

doi: 10.7541/2013.116

## 青虾咽侧体抑制激素基因全长 cDNA 序列的克隆及表达分析

卜宪飞<sup>1</sup> 李真真<sup>2</sup> 乔慧<sup>2</sup> 傅洪拓<sup>1,2</sup> 吴滢<sup>2</sup>  
龚永生<sup>2</sup> 蒋速飞<sup>2</sup> 熊贻伟<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,  
农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081)

**摘要:** 咽侧体抑制激素(Allatostatin, AST)是一类由几至几十个氨基酸构成的神经肽类激素, 在甲壳动物中刺激下颌器官合成甲基法尼酯, 影响甲壳动物的蜕皮和生殖。然而 *AST* 基因在甲壳动物中的克隆和表达却罕见报道。研究克隆了青虾的 *AST* 基因全长 cDNA 序列, 在甲壳动物中使用荧光定量 PCR 技术检测了 *AST* 基因在不同组织中的表达。青虾 *AST* 基因 cDNA 全长 2995 bp, 包括 242 bp 的 5'非编码区(UTR), 647 bp 的 3'UTR, 2106 bp 的开放阅读框(ORF)。开放阅读框编码 701 个氨基酸, 可转录翻译出 35 个 AST 多肽, 在 C 末端都具有相同的 Y/FXFGGL-amide 结构, 属于 A 型-AST。氨基酸序列比对显示保守氨基酸为 Tyr、Ala、Phe、Gly、Leu。蛋白相似度比对显示, AST 多肽在无脊椎动物的进化中是相对保守的。系统进化树分析表明, 青虾 AST 多肽与罗氏沼虾聚在一起, 具有最近的亲缘关系。荧光定量 PCR 检测显示, *AST* 基因在所有被检测组织中均有表达, 由高到低依次为: 肝胰脏>肠道>精巢>脑>心脏>卵巢。对青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列克隆和表达的研究为更进一步的了解 AST 多肽在青虾中的重要功能奠定了基础。

**关键词:** 青虾; 咽侧体抑制激素; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)01-0116-09

咽侧体抑制激素(Allatostatin, AST)是一类由几至几十个氨基酸构成的神经肽, 由脑神经细胞分泌的 AST 多肽前体水解而来。AST 多肽首先在昆虫中被发现, 迄今已在昆虫中分离纯化出 70 多种。AST 多肽通过神经或体液途径到达咽侧体(Corpora allata, CA), 抑制咽侧体的活性, 调节咽侧体对保幼激素(Juvenile hormone, JH)的合成与释放, 是参与昆虫蜕皮和生长发育过程的一类重要激素<sup>[1]</sup>。除此以外, AST 多肽还具有抑制肠道肌肉收缩<sup>[2, 3]</sup>、抑制心脏搏动和输卵管蠕动<sup>[4]</sup>, 并能通过抑制卵黄蛋白原的合成与释放从而抑制卵的形成等多种功能<sup>[5, 6]</sup>。在 AST 多肽分离鉴定的基础上, 许多编码 AST 的基因也已经被克隆。在 Donly 第一次鉴定了折翅螳的 *AST* 基

因全长 cDNA 序列<sup>[7]</sup>之后, 直翅目(*Orthopteran*)<sup>[8-10]</sup>、双翅目(*Dipteran*)<sup>[3, 11]</sup>、鳞翅目(*Lepidopteran*)<sup>[12, 13-16]</sup>、网翅目(*Dictyopteran*)<sup>[17, 18]</sup>中某些昆虫的 *AST* 基因全长 cDNA 序列也相继被确定。

除昆虫以外, AST 多肽也广泛存在于甲壳动物(*Crustacean*)、腔肠动物(*Coelenterate*)以及软体动物(*Mollusk*)中。在甲壳动物中, 斑节对虾(*Penaeus monodon*)、利莫斯螯虾(*Orcanectes limosus*)和三叶真蟹(*Carcinus maenas*)中都分离提取到多种 AST 多肽<sup>[19]</sup>。神经生理学研究表明, AST 多肽在甲壳类动物体内分布广泛, 除了参与神经、肌肉收缩节律以及神经肌肉接头兴奋电位调节之外, 还参与刺激下颌器官(Mandibular organs, MO)甲基法尼酯(Methyl farne-

收稿日期: 2011-09-14; 修订日期: 2012-08-17

基金项目: 国家十二五科技支撑计划(2012BAD26B04; 2012BAD25B07); 中央级基本科研业务费专项(2011JBFA02); 农业部农业科技跨越计划(2007 年度)资助

作者简介: 卜宪飞(1987—), 女, 吉林人; 硕士; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: buxianfei2005@126.com

