



肌质网钙泵 *SERCA* 基因在中华绒螯蟹钙离子调控中的功能及其对蜕壳的影响

于俊杰¹, 梁 猛¹, 陈 雪², 丁秀芳¹,
周立水¹, 冯文荣^{1,2}, 唐永凯^{1,2,3*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 中华绒螯蟹的蜕壳周期中具有高度复杂的钙调节机制, 本研究探索了水体中不同 Ca^{2+} 浓度 (40、80、160 和 320 mg/L) 对中华绒螯蟹的 Ca^{2+} 信号转导的影响, 并对其中的关键因子肌质网钙泵 (SERCA) 进行基因干扰以探索其功能。结果显示: ① 养殖水体高浓度 Ca^{2+} 可致 Y 器官和鳃组织中 Ca^{2+} 信号通路相关基因 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 相对表达量上升, 眼柄中 *MIH* 表达量下降, 血淋巴中 Ca^{2+} 与蜕皮激素水平上升, 说明高浓度的 Ca^{2+} 可促进中华绒螯蟹蜕壳。② 利用 RNAi 技术干扰 *SERCA* 基因表达, 普通水体和加入 320 mg/L Ca^{2+} 的水体中中华绒螯蟹 Y 器官中 *PMCA* 和 *NCX* 基因表达量上升、*RyR* 基因表达量下降, 且细胞内 Ca^{2+} 浓度上升, 表明 *SERCA* 基因在中华绒螯蟹维持细胞内 Ca^{2+} 浓度和细胞内钙稳态机制中发挥重要作用。③ 长期干扰 *SERCA* 基因的表达可延长中华绒螯蟹的蜕壳间隔, 且降低增重率与存活率。然而, 高钙环境下长期干扰 *SERCA* 基因, 相对于普通水体, 蜕壳间隔缩短, 存活率降低。研究表明, *SERCA* 基因可能是通过对 Ca^{2+} 信号的干扰而影响中华绒螯蟹的蜕壳。本实验将为中华绒螯蟹蜕壳机制的进一步研究提供基础参考。

关键词: 中华绒螯蟹; 肌质网钙泵 (SERCA); 蜕壳; 钙离子

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 又名河蟹、大闸蟹, 隶属甲壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 方蟹科 (Grapsidae) 绒螯蟹属, 在中国有较大的养殖规模与消费需求^[1-3]。蜕皮是甲壳动物生长发育过程中的一种重要且复杂的生物学现象, 影响着生长^[4-5]、繁殖^[6]和断肢再生^[7]等一系列生理过程。中华绒螯蟹一生中需要经过 18~20 次蜕壳才能完成其生长发育, 因此表现出循环的蜕壳周期: 蜕

壳间期 (C)、蜕壳前期 (D₀、D₁ 和 D₃₋₄)、蜕壳期 (E) 和蜕壳后期 (A-B)^[8-9]。中华绒螯蟹的蜕壳是一个高度复杂的调控过程, 主要受到其自体分泌的蜕皮激素和蜕皮抑制激素的调节^[5, 10-12]。蜕皮激素由位于前鳃腔的 Y 器官分泌, 对蜕壳活动起到促进作用, 蜕皮激素的合成与分泌受到由位于眼柄中的 X-窦腺复合体分泌的蜕皮抑制激素 (molt-inhibiting hormone, MIH) 的抑制调节作用^[11]。

收稿日期: 2022-04-11 修回日期: 2022-06-06

资助项目: 中央级基本科研业务费 (2020TD36); 江苏省农业重大新品种创制 (PZCZ201749); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 (JBGS (2021) 031); 江苏省现代农业产业技术体系 (JFRS-01-01)

第一作者: 于俊杰 (照片), 从事水产遗传育种研究, E-mail: 820821077@qq.com

通信作者: 唐永凯, 从事水产遗传育种研究, E-mail: tangyk@ffrc.cn



中华绒螯蟹的周期性蜕壳中包括旧壳的蜕去, 新壳的形成与矿化, 这个过程中包括了大量的离子转运过程^[13-15]。中华绒螯蟹的外壳中含有大量的有机 CaCO_3 , 因此蜕壳周期中需要高度复杂的钙调节机制, 以最大限度地降低机体钙扰动^[16]。真核细胞胞质内的 Ca^{2+} 浓度比细胞外的 Ca^{2+} 浓度低 2 万以上, 由此产生的跨膜 Ca^{2+} 浓度梯度驱动 Ca^{2+} 信号的产生^[17-18]。为了保持细胞内低钙浓度下 Ca^{2+} 信号的功能完整性, 并防止细胞毒性, 甲壳动物中存在高度协调的跨细胞钙转运机制, 使上皮细胞层在转移大量 Ca^{2+} 的同时, 严格调控细胞内的 Ca^{2+} 浓度^[19-20]。这主要由位于质膜和细胞器膜上的 Ca^{2+} 通道、 Ca^{2+} 泵 (ATPase) 和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers, NCX) 几个蛋白质家族来实现^[16, 20]。肌肉细胞的肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 和非肌肉细胞的内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是细胞中钙储存的细胞器^[18, 21], 在维持细胞内钙稳态中起着关键作用。在 Ahearn 等^[16] 提出的甲壳动物 (鳃、肠道和触角腺) 的钙转运上皮细胞的模型中, Ca^{2+} 通过位于 SR/ER 膜上的肌质网钙泵 (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) 从细胞质主动运输到 SR/ER 内, 并在静息状态下维持内质网管腔与胞浆之间较高的钙浓度差^[22-24]。在 SR/ER 膜上存在 ryanodine 受体 (ryanodine receptors, RyR) 和 1, 4, 5-三磷酸肌醇受体通道 (inositol 1,4,5 triphosphate receptors, IP_3R), 周期性地将储存的钙从 SR/ER 释放到细胞质中。靠近水环境或组织内的顶侧 (apical) 细胞膜的 NCX 和 Ca^{2+} 通道将 Ca^{2+} 被动运输进入细胞质中, 靠近血淋巴的基侧 (basolateral) 的质膜钙泵 (plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA) 和 NCX 将 Ca^{2+} 逆浓度梯度从细胞内主动运输到细胞外。

SERCA 作为唯一将 Ca^{2+} 由胞浆泵入 SR/ER 的 Ca^{2+} 泵^[18], 是 Ca^{2+} 信号传导的关键因子, 参与包括转录^[25]、细胞运动^[26]、凋亡、胞吐和信号传导^[27-28] 等细胞功能的许多方面, 而且在甲壳动物蜕皮的调控中具有重要作用^[29-31]。在甲壳动物中, 已从眼斑龙虾 (*Panulirus Argus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 等物种中克隆到 SERCA 基因^[29-31]。在本实验室以往的研究中, 克隆得到了中华绒螯蟹 SERCA 基因的 cDNA 全长序列 (MW725297), 并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 鉴定中华绒螯蟹的 SERCA 基因在神经 (眼柄) 和非神经 (肌肉、鳃、肝胰腺、

肠、Y 器官) 组织中广泛表达。目前, 甲壳动物中克隆得到了与脊椎动物 SERCA2a 和 SERCA2b 同源的两种亚型。通过比对, 证明中华绒螯蟹的 SERCA 基因与 SERCA2b 具有高度同源性。SERCA2b 被称为管家泵, 在平滑肌细胞和具有内质网的非肌肉细胞中广泛表达, 具有高 Ca^{2+} 亲和力和低 Ca^{2+} 转运能力, 因此推测中华绒螯蟹的 SERCA 主要负责 Ca^{2+} 特异性的调控与 Ca^{2+} 信号的产生。

本研究用不同浓度 Ca^{2+} 暴露中华绒螯蟹, 检测了 Y 器官和鳃组织中 Ca^{2+} 信号通路相关基因与眼柄中 *MIH* 基因相对表达量, 及血淋巴中 Ca^{2+} 与蜕皮激素水平变化。并利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术研究了 SERCA 基因干扰对 Ca^{2+} 信号通路相关基因、细胞内 Ca^{2+} 浓度及对蜕壳的影响。本研究首次聚焦 Ca^{2+} 信号传导的关键因子 SERCA 基因, 对其在中华绒螯蟹钙离子调控中的功能及其对蜕壳的影响进行了一系列的研究。实验结果将为探索 Ca^{2+} 信号通路对蜕壳的影响及 SERCA 基因在其中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验蟹为健康无断肢的处于蜕壳间期的中华绒螯蟹 (11.13 ± 1.04 g), 取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心苏州阳澄湖虾蟹绿色养殖基地, 暂养在 $100 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 的玻璃缸内, 水深 10 cm, 水温为 $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 24 h 曝气, 自然光照, 每 2 天换 1 次水, 每次更换约 1/2 体积的养殖水, 每日喂食 1 次配方饲料, 喂食前清除残饵。本研究获得了南京农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 [许可证编号: SYXK (Su) 2017-0007], 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照南京农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 中华绒螯蟹 Ca^{2+} 暴露实验

本实验养殖水温为 $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 每 2 天换 1 次水, 每次更换约 1/2 体积的养殖水, 每日投喂 1 次配方饲料, 投喂前清除残饵。对照组用水为充分曝气的自来水, Ca^{2+} 暴露实验组为向水体中添加分析纯 CaCl_2 获得不同 Ca^{2+} 浓度的养殖水, 40 L 水中需添加的 CaCl_2 量及添加 CaCl_2 后养殖水体实际 Ca^{2+} 浓度见表 1, 配制后的养殖水使用环境 Ca^{2+} 浓度比色法定量检测试剂盒 (GENMED, 中国) 验证实际 Ca^{2+} 浓度。将健康无断肢的处于蜕壳

表 1 养殖水体实验设计 Ca^{2+} 浓度、40 L 水添加的 CaCl_2 量及添加 CaCl_2 后养殖水体实际 Ca^{2+} 浓度Tab. 1 The concentration of Ca^{2+} added in the culture water, the corresponding amount of CaCl_2 to be added and the actual concentration of Ca^{2+} in the culture water after adding CaCl_2

组别 groups	实验设计 Ca^{2+} 浓度/(mg/L) experimental design of Ca^{2+} concentration	40 L 水添加的 CaCl_2 量/g the amount of CaCl_2 to be added in water of 40 L	养殖水中实际 Ca^{2+} 浓度/(mg/L) actual Ca^{2+} concentration in culture water
对照组 control group	0	0	41.2
实验组 I experimental group I	40	4.439	81.2
实验组 II experimental group II	160	17.757	201.2
实验组 III experimental group III	320	35.514	361.2

间期的实验蟹分别放入对照组与实验组养殖缸中, 每组 40 只, 雌雄比为 1:1, 设 2 个平行。

实验开始后 0、1、3、5 和 7 d 各选取 6 只健康无残肢的个体 ($n=6$, 雌:雄=1:1), 冰浴麻醉后取样。从第三步足基膜处抽取血淋巴, 每只蟹的血淋巴分为两部分, 一部分加入抗凝剂, 4°C , $3000 \times g$ 离心 15 min 吸取上清液即为血浆, 置于 -80°C 冰箱, 用于检测 Ca^{2+} 浓度; 另一部分不加入抗凝剂, 4°C 冰箱过夜后离心后 4°C , $5000 \times g$ 离心, 吸取上清液即为血清, 置于 -80°C 冰箱, 用于检测蜕皮激素含量。取鳃、Y 器官和眼柄加入 RNA keeper (Vazyme, 中国) 室温放置 20 min 后存于 -80°C 冰箱, 用于 RNA 的提取。

1.3 qRT-PCR 检测

按照 RNAiso Plus reagent (TaKaRa, 中国) 使用说明提取组织总 RNA, 反应产物立即用于反转录, 选用反转录试剂盒 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) (Vazyme, 中国) 合成第一链 cDNA。根据本实验室中华绒螯蟹的转录组文库, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因与内参基因 *UBE2B* 的荧光定量引物 (表 2), 用 Livak 等^[32] 描述的方法检测引物的扩增效率。以目的基因和内参基因的引物, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, 中国) 试剂盒进行荧光定量检测, qRT-PCR 反应结束后检查扩增曲线和熔解曲线, 以确保产物的特异性。分析不同 Ca^{2+} 浓度暴露的中华绒螯蟹鳃和 Y 器官中 Ca^{2+} 信号通路相关基因 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 与眼柄中 *MIH* 的相对表达量变化。

1.4 血淋巴中 Ca^{2+} 浓度检测

测定血浆样品的 Ca^{2+} 浓度, 使用血钙浓度检测试剂盒 (Solarbio, 中国), 按照说明书进行操作。每次测定的同时做标准曲线, 每个样品做 3 个重

表 2 实验所用引物

Tab. 2 PCR primer sequences used in the experiments

引物 primers	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	引物用途 purpose
SERCA-F	GCCCTCAACAGCTGTCCGAGA	qRT-PCR
SERCA-R	CATTACGGCAAACCAGTATCCA	qRT-PCR
PMCA-F	GCGGTTGACCTTGATCCTATGG	qRT-PCR
PMCA-R	TCTTGGCTTCCACTTGCTCCT	qRT-PCR
NCX-F	CTGCCATTACCTTTGTTGCTCTG	qRT-PCR
NCX-R	GTTGCTTCCTGTCACATCCCA	qRT-PCR
RyR-F	AGACATTTACGCCTTCTACCCG	qRT-PCR
RyR-R	CCAGATGTGGAAGATTTGTGCC	qRT-PCR
MIH-F	TGAAGACTGCGCCAACATCT	qRT-PCR
MIH-R	CGTGAGGTCGTCTTCTGTG	qRT-PCR
UBE2B-F	TTGCGTTCACAACCTCGTATCTACCR	qRT-PCR
UBE2B-R	GTCCGTGAGGAGGGAACAGA	qRT-PCR
dsSERCA-F	GGAGACCAAGTGAAGAAGGA	RNAi
dsSERCA-R	GTGGTGCCTCAGTCTCGTTG	RNAi
T7dsSERCA-F	TAATACGACTCACTATAGGGG GAGACCAAGTGAAGAAGGA	RNAi
T7dsSERCA-R	TAATACGACTCACTATAGGGG GTGGTGCCTCAGTCTCGTTG	RNAi
dsEGFP-F	GTGCCATCCTGGTCGAGCT	RNAi
dsEGFP-R	TGCACGCTGCCGTCTCGAT	RNAi
T7-dsEGFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGG AGAGTGCCCATCTGGTCGAGCT	RNAi
T7-dsEGFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGG AGATGCACGCTGCCGTCTCGAT	RNAi

复, 通过标准曲线计算样品中的 Ca^{2+} 浓度。

1.5 血淋巴中蜕皮激素浓度检测

测定血清样品的蜕皮激素浓度, 使用蟹蜕皮激素酶联免疫分析试剂盒 (Fankew, 中国), 利用酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法进行检测。每次测定的同时做标准曲线, 每个样品做 3 个重复, 通过标准曲线计算样品中蜕皮激素浓度。

1.6 *SERCA* 基因的 RNAi 实验

ds RNA 合成及 *SERCA* 基因干扰效率的检测 根据 *SERCA* 的 cDNA 序列和购入的 pUC19-EGFP 质粒中的 EGFP 序列, 使用 BLOCK-iT™ RNAi Designer (http://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/rnai_Design.jsp) 程序和 Primer Premier 5.0 软件设计 RNA 干扰引物。并根据 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒的使用说明在部分引物的 5' 端添加 T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTA TAGGG)。具体引物如表 1 所示。使用 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒, 以中华绒螯蟹 Y 器官的 cDNA 为模板, 合成 *SERCA* 基因的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA); 以 pUC19-EGFP 质粒为模板, 合成 *EGFP* 基因的 dsRNA。采用磁珠法纯化转录产物, 纯化后使用微量分光光度计检测产物的 A_{260} 吸光值, 确定其浓度, 并于 -20°C 保存转录产物。

将纯化后的 *SERCA* 和 *EGFP* 基因的 dsRNA 用 RNase-free ddH₂O 稀释到浓度 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 按照 $4\ \mu\text{g}/\text{g}$ 的比例, 使用 $50\ \mu\text{L}$ 的微量注射器从中华绒螯蟹第三步足基部注射。实验组注射 *SERCA* 基因的 dsRNA, 对照组 I 注射 ddH₂O, 对照组 II 注射 *EGFP* 基因的 dsRNA。注射前在 dsRNA 中加入少量酚红指示剂, 注射时酚红指示剂在血淋巴中扩散消失后再拔出注射器, 以确保 dsRNA 注射到实验蟹体内。取注射后 24、48、72 和 96 h 的中华绒螯蟹 ($n=6$) 的 Y 器官, 采用 qRT-PCR 方法检测 *SERCA* 的相对表达量变化, 从而在转录水平检测 dsRNA 的干扰效率。

SERCA 基因干扰后 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的表达与细胞内 Ca^{2+} 水平检测 随机选择处于蜕壳间期的中华绒螯蟹, 分为对照组 (注射 ddH₂O)、实验组 I (注射 *SERCA* 的 dsRNA) 和实验组 II (注射 *SERCA* 的 dsRNA 且养殖水中加入 $320\ \text{mg}/\text{L}$ 的 Ca^{2+}) ($n=6$)。注射 24 h 后取各组的 Y 器官, 采用 qRT-PCR 方法检测 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的相对表达量变化。使用 Fluo-3 AM 探针检测 Y 器官细胞内 Ca^{2+} 水平^[33]。组织细胞使用 0.05% 的胰酶和 0.01% 的胶原酶消化后, 细胞与乙酰氧甲基 (AM) 酯衍生物 Fluo-3 AM 进行孵育, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤细胞 3 次后, 用流式细胞仪检测 Ca^{2+} 浓度产生水平。

SERCA 基因干扰对蜕壳的影响 随机选择统一规格, 健康无残肢的处于同一蜕壳时期 (蜕壳后 4 d) 的中华绒螯蟹, 进行长期干扰实验。实

验过程中养殖水温为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 每日投喂 1 次配方饲料。实验蟹分为对照组 (注射 RNase-free H₂O)、实验组 I (注射 *SERCA* 的 dsRNA) 和实验组 II (注射 *SERCA* 的 dsRNA 且养殖水中加入 $320\ \text{mg}/\text{L}$ 的 Ca^{2+}), 每组 30 只, 每 4 天注射 1 次, 直到下一次蜕壳结束。在整个实验过程中, 每天观察并记录蜕壳和死亡情况的数据。在每只蟹下一次蜕壳后第 4 天测量体重, 并统计每只蟹的蜕壳间隔天数 (第 1 次和第 2 次蜕壳之间的天数)。

1.7 数据分析

qRT-PCR 结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[32] 计算基因的相对表达量。用 IBM SPSS Statistics (version 20) 软件对基因相对表达量、血淋巴蜕皮激素水平与 Ca^{2+} 浓度、细胞内 Ca^{2+} 水平和蜕壳情况进行统计分析, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 氏 HSD 检验, 检验方差齐性后确定差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 表示差异显著), 数据以平均值 \pm 标准误表示。使用 Graphpad Prism (version 8.0) 软件生成图形。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹 Ca^{2+} 暴露实验结果

不同浓度 Ca^{2+} 暴露对中华绒螯蟹 *SERCA*、*PMCA*、*RyR*、*NCX* 和 *MIH* 表达的影响 鳃组织中, *SERCA* 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 且 40、160 和 $320\ \text{mg}/\text{L}$ 处理组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。 *PMCA* 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 且 40、160 和 $320\ \text{mg}/\text{L}$ 处理组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。 *RyR* 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 且 $40\ \text{mg}/\text{L}$ 处理组上升幅度低于 160 和 $320\ \text{mg}/\text{L}$ 处理组 ($P < 0.05$)。 *NCX* 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$) (图 1)。

Y 器官中, *SERCA* 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 且 $40\ \text{mg}/\text{L}$ 处理组上升幅度低于 160 和 $320\ \text{mg}/\text{L}$ 处理组 ($P < 0.05$)。 *PMCA* 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、

5 和 7 d 后, 160 和 320 mg/L 处理组相对表达量显著上升 ($P < 0.05$)。RyR 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 且 5 d 与 7 d 的 40 mg/L 处理组上升幅度低于 160 和 320 mg/L 处理组 ($P < 0.05$)。NCX 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理后, 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 且 3 d 与 7 d 的 40 mg/L 处理组上升幅度低于 160 和 320 mg/L 处理组 ($P < 0.05$) (图 2)。

眼柄中 MIH 基因在不同浓度 Ca^{2+} 处理 1 d 后, 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 3、5 和 7 d 后, 160 和 320 mg/L 处理组相对表达量显著下降 ($P < 0.05$) (图 3)。

血淋巴中 Ca^{2+} 与蜕皮激素水平的变化趋势不同浓度 Ca^{2+} 处理 1、3、5 和 7 d 后, 中华绒

螯蟹血淋巴 Ca^{2+} 浓度变化趋势如图 4 所示。养殖水体中加入 Ca^{2+} 后, 血淋巴中 Ca^{2+} 浓度上升, 并与处理时间和 Ca^{2+} 浓度成正比。蜕皮激素浓度的变化趋势如图 5 所示, 向养殖水体添加 Ca^{2+} 后, 血淋巴中蜕皮激素浓度上升, 随处理时间增加而升高。40 mg/L 处理组上升幅度低于 160 和 320 mg/L 处理组 ($P < 0.05$), 160 和 320 mg/L 处理组 1、3、5 与 7 d 蜕皮激素水平均显著高于对照组, 且随着时间增加而升高。

2.2 SERCA 基因的 dsRNA 干扰

SERCA 基因的 dsRNA 干扰效率 利用 qRT-PCR 技术检测对照组 I、对照组 II 与实验组的 SERCA 基因的相对表达量。注射 24、48、72 和 96 h 后, SERCA 基因的干扰效率分别为 65.67%、

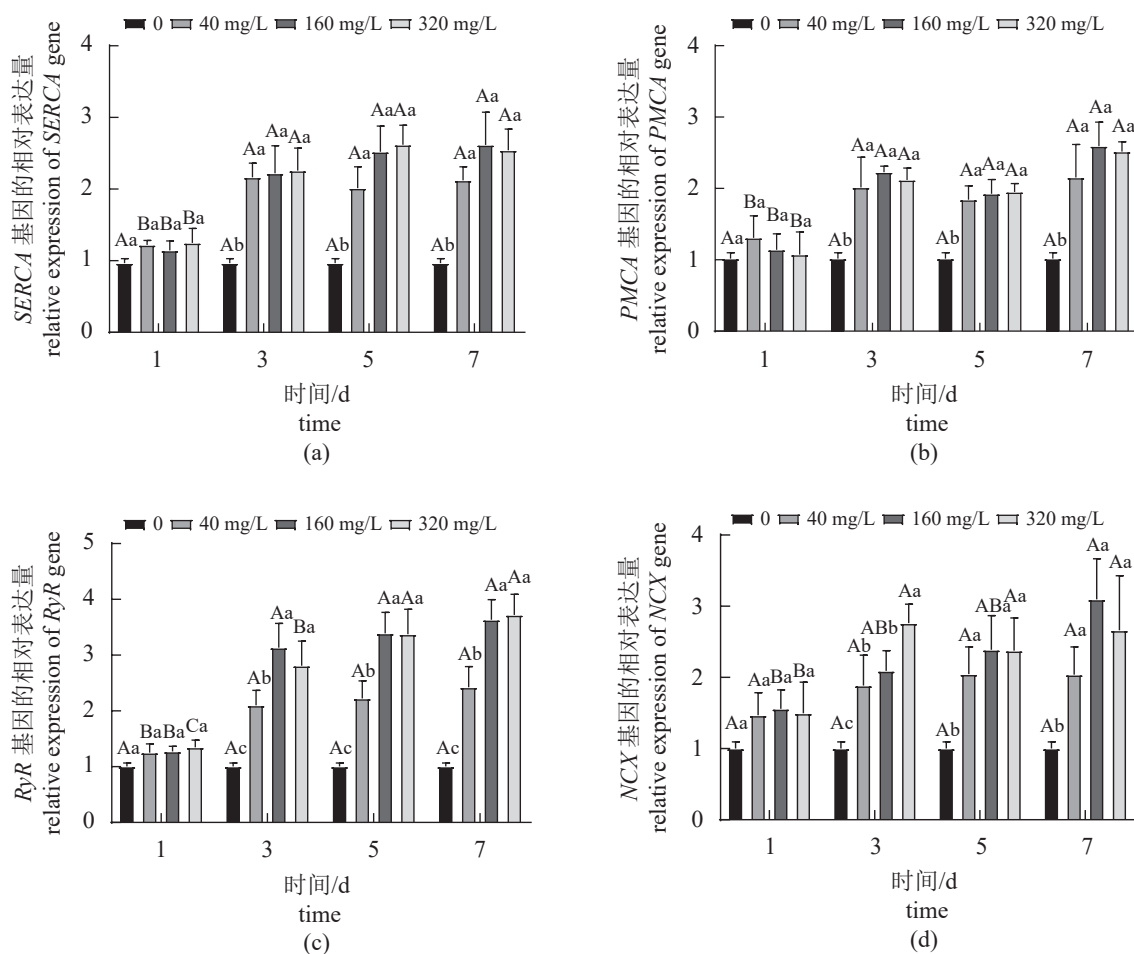


图 1 鳃组织中 SERCA (a)、PMCA (b)、RyR (c) 和 NCX (d) 基因的相对表达量

不同小写字母表示同一时间点不同处理组之间具有显著差异 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一处理组不同时间点之间具有显著差异 ($P < 0.05$), 图 2~图 6 同。

Fig. 1 Relative expression of SERCA (a), PMCA (b), RyR (c) and NCX (d) gene in the gills

Different lowercase letters indicated that there were significant differences ($P < 0.05$) among different treatment groups at the same time point, while different uppercase letters indicated significant differences ($P < 0.05$) between different time points in the same treatment group, the same as Fig. 2-Fig. 6.

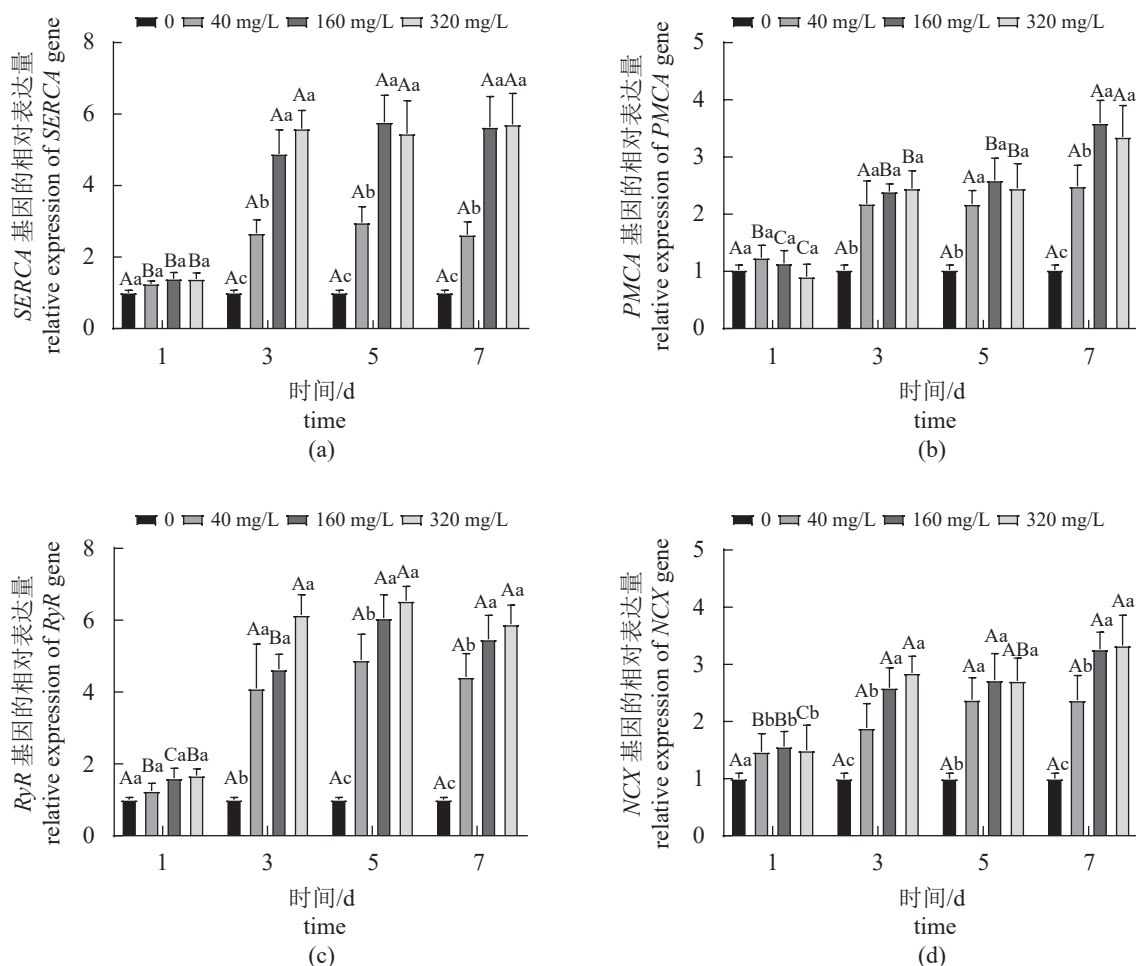


图2 Y器官中 *SERCA* (a)、*PMCA* (b)、*RyR* (c) 和 *NCX* (d) 基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of *SERCA* (a), *PMCA* (b), *RyR* (c) and *NCX* (d) gene in the Y-organs

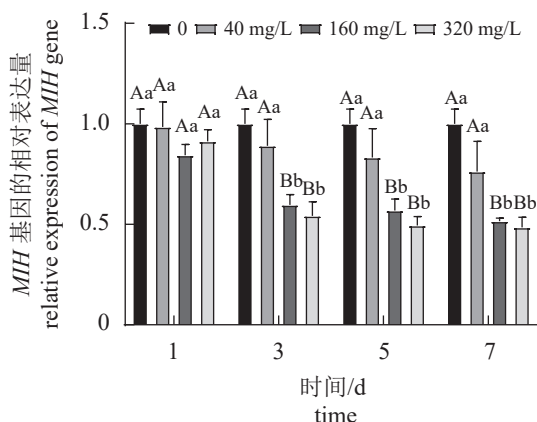


图3 眼柄组织中 *MIH* 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *MIH* gene in the eyestalks

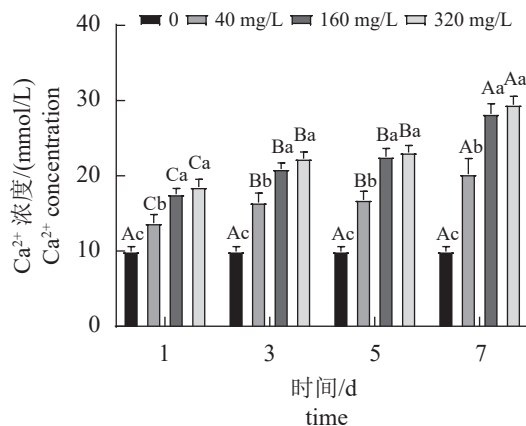


图4 血淋巴中 Ca^{2+} 浓度变化

Fig. 4 Concentration of Ca^{2+} in the hemolymph

55.50%、32.10% 和 15.43% (图 6), 说明 dsRNA 可有效降低 *SERCA* 基因的表达, 可用于下一步实验。

dsRNA 干扰后 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的表达 利用 qRT-PCR 技术检测了

SERCA 基因 dsRNA 干扰 24 h 后, 对照组、实验组 I 和实验组 II Y 器官中 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的相对表达水平。*SERCA* 基因有效敲减后, *RyR* 基因相对表达量显著下降 ($P < 0.05$),

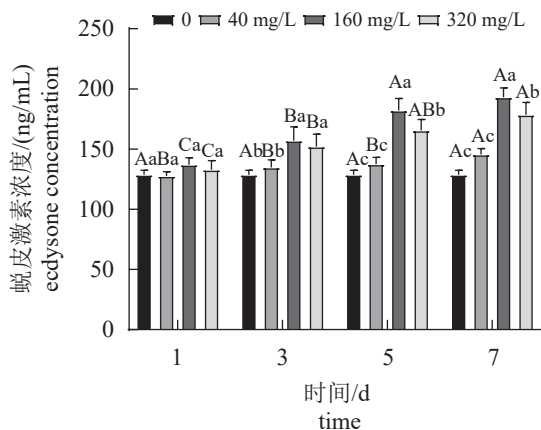


图5 血淋巴中蜕皮激素浓度变化

Fig. 5 Concentration of ecdysteroid in the hemolymph

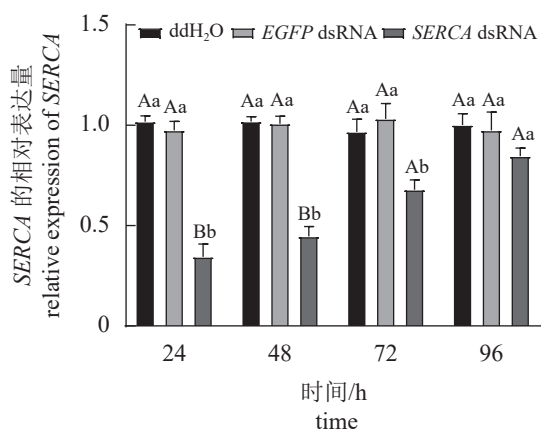


图6 不同处理时间 SERCA 基因的干扰效率检测

Fig. 6 RNAi efficiency of SERCA gene comparison among different injection times

PMCA 和 *NCX* 基因的相对表达量显著上升 ($P < 0.05$) (图7)。且实验组 I 与实验组 II 的 *SERCA* 和 *RyR* 基因的相对表达量与对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 实验组 II 的 *PMCA* 和 *NCX* 基因表达量显著高于实验组 I ($P < 0.05$)。

dsRNA 干扰后细胞内 Ca^{2+} 水平 使用 Fluo-3 AM 探针检测对照组、实验组 I 和实验组 II Y 器官细胞内 Ca^{2+} 水平。实验组 I 与实验组 II 的 Ca^{2+} 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且实验组 II 的 Ca^{2+} 水平高于实验组 I ($P < 0.05$) (图8)。

长期干扰 *SERCA* 基因对蜕壳的影响 最后一只实验蟹完成蜕壳 4 d 后进行实验数据统计。结果显示对照组蜕壳间隔为 (22.31 ± 2.17) d, 实验组 I 和实验组 II 蜕壳间隔分别为 (34.47 ± 3.56) d 和 (26.93 ± 3.04) d (表3)。三组相比, 蜕壳间隔: 实验组 I > 实验组 II > 对照组, 且差异显著 ($P < 0.05$); 存

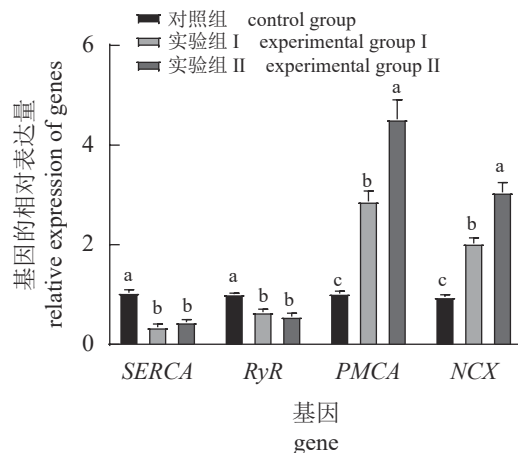


图7 SERCA 基因干扰后 SERCA、PMCA、RyR 和 NCX 基因的相对表达量

不同小写字母表示相同基因不同处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Relative expression level of SERCA, PMCA, RyR and NCX gene after knocking down SERCA gene

Different lowercase letters indicated that there were significant differences ($P < 0.05$) among different treatment groups of the same gene.

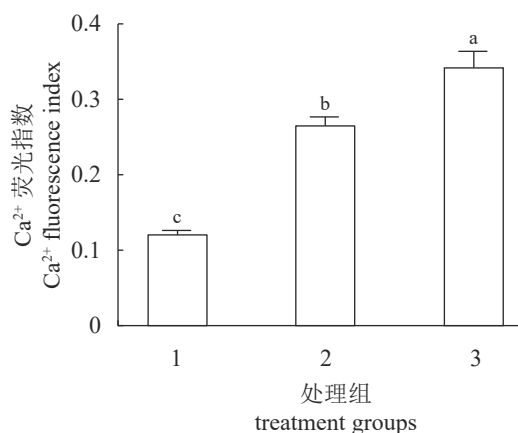


图8 细胞内 Ca^{2+} 荧光指数

1. 对照组, 2. 实验组 I, 3. 实验组 II; 不同小写字母表示不同处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 8 Calcium fluorescence index in the cells

1. control group, 2. experimental group I, 3. experimental group II; different lowercase letters indicated that there were significant differences among different treatment groups ($P < 0.05$).

活率: 对照组 > 实验组 I > 实验组 II; 增重率: 对照组 > 实验组 II > 实验组 I, 且差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 不同浓度 Ca^{2+} 暴露对中华绒螯蟹蜕壳的影响

甲壳动物在蜕皮周期中存在着复杂的 Ca^{2+} 吸

表3 SERCA 基因干扰后蜕壳情况统计

Tab. 3 Molting statistics after injecting dsRNA of SERCA

实验分组 groups	数量 number	存活率/% mortality rate	蜕壳间隔/d molt interval	增重率/% weight gain rate
对照组 control group	30	46.67	22.31±2.17 ^a	34.22±6.26 ^a
实验组 I experimental group I	30	33.33	34.47±3.56 ^a	23.05±5.26 ^b
实验组 II experimental group II	30	23.33	26.93±3.04 ^b	28.43±9.26 ^{ab}

注: 不同小写字母表示同一时间点不同处理组之间具有显著差异($P<0.05$)。

Notes: Different lowercase letters indicate that there are significant differences among different treatment groups ($P<0.05$).

收与分泌的调控机制。董双林等^[34]在对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的研究中发现, 当虾不能从饵料和自身外壳获得足够的 Ca^{2+} 时, 水环境中的 Ca^{2+} 浓度便对其生长产生重要的影响。成永旭等^[35]的研究发现, 盐度和钙离子浓度对中华绒螯蟹大眼幼体的成活率和生长有重要影响。王顺昌等^[36]测定了中华绒螯蟹蜕壳过程中肌肉、肝胰腺和甲壳中钙和磷含量的变动, 发现其蜕壳后48~96 h, 机体从水环境中由鳃摄入 Ca^{2+} 。也有多项研究证明, Ca^{2+} 信号与甲壳动物蜕皮激素的合成密切相关^[16, 37-39]。因此, 水环境中的 Ca^{2+} 浓度对中华绒螯蟹的蜕壳和生长存在重要的作用。相关研究结果表明 Ca^{2+} 信号参与促进蜕壳前期蜕皮激素的生成, 但这种 Ca^{2+} 信号的调控机制仍不清晰^[29]。本研究向养殖水体中加入不同浓度的 Ca^{2+} 后, Ca^{2+} 信号通路相关基因 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 及蜕壳相关基因 *MIH* 在不同组织中存在不同的变化趋势, 表示各基因在不同组织中存在特异性调控, 同时随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 实验组血淋巴中 Ca^{2+} 浓度与蜕皮激素浓度均呈现上升趋势, 暗示水环境 Ca^{2+} 浓度增加可能与中华绒螯蟹蜕壳的激活调控相关。

甲壳动物可以通过鳃来摄入环境水中的 Ca^{2+} , 并通过上皮细胞与血淋巴的运输, 完成 Ca^{2+} 的吸收、储存与蜕皮后新壳的硬化。生产过程中, 养殖户也会往水体中添加钙制剂, 来帮助养殖蟹完成蜕壳。本研究中, 不同浓度 Ca^{2+} 处理组的鳃组织中 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的相对表达量上升, 与血淋巴中 Ca^{2+} 浓度与蜕皮激素浓度的上升趋势相似。结合 Ahearn 等^[16]提出的甲壳动物的钙转运上皮细胞的模型, 推测环境水体中的 Ca^{2+} 浓度上升后, 刺激中华绒螯蟹的鳃上皮细胞基侧 Ca^{2+} 通道开放, 将水环境中的 Ca^{2+} 扩散进入基侧细胞质未搅动层 (unstirred layer, USL), 位于基侧细胞极的 *SERCA* 将 Ca^{2+} 转运到内质网, 位于

顶侧细胞极的 *RyR* 将 Ca^{2+} 扩散外流到另一侧 USL, 顶侧 *NCX* 利用跨膜钠梯度将 Ca^{2+} 从顶侧 USL 驱动到血淋巴中, 从而血淋巴中 Ca^{2+} 浓度上升。

已有研究表明, 用 Ca^{2+} 载体 A23187 孵育太平洋黄道蟹 (*Cancer antennarius*) 的 Y 器官, 能以浓度依赖的方式刺激蜕皮激素的产生^[40]。使用荧光钙指示剂 (Fluo-4) 测量蓝蟹 (*C. sapidus*) 自然蜕皮周期中 Y 器官细胞中的 Ca^{2+} 浓度, 结果表明蜕皮间期钙荧光较低, 蜕壳前期升高, 蜕壳后期急剧下降, 并保持较低水平, 且此变化模式类似于血淋巴中蜕皮激素的变化模式^[37]。一般认为 *NCX* 主要负责抑制细胞内 Ca^{2+} 的大幅增加, 而 Ca^{2+} 泵 (*SERCA* 与 *PMCA*) 主要负责 Ca^{2+} 特异性的调控与 Ca^{2+} 信号的产生^[41], 胞内 Ca^{2+} 通道 *RyR* 将胞内信息以周期性的 Ca^{2+} 波动或振动编码, 将所载信息传递给相应的受体, 从而介导 Ca^{2+} 信号的传递^[42]。在本研究中, 随着暴露水体 Ca^{2+} 浓度的升高, 血淋巴中 Ca^{2+} 浓度升高, 中华绒螯蟹 Y 器官中 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的相对表达量上升, 与此同时, 蜕皮激素的浓度呈上升趋势。推测处理组中血淋巴中 Ca^{2+} 浓度的增加促进了 Y 器官细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加, Ca^{2+} 信号通路相关基因 *SERCA*、*PMCA* 和 *RyR* 上调, 促进了 Ca^{2+} 信号的传递, 引起 Y 器官中蜕皮激素的生成, 进而促使处于蜕壳间期的中华绒螯蟹向蜕壳前期的转变。 Ca^{2+} 信号通路相关基因表达上调的另一个目的是对抑制细胞内 Ca^{2+} 的大幅增加进行调控, 以维持细胞内的钙稳态, 保证 Ca^{2+} 信号的完整性。

为了进一步了解 Ca^{2+} 信号与蜕皮激素合成的调控机制, 本研究还检测了眼柄组织中 *MIH* 基因的表达趋势。甲壳动物蜕皮激素的合成主要受到由眼柄中的 X-窦腺复合体合成的 *MIH* 的抑制作用。Mykles 等^[43]提出的 *MIH* 信号通路模型表明, *MIH* 与 Y 器官中的 G 蛋白偶联受体结合, 腺苷酸环化酶激活, 在第二信使 cAMP 和 cGMP 介导下,

cGMP 依赖的蛋白激酶抑制蜕皮激素的生成。研究发现, 切除蓝蟹眼柄后 *SERCA* 基因相对表达量上升^[29]。结合本研究中 *MIH* 基因的下调与 Ca^{2+} 信号通路相关基因的上调, 和血淋巴中蜕皮激素浓度的上升, 推测 Ca^{2+} 信号参与了 *MIH* 基因的下调, 从而激活 Y 器官中蜕皮激素的合成。

本研究中, 水体不同浓度的 Ca^{2+} 对 Ca^{2+} 信号相关基因的表达及血淋巴中 Ca^{2+} 浓度和蜕皮激素水平的影响存在差异, 且随着 Ca^{2+} 浓度升高, 蜕皮激素浓度显著增加, 说明水体环境高浓度 Ca^{2+} 可促进中华绒螯蟹的蜕壳。然而, 已有研究表明, 中华绒螯蟹不是因为蜕壳而生长, 而是因为生长而蜕壳。加速蜕壳或频繁蜕壳并不能使中华绒螯蟹快速生长, 相反会导致其生长畸形, 使其生长缓慢或停止, 导致其性早熟甚至死亡率上升^[44-45]。水环境中 Ca^{2+} 浓度过高使中华绒螯蟹过于频繁地蜕壳, 对养殖生产极为不利, 因此生产实践中在恰当的时机维持养殖水体适宜的 Ca^{2+} 浓度对中华绒螯蟹健康养殖至关重要。

3.2 *SERCA* 基因对中华绒螯蟹蜕壳的调控作用

SERCA 通常通过将胞浆中的 Ca^{2+} 泵入内质网来补充内质网 Ca^{2+} , 因此降低 *SERCA* 活性将导致两种不同的效应, 即内质网中 Ca^{2+} 的耗竭和胞浆中 Ca^{2+} 浓度的升高^[46]。本研究中, *SERCA* 基因干扰后, Y 器官中 *PMCA* 和 *NCX* 基因表达升高, *RyR* 表达降低, 且细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。这与已有的研究结果一致, 如当使用 *SERCA* 抑制剂 thapsigargin 或 RNAi 技术抑制 *SERCA* 基因的表达时, 细胞中基础 Ca^{2+} 浓度上升, 而内质网中 Ca^{2+} 储存的耗竭则会抑制 *RyR* 活性^[47]。当 *SERCA* 被 thapsigargin 抑制, 且线粒体被抗霉素和寡霉素抑制时, 细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度的降低几乎完全由 *PMCA* 活性介导^[48]。在 *SERCA* 沉默之后, 通过钙调神经磷酸酶的激活, *NCX* 的转录水平增加^[47]。推测中华绒螯蟹的 *SERCA* 基因被干扰后, 胞浆中 Ca^{2+} 浓度升高, 内质网中 Ca^{2+} 浓度降低, 从而抑制了将 Ca^{2+} 由内质网转运至胞浆中的 *RyR* 的活性。而胞浆中 Ca^{2+} 浓度升高后, 为了维持胞浆内 Ca^{2+} 处于较低的浓度, 从而保证 Ca^{2+} 信号完整性和防止细胞毒性, *PMCA* 和 *NCX* 转录水平增加, 将 Ca^{2+} 由胞浆主动运输至细胞外。本研究表明, 养殖水体高浓度的 Ca^{2+} 可促进中华绒螯蟹从水环

境中吸收 Ca^{2+} , 使血淋巴中 Ca^{2+} 浓度上升, 刺激 Y 器官中 Ca^{2+} 信号的上调, 表现为 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 基因的上调。干扰 *SERCA* 基因, 并向养殖水体中加入高浓度 (320 mg/L) 的 Ca^{2+} 后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度高于仅干扰 *SERCA* 组, 推测为了维持胞浆内 Ca^{2+} 的低浓度, 相对于仅干扰 *SERCA* 组, *PMCA* 与 *NCX* 的表达量增加, *RyR* 的表达量受到抑制。表明 *SERCA* 在中华绒螯蟹维持细胞内 Ca^{2+} 浓度和细胞内钙稳态中具有重要作用。

为了进一步探索 *SERCA* 基因在中华绒螯蟹的蜕壳中的调节机制, 实验连续注射 *SERCA* 基因的 dsRNA, 长期干扰 *SERCA* 的表达, 并在此基础上, 向养殖水体加入高浓度 (320 mg/L) Ca^{2+} 。结果显示, 相对于对照组, 长期干扰 *SERCA* 基因的表达可延长中华绒螯蟹的蜕壳间隔, 且存活率与增重率降低。魏薇等^[44] 的研究发现, 水环境中高浓度的 Ca^{2+} 可引起中华绒螯蟹 1 龄幼蟹性早熟, 可能是蜕壳次数增加和蜕壳间隔降低导致, 但同时高浓度的 Ca^{2+} (201.6 mg/L) 也降低了幼蟹的存活率。因为 *SERCA* 是 Ca^{2+} 信号传导的关键分子, 不仅参与了蜕壳的调控, 在多种细胞功能中也存在重要作用, 因此干扰 *SERCA* 基因的表达可能引起细胞内钙稳态失衡, 对 Ca^{2+} 信号形成干扰, 造成对其他生理活动的不利影响, 从而延长了中华绒螯蟹的蜕壳周期, 并降低存活率。干扰 *SERCA* 基因的基础上, 养殖水体中加入高浓度 (320 mg/L) 的 Ca^{2+} 后, 相对于仅干扰 *SERCA* 组, 蜕壳间隔与存活率降低, 增重率有所增加。养殖水体高浓度的 Ca^{2+} 促使中华绒螯蟹从水环境中摄取更多的 Ca^{2+} , 促进了 Ca^{2+} 的跨细胞转运过程, 本研究表明高钙能够促进蜕壳, 因而相对于仅干扰 *SERCA* 组缩短了蜕壳间隔。由于水体高浓度 Ca^{2+} 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 高于仅干扰 *SERCA* 组, 因此推测高钙环境与干扰 *SERCA* 基因双重胁迫可能加剧细胞内钙稳态失衡, 致使中华绒螯蟹存活率进一步降低。说明 *SERCA* 基因及水环境中 Ca^{2+} 浓度在中华绒螯蟹蜕壳的调控中具有重要作用。

4 结论

本研究表明, 养殖水体高浓度的 Ca^{2+} 可促进中华绒螯蟹鳃组织从水环境中吸收 Ca^{2+} , 使血淋巴中 Ca^{2+} 浓度上升, 刺激 Y 器官中 Ca^{2+} 信号的上调, 表现为 *SERCA*、*PMCA*、*RyR* 和 *NCX* 上

调。干扰 *SERCA* 基因, 并向养殖水体中加入高浓度 (320 mg/L) 的 Ca^{2+} 后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度高于仅干扰 *SERCA* 组, 推测为了维持胞浆内 Ca^{2+} 的低浓度, 相对于仅干扰 *SERCA* 组, *PMCA* 与 *NCX* 的活性增加, *RyR* 的活性受到抑制。长期干扰 *SERCA* 基因的表达可延长中华绒螯蟹的蜕壳间隔, 且降低增重率与存活率。在高钙环境下长期干扰 *SERCA* 基因, 相对于仅干扰 *SERCA* 组, 蜕壳间隔缩短, 但存活率降低。综上, *SERCA* 在维持细胞内 Ca^{2+} 浓度和细胞内钙稳态中具有重要作用, 进一步影响到中华绒螯蟹的蜕壳调控。本实验结果将为中华绒螯蟹蜕壳机制的进一步研究和基因遗传改良的探索提供基础参考, 并在开展科学养殖、提高养殖效益的探索中提供理论支持。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 王丹, 吴反修. 2021 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
Wang D, Wu F X. China fishery statistical yearbook 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [2] 戴红君, 孙艺伟, 任妮, 等. 我国中华绒螯蟹产业现状调查及发展对策分析 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49(18): 248-252.
Dai H J, Sun Y W, Ren N, et al. Investigation of Chinese hairy crab industry and analysis of development strategies[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(18): 248-252 (in Chinese).
- [3] 叶建勇, 王宣朋, 潘玉兰, 等. 淡水虾蟹生态养殖技术 [J]. 水产养殖, 2021, 42(12): 55-56.
Ye J Y, Wang X P, Pan Y L, et al. Ecological culture techniques of freshwater shrimp and crab[J]. Journal of Aquaculture, 2021, 42(12): 55-56 (in Chinese).
- [4] Chang E S, Mykles D L. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(3): 323-330.
- [5] 陈娇, 岳武成, 陈晓雯, 等. 中华绒螯蟹蜕壳生长及其与相关基因表达的关联分析 [J]. 动物学杂志, 2016, 51(6): 1059-1070.
Chen J, Yue W C, Chen X W, et al. Observation on individual molting, growth and association analysis with relative gene expression in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(6): 1059-1070 (in Chinese).
- [6] Shyamal S, Sudha K, Gayathri N, et al. The Y-organ secretory activity fluctuates in relation to seasons of molt and reproduction in the brachyuran crab, *Metopograpsus messor* (Grapsidae): ultrastructural and immunohistochemical study[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 196: 81-90.
- [7] Hopkins P M. Limb regeneration in the fiddler crab, *Uca pugilator*: hormonal and growth factor control[J]. *American Zoologist*, 2001, 41(3): 389-398.
- [8] 康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性的变化 [J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 806-812.
Kang X J, Tian Z H, Wu J L, et al. Molt stages and changes in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 78(1): 67-74 (in Chinese).
- [9] 黄姝, 王中清, 茅海成, 等. 中华绒螯蟹在实验室条件下的成蟹阶段蜕壳与生长观察 [J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(3): 359-365.
Huang S, Wang Z Q, Mao H C, et al. Observation on molting and growth of adult Chinese mitten crab reared in the laboratory condition[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(3): 359-365 (in Chinese).
- [10] 焦满静. 中华绒螯蟹蜕皮机制与影响因素的研究 [D]. 保定: 河北大学, 2013.
Jiao M J. Study on the mechanisms and influencing factors of the molting in *Eriocheir sinensis*[D]. Baoding: Hebei University, 2013 (in Chinese).
- [11] 黄姝. *EcR* 和 *MIH* 基因在中华绒螯蟹蜕壳过程中的相互调节机制研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
Huang S. Study on reciprocal regulation mechanism of *MIH* and *EcR* genes in the molting process of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [12] 路允良, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕壳及能量利用的影响 [J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 237-245.
Lu Y L, Wang F, Zhao Z Y, et al. Effects of salinity on growth, molt and energy utilization of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 237-245 (in Chinese).
- [13] Webster S G, Chang E S, Thiel M. Endocrinology of

- molting[J]. *Physiology*, 2015, 4(1).
- [14] Li C H, Cheng S Y. Variation of calcium levels in the tissues and hemolymph of *Litopenaeus vannamei* at various molting stages and salinities[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2012, 32(1): 101-108.
- [15] Zilli L, Schiavone R, Storelli C, *et al.* Analysis of calcium concentration fluctuations in hepatopancreatic R cells of *Marsupenaeus japonicus* during the molting cycle[J]. *The Biological Bulletin*, 2007, 212(2): 161-168.
- [16] Ahearn G A, Mandal P K, Mandal A. Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 137(2): 247-257.
- [17] Kretsinger R H. Calcium-binding proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1976, 45: 239-266.
- [18] Clapham D E. Calcium signaling[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1047-1058.
- [19] Wheatly M G. Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 283(7): 620-640.
- [20] Wheatly M G, Zanotto F P, Hubbard M G. Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 132(1): 163-178.
- [21] Altshuler I, Vaillant J J, Xu S, *et al.* The evolutionary history of sarco (endo) plasmic calcium ATPase (SERCA)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52617.
- [22] Stammers A N, Susser S E, Hamm N C, *et al.* The regulation of sarco (endo) plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA)[J]. *Canadian Journal of physiology and Pharmacology*, 2015, 93(10): 843-854.
- [23] Manjarrés I M, Rodríguez-García A, Alonso M T, *et al.* The sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is the third element in capacitative calcium entry[J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(5): 412-418.
- [24] Arai M, Otsu K, MacLennan D H, *et al.* Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins[J]. *Circulation Research*, 1991, 69(2): 266-276.
- [25] Arai M, Otsu K, MacLennan D H, *et al.* Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1992, 262(3): C614-C620.
- [26] Babu G J, Bhupathy P, Petrashevskaya N N, *et al.* Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(7): 3972-3979.
- [27] Baker D L, Hashimoto K, Grupp I L, *et al.* Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts[J]. *Circulation Research*, 1998, 83(12): 1205-1214.
- [28] Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease[J]. *Muscle & Nerve*, 2007, 35(4): 430-442.
- [29] Roegner M E, Chen H Y, Watson R D. Molecular cloning and characterization of a sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*)[J]. *Gene*, 2018, 673: 12-21.
- [30] Zhang Z P, Chen D D, Wheatly M G. Cloning and characterization of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) from crayfish axial muscle[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(22): 3411-3423.
- [31] Wang Y H, Luo P, Zhang L, *et al.* Cloning of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) gene from white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and its expression level analysis under salinity stress[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(11): 6213-6221.
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [33] Gee K R, Brown K A, Chen W N U, *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes[J]. *Cell Calcium*, 2000, 27(2): 97-106.
- [34] 董双林, 堵甫山, 赖伟. pH 值和 Ca²⁺浓度对日本沼虾生长和能量收支的影响 [J]. *水产学报*, 1994, 18(2): 118-123.
- Dong S L, Du P S, Lai W. Effects of pH and Ca²⁺ concentration on growth and energy budget of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(2): 118-123 (in Chinese).
- [35] 成永旭, 王武, 谭玉钧, 等. 盐度及钙镁离子对中华绒螯蟹大眼幼体育成III仔蟹的成活率和生长的影响 [J]. *水产学报*, 1997, 21(1): 84-88.
- Cheng Y X, Wang W, Tan Y J, *et al.* Effects of the

- ambient salinity and the ambient Ca^{2+} 、 Mg^{2+} concentration on the survival and growth of *Eriocheir sinensis* from the megalopa to the juvenile[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(1): 84-88 (in Chinese).
- [36] 王顺昌, 魏亦军, 申德林. 中华绒螯蟹蜕皮过程中肌肉、肝胰脏和甲壳中钙和磷含量的变动 [J]. 水产学报, 2003, 27(3): 219-224.
- Wang S C, Wei Y J, Shen D L. Calcium and phosphorus levels in the muscle, hepatopancreas and carapace of *Eriocheir sinensis* in different stages of moulting cycle[J]. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(3): 219-224 (in Chinese).
- [37] Chen H Y, Dillaman R M, Roer R D, *et al.* Stage-specific changes in calcium concentration in crustacean (*Callinectes sapidus*) Y-organs during a natural molting cycle, and their relation to the hemolymphatic ecdysteroid titer[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2012, 163(1): 170-173.
- [38] Wilder M N, Huang D T T, Jasmani S, *et al.* Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: changes with the molt cycle[J]. Aquaculture, 2009, 292(1-2): 104-110.
- [39] 侯纯强. 水中钙浓度对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 蜕皮和生长的影响及生理生态学机制 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Hou C Q. Effects and mechanism of Ca^{2+} concentration on the molting and growth of juvenile *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [40] Mattson M P, Spaziani E. Regulation of crab Y-organ steroidogenesis *in vitro*: evidence that ecdysteroid production increases through activation of cAMP-phosphodiesterase by calcium-calmodulin[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1986, 48(2-3): 135-151.
- [41] Philipson K D, Nicoll D A. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective[J]. Annual Review of Physiology, 2000, 62: 111-133.
- [42] 陈政良. IP_3R , RYR 与 Ca^{2+} 信号 [J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1994, 16(5): 216-222.
- Chen Z L. IP_3R , RYR and Ca^{2+} signal[J]. Foreign Medical Sciences: Molecular Biology Fascicles, 1994, 16(5): 216-222 (in Chinese).
- [43] Mykles D L, Chang E S. Hormonal control of the crustacean molting gland: insights from transcriptomics and proteomics[J]. General and Comparative Endocrinology, 2020, 294: 113493.
- [44] 魏薇, 魏华. 水环境中的 Ca^{2+} 浓度对中华绒螯蟹早熟和存活的影响 [J]. 淡水渔业, 2005, 35(3): 10-12.
- Wei W, Wei H. Effects of concentration of Ca^{2+} on precociousness and survival of the Chinese mitten-handed crab[J]. Freshwater Fisheries, 2005, 35(3): 10-12 (in Chinese).
- [45] 周宏轩. Ca^{2+} 和饵料脂肪对中华绒螯蟹性早熟能量学研究 [D]. 保定: 河北大学, 2010.
- Zhou H X. Effects of Ca^{2+} and dietary fat stress on energy metabolism and premature of *Eriocheir sinensis* [D]. Baoding: Hebei University, 2010 (in Chinese).
- [46] Fernandes D, Zaidi A, Bean J, *et al.* RNA i -induced silencing of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 2 in neuronal cells: Effects on Ca^{2+} homeostasis and cell viability[J]. Journal of Neurochemistry, 2007, 102(2): 454-465.
- [47] Seth M, Sumbilla C, Mullen S P, *et al.* Sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca^{2+} signaling mechanism in cardiac myocytes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(47): 16683-16688.
- [48] Bautista D M, Hoth M, Lewis R S. Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells[J]. The Journal of Physiology, 2002, 541(3): 877-894.

Function of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in calcium regulation and its effect on molting of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

YU Junjie¹, LIANG Meng¹, CHEN Xue², DING Xiufang¹,
ZHOU Lishui¹, FENG Wenrong^{1,2}, TANG Yongkai^{1,2,3*}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is a vital freshwater economic crab in China. Its growth is limited by exoskeleton. In the process of growth and development, the exoskeleton must be shed periodically in order to complete its phased growth. A highly complex calcium regulation mechanism is needed in the molting cycle of *E. sinensis*. Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase SERCA (SERCA) transports Ca^{2+} from the cytosol to the sarco/endoplasmic reticulum (SR/ER), where Ca^{2+} is mainly stored in cells. In order to improve the molecular mechanism of molting of *E. sinensis*, a series of functional analyses of the *SERCA* gene, the key factor of Ca^{2+} signal transduction, was carried out in this study. The experimental group prepared four kinds of culture water with different Ca^{2+} concentrations by adding analytical pure CaCl_2 (40 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L) to the fresh water, and the control group without CaCl_2 . The relative expression of genes were tested using qRT-PCR method. The result showed that the relative expression of genes related to Ca^{2+} signal pathway *SERCA*, *PMCA*, *RyR* and *NCX* in Y-organs and gill tissues increased, the relative expression of *MIH* in eyestalks decreased. The concentration of Ca^{2+} and ecdysone in hemolymph increased tested using ELISA method. The results showed that high concentration of Ca^{2+} could promote the absorption of Ca^{2+} from the water environment and transport across cells to hemolymph through the joint regulation of *SERCA*, *PMCA*, *RyR* and *NCX* in the gills of *E. sinensis*, thus increasing the concentration of Ca^{2+} in the hemolymph. In Y-organs, the relative expression of genes related to the Ca^{2+} signal pathway was increased, and the Ca^{2+} signal was up-regulated, which was involved in the regulation of intracellular calcium homeostasis. Meanwhile, the *MIH* gene was down-regulated in the eyestalks. This series of reactions promoted the transformation of *E. sinensis* to the premolt stage, accompanied by an increase in the concentration of ecdysone in hemolymph. After injecting the ds RNA of *SERCA* gene to *E. sinensis* for 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, the knock down efficiency of *SERCA* gene were 65.67 %, 55.5 %, 32.10 % and 15.43 %, respectively, which showed it could effectively knock down the expression of *SERCA* gene, meaning it can be used in the next experiment. After knocked down of *SERCA* gene by RNAi and no Ca^{2+} was added to the culture water, and knocked down *SERCA* gene in high calcium environment (320 mg/L of Ca^{2+} was added to the culture water), the relative expression of *PMCA* and *NCX* genes in Y-organs increased, while the relative expression of *RyR* gene decreased. The concentration of intracellular Ca^{2+} was tested using Fluo-3 AM probe and it was increased. It suggested that the *SERCA* gene played an important role in maintaining intracellular Ca^{2+} concentration and intracellular calcium homeostasis in *E. sinensis*. Continuous knock down of *SERCA* gene expression could significantly prolong ($P < 0.05$) the molting interval and decrease the weight gain rate and survival rate of *E. sinensis*. *SERCA* is the critical factor of Ca^{2+} signal transduction, which not only participates in the regulation of molting, but also plays an important role in many cellular functions, knock down of *SERCA* gene expression may cause intracellular calcium homeostasis imbalance, interfere with Ca^{2+} signal, and cause adverse effects on other physiological activities, thus reducing the survival rate of *E. sinensis*. Continuous knock down of the *SERCA* gene in a high calcium environment resulted in shorter molting interval but aggravated intracellular calcium disorder and decreased survival rate compared with continuous knock down of the *SERCA* gene group. The results of this experiment will provide an essential reference for the further study of the molting mechanism of *E. sinensis*. It suggests that *SERCA* gene plays an important role in molting of *E. sinensis*. The study will improve the molecular mechanism of molting of *E. sinensis*, provide basic reference for further study of the molting mechanism and genetic improvement of *E. sinensis*, and provide theoretical support in the exploration of scientific culture and improving culture efficiency.

Key words: *Eriocheir sinensis*; sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA); molting; Ca^{2+}

Corresponding author: TANG Yongkai. E-mail: tangyk@ffrc.cn

Funding projects: Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD36); Key Project for Jiangsu Agricultural New Variety Innovation (PZCZ201749); Jiangsu Revitalization of Seed Industry (JBGS (2021) 031); Jiangsu Modern Agricultural Industry Technology System (JFRS-01-01)