

中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (*Ers-MIH1*) - GST 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

郭豫杰, 周开亚, 马长艳

(南京师范大学 生命科学学院 遗传资源研究所, 江苏 南京 210097)

摘要: 蜕皮抑制激素 (molt-inhibiting hormone, MIH) 属甲壳动物高血糖激素 (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) 家族。MIH 抑制 Y-器官蜕皮激素的合成。以中华绒螯蟹 (*Eriocheir japonica sinensis*) 眼柄总 RNA 为模板, 根据中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (*Eriocheir japonica sinensis* molt-inhibiting hormone-1, *Ers-MIH1*) 基因序列设计引物, 用 RT-PCR 的方法获得了 *Ers-MIH1* 基因成熟肽的 cDNA 片段。序列分析表明, *Ers-MIH1* 基因成熟肽编码区含有 228 bp, 编码 75 个氨基酸残基, 与已发表的序列一致。将该 cDNA 片段插入到中间载体 pMD18-T 中, 酶切后再将该片段插入到 pGEX-4T-1 表达载体中, 构建成表达质粒 pGEX-4T-MIH1。在 BL21 细胞中经 IPTG 诱导表达, 得到 GST-MIH1 的融合蛋白。SDS-PAGE 分析表明, 经 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 发现大量 GST-MIH1 融合蛋白表达, 在分子量 (M_r) 为 34 kD 处有 1 条特异的蛋白质条带。中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 融合蛋白的成功表达为进一步深入研究 MIH 在中华绒螯蟹蜕皮过程中的作用机制奠定了基础。

关键词: 中华绒螯蟹; 蜕皮抑制激素 1; 原核表达; 融合蛋白

中图分类号: Q959.223 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)01-0009-05

在十足目甲壳动物中, 眼柄视神经节 X 器官-窦腺复合体 (x-organ-sinus gland, XO-SG) 是内分泌调控中心, 类似于哺乳动物的下丘脑-垂体系统, 分泌甲壳动物高血糖激素 (crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、蜕皮抑制激素 (molt-inhibiting hormone, MIH)、性腺发育抑制激素 (gonad-inhibiting hormone, GIH) 和大颚器官抑制激素 (mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH) 等多种神经肽类激素, 参与调节甲壳动物的生殖、发育和蜕皮等重要生理过程^[1-2]。这些激素的成熟肽由 71~78 个氨基酸残基组成, 氨基酸序列相似, 有 6 个位置保守的半胱氨酸, 形成 3 个链内二硫键, 同属于 CHH 家族或 CHH/MIH/GIH (VIH) 家族。

甲壳动物的个体发育伴随有周期性的蜕皮过程, 该过程受 Y-器官分泌的蜕皮激素 (ecdysteroid) 和蜕皮抑制激素 (MIH) 的正负调控。MIH 在眼柄神经内分泌细胞丛即 X-器官中合成, 并在神经血器官

即窦腺 (SG) 中贮存和释放^[3-4]。在蜕皮间期血淋巴中高水平的 MIH 抑制 Y-器官蜕皮激素的合成和释放, 只有当 MIH 的分泌量减少或停止时蜕皮现象才会发生^[4-6]。

Ers-MIH1 基因是本实验室克隆测序的基因 (GenBank 检索号: AY310313), 其编码的氨基酸序列与其他几种蟹类的 MIH 有较高的同源性^[1]。该基因含有 2 个内含子和 3 个外显子, 编码 110 个氨基酸的 MIH 前体分子 (包括 35 个氨基酸的信号肽和 75 个氨基酸的成熟肽)。本研究根据 *Ers-MIH1* 基因组 DNA 序列设计引物, 用 RT-PCR 的方法获得了 *Ers-MIH1* 基因成熟肽的 cDNA 片段, 并将该片段连接到 pGEX-4T-1 载体上, 在大肠杆菌中进行融合表达, 最后获得了 GST-MIH1 融合蛋白, 从而为进一步研究 MIH 的作用机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2003-08-15; 修订日期: 2003-11-04。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助 (30130040)。

作者简介: 郭豫杰 (1978-), 女, 硕士研究生, 从事动物分子生物学研究。

通讯作者: 周开亚。Tel: 025-83598388; E-mail: kyzhouj@jlonline.com

1) 宋霞, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (*Ers-MIH1*) 基因组 DNA 的分子克隆和序列分析 [J]. 动物学报, 2004. 待刊。

1.1.1 动物材料 中华绒螯蟹 (*Eriocheir japonica sinensis*)^[7] 由安徽芜湖龙湖水产养殖场提供。

1.1.2 菌株和克隆载体 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 和质粒 pGEX-4T-1 为本实验室保存, pMD18-T 载体 (Takara)。

