

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00210

中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因全长 cDNA 克隆和重组表达

孙妍^{1,2*} 张亦陈^{1*} 刘逸尘¹ 王雪惠² 王宇凡¹
耿绪云² 孙金生^{1,2} 杨卫军³

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津市水产养殖病害防治中心, 天津 300221;
3. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

摘要: 根据实验室分离自中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的一种蜕皮抑制激素(Molting-inhibiting hormone, MIH)N 端氨基酸测序结果设计简并引物, 采用 RACE 方法, 首次从中华绒螯蟹眼柄中克隆到蜕皮抑制激素基因全长 cDNA(*Es-MIH*, GenBank 登录号: DQ341280), 该基因全长为 1457 bp, 开放阅读框为 330 bp, 编码 110 个氨基酸(含有 35 个氨基酸的信号肽); 其成熟肽包含 C⁷-C⁴⁴、C²⁴-C⁴⁰ 和 C²⁷-C⁵³ 三个二硫键, 有典型的 CHH 家族结构域。该 cDNA 编码的氨基酸序列与地蟹(*Gecarcinus lateralis*)MIH 同源性最高, 达到了 85%。Northern 杂交和半定量 RT-PCR 显示蜕皮间期成体蟹仅在眼柄中有 MIH 基因表达, 提示该基因的表达具有一定组织特异性。利用 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA 系统重组表达 MIH 成熟肽, 纯化的重组蛋白得率为 0.3 g/L, 纯化产物经质谱鉴定为中华绒螯蟹 MIH。研究解决了 CHH 家族神经肽在机体中的表达量少, 直接纯化较难的问题, 为深入研究 MIH 的作用机制和在生产上控制中华绒螯蟹蜕皮和生长奠定了基础。

关键词: 中华绒螯蟹; 蜕皮抑制激素基因; 组织表达; 重组表达; 纯化

中图分类号: Q781; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)02-0210-08

眼柄 X 器官—窦腺(X-organ—Sinus Gland complex, XO-SG)复合体类似于哺乳动物的下丘脑—垂体系统, 是甲壳动物的重要神经内分泌器官。它合成和分泌多种神经多肽激素, 如同开关一样调控甲壳动物的蜕皮、性腺发育、代谢、色素反应、渗透压调节等重要生理活动^[1, 2]。因此, 对这一系统的研究不仅具有广泛的理论意义, 还将使人们在生产上控制甲壳动物的繁殖和生长成为可能具有潜在的应用价值。近年来, 研究的重点集中在调控甲壳动物血糖代谢、蜕皮和性腺发育的甲壳动物高血糖激素(Crustacean-hyperglycemic hormone, CHH)、性腺抑制激素(Gonad-inhibiting hormone, GIH)、蜕皮抑制激素(Molt-inhibiting hormone, MIH) 和大颚器官抑

制激素(Mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH)等神经多肽激素。由于这些神经多肽激素的氨基酸序列具有很高的同源相似性, 被称为 CHH/MIH/GIH 家族神经多肽激素。迄今, CHH/MIH/GIH 家族神经多肽激素只在甲壳动物中被发现。但是, 这些激素的合成和分泌量很微小, 每个细胞的储存量只有几个 pg, 并且一个甲壳动物的 XO 仅有约 200 个细胞。这给神经多肽激素分泌和作用机制的研究造成了很大的困难^[3]。

Webster 最早从青蟹的体内分离纯化得到了 MIH 并测定了其氨基酸组成顺序^[4]。之后, 人们陆续克隆并测定了黄道蟹(*Cancer pagurus*)^[5]、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)^[6]、凡纳滨对虾(*Penaeus*

收稿日期: 2010-01-20; 修订日期: 2010-10-07

基金项目: 国家自然科学基金(30571421、30871907); 天津市应用基础及前沿技术研究项目(10JCZDJC18200、09JCYBJC15000、10JCYBJC09200); 国家科技支撑计划项目(2006BAD09A11); 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20080618); 天津师范大学博士基金项目(52LX18119)资助

作者简介: 孙妍(1985—), 女, 天津人; 硕士; 主要从事水生生物分子生物学研究。E-mail: sunyan19850409@yahoo.com.cn

*并列第一作者: 张亦陈(1975—), 男, 山西人; 博士; 主要从事基因工程研究。E-mail: cnzhangyc@yahoo.com.cn

通讯作者: 孙金生, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

vannamei)^[7]、优游蟹(*Callinectes sapidus*)^[8]、日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[9]等甲壳动物 MIH 的 cDNA 序列。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、绒螯蟹属(*Eriocheir*), 是我国重要经济蟹类之一, 具有巨大的经济价值。但在实际大规模养殖生产中普遍出现由于蜕皮抑制激素分泌紊乱所导致的河蟹无法正常生长等问题, 严重地阻碍了我国河蟹养殖业的发展, 所以河蟹眼柄神经内分泌激素分泌和调控机制的问题急需被解决^[10]。作者在对眼柄神经内分泌系统进行免疫定位和组织细胞学研究的基础上, 分离、纯化了河蟹眼柄高血糖激素(CHH)和蜕皮抑制激素(MIH), 并进行了末端氨基酸序列分析^[11]。本文根据中华绒螯蟹眼柄蜕皮抑制激素 N 端测序结果设计引物, 以中华绒螯蟹眼柄总 RNA 为材料, 进行 MIH 编码基因的克隆和结构分析, 并进行了河蟹 MIH 成熟肽基因重组表达研究, 解决 CHH 家族神经肽在机体中的表达量少, 直接纯化较难的问题, 为深入探讨中华绒螯蟹蜕皮过程中的分子调节机制和在生产上控制中华绒螯蟹蜕皮和生长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取

