

引用格式:

曾奇龙, 陈兆明. 罗氏沼虾 *GIH-like* 基因的克隆与原核表达[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(1): 114–120.

ZENG Q L, CHEN Z M. Molecular cloning and prokaryotic expression of *GIH-like* gene of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(1): 114–120.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



罗氏沼虾 *GIH-like* 基因的克隆与原核表达

曾奇龙, 陈兆明*

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 运用 RT-PCR 技术获得罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) *GIH-like* 基因的开放阅读框(ORF)序列, 通过荧光定量 PCR 技术检测该基因在罗氏沼虾不同组织中的表达量, 并运用原核表达技术诱导表达罗氏沼虾 *GIH-like* 成熟肽的重组蛋白。结果显示: 罗氏沼虾 *GIH-like* 的 ORF 全长为 339 bp, 共编码 112 个氨基酸残基, 其中包含 34 个氨基酸组成的信号肽及 78 个氨基酸组成的成熟肽, 具有 CHH 家族 II 型肽的典型特征; 同源性和进化关系分析表明, 罗氏沼虾 *GIH-like* 与日本沼虾 *GIH* 的同源性最高, 亲缘关系最近; 荧光定量 PCR 结果显示, 罗氏沼虾 *GIH-like* 在眼柄中的表达量最高, 极显著($P<0.01$)高于其他组织的, 在脑、神经节、心脏等组织中表达量较低; 诱导表达的罗氏沼虾 *GIH-like* 重组蛋白的相对分子质量约为 2.6×10^4 , 除去标签蛋白后约为 8.5×10^3 , 与 Prot Param 预测的 9.4×10^3 接近。

关键词: 罗氏沼虾; 性腺抑制激素(GIH); *GIH-like* 基因; 原核表达; 重组蛋白

中图分类号: S945.4⁺1; S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)01-0114-07

Molecular cloning and prokaryotic expression of *GIH-like* gene of *Macrobrachium rosenbergii*

ZENG Qilong, CHEN Zhaoming*

(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: In this study, the open reading frame(ORF) sequence of *GIH-like* gene of *Macrobrachium rosenbergii* (*MrGIH-like*) was obtained by using RT-PCR, the expression of *MrGIH-like* in different tissues was detected by qPCR, and prokaryotic technology was used for the recombinant protein of *MrGIH-like* expression. The results showed that the ORF of *MrGIH-like* was 339 bp in length, which encoded 112 amino acid residues contain 34 amino acid signal peptide and 78 amino acid comprising the mature peptide, and *MrGIH-like* gene possessed a typical structure motif from the CHH-II family. The analysis of homology and phylogenetic tree showed that *MrGIH-like* had the highest identity and the shortest evolutionary distance with *GIH* of *Macrobrachium nipponense*. Quantitative Real-Time PCR analysis showed that the expression of *MrGIH-like* was the highest in eyestalk and very low in brain, nerve neuro, heart and other tissues, and the expression level was significantly($P<0.01$) different between eyestalk and the other tissues. The relative molecular mass of *MrGIH-like* recombinant protein was about 2.6×10^4 and about 8.5×10^3 after removed the tag fusion protein, which was very close to the relative molecular mass(9.4×10^3) predicted by Prot Param.

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*; gonad-inhibiting hormone(GIH); *GIH-like* gene; prokaryotic expression; recombinant protein

收稿日期: 2022-02-08

修回日期: 2022-11-02

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A030310049); 广东省科技计划项目(2014B020202014)

作者简介: 曾奇龙(1995—), 男, 广东河源市人, 硕士研究生, 主要从事甲壳动物神经肽研究, 1463674113@qq.com; *通信作者, 陈兆明, 博士, 教授, 主要从事甲壳动物遗传育种研究, siuming573@sina.com

