

三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的克隆及相关核受体基因在蜕皮中的功能分析*

张龙涛^{1,2,3} 吕建建^{1,3} 高保全^{1,3} 刘萍^{1,3} 付萍^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266235)

摘要 采用 RACE 技术克隆三疣梭子蟹核受体 *ftz-fl* 基因, 全长 cDNA 序列 1763bp。该基因 3' 和 5' 非编码区分别为 1034bp 和 141bp, 开放阅读框为 588bp, 推测编码 195 个氨基酸, 预测分子量为 22.8kDa, 理论等电点为 6.35, 命名为 *PTNHR* 基因。同源性和系统进化分析表明, 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因与刀额新对虾同源性高达 75.4%, 并且与刀额新对虾聚为一支。对核受体基因 *ftz-fl*、*EcR* 和 *RXR* 在蜕皮周期中的表达情况进行实时荧光定量 PCR 分析, 结果表明, 三个核受体基因在不同蜕皮时期, 均出现表达差异, 说明这三个基因都参与蜕皮调控过程。其中, *ftz-fl* 和 *RXR* 基因在不同蜕皮时期的表达模式上出现相反的表达特征, 预测这两个基因存在相互抑制的调节关系。*EcR* 和 *RXR* 基因在不同蜕皮时期的表达模式上出现部分相似的表达特征。

关键词 三疣梭子蟹; 核受体; 基因克隆; 基因表达; 去眼柄

中图分类号 S9 doi: 10.11693/hyhz20150300077

核受体(nuclear receptor)是多细胞生物中含量最丰富的几大类转录因子超家族之一, 机体的生长发育、细胞分化以及许多生理、代谢过程都可归于核受体与相应配体及其它调节因子的相互作用(Boulanger *et al*, 2011)。在哺乳类中, *ftz-fl* 可归于核受体第 5 家族的甾类激素受体, 这一家族也包括重要的甾类(类固醇)合成调控因子 SF-1。 *ftz-fl* 首先是作为转录因子激活果蝇(*Drosophila*)早期胚胎形成阶段分化基因 *fushi tarazu* 的同源异性盒(homeobox)而被发现的(Kuroiwa *et al*, 1984)。随后在其它许多物种中都发现了其同源类似物, 如小鼠(*Mus musculus*)、家蚕(*Bombyx mori*)、烟草天蛾(*Manduca sexta*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等(Chai *et al*, 2000; Choi *et al*, 2005; Cao *et al*, 2012; Shafi *et al*, 2013)。它们在 DNA 结合结构域和 *ftz-fl* box 区域都有相对的高度保守性, 且在其它区域保守性较弱。蜕皮激素(20E)与核受体

EcR 以及核受体家族的类视黄酸受体 *RXR* 形成异二聚体复合物(配体-受体)复合物是引发 20E 初级应答基因表达的关键环节(Riddiford *et al*, 2000)。20E-*EcR*-USP 与共激活因子 TAIMAN 复合物结合于启动子后, 启动早期的核受体应答基因的表达, 如 *ftz-fl*、*HR3* 等(Crossgrove *et al*, 2008)。通过这些早期应答的核受体基因进一步调控下游基因的表达, 如天冬氨酸凋亡酶编码基因、死亡激活因子等, 导致蜕皮和变态过程中的细胞自噬和凋亡, 从而调控蜕皮、变态等生理过程(Liu *et al*, 2009; Spindler *et al*, 2009)。此外, 也有研究证明 *ftz-fl* 基因在调控表皮基因的表达以及表皮蛋白的沉积上具有不可替代的作用(Yamada *et al*, 2000)。然而有关 *ftz-fl* 基因在甲壳动物蜕皮中的功能研究尚无报道。

通过对本实验室三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)转录组数据库的筛选, 获得一个在三疣梭子蟹不同

* 国家自然科学基金项目, 41576147 号, 41306177 号; 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目, 2015ASKJ02 号。张龙涛, E-mail: zhanglongt@126.com

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

收稿日期: 2015-03-15, 收修改稿日期: 2015-08-08

蜕皮时期显著差异表达的核受体超家族基因 *ftz-fl* 的 EST 序列, 克隆出该基因的全长 cDNA 序列并命名为 *PTNHr*。采用生物信息学软件分析该基因及其翻译的氨基酸序列; 借助 Blast 程序对与其相近物种的 *ftz-fl* 氨基酸序列同源性进行建树分析。采用实时荧光定量技术对核受体基因 *ftz-fl*、*EcR* 和 *RXR* 在蜕皮周期中的表达情况进行分析, 对 *ftz-fl* 基因在去除单侧眼柄后的表达情况进行分析, 初步的阐明这些基因与蜕皮激素在蜕皮过程中的相互联系。本研究结果将有助于补充 *ftz-fl*、*EcR* 和 *RXR* 基因在三疣梭子蟹中与蜕皮激素相互作用与调控关系, 进一步的丰富三疣梭子蟹蜕皮过程分子调控机制的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用三疣梭子蟹取自黄海水产研究所实验基地日照开航水产养殖有限公司, 体重为(32±5)g。暂养于室内圆柱形水泥池内, 水池底面积为 20m², 高度 1.5m, 池水深保持为 20—30cm, 水温 25°C 左右, pH 8.7, 溶解氧 5.5mg/L。暂养 3d, 每日 8:00 定时换掉 1/2 的水, 16:00 投喂蛤类或者野杂鱼(投喂量为蟹重的 1/10)。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

采用 Trizol 法分别提取三疣梭子蟹各个组织的总 RNA, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检验总 RNA 的质量和完整性。取等量的眼柄、肝胰腺和肌肉组织的总 RNA 混匀, 严格按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 试

剂盒的说明方法来合成 3'和 5'RACE 的 cDNA 第一链。

1.3 转录组测序

选取不同蜕皮时期三疣梭子蟹眼柄组织 RNA。构建 cDNA 文库, 送交诺禾致源公司的 Illumina Hiseq 2000 平台进行测序。从 29889 个 unigene 中总共筛选出 1389 个蜕皮相关的功能基因, 挑选出三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因序列做进一步的研究。

1.4 引物的设计

根据得到的三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件基于 RACE 原理设计 3'和 5'末端特异性引物。根据 NCBI 上已公布的三疣梭子蟹蜕皮激素受体基因(*EcR* JQ250795)和类视黄酸受体基因(*RXR* KF061043.1)设计荧光定量引物。实验中所用到的引物由上海生工生物有限公司合成(表 1)。

1.5 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因全长 cDNA 的克隆及验证

利用 Advantage 2 PCR Kit 试剂进行末端扩增, 3'用通用引物 UPM 和 NUP 分别与相应的特异性引物 NHr-F1 和 NHr-F2 进行巢式 PCR 扩增(反应程序 94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 3min, 27 个循环); 同样的程序以及相应的特异性引物进行 5'端的扩增。

将 3'和 5'RACE 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 切胶纯化并且连接到 PMD18-T 载体, 转化入大肠杆菌 Top ten 感受态细胞中, 在培养基中 37°C 过夜培养后, 挑取阳性菌落继续培养。进行菌落 PCR 后, 挑选含有目的条带的菌液送交上海桑尼公司测序。在该基因的两端设计正反向引物, 进行全长 cDNA 的验证。

表 1 实验中所用到的引物
Tab.1 The Sequences of the primer used in this experiment

引物	序列(5'—3')
NHr-F1	GCCTATCACAGTCTGCTACAGTCAA
NHr-F2	GTCAACTGGATGGAGACTCACCC
NHr-R1	ACCGTTGTCGGCAATGAAGTG
NHr-R2	CGTTGTCGGCAATGAAGTGGA
QNHr-F	GGCCAGAACTCCTGCTACTT
QNHr-R	GAAGTGTGTAGTCCCGAGCA
QEcR-F	CAGGCTATCACTACAACGCACT
QEcR-R	TGAGGCGACATTCTTGACAC
QRXR-F	GATGCCAAAGGAGTGACCTG
QRXE-R	TGGACCTGAGTGATGGGAGT
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
β-actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
β-actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC
YNHr-F	CCTCTTCTCGTACTGCAGAACCA
YNHr-R	GGCAGACAGATTGGACAAGTGCC

1.6 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 中的 BLAST 主页程序进行主要的核苷酸序列以及氨基酸序列的比对。利用 Vector NTI 11.0 进行核苷酸序列的拼接比对、冗余序列的去除、开放阅读框的预测和氨基酸的翻译。利用 DNAMAN 进行氨基酸序列的比对。利用 SMRAT 和 InterProScan 进行蛋白质跨膜区的分析。利用 ProParam tool 进行氨基酸残基分析及蛋白质等电点、分子量等预测。利用 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.7 蜕皮过程的分期及去除单侧眼柄实验

采用解剖镜观察三疣梭子蟹游泳足表皮生长状况的方法来区分不同蜕皮时期(沈洁等, 2011)。取处于蜕皮间期、蜕皮前期、蜕皮后期的蟹各 6 只, 分别取其眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、血液、鳃, 每两只螃蟹的组织放入一个 EP 管中, 存放于液氮中保存, 用以之后的提取 RNA 和定量分析使用。

采用烫伤法去除三疣梭子蟹的单侧眼柄。将烧红的镊子夹住蟹眼后红色膨大部分基部(此处为眼柄窦复合体)1—2s, 破坏单侧眼柄的分泌及调控功能。用土霉素按照 50—100mg/L 的浓度进行全池的消毒。暂养 7d 后挑取处于蜕皮间期、前期、后期的蟹, 取眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、血液、鳃组织, 存放于液氮中保存。

1.8 三疣梭子蟹 *ftz-fl*、*EcR* 和 *RXR* 基因的表达定量分析

用研钵将采集的组织样品在液氮中研磨, 每个 EP 管单独研磨, 然后在每 1mL Trizol 试剂中加入 50—100mg 的组织粉末, 震荡混匀分开标记后放入-80°C 中保存。按照 Trizol 法提取 RNA 的步骤提取各个组织的总 RNA, 利用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROX)试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。

采用 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂, 在 ABI 7500 Real Time PCR 仪对各个组织的基因表达情况进行测定。反应体系为 10 μ L, 包括 5 μ L 的 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)、0.1 μ L 的正反向引物、3.8 μ L 的 PCR 反应水、1 μ L 的 cDNA。反应程序为 95°C 10min, 95°C 10s, 60°C 34s, 40 个循环; 95°C 15s, 60°C 1min, 95°C 15s。为了得到更为可靠的定量分析结果, 采用 geNorm 软件对 β -actin 和 18S rRNA 这两个内参基因进行分析, 结果显示 β -actin 在蜕皮周期更为稳定。以 β -actin 基因作为内参, 样本和内参均设置 3 个重复, 每个样本为单个 EP 管中组织合成的模版。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各

个基因的相对表达量, 使用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析其显著性, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

2.1 总 RNA 提取

采用 Trizol 法提取的各个组织的 RNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 呈现 3 条清晰的条带, 说明 RNA 完整性较好; 用核酸定量仪检测 RNA, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.9—2.0 之间, 说明 RNA 纯度较高, 可用于后续实验。

