

中华绒螯蟹蜕皮激素受体基因(*Ers-EcR*)的 克隆和组织表达分析

官 磊¹, 张亦陈¹, 孙 妍², 刘逸尘¹, 耿绪云², 孙金生^{1,2*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

摘要: 蜕皮激素受体(ecdysteroid receptor, EcR)介导调控甲壳动物蜕皮生长、附肢再生等重要生命活动。为了解 EcR 在人工控制甲壳动物的繁殖和生长中的作用, 采用 RACE 方法结合同源克隆技术, 首次从中华绒螯蟹 Y-器官中克隆得到蜕皮激素受体基因全长 cDNA 序列(*Ers-EcR*, 登录号: KF736985), 并进行了结构解析和组织表达分析。结果发现, *Ers-EcR* 编码基因全长 2 176 bp, 开放阅读框为 1 638 bp, 编码 545 个氨基酸, 具有 DNA 结合域(DBD)和配体结合域(LBD)等典型的核受体超家族结构域, 但不具有信号肽结构。其中, DBD 含有 8 个保守的 Cys 残基, 可以形成 2 个锌指结构(C¹⁵⁶-C¹⁵⁹-C¹⁷³-C¹⁷⁶、C¹⁹²-C¹⁹⁸-C²⁰⁸-C²¹¹), 是典型的 DBD 特征。多重序列比对分析表明, *Ers-EcR* 氨基酸序列与拳手招潮蟹同源性最高, 达到 91%。荧光定量 PCR 结果显示成体中华绒螯蟹 *Ers-EcR* 基因在 Y-器官和肌肉组织中表达量最高, 在血液、肠道、卵巢、眼柄、心脏和肝胰腺中有一定表达, 在鳃、胸神经节和精巢表达量较低。这表明 *Ers-EcR* 基因在中华绒螯蟹各组织器官中的表达不具有典型的特异性, 提示 *Ers-EcR* 基因可能参与体内多种生命活动的调控。

关键词: 中华绒螯蟹; 蜕皮激素受体; 克隆; 表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

甲壳动物具有坚硬的外骨骼, 在蜕皮激素(ecdysteroid hormone, EH)的调控下周期性地蜕皮、吸水膨胀、生长并形成新的外骨骼^[1-2]。蜕皮激素受体(ecdysteroid receptor, EcR)是一种核受体超家族(nuclear receptor super family), 广泛存在于昆虫和甲壳类动物中, 作为蜕皮激素的受体介导调控甲壳动物蜕皮生长、附肢再生等重要生命活动, 启动动物繁殖和生长发育等生命过程的级联反应, 对 EcR 及其分子机制的研究一直是甲壳动物内分泌的重点内容^[3-4]。迄今, 对昆虫蜕皮激素受体的研究比较深入, 已经克隆和解析了黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[5]、家蚕(*Bombyx mori*)^[6]、棉铃虫(*Helicoverpa arraigera*)^[7]等多种昆虫 EcR 基因, 并在蜕皮激素与 EcR 的分子作用方式和级联反应调控机理

研究方面取得了重要进展, 一些研究成果已在提高蚕丝产量、研制杀虫剂等生产实际中得到应用^[8-10]。近几年, 一些甲壳动物如拳手招潮蟹(*Uca pugilator*)^[11]、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[12]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponens*)^[13]、黑背陆地蟹(*Gecarcinus lateralis*)^[14]、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[15]和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[16]的 EcR 基因相继被克隆和测序, 但对其与蜕皮激素的分子作用方式和调控机制的了解甚少。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、绒螯蟹属(*Eriocheir*), 是中国重要经济蟹类之一。对中华绒螯蟹 EcR 的研究将有助于实现在生产上人工控制中华绒螯蟹的蜕皮和生长, 培育出大规模精

收稿日期:2013-12-16 修回日期:2014-04-02

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究计划(2012CB114405); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A401, 2012AA092205); 国家科技支撑计划(2012BAD26B04); 农业部淡水水产种质资源重点开放实验室课题。

通信作者: 孙金生, E-mail: jinshsun@163.com

<http://www.scxuebao.cn>

品中华绒螯蟹。本研究利用本实验室中华绒螯蟹转录组测序数据及近缘物种 *EcR* 基因序列克隆和解析了中华绒螯蟹 Y-器官 *EcR* 基因的分子构造,并分析了该基因在成体中华绒螯蟹各组织中的表达情况,为下一步深入研究 *EcR* 基因对中华绒螯蟹蜕皮的分子调节机制提供了理论数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中华绒螯蟹取自天津市宁河新佳中华绒螯蟹养殖场,经暂养后选择健康中华绒螯蟹用于提取总 RNA;宿主菌株 DH5 α 为本实验室保存;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen); DNA Marker、PrimeScript Reverse Transcriptase 试剂盒、Taq 酶、pMD18-T vector 试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒均购自 TaKaRa;引物合成和测序工作由金唯智生物科技(北京)有限公司完成。

1.2 总 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

采用 TRIzol 试剂盒分别提取 20 只中华绒螯蟹 Y-器官、肌肉、肠道、心脏、眼柄、卵巢、精巢、肝胰腺、鳃、胸神经节和血液组织总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪 (Thermo) 定性和定量检测后, -80 °C 贮存备用。以中华绒螯蟹各组织总 RNA 为反转录模板, AOLP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16-3') 为引物, BDA-Oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAG-AGTACGCGGG-3') 为接头合成第一链 cDNA。

1.3 *Ers-EcR* 基因的克隆

根据本实验室中华绒螯蟹转录组测序数据和近缘物种 *EcR* 基因保守序列设计合成引物 *Ers-EcRF1* (5'-CATCGGGCTACCATTACA-3') 和 *Ers-EcRR1* (5'-AGCAACTTCGCAAACACC-3'), 以 Y-器官 cDNA 为模板经 PCR 扩增 *Ers-EcR* 基因部分序列。反应在 Bio-Rad PCR 仪上进行。PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, rTaq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 加灭菌超纯水至总体积 25 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。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, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 所获得

的阳性克隆由金唯智生物科技(北京)有限公司测序。

根据得到的 *Ers-EcR* 基因部分序列和近缘物种 *EcR* 基因保守序列设计合成引物 *Ers-EcR-Fz1F1* (5'-TCTGCCGTAGCCTTTGTA-3') 和 *Ers-EcR-fz1R1* (5'-GAATGTGGCTTGCGCAGT-3') 进行 3' 非翻译区 PCR 扩增。

按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 5' RACE-cDNA。设计 5' RACE 的下游特异性引物 *Ers-EcRR2* (5'-AGGCGACA-CTCTTGACACTTGC-3'), 上游引物为 NUP (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 进行 PCR 反应。

1.4 生物信息学分析

利用 Bioedit (V. 7. 0. 9. 0) 对测序结果进行拼接, 获得 *Ers-EcR* 全长 cDNA。基于此序列设计合成引物 *Ers-EcRF2* (5'-GACCCGTGCT-TGACTCGCGTG-3') 和 *Ers-EcR-fz1R1* (5'-GAATGTGGCTTGCGCAGT-3') 验证得到的全长 cDNA 序列。ORF Finder 确定开放阅读框 (open reading frame, ORF)。BLAST 程序分析 *Ers-EcR* cDNA 和蛋白序列。ProtParam tool 预测蛋白物理参数, SinalP 4. 1 Server 预测信号肽, SMART 程序分析氨基酸结构。ClustalX 进行多序列比对。ClustalX 和 MEGA 5. 10 软件构建系统发育树。

1.5 组织表达分析

将提取的中华绒螯蟹 Y-器官、肌肉、血液、肠道、卵巢、眼柄、心脏、肝胰腺、鳃、胸神经节和精巢共 11 种组织或器官总 RNA 分别进行反转录获得 cDNA。根据 *Ers-EcR* cDNA 全长序列设计一对特异性引物 *qEcR-f* (5'-GGCGTTATGATTCCAA-GACAGA-3'), *qEcR-r* (5'-ATTTTACAAA-GGCTACGGCAGA-3') 检测 *Ers-EcR* 表达, β -*actinF* (5'-AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC-3') 和 β -*actinR* (5'-TTCTCCATGTCGTCCCAGT-3') 扩增中华绒螯蟹 β -*actin* 作为内参。运用实时荧光定量方法对 *Ers-EcR* 在不同组织或器官中的表达情况进行分析。反应体系: 10 μ L SYBR Premix Ex TaqTM II, 0.5 μ L Forward Primer (10 μ mol/L), 0.5 μ L Reverse Primer (10 μ mol/L), 1.0 μ L cDNA, 8.0 μ L ddH₂O; 反应条件: 94 °C 变性 30 s; 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环; 在 55 °C 进行荧光信号收集。SPSS 17.0 统计分析软件进

行数据分析,当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 *Ers-EcR* 基因的克隆和序列分析

采用 RACE 方法给同源克隆技术获得了中华绒螯蟹 Y-器官蜕皮激素受体基因(*Ers-EcR*)序列。序列分析结果表明,*Ers-EcR* 的 cDNA 序列(登录

号:KF736985)长度为 2 176 bp,包含 5'UTR 55 bp, 3'UTR 483 bp,ORF 1 638 bp,编码 545 个氨基酸。采用 ProtParam 软件预测其蛋白分子量为 60.37 ku,理论等电点为 7.97。利用 SignalP 软件对编码区进行分析,发现 *Ers-EcR* 不存在信号肽序列,不属于分泌蛋白。推导出的 *Ers-EcR* 从 N 端到 C 端包含 5 个功能域:A/B 域(转录激活域)、C 域

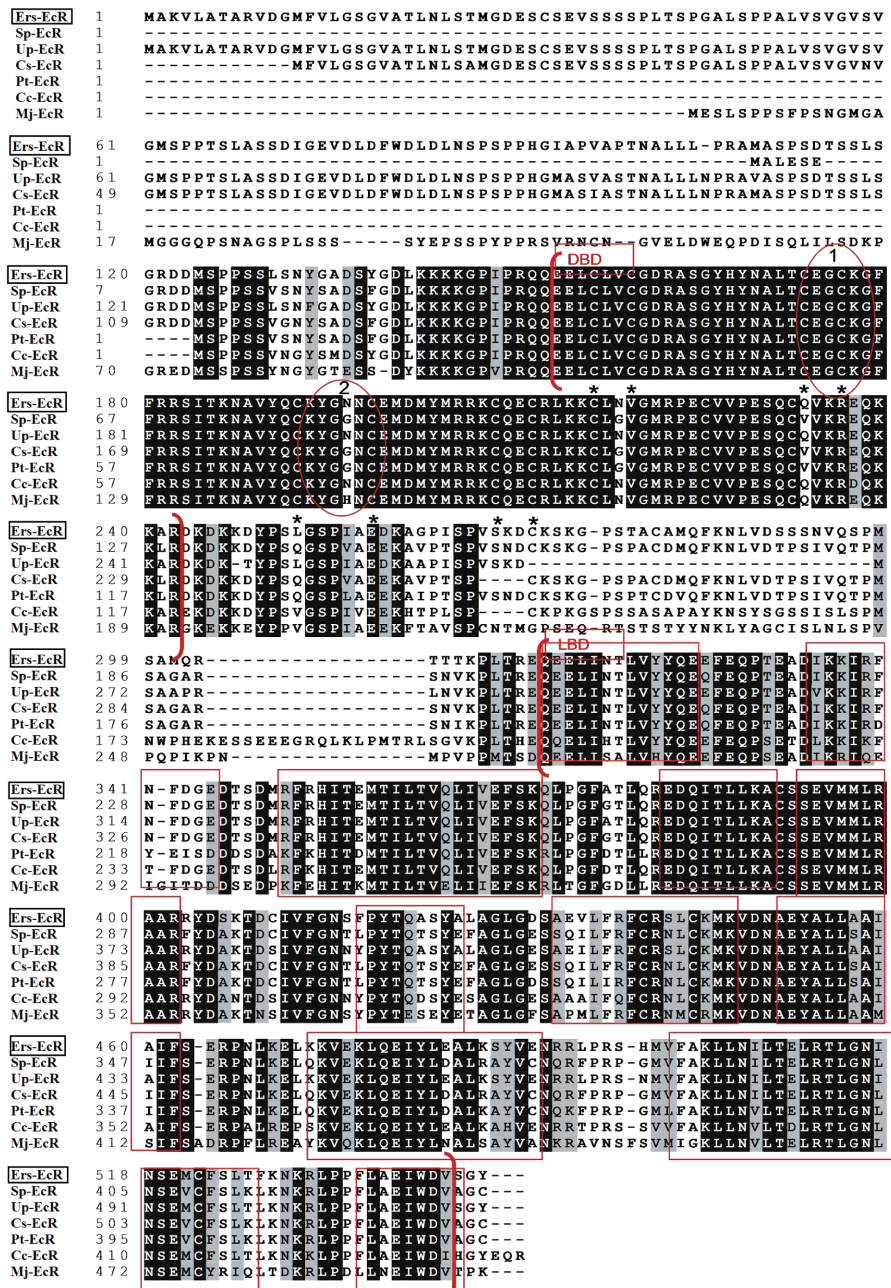


图 1 *Ers-EcR* 与其他甲壳纲物种 *EcR* 氨基酸序列的多重比对
椭圆框 1 代表 P-box 序列,椭圆框 2 代表 D-box 序列,长方形框代表 LBD 的 12 个 α -螺旋

Fig. 1 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *Ers-EcR* with other crustacean species

Square means twelve α -helices, P-box and D-box are indicated above the sequence GenBank accession number: AAC33432. 2(拳手招潮蟹. *Uca pugilator*, Up), AGB34182. 1(蓝蟹. *Callinectes sapidus*, Cs), AFN08659. 1(拟穴青蟹. *Scylla paramamosain*, Sp), AFH35032. 1(三疣梭子蟹. *Portunus trituberculatus*, Pt), BAF75375. 1(日本囊对虾. *Marsupenaeus japonicus*, Mj), ACO44665. 1(褐虾. *Crangon crangon*, Cc)

(DNA 结合域)、D 域(铰链域)、E 域(配体结合域)和 F 域。推导的 Ers-EcR 氨基酸序列经 SMART 分析表明, EcR 具有典型的核受体超家族结构域 DNA 结合域(DNA binding domain,

DBD)和配体结合域(Ligand binding domain, LBD), 且 DBD 具有 8 个保守的 Cys 残基(图 1、2), 可以形成 2 个锌指结构(C^{156} - C^{159} - C^{173} - C^{176} 、 C^{192} - C^{198} - C^{208} - C^{211}), 具有典型的 DBD 特征。



图 2 Ers-EcR 与昆虫纲物种 EcR 氨基酸序列的多重比对

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of Ers-EcR with other insect species

GenBank accession number: AEY63781.1 (松墨天牛, *Monochamus alternatus*, Ma), BAF49033.1 (戈斯以水蚤, *Daphnia magna*, Dm), ACK57879.1 (墨西哥棉铃象虫, *Anthonomus grandis*, Ag), AAD19828.1 (东亚飞蝗, *Locusta migratoria*, Lm), BAF46356.1 (西洋蜂, *Apis mellifera*, Am), ADX59693.1 (黄脸油葫芦, *Teleogryllus emma*, Te)

2.2 多重序列比对

将推导的 Ers-EcR 氨基酸序列与已公布的其

他物种的 EcR 氨基酸序列进行 BLAST 检索分析, 发现其与其他蟹类的 EcR 序列具有很高的相

似性,其中与拳手招朝蟹的相似性最高,达到91%,与蓝蟹、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)以及三疣梭子蟹的相似性也分别达到了88%、87%和83%;与虾类和昆虫类 EcR 氨基酸序列的相似性则较低,与褐虾(*Crangon crangon*)、日本囊对虾、东亚飞蝗(*Locusta migratoria*)以及墨西哥棉铃象虫(*Anthonomus grandis*)的相似性分别为78%、67%、66%和62%。

使用 ClustalX 软件,将 *Ers-EcR* 氨基酸序列与其他物种 EcR 氨基酸序列进行多序列比对,结果显示各物种 DBD 和 LBD 的氨基酸序列具有很高的保守性。DBD 具有 P-box 和 D-box, LBD 构象与“三明治”的三层结构类似,由 12 个 α -螺旋(H)排列构成;这与已发现的其他甲壳动物 EcR 结构域特征一致^[16](图 1 和图 2)。利用 MEGA 5.10 软件,将 *Ers-EcR* 的氨基酸序列与其他甲壳动物和昆虫 EcR 的氨基酸序列通过邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树(图 3)。结果显示 *Ers-EcR* 与甲壳动物在进化上属于同一支,昆虫为另一支,这与序列比对的结果一致。

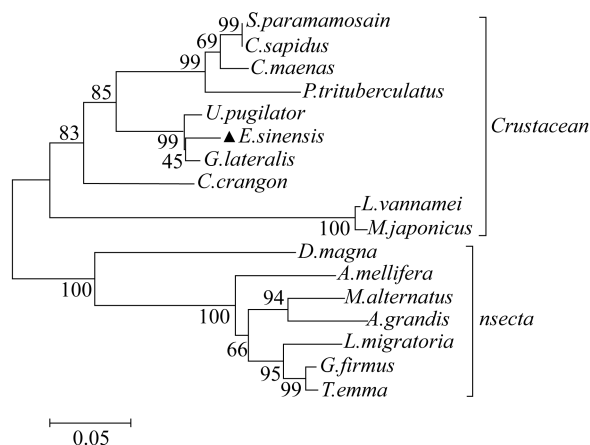


图 3 EcR 氨基酸序列的 NJ 系统发育树

Fig. 3 The NJ Phylogenetic tree of EcR

GenBank accession number: AAC33432. 2 (拳手招朝蟹. *U. pugilator*), AAT77808. 1 (黑背地蟹. *G. lateralis*), AGB34182. 1 (蓝蟹. *C. sapidus*), AFN08659. 1 (拟穴青蟹. *S. paramamosain*), AAR89628. 1 (青蟹. *C. maenas*), AFH35032. 1 (三疣梭子蟹. *P. trituberculatus*), BAF75375. 1 (日本囊对虾. *M. japonicus*), ACO44665. 1 (褐虾. *C. crangon*), AGS94405. 1 (凡纳滨对虾. *L. vannamei*), AEY63781. 1 (松墨天牛. *M. alternatus*), BAF49033. 1 (戈斯以水蚤. *D. magna*), ACK57879. 1 (墨西哥棉铃象虫. *A. grandis*), ADT64887. 1 (沙蠅. *G. firmus*), AAD19828. 1 (东亚飞蝗. *L. migratoria*), BAF46356. 1 (西洋蜂. *A. mellifera*), ADX59693. 1 (黄脸油葫芦. *T. emma*)

2.3 *Ers-EcR* 组织表达分析

采用荧光实时定量 PCR 的方法分析了 *Ers-EcR* 基因在中华绒螯蟹不同组织或器官中的分布情况。数据分析显示, *Ers-EcR* 基因在各组织或器官中均有表达,其中在肌肉和 Y-器官中表达量最高,在血液、肝胰腺、眼柄、肠道、卵巢和心脏中亦有一定表达,在鳃、精巢和胸神经节中表达量低(图 4)。

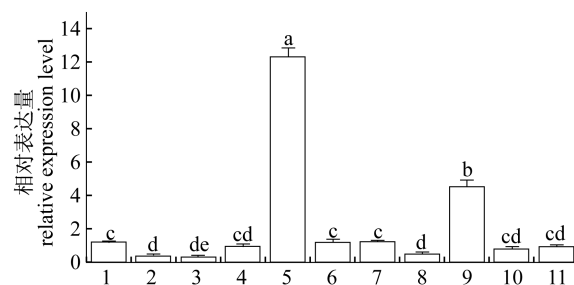


图 4 qRT-PCR 分析 *Ers-EcR* 在中华绒螯蟹不同组织中的表达情况

1. 肠道; 2. 鳃; 3. 胸神经节; 4. 眼柄; 5. YO; 6. 血淋巴; 7. 卵巢; 8. 精巢; 9. 肌肉; 10. 肝胰腺; 11. 心脏。不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 4 qRT-PCR analysis of *Ers-EcR* gene expression from different tissues of *E. sinensis*

