

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18207

三疣梭子蟹心激肽基因克隆及在低盐适应中的功能验证

孙东方¹, 吕建建^{1,2}, 高保全^{1,2}, 环朋朋¹, 蔡影¹, 刘萍^{1,2}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 采用 RACE 技术克隆获得三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)心激肽(CCAP)基因。该基因全长 606 bp, 5'端非编码区 72 bp, 3'端非编码区 108 bp, 开放阅读框 426 bp, 编码 141 个氨基酸, 预测分子量 15.6 kD, 理论等电点 9.55。同源性分析表明, 三疣梭子蟹 CCAP 与拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)和蓝蟹(*Callinectes sapidus*)的 CCAP 同源性较高, 分别为 85%和 82%。系统进化树分析显示, 三疣梭子蟹与蓝蟹首先聚为一支, 之后再与拟穴青蟹相聚。组织表达分析发现, CCAP 基因在胸神经节中的相对表达量最高, 其次是脑和眼柄组织。通过分析 CCAP 基因在低盐胁迫过程中的表达规律发现, 低盐可显著改变 CCAP 在胸神经节中的表达模式, 在 24 h, 48 h 和 72 h 实验组的表达量显著高于对照组($P<0.05$), 分别为对照组的 1.73, 2.16 和 2.19 倍。体外注射 CCAP 多肽可降低三疣梭子蟹在低盐条件下的死亡率, 并诱导钠钾 ATP 酶($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$)和 V 型 ATP 酶(V-ATPase)酶活力显著提高。本实验结果暗示 CCAP 通过调控 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 V-ATPase 活力以达到盐度适应的作用。

关键词: 三疣梭子蟹; 甲壳动物心激肽; 基因克隆; 盐度胁迫; 多肽注射

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0261-10

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)属于甲壳纲(Crustace)、十足目(Decapod)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*), 是中国重要的海水养殖经济蟹类之一^[1]。作为一种广盐性的水生甲壳动物, 三疣梭子蟹可在盐度为 13.7~47.7 的环境中生存^[2-3]。鳃作为水产动物适应盐度多变环境的主要器官^[4], 其上具有多种离子转运酶, 其中 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 、V-ATPase 和碳酸酐酶(carbonic anhydrase)等离子转运酶在盐度适应中发挥了重要的调节功能^[5]。神经肽作为一种神经信号分子在盐度适应中具有重要作用^[6], 其调节方式是神经内分泌因子作用于相关离子转运酶进而调节渗透压效应物的含量^[7]。夏季由于暴雨多发, 引起养殖池塘海水的盐度急剧下降, 使得三疣梭子蟹体

内渗透压失衡, 最终导致其生长缓慢, 疾病暴发。另外中国尚有大量低盐养殖区未充分利用, 如山东省黄河入海口附近滩涂, 江苏省南通长江入海口附近滩涂及大量凡纳滨对虾低盐养殖池。因此, 培育盐度适应能力强的优良品种对三疣梭子蟹产业的可持续发展具有重要的意义。

甲壳动物心激肽(crustacean cardioactive peptide, CCAP)是碳端酰胺化的九肽, 在甲壳动物和昆虫中广泛分布^[8-9]。CCAP 由前体基因编码形成, 其结构由疏水信号肽, 成熟肽和 4 个 CCAP 相关肽酶切位点组成。CCAP 成熟肽具有高度保守的一级结构 PFCNAFTGC-NH₂, 并在两个丝氨酸残基间形成分子内二硫键^[6]。最初, CCAP 在普通滨蟹(*Carcinus maenas*)的围心腺器官中发现, 因其具

收稿日期: 2018-06-10; 修订日期: 2018-09-10。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41576147, 41776160); 国家虾产业技术体系(CARS-48); 山东省泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助(20603022018027); 山东省重点研发计划(2018GSF121030, 2016GSF115028)。

作者简介: 孙东方(1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事三疣梭子蟹遗传育种研究。E-mail: 961012207@qq.com

通信作者: 刘萍, 研究员, 主要从事水产遗传育种研究。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

有调节心率的作用而得名^[10]。随后在蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[11]、果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[12]、蚊子(*Aedes aegypti*)^[13]等其他甲壳动物和昆虫中发现 CCAP 同样具有调节心率的作用。除此之外, CCAP 还可以促进昆虫变态期肠的蠕动^[14], 增加血液循环^[15], 调节烟草天蛾(*Manduca sexta*) 输卵管的收缩^[16]等。调节昆虫的蜕皮作用是 CCAP 的一个重要功能。在果蝇中, 去除 CCAP 神经元分泌细胞可导致果蝇羽化缺陷^[17], Arakane 等^[8]通过 RNA 干扰实验对 CCAP 及其受体进行干扰, 导致赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)的蜕皮行为终止。在甲壳动物中, CCAP 不仅在蜕皮行为中发挥了一定的作用^[18-19], 同时在渗透压调节过程中也发挥了重要的作用, 高盐和低盐胁迫都能引起凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) CCAP mRNA 的变化, 注射 CCAP 多肽能够显著提高凡纳滨对虾在淡水中的耐受力^[20]; 极端条件(缺氧, 低盐, 温度变化)可使蓝蟹眼柄中的 CCAP mRNA 迅速降低, 而胸神经节中的 mRNA 水平则不发生显著变化^[21]。然而, 有关三疣梭子蟹 CCAP 基因盐度适应的功能研究尚未见报道。

