

脊尾白虾 *EcR* 基因的克隆及其在卵巢和 胚胎发育过程中的表达分析

梁俊平^{1,2}, 王 芸³, 段亚飞³, 葛倩倩², 李吉涛²,
李 健^{2*}, 刘 萍², 聂国兴¹

(1. 河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,
农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 为了解蜕皮激素受体 (*EcR*) 在脊尾白虾卵巢和胚胎发育中的作用, 采用同源克隆和 RACE 技术, 克隆了脊尾白虾 *EcR* 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: KC506600), 用实时荧光定量 PCR 方法分析了 *EcR* 基因在雌虾不同组织、卵巢以及胚胎发育不同时期的表达特征。结果显示, 脊尾白虾 *EcR* 基因全长 2 638 bp, 开放阅读框 1 713 bp, 编码 570 个氨基酸, 脊尾白虾 *EcR* 在系统进化上与行抱卵繁殖的真虾类和蟹类亲缘关系较近, 而与对虾类较远。脊尾白虾 *EcR* 基因在各组织中均有表达, 但主要在肝胰腺内表达。在脊尾白虾繁殖期内, 肝胰腺内 *EcR* 的表达量始终高于卵巢, 表达量峰值出现在卵巢成熟时期, 而卵巢内 *EcR* 的表达量在卵巢成熟前期达到最大, 两种组织中 *EcR* 表达量与卵黄蛋白原 (Vg) 质量浓度变化趋势相一致。随着胚胎发育, *EcR* 表达量呈先上升后下降趋势, 在原肠期达到最大, 前溞状幼体期和溞状幼体 I 期的表达量虽有下降, 但仍保持较高水平。结果表明, 脊尾白虾 *EcR* 基因系统进化方向与虾蟹类不同繁殖方式相吻合, 其 mRNA 主要在肝胰腺内表达; 卵巢发育过程中, *EcR* 基因参与了肝胰腺和卵巢中 Vg 合成, 其在肝胰腺中表达量变化与性腺发育指数变化趋势一致, 对卵巢成熟有重要作用; 在胚胎发育过程中, *EcR* 基因参与了胚胎细胞分化及器官形成。

关键词: 脊尾白虾; 蜕皮激素受体; 胚胎发育; 卵巢发育

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

蜕皮激素是一种典型的类固醇激素, 在甲壳动物的生长、发育、繁殖以及胚胎发育中具有重要调控作用^[1-2], 但需与蜕皮激素受体 (ecdysteroid receptor, *EcR*) 结合才可实现其调控作用。蜕皮激素与 *EcR* 结合后, 解除与核受体相互作用的共阻遏因子, 募集一些共激活因子, 从而启动下游基因的转录^[3]。现已在日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)^[4]、褐虾 (*Crangon crangon*)^[5]、美洲龙螯虾 (*Homarus americanus*)^[6]、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)^[7-8]、凡纳滨对虾

(*Litopenaeus vannamei*)^[9]、大西洋砂招潮蟹 (*Uca pugilator*)^[10-11]、黑背陆地蟹 (*Gecarcinus lateralis*)^[12]、美洲蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)^[13-14]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[15-16] 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[17-18] 等多种甲壳动物中克隆得到了 *EcR* 基因序列。关于 *EcR* 的研究, 过去多集中其在蜕皮、生长和附肢再生过程中的调控作用; 近几年关于其在卵巢和胚胎发育中作用的报道逐渐增多, 在日本沼虾、大西洋砂招潮蟹、美洲蓝蟹、中华绒

收稿日期: 2014-10-23 修回日期: 2015-04-29

资助项目: 国家虾产业技术体系专项 (CARS-47); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103034)

通信作者: 李 健, E-mail: Lijian@ysfri.ac.cn

螯蟹和三疣梭子蟹中研究表明,*EcR* 参与了卵巢或胚胎发育过程。

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 又名白虾, 隶属长臂虾科 (Palaemonidae)、白虾属 (*Exopalaemon*), 是我国重要的小型经济虾类^[19]。脊尾白虾一个生命周期中可多次抱卵繁殖, 池塘养殖中 1 年可至少连续繁殖 2 次, 实现多茬养殖、多次轮捕, 已成为沿海地区池塘单养或混养的重要品种^[20]。亲虾是否能实现二次抱卵, 主要与第一次抱卵期间卵巢发育程度有关。据于天基等^[21]报道, 在池塘养殖中有部分脊尾白虾亲虾参与了二次抱卵, 但比例较低, 且受精卵平均孵化率只有 46%。上述问题已成为制约脊尾白虾池塘养殖经济效益提高的障碍之一, 要解决这一问题, 有赖于深入了解脊尾白虾卵巢及胚胎发育机理, 但关于脊尾白虾生殖内分泌研究目前还鲜见报道。本研究克隆得到了脊尾白虾 *EcR* 基因全长 cDNA 序列, 并分析了 *EcR* 在卵巢和胚胎发育不同阶段的表达模式, 以期阐明 *EcR* 在脊尾白虾卵巢成熟以及胚胎发育过程中的作用, 为完善脊尾白虾生殖内分泌调控机理提供基础资料, 并为脊尾白虾人工控制多次繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雌性脊尾白虾, 为室内人工培育 A 家系 F₁ 代, 体质量 (2.57 ± 0.64) g, 盐度 31.3, 水温 24.2 °C, 连续充气, 每天投喂冷冻大卤虫或高蛋白配合饵料, 投喂时间为 8:00 和 17:00。定时吸污换水。

实验所需分子试剂购自 Clontech 公司、宝生物工程(大连)有限公司、Invitrogen 公司等; 虾卵黄蛋白原酶联免疫分析(ELISA)试剂盒购于上海裕平生物科技有限公司; 总蛋白含量测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。寡聚核苷酸引物由生工生物工程(上海)公司合成。

