

文章编号: 1674-5566(2024)03-0533-10

DOI: 10.12024/jsou.20231204385

## 中华绒螯蟹 *Kcna* 基因功能及其与生长性状的关联分析

薛磊<sup>1,2,3</sup>, 侯鑫<sup>1,2,3</sup>, 曾详健<sup>1,2,3</sup>, 陈晓雯<sup>1,2,3</sup>, 王军<sup>1,2,3</sup>, 王成辉<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 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; 3. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为探究中华绒螯蟹 *Kcna* 基因的结构、表达模式及生长发育中的分子功能, 克隆了中华绒螯蟹 *Kcna* (命名为 *Es-Kcna*) 基因的全长, 并开展了生物信息学分析和时空表达模式研究; 观察了干扰 *Kcna* 基因后中华绒螯蟹生长表型性状的变化; 筛选了 *Es-Kcna* 基因的 SNP 标记并与种群地理分布、生长性状进行了关联分析。结果显示: *Kcna* 基因位于中华绒螯蟹第 46 号染色体上, 全长 945 304 bp, 含有 9 个外显子; 其中, cDNA 全长 2 080 bp, 开放阅读框 1 584 bp, 编码 527 个氨基酸; 原子总量为 8 433, 分子结构式为  $C_{2719}H_{4210}N_{702}O_{787}S_{15}$ , 预测蛋白等电点 (pI) 为 5.23, 相对分子量为 59.81 Ku。系统进化树分析显示 *Es-Kcna* 基因与三疣梭子蟹 *Kcna* 基因的亲缘关系最近。荧光定量 PCR 结果显示 *Es-Kcna* 基因在蜕壳前期、蜕壳间期和蜕壳后期的肌肉、心脏、肠道等 6 种组织中均有表达, 其中以肌肉组织中的表达丰度最高。与对照组相比, 干扰 *Kcna* 基因的表达后, 实验组蟹的体质量、蜕壳增重率和第二步足长度显著降低; 肌肉组织切片结果显示实验组步足肌肉肌纤维直径小于对照组。此外, 在 *Es-Kcna* 基因的第 8 外显子上鉴定出 1 个 SNP 位点 (A1 461G), 该位点在辽河野生群体显著富集 GG 基因型, 而在长江野生群体富集 AA 基因型。生长性状的关联分析表明, 具有 AA 型个体的步足长度显著长于 GG 型个体。本研究为 *Kcna* 基因调控中华绒螯蟹生长的分子功能和遗传育种研究提供了研究基础, 并为区分长江、辽河野生中华绒螯蟹提供重要参考。

**关键词:** 中华绒螯蟹; *Kcna*; 基因结构; RNA 干扰; SNP

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

电压门控钾离子通道蛋白 (Voltage-gated potassium channel protein shaker, *Kcna*) 是一类跨膜糖蛋白, 结构高度保守, 由  $\alpha$  亚基组成的同源四聚体构成, 广泛存在于原核生物及真核生物细胞膜上, 是钾离子通道家族中的重要成员之一<sup>[1]</sup>。*Kcna* 基因在参与肌细胞增殖、骨骼肌收缩、上皮细胞电解质转运和调节心率等方面发挥重要作用<sup>[2-4]</sup>。ISHIDA 等<sup>[5]</sup>报道了 *Kcna* 基因的缺失型突变可以引起人 (*Homo sapiens*) 神经性肌肉强直和良性家族性癫痫。XU 等<sup>[6]</sup>发现 *Kcna* 基因能够参与基础代谢从而调节小鼠 (*Mus musculus*) 体质量。RUIZ 等<sup>[7]</sup>证明果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 体内 *Kcna* 基因能够维持神经元和肌肉细胞的电兴奋性, 对其肌肉发育具有重要的分子调控作用。除此之外, 在水产动物中, 钾离子通道蛋白

家族相关基因也参与了鱼类尾鳍发育、免疫调控等过程。KON 等<sup>[8]</sup>发现钾离子通道蛋白 *Kcnk5b* 是影响金鱼 (*Carassius auratus*) 尾鳍长度的关键基因。SILIC 等<sup>[9]</sup>发现斑马鱼 (*Danio rerio*) 中钾离子通道蛋白基因 *Kcnj13*、*Kcnj1b*、*Kcnj10a*、*Kcnk9* 的突变都能诱导长鳍表型。PERATHONER<sup>[10]</sup>等发现 *Kcnk5b* 基因的单个碱基突变会造成斑马鱼突变体 *alf* (another long fin) 的长尾鳍表型。CONG 等<sup>[11]</sup>研究发现 *Kcna* 和 *Kcnc1* 两种钾离子通道蛋白基因参与了鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 巨噬细胞的先天性免疫防御过程。刘春影等<sup>[12]</sup>研究发现 *Kcnn2* 基因参与了星斑川鲮 (*Platichthys stellatus*) 淋巴细胞和中性粒细胞的免疫应答反应。此外, 钾离子通道蛋白家族基因如 *Kcna*, 在三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、克氏原螯虾

收稿日期: 2023-12-27 修回日期: 2024-02-22

基金项目: 崇明区农业科创项目 (2022CNKC-01-01)

作者简介: 薛磊 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: xl18115308010@163.com

