

海湾扇贝维甲酸受体(RXR) cDNA 克隆与表达分析

张 瑞^{1,2}, 阙华勇¹, 丛日浩¹, 李 莉¹, 张国范¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 维甲酸受体(RXR)是核受体超家族的重要成员, 已有研究表明其在脊椎动物中广泛参与调控生长发育、新陈代谢等多种重要的生理过程。本研究采用 RACE 技术克隆获得海湾扇贝(*Argopecten irradians*) RXR (AiRXR) cDNA 序列, 采用荧光定量 RT-PCR 技术分析该基因在性腺发育不同时期的不同组织中的表达特点。结果表明, AiRXR 的 cDNA 序列开放阅读框为 1338bp, 含有两个亚型: AiRXR α 和 AiRXR β , 两个亚型之间在 T-box 中相差 4 个氨基酸。该蛋白序列与人 (*Homo sapiens*) 和栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 等的 RXR 相似性很高。AiRXR 进化树分析显示, AiRXR 与软体动物 RXR 聚为一支。AiRXR 基因具有广泛的组织表达特点, 在检测的组织中(外套膜、鳃、性腺、闭壳肌)均有表达, 推测 AiRXR 以信号分子的形式参与多种组织细胞的生命过程; 在海湾扇贝性腺发育过程中 AiRXR 基因在性腺发育的各时期均有表达且增殖期表达量最高, 说明 AiRXR 基因可能参与调节性腺发育和分化的过程。

关键词: 海湾扇贝(*Argopecten irradians*); RXR 基因; 组织表达; 性腺发育

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)09-0001-08

doi: 10.11759/hyqx20160408003

核受体超家族是一大类组成型的转录因子, 能够调控多种代谢途径如胚胎发育、内环境和生理的稳态^[1]。维甲酸 X 受体 (RXR) 作为核受体超家族中的一员, 含有 5 个典型的核受体结构域: A/B、C、D、E 和 F。A/B 结构域中含有活性的配体非依赖性的转录激活域 (AF-1), 能够增强 E 结构域中 AF-2 的作用, 从而上调靶基因的表达。C 结构域中含有高度保守的 DNA 结合结构域, 该结构域中含有两个锌指结构, 能够介导核受体与位于靶基因启动子区域的特异顺向重复序列(也称反应元件)结合。D 结构域是铰链结构域, 含有一个相对保守的配体结合结构域 (LBD), 可以与配体结合, 改变蛋白结构进而诱导基因表达, E 区含一个配体依赖性的转录激活域 (AF-2), 它能传递配体结合信号, 控制配体依赖的转录和激活; F 结构域序列保守性很低, 具有较高的可变性^[2-3]。在脊椎动物中, RXR 分为三个亚型: α 、 β 和 γ , RXR 作为转录因子与其他核受体成员如蜕皮激素受体 (EcR)、视黄酸受体 (RAR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 形成二聚体结合靶基因参与胚胎发育、细胞增殖与分化、新陈代谢等多种重要的生理过程^[4-6]。在无脊椎动物如海绵动物^[7]、昆虫^[8]、甲壳动物^[9]等类群中也克隆获得 RXR 的同源基因序列。

海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 自然分布于美国的东海岸和墨西哥湾沿岸, 于 1982 年首次成功引入我国, 实现了苗种全人工培育, 带动海湾扇贝成为我国主要海水养殖贝类之一^[10]。性腺发育分为五个时期: 分化期、增殖期、成熟期、排放期和休止期^[11-12]。亲贝性腺发育的成熟度和同步性直接影响着苗种生产成败, 但迄今对贝类性腺发育的分子调控机制知之甚少。本研究采用 RACE 技术克隆获得海湾扇贝 RXR cDNA 序列并分析其结构, 采用荧光定量 RT-PCR 技术分析该基因在性腺发育不同时期的不同组织中的表达特点, 旨在探究 RXR 基因在海湾扇贝发育过程中的调控作用, 为进一步开展双壳类 RXR 的功能研究提供基础。

收稿日期: 2016-01-24; 修回日期: 2016-06-15

基金项目: 国家科技部高技术研发计划课题(863 计划, 2012AA10A410); 贝类产业技术体系项目(CARS-48); 中国科学院科技服务网络计划项目(KFJ-EW-ST5-060)

[Foundation: The National High Technology Research and Development Program, 863 Program, No.2012AA10A410; The Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System, No.CARS-48; Science and Technology Service Network Initiative No.KFJ-EW-ST5-060]

作者简介: 张瑞(1991-), 女, 满族, 吉林人, 硕士研究生, 从事海洋生物功能基因研究, 电话: 0532-82898695, Email: 13069312160@163.com; 阙华勇, 通信作者, 研究员, E-mail: hque@qdio.ac.cn