中华绒螯蟹由天津宁河七里海河蟹养殖场提供。取 8 只成体中华绒螯蟹的眼柄, 解剖出 X-器官窦腺复合体(XO-SG)^[12], 同时提取中华绒螯蟹的心脏、腹神经索、脑神经节和肌肉组织, 迅速放入液氮中, 提取的血淋巴经离心获得血细胞后, 与其他组织一起参照 TRIzol (Invitrogen)说明书的方法提取总 RNA。

1.2 MIH cDNA 的克隆

以 1 μ g 中华绒螯蟹 XO-SG 总 RNA 为反转录模板, AOLP(5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16-3')为引物, 合成第一链 cDNA。根据本实验室从 XO-SG 中分离纯化得到的天然蜕皮抑制激素的氨基酸序列(Applied Biosystems Model 476A 蛋白质测序仪测定), 设计引物 Erio-mihF1(5'-THATHRACGVCGABTGT-3')、Erio-mihR1(5'-CTACAGCAGCCTTCTACAT-3')和 Erio-mihR2(5'-GAACGGCTGAACAATAGA-3'), 以 cDNA 为模板通过巢式 PCR 的方法扩增了 MIH 的部分片段。3'端非翻译区序列以 Erio-mihF1 和 AOLP, Erio-mihF2(5'-GGGAATCG

TGACATCTAC-3') 和 OligodT₁₈MN 这两对引物通过巢式 PCR 的方法进行扩增。5'端的序列采用 SMART RACE 方法, 使用了 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa), 以环化 cDNA(稀释 50 倍)为模板, 用 ES-MIH S1(5'-CTCTTCGTCGTCGGTGTA-3')和 ES-MIHA1(5'-TATTGCCCCGAGGATGCTG-3')、ES-MIH S2(5'-CACCTCCATTCAGTCGCTTGT-3')和 ES-MIH A2(5'-TTCTGTGCGTGCCGTTCC-3')这两对引物通过巢式 PCR 的方法进行扩增, 获得的目的片段以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 进行常规的胶回收、连接、转化和测序工作(PCR 扩增引物由上海生工合成)。

1.3 序列的生物信息学分析

应用 Bioedit(version 7.0.9.0)和 DNAMAN(version 5.2.2)软件对测序获得的数据进行分析, 并用 ExPASy 数据库预测其蛋白特征及三维空间结构。在 NCBI 的 Protein Blast 数据库中搜索有较高同源性的蛋白质序列, 用 Clustal-X 和 MEGA 软件对其进行多序列比较和聚类分析。

1.4 MIH 的组织表达分析

半定量 RT-PCR 将 6 个组织(包括眼柄、脑神经节、肌肉、腹神经索、血细胞和心脏)的总 RNA 反转为 cDNA, 反应条件与上述相同。以各组织 cDNA 为模板扩增 β -actin 的部分序列, 引物为 β -actinf(5'-AGTAGCCGCCCCTGGTTGTAGAC-3'), β -actinr(5'-TTCTCCATGTGTCGTCGCCAGT-3'), 反应条件: 94 变性 4min; 94 变性 1min, 58 退火 1min, 72 延伸 1min, 26 个循环; 72 保温 10min。以调整好的各个组织 cDNA 模板量扩增 MIH 序列片段, 引物为 MIHf(5'-GCTCAATCCAGATTTTCC-3'), MIHr(5'-CGAGGATGCTGACGTAA-3'), 反应条件: 94 变性 4min; 94 变性 1min, 50 退火 1min, 72 延伸 1min, 26 个循环; 72 保温 10min。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

Northern 印迹分析 扩增的目的基因产物与 pGEM-T Easy 载体连接, 检验序列的正确性, 提取质粒并电泳检测其质量和浓度; 根据目的片段的插入方向, 选择限制性内切酶(*Sal*I)酶切质粒, 使其线性化; 用乙醇沉淀法对线性化质粒 DNA 进行纯化; 按 DIG RNA 标记试剂盒使用指南进行体外转录制备 RNA 探针。各个组织的总 RNA 的甲醛变性电泳及转膜采用常规方法进行, 预杂交、杂交、洗膜、免疫检测过程均参照试剂盒说明书(DIG Detection Starter Kit I)。