2.2 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因全长 cDNA 的克隆及验证

该基因的 EST 序列长 1165bp, 用 blastx 对序列进行在线比对, 结果显示: 该序列与其它物种的 *ftz-fl* 的相似度在 65% 以上。3'RACE 扩增结果得到大小为 666bp 的 cDNA 片段, 5'RACE 扩增结果得到大小为 539bp 的 cDNA 片段。将这两个片段与已知 EST 序列进行拼接, 去除冗余序列得到三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *PTNHr*。对该基因全长 cDNA 进行测序验证, 验证出覆盖开放阅读框的 1585bp 序列准确、可靠。该 cDNA 序列全长为 1763bp (GenBank 登录号 KP299258), 其中包括 588bp 的开放阅读框(ORF), 141bp 的 5'端非编码区(UTR), 1034bp 的 3'端非编码区(UTR) (图 1)。

2.3 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因序列的生物学分析

DNASTAR 软件分析表明, 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因编码一个由 195 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 22.8kDa, 理论等电点为 6.35。该蛋白具有核受体家族标志的 DNA 结合域(DBD)和配体结合域(LBD)。ProtParam tool 软件分析表明, *ftz-fl* 蛋白带有负电的氨基酸残基为 26 个(Asp 和 Glu), 带有正电的氨基酸残基为 23 个(Arg 和 Lys), 不稳定系数为 27.7, 亲水性平均数为-0.291, 属于稳定蛋白。使用 SMRAT 和 InterProScan 在线软件分析, *ftz-fl* 基因翻译的蛋白质结构中无跨膜结构域。

2.4 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的同源性分析

BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的氨基酸序列, 发现与刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)同源性达到 75.4%, 与切叶蚁(*Acromyrmex echinatio*)、德国小蠊(*Blattella germanica*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、烟草天蛾(*Manduca sexta*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)的同源性分别为 66.0%、67.5%、61.9%、61.9%和 66.0%(图 2)。

利用 MEGA6.0 软件进行系统进化分析, 构建系

```

1 GTGGCAGCGG GCGGGCCCGG GATCCCTCTG ATCATCCGTG AGCTGGTGGG GACCGTGGAC GACCAGGAGT GGCAGAGCTC CCTCTTCTCG 90
          M C K V L D Q N L F A
91 CTACTGCAGA ACCAGACCTA CAACCAGTGT GAGGTGGACC TGTTCGAGCT C ATG TGC AAG GTG CTC GAC CAA AAC TTA TTC GCG 174
  Q V D W A R N S C Y F K D L K V D D Q M K L L Q H
175 CAG GTG GAC TGG GCC AGA AAC TCC TGC TAC TTT AAG GAT CTC AAG GTT GAT GAT CAG ATG AAA CTC CTA CAA CAC 249
  S W S D L L I L D H L H Q R I H N R L Q D E T T L
250 TCT TGG TCT GAT CTG CTG ATT CTC GAT CAC CTA CAC CAA CGT ATA CAT AAT AGA CTT CAG GAC GAG ACC ACA CTG 324
  P N G Q K F D L L S L A L L G T T Q F A D R F H A
325 CCA AAT GGT CAG AAG TTT GAC CTG CTT TCC CTG GCT CTG CTC GGG ACT ACA CAG TTC GCT GAC CGT TTC CAT GCC 399
  V L S K L I D L K F D V P E Y I C L K F L I L L N
400 GTC CTC AGC AAG CTT ATT GAC CTC AAG TTT GAC GTT CCA GAG TAT ATT TGC CTC AAG TTC CTT ATT CTC CTT AAT 474
  P A E V R L L S D R R S V S T A H E Q V K Q A L M
475 CCA GCA GAG GTG AGA CTG CTG AGT GAC CGG CGC TCA GTC AGC ACG GCA CAC GAA CAG GTC AAA CAG GCC CTT ATG 549
  E Y I T N V H P E D T E K Y Q K M M D L L P E L H
550 GAG TAC ATC ACC AAT GTT CAT CCT GAG GAC ACG GAG AAA TAC CAG AAG ATG ATG GAC CTT CTA CCG GAA CTC CAC 624
  F I A D N G E K Y L Y F K H I N G A A P T Q T L L
625 TTC ATT GCC GAC AAC GGT GAA AAA TAC CTT TAC TTC AAG CAC ATA AAC GGT GCC GCA CCC ACG CAG ACT TTG TTA 699
  M E M L H T K R K *
700 ATG GAA ATG CTG CAC ACT AAA CGG AAA TAA GAGGAGTGG CAAACTTCA ACITCAGCC GTCCAGTGGC CCACATGTG 779
780 AGAGAGGGTG GAAAACAAG TTTTGTGTC CAGAGCAGG TGGGAAGTTC CTTGGTTCAGT GCAGTGAGTA CACCAGCTTG ACCAGCCAGC 869
870 CTGCCAGCCT ACCCAGCTAT CACAGTCTGC TACAGTCAAG TAGTACTGG CGTCTGCCAC AGCCCCGGAA CAAGGGTTC TGGGTGGCGC 959
960 AGAAGCAGCT GTGCACACT GCCCATCCCT TACAACAAG CTAAGGACTA AGCTTCATGT TGTCTGTGTG GACAATGTAG AGGAGGATCT 1049
1050 GTCTAACCAG CAACCCACTC ACTGTCAAGG TAGITCAAAA TTGCTGAGTG TCAACTGGAT GGAGACTCAC CCTCATCCAC CATCACCAGC 1139
1140 ATCACACCAC CACACCACCA CCACACCAC TCCACTGTG CAGGCATCCA AATAGTGTAG TGCTGTGCTA GTCAAAACCTT GTGAGGGGTG 1229
1230 GAGACGTTGC TCTGAACCTI GCCGACGCCA GACTGICATC TGTGGTGTCTA AGTAGCTCCG GGATGCCCTG AGGTACAAGA GTAGTGGAGT 1319
1320 GGCCTTGAGC AATGGACAGC ACGGGTGGCC AGTGTGTGGC TCGTGTGTGTG TGGCTCTCC CTCCCTCCCT CCCTCCCTCC CTCCCTGTT 1409
1410 TCATTTGTTA CCAGAAGCAC TCAITGGTGA ATCAGGACTA ATATTAGCAA GTTGAGGCTC TCAAGTGCAG ACCAGTCACT GGTGCGCTAC 1499
1500 TCTCACTAAA CGATATTAAC CTGATACATA CAAGTAGGAA GGTTTTTCTG TCCCAGTGTG GCGCATCATA CCTCATTCT CACTGTTCTT 1589
1590 ATGGTGGCGG TCTCCTCACT CACTCACTTT GGTACAAAG TCTCACTGTG GAATACGTTT CAACACTTAT ATATCTATIT ATTTCTGAGT 1679
1680 ATAATTACTA CAAAGACCTG GGCACCTGTC CAATCTGTCT GCCCAGATAC ATAAATAATA ATAAAAAATA AAAAAAATAA AAAAA 1763

```

图 1 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

Fig.1 *ftz-fl* nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *P. trituberculatus*

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 下划线: *ftz-fl* 基因 DNA 结合域和配体结合域; 方框: 配体结合位点

P. trituberculatusMCKVLDCNI FSCVDWARNSCVFF	23
A. echinator	MIREFLSSIDREWCTSLFGLLCSCTYNCCFVLLFELMCKVLDLNI FSCVDWARNSTEFK	60
B. germanicaMCKVLDCNI FSCVDWARNSVFFK	23
D. melanogasterMCKVLDCNI FSCVDWARNIVFFK	23
M. sextaMCKVLDCNI FSCVDWARNIVFFK	23
T. castaneumMCKVLDCNI FSCVDWARNSVFFK	23
M. ensisMCKVLCQNL FSCVDWERNSCVFFK	23
ConsensusMCKVLDLNI FSCVDWARNSCVFFK	
P. trituberculatus	DLK.....VDDCMKLI CHSWSDI LLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIISLA	73
A. echinator	DLK.....VDDCMKLI CHSWSDI VLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIICIG	110
B. germanica	DLK.....VDDCMKLI CHSWSDI VLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIICIG	73
D. melanogaster	DLK.....VDDCMKLI CHSWSDI VLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIISIG	73
M. sexta	YLK.....VDDCMKLI CHSWSDI VLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIICIG	73
T. castaneum	DLKELINLPMVFCVDDCMKLI CHSWSDI VLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIISIG	83
M. ensis	DLK.....VDDCMKLI CHSWSDI LLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIISLA	73
Consensus	DLK.....VDDCMKLI CHSWSDI LLDLHQRHNRHLCETLILNCGRFDIISLA	
P. trituberculatus	LIQVPSLAETFRRLSKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...AVRGLISRRSVSTAHEO	130
A. echinator	LIQVPSLAETFRRLSKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...DVRGLVNRKFCVCEGHO	166
B. germanica	LIQVPTLADHESDLMAKLCDLRFVDVPEYICVKFILLINE...DVRGIMNRHFVCEGYO	129
D. melanogaster	LIQVPELCIDYENELCNKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...SVRGLVNRKTVSEGHEN	129
M. sexta	LIQVPEALADHFNELCNKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...DVRGLVNRKFCVCEGYO	129
T. castaneum	LIQVPSLAETFRRLSKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...DVRGIMNRHFVCEGYO	139
M. ensis	LIQVPSLAETFRRLSKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...DVRGLVNRKFCVCEGYO	133
Consensus	LIQVPSLAETFRRLSKTLCELRFDVPEYICVKFILLINE...DVRGLVNRKFCVCEGYO	
P. trituberculatus	VKCAIMETITNVHFEELTEKYCKMMLLIPEHFFIADNGRKYLYRKHINGAAPTCTILMFMFL	190
A. echinator	VCCATMEYITLSSHESVLDKFNKLLAVIPDHFVATKGRFHTYKRFHNGGAPTCTILMFMFL	226
B. germanica	VCCATMDYITVNCYPCICDKFTRKLLLVIPDHFVATKGRFHTYKRFHNGGAPTCTILMFMFL	189
D. melanogaster	VCAAILDYITLTCYFSVNDKFRGIVNIIPEHFFIADNGRKYLYRKHINGAAPTCTILMFMFL	189
M. sexta	VCAAILDYITLTCYFVCDKFRGLVMVPEHFFIADNGRKYLYRKHINGAAPTCTILMFMFL	189
T. castaneum	VCCATMEYITVNCYPCICDKFNRKMLLIPEHFFIADNGRKYLYRKHINGAAPTCTILMFMFL	199
M. ensis	ATGIDGINSCLFRVSSGEIQLMMLLIPEHFFIADNGRKYLYRKHINGAAPTCTILMFMFL	193
Consensus	VKCAIMETITNVHFEELTEKYCKMMLLIPEHFFIADNGRKYLYRKHINGAAPTCTILMFMFL	
P. trituberculatus	HTRRK.....	195
A. echinator	FAARRK.....	231
B. germanica	FAARRK.....	194
D. melanogaster	FAARRK.....	195
M. sexta	FAARRKENGGMVNRSAFHTSTLTYLFTFNKFTLTPPALRTRSR	235
T. castaneum	FAARRK.....	204
M. ensis	HNCKEIEEVVTFCFQPSAFHVYIKGSRVSVSSHVRFEGGSFP..	237
Consensus	HTRRK.....	

图 2 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 氨基酸序列与其它物种的 *ftz-fl* 氨基酸序列比对

Fig.2 The amino acid sequence of *P. trituberculatus ftz-fl* alignment with other species

统进化树(图 3)。结果显示 13 个物种中, 三疣梭子蟹与刀额新对虾紧密聚为一支, 之后与赤拟谷盗、德国

小蠊亲缘关系较近。在昆虫中, 黑腹果蝇与嗜凤梨果蝇紧密聚为一支, 家蚕与烟草天蛾等聚为一支。

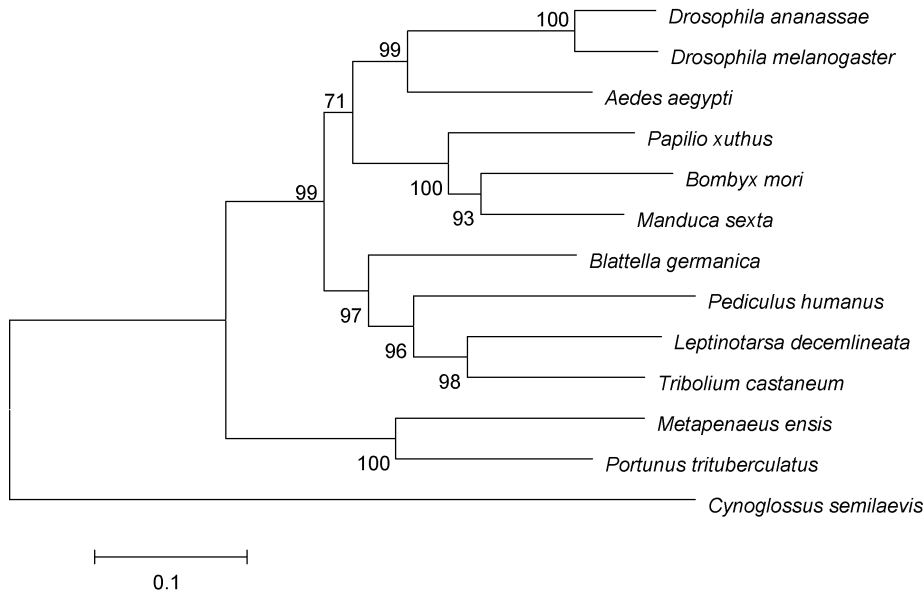


图 3 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建的三疣梭子蟹与其它物种的 *ftz-fl* 氨基酸的系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree of amino acid sequence of *P. trituberculatus ftz-fl* and other species made by MEGA 6.0

注: 分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度, 只显示置信度>80%的数值; 标尺长度代表每个位点发生 0.05 次置换。

各种登录号: 嗜凤梨果蝇(XM_001958169.1)、黑腹果蝇(M63711.1)、埃及伊蚊(AF274870.1)、柑橘凤蝶(AK404795.1)、家蚕(NM 001044063.2)、烟草天蛾(AF288089.1)、德国小蠊(FM163377.1)、人虱(XM_002430334.1)、马铃薯甲虫(KM091936.1)、赤拟谷盗(XM_008193152.1)、刀额新对虾(AF159132.1)。

GenBank accession number of different species: *Drosophila ananassae* (XM_001958169.1), *Drosophila melanogaster* (M63711.1), *Aedes aegypti* (AF274870.1), *Papilio xuthus* (AK404795.1), *Bombyx mori* (NM 001044063.2), *Manduca sexta* (AF288089.1), *Blattella germanica* (FM163377.1), *Pediculus humanus* (XM_002430334.1), *Leptinotarsa decemlineata* (KM091936.1), *Tribolium castaneum* (XM_008193152.1), *Metapenaeus ensis* (AF159132.1)

2.5 三疣梭子蟹三个核受体基因的表达情况分析

2.5.1 三疣梭子蟹不同蜕皮时期, 各个组织中 *ftz-fl*、*EcR* 和 *RXR* 基因的表达情况

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析三疣梭子蟹各个组织中 *ftz-fl* 基因在不同的蜕皮时期的表达特征。结果表明, 眼柄中 *ftz-fl* 基因在蜕皮后期的表达量明显高于蜕皮间期和蜕皮前期; 但是肝胰腺、心脏和鳃中 *ftz-fl* 基因在蜕皮后期却明显低于蜕皮间期和蜕皮前期; 血细胞和肌肉中该基因的表达量在蜕皮各个时期的变化不明显(图 4)。

三疣梭子蟹各个组织中 *EcR* 基因在不同的蜕皮时期的表达情况: 在眼柄、心脏和鳃中, 三疣梭子蟹 *EcR* 基因的表达量均为蜕皮前期高于蜕皮间期和蜕皮后期; 在血细胞、肌肉和肝胰腺中, *EcR* 基因的表达量为蜕皮后期高于蜕皮间期和蜕皮前期(图 5)。

三疣梭子蟹各个组织中 *RXR* 基因在不同的蜕皮时期的表达情况: 眼柄中 *RXR* 基因在蜕皮后期表达

量低于蜕皮间期和蜕皮前期; 血细胞、肝胰腺、心脏和鳃中 *RXR* 基因在蜕皮后期表达量明显高于蜕皮间期和蜕皮前期; 肌肉中 *RXR* 基因表达量在蜕皮各个时期中变化不明显(图 6)。

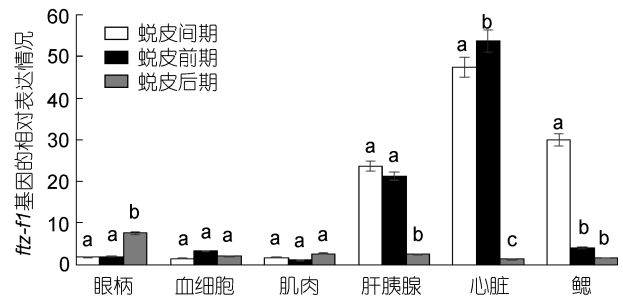


图 4 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因在不同蜕皮时期各个组织中的表达分布情况

Fig.4 Distribution of *ftz-fl* gene expression in different tissues in different molt stages

同一组织内, 不同字母之间为差异显著($P < 0.05$), 相同字母之间为差异不显著($P > 0.05$)。不同组织之间不具有可比性。下同

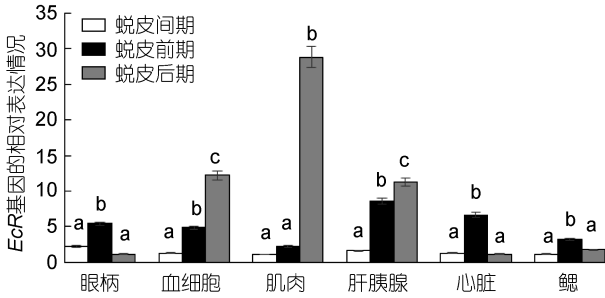


图 5 三疣梭子蟹 *EcR* 基因在不同蜕皮时期各个组织中的表达分布情况

Fig.5 Distribution of *EcR* gene expression in different tissues in different molt stages

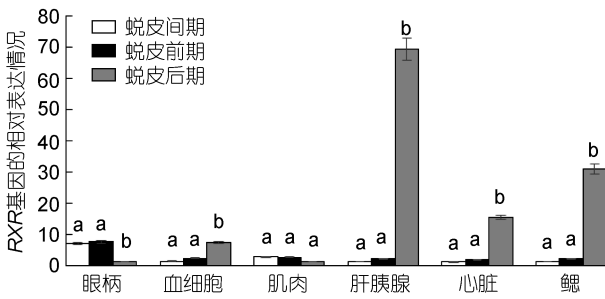


图 6 三疣梭子蟹 *RXR* 基因在不同蜕皮时期各个组织中的表达分布情况

Fig.6 Distribution of *RXR* gene expression in different tissues in different molt stages

2.5.2 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因在不同蜕皮时期, 去除单侧眼柄与正常相对比的表达情况 对去除单侧眼柄的三疣梭子蟹在不同蜕皮时期, 与相应的正常对照组进行实时荧光定量。结果显示: 在蜕皮前期与蜕皮间期, 去除单侧眼柄后 *ftz-fl* 基因的表达量在整体上明显低于相应的正常对照组, 并且表达差异较大(图 7、图 8)。但是在蜕皮后期, 去除单侧眼柄后 *ftz-fl* 基因的表达量在肝胰腺、心脏和鳃中的表达量却是高于正常对照组(图 9)。

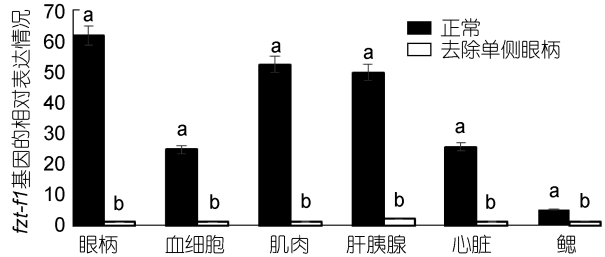


图 7 去除单侧眼柄后, *ftz-fl* 基因在三疣梭子蟹蜕皮前期与正常对照各个组织中的相对表达情况

Fig.7 After single eye- ablation, distribution of *ftz-fl* gene expression in different tissues of pre-molt stage compare to those in normal condition

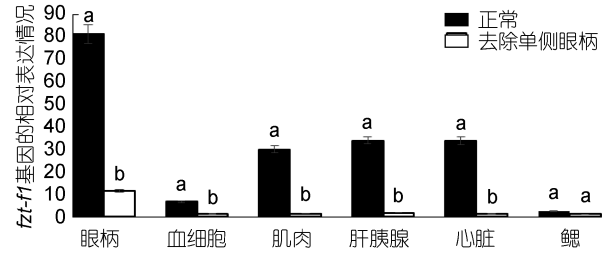


图 8 去除单侧眼柄后, *ftz-fl* 基因在三疣梭子蟹蜕皮间期与正常对照各个组织中的相对表达情况

Fig.8 After single eye- ablation, distribution of *ftz-fl* gene expression in different tissues in inter-molt stage compare to that in normal condition

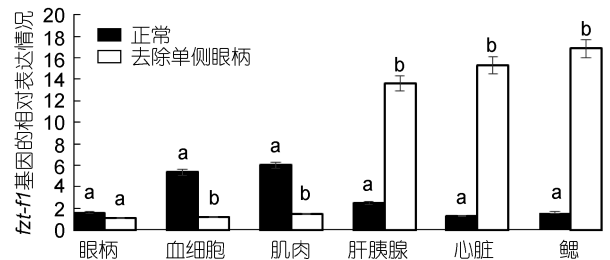


图 9 去除单侧眼柄后, *ftz-fl* 基因在三疣梭子蟹蜕皮后期与正常对照各个组织中的相对表达情况

Fig.9 After single eye- ablation, distribution of *ftz-fl* gene expression in different tissues of post-molt stage compare to normal condition

3 讨论

核受体是配体依赖性转录因子超家族, 能够直接与 DNA 结合, 调节下游靶基因的表达, 与机体的代谢、生殖和发育等多种生理过程密切相关(Mckenna *et al*, 2002)。 *ftz-fl* 基因属于核受体第 5 家族 A 组, 该组内的核受体基因是重要的甾类激素合成调控因子(Lu *et al*, 2001)。 *ftz-fl* 基因在鱼类中研究较为深入, 但是在甲壳类中却很少有报道(Liu *et al*, 1997; Masuda *et al*, 1998; Lin *et al*, 2000)。 本实验克隆得到三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因, 该基因具有核受体基因特有的 DNA 结合结构域(DBD)和配体结合区(LBD)。 该基因序列与刀额新对虾克隆出的 *ftz-fl* 蛋白同源性达到 75.4%, 系统进化分析中也与刀额新对虾聚为一支。

蜕皮激素对于甲壳类的蜕皮过程起着至关重要的作用。 已有的研究证明, 蜕皮激素在血液中是以 20-羟蜕皮酮(20E)形式存在。 20E 在血液内的浓度在蜕皮前期逐渐升高, 临近蜕皮时, 形成一个峰值, 然后浓度再迅速下降(Wang *et al*, 2000; Watson *et al*, 2001)。 整个调控过程是通过 20E-*EcR*-*RXR* 配体-受体复合物引发的应答基因级联放大反应完成, 20E 与蜕

皮激素受体 *EcR* 和类视黄酸受体(*RXR*)异二聚体复合物在细胞核内形成转录复合体,进而引发 20E 初级应答基因(如 *ftz-fl*、*HR3* 等)表达(Durica *et al*, 1999; LeBlanc, 2007)。初级反应基因编码的转录因子诱导表达的 20E 次级应答基因级联放大 20E 信号,进而调控下游基因表达。

实时定量分析 *ftz-fl* 基因在不同蜕皮时期各个组织中的相对表达情况,结果表明:眼柄中 *ftz-fl* 基因的表达量为蜕皮后期高于蜕皮前期和蜕皮间期,而在肝胰腺、心脏和鳃组织中 *ftz-fl* 基因的表达量为蜕皮后期低于蜕皮前期和蜕皮间期。推测在眼柄中,该基因与 20E 呈负调控关系,而在肝胰腺、心脏和鳃中该基因与 20E 呈正调控关系。由于眼柄中 X 器-窦腺复合体合成蜕皮抑制激素(*MIH*) (Nakatsuji *et al*, 2004),因此该基因在眼柄中的表达可能与 *MIH* 更为相关。对核受体基因 *EcR* 在蜕皮周期中的定量分析结果显示:眼柄、心脏和鳃组织中, *EcR* 基因在蜕皮前期表达量高于其它两蜕皮时期,表达模式与 20E 在蜕皮时期的浓度变化相似,说明了该基因与 20E 的协同调节作用,这与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的研究结果一致(Asazuma *et al*, 2007)。在血细胞、肝胰腺和肌肉中, *EcR* 基因的表达模式为蜕皮后期高于蜕皮前期高于蜕皮间期,出现了与 20E 浓度不协调的现象。也有学者发现,在蓝蟹(*Callinectes sapidus*)体内 *EcR* 基因的表达量与 20E 在血淋巴中的浓度并不协同,关于这一现象的解释还有待于进一步的研究(Techa *et al*, 2013)。核受体基因 *RXR* 在蜕皮周期的定量结果显示: *RXR* 与 *ftz-fl* 基因在肝胰腺、心脏和鳃组织中的表达模式上呈现出完全相反的趋势,这预示着 *RXR* 和 *ftz-fl* 这两个基因之间可能存在典型的抑制调控作用。而 *RXR* 与 *EcR* 基因在整体上呈现相似的表达模式,这与中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中的研究相一致(Priya *et al*, 2009; 王瑶等, 2013)。由于 *RXR* 蛋白和 *EcR* 蛋白是作为 20E 异二聚体复合物的组成部分,因此这两个基因在三疣梭子蟹的蜕皮功能上也更趋向于协同调节作用。

甲壳类蜕皮激素是由 Y 器官合成与分泌,而 Y 器官则受 *MIH* 的调控(罗荣生等, 1990; Gong *et al*, 2015)。眼柄中 X 器-窦腺复合体是 *MIH* 制造与分泌的器官,去除单侧眼柄将会造成 20E 浓度的上升(Devaraj *et al*, 2006; Wang *et al*, 2013)。去除单侧眼柄后对 *ftz-fl* 基因在各个组织中的表达量进行分析,发

现在去除单侧眼柄后该基因的表达量在各个蜕皮时期组织中出现明显下降;说明 20E 浓度的升高对 *ftz-fl* 基因的表达起到了明显的抑制作用。由此可以推测出, *ftz-fl* 基因在蜕皮过程中具有重要的作用,与 20E 具有紧密的联系,且更可能为抑制调控关系。

4 结论

本研究成功克隆出了三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因全长 cDNA 序列,并进行了生物信息学的分析。对三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因以及相关的核受体基因 *EcR* 和 *RXR*,在蜕皮周期各个组织中的表达情况进行了分析并预测之间可能存在的联系。本实验证明了 *ftz-fl* 基因在蜕皮过程中的调控作用,并对与三个重要的蜕皮功能相关核受体基因之间的联系进行了初步的探讨。有关 *ftz-fl* 基因以及核受体基因在蜕皮中的功能,还需要更多的研究。关于核受体基因之间的相互作用与联系也需要更为深入的生物学技术来进行研究。

参 考 文 献

- 王 瑶, 杨志刚, 郭子好等, 2013. 中华绒螯蟹 *RXR* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析. 水产学报, 37(12): 1761—1769
- 沈 洁, 朱冬发, 胡则辉等, 2011. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. 水产学报, 35(10): 1481—1487
- 罗荣生, 王幽兰, 曹梅讯等, 1990. 中华绒螯蟹血淋巴 20-羟蜕皮酮诱发蜕皮和卵巢发育的作用. 动物学报, 36(2): 157—164
- Asazuma H, Nagata S, Kono M *et al*, 2007. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 148(2): 139—150
- Boulanger A, Clouet-Redt C, Farge M *et al*, 2011. *Ftz-fl* and *Hr39* opposing roles on *EcR* expression during *Drosophila* mushroom body neuron remodeling. Nat Neurosci, 14(1): 37—44
- Cao J L, Chen J J, Jiang Z L *et al*, 2012. Molecular cloning and expression analysis of FTZ-F1 in the GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. Zool Res, 33(E3-4): E40—E46
- Chai C, Chan W K, 2000. Developmental expression of a novel Ftz-F1 homologue, *ff1b* (NR5A4), in the zebrafish *Danio rerio*. Mech Dev, 91(1—2): 421—426
- Gong J, Ye H H, Xie Y J *et al*, 2015. Ecdysone receptor in the mud crab *Scylla paramamosain*: a possible role in promoting ovarian development. J Endocrinol, 224(3): 273—287
- Choi C Y, Habibi H R, 2005. Molecular cloning and tissue distribution of SF-1-related orphan receptors during sexual maturation in female goldfish. Biotechnol Lett, 27(17): 1283—1290
- Crossgrove K, Maina C V, Robinson-Rechavic M *et al*, 2008. Orthologues of the *Drosophila melanogaster* *E75* molting control gene in the filarial parasites *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis*. Mol Biochem Parasitol, 157(1): 92—97

- Durica D S, Chung A C K, Hopkings P M *et al*, 1999. Characterization of *EcR* and *RXR* gene homologs and receptor expression during the molt cycle in the crab, *Uca pugilator*. *Amer Zool*, 39(4): 758—773
- Devaraj H, Natarajan A, 2006. Molecular mechanisms regulating molting in a crustacean. *FEBS J*, 273(4): 839—846
- LeBlanc G A, 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology*, 16(1): 61—81
- Kuroiwa A, Hafen E, Gehring W J, 1984. Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene *fushi tarazu* of *Drosophila*. *Cell*, 37(3): 825—831
- Wang C J, Zhu D F, Qi Y Z *et al*, 2013. Molt-inhibiting hormone levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of *Portunus trituberculatus*. *Acta Hydrobiol Sin*, 37(1): 22—28
- Lin W W, Wang H W, Sum C *et al*, 2000. Zebrafish *ftz-fl* gene has two promoters, is alternatively spliced, and is expressed in digestive organs. *Biochem J*, 348(2): 439—446
- Liu D, Le Drean Y, Ekker M *et al*, 1997. Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the *salmon gonadotropin* II beta subunit gene. *Mol Endocrinol*, 11(7): 877—890
- Liu Y, Sheng Z T, Liu H H *et al*, 2009. Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, 136(12): 2015—2025
- Lu T T, Repa J J, Mangelsdorf D J, 2001. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem*, 276(41): 37735—37738
- Ito M, Masuda A, Yumoto K *et al*, 1998. cDNA cloning of a new member of the FTZ-F1 subfamily from a rainbow trout. *Biochim Biophys Acta*, 1395(3): 271—274
- McKenna N J, O'Malley B W, 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108(4): 465—474
- Wang W L, Spaziani E, Huang H Z *et al*, 2000. Ecdysteroid hormones and metabolites of the stone crab, *Menippe mercenaria*. *J Exp Zool*, 286(7): 725—735
- Nakatsuji T, Sonobe H, 2004. Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen Comp Endocrinol*, 135(3): 358—364
- Priya T A J, Li F H, Zhang J Q *et al*, 2009. Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on *E75* and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 153(1): 121—129
- Riddiford L M, Cherbas P, Truman J W, 2000. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm*, 60(1): 1—73
- Shafi M, Wang Y N, Zhou X S *et al*, 2013. Isolation and expression analysis of FTZ-F1 encoding gene of black rock fish (*Sebastes schlegelii*). *J Ocean Univ China*, 12(1): 183—189
- Spindler K D, Hönl C, Tremmel C H *et al*, 2009. Ecdysteroid hormone action. *Cell Mol Life Sci*, 66(24): 3837—3850
- Techa S, Chung J S, 2013. Ecdysone and retinoid-X receptors of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Cloning and their expression patterns in eyestalks and Y-organs during the molt cycle. *Gene*, 527(1): 139—153
- Watson R D, Lee K J, Qiu S H *et al*, 2001. Molecular cloning, expression, and tissue distribution of crustacean molt-inhibiting hormone. *Am Zool*, 39(5): 407—417
- Yamada M, Murata T, Hirose S *et al*, 2000. Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 127(23): 5083—5092

CLONING OF *PORTUNUS TRITUBERCULATUS ftz-fl* cDNA AND EXPRESSION ANALYSIS OF RELATED NUCLEAR RECEPTORS DURING MOLTING CYCLE

ZHANG Long-Tao^{1,2,3}, LV Jian-Jian^{1,3}, GAO Bao-Quan^{1,3}, LIU Ping^{1,3}, FU Ping^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China)

Abstract We successfully cloned *ftz-fl* gene of *Portunus trituberculatus* for the first time using RACE (rapid-amplification of cDNA ends) method, and named it PTNHr. The full-length cDNA sequence of *ftz-fl* is 1763bp, which contains a 1034bp 5'-UTR, 141bp 3'-UTR, and 588bp open reading frame (ORF) that encodes 195 amino-acid polypeptides. It has a molecular mass of 22.8 kDa and isoelectric point (pI) of 6.35. Homologous analysis showed that *ftz-fl* has the highest homology to *Metapenaeus ensis*, and phylogenetic analysis showed that *ftz-fl* of *P. trituberculatus* was also in the same branch with *M. ensis*. In addition, using RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), we investigated the functions of *ftz-fl*, *EcR*, and *RXR* in different molting stages. The results reveal different expression patterns of the molting-regulation function of them, of which *ftz-fl* and *RXR* show opposite features, indicating a mutual suppression relation of them, while those of *EcR* and *RXR* are similar somewhat.

Key words *Portunus trituberculatus*; *ftz-fl*; Gene cloning; expression analysis; nuclear receptor