

脊尾白虾蜕皮抑制激素基因全长 cDNA 的克隆及其对环境胁迫的响应*

张美^{1,2} 刘萍² 李吉涛² 李健²

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 为研究脊尾白虾蜕皮抑制激素基因(MIH)在环境适应中的作用, 本文采用 RACE 技术从蜕皮间期脊尾白虾眼柄中克隆获得 MIH-like 基因全长 cDNA 序列, 命名为 EcMIH。该基因全长 1218bp, 包括 360bp 的开放阅读框, 420bp 的 5'端非编码区和 394bp 的 3'端非编码区; 开放阅读框编码 120 个氨基酸, 包括 41 个氨基酸组成的信号肽和 79 个氨基酸组成的成熟肽, 预测蛋白分子量为 13.71kDa, 理论等电点 pI 为 8.02。同源性比较分析发现, 脊尾白虾 MIH-like 基因与日本沼虾和罗氏沼虾同源性最高, 分别为 87%和 86%。荧光定量 PCR 分析结果表明, 脊尾白虾 MIH-like 基因在眼柄中的表达量最高, 在卵巢中的表达量最少, 而在肝脏、肌肉、鳃和血细胞中不表达。环境胁迫后该基因具有明显的时序性。pH6.5 胁迫后 24h 和 48h, 眼柄和腹神经节中 MIH-like 基因的表达量较对照组均显著增加 ($P<0.05$); 4mg/L 氨氮浓度组胁迫后 12h 和 24h, 眼柄和腹神经节中 MIH-like 基因的表达量较对照组均显著增加 ($P<0.05$); 盐度 39 胁迫后 12h 和 24h, 眼柄和腹神经节中 MIH-like 基因的表达量较对照组均显著增加 ($P<0.05$)。本研究结果表明脊尾白虾 *mih* 基因参与了环境胁迫后的机体应激反应。

关键词 脊尾白虾; 蜕皮抑制激素; 基因表达; 环境胁迫

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20141100332

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白虾、五须虾、小白虾、迎春虾等, 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、长臂虾科(Palaemonidae)、长臂虾属(*Palaemon*)、白虾亚属(*Exopalaemon*) (刘瑞玉, 1995), 产量仅次于中国毛虾(*Acetes chinensis*)和中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)。脊尾白虾具有肉质细嫩、繁殖能力强、生长速度快、环境适应性广和经济价值高等优点, 是我国特有的小型经济虾类之一。近年来, 作为沿海滩涂地区重要的特色水产品, 脊尾白虾繁育和养殖技术日渐成熟。梁俊平等(2012a)研究了脊尾白虾全人工繁育技术, 明确了胚胎发育、幼体孵化的适宜温度和盐度范围; 栗治国等(2013)对胚胎发育、幼体发育及其主要环境影响因素也进行了探

讨。在脊尾白虾疾病防治方面, 许文军等(2010)对池塘养殖脊尾白虾感染血卵涡鞭虫进行了系统的病原学研究; 沈辉等(2013)研究了白斑综合征病毒对脊尾白虾的致病性。在脊尾白虾免疫等功能基因方面, 段亚飞等(2013)首次构建了血细胞 cDNA 文库, 克隆了组织蛋白酶 L、谷胱甘肽过氧化物酶和组织蛋白酶 D 等基因, 并分析了这些基因在机体免疫应答反应中的作用; 李美玉等(2012)克隆了铁蛋白基因, 并分析了 WSSV 攻毒刺激后其在转录水平的表达变化。而关于环境胁迫方面的研究也有报道, 韩俊英等(2011)克隆得到热休克蛋白 HSP70 基因, 分析了其在温度、pH 值和氨氮胁迫下的响应; 李洋等(2013, 2014)克隆了酚氧化酶原基因和丝氨酸蛋白酶抑制剂基因, 分析了盐度胁迫后其在肝胰腺和血细胞组织中的表达

*国家高技术研究发展计划(863 项目), 2012AA10A409 号; 国家虾产业技术体系-北方养殖岗位项目, CARS-47 号; 国家自然科学基金项目, 31472275 号; 公益性(农业)行业专项项目, 201103034 号。张美, 硕士研究生, E-mail: zhangmei119891225@163.com

通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-11-26, 收修改稿日期: 2015-02-08

变化规律; 梁俊平等(2012b)确定了脊尾白虾的氨氮耐受范围, 任海等(2014)研究了急性氨氮胁迫对脊尾白虾抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响。

甲壳动物蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)属于高血糖激素家族基因, 在甲壳动物的生长、繁殖、蜕皮和渗透压调节等一系列活动中发挥重要作用。MIH 通过调控蜕皮激素的分泌来抑制蜕皮过程, 蜕皮激素控制蜕皮过程的发生, 由此可见蜕皮过程主要是由蜕皮抑制激素和蜕皮激素相互拮抗进行调控。目前 MIH 基因在鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*) (王在照等, 2002)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*) (Tiu *et al*, 2007)、中国对虾(王在照等, 2003)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (Sun, 1994)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (Lin *et al*, 1998)、日本囊对虾(*Penaeus japonicus*) (Ohira *et al*, 1997)等虾类中已见相关报道, 且发现在蜕皮调控研究中发挥了重要作用。近年来, 随着脊尾白虾养殖规模的迅速扩大及生态环境的不断恶化, 由病毒和细菌引发的虾类疾病频繁发生, 严重影响了虾类养殖业的可持续性发展, 造成了严重的经济损失。甲壳动物有复杂的神经内分泌系统, 能快速地启动调控因子, 直接或间接地应对外部因素的刺激。这些外部因素包括温度、盐度、光照周期性、营养和压力等。Lorenzon 等(2000)发现, 重金属 Hg、Cd 胁迫下岩虾(*Palaemon elegans*)体内高血糖激素(hyperglycemic hormone, CHH)表达量在 2h 之内出现升高。Sedlmeier(1988)揭示, 低盐度下 CHH 能促使淡水螯虾的渗透压上升。Santos 等(1993)发现, 注射葡萄糖后 CHH 和乳酸的水平显著降低, 注射乳酸后 CHH 和葡萄糖升高, 注射任何氨基酸对蟹血淋巴中的 CHH 葡萄糖和乳酸无任何影响。Stentiford 等(2001)研究发现, 感染血卵涡鞭虫的挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)血淋巴中 CHH 含量上升。Webster(1996)发现普通黄道蟹(*Cancer pagurus*)组织缺氧导致 CHH 表达量明显增加。而 MIH 的表达水平与外界环境胁迫的关系仅有少量报道, Chang 等(1990)报道, MIH 在美洲海螯虾(*Homarus americanu*)中具有显著的高血糖活性。Lago-Lestón 等(2007)研究了温度和盐度对凡纳滨对虾幼虾 CHH 和 MIH 表达的影响。目前为止, EcMIH 基因表达与 pH、氨氮胁迫的关系尚未见报道。

本研究采用同源克隆方法获得脊尾白虾 MIH-like 基因全长 cDNA 序列, 分析了脊尾白虾在 pH、氨氮、盐度胁迫后其眼柄和腹神经节中该基因的表达变化

规律, 研究结果对于解释脊尾白虾的环境适应性及其健康养殖具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用虾 本实验用健康脊尾白虾均为同一家系蜕皮间期, 2013 年 9 月取自山东昌邑海丰水产养殖有限责任公司, 体长(4.10±0.30)cm, 体重(1.10±0.30)g。放在 200L PVC 桶中暂养一周, 期间每日换水 1/3。投喂消毒处理后的沙蚕。之后进行为期 5 天的环境胁迫实验, 期间不投饵也不换水。

