

doi: 10.7541/2022.2021.0245

三疣梭子蟹基因克隆及其在蜕皮中的功能

吴捷^{1,2} 吕建建^{2,3} 张伟伟^{1,2} 李玉坤^{1,2} 高保全^{2,3} 刘萍^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266235)

摘要: 为研究水通道蛋白AQP的生理功能, 克隆了三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 水通道蛋白2基因 (*ptaqp2*), 该基因全长4126 bp, 编码522个氨基酸, 具有水通道蛋白基因家族的保守结构域及功能结构域; 进化树聚类分析结果显示, *ptaqp2*基因属于水通道蛋白基因家族C-AQP类基因; 组织表达结果显示, *ptaqp2*呈泛组织表达特征, 在眼柄中的表达量最高, 在肠和肌肉中也有较高表达, 在血淋巴中的表达最低; *ptaqp2*基因在不同蜕皮时期呈显著差异表达 ($P < 0.05$), 且在蜕皮前期表达量最高; 在蜕皮激素(Molting Hormone简称MH)刺激下, 该基因在肌肉、肠及胃中均呈不同程度的上调表达趋势; 通过RNAi技术在蜕皮前期敲降*ptaqp2*的表达, 发现能够显著推迟蜕皮过程。研究初步证明了*ptaqp2*基因在三疣梭子蟹蜕皮中发挥重要作用。

关键词: 水通道蛋白; 基因克隆; 蜕皮激素; RNA干扰; 三疣梭子蟹

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)11-1694-07



水通道蛋白(Aquaporin, AQP)最早由Agre及其同事发现并命名^[1, 2], 该蛋白是可以运输水和其他小分子物质的通道蛋白, 普遍存在于动、植物及微生物中。之前的研究证实AQP所介导的自由水快速被动地跨生物膜转运是水进出细胞的主要途径^[3, 4]。目前发现了多种具有不同功能的AQP基因, 其中有的只与水的运输相关, 被称为“Classical aquaporins”(C-AQP), 有的除了能够运输水分子外还能介导大分子的甘油等物质运输, 称为“Aquaglyceroporins”(AQGP)^[5]; 随后在哺乳动物中发现在细胞分化、凋亡等细胞活动中发挥作用的水通道蛋白, 称之为“Super aquaporins”或“Subcellular aquaporins”(S-AQP)^[6]; 另外, AQP-8与氨的运输有关^[7], 被单独列为一个亚家族^[8]。

在水产动物中, AQP基因的研究主要集中于渗透压调节或盐度适应功能。比如在莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、刀鲚(*Coilia nasus*)和卵形鲳(*Trachinotus ovatus*)等鱼类中均发现AQP基因发挥重要的渗透压调节功能^[9-11]。此外,

还发现该基因在鱼类低温适应中也具有一定的作用^[12, 13]。在水生甲壳动物中, AQP基因的克隆及功能研究也有零星报道。王渝等^[14]在三疣梭子蟹克隆并证明了AQP基因在盐度适应中发挥作用。杨志刚等^[15]克隆了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)AQP并发现其在具有渗透压调节作用。然而, 该基因在甲壳动物中是否还具有其他功能, 相关报道较少。

水生甲壳动物的蜕皮伴随着大量水分进入体内。之前的研究发现蓝蟹(*Callinectes sapidus*)在蜕皮过程中大量水通过肠和胃进入生物体内^[12], 并初步证明了AQP参与了甲壳动物蜕皮过程中的细胞体积调节^[16-18]。蜕皮激素(MH)是调控蜕皮的关键激素^[19], 然而, AQP基因在水生甲壳动物蜕皮吸水过程中是否受该激素调控尚未见报道。

三疣梭子蟹是我国重要的海水养殖品种^[20]。本研究通过RACE技术克隆*ptaqp2*基因全长, 明确该基因的序列特征及组织表达分布模式。采用荧光定量PCR(qPCR)技术, 分析其不同蜕皮时期以及MH刺激后的表达规律。利用RNAi技术敲降

收稿日期: 2021-09-16; 修订日期: 2022-06-24

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901304); 国家自然科学基金面上项目(41776160)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program (2018YFD0901304); the National Natural Science Foundation of China (41776160)]

作者简介: 吴捷(1996—), 男, 硕士; 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究。E-mail: 17806287246@163.com