1 材料与amp;方法

1.1 海湾扇贝样品的获取

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)取自青岛市古镇口湾,在性腺发育的5个时期:分化期、生长期、成熟期、排放期和休止期分别采集其鳃、性腺、外套膜、闭壳肌的组织样品,取样后的组织置于-80℃冰箱中待用。

1.2 海湾扇贝 RXR 基因的克隆

采用 Trizol 法提取海湾扇贝总 RNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 检测提取的 RNA 浓度。使用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Japan) 合成 RACE cDNA 第一条链,以此为模板进行 PCR 扩增。利用海湾扇贝转录组测序的数据获得 RXR 基因序列片段,根据获得的基因片段设计引物: AiRXR-F 和 AiRXR-R, 凝胶电泳检测条带的大小,PCR 反应体系为 25 μL,其中 cDNA 模板 2 μL、EX-taq 酶 (TaKaRa, Japan) 12.5 μL、灭菌水 10 μL、引物各 0.5 μL,PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 35 个循环,72℃延伸 10 min。对该基因片段进行验证后,设计 RACE 引物。采用巢式 PCR 扩增得到海湾扇贝 RXR cDNA 的全长, RXR 基因的全长所用引物见表 1。PCR 反应体系 25 μL,其中 cDNA 模板 2 μL、LA-taq 酶 (TaKaRa, Japan) 12.5 μL、灭菌水 10 μL、引物各 0.5 μL,PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 35 个循环, 72℃延伸 10 min。扩增并纯化后连接到 pEASY-T1 载体(北京全式金生物技术公司)并转化

到大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞 (北京全式金生物技术公司)中,涂平板,37℃培养过夜,挑取抗氨苄青霉素的阳性克隆,经菌液 PCR 检测后,交由北京六合华大股份有限公司进行测序。

1.3 RXR 基因序列分析及系统进化分析

运用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测克隆基因的开放阅读框 (ORF),在 NCBI Genbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 寻找与海湾扇贝 RXR 的同源序列,通过 CLUS-TALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 进行多序列同源比对,并用 BioEdit 软件分析。根据在线 BLASTp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)对蛋白结构进行预测,利用 MEGA 软件 (<http://www.megasoftware.net/>)中的最大似然法对预测 RXR 的 DBD 和 LBD 的结构域构建进化树。

1.4 海湾扇贝各组织 RXR 基因的表达

利用 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪,分析海湾扇贝 RXR (*Argopecten irradians* RXR, AiRXR) 在海湾扇贝性腺发育 5 个时期不同组织中的定量表达,每个样本做 3 个平行检测。已有的研究表明, RXR 的异构体在组织的表达没有明显的差异^[13],因此在海湾扇贝 RXR cDNA 的保守区设计荧光定量 PCR 的引物: AiRXR-DOU-F 和 AiRXR-DOU-R(表 1)。荧光定量 RT-PCR 反应条件: 94℃ 30s, 1 个循环; 94℃ 5s, 60℃ 30s, 40 个循环。通过 ABI 7500 Fast SDS software V2.0 软件输出数据,采用 2^{-ΔΔCt} 法对基因的相对表达量进行分析,18S rRNA 作为内参基因。

表 1 引物序列
Tab. 1 Sequences of primers

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	用途
AiRXR-F	AGAACAGTGC GGAAGGAT	RXR 片段扩增
AiRXR-R	TGTGAGAACACGGTCAAAGA	RXR 片段扩增
AiRXR-3'RACE -1	TATGAAATGTCTGGCAATGGG	3'RACE
AiRXR-3'RACE -2	GAAGGCGAGGTGGAAAGT	3'RACE
AiRXR-5'RACE -1	ACTGCTGCGGTGAACATG	5'RACE
AiRXR-5'RACE -2	GCCAGCACGTAACAGGATGA	5'RACE
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	接头引物
dGAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACG10	5'RACE 接头引物
dTAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT16	3'RACE 接头引物
Oligo(dT)-adaptor	GGCCACGCGTCGACTAGTACT16VN	cDNA 的合成
AiRXR-DOU-F	CATCACAACCCTCCCCACC	荧光定量 PCR
AiRXR-DOU-R	CGTTCCTATGCTTGGGCTTT	荧光定量 PCR
18S rRNA-F	CTGACCATAAACGATGCCGACT	荧光定量 PCR 内参基因
18S rRNA-R	AACTTTGGTTTCCCCTAAGCTG	荧光定量 PCR 内参基因

