

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15149

三疣梭子蟹核受体基因 *HR38* 的克隆及其在蜕皮中的表达分析

张龙涛^{1,2}, 吕建建¹, 高保全¹, 刘萍¹, 付萍¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 采用 RACE 技术, 克隆出三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)核受体基因 *HR38* 的 cDNA 全长, 命名为 *PTHR38*。该基因 cDNA 序列全长为 2950 bp, 5'和 3'非编码区(UTR)长分别为 101 bp 和 551 bp, 开放阅读框(ORF)长 2298 bp。推测编码 765 个氨基酸, 预测分子量为 84.2 kD, 理论等电点为 6.3。生物学分析预测, *PTHR38* 基因编码的蛋白属于不稳定蛋白, 不具有跨膜结构域。同源性分析表明, *PTHR38* 基因编码的氨基酸序列与大型溞(*Daphnia magna*)的同源性最高。实时荧光定量分析表明, *PTHR38* 基因在蜕皮周期的各个组织中均有差异表达, 在眼柄中表达差异最大。去除单侧眼柄后, *PTHR38* 的表达量在整体上呈现不同程度的上升趋势。

关键词: 三疣梭子蟹; 核受体; *HR38*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0307-09

甲壳类的蜕皮行为与其生长、发育、繁殖、附肢再生等生理过程密切相关, 并贯穿其整个生活史。甲壳类蜕皮调控机制以及参与的调控因子, 一直以来都是国内外学者所关注的重点^[1]。因此, 甲壳类的蜕皮过程以及影响因素的研究取得了一定的进展, 研究范围主要集中在蜕皮激素、高血糖激素家族、甲基法尼酯等内分泌激素的含量变化及其生理功能, 以及影响蜕皮的外源性因素等方面^[2-4]。尽管蜕皮激素在甲壳动物蜕皮中非常重要, 但是关于蜕皮激素的作用机制研究还不够系统与深入^[5-6]。

核受体是一类在生物体内广泛分布的配体依赖性转录因子, 能够与相应的配体及其辅调节因子相互作用, 调控基因的表达^[7]。蜕皮激素与核受体家族中的蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)以及超气门蛋白(ultraspiracle, USP)形成异二聚体启动蜕皮级联反应, 作为一条典型的蜕皮激素信号通路在昆虫中已被广泛地研究。*HR38* 作为孤儿核

受体家族(orphan nuclear receptors)的成员, 是除 EcR 之外, 唯一一个能与 USP 形成异二聚体的核受体^[6]。在果蝇(*Drosophila*)的研究中, Baker 等^[8]发现并证明了 *HR38* 和 USP 通过形成的异二聚体复合物的分解而参与调控了一条不同的蜕皮激素信号通路。除此之外, 也有研究证明 *HR38* 在调控蜕皮激素早期应答基因、碳水化合物代谢、表皮的形成等方面具有重要的作用^[9-11]。尽管 *HR38* 在果蝇中具有比较深入的研究, 但是在其他物种中尤其是水生甲壳类, 关于 *HR38* 的报道却十分稀少和罕见。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是中国主要的海产经济蟹类, 资源丰富, 并且在国内具有广泛的养殖面积。但是养殖生产过程中出现的如蜕皮成活率波动大、同步蜕皮水平低、性早熟等问题的解决也迫切需要理论方面的支持。鉴于 *HR38* 在典型与非典型蜕皮激素信号通路中都具有重要的作用, 本研究从实验室构建的三疣梭子

收稿日期: 2015-07-02; 修订日期: 2015-08-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41306177; 41576147).

作者简介: 张龙涛(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: zhanglongt@126.com

通信作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

蟹转录组文库中获得一个 HR38 的 EST 序列, 该序列同时也是蜕皮周期表达差异显著的 EST 序列。对 *HR38* 基因进行全长克隆、生物信息学分析以及蜕皮周期表达分析, 初步探讨其与蜕皮周期的关系。本研究旨在克隆 *HR38* 基因的 cDNA 全长, 探讨 *HR38* 基因在三疣梭子蟹蜕皮过程中的表达模式, 进一步丰富核受体基因家族的研究内容。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用三疣梭子蟹取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地日照开航水产养殖有限公司, 体重为(32±5) g。暂养于室内圆柱形水泥池内, 水温约 25℃, pH 8.7, 溶解氧 5.5 mg/L。暂养 3 天, 每日 8:00 定时换掉 1/2 的水, 16:00 投喂蛤类或者野杂鱼(投喂量为蟹重的 1/10)。

SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司; DNA 胶回收试剂盒购自北京 TIANGEN 公司; TRIzol Regent、PrimeScript RT reagent Kit、PMD18-T 载体和 Top 10 感受态细胞购自 TaKaRa 公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 和 FastStart Universal SYBR Green Master 荧光定量试剂购自 ROX 公司。

1.2 三疣梭子蟹 *HR38* 全长 cDNA 的克隆

采用 Trizol 法提取肝胰腺、肌肉、眼柄和性腺组织的总 RNA, 核酸定量仪和 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量以及完整性, 按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 说明书合成 3'RACE 和 5'RACE 的 cDNA 第一链。

选取得到的 *HR38* 基因 EST 序列, 用 Primer 软件设计 EST 序列验证引物、3'RACE 的特异性引物和巢式 PCR 反应的特异性引物(表 1)。采用 LA Taq 进行中间片段的 PCR 扩增以及验证。采用 Advantage 2 PCR Kit 试剂进行末端扩增, 3'RACE 利用特异性引物 HR38-F1、通用引物 UPM 和 3'RACE 模板进行 PCR 反应。将 PCR 产物进行 50 倍稀释, 作为巢式 PCR 反应的模板。3'RACE 巢