通信作者: 傅洪拓(1964—), 男, 湖南长沙人; 研究员, 博士生导师; 研究方向为水产动物遗传育种。Tel :0510-85558835; E-mail: fuht@ffrc.cn

soate, MF)的生物合成,从而促进蜕皮以及性腺的成熟<sup>[20-24]</sup>。然而目前有关甲壳动物 *AST* 基因的研究却很少有相关报道,仅见罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、克氏螯虾(*Procambarus clarkii*)和大海虾(*Panulirus interruptus*)*AST* 基因全长 cDNA 序列的克隆。同属无脊椎动物的甲壳动物与昆虫同源性较高,都具有周期性蜕皮等生命规律,因此在甲壳动物中开展 *AST* 基因的研究对于甲壳动物生长发育机制的研究具有十分重要的意义。

青虾(学名日本沼虾, *Macrobrachium nipponense*)是我国淡水养殖虾蟹类的重要品种,然而随着累代养殖规模的扩大,青虾养殖过程中普遍出现性早熟等品种退化现象。因此,开展青虾蜕皮及生殖发育相关功能和机制的研究,对实现青虾产业的可持续性发展,培育高产高效、品质优良的养殖品种十分必要。本研究拟采用分段克隆法克隆了青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列,并对其结构特征进行分析探讨,采用荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测了该基因在青虾体内的表达,以期为青虾蜕皮及生殖发育相关基因的克隆研究奠定基础。qRT-PCR 技术应用于甲壳动物 *AST* 基因的研究,可为甲壳类蜕皮及生殖发育相关研究提供有益借鉴。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**实验虾** 实验青虾为野生青虾,采自太湖无锡湖区,暂养在实验室一周,24h 充氧,养殖温度维持在 26—28℃,日换水量约为 1/2,每天投喂 2 次。用于即时 RNA 提取。

**仪器和试剂** RNAiso Plus、cDNA 第一链合成试剂盒、3'-Full RACE Kit、5'-Full RACE Kit 购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa); iScript cDNA Synthesis Kit、SsoFast EvaGreen Supermix 购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司(BIO-RAD); RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒和引物合成等其他试剂均购自上海生工生物工程有限公司(Sangon)。冷冻离心机(贝克曼库尔特 Microfuge 22R); 凝胶成像系统(法国 Vilber Chemi-smart 系列); 紫外分光光度计(艾本德 BioPhotometer); PCR 仪(艾本德 Authorized Thermal Cycler); 荧光定量 PCR 仪(伯乐 BIO-RAD iQ5)。

### 1.2 方 法

**总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成** 取青虾脑、肠道、肝胰脏、心脏、精巢、卵巢 6 种组织,按照 RNAiso Plus 的操作步骤,研磨、裂解组织后用传统的酚仿抽提法提取总 RNA。提取的各组织总 RNA 均使用 RNA-freeDNase 纯化,纯化后的 RNA 用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其质量及浓度,按照 TaKaRa cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转, -20℃ 保存,用于 *AST* 基因全长 cDNA 序列的克隆。用于荧光定量表达的 cDNA 由 BIO-RAD 的 iScript cDNA Synthesis Kit 合成, -20℃ 保存。

**引物设计** 由于已知甲壳类 *AST* 基因全长 cDNA 序列长度都在 3000 bp 左右,因此本研究采用分段克隆的方法,根据大海虾(*Panulirus interruptus*)、克氏螯虾(*Procambarus clarkii*)、罗氏沼虾(*M. rosenbergii*)的氨基酸序列及罗氏沼虾的 *AST* 基因全长 cDNA 序列的比对结果挑选 4 段保守序列,针对这 4 段保守序列分别设计 4 组引物(每组 2—3 对),保证目的片段中相邻的两段上有 20 个左右的重叠序列,克隆得到中间序列。

**青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列的获得** 采用分段克隆方法获得了青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列。

以青虾脑组织 cDNA 为模板,用 4 组引物克隆出了青虾 *AST* 基因的中间序列(表 1)。PCR 反应体系为 50 μL,反应条件为: 94℃ 2min; 94℃ 30s; 56℃ 30s; 72℃ 30s; 35 个循环, 72℃ 5min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收后与 pMD18-T 载体连接,并转化入感受态中。挑取阳性克隆菌落送往上海生工生物公司测序,将所得 *AST* 基因 cDNA 中间序列于 NCBI 中进行 Blastx 同源性分析。

根据已获得的青虾 *AST* 基因 cDNA 中间序列设计 3' RACE 引物 3ASF1 和 3ASF2 以及 5' RACE 引物 5ASR1 和 5ASR2(表 1)。根据 3'-Full RACE、5'-Full RACE 试剂盒操作步骤,分别扩增 *AST* 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列。反应循环数为 25,其他条件如前。PCR 产物同样经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收后,与 pMD18-T 载体连接,并转化入感受态中。挑取阳性克隆菌落送往上海生工生物公司测序,将所得 *AST* 基因 cDNA 3'端和 5'端序列于 NCBI 中进行 Blastx 同源性分析。

