

克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的 克隆及 mRNA 表达量的相对定量*

刘 红 崔 俊 颜 婕 蔡生力^①

(上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 从成熟的克氏原螯虾卵巢中提取总 RNA, 通过同源克隆得到了卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列, 长度为 506 bp, 在 NCBI 网站上进行比对后发现, 其与斑节对虾、短沟对虾、罗氏沼虾的卵黄蛋白原受体(VgR) cDNA 序列有较高的相似性。采用实时荧光定量 PCR 方法, 测定了卵巢不同发育时期卵巢和肝胰腺两个组织中卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达水平。结果显示, 卵巢是卵黄蛋白原受体基因表达的主要部位, 而肝胰腺只能检测到少量表达, 卵黄蛋白原受体基因在卵巢的卵原细胞增殖期相对表达量最高, 随后下降, 成熟期达到最低值, 恢复期开始回升。结合卵巢不同发育阶段卵巢质量的变化计算表达总量, 结果发现, 卵黄蛋白原受体基因的表达总量在卵原细胞增殖期为最低, 随后持续升高并至成熟期达到峰值, 恢复期急剧下降, 但仍略高于卵原细胞增殖期的表达量。此外, 运用所构建的系统进化树比较了克氏原螯虾 VgR mRNA 与其他物种间的遗传距离。

关键词 卵黄蛋白原受体; 克氏原螯虾; 克隆; 表达量

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0083-07

在卵生动物中, 雌性成熟的标志是卵黄蛋白的合成。卵黄蛋白是一种为胚胎提供营养物质的糖脂蛋白, 由卵黄蛋白原修饰而来(吴维福等, 2012)。在虾类中, 卵巢的外源卵黄蛋白原由肝胰腺合成, 通过血淋巴循环系统运输到卵巢, 被卵母细胞通过卵黄蛋白原受体介导的胞饮作用摄取, 在细胞内被酶解修饰成小分子量的卵黄相关蛋白并发挥其营养作用(Schneider, 1996; Willnow, 1997; Sappington *et al*, 1998)。卵黄蛋白原受体(Vitellogenin receptor, VgR)是低脂蛋白受体超家族中的一员, 在卵巢发育过程中与卵黄蛋白原结合, 起到受体介导的作用, 因此卵黄蛋白原受体在胚胎成熟的过程中有重要的作用。

目前, 已经公布了不少十足目虾、蟹类的卵黄蛋白原 cDNA 全序列, 针对甲壳动物卵黄蛋白原的合成部位的研究也较多(Tom *et al*, 1987; Yang *et al*, 2000)。但是关于卵黄蛋白原受体的 cDNA 全序列和 mRNA

表达量的研究很少。克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*) 分布在全球各地, 进入中国后, 已经成为重要的甲壳经济物种, 只是迄今为止, 克氏原螯虾的卵黄蛋白原受体序列及表达量的研究还未见报道。本研究以克氏原螯虾为研究对象, 克隆了卵黄蛋白原受体 mRNA 的部分序列, 并采用实时荧光定量 RT-PCR 相对定量法(Livak *et al*, 2001)对不同卵巢发育时期雌虾的卵巢和肝胰腺卵黄蛋白原受体 mRNA 表达水平进行分析, 从分子水平上探讨克氏原螯虾卵巢发育机理。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用克氏原螯虾雌虾, 平均体重为(10.90±4.55) g, 平均体长为(6.83±0.73) cm, 分别于 2012 年 5-8 月购自上海市浦东新区临港新城古棕路菜市场,

* 上海市教委创新项目(12YZ125)和上海高校水产学一流学科建设项目共同资助。刘 红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

① 通讯作者: 蔡生力, 教授, E-mail: slcai@shou.edu.cn

收稿日期: 2014-04-29, 收修改稿日期: 2014-07-25

在上海海洋大学繁殖发育实验室进行后续实验。以卵巢的颜色、形态及组织切片观察到的占主要比例的卵细胞的时相和进行统计分析的细胞直径大小为依据,将克氏原螯虾卵巢发育阶段分为6个时期,分别为卵原细胞增殖期、卵黄发生前期、初级卵黄发生期、次级卵黄发生期、成熟期和恢复期,每个发育阶段取3尾虾分析。