使用 EXCEL 软件进行统计分析($P < 0.05$)。

2 实验结果与分析

2.1 海湾扇贝 RXR 基因的 cDNA 克隆

克隆扩增得到 AiRXR 的 cDNA 含有两个亚型: AiRXR α 和 AiRXR β , 异构体中长度最短的 AiRXR α 编码序列 1338bp, 编码 446 个氨基酸, 理论的等电点为 6.89, 软件预测蛋白为 49.10 ku (http://web.expasy.org/compute_pi/), AiRXR β 在 AiRXR α 的 T-box 区域 A 和 V 之间插入了 4 个氨基酸 (CLAA)。氨基酸序列比对显示 AiRXR 含有典型的 RXR 家族结构即含有两个保守的蛋白结构域: DNA 结合结构域 (DBD) 和配体结合结构域 (LBD), DBD 中含有 P-BOX (EGCGK) 和 D-BOX (CREER)。D 区存在 T-box (EAVQEERQR), E 结构域中 AF-2 可激活 RXR 的转录活性(图 1)。

expasy.org/compute_pi/), AiRXR β 在 AiRXR α 的 T-box 区域 A 和 V 之间插入了 4 个氨基酸 (CLAA)。氨基酸序列比对显示 AiRXR 含有典型的 RXR 家族结构即含有两个保守的蛋白结构域: DNA 结合结构域 (DBD) 和配体结合结构域 (LBD), DBD 中含有 P-BOX (EGCGK) 和 D-BOX (CREER)。D 区存在 T-box (EAVQEERQR), E 结构域中 AF-2 可激活 RXR 的转录活性(图 1)。

```

1  ATGGACCATTCAAGAGATGGATTCCCTTGACAGTAGTGTCCAGCAGTGGCTTCTGGTTGATATCATCAGGATCTGGC.
1  M D H S E M D S L D S S V S S A S G C I S S G S G
76  GGTATGATGTCGTCAAATTTATCCATGAATTCATGTGGTGAATCCCCGCCGGACATCAAACCGGACCTGTCC.
26  G M M S S N L S M N S M S V N S P P D I K P D L S
151  CAGTTAATATATGGCATCTCCACCTGGGTCTTACTTTAGTTATAGCTCAGGCCATGCAGTCAATGTCTATCTTCATCA.
51  Q L N M A S P P G S Y F S Y S S G M Q S M S S S S
226  CAACCCCTCCCCACCAATTTGATGCACTCACCAGGAATGCATTCTCCTTCATCCTCAGTTACCTCCCCCTTCGATGATG.
76  Q P S P P L M H S P G M H S P S S S V T S P S M M
301  TCGTTGGGATCCCCAGGGTGGGTCTTTCACCTCCCAATCCACACATGCCACACACAAAGCCTCAGTAGCAAAACAC
101  S L G S P G S V S S P P N P H M P H T I L S S K H
376  ATTTGTCAATATGTGGAGACCGGGCTCAGGAAACATTACGGTGTITACAGTTGTGAGGGATGTAAAGGTTTC
126  I C A I C G D R A S G K H Y G V Y S C E G C K G F
451  TTCAAAGAACAGTCCGCAAGGATCTAACATACGCTTCAGAGACGACCCGCAATTGTGTAATAGATAAACGTCAA
151  F K R I V R K D L I Y A C R D D R N C V I D K R Q
526  AGGAAACAGATGTCACTACTGCGGATATATGAATGTCTGGCAATGGGCATGAACAGGAGAGCTGICCLAGAGGAA.
176  R N R C Q Y C R Y M K C L A M G M K R E A V Q E E
601  AGACAACGACTGAAGAAAAAGGTGAAGCGAGGTGGAAAGTACCAGTAGTGTACTCTGCATCTGCCAGTCCAGTGGAG
201  R Q R V K E K G E G E V E S T S S A N S D M P V E
676  AAGGTTCTGGACGACAGAGCTGTCACTGCACTTAAACTGGACACTTACATAGACACACAGAAAGATCCAGTGCACA
226  K V L D A E L S V D P K L D T Y I D T Q K D P V T
751  AATATTTGCCAGGCAGCTGACAAACAGTGTGTTACGTTGGTTCATGGGCTAGGAGATAACCACTTTACBGA
251  N I C Q A A D K Q L F T L V A W A R R I P H F T E
826  CTACCCCTGGAGATCAGGTCATCCTGTTCAGTGTGCTGGAAATGAGCTACTGATTGCTGCATTTTCACATCCG
276  L P L E D Q V I L L R A G W N E L L I A A F S H R
901  TCCATTTGGTAAAAGATGGTATACTGTGCGCCACCGGACTTCATGTTCAACGCAGCAGTGCACACCAGGCTGGT
301  S I V V K D G I L L A T G L H V H R S S A H Q A G
976  GTGGTACCATCTTTGACCGTGTTCACAGACTTGTGCTAAGATGAGGGAGATGAATATGCACAAACAGAR
326  V G I I F D R V L I E L V A K M R E M K M D K T E
1051  TTAGGCTGTCTACGTCACATTTGCTGTTCATCCAGATGCTAAAGGTTTGTCTGCTATTACAGGAGTCTAGGGC
351  L G C L R A I V L F N P D A K G L S A I Q E V E A
1126  CTGAGAGAAAAGTGTATGCATCAATGGAAGAAATATTCAAACACGTTATCTCTGATGACCTGGAGGGTTTGTCT
376  L R E K V Y A S L E E Y S K T R Y P D E P G R F A
1201  AAGCTGTGCTTAGACTGCCTGCCTGAGAGATCGGACTTAAAGTGCCTAGAACACTTGTCTTCTTCAAATTA
401  K L L L R L P A L R S I G L K C L E H L F F F K L
1276  ATTGGTGTATACCGGATAGACACTTCTCTGATGAAAATGCTGGAAAGCCCAAGCATAGGAACGTGA
426  I G D T P I D I F L M E M L E S P S I G T *
    
```

