

# 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\*

舒妙安 张龙韬 周宇芳 胡杭娇 徐宾朋 郭晓令

(浙江大学动物科学学院 杭州 310058)

**摘要** 采用 RT-PCR 及 RACE 技术, 从拟穴青蟹眼柄组织中克隆了两种 型高血糖激素 CHH 基因(分别命名为 C1 与 C2)cDNA 全序列。序列分析结果表明: C1 基因全长 1859bp, 开放阅读框长 420bp, 编码 139 个氨基酸, 分子量为 15.326kDa, 等电点为 5.540; C2 基因全长 1739bp, 开放阅读框长 426bp, 编码 141 个氨基酸, 分子量为 15.621kDa, 等电点为 7.618。与其它物种 CHH 氨基酸序列进行同源性比较分析显示, 拟穴青蟹 CHH 基因与榄绿青蟹 CHH 基因同源性最高(92%), 依次为日本鲟(80%)、三疣梭子蟹(78%)。聚类分析表明, 拟穴青蟹 CHH 氨基酸序列与榄绿青蟹和日本鲟紧密聚为一支。经荧光定量检测, 拟穴青蟹 CHH 基因在眼柄、肝胰腺、心脏、肠中表达量较高, 鳃、胃中表达量很少, 肌肉中表达极少。盐度骤变试验结果表明: 盐度胁迫 24h 后, C2 的表达量是 C1 的 30 倍以上; C2 基因盐度 5 时与对照组的表达量差异不显著( $P>0.05$ ), 盐度 15 时差异显著( $P<0.05$ ), 盐度 22、25、30 时差异极显著( $P<0.01$ ); 盐度变化越大, C2 的表达量越大。上述结果为进一步深入研究 CHH 基因的功能及调控机理奠定基础。

**关键词** 拟穴青蟹, 高血糖激素 CHH, 基因克隆, 表达分析  
**中图分类号** Q75

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*), 主要分布于我国浙江、福建、广东、广西、海南、台湾等沿海水域, 是我国东南沿海的 4 种青蟹——拟穴青蟹、锯缘青蟹(*S. serrata*)、榄绿青蟹(*S. olivacea*)和紫螯青蟹(*S. tranquebarica*)中的主要优势品种(林琪等, 2007), 是我国重要的海洋经济养殖蟹类之一。

眼柄是甲壳动物神经内分泌中的主要器官, 有着协同调控甲壳动物中各种复杂生理过程的重要作用(Fanjul-Moles, 2006)。甲壳动物眼柄中的 X-器窦腺复合体(X-organ-sinus gland, XO-SG)合成分泌高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)、蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)和大颚器抑制激素(mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH)(Keller,

1992; De Kleijn *et al.*, 1995), 这些激素的一级结构序列的高度相似性(De Kleijn *et al.*, 1995; Garefa *et al.*, 1998), 被称为高血糖激素家族(crustacean hyperglycemic hormone family, CHH 家族)激素, 在甲壳动物的变态发育、生殖、蜕皮、渗透压调节等方面都有重要的调控作用(Mettulio *et al.*, 2004; Okumura *et al.*, 2005)。甲壳动物高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)是一种多功能的激素, 在眼柄窦腺中的含量最为丰富(王雪惠等, 2006)。研究表明 CHH 基因与甲壳动物体内生理环境维持稳定以及对环境适应性有关(Thannumalaya *et al.*, 1998), 并且对渗透压调节具有重要的调控作用(Spaning-Pierrot *et al.*, 2000)。盐度(Chang *et al.*, 1998)、温度(Chang *et al.*, 1998)、重金属(Lorenzon *et al.*, 2000)、组织缺氧(Webster *et al.*, 1996)等多种胁迫条件和动物自身疾病(Stentiford *et al.*, 2001)等也能对 CHH 的释放产生

\* 浙江省重大科技专项农业项目, 2008C12008 号。舒妙安, E-mail: shuma@zju.edu.cn

收稿日期: 2011-12-12, 收修改稿日期: 2012-02-06

影响。

拟穴青蟹是我国重要的海洋经济养殖蟹类之一,对其神经内分泌等方面的研究很少,迄今为止只有对其蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆研究(邱高峰等, 2003)。本研究以杭州湾拟穴青蟹为研究对象,应用分子生物学方法,首次克隆得到两种 CHH 基因的全长 cDNA 序列,并对 CHH 基因在不同组织和不同盐度胁迫下眼柄中的表达情况进行了研究,为进一步阐明 CHH 基因的生理功能奠定基础,为耐低盐育种提供可靠依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用的拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)于 2011 年 9 月取自杭州湾沿海水域,经体重[(200±20)g]、体长[(10±1.2)cm]、体宽[(8±0.8)cm]测量后,饲养于 80cm×80cm 的圆形 PVC 桶中,并于试验前暂养一周,养殖水温为(25±0.4)°C,盐度为 8±0.2, pH 为 7.5±0.3,连续充气,暂养期间每天换水 1/3,并投喂贝类。将 18 只暂养的拟穴青蟹随机分成 6 组,设对照组和盐度骤变组,每组设 3 个平行。对照组盐度为 10,骤变组盐度为 5、15、20、25、30,各组的盐度用速溶海水晶调节。试验期间不投饵不换水,盐度胁迫 24h 后,对照组和盐度骤变组同时取样,包括:眼柄、胃、肝胰腺、鳃、心、肠、肌肉共 7 个组织,保存于液氮中。

