

咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾头胸甲中 *MnCP-3* 表达的影响

宁黔冀, 吕艳杰, 黄亚龙, 陈柯

(河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:为了分析咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾表皮蛋白(*Macrobrachium nipponense* cuticle proteins, MnCPs)基因表达的影响,首次到头胸甲中克隆得到一条基因,通过生物信息学分析确定其属于 CPs 基因,并将其命名为 *MnCP-3*.采用 Real-Time PCR(RT-PCR)测定了 *MnCP-3* 基因在头胸甲中蜕皮间期(C)、蜕皮前早期(D₀₋₂)、蜕皮前晚期(D₃₋₄)和蜕皮后期(A)4 个不同蜕皮时期中的表达水平以及 KK-42 处理后表达水平的变化.结果显示, *MnCP-3* 在 D₃₋₄ 期和 A 期表达较高. KK-42 处理后, C 期 *MnCP-3* 的表达水平在处理后 3~48 h 相对于对照组显著升高,在 D₀₋₂ 期 *MnCP-3* 的表达水平在 3、6、24 和 48 h 显著升高.结果提示, *MnCP-3* 可能参与新的外表皮和内表皮形成, KK-42 处理可显著诱导 C 期和 D₀₋₂ 期 *MnCP-3* 的表达,提前启动蜕皮过程的进行,加快新表皮的形成.

关键词:日本沼虾;表皮蛋白基因;头胸甲;KK-42

中图分类号:S966.1

文献标志码:A

甲壳动物的生长和发育是通过周期性蜕皮实现的^[1].旧表皮的降解和新表皮的形成几乎同时发生,并主要在蜕皮前期进行^[2].表皮的主要成分包括几丁质和蛋白质(又称表皮蛋白 cuticle proteins, CPs)^[3].研究表明,甲壳动物 CPs 种类繁多,大多数属于 CPR(Cuticular Protein with Rebers Riddiford Consensus, CPR)家族,含有保守的 Rebers-Riddiford (RR)基序^[4].昆虫中关于 CPs 的研究比较成熟,依据 RR 基序变异程度将其分为 3 种亚型:RR-1, RR-2 和 RR-3^[5].目前在甲壳动物中发现的主要是含有 RR-1 基序的 CPs,只在红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)中发现了几个含有 RR-2 基序的 CPs^[6],而含有 RR-1 和 RR-2 基序的 CPs 都含有几丁质-4 结合域^[7-8].同一种 CPs 既可单独参与外(或内)表皮的形成,也可同时参与外表皮和内表皮的形成^[9-11].

CPs 功能的研究,对确定其表达与蜕皮周期的关系尤为重要,表皮中各层的形成有时序性差别,导致参与每层表皮的 CPs 表达量也随着蜕皮周期发生变化^[12].目前,有关 CPs 的研究主要是在转录水平展开,如蓝蟹(*Callinectes sapidus*)关节膜和背部表皮组织中多种 CPs^[9-10]以及日本对虾(*Penaeus japonicus*)尾扇中两个 CPs^[11]的表达量能够随蜕皮周期发生变化,分别在蜕皮后期或蜕皮前期达到峰值.由于不同物种之间 CPs 的相似性较低,关于日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)CPs 的研究并未见报道.

我们先前实验发现,咪唑类物质 KK-42 能够显著调节日本沼虾表皮几丁质结合蛋白的表达^[13].本文在日本沼虾表皮组织转录组测序的基础上,新近发现的一个具有几丁质-4 结合域的 CPs 基因,并进行了克隆和鉴定,命名为 *MnCP-3*(依据我们实验室发现的 CPs 基因的先后顺序命名),通过 Real time PCR(RT-PCR)技术分析了不同蜕皮周期该基因在头胸甲的表达水平以及在 KK-42 处理前后该基因的表达水平变化,为阐明 CPs 在影响日本沼虾等甲壳动物表皮结构、功能等方面积累资料.

收稿日期:2018-01-10;**修回日期:**2018-09-10.

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);河南省自然科学基金项目(182300410033);河南师范大学青年科学基金(5101049279089);天津市动植物抗性重点实验室开放基金(5201049160124).

作者简介:宁黔冀(1964—),女,河北邯郸市人,河南师范大学教授,博士生导师,研究方向为甲壳动物生长发育调控, E-mail:nqjnqj1964@163.com.

通信作者:吕艳杰, E-mail:snowlyj@126.com.

1 材料与方法

1.1 实验材料

KK-42 由烟台大学应用化学系提供(相对质量浓度 $\geq 95\%$).日本沼虾捕捞于河南卫辉市顺城关公园.选取体长 (3.5 ± 0.5) cm、体质量在 0.4 g 左右的健康虾,饲养于水族箱,水温在 $(22\pm 1)^{\circ}\text{C}$,每天早晚各投喂金康达青虾专用饲料 1 次,日换水量 30%,饲养 1 周后用于实验研究.将虾随机平均分为 2 组:处理组用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 溶液浸泡处理 1 min,取出后迅速去除水分,立刻投放到水族箱中,按正常方式饲养;对照组用不含 KK-42 的溶液处理,方法同上.

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链合成

在对照组中分别选取处于蜕皮间期(C)、蜕皮前早期(D_{0-2})、蜕皮前晚期(D_{3-4})和蜕皮后期(A)的虾 4~5 只,取头胸甲;在 KK-42 处理后的 0、3、6、12、24 和 48 h,分别在处理组 and 对照组中各选取处于 C 期、 D_{0-2} 期的虾 4~5 只,取头胸甲,利用 Mini BEST Universal RNA Extraction Kit(TAKARA)试剂盒,提取 RNA.蜕皮周期的鉴定依据文献^[14]的方法.利用 5X All-In-One RT Master Mix(abm)反转录试剂盒,反应体系 20 μL ,按照说明书的反应条件反转录,得到 cDNA 第一链.

1.2.2 目的片段的克隆

根据目的片段保守的几丁质结合域,利用 Prime primer 5.0 设计上、下游引物(表 1).采用 PCR 扩增技术,反应体系 20 μL ,根据说明书中的反应条件克隆目的片段.

1.2.3 生物信息学分析

在 NCBI 网站上对 CPs 基因序列进行 BLAST 比对,找出同源序列.利用 Conserved Domain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)检索该基因的几丁质结合保守域,利用 Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析预测开放阅读框,使用 DNAMAN 软件进行多重序列比对分析.

1.2.4 *MnCP-3* 基因的表达

依据 RT-PCR 的引物设计原则在 Prime primer 5.0 上设计目的基因的上、下游引物(见表 1).以 β -actin 作为内参基因.按照 AceQTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix(Vazyme)试剂盒说明书上的步骤做 RT-PCR,目的基因和内参基因各设置 3 个重复.RT-PCR 数据按照 $-\Delta\Delta C_t$ 方法计算相对表达值,结果使用 SPSS13.0 单因素方差分析法(One-way ANOVA)进行多重比较分析($n=3$), $P<0.05$ 为差异性显著.

表 1 日本沼虾 *MnCP-3* 基因克隆和实时定量所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')	应用
<i>MnCP-3</i> -F	GGGATGTTGCCAAGGATG	PCR
<i>MnCP-3</i> -R	TACGATGTCTGTGGGCTCTT	
<i>MnCP-3</i> -F	CGTCAACGACGACGAAAACA	RT-PCR
<i>MnCP-3</i> -R	TGAGGGCATCAGCAGTATAAGTAAC	
β -actin-F	TATGCACTTCCTCATGCCATC	RT-PCR
β -actin-R	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	

2 结 果

2.1 *MnCP-3* 基因克隆和序列分析

NCBI 保守域检索显示,该序列含有的几丁质结合-4 保守域位于 144~305 bp,含有 RR 基序.以头胸甲的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增,得到包含该基因几丁质结合-4 保守域的特异性片段,可以确认该基因就是日本沼虾 CPs 基因,测序长度为 362 bp(见图 1),GenBank 注册号为:KY126106.经 BLAST 比对发现,*MnCP-3* 和端足虫(*Hyalella azteca*, XP_018014406.1)相似性最高,为 60%(见图 2).