1.1.3 试剂 TRIzol 试剂 (Gibco BRL); Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒 (Clontech); Bam H I, Xho I 和 T4 DNA 连接酶 (Takara); Taq DNA 聚合酶 (Promega); 质粒 DNA 提取试剂盒 (Plasmid Mini Kit) (上海华舜); DNA 回收试剂盒 (DNA gel extraction Kit) (杭州维特洁)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的制备 取蜕皮间期的成体中华绒螯蟹, 剪眼柄, 去除其外壳和色素组织, 得到的柔软组织立即浸入液氮中, 然后用 Trizol 试剂提取总 RNA, 具体操作按说明书进行。总 RNA 提取后进行纯度和完整性的检测。

1.2.2 RT-PCR 以提取的眼柄总 RNA 为模板, 用 Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒反转录合成第 1 链 cDNA。

根据 *Ers-MIH1* 基因组 DNA 序列 (GenBank 检索号: AY310313) 设计上游引物和下游引物, 分别为 5'-ccggttcATGGGAATCATCAACGCCGAG-3' 和 5'-cgctcgagTTATTGCCCGAGGATGCT-3'。上游引物 5' 端含 Bam H I 酶切位点及起始密码子 ATG, 下游引物 5' 端含 Xho I 酶切位点并位于终止密码子之后。用这 2 条引物以上述第 1 链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 原核表达载体的构建 RT-PCR 产物割胶纯化后, 连接于 pMD18-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞。将筛选出的阳性克隆进行插入片段的序列测定, 然后将测序正确的阳性克隆的质粒与表达载体质粒 pGEX-4T-1, 同时用 Bam H I 和 Xho I 在 37 °C 双酶切数小时。琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段及 pGEX-4T-1 载体后用 T4 DNA 连接酶连接。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 构建重组表达质粒 pGEX-4T-MIH1。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达 将重组表达质粒 pGEX-4T-MIH1 转化大肠杆菌 BL21, 37 °C 摇床培养 12 h 后, 按 1% 的接种量转接至新鲜的 2 × YTA 培养液中, 37 °C 250 r/min 培养至 A_{600} 接近 0.6 时, 用终

浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖核苷 (IPTG) 进行诱导, 28 °C 摇床培养若干小时。

1.2.5 SDS-PAGE 取 500 μ L 菌液离心后收集细胞, 加 50 μ L H₂O 和 50 μ L 的 2 × 样品缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油) 重悬细胞后于 100 °C 煮 5 min, 取 15 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳 (分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%), 然后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果

2.1 RT-PCR 的扩增结果

RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果表明, 扩增到了预期大小 (约为 247 bp) 的目的片段 (图 1)。

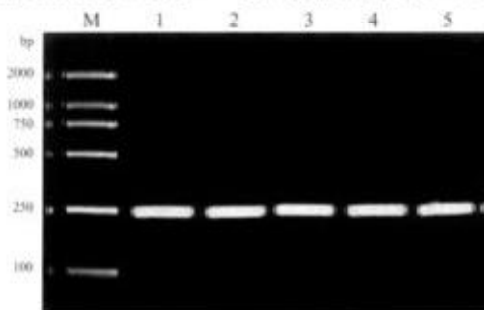


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

M: DNA 分子量标记; 1-5: RT-PCR 产物

M: DNA marker; 1-5: RT-PCR products

2.2 重组质粒 pMD18-T-MIH1 和 pGEX-4T-MIH1 的构建及酶切鉴定

将候选的 pMD18-T-MIH1 重组质粒转化 DH5 α 菌株后, 随机挑取 4 个克隆提取质粒。提取的质粒经 Bam H I 和 Xho I 双酶切, 酶切产物的电泳结果见图 2。图 2 中第 1 至第 4 泳道表明, 在每个克隆对应的泳道中都有约 250 bp 的条带, 说明这 4 个克隆中的重组 pMD18-T-MIH1 质粒都构建成功。提取重组质粒 pMD18-T-MIH1, 酶切后纯化插入片段并与经相同酶酶切的 pGEX-4T-1 载体相连, 构建 pGEX-4T-MIH1 重组质粒。pGEX-4T-MIH1 重组质粒双酶切产物的电泳图谱中也有约 250 bp 的条带 (图 2, 第 5 泳道)。将重组质粒 pGEX-4T-MIH1 进行插入片段的序列测定, 测序的结果与 GenBank 中 *Ers-MIH1* 成熟肽部分的核苷酸序列完全一致, 表明获得了拥有正确读码框架的重组表达质粒 pGEX-4T-MIH1。

