



研究报告

Research Report

## 中华绒螯蟹水通道蛋白 11 基因克隆及表达分析

张龙, 庞杨洋, 杨航, 杨志刚 ✉

上海海洋大学, 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 鱼类营养与环境生态研究中心, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海, 201306

✉通信作者, [zgyang@shou.edu.cn](mailto:zgyang@shou.edu.cn)

水生生物研究, 2023 年, 第 12 卷, 第 1 篇 doi: [10.5376/aor.cn.2023.12.0001](https://doi.org/10.5376/aor.cn.2023.12.0001)

收稿日期: 2023 年 1 月 3 日

接收日期: 2023 年 1 月 10 日

发表日期: 2023 年 1 月 17 日

本文首次以中文发表在基因组学与应用生物学上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

### 建议最佳引用格式:

张龙, 庞杨洋, 杨航, 杨志刚, 2023, 海德树茄子, 中华绒螯蟹水通道蛋白 11 基因克隆及表达分析, 水生生物研究, 12(1): 1-11 (doi: [10.5376/aor.cn.2023.12.0001](https://doi.org/10.5376/aor.cn.2023.12.0001))

(Zhang L., Pang Y.Y., Yang H., and Yang Z.G., 2023, Cloning and expression analysis of aquaporin 11 gene in *Eriocheir Sinensis*, Shuisheng Shengwu Yanjiu (Aquatic Organism Research), 12(1): 1-11 (doi: [10.5376/aor.cn.2023.12.0001](https://doi.org/10.5376/aor.cn.2023.12.0001)))

**摘要** 为研究水通道蛋白 11 (Aquaporin 11 AQP11) 基因在中华绒螯蟹生长蜕壳过程中的功能作用, 研究采用 RACE 技术克隆获得中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 水通道蛋白 11 基因 cDNA 全长序列。该序列总长为 1 746 bp, 5' 和 3' 非编码区分别为 463 bp 和 476 bp, 开放阅读框为 807 bp, 推测编码 269 个氨基酸, 预测分子量 29.46 KD, 理论等电点为 5.38。生物学信息分析表明, AQP11 含有 4 个跨膜区 (62~84, 159~181, 194~216, 231~250) 和 2 个 NPV 单元, 属于稳定蛋白; 同源性和进化树分析表明, 中华绒螯蟹 AQP11 氨基酸序列与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 同源性最高 82%, 与凡纳滨对虾聚为一支, 与甲壳动物的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCT (qRT-PCR) 检测显示, AQP11 基因在中华绒螯蟹各组织中均有表达, 其中在肠道中表达量最高, 其次是脑、肌肉和胸神经节, 在肝胰腺、鳃和血中表达量最低。研究发现, AQP11 基因在中华绒螯蟹肠道中的表达呈现, 在蜕壳间期 (C 期) 和蜕壳前期 (D 期) 过程中表达量较低, 在蜕壳期 (E 期) 表达量开始上升, 蜕壳后期 (AB 期) 表达量不变。AQP11 基因在肌肉中的表达呈现, 蜕壳间期 (C 期) 表达量低, 蜕壳前期 (D 期) 表达量开始上升, 蜕壳期 (E 期) 达到峰值, 随后到蜕壳后期 (AB 期) 下降。综上所述, 中华绒螯蟹 AQP11 基因在其蜕壳过程中发挥着重要的作用。

**关键词** 中华绒螯蟹; 水通道蛋白; 蜕壳周期; 基因克隆; 基因表达

## Cloning and Expression Analysis of Aquaporin 11 Gene in *Eriocheir Sinensis*

Zhang Long, Pang Yangyang, Yang Hang, Yang Zhigang ✉

Key Laboratory of Freshwater and Aquatic Germplasm Resources, Research Center for Fish Nutrition and Environmental Ecology, Ministry of Agriculture, National Experimental Teaching Demonstration Center of Fisheries Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306



✉ Corresponding author, [zgyang@shou.edu.cn](mailto:zgyang@shou.edu.cn)

**Abstract** In order to study the functional role of aquaporin 11 (Aquaporin 11 AQP11) gene in the process of growth and molting of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), the full-length cDNA sequence of aquaporin 11 gene of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) was cloned by RACE technology. The full-length of AQP11 cDNA is 1 746 bp, with a 463 bp 5'-untranslated region (UTR), a 476 bp 3'-UTR, and an open reading frame (ORF) of 807 bp which encodes a 269 amino acid polypeptide. Bioinformatics software analysis revealed that AQP11 gene contains 4 transmembrane domains, 2 NPV structural units, being part of stable proteins. Homologous analysis showed that AQP11 amino acid sequence of *Eriocheir sinensis* has the highest homology to *Litopenaeus vannamei* (82%), clustered with *Litopenaeus vannamei*, and has the closest relationship with crustaceans. Real-time quantitative RT-PCR showed that AQP11 gene could be detected in all tested tissues of *Eriocheir sinensis*, with the highest expression level in intestine, followed by the brain, muscle and thoracic ganglion, and the lowest expression level in the hepatopancreas, gills and blood. In the intestinal, the expression of AQP11 was significantly lower at the intermolt stage (stages C) and pre-molt stage (stage D), significantly enhancing and reaching the maximal level at the ecdysis (stage E). On the other hand, the expression of AQP11 gene in muscle showed low expression in the intermolt stage (stage C), and increased gradually at the pre-molt stage (stage D), significantly enhancing and reaching the maximal level at the ecdysis stage (E stage), and then reaching the postmolt stage (stage A and B) decline. In summary, our results indicate that AQP11 may play an important role in molting of *Eriocheir sinensis*.