1CTCCTGTTGAGCAACAACGCAGATAACATATCTGAACGAACAACATGAAGACCCCTAGTTT

1M K T L V

61TGCTGTGTCTCTTGGGCGTAGCCTACTGCGCCCTCAACTCGGGGACCGGGATGTTGCCA

6L L C L L G V A Y C A P Q L G D R D V A

121AGGATGAGGAGTCAATCGAGCCCTTCGAGTTCAGCATGGCGTCAACGACGACGAAAACA

26K D E E S I E P F E F S M A V N D D E N

181CAGTCTACACCACCCGTCAGGAATCCAGGATTCCAACGGCGTCGTTCAAGGGGAGTACT

46T V Y T T R Q E S Q D S N G V V Q G E Y

241CCTGGGTAGCAGCAAACGGCATCCGTTACATCGTTACTTATACTGCTGATGCCCTCAACG

66S W V A A N G I R Y I V T Y T A D A L N

301GATTCCAGTCCCAGATTCCGGAAGAGCCCACAGACATCGTAGTGAGAGTCCCGTTCCTC

86G F Q S Q I R E E P T D I V V R V P V P

361AG

灰色表示 chitin_bind_4 结构域；方框表示 RR 基序保守位点。

图1 MnCP-3 部分 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

日本沼虾 (<i>M. nipponensis</i> , KY126106)	MKTLLVLLCLLGVA YCAPQLG	20
埃及伊蚊 (<i>Aedes aegypti</i> , XP_001663233. 1)	QQQFAQFR.....QIKVSKPRFAQQYQGLGQATGGQKHL	115
达氏按蚊 (<i>Anopheles darlingi</i> , ETN63120. 1)	QQYQQPQHQPQPQLKVS KPRFQYL.....QGGQKQPLE	136
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018014406. 1)		0
家蚕 (<i>Bombyx mori</i> , NP_001166682. 1)	QAQYQFPQPQPQAQ.....PQFPQYR.....QQYQPQRAE	108
体虱 (<i>Pediculus humanus corporis</i> , XP_002424768. 1)	SDLTFKQLVKETCLTLFPKLSINRERLTVIKMAVIFDLHN	160
玉斑凤蝶 (<i>Papilio polytes</i> , XP_013134319. 1)	RFQYQFPQPQPQPQ.....QYR.....QQYAQEG..	105
一致序列 Consensus		
日本沼虾 (<i>M. nipponensis</i> , KY126106)	DRDVAKDEESIEPFEFSMAVNDDENTVYITRQESQDSNGV	60
埃及伊蚊 (<i>Aedes aegypti</i> , XP_001663233. 1)	EDE..EDYDENPSYQFGFIVRDEFTNYQNRKEQRDGN.V	152
达氏按蚊 (<i>Anopheles darlingi</i> , ETN63120. 1)	EDA..EDYDENPSYQFGFIVRDEFTNYQNRKEQRDGN.V	173
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018014406. 1)	..YKIAPQDIFDPWFSGLEVNDEFTNYQNRQESQDEQGV	38
