

# 编码中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因的 cDNA 片段克隆和序列分析\*

王在照 相建海<sup>1)</sup> 崔朝霞

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于 2000 年 3 月提取中华绒螯蟹眼柄总 RNA, 以此为模板, 根据日本对虾的神经肽 Pej-SG-IV 设计兼并引物, 进行 RT-PCR 扩增, 在适宜的反应条件下, 获得一特异性的产物, 将该片段克隆到载体中进行测序。结果表明, 中华绒螯蟹特异性 cDNA 片段由 213 个碱基组成。在生物信息数据库中查找由该 cDNA 推定的氨基酸序列的相似序列, 可以发现大量甲壳动物的 CHH 家族神经肽与它相似。在所有相似序列中, 甲壳动物的蜕皮抑制激素 (MIH) 与它的相似度最高, 这一结果提示由中华绒螯蟹的眼柄特异性 cDNA 片段推定的氨基酸序列可能是它的 MIH 片段。

**关键词** 中华绒螯蟹, 蜕皮抑制激素, cDNA 克隆, 序列分析

**中图分类号** Q75

甲壳动物眼柄中的 X-器官窦腺复合体能够合成一些调控生殖、发育和蜕皮的神经激素, 它们包括甲壳动物高血糖激素 (Crustacean Hyperglycemic Hormone, CHH)、性腺抑制激素 (Gonad-inhibiting Hormone, GIH)、蜕皮抑制激素 (Molt-inhibiting Hormone, MIH) 和大颚器官抑制激素 (Mandibular Organ-inhibiting Hormone, MOIH)。这些神经激素在结构上具有较高的相似性, 它们组成了甲壳动物特有的 CHH 家族神经肽 (De Kleijn *et al.*, 1995a)。MIH 控制甲壳动物的蜕皮, 在蜕皮间期血淋巴中高水平的 MIH 抑制 Y-器官的蜕皮酮的合成和释放, 因此, MIH 在蜕皮周期的多数时间内抑制 Y-器官的活动, 只有当 MIH 的分泌量减少或停止时蜕皮现象才会发生 (Spaziani *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1990)。目前已经在很多蟹类克隆了 MIH 基因, 它们包括: 普通滨蟹 *Carcinus maenas* (Webster *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1993)、美味优游蟹 *Callinectes sapidus* (Lee *et al.*, 1995)、普通黄道蟹 *Cancer pagurus* (Chung *et al.*, 1996)、首长黄道蟹 *Cancer magister* (Umphrey *et al.*, 1998) 和斑纹蜆 *Charybdis feriatius* (Chan *et al.*, 1998)。

我国对中华绒螯蟹的研究, 以前仅限于胚胎发育、幼体形态和二秋龄蟹组织学和细胞学 (顾志敏等, 1997; 堵南山等, 1992; 陈炳良等, 1992), 目前对于中华绒螯蟹神经内分泌的

\* 中国科学院知识创新工程项目, ZKCX-211 号; 国家自然科学基金资助项目, 40106018 号; 山东省重点资助项目, 011110104 号。王在照, 男, 出生于 1969 年 5 月, 博士, 副研究员, E-mail: [shrimpgenetics@ms.qdio.ac.cn](mailto:shrimpgenetics@ms.qdio.ac.cn)

1) 通讯作者

收稿日期: 2001-04-02, 收修改稿日期: 2001-10-26

研究主要有:孙金生等(2001)采用膜片钳技术测定不同甾醇类物质对河蟹眼柄神经分泌细胞的影响,顾志敏等(1991)研究了切除眼柄对河蟹的蜕皮、生长和性腺发育的影响,姜仁良等(1992)研究了蜕皮酮与河蟹的生长、蜕皮及性腺发育的关系。而对于河蟹的生长发育及繁殖的神经内分泌调控机制研究很少,鉴于河蟹养殖生产中存在的性早熟等问题,有必要首先对它的神经内分泌因子的结构和功能开展研究工作。为了确定 MIH 的生理活性和分子作用机制,必须首先得到这种神经肽。从克隆它的基因入手,根据其基因的核苷酸序列反推氨基酸序列,是一种比较省时省力的途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

处于蜕皮间期的成体中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* (体重为 75—100g)取自江苏省赣榆县下口育苗厂。根据日本对虾神经肽 Pej-SG-IV 的第 5—12 个氨基酸(NTCRGVMG)和第 69—77 个氨基酸(WISILNAGQ)分别设计上游引物 P<sub>1</sub>:5' AACAC(AGCT)TGC(AC)G(AGC)G(GC)GGT(GC)ATGGG3' 和反向引物 P<sub>2</sub>:5' CC(GC)GGTT(AGC)A(AG)GAT(AGCT)CT-GATCCA3',由上海 Sangon 公司合成。

### 1.2 RNA 的提取

剪切中华绒螯蟹的眼柄,除去外壳和色素组织,得到的柔软神经组织用异硫氰酸胍法提取眼柄总 RNA。用无 RNase 的 DNase 处理总 RNA 并除去 DNA 污染,利用变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,利用紫外分光光度计(DU650, Beckman)测定眼柄总 RNA 的浓度。

### 1.3 利用 RT-PCR 方法扩增中华绒螯蟹眼柄特异性 cDNA

以眼柄总 RNA 为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物,进行反转录反应,反转录的反应体积为 20 $\mu$ l,反应条件为:1 $\times$  反转录缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, 8mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 30mmol/L KCl, 10mmol/L DTT),终浓度为 2mmol/L 的 dNTP, 25pmol Oligo(dT)<sub>18</sub>, M-MLV 反转录酶 5U,在 37 $^{\circ}$ C 下培育 2h。直接以反转录产物为模板进行 PCR 扩增,反应体积为 25 $\mu$ l,反应条件为:1 $\times$  PCR 缓冲液,0.2mmol/L dNTP,引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 分别为 25pmol, Taq DNA 聚合酶 2U。反应在 PCR 扩增仪(PE 9600)上进行 35 个循环,每一个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 0.5min,在 57—65 $^{\circ}$ C 范围内退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,在第一个循环之前 94 $^{\circ}$ C 变性 5min,在最后一次循环之后延伸 10min。同时设以下对照:以眼柄 cDNA 为模板,以单引物 P<sub>1</sub> 或 P<sub>2</sub> 的扩增;以中华绒螯蟹基因组 DNA 为模板,以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物的扩增。

### 1.4 序列测定

从琼脂糖中将预期大小的 cDNA 片段切下并纯化,将纯化的 DNA 片段克隆到 pUCm-T 载体(上海生工生物工程技术公司)中用于测序,利用 DNA 测序试剂盒(Perkin Elmer 公司)在 ABI PRISM 310 自动基因分析仪测序。

## 2 实验结果

### 2.1 中华绒螯蟹眼柄总 RNA 的提取

采用异硫氰酸胍提取法提取中华绒螯蟹的眼柄总 RNA,得率较高。在剪取眼柄中的神经组织时容易携带色素组织,需要进行酸酚和氯仿的多次抽提,用紫外分光光度计检测 OD<sub>280</sub>,发现经过这种处理的眼柄总 RNA 中蛋白含量较低,经过去除 DNA 污染的处理后,

可以作为 RT-PCR 的模板。对用上述方法提取的眼柄总 RNA 进行变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,发现其完整性较好(图 1)。

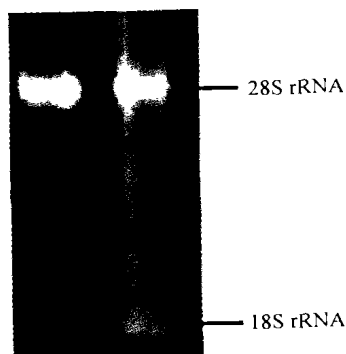


图 1 中华绒螯蟹眼柄总 RNA 的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of total RNA of the eyestalk from the crab *Eriocheir sinensis*