本实验通过三疣梭子蟹转录组测序得到 CCAP 基因片段, 运用 RACE 技术获得 cDNA 全长, 定量 PCR 分析了其在低盐胁迫下胸神经节中的表达模式。此外, 通过注射外源性的 CCAP 多肽并测定渗透压调节相关酶活力, 进一步分析了 CCAP 在低盐条件下发挥作用的方式, 以期在三疣梭子蟹渗透压调节的内分泌调控机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产养殖有限公司进行, 选取健康三疣梭子蟹(体重 $100 \text{ g} \pm 10.0 \text{ g}$)于室内水泥池中暂养一周, 盐度为 33, 温度维持在 $(18 \pm 3)^\circ\text{C}$, 持续充氧, 每天定时投喂蓝蛤并更换 1/3 体积的海水。

1.2 盐度胁迫实验

随机选取暂养一周的三疣梭子蟹进行盐度胁迫实验。实验设置实验组(盐度为 11)和对照组(盐

度为 33), 每组 80 只三疣梭子蟹并设置 3 个平行。实验期间的管理与暂养相同。各组分别在盐度胁迫 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 时间点取胸神经节, 每组取 3 只, 置于液氮中保存。另随机取 3 只三疣梭子蟹全组织用于组织表达分布的分析。

1.3 CCAP 多肽注射

CCAP 多肽 PFCNAFTGC-NH₂ (纯度 >97%) 于上海生工合成, 多肽修饰为碳端酰胺化, 两丝氨酸之间进行二硫键修饰。将合成的 CCAP 多肽先用少量双蒸水溶解并用 1×PBS 稀释至 $0.75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。从上述暂养的三疣梭子蟹中挑选 60 只健康体重活力相当的进行实验。实验设置两组, 注射 CCAP 多肽组和注射 PBS 组, 每组 50 只。在三疣梭子蟹游泳足基部血窦处, 每组每只分别注射 $40 \mu\text{L}$ CCAP(300 ng/g 体重)和 $40 \mu\text{L}$ 1×PBS。将两组中的 30 只放入盐度为 11 的低盐环境中实验, 观察死亡率; 剩余的 20 只放入正常的海水中用于组织取样, 并于注射后的 3 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h 时间点取鳃组织, 每组取 3 只。

1.4 CCAP cDNA 全长克隆

根据三疣梭子蟹转录组数据库中筛选得到的 CCAP 序列, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 3' 和 5' RACE 特异性引物。提取健康三疣梭子蟹全组织 RNA 并用 SMARTTM RACE Amplification Kit (Clontech 公司)合成 RACE cDNA 模板。使用 TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)与 RACE 通用引物 UPM、NUP 和四条 3' 和 5' RACE 特异性引物(表 1)进行 3' 和 5' 末端扩增, PCR 反应程序: 94°C 5 min, 94°C 30 s, $57/60^\circ\text{C}$ 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 72°C 10 min, 4°C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 使用胶回收试剂盒(生工)回收目的片段, 连接转化使用 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)和 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞(青岛擎科), 挑取阳性单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 目的单克隆菌液送青岛擎科生物技术有限公司进行测序。

1.5 序列分析

使用 Vector NTI 11.5 软件进行序列拼接, 得到 CCAP 基因 cDNA 全长, 采用 ORF Finder 在线

软件进行基因开放阅读框(ORF)预测,使用 Signal 4.1、SMART 在线生物信息分析软件对基因编码蛋白的基本物理性质、结构域、信号肽、跨膜结构和亲、疏水性进行预测分析,采用 Blast 在线程序分析目的基因与其他物种的同源性和一致性,使用 DNAMAN 5.2 软件对氨基酸序列进行多重序列比对。通过 MEGA 4.0 软件采用邻接法进行系统进化树的构建。

1.6 RNA 提取及反转录

运用 TRIzol 法提取三疣梭子蟹全组织及各实验组的 RNA,使用核酸定量仪(NanoDrop 2000 Thermo Scientific)和 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。利用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)反转录合成 cDNA 模板。具体操作如下:基因组 DNA 去除,5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, gDNA Eraser 1 μL, total RNA 1 μL, RNase Free dH₂O 6 μL, 室温反应 5 min; cDNA 合成, 5×PrimeScript Buffer 4 μL, PrimerScript RT Enzyme Mix 1 μL, RT Primer Mix 1 μL, 上述反应液 10 μL, RNase Free dH₂O 4 μL, 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 保存。反转录后的 cDNA 用于三疣梭子蟹 CCAP 基因的表达特征分析。

1.7 CCAP 基因的组织表达及各处理组的表达特征分析

根据已获得的三疣梭子蟹 CCAP 基因 cDNA 全长序列,利用 PrimerPremier 5.0 软件设计荧光定量引物,β-actin 作为内参(表 1)。使用 ABI 7500 Real Time PCR 仪和 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 试剂对三疣梭子蟹各组织及各实验组基因的定量表达情况进行分析,反应体系采用 TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM II 说明书中 20 μL 体系标准,PCR 反应程序为:95℃, 30 s; 95℃, 5 s, 60℃, 34 s, 40 个循环; 95℃, 15 s, 60℃, 1 min, 95℃, 15 s。采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析 CCAP 基因的相对表达量,通过 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析,利用 Excel 对统计结果进行作图, $P < 0.05$ 表示具有显著差异性。

