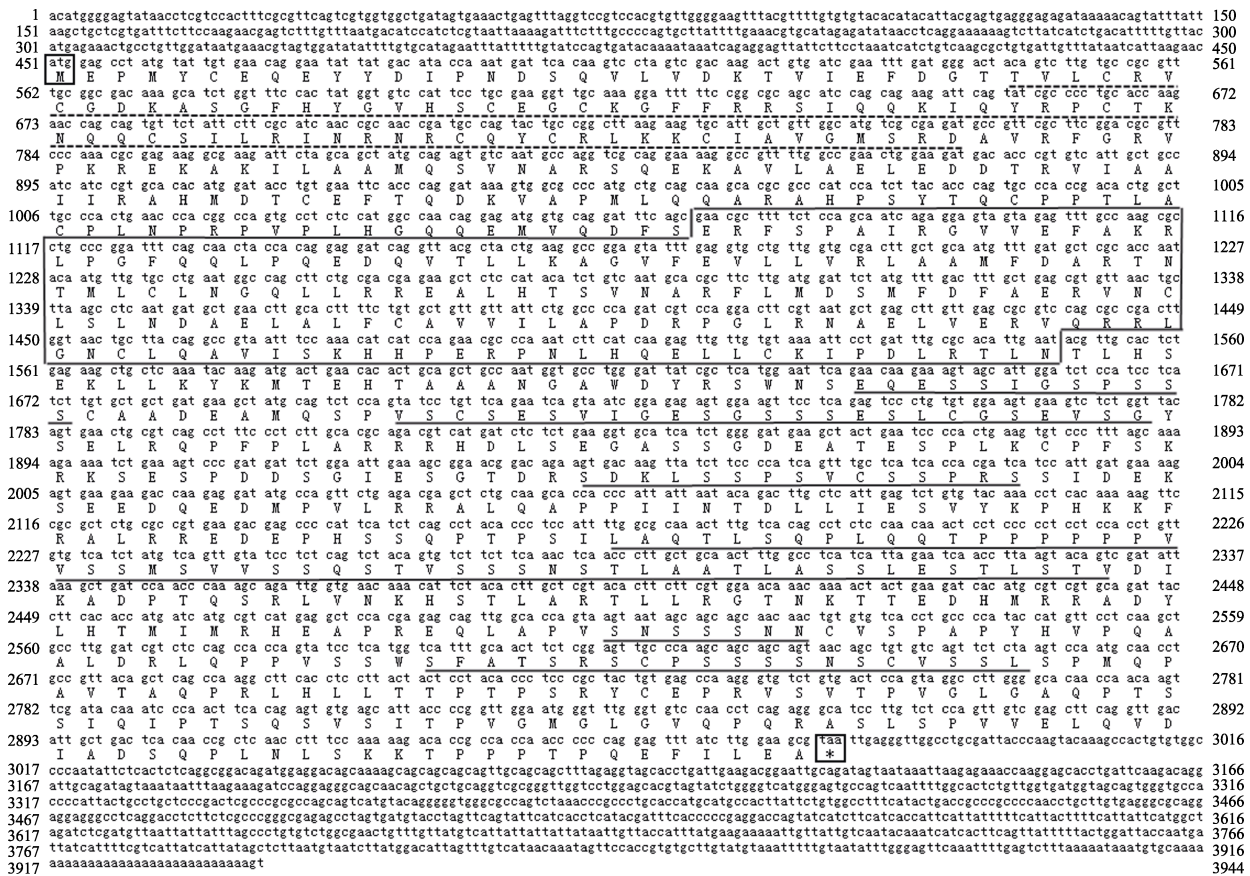


图 1 *EcE75* 的 cDNA 核苷酸序列及其预测的氨基酸序列

Fig.1 Prediction of amino acid sequence based on the cDNA sequence of *EcE75*

虚线下划线表示 C4 锌指结构区域, 方框表示配体结合结构域, 小方框(ATG)表示起始密码子, 小方框\*表示终止密码子, 其他下划线表示 6 个低组分复杂区域

