

三疣梭子蟹 *FAMeT* 基因克隆及其在蜕皮周期中的表达水平

谢 熙, 朱冬发*, 崔晓雨, 汤 洁, 邱锡尔

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了研究法尼酸甲基转移酶(*FAMeT*) 在甲壳动物蜕皮调控中的作用, 采用反转录 PCR (RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增技术(RACE) 克隆得到了三疣梭子蟹 *FAMeT* 的全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: KC192659), 它包括一个 201 bp 的 5' 非编码区、一个 318 bp 的 3' 非编码区和一个 825 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 274 个氨基酸; 推导的氨基酸序列与已公布的其他甲壳动物 *FAMeT* 进行比对, 发现一致性达 75%~97%, 其中与远海梭子蟹 *FAMeT* 的一致性最高; 而且该氨基酸序列由两个 CF (CPAMD8/*FAMeT*) 区域组成, 这两个 CF 区域是 *FAMeT* 的标志, 在所有甲壳动物的 *FAMeT* 里均有发现, 因此推导的氨基酸序列是三疣梭子蟹 *FAMeT* 基因。运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法分析了其在不同组织中、不同蜕皮周期中的表达量变化, 发现 *FAMeT* 在三疣梭子蟹的各个组织里均有表达, 且在胸神经节里表达最强; 在三疣梭子蟹蜕皮过程中, 大颚器中 *FAMeT* 在 D₁ 期表达最强, 然后逐渐下降至 D₄ 最低。该结果表明 *FAMeT* 在三疣梭子蟹蜕皮调控中起着重要的作用。

关键词: 三疣梭子蟹; 法尼酸甲基转移酶; 克隆; 蜕皮周期; 表达水平

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

法尼酸甲基转移酶 (farnesoic acid *O*-methyl transferase, *FAMeT*) 是甲基法尼酯 (methyl farnesoate, MF) 生物合成途径中最后一步的关键酶, 它具有催化法尼酸 (farnesoic acid, FA) 转变成 MF 的功能^[1]。MF 是一种倍半萜物质, 其化学结构与昆虫保幼激素 III (juvenile hormone, JH III) 相似, 是 JH III 的非环氧化形式, 被认为是甲壳动物的保幼激素^[2]。大量的研究表明, MF 在甲壳动物的生长发育及繁殖过程中, 如生殖、蜕皮、渗透压调节、蛋白代谢等方面, 起到了十分重要的作用^[3-7]。甲壳动物的大颚器 (mandibular organ, MO) 是唯一合成和分泌 MF 的内分泌器官^[8], 而且是甲壳动物里唯一能检测到 *FAMeT* 活性的器官^[9-10]。

甲壳动物 MF 的合成主要受到其 X 器官窦腺 (X-organ sinus gland, XO-SG) 复合体里分泌的大颚器抑制激素 (mandibular organ inhibiting

hormone, MOIH) 的调控^[11-12]。破坏或切除眼柄能消除其对 MF 合成的抑制作用, 用 XO-SG 提取液培养大颚器可以抑制 MF 的合成^[8,12]。目前普遍认为 MOIH 对 MF 合成的抑制作用是通过抑制 *FAMeT* 的活性来完成的, 例如, 进行切除眼柄手术后的龙虾中 *FAMeT* 的活性显著提高, 重新注射眼柄提取液同时抑制了 MF 合成和 *FAMeT* 活性^[9,13]。

蜕皮是甲壳动物蜕去旧的外骨骼并长出新的外骨骼的过程, 是甲壳动物生长和发育的标志性事件, 受神经系统和内分泌系统共同调节。MF 对甲壳动物蜕皮过程的调控作用至今尚无一致看法。Wilder 等^[14] 发现, 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 蜕皮周期中血淋巴 MF 浓度和蜕皮激素浓度一样呈周期性变化, 而且 MF 高峰出现较早, 由此认为 MF 可能促进蜕皮激素的合成; Tamone 等^[7] 认为 MF 能直接刺激 Y 器 (YO) 分

收稿日期: 2012-12-17 修回日期: 2013-03-27

资助项目: 国家自然科学基金项目 (40976098); 国家科技富民强县专项行动计划 (2011F012); 浙江省自然科学基金 (LY13C190006); 宁波市科技局科研项目 (2012A610137, 2011B81003)

