## 中华蛸章鱼胺受体 OARβ2R 基因克隆及表达分析

肖懿哲1,陈小灵2,孙玉龙3,张子平3,王艺磊2,朱友芳1

(1. 莆田市水产科学研究所, 福建 莆田 351100; 2. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 3. 福建农林大 学 动物科学学院, 福建 福州 350002)

> 摘要:为了解中华蛸(Octopus sinensis)受精卵的孵化及幼体发育机制,本研究对其章鱼胺受体基因 (OsOARβ2R)进行克隆和生物信息学分析,同时研究了 OsOARβ2R 在不同组织/器官、刚孵出的幼体不同 饥饿时间及不同的胚胎发育时期表达水平的变化。结果为:OsOARβ2R 开放阅读框全长为 1 158 bp,编码 385 个氨基酸,有7个跨膜结构域,具有G蛋白偶联受体的共性,其中TM3、TM5、TM6、TM74个跨膜 结构相对保守。经氨基酸同源对比及构建系统进化树分析,其与加州双斑蛸(O. bimaculoides)的OAR 的 一致性最高。荧光定量 PCR 结果显示,在成体 10 个组织/器官中,OsOARβ2R 在后唾液腺中表达水平最高, 其次是脑和小肠;在幼体饥饿实验中,随着饥饿时间的推移,OsOARβ2R 在后唾液腺中表达水平最高, 其次是脑和小肠;在幼体饥饿实验中,随着饥饿时间的推移,OsOARβ2R 的表达水平在饥饿2 d 后显著降 低,在饥饿3 d 时表达水平显著升高,且表达水平达到最高,之后表达水平开始回落;OsOARβ2R 在中华 蛸整个胚胎发育周期均可检测到,且在多细胞期表达水平最高,后显著下降,黑珠期显著高于红珠期及 初孵幼体。这些结果为研究中华蛸受精卵的孵化及幼体发育机制、提高人工育苗效率提供了基础资料。

关键词:中华蛸(Octopus sinensis); 章鱼胺受体; 饥饿; 胚胎发育 中图分类号: Q785; S968.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)09-0109-08 DOI: 10.11759/hykx20211227003

中华蛸(Octopus sinensis), 原名真蛸(O.vulgaris), 近年来根据形态学和分子生物学的差异将中华蛸和 真蛸分开<sup>[1-2]</sup>, 主要分布在北太平洋西部的浅温带水 域,特别是在中国、韩国和日本沿海,具有生命周期 短、产卵量大、食物转化率高等优点, 被认为具人工 养殖潜力的优良海水种类[3-6]。但在人工养殖条件下, 存在着幼体生长缓慢, 死亡率高等问题, 限制了养 殖业的进一步发展<sup>[7-9]</sup>。章鱼胺受体(octopamine receptor, OAR)是典型的 G 蛋白偶联受体, 参与生物体 包括生长、代谢、发育、免疫等多种至关重要的生 理学过程<sup>[10]</sup>。现已证明章鱼胺不仅在昆虫的生理活 动中扮演重要角色[11],在海洋无脊椎动物中也发挥 很大的作用, COON 等<sup>[12, 13]</sup>发现章鱼胺能够诱导太 平洋牡蛎(Crassostrea gigas)的附着变态; OARs 已经 从软体动物腹足类的椎实螺属和海兔螺属中被鉴定 出来,且发现其在生命活动中能够行使控制行为发 生、参与新陈代谢以及信号转导等多种生理功能[14]; PRYCE 等<sup>[15]</sup>在美洲牡蛎(C.virginica)的鳃、外套膜、 心脏、血淋巴以及神经系统中检测到了章鱼胺和 OARs的存在,并证实了其在美洲牡蛎的心脏活动中 行使重要功能。这些研究结果表明 OAR 在海洋无脊 椎动物中发挥的作用与昆虫有许多类似性,但尚未

看到中华蛸 OAR 基因(OsOARβ2R)的研究报道。本研 究克隆了 OsOARβ2R,并进行了生物信息学分析,研 究了 OsOARβ2R 在不同组织中的表达、刚孵出的幼 体在不同的饥饿时间及不同的胚胎发育时期表达水 平的变化。这些结果可为研究中华蛸受精卵的孵化 及幼体发育机制、提高人工育苗生产效率提供一些 基础资料。

