

doi: 10.7541/2018.063

中国米虾***bursicon***基因的功能及作用机制

任丽琦 翁洁羊 王鑫 孙金生 李冉

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

摘要: 为探讨米虾鞣化激素在其蜕皮周期及表皮角质层形成过程中的作用, 采用PCR技术克隆得到了米虾鞣化激素两个亚基基因的开放阅读框(ORF)序列。*bursicon-α* ORF全长441 bp, 共编码146个氨基酸; *bursicon-β* ORF全长411 bp, 共编码136个氨基酸。利用实时荧光定量PCR分析米虾整个蜕皮周期中鞣化激素2个亚基基因的表达特征, 结果发现, 鞣化激素*bursicon-α*和*bursicon-β*在米虾蜕皮周期的各个阶段的相对表达量存在差异, 在蜕皮前期(D期)相对表达量开始上升, 到D₃期时相对表达量最高, 蜕皮期E期相对表达量最低。RNA干扰(RNA interference, RNAi)介导*bursicon-α*和*bursicon-β*基因沉默后, 发现米虾的蜕皮周期延长, 表皮角质层明显变薄。结果提示, 鞣化激素(Bursicon)与新形成的外骨骼中角质层的加厚与硬化密切相关, 进而影响蜕皮时间。

关键词: 米虾; 鞣化激素; 表皮鞣化; 蜕皮周期; 实时荧光定量PCR; RNA干扰

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2018)03-0503-09

节肢动物的体表有坚硬的外骨骼, 包括基膜、表皮细胞层和角质层三部分。外骨骼有保护内部器官, 维持身体形态, 防止体内水分蒸发, 抵抗化学或机械损伤, 阻挡病原微生物入侵等作用^[1]。这类坚硬的外壳在虾、蟹、昆虫等中比较常见。由于外骨骼对节肢动物生长的限制作用, 所以旧表皮必须间歇式的蜕去并不断产生新表皮。动物刚形成的表皮较为柔软, 适应生长, 但是容易感染病原微生物或者受到外界损伤, 因此新形成的表皮需要迅速地进行鞣化。

1962年Fraenkel、Hsiao和Cottrell将刚羽化的红头丽蝇(*Calliphora erythrocephala*)颈部进行结扎, 结果其胸部和腹部的表皮没有发生骨化现象, 之后又向这些红头丽蝇体内注射了正常发育的同种个体的血淋巴, 发现胸部、腹部的表皮开始快速发生骨化^[2, 3]。所以Fraenkel和Hsiao认为在血淋巴中很可能有一种物质, 调控红头丽蝇刚刚羽化后新产生的表皮发生鞣化, 并将其命名为鞣化激素(Bursicon)^[4]。此后的40多年里, 尽管有许多关于鞣化激素生理活性的文章陆续发表, 但是一直不能成功分离和纯化

该激素, 其分子生理学性质也不能确定, 鞣化激素的研究一直没有突破性的进展。伴随高通量测序技术日渐成熟和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)基因组全序列的公布^[5], Dewey等研究表明在黑腹果蝇中CG13419基因编码鞣化激素BURS亚基, 并且证实鞣化激素除了可以使分泌形成的新表皮迅速鞣化外, 还与翅的伸展有关^[6]。Bhat等研究证明鞣化激素在许多昆虫中的分子量都大约为30 kD^[7], Honegger等也发现黑腹果蝇中的CG13419基因编码鞣化激素但是其编码的分泌蛋白仅有15 kD^[8]。之后Luo和Mendive等发现在黑腹果蝇中鞣化激素是一种由2个胱氨酸结蛋白构成的异源二聚体, 2个亚基分别是BURS (α)和PBURS (β)。其中PBURS (β)亚基由CG15284基因编码, 所编码的分泌蛋白也是15 kD。将CG13419和GG15284在细胞中一起转染, 两者共同表达的蛋白才可以促使颈部结扎的红头丽蝇的表皮发生骨化^[9, 10]。

Baker和Truman认为^[11], DLGR2是黑腹果蝇鞣化激素的受体, 该受体是一种G蛋白偶联受体并由*rickets*基因编码。鞣化激素具体作用机制被认为是

收稿日期: 2017-11-05; 修订日期: 2018-01-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31302168); 天津市应用基础与前沿技术计划(14JCYBJC30700); 天津师范大学博士基金(52XB1303)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (31302168); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (14JCYBJC30700); the Ph.D. Program Foundation of Tianjin Normal University (52XB1303)]

作者简介: 任丽琦(1991—), 女, 山西长治人; 硕士研究生; 主要从事水生生物发育学方面的研究。E-mail: 1874612421@qq.com

通信作者: 李冉, E-mail: liran_1006@163.com

Bursicon先和LGR2受体结合,导致第二信使的环腺苷酸(cAMP)大量生成^[10],进一步使下游蛋白激酶A(PKA)被激活,促进酪氨酸羟化酶(Tyrosinehydroxylase)的磷酸化^[12],酪氨酸(Tyrosine)在活化的酪氨酸羟化酶的催化下转变成多巴(DOPA),最后使表皮发生鞣化;而且鞣化激素可以经cAMP/PKA通路调控翅的成熟、伸展^[13];Bursicon或PBursicon两个亚基还可以分别形成同源二聚体,通过IMD通路,使转录因子Relish激活,进而参与昆虫的免疫过程^[14]。

在节肢动物的昆虫纲^[15-18]、甲壳纲^[19-23]、蛛形纲^[15]甚至是棘皮动物的紫海胆^[16]中都发现了鞣化激素,特别是在昆虫纲中研究的比较多。在甲壳纲中如普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[19,20]、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[21]、欧洲龙虾(*Homarus gammarus*)^[22]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[23]中也发现了鞣化激素的存在,对该激素合成和释放部位以及在发育过程和蜕皮周期中的表达模式进行了鉴定,尤其是在蓝蟹中的研究表明鞣化激素的重组蛋白可以促进其新表皮角质层的增厚。目前鞣化激素在米虾中尚未有报道。米虾属于甲壳纲(Crustacea)、匙指虾科(Atyidae),包括如多齿新米虾(*Neocaridina denticulate*)、弯额米虾(*Caridina curvifrons*)、浙江米虾(*Caridina zhejiangensis*)等。因为米虾具有个体偏小,生长迅速,易存活,繁殖周期短等特点,适合作为生理、生态等实验研究的材料。