1.8 三疣梭子蟹鳃组织 Na⁺/K⁺-ATPase 和 V-ATPase 活力测定

对注射 CCAP 多肽的鳃组织进行酶活力测

定。Na⁺/K⁺-ATPase 酶活力测定使用南京建成超微量 Na⁺/K⁺-ATPase 测试盒。各处理组鳃组织用液氮研磨,准确称取研磨后的组织重量并加入 9 倍体积的生理盐水, 2500 r/min, 离心 10 min, 取上清(10%匀浆上清),再用生理盐水 10 倍稀释成 1%,同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(南京建成)具体操作参考说明书进行。V-ATPase 酶活力使用上海酶联蟹 V 型 ATP 酶酶联免疫分析(ELISA)试剂盒进行测定。称取研磨后的组织 0.05 g, 加入 500 μL 的 1×PBS(pH 7), 匀浆后离心待检验。具体操作参考说明书进行。

2 结果与分析

2.1 CCAP 基因 cDNA 的克隆与生物信息学分析

采用 RACE 方法克隆得到三疣梭子蟹 CCAP cDNA 全长, GenBank 登录号: MG565968。CCAP 基因 cDNA 全长 606 bp, 其中开放阅读框 426 bp, 5'端非编码区 72 bp, 3'端非编码区 108 bp, 具有 polyA 结构。氨基酸序列分析表明, CCAP 基因编码 141 个氨基酸, 预测分子量 15.6 kD, 理论等电点 9.55。SMART、Signal 4.1 在线软件分析表明, 该蛋白具有一个 30 个氨基酸组成的信号肽(图 1)。利用在线软件 Blast 对 CCAP 氨基酸和其他物种的 CCAP 氨基酸进行同源性比对, 结果显示, CCAP 与拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)和蓝蟹最为相似, 同源性分别为 85%和 82%(图 2)。系统进化树分析显示, 三疣梭子蟹与蓝蟹首先聚为一支, 然后与拟穴青蟹相聚(图 3)。

2.2 CCAP 基因组织表达分析

采用荧光定量 PCR 分析了三疣梭子蟹 CCAP 基因在不同组织中的相对表达情况。结果显示, CCAP 基因在胸神经节中相对表达量最高, 脑、眼柄组织也有少量表达(图 4)。

2.3 盐度胁迫后 CCAP 基因在胸神经节中的差异表达分析

三疣梭子蟹在盐度胁迫后胸神经节中 CCAP 基因的表达情况如图 5 所示, 实验组在低盐胁迫后, CCAP 基因的表达量发生了明显的变化, 呈现先下降后上升的趋势, 盐度胁迫 6 h, 实验组 CCAP 基因的表达量显著低于对照组($P < 0.05$), 之

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Sequences of the primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
CCAP5' F	ATGCGAGACGCCAGGATGC	5' RACE
CCAP3' F	CAGATACTGAAGGAGGGACCGT	3' RACE
CCAP5' S	CCATCTTGTCTGAAGTTGCTCC	5' RACE
CCAP3' S	GGACATTGACAGCCTTCTTGA	3' RACE
CCAP R	CGCATTGCTTCCATCTTGTTTC	qPCR
CCAP F	CCTTTCTGCAATGCCTTCAC	qPCR
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	RACE
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	qPCR
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qPCR