The dotted line represents the C4 zinc finger structure, the box represents the ligand binding domain, the small box (ATG) represents the start codon, the small box \* indicates the stop codon, and the underlines represent the 6 low component complex regions

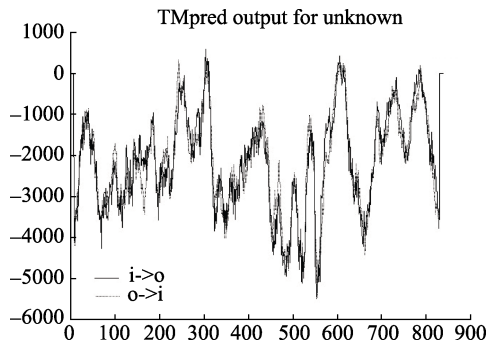


图 2 *EcE75* 跨膜螺旋预测

Fig.2 The prediction of transmembrane helice of *EcE75*

2.2 *EcE75* 蛋白同源性及系统进化树分析

经过多序列比对发现, *EcE75* 蛋白与三疣梭子

蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾、黑背陆地蟹、刀额新对虾同源性较高, 可以证明此序列就是脊尾白虾的 *E75* 蛋白(图 3)。系统进化树分析表明, *EcE75* 蛋白在进化上具有一定的保守性, 与甲壳动物聚为一支, 与三疣梭子蟹、黑背陆地蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾等亲缘关系最近, 相似性分别为 79%、79%、78% 和 78%(图 4)。

2.3 *EcE75* 基因组织表达分析

采用 RT-PCR 方法检测脊尾白虾肝胰腺、鳃、肌肉、肠、血、胃、心、表皮、壳、卵巢、眼柄、大颚器和腹神经节共 13 种组织中 *EcE75* 基因的表达情况。结果显示, *EcE75* 基因在 13 种组织中均有表达, 眼

