

## 中华绒螯蟹 *EcR* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析

王 瑶, 杨志刚, 沈 城, 姚琴琴, 曾奇韬, 刘启彬, 成永旭\*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为了研究蜕皮激素受体 (*EcR*) 在中华绒螯蟹蜕皮和性腺发育过程中的作用, 本实验采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 以及 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术, 克隆了中华绒螯蟹 *EcR* 基因全长 cDNA 序列。运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法, 分析该基因在不同组织、蜕皮过程及卵巢发育阶段的表达特征, 并研究了甲基法尼酯 (MF) 对卵巢中 *EcR* 的调控作用。结果显示, 中华绒螯蟹 *EcR* cDNA 全长 2 156 bp, 编码 422 个氨基酸, 其序列与招潮蟹相似性最高, 为 89%。荧光定量 PCR 结果显示, *EcR* 在 Y 器官中表达量最高; 在卵巢和肌肉中少量表达; 在肝胰腺、鳃、心脏、胃、肠、胸神经节和脑神经节中微量表达。在中华绒螯蟹不同蜕皮时期中, Y 器官中 *EcR* 表达量在 D 期和 E 期的表达量最高; 肝胰腺中 *EcR* 表达量从 AB 期到 D 期有上升的趋势, 到 E 期有所降低; 肌肉中 *EcR* 表达量在 AB 期最高; 鳃中 *EcR* 表达量在 D 期最高。在中华绒螯蟹卵巢发育过程中, *EcR* 在卵巢发育 I ~ IV 期的表达量有上升趋势, 到 V 期表达量降低; 体外注射实验中, MF1 (注射 1  $\mu\text{g}$ ) 组的 *EcR* 表达量与对照组和生理盐水组无显著差异, 而 MF2 (注射 2  $\mu\text{g}$ ) 组的 *EcR* 表达量显著上升; 离体培养实验中, MF1 组 ( $10^{-8}$  mol/L) 和 MF2 组 ( $10^{-7}$  mol/L) 显著高于对照组和生理盐水组。研究表明, *EcR* 基因在中华绒螯蟹蜕皮和卵巢发育过程有重要作用, MF 可以调控 *EcR* 基因在卵巢中的表达。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 蜕皮激素受体 (*EcR*); 基因克隆; 蜕皮; 卵巢发育; 甲基法尼酯

**中图分类号:** Q 785; S 966.1

**文献标志码:** A

甲壳动物的生长和繁殖受多种激素的共同调控<sup>[1-2]</sup>。蜕皮激素 (ecdysteroid hormones, EH) 是甲壳动物发育过程中最重要的激素之一, 促进甲壳动物蜕皮活动<sup>[3]</sup>。此外, 蜕皮激素在调节甲壳动物卵黄生成、卵巢成熟和蛋白合成中也起着重要作用<sup>[4-5]</sup>。在许多甲壳动物中, 已经发现卵巢在发育过程中有蜕皮甾类物质的积聚作用<sup>[6-11]</sup>。

蜕皮激素受体 (ecdysteroid receptor, *EcR*) 属于核受体超家族 (nuclear receptor super family) 成员<sup>[12]</sup>, 与其他核受体一样, *EcR* 需要与另外一种高度保守的核受体——维甲类 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 形成异源二聚体, 进而调节下一步的级联转录反应<sup>[13]</sup>。完成启动反应后, 蜕皮激素

即与 *EcR* 分离, 然后多巴脱羧酶、羽化激素基因等开始表达, 完成整个蜕皮过程<sup>[14-15]</sup>。*EcR* 在结构上可分为 6 个区, 从氨基端到羧基端依次为 A ~ F 区, 它们组成 4 个独立的功能结构域<sup>[17]</sup>。氨基端的 A/B 区为转录激活结构域, 该结构域保守性较低; C 区为高度保守的 DNA 结合结构域 (DBD); D 区为可变的铰链区; 羧基端 E/F 区含有配体结合区域 (LBD), 介导配体结合和二聚化过程<sup>[18]</sup>。

甲基法尼酯 (methyl farnesoate, MF) 由甲壳动物大颚器 (mandibular organ, MO) 分泌, 是一种保幼激素 (JH III) 的前体, 为甲壳动物体内的重要激素, 能够调控甲壳动物的生长及繁殖等多种

收稿日期: 2014-01-05 修回日期: 2014-03-07

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A409-5); 国家农业科技成果转化项目 (2012GB2C000147); 国家自然科学基金 (40806068, 41276158); 上海教委知识服务平台项目 (ZF1206); 上海市科委非政府合作项目 (11320706400; 13340721500)

通信作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

生理活动<sup>[19-21]</sup>。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 又称河蟹, 属甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 方蟹科 (Grapsidae), 绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 是我国一种重要的经济蟹类。近年来, 我国的中华绒螯蟹养殖产业规模不断扩大, 而蜕皮和性腺发育却成为影响中华绒螯蟹品质和产量的关键问题。针对中华绒螯蟹 *EcR* 基因功能的研究主要集中在胚胎发育过程、附肢再生以及蜕壳过程, 而在卵巢发育过程中的功能研究相关报道较少。本实验首次克隆了中华绒螯蟹 *EcR* 基因, 并比较了该基因在不同蜕皮时期及卵巢发育过程中的相对表达量, 同时研究了 MF 对中华绒螯蟹卵巢 *EcR* 的调控作用, 旨在了解中华绒螯蟹 *EcR* 基因的结构以及该基因在蜕皮和卵巢发育过程的作用, 为今后进一步研究中华绒螯蟹 *EcR* 的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

中华绒螯蟹取自上海海洋大学竖新养殖基地, 在实验室用循环水暂养, 喂食商业饲料。一龄未成熟的中华绒螯蟹 (8~10 g), 根据 Darch 的蜕皮分期方法, 将中华绒螯蟹分为蜕皮后期 (AB 期)、蜕皮间期 (C 期)、蜕皮前期 (D 期) 和蜕皮期 (E 期)。各取 3 只 AB 期、D 期及 E 期的中华绒螯蟹的 Y 器官、肝胰腺、鳃和肌肉组织, 用于蜕皮周期中 *EcR* 表达量变化分析。随机取 3 只处于 C 期的中华绒螯蟹 (50~60 g), 取卵巢、肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、Y 器官、胸神经节和脑神经节等组织, 用于组织表达分析。根据堵南山<sup>[22]</sup>的研究结果, 将中华绒螯蟹卵巢发育划分为 I~V 期 5 个阶段, 采集各发育阶段的卵巢组织, 用于卵巢发育过程中 *EcR* 表达水平变化分析。所有组织用液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱保存。

