

文章编号: 1000- 0615(2002)06- 0487- 06

## 编码鹰爪虾蜕皮抑制激素基因的 cDNA 片段的克隆和序列分析

王在照, 相建海

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 提取鹰爪虾眼柄总 RNA, 以眼柄总 RNA 为模板, 根据日本对虾的具有蜕皮抑制活性的神经肽 Pej-SGP-IV 的氨基酸设计兼并引物, 进行 RT-PCR 扩增, 在适宜条件下得到一特异性片段。将这一特异性片段克隆到载体中进行测序, 测得鹰爪虾的特异性 cDNA 片段由 213 个碱基对组成, 推测的氨基酸序列由 71 个氨基酸组成。序列比较发现许多甲壳动物的 CHH 家族神经肽与它相似。在所有与该序列推测的氨基酸序列相似的甲壳动物 CHH 家族神经肽中, MIH 与它的相似度最高, 表明由鹰爪虾眼柄特异性 cDNA 片段推定的氨基酸序列可能是鹰爪虾的 MIH 片段, 它相当于 MIH 成熟肽的第 5 至 75 个氨基酸。

**关键词:** 鹰爪虾; 蜕皮抑制激素; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding partial putative molt-inhibiting hormone from the shrimp *Trachypenaeus curvirostris*

WANG Zai-zhao, XIANG Jian-hai

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Total RNAs were extracted from eyestalks of the shrimp *Trachypenaeus curvirostris*. Eyestalk complementary DNAs were obtained from these total RNAs by reverse transcription. Based on the amino acid sequence of the neuropeptide Pej-SGP-IV which has molt-inhibiting activity from *Marsupenaeus japonicus*, two degenerate primers were designed. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using these primers and these eyestalk cDNAs. A specific cDNA was amplified under proper conditions. The specific cDNA was cloned into vector for sequencing. The sequencing results demonstrated that the specific cDNA from the shrimp *T. curvirostris* consisted of 213 base pairs. The alignment of the deduced amino acid sequence from eyestalk cDNA of the shrimp *T. curvirostris* with neuropeptides of CHH family from various crustaceans demonstrated that it had the highest identity and homology with most MIHs from various crustaceans. It suggested that the deduced amino acid sequence from eyestalk cDNA of the shrimp *T. curvirostris* was a part of MIH neuropeptide of *T. curvirostris*. The sequence corresponded to the amino acid sequence from 5 to 75 residues of MIH.

收稿日期: 2002-02-06

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(40106018); 中国科学院知识创新资助项目(ZKCX2-211)

作者简介: 王在照(1969-), 男, 山东临沂人, 博士, 副研究员, 主要从事海洋动物分子生物学研究。

通讯作者: 相建海(1946-), 男, 山西永济人, 研究员, 主要从事海洋动物生殖与遗传工程学研究。E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

**Key words:** *Trachypenaeus curvirostris*; molt-inhibiting hormone; complementary DNA cloning; sequence analysis

甲壳动物眼柄中的 X-器官-窦腺复合体能够合成一些调控生殖、发育和蜕皮的神经激素,包括甲壳动物高血糖激素(crustean 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)等,这些神经激素的氨基酸序列具有较高相似性,组成了甲壳动物所特有的 CHH 神经肽家族<sup>[1]</sup>。其中 MIH 控制甲壳动物蜕皮,在蜕皮间期,血淋巴中高水平的 MIH 抑制 Y-器官蜕皮酮的合成和释放,因此,MIH 在蜕皮周期的多数时间内抑制 Y-器官的活动,只有当 MIH 的分泌量减少或停止时蜕皮现象才可能出现<sup>[2,3]</sup>。目前已克隆了很多甲壳动物的 MIH 基因,而对虾科只有很少的种类确定了这种神经肽,包括:凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)<sup>[4]</sup>、日本对虾(*Penaeus japonicus*)<sup>[5]</sup>和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)<sup>[6]</sup>。在该领域国内的研究较少,蔡生力<sup>[7]</sup>综述了甲壳动物内分泌学的研究进展,王在照和相建海<sup>[8]</sup>对甲壳动物主要神经内分泌物质进行了总结,姜仁良等<sup>[9]</sup>研究了类固醇激素在中华绒螯蟹繁殖周期中的变化规律,赵维信等<sup>[10]</sup>研究了类固醇激素对罗氏沼虾性腺发育的人工诱导效应。

鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*)是一种中小型虾类,属对虾科鹰爪虾属,东非、南亚、澳大利亚及东亚均有分布,尤以日本列岛和黄海出产最多。我国北起辽宁,南到海南岛都有一定产量,特别是山东沿海产量最高<sup>[11,12]</sup>。鹰爪虾具有适应能力强、生长速度快等特点,具有潜在的开发价值,因此可以考虑将鹰爪虾作为中国对虾的补充养殖种类进行人工养殖试验。但是我国对鹰爪虾繁殖发育调控方面的研究几乎没有,1999年凡守军<sup>[13]</sup>做了雌性鹰爪虾卵巢人工催熟的研究。鹰爪虾神经内分泌的研究无人涉及,为了开发鹰爪虾资源,进行人工养殖,有必要对鹰爪虾的神经肽结构和功能开展研究。本文进行了鹰爪虾 MIH 基因片段的克隆和序列分析,从而为进一步获得基因的全长,体外表达这种 MIH 并检测其生物活性,实现鹰爪虾生长和繁殖的人工调控奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鹰爪虾(10g左右)于2000年6月购自青岛的鲜活海产品市场,运回后暂养在中国科学院海洋研究所水族楼虾贝实验室,24h不间断充气,直至剪取眼柄。根据日本对虾具有蜕皮抑制活性的  $Pei$ -SGP-IV<sup>[5]</sup>第5~12个氨基酸(NTCRGVMG)和第69~77个氨基酸(WISILNAGQ)设计两个兼并引物,上游引物  $P_1$ : 5' AACAC(AGCT)TGC(AC)G(AGC)G(GC)GGT(GC)ATGGG 3',反向引物  $P_2$ : 5' CC(GC)GGTT(AGC)A(AG)GAT(AGCT)CTGATCCA 3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 RNA的提取

剪取鹰爪虾的眼柄,除去外壳和色素组织,得到的柔软神经组织,用异硫氰酸胍法提取眼柄总RNA。用无RNase的DNase处理总RNA以消化其中的DNA污染,用变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,紫外分光光度计(DU650, Beckman)测量眼柄总RNA的纯度及浓度。

### 1.3 利用RT-PCR方法扩增鹰爪虾眼柄特异性cDNA

以无DNA污染的眼柄总RNA为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub>为引物,进行反转录反应,反转录的反应体积为20 $\mu$ L,反应条件如下:1 $\times$ 反转录缓冲液(50mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>Tris-HCl, 8mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>MgCl<sub>2</sub>, 30mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>KCl, 10mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>DTT),终浓度为2mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的dNTP, 25pmol Oligo(dT)<sub>18</sub>, M-MLV反转录酶5U,在37 $^{\circ}$ C下温育2h。直接以反转录产物为模板进行PCR扩增,反应体积为25 $\mu$ L,反应条件:1 $\times$ PCR缓冲液,0.2mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>dNTP,引物  $P_1$  和  $P_2$  分别为25pmol, TaqDNA聚合酶2U。使用PE 9600 PCR扩增仪(Perkin Elmer公司),反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性2min;94 $^{\circ}$ C变性30s,57~65 $^{\circ}$ C退火1min,延伸1min,35个循环;72 $^{\circ}$ C保温10min。在以眼柄cDNA为模板,以  $P_1$  和  $P_2$  为引物进行PCR扩增的同时设对照,它们分别是:眼柄

cDNA 为模板, 单引物 P<sub>1</sub> 或 P<sub>2</sub> 的扩增, 鹰爪虾基因组 DNA 为模板, 以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物的扩增。

## 1.4 序列测定

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 将预期大小的 cDNA 片段切下并纯化, 然后将纯化的 DNA 片段克隆到 pUCm-T 载体(上海生工生物工程技术有限公司)中作为测序模板, 利用 DNA 测序试剂盒和 ABI PRISM 310 基因分析仪(Perkin Elmer 公司)测序。

## 2 结果

### 2.1 鹰爪虾眼柄总 RNA 的提取

由于鹰爪虾的眼柄较小, 每提取一次 RNA 需要 8~10 个眼柄。在剪取眼柄中的 X-器官腺复合体所在的神经组织时不可避免地携带一些色素组织, 因此在使用酚和氯仿抽提时需重复多次, 眼柄总 RNA 进行变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 可见清晰的 28S 和 18S RNA 条带, 其 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 大于 1.9, 符合实验要求。总 RNA 经除 DNA 污染后可以用作反转录的模板。

### 2.2 鹰爪虾眼柄特异性 cDNA 的获得

以眼柄总 RNA 为模板, 以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物进行反转录, 再以反转录产物为模板, P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物进行特异性 PCR 扩增, 通过优化 Mg<sup>2+</sup> 浓度、退火温度等反应条件, 最终确定在退火温度 62℃ 时, 反应条件最佳, 在此条件下得到一条大小为 210bp 左右的特异片段。该扩增反应设对照, 其中两个为以反转录产物为模板以单引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为分别扩增, 另外一个是以鹰爪虾基因组 DNA 为模板, 以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物进行的扩增, 所有对照组的扩增都无该特异性产物。

### 2.3 将鹰爪虾特异性 cDNA 克隆到载体中

电泳后将目的片段切下, 分离纯化后将其克隆到 pUCm-T 载体中, 筛选阳性克隆, 摇菌后提取重组质粒 DNA, PCR 扩增方法检测重组质粒中是否包含目的片段, 经重组 DNA 为模板 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物进行扩增, 可以得到与 RT-PCR 扩增产物相同的条带。用此重组 DNA 直接作为测序 PCR 的模板。

### 2.4 序列测定

以包含目的片段的重组 DNA 为模板, 以 M13 反向引物和 T7 正向引物为引物进行测序, PCR 反应, 将测序 PCR 产物纯化、变性处理, 在 ABI PRISM 310 基因自动分析仪上测序。

### 2.5 序列同源性和相似性比较

鹰爪虾眼柄这一特异 cDNA 大小为 213bp, 由它推导的氨基酸序列由 71 个氨基酸残基组成(图 1)。由鹰爪虾这段特异性 cDNA 推导的氨基酸序列与其它甲壳动物 CHH 家族神经肽进行相似性比较, 这一氨基酸序列与刀额新对虾和日本对虾的 MIH 相似程度最高, 其同源性分别是 73.2% 和 71.8%, 而与斑纹、普通黄道蟹、普通滨蟹、味美优游蟹和克氏原螯虾的 MIH 同源性较低, 分别为 43.7%、43.7%、43.7%、42.3% 和 43.7%。它与凡纳对虾的 MIH 类似物的同源性比例很低, 为 25.4% (图 2)。

鹰爪虾的这一氨基酸序列与甲壳动物 CHH 家族的其它神经肽相似性普遍较低, 它与蜘蛛蟹(*L. emarginata*) 的 MOIH 同源性是 26.8%, 与凡纳对虾、普通黄道蟹和普通滨蟹的 CHH 的同源性较低, 分别为 26.8%、26.8%、25.4%, 但与美洲螯龙虾的 GIH 的同源性比例较高, 是 43.7%。以上序列比较提示这个由鹰爪虾眼柄 cDNA 推测的氨基酸序列是鹰爪虾的 MIH 序列(图 2)。

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

图1 鹰爪虾眼柄特异性的cDNA片段及其由它推断的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence from the shrimp *T. curvirostris*

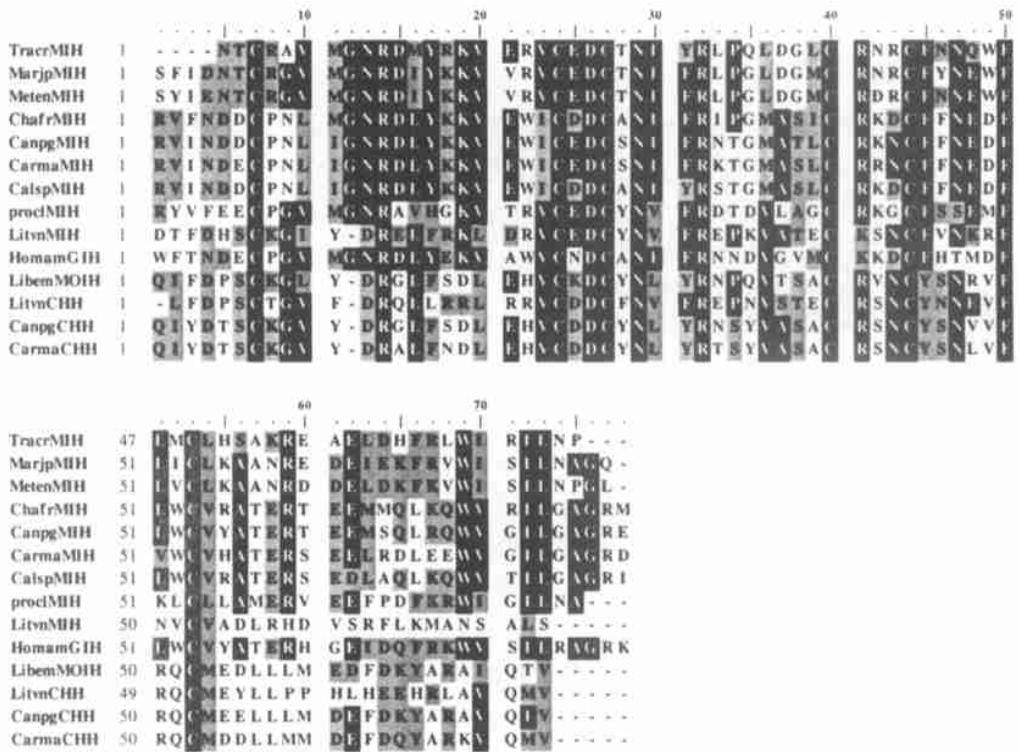


图2 鹰爪虾部分MIH序列与其它甲壳动物的CHH家族神经肽序列比较

Fig. 2 Alignment of partial MIH from *T. curvirostris* with published CHH family neuropeptides of crustaceans

TracerMIH 为鹰爪虾的 MIH; MarjpMIH 为日本对虾的 MIH<sup>[5]</sup>; MetenMIH 为刀额新对虾的 MIH<sup>[6]</sup>; ChafrMIH 为斑纹 *Charybdis feriatius* 的 MIH<sup>[14]</sup>; CanpgMIH 为普通黄道蟹 *Cancer pagurus* 的 MIH<sup>[15]</sup>; CarmaMIH 为普通滨蟹 *Carinus maenas* 的 MIH<sup>[16]</sup>; CalspMIH 为味美优游蟹 *Callinectes sapidus* 的 MIH<sup>[17]</sup>; proclMIH 为克氏原螯虾 *Procambarus darkii* 的 MIH<sup>[18]</sup>; LitvnMIH 为凡纳对虾的 MIH<sup>[4]</sup>; HomamGIH 美洲螯龙虾的 GIH<sup>[19]</sup>; LibemMOIH 为蜘蛛蟹 *L. emarginata* 的 MOIH<sup>[20]</sup>; LitvnCHH 为凡纳对虾的 CHH<sup>[21]</sup>; CanpgCHH 为普通黄道蟹的 CHH<sup>[22]</sup>; CarmaCHH 为普通滨蟹的 CHH<sup>[23]</sup>

### 3 讨论

查找大量的相似序列, 并对这些相似序列进行同源性和相似性分析, 发现鹰爪虾的这一特异性 cDNA 片段推导的氨基酸序列与其它绝大多数甲壳动物的 MIH 的氨基酸序列相似度普遍较高, 而与甲壳动物 CHH 家族的其它神经肽相似度较低, 因此认为克隆到的特异性 cDNA 片段很可能是编码其部分 MIH 的基因。鹰爪虾的 MIH 片段与刀额新对虾和日本对虾的同源性超过 70%, 而与蟹类和克氏原螯虾的同源性却只有 43% 左右。鹰爪虾与很多甲壳动物的 MIH 的较低的同源性是出人意料的, 一般认为象 MIH 这样的重要功能基因, 其氨基酸序列应该是很保守的。

鹰爪虾 MIH 片段与凡纳对虾的 MIH 类似物的相似性很低, 其同源性比例只有 25.4%, 而通过核酸和氨基酸序列比较和结构分析, 不难发现凡纳对虾的 MIH 与其它甲壳动物的 CHH 有很高的相似性。这提示鹰爪虾的 MIH 与凡纳对虾的 MIH 类似物可能不属于同一类神经肽。凡纳对虾的眼柄 cDNA 根据美洲螯龙虾的具有蜕皮抑制活性的 CHH 设计引物, 通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)的方法获得的, 而扩增产物的检测用普通滨蟹的 CHH 的 cDNA 作为探针, 再以这样的 cDNA 推断凡纳对虾的 MIH 多肽, 这样就很难确定这种所谓的 MIH 具有蜕皮抑制活性还是高血糖活性, 或者同时具有两种活性<sup>[17]</sup>。

比较鹰爪虾的 MIH 片段与美洲螯龙虾的 GIH, 可以发现它们的氨基酸序列同源性比例较高, 甚至高于鹰爪虾 MIH 部分氨基酸序列与其它蟹类和螯虾类的 MIH 的同源性比例, 对以上所比较 CHH 家族神经肽进行分子系统学分析, 结果显示 HomamGIH 与虾蟹类的 MIH 聚在一起(数据未显示)。1994 年 de Kleijn 等<sup>[19]</sup>的研究认为美洲螯龙虾的 GIH 除了具有抑制性腺发育外, 它还参与蜕皮活动的调控, 而且通过比较很多蟹类的 MIH 与美洲螯龙虾的 GIH 的氨基酸序列, 可以发现它们在结构上具有很高的相似性, 因此与美洲螯龙虾的 GIH 相类似, 蟹的 MIH 可能对性腺的发育具有调控作用。查阅相关文献可以发现, 到目前为止, 这些已证实具有 MIH 的蟹类及其它的螯虾和对虾类除了具有 MIH 和 CHH 外, 没有发现一种专门具有性腺抑制活性的 GIH。而美洲螯龙虾也没有发现具有专一蜕皮抑制活性的 MIH。这提示鹰爪虾的 MIH 可能具有抑制性腺发育的功能, 或者是美洲螯龙虾的 GIH 可能具有抑制蜕皮的功能。因此, van Herp 认为 MIH 和 GIH 很可能是同一种神经肽, 所谓的 MIH 可能同时具有抑制蜕皮和控制性腺发育的功能(个人通讯)。

如图 2 所示, 不管相似程度如何, 由 71 个氨基酸组成的鹰爪虾的 MIH 片段与所有的甲壳动物的 CHH 家族各种神经肽都表现出甲壳动物 CHH 家族神经肽的特征: 6 个半胱氨酸位于相同的位置, 可形成 3 个链内二硫键; 成熟肽链中半胱氨酸周围多为保守的氨基酸序列。

#### 参考文献:

- [1] de Kleijn D P V, van Herp F. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea[J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 112B: 573- 579.
- [2] Chang E S, Prestwich G D, Bruce M J. Amino acid sequence of a peptide with both molt- inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1990, 171: 818- 826.
- [3] Yang W, Aida K, Terauchi A, et al. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting hormone activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Peptide, 1996, 17: 197- 202.
- [4] Sun P S. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Mol Mar Biol Biotech, 1994, 3: 1- 6.
- [5] Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, et al. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Zool Sci, 1997, 14: 785- 789.
- [6] Gu P L, Chan S M. Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis* [J]. Mol Mar Bio Biotech, 1998, 7: 214- 220.
- [7] Cai S L. Review of crustacean endocrinology[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22(2): 154- 161. [蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究与发展[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 154- 161.]
- [8] Wang Z Z, Xiang J H. A review on the structure and function of crustacean hyperglycemic neurohormone family[J]. Journal of Fisheries of

- China, 2001, 25(2): 175- 180. [王在照, 相建海. 甲壳动物CHH家族神经激素结构和功能研究进展[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 175- 180.]
- [9] Jiang R L, Tan Y J, Wu J M, et al. Changes of hemolymph 20-hydroxyecdysone 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone levels in *Eriocheir sinensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(2): 101- 106. [姜仁良, 谭玉钧, 吴嘉敏, 等. 中华绒螯蟹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮、17 $\beta$ -雌二醇和睾酮含量的变化[J]. 水产学报, 1992, 16(2): 101- 106.]
- [10] Zhao W X, Wei H, Wang Z Q, et al. Induced synchronous spawning in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Fisheries of China, 1995, 19(4): 289- 296. [赵维信, 魏华, 汪自强, 等. 人工诱导罗氏沼虾同步产卵与卵巢组织学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(4): 289- 296.]
- [11] Liu R Y. Penaeoid Shrimp of North China[M]. Beijing: Science Press, 1955. 14- 15. [刘瑞玉. 中国北部经济虾类[M]. 北京: 科学出版社, 1955. 14- 15.]
- [12] Liu R Y, Zhong Z R. Penaeoid Shrimp of the South China Sea[M]. Beijing: Agriculture Press, 1988. 184- 193. [刘瑞玉, 钟振如. 南海对虾类[M]. 北京: 农业出版社, 1988. 184- 193.]
- [13] Fan S J. Study on reproductive biology of *Trachypenaeus amirostris*[D]. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 1999. [凡守军. 鹰爪虾繁殖生物学研究[D]. 中国科学院海洋研究所学位论文, 1999.]
- [14] Chan S M, Chen X G, Gu P L. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab *Charybdis feriatus* [J]. Gene, 1998, 224: 23- 33.
- [15] Chung J S, Wilkinson M C, Webster S G. Determination of the amino acid sequence of the molt-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. Neuropeptides, 1996, 30: 95- 101.
- [16] Webster S G. Amino acid sequence of putative molt-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas* [J]. Proc Roy Soc London, 1991, 244B: 247- 252.
- [17] Lee K J, Elton T S, Bej A K, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 209: 1126- 1131.
- [18] Nagasawa H, Yang W J, Shimizu H, et al. Isolation and amino acid sequence of a molt inhibiting hormone from the American crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(3): 554- 556.
- [19] de Kleijn D P V, Sleutels F J G T, Martens G J M, et al. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus* [J]. FEBS Lett, 1994, 353: 255- 258.
- [20] Liu Lei, Laufer H, Gogarten P J, et al. cDNA cloning of a mandibular organ inhibiting hormone from the spider crab *Libinia emarginata* [J]. Invertebrate Neuroscience, 1997, 3: 199- 204.
- [21] Sefiani M, Le Caer J P, Soyez D. Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1996, 103: 41- 53.
- [22] Chung J S, Wilkinson M C, Webster S G. Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus* [J]. Regul Pept, 1998, 7: 17- 24.
- [23] Kegel G, Reichwein B, Weese S, et al. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas* [J]. FEBS Lett, 1989, 255: 10- 14.