

## 三疣梭子蟹 *EcR* 基因的克隆及表达分析

崔晓雨, 朱冬发\*, 汤洁, 谢熙, 邱锡尔

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 为研究蜕皮激素受体 (*EcR*) 在甲壳动物生长和生殖过程中的作用, 采用反转录 PCR (RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术, 克隆了三疣梭子蟹蜕皮激素受体 (*PtEcR*) 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: KC354381), 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法, 分析该基因在不同组织、蜕皮时期和二次卵巢发育阶段的表达特征。结果表明, *PtEcR* cDNA 全长 2 231 bp, 包含 1 269 bp ORF, 编码 422 个氨基酸; 推导的 *PtEcR* 氨基酸序列与已公布的其他甲壳动物 *EcR* 进行比对, 发现一致性达 67%~97%; 系统进化树分析 *PtEcR* 与其它甲壳动物 *EcR* 聚为一支, 而昆虫 *EcR* 聚为另一支。*PtEcR* 在检测的三疣梭子蟹 10 个组织中均有表达, 其中在 Y-器 (YO) 表达量最高。在蜕皮周期中, 自蜕皮后期至蜕皮前期 D2 亚期 *PtEcR* 在 YO 中的表达量一直较低; 至 D3 亚期和 D4 亚期, *PtEcR* 表达量显著升高, 这与血淋巴中 20-羟基蜕皮酮 (20E) 浓度在 D3/D4 亚期显著升高相协同, 表明 *PtEcR* 在三疣梭子蟹蜕皮过程中起着重要的作用。二次卵巢发育阶段, *PtEcR* 在 YO 和肝胰腺 (Hp) 中的表达量自 II 期逐渐升高至 IV 期达到最高; 卵巢 (Ov) 中, 则在 I、III 期较低, II、IV 期较高, 表明 *PtEcR* 可能参与卵巢发育和卵黄发生。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 蜕皮激素受体; 蜕皮周期; 二次卵巢发育

**中图分类号:** Q 785; S 968.25<sup>+2</sup>

**文献标志码:** A

甲壳动物个体发育过程中存在蜕皮现象, 是甲壳动物生长和发育的标志特征, 它贯穿甲壳动物个体发育的始终, 蜕皮过程受到蜕皮激素 (ecdysteroids, Ecs) 的严格调控<sup>[1-2]</sup>。在甲壳动物血淋巴中, 蜕皮激素的浓度在蜕皮周期中呈周期性变化, 在蜕皮后期和蜕皮间期较低, 在蜕皮前期逐渐上升直至最大值, 引发蜕皮<sup>[3]</sup>。蜕皮激素不仅参与蜕皮活动, 而且可能参与卵巢发育过程。在普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 卵巢发育过程中, 血淋巴、卵巢和肝胰腺组织中均可检测到蜕皮激素<sup>[4]</sup>; 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)<sup>[5]</sup>、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)<sup>[6]</sup> 和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[7]</sup> 血淋巴中蜕皮激素的周期性变化均与卵巢发育相关联, 蜕皮激素可促进卵母细胞早期发育。但是, 斑节对虾

(*Penaeus monodon*) 卵巢和血淋巴中的蜕皮激素含量随着卵巢发育进程不断下降<sup>[8]</sup>; 三角招潮蟹 (*Uca triangularis*) 卵巢发育过程中, 血淋巴中蜕皮激素的含量并无明显变化<sup>[9]</sup>。

蜕皮激素通过与蜕皮激素受体 (ecdysteroid receptor, *EcR*) 结合<sup>[10]</sup>, 在甲壳动物的生长、发育和繁殖中起着重要的调节作用<sup>[11-14]</sup>。*EcR* 是甲壳动物体内重要的调控蛋白, 属于核受体超家族成员<sup>[15]</sup>, 处于发育、变态及繁殖等过程的级联调控起始位置<sup>[16-17]</sup>。目前对 *EcR* 功能的研究主要集中在蜕皮、附肢再生和卵巢发育调控及蜕皮激素信号转导<sup>[17-18]</sup>等方面。在甲壳动物中, 已从招潮蟹 (*U. pugilator*)<sup>[19]</sup>、黑背陆地蟹 (*Gecarcinus lateralis*)<sup>[20]</sup>、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)<sup>[21]</sup>、美洲龙虾 (*Homarus*

收稿日期: 2013-08-09 修回日期: 2013-09-22

资助项目: 国家自然科学基金项目 (41376152, 40976098); 浙江省自然科学基金项目 (LY13C190006); 宁波市自然科学基金项目 (2012A610137)

通信作者: 朱冬发, E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn

americanus)<sup>[22]</sup>、蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)<sup>[23]</sup> 等中获得全长 cDNA 编码的 *EcR*。日本囊对虾 YO 中, *EcR* 在不同蜕皮周期中的表达水平和血淋巴中蜕皮激素浓度的变化趋势相协同<sup>[21]</sup>; 但是, 蓝蟹 YO 中<sup>[23]</sup>, *EcR* 表达量与血淋巴中蜕皮激素浓度的变化截然相反。由此可知, *EcR* 在甲壳动物蜕皮过程中的作用方式尚无定论, 可能因种而异。另外, *EcR* 在卵巢发育中的作用, 仅在招潮蟹中有过报道<sup>[18]</sup>。

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 俗称白蟹、枪蟹, 隶属于甲壳纲、十足目、梭子蟹科、梭子蟹属, 是一种大型海产经济蟹类。人工苗种繁育过程中遇到性早熟、性腺发育不良和蜕壳未遂等问题, 严重影响三疣梭子蟹的品质和产量, 而这些问题的解决有赖于甲壳类动物蜕皮调控机制和卵巢发育机制的阐明。本研究以三疣梭子蟹为研究对象, 克隆获得了 *EcR* 的全长 cDNA 序列, 并运用实时荧光定量 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 方法分析其在不同组织、蜕皮周期和卵巢发育阶段的表达量变化, 为进一步阐明蟹类蜕皮机制和卵巢发育机制, 丰富和完善甲壳动物内分泌的调控理论提供基础材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