<i>Exopalaemon carinicauda</i>	EXPALAEMLCARINICAUDAMEP... 100
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	.FENNERPENAEUSCHINENSIS... 99
<i>Gecarcinus lateralis</i>	...GECARCINUSLATERALIS... 96
<i>Liopenaeus vannamei</i>	...LITPENAEUSVANNAMEI... 95
<i>Metapenaeus ensis</i>	...METAPENAEU...SENSIS... 93
<i>Portunus trituberculatus</i>	.PRTUNUSTRITUBERCLATU... 99
Consensus	m c q y p d qvl dktviefdgttvlcrvcgdkasgfhvgvhscecgkgrfrrrsiooktoyrpctknqccsi
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	LRINRNRCOCYRLKCKTAVGMSRDAVRFGRVPRKREKAKILAAAGSVNARS... 200
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	LRINRNRCOCYRLKCKTAVGMSRDAVRFGRVPRKREKAKILAAAGSVNARS... 199
<i>Gecarcinus lateralis</i>	LRINRNRCOCYRLKCKTAVGMSRDAVRFGRVPRKREKAKILAAAGSVNARS... 196
<i>Liopenaeus vannamei</i>	LRINRNRCOCYRLKCKTAVGMSRDAVRFGRVPRKREKAKILAAAGSVNARS... 195
<i>Metapenaeus ensis</i>	LRINRNRCOCYRLKCKTAVGMSRDAVRFGRVPRKREKAKILAAAGSVNARS... 193
<i>Portunus trituberculatus</i>	LRINRNRCOCYRLKCKTAVGMSRDAVRFGRVPRKREKAKILAAAGSVNARS... 199
Consensus	lrinrnrcocylrkkctavgmsrdavrfgrvprkrekakilaamgsvna sqe avl eled trv aairahmdtc ft kvapm qgar hpsytqc
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	PPYLACPLNPRPVPLHCQCEIVODFSEFRFS... 300
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	PPYLACPLNPRPVPLHCQCEIVODFSEFRFS... 299
<i>Gecarcinus lateralis</i>	PPYLACPLNPRPVPLHCQCEIVODFSEFRFS... 296
<i>Liopenaeus vannamei</i>	PPYLACPLNPRPVPLHCQCEIVODFSEFRFS... 295
<i>Metapenaeus ensis</i>	PPYLACPLNPRPVPLHCQCEIVODFSEFRFS... 293
<i>Portunus trituberculatus</i>	PPYLACPLNPRPVPLHCQCEIVODFSEFRFS... 299
Consensus	pp lacpl prpvpl hcqce ivodfsefrfs pairgvvefakrlpgfqqllpqedqvtllkagvfevllvrla mfdartn mlcinqgl rrealhtsvna
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	RFLVDSMDFAEFRVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNAIVDRVCRHIN... 400
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	RFLVDSMDFAEFRVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNAIVDRVCRHIN... 399
<i>Gecarcinus lateralis</i>	RFLVDSMDFAEFRVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNAIVDRVCRHIN... 396
<i>Liopenaeus vannamei</i>	RFLVDSMDFAEFRVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNAIVDRVCRHIN... 395
<i>Metapenaeus ensis</i>	RFLVDSMDFAEFRVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNAIVDRVCRHIN... 393
<i>Portunus trituberculatus</i>	RFLVDSMDFAEFRVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNAIVDRVCRHIN... 399
Consensus	rfl vdsmdfaer n l i daelalfcavv l adprglrna iv rv r l n l v khnpe p l ll kipdirtintlhsekllkykmtf
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	HTAANGAWDYR..SWSNEQESSV... 497
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	HTAANGAWDYR..SWSNEQESSV... 498
<i>Gecarcinus lateralis</i>	HTAANGAWDYR..SWSNEQESSV... 496
<i>Liopenaeus vannamei</i>	HTAANGAWDYR..SWSNEQESSV... 494
<i>Metapenaeus ensis</i>	HTAANGAWDYR..SWSNEQESSV... 492
<i>Portunus trituberculatus</i>	HTAANGAWDYR..SWSNEQESSV... 499
Consensus	htaa wd sw eqess gspsss deam svpscse es ss es cgsevsgy elr pipr rrrhd segassgdea esplk
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	PFSKRKSPDDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEK... 593
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	PFSKRKSPDDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEK... 596
<i>Gecarcinus lateralis</i>	PFSKRKSPDDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEK... 593
<i>Liopenaeus vannamei</i>	PFSKRKSPDDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEK... 592
<i>Metapenaeus ensis</i>	PFSKRKSPDDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEK... 592
<i>Portunus trituberculatus</i>	PFSKRKSPDDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEK... 596
Consensus	pfskrks spddsgiesgtdsrdklsppvcspssrsidk seered dmvlrra lcap lntdllmeeay kpkkfra . lrreephsscpfssl
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	LACTSQPPHH... 693
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	LACTSQPPHH... 666
<i>Gecarcinus lateralis</i>	LACTSQPPHH... 658
<i>Liopenaeus vannamei</i>	LACTSQPPHH... 662
<i>Metapenaeus ensis</i>	LACTSQPPHH... 622
<i>Portunus trituberculatus</i>	LACTSQPPHH... 661
Consensus	lactsqpph . . . . . cts slaathatlastlslts . . . . . spslaashstlartllgk . kisedamrradllhsmimr
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	HEAPREQLAPVNSSSNVCSPAPYHVQCAALDRL... 790
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	HEAPREQLAPVNSSSNVCSPAPYHVQCAALDRL... 758
<i>Gecarcinus lateralis</i>	HEAPREQLAPVNSSSNVCSPAPYHVQCAALDRL... 746
<i>Liopenaeus vannamei</i>	HEAPREQLAPVNSSSNVCSPAPYHVQCAALDRL... 752
<i>Metapenaeus ensis</i>	HEAPREQLAPVNSSSNVCSPAPYHVQCAALDRL... 622
<i>Portunus trituberculatus</i>	HEAPREQLAPVNSSSNVCSPAPYHVQCAALDRL... 746
Consensus	hev . rerlpt . . . . . prvsrpfy yvpcavdrvqpaswscpasrgccssst . . . . . ssssgmsfmlqpa vtaqprhllt ttppsryyep rsmstt pvg
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	LGAQPSGSPSAST... 858
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	LGAQPSGSPSAST... 819
<i>Gecarcinus lateralis</i>	LGAQPSGSPSAST... 816
<i>Liopenaeus vannamei</i>	LGAQPSGSPSAST... 813
<i>Metapenaeus ensis</i>	LGAQPSGSPSAST... 622
<i>Portunus trituberculatus</i>	LGAQPSGSPSAST... 816
Consensus	lgaqpspsdasapsqgmehvpsqgaphorttssmvelqvdiadsqplnlskktppptpoeffile

