

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18435

拟穴青蟹保幼激素酯酶结合蛋白(JHEBP)基因的克隆与表达分析

赵俊霞^{1,2}, 赵明^{1,2}, 张凤英¹, 蒋科技¹, 马春艳¹, 王伟¹, 马凌波¹

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部远洋与极地渔业创新重点实验室, 上海 200090;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 甲基法尼酯(MF)是甲壳类的保幼激素(JH), MF的代谢可能主要由保幼激素酯酶(JHE)催化完成, 保幼激素酯酶结合蛋白(JHEBP)能紧密结合JHE, 在JHE的代谢中具有重要作用, 研究JHEBP对于MF降解通路的探究具有一定促进作用。本研究获得了拟穴青蟹JHEBP基因的cDNA全序列, 命名为*Sp-JHEBP*。*Sp-JHEBP*序列全长为1647 bp, 包含一个891 bp的开放阅读框(ORF), 可编码296个氨基酸, 预测相对分子质量33.79 kD, 等电点8.63。利用Target P预测*Sp-JHEBP*定位于线粒体, Mitoprot预测*Sp-JHEBP*的前31个氨基酸组成的肽段为线粒体定位信号肽。多重序列比对分析发现, *Sp-JHEBP*的氨基酸序列与多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)的一致度最高(67%), 其次为黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*) (43%)。系统发育树分析JHEBP与物种分化并不一致, 这表明JHEBP随着物种分化, 功能上可能也出现了分化。*Sp-JHEBP*在所检测的9个组织中均有表达, 在卵巢中的表达量远高于其它组织, 其次是鳃、血淋巴、肝胰腺。在幼体发育过程中, *Sp-JHEBP*在受精卵时期最高, 从Z1至Z5期逐渐升高, 到Z5期达到最高, 随后逐渐下降到C1期。体外处理MF和法尼酸(FA)显示*Sp-JHEBP*受高浓度MF上调, 在0.1~5 μmol/L之间随着FA浓度升高*Sp-JHEBP*表达量升高。综合分析我们认为*Sp-JHEBP*可能通过降解JHE来参与MF的代谢, 该研究结果对青蟹MF降解分子网络的研究具有一定的推动作用。

关键词: 拟穴青蟹; 甲基法尼酯; 保幼激素酯酶结合蛋白; 保幼激素酯酶; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)06-1086-10

保幼激素(juvenile hormone, JH)是节肢动物中一种重要的内分泌激素, JH与蜕皮激素(ecdysteroid, Ecd)协调调控昆虫的生长发育。研究表明, JH在昆虫幼虫期阻止变态发育的提前发生^[1], 在成虫期促进脂肪体营养积累进而促进卵子成熟^[2-3]。甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF)是甲壳动物的保幼激素, MF是昆虫中最常见的保幼激素 III (JH III)的前体或称非环氧化形式; Laufer等^[4] 1987年首次在蜘蛛蟹(*Libinia emarginata*)的血淋巴中发现了MF, 并确认了其由大颚器(mandibular organs, MO)合成分泌。随后, 大量研究表明MF似乎具

有与JH相似的调控功能^[5-6]。MF能调控藤壶腺介幼体早期变型, 且具有剂量依赖性^[7]; 另外, 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[8]、色拉淡水蟹(*Oziotelphusa senex senex*)^[9-10]的MO在卵巢发育期间活跃, MF的合成显著增加。这些研究对于MF代谢调控的研究具有重要意义。

目前甲壳动物中MF代谢研究主要参考昆虫, 现已初步确定MF在MO中主要是通过经典的甲羟戊酸途径和节肢动物特有的倍半萜烯类物质合成途径合成, 并基本确定MF的合成通路较为保守^[11-12]。在昆虫中JH的代谢由保幼激素酯酶

收稿日期: 2018-12-21; 修订日期: 2019-06-11.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(41506195); 中央级科研院所基本科研业务费(2014Z01); 宁波市科学技术局农业重大科技专项(2016C11003); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2016HY—JC0302)

作者简介: 赵俊霞(1994—), 女, 硕士, 主要从事甲壳类生物技术研究, E-mail: zzjunxia@163.com; 共同第一作者: 赵明(1989—), 男, 博士, E-mail: mingzhaol@hotmail.com

通信作者: 马凌波, 男, 博士, 研究员, E-mail: malingbo@vip.sina.com

(juvenile hormone esterase, JHE)、保幼激素环氧水解酶(juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)和保幼激素二醇激酶(juvenile hormone diol kinase, JHDK)等催化完成^[13]。

由于 MF 相比 JH III 缺少一个环氧基(JHEH 的靶点), MF 的降解途径仍在摸索之中。现已确定 MF 的降解由 JHE 参与催化^[14-15], JHE 降解 MF 生成法尼酸(farnesoic acid, FA), 但目前甲壳动物中未鉴定出能降解 MF 的 JHE。JHE 属于羧酸酯酶(carboxylesterase, CXE)家族的一员, 基于序列的相似性, 该家族的基因大多被注释成 JHE。在昆虫的研究中发现一个物种中存在多条 CXE, 但可能仅有一条 CXE 能降解 JH^[16-17]。甲壳动物中也发现了很多 JHE, 但都没有明确的功能验证^[18]。昆虫中 JHE 在血淋巴的围心细胞溶酶体中被清除, Shanmugavelu 等^[19]首先在烟草天蛾(*Manduca sexta*)中发现一种能结合 JHE 的 29 kD 蛋白, 称为保幼激素酯酶结合蛋白(juvenile hormone esterase binding protein, JHEBP), JHEBP 结合 JHE 可被围心细胞吸收, JHE 突变后导致 JHEBP 不能结合进而影响 JHE 降解, 推测 JHEBP 可能促进 JHE 的降解失活。并且在家蚕(*Bombyx mori*)的研究中发现 JHEBP 在脂肪体中 mRNA 的表达模式与 JHE 一致, 也与血淋巴中 JHE 活性一致^[20]。关于 JHE 的注释有很多, 但 JHEBP 目前只有一个。因此, 可以通过 JHEBP 从侧面对 JHE 进行鉴定, 并且 JHEBP 的研究也能丰富我们对 MF 代谢调控的认识。

目前在甲壳动物中关于 JHEBP 的研究较少, 仅在多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)中有部分序列的报道^[11]。拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、梭子蟹科(Protunidae)、青蟹属(*Scylla*), 是中国东南沿海重要的经济养殖蟹类, 在中国海水养殖职业中占有重要地位, 其营养价值高, 市场接受范围广^[21]。鉴于 MF 在甲壳动物变态发育过程中的重要性, 本研究克隆获得了拟穴青蟹 *JHEBP* 基因的 cDNA 全长, 并对其基本生物信息学以及表达调控模式进行了初步分析, 为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟穴青蟹不同发育时期幼体取自东海水产研究所海南省琼海养殖基地, 不同时期幼体样本的鉴定参考曾朝曙等^[22]关于幼体的形态学描述。成体样本取自基地养殖的青蟹, 卵巢发育分期的鉴定参考上官步敏等^[23]的研究。用于表达分析的样本加 RNA 保存液(生工生物工程(上海)股份有限公司, 上海)保存至-80℃, 用于 RNA 提取。

1.2 实验方法

1.2.1 拟穴青蟹 *JHEBP* 的 cDNA 全长克隆 前期通过转录组测序获得了青蟹 *JHEBP* 的核心序列, 提取成体雌蟹的神经节组织构建 5'-RACE 和 3'-RACE cDNA 文库, 在预测的 ORF 区设计 RACE 特异性引物, 进行 5'-RACE 和 3'-RACE PCR 扩增反应得到该基因全长 cDNA 序列。RACE 使用 Clontech 公司(TaKaRa, 大连, 中国)的 Smart™ Race cDNA Amplification kit 试剂盒按照使用说明书进行操作。5'-RACE 的特异性引物为 Sp-JHEBP-GSP5R (TTCCTGGCTTGAAGTGGTTT), 3'-RACE 的特异性引物为 Sp-JHEBP-GSP3R (ACA-ACCACAGAAAGCCTCACCA), 另一方向引物为试剂盒自带通用引物。

RACE 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 将目的条带进行割胶回收, 克隆到 pMD19-T 载体上转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆送至上海杰李生物公司进行测序。测序结果利用 DNAMAN 软件进行拼接获得 *JHEBP* 的 cDNA 全长。除试剂盒提供的引物外, 其他引物委托上海杰李生物技术有限公司合成。

1.2.2 生物信息学分析 使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找序列的开放阅读框并翻译, 在 Nr 数据库进行 blast 比对分析从而对基因进行初步注释。利用 ExPASy (http://au.expasy.org/drug_design) 分析蛋白质的分子量和等电点。使用 Target P 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) 预测 *Sp-JHEBP* 的亚细胞定位及线粒体定位序列。

在 GenBank 数据库中下载多个物种的 *JHEBP* 序列,以青蟹、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和烟草天蛾(*Manduca sexta*)的 *JHEBP* 为查询序列,对多个具有基因组数据的节肢动物通过本地 Blast 方法获得它们的 *JHEBP* 或其同源序列($E < 10^{-10}$),最终所使用的序列包括:多齿新米虾 *Neocaridina denticulata* AIY69124.1、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* NM_138145.3、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* JQ929896.1、烟草天蛾 *Manduca sexta* AF-153450.1、粉斑螟蛾 *Cadra cautella* KY938809.1、家蚕 *Bombyx mori* DQ839420.1、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* OWR45341.1、冬尺蠖蛾 *Operophtera brumata* KOB74702.1、大型蚤 *Daphnia magna* KZS-15127.1、蚤状蚤 *Daphnia pulex* EFX63702.1、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* CH477427.1、意蜂 *Apis mellifera* XP_003251281.1、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* XP_015789759.1、真宽水蚤 *Eurytemora affinis* XP_023335781.1。本地 Blast 判断标准是取与 3 个物种一致性最高的一条序列在 NCBI 上进行比对验证,如果出现 3 个物种不一致的情况,以果蝇(*Drosophila melanogaster*)的和烟草天蛾(*Manduca sexta*)为准。

使用 DNAMAN 软件对部分物种的 *JHEBP* 氨基酸序列进行多重比对分析,使用 MEGA7 的 clustalW 对 15 条 *JHEBP* 序列进行比对,邻接法构建发育树,Bootstrap 设置为 1000。

1.2.3 *Sp-JHEBP* 基因的组织表达分析和时空分布分析 提取成体雌蟹(卵巢发育 III 期)的卵巢、肝胰腺、大颚器、胸神经节、血淋巴、肌肉、脑神经节、鳃、心脏组织,以及从受精卵(抱卵第一天)到仔蟹 I 期不同幼体发育时期样本的总 RNA,使用 DNAase I 处理后反转录用于 *Sp-JHEBP* 的表达分析。RNA 提取使用北京艾德莱生物技术有限公司的总 RNA 提取试剂盒,反转录使用 TOYOBO 的荧光定量反转录试剂盒参考说明书进行。荧光定量使用试剂为 TaKaRa 公司的 SYBR green PCR master mix (TaKaRa, 大连)。反应体系和程序均参考实验室之前发表的论文进行^[24]。

由于 18S rRNA 在拟穴青蟹的多种不同样本中能稳定表达,适合作为拟穴青蟹基因表达分析

的内参基因。本文使用 18 S 作为内参基因^[19], *Sp-JHEBP* 的特异性引物为 *Sp-JHEBP*-RTF (GTGG-TCTGAGGGCAGTCTATG)和 *Sp-JHEBP*-RTR (TG-GTCCAGTCATCCACAACC)。采用标准曲线法进行分析计算检测 *Sp-JHEBP* 基因在各个样本中的相对表达量。

1.2.4 MF、FA 对 *Sp-JHEBP* 的表达调控分析 甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF)和法尼酸(farnesoic acid, FA)购自 Echelon Biosciences 公司(UT, USA),使用时溶解在二甲基亚砷(DMSO)中并稀释至使用浓度。体外培养三只雌性卵巢发育 I 期的肝胰腺和卵巢组织,用无菌生理盐水漂洗 9 遍后剪成 30mg 左右的小块放入 12 孔的无菌培养皿中室温轻微震荡培养,培养基使用 DMEM 高糖培养基(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)加 10%的胎牛血清(Thermo Fisher Scientific, MA, USA),以 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMSO 为对照组检验不同浓度 MF 和 FA 对 *Sp-JHEBP* 的表达调控,每个处理设置 3 个平行重复,培养 6 h 后提取组织 RNA 检测 *Sp-JHEBP* 的表达量进行分析。

1.2.5 统计分析 表达量所有数据均以平均值 \pm 标准差表示,使用 SPSS 17.0 软件对数据 one-way ANOVA 分析,用 Duncan 氏法进行比较,取 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为极显著。

2 结果与分析

2.1 拟穴青蟹 *Sp-JHEBP* 的 cDNA 序列分析

本研究采用 RACE 技术克隆获得了青蟹 *JHEBP* 的全长,命名为 *Sp-JHEBP* (GenBank 接收号: KT869363)。*Sp-JHEBP* 的 cDNA 序列全长为 1647 bp,开放阅读框(OFR)为 891 bp,可编码 296 个氨基酸。此外,有 150 bp 的 5' UTR 和 606 bp 的 3' UTR,其中 3' UTR 区域含有典型的加尾信号 AATAAA 和 poly A 尾(图 1);预测的相对分子量为 33.79 kD, pI 为 8.63。使用 Target P 预测 *Sp-JHEBP* 定位于线粒体,利用 Mitoprot 预测 *Sp-JHEBP* 的前 31 个氨基酸组成的肽段为线粒体定位信号肽。

2.2 *JHEBP* 的多序列比对和系统发育分析

多序列比对分析发现,拟穴青蟹 *JHEBP* 序列与多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)的一致度

```

1                               CGTTGGGAAAGAGACCATACTTCATAACGA
31 CTGAACAACACAAGCAGTCTTCCCTTAGCAACTACCGCAGAATGTATACTTCCCTTGTGATT
91 GTTAATCATCGCACACACCTATTTCAGCTGCAGCAGCAGCAGCAAGGTCAACACTGTGCATA
151 ATGTTTAAGGCAGCAGGAAGATCATTAAAGCCAGCTGAACCACTCGCTCCCCGGCGGAGG
    M F K A A G R S L S Q L N H S L P G G G      20
211 TCGAGGTGGTGTCTCTGGAGGCTGGACAGAAGGGTCGCTTTGGCACACGTCTTAGCACC
    S R W C P G G L D R R V A L A H V L S T      40
271 TCAAAATGGGGAGCAGCACCTCCCGCTCCAGCCCAGCACTATGCCTTCATAGTGGTGGG
    S K W G A A P P A S S P A L C L H S G G      60
331 GGGAGGAAAAGCCTGGATCAGTTTTCCCTTGAGTCTCCTGTAAAATGTCAACAACTCAGG
    G R E S L D Q F S F E S P V K C Q Q L R      80
391 TTCTACCGATCAGGAAGGGTCAGCAGAAGCATTGAACAAGAGAAACCACAACCACAGAAA
    F Y R S G R V S R S I E Q E K P Q P Q K      100
451 GCCTCACCAAGCTGATGGAGTTCCTTGGGTGGTGTGGCCAAGTCTGTGGCATTCTATT
    A S P Q L M E F P W V V W P S L W H S I      120
511 CGGAACGGATATTTGCCAACCTCCTGATTCACCGCTATTTAGATCAAGAATTTGATATG
    R N W I F A N L L I H R Y L D Q E F D M      140
571 ACATCTTTTAAAAGAGGAGCTATTCAGGCTCTGGTGTATGTATCTCAAGAGCTTTCAAAA
    T S F K R G A I Q A L V Y V S Q E L S K      160
631 GGCAACTTTGAAGCTCTTGAAGGTTTAGTGACAACACCTTCTTTGGAAGAAATCAAAAAG
    G N F E A L E G L V T T P S L E E I K K      180
691 AATTTTGCCCATTTTTCTTTGAAACAAAGGCTGGACCTGGCTGTTGAGAAAGAAGATATA
    N F A H F S L K Q R L D L A V E K E D I      200
751 TTTTTTTCATTCCTTATCAAATTGGAATGATATTTACCAATGAAGGTACCACD CAGAG
    F F S F P Y Q I G M I F T N E G T T H E      220
811 CGTATTTTTGTGGAGATTACCATGTGCTACCACGTATTCGAGGTTTCCAGGAATATGTG
    R I F V E I T M C Y H V F R G F Q E Y V      240
871 AACTCCCCCTCAGCTAGTGAAGGTGGTCTGAGGGCAGTCTATGATAACCATGAGCGCATA
    N S P S A S E G G L R A V Y D N H E R I      260
931 TCCATTGCTAACTATAGGTTTATCCGAGGTTTACTAAGGGGTTGTGGATGACTGAGCC
    S I A N Y R F I R E F T K G V V D D W T      280
991 ATAAGTCTAGCAAACCACTTCAAGCCAGGAGACACCTTCAGCGCCAGTGA
    I S L A N H F K P G E H L Q R Q *      296
1042 TGGACAAACGTAGCTGATATGTGCATTGTAATGAATTTAGTATGCAAATTTAAAAGTTTAT
1102 GAAGGAATTTATTTATGTATTTTTATTCCAAAATTTACATAACTGTAACTTATCCAGT
1162 GTTTTATTGATCACAAGTCATCAAGGAAGTAAATTTGTAACACATGAGCAAGTCATTAGTA
1222 ATGTTTATGTAACCTAAATCTAGAGCTATGAATACCTGATTATAAATTATTACATGGAT
1282 GTCTCTTGTCACATTATGAGACGTTTATAATGCATGATTCTGTTATAAAGGTTTCAGAT
1342 TAATTTTGAGACTAACTCATCAGACATGAAAGAGTTACAACGACTTAAAGTTGAGTAGCA
1402 ATATTATGTTAATTAGCCAACCACTGTTTGATAATTTCTTGTGTTATTTTGACATGTTTA
1462 CCTTATCTTCGAATTCAGTTTATAAGTAAATAAATGACAATAACAATACAATGTGAAC
1522 CAATGTACAATATAACTGTCAGGGTTTATGTATGATTTGTGCTACAGTATTTATTTGTG
1582 AAATGACTATTTTTTATTGTAGCTTGGTGTAAATTAAATAAATGGCAGAATAGGAAAAA
1642 AAAAAA
    
```

图 1 拟穴青蟹 JHEBP 的 cDNA 全长及编码的氨基酸序列

下划线所示为荧光定量引物结合位点; *代表终止密码子; 方框所示为 3' UTR 中的加尾信号。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of JHEBP from *Sylla paramamosain*. The underlined are the binding sites of fluorescence quantitative primers. * stands for termination codon; The box shows a trailing signal in the 3' UTR.

最高, 为 67%, 其次是黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*), 为 43%; 值得注意的是, *Sp-JHEBP* 与大型溞(*Daphnia magna*)和蚤状溞(*Daphnia pulex*)的一致度较低, 分别为 28.5%和 24.8% (图 2)。

利用 Pfam 数据库预测 *Sp-JHEBP* 的保守结构域, 结果没有找到 *Sp-JHEBP* 的保守相关结构域, 但与其它物种的 JHEBP 多序列比对分析发现 Tim44-like 在青蟹中也较为保守(图 2), 查找 Pfam 中 Tim44-like 结构域分析发现此结构域保守性较

差, 表明对此结构域的分类可能仍需进一步划分。

查找节肢动物门 14 种进化地位区分较大物种的 JHEBP 与 *Sp-JHEBP* 进行比对, 使用 MEGA7 构建 NJ 系统发育进化树(图 3)。结果表明 JHEBP 的进化与物种进化存在一定差异, 没有形成与物种分化相似的明显分支结构。这些序列中, 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 JHEBP 是利用烟草天蛾(*Manduca sexta*)的 JHEBP 序列比对所获得^[25], 但二者并未聚到一起, 这表明 JHEBP 在不

SP-JHEBP	MFKAAGRSLSCLNHSLPGGSRWCFGLRRVALAHVLSSTKWCAAPPASSPALCIHSGG	60
<i>Drosophila melanogaster</i>MCHTLTRCI GMARISIMRLCPRPTVA	26
<i>Ixodes scapularis</i>ITVSSRRVRKI LRMSNSTEIEFNIMCTRI CRTGI TSASAADNSKK	45
<i>Bactrocera dorsalis</i>MLRVINFRRTIV	12
<i>Manduca sexta</i>MNLALRCVILTR	11
<i>Cadra cautella</i>MNLVLRCAITR	11
<i>Bombyx mori</i>MNLVLRHVILTR	11
<i>Danaus plexippus</i>MNSFVRTVITS	11
<i>Daphnia magna</i>MTYRFMSSTARTIHC SRSLWATCTKSAI FHSILPEGL	37
<i>Daphnia pulex</i>MTYKIMSSTVRNICRSRSLVSSRMTC SVFVNRCESCL	37
<i>Neocaridina denticulata</i>	0
Consensus		
SP-JHEBP	GRESLDCFSFESEFVKCCCLRFYRSGRVSRSTIECEKPCPKASFCIMFEFF .WVWPSLWHS	119
<i>Drosophila melanogaster</i>	ASGGCFAGSISKPTCPVSRSFASIFCECKKFCNARESI NRILERTIMDFE .ETVWPSAINNS	85
<i>Ixodes scapularis</i>	TMNVFCCSPSHCI GGSVTPSHALCAPI INSKRSCASRSENCDCIIMNCF .RIVWPSFELT	104
<i>Bactrocera dorsalis</i>	TSFKTKELCNNKLLIPNHRSSNIFENPHSN . FHLDCGRSLERTIMDFE .ETIWPSTINT	69
<i>Manduca sexta</i>	CSFRI CDRYAHKNVAKCIPLTSCCVICRYKYSNPTE SRRI FCI MFEFF .FVWPSFVKF	70
<i>Cadra cautella</i>	CTFRI CERNFYKYPFKCI SVTSN CNVTCFRNYCCFPTETKKI FCI MFEFF .FVWPSFVKF	70
<i>Bombyx mori</i>	CSLRLCKIAYNNVCKCIAITTSKCFIICRYKSECGTE TRKIL FCI MFEFF .FIMWPSFKY	70
<i>Danaus plexippus</i>	RTFRI CDRFSYKYLCS . PLT SVCFVICRRNYSCEKTEVRKI FCI MFEFF .FVWPSFVKF	68
<i>Daphnia magna</i>	IATKCACLSVVSAIPANRSYIHTSTSTWSENRRNESEHPTACI FCI MNNPHTVWPSFFKS	97
<i>Daphnia pulex</i>	FTLEPFCL IENSVKSIHCRSLHTTTSNRLENRNC . LATCL FCI MNNAPHIVWPSIFKG	95
<i>Neocaridina denticulata</i>RSEFIMNEFF .WVWPSLWHT	19
Consensuslm wps	
SP-JHEBP	IRNWIIFANL I IHRMLDCEFLMSTSKRGAICAI VYVSCET SKGNFEAT EGIIVTTPSTIEETK	179
<i>Drosophila melanogaster</i>	IKNWITTCF I ITRPYLSEFCIKDFTYGAICAI CVVSSKIMGGCI DSTCNIVSFFATAFIR	145
<i>Ixodes scapularis</i>	IKNWTICATF I IKPYLDRSYNCTEFLNGAKCAITVVSALVARGDFKSTIEGLVASPTISEVO	164
<i>Bactrocera dorsalis</i>	IRNWIILICF I ITRPYLREFTIKDIPYGAICAI C IISRKILNGEFCALNGFVSKFATINELK	129
<i>Manduca sexta</i>	VKNWMEANF I ITRPYLDOEFLSIEFTEASKHACVVSALCCSDFKATIEGLVEKDAIAALK	130
<i>Cadra cautella</i>	VKNWMEANF I ITRPYLDOEFLSIEFTEASKHACVVSALCRSDFKSTIEGLVCKDAIAALK	130
<i>Bombyx mori</i>	VKNWMEANF I ITRPYLDOEFLSIEFTEASKHACVVSALCNSDFKSTIEGLVCKDAIAALK	130
<i>Danaus plexippus</i>	TKNWMEANF I ITRPYLSEFNIREFTEASKHACVVSSEGTCKSDFKSTIEGLVEKDAIEFKK	128
<i>Daphnia magna</i>	VSNIMSSFT I ITRPYLNDHSTKDFVRCIKCAI I VIANAVGLIDGKFI I DREAFSEIK	157
<i>Daphnia pulex</i>	ISGMICIGWIKPYLDFNEFTVDDFLRGAICAI I IANAVSGLIESVKEMIEEAYNEIK	155
<i>Neocaridina denticulata</i>	IRNWIIFANL I ITRPYLREFTLSIEFKSAGIICALVHVSCELSRGNFEALIEGLIMIKESLDETR	79
Consensusy f a	
SP-JHEBP	KNFAHFSIKORLDIAVEK . EDIFEFYQICGMFTNEGTHTHERIEVEITMCFYVFRCHCE	238
<i>Drosophila melanogaster</i>	FVICKLSMTCORRQIEIKE . SDIYLSFPEYQVGMFEDDANCKIKRFEVEITMVFHVMRGI SE	204
<i>Ixodes scapularis</i>	RNYSRFEFEORCKLSVEL . TDIYFCFLYQICGIMDERND . . CRFVEATVVFYMEGIER	220
<i>Bactrocera dorsalis</i>	FTICKLSVAORRQIEINK . TDIYFAFPEYQVGIIFDEECEKICKRVEVEITMVFHVLRGITE	188
<i>Manduca sexta</i>	TAVSKI SVSORCII LAIEK . EDIFYAFPEYQVGMFDESE . . . KRWVEITMCFYVIRGKH	185
<i>Cadra cautella</i>	NAVSKLSVSORCII LAIEK . DDIFYAFPEYQVGMFDESE . . . KRWVEITMCFYVIRGKH	185
<i>Bombyx mori</i>	TAVSCLSVSORCII LAIEK . EDIFYAFPEYQVGMFDESE . . . KRWVEITMCFYVIRGKH	185
<i>Danaus plexippus</i>	TAVSCLSVSORCII LSTDK . EDIFYAFPEYQVGMFDESE . . . KRWVEITMCFYVIRGKO	183
<i>Daphnia magna</i>	ENIRRETSKGLAELAVPNEDVYLTFPEYQVGIIMNDNAKGVCEREVEITVCFEILKGLISE	217
<i>Daphnia pulex</i>	ENMKRCSSECLACFALSTIEDVYMTFPEYQVGIIMNDNKEGVCEREVEITVCSFIFKGLISE	215
<i>Neocaridina denticulata</i>	SNFALLSLKORLDIAVVA . EDIFEFYQICGMFTNEGGFKERVEVEITMCFYIFKGLCHD	138
Consensusq d f yq g ve t h g	
SP-JHEBP	YVN . . SPSASEGGI RAVYNHERISTANYRFTIREFTKGVVDDTITSLANHFKEGHEHLCRO	296
<i>Drosophila melanogaster</i>	MRE . . RGEETFPWNVGTI PFYQIKVFTQNYRFVKEFTAGHCSDTIVNVA NCFRATIEITNET	262
<i>Ixodes scapularis</i>	IRC SPSI PDETMCEVRSRVHVANYRFTIREYTKVCGDITINCLNHFKLGE	270
<i>Bactrocera dorsalis</i>	MRN . . RGEETFPWNVGSI PFYQIKVFTQNYRFKKEFTINGVSDITVNAI NHFKELIVREK	246
<i>Manduca sexta</i>	MKE . . SGDI PPFVSI GVCPEYQDNIF I I NYRFTIREFTKGVVDSWVNIVNHFCPHITVKKM	243
<i>Cadra cautella</i>	MCE . . TGDLPEISLGVCPEYQDNIF I I NYRFTIREFTKGVVDSWVNIVNHFCCTIVKK .	242
<i>Bombyx mori</i>	MKE . . SGDMPEPTI GACFCYQDNIF I I NYRFTIREFTKGVVDSWVNIVNHFCPHMI IKKM	243
<i>Danaus plexippus</i>	MCE . . SKLVTEISLGVCPEYQDNIF I I NYRFTIREFTKGVVDSWVNIVNHFCPHATMRK .	240
<i>Daphnia magna</i>	LIKT . GFCFCGP . . SSFCTHREKTVI QNYRFTIREFTKGVVDSWVNIVNHFNLSNES . . .	271
<i>Daphnia pulex</i>	LIKN . SDFCRGPPSTFCFKHREKTVI QNYRFTIREFTKGVVDSWVNIVNHFNHMADES . . .	271
<i>Neocaridina denticulata</i>	HLENI AKSPASCTFSTVYENYDRISIANYRFTIREYTCQVEDQITVNV	185
Consensusnyrf e t g w	

图 2 JHEBP 氨基酸序列与其他物种 JHEBP 的序列比对

黑色下划线标注为家蚕预测的 Tim44-like 结构域。

Fig. 2 JHEBP amino acid sequence compared with JHEBP of other species. Tim44-like is underlined in *Bombyx mori*.

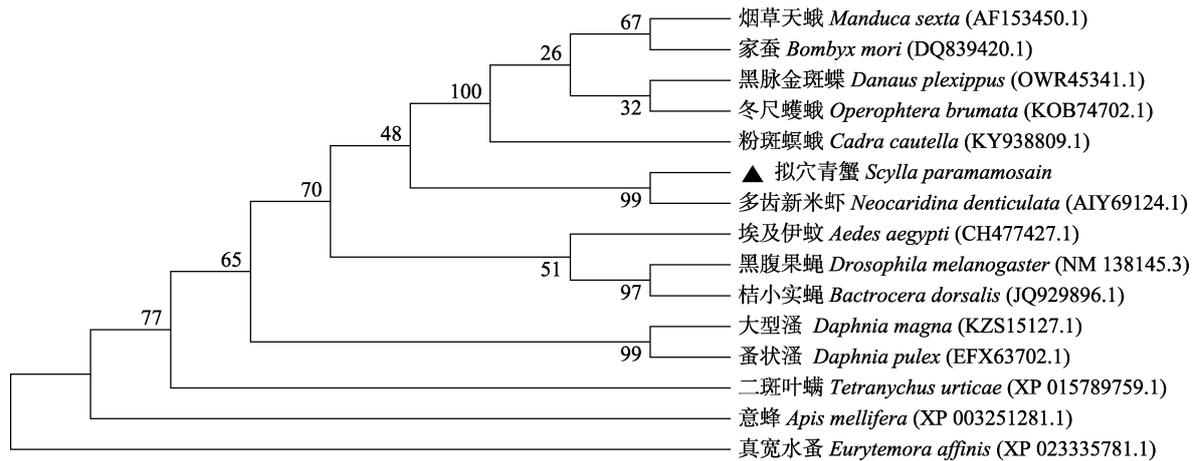


图 3 基于 JHEBP 氨基酸序列的物种的 NJ 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic Tree of JHEBPs based on Neighbor-joining method of species amino acid sequence

同物种中可能发生了重要进化。

2.3 Sp-JHEBP 基因的组织分布及时空发育分析

利用 qRT-PCR 检测 Sp-JHEBP 基因在拟穴青蟹成体雌蟹不同组织中的表达情况。结果显示, Sp-JHEBP 在所检测的 9 个组织(卵巢、肝胰腺、大颚器、胸神经节、血淋巴、肌肉、脑神经节、鳃、心脏)中均有表达, 其中在卵巢中的表达量明显高于其他组织, 统计学检验为极显著($P < 0.01$); 其次是鳃、血淋巴、肝胰腺, 其余组织之间无显著差异(图 4)。

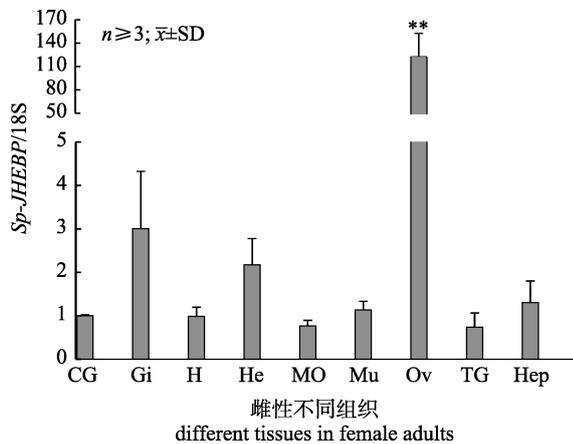


图 4 Sp-JHEBP 基因在不同组织中的表达

CG: 脑神经节; Gi: 鳃; H: 心脏; He: 血淋巴; Hep: 肝胰腺;
MO: 大颚器; Mu: 肌肉; Ov: 卵巢; TG: 胸神经节。
**代表差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 4 The tissues distribution analysis of Sp-JHEBP
CG: cerebral ganglion; Gi: gill; H: heart; He: hemolymph;
Hep: hepatopancreas; MO: mandibular organs; Mu: muscle;
Ov: Ovary; TG: thoracic ganglion. ** indicate significant differences ($P < 0.01$).

在幼体发育过程中, Sp-JHEBP 基因在受精卵时期(抱卵第 1 天)显著高于其他几个时期($P < 0.05$, 图 5)。蚤状幼体 I 期(Z1)最低, 然后随着发育逐渐升高, 在蚤状幼体 V 期(Z5)达到最高, 随后从大眼幼体期(M)下降至仔蟹 I 期(C1)。

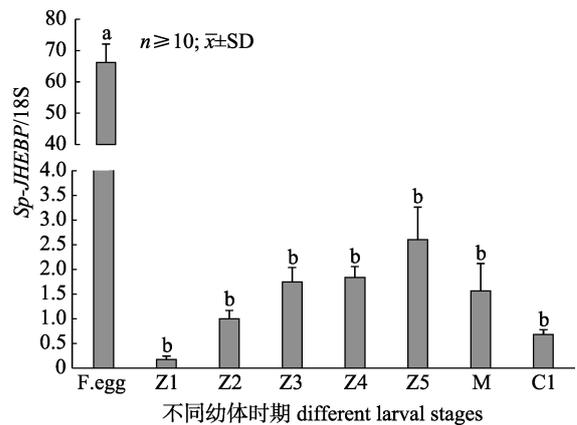


图 5 Sp-JHEBP 基因在不同发育阶段中的表达

C1: 一期仔蟹; F.egg: 受精卵; M: 大眼幼体; Z1-Z5: 蚤状幼体 I-V 等时期。不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 5 The expression pattern of Sp-JHEBP during different larval development stages

C1: the first juvenile crab; F. egg: fertilized eggs; M: megalopa stage; Z1-Z5: five developmental phases of the zoea stage. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.4 MF、FA 对 Sp-JHEBP 的表达调控分析

在肝胰腺中, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 对 Sp-JHEBP 有大约 2 倍的上调, 但 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 基本没有调控, 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 能上调 Sp-JHEBP 表达约 2 倍。FA 对 Sp-JHEBP

的调控从 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 到 5 $\mu\text{mol/L}$ 随着浓度增加上调效果增强, 但 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 FA 对 *Sp-JHEBP* 的调控不明显(图 6)。

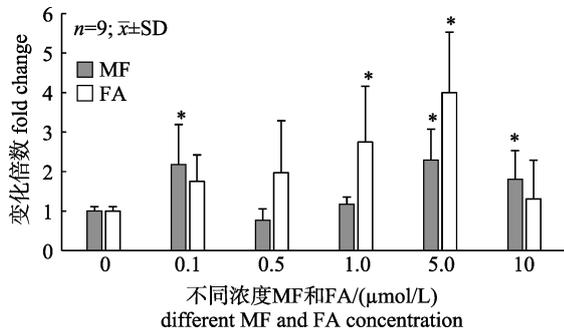


图 6 体外肝胰腺中 MF 和 FA 对 *Sp-JHEBP* 表达的调控
*代表与对照组差异显著($P < 0.05$).

Fig. 6 The regulatory role of different MF and FA concentration on *Sp-JHEBP* in hepatopancreas
* indicates significant differences with control ($P < 0.05$).

在卵巢中, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 不能上调 *Sp-JHEBP* 的表达, 但 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 FA 能上调 *Sp-JHEBP* 表达, 约 2 倍(图 7)。

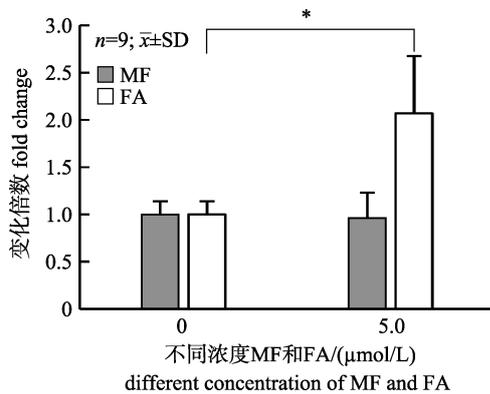


图 7 体外卵巢中 MF 和 FA 对 *Sp-JHEBP* 表达的调控
*代表差异显著($P < 0.05$).

Fig. 7 The regulatory role of different MF and FA concentration on *Sp-JHEBP* in ovary
* indicates significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

MF 作为甲壳动物的保幼激素, 在甲壳动物的生长发育中具有重要调控作用。MF 合成通路已有一些研究, 其中包括关键酶的基因克隆和转录调控等^[12-24]。相比而言, MF 代谢的研究则进展缓慢。相比昆虫的 JH III, 由于缺少 JHEH 的靶标环氧基, MF 的代谢可能主要由 JHE 催化完成, 目

前甲壳动物中尚未有功能明确的 JHE 基因的报道。JHEBP 能结合运输 JHE 至靶细胞, 进而促进 JHE 的溶酶体水解, 在昆虫 JH III 的失活通路中起到一定作用^[19]。

本研究通过转录组数据库查找和 RACE 克隆获得了拟穴青蟹 *Sp-JHEBP* 的 cDNA 全长, 亚细胞定位预测分析 *Sp-JHEBP* 定位于线粒体, 这与果蝇(*Drosophila melanogaster*)中实验得到的结果一致^[25]。利用 Pfam 数据库没有找到 *Sp-JHEBP* 较为保守的蛋白结构域, 但与其它物种的 JHEBP 多序列比对分析发现家蚕(*Bombyx mori*)中预测的 Tim44-like 结构域在青蟹中也较为保守^[20]。下载 Pfam 数据库的 Tim44-like 结构域的 seed 文件, 进一步分析发现 Tim44-like 结构域的核心序列保守性较差, 因而可能需要对 Tim44-like 结构域进行更精确的划分。此外, 对 15 个物种的 JHEBP 基因进行进化分析发现 JHEBP 的进化与物种进化并不一致, 这表明 JHEBP 随着物种分化功能上可能也出现了分化。

成体雌蟹中 *Sp-JHEBP* 在所检测 9 个组织中均有表达, 卵巢中的表达远高于其它组织, 这与家蚕中的结果一致^[20]。奇怪的是, *Sp-JHEBP* 在幼体不同时期的表达与变态发育似乎没有相关性, 在幼体变态前期(Z5 和 M)没有明显降低反而明显升高, 这表明 *Sp-JHEBP* 在幼体发育中的作用仍值得进一步探讨。此外, *Sp-JHEBP* 在受精卵时期的显著高表达暗示其在胚胎发育过程中可能具有重要功能。目前在烟草天蛾(*Manduca sexta*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)中均已证明 *Sp-JHEBP* 有结合 JHE 的能力, 但 JHEBP 对 JHE 起降解还是保护作用目前没有定论。在果蝇幼虫第三龄期过表达 JHEBP (P29)导致提前羽化, 在新生羽化成虫中的过表达导致卵巢发育和生殖力降低, 这表明 JHEBP 可能是保护 JHE 不被降解^[26]。值得注意的是, 由于保幼激素酸甲基转移酶(juvenile hormone acid methyl transferase, JHAMT)的存在, JHE 导致的 JH 失活是一种可逆反应^[27], 因而对 JHEBP 的功能还需进一步研究。

为了更进一步探讨青蟹中 JHEBP 与 MF 的关系, 利用体外组织培养检验不同浓度 MF 和 FA 对

Sp-JHEBP 表达调控的影响。在肝胰腺中, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 能上调 *Sp-JHEBP* 表达约 2 倍, 但 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 对 *Sp-JHEBP* 没有显著作用, 这与家蚕(*Bombyx mori*)中的研究结果有相似之处, 低浓度的 JH III 对家蚕 JHEBP 没有显著影响, 但高浓度的 JH III (10 $\mu\text{mol/L}$) 能显著上调^[20]。但有意思的是青蟹肝胰腺中 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 MF 也能显著促进 *Sp-JHEBP* 表达的上调, 目前尚不知其原因。为了进一步研究, 随后我们检验了不同浓度的 FA 对 *Sp-JHEBP* 调控的影响, 发现从 0.1 到 5 $\mu\text{mol/L}$ 随着浓度增加上调效果增强, 而卵巢中 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 FA 也上调 *Sp-JHEBP* 表达, 综上所述 FA 能上调 *Sp-JHEBP* 的表达, 因此 *Sp-JHEBP* 可能参与了 MF 的代谢。值得注意的是, 由于 MF 与 JH III 在结构上的差异, 二者的降解途径也存在一定差异, JHE 降解 JH III 生成 JH III acid (JH IIIA), 而 JH IIIA 会被 JHEH 进一步降解^[13], 但由于 MF 缺少环氧基, 尚不知 FA 在体内如何代谢。由于 MF 在肝胰腺、卵巢等靶组织中可能被降解成 FA, 其中肝胰腺是 JHE 活性最高的组织^[14-15], 因而 MF 对 JHEBP 的调控还需进一步探讨。尽管如此, 由于体内 MF 的水平是被严格调控的, 高浓度的 MF 会引发 MF 降解通路, 因而 JHE 表达可能会上调, JHE 的上调可能意味着 FA 的浓度升高, 进而引起 JHEBP 的上调; MF 通过 JHE 降解产生的 FA 明显上调 JHEBP 的表达, 表明 JHEBP 可能以一种负反馈的形式参与 MF 的降解。因此, 本研究推测 *Sp-JHEBP* 可能参与了 JHE 的降解。

综上, 本研究首次从拟穴青蟹中克隆获得 *Sp-JHEBP* 基因的 cDNA 全长, 通过生物信息学和转录表达综合分析初步证明 *Sp-JHEBP* 可能参与了 MF 的代谢, 该研究对青蟹 MF 降解分子网络研究具有一定的推动作用。

参考文献:

[1] Smykal V, Daimon T, Kayukawa T, et al. Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose[J]. *Developmental Biology*, 2014, 390(2): 221-230.

[2] Guo W, Wu Z X, Song J S, et al. Juvenile hormone-receptor

complex acts on *Mcm4* and *Mcm7* to promote polyploidy and vitellogenesis in the migratory locust[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004702.

- [3] Wu Z X, Guo W, Xie Y T, et al. Juvenile hormone activates the transcription of cell-division-cycle 6 (*Cdc6*) for polyploidy-dependent insect vitellogenesis and oogenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(10): 5418-5427.
- [4] Laufer H, Borst D, Baker F C, et al. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean[J]. *Science*, 1987, 235(4785): 202-205.
- [5] Borst D W, Laufer H, Landau M, et al. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development[J]. *Insect Biochemistry*, 1987, 17(7): 1123-1127.
- [6] Nagaraju G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone?[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 39-54.
- [7] Smith P A, Clare A S, Rees H H, et al. Identification of methyl farnesoate in the cypris larva of the barnacle, *Balanus amphitrite*, and its role as a juvenile hormone[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30(8-9): 885-890.
- [8] Zhao W X, Bai H. The synthesis of methyl farnesoate by mandibular organ in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(3): 193-196. [赵维信, 白桦. 克氏原螯虾大颚器合成甲基法尼酯的研究[J]. *水产学报*, 2001, 25(3): 193-196.]
- [9] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. Mandibular organ: it's relation to body weight, sex, molt and reproduction in the crab, *Ozotelphusa senex senex* Fabricius (1791)[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 603-612.
- [10] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. *In vitro* methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of the crab *Ozotelphusa senex senex*[J]. *Fisheries Science*, 2006, 72(2): 410-414.
- [11] Sin Y W, Kenny N J, Qu Z, et al. Identification of putative ecdysteroid and juvenile hormone pathway genes in the shrimp *Neocaridina denticulata*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 214: 167-176.
- [12] Xie X, Tao T, Liu M X, et al. The potential role of juvenile hormone acid methyltransferase in methyl farnesoate (MF) biosynthesis in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. *Animal Reproduction Science*, 2016, 168: 40-49.
- [13] Li S, Jiang R J, Cao M X. Metabolism of juvenile hormone[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(3): 389-393. [李胜, 蒋容静, 曹梅讯. 保幼激素的代谢[J]. *昆虫学报*, 2004, 47(3): 389-393.]
- [14] Homola E, Chang E S. Distribution and regulation of esterases that hydrolyze methyl farnesoate in *Homarus americanus* and other crustaceans[J]. *General and Comparative*

- Endocrinology, 1997, 106(1): 62-72.
- [15] Takac P, Ahl J S B, Laufer H. Seasonal differences in methyl farnesoate esterase activity in tissues of the spider crab *Libinia emarginata*[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 1997, 31(1-3): 211-216.
- [16] Bai H, Ramaseshadri P, Palli S R. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(8): 829-837.
- [17] Crone E J, Sutherland T D, Campbell P M, et al. Only one esterase of *Drosophila melanogaster* is likely to degrade juvenile hormone *in vivo*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(6): 540-549.
- [18] Lee S O, Jeon J M, Oh C W, et al. Two juvenile hormone esterase-like carboxylesterase cDNAs from a *Pandalus* shrimp (*Pandalopsis japonica*): Cloning, tissue expression, and effects of eyestalk ablation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 159(3): 148-156.
- [19] Shanmugavelu M, Baytan A R, Chesnut J D, et al. A novel protein that binds juvenile hormone esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm *Manuca sexta* L[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(3): 1802-1806.
- [20] Hao W, Zhang Y, Xu Y S. Identification of a juvenile hormone esterase binding protein gene and its developmental and hormone regulation in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(9): 906-912.
- [21] Ma L B, Zhang F Y, Ma C Y, et al. *Scylla paramamosain* (Estampador) the most common mud crab (*Genus Scylla*) in China: evidence from mtDNA[J]. Aquaculture Research, 2006, 37(16): 1694-1698.
- [22] Zeng C S, Li S J, Zeng H. Studies on the morphology of the larvae of *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2001, 21(2): 1-6. [曾朝曙, 李少菁, 曾辉. 锯缘青蟹 *Scylla serrata* 幼体形态观察[J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(2): 1-6.]
- [23] Shangguan B M, Liu Z C, Li S J. Histological studies on ovarian development in *Scylla serrata*[J]. Journal of Fisheries of China, 1991, 15(2): 96-103. [上官步敏, 刘正琮, 李少菁. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 96-103.]
- [24] Zhao M, Jiang K J, Song W, et al. Two transcripts of HMG-CoA reductase related with developmental regulation from *Scylla paramamosain*: Evidences from cDNA cloning and expression analysis[J]. IUBMB Life, 2015, 67(12): 954-965.
- [25] Liu Z Y, Ho L, Bonning B. Localization of a *Drosophila melanogaster* homolog of the putative juvenile hormone esterase binding protein of *Manuca sexta*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(2): 155-163.
- [26] Liu Z Y, Li X L, Prasifka J R, et al. Overexpression of *Drosophila* juvenile hormone esterase binding protein results in anti-JH effects and reduced pheromone abundance[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 156(1): 164-172.
- [27] Niwa R, Niimi T, Honda N, et al. Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(7): 714-720.

Cloning and expression analysis of juvenile hormone esterase binding protein from the mud crab, *Scylla paramamosain*

ZHAO Junxia^{1,2}, ZHAO Ming^{1,2}, ZHANG Fengying¹, JIANG Keji¹, MA Chunyan¹, WANG Wei¹, MA Lingbo¹

1. Key Laboratory of Oceanic and Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

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

Abstract: Methyl farnesoate (MF) is a sesquiterpenoid hormone that plays a pivotal role in the regulation of metamorphosis and gonad development in crustaceans. MF is the precursor or non-epoxidized form of JH III, the most common juvenile hormone (JH) in insects. Because of the lack of epoxy, which is the target site of juvenile hormone epoxide hydrolase, MF might mainly be degraded by the juvenile hormone esterase (JHE). Juvenile hormone esterase binding protein (JHEBP) binds to JHE and regulates the metabolism of JHE and also play important roles in MF degradation. In this study, we obtained the full-length JHEBP cDNA sequence from the mud crab, *Scylla paramamosain*, which we named *Sp-JHEBP*. The full length of *Sp-JHEBP* was 1,647 bp, with a predicted 891 bp open reading frame (ORF) encoding 296 amino acids with a predicted molecular weight of 33.79 kD. No conserved protein domain was found using the Pfam database, but the Tim44-like domain was relatively conserved in this crab and insects. In addition, the subcellular location prediction suggested that *Sp-JHEBP* was located in the mitochondria with a high probability, which is consistent with the experimental results in *Drosophila*. Phylogenetic analysis revealed that JHEBP was not correlated with the species tree, suggesting that the function of JHEBP might have evolved differentiation with species evolution. Furthermore, the quantitative real-time polymerase chain reaction revealed that *Sp-JHEBP* mRNA was ubiquitously expressed in all of the detected tissues, with the highest expression in the ovary, followed by the gills, hemolymph, and hepatopancreas. During the larval development, the expression of *Sp-JHEBP* was the highest in fertilized eggs, and increased from zoea I to zoea V, then decreased to the first juvenile crab stage. In addition, the *in vitro* study showed that *Sp-JHEBP* was up-regulated by high concentration of MF (>5 $\mu\text{mol/L}$), and was also induced by FA in a concentration-dependent manner from 0.1 to 5 $\mu\text{mol/L}$. Taken together, we hypothesized that *Sp-JHEBP* participates in MF metabolism through the degradation pathway of JHE. This study will promote our understanding of the MF degradation pathway.

Key words: *Scylla paramamosain*; methyl farnesoate; juvenile hormone esterase binding protein; juvenile hormone esterase; gene expression

Corresponding author: MA Lingbo. E-mail: malingbo@vip.sina.com