

文章编号: 1000- 0615(2003)03- 0207- 06

锯缘青蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的 分子克隆及其表达分析

邱高峰, 张爱萍, 楼允东

(上海水产大学农业部水产增殖生态生理重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 根据近缘种类同源序列设计简并引物, 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术, 首次扩增获得锯缘青蟹(*Scylla serrata*)眼柄组织中编码蜕皮抑制激素(MIH)成熟肽全长 cDNA 序列及部分信号肽序列。将该序列克隆到 pUCmT 载体上进行序列测定。结果表明, 编码锯缘青蟹 MIH 成熟肽的 cDNA 由 234 个碱基组成, 由此推测 MIH 成熟肽含 78 个氨基酸残基。该序列不仅与其它短尾类甲壳动物的 MIH 氨基酸序列具有高度的同源性(79%~91%), 还与该激素同一家族的性腺抑制激素、大颚器抑制激素的氨基酸序列具有较高的相似性。RNA 斑点杂交结果显示, MIH 基因在眼柄神经节及脑组织中均有表达, 而在肌肉、中肠腺中不表达。

关键词: 锯缘青蟹; 蜕皮抑制激素; cDNA 分子克隆; 表达分析

中图分类号: S917.4 文献标识码: A

cDNA cloning and expression analysis of molt inhibiting hormone in the mud crab *Scylla serrata*

QIU Gao-feng, ZHANG Ai-ping, LOU Yun-dong

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In the present study, cDNA encoding molt-inhibiting hormone (MIH) was amplified from the total RNA of eyestalk neural ganglia of the mud crab, *Scylla serrata*, by means of reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) with degenerate oligonucleotide primers based upon the homology DNA sequence of MIH from other Brachyurasppecies. Then the fragments were cloned with pUCm-T vector and sequenced. The total length of 316bp sequence was obtained that encoded full-length mature peptide of 78 amino acids and partial signal peptide. According to the search results of GenBank databases, the cDNA fragment and the deduced amino acid sequence of mature peptide share 79%~91% identity with that of other species in the Brachyura. Expression of MIH was detected in the eyestalk, brain, midgut gland and muscle tissues examined by RNA dot hybridization. The results indicated that the MIH was expressed only in the eyestalk and brain not in other tissues.

收稿日期: 2002-09-24

资助项目: 上海市科委“青年科技启明星”项目

作者简介: 邱高峰(1965-), 男, 福建长汀人, 理学博士, 副教授, 现为日本国立水产养殖研究所特别研究员、博士后。主要从事水产动物遗传育种与生物技术、生殖生物学方面的研究。现在通讯地址: Fisheries Research Agency, National Research Institute of Aquaculture, 422-1, Nakatsuhamaura, Nansei, Watarai, Mie, 516-0193, Japan

Key words: *Scylla serrata*; molt-inhibiting hormone(MIH); cDNA molecular cloning; expression analysis

眼柄是十足类甲壳动物重要神经内分泌器官所在地,其内分泌激素一直是甲壳动物生理学研究的热点之一。眼柄中的神经血窦器即窦腺,具有储存神经分泌产物的作用,该腺体由一群被称为X器官的神经元之末梢构成,由X器官分泌的激素运送至窦腺储存。现已查明,X器官分泌的激素种类至少有6种,除蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)外,还有性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)、高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、大颚器抑制激素(mandibular-organ-inhibiting hormone, MOIH)等,均被鉴定为肽类激素^[3,4,7,11,15],该类激素在氨基酸组成和顺序上具有很大的相似性,统称为CHH激素族,在调节甲壳动物的生长、变态、生殖、血糖平衡等一系列的生理活动中发挥着重要作用。

锯缘青蟹(*Scylla serrata*)是我国近海重要的大型经济蟹类,味道鲜美,营养丰富,具有很高的商业价值。上官步敏等^[1]曾对其X-器官神经内分泌细胞进行过形态学研究,国内有关虾蟹类甲壳动物分子内分泌学研究至今尚属空白。本文采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术首次克隆了锯缘青蟹MIH cDNA,并进行序列分析,同时还应用分子杂交技术对MIH基因在不同组织的表达进行分析鉴定,从分子水平上对MIH的结构及功能进行探讨,以期为进一步研究甲壳动物内分泌激素的分子调控机理,解决养殖生产实践中所遇到的与生理学相关的难题提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 锯缘青蟹眼柄总 RNA 的提取

将锯缘青蟹眼柄剪下,去除复眼色素部分后,剥离神经组织,于研钵中加液氮研磨至粉末,转移到1.5mL Ependorf 离心管中,用Trizol (GMBL 公司产品)法抽提总RNA,紫外分光光度计测RNA的纯度,甲醛变性凝胶电泳分析RNA的质量。RNA样品溶于DEPC处理过的水中,加等量100%乙醇,于-70℃保存。

1.2 引物设计与 RT-PCR

根据文献报道的美洲蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[10]、斑锈 (*Charybdis feriatius*)^[2]、普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[15]的MIH cDNA序列设计简并引物,上游引物(P1):TTCTT(GC)(CT)CA(AG)AGGACG(TA)GGCTGC,位于信号肽区域;下游引物(P2):TCA(CG)(AT)(TC)CCG(AG)CC(ACGT)GCCCC(AG)AG,位于MIH结构域的3'末端,含终止密码子TGA;下游引物(P3):GAAGTC(TC)TCGTTAAAGAA(AG)CAG,位于MIH结构域中部,为较保守区域。

RT-PCR反应按试剂盒(Takara公司)说明书中的操作步骤进行,首先以总RNA为模板在AMV逆转录酶作用下合成cDNA第一条链,然后取5μL合成液进行第一轮PCR扩增,加入引物P1、P2、1.25U Pfu高保真高温聚合酶、1.5μL(25mmol·L⁻¹)MgCl₂、2μL 10×PCR Buffer制成25μL的反应体系。反应条件为94℃、30s,50℃~58℃、45s,72℃、1min,共30个循环,结束后72℃再延伸10min。为了鉴定第一轮PCR结果的真伪,进行第二轮巢式PCR反应,采用P1、P3引物,反应条件同上。

1.3 PCR产物的克隆与测序

1.3.1 PCR产物的纯化及添A反应

切下琼脂糖胶板上的目的条带,用DNA Gel Purification试剂盒(上海博采生物技术公司产品)纯化回收PCR产物,加Taq酶进行添A反应。

1.3.2 连接与转化

纯化后的添A产物在T4 DNA连接酶作用下与pUCm-T载体进行连接反应,连接产物转化大肠杆

菌 DH5 α 的感受态细胞后, 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的选择平板上, 倒置培养过夜。挑白斑, 纯化质粒, 经 *Pst* I 酶切鉴定, 并以质粒为模板进行 PCR 扩增检测, 将 PCR 扩增获得阳性结果的重组质粒于 ABI PRISM377 全自动荧光测序仪上进行序列测定, 用 DNA 分析软件分析测定结果。

1.4 RNA 点杂交检测 MIH 基因在不同组织中的表达

1.4.1 探针的制备

将 P1、P2 为引物扩增的 PCR 产物作为探针制备的模板, 以随机引物法制备非同位素 Digoxigenin-labeled (Roche 公司产品) 探针。反应体系为: 2 μ L 六核苷酸混合物、2 μ L dNTP 混合物 (dUTP 为 DIG 标记)、1 μ L Klenow 酶、5 μ L PCR 产物 (约 1 μ g), 于 37 $^{\circ}$ C 温育 90min 后, 加 2 μ L 0.2 mol \cdot L $^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 终止反应。探针使用前经 100 $^{\circ}$ C 变性处理 10min 后置于冰上待用。

1.4.2 预杂交和杂交

将来自眼柄、脑、肌肉及中肠腺等不同组织的总 RNA (约 5 μ g) 变性后点于经 DEPC 处理过的尼龙膜上, 室温晾干, 80 $^{\circ}$ C 烘 2 h。于 42 $^{\circ}$ C 预杂交 1h 后, 置于含探针 (50pg \cdot mL $^{-1}$) 的杂交液中杂交过夜。

1.4.3 洗膜、显色

杂交后的尼龙膜于室温下用 2 \times SSC, 0.1% SDS 漂洗两次, 每次 5 min, 0.1 \times SSC, 0.1% SDS 65 $^{\circ}$ C 洗两次, 每次 15min。然后按 DIG 检测试剂盒 (Roche 公司产品) 说明书进行以下步骤: washing buffer (0.3% Tween 20, 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ 顺丁烯二酸溶液 pH7.5) 中洗 3min; blocking solution 中温育 30min; antibody solution (anti Dig AP conjugate 浓度为 150mU \cdot mL $^{-1}$) 中温育 30min; washing buffer 洗两次, 每次 15min; detection buffer (0.1 mol \cdot L $^{-1}$ Tris HCl, 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, 50mmol \cdot L $^{-1}$ MgCl $_2$, pH 9.5) 中平衡 5 min; 将尼龙膜置于新配置的 Color substrate solution (NBT/BCIP stocksolution 与 detection buffer 的比例为 1:50) 中, 避光显色 10min 至过夜。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

应用巢式 PCR 法进行扩增。第一轮 PCR 反应以 P1、P3 为引物, 扩增出约 310bp 的条带, 与预计的产物大体相当。第二轮反应以 P1、P2 为引物, 以 P1、P3 扩增产物为模板进行二次 PCR, 扩增出 1 条约 220bp 的条带 (图 1), 推测扩增产物为目的片段。

2.2 MIH cDNA 的克隆

RT-PCR 产物 (以 P1、P3 为引物) 经 T/A 克隆后, 筛选得到 6 个重组子, 经 *Pst* I 酶切鉴定, 均有约 400 bp (包含约 60bp 的载体序列在内) 的插入片段, 纯化后的重组质粒经 PCR 扩增, 得到约 310 bp 的片段, 如图 1 所示。

2.3 测序结果

挑选的 3 个阳性克隆经测序, 得到一致的结果。

所得序列长度为 316bp, 包括编码 MIH 成熟肽的全长序列和编码信号肽的部分序列及终止密码子 TGA (图 2)。以 online blast 软件搜索 GenBank 数据库结果显示, 由锯缘青蟹的 MIH cDNA 推导的成熟肽氨基

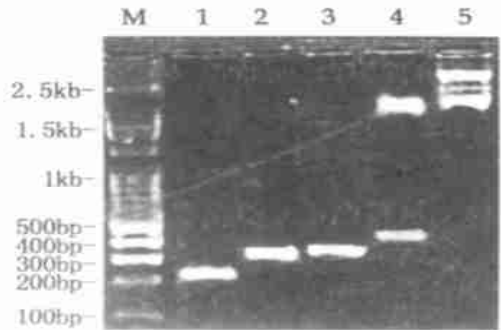


图 1 PCR 产物及重组质粒的酶切电泳图谱

Fig. 1 Analysis of RT-PCR products of the MIH cDNA and the recombinants through agarose gel electrophoresis

1. P1、P2 引物扩增的巢式 PCR 产物; 2. P1、P3 引物扩增的 PCR 产物; 3. P1、P3 引物扩增的 RT-PCR 产物; 4. 重组 DNA 的 *Pst* I 酶切图谱; 5. 不同构型的重组 DNA; M. DNA 分子量标记

1. Nested PCR product amplified by primer P1、P2; 2. PCR product amplified by primer P1、P3 with the recombinant DNA as template; 3. RT-PCR product amplified by primer P1、P3; 4. Recombinant DNA digested with *Pst* I; 5. Recombinant DNA with different conformations; M. DNA Marker

酸序列与短尾类(Brachyura) 的美洲蓝蟹、斑锈蟹、普通滨蟹、首长黄道蟹(*Cancer pagurus*)、普通黄道蟹(*Cancer magister*) 的 MIH 序列具有高度的同源性, 相似性分别为 91%、85%、84%、83% 和 79%。; 与首长黄道蟹的 MOIH^[14] 及美洲螯龙虾 GIH 的氨基酸序列^[9] 相似性也较高, 分别为 56% 和 58% (图 3); 与 CHH 的序列相似性较低, 仅为 23% ~ 30%。

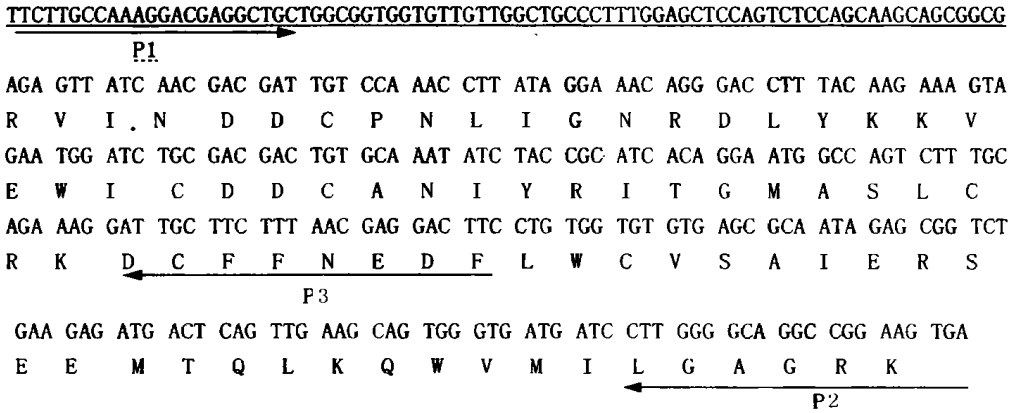


图 2 锯缘青蟹 MIH cDNA 序列及推导的成熟肽氨基酸序列(GenBank 登录号: AY083797)

下画线部分为信号肽部分, 箭号示 PCR 引物 P1、P2、P3 的位置

Fig. 2 Sequence of the MIH cDNA and the deduced amino acid of mature peptide in the mud crab *Scylla serrata*(GenBank accession number: AY083797)

Partial signal peptide is underlined, and the positions of the PCR primer P1, P2 and P3 is showed by arrows

2.4 MIH 基因在不同组织中的表达

经显色 30min 后观察到来自眼柄组织的 RNA 斑点显出紫色斑点, 其它均无颜色, 显色 4h 后观察到来自脑组织的 RNA 斑点显出紫色, 过夜后再次观察, 其它组织仍无颜色变化(图 3)。说明 MIH 基因只在眼柄和脑组织中表达, 而在肌肉与中肠腺中不表达。



图 3 RNA 斑点杂交检测 MIH 基因在不同组织中的表达

Fig. 3 Expression of MIH gene in different tissues detected by RNA dot hybridization

- 1. 眼柄神经组织; 2. 脑; 3. 肌肉; 4. 中肠腺
- 1. eyestalk; 2. brain; 3. muscle; 4. midgut gland

3 讨论

MIH 是甲壳动物特有的神经肽类激素, 迄今分

离出的全长 cDNA 序列, 通常采用的方法为首先分离纯化多肽激素, 进行氨基酸序列测定, 根据其氨基酸序列设计简并引物, 合成探针, 从 cDNA 文库中筛选出目的 cDNA 序列^[8, 10, 12, 13], 但眼柄中激素的含量极微, 且难以提取, cDNA 文库的筛选也极为烦琐, 因此该方法工作量较大。本研究根据比较已报道的近缘种类的 cDNA 同源序列, 设计了 3 条简并引物, 直接进行 RT-PCR 扩增, 成功分离出锯缘青蟹的目的 MIH cDNA 序列。扩增中使用的 Taq 酶为具有高保真性的 Pfu 酶, 该酶能纠正 PCR 扩增过程中产生的错配, 保证了 cDNA 序列的正确性。

MIH 氨基酸组成具有种间多态性, 已知短尾类(蟹类)由 78 个氨基酸残基组成^[2, 3, 8, 10, 15], 而对虾类和螯虾类的数目种间差异较大。日本对虾(*Penaeus japonicus*) 和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*) 的 MIH 由 77 个氨基酸组成^[5, 12], 南美白对虾(*Penaeus vannamei*) 的 MIH 仅为 72 个^[13], 克氏原螯虾(*Procambarus darkii*) 的则为 75 个氨基酸^[11](图 4)。序列分析表明, MIH 种间多态性是由于缺失了近 C-端的几个氨基酸残基所致, C-末端的氨基酸序列的保守性较差, 推测 MIH 在体内有多种不同的构型(isoform)。不同

物种的生物中具有同一功能的蛋白质, 在进化过程中可能来自相同的祖先, 由于进化过程中趋异突变 (divergent mutation) 而导致蛋白质的一级结构发生改变, 而产生种属差异。这种突变多为中性突变 (neutral mutation), 发生在性质相似的氨基酸之间, 往往在各种蛋白质分子表面的氨基酸残基比较多见, 而蛋白质分子内部残基的变异比较少见, 分析不同物种的 MIH 激素可发现这一现象。

```

MIH1 RVINDDCPNLIGNRDLYKKVVEWICDDCANIYRITGMASLORRKCFFNEDFLWCVSATERSEEMTQLKQWVMIIGAGRK
MIH2 RVINDDCPNLIGNRDLYKKVVEWICDDCANIYRSTGMASLORRKCFFNEDFLWCVRATERSEDLAQLKQWVTILGAGRI
MIH3 RVFNDDCPNLMGNRDLYKKVVEWICDDCANIFRIPGMASLORRKCFFNEDFLWCVRATERTEEMMQLKQWVRILGAGRM
MIH4 RVINDECPNLIGNRDLYKKVVEWICDDCSNIFRKTGMASLORRNCFFNEDFLWCVHATERSEELRDLLEWVGILGAGRD
MIH5 RVINDDCPNLIGNRDLYKKVVEWICDDCSNIFRNTGMATLORRNCFFNEDFLWCVYATERTEEMSQRQWVGILLGAGRE
MIH6 RVINDDCPNLIGNRDLYKRVVEWICDDCSNIFRNTGMATLORRNCFFNEDFLWCVYATERTEEMSQRQWVGILLGAGRE
MIH7 RYVFEECPGVMGNRAVHGKVRVCEDCYNVFRDTPDLVLAGORRKGCFSSSEMFKLCLLAMERVEEFPDFKRWIGILLNA
MIH8 SFIDNTRGVMGNRDLYKKVVRVCEDCYNIFRPLGLDGMCRNRKCFYNEWFLICLKAANREDEIEKFRVWISILLNAGQ
MIH9 SYIENTCRGVMGNRDLYKKVVRVCEDCYNIFRPLGLDGMCRDRCFNNEWFLVCLKAANRDELDFKFWVWISILLNPGL
MIH10DTFDHSCKGIYD-RELFRKLDVRVCEDCYNVFRFPKVAATECKSNCFVNRKFNVCVADL RHDVSRFLKMANSAALLS
GIH1 WFTNDECPGVMGNRDLYEKVAWVCNDCANIFRNNVGVMCCKKDCFFHTMDFLWCVYATERHGEIDQFRKWWISILLRAGRK
MOIH RRINNDQCNFIGNRAMYEKVDWICKGANIFRQDGLLNNRSCNCFYNTFEIWCIDATENTRNKEQLEQWAAILLGAGWN

```

图 4 推导的锯缘青蟹 MIH 氨基酸序列与其它十足类甲壳动物 CHH 家族氨基酸序列的对比 (阴影部分为相同的氨基酸)

Fig. 4 Alignments of the deduced amino acid sequence for *Scylla serrata* MIH cDNA with those of other members of CHH family of decapods (gray shadows denote identical amino acid)

MIH1: 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*); MIH2: 美洲蓝蟹 (*Callinectes sapidus*); MIH3: 斑锈 (*Charybdis feriatus*); MIH4: 普通滨蟹 (*Caraimus maenas*); MIH5: 首长黄道蟹 (*Cancer pagurus*); MIH6: 普通黄道蟹 (*Cancer magister*); MIH7: 克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*); MIH8: 日本对虾 (*Penaeus japonicus*); MIH9: 刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*); MIH10: 南美白对虾 (*Penaeus vannamei*); GIH1: 美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*); MOIH: 首长黄道蟹 (*Cancer pagurus*)

其次, 短尾类 MIH cDNA (编码成熟肽部分) 的单核苷酸序列多态性多发生在密码子的第二、三位碱基上。不同物种间 MIH 激素氨基酸序列的替换一般为疏水性氨基酸与疏水性氨基酸之间的替换, 或亲水性氨基酸与亲水性氨基酸之间的替换, 例如天冬氨酸(D) 替换为谷氨酸(E)、天冬酰胺(N), 异亮氨酸(I) 替换为苯丙氨酸(F), 丝氨酸(S) 替换为苏氨酸(T), 丙氨酸(A) 替换为丝氨酸(S) 等(图 4), 并不影响激素的构型。

由于 CHH 家族某些激素成员之间具有较高的序列相似性, 因而不难理解某些序列相似性高的激素具有相近的生理功能。同一物种的不同激素可以有相似的生理功能, 例如, 美洲螯龙虾的 MIH 由于与同种的 CHH 序列高度相似^[4], 不仅能抑制蜕皮, 还能引起高血糖; 不同物种的同一激素也可以有相似的生理功能, 例如, 泥污鲸螯虾 (*Orconectes limosus*) 与美洲龙螯虾的 CHH 同源性为 81%^[7], 可有效地引起美洲龙螯虾产生高血糖。

目前虾蟹类养殖中, 普遍出现性早熟现象, 造成这一现象的因素是多方面的, 其中一个主要的因素是由于早期幼蟹性腺发育过快, 蜕皮次数过频。通过基因工程的方法大量生产 MIH, 控制早期幼蟹生长, 将为抑制甲壳动物的性早熟探索出一条新的途径。

参考文献:

- [1] Shangguan B M, Li S J. Studies on the cytology of neurosecretory cell of X-organ in *Scylla serrata* [J]. Acta Oceanol Sin, 1994, 16(6): 116-121. [上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹 X-器官神经内分泌细胞的细胞学研究[J]. 海洋学报, 1994, 16(6): 116-121.]
- [2] Chan S M, Chen X G. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab *Charybdis feriatus* [J]. Gene, 1998, 224: 23-33.
- [3] Chang E S, Keller R. Determination of the amino acid sequence of the molt-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. Neuropeptides, 1996, 30:95-101.
- [4] Chang E S, Prestwich G D. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster *Homarus americanus* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 171: 818-826.
- [5] 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 Biol Biotechnol, 1998, 7: 214-220.
- [6] Heather G M, Gerl G. A comparative immunocytochemical study of the hyperglycaemic, molt-inhibiting and vitellogenesis-inhibiting neurohormone family in three species of decapod crustacean [J]. Cell Tissue Res, 1999, 295: 171-182.
- [7] Kegel G, Reichwein B. Amino acid sequence of CHH from the crayfish *Orconectes limosus*. Emergence of a novel neuropeptide family [J]. Peptides, 1991, 12: 909-913.
- [8] Klein J M, Mangerich S, Kleijn D P, et al. Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor [J]. FEBS Lett, 1993, 334(1): 139-142.
- [9] Kleijn, D P V. Cloning and expression of mRNA encoding prepro gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus* [J]. FEBS Lett, 1994, 353:255-258.
- [10] 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.
- [11] Nagasawa H. Isolation and amino acid sequence of a molt-inhibiting hormone from the American crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60: 554-556.
- [12] Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, et al. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone from the kunuma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Zoological Science, 1997, 14: 785-789.
- [13] 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 Biotechnol, 1994, 3(1): 1-6.
- [14] Tang C H. Molecular characterization and expression of mandibular organ-inhibiting hormone, a recently discovered neuropeptide involved in the regulation of growth and reproduction in the crab *Cancer pagurus* [J]. J Biochem, 1999, 343:355-360.
- [15] Webster S G. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carinus maenas* [J]. Proc R Soc Lond, 1991, 244: 247-252.