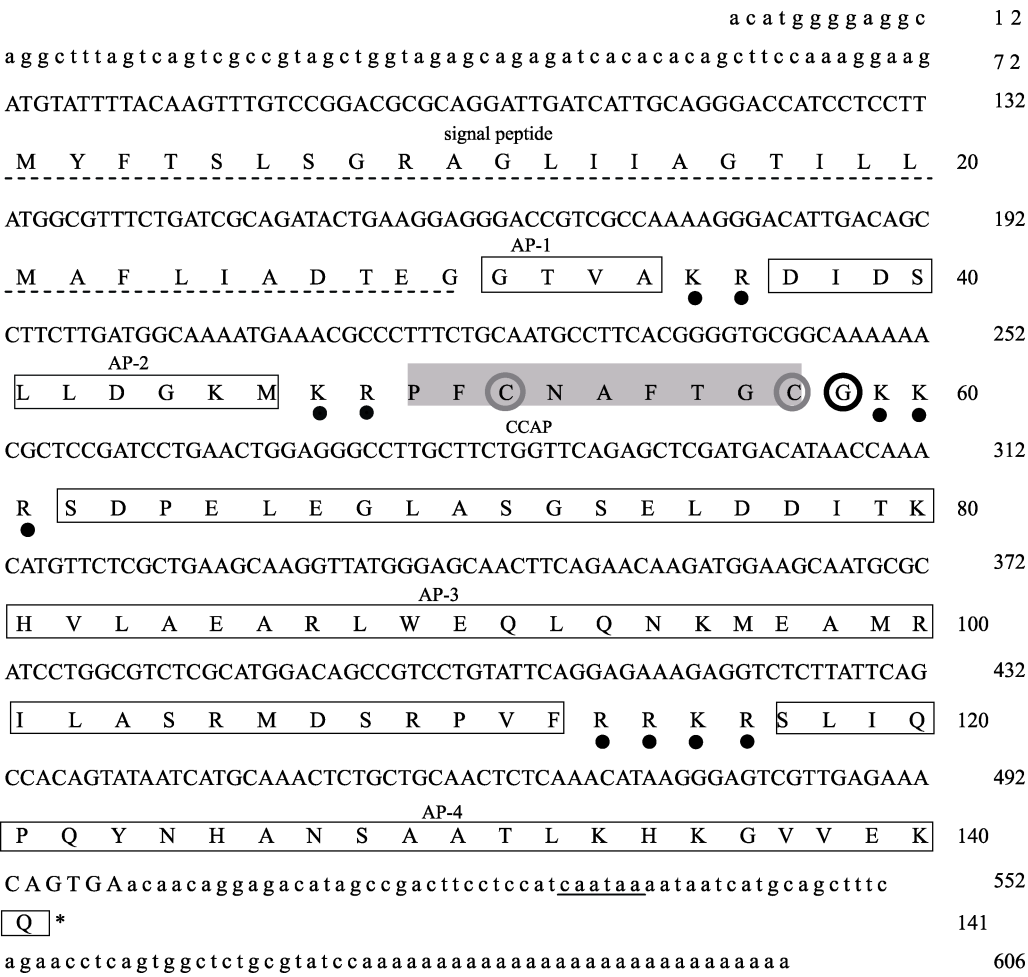


图 1 三疣梭子蟹 CCAP 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列
虚线表示信号肽, 实线表示加尾信号, 黑点表示酶切位点, 黑色圆圈表示酰胺化位点,
灰色圆圈表示保守性半胱氨酸, 黑色方框表示相关肽, 灰色部分表示成熟肽。

Fig. 1 CCAP nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Portunus trituberculatus*
The dotted line represents the signal peptide, the solid line represents the polyadenylation signal, the black dot represents the cleavage site, the black circle represents the amidation site, the grey circle represents the conservative cysteine, the black box represents the associated peptide, and the grey part represents the mature peptide.

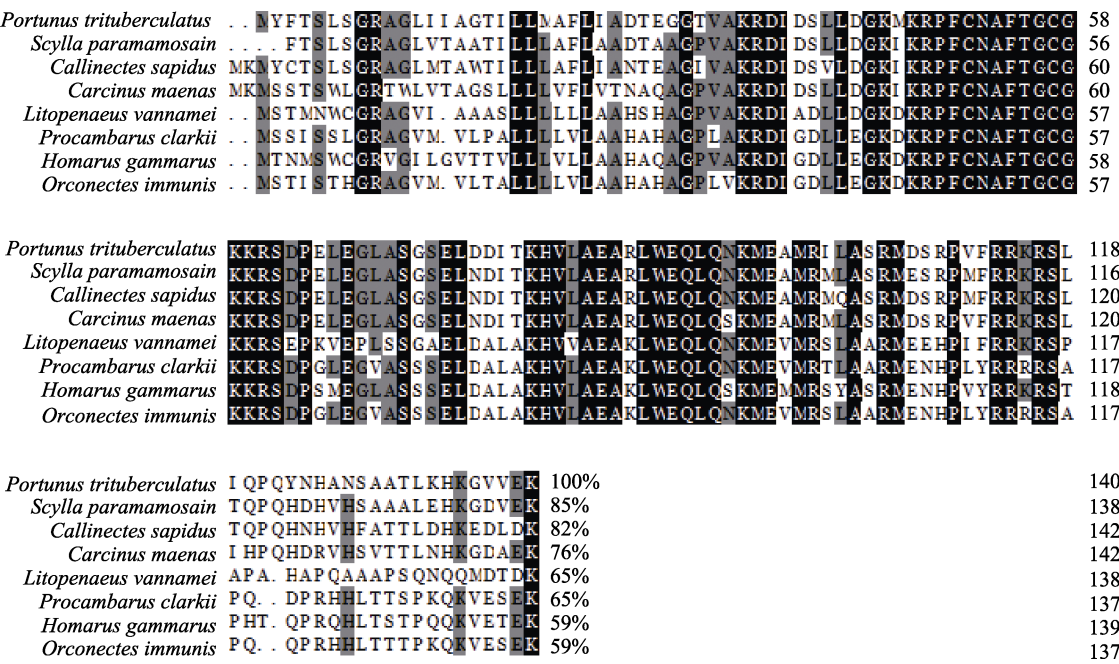


图 2 三疣梭子蟹 CCAP 氨基酸序列与其他甲壳动物 CCAP 氨基酸序列对比

Fig. 2 The CCAP amino acid sequence alignment of *Portunus trituberculatus* and that of other crustaceans

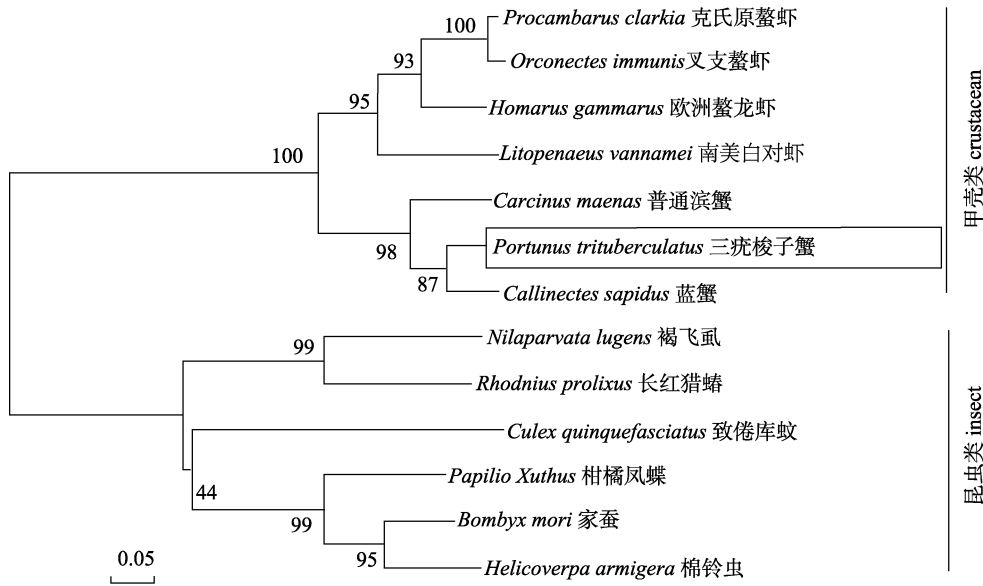


图 3 CCAP 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig. 3 The Neighbor-Joining Phylogenetic tree for amino acid sequences of CCAP

后逐渐上升, 在 24 h、48 h 和 72 h 实验组的表达量显著高于对照组($P<0.05$)分别为对照组的 1.73、2.16 和 2.19 倍。

2.4 注射 CCAP 多肽后三疣梭子蟹的活力分析及盐度相关酶活力测定

三疣梭子蟹在低盐胁迫下注射 CCAP 多肽组

和注射 PBS 组各时间点的死亡率如图 6 所示。7 h 注射 PBS 组死亡率为 24%, 注射 CCAP 多肽组死亡率为 4%, 12 h 后各时间点的死亡率增加趋势趋于一致。注射 CCAP 和 PBS 后, 鳃组织中 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 酶活趋势如图 7、图 8 所示。图 7 显示, 注射 CCAP 多肽组 Na^+/K^+ -

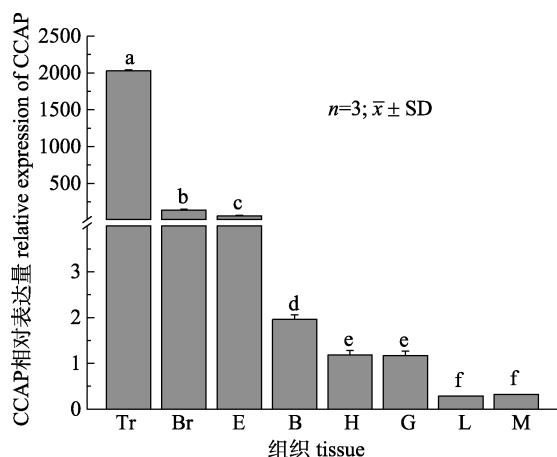


图 4 三疣梭子蟹 CCAP 基因在各组织中的表达
B, 血液; Br, 脑; E, 眼柄; G, 鳃; H, 心脏; L, 肝胰腺;
M, 肌肉; Tr, 胸神经节。柱上不同小写字母
代表不同组织中差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 4 Distribution of CCAP gene expression in different tissues of *Portunus trituberculatus*
B, blood; Br, brain; E, eyestalk; G, gill; H, heart;
L, liver; M, muscle; Tr, thoracalia.
Different lowercase letters indicated significant differences ($P<0.05$).

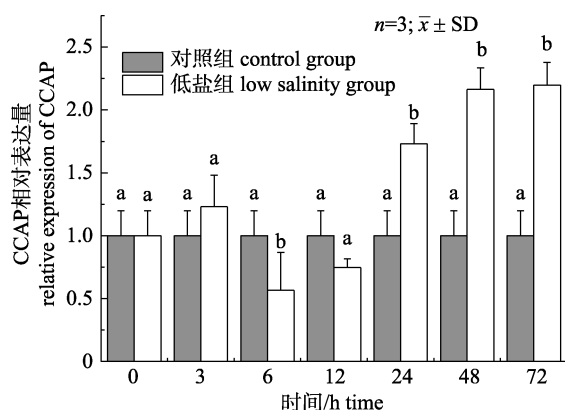


图 5 低盐胁迫下 CCAP 基因在胸神经节中的
表达水平随盐度胁迫时间的变化

不同字母代表同一时间实验组与对照组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 5 Expression profiles of CCAP gene in thoracalia after low salinity stress of *Portunus trituberculatus*
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$).

ATPase 活力较对照组呈现先上升后降低的趋势并且在 3 h 显著高于对照组, 是对照组的 1.9 倍, 12 h 和 24 h 则显著低于对照组; V-ATPase 酶活则呈现先上升后下降的趋势并且在 3 和 6 h 显著高于对照组, 均为对照组的 1.2 倍(图 8)。

3 讨论

本研究采用 RACE 技术获得了三疣梭子蟹

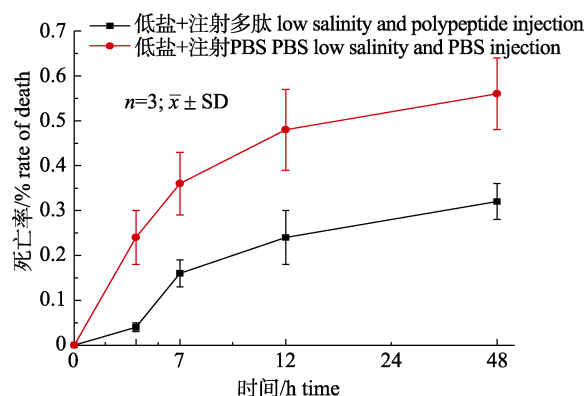


图 6 低盐胁迫下注射 CCAP 多肽后累计死亡率变化

Fig. 6 The rate of death after CCAP injection in low salinity of *Portunus trituberculatus*

