

日本沼虾表皮蛋白基因的克隆及表皮组织差异性表达分析

苗泽龙, 吕艳杰, 张俊芳, 杨洪, 宁黔冀

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:为探究日本沼虾表皮蛋白(*Macrobrachium nipponense* cuticle proteins, MnCPs)表达模式与表皮组织差异的关系,根据日本沼虾表皮组织转录组测序结果,从头胸甲中克隆到 1 个含几丁质结合-4(chitin_bind_4)结构域的表皮蛋白(cuticle proteins, CPs)基因,命名为 *MnCP-2*,经 BLAST 检索,*MnCP-2* 与远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*, ABM54465.1)有 50% 的相似性.以健康幼虾(体长 3.0~4.0 cm)的头胸甲、尾扇、游泳足和步足 4 种厚度存在差异的表皮组织为材料,分别提取 C 期、D₀₋₂ 期、D₃₋₄ 期和 A 期的 RNA,采用 Real-time PCR 技术,分析了 *MnCP-2* 在蜕皮周期不同阶段的相对表达量.结果显示,*MnCP-2* 在头胸甲、尾扇和游泳足中表达水平的峰值出现在 D₃₋₄ 期,而在步足中则出现在 D₀₋₂ 期.提示 *MnCP-2* 编码的蛋白可能在新外表皮的形成中发挥重要作用,它在表皮组织不同部位的差异性表达可能是导致表皮结构差异的原因之一.

关键词:日本沼虾;表皮蛋白;头胸甲;尾扇;游泳足;步足;基因克隆;表达

中图分类号:S966.1

文献标志码:A

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)等甲壳动物有着坚硬的表皮,表皮中的有机物主要是几丁质和表皮蛋白(cuticle proteins, CPs)^[1],由于几丁质的生物活性不大,因此对于新表皮的形成 CPs 的研究便成了重中之重.甲壳动物的许多 CPs 都含有某种基序,其中最普遍的就是 RR 基序,由 Rebers 和 Riddiford^[2]首次发现,Rebers 和 Willis 描述其特征,RR 基序已经被证实可以结合几丁质^[3].RR 序列有三种变异,RR-1 (Gx₈Gx₆YxAxExGYx₇Px₂P)、RR-2 (Gx₈Gx₆YxAx₄GFNAVV)和极少被鉴别的 RR-3^[4-6].目前已经从日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[7-9]、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[10-11]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[12-15]、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[16]等甲壳动物中鉴别出多种 CPs,研究证明这些 CPs 主要作用就是参与蜕皮前后新表皮的形成^[17],因此与甲壳动物的蜕皮活动息息相关.生物信息学的发展进一步加快了甲壳动物 CPs 的研究,利用转录组学鉴别分析 CPs 已经成为今后发展的方向,例如 Moshe Tom 等人通过转录组分析,根据蜕皮钙化指数在克氏原螯虾中将蜕皮前期细分为 P1-P7 7 个时期来解释蜕皮相关基因(包括编码 CPs 的基因)的表达模式,从而得出这些基因对蜕皮调节及外骨骼重建的重要性^[18].

由于 CPs 在不同物种间的相似性较低,没有可比性,而有关日本沼虾表皮蛋白(*M. nipponense* cuticle proteins, MnCPs)的研究尚未见报道.因此,本实验结合转录组测序技术,克隆出了 *MnCP-2* 的部分 cDNA 片段,采用 Real-time PCR 分析了不同蜕皮时期 *MnCP-2* 在头胸甲、尾扇、游泳足和步足 4 种厚度存在差异的表皮组织的表达,为进一步阐述 CPs 的功能,尤其在日本沼虾等甲壳动物蜕皮周期中的功能提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验动物

日本沼虾于 2016 年 5~10 月捕捞于河南卫辉顺城关公园,选取健康幼虾[体长(3.0~4.0) cm]50 尾饲

收稿日期:2017-03-28;修回日期:2017-12-20.

基金项目:国家自然科学基金(30940008);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A240003);河南师范大学青年科学基金(5101049279089).

作者简介:苗泽龙(1993-),男,河南洛阳人,河南师范大学硕士研究生,主要研究方向为动物生长发育调控,E-mail:15560101651@163.com.

通信作者:吕艳杰,河南师范大学副教授,博士,E-mail:snowlyj@126.com.

养于水族箱中,水温(22 ± 1) °C,一周后用于实验.