图 3 EcE75 与其他物种的氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of EcE75 with other species

*Exopalaemon carinicauda* KY471317; *Fenneropenaeus chinensis* ACF36863.1; *Gecarcinus lateralis* AAY89587.2; *Liopenaeus vannamei* AGS94407.1; *Metapenaeus ensis* O77245.1; *Portunus trituberculatus* AJT60335.1

柄表达量最高, 卵巢次之, 肌肉和血细胞表达量较低, 肝胰腺中最低(图 5)。

2.4 EcRXR 基因在不同蜕皮分期的表达分析

EcRXR 基因在不同蜕皮分期的脊尾白虾眼柄中的表达情况如图 6 所示。生长蜕皮时, EcRXR 的表达量呈逐渐降低的趋势, 蜕皮间期显著高于蜕皮前期和后期(P<0.05), 蜕皮前期和后期差异不显著; 生殖蜕

皮时, EcRXR 的表达量呈逐渐升高的趋势, 蜕皮间期显著低于蜕皮前期和后期(P<0.05), 蜕皮前期和后期差异不显著; 蜕皮间期时, 生长蜕皮显著高于生殖蜕皮(P<0.05); 蜕皮前期和后期时, 生长蜕皮显著低于生殖蜕皮(P<0.05)。

2.5 EcECR 基因在不同蜕皮分期的表达分析

EcECR 基因在不同蜕皮分期的脊尾白虾眼柄中

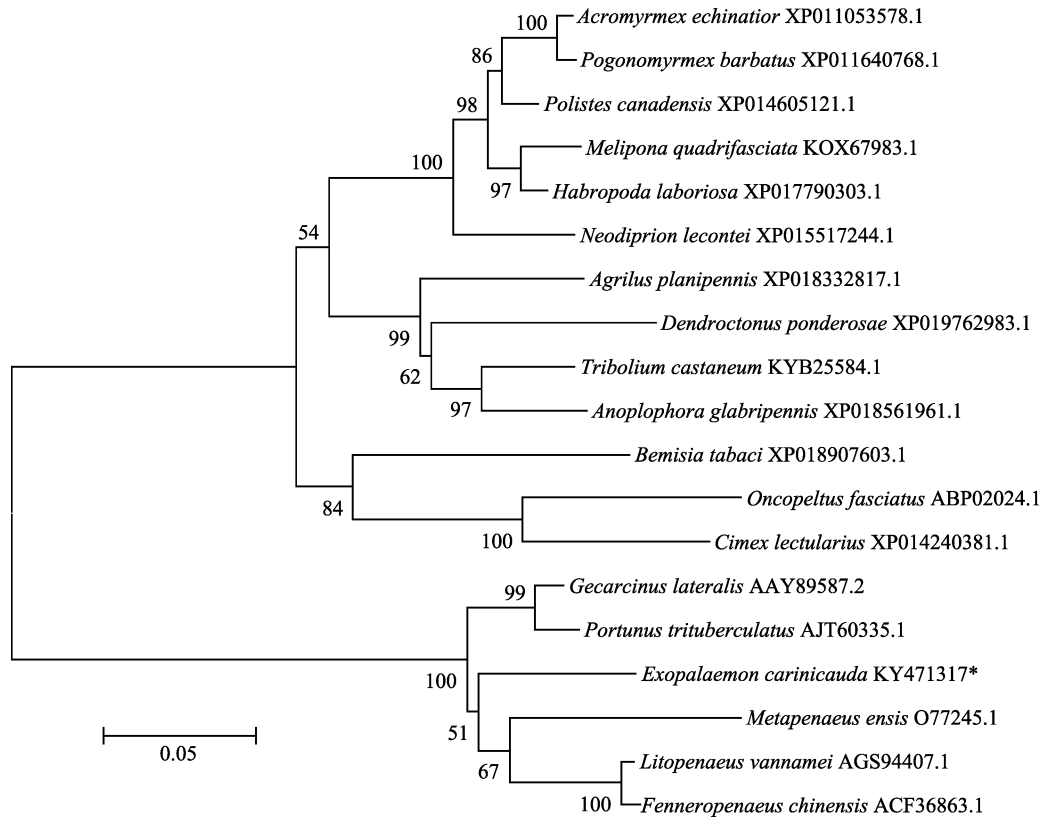


图 4 脊尾白虾与其他物种的 *E75* 蛋白系统进化树

Fig.4 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *EcE75* and other species

标尺长度表明每个位点发生 0.05 次置换

The length of the ruler indicates 0.05 replacements at each site

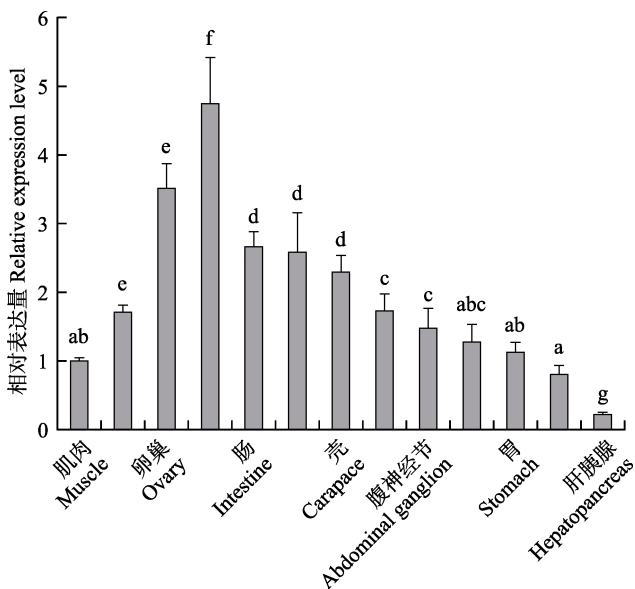


图 5 *EcE75* 基因在不同组织中的表达

Fig.5 Relative expression level of *EcE75* in different tissues

不同字母代表组织间差异显著 ( $P < 0.05$ )  
Different letters mean significant difference among tissues at 0.05 level

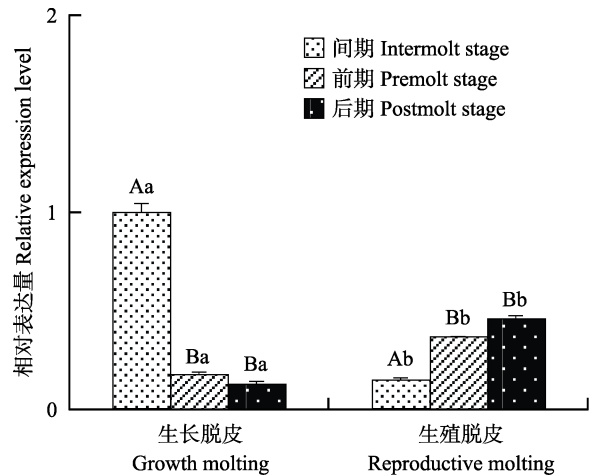


图 6 *EcRXR* 基因在不同蜕皮分期的表达

Fig.6 Relative expression level of *EcRXR* in different molting stages

同种蜕皮的不同分期用大写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同种蜕皮的同一分期用小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同 Capital letters indicate significant difference among different stages of the same type of molting, while lower case letters indicate significant difference between different types of molting in the same stages. The same as below

的表达情况如图 7 所示,生长蜕皮时, *EcECR* 的表达量呈逐渐降低的趋势,蜕皮间期显著高于蜕皮前期 ( $P < 0.05$ ),蜕皮前期显著高于蜕皮后期 ( $P < 0.05$ );生殖蜕皮时,蜕皮前期显著高于蜕皮间期和后期 ( $P < 0.05$ ),蜕皮间期与后期差异不显著;间期时,生长蜕皮显著高于生殖蜕皮 ( $P < 0.05$ );前期和后期时,生长蜕皮显著低于生殖蜕皮 ( $P < 0.05$ )。

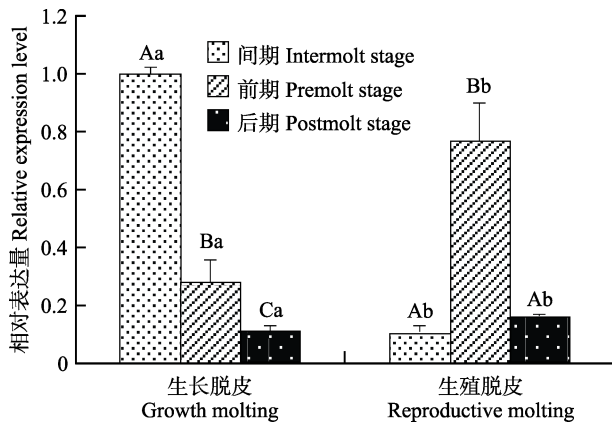


图 7 *EcECR* 基因在不同蜕皮分期的表达  
Fig.7 Relative expression level of *EcECR* in different molting stages

## 2.6 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的表达分析

*EcE75* 基因在不同蜕皮分期的脊尾白虾眼柄中的表达情况如图 8 所示。*EcE75* 的表达量在生长蜕皮时,蜕皮后期显著低于蜕皮间期和前期 ( $P < 0.05$ ),蜕皮间期和前期差异不显著;生殖蜕皮时,蜕皮前期显著高于蜕皮间期和后期 ( $P < 0.05$ ),蜕皮间期与后期差异不显著;蜕皮间期和后期时,生长蜕皮显著高于生殖蜕皮 ( $P < 0.05$ ),前期时,生长蜕皮显著低于生殖蜕皮 ( $P < 0.05$ )。

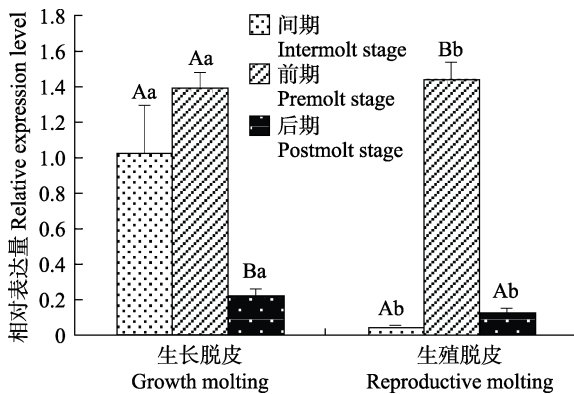


图 8 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的表达  
Fig.8 Relative expression level of *EcE75* in different molting stages

## 3 讨论

本研究首次克隆得到脊尾白虾的 *E75* 基因,该基因全长为 3944 bp,包括 2520 bp 的开放阅读框(ORF),该开放阅读框编码 839 个氨基酸。*EcE75* 基因编码的蛋白包含 1 个 C4 锌指结构、1 个配体结合结构域及 6 个低组分复杂区域。氨基酸序列比对结果显示,克隆得到的 *EcE75* 基因具有 *E75* 基因典型的结构域。系统进化树分析表明,脊尾白虾 *E75* 在进化上具有一定的保守性,与甲壳动物聚为一支,与三疣梭子蟹、黑背地蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾等亲缘关系最近,表明本研究克隆得到的 *E75* 基因确定为脊尾白虾 *E75* 基因。*EcE75* 基因在脊尾白虾的 13 种组织中均有表达,其中,眼柄的表达量最高,卵巢次之。不同物种的组织表达量有差异,如凡纳滨对虾肌肉中表达量最高,眼柄次之(钱昭英, 2014);三疣梭子蟹眼柄中表达量最高,表皮次之(Xi *et al.*, 2016)。而脊尾白虾 *E75* 基因在眼柄和卵巢中的高表达,暗示其可能与蜕皮及卵巢发育相关,需要进一步进行功能验证。