通信作者: 王成辉, E-mail: wangch@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>

(*Procambarus clarkii*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)等多种甲壳动物基因组中均有发现,但其对甲壳动物生长发育等的分子功能研究仍有待深入。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),又名河蟹,是我国重要的名贵水产品,是我国很多地区水产养殖的特色产业<sup>[13]</sup>。生长蜕壳、肌肉发育、步足长度等是中华绒螯蟹选育过程中的重要目标性状,选育出具有长步足的新品种是主要研究方向之一<sup>[14]</sup>。研究 *Kcna* 基因对重要性状形成的分子调控机制有助于中华绒螯蟹的养殖管理和良种选育。鉴于 *Kcna* 基因在调控动物肌肉发育、生长等方面的分子功能,本研究旨在通过中华绒螯蟹 *Kcna* 基因的克隆、时空表达分析和 RNA 干扰实验,解析中华绒螯蟹 *Kcna* 基因结构和分子功能,并筛选出在不同水系中华绒螯蟹中存在明显分化且与生长性状相关联的 SNP 位点,以期中华绒螯蟹的种质保护和良种选育等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验中筛选 *Kcna* 基因 SNP 分子标记的 2 龄实验蟹来自于上海海洋大学水产动物种质资源研究室前期(2005—2017年)收集的长江、辽河水系野生群体以及养殖群体,开展 *Kcna* 基因分子功能的 1 龄实验蟹为在实验室条件下饲养的“江海 21”品种。选取生长健康、规格一致(2~3 g)的扣蟹放在循环水养殖系统中饲养,水温(26±1) °C,每天喂食两次并及时清理残饵与粪便。取蜕壳后 2 d(蜕壳后期)、蜕壳后 15 d(蜕壳间期)和新颚足刚毛形成<sup>[15]</sup>(蜕壳前期)实验蟹,无菌环境下分别取肝胰腺、肠道、肌肉、鳃、眼柄和心脏组织,-80 °C 保存用于 RNA 提取;实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

### 1.2 *Es-Kcna* 基因的 cDNA 全长克隆

在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中下载预测的中华绒螯蟹 *Kcna* (XM\_050831530.1)基因序列<sup>[16]</sup>,为验证拼接序列的准确性,根据已知序列设计 cDNA 全长克隆引物,完成 *Kcna* 基因全长的克隆验证(表 1)。具体是:参照本实验室方法<sup>[17]</sup>提取河蟹不同组织的总 RNA,

通过琼脂糖凝胶电泳以及 Nano Drop 2000 紫外分光光度计分析 RNA 纯度及浓度,检测合格后利用 3'/5'RACE 试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)将 RNA 逆转录成 cDNA 并进行巢式 PCR 扩增,具体反应体系和扩增程序参照董哲<sup>[18]</sup>的研究方法。获得目的片段后,通过琼脂糖凝胶电泳将 PCR 产物目的条带切胶回收,纯化后连接至 pMD19-T 载体上,再转化至 *E. coli*-DH5 $\alpha$  感受态细胞上,经菌液 PCR 验证,将阳性克隆送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

### 1.3 *Es-Kcna* 基因的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件进行测序序列的拼接和人工校准。分别利用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测 *Kcna* 基因的开放阅读框,Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质理化性质, TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测蛋白跨膜结构域,SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构和功能。为构建 *Kcna* 基因的系统进化树,分别从 NCBI 数据库上下载三疣梭子蟹、克氏原螯虾、斑节对虾、凡纳滨对虾、中国明对虾(*Penaeus chinensis*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)和果蝇的 *Kcna* 基因的氨基酸序列,利用 Clustal W 软件进行氨基酸多序列比对,然后用 MEGA 11.0 软件中的最大似然法构建系统发育进化树。

### 1.4 *Es-Kcna* 基因的时空表达模式探究

将不同蜕壳时期的肌肉、心脏、肝胰腺、眼柄、鳃和肠道的总 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录体系:5 $\times$  gDNA digester Mix 3  $\mu$ L, Total RNA 1  $\mu$ g, RNase-free H<sub>2</sub>O 补充至 15  $\mu$ L;反应程序:42 °C 孵育 2 min,向反应液中加入 4 $\times$  Hifair III SuperMix plus 5  $\mu$ L, 25、55、85 °C 分别反应 5、15、5 min。qPCR 引物及内参基因见表 1,反应体系:SYBR Green remix Ex Taq 10  $\mu$ L;上下游引物各 0.4  $\mu$ L;模版 cDNA 1.0  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ L, 共计 20  $\mu$ L;反应程序:95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环;每个组织样本有 6 个生物学重复,每个样本设 3 个技术重复,利用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算相对表达量,具体计算方法参照姜鹏飞<sup>[19]</sup>的资料。

表 1 *Kcna* 基因分子克隆、荧光定量 PCR、RNA 干扰及 SNP 分子标记筛选引物  
Tab. 1 Primers designed for cloning, qPCR, RNA interference and SNPs screening of *Kcna* gene

| 引物 Primers | 序列(5'-3') Sequences                         | 用途 Usage                 |                            |
|------------|---|--------------------------|----------------------------|
| K-5race-RT | TGGCACCTTGACTGGTCTTC                        | 5race                    |                            |
| K-5race-1R | CCGGTTGCGATCGAAGAAGT                        |                          |                            |
| K-5race-2R | TCCGGAAACTGATTCAACGT                        |                          |                            |
| K-3race-1F | TCGGCTCACTGTGTGCCATC                        | 3race                    |                            |
| K-3race-2F | CAGACCAGGAGGAGATGCAG                        |                          |                            |
| K-ORF-F    | GGCCTCGCTTGGGATTACAC                        | ORF 克隆<br>cloning of ORF |                            |
| K-ORF-R    | TGAATCCTTCTGCCACACAA                        |                          |                            |
| K-qpcr-F   | GCCGGAGAACGAATTCCAAA                        | qPCR                     |                            |
| K-qpcr-R   | TGATGGCAACCCTCTAGCA                         |                          |                            |
| S27-F      | GGTTCGATGACAATGGCAAGA                       |                          |                            |
| S27-R      | CCACACTACTGGCGGTCAA                         |                          |                            |
| K-ds-F     | TACGTTGGCGACTGTGGTAG                        |                          | RNA 干扰<br>RNA interference |
| K-ds-R     | GCGGGTTGCAATTCTGCTTT                        |                          |                            |
| G-ds-F     | CAGTGCTTCAGCCGCTACCC                        |                          |                            |
| G-ds-R     | AGTTCACCTTGATGCCGTTCTT                      |                          |                            |
| K-T7-ds-F  | taatacgaactcactatagggTACGTTGGCGACTGTGGTAG   |                          |                            |
| K-T7-ds-R  | taatacgaactcactatagggGCGGGTTGCAATTCTGCTTT   |                          |                            |
| G-T7-ds-F  | taatacgaactcactatagggCAGTGCTTCAGCCGCTACCC   |                          |                            |
| G-T7-ds-R  | taatacgaactcactatagggAGTTCACCTTGATGCCGTTCTT |                          |                            |
| K-SNP-F    | ACCATCTCTATACCCTGTCCCTT                     | SNP 筛选<br>SNP screening  |                            |
| K-SNP-R    | TCAGACGTCAGTTTCGATGCTCAT                    |                          |                            |

