

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) CYP4C 基因的 cDNA 克隆及表达分析*

张晓燕^{1,2} 李健¹ 刘萍¹ 陈萍¹ 孙铭^{1,3} 杨爱国⁴

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 上海 201306;
3. 中国海洋大学 青岛 266071; 4. 青岛汇泉海洋科技开发有限公司 青岛 266071)

摘要 采用 RT-PCR 及 Smart-TM Race 技术, 首次获得三疣梭子蟹 CYP4C 基因 cDNA 全长序列。该基因全长 1888bp, 编码一个由 514 个氨基酸组成的多肽, 预测分子量大小为 59.54kDa, 理论等电点为 8.08。氨基酸序列中含有 CYP 基因家族特有的 K 螺旋保守序列(ExxR)和血红素结合区(FxxGxxxCxG)。同源性及系统进化分析表明, 三疣梭子蟹 CYP4C 基因与岸蟹、凡纳滨对虾、日本沼虾、中国对虾、沟虾、红螯螯虾的同源性分别为 88%、72%、66%、59%、60%、59%。荧光定量 RT-PCR 结果表明, CYP4C 在肝胰腺、肌肉、眼柄、鳃和心脏中均有分布, 在肝胰腺中表达量最高。高盐(45)胁迫后, 三疣梭子蟹 CYP4C 的表达量显著高于对照组, 随着胁迫时间的延长出现逐渐降低的趋势, 在胁迫 48h 后表达量达到对照组水平; 低盐(11)胁迫条件下, CYP4C 的表达水平随着胁迫时间的延长呈现逐渐下降的趋势, 且从胁迫 6h 开始显著低于对照组。研究推测, CYP4C 基因参与三疣梭子蟹盐度适应调节, 是蜕皮机制的调控因子之一。

关键词 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*), CYP4C, 基因克隆, 表达, 盐度胁迫

中图分类号 Q78 **doi:** 10.11693/hyhz20121227001

细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)酶系是一个广泛存在于动物、植物和微生物等各种生物有机体中的超基因家族, 它参与多种外源物质(药物、有机污染物等)和内源物质(蜕皮激素、脂肪酸、保幼激素等)在生物体内的转化与代谢过程(Simpson, 1997; 冷欣夫等, 2001), 是细胞色素 P450 家族中最古老的家族之一。在脊椎动物中, 主要参与脂肪酸及前列腺素的 ω -羟基化, 参与胆汁酸的生物合成(Lundell, 2002); CYP4 在昆虫中的研究较为深入, 可以被许多外源物质(烟碱、杀虫剂、外毒素等)诱导, 参与昆虫的解毒机制及蜕皮激素、保幼激素等内源物的合成、代谢(Feyereisen, 1999; 腾达等, 2004; 李秀兰等, 2005; 王燕红等, 2009)。在海洋无脊椎动物中, CYP4 的研究相对较少, 甲壳动物中仅有岸蟹(*Carcinus maenas*)、美

洲螯虾(*Homarus americanus*)、沟虾(*Orconectes limosus*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等少数物种的 CYP4 基因得到克隆(Snyder, 1998; Aragon *et al*, 2002; Rewitz *et al*, 2003; 夏西超等, 2012), 主要涉及多环芳烃类、海洋污染物等外源物质对其的诱导作用及其代谢, 以及参与蜕皮激素等内源物质的合成代谢等功能的研究, 而有关三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)这方面的研究尚未见报道。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*), 属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae), 梭子蟹属(*Portunus*), 广泛分布于中国近海、日本、朝鲜半岛及马来西亚群岛等海域(薛俊增等, 1997), 是我国大型海产经济蟹类, 生长快、肉味鲜美, 营养价值和经济价值都较高, 现已成为我国

* 国家 863 计划课题, 2012AA10A409 号; 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目资助, 20603022012021 号。张晓燕, 硕士研究生, E-mail: yanerzhang2006@163.com

通讯作者: 李健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-12-27, 收修改稿日期: 2013-03-15

重要的人工养殖和海洋捕捞种类之一。

盐度是影响水生动物生理状态的主要环境因子之一, 盐度的变化对虾蟹类蜕皮、生长代谢及免疫都有显著的影响(Mu *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2006; 杨其彬等, 2008; 王冲等, 2010)。CYP4 作为生长、蜕皮和调控代谢相关基因, 环境因子的急剧变化对其产生影响方面的研究, 目前尚未见报道。本研究通过克隆获得三疣梭子蟹细胞色素 CYP4C 基因全长序列, 并对其在急性盐度胁迫下组织表达特征进行了初步研究, 以期在三疣梭子蟹 CYP4C 与环境盐度适应的相关性研究及其在盐度适应过程中生理功能的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物 本实验选择三疣梭子蟹体重在 100—120g 的健康个体, 于山东昌邑市海丰水产养殖有限责任公司室内水泥养殖池进行实验。

实验试剂 SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司; TaKaRa LA Taq、M-MLV、Oligo(dT)18、DNase、PMD18-T 和 Top10 感受态细胞购自 TaKaRa 公司; Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; 实验所用引物为上海生物工程有限公司合成, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取健康三疣梭子蟹的肝胰腺于液氮中研磨, Trizol 试剂提取总 RNA, 核酸蛋白测定仪(Biodrop, BO-1000)与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其质量及完整性, DNase 去除基因组 DNA 后, 用 M-MLV Promega 产品完成第一链 cDNA 合成, 反转录产物于 -20°C 冰箱保存备用。

1.3 三疣梭子蟹 CYP4C 基因 cDNA 片段的克隆

从 NCBI 中搜寻沟虾(*O. limosus*)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)、岸蟹(*Carcinus maenas*)和凡纳滨对虾(*L. vannamei*)的 CYP4C cDNA 序列, 利用 ClustalX 对以上序列进行同源性对比以确定其保守区域, 设计兼并引物 F 和 R。以三疣梭子蟹肝胰腺 cDNA 为模板, 以 F 和 R 为引物, 进行三疣梭子蟹 CYP4C 基因中间片段的扩增。PCR 扩增体系为 50 μ L, 反应条件: 94 预变性 5min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10min, 4°C 保存。2.0%琼脂糖凝胶电泳检测所扩增的片段大小。扩

增的 PCR 产物使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行回收纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后, 送往上海生物工程有限公司进行测序。

1.4 CYP4C 基因全长的克隆

测序结果经 NCBI 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)后, 其实验所得三疣梭子蟹 CYP4 基因部分序列与其他物种的 CYP4 基因同源。以已获得的 CYP4C 基因片段设计 3'和 5'RACE 特异性引物 race3'和 race5'(表 1)。利用 SMARTTM RACE Amplification Kit 扩增得到 cDNA 全长。

表 1 本研究所用引物序列
Tab.1 The sequence of primers used in this study

| 引物 | 序列(5'—3') |
|--------|-------------------------------|
| F | CCRGCBTCCACYTCAAG |
| R | TTCTCWGGCAGRAAGCG |
| Race5' | ACACCCCAGCAGGTAGAGGGACCAGTTGA |
| Race3' | CAAAACTCAAGGACAAGGAGGAGGATG |
| F1 | CCTCGCAGTCTCCCTATCTT |
| R1 | GCTGTAGTCACGGCTCTTGTG |
| 18S-F | AGGAGGAGGTTGAGAAGATTGT |
| 18S-R | GCAGCTTGGTTTCCAGGTAG |

1.5 序列分析

使用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN 和 BLASTX 软件对 CYP4 基因的同源性进行分析, 在 <http://www.expasy.ch/tools/pi> 上进行蛋白质理化性质分析。利用 PredictProtein 服务器对 CYP4C 蛋白序列进行功能位点分析(PROSITE motif search), 利用 SignalP3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)_tool.html)工具进行蛋白信号肽分析, 采用 Vector NTI Advance10.3 软件和 ClustalW 软件将克隆的序列和已知的其他物种的氨基酸序列比对及同源性分析, 用 MEGA 4.1 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树。

1.6 半致死盐度预实验

三疣梭子蟹的适应盐度为 13—38, 最适生活盐度为 20—35(季东升, 2005)。选取 11、17、23、30、37、45 六个盐度进行半致死盐度预实验, 在 7 天的预实验中发现, 盐度 30 的实验组死亡率为零, 在 72h 和 96h 的半致死盐度分别为 45 和 11。因此, 本实验选择 11 和 45 为极限盐度组, 30 为正常对照组。

1.7 急性盐度胁迫实验

选择 11、30 和 45 三个盐度分别作为低盐、对照

3 个肉蔻酰基位点: (125-130, 197-202, 459-464); 8 个蛋白激酶 K 磷酸化位点: (105-107, 130-132, 136-138, 161-163, 356-358, 413-415, 483-485, 511-513); 2 个酰胺化位点: (130-133, 282-285); 1 个 P450 家族特有的亚铁血红素结合区(450-459)。

2.2 CYP4C 基因多序列比对及系统进化树分析

使用 Clustal W1.8 软件对三疣梭子蟹 CYP4C 氨基酸序列进行同源序列分析, 结果如图 3 所示。三疣梭子蟹 CYP4C 基因与岸蟹(*C. maenas*)、凡纳滨对虾(*L. vannamei*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、沟虾(*O. limosus*)、红螯螯虾(*C. quadricarinatus*)的同源性分别为 88%、72%、66%、59%、60%、59%。利用 MEGA 4.1 软件进行系统进化分析, 结果表明, 三疣梭子蟹 CYP4C 基因与甲壳动物中的青蟹紧密聚为一支, 之后又与凡纳滨对虾和日本沼虾聚为一支(图 2)。

2.3 CYP4C 基因在三疣梭子蟹各组织中的表达

Real-time PCR 结果表明: CYP4C 基因在心脏、肌肉、肝胰腺、眼柄和鳃中都有表达。其中, 在肝胰腺中表达量最高, 其次是鳃, 在心脏中表达最少(图 4)。

Real-time PCR 检测三疣梭子蟹肝胰腺在盐度胁迫

(高盐、低盐)下的各个时间点 CYP4C 基因转录表达的变化如图 5 所示。结果发现, 高盐胁迫后, 三疣梭子蟹 CYP4C 的表达量显著高于对照组, 随着胁迫时间的延长出现逐渐降低的趋势, 在胁迫 48h 后表达量达到对照组水平; 低盐胁迫条件下, CYP4C 的表达水平随着胁迫时间的延长呈现逐渐下降的趋势, 且从胁迫 6h 开始显著低于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究首次克隆了三疣梭子蟹 CYP4C 基因全长 cDNA 序列, 全长 1888bp, 编码一个由 514 个氨基酸组成的多肽。通过与已知的 P450 家族的氨基酸序列比对发现, 该基因的氨基酸序列中含有典型的 P450 蛋白保守序列。这些区域包括: P450 最具有特征的血红素结合区(FxxGxxxCxG)和绝对保守的半胱氨酸(Cys); 位于螺旋 K 中的绝对保守序列(ExxR), 以及疏水螺旋 I 区的中心部分(GxxT)。其蛋白序列还包含糖基化、磷酸化、酰基化等多个功能位点, 有助于进一步研究蛋白质的主要定位、稳定性结构以及功能作用的发现。系统进化分析发现, 三疣梭子蟹 CYP4C 基因与甲壳动物的青蟹、凡纳滨对虾和日本沼虾的亲缘关系最近。

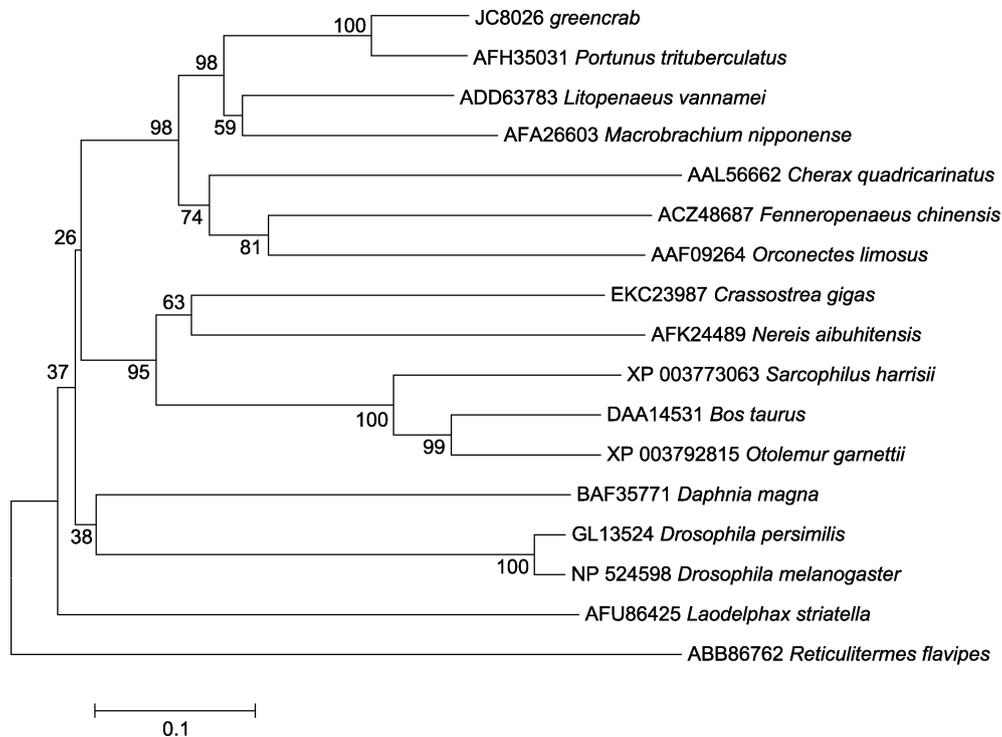


图 2 不同物种的 CYP4C 基因系统进化树
Fig.2 CYP4C phylogenetic tree of different species

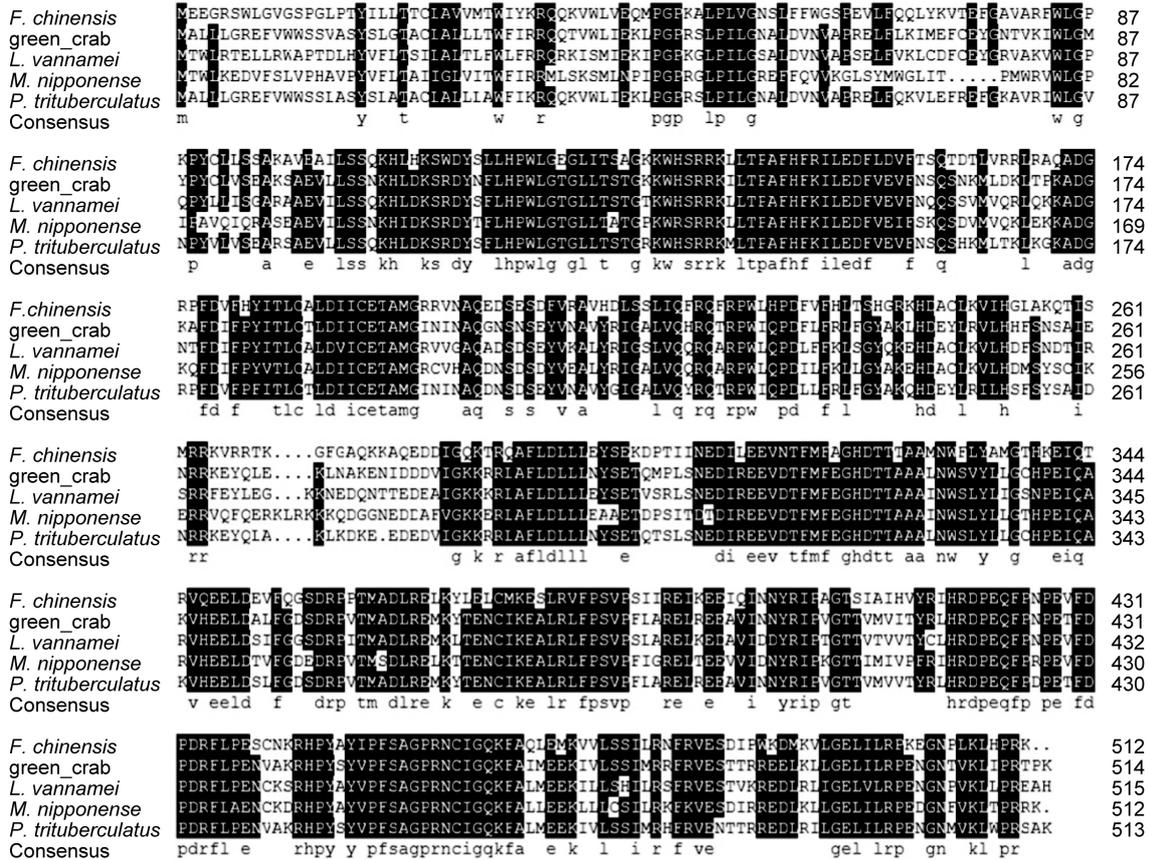


图3 三疣梭子蟹 CYP4C 氨基酸序列与其他甲壳动物 CYP4 的氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple alignment of CYP4C amino acid sequence with other CYP4 crustaceans 相同的氨基酸用深色背景表示; 缺失的氨基酸用“-”表示; 所使用 CYP4 基因的 GenBank 登录号见图 2

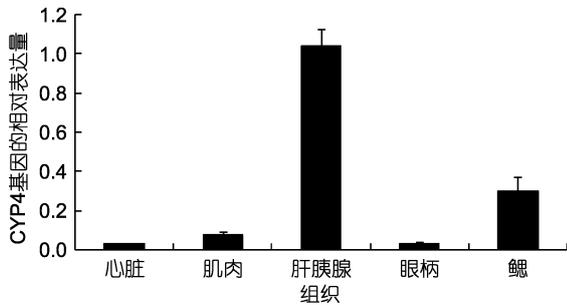


图4 三疣梭子蟹 CYP4C 基因在器官/组织中表达量 Fig.4 Distribution of CYP4C transcript in different organs/tissues

细胞色素 P450 是一种广泛存在于生物界的多功能酶系, 不仅具有显著的种属差异性, 还表现出组织、器官的差异性。如在脊椎动物中, P450 在肝脏中的含量最丰富, 其他组织如皮肤、肺、肾、胃、脑、消化道、胃肠道、淋巴细胞、单核粒细胞和骨髓等组织中也有发现(Arukwe, 2002; Ortiz-Delgado *et al*, 2002; 任彭等, 2006); 在昆虫中, 中肠、脂肪体以及

马氏管的 P450 含量比较丰富(邱立红等, 1999; 邱星辉等, 2000); 在鱼类中, 在肝、肠、肾、鳃等组织中表现出较高的转录水平(朱磊等, 2011)。本实验的研究结果表明, 三疣梭子蟹 CYP4C 基因在肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄和心脏中都有表达, 在肝胰腺中表达量最高, 说明肝胰腺是 CYP4C 基因的主要合成场所, 在凡纳滨对虾的研究中也有类似结果(夏西超等, 2012)。

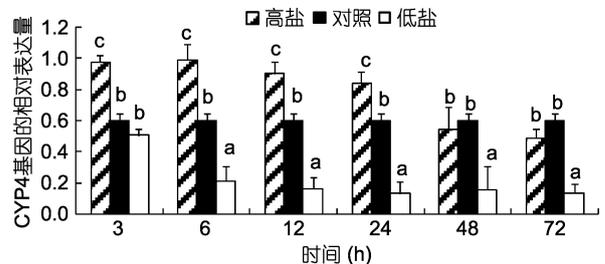


图5 三疣梭子蟹 CYP4C 基因在盐胁迫条件下不同时间点的表达量 Fig.5 Distribution of CYP4C transcript in different time under salinity stress

许多学者认为, CYP450 在组织器官中的分布具有选择性, 如肝脏作为药物代谢的主要场所, CYP450 的含量也是最丰富的。鳃、皮肤等组织作为外源物质进入体内的第一道防线, 其含量也是比较高的。CYP450 的这种选择性分布, 可以在生物体最大限度的发挥作用(Hodgson *et al.*, 1985; 邱星辉等, 1997)。

盐度变化能够引起甲壳动物自身的渗透调节, 适当地降低盐度能够缩短甲壳动物的蜕皮周期、提高蜕皮率达到促进生长的作用(Bray *et al.*, 1994; Mu *et al.*, 2005; 李英等, 2010)。有节律地降低盐度可以提高中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的蜕皮率, 加快其生长(Mu *et al.*, 2005)。青蟹在盐度 15 时退壳率明显高于盐度 25 实验组(于忠利等, 2010), 罗氏沼虾、斑节对虾等广盐性物种也有低盐环境加快蜕皮的现象(徐桂荣等, 1997; 杨其彬等, 2008)。甲壳动物的蜕皮活动主要受蜕皮激素的调控, CYP4 家族在蜕皮激素 20E 代谢中发挥着重要作用, 是生长蜕皮相关基因(Simpson, 1997; Gilbert *et al.*, 2009)。Aragon 等(2002)发现 CYP4C15 基因在小龙虾 Y-器官中显著表达, 岸蟹表皮部位的 CYP4C39 与蜕皮激素降解有关(Rewitz *et al.*, 2003), 夏西超等(2012)发现 KK-42 可显著抑制凡纳滨对虾血淋巴 CYP4V18 表达, 并可诱导蜕皮激素 20E 的浓度升高。鉴于盐度对蜕皮活动的影响以及 CYP4 家族基因在蜕皮激素代谢中发挥的重要作用, 本研究探讨了盐度与 CYP4C 基因的相关性, 结果显示: 低盐胁迫下能够显著降低 CYP4C 基因在三疣梭子蟹肝胰腺中的表达, 并于 6h 之后达到稳定的低水平状态; 高盐胁迫下, 24h 之内, CYP4C 的表达量显著高于对照组, 之后略有下降。说明 CYP4C 能够适应盐度变化, 其表达量随盐度变化波动并于一定时间达到稳定。推断在高盐条件下诱导表达, 抑制蜕皮激素的合成, 延长蜕皮周期; 而低盐能显著降低 CYP4C 的表达量, 诱导蜕皮激素的合成, 提高蜕皮率。

本研究首次成功克隆了三疣梭子蟹 CYP4C 基因 cDNA 全长, 通过分析急性盐度胁迫下的三疣梭子蟹肝胰腺中 CYP4C 基因的表达特征, 可以进一步认定 CYP4C 参与了三疣梭子蟹的盐度适应性调节过程, 推断 CYP4C 是盐度影响蜕皮的重要调控因子之一, 为深入研究三疣梭子蟹 CYP4C 基因在甲壳动物蜕皮机制中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

于忠利, 乔振国, 王建纲, 2010. 盐度和水流对青蟹蜕壳率、存

- 活率影响的初步研究. 海洋科学, 34(10): 68—70
- 王冲, 姜令绪, 王仁杰, 李玉全, 2010. 盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响. 水产科学, 29(9): 510—514
- 王燕红, 王东, 李兵等, 2009. 野桑蚕细胞色素 P450 家族 CYP4M5 基因的克隆和诱导表达. 蚕业科学, 35(1): 78—83
- 朱磊, 胡晓, 房文红, 胡琳琳等, 2011. 异育银鲫 P450 家族 CYP3A136 基因的克隆与表达. 水产学报, 35(10): 1450—1456
- 任彭, 刘兆平, 2006. 细胞色素 P450 研究概况及其在应用. 食品与药品, 8(10): 8—12
- 李秀兰, 腾达, 孙艳等, 2005. 淡色库蚊细胞色素 P450 CYP42r6 基因的克隆、表达及鉴定. 中国人兽共患病杂志, 21(7): 552—557
- 李英, 王芳, 董双林等, 2010. 盐度突变对凡纳滨对虾稚虾蜕皮和呼吸代谢的影响. 中国海洋大学学报, 40(7): 47—52
- 杨其彬, 叶乐, 温为庚等, 2008. 盐度对斑节对虾蜕壳、存活、生长和饲料转化率的影响. 南方水产, 4(1): 16—21
- 邱立红, 张文吉, 李晓薇, 1999. 棉铃虫微粒体多功能氧化酶系组分含量及酶活性在不同生长发育阶段的变化规律的研究. 农药学报, 1(1): 45—50
- 邱星辉, 冷欣夫, 1997. 细胞色素 P450 的多样性. 生命的化学, 17(6): 13—16
- 邱星辉, 冷欣夫, 2000. 棉铃虫加单氧酶活性的组织分布. 生态学报, 2(2): 299—30
- 冷欣夫, 邱星辉, 2001. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京: 科学出版社, 1—55
- 季东升, 2005. 三疣梭子蟹池塘养殖技术. 特种经济动植物, (3): 12—13
- 夏西超, 王文锋, 杨洪等, 2012. 凡纳滨对虾细胞色素 P450 家族新基因 CYP4V18 的克隆及 KK-42 对其转录的抑制. 中国水产科学, 19(5): 767—774
- 徐桂荣, 朱正国, 臧维玲等, 1997. 盐度对罗氏沼虾幼虾生长的影响. 上海水产大学学报, 6(2): 124—127
- 腾达, 李秀兰, 公茂庆等, 2004. 淡色库蚊抗溴氰菊酯品系 CYP4 家族新成员基因克隆及序列分析. 中国寄生虫病防治杂志, 17(2): 65—67
- 薛俊增, 堵南山, 赖伟, 1997. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究. 东海海洋, 15(4): 60—65
- Aragon S, Claudinot S, Blais C *et al.*, 2002. Molting cycle dependent expression of CYP4C15, a cytochrome P450 enzyme putatively involved in ecdysteroid genesis in the cray fish *Orconectes limosus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32(2): 153—159
- Arukwe A, 2002. Complementary DNA cloning, sequence analysis and differential organ expression of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 133(4): 613—624
- Bray W A, Lawrence A L, Leung-turgillo J R, 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei*,

- with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, 122: 133—146
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review Entomology*, 44: 507—533
- Gilbert L I, Rewitz E F, 2009. The function and evolution of the Halloween genes: The pathway to the arthropod molting hormone. *Ecdysose: Structures and Function*, 231—269
- Hodgson E, 1985. Microsomal monooxygenases. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, UK: 225—321
- Lundell K, 2002. Cloning and expression of two novel pig liver and kidney fatty acid hydroxylases [cytochrome P450 (CYP) 4A24 and CYP4A25]. *Journal of Biochemistry*, 363(2): 297—303
- Mu Y C, Wang F, Dong S L *et al*, 2005. The effects of salinity fluctuation in different ranges on intermolt period and growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 27(2): 122—126
- Ortiz-Delgado J B, Sarasquete C, Behrens A *et al*, 2002. Expression cellular distribution and induction of cytochrome P4501A(CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus autata*, brain. *Aquatic Toxicology*, 60(3—4): 269—283
- Rewitz K, Styrisshave B, Andersen O, 2003. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(2): 252—260
- Romano N, Zeng C S, 2006. The effects of salinity on the survival growth and haemolymph osmolality of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 260(14): 151—162
- Simpson A E C M, 1997. The cytochrome P450 4(CYP4) family. *General Pharmacology*, 28(3): 351—359
- Snyder M J, 1998. Identification of a new cytochrome P450 family, CYP4, from the lobster, *Homarus americanus*, and expression following hormone and xenobiotic exposures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 358(2): 271—276

CLONING AND EXPRESSION OF CYP4C GENE IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

ZHANG Xiao-Yan^{1,2}, LI Jian¹, LIU Ping¹, CHEN Ping¹, SUN Ming^{1,3}, YANG Ai-Guo⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Ocean University of Shanghai, Shanghai 201306, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266071, China; 4. Qingdao Huiquan Ocean Science and Technology Development Company Limited, Qingdao 266071, China)

Abstract A complete cDNA sequence of CYP4C gene in *Portunus trituberculatus* was first cloned in RT-PCR and Smart-TM Race technology. The length of the CYP4C gene is 1888bp encoding a protein of 514 amino acids. Bioinformatics analysis deduced that the CYP4C gene protein molecular weight is 59.54kDa with a theoretical pI 8.08. The amino acid sequence has CYP conserved domains of helix K (ExxR) and heme-binding motif (FxxGxxxCxG). Blast analysis revealed that the similarities of CYP4C with *C. maenas*, *L. vannamei*, *Macrobrachium nipponense*, *Fenneropenaeus chinensis*, *O. limosus*, *C. quadricarinatus* were 88%, 72%, 66%, 59%, 60%, 59%, respectively. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to assess the mRNA expression of CYP4C in different tissues and its expression level of CYP4C in salinity stress. The results show that CYP4C could be expressed in all tested tissues of *P. trituberculatus*, including hepatopancreas, muscle, eyes, gills, and heart, among them the highest expression level was observed in hepatopancreas, while the lowest in heart. The expression level of CYP4C was up-regulated distinctly in the hepatopancreas at salinity 45, and then gradually reduced with time to the level of control group after 48 h, while at salinity 11, the CYP4C expression dropped significantly below that of the control group 6 h later. The results imply that CYP4C is involved in the accommodation to salinity change and play an important role in its molting.

Key words *Portunus trituberculatus*; CYP4C; gene cloning; expression; salinity stress