1.2 方法

1.2.1 克氏原螯虾卵巢质量测定 解剖克氏原螯虾雌虾,获得发育各时期卵巢样品,称量卵巢的质量,每个阶段的卵巢质量用3尾虾的卵巢质量平均值表示。

1.2.2 总RNA提取和cDNA合成 解剖克氏原螯虾雌虾,获得肝胰腺和卵巢样品,迅速将其置于液氮中冷冻,随后放置于液氮预冷过的无RNase的离心管内,并转移至-80℃保存。总RNA的提取按照Trizol(Invitrogen)试剂盒操作步骤提取,DEPC水溶解,保存于-80℃。提取的总RNA用微量分光光度计Nano-drop2000进行定量测定, A_{260nm}/A_{280nm} 在1.8-2.0之间,变性琼脂糖凝胶电泳证实RNA的完整性。用TaKaRa第一链合成试剂盒逆转录,参照说明书步骤操作,将反转录cDNA置于-20℃保存。

1.2.3 引物设计 参照GenBank中已知的十足目以及昆虫的卵黄蛋白原受体cDNA序列设计简并引物F1(5'-GAYTGYKMSGAYGGCTCTGACGAGA-3')和R1(5'-CCACAGTCATCCTCGCCRTC-3'),具体参考物种如下:*Macbrachium rosenbergii* (GU454802.1) (Roth *et al.*, 2012)、*Marsupenaeus japonicus* (AB304798.1) (Mekuchi *et al.*, 2008)、*Penaeus monodon* (EU024890) (Tiu *et al.*, 2008)、*Penaeus semisulcatus* (AY075108.1) (Michelis *et al.*, 2002)、*Aedes aegypti* (AY027888.1) (Cho *et al.*, 2001)、*Rhyparobia maderae* (AB255883.1) (Tiu *et al.*, 2008)。参照GenBank中已知克氏原螯虾18S cDNA序列以及克隆所得克氏原螯虾卵黄蛋白原受体部分序列,设计荧光定量PCR所用卵黄蛋白原受体引物和内参引物VgR-F (5'-TGTCCTCCTCACAGTTCACC-3')、VgR-R (5'-CATCGGCACAATCTGGGTCA-3')、18S-F (5'-CGCAAATTACCCACTCCCG-3')、18S-R (5'-GCACCAGACTTGCCCTCC-3')。

1.2.4 RT-PCR扩增和克隆测序 RT-PCR扩增体系为100 μl,产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收纯化片段,连接到PMD-19T载体,转化到DH5α菌株。采用PCR扩增法筛选阳性克隆,将挑选的阳性克隆菌液送往上海生工生物有限公司进行测序。

1.2.5 荧光定量RT-PCR扩增 荧光定量RT-PCR参照SYBR Premix *ExTaq*TM(TaKaRa)试剂盒说明书操作。每期取3个样品,共6个期,每个样品设置3个平行对照。荧光定量PCR(ΔΔCt法)扩增体系为20 μl,包括10 μl SYBR Premix *Ex Taq*TM (2×)、0.4 μl PCR Forward Primer (10 μmol/L)、0.4 μl PCR Reverse Primer(10 μmol/L)、0.4 μl ROX Reference Dye II (50×)、1.0 μl cDNA模板、7.8 μl ddH₂O。反应程序为95℃ 30 s; 95℃ 5 s,60℃ 34 s,40个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。

1.2.6 序列分析 根据所得克氏原螯虾卵黄蛋白原受体cDNA部分序列,结合已经发表的其他节肢动物的卵黄蛋白原受体cDNA全长序列,用MEGA 4.0软件的NJ法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。其他物种的卵黄蛋白原氨基酸序列均从NCBI中的GenBank下载,具体的物种分别为:*M. rosenbergii* (GU454802.1)、*M. japonicus* (AB304798.1)、*P. monodon* (EU024890)、*P. semisulcatus* (AY075108.1)、*A. aegypti* (AY027888.1)、*R. maderae* (AB255883.1)、*Caenorhabditis elegans* (CAA98143.1)。以线虫作为外延物种构建得到部分节肢动物卵黄蛋白原受体的系统进化树(NJ法)。