1.1.2 实验试剂及耗材 TRIzol Reagent、FS Universal SYBR Green Master (ROX)购自 Roche 公司; LATAq 试剂盒、PrimeScrip™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、PMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司; SMART™ RACE Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 大肠杆菌 Top10 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 脊尾白虾眼柄总 RNA 提取

取 4 尾去眼球及眼球内黑色素的健康脊尾白虾眼柄, 只留柄部供总 RNA 的提取。提取方法按照罗氏说明书进行。用快速核酸/蛋白分析仪对总 RNA 进行定性和定量检测。紫外分光光度计和 1.0%的 TAE 琼脂糖凝胶电泳检测其质量和完整性。

1.3 脊尾白虾 EcMIH 基因 cDNA 中间片段克隆

参考 GenBank 公布的中国对虾(AF312977.4)、罗氏沼虾(KC990939.1)、凡纳滨对虾(DQ412566.1)日本囊对虾(AB162448.1)、刀额新对虾(AB162448.1)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)(AY496454.1)MIH 基因的 cDNA 编码区, 利用 DNAMAN 软件根据保守区设计一对简并引物 FMI 和 RM1(表 1)。

以脊尾白虾眼柄 cDNA 为模板, 利用设计好的简并引物克隆出脊尾白虾 EcMIH 基因的中间序列。PCR 反应程序: 94°C 5min; 94°C 30s, 57°C 30s, 72°C 30s, 30 个循环; 72°C 10min。将 PCR 产物送上海桑尼生物科技有限公司测序, 得到脊尾白虾 MIH 基因中间目的片段 206bp。

1.4 脊尾白虾 EcMIH 基因全长 cDNA 的克隆

根据已获得脊尾白虾 EcMIH 基因 cDNA 中间序列设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物。MspF1、MspF2、MspR1 和 MspR2, 然后再根据获得 3'RACE 和 5'RACE 部分序列设计特异性引物 MspF3 和

MspR3(表1)。用 SMART™ RACE Amplification Kit 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链。

表1 引物名称和序列
Tab.1 Names and sequences of the primers

引物名称	序列	引物用途
FM1	AGGCGTVATGGGBAAYMGBGA	中间片段扩增
RM1	TGGATSAGCATCCTVMRHGCCGG	中间片段扩增
MspF1	AAGACTGTTTCTACAACGT	3'RACE 扩增
MspF2	ACTTCCTATGGTGCCTCTATGC	3'RACE 扩增
MspF3	CGTGAACAACCTCAACCG	3'RACE 扩增
MspF4	TGTGTGCGATGACTGCTCT	荧光定量
MspR1	CCTTGTTGAGTTGGCCACCT	5'RACE 扩增
MspR2	GCATAGACGCACCATAGGAAGT	5'RACE 扩增
MspR3	GACTTCCTATGGTGCCTCTATGC	5'RACE 扩增
MspR4	GCCTTCCGTGGCATAGAC	荧光定量
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC	接头引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	接头引物
β-actin-F	CCGAGACATCAAGGAGAAGC	荧光定量内参
β-actin-R	ATACCGCAAGATTCCATACCC	荧光定量内参

以脊尾白虾眼柄第一链 cDNA 为模板, 利用 LA Taq (TaKaRa)试剂盒进行 3'RACE、5'RACE 扩增。第一次扩增反应体系为: 模板 cDNA 0.2μL; TaKaRa LA Taq (5U/μL) 0.1μL; 10×LA PCR Buffer 1μL; dNTP mixture (各 2.5mm) 1.6μL; 引物各 0.2μL; 灭菌水 6.7μL。第二次扩增反应体系为: 引物各 0.2μL; TaKaRa LA Taq (5U/μL) 0.1μL; 第一次 PCR 产物 0.5μL; 10×LA PCR Buffer 1μL; dNTP mixture (各 2.5mm) 1.6μL; 灭菌水 6.4μL。3'RACE 第一次扩增用引物 MspF1 和通用引物 UPM, 第二次扩增用引物 MspF2、MspF3 和通用引物 NUP。5'RACE 第一次扩增用引物 MspR1 和通用引物 UPM, 第二次扩增用引物 MspR2、MspR3 和通用引物 NUP。反应程序为: 94°C 4min; 94°C 30s, 57°C 30s, 72°C 2min, 30 个循环; 72°C 10min。

PCR 扩增产物经 1.0%的 TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。使用 DNA 胶回收试剂盒切胶回收目的片段, 纯化并检测。胶回收产物与 PMD18-T 载体相连接。5μL 连接产物转化到 50μL *E.coli* Top10 感受态细胞。挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定。鉴定结果送与上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.5 序列分析

利用 NCBI 中的 VecScreen 去除载体序列, 再用 BLAST 进行序列比对, 用 ContigExpress 软件将 5'端序列、中间片段、3'端序列进行拼接。使用 BLAST

对获得的 MIH 基因序列以及推导出的氨基酸序列进行同源性比对。然后用 EditSeq 程序搜寻开放阅读框 (ORF)并将其翻译成氨基酸。利用 SMART 软件进行功能域预测。用 DNAMAN 软件对脊尾白虾 MIH-like 基因与其它物种的 MIH 氨基酸序列进行多序列比对, 采用 MAGE4.0 软件中的邻接法(Neighbour-Joining)构建系统进化树。

1.6 胁迫实验设计

1.6.1 pH 根据于天基等(2014)报道的脊尾白虾半致死 pH 值的测定。设定本实验的 pH 值胁迫组 3 个, pH 值分别为 6.5(低 pH 值胁迫组)、8.0(对照组)、9.5(高 pH 值胁迫组)。胁迫组所用海水使用 25%NaOH 和盐酸调节养殖用水的 pH 值, 实验期间各处理组 pH 值的变动幅度为±0.1。pH 值每 4h 调整一次。每组设 3 个平行, 每个平行 36 尾虾。实验期间分别于 0、3、6、12、24、48、72、96h, 从实验桶中随机挑选 4 尾虾, 取其眼柄和腹神经节, 保存于液氮中。实验期间海水温度为 18°C, 盐度为 32。

1.6.2 盐度胁迫实验 根据刘海(2005)报道的脊尾白虾在不同盐度水体中适应性试验。设计 7 个盐度梯度, 分别为 4、11、18、25、32、39、46, 盐度 32 为自然海水对照组。其它盐度组用淡水和海盐调节, 每组设 3 个平行, 每个平行 36 尾虾。实验期间分别于 0、3、6、12、24、48、72、96h, 从实验桶中随机挑选 4 尾虾, 取其眼柄和腹神经节, 保存于液氮中。实验期间海水温度为 18°C, pH 值为 7.8±0.2。

1.6.3 氨氮实验 根据 Chen 等(1988)和钟硕良等(1997)测定的养殖池塘底层海水的氨氮浓度为 0—46mg/L 和 0.01—29.3mg/L, 以及梁俊平(2012b)报道的脊尾白虾成虾 72h 半致死质量氨氮浓度 (140.28mg/L), 设计本实验的 5 个氨氮梯度, 分别为 0mg/L(对照)、2mg/L(低浓度)、4mg/L(中浓度)、6mg/L(中高浓度)和 8mg/L(高浓度), 每个梯度设 3 个平行, 每个平行 36 尾虾。使用 20g/L 的氯化铵调整不同实验组的氨氮浓度, 每个时间点取样的同时采集水样, 奈氏试剂法(陈佳蓉, 1996)测定水体的总氨氮浓度并测定水体的 pH 值、温度和盐度。根据 Bower and Bidwell 方程计算水体中 NH₃ 的浓度。实验期间分别于 0、3、6、12、24、48、72、96h, 从实验桶中随机挑选 4 尾脊尾白虾, 取其眼柄和腹神经节, 保存于液氮中。实验期间海水温度为 18°C, 盐度为 32, pH 值为 7.8±0.2。此外, 为了检测脊尾白虾 EcMIH 基因在不同组织中的表达水平, 另取 12 尾健康脊尾白虾

的眼柄、腹神经节、心脏、血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃等组织,用于 RNA 的提取及反转录合成 cDNA。

1.7 脊尾白虾 EcMIH 基因的表达分析

Trizol 试剂提取各实验组脊尾白虾眼柄和腹神经节等组织的总 RNA,反转录合成 cDNA,方法按韩俊英等(2011)进行。以 EcMIH 基因的 cDNA 序列为模板,设计荧光定量引物 MspF4 和 MspR4(表 1),根据 GenBank 中脊尾白虾的 β -actin 基因序列设计一对内参引物 β -actin-F、 β -actin-R(表 1),并检测荧光定量引物及内参引物的特异性,结果显示良好。利用 Real-time PCR 检测 pH、盐度、氨氮胁迫后的脊尾白虾眼柄和腹神经节中不同时间点 MIH 基因的相对表达量。反应体系和程序参考 FS Universal SYBR Green Master (ROX)说明书,采用 10 μ L 反应体系,包括正反向引物各 0.1 μ L; 5 μ L FS Universal SYBR Green Master (ROX); 1.0 μ L cDNA; 3.8 μ L DEPC 水。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 10min; 95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s。实验中每 4 尾混合作为一个样品,数据为 3 个重复的平均值 \pm 标准差,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算脊尾白虾 EcMIH 基因的相对表达量,用 SPSS17.0 软件进行 One-Way ANOVA 显著性分析。

2 结果

2.1 脊尾白虾 EcMIH 基因 cDNA 全长的克隆和序列特征分析

采用 RACE 方法获得全长为 1218bp,包括 360bp 的开放阅读框,394bp 的 3'端非编码区(UTR)以及 420bp 的 5'端非编码区(UTR)的脊尾白虾 EcMIH 基因,序列比较分析确定此基因为脊尾白虾 MIH-like 基因,3'端非编码区没有典型的多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA,有明显的 PolyA 尾(GenBank 登录号为 KM103727)(图 1)。

氨基酸序列分析发现 EcMIH 基因编码区序列编码 120 个氨基酸,预测的蛋白分子量为 13.71kDa,理论等电点 pI 为 8.02。脊尾白虾 MIH 由信号肽和成熟肽组成,其 N 端含有 41 个氨基酸组成的信号肽。成熟肽由 79 个氨基酸组成,其中成熟肽序列含 6 个非常保守的半胱氨酸残基分别为 Cys7、Cys24、Cys27、Cys40、Cys44 和 Cys53,第 12 位及第 72 位氨基酸残基分别为 Gly 和 Ile,其中 Gly12 是 CHH 家族基因中组的特征位点(Lee *et al*, 1995),Ile72 对 EcMIH 基因的活性有非常重要的作用(Katayama *et al*, 2003)。

1	ACA TGG GGA CGT AAA CTT TCC TCG GCC GCA GAG CAC GAC	39
40	AGA CAG AAG GAC GAC CGA GTA CGA AGC GTG CGT TTC AAA	78
79	GGC ACT GCT TTC ATC TGC CAG GAA CCA GCA ACT CAC AAC	117
118	CGA AGC ATT CGC TGA CTG ACT GCT GGC TGG CTG GCT GAT	156
157	CCC CAA GOC AIT CTT OGC TCG CTT GCG TCT GTC TAA TOC	195
196	GCT CAA ACC CAT CAG TTT TOC CCC AGA CCC TTA TOC TTA	234
235	TAA OCT TTG TTC CGA AGC TGT TTT CCT CCC CAG CTG TTT	273
274	TGT ATC CCT GCA TCC ACC TCG TTC GCA TCT TGT CGA CAT	312
313	TCC TCT GTT CAT TTG ATC OCT TGA GTG TCT GTC CAG TTT	351
352	GAA GGC GAA GTT TTA GTG TCG ATA AAC TGT ATA TCG TAT	390
391	TTT TTA AAT CTG TTG CTT GCT CAG TGT TTC atg tct act	429
	M S T	
430	caa aga cac ctg caa gga atg gta acc agg acg acg cag	468
	Q R H L Q G M V T R T T I Q	
469	agg atc ttt gcc cag aga gtt ctg gtc aca gca gcg ctg	507
	R I F A Q R V L V T A A L	
508	gtc atc agc ctg ttc ctg atc tct gga acg tgc gcc/agg	546
	V I S L F L I S G T S A /R	
547	tat cta gat gac gag tgc cct ggt gtc atg ggc aac aga	585
	Y L D D E C P G V M G N R	
586	gat ctg tat gag aag gtc gtc agt gtc tgc gat gac tgc	624
	D L Y E K V V S V C D D C	
625	tct aat atc ttc cgg atg aat gat gtc ggt aac aga tgc	663
	S N I F R M N D V G N R C	
664	agg aaa gac tgt ttc tac aac gtc gac ttc cta tgg tgc	702
	R K D C F Y N V D F L W C	
703	gtc tat gcc acg gaa agg cac ggc gac gtc gaa caa ctc	741
	V Y A T E R H G D V E Q L	
742	aac cgg tgg atc agc atc ctc cac gcc sgt aga aaa tga	780
	N R W I S I L H A G K *	
781	AAG AAC ATC TCT TAA CTG AAA TAT CCT TTA AAA TAA GCT	819
820	CCA GGA CCA CAC GCC AGA ATG TAC TCA ATG TTT TCA AGA	858
859	TAT AGA GAT ATA TTG TGA AAA TGC CAT ATC ATC CGA GAT	897
898	ATC TAT CAG CTA AGA TGT TGA AAC TGA CAT CAG CCA TCT	936
937	TGA TTT TTT ATT TAG TGC ATT CTT ATA TGG GTA GCC ATC	975
976	CAA CTT TTT TTT TCA TTT CTT TCA TAA ATC AAG ATT AAG	1014
1015	TTT TAT CAC ATT CCA AAC ATT GCA ACA ATG TGA ATA TTG	1053
1054	CAC ATC CTC AAT TAT TGA OCT CGA TTT TGC AGT TTC TTT	1092
1093	TAA CAT ATT TCT TTG TGT ATA TAT TCA GGG AAG AAA AAC	1131
1132	TTT TCA CTC ACT AAG TTT GGT AAA TTT CAT GTT ATA CTT	1170
1171	TTC CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	1209
1210	AAA AAA AAA	1218

图 1 脊尾白虾 MIH-like 基因全长 cDNA 序列及开放阅读框推测的氨基酸序列

Fig. 1 The full-length MIH-like cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *E. carinicauda*

对应的核苷酸序列的氨基酸用单个大写字母表示。细线方框内的 atg 为起始密码子,粗下划线表示信号肽,信号肽和成熟肽之间用竖线(/)划分,引物序列用箭头表示。用*表示终止密码子。第 12 位及第 72 位氨基酸残基 Gly 和 Ile 为 CHH 家族基因中组的特征位点用阴影表示

2.2 脊尾白虾 EcMIH 基因同源性分析

利用 NCBI 中的 BLAST 对脊尾白虾 EcMIH 基因进行同源性比较分析(图 2),发现脊尾白虾 EcMIH 基

因与日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)和罗氏沼虾的同源性最高, 分别为 87%和 86%。脊尾白虾 MIH-like 与其它虾蟹类如寄居蟹属(*Cancer pagurus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等的 MIH 成熟肽同源性分别为 58%、51%、49%、46%、47%。与挪威海螯虾、美洲海螯虾、斑节对虾和青虾等的性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)成熟肽同源性分别为 61%、70%、43%、54%, 与黄道蟹大颚器抑制激素(mandibular organ inhibiting hormone, MOIH)MOIH1 和 MOIH2 成熟肽同源性为 50%, 与罗氏沼虾、云斑厚纹蟹(*Pachygrapsus marmoratus*)、普通滨蟹(*Carcinus maenas*)、凡纳滨对虾的 CHH 成熟肽同源性较低分别为 46%、44%、31%、36%。MEGA 4.0 软件构建系统进化树, 结果表明(图 3), 脊尾白虾 MIH-like 与罗氏沼虾 MIH 和日本沼虾 MIH 聚为一支。MIH、MOIH 和 GIH 聚为一类, CHH 单独聚为一类, 这符合高血糖激素家族基因的分类, 分为 CHH 族和 CHH 族(De Kleijn *et al*, 1995)。由图可见, 所有游泳亚目(Natnatai)的 CHH 家族基因聚为一类, 所有爬行亚目(Peptnatai)CHH 家族基因聚为一类, 这符

合十足目的分类(魏崇德等, 1991)。

2.3 脊尾白虾 MIH 基因组织表达分析

采用 Real-time PCR 分析了脊尾白虾 EcMIH 基因在不同组织中的表达情况, 发现 EcMIH 基因在眼柄(830.79±0.56)、腹神经节(297.34±0.47)、肠(6.02±0.44)、心脏(65.19±0.34)、胃(2.11±0.43)和卵巢(1.00±0.36)中均有表达。而在肝脏、肌肉、鳃和血中不表达。在眼柄中的表达量最高, 在卵巢中的表达量最少(图 4)。

Real-time PCR 检测 pH 胁迫后不同时间脊尾白虾眼柄和腹神经节中 EcMIH 基因的表达情况如图 5 所示。结果表明: 无论是低 pH 胁迫组(pH6.5)还是高 pH 胁迫组(pH9.5), EcMIH 基因的表达量在胁迫 3—72h 期间都显著高于对照组($P < 0.05$)。pH 胁迫后, 眼柄和腹神经节中高浓度组(pH9.5) EcMIH 基因表达均呈现先上升后下降至初始水平的趋势, 但两者变化不完全一致, 眼柄中 EcMIH 基因的表达量在 3h 达到最高(43.86±0.35), 12h 达到最低(0.81±0.15), 而腹神经节在 24h 达到最高(14.58±0.18), 低浓度组, 眼柄中 EcMIH 基因的表达量在 48h 达到最高(15.38±0.21), 72—96h 趋于正常水平, 而腹神经节中 EcMIH 基因的表达量在 72h 达到最高(3.13±0.25), 96h 趋于正常水平。

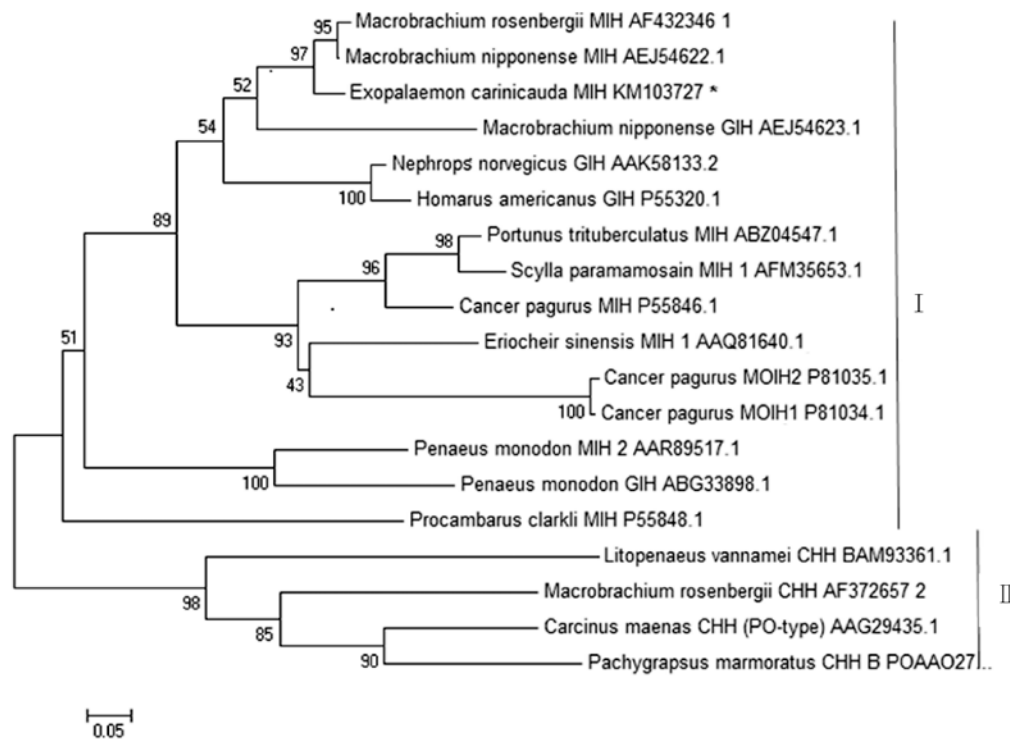


图 3 基于 MIH-like 成熟肽氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig.3 NJ tree based on MIH-like mature peptide amino acid of different species

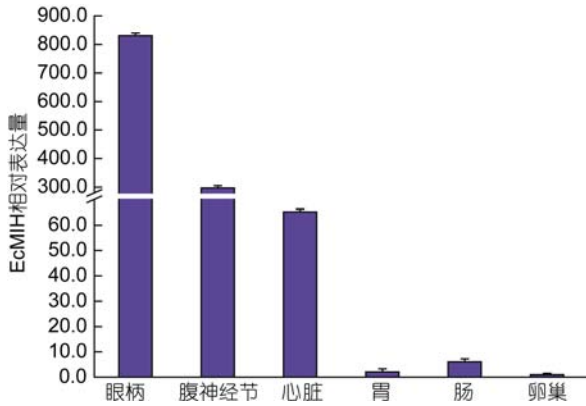


图4 EcMIH 基因在脊尾白虾不同组织中的表达分布
Fig.4 Distribution of EcMIH gene in different tissues of *E. carinicauda*
注: 数据是 3 个重复的平均值±标准差, 各组织表达量均以卵巢为比较的倍数表达

Real-time PCR 检测盐度胁迫后不同时间脊尾白虾眼柄和腹神经节中 EcMIH 基因的表达情况如图 7 所示。盐度胁迫后, 低浓度组(盐度 4、11、18)眼柄中

EcMIH 基因的表达呈现先升高后下降, 而腹神经节为先升高后下降再升高, 96h 后腹神经节中无论高盐(盐度 39、46)还是低盐(盐度 4、11、18、25) EcMIH 基因的表达量都显著高于对照组($P < 0.05$)。盐度 4 胁迫下, 眼柄中 EcMIH 基因的表达量与对照组相比在 3h 显著升高, 但 6—96h 均低于对照组; 盐度 11 组在 3—96h 均低于对照组; 而盐度 18 组除 3h、24h 外均低于对照组。在腹神经节中, 低浓度组(盐度 4、11、18、25)在 3—96h (72h 除外) EcMIH 基因的表达量均高于对照组($P < 0.05$), 但盐度 4 在 3h 达到最高(46.94 ± 0.41), 盐度 11、18 在 12h 达到最高, 分别为(5.93 ± 0.32)、(4.12 ± 0.22), 盐度 25 在 24h 达到最高(8.37 ± 0.31)。

高盐(盐度 39、46)胁迫下, 眼柄中 EcMIH 基因的表达量在 3—96h 均高于对照组; 但盐度 39 的变化趋势为先升高后下降的趋势, 而盐度 46 的变化趋势为先升高后下降再升高的趋势; 盐度 39 胁迫 EcMIH 基因的表达量在 72h 达到最高(15.75 ± 0.36), 96h 趋于

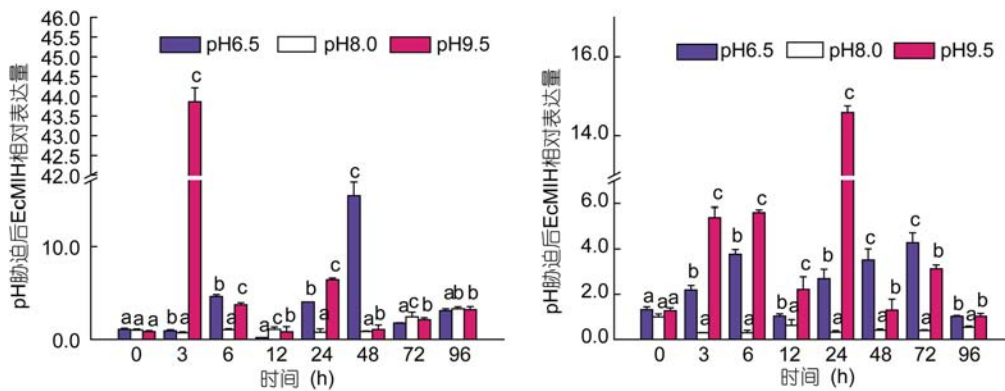


图5 不同 pH 胁迫后 EcMIH 基因在眼柄(左)和腹神经节(右)中的表达

Fig.5 The expression of EcMIH gene in eyestalk (left) and ventral ganglion (right) after different pH treatments at different time
同一时间点不同字母者表示差异显著($P < 0.05$), 数据是 3 个重复的平均值±标准差, 各组表达量均以与 0h 空白对照组相比较的倍数表达。下同

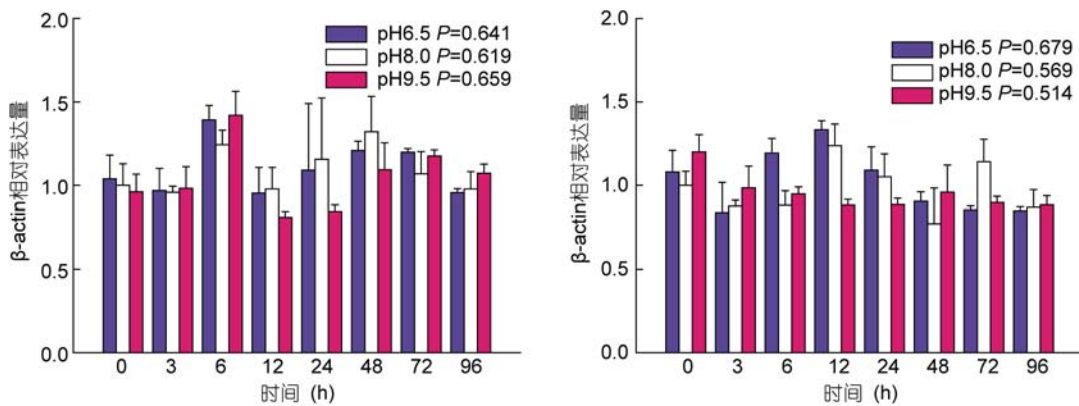


图6 不同 pH 胁迫后 beta-actin 基因在眼柄(左)和腹神经节(右)中的表达($P > 0.05$)

Fig.6 The expression of beta-actin gene in eyestalk (left) and ventral ganglion (right) after different pH treatments at different time ($P > 0.05$)

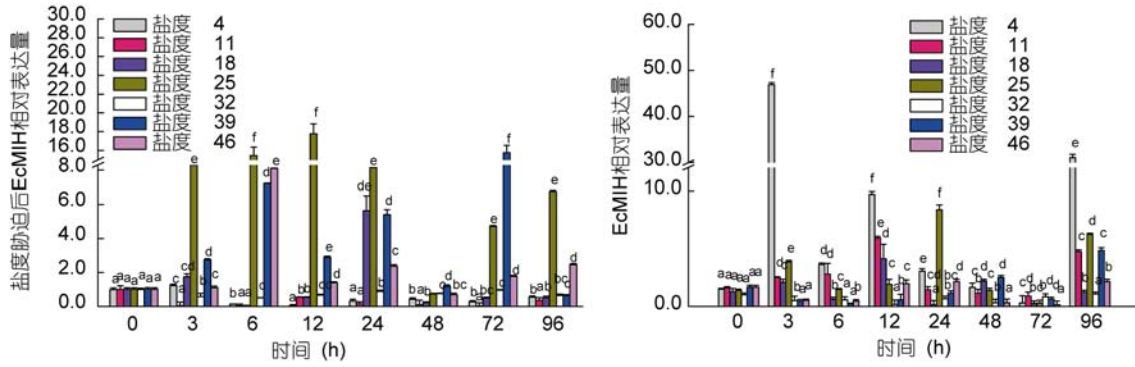


图 7 盐度胁迫后 EcMIH 基因在眼柄(左)和腹神经节(右)中的表达

Fig.7 The expression of EcMIH gene in eyestalk (left) and ventral ganglion (right) after salinity stress

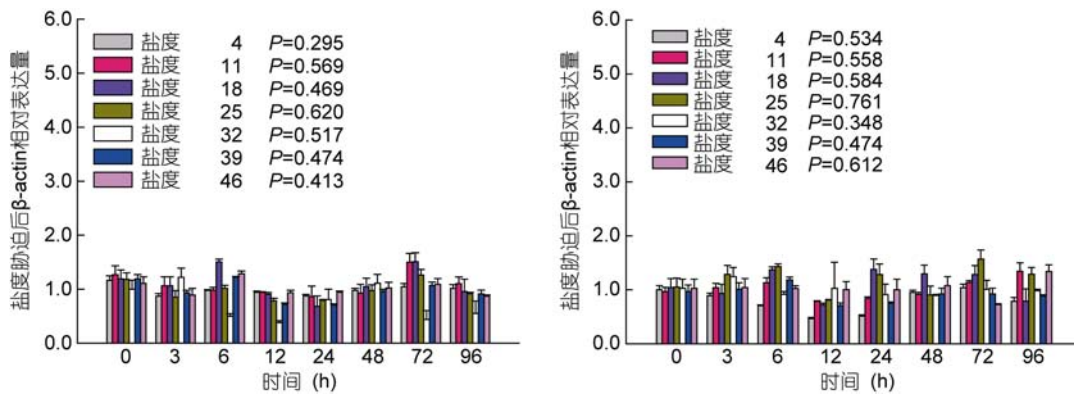


图 8 盐度胁迫后 β -actin 基因在眼柄(左)和腹神经节(右)中的表达($P>0.05$)

Fig.8 The expression of β -actin gene in eyestalk (left) and ventral ganglion (right) after salinity stress ($P>0.05$)

正常水平; 盐度 46 在 6h 达到最高(8.09±0.34), 12h 下降, 24h 升高, 48h 下降, 72—96h 再次显著升高, 分别为(1.77±0.24)、(2.47±0.21)。

Real-time PCR 检测氨氮胁迫后脊尾白虾眼柄和腹神经节中 EcMIH 基因的表达情况如图 9 所示。氨氮胁迫后, 眼柄中 EcMIH 基因的表达呈现先升高后下降再升高的趋势, 而腹神经节呈现先下降再升高的趋势。腹神经节中低浓度组、中高浓度组和高浓度

组 EcMIH 基因的表达量在 96h 均达到最高, 分别为(11.07±0.32), (1.28±0.12), (5.10±0.31); 中浓度组在 72h 达到最高值(8.03±0.35), 而眼柄中各氨氮组的变化不完全一致, 低浓度组和中高浓度组在 3h 达到最高(1.88±0.22), (1.32±0.11); 中浓度组在 24h 达到最高(4.29±0.31), 48—72h 表达量下降, 96h 再次显著升高(2.26±0.15); 高浓度组在 96 h 达到最高(3.80±0.21)。

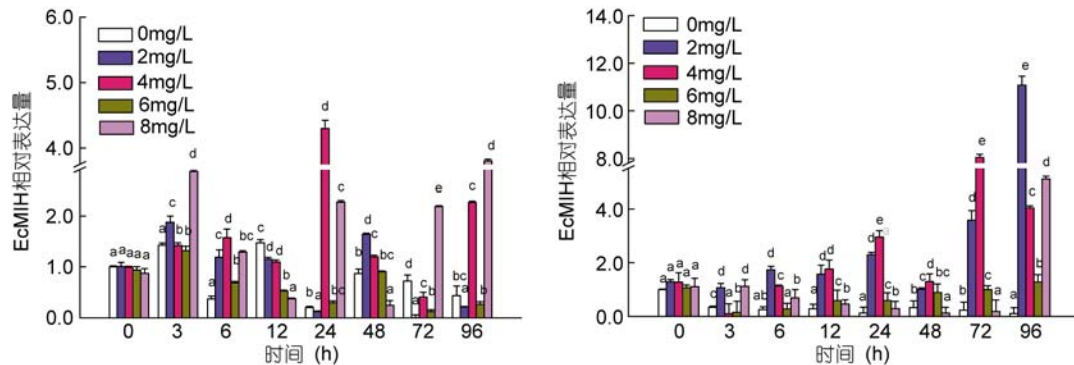


图 9 不同氨氮胁迫后 EcMIH 基因在眼柄(左)和腹神经节(右)中的表达

Fig.9 The expression of EcMIH gene in eyestalk (left) and ventral ganglion (right) after different NH₄Cl treatments at different time

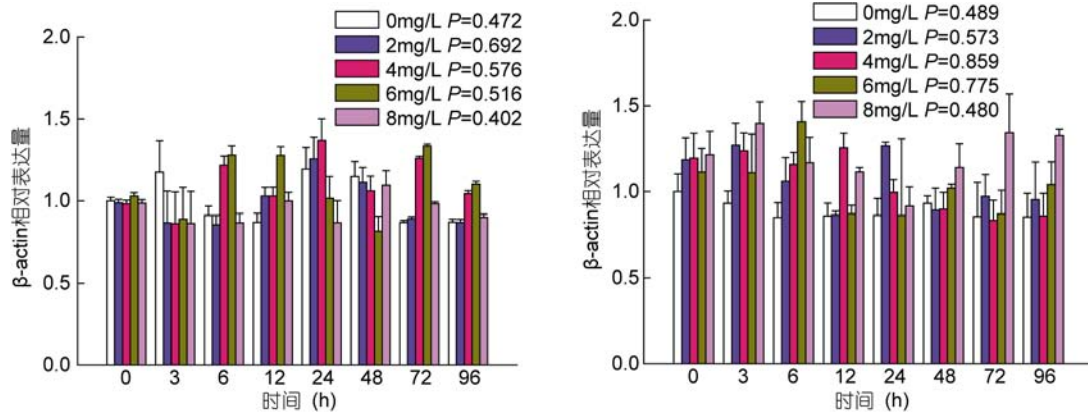


图 10 不同氨氮胁迫后 β -actin 基因在眼柄(左)和腹神经节(右)中的表达($P>0.05$)

Fig. 10 The expression of β -actin gene in eyestalk (left) and ventral ganglion (right) after different NH_4Cl treatments at different time ($P>0.05$)

3 讨论

甲壳动物内分泌学中眼柄 XO-SG 系统的研究一直备受关注。MIH 是甲壳动物所特有的家族神经肽类激素,抑制 Y 器蜕皮类固醇的合成、抑制蜕皮激素的分泌,对卵巢发育也有影响,只有当 MIH 分泌量减少或停止时才会导致蜕皮现象的发生。本研究根据已报道虾蟹 MIH 全长 cDNA 序列比较其同源性,设计简并引物,克隆得到脊尾白虾 MIH-like 基因全长 cDNA 序列,成熟肽的同源性比较发现,该基因与日本沼虾 MIH-like、罗氏沼虾 MIH-A 和远海梭子蟹 MIH 同源性最高,由此可确定脊尾白虾 MIH-like 基因为脊尾白虾的 MIH 基因。脊尾白虾 MIH 成熟肽序列含 6 个非常保守的半胱氨酸残基,其 N 端含有 41 个氨基酸组成的信号肽,成熟肽与日本囊对虾(Ohira *et al.*, 2005)一致,由 79 个氨基酸组成;通过比较虾蟹类 MIH 氨基酸序列信号肽和成熟肽的切割位点,发现蟹类前 2 位氨基酸残基为 AA(Lee *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2013) 或 TA(Lu *et al.*, 2001)而虾类为 SA(Chen *et al.*, 2007; Toullec *et al.*, 2013);比较成熟肽氨基酸组成,发现其由于近 C-端缺失了几个氨基酸残基,C-末端氨基酸序列的保守性较差,具有种间多态性。短尾类(蟹类)为 78 个氨基酸。克氏原螯虾(Nagasawa *et al.*, 1996)和中国对虾(王在照等, 2003)为 75 个氨基酸。刀额新对虾(Tiu *et al.*, 2007)为 77 个氨基酸,南美白对虾(Sun, 1994)为 72 个氨基酸,鹰爪虾(王在照等, 2002)为 71 个氨基酸,由此推测 MIH 在不同虾体内可能有多种不同构型。脊尾白虾 MIH 与 GIH 的同源性很高,与 CHH 的同源性很低,与其它虾蟹类 CHH 的同源性也很低,这符合 CHH 家族基因的分类,也说明 I 型肽和 II 型肽之间在种内和种间存在很大差异。

甲壳动物 MIH 的组织表达目前仅见少量报道。刀额新对虾胚胎期没有检测到 MIH 基因的表达(Gu *et al.*, 1998),锈斑螯(*Charybdis feriatius*)孵化前的胚胎中检测到 MIH 基因的表达(Chan *et al.*, 1998),这可能由于物种差异所致;而在成体侧向地蟹(*Gecarcinus lateralis*)(Lee *et al.*, 2007)、中华绒螯蟹(孙妍等, 2011)、凡纳滨对虾(Sun, 1994)、日本囊对虾(Ohira *et al.*, 1997)、可口美青蟹(*Callinectes sapidus*)(Lee *et al.*, 1995)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)(Qiu *et al.*, 2003)、刀额新对虾、锈斑螯和日本螯(*Charybdis japonica*)(沈建明等, 2010)的眼柄中均检测到 MIH 的表达,表明眼柄 X 器官—窦腺复合体是甲壳动物的重要神经内分泌器官,通过合成和分泌多种神经多肽激素,调控甲壳动物的性腺发育、色素反应、蜕皮、代谢、渗透压调节等重要生理活动。而日本囊对虾、可口美青蟹、锯缘青蟹、刀额新对虾和锈斑螯的 MIH 在脑、胸神经节、腹神经节中也有表达,日本螯 MIH 在脑、胸神经节、精巢和卵巢中也有表达。本研究发现,脊尾白虾 EcMIH 基因在眼柄的表达量最高是卵巢的 830 倍;脊尾白虾 MIH-like 除在眼柄表达外,在腹神经节、心脏、肠、胃和卵巢中也有表达,这表明 MIH 表达具有较强的组织特异性。而 MIH 在这些组织的表达与眼柄的表达在功能上是否相同有待进一步研究。

pH、盐度、氨氮是影响海水养殖虾蟹类生理生态的重要环境因子,可直接影响水生生物的存活、生长、蜕皮、繁殖和免疫活性(蔡生力等, 1995)。本文分别研究了不同 pH、盐度、氨氮胁迫对脊尾白虾 EcMIH 基因表达的影响。结果发现,在眼柄中高 pH、高氨氮胁迫组(8mg/L)在胁迫 3h 后 EcMIH 基因的表达量均上升,高盐胁迫组(盐度 39、46)在胁迫 3—6h

后表达量上升, 根据这一应激反应, 推测 MIH 具有高血糖活性。而在腹神经节中高氨氮(8mg/L)胁迫 0—72h 脊尾白虾 MIH 的高血糖活性受到抑制, 96h 后 MIH 的表达量升高, 高血糖活性抑制解除。由此推测在高氨氮(8mg/L)的环境下眼柄为 MIH 高血糖活性的主要调节器官; 在眼柄中, 低盐胁迫下 MIH 的高血糖活性受到抑制, 盐度 4 胁迫, 眼柄中 EcMIH 基因的表达量与对照组相比在 3h 升高, 但 6—96h 均低于对照组; 盐度 11 在 3—96h 均低于对照组; 而盐度 18 除 3h、24h 外均低于对照组, 而腹神经节中, EcMIH 基因的表达量在胁迫 3h 后开始上升, 由此推测低盐环境下, 腹神经节为 MIH 高血糖活性的主要调节器官。在眼柄中各氨氮胁迫组在胁迫 3h 后 EcMIH 基因的表达量均表现升高, 而在腹神经节中胁迫 3h 后 EcMIH 基因的表达量均表现下降, 由此推测氨氮胁迫环境下眼柄为 MIH 高血糖活性的主要调节器官。盐度胁迫 72—96h 脊尾白虾 MIH 基因表达量从低盐到高盐的变化趋势为先升高后降低在升高, 此变化趋势与 Lago-Lestón 等(2007)用不同温度盐度胁迫凡纳滨对虾的结果一致: 他们研究了温度和盐度对凡纳滨对虾幼虾 CHH 和 EcMIH 基因的表达变化规律, 发现在盐度(18、25、39、46)胁迫 24h 后, EcMIH 基因表达量均显著增加($P < 0.05$); 温度对基因表达的影响高于盐度; 盐度(10, 16, 22, 28, 34 和 40)和温度(20°C, 24°C, 28°C 和 32°C)胁迫 24h, 在不同盐度胁迫下 MIH-2 基因的表达量明显低于 MIH-1, 且在盐度 28 表达量几乎为零; 温度为 20°C 和 32°C 时 MIH 基因在不同盐度胁迫下其表达量高于温度为 24°C 和 28°C; 温度为 28°C 时, MIH 基因的表达量在不同盐度胁迫 24h 后呈下降趋势, 且在盐度 40 时 MIH 基因的表达量最低; 温度为 20°C 胁迫 24h 后, MIH 基因的表达量在盐度 16 为最高, 在盐度 22, 28, 34 表达量下降, 在盐度 40 表达量上升; Liv-MIH 神经肽除了受蜕皮抑制活动影响外还可能其它多效性的影响(比如高血糖活性)。Chang 等(1998)利用 ELISA 方法研究美洲螯龙虾, 发现盐度的降低、升高均能导致 CHH 含量的增加。拟穴青蟹盐度骤变实验 CHH2 基因的表达量显著增加, 与本研究的 EcMIH 基因表达趋势基本一致(舒妙安等, 2012)。由此可推测出脊尾白虾 EcMIH 基因参与了环境胁迫后的机体应激反应。

4 结论

本研究成功克隆了脊尾白虾 MIH-like 基因全长

cDNA 序列, 初步揭示了 pH、盐度、氨氮胁迫后该基因在眼柄和腹神经节中的表达变化规律, 确定 MIH 基因的表达水平与环境胁迫密切相关, 表明该基因参与了环境胁迫后的机体应激反应, 为甲壳动物高血糖激素家族响应环境胁迫的机理研究提供了参考。

