

## 中华绒螯蟹类浮肌蛋白基因 *Esflo1* 的克隆和组织表达分析

庄翠珩<sup>1</sup>, 孙金生<sup>2</sup>, 张亦陈<sup>1</sup>, 田金泽<sup>1</sup>, 耿绪云<sup>2</sup>,  
朱丽娜<sup>1</sup>, 李 冉<sup>1\*</sup>

(1. 天津师范大学生命科学学院,天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387;

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心,天津 300221)

**摘要:** 为了解甲壳动物高血糖激素如何调节中华绒螯蟹体内的血糖水平,实验前期进行了转录组和表达谱分析,最终选取 *Esflo1* 作为研究对象。根据转录组数据提示,结合 RACE 方法首次从中华绒螯蟹肝胰腺组织中克隆得到 *Esflo1* 基因并进行了序列及组织表达分析。结果显示 *Esflo1* 基因开放阅读框(ORF)1 281 bp,编码 426 个氨基酸,具有典型的 SPFH 超家族和 PHB 结构域,不含信号肽序列。多重序列比对分析表明,*Esflo1* 氨基酸序列与中华绒螯蟹 *flotillin-1* 相似度最高,达到 57%。荧光定量 PCR 结果显示成熟中华绒螯蟹 *Esflo1* 基因在肝胰腺组织中的表达量最高,其次为肌肉,另外在心脏、鳃、肠道、胸神经节和胃中均有一定量表达,在脑中表达量较低。上述实验结果为下一步继续研究中华绒螯蟹糖代谢的生理机制奠定了基础,也为其他养殖类甲壳动物糖类代谢的研究提供了重要参考。

**关键词:** 中华绒螯蟹;甲壳动物高血糖激素;浮肌蛋白;组织表达

**中图分类号:** Q 785; S 966.1

**文献标志码:** A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 又称河蟹、毛蟹、清水蟹,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。近些年来,中华绒螯蟹养殖业在我国发展迅速,已成规模化。如何缩短中华绒螯蟹的成熟期,加速肝胰腺的营养物质积累,促进生殖腺发育一直是中华绒螯蟹养殖业发展的关键问题<sup>[1]</sup>。甲壳动物的能量和物质代谢通过甲壳动物高血糖激素 (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) 家族成员调控来实现<sup>[2-4]</sup>。CHH 主要负责调控血糖水平、维持能量供应、调控蜕皮、繁殖以及细胞的渗透压<sup>[5-7]</sup>,因此是甲壳动物体内重要的一类神经多肽激素。

浮肌蛋白-1 (*flotillin-1*) 是 *flotillin/Reggie* 家族中的成员。早在 1997 年, Schulte 等<sup>[8]</sup> 发现金鱼 (*Carassius auratus*) 视神经损伤后,轴突再生过程中有 2 种蛋白被大量表达。他们将这 2 种蛋白命

名为 Reggie1 和 Reggie2,后经证实这 2 种蛋白即 *flotillin-1* 与 *flotillin-2*。迄今为止,已经在人 (*Homo sapiens*)<sup>[9]</sup>、小鼠 (*Mus musculus*)<sup>[10-11]</sup>、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)<sup>[12]</sup> 和非州爪蟾 (*Xenopus laevis*)<sup>[13-14]</sup> 等生物中成功克隆得到了 *flotillin-1* 基因。研究表明 *flotillin-1* 位于细胞膜上,参与细胞信号转导、细胞分裂、内吞、胰岛素信号通路<sup>[15-16]</sup> 及轴突的再生等多种重要的生理过程<sup>[17-18]</sup>。最近的研究表明 *flotillin-1* 所介导的胞吞通路在特殊情况下负责调节肌蛋白的胞吞作用。而且在研究哺乳动物与记忆相关的系统工作时,人们发现 *flotillin-1* 的表达水平会随之上升,推测其与记忆的形成存在一定的关系<sup>[19]</sup>。但至今为止 *flotillin-1* 基因在水生动物中的报道还非常有限,仅见大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[20]</sup>、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[21]</sup> 等。