### 1.2 RNA 的提取

分离不同组织,液氮研磨组织样品,每 0.05g 组

织中加 1ml 购于 Invitrogen 公司的 Trizol Reagent,提取拟穴青蟹眼柄中的总 RNA。提取的总 RNA 用微量分光光度计 Nanodrop2000 进行定量测定,然后再通过 TBE 琼脂糖凝胶电泳确认其完整性。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第一链,用于基因 3'和 5'端序列快速扩增和荧光定量的模板。

### 1.3 拟穴青蟹 CHH 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

根据 GenBank 中已报道的甲壳类的高血糖激素 CHH 的 cDNA 序列设计引物,正向引物为 CHH-F,反向引物为 CHH-R(表 1)。用 TaKaRa Taq<sup>TM</sup> 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 TaKaRa Taq (5U/μl), 0.2μl; 10× PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus), 2.5μl; dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L), 1μl; 模板 cDNA, 1μl; 引物 CHH-F (10 μmol/L), 1μl; 引物 CHH-R (10 μmol/L), 1μl; ddH<sub>2</sub>O 补足 20μl。PCR 反应程序为 94°C 预变性 5min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 30 个循环; 72°C 延伸 10min; 最后 4°C 保存。PCR 产物用 Axygen 胶回收试剂盒纯化,连接到 pMD-18T 载体(TaKaRa)。连接产物转染 Top10 感受态细胞(Invitrogen)。PCR 筛选获得的阳性克隆,送至 Invitrogen 公司进行双向测序。获得的序列用 BLASTX 进行比对分析,该序列与已知甲壳类的 CHH 基因同源。

根据上述已获得的拟穴青蟹 CHH 基因部分序列为模板,设计 3'和 5'端 RACE 所需的引物(表 1)。用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 扩增试剂盒(Clontech)反转录合成的 cDNA 第一链为模板,分别

表 1 本研究所用的引物  
Tab.1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列(5'→3')	用途
CHH-F	CGGCGCACCCCTTAGAAAAAAGAC	Gene
CHH-R	CCCTTTAACCCCTTGCTAAGCTGCC	Cloning
GSP1	TCC GTT GAA GGG GCG ACT ATG GTG	5'Race
GSP2	CTA CAG CAA CGT GGT CAT CCG CC	3'Race
GSP3	GTA GGA CCC AGA CCA AGA CCC ACA	3'Race
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Race
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Race
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	NestRace
OligoG	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	5'Race
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	3'Race
CHH-SF	CTG CTG CAC AAT CCT GAC	RT-PCR
CHH-SR	CTT CGA AGT TGT CCA TCA GC	RT-PCR
CHH-DF	CTA CCT TAA AGC CAC CAC	RT-PCR
CHH-DR	ATC AGA TAG GCT CGT TTC	RT-PCR
-actin-F	GCCCTTCCTCACGCTATCCT	
-actin-R	GCGGCAGTGGTCATCTCCT	

用引物 GSP1、GSP2、GSP3 与 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物配对, 并完全按照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 CHH 基因 3'和 5'端基因序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与 CHH 基因片段的克隆所述相同。

#### 1.4 拟穴青蟹 CHH 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化树

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。将所得序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), 利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框(ORF)预测与氨基酸翻译。对推导出的蛋白序列通过 ProtParam 软件(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白理化特性预测。使用 Interpro Scan 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)进行蛋白质功能结构域分析。使用 DNAMAN 对拟穴青蟹及其它物种的 CHH 基因氨基酸序列进行多重比对, 然后用 MEGA4.0 软件(KUMAR *et al*, 2004)构建 NJ 系统树。