家蚕 (<i>Bombyx mori</i> , NP_001166682. 1)	PQQPQEEYDPHPSYQFGFIVNDQCYTNYQNRKEQRDGD.V	147
体虱 (<i>Pediculus humanus corporis</i> , XP_002424768. 1)	FLKNQKLAEPFPQFQFSFIVNDDENTNYQNRKE.QREGNK	199
玉斑凤蝶 (<i>Papilio polytes</i> , XP_013134319. 1)	PQRTPEYDPHPSYQFGFIVNDQCYTNYQNRKEQRDGD.V	144
一致序列 Consensus	f v dd t y r e	
日本沼虾 (<i>M. nipponensis</i> , KY126106)	VQGEYSVVAANGIRYIVTYTADALNGFSQIREBPTDIVV	100
埃及伊蚊 (<i>Aedes aegypti</i> , XP_001663233. 1)	IKGSYSVVDSDGFI RTVITYTADPEKEGFKAEVSRQPTDIVV	192
达氏按蚊 (<i>Anopheles darlingi</i> , ETN63120. 1)	IKGSYSVVDSDGFI RTVITYTADPEKEGFKAEVSRQPTDIVV	213
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018014406. 1)	VRCQYSVVAENGVRITVITYTADAVNGYQCSIKEEQTDIIV	78
家蚕 (<i>Bombyx mori</i> , NP_001166682. 1)	IKGSYSVVDSDGFI RTVITYTADPEKEGFKAEVSRQPTDIVV	187
体虱 (<i>Pediculus humanus corporis</i> , XP_002424768. 1)	ISGSYSVVDALGFI RTVITYTADPEVEGFKAEVSRPTNIVV	239
玉斑凤蝶 (<i>Papilio polytes</i> , XP_013134319. 1)	IKGSYSVVDSDGFI RTVITYTADPEKEGFKAEVSRQPTDIVV	184
一致序列 Consensus	g ys v g vtytad g t i v	
日本沼虾 (<i>M. nipponensis</i> , KY126106)	RVEVEQ.....	106
埃及伊蚊 (<i>Aedes aegypti</i> , XP_001663233. 1)	KIKKPIIEY.....QQQSHQIHQQQFPQQQHR.LQQQP	224
达氏按蚊 (<i>Anopheles darlingi</i> , ETN63120. 1)	KIETPFAQSSQHERFAQSPQPQNGGYRLQQQPQ.QQQP	252
端足虫 (<i>Hyalella azteca</i> , XP_018014406. 1)	RFFVEAFLPNDARAAP.....	94
家蚕 (<i>Bombyx mori</i> , NP_001166682. 1)	KIETPFAQIAQQPQLAHQFQISHQPQIGHQQQIG.HQSRP	226
体虱 (<i>Pediculus humanus corporis</i> , XP_002424768. 1)	KVETPQESTDDTQANLYSPSPRAQYNSAQAKQVGIQYNGA	279
玉斑凤蝶 (<i>Papilio polytes</i> , XP_013134319. 1)	KIETPFAQGLEQLSHQ.QFQIQHQPFPQHCHQPQQHQPQH	223
一致序列 Consensus	p p	

黑色代表相同水平为 100%，灰色代表相同水平≥50%，但<100 %。

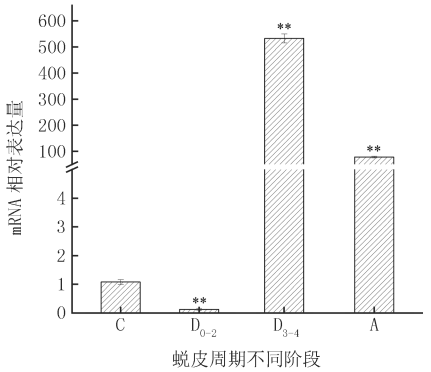
图2 MnCP-3 的保守区域氨基酸序列与其它物种的序列比对

2.2 头胸甲中 *MnCP-3* 在蜕皮周期不同阶段的表达

在头胸甲中,蜕皮周期不同阶段,*MnCP-3* 在 D_{3-4} 期和 A 期高表达,且峰值出现在 D_{3-4} 期(见图 3)。

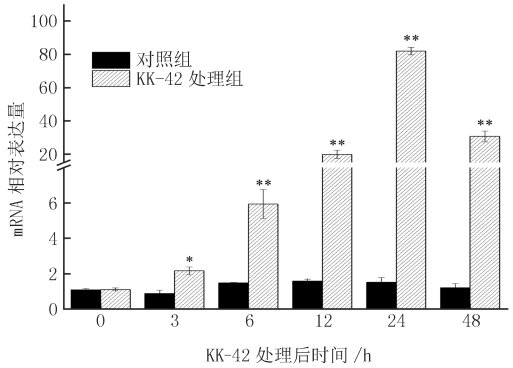
2.3 KK-42 对头胸甲中 *MnCP-3* 表达的影响

KK-42 对 *MnCP-3* 的表达有显著诱导作用,在 C 期,处理后 3~48 h 与对照组相比都显著升高,且在 24 h 到达峰值,相对升高有 80 多倍(见图 4);在 D_{0-2} 期,处理后 3、6、24 和 48 h 与对照组相比显著升高(见图 5)。



C 蜕皮间期; D_{0-2} 蜕皮前期早期; D_{3-4} 蜕皮前期晚期; A 蜕皮后期; ** 与 C 期相比, $P<0.01$ 。

图 3 头胸甲中 *MnCP-3* 基因在蜕皮周期不同阶段的表达



* 与对照组相比, $P<0.05$; ** 与对照组相比, $P<0.01$ 。下同。

图 4 KK-42 对 C 期日本沼虾头胸甲中 *MnCP-3* 表达的影响

3 讨 论

甲壳动物的蜕皮过程就是新旧表皮的更替,构成表皮的 CPs 种类较多,大多数含有保守的 RR 基序^[4]。*MnCP-3* 具备上述特征(图 1),多序列比对结果显示与昆虫的 CPs 基因具有一定的同源性(图 2),可以确认该基因属于 CPs 基因家族。

甲壳动物的表皮结构由外到内分别为上表皮、外表皮、内表皮和上皮细胞层,CPs 主要参与外表皮和内表皮的形成,这两层形成时间的不同与相应的 CPs 高水平表达时间的差异有关^[15]。日本对虾尾扇中的两个蛋白(DD9A 和 DD9B)^[11]以及蓝蟹关节膜中的两个蛋白(CsAMP8.1 和 CsAMP6.0)^[9]在蜕皮后期(A 期)高表达,认为它们在内表皮的形成和完善方面发挥作用。蓝蟹背部表皮中的两个蛋白 CsCP8.5 和 CsCP8.2,在蜕皮前期(D_{3-4} 期)高表达,认为其功能是形成新的外表皮^[9]。而蓝蟹关节膜中另外一个蛋白 CsAMP13.4,在 D 期和 A 期都高表达,认为其功能是参与外、内表皮结构的形成^[7]。本文结果显示,头胸甲中 *MnCP-3* 的高表达出现在 D_{3-4} 期和 A 期(图 3),提示该基因可能同时参与了新的外表皮和内表皮形成。当然,这需要以后在蛋白水平的检测以进一步确定其功能。

我们前期实验研究发现,在日本沼虾步足表皮组织中发现了一个参与新的外表皮形成的几丁质结合蛋白 *MnCBP-1*,在 C 期和 D_{0-2} 期表达量低,经 KK-42 处理后这两个时期表达水平显著升高,认为是加快了新表皮的形成,缩短了蜕皮周期^[13]。而且 KK-42 处理可显著提高日本沼虾血淋巴 20 羟蜕皮酮滴度(20-hydroxydsone, 20E),通过影响蜕皮激素使蜕皮过程提前启动,显著缩短蜕皮周期^[16]。本实验结果显示, KK-42 处理可明显上调 C 期和 D_{0-2} 期 *MnCP-3* 在头胸甲中的表达(见图 4,图 5),这可能是 KK-42 通过提高日本沼虾血淋巴 20E 滴度间接实现的,推测可能是提前启动蜕皮过程的进行,从而加快新表皮的形成,缩短了蜕皮周期,具体原因需要进一步的研究。

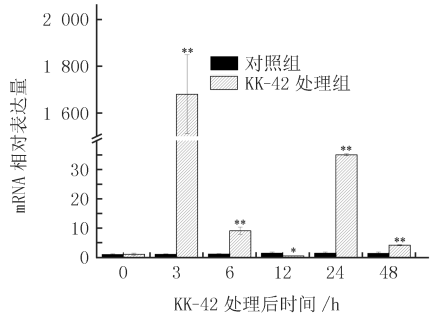


图 5 KK-42 对 D_{0-2} 期日本沼虾头胸甲中 *MnCP-3* 表达的影响

参 考 文 献

[1] Chang E S.Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview[J].Journal of Experimental

Marine Biology and Ecology,1995,193(1/2):1-14.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Willis J H.Structural cuticular proteins from arthropods: annotation,nomenclature,and sequence characteristics in the genomics era[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2010,40(3):189-204.

[5] 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.

[6] Abehsera S,Glazer L,Tynyakov J,et al.Binary gene expression patterning of the molt cycle: The case of chitin metabolism[J].Plos One, 2015,10(6): e0130787.

[7] Tetreau G,Dittmer N T,Cao X L,et al.Analysis of chitin-binding proteins from *Manduca sexta*, provides new insights into evolution of peritrophin A-type chitin-binding domains in insects[J].Insect Biochemistry and Molecular Biology,2015,62(11):127 - 141.

[8] Ioannidou Z S,Theodoropoulou M C,Papandreou N C,et al.CutProtFam-Pred: Detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone,based on profile Hidden Markov Models[J].Insect Biochemistry and Molecular Biology,2014,52(1):51-59.

[9] 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 and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology,2007,146(3):370-383.

[10] Wynn A,Shafer T H.Four differentially expressed cDNAs in *Callinectes sapidus* containing the Rebers-Riddiford consensus sequence[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology,2005,141(3):294-306.

[11] 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 and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000,125(1):127-136.

[12] Kuballa A V,Holton T A,Paterson B,et al.Moult cycle specific differential gene expression profiling of the crab *Portunus pelagicus*[J]. BMC Genomics,2011,12(1):147.

[13] 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(5):106-111.

[14] 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.

[15] Roer R,Abehsera S,Sagi A.Exoskeletons across the Pancrustacea: Comparative Morphology,Physiology,Biochemistry and Genetics[J]. Integrative and Comparative Biology,2015,55(5): 771-791.

[16] 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(4): 130-133.

Effect of Imidazole Derivative KK-42 on Expression of *MnCP-3* in Carapace from *Macrobrachium Nipponensis*

Ning Qianji, Lü Yanjie, Huang Yalong, Chen Ke

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

Abstract: In order to analyze the effect of imidazole derivative KK-42 on expressions of *Macrobrachium nipponense* cuticular proteins (MnCPs) gene preliminarily, a novel cuticular protein gene named *Macrobrachium nipponense* cuticular protein-3 (*MnCP-3*) containing chitin_bind_4 conserve domain was cloned from carapace. The relative expression of *MnCP-3* in carapace during four molt stages-intermolt stage (C), early premolt stage (D_{0-2}), late premolt stage (D_{3-4}) and postmolt stage (A) and the effect after KK-42 treatment were measured by Real-time PCR (RT-PCR). The results showed that the relative expression of *MnCP-3* was higher during stages D_{3-4} and A. What's more, the expression levels were higher than that of control from 3 to 48 h during stage C and at 3, 6, 24 and 48 h during D_{0-2} after KK-42 treatment. It suggests that *MnCP-3* is likely involved in forming of new exocuticle and endocuticle, and the expression of *MnCP-3* could be induced significantly at stage C and D_{0-2} after KK-42 treatment, which results in starting molting process in advance and accelerating formation of new cuticle.

Keywords: *Macrobrachium nipponense*; CPs; Carapace; KK-42

[责任编辑 王凤产]