图 1 海湾扇贝 RXR cDNA 序列

Fig. 1 cDNA sequence of *A. irradians* retinoid X receptor (RXR)

2.2 同源序列分析和进化树分析

将克隆得到的 AiRXR 的 DBD 和 LBD 结构域分别与人 (*Homo sapiens*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、小鼠 (*Mus musculus*)、爪蟾 (*Xenopus laevis*) 和栉孔扇贝

(*Chlamys farreri*) 等 13 个物种的 22 个 RXR 氨基酸的 DBD 和 LBD 结构域进行同源比对, 发现 AiRXR α 和 AiRXR β 与人和爪蟾的同源性均为 79%~84%, 与栉孔扇贝 RXR 的同源性高达 90% (图 2)。

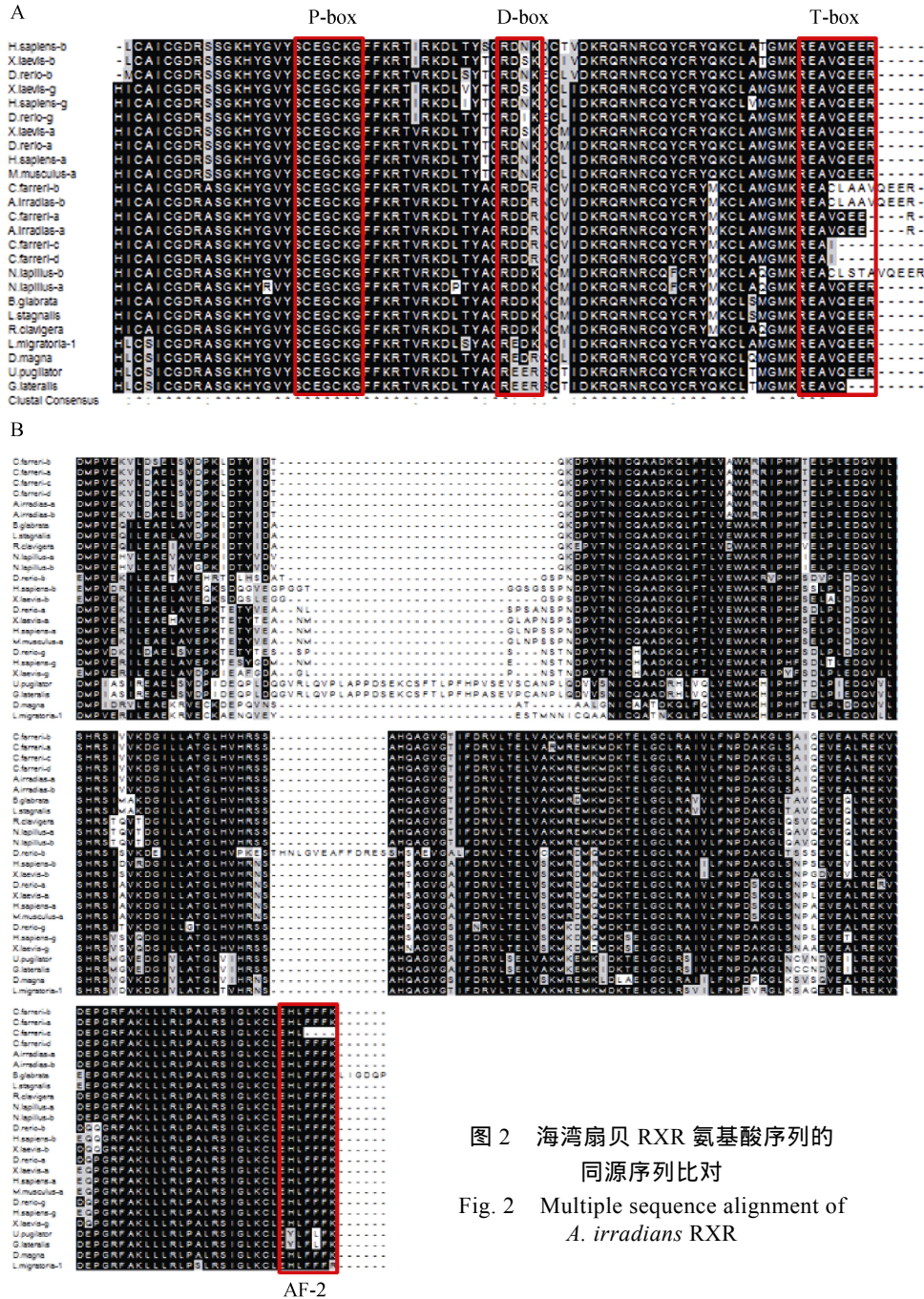


图 2 海湾扇贝 RXR 氨基酸序列的同源序列比对
Fig. 2 Multiple sequence alignment of *A. irradians* RXR

B.glabrata (*Biomphalaria glabrata*, 光滑双脐螺, AAL86461)、*U. pugilator* (*Uca pugilator*, 招潮蟹, AAC32789)、*D.magna* (*Daphnia magna*, 大型蚤, ABF74729)、*D.erio-a* (*Danio rerio-a*, 斑马鱼, NP_571228)、*D.erio-b* (*Danio rerio-b*, 斑马鱼, NP_571313)、*D.erio-g* (*Danio rerio-g*, 斑马鱼, NP_001002345)、*G.lateralis* (*Gecarcinus lateralis* s., 