1.2 实验方法

组织取样 脊尾白虾卵巢发育分期根据王绪峨^[22]描述确定, 每个发育阶段各取脊尾白虾雌虾 15 尾, 吸除体表水分, 精确称量体质量。将每尾虾分离卵巢、肝胰腺, 并精确称其质量, 用于计算性腺发育指数和肝胰腺指数。然后以 5 尾雌虾作为一个重复, 每尾虾取相同质量的组织混合为

一个样品, 即每个组织 3 个重复, 样品液氮冷却, 并用液氮研磨成粉末, 取 50 mg 迅速转至 1.5 mL 离心管(内含 1.0 mL Trizol 液), 漩涡振荡, 混匀后置 -80 °C 保存, 用于总 RNA 提取; 另取 50 mg 卵巢和肝胰腺样品转移至 1.5 mL 离心管(内含 0.5 mL 1 × PBS 缓冲液), 漩涡振荡, 混匀后 4 °C 8 000 × g 离心 10 min, 置 -20 °C 保存, 用于蛋白含量测定。

脊尾白虾胚胎发育分期根据王绪峨^[23]描述确定, 选择不同时间抱卵的雌虾, 轻轻将卵剖离, 在显微镜下观察, 取受精卵、十六细胞期、三十二细胞期、原肠期、无节幼体期、前溞状幼体、后溞状幼体、溞状幼体 I 期, 每个发育期选 3 尾虾, 即每个发育期 3 个重复, 样品用液氮研磨成粉末, 各取 50 mg 迅速转至 1.5 mL 离心管(内含 1.0 mL Trizol 液), 漩涡振荡, 混匀后置 -80 °C 保存用于总 RNA 提取。

性腺发育指数和肝胰腺指数的计算 性腺发育指数(gonadosomatic index, *GSI*)的计算公式为 $GSI = \text{卵巢质量} / \text{虾体质量} \times 100\%$, 肝胰腺指数(hepatosomatic index, *HSI*)的计算公式为 $HSI = \text{肝胰腺质量} / \text{虾体质量} \times 100\%$ 。

脊尾白虾卵黄蛋白原含量的测定 应用双抗体夹心法测定标本中虾卵黄蛋白原(vitellogenin, *Vg*)水平, 参考虾卵黄蛋白原酶联免疫分析(ELISA)试剂盒说明书进行。总蛋白含量测定参考试剂盒说明书。

总 RNA 提取和 cDNA 合成 总 RNA 的提取方法参考 Trizol 使用说明书, 通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度和完整性, 用 DNase I 和 RNase-free 去除总 RNA 中残留的基因组 DNA, 参考 Reverse transcriptase M-MLV 使用说明书合成 cDNA。利用 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒合成 RACE 模板, 具体方法参考说明书。

脊尾白虾 *EcR* cDNA 全长克隆 依据 GenBank 数据库中公布的日本囊对虾(AB295492.1), 褐虾(FJ231410.1), 美洲龙螯虾(HQ335007.1) *EcR* 基因序列, 利用 DNAMAN 软件比对其保守序列, 根据这些序列的保守区域设计兼并引物(表 1)。以脊尾白虾肝胰腺合成的 cDNA 为模板, 以 *EcR*-F/R 为引物, 采用 10 μL PCR 反应体系扩增 *EcR* 基因的保守片段。在 PCR 管中依次加入: dd

H₂O, 6.85 μL; 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ plus), 1.0 μL; dNTP Mixture (2.5 mmol/L), 0.8 μL; 模板 cDNA, 0.5 μL; EcR-F (10 μmol/L), 0.4 μL; EcR-R (10 μmol/L), 0.4 μL; TaKaRa Taq (5 U/μL), 0.05 μL。轻弹 PCR 管底混匀样品, 瞬时离心。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。扩增完成后, 取 2 μL 反应产物, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上以 200 V 恒定电压电泳检测, 对照 2 000 bp

DNA Ladder 验证扩增结果。参照 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明回收、纯化扩增产物, 并连接至 pMD-18T 载体, 重组质粒转化至大肠杆菌 Top10, 经菌落 PCR 初步鉴定为阳性克隆后由上海桑尼生物科技有限公司双向测序。以 5' Race cDNA 和 3' Race cDNA 为模板, 用特异引物 EcR5' 和 EcR3' 和通用引物 UPM 分别扩增 5' 端和 3' 端序列, 然后对所得序列进行电子拼接, 获得其全长 cDNA 序列。

表 1 实验中所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in the study

引物类型 primer type	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence
兼并引物 degenerate primer	EcR-F	GGCATGCGRCCMGARTGTGT
兼并引物 degenerate primer	EcR-R	TCWGCATTRTCMACYTTCAT
特异引物 specific primer	EcR5'	TAGGCTTACAAGGACTGAGAGGAGTGTGC
特异引物 specific primer	EcR3'	GAGCCAAGCCTTTGACCCACGAACAGCAA
荧光定量引物 real time PCR primer	QEcr-F	GTCGTCTCTCAACGGCTACAG
荧光定量引物 real time PCR primer	QEcr-R	TCTCCACACACCAGGCATAAT
内参引物 internal primer	Actin-F	CCGAGACATCAAGGAGAAGC
内参引物 internal primer	Actin-R	ATACCGCAAGATTCCATACCC

生物信息学分析 利用 DNAMAN 对序列进行拼接; 利用 DNASTar 中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框 (ORF) 的预测与氨基酸翻译; 通过 GOR4 方法 (<http://www.expasy.org/>) 进行二级结构分析; 用 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 软件分析蛋白的结构域; 通过 NCBI 中 BLAST 对脊尾白虾及其他物种的 EcR 氨基酸序列进行多重比对; 用 MEGA 5.0 软件构建 N J 系统进化树。

EcR 基因在不同组织中表达分析 根据脊尾白虾 *EcR* 基因序列和内参基因 β -actin 基因序列 (JQ045354.1), 利用 Primer 5.0 软件设计特异引物 (表 1)。荧光定量 PCR 扩增体系及反应程序参考 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书。每种组织 3 个重复样品, 每个样品平行测定 3 次。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算 *EcR* 基因的 mRNA 表达量, 基因表达量用“平均值 ± 标准差”表示。

卵巢和胚胎发育不同时期 *EcR* 基因的表达分析 取卵巢发育不同时期的肝胰腺、卵巢组织, 不同发育时期的胚胎, 每个时期每种组织 3 个重复样品, 每个样品平行测定 3 次。其他方法步

骤同上。

数据处理 数据统计采用 SPSS 16.0 软件中单因素方差分析 (One-Way ANOVA), Duncan multiple range test 用来检验显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 实验结果

2.1 脊尾白虾 *EcR* 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

以脊尾白虾肝胰腺 cDNA 为模板, 利用兼并引物 EcR-F/R 扩增得到一条与预期长度相同的 760 bp 保守片段; 以 5' Race 和 3' Race cDNA 为模板, 用特异引物 EcR5' 和 EcR3' 分别与通用引物 UPM 配对, 扩增得到了 1 007 bp 的 5' 端和 1 481 bp 的 3' 端。通过序列拼接获得一条长为 2 638 bp 的 *EcR* cDNA, 该序列已登录 GenBank, 登录号: KC506600。

脊尾白虾 *EcR* 基因开放阅读框长度 1 713 bp, 编码 570 个氨基酸。该基因两翼分别存在 181 bp 的 5' 非编码区和 744 bp 的 3' 非编码区, poly(A) 前存在一个加尾序列 ATAAA (图 1)。EcR 推导的蛋白分子量为 62 840.2 u, 分子式为 C₂₇₃₈H₄₃₅₅N₇₅₇O₈₆₉S₃₃, 理论等电点为 6.55。

2.2 脊尾白虾 *EcR* 蛋白二级结构及功能域分析

使用 GOR4 法对脊尾白虾 *EcR* 进行二级结构预测,结果表明,该蛋白有 29.47% 的 α 螺旋,53.16% 的无规则卷曲;经 SMART 软件分析该蛋白包含两种结构域,分别为 DNA 结合结构域

(DNA-binding domain, DBD) 和配体结合结构域 (ligand binding domain, LBD),其中 DNA 结构域中包含 8 个保守的 Cys 残基 (C¹⁶²-C¹⁶⁵-C¹⁷⁹-C¹⁹⁸-C²⁰⁴-C²¹⁴-C²¹⁷-C²²²),可形成 2 个 ZnF_C₄ 结构 (C₄ zinc finger domain)(图 1)。

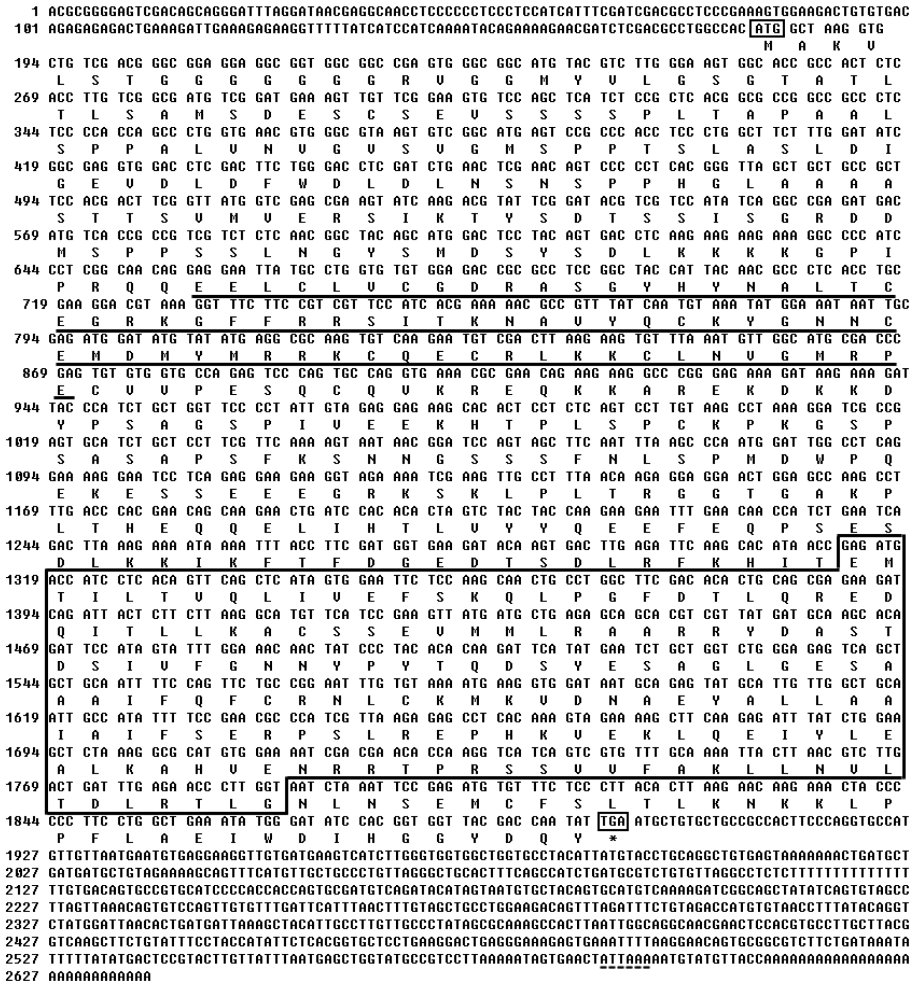


图 1 脊尾白虾 *EcR* 基因 cDNA 核苷酸序列和推导氨基酸序列

[ATG] 起始密码子, [TGA] 终止密码子, ATTTAAA 多腺苷酸信号, 下划线表示 ZnF_C₄ 结构域, 实线框表示配体结合结构域 (ligand-binding domain, LBD), “*” 表示终止密码子, 不翻译氨基酸

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *EcR* cDNA

[ATG] is a start codon, [TGA] is a stop codon, ATTTAAA is a consensus polyadenylation signal, ZnF_C₄ domain is underlined, ligand-binding domain is boxed, “*” represents no translation amino acid

2.3 脊尾白虾 *EcR* 氨基酸与其他物种 *EcR* 氨基酸的比较

通过 BLAST 比对,脊尾白虾 *EcR* 氨基酸与褐虾 (ACO44665.1) 和日本沼虾 (AHA33383.1) 的一致性最高,为 93%,与美洲龙螯虾 (AEA29831.1) 的一致性为 81%,与中华绒螯蟹 (AHW40459.1)、大西洋砂招潮蟹 (AAC33432.2) 和拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) (AFN08659.1) 的一致性分别为

77%、76% 和 75%,与三疣梭子蟹 (AFH35032.1)、美洲蓝蟹 (AET06180.1) 和黑背陆地蟹 (AAT77808.1) 的一致性均为 74%,与凡纳滨对虾 (AGS94406.1) 和日本囊对虾 (BAF75375.1) 的一致性分别为 69% 和 68%。

2.4 脊尾白虾 *EcR* 氨基酸系统进化树的构建

16 种动物的 *EcR* 在进化上可分为两大支,在分类地位上分别属于甲壳纲 (Crustacea) 和昆虫

纲 (Insecta) (图 2)。脊尾白虾 *EcR* 在进化上与褐虾和日本沼虾亲缘关系最近,与美洲龙螯虾亲缘

关系次之,之后与蟹类聚在一起,而与对虾类的日本囊对虾和凡纳滨对虾亲缘关系却较远。

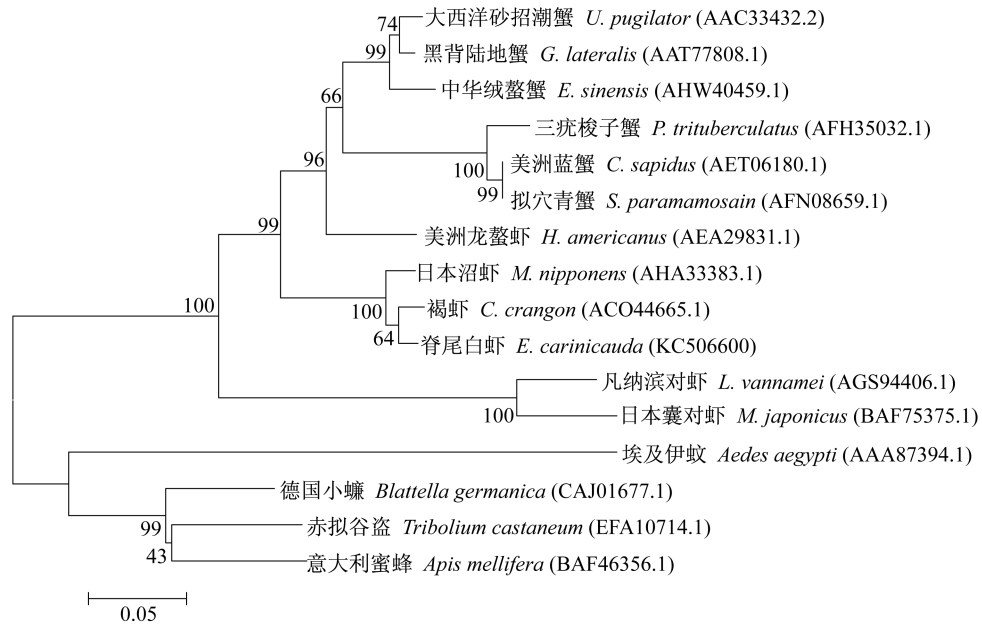


图 2 脊尾白虾 *EcR* 氨基酸序列 N J 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis (N J) of *E. carinicauda* and other deduced crustacean *EcR* amino acid sequences

2.5 脊尾白虾卵巢发育期性腺指数和肝胰腺指数变化

随着卵巢的发育,性腺指数逐渐增大,到IV期(成熟期)达到最大,为 7.43%,而在V期(恢复期)即交尾抱卵后降到最小 0.67%;肝胰腺指数随着卵巢的发育也逐渐升高,到III期时达到最大,为 4.04%,IV期时降到最低 2.63%,而到V期时又恢复到 3.06%,与II期(3.21%)相近(图 3)。

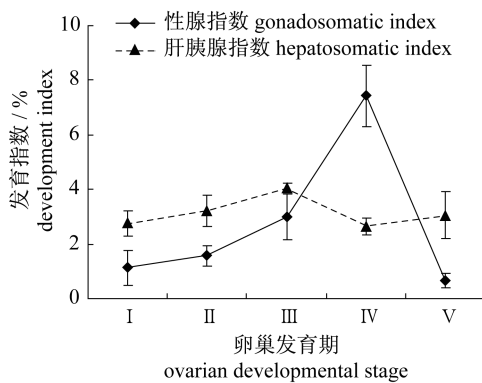


图 3 脊尾白虾卵巢发育期性腺指数和肝胰腺指数变化

Fig. 3 The gonadosomatic index and heaptosomatic index of *E. carinicauda*

2.6 脊尾白虾卵巢发育期 Vg 质量浓度变化

卵巢发育至 I 期和 II 期时,卵巢中的 Vg 质

量浓度无显著性差异 ($P > 0.05$); III 期时 Vg 质量浓度达 168.13 ng/mg,显著高于 I、II 期 ($P < 0.05$); V 期时 Vg 质量浓度达到最高,为 281.26 ng/mg,但与 IV 期无显著性差异 ($P > 0.05$)。随着卵巢的发育,肝胰腺中 Vg 质量浓度显著升高 ($P < 0.05$),在 IV 期时达到最大,为 619.52 ng/mg, V 期时 Vg 质量浓度下降,为 374.69 ng/mg,但仍高于 I、II 和 III 期 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.7 脊尾白虾 *EcR* 基因组织表达特点

荧光定量检测显示,*EcR* 在雌性脊尾白虾各种组织中均有表达,但主要在肝胰腺中表达,在受精卵、大颚腺和鳃中的表达量次之,在肌肉和卵巢中的表达量最低(图 5)。

2.8 脊尾白虾卵巢发育不同时期 *EcR* 基因的表达

随着卵巢的发育,卵巢内 *EcR* 的表达量逐渐升高,在 III 期时达到最大 ($P < 0.05$),IV 和 V 期有所下降,但仍高于 I、II 期 ($P < 0.05$);肝胰腺内 *EcR* 的表达量在 IV 期时达到最高 ($P < 0.05$),V 期时的表达量显著低于其他时期 ($P < 0.05$) (图 6)。在同一发育时期,肝胰腺中 *EcR* 的表达量始终高于卵巢中的表达量。

2.9 脊尾白虾胚胎发育不同时期 *EcR* 基因的表达

随着胚胎发育, *EcR* 表达量逐渐升高, 在卵裂前表达量最低, 在原肠期达到最大 ($P < 0.05$), 随后逐渐降低, 但在前溞状幼体期和溞状幼体 I 期仍保持较高的表达量, 无节幼体期和后溞状幼体期的表达量与卵裂期差异不显著 ($P > 0.05$) (图 7)。

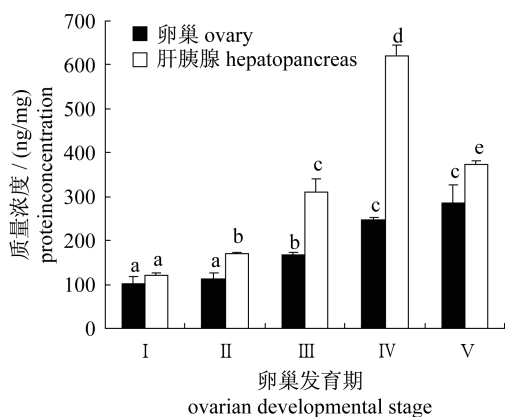


图 4 脊尾白虾卵巢发育期卵巢和肝胰腺中 Vg 质量浓度变化

相同小写字母表示同一组织中 Vg 质量浓度在卵巢不同发育期差异不显著 ($P > 0.05$)

Fig. 4 The vitellogenin concentration in ovary and hepatopancreas of female *E. carinicauda*

Same lowercase letters indicate no significant difference of Vg concentration during ovarian development ($P > 0.05$)

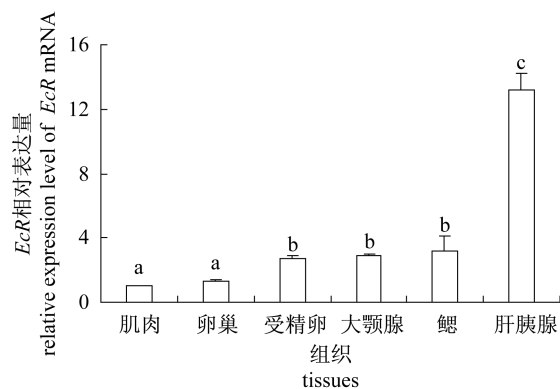


图 5 脊尾白虾 *EcR* 在各组织器官中的表达量

相同小写字母表示不同组织 *EcR* 的表达量差异不显著 ($P > 0.05$)

Fig. 5 Relative expression level of *EcR* mRNA in tissues of *E. carinicauda*

Same lowercase letters indicate no significant difference of *EcR* mRNA expressions in different tissues ($P > 0.05$)

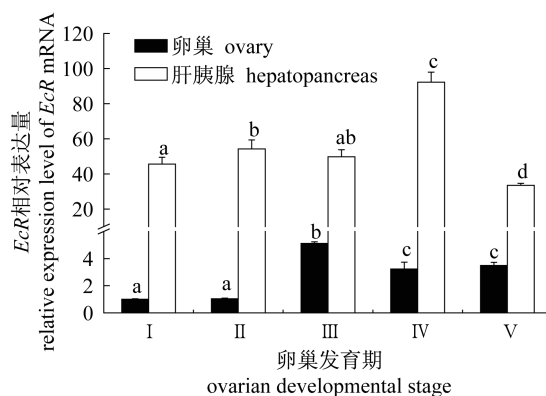


图 6 脊尾白虾卵巢不同发育期 *EcR* 的表达量变化

相同小写字母表示同一组织中 *EcR* 表达量在卵巢不同发育期差异不显著 ($P > 0.05$)

Fig. 6 Relative expression levels of *EcR* in ovary and hepatopancreas of *E. carinicauda*

Same lowercase letters indicate no significant difference of *EcR* mRNA expressions during ovarian development ($P > 0.05$)

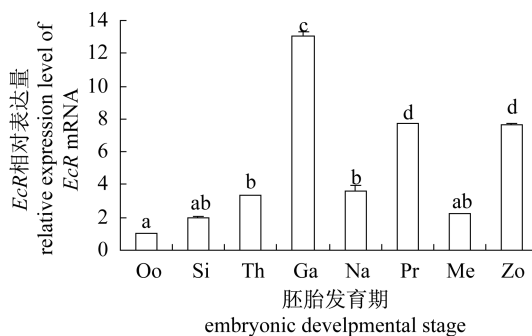


图 7 脊尾白虾胚胎不同发育期 *EcR* mRNA 的表达量

Oo. 受精卵, Si. 十六细胞期, Th. 三十二细胞期, Ga. 原肠期, Na. 无节幼体期, Pr. 前溞状幼体, Me. 后溞状幼体, Zo. 溞状幼体 I 期

相同小写字母表示不同发育期胚胎 *EcR* 表达量差异不显著 ($P > 0.05$)

Fig. 7 Relative expression levels of *EcR* in embryos of *E. carinicauda*

Oo. oosperm, Si. sixteen cells, Th. thirty-two cells, Ga. gastrula, Na. nauplius, Pr. protozoa, Me. metazoea, Zo. zoea I

Same lowercase letters indicate no significant difference of *EcR* mRNA expressions during embryonic development ($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 脊尾白虾 *EcR* 基因克隆及其序列分析

本研究获得了脊尾白虾 *EcR* 基因 cDNA 序列, 全长 2 638 bp, 开放阅读框 1 713 bp, 编码 570 个氨基酸。结构域预测, *EcR* 蛋白具有两个典型的核受体家族结构域, 1 个 DBD 结构域, 包含两

个 C₄ 型锌指结构,为特异 DNA 结合区域^[24];1 个 LBD 结构域,位于 DBD 的羧基端,可结合相应的配体^[25],这与其他甲壳动物 *EcR* 蛋白结构域一致^[13,15-18]。脊尾白虾 *EcR* 氨基酸序列与褐虾、日本沼虾和美洲龙螯虾的一致性最高,蟹类次之,而与对虾类的日本囊对虾和凡纳滨对虾的一致性最低;系统发育树也表明,脊尾白虾 *EcR* 与真虾类的褐虾、日本沼虾、美洲龙螯虾和蟹类亲缘关系较近,而与对虾类的日本囊对虾和凡纳滨对虾亲缘关系却较远。*EcR* 的这种系统进化方向恰与虾蟹繁殖方式^[26]相一致,即行抱卵繁殖的真虾类和蟹类聚为一支,而行非抱卵繁殖的对虾类聚为另一支。但虾蟹的繁殖方式是否受到了 *EcR* 多方向进化影响,还有待于进一步深入研究。

3.2 脊尾白虾 *EcR* 在各组织中的表达分析

脊尾白虾 *EcR* 基因主要在肝胰腺内表达,其次在受精卵、大颚腺和鳃中,而在卵巢和肌肉中的表达量较低;日本沼虾 *EcR* 也主要在肝胰腺内表达,而在卵巢和肌肉中的表达量较低^[8];日本囊对虾 *EcR* 主要在 Y-器官中表达,卵巢和肝胰腺内表达却相对较低^[4]。对同一物种,不同研究者研究结果也有所不同,如在三疣梭子蟹中,崔晓雨等^[15]研究表明,*EcR* 主要在 Y-器官中表达量最高,在肝胰腺中的表达量最低;张晓燕等^[16]研究却发现,*EcR* 主要在肝胰腺和卵巢中表达。关于中华绒螯蟹 *EcR* 基因组织表达特点,王瑶等^[17]研究表明,*EcR* 在肌肉中表达量与卵巢中表达量无显著性差异;宫磊等^[18]研究却发现,*EcR* 在肌肉中表达量显著高于卵巢中表达量。由此可见,*EcR* 在不同物种中的主要表达组织器官有所不同,即使同一物种,在不同生理状态下 *EcR* 的主要表达部位也会有所变化。*EcR* 的这种组织表达特性,可能对动物体内多种生命活动具有调控作用^[18]。本研究中,*EcR* 基因主要在肝胰腺内表达,可能与取材有关,本研究所选脊尾白虾均为性腺开始发育的雌虾,而肝胰腺作为卵黄蛋白原主要合成部位^[27],*EcR* 可能与卵黄蛋白原合成有关。

3.3 脊尾白虾 *EcR* 在卵巢发育中的表达分析

甲壳动物卵巢发育主要是卵黄蛋白等营养物质的积累过程,在此过程中蜕皮激素对卵巢成熟和卵黄蛋白合成有重要调控作用^[28-30]。如在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和美洲龙螯虾中,当用

不同浓度的蜕皮激素处理肝胰腺组织后,可显著增加 *Vg* 基因的转录水平^[31-32]。而蜕皮激素这种作用的发挥需与其受体 *EcR* 结合才能得以实现,因 *Vg* 基因的 5'调控区域包含一个蜕皮激素应答原件,这个应答原件直接与 *EcR*/*USP* 异源二聚体结合,当适量增加蜕皮激素活性,*EcR*/*USP* 会协同提高 *Vg* 基因表达量^[18,33]。本研究显示,随着卵巢发育,脊尾白虾卵巢中 *EcR* 基因的表达量逐渐升高,在 III 期时达到最高,之后有所降低,但与 I、II 期相比仍保持在较高的水平,与卵巢内 *Vg* 质量浓度趋势基本一致;与卵巢不同的是,肝胰腺中 *EcR* 基因表达量和 *Vg* 浓度在 IV 期(卵巢成熟)时达到最大,而此时期肝胰腺指数却最小,即肝胰腺中 *Vg* 输送到卵巢后仍在继续合成 *Vg*。有研究表明,脊尾白虾在产卵后的恢复期存在大量的卵原细胞和卵黄合成前期卵母细胞,又进入了细胞增殖期^[34],且在池塘养殖中也观察到了脊尾白虾亲虾二次抱卵现象^[21]。说明脊尾白虾卵巢和肝胰腺中 *EcR* 均参与了 *Vg* 的合成,且对卵巢多次成熟可能有重要调控作用。

3.4 脊尾白虾 *EcR* 在胚胎发育中的表达分析

根据王绪峨^[23]对脊尾白虾早期胚胎发育分期,本研究选择各发育期特征差异明显的受精卵、十六细胞期、三十二细胞期、原肠期、无节幼体期、前溞状幼体、后溞状幼体、溞状幼体 I 期进行了 *EcR* 表达分析。在胚胎发育初期,*EcR* 的表达量上升较为缓慢,因为胚胎发育初期主要是卵裂阶段,卵黄消耗较少,与卵黄结合的母源蜕皮激素释放较少。当胚胎发育到原肠期时细胞分裂速度加快,细胞开始分化,各种器官原基开始形成,大量卵黄被消耗,母源蜕皮激素释放增多,*EcR* 的表达量也达到最大。胚胎发育后期,无节幼体和后溞状幼体中 *EcR* 的表达量明显降低,前溞状幼体和溞状幼体中 *EcR* 的表达量与原肠期相比虽有所下降,但仍保持在较高水平,这可能与前溞状幼体期形成了复眼和心脏等重要特征以及溞状幼体期存在蜕皮现象有关;Techa 等^[14]研究也发现,美洲蓝蟹胚胎发育过程中,*EcR* 的表达量在复眼和心脏出现时较高。在前溞状幼体期 Y-器官即形成,可利用储存的类固醇合成内源性蜕皮激素^[2],因而,在此时期有赖于蜕皮激素激活的 *EcR* 的表达量也会升高。而在日本沼虾胚胎发育中,*EcR* 的表达量在后无节幼体期最高,在前溞状幼体期和

溞状幼体期显著下降^[7],可能是由于物种不同,*EcR* 在同时期胚胎发育中所起作用大小不同,也可能是由于胚胎发育期划分不一致所致,康现江等^[35]在描述日本沼虾胚胎发育时将眼点出现、心跳开始归为后无节幼体期,而陈瑛等^[36]则认为此形态应属于前溞状幼体期。

参考文献:

- [1] Cai S L. A 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. 水产学报, 1998, 22(2): 154 - 161.]
- [2] Subramoniam T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2000, 125 (2): 135 - 156.
- [3] Li K, Li S, Cao Y. Transcriptional regulation by 20-hydroxyecdysone and its nuclear receptor EcR-USP [J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54 (8): 933 - 937. [李康, 李胜, 曹阳. 蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制. 昆虫学报, 2011, 54 (8): 933 - 937.]
- [4] Asazuma H, Nagata S, Kono M, et al. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid-X-receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 148 (2): 139 - 150.
- [5] 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.
- [6] Tarrant A M, Behrendt L, Stegeman J J, et al. Ecdysteroid receptor from the American lobster *Homarus americanus*; EcR/RXR isoform cloning and ligand-binding properties [J]. General and Comparative Endocrinology, 2011, 173 (2): 346 - 355.
- [7] Chen H, Wang W Q, Zhu X L. Cloning of cDNA encoding *EcR* and its expression analysis during embryogenesis in the freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense* [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.]
- [8] Shen H, Zhou X, Bai A, et al. Ecdysone receptor gene from the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*: Identification of different splice variants and sexually dimorphic expression, fluctuation of expression in the molt cycle and effect of eyestalk ablation [J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 193: 86 - 94.
- [9] Qian Z, He S, Liu T, et al. Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 172: 10 - 30.
- [10] 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 pugilator* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 109 (3): 375 - 389.
- [11] Durica D S, Wu X, Anilkumar G, et al. Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 189 (1 - 2): 59 - 76.
- [12] 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]. Journal of Experimental Biology, 2005, 208: 3177 - 3197.
- [13] Techa S, Chung J 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.
- [14] Techa S, Alvarez J V, Chung J. Changes in ecdysteroid levels and expression patterns of ecdysteroid-responsive factors and neuropeptide hormones during the embryogenesis of the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 214: 157 - 166.
- [15] 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.]
- [16] Zhang X Y, Li J, Liu P, *et al.* Cloning and expression analysis of *EcR* gene in *Portunus trituberculatus* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 96 - 103. [张晓燕, 李健, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹蜕皮激素受体 *EcR* 基因的 cDNA 克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 96 - 103.]
- [17] Wang Y, Yang Z Q, Shen C, *et al.* The full length cDNA cloning and expression analysis of *EcR* from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 651 - 661. [王瑶, 杨志刚, 沈城, 等. 中华绒螯蟹 *EcR* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析. 水产学报, 2014, 38(5): 651 - 661.]
- [18] Gong L, Zhang Y C, Sun Y, *et al.* Cloning and expression analysis of ecdysteroid receptor gene (*Ers-EcR*) in *Eriocheir sinensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(6): 786 - 793. [宫磊, 张亦陈, 孙妍, 等. 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. 水产学报, 2014, 38(6): 786 - 793.]
- [19] Liang J P, Li J, Li J T, *et al.* Effects of water temperature on the embryonic development, survival and development period of larvae of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) reared in the laboratory [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(4): 1142 - 1152. [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 不同温度对脊尾白虾胚胎发育与幼体变态存活的影响. 生态学报, 2013, 33(4): 1142 - 1152.]
- [20] Li M Y. An approach to the reproduction and growth of shrimp *Exopalaemon carinicauda* cultured in earthen ponds with reference to its maximum sustaining yield on catch rotation [J]. Journal of Fisheries of China, 1994, 18(2): 85 - 92. [李明云. 池养脊尾白虾的繁殖、生长及其最大持续轮捕量的初步探讨. 水产学报, 1994, 18(2): 85 - 92.]
- [21] Yu T J, Li J, Li J T, *et al.* The growth and reproduction characteristics of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) cultured in ponds [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2014, 4(2): 16 - 25. [于天基, 李健, 李吉涛, 等. 池养脊尾白虾的生长与繁殖特性. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(2): 16 - 25.]
- [22] Wang X E. Study on the breeding biology of *Exopalaemon carinicauda* [J]. Chinese Journal Zoology, 1987, 22(1): 7 - 10. [王绪娥. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察. 动物学杂志, 1987, 22(1): 7 - 10.]
- [23] Wang X E. Early embryonic development on *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis) and relation of its incubation with temperature and salinity [J]. Journal of Fisheries of China, 1989, 13(1): 59 - 64. [王绪娥. 脊尾白虾早期胚胎发育以及温、盐度与其孵化的关系. 水产学报, 1989, 13(1): 59 - 64.]
- [24] Zhao N, Zhao F, Li Y H. Advances in research on zinc finger protein [J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(1): 131 - 134. [赵楠, 赵飞, 李玉花. 锌指蛋白结构及功能研究进展. 生物技术通讯, 2009, 20(1): 131 - 134.]
- [25] Reinking J, Lam M M, Pardee K, *et al.* The *Drosophila* nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive [J]. Cell, 2005, 122(2): 195 - 207.
- [26] Wang K X. The increase aquaculture science of crustacean [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997. [王克行. 虾蟹类增殖学. 北京: 中国农业出版社, 1997.]
- [27] Li Y Y, Cai S L, Liu H. Quantitative analysis of vitellogenin mRNA expression in *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11): 1667 - 1674. [李媛媛, 蔡生力, 刘红. 实时荧光定量 PCR 检测凡纳滨对虾和罗氏沼虾卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的表达. 水产学报, 2012, 36(11): 1667 - 1674.]
- [28] Nagaraju G P. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview [J]. The Journal of Experimental Biology, 2011, 214: 3 - 16.
- [29] Zhao W X, Wang Y Q, Ouyang Y C. Relationship between 20-hydroxyecdysone content and growth and gonad development of *Penaeus orientalis* [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1992, 11(4): 305 - 309. [赵维信, 王义强, 欧阳迎春. 中国对虾体内 20-羟基蜕皮酮含量与生长和性腺发育的关系. 台湾海峡, 1992, 11(4): 305 - 309.]
- [30] Luo R S, Wang Y L, Cao M X, *et al.* The role of hemolymph 20-hydroxyecdysone in molting and oocyte development of the crab *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards [J]. Acta Zoologica Sinica, 1990, 36(2): 157 - 164. [罗荣生, 王幽兰, 曹梅讯, 等. 中华绒螯蟹血淋巴 20-羟基蜕皮酮诱发蜕皮和卵巢发育的作用. 动物学报, 1990, 36(2): 157 - 164.]
- [31] Tiu S H K, Hui J H L, Mak A S C, *et al.* Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVgl) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 666 - 674.

- [32] Tiu S H, 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.
- [33] Martín D, Wang S F, Raikhel A S. The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 173(1 - 2) : 75 - 86.
- [34] Li Z G, Zhang C S, Li F H, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950) [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(3) : 362 - 370. [栗治国, 张成松, 李富花, 等. 脊尾白虾的性腺发育及组织结构观察. 水产学报, 2014, 38(3) : 362 - 370.]
- [35] Kang X J, Sun T C, Wang S A. Preliminary study on the isolated culture of the fertilized egg and embryonic development of the *Macrobrachium nipponense* (Crustacea Decapoda) [J]. Journal of Hebei University; Natural Science Edition, 1996, 16(4) : 41 - 45. [康现江, 孙天才, 王所安. 日本沼虾受精卵的离体培养及其胚胎发育的初步观察. 河北大学学报: 自然科学版, 1996, 16(4) : 41 - 45.]
- [36] Chen Y, Zhu Q, Chen H, *et al.* The morphological and histological observation of embryonic development in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(1) : 33 - 40. [陈瑛, 朱琴, 陈辉, 等. 日本沼虾胚胎发育的形态及组织学观察. 上海海洋大学学报, 2012, 21(1) : 33 - 40.]

Molecular cloning of ecdysteroid receptor and its expression during the ovarian development and embryogenesis of *Exopalaemon carinicauda*

LIANG Junping^{1,2}, WANG Yun³, DUAN Yafei³, GE Qianqian²,
LI Jitao², LI Jian^{2*}, LIU Ping², NIE Guoxing¹

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Engineering Technology Research Center of
Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Xinxiang 453007, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery
Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries,
Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China;

3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of
Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of South China Sea
Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda* supports a large yield of polyculture ponds in eastern China. However, the artificial breeding technique for *E. carinicauda* is not quite advanced, which limits the further development of the *E. carinicauda* culture, and there have been few studies on the mechanism of gonadal development and embryonic development. Recent studies have shown that ecdysteroid receptor (EcR) is not only involved in molting and growth of Arthropod but also plays important roles in ovarian development and embryogenesis. To study the regulatory role of EcR in ovarian development and embryogenesis of *E. carinicauda*, the full-length *EcR* cDNA of *E. carinicauda* (*EcEcR*) was cloned by the methods of degenerated oligonucleotide primers and rapid amplification of the cDNA ends (RACE), and quantitative real-time PCR was used to quantify the relative expression level of *EcEcR* in different tissues, ovarian development and embryogenesis of *E. carinicauda*. The results showed that the full-length *EcEcR* (GenBank accession number: KC506600) was 2 638 bp, containing an open reading frame (ORF) of 1 713 bp encoding a 570 amino acid polypeptide. Multi-sequence alignment analysis showed that *EcEcR* shared the high identities with *Crangon crangon*, *Macrobrachium nipponens*, *Homarus americanus*, however, it shared lower identity with EcRs from *Marsupenaeus japonicas* and *Litopenaeus vannamei*. *EcEcR* was expressed in various tissues and the highest in the hepatopancreas. The *EcEcR* mRNA levels in ovary and hepatopancreas of *E. carinicauda* reached a maximum at the stage III and stage IV, respectively, and the *EcEcR* expression levels were higher in hepatopancreas than in ovary during the ovarian development. However, the *EcEcR* mRNA levels in ovary at stages IV and V were significantly higher than those at stages I and II. Another very important finding was that significantly positive correlations existed between the *EcEcR* expression level and total vitellogenin content. During embryogenesis, the levels of *EcEcR* expression were higher at stages of gastula, protozoa and metazoa than those at other stages. The results indicated that the relationships displayed in the phylogenetic tree of EcRs may correspond to their breeding practice, and *EcEcR* mRNA was expressed highly in hepatopancreas. *EcEcR* was involved in vitellogenin synthesis during ovarian development of *E. carinicauda*, and the *EcEcR* expression level in hepatopancreas was consistent with the gonadosomatic index. *EcEcR* played an important role in the ovarian maturation, and may play key roles in cell differentiation and organogenesis during embryo development.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; ecdysteroid receptor; embryonic development; ovarian development

Corresponding author: LI Jian. E-mail: Lijian@ysfri.ac.cn