表 1 本实验所用的引物及其序列  
Tab.1 Primers and their sequences

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')	长度 Length (bp)	作用 Function
ASF1	TTACGGCTTTGGGCTTG	17	扩增中间序列 1
ASR1	TGCTGAATTACAGGGACACA	20	
ASF2	CGAAGAAGGTGAGGAAAATGATGC	24	扩增中间序列 2
ASR2	CCATTGGTTCTGTTCTTGGAGT	24	
ASF3	TCAGGGCATACTCAGTCATCGC	22	扩增中间序列 3
ASR3	TACATCTGCCTCCGCTTTC	20	
ASF4	TCGCTCTTATTCCTTGGACTTGG	24	扩增中间序列 4
ASR4	GCATACTGACCAGCTCGTTACCC	24	
3ASF1	AGAACCAGAACCAAATGGCTCTTC	24	3'-Full RACE
3ASF2	CTCCTTATGACGACCTTGTTC	24	
5ASR1	CGCTTCCATAATCCACCC	20	5'-Full RACE
5ASR2	TGACTGAGTATGCCCTGAACCC	22	
QASF1	GAAAGGACGGCCGCTACTAGGA	21	荧光定量 PCR 分析特异引物
QASR1	AAAGCTGCGATGACTGAGTATGC	23	
Actin F	TATGCACTTCCTCATGCCATC	21	荧光定量 PCR 分析内参引物
Actin R	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	19	

序列分析 采用 ContigExpress 软件将中间序列、3'端序列、5'端序列拼接得到 *AST* 基因全长 cDNA 序列。

在 NCBI 中对 *AST* 基因全长 cDNA 序列 BLAST 比对并做同源性分析; 用 DNASTar 软件寻找开放阅读框并翻译出相应的氨基酸序列; 使用 SMART 在线软件分析蛋白质的结构及功能; 用 ClustalX 软件及 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件对蛋白序列作比对及同源性分析; 采用 MAGE4.0 软件以邻接法(Neighbour-Joining)根据不同物种的 *AST* 氨基酸序列构建系统进化树。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)的相对表达分析 取青虾精巢、卵巢、心脏、肝胰脏、脑、肠道 6 种组织的 RNA, 用 BIO-RAD 的 iScript cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。根据获得的 *AST* 基因全长 cDNA 序列设计一对荧光定量特异引物 QASF1 和 QASR1(表 1); 根据罗氏沼虾  *$\beta$ -actin* 基因全长 cDNA 序列设计一对内参引物 Actin F 和 Actin R(表 1)。qRT-PCR 反应体系为 25  $\mu$ L: 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, Super Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L, 模板 cDNA 1  $\mu$ L (总量为 50 ng)。反应条件按照 BIO-RAD SsoFast EvaGreen Supermix 推荐条件: 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s; 60 $^{\circ}$ C 10s; 35 个循环。反应在 BIO-RAD iQ5 中进行, 每种组织 cDNA 样品做 3 个重复, 并作 3 个不加

cDNA 模板的阴性对照重复。内参基因  *$\beta$ -actin* 基因同样每种组织 cDNA 样品做 3 个重复, 并作 3 个不加 cDNA 模板的阴性对照重复, 反应条件同上。

用 BIO-RAD iQ5 自带实时分析软件进行溶解曲线分析, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[25, 26]</sup>计算目的基因 mRNA 的相对表达量并作图; 使用 SPSS13.0 软件进行显著性分析; 用 Turkey 法进行多重比较分析( $P < 0.05$  为显著水平)。

## 2 结果

### 2.1 青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列的克隆和分析

以青虾脑组织 cDNA 为模板, 采用分段克隆方法和 3' RACE、5' RACE 法对 *AST* 基因全长 cDNA 序列进行克隆, 得到全部中间序列和 3'末端、5'末端。采用 ContigExpress 软件分析并拼接各片段, 得到 *AST* 基因 cDNA 序列全长 2995 bp, 包括 242 bp 的 5'非编码区(Untranslated region, UTR), 2106 bp 的开放阅读框(Open reading frame, ORF)以及 647 bp 的 3' UTR, 并且 3'端具有典型的 AATAAA 加尾信号。开放阅读框含有一个典型的起始密码子 ATG 及一个终止密码子 TAG, 共编码 701 个氨基酸。这些氨基酸的酶切位点为 G-K/R-R, 可转录翻译出 35 个 *AST* 多肽, 这些多肽分别由 6—18 个氨基酸组成, 并且在 C 末端具有相同的 Y/FXFGI-amide 结构,

属于 A 型-AST。青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列已提交 GenBank, 序列号为 JQ014170。