性腺抑制激素(GIH)又被称为卵黄抑制激素(VIH),是隶属于甲壳动物高血糖激素(CHH)家族的一种神经肽类激素,是 CHH 家族神经肽的重要组成部分^[1]。GIH 由 X 器官-窦腺(XO-SG)复合体分泌并储存,经血液循环作用于卵巢、大颚器官、促雄性腺等组织,主要起抑制性腺发育的作用^[2-3]。GIH 既无性别特异性,也无种类特异性^[4],在雌性中,其直接作用于卵巢,通过抑制卵黄蛋白原的形成和减少卵黄发生相关蛋白的合成来抑制卵巢的发育和成熟;在雄性中,GIH 则通过抑制促雄性腺分泌促雄性腺激素来间接抑制雄性的精巢发育和交配行为。GIH 的一级结构由 72~87 个氨基酸残基组成,包含 6 个保守的半胱氨酸,并根据信号肽与成熟肽的连接方式被划为 II 型 CHH^[5]。研究^[6-7]表明,不同物种间 GIH 的相对分子质量差异非常大,大的约为 1.1×10^4 ,小的约为 3.0×10^3 ,而蟹类的 GIH 一般较小,约为 $2.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^3$ 。关于 GIH 的研究在龙虾、对虾、沼虾和蟹中已有较多的报道。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)又名马来西亚大虾、淡水长臂大虾、泰国虾,隶属于节肢动物门、甲壳动物亚门、软甲纲、真软甲亚纲、真虾总目、十足目(Decapoda)、长臂虾总科(Palaemonoidea)、长臂虾科(Palaemonidae)、沼虾属(*Macrobrachium*),是世界上体型最大的淡水虾。罗氏沼虾是一种热带经济虾种,主要分布在东南亚地区,由于其具有生长快、食性杂、个体大、易驯养、营养价值高、抗病能力强等众多优点,自 1976 年中国农业科学院从日本引进以来,罗氏沼虾已成为中国重要的淡水养殖品种之一^[8]。国内外对罗氏沼虾的研究主要集中在营养需求、种苗繁育、病害等方面^[9],而在分子层面的研究较少。笔者基于实验室提供的罗氏沼虾眼柄转录组数据筛选出罗氏沼虾 *GIH-like* (*MrGIH-like*)核心序列(EST),根据 EST 序列设计引物克隆 *MrGIH-like* 的开放阅读框(ORF)序列,并对其进行生物信息学分析;采用荧光定量 PCR(qPCR)技术检测 *MrGIH-like* 基因在不同组织中的表达分布,并利用原核表达技术获得该基因的重组蛋白,旨在为后续研究基因功能提供基础数据和材料,同时为丰富 CHH 家族神经肽的研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 供试虾

从广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地挑选一批健康、活力好的罗氏沼虾,平均体长 (10.38 ± 0.25) cm,平均体质量 (9.04 ± 0.41) g,暂养于 5 m^2 水池中,每天投喂 3 次人工配合饲料,每 2 d 换水 1/3。暂养 1 周后用于试验。

1.2 主要试剂

TransZol Up Plus RNA Kit、DH5 α 大肠埃希菌感受态细胞菌种、BL21(DE3)大肠埃希菌感受态细胞、反转录试剂盒均为 TransGenBiotech 产品;2 \times Taq Plus Master Mix 为 Vazyme 产品;pMD19-T Vector Cloning Kit、T4 DNA 连接酶、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 均为 Takara 产品;胶回收试剂盒为 SangonBiotech 产品;原核表达载体 pET-32a 由广东海洋大学水产学院实验室保存。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 的制备

从池中选取 3 只大小相近、活力良好、附肢完全的罗氏沼虾,用剪刀、镊子快速剪取对虾的眼柄、肝胰腺、肌肉等组织;参照 TransZol Up Plus RNA Kit 试剂盒说明书进行组织总 RNA 提取;采用 SimpliNano 微量分光光度计对提取的 RNA 进行定性和定量,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性;将合格的 RNA 置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,备用。将上述 RNA 按照反转录试剂盒说明书进行反转录,所得 cDNA 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用于 *MrGIH-like* 基因克隆与组织表达分析试验。

1.3.2 *MrGIH-like* 基因克隆

根据从罗氏沼虾眼柄转录组数据库中筛选的 *MrGIH-like* 基因 EST 序列,运用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 GIH-like-F/R(表 1),引物由上海生物工程技术有限公司合成。采用 PCR 技术扩增 *MrGIH-like* 基因 ORF 序列。扩增体系($20.0 \text{ } \mu\text{L}$): 2 \times Taq Plus Master Mix 10.0 uL, GIH-like-F 1.0 μL , GIH-like-R 1.0 μL , 眼柄 cDNA 1.0 μL , ddH $_2$ O 7.0 μL 。反应程序: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $58.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 34 个循环;然后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 复性 10 min; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。用 1%的琼脂糖凝

