

凡纳滨对虾繁育相关基因*Allatostatin-AR*的克隆与表达分析

骆永丽, 刘红, 刘志伟, 戴习林, 王怡悦, 朱启飞

Cloning and expression of breeding-& development-related gene *Allatostatin-A receptor* from *Litopenaeus vannamei*

LUO Yongli, LIU Hong, LIU Zhiwei, DAI Xilin, WANG Yiyue, ZHU Qifei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503463>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

克氏原螯虾泛素结合酶E2基因的克隆及其在卵巢中的表达分析

Cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2 gene of *Procambarus clarkii*

上海海洋大学学报. 2018, 27(6): 814 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180402288>

4种饵料对选育中间养成阶段的凡纳滨对虾投喂效果分析

Effects of four diets on the growth performance in *Litopenaeus vannamei* during the middle stage of selective breeding

上海海洋大学学报. 2021, 30(2): 266 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191102866>

三角帆蚌中*WNT4*基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

三角帆蚌*KLHL10*基因的特征和表达分析

Characterization and expression analysis of *KLHL10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 389 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402983>

摘除眼柄与注射眼柄粗提物对凡纳滨对虾性腺发育相关基因表达的影响

Effects of the eyestalk hormones and eyestalk ablation on the gene expressions related gonadal development of *Litopenaeus vannamei*

上海海洋大学学报. 2016, 25(3): 344 <https://doi.org/10.12024/jsou.20150901551>

文章编号: 1674-5566(2023)01-0020-11

DOI:10.12024/jsou.20210503463

凡纳滨对虾繁育相关基因 *Allatostatin-AR* 的克隆与表达分析

骆永丽^{1,2}, 刘红^{1,2}, 刘志伟^{1,2}, 戴习林^{1,2}, 王怡悦^{1,2}, 朱启飞^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 咽侧体抑制素主要抑制昆虫咽侧体保幼激素的分泌, 是昆虫体内重要的神经肽, 在甲壳动物体内可能参与繁殖发育的调节。本研究利用 RACE PCR 技术对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) A 型咽侧体抑制素受体 (*Allatostatin-A receptor*, *AST-AR*) 基因进行克隆, 获得全长为 2 650 bp 的 cDNA, 包括 1 425 bp 的开放阅读框, 1 170 bp 5' 非编码区, 55 bp 3' 非编码区, 编码 474 个氨基酸, 形成具有 7 个跨膜区的不稳定亲水性蛋白。同源性和系统发育分析结果表明凡纳滨对虾 *AST-AR* 基因与斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、美洲龙虾 (*Homarus americanus*) 同源性最高, 亲缘关系最近。氨基酸多重序列比对结果显示 *AST-AR* 氨基酸 TM7 后 C 末端精氨酸在不同物种之间高度保守。实时荧光定量 PCR 结果显示, *AST-AR* 基因在雌、雄凡纳滨对虾多个组织 (眼柄、脑、胃、肝胰腺、鳃、性腺、肠、肌肉) 中均有表达, 除脑组织外 *AST-AR* 基因在雌性凡纳滨对虾中相对表达量高于雄性。在幼体发育中, *AST-AR* 基因的相对表达量随发育阶段上升, 同时该基因在不同群体仔虾生长对比实验中表达量差异显著。据此推测 *AST-AR* 基因参与凡纳滨对虾的繁殖、幼体发育、幼虾生长到成虾, 基因表达基本贯穿凡纳滨对虾的一生。

关键词: *Allatostatin-A receptor*; 凡纳滨对虾; 繁殖; 发育; 基因克隆; 表达

中图分类号: Q 71 **文献标志码:** A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界上养殖范围最大的虾类之一, 2019 年的中国渔业统计年鉴表明, 凡纳滨对虾养殖产量约占虾类总产量的 79%^[1]。凡纳滨对虾肉质丰富、口味鲜美、含有人体所需的各种矿物质, 逐渐成为消费者追捧的美食^[2-3]。除此之外, 凡纳滨对虾具有抗病力强、存活率高、养殖周期短、生长速度快等优点, 深受养殖户的喜爱, 在我国的虾类养殖规模和产量、产值方面多年来稳居第一^[4-5]。由于凡纳滨对虾是外来引进品种, 种源和种质问题已经严重制约了我国凡纳滨对虾产业的可持续发展。为培育出我国自己的优良凡纳滨对虾养殖品系, 有必要对凡纳滨对虾繁殖发育相关基因进行研究。

由于对虾的种虾价高量少, 其调控繁殖的基因研究相对较少。咽侧体抑制素 (*Allatostatin*,

AST) 是昆虫体内一组非常重要的神经肽, 最初是从蟑螂 (*Diploptera punctata*) 中分离得到的, 因抑制了咽侧体保幼激素的生物合成而得名^[6]。根据结构特点, 咽侧体抑制素被划分为 3 组: A-型咽侧体抑制素 (*AST-A*)^[7]、B-型咽侧体抑制素 (*AST-B*)^[8] 及 C-型咽侧体抑制素 (*AST-C*)^[9]。研究发现 A-型咽侧体抑制素可能参与调节甲壳动物生殖繁育的过程。在青虾中, *AST-A* 参与刺激大颚腺 (*Mandibular organs*, *MO*) 中甲基法尼酯 (*Methyl farnesoate*, *MF*) 的生物合成, 从而促进蜕皮以及性腺的成熟^[10]。在黏虫中, *AST-A* 抑制调节生殖发育的保幼激素的合成^[11]。在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中, *AST-A* 以神经分泌和自分泌两种方式抑制卵巢发育^[12]。*AST-A* 能够激活特定的 G 蛋白偶联受体, 即 A 型咽侧体抑制素受体 (*Allatostatin-A receptor*, *AST-AR*)。DEVECI

收稿日期: 2021-05-31 修回日期: 2021-09-03

基金项目: 上海市科技兴农项目 (2019-02-08-00-F01111)

作者简介: 骆永丽 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为凡纳滨对虾良种繁育。E-mail: 2605203817@qq.com

通信作者: 刘红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

等^[13]发现在果蝇中 *AST-A* 及其受体信号系统有助于协调幼虫的生长与性腺成熟的开始。在长红锥蝽 (*Rhodnius prolixus*) 中, *AST-AR* 基因在雌性性腺中相对表达量高于雄性, 且参与生殖过程调节^[14]。近几年, 在蜜蜂 (*Apis mellifera*)^[15]、按蚊 (*Anopheles Mosquitoes*)^[16]、温室希蛛 (*Parasteatoda tepidariorum*)^[17] 等生物体中有关 *AST-AR* 基因的功能研究也相继被报道。*AST-AR* 在节肢动物昆虫中研究比较详细, 在甲壳动物虾蟹类中的工作起步较晚, 主要集中在真虾和螯虾中, 对虾尤其是凡纳滨对虾中还未见相关工作。为探究 *AST-AR* 基因在凡纳滨对虾繁殖发育中的可能作用, 本实验首先克隆 *AST-AR* 基因, 通过基因结构分析、基因表达的雌雄差异、发育阶段的基因表达差异来探究该基因与对虾繁育的可能联系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

AST-AR 基因克隆所需的凡纳滨对虾购自上海市浦东新区古棕路菜市场, 体长 9~12 cm, 体质量 10~20 g。取凡纳滨对虾的脑组织, 保存于 RNAsafe 稳定液 (上海翊圣生物科技有限公司) 中, -80 °C 冰箱保存备用。

AST-AR 基因表达的雌雄差异、组织差异及发育阶段所需的凡纳滨对虾来自上海海洋大学大洋山基地。挑选精巢发育成熟的雄虾和发育至成熟期的雌虾, 各 3 尾, 解剖获取脑、眼柄、鳃、肝胰腺、胃、肠、肌肉、性腺组织, 以及溞状幼体 300 mg、糠虾幼体 300 mg、仔虾第 1 天个体 9 尾、仔虾第 10 天个体 9 尾, 置于 RNAsafe 稳定液 (上海翊圣生物科技有限公司) 中, -80 °C 冰箱保存备用。

另外选取即将进行生长对比试验的 4 个群体凡纳滨对虾仔虾, 待生长对比试验结束后分别解剖获得其肠组织, 液氮速冻, -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

提取凡纳滨对虾上述样品的总 RNA (Total RNA Extractor 试剂盒, TaKaRa), Nanodrop 2000 核酸蛋白检测仪检测提取的总 RNA 质量浓度和 OD 值, 琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。cDNA 合成后 (SMARTer RACE 5'/3' kit 试剂盒) -20 °C

冰箱保存备用。

1.2.2 *Allatostatin-A receptor* 基因全长克隆

在本实验室前期的凡纳滨对虾脑神经节转录组中搜索到类似 *AST-AR* 基因的 Unigene, 长度为 1 208 bp。NCBI 数据库 Blast 比对搜索获得凡纳滨对虾的 *Allatostatin-A receptor-like* (GeneBank 登录号: 113814646) 预测序列 (2 646 bp)。在两条序列的保守区域设计引物 (表 1), 以合成的 cDNA 第一链为模板, 进行该基因保守片段的扩增。扩增体系 50 μL: Mix 25 μL (上海翊圣生物科技有限公司), ddH₂O 17.5 μL, 上下游引物 (53F/53R) 各 2.5 μL, cDNA 2.5 μL; PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s; 57 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 90 s; 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 符合实验要求的扩增产物进行胶回收 (琼脂糖凝胶回收试剂盒, 天根生物科技有限公司)。回收产物克隆 (pMDTM-19-Vector, TaKaRa, 大连), 菌液直接测序 (上海生工)。根据获得的保守片段序列设计特异性引物 5R3、5R1 (5' RACE) 和 2F (3' RACE), 扩增 *AST-AR* 基因 RACE 片段 (SMARTer RACE 5'/3' kit 试剂盒, TaKaRa)。最后用 DNAMAN 软件对测序结果 (图 1) 进行拼接获得 *AST-AR* 基因 cDNA 全长, 再据此设计引物 (表 1, YZF/YZR) 进行全长验证。实验引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2.3 *Allatostatin-A receptor* 基因序列分析

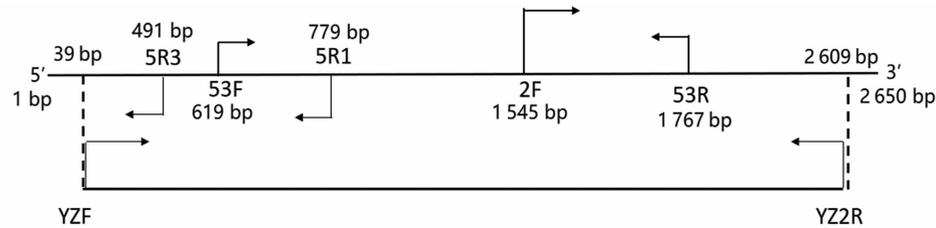
将多个 PCR 扩增产物的测序结果去除接头等再拼接获得 cDNA 全长。利用表 2 中的软件对 *AST-AR* 基因序列、编码蛋白结构进行分析。

1.2.4 凡纳滨对虾 *Allatostatin-A receptor* 基因表达分析

为研究 *AST-AR* 基因在雌、雄个体不同组织, 不同幼体发育阶段以及不同生长特性的养殖群体中的表达情况, 采用 SYBR Green Pro Taq HS qPCR Kit (艾克瑞生物科技有限公司) 进行实时荧光定量 PCR 实验, 以凡纳滨对虾 18S 核糖体基因表达量为内参, 内参基因和样品各重复 4 次。实时荧光定量 PCR 反应体系 20 μL: SYBR 10 μL、上下游引物各 0.4 μL、模板 0.2 μL、ddH₂O 9 μL; 实时荧光定量 PCR 反应程序为: 95 °C 2 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。使用 2^{-ΔΔC_t} 法计算凡纳滨对虾 *AST-AR* 基因的相对表达量, 数

值采用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。使用 SPSS 20.0 软件的 One-Way ANOVA 统计分析,

$P < 0.05$ 代表差异显著。利用 Excel 2016 软件作图。



53F/53R. 保守片段扩增引物; 5R1, 5R3. 5'RACE 片段扩增引物; 2F. 3'RACE 片段扩增引物; YZF/YZ2R. 全长验证扩增引物。

53F/53R. conservative fragment amplification primers; 5R1, 5R3. 5' RACE fragment amplification primers; 2F. 3' RACE fragment amplification primer; YZF/YZ2R. full length validation amplification primers.

图 1 *AST-AR* 基因分段过程克隆示意图

Fig. 1 Fragmented cloning diagram of *AST-AR* gene

表 1 基因所用引物

Tab. 1 Primers used in gene cloning

PCR 反应 PCR reaction	所用引物代号 Primers	扩增产物长度 Length of expected product/bp	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
5'RACE	5R3	491	CCGATTTCCTTCCGTTCT
	5R1	288	TGTGTGAAAATCCGTATGG
扩增核心片段 Amplification of core fragment	53F	1 148	GGTTGGCACTCCCTTACT
	53R		GACGCACGAGCCCAGAAT
3'RACE	2F	1 105	CGTCCCTTTCACGGCTTC
全长验证 Full length verification	YZF	2 146	TCAGACAGCAATCAAGCACC
	YZ2R		TCGTAAGGAAGTCACTCTGG
荧光定量 PCR Real-time PCR	18SF	133	CCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTT
	18SR		GCAGATGCTTTCGCACTAGCT
	1F	140	CATCATCTTCTCGTTGGCTTTTC
	1R		GACGCAGAAGACGATGAAGAGG

表 2 利用生物学信息软件分析 *AST-AR* 基因序列

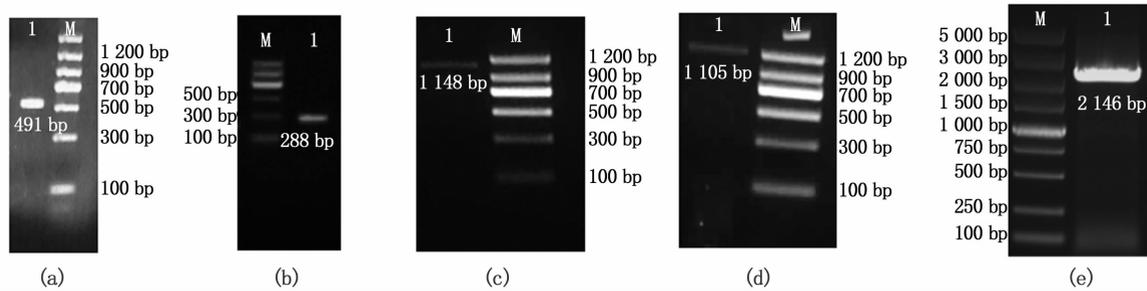
Tab. 2 Analysis of *AST-AR* gene sequence using biological information software

软件名称 Name of software	用途 Usage
NCBI-ORF Finder	预测开放阅读框序列
DNAMAN	氨基酸多重序列比对
ExPASy ProtParam	预测蛋白质理化性质
PSORT Prediction	预测蛋白亚细胞定位
TMHMM	预测跨膜区
SignalP5.0	预测信号肽位置
SWISS-MODEL	构建蛋白质三级结构模型
MEGA X	以邻接(NJ)方法构建系统进化树

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾 *Allatostatin-A receptor* 基因的克隆及序列分析

根据凡纳滨对虾脑神经节转录组数据库中标注的 *AST-AR* 基因转录本, 通过分段法共克隆获得 4 条片段, 长度分别为 491、288、1 148 和 1 105 bp(图 2a~2d), 拼接后与验证片段(图 2e, 2 146 bp)序列进行比对, 发现该基因拼接处 2 条序列的碱基相同。



(a) ~ (d) 分段克隆获得 4 条扩增产物的电泳结果; (e) 验证 *AST-AR* 基因 PCR 产物电泳结果。

(a) - (d) The segmented cloning method obtained the electrophoresis results of 4 amplified products; (e) *AST-AR* gene verification PCR product electrophoresis results.

图 2 *AST-AR* 基因分段扩增 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 *AST-AR* gene fragmented amplification PCR product electrophoresis results

最终获得 *AST-AR* 基因 cDNA 全长 2 650 bp (图 3), 包括 5' 非编码区 (1 170 bp), 3' 非编码区 (55 bp), 开放阅读框 (1 425 bp), 编码 474 个氨基酸, 含有 1 个典型的起始密码子 ATG 和 1 个终止密码子 TGA。AST-AR 蛋白理论相对分子质量为 53 242.92 u, 等电点为 6.02, 表现为亲水性, 分子式为 $C_{2412}H_{3771}N_{623}O_{678}S_{28}$ 。SignalP 5.0 分析表明, *AST-AR* 预测蛋白无明显信号肽。亚细胞定位分析结果发现, *AST-AR* 预测蛋白定位于内质网、线粒体、高尔基体的概率为 30%、30%、40%, 由此推测 *AST-AR* 预测蛋白质最有可能位于高尔基体, 其次是内质网、线粒体。TMHMM 分析表明, *AST-AR* 预测蛋白具有 7 个跨膜螺旋结构 (66 ~ 88 aa, 108 ~ 130 aa, 145 ~ 167 aa, 87 ~ 209 aa, 239 ~ 261 aa, 289 ~ 308 aa, 323 ~ 345 aa)。使用 SWISS-MODEL 工具对凡纳滨对虾 *AST-AR* 预测蛋白进行三级结构建模, 结果见图 4。同源模板与序列的相似性为 33.45%, GMQE 为 0.38, QMEAN 为 -3.76, 说明该蛋白与模板蛋白匹配度一般。其中, α 螺旋占 39.03%, β 转角为 4.22%, 延伸连占 17.93%, 无规则卷曲为

38.82%。

2.2 凡纳滨对虾 *Allatostatin-A receptor* 基因预测氨基酸同源性与系统进化树分析

将预测的凡纳滨对虾 *AST-AR* 基因氨基酸序列与节肢动物门其他物种氨基酸序列进行同源性分析 (图 5), 发现凡纳滨对虾 *AST-AR* 基因编码的氨基酸序列与斑节对虾 (*Penaeus monodon*, XP_037800171.1)、美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*, QCB19932.1)、麦双尾蚜 (*Diuraphis noxia*, XP_015367600.1)、大腹园蛛 (*Araneus ventricosus*, GBN06801.1)、白魔按蚊 (*Anopheles albimanus*, XP_035776538.1) 和黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, NP_524700.1) 等的 *AST-AR* 基因编码的氨基酸序列的相似性分别为 96.41%、71.46%、60.07%、59.29%、58.50% 和 50.00%。氨基酸多重序列比对分析结果显示, *AST-AR* 具有 7 个跨膜结构域, 且 7 个跨膜区在所有物种间高度保守, 在 N 端和 C 端观察到的保守性很少。*TM7* 结构内有 1 个 NSxxNPxxY 基序, 并且在该结构的 C 末端精氨酸残基高度保守, 表明这些保守氨基酸残基可能与 *AST-AR* 基因生理功能有关。

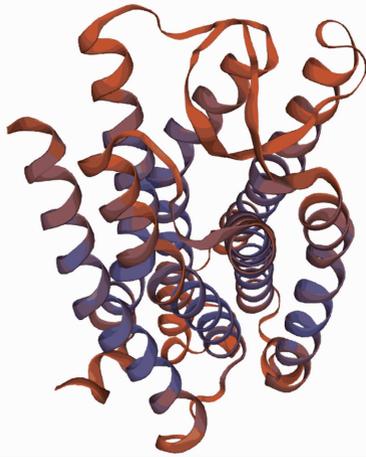
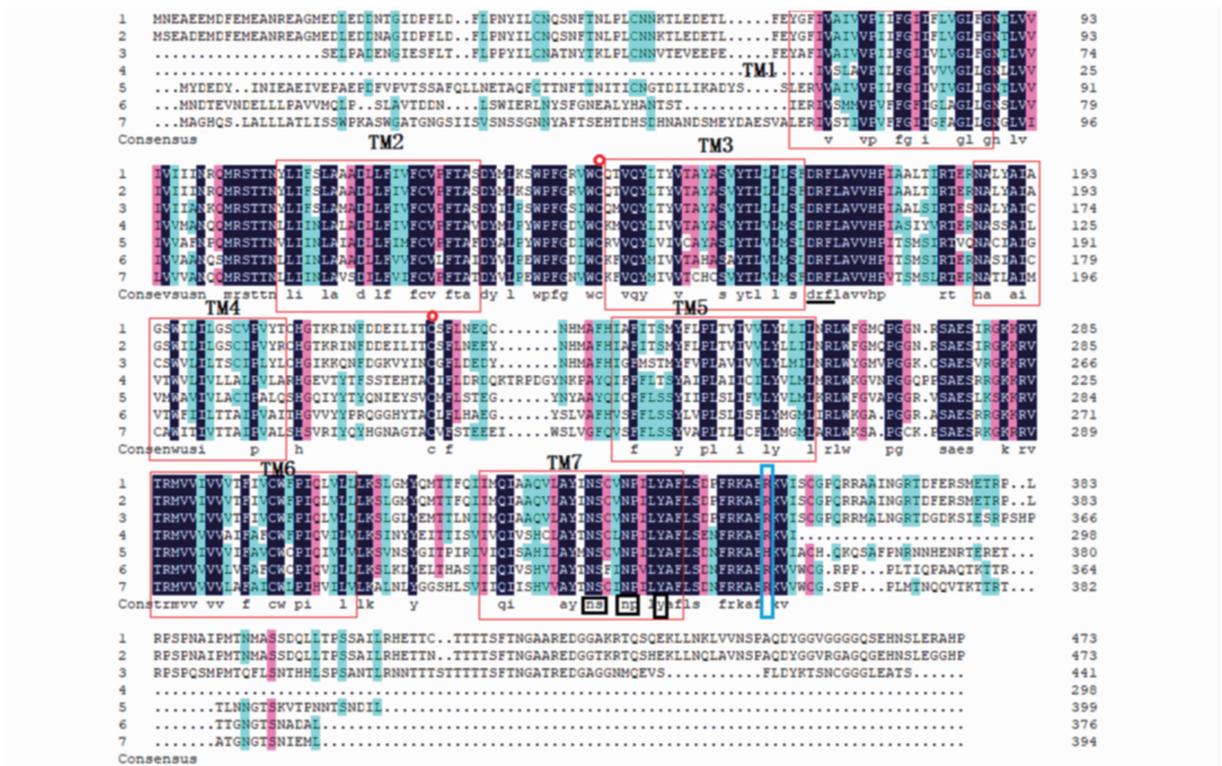


图 4 *AST-AR* 基因编码的蛋白三级结构预测
 Fig. 4 Prediction of tertiary structure of protein encoded by *AST-AR* gene

从 NCBI 数据库中下载 12 个代表物种 *AST-AR* 基因氨基酸序列,使用 MEGA X 软件构建 *AST-AR* 基因的 NJ 系统进化树。结果表明(图 6),凡纳滨对虾与斑节对虾、美洲螯龙虾聚为一支。

2.3 凡纳滨对虾 *Allatostatin-A receptor* 基因表达分析

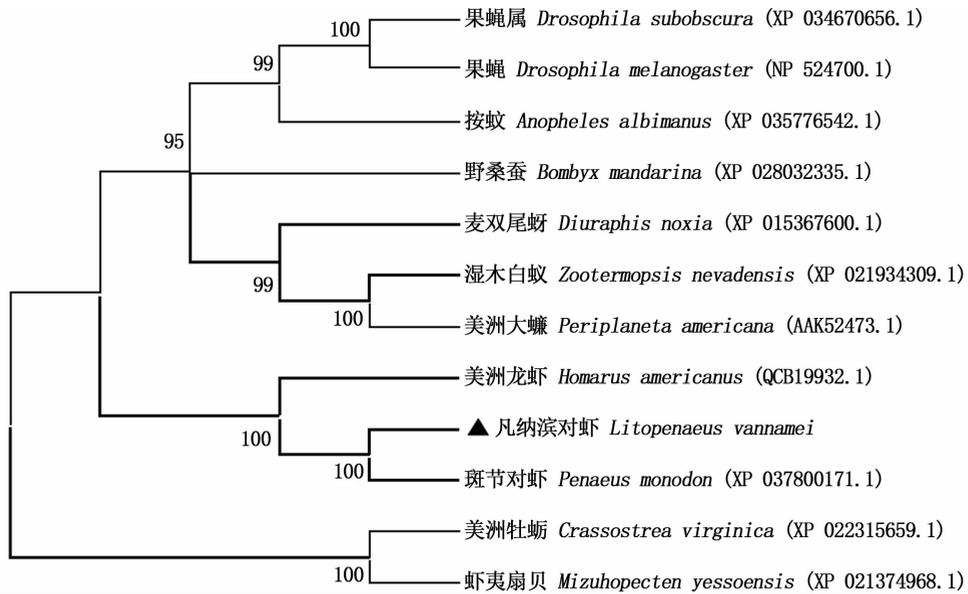
利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *AST-AR* 基因在雌、雄凡纳滨对虾 8 个组织(眼柄、脑、胃、肝胰腺、鳃、性腺、肠、肌肉组织)中的相对表达量。结果显示(图 7),*AST-AR* 基因在雌、雄凡纳滨对虾的 8 个组织中均有表达,其中在雌性凡纳滨对虾眼柄、肠、肌肉组织中相对表达量显著高于雄性。在雌性凡纳滨对虾中,*AST-AR* 基因在肠、脑、



序列中用黑色背景表示相同氨基酸残基,粉红色背景表示同源性超过 75%,浅蓝色背景表示同源性超过 50%;图中 1,2,3,4,5,6,7 分别是凡纳滨对虾 (*L. vannamei*)、斑节对虾 (*P. monodon*)、美国龙虾 (*H. americanus*)、麦双尾蚜 (*D. noxia*)、大腹园蛛 (*A. ventricosus*)、白魔按蚊 (*A. albimanus*)、黑腹果蝇 (*D. melanogaster*)。红色框区域代表 7 个跨膜结构区 (TM1 到 TM7);2 个红圈对应的保守半胱氨酸残基之间可能形成二硫键;蓝色框区域代表各物种间保守的精氨酸残基 (Arg);序列下方的黑色划线及黑色框区表示保守的 DRY 基序和 NSxxNPxxY 基序。

Position with >50% similarity are shaded in light blue, Position with >75% similarity are shaded in pink, while completely conserved positions are shaded in black; The species 1 - 7 in the picture are *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Homarus americanus*, *Diuraphis noxia*, *Araneus ventricosus*, *Anopheles albimanus* and *Drosophila melanogaster*. The red frame area represents 7 transmembrane structural areas; the conserved cysteine residues corresponding to the two red circle may form disulfide bonds; The blue box area represents the conserved arginine residues (Arg) among various species; The black underline and black box below the sequence indicate the conservative DRY motif and NSxxNPxxY motif.

图 5 凡纳滨对虾中 *AST-AR* 与其他物种氨基酸序列的比对
 Fig. 5 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *Litopenaeus vannamei* *AST-AR* with the corresponding sequences from other species

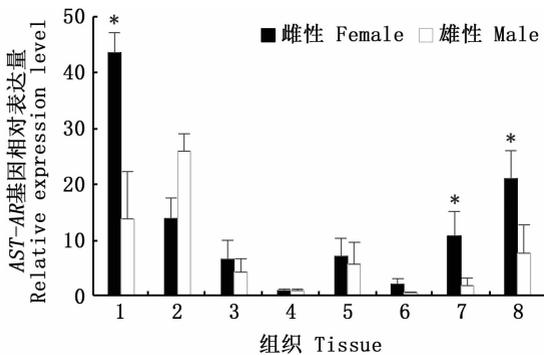


系统发生树中的值表示分支的可靠性。

The values in the phylogenetic tree represent the reliability of the branch.

图 6 不同物种 AST-AR 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of AST-AR amino acid sequence from different species



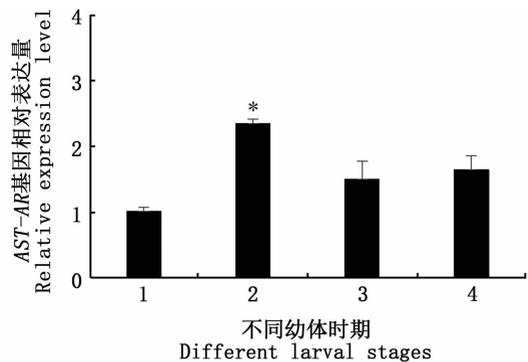
* 表示雌雄间存在显著性差异 ($P < 0.05$) ; 1. 眼柄; 2. 脑; 3. 胃; 4. 肝胰腺; 5. 鳃; 6. 性腺; 7. 肠; 8. 肌肉。
Significant differences are indicated by asterisks ($P < 0.05$) ; 1. Eyestalk; 2. Brain; 3. Stomach; 4. Hepatopancreas; 5. Gill; 6. Gonad; 7. Intestines; 8. Muscle.

图 7 AST-AR 基因在雌雄凡纳滨对虾不同组织中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of AST-AR of different tissues in male and female *L. vannamei*

肌肉和眼柄中的的相对表达量依次升高。在雌性凡纳滨对虾中,AST-AR 基因在脑组织中相对表达量最高。由图 8 可知,AST-AR 基因在不同幼体时期均有表达,且相对表达量差异显著,其中糠虾幼体相对表达量最高。AST-AR 基因在糠虾幼体的饵料卤虫中相对表达量为 $54\ 819.01 \pm$

4 852.83。利用实时荧光定量 PCR 技术检测 4 个群体凡纳滨对虾的肠组织中 AST-AR 基因的相对表达量,结果显示(图 9),该基因在引进雄虾与厄瓜多尔野生雌虾杂交后代群体的相对表达量最高 ($P < 0.05$)。

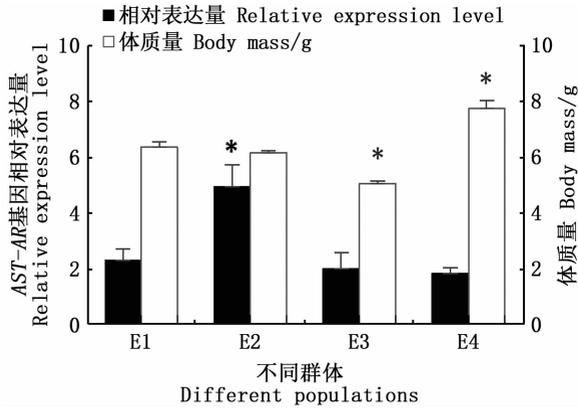


* 表示 AST-AR 基因在不同幼体时期表达存在显著性差异 ($P < 0.05$) ; 1. 溞状幼体; 2. 糠虾幼体; 3. 仔虾第 1 天; 4. 仔虾第 10 天。

Asterisk indicate significant difference in expression of AST-AR gene at different larval stages ($P < 0.05$) ; 1. Zoea larva; 2. Mysis larva; 3. P1; 4. P10.

图 8 AST-AR 基因在凡纳滨对虾不同幼体时期的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of AST-AR gene of different larval stages of *L. vannamei*



黑色柱状图上 * 表示不同群体表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$), 白色柱状图上 * 表示不同群体体质量存在显著性差异 ($P < 0.05$); E1. 厄瓜多尔野生雄虾与引进雌虾杂交后代; E2. 引进雄虾与厄瓜多尔野生雌虾杂交后代; E3. 选育群体与厄瓜多尔野生雄虾杂交后代; E4. 选育群体的自交后代。Asterisk on the black histogram indicate significant difference in expression of *AST-AR* gene at different populations ($P < 0.05$), Asterisk on the white histogram indicate significant difference in mass at different populations ($P < 0.05$); E1. The progeny of Hainan female shrimp and wild male shrimp; E2. The progeny of Hainan male shrimp and wild female shrimp; E3. The progeny of Guam female shrimp and wild male shrimp; E4. Guam prawns self-breeding progeny.

图 9 4 个群体凡纳滨对虾体质量及肠组织中 *AST-AR* 基因的相对表达量分析

Fig. 9 Analysis of the body mass and the relative expression of *AST-AR* gene in intestinal tissues of the four populations of *L. vannamei*

3 讨论

A 型咽侧体抑制素最初是从蟑螂中分离得到,该蛋白具有保守的 C 末端 FGL 酰胺基序,广泛存在于脑、肠组织中^[18]。HERGARDEN 等^[19]的研究表明 *AST-A* 型神经肽能调节果蝇的摄食行为。除此之外,*AST-A* 还可以调节保幼激素的合成,参与昆虫的发育和繁殖过程^[20]。

AST-AR 是由一种激素原前体蛋白水解裂解产生,并由 FGL-酰胺 (*AST-A*) 肽家族成员激活的 G 蛋白偶联受体,该受体基因在大部分昆虫中仅有 1 个,但在果蝇中有 2 个^[21]。果蝇的 *AST-ARI* (*DAR-1*) 和 *DAR-2* 基因、美洲大蠊的 *ASTR* 基因与哺乳动物甘丙肽受体基因是同源基因^[22-23]。甘丙肽受体能够影响哺乳动物^[24-25]和秀丽广杆线虫^[26]的摄食行为。研究^[27]发现 *AST-A* 及其受体通过控制胰岛素神经分泌细胞中的胰岛素样

肽的分泌来促进果蝇幼体生长,*AST-ARI* 是果蝇性成熟的关键因子。因此推测,在凡纳滨对虾中 *AST-AR* 可能也参与调节摄食和生殖过程。

为了研究凡纳滨对虾中 *AST-AR* 基因是否参与繁殖发育过程,本实验首先克隆该基因 cDNA 全长 2 650 bp,利用 DNAMAN 软件把克隆的 *AST-AR* 序列与 NCBI 上预测的 *AST-AR* 序列比对,发现两条序列的编码区是相同的,但在 5' 非编码区、3' 非编码区上有个别碱基的突变与缺失。这可能是由于非编码区不参与氨基酸编码,与编码区相比其受到的选择压力较小,更容易发生变异。节肢动物 *AST-AR* 的特征性保守半胱氨酸残基在 TM2 / TM3 之间和 TM4 / TM5 之间形成二硫键。在 TM3 结构外有一个 DRY 基序, TM7 结构内有 1 个 NSxxNPxxY 基序^[28-29]。研究^[30-31]发现 DRY 基序的天冬氨酸和精氨酸残基在 G 蛋白偶联受体的激活中具有关键作用。NSxxNPxxY 基序中的氨基酸突变将会影响受体表达、配体亲和力和功能^[28]。位于 *AST-AR* 基因编码的氨基酸序列 TM7 后 C 末端区域的精氨酸 (Arg) 残基与人类 *KISS1R* 基因编码的氨基酸序列 C 末端区域的精氨酸 (Arg) 残基一样是保守的,该位置氨基酸在人类的 *KISS1R* 中与性早熟等生理过程相关^[16],推测 *AST-AR* 可能与 *KISS1R* 具有类似功能,参与调节繁殖过程。凡纳滨对虾 *AST-AR* 基因的氨基酸序列与斑节对虾 (XP 037800171. 1)、美洲龙虾 (QCB19932. 1) 相似度最高并聚为一支,符合它们之间的分类进化关系。

本研究中,*AST-AR* 基因在眼柄的高表达与斑节对虾 *AST-AR* 基因^[32]、蜜蜂 *AST-AR* 基因^[15] 的研究结果相符;在脑组织中相对表达量高,可能是在甲壳动物中 *AST-AR* 基因是由脑神经细胞分泌^[33];前人在雌性按蚊^[16]和温室希蛛^[17]的肠组织中发现了 *AST-AR* 基因并推测该基因参与调节肠道蠕动收缩等功能。除此之外,*AST-AR* 基因在凡纳滨对虾的肌肉中有较高的表达量,推测该基因参与凡纳滨对虾的生长调节。*AST-AR* 的广泛分布反映了其功能的多样性。由于 *AST-AR* 基因在雌性凡纳滨对虾性腺中表达量高于雄性,因此推测该基因可能参与凡纳滨对虾繁殖过程。*AST-AR* 基因在糠虾时期相对表达量最高,且显著高于其他幼体时期。卤虫是凡纳滨对虾糠虾幼体时期的饵料,该基因在卤虫中相对表达量高,因此

推测 *AST-AR* 基因在糠虾幼体中相对表达量高可能是由于该幼体时期凡纳滨对虾主要以卤虫为饵料。基因在不同幼体时期表达水平还可能与基因的功能相关,*AST-AR* 基因在不同组织及不同幼体时期中具体的作用与功能还有待进一步研究。

本文对 4 个凡纳滨对虾群体的 70 d 淡水养殖实验结果表明,选育群体的自交后代生长最快,但 *AST-AR* 基因的表达量却并不是最高,这可能与两方面原因有关:肠道中 *AST-AR* 基因的表达量并不是最高,眼柄、脑、肌肉组织中的表达都高于肠道,本实验是取样在前,不同组织表达量测定在后,前人在其他物种中研究发现肠道是 *AST* 的主要分布区之一,这在凡纳滨对虾中没有得到验证;其次肠道中该基因的表达雌雄差异显著,雌虾肠道的表达量远高于雄虾,生长对比试验结束时虾的个体大小还未能达到性腺成熟,雌雄从外形上很难区分,取样时就未能考虑性别,这也很大可能导致 *AST-AR* 基因表达量的结果与生长结果不能达到正相关。

AST-AR 基因在凡纳滨对虾(对虾派)的表达情况与日本沼虾(真虾派)雌虾的表达情况差异明显,凡纳滨对虾雌虾的眼柄表达量最高,卵巢中也有较高表达,雄虾的精巢几乎没有表达;*AST* 在日本沼虾的精巢有较高表达,卵巢几乎没有^[34]。对虾和真虾的卵巢发育难易程度完全不同,对虾的卵巢发育受眼柄分泌的性腺抑制激素(GIH)影响,人工养殖条件下雌虾卵巢很难自然成熟,通常会切除单侧眼柄来部分解除抑制;而真虾类(如沼虾)卵巢很容易成熟,人工养殖条件下经常出现性早熟现象。*AST* 与 *AST-AR* 基因在两类虾卵巢中表达的明显差异可能正是与卵巢的成熟调节有关。*AST-AR* 基因在凡纳滨对虾的幼体、幼虾、成虾中均有表达,且表达量在雌雄间、幼体不同发育阶段、成虾不同组织存在差异,说明 *AST-AR* 基因在凡纳滨对虾的繁殖、发育、生长等重要生理过程中发挥作用,该基因基本贯穿凡纳滨对虾的一生。综上,凡纳滨对虾 *AST-AR* 基因可能具有调节繁殖、发育、生长等多种功能。

参考文献:

- [1] 廖静. 见证凡纳滨对虾良种的诞生和崛起[J]. 海洋与渔业, 2019(12): 70-71.
LIAO J. Witness the birth and rise of *Litopenaeus vannamei*

- [J]. Ocean and Fishery, 2019(12): 70-71.
[2] 唐扬, 孟小菲, 沈瑞福, 等. 凡纳滨对虾家系选育的研究与应用[J]. 水产科学, 2018, 37(4): 555-563.
TANG Y, MENG X F, SHEN R F, et al. Research and application of family selective breeding in culture of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fisheries Science, 2018, 37(4): 555-563.
[3] 陆羚子, 李云梦, 王岩. 浙江省舟山市温室养殖池塘中凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的生长与环境变化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2020, 46(4): 489-499.
LU L Z, LI Y M, WANG Y. Growth of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and environmental variation in greenhouse ponds located in Zhoushan City of Zhejiang Province[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2020, 46(4): 489-499.
[4] 张哲, 黄种持, 杨章武, 等. 凡纳滨对虾选育群体子代仔虾幼体耐低盐能力比较研究[J]. 渔业研究, 2020, 42(4): 366-371.
ZHANG Z, HUANG Z C, YANG Z W, et al. Comparative study on the low salt tolerance in larval offspring of *Litopenaeus vannamei* breeding populations [J]. Journal of Fisheries Research, 2020, 42(4): 366-371.
[5] 胡哲, 周晓东, 鞠晓晨, 等. 凡纳滨对虾在冰箱 -18℃、-40℃ 冷冻条件的冻藏品质变化研究[J]. 轻工标准与质量, 2020(4): 89-92.
HU Z, ZHOU X D, JU X C, et al. Study on the change of frozen storage quality of *Litopenaeus vannamei* in refrigerator at -18℃ and -40℃ [J]. Standard & Quality of Light Industry, 2020(4): 89-92.
[6] PRATT G E, FARNSWORTH D E, SIEGEL N R, et al. Identification of an allatostatin from adult *Diptera punctata* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989, 163(3): 1243-1247.
[7] BENDENA W G, DONLY B C, FUSE M, et al. Molecular characterization of the inhibitory myotropic peptide leucomyosuppressin[J]. Peptides, 1997, 18(1): 157-163.
[8] LORENZ M W, KELLNER R, HOFFMANN K H. A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(36): 21103-21108.
[9] KRAMER S J, TOSCHI A, MILLER C A, et al. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(21): 9458-9462.
[10] 卜宪飞, 李真真, 乔慧, 等. 青虾咽侧体抑制激素基因全长 cDNA 序列的克隆及表达分析[J]. 水生生物学报, 2013, 37(1): 116-124.
BU X F, LI Z Z, QIAO H, et al. Cloning, characterization and expression of full length cDNA encoding allatostatin (ast) in *Macrobrachium nipponense* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(1): 116-124.

- [11] 程李莉,江幸福,程云霞,等.黏虫咽侧体抑制神经肽基因克隆与成虫期表达模式分析[J].植物保护,2018,44(1):20-26.
CHENG L L, JIANG X F, CHENG Y X, et al. Cloning and expression analysis of allatostatin gene in adults of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) [J]. Plant Protection, 2018, 44(1): 20-26.
- [12] 黄一越.拟穴青蟹咽侧体抑制素 A 型(AST-A)生殖调控作用研究[D].厦门:厦门大学,2017.
HUANG Y Y. Studies on reproductive function of a-type Allatostatin (AST-A) in the mud crab *Scylla paramamosain* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2017.
- [13] DEVECI D, MARTIN F A, LEOPOLD P, et al. AstA signaling functions as an evolutionary conserved mechanism timing juvenile to adult transition[J]. Current Biology, 2019, 29(5): 813-822. e4.
- [14] ZANDAWALA M, ORCHARD I. Identification and functional characterization of FGLamide-related allatostatin receptor in *Rhodnius prolixus* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 57: 1-10.
- [15] URLACHER E, SOUSTELLE L, PARMENTIER M L, et al. Honey bee allatostatins target Galanin/Somatostatin-like receptors and modulate learning: a conserved function? [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146248.
- [16] FELIX R C, TRINDADE M, PIRES I R P, et al. Unravelling the evolution of the allatostatin-type A, KISS and galanin peptide-receptor gene families in bilaterians: insights from Anopheles Mosquitoes [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0130347.
- [17] SAWADRO M K, BEDNAREK A W, MOLEND A E, et al. Expression profile of genes encoding allatoregulatory neuropeptides in females of the spider *Parasteatoda tepidariorum* (Araneae, Theridiidae) [J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0222274.
- [18] CHEN J T, REIHER W, HERMANN-LUIBL C, et al. Allatostatin a signalling in *Drosophila* regulates feeding and sleep and is modulated by PDF [J]. PLoS Genetics, 2016, 12(9): e1006346.
- [19] HERGARDEN A C, TAYLER T D, ANDERSON D J. Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(10): 3967-3972.
- [20] STAY B, TOBE S S. The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52: 277-299.
- [21] PAN X Y, O'CONNOR M B. Developmental maturation: *Drosophila* AstA signaling provides a kiss to grow up [J]. Current Biology, 2019, 29(5): R161-R164.
- [22] ABDEL-LATIEF M, HOFFMANN K H. Functional activity of allatotropin and allatostatin in the pupal stage of a holometabolous insect, *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) [J]. Peptides, 2014, 53: 172-184.
- [23] LENZ C, WILLIAMSON M, GRIMMELIKHUIJZEN C J P. Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 273(2): 571-577.
- [24] LENZ C, WILLIAMSON M, HANSEN G N, et al. Identification of four *Drosophila* allatostatins as the cognate ligands for the *Drosophila* orphan receptor DAR-2 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 286(5): 1117-1122.
- [25] ADAMS A C, CLAPHAM J C, WYNICK D, et al. Feeding behaviour in galanin knockout mice supports a role of galanin in fat intake and preference [J]. Journal of Neuroendocrinology, 2008, 20(2): 199-206.
- [26] LEIBOWITZ S F. Regulation and effects of hypothalamic galanin: relation to dietary fat, alcohol ingestion, circulating lipids and energy homeostasis [J]. Neuropeptides, 2005, 39(3): 327-332.
- [27] CHRIST P, HILL S R, SCHACHTNER J, et al. Functional characterization of the dual allatostatin-A receptors in mosquitoes [J]. Peptides, 2018, 99: 44-55.
- [28] FRITZE O, FILIPEK S, KUKSA V, et al. Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(5): 2290-2295.
- [29] ROVATI G E, CAPRA V, NEUBIG R R. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state [J]. Molecular Pharmacology, 2007, 71(4): 959-964.
- [30] OKADA T, ERNST O P, PALCZEWSKI K, et al. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(5): 318-324.
- [31] ALEWIJNSE A E, TIMMERMAN H, JACOBS E H, et al. The effect of mutations in the dry motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H2 receptor [J]. Molecular Pharmacology, May 2000, 57(5) 890-898.
- [32] DUVE H, JOHNSEN A H, SCOTT A G, et al. Allatostatins of the tiger prawn *Penaeus monodon* (Crustacea: Penaeidea) [J]. Peptides, 2002, 23(6): 1039-1051.
- [33] YIN G L, YANG J S, CAO J X, et al. Molecular cloning and characterization of FGLamide allatostatin gene from the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Peptides, 2006, 27(6): 1241-1250.
- [34] 卜宪飞.青虾咽侧体抑制激素(*Allatostatin*, *AST*)基因全长 cDNA 序列的克隆及表达分析[D].南京:南京农业大学,2012.
BU X F. Cloning and expression of full length cDNA encoding *Allatostatin* (*AST*) in *Macrobrachium nipponense* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.

Cloning and expression of breeding-& development-related gene *Allatostatin-A receptor* from *Litopenaeus vannamei*

LUO Yongli^{1,2}, LIU Hong^{1,2}, LIU Zhiwei^{1,2}, DAI Xilin^{1,2}, WANG Yiyue^{1,2}, ZHU Qifei^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Allatostatin-A receptor* gene was cloned from *Litopenaeus vannamei* by RACE PCR, and the sequence length is 2 650 bp, including 1 425 bp of ORF, 1 170 bp of 5'-UTR, 55 bp of 3'-UTR, encoding 474 amino acids, forming an unstable hydrophilic protein with seven transmembrane regions, and subcellular localization is mainly located on the cytoplasmic membrane. The results of homology and phylogenetic analysis showed that the *Allatostatin-A receptor* gene of *Litopenaeus vannamei* has the highest homology with *Penaeus monodon* and *Homarus americanus*, and has the closest genetic relationship. The result of multiple amino acid sequence alignment showed that the C-terminal Arg after *Allatostatin-A receptor* amino acid TM7 is highly conserved among different species. Real time PCR results showed that the *Allatostatin-A receptor* gene was expressed in multiple tissues (eyestalk, brain, stomach, hepatopancreas, gill, gonad, intestine, muscle) of female and male *Litopenaeus vannamei*. Except for brain tissue, the relative expression of *Allatostatin-A receptor* gene in female *Litopenaeus vannamei* is higher than that in males. With the development of *Litopenaeus vannamei* larvae, the relative expression of *Allatostatin-A receptor* gene increased. The expression level of *Allatostatin-A receptor* gene was the highest in the hybrid offspring of imported male shrimp and Ecuadorian wild female shrimp. It is speculated that the *Allatostatin-A receptor* gene may be involved in the reproduction process of *Litopenaeus vannamei*, and whether it is involved in the growth regulation of *Litopenaeus vannamei* remains to be further studied.

Key words: *Allatostatin-A receptor*; *Litopenaeus vannamei*; reproduction; development; gene cloning; expression