三疣梭子蟹暂养于宁波市宁海县得水育苗场。采用形态观察法将三疣梭子蟹蜕皮周期划分为蜕皮后期 (A 期和 B 期), 蜕皮间期 (C 期)、蜕皮前期 (D0、D1、D2、D3 和 D4 亚期) 和蜕皮期 (E 期) 4 个阶段<sup>[24]</sup>, 采集 C 期三疣梭子蟹 (甲宽: 15 ~ 18 cm; 体质量: 180 ~ 450 g) 表皮、卵巢、精巢、肝胰腺、眼柄、大颚器、Y-器、胸神经节、心脏和肌肉 10 个组织, 用于 *PtEcR* 组织表达分析。采集各蜕皮期三疣梭子蟹 (甲宽: 8 ~ 12 cm; 体质量: 45 ~ 80 g) YO 用于蜕皮周期中 *PtEcR* 表达水平变化分析。采用形态学测定法将三疣梭子蟹第二次卵巢发育划分为 I、II、III 和 IV 4 个阶段<sup>[25]</sup>, 采集各卵巢发育阶段三疣梭子蟹 (甲宽: 14.3 ~ 18.3 cm; 体质量: 175 ~ 455 g) YO、Hp、Ov 用于二次卵巢发育过程中 *PtEcR* 表达水平变化分析。

Trizol (Sangon Biotech 公司); RNA 保存液 (康为世纪); SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司); Proteinase K、

DNase I (RNase Free)、PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time)、Ex Taq、pMD<sup>®</sup> 18-T Vector、*E. coli* DH5 $\alpha$ 、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 均购自 TaKaRa 公司; 引物合成及测序由 Sangon Biotech 公司完成。

### 1.2 核心序列的获得

取三疣梭子蟹 YO 组织, 利用 Trizol (Sangon Biotech 公司) 方法获得总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time) 反转录得到第一链 cDNA, -20 °C 冷藏备用。

根据已公布的甲壳动物 *EcR* 核苷酸序列, 寻找保守位点, 设计巢式引物 *EcR*-F1、*EcR*-F2 和 *EcR*-R1、*EcR*-R2 (表 1) 扩增 *PtEcR* 核心序列片段。反应在 Mastercycler pro PCR 仪上进行。PCR 产物经电泳后, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化, 连入 pMD18-T 载体, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 所获得的阳性克隆由 Sangon Biotech 公司完成测序。

### 1.3 3'和 5' RACE 获得全长序列

用于 3' RACE 的 3' RACE-cDNA 以 AP (表 1) 为接头, 引物用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (perfect real time) 反转录得到第一链 cDNA。根据得到的核心序列设计特异性引物 *ECR3*-F1、*ECR3*-F2、*ECR3*-F3、*ECR3*-F4 和 3' outer、3' inner (表 1), 进行 2 轮反应。第一轮 PCR 以 3' RACE-cDNA 为模板, 3' outer 和 *ECR3*-F1、*ECR3*-F2、*ECR3*-F3 为上下游引物进行 PCR 扩增。第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物为模板, 3' inner 和 *ECR3*-F2、*ECR3*-F3、*ECR3*-F4 为上下游引物进行 PCR 扩增。

按照 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 5' RACE-cDNA。设计 5' RACE 的下游特异性引物 *ECR5*-R1、*ECR5*-R2、*ECR5*-R3、*ECR5*-R4 (表 1), 进行 2 轮 PCR 反应。

### 1.4 序列分析

利用 Vector NTI 7 软件包对测序结果进行拼接, 获得 *PtEcR* 全长 cDNA。基于此序列基础上, 设计引物 *EcR*-YZF 和 *EcR*-YZR (表 1) 验证得到的全长 cDNA 序列。BLAST 程序分析 *PtEcR* cDNA 和氨基酸序列。ORF Finder 确定开放阅读框 (open reading frame, ORF)。ProtParam tool 预测氨基酸物理参数, SinalP 4.1 Server 预测信号

肽,SMART 程序分析氨基酸结构。MEGA 4.1 软件构建系统进化树。ClustalX 进行多序列比对。

### 1.5 实时荧光定量 qRT-PCR 分析

将取好的组织利用 Trizol 方法抽取 RNA,取 1.0  $\mu\text{g}$  RNA 用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time) 方法合成 cDNA。根据 *PtEcR* cDNA 全长设计一对特异性引物 EcR-F 和 EcR-R

(表 1)检测 *PtEcR* 表达,actin-F 和 actin-R 扩增三疣梭子蟹  $\beta$ -actin (FJ641977.1) 作为内参。运用实时荧光定量方法对 *PtEcR* 在不同组织、蜕皮周期和卵巢发育过程中的表达情况进行分析。SPSS 17.0 统计分析软件进行数据分析,当  $P < 0.05$  时差异显著。

表 1 PCR 引物序列  
Tab.1 Nucleotide sequences of primers used for PCR

引物 primer name	序列(5'→3') primer sequence(5'→3')	用途 usage
AP	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTCACTATAGGT(17)	RT-PCR
EcR-F1	TGGCAACAACCTGTGAGATGGA	RT-PCR
EcR-F2	CAGAATGTGTTGTGCCTGAGTCT	RT-PCR
EcR-R1	TCCGCAACTCTGTGAGGATATTA	RT-PCR
EcR-R2	GTTCCCTTAGGTTTGGCCTCTCT	RT-PCR
3'outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT	3' RACE
3'inner	TCCACTAGTGATTCACTATAGG	3' RACE
EcR3-F1	TTGACACTCCTAGCATCGTTCA	3' RACE
EcR3-F2	TAAGTGATGACGACTCGGATGC	3' RACE
EcR3-F3	ACTGCTAAAGGCTTGCTCGTC	3' RACE
EcR3-F4	TTGTCGCAACCTCTGTAAGATG	3' RACE
EcR5-R1	CGAGCAAGCCTTTAGCAGTG	5' RACE
EcR5-R2	CAGCTGCACTGTGAGGATGGT	5' RACE
EcR5-R3	TGGCATCCGAGTCGTCATC	5' RACE
EcR5-R4	CACTGGACTTGTGGAATGGC	5' RACE
EcR-F	TAAGTGATGACGACTCGGATGC	qRT-PCR
EcR-R	ACGAGCAAGCCTTTAGCAGTG	qRT-PCR
actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCCG	qRT-PCR
actin-R	GATAGCGTGAGGAAGGGCATA	qRT-PCR
EcR-YZF	TGCGGTGAAGTGTGGAGAC	PCR
EcR-YZR	CATAAGCAAGACACGGGGAGT	PCR