胶电泳检测 PCR 结果,若条带正确,扩大体系 100 μL 扩增目的条带,再用胶回收试剂盒回收目的条带,然后与 pMD19-T 载体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接,接着将连接产物转入 DH5 α 大肠埃希菌感受态细胞,于 LB(Amp $^+$)固体培养基培养 12~16 h 后筛选阳性克隆,送至上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 试验所用的引物序列

Table 1 Primer sequence information used in this study		
引物	序列(5'-3')	用途
GIH-like-F	GATTATGGCATCTCGTCTAAACC	ORF 克隆
GIH-like-R	CAATTCTCACTTGGCTCCG	ORF 克隆
GIH-like-qF	AATACATCGTCAGAATTGCG	荧光定量PCR
GIH-like-qR	CGGACGCACCACATGAA	荧光定量PCR
GIH-like-matF	CGGTTTTTGGACGACGAG	成熟肽克隆
GIH-like-matR	AATTCTCACTTGGCTCCGAC	成熟肽克隆
t7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	菌液鉴定
t7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	菌液鉴定
M13-47	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	菌液鉴定
M13-48	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	菌液鉴定
EF1 α -F	GAAGTCTGGCGACTCCTGC	内参检测
EF1 α -R	AAGAGGAGCATACTGTTGGAAGG	内参检测

1.3.3 生物信息学分析

运用 ORF Finder(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)推导出对应的氨基酸序列,并使用 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行氨基酸的同源性搜索比对;运用 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测基因的信号肽;利用 TMHMM Server v.2.0 进行跨膜结构域分析;运用 ExPASy-ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>), ExPASy-ProtScale(<https://web.expasy.org/>)分别对氨基酸序列进行理化性质和亲水性分析;利用 SOPMA 进行二级结构分析;通过 SWISS-MODEL 对蛋白质的三级结构进行预测;从 NCBI 上下载不同物种 GIH 的氨基酸序列,运用 CLASTWL 进行序列比对及同源性分析,并使用 MEGA-X 进行系统进化树的构建。

1.3.4 MrGIH-like 基因的组织表达分析

根据克隆得到的 MrGIH-like ORF 序列,运用 Primer 5.0 软件设计产物大小为 80~150 bp 的荧光定量引物 GIH-like-qF/qR(表 1),以 1.3.1 获得的各个组织的 cDNA 为模板,参照 SYBR PrimeScript

RT-PCR Kit 说明书对不同组织的 *GIH-like* 基因和内参基因(*EF1 α*)进行 3 个重复的扩增,同时设置阴性对照。试验反应体系(25.0 μL): SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus) 12.5 μL , GIH-like-qF 1.0 μL , GIH-like-qR 1.0 μL , cDNA 模板 2.0 μL , RNase-free Water 补足至 25.0 μL 。反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 40 个循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 10 min。

1.3.5 MrGIH-like 重组蛋白诱导表达

根据克隆得到的 MrGIH-like ORF 序列,利用 Primer 5.0 软件设计 MrGIH-like 成熟肽克隆引物 GIH-like-matF/matR(表 1)。扩增 MrGIH-like 成熟肽片段并将目的条带纯化回收,目的条带与原核表达载体 pET-32a 经双酶切后由 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,并将构建好的原核表达载体 pET-32a-GIH-like 转入 BL21(DE3)大肠埃希菌感受态细胞, LB(Amp $^+$)固体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,筛选阳性克隆测序。将正确测序的阳性克隆载体 pET-32a-GIH-like 接种到 5 mL LB(Amp $^+$)液体培养基中, 180 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养过夜活化菌种;取 50 μL 活化菌液接种于 5 mL 新的 LB(Amp $^+$)液体培养基中, 180 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.6;加入 0.2 mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 诱导 8 h,之后 8000 r/min 离心收集菌体,并用超声波破碎处理后进行 SDS-PAGE 分析。

