

日本沼虾表皮几丁质合成酶基因克隆及表达分析

王 佩, 郭爱莲, 张 宇, 吕艳杰, 宁黔冀*

(河南师范大学生命科学学院,河南 新乡 453002)

摘要: 为了解日本沼虾几丁质合成酶(Chs)基因在蜕皮过程中的作用,本实验采用 RACE 技术首次从表皮中克隆了几丁质合成酶基因(*MnChs*)cDNA 全长,并用生物软件对其序列进行生物信息学分析,RT-PCR 技术检测该基因的时空表达模式。结果表明,其 cDNA 全长 5 133 bp,5' UTR 为 283 bp,3' UTR 为 159 bp,开放阅读框(ORF)长度为 4 701 bp,编码 1 566 个氨基酸,分子量为 179.57 ku,理论等电点为 6.09,包含 2 个几丁质合成酶的标签序列 EDR 和 QRRRW 及 Chitin-synth-C 结构域。经 BLAST 比对,与日本仿长额虾、淡水枝角水蚤 Chs 相似性分别为 89% 和 63%。RT-PCR 结果显示,在蜕皮周期各阶段,不同组织 *MnChs* 的表达量差异显著:头胸甲在 A 期达到最高,胃肠在 D₀ 和 D₄ 期均较高,尾扇和肌肉在 D₄ 期最高,肝胰腺则普遍较低。结果表明,*MnChs* 基因转录物不仅存在于表皮,在其他组织中也有分布,且 mRNA 水平的变化与蜕皮周期有关,作为几丁质生物合成的关键酶,推测该基因的表达在新表皮和内表皮的形成中发挥重要作用。

关键词: 日本沼虾;几丁质合成酶;克隆;序列分析;表达

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

甲壳动物体表被覆坚硬的表皮,起到支撑和保护作用的同时也限制了生长,因此,周期性蜕皮与生长、发育等生理过程密切相关。蜕皮周期的标志性事件就是褪去旧表皮,形成新表皮。几丁质是一种由 β -1,4 糖苷键连接 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖而形成的无分支长链多聚糖,是构成节肢动物表皮的主要成分,有关几丁质的代谢一直是研究的热点问题之一,其中涉及几丁质降解途径及其机制的报道已有很多^[1-2],对几丁质生物合成的研究多为昆虫,目前已经明确几丁质合成酶(chitin synthase,Chs)是其中的一个关键酶^[3]。

学者们对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[4]、烟草天蛾(*Manduca sexta*)^[5]和赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)^[6]等昆虫 Chs 研究发现,其 mRNA 长度超过 4 500 个碱基,编码超过 1 500 个氨基酸,含有 Chitin-synth-C 结构域。根据 Chs 氨基酸序列的相对差异,Chs 被分为两类:ChsA 及 ChsB,ChsA 多在表皮层细胞及气管

细胞中表达,而 ChsB 被限制在中肠围食膜的上皮细胞中表达^[7]。ChsA 在卵的孵化、幼虫蜕皮、化蛹及蛹的发育过程中参与表皮和气管等组织几丁质的合成,如在甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)蜕皮过程中,ChsA 主要在表皮组织中表达^[8];采用 dsRNA 干扰亚洲飞蝗(*Locusta migratoria*) ChsA,蜕皮无法完成^[9];ChsB 只在昆虫进食期负责中肠围食膜几丁质的合成。与昆虫相比,甲壳动物 Chs 的研究报道很少,但初步结果表明,Chs 表达水平的变化与蜕皮周期有关。在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中,Chs 转录物在多个组织均有分布,其 mRNA 表达量从蜕皮前期开始升高^[10];南极磷虾(*Euphausia superba*) Chs 也呈类似的表达趋势^[11]。

本研究以获得的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)表皮组织转录组数据资料为基础,对其中一个预测为编码几丁质合成酶的序列用 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA

收稿日期:2015-04-11 修回日期:2015-07-10

资助项目:国家自然科学基金(30940008);河南省基础与前沿技术研究(142300410021)

通信作者:宁黔冀,E-mail:nqjnqj1964@163.com

ends, RACE) 技术进行全长 cDNA 克隆, 经相关的生物信息学分析, 命名为 *MnChs* (*M. nipponense* chitin synthase) (NCBI 登录号: KP710198)。基于对该基因表达特点的预测, 选取了蜕皮周期过程中 4 个关键时间点, 应用 RT-PCR 技术分析了该基因的时空表达模式, 为进一步揭示 *MnChs* 基因的功能, 尤其在日本沼虾等甲壳动物蜕皮周期中的作用积累资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

日本沼虾捕捞于河南原阳黄寺渔场。选取健康幼虾[体长(3.0 ± 0.5 cm)], 饲养于水族箱中, 水温(27 ± 1) °C, 每天投喂 2 次, 1 周后用于实验研究。

1.2 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

用 RNAiso Plus (TaKaRa) 分别提取 A 期、C 期、D₀ 和 D₄ 期日本沼虾的胃肠、肝胰腺、肌肉组织以及整个头胸甲和尾扇各组织的 RNA, RNA 的完整性和纯度用凝胶电泳检测, RNA 的浓度根据 A₂₆₀ 进行定量。按照 PrimeScript™ RT 试剂盒 (TaKaRa) 操作说明合成 cDNA 第一链。合成的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。实验过程中蜕皮周期的鉴定依据 Cesar 等^[12] 的方法。

1.3 *MnChs* 的全长 cDNA 克隆及序列测定

根据转录组测序提供的几丁质合成酶基因 *MnChs* 核心序列信息设计引 *MnChs*-F1 和 *MnChs*-R1 (表 1), 25 μL PCR 反应体系: TaKaRa Taq™ (5 U/μL) 0.125 μL, 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL, dNTP 2 μL, cDNA 1 μL, 引物各 0.5 μL, 用 ddH₂O 补至 25 μL。PCR 循环条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 终延伸 10 min。由 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。根据扩增得到的核心序列测序结果, 分别设计 RACE 外围引物 5O-*MnChs* 和 3O-*MnChs* 及内围引物 5I-*MnChs* 和 3I-*MnChs* (表 1), 根据 RACE 试剂盒 (Clontech) 说明书扩增 5' 末端和 3' 末端 cDNA 序列, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 并割胶回收目的片段, 按照 T4 DNA Ligase Kit (Promega) 要求连接在 pGEM-T 载体上进行转化测序。测序结果应用 DNAMAN 软件进行拼接获得全长 cDNA, 根据获得的全长 cDNA 序列, 设计引物

MnChs-F2 和 *MnChs*-R2 (表 1), 对获得的全长 cDNA 测序验证。

1.4 生物信息学分析

根据 DNAMAN 拼接获得的全长 cDNA 序列信息, 利用 ORF finder 分析软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测开放阅读框及蛋白翻译情况, 使用 NCBI Blastx 进行氨基酸序列同源性比对, 使用 ProtParam 软件 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.90.html>) 预测蛋白理化性质, SMART 软件预测功能域, SignalP 程序分析信号肽, DNAMAN 软件进行多序列比对分析。将同源性较高的物种氨基酸序列下载并利用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

1.5 *MnChs* 的时空表达分析

根据获得的全长 cDNA 序列和 18S rRNA 的 cDNA 序列设计目的基因引物 *MnChs*-F3 和 *MnChs*-R3 及内参基因引物 18S-F 和 18S-R (表 1)。RT-PCR 按照 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Japan) 要求进行, 在 20 μL 反应体系中依次加入灭菌 ddH₂O 8.8 μL、2 × SYBR Premix Ex Taq™ 8 μL、ROX Reference Dye 0.4 μL、正反向引物各 0.4 μL、cDNA 模板 2.0 μL, 按照两步法 PCR 扩增标准程序进行扩增, PCR 循环条件, 预变性: 95 °C 30 s, 循环 1 次; PCR 反应: 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 循环 40 次。结果采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析, 实验所得数据采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏多重极差检验法统计分析 ($P < 0.05$)。

表 1 日本沼虾 *MnChs* 基因克隆和荧光定量所用引物

Tab.1 Primer sequences used for *MnChs* clone and RT-PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences	用途 usages
<i>MnChs</i> -F1	CACTGCTTGCGGATTGAGAT	RT-PCR
<i>MnChs</i> -R1	AATGCCGTCTCGCCTAAC	RT-PCR
5O- <i>MnChs</i>	CGGGTCCCCAGACAGGTA	RACE
3O- <i>MnChs</i>	AATTAGAAAGTGCCATGAGATACCG	RACE
5I- <i>MnChs</i>	CTCCCGAGACCAGCACGAC	RACE
3I- <i>MnChs</i>	GCTATGTTGTTCCATCGTT	RACE
<i>MnChs</i> -F2	TGCTGGTCTCGGGAGTCAT	RT-PCR
<i>MnChs</i> -R2	CTGCTACATTGCCATTTTCA	RT-PCR
<i>MnChs</i> -F3	GCTGTTGCCCTTTTGGTG	qRT-PCR
<i>MnChs</i> -R3	CCTGGCTGGACTTTGTTGT	qRT-PCR
18S-F	TGTTACGGGTGACGGAGAA	qRT-PCR
18S-R	CATTCCAATTACGCAGACTCGG	qRT-PCR

2 结果

2.1 *MnChs* cDNA 全长克隆

MnChs cDNA 全长 5 133 bp(图 1), ORF 长

度为 4 701 bp, 5'UTR 为 283 bp, 3'UTR 为 159 bp, 该序列提交 GenBank 的注册号为 KP710198, 将其命名为 *MnChs*。

```

1      cctccagtggcgtctcgaccgtgttgacgaaagaatattacctgtctctgggaacccgtgtgattggctatgggttttctttgacttotg
91     ttacgaaagccatcgaaggtagcaatgtgtctcaaaagtaaacagacctagatctttagtagaaagtgggtgctgtaatccgtaaaaaa
181    ataactcaggagatagaaaaggaatattttataattcgaaggagcttcaagtgaattccctgcttcgggaggtgagaggcaacagggg
271    actgaactccaggatgccgccacctatgcctatgcagatgcccccgggaggacagcgatgcagaattttcagatgacgaaaaatATCCC
1      M P P P M P M Q M P P G E D S D A E F S D D E N I P
361    CCTCAATCAGGATATCTACGGAGGAAGCCGCCCTCCGTTCAAGAGACCAAAAATGGGATGTGTTCCGATCGCTGCCACCATCCACGGG
27     L N Q D I Y G G S R R S V Q E T K N W D V F R S L P P S T G
451    TTCTCTGTCGGAGGACAACCAGAAAATCTTGGATGTCACCATCAAGATCCTTAAGGTCGTCACGTACTCCTGACGTTCGGCGTCGTCT
57     S L S E D N Q K F L D V T I K I L K V V T Y L L T F G V V L
541    GGTCTCGGGAGTCATCACAAGGGCCTAGTCTCCTCATGACGTCACAGCTCAAAAGTCCAAAATGTCTCCGTCTGTCCAACAGATA
87     V S G V I T K G L V L L M T S Q L K S S K N V S V C S N R Y
631    CTCAGTCTGCTAAACGAAAAGTTTTAAAGCTAGCATTCCGGAGGAGAAAATGTCGTTGGGCCTGGATGCTTCTCTTCTGCTTCAT
117    S S L L N E K V F K A S I P E E E N V V W A W M L L F C F I
721    CGTGCCGAAAATGGGCACCTGGTTCAGATCGAGAGAATGTGTGTGTTCAAGTCTGGAAAAGCCCTTTTTCGGTGATTCTCTCGGGT
147    V P E M G T W F R S T R M C V F K S W K K P F F G D F F W V
811    GTGGATCTTTGAGACCTTCCATGCTCTGGGAACAGCCCTCCTCATGTACATGTTCTACCAGATCTAGATGTCATCAAGGGAGCTATGCT
177    W I F E T F H A L G T A L L M Y M V L P D L D V I K G A M L
901    TACCAACTCGGTCGCTTTCATTCTCGGCTTTTTGGTCTTCTGTCGCAACAAGAAAAGAAATCCCATGTTGCACTGAAGGTGATTATGGA
207    T N C V A F I P G L F G L L S R T K K E S H V A L K V I M D
991    TTTGGTCGGGTTGGCTTGCCAGCTCACAGGATTTGTTGTGGCCTATTGTAGAGTACGGGAAGGCCCAATAACTACACAGTCTGGGT
237    L V A L A C Q L T G F V V W P I V E Y G K D P N N Y T V W V
1081   TATTCCATTTGCAATCTTCTGACGTCATTTGGATGGTGGGAGAATTATGTTGATCGTCATCAAAATTCAGAATAATAAAATACTTTGG
267    I P F A I F L T S F G W W E N Y V D R H S K F R I I K Y F G
1171   AGGAATTAAGGAGCGGTTATGAAAACAAGATATTTCTGTTATATTTTGTATCCCTGTGGAAATGCTGATTTCTTTACCATGATGGT
297    G I K E R L W K T R Y F C Y I F V S L W K C L I F F T M M V
1261   CATCTGCAATGAGCACCCGCTCTGGAGCATTTCACTACCATAATTTGAACTCGCGGATGCTTTCAGCGCTCACAAAATAAATATACTAGGT
327    I C M S T R L E H F S T I F E L G D A F S A H K I N Y T E V
1351   TCGAGAAACAATCTCCGGAATGTCATACTGACTTAATGAAGTAGCTCCTTTAAACGAAGTTATATCAATTGATTACAAACACAGGGAC
357    R E T I S G N V I P D L N E V A P L N E V I S I D S Q P G T
1441   ACCCATCTACGTTTTCTGATCCAAGTCTTACTGCCTGGCTATGCTATATTTTCGGTAAATTCGCCTGCAAAATCTGCATTACAGGGCTT
387    P I Y V F L I Q V L T A W L C Y I F G K F A C K I C I Q G F
1531   CAGCTTTGCAATCCCTGTGAACCTGACAATCCCTGTTTCCATTTCTCTGCTCATCACTGCTTGGGATTGAGATATGAGAATGCTGCAC
417    S F A F P V N L T I P V S I S L L I T A C G L R Y E N V C T
1621   TTTTGCATATATGCCAGCCTATCTTTCTGGGAGTGCAAAAGATGGAGATATCCTTATTGATTTCTAAATAATGATTATGCTTGGATATG
447    F A Y M P A Y L F W E C K D G D I L I D F L N N D Y A W I W
1711   GCTATTTTGGTTGTTGTACAAACATGGATCACACTGCATATCTGGAATCCAAAATGTGAACGCTAGCATCGACTGAGAAATGTTTGT
477    L F W L L S Q T W I T L H I W T P K C E R L A S T E K L F V
1801   CTCTCCAATGTACAACCTCCTGTTAATTGACCAGTCGTTGCCCTGAACCGCCGAGAGATGATGAAGGAGATGTTAAGACAGAGGAATT
507    S P M Y N S L L I D Q S L A L N R R R D D E G D V K T E E L
1891   GAATCTTAACCCAGATGAACACGAAAATGAGGTGTACAGTACTATGAGACAATCTCCATCCACACGATTATCAACACAAAATGCATC
537    N L N P D E H E N E V S Q Y Y E T I S I H T D S S N T N A S
1981   AAAACCAAGTCGTCGGATCATATTGTTGCATCTATGCTACAGCAACTATGTGGCATGAAAATGAAGAGGAGATGATGGAGATGTTGAA
567    K T K S S D H I V R I Y A T A T M W H E N E E E M M E M L K
2071   GAGTATCTTAGGATGGATGAGGATCAGTCTGCCCGCCGCTGGCTCAGAAGTACCTGAAAATGTTGATCTTGATTACTATGAATTTGA
597    S I L R M D E D Q S A R R V A Q K Y L K I V D L D Y Y E F E
2161   AACTCACATTTTCTTGATGATGCCTTTGAAATATCTGACGAAAATGAGGATGAGAATGTAGTAAACAGTTTGTGAAGCTACTAGTGAC
627    T H I F F D D A F E I S D E N E D E N V V N Q F V K L L V T
2251   TTTAATGGATGATGTGCAACCCATGTACATCAGACAACATTCGATTAGGCCACTAAGAAAATCCCCACACCCATGAGAGCCGCTCT
657    L M D D A A T H V H Q T N I R I R P P K K F P T P Y G G R L

```

2341 TGTTTGGACACTCCCTGGAAAAACAAGATTGTTGCTCATTTGAAAGACAAATCCAAAATCAGGCACAAGAAGAGGTGGAGCCAGGTGAT
687 V W T L P G K T K I V A H L K D K S K I R H K K R W S Q V M
2431 GTACATGTACTACCTACTTGGGTTCAAACCTATGGACCAACCCATATCAGTGGACAGAAAAGAAGTGATTGCTGAGAATACCTTCCTTTT
717 Y M Y Y L L G F K L M D Q P I S V D R K E V I A E N T F L L
2521 AACTTTAGATGGAGATATTGATTTTACTCCTAATGCTGTTGCCCTTTTGGTGGATCTTATGAAAAAGAACTAACCTAGGTGCTGCTTG
747 T L D G D I D F T P N A V A L L V D L M K K N T N L G A A C
2611 TGGACGTATTATCCTGCTGGGTTCTGGACTCATGGTGTGGTATCAGATGTTTGTAGTATGCTATTGGTCATTGGCTGCAAAAAGCAACTGA
777 G R I H P V G S G L M V W Y Q M F E Y A I G H W L Q K A T E
2701 ACATATGATTGGGTGTACTCTGTAGTCTGGATGTTTCTCACTTTTCCGTGAAAAGCCCTTATGGATGATAATGTCATGGCCAAATA
807 H M I G C V L C S P G C F S L F R G K A L M D D N V M A K Y
2791 CACAACAAAGTCCAGCCAGGCTCGCCATTATGTACAGTATGATCAGGGAGAGGATCGATGGCTTTGTACACTATTGCTTCAGAGAGGATA
837 T T K S S Q A R H Y V Q Y D Q G E D R W L C T L L L Q R G Y
2881 TCGAGTAGAGTACAGTGTCTCAGATGCCTACACTCATGCTCTGAAGGTTTTTCAGAATCTACAACCAAGTCGACGATGGGTCCC
867 R V E Y S A A S D A Y T H A P E G F S E F Y N Q R R R W V P
2971 CTCAACTATGGCTAATATCATGGATCTTTTGAAGATTATAAGAGAACTGTTCAAGTTAATGATAATATTTCCCTTCCATATATTTTCTA
897 S T M A N I M D L L Q D Y K R T V Q V N D N I S L P Y I F Y
3061 TCAGACTATGTTGATGGCTGGTACAATTCTGGCCCCGTTACAATCTTCTTATGTTGGTGGTGGCTTTGTGGCTGCTTCCGTATTGG
927 Q T M L M A G T I L G P G T I F L M L V G A F V A A F R I G
3151 TAATCGCTTTCATTCCAGTACAACATTATTCCTATTTTCTCTTCATGATTGTTGTTTACACTGAATTCTAATATCCAGTTGGTGGT
957 N W L S F Q Y N I I P I F L F M I V C F T L N S N I Q L V V
3241 AGCCCAGATATTGTCTGCTTCTTATGCTCTCATAATGATGGCTGTCATTGTTGGTACAACCTCCAGTTAGGGCAGGACGGCATTGGCTC
987 A Q I L S A S Y A L I M M A V I V G T T L Q L G E D G I G S
3331 ACCATCAGCCATTTTCTTGATAGCATTGAGTGGCAGCTTCTTCATAGTGTGTTGATGCATCCCCAGGAGTTAAATGTATTATACCTGG
1017 P S A I F L I A L S G S F F I A A C M H P Q E F K C I I P G
3421 TCTTTTGTATCTTTTGTCCATTCGTCATGTACCTTCTTTTGTATCATCTATTCCTTATCAATCTCAACAATGCTCTTGGGGTACAGC
1047 L L Y L L S I P S M Y L L L I I Y S L I N L N N V S W G T R
3511 AGAGATAGCCACAAAGAAGACAAAAGAACTTGAAGCAGAACGCAAAAGCAGCAGAGGAAGCTAAGAAAATGAAGAAGAAAGGATT
1077 E I A T K K T K K E L E A E R K A A E E A K K M K K K E G F
3601 TCTTGGCTTCCITCAGAGATAATTCTGCTGATGAAGATGAGGGTCTCTTGAATTTTCTTTTGTGGGCTTTTCAAGCTTATGTGCTG
1107 L G F L H R D N S A D E D E G S L E F S F A G L F K L M C C
3691 TGTACATCCAAAGCCTAGCAATGAGCAACAGCAATGGCCAGTATTGCCAACTCTTTGGAAATCCTCAAGAAACGTTTGAATAATTGA
1137 V H P K P S N E Q Q Q L A S I A N S L E I L K K R F E N I E
3781 ATCACATATGGGTATACAACCAAGTTCTCGAAGGCGTCTACAATTCAGCCAGTAATTCATGCGTCCAGATGGTAATAACTCAGTCAA
1167 S H M G I Q P S S R R R S T I Q P R N S M R P D G N N S V N
3871 TGAAAACTAGATGATGAATTTAGCGATAGTAAAGTGAACGGTCAGGGCCAAAAGAGGAGAGAGATGATCTTGTGAATCCATACTGGAT
1197 E N L D D E F S D S E S E R S G P K E E R D D L V N P Y W M
3961 GGAAGACAAAGCTCTGAAAAGAGGAGAAGTAGATTATATGCCAGGTGTGAGGTACAGTTCTTCAAGACCTTATTGAAAAATATTGTA
1227 E D K A L K R G E V D Y M P G V E V Q F F K D L I E K Y L Y
4051 TCCCTTGGACAAAAATGCGAATGAACAGAAAAAGTCGAGGTGGAGTTAAAGGAACTGAGGAACAAATCCTTCTTTGGATTCTTCATGCT
1257 P L D K N A N E Q K K V E V E L K E L R N K S F F G F F M L
4141 GAACGCGCTCTTTGCTCATTGTATTCCTTCTTCAACTGAACAAGGATAACCTTCACATCGACTGGCCACTGGGCATCAAGAAAAACAT
1287 N A L F V L I V F L L Q L N K D N L H I D W P L G I K E N I
4231 CACCATTATACCAGAAACTCAGGAGTACTCATCAGTCAAGAATATCTACAACCTGGAACCAATTGGTCTTGTGTTTGTGTTCTTCTTGC
1317 T I I P E T Q E V L I S Q E Y L Q L E P I G L V F V F F F A
4321 CCTCATTTAATCATTGATTTGTAGCTATGTTGTTCCATGTTTTGGTACCATCTCTCACATTCTTGCATCCACTGAACTCACCTGCTG
1347 L I L I I Q F V A M L F H R F G T I S H I L A S T E L T C C
4411 CAATAAGAAGTCAAGAAGTGTACAGAGGATGCATTTATCCAAAGGAATGCTGTTGATATTGTGAGACAGTTACAGAAACTCAAAGGTAT
1377 N K K S E D V T E D A F I Q R N A V D I V R Q L Q K L K G I
4501 AGAGGATGATTATGATAGTATGCTAATGATGGGCAGCTAGGAAGACGCAAGACAATCCATAATCTGGCACGTGCTCAAAAAGAA

```

1407     E D D Y D S D S A N D G Q L G R R K T I H N L A R H A Q K K
4591    GCAGGCCATTGGGACTGGATGGCTTCAAAAAACGATTCTTCAGTATTCAGCTGAGGCTGCTGAAAAATGGCAATGTAGCAGAAC
1437     Q A I G T L D V A F K K R F F S I S A E A A E N G N V A E T
4681    TCCGGTTTTGGGCAATATGCGGAGACTGAGTATGCGACGAGACTATCAAAGCATTAGCTGAGAGCGTGAAACTGTTGTCAGGAGAG
1467     P V L G N M R R L S M R R E T I K A L A E R R E T V V Q E R
4771    ACGTCAGTCAAGGATGCAAACACTTGGAGCAAAGAAGCCACGAACAAGAACTTCAATTGCTTCAGAGGCAGACAACCAGCGGTGTTCCAC
1497     R Q S R M Q T L G A K K P R T R T S I A S E A D N Q R V F T
4861    TCCAACGGTGGTCTATCAACAATGCATATGAGTCTGATACTGAACACCTTGGTGGGGGTCTTCAATTAGAAGTGCATGAGATACCG
1527     P T G G S I N N A Y E S D T E H L G G G S S I R S A M R Y R
4951    AAATGCAGAAGAAATGTTTTATATAAGCCATAAtttaatatgtctcatttttctctatcacgaagtatcgaaaatatagtaaatct
1557     N A E E N V L Y K P *
5041    cgccctcctctattgaatgtacagcaacagtttacagaactttcatccgagctcataaacatgacaagtttgagtatatttgatgctgcaa
5131    cct

```

图1 *MnChs* cDNA 全长及推导的氨基酸序列

黑体:起始密码子(ATG)和几丁质合成酶的标签序列(EDR 和 QRRRW); * 表示终止密码子 TAA; 灰色:跨膜螺旋区; 下划线:糖基化结合位点; 细线方框:Chitin-synth-C 结构域; 小写字母:5' 非翻译区(5' UTR)和 3' 非翻译区(3' UTR)

Fig. 1 Chitin synthase cDNA sequence and deduced amino acid sequence from *M. nipponense*

Black color indicates the start codon(ATG) and two CHS signature motifs EDR and QRRRW; “*” indicates the stop codon(TAA); gray color indicates transmembrane helices; glycosylation binding sites are underlined; Chitin-synth-C domain signature is marked with filament box; lowercase letters indicate 5' UTR and 3' UTR

2.2 编码蛋白的理化参数及结构预测

该基因编码的蛋白质由 1 566 个氨基酸残基组成,起始密码子(ATG)位于 284 bp 处,终止密码子(TAA)位于 4 982 bp 处,第 691 ~ 901 位为 Chitin-synth-C 结构域(图 1, 2),蛋白质分子式为

$C_{8145}H_{12628}N_{2104}O_{2309}S_{81}$, 分子质量约为 179.57 ku, pI 为 6.09, 负电荷氨基酸残基总数(Asp + Glu)为 183, 正电荷氨基酸残基总数(Arg + Lys)为 167。*MnChs* 的氨基酸序列共有 16 个跨膜螺旋区, 10 个糖基化位点(图 1)。

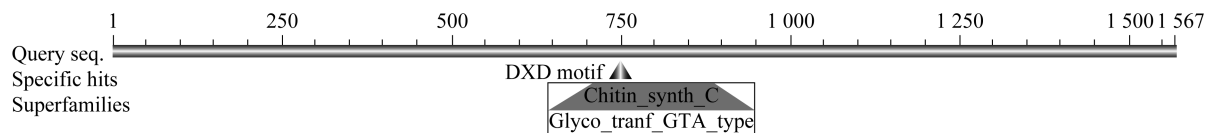


图2 *MnChs* Chitin-synth-C 结构域位置示意图

Fig. 2 Distribution of the Chitin-synth-C domain signature in *M. nipponense*

2.3 同源性比对及系统进化树构建

经 BLAST 比对,该序列与长额虾科(Pandalidae)、拟长额虾属(*Pandalopsis*)的日本仿长额虾(*P. japonica*) Chs 相似性最高,同源性为 89%,与某些昆虫类 Chs 的同源性在 60% ~ 65% (图 3)。将上述动物 Chs 的氨基酸序列用 MEGA5.0 软件构建系统发育进化树(图 4),可以看出 *MnChs* 蛋白与日本仿长额虾的蛋白亲缘关系最近,将 *MnChs* 编码的氨基酸序列与昆虫类的 ChsA 和 ChsB 进行聚类分析(图 5),*MnChs* 则分布于 ChsA 区域,属于 A 类几丁质合成酶。

2.4 日本沼虾幼虾 *MnChs* 基因的时空表达

MnChs 基因的转录物在多种组织均有表达,为便于比较,将各组织 C 期的相对表达量均设为

1(为参照)。结果显示,头胸甲上皮组织和尾扇中 *MnChs* 的表达均呈显著的周期性变化,分别在 A 期和 D₄ 期达到最高;胃肠和肌肉在蜕皮前期 D₀ 和 D₄ 期较高,至 A 期显著降低;肝胰腺则普遍较低(图 6)。

3 讨论

实验首次从日本沼虾头胸甲上皮组织克隆到 1 个 *MnChs* 全长 cDNA,编码的蛋白分子量为 179.57 ku,含有昆虫 Chs 标签序列 EDR 和 QRRRW(图 1)及 Chitin-synth-C 结构域(图 2)。生物信息学分析显示 *MnChs* 含有 16 个跨膜螺旋区,是典型的跨膜蛋白,这与赤拟谷盗^[5]和烟草

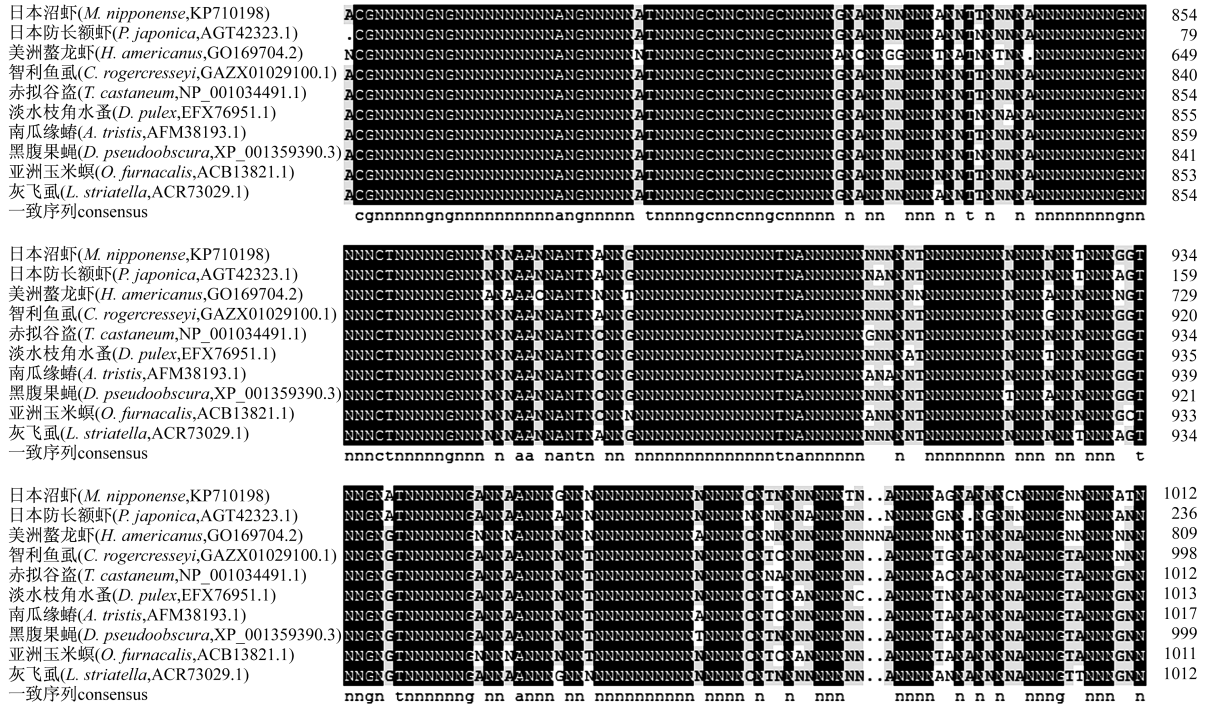


图 3 MnChs 基因的保守区域氨基酸序列与其他物种的序列比对

图中黑色代表相同水平为 100% ,灰色代表相同水平 ≥50%

Fig. 3 The alignment of amino acid sequences of putative catalytic region of MnChs gene with those from other species

Black denotes the homology level is 100% ,gray denotes the homology level is greater than or equal to 50%

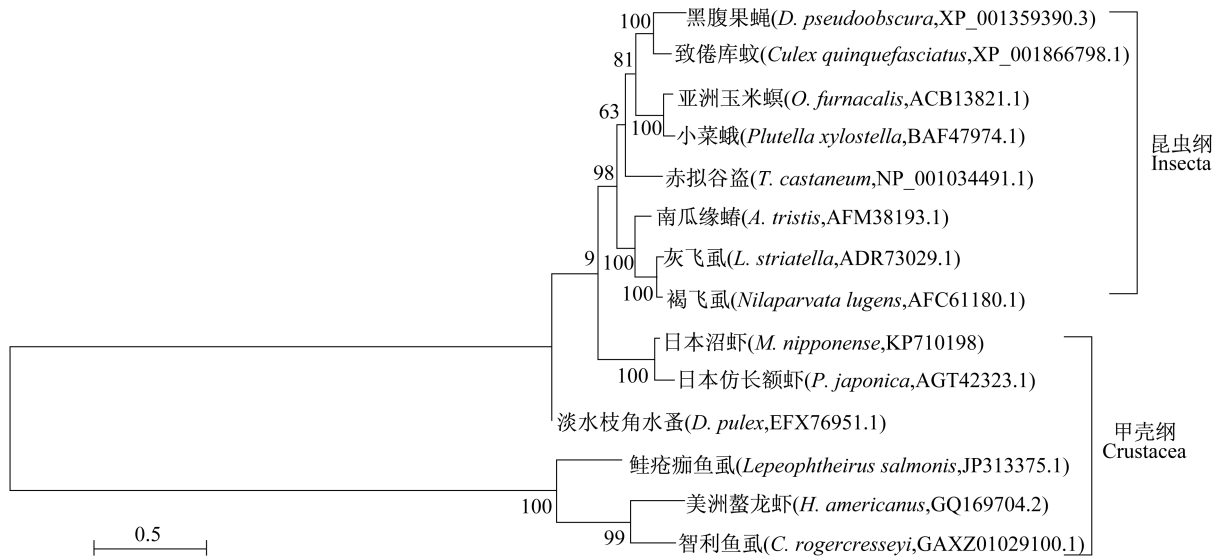


图 4 不同物种 Chs 氨基酸构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed for Chs amino acid sequences of species

天蛾^[13]等昆虫中的 Chs 特性相似,这种跨膜螺旋的数目决定了 N 端在膜上的位置^[14],它们可能成簇地排列形成疏水小孔,由膜内侧催化中心区域形

成的新生几丁质链,可由该孔向膜外运输^[13,15]。聚类分析表明,MnChs 分布于 ChsA 区域(图 5),昆虫 ChsA 的表达部位主要在表皮。

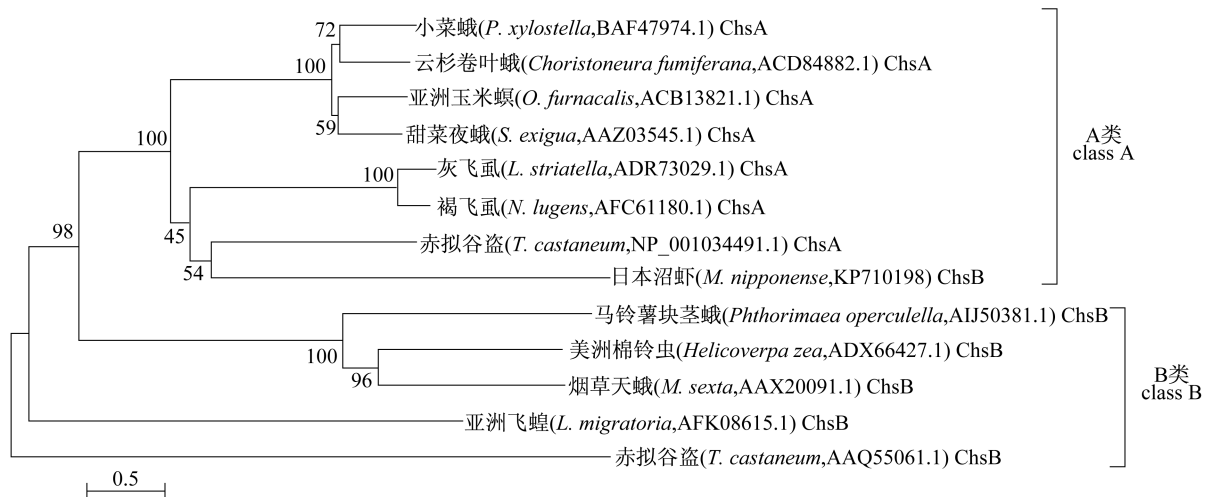


图5 基于 MnChs 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on MnChs amino acid sequences

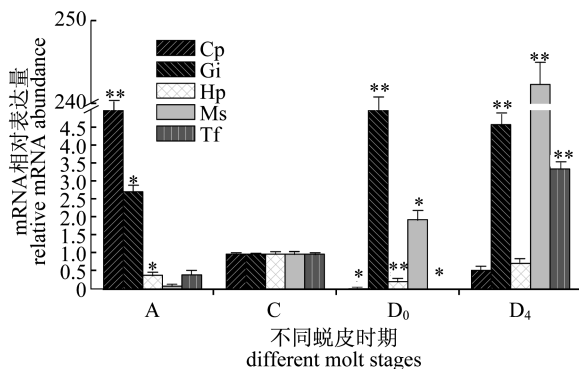


图6 各组织 MnChs 基因在不同蜕皮阶段的表达量

Cp: 头胸甲; Gi: 胃肠; Hp: 肝胰腺; Ms: 肌肉; Tf: 尾扇。A: 蜕皮后期; C: 蜕皮间期; D₀ 和 D₄: 蜕皮前期。n = 5: 组织/蜕皮阶段。“*”和“**”分别表示与 C 期相应组织比有显著或极显著差异 (P < 0.05, P < 0.01)。各组织显著性分析以 C 期为参照

Fig. 6 MnChs mRNA levels in each tissue at different molt stages

Cp: carapace, Gi: gastrointestinal, Hp: hepatopancreas, Ms: muscle, Tf: tail fan; A: post molt stages, C: intermolt, D₀ and D₄: premolt, n = 5: each tissue/each molt stage; * P < 0.05, ** P < 0.01, vs stage C in the same tissue. The stage C is the calibrator in significance test of each tissue

几丁质是构成表皮和消化道的主要成分,分布在表皮的外表皮层和内表皮层以及消化道中源自外胚层的前肠和后肠^[16-17]。以日本沼虾的表皮组织头胸甲为例,在组织学水平研究了蜕皮周期中新表皮的形成过程,发现新上表皮出现在蜕皮前期的 D₃ 期^[18],新外表皮和内表皮分别出现

在蜕皮前晚期 (D₄ 期) 和蜕皮后期 (B 期)^[19]。一般认为,表皮上皮细胞是合成几丁质的主要部位,结果显示,头胸甲上皮组织 MnChs 的表达呈显著的周期性变化,只在 A 期高表达 (图 6),合成的几丁质可能用于新内表皮的形成;该基因在另一种表皮组织——尾扇中的表达模式与头胸甲明显不同,高峰前移至 D₄ 期,推测在动物表皮的不同部位,新表皮形成速度可能不完全一致,尚待进一步研究。胃肠道是食物消化吸收的场所,与昆虫 ChsA 表达特点不同^[7], MnChs 基因转录物水平在 D₀、D₄ 期显著升高,至 A 期有所降低 (图 6),推测此期合成的几丁质可能不仅参与新的消化道形成,而且还是新表皮中外表皮和内表皮几丁质的来源之一。日本沼虾等甲壳动物的表皮又称外骨骼,是肌肉附着部位。MnChs 在肌肉组织的表达具有周期性变化,在 D₀ 期、尤其 D₄ 期极显著升高,据报道,昆虫 ChsA 基因含有可变剪切现象^[20],推测 MnChs 的表达产物可能在蜕皮过程中发挥着不同的作用。肝胰腺是甲壳动物有机物合成和储备的重要场所,但在所观察的蜕皮周期过程中, MnChs 的表达量普遍较低,推测肝胰腺可能不是几丁质合成的主要部位。C 期,表皮各层的结构趋于稳定,与蜕皮相关的活动处于低水平,所以,不同组织 MnChs 基因的表达水平较低。

本实验首次从日本沼虾表皮克隆到的 MnChs 与昆虫 ChsA 聚为一支,但与昆虫不同,基因的表达除了表皮 (头胸甲和尾扇) 组织外,在胃肠以及肌肉组织也有高表达,且具有周期性变化。MnChs 是几丁质生物合成中的关键酶,推测该基

因的表达在外表皮和内表皮的形成中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Zhang S Y, Jiang S F, Xiong Y W, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*; cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167: 30 – 40.
- [2] Adrangi S, Faramarzi M A. From bacteria to human; a journey into the world of chitinases [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1786 – 1795.
- [3] Merzendorfer H. Insect chitin synthases; a review [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2006, 176(1): 1 – 15.
- [4] Gagou M E, Kapsetaki M, Turberg A, *et al.* Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila metamorphosis* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(2): 141 – 146.
- [5] Zimoch L, Hogenkamp D G, Kramer K J, *et al.* Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(6): 515 – 527.
- [6] Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer K J, *et al.* The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix [J]. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14(5): 453 – 463.
- [7] Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(24): 4393 – 4412.
- [8] Chen X F, Yang X, Senthil K N, *et al.* The class A chitin synthase gene of *Spodoptera exigua*; molecular cloning and expression patterns [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(5): 409 – 417.
- [9] Zhang J Z, Liu X J, Zhang J Q, *et al.* Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40(11): 824 – 833.
- [10] Rocha J, Garcia C F L, Muhlia A A, *et al.* Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molting cycle [J]. *Aquaculture*, 2012, 330 – 333: 111 – 115.
- [11] Seear P J, Tarling G A, Burns G, *et al.* Differential gene expression during the moult cycle of Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11 – : 582.
- [12] Cesar J R O, Zhao B P, Malecha S, *et al.* Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle [J]. *Aquaculture*, 2006, 216(2): 688 – 694.
- [13] Zhu Y C, Specht C A, Ditter N T, *et al.* Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(11): 1497 – 1506.
- [14] Yang H E, Liu S Z, Li Y Z, *et al.* Chitin synthase from insects and its inhibitors. [J]. *Entomological Knowledge*, 2007, 44(5): 769 – 773. [杨化恩, 刘守柱, 李友忠, 等. 昆虫几丁质合成酶及其抑制剂. 昆虫知识, 2007, 44(5): 769 – 773.]
- [15] Tellam R L, Vuocolo T, Johnson S E, *et al.* Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(19): 6025 – 6043.
- [16] Promwikorn W, Boonyoung P, Kirirat P. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2005, 27(3): 499 – 509.
- [17] Ceccaldi H. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture [J]. *Advances in Tropical Aquaculture*, 1989, 26(9): 243 – 259.
- [18] Lü Y J, Chen X L, Guo A L, *et al.* Effect of KK-42 on the carapace structure in *Macrobrachium nipponense* during premolt D₃ stage [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 1964 – 1969. [吕艳杰, 陈香丽, 郭爱莲等. KK-42 对日本沼虾 D₃ 期头胸甲表皮结构的影响. 水产学报, 2014, 38(12): 1964 – 1969.]
- [19] Chen X L. The effect of imidazole derivative KK-42 on the structure of cuticle in *Macrobrachium nipponense* [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2014. [陈香丽. 咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾表皮结构的影响. 新乡: 河南师范大学, 2014.]

- [20] Qu M B. Gene expression patterns and functions of the insect chitin synthases from *Ostrinia furnacalis* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012.

[屈明博. 亚洲玉米螟几丁质合酶基因表达与生理功能研究. 大连: 大连理工大学, 2012.]

Gene cloning and expression analysis of cuticular chitin synthase from *Macrobrachium nipponense*

WANG Pei, GUO Ailian, ZHANG Yu, LÜ Yanjie, NING Qianji*
(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: In order to study the role of chitin synthase (Chs) gene from *Macrobrachium nipponense* in the molting cycle, the *M. nipponense* chitin synthase (*MnChs*) of the cuticular tissue was first cloned using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method, and its sequence was analyzed with a biological software. Spatio-temporal expression of the *MnChs* was determined by RT-PCR. The full-length contains 5 133 bp with a 283 bp of 5'-untranslated region (UTR), a 159 bp of 3'UTR and a 4 701 bp of open reading frame encoding a putative *MnChs* protein of 1566 amino acids with a predicted molecular mass of 179.57 ku and pI of 6.09. It includes two specific tag sequence of Chs (EDR, QRRRW) and a Chitin-synth-C domain. Sequence comparison shows that the *MnChs* deduced amino acid sequence shares an overall similarity of 89% to *Pandalopsis japonica* and of 63% to *Daphnia pulex*. The significant difference of *MnChs* mRNA levels among tissues is observed during molt stages. The high level occurs at stage A in carapace, at stage D₀ and D₄ in gastrointestinal, at stage D₄ in tail fan and muscle. However, the level from hepatopancreas is relatively lower during molt stages. In conclusion, our present results show that *MnChs* is not only expressed in cuticle, but also in other tissues, and its level change is related to the molting cycle. As a key enzyme catalyzing chitin synthesis, *MnChs* expression may be involved in the formation of new exocuticle and endocuticle.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; chitin synthase; clone; sequence analysis; expression

Corresponding author: NING Qianji. E-mail: nqjnqj1964@163.com