本研究以米虾为实验对象,首次克隆了米虾鞣化激素 α 和 β 两个亚基基因的开放阅读框片段,利用实时荧光定量PCR测定了米虾蜕皮周期中两个亚基基因的表达特征。利用RNA干扰技术分析鞣化激素功能,为进一步研究鞣化激素在米虾生长发育过程中的生理功能提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的中国米虾购买于浙江,体长约1.5—2.5 cm,健康有活力,米虾购买回后养在实验室中,水箱大小为15 cm×20 cm×15 cm,曝气,温度为26—28℃,每天投喂虾粮,1周更换3次水。

1.2 米虾总RNA提取和反转录

按TRIzol[®] Reagent (Thermo Fisher Scientific)试剂使用说明提取米虾总RNA,超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific)和1%琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和完整性。以总RNA为模板,参考反转录试剂盒(TransScript[®] one-step gDNA Remover and cDNA Synthesis SuperMix,北京全式金生物)说明

书,反转录获得cDNA第一条链,使用内参基因 β -actin引物(β -actin F、 β -actin R,表1)通过PCR对cDNA模板进行检测。

1.3 米虾鞣化激素基因bursicon- α 和bursicon- β 序列的克隆

用软件Primer 5.0设计bursicon- α 和bursicon- β 的ORF区的引物(bursicon- α F、bursicon- α R、bursicon- β F、bursicon- β R,表1),参考Ex Taq酶(TakaRa)的使用说明书,以米虾cDNA为模板PCR扩增目的基因bursicon- α 和bursicon- β 的ORF区。bursicon- α 反应程序为94℃预变性4min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸10min。bursicon- β 反应程序的退火温度为60℃,其余与bursicon- α 反应程序相同。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测后,扩大体系,参照使用说明书,用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生化科技有限公司)将目的片段切胶回收纯化,连接到pMDTM18-T Vector (Takara)上,并将菌液送至金唯智生物科技有限公司完成测序。

1.4 bursicon生物信息学分析

用DNASTar (version7.1)软件分析bursicon- α 和bursicon- β 基因序列和氨基酸序列。利用蛋白组学在线ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析

表1 本研究所用的引物序列

Tab. 1 Primers used in the study

引物 Primers	片段大小 Product size (bp)	引物序列 Primer sequences (5'—3')
β -actin F	21	TGTGACGATGAAGTAGCAGCA
β -actin R	22	AATCTTTCTGACCCATTCCAAC
bursicon- α F	26	ATGCACTTAAAGAAGGTTAATACAAG
bursicon- α R	22	TTAAATGAAGGGTACGTTTCC
bursicon- β F	24	ATGTGGTCACGGTGGGTATGGATT
bursicon- β R	26	TTATCGTGTGGAATCACCACATTGG
bursicon- α QPCR F	20	ATTCCAAGCCCATTCCATCC
bursicon- α QPCR R	20	TCCCTCTTCAACATCGGTGC
bursicon- β QPCR F	23	TCCATCAACCATACACATTTCCA
bursicon- β QPCR R	20	ATCCAGTCAAGCGATTTCGG
dsburs α F	27	GCTCTAGAATTCCAAGCCCATTCCATC
dsburs α R	27	GGAATTCGTTCCTCTTCAACATCGGT
dsburs β F	28	GCTCTAGATCACGGTGGGTATGGATTGT
dsburs β R	27	GGAATTCGTGTATTGACGGAGGGTTGG

蛋白理化性质,用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白的结构域,用SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)检测蛋白是否有信号肽。将**bursicon- α** 和**bursicon- β** 的ORF区在NCBI (National Center for Biotechnology Information)的GenBank数据库中进行BLASTx比对,鉴定所编码的蛋白质并且找出多个同源序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),同源序列在BioEdit软件中进行比对后用MEGA 5.2软件中的NJ法(Neighbor-joining)进行系统树构建。

1.5 鞣化激素基因**bursicon**在不同蜕皮周期的表达特征分析

根据康现江等^[24]对中华锯齿米虾蜕皮周期的分类方法,可将米虾的蜕皮周期分为4个时期:蜕皮后期(A-B期)、蜕皮间期(C期)、蜕皮前期(D期)和蜕皮期(E期)。其中D期可进一步分为D₀₋₁、D₂、D₃、D₄ 4个亚期。参考TRIzol使用说明提取米虾不同蜕皮时期胸腹神经节中的RNA并进行反转。使用实时荧光定量PCR仪FAST7500(ABI),以A-B期、C期、D₀₋₁期、D₂期、D₃期、D₄期、E期共7个时期的cDNA为模板分别检测**bursicon- α** 和**bursicon- β** 在不同蜕皮时期的相对表达量。根据获得的**bursicon- α** 和**bursicon- β** 的ORF区的基因序列用Primer 5.0设计特异性引物(**bursicon- α** QPCR F、**bursicon- α** QPCR R、**bursicon- β** QPCR F、**bursicon- β** QPCR R,表1)。以 β -actin为内参基因。参考Fast-Star Universal SYBR Green Master (Rox)说明书进行Real-time PCR反应。每组样品设3个平行,按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对得到的数值进行统计计算后,用SPSS17.0软件分析各时期**bursicon- α** 和**bursicon- β** 相对表达量的显著性差异,并用Origin 8.0作图。

1.6 RNA干扰

设计**bursicon- α** 和**bursicon- β** 双链RNA片段的特异性引物(ds**burs** α F、ds**burs** α R、ds**burs** β F、ds**burs** β R,表1),利用HT115菌株来制备目的基因的双链RNA片段**bursicon- α** dsRNA (ds**burs** α)和**bursicon- β** dsRNA (ds**burs** β),以GFP dsRNA (dsGFP)为对照。将米虾分为3组,用显微注射器分别向每组米虾中注射合成的dsRNA (dsGFP组、ds**burs** α 组、ds**burs** β 组),每只虾注射1 μ g。第2、第6天分别取样,提取总RNA,经反转录、实时荧光定量PCR对干涉效果进行检测。选取处于蜕皮周期D₀₋₁期同等大小的米虾,分为4个组,分别注射dsGFP、ds**burs** α 、ds**burs** β 、ds**burs** α 与ds**burs** β 质量浓度比为1:1的混合液。注射总量为1 μ g/只,48h后每组虾剪其尾扇并在显微镜下观察所处的蜕

皮时期,记录每组虾从蜕皮后期D₀₋₁期到蜕皮期E期的时间。

1.7 组织学观察

同样以蜕皮周期处于D₀₋₁期的米虾为实验对象,分为4组分别注射dsRNA (同上)。当米虾蜕皮周期处于D₃期时,在旧的外骨骼下生成了新的外骨骼。每组处理组用解剖剪和镊子将其头胸部背部旧的外骨骼小心剥离后分别取其新的外骨骼并固定在4%的多聚甲醛中,石蜡包埋后切片并用甲苯胺蓝染色,最后用光学显微镜观察、拍照。

2 结果

2.1 **bursicon- α** 和**bursicon- β** 基因的克隆与序列分析

米虾**bursicon- α** 基因开放阅读框(ORF)为441 bp,编码146个氨基酸,翻译的蛋白理论等电点为5.67,预测分子量为15993.65 Da,氨基酸序列的1—26位是信号肽(GenBank登录号: MG766223)。经保守结构域预测**bursicon- α** 基因翻译形成的氨基酸序列具有一个C末端胱氨酸结节状结构域(CTCK),长度为89个氨基酸,位于氨基酸序列的第31至第119位并且该结构域与二聚体的形成有关。此外 α 亚基含有11个半胱氨酸残基。**bursicon- β** 基因开放阅读框(ORF)为411 bp,编码136个氨基酸,翻译的蛋白理论等电点为6.07,预测分子量为15145.19 Da,氨基酸序列的1—21位是信号肽(GenBank登录号为MG766224)。**bursicon- β** 基因翻译形成的氨基酸序列同样含有一个C末端胱氨酸结节状结构域(CTCK),长度为103个氨基酸,位于氨基酸序列的第30至第132位。此外 β 亚基中也含有11个半胱氨酸残基。

2.2 米虾中鞣化激素Bursicon同源性分析及系统进化树构建

利用BioEdit软件,将米虾和其他甲壳纲、昆虫纲中13种物种中鞣化激素 α 亚基的氨基酸序列进行了比对后采用MEGA5.2软件中的NJ法构建系统进化树(图1)。结果表明米虾 α 亚基与甲壳纲十足目的 α 亚基序列亲缘关系较近,包括斑节对虾、蓝蟹、普通滨蟹、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)。同时BLAST分析表明米虾 α 亚基与斑节对虾的同源性高达89%,亲缘关系最近。

同上述方法相同,采用MEGA5.2软件中的NJ法构建 β 亚基系统进化树(图2)。结果表明米虾 β 亚基和甲壳纲十足目的斑节对虾、欧洲龙虾亲缘关系较近。同时BLAST分析表明米虾 β 亚基与斑节对虾的同源性高达77%,亲缘关系最近。

2.3 蜕化激素在米虾蜕皮周期中的表达特征分析

利用实时荧光定量PCR检测了蜕皮周期中 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 的相对表达量(图 3), 结果发

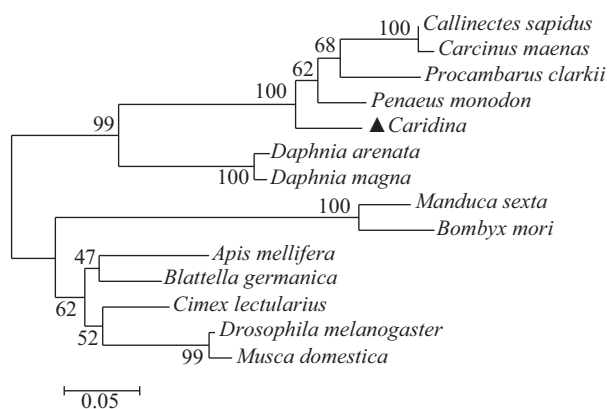


图 1 米虾和其他物种 *Bursicon-α* 亚基系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *bursicon-α* subunit in *Caridina* and other species

物种名称及其 *Bursicon-α* 亚基的 GenBank 登录号 Species and GenBank accession numbers of their *Bursicon-α* subunits: 蓝蟹 *Callinectes sapidus* (ACG50067.1); 普通滨蟹 *Carcinus maenas* (ABX55995.1); 克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* (ADY80040.1); 斑节对虾 *Penaeus monodon* (AKJ74864.1); 米虾 *Caridina* (MG766223); 水蚤 *Daphnia arenata* (ABX55998.1); 大型蚤 *Daphnia magna* (KZS13469.1); 烟草天蛾 *Manduca sexta* (Q4FCM6.1); 家蚕 *Bombyx mori* (CAH89262.2); 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (NP_001091704.1); 德国小蠊 *Blattella germanica* (CUTO8823.1); 温带臭虫 *Cimex lectularius* (XP_014256820.1); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_650983.1); 家蝇 *Musca domestica* (ABO20870.1)。标尺示遗传距离 Scale bar indicates the genetic distance

现米虾胸腹神经节中 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 在蜕皮周期不同阶段的相对表达量存在差异。 α 和 β 两个亚基的表达趋势相似, 在蜕皮后期(D期)相对表达