1.2.7 mRNA的差异表达、表达总量及贡献率的数据分析与计算方法 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体mRNA相对表达水平用Livak等(2001)建立的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,其中18S内参基因和目的基因均取9个数据(每期取3条虾,每条虾取3个平行样品)的平均值,扣除内参,进行相对表达量的计算,然后选取相对表达量最低的样本为校验样本(以表达量最低的样本作为1进行参照),计算目的基因的组织阶段相对表达量,结果用平均值±标准差表示,以此为依据分别计算不同组织(卵巢和肝胰腺)和不同发育阶段的表达量以及表达总量,计算公式如下:

组织阶段表达量=组织阶段相对表达量×该期组织(卵巢或肝胰腺)平均质量

组织各阶段表达总量=卵巢或肝胰腺在整个卵巢发育阶段的组织阶段表达量的总和

个体表达总量=卵巢和肝胰腺的组织各阶段表达总量之和

组织贡献率=卵巢或肝胰腺的组织各阶段表达总量占个体表达总量的百分比

采用SPSS 17.0统计软件进行数据的单因素方差分析(ANOVA)和Duncan多重比较检验统计差异, $P < 0.05$ 为差异显著。

1.2.8 mRNA 表达量的数据来源及计算方法 卵黄蛋白原 mRNA 表达量数据来源于本实验室未发表的研究结果(于改红), 数据来源方法如下: 通过雌性克氏原螯虾卵巢总 RNA 提取、cDNA 反转录、卵黄蛋白原序列引物设计和克隆测序得到克氏原螯虾卵黄蛋白原部分 cDNA 序列, 利用此序列和 18S 内参基因进行实时荧光定量 PCR, 得到不同卵巢发育时期卵黄蛋白原在卵巢和肝胰腺的表达量。其中表达量的计算参考卵黄蛋白原受体的计算方法。

2 结果

2.1 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的克隆

以克氏原螯虾卵巢总 RNA 为模板, 扩增产出 VgR cDNA 片段, 测序得知产物长度为 506 bp, 序列结果如图 1 所示。将所得序列在 NCBI 上 BlastX 比对, 发现该序列与日本囊对虾、短沟对虾、斑节对虾、罗氏沼虾的卵黄蛋白原受体氨基酸序列相似度分别为 52%、51%、51%、40%。如图 2 所示, 由部分节肢动物卵黄蛋白原受体的系统进化树分析可知, 节肢动物卵黄蛋白原受体在系统进化树中分为两簇: 埃及伊

5'-GATTGTTACGATGGCTCTGACGAGATCAACTGCACAATGT
CATGTCCTCCTCACAAAGTTCACCTGTAAGGATGGGACCTGCA
TACCATCTTTGTGGCAGTGTGACGGAGGCGAGGACTGCACA
GATGGCTCTGATGAGCAAGACTGCCAGTAAACTGCAAGGT
GGGAGAATTCATGTGCAGCAACAAGCAATGTGTCCCACTGT
ATGTGACATGTGATGGTGACCCAGATTGTGCCGATGGGTCT
GATGAGAGCCCCACAAAATGTTTCAGTCATACCTCCTAACTT
GCCAGTGGTGTGCCCTAGTGGCCATGTAATGTGTGCTCTCAG
CCCTTCAAACTTGAACCAATATGCATCCCAAGCACTGCTGT
GTGCGATGGTAAGCGGACTGTCCTCAGGAGGATGATGAGG
ACTGTACGTGGTGTTCACAATATGAGTTTCATTGTGCACAGAA
CGGATCGTTGCATTCCATTGAGGTGGGTGTGTGATGGCGAG
GATGACTGTGG-3'

图 1 克氏原螯虾 VgR cDNA 部分序列(506 bp)

Fig.1 Partial cDNA sequence of VgR of *P. clarkia* (506 bp)

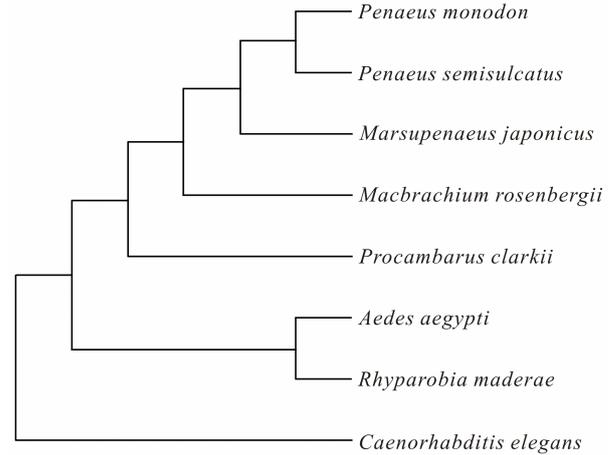


图 2 克氏原螯虾等部分节肢动物的 VgR 系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of VgR among some arthropod species

P. clarkia: 克氏原螯虾; *M. rosenbergii*: 罗氏沼虾;
M. japonicus: 日本囊对虾; *P. monodon*: 斑节对虾;
P. semisulcatus: 短沟对虾; *A. aegypti*: 埃及伊蚊;
R. maderae: 马德拉蜚蠊; *C. elegans*: 秀丽广杆线虫

蚊和马德拉蜚蠊等昆虫聚为一簇, 而包括克氏原螯虾在内的甲壳动物聚为另外一簇。在所分析的几种甲壳动物中, 克氏原螯虾与罗氏沼虾的遗传距离相对较近, 而与日本囊对虾、短沟对虾、斑节对虾等遗传距离相对较远, 作为外延物种的秀丽广杆线虫与所有的节肢动物独立分开。

2.2 卵巢和肝胰腺中卵黄蛋白原受体 mRNA 的差异表达

在不同卵巢发育时期, 卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的相对表达量见表 1。从表 1 可见, 卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达量在卵巢与肝胰腺中差异较大, 卵巢远远大于肝胰腺, 二者比值从卵黄发生前期的 1000 多倍到成熟期的 30 倍左右。肝胰

表 1 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的相对表达量

Tab.1 The relative expression of vitellogenin receptor mRNA in ovary and hepatopancreas at different ovarian developmental stages

卵巢发育时期 Ovarian developmental stage	卵巢 VgR 表达量 Expression of VgR in ovary	肝胰腺 VgR 表达量 Expression of VgR in hepatopancreas	比值 (卵巢/肝胰腺) Ratio O/H
卵原细胞增殖期 Oogonium proliferation stage	1302.7±198.1 ^c	9.6±0.9 ^{cd}	135.7 : 1
卵黄发生前期 Pre-vitellogenesis stage	1158.6±177.6 ^c	1.0±0.2 ^a	1158.6 : 1
初级卵黄发生期 Primary vitellogenesis stage	641.7±35.6 ^b	2.8±0.8 ^{ab}	229.2 : 1
次级卵黄发生期 Secondary vitellogenesis stage	436.5±65.1 ^b	8.5±1.9 ^c	51.4 : 1
成熟期 Mature stage	138.1±8.2 ^a	4.7±1.2 ^b	29.4 : 1
恢复期 Recovery stage	646.5±113.1 ^b	11.2±0.1 ^d	57.7 : 1

注: 同一列数值右上角标有不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)

Note: Data within the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

表 2 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的表达量以及贡献率

Tab.2 The relative expression and contribution ratio of vitellogenin receptor mRNA in ovary and hepatopancreas at different ovarian developmental stages

卵巢发育时期 Ovarian developmental stage	卵巢 Ovary		肝胰腺 Hepatopancreas		各期表达比值 (卵巢/肝胰腺) Expression ratio at different stages (O/H)
	表达量 Expression	占总量的百分比 Percentage of total expression(%)	表达量 Expression	占总量的百分比 Percentage of total expression(%)	
卵原细胞增殖期 Oogonium proliferation stage	13.1±1.9 ^a	5.3	11.2±1.1 ^b	16.2	1.2 : 1
卵黄发生前期 Pre-vitellogenesis stage	34.7±5.3 ^{bc}	14.2	1.5±0.3 ^a	2.2	23.1 : 1
初级卵黄发生期 Primary vitellogenesis stage	44.9±2.5 ^{cd}	18.3	4.9±1.4 ^a	7.1	9.2 : 1
次级卵黄发生期 Secondary vitellogenesis stage	52.3±7.8 ^d	21.3	18.9±4.2 ^c	27.3	2.8 : 1
成熟期 Mature stage	67.7±4.1 ^e	27.6	16.2±4.2 ^c	23.4	4.2 : 1
恢复期 Recovery stage	32.3±5.7 ^b	13.2	16.6±0.1 ^c	23.9	1.9 : 1
卵巢/肝胰腺表达总量 Total expression O/H		245		69.3	
贡献率 Contribution(%)		77.9		22.1	

注：同一列数值右上角标有不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)；占表达总量的百分比=组织阶段表达量/组织各阶段表达总量 $\times 100\%$

Note: Data within the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$); Percentage of total expression=Expression in each stage/Total expression in each stage $\times 100\%$

腺中，卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达量一直处于极低水平，在整个卵巢发育周期中有一定波动，卵原细胞增殖期、次级卵黄发生期和恢复期相对表达量较高，卵黄发生前期和初级卵黄发生期相对表达量较低，恢复期与卵黄发生前期的表达量相差近 10 倍，差异显著($P < 0.05$)。

在卵巢中，卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达量一直处于较高水平，而且随着卵巢的发育有明显的变化，在卵原细胞增殖期时相对表达量为最高，卵黄发生前期有所下降，到成熟期降至最低，随后的恢复期显著回升至接近初级卵黄发生期的水平($P < 0.05$)。卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵原细胞增殖期与卵黄发生前期的卵巢中处于较高表达水平，二者差异不显著($P > 0.05$)；初级卵黄发生期比卵黄发生前期相对表达量显著下降($P < 0.05$)，成熟期的最低水平与次级卵黄发生期以及恢复期均差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中表达总量的变化及贡献率

随着卵巢的发育，克氏原螯虾卵巢的质量发生了剧烈的变化，由卵原细胞增殖期的平均 0.01 g 增加到成熟期的平均 0.49 g，增加了近 50 倍，因而卵巢中卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量也随之变化(表 2)，呈

现出与卵巢相对表达量近乎完全相反的结果，即：在卵原细胞增殖期为最低，表达量随卵巢的发育而增加，成熟期达到峰值，恢复期显著下降($P < 0.05$)，但仍略高于卵原细胞增殖期的表达量，其中卵黄发生前期的表达量约为卵原细胞增殖期的 3 倍，差异显著($P < 0.05$)，而成熟期表达量的峰值也显著高于其他任何发育时期($P < 0.05$)。结合卵巢在整个发育阶段中卵黄蛋白原受体 mRNA 的总表达量以及各阶段表达量所占比例，仅次级卵黄发生期和成熟期就占到 48.9%，接近一半，而卵原细胞增殖期仅占 5.3%。

肝胰腺的质量在克氏原螯虾卵巢发育过程中变化不大，由卵原细胞增殖期的平均 1.17 g 增加到成熟期的平均 3.46 g，大约增加了两倍，反映在卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量上变化也不太剧烈，除卵黄发生前期和初级卵黄发生期显著较低(二者占肝胰腺卵黄蛋白原受体 mRNA 总表达量的 9.3%)，其他各时期均比较接近(表 2)。

从卵巢和肝胰腺各期卵黄蛋白原受体 mRNA 表达量比值看，卵巢和肝胰腺在卵黄发生前期表达量相差最大，卵巢的表达量约为肝胰腺的 23.1 倍，在卵原细胞增殖期两者表达量基本相当，差异最小(1.2 倍)。从整个卵巢发育时期看，卵巢在各期卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量均高于肝胰腺，最终结果是：在克氏

表 3 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 和卵黄蛋白原 mRNA 主要合成部位的表达量和各期占表达总量比值
Tab.3 Total expressions and proportion of vitellogenin receptor mRNA and vitellogenin mRNA in the main synthesis site at different ovarian developmental stages

卵巢发育时期 Ovarian developmental stage	卵巢 VgR 表达量 Expression of VgR in ovary	肝胰腺 Vg 表达量 Expression of Vg in hepatopancreas	卵巢 VgR 各期占表达总量 VgR total expression of in ovary	肝胰腺 Vg 各期占表达总量 Vg total expression in hepatopancreas
卵原细胞增殖期 Oogonium proliferation stage	28.9±4.4	3.6±1.4	0.005	0*
卵黄发生前期 Pre-vitellogenesis stage	77.2±11.8	37.2±7.7	0.142	0*
初级卵黄发生期 Primary vitellogenesis stage	99.8±5.5	150±108.8	0.183	0*
次级卵黄发生期 Secondary vitellogenesis stage	116.4±17.3	11680±318.4	0.214	0.245
成熟期 Mature stage	150.3±9.1	23120±426.3	0.276	0.752
恢复期 Recovery stage	71.8±12.5	18.8±28.9	0.132	0*

注: VG 数据引用于本实验室于改红的研究结果, 没有正式发表。*为数值太小, 近似于 0

Note: The data of VG cited from not-published results of YU Gaihong in our laboratory. * means the number is small and close to 0

原螯虾卵巢发育的整个阶段中, 卵巢中卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量占 77.9%, 肝胰腺为 22.1%, 相差两倍以上(表 2)。

3 讨论

关于十足目甲壳动物卵黄蛋白原受体的研究目前还不多, 其 cDNA 全序列目前也仅有 Roth 等(2012)和 Tiu 等(2008)报道, 另外为 cDNA 部分序列(Mekuchi *et al.*, 2008; Tiu *et al.*, 2008), 基本集中在对虾(3 条)和沼虾(1 条), 螯虾类还未见报道。本研究首次克隆了克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 的部分序列, 由所获得的部分序列可知卵黄蛋白原受体的 cDNA 序列在已知的 5 种十足目甲壳动物中比较保守, 其氨基酸序列相似度在 40% 以上。与昆虫相比, 5 种十足目甲壳动物自己聚为一簇, 选用的两种昆虫另成一簇, 与线虫分开, 初步判断卵黄蛋白原受体基因在进化过程中在节肢动物内具有一定的保守性。

对卵黄蛋白原受体蛋白合成部位的研究发现, 在昆虫中, 卵黄蛋白原受体 mRNA 主要是在成虫的卵母细胞中表达(Tufail *et al.*, 2005、2007; Cho *et al.*, 2001); 在十足目甲壳动物的斑节对虾和罗氏沼虾中, 也只是在卵巢中检测到卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达, 在其他组织如眼柄、肌肉、心脏、血液、鳃、神经、游泳足(Tiu *et al.*, 2008)以及肝胰腺(Roth *et al.*, 2012)均未能检测到卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达。在本研究中, 卵巢和肝胰腺均检测到卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达, 只是肝胰腺中的表达量相对较低, 约

为卵巢和肝胰腺表达总量的 20%, 其余大约 80% 的卵黄蛋白原受体 mRNA 是在卵巢中表达; 卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量也随卵巢发育进程而变化, 卵巢中的相对单位表达量在卵原细胞增殖期最高, 成熟期降至最低, 而考虑了卵巢质量变化后, 卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量则呈现与其相对表达量相反的变化, 卵原细胞增殖期最低, 随卵巢发育增加, 成熟期到达峰值。斑节对虾卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量和罗氏沼虾的结果与它们的相对单位表达量结果相似, 即在卵巢发育早期相对表达量高, 后期下降, 这也说明十足目甲壳动物在卵黄蛋白原的合成中具有相对相似的变化趋势。

虽然卵原细胞增殖期的卵巢卵黄蛋白原受体 (VgR)mRNA 单位相对表达量最高, 此时卵巢的质量却是最小的, 卵巢实际表达的卵黄蛋白原受体不会太多; 到成熟期时卵巢卵黄蛋白原受体 mRNA 单位相对表达量是卵原细胞增殖期的大约 10%, 但是卵巢的质量却增加了近 50 倍, 此时卵巢实际表达的卵黄蛋白原受体显著高于其他各发育阶段, 这也符合卵巢发育及卵黄蛋白原合成的规律。结合分析卵黄蛋白原 mRNA 的 (Vg) 表达情况(表 3, 本实验室待发表的结果), Vg mRNA 在克氏原螯虾的主要表达部位是肝胰腺, 其表达量随卵巢的发育不断上升, 成熟期达到峰值, 这与卵巢中 VgR mRNA 的表达量变化趋势完全一致, 而克氏原螯虾 Vg 的合成方式以外源性合成为主, 肝胰腺合成的 Vg 经循环系统到达卵巢, 卵母细胞通过受体(即 VgR)介导的方式从周围摄取 Vg 供其

发育。而本研究中在肝胰腺检测到 VgR mRNA, 可能是因为 Vg 还参与肝胰腺中其他脂蛋白的运输和调控作用或者是 VgR 参与转运极低密度脂蛋白(Stifani, 1990; Mac-Lachlan *et al*, 1994)之故。

参 考 文 献

- 吴维福, 李郁娇, 黎东, 等. 三丁基锡对罗氏沼虾卵黄蛋白原(VTG)表达和性腺发育的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 77-83
- Cho KH, Raikhel AS. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Insect Mol Biol*, 2001, 10(5): 465-474
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- Mac-Lachlan I, Nimpf J, Schneider WJ. Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *J Biol Chem*, 1994, 269 (39): 24127-24132
- Mekuchi M, Ohira T, Wilder MN. Characterization and expression of the putative ovarian lipoprotein receptor in the Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool Sci*, 2008, 25(4): 428-437
- Michelis R, Meron H, Tietz A, *et al*. Putative ovarian lipoprotein receptor in the shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Marine Biology and Biotechnology Israel Oceanographic and Limnological Research Tel Shikmona - POB 8030, Haifa 31080, Israel*, 2002
- Roth Z, Khalaila I. Identification and characterization of the vitellogenin receptor in *Macrobrachium rosenbergii* and its expression during vitellogenesis. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(7): 478-487
- Schneider WJ. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *Int Rev Cytol*, 1996, 166: 103-137
- Stifani S. A single chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1990, 87(5): 1955-1959
- Sappington TW, Raikhel AS. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28(5-6): 277-230
- Tiu SHK, Benzie J, Chan SM. From hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin. *Biol Reprod*, 2008, 79(1): 66-74
- Tufail M, Takeda M. Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37(3): 235-245
- Tom M, Goren M, Ovadia M. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Int J Invert Reprod Dev*, 1987, 12(1): 1-12
- Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med*, 1999, 77(3): 306-315
- Yang WJ, Ohira T, Tsutsui N, *et al*. Determination of amino acid sequence and site of mRNA express of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Exp Zool*, 2000, 287(6): 413-422

(编辑 冯小花)

Cloning and Relative Quantification Analysis of Expression of the Partial Vitellogenin Receptor cDNA/mRNA of the Crayfish *Procambarus clarkii*

LIU Hong, CUI Jun, YAN Jie, CAI Shengli^①

(College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In oviparous animals, vitellin (Vt) and vitellogenin (Vg) are of importance for early embryonic development. Vitellogenin molecules are transported into a developing egg cell through vitellogenin receptor-mediated endocytosis. At present most studies of vitellogenesis have emphasized on vitellogenin. Here we analyzed the expression of vitellogenin receptor (VgR) mRNA in order to elucidate the dynamic relationship between vitellogenin and its receptor. Total RNA was extracted from ovary and hepatopancreas of the crayfish *Procambarus clarkii* at different ovarian developmental stages. A partial cDNA fragment of 506 bp was cloned with RT-PCR using degenerated primers. Relative VgR expression levels were compared between ovary and hepatopancreas of *P. clarkii* at different ovarian developmental stages using real-time fluorescent quantitative RT-PCR. It was found that in *P. clarkii*, ovary was the major organ that expressed VtR gene and there was also VgR mRNA in hepatopancreas. During the development of ovary, the relative VgR expression reached its climax at the beginning (the oogonium proliferation stage) and then decreased along with the developmental process until it reached the minimum at the mature stage. Considering the quantity changes in ovary during the whole developmental stages, the total relative VgR expression level was calculated as the relative VgR expression level multiplied by the mean value of ovary quantity at each developmental stage. It showed an opposite trend that the minimum appeared at the beginning (the oogonium proliferation stage) and the expression level constantly increased along with the developmental process until it reached the maximum at the mature stage. The total relative VgR expression level was similar to the Vg expression level in ovary and hepatopancreas in *P. clarkia*, which was an indicator of the relationship of the receptor and its target molecule between VgR and Vg. The present study was the first report of the relationship between vitellogenin and its receptor in Decapoda crustaceans in terms of the mRNA expression. Furthermore, we constructed the phylogenetic tree based on VgR sequences to evaluate the evolutionary relationship between *P. clarkii* and the other arthropod species.

Key words *Procambarus clarkii*; Vitellogenin receptor; Cloning; Expression

① Corresponding author: CAI Shengli, E-mail: slcai@shou.edu.cn