通信作者: 刘萍, 女, 研究员; 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

*ptaqp2*基因的表达,以研究其对蜕皮的影响。研究结果有助于深入解析水生甲壳动物的蜕皮机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 三疣梭子蟹取自山东潍坊昌邑海丰水产有限公司,蟹处于同一发育时期,体重为(35.5±5.5) g。饲养在5个室内养殖用的蟹池(蟹池长为4 m,宽为2.5 m,高为1.3 m),池中注入20 m³,盐度为33, pH为8.3的自然海水,每池100只,暂养3d。水温控制在(25±1)℃,持续供氧,每天下午定时换1/3体积的海水,换水后定时投喂新鲜的蓝蛤(*Potamocorbula laevis*)。

不同蜕皮周期材料制备 根据甲壳硬度和游泳足趾节末端新旧表皮的变化^[21],将暂养蟹分为蜕皮后期(A)、蜕皮间期(C)和蜕皮前期(D),并各取3只,分别解剖,取肠、胃、肌肉和眼柄四个组织于液氮中保存。

MH刺激后材料制备 从暂养的蟹中,挑选50只健康的三疣梭子蟹,依据拟穴青蟹和三疣梭子蟹蜕皮时期的MH含量^[22, 23],向三疣梭子蟹注射MH(注射部位游泳足基部, MH浓度为40 ng/mL),注射MH激素后于0、24h、48h和72h随机挑选3只蟹解剖,取肠、胃、肌肉和眼柄4个组织,样品液氮保存。

1.2 RNA提取及反转录

采用Trizol法提取各个实验组的总RNA,利用核酸定量仪(NanoDrop 2000 Thermo Scientific)检测RNA的浓度及质量,通过1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。按照PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)说明书进行反转录,合成cDNA模板,用于*ptaqp2*基因定量分析。

1.3 基因克隆

随机选取9只暂养3d的三疣梭子蟹,取心脏、表皮、胃、肝胰腺、血细胞(抽取的血淋巴加等量抗凝剂存于1.5 mL离心管,4℃,7000 r/min离心10min,弃上清)、眼柄、肌肉、肠和鳃9个组织液氮储存,提取RNA并合成3'和5'RACE的cDNA模板,通过实验室已有的该基因序列设计3'和5'RACE引物^[24],引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。反应体系参照Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase说明书,反应程序95℃ 3min; 95℃ 15s, 65℃ 15s, 72℃ 1min,共35个循环; 72℃ 10min,进行3'和5'扩增。对PCR产物进行切胶回收,连接转化,挑取阳性单克隆,通过DNA测序通用引物M13进行菌落PCR鉴定,将目的产物送睿

博生物公司进行测序。使用SeqMan软件去掉测序结果中的冗余序列后,然后利用Cexpress软件拼接获得完整的基因序列。

1.4 序列分析

利用软件BioEdit预测ORF开放阅读框,并翻译为蛋白序列;将蛋白序列提交到SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),预测信号肽;通过NCBI的保守结构域(CDD)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/search>)和SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行功能结构域的预测和确定;采用TMHMM SerVer 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜结构预测。使用DNAMAN 分析软件将三疣梭子蟹的氨基酸序列与其他物种进行多重序列比对;最后通过软件MEGA 7.0以Neighbor Joining法构建系统进化树^[25]。

1.5 qPCR分析

根据已知的三疣梭子蟹管家基因 β -actin和以获得全长的*ptaqp2*基因,通过Primer Premier 5.0软件设计内参引物和荧光定量特异性引物(表1)。采用实时荧光定量PCR(qPCR)对*ptaqp2*基因在各个组织以及各个实验组中的相对表达量进行检测分析,反应体系为: 2×SYBR[®] Green Pro Taq HS Premix II 5 μL, ROX 0.2 μL, Primer F 0.4 μL, Primer R 0.4 μL, Template cDNA 1 μL, ddH₂O 3 μL;程序参照TOYOBO SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix说明书进行。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算,借助SPSS19.0对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),后续使用Origin Pro和Excel软件进行结

表1 实验所用的引物序列

Tab. 1 The sequence of primers used in the experiment

引物 Primer	序列Sequence(5'—3')	作用Usage
<i>ptaqp2</i> F	TGCCAATTCTCATTATCACTTTGCCA ACAC	3'RACE
<i>ptaqp2</i> R	GCAACCTACCCAAATGCTCAATAAC TACA	5'RACE
<i>ptaqp2</i> F	TCTTTTCTTCCGTCAATCCCTACC	q-PCR
<i>ptaqp2</i> R	ACTTGTCTTGACGAAGGCTGG	q-PCR
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE通用 引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE通用 引物
β -actin- F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	q-PCR通用 引物
β -actin- R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	q-PCR通用 引物
M13F	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	DNA测序 通用引物
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	DNA测序 通用引物

果的统计与整理, $P < 0.05$ 为差异显著^[26]。

1.6 RNAi实验

RNAi实验所用的双链RNA由生工生物工程(上海)股份有限公司设计及合成, *ptaqp2*ai: GGUCUGGAGUUUCUCUUAATT; *ptaqp2*bi: CCCAGUCAGUGUAUGCCAATT; *ptaqp2*ci: CCAGUAAGUCAGGUGUAUUTT; NC: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT。将双链RNA浓度稀释为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 并将3个双链RNA按等体积混合。随后选取处于蜕皮前期的三疣梭子蟹, 利用微量注射器按体重向游泳足基部注射(注射量为 $1 \mu\text{g}/\text{g}$)。实验设计空白对照组、NC(阴性对照)对照组以及干扰实验组(实验持续10d, 确保空白对照组蜕皮率达70%以上), 每组共3个平行, 分别于0、24h和48h取肠、胃、肌肉和肝胰腺于液氮保存, 并提取RNA^[26]。

2 结果

2.1 *ptaqp2*基因的cDNA序列全长克隆及序列分析

*ptaqp2*基因cDNA序列全长4126 bp, 3'端和5'端非编码区分别为425和2132 bp, 开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)为1569 bp, 共编码氨基酸522个, 分子质量56.17 kD, 理论等电点为8.84。保守结构域预测结果显示该基因具有MIP保守结构域pfam00230。Pfam数据库预测显示此基因有MIP功能结构域PF00230.20。跨膜结构预测显示, 该基因具有6个跨膜结构。

2.2 *ptaqp2*同源性分析

将*ptaqp2*的氨基酸序列与其他物种进行氨基酸序列比对: *ptaqp2*基因与人(*Homines*)AQP2、AQP4基因、小鼠(*Mus musculus*)AQP2、AQP4基因、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的bib基因、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的AQPe.a基因和大青叶蝉(*Cicadella viridis*)的AQP-cic基因同源性分别为43.36%、40.60%、42.92%、40.17%、43.32%、39.69%和38.40%。所有比对的基因都含有AQP所具有的两个保守的NPA序列。聚类分析表明(图1和图2), *ptaqp2*与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的bib基因聚为一枝, 同属于水通道蛋白四大类中的C-AQP。

2.3 *ptaqp2*的组织表达特点

利用qPCR技术, 对*ptaqp2*基因进行全组织表达的分析(图3): *ptaqp2*呈泛组织表达, 在眼柄、肠、肌肉、心脏、表皮、胃、肝胰腺、血细胞及鳃中均有表达, 其中在眼柄中表达最高, 其次为肠和肌肉, 在血细胞和鳃中几乎不表达。

2.4 *ptaqp2*在不同蜕皮时期的表达规律

*ptaqp2*在4个组织(肌肉、肠、胃和眼柄)中都在蜕皮前期高表达。与蜕皮后期相比表达上调1.5倍左右, 差异显著($P < 0.05$)。在蜕皮间期表达较低, 与蜕皮后期相比表达下调, 在肠、胃组织中与蜕皮后期相比分别下调了1倍和2倍, 差异显著($P < 0.05$), 但在肌肉与眼柄中差异不显著(图4)。

2.5 *ptaqp2*在MH刺激下的表达模式

在MH刺激后(图5), *ptaqp2*在眼柄中呈现下调表达趋势, 持续到72h, 与0相比下调2倍左右, 差异显著($P < 0.05$); 除眼柄外的3个组织(肌肉、肠和胃)中都呈现出不同的上调表达趋势, 但表达趋势有所不同。在肌肉和胃中持续上调到72h, 表达量最高时约为0的2倍, 差异显著($P < 0.05$); 在肠中24h表达量达到最高约为0的2.5倍差异显著($P < 0.05$), 随后下调, 72h时恢复正常表达水平。

2.6 *ptaqp2*敲降对蜕皮率的影响

注射双链RNA后(图6), 在3个组织(胃、肠和肌肉)中*ptaqp2*基因的表达均显著下调。其中在胃和肌肉组织中24h时干扰效果最显著, 干扰效率分别为58.14%和51.50%, 在肠组织中48h时干扰效果最显著, 干扰效率为55.40%, 但在眼柄中未发现干扰效果。在维持10d的干扰实验结束后, 对照组、NC组和干扰组的蜕皮率分别为76.5%、84.6%和33.3%(图7)。干扰组蜕皮率显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论

AQP广泛存在于植物、单细胞生物、无脊椎动物和脊椎动物中, 能够高效转运水, 在多种生理过程中发挥重要作用。有研究发现AQP在甲壳动物不同蜕皮时期差异表达, 且与 Na^+/K^+ -ATPase和 $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ 等渗透压调控相关基因具有共表达趋势^[16], 相关研究表明AQP与甲壳动物的蜕皮密切相关^[17-19]。为进一步探究AQP在蜕皮中的功能, 本研

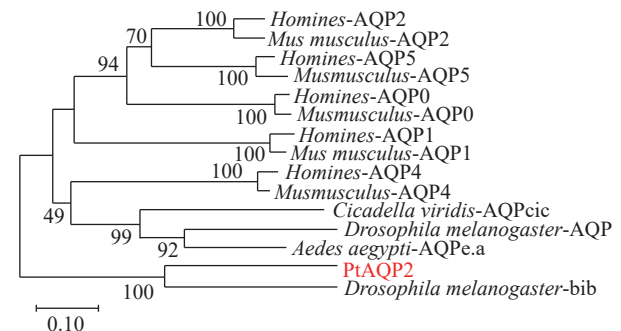


图1 三疣梭子蟹水通道蛋白*ptaqp2*的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of aquaporin *ptaqp2* from *P. trituberculatus*

究首次克隆了*ptaqp2*基因, 该基因与果蝇的基因聚为一枝, 与*PtAQP1*基因^[14]的同源性在20%左右, 但二者均具有两个保守的NPA结构域, 同属于水通道蛋白的C-AQP大类的基因。

水生甲壳动物在蜕皮时大量饮水, 之后主要通过肠腺和胃进入生物体内^[16], 其主要表现在肌肉吸水膨胀。相关研究表明AQP与甲壳动物的蜕皮有关且参与了肌肉细胞体积调节^[12-14]。在本研究

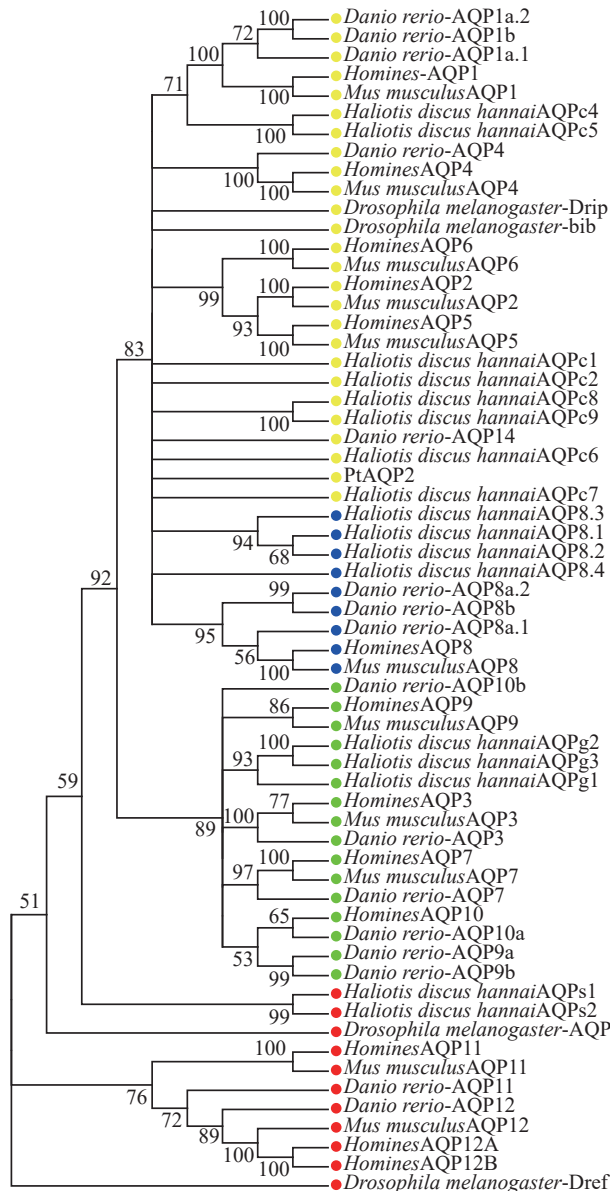


图2 三疣梭子蟹水通道蛋白*ptaqp2*聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *Ptaqp2* in *P. trituberculatus*

各个蛋白对应的GenBank登录号: 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)Drip、AQP、Dref、bib(NP_523697.1、NP_001163140.1、NP_001260311.1、NP_001260313.1); 人(*Homines*)AQP0、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP5、AQP6、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10、AQP11、AQP12A、AQP12B(NP_036196.1、NP_001316801.1、NP_000477.1、NP_001305073.1、NP_001304313.1、NP_001642.1、NP_001643.2、O14520.1、NP_001160.2、NP_001307564.1、XP_011508406.1、NP_766627.1、NP_945349.1、XP_011509974.1); 小鼠(*Mus musculus*)AQP0、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP5、AQP6、AQP7、AQP8、AQP9、AQP11、AQP12(NP_032626.2、NP_031498.1、NP_033829.3、NP_057898.2、NP_001295570.1、NP_033831.1、NP_780296.1、NP_001365567.1、NP_001102515.1、NP_001258772.1、NP_780314.1、NP_001153130.1); 斑马鱼(*Zebrafish*)AQP1a.1、AQP3a、AQP4、AQP3b、mipa、AQP8a.1、AQP1a.2、mipb、AQP10a、AQP7、AQP9b、AQP9a、AQP8a.2、AQP12、AQP11、AQP8b、AQP10b、AQP5like(NP_996942.1、AOE47042.1、NP_001345242.1、NP_001159593.1、NP_001003534.1、NP_001004661.1、NP_001129154.1、NP_001018356.1、NP_001002349.1、NP_956204.2、NP_001171215.1、NP_001028268.1、NP_001073651.1、NP_001039327.1、NP_001314822.1、NP_001108382.2、NP_001076516.1、XP_021327889.1); 埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)AQPc.a (Q9NHW7.2); 大青叶蝉(*Cicadella viridis*)AQP-cic(Q23808.1)

中,我们发现 $ptaqp2$ 在眼柄、肌肉、肠和胃中有较高水平的表达,而上述组织均与甲壳动物的蜕皮密切相关。另外,该基因在上述组织不同蜕皮时期显著差异表达,其中在蜕皮前期表达量最高,相关文献表明蜕皮激素(MH)相关的调节基因在蜕皮前期上调表达,蜕皮前期是、蜕皮过程重要的准备阶段^[19],而 $ptaqp2$ 基因受MH调节,推测其在蜕皮前期高表达,主要发挥准备作用。这表明 $ptaqp2$ 基因在三疣梭子蟹蜕皮中发挥一定功能。

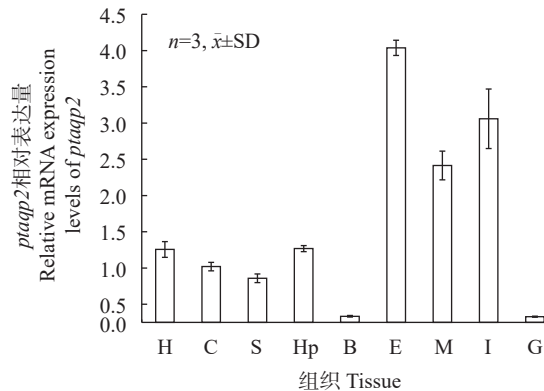


图3 三疣梭子蟹 $ptaqp2$ 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 3 Relative mRNA expression level of *P. trituberculatus ptaqp2* gene in different tissues

H. 心脏; C. 表皮; S. 胃; Hp. 肝胰腺; B. 血细胞; E. 眼柄; M. 肌肉; I. 肠; G. 鳃

H. Heart; C. Cuticle; S. Stomach; Hp. Hepatopancreas; B. Blood; E. Eyestalk; M. Muscle; I. Intestine; G. Gill

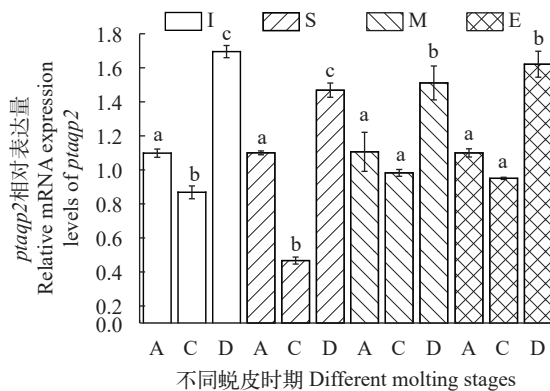


图4 三疣梭子蟹 $ptaqp2$ 基因在不同蜕皮时期组织中的表达分析

Fig. 4 Relative mRNA expression level of *ptaqp2* in *P. trituberculatus* at different moulting periods

A. 蜕皮后期; C. 蜕皮间期; D. 蜕皮前期; M. 肌肉; I. 肠; S. 胃; E. 眼柄; 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 相同字母表示组间差异不显著; $n=3$, $\bar{x}\pm SD$; 下同

A. Post-molt stages; C. Intermolt stage; D. Proecdysis stage; M. Muscle; I. Intestines; S. Stomach; E. Eyestalk; Different letters indicate significant differences ($P<0.05$). Same letters indicate no significant differences. The same applies below

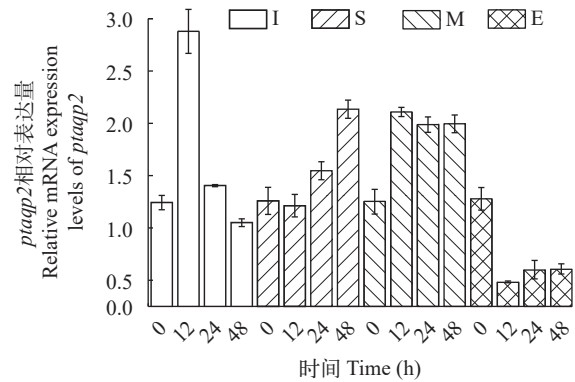


图5 MH刺激下三疣梭子蟹 $ptaqp2$ 在不同组织中的表特点

Fig. 5 Relative mRNA expression level of *ptaqp2* in different tissues of *P. trituberculatus* stimulated by MH

M. 肌肉; I. 肠; S. 胃; E. 眼柄

M. Muscle; I. Intestines; S. Stomach; E. Eyestalk

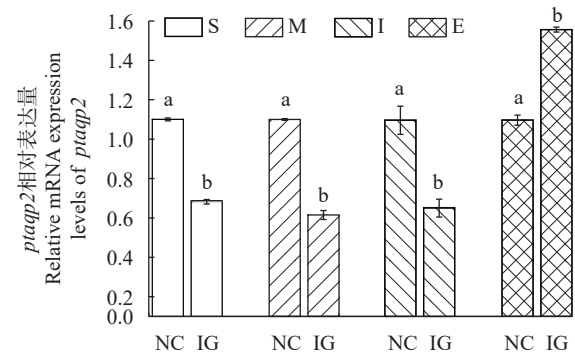


图6 三疣梭子蟹 $ptaqp2$ 基因干扰后的表达分析

Fig. 6 Relative mRNA expression level of *ptaqp2* after interference in *P. trituberculatus*

NC. 阴性对照; IG. 干扰组; S. 胃; M. 肌肉; I. 肠; E. 眼柄

NC. Negative control; IG. Interference group; S. Stomach; M. Muscle; I. Intestines; E. Eyestalk

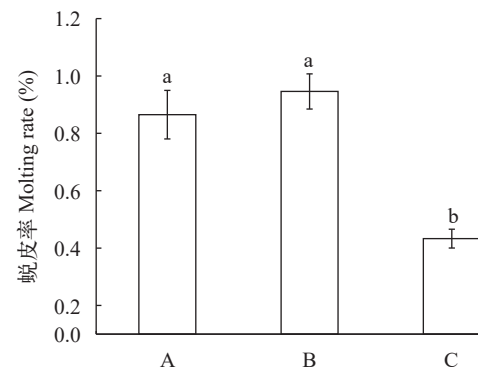


图7 蜕皮率统计

Fig. 7 Moulting rate of different experimental groups

A. 对照组; B. 阴性对照组; C. 干扰组

A. Control group; B. Negative control group; C. Interference group

蜕皮激素(MH)是蜕皮调控的重要激素, MH从蜕皮间期开始分泌产生, 在蜕皮前期达到最大, 蜕皮后期消失^[20]。为了验证AQP基因是否受MH的调控, 我们进行了MH刺激实验。结果发现: 在MH刺激下, *ptaqp2*基因在肠、胃和肌肉中的表达均显著上调。尤其是在肌肉中, 处理后24h开始上调表达并一直持续到72h。该结果与不同蜕皮时期的表达结果一致, 表明MH能够刺激*ptaqp2*基因上调表达, 在三疣梭子蟹蜕皮过程中的吸水环节发挥重要作用。值得注意的是, 我们观察到MH刺激后*ptaqp2*基因在眼柄中的表达呈下调表达。甲壳动物的蜕皮过程主要是由Y器(Y-organ)分泌的蜕皮类固醇激素MH与X器-窦腺复合体(X-organ-sinus gland, XO-SG)分泌的蜕皮抑制激素MIH相互拮抗而进行调控的, 其中XO-SG甲器官位于眼柄中。我们推测在注射MH后, 导致体内MH水平骤升, 可能诱导X器官有限的分泌MIH激素, 而AQP基因的表达可能会在这一过程中受到抑制。

为了进一步证实*ptaqp2*基因在蜕皮中的功能, 我们采用RNAi技术敲降了该基因在蜕皮前期的表达量。定量结果显示, 该基因在肌肉、胃和肠组织中均被显著敲降。我们发现*ptaqp2*基因敲降组的蜕皮率显著低于对照组和NC组($P<0.05$), 进一步明确了*ptaqp2*基因在三疣梭子蟹蜕皮中发挥重要作用。

综上所述, 本研究成功克隆了三疣梭子蟹*ptaqp2*基因cDNA全长序列并分析了该基因的功能结构域和跨膜结构域, 丰富了甲壳动物水通道蛋白基因家族。通过分析*ptaqp2*基因的组织表达特征、不同蜕皮时期的表达规律、MH刺激后的表达模式及RNAi后的蜕皮情况, 探究了该基因在三疣梭子蟹蜕皮中的功能及可能的调控机制。研究结果有助于系统解析水生甲壳动物的蜕皮机制。

参考文献:

- [1] Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, *et al.* Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28, 000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263**(30): 15634-15642.
- [2] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein [J]. *Science*, 1992, **256**(5055): 385-387.
- [3] Wang W D. Aquaporin [J]. *Bulletin of Biology*, 2002, **37**(6): 24-25. [王卫东. 水通道蛋白 [J]. *生物学通报*, 2002, **37**(6): 24-25.]
- [4] Henzler T, Steudle E. Reversible closing of water channels in *Chara* internodes provides evidence for a composite transport model of the plasma membrane [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1995, **46**(2): 199-209.
- [5] Agre P, King L S, Yasui M, *et al.* Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine [J]. *The Journal of Physiology*, 2002, **542**(Pt 1): 3-16.
- [6] Ishibashi K, Koike S, Kondo S, *et al.* The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis [J]. *The Journal of Medical Investigation*, 2009, **56**(Suppl): 312-317.
- [7] Saparov S M, Liu K, Agre P, *et al.* Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(8): 5296-5301.
- [8] Finn R N, Chauvigné F, Hlidberg J B, *et al.* The lineage-specific evolution of aquaporin gene clusters facilitated tetrapod terrestrial adaptation [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(11): e113686.
- [9] Li Q Q, Zhu H P, Lu M X, *et al.* Effects of salt stress on aquaporin 1(AQP1) gene expression in tilapia *Oreochromis mossambicus* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, **35**(11): 2996-3006. [李茜茜, 朱华平, 卢迈新, 等. 盐胁迫对橙色莫桑比克罗非鱼AQP1基因表达的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, **35**(11): 2996-3006.]
- [10] Wang M Y, Yang J, Xu P, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of aquaporin-1 from the *Coilia nasus* under high-salinity conditions [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, **24**(3): 449-458. [王美垚, 杨健, 徐跑, 等. 刀鲚水通道蛋白1的分子克隆及高盐作用下的表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2017, **24**(3): 449-458.]
- [11] Zhang J S, Liu Z F, Ma A J, *et al.* Response of aquaporin (AQP1, AQP3) and ion channel protein (CFTR, NHE1) of turbot (*Scophthalmus maximus*) to low-salinity stress [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, **41**(4): 41-49. [张金生, 刘志峰, 马爱军, 等. 大菱鲆水通道蛋白(AQP1、AQP3)以及离子通道蛋白(CFTR、NHE1)对低盐胁迫的响应 [J]. *渔业科学进展*, 2020, **41**(4): 41-49.]
- [12] Zhu H P, Liu Y J, Liu Z G, *et al.* Effects of cold stress on Aquaporin gene (AQP1) expression in tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, **21**(6): 1181-1189. [朱华平, 刘玉姣, 刘志刚, 等. 低温胁迫对尼罗罗非鱼水通道蛋白基因(AQP1)表达的影响 [J]. *中国水产科学*, 2014, **21**(6): 1181-1189.]
- [13] Shi Yingdi, Li Xiaoxia, Luo Juntao, *et al.* Expression and epigenetic regulation of water channel protein 1a (AQP1a) under cold pressure [C]. Abstracts of Papers Presented at the Annual Conference of Chinese Fisheries Association in 2015. Hangzhou, 2015: 343. [时应娣, 李晓霞, 罗军涛, 等. 低温压力下水通道蛋白(AQP1a)基因的表达表观调控及表达量变化调控的初步探讨 [C]. 2015年中国水产学会学术年会论文摘要集. 杭州, 2015: 343.]
- [14] Wang Y, Lu J J, Liu P, *et al.* Cloning and characterization of aquaporins 1 and its expression analysis under salinity stress in *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, **21**(5): 893-901. [王渝, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹水通道蛋白1 cDNA及其盐度胁迫下的表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2014, **21**(5): 893-901.]
- [15] Yang Z G, Zhang L, Chen C Y, *et al.* Study on cloning,

- expression and RNA interference of aquaporin 1 gene of *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2021, **60**(1): 93-101. [杨志刚, 张龙, 陈春宇, 等. 中华绒螯蟹水通道蛋白1基因的克隆、表达及RNA干扰研究 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2021, **60**(1): 93-101.]
- [16] Liu L, Liu X, Fu Y, *et al.* Transcriptome analysis of the whole body provides novel insights into the molecular mechanisms of growth, immunity, and metabolism during the molting cycle of the juvenile mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Scientific Reports*, 2022(12): 11395.
- [17] Neufeld D, Cameron J. Mechanism of the net uptake of water in moulting blue crabs (*Callinectes sapidus*) acclimated to high and low salinities [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1994, **188**(1): 11-23.
- [18] Wilder M N, Do Thi Thanh Huong, Jasmani S, *et al.* Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: changes with the molt cycle [J]. *Aquaculture*, 2009, **292**(1/2): 104-110.
- [19] Foguesatto K, Boyle R T, Rovani M T, *et al.* Aquaporin in different moult stages of a freshwater decapod crustacean: expression and participation in muscle hydration control [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, **208**: 61-69.
- [20] Chang E S, Mykles D L. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, **172**(3): 323-330.
- [21] Sun Y M, Yan Y, Sun J J. The larval development of *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1984, **8**(3): 219-226. [孙颖民, 闫愚, 孙进杰. 三疣梭子蟹的幼体发育 [J]. 水产学报, 1984, **8**(3): 219-226.]
- [22] Shen J, Zhu D F, Hu Z H, *et al.* Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, **35**(10): 1481-1487. [沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期 [J]. 水产学报, 2011, **35**(10): 1481-1487.]
- [23] Xu B P. The functional study of the ions transport related molecules in *Scylla paramamosain* during the molt cycle [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. [徐宾朋. 拟穴青蟹蜕皮周期中离子转运相关基因的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.]
- [24] Wang C J, Zhu D F, Qi Y Z, *et al.* Molt-inhibiting hormone levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of *Portunus trituberculatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(1): 22-28. [汪春建, 朱冬发, 元一舟, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期中MIH基因mRNA水平与蜕皮激素浓度变化 [J]. 水生生物学报, 2013, **37**(1): 22-28.]
- [25] Song L, Zhang F, Lü J J, *et al.* Cloning and functional identification of chitinase gene 1 in swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, **42**(1): 144-153. [宋柳, 张凤, 吕建建, 等. 三疣梭子蟹几丁质酶基因1的克隆及功能鉴定 [J]. 渔业科学进展, 2021, **42**(1): 144-153.]
- [26] Duan Y F, Liu P, Li J T, *et al.* Cloning and expression analysis of Cathepsin L cDNA of *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Zoological Research*, 2013, **34**(1): 39-46. [段亚飞, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾组织蛋白酶L基因的克隆及其表达分析 [J]. 动物学研究, 2013, **34**(1): 39-46.]

CLONING OF AQP2 GENE OF *PORTUNUS TRITUBERCULATUS* AND ITS FUNCTION IN MOLTING

WU Jie^{1,2}, LÜ Jian-Jian^{2,3}, ZHANG Wei-Wei^{1,2}, LI Yu-Kun^{1,2}, GAO Bao-Quan^{2,3} and LIU Ping^{2,3}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Qingdao 266071, China; 3. Qingdao National Laboratory of Marine Science and Technology, Functional Laboratory of Marine Fishery Science and Food Production Process, Qingdao 266235, China)

Abstract: In order to study the physiological function of aquaporin AQP, the aquaporin 2 gene (*ptaqp2*) of *Portunus trituberculatus* was cloned, which is full-length 4126 bp, encodes 522 amino acids and has the conserved domain and functional domain of aquaporin gene family. Cluster analysis showed that *ptaqp2* gene belonged to C-AQP gene of aquaporin gene family. The results of tissue expression showed that the expression of *ptaqp2* was the highest in eye stalk, the highest in intestine and muscle, and the lowest in hemolymph. The expression of *ptaqp2* gene was significantly different in different molting stages, and the highest expression was in the early stage of molting. Under the stimulation of Molting Hormone (MH), the expression of *ptaqp2* gene was up-regulated in muscle, intestine and stomach. By knocking down the expression of *ptaqp2* in the early stage of molting by RNAi technique, it was found that it could significantly delay the molting process. It has been preliminarily proved that *ptaqp2* gene plays an important role in molting of *Portunus trituberculatus*.

Key words: Aquaporin; Gene cloning; Molting Hormone; RNAi; *Portunus trituberculatus*