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

泌蜕皮激素从而调控蜕皮,因为 MF 能显著促进首长黄道蟹 (*Cancer magister*) 离体培养的 Y 器合成、分泌蜕皮酮;但 Byard 等^[15]发现,摘除美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 大颚器后,成体雌虾的蜕皮周期并无改变。MF 对甲壳动物蜕皮的调控作用有待进一步研究。

由于 FAMeT 在 MF 合成中起着重要的作用,本研究以三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 为实验材料,克隆获得了其 *FAMeT* 基因的全长 cDNA 序列,并运用实时荧光定量 (quantitative real-time PCR) 的方法分析了其在不同组织中、不同蜕皮周期中的表达量变化,旨在进一步阐明蟹类蜕皮机制,丰富和完善甲壳动物内分泌的调控理论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

头胸甲宽 (CW) 为 8 ~ 12 cm、体质量 (BW) 为 45 ~ 80 g 的野生三疣梭子蟹,暂养于宁波市宁海县得水育苗场,雌雄各半。采用形态观察法将三疣梭子蟹蜕皮周期划分为蜕皮后期 (A 期和 B 期)、蜕皮间期 (C 期)、蜕皮前期 (D₀、D₁、D₂、D₃ 和 D₄ 亚期) 和蜕皮期 (E) 4 个阶段^[16]。采集 C 期三疣梭子蟹眼柄、心脏、肌肉、胸神经节、精巢、

卵巢、肝胰腺、鳃、MO 和 Y 器用于组织表达差异分析;采集各期 (E 期除外) 三疣梭子蟹 MO 用于蜕皮周期中 *FAMeT* 基因表达水平变化的分析。每期选取 3 只蟹做平行实验,样品取好后转移至 RNA 保护液 [生工生物工程 (上海) 有限公司] - 20 °C 保存,用于总 RNA 提取。

1.2 总 RNA 提取

将上述样品从 RNA 保护液中转移至 Trizol 试剂 [生工生物工程 (上海) 有限公司] 中,按试剂说明书提取各个样品中的 Total RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性,紫外分光光度计进行纯度分析。提取 Total RNA 后,再使用 DNase I 分解混入的基因组 DNA,最后进行苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等纯化 Total RNA。

1.3 三疣梭子蟹 *FAMeT* 基因的克隆及序列分析

cDNA 的合成 取 MO 总 RNA 1 μg,用 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 反转录得到第一链 cDNA;用于 3'-RACE 的 3'-RACE-cDNA 以 AP (表 1) 为接头引物,用与上述相同的方法获得;用于 5'-RACE 的 5'-RACE-cDNA 按照 5'-Full RACE kit (TaKaRa) 合成。所有 cDNA 放于 -20 °C 冰箱保存备用。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Nucleotide sequences of primers used for PCR

引物 primer	序列 (5'→3') sequence	用途 usage
Fao-d-F	AAGGTGGACTCCGGACATC	RT-PCR
Fao-d-R	TCCCAGCCGCCAATGA	RT-PCR
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₁₇	3'-RACE
AP1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'-RACE
GSP3-F	TGACAGGGTACTCAGCACAGAG	3'-RACE
GSP5-1	AGGCGACGCTGAAGGTGATA	5'-RACE
GSP5-2	GTCCTCTGTGCTGAGTACCCTGT	5'-RACE
outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	5'-RACE
inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	5'-RACE
Fao-F	GAGTTCTGGATTGCCGTGG	qRT-PCR
Fao-R	GCCCCAGCCAGTGGAGTA	qRT-PCR
actin-F	CGAAACCTTCAACTCCCG	qRT-PCR
actin-R	GATAGCGTGAGGAAGGGCATA	qRT-PCR

RT-PCR 根据已公布的甲壳动物 FAMeT 核苷酸序列,设计引物 Fao-d-F 和 Fao-d-R (表 1)。

以第一链 cDNA 为模板 Fao-d-F 和 Fao-d-R 为上下游引物进行 PCR 扩增,体系为 25 μL。扩增条

件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s,51 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

3'-RACE 和 5'-RACE 根据 RT-PCR 产物测序结果设计特异性引物 GSP3-F(表 1),进行 3'-RACE。以 3'-RACE-cDNA 为模板,GSP3-F 及接头引物 AP1(表 1)为上下游引物进行 PCR 扩增,体系为 25 μL。扩增条件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

根据 3'-RACE 产物测序结果,设计用于 5'-RACE 的下游特异性引物 GSP5-1 和 GSP5-2(表 1),上游引物由 5'-Full RACE kit 提供,分别为 outer primer 和 inner primer。按 5'-Full RACE kit 说明书进行两轮 PCR,第一轮 PCR 以 5'-RACE-cDNA 为模板,outer primer 和 GSP5-1 为上下游引物进行 PCR 扩增,扩增体系:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物为模板,inner primer 和 GSP5-2 为上下游引物进行 PCR 扩增,扩增体系:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物的克隆与测序 参照文献[17]的方法。

序列分析 利用 Vector NTI Suite 10.0 软件包对测序结果进行拼接,利用 ORF Finder 确定其完整编码序列并显示其编码的氨基酸序列,并利用蛋白分析专家系统服务器 ExPASy Proteomics Server(<http://ca.expasy.org/>)所提供的蛋白质在线分析工具进行分析;用 Signal 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测出信号肽序列;用 Vector NTI 10.0 软件包中的 AlignX 软件将得到的氨基酸序列与已公布的 FAMeT 氨基酸序列进行比对分析,并用 MEGA 4.0 软件包中的邻位法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

1.4 实时荧光定量 PCR

将取好的样品按照“总 RNA 提取”中的方法进行抽取总 RNA,取 1.0 μg 的总 RNA 用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒进行反转录;然后运用实时荧光定量的方法对 FAMeT 在三疣梭子蟹不同组织及不同蜕皮周期中的表达情况进行分析。引物设计见表 1,扩增体系、反应程序和数

据处理均参照汪春建等^[18]的方法。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹 FAMeT 的 cDNA 全长与序列分析

用引物 Fao-d-F 和 Fao-d-R 得到的产物,经测序显示该片段长度为 362 bp,用引物 GSP3-F 和 AP1 进行 3'-RACE 得到的产物,经测序显示该片段长度为 727 bp。用 outer primer 和 GSP5-1, inner primer 和 GSP5-2 两对引物通过两轮 PCR 进行 5'-RACE 得到的产物,测序结果显示该片段为 642 bp。将测序得到的序列进行拼接,结果得到长度为 1 344 bp 的 cDNA 序列(图 1),该序列(GenBank 登录号为 KC192659)包含起始密码子 ATG、终止密码子 TAA、mRNA 不稳定基序(ATTTA)及加尾信号(AATAAA)。该基因的 5'非编码区为 201 bp,3'非编码区为 318 bp,开放阅读框(ORF)位于 202~1 026 bp,长 825 bp,编码 274 个氨基酸。利用 SignalP 软件对编码区进行分析,发现三疣梭子蟹 FAMeT 不存在信号肽序列,不属于分泌蛋白。采用 ProtParam 软件预测三疣梭子蟹 FAMeT 分子式为 $C_{1402}H_{2080}N_{362}O_{424}S_{12}$,推测蛋白质分子量大小为 31.1 ku,理论等电点为 4.71。利用 PredictProtein 软件分析显示,该蛋白可能存在 3 个蛋白酶 C 磷酸化位点,6 个酪蛋白激酶 II(CK II)磷酸化位点和 4 个 N 端酰基化位点。另外,推导的氨基酸序列由两个 CF(CPAMD8/FAMeT)区域组成,这两个 CF 区域是 FAMeT 的标志,在所有甲壳动物的 FAMeT 里均有发现。

由此 cDNA 推导的氨基酸序列与已公布的虾蟹类的 FAMeT 氨基酸序列进行比对,结果表明:推导的氨基酸序列与远海梭子蟹(*P. pelagicus*) FAMeT 氨基酸序列一致性最高,与其短、中、长 3 种亚型的一致性分别为 97%、97% 和 96%;与拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)短、中、长 3 种亚型的一致性分别为 95%、93% 和 93%;与锯缘青蟹(*S. serrata*)短、中、长 3 种亚型的一致性分别为 95%、94% 和 93%;与食用黄道蟹(*Cancer pagurus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的 FAMeT 一致性分别为 89% 和 88%;与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、美洲螯龙虾、日本

仿长额虾 (*Pandalopsis japonica*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、东方扁虾 (*Thenus orientalis*)、红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 和克氏原螯虾 (*Procambarus*

clarkii) 的 *FAMeT* 一致性分别为 79%、79%、79%、79%、78%、78%、78%、77%、77%、77% 和 75%。将上述 23 条氨基酸序列用邻接法构建系统进化树(图 2),结果显示三疣梭子蟹 *FAMeT* 基因与远海梭子蟹、拟穴青蟹和锯缘青蟹最为接近,聚为一支,与其传统的分类地位相吻合。

```

1      ctgatttgggtgttgtttggcgctgggagaaccaacactecgccattcgcctcaataa
61     ggagggaaaaggaaccggtgacgatatggccaaggtggaaactccgacgtggtgtgctg
121    cgaggaggagaggaagttgtacgtgagcttcaggacggccagatcaagtcggctacat
181    ggacactgacccttctggaATGGACGAACCCCGAGCCCTGGGCACGGATGAGAACAAAG
1      M D E P R A L G T D E N K
241    GAGTACCGCTTCAGGCAACTCCACGGCAAGACTCTTCGCTTCCAGGTCAAGACGGCGCAC
14     E Y R F R Q L H G K T L R F Q V K T A H
301    GACTGCCATGTGGCATTACCTCCGCCGCCGAGGAGACCCCGATGGTGGAAAGTGTTC
34     D C H V A F T S A A E E T D P M V E V F
361    ATTGGTGGCTGGGAGGGCGCCCTCTGCCATCAGGTTCAAGAAAGCCGACGATTGGTG
54     I G G W E G A A S A I R F K K A D D L V
421    AAGGTGACACTCCGACATCGTGACCGAGGCGGAGTATCGCGAGTTCTGGATTGCCGTG
74     K V D T P D I V T E A E Y R E F W I A V
481    GACCATAACGAAGTGCCTGGGCAAGGCCGGGAGTGGGAGCCCTTATGCAGGCGCCC
94     D H N E V R V G K A G E W E P L M Q A P
541    ATCCCGAGCCCTTCGAGATCACCACTATGGCTACTCCACTGGCTGGGGCGGACTGGA
114    I P E P F E I T H Y G Y S T G W G A T G
601    TGGTGGAAAGTTCCTGAATGACAGGGTACTCAGCACAGAGGACTGTCTCACCTACAATTC
134    W W K F L N D R V L S T E D C L T Y N F
661    GAGCCTGTCTACGGTACTCTATCACCTTCAGCGTGCCTGCAGTAATGACGCACACTTG
154    E P V Y G D S I T F S V A C S N D A H L
721    GCCCTCACTTCGGCGCCGAGGAGACCAGTCCCATGTACGAGATCTTCATTGGCGGCTGG
174    A L T S G A E E T S P M Y E I F I G G W
781    GAGAACCAACTCCGCCATTCCGCTCAATAAGGGTACGATATGGCCAAGGTGAAACT
194    E N Q H S A I R L N K G D D M A K V E T
841    CCCGACGTGGTGTGCTGCGAGGAGGAGGAAAGTTCTACGTGAGCTTCAGGAACGGCCAG
214    P D V V C C E E E R K F Y V S F R N G Q
901    ATCAAGTTCGGCTACATGGACACTGACCCCTCCTGGAATGGACTGACCCCGAGCCTGG
234    I K V G Y M D T D P F L E W T D P E P W
961    AAGATCACCCATGTGGGATATTGCACAGGCTGGGGTGTACAGGCAAGTGGAAAGCTGAA
254    K I T H V G Y C T G W G A T G K W K L E
1021   ATCtaagtaaatataagtgagtggtgatgtcagaccgccatacgtgatgtcaaacac
274    I
1081   cgccaccactgctactctgcccgatgttctcggccacctatgctacgtaatacagctta
1141   catccttgtcttctgtttgagtttataataaaatttcgaagccagagaagcactgcaa
1201   ggtgaagcctctgcaaacacctgttctcattaaccttcacatgtctcctccggtcaag
1261   agagtcagaggaaggggtattttcaatactttagcttcacgtcattaaaattaaaa
1321   cactacaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

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

编码区用大写字母表示,非编码区用小写字母表示,氨基酸用单个大写字母表示,排在对应核苷酸序列下面。起始密码子和终止密码子用粗体表示,2 个 CF 保守区域用斜体表示。加尾信号用下划线标出,酪蛋白激酶 II (CK II) 磷酸化位点用方框标出。

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

The untranslated regions (UTRs) are indicated by the lower case letters and the coding sequence is shown in upper case letters. One letter amino acid sequence code is shown. The translation start codon and the stop codon are indicated by bold letters. The phosphorylation sites are shown in boxes and the CF domains are shown as the italicized amino acid sequence. The polyadenylation signals in the UTR are underlined and the CK II phosphorylation sites are showed in the box.

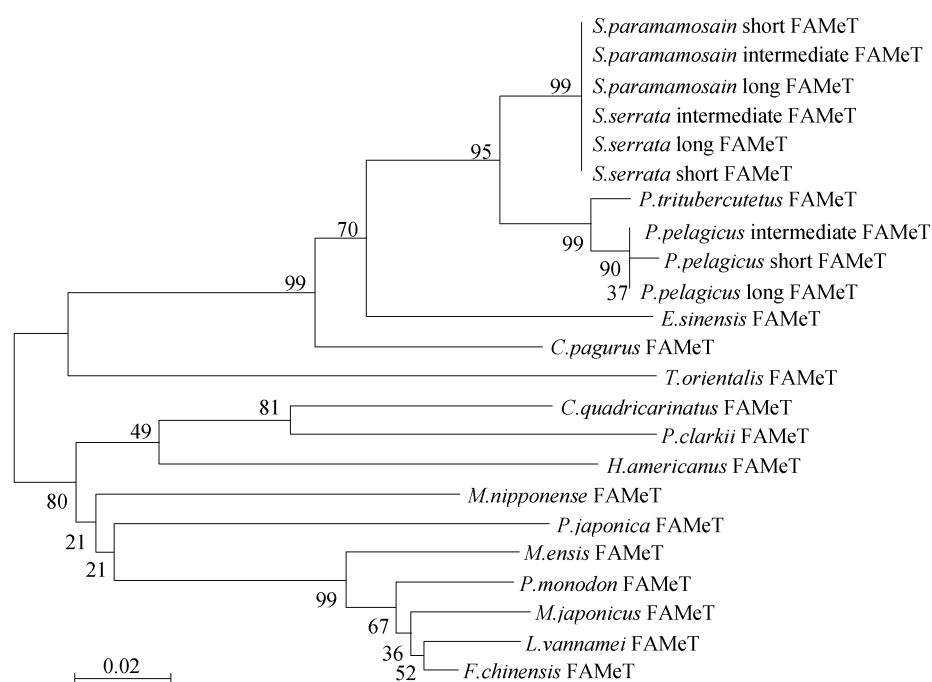


图2 虾蟹类 FAMeT 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 2 The NJ phylogenetic tree of FAMeT in crabs and shrimps

2.2 FAMeT 在三疣梭子蟹不同组织中的表达差异

实时荧光定量的结果显示, *FAMeT* 在三疣梭子蟹的各个组织中均有表达(图3)。其中, 胸神经节里 *FAMeT* 相对表达量最高, 鳃次之, 大颚器再次之; 其他组织里 *FAMeT* 相对表达量较少, 与胸神经节、鳃和大颚器中的相对表达量有显著性差异 ($P < 0.05$)。这说明 *FAMeT* 可能参与调控三疣梭子蟹的多种生理功能。

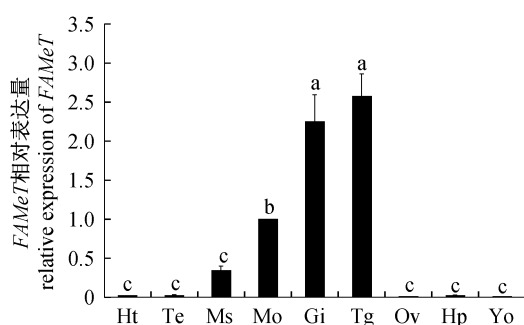


图3 *FAMeT* 在三疣梭子蟹不同组织里的相对表达量
Ht. 心脏; Te. 精巢; Ms. 肌肉; Mo. 大颚器; Gi. 鳃; Tg. 胸神经节; Ov. 卵巢; Hp. 肝胰腺; Yo. Y 器; 不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 3 The relative expression of *FAMeT* in different tissues in *P. trituberculatus*

Ht. heart; Te. testis; Ms. muscle; Mo. mandibular organ; Gi. gill; Tg. thoracic ganglia; Ov. ovary; Hp. hepatopancreas; Yo. Y-organ; Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$), the same below.

2.3 大颚器中 FAMeT 在蜕皮周期中的表达水平变化

考虑到 MO 是唯一合成与分泌 MF 的场所, 以三疣梭子蟹的 MO 为实验材料来研究 *FAMeT* 在蜕皮过程中的相对表达量变化。实时荧光定量的结果显示, MO 里 *FAMeT* 在三疣梭子蟹蜕皮周期的各个时期均有表达(图4)。D₁ 期 *FAMeT* 的相对表达量较 A、B、C 和 D₀ 期有显著增加 ($P < 0.05$), 之后 *FAMeT* 的相对表达量逐渐下降, 至 D₄ 期达到最低。

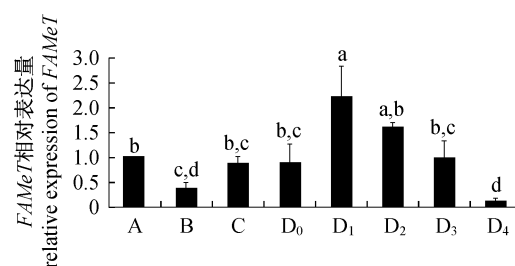


图4 MO 里 *FAMeT* 在三疣梭子蟹蜕皮周期中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression of *FAMeT* in MO during molting cycle in *P. trituberculatus*

3 讨论

本研究克隆得到了三疣梭子蟹的 *FAMeT* 的

全长 cDNA 序列,根据其开放阅读框推导的氨基酸序列与已公布的其他甲壳动物 *FAMeT* 的氨基酸序列有较高的一致性。但一些学者在克隆远海梭子蟹、拟穴青蟹^[19]和锯缘青蟹^[20] *FAMeT* 的过程中均发现了 3 种亚型,亚型之间只有 3~5 个氨基酸的差别,然而本研究并没有发现亚型的存在,这可能是由于克隆过程中提取总 RNA 的组织不同所造成的。前述 3 个物种在克隆 *FAMeT* 的时

候,总 RNA 均取自于胸神经节;而考虑到 MO 是 MF 唯一的合成场所,所以总 RNA 取自 MO。Ruddell 等^[21]用 MO 总 RNA 来克隆食用黄道蟹的 *FAMeT* 基因,也未报道亚型的存在。将三疣梭子蟹 *FAMeT* 与上述 3 个物种 *FAMeT* 的 3 种亚型进行氨基酸序列比对,发现其与这 3 个物种 *FAMeT* 短亚型一致性更高,而且在特定区域发生了 3 或 5 个氨基酸的缺失(图 5)。

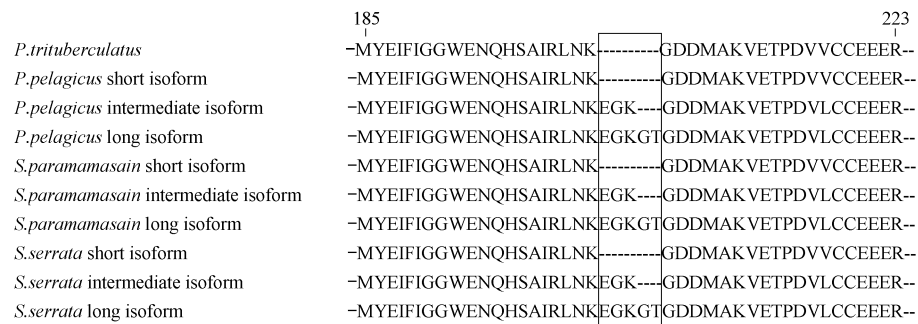


图 5 三疣梭子蟹 *FAMeT* 与远海梭子蟹、拟穴青蟹和锯缘青蟹 *FAMeT* 亚型的特定区域氨基酸序列比对发生缺失的区域用方框标出。

Fig. 5 The amino acid sequence alignment of *P. trituberculatus* *FAMeT* with isoforms of *P. pelagicus*, *S. paramamosain* and *S. serrata* *FAMeTs*

The deleted areas are showed in box.

目前, MF 生理功能及作用机理已经成为当前甲壳动物内分泌学研究的一个热点^[2], 一些研究表明, 作为催化法尼酸转化为 MF 的关键酶, *FAMeT* 也参与了许多甲壳动物的重要生理调控^[19,21-23]。对拟穴青蟹^[19]、食用黄道蟹^[21]、凡纳滨对虾^[22]和刀额新对虾^[23]的研究表明, *FAMeT* 在心、脑、胸神经节、大颚器、眼柄、胃、卵巢、肝胰腺和鳃中均有稳定的表达。本研究的结果同样显示, *FAMeT* 在三疣梭子蟹的各个组织中也均有表达; 胸神经节和鳃中 *FAMeT* 表达量较高, 显著高于其他组织, 这与其他研究结果一致^[19,21-23]; MO 作为 MF 唯一合成与分泌的场所, 其 *FAMeT* 表达量水平虽然显著高于其他组织, 但却显著低于胸神经节和鳃。由于 *FAMeT* 并不属于分泌蛋白, 所以我们认为造成这种现象的原因可能有两种: 第一, *FAMeT* 不仅在 MO 里作为一种甲基转移酶催化法尼酸转化为 MF, 还在其他组织中参与催化别的生理反应; 第二, 由于三疣梭子蟹的胸神经节和鳃中可能也存在 *FAMeT* 的 3 种亚型, 我们设计的荧光定量引物同时扩增出 3 种亚型从而导致胸神经节和鳃中 *FAMeT* 表达量高于 MO。由

于实验过程中没有发现亚型的存在, 这种猜测有待进一步验证。

甲壳动物蜕皮的调控是复杂的, 不仅存在蜕皮酮和甾腺肽类激素的参与, MF 也扮演了重要角色^[24]。研究表明, 甲壳动物蜕皮过程中 MF 在血淋巴中含量在蜕皮间期处于一个较低的水平, 而在蜕皮前期则快速上升, 但是却在即将蜕皮的时候突然下降^[7,25-26]。*FAMeT* 作为 MF 合成最后一步的关键酶, 被认为参与了凡纳滨对虾^[22]和拟穴青蟹^[19]的蜕皮调控。结果显示, 三疣梭子蟹大颚器里 *FAMeT* 基因在蜕皮周期的各个阶段均有表达, 且 D₁ 期比 A、B、C 和 D₀ 期的相对表达量有显著的增加, 之后其表达量逐渐下降, 到 D₄ 期降至最低, 这与 MF 在血淋巴中的含量变化趋势相似^[7,25-26]。因此, 我们认为在三疣梭子蟹蜕皮过程中, *FAMeT* 基因是在蜕皮前期高效表达并催化 MF 的合成, 使 MF 在蜕皮前期血淋巴中维持较高的浓度水平, 从而参与调控蜕皮的发生。

参考文献:

[1] Borst D W, Organ J, Tsukimura B, et al. Regulation

<http://www.scxuebao.cn>

- of the crustacean mandibular organ [J]. *American Zoologist*, 2001, 41(3):430-441.
- [2] Nagaraju G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4):39-54.
- [3] Chang E S, Chang S A, Mulder E P. Hormones in the lives of crustaceans: An overview [J]. *American Zoologist*, 2001, 41(5):1090-1097.
- [4] Laufer H, Demir N, Pan X, *et al.* Methyl farnesoate controls adult male morphogenesis in the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(4):379-384.
- [5] Rodriguez E M, Lopez G L S, Medesani D A, *et al.* Effect of methyl farnesoate, along and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 125(1):34-40.
- [6] Chan S M, Mak A S, Choi C L, *et al.* Vitellogenesis in the red crab, *Charybdis feriatus*: Contributions from small vitellogenin transcripts (CfVg) and farnesoic acid stimulation of CfVg expression [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1040:74-79.
- [7] Tamone S L, Chang E S. Methyl farnesoate stimulates ecdysteroid secretion from crab Y-organs *in vitro* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, 89(3):425-432.
- [8] Laufer H, Borst D, Baker F C, *et al.* Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean [J]. *Science*, 1987, 235(4785):202-205.
- [9] Claerhout T, Bendena W, Tobe S S, *et al.* Characterization of methyl transferase activity in the mandibular organ of the American lobster, *Homarus americanus* [J]. *The Biological Bulletin*, 1996, 191(2):304.
- [10] Wainwright G, Webster S G, Rees H H. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate, in the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. *Biochemical Journal*, 1998, 334(3):651-657.
- [11] 杨济芬, 朱冬发, 沈建明, 等. 甲壳动物高血糖激素家族生理功能研究进展 [J]. *动物学杂志*, 2009, 44(1):151-158.
- [12] Wainwright G, Webster S G, Rees H H. Involvement of adenosine cyclic-3', 5'-monophosphate in the signal transduction pathway of mandibular organ-inhibiting hormone of the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 154(1-2):55-62.
- [13] Li S, Wagner C A, Friesen J A, *et al.* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the lobster mandibular organ: Regulation by the eyestalk [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 134(2):147-155.
- [14] Wilder M N, Okada S, De-Kleijin D P V, *et al.* Hemolymph profiles of juvenoid substances in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* in relation to reproduction and molting [J]. *Fisheries Science*, 1995, 61:175-176.
- [15] Byard E H, Shivers R R, Aiken D E. The mandibular organ of the lobster, *Homarus americanus* [J]. *Cell and Tissue Research*, 1975, 162(1):13-22.
- [16] 沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期 [J]. *水产学报*, 2011, 35(10):1481-1487.
- [17] 朱冬发, 沈建明, 杨济芬, 等. 三疣梭子蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. *动物学报*, 2008, 54(6):1112-1118.
- [18] 汪春建, 朱冬发, 亓一舟, 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 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(1):22-28.
- [19] Yang Y N, Ye H H, Huang H Y, *et al.* Cloning, expression and functional analysis of farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) in the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2012, 45(3):209-222.
- [20] Kuballa A V, Guyatt K, Dixon B, *et al.* Isolation and expression analysis of multiple isoforms of putative farnesoic acid O-methyltransferase in several crustacean species [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(1):48-58.
- [21] Ruddell C J, Wainwright G, Geffen A, *et al.* Cloning, characterization, and developmental expression of a putative farnesoic acid O-methyltransferase in the female edible crab *Cancer pagurus* [J]. *The Biological Bulletin*, 2003, 205(3):308-318.
- [22] Hui J, Tobe S S, Chan S M. Characterization of the putative farnesoic acid O-methyltransferase (LvFAMeT) cDNA from white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Evidence for its role in molting [J]. *Peptides*, 2008, 29(2):252-260.
- [23] Gunawardene Y I, Tobe S S, Bendena W G, *et al.* Function and cellular localization of farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) in the shrimp, *Metapenaeus ensis* [J]. *European Journal of*

- Biochemistry, 2002, 269(14):3587–3595.
- [24] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. *In vitro* methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of crab *Ozioelphusa senex* [J]. Fisheries Science, 2006, 72(2):410–414.
- [25] Chang E S, Bruce M J. Ecdysteroid titers of juvenile lobster following molt induction [J]. Journal of Experimental Zoology, 1980, 214(2):157–160.
- [26] Chan S M, Rankin S M, Keeley L L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*; setogenesis and hemolymph levels of protein, ecdysteroid and glucose [J]. The Biological Bulletin, 1988, 175(2):185–192.

Cloning and expression analysis of farnesoic acid *O*-methyl transferase (*FAMeT*) gene during molting in *Portunus trituberculatus*

XIE Xi, ZHU Dongfa*, CUI Xiaoyu, TANG Jie, QIU Xier

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To study the regulatory role of farnesoic acid *O*-methyl transferase (*FAMeT*) in molting process of crustaceans, the full-length *FAMeT* cDNA (GenBank accession number: KC192659) of *Portunus trituberculatus* is cloned by using reverse transcript PCR (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). *FAMeT* cDNA contains a 201 bp 5'-untranslated region (5'-UTR), a 318 bp 3'-untranslated region (3'-UTR) and a 825 bp opening reading frame, which encodes 274 amino acid residues. Alignment of deduced amino acid sequence with *FAMeT* amino acid sequences of other crustaceans revealed that it shares the highest identity with *P. pelagicus* among the identities ranging from 75% to 97%. The amino acid residues consist of two copies of CF (CPAMD8/*FAMeT*) domain, which are the hallmark domain of *FAMeT* and are present in all crustacean *FAMeT*s. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to quantify the relative expression level of *FAMeT* in different tissues and at molting stages in *P. trituberculatus*. The results showed that *FAMeT* was expressed in various tissues. The mRNA level of *FAMeT* was the highest in taoracic ganglia, followed by gill and mandibular organ (MO). During the molting process, the expression of *FAMeT* in MO increased to the maximum at D₁ stage, then gradually decreased to the minimum at D₄ stage. The results suggest that *FAMeT* plays an important role in molting regulation in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; farnesoic acid *O*-methyl transferase (*FAMeT*); gene cloning; molting stage; expression level

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