陆地蟹, AAZ20368)、*H. sapiens-a* (*Homo sapiens-a*, 人, ABB96254)、*H. sapiens-b* (*Homo sapiens-b*, 人, AAA60293)、*H. sapiens-g* (*Homo sapiens-g*, 人, AAA80681)、*L. migratoria-1* (*Locusta migratoria-1*, 东亚飞蝗, AAQ55293)、*L.stagnalis* (*Lymnaea stagnalis*, 静水椎实螺, AAW34268)、*M. musculus* (*Mus musculus-a*, 小鼠, NP_035435)、*N. lapillus-a* (*Nucella lapillus-a*, 大西洋犬峨螺, ABS70715)、*N. lapillus-b* (*Nucella lapillus-b*, 大西洋犬峨螺, ABS70716)、*R. clavigera* (*Reishia clavigera*, 荔枝螺, AAU12572)、*X. laevis-a* (*Xenopus laevis-a*, 爪蟾, P51128)、*X. laevis-b* (*Xenopus laevis-b*, 爪蟾, NP_001080936)、*X. laevis-g* (*Xenopus laevis-g*, 爪蟾, NP_001088948)、*C. farreri-a* (*Chlamys farreri-a*, 栉孔扇贝, AFL91696.1)、*C. farreri-b* (*Chlamys farreri-b*, 栉孔扇贝, AFL91697.1)、*C. farreri-c* (*Chlamys farreri-c*, 栉孔扇贝, AFL91698.1)、*C. farreri-d* (*Chlamys farreri-d*, 栉孔扇贝, AFL91699.1)。