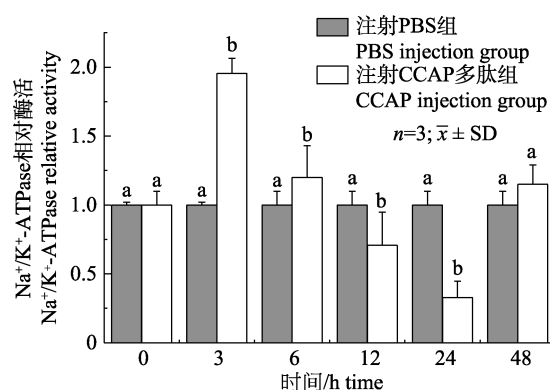


图 7 注射 CCAP 多肽后 Na^+/K^+ -ATPase
相对酶活随时间变化

不同字母代表同一时间实验组与对照组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 7 The relative enzyme activity of Na^+/K^+ -ATPase changes with time after CCAP injection of *Portunus trituberculatus*
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$).

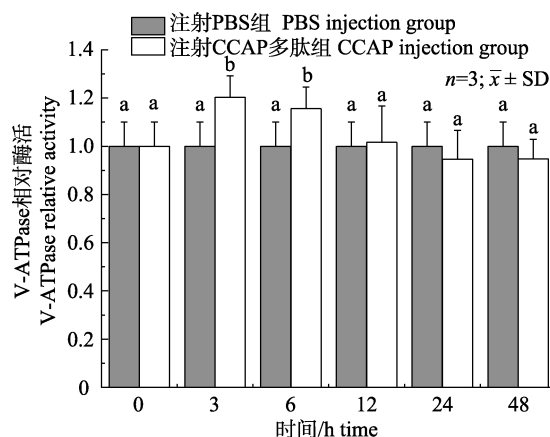


图 8 注射 CCAP 多肽后 V-ATPase 相对酶活随时间变化
不同字母代表同一时间实验组与对照组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 8 The relative enzyme activity of V-ATPase changes with time after CCAP injection of *Portunus trituberculatus*
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$).

CCAP cDNA 全长, CCAP 由 30 个氨基酸组成的信号肽和 AP1、AP2、九肽、AP3、AP4 组成。其中成熟肽序列 PFCNAFTGC 具有较高的保守性^[6, 20], 可能对节肢动物的生理活动起到了关键作用。同源性比较显示, CCAP 与拟穴青蟹的同源性较高; 系统进化树分析表明, CCAP 主要分为两个进化支, 三疣梭子蟹与蓝蟹、拟穴青蟹等甲壳动物聚为一支, 与昆虫类亲缘关系较远, 所以三疣梭子蟹 CCAP 在系统发生上归为甲壳动物 CCAP。

CCAP 在十足目动物中具有多种生理功能, 它不仅调节心率^[22-25], 还可以调节胃肠神经肌肉系统^[24-30], 诱导色素分布^[31-32], 诱导视网膜对光的敏感性并通过视网膜控制蜕皮^[18-19, 33-34]等功能。组织表达分析结果显示, CCAP 基因在胸神经节相对表达量最高, 在脑和眼柄少量表达。作为主要的神经内分泌器官, 眼柄、胸神经节和脑具有分泌多种激素的功能^[6, 35]。在胸神经节中, Berlind 等^[36]发现胸腺提取物能够降低低渗环境下水的渗入, McNamara 等^[37]研究表明外界环境变化时, 注射胸腺提取物可以使淡水沼虾 (*Macrobrachium olfersii*) 血淋巴中的离子浓度保持平衡, 提示胸神经节在甲壳动物渗透压调节中发挥了一定的作用。为了探索 CCAP 在三疣梭子蟹盐度适应中的作用, 本实验分析了低盐胁迫下 CCAP 在胸神经节中的表达变化规律。盐度胁迫 6 h CCAP 的表达量显著低于对照组, 推测其可能与盐度胁迫初期的应激反应有关, 随后 CCAP 表达量呈现逐渐上升的趋势, 24~72 h 显著高于对照组, 最高达 2.19 倍, 说明低盐胁迫激活 CCAP 的上调表达, 表明 CCAP 基因参与了三疣梭子蟹渗透压调节过程。

许多研究表明渗透压和离子转运过程受神经内分泌系统的调控, 例如去除双侧眼柄和单侧眼柄可改变斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 渗透压和离子浓度, 同样能够引起鳃组织中 Na^+/K^+ -ATPase 酶活性的改变^[38]。甲壳动物的鳃上皮依赖于各种酶进行渗透压调节活动, 其中 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 发挥了重要作用^[39]。Chen 等^[20]通过体外注射 CCAP 使得凡纳滨对虾在淡水中的耐受力增强, 存活率增加。本研究通过化学合成碳端酰

胺化的 CCAP 九肽并进行分子内二硫键的修饰, 随后注射到三疣梭子蟹体内。结果显示, 三疣梭子蟹在 7 h 实验组死亡率显著降低, 这一结果与 Chen 等^[20]的研究一致。进一步测定鳃组织中 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 酶的活力变化, 结果显示, 体外注射的 CCAP 对 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 酶活力具有一定激活作用, 尤其在注射后的 3~6 h CCAP 可以显著提高 Na^+/K^+ -ATPase 酶的活力 (最高达 1.9 倍)。而 Na^+/K^+ -ATPase 活力在 12~24 h 显著降低, 可能由于前期的 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 活力上升破坏了体内的渗透压平衡, 当 CCAP 降解时, Na^+/K^+ -ATPase 通过降低酶活力来稳定体内的渗透压, 间接证明了 CCAP 对 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 的调控作用, 同时也说明体外注射的 CCAP 在体内存在的时效性。之前报道高血糖素中的 CHH 和 ITP 可能在甲壳动物的渗透压调节中发挥了一定的调控作用^[40-41], 而本研究提供的直接证据表明 CCAP 在三疣梭子蟹低盐胁迫中发挥保护作用, 说明 CCAP 在三疣梭子蟹盐度适应中发挥了一定调节作用, 并可能通过调控 Na^+/K^+ -ATPase 和 V-ATPase 活力调节三疣梭子蟹体内渗透压平衡。