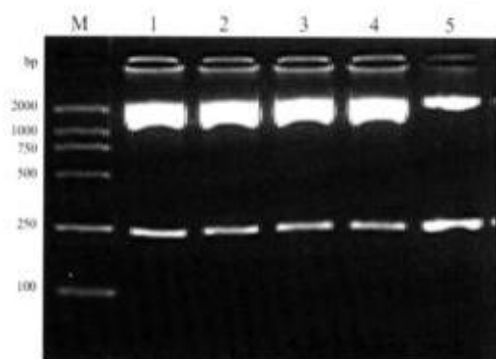


图2 重组质粒 pMD18-T-MIH1 和 pGEX-4T-MIH1 限制性酶切分析

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of pMD18-T-MIH1 and pGEX-4T-MIH1 recombinant plasmids

M: DNA 分子量标记; 1-4: 候选质粒 pMD18-T-MIH1 经 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切; 5: 候选质粒 pGEX-4T-MIH1 经 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切
M: DNA marker; 1-4: pMD18-T-MIH1 candidates digested by *Bam* H I and *Xho* I; 5: pGEX-4T-MIH1 candidates digested by *Bam* H I and *Xho* I

2.3 融合蛋白的表达

将重组质粒 pGEX-4T-MIH1 转化 BL21 菌株后, 以 IPTG 诱导若干小时, 离心后加上样缓冲液煮沸破碎细胞, 进行 12% 浓度的 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 3。从图 3 看出, 加入 IPTG 诱导后, 转入空载体的细菌总蛋白提取物中出现了分子量约为 26 kD 的 1 个新蛋白条带, 而转入重组质粒 pGEX-4T-MIH1 的细菌总蛋白提取物中出现的新蛋白质分子量为 34 kD 左右(图 3)。这与预期结果一致, 因为 pGEX-4T-1 表达载体中有 26 kD 的谷胱甘肽 S-转移酶(GST), 而表达产物是 MIH1 与 GST 的融合蛋白。MIH1 的分子量为 7.8 kD, 所以融合蛋白的分子量为 34 kD 左右。

3 讨论

自 1985 年开展中华绒螯蟹的人工养殖以来, 在各地河蟹养殖中普遍存在的问题是 1 龄蟹苗的性早熟及有些 2 年生的河蟹因蜕皮未遂而成僵蟹等, 给生产者带来很大损失。这些问题的发生可能与中华绒螯蟹体内神经肽类激素的分泌活动不正常有关。甲壳动物神经内分泌调节机制的研究揭示神经肽参与调节甲壳动物多种生理活动^[8-9]。甲壳动物高血糖激素家族[CHH 家族或 CHH/MIH/GIH(VIH) 家族]也已成为目前研究的热点^[2,10-11]。MIH 与脊椎动物中的赖氨酸血管加压素的理化性质相似, 其分

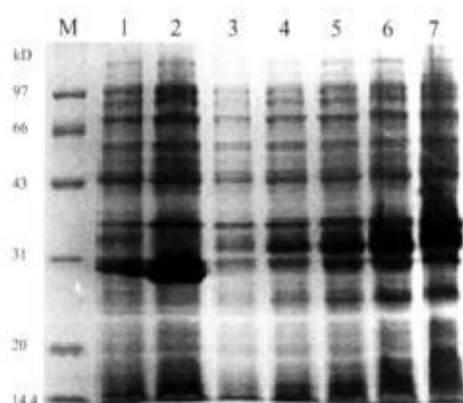


图3 大肠杆菌中 GST-MIH1 融合蛋白的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed GST-MIH1 fusion protein in *E. coli* DE3

M: 蛋白质分子量标记; 1-2: BL21/pGEX-4T-1 经 IPTG 分别诱导 1 h 和 6 h; 3-7: BL21/pGEX-4T-MIH1 经 IPTG 分别诱导 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h。箭头示表达的 GST-MIH1 融合蛋白。

M: Protein marker; 1-2: BL21/pGEX-4T-1 induced with IPTG for 1 h and 6 h respectively; 3-7: BL21/pGEX-4T-MIH1 induced with IPTG for 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h respectively. Arrow indicates the expressed GST-MIH1 fusion protein