1. intestine; 2. gill; 3. thoracic nerve cord; 4. eyestalk; 5. Y-organ; 6. haemocyt; 7. ovary; 8. testis; 9. muscle; 10. hepatopancreas; 11. heart. Bars with different letters are significantly different($P < 0.05$)

3 讨论

本研究采用 RACE 方法结合同源克隆技术,获得 *Ers-EcR* 基因 cDNA 全长序列,与已知的其他物种 EcR 结构类似^[17-18],自 N 端到 C 端依次为 A/B 域(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。C 域具有 8 个保守的 Cys 残基,形成 2 个锌指结构($C^{156}-C^{159}-C^{173}-C^{176}-C^{192}-C^{198}-C^{208}-C^{211}$),且 Cys 周围的氨基酸序列高度保守,具有 P-box 和 D-box 序列;E 域构象与“三明治”的结构类似,由 12 个 α -螺旋(H)排列构成;这些保守的氨基酸序列对形成锌指结构以及 EcR 行使功能具有重要作用^[19-20]。*Ers-EcR* 和昆虫类 EcR 氨基酸序列对比显示,保守氨基酸多集中于 DBD 周围, LBD 也相对保守,这提示在甲壳动物和昆虫中, EcR 调控的下游基因以及信号通路可能具有相似性,目前对昆虫类 EcR 的分子调节机制及其生理功能的

研究已经有一定基础^[21-24],这为中华绒螯蟹等甲壳动物系统开展 EcR 分子调控机制的研究提供了重要参考。在昆虫中, EcR 基因有 A、B1 和 B2 3 个同工型,主要差别为 A/B 域的不同^[10]。拟穴青蟹和蓝蟹^[15]等甲壳动物中发现 EcR 基因存在亚型,主要差别是 C、D 域碱基的插入和替换;本研究中,通过 PCR 验证全长 cDNA 序列,并未发现 *Ers-EcR* 基因存在亚型,在三疣梭子蟹研究中同样未发现 EcR 基因存在亚型^[16]。

为了解 *Ers-EcR* 基因的功能和调控机制,本研究对中华绒螯蟹各组织或器官 *Ers-EcR* 基因表达量进行了分析,结果显示 *Ers-EcR* 基因在各组织或器官中广泛表达,推测其为组成性表达,这与拳手招潮蟹、日本囊对虾及三疣梭子蟹的相应结果一致^[11-12,16]。上述结果提示该基因可能参与了中华绒螯蟹蜕皮、生长、代谢、繁殖和附肢再生等多种重要的生命活动。对昆虫类蜕皮信号通路的研究发现,当蜕皮激素与 EcR 结合后, EcR 与 USP 会立即形成异二聚体进而启动一系列级联反应,完成蜕皮活动^[22-24]。Zheng 等^[7]在棉铃虫的研究中发现利用 RNAi 技术沉默 EcR 基因会抑制一系列 20E 效应基因的表达,进而影响蜕皮活动的正常发生。在甲壳动物的研究中,三疣梭子蟹 Y-器官 EcR 基因在蜕皮周期各阶段表达量与血液中的蜕皮激素浓度相协调,当 EcR 基因的表达量达到最高值时,血液中的蜕皮激素浓度会下降,这可能是由于高浓度的 EcR 对 Y-器官合成蜕皮激素具有负反馈调节作用^[16];在日本囊对虾肝胰腺和肌肉组织中也有类似结论^[11],说明 EcR 基因在昆虫及甲壳类动物蜕皮活动中扮演重要角色。Swevers 等^[25]在对家蚕的研究中发现 EcR 基因稳定表达于卵黄生成阶段,绒毛膜发生前期不表达,后期再次表达;崔晓雨等^[16]在对三疣梭子蟹二次卵巢发育的研究中发现, Y-器官和肝胰腺中 EcR 基因表达量明显上升,表明其可能参与三疣梭子蟹卵巢发育及卵黄发生。另外还有研究发现随着蜕皮激素浓度的升高,卵黄蛋白原基因的表达量也随之上升,而卵黄蛋白原的合成则发生于肝胰腺,间接提示 EcR 基因可能对卵黄生成以及肝胰腺储能发挥着重要作用^[26-27]。Vafopoulou 等^[28]发现克氏原螯虾 (*Procambarus clarki*) 血液中的 EcR 基因对于机体创伤愈合具有重要的调节作用, Chung 等^[11]在拳手招潮蟹中发

现 EcR 基因在非再生附肢肌肉中的蜕皮周期各阶段稳定表达,而在再生附肢胚芽组织中高表达,表明 EcR 基因在甲壳动物附肢再生过程发挥重要作用。这些结果均提示 EcR 参与调节甲壳动物和昆虫类多种生命活动,对 EcR 功能的全面了解有待进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] Snyder M J, Chang E S. Ecdysteroids in relation to the molt cycle of the American lobster, *Homarus americanus*. 1. Hemolymph titers and metabolites [J]. General and Comparative Endocrinology, 1991, 81(1): 133 - 145.
- [2] Chaix J C, De R M. Ecdysteroid levels during ovarian development and embryogenesis in the spider crab *Acanthonyx lunulatus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1982, 47(1): 7 - 14.
- [3] Lachaise F, Lafont R. Ecdysteroid metabolism in a crab *Carcinus maenas* [J]. Steroids, 1984, 43(3): 243 - 259.
- [4] Chang E S. Endocrine regulation of molting in crustaceans and insects-variations on common themes [J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1995, 210: 21.
- [5] Celnikier S E, Wheeler D A, Kronmiller B, et al. Finishing a whole-genome shotgun: Release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence [J]. Genome Biology, 2002, 3(12): research0079.1.
- [6] Kamimura M, Tomita S, Kiuchi M, et al. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms-ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands [J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 248(3): 786 - 793.
- [7] Zheng W W, Yang D T, Wang J X, et al. Hsc70 binds to ultraspiracle resulting in the upregulation of 20-hydroxyecdysone-responsive genes in *Helicoverpa armigera* [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2010, 315(1-2): 282 - 291.
- [8] Hayward D C, Dhadialla T S, Zhou S, et al. Ligand specificity and developmental expression of RXR and ecdysone receptor in the migratory locust [J]. Journal of Insect Physiology, 2003, 49(12): 1135 - 1144.
- [9] Siaussat D, Bozzolan F, Queguiner L, et al. Effects of juvenile hormone on 20-hydroxyecdysone-inducible EcR, HR3, E75 gene expression in imaginal wing

- cells of *Plodia interpunctella lepidoptera* [J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271 (14): 3017 – 3027.
- [10] Liu Y J, Xu P J, Li Y W, *et al.* Progress in ecdysone receptor (EcR) and insecticidal mechanisms of ecdysteroids[J]. Acta Entomologica Sinica, 2007, 50 (1): 67 – 73. [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. 昆虫学报, 2007, 50(1): 67 – 73.]
- [11] 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 pugilato* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 109(3): 375 – 389.
- [12] Hideakia A, Shinjin N, Michiko K, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid-X-receptor from the kurum a prawn, *Marsupenaeus japonicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2007, 148 (2): 139 – 150.
- [13] Chen H, Wang W Q, Zhu X L. Cloning of cDNA encoding EcR and its expression analysis during embryogenesis in the freshwater prawn, *Macrobrachium nipponens* [J]. Marine Fisheries, 2009, 31(4): 347 – 356. [陈辉, 王文清, 朱小玲. 日本沼虾蜕皮激素受体(EcR)的cDNA克隆及其在胚胎发育过程中的表达分析. 海洋渔业, 2009, 31(4): 347 – 356.]
- [14] 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]. The Journal of Experimental Biology, 2005, 208 (16): 3177 – 3197.
- [15] Techa S, Chung 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.
- [16] Cui X Y, Zhu D F, Tang J, *et al.* Cloning and expression analysis of ecdysteroid receptor (*EcR*) in *Portunus trituberculatus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37 (11): 1645 – 1654. [崔晓雨, 朱冬发, 汤洁, 等. 三疣梭子蟹 EcR 基因的克隆及表达分析. 水产学报, 2013, 37(11): 1645 – 1654.]
- [17] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression [J]. Physiological Reviews, 2001, 81 (3): 1269 – 1304.
- [18] Hu X, Cherbas L, Cherbas P. Transcription activation by the ecdysone receptor (EcR/USP): Identification of activation functions [J]. Molecular Endocrinology, 2003, 17(4): 716 – 731.
- [19] Wu X, 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.
- [20] 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.
- [21] Talbot W S, Swyryd E A, Hogness D S. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms [J]. Cell, 1993, 73(7): 1323 – 1337.
- [22] Vanacker J M, Delmarre C, Guo X J, *et al.* Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor Related alpha [J]. Cell Growth and Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research, 1998, 9 (12): 1007 – 1014.
- [23] Henrich V C, Rybczynski R, Gilbert L I. Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: Mechanisms and models in insect development [J]. Vitamins and Hormones-advances in Research and Applications, 1999, 55: 73 – 125.
- [24] Thummel C S. From embryogenesis to metamorphosis: The regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members [J]. Cell, 1995, 83(6): 871 – 877.
- [25] Swevers L, Drevet J R, Lunke M D, *et al.* The silkworm homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform): Cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25 (7): 857 – 866.
- [26] Yang F. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunustrituberculatus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005: 32 – 53. [杨帆. 三疣梭子蟹卵黄蛋白原的基因克隆及分子特征分析. 杭州: 浙江大学, 2005: 32 – 53.]

- [27] Tiu S H K, 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.
- [28] Vafopoulou X, Laufer H, Steel C G. Spatial and temporal distribution of the ecdysteroid receptor (EcR) in haemocytes and epidermal cells during wound healing in the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 152(2–3): 359–370.

Cloning and expression analysis of ecdysteroid receptor gene (*Ers-EcR*) in *Eriocheir sinensis*

GONG Lei¹, ZHANG Yichen¹, SUN Yan², LIU Yichen¹, GENG Xuyun², SUN Jinsheng^{1,2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Aquatic Animal Infectious Disease Control and Prevention Center, Tianjin 300221, China)

Abstract: Ecdysteroid receptor (EcR) could mediate the regulation effect of ecdysteroid hormone (EH), and plays important roles in molting and growth of Arthropod. To study the structure and function of ecdysteroid receptor (*EcR*) gene in *Eriocheir sinensis*, a complete cDNA sequence encoding *EcR* (*Ers-EcR*, GenBank Accession No: KF736985) was cloned from Y-organ of *E. sinensis* by 5' and 3' RACEs. The full-length cDNA consists of 2 176 bp with a 1 638 bp open reading frame, encoding 545 amino acids without signal peptide. Typical domains of nuclear receptor super family: DNA binding domain (DBD) and ligand binding domain (LBD) were identified by SMART (simple modular architecture research tool) in *Ers-EcR*. DNA binding domain contains 8 conserved cysteines forming two zinc finger motifs (C¹⁵⁶-C¹⁵⁹-C¹⁷³-C¹⁷⁶, C¹⁹²-C¹⁹⁸-C²⁰⁸-C²¹¹), which is the typical character of DNA binding domain. Multi-sequence alignments analysis showed *Ers-EcR* shared the highest identity with *Uca pugilator* (91%), also shared high identities with *Callinectes sapidus* (88%), *Scylla paramamosain* (87%) and *Portunus trituberculatus* (83%), however, it showed lower identity with EcRs from shrimps and insects. Phylogenetic analysis revealed that *Ers-EcR* was closely related to *U. pugilator* and *Gecarcinus lateralis*. Tissue distribution of *Ers-EcR* was detected by quantitative real-time PCR, although strong expression of *Ers-EcR* was detected in muscles and Y-organ, and its expression could also be found in eyestalk, intestine, hepatopancreas, heart, haemocyte, ovary, testis, thoracic nerve cord and gill. This study would facilitate the study of the roles of *Ers-EcR* in molt and growth regulation in crustacean.

Key words: *Eriocheir sinensis*; ecdysteroid receptor; cloning; expression

Corresponding author: SUN Jinsheng. E-mail: jinshsun@163.com