1.4 数据统计分析

运用 SPSS 19.0 对荧光定量 PCR 结果进行单因素方差分析及多重组间比较。

2 结果与分析

2.1 MrGIH-like 基因序列分析结果

MrGIH-like 基因的 ORF 大小为 339 bp,共编码 112 个氨基酸,成熟肽大小为 78 个氨基酸,其中包含 6 个保守的半胱氨酸残基(Cys⁴¹, Cys⁵⁸, Cys⁶¹, Cys⁷⁴, Cys⁷⁸, Cys⁸⁷); SignalP-5.0 Server 信号肽预测结果显示,1~34 位为 MrGIH-like 信号肽; TMHMM Server 在线软件预测,蛋白在 14~37 个氨基酸存在 1 个跨膜区; NCBI 预测结果显示,38~102 个氨基酸为该基因的保守结构域(图 1)。

```

1 ATGGCATCTCGTCTAAACCAAGCTTTCACGCTTAAGAAATTAACATATGTTGCGATAATGATGGCTGTGTTCCGAATACTACTAGTGGAT
1 M A S R L N Q A F T L K K L T Y V A I M M A V F G I L L V D
91 CAGACTTCGGCCGGTTTTGGACGACGAGTGTGAGGAGTCATGGGAATCGTGAATTCACGAATACATCGTGAATTTGCGATGAC
31 Q T S A R F L D D E R G V M G N R D L Y E Y I V R I D D
181 TGGAAAACTTATTCAGAAAAGCAACGTTGGATCTAGATGCAAGAAAACTGCTTCTACAACGAGGACTTCATGGTGGCTCCGCCGC
61 E N L F R K S N V G S R K K N F Y N E D F M W V R A
271 ACTGAGCGTACCGACGAGTTGGAGCATCTGAACCGAGCAATGAGCATAATACGAGTCCGACGCAAGTGA
91 T E R T D E L E H L N R A M S I I R V G R K *
    
```

单下划线示跨膜区；阴影示信号肽；方框示半胱氨酸；双下划线示保守结构域；*示终止密码子。

图 1 罗氏沼虾 *GIH-like* 基因的碱基序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *GIH-like* of *Macrobrachium rosenbergii*

2.2 MrGIH-like 蛋白理化性质分析结果

Prot Param 预测结果显示, MrGIH-like 蛋白的相对分子质量为 1.3133×10^4 , 理论等电点为 8.58。MrGIH-like 氨基酸序列中带正电荷的氨基酸(Arg、Lys)残基有 18 个, 占氨基酸总数的 16.1%; 带负电荷的氨基酸(Asp、Glu)残基有 15 个, 占氨基酸总数的 13.3%(表 2)。MrGIH-like 蛋白的不稳定系数为 21.90, 为稳定蛋白, 脂溶性指数为 82.68。疏水性分析显示, MrGIH-like 蛋白的总平均亲水性指数为 -0.230, 为亲水蛋白, 最高疏水性指数和最高亲水性指数出现在第 25 位和第 95 位, 分别为 2.956、-2.144(图 2)。

表 2 罗氏沼虾 *GIH-like* 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of MrGIH-like protein

氨基酸类别	个数	占比/%	氨基酸类别	个数	占比/%
Ala(A)	7	6.2	Lys(K)	6	5.4
Arg(R)	12	10.7	Met(M)	6	5.4
Asn(N)	7	6.2	Phe(F)	6	5.4
Asp(D)	8	7.1	Pro(P)	0	0.0
Cys(C)	6	5.4	Ser(S)	5	4.5
Gln(Q)	2	1.8	Thr(T)	5	4.5
Glu(E)	7	6.2	Trp(W)	1	0.9
Gly(G)	5	4.5	Tyr(Y)	4	3.6
His(H)	1	0.9	Val(V)	8	7.1
Ile(I)	6	5.4	Pyl(O)	0	0.0
Leu(L)	10	8.9	Sec(U)	0	0.0

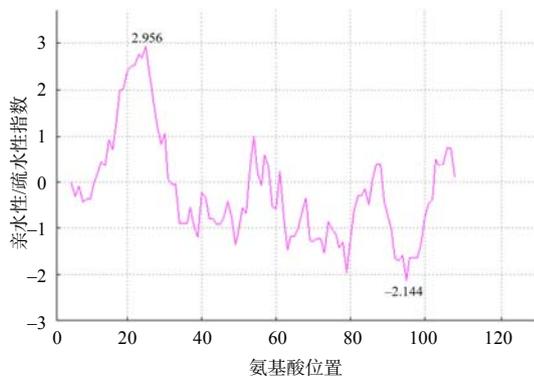


图 2 罗氏沼虾 *GIH-like* 蛋白疏水性预测结果

Fig.2 The hydrophobic prediction result of MrGIH-like protein

2.3 MrGIH-like 基因同源性分析结果及系统进化树

将 MrGIH-like 氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对, MrGIH-like 氨基酸序列与沼虾 *GIH* 同源性较高, 与其他虾蟹类 *GIH* 同源性较低, 符合物种分类学地位。其中, 与日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*, AEJ54623.1)的同源性最高, 为 91.64%; 而与马氏沼虾(*Macrobrachium malcolmsonii*, ARB18039.1)的同源性次之, 为 68.12%; 与脊尾白虾(*Palaemon carinicauda*, AIJ49750.1)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*, AAB21582.1)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*, AHE40786.1)、斑节对虾(*Penaeus monodon*, ACT35015.1)的同源性较低, 分别为 56.64%、51.95%、49.45%、41.67%; 与凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*, AGX26044.1)的同源性最低, 仅为 37.78%。将 MrGIH-like 氨基酸序列与上述物种的氨基酸序列进行多序列比对, 发现除了 6 个保守的半胱氨酸残基外, 序列在成熟肽的 11~17 位和 63~66 位也较为保守, 其中第 12 位为 II 型 CHH 所特有的 Gly 残基(Gly⁴⁶), 成熟肽 C 端还有潜在的酰胺化位点 Gly¹¹⁰(图 3)。选择日本沼虾, 马氏沼虾, 脊尾白虾, 美洲螯龙虾, 拟穴青蟹, 欧洲龙虾(*Homarus gammarus*, ABA42181.1), 刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*, AAL33882.1), 斑节对虾, 波纹龙虾(*Panulirus homarus*, QHR84460.1), 短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*, BAV60264.1), 凡纳滨对虾, 运用 MEGA-X 对 MrGIH-like 基因的氨基酸序列进行进化关系分析, 采用邻接法(neighbor joining)构建系统进化树, 自展法重复检验 1000 次, 结果如图 4 所示: 罗氏沼虾 *GIH-like* 与日本沼虾 *GIH* 聚在一支, 与凡纳滨对虾距离最远, 同源性分析结果与多重序列比对结果一致。