## 2.2 中华绒螯蟹特异性 cDNA 片段的克隆

以眼柄总 RNA 为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物, 反转录得到眼柄 cDNA。直接以反转录产物为模板, 以根据日本对虾神经肽 Pej-SG-IV 设计的兼并引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物进行 PCR 扩增, 通过改变退火温度、Mg<sup>2+</sup> 的浓度等而优化 PCR 反应条件, 最终获得 210bp 左右的特异性 PCR 产物。而对照组中, 以基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增不能获得这条带; 以反转录产物为模板, 以单引物 P<sub>1</sub> 或 P<sub>2</sub> 为引物, 也不能得到这条带。

## 2.3 重组 DNA 的获得

将特异性 cDNA 片段连到 pUCm-T 载体上, 将重组载体转化至大肠杆菌, 筛选阳性克隆后大量繁殖细菌。得到的重组 DNA 采用 PCR 扩增的方法检测是否包含目的片段, 以重组 DNA 为模板, 以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物扩增可以得到与特异性 cDNA 片段大小相同的带, 因此可以确定特异性 cDNA 片段已克隆到 T-载体中, 经过纯化的这种重组 DNA 可以作为测序 PCR 的模板。

## 2.4 测序结果

以含有目的片段的重组 DNA 为模板, 以载体上的 M13 反向引物为引物进行测序 PCR, 利用 ABI PRISM 310 基因自动分析仪测序, 测序结果见图 2。

1	AAC ACC TGC AGC GCG GTG ATG GGA AAC CGT GAC ATG TAC AGA AAG	45
1	Asn Thr Cys Ser Ala Val Met Gly Asn Arg Asp Met Tyr Arg Lys	15
46	GTG GAG CGT GTT TGC GAG GAC TGC ACC AAT ATC TAT CGG TTA CCA	90
16	Val Glu Arg Val Cys Glu Asp Cys Thr Asn Ile Tyr Arg Leu Pro	30
91	CAG CTG GAT GGT TTA TGC AGA AAT CGA TGC TTC AAT AAT CAG TGG	135
31	Gln Leu Asp Gly Leu Cys Arg Asn Arg Cys Phe Asn Asn Gln Trp	45
136	TTC CTG ATG TGC CTT CAC TCG GCC AAG CGG GAG GCC GAA CTC GAC	180
46	Phe Leu Met Cys Leu His Ser Ala Lys Arg Glu Ala Glu Leu Asp	60
181	CAT TTC AGA CTC TGG ATC AGA ATC CTG AAC CCG	213
61	His Phe Arg Leu Trp Ile Arg Ile Leu Asn Pro	71

图 2 中华绒螯蟹眼柄特异性的 cDNA 片段及由它推断的氨基酸序列  
Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence from the crab *E. sinensis*

## 2.5 序列相似性的比较

以氨基酸序列的形式在基因数据库中查找, 可以发现测序得到的中华绒螯蟹眼柄的特异性 cDNA 序列有大量的相似序列, 其中包括日本对虾 MIH 和刀额新对虾的 MIH 等氨基酸序列相似性非常高的序列。该序列由 213 个碱基组成, 由它推导的氨基酸序列是由

71 个氨基酸组成(图 2)。由图 3 计算出中华绒螯蟹眼柄的特异性 cDNA 推导的氨基酸序列与其他甲壳动物的 MIH 的同源性和相似性比例,通过与相似序列比较可以发现,中华绒螯蟹的这段推导的氨基酸序列与刀额新对虾和日本对虾的 MIH 的同源性和相似性比例最高,其同源性比例分别为 71.8% 和 70.4%,相似性比例分别是 84.5% 和 81.7%。与斑纹蛄、普通黄道蟹、普通滨蟹、味美优游蟹等蟹类及克氏原螯虾的 MIH 的同源性为 42.2%—43.6%,相似性为 60.6%—67.6%。而这段氨基酸序列与凡纳对虾的 MIH 的同源性和相似性都很低,分别为 28.1% 和 55%。

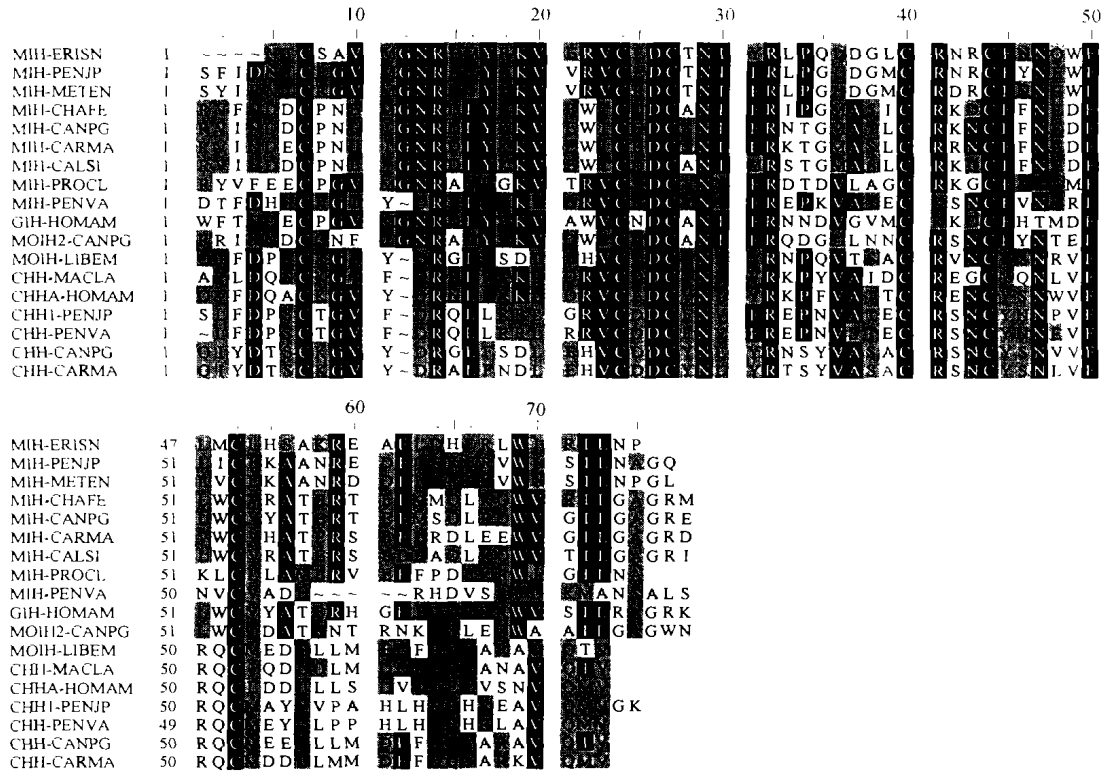


图 3 由 cDNA 推测的中华绒螯蟹部分 MIH 序列与其他甲壳动物的 CHH 家族神经肽的序列比较

Fig.3 Alignment of partial MIH from *E. sinensis* with CHH family neuropeptides from other crustaceans

图中,MIH-ERISN 为中华绒螯蟹的 MIH; MIH-PENJP 为日本对虾的 MIH(Ohira *et al.*, 1997); MIH-MENTEN 为刀额新对虾的 MIH(Gu *et al.*, 1998); MIH-CHAFE 为斑纹蛄的 MIH; MIH-CANPG 为普通黄道蟹的 MIH; MIH-CARMA 为普通滨蟹的 MIH; MIH-CALSI 为味美优游蟹的 MIH; MIH-PROCL 为克氏原螯虾的 MIH(Nagasawa *et al.*, 1996); MIH-PENVA 为凡纳对虾的 MIH; GIH-HOMAM 为美洲螯龙虾的 GIH; MOIH2-CANPG 为普通黄道蟹的 MOIH2(Wainwright *et al.*, 1996); MOIH2-LIBEM 为蜘蛛蟹 *L. emarginata* 的 MOIH(Liu *et al.*, 1997); CHH-MACLE 为沼虾 *M. lanchesteri* 的 CHH(Ju *et al.*, 1998)<sup>1)</sup>; CHHA-HOMAM 为美洲螯龙虾的 CHHA(De Kleijn *et al.*, 1995a, b); CHH1-PENJP 为日本对虾的 CHH1(Yang *et al.*, 1997); CHH-PENVA 为凡纳对虾的 CHH(Sefiani *et al.*, 1996); CHH-CANPG 为普通黄道蟹的 CHH(Chung *et al.*, 1998); CHH-CARMA 为普通滨蟹的 CHH(Kegel *et al.*, 1989)

1) Ju B. Khoo H W, 1998. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone(CHH) mRNA transcripts and genomic sequences in *Macrobrachium lanchesteri* (de Man). Submitted to the EMBL/GenBank/DBJ database

图 3 显示,由中华绒螯蟹眼柄的特异性 cDNA 推定的氨基酸序列与甲壳动物 CHH 家族其他多数神经肽之间的同源性及相似性比例普遍较低,它与普通黄道蟹和蜘蛛蟹 *L. emarginata* 的 MOIH 的氨基酸序列同源性分别是 39.1% 和 29%,相似性分别为 49.2% 和 50.7%。而与沼虾 *M. lanchasteri*、美洲螯龙虾、日本对虾、凡纳对虾、普通黄道蟹和普通滨蟹的 CHH 的同源性比例在 27.5%—31.9% 之间,相似性为 49.2%—59.4%,而与美洲螯龙虾 GIH 的同源性和相似性相对较高,分别是 46.4% 和 62.3%。

### 3 讨论

经查找大量的相似序列,并进行同源性和相似性分析,可以发现由中华绒螯蟹的特异性 cDNA 片段推断的氨基酸序列具有其他所有甲壳动物 CHH 家族神经肽共同具有的特点:六个半胱氨酸位置的保守性,这六个半胱氨酸可以在肽的高级结构中形成三个链内二硫键;半胱氨酸周围的保守的氨基酸序列。它与其它绝大多数甲壳动物的 MIH 的氨基酸序列相似性多数较高,而与甲壳动物 CHH 家族的其它神经肽的相似性较低,这提示由中华绒螯蟹特异性 cDNA 片段推断的氨基酸序列很可能是它的 MIH 片段。由图 3 可以看出,中华绒螯蟹的 MIH 部分氨基酸序列与对虾类 MIH 的同源性均超过 70%,相似性也都超过 80%;而与其他蟹类的 MIH(包括斑纹蛭、普通黄道蟹、普通滨蟹和美味优游蟹)的同源性却只有 40% 左右,相似性也只有 60% 左右,这可能说明不同甲壳动物的 MIH 氨基酸序列相似性与物种之间亲缘关系没有直接联系。多年以前科学家们就已经发现物种之间的亲缘关系与它们某些基因的亲缘关系并不一定完全吻合(Goodman *et al.*, 1979; Avise *et al.*, 1983; Tajima, 1983; Pamilo *et al.*, 1988; Takahata, 1989)。Maddison(1996)提出假说,认为就像原子周围的电子云一样,系统演化可以看作是一种“基因历史云”,基因进化树可以与相对应的物种进化树不一致,一组物种的遗传历史是由多数符合物种亲缘关系的基因进化树和有一部分与物种亲缘关系不符的基因进化树复合而成。

中华绒螯蟹的这一部分 MIH 与凡纳对虾的 MIH 类似物的同源性和相似性比例很低,只有 28% 和 55%(图 3)。通过核酸和氨基酸序列比较和结构分析,不难发现凡纳对虾的 MIH 与其它甲壳动物的 CHH 有很高的相似性。这提示中华绒螯蟹的 MIH 与凡纳对虾的 MIH 类似物可能不属于同一类神经肽。另外,以来自美洲螯龙虾的具有蜕皮抑制活性的 CHH 的特异性引物通过 cDNA 末端快速扩增(5'RACE 和 3'RACE)的方法得到凡纳对虾的眼柄 cDNA,而扩增产物的检测用普通滨蟹的 CHH 的 cDNA 作为探针,再以这样的 cDNA 推断凡纳对虾的 MIH 多肽(Sun, 1994)。因此这就很难确定这种所谓的 MIH 是否具有蜕皮抑制活性还是高血糖活性,或者两种活性都具有(Lee *et al.*, 1995)。

比较河蟹的部分 MIH 与美洲螯龙虾的 GIH 氨基酸序列同源性和相似性,可以发现它们的比例很高,分别为 46.4% 和 62.3%(图 3),该比例甚至高于河蟹 MIH 部分氨基酸序列与其它蟹类和螯虾的 MIH 的同源性和相似性。De Kleijn 等(1994)认为,美洲螯龙虾的 GIH 除了具有抑制性腺发育外,它还参与蜕皮活动的调控,而且通过比较很多蟹类的 MIH 与美洲螯龙虾的 GIH 的氨基酸序列,可以发现它们在结构上具有很高的相似性,因此与美洲螯龙虾的 GIH 相类似,蟹的 MIH 可能对性腺的发育具有调控作用,这需要进一步的实验证实。

**致谢** 中国科学院海洋研究所刘保忠博士参加了 DNA 的测序工作,宋林生研究员在实验思路给予启发,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

- 孙金生,刘安西,贺秉军等,2001.不同甾醇类物质对河蟹眼柄神经分泌细胞  $I_{Ca}$  的影响.海洋与湖沼,32(6):627—634
- 陈炳良,堵南山,1992.中华绒螯蟹幼体中肠的超微结构.海洋与湖沼,23(5):533—535
- 姜仁良,谭玉均,吴嘉敏等,1992.中华绒螯蟹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮、17 $\beta$ -雌二醇和睾酮含量的变动.水产学报,16(2):101—106
- 顾志敏,何林岗,1997.中华绒螯蟹发育周期的组织学细胞学观察.海洋与湖沼,28(2):138—145
- 顾志敏,何林岗,1991.切除单侧眼柄对中华绒螯蟹蜕皮、生长、成熟的影响.淡水渔业,5:10—13
- 堵南山,陈炳良,赖伟,1992.中华绒螯蟹幼体消化系统发育的研究.海洋与湖沼,23(1):79—82
- Avise J C, Shapiro J F, Daniel S W *et al*, 1983. Mitochondrial DNA differentiation during the speciation process in *Peromyscus*. *Mol Biol Evol*, 1:38—56
- Chan S M, Chen X G, Gu P L, 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab *Charybdis feratus*. *Gene*, 224:23—33
- 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 Comm*, 171:818—826
- Chung J S, Wilkinson M, Webster S G, 1996. Determination of the amino acid sequence of the molt-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus*. *Neuropeptides*, 30:95—101
- Chung J S, Wilkinson M C, Webster S G, 1998. Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. *Regul Pept*, 7:17—24
- De Kleijn D P V, Van Herp F, 1995a. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea. *Comp Biochem Physiol*, 112B:573—579
- De Kleijn D P V, De Leeuw E P H, Van Den Berg M C *et al*, 1995b. Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Acta*, 1260:62—66
- De Kleijn D P V, Sleutels F J G T, Martens G J M *et al*, 1994. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Lett*, 353:255—258
- Goodman M, Czelusniak J, Moore G W *et al*, 1979. Fitting the gene lineage into its species lineage, a parsimony strategy illustrated by cladograms constructed from globin sequences. *Syst Zool*, 28:132—163
- 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*. *Mol Mar Bio Biotech*, 7:214—220
- Kegel G, Reichwein B, Weese S *et al*, 1989. Amino acid sequence of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. *FEBS Lett*, 255:10—14
- Klein J M, Mangerich S, De Kleijn D P V *et al*, 1993. Molecular cloning of crustacean putative molting-inhibiting hormone (MIH) precursor. *FEBS Lett*, 334:139—142
- 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*. *Biochem Biophys Res Commun*, 209:1126—1131
- Liu Lei, Laufer H, Gogarten P J *et al*, 1997. cDNA cloning of a mandibular organ inhibiting hormone from the spider crab *Libinia emarginata*. *Invertebrate Neuroscience*, 3:199—204
- Maddison W P, 1996. Molecular Approaches and the Growth of Phylogenetic Biology. In: Ferraris J, Dand Stephen R P ed. *Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols*. New York: Wiley-Liss Inc, 48—63
- 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*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 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*. Zool Sci, 14:785—789
- Pamilo P, Nei M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. Mol Biol Evol, 5:568—583
- Sefiani M, Le Caer J P, Soyez D. 1996. Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Gen Comp Endocrinol, 103:41—53
- Spaziani E, Watson R D, Mattson M P *et al*, 1989. Ecdysteroid biosynthesis in the crustacean Y-organ and control by an eyestalk neuropeptide. J Exp Zool, 252:271—282
- 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*. Mol Mar Biol Biotech, 3:1—6
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. Genetics, 123:229—240
- Takahata N. 1989. Gene genealogy in three related populations: consistency probability between gene and population trees. Genetics, 122:957—966
- Umphrey H R, Lee K J, Watson R D *et al*, 1998. Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*. Mol Cell Endocrinol, 136:145—149
- Wainwright G, Webster S G, Wilkinson M C *et al*, 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab *Cancer pagurus*. Involvement in multihormonal regulation of growth and reproduction. J Biol Chem, 271(22):12749—12754
- Webster S G, Dirksen H. 1991. Putative molt-inhibiting hormone in larvae of the shore crab *Carcinus maenas* L. An immunocytochemical approach. Boil Bull, 180:65—71
- Yang W, Aida K, Nagasawa H. 1997. Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Peptide, 18:479—485

## MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF cDNA ENCODING PARTIAL PUTATIVE MOLT-INHIBITING HORMONE FROM THE CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS*

WANG Zai-Zhao, XIANG Jian-Hai, CUI Zhao-Xia

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** Total RNAs were extracted from eyestalks of the crab *Eriocheir sinensis*. Eyestalk complementary DNAs were obtained from these total RNAs by reverse transcription. Based on the amino acid sequence of Pej-SG-IV from *Penaeus japonicus*, two degenerate primers were designed. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed by using these eyestalk cDNAs and the degenerate primers. A specific cDNA was cloned under proper reaction conditions. The specific cDNA was subcloned into pUCm-T vector for sequencing. The sequencing results demonstrated that the specific cDNA from the crab *E. sinensis* consists of 213 base pairs. The alignment of the deduced amino acid sequence from eyestalk cDNA of the crab *E. sinensis* with neuropeptides of CHH family from various crustaceans demonstrates that it has the highest identity and homology with most MIHs from other crustaceans. The highest and the second highest amino acid identity percentages with MIH from the shrimp *Metapenaeus ensis* and *P. japonicus* are 71.8% and 70.4%, respectively. It suggests that the deduced amino acid sequence from eyestalk cDNA of the crab *E. sinensis* is a part of its MIH neuropeptide of *E. sinensis*.

**Key words** *Eriocheir sinensis*, Molt-inhibiting hormone, Complementary DNA cloning, Sequence analysis