

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17405

低盐胁迫下三疣梭子蟹蝗抗利尿肽基因的表达

孙东方^{1,3}, 吕建建^{2,3}, 环朋朋^{1,3}, 高保全^{2,3}, 刘萍^{2,3}

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

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;

3. 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

摘要: 本研究采用 RACE 技术克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)蝗抗利尿肽(neuroparsin, *PtNP*)基因。该基因全长 1920 bp, 5'端非编码区 237 bp, 3'端非编码区 1373 bp, 开放阅读框 309 bp, 编码 102 个氨基酸, 预测分子量 10.8 kD, 理论等电点 7.42。*PtNP* 含有 12 个半胱氨酸残基, 具十足目动物蝗抗利尿肽典型的特征。同源性和系统进化分析表明, *PtNP* 与拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)NP4 的同源性最高(89%), 并且三疣梭子蟹与拟穴青蟹首先聚为一支。组织表达分析发现, *PtNP* 基因在脑组织中的相对表达量最高, 其次是鳃和眼柄, 在卵巢、肌肉、心脏和肝胰腺中表达量较低或不表达。通过分析 *PtNP* 基因在低盐胁迫过程中的表达规律发现, 低盐胁迫可显著改变 *PtNP* 基因在脑、鳃和眼柄组织中的表达模式, 整体呈现上调表达趋势, 其中在脑、鳃和眼柄中表达量分别最高上调至 7.7 倍、2.8 倍和 2.6 倍, 且存在显著差异($P<0.05$)。去除眼柄后该基因在鳃中的表达呈上升趋势, 且去除双侧眼柄组的表达量显著高于去除单侧眼柄组($P<0.05$)。本研究结果表明 *PtNP* 基因在三疣梭子蟹盐度适应中可能发挥一定作用且受神经内分泌系统的调控。

关键词: 三疣梭子蟹; 蝗抗利尿肽; 基因克隆; 盐度胁迫; 去除眼柄; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-0967-09

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae), 是一种重要的海洋经济动物^[1], 在中国分布广泛。三疣梭子蟹可存活于盐度为 13.7~47.7 的环境中, 属广盐性水生甲壳动物, 具有生殖洄游习性, 常在港湾或河口低盐区排幼^[2], 深海高盐区越冬。盐度是影响三疣梭子蟹生长发育至关重要的环境因子之一, 对其摄食、蜕皮、生长、代谢、免疫等具有重要作用^[3]。耐盐性状, 尤其是耐低盐性状是三疣梭子蟹重要的育种性状。在中国北方, 三疣梭子蟹多以室内育苗、室外养殖为主, 生长周期较长。夏季由于暴雨多发, 养殖

海水盐度急剧下降, 使得三疣梭子蟹体内渗透压失衡, 导致其生长缓慢, 疾病暴发。因此, 开展盐度适应机制研究对三疣梭子蟹耐盐良种的培育具有重要意义。

渗透压调节是甲壳动物进行盐度适应的重要生理活动, 研究证明渗透压调节受神经内分泌系统调控, 其中神经肽在该过程中发挥了重要作用^[4]。甲壳动物神经肽由甲壳动物中枢神经系统分泌, 通过内分泌方式直接或间接作用于靶器官, 对甲壳动物的新陈代谢、渗透压调节和激素的合成与释放起着至关重要的作用^[5-6]。目前, 三疣梭子蟹盐度相关研究主要集中在盐度对个体发育^[7]、

收稿日期: 2017-11-09; 修订日期: 2018-01-08.

基金项目: 国家虾蟹产业技术体系项目(CARS-48); 泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002); 国家自然科学基金面上项目(41576147, 41506186); 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放课题(2016LMFS-A12); 江苏省水产三新工程项目(Y2015-3).

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工作. E-mail: 961012207@qq.com

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

生长代谢^[8]、酶活力^[9]等的影响及盐度相关基因的克隆与表达分析^[10-12]，涉及神经肽在渗透压调节方面的分子机理研究较少。

蝗抗利尿肽(neuroparsin, NP)是一类分子量为 8 kD 的小分子神经内分泌多肽，该基因编码 97~106 个氨基酸，预测信号肽为 25~29 个氨基酸，成熟肽为 72~77 个氨基酸。蝗抗利尿肽类似于脊椎动物胰岛素生长因子结合蛋白 N 端结构域^[13]，可能与内源性的胰岛素样相关肽相结合，胰岛素相关肽信号通路与生长发育有重要关系^[14]。在昆虫的研究中，蝗抗利尿肽最初从东亚飞蝗(*Locusta migratoria*)的脑部神经内分泌细胞中分离^[15]，随后在沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)中也分离出蝗抗利尿肽，并且指出该神经肽对卵黄生成具有抑制作用^[13]。在昆虫的发育、蜕皮和生殖时期，蝗抗利尿肽基因的转录水平发生改变，推测该肽可能与生殖和发育有关^[16]。Boureme 等^[17]证明蝗抗利尿肽类似肽(neuroparsin-like peptides, NPLP)具有刺激蟑螂(*Blaberus craniifer*)和非洲蝗虫(*Locusta migratoria migratoria*)的肠道对水分重吸收的作用。在甲壳动物研究中，Bao 等^[18]通过转录组对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)神经肽的分析中发掘了 4 个蝗抗利尿肽基因，推测 NP1~3 可能刺激拟穴青蟹早期卵黄的形成，NP4 则与晚期卵黄的积累有关。Suwansaard 等^[19]从雌性罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)转录组测序数据中获得两个编码蝗抗利尿肽的基因 Mro-NP-1 和 Mro-NP-2，基因表达结果显示，Mro-NP-1 出现在罗氏沼虾卵巢发育的整个时期(I-IV)，Mro-NP-2 只出现在前 3 个时期。此外，蝗抗利尿肽还与抗利尿行为、碳水化合物调节、油脂代谢有关^[20]。然而，在甲壳动物中尚未见该基因具有盐度适应功能的研究报道。

本实验通过三疣梭子蟹转录组测序得到蝗抗利尿肽基因片段^[21]，比较转录组分析发现，该基因在低盐胁迫后的鳃组织中显著差异表达，推测其与三疣梭子蟹低盐适应相关。因此，为了探讨蝗抗利尿肽在三疣梭子蟹盐度适应中的功能，作者研究了该基因在盐度胁迫下主要组织中的表达模式，此外分析了去除眼柄后该基因在鳃中表达

变化规律，以期为三疣梭子蟹渗透压调节的内分泌调控机制研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2016 年 9 月在山东省昌邑市海丰水产养殖有限公司实验基地进行，随机选取体重(100±10) g 的健康三疣梭子蟹于 10 m³ 的室内水泥池中暂养 1 周，水温(25±3)℃，盐度为 33，持续充氧，每天更换 1/3 体积的海水，定时投喂蓝蛤。

1.2 实验方法

1.2.1 盐度胁迫实验 随机挑选暂养 7 d 的三疣梭子蟹分为两组：对照组(盐度为 33，自然海水)，实验组(盐度为 11，海水和淡水调配)，每组随机选取 80 只三疣梭子蟹置于 10 m³ 水泥池中实验，实验期间的饲养管理与暂养期保持一致。各组分别在盐度胁迫 0、3、6、12、24、48、72 h 时间点取眼柄、脑和鳃组织置于液氮中保存，每组取 3 只。另随机取 3 只三疣梭子蟹全组织用于后续组织表达分布的分析。

1.2.2 去眼柄实验 随机挑选暂养 7 d 的三疣梭子蟹分为 3 组：对照组，去单侧眼柄组，去双侧眼柄组。每组随机选取 30 只三疣梭子蟹，实验组采用镊烫法^[22]去除眼柄，对照组不做任何处理，随后置于 10 m³ 水泥池中饲养，实验期间的饲养管理与暂养期保持一致。各组分别在实验 24、48、72 h 时间点取鳃组织置于液氮中保存，每组取 3 只。

1.3 *PtNP* cDNA 全长的克隆及测序

从三疣梭子蟹转录组测序数据中筛选得到 *PtNP* 基因 EST 序列，通过 Primer Premier 5.0 软件设计 3' 和 5'RACE 特异性引物，并于青岛擎科生物技术有限公司合成。提取健康三疣梭子蟹眼柄、脑、胸神经节、肌肉、鳃等混合组织的 RNA，利用 SMART™ RACE Amplification Kit(购自 Clontech 公司)制备 RACE cDNA 模板。3' 和 5' 末端扩增使用 TaKaRa LA *Taq* DNA 聚合酶(购自 TaKaRa 公司)与 RACE 通用引物 UPM、NUP 和 4 条 3' 和 5' RACE 特异性引物(表 1)进行巢式 PCR，PCR 反应程序：94℃ 5 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，

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
NP5' F	AGCGTCAAAGGGAGAACAG	5' RACE
NP3' F	AGCGTCGCTCAAGTGTATGC	3' RACE
NP5' S	ATGAGGCGAGGATGAGTGTG	5' RACE
NP3' S	TCCATTGCTCGCTCAAC	3' RACE
NP R	AGCGTCAAAGGGAGAACAG	qPCR
NP F	CACACTCATCCTCGCCTCAT	qPCR
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	RACE
β -actin-F	CGAACCTCAACACTCCCC	qPCR
β -actin-R	GGGACAGTGTGAAACGCC	qPCR

72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min, 4℃保存。用1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 使用胶回收试剂盒(购自 TaKaRa 公司)回收目的片段, 连接转化使用 pMD18-T 载体(购自 TaKaRa 公司)和 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞(购自 TaKaRa 公司), 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。

1.4 序列分析

测序完成后使用 Vector NTI 11.5 软件进行拼接, 得到 *PtNP* 基因 cDNA 全长, 采用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件进行基因开放阅读框(ORF)预测, 使用 Signal 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 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(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 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 5.2.9 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(Neighbor-joining)进行系统进化树的构建。

1.5 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

参照 Invitrogen 说明书, 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(购自 TaKaRa 公司)合成 cDNA。具体操作如下: 基因组 DNA 除去

反应体系及程序, 5×gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, 总 RNA 1 μ L, RNase Free dH₂O 6 μ L, 室温反应 5 min; cDNA 合成体系及程序: 5×PrimeScript Buffer 4 μ L, PrimerScript RT Enzyme Mix 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, 上述反应液 10 μ L, RNase Free dH₂O 4 μ L, 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃保存。反转录后的 cDNA 用于三疣梭子蟹 *PtNP* 基因的表达特征分析。

1.6 *PtNP* 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 *PtNP* 基因 cDNA 全长序列, 利用 Primer Premer 5.0 软件设计荧光定量引物, β -actin 基因作为内参。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 μ L 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 *PtNP* 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, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *PtNP* 基因全长 cDNA 的序列分析

采用 RACE 方法克隆得到三疣梭子蟹抗利尿肽 cDNA 全长, 命名为 *PtNP*, GenBank 登录号:

MF100766。*PtNP* 基因 cDNA 全长 1920 bp, 其中开放阅读框 309 bp, 5'端非编码区 237 bp, 3'端非编码区 1373 bp, 具有 polyA 结构。

PtNP 氨基酸序列分析表明, *PtNP* 基因编码

102 个氨基酸, 预测分子量 10.8 kD, 理论等电点 7.42。SMART、Signal4.1 在线软件分析表明, 该多肽于 10~29 氨基酸之间具跨膜结构域, 且有 28 个氨基酸组成的信号肽(图 1)。

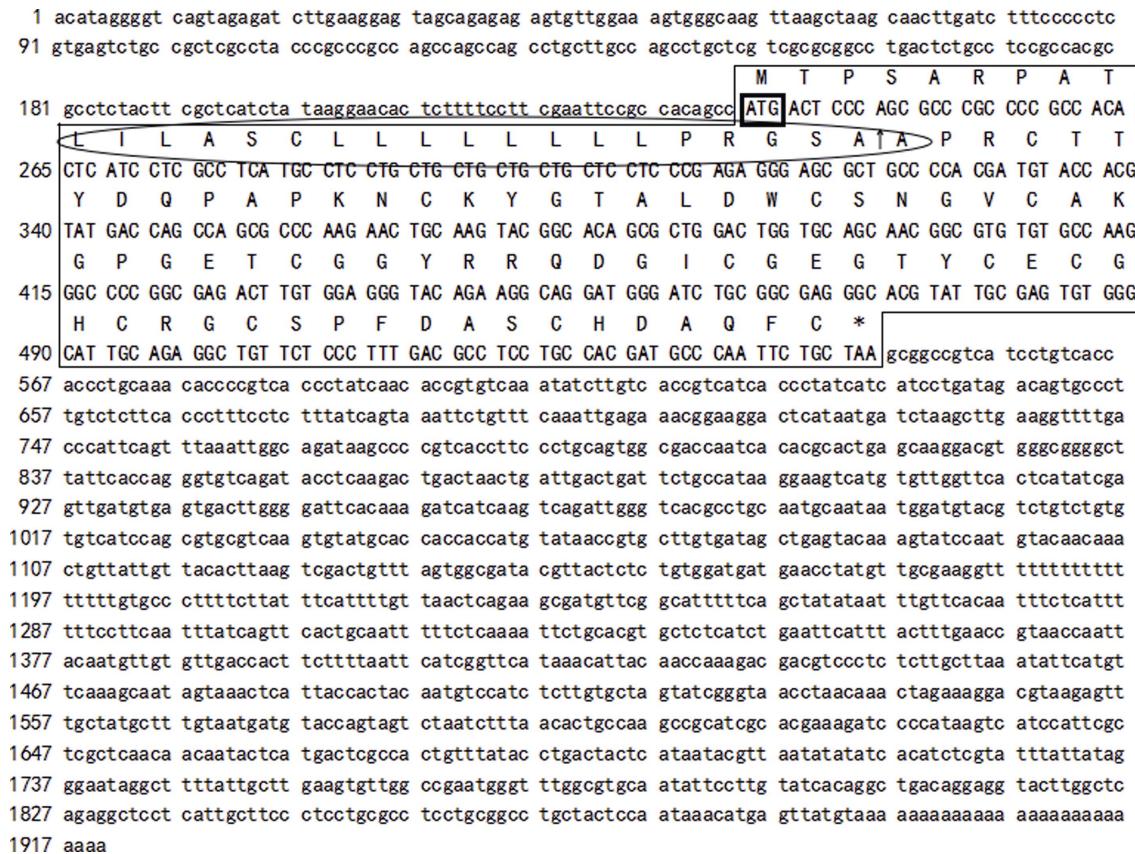


图 1 三疣梭子蟹 *PtNP* 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 方框中为 *PtNP* 基因编码的氨基酸序列; 椭圆框中为跨膜结构域; ↑ 为信号肽切割位点.

Fig. 1 Neuroparsin nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Portunus trituberculatus*

ATG: start codon; *: stop codon; Box: amino acid sequence; Oval: transmembrane region; ↑ denotes cleavage site of the signal peptide.

2.2 *PtNP* 氨基酸同源性及系统进化树分析

利用在线软件 Blast 对 *PtNP* 氨基酸序列和其他物种的 NP 氨基酸序列进行同源性比对, 结果显示, *PtNP* 与拟穴青蟹的 NP4 和 NP1 最为相似, 同源性分别为 89% 和 70%; 与斑节对虾(*Penaeus monodon*)、非洲龙虾(*Jasus lalandii*)NP 的同源性为 43%、51%; 与长红猎蝽(*Rhodnius prolixus*)、沙漠蝗的 NP 同源性为 59%、39%(图 2)。利用 NP 的氨基酸序列进行系统进化树分析显示, 三疣梭子蟹与拟穴青蟹首先聚为一支, 之后的聚类依次为非洲龙虾、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、斑节对虾; 而与昆虫类亲缘关系较远(图 3)。

2.3 *PtNP* 基因组织表达分析

采用实时荧光定量 PCR 分析了三疣梭子蟹抗利尿肽基因在不同组织中的相对表达情况。其中, *PtNP* 基因在脑组织中相对表达量最高, 其次是鳃和眼柄中, 在卵巢、肌肉、心脏和肝胰腺中表达量很少, 甚至不表达(图 4)。

2.4 盐度胁迫后 *PtNP* 基因在脑、鳃和眼柄组织中的差异表达分析

三疣梭子蟹在盐度胁迫后脑组织中的 *PtNP* 基因的表达情况如图 5 所示, 实验组在低盐胁迫后, *PtNP* 基因的表达量发生了明显的变化, 呈现逐渐上升后下降再上升的趋势, 除胁迫 3 h 和 48 h 外,

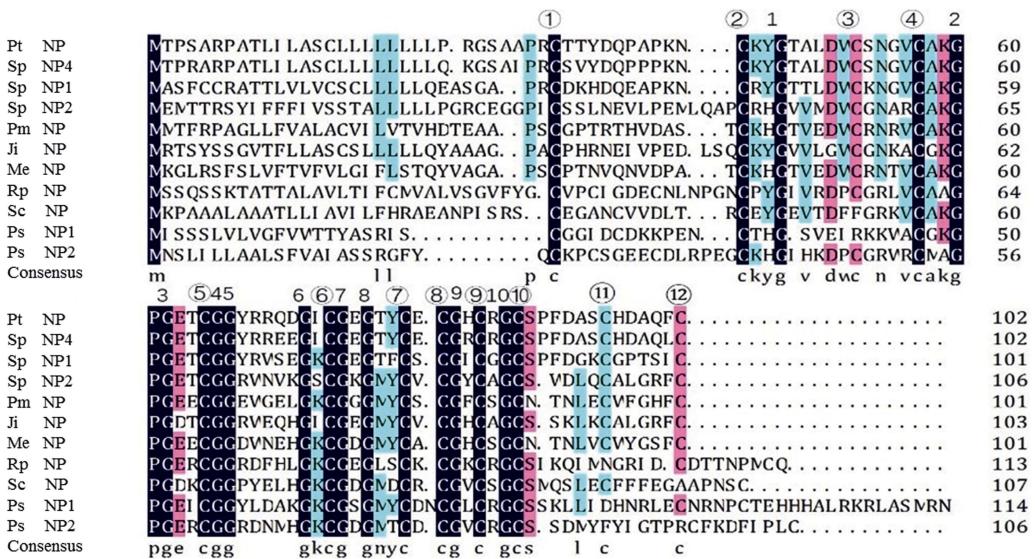


图 2 三疣梭子蟹 *PtNP* 氨基酸序列与其他物种的 NP 氨基酸序列比对

①-⑫为半胱氨酸; 1-10 为甘氨酸; 前两个字母为物种名称缩写: Pt, 三疣梭子蟹; Sp, 拟穴青蟹; Pm, 斑节对虾; Jl, 非洲龙虾; Me, 刀额新对虾; Rp, 长虹猎蝽; Sc, 沙漠蝗; Ps, 斯氏珀蝽.

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* NP with other species

①–⑫ represent cysteine; 1–10 represent glycine. The left letters were sequence names and the first two letters represented species' names. The specific meanings were as follows: Pt, *Portunus trituberculatus*; Sp, *Scylla paramamosain*; Pm, *Penaeus monodon*; Jl, *Jasus lalandii*; Me, *Metapenaeus ensis*; Rp, *Rhodnius prolixus*; Sc, *Schistocerca gregaria*; Ps, *Plautia stali*.

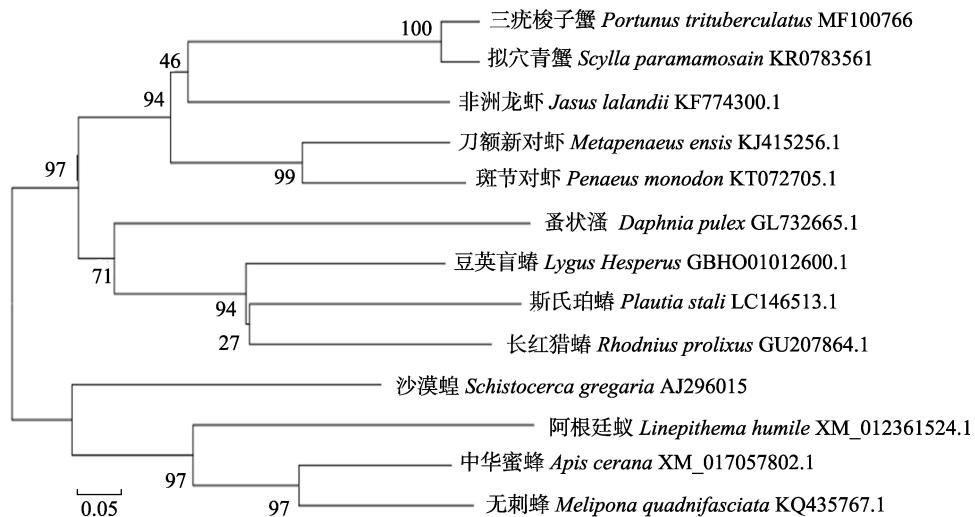
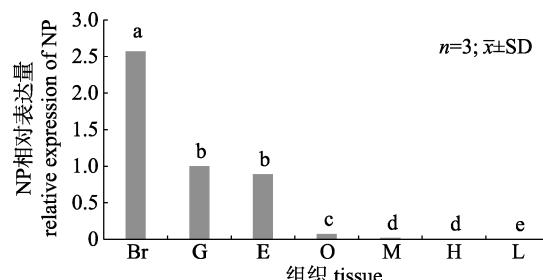


图 3 基于 *PtNP* 氨基酸序列的不同物种 NP 进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree for amino acid sequences of neuroparsin in different species based on *PtNP* amino acid sequence

其他取样时点实验组 *PtNP* 基因的表达量均极显著高于对照组($P<0.01$)，在胁迫后 12 h 出现一个高峰，其表达量为对照组的 4.8 倍，而后逐渐下降，24 h 和 48 h 时表达量分别为对照组的 1.8 倍和 1.5 倍。随后 *PtNP* 基因的表达量又急剧上升，在 72 h 时表达量达到最大值，为对照组的 7.7 倍。在鳃组

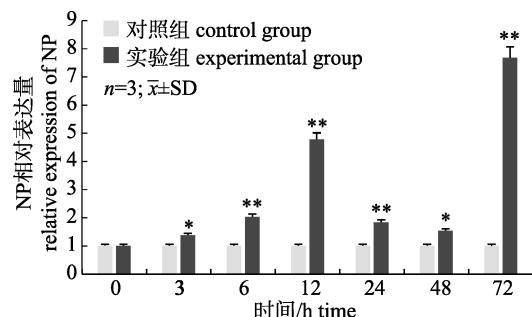
织中(图 6), 实验组在低盐胁迫后, *PtNP* 基因的表达量也发生了明显的变化, 呈现下降, 上升, 再下降后逐渐上升的趋势, 在胁迫后 3 h 实验组较对照组表达量显著下调(0.3 倍, $P<0.01$), 胁迫后 6 h *PtNP* 基因表达量恢复到对照组水平, 胁迫后 12 h 实验组表达量下调为对照组的 0.19 倍($P<0.01$)。

图 4 三疣梭子蟹 *PtNP* 基因在各组织中的表达

Br: 脑; E: 眼柄; G: 鳃; H: 心脏; L: 肝胰腺; M: 肌肉; O: 卵巢。柱上不同小写字母代表不同组织中差异显著($P<0.01$)。

Fig. 4 Distribution of *PtNP* gene expression in different tissues of *Portunus trituberculatus*

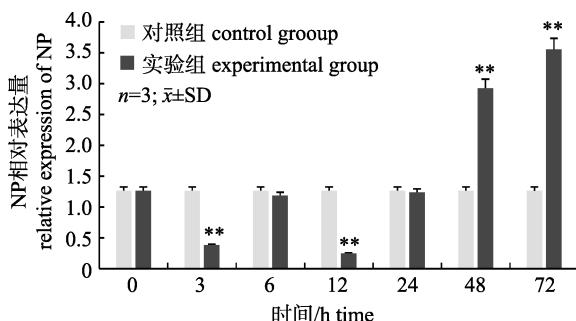
Br: brain; E: eyestalk; G: gill; H: heart; L: liver; M: muscle; O: ovary. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.01$)。

图 5 低盐胁迫下 *PtNP* 基因在三疣梭子蟹脑组织中的表达水平随盐度胁迫时间的变化

* 代表同一时间实验组与对照组差异显著($P<0.05$); ** 代表同一时间实验组与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Fig. 5 Expression profiles of *PtNP* gene in brain of *Portunus trituberculatus* under low salinity stress

* indicates significant difference ($P<0.05$) at the same time point;
** indicates extremely significant difference ($P<0.01$) at the same time point.

图 6 低盐胁迫下 *PtNP* 基因在三疣梭子蟹鳃组织中的表达水平随盐度胁迫时间的变化

**代表同一时间实验组与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Fig. 6 Expression profiles of *PtNP* gene in gill of *Portunus trituberculatus* under low salinity stress

** indicates extremely significant difference ($P<0.01$) at the same time point.

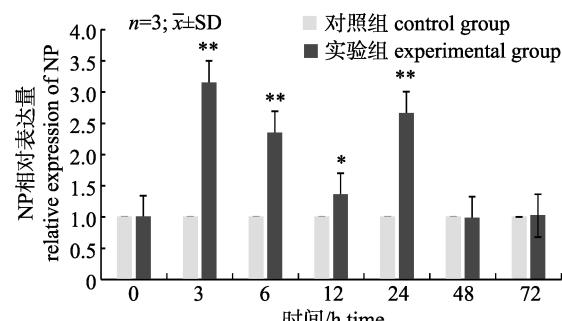
并在 24 h 恢复至对照组水平, 胁迫后 48 h 和 72 h 表达量分别为对照组的 2.3 倍和 2.8 倍, 且存在极显著差异($P<0.01$)。眼柄组织中 *PtNP* 基因的表达情况如图 7 所示, 低盐胁迫后, 实验组较对照组 *PtNP* 基因的表达量发生了明显的变化, 3~24 h *PtNP* 基因的表达量显著高于对照组($P<0.05$), 其表达量分别为对照组的 3.1 倍、2.3 倍、1.3 倍、2.6 倍, 呈现先降低后升高的趋势, 48 h 恢复至对照组水平。

2.5 去除眼柄后三疣梭子蟹鳃组织中 *PtNP* 基因的差异表达分析

去除眼柄后 *PtNP* 基因在鳃组织中的表达情况如图 8 所示, 去除单侧眼柄 24 h *PtNP* 基因的表达量显著下降($P<0.05$), 为对照组的 0.7 倍, 随后逐渐上升, 48~72 h *PtNP* 基因的表达量比对照组显著提高($P<0.05$), 分别是对照组的 1.7 倍和 1.8 倍。去除双侧眼柄 *PtNP* 基因在鳃中的表达量在 24~72 h 较对照组显著增加($P<0.05$), 分别是对照组的 1.7 倍, 4.2 倍和 8.8 倍。去除双侧眼柄的表达量显著高于去除单侧眼柄的表达量($P<0.05$)。

3 讨论

迄今, 尚不清楚蝗抗利尿肽是否参与了甲壳动物盐度适应过程。本研究利用从三疣梭子蟹转录组测序数据中获得的蝗抗利尿肽(*PtNP*)基因序列信息, 通过 5' 和 3' RACE 克隆得到该基因 cDNA

图 7 低盐胁迫下 *PtNP* 基因在三疣梭子蟹眼柄组织中的表达水平随盐度胁迫时间的变化

* 代表同一时间实验组与对照组差异显著($P<0.05$); ** 代表同一时间实验组与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Fig. 7 Expression profiles of *PtNP* gene in eyestalk of *Portunus trituberculatus* under low salinity stress

* indicates significant difference ($P<0.05$) at the same time point; ** indicates highly significant difference ($P<0.01$) at the same time point.

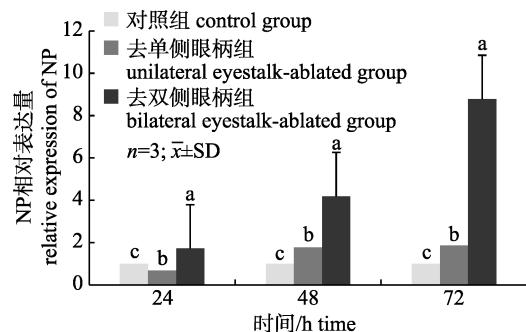


图8 切除眼柄 *PtNP* 基因在三疣梭子蟹鳃组织中的表达水平随时间的变化

不同小写字母上标表示同一时间点不同处理组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 8 Expression profiles of *PtNP* gene in gill of *Portunus trituberculatus* after eyestalk ablation. The different letters up the error bars indicates significant difference among different treatment groups at the same time point ($P<0.05$).

全长。*PtNP* 含有 12 个半胱氨酸残基, 具十足目动物蝗抗利尿肽典型的特征。*PtNP* 与拟穴青蟹的 NP4 同源性较高, 推测 *PtNP* 基因可能与拟穴青蟹的 NP4 基因为同一亚型。在甲壳动物和昆虫中, *PtNP* 具有较低的保守性, 在第二半胱氨酸与第五甘氨酸和第六甘氨酸与第十半胱氨酸之间的序列保守性较高。在该氨基酸序列的 N 端和 C 端没有保守的氨基酸残基。

利用 RT-qPCR 技术对 *PtNP* 基因的组织表达模式进行了分析。结果显示, 该基因主要在脑、鳃和眼柄组织中表达, 卵巢中少量表达, 这与罗氏沼虾 NP 基因表达的研究结果一致^[19]; 而与 NP4 在拟穴青蟹眼柄中不表达的结果不一致^[18]。这种组织特异性可能与蝗抗利尿肽的多效性(在不同组织中发挥不同作用, 行使多种生理功能)有关^[23]。鳃是甲壳动物最重要的渗透压调节器官之一, 直接参与体内与外界渗透压的调节^[21, 24]。*PtNP* 基因于鳃组织中高表达, 暗示其在盐度适应中可能发挥一定作用。另外, 脑和眼柄是甲壳动物重要的神经内分泌器官, 在渗透压调节中也发挥了一定的调控作用^[25-26], *PtNP* 基因大量表达于脑和眼柄中, 表明其在神经内分泌系统中具有重要作用, 亦可能参与三疣梭子蟹渗透压调节。

为了探索 *PtNP* 在盐度适应中的功能, 本研究分析了盐度胁迫过程中该基因在脑、鳃和眼柄组

织中的表达变化规律。发现该基因在各组织中的表达均发生了显著变化, 且整体呈上调表达趋势, 其中在脑、鳃和眼柄中表达量分别最高上调至 7.7 倍、2.8 倍和 2.6 倍, 暗示其在 3 个组织中发挥一定的盐度适应功能或受盐度胁迫影响显著。另外, *PtNP* 基因在脑和眼柄中能够迅速响应盐度胁迫, 3 h 时即显著上调表达, 而在鳃组织中却显著下调(下调至 0.3 倍), 推测可能由于鳃组织直接接触低盐海水导致应激或损伤, 从而间接抑制或干扰了 NP 基因的表达。

位于眼柄中的 X 器官-窦腺复合体是重要的神经内分泌器官^[27], 已有研究发现眼柄切除显著诱导了钠钾 ATP 酶、碳酸酐酶及钠钾氯共转运蛋白等重要的离子转运基因在鳃中的表达, 表明其在甲壳动物渗透压调节中具重要作用^[28-30]。为了进一步研究 *PtNP* 基因是否受眼柄神经内分泌系统的调控, 我们采用镊烫法对三疣梭子蟹进行了单侧和双侧的眼柄切除手术, 继而分析了眼柄切除后 *PtNP* 基因在鳃组织中的表达变化规律。研究发现, 去除眼柄后该基因在 48~72 h 间显著上调表达, 且去除双侧眼柄组的表达量显著高于去除单侧眼柄组, 暗示 *PtNP* 基因在鳃中的表达受眼柄神经内分泌系统的调控。有趣的是, 我们注意到眼柄切除后 *PtNP* 在鳃中的表达趋势与本课题组之前研究的钠钾氯共转运蛋白基因的表达趋势相似^[31], 该基因是鳃上皮细胞重要的离子转运基因^[32], 由此推测 *PtNP* 可能是眼柄神经内分泌系统介导鳃上皮细胞离子转运信号通路中的基因, 该推论尚需要后续实验验证。

本研究主要探讨了 *PtNP* 基因在三疣梭子蟹低盐适应中的功能及可能的调控机制: 克隆了 *PtNP* cDNA 全长, 分析了 *PtNP* 基因在主要组织中的表达情况, 明确了低盐胁迫进程中该基因在脑、鳃和眼柄组织中的表达变化模式, 发现 *PtNP* 在三疣梭子蟹盐度适应中发挥了一定的作用且可能受神经系统的调控, 为深入研究神经肽在盐度适应中的作用机制提供了参考。

参考文献:

- [1] Dai A Y, Yang S L, Song Y Z, et al. Marine Crabs in China Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 1986: 213-214. [戴爱

- 云, 杨思谅, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类[M]. 北京: 海洋出版社, 1986: 213-214.]
- [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] 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 Science, 2001, 19(1): 44-51. [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): 44-51.]
- [4] Cai S L. A review of crustacean endocrinology[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22(2): 154-161. [蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究与展望[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 154-161.]
- [5] Christie A E, Dickinson P S, Stemmler E A. Crustacean neuropeptides[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67: 4135-4169.
- [6] Wang Z Z, Xiang J H. A review on the structure and function of crustacean hyperglycemic neurohormone family[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(2): 175-180. [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.]
- [7] Zhang D B, Li A G. Research of survival limits and salinity suitable in zoea of *Portunus trituberculatus*[J]. Marine Science, 1992, 16(1): 8-10. [张德波, 李爱国. 三疣梭子蟹溞状幼体的生存下限盐度及适宜盐度的研究[J]. 海洋科学, 1992, 16(1): 8-10.]
- [8] Lu Y L, Wang F, Zhao Z Y, et al. Effects of salinity on growth, molt and energy utilization of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 237-245. [路允良, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕壳及能量利用的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 237-245.]
- [9] Zhou D, Mu C K, Song W W, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme and ATPase activities in tissues of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Ecological Science, 2014, 33(4): 698-703. [周东, 母昌考, 宋微微, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹组织中抗氧化酶和 ATP 酶活力的影响[J]. 生态科学, 2014, 33(4): 698-703.]
- [10] Ma J W, Lv J J, Liu P, et al. Na^+/H^+ -exchanger in swimming crab (*Portunus trituberculatus*): cloning, characterization and mRNA expression under salinity stress[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(5): 902-907. [马金武, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 Na^+/H^+ -exchanger 基因克隆鉴定及在盐度胁迫下的表达分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5): 902-907.]
- [11] Wang Y, Lv J J, Liu P, et al. Cloning and characterization of chloride intracellular channel gene and its expression under low salinity stress in *Portunus trituberculatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(6): 1359-1366. [王渝, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)胞内氯离子通道蛋白基因克隆及其表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1359-1366.]
- [12] Han X L, Liu P, Gao B Q, et al. Na^+/K^+ -ATPase α -subunit in swimming crab *Portunus trituberculatus*: molecular cloning, characterization, and expression under low salinity stress[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015, 33(4): 828-837.
- [13] Badisco L, Claeys L, Vanloy T, et al. Neuroparsins, a family of conserved arthropod neuropeptides[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 153(1): 64-71.
- [14] Nagasawa H, Guo F, Zhong X C, et al. Large-scale purification of prothoracotrophic hormone of the silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Scientia Sinica, 1980, 23(8): 1053-1060.
- [15] Girardie J, Boureme D, Couillaud F, et al. Anti-juvenile effect of neuroparsin A, a neuroprotein neuroprotein isolated from locust corpora cardiaca[J]. Journal of Insect Biochemistry, 1987, 17(7): 977-983.
- [16] Brown M R, Graf R, Swiderek K M, et al. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(7): 3967-3971.
- [17] Boureme D, Fournier B, Matz G, et al. Immunological and functional cross-reactivities between locust neuroparsins and proteins from cockroach corpora cardiaca[J]. Journal of Insect Physiology, 1989, 35(4): 265-271.
- [18] Bao C, Yang Y, Huang H, et al. Neuropeptides in the cerebral ganglia of the mud crab, *Scylla paramamosain*: transcriptomic analysis and expression profiles during vitellogenesis[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17055.
- [19] Suwansaard S, Thongbuakaew T, Wang T, et al. In silico neuropeptidome of female *Macrobrachium rosenbergii* based on transcriptome and peptide mining of eyestalk, central nervous system and ovary[J]. Plos One, 2015, 10(5): e0123848.
- [20] Veenstra J A. What the loss of the hormone neuroparsin in the melanogaster subgroup of *Drosophila* can tell us about its function[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40(4): 354-361.
- [21] Lv J, Liu P, Wang Y, et al. Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation[J]. Plos One, 2013, 8(12): e82155.
- [22] Jia F L, Meng X L, Liu P, et al. Cloning and expression analysis of Cdk7, a gene involved in ovarian development, from swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1032-1040. [贾复龙, 孟亮亮, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹细胞 Cdk7 基因克隆及其在卵巢发育中的表达[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1032-1040.]
- [23] Fournier B, Herault J P, Proux J. Antidiuretic factor from the nervous corpora cardiaca of the migratory locust: improvement of an existing in vitro bioassay[J]. General and Comparative Endocrinology, 1987, 68(1): 49-56.
- [24] Genovese G, Luchetti C G, Luquet C M. Na^+/K^+ -ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater[J]. Marine Biology, 2004, 144(1): 111-118.
- [25] Kamemoto F I, Kato K N, Tucker L E. Neurosecretion and salt and water balance in the annelida and crustacea[J]. American Zoologist, 1966, 6(2): 213-219.

- [26] Kamemoto F I. Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod crustacea[J]. American Zoologist, 1976, 16(2): 141-150.
- [27] Morris S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans[J]. Journal of Experimental Biology, 2001, 204(5): 979-989.
- [28] Nan F H, Hong M C, Sheen S S. The effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic regulation and Gill Na⁺/K⁺-ATPase activity in *Marsupenaeus japonicus* (Bate, 1888) (Decapoda, Natantia)[J]. Crustaceana, 2004, 77(4): 385-395.
- [29] Henry R P, Campoverde M. Neuroendocrine regulation of carbonic anhydrase expression in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2006, 305A(8): 663-668.
- [30] Henry R P, Borst D W. Effects of eyestalk ablation on carbonic anhydrase activity in the euryhaline blue crab *Callinectes sapidus*: Neuroendocrine control of enzyme expression[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2006, 305A(1): 23-31.
- [31] Lv J J, Zhang D N, Liu P, et al. Effects of salinity acclimation and eyestalk ablation on Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter gene expression in the gill of *Portunus trituberculatus*: a molecular correlate for salt-tolerant trait[J]. Cell Stress and Chaperones, 2016, 21(5): 829-836.
- [32] Kang C K, Tsai H J, Liu C C, et al. Salinity-dependent expression of a Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias danica*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 157(1): 7-18.

Expression analysis of neuroparsin gene under low salinity stress in swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

SUN Dongfang^{1,3}, LYU Jianjian^{2,3}, HUAN Pengpeng^{1,3}, GAO Baoquan^{2,3}, LIU Ping^{2,3}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
3. 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

Abstract: The swimming crab (*Portunus trituberculatus*), which is an economically important marine crab in China, is a widespread species in coastal Japan, Korea, and China. Neuropeptides have a significant effect on osmoregulation, growth, development, and immunity of crabs. To investigate the function of neuroparsin under low salinity stress in *P. trituberculatus*, the neuroparsin gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends. The *PtNP* gene is 1920 bp long, including a 309 bp open reading frame (ORF) that encodes a 102-aa polypeptide; its isoelectric point was 7.42 and the molecular mass was 10.8 kDa. The *PtNP* gene contains 12 cysteine residues, which is a typical characteristic of neuroparsin in decapods. The homology and phylogenetic systematic analyses revealed that the highest homology and similarity (reaching up to 89%) occurred between *PtNP* and the NP gene of *Scylla paramamosain* and *P. trituberculatus* clustered with *S. paramamosain*. The tissue expression analysis showed that the expression of *PtNP* gene was relatively high in the brain, followed by the gill and eye, with very little or no expression in the ovaries, muscles, heart, liver, and pancreas. The expression pattern analysis of the *PtNP* gene under low salt stress condition showed that low salt stress can significantly change the expression of *PtNP* gene in the brain, gill, and eyestalk, and the overall expression was upregulated. In the brain, gill, and eyestalk, the expression of *PtNP* was 7.7, 2.8, and 2.6 times higher than that of the control, respectively ($P<0.05$). The *PtNP* gene expression in the gills presented an increasing trend after the ablation of eyestalk. Furthermore, the expression of *PtNP* after the ablation of bilateral eyestalk was significantly higher than that after the ablation of unilateral eyestalk ($P<0.05$). The results of this study showed that the *PtNP* gene might play a role in the salinity adaptation of *P. trituberculatus*, which is regulated by its neuroendocrine system.

Key words: *Portunus trituberculatus*; neuroparsin; gene cloning; salinity stress; gene expression; eyestalk ablation; expression analysis

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