### 1.5 *Es-Kcna* 基因的 RNA 干扰实验

使用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems 试剂盒 (Promega, 美国) 合成 *Kcna* 和 *GFP* 基因的 dsRNA 序列。实验初始时, 挑选规格一致的实验蟹共 36 只, 每只蟹记录初始体质量 ( $W_1$ )、壳长 ( $L_1$ ) 和第二步足长度 ( $F_1$ , 下文简称步足长度), 随机分为实验组和对照组, 每组 18 只; 分别从左侧第二步足基部注射等量的 *Kcna* 基因的 dsRNA ( $3 \mu\text{g/g}$ ) (实验组) 和不含有 *Kcna* 基因序列的绿色荧光蛋白 *GFP* 基因的 dsRNA (对照组)。两组均每 3 天注射 1 次, 直到下一次蜕壳完成。RNA 干扰过程中, 每天检查记录蜕壳和死亡情况。在下次蜕壳后第 4 天, 记录终末体质量 ( $W_2$ )、壳长 ( $L_2$ ) 和步足长度 ( $F_2$ ), 记录每只蟹的蜕壳间隔天数 ( $M$ ), 并计算蜕壳增重率 (WGR) 和特定生长率 (SGR), 公式如下:

$$W_{GR}(\%) = 100 \times (W_2 - W_1) / W_1 \quad (1)$$

$$S_{GR}(\%/d) = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / M \quad (2)$$

式中:  $W_1$  和  $W_2$  分别为初始和终末时各组扣蟹平均体质量;  $M$  为每只蟹的蜕壳间隔天数。

干扰周期结束后, 对实验蟹左侧第二步足肌肉取样, 进行石蜡切片和 H.E 染色, 并利用 Image J 软件进行肌纤维直径测量。具体测量方法是: 在显微镜下随机选取 5 个视野, 每个视野内任选 10 根肌纤维测量其长轴与短轴, 计算出两者平均值, 即为肌纤维直径<sup>[20]</sup>。

### 1.6 *Es-Kcna* 基因的 SNP 标记筛选及与生长性状的关联分析

对不同年份长江 (2005、2014、2017) 和辽河 (1999、2014、2017) 水系共 256 只野生中华绒螯蟹样本及 245 只来自于养殖群体的样本进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 使用 Bioedit 软件进行测序结果比对并结合峰图筛选 *Kcna* 基因的 SNP 位点。将筛选出的 SNP 位点与中华绒螯蟹的水系来源、生长性状进行关联分析, 统计不同水系中华绒螯蟹 SNP 基因型的分布频率, 用 Graphpad Prism 9.0.0 进行生长性状与基因型的关联性分析。

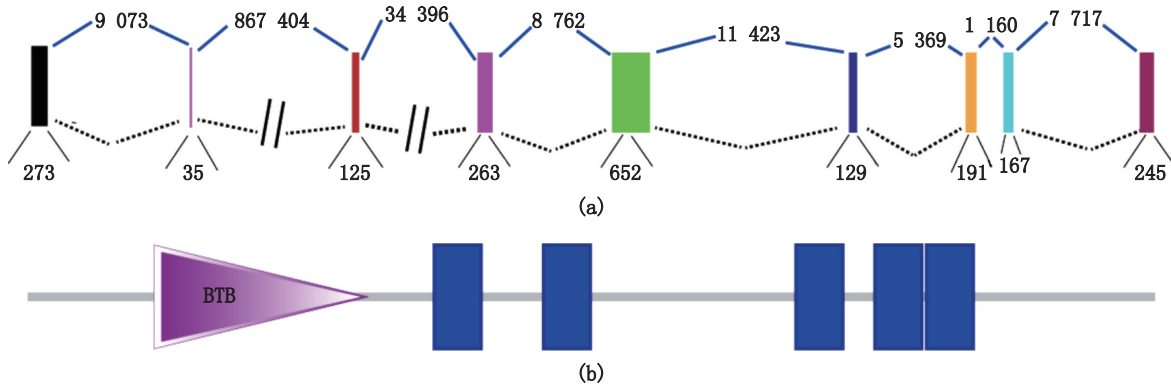
## 2 结果

### 2.1 *Es-Kcna* 基因的结构、理化性质及系统进化

基于测序验证获得的 *Kcna* 基因序列, 结合已

经发表的中华绒螯蟹基因组<sup>[16]</sup>,发现 *Kcna* 基因位于中华绒螯蟹第 46 号染色体上,全长 945 304 bp,共包括 9 个外显子(图 1a);cDNA 全长 2 080 bp,其中 ORF 为 1 584 bp,共编码 527 个氨基酸,具有 1 个 BTB 结构域和 5 个跨膜结构区

(图 1b)。理化分析显示 *Es-Kcna* 基因的原子总量为 8 433,分子结构式为  $C_{2719}H_{4210}N_{702}O_{787}S_{15}$ ,预测蛋白等电点(pI)为 5.23,相对分子量为 59.81 ku。系统进化树结果显示 *Es-Kcna* 基因与三疣梭子蟹 *Kcna* 基因的亲缘关系最近(图 2)。



(a) Gene structure of *Kcna*; (b) Protein domain prediction of *Kcna*.

图 1 中华绒螯蟹 *Kcna* 基因结构和蛋白结构域预测

Fig. 1 Gene structure and protein domain prediction of *Kcna* gene in *E. sinensis*

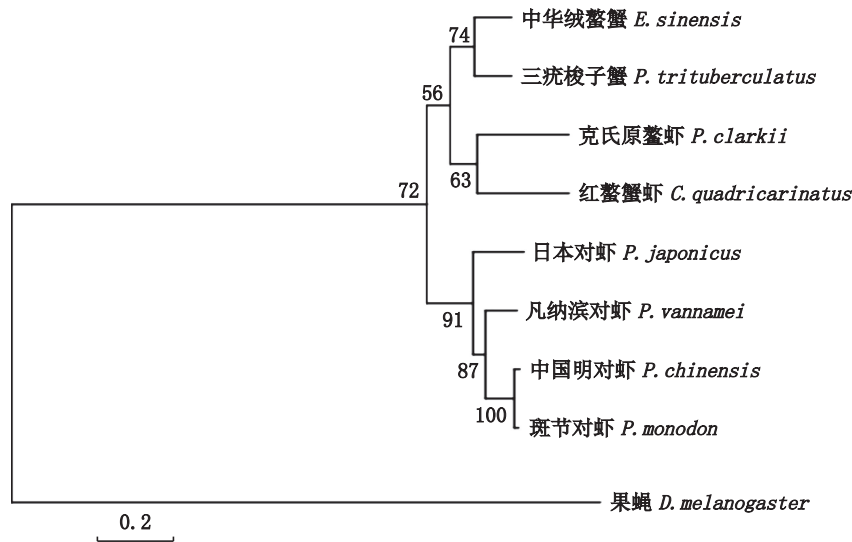


图 2 中华绒螯蟹与其他节肢动物 *Kcna* 基因系统进化树

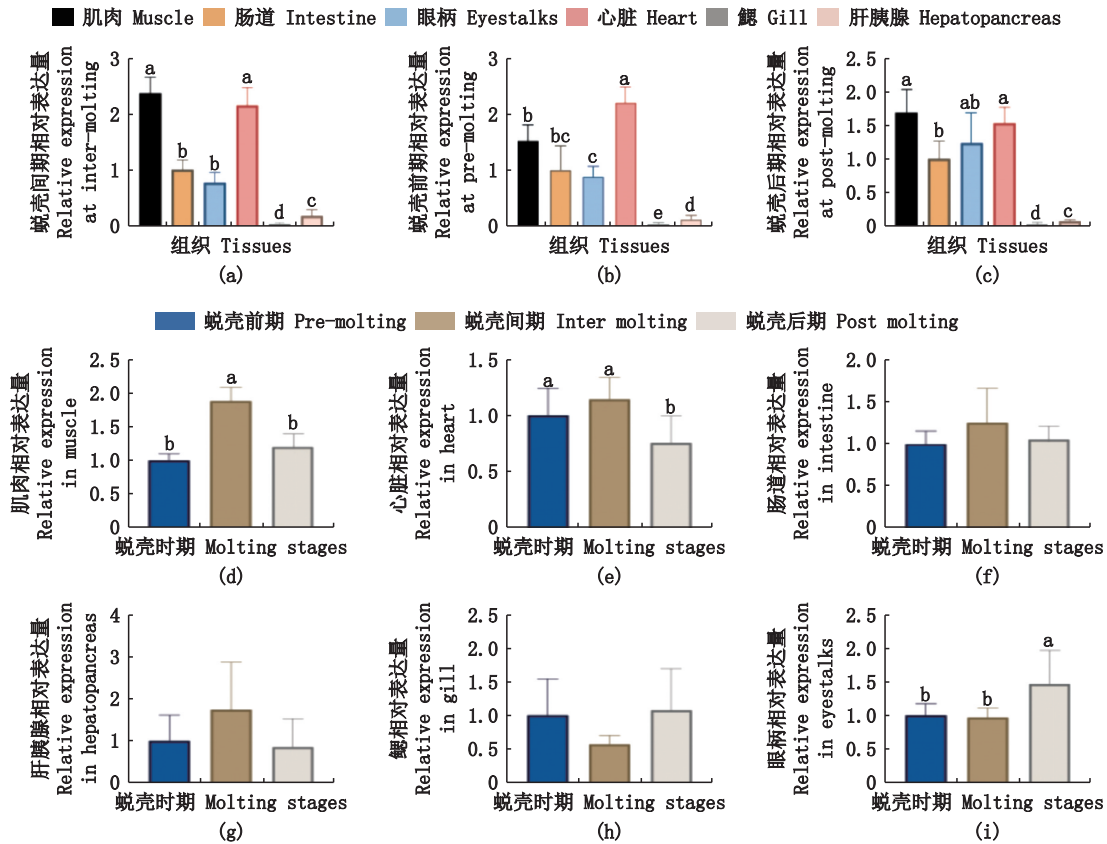
Fig. 2 Phylogenetic tree of *Kcna* gene among *E. sinensis* and other arthropod species

## 2.2 *Es-Kcna* 基因时空表达分析

荧光定量发现 *Kcna* 基因在中华绒螯蟹不同蜕壳时期的肌肉、肠道、眼柄、心脏、鳃和肝胰腺中均有表达。整体而言,在肌肉和心脏中的表达量相对较高,蜕壳间期和后期肌肉中表达量最高(图 3a, 3c),蜕壳前期心脏中表达量最高(图 3b),而鳃和肝胰腺在 3 个时期表达量均很低(图 3a, 3b, 3c)。

从不同蜕壳时期来看, *Es-Kcna* 基因在肌肉、

心脏、肠道和肝胰腺中的表达量均是蜕壳间期最高;在肌肉中,蜕壳间期的表达量显著高于前期和后期( $P < 0.05$ ),见图 3d;在心脏中的表达量则是前期和间期显著高于后期( $P < 0.05$ ),见图 3e;在眼柄中,蜕壳后期的表达量显著高于前期和间期( $P < 0.05$ ),见图 3i;在肠道和肝胰腺中的表达量均是间期>前期>后期,但都无显著差异( $P > 0.05$ ),见图 3f, 3g;在鳃中的表达量则是后期>前期>间期,无显著差异( $P > 0.05$ ),见图 3h。



(a, b, c) *Kcna* 基因在不同组织中的表达比较; (a) 蜕壳间期, (b) 蜕壳前期, (c) 蜕壳后期; (d, e, f, g, h, i) *Kcna* 基因在相关组织不同蜕壳时期的表达比较; (d) 肌肉, (e) 心脏, (f) 肠道, (g) 肝胰腺, (h) 鳃, (i) 眼柄。图中不同小写字母表示组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。 (a, b, c) the expression profiles of *Kcna* gene among different molting stages in relative tissues, (d) muscle, (e) heart, (f) intestine, (g) hepatopancreas, (h) gill, (i) eyestalk. Different lowercase letters indicate significant differences among groups ( $P < 0.05$ ).

图3 *Kcna* 基因在中华绒螯蟹不同组织和不同蜕壳时期中的表达情况

Fig. 3 Expression profiles of *Kcna* gene in different tissues and molting stages of *E. sinensis*

### 2.3 *Kcna* 基因的 RNA 干扰效应

经过一个完整蜕壳周期的 RNA 干扰, 发现对照组终末体质量 ( $W_2$ )、终末步足长度 ( $F_2$ ) 和蜕壳增重率 (WGR) 都显著高于实验组 ( $P < 0.05$ ); 终末壳长 ( $L_2$ )、蜕壳周期 (MI) 和特定生长率 (SGR) 无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。肌肉组织切片结果显示, 实验组第二步足肌纤维直径为  $(174.26 \pm 24.31) \mu\text{m}$ , 对照组为  $(187.74 \pm 35.40) \mu\text{m}$ , 实验组小于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 见图版。

### 2.4 *Kcna* 基因的 SNP 分子标记筛选及与地理种群、生长性状关联分析

对 256 只来自于长江和辽河水系的野生样本和 245 只养殖样本进行 *Kcna* 基因的 PCR 产物测序, 在 *Es-Kcna* 基因第 8 外显子上鉴定出一个 SNP 突变位点 (A1 461G)。将该位点与野生样本的水系来源进行关联, 结果发现长江水系中华绒螯蟹

中 *Kcna* 基因的 AA 型的比例显著高于 GG 型, 在 2005 年度时 AA 的比例达到了 63.30% (表 3); 而辽河水系中华绒螯蟹中 *Kcna* 基因的 GG 型的比例显著高于 AA 型, 在 1999 年度中辽河水系中 GG 型比例达 86.11%, 而 2017 年度 GG 型比例达到了 97.83% (表 3)。GG 基因型在野生辽河水系中显著富集, 而 AA 基因型在野生长江水系中富集 (表 3)。

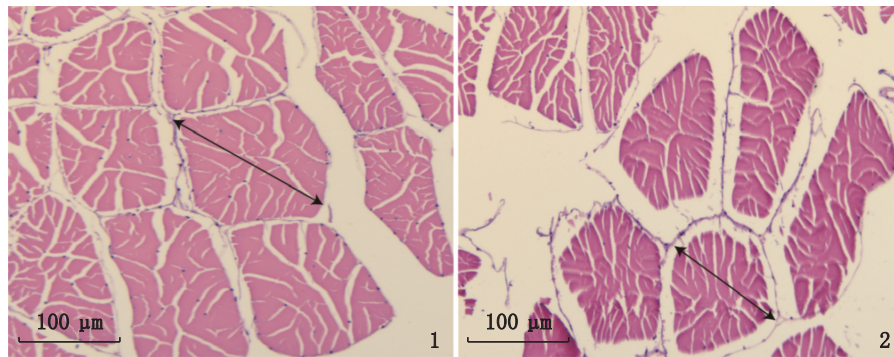
将该 SNP 分子标记位点 (A1 461G) 与体质量、壳长、步足长度进行关联分析。在具有表型数据的 190 只野生群体中, 由于采集的野生个体规格差异较大, 故体质量、壳长、步足长度本身存在一定的差异, 为了减少误差, 将步足长度矫正为比例性状, 即步足长度/壳长, 发现 AA 型平均步足长度比例为 0.75, 显著高于 AG 型的 0.73 和 GG 型的 0.70 ( $P < 0.05$ ), 见表 4; 在 245 只养殖群体中, AA 型平均比例为 0.72, 显著高于 AG 型的 0.71 和 GG 型的 0.70 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

表2 *Kcna* 基因RNA干扰对中华绒螯蟹生长性状的影响( $n=18$ )  
 Tab. 2 Effects of RNA interference for *Kcna* gene on growth performance of *E. sinensis* ( $n=18$ )

| 生长指标 Indicators of growth              | 实验组 Experimental group  | 对照组 Control group       |
|--|-------------------------|-------------------------|
| 初始体质量 Initial body mass/g              | 2.83±0.41               | 2.85±0.35               |
| 终末体质量 Final body mass/g                | 3.44±0.52 <sup>b</sup>  | 3.56±0.61 <sup>a</sup>  |
| 初始壳长 Initial carapace length/mm        | 16.28±0.69              | 16.63±0.72              |
| 终末壳长 Final carapace length/mm          | 18.11±0.45              | 18.29±0.41              |
| 初始步足长度 Initial leg length/mm           | 12.31±0.74              | 12.64±0.72              |
| 终末步足长度 Final leg length/mm             | 13.86±0.45 <sup>b</sup> | 14.45±0.41 <sup>a</sup> |
| 蜕壳周期 Molting interval/d                | 27.81±4.22              | 28.26±3.94              |
| 蜕壳增重率 Weight gain rate after molting/% | 21.31±3.14 <sup>b</sup> | 25.75±4.60 <sup>a</sup> |
| 特定生长率 Specific growth rate/(%/d)       | 0.70±0.23               | 0.78±0.34               |

注:表中不同小写字母表示组间存在显著差异( $P<0.05$ )。

Notes: Different lowercase letters in the table indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ ).



1. 对照组; 2. 实验组。

1. Control group; 2. Experimental group.

图版 RNA干扰后第二步足肌纤维直径变化

Plate Changes in muscle fiber diameter of the second walking leg after RNA interference

表3 中华绒螯蟹长江和辽河野生群体中不同年份 *Kcna* 基因SNP的分布频率  
 Tab. 3 SNP distribution frequency of *Kcna* gene in wild populations of *E. sinensis* from the Yangtze and Liaohe rivers in different years

| 基因型<br>Genotypes | 1999年                  |                       | 2005年                  |                       | 2014年                  |                       | 2017年                  |                       |
|------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                  | 长江<br>Yangtze<br>river | 辽河<br>Liaohe<br>river | 长江<br>Yangtze<br>river | 辽河<br>Liaohe<br>river | 长江<br>Yangtze<br>river | 辽河<br>Liaohe<br>river | 长江<br>Yangtze<br>river | 辽河<br>Liaohe<br>river |
| AA               | -                      | 0%                    | 63.30%                 | -                     | 50%                    | 20.34%                | 37.21%                 | 0%                    |
| GG               | -                      | 86.11%                | 0.70%                  | -                     | 11.90%                 | 67.80%                | 18.60%                 | 97.83%                |
| AG               | -                      | 13.89%                | 30.00%                 | -                     | 38.10%                 | 11.86%                | 44.19%                 | 2.17%                 |

注:“-”代表未分析该年度的野生样本。

Notes: “-” means no wild individuals used for the year.

表4 中华绒螯蟹 *Kcna* 基因突变位点与生长性状关联分析  
Tab. 4 Correlation analysis of *Kcna* gene mutation site with growth traits

| 项目<br>Items                 | 基因型<br>Genotypes | 样本量<br>Numbers/只 | 体质量<br>Mass/g             | 壳长<br>Carapace length/<br>mm | 步足长度<br>Leg length/mm   | 步足长度/壳长<br>Leg length/<br>carapace length |
|-----------------------------|------------------|------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------|---|
| 野生群体<br>Wild population     | AA               | 49               | 116.22±55.86 <sup>b</sup> | 55.75±7.32 <sup>b</sup>      | 41.64±5.96 <sup>a</sup> | 0.75±0.05 <sup>a</sup>                    |
|                             | GG               | 98               | 137.39±53.14 <sup>a</sup> | 58.93±6.70 <sup>a</sup>      | 41.19±5.72 <sup>b</sup> | 0.70±0.05 <sup>c</sup>                    |
|                             | AG               | 43               | 139.04±52.29 <sup>a</sup> | 59.35±6.50 <sup>a</sup>      | 43.55±6.00 <sup>a</sup> | 0.73±0.06 <sup>b</sup>                    |
| 养殖群体<br>Cultured population | AA               | 17               | 242.06±39.03              | 70.60±2.57                   | 50.64±3.70              | 0.72±0.03 <sup>a</sup>                    |
|                             | GG               | 42               | 234.33±51.86              | 70.20±4.40                   | 49.19±4.82              | 0.70±0.04 <sup>c</sup>                    |
|                             | AG               | 186              | 237.45±46.91              | 70.44±3.85                   | 50.07±3.26              | 0.71±0.04 <sup>b</sup>                    |

注:表中不同小写字母表示组间存在显著差异( $P < 0.05$ )。

Notes: Different lowercase letters in the table indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

中华绒螯蟹 *Kcna* 基因编码的蛋白具有 1 个 BTB 结构域和 5 个跨膜结构区,符合典型的电压门控钾离子通道蛋白结构特征<sup>[21]</sup>。BTB 结构域最早由 LASKI<sup>[22-23]</sup>在果蝇体内发现。转录因子 bric-a-brac、tramtrack 和 broad complex 在其编码蛋白 N 端有 1 个序列保守的区域,这个区域被命名为 BTB 结构域。众多研究指出,BTB 蛋白与动植物的生长发育、抗逆、转录调节、细胞骨架的组织及周期调控相关<sup>[24-27]</sup>,推测 BTB 蛋白在中华绒螯蟹的生长发育中参与肌肉细胞的生长、增殖以及蜕壳前后肌细胞骨架重塑等一系列生物学过程。系统进化树结果显示与三疣梭子蟹亲缘性最高且甲壳动物聚为单独的进化枝,表明 *Kcna* 基因在甲壳动物的进化过程中相对保守,可能具有相似生物学功能。

*Kcna* 基因在动物肌肉细胞发育和骨骼肌收缩中扮演着重要的分子调控角色,这已经得到了先前研究的证实<sup>[7, 28-29]</sup>。本研究通过荧光定量 PCR 实验发现, *Es-Kcna* 基因在不同蜕壳时期的肌肉和心脏中均高表达,这提示该基因可能参与了中华绒螯蟹的肌肉发育过程,进而影响其生长发育。据研究表明,蜕壳间期是中华绒螯蟹蜕壳周期中的一个关键阶段,为生长和发育提供能量积累<sup>[30]</sup>,因此,蜕壳间期高表达的 *Kcna* 基因可能通过调控肌肉细胞的增殖来为其生长发育积累能量。此外, KON 等<sup>[8]</sup>和 SILIC 等<sup>[9]</sup>的研究表明钾离子通道蛋白基因家族其他相关基因能够调节金鱼和斑马鱼的尾鳍长度。在本研究中,我们利用 RNA 干扰技术成功敲降了 *Kcna* 基因的表达。结果显示,敲降 *Kcna* 基因的表达后,扣蟹体质量、蜕壳增重率和步足长度显著降低,步足肌纤维直

径也变短。因此,推测 *Kcna* 基因正向调控中华绒螯蟹肌肉细胞的增殖和骨骼肌的收缩,并影响了中华绒螯蟹的步足长度。然而,关于 *Kcna* 基因如何调控中华绒螯蟹肌肉发育和步足长度的分子机制仍有待后续进一步深入研究。

目前,随着现代分子生物学和遗传学的不断发展,中华绒螯蟹分子育种技术也日益展开。陈义培等<sup>[31]</sup>报道了中华绒螯蟹 *MSTN* 基因的 C714 位点 TT 基因型对生长最为有利;姜鹏飞等<sup>[19]</sup>在中华绒螯蟹 *Scarb1* 基因第 1 外显子筛选到 1 个 SNP 位点 C432T,表现为 TT 基因型在蜕壳后体质量、壳长显著增加。本研究成功从中华绒螯蟹 *Kcna* 基因的第 8 外显子中筛选到 1 个 SNP 位点,即 A1 461G。此 SNP 分子标记在长江和辽河水系的野生中华绒螯蟹种群中表现出明显的基因型分布差异。具体来说,长江水系中 AA 型的频率较高,而辽河水系中 GG 型的频率较高。目前,中华绒螯蟹不同水系的区分主要依赖于外部形态指标、蜕壳次数、繁殖行为、生化指标以及微卫星多态性等方法<sup>[32-34]</sup>。相比之下,利用 SNP 分子标记进行不同水系区分的研究较少。因此,该 SNP 位点有可能成为鉴别中华绒螯蟹不同水系种质的重要分子标记。此外,还发现在野生和养殖的中华绒螯蟹群体中, *Kcna* 基因的 SNP 位点(A1 461G)为 AA 型的个体其步足长度显著长于 GG 型的个体。结合之前的研究, *Kcna* 基因具有正向调控肌肉发育的功能。因此,这个 SNP 位点也有可能成为中华绒螯蟹良种选育的分子辅助育种标记。

### 参考文献:

- [1] 李燕,张玥. 电压门控钾离子通道的结构与特异性[J]. 生物学通报, 2023, 58(8): 72-75.  
LI Y, ZHANG Y. The structure and specificity of voltage-gated potassium ion channels [J]. Bulletin of Biology,

- 2023, 58(8): 72-75.
- [2] ZHU P P, LI J L, ZHANG L T, et al. Development-related aberrations in Kv1.1  $\alpha$ -subunit exert disruptive effects on bioelectrical activities of neurons in a mouse model of fragile X syndrome [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2018, 84: 140-151.
- [3] WIPFF J, DIEUDÉ P, GUEDJ M, et al. Association of a KCNA5 gene polymorphism with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the european caucasian population [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2010, 62(10): 3093-3100.
- [4] WU J, CHEN Z D, LIU Q J, et al. Silencing of *Kv1.5* gene inhibits proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(11): 26914-26926.
- [5] ISHIDA S, SAKAMOTO Y, NISHIO T, et al. *Kcna1*-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures [J]. *Brain Research*, 2012, 1435: 154-166.
- [6] XU J C, KONI P A, WANG P L, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight [J]. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(5): 551-559.
- [7] RUIZ-CAÑADA C, KOH Y H, BUDNIK V, et al. DLG differentially localizes *shaker* K<sup>+</sup>-channels in the central nervous system and retina of *Drosophila* [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 82(6): 1490-1501.
- [8] KON T, OMORI Y, FUKUTA K, et al. The genetic basis of morphological diversity in domesticated goldfish [J]. *Current Biology*, 2020, 30(12): 2260-2274. e6.
- [9] SILIC M R, WU Q Y, KIM B H, et al. Potassium channel-associated bioelectricity of the dermomyotome determines fin patterning in zebrafish [J]. *Genetics*, 2020, 215(4): 1067-1084.
- [10] PERATHONER S, DAANE J M, HENRION U, et al. Bioelectric signaling regulates size in zebrafish fins [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(1): e1004080.
- [11] CONG B L, CHAI Y M, WANG B, et al. Molecular characterization and functional analysis of four teleostean K<sup>+</sup> channels in macrophages of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 426-435.
- [12] 刘春影. 钾离子通道在星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)先天性免疫防御中的作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- LIU C Y. Studies on the effects of potassium channels in the innate immune defense from starry flounder (*Platichthys stellatus*) [D]. Ji'nan: Shandong University, 2016.
- [13] 关伟晔, 周振旗, 谢昕洋, 等. 中华绒螯蟹分子育种群体与传统育种群体的耐低氧性能[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(4): 447-456.
- GUAN W Y, ZHOU Z Q, XIE X Y, et al. Study on hypoxia tolerance in a molecular breeding population and traditional breeding population of *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(4): 447-456.
- [14] 王成辉, 张根玉. 中华绒螯蟹“江海21”[J]. *中国水产*, 2017(1): 69-75.
- WANG C H, ZHANG G Y. *Eriocheir sinensis* "Jianghai 21" [J]. *China Fisheries*, 2017(1): 69-75.
- [15] 康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性的变化[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 806-812.
- KANG X J, TIAN Z H, WU J L, et al. Molt stages and changes in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 806-812.
- [16] WANG J, CHEN X W, HOU X, et al. "Omics" data unveil early molecular response underlying limb regeneration in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Science Advances*, 2022, 8(37): eabl4642.
- [17] HOU X, CHEN X W, YANG H, et al. V-ATPase subunit b plays essential roles in the molting process of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Biology Open*, 2020, 9(5): bio048926.
- [18] 董哲, 任桂敏, 李桑, 等. 利用3'RACE和5'RACE技术克隆日本刺沙蚕中枢神经系统TPH基因全长[J]. *辽宁医学院学报*, 2016, 37(6): 1-4.
- DONG Z, REN G M, LI S, et al. 3'RACE and 5'RACE used to clone tryptophan hydroxylase gene in central nervous system of nereis (*N. japonica*) [J]. *Journal of Liaoning Medical University*, 2016, 37(6): 1-4.
- [19] 姜鹏飞, 侯鑫, 王军, 等. 中华绒螯蟹 *Scarb1* 基因功能及其与生长性状的关联分析[J]. *水产学报*, 2023, 47(1): 019113.
- JIANG P F, HOU X, WANG J, et al. Study on function of *scarb1* gene in *Eriocheir sinensis* and its association with growth traits [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(1): 019113.
- [20] 张凯军, 王静安, 倪康达, 等. 不同水温对个体养殖系统中华绒螯蟹幼蟹蜕壳生长和摄食率的影响[J]. *淡水渔业*, 2021, 51(5): 100-105.
- ZHANG K J, WANG J A, NI K D, et al. Effects of different water temperatures on molting, growth and feeding rates of juvenile *Eriocheir sinensis* cultured in individual culture system [J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(5): 100-105.
- [21] MILLER C. An overview of the potassium channel family [J]. *Genome Biology*, 2000, 1(4): reviews0004. 1.
- [22] ZOLLMAN S, GODT D, PRIVÉ G G, et al. The BTB



- domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in drosophila [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(22): 10717-10721.
- [23] ALBAGLI O, DHORDAIN P, DEWEINDT C, et al. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins [J]. Cell Growth & Differentiation, 1995, 6(9): 1193-1198.
- [24] LI J H, SU X X, WANG Y L, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the BTB domain-containing protein gene family in tomato [J]. Genes & Genomics, 2018, 40(1): 1-15.
- [25] BONCHUK A, BALAGUROV K, GEORGIEV P, et al. BTB domains: a structural view of evolution, multimerization, and protein-protein interactions [J]. BioEssays, 2023, 45(2): 2200179.
- [26] KOVALOVSKY D, UCHE O U, ELADAD S, et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions [J]. Nature Immunology, 2008, 9(9): 1055-1064.
- [27] ZACHARCHENKO T, WRIGHT S. Functionalization of the BCL6 BTB domain into a noncovalent crystallization chaperone [J]. International Union of Crystallography, 2021, 8(2): 154-160.
- [28] ARÉVALO-MARTÍNEZ M, CIDAD P, GARCÍA-MATEO N, et al. Myocardin-dependent Kv1.5 Channel expression prevents phenotypic modulation of human vessels in organ culture [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2019, 39(12): e273-e286.
- [29] LEE HAMILTON D, BEALL C, JEROMSON S, et al. Kv1.3 inhibitors have differential effects on glucose uptake and AMPK activity in skeletal muscle cell lines and mouse ex vivo skeletal muscle [J]. The Journal of Physiological Sciences, 2014, 64(1): 13-20.
- [30] HUANG S, WANG J, YUE W C, et al. Transcriptomic variation of hepatopancreas reveals the energy metabolism and biological processes associated with molting in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14015.
- [31] 陈义培, 吴廉, 陈晓雯, 等. 中华绒螯蟹 *MSTN* 基因 SNPs 多态性及与生长性状的关联分析 [J]. 水生生物学报, 2018, 42(2): 293-299.
- CHEN Y P, WU L, CHEN X W, et al. Polymorphism of *MSTN* gene and its association with growth traits in Chinese mitten Crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(2): 293-299.
- [32] 陈卉, 成梦情, 董转章, 等. 不同产地中华绒螯蟹鉴定方法及其研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(3): 11-17.
- CHEN H, CHENG M Q, DONG Z Z, et al. Identification methods and research progress on *Eriocheir sinensis* from different habitats [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(3): 11-17.
- [33] 张凯军, 姜鹏飞, 王军, 等. 不同温度对中华绒螯蟹生长及肠道微生物菌群的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 384-393.
- ZHANG K J, JIANG P F, WANG J, et al. Effects of different temperatures on growth and gut microbiota of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 384-393.
- [34] 王武, 王成辉, 马旭洲. 河蟹生态养殖 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- WANG W, WANG C H, MA X Z. Ecological aquaculture of *Eriocheir sinensis* [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2013.

## Molecular function of *Kcna* gene and its association with growth traits in *Eriocheir sinensis*

XUE Lei<sup>1,2,3</sup>, HOU Xin<sup>1,2,3</sup>, ZENG Xiangjian<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiaowen<sup>1,2,3</sup>, WANG Jun<sup>1,2,3</sup>, WANG Chenghui<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to investigate the gene structure, expression pattern, and molecular function of *Kcna* gene in *Eriocheir sinensis*, this study cloned the full-length *Kcna* gene of *E. sinensis* (named *Es-Kcna*), and conducted bioinformatics analysis and spatio-temporal expression pattern research; observed the changes in growth phenotype characteristics of *E. sinensis* after RNA interfering with *Es-Kcna* gene; and screened the SNP molecular markers of *Es-Kcna* gene and conducted association analysis with population geographic distribution and growth characteristics. The results showed that *Kcna* gene was located on chromosome 46 of *E. sinensis*, with a length of 945,304 bp and nine exons. The full-length cDNA was 2 080 bp, the open reading frame was 1 584 bp, and encoded 527 amino acids, the total number of atoms is 8 433, the molecular structure formula is  $C_{2719}H_{4210}N_{702}O_{787}S_{15}$ , the predicted isoelectric point (pI) is 5.23, and the relative molecular weight is 59.81 KDa. Phylogenetic tree analysis showed that *Es-Kcna* gene was most closely related to the *Kcna* gene of *Portunus trituberculatus*, and the crustaceans clustered into a separate clade. Fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) results showed that *Es-Kcna* gene was expressed in six tissues, including muscle, heart, intestine, eyestalk, gill and hepatopancreas at pre-molting, inter-molting and post-molting stages, with the highest expression abundance identified in muscle tissue. Compared with the control group, the body weight, molting weight gain rate and second walking leg length of the experimental group crabs were significantly decreased after RNA interfering of the *Kcna* gene. Muscle tissue slice results showed that the diameter of muscle fibers in the walking legs of the experimental group was smaller than that of the control group. In addition, a SNP (A1 461G) was identified in the exon 8 of *Es-Kcna* gene. The association analysis of population distribution showed that this SNP was significantly enriched in the GG genotype in the wild population of Liaohe River, while the AA genotype was enriched in the wild population of Yangtze River. The association analysis of growth traits showed that the second walking leg length of individuals with the AA genotype was significantly longer than that of individuals with the GG genotype. The present study provided insight into the molecular function on *Kcna* gene in regulating growth and potential utilization in genetic breeding of *E. sinensis*, and provided an important reference for distinguishing wild *E. sinensis* from the Yangtze and Liaohe rivers.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; *Kcna*; gene structure; RNA interference; SNP