本研究通过克隆中华绒螯蟹 (*Eriocheir*

收稿日期:2015-04-20 修回日期:2015-07-16

资助项目:国家自然科学基金青年基金(31302168);天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCYBJC30700);天津师范大学博士基金(52XB1303)

通信作者:李冉, E-mail:liran\_1006@163.com

*sinensis* flotillin-1 like, *Esflo1*) 基因及序列分析, 推测中华绒螯蟹 *Esflo1* 基因的结构和功能。同时, 通过比较 *Esflo1* 基因在中华绒螯蟹各组织器官中的相对表达量, 确定其发挥作用的主要器官, 为今后进一步研究中华绒螯蟹 *Esflo1* 基因的分子作用机制, 探究中华绒螯蟹 CHH 调控糖代谢的机制, 提高中华绒螯蟹产量, 推动中华绒螯蟹养殖业发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验 1 龄性成熟中华绒螯蟹平均体质量为  $(150 \pm 10)$  g, 取自天津市七里海河蟹养殖基地。室温暂养于实验室养殖箱内, 隔天傍晚投喂鲫碎肉, 次日清晨换新鲜曝气水。随机取 4 只健康中华绒螯蟹, 雌雄各 2 只, 取脑、胸神经节、肝胰腺、肌肉、肠道、胃、心脏和鳃组织, 立即放置于液氮中, 取样结束后将所有组织冻存于  $-80$  °C 冰箱中备用。

宿主菌株 DH5 $\alpha$  为本实验室保存; TRIzol 总 RNA 提取试剂购自 Invitrogen; PrimerScript Reverse Transcriptase 试剂盒、ExTaq 酶、pMD19-T vector 试剂盒、SYBR Premix ExTaq<sup>TM</sup> II 试剂盒均购买于 TaKaRa; 引物合成工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 测序工作由金唯智生物科技(北京)有限公司完成。

### 1.2 总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

将各冻存组织取出, 以 Trizol 法分别提取 8 种组织的总 RNA。提取之后, 用 Nanodrop2000 微量分光光度计 (Thermo) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所有 RNA 样品纯度及完整度。

依据 Primerscript Reverse transcriptase (TaKaRa) 说明书进行操作, 从各样品取 1  $\mu$ g 总 RNA, 作为反转录反应的模板, 以 AOLP [5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC(T) 16-3'] 为引物, BDA-Oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGC-AGAGTACGCGGG-3') 为接头合成第一链 cDNA, 用于之后的半定量 PCR 反应。其余 RNA 置于  $-80$  °C 冰箱中保存。

### 1.3 引物设计与 PCR 扩增反应

根据中华绒螯蟹 *Esflo1* 基因保守区序列设计下游引物: 5R1 (5'-CTCCACCACCTTCGCTCTCC-ATCACTTC-3') 和 5R2 (5'-CGGTTTCTGCTTGC-

TTAGCCCGAACCT-3'), 以反转录获得的中华绒螯蟹肝胰腺 cDNA 为模板, 在 PCR 仪上进行 *Esflo1* 基因 5'Race 片段的扩增。

PCR 反应体系: cDNA 模板 1  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 上下游引物 (2.5  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 10  $\times$  Ex Taq PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, Ex Taq 酶 0.2  $\mu$ L, 用灭菌超纯水将总体积补至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 5  $\mu$ L, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (生工), 按照说明书将目的片段产物进行回收纯化, 之后取 2  $\mu$ L 回收产物与 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 在 16 °C 进行过夜连接, 连接产物经热击转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 转化产物在 37 °C 150 r/min 的条件下振荡培养 40 min 后均匀涂布于含有氨苄的 LB 固体培养基上, 置于恒温生化培养箱中过夜培养 (12 ~ 16 h)。次日随机挑选多个单一菌落, 接种于含有氨苄的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养 3 h 后, 以菌液作为模板进行 PCR 检测, 筛选出阳性克隆, 后由金唯智生物工程有限公司进行测序。

### 1.4 序列的拼接与生物信息学分析

运用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体片段的去除和拼接。利用 ORF (open reading frame) finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找目的基因的开放读码框; 用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、ClustalX 及 DNASTAR 中的 MegAlign 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://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 进行蛋白质等电点和相对分子质量的计算。SMART 程序分析氨基酸结构, SignalP4.1 Server 预测信号肽, TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜区域的预测。用 MEGA 5.2.2 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 进行系统进化树的构建。

### 1.5 中华绒螯蟹不同组织中 *Esflo1* 基因的 mRNA 表达分析

以获得的完整 *Esflo1* 基因 ORF 区序列为依据, 利用 Primer Premier 软件设计一对用于实时荧光定量 PCR 的特异性引物 QF (5'-GTGT-

CCTCAGGTGACTCTCCT-3')/QR (5'-GCTTTGTGTTGTTCTTCGTTCC-3')。根据 GenBank 中中华绒螯蟹  $\beta$ -actin 基因全长序列设计一对内参引物 actinF (5'-GGTTGCCGCCCTGGTTGTG-GAC-3')/ actinR (5'-TTCTCCATGTCGTCCCA-GT-3')。将提取的中华绒螯蟹肝胰腺、肌肉、心脏、鳃、肠道、胃、胸神经节和脑共 8 种组织或器官的总 RNA 分别进行反转录获得 cDNA,以特异性引物 QF/QR 检测 *Esf1ol* 表达,利用 actinF/ actinR 扩增中华绒螯蟹  $\beta$ -actin 作为内参。运用实时荧光定量的方法对 *Esf1ol* 在不同组织或器官中的表达情况进行分析。PCR 反应体系:10  $\mu$ L SYBR Premix Ex TaqII,0.5  $\mu$ L Forward Primer(10  $\mu$ mol/L),0.5  $\mu$ L Reverse Primer(10  $\mu$ mol / L),1.0  $\mu$ L cDNA,8.0  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应条件:94  $^{\circ}$ C 变性 30 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 20 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s,40 个循环,在 55  $^{\circ}$ C 进行荧光信号收集。SPSS 17.0 统计分析软件进行数据分析,当  $P < 0.05$  时差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Esf1ol* 基因片段 cDNA 的序列分析

以中华绒螯蟹总 RNA 为模板扩增获得的开放阅读框 (ORF) 全长 1 281bp,编码 426 个氨基酸,编码蛋白理论等电点为 9.15,预测分子量为 47.18 ku。利用 SignalP 软件对编码区进行分析,发现 *Esf1ol* 不存在信号肽序列,不属于分泌蛋白。*Esf1ol* 氨基酸序列经 SMART 分析表明,包含有典型的 SPFH 超家族结构,此外还具有 PHB 结构域,属于 Band 7 蛋白家族。这一家族蛋白为构成细胞膜的重要组成部分且具有调节阳离子电导的功能。经 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测,*Esf1ol* 蛋白具有 1 个跨膜结构(图 1,N 端位于膜外)。经 Blast X、Blast N 与多序列比对表明,此氨基酸序列与拟穴青蟹等的 *flotillin-1* 氨基酸序列具有高度相似性(图 2),因此定义此序列为中华绒螯蟹 *flotillin-1* like(*Esf1ol*) 序列。