### 1.2 体外注射 MF 对中华绒螯蟹卵巢 *EcR* 表达量的影响

挑选体质健壮, 规格统一的中华绒螯蟹 (50~60 g) 进行实验, 于第三步足基节与底节的关节膜处注射。实验分 4 组, 对照组不进行注射, 生理盐水组注射 100 μL 生理盐水 (NaCl 14.5 g, KCl 0.355 g, CaCl<sub>2</sub> 0.899 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.58 g, CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 1.19 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.25 g, MgCl<sub>2</sub> ·

6H<sub>2</sub>O 0.85 g, HEPES 2.38 g, 500 mL 超纯水, pH 值 7.2), MF1 组注射 1 μg MF (International laboratory, 1 μg MF 加入 100 mL 生理盐水中), MF2 组注射 2 μg MF (2 μg MF 加入 100 mL 生理盐水中), 每 5 天注射一次, 连续注射 5 次。在实验第 20 天, 取中华绒螯蟹的卵巢组织, 并保存于 -80 °C 冰箱用于 RNA 提取。

### 1.3 离体培养 MF 对中华绒螯蟹卵巢 *EcR* 表达量的影响

在无菌的操作环境中, 取出中华绒螯蟹卵巢组织置于新洁尔灭 (上海威奥生物) 中剪碎成为 1~3 mm<sup>3</sup> 左右的小块, 将剪碎组织块吸入玻璃培养板, 每孔加 L-15 培养液 (博士德生物) 4 mL。实验分 4 组, 对照组不进行处理, 生理盐水组加入 1 μL 生理盐水, MF1 组加入 10<sup>-8</sup> mol/L MF, MF2 组加入 10<sup>-7</sup> mol/L MF。黑暗条件下置于振荡器中培养, 振荡频率为 50~60 r/min, 培养温度为 26 °C, 培养时间为 24 h。提取各卵巢 RNA 用于检测 *EcR* 基因表达水平。

### 1.4 总 RNA 的提取与反转录反应

取冻存的中华绒螯蟹各组织, 参照 RNAiso<sup>TM</sup> Plus (TaKaRa) 操作说明书进行总 RNA 的提取, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性、紫外分光光度计 (Q5000) 检测 RNA 纯度。

根据 Primscript<sup>TM</sup> Reverse transcriptase (TaKaRa) 说明书操作, 取 1 μg 中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA, 用于 PCR 的扩增; 利用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成 cDNA 第一链, 作为基因 3' 和 5' 端序列快速扩增的模板。其余 RNA 置于 -80 °C 冰箱中保存, 用于荧光定量 PCR 反应。

### 1.5 引物设计和 PCR 扩增反应

根据 GenBank 中拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) *EcR* 基因 (JQ821372.1) 保守区序列设计上、下游引物 HXEcR-1/HXEcR-2, 引物由上海生工生物工程有限公司合成 (表 1)。以中华绒螯蟹的 cDNA 为模板, HXEcR-1/HXEcR-2 为引物进行 *EcR* 基因 cDNA 片段的扩增。

PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, *rTaq* 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 加灭菌超纯水至总体积 25

$\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 PCR 扩增产物 3  $\mu\text{L}$  经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

### 1.6 *EcR* 基因 cDNA 的克隆

将目的片段产物按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Tiagen)说明书进行回收纯化后,取 1  $\mu\text{L}$  回收产物与 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 连接,连接产物经热激后转化至大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中,转化产物在 37  $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 条件下振荡培养 1 h 后涂布于含有 X-Gal、IPTG 以及氨苄的 LB 固体培养基上,置恒温培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养(12 ~ 16 h)。次日在长出的蓝白斑菌落中挑选白斑,接种于含氨苄的 LB 液体培养基中继续振荡培养 4 h 后,进行菌液 PCR 验证并筛选出阳性克隆后由上海生工生物工程有限公司进行测序。

根据已获得的 *EcR* 基因片段设计 3'-RACE 上游引物 HXEcR-3、5'-RACE 下游引物 HXEcR-4 (表 1),以 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit(Clontech) 反转录合成的 cDNA 第一链为模板,用 3'-RACE 和 5'-RACE 引物与 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物 (UPM) 配对,并按照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 *EcR* 基因 3' 和 5' 端序列的扩增。PCR 扩增产物的回收纯化、克隆和测序与 *EcR* 基因片段的克隆所述相同。

### 1.7 序列的拼接与生物信息学分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。利用 ORF (open reading frame) finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找开放阅读框;用 BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))、ClustalW 及 DNAMAN 等软件进行序列的验证、翻译及蛋白质相似性分析;使用 Compute pI-Mw ([http://cn.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)) 进行蛋白质等电点和相对分子质量的计算。用 MEGA 4.0 软件进行 NJ 系统进化树的构建。

### 1.8 *EcR* 基因的组织表达分析

以获得的基因序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对用于定量 PCR 的特异性引物 HXEcR-5/HXEcR-6 (表 1),对 *EcR* 基因的表达进行检测,并根据 GenBank 中华绒螯蟹  $\beta$ -actin 基因全长序列 (GenBank accession no. HM053699.1) 设计一对内参引物  $\beta$ -actin-1/ $\beta$ -actin-2 (表 1)。利用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 序列检测系统进行定量 PCR 扩增反应,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 10  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ); 0.4  $\mu\text{L}$  PCR Forward Primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ); 0.4  $\mu\text{L}$  PCR Reverse Primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ); 0.4  $\mu\text{L}$  ROX; 2.0  $\mu\text{L}$  cDNA 模板; 6.8  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O。反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  34 s, 40 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s; 样品和内参分别设 3 个重复, $\beta$ -actin 为内参。荧光定量 PCR 数据分析采用相对  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法,用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

表 1 核苷酸引物序列  
Tab.1 Oligo nucleotide primer sequence

引物名称 primer name	核苷酸序列 (5'-3') primer sequence	用途 usage
Universal Primer Mix (UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
HXEcR-1	AGCGAGAAGACCAGATTACCCT	RT-PCR
HXEcR-2	CAGCAACCAGCAACATCCCAGA	RT-PCR
HXEcR-3	TCCTCACAGAGTTGCGGACCCTTGG	3'-RACE
HXEcR-4	CAAACACCATGTGAGACCGAGGCAGT	5'-RACE
HXEcR-5	GGTGGACAACGCAGAGTATG	real-time PCR
HXEcR-6	TGAATGTGAGGGAGAAGCA	real-time PCR
$\beta$ -actin-1	ACCTCGTTCTATTTGTTCGG	real-time PCR
$\beta$ -actin-2	ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC	real-time PCR

## 2 结果

### 2.1 *EcR* 基因片段 cDNA 的序列分析

以中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为模板扩增获

得的 cDNA 序列全长 2 156 bp, 其中包括 131 bp 的 5' 非编码区 (UTR), 756 bp 的 3' 非编码区 (UTR), 开放阅读框 (ORF) 长 1 269 bp, 编码 422 个氨基酸, 加尾信号 (AATAAA) 以及 Poly-A 尾

(图2)。序列编码的蛋白理论等电点为 8.85, 分子量为 48.11 ku。经 BLASTn、BLASTx 以及多序列比对表明,此氨基酸序列与拟穴青蟹、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、美洲海螯虾 (*Homarus americanus*) 以及日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 等的 *EcR* 氨基酸序列具有高度的相似性(图3),且具有 *EcR* 基因的典型结构,由此确定此序列为中华绒螯蟹 *EcR* 基因片段的 cDNA 序列。

## 2.2 同源性分析以及蛋白系统进化树的构建

将中华绒螯蟹 *EcR* 氨基酸序列与招潮蟹

(*Uca pugilator*)、拟穴青蟹、美洲海螯虾、三疣梭子蟹、蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)、褐虾 (*Crangon crangon*)、大型蚤 (*Daphnia magna*) 以及赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、埃及伊蚊 (*Aedes albopictus*) 等 *EcR* 氨基酸进行对比,其相似性分别为 89%、87%、87%、83%、83%、7%、66%、65% 和 57%。利用 MEGA 4.0 软件的 NJ 法将上述相关氨基酸序列构建系统进化树,结果显示昆虫 *EcR* 聚为一支,甲壳动物 *EcR* 聚为另一支,其中,中华绒螯蟹 *EcR* 与招潮蟹 *EcR* 聚为一支,亲缘关系最近(图3)。

```

1ATGGGGCTGTCTGTCTCGAAGGGTTGTGTGTTCTCGCGCACTCCGGTTATTTCCCTTC
61TAATCCTTACGTAAAAGTTGTCGGGAAATCGGTGTAACAAAAAGCTCATAATTGTAAGAAG
121GGCGAGATGACATGTCGCGCCCTCATCGCTGAGTAACTACGGTGCCGACTCCTACGGCG
1      M S P P S S L S N Y G A D S Y G D      A/B区
181 ACCTGAAGAAGAAGAAAGGCCCATCCCGCGCCAGCAGGAGGAGTTGTGTCTGGTGTGCG
18      L K K K K G P I P R Q      Q E E L C L V C G
241 GCGACAGGGCATCGGGCTACCACTACAACGCCCTCACCTGTGAAGGATGCAAAGGTTTCT
38      D R A S G Y H Y N A L T C E G C K G F F
                               P-box
301 TCCGGAGATCCATCACGAAGAATGCCGTGTACCAGTGTAATATGGCAACAACCTGTGAGA
58      R R S I T K N A V Y Q C K Y G N N C E M
                               D-box      C区
361 TGGATATGTACATGCGGCGCAAGTGTCAAGAGTGTGCGCTCAAAAAGTGTCTCAACGTGG
78      D M Y M R R K C Q E C R L K K C L N V G
421 GCATGCGGCCAGAATGTGTTGTGCCGAGTCTCAGTGCCAGGTGAAGAGAGAACAGAAAA
98      M R P E C V V P E S Q C Q V K R E Q K K

481 AGGCACGAGACAAGGACAAAAAGGATTACCCGAGCCTAGGGTCCCCTATAGCCGAGGACA
118     A R D K D K K D Y P S L G S P I A E D K
541 AGGCTGGCCCATTAGTCCAGTGAGTAAAGATTGTAATCCAAAGGTCCATCAACTGCGT
138     A G P I S P V S K D C K S K G P S T A C      D区
601 GTGCTATGCAGTTCAAAAATCTTGTTGACAGCTCTAGCAACGTTCACTCTCCTATGTCAG
158     A M Q F K N L V D S S S N V Q S P M S A
661 CCATGCAGCGGACAACCACCAAGCCACTCACGCGGGAGCAGGAGGAGCTGATCAATACTC
178     M Q R T T T K P L T R E Q E E L I N T L
721 TAGTCTACTACCAAGAAGAGTTTGAACAGCCAACCTGAAGCGGATATAAAGAAGATCAGAT
198     V Y Y Q E E F E Q P T E A D I K K I R F
781 TTAACCTTCGATGGTGAAGATACAAGTGACATGAGATTCAGGCACATAACCGAGATGACGA
218     N F D G E D T S D M R F R H I T E M T I
841 TCCTCACAGTTCAGTTCATAGTGAATTCTCCAAGCAACTACCAGGTTTCGCCACACTTC
238     L T V Q L I V E F S K Q L P G F A T L Q
901 AACGAGAAGACCAGATTACCCTGCTCAAGGCTTGTTATCAGAGGTAATGATGCTTCGAG
258     R E D Q I T L L K A C S S E V M M L R A
961 CAGCCCGCGTTATGATTCCAAGACAGATTGCATTGTGTTGGAAACAGCTTCCCCTACA
278     A R R Y D S K T D C I V F G N S F P Y T      E/F区
1021 CACAAGCCTCCTATGCACTAGCTGGCTTGGGAGATTCAGCAGAGGTAATCTTCCGTTTCT
298     Q A S Y A L A G L G D S A E V L F R F C
1081 GCCGTAGCCTTTGTAATAAGAGGTGGACAACGCAGAGTATGCACTACTAGCTGCCATAG
318     R S L C K M K V D N A E Y A L L A A I A
1141 CTATTTCTCAGAGAGGCCAAACCTAAAGGAACCTCAAAAAGGTGGAAAACTTCAGGAAA
338     I F S E R P N L K E L K K V E K L Q E I