## 2 结果

### 2.1 *PtEcR* cDNA 全长序列的克隆及序列分析

以 cDNA 为模板,克隆获得 784 bp 的片段,在此基础上,设计特异性引物进行 RACE。5' RACE 得到 391 bp cDNA 片段;3' RACE 获得 1 277 bp cDNA 片段;通过序列拼接和验证,确定 *PtEcR* 全长为 2 231 bp,该序列已登陆 GenBank,登录号:KC354381。

*PtEcR* cDNA 包含 5'UTR 206 bp,3'UTR 756 bp,ORF 1 269 bp,编码 422 个氨基酸。采用 ProtParam 软件预测三疣梭子蟹 EcR 分子式为  $C_{6707}H_{11186}N_{2230}O_{2795}S_{493}$ ,推算的分子量为 47.9 ku,理论等电点为 8.54。利用 SignalP 软件对编码区进行分析,发现三疣梭子蟹 EcR 不存在信号肽序列,不属于分泌蛋白。推导出的 *PtEcR* 从 N 端到 C 端包含 5 个功能域(图 1):A/B(转录激活域)、C 域(DNA 结合域)、D 域(铰链域)、E 域(配体

结合域)和 F 域。

将推测的 PtEcR 氨基酸序列与已公布的其他甲壳动物 EcR 进行 BLAST 检索分析,发现其与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 一致性最低,为 67%;与拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) EcR

氨基酸序列一致性最高,与其 3 种亚型的一致性分别为 95%、95% 和 97%。PtEcR 氨基酸序列与蓝蟹 3 种亚型的一致性分别为 95%、96% 和 95%,与普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 一致性为 90%,与招潮蟹一致性为 86%。

```

1   GGGGGGGTTCATCTTCCATCTGGGTCTACGCGGCACATGGCTCAGTGAAGGGCAGCGACAACGTTGTGAGTGAGGTGCGGCGTGCC
91  GGCGAGACAAAAGTTTCCGGTGAAGTGTGGAGACGCGCCGAGCTGGGCTACAGGGGCGCGTCCGCCCGCCCGTCCAGACAGGCAACT
181 TCCCGGCTATTGAAGGGCAGATGACATGTCGCCGCCCTCTTCAGTGAGCAACTACAGCGCCGACTCCTTCGGCGACCTGAAGAAGAAGA
1   M S P P S S V S N Y S A D S F G D L K K K
271 AAGGCCCCATCCCCCGCAGCAGGAGGAGCTGTCTAGTGTGGGGGACAGGGCGTCAGGCTATCACTACAACGCACTCACCTGCGAGG A/B
22  K G P I P R Q Q E E L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E
361 GATGTAAGGTTTCTCCGGAGATCCATCACAAGAATGCTGTGTACCAGTGTAAATATGGTGGCAACTGCGAAATGGATATGTACATGC
52  G C K G F F R R S I T K N A V Y Q C K Y G G N C E M D M Y M
451 GACGCAAGTGTCAAGAATGTCGCCTCAAAAAGTGTCTTGGTGTGGGCATGCGACCAGAATGTGTCGTGCGGAGTCTCAGTGGTGGTGA C
82  R R K C Q E C R L K K C L G V G M R P E C V V P E S Q C V V
541 AGAGAGAGCAGAAAAAGCTACGAGACAAGGATAAGAAGGACTACCCAAGCAAGGCTCCCACTGGCTGAGGAAAAGGCCATTCACAACA
112 K R E Q K K L R D K D K D Y P S Q G S P L A E E K A I P T
631 GTCCAGTGAGTAATGATTGTAATCCAAGTCCATCACCTACATGTGTGTGTCAGTTCAAAAATCTTGTGACACTCCTAGCATCGTTC
142 S P V S N D C K S K G P S P T C D V Q F K N L V D T P S I V D
721 AGACTCCTATGTCTGCTGGGGCCAGATCAAATATCAAACCACTCACTCGAGAGCAGGAGGAGTTGATCAACACGCTAGTCTACTACCAAG
172 Q T P M S A G A R S N I K P L T R E Q E E L I N T L V Y Y Q
811 AACAGTTTGAGCAGCCAACGGAAGCAGACATAAAAAAGATAAGAGATTACGAAATAAGTGATGACGACTCGGATGCCAAGTTTAAACACA
202 E Q F E Q P T E A D I K K I R D Y E I S D D D S D A K F K H
901 TCACAGACATGACCATCCTCACAGTGCAGTGTAGTGTGTAATTCCTCAAGCGCCTGCCCGCTTTCGACACTACTCAGAGAGGATCAGA
232 I T D M T I L T V Q L I V E F S K R L P G F D T L L R E D Q
991 TTCACTGCTAAAGGCTTGTCTGTCAGAAAGTATGATGCTCCGAGCAGCCGGTTCTATGATGCCAAGCAGACTGCATTGTGTTGGAA
262 I T L L K A C S S E V M M L R A A R F Y D A K T D C I V F G
1081 ATACCTTGCCCTACACACAAACATCTTATGAGTTTGTGGTGGGAGATTTCATCACAATACTCTCCGTTTTGTGCAACCTCTGTA E/F
292 N T L P Y T Q T S Y E F A G L G D S S Q I L F R F C R N L C
1171 AGATGAAAGTTGACAATGCTGAATATGCACTTCTGTCTGCCATAATTATATTTTCAGAGAGGCCAAACCTAAAGAACTCCAAAAGGTG
322 K M K V D N A E Y A L L S A I I I F S E R P N L K E L Q K V
1261 AAAAGCTCAAGAAATATACTCGATGCATTGAAGGCATACGTGTGTAATCAAAGTTTCCCGGCTGGCATGTGTTGCAAAGTTGC
353 E K L Q E I Y L D A L K A Y V C N Q K F P R P G M L F A K L
1351 TTAATGCTCTACTGAGTTGCGAACCTTGGGAACCTGAACTCTGAGGTATGCTTCTCCCTCAAACCTCAAGAACAAAAGACTCCACCGT
382 L N V L T E L R T L G N L N S E V C F S L K L K N K R L P P
1441 TTTTGGCTGAGATCTGGGATGTGCTGGTGTGCTGAGCCTCAGCCACCTCCTGGGTGCCATATTACCGAGTAAAATGTTGGCGCAAGAAG
412 F L A E I W D V A G C *
1531 GTTGTGAGCCCTTGGGGTGGTGGATGGACTCTACACTATGTACCTGTGCGCTGTAAGTGAGAGACTGTTGATGTTGTGGCAGCAGCTT
1621 CACTGCCACCCAGGGCCACTTTCAGCCACTGACGTGTTATGGTTCAGGCCATCACTGTGACAGTGTGTGACTCCATTAGT
1711 GCAATGATGAGTGATAATGATGCACTTTAGATGTGAAGGGCAGCAGTATGGCATTGTAGCCATTTTATTAACACATTTTATAAAACC
1801 TTCAGATATAATGAAAGTGGTGTGCATATTGACTGTTTCATATACATACATATACTACTTGTATGTGTAATAATGTTTTTGTATGTAA
1891 TTTTTTTTATAATAATATAAGTAAAAAGGCTACATTGCACTGTTGCTCAGACTGCGCAAGCCACATTTGCGCAGGCAACGAACCTCC
1981 CCGTGTCTTGTCTATGGTCAAGCCTCTGTTCTACACTATTCCTCAAGGTGCTCCTGCGGACTGAGGAGAGGGGAATCTAAACACAAGG
2071 AACAGTGCATGCTTCTGATCCATATTTTATATGAATCTTGTAAATTAATGAGCTGGTATGCCGCTTACAAGTAGTAACTATT
2161 GAAAATATATGTTAATATTACTGTAATGTTATTAATACTGCTATGAAATGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 EcR 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

下划线区域分别表示 C 域和 E/F 域,剩余区域为 A/B 域和 D 域; \* 处为终止密码子

Fig. 1 The full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of the EcR from *P. trituberculatus*

Bold underlines indicate the C and E/F domain, remaining areas represent the A/B and D domain; the stop codon is marked with asterisk (\*).

利用 MEGA 4.1 软件,将 *PtEcR* 的配体结合域氨基酸序列(LBD)与其他甲壳动物和昆虫 *EcR* 的 LBD 通过邻接法(NJ)构建系统进化树(图 2)。结果显示 *PtEcR* 与甲壳动物在进化上属于同一支,昆虫为另一支。进一步使用 ClustalX 软件,将 *PtEcR* 的氨基酸序列与拟穴青蟹 *EcR3* (*SpEcR3*, AFN08661)、蓝蟹 *EcR* (*CsEcR*, AET06181)和招潮蟹 *EcR* (*UpEcR*, AAC33432)的氨基酸序列进行多序列比对,结果(图 3)显示一致性为 82.69%;C 域含有 P-box 和 D-box;D 域含有 T-box 和 A-box;E 域由 12 个  $\alpha$ -螺旋(H)和 2 个  $\beta$ -折叠(S)反向排列成类似“三明治”的 3 层结构,中间形成配体结合袋;F 域,保守性最低,F 域并非是 *EcR* 功能所必须的,*PtEcR* 与其它甲壳动物 *EcR* 结构域特征一致<sup>[26]</sup>。表明本研究获得序列为三疣梭子蟹 *EcR* 基因。

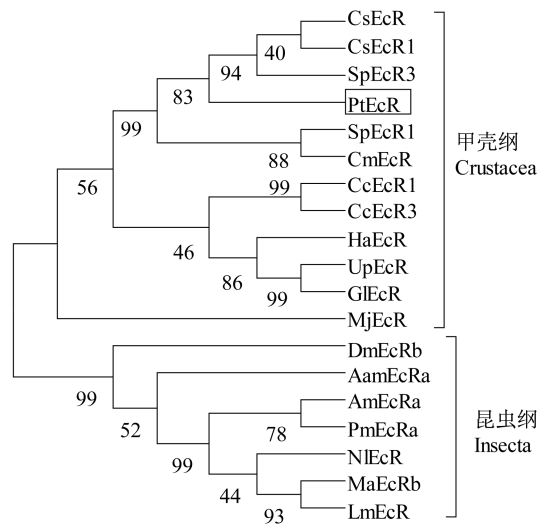


图 2 *EcR* 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 2 The NJ Phylogenetic tree of *EcR*

*Callinectes sapidus* *EcR* (*CsEcR*, AET06181); *Callinectes sapidus* *EcR1* (*CsEcR1*, AET06179); *Scylla paramamosain* *EcR3* (*SpEcR3*, AFN08661); *Portunus trituberculatus* *EcR* (*PtEcR*, KC354381); *Scylla paramamosain* *EcR1* (*SpEcR1*, AFN08659); *Carcinus maenas* *EcR* (*CmEcR*, AAR89628); *Crangon crangon* *EcR1* (*CcEcR1*, ACO44665); *Crangon crangon* *EcR3* (*CcEcR3*, ACO44667); *Homarus americanus* *EcR* (*HaEcR*, AEA29831); *Uca pugilator* *EcR* (*UpEcR*, AAC33432); *Gecarcinus lateralis* *EcR* (*GIeR*, AAT77808); *Marsupenaeus japonicus* *EcR* (*MjEcR*, BAF75375); *Daphnia magna* *EcRb* (*DmEcRb*, BAF49033); *Amblyomma americanum* *EcRa* (*AamEcRa*, AAB94566); *Apis mellifera* *EcRa* (*AmEcRa*, BAF46356); *Pheidole megacephala* *EcRa* (*PmEcRa*, BAE47509); *Nilaparvata lugens* *EcR* (*NIEcR*, ACO55653); *Monochamus alternatus* *EcRb* (*MaEcRb*, AEY63781); *Locusta migratoria* *EcR* (*LmEcR*, AAD1982)

## 2.2 *PtEcR* 在不同组织中的表达差异

荧光定量 PCR 分析表明,*PtEcR* 在 10 个组织中均有表达(图 4)。无论雌雄,YO 中表达量均最高。雌蟹中,Ov 和 Ms 表达量较高;雄蟹中,ES、MO 和 Ms 中表达量较高。

## 2.3 *PtEcR* 在蜕皮周期中的表达水平变化

鉴于 *PtEcR* 在雌雄蟹 YO 中表达量均最高,以三疣梭子蟹 YO 为实验材料研究 *PtEcR* 在蜕皮周期中的表达变化。实时荧光定量结果显示(图 5):自蜕皮后期至蜕皮前期 D2 亚期 *PtEcR* 在 YO 中的相对表达量一直较低;至 D3 亚期和 D4 亚期,*PtEcR* 表达量均显著升高。

## 2.4 *PtEcR* 在第二次卵巢发育阶段中的表达水平变化

实时荧光定量 PCR 分析表明(图 6):*PtEcR* 在 YO 的表达量自第二次卵巢发育 II 期逐渐升高至 IV 期达到最高;Hp 中 *PtEcR* 表达变化趋势与 YO 中相同;Ov 中,则在 I、III 期较低,II、IV 期较高。

## 3 讨论

本研究采用 RACE 技术,获得 *PtEcR* cDNA 全序列,与已知的其它甲壳类的 *EcR* 同源,具有共同的结构特征,自 N 端到 C 端均由 A/B、C、D、E 和 F 5 个结构域组成(图 1)。在昆虫中,*EcR* 有 A、B1 和 B2 3 个同工型,主要差别为 A/B 域的不同,这些同工型 *EcR* 的表达有着发育阶段和组织的特异性,且具有不同的生物学功能<sup>[27]</sup>。拟穴青蟹、日本囊对虾<sup>[21]</sup>、美洲龙虾<sup>[22]</sup>和蓝蟹<sup>[23]</sup>等甲壳动物中发现 *EcR* 存在亚型,主要差别是 C、D 域氨基酸的插入和替换;本研究中,通过 PCR 验证全长 cDNA 序列,并未发现 *PtEcR* 存在亚型。从进化树中发现所有甲壳类动物的 *EcR* 聚为一支,而所有昆虫类动物的 *EcR* 聚为一支(图 2),表明甲壳类与昆虫类的 *EcR* 在结构特征上存在一定差异,这可能与两类动物 *EcR* 形成不同的异二聚体复合物有关。昆虫 *EcR* 与超气孔蛋白(ultraspiracle protein, USP)形成异二聚体<sup>[15]</sup>;而甲壳动物 *EcR* 与维甲酸 X 受体(RXR)形成异二聚体<sup>[28-31]</sup>;只有当 *EcR* 与 USP/RXR 形成异二聚体后,蜕皮激素才能结合到 *EcR* 上,通过 *EcR*-USP/RXR 诱导下游基因表达和传递蜕皮激素信号<sup>[12,28-31]</sup>。

PtEcR	-----		0	
SpEcR3	-----		0	
CsEcR	-----M F V L G S G V A T L N L S A M G D E S C S E V S S S S P L T S P G A L S P		38	
UpEcR	M A K V L A T A R V D G M F V L G S G V A T L N L S T M G D E S C S E V S S S S P L T S P G A L S P		50	
PtEcR	-----		0	
SpEcR3	-----		0	
CsEcR	P A L V S V G V N V G M S P P T S L A S S D I G E V D L D F W D L D L N S P S P P H G M A S I A S T		88	
UpEcR	P A L V S V G V S V G M S P P T S L A S S D I G E V D L D F W D L D L N S P S P P H G M A S V A S T		100	
PtEcR	-----M S P P S S V S N Y S A D S F G D L K K K K G P I P		26	
SpEcR3	-----M A L E S -----E G R D D M S P P S S V S N Y S A D S F G D L K K K K G P I P		36	
CsEcR	N A L L L N P R A M A S P S D T S S L S G R D D M S P P S S V G N Y S A D S F G D L K K K K G P I P		138	
UpEcR	N A L L L N P R A V A S P S D T S S L S G R D D M S P P S S L S N F G A D S Y G D L K K K K G P I P		150	
		<b>P-box</b>	<b>D-box</b>	
PtEcR	R Q Q E E L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E G C K G F F R R S I T K N A V Y Q C K Y G G N C E		76	
SpEcR3	R Q Q E E L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E G C K G F F R R S I T K N A V Y Q C K Y G G N C E		86	
CsEcR	R Q Q E E L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E G C K G F F R R S I T K N A V Y Q C K Y G G N C E		188	
UpEcR	R Q Q E E L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E G C K G F F R R S I T K N A V Y Q C K Y G N N C E		200	
		<b>T-box/A-box</b>		
PtEcR	M D M Y M R R K C Q E C R L K K C L G V G M R P E C V V P E S Q C V V K R E Q K K L R D K D K K D Y		126	
SpEcR3	M D M Y M R R K C Q E C R L K K C L G V G M R P E C V V P E S Q C V V K R E Q K K L R D K D K K D Y		136	
CsEcR	M D M Y M R R K C Q E C R L K K C L G V G M R P E C V V P E S Q C V V K R E Q K K L R D K D K K D Y		238	
UpEcR	M D M Y M R R K C Q E C R L K K C L N V G M R P E C V V P E S Q C V V K R E Q K K A R D K D K - T Y		249	
PtEcR	P S Q G S P L A E E K A I P T S P V S N D C K S K G P S P T C D V Q F K N L V D T P S I V Q T P M S		176	