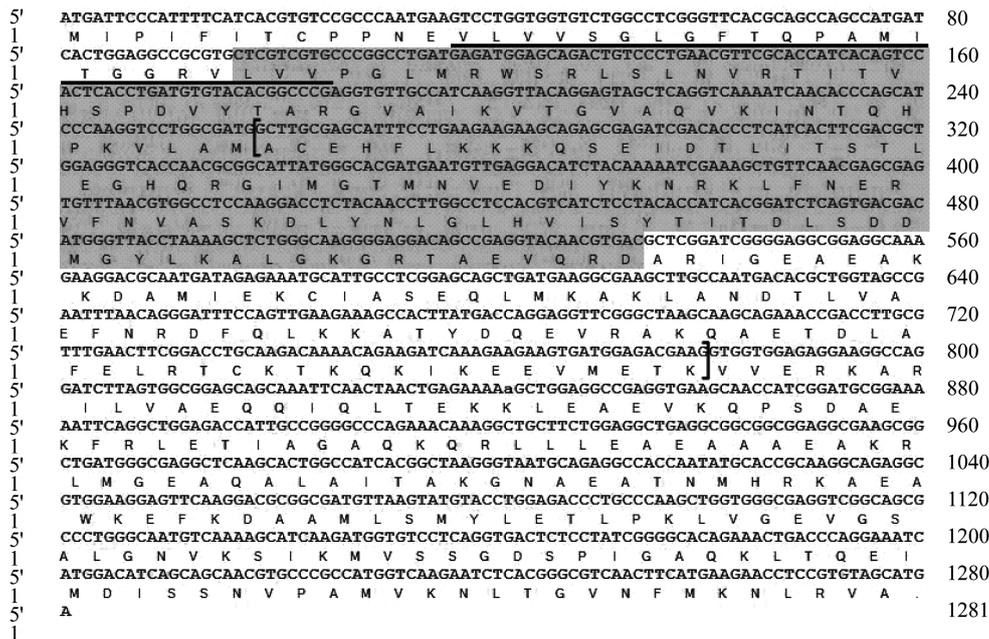


图 1 中华绒螯蟹 *Esf1ol* 基因 cDNA 及其编码的氨基酸序列

下划线部分表示跨膜区域(N 端部分位于膜外),阴影部分表示 SPFH 结构域,“[]”部分表示 PHB 结构域

Fig. 1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Esf1ol* gene

The underline stands for transmembrane region (N-terminal region outside), the shadow stands for SPFH domain, and the “[]” stands for PHB domain

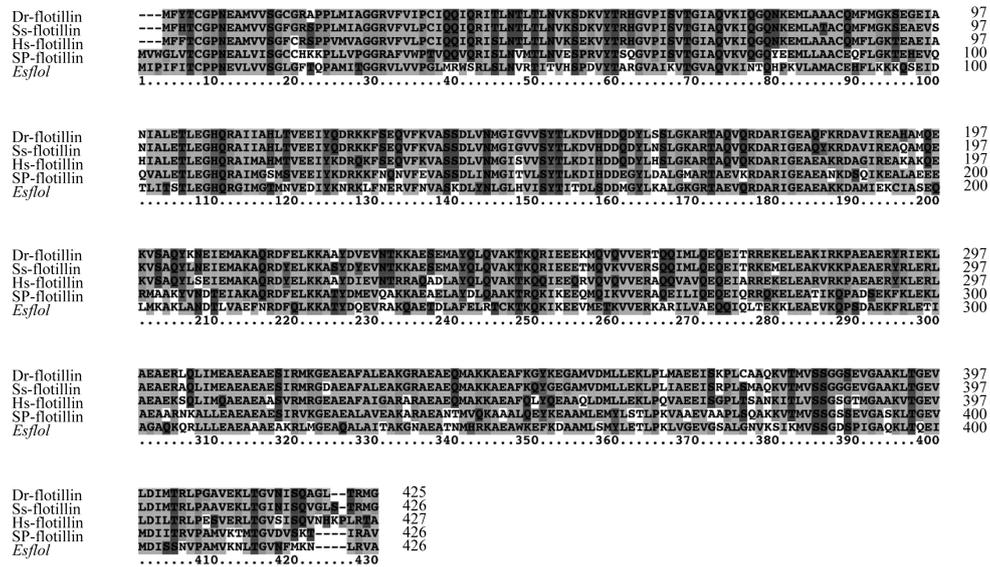


图2 中华绒螯蟹 Esflol 与其他物种 flotillin-1 氨基酸序列比对图

基因登录号: NP\_958864.1 (斑马鱼, Dr-flotillin), ACN10783.1 (大西洋鲑, Ss-flotillin), NP\_005794.1 (人类, Hs-flotillin), AEN94568.1 (拟穴青蟹, Sp-flotillin)

Fig. 2 Amino acid sequence comparison of Esflol with flotillin-1 in other species

GenBank accession number: NP\_958864.1 (*D. rerio*, Dr-flotillin), ACN10783.1 (*S. salar*, Ss-flotillin), NP\_005794.1 (*H. sapiens*, Hs-flotillin), AEN94568.1 (*S. paramemosain*, Sp-flotillin)

2.2 同源性分析以及蛋白系统进化树的构建

利用 ClustalX 软件,将中华绒螯蟹 Esflol 氨基酸序列与褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、小鼠、人、拟穴青蟹、苏门答腊猩猩 (*Pongo abelii*)、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*)、大西洋鲑、黑腹果蝇、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、地中海实蝇 (*Ceratitis capitata*)、斑马鱼和囊舌虫 (*Saccoglossus kowalevskii*) 的 flotillin-1 氨基酸进行比对后,利用 MEGA5.2 软件的邻接法将上述相关氨基酸序列构建系统进化树(图 3),结果显示 Esflol 蛋白区别于 flotillin-1 蛋白,单独处于一支,但是相对于其余物种,与甲壳纲和昆虫纲动物具有较近的亲缘关系。

2.3 中华绒螯蟹 Esflol 基因的组织表达分析

以中华绒螯蟹肝胰腺、肌肉、心脏、鳃、肠道、胸神经节、胃、脑 8 种组织的 cDNA 为模板,β-actin 为内参基因,利用荧光实时定量 PCR 方法研究中华绒螯蟹 Esflol mRNA 的组织表达特征。结果表明,在中华绒螯蟹的这些组织中,Esflol 基因几乎都有表达,其中肝胰腺、肌肉、心脏中的表达量最高,其次为胃、鳃、肠道和胸神经节,在脑组织中表达量最少(图 4)。

3 讨论

本研究利用同源克隆的方法首次克隆得到中华绒螯蟹 Esflol 基因的 ORF 区全长 cDNA 序列,ORF 区序列长度 1 281bp,编码 426 个氨基酸,序列以起始密码子(ATG)开始,以终止密码子(TGA)结束,可以判断其 ORF 区 cDNA 序列的完整性。利用 NCBI 的 BlastP 程序,对翻译所得氨基酸序列进行 Blast 比对,发现 Esflol 与拟穴青蟹和中华绒螯蟹的 flotillin-1 相似度均高达 56% 和 57%,与其他节肢动物的 flotillin-1 氨基酸序列进行多重比对的结果也表现出高度同源性。但是从系统进化树上可以看出,甲壳动物与节肢动物各聚为一支,Esflol 与其他物种的 flotillin-1 基因存在一定差异性。由此推测,Esflol 的生理功能极有可能与 flotillin-1 相似,除此之外可能还参与了其他特殊的信号通路。Esflol 的氨基酸序列中包含有 SPFH 与 PHB 结构域,这些都是 flotillin 蛋白家族的显著特征<sup>[22]</sup>,更与其生理功能具有紧密的联系,此家族蛋白参与多种细胞生命活动,例如调节轴突的生长修复、膜蛋白的富集、活化 T 淋巴细胞、信号转导、细胞骨架重排、表皮生长因子诱

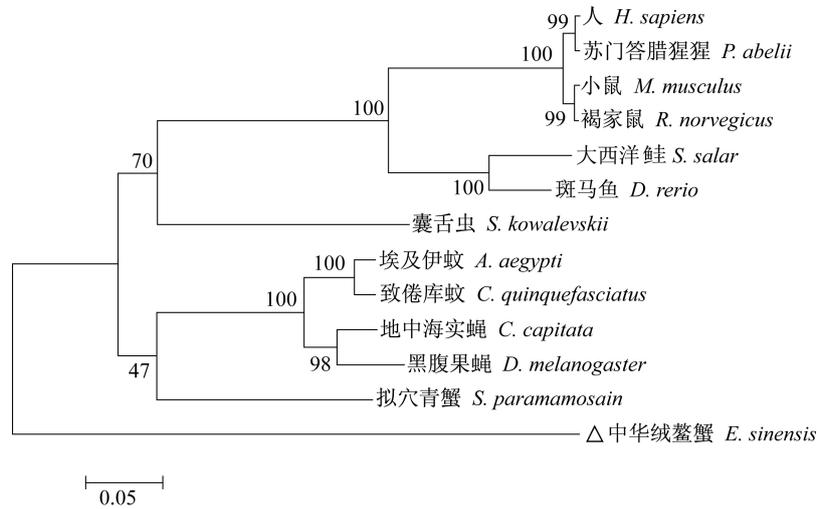


图 3 中华绒螯蟹 *Esflo1* 与不同物种 *flotillin-1* 氨基酸序列的系统进化树分析

基因登录号:NP\_073192.2(褐家鼠)、NP\_032053.1(小鼠)、NP\_005794.1(人)、AEN94568.1(拟穴青蟹)、NP\_001125483(苏门答腊猩猩)、XP\_001850365.1(致倦库蚊)、NP\_005794.1(大西洋鲑)、NP\_477358.1(黑腹果蝇)、XP\_001651132.1(埃及伊蚊)、XP\_004522537.1(地中海实蝇)、NP\_958864.1(斑马鱼)、NP\_001171849.1(囊舌虫)

Fig. 3 The phylogenetic tree based on amino acid sequences of *Esflo1* and *flotillin-1* in other species

GenBank accession number:NP\_073192.2(*R. norvegicus*), NP\_032053.1(*M. musculus*), NP\_005794.1(*H. Sapiens*), AEN94568.1(*S. paramamosain*), NP\_001125483(*P. abelii*), XP\_001850365.1(*C. quinquefasciatus*), NP\_005794.1(*S. salar*), NP\_477358.1(*D. melanogaster*), XP\_001651132.1(*A. aegypti*), XP\_004522537.1(*C. capitata*), NP\_958864.1(*D. rerio*), NP\_001171849.1(*S. kowalevskii*)

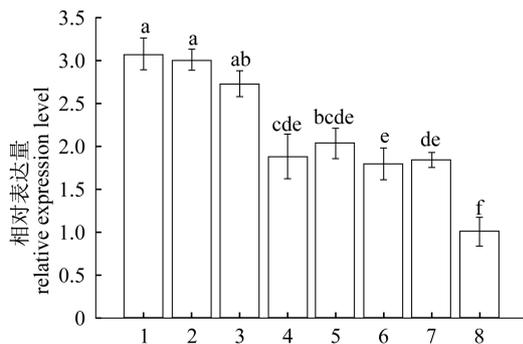


图 4 定量 PCR 分析 *Esflo1* 基因在中华绒螯蟹不同组织中的表达情况

1. 肝胰腺; 2. 肌肉; 3. 心脏; 4. 鳃; 5. 肠道; 6. 胸神经节; 7. 胃; 8. 脑。不同小写字母表示差异显著性( $P < 0.05$ )

Fig. 4 Real-time PCR analysis of *Esflo1* expression in different tissues of *E. sinensis*

1. hepatopancreas; 2. muscle; 3. heart; 4. gill; 5. gut; 6. thoracic ganglia; 7. stomach; 8. brain. Different letter superscripts mean significant differences( $P < 0.05$ )

导的细胞内吞、黏着斑形成<sup>[23]</sup>等。组织表达结果显示中华绒螯蟹 *Esflo1* 基因集中高度表达于肝胰腺、心脏、肌肉这 3 个组织中,与大黄鱼(*Larimich-*

*thys crocea*)*flotillin-1* 基因在肝胰腺中大量表达的结果相吻合<sup>[24]</sup>。

本实验室前期针对去除眼柄前后的中华绒螯蟹肝胰腺组织进行基因的转录组和表达谱分析,发现在去除眼柄之后,中华绒螯蟹肝胰腺中 *Esflo1* 基因的表达量较平时上调了 2.8 倍,推测 *Esflo1* 可能参与了 CHH 调节血糖平衡的信号通路。基于在近缘物种中 *flotillin* 的细胞膜定位及其在哺乳动物中被发现的参与胰岛素信号传递的功能,推测 *Esflo1* 蛋白很有可能作为 CHH 的直接或间接受体参与糖代谢这一重要的生理活动,是 CHH 调控糖代谢通路中一个重要的环节。肝胰腺和肌肉是 CHH 作用的主要靶器官,通过组织表达分析,*Esflo1* 大量表达于中华绒螯蟹肝胰腺、肌肉、心脏这 3 种储存糖原的组织中,说明 *Esflo1* 蛋白极有可能作为 CHH 的受体,在将糖原转化为血糖的通路中发挥着重要作用。本研究的结果为后期所要开展的针对甲壳动物碳水化合物代谢分子机理的研究奠定了一定的理论基础,对于推动中华绒螯蟹养殖业发展具有重要意义。

## 参考文献:

- [ 1 ] Wang C H, Li S F. Advances in studies on germplasm in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [ J ]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9 ( 1 ): 82 - 86. [ 王成辉, 李思发. 中华绒螯蟹种质研究进展. 中国水产科学, 2002, 9 ( 1 ): 82 - 86. ]
- [ 2 ] Lacombe C, Greve P, Martin G. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family [ J ]. Neuropeptides, 1999, 33 ( 1 ): 71 - 80.
- [ 3 ] 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展望. 水产学报, 1998, 22 ( 2 ): 154 - 161. ]
- [ 4 ] Treeratrakool S, Udomkit A, Eurwilaichitr L, et al. Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone ( CHH ) of *Penaeus monodon* in *Pichiapastoris* [ J ]. Marine Biotechnology ( NY ), 2003, 5 ( 4 ): 373 - 379.
- [ 5 ] Yang J F, Zhu D F, Shen J M, et al. Physiological significance of crustacean hyperglycemic hormone family [ J ]. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44 ( 1 ): 151 - 158. [ 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. 动物学杂志, 2009, 44 ( 1 ): 151 - 158. ]
- [ 6 ] Wang Z Z, Xiang J H. A review on the structure and function of crustacean hyperglycemic neurohormone family [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25 ( 2 ): 175 - 180. [ 王在照, 相建海. 甲壳动物 CHH 家族神经激素结构和功能研究进展. 水产学报, 2001, 25 ( 2 ): 175 - 180. ]
- [ 7 ] Kang X J, Wen X R, Mu S M, et al. Extraction and function of hyperglycemic hormone in *Eriocheir sinensis* [ J ]. Journal of Hebei University: Natural Science Edition, 2007, 27 ( 1 ): 68 - 74. [ 康现江, 温秀荣, 穆淑梅, 等. 中华绒螯蟹高血糖素的分离及其功能初探. 河北大学学报: 自然科学版, 2007, 27 ( 1 ): 68 - 74. ]
- [ 8 ] Schulte T, Paschke K A, Laessing U, et al. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration [ J ]. Development, 1997, 124 ( 2 ): 577 - 587.
- [ 9 ] Edgar A J, Polak J M. Flotillin-1: gene structure; cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals [ J ]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2001, 33 ( 1 ): 53 - 64.
- [ 10 ] Carcea I, Maayan A, Mesias R, et al. Flotillin-mediated endocytic events dictate cell type-specific responses to semaphorin 3A [ J ]. Journal of Neuroscience, 2010, 30 ( 45 ): 15317 - 15329.
- [ 11 ] James D J, Cairns F, Salt I P, et al. Skeletal muscle of stroke-prone spontaneously hypertensive rats exhibits reduced insulin-stimulated glucose transport and elevated levels of caveolin and flotillin [ J ]. Diabetes, 2001, 50 ( 9 ): 2148 - 2156.
- [ 12 ] Zhao F, Zhang J, Liu Y S, et al. Research advances on flotillins [ J ]. Virology Journal, 2011. doi: 10.1186/1743-422X-8-479.
- [ 13 ] Klein S L, Strausberg R L, Wagner L, et al. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: the NIH *Xenopus* initiative [ J ]. Developmental Dynamics, 2002, 225 ( 4 ): 384 - 391.
- [ 14 ] Pandur P D, Dirksen M L, Moore K B, et al. *Xenopus* flotillin1, a novel gene highly expressed in the dorsal nervous system [ J ]. Developmental Dynamics, 2004, 231 ( 4 ): 881 - 887.
- [ 15 ] Wakasugi K, Nakano T, Kitatsuji C, et al. Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein [ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 318 ( 2 ): 453 - 460.
- [ 16 ] Johansson E, Jonson I, Bosaeus M, et al. Identification of flotillin-1 as an interacting protein for antisecretory factor [ J ]. Regulatory Peptides, 2008, 146 ( 1 - 3 ): 303 - 309.
- [ 17 ] Bitsikas V, Riento K, Howe J D, et al. The role of flotillins in regulating  $\alpha$  production, investigated using flotillin 1<sup>-/-</sup>, flotillin 2<sup>-/-</sup> double knockout mice [ J ]. PLoS ONE, 2014, 9 ( 1 ): e85217.
- [ 18 ] Ren K, Gao C, Zhang J, et al. Flotillin-1 mediates PrPc endocytosis in the cultured cells during Cu<sup>2+</sup> stimulation through molecular interaction [ J ]. Molecular Neurobiology, 2013, 48 ( 3 ): 631 - 646.
- [ 19 ] Monje F J, Divisch I, Demit M, et al. Flotillin-1 is an evolutionary-conserved memory-related protein up-regulated in implicit and explicit learning paradigms [ J ]. Annals of Medicine, 2013, 45 ( 4 ): 301 - 307.
- [ 20 ] Leong J S, Jantzen S G, von Schalburg KR, et al. Salmosalar and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome [ J ]. BMC Genomics, 2010, 30; 11: 279.
- [ 21 ] Saslowsky D E, Cho J A, Chinnapan H, et al. Intoxication of zebrafish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins

- but not Derlin-1 or-2 [ J ]. The Journal of Clinical Investigation, 2010, 120 ( 12 ) : 4399 – 4409.
- [ 22 ] Langhorst M F, Reuter A, Stuermer C A. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins [ J ]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62 ( 19 – 20 ) : 2228 – 2240.
- [ 23 ] von Philipsborn A C, Ferrer V A, Rivera M E, et al. Restricted expression of reggie genes and proteins during early zebrafish development [ J ]. Journal of Comparative Neurology, 2005, 14, 482 ( 3 ) : 257 – 272.
- [ 24 ] Lin T S, Xue L Y, Zhang X J, et al. Molecular characterization of Flotillin-1 gene in *Larimichthys crocea* [ J ]. Journal of Biology, 2012, 29 ( 2 ) : 8 – 11. [ 林天势, 薛良义, 张晓菊, 等. 大黄鱼 Flotillin-1 基因分子特征分析. 生物学杂志, 2012, 29 ( 2 ) : 8 – 11. ]

## Cloning and expression analysis of *Esflol* gene in *Eriocheir sinensis*

ZHUANG Cuiheng<sup>1</sup>, SUN Jinsheng<sup>2</sup>, ZHANG Yichen<sup>1</sup>, TIAN Jinze<sup>1</sup>,  
GENG Xuyun<sup>2</sup>, ZHU Lina<sup>1</sup>, LI Ran<sup>1\*</sup>

( 1. College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin 300387, China;  
2. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Tianjin 300221, China )

**Abstract:** The crustacean hyperglycemic hormone ( CHH ) family has been found only in arthropods currently, and plays significant roles in regulation of glucose levels, molting, stress response and a variety of physiological metabolic activities. We selected *Esflol* ( *Eriocheir sinensis* flotillin-1 like, *Esflol* ) as our object of study after transcriptome analysis and gene expression profiling, to understand the importance of this family—crustacean hyperglycemic hormone ( CHH ), how to regulate glucose levels of the *E. sinensis*. According to the prompting of transcriptome, a cDNA sequence encoding *Esflol* was cloned from hepatopancreas of *E. sinensis* by RACEs, and the results of tissue expression analysis were also obtained. The results show that the open reading frame of *Esflol* consists of 1281 bp, encoding 426 amino acids without signal peptide. Typical domains of SPFH super family and PHB domain. Multi-sequence alignments analysis showed *Esflol* shared the highest identity with *E. sinensis* flotillin-1 ( 57% ). Tissue distribution of *Esflol* was detected by quantitative real-time PCR, although strong expression of *Esflol* was detected in hepatopancreas and muscles, and its expression could also be found in heart, gill, gut, ganglion and stomach, and in lower expression levels of brain. This study lays the foundation for sugar metabolic physiological mechanism research of *E. sinensis*, and also provides a reference for sugar metabolic physiological mechanism research of other aquaculture crustaceans.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; crustacean hyperglycemic hormone; flotillin-1; tissue expression

**Corresponding author:** LI Ran. E-mail: liran\_1006@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China ( 31302168 ); Natural Science Foundation of Tianjin ( 14JCYBJC30700 ); Doctoral Starting up Foundation of Tianjin Normal University ( 52XB1303 )