1.2 RNA 的提取

依据 Cesar 等^[19]的方法分别选取 C 期、D₀₋₂期、D₃₋₄期和 A 期各 4-5 只幼虾,分离出头胸甲、尾扇、游泳足和步足等表皮组织,利用 Mini BEST Universal RNA Extraction Kit(TAKARA)试剂盒,按照说明书的操作步骤提取上述不同表皮组织的 RNA.

1.3 RNA 反转录为 cDNA

利用反转录试剂盒 5X All-In-One RT Master Mix(abm),按照说明书的反转录条件将提取出的 RNA 反转录为 cDNA 模板.

1.4 克隆目的片段

根据引物设计原则,经 BLAST 比对,找出较为保守的几丁质结合域,利用软件 Prime primer 5 设计上、下游引物(表 1),按照说明书的 PCR 反应条件扩增获得目的片段.

1.5 生物信息学分析

通过 NCBI 网站对 *MnCP-2* 进行 BLAST 比对,寻找相似的同源基因.利用 Conserved Domain(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)确定基因的几丁质结合保守域,利用 Open Reading Frame (ORF)Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析预测开放阅读框,使用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析.

1.6 *MnCP-2* 的表达分析

根据引物设计原则,利用软件 Prime primer 5 设计上、下游引物(表 1),按照 AceQTM qPCR SYBR® Green Master Mix(Vazyme)试剂盒说明书步骤操作, β -actin 为内参基因,实验均设 3 个重复,采用比较 C_t值(- $\Delta\Delta C_t$ 法)计算相对表达量,使用 SPSS13.0 进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著.

表 1 日本沼虾 *MnCP-2* 克隆及实时荧光定量所用的引物

引物名称	序列(5'-3')	用途
<i>MnCP-2</i> -F1	ACTTTTCTTCATGGTCCTTGTC	PCR
<i>MnCP-2</i> -R1	TTGGGCTCCCCTTCGTA	
<i>MnCP-2</i> -F2	AATACAGCTACAAATACGGAGTGGC	Real-time PCR
<i>MnCP-2</i> -R2	CCCCGTTGACGGTGTAAAGTC	
β -actin-F	TATGCACTTCTCATGCCATC	Real-time PCR
β -actin-R	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	

2 实验结果

2.1 日本沼虾表皮组织总 RNA 的提取及 *MnCP-2* 的部分序列克隆

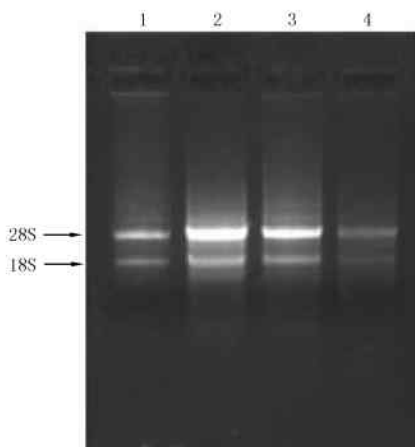
提取的 RNA 在紫外照射下有 28S 和 18S 两条带,亮度接近 2 : 1(图 1).将提取出的 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 反应扩增,获得含有几丁质结合-4 结构域的 *MnCP-2* 的特异性目的片段,PCR 产物长度是 276 bp(图 2).

2.2 *MnCP-2* 的生物信息学分析

MnCP-2 经测序为 463 bp,开放阅读框为 28~351 bp,长度为 324 bp,几丁质结合-4 结构域位于 124~282 bp(图 3),与远海梭子蟹的表皮蛋白 PpCB6(*P. pelagicus*, ABM54465.1)有 50% 的相似性(图 4),GenBank 登录号为 KY126405.

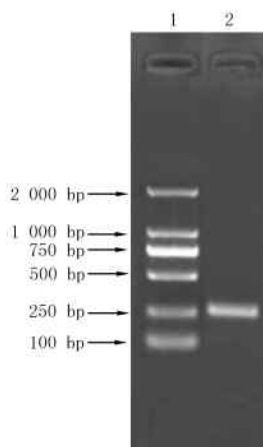
2.3 *MnCP-2* 的表达分析

MnCP-2 在 4 种表皮组织的表达模式不尽相同.在头胸甲、尾扇和游泳足,mRNA 表达水平的峰值出现在 D₃₋₄期,而在步足中则是 D₀₋₂期.在相同的蜕皮周期,4 种表皮组织间该基因的表达量也存在明显差异,C 期和 D₀₋₂期,头胸甲和步足的表达量显著高于尾扇和游泳足,而在 D₃₋₄和 A 期则恰好相反($P < 0.05$)(图 5).



泳道1~4分别是:1.头胸甲;2.尾扇;3.游泳足;4.步足。

图1 日本沼虾RNA凝胶电泳图



泳道1. DL2000 marker;泳道2. MnCP-2的扩增序列。

图2 MnCP-2基因部分序列PCR凝胶电泳图

```

1      GCCTCAGCGTCTGCACAAATCAACATCATGGCTTTGAAACTTTTCTTCATGGTCCTTGTC
1      M A L K L F F M V L V
61     ATCAGGGAGTCTTCTGCGAAAAATACAAACC TGATGTTGAGGAACCCAGGGTCCAGCA
12     I S G V F C E K Y K P D V E E P Q [G] P A
121    AAATACAGCTACAAATACGGAGTGGCCGACGCTGAGAGCGGAATAGTTATGGCCACGAC
32     K [Y] S Y K Y [G] V A D A E S G N S Y G H D
181    GAAACCAGAGACGGAGACGCCATCCAGGGCTCTTACATCATCCGCTTCCAGATTCCAGA
52     E T R D G D A I Q G S Y I I R L P D S R
241    ACOCAGAAAGTGACTTACACGTCAAACGGGGCTCGGGTTATGTGGCCGATGTCACCTAC
72     T Q K V T Y T V N G G S G Y V A D V T Y
301    GAAGGGGAGCCCAAGTACCCGACGTCGCC TCCCAAGAAGGGATACAATTAACCTTACTGT
92     E G E P K Y P D V P P K K G Y N *
361    CCTCCACTATGGTTAGTCTAAAGTAGACTCAGATCTTACGCGCCTAAOCTCTTCATTGAT
421    TCTCGATTTTTACCTTCTCTCTCTCTGAAAGAAATCTGATC
  
```

灰色表示chitin_bind_4结构域, 细线方框加粗字母表示RR基序保守位点, *表示终止密码子。

图3 日本沼是MnCP-2部分cDNA序列和推导的氨基酸序列

日本沼虾 (<i>M. nipponense</i> , KY126405)KEDVEEPQGFAR...NSYKYGVAEESGNBYGHDET	53
远海梭子蟹 (<i>P. pelagicus</i> , ABM54465.1)	GSDSDSYESYESYESSSEAKNEFEWSVEDASTGNDHHRBA	120
疣瘤鱼虱 (<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , AC012414.1)	YHAFSFSYKPIRYDESPQNAFKYGVSDYSQAQTADBN	62
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018022126.1)	YAAANSQRADDQFEEAR...YDFAWGVRDDESQNMENQVBT	64
端足虫 (<i>H. azteca</i> , XP_018022127.1)	YAAANSQRVDDQFEEAR...YDFAWGVRDDESQNMENQVBT	64
Consensus	y v d g e	
日本沼虾 (<i>M. nipponense</i> , KY126405)	RGLAIGCSYIIRLEDSRRCQVYITVNGSSGVVAVVYEG	93
远海梭子蟹 (<i>P. pelagicus</i> , ABM54465.1)	RDGHEITACGYYSVCLSDRRCQVYIYVHGKNGVAVVYEG	160
疣瘤鱼虱 (<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , AC012414.1)	IRGKLTIGCSYCVPLEDRRCQVYITVHGKNGVAVVYEG	108
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018022126.1)	RQADVITRGCYVAVLEDRRCQVYIYVHGKNGVAVVYEG	104
端足虫 (<i>H. azteca</i> , XP_018022127.1)	RQADVITRGCYVAVLEDRRCQVYIYVHGKNGVAVVYEG	104
Consensus	d g y l d r q v y v g g va v yeg	
日本沼虾 (<i>M. nipponense</i> , KY126405)	EPKVEIDVF...PKKGYN.....	107
远海梭子蟹 (<i>P. pelagicus</i> , ABM54465.1)	EARVIEDSFSRESFESRSFESRSFESFESFESFESGDSDESEFE	200
疣瘤鱼虱 (<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , AC012414.1)	TPSYEKYEPKHAHKFASYNHAFAPAYKFPASYSYA.....	141
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018022126.1)	EACRFECFG...EHQQQSY...APQYS.....	124
端足虫 (<i>H. azteca</i> , XP_018022127.1)	EACRFECFG...EHQQQSY...APQYS.....	124
Consensus	p	

黑色代表相同水平为100%, 灰色代表相同水平 50%。

图4 MnCP-2的保守区域氨基酸序列与其它物种的序列比对

3 讨论

首次从日本沼虾的表皮组织中克隆出了 *MnCP-2* 的部分 cDNA 片段, 含有几丁质结合-4 结构域(图 3), 经多序列比对, *MnCP-2* 与甲壳动物或昆虫的多种 CPs 均有一定的相似性(图 4). 研究表明, 甲壳动物自蜕皮前期开始, 新表皮就逐渐形成、增厚^[20-21], 这应该与表皮蛋白的高表达密切相关. 在蓝蟹的背部表皮发现的三种表皮蛋白(CsCP8.5, CsCP8.2, CsCP14.1) 和在关节膜中发现的一种蛋白(CsAMP9.3) 都是在 D₃₋₄ 期表达最高^[10-11], 本实验室最新发现的日本沼虾 *MnCBP-1* 的表达峰值也出现在 D₃₋₄ 期^[22], 它们都被认为参与了蜕皮前外表皮的形成. 本文结果 *MnCP-2* 的表达峰值出现在 D 期(D₀₋₂ 或 D₃₋₄ 期), 推测其主要参与新外表皮的形成; 4 种表皮组织, 峰值出现的时间并不一致(图 5), 说明同一个基因在表皮不同部位的表达存在时序性差异^[23], 也有可能是由于该基因在不同表皮组织的剪接方式不同(可变剪接, alternatives plicing), 从而翻译产生不同的蛋白质^[24].

CPs 在甲壳动物表皮不同部位的分布特征目前未见报道. *MnCP-2* mRNA 含量在 4 种表皮组织间存在明显的差异(图 5), 说明 *MnCP-2* (可能还包括其他表皮蛋白) 在整个表皮并不是均匀分布, 这可能导致了表皮结构(如厚度)的差异, 当然, 在今后的研究中蛋白水平的验证是必要的.

综上, *MnCP-2* 在不同表皮组织的表达既有共同的特征(都随蜕皮周期变化), 又有明显的差异, 这可能是导致表皮不同部位结构差异的原因之一.

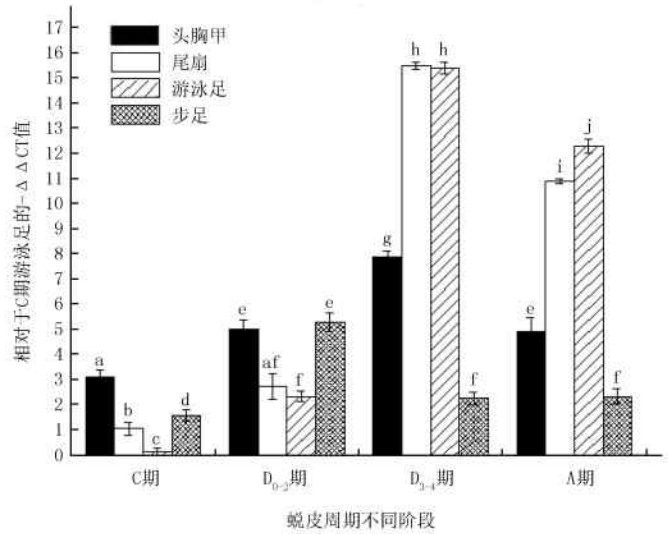


图5 4种表皮组织内 *MnCP-2* 在蜕皮周期不同阶段的 mRNA 表达水平
C. 蜕皮间期; D₀₋₂. 蜕皮前期早期; D₃₋₄. 蜕皮前期晚期; A. 蜕皮后期;
字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$).

图5 4种表皮组织内 *MnCP-2* 在蜕皮周期不同阶段的 mRNA 表达水平

参 考 文 献

- [1] Chang E S, Mykles D L. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives[J]. General & Comparative Endocrinology, 2011, 172(3): 323-330.
- [2] Rebers J E, Riddiford L M. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes[J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 203(2): 411-423.
- [3] Rebers J E, Willis J H. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2001, 31(11): 1083-1093.
- [4] Andersen S O. Characterization of proteins from arthroal membranes of the lobster, *Homarus americanus*[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology, 1998, 121(4): 375-383.
- [5] Andersen S O. Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 1998, 28(5/6): 421-434.
- [6] Andersen S O. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2000, 30(7): 569-577.
- [7] Watanabe T, Persson P, Endo H, et al. Molecular analysis of two genes, DD9A, and B, which are expressed during the postmolt stage in the decapod crustacean *Penaeus japonicus*[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2000, 125(1): 127-136.
- [8] Endo H, Persson P, Watanabe T. Molecular cloning of the crustacean DD4 cDNA encoding a Ca^{2+} -binding protein[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2000, 276(1): 286-291.

- [9] Ikeya T, Persson P, Kono M, et al. The DD5, gene of the decapod crustacean *Penaeus japonicus*, encodes a putative exoskeletal protein with a novel tandem repeat structure[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, 128(3):379-388.
- [10] Wynn A, Shafer T H. Four differentially expressed cDNAs in *Callinectes sapidus* containing the Rebers-Riddiford consensus sequence[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2005, 141(3):294-306.
- [11] 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.
- [12] Inoue H, Ohira T, Ozaki N, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 136(4):755-765.
- [13] Inoue H, Ohira T, Ozaki N, et al. A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2004, 318(3):649-654.
- [14] Inoue H, Yuasahashimoto N, Suzuki M, et al. Structural determination and functional analysis of a soluble matrix protein associated with calcification of the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(10):2697-2707.
- [15] Suzuki M, Sugisakanobayashi A, Kogure T, et al. Structural and functional analyses of a strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the exoskeleton of the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2013, 77(2):361-368.
- [16] Tynyakov J, Bentov S, Abehsera S, et al. A Novel Chitin Binding Crayfish Molar Tooth Protein with Elasticity Properties[J]. *Plos One*, 2015, 10(5):e0127871.
- [17] Roer R, Abehsera S, Sagi A. Exoskeletons across the Pancrustacea: Comparative Morphology, Physiology, Biochemistry and Genetics. *Integrative and Comparative Biology* [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2015, 55(5):771-791.
- [18] Tom M, Manfrin C, Chung S J, et al. Expression of cytoskeletal and molt-related genes is temporally scheduled in the hypodermis of the crayfish *Procambarus clarkii* during premolt[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(23):4193-4202.
- [19] Cesar J R D O, Zhao B, Malecha S, et al. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2):688 - 694.
- [20] Kuballa A V, Merritt D J, Elizur A. Gene expression profiling of cuticular proteins across the moult cycle of the crab *Portunus pelagicus* [J]. *BMC Biology*, 2007, 5(1):1-26.
- [21] 吕艳杰, 陈香丽, 宁黔冀. KK-42 对日本沼虾蜕皮前期外骨骼结构及 NAGase 活力的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 43(4):130-133.
- [22] 张宇, 王佩, 吕艳杰, 等. 日本沼虾表皮几丁质结合蛋白基因的克隆以及 KK-42 对其表达的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(5):106-111.
- [23] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社. 2013, 15.
- [24] 王林嵩, 梁卫红, 王歌. 普通分子生物学[M]. 北京: 科学出版社. 2012:203.

Cloning and differential expression analysis of cuticle protein genes in different cuticular tissues from *Macrobrachium nipponense*

Miao Zelong, Lü Yanjie, Zhang Junfang, Yang Hong, Ning Qianji

(College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: In order to understand the relationship between expression patterns of *Macrobrachium nipponense* cuticle proteins (MnCPs) and differences in cuticular tissues, a gene containing chitin_bind_4 conserved domain called *MnCP-2* was first cloned in carapace from *M. nipponense*, according to the result derived from transcriptome sequencing. BLAST search shows that *MnCP-2* has 50% similarity with CPs from *Portunus pelagicus*. RNA was extracted from the stage C, D₀₋₂, D₃₋₄ and A of healthy juvenile *M. nipponense* (body length 3.0~4.0 cm) in the carapace, tail fan, pleopod and pereopod which have different thicknesses. Real-time PCR technique was used to analyze the expression levels of *MnCP-2*. The result showed *MnCP-2* mRNA expression level was highest during stage D₃₋₄ in carapace, tail fan and pleopod, while during stage D₀₋₂ in pereopod ($P < 0.05$). Consequently, it suggests that *MnCP-2* likely have an important role in forming new exocuticle, and their differential expressions in different cuticular tissues is possible one of the reasons why cuticle has different structures.

Keywords: *Macrobrachium nipponense*; cuticle proteins; carapace; tail fan; pleopod; pereopod; gene clone; expression

[责任编辑 王凤产]