P-box、D-box、T-box 和 AF-2 用框架标记

利用 MEGA5.0 软件对 *Ai*RXR 与其他 13 个物种的 RXR 的 DBD 和 LBD 部分结构域构建进化树，

发现 AiRXR 与栉孔扇贝 RXR 聚在一起, 并与其他软体动物聚为一大支, 与脊椎动物 RXR 分离开, 说

明 AiRXR 属于 RXR 家族成员, 并且序列相对保守 (图 3)。

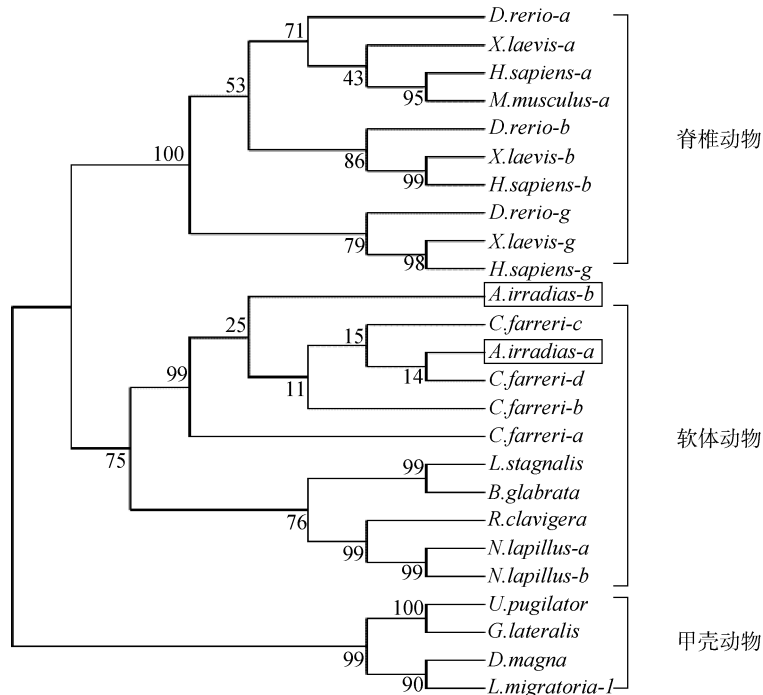


图 3 海湾扇贝 RXR 氨基酸序列系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of *A. irradians* RXR

GenBank accession number: *B. glabrata* (AAL86461), *U. pugilator* (AAC32789), *D. magna* (ABF74729), *D. rerio-a* (NP_571228), *D. rerio-b* (NP_571313), *D. rerio-g* (NP_001002345), *G. lateralis* (AAZ20368), *H. sapiens-a* (ABB96254), *H. sapiens-b* (AAA60293), *H. sapiens-g* (AAA80681), *L. migratoria-l* (AAQ55293), *L. stagnalis* (AAW34268), *M. musculus* (NP_035435), *N. lapillus-a* (ABS70715), *N. lapillus-b* (ABS70716), *R. clavigera* (AAU12572), *X. laevis-a* (P51128), *X. laevis-b* (NP_001080936), *X. laevis-g* (NP_001088948), *C. farreri-a* (AFL91696.1), *C. farreri-b* (AFL91697.1), *C. farreri-c* (AFL91698.1), *C. farreri-d* (AFL91699.1). 海湾扇贝 RXR 用框架标记

2.3 海湾扇贝 RXR 在性腺不同发育时期各组织中的表达

荧光定量 PCR 用于检测 AiRXR 在性腺不同发育时期的表达, 结果表明, AiRXR α 与 AiRXR β mRNA 在性腺发育的五个时期: 分化期、增殖期、成熟期、排放期和休止期中均有表达, 但在性腺增殖期表达量最高 ($P < 0.05$)。在性腺发育时期, AiRXR 在组织中的表达差异显著 ($P < 0.05$); 在发育时期的性腺组织中, AiRXR 在增殖期的表达量最高, 并在成熟期、排放期和休止期中表达量迅速下降 (图 4)。

3 讨论

本研究首次克隆获得海湾扇贝 RXR 基因 (AiRXR) 的 cDNA 序列, 发现其含有 2 个 RXR 亚型: AiRXR α 和 AiRXR β , 蛋白预测表明两个异构体之间插入一个相差 12 个核苷酸的 T-box (+4)。在腹足类

软体动物如 *N. lapillus*^[14] 和 *T. clavigera*^[4] 中也发现了相似的 RXR 的异构体。对其进行蛋白保守区预测, 显示其具有 RXR 核受体家族蛋白所具有的 A-F 区域的完整结构。从 N 端到 C 端, 海湾扇贝 RXR 氨基酸序列的 C 区存在高度保守的 P-box 和 D-box 两个典型的结构, 其中 P-box 主要参与特异性结合 DNA, D-box 与同型二聚体的形成有关。D 区存在参与 DNA 识别的 T-box, 由于 AiRXR α 和 AiRXR β 在 T-box 相差 4 个氨基酸序列, 因此 AiRXR α 和 AiRXR β 在识别靶基因的位置存在差异。E/F 结构域中的 AF-2 能够传递配体结合信号, 控制配体依赖的转录和激活^[15]。

在脊椎动物中发现 RXR 与 9-顺式维甲酸 (9cRA) 有较高的亲和力, 参与调控维甲酸信号途径, 并且在腹足类动物 *T. clavigera*、*B. glabrata* 和 *N. lapillus* 中也发现 RXR 可与 9cRA 结合^[14, 16], 因此推测 9cRA 可能与 AiRXR 结合。目前已发现环境中的三丁基锡

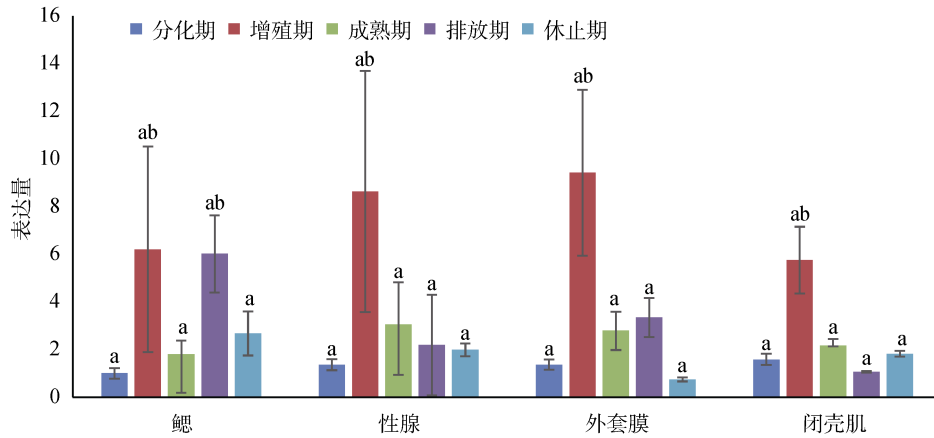


图 4 海湾扇贝 RXR 在性腺发育时期各组织中的表达

Fig. 4 Expression of *A. irradians* RXR in various tissues during gonadal development

(TBT) 能够与人的 RXR(hRXR)结合, 结合位点位于 9cRA 结合区; 疣荔枝螺(*Thais clavigera*)的 RXR(TcRXR) 与 hRXR 的 LBD 有相似的空间结构, 因此推测软体动物中 TBT 可能与 TcRXR 结合^[17-18]。采用荧光素酶双报告技术研究发现 TcRXR 对外界的 TBT 有响应^[4]。AiRXR 是否参与海湾扇贝的三丁基锡应激反应, 尚待进一步的实验证实。

双壳类贝类中存在多种性腺发育的途径, 既有雌雄分化也有雌雄同体的形式, 由于性别分化的多样性, 因此研究双壳类性别分化和性别决定机制具有重要的价值^[14]。本研究发现 AiRXR 在海湾扇贝性腺发育的 5 个时期均有表达并且在增殖期表达最高, AiRXR 的表达趋势与杂色鲍的 RXR 表达一致^[19]。这一发现说明软体动物 RXR 参与了细胞增值与分化的过程, 类似脊椎动物存在的作用^[20], 而且也可据此推断 RXR 在调节性腺发育的过程发挥了作用。AiRXR 在性腺发育时期的各组织中均有表达, 且在性腺中表达较高, 为 AiRXR 可能参与调节性腺发育提供了进一步的证据。影响软体动物性腺发育的温度、饵料、水质等生态环境因子是否会影响 RXR 的表达, RXR 的表达调控作用与环境因子的关联性, 还有待进一步的研究^[21-22]。

4 结论

本文报道了海湾扇贝 RXR 基因的 cDNA 序列及其在性腺发育不同时期的不同组织中的表达特点, 研究结果有助于阐明海湾扇贝性腺发育的分子机制, 丰富软体动物繁殖生物学和水产养殖学的知识, 为软体动物的性腺分化与发育分子机制的研究提供了重要的基础资料。

参考文献:

- [1] Vogeler S, Galloway T S, Lyons B P, et al. The nuclear receptor gene family in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, contains a novel subfamily group[J]. BMC Genomics BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-15.
- [2] Mangelsdorf D J, Borgmeyer U, Heyman R A, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid[J]. Genes and Development, 1992, 6(3): 329-344.
- [3] 李维, 王淑红, 王艺磊, 等. 软体动物维甲酸 X 受体研究进展[J]. 动物学杂志, 2013, 48(4): 655-664. Li Wei, Wang Shuhong, Wang Yilei, et al. Retinoid X Receptor in Mollusc.[J]. Chinese Journal of Zoology, 2013, 48(4): 655-664.
- [4] Urushitani H, Katsu Y, Ohta Y, et al. Cloning and characterization of retinoid X receptor (RXR) isoforms in the rock shell, *Thais clavigera*[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103: 101-111.
- [5] Mark M, Chambon P. Functions of RARs and RXRs in vivo: Genetic dissection of the retinoid signaling pathway[J]. Pure and Applied Chemistry, 2003, 75(11-12): 1709-1732.
- [6] Reddy J K, Mannaerts G P. Peroxisomal lipid metabolism.[J]. Annual Review of Nutrition, 1994, 14(14): 343-370.
- [7] Wiens M, Batel R M, Weg M. Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*[J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206: 3261-3271.
- [8] Maestro O, Cruz J, Pascual N, et al. Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae)[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2005, 238(1-2): 27-37.

- [9] Nagaraju G P C, Balney R, Borst D W. Molecular cloning and sequence of retinoid X receptor in the green crab *Carcinus maenas*: a possible role in female reproduction[J]. *Journal of Endocrinology*, 2011, 210(3): 379-390.
- [10] 张福绥. 海湾扇贝引进中国 10 周年[J]. *齐鲁渔业*, 1993: 9-12.
Zhang Fusui. The 10th anniversary of bay scallop introduced into China[J]. *Shandong Fisheries*, 1993: 9-12
- [11] 吕豪, 李霞, 董义超, 等. 海湾扇贝种贝人工促熟条件下积温 and 性腺发育周期的关系[J]. *海洋科学*, 2008, 32(4): 57-60.
Lü Hao, Li Xia, Dong Yichao, et al. The relation between effective accumulated temperature and gonad development period of scallop, *Argopecten irradians*[J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(4): 57-60.
- [12] 张守都, 许飞, 李莉, 等. 海湾扇贝混交家系中优先受精以及自然选择压力下杂合子过剩的研究[J]. *海洋科学*, 2013, 3: 1-5.
Zhang ShouDu, Xu Fei, Li Li, et al, Investigation of preferential fertilization and heterozygote excess in mixed family of bay scallop (*Argopecten irradians*) [J]. *Marine Sciences*, 2013, 3: 1-5.
- [13] Lü J, Feng L, Bao Z, et al. Molecular characterization of RXR (Retinoid X Receptor) gene isoforms from the bivalve species *Chlamys farreri*[J]. *Plos One*, 2013, 8(5): 546-555.
- [14] Castro L F C, Lima D, Machado A, et al. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 85(1): 57-66.
- [15] H Asazuma, S Nagata, M Kono, et al. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol. Part B[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 148(2): 139-150.
- [16] Junichi Nishikawa, Satoru Mamiya, Tomohiko Kanayama, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 38(23): 6271-6276.
- [17] Nishikawa J. Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor[J]. *Marine Biology*, 2006, 149(1): 117-124.
- [18] Albane L M, Marina G, Dominique R, et al. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors.[J]. *Embo Reports*, 2009, 10(4): 367-373.
- [19] 王鑫, 王淑红. 维甲酸 X 受体在杂色鲍性腺发育中的调控作用研究.[J]. *安徽农业科学*, 2015(23): 140-142.
Wang Xin, Wang Shuhong. The role of Retinoid X Receptor in Gondal development of *Haliotis diversicolor*. [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 23: 140-142.
- [20] Tallafuss A, Hale L A, Yan Y L, et al. Characterization of retinoid-X receptor genes rxra, rxrba, rxrbb and rxrg during zebrafish development.[J]. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(5): 556-565.
- [21] Wayne N L. Regulation of seasonal reproduction in mollusks.[J]. *Journal of Biological Rhythms*, 2001, 16(4): 391-402.
- [22] Sternberg R M, Hotchkiss A K, Leblanc G A. Synchronized expression of retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an imposex-susceptible mollusc[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(4): 1345-1351.

Molecular cloning and expression of the retinoid X receptor gene in *Argopecten irradians*

ZHANG Rui^{1, 2}, QUE Hua-yong¹, CONG Ri-hao¹, LI Li¹, ZHANG Guo-fan¹

(1. Institute of Oceanology of the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Jan. 24, 2016

Key words: *Argopecten irradians*; AiRXR gene; tissue expression; gonadal development

Abstract: The retinoid X receptor (RXR) is a member of the nuclear family of receptors. It has been proven that RXR plays a crucial role in regulating growth, development, metabolism, and other physiological process in vertebrates. Using the RACE technique, the cDNA sequence of *Argopecten irradians* RXR (AiRXR) was cloned. The ORF of AiRXR was 1338 bp. Two isoforms were confirmed as AiRXR α and AiRXR β with a difference of four amino acids in the T-box. The homologous analysis of the amino acids showed that AiRXRs share a high degree of similarity with the RXRs of *Homo sapiens* and *Chlamys farrerii*. The results of qRT-PCR illustrated that the AiRXR genes are expressed in multiple tissues (mantles, gills, gonads, and adductor muscles) throughout gonadal development, indicating that AiRXRs act as one of the signal molecules involved in multiple physiological processes. The highest level of AiRXR expression was observed at the proliferation stage of gonadal development, implying that AiRXR may be involved in the regulation of gonadal development and differentiation.

(本文编辑: 梁德海)