## 2.2 青虾 *AST* 氨基酸序列比对及系统进化分析

经 DNASTar 软件分析表明, 青虾 *AST* 多肽前体由 701 个氨基酸组成, 经蛋白酶水解可转录并翻译出 35 个 *AST* 多肽, 分析显示这些多肽共 30 种。使用 clustalx 软件将青虾 30 种多肽与克氏螯虾 (*Procambarus clarkii*)、三叶真蟹 (*Carcinus maenas*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、大海虾 (*Panulirus interruptus*)、罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 的 *AST* 多肽比对, 得到保守的多肽及氨基酸种类(表 2)。

使用 clustalx 和 MEGA4.0 软件, 选取昆虫纲的果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (AF263923.1)、草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (AJ508906.1)、家蚕 (*Bombyx mori*) (AF309090.1)、德国小蠊 (*Blattella germanica*) (AF068061.1)、太平洋折翅蠊 (*Diploptera punctata*) (U00444.1)、长须蜚蠊 (*Supella longipalpa*) (AF068063.1)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (U66841.1)、散白蚁 (*Reticulitermes flavipes*) (FJ668632.1), 以及甲壳纲的大海虾 (*Panulirus interruptus*) (AB245091.1)、克氏螯虾 (*Procambarus clarkii*) (AB106899.1)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) (DQ088626.1) 11 个物种的 *AST* 氨基酸序列与青虾的 *AST* 氨基酸序列进行比对。分析显示, 青虾 *AST* 氨基酸序列与罗氏沼虾相似度为 100%, 与大海虾、克氏螯虾相似度在 95% 以上, 与太平洋折翅蠊、长须蜚蠊、埃及伊蚊、散白蚁的相似度为 85%—95% (表 3)。使用 MEGA4.0 软件构建 NJ 系统进化树<sup>[27]</sup>, 计算方法采用 Bootstrap 法重复计算 1000 次。进化树中甲壳纲和昆虫纲分为两支, 青虾与罗氏沼虾具有最近的亲缘关系, 与昆虫纲的进化关系相对远一些(图 1)。

## 2.3 青虾 *AST* 基因在不同组织内的表达分析

采用荧光定量 PCR 技术检测 *AST* 基因在青虾体内不同组织的表达情况。结果显示, 青虾 *AST* 基因在所有被检测组织中均有表达, 由高到低依次为: 肝胰脏>肠道>精巢>脑>心脏>卵巢(图 2)。在 qRT-PCR 实验中, 每个组织及其参照基因分别做了三个重复, 对得到的三组数值进行 *T* 检验  $P>0.05$ , 证明实验结果可靠。通过方差分析, *AST* 基因在肝胰脏中的表达量与其他 5 种组织相比存在显著差异 (\*\* $P<0.01$ ), 而在其他 5 种组织中均无显著差异 ( $P>0.05$ )。

表 2 青虾 *AST* 多肽前体的种类、重复次数及相应的氨基酸序列

Tab. 2 *AST* and amino acid sequences of *M. nipponense* *AST* peptides, as well as their copy numbers

AST 咽侧体抑制激素	Sequence 氨基酸序列	Copy number 重复次数
1	HNDYVFGL-NH <sub>2</sub>	1
2	SPGYSFGL-NH <sub>2</sub>	1
3*	DRAYSFGL-NH <sub>2</sub>	1
4	EGLYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
5	SGTYNFGL-NH <sub>2</sub>	1
6	GQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
7	SKTFSFGL-NH <sub>2</sub>	1
8*	VRLYFFGL-NH <sub>2</sub>	1
9	SQQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
10	PRHYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
11	PSSYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
12	PKNYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
13	DSDIQRPGQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
14	PQHYAFGL-NH <sub>2</sub>	4
15	PQQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
16*	PHHYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
17	AQQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
18	ASSYGFGL-NH <sub>2</sub>	1
19	AGQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
20*	GGHYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
21	SPYSFGL-NH <sub>2</sub>	1
22	PDAYSFGL-NH <sub>2</sub>	1
23	SRTYQFGL-NH <sub>2</sub>	1
24*	AGPYTFGL-NH <sub>2</sub>	1
25	ENQYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
26	AGHYSFGL-NH <sub>2</sub>	1
27	SSPYAFGL-NH <sub>2</sub>	3
28	SRPYAFGL-NH <sub>2</sub>	1
29	SGSYSFGL-NH <sub>2</sub>	1
30	VPGSYGFGL-NH <sub>2</sub>	1

注: 保守的氨基酸序列用粗体标出; 带星号标记的咽侧体抑制激素是青虾所特有的

Note: The conserved amino acids are marked with bold letters. *AST* marked by asterisks are specific peptides in *M. nipponense*

## 3 讨论

### 3.1 青虾 *AST* 多肽

青虾 *AST* 基因全长 cDNA 序列共编码 701 个氨基酸, 经蛋白酶水解能够转录并翻译出 35 个 *AST* 多肽, 其中 *AST*-14 重复了 4 次, *AST*-27 重复 3 次, 共 30 种。目前许多甲壳动物的 *AST* 多肽已被分离鉴定, 克氏螯虾鉴定出 29 个, 三叶真蟹鉴定出 20