眼柄对于甲壳动物蜕皮调控具有重要作用,且 *ECR*、*RXR* 和 *E75* 基因在眼柄中都具有高的表达量,因此,本研究检测了不同蜕皮分期 *EcRXR*、*EcECR* 和 *EcE75* 的表达规律。结果显示, *EcRXR* 与 *EcECR* 的表达规律基本一致,生殖蜕皮的蜕皮前期和后期表达量都比生长蜕皮高。Lachaise 等(1981)和 Chan(1995)研究表明,在卵巢的发育过程中,随着卵巢的逐渐成熟,蜕皮激素的浓度随之增加,在产卵前下降,而蜕皮激素的活性形式 20E 需要结合 *ECR* 和 *RXR* 形成的二聚体,从而导致 *ECR* 和 *RXR* 表达量升高。*EcRXR* 在生殖蜕皮的蜕皮后期表达量高于蜕皮前期,这与 Durica 等(1996)的研究结果相似,推测可能与卵巢发育有关。*EcE75* 基因在生殖蜕皮的表达规律与 *EcECR* 一致,而生长蜕皮前期,表达量与蜕皮间期表达量差异不显著,与 *EcECR* 和 *EcRXR* 的表达规律不一致,原因有待进一步研究。生长蜕皮与生殖蜕皮的主要区别在于生殖蜕皮伴随卵巢发育,而本研究中,相较于生长蜕皮, *EcECR*、*EcRXR* 和 *EcE75* 在生殖蜕皮的高表达,说明其可能与脊尾白虾的卵巢发育有关。通过对脊尾白虾 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 基因在不同蜕皮分期的表达研究,为虾蟹类蜕皮机制及苗种育成提供了参考信息。

## 参 考 文 献

Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, *et al.* Loss of the ecdysteroid-inducible *E75A* orphan nuclear receptor

- uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 2002, 3(2): 209–220
- Chan SM. Cloning of a shrimp (*Metapenaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: An insect homologue of *E75* gene. *FEBS Letters*, 1998, 436(3): 395–400
- Chan SM. Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei*, (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1995, 112(1): 51–59
- Crossgrove K, Maina CV, Robinsonrechavi M, *et al.* Orthologues of the *Drosophila melanogaster* *E75* molting control gene in the filarial parasites *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008, 157(1): 92–97
- Dubrovsky EB. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2005, 16(1): 6–11
- Durica DS, Hopkins PM. Expression of the genes encoding the ecdysteroid and retinoid receptors in regenerating limb tissues from the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Gene*, 1996, 171(2): 237–241
- Gao Y, Zhang X, Wei J, *et al.* Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144350
- Hannas BR, LeBlanc GA. Expression and ecdysteroid responsiveness of the nuclear receptors HR3 and *E75* in the crustacean *Daphnia magna*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 315(2): 208–218
- Kim HW, Lee SG, Mykles DL. Ecdysteroid-responsive genes, *RXR* and *E75*, in the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Differential tissue expression of multiple *RXR* isoforms generated at three alternative splicing sites in the hinge and ligand-binding domains. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, 242(1–2): 80–95
- Lachaise F, Goudeau M, Hetru C, *et al.* Ecdysteroids and ovarian development in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1981, 362(5): 521–529
- Liang JP, Wang Y, Duan YF, *et al.* Molecular cloning of ecdysteroid receptor and its expression during the ovarian development and embryogenesis of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 942–952 [梁俊平, 王芸, 段亚飞, 等. 脊尾白虾 *EcR* 基因的克隆及其在卵巢和胚胎发育过程中的表达分析. *水产学报*, 2015, 39(7): 942–952]
- Litoff EJ, Garriott TE, Ginjupalli GK, *et al.* Annotation of the *Daphnia magna* nuclear receptors: Comparison to *Daphnia pulex*. *Gene*, 2014, 552(1): 116–125
- Liu F, Li J, Li JT, *et al.* Cloning and expression of retinoid X receptor under temperature and salinity stresses and molting cycles in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(4): 828–837 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)维甲酸 X 受体基因克隆及其在温盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析. *海洋与湖沼*, 2016, 47(4): 828–837]
- Priya TAJ, Li FH, Zhang JQ, *et al.* Molecular characterization of an ecdysone inducible gene *E75* of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and elucidation of its role in molting by RNA interference. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 156(3): 149–157
- Qian Z, He S, Liu T, *et al.* Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2014, 172(6): 10–30
- Qian ZY. Isolation, identification, expression and function studies of growth performance candidate genes in *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of North West Agriculture and Forestry University, 2014 [钱昭英. 凡纳滨对虾生长性能相关候选基因的分离鉴定、表达规律及调控功能研究. 西北农林科技大学博士研究生学位论文, 2014]
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, *et al.* Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta*, and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(12): 1327–1338
- Thummel CS, Chory J. Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. *Genes and Development*, 2002, 16(24): 3113
- Verhaegen Y, Parmentier K, Swevers L, *et al.* The heterodimeric ecdysteroid receptor complex in the brown shrimp *Crangon crangon*: *EcR* and *RXR* isoform characteristics and sensitivity towards the marine pollutant tributyltin. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(1): 158–169
- Wang ZF. Study on the characteristics of reproduction and molting in *Neocaridina denticulata sinensis*. Master's Thesis of Hebei University, 2014, 22–27 [王战芳. 中华锯齿米虾繁殖及蜕皮特征的研究. 河北大学硕士研究生学位论文, 2014, 22–27]
- Xi X, Zhou Y, Liu M, *et al.* The nuclear receptor *E75* from the swimming crab, *Portunus trituberculatus*: cDNA cloning, transcriptional analysis, and putative roles on expression of ecdysteroid-related genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 200: 69–77
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, *et al.* Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *ultraspiracle* genes. *Nature*, 1994, 366(6454): 476–479
- Zhang M, Liu P, Li JT, *et al.* Cloning and expression of molt-inhibiting hormone gene from *Exopalaemon carinicauda* under environmental stresses. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 764–775 [张美, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾蜕皮抑制激素基因全长 cDNA 的克隆及其对环境胁迫的响应. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 764–775]



