

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15466

脊尾白虾 *VgR* 基因克隆及其在卵巢发育过程中的表达分析

梁俊平^{1,2}, 李健^{2,3}, 李吉涛², 刘萍^{2,3}, 刘德月²

1. 河南师范大学 水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007;

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

3. 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: 为了解卵黄蛋白原受体(vitellogenin receptor, *VgR*)在脊尾白虾卵巢发育中的作用, 采用同源克隆和 RACE 技术, 克隆了脊尾白虾 *VgR* 基因全长 cDNA 序列, 用实时荧光定量 PCR 方法分析了 *VgR* 基因在雌虾不同组织、卵巢发育不同时期的表达特征。结果显示, 脊尾白虾 *VgR* 基因全长 5892 bp, 开放阅读框 5661 bp, 编码 1886 个氨基酸。脊尾白虾 *VgR* 具有低密度脂蛋白受体(LDLR)家族典型结构特征, 属于 LDLR 家族, 进化上与日本沼虾等甲壳动物 *VgR* 亲缘关系最近, 然后与昆虫 *VgR* 分支聚为一支, 而与 LDLR 家族中其他成员亲缘关系较远。脊尾白虾 *VgR* 在各组织中均有表达, 但主要在卵巢内表达。随着卵巢的发育, 卵巢 *VgR* 表达量逐渐升高, 在 III 期达到最大, 与肝胰腺 *Vg* 表达量、血液 *Vg* 浓度变化趋势相一致; 而在卵巢成熟时, 卵巢 *VgR* 表达量降到了最低, 与肝胰腺 *Vg* 表达情况截然相反; 排卵后的恢复期, 血液中 *Vg* 浓度仍维持在较高水平, 卵巢 *VgR* 表达量又升至 III 期水平, 同时卵巢 *Vg* 表达量也升至最高。由此可见, 甲壳动物与昆虫 *VgR* 起源于同一祖先, 但在进化上已形成独立一支; 脊尾白虾卵巢成熟前, 卵巢主要通过 *VgR* 介导作用摄取血液中 *Vg*, 以供卵巢快速成熟; 卵巢成熟期, 肝胰腺呈现补偿性合成 *Vg*, 以尽快恢复其营养储备功能; 卵巢恢复期, 卵巢通过 *VgR* 介导摄入外源 *Vg* 和内源合成 *Vg* 两种途径, 为卵巢二次发育提供营养物质。

关键词: 脊尾白虾; 卵黄蛋白原受体; 卵黄蛋白原; 卵巢发育; 组织表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0800-13

卵黄蛋白原(Vitellogenin, *Vg*)是存在于卵生非哺乳动物中的一种糖磷脂蛋白, 在动物繁殖过程中具有重要的生理功能, 可在水解酶作用下形成各种卵黄营养物质供卵细胞及胚胎发育需要^[1]。由于物种间差异, *Vg* 合成部位也有所不同, 因此关于外源性 *Vg* 转运机制一直是繁殖生物学中关注的热点^[2-3]。关于 *Vg* 的转运机制, 目前在昆虫中研究较为清晰, 昆虫 *Vg* 由脂肪体合成后经血液分泌到滤泡细胞间隙, 然后与卵细胞膜微绒毛上分布的卵黄蛋白原受体(vitellogenin receptor, *VgR*)结合形成内陷囊泡, 内陷进入卵细胞内的多

个囊泡相互融合形成一个中间卵黄体, *VgR* 经中间卵黄体的管腔重新回到细胞质膜进行下一次转运^[4]。在甲壳动物中, 卵巢和肝胰腺均可合成 *Vg*, 肝胰腺合成的 *Vg* 首先分泌到过血淋巴, 然后被转运至卵巢, 但其转运机制尚不完全清楚^[5]。最近研究表明, 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[6]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[7-8]、日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*)^[9]和日本沼虾(*M. nipponense*)^[10]中也存在 *VgR*, 在卵巢发育过程中 *VgR* 基因表达模式与 *Vg* 表达存在一定相关性。Tiu 等^[7]研究发现, 当斑节对虾 *VgR* 基因被沉默后,

收稿日期: 2015-12-12; 修订日期: 2016-02-13.

基金项目: 国家虾产业技术体系(CARS-47); 公益性行业(农业)科研专项经费(201103034); 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).

作者简介: 梁俊平(1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为水产动物健康养殖. E-mail: liangjunpinglover@163.com

通信作者: 李健, 研究员, 博士生导师. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

血淋巴中 *Vg* 浓度显著升高, 而卵巢中 *Vg* 浓度显著下降; 当将日本沼虾 *Vg* 基因沉默后, 卵巢中 *VgR* 基因表达量显著降低^[10]。说明甲壳动物 *VgR* 与昆虫 *VgR* 具有类似的功能, 在外源性 *Vg* 转运中扮演着重要角色。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)属长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属, 是中国重要的小型经济虾类。脊尾白虾行抱卵繁殖, 在繁殖季节可连续多次抱卵^[11-12], 而在实际生产中发现池塘养殖中只有少部分脊尾白虾亲虾参与了二次抱卵, 且平均孵化率只有 46%^[13]。因此, 提高脊尾白虾二次繁殖率, 实现多次轮捕, 是有效提高脊尾白虾池塘养殖经济效益的重要途径, 而要解决这一问题有赖于进一步深入了解脊尾白虾多次繁殖机理, 但关于脊尾白虾繁殖机理研究尚处于起步阶段。作者前期研究发现, 脊尾白虾卵巢发育过程中, 卵巢和肝胰腺内 *Vg* 呈逐渐升高趋势, 即使在排卵后也保持相当高的水平, 推测其为卵巢二次成熟提供了物质基础^[14]。那么, 在此过程中, *VgR* 表达量与 *Vg* 积累是否存在一定相关性? 本研究将克隆脊尾白虾 *VgR* 基因全长, 分析其在卵巢发育过程中 mRNA 表达量与 *Vg* 积累的关系, 以期揭示脊尾白虾多次繁殖机理提供理论基础, 并为完善甲壳动物 *Vg* 转运机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 性成熟脊尾白虾, 为室内人工培育 A 家系 F₃, 体重(2.04±0.49) g, 盐度 31.3, 水温 24.2℃, 充气, 每天投喂冷冻大卤虫或高蛋白配合饵料, 投喂时间为 8:00 和 17:00。定时吸污换水。

1.1.2 实验试剂 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit Advantage[®] PCR Kit & lymerase Mix 购自 Clontech 公司; TaKaRa *Taq*TM、dNTP Mixture、TaKaRa *LA Taq*[®]、Cloned Ribonuclease Inhibitor、SYBR[®]Premix *Ex Taq*TM II、DEPC 水、Oligo (dT)₁₈Primers、M-MLV、pMD[®]18-T Vector、胶回收纯化试剂盒、DL2000TM DNA Marker 购自宝生

物工程(大连)有限公司; Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; Top10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司、Tryptone、Yeast extract 等购自 Sigma 公司; 寡聚核苷酸引物由生工生物工程(上海)公司合成。虾卵黄蛋白原酶联免疫分析(ELISA)试剂盒购于上海裕平生物科技有限公司; 总蛋白含量测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 取样 根据王绪峨^[15]和栗治国等^[16]对脊尾白虾卵巢发育特征描述, 分别选取卵巢发育至 I、II、III、IV、V 期的雌虾, 吸干体表面水分称量其体重; 用 1 mL 一次性无菌注射器吸取 0.2 mL 抗凝剂, 从围心腔抽取 0.2 mL 的血淋巴, 混合均匀后注入到 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中, 4℃ 800 g 离心 10 min, 吸取上清液置 4℃ 保存, 用于 *Vg* 含量测定; 向血细胞中加入 1.0 mL 的 TRIzol, 漩涡震荡, 置-80℃保存用于总 RNA 提取。然后迅速分离卵巢、肝胰腺、鳃、肌肉, 称量卵巢和肝胰腺质量, 各组织加液氮研磨成粉末, 取 50 mg 样品迅速转至 1.5 mL 离心管(内含 1.0 mL TRIzol 液), 漩涡震荡, 置-80℃保存用于总 RNA 提取。

每个发育时期的雌虾各取 9 尾, 每 3 尾虾样品合并作为一个重复, 即每个发育时期组织样品为 3 个实验重复。

1.2.2 性腺发育指数和肝胰腺指数的计算 性腺发育指数(gonadosomatic index, GSI)的计算公式为, $GSI = \text{卵巢质量} / \text{虾体重} \times 100\%$; 肝胰腺指数(hepatosomatic index, HSI)的计算公式为 $HSI = \text{肝胰腺质量} / \text{虾体重} \times 100\%$ 。

1.2.3 卵黄蛋白原含量测定 本研究应用双抗体夹心法测定标本中 *Vg* 水平, 依据虾卵黄蛋白原酶联免疫分析(ELISA)试剂盒说明书进行。

1.2.4 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 采用 Trizol 法提取脊尾白虾各组织 RNA, 用快速核酸/蛋白分析仪进行总 RNA 的纯度和浓度测定, 用 MOPS 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性。按照 M-MLV 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.5 5'RACE 和 3'RACE cDNA 模板合成 根据

SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)说明书合成 RACE 模板。

1.2.6 *VgR* cDNA 全长克隆策略 依据罗氏沼虾(GenBank 登录号: GU454802.1)、斑节对虾(GenBank 登录号: EU024890.1)、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*) (GenBank 登录号: GU723297.1)和德国小蠊(*Blattella germanica*) (GenBank 登录号: AM050637.1)*VgR* 基因保守区域设计兼并引物。用兼并引物 *VgR*-F1/R1 扩增片段 1, 用兼并引物 *VgR*-F2 和特异引物 *VgR*-R2 扩增片段 2, 用特异引物 GSP1 和通用引物 UPM 扩增片段 3, 用特异引物 GSP3 和通用引物 UPM 扩增 3'端, 用特异引物 GSP2 和通用引物 UPM 扩增 5'端。实验用引物如表 1 中所列, 克隆过程如图 1 所示。

每段片段扩增完成后, 取 2 μL 反应产物, 在

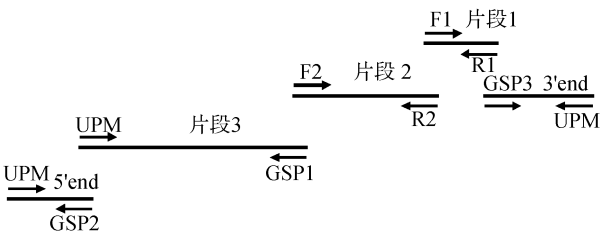


图 1 脊尾白虾 *VgR* cDNA 全长克隆策略图
Fig. 1 Clone strategy of *E. carinicauda VgR*

1.5%的琼脂糖凝胶上以 200 V 恒定电压电泳检测, 对照 2000 bp DNA Ladder 验证扩增结果。参照 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书回收、纯化扩增产物, 并连接至 pMD-18T 载体, 重组质粒转化至大肠杆菌 Top10, 经菌落 PCR 初步鉴定为阳性克隆后由上海桑尼生物科技有限公司双向测序。最后对所得序列进行电子拼接, 获得其全长 cDNA 序列。

表 1 实验中所用引物
Tab. 1 Oligonucleotide primers used in the experiment

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 application
VgR-F1	CMAARGAGMGRGTMTACTGGAC	片段 1 fragment 1 amplification
VgR-R1	TGCASWGGTGRGWGCAKTTCTT	片段 1 fragment 1 amplification
VgR-F2	AGGTGTGYGCTGCRGWYTCGG	片段 2 fragment 2 amplification
VgR-R2	GCAATCAACGCTCTGCCTTCAA	片段 2 fragment 2 amplification
GSP1	CCTGCTGCTTTCTTCAACGAACTGG	片段 3 fragment 3 amplification
GSP2	CTCCTCCTCATCGAATGGTCCAAGCA	5'RACE amplification
GSP3	TAATCCTGTTGCCTTGATGCTCCTGGG	3'RACE amplification
RTVgR-F	ATAATCCTGTTGCCTTGATGCT	RT-PCR
RTVgR-R	TCTCCTTTGTCTTTTACGCACA	RT-PCR
RTVg-F	TGCCATCTAACTTCACCAAGG	RT-PCR
RTVg-R	CAAATCGTGCTCCAATCTCTC	RT-PCR
18S-F	CCGAGACATCAAGGAGAAGC	RT-PCR
18S-R	ATACCGCAAGATTCCATACCC	RT-PCR
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE amplification

1.2.7 生物信息学分析 利用 DNAMAN 对序列进行拼接; 利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框(ORF)的预测与氨基酸翻译; 通过 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析; 通过 GOR4 方法(<http://www.expasy.org/>)进行蛋白二级结构分析; 用 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)软件分析蛋白结构域; 用 ProtParam 程序([\[expasy.org/tools/protparam.html\]\(http://www.expasy.org/tools/protparam.html\)\)对蛋白质基本物理化学参数进行分析; 使用 NetNGlyc1.0 软件\(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>\)预测可能存在的糖基化位点; 使用 TMHMM 软件\(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>\)对蛋白进行跨膜预测; 用 NCBI 中 BLAST \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>\)程序对脊尾白虾与其他物种的 *VgR* 氨基酸序列进行多重比对, 然后用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 系统树。](http://www.</p></div><div data-bbox=)

1.2.8 *VgR* 基因与 *Vg* 基因表达分析 根据本研究获得的脊尾白虾 *VgR* 基因序列, 设计特异引物 RTVgR-F/R, 对脊尾白虾卵巢发育至 II 期的卵巢、肝胰腺、肌肉、鳃和血细胞以及卵巢发育不同时期的肝胰腺和卵巢的 *VgR* 基因的表达水平进行检测; 根据已提交到 GenBank 的 *Vg* 基因序列(GenBank 登录号: JQ319034)为模板, 设计特异引物 RTVg-F/R, 对卵巢发育不同时期的肝胰腺和卵巢 *Vg* 基因的表达水平进行检测。每种组织取 3 个重复样品, 每个样品测定 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *VgR* 基因和 *Vg* 基因的 mRNA 表达量。

1.2.9 数据处理 数据统计采用 SPSS16.0 统计分析软件中单因子方差分析(one-way ANOVA)进行比较, Duncan multiple range test 用来检验显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 脊尾白虾 *VgR* 基因克隆及序列分析

以脊尾白虾卵巢 cDNA 为模板, 利用兼并引物、特异引物和通用引物扩增获得了脊尾白虾 *VgR* 基因 3 段序列, 片段 1 为 318 bp, 片段 2 为 2104 bp, 片段 3 为 2988 bp; 以 5'Race 和 3'Race cDNA 为模板, 利用特异引物和通用引物扩增到了 559 bp 的 5'端和 1104 bp 的 3'端。序列拼接得到一条长为 5892 bp 的 *VgR* cDNA, 该序列已提交 GenBank, 登录号: KC506601。

脊尾白虾 *VgR* 基因开放阅读框 5661 bp, 编码 1886 个氨基酸(图 2)。该基因两端分别存在 37 bp 的 5'非编码区和 194 bp 的 3'非编码区, poly(A)尾前存在一个加尾序列 AATAAA。*VgR* 推导的蛋白分子量为 209613.3 D, 分子式为 $C_{9019}H_{14023}N_{2525}O_{2882}S_{177}$, 理论等电点为 5.13。经 SignalP4.1 Server 程序分析该氨基酸 N 端前存在 19 个氨基酸组成的信号肽。经 NetNGlyc1.0 软件分析第 41、302、331、762、879、910、930、991、1037、1111、1363 位存在 N-糖基化位点。

2.2 脊尾白虾 *VgR* 蛋白二级结构及结构域预测

经 GOR4 法预测, 脊尾白虾 *VgR* 蛋白有

10.76%的 α 螺旋, 59.76%的无规则卷曲。经 SMART 软件分析, 该蛋白包含 3 种结构域: 2 个配体结合结构域(ligand binding domain, LBD), 2 个表皮生长因子前体结构域(epidermal growth factor precursor domain, EGFP)和 1 个跨膜区(transmembrane domain, TMD)(图 2, 图 3)。其中, LDB I 由 5 个 LDLa 重复结构组成, LDB II 由 8 个重复结构组成, 每个重复结构包含有 6 个半胱氨酸残基, 6 个半胱氨酸残基通过二硫键连接, 连接方式为 C_I-C_{III} 、 $C_{II}-C_V$ 、 $C_{IV}-C_{VI}$; EGFP I 由 4 个 EGF 结构域和 8 个 YWTD 重复结构组成, EGFP II 由 4 个 EGF 结构域和 1 个 YWTD 重复结构组成, 每个 EGF 也是由 6 个半胱氨酸残基构成, 连接方式为 C_I-C_{III} 、 $C_{II}-C_{IV}$ 、 C_V-C_{VI} 。经 TMHMM 软件分析该蛋白跨膜区域位于 1731~1753 位; 1~1730 区位于细胞膜外, 1754~1886 区位于细胞膜内, 胞内尾区包含有 2 个 NPXF 序列(图 2)。

2.3 脊尾白虾 *VgR* 氨基酸系统进化树的构建

用 MEGA 5.0 软件中自展法(bootstrap test of phylogeny)构建 NJ 进化树, 重复取样次数为 1000, 聚类结果显示低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)家族在进化上聚类为两大支。脊尾白虾 *VgR* 与日本沼虾等甲壳动物 *VgR* 聚为一分支, 然后与昆虫 *VgR* 分支聚为一大支, 起源于同一祖先; 脊椎动物 *VgR*、脊椎动物 LDLR 和脊椎动物极低密度脂蛋白受体(very low-density lipoprotein receptor, vLDLR)聚为一分支, 甲壳动物脂蛋白受体(lipophorin receptor, LpR)、昆虫 LpR 和昆虫 vLDLR 聚为一分支, 两分支起源于同一祖先(图 4)。

2.4 脊尾白虾卵巢发育不同时期性腺指数和肝胰腺指数变化

脊尾白虾性腺指数随着卵巢发育逐渐增大, 从 I 期的 0.93%增至 IV 期(成熟期)的 9.27% ($P < 0.05$), 排卵后的恢复期(V 期)降到最小值 0.76%; 肝胰腺指数随着卵巢的发育也逐渐升高, 在卵巢成熟前的 III 期达到最大值 5.01% ($P < 0.05$), 成熟期时降到最低值 2.71%, 而在恢复期又升至 4.01%, 与 II 期(4.00%)相近($P > 0.05$)(图 5)。

MSFLVVSFVFSLYFGDAW ATTYSAGSHIRHNRSYPYSIPT NL TTVHPEGASSKSISSVPC	60
TSGEWKCSGDGMCIDKSLRCDRIHPCPDMSDELGCEDCDKLRFYRCRNGECIPKFFQCDG	120
TIDCSDKSDELDCIDKESSCPLKQFRCKLNNLCIPKLWLCDGAPDCLDHSDEECPTKPA	180
CREDQFRCKNGVSVSLGYVCDGEFDCKEGEDSDCEISRCKENPNHYQCKDGTCLQPEKV	240
CDGRRDCSDGSDEGGLCSRQCKVGDCHLCTSTPGGPHCMCSQGYRPLSDKDCADIDECQ	300
RV SI CDHFCENLP GSYKVCVCGEKYNLESD NK TCVNEGFGYGFIIVAMNREIREIYNAI	360
SYN SV FSGQDLIQCVAYDPVEDKVYWSNSIAILRKGRMTSEQPEAIVNKGIRRVESLAVD	420
WYGRNLYVADSGIQKIIVCALSGLNCQVLLDNVNPRTLRLDIKNRLLFWTDTKRQVIMKA	480
GMDGSKPVSLSIDGKIPNGLALDPPARRVYWM DAGHSRIEHVLYDGTDRKNLPYGAVSH	540
PFSMDVWESRLYWSDDLDEHVRSCLKTNGKSVQMV LKGTSRNDFYGLTLYHTTMFDQGN	600
PCRERLCSHLCLLSPGSTAGYKACAPAE ME ISTDMHSCAKAHVAFPFVSDGDKFYMLFN	660
PEMGTMRIERELSHLRVERVGDVYDPRQRSVIVSDVFKNLLRVPLESGRVHHIMDNV	720
AVGVSFDWLRNNVYWVDGEKKVVEVISGAGYHRNVLASGYH N PTDITVAPLQGGFFVTD	780
GLVPFTQRCGLEGMNCKNVVTENLYRPSSIVMDKDFEMQRIYWCDEMGVIETAATDGTR	840
RALLQSR LHSPI SIMVSKDYLMWTL EARDNLYIASKKT ND TRAFSLKLDTADYGVRLKL	900
ADVGEVFPV WV SLAFCQGGNGGCSHLCLG MN THQVCSGLGYQLMPDGKLCSTLDPCPN	960
FFSCHTTGECVLSSWKCDGTPDCSDRSDEL N CTQQQKPCSSDQFRCCSGNCISKAWVCDG	1020
NNDCFDGSDEKLPDCQ NK TCRANYYACKSGQCVPGMWRCDFKECEDGSDDEDCPENCGE	1080
HKFTCNDGSCIPDVWHCDNGEDCRDGSDEW N CTGKVT TTVSGLTDSKKWTCDDEITC	1140
EVLGDGDPVCVEESSRCDGMEQCPYGDDEKDCGADDQFKCLYTDRCIPRRWVCNQIKDC	1200
KDGSDEDCSLNATTTIVPDSEKTTTSGWLCQPGEHPCKNQCIKSSMLCDGSSDCNDGSD	1260
EWDHCF TN CQKYNGGCQHECHSTVDVAVYCSCHRGYHLDSGKSLDDE EC DVEETCAHL	1320
TEMKGSYMCSCMEGYTLEPDRRTCKLTKDKEWALVAGSEGIL N MTTQLQVMSRIPLEDDV	1380
SLNSFD FDFPSSDSFIYADDKGFIVQMAAKADFPFGAIETVWRSSNPQGI AVDAVASNLYF	1440
SEYFVNPPSIETKAKAEDKSKRSMVETEDVYSIINMCSLKNRRCTRVYEA FNKVPSTKV	1500
APVEENFFFCINHQSGENQGGIMASKLDGTS P RVLHQEVVRCGALALDLPKKRIYWTD	1560
VLNSIQSVSWNGDGYRLVIEEGVHNPAVLMMLLGEKLTWSNKGKGLGQCHKYYSYKGLL	1620
DSGDKNKKFEGRALIAVGPPLNVD P CLDKNC SHLCVKDKGEGKCLCENGFKVSQQDPTA	1680
CIRAD TC PGNFCAGVTC EM ISSKR FV CRCP SG FSGMLCEVSQDPLKQSSNVGTAVAVVLI	1740
VVILVALVAGVLWYRRQPFLFWMSKRMSNQTYRFS N PAFGVMADTRIVSSKSPVPSSCA	1800
SQGT NPP FFHLITGPDGDGSGCENPFSSVVEVSQINTSLDSAVVSGTDSSTSYNAAFNKVDL	1860
ESPIPPPNYLQEERKEWVLSYPYNPLK	1886

图 2 脊尾白虾 *VgR* 基因推测氨基酸序列

信号肽用加粗表示, *N*-糖基化位点用斜体加粗表示, 低密度脂蛋白受体 A 型结构域用单下划线表示, 表皮生长因子结构域用灰色阴影表示, 低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域用方框表示, 跨膜结构域用双下划线表示, 胞质尾区(NPXF)用虚下划线表示。

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of *E. carinicauda* *VgR*

Signal peptide is in bold. Predicted *N*-glycosylation sites are bold-italicized. The single underlines indicate low-density lipoprotein receptor class A domains. Shaded areas indicate the EGF-like domains. The outlined rectangles indicate low-density lipoprotein-receptor YWTD domains. The double underline indicates the transmembrane domain. The dotted underlines indicate internalization signal (NPXF).

2.5 脊尾白虾 *VgR* 基因组织表达特点

荧光定量检测显示, 脊尾白虾 *VgR* 在各组织中均有表达, 但主要在卵巢内表达($P<0.05$), 肝胰腺、胃、鳃和肌肉等组织中有少量表达, 血细胞内表达极其微量。*VgR* 在卵巢内的表达量为肝胰腺中的 625 倍, 为鳃的 953 倍, 为肌肉的 1504 倍, 为血细胞的 34758 倍(图 6)。

2.6 脊尾白虾卵巢发育不同时期 *VgR* 基因表达量变化

如图 7 所示, 随着卵巢发育, 卵巢内 *VgR* 的表达量呈现先升高后降低又升高的趋势, III 期时的表达量显著高于 I 期、II 期($P<0.05$), IV 期时的表达量最低($P<0.05$), 而在 V 期时表达量达到最大($P<0.05$); 随着卵巢的发育, 肝胰腺内 *VgR* 的

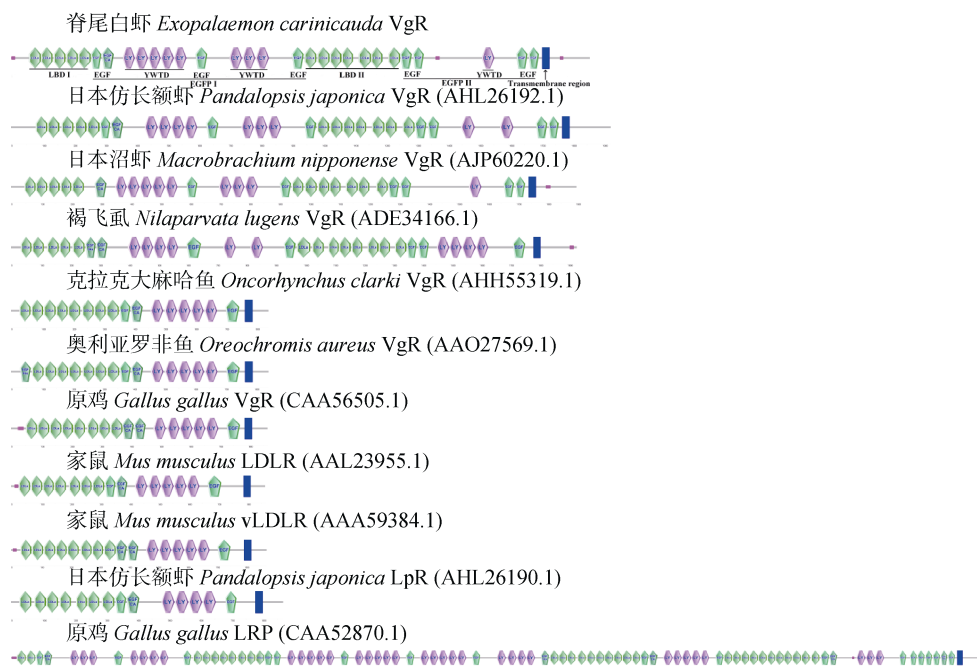


图 3 5 种低密度脂蛋白受体结构域预测

●: 低密度脂蛋白受体 A 型结构域; ●: 低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域; ●: 表皮生长因子结构域; ■: 跨膜结构域。

Fig. 3 Domain organization of five low-density lipoprotein receptors

●: Low-density lipoprotein-receptor class A domain; ●: Low-density lipoprotein-receptor YWTD domain; ●: Epidermal growth factor domain; ■: Transmembrane region.

表达量在 IV 期时显著高于其他时期的表达量 ($P < 0.05$), I 期和 V 期的表达量相近 ($P > 0.05$), II 期和 III 期的表达量最低 ($P < 0.05$)。在卵巢整个发育过程中, 卵巢内 *VgR* 的表达量始终显著高于肝胰腺内的表达量 ($P < 0.05$)。

2.7 脊尾白虾卵巢发育不同时期卵巢和肝胰腺 *Vg* 基因表达量及血淋巴 *Vg* 浓度变化

如图 8 所示, 随着卵巢的发育, 肝胰腺内 *Vg* 的表达量在 I 期、II 期无显著性差异 ($P > 0.05$), III 期时显著升高, 卵巢成熟期即 IV 期时达到最大值 ($P < 0.05$), 排卵后即 V 期时降低到 III 期水平; 随着卵巢发育, 卵巢内 *Vg* 的表达量呈逐渐升高趋势, 但直到卵巢成熟, 各发育期间无显著性差异 ($P > 0.05$), 而在 V 期时显著升高 ($P < 0.05$)。随着卵巢发育, 血淋巴中 *Vg* 浓度在 I 期时最低, 为 $6.54 \mu\text{g/mL}$; II 期时显著升高为 $31.90 \mu\text{g/mL}$; 在 III 期时达到最高值, 为 $59.45 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$), IV 期和 V 期又下降至 II 期水平 ($P > 0.05$) (图 9)。

3 讨论

3.1 脊尾白虾 *VgR* 与 LDLR 家族同源性分析

LDLR 家族是一类广泛存在于组织细胞表面的跨膜糖蛋白, 主要作用是通过内吞方式将胞外配体转运到胞质内。脊椎动物 LDLR 家族包括 LDLR、vLDLR、载脂蛋白 E 受体 2 (ApoE receptor 2)、LDLR-相关蛋白 (LDLR-related protein, LRP)、兆蛋白 (megalin)、LpR 和 *VgR* 等, 其中 *VgR* 主要存在于非哺乳脊椎动物中, 但与哺乳动物 vLDLR 亲缘关系最近, 呈直系同源^[17]。在昆虫中却发现, *VgR* 与 LpR 向着不同方向进化, 昆虫 LpR 与脊椎动物 LDLR、vLDLR、*VgR* 亲缘关系更近^[18]。虽然日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 和短沟对虾 (*P. semiculatus*) LpR 的序列与 *VgR* 呈现高度相似性, 但由于序列不完整, 且基因名称仍为推断的 LpR, 多数研究舍弃了其进化分析^[9]。为确保聚类结果准确, 本研究也未对这两种虾 LpR 进行聚类分析。本研究结果显示, 脊尾白虾

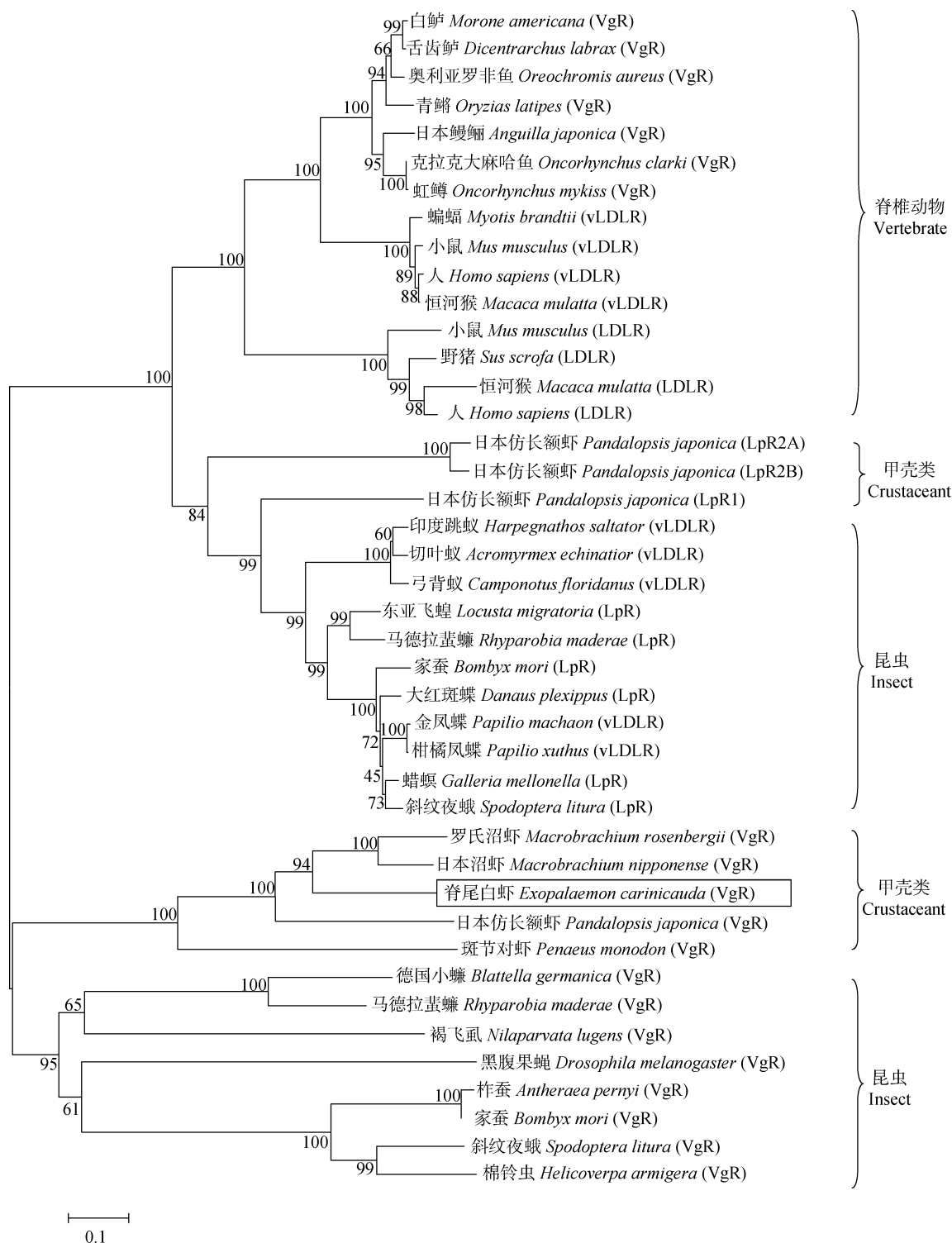


图 4 脊尾白虾 VgR 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis (Neighbor Joining) of *E. carinicauda* and other deduced VgR amino acid sequences

VgR 与甲壳动物 VgR 聚为一支, 然后与昆虫 VgR 聚为一支, 与鱼类 VgR 亲缘关系最远; 而无脊椎动物 LpR、vLDLR 与脊椎动物 LDLR、vLDLR 亲

缘关系较近(图 4)。由此可见, 无脊椎动物 VgR 在进化中已形成独立一支, 且进化速度快于无脊椎动物 LpR^[18]。

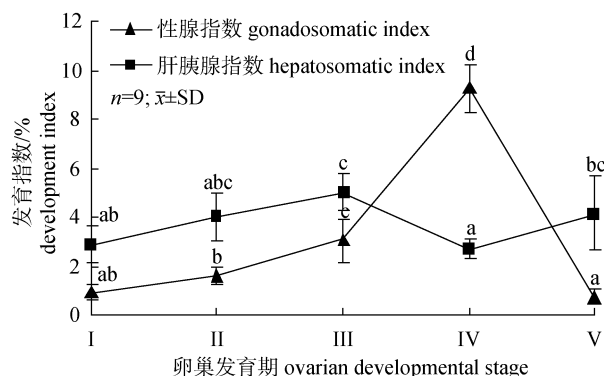


图5 脊尾白虾卵巢发育不同时期性腺指数和肝胰腺指数变化

不同小写字母表示发育指数差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Gonadosomatic index and hepatosomatic index of *E. carinicauda*

Different lowercase letters indicate significant difference of development index during ovarian development ($P<0.05$).

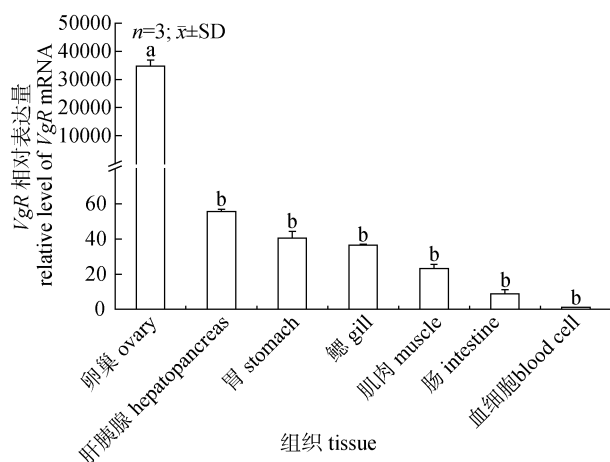


图6 脊尾白虾 *VgR* 在各组织中的表达情况

不同小写字母表示不同组织 *VgR* 的表达量差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Relative expression levels of *VgR* mRNA in tissues of *E. carinicauda*

Different lowercase letters indicate significant difference of *VgR* mRNA expressions in different tissues ($P<0.05$).

3.2 脊尾白虾 *VgR* 结构域分析

LDLR 家族典型结构由 5 个保守结构域组成: 配体结合结构域(LBD)、表皮生长因子前体结构域(EGFP)、O-联糖结构域(O-linked sugar domain, OLSD)、跨膜区(TMD)和胞内尾区(cytoplasmic domain)^[9]。配体结合结构域介导受体与配体之间的相互作用, 包含多个由 6 个半胱氨酸组成的 LDLa 重复模块, LDLR 家族各成员的 LDLa 数量

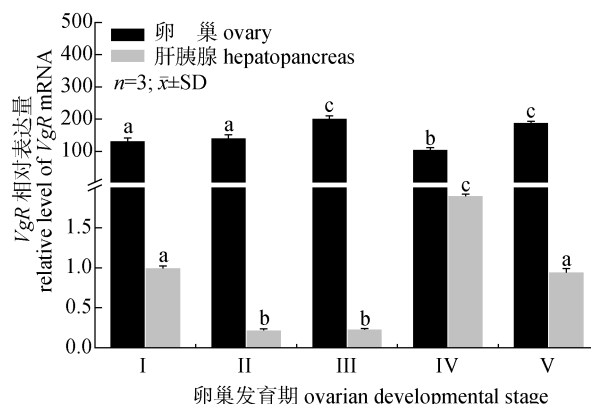


图7 脊尾白虾卵巢发育不同时期卵巢和肝胰腺中 *VgR* 相对表达量

不同小写字母表示同一组织中 *VgR* 表达量在卵巢发育不同时期差异显著($P<0.05$).

Fig. 7 Relative expression levels of *VgR* mRNA in ovary and hepatopancreas of *E. carinicauda*

Different lowercase letters indicate significant difference of *VgR* mRNA expressions during ovarian development ($P<0.05$).

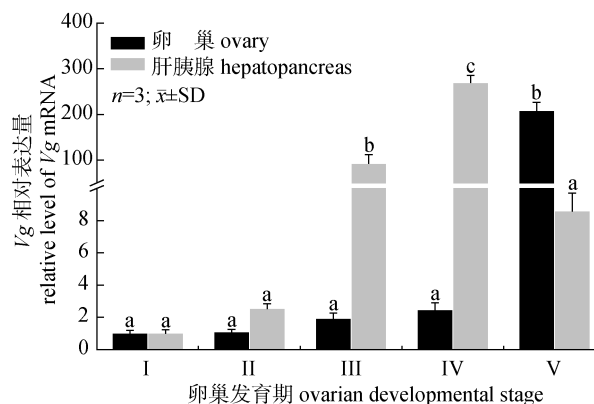


图8 脊尾白虾卵巢发育不同时期卵巢和肝胰腺中 *Vg* 相对表达量

不同小写字母表示同一组织中 *Vg* 表达量在卵巢发育不同时期差异显著($P<0.05$).

Fig. 8 Relative expression levels of *Vg* mRNA in ovary and hepatopancreas of *E. carinicauda*

Different lowercase letters indicate significant difference of *Vg* mRNA expressions during ovarian development ($P<0.05$).

也各不相同。在昆虫和其他甲壳动物中, *VgR* 一般也含有 2 个 LBD^[9, 19], 而在克拉克大麻哈鱼 (*Oncorhynchus clarki*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、白鲈 (*Morone americana*) 和奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 等脊椎动物中只有一个包含有 7~8 个 LDLa 重复模块的 LBD^[17, 20-22] (图 3)。

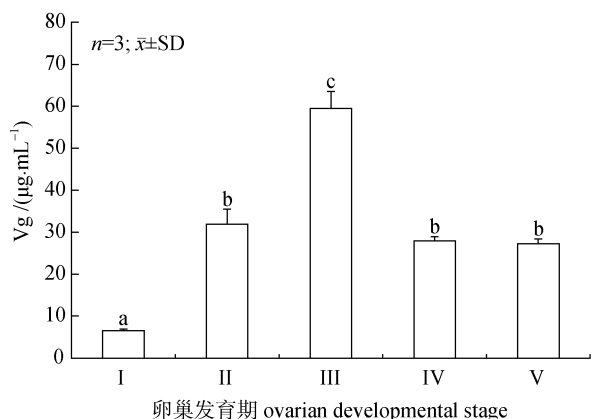


图 9 脊尾白虾卵巢发育不同时期血淋巴中 Vg 浓度变化
不同小写字母表示血淋巴中 Vg 质量浓度在卵巢发育不同时期差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 9 Vitellogenin concentration in hemolymph of female *E. carinicauda*
Different lowercase letters indicate significant difference of Vg concentration in hemolymph during ovarian development ($P < 0.05$).

脊尾白虾 VgR 存在两个 LBD: LDB I 和 LDB II, 共由 13 个 LDLa 重复模块组成, 每个 LDLa 重复结构也包含有 6 个半胱氨酸残基。研究认为, 半胱氨酸残基重复结构不仅参与配体结合, 同时可结合 Ca^{2+} , 而 Ca^{2+} 可进一步促进受体与配体的结合^[23]。不同物种 LDLa 重复模块结构差异与推测的 VgR 蛋白分子量相一致, 脊尾白虾等甲壳动物 VgR 分子量(208~215 kD)与昆虫 VgR 分子量(180~215 kD)^[19, 24-25]相近, 约为克拉克大麻哈鱼等脊椎动物 VgR 分子量(92~97 kD)的 2 倍^[17, 21-22, 26]。这种结构亚基数量和排列差异可能与结合配体的种类有关。例如, 原鸡(*Gallus gallus*) VgR 结构域中只有 1 个 LBD, 由 8 个 LDLa 重复模块构成, 该结构域可结合 8 种配体^[4, 27], 而原鸡 LRP 蛋白分子量高达 507 kD, 蛋白结构域中含有 31 个 LDLa 重复模块, 划分为了 4 个 LBD(图 3), 可结合 20 多种配体^[4, 28]。另在甲壳动物中也发现, 从锯缘青蟹(*Scylla serrata*)卵巢中分离出的 VgR 可结合哺乳动物 LDL 和 vLDL^[29]。由此推测, 脊尾白虾等甲壳动物 VgR 不仅可识别 Vg, 还可能识别其他多种配体, 有多种生物学功能。

LBD 之后是 EGFP, 包含有 EGF 和由 YWTD 基序组成的 β -动力区域。研究发现, EGFP 主要功

能是参与配体与 LDLR 在酸性条件下的解离。当 EGFP 发生突变后, 并不影响 vLDL 与配体的结合力, 但会影响胞体内配体在酸性条件下从配体域中解离^[23, 30]。脊尾白虾 VgR 的 LBD 后连接有 2 个 EGFP, 第一个 EGFP 由 4 个 EGF 和 8 个 YWTD 构成, 第二个 EGFP 由 4 个 EGF 和 1 个 YWTD 构成, 昆虫和其他甲壳动物 VgR 也包含有类似的 EGFP; 而昆虫和甲壳动物的 LpR 只有一个 EGFP, 与脊椎动物的 LDLR、VgR/vLDL 相近^[18]。OLSD 是一个富含丝氨酸和苏氨酸的短链, 大多数定位于细胞膜表面糖基化位点靠近跨膜区部分。关于 OLSD 的功能尚不是完全清楚, Davis 等^[31]研究发现, 人 LDLR 的 OLSD 删除后, 并不影响 LDLR 与配体结合、胞吞, 也不影响受体半衰期或再循环。但自然缺失 OLSD 的 LDLR, 会引起人类家族性高胆固醇血症^[32]。本研究发现, 脊尾白虾 VgR 并不含有 OLSD, 在罗氏沼虾、斑节对虾、日本仿长额虾等甲壳动物中同样也不存在 OLSD^[9]。多数昆虫 VgR 基本都含有 OLSD, 但也有种类不含有该结构域^[19]。推测, OLSD 对脊尾白虾等甲壳动物 VgR 功能发挥可能是非必需的。与 LDLR 家族其他成员类似, 脊尾白虾 VgR 也存在一个 TMD 和一个胞内区。TMD 使 VgR 锚定在细胞膜, 胞内区 NPXF 形成的紧密发夹结构可能在结合胞内配体及信号传导中有重要作用^[18, 33]。

3.3 脊尾白虾 VgR 基因在各组织中表达分析

克拉克大麻哈鱼^[17]、白鲈^[21]、奥利亚罗非鱼^[22]和原鸡^[27]等脊椎动物 VgR 在各种组织中也均有表达, 甚至在雄性白鲈性腺中也有表达, 但均主要在雌性卵巢内表达。昆虫不同发育阶段的 VgR 表达组织稍有差别, 在蛹阶段, 卵巢和脂肪体内均有 VgR 表达; 在成虫阶段, 多数种类只在在卵巢内表达^[3, 24-25, 34], 但也有例外, 例如, 成体褐飞虱(*Nilaparvata lugens*) VgR 除主要在卵巢内表达外, 在其他组织中也均有表达, 甚至在雄性体内也有表达^[19]。在甲壳动物中, 不同物种 VgR 表达部位也不尽相同。罗氏沼虾、斑节对虾 VgR mRNA 只特异性地在卵巢内表达, 其他组织中均无表达^[6-8], 日本仿长额虾 VgR mRNA 除主要

在卵巢中表达外, 在神经组织和表皮中也有微量表达, 在肝胰腺中不表达^[9]。本研究表明, 脊尾白虾 *VgR* mRNA 在卵巢、肝胰腺、肌肉和鳃中均有表达, 但主要在卵巢内表达; 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)卵巢和肝胰腺中也均可检测到 *VgR* mRNA 表达, 但肝胰腺中表达量相对较低^[35], 与本研究结果相近。综上所述, 不同物种 *VgR* 组织分布虽有一定差异, 但主要表达部位为卵巢。研究认为, *VgR* mRNA 这种组织表达特异性与 *VgR* 是否存在 OLSD 结构有关, 缺失 OLSD 的 *VgR* 在卵巢中表达量显著高于其他组织, 而含有 OLSD 的 *VgR* 在非卵巢组织中表达量更高^[36]。由此推测, 脊尾白虾 *VgR* 的组织表达特性可能也与其结构中缺失 OLSD 有关。

3.4 脊尾白虾 *VgR* 与 *Vg* 在卵巢发育过程中表达变化相关性分析

在斑节对虾和日本沼虾中通过 RNAi 技术已证实, 卵巢中 *VgR* 表达量与 *Vg* 转入存在密切的相关性, 而肝胰腺中 *VgR* 在肝胰腺 *Vg* 转出过程中无明显介导作用^[7, 10]。本研究也显示, 卵巢成熟前, 卵巢 *VgR* 与肝胰腺 *Vg* 表达量变化趋势相一致。随着卵巢发育, 脊尾白虾肝胰腺指数逐渐升高, III 期时达到最大值, 此时肝胰腺中 *Vg* 表达量也显著升高, 同时血淋巴中 *Vg* 浓度和卵巢中 *VgR* 表达量也达到最大值, 由此可见, 在卵巢成熟过程中, 脊尾白虾肝胰腺中 *Vg* 首先分泌到血淋巴, 之后通过卵巢 *VgR* 介导作用转运到了卵巢。卵巢成熟时(IV 期), 卵巢 *VgR* 表达量降到了最低值, 肝胰腺指数虽降到了最低值, 但其 *Vg* 表达量却升到了最高值, 且在恢复期(V 期)时肝胰腺指数迅速恢复到了 II 期水平, 说明肝胰腺中大部分 *Vg* 转移到卵巢后, 似乎存在一种补偿性合成 *Vg* 模式, 以尽快恢复其营养储备功能。组织学特征也显示, 恢复期的卵巢中充满了大量卵原细胞和卵黄合成前期卵母细胞, 预示卵巢又进入了增殖期^[16]。V 期的肝胰腺 *Vg* 表达量虽然下降至了 I 期、II 期的水平, 但卵巢中 *Vg* 表达量却显著升高, 同时卵巢中 *VgR* 表达量又升到了 III 期的水平, 且血淋巴中 *Vg* 浓度仍保持在 II 期时较高浓度水平。

斑节对虾卵巢 *VgR* 表达量与肝胰腺 *Vg* 表达量变化趋势也相同, 但在卵巢成熟后期卵巢 *Vg* 表达量呈显著升高趋势, 显著高于肝胰腺 *Vg* 表达量, 与本研究结果相反, 同时该研究也没关注卵巢恢复期 *VgR* 表达量变化^[7]。罗氏沼虾卵巢整个发育阶段, 卵巢 *VgR* 表达量也随着肝胰腺 *Vg* 表达量变化呈正相关变化, 但恢复期时的卵巢 *VgR* 表达量并未出现显著升高现象^[6]。说明脊尾白虾卵巢恢复期时, 在从外源和内源两种途径为卵巢二次发育摄取营养物质。

脊尾白虾卵巢发育不同时期, 肝胰腺中 *VgR* 表达量与肝胰腺指数呈相反变化趋势, 特别是在肝胰腺指数最低时 *VgR* 表达量骤然升到了最高值。其原因可能为: 一是脊尾白虾 *VgR* 可能参与了其他脂蛋白等配体转运, 为肝胰腺短时内快速发育摄取外源营养物质, 以供合成卵黄蛋白原。在克氏原螯虾研究中也发现肝胰腺 *VgR* 表达量占了卵巢和肝胰腺总表达量的 22%, 推测其可能参与了极低密度脂蛋白转运^[35]。二是推测脊尾白虾体内可能存在一种 *Vg* 逆转运机制, 即在卵巢成熟后, 血淋巴中存在较高浓度 *Vg* 时, 有部分 *Vg* 通过肝胰腺 *VgR* 介导作用重新被转运到了肝胰腺内, 起到暂时储备作用, 或者被分解后重新利用。*VgR* 这种高效转运机制可能为脊尾白虾卵巢二次发育奠定了重要的物质基础, 但尚需进一步研究证实。

总之, 脊尾白虾 *VgR* 具有 LDLR 家族典型结构特征, 属于 LDLR 家族, 在进化上与无脊椎动物 *VgR* 形成一支。脊尾白虾 *VgR* 虽主要在卵巢内表达, 但其他组织中也有分布。卵巢发育成熟及排卵后恢复过程中, *VgR* 对卵巢摄取外源 *Vg* 具有重要作用。

参考文献:

- [1] Li Z J, Yang L J, Wang J, et al. The progress in studies on vitellogenin[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2010, 22(3): 284–290. [李兆杰, 杨丽君, 王静, 等. 卵黄蛋白原的研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(3): 284–290.]
- [2] Subramoniam T. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans[J]. Fish Sci, 2011, 77(1): 1–21.

- [3] Liu Q N, Zhu B J, Liu C L, et al. Characterization of vitellogenin receptor (VgR) from the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*[J]. Bull Insectol, 2011, 64(2): 167–174.
- [4] Sappington T W, Raikhel A S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1998, 28(5): 277–300.
- [5] Avarre J C, Michelis R, Tietz A, et al. Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs[J]. Biol Reprod, 2003, 69(1): 355–364.
- [6] Roth Z, Khalaila I. Identification and characterization of the vitellogenin receptor in *Macrobrachium rosenbergii* and its expression during vitellogenesis[J]. Mol Reprod Develop, 2012, 79(7): 478–487.
- [7] Tiu S H K, Benzie J, Chan S M. From hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin[J]. Biol Reprod, 2008, 79(1): 66–74.
- [8] Klinbunga S, Sittikankaew K, Jantee N, et al. Expression levels of vitellogenin receptor (Vtgr) during ovarian development and association between its single nucleotide polymorphisms (SNPs) and reproduction-related parameters of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 2015, 435: 18–27.
- [9] Lee J H, Kim B K, Seo Y, et al. Four cDNAs encoding lipoprotein receptors from shrimp (*Pandalopsis japonica*): Structural characterization and expression analysis during maturation[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2014, 169: 51–62.
- [10] Bai H, Qiao H, Li F, et al. Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation [J]. Gene, 2015, 562(1): 22–31.
- [11] Liang J P, Li J, Li J T, et al. Effects of water temperature on the embryonic development, survival and development period of larvae of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) reared in the laboratory[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(4): 1142–1152. [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 不同温度对脊尾白虾胚胎发育与幼体变态存活的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(4): 1142–1152.]
- [12] Oh C W, Kim J N. Reproductive biology of *Exopalaemon carinicauda* (Decapoda, Palaemonidae) in the Hapyeong Bay of Korea[J]. Crustaceana, 2008, 81(8): 949–962.
- [13] Yu T J, Li J, Li J T, et al. The growth and reproduction characteristics of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) cultured in ponds[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2014, 4(2): 16–25. [于天基, 李健, 李吉涛, 等. 池养脊尾白虾的生长与繁殖特性[J]. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(2): 16–25.]
- [14] Liang J P, Wang Y, Duan Y F, et al. Molecular cloning of ecdysteroid receptor and its expression during the ovarian development and embryogenesis of *Exopalaemon carinicauda*[J]. 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[J]. 水产学报, 2015, 39(7): 942–952.]
- [15] Wang X E. Study on the breeding biology of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Chinese Journal of Zoology, 1987, 22(1): 7–10. [王绪峨. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察. 动物学杂志, 1987, 22(1): 7–10.]
- [16] Li Z G, Zhang C S, Li F H, et al. Histological study on the gonadal development of *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(3): 362–370. [栗治国, 张成松, 李富花, 等. 脊尾白虾的性腺发育及组织结构观察[J]. 水产学报, 2014, 38(3): 362–370.]
- [17] Mizuta H, Luo W, Ito Y, et al. Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*)[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2013, 166(1): 81–90.
- [18] Tufail M, Takeda M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms[J]. J Insect Physiol, 2009, 55(2): 88–104.
- [19] Lu K, Shu Y, Zhou J, et al. Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stål)[J]. J Insect Physiol, 2015, 73: 20–29.
- [20] Davail B, Pakdel F, Bujo H, et al. Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout[J]. J Lipid Res, 1998, 39(10): 1929–1937.
- [21] Hiramatsu N, Chapman R W, Lindzey J K, et al. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*)[J]. Biol Reprod, 2004, 70(6): 1720–1730.
- [22] Li A K, Sadasivam M, Ding J L. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtgR) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E[J]. J Biol Chem, 2003, 278(5): 2799–2806.
- [23] Rudenko G, Henry L, Henderson K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH[J]. Science, 2002, 298(5602): 2353–2358.
- [24] Shu Y H, Wang J W, Lu K, et al. The first vitellogenin receptor from a Lepidopteran insect: molecular characteriza-

- tion, expression patterns and RNA interference analysis[J]. *Insect Mol Biol*, 2011, 20(1): 61–73.
- [25] Smith A D, Kaufman W R. Molecular characterization of the vitellogenin receptor from the tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae)[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43(12): 1133–1141.
- [26] Pousis C, Santamaria N, Zupa R, et al. Expression of vitellogenin receptor gene in the ovary of wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)[J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 132(1): 101–110.
- [27] Bujo H, Hermann M, Kaderli M O, et al. Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat member of the LDL receptor family[J]. *EMBO J*, 1994, 13(21): 5165.
- [28] Nimpf J, Stifani S, Bilous P T, et al. The somatic cell-specific low density lipoprotein receptor-related protein of the chicken. Close kinship to mammalian low density lipoprotein receptor gene family members[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(1): 212–219.
- [29] Warriar S, Subramoniam T. Receptor mediated yolk protein uptake in the crab *Scylla serrata*: crustacean vitellogenin receptor recognizes related mammalian serum lipoproteins[J]. *Mol Reprod Develop*, 2002, 61(4): 536–548.
- [30] Van Hoof D, Rodenburg K W, Van der Horst D J. Intracellular fate of LDL receptor family members depends on the cooperation between their ligand-binding and EGF domains[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(6): 1309–1320.
- [31] Davis C G, Elhammer A, Russell D W, et al. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(6): 2828–2838.
- [32] Koivisto P V, Koivisto U M, Kovanen P T, et al. Deletion of exon 15 of the LDL receptor gene is associated with a mild form of familial hypercholesterolemia FH-Espoo[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1993, 13(11): 1680–1688.
- [33] Willnow T E. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism[J]. *J Mol Med*, 1999, 77(3): 306–315.
- [34] Qian C, Fu W W, Wei G Q, et al. Identification and expression analysis of vitellogenin receptor from the Wild Silkworm, *Bombyx mandarina*[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2015, 89(4): 181–192.
- [35] Liu H, Cui J, Yan J, et al. Cloning and relative quantification analysis of expression of the partial vitellogenin receptor cDNA/mRNA of the Crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 83–89. [刘红, 崔俊, 颜婕, 等. 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的克隆及 mRNA 表达量的相对定量[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 83–89.]
- [36] Pousis C, Santamaria N, Zupa R, et al. Expression of vitellogenin receptor gene in the ovary of wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)[J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 132(1): 101–110.

Molecular cloning of the vitellogenin receptor and its expression during ovarian development of *Exopalaemon carinicauda*

LIANG Junping^{1,2}, LI Jian^{2,3}, LI Jitao², LIU Ping^{2,3}, LIU Deyue²

1. College of Fisheries, Henan Normal University; Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Xinxiang 453007, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China;
3. Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: The vitellogenin receptor (VgR) plays an important role in oocyte maturation. VgRs have been studied extensively in various animals from vertebrates to invertebrates, including the chicken, *Gallus gallus*, fish, *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis aureus*, insects, *Bombyx mori* and *Blattella germanica*, and crustaceans, *Macrobrachium rosenbergii* and *Pandalopsis japonica*. The aims of this study were to identify and characterize the VgR from *Exopalaemon carinicauda*, to investigate its expression level during ovarian development, and to describe its interactions with Vg. The full-length *E. carinicauda* VgR cDNA was cloned using degenerated oligonucleotide primers and rapid amplification of cDNA ends technology. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis was used to quantify relative VgR expression levels in different tissues during *E. carinicauda* ovarian development. The results showed that the full-length *E. carinicauda* VgR was 5892 bp, containing an open reading frame of 5661 bp, encoding a 1886 amino acid polypeptide. The shrimp VgR contained several conserved domains, such as a ligand-binding domain, an epidermal growth factor-precursor domain, a transmembrane domain, and a cytoplasmic domain; thus, it belongs to the low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene family. A phylogenetic analysis revealed that the shrimp VgR was more closely related to VgRs from other crustaceans and insects, rather than to vertebrate VgRs, and was distant from other LDLR members. The *E. carinicauda* VgR was expressed in various tissues, and the highest expression was detected in the ovary. Ovarian VgR mRNA expression level reached the maximum at stage III of ovarian development and was significantly positively correlated with Vg content in hemolymph and Vg expression level in the hepatopancreas before ovarian maturation was completed. The relative VgR expression level in the ovary reached the minimum at maturation when Vg expression level in the hepatopancreas reached the maximum. Post-spawning Vg concentration remained high when ovarian Vg expression level reached the maximum. These results indicate that all VgRs from crustaceans were orthologs of insect VgRs. Vg is synthesized rapidly in the hepatopancreas during maturation to supply a nutrient source for the developing ovary. The *E. carinicauda* VgR sequesters Vg in the hemolymph into developing oocytes during ovarian development. Vg was synthesized within and outside the ovary and was transported into the ovary by VgR during the ovarian recovery stage for subsequent ovarian development.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; vitellogenin receptor; vitellogenin; ovarian development; tissue expression

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