参考文献:

- [1] Dai A Y, Feng Z Q, Song Y Z, et al. Preliminary investigation on fishery biology of *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Zoology, 1997(2): 36-39. [戴爱云, 冯钟琪, 宋玉枝, 等. 三疣梭子蟹渔业生物学的初步调查[J]. 动物学杂志, 1977(2): 36-39.]
- [2] Sui Y M, Gao B Q, Liu P, et al. The tolerance to and optimal salinity for growth in swimming crab *Portunus trituberculatus* "Huangxuan No. 1"[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(5): 398-401. [隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(5): 398-401.]
- [3] Wang X Q, Cao M, Yan B L, et al. Integrated culture of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Fisheries Science, 2009, 28(2): 105-108. [王兴强, 曹梅, 阎斌伦, 等. 三疣梭子蟹综合养殖技术[J]. 水产科学, 2009, 28(2): 105-108.]
- [4] Zhou S L, Jiang N C, Lu J P, et al. Progress of the study on osmotic regulation in crustacean I. The gill's structure and function and its' concerned factors[J]. Donghai Marine Sci-

- ence, 2001, 19(1): 44-52. [周双林, 姜乃澄, 卢建平, 等. 甲壳动物渗透压调节的研究进展 I: 鳃的结构与功能及其影响因子[J]. 东海海洋, 2001, 19(1): 45-52.]
- [5] McNamara J C, Faria S C. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod crustacea: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(8): 997-1014.
- [6] Christie A E, Dickinson P S, Stemmler E A. Crustacean neuropeptides[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(24): 4135-4169.
- [7] Pan L Q, Liu H Y. Review on the osmoregulation of crustacean[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 109-114. [潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 109-114.]
- [8] Arakane Y, Li B, Muthukrishnan S, et al. Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. *Mechanisms of Development*, 2008, 125(11-12): 984-995.
- [9] Dirksen H, Keller R. Immunocytochemical localization of CCAP, a novel crustacean cardioactive peptide, in the nervous system of the shore crab, *Carcinus maenas* L.[J]. *Cell & Tissue Research*, 1988, 254(2): 347-360.
- [10] Stangier J, Hilbich C, Beyreuther K, et al. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(2): 575-579.
- [11] Fort T J, Garc Acrescioni K, Agricola H J, et al. Regulation of the crab heartbeat by crustacean cardioactive peptide (CCAP): central and peripheral actions[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2007, 97(5): 3407-3420.
- [12] Nichols R, Kaminski S, Walling E, et al. Regulating the activity of a cardioacceleratory peptide[J]. *Peptides*, 1999, 20(10): 1153-1158.
- [13] Chen W, Hillyer J F. FlyNap (triethylamine) increases the heart rate of mosquitoes and eliminates the cardioacceleratory effect of the neuropeptide CCAP[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e70414.
- [14] Tublitz N J, Allen A T, Cheung C C, et al. Insect cardioactive peptides: regulation of hindgut activity by cardioacceleratory peptide 2 (CCAP2) during wandering behaviour in *Manduca sexta* larvae[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1992, 165: 241-264.
- [15] Tublitz N J, Truman J W. Insect cardioactive peptides II neurohormonal control of heart activity by two cardioacceleratory peptides in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1985, 114: 381-395.
- [16] Marshall A K, Reynolds S E. Control of the insect oviduct: the role of the neuropeptide CCAP in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[C]. London: Cambridge University Press, 1998: 334-353.
- [17] Li B, Beeman R W, Park Y. Functions of duplicated genes encoding CCAP receptors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(9): 1190-1197.
- [18] Chung J S, Webster S G. Expression and release patterns of neuropeptides during embryonic development and hatching of the green shore crab, *Carcinus maenas*[J]. *Development*, 2004, 131(19): 4751-4761.
- [19] Philippen M K, Webster S G, Chung J S, et al. Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2000, 203: 521-536.
- [20] Chen T, Ren C H, Wang Y H, et al. Crustacean cardioactive peptide (CCAP) of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Molecular characterization and its potential roles in osmoregulation and freshwater tolerance[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 405-412.
- [21] Chung J S, Wilcockson D C, Zmora N, et al. Identification and developmental expression of mRNAs encoding crustacean cardioactive peptide (CCAP) in decapod crustaceans[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209: 3862-3872.
- [22] Cruz-Bermúdez N D, Marder E. Multiple modulators act on the cardiac ganglion of the crab, *Cancer borealis*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210: 2873-2884.
- [23] Wilkens J. Possible mechanisms of control of vascular resistance in the lobster *Homarus americanus*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, 200: 487-493.
- [24] Fort T J, García-Crescioni K, Agricola H J, et al. Regulation of the crab heartbeat by crustacean cardioactive peptide (CCAP): central and peripheral actions[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2007, 97(5): 3407-3420.
- [25] Stangier J, Hilbich C, Beyreuther K, et al. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(2): 575-579.
- [26] Chung J S, Wilcockson D C, Zmora N, et al. Identification and developmental expression of mRNAs encoding crus-