## Cloning of *E75* Gene and Expression Analysis of *E75*, *ECR* and *RXR* During Different Molting Stages of *Exopalaemon carinicauda*

XU Yang<sup>1</sup>, WANG Jiajia<sup>1</sup>, GE Qianqian<sup>1</sup>, CUI Yanting<sup>1</sup>, MA Li<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** Based on the cloning of *Exopalaemon carinicauda* *E75* (*EcE75*, GenBank accession number: KY471317), we studied its role in molting and the expression pattern of *EcECR* and *EcRXR* during different stages of molting. The full-length cDNA of *EcE75* is 3944 bp long, which contains an open reading frame (ORF) of 2520 bp. The protein encoded by *EcE75* is composed of 839 amino acids. The estimated mass of the deduced amino acid sequence of *EcE75* is 92.307 kDa, and the calculated theoretical isoelectric point (pI) is 7.48. The ZnF\_C4 and the HOLI domains were detected in *EcE75*, and one distinct transmembrane helix was identified. The gene *EcE75* is conserved during evolution. The phylogenetic tree constructed based on *E75* sequences showed that *EcE75* was clustered with that of the same clade of crustaceans. *E. carinicauda* has the highest homology with *Fenneropenaeus chinensis*, *Portunus trituberculatus*, *Litopenaeus vannamei*, and *Gecarcinus lateralis*. The tissue distribution analysis showed that *EcE75* transcript could be detected in all tested tissues of *E. carinicauda*, and relatively abundant in eyestalk and ovary. The expression pattern of the genes *EcRXR*, *EcECR*, and *EcE75* was consistent during different stages of molting. At the premoult and postmoult stages, the expression of genes of reproductive molting was significantly higher than that of growth molting. The results showed that there was significant difference between the growth and reproductive molting because of the ovary development. Furthermore, it revealed the effect of ecdysone stimulation on ovarian development through the upregulation of expression of the genes *EcRXR*, *EcECR*, and *EcE75*. The present study on the expression of the genes *EcRXR*, *EcECR*, and *EcE75* at different stages of molting provides a theoretical basis and a scientific ground for further research on the mechanism of molting.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; *EcECR*; *EcRXR*; *EcE75*; Molting stage

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn