



罗氏沼虾细胞色素P450家族CYP302a1基因克隆及其在蜕皮周期中的表达

杨光^{1,2}, 秦真东², 赵丽娟², 詹凡玢², 沈海洋^{1,2}, 张梦兰^{1,2},
卢志杰^{1,2}, 叶成凯^{1,2}, 李凤麟², 潘淦^{1*}, 林鑫^{2*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东 广州 510631;

2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225)

摘要: 蜕皮是甲壳动物重要的生理活动, 与其蜕皮激素的合成密切相关, 细胞色素P450(CYP)302a1是甲壳动物蜕皮激素合成通路中的关键酶之一。本研究克隆了罗氏沼虾CYP302a1基因(*Mr-CYP302a1*), cDNA全长1 859 bp, 开放阅读框(ORF)为1 629 bp, 编码543个氨基酸(aa), 分子量大小为61.09 ku, 等电点为8.42。氨基酸序列分析显示CYP302a1基因的保守结构域含有5个P450基因家族特征保守区域: heme-binding、helix-K、helix-C、helix-I及PERF。系统进化分析结果显示*Mr-CYP302a1*首先与绿虾CYP302a1聚为一支, 然后与凡纳滨对虾及三疣梭子蟹等十足目甲壳动物的CYP302a1聚为一支, 与甲壳动物的亲缘关系最近。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测表明*Mr-CYP302a1*在罗氏沼虾的多个组织中均有表达, 其中在Y器官中的表达量最高, 性腺中次之。同时研究发现, *Mr-CYP302a1*基因在罗氏沼虾的蜕皮后期(A期和B期)表达量很低, 蜕皮间期(C期)表达量开始上升, 在蜕皮前期D₁亚期达到峰值。对*Mr-CYP302a1*进行蛋白表达及多克隆抗体制备, 蛋白印迹法(Western blot, WB)检测表明*Mr-CYP302a1*蛋白在罗氏沼虾Y器官中的表达量最高, 在蜕皮过程中的蜕皮前期D₁亚期达到峰值。综上所述, 该基因在罗氏沼虾的蜕皮过程中扮演着十分重要的角色。

关键词: 罗氏沼虾; 蜕皮周期; 基因克隆; CYP302a1; 组织表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

在甲壳动物的变态、生长、发育、繁殖过程中, 蜕皮发挥着极其重要的作用, 并贯穿于整个甲壳动物的个体发育^[1]。同时, 研究发现蜕皮是一个复杂的生理过程, 受到多种环境因子和自身因素的影响, 其中一个重要的调控因子是蜕皮类固醇^[2]。蜕皮类固醇共有4种: 蜕皮激素、25-脱氧蜕皮激素、3-脱氢蜕皮激素及3-脱

氢-25脱氢蜕皮激素^[3]。蜕皮激素又被称为羽化激素, 首先在飞蛾类昆虫中被发现^[4], 随后在南非岩龙虾(*Jasus lalandii*)、美洲蓝蟹(*Callinectes sapidus*)等物种中相继被发现^[5]。蜕皮激素的合成受到多种激素和物质的调控, 蜕皮抑制激素(molt inhibiting hormone, MIH)和甲壳动物高血糖类激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)能

收稿日期: 2019-07-07 修回日期: 2019-09-25

资助项目: 国家自然科学基金(31872606); 广东省海洋与渔业局基金(GDME-2018C006, D21822202); 中国—东盟海上合作基金(CAMC-2018F); 广东省教育厅基金(KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项(2019KJ141)

通信作者: 潘淦, E-mail: pg2829@sina.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

够抑制蜕皮激素的形成^[6-7],除此之外,血淋巴的钙水平也可以影响蜕皮激素的分泌^[8]。

Y器官(Y-organ, YO)是一种上皮内分泌腺,是甲壳动物重要的内分泌器官之一,位于前鳃腔,呈卵形^[9]。经典的形态学及内分泌学研究表明,在甲壳类动物中,蜕皮激素由Y器官合成并分泌^[10],然后在表皮、眼柄神经节、生殖腺、肝胰腺等组织中生成20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)^[11-12]。20E是蜕皮激素的主要生物活性形式,能够直接控制甲壳动物的蜕皮过程^[13-14]。蜕皮激素在合成和分泌的过程中需要CYP307a1、CYP306a1、CYP302a1、CYP315a1和CYP314a1等细胞色素P450家族蛋白酶的共同参与^[3,15]。细胞色素P450家族蛋白酶的编码基因又称为“Halloween家族基因”,含有helix-K、helix-C、heme-binding、PERF和helix-I这5个保守结构域。早期的研究发现,Halloween家族基因在果蝇蜕皮激素合成过程中起着重要的调控作用^[16-17]。和昆虫相比,虽然有关Halloween家族基因在甲壳动物中的研究相对较少,但随着高通量测序技术的发展,甲壳动物Halloween家族基因的研究也逐渐成为了研究的热点。多个学者在多种甲壳动物中克隆了Halloween家族基因,比如三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) CYP302a1基因^[18]、岸蟹(*Carcinus maenas*)的CYP330a1基因^[19]。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*),又称“马来西亚大虾”,是一种大型淡水虾,原产于东南亚,隶属于节肢动物门(Arthropoda),软甲纲(Malacostraca),十足目(Decapoda),长臂虾科(Palaemonidae),沼虾属(*Macrobrachium*),能够在各种类型的淡水和半咸水中生活。自1976年引进以来,罗氏沼虾已发展成为我国重要的淡水养殖品种之一^[20]。但在罗氏沼虾养殖产业中仍存在一些问題,例如蜕皮失败、蜕皮僵死等^[21],制约了养殖产业的快速发展。因此开展罗氏沼虾蜕皮调控的分子机制研究对罗氏沼虾人工健康养殖和可持续发展有着重要意义。作为蜕皮激素合成通路上重要的调控基因,罗氏沼虾CYP302a1基因还没有被报道。本实验通过qRT-PCR、WB等多种方法研究CYP302a1基因和蛋白在罗氏沼虾不同组织和不同蜕皮周期中的表达变化情况,为进一步揭示其在罗氏沼虾蜕皮调控中的作用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

购自广州金洋水产养殖有限公司的罗氏沼虾,体长9~12 cm,体质量40~80 g,购买后暂养于实验室玻璃水族箱中,暂养至少1周。暂养期间保持含氧量充足,水温23~26 °C,每天投喂饲料2次,每2天换水1次。

1.2 样品采集

根据形态学变化特征,将罗氏沼虾蜕皮周期分为蜕皮后期(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个时期^[22-23]。在C期,采集5只雌虾和5只雄虾的Y器官、表皮、性腺(卵巢和精巢)、眼柄、胸腺神经节、心脏、肝胰腺和大颚器8个组织。在不同蜕皮周期(E期除外),分别采集5只虾的Y器官。各组织在冰上解剖后分装于RNAiso Plus试剂(TaKaRa,大连)中,放入液氮,于-80 °C冻存备用。

1.3 总RNA提取

按照Trizol试剂盒(TaKaRa,大连)说明书,对上述采集的组织样品进行总RNA提取。总RNA用DNaseI(TaKaRa,大连)去除基因组DNA后,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用微量分光光度计Nano-2000(杭州奥盛仪器有限公司)检测RNA的浓度。

1.4 基因克隆

按照反转录试剂盒(Vazyme,南京)说明书反转录得到cDNA,-20 °C保存。利用Clone Manager找到CYP302a1基因的ORF,设计引物(表1)。PCR扩增体系:cDNA模板1 μL,上下游引物各1 μL(10 μmol/L),2×Taq Mix:10 μL,ddH₂O:7 μL。扩增反应程序:94 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,35个循环;最后72 °C延伸10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)回收。将回收产物连接到pMDTM18-T Vector(TaKaRa,大连),并转化到*E. coli* DH5α,涂布于含氨苄青霉素(50 μg/mL)的LB平板,静置2 min,倒置于37 °C恒温培养箱培养12~16 h。挑单菌落于10 mL含氨苄青霉素的LB培养基中培养,随后菌液PCR检

测。使用质粒提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)对阳性菌液进行质粒提取,测序。将测

序结果序列与转录组报告中CYP302a1基因序列进行比对。

表1 实验引物及其序列

Tab. 1 Primers and sequences

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence from 5' to 3'	应用 usage
CYP302a1-F1	ATGATTCCCAGAAATGCTAAAGTTCTGTC	RT-PCR
CYP302a1-R1	TTA GTTTCTTGGAGTAAATGTGAAATCTA	
CYP302a1-F2	GGCGATATCATGATCCCAGAAATGCTAAAGTTCTGTC	亚克隆CYP302a1基因
CYP302a1-R2	CGCGGATCCTTA GTTTCTTGGAGTAAATGTGAAATCTA	
CYP302a1-F3	TGATCGACCCGAGATGTACAAC	qRT-PCR
CYP302a1-R3	GGATGAGACCCGTTACTGGATC	
β -actin-F1	GTCGTGACTTGACCGATTACCT	qRT-PCR
β -actin-R1	ATCTCCTGCTCGAAGTCCAATG	

1.5 序列分析

使用Emboss(<http://emboss.Bioinformatics.NI/>)预测氨基酸序列, ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测ORF氨基酸序列的理化性质, SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质的结构域, TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析蛋白质的跨膜区, SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白质的信号肽。用于CYP302a1氨基酸多序列比对和构建系统进化树的不同物种的氨基酸序列用Blast比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>); 使用Clustal X程序和MEGA 7.0软件进行多重序列比对和系统进化树[Neighbor-Joining(NJ)法]构建。以食蟹猕猴CYP11B2蛋白为模版, WISS-MOEDL软件对罗氏沼虾CYP302a1蛋白进行三级结构同源建模。

1.6 CYP302a1重组质粒的构建、重组蛋白的表达和检验

根据得到的罗氏沼虾CYP302a1基因序列, 设计引物(表1)扩增ORF区域(1 629 bp)。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环, 72 °C延伸10 min。将获得的PCR产物连接到pET-32a质粒(TaKaRa, 大连), 将构建的重组质粒转入*E. coli* BL21(DE3), 使用0.4 mmol/L IPTG, 37 °C诱导4 h, 收集菌体, PBS重悬, 加入5× loading buffer, 沸水浴12 min, 上样于12% SDS-PAGE胶, 检测重组蛋白的表达情况。利用WB检验蛋白: 待12% SDS-

<http://www.sxuebao.cn>

PAGE电泳结束后, 进行转膜, 将膜浸泡于含5%脱脂牛奶(BD, 美国)的TBST溶液中室温封闭2 h, 小鼠抗His-tag单抗(1 : 1 000比例稀释)室温孵育膜3 h, TBST洗涤3次(5 min/次), 加入HRP标记山羊抗小鼠二抗IgG(1 : 10 000比例稀释)(博奥森生物技术有限公司, 北京)孵育55 min, TBST洗涤3次(5 min/次), ECL显色1 min, ChemiScope 6000拍照。

1.7 CYP302a1重组蛋白纯化、多克隆抗体制备、特异性检验及其效价检验

收集经IPTG诱导过的菌液, 用PBS按比例稀释后进行超声波破碎, 功率300 W, 10 s超声/10 s间隔, 超声20 min。将破碎后的菌液离心, 沉淀用PBS按比例重悬, 加入5× loading buffer混匀, 沸水浴12 min, 上样于12% SDS-PAGE胶, 检测CYP302a1蛋白的表达情况。根据包涵体蛋白纯化的方法^[22-23]对包涵体蛋白进行洗涤、复性与溶解。用12% SDS-PAGE胶检测CYP302a1重组蛋白的纯化情况, 考马斯亮蓝快速染液(天根生化科技有限公司, 北京)染色, 脱色后用ChemiScope 6000拍照。

用纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔(广东省医学实验动物中心)3次, 分离血清, 获得CYP302a1多克隆抗体。WB检测CYP302a1多克隆抗体的特异性, 采集罗氏沼虾Y器官新鲜组织0.1 g, 加入1 mL RIPA裂解液(包括1 mmol/L PMSF、10 mmol/L 氟化钠、1 mmol/L原硫酸钠)(碧云天生物技术有限公司, 上海), 用玻璃研磨棒于冰上研磨, 4 °C

下12 000 r/min离心3 min, 取上清液。用Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 上海)测定蛋白浓度, 上样30 μ g, SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、抗体孵育、显色, 其中CYP302a1多克隆抗体稀释比例为1:1 000。采用酶联免疫吸附检测法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测CYP302a1多克隆抗体的效价。

1.8 qRT-PCR分析

使用AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Vazyme公司, 南京)试剂, 在Roche Light Cycler 480(Roche, 美国)上进行qRT-PCR, 引物见表1。qRT-PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 10 s、72 $^{\circ}$ C 10 s, 45个循环。每个组织样品测定3次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[24]进行数据分析, 内参为 β -actin。数据显示为平均值 \pm 标准差, 使用GraphPad Prism 7软件中的单因素方差分析进行数据分析, $P < 0.05$ 表示差异显著(以*表示), 并用GraphPad Prism 7绘图。

1.9 Western blot分析

按照“CYP302a1重组蛋白纯化、多克隆抗体制备、特异性检验及其效价检验”中的方法提取各组织总蛋白及检测蛋白浓度。分别采集不同蜕皮周期(E期除外)虾的Y器官, 参照“CYP302a1重组蛋白纯化、多克隆抗体制备、特异性检验及其效价检验”中的方法检测罗氏沼虾CYP302a1蛋白在各组织和各时期的表达情况, 以 β -actin作为内参蛋白, 并用Image-Pro plus 6.0软件分析CYP302a1蛋白和 β -actin蛋白条带的光密度(IOD)来计算其灰度值。

2 结果

2.1 罗氏沼虾CYP302a1 cDNA序列分析

罗氏沼虾CYP302a1基因cDNA全长1 859 bp, ORF为1 629 bp, 5'非编码区(UTR)为200 bp, 3'非编码区(UTR)为20 bp, 未发现典型的poly(A)加尾信号AATAAA, 而是一个AAAAAA弱的加尾信号(图1-a)。ProtParam在线软件预测ORF编码的氨基酸分子量为61.09 ku, 理论等电点为8.42, 亮氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸含量相对较高, 分别为11.4%、8.6%、6.9%, 是亲水碱性蛋白, 无跨膜结构和信号肽。ORF编码543个氨基酸(aa), 其中70~533为P450保守结构域(图1-b)。

罗氏沼虾CYP302a1蛋白的三级结构是由 α 螺旋、 β -转角和无规则卷曲等二级结构所组成(图1-c)。ExPASy ProtParam Tool预测的蛋白分子式为 $C_{2752}H_{4334}N_{738}O_{797}S_{18}$, 包含1个N端糖基化位点(270~273位), 1个cAMP和cGMP依赖性蛋白磷酸化位点(292~295位), 6个蛋白激酶C磷酸化位点(36~38、46~48、290~292、413~415、451~453、539~541位), 6个酪蛋白磷酸化位点(318~321、328~331、337~340、372~375、389~392、532~535位), 2个酪氨酸激酶磷酸化位点(129~137、93~501位), 3个N-肉蔻酰基化位点(165~174、218~227、355~364位), 1个酰胺化位点(491~494位), 1个细胞色素P450家族特有的亚铁血红素结合区(483~492位)。