1.5 *MIH* 的表达和纯化

表达载体的构建 根据前面反转录得到的 *Es-MIH* cDNA 序列和表达载体序列特征, 设计引物 *Es-MIH-f*(5'-GCGGGATCCGGAATCATCAACGCC-3')和 *Es-MIH-r*(5'-GCCAAGCTTTTATTGCCCGAGGATGCTG-3')。上游引物 5'端含 *Bam*H 酶切位点, 下游引物 5'端含 *Hind* 酶切位点。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增其成熟肽基因片段。将测序正确的阳性克隆的质粒与表达载体质粒 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA(由中国科学院海洋研究所李富花研究员馈赠), 同时用 *Bam*H 和 *Hind* 在 33℃ 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段及表达载体质粒, 并用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA-MIH, 转化大肠杆菌 BI21 (DE3)plysS 感受态细胞(具体操作参照 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA Expression Kit)。

重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析 取 0.5 mL 保种菌体接入 5 mL 新鲜的 LB 培养液中(含 100 µg/mL 氨苄青霉素), 37℃, 220 r/min 培养至 A_{600} 达到 0.6—0.8 时, 取出 1 mL 未诱导的菌液, 其余的菌液用终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖核苷(IPTG)在 37℃, 220 r/min 诱导培养 6h, 在 0.5、1、2、3、4、5、6h 分别取样(500 µL/次), 将收集到的培养液在 4℃, 10000 r/min 条件下离心 2min, 菌泥保存于-20℃待用。在每个样品中加 100 µL 上样缓冲液(1 mol/L pH 6.8 Tris-HCl, 1%溴酚蓝, 0.154 g DTT, 10%SDS, 10%甘油)处理, 沸水浴裂解菌体, 溶解包涵体, 利用 SDS-PAGE 法分析蛋白在诱导后不同时间点的表达量。

重组蛋白的分离纯化及复性 应用 BioLogic DuoFlow 层析系统(Bio-Rad), 对重组蛋白进行分离纯化, 具体操作按照 Bio-Scale Mini profanity IMAC 操作手册进行。分离纯化后的重组蛋白, 依次在含有 8、4、2、1、0.5 mol/L 尿素的 50 mmol/L(pH 7.4)PBS 缓冲液中透析各 8h, 复性后冻干称重保存。

1.6 胶内酶解与 LC-ESI-MS 鉴定

将 SDS-PAGE 胶上的目的斑点切下, 利用胰蛋白酶进行胶内酶解, 取 20 µL 酶解后的样品进行离子阱质谱分析(LCQ DECA XP^{plus}MS, ThermoFirmigan, San Jose, CA, USA), 利用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对。

2 结果

2.1 *MIH* cDNA 克隆

***MIH* 全长 cDNA 序列分析** 以中华绒螯蟹眼柄 RNA 为模板扩增获得的 *Es-MIH* 的 cDNA 全长为 1457 bp, 包含 5'UTR(189 bp), 330 bp 的 ORF(编码多肽序列共 110 Aa: 信号肽 35 Aa, 成熟肽 75 Aa), 3'UTR(938 bp), 加尾信号(AATAAA)以及 Poly-A 尾, 该序列已在 GenBank 注册(登录号: DQ341280)。成熟肽含有 6 个位置保守的 Cys 残基(Cys⁷、Cys²⁴、Cys²⁷、Cys⁴⁰、Cys⁴⁴、Cys⁵³)和一个 Gly 残基(Gly¹²), 其成熟肽经预测可形成 C⁷-C⁴⁴、C²⁴-C⁴⁰ 和 C²⁷-C⁵³ 三个二硫键, 成熟肽的第 2 至第 74 位是典型的 CHH 家族成员结构域(E-value=2.80e-33), 其中含有节肢动物 CHH/MIH/GIH 高度保守的氨基酸序列。

多序列比对分析 由 *Es-MIH* 的 cDNA 序列推导的成熟肽与已公布的其他物种的 MIH 氨基酸序列进行比对, 结果表明: *Es-MIH* 与其他甲壳动物 MIH 成熟肽一样, 含有 15 个保守的氨基酸序列(Gly¹²、Arg¹⁴、Asp²⁶、Asn²⁹、Arg³²、Phe⁵⁰、Arg⁵⁹、Ile⁷²、Leu⁷³ 及第 7、24、27、40、44 和 53 位的 Cys)。Es-MIH 成熟肽第 12 位上为保守的 Gly 残基, 且其前体缺少 CHH 前体相关肽(CPRP)。推导的成熟肽与其他蟹类 MIH 有很高的相似性, 其中与地蟹(*Gecarcinus lateralis*)的相似性最高, 达到了 85%; 与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和青蟹(*Carcinus maenas*)的相似性也较高, 分别达到了 62%和 66%, 与锯缘青蟹(*Scylla serrata*)和远洋梭子蟹(*Portunus pelagicus*)的相似性也达到了 61%和 62%; 但它与虾类 MIH 的相似性比较低, 与中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)MIH 的相似性为 43%, 与刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)和南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)MIH 的相似性分别为 44%和 42%。利用 MEGA(version3.1)软件的邻接法(Neighbor-Joining)将上述相关序列构建系统发育树(图 1), 结果显示这 21 条序列共聚为两组, 分别为蟹类 MIH(图 1A)和虾类 MIH(图 1B), *Es-MIH* 与黑背陆地蟹 MIH 聚在一支, 表明其亲缘性最近, 这也正与多序列比对的结果相吻合。

