



脊尾白虾隐花色素基因 *cry1* 的克隆及其功能分析

朱佶轩¹, 戴琴¹, 高威¹, 段健诚¹, 宋崇阳¹,
张攀¹, 阎斌伦^{1,2,3}, 高焕^{1,2,3*}

(1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点实验室,
江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室, 江苏 连云港, 222005;
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005;
3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探究隐花色素基因 (*cry1*) 在甲壳类中的节律调节功能, 实验根据脊尾白虾转录组序列, 利用 RACE 技术获得了脊尾白虾 *cry1* 的 cDNA 序列全长并对其进行功能分析。脊尾白虾 *cry1* 全长 2 190 bp, 开放阅读框 1 845 bp, 5'端非编码区为 241 bp, 3'端非编码区为 104 bp, 共翻译出 614 个氨基酸, 预测蛋白质的分子质量为 70.5 ku, 理论等电点为 5.09。同源性分析显示, 脊尾白虾 *cry1* 与凡纳滨对虾的同源性最高, 为 71.6%。荧光定量分析结果显示, 脊尾白虾 *cry1* 在眼柄、鳃、心脏、胃、肝胰腺、性腺、肌肉、肠道和腹索神经中均有表达, 其中眼柄的表达量最高, 性腺和心脏次之; 不同时间段的表达结果发现, 其表达量在日节律 (24 h) 中表现出先下降再上升的趋势。不同光色条件下 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 结果显示, 注射小干扰 RNA (siRNA) 后 3~6 h 蓝光光照下脊尾白虾 *cry1* 的表达量显著高于白光光照, 9~24 h 蓝色和白色光照下的表达量无显著差异, 而 RNA 干扰组的表达量显著低于对照组, 此结果表明 *cry1* 可能主要响应蓝光周期节律。目前对甲壳类生物钟的研究较少, 该研究为深入探究甲壳类生物钟基因的调控机制提供帮助。

关键词: 脊尾白虾; 隐花色素基因; 组织表达; 日节律; RNA 干扰

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

隐花色素 (Cryptochrome, Cry) 是一类蓝紫光受体, 广泛存在于动物、植物、细菌和人体内, 其主要功能是通过接收蓝光和近紫外光参与植物的光形态建成及动、植物的生物钟调控^[1]。多数生物体内含有多种隐花色素, 如小鼠 (*Mus musculus*)、家蚕 (*Bombyx mori*) 中同时发现 *cry1* 和 *cry2* 2 种类型, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发

现了 *cry1*、*cry2* 和 *cry3* 等 3 种类型, 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中只发现 *cry1*, 西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 中发现 *cry2*^[2-4]。

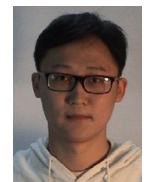
目前, 关于 *cry* 的研究主要集中在其对动植物生长发育的影响方面。在植物中, 主要研究隐花色素在去黄化、调节开花、调控气孔开放及调控基因表达等方面^[5-7]。在动物中, 隐花色

收稿日期: 2020-05-18 修回日期: 2020-06-09

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901302); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏省“六大人才高峰”创新人才团队资助项目 (2016-HYGC-CXTD-004); 江苏省 2018 年度普通高校研究生科研创新计划 (KYCX18-2571)

第一作者: 朱佶轩 (照片), 从事海洋经济类甲壳的遗传育种、种质发掘与繁育研究, E-mail: 2509459990@qq.com

通信作者: 高焕, E-mail: huanmr@163.com



素的功能则主要体现在生物钟的调节、磁场感知及繁殖调控等方面^[8-10], 如敲除 *cry1* 和 *cry2* 的小鼠会分别出现加速和减缓周期性活动^[11]。水生动物中, 汪京京^[12]发现, 永恒蛋白 Timeless 能够通过结合 Cry1 负向调节斑马鱼 (*Danio rerio*) 的生物钟; 张鹏^[13]发现干扰 *cry2* 的表达会激活中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的免疫系统, 促进免疫炎症效应分子的产生, 但 *cry* 在甲壳类生物节律中的功能还鲜见报道。脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 作为我国特有的海洋经济虾类, 其生物钟相关基因的种类和功能还不得而知, 对其调控机制更是缺少了解, 因此, 对 *cry1* 开展研究, 有助于加深以脊尾白虾为代表的甲壳类生物的生物钟调节机制的认识。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用脊尾白虾为本实验室自繁的一个家系中的成年个体, 选取 3 只健康、大小相似的个体, 分别取其眼柄、胃、心脏、鳃、肠、肌肉、性腺、肝胰腺和腹索神经 9 个组织, 用于 RNA 提取。

为了研究 *cry1* 在近日节律中的表达特征, 从 0 点开始, 每隔 3 h (即 0、3、6、9、12、15、18、21 时) 进行取样, 每个时间点取 3 个平行样, 用于提取相应时间点的 RNA。

1.2 总 RNA 提取

使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 进行 RNA 提取, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性, 用 Gene Quantity Pro 测定 RNA 纯度及浓度, -80°C 保存。