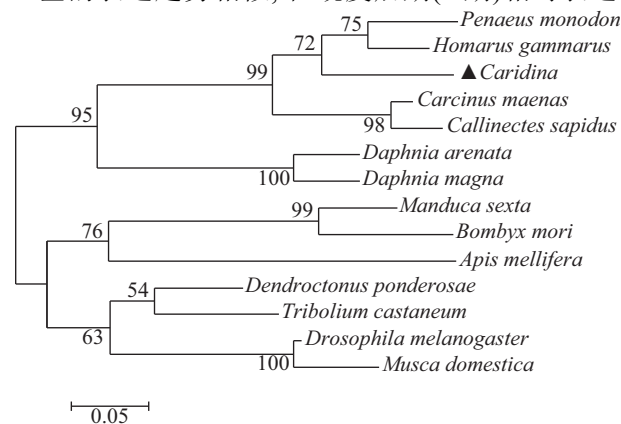


图 2 米虾和其他物种 *Bursicon-β* 亚基系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *bursicon-β* subunit in *Caridina* and other species

物种名称及其 *Bursicon-β* 亚基的 GenBank 登录号 Species and GenBank accession numbers of their *Bursicon-β* subunits: 斑节对虾 *Penaeus monodon* (ALO17552.1); 欧洲龙虾 *Homarus gammarus* (ADI86243.1); 米虾 *Caridina* (MG766224); 普通滨蟹 *Carcinus maenas* (ABX55996.1); 蓝蟹 *Callinectes sapidus* (ACG50066.1); 水蚤 *Daphnia arenata* (ABX55997.1); 大型蚤 *Daphnia magna* (KZS13470.1); 烟草天蛾 *Manduca sexta* (ABB92831.1); 家蚕 *Bombyx mori* (NP_001037289.1); 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (CAM06632.1); 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (XP_019755392.1); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (NP_001107780.1); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_609712.1); 家蝇 *Musca domestica* (ABO20869.1)。标尺示遗传距离 Scale bar indicates the genetic distance

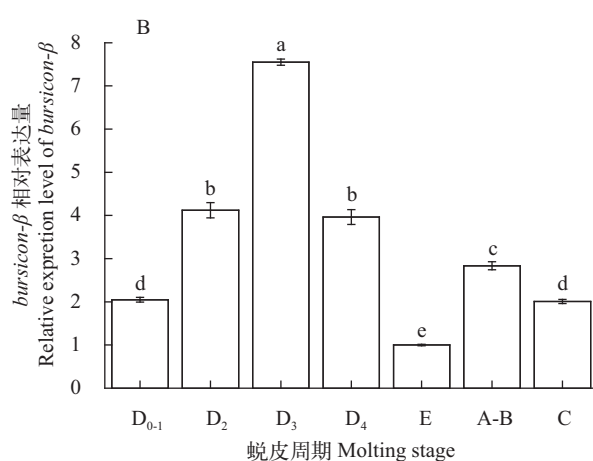
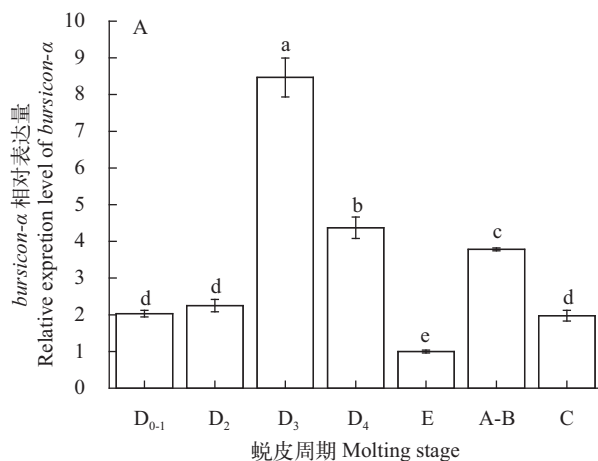


图 3 米虾 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 在不同蜕皮阶段的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *bursicon-α* and *bursicon-β* in *Caridina* under different molt stages

D₀₋₄. 蜕皮前期, E. 蜕皮期, A-B. 蜕皮后期, C. 蜕皮间期; 利用 SPSS Statistics 17.0 进行单因素 ANOVA 分析, Duncan 氏多重比较法对组间基因的相对转录水平进行检验 ($P < 0.05$), 柱上不同的小写字母表示差异显著, 相同的小写字母表示差异不显著; 下同

D₀₋₄. premolt stage, E. molt stage, A-B. postmolt stage, C. intermolt stage. The data were analyzed by SPSS Statistics 17.0 through one-way ANOVA analysis of variance. The relative expression levels of genes among groups were tested by Duncan's test ($P < 0.05$). Different lowercase letters above columns indicate statistically significant differences and the same lowercase letters are not significantly different. The same applies below

量开始上升, 到蜕皮后期D₃期时相对表达量最高, 之后相对表达量开始下调, 在蜕皮期E期相对表达量最低。

2.4 RNA干扰沉默鞣化激素基因对米虾表型的影响

dsRNA干扰后**bursicon**基因的表达特征分析

为了研究鞣化激素基因对米虾蜕皮发挥的作用, 我们采用肌肉注射, 分别将**dsburs α**和**dsburs β**注射到实验组的米虾体内, 之后利用实时荧光定量PCR检测干扰效果(图4)。实验表明, 在干扰48h后, 实验组中(注射**dsburs α**、**dsburs β**) **bursicon-α**和**bursicon-β**的相对表达量与对照组(注射**dsGFP**)相比显著下降, 表明dsRNA的干扰效果明显。

dsRNA干扰后对蜕皮过程的影响 本研究选取处于蜕皮前期D₀₋₁的米虾作为实验对象, 注射dsRNA 48h后, 剪取米虾的尾扇并在显微镜下观察。结果表明在注射dsRNA 2d后, 对照组即注射**dsGFP**的米虾的蜕皮时期向前推进到了蜕皮前期D₃期(premolt, D₃ stage); 然而分别向米虾中注射了**dsburs α**、**dsburs β**、**dsburs α**和**dsburs β**质量浓度比为1:1混合液的三组实验组蜕皮时期仅向前推进到了蜕皮前期D₂期(premolt, D₂ stage)(图5)。与对照组相比, 实验组的蜕皮过程出现了延迟。

对4组米虾蜕皮时间进行统计, 分别记录从蜕皮前期(D₀₋₁ stage)到蜕皮期(E stage)的时间(图6)。结果表明注射**dsGFP**的对照组蜕皮时间平均为

59.9h, 注射**dsburs α**的实验组蜕皮时间平均为89.6h, 注射**dsburs β**的实验组蜕皮时间平均为89.9h, 按质量浓度比为1:1注射**dsburs α**和**dsburs β**混合液的实验组蜕皮时间平均为91.7h。比较4组米虾蜕皮时间发现, 与对照组相比, 3组实验组从蜕皮前期(D₀₋₁ stage)到蜕皮期(E stage)的时间明显增加。

dsRNA干扰后对米虾甲壳角质层厚度和硬度的影响

选取处于蜕皮前期D₀₋₁期的米虾注射dsRNA, 当其处于蜕皮前期D₃期时, 将新形成的外骨骼剥离并制作石蜡切片(图7A)并对双链干扰前后米虾的角质层厚度做统计学分析(图7B)。结果显示, 对照组中(注射**dsGFP**)米虾角质层厚度为(3.57±0.18) μm, 注射**dsburs α**的实验组中米虾角质层厚度为(1.13±0.12) μm, 注射**dsburs β**的实验组中米虾角质层厚度为(1.04±0.15) μm, 注射**dsburs α**和**dsburs β**质量浓度比为1:1混合液的实验组中米虾角质层的厚度为(1.02±0.14) μm。与对照组相比, 3组实验组注射dsRNA后形成新表皮中角质层厚度变薄。

3 讨论

鞣化激素属于神经激素。它与昆虫及甲壳动物等体壁的骨化(黑化和硬化)有关, 甚至影响昆虫翅的伸展。以模式昆虫果蝇为研究对象发现, 鞣化激素由Bursicon-α (BUR)和Bursicon-β (PBURS)两个胱氨酸结蛋白亚基构成^[9, 10]。目前已经在许多不同种昆虫及甲壳动物中对鞣化激素基因有了一定

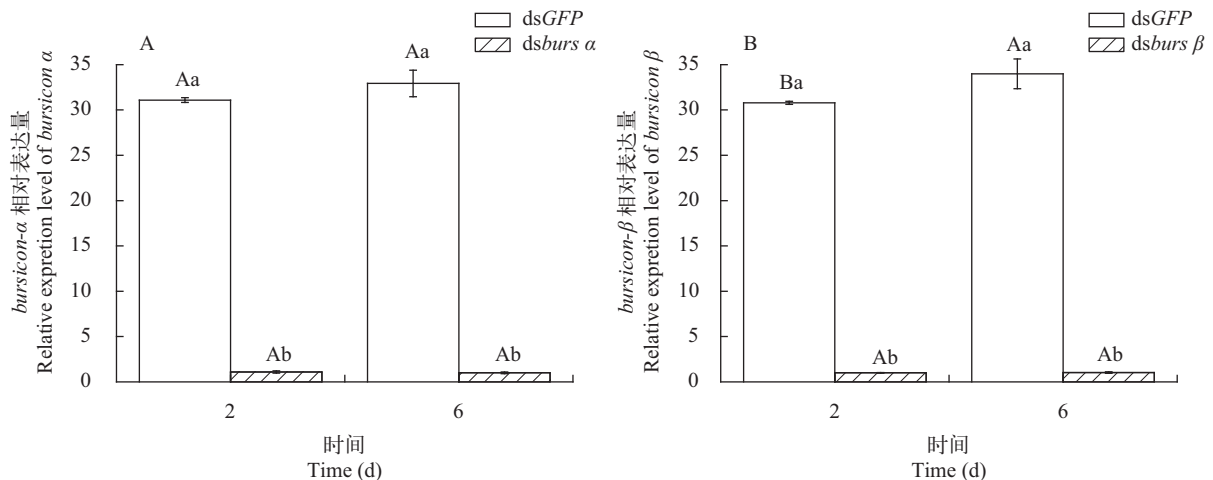


图4 RNA干扰后**bursicon-α**和**bursicon-β**相对表达量随时间的变化

Fig. 4 The relative expressions of **bursicon-α** and **bursicon-β** change over time after interfering the dsRNA

dsGFP. 注射**dsGFP**的对照组; **dsburs α**. 注射**dsburs α**的实验组; **dsburs β**. 注射**dsburs β**的实验组; 小写字母表示组内显著性差异; 大写字母表示组间显著性差异

dsGFP. control group interfered with **dsGFP**; **dsburs α**. experimental group interfered with **dsburs α**; **dsburs β**. experimental group interfered with **dsburs β**; Lowercase letters indicate statistically significant differences within the group; Capital letters indicate statistically significant differences among groups

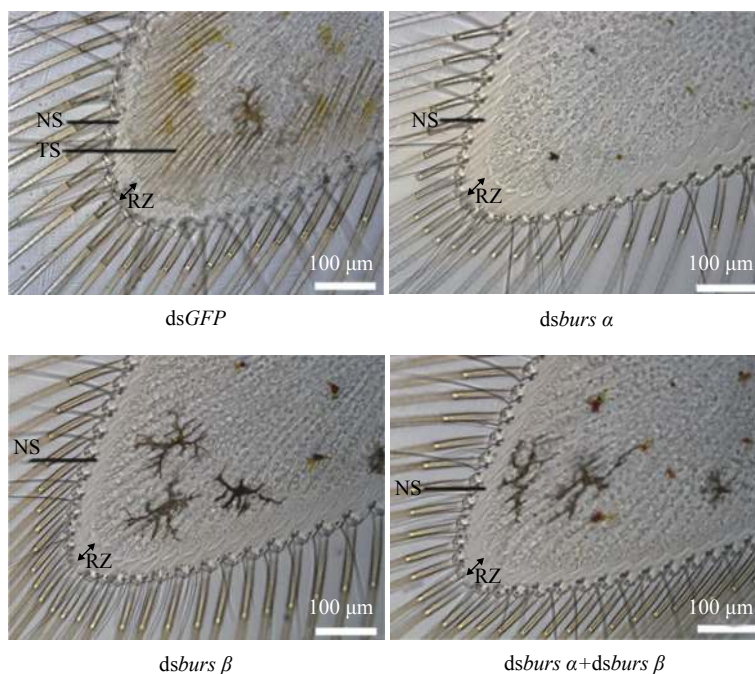


图5 dsRNA干扰对米虾蜕皮过程的影响

Fig. 5 Effect of dsRNA interference during molting process of *Caridina*

dsGFP. 注射dsGFP的对照组, 处于蜕皮前期D₃期; dsburs α . 注射dsburs α 的实验组, 处于蜕皮前期D₂期; dsburs β . 注射dsburs β 的实验组, 处于蜕皮前期D₂期; dsburs α +dsburs β . 按质量浓度1:1注射dsburs α 和dsburs β 的实验组, 处于蜕皮周期D₂期; 下同; RZ. 上皮回缩所形成的透明区; TS. 管形套; NS. 新刚毛

dsGFP. control group interfered with dsGFP, at stage D₃; dsburs α . experimental group interfered with dsburs α , at stage D₂; dsburs β . experimental group interfered with dsburs β , at stage D₂; dsburs α +dsburs β . experimental group interfered with an equal concentration of dsburs α and dsburs β , at stage D₂. The same applies below. RZ. retracted zone; TS. tubular sheath; NS. new setae

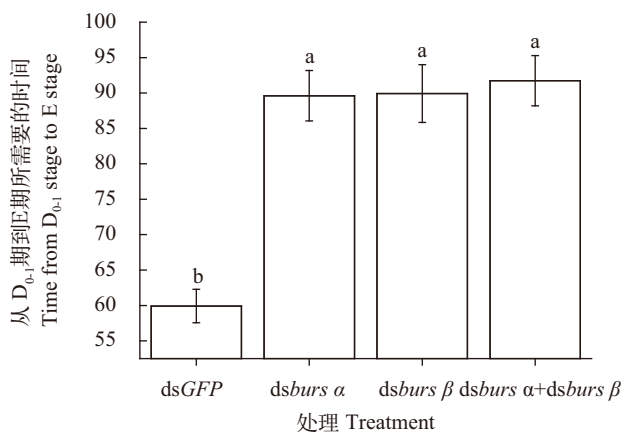


图6 dsRNA干扰对米虾蜕皮时间的影响

Fig. 6 Effect of dsRNA interference on ecdysis time of *Caridina*

的研究。

本文首次克隆获得了米虾鞣化激素两个亚基基因的ORF区序列。bursicon- α 基因ORF区长441 bp, 编码146个氨基酸; bursicon- β 基因ORF区长411 bp, 编码136个氨基酸。序列分析表明, 米虾中克隆得到的鞣化激素与其他甲壳纲和昆虫纲中的物种有较高的序列一致性, 说明克隆得到的基因的确是鞣化激素基因(图1、图2)。Blast比对米虾鞣化激素

α 亚基与其他13种物种的 α 亚基序列发现, 米虾与蓝蟹、普通滨蟹、克氏原螯虾、斑节对虾、水蚤(*Daphnia arenata*)、大型蚤(*Daphnia magna*)六种甲壳纲物种有68%—89%的相似性; 与烟草天蛾(*Manduca sexta*)、家蚕(*Bombyx mori*)、西方蜜蜂(*Apis mellifera*)、德国小蠊(*Blattella germanica*)温带臭虫(*Cimex lectularius*)、黑腹果蝇、家蝇(*Musca domestica*)七种昆虫有58%到70%的相似度。其中米虾和斑节对虾的同源性最高(89%), 和家蚕同源性最低(58%)。同样Blast比对米虾 β 亚基与其他13种物种的 β 亚基序列发现, 米虾与斑节对虾、欧洲龙虾、普通滨蟹、蓝蟹、水蚤、大型蚤六种甲壳纲物种有58%到77%的相似度。与烟草天蛾、家蚕、西方蜜蜂、中欧山松大小蠹(*Dendroctonus ponderosae*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、黑腹果蝇、家蝇七种昆虫有47%到54%的相似度。其中米虾和斑节对虾的同源性最高(77%), 和家蚕、家蝇同源性最低(47%)。进一步结构域分析发现米虾鞣化激素两个亚基的氨基酸序列都比较保守。

米虾Bursicon- α 和Bursicon- β 都有一个CT结构域, 并且氨基酸序列中均含有11个半胱氨酸残

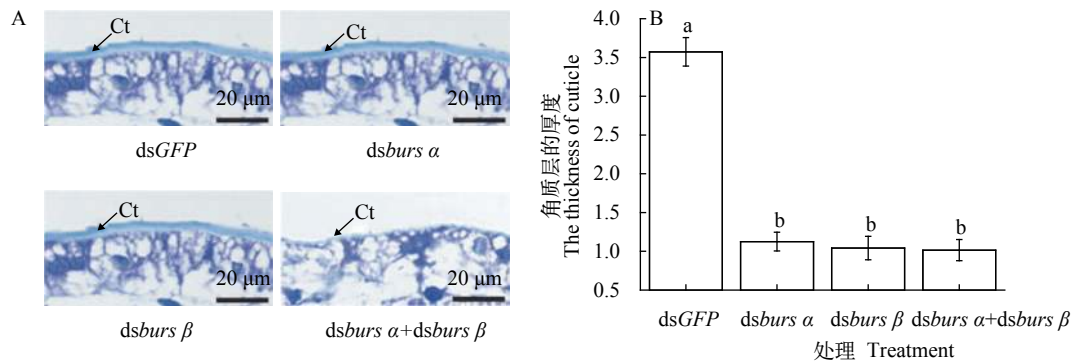


图7 由dsRNA介导的**bursicon-α**和**bursicon-β**敲降对米虾角质层形成和鞣化的影响

Fig. 7 The *bursicon-α* and *bursicon-β* knockdown mediated by dsRNA impairs the complete formation and tanning of cuticle of *Caridina*

基。在C1-7、C2-8、C3-9、C4-10、C5-C11间存在二硫键,而且C6是两个亚基即BURS和PBURS的聚合位点^[9]。在C3和C4之间的氨基酸序列为X-G-X(X代表任意氨基酸残基),C6与C7紧密相邻,C9和C10间隔一个氨基酸残基^[25]。研究发现鞣化激素属于分泌蛋白,合成以后会分泌到血淋巴中发挥作用^[26,27]。米虾的**bursicon-α**和**bursicon-β**基因分别含有26和21个氨基酸的信号肽,属于分泌蛋白,与上述结果相吻合。目前已经在蓝蟹^[21]和斑节对虾^[23]中表达出了鞣化激素两个亚基基因的蛋白,但是关于米虾鞣化激素蛋白的表达还有待进一步研究。

蜕皮周期中实时荧光定量PCR分析显示,米虾蜕皮周期各时期里鞣化激素均有表达,在蜕皮前期相对表达量逐渐升高,D₃时期时达到最大(图3)。这个结果与以普通滨蟹为研究对象的结果相似^[19,20]。这说明鞣化激素参与调节米虾蜕皮过程中表皮的鞣化过程。已知甲壳动物体的外骨骼包括上表皮层(epicuticle)、外表皮层(exocuticle)、内表皮层(endocuticle)以及膜质层(membranous layer)四层^[1]。当蜕皮周期处于D₀₋₂阶段时,上皮细胞层会分泌几丁质酶、蛋白酶等多种酶类并向外运输,导致膜质层和内表皮中的成分被降解,分解后的产物可以重吸收入上皮细胞层中,作为新表皮合成的原料^[28]。此时在旧的表皮之下,新表皮已经开始逐渐形成。上表皮最先形成,之后在上表皮之下开始出现外表皮^[29]。D₃₋₄阶段,肌肉与旧表皮的连接处逐渐被分解,新表皮增厚但并没有发生钙化。AB阶段,内表皮开始形成同时表皮发生钙化^[30]。C阶段,外表皮钙化完全,新表皮的结构完整,内表皮继续钙化,整个表皮变硬^[28]。鞣化激素主要是在胸腹神经节中合成,猜测在米虾蜕皮后鞣化激素可能由胸腹神经节释放到血淋巴中,促进米虾蜕皮后表皮的鞣化。

鞣化激素是2个亚基通过二硫键聚合形成二聚体,所以2个亚基应该等量表达,但在本实验中蜕皮

周期里2个亚基基因的相对表达量并不相等,猜测2个亚基可能既可以形成异源二聚体也可以单独形成同源二聚体。An等将重组BURS和PBURS同源二聚体注射到颈部结扎的黑腹果蝇中,结果发现一些免疫相关的基因表达量增加,重组蛋白的注射剂量和时间的差异使得免疫反应发生的程度不同。并且研究表明注射2个亚基重组二聚体蛋白的虫体匀浆液对革兰氏阴性菌*Escherichia coli*的生长有抑制作用。进而猜测,BURS亚基和PBURS亚基分别形成的同源二聚体可能经IMD通路与某种新受体结合参与免疫过程^[14]。在米虾中关于鞣化激素与免疫的关系仍需要进一步探讨。

本研究利用RNAi技术,使得米虾鞣化激素两个亚基的基因沉默,实时荧光定量PCR检测敲降结果发现,实验组在注射双链RNA 2d后**bursicon-α**和**bursicon-β**基因的相对表达量就显著下调,说明dsRNA作用效果明显(图4)。**bursicon-β**双链干扰实验中对对照组第2天和第4天的表达量有一些差异(图4B),也许是因为这两组对照组中米虾所处的蜕皮周期不同造成的。另外我们观察到**bursicon-α**和**bursicon-β**基因相对表达量下降后米虾蜕皮周期出现了延迟(图5、图6),该结果与在赤拟谷盗中的研究结果相似^[31]。同时米虾新形成表皮的角质层明显变薄(图7),这一结果说明,鞣化激素对米虾表皮角质层的增厚和鞣化起着非常重要的作用,和前人在蓝蟹^[21]、西方蜜蜂^[32]中的研究结果相似。鞣化激素是一种异源二聚体,Baker和Truman^[11]发现组成鞣化激素的2个亚基单独存在时并不可以产生作用,即两者共同表达时,才能激活受体,发挥功能。Luo等^[9]对生物活性的研究发现,当**bursicon-α**和**bursicon-β**基因都表达时颈部结扎的红头丽蝇的表皮才能够再次鞣化,结果表明2个亚基组成异源二聚体后才有生物活性。所以在本实验中利用双链RNA干扰技术将**bursicon-α**和**bursicon-β**分别单独

敲降或共同敲降, 均可使米虾的蜕皮周期延长, 甚至角质层变薄。已有研究表明, 在昆虫中鞣化激素主要是影响了酪氨酸转变为多巴的过程^[33]。但是在米虾中鞣化激素对表皮鞣化的具体调节机制尚不清楚, 需要继续探索。

参考文献:

- [1] Neville A C. Biology of the Arthropod Cuticle [M]. Springer Berlin Heidelberg. 1974, 7—9
- [2] Fraenkel G, Hsiao C. Hormonal and nervous control of tanning in the fly [J]. *Science*, 1962, **138**(3536): 27—29
- [3] Cottrell C B. The imaginal ecdysis of blowflies. detection of the blood-borne darkening factor and determination of some of its properties [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1962, **39**(1): 67—73
- [4] Fraenkel G, Hsiao C. Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insects [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1965, **11**(5): 513—556
- [5] Adams M D, Celniker S E, Holt R A, *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 2000, **287**(5461): 2185
- [6] Dewey E M, McNabb S L, Ewer J, *et al.* Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading [J]. *Current Biology Cb*, 2004, **14**(13): 1208—1213
- [7] Bhat H L, Dutta P S, Koteswara Rao K S R, *et al.* Bursicon, the cuticle sclerotizing hormone——comparison of its molecular mass in different insects [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1995, **41**(12): 1045—1053
- [8] Honegger H W, Market D, Pierce L A, *et al.* Cellular localization of bursicon using antisera against partial peptide sequences of this insect cuticle-sclerotizing neurohormone [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2002, **452**(2): 163—177
- [9] Luo C W, Dewey E M, Sudo S, *et al.* Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(8): 2820—2825
- [10] Mendive F M, Loy T V, Claeysen S, *et al.* *Drosophila*, molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2 [J]. *FEBS Letters*, 2005, **579**(10): 2171—2176
- [11] Baker J D, Truman J W. Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, **205**(Pt 17): 2555
- [12] Davis M M, O'Keefe S L, Primrose D A, *et al.* A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster* [J]. *Development*, 2007, **134**(24): 4395—4404
- [13] Kimura K, Kodama A, Hayasaka Y, *et al.* Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for postecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster* [J]. *Development*, 2004, **131**(7): 1597—1606
- [14] An S, Dong S, Wang Q, *et al.* Insect neuropeptide bursicon homodimers induce innate immune and stress genes during molting by activating the NF- κ B transcription factor Relish [J]. *PloS One*, 2012, **7**(3): e34510
- [15] Robertson H M, Navik J A, Walden K K, *et al.* The bursicon gene in mosquitoes: an unusual example of mRNA trans-splicing [J]. *Genetics*, 2007, **176**(2): 1351—1353
- [16] Van L T, Van Hiel M B, Vandersmissen H P, *et al.* Evolutionary conservation of bursicon in the animal kingdom [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2007, **153**(1—3): 59—63
- [17] Huang J, Zhang Y, Li M, *et al.* RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm [J]. *FEBS Letters*, 2007, **581**(4): 697—701
- [18] Tanaka Y, Suetsugu Y, Yamamoto K, *et al.* Transcriptome analysis of neuropeptides and G-protein coupled receptors (GPCRs) for neuropeptides in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [J]. *Peptides*, 2014, **53**(2): 125
- [19] Wilcockson D C, Webster S G. Identification and developmental expression of mRNAs encoding putative insect cuticle hardening hormone, bursicon in the green shore crab *Carcinus maenas* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, **156**(1): 113
- [20] Webster S G, Wilcockson D C, Mrinalini, *et al.* Bursicon and neuropeptide cascades during the ecdysis program of the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2013, **182**(1): 54—64
- [21] Chung J S, Katayama H, Dirksen H. New functions of arthropod bursicon: inducing deposition and thickening of new cuticle and hemocyte granulation in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *PloS One*, 2012, **7**(9): 1602—1603

- [22] Sharp J H, Wilcockson D C, Webster S G. Identification and expression of mRNAs encoding bursicon in the pleiomorphic central nervous system of *Homarus gammarus* [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2010, **169**(1): 65—74
- [23] Sathapondecha P, Panyim S, Udomkit A. A novel function of bursicon in stimulation of vitellogenin expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2015, **446**: 80—87
- [24] Wang Z F. Study on the characteristics of reproduction and molting in *Neocaridina denticulata sinensis* [D]. Hebei University. 2014 [王战芳. 中华锯齿米虾繁殖及蜕皮特征的研究. 硕士学位论文, 河北大学. 2014]
- [25] Vitt U A, Hsu S Y, Hsueh A J. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules [J]. *Molecular Endocrinology*, 2001, **15**(5): 681
- [26] Truman J W. Physiology of insect ecdysis III. relationship between the hormonal control of eclosion and of tanning in the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1973, **58**(3): 821
- [27] Reynolds S E, Taghert P H, Truman J W. Eclosion hormone and bursicon titres and the onset of hormonal responsiveness during the last day of adult development in *Manduca sexta* (L.) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1979, **69**(4): 445—447
- [28] Promwikorn W, Boonyoung P, Kirirat P. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 2005, **27**(3): 499—509
- [29] Faircloth L M, Shafer T H. Differential expression of eight transcripts and their roles in the cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, **146**(3): 370—383
- [30] Dillaman R, Hequembourg S, Gay M. Early pattern of calcification in the dorsal carapace of the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Journal of Morphology*, 2005, **263**(3): 356—374
- [31] Bai H, Palli S R. Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi [J]. *Developmental Biology*, 2010, **344**(1): 248
- [32] Costa C P, Elias-Neto M, Falcon T, *et al.* RNAi-mediated functional analysis of bursicon genes related to adult cuticle formation and tanning in the honeybee, *Apis mellifera* [J]. *PloS One*, 2016, **11**(12): e0167421
- [33] Seligman M, Friedman S, Fraenkel G. Bursicon mediation of tyrosine hydroxylation during tanning of the adult cuticle of the fly, *Sarcophaga bullata* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1969, **15**(4): 553—562

THE FUNCTION AND MECHANISM OF *BURSICON* GENE IN *CARIDINA*

REN Li-Qi, WENG Jie-Yang, WANG Xin, SUN Jin-Sheng and LI Ran

(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: To study the function of *bursicon* gene in *Caridina* during molting and cuticle formation, its open reading frame (ORF) containing two subunits genes were amplified by PCR respectively. The ORF of *bursicon-α* is 441 bp in length, encoding a protein with 146 amino acid residues. The ORF of *bursicon-β* is 411 bp in length, encoding a protein with 136 amino acid residues. The dynamic changes in the expression of both bursicon subunit genes during the molt cycle in *Caridina* have been analyzed by the real-time quantitative PCR. Relative expression of both *bursicon-α* and *bursicon-β* had different levels in different stages of the molt cycle, which increased through premolt stage (D stage) and reached their peak level at the D₃ stage. The mRNA accumulation decreased to its lowest level at the molt stage (E stage). RNA interference-mediated knockdown of *bursicon-α* and *bursicon-β* retard the molting process and ecdysis behavior of *Caridina*. The cuticle of dsRNA-treated *Caridina* was thinner than that in the control group. These findings demonstrate that bursicon is involved in the thickening and hardening of cuticle in newly formed exoskeleton. Moreover, bursicon plays an important role in molt cycle.

Key words: *Caridina*; Bursicon; Cuticular tanning; Molt cycle; Real-time quantitative PCR; RNA interference