泌受眼柄神经节中五羟色胺能神经原释放的 5-羟色胺的调节^[12], MIH 通过与受体结合, 激活细胞膜上的腺苷酸环化酶而提高细胞内 cAMP 水平^[13], 或是通过激活细胞膜上的鸟苷酸环化酶而升高细胞内 cGMP 水平^[14], 进而激活蜕皮激素合成途径中一种重要的起负调控作用的激酶, 从而抑制 Y-器官蜕皮激素的合成^[15]。Lee 等^[16]发现在蜕皮周期中 MIH mRNA 水平在蜕皮前期稳定下降, 达到一个最小值后, 在蜕皮后期上升, 在蜕皮间期一直保持上升水平, 正好与血淋巴中蜕皮激素的水平成负相关。但 Ohira 等^[17]认为, 蜕皮周期中 MIH mRNA 水平并无显著变化, 并提出 MIH 的合成及分泌属于转录后调控机制这一假设。由于这方面积累的资料较少, 有关 MIH 基因表达调控机理的研究还需进一步加强。研究发现 CHH 家族神经肽在结构上具有相似性, 并且该家族的有些成员呈现出多功能性^[18-20], 某一特定的生理功能的发挥往往是各种激素共同作用的结果。鉴于一种激素具有几种不同的生理作用, 有必要纯化不同的激素, 研究这些神经肽的作用机理和分布于各种器官组织中的受体结构以及不同激素之

间的相互关系。

由于 CHH 家族神经肽在机体中的表达量较少, 直接纯化该家族神经肽具有较大的难度。本研究将 *Ers-MIH1* 基因的成熟肽的 cDNA 片段插入到原核表达载体 pGEX-4T-1, 并在 BL21 中成功地进行了融合表达。pGEX-4T-1 是一种用于蛋白表达的质粒载体^[21-22], 其结构特点是分子量较小(仅有 4 850bp), 带有源自 pBR322 的复制子、编码抗氨苄青霉素的序列、强启动子 *tac* 和编码谷胱甘肽转移酶(GST; 分子量约为 26 kD)的纯化标签。通过紧随其后的多克隆位点可以插入 DNA 片段, 使之与 GST 形成融合蛋白进行表达^[23]。BL21 是一个广泛用于表达外源蛋白的宿主菌, 尤其适合于 GST 融合表达系统^[24]。该细菌中除敲掉了在细胞膜外降解蛋白的酶 *omp^T* 基因, 还缺少多种蛋白酶, 降低了重组产物表达后被细胞降解或剪切的概率^[25-26]。选择易于形成可溶性融合蛋白的 pGEX 表达载体系统是本研究表达成功的重要原因之一, 该系统使外源蛋白的表达和纯化都比较容易^[23]。虽然融合蛋白的 GST 标签有利于将目的蛋白进行亲和层析分离纯化, 但同时也带来了问题, 即融合蛋白的 N 端带有 26 kD 的 GST 会导致目的蛋白的空间构象不正确, 从而导致融合蛋白往往检测不出活性。从本研究的 GST 和融合蛋白的表达量来看, 在等量总蛋白质中, GST 的表达效率似乎更高些(图 3), 表明形成融合基因后会在一定程度上降低蛋白表达量。从图 3 中还可看出, 经 IPTG 诱导后 4 h, 融合蛋白的表达量达到最大值, 进一步延长诱导时间并不能提高表达效率。目前, 我们正在利用融合蛋白的 GST 标签进行亲和层析分离纯化、凝血酶酶切融合蛋白以及目的蛋白的变性、复性等研究。纯化的产物可用于 MIH 生物活性检测, 也可用于制备抗体进行免疫沉淀和免疫组化等研究。*Ers-MIH1* 融合蛋白的成功表达为进一步研究 MIH 的结构与功能的关系以及阐明中华绒螯蟹蜕皮的分子机制奠定了基础。

致谢: 安徽省水产新技术研究所赵乃刚研究员、汪朝晖先生为本研究提供了实验材料, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] De Kleijn D P V, Van Herp F. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea[J]. *Com Biochem Physiol*, 1995, 112B: 537-579.
- [2] 宋 霞, 周开亚. 甲壳类的眼柄神经激素[J]. *动物学杂志*, 2000, 35(4): 39-43.
- [3] Umohrey H R, Lee K J, Watson R D, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, 136: 145-149.
- [4] Lachais F, Le Roux A, Hubert M, et al. The molting gland of Crustaceans: localization, activating and endocrine control (a review)[J]. *Crust Biol*, 1993, 13: 198-234.
- [5] Chang E S, Prestwich G D, Bruce M J. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1990, 171(2): 818-826.
- [6] Spaziani E, Watson R D, Mattson M P, et al. Ecdysteroid biosynthesis in the crustacean Y-organ and control by an eyestalk neuropeptide[J]. *J Exp Zool*, 1989, 252(3): 271-282.
- [7] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(2): 439-316.
- [8] Keller R. Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects[J]. *Experientia*, 1992, 48: 439-448.
- [9] 蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究展望[J]. *水产学报*, 1998, 22(2): 154-161.
- [10] 张爱萍. 虾蟹类眼柄激素的生理生化及基因克隆研究进展[J]. *水产学杂志*, 2001, 14(1): 11-20.
- [11] 王在照, 相建海. 甲壳动物 CHH 家族神经激素结构和功能研究进展[J]. *水产学报*, 2001, 25(2): 175-180.
- [12] Mattson M P, Spaziani E. 5-Hydroxy-tryptamine mediates release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia[J]. *Bio Bull*, 1985, 169: 246-255.
- [13] Mark P, Mattson, Eugene, Spaziani. Regulation of crab Y-organ steroidogenesis in vitro: evidence that ecdysteroid production increases through activation of cAMP-Phosphodiesterase by calcium-calmodulin[J]. *Molecular and cellular Endocrinology*, 1986, 48: 135-151.
- [14] Sedlmeier. Regulation of ecdysteroid biosynthesis in crayfish Y-organ. I Role of cyclic nucleotides[J]. *Exp Zool*, 1993, 265: 448-453.
- [15] Lachaise F, Le Roux A, Hubert M, et al. The molting gland of crustaceans: localization, activity and endocrine control[J]. *J Crust Biol*, 1993, 13(2): 198-234.
- [16] Lee K J, Watson R D, Roer R D. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab *Callinectes sapidus*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249, 3: 624-627.
- [17] Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, et al. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. *Zoolog Sci*, 1997, 14(15): 785-789.
- [18] Chang E S, Prestwich G D, Bruce M J. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*[J]. *Biochem Biophys Res Com-*

- mum, 1990, 171: 818-826.
- [19] Tensen C P, De Kleijn D P V, Van Herp F. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormone from the lobster *Homarus americanus* [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 200: 103-106.
- [20] Lee K J, Elton T S, Bej A K, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding putative moult-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209: 1126-1131.
- [21] 丰竹, 张斌, 刘瑾, 等. ENCI的克隆, 原核表达与数种细胞表达谱分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(5): 605-608.
- [22] 徐云剑, 苏力坦·阿巴白克力, 吉棚, 等. PPF1基因C端片段在大肠杆菌中的融合表达和纯化以及抗体制备[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(5): 594-599.
- [23] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase [J]. *Gene*, 1988, 67: 31-40.
- [24] Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes [J]. *J Mol Biol*, 1986, 189: 113-130.
- [25] Grodberg J, Dunn J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification [J]. *J Bacteriol*, 1988, 170: 1245-1253.
- [26] Philips T A, VanBogelen R A, Neidhardt F C. lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein [J]. *J Bacteriol*, 1984, 159: 183-287.

Expression of *Eriocheir japonica sinensis* molt-inhibiting hormone-1-GST fusion protein in *E. coli*

GUO Yu-Jie, ZHOU Kai-Ya, MA Chang-Yan

(Institute of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Molt-inhibiting hormone (MIH) is a member of CHH (crustacean hyperglycemic hormone) family. MIH negatively regulates the synthesis of ecdysteroids in Y-organs and plays an important role in the regulation of growth and development. In this study, a primer pair was designed based on the complete sequence of molt-inhibiting hormone-1 (*Ers-MIH1*) gene of mitten crab (*Eriocheir japonica sinensis*) obtained by Song et al of this lab. The mature peptide-coding cDNA fragment of *Ers-MIH1* gene was amplified by RT-PCR using the total RNA extracted from eyestalk neural tissues as a template. The analysis of the sequence data indicated that the coding region of the cDNA fragment, which encoded 75 amino acid residues, is 228 bp in size. The sequence is identical with that of *Ers-MIH1* coding region reported by Song et al. The PCR product was cloned into the pMD18-T vector to produce the new construct pMD18-T-MIH1. The cloned *Ers-MIH1* fragment was cut out again with two restriction enzymes and was inserted into the prokaryotic expression vector, pGEX-4T-1, to produce the expression vector pGEX-4T-MIH1. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). GST-MIH1 fusion protein was obtained after the addition of IPTG into the growth media. SDS-PAGE analysis revealed that the GST-MIH1 fusion protein was highly expressed after the induction with IPTG for 4 h. A protein band of 34 kD Mr appeared on SDS-PAGE gel. It is anticipated that the fusion protein will be proved useful for studies on structure and function of MIH.

Key words: *Eriocheir japonica sinensis*; molt-inhibiting hormone-1; prokaryotic expression; fusion protein

Corresponding author: ZHOU Kai-ya. E-mail: Kyzhouj@jlon line. com