1.3 cDNA 第一链合成

使用 PrimerScriptTM RT Master Mix (TaKaRa) 试剂盒, 取脊尾白虾各组织混合 RNA 为模板反转录为 cDNA, 检测 cDNA 浓度后稀释至 50 ng/ μL 用于后续实验。另取部分 RNA 使用 SMARTer RACE 5'/3' Kit (TaKaRa) 试剂盒, 分别合成 5' 和 3' RACE-ready cDNA, 以每管 10 μL 进行分装, -20°C 保存。

1.4 *cry1* cDNA 序列的克隆及其生物学信息分析

以脊尾白虾转录组序列为模板, 用 Primer

premier 5.0 软件设计 *cry1* 核心序列引物 (表 1), 通过 PCR 扩增获得 *cry1* 核心片段, 经纯化、克隆后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。根据获得的核心片段设计特异性引物 *cry1*-F-130、*cry1*-F-35 用于 5' 端的快速扩增, *cry1*-Z-827、*cry1*-Z-1173 用于 3' 端的快速扩增 (表 1)。PCR 反应体系和反应程序按 SMARTer RACE 5'/3' Kit (TaKaRa) 试剂盒的说明设置。扩增产物经过纯化及克隆测序后, 用 DNAMAN 8 软件进行拼接获得脊尾白虾 *cry1* 的完整 cDNA 序列。

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对 *cry1* 的 cDNA 序列及对应氨基酸序列进行比对; 利用在线分析软件 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 *cry1* 的开放阅读框 (ORF) 及其编码的氨基酸序列; 利用 DNA star 软件进行理论等电点和分子量的计算; 利用 MEGA 6.0 软件进行氨基酸序列的多重比对及系统进化树的构建。

1.5 脊尾白虾 *cry1* 表达特征分析

利用 Thermo Fisher (<http://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/design.do>) 在线设计 RNA 干扰引物, 根据脊尾白虾 *cry1* 的 cDNA 序列设计荧光定量引物, 以脊尾白虾 18S *rRNA* 为内参基因 (表 1)。挑选健康且大小均匀的成年脊尾白虾 (80 尾, 每组 20 尾) 进行 RNA 干扰实验, 操作方法按照 TR102-T7 RNAi Transcription Kit (Vazyme, 中国) 试剂盒说明进行, 干扰组按 4 $\mu\text{g/g}$ 在脊尾白虾的心脏表皮处注射小干扰 RNA (siRNA) 对 *cry1* 进行沉默, 对照组按 4 $\mu\text{g/g}$ 注射生理盐水。注射完成后, 在蓝光灯 (15 W) 和日光灯 (30 W) 下均放置注射组和对照组进行连续光照, 水面光照强度为 1200 lx, 持续 24 h。分别在处理后 3、6、9、12 和 24 h 取样, 每组每次取 3 个平行样品。

以不同组织、时间和光色条件下获得的脊尾白虾 cDNA 为模板, 使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa), 按说明书要求设置反应体系和程序, 在 Step One Plus 仪中进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 扩增, 定量结果用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[14] 进行统计分析。

2 结果

2.1 脊尾白虾 *cry1* 特征

脊尾白虾 *cry1* 的 cDNA 全长 2 190 bp, 5' 非

表 1 脊尾白虾 *cry1* 引物序列Tab. 1 Primers sequence of *cry1* gene

| 引物名称 primers name | 引物序列(5'-3') primers sequence | 用途 purpose |
|------------------------------|---|---|
| EC- <i>cry1</i> -11-31-F | CAATCCACTGGTTTCGTCAT | 核心序列扩增引物 core sequence amplification primers |
| EC- <i>cry1</i> -833-852-R | AGGCAACCCCTTTATGCAATT | |
| EC- <i>cry1</i> -716-736-F | TGCCCAATCAAGTTAATCCT | |
| EC- <i>cry1</i> -1196-1216-R | GCTTACCCACATCCAGTTCC | |
| <i>cry1</i> -F-130 | GCTGCCAACTTTGTTCTGCCTTTCC | 5'RACE引物5' RACE primers |
| <i>cry1</i> -F-35 | ATGAATACGCAACCCATGACGAAACCA | |
| <i>cry1</i> -Z-827 | ACCTCTGTATATTCGCGATGCATGGTC | 3'RACE引物3' RACE primers |
| <i>cry1</i> -Z-1173 | TGTTGACATAGTAACCTCTTCTGATAG | |
| <i>cry1</i> -RNAi-A1 | GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCCTGGCAACGCCTTTAATTTT | RNAi引物 RNAi primers |
| <i>cry1</i> -RNAi-B1 | AAAATTAAGCGGTTGCCAGGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC | |
| <i>cry1</i> -RNAi-C1 | AACCTGGCAACGCCTTTAATTCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC | |
| <i>cry1</i> -RNAi-D1 | GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAATTAAGCGGTTGCCAGGTT | |
| <i>cry1</i> -1193-F | CGTGAGCGTGAGGAATGT | 荧光定量引物 fluorescent quantitative primers |
| <i>cry1</i> -1441-R | AGGAGGCAACCCCTTTATG | |
| EC-18S-F | TATACGCTAGTGGAGCTGGAA | 内参基因引物 internal reference gene primers |
| EC-18S-R | GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT | |

编码区 241 bp, 3'非编码区 104 bp, 开放阅读框 1 845 bp, 共翻译 614 个氨基酸 (aa), 在序列 poly A 尾部上游 21 bp 处有多聚腺苷酸信号序列 AATAA (图 1), 预测蛋白质分子质量为 70.5 ku, 理论等电点为 5.09, 在 117~246 aa 处存在一个光裂解酶区域。

2.2 氨基酸序列比对及同源性分析

通过 Clustal W 软件将脊尾白虾 *Cry1* 的氨基酸序列与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、福寿螺 (*Pomacea canaliculata*)、南极磷虾 (*Euphausia superba*) 和双斑蟋 (*Gryllus bimaculatus*) 进行比对分析, 结果显示, 脊尾白虾与凡纳滨对虾的相似性最高, 为 71.6%, 其次与南极磷虾的相似性为 68.34%。

系统进化树结果显示, 脊尾白虾 *Cry1* 与同为甲壳类的凡纳滨对虾和南极磷虾同源性最高, 首先聚为一支, 再与昆虫类的双斑蟋、桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*) 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 以及软体动物福寿螺和夏威夷短尾乌贼 (*Euprymna scolopes*) 聚为一大支, 与哺乳类的智人 (*Homo sapiens*)、小鼠以及被子植物门的拟南芥和玉米

(*Zea mays*) 同源性较低 (图 2)。

2.3 脊尾白虾 *cry1* 在不同组织和时段的表达特征分析

利用 qRT-PCR, 在脊尾白虾的 9 个组织中检测 *cry1* 的表达水平。结果显示, *cry1* 在 9 个组织中均有表达, 其中在眼柄中的表达量最高, 其次是性腺和心脏组织 (图 3)

不同时间段脊尾白虾 *cry1* 的 qRT-PCR 结果显示, *cry1* 的表达量随时间段的不同发生规律性变化。在 3~9 h 和 15~18 h 之间表达量呈现出逐渐降低的趋势, 并分别在 9 和 18 h 出现 2 个谷值; 在 9~15 h 和 18~21 h 之间呈现出上升趋势; 且 *cry1* 在暗期的表达量显著高于光照时期 (图 4)。

2.4 脊尾白虾 *cry1* 不同光色下 RNA 干扰的表达特征

RNA 干扰后在蓝光和白光的持续光照下, 脊尾白虾 *cry1* 的表达水平显示, *cry1* 对蓝光和白光均有响应, 在 3~6 h, 蓝光对照组 (BD) 的 *cry1* 表达量呈上升趋势且在 6 h 达到最大值, 极

| | | | |
|------|---|------------|------|
| 1 | | AAGCAGTGGT | 10 |
| 11 | ATCAACGCAGAGTACATGGGGAGTGTATTATTATTCATACTTTGAGCCTACGGCTGCCTA | | 70 |
| 71 | CCTATCTTCCTTCAGTATATAGTCTTTGCGCTGCCACCTTGAGACTGCAAAAGTTCCGTGT | | 130 |
| 131 | GCCACCAAGGGTTGTGCGACCACCTTACCAGTCCGGTAGGCCACGACGTCTGCAGGTCA | | 190 |
| 191 | CATGCCACTGTGCGATCTCTCCGCACGGGAAGCTAGCCAGACCCCATATATG | | 250 |
| 1 | | M V W | 3 |
| 251 | TTTCCGGAGACTTGCATGCTCTGCTATGAGCTCTCGTCGCTTCTCTCAATGATGAGGCT | | 310 |
| 4 | F P E T C M L C Y E L S S L L L N D E A | | 23 |
| 311 | GAAGAGGATTCTCTCAAAGCGGCCAGAACCAACCTCCGGACCTGGGTCTCTGGATATGGG | | 370 |
| 24 | E E D S L K A A R T N L R T W V S G Y G | | 43 |
| 371 | AGGAACGCCCTCAAGGCTGCCCTACCTGCTAGACGGGACATGGCTCCCGGCTCTTC | | 430 |
| 44 | R N A P Q G C P Y L L D G D M A S R L F | | 63 |
| 431 | CCGGTTCTCCCTCGGCCCGGTACCAACTGACCTGGCAACGCCTTAATTGAAGTTCTC | | 490 |
| 64 | P G S P S A A V P T D L A T P L I E V L | | 83 |
| 491 | TGGGCTGCTCTGCCCGAGAAGACGAACATCAGTTTTCTGGGGACATCTCCGCTCTAGAC | | 550 |
| 84 | W A A L P A E D E H Q F S G D I S A L D | | 103 |
| 551 | ATCCACGTTGAACCGATGGATGAGCAGGATACCACAATGAAAACGTC AATCCACTGGTTT | | 610 |
| 104 | I H V E P M D E Q D T T M K T S I H W F | | 123 |
| 611 | <u>CGTCATGGGTTGCGTATTCATGACAATCCAGCTTTGTTACAGTCCCTGTATCATTGTGAT</u> | | 670 |
| 124 | R H G L R I H D N P A L L Q S L Y H C D | | 143 |
| 671 | <u>CGTTTTTTTGTGTTTTTATATTTGATGGGGAAAGTGCAGGAACAAAGTTGGCAGCTTAC</u> | | 730 |
| 144 | R F F A V F I F D G E S A G T K L A A Y | | 163 |
| 731 | <u>AATCGTATCCACTTTCTGACAGAAGCTCTAAAGGACTTAGATTGCTACTTTAGGAATCGA</u> | | 790 |
| 164 | N R I H F L T E A L K D L D C Y F R N R | | 183 |
| 791 | <u>GGATCGCAGTTATATGTCTTAAAGGTGATCCACTTCAGATATTTCGAATGCTACACAAA</u> | | 850 |
| 184 | G S Q L Y V F K G D P L Q I F R M L H K | | 203 |
| 851 | <u>AGCTGTGGAATTTCTCGTTAACATTTGAACAGGACTGTGAAGCCATCTGGAATAACCGT</u> | | 910 |
| 204 | S C G I S R L T F E Q D C E A I W N N R | | 223 |
| 911 | <u>GATAATGCTGTAAGACATTTGTGTGAAGAATTGGGTATTGAACTGTTGAGTGTATTTCA</u> | | 970 |
| 224 | D N A V R H L C E E L G I E L V E C I S | | 243 |
| 971 | <u>CATACCCTGTGGGATCCTTCTAGTGTCAATAAGCAAATGGAGGACACCACCACTCACT</u> | | 1030 |
| 244 | H T L W D P S S V I K A N G G H P P L T | | 263 |
| 1031 | TATGAAATGTTTCTGCAAGTCTCGTCTTACTGGGGCTACCACCTCGCCCCTCTCCATAC | | 1090 |
| 264 | Y E M F L Q V S S L L G L P P R P S P Y | | 283 |
| 1091 | CCTGACTGGAGTAATGTAATGTTTGGCGAAATATCGGATGCTTTGGCTGAAAACTTGGT | | 1150 |
| 284 | P D W S N V M F G E I S D A L A G K L G | | 303 |
| 1151 | CTATGTCCAAAAATACCAACCCCTGAAGAACTTGGATTTTTCCGTGAGCGTGAGGAATGT | | 1210 |
| 304 | L C P K I P T P E E L G F F R E R E E C | | 323 |
| 1211 | ATCACATATGTAGGAGGAGAAACCGCAGCCCTGAAGCATTTAGAAGAACGCTTGAGATCA | | 1270 |
| 324 | I T Y V G G E T A A L K H L E E R L R S | | 343 |
| 1271 | GAAGAGGATGCATTTAGAGATGGATATATATTGCCAATCAAGTTAATCCTGATCTCCTT | | 1330 |
| 344 | E E D A F R D G Y I L P N Q V N P D L L | | 363 |

(图 1 Fig. 1)

| | | |
|------|--|------|
| 1331 | GGTCCTCCAATGAGCATGTCAGCTGCACTCAAATTTGGCTGCCTGTCTGTCAGAAAAGTTC | 1390 |
| 364 | G P P M S M S A A L K F G C L S V R K F | 383 |
| 1391 | TTCTGGGATGTACAGGAAGTTATTTTAAATTCATAAAGGGTGCCTCCTCCATCATAT | 1450 |
| 384 | F W D V Q E V Y F K L H K G L P P P S Y | 403 |
| 1451 | TCACTCACTGCCAGCTTATCTGGAGAGAATTTTTTTTTTGCATGTCTGCTAACAATCCA | 1510 |
| 404 | S L T A Q L I W R E F F F C M S A N N P | 423 |
| 1511 | AAGTATGACAAAATTGAGGGTAACCAATATGCATTGATATACCATGGTATGAAGATGAA | 1570 |
| 424 | K Y D K I E G N P I C I D I P W Y E D E | 443 |
| 1571 | GAGCACTTTAATGCATGGAAAGATGGACAAACAGGTTACCCTTTCATCGATGCTCCATG | 1630 |
| 444 | E H F N A W K D G Q T G Y P F I D A S M | 463 |
| 1631 | AGACAGCTTCGAAAAGAAGGATGGATTATCATGTTTGCCGCACAGCGGTGGCATGTTTT | 1690 |
| 464 | R Q L R K E G W I H H V C R T A V A C F | 483 |
| 1691 | CTGACAAGAGGTGATCTCTGGATCAGCTGGGAAAAAGGACTTCAGGTGTTTTTGAAGTAC | 1750 |
| 484 | L T R G D L W I S W E K G L Q V F L K Y | 503 |
| 1751 | CTGATAGATGCTGATTGGTCTGTGTCTGCGGGAAGTGGATGTGGGTAAGCTCATCAGCT | 1810 |
| 504 | L I D A D W S V S A G N W M W V S S S A | 523 |
| 1811 | TTTGAACGGCAACTAGATTGTACCACTTGTATTTGCCCTGTTAACTATGGAAGAAGAGTA | 1870 |
| 524 | F E R Q L D C T T C I C P V N Y G R R V | 543 |
| 1871 | GAACCAACTGGAGACTATATAAGGCGTTACGTACCAGAGTTAGCAAATTTCCCGCAAGAA | 1930 |
| 544 | E P T G D Y I R R Y V P E L A N F P Q E | 563 |
| 1931 | TACATATTTGAGCCATGGATGGCACCAGTGTACAGAAGAAATACAACCTGTATCATT | 1990 |
| 564 | Y I F E P W M A P L A V Q K K Y N C I I | 583 |
| 1991 | GGTGAAGACTATCCTGAACGTGTTGTTATTCATGAGGTAGTCTCAAAGGAGAATCGAAAG | 2050 |
| 584 | G E D Y P E R V V I H E V V S K E N R K | 603 |
| 2051 | ATGATGGAAGATATAAGTTTGTTTAGATTATTT <u>TAA</u> GTTTGTAAATAGTACAATTATAGTG | 2110 |
| 604 | M M E D I S L F R L F * | 614 |
| 2111 | CTGTACTGTAATTGTAATTTACAAGATTA <u>AATAA</u> CACATTTTGACAATTTGTCCAAAAAAA | 2170 |
| 2171 | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | 2190 |

图 1 脊尾白虾 *cry1* 的 cDNA 序列及对应氨基酸序列

方框内为起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA), 下划线部位为光裂解酶区域, 双下划线部位为加尾信号 (AATAA)

Fig. 1 cDNA sequence and amino acid sequence of *cry1* gene of *E. carinicauda*

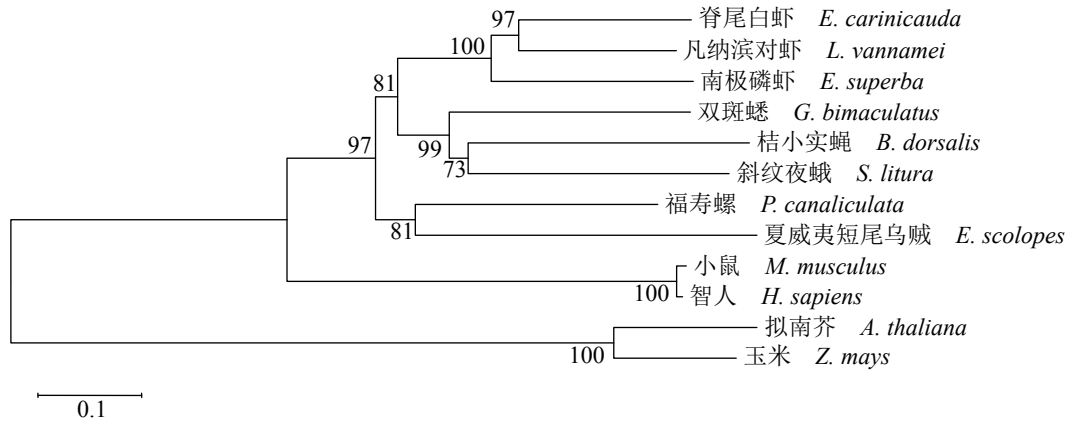
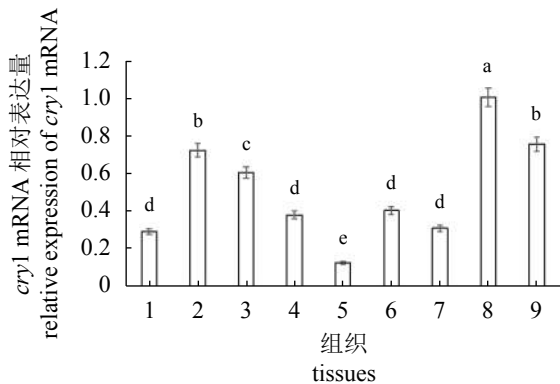
In the box are the start codon (ATG) and the stop codon (TAA); the underlined part is the photolyase region, and the double underlined part is the tail signal (AATAA)

显著高于白光对照组 (WD) ($P < 0.01$), 6~9 h 表达量降低, 9~24 h 基本保持稳定, 且和白光对照组无显著差异; 白光对照组中 *cry1* 表达量在 3 h 最低, 12 h 达到最大值, 6~24 h 之间表达量基本稳定; 各时间点干扰组的 *cry1* 表达量均极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 干扰效率为 60%, 且白光干扰组 (WS) 在 0~24 h 内无显著变化 (图 5)。

3 讨论

cry 是一类重要的生物钟基因, 在动植物体

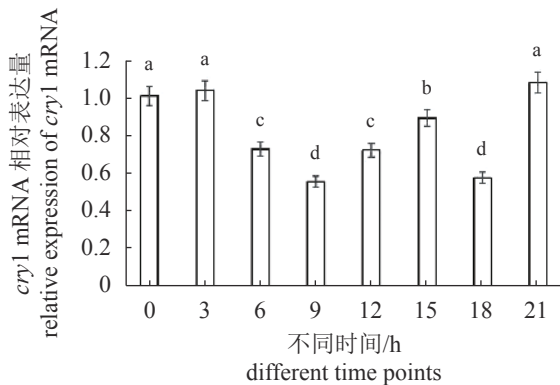
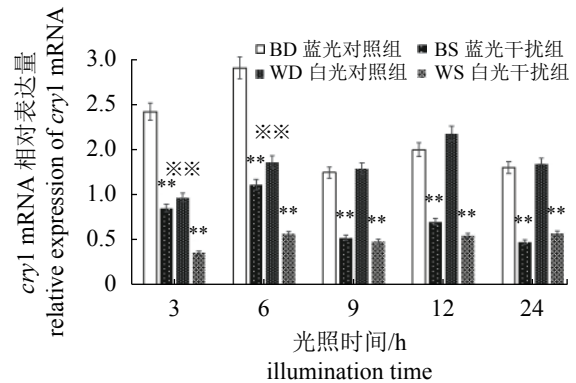
内能通过感受蓝紫光的变化来调节生物的节律行为。*cry* 主要分为 *cry1* 和 *cry2* 2 种, 其中 *cry1* 因具有光受体在调节动植物的行为节律中起主导作用^[15]。研究表明, *cry1* 的 N 端含有与 DNA 光裂解酶相似但不具备活性的 PHR 结构域, 能够与 2 个生色团 FAD 和叶酸非共价结合, 构成光信号感受区域^[16]。本研究中对获得的脊尾白虾 Cry1 进行氨基酸序列分析后, 发现 Cry1 蛋白结构在 N 端 117~246 aa 处包含了与 DNA 光裂解酶同源的结构以及在 C 末端的一个 FAD 黏合物

图2 脊尾白虾 *Cry1* 系统进化树分析Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on *Cry1* amino acid sequences of *E. carinicauda* and other organisms图3 脊尾白虾 *cry1* 在不同组织中的表达特征

1. 肌肉, 2. 性腺, 3. 肝胰腺, 4. 腹索神经, 5. 鳃, 6. 胃, 7. 肠, 8. 眼柄, 9. 心脏; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 3 *cry1* gene expression in different tissues of *E. carinicauda*

1. muscle, 2. gonad, 3. hepatopancreas, 4. ventral nerve, 5. gill, 6. stomach, 7. intestine, 8. eyestalk, 9. heart; different letters represent significant difference ($P < 0.05$); the same below

图4 脊尾白虾 *cry1* 在不同时间点的表达特征Fig. 4 Expression characteristics of the *cry1* gene of *E. carinicauda*图5 脊尾白虾 *cry1* 不同光色下 RNA 干扰的表达特征

** . 与同光色对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), ※※ . 与蓝光对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 5 RNA interference expression characteristics of the *E. carinicauda cry1* gene under different light colors

** . extremely significant difference compared to the same light color control group ($P < 0.01$), ※※ . extremely significant difference compared to the blue light control group ($P < 0.01$)

结合区域, 与葱蝇 (*Delia antiqua*) 中获得的 *Cry1* 相似^[17]。进一步通过进化树分析发现, 脊尾白虾 *cry1* 的序列与凡纳滨对虾和南极磷虾的 *cry1* 相似性最高, 说明本研究获得的是脊尾白虾 *cry1*。

已有研究表明, *cry1* 在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的不同部位均有所表达, 但主要集中于眼柄和脑部^[18]。为了了解该基因在脊尾白虾中的主要效应组织, 本研究对脊尾白虾 *cry1* 在不同组织中的表达特征进行了分析, 发现 *cry1* 在眼柄、鳃、肝胰腺、性腺、心脏、肌肉、胃、肠和腹索神经等 9 个组织中均有表达, 其中眼柄

的表达量显著高于其他组织,说明眼柄不仅是 *cry1* 的主要效应器官,也可能是其他甲壳类动物的主要效应器官。由于眼柄不仅是甲壳动物的感光器官,还是重要的神经内分泌器官,因此 *cry1* 在生物钟环路内除了发挥光信号转导的作用,还可能参与了诸多生理过程的调控^[13]。

为了探讨外界光线变化对脊尾白虾 *cry1* 表达节律的影响,本研究在近日节律中每隔 3 h 进行取样分析,结果表明,脊尾白虾 *cry1* 在暗期的表达量显著高于光期。在 0~24 h 内 *cry1* 在眼柄中的表达量先随光照时间的增加而降低,在 9 h 降到最低值后开始上升,随后又在 18 h 下降至第 2 个谷值,最后重新进入暗期, *cry1* 的表达量再次出现显著上升,说明其在近日节律中存在规律性的振荡变化。这种节律性的变化与脊尾白虾在暗期中更加活跃的活动节律相一致。据已有研究报道,脊尾白虾不仅在傍晚时的摄食积极性高于上午,其蜕皮、产卵和互残行为一般也发生在夜晚或清晨^[19],因此, *cry1* 可能通过昼夜节律的变化调节脊尾白虾的生理活动。进一步设置蓝色和白色 2 种光照条件,分析脊尾白虾 *cry1* 对 2 种光色的响应程度,发现 *cry1* 能够持续响应 2 种不同光色。在 3~6 h 时, *cry1* 在蓝光下的表达量上升且显著高于白光,在 9~24 h 时其表达量降低,与白光条件下无显著差异,这与李红丹等^[20]和闫蕾^[21]的研究结果相似,说明在蓝光和白光条件下, *cry1* 均参与脊尾白虾的光信号转导过程,且对蓝光的响应更加强烈。再利用 RNA 干扰技术对脊尾白虾 *cry1* 进行抑制,结果显示,在 2 种光色条件下干扰组的表达量均显著低于对照组,说明本研究成功干扰了 *cry1* 的表达,为后续研究 *cry1* 与其他生物钟相关基因的互作关系奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] Liu B, Yang Z H, Adam G, *et al.* Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Plant Research*, 2016, 129(2): 137-148.
- [2] 吕垣澄, 吴晓晖. 动物隐花色素研究进展[J]. *水产学报*, 2014, 36(9): 864-870.
- Lv Y C, Wu X H. Research progresses in animal cryptochromes[J]. *Hereditas*, 2014, 36(9): 864-870(in Chinese).
- [3] 梁辉, 王文栋, 朱晓苏, 等. 家蚕隐花色素基因 *Cry1* 与 *Cry2* 的表达谱与功能研究 [C]//2011 年全国时间生物医学学术会议论文集. 南宁: 中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会, 2011: 40-54.
- Liang H, Wang W D, Zhu X S, *et al.* Cloning and functional identification of *Cry* gene from *Bombyx mori*[C]//The Professional Committee of Time Biomedicine of the Chinese Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Nanning: Time Biomedical Committee of Chinese Society of Integrated Traditional and Western Medicine, 2011: 40-54 (in Chinese).
- [4] 韦献雅, 牛应泽, 余青青, 等. 拟南芥 *CRY1* 基因 C 末端导入甘蓝型油菜的遗传及表达[J]. *高技术通讯*, 2007, 17(6): 648-652.
- Wei X Y, Niu Y Z, Yu Q Q, *et al.* Inheritance and expression of the C-terminal fragment of *Arabidopsis Cry1* gene transferred into *Brassica napus*[J]. *Chinese High Technology Letters*, 2007, 17(6): 648-652(in Chinese).
- [5] Zhang Y C, Gong S F, Li Q H, *et al.* Functional and signaling mechanism analysis of rice CRYPTOCHROME 1[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(6): 971-983.
- [6] Hirose F, Shinomura T, Tanabata T, *et al.* Involvement of rice cryptochromes in de-etiolation responses and flowering[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(7): 915-925.
- [7] 张小冰. 植物隐花色素及其功能研究进展[J]. *生物学教学*, 2010, 35(7): 4-5.
- Zhang X B. Research advances in plant cryptochrome and its function[J]. *Biology Teaching*, 2010, 35(7): 4-5(in Chinese).
- [8] 朱涵毅, 薛慧良, 徐金会, 等. 黑线仓鼠 *Cry1*, *Cry2* 克隆及生物信息学分析[J]. *曲阜师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 45(4): 74-82.
- Zhu H Y, Xue H L, Xu J H, *et al.* Clone and bioinformatics analysis of *Cry1*, *Cry2* in *Cricetulus barabensis* [J]. *Journal of Qufu Normal University (Natural Science)*, 2019, 45(4): 74-82(in Chinese).
- [9] Gegeer R J, Foley L E, Casselman A, *et al.* Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism[J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 804-807.
- [10] Hazlerigg D G, Andersson H, Johnston J D, *et al.* Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal[J]. *Current Biology*, 2007, 17(12): 1007-1012.

- 2004, 14(4): 334-339.
- [11] Van der Horst G T J, Muijtjens M, Kobayashi K, *et al.* Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms[J]. *Nature*, 1999, 398(6728): 627-630.
- [12] 汪京京. Timeless 通过结合 *Cry1aa* 负向调控斑马鱼生物钟 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- Wang J J. Zebrafish Timeless negatively regulates the circadian clock through binding to *Cry1aa*[D]. Suzhou: Soochow University, 2015 (in Chinese).
- [13] 张鹏. 中华绒螯蟹隐花色素 *EsCry* 和铁硫簇组装蛋白 *EsIscA2* 在生物节律和免疫调控中的作用初探 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2018.
- Zhang P. Role of *EsCry* and *EsIscA2* in biological rhythm and immune regulation of Chinese mitten crab[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [14] 易健明, 屈武斌, 张成岗. 实时荧光定量PCR的数据分析方法[J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(1): 140-145.
- Yi J M, Qu W B, Zhang C G. Data analysis methods of real-time fluorescent quantitative PCR[J]. *Letters in Biotechnology*, 2015, 26(1): 140-145(in Chinese).
- [15] 黄玲燕. 斜纹夜蛾光受体 *CRY1* 基因沉默及其对生殖相关基因表达影响研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- Huang L Y. Silencing of photoreceptor *CRY1* gene and its effect on the expression of reproduction-related genes in *Spodoptera litura*[D]. Kunming: Yunnan University, 2017 (in Chinese).
- [16] 朱春利, 张桂荣, 蔡爱军, 等. 植物隐花色素结构与功能研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(1): 174-178.
- Zhu C L, Zhang G R, Cai A J, *et al.* Advances in the structure and function of cryptochrome in plants[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(1): 174-178(in Chinese).
- [17] 胡甘雨. 葱蝇隐花色素基因 *cry* 的克隆, 特征及昼夜表达模式 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2014.
- Hu G Y. Molecular cloning, characteristics and expression of cryptochrome in the onion maggot, *Delia antiqua*[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2014 (in Chinese).
- [18] Fanjul-Moles M L, Escamilla-Chimal E G, Gloria-Soria A, *et al.* The crayfish *Procambarus clarkii cry* shows daily and circadian variation[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207(9): 1453-1460.
- [19] 姜令绪, 王仁杰, 周莉, 等. 脊尾白虾在不同盐度条件下的行为变化[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(12): 1564-1567.
- Jiang L X, Wang R J, Zhou L, *et al.* Behavioral analysis of *Exopalaemon carinicauda* under different salinity conditions[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(12): 1564-1567(in Chinese).
- [20] 李红丹, 闫蕾, 孙蕾, 等. 玉米隐花色素 *CRY1b* 和 *CRY2* 基因转录丰度对不同光质处理的响应[J]. *作物学报*, 2018, 44(9): 1290-1300.
- Li H D, Yan L, Sun L, *et al.* Transcription abundances of *CRY1b* and *CRY2* genes in response to different light treatments in maize[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(9): 1290-1300(in Chinese).
- [21] 闫蕾. 玉米隐花色素基因 *CRY1a* 的克隆及功能分析 [D]. 太原: 山西大学, 2016.
- Yan L. Cloning and functional analysis of cryptochrome 1a in Maize[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016 (in Chinese).

Cloning of cryptochrome 1 gene and its expression characteristics analysis in *Exopalaemon carinicauda*

ZHU Jixuan¹, DAI Qin¹, GAO Wei¹, DUAN Jiancheng¹, SONG Chongyang¹,
ZHANG Pan¹, YAN Binlun^{1,2,3}, GAO Huan^{1,2,3*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

3. The Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: Cryptochrome (Cry) is a kind of blue violet light receptor, which widely exists in animals, plants, bacteria and human body. At present, the research on *cry* mainly focuses on its biological function, but rarely reported in crustacean biological rhythm. *Exopalaemon carinicauda* is a unique marine economic shrimp in China. Studying and understanding the circadian clock genes will help deepen the understanding of the biological clock regulation mechanism of crustaceans represented by *E. carinicauda*. The results showed that the full length of *cry1* in *E. carinicauda* was 2 190 bp, the open reading frame was 1 845 bp, the 5' noncoding region was 241 bp, and the 3' noncoding region was 104 bp. A total of 614 amino acids were translated. The predicted molecular weight of the protein was 70.5 ku and the theoretical isoelectric point was 5.09. After analyzing the amino acid sequence of Cry1, it was found that the Cry1 contains a structure homologous to DNA photolyase at 117-246 aa of N-terminal and a FAD binding domain at C-terminal. Homology analysis showed that the *cry1* of *E. carinicauda* shared the highest homology with *Litopenaeus vannamei* and *Euphausia superba* (71.6% and 68.3%, respectively). Results of qRT-PCR analysis showed that *cry1* of *E. carinicauda* was expressed in eyestalk, gill, heart, stomach, hepatopancreas, gonad, muscle, intestine and ventral cord nerve, and the expression level of eyestalk was the highest. The expression results at different time periods showed that the expression level of the *cry1* in the eyestalks of *E. carinicauda* firstly decreased with the increase of the light time within 0-24 h, then began to increase after the lowest value at 9 h, and then decreased at 18 h. To the second trough, and finally re-entering the dark period, there is a significant increase again, and it was consistent with the more active rhythm of the *E. carinicauda* in the dark phase. After performing RNA interference under different light color conditions, the expression of *cry1* in RNA interference group was significantly lower than that in control group under two light color conditions, which indicated that the expression of *cry1* gene was successfully interfered in this study. The expression of *cry1* in blue light was significantly higher than that in white light at 3-6 h after injection, but decreased at 9-24 h. The difference indicates that the *cry1* is involved in the light signal transduction process under both blue and white light conditions, particularly involved in responding to the blue light periodic rhythm. This study provides a theoretical basis for in-depth exploration into the regulatory mechanism of crustacean circadian clock in the current situation where there is little research on crustacean circadian clock genes.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; *cry* gene; tissue expression; daily rhythm; RNA interference

Corresponding author: GAO Huan. E-mail: huanmr@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China(17KJA240001); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions(PAPD); "Six Talent Summit" Innovative Talent Team of Jiangsu (2016-HYGC-CXTD-004); University Postgraduate Research and Innovation Project in Jiangsu Province for 2018(KYCX18-2571)