- tacean cardioactive peptide (CCAP) in decapod crustaceans[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209: 3862-3872.
- [27] Pulver S R, Marder E. Neuromodulatory complement of the pericardial organs in the embryonic lobster, *Homarus americanus*[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2002, 451(1): 79-90.
- [28] Stangier J, Hilbich C, Dircksen H, et al. Distribution of a novel cardioactive neuropeptide (CCAP) in the nervous system of the shore crab *Carcinus maenas*[J]. *Peptides*, 1988, 9(4): 795-800.
- [29] Richards K S, Marder E. The actions of crustacean cardioactive peptide on adult and developing stomatogastric ganglion motor patterns[J]. *Journal of Neurobiology*, 2000, 44(1): 31-44.
- [30] Trube A, Audehm U, Dircksen H. Crustacean cardioactive peptide-immunoreactive neurons in the ventral nervous system of crayfish[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 1994, 348(1): 80-93.
- [31] Granato F C, Tironi T S, Maciel F E, et al. Circadian rhythm of pigment migration induced by chromatophorotropins in melanophores of the crab *Chasmagnathus granulata*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 138(3): 313-319.
- [32] Nery L E, Da Silva M A, Castrucci A M. Possible role of non-classical chromatophorotropins on the regulation of the crustacean erythrophore[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 284(6): 711-716.
- [33] Wilcockson D C, Webster S G. Identification and developmental expression of mRNAs encoding putative insect cuticle hardening hormone, bursicon in the green shore crab *Carcinus maenas*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(1): 113-125.
- [34] Gaus G, Stieve H. The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish *Orconectes limosus*[J]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1992, 47(3-4): 300-303.
- [35] Dircksen H, Keller R. Immunocytochemical localization of CCAP, a novel crustacean cardioactive peptide, in the nervous system of the shore crab, *Carcinus maenas*[J]. *Cell & Tissue Research*, 1988, 254(2): 347-360.
- [36] Berlind A, Kamemoto F I. Rapid water permeability changes in eyestalkless euryhaline crabs and in isolated, perfused gills[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1977, 58(4): 383-385.
- [37] McNamara J C, Salomão L C, Ribeiro E A. Neuroendocrine regulation of osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (crustacea, decapoda)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 84(1): 16-26.
- [38] Wiwiegweaw A, Udomkit A, Panyim S. Molecular structure and organization of crustacean hyperglycemic hormone genes of *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(2): 177-184.
- [39] Morris S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204: 979-989.
- [40] Tiu S H K, He J G, Chan S M. The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed putative ion transport peptide (LvITP) for osmo-regulation[J]. *Gene*, 2007, 396(2): 226-235.
- [41] Liu M Q, Pan L Q, Li L, et al. Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Peptides*, 2014, 53: 115-124.

Cloning of crustacean cardioactive peptide and its functional verification under low-salt adaptation in swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

SUN Dongfang¹, LYU Jianjian^{1,2}, GAO Baoquan^{1,2}, HUAN Pengpeng¹, CAI Ying¹, LIU ping^{1,2}

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, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: The swimming crab *Portunus trituberculatus*, an important marine economic animal widely distributed in China, belongs to Crustacea, Decapoda, Decapoda, *Portunidae*, *P. trituberculatus* is an aquatic crustacean with wide tolerance to salinity (13.7–47.7). Salinity is one of the most important environmental factors affecting the growth and development of *P. trituberculatus*. Ingestion, molting, growth, metabolism, immunity, and other processes in *P. trituberculatus* are greatly affected by salinity. Therefore, it is important to study the mechanism of salinity adaptation to breed improved salt-tolerant varieties of *P. trituberculatus*. In this study, random amplification of cDNA ends technology was used to clone the crustacean cardioactive peptide (CCAP) gene. The full-length CCAP gene was 606 base pairs (bp) long, including an open reading frame of 426 bp, 5' untranslated region of 72 bp, and 3' untranslated region of 108 bp, with a poly A structure. Amino acid sequence analysis showed that the CCAP gene encodes 141 amino acids with a predicted molecular weight of 15.6 kD and isoelectric point of 9.55. Homology analysis showed that the homology between CCAP of *P. trituberculatus* and *Scylla paramamosain* and *Callinectes sapidus* was higher at 85% and 82%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *P. trituberculatus* and *C. sapidus* were clustered first, followed by *S. paramamosain*. Tissue expression analysis revealed that the relative expression of the CCAP gene was highest in the in thoracic ganglia, followed by in the brain and eye stalk. Analysis of the expression pattern of the CCAP gene during low-salinity stress showed that low salinity significantly altered the expression pattern of CCAP in the thoracic ganglia; CCAP gene expression in the experimental group was significantly higher than that in the control group at 24, 48, and 72 h ($P < 0.05$) with values 1.73-, 2.16-, and 2.19-fold higher than that in the control group, respectively. *In vitro* injection of CCAP polypeptide reduced the mortality of *P. trituberculatus* under low-salinity conditions and the activities of Na^+/K^+ -ATPase and V-ATPase were significantly increased. The results demonstrate that CCAP plays a protective role in *P. trituberculatus* under low-salinity conditions by regulating osmotic pressure and may be associated with increased Na^+/K^+ -ATPase and V-ATPase activities to modulate the osmotic pressure balance in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; crustacean cardioactive peptide; gene cloning; salinity stress; polypeptide injection

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn