

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00082

青虾高血糖激素基因全长 cDNA 序列的克隆及表达分析

金舒博¹, 王宁², 乔慧¹, 傅洪拓^{1,2}, 吴滢¹, 龚永生¹, 蒋速飞¹, 熊贻伟¹

1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 本研究首次克隆了青虾(*Macrobrachium nipponense*)高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)基因全长 cDNA 序列, 并使用荧光定量 PCR 技术首次检测了 CHH 基因在青虾不同组织中的表达。青虾 CHH 基因 cDNA 全长 1 017 bp, 包括 241 bp 的 5'UTR, 408 bp 的开放阅读框(ORF), 355 bp 的 3'UTR, 开放阅读框编码 135 个氨基酸。成熟肽包含 6 个 CHH 家族中位置保守的 Cys 残基。青虾 CHH 成熟肽 C 端为 GK, 确定为 ES 型 CHH 基因。蛋白相似度比对显示, 所分离的青虾 CHH 被归为 CHH 家族 I 型肽。系统进化树分析表明, 青虾 CHH 多肽与罗氏沼虾聚在一起, 具有最近的亲缘关系。荧光定量 PCR 检测显示, CHH 基因在青虾不同组织中均有表达, 其表达量由高到依次为眼柄、精巢、腹神经节、脑、肠、肝、心脏、卵巢。以卵巢为参照其表达量设为 1 时, 眼柄与精巢 CHH 基因表达量分别为卵巢的 500 倍和 250 倍, 由此推测 CHH 基因可能与雄性生殖过程相关。

关键词: 青虾; ES 型高血糖激素; cDNA; 定量 PCR

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0082-11

甲壳类高血糖激素家族(CHH 家族)是甲壳动物眼柄神经激素中最重要的一类, 在甲壳类动物蜕皮和生殖过程起重要作用^[1-3]。高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)是其中最重要的神经肽类激素。研究表明, CHH 基因不仅对甲壳类动物蜕皮和生殖过程起重要作用, 同时也参与甲壳动物离子和能量代谢调节、血糖调节、渗透压以及对光线和背景颜色等重要的生理功能^[4-7], 是甲壳动物眼柄中含量最丰富且被研究得最多的激素。CHH 基因已相继在美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)^[8]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[9]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[10]、南美白对虾(*Litopenaeus schmitti*)^[11]、红斑青蟹(*Callinectes sapidus*)^[12]、阿拉斯加唐纳蟹(*Chionoecetes bairdi*)^[13]等甲壳类动物中克隆, 同时 CHH 基因在甲壳类动物不同组织表达的研究也有少量

报道^[14]。青虾(*Macrobrachium nipponense*)是中国重要的淡水养殖虾类, 而目前对青虾 CHH 基因的克隆尚未见报道。

本研究拟以青虾为实验材料, 通过 RACE 技术克隆出 CHH 基因全长 cDNA 序列, 并采用荧光定量 PCR 对 CHH 基因在青虾不同组织中的表达进行分析, 以期为青虾 CHH 基因功能的研究奠定基础, 并为青虾蜕皮及生殖发育相关功能和机制的研究提供参考, 为其他甲壳类动物相关研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验虾 实验青虾为野生青虾, 采自太湖无锡湖区。野生青虾暂养在实验室 1 周, 24 h 充氧并维持水温在 26~28℃, 日换水量约为总水量的

收稿日期: 2012-01-16; 修订日期: 2012-06-30.

基金项目: 江苏省高新技术研究项目(BG2007328); 中央级科研院所基本科研业务费专项基金项目(2011JBFA02).

作者简介: 金舒博(1986-), 男, 硕士, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: jinsb@ffrc.cn

通信作者: 傅洪拓(1964-), 研究员, 博士生导师, 研究方向为水产动物遗传育种. Tel: 0510-85558835; E-mail: fuht@ffrc.cn

1/2, 每天投喂 2 次。挑取 3 只健康活泼个体用于心脏、精巢、卵巢、脑、肝腹神经节、眼柄及肠道等 8 个组织的 RNA 提取。眼柄总 RNA 提取时, 先除去眼球及眼球内的色素, 只留柄部供总 RNA 的提取。

1.1.2 仪器和试剂 RNAiso Plus、cDNA 第一链合成试剂盒、3'-Full RACE Kit、5'-Full RACE Kit 购自 TaKaRa; iScript cDNA Synthesis Kit、SsoFast EvaGreen Supermix 购自 BIO-RAD; RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒等其他试剂均购自 Sangon; 引物由 Sangon 合成。低温离心机(贝克曼库尔特 Microfuge 22R), 凝胶成像系统(贝克曼库尔特 CEQ 8000), 紫外分光光度计(艾本德 BioPhotometer), PCR 仪(艾本德 Authorized Thermal Cycler)。荧光定量 PCR 仪(伯乐 BIO-RAD iQ5)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 取青虾眼柄、腹神经节、脑、肠道、肝、心脏、精巢、卵巢 8 种组织各 100 mg 用于总 RNA 的提取。RNA 提取方法按照 RNAiso Plus 的操作步骤进行。研磨、裂解组织后用传统的酚仿抽提法提取总 RNA, 并使用 RNA-freeDNaseI 纯化试剂盒用于各组织总 RNA 的纯化, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度并通过琼脂糖凝胶电泳检测各组织总 RNA 的完整性。眼柄总 RNA 按照 TaKaRa cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转, -80°C 保存, 用于之后 *CHH* 基因 cDNA 全长序列的克隆。cDNA 按照 BIO-RAD 的 iScript cDNA Synthesis Kit 第一链合成试剂盒说明书进行反转, 用

于之后 *CHH* 基因在各组织中表达的荧光定量 PCR 检测。cDNA 反应体系: $4\ \mu\text{L} \times \text{iScript reaction mix}$, $1\ \mu\text{L}$ iScript reverse transcriptase, $1\ \mu\text{g}$ 总 RNA, 加 Nuclease-free water 至总反应体积为 $20\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 25°C 5 min; 42°C 30 min; 85°C 5 min; 4°C 5min。合成的 cDNA 于 -20°C 保存备用。

1.2.2 青虾 *CHH* 基因的克隆 通过对罗氏沼虾 *CHH* 和热液口虾(*Rimicaris kairei*) *CHH2* 的 cDNA 编码区进行比较, 依据二者的保守区设计正反向简并引物 FS1 和 RS1(表 1)。以青虾眼柄组织 cDNA 为模板, 用设计的简并引物克隆出了青虾 *CHH* 基因的中间序列。PCR 反应体系为 $50\ \mu\text{L}$, 反应条件为: 94°C 2 min; 94°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s; 35 个循环, 72°C 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收后与 pMD18-T 载体连接, 并转化入感受态大肠杆菌中, 通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆菌落送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 将所得 *CHH* 基因 cDNA 中间序列于 NCBI 中进行 Blastx 同源性分析。

根据已获得的青虾 *CHH* 基因 cDNA 中间序列, 采用 Primer 5.0 软件设计 3'RACE 特异性引物(FS2 和 FS3)以及 5'RACE 特异性引物(RS2 和 RS3)(表 1)。根据 3'-Full RACE、5'-Full RACE 试剂盒操作步骤, 以青虾眼柄 cDNA 为模板, 结合套式 PCR 技术分别扩增 *CHH* 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列。反应循环数为 25, 其他条件同前。PCR 产物同样经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收后, 与 pMD18-T 载体连接, 并转化入感受态中。蓝白斑筛选法挑取阳性克隆菌落送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 将所得 *CHH* 基因 cDNA

表 1 基因克隆所用的引物及其序列
Tab. 1 Primers and their sequences used in gene cloning

引物 primer	引物序列 primer sequence	长度/bp length	作用 function
FS1	5'-GYSTYGMCAGGATRGAGAAGCTC-3'	23	中间序列扩增
RS1	5'-ATCTGGACWGMGKTSRCGTATTC-3'	23	middle fragment extension
FS2	5'-TACAACCTCTACAGGAAGCCATACG-3'	25	3' 端序列扩增
FS3	5'-GGGAGGGCTGCTACCAGAACTT-3'	22	3'-Full RACE
RS2	5'-CAAGTTCTGGTAGCAGCCCTCC-3'	22	5' 端序列扩增
RS3	5'-CTTTCAGGATTGGTCGAGGATG-3'	23	5'-Full RACE

3'端和 5'端序列于 NCBI 中进行 Blastx 同源性分析。

1.2.3 序列分析 采用 ContigExpress 软件将中间序列、3'端序列、5'端序列进行拼接, 得到 *CHH* 基因全长 cDNA 序列并使用 DNASTar 软件寻找开放阅读框并翻译出相应的氨基酸序列。在 NCBI 中对 *CHH* 基因全长 cDNA 序列进行 BLAST 比对并做同源性分析^[15]; 使用 SMART 在线软件分析蛋白质的结构及功能; 用 ClustalX 软件及 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件对蛋白序列作比对及同源性分析并采用 MAGE4.0 软件以邻接法(Neighbour- Joining)根据不同物种的 *CHH* 氨基酸序列构建系统进化树^[16-17]。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)作相对表达分析 本实验的总 RNA 提取共设置 3 个平行样本, 每个样本挑选 3 只健康活泼的青虾用于总 RNA 的提取, 用 BIO-RAD 的 iScript cDNA Synthesis Kit 分别反转录 3 个平行样本总 RNA 合成 cDNA, 并将 3 次反转录得到的 cDNA 混合, 用作 qRT-PCR 反映的模板 cDNA。根据获得的 *CHH* 基因全长 cDNA 序列设计 1 对荧光定量特异引物 QAFS1 和 QARS1(表 2); 根据罗氏沼虾 β -actin 基因全长 cDNA 序列设计 1 对内参引物 Actin F 和 Actin R(见表 2)。qRT-PCR 反应体系为 25 μ L: 上下游引物各 0.5 μ L, Super Mix 10 μ L, ddH₂O 13 μ L, 模板 cDNA 1 μ L(总量 50 ng)。反应条件按照 BIO-RAD SsoFast EvaGreen Supermix 推荐条件, 采用两步 PCR 法进行扩增, 即首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 然后进入 40 个循环, 每个循环中 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环结束后, 从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温到 95 $^{\circ}$ C, 绘制熔解曲线。反应在 BIO-RAD iQ5 中进行, 每种组织 cDNA 样品做 3 个荧光定量特异引物和内

参基因 β -actin 基因重复, 并分别作 3 个不加 cDNA 模板的阴性对照重复, 反应条件同上。

用 BIO-RAD iQ5 自带实时分析软件进行熔解曲线分析, 将卵巢 *CHH* 基因 mRNA 的表达量设定为 1, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量并作图^[18-19]; 使用 Excel 软件进行各组织表达量的方差分析; 使用 SPSS13. 软件进行差异显著性分析; 用 Turkey 法进行多重比较分析, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 青虾 *CHH* 基因全长 cDNA 克隆

克隆青虾 *CHH* 基因 cDNA 全长测序后获得 304 bp 的中间片段, 507 bp 的 3'端片段以及 483 bp 的 5'端片段。BLASTx 分析显示这些片段与罗氏沼虾的相似度分别为 97%、98%和 97%, 并且青虾 *CHH* 基因 cDNA 全长序列与罗氏沼虾 *CHH* 基因 cDNA 全长序列的相似度为 97%, 证明片段确为青虾 *CHH* 基因的部分 cDNA 片段。应用软件 ContigExpress 拼接中间序列、3'端序列和 5'端序列, 得到 *CHH* 基因 cDNA 全长序列为 1 017 bp, 包括 241 bp 的 5'UTR, 408 bp 的 ORF, 355 bp 的 3'UTR, 3'UTR 中没有典型的加尾信号, 但具有典型的 Poly(A)尾(图 1)。

2.2 生物信息学分析

编码区序列编码 135 个氨基酸(图 1), 预测的蛋白分子量为 15.15 kD, 理论等电点 pI 为 8.250, 碱性氨基酸 17 个, 酸性氨基酸 14 个, 疏水性氨基酸 49 个, 极性氨基酸 40 个。用 Signal 3.0 Server 预测信号肽的切割位点在 Ala26 和 Trp27 之间, 同时发现了 *CHH* 氨基酸序列中连接 *CHH* 前体相

表 2 荧光定量 PCR 所用的引物及其序列
Tab. 2 Primers and their sequences used in quantitative real-time PCR

引物 primer	引物序列 primer sequence	长度/bp length	作用 function
QAFS1	5'- CTCCCCGGAAGCCTTAAAAAG-3'	20	RT-PCR primer
QARS1	5'- TTGACTAGCTTGGGACCTCTGTAGT-3'	25	
Actin F	5'- TATGCACTTCCTCATGCCATC -3'	21	RT-PCR control primer
Actin R	5'- AGGAGCGGGCAGTGGTCAT -3'	19	

关肽(CHH-precursor related peptide, CPRP)和成熟肽的二盐基切割位点“K60R61”, 由此推断 CHH 前体包括 26 个氨基酸组成的信号肽、33 个氨基酸组成的 CPRP、二盐基切割位点 KR 和 74 个氨基酸组成的成熟肽。成熟肽包含 6 个在 CHH 家族中位置保守的 Cys 残基(Cys68, Cys84, Cys87, Cys100, Cys104, Cys113), C 端有潜在的酰胺化位点 Gly134, 且在第 1 个保守的 Cys 残基后面第 5 位上没有 CHH 家族 II 型肽所特有的 Gly 残基。

```

61 CTCCGCACACAACCTTTGTGAGTTCAGTCAACAACGTCATCCACCAAGGAGACAGTAGAC
121 CTACGTAGACCTCGTCTGCTCTTCGTCGTCGGAAGTTTATCTAACGAGTTCGTCGGCCA
181 GAAGTGCTACTTCGCATCATCCGTTCTGCCAAGCAACCGTCAAAAAACACACAGCAAA
241 CATGATTCGCAGCAGTGTGATGGGACCCACCATGTTCTCTGGTCTCCTCCTCGTGGC
aa1  M I R S S V M G P T M F L V V L L L V A
301 GACCCACCAAACTCGGCTTGGTCCGTCGATGGCTCCGACAGGATAGAGAAGCTCTTATC
aa21  T H Q T S A W S V D G L A R I E K L L S
361 CACGTGCTCCTCGGCTTCCGCCGCTCTCCACGAGAGGCCAGGCTCAACCTGAAGAA
aa41  T S S S A S A A S P T R G Q G L N L K K
421 AAGGGCATCCACGACCAATCCTGCAAAGGGATCTTCGACCGGAGCTCTCAAGAAGCT
aa61  R A I L D Q S C K G I F D R E L F K K L
481 CGACCGGTGTGCGACGATGTTACAACCTCTACAGGAAGCCATACGTCGCCATCGACTG
aa81  D R V C D D C Y N L Y R K P Y V A I D C
541 CAGGGAGGCTGCTACCAGAACTTGGTTTTCCGACAGTCATTAGGACCTCCAGCTGAT
aa101 R E G C Y Q N L V F R Q C I Q D L Q L M
601 GGACCGCTCGACGAGTACGCCAACGCTGTTCAAGTTCGTTGGGAAGTAGATCCACCTCA
aa121 D Q L D E Y A N A V Q V V G K *
661 CCGAGTACATCCTAGAAGTGCATGACGCTTTTCGAATGCGCGGGATTGTGGCTGCTAGAC
721 CTATATTCGTTTCTCTCTCCCGGAAGCCTTAAAGAACAACAACTTCTCTTTTC
781 ATTTAGTACTACAGAGTCCCAAGCTAGTCAAAGTCTTCTTTATTATCTCAGTGCCTCT
841 CATCTGCCACTTATTCTGCAATGTTGTTCTCTGCTTTCTCTGTTGATTGCGCTGCAT
901 TTTATTTTCGGCTTACTATCTTCCGGATAGGATGCGACAGGGAAGTCAAAATACATT
961 CCAAAGAAAAGATGGCCCTTCTGTCAACGGCAGCTTCCTCTCAAAAAA

```

图 1 CHH cDNA 序列及其编码的氨基酸序列
阴影部分表示信号肽; 下划线表示 CHH 前体相关肽; 斜体表示二盐基切割位点; 潜在的酰胺化位点(Gly¹³⁴)用粗体表示; “*”表示终止密码子。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of CHH cDNAs

Signal peptide is shaded; CHH-precursor related peptide is underlined; the dibasic cleavage site (KR) is italic; the putative amidation site (Gly¹⁰⁸) is in bold; the asterisk indicates stop codon.

2.3 青虾 CHH 同源性分析

使用在线分析软件 ClustalW1.83 将青虾 CHH 基因编码的前体氨基酸序列与已公布的部分虾蟹类 CHH[包括 PO(pericardial organ)型和 ES (eyestalk)型, PO 型用 CHH-PO 表示]前体氨基酸序列(表 3)进行了比对(图 2), 同时分别依据前体

和成熟肽的比对结果用 ClustalW1.83 计算了青虾 CHH 与其他物种 CHH 的前体和成熟肽的相似性(表 4)。结果显示, 青虾 CHH 前体与罗氏沼虾 CHH 和另一种沼虾 *Macrobrachium lanchesteri* 的 CHH 前体最为相似(98%, 96%), 其次与罗氏沼虾 CHH-PO(PO 型)前体相似(80%), 与其他虾蟹 CHH 前体的相似性都很低(34%~56%)。青虾 CHH 成熟肽同样与罗氏沼虾 CHH 以及 *M. lanchesteri* CHH 的相似性最高(99%), 而与罗氏沼虾 CHH-PO 的相似性为 66%, 与利莫斯螯虾(*Orconectes limosus*)CHHA、克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*) CHH 以及挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)、欧洲螯龙虾(*Homarus gammarus*)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)CHHB 的相似性为 62%~69%。无论是成熟肽还是前体, 青虾 CHH 与热液口虾(*Rimicaris kairei*)、圣诞岛红蟹(*Gecarcoidea natalis*)、云斑厚纹蟹(*Pachygrapsus marmoratus*)、三叶真蟹(*Carcinus maenas*)、榄绿青蟹(*Scylla olivacea*)这 5 种虾蟹的 ES 型 CHH 的相似性都高于青虾 CHH 与这 5 种虾蟹的 PO 型 CHH 的相似性。

2.4 青虾 CHH 的系统进化分析

使用 MEGA4.0 软件构建 NJ 系统进化树, 计算方法采用 Bootstrap 法重复计算 1 000 次。甲壳类动物中的 CHH 与昆虫纲中发现的离子转运肽(ion-transport peptide, ITP)具有相似的功能, 故选取甲壳类动物 CHH 和昆虫类动物 ITP 构建系统进化树。蟹类的 CHH 分为 ES 型和 PO 型两支, 沼虾类的 CHH 也分为 ES 型和 PO 型两支, 这说明在亲缘关系相近的物种中 ES 型 CHH 和 PO 型 CHH 的相似性较低。基于分离的青虾 CHH 基因所编码氨基酸序列以及在基因库中已报道的甲壳动物 CHH 和昆虫纲中发现的 ITP 前体氨基酸序列(表 4), 使用 MEGA 4 构建 NJ 系统发育树(图 3), 系统发育树分为甲壳动物 CHH 与昆虫 ITP 家族两簇, 青虾与其他甲壳类动物 CHH 聚为一簇, 与昆虫纲动物中 ITP 前体氨基酸序列进化关系相对较远。甲壳动物 CHH 簇中, 青虾 CHH 先与罗氏沼虾和 *M. lanchesteri* 聚为一支, 序列相似度为 100%, 与罗氏沼虾 PO-CHH 的序列相似度也达到

表 3 用于序列分析的 CHH 家族神经肽
Tab. 3 CHH family neuropeptide for sequence analysis

序列名称 sequence name	GenBank 登录号 GenBank access no	来源物种 resource species
青虾 CHH		<i>Macrobrachium nipponense</i>
罗氏沼虾 CHH	AAL40915	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
沼虾 CHH	O77220	<i>Macrobrachium lanchesteri</i>
罗氏沼虾 CHH-PO	AAL40916	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
热液口虾 CHH2	ACS35347	<i>Rimicaris kairei</i>
挪威海螯虾 CHHB	AAQ22392	<i>Nephrops norvegicus</i>
利莫斯螯虾 CHHA	Q25589	<i>Orconectes limosus</i>
欧洲螯龙虾 CHHB	ABA42180	<i>Homarus gammarus</i>
美洲螯龙虾 CHHB	1093946	<i>Homarus americanus</i>
克氏原螯虾 CHH	Q25683	<i>Procambarus clarkia</i>
日本螯 CHH	ACN87216	<i>Charybdis japonica</i>
热液口虾 CHH1-PO	ACS35346	<i>Rimicaris kairei</i>
红黄道蟹 CHH	ABQ41269	<i>Cancer productus</i>
三叶真蟹 CHH	P14944	<i>Carcinus maenas</i>
榄绿青蟹 CHH	AAQ75760	<i>Scylla olivacea</i>
日本囊对虾 CHH2	Q9U5D2	<i>Marsupenaeus japonicas</i>
溪蟹属一种 CHH-PO	ABA70561	<i>Potamon ibericum</i>
斑节对虾 CHH1	O97383	<i>Penaeus monodon</i>
云斑厚纹蟹 CHHB-PO	AAO27806	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>
云斑厚纹蟹 CHHB	AAO27805	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>
圣诞岛红蟹 CHH-PO	ABL09571	<i>Gecarcoidea natalis</i>
圣诞岛红蟹 CHH	ABL09570	<i>Gecarcoidea natalis</i>
榄绿青蟹 CHH-PO	ABP88270	<i>Scylla olivacea</i>
三叶真蟹 CHH1-PO	AAG29432	<i>Carcinus maenas</i>
刀额新对虾 CHHB	Q9NGP0	<i>Metapenaeus ensis</i>
飞蝗 ITP	AAD20820	<i>Locusta migratoria</i>
沙漠蝗 ITP	Q26491	<i>Schistocerca gregaria</i>
果蝇 ITPE	NP_001163293	<i>Drosophila melanogaster</i>
对红锥蝽 ITPB	ACZ96371	<i>Rhodnius prolixus</i>
赤拟谷盗 IPT	EFA07585	<i>Tribolium castaneum</i>
烟草天蛾 IPT	AAY29658	<i>Manduca sexta</i>

71%，再与螯虾类 CHH 聚为一支，然后蟹类的 CHH 聚在一起，最后与对虾的 CHH 聚为一支。

2.5 青虾 CHH 基因在不同组织内的表达分析

采用荧光定量 PCR 技术检测 CHH 基因在青虾体内不同组织的表达情况。结果显示，青虾 CHH 基因在所有被检测组织中均有表达，其表达量由高到低依次为眼柄、精巢、腹神经节、脑、肠、肝、心脏、卵巢。将卵巢表达量设为 1，眼柄组织具有最高的相对表达量，为卵巢的 500 倍；其次精巢的表达量为卵巢的 250 倍；在腹神经节、

脑、肠中的表达量分别为卵巢的 16.67、14.3、11.17 倍；在肝和心脏中相对表达量较低，分别为卵巢的 6.67 和 2.63 倍。在实验中，每个组织及其参照基因分别做了 3 个重复，对得到的 3 组数值进行 *t* 检验，结果显示无显著性差异 ($P < 0.05$ ，图 4)。

3 讨论

3.1 青虾 CHH 序列特征

本研究获得的青虾 CHH cDNA 序列的信号肽的切割位点在 Ala26 和 Trp27 之间，这与其他虾

图 2 青虾 CHH 前体与其他甲壳动物 CHH 前体的氨基酸序列比对

竖线“|”表示信号肽和二盐基的切割位点.

Fig. 2 Alignment of precursor amino acid sequence of *Macrobrachium niponense* CHH with other crustacean preproCHHs
The single peptide and dibasic cleavage sites are indicated by the vertical line “|”.

表 4 青虾 CHH 与其他甲壳动物 CHH 成熟肽和前体的相似性

Tab. 4 The identity of proCHH/mature CHH between *Macrobrachium niponense* and other crustaceans

序列名称 sequence name	青虾 CHH 成熟肽 mature CHH of <i>M.niponense</i>	青虾 CHH 前体 proCHH of <i>M.niponense</i>	%
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i> CHH	99	98	
<i>M. lanchesteri</i> CHH	99	96	
热液口虾 <i>Rimicaris kairei</i> CHH2	69	56	
利莫斯螯虾 <i>Orconectes limosus</i> CHHA	69	52	
圣诞岛红蟹 <i>Gecarcoidea natalis</i> CHH	68	52	
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkia</i> CHH	68	51	
挪威海螯虾 <i>Nephrops norvegicus</i> CHHB	68	50	
云斑厚纹蟹 <i>Pachygrapsus marmoratus</i> CHHB	68	50	
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i> CHH-PO	66	80	
欧洲螯龙虾 <i>Homarus gammarus</i> CHHB	65	49	
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i> CHHB	62	47	
三叶真蟹 <i>Carcinus maenas</i> CHH	62	45	
榄绿青蟹 <i>Scylla olivacea</i> CHH	55	41	
热液口虾 <i>Rimicaris kairei</i> CHH1-PO	55	47	
三叶真蟹 <i>Carcinus maenas</i> CHH1-PO	47	37	
圣诞岛红蟹 <i>Gecarcoidea natalis</i> CHH-PO	45	40	
云斑厚纹蟹 <i>Pachygrapsus marmoratus</i> CHHB-PO	45	38	
榄绿青蟹 <i>Scylla olivacea</i> CHH-PO	42	34	

蟹类 CHH 的信号肽切割位点相对位置一致。青虾 CHH 前体包括 26 个氨基酸组成的信号肽、74 个氨基酸组成的成熟肽以及 CHH 家族 I 型肽特有的 CHH 前体相关肽(CPRP)和二盐基切割位点 KR。成熟肽包含 6 个在 CHH 家族中位置保守的 Cys 残基, 且在第 1 个保守的 Cys 残基后面第 5 位上没有 CHH 家族 II 型肽中所特有的 Gly 残基, 从这些结构特征可以断定所分离的序列为青虾的 CHH cDNA 序列。青虾 CHH 成熟肽 C-端为 GK, 确定为 ES 型 CHH 基因。

对青虾 CHH 的氨基酸序列进行同源性分析时也发现, 青虾 CHH 无论是成熟肽的相似性还是前体的相似性, 都与罗氏沼虾和另一种沼虾 *M. lanchesteri* 的 CHH-ES 最为相似, 虽然青虾 CHH 前体与罗氏沼虾 CHH-PO 前体相似达到 80%, 但也不及与罗氏沼虾 CHH-ES 的相似性(98%)高, 同

时, 无论是成熟肽还是前体, 青虾 CHH 的氨基酸序列与热液口虾、圣诞岛红蟹、云斑厚纹蟹、三叶真蟹、榄绿青蟹这 5 种虾蟹的 ES 型 CHH 的相似性各自都比青虾 CHH 与这 5 种虾蟹的 PO 型 CHH 的相似性高, 由此可以确定所本研究获得的青虾 CHH 为 ES 型, 对于其是否像美洲螯龙虾和欧洲螯龙虾的 CHH 一样存在 CHHA、CHHB 两种对映异构体, 还需要进一步的研究加以确定。

3.2 青虾 CHH 系统进化

整个 CHH 系统发育树分为甲壳动物 CHH 与昆虫 ITP 家族两簇, 青虾与其他甲壳类动物 CHH 聚为一簇, 与昆虫纲动物 ITP 前体进化关系相对较远。昆虫 ITP 家族是 CHH 家族的第五种类型的神经肽, 因其在结构上与 CHH 相似, 具有 6 个保守的 Cys 残基, 且在第 1 个保守的 Cys 残基后面第 5 位上没有 CHH 家族 II 型肽中所特有的 Gly

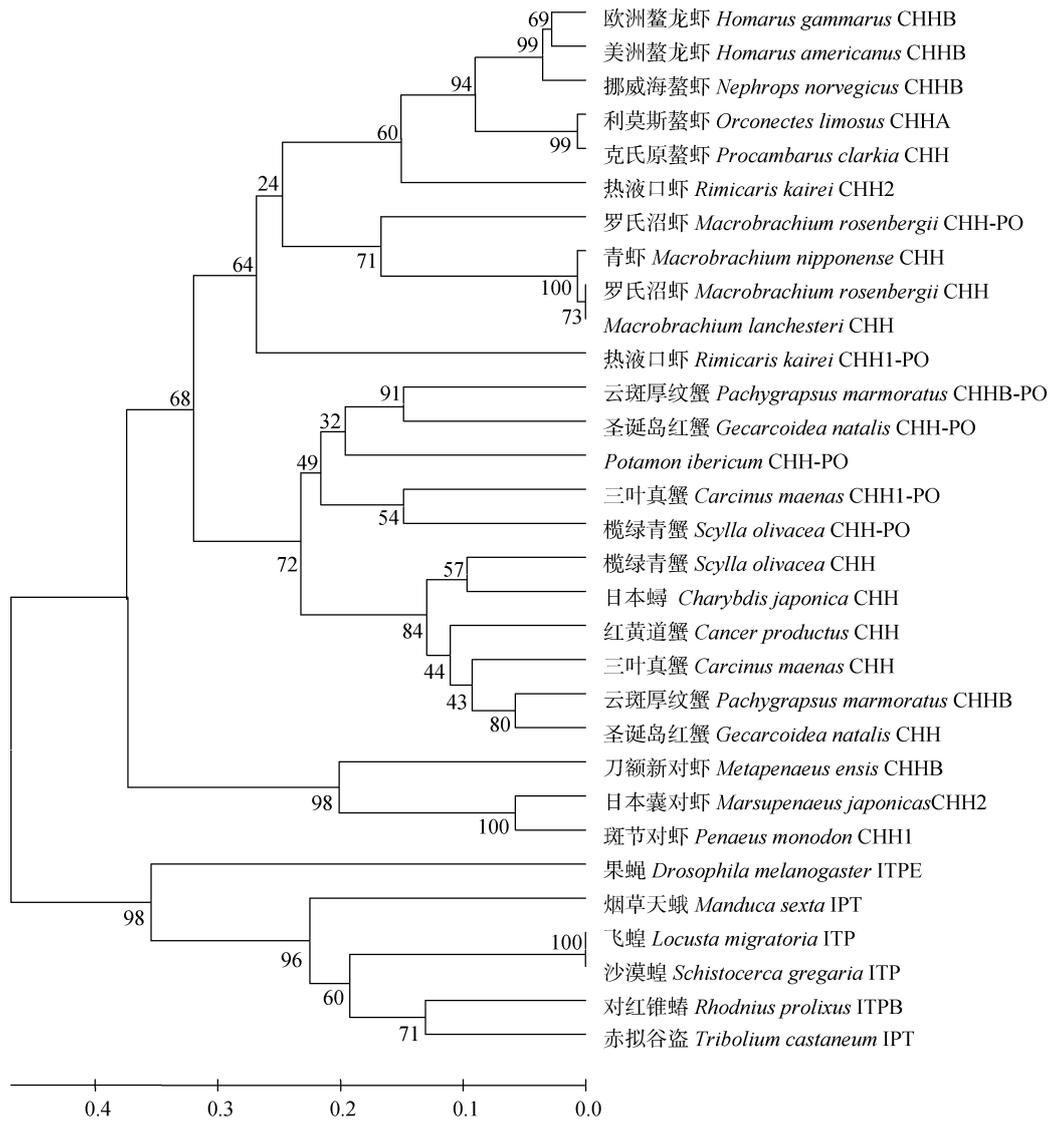


图 3 CHH 前体的 NJ 系统进化树

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree analysis of preproCHH

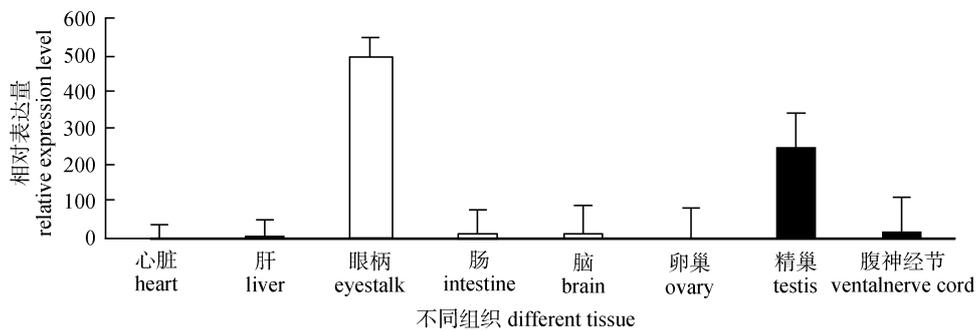


图 4 qRT-PCR 方法检测 CHH 基因在青虾不同组织内的表达

Fig 4 Expression of CHH mRNA in different tissues of *Macrobrachium nipponense* by qRT-PCR

残基, 同时也都具有前体相关肽以及二盐基切割位点, 所以将其归为 CHH 家族 型肽^[20-21]。昆虫

ITP 家族与甲壳动物 CHH 家族可能都是由早期的 I 型肽进化而来, ITP 的主要功能是调节渗透压,

而 CHH 主要功能是调节糖代谢。同时研究也发现, CHH 的不同异构体以及在不同物种具有功能的多样性,除了参与调节脂代谢^[22]、抑制大颚器官分泌甲基 MF^[1]、抑制蜕皮^[23]和性腺发育^[24]等功能外,和 ITP 一样也具调节渗透压的功能^[25],不过也不能据此推断 ITP 是由功能多样的 CHH 进化而来,毕竟对于 ITP 的研究还较少。Shirley 等^[26]在南美白对虾中发现了 ITP,其在眼柄中表达量低,在鳃中表达量高,并通过 RNAi 技术证明了其具有调节渗透压的功能,并且其与昆虫 ITP 氨基酸序列的同源性高,因此将其确定为 ITP,南美白对虾 ITP 是由编码南美白对虾 CHH 的基因组通过选择性剪接而形成的,这也说明 ITP 与 CHH 拥有共同的起源。在蟹类 CHH 的进化分支中也有两处 bootstrap 值低于 50%,要研究 CHH 的系统进化还需要在更多的物种上研究 CHH。

3.3 CHH 基因组织表达差异

在甲壳动物中,眼柄是 CHH 多肽表达量最高的组织。红斑青蟹的眼柄神经节及胸神经节均检测出很高的 CHH 基因的表达量^[14]。在斑节对虾^[9]、南美白对虾^[11]、阿拉斯加唐纳蟹(*C. bairdi*)^[13]、罗氏沼虾^[27]的以眼柄为中心的中枢神经系统中,都检测到大量 CHH 多肽。以上 CHH 多肽在不同组织中的存在情况都是基于免疫化学、神经生理学及半定量 PCR 研究得到的。

本研究采用荧光定量 PCR 法对 CHH 基因在青虾眼柄、精巢、卵巢、肠、心脏、肝脏、脑及腹神经节 8 个组织中的分布进行监测。与免疫化学、神经生理学及半定量 PCR 研究方法相比较,荧光定量 PCR 技术检测灵敏度更高,结果更可靠。青虾 CHH 基因在所有被检测的组织中均有表达,其中在眼柄中的表达量最高,在精巢、肠道、脑及腹神经节中均有较高的表达,在心脏及干中的表达量较低,在卵巢中的表达量最低。CHH 基因在精巢中的表达量是其在卵巢中表达量的 250 倍 ($P < 0.01$),由此推测,CHH 基因可能与青虾雄性的发育过程相关,其在雄性生殖发育过程中的功能还需进一步验证。

本研究首次克隆得到青虾 CHH 基因全长

cDNA 序列,并对其结构特征进行了分析和探讨,采用荧光定量 PCR 技术检测了该基因在青虾不同组织间的差异表达,研究结果可为青虾蜕皮及生殖发育相关基因的克隆研究奠定基础。荧光定量 PCR 结果显示,CHH 基因可能在雄性生殖发育过程中起着重要的作用。本研究结果可为更进一步的了解 CHH 多肽在青虾中的重要功能奠定了基础,同时也为其他甲壳类动物 CHH 基因的研究提供借鉴。

参考文献:

- [1] Liu L, Laufer H, Wang Y J, Hayes T. A neurohormone regulating both mehtylfarnesoate synthesis and glueose metabolism in a crustacean[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237: 694-701.
- [2] Tang C H, Lu W, Wainwriht G, et al. Molecular characterization and expression of amndibular organ-inhibiting hormone, a recently discovered neuropeptide involved in regulation of growth and reproduction in the crab, *Cancer pagurus*[J]. *Biochem*, 1999, 343: 355-360.
- [3] Keller R. Crustacean neuropeptides: structures, structure, functions and comparative aspects[J]. *Experientia*, 1992, 48: 439-448.
- [4] Cooke I M, Sullivan R E. Hormones and neurosecret ion [M]/Bliss D E, Atwood H L, Sandeman D C, ed. *The biology of crustacean. neurobiology: structure and function*. New York: Academic Press, 1982, 3: 205-290.
- [5] Keller R. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects [J]. *Experientia*, 1992, 48: 439-448.
- [6] 蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究展望[J]. *水产学报*, 1998, 22(2): 154-161.
- [7] Lacombe C, Greve P, Martin G. Overview on the sub2-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family [J]. *Neuropeptides*, 1999, 33: 71-80.
- [8] de Kleijn D P, de Leeuw, E P, van den Berg M C, et al. Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*[J]. *Biochim Biophys*, 1995, 1260 (1): 62-66.
- [9] Wiwegweaw A, Udomkit A, Panyim S. Molecular structure and organization of crustacean hyperglycaemic hormone genes of *Penaeus monodon*[J]. *Biochem Mol Biol*, 2004, 37(2): 177-184.

- [10] Chen S H, Lin C Y, Kuo C M. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Evidence of alternative splicing[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6 (1): 83–94.
- [11] Lugo J M, Morera Y, Rodriguez T, et al. Molecular cloning and characterization of the crustacean hyperglycemic hormone cDNA from *Litopenaeus schmitti*. Functional analysis by double-stranded RNA interference technique[J]. FEBS, 2006, 273 (24): 5669–5677.
- [12] Choi C Y, Zheng J, Watson R D. Molecular cloning of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from eyestalk ganglia of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 148 (3): 383–387.
- [13] Chung J S, Bembe S, Tamone S, et al. Molecular cloning of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) precursor from the X-organ and the identification of the neuropeptide from sinus gland of the Alaskan Tanner crab, *Chionoecetes bairdi*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 162 (2): 129–133.
- [14] Choi C Y, Zheng J, Watson R D. Molecular cloning of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from eyestalk ganglia of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 148(3): 383–387
- [15] Jacob A, Lancaster J, Buhler J. Mercury BLASTP: accelerating protein sequence alignment[J]. Assoc Comput Mach, 2008, 1(2): 9.
- [16] Tamurak K, Dudley J. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24 (8): 1596–1599.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acid Res, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [18] Davey M, Duve H, Thorpe A, et al. Characterisation of the helicostatin peptide precursor gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae)[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1999, 29(12): 1119–1127.
- [19] Lenz C, Williamson M, Grimmelikhuijzen C J. Molecular cloning and genomic organization of an allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(3): 26–31.
- [20] Lacombe C, Greve P, Martin G. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family[J]. Neuropeptides, 1999, 33(1): 71–80.
- [21] Endo H, Nagasawa H, Watanaba T. Isolation of a cDNA encoding a CHH-family peptide from the silkworm *Bombyx mori*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 355–361.
- [22] Santos E A, Nery L E, Keller R, et al. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism[J]. Physiol Zool, 1997, 70: 415–420.
- [23] Tensen C P, Janssen K P C, van Herp F. Isolation, characterization and physiological specificity of the crustacean hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus* (Milne-Edwards)[J]. Invert Reprod Dev, 1989, 16: 155–164.
- [24] Huberman A, Aguilar M B, Brew K, et al. Primary structure of the major isomorphs of the crustacean hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish peptides[J]. Peptides, 1993, 14: 7–16.
- [25] Pienot C, Soye D, Van Herp F, et al. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 119: 3401–350.
- [26] Shirley H K, Tiu 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 osmoregulation [J]. Gene, 2007, 396: 226–235.
- [27] Sithigorngul P, Panchan N, Vilaivan T, et al. Immunohistochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol, 2011, 124(1): 73–80.

Molecular cloning and expression of a full length cDNA encoding crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)

JIN Shubo¹, WANG Ning², QIAO Hui¹, FU Hongtuo^{1,2}, WU Yan¹, GONG Yongsheng¹, JIANG Sufei¹, XIONG Yiwei¹

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. WuXi Fishery College Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is a neuropeptide hormone that is secreted by a subset of cells in the X-organ of the eyestalk. CHH plays a role in the regulation of ions and energy metabolism, molting, reproduction, and other important physiological processes in crustaceans. The *CHH* gene has been cloned in a variety of crustacean species. However, little is known about the pattern of expression in different tissues. We cloned the full-length *CHH* cDNA sequence of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* and used quantitative real-time PCR to detect the expression of *CHH* in different tissues. We cloned a 1017 bp cDNA of the *CHH* gene, containing a 241 bp 5'-untranslated region (UTR), a 355 bp 3'UTR, and 408 bp open reading frame (ORF). The ORF encoded a 135 amino acid CHH precursor polypeptide. The mature peptide contained six conserved Cys residues in the CHH family. The C-terminus mature peptide was GK, which has the same characteristics as ES-CHH. Based on protein similarity comparison, the separated *CHH* gene was classified into the type I CHH family of peptides. Phylogenetic tree analysis revealed that oriental river prawn CHH was most closely related to that of *Macrobrachium rosenbergii*. The *CHH* gene was expressed in all tissues tested in oriental river prawn. Expression was significantly higher in the eyestalk and testis than in the ovary (500 and 250 higher, respectively). *CHH* gene expression was very high in the intestine and ventral nerve cord, but very low in the ovary, liver, brain, and heart. The pattern of expression suggests that the CHH peptide plays a role in male reproduction. Our results provide insight into the role of CHH peptide in the oriental river prawn, and further our understanding of the *CHH* gene in crustacean species.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; ES-type crustacean hyperglycemic hormone; full-length of cDNA; quantitative PCR

Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn