

## 三疣梭子蟹 *CYP302a1* 基因克隆及其表达分析

柳志业, 朱冬发\*, 谢 熙, 邱锡尔, 周彦琦, 沈锡权

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 细胞色素 P450(*CYP*)302a1 是昆虫蜕皮激素合成通路中的关键酶, 为了研究其在三疣梭子蟹蜕皮过程中的调控作用, 实验采用反转录 PCR (RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术, 克隆得到了三疣梭子蟹 *CYP302a1* 全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: KM596851)。该序列全长为 3 171 bp, 包含一个长度为 1 626 bp 的开放阅读框, 编码 541 个氨基酸; 序列分析显示该氨基酸含 helix-C、helix-K、helix-I、PERF 及 heme-binding 共 5 个 P450 特征保守区域; 系统进化树分析发现三疣梭子蟹 *CYP302a1* 与日本剑水蚤 *CYP302a1* 聚为一小支, 再与其他物种 *CYP302a1* 聚为一支。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析了 *CYP302a1* 在不同组织和蜕皮过程中的表达水平变化。结果显示, *CYP302a1* 的表达量在 Y 器中最高, 而在其他组织中均极低 ( $P < 0.05$ ); 蜕皮过程中, *CYP302a1* 在蜕皮后期 (A、B 期) 表达量最低, 从蜕皮间期 (C 期) 开始上升, 至蜕皮前期的 D<sub>1</sub> 亚期达到最大值, 随后下降。结果表明 *CYP302a1* 在三疣梭子蟹蜕皮调控中可能起着重要作用。

**关键词:** 三疣梭子蟹; *CYP302a1*; 蜕皮周期; 基因克隆; 表达水平

**中图分类号:** Q 785; S 968.2

**文献标志码:** A

周期性蜕皮对节肢动物的生长、繁殖和形态发生起着重要作用, 其包括褪去外骨骼、长出新骨骼、肌肉再生和能量储备等多种生物过程<sup>[1]</sup>。蜕皮的调控是精密和复杂的, 受到一系列环境和自身因素的影响<sup>[2]</sup>, 其中一个重要的调控因子即是蜕皮激素 (ecdysteroids)。蜕皮激素是一种类固醇激素, 其最早由 Butenandt 等<sup>[3]</sup>从蛾蛹中分离得到。随后, 其化学结构和组织来源 (前胸腺) 也被相继确定<sup>[4]</sup>。有关研究表明, 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 是蜕皮激素主要的活性形式, 诱导和调节蜕皮周期中多项形态、生理、生化和分子水平的变化<sup>[5]</sup>。

与昆虫相比, 甲壳动物关于蜕皮激素的研究起步较晚。自 Hampshire 等<sup>[6]</sup>报道了南非岩龙虾 (*Jasus lalandii*) 中的蜕皮激素以来, 已在美洲蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)<sup>[7]</sup>、真蟹 (*Carcinus maenas*)<sup>[8]</sup>、*Cancer antennarius*<sup>[9]</sup> 等物种中分离

和鉴定到甲壳动物的蜕皮激素。Y 器 (Y-organ, YO) 与昆虫的前胸腺同源, 是甲壳动物合成和分泌蜕皮激素的器官, 但其分泌的蜕皮激素并无活性, 必须在外周组织中经 20-羟化酶 (*CYP314a1*) 的催化作用下转化成具有生物活性的蜕皮激素<sup>[10]</sup>。YO 中蜕皮激素的合成主要分为两个阶段: 第一阶段是将食物中的胆固醇转化为 5 $\beta$ -diketol (3D2, 22, 25, dE), 这一过程在所有节肢动物中均一致; 第二阶段是将 5 $\beta$ -diketol 转化为最终产物, 这一过程因物种蜕皮时期的差异其分泌物有所不同。蜕皮激素合成的第二阶段包括 *CYP306a1*、*CYP302a1* 和 *CYP315a1* 等细胞色素 P450 家族蛋白酶分别催化 C25、C22 和 C5 的羟基化<sup>[11-12]</sup>。上述 *CYP306a1*、*CYP302a1*、*CYP315a1* 和 *CYP314a1* 的编码基因又被称为“Halloween 家族基因”。这些 Halloween 家族基因最早发现自一系列果蝇 (*Drosophila*

收稿日期: 2014-12-04 修回日期: 2015-03-02

资助项目: 国家自然科学基金 (41376152, 40976098); 浙江省自然科学基金 (LY13C190006)

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

*melanogaster*) 胚胎发育突变体的性状研究,因此又分别根据其突变体命名为 *phantom* (*phm*)、*disembodied* (*dib*)、*shadow* (*sad*) 和 *shade* (*shd*)<sup>[13-15]</sup>。这些突变体大多在胚胎发育末期死亡,且表现性状与蜕皮激素缺失有关,由此推测 Halloween 家族基因在果蝇蜕皮激素合成过程中起着重要的调控作用。Chávez 等<sup>[16]</sup>用图位克隆方法分离得到了果蝇的 *CYP302a1* (*dib*) 基因并证明了其在蜕皮激素合成中的重要作用,其 *dib* 突变体中蜕皮酮 (ecdysone) 和 20E 含量极低,也无法检测到 *IMP-E1* 和 *L1* 等蜕皮激素响应基因的表达。*phm*、*sad* 和 *shd* 突变体中也有类似报道<sup>[17-21]</sup>。

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 广泛分布于中国、日本及朝鲜等海域,其生长迅速,味道鲜美,已成为我国重要的海水养殖品种。但三疣梭子蟹在人工增殖过程中常常会遇到蜕皮过频和蜕皮未遂等棘手问题,严重影响了三疣梭子蟹的产量和品质<sup>[22]</sup>。因此,其蜕皮调控分子机制的研究极其重要。作为蜕皮激素合成的重要调控因子,*CYP302a1* 基因在软甲纲 (Malacostraca) 甲壳动物中尚未见报道。本实验通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了三疣梭子蟹 *CYP302a1* (*dib*) 的全长,并运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析了其组织表达情况和在蜕皮周期中的表达变化,为阐明其在三疣梭子蟹蜕皮调控中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

选取头胸甲宽 (CW) 为 8 ~ 12 cm、体质量 (BW) 为 42 ~ 83 g 的野生三疣梭子蟹,暂养于宁波市宁海县得水育苗场。根据形态学特征变化研究,将三疣梭子蟹蜕皮周期分为蜕皮后期 (A、B 期)、蜕皮间期 (C 期)、蜕皮前期 (D<sub>0</sub>、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 和 D<sub>4</sub> 亚期) 和蜕皮期 (E) 四个阶段<sup>[23]</sup>。用消毒镊子及剪刀采集 5 只 C 期蟹 (CW: 15.0 ~ 16.5 cm; BW: 170 ~ 265 g) 的眼柄、心脏、表皮、胸神经节、性腺 (卵巢和精巢)、肝胰腺、大颚器和 Y 器等 8 个组织用于分析 *CYP302a1* 的组织表达差异;采集蜕皮周期各期 (E 期除外) 蟹的 Y 器用于分析 *CYP302a1* 在蜕皮周期中的表达水平变化。每期取 5 只蟹用于平行实验。各组织在冰上解剖

后被转移至 RNA 保护液 (生工生物,上海) -20 °C 保存备用。

### 1.2 总 RNA 提取

将上述组织样品按照 Trizol 试剂盒 (生工生物,上海) 说明进行总 RNA 提取。总 RNA 用 DNase I (Takara,大连) 去除基因组 DNA 后,用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用超微量分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific,美国) 进行纯度分析。

### 1.3 基因克隆

采用 RT-PCR 进行 *CYP302a1* 核心片段的扩增。模板 cDNA 由 YO 总 RNA 通过 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit 试剂盒 (Takara,大连) 反转录获得,扩增引物设计自 NCBI 已知物种 *CYP302a1* 序列的保守区域 (表 1)。根据得到核心序列设计基因特异性引物,并利用 RACE 技术分别对 *CYP302a1* 的 3' 和 5' 端进行巢式 PCR 扩增 (表 1)。其中,3' RACE-cDNA 将接头引物 AP 替换上述试剂盒中的 Oligo dT primer 和 Random 6 mers 后用相同的方法进行制备,5' RACE-cDNA 按照 SMARTer<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒 (Clontech,日本) 进行合成 (表 1)。以上 PCR 均在 25 μL 体系下进行反应,反应条件如下:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,52 °C 30 s,72 °C 30 s,33 个循环;72 °C 延伸 10 min。所有 PCR 产物经琼脂糖电泳后,用 DNA 回收试剂盒 (生工生物,上海) 进行回收和连接,并转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞进行培养,之后选取阳性克隆菌落交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

### 1.4 序列分析

使用 Vector NTI 对测序得到的序列进行拼接和分析,获得 *CYP302a1* 基因全长 cDNA 序列。在 NCBI 上利用在线 ORF Finder 确定其开放阅读框 (ORF) 序列,并翻译成氨基酸序列,使用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析与其他物种相似性。利用 ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>) 所提供的多种蛋白质在线软件对氨基酸序列进行蛋白预测分析;用 Signal 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测氨基酸序列信号肽;利用在线 TMHMM 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测氨基酸跨膜区域;利用

<http://www.sexuebao.cn>

ClustalX 软件将该氨基酸序列与已公布的 CYP302a1 氨基酸序列进行同源性比对分析,并用 MEGA 4.0 软件的邻位法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树。

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

引物 primer	序列 sequence(5'→3')	用途 usage
CYP-F1	AAGATGAGGCGTGAAGGG	RT-PCR
CYP-R1	GCAATGAGGTAAAGCCAAGA	RT-PCR
CYP-3'F1	GAAGAGGAAGGCTGAAGGAG	3' RACE
CYP-3'F2	CTGTTGGTTGGGTCTGATGG	3' RACE
3'outter primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	3' RACE
3'inner primer	TCCACTAGTGATTTCACTATAGG	3' RACE
AP	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTTCACTATAGG(T) <sub>17</sub>	3' RACE
CYP-5'F1	CGCTGAGGATCATGGAAGT	5' RACE
CYP-5'F2	CCTCAAGCAGACTCGCAAT	5' RACE
5'outter primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5' RACE
5'inner primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5' RACE
CYP-F11	TGCGAGTCTGCTTGAGGTG	qRT-PCR
CYP-R11	AGCCATTGTCAGTGGGGAG	qRT-PCR
β-actin F	CGAAACCTTCAACTCCCG	qRT-PCR
β-actin R	GATAGCGTGAGGAAGGGCATA	qRT-PCR

### 1.5 qRT-PCR 分析

将取好的组织提取总 RNA,取 1.0 μg 总 RNA 用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit 试剂盒 (Takara, 大连) 进行反转录获得 cDNA。在 ORF 处设计荧光定量引物 CYP-F11 和 CYP-R11,以 β-actin 为内参 (表 1)。按照 Perfect Real Time PrimerScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (Takara, 大连) 说明进行实时荧光定量 PCR 反应。反应条件如下: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 56.5 °C 20 s, 68 °C 30 s, 共 40 个循环。溶解曲线条件, 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 95 °C 15 s。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法计算目的基因相对表达量。用 SPSS Statistics 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 利用 Excel 对统计结果进行作图, P < 0.05 表示存在显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 三疣梭子蟹 CYP302a1 cDNA 序列分析