参 考 文 献

- 于天基, 李 健, 李吉涛等, 2014. 池养脊尾白虾的生长与繁殖特性. 中国渔业质量与标准, 4(2): 16—25
- 王在照, 相建海, 2002. 编码鹰爪虾蜕皮抑制激素基因的 cDNA 片段的克隆和序列分析. 水产学报, 26(6): 487—492
- 王在照, 焦传珍, 张晓军等, 2003. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆及序列分析. 遗传学报, 30(2): 128—134
- 任 海, 李 健, 李吉涛等, 2014. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响. 农业环境科学学报, 33(4): 647—655
- 刘 海, 2005. 脊尾白虾在不同盐度水体中适应性试验. 苏盐科技, (1): 20, 30
- 刘瑞玉, 1995. 中国北部的经济虾类. 北京: 科学出版社, 48—49
- 孙 妍, 张亦陈, 刘逸尘等, 2011. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因全长 cDNA 克隆和重组表达. 水生生物学报, 35(2): 210—217
- 许文军, 谢建军, 施 慧等, 2010. 池塘养殖脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 感染血卵涡鞭虫的研究. 海洋与湖沼, 41(3): 396—402
- 李 洋, 刘 萍, 李 健, 等, 2014. 脊尾白虾酚氧化酶原基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 45(2): 299—306
- 李 洋, 刘 萍, 李 健等, 2013. 脊尾白虾丝氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆及表达分析. 中国水产科学, 20(6): 1166—1174
- 李美玉, 李 健, 刘 萍等, 2012. 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 43(2): 306—312
- 沈 辉, 万夕和, 王李宝等, 2013. 白斑综合征病毒对脊尾白虾的致病性研究. 海洋科学, 37(5): 55—60
- 沈建明, 朱冬发, 杨济芬等, 2010. 日本螯蜕皮抑制激素基因的克隆及表达分析. 见: 经济发展方式转变与自主创新——第十二届中国科学技术协会年会(第三卷), 1—8
- 陈佳蓉, 1996. 水化学实验指导书. 北京: 中国农业出版社, 1996, 136—139
- 段亚飞, 刘 萍, 李吉涛等, 2013. 脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库的构建及 EST 序列分析. 中国水产科学, 20(2): 243—249
- 钟硕良, 陈月忠, 林克冰等, 1997. 虾池底质中 NH_4^+ -N、 S^{2-} 和异养细菌含量的变化及其相关性研究. 台湾海峡, 16(4): 449—454
- 栗治国, 2013. 脊尾白虾繁殖生物学及人工种苗繁育技术的研究. 青岛: 中国科学院海洋研究所硕士学位论文
- 梁俊平, 李 健, 刘 萍等, 2012a. 脊尾白虾生物学特性与人工繁育的研究进展. 中国农学通报, 28(17): 109—116

- 梁俊平, 李健, 李吉涛等, 2012b. 氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验. 水产科学, 31(9): 526—529
- 舒妙安, 张龙韬, 周宇芳等, 2012. 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 两种型高血糖激素基因全长 cDNA 的克隆及组织表达分析. 海洋与湖沼, 43(4): 695—701
- 韩俊英, 李健, 李吉涛等, 2011. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 35(8): 1130—1138
- 蔡生力, 王崇明, 许小幸, 1995. 1993 年青岛流亭镇对虾爆发性流行病调查. 海洋科学, 6: 15—18
- Chan S-M, Chen X-G, Gu P-L, 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*). Gene, 224(1—2): 23—33
- Chang E S, Keller R, Chang S A, 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. General and Comparative Endocrinology, 111(3): 359—366
- Chang E S, Prestwich G D, Bruce M J, 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. Biochem Biophys Res Commun, 171: 818—826
- Chen H-Y, Watson R D, Chen J-C et al, 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. General and Comparative Endocrinology, 151(1): 72—81
- Chen J-C, Liu P-C, Lin Y-T et al, 1988. Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*. Journal of the World Aquaculture Society, 19(3): 127—131
- De Kleijn D P V, Van Herp F, 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 112(4): 573—579
- Gu P L, Chan S-M, 1998. Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp, *Metapenaeus ensis*. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 7(3): 214—220
- Katayama H, Nagata K, Ohira T et al, 2003. The solution structure of molt-inhibiting hormone from the Kuruma Prawn *Marsupenaeus japonicus*. The Journal of Biological Chemistry, 278(11): 9620—9623
- Lago-Lestón A, Ponce E, Muñoz M E et al, 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. Aquaculture, 270(1—4): 343—357
- Lee K J, Elton T S, Bej A K, et al, 1995. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 209(3): 1126—1131
- Lee K J, Kim H-W, Gomez A M et al, 2007. Molt-inhibiting hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Cloning, tissue expression, and expression of biologically active recombinant peptide in yeast. General and Comparative Endocrinology, 150(3): 505—513
- Lin C Y, Chen S H, Kou G H et al, 1998. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 121(4): 315—321
- Lorenzon S, Francese M, Ferrero E A, 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. Archives of Environmental Contamination Toxicology, 39(2): 167—176
- Lu W Q, Wainwright G, Olohan L A et al, 2001. Characterization of cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancerpagurus*; expression of MIH in non-X-organ tissues. Gene, 278(1—2): 149—159
- Nagasawa H, Yang W-J, Shimizu H et al, 1996. Isolation and amino acid sequence of a molt-inhibiting hormone from the American crayfish, *Procambarus clarkii*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60(3): 554—556
- Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H et al, 1997. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zoological Science, 14(5): 785—789
- Ohira T, Katayama H, Tominaga S et al, 2005. Cloning and characterization of a molt-inhibiting hormone-like peptide from the prawn *Marsupenaeus japonicus*. Peptides, 26(2): 259—268
- Qiu G F, Zhang A P, Lou Y D, 2003. cDNA cloning and expression analysis of molt-inhibiting hormone in the mud crab *Scylla serrata*. Journal of Fisheries of China, 27(3): 207—212
- Santos E A, Keller R, 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: A role of the Crustacean hyperglycemic hormone (CHH). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 106(2): 343—347
- Sedlmeier D, 1988. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. Regulatory Peptides, 20(2): 91—98
- Stentiford G D, Chang E S, Neil D M, 2001. Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): Effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). General and Comparative Endocrinology, 121(1): 13—22
- Stewart M J, Stewart P, Sroyraya M et al, 2013. Cloning of the crustacean hyperglycemic hormone and evidence for molt-inhibiting hormone within the central nervous system of the blue crab *Portunus pelagicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 164(2): 276—290
- Sun P S, 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(1): 1—6
- Tiu S H-K, Chan S-M, 2007. The use of recombinant protein and RNA interference approaches to study the reproductive functions of a gonad-stimulating hormone from the shrimp *Metapenaeus ensis*. FEBS Journal, 274(17): 4385—4395
- Toullec J-Y, Corre E, Bernay B et al, 2013. Transcriptome and peptidomic characterisation of the main neuropeptides and peptidic hormones of a euphausiid: the ice krill, *Euphausia crystallorophias*. PLoS One, 8(8): e71609
- Webster S G, 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. The Journal of Experimental Biology, 199(Pt7): 1579—1585

CLONING AND EXPRESSION OF MOLT-INHIBITING HORMONE GENE FROM *EXOPALAEMON CARINICAUDA* UNDER ENVIRONMENTAL STRESSES

ZHANG Mei^{1,2}, LIU Ping², LI Ji-Tao², LI Jian²

(1. Ocean University of Dalian, Dalian 116023, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract We cloned the full-length MIH (molt-inhibiting hormone)-like cDNA from the eyestalk ganglia of ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*, and named as EcMIH by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length of MIH cDNA was 1218bp containing a 420bp 5' untranslated region (5'UTR), a 438 bp 3' untranslated region (3'UTR) and a 360bp open reading frame (ORF) encoding 120 amino acids consisting of a 41-residue signal peptide and a 79-residue mature peptide; the molecular mass was 13.71 kDa and the pI (isoelectric point) was 8.02. Sequence analysis indicated that the EcMIH was in homology with those of *Marsupenaeus japonicas* and *Macrobrachium rosenbergii*, in 87% and 86% identity, respectively. Tissue expression analysis showed that the EcMIH mRNA expressed at the highest level in eyestalk while extremely low in ovary, and not expressed in liver, muscle, gill, and blood cells. Under different environmental stresses, the MIH-like gene expression level in eyestalk and ventral ganglion significantly increased ($P<0.05$) compared to the control (i.e., in pH 6.5 group for 24h and 48h, in 4mg/L NH_4Cl group for 12h and 24h, and in salinity 39 group for 12h and 24h). Therefore, the EcMIH is involved in response against environmental stresses.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; molt-inhibiting hormone (MIH); gene expression; environmental stress