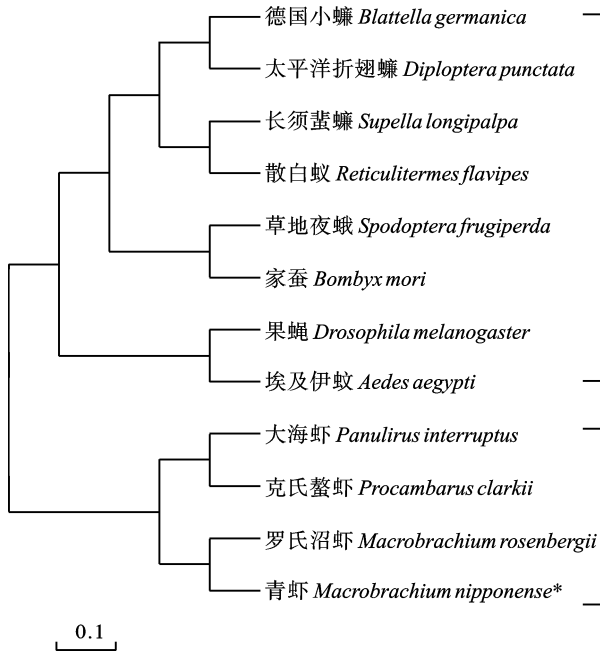


图1 基于青虾及其他甲壳动物和昆虫 AST 蛋白序列的 NJ 系统进化树

Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree analysis of *M. nipponense* AST protein with related crustaceans and insect vertebrate AST proteins

青虾 AST 用\*标记 *M. nipponense* AST is marked with asterisk

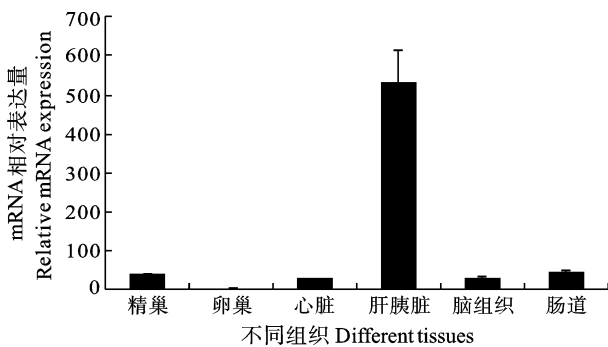


图2 qRT-PCR 方法检测 AST 基因在青虾不同组织内的表达 ( $P>0.05$ )

Fig. 2 Expression of AST mRNA in *M. nipponense* in different tissues by qRT-PCR ( $P>0.05$ )

个, 利莫斯螯虾鉴定出 3 个, 斑节对虾鉴定出 40 个, 大海虾鉴定出 39 个, 罗氏沼虾鉴定出 35 个。作者推测, 重复次数多的 AST 多肽可能在 AST 基因的生理功能中起到某种重要作用, 有待进一步研究。

昆虫 AST 多肽根据 C 末端序列不同, 可以分为三种类型<sup>[35]</sup>: 从蜚蠊中分离纯化出的 AST 多肽 C 末端都具有相似的酰胺化的氨基酸序列 Y/F-X-F-G-L, 称为 A 型-AST; 从蟋蟀中分离纯化出的 AST 多肽, C 末端都具有另一种酰胺化的氨基酸序列 W(X(6)),

即 B 型-AST; 最初由烟草天蛾中分离出的 AST 多肽, C 末端氨基酸未经过酰胺化, 为 C 型-AST。A 型-AST 是研究最为广泛的类型, 其 Y/F-X-F-G-L 序列对于抑制昆虫咽侧体保幼激素的合成是十分必要的<sup>[35]</sup>。

在本研究中青虾 AST 多肽的 C 末端都具有酰胺化的氨基酸序列 Y/F-X-F-G-L, 属于典型的 A 型-AST, 与昆虫中蜚蠊类 AST 多肽类型特征一致。其他已报道的甲壳类 AST 多肽也为 A 型。蛋白质的不同结构决定其多样性的功能。因此作者推测, 甲壳类 AST 多肽可能具有与蜚蠊类 AST 多肽相似的某种功能。

AST 多肽比对分析得到保守的氨基酸分别为 Tyr、Ala、Phe、Gly、Leu 五种。青虾 30 种 AST 多肽中, AST-3、8、16、20、24 在已知的其他甲壳动物中均未发现, 是青虾所特有的, 其他 25 种 AST 多肽与罗氏沼虾共有。其中 AST-19, 26 为青虾、罗氏沼虾、斑节对虾共同拥有, AST-29 为青虾、罗氏沼虾、大海虾共同拥有。青虾特有的 AST 多肽可能在蜕皮、生殖或者其他生理过程中起到与其他物种不同的作用。

### 3.2 系统进化

AST 氨基酸序列比对和进化树的分支情况显示, 青虾与罗氏沼虾的蛋白相似度最高, 此外与克氏螯虾、大海虾也具有较高的蛋白相似度。除了甲壳动物之间的 AST 氨基酸序列比对, 本研究还选取了部分昆虫纲动物与甲壳动物两两比对, 蛋白相似度都在 60% 以上, 由此推测 AST 多肽在无脊椎动物的进化上是相对保守的。甲壳动物和昆虫都具有周期性蜕皮、产卵繁殖的特性, 具有高蛋白相似度的 AST 多肽作为调节这两个重要功能的激素共同存在于甲壳动物和昆虫中, 也说明甲壳动物和昆虫的进化地位相近, 这与分类学上甲壳动物和昆虫同属于节肢动物门的分类结果是一致的。

### 3.3 组织差异表达

在昆虫中, AST 多肽被发现存在于多种组织中。例如检测到在德国小蠊的脑和肠道和太平洋折翅蠊的卵巢中有大量 AST 多肽的存在<sup>[7, 36, 34]</sup>; 在双斑蟋蟀的脑、肠道、卵巢、精巢中均有大量 AST 多肽的存在<sup>[9]</sup>。在甲壳动物中, 在罗氏沼虾<sup>[37]</sup>、利莫斯螯虾<sup>[12]</sup>、斑节对虾<sup>[19]</sup>、约拿蟹(*Cancer borealis*)<sup>[22, 23]</sup>、三叶真蟹<sup>[38]</sup>的以脑为中心的中枢神经系统中, 都检测到大量 AST 多肽, 这与 AST 多肽是由脑神经细胞

分泌是密不可分的。此外,肠道也是 AST 的主要分布区,在利莫斯螯虾<sup>[12]</sup>、约拿蟹<sup>[22, 23]</sup>肠道内分泌细胞中发现的 AST 多肽具有抑制肠道收缩的频率和幅度的功能<sup>[39]</sup>。心脏也含有部分 AST 多肽,克氏螯虾心包膜中发现的 AST 多肽,可以影响心脏收缩的频率<sup>[24]</sup>。精巢和卵巢含有少量 AST 多肽,克氏螯虾性腺 AST 多肽研究发现 AST 多肽能促进甲基化尼酯的产生,起到明显的促进性腺和卵成熟作用<sup>[40]</sup>。

以上 AST 多肽在不同组织中的存在情况都是基于免疫化学和神经生理学研究得到的。本研究采用荧光定量 PCR 技术检测了青虾 AST 基因在不同组织中的表达情况。青虾 AST 基因在 6 种被检测组织中均有表达,在肝胰脏中表达量最高,与其他组织表达量均达到极显著差异,其次在肠道和精巢中也具有较高的表达量,在脑和心脏中的表达量相对较低,在卵巢的表达量最低,组织间差异不显著。基因组分布表达情况可能与基因功能相关联,AST 基因在不同组织中具体的作用与功能还有待进一步研究。

本研究采用分段克隆法克隆得到青虾 AST 基因全长 cDNA 序列,并对其结构特征进行了分析和探讨,采用荧光定量 PCR 技术检测了该基因在青虾不同组织间的差异表达,研究结果可为青虾蜕皮及生殖发育相关基因的克隆研究奠定基础。同时为青虾 AST 基因后续功能的研究提供了参考资料。

#### 参考文献:

- [1] Stay B, Woodhead A P, Joshi S. Allatostatins neuropeptide inhibitors of juvenile hormone biosynthesis in brain and corpora allata of the cockroach *Diploptera punctata* [A]. In: Men J J, Kelly T J, Masler E P (Eds.). *Insect Neuropeptides* [C]. ACS Symposium Series 453. Washington DC: American Chemical Society. 1991, 164—176
- [2] Duve H, Wren P, Thorpe A. Innervation of the foregut of the cockroach *Leucophaea maderae* and inhibition of spontaneous contractile activity by allatostatin neuropeptides [J]. *Physiological Entomology*, 1995, **20**: 33—44
- [3] East P, Tregenza K, Duve H, et al. Identification of the dipteran Leuc-allatostatin peptide family: characterization of the prohormone gene from *Calliphora vomitoria* and *Lucilia cuprina* [J]. *Regulatory Peptides*, 1996, **67**: 1—9
- [4] Veelaert D, Devreese B, Schoofs L, et al. Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust *Schistocerca gregaria*: new members of the cockroach allatostatin family [J]. *Molecular and Cell Endocrinology*, 1996, **122**: 183—190
- [5] Martin D, Piulachs M D, Belles X. Allatostatin inhibits vitellogenin release in a cockroach [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, **839**: 341—342
- [6] Martin D, Piulachs M D, Belles X. Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1996, **121**: 191—196
- [7] Donly B C, Ding Q, Tobe S S. Molecular cloning of the gene for the allatostatin family of neuropeptides from the cockroach *Diploptera punctata* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, **90**: 807—811
- [8] Belles X, Graham L A, Bendena W G, et al. The molecular evolution of the allatostatin precursor in cockroaches [J]. *Peptides*, 1999, **20**: 11—22
- [9] Meyering-Vos M, Wu X, Huang J, et al. The allatostatin gene of the cricket *Gryllus bimaculatus* [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, **184**: 103—114
- [10] Vanden Broeck J, Veelaert D, Bendena W G, et al. Molecular cloning of the precursor cDNA for *Schistostatins* locust allatostatin-like peptides with myoinhibiting properties [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1996, **122**: 191—198
- [11] Veenstra J A, Noriega F G, Graf R, et al. Identification of three allatostatins and their cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Peptides*, 1997, **18**: 937—942
- [12] Dircksen H, Skiebe P, Abel B, et al. Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus* [J]. *Peptides*, 1999, **20**: 695—712
- [13] Abdel-Latif M, Meyering-Vos M, Hoffmann K H. Type-Allatostatin from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: molecular cloning, expression and tissue-specific localization [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2004, **56**: 20—32
- [14] Davey M, Duve H, Thorpe A, East P. Characterisation of the helicostatin peptide precursor gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, **29**: 1119—1127
- [15] Lenz C, Williamson M, Grimmelikhuijzen C J. Molecular cloning and genomic organization of an allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **273**: 26—31
- [16] Secher T, Lenz C, Cazzamali G, et al. Molecular cloning of a functional allatostatin gut/brain receptor and an allatostatin preprohormone from the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Biochemical Journal*, 2001, **276**: 52—60
- [17] Belles X, Graham L A, Bendena W G, et al. The molecular evolution of the allatostatin precursor in cockroaches [J]. *Peptides*, 1999, **20**: 11—22
- [18] Ding Q, Donly B C, Tobe S S, et al. Comparison of the allatostatin neuropeptide precursors in the distantly related cockroaches *Periplaneta americana* and *Diploptera punctata*

- [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, **234**: 737—746
- [19] Duve H, Johnsen A H, Scott A G, *et al.* Allatostatins of the tiger prawn *Penaeus monodon* (Crustacea: Penaeidea) [J]. *Peptides*, 2002, **23**: 1039—1051
- [20] Mangerich S, Keller R, Dircksen H. Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment-concentration hormone in two species of decapod crustaceans [J]. *MedSci Entry for Cell and Tissue Research*, 1986, **245**: 377—386
- [21] Mangerich S, Keller R, Dircksen H, *et al.* Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) and coexistence with PMRF-amide immunoreactivity in the eyestalks of two decapod crustaceans [J]. *MedSci Entry for Cell and Tissue Research*, 1987, **250**: 365—375
- [22] Skiebe P, Schneider H. Allatostatin peptides in the crab stomatogastric nervous system: inhibition of the pyloric motor pattern and distribution of allatostatin-like immunoreactivity [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1994, **194**: 195—208
- [23] Jorge-Rivera J, Marder Y E. Allatostatin decreases stomatogastric neuromuscular transmission in the crab *Cancer borealis* [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1997, **200**: 37—46
- [24] Kwok R, Rui Zhang J, Tobe S S. Regulation of methyl farnesoate production by mandibular organs in the crayfish *Procambarus clarkii*: a possible role for allatostatins [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, **51**: 367—378
- [25] Peng J X, Yin Q, Cui L. Molecular cloning of *litopenaeus vannamei* tcp-1-beta gene and analysis on its relationship with cold tolerance [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(4): 604—609 [彭金霞, 殷勤, 崔亮. 凡纳滨对虾 TCP-1-Beta 基因的克隆及其与耐寒性状的相关性. 水生生物学报, 2011, **35**(4): 604—609]
- [26] Liao S, Chen Y, Du F K, *et al.* Resistance of siGCRV transgenic rare minnow (*Gobiocypris rarus*) to grass carp reovirus [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 837—842 [廖莎, 陈芸, 杜富宽, 等. 抗草鱼出血病病毒转基因稀有鲫的初步研究. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 837—842]
- [27] Sun Y, Zhang Y C, Liu Y C. Cloning and expression analysis of molt-inhibiting hormone gene (Es-MIH) in *eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(2): 210—217 [孙妍, 张亦陈, 刘逸尘. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因全长 cDNA 克隆和重组表达. 水生生物学报, 2011, **35**(2): 210—217]
- [28] Duve H, Thorpe A. Distribution and functional significance of Leu-callatostatins in the blowfly *Calliphora vomitoria* [J]. *MedSci Entry for Cell and Tissue Research*, 1994, **276**(2): 367—379
- [29] Lange A B, Chan K K, Stay B. Effect of allatostatin and proctolin on antennal pulsatile organ and hindgut muscle in the cockroach *Diploptera punctata* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1993, **24**(2): 87—92
- [30] Dircksen H, Skiebe P, Abel B, *et al.* Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus* [J]. *Peptides*, 1999, **20**(6): 695—712
- [31] Skiebe P. Allatostatin-like immunoreactivity in the stomatogastric nervous system and the pericardial organs of the crab *Cancer pagurus*, the lobster *Homarus americanus*, and the crayfish *Cherax destructor* and *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 1999, **403**(1): 85—105
- [32] Stay B, Zhang J R, Tobe S S. Methyl farnesoate and juvenile hormone production in embryos of *Diploptera punctata* in relation to innervation of corpora allata and their sensitivity to allatostatin [J]. *Peptides*, 1990, **23**: 81—99
- [33] Bendena W G, Donly B C, Tobe S S. Allatostatins: a growing family of neuropeptides with structural and functional diversity [J]. *Annals of the New York Academy of Science*, 1999, **897**: 311—329
- [34] Garside C S, Koladich P M, Bendena W G, *et al.* Expression of allatostatin in the oviducts of the cockroach *Diploptera punctata* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **32**(9): 89—99
- [35] Zeng H M, Huang J S. Advances of research on insect neuropeptide allatostatin [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2003, **15**(3): 168—191 [曾辉明, 黄俊生. 昆虫神经肽 allatostatin 的研究进展. 生命科学, 2003, **15**(3): 168—191]
- [36] Aguilar R, Maestro J L, Vilaplana L, *et al.* Allatostatin gene expression in brain and midgut, and activity of synthetic allatostatins on feeding-related processes in the cockroach *Blattella germanica* [J]. *Regulatory Peptides*, 2003, **115**(3): 171—177
- [37] Yin G L, Yang J S, Yang W J. Molecular cloning and characterization of FGLamide allatostatin gene from the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Peptides*, 2006, **27**: 1241—1250
- [38] Duve H, Johnsen A H, Maestro J L, *et al.* Isolation and identification of multiple neuropeptides of the allatostatin superfamily in the shore crab *Carcinus maenas* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, **250**(3): 727—734
- [39] Francisco Martinez-Perez, Belunda S W Chang, Stephen S Tobe. FGLamide Allatostatin genes in Arthropoda: Introns early or late? [J]. *Peptides*, 2009, **30**: 1241—1248
- [40] Laufer H, Borst D, Baker F C, *et al.* Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean [J]. *Science*, 1987, **235**: 202—205