2.2 *Es-MIH* mRNA 在中华绒螯蟹各组织中的分布

首先利用 RT-PCR 方法分析了 *Es-MIH* mRNA

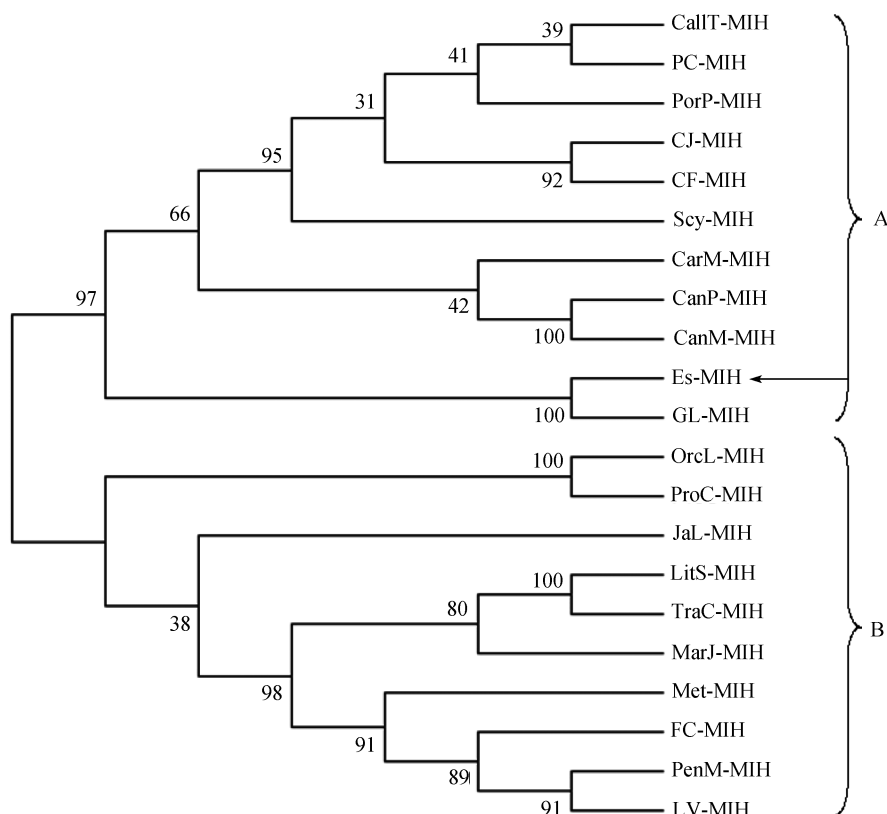


图 1 主要甲壳动物(虾蟹类)MIH 的系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree for MIH of some species from shrimps and crabs
A 群为蟹类 MIH, B 群为虾类 MIH, 其中箭头标示为中华绒螯蟹 MIH(*Es-MIH*)

A. shrimp MIH; B. crab MIH; Signal with arrow is *Eriocheir sinensis*

GenBank accession number: *GL-MIH* (黑背陆地蟹: ABF06632), *CarM-MIH* (青蟹: Q27225), *CanP-MIH* (食用寄居蟹: CAC05346), *CanM-MIH* (太平洋蟹: O61389), *CJ-MIH* (日本蟳: ACD11361), *CF-MIH* (锈斑蟳: O96605), *PC-MIH* (三疣梭子蟹: ABZ04547), *CallT-MIH* (蓝蟹: P55321), *Scy-MIH* (泥蟹: AAL99355), *PorP-MIH* (远海梭子蟹: ABM74397), *FC-MIH* (中国对虾: AAL55258), *PenM-MIH* (斑节对虾: AAR89516), *Met-MIH* (刀额新对虾: O76534), *LV-MIH* (南美白对虾: AAR04348), *MarJ-MIH* (日本对虾: BAE78494), *LitS-MIH* (凡纳滨对虾: AAL55257), *TraC-MIH* (鹰爪虾: AAL55259), *OrcL-MIH* (利莫斯螯虾: P83636), *ProC-MIH* (克氏原螯虾: P55848), *JaL-MIH* (南非龙虾: P83220), *Es-MIH* (中华绒螯蟹: DQ341280)

在不同组织中的表达, 电泳图谱(图 2)。从图中可以看到 *Es-MIH* 基因仅在眼柄中有表达。Northern Blot 的结果显示仅在眼柄中出现了明显的特异条带, 而在脑神经节、肌肉、腹神经索、血细胞和心脏组织

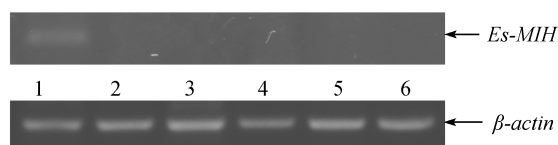


图 2 RT-PCR 分析 *Es-MIH* 在中华绒螯蟹不同组织中的表达情况
Fig. 2 RT-PCR analysis of the *Es-MIH* gene expression from different tissues of *E. sinensis*
泳道 1. 眼柄; 2. 脑; 3. 肌肉; 4. 腹神经索; 5. 血细胞; 6. 心脏
Lane 1. eyestalk; Lane 2. encephalon; Lane 3. muscle; Lane 4. ventral nerve cord; Lane 5. haemocyte; Lane 6. heart

中均未发现阳性条带(图 3), 这说明 *Es-MIH* 的表达具有组织特异性。

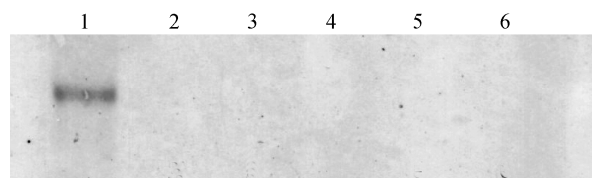


图 3 利用 Northern blot 分析 *Es-MIH* 在中华绒螯蟹不同组织中的表达特征

Fig. 3 Northern blots analysis of total RNA from various *Eriocheir sinensis* tissues with RNA probes specific for *Es-MIH*
泳道 1. 眼柄; 2. 脑; 3. 肌肉; 4. 腹神经索; 5. 血细胞; 6. 心脏
Lane 1. eyestalk; Lane 2. encephalon; Lane 3. muscle; Lane 4. ventral nerve cord; Lane 5. haemocyte; Lane 6. heart

2.3 重组蛋白的表达与纯化

经 IPTG 诱导后, 以 SDS-PAGE 检测重组蛋白 rEs-MIH 的表达, rEs-MIH 重组蛋白的表达与诱导时间显著相关, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 之后, 随着诱导时间的延长, 蛋白的表达量显著增加, 当诱导到 5h 后表达量达到平台期, 继续培养, 目的蛋白的表达量不再显著增加(图 4)。通过 Quantity One 4.4.0(Bio-Rad)分析诱导表达 5h 后的 SDS-PAGE 图像, 结果表明重组蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 25%。

利用 Ni-IDA 技术对目的蛋白进行纯化, 电泳检测显示在 14 kD 左右有单一条带, 这与 Es-MIH 预测蛋白分子量 14.2 kD 的结果相一致(图 5), 纯化的

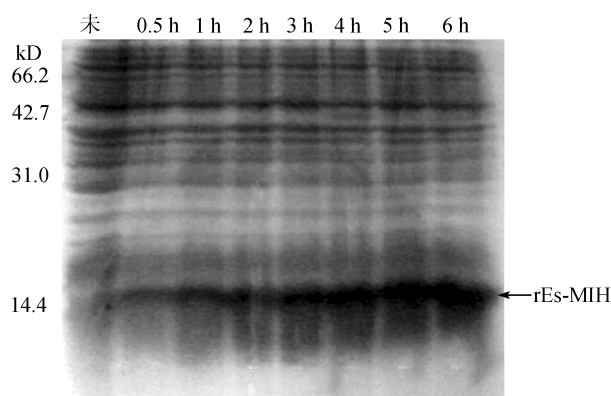


图 4 诱导不同时间对 rEs-MIH 表达量的影响

Fig. 4 Expressed HIS-MIH fusion protein during different time after induced by IPTG

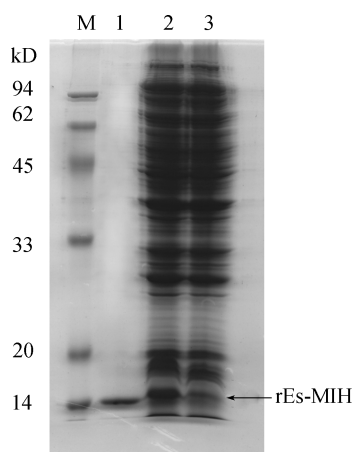


图 5 重组蛋白 rEs-MIH 的纯化

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purification of HIS-MIH fusion protein. M. 蛋白质分子量标记; 泳道 1. 纯化目的蛋白; 2. 加入 IPTG 诱导 5h 表达的蛋白; 3. 未加入 IPTG 进行诱导的阴性对照

M. Protein Molecular weight marker; Lane 1. Purified protein (rEs-MIH); Lane 2. Total proteins of bacteria (induced for 5h). 3. Total proteins of bacteria (non-induced)

目的蛋白得率约为 0.3 g/L。

2.4 质谱鉴定结果

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 切下目的条带, 利用 LC-ESI-MS 进行分析和鉴定。用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对后发现数据库中收录的河蟹 *MIH1*(QI34597340)推导的氨基酸序列中有 2 条肽段与重组的河蟹 MIH 蛋白完全匹配, 序列分别为 -IDGLGMLCR- 和 -NIDFLWCV YASER-(图 6)。由此可以判定, 上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白 rEs-MIH, 中华绒螯蟹 MIH 成熟肽成功地获得了体外重组表达。

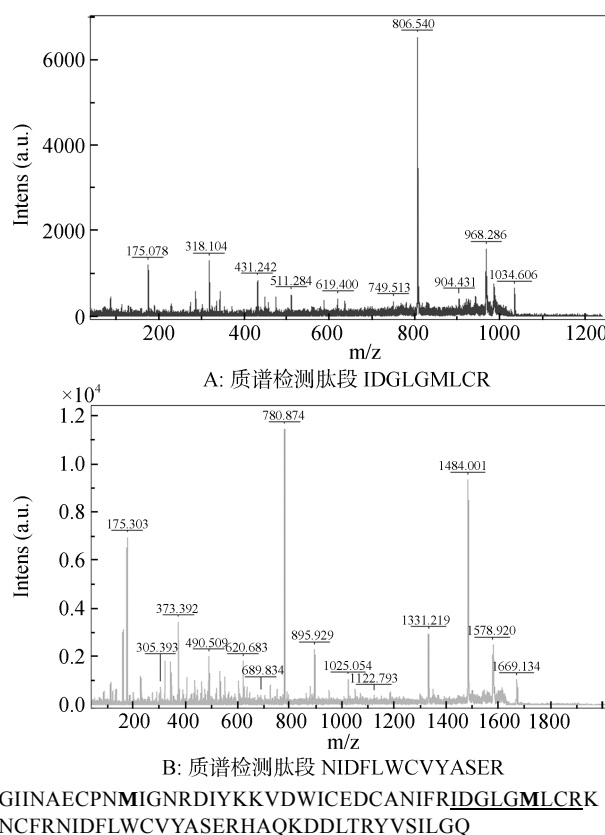


图 6 重组蛋白(rEs-MIH)中与中华绒螯蟹 MIH1 相匹配的两个肽段(A 和 B)以及它们在中华绒螯蟹 MIH(Es-MIH)成熟肽氨基酸序列中的位置(两个匹配肽段用下划线标出)

Fig. 6 two suited peptides (A and B) between rEs-MIH and Es-MIH1 and the position of mature peptide of Es-MIH are underlined with single line

3 讨论

对眼柄 XO-SG 系统的研究一直是甲壳动物内分泌学的重点内容。自 20 世纪 90 年代初, 我国也开始了甲壳动物眼柄神经内分泌系统的研究, 已对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium*

rosenbergii)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等我国重要经济虾蟹类眼柄神经内分泌系统的组织学和细胞学进行了较全面地观察^[13-16], 并利用同源克隆方法对中国对虾、锯缘青蟹和河蟹 MIH 编码基因进行了克隆和初步分析^[17,18]。作者在分离纯化出中华绒螯蟹蜕皮抑制激素的基础上, 根据 N 端测序结果设计引物, 以中华绒螯蟹眼柄总 RNA 为材料, 采用 RACE 技术, 首次克隆了大小为 1457 bp 的中华绒螯蟹 MIH 全长 cDNA。通过对虾蟹类 MIH 氨基酸序列信号肽和成熟肽的割裂位点的比较分析, 发现该割裂位点的前 2 位氨基酸残基在虾类和蟹类中是不同的, 蟹类为 AA^[19]或 TA^[5], 而虾类均为 SA^[20]。另外, MIH 的氨基酸组成具有种间多态性, 已知的短尾蟹类由 78 个氨基酸残基组成^[21-23], 而对虾类和蟹类 MIH 的数目种间差异较大, 日本对虾(*Penaeus japonicus*)和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)的 MIH 由 77 个氨基酸组成^[6,9], 南美白对虾(*Penaeus vannamei*)的 MIH 仅为 72 个氨基酸^[7], 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)MIH 则为 75 个氨基酸^[24]。Es-MIH 在信号肽与成熟肽之间缺少 CHH 前体相关肽(CPRP), 仅含有 15 个位置保守的氨基酸序列(Gly¹²、Arg¹⁴、Asp²⁶、Asn²⁹、Arg³²、Phe⁵⁰、Arg⁵⁹、Ile⁷²、Leu⁷³及第 7、24、27、40、44 和 53 位的 Cys)。这些特征均符合 CHH 家族 II 组神经肽的特征^[19]。通过多序列比对, 我们发现在这 21 个序列中的第 72 位氨基酸残基均是 Ile, Katayama, *et al.* 在研究日本囊对虾 MIH 结构时指出, Ile⁷²对于 MIH 的活性至关重要^[25]。系统发生树显示, 虾类与蟹类分成了明显的两支, 并且中华绒螯蟹的 MIH 与地蟹的亲缘性最高达到了 85%, 被聚在一起, 与其他的蟹类也有较高的相似性, 而与虾类 MIH 的相似性较低(图 1)。这说明 MIH 氨基酸的组成及其特征在虾类与蟹类之间存在一定的种间差异。

在甲壳动物 MIH 的组织表达研究方面, 仅见少量报道。在刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)的胚胎期没有检测到 MIH 基因的表达^[6], 但在锈斑蟳孵化前的胚胎中检测到较弱的 MIH 基因表达^[21], 锯缘青蟹的 MIH 基因只在眼柄和脑组织中有表达, 而在肌肉与中肠腺中不表达^[26]。本研究利用半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交分析 MIH 基因在成体中华绒螯蟹的不同组织中的表达差异, 结果显示该基因仅在眼柄中有表达, 其余组织均未检出, 这表明

MIH 的表达具有较强的组织特异性。

CHH 家族神经肽在甲壳动物个体发育和生殖等活动中起重要调控作用, 但含量很低, 阻碍了对其开展深入研究和利用。蟹类仅能产生极微量的 MIH, 用基因工程方法可以制备足量的重组 MIH, 进而可用于系统开展其功能和调控机制的研究。作者利用 BioLogic DuoFlow 层析系统(Bio-Rad), 纯化重组 MIH 成熟肽, 经质谱鉴定了其正确性, 建立了高效制备中华绒螯蟹蜕皮抑制激素的方法, 目的蛋白得率约为 0.3 g/L, 较好地解决了 CHH 家族神经肽在机体中的表达量少, 直接纯化较难的问题, 重组 MIH 的生物活性及其分子机制的研究正在进行中。

致谢:

中国科学院海洋研究所相建海研究员、李富花研究员为本实验提供了表达载体并进行了相关的质谱鉴定工作, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] Cooke I M, Sullivan R E. Hormone and secretion. In: Bliss D E (Eds.), *The Biology of Crustacean* [M]. New York: Academic Press. 1982, 3: 205—290
- [2] Keller R. Crustacean neuropeptides: structure, function and comparative aspects [J]. *Experientia*, 1992, 48(5): 439—448
- [3] Van Herp F. Molecular, cyclogical, and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormones family [M]. *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*, 1998, 53—70
- [4] Webster S G. Amino acid sequence of putative molt inhibiting hormone from the crab, *Carcinus maenas* [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological sciences. B*, 1991, 244(1311): 247—252
- [5] Lu W, Wainwright G, Olohan L A, *et al.* Characterization of cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer pagurus*, expression of MIH in non-X-Organ tissue [J]. *Gene*, 2001, 278(1-2): 149—159
- [6] Gu P L, Chan S M. Cloning of a cDNA encoding a putative molting inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp, *Metapenaeus ensis* [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(3): 214—220
- [7] Sun P S. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(1): 1—6
- [8] Lee K J. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 209(3): 1126—1131
- [9] Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, *et al.* Molecular cloning

- of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Zoological Science*, 1997, **14**(5): 785—789
- [10] Sun J S, Gao C L, Xiang J H. Research on the Glutamate gated channels in the neurosecretory cells of MTXO in the eyestalk of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(6): 647—652 [孙金生, 高春蕾, 相建海. 河蟹眼柄神经内分泌细胞 Glu 受体研究. 水生生物学报, 2004, **28**(6): 647—652]
- [11] Wang X H, Sun J S, Yang W J. Isolation and activity of a crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(2): 150—155 [王雪惠, 孙金生, 杨卫军. 中华绒螯蟹眼柄神经多肽激素(CHH)的分离纯化及活性鉴定. 水产学报, 2006, **30**(2): 150—155]
- [12] Sun J S, Liu A X, Du Y Z. Microstructure and ultrastructure of sinus gland in the eyestalk of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(1): 27—31 [孙金生, 刘安西, 杜育哲. 中华绒螯蟹窦腺的显微和超微结构. 动物学报, 2001, **47**(1): 27—31]
- [13] Shangguan B M, Li S J. Cytologic research of X-organ in *Scylla serrata* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1994, **16**(6): 116—121 [上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹 X 器官神经分泌细胞的细胞学研究. 海洋学报, 1994, **16**(6): 116—121]
- [14] Shangguan B M, Li S Q. Microstructure and ultrastructure of sinus gland in the eyestalk of *Scylla serrata* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1995, **41**(4): 341—346 [上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹窦腺显微和超微结构研究. 动物学报, 1995, **41**(4): 341—346]
- [15] Kang X J, Li Y. Neurosecretory structure of eyestalk in *Fennopenaeus chinensis* [J]. *Journal of Hebei University* (Natural Science Edition), 1998, **18**(1): 45—48 [康现江, 李阳. 中国对虾眼柄的神经分泌结构. 河北大学学报(自然科学版), 1998, **18**(1): 45—48]
- [16] Yao B. Ultrastructure of neurosecretory cell in eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Supplement to the Journal of Sun Yatsen University*, 1995, (3): 64—67 [姚泊. 罗氏沼虾眼柄神经分泌细胞的超微结构. 中山大学学报论丛, 1995, (3): 64—67]
- [17] Wang Z Z. Molecular cloning and sequence analysis of full length cDNA encoding molt-inhibiting hormone from *Fennopenaeus chinensis* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(2): 128—134 [王在照. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆和序列分析. 遗传学报, 2003, **30**(2): 128—134]
- [18] Song X, Zhou K Y, Ma C Y. Molecular cloning and Northern blot analysis of a cDNA fragment of molt-inhibiting hormone gene 1 from *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, **10**(5): 353—358 [宋霞, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1(MIH1)基因的 cDNA 片段克隆和 Northern 印迹分析. 中国水产科学, 2003, **10**(5): 353—358]
- [19] Lee K J, Kim H W, Gomez A M, et al. Molt-inhibiting hormone from the tropical land crab *Gecarcinus lateralis*: cloning, tissue expression, and expression of biologically active recombinant peptide in yeast [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, **150**(3): 505—513
- [20] Chen H Y, Watson R D, Chen J C. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, **151**(1): 72—81
- [21] Chan S M. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab *Charybdis feriatus* [J]. *Gene*, 1998, **224**(1-2): 23—33
- [22] Chang E S, Keller R. Determination of the amino acid sequence of the molt-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. *Neuropeptides*, 1996, **30**(1): 95—101
- [23] Klein J M, Mangerich S, Kleijn D P, et al. Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor [J]. *FEBS Letters*, 1993, **334**(1): 139—142
- [24] Nagasawa H. Isolation and amino acid sequence of a molt-inhibiting hormone from the American crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, **60**(3): 554—556
- [25] Katayama H, Ohira T, Nagata S, et al. Structure-activity relationship of crustacean molt-inhibiting hormone from the Kuruma Prawn *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Biochemistry*, 2004, **43**(30): 9629—9635
- [26] Qiu G F, Zhang A P, Lou Y D. cDNA cloning and expression analysis of molt-inhibiting hormone in the mud crab *Scylla serrata* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, **27**(3): 209—212 [邱高峰, 张爱萍, 楼允东. 锯缘青蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的分子克隆及其表达分析. 水产学报, 2003, **27**(3): 209—212]

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF MOLT-INHIBITING HORMONE GENE (*Es-MIH*) IN *ERIOCHEIR SINENSIS*

SUN Yan^{1,2}, ZHANG Yi-Chen¹, LIU Yi-Chen¹, WANG Xue-Hui², WANG Yu-Fan¹, GENG Xu-Yun²,
SUN Jin-Sheng^{1,2} and YANG Wei-Jun³

(1. College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. Tianjin Aquaculture Disease Prevention & Treatment Center, Tianjin 300221, China; 3. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Periodic molting is essential for growth and development in crustaceans. Molting is triggered by steroid hormones (ecdysteroids) which secreted by paired endocrine glands, the Y-organs. The synthesis of ecdysteroids by Yorgans is negatively regulated by a peptide neurohormone, moltinhibiting hormone (MIH), a polypeptide neurohormone released from neurosecretory cells in the X-organ/sinus gland complex of the eyestalks. To clone a full length cDNA of molt-inhibiting hormone gene from *Eriocheir sinensis* by RACE-PCR, degenerate primers was designed according to the partial amino acid sequences of MIH which was isolated by our lab. A novel MIH (*Es-MIH*, GenBank accession No. DQ341280) of 1457 bp was successfully cloned from Chinese mitten crab. It was consisted of a 330bp open reading frame, the untranslation region of 5' and 3' end were 189 and 938 nucleotides, respectively. Deduced protein contained a putative signal peptide of 35 amino acids and a mature peptide of 75 amino acids. *Es-MIH* contains 6 conserved cysteines which formed three disulfide bonds (C⁷-C⁴⁴, C²⁴-C⁴⁰ and C²⁷-C⁵³). A typical Crust_neurohorm domain (position 2—74 nt in mature peptide) (*E*-value=2.80e-33) was identified by SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) in Expasy. There was an arthropod CHH/MIH/GIH neurohormones family signature in this domain. Multiple alignment results showed that *Es-MIH* has the highest identity with *Gecarcinus lateralis* MIH (85%), it also shared high identities with *Carcinus maenas* (66%) and *Portunus trituberculatus* (62%), moreover, it showed highly identity with MIH from shrimps, such as *Metapenaeus ensis* MIH (44%), *Fenneropenaeus chinensis* MIH (43%), *Penaeus monodon* MIH (43%) and *Litopenaeus vannamei* MIH (42%). Northern blotting reveled that transcripts of *Es-MIH* were only found in eyestalks, no bands could be observed in heart, muscle, ventral nerve cord, brain and haemocytes lanes. Semi-quantitative RT-PCR gave similar results. It indicated that *Es-MIH* was specifically expressed in eyestalk. The recombinant *Es-MIH* (rEs-MIH) was expressed by pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA expression system. The optimal time for isopropyl β-D-thiogalactopyranoside induction was 5 hours. After collection and lyses of host *E. coli*, rEs-MIH was purified by immobilized metal affinity chromatography column. The yield of rEs-MIH could reach 0.3 g/L. The LC-ESI-MS analysis showed that two peptide fragments of the recombinant protein were identical to the corresponding sequence of *Eriocheir sinensis* MIH1 (GenBank accession No. GI34597340). Low content and difficulties of purification of polypeptide neurohormone in crustacean was solved in this research by means of genetic engineering, which could facilitate understanding the probable role of MIH in development process of crab and would be helpful to crustacean culture.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Molt-inhibiting hormone; Cloning; Expression profile; Prokaryotic expression