#### 1.5 拟穴青蟹 CHH 基因在各组织中表达分析

以获得的基因序列为模板, 利用 Primer 5.0 软件设计两对特异引物 CHH-SF、CHH-SR 和 CHH-DF、CHH-DR(表 1), 对不同盐度胁迫的拟穴青蟹的眼柄中 CHH 基因的表达量进行检测, 并根据 GenBank 中拟穴青蟹的  $\beta$ -actin 基因序列设计一对内参引物  $\beta$ -actin-F、 $\beta$ -actin-R(表 1)。荧光定量 PCR(ddCt 法)扩增体系为 20 $\mu$ l, 包括: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ), 10 $\mu$ l; PCR Forward Primer (10 $\mu$ mol/L), 0.4 $\mu$ l; PCR Reverse Primer (10 $\mu$ mol/L), 0.4 $\mu$ l; ROX Reference Dye (50 $\times$ )\*3, 0.4 $\mu$ l; cDNA 模板, 2.0 $\mu$ l; dH<sub>2</sub>O, 6.8 $\mu$ l。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s。将荧光定量 PCR 检测结果导出, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 用 SPSS11.0 软件进行分析。引物 CHH-SF 与 CHH-SR 能特异性扩增 C1, 引物 CHH-DF 与 CHH-DR 能同时扩增 C1 和 C2, 将定量结果用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法算出后相减得到 C2 的定量结果。

## 2 结果

### 2.1 拟穴青蟹高血糖激素 CHH 的克隆及序列分析

通过引物 CHH-F 和 CHH-R 扩增获得一条长约 398bp 的特异条带。引物 GSP2 得到的 3' RACE 产物为 1269bp 的序列, 未包含加尾信号 AATAAA, 引物

GSP3 得到的 3' RACE 产物为 505bp 的序列, 与引物 GSP2 得到的片段有 384bp 完全重叠, 包含 poly(A)尾巴, 具有加尾信号 AATAAA, 得到了 3'端全长。引物 GSP1 得到的 5' RACE 产物为 704bp 与 584bp 的两条序列, 在上游出现多个“终止密码子”, 获得了 5'端全长。将以上序列拼接后获得了 1859bp 和 1739bp 的两条序列, 获得了拟穴青蟹两种高血糖激素基因 C1(基因登录号: JQ421462)和 C2(基因登录号: JQ421463)的 cDNA 全长。序列分析表明拟穴青蟹高血糖激素 C1 全长 mRNA 序列包括 75bp 的 5'非编码区(UTR), 420bp 的开放式阅读框(ORF), 1364bp 的 3'端非编码区(UTR)及 poly(A)尾巴, 编码 139 个氨基酸的蛋白; 拟穴青蟹高血糖激素 C2 全长 mRNA 序列包括 75bp 的 5'非编码区(UTR), 426bp 的开放式阅读框(ORF), 1238bp 的 3'端非编码区(UTR)及 poly(A)尾巴, 编码 141 个氨基酸的蛋白。图 1 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点。

### 2.2 编码蛋白组成和结构分析

利用 DNASTAR 中的 Edisequce 程序将该基因编码序列翻译为相应的氨基酸序列, 发现 C1 基因编码一个由 139 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其分子量为 15.326kDa, 等电点为 5.540。该蛋白包含 13 个碱性氨基酸(K, R)、17 个酸性氨基酸(D, E)、48 个疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V)和 37 个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)。C2 基因编码一个由 141 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其分子量为 15.621kDa, 等电点为 7.618。该蛋白包含 16 个碱性氨基酸(K, R)、15 个酸性氨基酸(D, E)、47 个疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V)和 40 个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)。通过 Motif Scan 在线程序分析的结果显示, 整个氨基酸序列特征也与甲壳动物高血糖激素家族氨基酸序列特征相符合, 在 28—64 氨基酸间存在可能的 CHH 序列相关前导肽(CHH, precursor-related peptide, CPRP)。

### 2.3 编码蛋白序列比对以及进化树构建

利用 DNAMAN 软件对该基因编码的氨基酸序列与榄绿青蟹(*Scylla olivacea*) (AAQ75760.1)、日本螯(*Charybdis japonica*) (ACN87216.1)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (ACB46189.1)、蓝蟹(*Callinectes sapidus*) (AAS45136.1)、毛足圆盘蟹(*Discoplax hirtipes*) (AEM45614.1)、细纹方蟹(*Grapsus tenuicrustatus*) (AER27832.1)和红黄道蟹(*Cancer productus*) (ABQ41272.1)7 个氨基酸序列进行比对, 发现所有比对蛋白有高度的氨基酸保守序列,

C1 M S T F T S V I Q M A V L V A C I A M A 20  
 C1 ATGTCTACCTTCACCTCAGTAATCCAAATGGCGGTCTTGTGGCGTGATTGCAATGGCG 135  
 C2 ATGTCTACCTTCACCTCAGTAATCCAAATGGCTGTCTTGTGGCGTGATTGCAATGGCG 135  
 C2 M S T F T S V I Q M A V L V A C I A M A 20  
 C1 T L P Q T Q G R S A D G F G R M G R L L 40  
 C1 ACCTTACCACAGACCCAGGGACGCTCCGCAGATGGGTTTGGGCGTATGGGTCGGTGTCTG 195  
 C2 ACCTTACCACACACCCAGGGGCGTCCGCAGATGGTTTTGGGCGTATGGGTCGGTGTCTG 195  
 C2 T L P H T Q G R S A D G F G R M G R L L 40  
 C1 A S L K G D S L G P V Q D Y G V E G A A 60  
 C1 GCGTCCCTCAAGGGTACTCTTTGGGCCCGTCCAAGATTACGGCGTAGAGGGAGCGGCG 255  
 C2 GCGTCCCTCAAGGGTACTCTTTGGGCCCGTCCAAGATTACGGCGTAGAGGGAGCGGCG 255  
 C2 A S L K A D S L G P V Q D Y G V E G A A 60  
 C1 H P L E K R Q I F D S S C K G V Y D R A 80  
 C1 CACCCCTTAGAGAAGAGACAGATTTTTGATTCTCTCTGCAAGGGTGTTCACGATAGAGCG 315  
 C2 CACCCCTTAGAGAAGAGACAGATTTTTGATTCTCTCTGCAAGGGTGTTCACGATAGAGCG 315  
 C2 H P L E K R Q I F D S S C K G V Y D R A 80  
 C1 I F S E L E H V C N D C Y N L Y R T S R 100  
 C1 ATCTTCAGTGAGCTTGAACACGCTGTGAATGACTGCTACAATCTTACAGAACATCCCGT 375  
 C2 ATCTTCAGTGAAGTGAACACGCTTGTGAATGACTGCTACAATCTTACAGAACATCCCGT 375  
 C2 I F S E L E H V C N D C Y N L Y R T S R 100  
 C1 V A S G C R A N C F E N H V F D D C V Y 120  
 C1 GTCGCCAGTGGGTGCAGGGCGAACTGTTTCGAAAACCATGTATTTGATGACTGTGTGTAT 435  
 C2 GTCGCCAGTGGGTGCA..... 451  
 C2 V A S G C ..... 105  
 C1 D L L L H N P D E V L L M R D A I R G \* 139  
 C1 GACCTGCTGCTGCACAATCTGACGAGGTGCTGCTTATGAGAGACGCCATCAGGGGTTAA 495  
 C2 ..... 451  
 C1 ATGTGTCAAGACCATGATCTAACTGCTACAGCAACGTGGTCATCCGCCAGTGCATGGAAG 555  
 C2 ..... GATCTAACTGCTACAGCAACGTGGTCATCCGCCAGTGCATGGAAG 496  
 C2 .....R S N C Y S N V V I R Q C M E 120  
 C1 ACCTCTGCTGATGGACAACCTCGAAGAAATGCCAGAAAAATACAAATGGTTGGCAAGA 615  
 C2 ACCTCTGCTGATGGACAACCTCGAAGAAATGCCAGAAAAATACAAATGGTTGGCAAGA 556  
 C2 D L L L M D N F E E I A R K I Q M V G K 140  
 C1 AGTAA..... 620  
 C2 AGTAA..... 561  
 C2 K \* ..... 141

图1 拟穴青蟹两种型高血糖激素(C1和C2)的cDNA序列及其预测的氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequences and deduced amino acid sequences of two genes (C1 and C2) encoding CHH from the mud crab *S. paramamosain*

注: 起始密码子加边框, 终止密码子用星号(\*)标出; 信号肽用下划线标出(在蛋白序列上的位置为1—18); 高血糖激素CHH前导肽(CPRP)用阴影标出

其序列特征为 RSAXG; HPXEKRQIXD; CKGVYXR; LEHVXCDCYNLYR; VXSXCRXNC(图2)。

基于高血糖激素氨基酸序列采用MEGA4.0软件以NJ法构建了17种动物的系统进化树(图3)。进化树分析表明, 该序列与蟹类的物种紧密聚在一起, 然后与虾类聚在一起。

2.4 拟穴青蟹CHH基因的表达特征

以-actin为内参基因, 荧光定量PCR检验拟穴青蟹高血糖激素CHH基因C1和C2在眼柄、肝胰腺、鳃、胃、肠、心、肌肉7个组织中的表达。结果显示, C1和C2基因在7个组织中表达存在较大差异, 在胃、鳃里表达很少, 肌肉里表达极少。眼柄中的表达量分别与肝胰腺、鳃、胃、肠、心、肌肉6个组织的表达量相比, 差异极显著( $P < 0.01$ )(图4)。在盐度5—30的骤变试验中, 盐度胁迫24h后, 以C1基因中盐度10的试验组为标准, 所得C1的相对表达量分别为1.95、1.00、1.41、1.02、1.65、1.09, C2的相对表达量分别为89.96、31.03、55.87、61.12、65.27、109.46, C2的表达量是C1的30倍以上。C2基因中盐度为5的试验组与对照组之间没有显著差异( $P > 0.05$ ), 盐度为15的试验组与对照组之间有显著差异( $P < 0.05$ ), 盐度为22、25、30的试验组与对照组之间有极显著差异( $P < 0.01$ )(图5)。

3 讨论

甲壳动物高血糖激素基因家族中, 比较不同激素基因的cDNA序列发现, 只有在CHH基因的cDNA序列中发现在信号肽与成熟肽之间存在着一段CHH基因序列相关前导肽(CHH precursor-related peptide, CPRP), 而MIH、GIH和MOIH的cDNA序列中信号肽则直接与成熟肽相连(Mettulio *et al*, 2004)。因此, 根据基因结构可以将CHH基因家族神经肽分为CHH与MIH、GIH、MOIH两个亚族, 或者称CHH族与CHH族(Garefa *et al*, 1998)。CHH基因在同一个物种中亦存在多种构型现象, 这些不同构型的CHH基因在甲壳动物体内发挥不同的生理功能(Hsu *et al*, 2008)。本研究从拟穴青蟹眼柄中克隆获得两条全长

cDNA 序列 C1 和 C2, C1 全长 1859bp, 编码 139 个氨基酸; C2 全长 1739bp, 编码 141 个氨基酸。编码得到的拟穴青蟹 C1 和 C2 氨基酸序列与其它相近物种的 CHH 基因氨基酸序列比对发现, 拟穴青蟹的 C1 和 C2 氨基酸序列与榄绿青蟹 (*Scylla olivacea*) (AAQ75760.1)、日本蟳 (*Charybdis japonica*) (ACN87216.1)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) (ACB46189.1) 的同源性分别为: 92%、80%、78%, 均具有很高的同源性。这两条序列均存在 CPRP, 由此确定本研究获得的两条序列属于 CHH 族的两种异构型。

CHH 基因是甲壳动物眼柄中含量最丰富且被研究较多的激素。CHH 基因能够抑制大颚腺分泌甲基法尼脂, 促使中肠释放淀粉酶(Sedlmeier, 1998), 肝胰腺分泌消化酶(Keller, 1992), 由此推测在肠道和肝胰腺中有 CHH 基因的表达。Okumura 等(2005)对罗氏沼虾的研究发现, 眼柄中的 CHH 基因重组表达蛋白具有血糖水平调节活性, 而心、鳃等器官的重组蛋白则不具备血糖水平调节活性。除了眼柄中有 CHH 基因的表达之外, 在围心腔、视网膜、胸神经节、腹神经索等均检测到 CHH 基因的存在(Fanjul-Moles, 2006)。本研究采用荧光定量 RT-PCR 方法对拟穴青蟹 C1、C2 基因 mRNA 组织表达进行分析, 结果表明, CHH 基因在眼柄、肝胰腺、心脏、肠、鳃、胃和肌肉中都有表达, 其中眼柄、肝胰腺、心脏、肠表达量较高, 鳃、胃中表达量很少, 肌肉中表达极少。Tsai 等(2008)用半定量法检测了榄绿青蟹 CHH 基因在 12 个组织中的表达, CHH 基因在眼柄、围心腔、胸神经节、脑中表达, 在肝胰腺、心脏、鳃、肌肉中不表达, 与本研究结果存在差异。作者推测一方面与试验所采用的检测方法的精确性是否有关, 另一方面与物种间本身是否存在差异, 有待进一步的研究。

拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C1	MSTFTSVIQMAVLVACIAMATLPQTQGRSADGFGRMGRLASLKG	45
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C2	MSTFTSVIQMAVLVACIAMATLPHTQGRSADGFGRMGRLASLKA	45
榄绿青蟹 <i>Scylla olivacea</i>	MSALTSIMQMAVLVACITMATLPDTPQRS AEGFGRMGRLASLKA	45
日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	MSPLKSVPQMALLVSVCLAVLTL-HTAARSAEGFGRMGRLLESKA	44
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	MQSIKSVCQVSLVAACI-IFTLPWTPQRS AEGFGRMGRLASLKA	44
蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	MQSIKTVCQITLLVTM-MATLSYTHARSAEGLGRMGRLASLKS	44
毛足圆盘蟹 <i>Discoplax hirtipes</i>	-----MALVAVAVFAS-MHALPHAHARSADGFGRMERLLTSLRG	38
细纹方蟹 <i>Grapsus tenuicrustatus</i>	--MTSAVALVVVTVVAS-LSTLPHASARSADGLVRMERLLASLRG	42
红黄道蟹 <i>Cancer productus</i>	MLTSRTLPTIILGVLCIYLSSTIPNAHARSAQGMGKMEHLLASRYG	45
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C1	--DSLGPVQD---YGVEGAAHPLEKRQIFDSSCKGVYDRAIFSEL	85
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C2	--DSLGPVQD---YGVEGAAHPLEKRQIFDSSCKGVYDRAIFSEL	85
榄绿青蟹 <i>Scylla olivacea</i>	--DSLGPVQD---FGVEGAAHPLEKRQIFDSSCKGVYDRAIFNEL	85
日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	--DTLGPQM---YGVEGAGHPLEKRQIYDASCKGVYNRAIFSEL	84
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	--DSLTPMQG---YGTETGHPLEKRQIYDSSCKGVYDRAIFSEL	83
蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	--DTVTPLRG---FEGETGHPLEKRQIYDSSCKGVYDRAIFNEL	83
毛足圆盘蟹 <i>Discoplax hirtipes</i>	SAESPAAL-----GEASAAHPLEKRQIYDRSCKGVYDRSLFSLK	77
细纹方蟹 <i>Grapsus tenuicrustatus</i>	NGEQTPALGELRAAGEGSATHPLEKRQIYDRACKGVYDRSLFSLK	87
红黄道蟹 <i>Cancer productus</i>	ALESNTPIG---DLPGLLVHPVEKRQIYDSSCKGVYDRGLFSDL	86
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C1	EHVCNDCYNLYRTSRVASGCRANCFENHFDDCVYDLLLLHNPDEV	130
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C2	EHVCNDCYNLYRTSRVASGCRSNCSYNSVVRQCMEDLLMDNFEE	130
榄绿青蟹 <i>Scylla olivacea</i>	EHVCNDCYNLYRTSHVASGCRSNCSYNSVVRQCMEDLLMDNFEE	130
日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	EHVCDDCYNLYRNARVASGCRSNCSYNSVVRQCMDDLLMDNFDE	129
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	EHVCDDCYNLYRTSRVASGCRSNCSYNSVVRQCMEDLLMDNFEE	128
蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	EHVCDDCYNLYRNSRVASGCRSNCSYNSVVRQCMEDLLMDNFEE	128
毛足圆盘蟹 <i>Discoplax hirtipes</i>	EHVCDDCYNLYRTSYVSSACRENCYSNLVFRQCMDDLLMDVDFE	122
细纹方蟹 <i>Grapsus tenuicrustatus</i>	EHVCDDCYNLYRTHHVASSRENCYSNLVFRQCMDDLLMDVDFE	132
红黄道蟹 <i>Cancer productus</i>	EHVCDDCYNLYRNSYVASACRSNCYSNSVVRQCMEEMLMEEFDK	131
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C1	LLMRDAIRG---	139
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> C2	IARKIQMVGGKK-	141
榄绿青蟹 <i>Scylla olivacea</i>	IARKIQMVGGKK-	141
日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	YARKIQVIGKK-	140
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	YARKIQMVGGKK-	139
蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	YARKIQVVGKK-	139
毛足圆盘蟹 <i>Discoplax hirtipes</i>	YAKAVQMVGRKKK	134
细纹方蟹 <i>Grapsus tenuicrustatus</i>	YAKAVQVVGRRK	144
红黄道蟹 <i>Cancer productus</i>	YARAVQIVGKKK	143

图 2 拟穴青蟹 CHH 氨基酸序列与 7 种生物 CHH 氨基酸序列比对  
Fig.2 Amino-acid sequences alignment of *S. paramamosain* with different animals' CHHs

注: 榄绿青蟹 *Scylla olivacea* (AAQ75760.1); 三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* (ACB46189.1); 日本蟳 *Charybdis japonica* (ACN87216.1); 蓝蟹 *Callinectes sapidus* (AAS45136.1); 毛足圆盘蟹 *Discoplax hirtipes* (AEM45614.1); 红黄道蟹 *Cancer productus* (ABQ41272.1); 细纹方蟹 *Grapsus tenuicrustatus* (AER27832.1)

盐度骤变试验表明, 随着盐度的增加(15、20、25、30)或减少(5), C1 的表达量没有规律, C2 的表达量显著增加, 且 C2 的表达量是 C1 的 30 倍以上, 表明 C2 基因在盐度变化中起主导作用, 与渗透压调节更为

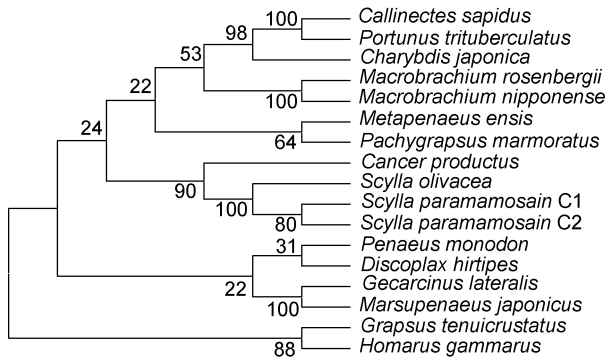


图3 利用 MEGA4.0 构建的基于 CHH 氨基酸序列的 NJ 系统树

Fig.3 NJ tree based on CHH amino acid sequences using MEGA4.0

注: *Penaeus monodon*: 斑节对虾(AF346382.1); *Metapenaeus ensis*: 刀额新对虾(AF247160.1); *Gecarcinus lateralis*: 地蟹(DQ492296.2); *Macrobrachium rosenbergii*: 罗氏沼虾(AF219382.1); *Pachygrapsus marmoratus*: 云斑厚纹蟹(AY180334.1); *Callinectes sapidus*: 蓝蟹(AY536012.1); *Grapsus tenuicrustatus*: 细纹方蟹(JN048801.1); *Charybdis japonica*: 日本蟳(FJ768717.1); *Discoplax hirtipes*: 毛足圆盘蟹(JF894386.1); *Cancer productus*: 红黄道蟹(EF592486.1); *Scylla olivacea*: 榄缘青蟹(EF530127.1); *Portunus trituberculatus*: 三疣梭子蟹(EU395808.1); *Homarus gammarus*: 欧洲龙虾(DQ181791.1); *Marsupenaeus japonicus*: 日本对虾(AB247560.1); *Macrobrachium nipponense*: 日本沼虾(HQ724327.1); *Scylla paramamosain C1*: 拟穴青蟹(JQ421462); *Scylla paramamosain C2*: 拟穴青蟹(JQ421463)

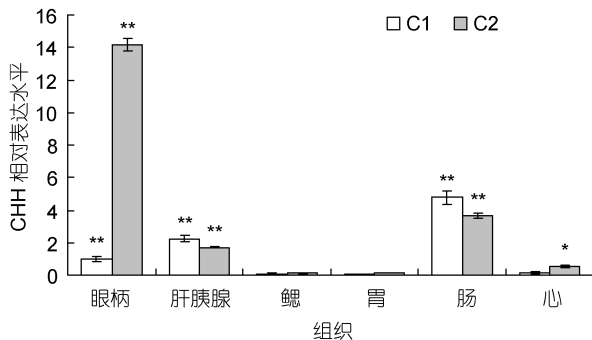


图4 基于荧光定量 PCR 检测的 C1 和 C2 基因在各组织中的表达水平

Fig.4 C1 and C2 genes expression level in different tissues detected by qRT-PCR

\*表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )

紧密,由此推测 CHH 基因参与拟穴青蟹的耐盐机制调节。Chang 等(1998)利用 ELISA 方法研究美洲螯龙虾时发现,盐度的降低、升高均能导致高血糖激素 CHH 含量的增加,与本研究结果相一致。除了盐度外,其它方面的胁迫也能引起 CHH 基因的变化。Webster

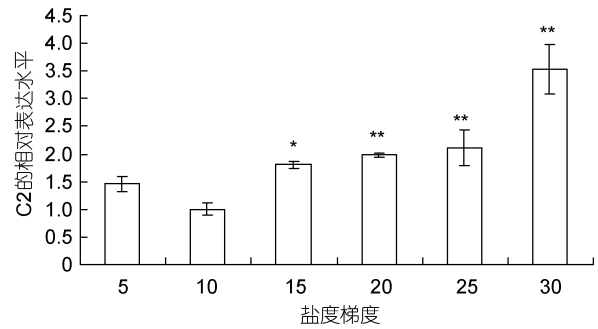


图5 基于荧光定量 PCR 检测的 C2 基因在盐度胁迫 24h 后眼柄中的表达水平

Fig.5 C2 gene expression level in the eyestalk detected by qRT-PCR after 24h's stress in salinity

\*表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )

等(1996)对普通黄道蟹(*Cancer pagurus*)的研究中发现,组织缺氧可导致 CHH 含量水平明显增加。Lorenzon 等(2000)对岩虾(*Palaemon elegans*)的研究中发现,在 Hg、Cd 等重金属胁迫下,岩虾体内 CHH 在 2h 之内出现升高。Stentiford 等(2001)利用血卵涡鞭虫(*Hematodinium sp.*)感染挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)的试验中,发现感染血卵涡鞭虫的螯虾血淋巴中 CHH 含量上升。上述研究表明,甲壳动物高血糖激素 CHH 在甲壳动物的生理机能调节以及对环境适应性等方面有着重要的作用。

环境骤变是影响拟穴青蟹养殖效益的重要因素。研究拟穴青蟹高血糖激素 CHH 的调控机理,对于提高拟穴青蟹的抗逆性具有重要的意义。本研究首次克隆得到拟穴青蟹两种型高血糖激素 CHH cDNA 全长序列,并对其结构及表达规律进行了分析,为进一步揭示 CHH 的生理功能奠定基础,同时也为阐明拟穴青蟹耐低盐调控机理提供科学依据。

## 参 考 文 献

- 王雪惠,孙金生,杨卫军,2006. 中华绒螯蟹眼柄神经多肽激素的分离纯化及活性鉴定. 水产学报, 30(2): 151—155
- 邱高峰,张爱萍,楼允东,2003. 锯缘青蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的分子克隆及其表达分析. 水产学报, 27(3): 207—212
- 林琪,李少菁,黎中宝,2007. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成. 水产学报, 31(2): 211—219
- Chang E S, Keller R, Chang S A *et al*, 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. Gen Comp Endocrinol, 111(03): 359—366
- De Kleijn D, Van Herp F, 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. Comp Biochem Physiol, 112(2): 573—579

- Fanjul-Moles M L, 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 142(3—4): 390—400
- Garefa U, Araehiga H, 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell Mol Neurobiol*, 18: 81—99
- Hsu Y W, Weller J R, 2008. Molecular cloning of four cDNAs encoding prepro-crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the eyestalk of the red rock crab *Cancer products*: identification of two genetically encoded CHH isoforms and two putative post-translationally derived CHH variants. *Gen Comp Endocrinol*, 155(03): 517—525
- Keller R, 1992. Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects. *Experientia*, 48: 439—488
- KUMAR S, TAMURA K, NEI M, 2004. MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5(2): 150—163
- Lorenzon S, Francese M, 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 39(02): 167—176
- Mettulio R, Giulianini P G, 2004. Functional analysis of crustacean hyperglycemic hormone by *in vivo* assay with wild-type and mutant recombinant proteins. *Regul Pept*, 119(3): 189—197
- Okumura T, Ohira T, Katayama H *et al*, 2005. *In vivo* effects of a recombinant molt-inhibiting hormone on molt interval and hemolymph ecdysteroid level in the Kuruma Prawn, *Macrobrachium japonicum*. *Zoological Science*, 22: 317—320
- Sedlmeier, 1998. The crustacean hyperglycemic hormone releases amylase from crayfish midgut gland. *Peptides*, 20: 90—98
- Spaning-Pierrot C, Soyez D, Van Herp F *et al*, 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill of the green crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen Comp Endocrinol*, 119: 340—350
- Stentiford G D, Chang E S, Chang S A *et al*, 2001. Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). *Gen Comp Endocrinol*, 121: 13—22
- Thannumalaya P S, Barbara R, Heimrich D *et al*, 1998. On the isolation and characterization of a crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the shrimp *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 162: 99—111
- Tsai Kuo-Wei, Su-Jung Chang, Hsin-Ju Wu *et al*, 2008. Molecular cloning and differential expression pattern of two structural variants of the crustacean hyperglycemic hormone family from the mud crab *Scylla olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 159: 16—25
- Webster S, 1996. Measurement of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *Exp Biol*, 199(7): 1579—1585

## CLONING AND EXPRESSION OF TWO GENES ENCODING TYPE CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE FAMILY FROM THE MUD CRAB *SCYLLA PARAMAMOSAIN*

SHU Miao-An, ZHANG Long-Tao, ZHOU Yu-Fang, HU Hang-Jiao,  
XU Bin-Peng, GUO Xiao-Ling

(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310058)

**Abstract** The cDNAs of two crustacean hyperglycemic hormones, designated as C1 and C2, were isolated from the eyestalk of mud crab *Scylla paramamosain* through RT-PCR and RACE. Sequence analysis indicated that C1 had an open reading frame of 420bp encoding 139aa of 15.326kDa and pI at 5.540; C2 had an open reading frame of 426bp encoding 141aa of 15.621kDa and pI at 7.618. The amino acid sequences of C1 and C2 possessed 92%, 80%, 78% identity with the CHHs of *S. olivacea*, *Charybdis japonica*, *Portunus trituberculatus* respectively. C1 and C2 protein firstly clustered with CHHs of *S. olivacea* and *Charybdis japonica* in the phylogenetic analysis. The expression of C1 and C2 in tissues were analyzed by Real-Time PCR, the result showed that C1 and C2 were expressed in eyestalk, hepatopancreas, intestinal, heart, gill and stomach, but not in muscle. After 24h's stress in salinity, the expression of C2 increased by a factor of thirty compared with C1. The expression of C2 in salinity 10 was not significant compared with salinity 5 ( $P>0.05$ ), but significant with salinity 15 ( $P<0.05$ ) and great significant with salinity 20, 25, 30 ( $P<0.01$ ). The more the salinity changed, the more the C2 expressed. These results served further studies on functions and regulation mechanism of CHHs.

**Key words** *Scylla paramamosain*, Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), Gene cloning, expression analysis