## CLONING, CHARACTERIZATION AND EXPRESSION OF FULL LENGTH cDNA ENCODING ALLATOSTATIN (AST) IN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE*

BU Xian-Fei<sup>1</sup>, LI Zhen-Zhen<sup>2</sup>, QIAO Hui<sup>2</sup>, FU Hong-Tuo<sup>1, 2</sup>, WU Yan<sup>2</sup>, GONG Yong-Sheng<sup>2</sup>,  
JIANG Su-Fei<sup>2</sup> and XIONG Yi-Wei<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fishery College Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Allatostatin (AST) is a type of neuropeptide, it is made up of a few to dozens of amino acid. In crustaceans, AST has a significant stimulatory effect on MF synthesis, which involved in moulting and reproduction, so it is suggesting that AST in crustaceans has a positive effect on moulting and reproduction. However, *AST* gene cloning and expression of crustaceans is rarely reported. To investigate gene cloning and expression of AST cDNA in *Macrobrachium nipponense*, we cloned *AST* gene in *M. nipponense* and used quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to detecting the expression of *AST* gene in various tissues. The cloned *AST* cDNA was 2995 bp in length containing a 242 bp 5' untranslated region (UTR), a 647 bp 3' UTR and a 2106 bp open reading frame (ORF). The ORF encoded a AST precursor polypeptide 701 amino acid residues, which can be hydrolyzed into 35 allatostatins at dibasic cleavage sites. These 35 allatostatins had a C-terminal Y/FXFGL-amide in common, which is the characteristics of A type-AST. On the basis the comparison of the amino acid sequences, five amino acids including Tyr, Ala, Phe, Gly and Leu were considered as conserved amino acids during evolution. According to the phylogenetic tree, the insects and crustaceans were divided into two branches through the comparison between different insect and crustaceans. *M. nipponense* had a closest relationship with *M. rosenbergii*. The result of qRT-PCR revealed that *AST* gene was expressed in all the tested tissues. The tissue' expression levels of AST were in the decreasing order hepatopancreas, intestines, testis, brain, heart, and ovary. Our research on *AST* gene clone and expression contributes to further researching of the function of AST in *M. nipponense*.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; Allatostatin (AST); Gene clone; Gene expression