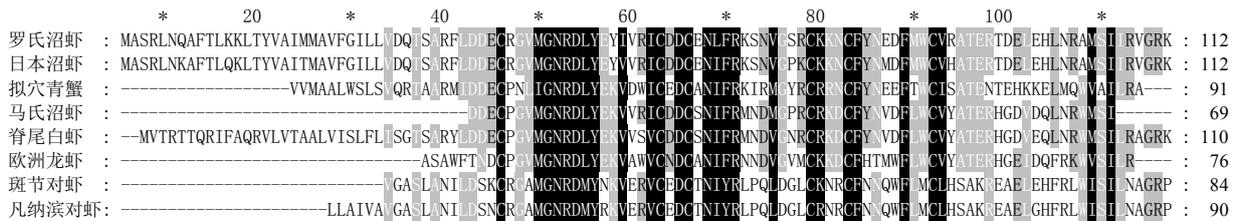


图3 罗氏沼虾 GIH-like 氨基酸多重序列比对结果

Fig.3 The multiple sequence alignment result of MrGIH-like amino acid

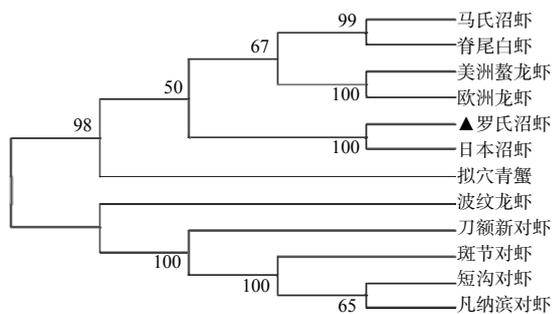


图4 罗氏沼虾 GIH-like 氨基酸序列的进化树分析结果

Fig.4 The phylogenetic tree analysis result of MrGIH-like amino acid sequences

2.4 MrGIH-like 蛋白空间结构预测结果

选取与 MrGIH-like 同源性最高的日本沼虾 GIH, 运用 SWISS-MODEL 分别对这 2 个蛋白进行三维结构预测, 结果如图 5 所示, 预测的 2 个蛋白的三维结构基本一致。运用 SOPMA 对 MrGIH-like 蛋白的二级结构进行分析, 结果表明, MrGIH-like 蛋白包含 68 个 α -螺旋、5 个延伸链、4 个 β -转角及 35 个无规则卷曲, 分别占总结构的 60.71%、4.46%、3.57%和 31.25%。

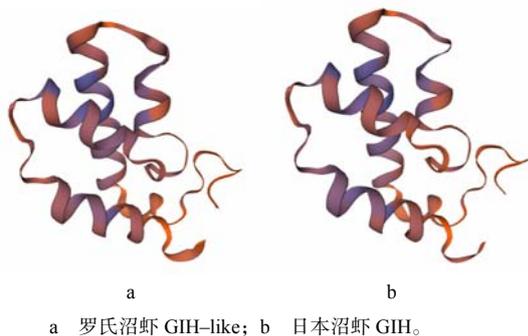


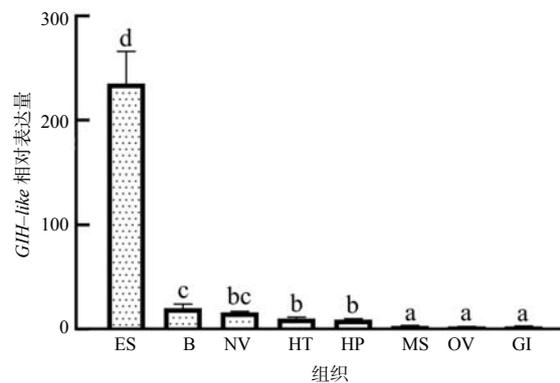
图5 SWISS-MODEL 预测的罗氏沼虾 GIH-like 和日本沼虾 GIH 的三维结构模型

Fig.5 3-D structure model predicted by SWISS-MODEL of MrGIH-like and MnGIH

2.5 MrGIH-like 基因的组织表达分析结果

运用荧光定量 PCR 技术检测 MrGIH-like 基因在不同组织的差异表达。结果显示, MrGIH-like 基

因除了在眼柄表达量较高以外, 在其他组织的表达量都较低, 在肌肉、卵巢、鳃中几乎不表达, 眼柄组织 MrGIH-like 基因的相对表达量极显著 ($P < 0.01$) 高于其他组织的(图 6)。



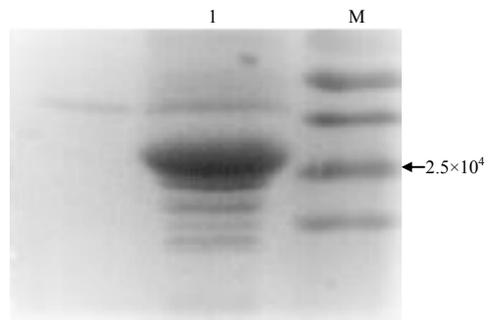
ES 眼柄; B 脑; NV 神经节; HT 心脏; HP 肝胰腺; MS 肌肉; OV 卵巢; GI 鳃。

图6 罗氏沼虾 GIH-like 基因在不同组织的相对表达量

Fig.6 Relative expression of MrGIH-like gene in different tissues

2.6 MrGIH-like 重组蛋白诱导表达结果

利用原核表达技术对 MrGIH-like 成熟肽进行重组蛋白诱导表达, 结果如图 7 所示。SDS-PAGE 电泳结果显示, 诱导表达出的融合蛋白的相对分子质量约为 2.6×10^4 , 除去原核表达载体 pET-32a 的标签蛋白, MrGIH-like 成熟肽蛋白的相对分子质量约为 8.5×10^3 , 与预测的 9.4×10^3 接近。



1 罗氏沼虾 GIH-like 重组蛋白; M Marker。

图7 罗氏沼虾 GIH-like 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.7 SDS-PAGE electrophoresis result of MrGIH-like recombinant protein

3 结论与讨论

CHH 家族根据信号肽与成熟肽连接方式分为 CHH-I 型和 CHH-II 型。CHH-I 型的信号肽与成熟肽之间存在一段 CHH 序列相关前导肽(CPRP), CHH-II 型则不存在, 而性腺抑制激素由于缺少 CPRP 被划分为 CHH-II 型^[10-12]。本研究中, 对克隆得到的基因序列进行分析, SignalP-5.0 Server 预测结果显示, 该基因的信号肽与成熟肽直接相连, 成熟肽大小为 78 个氨基酸, 多重序列比对结果显示, 其成熟肽片段存在 6 个保守的半胱氨酸残基, 且第 12 位为 II 型 CHH 所特有的甘氨酸残基^[13-14], 这些结果都表明该基因为 II 型 CHH 家族基因。同源性及进化关系分析结果表明, 该基因与日本沼虾 *GIH* 的同源性最高, 亲缘关系最近; SWISS-MODEL 建模结果显示, 2 个蛋白的三维结构近乎重合, 结构决定功能, 相似的结构往往具有相似的功能, 说明该基因极有可能为罗氏沼虾 *GIH-like* 基因。

GIH 已经在许多甲壳动物种类中被报道, 但在不同种类的甲壳动物中, *GIH* 的组织分布的差异较大。DE KLEIJN 等^[15]利用 Northern blot 方法对美洲螯龙虾的 *GIH* 前体 mRNA 进行定位, 发现其仅在眼柄的端髓中表达。EDOMI 等^[16]则发现挪威龙虾 (*Nephrops norvegicus*) 的 *GIH* 在眼柄和上食道神经节中均有分布。姜姝娜^[17]和张美^[18]分别对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 的 *GIH* 进行组织表达水平检测, 发现两者均在眼柄中表达最高, 在其他组织中表达量低或者不表达。本研究中, 运用荧光定量 PCR 技术对罗氏沼虾的 8 个组织进行了 *MrGIH-like* 表达水平检测, 结果表明, *MrGIH-like* 基因在眼柄中的相对表达量最高, 极显著 ($P < 0.01$) 高于与其他组织的, 在脑、神经节、心脏和肝胰腺中少量表达, 在肌肉、卵巢和鳃中几乎不表达。不同种类甲壳动物 *GIH* 的组织分布差异较大, 可能与物种的选择进化有关。

原核表达技术是研究 CHH 家族激素功能的重要手段, 它可获得大量有活性的重组 CHH 家族激素蛋白, 解决了部分 CHH 家族激素合成分泌过少, 导致难以分离和纯化的问题。UDOMKIT 等^[19]将提纯 CHH 重组蛋白注射到切除双侧眼柄的斑节对虾

中, 发现试验组血糖水平明显升高, 说明重组蛋白具有生物活性; OKUMURA 等^[20]和张志甫^[3]的研究也证明了 *MIH* 和 *GIH* 的重组蛋白具有生物学活性。本研究中, 利用原核表达技术成功诱导表达了 *MrGIH-like* 基因的重组蛋白, SDS-PAGE 电泳结果显示, 该融合蛋白约为 2.6×10^4 , 除去标签蛋白后约为 8.5×10^3 , 与预测的 9.4×10^3 接近。

参考文献:

- [1] TREERATTRAKOOL S, PANYIM S, CHAN S M, et al. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(5): 970-980.
- [2] VAN HERP F. Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family [J]. Recent Advances in Arthropod Endocrinology, 1998, 65: 53-70.
- [3] 张志甫. 中华绒螯蟹性腺抑制激素基因的克隆与表达 [D]. 保定: 河北大学, 2011.
- [4] 蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究及展望[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 154-161.
- [5] 叶满. 凡纳滨对虾性腺抑制激素定位及激素对性腺发育基因表达的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
- [6] AGUILAR M B, QUACKENBUSH L S, HUNT D T, et al. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri*(Ortmann)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1992, 102(3): 491-498.
- [7] MEUSY J J, MARTIN G, SOYEZ D, et al. Immunochemical and immunocytochemical studies of the crustacean vitellogenesis inhibiting hormone(VIH)[J]. General and Comparative Endocrinology, 1987, 67(3): 333-341.
- [8] 强光峰, 杨国梁, 陈雪峰, 等. 罗氏沼虾高世代育种群体收获体重加性和显性遗传效应[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1027-1034.
- [9] 袁锐, 张朝晖, 陈辉, 等. 罗氏沼虾“铁壳”现象及其防控研究进展[J]. 水产科学, 2017, 36(3): 383-390.
- [10] KELLER R. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects[J]. Experientia, 1992, 48(5): 439-448.
- [11] LACOMBE C, GRÈVE P, MARTIN G. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone

- family[J]. *Neuropeptides*, 1999, 33(1): 71–80.
- [12] DE KLEIJN D P V, VAN HERP F. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 112(4): 573–579.
- [13] LEE K J, ELTON T S, BEJ A K, et al. 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.
- [14] KATAYAMA H, NAGATA K, OHIRA T, et al. The solution structure of molt-inhibiting hormone from the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 9620–9623.
- [15] DE KLEIJN D P V, SLEUTELS F J G T, MARTENS G J M, et al. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone(GIH) in the lobster *Homarus americanus*[J]. *FEBS Letters*, 1994, 353(3): 255–258.
- [16] EDOMI P, AZZONI E, METTULIO R, et al. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster(*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization[J]. *Gene*, 2002, 284(1/2): 93–102.
- [17] 姜姝娜. 凡纳滨对虾性腺抑制激素基因的克隆与表达[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.
- [18] 张美. 脊尾白虾高血糖激素家族基因的克隆、表达及功能研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2015.
- [19] UDOMKIT A, TREERATTRAKOOL S, PANYIM S. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 298(1): 79–91.
- [20] OKUMURA T, OHIRA T, KATAYAMA H, et al. In vivo effects of a recombinant molt-inhibiting hormone on molt interval and hemolymph ecdysteroid level in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Zoological Science*, 2005, 22(3): 317–320.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正

(上接第99页)

- [18] SHARMA K K, TRIPATHY V, RAO C S, et al. Persistence, dissipation, and risk assessment of a combination formulation of trifloxystrobin and tebuconazole fungicides in/on tomato[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2019, 108: 104471.
- [19] 袁雅洁, 龚道新, 吴亮, 等. 肟菌酯在辣椒和土壤中的消解动态[J]. *农药*, 2015, 54(2): 126–128.
- [20] NY/T 788—2018 农作物中农药残留试验准则[S].
- [21] 董燕, 罗焕, 孙克, 等. 肟菌酯分析方法述评[J]. *农药*, 2014, 53(10): 776–779.
- [22] 郭亚歌, 徐军, 董丰收, 等. 关于 JMPR 植物源产品残留定义中含有代谢产物的农药在进行膳食风险评估时残留数据计算的介绍[J]. *植物保护*, 2021, 47(2): 169–178.
- [23] 张洋, 杨丽华, 龚道新, 等. 油菜籽中高效氟吡甲禾灵及其代谢物的残留检测与膳食风险评估[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2021, 47(3): 326–331.
- [24] LI W, SHEN S, CHEN H Y, et al. Dissipation study and dietary risk assessment of dinotefuran, DN, and UF in wolfberry[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2020, 100(13): 1524–1535.
- [25] 中华人民共和国农业农村部农药检定所. 农药登记数据[DB/OL]. [2021–10–10]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>.
- [26] 中华人民共和国卫生部, 中华人民共和国科学技术部, 中华人民共和国国家统计局. 中国居民营养与健康现状[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2004, 2(12): 919–922.
- [27] 魏进, 张盈, 曾雪, 等. 超高效液相色谱串联质谱法快速检测核桃中戊唑醇、肟菌酯及肟菌酸残留[J]. *植物保护*, 2021, 47(4): 134–140.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正