SpEcR3	P S Q G S P V A E E K A V P T S P V S N D C K S K G P S P A C D M Q F K N L V D T P S I V Q T P M S		186	
CsEcR	P S Q G S P V A E E K A V P T S P - - - C K S K G P S P A C D M Q F K N L V D T P S I V Q T P M S		284	
UpEcR	P S L G S P I A E D K A A P I S P - - - - - - - - - - - - - - - V S K D M S		272	
		<b>H1</b>	<b>H2/S</b>	
PtEcR	A G A R S N I K P L T R E Q E E L I N T L V Y Y Q E Q F E Q P T E A D I K K I R D Y E I S D D D S D		226	
SpEcR3	A G A R S N V K P L T R E Q E E L I N T L V Y Y Q E Q F E Q P T E A D I K K I R D Y E I S D D D S D		236	
CsEcR	A G A R S N V K P L T R E Q E E L I N T L V Y Y Q E Q F E Q P T E A D I K K I R D Y E I S D D D S D		334	
UpEcR	A A P R L N V K P L T R E Q E E L I N T L V Y Y Q E E F E Q P T E A D V K K I R F N F D G E D T S D		322	
		<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>
PtEcR	A K F K H I T D M T I L T V Q L I V E F S K R L P G F D T L L R E D Q I T L L K A C S S E V M M L R		276	
SpEcR3	A K F K H I T D M T I L T V Q L I V E F S K R L P G F D T L L R E D Q I T L L K A C S S E V M M L R		286	
CsEcR	A K F K H I T D M T I L T L Q L I V E F S K R L P G F D T L L R E D Q I T L L K A C S S E V M M L R		384	
UpEcR	M R F R H I T E M T I L T V Q L I V E F S K Q L P G F A T L Q R E D Q I T L L K A C S S E V M M L R		372	
		<b>S1</b>	<b>S2/H6</b>	<b>H7</b>
PtEcR	A A R F Y D A K T D C I V F G N T L P Y T Q T S Y E F A G L G D S S Q I L F R F C R N L C K M K V D		326	
SpEcR3	A A R F Y D A K T D C I V F G N T L P Y T Q T S Y E F A G L G E S S Q I L F R F C R N L C K M K V D		336	
CsEcR	A A R F Y D A K T D C I V F G N T L P Y T Q T S Y E F A G L G E S S Q I L F R F C R N L C K M K V D		434	
UpEcR	A A R R Y D A K T D S I V F G N N Y P Y T Q A S Y A L A G L G E S A E I L F R F C R S L C K M K V D		422	
		<b>H8</b>	<b>H9</b>	
PtEcR	N A E Y A L L S A I I I F S E R P N L K E L Q K V E K L Q E I Y L D A L K A Y V C N Q K F P R P G M		376	
SpEcR3	N A E Y A L L S A I I I F S E R P N L K E L Q K V E K L Q E I Y L D A L R A Y V C N Q R F P R P G M		386	
CsEcR	N A E Y A L L S A I I I F S E R P N L K E L Q K V E K L Q E I Y L D A L R A Y V C N Q R F P R P G M		484	
UpEcR	N A E Y A L L A A I A I F S E R P N L K E L K K V E K L Q E I Y L E A L K S Y V E N R R L P R S N M		472	
		<b>H10/H11</b>	<b>H12</b>	
PtEcR	L F A K L L N V L T E L R T L G N L N S E V C F S L K L K N K R L P P F L A E I W D V A G C		422	
SpEcR3	V F A K L L N I L T E L R T L G N L N S E V C F S L K L K N K R L P P F L A E I W D V A G C		432	
CsEcR	V F A K L L N I L T E L R T L G N L N S E V C F S L K L K N K R L P P F L A E I W D V A G C		530	
UpEcR	V F A K L L N I L T E L R T L G N I N S E M C F S L T L K N K R L P P F L A E I W D V S G Y		518	

图3 PtEcR与其它蟹类 EcR 氨基酸序列比对

序列上方的划线代表 P-box、D-box、T-box、A-box、 $\alpha$ -螺旋 (H1 - H12) 和  $\beta$ -折叠 (S, S1, S2)

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of PtEcR with other orthologues

Conserved  $\alpha$ -helices (H1 - H12),  $\beta$ -sheets (S, S1, S2) and other functional domains are indicated above the sequence

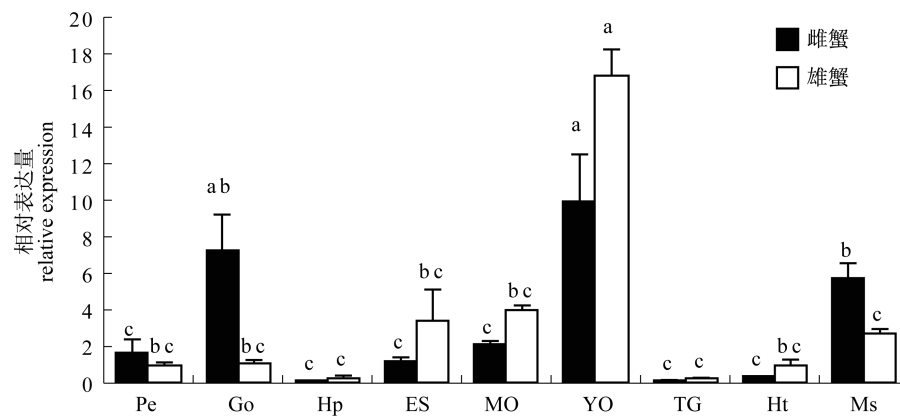


图 4 *PtEcR* 在不同组织的相对表达量

Pe. 表皮; Go. 性腺; Hp. 肝胰腺; ES. 眼柄; MO. 大颚器; YO. Y-器; TG. 胸神经节; Ht. 心脏; Ms. 肌肉。字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 4 The relative expression of *PtEcR* in various tissues

Pe. perider; Go. gonad; Hp. hepatopancreas; ES. eyestalk ganglia; MO. mandibular organ; YO. Y-organ; Ht. heart; Ms. muscle; TG. thoracic ganglion. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ), the same below

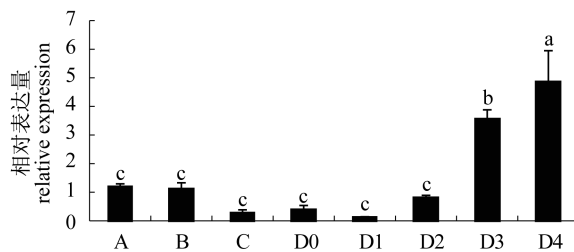


图 5 *PtEcR* 在蜕皮周期中 YO 中的相对表达量

Fig. 5 The relative expression of *PtEcR* in YO during molting stages

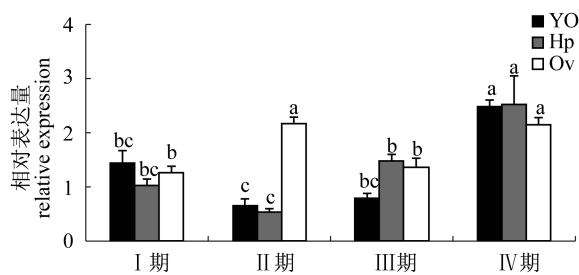


图 6 *PtEcR* 在卵巢发育过程中的相对表达量

Fig. 6 The relative expression of *PtEcR* in ovarian development

*PtEcR* 在 YO 中表达量最高,这与日本囊对虾<sup>[21]</sup>组织表达结果一致。三疣梭子蟹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 的浓度自蜕皮间期 C 期开始上升,到蜕皮前期 D3 亚期逐渐上升至达到顶峰, D4 亚期略有回落<sup>[32]</sup>。本研究中 *PtEcR* 在 YO 的表达量变化(图 5)与血淋巴中蜕皮激素浓度变化趋势相协同,这与日本

囊对虾<sup>[21]</sup>结果一致。血淋巴中 20E 在 D4 亚期略有回落,而此时 *PtEcR* 相对表达量达到最高值,可能高浓度的 *EcR* 对 YO 合成蜕皮激素存在负反馈作用<sup>[21]</sup>。但在蓝蟹<sup>[23]</sup>蜕皮周期中, *EcR* 在 YO 中表达量与血淋巴蜕皮激素浓度并不协同。造成这种物种间差异的原因尚待进一步探明。