Blast比对结果显示, 罗氏沼虾氨基酸序列与绿虾(*Neocaridina denticulata*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、三疣梭子蟹、光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)、麦茎蜂(*Cephus cinctus*)、桃蚜(*Myzus persicae*)相似性分别为47.23%、62.59%、51.72%、45.16%、41.83%和43.96%。Clustal X软件比对分析显示, 该氨基酸序列与其他甲壳动物和昆虫类动物CYP302a1蛋白一样, 包含5个P450特征保守区域, 分别为PERF、helix-C、helix-I、helix-K和heme-binding(图2)。系统进化树结果显示罗氏沼虾CYP302a1与绿虾CYP302a1同源性最高, 首先与其聚为一支, 再与其他甲壳类十足目动物的CYP302a1聚为一支, 而昆虫纲(Insecta)动物的CYP302a1则共同聚为一支(图3), 以上结果显示CYP302a1的分子系统进化关系和物种分类关系基本一致。

2.2 罗氏沼虾CYP302a1多克隆抗体制备及特异性检测

重组质粒经双酶切后, 出现2条明显的条带, 目的条带大小与预测一致(图4-a)。SDS-PAGE蛋白胶结果表明, 重组的CYP302a1蛋白主要表达在包涵体中, 纯化该包涵体之后可得到大小为79.09 ku的单一一条带(图4-b), 使用His-tag一抗可检测到重组的罗氏沼虾CYP302a1蛋白在79.09 ku左右有单一且明显的条带, 大小和预测的一致(His-tag大小为18 ku左右, CYP302a1蛋白大小为61.09 ku, 合计79.09 ku), 说明重组CYP302a1蛋白中含有His-tag标签(图4-c)。用重组CYP302a1蛋白免疫新西兰大白兔得到的多克隆

```

1  GATCTAGCGACCAACAAGAGGCGGTTGACTACTGTGCACCTGTTTGAACCTAACGTTAACGATTTTCTGCACCAACCGTCAACAGTTACGTGTACCATATT 100
101 CTTAAAGTTGTGTACGCTGAGTGGGTGTTAAACGTTGGCGGGCATGTGAAACGTTGCAGAAAAGTAGAGTTGCTGTAGATTATATAACATTTCGATCC 200
201 TCGCATACAAtgattccgaaagctaaagtctgtcaaggtctctgtggcgacatggcagagggsaatgctgctctcattttccgttgtaaatct 300
1  I P E M L K F C Q G P V W C T W Q R E M L P L I F R C K S 30
301 gcacaggctctgcttagcagacgatctggaacagcagcacttacagttcccagccagatgatttggaaaaccccacagctctgggaaagcagcag 400
31  A Q A L A S R R S G T A A P Y S S R A S D D L E N P T A L G K A A A 64
401 caaagcccttgaagatatactggacaaaagtctgctctagttggaacttggatctctatcttccctttatcggtlaaatactcattcggtcgact 500
65  K P F E D I P G P K S L P L V G T L Y L Y L P F I G K Y S F G R L 97
501 gctctacaccggtctcaagaanaaagggaatttggctccactctcgcgagagttgattagaacgtgtaactctctctgtatllgacctcgggac 600
98  H H T G L K K L R E F G P I V R E E L I S N V N L L L L F D P R D 130
601 atcgagacgatgtacgcagcggagggcgatacccgatgagagctccatctatgcctcgcagaaatcacagcttgatgacccagatgtacacactctg 700
131 I E T M Y A T E G R Y P M R R S H I A L E K Y R L D R P E M Y N S G 164
701 gcagctcttcccaacaatgacctgaatggtgaaattaccgagccagccagcagaaagttttgagcagccacaaagcctcctcagccctccact 800
165  G L L P T N G P E W W K L R S P A Q K V L S R P Q S V L S R L P V 197
801 tgcagtgaggttgcacaagattctgtgatctggttccatcttaccgtgatccaggttaacgggtctcctcccaatttctctgatctgagaaaagact 900
198  A S E V A Q D F V D L V A I L R D P V T G L I P N F L D L E K R L 230
901 tttctgaattacttggcagcaactggatctcagacttggctgcatcgacaagaacatccacatgaataagtcagggcaatgacctaataa 1 000
231 F L E L T M A A T L D V R L G C I D K D N P H E I S Q E A M N L I K 264
1 001 aagcctccgacgactcgaattccaccatcttcagtagcacaacggattccacctctggaagcttcaatacacccacttacaanaagttacaanaatg 1 100
265  A S D D S N S T I F S T D N G F H L W K V F N T P T Y K K L T N G 297
1 101 acagataccatttacagatagcgtataagtagtggagggcaagatagtgaaactgaagcttgataaccaagcagcctgtg 1 200
298  Q D T I Y R I A Y K Y V E A K D S E L K S R L E D S D N P T T Y L 330
1 201 gaaatttctctccgaagtggctcagacaagaacatcgttagtgatattctgcagaccttattgctggagctgacagggaaagcttcaactttt 1 300
331 E Y F L L R S G L D K K D I V S V F C D T L L A G T D T G S F T L S 364
1 301 cctatgcttataatcttgcacaacaatccagaaaacagagacgtctgctcaagaagctcgagatctctctctcagtcagatggaaggttaacgaa 1 400
365  Y A L Y N L A T N P E K Q E L L A Q E A R D L L S Q S D G K V T K 397
1 401 agtctcctagcaaaagcaagtaacttgaagcgttggtaggaagcagcagactccatcaatctctatagcgttggagagatgttctgtagaaga 1 500
398  V V L A K A R Y L K A V V K E S S R L H P I S I G V G R I V A E E 430
1 501 accgttatcagggctacacaacccaanaagtagcgttaattgtgactcaaaatcaagtatcngtgcctgctgaatatttcganaacccaagcagat 1 600
431 T V I R G Y N I P K G T V I V T Q N Q V S C R L P E Y F E N P N E F 464
1 601 tectgctgagagatggttcacaanagaccatcaatctcttctgtctcttctcgttggcattggtcccgagcctgattggaagaatgacgta 1 700
465  L P E R W F T K D A I N P F L S L P F G H G F R A C T G R R M A E 497
1 701 gcaaatgtatagcagcacttataatgtagcagcattataaaattgctggaagggcgaanaactcgactgctactccactcacataaatgaacca 1 800
498  Q N V Y A A L I M I A A N Y K I G W K G G K L D C Y S T H I N E P 530
1 801 gatctccactagatttcacatttactccaagaasactaaAAAAAAAAAACTAAAAA 1 859
531 D S P L D F T F T P R N * 542

```

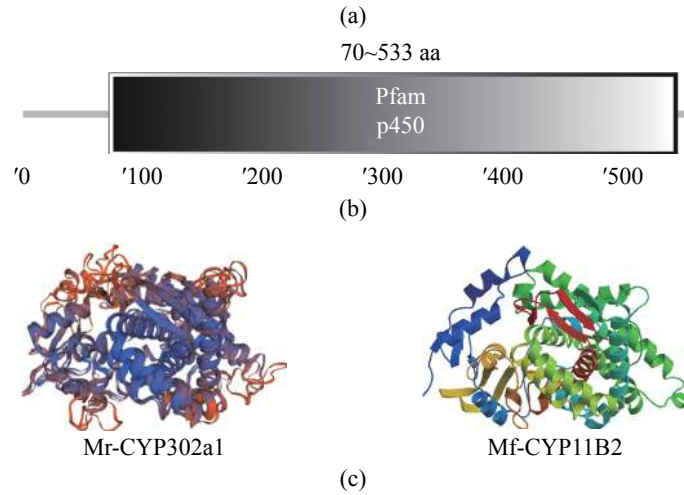


图 1 罗氏沼虾CYP302a1的cDNA核苷酸序列和编码区氨基酸序列

(a)起始密码子用正方形方框标出, helix-C用黑色长方形方框标出, helix-I用浅灰色背景标出, helix-K用双横线标出, PERF用灰色粗横线标出, heme-binding用深灰色背景的方框标出, poly(A)尾巴用下画黑粗线标出; (b)罗氏沼虾CYP302a1的结构域; (c)罗氏沼虾CYP302a1和食蟹猕猴CYP11B2三级结构比较

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CYP302a1 from M. rosenbergii

(a) initiation codon is surrounded by square box; helix-C is marked with black rectangular squares; helix-I is marked with a light gray background; helix-K is marked with double horizontal lines; PERF is marked with gray horizontal lines; heme-binding is marked by a box on a dark gray background; poly(A) was underlined. (b) the domain of the CYP302a1 of M. rosenbergii. (c) the comparison of the tertiary structures of M. rosenbergii CYP302a1 protein and M acaca fasciculari CYP302a1 protein

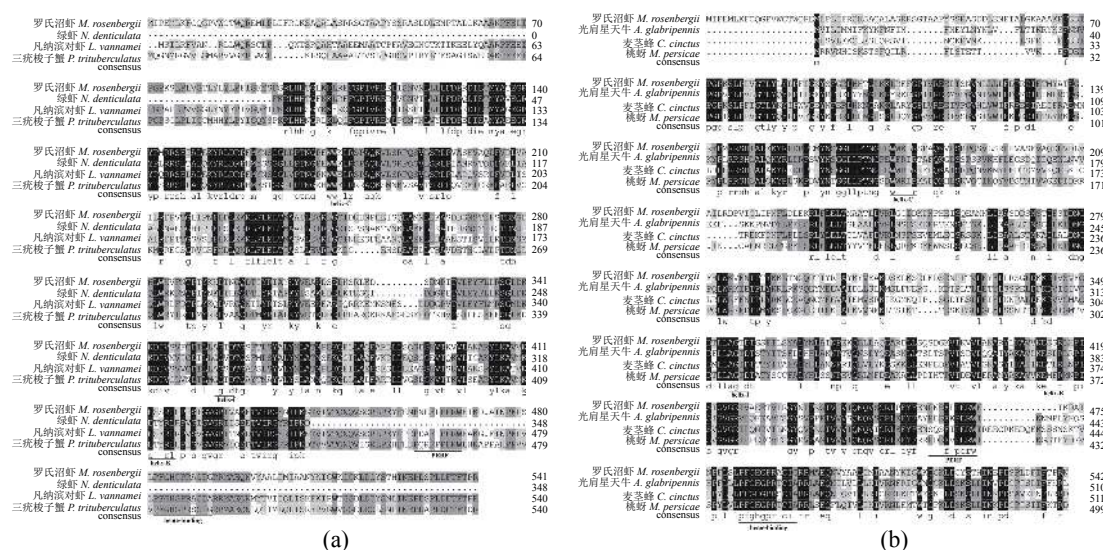


图2 罗氏沼虾CYP302a1氨基酸序列与其他物种CYP302a1氨基酸序列比对

下划线.5个P450特征保守区域(helix-C、helix-I、helix-K、PERF、hemebinding);黑色区域.相同序列;深灰色区域.75%相似序列;浅灰色区域.50%相似序列;白色区域.完全不同序列;“-”表示缺失氨基酸;物种的GenBank ID:罗氏沼虾;绿虾 AIY69125.1,凡纳滨对虾,XP_027209672.1;三疣梭子蟹, AJA06113.1;光肩星天牛, XP_018574126.1;麦茎蜂, XP_015605352.1;桃蚜, XP_022181134.1

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of *M. rosenbergii* CYP302a1 with other species

5 conserved domain (helix-C, helix-I, helix-K, PERF, hemebinding) was underlined; black background: identical sequence; dark gray background: 75% similar sequence; light gray background: 50% similar sequence; white area: completely different sequence; (-) represents missing amino acid; the GenBank IDs of reference sequences are shown as follows: *Macrobrachium rosenbergii*; *Neocaridina denticulata*, AIY69125.1; *L. vannamei*, XP_027209672.1; *Portunus trituberculatus*, AJA06113.1; *Anoplophora glabripennis*, XP_018574126.1; *Cephus cinctus*, XP_015605352.1; *Myzus persicae*, XP_022181134.1

抗体进行免疫印迹检测罗氏沼虾Y器官中的CYP302a1蛋白,实验结果表明,罗氏沼虾Y器官中检测到一条61.09 ku左右清晰的特异性蛋白条带,和预测的CYP302a1蛋白大小一致(图4-d)。用酶联免疫吸附法测定多克隆抗体血清的效价,结果显示多克隆抗体的效价不低于1:51200(图4-e)。

2.3 罗氏沼虾CYP302a1组织分布和蜕皮各周期的表达差异分析

利用qRT-PCR检测CYP302a1在罗氏沼虾各个组织中的表达。实验结果显示,雌虾和雄虾CYP302a1的组织分布情况较为相似,在所有检测组织中均有表达,在Y器官中表达量最高,性腺中次之,肝胰腺和表皮中有微量表达,而在其他组织中表达量极低($P < 0.05$)。qRT-PCR检测了Y器官中CYP302a1在罗氏沼虾蜕皮周期中的表达变化情况,实验结果显示,CYP302a1表达量在蜕皮后期(A期和B期)处于较低水平,但在蜕皮间期(C期)显著升高($P < 0.05$),在D₁期达到最高且显著高于其他各期($P < 0.05$),之后,表达量开始下降,但仍显著高于蜕皮后期($P < 0.05$)(图5)。

2.4 罗氏沼虾CYP302a1在蛋白水平上的组织表达和周期变化分析

利用WB检测CYP302a1蛋白在罗氏沼虾各个组织中的差异表达和蜕皮周期变化情况。WB实验结果与qRT-PCR实验结果大致相同。WB实验结果显示蛋白质在雌虾和雄虾中的表达情况基本相似,在Y器官中的表达量相对较高,性腺中次之,表皮和肝胰腺中最少($P < 0.05$)。在Y器官中检测CYP302a1蛋白在罗氏沼虾蜕皮周期中各个时期的变化情况,实验结果显示在蜕皮后期(A期和B期)CYP302a1蛋白表达量较低,在蜕皮间期(C期)显著升高,在蜕皮前期D₁亚期达到峰值,且在整个蜕皮前期(D期)整体维持在较高的水平(图6)。

3 讨论

细胞色素P450是一个古老的基因家族,广泛分布于细菌、真菌、节肢动物、脊椎动物等体内,有35亿年的进化历史^[25]。虽然其家族成员氨基酸序列变异性高,但仍存在一定的保守结构域。昆虫中报道的保守结构域包括helix-K、

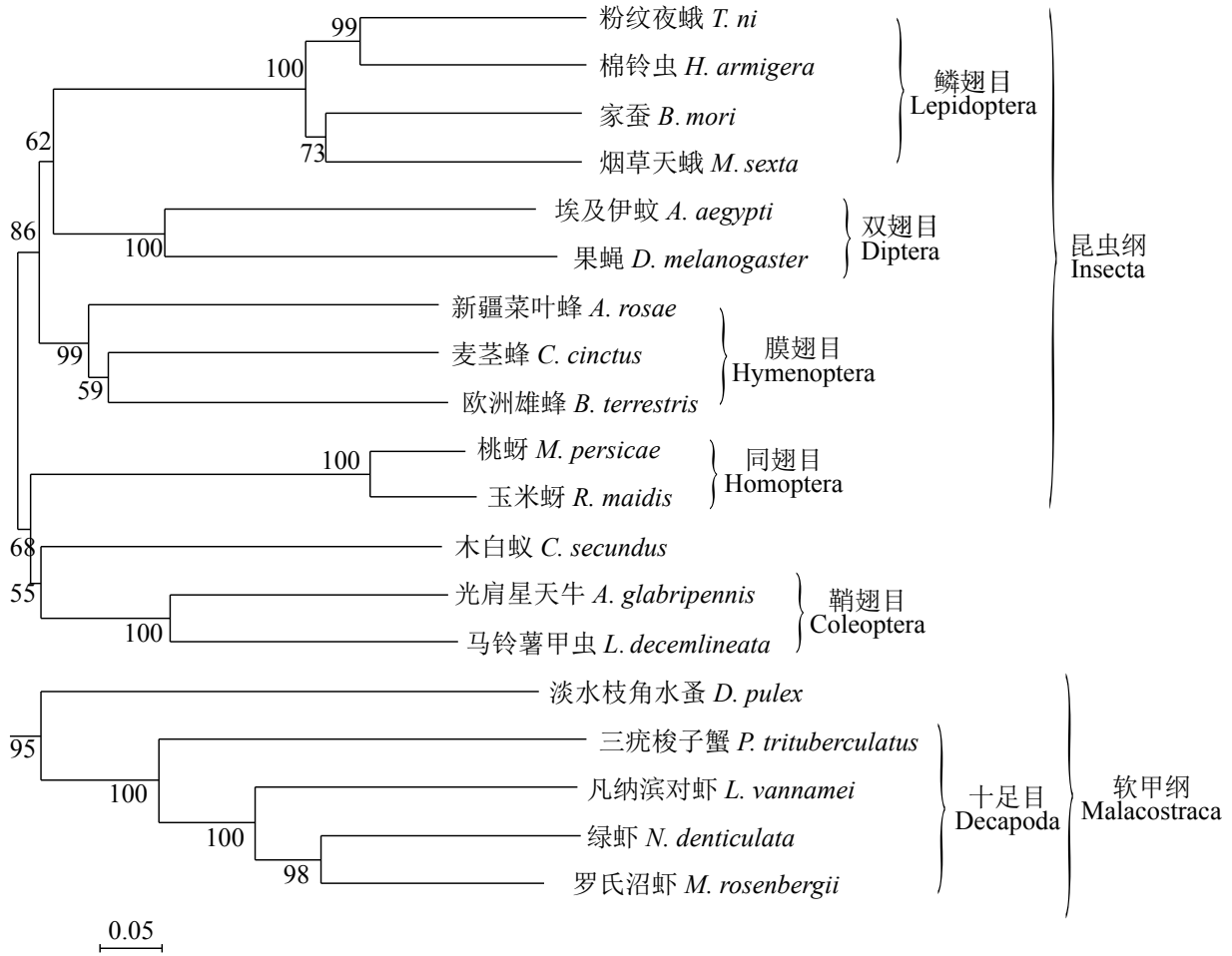


图 3 CYP302a1基因系统进化树

所用氨基酸序列的物种名和相应的登录号：粉纹夜蛾，XP_026729307.1；棉铃虫，AID54852.1；家蚕，BAD99022.1；烟草天蛾，ABC96069.1；埃及伊蚊，AAX85206.1；果蝇，NP_524810.2；新疆菜叶蜂，XP_012267510.1；麦茎蜂，XP_015605352.1；欧洲雄蜂，XP_020718318.1；桃蚜，XP_022181134.1；玉米蚜，XP_026815381.1；木白蚁，XP_023709673.1；光肩星天牛，XP_018574126.1；马铃薯甲虫，AGT57842.1；淡水枝角水蚤，EFX63066.1；三疣梭子蟹，AJA06113.1；凡纳滨对虾，XP_027209672.1；绿虾，AIY69125.1；罗氏沼虾

Fig. 3 Phylogenetic tree of CYP302a1

The species and GenBank accession numbers of amino acid sequences are listed as follows: *Trichoplusia ni*, XP_026729307.1; *Helicoverpa armigera*, AID54852.1; *Bombyx mori*, BAD99022.1; *Manduca sexta*, ABC96069.1; *Aedes aegypti*, AAX85206.1; *Drosophila melanogaster*, NP_524810.2; *Athalia rosae*, XP_012267510.1; *Cephus cinctus*, XP_015605352.1; *Bombus terrestris*, XP_020718318.1; *Myzus persicae*, XP_022181134.1; *Rhopalosiphum maidis*, XP_026815381.1; *Cryptotermes secundus*, XP_023709673.1; *Anoplophora glabripennis*, XP_018574126.1; *Anoplophora glabripennis*, XP_018574126.1; *Leptinotarsa decemlineata*, AGT57842.1; *Daphnia pulex*, EFX63066.1; *Portunus trituberculatus*, AJA06113.1; *Litopenaeus vannamei*, XP_027209672.1; *Neocaridina denticulata*, AIY69125.1; *Macrobrachium rosenbergii*

helix-C、heme-binding、PERF和helix-I^[26-27]，将罗氏沼虾CYP302a1氨基酸序列和十足目甲壳动物以及昆虫动物的CYP302a1蛋白氨基酸序列进行多重序列比对后发现，罗氏沼虾CYP302a1包含上述5个保守结构域，与昆虫蛋白的结构相似。在这5个保守结构域中，heme-binding为细胞色素P450的标志性基序，helix-C位于细胞色素P450的N端，和血红素的丙酸酯结合；helix-I位于吡咯环B上，可能和细胞色素P450与底物分子或氧分

子的结合有关^[28]；helix-K可以稳定血红素核心结构，PERF能够和helix-K形成盐桥^[29]。在脊椎动物中，heme-binding编码的半胱氨酸与血红蛋白上血红素中的二价铁相结合，铁首先接受电子被还原，然后和CO结合，在450 nm处产生特征吸收峰^[30]，但是虾类通常只是含有血蓝蛋白，罗氏沼虾heme-binding也许和血蓝蛋白上的铜离子结合从而发挥其生物学功能，需要进一步研究。进化树分析显示罗氏沼虾CYP302a1与软甲

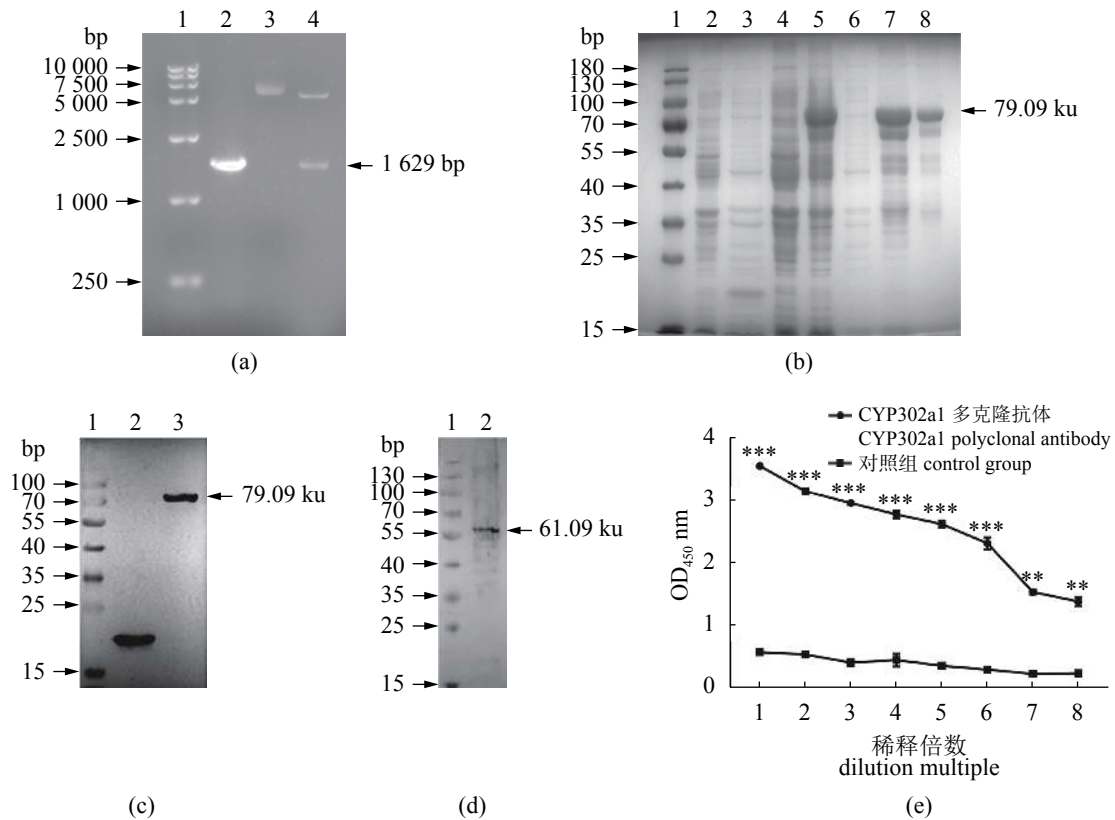


图4 罗氏沼虾CYP302a1基因克隆、表达、多克隆抗体制备及效价检测

(a) *Mr-CYP302a1*基因的克隆及融合表达载体酶切检验: 1. DNA Marker, 2. *Mr-CYP302a1* PCR片段, 3. 重组质粒, 4. 重组质粒双酶切检验; (b) SDS-PAGE鉴定纯化的Mr-CYP302a1重组蛋白: 1. 蛋白Marker, 2. 未加IPTG诱导的pET-32A空载, 3. IPTG诱导的pET-32A空载, 4. 未加IPTG诱导的重组蛋白, 5. IPTG诱导的重组蛋白, 6. 重组蛋白上清液, 7. 沉淀的重组蛋白, 8. 纯化的重组蛋白; (c) His标签一抗检测的Mr-CYP302a1重组蛋白: 1. 蛋白Marker, 2. 表达的pET-32A空载总菌体, 3. 含重组蛋白的总菌体; (d) Mr-CYP302a1多克隆抗体特异性鉴定: 1. 蛋白Marker, 2. Y器官总蛋白, 条带分子量为61.09 ku, 和Mr-CYP302a1预测的分子量大小一致; (e) Mr-CYP302a1多克隆抗体效价检测。ns表示无显著性差异, 下同

Fig. 4 Molecular cloning and expression of *Mr-CYP302a1* and preparation of polyclonal antibody

(a) cloning of *Mr-CYP302a1* gene and digestion test of fusion expression vector with restriction enzyme: 1. DNA Marker, 2. *Mr-CYP302a1* PCR fragment, 3. fusion expression vector, 4. enzyme digestion verification; (b) purified recombinant Mr-CYP302a1 protein by SDS-PAGE. 1. protein marker, 2. *E. coli* BL21 with pET-32A vector without IPTG, 3. *E. coli* BL21 with pET-32A vector with IPTG, 4. *E. coli* with pET-32A- Mr-CYP302a1 protein without IPTG, 5. *E. coli* with pET-32A- Mr-CYP302a1 with IPTG, 6. supernatant of *E. coli* with pET-32A- Mr-CYP302a1, 7. pellet of *E. coli* with pET-32A- Mr-CYP302a1, 8. purified recombinant Mr-CYP302a1 protein; (c) verification of recombinant Mr-CYP302a1 protein using His-tag antibody. 1. protein maker. 2. *E. coli* BL21 with pET-32A vector. 3. *E. coli* with pET-32A- Mr-CYP302a1; (d) polyclonal antibody of Mr-CYP302a1. 1. protein marker, 2. total protein of YO; (e) effect detection of the Mr-CYP302a1 Polyclonal antibody; 1. 400×, 2. 800×, 3. 1 600×, 4. 3 200×, 5. 6 400×, 6. 12 800×, 7. 25 600×, 8. 51 200×. *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$; ****. $P < 0.0001$; ns. not significant difference, the same below

纲的十足目先聚为一支, 再与昆虫纲的鞘翅目(Coleoptera)、同翅目(Homoptera)聚为一支, 然后与膜翅目(Hymenoptera)、双翅目(Diptera)聚为一支, 最后与鳞翅目(Lepidoptera)组成的分支聚为一大支。本实验结果与柳志业等^[18]在三疣梭子蟹中的研究结果不同, 其系统发育进化分析表明三疣梭子蟹CYP302a1与甲壳动物亚门的桡足纲(Copepoda)首先聚为一支, 然后与昆虫纲的双翅目聚为一支, 再与同翅目聚为一支, 最后与鳞翅目组成的分支聚为一大支, 具体原因尚不清

楚, 有待进一步研究。

细胞色素P450酶系参与多种外源物质和内源物质在生物体内的转化、合成与代谢过程。相关研究表明, 细胞色素P450广泛存在于生物体的各个组织中, 但是不同组织的表达量存在差异。qTR-PCR结果表明, CYP302a1在罗氏沼虾的多个组织中均有不同程度的表达, 其中Y器官中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$)。由于CYP302a1是蜕皮激素合成通路中的关键酶, 所以实验结果与Y器官是甲壳动物合成蜕皮激素的主要器官

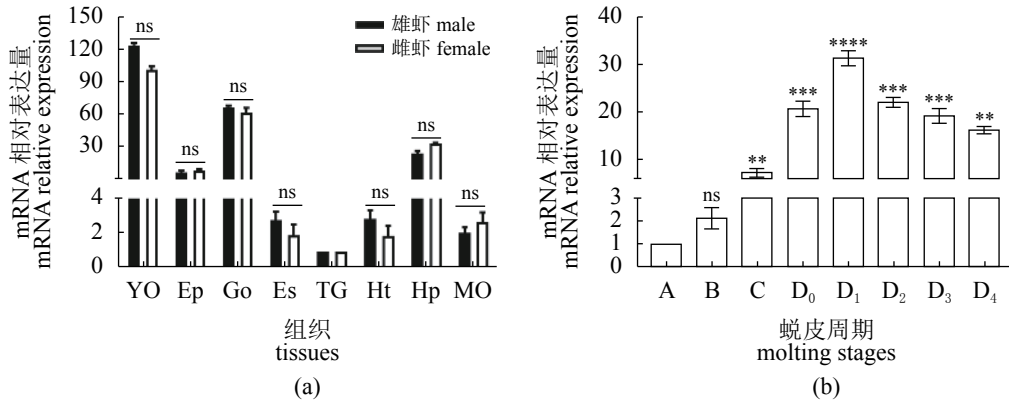


图 5 *CYP302a1*在罗氏沼虾不同组织(a)和Y器官不同蜕皮周期中(b)的相对表达量

YO. Y器官, Ep. 表皮, Go. 性腺, Es. 眼柄, TG. 胸腺神经节, Ht. 心脏, Hp. 肝胰腺, MO. 大颚器; A, B. 蜕皮后期; C. 蜕皮间期; D₀、D₁、D₂、D₃、D₄蜕皮前期, 下同

Fig. 5 Relative expression of *CYP302a1* in different tissues(a) and different molting stages in Y-organ(b) of *M. rosenbergii*

YO. Y-organ, Ep. epidermis, Go. gonad, Es. eye stalk, TG. thoracic ganglion, Ht. heart, Hp. hepatopancreas, MO. mandibular organ; A, B. postmolt; C. intermolt; D₀, D₁, D₂, D₃, D₄ premolt, the same below

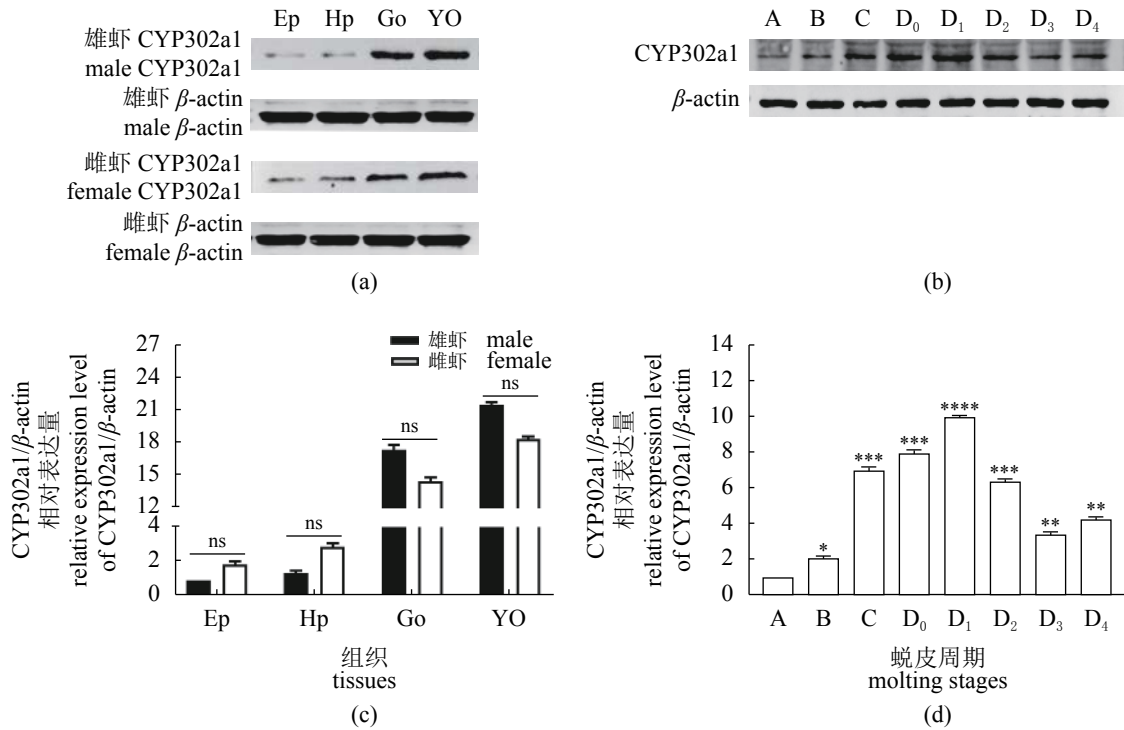


图 6 罗氏沼虾CYP302a1蛋白在不同组织和在Y器官不同蜕皮周期中的相对表达量

(a) WB检测CYP302a1蛋白在不同组织中的表达; (b)WB检测Y器官中CYP302a1蛋白在不同蜕皮时期的表达; (c)在不同组织中罗氏沼虾CYP302a1蛋白和 β -actin蛋白WB检测条带的灰度值分析; (d)在不同蜕皮时期中罗氏沼虾CYP302a1蛋白和 β -actin WB检测蛋白条带的灰度值分析

Fig. 6 Protein expression profiles of Mr-CYP302a1 in different tissues and different molting stages in YO of *M. rosenbergii*

(a) CYP302a1 protein expression in tissues with WB; (b) CYP302a1 protein expression in different molting stages in Y-organ with WB; (c) gray value analysis of CYP302a1 protein and β -actin protein WB bands in *M. rosenbergii* in tissues; (d) gray value analysis of CYP302a1 protein and β -actin with WB protein bands in *M. rosenbergii* during different molting periods

的结论一致^[10]。此外CYP302a1在其他组织中的极低表达也表明了其编码的蛋白质功能的单一性。实验结果与已报道的三疣梭子蟹CYP302a1和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)CYP306a1的组织表达差异十分相似^[18,31]。而冯艳艳等^[32]的相关研究表明CYP2在三疣梭子蟹的肝胰腺中表达量最高,其他研究者也发现了CYP4在岸蟹的肝胰腺中表达量最高的情况^[33]。这说明Halloween家族基因在不同甲壳动物中可能拥有不同的组织分布情况,这与昆虫Halloween家族基因在不同物种中的组织差异表达大致相同^[34-35]的情况不一致。

蜕皮激素是甲壳动物蜕皮的重要调控分子,其血淋巴浓度通常在蜕皮周期中呈现规律性变化。Soumoff等^[5]研究表明,美洲蓝蟹的蜕皮激素浓度在蜕皮前期D₃亚期达到峰值。凡纳滨对虾蜕皮激素浓度高峰则出现在蜕皮前期D₁亚期^[36]。有关研究表明三疣梭子蟹血淋巴中蜕皮激素浓度从蜕皮后期开始上升,在蜕皮前期D₃亚期达到峰值,且三疣梭子蟹CYP302a1在蜕皮周期的D₁亚期达到最高值^[18,37]。相关研究表明,罗氏沼虾血淋巴中蜕皮激素浓度在蜕皮周期的蜕皮前期整体维持在较高水平,且在D₃亚期达到最大值^[38]。本研究发现,罗氏沼虾CYP302a1在Y器官中的表达情况与蜕皮激素浓度变化趋势大致相同。而罗氏沼虾CYP302a1的表达量在蜕皮前期D₁亚期达到最大值,早于蜕皮激素峰值出现的时间(D₃亚期),说明罗氏沼虾CYP302a1基因是通过参与蜕皮激素的合成来调节血淋巴中蜕皮激素的浓度,进而参与调控罗氏沼虾的蜕皮这一重要的生理活动,其精细调控机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kuballa A V, Holton T A, Paterson B, *et al.* Moulting cycle specific differential gene expression profiling of the crab *Portunus pelagicus*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 147.
- [2] Loeb M J. Hormonal control of growth and reproduction in the arthropods: introduction to the symposium[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 1993, 33(3): 303-307.
- [3] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3-5): 196-203.
- [4] Truman J W, Riddiford L M. Neuroendocrine control of ecdysis in silkmoths[J]. *Science*, 1970, 167(3925): 1624-1626.
- [5] Soumoff C, Skinner D M. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other crustacea[J]. *The Biological Bulletin*, 1983, 165(1): 321-329.
- [6] Chung J S, Zmora N, Katayama H, *et al.* Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: functions, titer, and binding to target tissues[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(3): 447-454.
- [7] Webster S G. High-affinity binding of putative moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenas*[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1993, 251(1330): 53-59.
- [8] Spaziani E, Mattson M P, Wang W L, *et al.* Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean Y-organs[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 1999, 39(3): 496-512.
- [9] 蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究展望[J]. *水产学报*, 1998, 22(2): 154-161.
- Cai S L. A review of crustacean endocrinology[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(2): 154-161(in Chinese).
- [10] Chang E S, O'Connor J D. Secretion of α -ecdysone by crab Y-organs *in vitro*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(2): 615-618.
- [11] Snyder M J, Chang E S. Role of the midgut gland in metabolism and excretion of ecdysteroids by lobsters, *Homarus americanus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1992, 85(2): 286-296.
- [12] Spaziani E, Desantis K, O'Rourke B D, *et al.* The clearance *in vivo* and metabolism of ecdysone and 3-dehydroecdysone in tissues of the crab *Cancer antennarius*[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 1997, 279(6): 609-619.
- [13] Galbraith M N, Horn D H S, Middleton E J, *et al.* Structure of deoxycrustecdysone, a second crustacean moulting hormone[J]. *Chemical Communications (London)*, 1968, 2(2): 83-85.
- [14] Horn D H S, Middleton E J, Wunderlich J A, *et al.*

- Identity of the moulting hormones of insects and crustaceans[J]. *Chemical Communications (London)*, 1966(11): 339-341.
- [15] Böcking D, Dauphin-Villemant C, Sedlmeier D, *et al.* Ecdysteroid biosynthesis in moulting glands of the crayfish *Orconectes limosus*: evidence for the synthesis of 3-dehydroecdysone by *in vitro* synthesis and conversion studies[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, 23(1): 57-63.
- [16] Chavez V M, Marques G, Delbecque J P, *et al.* The drosophila disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels[J]. *Development*, 2000, 127(19): 4115-4126.
- [17] Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, *et al.* Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: II. Zygotic loci on the third chromosome[J]. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 1984, 193(5): 283-295.
- [18] 柳志业, 朱冬发, 谢熙, 等. 三疣梭子蟹CYP302a1基因克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2015, 39(5): 628-637. Liu Z Y, Zhu D F, Xie X, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of CYP302a1 from *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(5): 628-637(in Chinese).
- [19] Rewitz K, Styriahave B, Andersen O. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310(2): 252-260.
- [20] 刘恩生, 万全. 罗氏沼虾的养殖现状与发展前景(综述)[J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(2): 189-192. Liu E S, Wan Q. Current status and development prospects of *Macrobrachium rosenbergii* (Review)[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 1997, 24(2): 189-192(in Chinese).
- [21] 黄景, 陈琴. 罗氏沼虾亲虾蜕壳僵死的原因探讨[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(2): 129-131. Huang J, Chen Q. The studies on the reason causing parent *Macrobrachium rosenbergii* to death at exuviation[J]. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 2003, 22(2): 129-131(in Chinese).
- [22] 卢志杰, 叶成凯, Sarath B V, 等. 罗氏沼虾谷氨酰胺合成酶基因的克隆与表达[J]. 水产学报, 2019, 43(3): 549-562. Lu Z J, Ye C K, Sarath B V, *et al.* Cloning and expression of glutamine synthetase from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 549-562(in Chinese).
- [23] 叶成凯, 卢志杰, Sarath B V, 等. 罗氏沼虾几丁质酶3B基因的克隆及其在蜕皮周期中的表达[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 751-762. Ye C K, Lu Z J, Sarath B V, *et al.* Cloning and expression analysis of chitinase-3B from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during molting cycle[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 751-762(in Chinese).
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Nelson D R. Metazoan cytochrome P450 evolution[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1998, 121(1-3): 15-22.
- [26] Ranson H, Nikou D, Hutchinson M, *et al.* Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2002, 11(5): 409-418.
- [27] Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, *et al.* Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(33): 9268-9273.
- [28] 郑明奇, 邱星辉, 张文吉, 等. 棉铃虫细胞色素P450的分子生物学[J]. 生命的化学, 2001, 21(3): 229-231. Zheng M Q, Qiu X H, Zhang W J, *et al.* Molecular biology of cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*[J]. *Chemistry of Life*, 2001, 21(3): 229-231(in Chinese).
- [29] 艾均文, 董元凌, 孔卫青, 等. 家蚕细胞色素P450基因CYP6AE2的分子克隆与序列分析[J]. 蚕业科学, 2007, 33(3): 380-386. AI J W, Dong Y L, Kong W Q, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a novel cytochrome P450 Gene, CYP6AE2, from silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Science of Sericulture*, 2007, 33(3): 380-386(in Chinese).
- [30] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- success story[J]. *Genome Biology*, 2000, 1(6): reviews3003.1.
- [31] Asazuma H, Nagata S, Nagasawa H. Inhibitory effect of molt-inhibiting hormone on *phantom* expression in the Y-organ of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2009, 72(4): 220-233.
- [32] 冯艳艳, 李健, 张德宁, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)CYP2基因的cDNA克隆及表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(5): 997-1005.
- Feng Y Y, Li J, Zhang D N, *et al.* Cloning and expression of CYP2 gene in *Portunus trituberculatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(5): 997-1005(in Chinese).
- [33] Dam E, Rewitz K F, Styriehave B, *et al.* Cytochrome P450 expression is moult stage specific and regulated by ecdysteroids and xenobiotics in the crab *Carcinus maenas*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377(4): 1135-1140.
- [34] Iga M, Smaghe G. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*[J]. *Peptides*, 2010, 31(3): 456-467.
- [35] Rewitz K F, Rybczynski R, Warren J T, *et al.* Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36(3): 188-199.
- [36] Blais C, Sefiani M, Toullec J Y, *et al.* *In vitro* production of ecdysteroids by Y-organs of *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Correlation with hemolymph titers[J]. *Invertebrate Reproduction and Development*, 1994, 26(1): 3-11.
- [37] 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.
- Wang C J, Zhu D F, Qi Y Z, *et al.* Molt-inhibiting hormone levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of *Portunus trituberculatus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(1): 22-28(in Chinese).
- [38] Okumura T, Kamba M, Sonobe H, *et al.* *In vitro* secretion of ecdysteroid by Y-organ during molt cycle and evidence for secretion of 3-dehydroecdysone in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda: Caridea)[J]. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2003, 44(1): 1-8.

Cloning and characterization of cytochrome P450 302a1 (*CYP302a1*) during molting stages in *Macrobrachium rosenbergii*

YANG Guang^{1,2}, QIN Zhendong², ZHAO Lijuan², ZHAN Fanbin², SHEN Haiyang^{1,2},
ZHANG Menglan^{1,2}, LU Zhijie^{1,2}, YE Chengkai^{1,2}, LI Fenglin², PAN Gan^{1*}, LIN Li^{2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center,
Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Zhongkai University of
Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The molting process is an essential physiological process in crustaceans that is closely related to the synthesis of ecdysteroids. Cytochrome P450(CYP)302a1 is the key enzyme which plays a critical role in the synthesis of ecdysteroids. Here we present the cloning and characterization of *CYP302a1* gene from *Macrobrachium rosenbergii* (*Mr-CYP302a1*). The acquired gene was 1 859 bp in full-length with the open reading frame (ORF) of 1 629 bp that encodes 543 amino acids (aa) with a molecular weight of 61.09 ku and an isoelectric point of 8.42. The aa sequence analysis revealed that there were five P450 characteristic conserved regions, i.e., heme-binding, helix-K, helix-C, helix-I, and PERF. Phylogenetic analysis demonstrated that *Mr-CYP302a1* was closely related to the *CYP302a1* of *Neocaridina denticulata*, and then clustered with the *CYP302a1* from Decapoda crustaceans such as *Litopenaeus vannamei* and *Portunus trituberculatus*. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) results showed that *Mr-CYP302a1* was expressed in almost all the tissues tested with significantly higher expression levels in the Y-organ. On the other hand, the expression of *Mr-CYP302a1* was significantly lower at the postmolt stage (stages A and B), and it was increased gradually at the intermolt (stage C), significantly enhanced and reached the maximal level at the D₁ stage. *Mr-CYP302a1* was expressed and its polyclonal antibody was generated. Western blot (WB) showed that the expression of Mr-CYP302a1 protein was the highest in Y-organs of *M. rosenbergii*. The expression level of Mr-CYP302a1 protein also reached a peak at D₁ stage during the molting process. In summary, our results indicate that *Mr-CYP302a1* may play an important role in molting of *M. rosenbergii*.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; molting stage; gene cloning; *CYP302a1*; expression

Corresponding authors: PAN Gan. E-mail: pg2829@sina.com; LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872606); Foundation of Guangdong Provincial Bureau of Marine and Fisheries (GDME-2018C006, D21822202); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F); Foundation of Guangdong Provincial Department of Education (KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604); Guangdong Provincial Special Fund For Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams (2019KJ141)