将 PCR 产物的测序结果进行拼接, 得到全长为 3 171 bp 的三疣梭子蟹 CYP302a1 的 cDNA 序

列。该序列现已登录 GenBank (登录号: KM596851), 包含 397 bp 的 5' 端非编码区, 1 147 bp 的 3' 端非编码区和 1 626 bp 的开放阅读框 (ORF) (图 1)。ORF 编码 541 个氨基酸, 其中 65 ~ 512 为 P450 保守结构域。ExPASy ProtParam Tool 预测的蛋白分子式为 C<sub>2729</sub>H<sub>4340</sub>N<sub>786</sub>O<sub>784</sub>S<sub>24</sub>, 分子量大小约 61.4 ku, 等电点为 8.48, 包含 8 个酪蛋白激酶磷酸化位点, 3 个豆蔻酰化位点, 7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 1 个 N 糖基化位点。Signal 4.1 Server 和 TMHMM 分析发现其氨基酸序列无信号肽序列和跨膜结构域。

Blast 比对发现, 推导的氨基酸序列与果蝇, 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 及日本剑水蚤 (*Tigriopus japonicas*) 的相似性分别为 40%、40%、39%、38% 和 37%。ClustalX 软件比对分析显示, 该氨基酸序列与其他物种 CYP302a1 一样包含 5 个 P450 特征保守区域: helix-I、helix-C、helix-K、PERF 和 heme-binding (图 2)。

```

1      gccgcaccactaaagtaagaatatacacacaggagataaagaacatttagccagacacgtgttaacaaggacaaacac
79     tgagagtaataatctgccatctgaatcaagggcattcaagagagggcgacgcaccgaacaagtgtgacgtcagaa
157    agttgccaggaatgacgtcaatggcagaggagacaagctcattgggtcagtggaagagagaaagatagacgtgcgga
235    actgagcgttggcaggaaggtgtcaaaaggaacaaactgaacttcgcagcaaaaaccagacacacaccttccctatgt
313    agtgctatgacattaacgacaagagacatcagagaagagagtaggcttacatcagatcatcgctgtgactcctccag
391    aacaaggATGCAGGGCAATATGAGGGGCGTAGTGTGGGGATGGCCAGGGTGTGCGGAGCGGCTGGCATGCCCAAA
1      M Q G N M R G V V L G M A R V V G E R L A C P K
469    GCTATCTCAACACGCGAGCTGCAGCCTTACTGTTTCTTCCCTGGCAGGTCATCTGTGCCTATACGCTATCTAACAGAGAG
25     L S Q H A A A A L T V S L P G H S V P I R Y L T E S
547    TGCCGGGATATCCTGGGAAGATGCCAAGCCTTTGAGGAGATTCCCGGACCTTCGTGTCTCCCGCTAATAGGTTGCAT
51     A G I S W E D A K P F E E I P G P S C L P L I G C M
625    GCATCATTATCTACCTTACATAGGCCAATACTCTCCCAAGCGGCTTACCACAAATGGGCGCCTCAAGTTGCAGCAGTT
77     H H Y L P Y I G Q Y S P K R L H H N G R L K L Q Q F
703    TGGTCTATTGTGCGGGAATCTTCCAGGCAACAAACCTGGTGTACCTTTTGACCCGGAGGATATCGAGGCCAT
103    G P I V R E N L P G N T N L V Y L F D P E D I E A M
781    GTACGCCGAGGAGGACGCTACCCCTCCCGTCGCTCCACCTTGCCTGCAGAAGTACCGCTGGACAGACCCGCACAT
129    Y A E E G R Y P S R R S H L A L Q K Y R L D R P H M
859    GTTCAGCACCGGGGAATCCTACCTACGAATGGCAACAACTGGTGGAACTGCGGCGCGGGCTCAAAGTCCATGAA
155    F S T G G I L P T N G K H W W E L R R R A Q K S M N
937    TAAGGTGTCTGCCGTTACCAGCCGCTCCCGCAAGTTGATGAGATATGCAGGGAGTTTGCAGAATTGGTATGCAAGAT
181    K V S A V T S R L P Q V D E I C R E F A E L V C K M
1015   GAGGCGTGAAGGTCAGGTCGTGGGTCACCTTATGGATCGAGAAGCGTCTTCTCCGAGTTGACCATTGCGGAG
207    R R E G S G R V G H F M D L Q K R L F L E L T I A S
1093   TCTGCTGAGGTGCGCCTCGGCAACTGGGTGAGCACAGTGACGAAGCTGAGCTGCTCACACATGCTGTTGACGAAAC
233    L L E V R L G K L G E H S D E A E L L T H A V D E T
1171   CAACTGCTTGTCTCCCACTGACAATGGCTTGCAGCTGTGGAGGTATATAAGGACACCCATGTACCGTAGGCTTGT
259    N C L V L P T D N G L Q L W R Y I R T P M Y R R L V
1249   GGCAGCCCAGGACACCATGTACAGAATTGCTCTTAAATATGTGAAACAAAAGATGATGAGTTGAGACATGCTCGGCA
285    A A Q D T M Y R I A L K Y V E T K D D E L R H A R Q
1327   GAAGAGGAAGGCTGAAGGAGAATCAGAACTAGACACGAAACACGTCACCAAGTATCTGGAGTCATTCTTTGAGAGTGG
311    K R K A E G E S E L D T K H V T S I L E S F F E S G
1405   CCTGGAGGACAAAGACATCGTGGGCTTGTCAATGACACACACTCATGGGAGGCATTGATACGGGTGCCTACACAAATGGC
337    L E D K D I V G L V N D T L M G G I D T G A Y T M A
1483   CTATGTGCTTACAGTCTGGCTAACAATCAAGACAAGCAGGACTTACTGGCAGTGGAGGCCAGGCGACTGTTGGTTGG
363    Y V L Y S L A N N Q D K Q D L L A L E A R R L L V G
1561   GTCTGATGGCAAGGTGACCACAAAGTGTAAAGTGAGGCACGCTACCTGAAGGCAGTGTGAGGAGACTTATCGTGT
389    S D G K V T T K V L S E A R Y L K A V M K E T Y R I
1639   GCACCAATTTCCGTCGGGGTGGGAGGGTATCCAGGAAGACACAGTCAATCCGGGCTTCCAGGATACCTAAGGATAC
415    H P I S V G V G R V I Q E D T V I R G F R I P K D T
1717   AGTGGTGGTGACACAAAACAGGTCATCAGCCGCTTCCCGGAGCACTCCATGATCCTCAGCGCTTCCGCTGAACG
441    V V V T Q N Q V I S R L P E H F H D P Q R F P P E R
1795   CTGGCTGCATAAGGCTCCTCCAGCCATCCCTTTGTTGTTGTTCCCTTTGGTCACGGGCCAGGTCATGCATTGGCCG
467    W L H K A P P A H P F V V V P F G H G P R S C I G R
1873   AAGGATGGCAGAACAGAACCTTCAAACATAATGTTACAGCTCATCTCCCGGTACCGTGTGGGGTGGGTTGGGAGGTG
493    R M A E Q N L Q T I M L Q L I S R Y R V G W V G E
1951   ACTGGACTGTCTCCAACCTAATCAATGAACAGATGCTCCACTGGACTTACCTTCACTGACAGGGAGTGAGTGTG
519    L D C L S N L I N E P D A P L D F T F T D R E *
2029   cgtgtgaatgcaccagctaggcaccatcactgtgccaggcagacatgttactcttagacaagtttactgctgtgattt
2107   ttcttttactggtatgtatttcaagcaatttactagtttcttatctgtaatacaatattttagattatttactgata
2185   aaacatattaagctatagggttgggtttgttagttttatcacaattgaagcattctttatgcttcatctatgtc
2263   ataagcattttctgtaattaacctatagaattttatgtaaaacgatacctgttcagataaacaagatattgtgattt
2341   aactgtctccgatgacatcatcccaccttagtcatggaggagctcttgcacagaaggatggagatctcatagatc
2419   gttgataaggattgctgactgcttactgaaaagtagttttatggatggttgttcttctttaaactccctca
2497   aagtaacagtgacagaagtgcttaatatgtttatgttcatgttcatatactgctctattcttgcatactctattcca
2575   ttcagctcccacctcccctcaacttgaagcattcctcaatttcagtgagttttctataaccacaataatccactac
2653   aacctcttgcagttttgtctgagaagatgactgatggtgtgaatgatatgaagtggactaggataaaatgattt
2731   cggaaaggagttcctaattgtctaggtgcttgccttctcactacactgcaataagaaaacttggcaactcttaga
2809   atcttgcacttggcttacctcatgtcttttaactgctgttggagaaaatccgttataaaaatggtaaaaatgc
2887   acaagtatgcaactgtatgtgtatcaatttacagattttctttcttgttggtaagatgttgactcagctcatgca
2965   aagttgatgtgtgtgagttgtgttctctgtgtacagcaacacatgtgtgtcaogtctgttggggcctgtgctc
3043   gtccctgggatggcactagctgaggtgaatatttagttaacaattgaaatgttcttattgataacttgggatcttgatg
3121   attgtgcaacttttaaaatacaccactacactgttaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 三疣梭子蟹 *CYP302a1* 的 cDNA 核苷酸序列和编码区氨基酸序列

起始密码子用方框标出, helix-C 用粗横线 \_\_\_\_\_ 标出, helix-I 用灰色背景标出, helix-K 用双横线 == 标出, PERF 波浪线 ~~~ 标出, heme-binding 用点线 ..... 标出

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *CYP302a1* from *P. trituberculatus*

Initiation codon is surrounded by box; helix-C is lined with \_\_\_\_\_; helix-I is printed with grey background; helix-K is lined with ==; PERF is lined with ~~~; heme-binding is lined with dot line .....

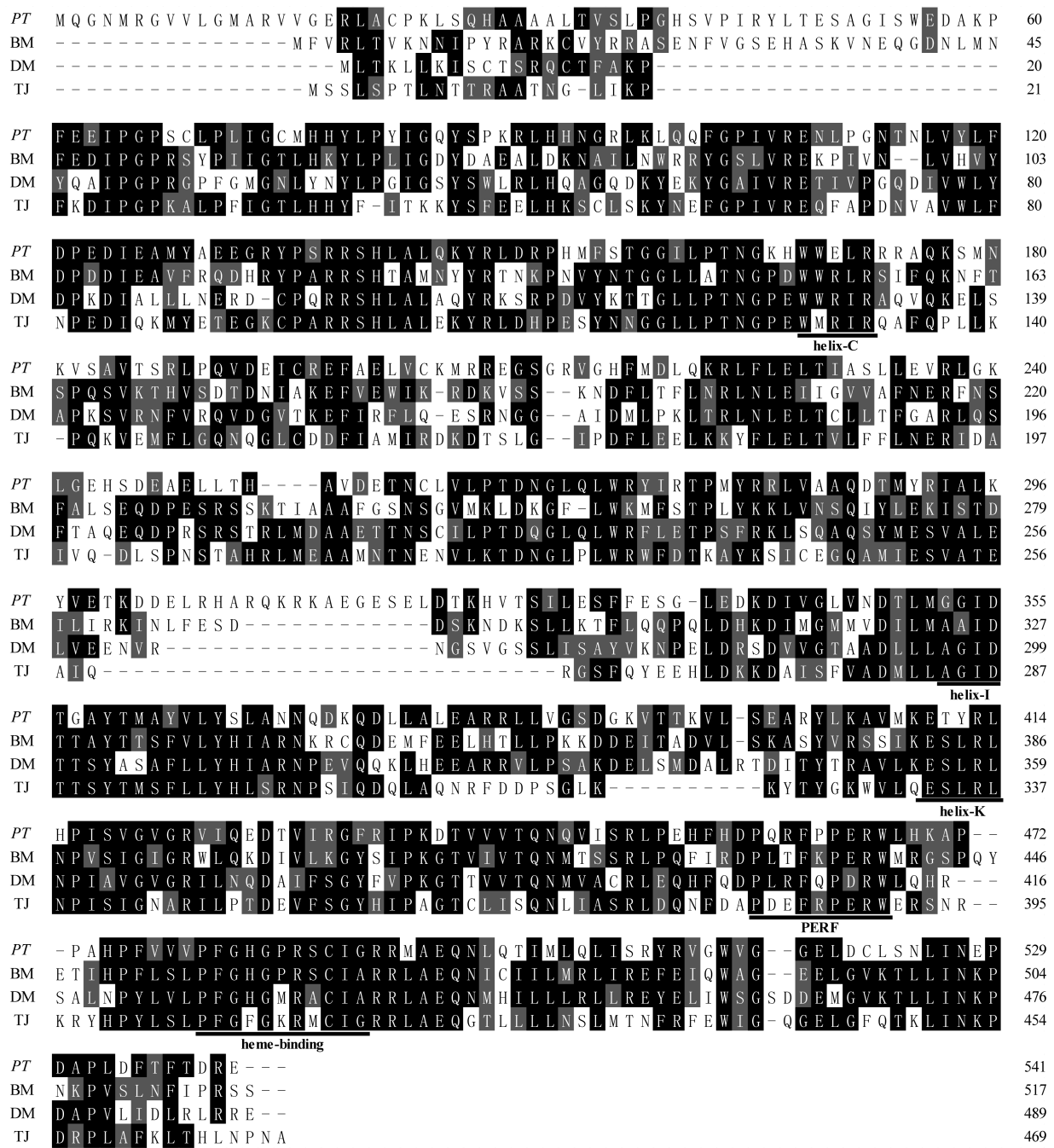


图 2 三疣梭子蟹 CYP302a1 氨基酸序列与其他物种 CYP302a1 氨基酸序列比对

Pt. 三疣梭子蟹; Bm. 家蚕; Dm. 果蝇; Tj. 日本剑水蚤; 下划线: 5 个 P450 特征保守区域 (helix-C, helix-I, helix-K, PERF, heme-binding); 黑色区域: 相同序列; 灰色区域: 相似序列

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of *P. trituberculatus* CYP302a1 with other orthologus

Pt. *P. trituberculatus*; Bm. *B. mori*; Dm. *D. melanogaster*; Tj. *T. japonicus*; 5 conserved domain (helix-C, helix-I, helix-K, PERF, heme-binding) was lined; black background: identical sequence; grey background: similar sequence

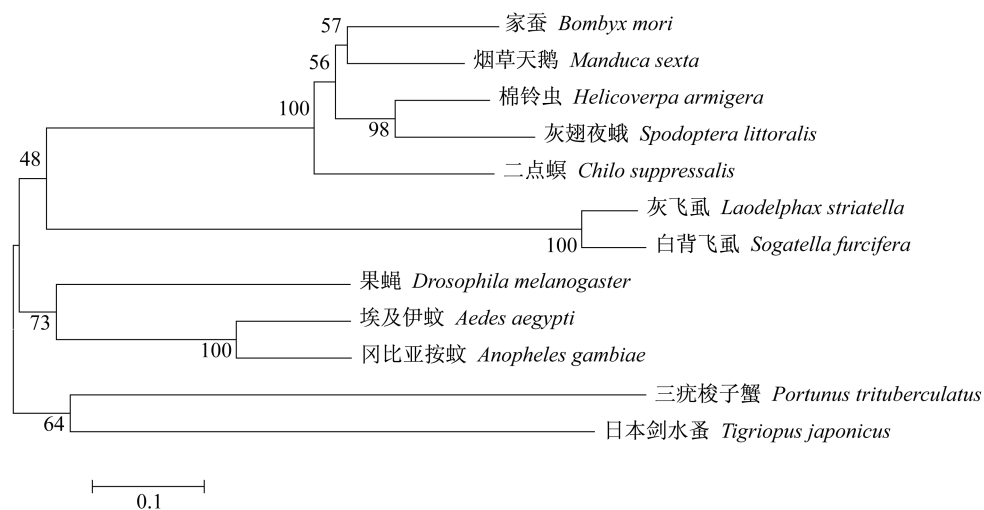


图 3 *CYP302a1* 基因系统进化树

所用氨基酸序列的物种名和相应的登录号:家蚕 BAD99022.1;烟草天蛾 ABC96069.1;棉铃虫 AID54852.1;灰翅夜蛾 ACM46003.1;二点螟 AHW57353.1;灰飞虱 AGU16449.1;白背飞虱 AGU16444.1;果蝇 NP\_524810.2;埃及伊蚊 AAX85206.1;冈比亚按蚊 ABU42523.1;三疣梭子蟹 KM596851;日本剑水蚤 AIL94171.1

Fig. 3 Phylogenetic tree of *CYP302a1*

The species and Genbank Accession numbers of amino acid sequences are listed as follows: *Bombyx mori*, BAD99022.1; *Manduca sexta* ABC96069.1; *Helicoverpa armigera* AID54852.1; *Spodoptera littoralis* ACM46003.1; *Chilo suppressalis* AHW57353.1; *Laodelphax striatella* AGU16449.1; *Sogatella furcifera* AGU16444.1; *Drosophila melanogaster* NP\_524810.2; *Aedes aegypti* AAX85206.1; *Anopheles gambiae* ABU42523.1; *Portunus trituberculatus* KM596851; *Tigriopus japonicus* AIL94171.1

另外,系统进化树显示其与日本剑水蚤聚为一小类,再与其他物种的 *CYP302a1* 聚为一支(图 3)。而其余的 Halloween 基因编码的氨基酸 *CYP306a1*, *CYP315a1*, *CYP314a1* 分别聚为一支。以上结果表明推导的氨基酸序列即为三疣梭子蟹的 *CYP302a1*。

## 2.2 组织表达差异分析

利用 qRT-PCR 检测 *CYP302a1* 在三疣梭子蟹各个组织中的表达差异。结果显示,雌蟹和雄蟹中 *CYP302a1* 的组织分布情况比较相似:*CYP302a1* 在所有被测组织中均有表达,但其表达量在 YO 最高,而在其他组织中均极低 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

## 2.3 *CYP302a1* 在三疣梭子蟹蜕皮周期中的表达水平变化

组织表达结果显示, *CYP302a1* 主要在 YO 中表达,因此我们用 qRT-PCR 检测 YO 中 *CYP302a1* 在蜕皮周期中的表达变化以研究其在三疣梭子蟹蜕皮调控中的作用。结果显示, *CYP302a1* 表达量在蜕皮后期(A期和B期)处于极低的水平;其表达水平在蜕皮间期(C期)显著升高 ( $P < 0.05$ ),并继续上升在  $D_1$  期达到最高,

显著高于其他各期 ( $P < 0.05$ );之后, *CYP302a1* 的表达量显著下降,但仍显著高于蜕皮后期 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

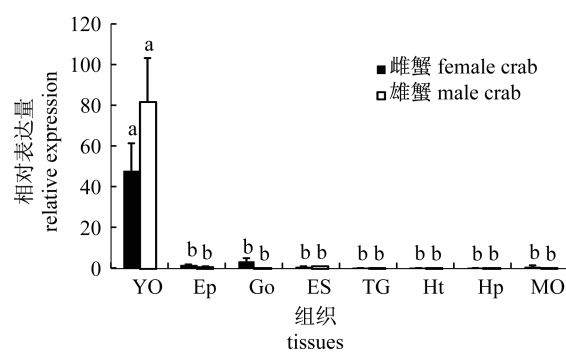


图 4 *CYP302a1* 在三疣梭子蟹

不同组织中的相对表达量

YO. Y 器; Ep. 表皮; Go. 性腺; ES. 眼柄; TG. 胸腺神经节; Ht. 心脏; Hp. 肝胰腺; MO 大颚器; 不同小写字母代表显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 4 The relative expression of *CYP302a1* in different tissues in *P. trituberculatus*

YO. Y-organ; Ep. epidermis; Go. gonad; ES. eye stalk; TG. thoracic ganglion; Ht. heart; Hp. hepatopancreas; MO. mandibular organ. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

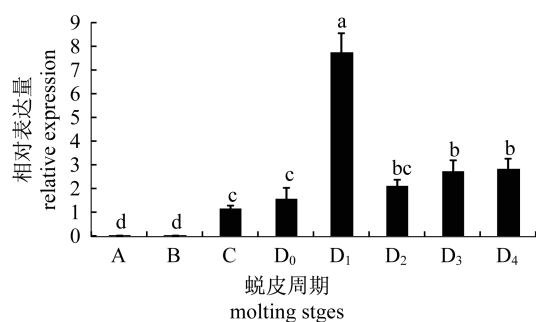


图5 YO中CYP302a1在三疣梭子蟹中蜕皮周期的相对表达量

不同小写字母代表显著性差异( $P < 0.05$ )

A, B. 蜕皮后期; C. 蜕皮间期; D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>. 蜕皮前期

Fig. 5 The relative expression of CYP302a1 in YO during molting cycle in *P. trituberculatus*

Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

A, B. post-molt stage; C. inter-molt stage; D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>. pre-molt stage

### 3 讨论

细胞色素 P450 是一个古老的基因超家族,具有 35 亿年的进化历史<sup>[24]</sup>,其家族成员虽然在氨基酸序列变异性很高,但仍存在一定的保守结构域。昆虫中报道的保守结构域包括 helix-C、helix-I、helix-K、PERF 和 heme-binding。其中 heme-binding(FXXGXXXCXG)为细胞色素 P450 的标志性基序,绝对保守的半胱氨酸是血红素铁的第 5 配体,能和血红素中铁元素结合,血红素铁接受电子被还原后再与 CO 结合,会在 450 nm 附近产生特征吸收峰<sup>[25]</sup>。helix-C(WXXR),位于细胞色素 P450 的 N 端,其能够与血红素的丙酸酯相结合。helix-I(GXXT)位于活性中心吡咯环 B 的上方,其可能和细胞色素 P450 与氧分子或底物分子的结合有关<sup>[26]</sup>。helix-K(EXXR)能够参与稳定血红素核心结构的作用。PERF(PXXF),能够与 helix-K 形成盐桥而相互作用<sup>[27]</sup>。本实验推导的氨基酸序列经多重比对后发现,包含这 5 个保守结构域,证明其属于 P450 家族基因。此外,该氨基酸序列与其他物种 CYP302a1 一致性较高,共同聚为一支,由此推断该序列为三疣梭子蟹 CYP302a1 基因。三疣梭子蟹与甲壳动物日本剑水蚤先聚为一类,再与双翅目(Diptera)昆虫聚为一支,最后与由鳞翅目(Lepidoptera)和半翅目(Hemiptera)组成的分支聚为泛甲壳动物大类,其他物种的 Halloween 基因家族编码的氨基酸也与 CYP302a1 分类相似,

各自聚在相应的组别中。以上结果与谢维等<sup>[28]</sup>在昆虫中对呼吸功能蛋白的分类有所差异,其鳞翅目与双翅目先聚为一类,再与半翅目聚集。其原因尚不清楚,有待进一步研究。

作为 Halloween 家族基因成员之一,CYP302a1 是蜕皮激素合成通路中的关键酶,催化 C22 的羟基化<sup>[29]</sup>。qRT-PCR 结果表明,CYP302a1 在三疣梭子蟹的多个组织中均有不同程度的表达,其中 YO 中的表达量显著高于其他组织( $P < 0.05$ ),这与 YO 是甲壳动物合成蜕皮激素的主要器官<sup>[30]</sup>的结论一致。此外,CYP302a1 在其他组织中的极低表达也表明了其功能的单一性。我们的结果与已报道的日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) CYP306a1 (*phm*)的组织表达差异十分相似<sup>[31]</sup>,这说明 Halloween 家族基因(*shd* 除外)在甲壳动物中可能拥有相似的组织分布情况。这与昆虫 Halloween 家族基因的组织差异表达情况一致。Iga 等<sup>[32]</sup>研究了灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)的 *phm*、*dib*、*sad* 和 *shd* 的基因表达情况,除 *shd* 主要在脂肪体、马氏管等器官表达外,其余基因均主要在其蜕皮激素合成器官前胸腺中表达;Rewitz 等<sup>[33]</sup>也在烟草天蛾中报道了类似的结果。

蜕皮激素是甲壳动物蜕皮的重要调控因子,其血淋巴浓度通常在蜕皮周期中呈规律性变化。Soumoff 等<sup>[7]</sup>研究表明,美洲蓝蟹的蜕皮激素浓度在蜕皮前期 D<sub>3</sub> 亚期达到峰值。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[34]</sup>蜕皮激素浓度高峰则出现在蜕皮前期 D<sub>1</sub> 亚期。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血淋巴蜕皮激素浓度和 YO 的活性均在蜕皮前期达到最大<sup>[35]</sup>。相关研究表明,三疣梭子蟹血淋巴蜕皮激素浓度从蜕皮后期开始上升至蜕皮前期 D<sub>3</sub> 亚期达到最高<sup>[36]</sup>。本实验中,三疣梭子蟹 CYP302a1 在 YO 中的表达水平与蜕皮激素浓度变化趋势相同。而 CYP302a1 的表达量在蜕皮前期 D<sub>1</sub> 亚期达到最大,早于蜕皮激素浓度高峰出现的时间(D<sub>3</sub> 亚期),这恰恰说明三疣梭子蟹 CYP302a1 基因是通过参与蜕皮激素的合成来调节血淋巴中蜕皮激素的浓度,进而参与调控蜕皮的发生。

### 参考文献:

[1] Kuballa A V, Holton T A, Paterson B, et al. Moulting

<http://www.scxuebao.cn>

- cycle specific differential gene expression profiling of the crab *Portunus pelagicus* [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1):147.
- [ 2 ] Kuballa A, Elizur A. Novel molecular approach to study moulting in crustaceans [J]. Bulletin-Fisheries Research Agency Japan, 2007, 20:53.
- [ 3 ] Butenandt A, Karlson P. Über die isolierung eines metamorphose-hormons der insekten in kristallisierter form [J]. Zeitschrift Fur Naturforschung Section Ba Journal of Chemical Sciences, 1954, 9 ( 6 ): 389 – 391.
- [ 4 ] Huber R, Hoppe W. Zur chemie des ecdysons, VII; die kristallund molekülstrukturanalyse des insektenverpuppungshormons ecdyson mit der automatisierten faltmolekülmethode [J]. Chemische Berichte, 1965, 98(7):2403 – 2424.
- [ 5 ] Gilbert L I, Rybczynski R, Warren J T, *et al.* Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway [J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47(1):883 – 916.
- [ 6 ] Hampshire F, Horn D H S. Structure of crustecdysone, a crustacean molting hormone [J]. Chemical Communications ( London ), 1966 ( 2 ): 37 – 38.
- [ 7 ] Soumoff C, Skinner D M. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other Crustacea [J]. The Biological Bulletin, 1983, 165(1):321 – 329.
- [ 8 ] Lachaise F, Lafont R. Ecdysteroid metabolism in a crab: *Carcinus maenas* [J]. Steroids, 1984, 43 ( 3 ): 243 – 259.
- [ 9 ] Watson R D, Spaziani E. Biosynthesis of ecdysteroids from cholesterol by crab Y-organs, and eyestalk suppression of cholesterol uptake and secretory activity, *in vitro* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1985, 59 ( 1 ): 140 – 148.
- [ 10 ] Lachaise F, Le Roux A, Hubert M, *et al.* The molting gland of crustaceans; Localization, activity, and endocrine control ( a review ) [J]. Journal of Crustacean Biology, 1993:198 – 234.
- [ 11 ] Böcking D, Dauphin-Villemant C, Sedlmeier D, *et al.* Ecdysteroid biosynthesis in moulting glands of the crayfish *Orconectes limosus*; Evidence for the synthesis of 3-dehydroecdysone by *in vitro* synthesis and conversion studies [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1993, 23(1):57 – 63.
- [ 12 ] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 127(3):196 – 203.
- [ 13 ] Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, *et al.* Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* [J]. Wilhelm Roux ' s Archives of Developmental Biology, 1984, 193 ( 5 ): 283 – 295.
- [ 14 ] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H, *et al.* Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* [J]. Wilhelm Roux ' s Archives of Developmental Biology, 1984, 193 ( 5 ): 267 – 282.
- [ 15 ] Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Jürgens G. *et al.* Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* [J]. Wilhelm Roux ' s Archives of Developmental Biology, 1984, 193 ( 5 ): 296 – 307.
- [ 16 ] Chávez V M, Marqués G, Delbecque J P, *et al.* The drosophila disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels [J]. Development, 2000, 127(19):4115 – 4126.
- [ 17 ] Warren J T, Petryk A, Marqués G, *et al.* Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(17):11043 – 11048.
- [ 18 ] Warren J T, Petryk A, Marqués G, *et al.* Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*; A P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34 ( 9 ): 991 – 1010.
- [ 19 ] Petryk A, Warren J T, Marqués G, *et al.* Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(24):13773 – 13778.
- [ 20 ] Gilbert L I, Warren J T. A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone [J]. Vitamins & Hormones, 2005, 73:31 – 57.
- [ 21 ] Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, *et al.* CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila* [J]. Journal of Biological



- Chemistry, 2004, 279(34): 35942 - 35949.
- [22] Liu C J, Hou Y L, Wang W, *et al.* The pubertas praecox of *Portunus trituberculatus* in cultivation [J]. *Shandong Fisheries*, 1999, 16(6): 19 - 20. [刘昌杰, 侯艳丽, 王伟, 等. 虾池养殖三疣梭子蟹当年性早熟初报. *齐鲁渔业*, 1999, 16(6): 19 - 20.]
- [23] Shen J, Zhu D F, Hu Z H, *et al.* Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1481 - 1487. [沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. *水产学报*, 2011, 35(10): 1481 - 1487.]
- [24] Nelson D R. Metazoan cytochrome P450 evolution [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1998, 121(1): 15 - 22.
- [25] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: A success story [J]. *Genome Biology*, 2000, 1(6): 3003.1 - 3003.9.
- [26] Zheng M Q, Qiu X H. The molecular biology of cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera* [J]. *Chemistry of Life*, 2001, 21(3): 229 - 231. [郑明奇, 邱星辉. 棉铃虫细胞色素 P450 的分子生物学. *生命的化学*, 2001, 21(3): 229 - 231.]
- [27] Ai J W, Dong Y L, Kong W Q, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a novel cytochrome P450 gene, *CYP6AE2*, from silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2007, 33(3): 380 - 386. [艾均文, 董元凌, 孔卫青, 等. 家蚕细胞色素 P450 基因 *CYP6AE2* 的分子克隆与序列分析. *蚕业科学*, 2007, 33(3): 380 - 386.]
- [28] Xie W, Luan Y X. Members of the arthropod hemocyanin superfamily and their evolution [J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2011, (1): 106 - 114. [谢维, 栾云霞. 节肢动物血蓝蛋白家族的组成与演化. *生命科学*, 2011, (1): 106 - 114.]
- [29] Niwa R, Sakudoh T, Namiki T, *et al.* The ecdysteroidogenic P450 *Cyp302a1*/disembodied from the silkworm, *Bombyx mori*, is transcriptionally regulated by prothoracicotropic hormone [J]. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14(5): 563 - 571.
- [30] Chang E S, O' Connor J D. Secretion of alpha-ecdysone by crab Y-organs *in vitro* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(2): 615 - 618.
- [31] Asazuma H, Nagata S, Nagasawa H. Inhibitory effect of molt-inhibiting hormone on phantom expression in the Y-organ of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2009, 72(4): 220 - 233.
- [32] Iga M, Smagghe G. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis* [J]. *Peptides*, 2010, 31(3): 456 - 467.
- [33] Rewitz K F, Rybczynski R, Warren J T, *et al.* Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36(3): 188 - 199.
- [34] Blais C, Sefiani M, Toullec J Y, *et al.* *In vitro* production of ecdysteroids by Y-organs of *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Correlation with hemolymph titers [J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1994, 26(1): 3 - 11.
- [35] Okumura T, Kamba M, Sonobe H, *et al.* *In vitro* secretion of ecdysteroid by Y-organ during molt cycle and evidence for secretion of 3-dehydroecdysone in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda: Caridea) [J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2003, 44(1): 1-8.
- [36] Wang C J, Zhu D F, Qi Y Z, *et al.* Molt-inhibiting hormone levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of *Portunus trituberculatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(1): 22 - 28. [汪春建, 朱冬发, 齐一舟, 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. *水生生物学报*, 2013, 37(1): 22 - 28.]

## Molecular cloning and expression analysis of *CYP302a1* from *Portunus trituberculatus*

LIU Zhiye, ZHU Dongfa\*, XIE Xi, QIU Xier, ZHOU Yanqi, SHEN Xiquan  
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** *CYP302a1* is the key enzyme in biosynthesis of the ecdysteroids. The aim of this study is to analyze the function of *CYP302a1* during the process of the molting in swimming crab *Portunus trituberculatus*. The full-length cDNA of *CYP302a1* is cloned from Y-organs of the *P. trituberculatus*. The length of the *CYP302a1* (Genbank accession NO. :KM596851) is 3 171 bp and contains an ORF of 1 626 bp encoding 541 amino acid. The amino acid contains 5 conserved domains including helix-C, helix-K, helix-I, PERF and heme-binding. The phylogenetic tree showed that *CYP302a1* of *P. trituberculatus* was clustered with that of *Tigriopus japonicas*, which is separated from other CYPs. Tissue distribution showed that transcript of *CYP302a1* was mainly detected in the Y-organ (YO) and far exceeded other tissues. The transcript level of *CYP302a1* during molting cycle was determined by qRT-PCR. During molting process, levels of *CYP302a1* in YO were extremely low during postmolt (stages A and B), began to increase during intermolt (stage C) and reached the peak at D<sub>1</sub> stage, then declined. The combined results showed that *CYP302a1* might play an essential role in the molting of *P. trituberculatus*.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; *CYP302a1*; molting cycle; cloning; gene expression

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