三疣梭子蟹第一次产卵后,通常会进行第二次卵巢发育(在此期间不需要再交配),第二次卵巢发育时间为 1 个月左右<sup>[25]</sup>,时间较短,便于取材和分析。卵巢发育受到神经内分泌(神经激素和神经递质)和外界环境等方面的影响<sup>[33]</sup>。有研究表明,卵巢组织中存在蜕皮激素,蜕皮激素在蟹类卵母细胞的减数分裂、卵黄发生和胚胎形成等繁殖过程中发挥重要作用<sup>[34]</sup>。目前仅 Durica 等<sup>[18]</sup>对 *EcR* 在卵巢发育过程中的作用进行初步研究。Hp 做为重要的营养储存场所,可以合成三疣梭子蟹卵黄蛋白原<sup>[35]</sup>,有研究表明蜕皮激素参与三疣梭子蟹卵黄蛋白原的合成<sup>[34]</sup>,在一定范围内随着蜕皮激素浓度的升高,卵黄蛋白原基因的表达量逐渐升高<sup>[36]</sup>,而蜕皮激素作用必须通过与 *EcR* 结合才能得以完成<sup>[28,30-31]</sup>。随着二次卵巢发育的进行, YO 和 Hp 中 *PtEcR* 表达量呈明显的上升趋势,表明 *EcR* 可能参与三疣梭子蟹卵巢发育和卵黄发生。

#### 参考文献:

- [1] Lachaise F, Lafont R. Ecdysteroid metabolism in a <http://www.sexuebao.cn>

- crab; *Carcinus maenas* L. [J]. *Steroids*, 1984, 43 (3):243 – 259.
- [ 2 ] Hopkins P M. Hormonal control of the molt cycle in the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. *American Zoologist*, 1992, 32(3):450 – 458.
- [ 3 ] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3 – 5):196 – 203.
- [ 4 ] Styris have B, Lund T, Andersen O. Ecdysteroids in female shore crabs *Carcinus maenas* during the moulting cycle and oocyte development [J]. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 2008, 88(3):575 – 581.
- [ 5 ] Okumura T, Han C H, Suzuki Y. Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. *Zoological Science*, 1992, 9(1):37 – 45.
- [ 6 ] 罗荣生, 王幽兰, 曹梅讯, 等. 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 [J]. *动物学报*, 1990, 36(2):157 – 164.
- [ 7 ] 赵维信, 王义强, 欧阳迎春. 中国对虾体内 20-羟基蜕皮酮含量与生长和性腺发育的关系 [J]. *台湾海峡*, 1992, 11(4):305 – 309, 381.
- [ 8 ] Young N J, Webster S G, Rees H H. Ecdysteroid profiles and vitellogenesis in *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1993, 24(2):107 – 118.
- [ 9 ] Kappalli S, Supriya N T, Krishnakumar V, et al. Hemolymph ecdysteroid titers in a brachyuran Crab *Uca triangularis* that concomitantly undergoes molting and reproduction [J]. *Zoological Studies*, 2012, 51(7):966 – 976.
- [ 10 ] Hopkins P M. Crustacean ecdysteroids and their receptors [M] // *Ecdysone: structures and functions*. Springer Netherlands, 2009:73 – 97.
- [ 11 ] Hopkins P M, Chung A C K, Durica D S. Limb regeneration in the fiddler crab, *Uca pugilator*: histological, physiological and molecular considerations [J]. *American Zoologist*, 1999, 39(3):513 – 526.
- [ 12 ] Riddiford L M, Cherbas P, Truman J W. Ecdysone receptors and their biological actions [J]. *Vitamins & Hormones*, 2000, 60:1 – 73.
- [ 13 ] Lafont R, Mathieu M. Steroids in aquatic invertebrates [J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16(1):109 – 130.
- [ 14 ] Brown M R, Sieglaff D H, Rees H H. Gonadal ecdysteroidogenesis in arthropoda: occurrence and regulation [J]. *Annual Review of Entomology*, 2009, 54:105 – 125.
- [ 15 ] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression [J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3):1269 – 1304.
- [ 16 ] Clayton G M, Peak-Chew S Y, Evans R M, et al. The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveal a nuclear receptor locked in an inactive conformation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(4):1549 – 1554.
- [ 17 ] Das S, Durica D S. Ecdysteroid receptor signaling disruption obstructs blastemal cell proliferation during limb regeneration in the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 365(2):249 – 259.
- [ 18 ] Durica D S, Wu X, Anilkumar G, et al. Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 189(1 – 2):59 – 76.
- [ 19 ] Chung A C K, Durica D S, Clifton S W, et al. Cloning of crustacean ecdysteroid receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, 139(1 – 2):209 – 227.
- [ 20 ] Kim H W, Chang E S, Mykles D L. Three calpains and ecdysone receptor in the land crab *Gecarcinus lateralis*: sequences, expression and effects of elevated ecdysteroid induced by eyestalk ablation [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(16):3177 – 3197.
- [ 21 ] Asazuma H, Nagata S, Kono M, et al. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(2):139 – 150.
- [ 22 ] Tarrant A M, Behrendt L, Stegeman J J, et al. Ecdysteroid receptor from the American lobster *Homarus americanus*: EcR/RXR isoform cloning and ligand-binding properties [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(2):346 – 355.
- [ 23 ] Techa S, Chung J S. 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 [J]. *Gene*, 2013, 527 (1): 139 – 153.
- [24] 沈洁,朱冬发,胡则辉,等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期[J]. *水产学报*, 2011, 35(10): 1481 – 1487.
- [25] 姚桂桂,吴旭干,杨筱珍,等. 三疣梭子蟹的第二次卵巢发育规律[J]. *动物学研究*, 2007, 28(4): 423 – 429.
- [26] Billas I M L, Browning C, Lawrence M C, *et al.* The structure and function of ecdysone receptors [M] // *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer Netherlands, 2009: 335 – 360.
- [27] 刘永杰,徐蓬军,李艳伟,等. 昆虫蜕皮激素受体及其类似物的杀虫机制研究进展[J]. *昆虫学报*, 2007, 50(1): 67 – 73.
- [28] Chung A C K, Durica D S, Hopkins P M. Tissue-specific patterns and steady-state concentrations of ecdysteroid receptor and retinoid-X-receptor mRNA during the molt cycle of the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1998, 109(3): 375 – 389.
- [29] 李康,李胜,曹阳. 蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制[J]. *昆虫学报*, 2011, 54(8): 933 – 937.
- [30] Wu X H, Hopkins P M, Palli S R, *et al.* Crustacean retinoid-X receptor isoforms: distinctive DNA binding and receptor-receptor interaction with a cognate ecdysteroid receptor [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 218(1 – 2): 21 – 38.
- [31] Verhaegen Y, Parmentier K, Swevers L, *et al.* The brown shrimp (*Crangon crangon* L.) ecdysteroid receptor complex: Cloning, structural modeling of the ligand-binding domain and functional expression in an EcR-deficient *Drosophila* cell line [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3): 415 – 423.
- [32] 汪春建,朱冬发,亓一舟,等. 三疣梭子蟹蜕皮周期中 MIH 基因 mRNA 水平与蜕皮激素浓度变化[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(1): 22 – 28.
- [33] 江新琴,俞存根,陈全振. 蟹类繁殖力和卵巢发育研究进展[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(3): 281 – 286.
- [34] Subramoniam T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 2000, 125(2): 135 – 156.
- [35] 杨帆. 三疣梭子蟹卵黄蛋白原的基因克隆及分子特征分析[D]. 杭州: 浙江大学生命科学学院, 2005.
- [36] Tiu S H, Chan S M, Tobe S S. The effects of farnesoic acid and 20-hydroxyecdysone on vitellogenin gene expression in the lobster, *Homarus americanus*, and possible roles in the reproductive process [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(2): 337 – 345.

## Cloning and expression analysis of ecdysteroid receptor (*EcR*) in *Portunus trituberculatus*

CUI Xiaoyu, ZHU Dongfa<sup>\*</sup>, TANG Jie, XIE Xi, QIU Xier  
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** To study the regulatory role of ecdysteroid receptor (*EcR*) in molting and ovarian development of crustaceans, the full-length *EcR* cDNA of *Portunus trituberculatus* (*PtEcR*) was cloned by using reverse transcript PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length of *PtEcR* (GenBank accession number: KC354381) was 2 231 bp, included a 1 269 bp ORF which encoded 422 amino acid residues. The alignment of amino acid sequence of *PtEcR* and that of other crustaceans showed that their identities were 67% to 97%. Phylogenetic analysis of *EcR* showed *PtEcR* was clustered in crustaceans *EcR*s and separated from insect *EcR*s. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to quantify the relative expression level of *PtEcR* in different tissues, molting process and the second ovarian development in *P. trituberculatus*. *PtEcR* was expressed in various tissues and highest in the Y-organ (YO). During the molting process, the expression levels of *PtEcR* in YO remained low from postmolt period to substages of D2 premolt period, then significantly increased at substages D3 and D4. The changes in the expression levels of *PtEcR* were consistent with those in the levels of hemolymphatic 20-hydroxyecdysone, which demonstrated that *PtEcR* played an important role in molting regulation of *P. trituberculatus*. During the second ovarian development, the expression levels of *PtEcR* in YO and hepatopancreas gradually increased to the maximum from stage II to IV; The expression levels of *PtEcR* in ovary at stages II and IV were significantly higher than those at stage I and III. The results indicated that *PtEcR* may play an important role during ovarian development in *P. trituberculatus*.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; ecdysteroid receptor (*EcR*); molting stage; second ovarian development

**Corresponding author:** ZHU Dongfa. E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn