

中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (Ers-MIH 1) 基因组 DNA 的分子克隆和序列分析*

宋霞 周开亚** 马长艳

南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京 210097

摘要 运用反向 PCR (IPCR) 技术首次克隆得到全长为 3 506 bp 的中华绒螯蟹 (*Eriocheir japonica sinensis*) 蜕皮抑制激素 1 (MIH 1) 基因组 DNA 序列 (GenBank 检索号: A Y310313)。该序列包括 3 个外显子、2 个内含子、412 bp 的 5' 端上游调控区和 917 bp 的 3' 端 UTR。编码区的第 1 个内含子将信号肽分开, 第 2 个内含子将成熟肽分开。MIH 1 基因的外显子和内含子接头区符合受体拼接点和供体拼接点的 GT-AG 法则。MIH 1 基因 412 bp 的 5' 端侧翼区含有和其它真核基因相似的启动子元件, 即包括与其它节肢动物高度相似的起始子、TATA 盒以及 cAMP 效应元件结合蛋白的结合位点序列。中华绒螯蟹 MIH 1 基因的组织方式与斑纹螯和食用黄道蟹的 MIH 基因相同。推导的多肽由 75 个氨基酸的成熟肽和 35 个氨基酸的信号肽组成, 成熟肽的氨基酸序列和食用黄道蟹、三叶真蟹及美洲黄道蟹的一致性在 64% - 65% 之间 [动物学报 50 (1): 83 - 90, 2004]。

关键词 中华绒螯蟹 蜕皮抑制激素 分子克隆 序列分析

Molecular cloning and sequence analysis of genomic DNA of the molt-inhibiting hormone 1 gene from *Eriocheir japonica sinensis**

SONG Xia, ZHOU Kai-Ya**, MA Chang-Yan

Institute of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

Abstract A full-length sequence of molt-inhibiting hormone 1 (MIH 1) genomic DNA from *Eriocheir japonica sinensis* (GenBank Accession No: A Y310313) was cloned by the inverse PCR method. The sequence is 3 506 bp in size and consists of 3 exons, 2 introns, 412 bp of 5' upstream regulatory region and 917 bp of 3' UTR. The first intron separates the signal peptide and the second intron separates the mature peptide in the coding region. The exon-intron boundary of the Ers-MIH 1 gene follows Chambon's rule for the splice donor and acceptor sites. The 412 bp of the upstream 5' flanking region of the MIH 1 gene contains promoter elements with characteristics similar to other eukaryotic genes. These included sequences with high degrees of similarity to the arthropod initiator, TATA box and cAMP response element binding protein. The organization of the Ers-MIH 1 gene is identical to that of the molt-inhibiting hormone gene of *Charybdis feriatus* and *Cancer pagurus*. The deduced polypeptide consists of a 75-amino acid mature peptide and a 35-amino acid region of signal peptide. The mature peptide shares amino acid identity 64% - 65% to the MIH from *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas* and *Cancer magister* [Acta Zoologica Sinica 50 (1): 83 - 90, 2004].

Key words *Eriocheir japonica sinensis*, Molt-inhibiting hormone, Molecular cloning, Sequence analysis

蜕皮抑制激素 (Molt-inhibiting hormone, MIH) 属于甲壳动物高血糖激素 (Crustacean hyperglycemic hormone, CHH) 家族神经肽。CHH 家族神经肽由甲壳动物的眼柄 X-器官腺复合体合成和分泌, 具有调节甲壳动物的血糖以及调控生

殖、生长和发育等重要生理过程的功能。除了 MIH 外, CHH 家族神经肽还包括高血糖激素 (Crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、性腺抑制激素 (Gonad-inhibiting hormone, GIH) 和大颚器官抑制激素 (Mandibular organ-inhibiting hor-

2003-07-12 收稿, 2003-09-15 修回

* 国家自然科学基金重点项目资助 (No. 30130040) [This research was funded by the grant of Key Project of National Natural Science Foundation of China (No. 30130040)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: Kyzhouj@jlonline.com

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

me, MOIH) (Keller, 1992)。这些神经肽的成熟肽通常由 72 - 78 个氨基酸残基组成, 它们的共同特征是具有 6 个位置保守的 Cys 残基, 从而形成 3 个链内二硫键 (Van Herp, 1998)。MIH 的主要功能是通过抑制 Y 器官蜕皮激素的合成而对甲壳动物的生长起关键性的调节作用。目前已在多种虾类和蟹类克隆了 MIH 基因的 cDNA 序列 (Sun, 1994; Ohira et al., 1997; Lu et al., 2001)。近来又陆续有研究者用原核和真核表达系统表达出有活性的 MIH 融合蛋白 (Ohira et al., 1999; Gu et al., 2001; Lee and Watson, 2002), 解决了由于表达量少而不易从成体纯化较多 MIH 蛋白的难题。关于 MIH 基因组 DNA 序列方面的研究较薄弱, 对 MIH 基因组 DNA 序列的克隆研究可以为该基因表达调控机理的阐明提供重要的资料 (Chan et al., 1998; Lu et al., 2000)。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir japonica sinensis*) 又名河蟹、毛蟹、大闸蟹, 是我国重要的经济蟹类。蜕皮是河蟹生长的重要环节, 外骨骼的周期性蜕皮是河蟹生长所必须的, 但在养殖过程中有些两年生的河蟹因蜕皮未遂而成僵蟹, 所以从分子水平阐明河蟹的蜕皮机制非常重要。王在照等 (2002) 和宋霞等 (2003) 分别报道了中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因的部分 cDNA 序列。本研究在通过 3' RACE 已经获得了中华绒螯蟹 MIH 1 (Ers-MIH 1) 基因部分 cDNA 序列 (宋霞等, 2003) 的基础上, 进一步用反向 PCR (inverse-PCR, IPCR) 的方法获得

了 Ers-MIH 1 的基因组 DNA 序列, 并对其结构特征进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物材料 中华绒螯蟹由安徽河蟹原种场提供。

1.1.2 主要试剂 *Ex Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA Ligase (TaKaRa 公司), PCR 产物纯化试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司), pGEM-T Easy 载体 (Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 取中华绒螯蟹的蟹足肌肉 1 g, 依据 Sambrook et al. (1989) 的方法制备基因组 DNA。

1.2.2 引物设计 参照斑纹蟊 (*Charybdis farratus*) 和食用黄道蟹 (*Cancer pagurus*) MIH 基因的内含子分布的位置 (Chan et al., 1998; Lu et al., 2000), 根据已获得的 Ers-MIH 1 基因的部分 cDNA 序列 (GenBank 检索号: A Y309062), 设计用于扩增内含子 2 的引物 ErsFP、ErsRP 及反向 PCR 扩增的巢式引物 IFP1、IRP1 和 IRP2。各引物的位置见图 1, 序列如下:

ErsFP: 5-AAACCTGATCGGGAATCGTGAC-3

ErsRP: 5-AGTTATTGCCCGAGGATG-3

IFP1: 5-CCAACA TCTTCCGCA TCGAC-3

IRP1: 5-TCACA GA TCCA GTCCACCTTC-3

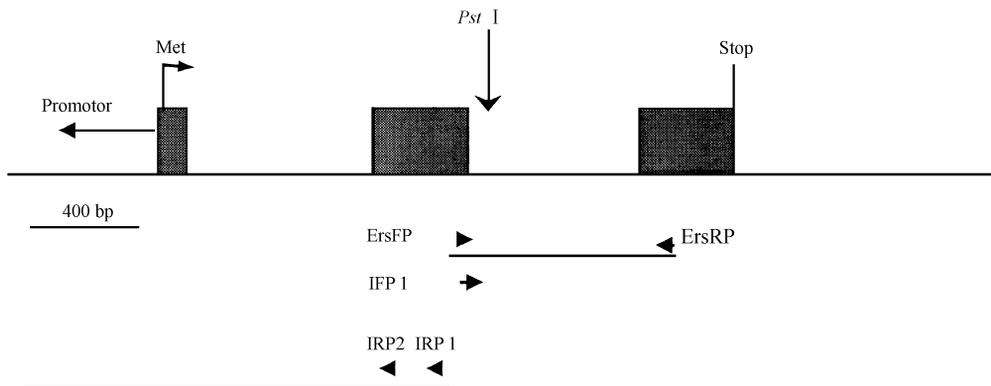


图 1 PCR 克隆 Ers-MIH 1 基因的策略

引物 ErsFP, ErsRP 用于内含子 2 的扩增, 引物 IFP1、IRP1 和 IRP2 用于反向 PCR, 黑框表示外显子的位置和大小, 外显子 1 内的 Met 表示翻译的起始位点, 而外显子 3 内的 Stop 表示翻译的结束位点。

Fig. 1 Strategy for PCR cloning of the Ers-MIH 1 gene

Primers ErsFP and ErsRP are used for the amplification of intron 2, primers IFP1, IRP1 and IRP2 are used in inverse PCR. The black boxes indicates the locations and sizes of exons. Methionine in exon 1 indicates the translation initiation site, whereas Stop in exon 3 indicates the translation termination site.

IRP2: 5-CTTGTAAGATGTCACGATTCCC-3

1.2.3 PCR 扩增 Ers-MIH 1 基因的内含子 2 以制备的基因组 DNA 为模板用引物 ErsFP 和 ErsRP PCR 扩增内含子 2: 30 μ l 反应体系中 (50 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 200 nmol/L dNTP, 引物各 10 pmol) 含有 100 ng 基因组 DNA。反应程序为: 95 预变性 3 min; 98 5 s, 60 30 s, 72 3 min, 30 个循环; 72 延伸 20 min。

1.2.4 IPCR 扩增 Ers-MIH 1 基因的内含子 1 及 5 端上游调控区

1.2.4.1 基因组 DNA 的酶切 在含 3 μ g 基因组 DNA 的 30 μ l 酶切反应体系中用 *Pst* 建立酶切反应, 反应结束后酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

1.2.4.2 酶切产物的自连反应 在 50 μ l 连接体系 (66 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 6.6 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L ATP, T4DNA Ligase 350 U) 中, 酶切产物分别按 500 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml 的浓度加入连接体系, 14 温育 18 h。

1.2.4.3 反向 PCR (IPCR) 第 1 次 PCR 扩增: 直接取 5 μ l 连接液加入 30 μ l 反应体系 (50 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 200 nmol/L dNTP, 引物 IFP1 和 IRP1 各 10 pmol), 95 预变性 3 min; 98 5 s, 58 30 s, 72 6 min, 28 个循环; 72 延伸 7 min。第 2 次 PCR 扩增: 取适量第 1 次 PCR 产物加入同第 1 次 PCR 扩增相同的反应体系, 引物为 IFP1 和 IRP2 各 10 pmol。95 预变性 3 min; 96 5 s, 60 30 s, 72 3 min, 30 个循环; 72 延伸 20 min。

1.2.5 PCR 产物的克隆及序列测定 内含子 2 和反向 PCR 的扩增产物纯化后和 pGEM-T Easy 载体连接、转化 JM109 感受态细胞, 然后进行序列测定。

1.2.6 序列的拼接和分析 将克隆测序获得的内含子 2 的序列和已获得的 Ers-MIH 1 基因的部分 cDNA 序列及反向 PCR 产物的序列进行拼接, 以获得 Ers-MIH 1 的基因组 DNA 序列 (拼接策略见图 1)。

用 Blastp 程序将 Ers-MIH 1 的成熟肽序列在 Swissprot 数据库中搜寻同源蛋白; 用 GenomeNet

www server (<http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 和 PatSearch version1.1 软件在 TRANSFAC 数据库中 (<http://transfac.gfbraunschweig.de/TRANSFAC>) 进行上游调控元件的鉴定; 用 Clustal X (1.8) (Thompson et al., 1999) 软件将 Ers-MIH 1 与其它 CHH 家族神经肽进行氨基酸序列比对分析; 用 MEGA (2.1) 软件将 Ers-MIH 1 与其它 4 种蟹类和 4 种虾类的 MIH 以及 1 种 GIH、1 种 CHH 和 1 种 MOIH 的氨基酸序列基于 p-distance 遗传距离模型构建 NJ (NeighborJoining) 树, 各节点的支持率以序列数据收集 1 000 次重复抽样检验的自引导值表示。

2 结 果

2.1 Ers-MIH 1 基因内含子 2 的 PCR 扩增

引物 ErsFP 和 ErsRP PCR 扩增产物的电泳结果表明扩增出 1 条主带和 1 条附带 (图 2)。将主带割胶纯化后, 进行克隆测序。

2.2 Ers-MIH 1 基因的内含子 1 及 5 端上游调控区的 IPCR 扩增

Pst 酶切产物以 100 ng/ml 浓度进行的自连反应的产物经巢式 PCR 扩增后获得一个约 2 kb 左右的片段 (图 3)。该片段克隆测序后进行 Blastx 分析的结果表明, *Pst* 酶切后自连产物的扩增片段中包含了 Ers-MIH 1 基因的 5 端上游调控区、外显子 1、内含子 1 和外显子 2 的部分序列。

2.3 Ers-MIH 1 基因的拼接和序列分析

将反向 PCR 产物克隆测序获得的序列和内含子 2 的序列以及 3 RACE 获得的 MIH 1 基因部分 cDNA 序列 (GenBank 检索号: AY309062) 进行拼接, 获得了全长 3 506 bp 的 Ers-MIH 1 的基因组 DNA 序列 (图 4)。该序列已存入 GenBank, 检索号为 AY310313。

Ers-MIH 1 的基因组 DNA 序列存在 3 个外显子和 2 个内含子。推导的 Ers-MIH 1 肽含有 110 个氨基酸, 其中包括 35 个氨基酸的信号肽和 75 个氨基酸的成熟肽。信号肽由外显子 1 和 2 编码, 内含子 1 长 1 194 bp, 分隔了这两个外显子。成熟肽由外显子 2 和 3 编码, 内含子 2 长 650 bp, 分隔了外显子 2 和 3。内含子 1 的位置在信号肽的 Gln 与 Arg 的密码子之间, 内含子 2 在成熟肽的 Arg 密码子内部。内含子 1 和 2 的位置与斑纹螯和食用黄道蟹的 MIH 基因完全相同 (Chan et al., 1998; Lu et

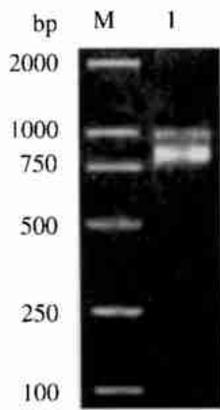


图 2 Ers-MIH1 基因内含子 2 的 PCR 扩增结果

M: DNA 分子量标记。1: 引物 ErsFP 和 ErsRP 的扩增产物。

Fig.2 Results of PCR amplification of intron 2 of Ers-MIH1 gene

M: DNA marker DL 2 000. 1: Amplification products of primer ErsFP and ErsRP.

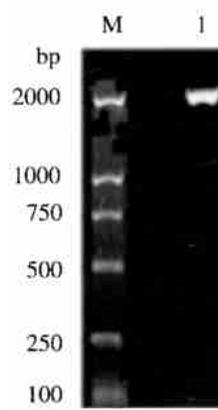


图 3 反向 PCR 扩增产物

M: DNA 分子量标记。1: 反向 PCR 扩增产物。

Fig.3 Amplification products of inverse PCR

M: DNA marker DL 2 000. 1: Amplification products of inverse PCR.

1-64 (GAG)₄ 77-96 (GAG)₆ 115-141 (C)₈ 150-171 TGACGTAA 180-193 TATAA 199-221
 GCATTCAGC 231-412 ATGGTGTCCCGCGCTCAATCCAGATTTTCCTCTCAG 449-1642
Intron 1 AGGACGTGG
 M V S R A Q S R F S S Q R T W
 CTGGTGGCGCGGTGGTGTGGCCGCTCTGTGTAGCTTCGGTGTCCAGCGGGCCGCGCGGGAATCATCAACGCC
 L V A A V V L A V L C S F G V Q R A A A G I I N A
 GAGTGTCCAAACATGATCGGGAATCGTGACATCTACAAGAAGTGGACTGGATCTGTGAAGACTGCGCCAACATC
 E C P N M I G N R D I Y K K V D W I C E D C A N I
 TTCCGCATCGACGGTCTGGGCATGCTCTGCAG 1834-2483
Intron 2 GAAGAACTGCTTAGGAACATCGACTTCCTG
 F R I D G L G M L C R K N C F R N I D F L
 TGGTGTGTGATCGCCTCGGAACGGCACAGCAGAAAGACGACCTCACGGTTACGTCAGCATCTCGGGCAATAA
 W C V Y A S E R H A Q K D D L T R Y V S I L G Q *
 2590-3485 AAATAAA 3492-3506

图 4 Ers-MIH1 的基因组 DNA 序列

*表示终止密码子, 假定的转录起始位点以箭头表示, TATA 序列用框注明, cAMP 效应元件结合元件以下划线表示, 节肢动物起始子元件用双下划线表示, polyA 信号用点下划线表示。

Fig.4 Genomic DNA sequence of the Ers-MIH1

* indicates a stop codon. Putative transcription initiation site is indicated by arrow, TATA sequences are boxed. cAMP response element binding (CREB) elements are underlined and arthropod initiator elements are double underlined. The polyadenylation signals are indicated by dotted, underlined letters.

al., 2000)。Ers-MIH1 基因的外显子和内含子接头区符合受体拼接点和供体拼接点的 Chambon 法则 (GT-AG 法则) (Mount, 1982)。

比对结果表明, Ers-MIH1 的多肽链中具有 CHH 家族神经肽共有的 6 个 Cys 残基 (图 5)。Blastp 分析结果表明, Ers-MIH1 与蟹类 MIH 的一致性高于虾类。其中与食用黄道蟹 (*Cancer pagurus*)、三叶真蟹 (*Carcinus maenas*) 和美洲黄

道蟹 (*Cancer magister*) MIH 的序列一致性在 64% - 65% 之间, 与刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 和日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) MIH 的一致性分别为 49% 和 42%。

比对后的 144 个氨基酸位点中, 有变异位点 120 个, 占总分析位点的 83%。NJ 法构建的系统发生树中, 5 种蟹类的 MIH 和 1 种螯虾类的 GIH 形成 1 个单系, 3 种虾类的 MIH 形成另 1 个单系。

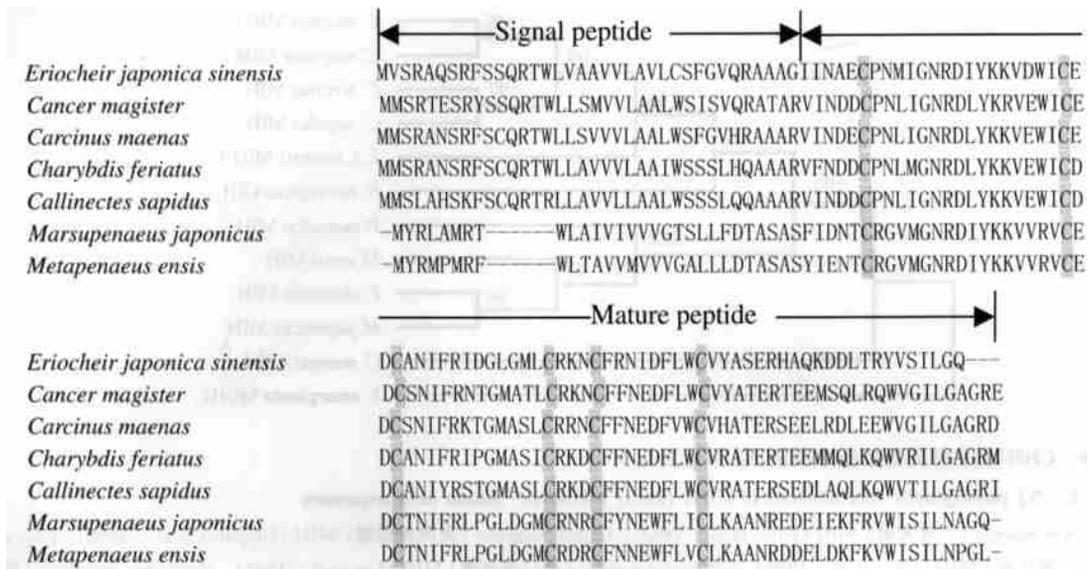


图 5 Ers-MIH 1 和其它 MIH 的比对

Fig. 5 Alignments of Ers-MIH 1 with other MIHs

Cancer magister (美洲黄道蟹) MIH (Umphrey et al., 1998), *Carcinus maenas* (三叶真蟹) MIH (Klein et al., 1993), *Charybdis feriatius* (斑纹螯) MIH (Chan et al., 1998), *Callinectes sapidus* (可口美青蟹) MIH (Lee et al., 1995), *Marsupenaeus japonicus* (日本对虾) MIH (Ohira et al., 1997), *Metapenaeus ensis* (刀额新对虾) MIH (Gu and Chan, 1998)。

在蟹类中，三叶真蟹 (*Carcinus maenas*) 和美洲黄道蟹 (*Cancer magister*) 的 MIH，斑纹螯 (*Charybdis feriatius*) 和可口美青蟹 (*Callinectes sapidus*) 的 MIH 分别聚合，前者与后者以高达 99 的自引导值相聚。中华绒螯蟹的 MIH 1 为这 4 种蟹类 MIH 的姐妹群，自引导值达 98。挪威海螯虾 (*Nephrops norvegicus*) 的 GIH 嵌入蟹类和虾类的 MIH 中，介于蟹类和虾类的 MIH 之间。CHH 和 MOIH 与上述的 MIH 和 GIH 的关系均较远 (图 6)。

2.4 Ers-MIH 1 基因上游调控元件的鉴定

Ers-MIH 1 基因 5' 端上游调控序列的分析结果表明，该序列存在着许多公认的启动子元件，其特征与其它真核基因的相似。包括位于转录起始点下游的节肢动物起始子相似序列 TCA GC、TATA box、cAMP 效应元件结合蛋白 (cAMP-responsive element binding protein, CREB protein) 的结合位点序列 TGACGTAA。

3 讨论

CHH 家族神经肽的共同特征是含有 6 个位置保守的 Cys 残基，形成 3 个链内二硫键。根据成熟肽及其前体的一级结构特征，CHH 家族神经肽可分为 CHH 和 VIH (Vitellogenin inhibiting hormone) 2 个组，其中 VIH 组又可分为 RIH (Re-

production inhibiting hormone) 和 MIH 2 个亚组 (de Kleijn and van Herp, 1995; Yang et al., 1995; Lacombe et al., 1999)。CHH 组的前体由信号肽、前体相关肽 (CHH precursor-related peptide, CPRP) 和成熟肽组成，该组共有的 3 个二硫键的位置为 C⁷-C⁴³、C²³-C³⁹、C²⁶-C⁵²；VIH 组仅由信号肽和成熟肽组成，缺少 CPRP，该组共有的 3 个二硫键的位置为 C⁷-C⁴⁴、C²⁴-C⁴⁰、C²⁷-C⁵³ (Marco et al., 2000)。本研究获得的 Ers-MIH 1 基因组 DNA 序列长 3 506 bp，包括 3 个外显子和 2 个内含子，推导的多肽只含有信号肽和成熟肽，缺少 CPRP，且其 3 个二硫键的位置为 C⁷-C⁴⁴、C²⁴-C⁴⁰、C²⁷-C⁵³，由此可判断 Ers-MIH 1 属于 CHH 家族神经肽的 VIH 组。Blastp 分析结果表明，Ers-MIH 1 与食用黄道蟹 (*Cancer pagurus*)、三叶真蟹 (*Carcinus maenas*) 和美洲黄道蟹 (*Cancer magister*) 等蟹类 MIH 的氨基酸序列一致性较高。同时系统分析的结果也表明 Ers-MIH 1 与其它蟹类 MIH 的关系接近，从以上结果可初步判断本研究获得的序列属于 VIH 组的 MIH 亚组。另外，挪威海螯虾 (*Nephrops norvegicus*) 的 GIH 嵌入蟹类和虾类的 MIH 之中 (图 6)，进一步证明了 CHH 家族神经肽分为 CHH 和 VIH 2 个组的合理性。目前，GenBank 公布的 MIH 基因序列共有 17 个，其中 13 个为 cDNA 序列，4 个为基因组 DNA 序列。斑纹螯

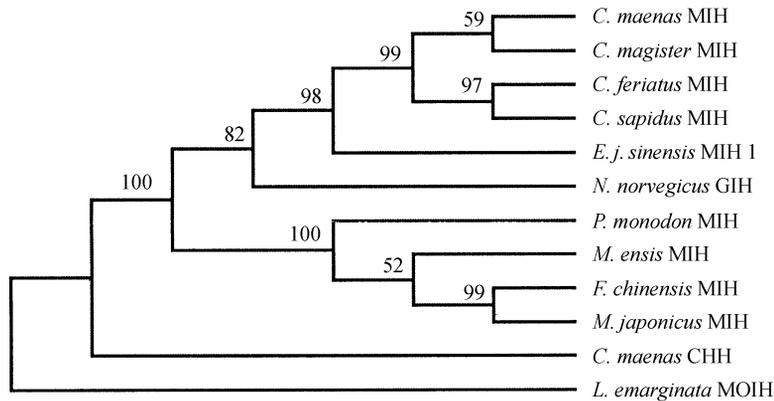


图 6 CHH 家族成员氨基酸序列的 NJ 系统发生树

Fig. 6 NJ phylogenetic tree analysis of CHH family members' amino acid sequences

Carcinus maenas (三叶真蟹) MIH (Klein et al., 1993), *Cancer magister* (美洲黄道蟹) MIH (Umphrey et al., 1998), *Charybdis feriatius* (斑纹蟳) MIH (Chan et al., 1998), *Callinectes sapidus* (可口美青蟹) MIH (Lee et al., 1995), *Nephrops norvegicus* (挪威海鳌虾) GIH (Edomi et al., 2002), *Penaeus monodon* (斑节对虾) MIH (Krungkasem et al., 2001), *Metapenaeus ensis* (刀额新对虾) MIH (Gu and Chan, 1998), *Fenneropenaeus chinensis* (中国对虾) MIH (Wang et al., 2003), *Marsupenaeus japonicus* (日本对虾) MIH (O-hira et al., 1997), *Carcinus maenas* CHH (Weidemann et al., 1989), *Libinia emarginata* (蜘蛛蟹) MOIH (Liu et al., 1997)。

(*Charybdis feriatius*) 和食用黄道蟹 (*Cancer pagurus*) 的 MIH 基因组 DNA 序列为目前获得的较长的序列 (分别为 4 313 bp 和 3 227 bp), 本研究报道的为第 5 个获得的 MIH 基因组 DNA 序列。

节肢动物起始子的一致序列为 TCA GT (Cherbas and Cherbas, 1993), 通常位于 +4 - +8 位。Ers-MIH 1 基因在 +4 位含有与之类似的 TCA GC 序列, 这个序列与转录起始有关的 CAP 信号序列 (Bucher, 1990) 具有高度一致性。MIH 基因通常在转录起始点上游 24 bp 和 42 bp 处分别含有 TATA box (Bucher, 1990) 和 CREB 蛋白结合序列 (Benbrook and Jones, 1994)。Ers-MIH 1 基因在这 2 个位置分别含有相应的调控元件 (图 4)。CREB 蛋白被认为是 cAMP 效应元件的结合蛋白, 说明 cAMP 可能参与 MIH 基因的表达调控。由于 MIH 在河蟹生长过程中起重要的调节作用, 所以对 MIH 基因表达调控的进一步研究是必要的。

克隆一条完整基因的传统方法需要构建文库, 然后对文库进行筛选。到目前为止, CHH 家族神经肽的基因组 DNA 序列的获得均采用了以 cDNA 探针筛选基因组 DNA 文库的方法。该法虽可获得特异性的基因, 但对文库质量要求较高, 必须构建较高覆盖率的基因组 DNA 文库。另一方面, 运用杂交技术筛选文库的方法存在工作量大且周期长的问题。锚定 PCR (anchored PCR) (Shyamal and Ames, 1989) 和反向 PCR (Ochman et al., 1988) 方法的出现为解决这类问题提供了新的途径。反向

PCR 的主要优势在于它通过 2 条基因特异性引物, 可以快速、高效地扩增基因组中已知序列两侧的未知序列。该技术较构建和筛选文库的方法相比, 具有操作简便、周期短等特点。反向 PCR 获得成功的一个重要环节是要形成分子内的连接。为达到分子内连接的最大效率, 连接体系应使用低浓度的模板 DNA, 高浓度 DNA 可能增加异体分子连接, 导致非特异性扩增。本研究通过设立一系列浓度梯度筛选到了最佳连接体系。此外, 用于自连反应的酶切产物的纯度要求很高, 自连体系的缓冲液不能有一价盐的存在。本研究中, *Pst* 的酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 最后获得了满意的 PCR 扩增的效果。

致谢 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所徐信荣实验师协助工作, 连云港川海水产养殖场有限公司陈文勇董事长和安徽河蟹原种场张小梅场长提供实验材料, 特致衷心感谢。

参考文献 (References)

- Benbrook DM, Jones NC, 1994. Different binding specificities and transactivation of variant CREs by CREB complexes. *Nucleic Acids Res.* 22: 1 463 - 1 469.
- Bucher P, 1990. Weight matrix description of four eukaryotic RNA polymerase promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212: 563 - 578.
- Chan SM, Chen XG, Gu PL, 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatius*).

- Gene 224: 23 - 33.
- Cherbas L, Cherbas P, 1993. The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 81 - 90.
- Edomi P, Azzoni E, Mettullo R, Pandolfelli N, Ferrero EA, Giulianini PG, 2002. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production and immunolocalization. *Gene* 284 (1 - 2): 93 - 102.
- Gu PL, Chu KH, Chan SM, 2001. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Res.* 303 (1): 129 - 136.
- Gu PL, Chan SM, 1998. Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 7 (3): 214 - 220.
- Keller R, 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48: 439 - 448.
- de Kleijn DPV, van Herp F, 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Compar. Biochem. Physiol.* 112B: 573 - 579.
- Klein JM, Mangerich S, De Kleijn DPV, Keller R, Weidemann WM, 1993. Molecular cloning of crustacean molting-inhibiting hormone (MIH) precursor. *FEBS Lett.* 334: 139 - 142.
- Krungkasem C, Ohira T, Yang WJ, Abdulah R, Nagasawa H, Aida K, 2001. Identification of two distinct molt-inhibiting hormone related peptides from the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J. Mar. Biotechnol.* 20 (3): 232 - 236.
- Lacombe C, Greve P, Martin G, 1999. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides* 33 (1): 71 - 80.
- Lee KJ, Elton TS, Bej AK, Watts AK, Watson RD, 1995. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molting-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 1126 - 1131.
- Lee KJ, Watson RD, 2002. Expression of crustacean (*Callinectes sapidus*) molt-inhibiting hormone in insect cells using recombinant baculovirus. *J. Exp. Zool.* 292 (1): 41 - 51.
- Liu L, Laufer H, Gogarten PJ, Wang M, 1997. cDNA cloning of a mandibular organ inhibiting hormone from the spider crab *Libinia emarginata*. *Invert. Neurosci.* 3 (2 - 3): 199 - 204.
- Lu W, Wainwright G, Olohan LA, Webster SG, Rees HH, Turner PC, 2001. Characterization of cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer pagurus*; expression of MIH in non-X-organ tissues. *Gene* 278 (1 - 2): 149 - 159.
- Lu W, Wainwright G, Webster SG, Rees HH, Turner PC, 2000. Clustering of mandibular organ-inhibiting hormone and molt-inhibiting hormone genes in the crab, *Cancer pagurus*, and implications for regulation of expression. *Gene* 253 (2): 197 - 207.
- Marco HG, Stoeva S, Voelter W, Gade G, 2000. Characterization and sequence elucidation of a novel peptide with molt-inhibiting activity from the South African spiny lobster, *Jasus lalandii*. *Peptides* 21: 1313 - 1321.
- Mount SM, 1982. A catalogue of splice junction sequence. *Nucleic Acids Res.* 10: 459 - 472.
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL, 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621 - 623.
- Ohira T, Nishimura T, Sonobe H, Okuno A, Watanabe T, Nagasawa H, Kawazoe I, Aida K, 1999. Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (9): 1576 - 1581.
- Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, Aida K, 1997. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 14: 785 - 789.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shyamal V, Ames GFL, 1989. Genome walking by single-specific primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene* 84: 1 - 8.
- Song X, Zhou KY, Ma CY, 2003. Molecular cloning and Northern blot analysis of a cDNA fragment of the molt-inhibiting hormone 1 gene from *Eriocheir japonica sinensis*. *J. Fish Sci. Chn.* 10 (5): 353 - 358 (In Chinese).
- Sun PS, 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 1 - 6.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1999. CLUSTAL X multiple sequence alignment program, version 1.8.
- Umphrey HR, Lee KJ, Watson RD, E Spaziani, 1998. Molecular cloning of a cDNA encoding molting-inhibiting hormone of the crab *Cancer magister*. *Mol. Cell Endocrinol.* 136: 145 - 149.
- Van Herp F, 1998. Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycaemic hormone family. In: Coast GM, Webster SG, ed. *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Cambridge, MA: Cambridge University Press, Society for Experimental Biology Seminar Series 65, 53 - 70.
- Wang ZZ, Jiao CZ, Zhang XJ, Xiang JH, 2003. Molecular cloning and sequence analysis of full length cDNA encoding molt-inhibiting hormone from *Fennropenaeus chinensis*. *Acta Genet. Sin.* 30 (2): 128 - 134 (In Chinese).
- Wang ZZ, Xiang JH, Cui ZX, 2002. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding partial putative molt-inhibiting hormone from the crab *Eriocheir sinensis*. *Oceanol. Limnol. Sin.* 33 (4): 432 - 438 (In Chinese).
- Weidemann W, Gromoll J, Keller R, 1989. Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Lett.* 257 (1): 31 - 34.
- Yang WJ, Aida K, Nagasawa H, 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 135: 205 - 212.
- 宋 霞, 周开亚, 马长艳, 2003. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (MIH 1) 基因的 cDNA 片段克隆和 Northern 印迹分析. *中国水产科学* 10 (5): 353 - 358.

王在照, 焦传真, 张晓军, 相建海, 2003. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆及序列分析. 遗传学报 30 (2): 128 - 134.

王在照, 相建海, 崔朝霞, 2002. 编码中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因的 cDNA 片段克隆和序列分析. 海洋与湖沼 33 (4): 432 - 438.