式 PCR 反应的引物为 HR38-F2 和通用引物 NUP。按照 3'RACE 的步骤, 进行相应的 5'RACE 扩增。将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、切胶纯化并且连接到 PMD18-T 载体, 转化入大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中, 在培养基中 37℃过夜培养后, 挑取阳性菌落继续培养。进行菌落 PCR 后, 挑选含有目的条带的菌液送交上海桑尼公司测序。

表 1 实验中所用到的引物
Tab. 1 Sequences of the primers used in this experiment

	引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
RACE	HR38-F1	TCTCAGTGCCTGAGTGCATTGGC
	HR38-F2	TTTGTATACCATGTCTAACTCCGCGAC
实时定量 PCR	QHR38-F	CCAGAGCGAGTGTTGGAGA
	QHR38-R	GCAGGGTTGAGTATGTCACG
	β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
	β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC

1.3 核苷酸序列和氨基酸序列的生物学分析

采用 NCBI 中的 BLAST 主页程序经行主要的核苷酸序列以及氨基酸序列的比对。用 Vector NTI 11.0 进行核苷酸序列的拼接比对、冗余序列的去除、开放阅读框的预测和氨基酸的翻译。采用 DNAMAN 进行氨基酸序列的比对。用 SMRAT (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>)在线软件进行蛋白质跨膜区的分析。用 ProParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件进行氨基酸残基分析及蛋白质等电点、分子量等的预测。利用 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.4 蜕皮周期的取样及去除单侧眼柄实验

取暂养后处于蜕皮间期、蜕皮前期、蜕皮后期的蟹各 6 只, 分别取其眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、血液、鳃、表皮, 每两只的样品存放于一个 EP 管中, 存放于液氮中保存。采用解剖镜观察三疣梭子蟹游泳足表皮生长状况的方法来区分不同蜕皮时期^[12]。

采用烫伤法去除三疣梭子蟹的单侧眼柄。将烧红的镊子夹住蟹眼后红色膨大部分基部(此处为眼柄窦窝复合体)1~2 s, 破坏单侧眼柄的分泌及调控功能。用土霉素按照 50~100 mg/L 的浓度

进行全池的消毒。暂养 7 d 后挑取处于蜕皮间期、蜕皮前期、蜕皮后期的蟹,取眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、血液、鳃,存放于液氮中保存。

1.5 三疣梭子蟹 *HR38* 基因的表达定量分析

将存放于液氮中的组织进行研磨,加入 Trizol 后震荡混匀。按照 Trizol 法提取 RNA 的步骤提取各个组织的 RNA,并检验 RNA 的质量与完整性,采用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。

在 ABI 7500 Real Time PCR 平台对各个组织的基因表达情况进行测定。以 β -actin 基因作为内参,采用的实时定量反应程序:95℃ 10 min;95℃ 10 s,60℃ 34 s,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。将得到的 C_t 值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *HR38* 基因的相对表达量,并用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,获得其显著性。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹 *HR38* 基因 EST 序列的验证及 cDNA 全长的获得

总共分三段验证 *HR38* 的 EST 序列,得到三条长度分别为 537 bp、978 bp 和 967 bp 的片段,验证出长达 2482 bp 的 EST 序列的正确性。3'RACE 末端扩增得到 376 bp 的片段,用 Vector 软件拼接得到的片段和 EST 序列,去除冗余序列后得到三疣梭子蟹的 *HR38* 基因全长 cDNA 序列,命名为 *PTHR38*,GenBank 登录号:KP954701。该基因 cDNA 序列全长 2950 bp,包括 2298 bp 的开放阅读框(ORF),101 bp 的 5'端非编码区(UTR)和 551 bp 的 3'UTR(图 1)。

2.2 三疣梭子蟹 *HR38* 基因序列的生物信息学分析

从 *HR38* 氨基酸序列分析可知,该基因编码一个由 765 个氨基酸组成的蛋白质,预测分子量为 84.2 kD,理论等电点为 6.3。采用 InterProScan 在线软件分析,*PTHR38* 属于孤儿核受体家族,具有核受体锌指结构、DNA 结合结构域(DBD)和配体结合结构域(LBD),没有跨膜结构域。采用 ProtParam tool 软件分析,该基因负电荷的氨基酸

残基总数(Asp+Glu)为 74,正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为 65,不稳定系数计算值为 64.49,亲水性平均数为-0.473,是一类不稳定的蛋白。

利用 NCBI BLAST 对三疣梭子蟹 *HR38* 基因编码的氨基酸序列进行比对,并与其他物种进行同源性分析。发现该序列与大型蚤(*Daphnia magna*)的 *HR38* 相似性最高,为 70.6%。与其他物种如印度跳蚊(*Harpegnathos saltator*, XM 011145302.1)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, Y15606.1)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*, AAF23095.1)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*, XM 008196098.1)、佛罗里达弓背蚊(*Camponotus floridanus*, EFN73183.1)、剑水蚤(*Tigriopus japonicus*, AID52854.1)和意蜂(*Apis mellifera*, XP 006560458.1)的 *HR38* 的相似性分别为 67.3%、60.4%、55.3%、52.7%、50.5%、48.0% 和 45.7%。

利用 MEGA 6.0 软件进行系统进化分析,结果表明,切叶蚁(*Acromyrmex echinator*)、印度跳蚊和意蜂的 *HR38* 亲缘关系较近,三疣梭子蟹 *PTHR38* 与昆虫 *HR38* 亲缘关系较近(图 2)。将三疣梭子蟹 *PTHR38* 基因编码的氨基酸序列与大型蚤、印度跳蚊、黑腹果蝇和埃及伊蚊的 *HR38* 基因编码的氨基酸序列进行比对,发现 DNA 结合区与配体结合区保守度较高(图 3)。

2.3 三疣梭子蟹 *HR38* 基因的表达定量分析

对三疣梭子蟹各个组织中 *HR38* 基因在不同蜕皮时期的表达情况进行实时荧光定量分析。结果显示,在蜕皮周期的各个组织中,*PTHR38* 基因均有差异表达。其中,眼柄组织中,该基因在蜕皮后期的表达量明显低于蜕皮前期和蜕皮间期。肌肉和肝胰腺中,该基因表现为蜕皮后期表达量高于蜕皮前期和蜕皮间期。表皮中,该基因在蜕皮前期和蜕皮后期表达量升高(图 4)。

去除单侧眼柄后,对三疣梭子蟹在不同蜕皮时期与相应的正常对照组进行相对定量分析。结果显示,在整体上看,去除单侧眼柄后,*PTHR38* 基因的表达量呈不同程度的上升趋势。但是在各个时期的肝胰腺组织中,*PTHR38* 基因在去除单侧眼柄后表达量明显降低(图 5—图 7)。

1 GTCCGCTTCG GTTGTAGTGT GTGTCGTCG TGGCCAGAGC GAGTGTGGA GAATATACAC CAGAATACCT CGCCTGTATC GTGACCTCTC 90
M R D L W Y E T Y L D L D Q L T Y T G V T A
91 TAGTCTCTA G ATG AGG GAC CTG TGG TAC GAG ACC TAC CTT GAC CTG GAT CAG CTC ACC TAC ACG GGG GTC ACC GCC 167
A G Q G D L A F P H L T S S H V T Y S T L P V T S
168 GCC GGA CAG GGT GAC TTG GGC TTC CCA CAC TTG ACC TCA AGT CAC GTG ACA TAC TCA ACC CTG CCT GTG ACC TCA 242
S T P S P P V P A L A P I K S S P D S P E A P A D
243 AGC ACA CCC TCG CCG CCC GTA CCG GCG CTG GCA CCC ATC AAA TCC TCT CCT GAC TCG CCA GAG GCA CCA GCT GAC 317
F G Y N L G V D V T Q E S P L T P D D T P A V P H
318 TTC GGC TAC AAT CTA GGC GTG GAC GTG ACG CAG GAG AGC CCC CTC ACG CCC GAC GAC ACG CCT GCC GTG CCC CAC 392
P A F T P P H S H A H N M L V L Q P Q Q S L L H Q
393 CCA GCC TTC ACG CCG CCC CAC TCC CAC GCC CAC AAC ATG CTC GTC CTC CAA CCA CAG CAG TCA CTG CTC CAC CAG 467
S M A E A L T A S Y S L S P S F G D D S L S G T T
468 AGT ATG GCT GAG GCG CTG ACC GCG TCC TAC AGC CTA TCT CCT TCC TTC GGC GAC GAC TCC CTG AGC GGG ACC ACC 542
S D D F K L G S A F T A T P T Q S Y G E G G N D S
543 AGT GAT GAC TTC AAG CTA GGA TCA GGC TTC ACG GGC ACT CCC ACC CAG AGC TAT GGC GAA GGA GGC AAC GAC TCT 617
F S S E I F Q A E Y L P A Q P L E D L K P V I T
618 TTC AGC AGC GAA ATT TTC CAA GCA GAA TAT TTG CTT CCA GCG CAG CCC CTG GAA GAC CTG AAG CCC GTC ATC ACC 692
H P P T G A S P P R S P G H A A S T P V S V A A Q
693 CAT CCA CCC ACT GGC GCC TCG CCT AGA TCT CCA GGC CAG GCA GCA TCA ACG CCC GTT TCA GTA GCA GCC CAG 767
G G A S A L P S F Q E T Y S P R Y R P L G S A E V
768 GGA GGA GCT TCT GCT CTG CCT AGC TTC CAG GAG ACT TAC TCC CCA AGA TAC AGA CCA CTC GGC TCC GCT GAA GTT 842
F T F N K T D D G R P V E Y P Q P P P A H Q A F T
843 TTC ACT TTC AAC AAG ACT GAT GAT GGC AGA CCT GTG GAG TAC CCG CAG GAG CCT CCC CCA GCT CAG GGC TTC TCT ACC 917
Q A S P Q H Q Q Q P Q L Q Q Q Q P Q Q Q Q L S Q
918 CAA GCC TCC CCG CAG CAC CAG CAG CAA CCA CAA CTA CAA CAA CAG CAA CCA CAA CAG CAA CAG CTC TCA CAG 992
Q Q Q Q P A P S F E A Y P H P S Q V Y S R P A P Y
993 CAG CAG CAG CAG CCA GCC CCG TCC TTC GAG GCT TAC CCC CAC CCG TCA CAA GTG TAC TCC CGG CCC GCA CCC TAC 1067
P S P S V P V T H A Y T T S T K A F G G E F Y P A
1068 CCT AGC CCC TCT GTG CCC GTC ACT CAC GCC TAC ACC ACT TCA ACC AAG GCC TTT GGT GGA GAG TTC TAC GCT GCT 1142
G P T Y D P L Q P L P H E Q Y I R P S T S H H Y T
1143 GGT CCT ACC TAC GAG CCT CTG CAG CCC CTG CCT CAT GAG CAG TAC ATC CGC CCC TCC ACT TCC CAC CAC TAC ACT 1217
E M G A A S T S T P S V S F I G R K T A V E H I
1218 GAG ATG GGA GCC GCC TCC ACC TCC AGC ACA CCT TCT GTG TCC TTC ATT GGC CGC AAG ACA GCC GTT GAG CAC ATT 1292
D P A L M R L H P S P M T S A A R P V S E Q K P Q
1293 GAT CCA GCA CTA ATG AGG CTC CAC CCC TCG CCC ATC ACC TCC GCA GCC AGA CCA GTG AGT GAA CAG AAG CCC CAG 1367
S P A Q L C A V C G D T A A C Q H Y G V R T C E G
1368 TCC CCG GCG CAG CTG TGC GCA GTG TGC GGC GAC ACG GCC GCC TGC CAA CAT TAC GGG GTC CGT ACA TGT GAA GGA 1442
C K G F F K R T V Q K N A K Y V C L A D K N C P V
1443 TGC AAG GGA TTC TTC AAG GCG ACC GTC CAG AAA AAT GCC AAA TAT GTT TGT CTT GCA GAC AAG AAC TGT CCC GTG 1517
D K R R R N R C Q F C R F Q K C L V V G M V K E V
1518 GAC AAG CGA CGC CGC AAC AGG TGT CAG TTC TGC CGC TTC CAG AAG TGT TTG GTG GTA GGA ATG GTG AAG GAA GTG 1592
V R T D S L K G R R G R L P S K P K S P Q E S P P
1593 GTC AGA ACT GAC AGT TTG AAA GGC CGC GGC CGT CTG CCC AGC AAG CCC AAG AGT CCA CAG GAG TCT CCT CCC 1667
S P P V S L I T A L V R A H V D T T P D L A N L D
1668 TCA CCC CCC GTG TCC CTT ATC ACC GGC CTG GTG CGC GGC CAT GTA GAC ACC ACC CCT GAC CTC GCT ACG CTG GAC 1742
Y S Q Y R E P S S G A E S P S T E A E R I Q Q F Y
1743 TAC TCC CAG TAC CGC GAG CCA TCC AGC GGC GCC GAG TCT CCC TCC ACG GAG GCC GAG AGG ATC CAG CAG TTC TAC 1817
S L L T S S I E V I R H F A E K I P G Y H D L A R
1818 TCC CTC CTC ACC TCA AGC ATC GAG GTC ATT CGA CAC TTC GCA GAA AAG ATC CCC GGC TAT CAT GAC CTG GCC CGC 1892
E D Q D L L F Q S A S L E L F V L R V A Y R L V S
1893 GAG GAC CAG GAC CTC CTC TTC CAG TCT GCA TCC CTC GAG CTC TTC GTG TTG AGA GTT GCC TAC AGA CTC GTG AGT 1967
N P D D T K F V F D N G R V L H R S Q C D R S F G
1868 AAT CCG GAC GAC ACC AAG TTC GTG TTT GAC AAC GGC CGA GTC CTG CAC AGG TCA CAA TGT GAT CGT TCC TTC GGC 2042
E W L Q G I L D F S V S L K T M E L D I S A F A C
2043 GAG TGG CTG CAA GGC ATC CTG GAC TTC TCT GTC TCA AAG ACA ATG GAA CTG GAT ATT TCA GCA TTC GCT TGT 2117
L S A L T I I T E R H G L K D T K K V E Q L Q M K
2118 CTC TCA GCC CTG ACA ATC ATC ACA GAG CGA CAT GGA CTC AAG GAC ACC AAA AAG GTG GAG CAG TTG CAG ATG AAG 2192
I I S S L R D H V T Y N A E A Q K K P H Y F S R I
2193 ATC ATC AGC TCG CTC AGA GAT CAC GTG ACA TAC AAC GCA GAG GCG CAG AAG AAG CCT CAC TAC TTC TCA CGG ATC 2267
L G K L P E L R S L S V Q G L Q R I F Y L K L E D
2268 CTG GGT AAG CTG CCG GAG CTC CGG TCG CTC TCC GTG CAA GGC CTT CAG CGG ATC TTC TAC CTA AAA CTG GAG GAT 2342
L V P A P Q L I E N M F V S S L P F *
2343 CTG GTG CCT GCT CCT CAG CTC ATA GAG AAC ATG TTC GTG TCC AGT CTC CCC TTC TGA ACCCTTCGGA GATTCTAAAG 2419
2420 TCTTATCTC ACTAGCAAGG GTGCAAGGAG CTGCCCCCTC GCOCGCCCTC CTCGCCGGTC ACCCTCCAGA TGATGGTGAA GGGCTCTCA 2509
2510 GTGCCGTGAGT GCATTGGCCC CCGGAGCCAC AGGCGGTTTG TATACCAIGT CTAACCTCCG CACCTCGTCC TCCCGCCCGG GTGCTGTGTT 2599
2600 TCTTACGAC ACGCCCGCCC ATCAGAAAAT ATGATCAACC CAGATAGCCT CCGGGTGTTC CCAGCAGCGA GTCTCAGTCA GGACCCAAAC 2599
2690 CCTCGCGGCA CCACAGAGG GCTCCTGTG CTGCGGTGCT GAGGAGGCGG TGGCGGTGTC ACACGTACTC ATGATTGTIT CACAGAGTIA 2779
2780 CTTTGAAGC ATGAAGACTA TGTATTTC TGATAATTGG TACGTACATA GAGCGAGGTG GAAGGTAGCC GCGCGCGCG GAGGCCGACG 2869
2870 CGGCTGTIAG ACTTGTCAIT TTGGCGGAC GCCTGACAA ACTAGTCATT CTGTGATTTI ACTGAAAAA AAAAAAAA A 2950

图 1 三疣梭子蟹 *HR38* 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 方框: DNA 结合区; 下划线: 配体结合区。

Fig. 1 *HR38* nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Portunus trituberculatus*
ATG: the start codon; *: the stop codon; boxes: DNA binding domain; underline: ligand binding domain.

三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MRDLWYETYLDDLQTYTGVTAGQGLAFPHLTSSHVYSTLPVTSSTPSPVPALAIKSSPDSPEAPADFNGYLVGD	80
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>		0
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>		0
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>		0
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>		0
Consensus		
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	VTQESPLTPDDTPAVPHPAFTPPHSHAHNMLVLQFQQSLHQSMAEALTASYLSLSPFGDDSLSGTTSDDFKLGSFTAT	160
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>		0
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>		0
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>		0
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>		0
Consensus		
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	PTQSYGEGGNDSSFSEIFAQAYLLPAQPLEDLKPVITHPTGASPPRSPGHAASTPVSVAAQGGASALPSFQETYSPPRYR	240
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	MDEDCFKIAASPHQSVGYGHGHHAAVHQPHY	36
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>		0
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	FPPLSGGWSASPP.APSQLQQLHTLQSQAQMSHPNSSNNSSNNAGNSHNSG	51
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>		0
Consensus		
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	PLGSAEVFTFNKTDGPRVEYPPPPAHQAFTQASPPHQQQPQLQQQQPQQQLSQQQQPAPSPFEAYPHPSQVYSRPA	320
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	EFFQHTTAPPTQYSNPSPGGSFYPTPAYEQHAASVQPRNTTQTNTSTIVSFPQNYGAVTPQDSYSLPFPFTIAELHVSIT	116
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>		0
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	GYNYHGFN.AINASANLSPSSASSLYEYNGVSAANDFYGQQQQQQQSYQHNYNSHNGERYSLPTFTTISELAATA	130
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	MVYGAPTAIANVAAPVAAPTDLCEENVDTVVVGT	34
Consensus		
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	PYPSPSVFVTHAYTTSTKAFGEFYPAGTYDPLQLPHEQYIRPSTSHHYTEMGAASSTSTPSVSFIG.....RKTA	393
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	C.....YRRAS.....LPLQSESTSS..SESEKPPRVGIYKYSALPSASSASSSPGYINNNNPNTINNNE	176
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>		0
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	AVEAAAAATVGGPPPVRRAS.....LFPVQRTVSFAGSTAQSPFLAKITLNQRHSHAHALQLNSAPN.....	193
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	R.....SRRAS.....LTPQSEASSSGSTESPKPRGS.....GSGGTASVSVPSP.....	76
Consensus		
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	VEHIDPALMLHPSMPTSAARPVSEQKQPSAOLCAVCGDIAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNKYVCLADKNCVPD	473
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	VAAAAAAVAAAAVAGSATPAPRGPTQPSOLCAVCGDIAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKGSKYVCLADKACVPD	256
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	PSOLCAVCGDIAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKGSKYVCLADKNCVPD	50
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	SAASSPASADLQAGR.LLQAPSOOLCAVCGDIAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKGSKYVCLADKNCVPD	262
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	GSGTSGGER.APPSPSOOLCAVCGDIAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKGSKYVCLADKACVPD	139
Consensus	p qicavcgd aacqhygvrtcegckgffkrtvqk kyvcla cpvd	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	KRRNRRCQFCRFQKCLVGMVKEVVRTDSLKGRRLPSKPKSFQESPPSPFVSILITALVRHVDTHPDLANIDYSQYRE	553
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	KRRNRRCQFCRFQKCLVGMVKEVVRTDSLKGRRLPSKPKSFQESPPSPFVSILITALVRHVDTHPDLANIDYSQYRE	336
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	KRRNRRCQFCRFQKCLVGMVKEVVRTDSLKGRRLPSKPKSFQESPPSPFVSILITALVRHVDTHPDLANIDYSQYRE	130
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	KRRNRRCQFCRFQKCLVGMVKEVVRTDSLKGRRLPSKPKSFQESPPSPFVSILITALVRHVDTHPDLANIDYSQYRE	342
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	KRRNRRCQFCRFQKCLVGMVKEVVRTDSLKGRRLPSKPKSFQESPPSPFVSILITALVRHVDTHPDLANIDYSQYRE	219
Consensus	krrnrqcqfcrfqkcl vgmvkevrvrtdslkgrgrlpskpk qe spp s italvr h dt p dys y	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	PSSGAE.....SPSTAEKICQFYSLTSSIFVTRHFAEKIPGYHDAAREDDQLLQASALEFVLRVAYRLVSNPD	626
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	PGQNE.....PIISBAEKVQFYSLTSSIFVTRHFAEKIPGYHDAAREDDQLLQASALEFVLRVAYRLVSNPD	406
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	QSGNEKQLASSHTTEVQADHIOBEALLTICIDVIRVMAEKIPGFCCLCKDQELLQASALEFVLRVAYRLVSNPD	208
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	QSMS.....EADKVCQFYQLTSSIFVTRHFAEKIPGYHDAAREDDQLLQASALEFVLRVAYRLVSNPD	407
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	PRPGD.....PPITEAEKICQFYSLTSSIFVTRHFAEKIPGYHDAAREDDQLLQASALEFVLRVAYRLVSNPD	289
Consensus	a qf llt vi a k pg l dq ll qsa le fv r yr d	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	TKFVFDNGRVLHRSQDQSFQWGLQGLTFESVSKTMELEDSAFACLTLTITRERGLKDKKVEQLQMKIISLDRHV	706
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	TKMTFONGVVLHKKHQQRQSFQWGLQGLTFESVSKTMELEDSAFACLTLTITRERGLKDKKVEQLQMKIISLDRHV	486
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	EKFIFDNGVVLHSSQCKPSFGFWGAIIEFAHSLHSMIDISAFACLTLTITRERGLKDKKVEQLQMKIISLDRHV	288
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	TKLIFONGTVLHRTQCLRSFGWGLQGLTFESVSKTMELEDSAFACLTLTITRERGLKDKKVEQLQMKIISLDRHV	487
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	TKLVEFONGVLALEQQQSFQWGLHSLTLECKALHFLVETDSAFACLTLTITRERGLKDKKVEQLQMKIISLDRHV	369
Consensus	k f ng vl qc sfg w i f l d safacl lt ter gl e lqmki slrdhv	
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	TYNPEACKKPHYFSRILKLPRLSLSVQGLQRIFYKLEDLVPAPLIENMFVSSLP	764
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	TYNSEACKKPHYFNRLKLPRLSLSVQGLQRIFYKLEDLVPAPLIENMFVSSLP	544
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	TYNPEACKKPHYFSRILKLPRLSLSVQGLQRIFYKLEDLVPAPLIENMFVSSLP	330
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	TYNPEACKKPHYFSRILKLPRLSLSVQGLQRIFYKLEDLVPAPLIENMFVSSLP	545
印度跳蚊 <i>Harpegnathos saltator</i>	TYNPEACKKPHYFSRILKLPRLSLSVQGLQRIFYKLEDLVPAPLIENMFVSSLP	427
Consensus	tyn eq k y l klpelrsls q l 1	

图 2 三疣梭子蟹 *HR38* 氨基酸序列与其他物种的 *HR38* 序列的比对Fig. 2 The amino acid sequence of *Portunus trituberculatus* *HR38* alignment with other species

3 讨论

HR38 作为孤儿核受体家族的成员, 研究证明了其直接与哺乳类的神经生长因子诱导基因

(*NGFIB*)同源^[13]。*HR38* 作为介导 20-羟蜕皮甾酮 (20E) 的非典型性信号通路的调节剂调节果蝇的蜕皮激素信号通路^[14]。除此之外, 也有研究发现 *HR38* 在表皮蛋白的合成和糖代谢中有重要的作

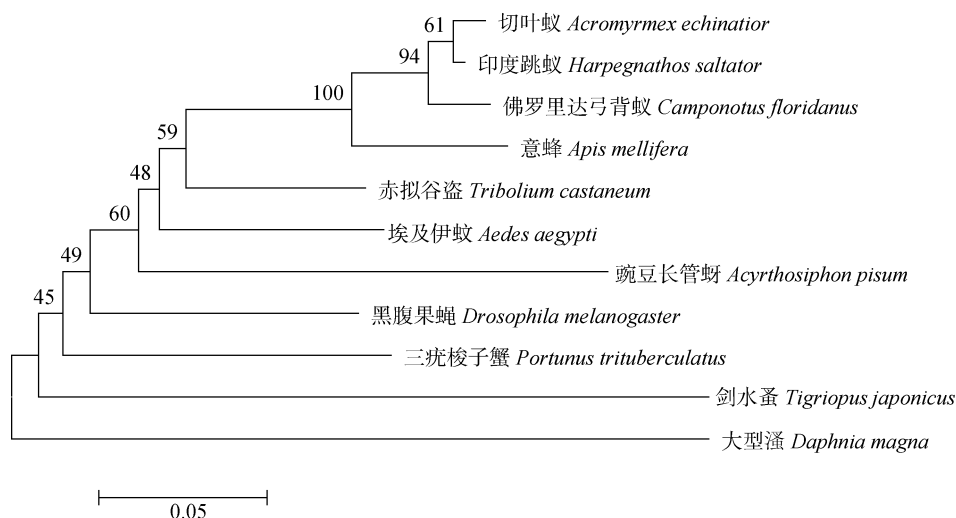


图 3 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建的三疣梭子蟹与其他物种的 HR38 氨基酸序列的系统进化树

分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度, 只显示置信度>80%的数值; 标尺长度代表每个位点发生 0.1 次置换。

Fig. 3 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* HR38 and other species made by MEGA 6.0. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1000 replicates; shown only when confidence coefficient >80%); the length of the scaleplate stands for it occurred substitution at 0.1 turn.

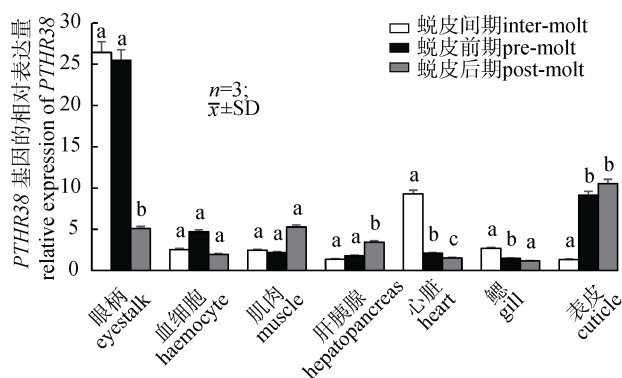


图 4 三疣梭子蟹 HR38 基因在不同蜕皮时期各个组织中的表达分布情况

同一组织内标有不同字母的时期之间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 4 Distribution of *HR38* gene expression in different tissues of different moult stage

Within the same tissue, different letters indicate significant difference between stages ($P < 0.05$).

用^[15]。但是关于 HR38 的研究报道主要集中在昆虫纲的几个物种上^[16-18]。本研究克隆出的三疣梭子蟹 HR38 基因 cDNA 全长 2950 bp, 推测编码 765 个氨基酸。生物学分析表明, 该基因具有核受体家族典型的锌指结构域、DNA 结合结构域 (DBD) 和配体结合结构域 (LBD), 其氨基酸序列与大型溞 (*Daphnia magna*) 的 HR38 相似性最高, 为 70.6%。

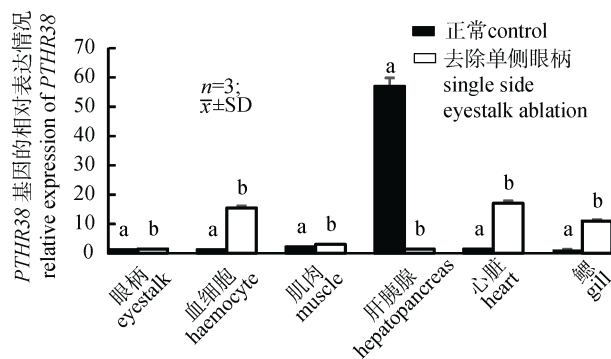


图 5 去除单侧眼柄后, PTHR38 基因在三疣梭子蟹蜕皮前期与正常对照各个组织中的相对表达情况

同一组织内标有不同字母的处理之间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 5 After single eye ablation, distribution of *PTHR38* gene expression in different tissues of pre-moult stage compared to normal condition

Within the same tissue, different letters indicate significant difference between different treatments ($P < 0.05$).

对三疣梭子蟹 HR38 在蜕皮周期的各个组织中的表达进行实时定量分析, 结果表明, 该基因在蜕皮周期的各个组织中均出现不同程度的差异表达现象, 由此推测 *PTHR38* 参与到了三疣梭子蟹的蜕皮调控过程中。Kozlova 等^[16]关于 HR38 的研究发现, 在整个发育时期 HR38 基因都有表达。血淋巴中该基因的表达量在蜕皮前期高于蜕皮间期和蜕皮后期, 这个表达模式与血液中 20E

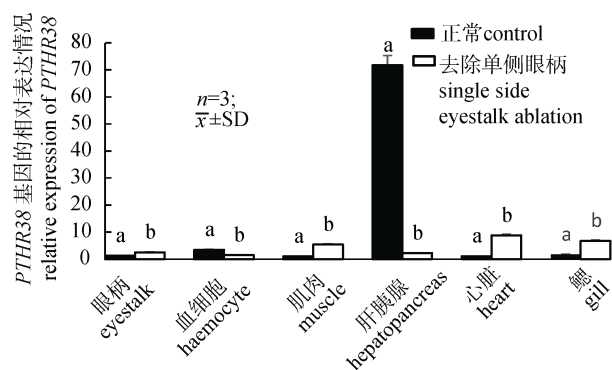


图6 去除单侧眼柄后, *PTHR38* 基因在三疣梭子蟹蜕皮间期与正常对照各个组织中的相对表达情况
同一组织内标有不同字母的处理之间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 6 After single eye ablation, distribution of *PTHR38* gene expression in different tissues of inter-moult stage compared to normal condition

Within the same tissue, different letters indicate significant difference between different treatments ($P < 0.05$).

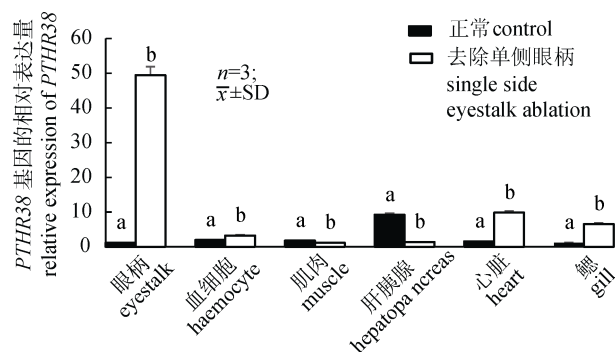


图7 去除单侧眼柄后 *PTHR38* 基因在三疣梭子蟹蜕皮后期与正常对照各个组织中的相对表达情况
同一组织内标有不同字母的处理之间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 7 After single eye ablation, distribution of *PTHR38* gene expression in different tissues of post-moult stage compared to normal condition

Within the same tissue, different letters indicate significant difference between different treatments ($P < 0.05$).

的浓度变化相一致^[19]。由此猜测 *PTHR38* 的表达水平在蜕皮过程中随着蜕皮激素浓度的变化而变化, 两者更趋向于协同调控关系。*PTHR38* 为核受体基因, 其参与的生理过程众多, 有研究表明, *HR38* 参与碳水化合物代谢和糖原的合成^[15]。在三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺中, 该基因在蜕皮后期表达量高于蜕皮前期和蜕皮间期, 推测该基因也参与到了三疣梭子蟹的物质能量代谢过程中。

甲壳类的神经内分泌调节中心的 X 器-窦腺复合体(XO-SG)着生于眼柄基部。XO-SG 合成和

分泌蜕皮抑制激素(MIH), MIH 作用于 Y 器官从而抑制蜕皮激素的合成^[20-21]。去除单侧眼柄, 可以减小 MIH 对 Y 器官的抑制作用, 使体内蜕皮激素水平增高^[22-23]。对去除单侧眼柄后, *PTHR38* 在各个组织的表达情况进行定量分析。结果表明, 去除单侧眼柄相对于正常对照, *PTHR38* 基因的表达量在整体上呈不同程度的上升趋势, 由此进一步说明了 *PTHR38* 基因的表达量与蜕皮激素之间的协同调节作用。但是在各个时期的肝胰腺中, 去除单侧眼柄造成了 *PTHR38* 表达量的降低。由于 *HR38* 参与碳水化合物的代谢和糖原的储存等多种生理过程的调节, 而且蜕皮行为伴随着大量的能量消耗, 因此推测, 在三疣梭子蟹肝胰腺中, *PTHR38* 基因的表达受营养状况与蜕皮激素水平的双因素影响。去除单侧眼柄后, 另一侧眼柄中的 *PTHR38* 表达量升高, 并且在蜕皮后期的升高趋势最大, 推测 *HR38* 基因在调控蜕皮的神经内分泌系统中起到一定的信号传导作用。

4 结论

本研究首次克隆出三疣梭子蟹 *HR38* 基因 cDNA 全长序列, 并且对该序列进行了生物信息学分析, 补充了 *HR38* 在水生甲壳类中的研究进展。其表达分析结果证明, 眼柄和心脏中的 *HR38* 基因在蜕皮前期和蜕皮间期的表达水平显著高于蜕皮后期, 初步推测 *HR38* 在三疣梭子蟹蜕皮过程中与蜕皮激素浓度具有一定的协同关系, 去除单侧眼柄实验也证明了这一结论。有关 *HR38* 基因在三疣梭子蟹蜕皮中的准确生理功能还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Li X G, Zhou G, Gu X H. Review of aquatic crustaceans molting and its influencing factors[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 29(2): 294-302. [李旭光, 周刚, 谷孝鸿. 水生甲壳类蜕皮发生过程及其影响因素的研究与进展[J]. 动物学杂志, 2014(2): 294-302.]
- [2] Zhao H X. The molt regulation research of crustacea and application of ecdysone[J]. Guangdong Feed, 2006, 15(1): 32-35. [赵红霞. 甲壳动物蜕皮调控研究及蜕壳素的使用[J]. 广东饲料, 2006, 15(1): 32-35.]

- [3] Fan X R. Review of crustaceans eyestalk neuroendocrine system[J]. Tianjin Fisheries, 2010(1): 12–18. [范晓锐. 甲壳动物眼柄神经内分泌系统研究概述[J]. 天津水产, 2010(1): 12–18.]
- [4] Chang E S, Bruce M J, Tamone S L. Regulation of crustacean molting: A multi-hormonal system[J]. Am Zool, 1993, 33(3): 324–329.
- [5] Chung J S, Dirksen H, Webster S G. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(23): 13103–13107.
- [6] Keller R. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects[J]. Experientia, 1992, 48(5): 439–448.
- [7] Robinson-Rechavi M, Garcia H E, Laudet V. The nuclear receptor superfamily[J]. J Cell Sci, 2003, 116: 585–586.
- [8] Baker K D, Shewchuk L M, Kozlova T, et al. The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway[J]. Cell, 2003, 113(6): 731–742.
- [9] Sutherland J D, Kozlova T, Tzertzinis G, et al. *Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7966–7970.
- [10] Davis M M, Yang P, Chen L, et al. The orphan nuclear receptor DHR38 influences transcription of the DOPA decarboxylase gene in epidermal and neural tissues of *Drosophila melanogaster*[J]. Genome, 2007, 50(11): 1049–1060.
- [11] Ruaud A F, Lam G, Thummel C S. The *Drosophila* NR4A nuclear receptor DHR38 regulates carbohydrate metabolism and glycogen storage[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(1): 83–91.
- [12] Shen J, Zhu D F, Hu Z H, et al. Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1481–1487. [沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1481–1487.]
- [13] Zhu J S, Miura K, Chen L, et al. AHR38, a homolog of NGFI-B, inhibits formation of the functional ecdysteroid receptor in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. EMBO J, 2000, 19(2): 253–262.
- [14] Baker K D, Shewchuk L M, Kozlova T, et al. The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway[J]. Cell, 2003, 113(6): 731–742.
- [15] Ranhotra H S. The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases[J]. J Recept Sig Transduct, 2015, 35(2): 184–188.
- [16] Kozlova T, Pokholkova G V, Tzertzinis G, et al. *Drosophila* hormone receptor 38 functions in metamorphosis: a role in adult cuticle formation[J]. Genetics, 1998, 149(3): 1465–1475.
- [17] Bruey-Sedano N, Alabouvette J, Lestrade M, et al. The *Drosophila* ACP65A cuticle gene: Deletion scanning analysis of *cis*-regulatory sequences and regulation by DHR38[J]. Genesis, 2005, 43(1): 17–27.
- [18] Kozlova T, Lam G, Thummel C S. *Drosophila* DHR38 nuclear receptor is required for adult cuticle integrity at eclosion[J]. Dev Dyn, 2009, 238(3): 701–707.
- [19] Chang E S. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1995, 193(1–2): 1–14.
- [20] Chung J S, Webster S G. Molt cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(15): 3280–3288.
- [21] Hopkins P M. Hormonal control of the molt cycle in the fiddler crab *Uca pugilator*[J]. Am Zool, 1992, 32(3): 450–458.
- [22] 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.
- [23] Zarubin T P, Chang E S, Mykles D L. Expression of recombinant eyestalk crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*, that inhibits Y-organ ecdysteroidogenesis in vitro[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(6): 1231–1237.

Cloning and expression analysis in molting cycle of nuclear receptor *HR38* gene in *Portunus trituberculatus*

ZHANG Longtao^{1,2}, LYU Jianjian¹, GAO Baoquan¹, LIU Ping¹, FU Ping¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

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

Abstract: The nuclear receptor superfamily contains a large number of transcription factors that mediate many physiological process, such as cell differentiation, growth and development. Family members have a conserved functional domain that includes a DNA-binding domain and a ligand-binding domain. HR38, a member of the nuclear receptor superfamily, is an orphan receptor for which no ligand is known. HR38 is involved in an unusual ecdysteroid signaling pathway in *Drosophila*. *Portunus trituberculatus* is a major Chinese aquaculture species and is also an important Chinese export. The crustacean molting cycle is a physiologically important growth process. To investigate its function in the molting cycle of *Portunus trituberculatus*, cDNA encoding nuclear receptor HR38 of *Portunus trituberculatus* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and named *PHR38*. The full-length *PTHR38* cDNA is 2950 bp, including a 101-bp 5' untranslated region (UTR) and a 551-bp 3' UTR. The 2298-bp open reading frame (ORF) encodes a 765-amino acid polypeptide. Bioinformatic analysis revealed that *PTHR38* is an unstable protein and has no transmembrane domains. Homology analysis showed that *PTHR38* of *Portunus trituberculatus* has the highest homology to the HR38 gene of *Daphnia magna*. Six crabs at each main molting stage (inter-, pre- and post-molting) were selected by morphological feature observation. Eyestalks were excised, the crabs were depigmented, their exoskeletons were removed, and different tissues were sampled before being stored in Trizol Reagent for RNA extraction. Quantitative real-time PCR showed different expression patterns of *PTHR38* at each stage of the molting cycle, which suggested that *PTHR38* functions in the molting cycle of *Portunus trituberculatus*. It also showed a similar expression tendency to ecdysone in hemocytes and thus might be associated with ecdysone. In muscle and the hepatopancreas, *PTHR38* was upregulated in the post-molting stage. Previous studies showed that HR38 participates in the metabolism of carbohydrates, which suggested that *PTHR38* might function in energy metabolism processes. After eyestalk ablation, the expression of *PTHR38* was upregulated, which also suggested a connection between *PTHR38* and ecdysone.

Key words: *Portunus trituberculatus*; nuclear receptor; *HR38*; gene cloning; gene expression

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