**Keywords** *Eriocheir sinensis*; Aquaporins; Molt Cycle; Gene cloning; Gene expression

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一种在细胞膜上允许水和小的不带电荷的溶质穿过脂质双层通过的跨膜蛋白(Denker et al., 1988)。到目前为止,已经鉴定出 13 个哺乳动物水通道蛋白(AQPs)成员(AQP0-12),其中大多数已被验证(An et al., 2008)。在根据其空间结构与运输物质的不同, AQP 族可以根据其渗透性特征分为三个主要子族。即经典的水选择性水通道蛋白(AQP0, -1, -2, -4, -5, -6, -8)、甘油转运水通道蛋白(Aquaglyceroporins) (AQP3, -7, -9, -10)以及尚未阐明其功能的非正统水通道蛋白(AQP-11 和-12) (An et al., 2008; Soto et al., 2012; Abascal et al., 2014)。研究表明, AQP 在离子、水分子转运、渗透压调节等方面中起到重要作用(王渝等, 2014)。随着机体渗透压的改变,水的转运模式随之发生改变这不仅直接影响到水通道蛋白的表达,同时还会影响到水通道蛋白的合成(Tan et al., 2018),而机体内大部分的物质交换以及合成代谢是在细胞液中进行的,因此, AQP 在维持细胞内外渗透压稳定发挥着重要作用(Sade et al., 2010)。水通道蛋白通过改变自身孔径的大小以及空间结构,使通道具有亲水性和选择透过性,限制了大部分离子通过,只允许水分子以及特定离子同过。水通道蛋白的这一特殊结构与功能,保证了机体渗透压始终保持一个动态平衡(Tipsmark et al., 2010; Yakata et al., 2011)。目前,对水生动物水通道蛋白的研究主要集中在植物、哺乳类动物和鱼类中(Tipsmark et al., 2010; Giffard-Mena et al., 2011; Guo et al., 2017; Vorontsova et al., 2018),而其在甲壳类动物中的研究很少(Chung et al., 2012; 王渝等, 2014; Foguesatto et al., 2017)。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)广泛分布于中国长江中下游的河流和湖泊中,是我国重要的商业蟹种之一(成永旭等, 2000)。研究表明,在中华绒螯蟹生长发育过程中,蜕壳是其最重要的一环,蜕壳过程中出现微小的变化都会导致其死亡,蜕壳的成功率关系到中华绒螯蟹养殖的成败。但是,目前关于蜕壳的研究主要集中在酶活、免疫、蜕皮激素和能量等方面(成永旭等, 2000),而对水转运起到重要作用的水通道蛋白基因



还没有报道。

本研究利用已有的中华绒螯蟹水通道蛋白 11 基因序列, 通过分子克隆技术, 获得了 AQP11 基因全长 cDNA 序列, 并对其在蜕壳过程中的中华绒螯蟹肌肉和肠组织中的表达水平变化进行了研究, 为进一步揭示其在中华绒螯蟹蜕壳过程中的作用提供了理论依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 中华绒螯蟹 AQP11 基因克隆及结构分析

AQP11 基因 cDNA 全长为 1 746 bp, 其开放阅读框(ORF)序列长 807 bp, 推测编码 269 个氨基酸, 蛋白分子量为 29.46 kDa, 理论等电点  $PI$  为 5.38。通过分析发现其氨基酸中异亮氨酸(Leu)和缬氨酸(Ala)含量最高, 分别占 11.2%和 10.1%。总正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)为 17 个, 总负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)为 23 个, 原子组成为 C1352H2088N332O368S18。TMHMM 2.0 在线软件 4 个跨膜区(62~84, 159~181, 194~216 和 231 250)和 2 个 NPV (天冬酰胺-脯氨酸-缬氨酸)单元。利用 Signalp 5.0 软件检测发现中华绒螯蟹 AQP11 基因的 N 端不存在信号肽, 该蛋白为非分泌蛋白(图 1)。

```

ATGGGGAGTATGGAGCAGTGCCGGCGAGGTTAACAACTGCAGCAACCTTAGTAGCAGTAGCCGTAGCGCC
CAIACCACCCCGCCCTCACTCCTTATCACGCTCCGGAGACGAAAGGACCAACTTACCCGCGCGGCCACG
AGTCTGCGCGCCCTGGAACGAGAAGAAAGCGCATCGTTAGCAGTAAAGAGAGGCACCAGGCCACAGG
TATTAATTATGTAACCTTTATCCAAGTGACTGAAAATCTGGGTCCCAAGACTTAAAAAGTGACTCTGGG
TAACACTCAAACCTTTGTGGGCCCGCAAGTTGCGGTGGGCGTCTAGCTGCTACAGGGGGTGGCGGTGCG
AGGAAAGACGCTATGGTGTACTTTAAATATGGAGTGTCTTAATCCGTGATACAGAGGATTTATTACTG
AAGCGATAAGAACGTCAGTGATACCAAGACAGCGACGGGTCAAC
1  ATGGAGGCGCGAGTATGGACCCGAACATGTCGATCGTGGTGTCTGCTCACCATCGCG
1 M E A A A S M D P N M S I V V S S L T I A
61 ACCGAGATGGCGTTGTGCACTTCACTCCGCGCCGCTCAGCGAGATGGTCAAGGAGAG
21 T Q M A L S H F I R G R L S E M V E G E
121 CTGCTCAAGGGCTGCTCCTCGAGCTGGTGGCCGCGGAGATGTGTGGCACCTGCTTC
41 L L K G C L L E L V A A A E M C G T C F
181 GAGCTCATCATCGCTGATAACTACGGCGTGTACGCGTACGGCGTGTACCTCTTCTG
61 E L I I I A D N Y G V Y A Y G V Y L F L
241 ATGACCATCTGGTGGGGCCAGTCTGGGGCCAGGCCACC GCCTGCCCTACAACCTGCTG
81 M T I W W G Q S W G T A T A C P Y N L L
301 GAGGAGTACGTGGAGACGGGATCCAAACCCCGTCCACGTGGTGTCAAGATCGTGGCGCAA
101 E E Y V E T G S N P V H V V L K I V A Q
361 GTGATCGGCGCATCGCTCCTCAGTGGGTGAAGCGGCTGTGGATGCTGGAGGTGGCG
121 V I G G I A S F R W V K R L W M L E V A
421 GCGACACGTAGGGCGCGGGTGGATGACTGCACCGCCGACCTGCAGGTGCCGGTCA
141 A T H V G R G V D D C T A D L Q V P V I
481 GTGGGCTTCTCATCGAGGCGCTGCTCACCTGTGCCTGTAGACTCTTCTCCAGAGTCTT
161 V G F F I E A L L T C A C R L F S R V L
541 GGGGAATTCGAGCTAAAGTTTGGCTCCGCACTCGACTCCTTCTTTGCCACCTCCATGGT
181 G E F E P K F A S A I D S F F A T S M V
601 ATCCTCGCTTTCGACTCTGCGGCTACTTCAACCCCGTGTGGCGACGGGCTCAAG
201 I L A F D Y S G G Y F N P V L A T G L K
661 TGGAGCTGCCGCGGCCACACCAACGCCGAGCACATCGTGGTGTACTGGGCGGCTCCATC
221 W S C R G H T N A E H I V V Y W A G S I
721 CTGGGCGCCATGCTGTCCCTGCGGGTGTGGACCATTCCCTCACTCAAGAACCACATCCTC
241 L G A M L S L R V W T I P S L K N T I L
781 GCGCCCTCAAGCCCAAGCTGGAATGA
261 A P F K P K L E *
TCGACTCAGAAAGAAGAGAGAGTTTCCAGAACCTTACCTTCGAGCAGTATCATGGCGCGGTTGATCCTA
TTCACAAACGACAAATATTTTCTCAGTCAGGAAATGGATATCACGCCATTTTCGCGACCCTTGAACCC
GCATGTTCAAGTACAACTCTTCTGCCTGACCTCTTGGTGCCGTGCTGCTCGGGGGCCACTGCCACAC
ACCGATAACCAAGTAAGAGCGGAGTCACTCAAGCCGCGTCTACAGTCCCTCGTACAATGTTTAAATC
TCAACAGTGAACGAAACCGAACGCATCGTCTTCGCACATCTTACTCGAAGTTAGTTTAAATAATGGTT
TATATTTCCAAAAACAGCGCTCCGATAACAGTGGAAAGCGTGTGTCCCTGTTCCGATGTCATAGTATTAG
TCCAGGTAACAATTCACTAATTCTGAGGCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 中华绒螯蟹 AQP11 基因核苷酸序列和氨基酸序列

注: ATG: 起始密码子; TGA 表示终止密码子; 方框表示 NPV 结构单元

Figure 1 Nucleotide and proteins sequence of *Eriocheir sinensis* AQP11 gene

Note: ATG: the start codon; TGA: donates the stop codon; NPV motifs are marked in boxes





## 1.2 AQP11 基因的同源性分析

将中华绒螯蟹 AQP11 基因编码的氨基酸序列与其他物种的 AQP11 氨基酸序列进行比对分析, 发现其与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性最高 82%; 与其他物种如叶蜂(*Athalia rosae*)、小麦茎叶蜂(*Cephus cinctus*)、沙蚕(*Trinorchestia longiramus*)、斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)和地中海果蝇(*Ceratitis capitata*)、内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)的同源性分别为 48%、49%、70%、48%、53%和 48%。通过与上述物种的氨基酸对比发现, 都含有保守序列 ATACPY、YSGGYSNP (图 2)。

利用 MEGA 5.0 软件构建进化树发现, 中华绒螯蟹与凡纳滨对虾为一支, 其次与斜纹夜蛾、地中海果蝇、内华达古白蚁为一支, 之后与海胆聚为一支, 之后在于脊椎动物中鱼类聚为一支, 最后与人和小鼠等哺乳类动物聚为一支(图 3)(图 4)。

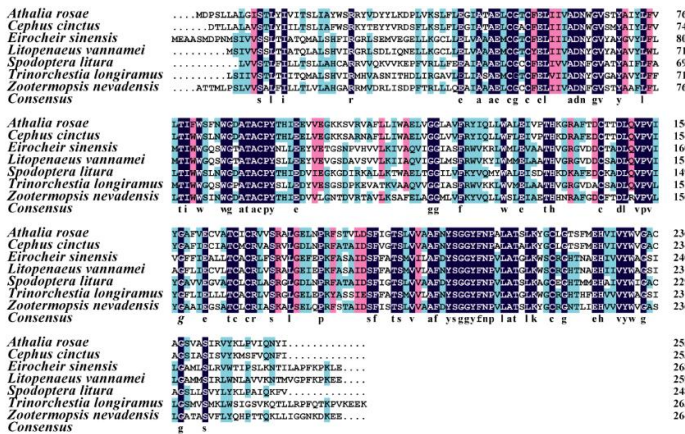


图 2 中华绒螯蟹 AQP11 氨基酸序列与其他物种 AQP 氨基酸序列比对  
 Figure 2 Amino acid sequences alignment of *Eriocheir sinensis* AQP11 with other species' AQP

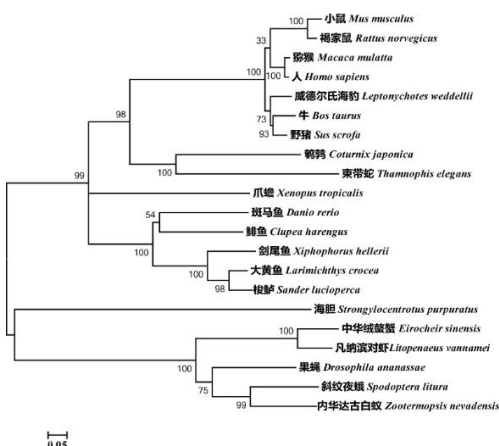


图 3 利用 MEGA 5.0 软件构建的基于 AQP11 氨基酸序列的系统进化树  
 注: 各物种 AQP 登录号: 小鼠(NP\_78031), 褐家鼠(NP\_778128), 猕猴(NP\_001253424), 人(AAH\_40443), 威德尔氏海豹(XP\_006739572), 牛(NP\_001103539), 野猪(NP\_001106152), 鹌鹑(XP\_015707992), 束带蛇(XP\_032075591), 爪蟾(XP\_004912256), 斑马鱼(NP\_001314822), 鲱鱼(XP\_012691681), 剑尾鱼(XP\_032400843), 大黄鱼(KAE\_8294898), 梭鲈(XP\_031160098), 海胆(XP\_003725070), 凡纳滨对虾(XP\_027231404), 果蝇(XP\_014763501), 斜纹夜蛾(XP\_022822820), 内华达白蚁(XP\_02140669)

Figure 3 phylogenetic tree based on AQP11 amino acid sequence by MEGA 5.0  
 Note: GenBank accession number of AQP: *Mus musculus* (NP\_780314), *Rattus norvegicus* (NP\_775128), *Macaca mulatta* (NP\_001253424), *Homo sapiens* (AAH\_40443), *Leptonychotes weddellii* (XP\_006739572), *Bos taurus* (NP\_001103539), *Sus scrofa* (NP\_001106152), *Coturnix japonica* (XP\_015707992), *Thamnophis elegans* (XP\_032075591), *Xenopus tropicalis* (XP\_004912256), *Danio rerio* (NP\_001314822), *Clupea harengus* (XP\_02691681), *Xiphophorus helleri* (XP\_032400843), *Larimichthys crocea* (KAE\_8294898), *Sander lucioperca* (XP\_031160098), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_003725070), *Litopenaeus vannamei* (XP\_027231404), *Drosophila ananassae* (XP\_014763501), *Spodoptera litura* (XP\_022822820), *Zootermopsis nevadensis* (XP\_02140669)



*Sander lucioperca* (XP\_031160098), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_003725070), *Litopenaeus vannamei* (XP\_014763501), *Drosophila annassae* (XP\_014763501), *Spodoptera litura* (XP\_022822820), *Zootermopsis nevadensis* (XP\_02194066)

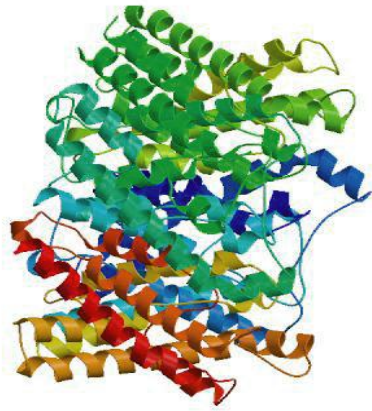


图 4 AQP11 蛋白预测的三级结构  
Figure 4 The predicted 3D structure of AQP11

### 1.3 AQP11 基因的组织表达分析

利用半定量 PCR 技术分析了 AQP11 基因在不同组织中的表达水平(图 5), 结果显示, AQP11 基因在各组织中均有表达。其中, 在肠道中的表达量最高, 之后是脑、肌肉和胸神经节, 在肝胰腺、鳃和血细胞中表达量最低。(P<0.05)。

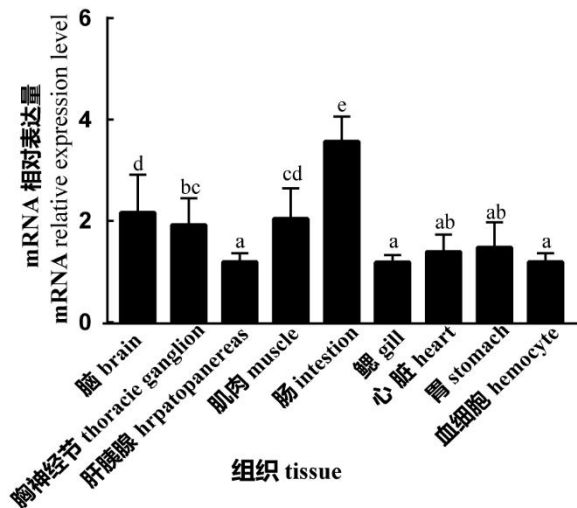


图 5 中华绒螯蟹 AQP11 基因在不同组织中的表达分布  
Figure 5 Expression distribution of AQP11 gene in different tissues of *Eriocheir sinensis*

### 1.4 AQP11 基因在蜕壳周期中的表达分析

肠道中 AQP11 在中华绒螯蟹蜕壳周期中的表达量变化情况如图 6 所示。AQP11 表达量在蜕壳间期(C 期)和蜕壳前期(D 期)处于较低水平, 但在蜕壳期(E 期)显著升高并达到最高(P<0.05), 随后蜕壳后期(AB 期)表达量不变, 依然显著高于蜕壳间期(C 期)和蜕壳前期(D 期) (P<0.05, 图 6)。

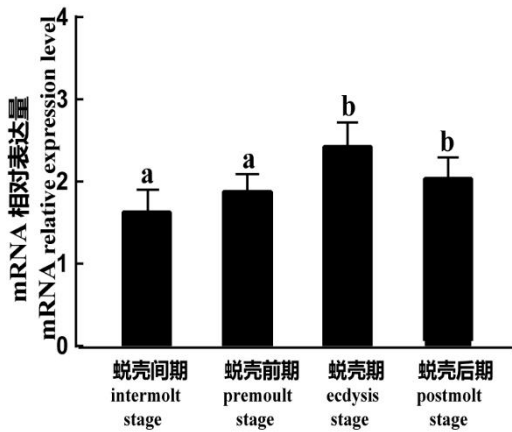


图 6 中华绒螯蟹蜕壳周期中 AQP11 基因在肠中的表达分布  
Figure 6 Expression of AQP11 gene in *Eriocheir sinensis* intestine tissue during different molting stages

Real-time PCR 检测了中华绒螯蟹肌肉中 AQP11 基因在蜕壳周期中的表达情况。蜕壳间期(C 期)表达量处于较低水平,但在蜕壳前期(D)显著升高( $P<0.05$ ),在蜕壳期(E 期)达到最高( $P<0.05$ ),随后于蜕壳后期(AB 期)表达量降低( $P<0.05$ , 图 7)。

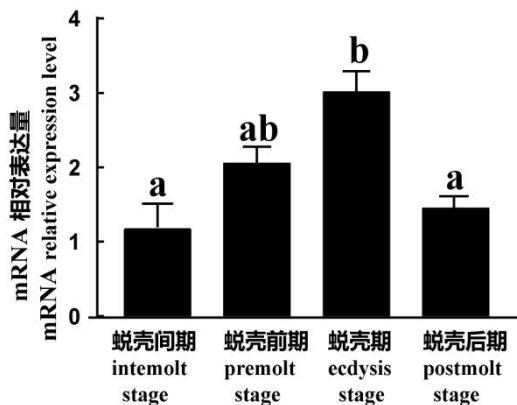


图 7 中华绒螯蟹蜕壳周期中 AQP11 基因在肌肉中的表达分布  
Figure 7 Expression of AQP11 gene in *Eriocheir sinensis* muscle tissue during different molting stages

## 2 讨论

在本研究中,我们从中华绒螯蟹的肠道中分离出全长的 AQP11 基因,并研究了其组织表达分布以及蜕壳对其表达量的影响。其基因全长 1 746 bp,包含 807 bp 的开放阅读框,编码 268 个氨基酸;蛋白结构分析发现,AQP11 其基因编码的蛋白含有 4 个跨膜区和两个 NPV (Asn-Pro-Val)结构单元。在哺乳类动物中(AQP0-AQP10)的输水结构单元为 NPA (Asn-Pro-Ala),而 AQP11、AQP12 基因的输水结构单元多变(Yakata et al., 2007; Yeung and Cooper, 2010),与本实验结果类似,中华绒螯蟹 AQP11 基因中的输水单元也存在变异,即由缬氨酸(Val)替代了丙氨酸(Ala)。这种改变虽然降低了 AQP11 对水的转运速度但是保证 AQP11 对水长期匀速转运,增强了 AQP11 在离子转运方面的功能,扩大了其组织分布范围(Yakata et al., 2011; Bestetti



et al., 2020)。系统进化树分析表明, 中华绒螯蟹 AQP11 与凡纳滨对虾为一支, 之后与果蝇、斜纹夜蛾和中华达白蚁为一支。

中华绒螯蟹 AQP11 基因在鳃、肝胰腺、肌肉、肠道、胃、心脏、脑神经节和胸神经节中均有表达, 在肠道中的表达量最高, 其次是脑神经节, 在肝胰腺、鳃和心脏中表达量较低。AQP11 在哺乳类动物组织器官中均有表达(Kenichi et al., 2009)。在干扰小鼠肾脏中 AQP11 基因的表达时发现, 在干扰后数小时小鼠肾脏近曲小管会出现肿胀和空泡导致小鼠对水的重吸收率降低导致小鼠死亡。这进一步证明了 AQP11 基因对水的转运作用(Morishita et al., 2005)。

蜕壳是甲壳类动物生长发育过程中最重要的一环, 甲壳动物的甲壳(外骨骼)硬化后, 将形成固定的空间大小使组织无法向其脊椎动物一样继续生长, 因此在其生长过程中每隔一段时间甲壳类动物都要蜕去旧的外骨骼, 长出新的外骨骼, 完成机体增长(陈娇, 2006)。研究发现, 虾类蜕壳周期中水通道蛋白通过调节细胞体积大小保证蜕壳的顺利进行。在蜕壳前期(D 期)通过减少细胞内水的含量, 从而减小组织体积达到顺利蜕壳的目的, 在蜕壳期(E 期)扩大细胞体积在外壳硬化前达到其组织最大规模, 蜕壳后期(AB 期)排除细胞内多余水分提供空间, 当细胞内外渗透压再次趋于平衡时, 恢复部分水通道蛋白活性, 维持机体正常生理代谢(陈娇, 2016; Foguesatto et al., 2017)。这与本实验结果相似。这种调节方式提高了中华绒螯蟹的蜕壳成功率。但是其具体的调节机制还有待于进一步的研究。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

健康的中华绒螯蟹取自上海海洋大学(上海市崇明养殖基地), 体重( $5.82 \pm 2$ ) g。暂养于室内循环水养殖系统中, 上下两层, 6 个养殖池, 暂养 1 周, 养殖水温  $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。每天 18:00 定时投喂商品饲料, 并将昨天的残饵吸出。通过显微镜观察对其进行蜕壳周期分类。将处于同一时期的螃蟹集中进行单养, 在第一次统一蜕壳后开始实验(康现江等, 2013)。

Trizol Reagent、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、SMARTer RACE 5'/3' Kit、pMD™ 19-T Vector Cloning Kit和PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)均购自大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司; DNA胶回收试剂盒和TOP10感受态细胞采购自北京天根生化科技有限公司。ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix采购自南京诺唯赞生物有限公司。

#### 3.2 样品采集

通过显微镜观察中华绒螯蟹第三颚足尖端组织变化, 将处于同一蜕壳时期的中华绒螯蟹分为一类(AB 期, C 期, D 期, E 期)(康现江等, 2013), 在其统一蜕壳后开始实验, 将实验用蟹放入单养的循环水槽中, 每



组设 8 个平行, 每个平行 20 只。各组取肌肉和肠, 液氮冷冻保存, 用于 RNA 提取, 每个蜕壳期取 8 只。另取 6 只在蜕壳间期(C 期)健康的中华绒螯蟹的鳃、肝胰腺、肌肉、胸神经节, 肠道、胃、脑, 液氮保存, 用于提取 RNA。

### 3.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

用 Trizol 试剂分别提取肠、肌肉和鳃组织的总 RNA, 使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性; 使用核酸定量仪测定 RNA 浓度。分别取等量的 RNA 均匀混合, 通过逆转录试剂反转合成第一条链 cDNA。

### 3.4 AQP11 cDNA 的克隆与鉴定

根据已获得的核心片段, 设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物(表 1), 使用 SMARTer RACE 5'/3' Kit 快速扩增 5' 和 3' 末端。所需引物及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 引物与序列

Table 1 Primers and sequences

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Function
AQP-F1	CAGCGAGATGGTCGAAGGAGAG	RT-PCR
AQP-R1	AAGGAGGGTCAGGCAGAAGAGG	
AQP-F2	CTGCTTCGAGCTCATCATCATC	
AQP-R2	GCGTTCGGTTTCGTTTCACTGT	
3'-R1	CTTGCCACCTCCATGGTGATCCTC	RACE
3'-R2	ATCGTGGGCTTCTTCATCGAGGCG	
5'-F1	AGCATCCACAGCCGCTTCACCCA	qRT-PCR
5'-F2	CGATGGCGGAGCAAACCTTAGGC	
qAQP-F1	CGCTGCTCACCTGTGCCTGT	
qAQP-R1	GTGCTCGGCGTTGGTGTGGCCGCGG	
18S-F1	AACATCTAAGGGCATCATCACAGA	
18S-R1	TCCAGTTCGCAGCTTCTTCTT	

3'RACE 和 5'RACE 扩增产物经凝胶电泳检测后, 回收目的片段, 进行连接转化以及 PCR 扩增检测, 符合预期送公司进行检测。

### 3.5 AQP11 基因的序列分析





对测得的序列使用 DNAMAN 软件进行拼接处理, 然后用 NCBI ORF find (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 在线软件对 AQP11 基因开放阅读框进行预测。同时使用 NCBI BLAST 在线软件对 AQP11 基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行比对。使用 ExPASy-ProtParam tool 在线软件预测蛋白质理化性质, 使用 SWIS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 和 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件对蛋白质三维结构和跨膜区进行预测分析。使用 DNAMAN 软件和 MEGA 5.0 软件进行氨基酸序列比对和系统进化树构建。

### 3.6 AQP11 基因的表达分析

使用 PrimScript RT reagent Kit 将中华绒螯蟹各组织的总 RNA, 反转录合成 cDNA。根据已获得的 AQP11 基因全长序列, 设计荧光定量引物, 以 18S 为内参(表 1), 对中华绒螯蟹各组织中 AQP11 基因的相对表达量进行检测。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂在荧光定量仪器上检测各组织中 AQP11 基因的表达情况。荧光定量 PCR 反应体系为 10  $\mu$ L, 5  $\mu$ L ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 0.2  $\mu$ L qAQP-R1, 0.2  $\mu$ L qAQP-F1, 1  $\mu$ L cDNA 模板, 3.6  $\mu$ L 无菌 ddH<sub>2</sub>O。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 30 S, 95  $^{\circ}$ C 5 S, 60  $^{\circ}$ C 34 S, 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 S, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 S。实验采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算, 使用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差分析。

### 作者贡献

张龙负责生物学信息分析、实时荧光定量 PCR 实验以及文章撰写; 庞杨洋负责实验采样以及文章的修改; 杨航负责论文的修改以及校对; 杨志刚是项目的设计者及负责人。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家重点研发项目(2018YFD0900603), 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-48)和上海市科委工程技术中心能力提升项目(19DZ2284300)共同资助。

### 参考文献

- Abascal F., Irisarri I., and Zardoya R., 2014, Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(5): 1468-1481  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.001>  
PMid:24355433
- An K.W., Kim N.N., and Choi C.Y., 2008, Cloning and expression of aquaporin 1 and arginine vasotocin receptor mRNA from the black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: effect of freshwater acclimation, *Fish Physiol Biochem*, 34(2): 185-194  
<https://doi.org/10.1007/s10695-007-9175-0>



PMid:18649036

Bestetti S., Galli M., Sorrentino I., Pinton P., Rimessi A., Sitia R., and Medraño-Fernandez. 2020, Human aquaporin-11 guarantees efficient transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across the endoplasmic reticulum membrane, *Redox Biology*, 28: 101326-101333

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101326>

PMid:31546170 PMCID:PMC6812059

Chen J., 2016, Observation on individual molting, growth and analysis of relative gene expression in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, Thesis for M.S., Shanghai Ocean University, Supervisor: Wang C.H., pp.15-17 (陈娇, 2016, 中华绒螯蟹蜕壳生长的个体观察和相关基因的表达分析, 上海海洋大学, 导师: 王成辉, pp.15-17)

Cheng Y.X., Du N.S., Lai W., 2000, The lipid accumulations during the stages of the ovarian fast maturation and their effect on the spawning of *Eriocheir sinensis*, *Shuichan Xuebao (Journal of Fisheries of China)*, 24(2): 113-119 (成永旭, 堵南山, 赖伟, 2000, 中华绒螯蟹卵巢快速发育期内脂类积累以及对抱卵的影响, 水产学报, 24(2): 113-119)

Chung J.S., Maurer L., Bratcher M., Pitula J.S., and Ogburn M.B., 2012, Cloning of aquaporin-1 of the blue crab, *Callinectes sapidus* its expression during the larval development in hyposalinity, *Aquatic Biosystems*, 8(1): 21-31

<https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-21>

PMid:22943628 PMCID:PMC3489796

Denker B.M., Smith B.L., Kuhajda F.P., and Agre P., 1988, Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules, *J Biol Chem*, 263(30): 15634-15642

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)37635-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)37635-5)

PMid:3049610

Foguesatto K., Boyle R.T., Rovani M.T., Freire C.A., and Souza M.M., 2017, Aquaporin in different moult stages of a freshwater decapod crustacean: Expression and participation in muscle hydration control, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 208: 61-69

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.003>

PMid:28286329

Giffard-Mena I., Boulo V., Abed C., Cramb G., Charmantier G., 2011, Expression and Localization of Aquaporin 1a in the Sea-Bass (*Dicentrarchus labrax*) during Ontogeny, *Front Physiol*, 2: 34-46

<https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00034>

PMid:21808622 PMCID:PMC3137954

Guo H., Wei M., Liu Y., Zhu Y., Xu W.T., Meng L., Wang N., Shao C.W., Lu S., Gao F.T., Cui Z.K., Wei Z.F., Zhao F.Z., Chen S.L., 2017, Molecular cloning and expression analysis of the aqp1aa gene in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), *PLoS One*, 12(4): e0175033

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175033>

PMid:28380032 PMCID:PMC5381947

Ishibashi K., Koike S., Kondo S., Hara S., Tanaka Y., 2009, The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis, *J Med Invest*, 56: 312-317

<https://doi.org/10.2152/jmi.56.312>

PMid:20224213

Kang X.J., Tian Z.H., Wu J.L., and Mu S.M., 2013, Molt stages and changes in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, *Zhongguo Shuichan Kexue (Journal of Fishery Sciences of China)*, 19(5): 806-812 (康现江, 田志环, 吴江立, 穆淑梅, 2013, 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, 中国水产科学, 19(5): 806-812)

<https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2012.00806>

Morishita Y., Matsuzaki T., Hara-chikuma M., Andoo A., Shimono M., Matsuki A., Kobayashi K., Ikeda M., Yamamoto T., Verkman A., Kusano E., Ookawara S., Takata K., Sasaki S., and Ishibashi K., 2005, Disruption of aquaporin-11 produces polycystic



- kidneys following vacuolization of the proximal tubule, *Mol Cell Biol*, 25(17): 7770-7779  
<https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7770-7779.2005>  
PMid:16107722 PMCID:PMC1190286
- Sade N., Gebretsadik M., Seligmann R., Schwartz A., Wallach R., and Moshelion M., 2010, The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress, *Plant Physiol*, 152(1): 245-254  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.145854>  
PMid:19939947 PMCID:PMC2799360
- Soto G., Alleva K., Amodeo G., Muschietti J., and Ayub N.D., 2012, New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: orthologous identification and functional transfer is possible, *Gene*, 503(1): 165-176  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.021>  
PMid:22561693
- Tan X.F., Xu H., Khan S., Equiza M.A., Lee S.H., Vaziriyeqaneh M., and Zwiazek J.J., 2018, Plant water transport and aquaporins in oxygen-deprived environments, *J Plant Physiol*, 227: 20-30  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.003>  
PMid:29779706
- Tipsmark C.K., Sorensen K.J., and Madsen S.S., 2010, Aquaporin expression dynamics in osmoregulatory tissues of Atlantic salmon during smoltification and seawater acclimation, *J Exp Biol*, 213(3): 368-379  
<https://doi.org/10.1242/jeb.034785>  
PMid:20086120
- Vorontsova I., Gehring I., Hall J.E., and Schilling T.F., 2018, Aqp0a Regulates Suture Stability in the Zebrafish Lens, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59(7): 2869-2879  
<https://doi.org/10.1167/iovs.18-24044>  
PMid:30025131 PMCID:PMC5987579
- Wang Y., Lu J.J., Liu P., Gao B.Q., Li J., and Chen P., 2014, Cloning and characterization of aquaporins 1 and its expression analysis under salinity stress in *Portunus trituberculatus*, *Zhongguo Shuichan Kexue (Journal of Fishery Sciences of China)*, 21(5): 893-901(王渝, 吕建建, 刘萍, 高保全, 李健, 陈萍, 2014, 三疣梭子蟹水通道蛋白 1 cDNA 及其盐度胁迫下的表达分析, *中国水产科学*, 21(5): 893-901)
- Yakata K., Hiroaki Y., Ishibashi K., Sohara E., Sasaki S., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., 2007, Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity, *Biochim Biophys Acta*, 1768(3): 688-693  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.005>  
PMid:17178102
- Yakata K., Tani K., and Fujiyoshi Y., 2011, Water permeability and characterization of aquaporin-11, *J Struct Biol*, 174(2): 315-320  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.01.003>  
PMid:21251984
- Yeung C H., and Cooper T G., 2010, Aquaporin AQP11 in the testis: molecular identity and association with the processing of residual cytoplasm of elongated spermatids, *Reproduction*, 139(1): 209-216  
<https://doi.org/10.1530/REP-09-0298>  
PMid:19812234