```

```

1201 TCTACCTGAAGCATTGAAGTCTTATGTAGAGAATCGACGACTGCCTCGGTCTCACATGG
358 Y L E A L K S Y V E N R R L P R S H M V
1261 TGTTCGGAAGTTGCTTAATATCCTCACAGAGTTGCGGACCCTTGAAATATTAACCTCAG
378 F A K L L N I L T E L R T L G N I N S E
1321 AGATGTGCTTCCCTCACATTCAAGAAACAAAAGACTCCCACCCTTCTGGCTGAGATCT
398 M C F S L T F K N K R L P P F L A E I W
1381 GGGATGTTTCTGGATACTTGAGCCTCAGCCACCTCCCGGGTGCCATATTACCGAGGTA
418 D V S G Y *
1441 TGTGGCGCAAGAAGTTGTGAGCCCTCTGGGGTGGTGGATGGACTCTACACTATGTAC
1501 CTGCAGGCTGTGAGTGAGAGACTGTTGATGCTGTGGCAGCAGCTTACACTGCCACCCAG
1561 GGCCACTTTCAGCCACTTGACGTGTCTATGGTTCAGGCCACAGTGAATGTGCCGTGTA
1621 GCACTCCACTAGTGAATGTGAGTGATAATGATGCACTTTAGATGTGAAGGGCAGCAGT
1681 ATGGGCATTGTAGCCATTTTTTATAACACATTTTATAAACCTTCAAATATAATGAAAAT
1741 GGTGTGTGATTGACTGTTTCATATACATATACCTACATGTATGTGTAATAATGTTTTTGC
1801 TATATAATTTTTTATATATAATATATAAGAGTAAAAAGGGCTACATTGCACTGTTGCTC
1861 AGACACTGCGCAAGCCACATTCTGGCAGGCAACGAACCTCCCGTGCCTTGCTTACGGTCA
1921 AGTCTCTGTTTCTACACTATTCTCAAGGTGCTCTGCGGGACTGAGGAGAGGGGAATTT
1981 AAACACAAGGAACAGTGCATGCTTCTGATCATATTTTTATGAAATCTTGTTAATTT
2041 AATGAGCTGGTATGCCGCTCTACAAGTAGACAACACTACTGAAAATGTATTATACTGTA
2101 ATGTTATTAATACTGCTATGAAGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAA

```

图1 中华绒螯蟹 EcR 基因全长 cDNA 核苷酸序列及其氨基酸序列推测

EcR 基因具有加尾信号 AATAAA,出现在距 Poly(A)尾 8 bp 处,用双下划线标出。A/B 区和 D 区分别用方框标出,A/B 区和 D 区之间的结构域为 C 区,D 区后面的结构域为 E/F 区。C 区的 P 盒、D 盒用阴影标出,单下划线为 8 个半胱氨酸残基

Fig.1 cDNA nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. sinensis* EcR gene

The EcR poly(A) addition signal AATAAA begins 8 bp from the poly(A) tail are double underlined. The functional domains A/B and D are indicated with boxes, between domains A/B and D is domain C, and behind domain D is domain E/F. The shadows stand for P-box, D-box. The eight cysteine residues are single underlined.

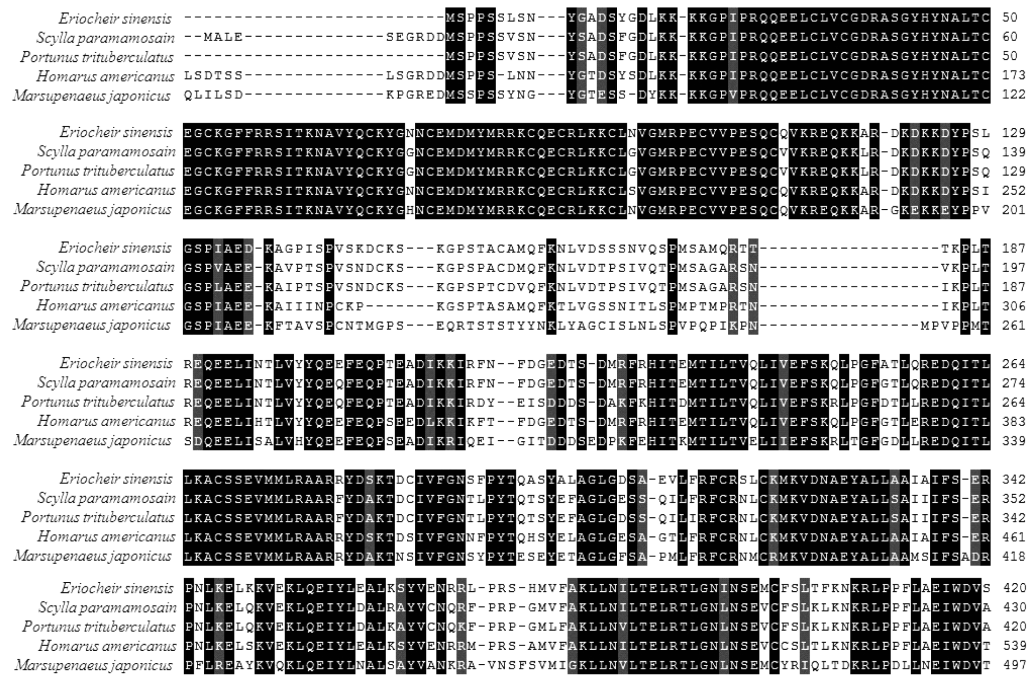


图2 中华绒螯蟹 EcR 氨基酸序列与其他物种 EcR 氨基酸序列比较

Fig.2 EcR amino acid sequences comparison of *E. sinensis* with different species

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis* (中华绒螯蟹: KF732874), *Scylla paramamosain* (拟穴青蟹: AFN08659.1), *Portunus trituberculatus* (三疣梭子蟹: AGH55535.1), *Homarus americanus* (美洲海螯蟹: AEA29831.1), *Marsupenaeus japonicus* (日本囊对虾: BAF75375.1)

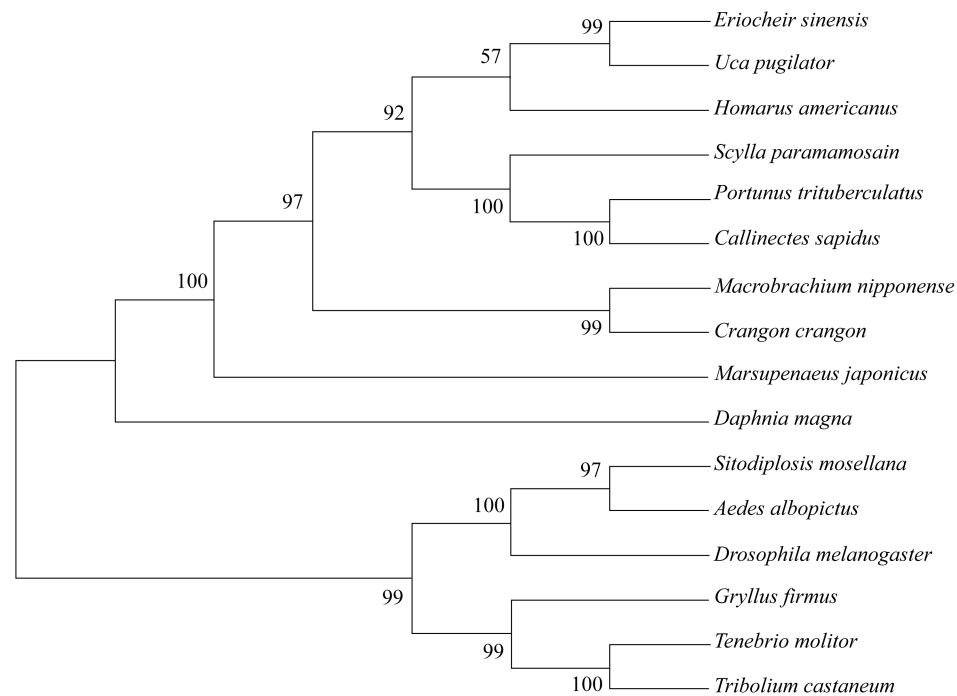


图 3 利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 *EcR* 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on *EcR* amino acid sequences using MEGA 4.0

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis* (中华绒螯蟹: KF732874), *Scylla paramamosain* (拟穴青蟹: AFN08659.1), *Portunus trituberculatus* (三疣梭子蟹: AGH55535.1), *Homarus americanus* (美洲海螯虾: AEA29831.1), *Uca pugilator* (招潮蟹: AAC33432.2), *Callinectes sapidus* (蓝蟹: AET06179.1), *Marsupenaeus japonicus* (日本囊对虾: BAF75375.1), *Macrobrachium nipponense* (日本沼虾: AHA33386.1), *Crangon crangon* (褐虾: ACO44665.1), *Daphnia magna* (大型蚤: BAF49030.1), *Sitodiplosis mosellana* (麦红吸浆虫: AGV06207.1), *Drosophila melanogaster* (黑腹果蝇: AAA28498.1), *Aedes albopictus* (埃及伊蚊: AAF19032.1), *Gryllus firmus* (沙蟋: ADT64887.1), *Tenebrio molitor* (黄粉虫: CAA72296.1), *Tribolium castaneum* (赤拟谷盗: NP\_001107650.1)

### 2.3 中华绒螯蟹 *EcR* 基因的表达分析

以 HXEF-5/HXEF-6 为荧光定量 PCR 引物, 中华绒螯蟹卵巢、肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、Y 器官、腹神经节和脑神经节 10 个组织的 cDNA 为模板,  $\beta$ -actin 为内参基因, 利用荧光定量 PCR 方法研究中华绒螯蟹 *EcR* mRNA 的组织表达特征, 设定中华绒螯蟹 *EcR* 基因在肠中的表达量为 1, 根据 *EcR* 基因在各个组织中的相对表达量作柱形图 (图 4)。从图中可以看出, *EcR* 基因在所有检测的组织中均有表达, 且在中华绒螯蟹 Y 器官中表达量最高, 与其他组织的表达量均呈显著差异 ( $P < 0.05$ ); 卵巢和肌肉中有少量表达 ( $P < 0.05$ ); 肝胰腺、鳃、心脏、胃、肠、胸神经节和脑神经节中有微量表达。

取不同蜕皮时期中华绒螯蟹典型的 4 个组织 Y 器官、肌肉、肝胰腺和鳃, 利用荧光定量 PCR 方法检测 *EcR* mRNA 在这些组织中的表达情况。设定中华绒螯蟹 *EcR* 基因在 E 期鳃中的表达量

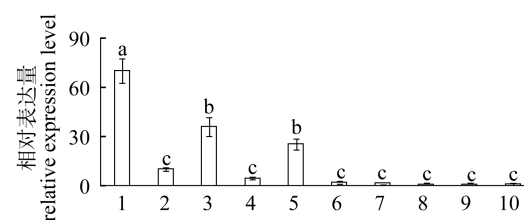


图 4 中华绒螯蟹 *EcR* 基因在各组织中的相对表达情况

1. Y 器官; 2. 肝胰腺; 3. 卵巢; 4. 鳃; 5. 肌肉; 6. 心脏; 7. 胃; 8. 肠; 9. 胸神经节; 10. 脑神经节  
不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ). 以下注释同

Fig. 4 The relative expression of *EcR* gene in different tissues of *E. sinensis*

1. Y-organ; 2. hepatopancreas; 3. ovary; 4. gill; 5. muscle; 6. heart; 7. stomach; 8. intestine; 9. thoracic ganglia; 10. cerebral ganglion

Expression levels of *EcR* gene was calculated as a ratio relative to  $\beta$ -actin in the same sample of three individuals, and as fold expression based on intestine. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD. Different letters indicate the significant difference at  $P < 0.05$  with respect to control. The same as the following

为1,根据 *EcR* 基因在各蜕皮时期4个组织中的相对表达量作柱形图(图5)。荧光定量PCR结果显示在中华绒螯蟹不同蜕皮时期中,Y器官中 *EcR* 基因表达量在D期和E期的表达量最高,与AB期、C期呈显著性差异( $P < 0.05$ );肝胰腺中 *EcR* 基因表达量从AB期到D期有上升的趋势,到E期有所降低;肌肉中 *EcR* 基因表达量在AB期最高,与其他各蜕皮时期呈显著性差异( $P < 0.05$ );鳃中 *EcR* 基因表达量在D期最高,显著高于其它各蜕皮时期( $P < 0.05$ )。

设定中华绒螯蟹 *EcR* 基因在I期卵巢的表达量为1,根据 *EcR* 基因在不同发育时期中卵巢的相对表达量作柱形图(图6),荧光定量PCR结果显示,在中华绒螯蟹不同卵巢发育时期中,*EcR* 基因在卵巢发育I~IV期的表达量有上升趋势,到V期表达量降低。设定中华绒螯蟹 *EcR* 基因在对

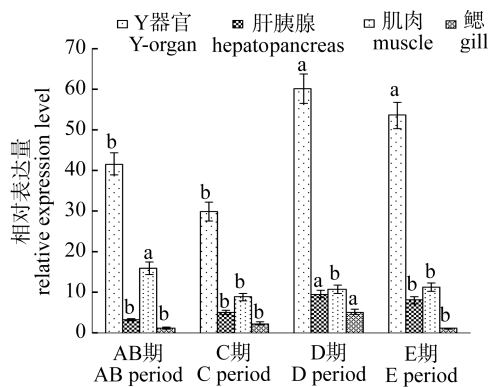


图5 *EcR* 基因在不同蜕皮时期中华绒螯蟹4个组织中的相对表达情况

Fig. 5 The relative expression of *EcR* gene in four tissues of *E. sinensis* in different molting periods

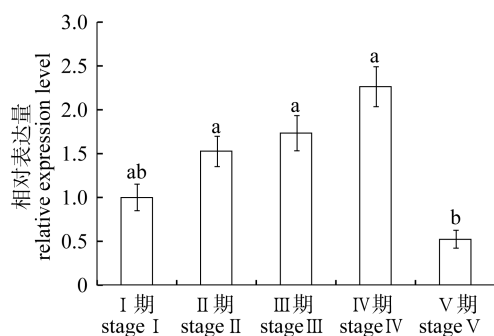


图6 *EcR* 基因在中华绒螯蟹卵巢发育过程中的相对表达情况

Fig. 6 The relative expression of *E. sinensis EcR* gene in different ovarian development stage

照组的表达量为1,根据 *EcR* 基因在各实验组中的相对表达量作柱形图(图7),由图中可以看出,在体外注射实验中,MF1组的 *EcR* 基因表达量与对照组和生理盐水组无显著差异,而MF2组的 *EcR* 基因表达量显著上升( $P < 0.05$ );离体培养实验中,MF1组和MF2组显著高于对照组和生理盐水组( $P < 0.05$ )(图8)。

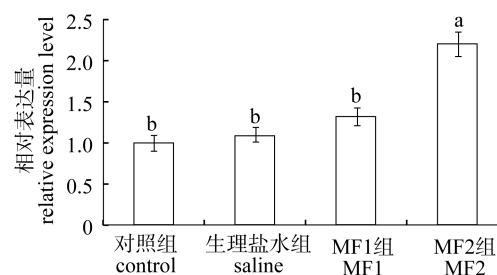


图7 注射MF对中华绒螯蟹卵巢*EcR* 基因相对表达量的影响

Fig. 7 Effect of MF injection on *E. sinensis* ovarian *EcR* gene relative expression

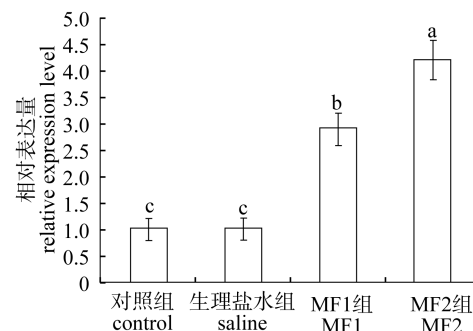


图8 MF对中华绒螯蟹离体培养卵巢中*EcR* 基因相对表达量的影响

Fig. 8 Effect of MF on *E. sinensis* ovarian *EcR* gene expression in vitro

### 3 讨论

本研究首次从中华绒螯蟹中克隆得到 *EcR* 基因的全长 cDNA 序列。通过在 GenBank 中进行 BLAST 同源性比对,中华绒螯蟹 *EcR* 与其他甲壳动物以及昆虫的 *EcR* 氨基酸序列有着很高的相似性。在蛋白保守区数据库 (conserved domain database, CDD) 对 *EcR* 进行蛋白保守区预测,显示其具有 *EcR* 核受体家族蛋白所具有的 A~F 区 5 个功能结构域的完整结构。从 N 端到 C 端,中华绒螯蟹 *EcR* 氨基酸序列的 C 区存在高

度保守的 P-box (EGCKG) 和 D-box (KYGNN) 两个典型的特殊结构,其中 P-box 决定着与 DNA 的结合的特异性,D-box 与同型二聚体的形成有关,从而保证了调控识别应答元件、形成二聚体的功能<sup>[12]</sup>;此外,C 区含有由两个锌原子与 8 个半胱氨酸残基形成的 C4 锌指结构。这与该基因在其他甲壳动物中的研究结果相同<sup>[23]</sup>。从系统进化树中发现,甲壳动物的 *EcR* 聚为一支,其中中华绒螯蟹与招潮蟹聚为一支,表明它们亲缘关系最近(图 3),符合物种的分子进化关系。由此,初步确定此序列为中华绒螯蟹 *EcR* 序列。

*EcR* 基因在在中华绒螯蟹 Y 器官、卵巢、肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、腹神经节和脑神经节中均有表达(图 4),这与 *EcR* 基因在其他甲壳动物中的表达情况一致<sup>[10-12,24-26]</sup>。Y 器官,又称蜕皮腺,是非神经上皮内分泌腺之一,是控制甲壳动物蜕皮的内分泌器官,通过分泌蜕皮激素控制动物的蜕皮、生长和繁殖等行为<sup>[27]</sup>。作为蜕皮激素的受体,*EcR* 基因在中华绒螯蟹 Y 器官中表达量显著高于其他组织,日本囊对虾、三疣梭子蟹和蓝蟹中的研究结果也发现 *EcR* 基因在甲壳动物的蜕皮过程有重要作用<sup>[24,26,28]</sup>,推测 *EcR* 基因参与中华绒螯蟹蜕皮过程。

为了研究 *EcR* 基因在中华绒螯蟹蜕皮过程中的作用,本实验进一步研究了 *EcR* mRNA 在中华绒螯蟹不同蜕皮时期的 Y 器官、肝胰腺、鳃和肌肉组织中的表达量(图 5)。在不同蜕皮时期中,Y 器官中 *EcR* 基因表达量在 D 期和 E 期的表达量最高,说明 *EcR* 基因确实与中华绒螯蟹个体的蜕皮过程有关。*EcR* 作为蜕皮激素的受体,通过与 RXR 形成异源二聚体,进而与 20-羟基蜕皮酮结合,启动下游基因的表达,间接介导中华绒螯蟹蜕皮过程<sup>[24]</sup>。肝胰腺中 *EcR* 基因表达量从 AB 期到 D 期有上升的趋势,到 E 期有所降低,其在蜕皮周期中表达水平的变化与血淋巴中 20-羟基蜕皮酮的滴度变化趋势呈现出一致性<sup>[8]</sup>。在招潮蟹的研究中,通过 Northern 印迹检测到在蜕皮周期的肝胰腺中,*EcR* 转录本浓度在 C 期处于较低水平,而在 D 期开始有明显的增加,并在 AB 期处于低水平状态,也与蜕皮激素在血淋巴中的水平变化相一致,说明 *EcR* 基因在肝胰腺的不同表达水平与蜕皮激素在血淋巴中的变化水平相关<sup>[17,29]</sup>。此外,在对日本囊对虾的研究中也发

现,不同蜕皮阶段的肝胰腺中,*EcR* 基因的表达水平与蜕皮周期具有明显的相关性。肌肉中 *EcR* 表达量在 AB 期最高,与日本囊对虾中结果一致<sup>[24]</sup>,且与其异源二聚体 RXR 在中华绒螯蟹中的研究结果相似<sup>[30]</sup>;鳃中 *EcR* 表达量与蜕皮激素在中华绒螯蟹蜕皮过程中表达趋势也是相一致的<sup>[8]</sup>。

目前对 *EcR* 功能的研究主要集中在蜕皮、四肢再生及蜕皮激素信号转导<sup>[17,31-32]</sup>等方面,在卵巢发育方面的研究较少。有研究表明,蜕皮激素在甲壳动物类卵黄发生过程中有重要作用<sup>[4]</sup>。在招潮蟹中的研究,*EcR* 的表达量从卵巢未发育期开始不断增加并且在成熟期达到最大值<sup>[17]</sup>;在三疣梭子蟹的研究中也发现 *EcR* 可能参与卵巢发育和卵黄发生<sup>[26]</sup>。本实验研究了 *EcR* 基因在中华绒螯蟹不同卵巢发育时期中的表达水平的变化,结果显示 *EcR* 基因表达量在卵巢发育 I ~ IV 期有上升趋势,到 V 期有所下降(图 6)。Okumura 等<sup>[27]</sup>研究表明,卵黄发生过程中,在血淋巴中的蜕皮激素进入到卵巢,因而卵巢中存在较高滴度的蜕皮激素,所以其作用受体 *EcR* 的表达水平也相应较高<sup>[7]</sup>,推测 *EcR* 与中华绒螯蟹卵巢发育过程有关。

甲基法尼酯(MF)是甲壳动物体内的重要激素,能够调控甲壳动物的生长及繁殖等多种生理活动。有研究认为,MF 通过调控 20E 从而提高 *EcR*-RXR 异源二聚体转录因子的活性,进而促进卵巢发育过程发生<sup>[33]</sup>。先前的实验已经证实,MF 对中华绒螯蟹卵巢发育有调控作用,且对 *EcR* 的异源二聚体配体 RXR 基因在卵巢中的表达有促进作用。本实验通过体外注射和离体培养方法研究了 MF 对 *EcR* 的调控作用,发现 MF 可以调控 *EcR* 在中华绒螯蟹卵巢中的表达,但其具体功能和作用机制还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Zhu X M, Li S J. Regulation of molting in crustacean larvae [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25 (4): 380 - 384. [朱小明,李少菁. 甲壳动物幼体蜕皮的调控. 水产学报, 2001, 25(4): 380 - 384.]
- [2] Shen Y C, Chen Z Z, Liu L, et al. The effects of salinity and nutrition on molt and growth of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 291 - 299. [申玉春,陈作洲,刘



- 丽等. 盐度和营养对凡纳滨对虾蜕皮和生长的影响. 水产学报, 2012, 36(2): 291 - 299. ]
- [ 3 ] Hopkins P M. Hormonal control of the molt cycle in the fiddler crab, *Uca pugilator* [ J ]. American Zoologist, 1992, 32(3): 450 - 458.
- [ 4 ] Subramoniam T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology, 2000, 125(2): 135 - 156.
- [ 5 ] Brown M R, Sieglaff D H, Rees H H. Gonadal ecdysteroidogenesis in arthropoda; occurrence and regulation [ J ]. Annual Review Entomology, 2009, 54: 105 - 125.
- [ 6 ] Styrihave B, Lund T, Andersen O. Ecdysteroids in female shore crabs *Carcinus maenas* during the moulting cycle and oocyte development [ J ]. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 2008, 88(3): 575 - 581.
- [ 7 ] Okumura T, Han C-H, Suzuki Y, *et al.* Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* [ J ]. Zoological Science, 1992, 9(1): 37 - 45.
- [ 8 ] Luo R S, Wang Y L, Cao X M, *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-羟蜕皮酮诱发蜕皮和卵巢发育的作用. 动物学报, 1990, 36(2): 157 - 164. ]
- [ 9 ] 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. ]
- [ 10 ] Young N J, Webster S G, Rees H H. Ecdysteroid profiles and vitellogenesis in *Penaeus monodon* ( Crustacea: Decapoda ) [ J ]. Invertebrate Reproduction & Development, 1993, 24 ( 2 ): 107 - 117.
- [ 11 ] Chan S M. Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* ( Crustacea Decapoda ) [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology, 1995, 112 ( 1 ): 51 - 59.
- [ 12 ] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression [ J ]. Physiological Reviews, 2001, 81(3): 1269 - 1304.
- [ 13 ] Durica D S, Hopkins P M. Expression of the genes encoding the ecdysteroid and retinoid receptors in regenerating limb tissues from the fiddler crab, *Uca pugilator* [ J ]. Gene, 1996, 171(2): 237 - 241.
- [ 14 ] Dhadialla T S, Carlson G R, Le D P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity [ J ]. Annual Review of Entomology, 1998, 43: 545 - 569.
- [ 15 ] Pail S R, Retnakaran A. Ecdysteroid and juvenile hormone receptors: properties and importance in developing novel insecticides [ J ]. Springer Berlin Heidelberg, 2001, 10: 107 - 132.
- [ 16 ] Chung A C, Durica D S, Clifton S W, *et al.* Cloning of crustacean ecdysteroid receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid [ J ]. Molecular Cell Endocrinology, 1998, 139(1-2): 209 - 217.
- [ 17 ] 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 Cell Endocrinology, 2002, 189(1-2): 59 - 76.
- [ 18 ] Devarakonda S, Harp J M, Kim Y C, *et al.* Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex [ J ]. The Embo Journal, 2003, 22 ( 21 ): 5827 - 5840.
- [ 19 ] Nagaraju G PC. Is methyl farnesoate a crustacean hormone [ J ]. Aquaculture, 2007, 272(6): 39 - 54.
- [ 20 ] Laufer H, Landau M, Homola E. Methyl farnesoate: Its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean [ J ]. Insect Biochemistry, 1987, 17(7): 1129 - 1131.
- [ 21 ] Laufer H, Borst D W, Baker F C, *et al.* Identification of a juvenile hormone like compound in a crustacean [ J ]. Science, 1987, 235(4785): 202 - 205.
- [ 22 ] Xue L Z, Du N S, Lai W. Histology of female reproductive system in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* ( Crustacea, Decapoda ) [ J ]. Journal of East China Normal University: Natural Science Edition, 1987, ( 3 ): 88 - 97. [ 薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究. 华东师范大学学报: 自然科学版, 1987, ( 3 ): 88 - 97. ]
- [ 23 ] Billas I M L, Browning C, Lawrence M C, *et al.* The structure and function of ecdysone receptors [ M ]. Ecdysone: Structures and Functions, Springer

- Netherlands,2009;335 – 360.
- [24] 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 japonicas* [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology,2007,148(2):139 – 150.
- [25] Chen H, Wang W Q, Zhu X L. Cloning of cDNA encoding EcR and its expression analysis during embryogenesis in the freshwater prawn, *Macrobrachium nipponens* [ 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.]
- [26] Cui X Y, Zhu D F, Tang J, *et al.* Cloning and expression analysis of ecdysteroid receptor (*EcR*) in *Portunustrituberculatus* [ 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.]
- [27] Skinner D M, Biiss D E, Mantei L H, *et al.* Moulting and regeneration [ M ]. The Biology of Crustacea. New York; Academic Press, 1985:43 – 46.
- [28] 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.
- [29] Chung A C, Durica D S, Hopkins P M. Tissue-specific patterns and steady-state concentration 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.
- [30] Wang Y, Yang Z G, Cheng Y X, *et al.* The full length cDNA cloning and expression analysis of RXR from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(12):1761 – 1769. [王瑶,杨志刚,成永旭,等. 中华绒螯蟹 RXR 基因全长 cDNA 克隆及表达分析. 水产学报,2013,37(12):1761 – 1769.]
- [31] Sunetra D, David S. D. Ecdysteroid receptor signaling disruption obstructs blastemal cell proliferation during limb regeneration in the fiddler crab, *Uca pugilator* [ J ]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013, 365(2):249 – 259.
- [32] Hwang D S, Lee J S, Lee K W, *et al.* Cloning and expression of ecdysone receptor (EcR) from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus* [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology, 2010, 151(3):303 – 312.
- [33] Wang Y H, Wang G, Leblanc, G A. Cloning and characterization of the retinoid X receptor from a primitive crustacean *Daphnia magna* [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 2(15):309 – 318.

## 《水产学报》创刊 50 周年特刊征稿

1964 年,著名鱼类学家朱元鼎先生创办了我国水产领域的第一本综合性学术期刊——《水产学报》,2014 年,《水产学报》将迎来五十岁华诞。五十年风雨,五十年沧桑,五十年磨砺,五十年辉煌,在历任主编、各方领导、读者、作者及广大广告客户的关心和支持下,《水产学报》如今已成长为国内水产领域最重要的学术期刊。

为回报广大作者、读者和广告客户的厚爱,《水产学报》计划在 2014 年 9 月正刊出版“纪念《水产学报》创刊 50 周年特刊”,内容将主要包含水产领域的重要基础研究、重大应用成果与展望,以期集中反映我国近年来在水产及其相关领域取得的重大成就。

### 特刊主要内容:

1. 相关单位及领导贺词;2. 专家特邀文章、作者自由投稿;3. 水产及相关领域的国家重点实验室介绍;4. 知名水产相关企业介绍。

### 特刊稿件截稿日期:

2014 年 7 月 10 日

### 投稿方式以及格式:

请通过水产学报网上投稿系统直接上传稿件(请在投稿栏目中选择“纪念《水产学报》创刊 50 周年特刊”)。本特刊投稿文体为中文。



## The full length cDNA cloning and expression analysis of *EcR* from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

WANG Yao, YANG Zhigang, SHEN Cheng, YAO Qinqin, ZENG Qitao, LIU Qibin, CHENG Yongxu\*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** To study the regulatory role of ecdysteroid receptor (*EcR*) in molting and ovarian development of Chinese mitten crab, the full-length *EcR* gene of *Eriocheir sinensis* was cloned by using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA sequence of *EcR* was 2 156 bp, and included a 1269bp ORF which encoded 422 amino acid residues. The alignment of *EcR* amino acid sequence of *Eriocheir sinensis* shared 89% identity with *Uca pugnator*. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to quantify the relative expression level of *EcR* in different tissues, molting process, ovarian process and regulation of MF on ovarian *EcR* in *E. sinensis*. The result showed the *EcR* mRNA were expressed in all tissues examined and highly in Y-organ, with small amount in ovary and muscle, and trace in hepatopancreas, gill, heart, stomach, intestine, thoracic ganglion and cerebral ganglion. During the molting process, the expression levels of *EcR* mRNA of Y-organ remained low from AB period to C period, then significantly increased in D period and E period. ( $P < 0.05$ ); the amount of *EcR* expression in hepatopancreas was rising from AB period to D period, and decreased in E period; *EcR* expression in muscle was highest in AB period ( $P < 0.05$ ); *EcR* expression in gill was highest in D period ( $P < 0.05$ ). In the process of *Eriocheir sinensis* ovarian development, the levels of *EcR* expression in ovary gradually increased to the maximum from stage I to IV, low in stage V. In injection experiment, *EcR* expression of the MF1 (1  $\mu\text{g}/\text{crab}$ ) group had no significant difference with the control group and physiological saline group, MF2 (2  $\mu\text{g}/\text{crab}$ ) group ( $P < 0.05$ ) had a marked increase; *In vitro* experiment, *EcR* expression was significantly increased in MF1 ( $10^{-8}$  mol/L) group and MF2 ( $10^{-7}$  mol/L) group ( $P < 0.05$ ). The results indicated that *EcR* might play an important role during molting process and ovarian development in *Eriocheir sinensis*, and MF could regulate *EcR* gene expression in ovarian. However, further studies are required to explore the underlying molecular mechanisms and clarify the function of *EcR* mRNA.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; *EcR*; gene cloning; molting; ovarian development; methyl farnesoate

**Corresponding author:** CHENG Yongxu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn