

太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*) CRH-BP 基因克隆及表达分析*

王 斌 武敏敏 胡利腾 张建设^①

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 促肾上腺皮质激素释放激素结合蛋白(CRH-BP)是一种糖基化蛋白,与促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)具有很高的亲和力,对 CRH 诱导的脑垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)的释放起到抑制作用。本研究采用 RT-PCR 与 RACE 基因克隆方法首次获得太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*) CRH-BP 基因全长 cDNA 序列(GenBank 登录号: MF289345) 1950bp,其中 ORF 区 1245bp 编码 415 个氨基酸,5'非编码区 841bp,3'非编码区 294bp,理论分子量/等电点为 45.816/5.87。生物学序列分析结果表明,太平洋真宽水蚤 CRH-BP 氨基酸序列与桡足类中近亲真宽水蚤同源性最高;具有 6 个蛋白修饰位点及蛋白家族标签序列,具有明显的跨膜结构域及信号肽。实时荧光定量 PCR 分析结果表明,太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因在盐度、温度及 pH 环境胁迫中的 mRNA 表达量均具有一定的时间梯度表达性与浓度梯度表达性特征。本文通过对太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因结构及不同环境因子刺激下的表达特点的研究为探究桡足类在环境应激、生殖生理及免疫调控等方面奠定了理论基础。
关键词 太平洋真宽水蚤;促肾上腺皮质激素释放激素结合蛋白;基因克隆;环境胁迫;实时荧光定量 PCR

中图分类号 Q789;Q955 doi: 10.11693/hyhz20180500139

促肾上腺皮质激素释放激素结合蛋白(CRH-BP)又称促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白(CRF-BP),是 CRH 家族一员。CRH 家族在应激反应中发挥重要作用,依靠 CRH→受体→G 蛋白→cAMP→PKA→功能蛋白表达→生物学效应这一信使途径在应激反应中发挥作用,调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)和整个应激系统(Lee *et al.*, 2008)。Behan 等分离出与 CRH 有很高亲和力的 CRH-BP,认为 CRH-BP 通过与游离的 CRH 结合调节 CRH 利用率从而发挥作用(Behan *et al.*, 1989),CRH-BP 基因最早克隆自哺乳动物(Linton *et al.*, 1988),多种脊椎动物与无脊椎动物 CRH-BP 及其同源基因也得到鉴定(Seasholtz *et al.*, 2002; Huisin *et al.*, 2005)。研究发现不同物种的 CRH-BP 序列结构在进化过程中高度保守,这种结构特征的保持对于其生

物活性的发挥是很有必要的(Westphal *et al.*, 2006)。脊椎动物中,CRH-BP 抑制 CRH 释放而被视为 CRH 信号通路的拮抗剂(Chan *et al.*, 2000)。此后也有报道认为 CRH-BP 对 HPA 轴和应激系统具有一定的调节功能(Seasholtz *et al.*, 2001)。此外,CRH-BP 在啮齿类和灵长类脑中都有表达,许多研究也表明 CRH-BP 对大脑中枢起调节作用(Westphal *et al.*, 2006)。Burrows 等(2001)对转基因小鼠研究中发现,在抑制性应激条件下,应激系统做出应答,CRH-BP 表达量代偿性增加,从而增强自主活动能力。无脊椎动物中尤其是昆虫中 CRH 基因研究较多,对 CRH-BP 相关研究有限。蜜蜂 CRH-BP 全序列分析认为其高度保守,且昆虫 CRH 家族中利尿剂激素(DH- I)极有可能亲和 CRH-BP (Liu *et al.*, 2011)。日本虎斑猛水蚤 CRH-BP 的研究认

*国家海洋局公益性行业科研专项,201505025 号;舟山市海洋与渔业局 2018 年现代渔业发展市级专项。王 斌,硕士研究生, E-mail: 1094478342@qq.com; 同等贡献第一作者:武敏敏,硕士研究生, E-mail: 1224333108@qq.com

通信作者:张建设,博士,副教授, E-mail: zhangjianshe@zjou.edu.cn

收稿日期:2018-05-31,收修改稿日期:2018-09-20

为 CRH-BP 基因高度保守, CRH-BP 基因活性与个体发育程度及性别有关联, 参与应激反应, 能够缓解急性应激维持内环境稳定(Lee *et al.*, 2008)。作为应激反应中重要的调控因子, 对环境胁迫下 CRH-BP 基因表达特征的研究是很有必要的。

太平洋真宽水蚤广泛分布于太平洋东部海域, 是舟山海域的季节性优势浮游动物之一。其生活的近岸和潮间带区域水温、盐度和 pH 等环境因子变动较大, 成为影响桡足类生长、存活和发育的主要环境因子(吴利等, 2011; 李光福, 2015)。目前, 对太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因的克隆及环境胁迫下的基因表达相关研究还未见报道。本研究采用 RACE 方法获得太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因全长序列, 并对序列的各种生物学特征进行分析, 并进一步分析了其在盐度、温度及海水酸化等生态因子急性胁迫下的表达特征, 为阐释太平洋真宽水蚤 CRH-BP 在应对环境变化过程中的功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 桡足类培养 本实验所用太平洋真宽水蚤是使用小型浮游生物拖网, 拖取自浙江省舟山市舟山群岛长峙岛附近海域。拖取样品后暂养于 10L 塑料桶内, 于 1h 内运回实验室, 筛选纯化后于培养箱中驯化培养, 实验用海水为煮沸后的 0.45 μ m 膜过滤海水, 实验培养温度为 (20.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C, 海水盐度为 30.0, 光照条件为 12L:12D, 培养过程中 24h 持续充氧, 定期投喂饵料, 本实验选取饵料为海水小球藻。正式实验时, 选取子代中外观形态与附肢完整, 生命活性强的健康太平洋真宽水蚤成体作为实验对象。

海水小球藻购自上海光语生物科技有限公司藻种库, 在 *f*2 培养液、温度 (20.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、盐度 28.0 \pm 0.5、光暗周期 12L:12D 条件下培养至藻类指数生长期时实验备用。

1.1.2 实验样品处理 盐度胁迫组选择 10.0、30.0 和 45.0 三个盐度组, 每个处理组设 3 个平行, 0.45 μ m 膜过滤海水加海水晶与超纯水分别配置 45.0 与 10.0 两组海水。每个处理每个平行分别挑选驯化后的健康个体 100 只置于 1L 烧杯内进行实验, 分别于胁迫后 0、3、6、12、24、48h 取水蚤个体, 液氮保存, 用于 RNA 的提取, 每个时间点取 10—15 只。实验培养温

度为 (20.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C, 光照条件为 12L:12D。

温度胁迫组实验选择 (15.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、(20.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 和 (25.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 三个温度组, 三个培养箱设置所需温度, 每个温度处理下设置三个平行。每个处理每个平行分别挑选驯化后的健康个体 100 只置于 1L 烧杯内进行实验, 分别于胁迫后 0、3、6、12、24、48h 取水蚤个体, 液氮保存, 用于 RNA 的提取, 每个时间点取 10—15 只。实验所用海水为 0.45 μ m 膜过滤海水, 光照条件为 12L:12D。

海水酸化组实验选择 pH 分别为 6.20、7.30、8.10, 每个处理组设 3 个平行。过滤海水的 pH 在 8.10 左右, 用 1mol/L HCl 调节出实验组所需 pH 值, 配制过程中要注意不断搅匀。每个处理每个平行分别挑选驯化后的健康个体 100 只置于 1L 烧杯内进行实验, 分别于胁迫后 0、3、6、12、24、48h 取水蚤个体, 液氮保存, 用于 RNA 的提取, 每个时间点取 10—15 只。实验培养温度为 20.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C, 所用海水为 0.45 μ m 膜过滤海水, 光照条件为 12L:12D。

处理后的实验样品由液氮速冻并保存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱。每组对照组中随机选取 10 只太平洋真宽水蚤作为克隆材料, 选取盐度、温度及 pH 不同梯度组胁迫处理后的太平洋真宽水蚤总 RNA 作为 qRT-PCR 实验材料。每个实验组下个体重复进行 3 次 qRT-PCR 实验。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

取对照组收集样品进行总 RNA 提取, 试剂选用 TaKaRa 公司 Trizol Total RNA 提取试剂盒, 按照说明书进行操作, 获得的总 RNA 以 1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测, 并置于紫外分光光度计 (Bio-Rad, USA) 下观察电泳条带。反转录采用 TaKaRa M-MLV RTase Cdna Synthesis Kit 试剂盒 (TaKaRa) 进行, 获得相应 cDNA。

1.3 目的基因全长 cDNA 扩增

参照以往研究获得的桡足类 CRH-BP 全长序列进行简并引物设计, 进一步获得太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因的中间片段。根据中间片段设计 CRH-BP 基因特异性引物进行 5' RACE 和 3' RACE 操作, 采用 TaKaRa 5'/3'-Full RACE 试剂盒, 按照试剂盒说明书进行 RACE 实验。分离纯化获得的片段后链接到载体 pMD18-T, 然后转化到 DH5 α 感受态细胞中, 进行阳性克隆筛选, 后续测序工作交由上海美吉生物技术有限公司。实验所用引物见表 1。

表 1 常规 PCR 及 RACE 所用引物
Tab.1 Primers used for PCR and RACE in this study

基因	引物	序列(5'—3')	扩增片段(bp)	功能
CRH-BP	CRH-BP F	GGGCTAAAAGGAGCCAAGAC	813	核心心序列
	CRH-BP R	CCGCAGATAGTTTCCGAGGT		
	CRH-BP 5'outer	CTTGTGTCTGAATTAGGTCACCAT	841	5'RACE
	CRH-BP 5'inner	AACTCTGACACTGAACCCCTC		
	CRH-BP 3'outer	CCTCAACACAGAATACACAGATTTG	296	3'RACE
	CRH-BP 3'inner	AGGAGTTGGGATCTTATAAGAGAC		

1.4 太平洋真宽水蚤 CRH-BP 全长序列分析

利用 DNAMAN 8.0 软件拼接工具拼接测序结果, 得到 Ep.CRH-BP 基因全长 cDNA 序列。NCBI 在线网站 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>) 预测编码区及非编码区。ExPasy 网站(<http://web.expasy.org/compute.pi/>) 分析分子量和等电点。信号肽以及跨膜区的预测分别使用 SignalP 4.1 Server 网址与 TMHMM Serverv.2.0 进行; 使用 Swissport 在线软件(<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行 CRH-BP 基因蛋白质结构的预测分析; 用 DNAMAN8.0 软件多重序列比对工具将 CRH-BP 基因氨基酸序列与其他物种进行同源性比对, 使用 MEGA6.0 以 Maximum Likelihood method 构建进化树分析物种进化关系。

1.5 荧光定量 PCR(qRT-PCR)表达分析

根据已获得的 Ep.CRH-BP 基因 ORF 区, 利用 Prime 5.0 设计 qRT-PCR 所需引物, 内参引物选择 18S rRNA, 引物序列交由上海华大生物公司合成。样品分别经过盐度、温度以及 pH 三个梯度组急性胁迫处理 48h, 于 3、6、12、24、48h 五个时间段取样进行总 RNA 提取, 反转录得到 cDNA 模板进行 qRT-PCR 实验。目的基因与内参均设置 3 个技术重复与 3 个实验重复。重复实验中差异较大的数据排除, 其余采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行 Ep.CRH-BP 基因相对表达分析, 采用 SPSS 22.0 进行数据分析, 主要进行单因素方差分析以及显著性差异分析, 设定当 $P < 0.05$ 时为具有显著性差异。

表 2 qRT-PCR 所用引物
Tab.2 Primers used for qRT-PCR in this study

引物	序列(5'—3')	扩增片段(bp)	作用
CRH-BP F	AGGAGACACCACTACGAA	189	qRT-PCR primer
CRH-BP R	GTCTCCCTCAGGTCACTTT		
18S F	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	209	qRT-PCR control primer
18S R	TCAATTCAGTGTAGCGCGTG		

2 结果与分析

2.1 太平洋真宽水蚤全长 CRH-BP 基因序列分析

RACE 结果如图 1 所示, 分别为 CRH-BP 基因 5' 与 3'RACE 电泳图, 所用 DNA Marker 为 2000bp(已标注)。将扩增得到的 5'RACE 及 3'RACE 序列片段与 ORF 区进行拼接, 拼接工具选用 DNAMAN8.0 软件。拼接得到 Ep.CRH-BP 基因 cDNA 序列全长 (MF289345) 1950bp, ORF 1245bp, 共编码 415 个氨基酸(AA), 5'UTR 与 3'UTR 核苷酸数分别为 841bp、296bp, 具有典型结构 polyA 尾巴以及 AATAAA 加尾信号, 如图 2 分析 CRH-BP 基因全长序列发现 HSP 70.1(热休克蛋白 70.1)和 XRE(X 反应元件)位点, 这

表明, 太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因参与对环境胁迫的响应以及对太平洋真宽水蚤生长发育的调控。

2.2 太平洋真宽水蚤 CRH-BP 序列比对及同源性分析

使用 DNAMAN8.0 进行多重序列同源比对, 将 Ep.CRH-BP 基因编码的氨基酸序列与部分桡足类及昆虫纲的 CRH-BP 基因进行比对(图 3), 并计算 Ep.CRH-BP 蛋白序列与比对序列之间的同源相似性(表 3)。Blast 结果显示, 太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*) CRH-BP 基因与近亲真宽水蚤(*Eurytemora affinis*)相似度为 63%, 与虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicus*)同源性为 42%, 与大型蚤(*Daphnia magna*)同源性 40%, 与昆虫纲同源性在 30%—45%之间, 与近亲真宽水蚤同源性最高。Ep.CRH-BP 基因属于 CRH-BP 家族基因成员。

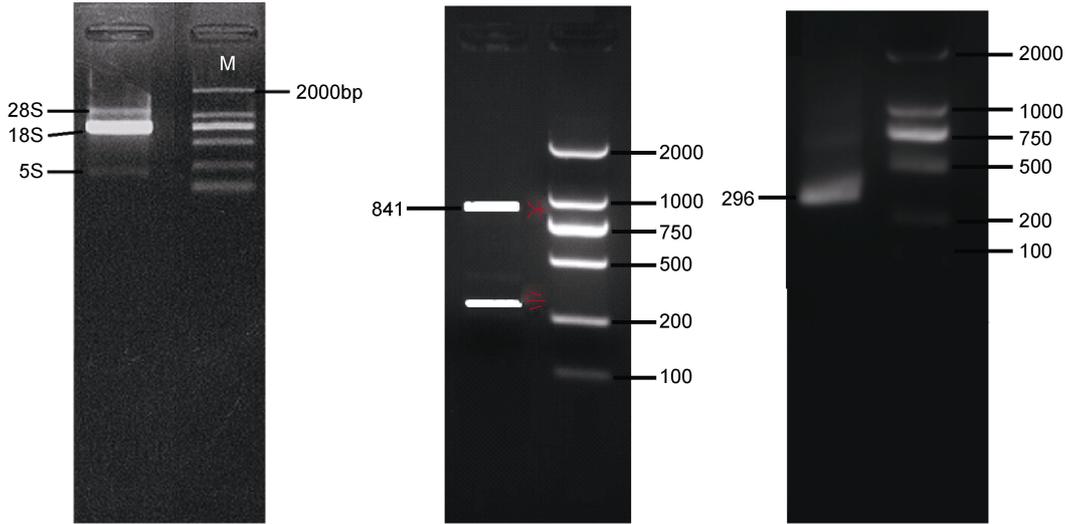


图 1 RNA, CRH-BP 5'/3'RACE 电泳图片

Fig.1 Electrophoresis patterns of RNA, and 5'/3' RACE of CRH-BP

```

1      TGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGCGTCTAAAACGACCAAGCTAATATGCTTGATTGCTTCTACAAGAG
79     AGAAATGCTGGTTGTTTACTTCTGGCAACTGTGTCTTACCCCTGTTTCTGTTTCTCCTCCTCCTCCCAACCA
1      M L V V L L L A T V S L P P C F C F S S S F P N Q
157    GCGTTATTTTCTGGTTTAAATCCCGTCTACGAACTAAGTCTGAGCAACCTGGCAGATTTACAGGTATCTGGCCC
26     R Y F P G F N P A L R T N S E P T L A D L Q V S G P
235    CCTCCTCGTACCAGGAGTCAAGCTTCTTCCGAGATACTTTAAAAATCAGTTTCAACCAAGGGCTTCCAGG
52     L L A T R Q S S F L P R Y F K K S V F K P R A F P G
313    GTGAAATCCTATAAGAGGAAGCGTGGCTTCTCCCAAGGAACTGTACATAAACCCAGGCTAAGCAGTACGCCCTGT
78     L N S Y K R K R G F S Q G T V H K P Q A K Q Y S P V
391    ACATGAACTAAGCGGTACAGCCCTTACATCAACCTAAGACTAAACGGTACAACCTGTCCAAGAACCAGTGGAAAGC
104    H E T K R Y S P S H Q P K T K R Y N P V Q E P V E A

      ↓ Hsp 70.1
469    TGATTGGAGTAAATTTGCCGCACATCGAGCAAAATTATAGATTGCATGACCGTGAAACAATCACTGATGGTAGTGAAC
130    D W S N L P H I E Q I I D C M T V E T I T D G S E T
547    GATCTGGTTTTTAAAGTCCAAGGGGGAGGCAGAAACATGTGGACTGTATATGTTGGTGAACCGACAGCAGCTGGGA
156    I W F F K S K G E A E T C G L Y I V G E P D S L V E
625    GCGACTGTGTAATAACTGGATGTTGACTGCTCTAATGGCCTCATCATGGTGTGTTAACGGGTGGGAGTTGAACGGAAA
182    A T V D K L D V D C S N G L I M V F N G W E L N G N
703    TATTTTCCGAGTAGTGAGGACCATCAGCTTCTCTGAAAGAAAGATCTGCAACGTTCTGCAATCAGGAGACACCACC
208    I F P S S E D H Q L P L K E R S A T F C N Q E T P P
781    TACGAAGGTTGTTGATCCAGCCAGACGCTGCAC TAGTCTTATAAGATCCCAACTCCTGGTGGGGGTTGAGTGT
234    T K V V V S S Q N A A L V S Y K I P T P G E G F S V
859    CAGAGTTAAACCATCCGTAACCCAGATCCTTGAATATACTGATGTCATCTCTTAATGGATACTTTACTCTTCAAAA
260    R V K T I R N P D P C N I L M S S L N G Y F T L Q N

      ↓ XRE                                ↓ Hsp 70.1
937    CCATGGAATAGCACGGAACGTGTTCTTTAAC CACGCTTCTGTTCCCGGCAACTTTGCACTCCTCTCATGGATGTTGG
386    H G I A R N C S L T T L L F P A N F A L L S L D V G
1015   AGAACCCACAGGGCTAAAAGGAGCAAGACTCTGGGCTTCAAACCTCAGTGTCTACTTTCATGGATGGTCCGACTACAT
312    E P Y R A K R S Q D S G L Q T Q C S L H G W S D Y I
1093   TGAGCTCGGTGGAAGCATGGAGCTTGACTCAACAAATCTTGTACCTCGGAACTATCTGCGGATTTGATGCCAAACC
338    E L G G S M E L D S T N L V T S E T I C G F D A K P
1171   AATTGAAAAGGATTGACTGTGTTGTGCGGTTCTAGCAGTGCAGTGCCTGTTCCAGTGGGAACCTTGAAGAATTCAGT
364    I E K G L T V L C G S S T V R L V S S G N F E N S V
1249   GTCCGTCTACATAAAGCTGCCGAAGATGAAGACCTGGATTTCAACACAAATCATGTAATCAGCTGTCCCTGAGCCTA
390    S V Y I K A A E D E D L D F N T N H V I S C P E H *
1327   GACCTGTTCCAGCTGTCTGAACACTATAGATCTGCTCGAGCAATCAGGATATTCAAATTTTTTATTATTAATGTT
1405   CCAAAATGGCTTCAAAAATATTCAGTATACATGATTCAAGTACTTTAACAGGATATGTCAGGTTGTGAATTTAAG
1483   ATAAATAATGTTCCCGTATAATGTTTTTTGTTGACTGAATATACATTGCTGAACTCATCTTAAATGTTAGTAGTC
1561   TTATGACCATCTACATTTATAATTTATGTTTTCTTGTGCTGGAATTAGGTACCAATTTTTATCCACACAGTGAATAA
1639   TTGAGCAAAAACCTCAACACAGAATACAGATTTGTAATTTATTCATTTAAATTTATTTTACTATCATTTAGTACT
1717   ATTACAACAACCTCCACGAATAGAGACAAAACAAAACCTTGTAAAGTGACCTGAGGGAAGACACTGTTTTTCT
1795   CTATGCACAAAATGCCAAGATAACTTACATGACTAGAGGCTTTTGTATGTGATGTGATGCGAGCATATGTAGATTTGT
1873   ATTTATATATGCCGTCTTTATTTATAATGTAATTATAGTGGATGGAG AATAAAAAGTTTCAATTTCAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 CRH-BP cDNA 序列及编码氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Ep.CRH-BP

注: “*”表示终止密码子, 预测的 XRE 及 Hsp70.1 家族结构特征用红色箭头标示, 终止信号用横线标示。XRE(X 反应元件), Hsp70.1(热休克蛋白 70.1)

CRH-BP[Eurytemora_pacifica]	MLVLLLATVSLPPCCFCFSSSPFNQRY.FFGFNPALRTNSEPTLADLQVSGPLL.....ATRQSSFLPRYFKKSVFKPRAFPGLNSYK	82
CRH-BP[Eurytemora_affinis]	...MLVFLFTLFAISSTYSAFATQRHFFPGLDVTTRNTEPTLADLQVSKPHHVARPSLSAFHQLEGHQYKRRVQKPRHFASAALNK	87
CRH-BP [Eurytemora_affinis]	0
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]	0
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]	0
CRH-BP [Daphnia_magna]	0
Consensus		
CRH-BP[Eurytemora_pacifica]	RKRGSFQGTVHKPQAKQYSPVHETKRYSPSHQPKTKRYNFVQEPVADWSNI...HIEQIICMTVETITIGSETIWFFFKSGEAE...TCGY	171
CRH-BP[Eurytemora_affinis]	QKRGSVHS.....QEMAFG.WDSYENIEQITTCMTVGTMGSEEEITWFFRSQGETP...TCGY	142
CRH-BP [Eurytemora_affinis]QDRRAELKSRKVEKRNVEK...LEERNLE.....DCMTVSHSESG...IFSYSSEFSE...VCGLY	56
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]EPQWITTCMTVASRPRYIYQ...STEGS.TCGVY	33
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]EPQWITTCMTVASRPRYIYQ...STEGS.TCGVY	33
CRH-BP [Daphnia_magna]IDTCMTVTSKGFHYKASPKDEVEP...TCGY	33
Consensuscmtv.....cg y	
CRH-BP[Eurytemora_pacifica]	IVGEPST...VEATVDKLDVDCSN.GLIMVFNWELNNGNIFPSSDHLPLKERSATFCNCTEPTKV.VVSSQNAALVSKIPETPGEGF	257
CRH-BP[Eurytemora_affinis]	IVGEPST...VEATVDKLDVDCSN.GLIMVFNWELNNGNIFPSSDHLPLKERSATFCNCTEPTKV.VVSSQNAALVSKIPETPGEGF	228
CRH-BP [Eurytemora_affinis]	LVGRBNKLVVTLCTAE.SGEGDQ.DIIVVFNWELNNGHVPSSDQDHLPLKERSATFCNCTEPTKV.VVSSQNAALVSKIPETPGEGF	143
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]	IAPNPDI...VEIETETVPCDG.SLIAHLRWELNNGHVPSSDQDHLPLKERSATFCNCTEPTKV.VVSSQNAALVSKIPETPGEGF	120
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]	IAPNPDI...VEIETETVPCDG.SLIAHLRWELNNGHVPSSDQDHLPLKERSATFCNCTEPTKV.VVSSQNAALVSKIPETPGEGF	119
CRH-BP [Daphnia_magna]	ITTDPRQ...VEIETETVPCDG.SLIAHLRWELNNGHVPSSDQDHLPLKERSATFCNCTEPTKV.VVSSQNAALVSKIPETPGEGF	119
Consensus	p c gweln p dh lp r c ssqn a f	
CRH-BP[Eurytemora_pacifica]	SVRVTRNPLPCNIIILMSSNGYFTLONGIARNCSTTLFFPANFALLSLDVGEPY...R.....AKRSQDSLQIQ	327
CRH-BP[Eurytemora_affinis]	SVRVTRNPLPCNIIILMSSNGYFTLONGIARNCSTTLFFPANFALLSLDVGEPY...R.....AKRSQDSLQIQ	298
CRH-BP [Eurytemora_affinis]	TVSVEYDNPFCNIVLMSMTGVFKISNGEPRNCSTTLFFPAKVKILVNVGSRFKRSVR.....RSRGRFNIIIPR	218
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]	SFRVREPNPLPCNIIILMSSNGYFTLONGIARNCSTTLFFPANFALLSLDVGEPY...R.....AKRSQDSLQIQ	184
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]	SFRVREPNPLPCNIIILMSSNGYFTLONGIARNCSTTLFFPANFALLSLDVGEPY...R.....AKRSQDSLQIQ	183
CRH-BP [Daphnia_magna]	SIRVNVYKNEPCNIIILMSSNGYFTLONGIARNCSTTLFFPANFALLSLDVGEPY...R.....AKRSQDSLQIQ	203
Consensus	v np pcn l n g n s tt lfpa g	
CRH-BP[Eurytemora_pacifica]	CSLHNSDYIEIIGSSMLDSTNIVISITCGFDAPTE.KGLTVLCGSSTVRVVSSGFNSVSYVYK.AAEDDLLENINHVISCFE	413
CRH-BP[Eurytemora_affinis]	CSQHNSDYIEIIGSSMLDSTNIVISITCGFDAPTE.KGLTVLCGSSTVRVVSSGFNSVSYVYK.AAEDDLLENINHVISCFE	384
CRH-BP [Eurytemora_affinis]	CSSEMGEKDLLELGA.DLSSNLETRSTICGFPKESI.KDLTVLCGSSTVRVVSSGFNSVSYVYK.AAEDDLLENINHVISCFE	303
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]DKVEIIGSSMLKSAHLATKETEPCETPK.HGKSTVLCGSSTVRVVSSGFNSVSYVYK.AAEDDLLENINHVISCFE	265
CRH-BP [Tigriopus_japonicus]DKVEIIGSSMLKSAHLATKETEPCETPK.HGKSTVLCGSSTVRVVSSGFNSVSYVYK.AAEDDLLENINHVISCFE	264
CRH-BP [Daphnia_magna]	CEKKNMSDYIOLIGSSMLDSTNIVISITCGFDAPTE.KGLTVLCGSSTVRVVSSGFNSVSYVYK.AAEDDLLENINHVISCFE	279
Consensus	d gg c t cg tvr vs n dl	

图3 Ep.CRH-BP 氨基酸序列对比

Fig.3 Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequence of Ep.CRH-BP gene

使用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树，计算方法采用 Maximum Likelihood method，重复计算 10000 次。表 3 详细列出构建系统进化树所用物种名及 GenBank 序列登录号等相关信息。进化树结果如图 4 所示，太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因与近亲真宽水蚤

(*E. affinis*)位于同一进化枝，同源性分析结果显示二者氨基酸序列相似度最高，表明二者亲缘关系最近，总体上，桡足类(Copepods)与温带臭虫(*Cimex lectularius*)系统进化发育树聚为一簇，与其它昆虫类的进化关系较远。

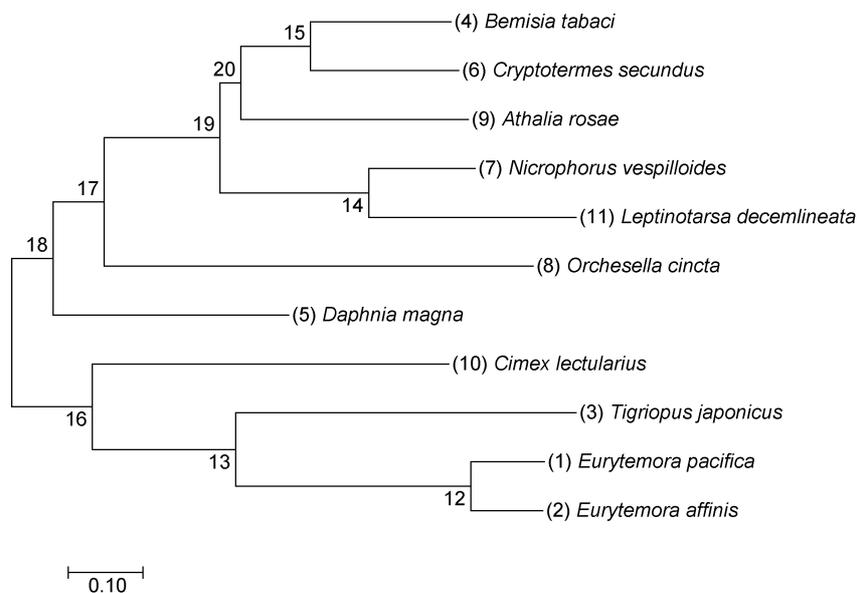


图4 CRH-BP 的系统进化树

Fig.4 Molecular phylogenetic analysis of CRH-BP by maximum likelihood method

表 3 序列分析所用 CRH-BP 家族基因
Tab.3 CRH-BP family neuropeptide for sequence analysis

序列名称	GenBank 登录号	来源物种	同源性
太平洋真宽水蚤 CRH-BP	MF289345	<i>Eurytemora pacifica</i>	
近亲真宽水蚤 CRH-BP	XP023333201.1	<i>Eurytemora affinis</i>	63%
虎斑猛水蚤 CRH-BP	ABK76307.1	<i>Tigriopus japonicus</i>	42%
烟粉虱	XP018898271.1	<i>Bemisia tabaci</i>	42%
大型蚤 CRH-BP	KZS20787.1	<i>Daphnia magna</i>	40%
截头堆砂白蚁 CRH-BP	XP023709297.1	<i>Cryptotermes secundus</i>	40%
翅目 CRH-BP	XP017770809.1	<i>Nicrophorus vespilloides</i>	40%
长角跳虫 CRH-BP	ODN06056.1	<i>Orchesella cincta</i>	38%
茭菁叶蜂 CRH-BP	XP012260479.1	<i>Athalia rosae</i>	45%
温带臭虫 CRH-BP	XP014254909.1	<i>Cimex lectularius</i>	41%
马铃薯甲虫 CRH-BP	XP023018565.1	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	40%

2.3 太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因的生物信息学分析
使用 DNAMAN 软件对 CRH-BP 蛋白进行氨基酸疏水性分析, 结果如图 5, 氨基酸的疏水性最大为

3.93, 最小值为-3.15, 亲水氨基酸为 251 个, 疏水性氨基酸 163 个, 亲水性氨基酸显著多于疏水性氨基酸, 推测该蛋白为亲水性蛋白。

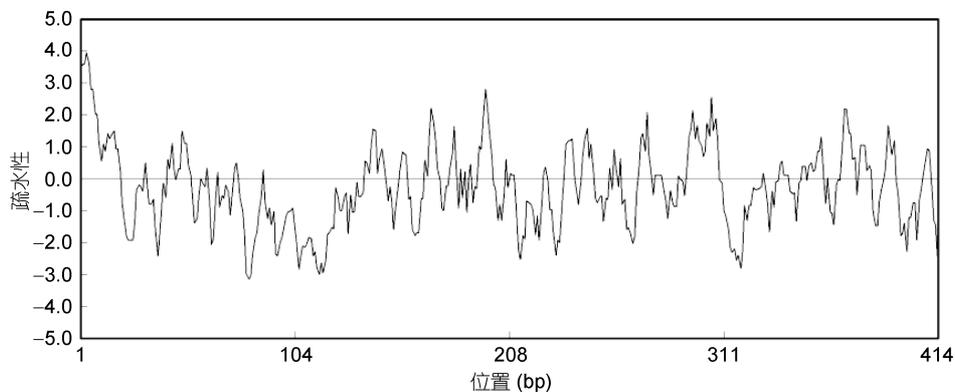


图 5 Ep.CRH-BP 氨基酸疏水性分析

Fig.5 Analysis of Ep.CRH-BP hydrophobic amino acid

使用 TMHMM 2.0 在线软件对蛋白进行跨膜区分析, 结果如图 6 所示; 该蛋白的氨基酸具有明显的跨膜区。使用 SignalP 4.0 在线软件对蛋白质信号肽进行预测, 结果如图 7 所示, CRH-BP 蛋白存在一个由 17 个氨基酸组成的信号肽。使用 Swiss Pdb Viewer4.0.1 软件对 CRH-BP 蛋白进行功能位

点模式(Prosite pattern)分析(见表 4), 结果显示该蛋白存在 6 个蛋白翻译后修饰位点: PS00001 N-糖基化位点; PS00002 糖胺聚糖附着位点; PS00005 磷酸化位点; PS00006 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; PS00008 豆蔻酰化位点; PS00342 微体 C-末端的定位信号。

表 4 CRH BP 蛋白进行功能位点模式(Prosite pattern)分析
Tab.4 CRH BP proteins analyzed by functional site patterns (Prosite pattern)

位置	名称	序列
PS00001	N-glycosylationsite	N-{P}-[ST]-{P}
PS00002	Glycosaminoglycanattachmentsite	S-G-x-G
PS00005	ProteinkinaseCphosphorylationsite	[ST]-x-[RK].
PS00006	CaseinkinaseIIphosphorylationsite	[ST]-x(2)-[DE]
PS00008	N-myristoylationsite	G-{{EDRKHPFYW}}-x(2)-[STAGCN]-{P}
PS00342	MicrobodiesC-terminaltargetingsignal	[STAGCN]-[RKH]-[LIVMAFY]>

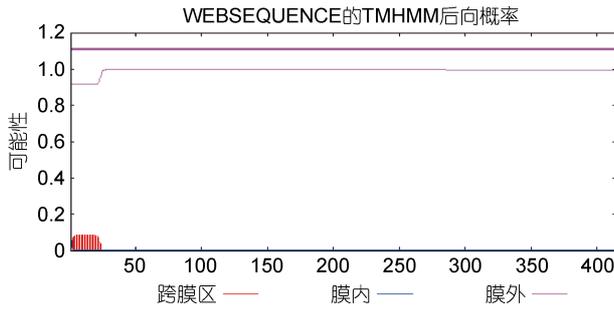


图 6 Ep.CRH-BP 氨基酸序列跨膜区分析

Fig.6 Transmembrane region analysis of Ep.CRH-BP amino acid sequence

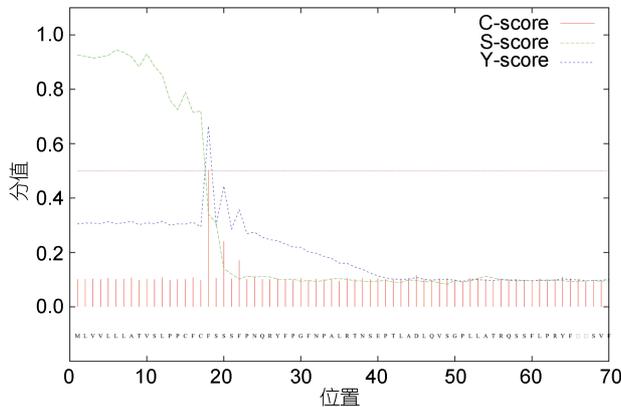


图 7 Ep.CRH-BP 信号肽预测结果

Fig.7 The signal peptide prediction of Ep.CRH-BP

2.4 太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因表达分析

通过 real time PCR 方法对 Ep.CRH-BP 基因在海水盐度、温度及 pH 变化三种环境因子胁迫下的表达情况进行检测,以太平洋真宽水蚤 18S rRNA 基因作为内参基因,选取对照组太平洋真宽水蚤的表达量作为参照,每个处理下做了 3 个重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量,并用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析。实验结果表明,Ep.CRH-BP 基因在不同环境因子胁迫下均会出现显著性表达,具有一定的时间梯度表达性与浓度梯度表达性特征(图 8, 图 9, 图 10)。

分析结果如下: Real-time PCR 结果表明,盐度胁迫应激条件下,CRH-BP 基因表达上调,盐度为 10 时无显著影响,48h 内基因表达量逐渐升高,24h 内处于较稳定状态;盐度为 45 刺激 48h,基因表达量显著升高,盐度 45 刺激造成的基因上调幅度明显大于盐度 10。6h 内,低温和高温胁迫下 CRH-BP 基因表达与温度为 20℃ 相比无明显变化,15℃ 刺激 3h 出现基因表达轻微上调,12h、24h 基因表达量显著上调。25℃ 刺激 24h 内基因表达量逐渐上调,24h 显著升高,48h 降

低。pH 6.20 及 pH 7.30 刺激 3h 基因表达量显著上升,3h 后基因表达量下降无显著性。

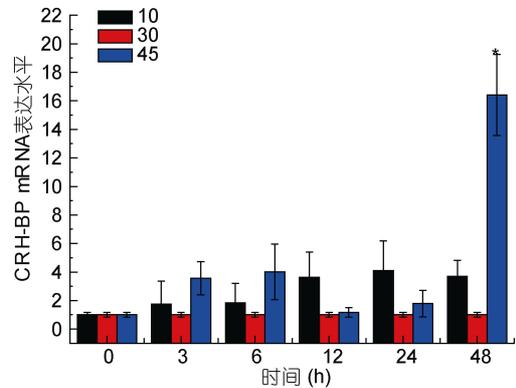


图 8 盐度胁迫 Ep. CRH-BP mRNA 表达水平

Fig.8 The mRNA expression levels of Ep. CRH-BP under salinity stress

注: 柱上短线表示平均值±标准差, 星号表示有显著差异($P<0.05, n=3$)

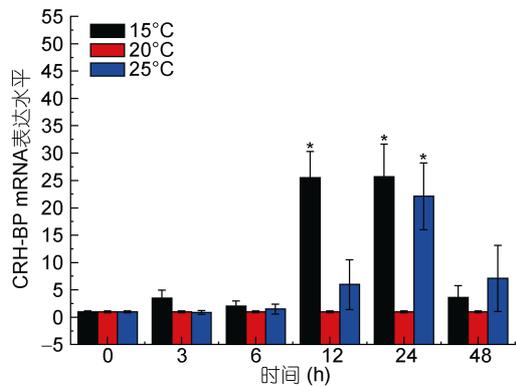


图 9 温度胁迫 Ep. CRH-BP mRNA 表达水平

Fig.9 The mRNA expression levels of Ep. CRH-BP under temperature stress

注: 柱上短线表示平均值±标准差, 星号表示有显著差异($P<0.05, n=3$)

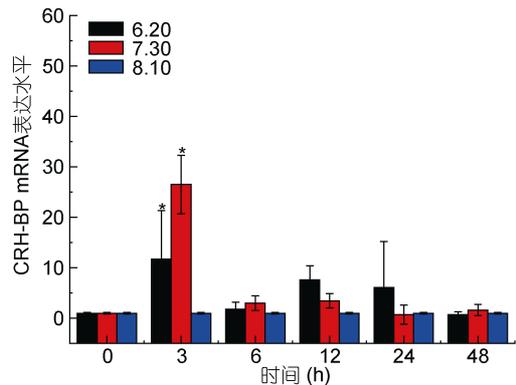


图 10 海水酸化 Ep. CRH-BP mRNA 表达水平

Fig.10 The mRNA expression levels of Ep. CRH-BP under seawater acidification

注: 柱上短线表示平均值±标准差, 星号表示有显著差异($P<0.05, n=3$)

3 讨论

本研究首次克隆了太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因序列全长 1 950bp, 其中完全开放阅读框为 1 245bp 编码 415 个氨基酸, 5'非编码区 841bp, 3'非编码区 296bp, 分子量约 45.816kDa, 理论等电点 5.87。CRH-BP 编码蛋白质疏水性分析显示为亲水性蛋白质。通过与其他物种 CRH-BP 氨基酸序列进行比对分析, Ep.CRH-BP 与近亲真宽水蚤亲缘性最高, 其蛋白序列当中有明显的跨膜结构域和信号肽, 表明 CRH-BP 蛋白质为可溶性蛋白。蛋白质一级结构序列是其蛋白质特定功能的结构基础。太平洋真宽水蚤的守恒残基数目及位点较多, 包括脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、天冬氨酸(D)、组氨酸(H)、精氨酸(R)、半胱氨酸(C)等 26 个保守位点, 可以推测这些种类的功能相似性很大。这些保守位点对该基因功能的实现有很大的影响, 为 CRH-BP 功能的研究提供结构基础(蒲龄, 2014)。蛋白后翻译位点分析显示该蛋白含糖基化、磷酸化等多个功能位点, 对于更深一步研究蛋白质的稳定性结构、主要定位及功能作用的发掘是有帮助的。为了比较 CRH-BP 基因的种系发育情况, 使用 Maximum likelihood method 法构建系统发育树, 太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因与近亲真宽水蚤(*E. affinis*) 位于同一进化枝, 同源性分析显示二者氨基酸序列相似度最高, 表明二者亲缘关系最近。

哺乳动物和某些鱼类中, CRH-BP 作用机制及生理功能已经得到明确定义(Majzoub, 2006), 哺乳动物中 CRH-BP 是关键应激调节因子, 通过与 CRH 或亲和力较高的 CRH 类似物结合从而抑制 CRH 作用, 因此哺乳动物应激过程中 CRH-BP 主要起分子伴侣作用。以往的急性抑制应激实验中发现, 应激后 CRH-BP 基因的表达水平比正常状况下的表达水平均有显著提高(Seasholtz *et al.*, 2002), 急性应激导致小鼠中 CRH-BP 基因表达水平提高 2—3 倍且这种高水平表达从抑制开始会持续两个小时左右(Chatzaki *et al.*, 2002)。Doyon 等人在早期对虹鳟的研究中发现, 追逐和限制生活空间等物理压力会导致虹鳟 CRH-BP 基因表达量上调。并进一步提出 CRF-BP 参与调节虹鳟应激轴的活性, 可能是通过隔离 CRH 受体, 这可能有助于恢复应激后稳态(Doyon *et al.*, 2005)。温度升高同样导致草鱼不同组织中 CRH-BP 基因表达上调(蒲龄, 2014)。Mazon 等(2006)的研究表明, CRH-BP 在鲤鱼鳃和皮肤中表达, 以响应急性应激和博氏锥

虫引起的寄生虫感染。桡足类相关研究目前主要是针对虎斑猛水蚤, 在温度及盐度改变造成的生理压力下, 虎斑猛水蚤 CRH-BP 基因表达量随温度和盐度的升高而上调, 这两种压力条件下 CRH-BP 的上调表明 CRH-BP 基因调节虎斑猛水蚤应激反应(Lee *et al.*, 2008)。但仍需进一步的研究来确定 CRH-BP 在桡足类中应激反应过程中的作用机制。温度、盐度和 pH 是影响桡足类生长和存活的环境因子(夏品华等, 2011), 制约海洋生物的生长、发育、生殖、蜕皮、免疫等生理机能(陈光荣等, 2010; 王庆等, 2012)。本研究通过荧光定量 PCR 法检测太平洋真宽体内 CRH-BP 基因在不同环境因子胁迫下的表达情况, 探讨了盐度、温度及海水酸化三种环境条件胁迫与太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因相关性, 发现在应激胁迫后均有表达, 但随浓度时间变化有所不同。结果显示: 低盐 10 胁迫下整体基因表达比较稳定; 高盐 45 胁迫下, 48h 基因表达量显著升高。低温 15°C 胁迫 12h 后基因表达量显著上调。高温 25°C 胁迫 24h 内基因表达量逐渐上调, 24h 显著升高。海水酸化胁迫下 3h 具有显著性。预示着 CRH-BP 基因表达量上调, 对于机体应激反应的缓解起重要作用。

大量研究证明脊椎动物与无脊椎动物中 CRH-BP 都起重要调节作用, 但对桡足类中调控机制的了解尚待完善。对于太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因的序列分析和表达检测, 为研究其他桡足类乃至甲壳类生物体内免疫、防御机制等提供了重要的参考资料。

4 结论

本研究利用 RACE 技术首次克隆获得太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因全长 cDNA 序列, 并利用多种生物软件进一步分析其生物学信息特征。采用 qRT-PCR 对三种环境因子胁迫下 CRH-BP 基因在太平洋真宽水蚤体内的差异表达情况进行检测并进行数据分析。研究结果显示太平洋真宽水蚤 CRH-BP 在生态毒理学及环境胁迫研究中良好的应用前景, 也为进一步探讨太平洋真宽水蚤 CRH-BP 基因相关功能性研究奠定基础, 为桡足类 CRH-BP 基因的克隆研究及系统分类与演化提供依据。

参 考 文 献

- 王 庆, 刘丽君, 杨宇峰, 2012. 南方某水库轮虫群落特征及其对环境因子的响应. 生态学报, 30(13): 3385—3395
李光福, 2015. 四种环境因子对指状伪镖水蚤摄食、繁殖和发育的影响. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 15—20

- 吴利, 冯伟松, 张堂林等, 2011. 春、秋季武湖浮游动物群落特征及其与环境因子的关系. 水生态学杂志, 32(2): 31—37
- 陈光荣, 雷泽湘, 谭镇等, 2010. 环境因子对广东城市湖泊后生浮游动物的影响. 水生态学杂志, 3(4): 28—32
- 夏品华, 马健荣, 李存雄等, 2011. 红枫湖水库冬春季浮游生物群落与环境因子的典范对应分析. 环境科学研究, 24(4): 378—386
- 蒲龄, 2014. 草鱼 CRH-BP 基因 cDNA 全长克隆与表达分析. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 38—40
- Behan D P, Linton E A, Lowry P J, 1989. Isolation of the human plasma corticotrophin-releasing factor-binding protein. *Journal of Endocrinology*, 122(1): 23—31
- Chan R K W, Vale W W, Sawchenko P E, 2000. Paradoxical activational effects of a corticotrophin-releasing factor-binding protein “ligand inhibitor” in rat brain. *Neuroscience*, 101(1): 115—129
- Chatzaki E, Margioris A N, Gravanis A, 2002. Expression and regulation of corticotrophin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) in rat adrenals. *Journal of Neurochemistry*, 80(1): 81—90
- Doyon C, Trudeau V L, Moon T W, 2005. Stress elevates corticotrophin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein mRNA levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology*, 186(1): 123—130
- Huisling M O, Flik G, 2005. The remarkable conservation of corticotrophin-releasing hormone (CRH)-binding protein in the honeybee (*Apis mellifera*) dates the CRH system to a common ancestor of insects and vertebrates. *Endocrinology*, 146(5): 2165—2170
- Lee K W, Rhee J S, Raisuddin S *et al*, 2008. A corticotrophin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) gene from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 158(1): 54—60
- Linton E A, Wolfe C D A, Behan D P *et al*, 1988. A specific carrier substance for human corticotrophin releasing factor in late gestational maternal plasma which could mask the acth-releasing activity. *Clinical Endocrinology*, 28(3): 315—324
- Liu L, Yu X L, Meng F *et al*, 2011. Identification and characterization of a novel corticotrophin-releasing hormone-binding protein (CRH-BP) gene from Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*). *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 78(3): 161—175
- Majzoub J A, 2006. Corticotrophin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology*, 155(S1): S71—S76
- Mazon A F, Verburgvan-Van Kemenade B M, Flik G *et al*, 2006. Corticotrophin-releasing hormone-receptor 1 (CRH-R1) and CRH-binding protein (CRH-BP) are expressed in the gills and skin of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and respond to acute stress and infection. *Journal of Experimental Biology*, 209(3): 510—517
- Seasholtz A F, Burrows H I, Karolyi I J *et al*, 2001. Mouse models of altered CRH-binding protein expression. *Peptides*, 22(5): 743—751
- Seasholtz A F, Valverde R A, Denver R J, 2002. Corticotrophin-releasing hormone-binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals. *Journal of Endocrinology*, 175(1): 89—97
- Westphal N J, Seasholtz A F, 2006. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Frontiers in Bioscience*, 11: 1878—1891

cDNA CLONING AND EXPRESSION OF CRH-BP GENE OF COPEPOD *EURYTEMORA PACIFICA*

WANG Bin, WU Min-Min, HU Li-Teng, ZHANG Jian-She

(Marine Science College of Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316022, China)

Abstract CRH-BP (Corticotropin releasing hormone binding protein) is a glycosylated protein in a high affinity with corticotropin releasing hormone (CRH). CRH induces the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and CRH-BP can inhibit the release of ACTH by combining CRH. In this study, *Eurytemora pacifica* was selected as the research subject from which the full-length cDNA sequence of CRH-BP gene was obtained by RT-PCR and RACE methods. The full-sequence of CRH-BP (GenBank accession number: MF289345) was 1950bp, having a complete open reading frame of 1245bp encoding 415 amino acids, 5' and 3' non-encoding ones for 841bp and 296bp, respectively, the molecular weight of 45.816kDa, and isoelectric point of 5.89. Sequence comparison indicated high homology in amino acid sequence of CRH-BP cDNA to *E. affinis*, sharing 6 protein post-translational modification and protein family sequence tagged sites, an obvious signal peptide, and transmembrane domain. CRH-BP mRNA expression analysis of *E. pacifica* showed that Ep.CRH-BP gene expression could be up-regulated under salinity, temperature, or pH stress, depending on temporal and concentration conditions. Therefore, these results shall be helpful to further explore the structure and function of the copepod CRH-BP gene, and to provide a basis for studying the molecular mechanism of stress response from the copepod.

Key words CRH-BP; *Eurytemora pacifica*; gene cloning; environmental factors; RT-PCR