## 1 材料与方法

## 1.1 样品采集

实验用的中华蛸组织样品 2021 年 7 月采自福建 省莆田市南日海区。采集肌肉、脑、鳃、鳃心、消

收稿日期: 2021-12-27; 修回日期: 2022-05-08

基金项目:中央引导地方科技发展专项(020L3011);福建省科技厅项目(2021S21010093);莆田市科技局项目(2020NJJ005)

<sup>[</sup>Foundation: Special Funds Provided by the Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China to Guide the Development of Science and Technology in Fujian Province, No. 2020L3011; The Project of Department of Science and Technology of Fujian Province, No. 2021S21010093; The Project of Putian Science and Technology Bureau of Fujian Province, No. 2020NJJ005]

作者简介:肖懿哲(1964—),男,福建莆田人,本科,主要从事水产 养殖技术工作,电话:0594-6298821,E-mail:yzxiaoxyz@163.com;朱 友芳(1964—),通信作者,主要从事水产养殖及病害防治研究,E-mail: e365cn@163.com

化腺、小肠、唾液腺、肾脏、眼、心脏等 10 个组织/器官,用于 OsOARβ2R 在各组织中的分布研究。

饥饿时间对 OsOARβ2R 表达水平的影响采样时 间为2019年5月,试验水温为22.5±0.5℃,试验水体 100 L,设置 3 个平行组,每组放养刚孵出的中华蛸 幼体1000只。幼体孵出时为0h,不投喂饵料,饥饿 天数分别为0、1、2、3、4和5d,每个时相取6份样 品储存于液氮中。

不同的胚胎发育时期的样品 2021 年 3~4 月采自 在莆田南日海区的网箱,母蛸在产卵巢中产卵并护 卵,自然水温孵化,孵化水温 14.7~20.8℃,采集多 细胞期(multi-cell stage)、红珠期(red-bead stage)、黑 珠期(black-bead stage)和初孵幼体(newly-hatched larvae)共4个时期的胚胎,每个时相取6份样品储存 于液氮中。

## 1.2 中华蛸 OsOARβ2R 基因克隆

利用课题组中华蛸转录组数据库筛选获得的 OsOARβ2R cDNA序列,采用从头到趾引物(表1)扩增、 测序验证开放阅读框(ORF)序列的准确性。本研究中所 用引物均由捷瑞(上海)生物工程有限公司合成。

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
OARβ2R-F	TTTTGTTGGCTCCGATAGATA	OPE 验证
<i>OARβ2R</i> -R	TGTTAGCACGCATTTTACCTC	
<i>qOARβ2R</i> -F	TCGCAGACAAGAGCACGCTATTC	完量 PCR
<i>qOARβ2R</i> -R	CGTATCCGTATATCGACTTCCGTTGG	<u></u> L 重 I CK
<i>qPCR-β-actin-</i> F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	内参其因
<i>qPCR-β-actin-</i> R	TGGTCTCATGGATACCAGCA	ri多坐凹

表 1 本研究所用引物序列 Tab. 1 Primers used in this study

ORF 区扩增的模板为脑 cDNA,反应体系为: 2 µL 的 2.5 mmol/LdNTP Mix, 2.5 µL 的 10×EX Taq buffer, 0.1 µL 的 5 U/µLEX Taq DNA 聚合酶, 1 µL 的 cDNA 模板, 1 µL 的 10 µmol/L*OsOAR* $\beta$ 2*R*-F, 1 µL 的 10 µmol/L*OsOAR* $\beta$ 2*R*-R 引物,反应总体积为 25 µL, 扩增产物纯化后 PCR 产物由捷瑞(上海)生物工程有 限公司测序。

## 1.3 OsOARβ2R 基因及其氨基酸序列分析

根据测序结果分析获得 OsOARβ2R 的 ORF, OsOARβ2R分析采用 NCBI 的 BLAST 软件, OsOARβ2R 翻译采用 EXPASY 网站的 Translate 软件。蛋白质结构 域分析采用 NCBI 的 CDD 软件,通过 SWISS-MODEL 网站进行三维模型构建。OAR 序列多重比对采用 DNAman 软件,系统进化树采用 MEGA-X 软件的邻接 法(Neighbor-Joining, NJ)构建。

## 1.4 OsOARβ2R 基因的定量

以 β-actin 作为内参基因, 引物序列见表 1。 qRT-PCR 采用 biosharp® SYBR Green Master Mix 试 剂盒(兰杰柯科技, 广州), 反应体系: 模板 4.5 μL, 引物(qOARβ2R-F、qOARβ2R-R, 10 μmol/L)各 0.25 μL, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 5 μL。反应过 程:95℃变性 1 min, 40 个循环; 95℃变性5 s; 60℃退 火 10 s; 72℃延伸 15 s; 结束后根据熔解曲线, 分析 产物的特异性。以 2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算中华蛸不同组织、 幼体不同饥饿时间和不同发育阶段 *OsOARβ2R* 基因 相对表达水平, 使用 SPSS 23 软件进行显著性差异 分析。P<0.05 表示差异显著。数据以平均值±标准误 差(mean ± SE, *n*=6)表示。

## 2 结果

## 2.1 OsOARβ2R 序列分析

*OsOARβ2R* 的 ORF 长度 1 158 bp, 编码 385 个氨 基酸, 预测的蛋白质的相对分子量为 44.536 kDa, 等 电点为 8.58。利用 NCBI 的 CDD 软件预测 *OsOARβ2R* 的蛋白质(*Os*OARβ2R)具有 7 个跨膜结构域(TM1-7) (图 1)。预测的 *Os*OARβ2R 蛋白质三级结构显示, 其 含有 9 个 α-螺旋, 2 个 β-折叠(图 2)。

## 2.2 OsOARβ2R 序列多重比对和系统进化 树分析

选取加州双斑蛸(O. bimaculoides, 登录号: XP\_014771877.1)、欧洲大扇贝(Pecten maximus, 登 录号: XP\_033757386.1)、福寿螺(Pomacea canaliculate, 登录号: XP\_025094782.1)、加州海兔(Aplysia californica, 登录号: NP\_001191606.1)、海天牛

1	atgc	aaat	taaa	tca	aac	tgc	aag	ccg	aac	aaa	cat	ggc	tga	ctt	tac	aaa	cga	aac	tta	tgt	aga	gga	atc	ttca	75
1	M Q	Ι	Ν	Q	Т	А	S	R	Т	Ν	М	А	D	F	Т	Ν	Е	Т	Y	V	Е	Е	S	S	25
76	cttg	attt	tcct	ctt	tat	ttt	tag	gtc	tat	agc	aat	ggt	tgc	tat	aat	ggt	gtg	cgc	tgt	ttt	cgg	gaa	ctt	tctg	150
26	L D	F	L	F	Ι	F	R	S	Ι	А	М	V	А	Ι	М	V	С	А	V	F	G	Ν	F	L	50
151	gtca	taat	tag	cgt	gta	taa	att	cta	tcg	tct	acg	agt	gtt	aac	gaa	cta	ttt	cat	tgt	gtc	att	ggc	gtt	tgca	225
51	V I	Ι	S	V	Y	Κ	F	Y	R	L	R	V	L	Т	Ν	Y	F	Ι	V	S	L	А	F	А	75
226	gact	tatt	tagt	cgc	ttt	aat	ggt	cat	gcc	gtt	tag	tgc	tag	tat	cga	aat	cat	gaa	cgg	cca	atg	gtt	ttt	cggc	300
76	DL	L	V	А	L	M	V	М	Р	F	S	A	S	Ι	Е	Ι	М	N	G	Q	W	F	F	G	100
301	cgta	ctat	tgtg	tga	tat	att	taa	tgc	gaa	cga	cgt	tct	ttt	cag	tac	ggc	ttc	cat	ttt	gca	tct	ttg	ttg	catc	375
101	R T	М	С	D	Ι	F	Ν	А	Ν	D	V	L	F	S	Т	А	S	Ι	L	Η	L	С	С	Ι	125
376	agta	tgga	atcg	tta	cat	agc	tat	aat	gta	tcc	gtt	aaa	ata	tga	ttg	tca	tat	gac	aag	ggt	acg	agta	atta	agtg	450
126	S M	D	R	Y	Ι	А	Ι	М	Y	Ρ	L	K	Y	D	С	Η	М	Т	R	V	R	V	L	V	150
451	atgc	tcgt	tat	aac	atg	ggt	gtc	ttc	agt	gtg	tat	atc	tta	cat	tcc	agt	tca	ttc	tca	gct	cta	cac	cac	caaa	525
151	<u>M</u> L	V	Ι	Т	W	V	S	S	V	С	Ι	S	Y	Ι	Р	V	Н	S	Q	L	Y	Т	Т	Κ	175
526	gaaa	atgt	ttt	gga	gct	gta	caa	tgc	aac	gaa	cac	gtg	tcc	gtt	cgt	agt	caa	cac	tca	ata	tgc	agt	tat	gtcg	600
176	E N	V	L	E	L	Y	Ν	А	Т	Ν	Т	С	Ρ	F	V	V	Ν	Т	Q	Y	Α	V	M	S	200
601	tctt	tcgt	ttc	gtt	ttg	gat	acc	tgg	tgc	gat	aat	ggt	ttg	ttt	gta	tgt	aaa	aat	ata	ttt	gga	agc	tcg	caga	675
601 201	tctt <u>S</u> F	tcgt V	tttc S	gtt F	ttg W	gat I	acc P	tgg G	tgc A	gat I	aat M	ggt V	ttg C	ttt L	gta Y	tgt V	aaa K	aat I	ata Y	ttt L	gga E	agc A	tcg R	caga R	675 225
601 201 676	tctt <u>S F</u> caag	tcgt V agca	ttc S acgc	gtt F tat	ttg: W tca	gat I atc	acc P gac	tgg G agt	tgc <u>A</u> gat	gat I gct	aat M tca	ggt V Icac	ttg C gaa	ttt L cta	gta Y tca	tgt V tag	aaa K tgg	aat I cct	ata Y att	ttt; L ggc	gga E caa	agc A cgg	tcg R aag	caga R tcga	675 225 750
601 201 676 226	tctt <u>SF</u> caag QE	tcgt V agca H	tttc S acgc A	gtt F tat I	ttg: W tca: Q	gat I atc S	acc P gac T	tgg <u>G</u> agt V	tgc <u>A</u> gat M	gat I gct L	aat M tca H	ggt V cac T	ttg C gaa N	ttt L cta Y	gta Y tca H	tgt V tag S	aaa K tgg G	aat I cct L	ata Y att L	ttt L ggc A	gga E caa N	agc A cgg G	tcg R aag S	caga R tcga R	675 225 750 250
601 201 676 226 751	tctt <u>SF</u> caag QE tata	tcgt V agca H cgga	sttc S acgc A A	gtt F tat I gtc	ttg: <u>W</u> tca: Q aga:	gat I atc S aca	acc <u>P</u> gac T aag	tgg <u>G</u> agt V aaa	tgc <u>A</u> gat M tga	gat I gct L acg	aat M tca H aaa	ggt V cac T gcg	ttg C gaa N aat	ttt L cta Y aaa	gta Y tca H gcg	tgt V tag S tga	aaa K tgg G aca	aat I cct L taa	ata Y att L agc	ttt L ggc A agc	gga E caa N taa	agc A cgg G aac	tcg R aag S gct	caga R tcga R gggg	675 225 750 250 825
601 201 676 226 751 251	tctt <u>S F</u> caag Q E tata Y T	tcgt V agca H cgga D	sttc S acgc A atac T	gtt F tat I gtc S	ttg: V tca: Q aga: E	gat I atc, S aca Q	acc P gac T aag R	tgg <u>G</u> agt V aaa N	tgc <u>A</u> gat M tga E	gat I gct L acg R	aat M tca H aaa K	ggt V cac T gcg R	ttg C gaa N aat I	ttt L cta Y aaa K	gta Y tca H gcg R	tgt V tag S tga E	aaa K tgg G aca H	aat I cct L taa K	ata Y att L agc A	ttt; L ggc A agc A	gga E caa N taa K	agc A cgg G aac T	tcg R aag S gct L	caga R tcga R gggg G	675 225 750 250 825 275
601 201 676 226 751 251 826	tctt <u>S F</u> caag Q E tata Y T atca	tcgt <u>V</u> agca H cgga D taat	tttc S acgc A atac T tggg	gtt F tat I gtc S cgc	ttg: V tca: Q aga: E att	gat I atc, S aca Q tct	acc <u>P</u> gac T aag R tgc	tgg G agt V aaa N ttg	tgc A gat M tga E ttt	gat I gct L acg R tat	aat M tca H aaa K gcc	ggt V cac T gcg R gtt	ttg C gaa N aat I ctt	ttt L cta Y aaa <u>K</u> ctc	gta Y tca H gcg <u>R</u> ctg	tgt V tag S tga <u>E</u> gta	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt	aat I cct L taa <u>K</u> aat	ata Y att L agc <u>A</u> cac	ttt; L ggc A agc <u>A</u> aaa	gga E caa N taa <u>K</u> cat	agc A cgg G aac T ctg	tcg R aag S gct L cca	caga R tcga R gggg <u>G</u> agag	675 225 750 250 825 275 900
601 201 676 226 751 251 826 276	tctt <u>S F</u> caag Q E tata Y T atca <u>I I</u>	tcgt agca H cgga D taat <u>M</u>	tttc S acgc A atac T tggg G	gtt F tat I gtc S cgc A	ttg: V tca: Q aga: E att F	gat I atc S aca Q tct L	acc P gac T aag R tgc A	tgg G agt V aaa N ttg C	tgc A gat M tga E ttt F	gat I gct L acg R tat <u>M</u>	aat M tca H aaa K gcc P	ggt V Cac T gcg R gtt F	ttg C gaa N aat I ctt F	ttt L cta Y aaa <u>K</u> ctc S	gta Y tca H gcg <u>R</u> ctg W	tgt V tag S tga <u>E</u> gta Y	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V	aat I cct L taa <u>K</u> aat	ata Y att L agc A cac T	ttt L ggc A agc <u>A</u> aaa N	gga E caa N taa <u>K</u> cat I	agc A cgg G aac T ctg C	tcg R aag S gct <u>L</u> cca Q	caga R tcga R ggggg <u>G</u> agag E	675 225 750 250 825 275 900 300
601 201 676 226 751 251 826 276 901	tctt <u>S</u> F caag Q E tata Y T atca <u>I I</u> gctt	tcgt V agca H cgga D taat <u>M</u> gccc	tttc S acgc A atac T tggg <u>G</u>	gtt F tat I gtc S cgc A	ttg: V tca: Q aga: E att F ccc	gat I atc S aca Q tct L cgt	acc P gac T aag R tgc <u>A</u> att	tgg G agt V aaa N ttg <u>C</u> gag	tgc gat M tga E ttt F ttc	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac	aat M tca H aaa K gcc P act	ggt V cac T gcg R gtt <u>F</u> att	ttg C gaa N aat I ctt F ctg	ttt L cta Y aaa <u>K</u> ctc S gat	gta Y tca gcg R ctg W cgg	tgt V tag S tga <u>E</u> gta Y tta	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt	aat I cct L taa K aat I taa	ata Y L agc <u>A</u> cac T ttc	ttt ggc A agc A aaa N ctg	gga E caa N taa <u>K</u> cat I tct	agc A cgg G aac T ctg C aaa	tcg R aag S gct <u>L</u> cca Q ccc	caga R tcga R gggg <u>G</u> agag E tata	<ul> <li>675</li> <li>225</li> <li>750</li> <li>250</li> <li>825</li> <li>275</li> <li>900</li> <li>300</li> <li>975</li> </ul>
601 201 676 226 751 251 826 276 901 301	tctt <u>S</u> F caag Q E tata Y T atca <u>I</u> I gctt A C	tcgt V agca H cgga D taat <u>M</u> gccc	tttc S acgc A atac T tggg <u>G</u> tta Y	gtt F tat I gtc S cgc A tcc P	ttg: V tca: Q aga: E att F ccc P	gat atc S aca Q tct L cgt	acc P gac T aag R tgc A att L	tgg G agt V aaa N ttg C gag S	tgc gat M tga E ttt F ttc S	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac T	aat M tca H aaa K gcc P act L	ggt V Cac T gcg R gtt F att	ttg gaa N aat I ctt F ctg	ttt L cta Y aaa <u>K</u> ctc S gat	gta Y tca H gcg <u>R</u> ctg Cgg G	tgt V tag S tga <u>E</u> gta Y tta Y	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt F	aat I cct taa K aat I taa N	ata Y L agc A cac T ttc S	ttt ggc A agc A aaa N ctg C	gga E caa N taa <u>K</u> cat I tct L	agc A cgga G aac T ctgo C aaao N	tcg R aag S gct L cca Q ccc P	caga R tcga R gggg <u>G</u> agag E tata I	675 225 750 250 825 275 900 300 975 325
601 201 676 226 751 251 826 276 901 301 976	tctt <u>S</u> F caag Q E tata Y T atca <u>I I</u> gctt A C atct	tcgt agca H cgga D taat gccc P atgc	tttc S acgc A atac T tggg <u>G</u> etta Y	gtt F Itat I gtc S ccgc A tcc P 	ttg: V tca: Q aga: E att F ccc P caa	gat I atc S aca Q tct L cgt V tag	acc P gac T aag R tgc <u>A</u> att aga	tgg <u>G</u> agt V aaaa N ttg <u>C</u> gag <u>S</u> ctt	tgc A gat M tga E ttt F ttc S tag	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac <u>T</u> aaaa	aat M tca H aaaa K gcc <u>P</u> act L tgc	ggt V cac gcg R gcg R sgtt <u>F</u> att	ttg C gaa N aat I ctt F ctg W cat	ttt L cta Y aaaa <u>K</u> ctc <u>S</u> gat I caa	gta Y tca H gcg R ctg Cgg Cgg G act	tgt V tag S tga <u>E</u> gta Y tta Y gct	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt <u>F</u> caa	aat I cct: L taa Aat I taa N act	ata Y att agc A cac T ttc S tga	ttt ggc A agc A aaaa N ctg C aaaa	gga E caa N taa <u>K</u> cat I tct L atg	agc A cgga G aaac T ctga C aaaa N ccg	tcg R aag S gct <u>L</u> cca Q ccc P ttg	caga R tcga R gggg G agag E tata I tttc	675 225 750 250 825 275 900 300 975 325 1050
601 201 676 226 751 251 826 276 901 301 976 326	tctt <u>S</u> F caag Q E tata Y T atca <u>I I</u> gctt A C atct <u>I Y</u>	tcgt agca H cgga D taat <u>M</u> gccc P atgc	S acgc A atac T tggg <u>G</u> Stta Y Stta Y	gtt F tat I gtc S cgc A tcc P ctt F	ttg; <u>W</u> tcaa Q aga: <u>E</u> att: <u>F</u> ccaa <u>N</u>	gat I atc. S aca Q tct L cgt V tag R	acc P gac T aagg R tgc <u>A</u> att D	tgg <u>G</u> agt V aaaa N ttg <u>C</u> gag <u>S</u> ctt	tgc. A gat M tga E ttt F ttc. S tag R	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac <u>T</u> aaaa N	aat M tca H aaaa K gcc <u>P</u> act L tgc A	ggt V ccac T gcg gtt <u>F</u> att F	ttg C gaa N aat I ctt <u>F</u> ctg W cat I	ttt L cta Y aaaa <u>K</u> ctc <u>S</u> gat I caa K	gta Y tca H gcg R ctg Ccgg G act L	tgt V tag S tga <u>P</u> gta Y tta <u>Y</u> gct L	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt <u>F</u> caa K	aat: I L taa: <u>K</u> aat I taa N act	ata Y att A agc A cac T ttc S tga E	ttt ggc A agc A aaaa N ctg C aaaa K	gga E caa N taa <u>K</u> cat I tct L atg C	agc A cgg G aaac T ctg C aaaa N ccg R	tcg R aag S gct; <u>L</u> ccca: Q cccc <u>P</u> ttg C	caga R tcga R gggg <u>G</u> agag E tata I tttc F	675 225 750 250 825 275 900 300 975 325 1050 350
601 201 676 226 751 251 826 276 901 301 976 326 1051	tctt <u>S</u> F caag Q E tata Y T atca <u>I I</u> gctt A C atct <u>I Y</u> cggc	tcgt <u>V</u> agca H cgga D taat <u>M</u> gcccc P atgc A aaga	S acgc A atac T tgggg <u>G</u> Y tta Y	gtt F tat I gtc S ccgc A tcc P ccga	ttg: <u>W</u> tcaa Q agaa E att <u>F</u> cccc <u>P</u> caa <u>N</u> cgt	gat I atc, S aca Q tct L cgt tag R cgt	acc P gac T aag R tgc <u>A</u> att aga D tca	tgg <u>G</u> agt. V aaaa N ttg <u>G</u> gag <u>S</u> ctt F	tgc A gat M tga E ttt F ttc S tag R aaaa	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac <u>T</u> aaaa N cta	aat M tca H aaaa K gccc <u>P</u> act L tgc A	ggt V cac T gcg R sgtt <u>F</u> att F ttt F	ttg C gaa N aat I ctt F ctg W cat I gaa	ttt L cta Y aaaa K ctc S gat L caa K tat	gta Y tca H gcg <u>R</u> ctg Cgg <u>G</u> act L ctc	tgt V tag S tga <u>P</u> gta <u>Y</u> tta <u>Y</u> gct L aga	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt <u>F</u> caa K cca	aat: I Ccct: L taa: <u>K</u> aat I taa N act L caa	ata Y att L agc Cac T ttc S tga E aga	ttt, L ggc A agc A aaaa N ctg C aaaa K cat,	gga E caa N taa <u>K</u> cat I tct <u>L</u> atg C gac	agc A cgg; G aaac; <u>T</u> ctg; C aaaa N ccg R aaag	tcg R aag S gct; <u>L</u> ccaa Q cccc <u>P</u> ttg C cgt	caga R tcga R gggg G agag E tata I tttc F tcat	675 225 750 250 825 275 900 300 975 325 1050 350 1125
601 201 676 226 751 251 826 276 901 301 976 326 1051 351	tctt <u>S</u> <u>F</u> caag Q E tata Y T atca <u>I I</u> gctt A C atct <u>I Y</u> cggc R Q	tcgt V agca H cgga D taat gccc P atgc A aaga D	tttc S acgc A atac T tgggg <u>G</u> tta Y attc S	gtt F tat I gtc S cgc A tcc F cga D	ttg: <u>W</u> tcaa Q agaa E att <u>F</u> cccc <u>P</u> caa <u>N</u> cgt V	gat. <u>I</u> atc. S aca Q tct <u>L</u> cgt. V tag. R cgt V	acc <u>P</u> gac: T aagg R tgc <u>A</u> att. D tca H	tgg G agt V aaaa N ttg gag S ctt F ttt L	tgc A gat M tga E ttt F ttc S tag R aaaa N	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac <u>T</u> aaaa N cta Y	aat M tca H aaaa K gcc <u>P</u> act L tgc A tgc	ggt V Cacc T gcg R gtt <u>F</u> att F ttt T	ttg C gaa N aat <u>F</u> ctg Ctg Cat I gaa N	ttt L cta Y aaaa K ctc S gat I caa K tat I	gta Y tca H gcg <u>R</u> ctg <u>G</u> act L ctc S	tgt V tag S tga <u>E</u> gta <u>Y</u> tta gct L aga D	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt F ccaa K cca H	aat: I Cct: L taa: <u>K</u> aat I taa L caa: K	ata Y att L agc A cac T ttc S tga E aga D	ttt, L ggc A agc A aaaa N ctg C aaaa K cat, M	gga E caa N taa <u>K</u> cat I tct L atg C gac T	agc A cgg; G aaac; T ctg; C aaaa C R aag S	tcg R aag S gct; <u>L</u> ccca Q cccc P ttg C cgt V	caga R tcga R gggg G agag E tata I tttc F tcat H	675 225 750 250 825 275 900 300 975 325 1050 350 1125 375
601 201 676 226 751 251 826 276 901 301 976 326 1051 351 1126	$\begin{array}{c c} \text{tctt} \\ \underline{S} & \underline{F} \\ \text{caag} \\ \textbf{Q} & \textbf{E} \\ \text{tata} \\ \textbf{Y} & \textbf{T} \\ \text{atca} \\ \textbf{I} & \textbf{I} \\ \textbf{gctt} \\ \textbf{A} & \textbf{C} \\ \text{atct} \\ \textbf{I} & \underline{Y} \\ \text{cggc} \\ \textbf{R} & \textbf{Q} \\ \text{ctaa} \end{array}$	tcgt v agca H cgga D taat M gccc P atgc A aaga D gtgt	tttc S acgc A atac T tgggg <u>G</u> ttta Y tta Y tta S caga	gtt F tat I gtc S cgc A tcc P  cga D ccac	ttg; <u>W</u> tcaa Q agaa E cccc <u>P</u> ccaa <u>N</u> cgtr V ccg;	gat. I atc. S aca Q tct L cgt. V tag R cgt V gag	acc <u>P</u> gac T aag R tgc <u>A</u> att <u>L</u> aga D tca H gca	tgg <u>G</u> agt V aaaa N ttg <u>G</u> gag S ctt F ttt L acc	tgc gat M tga E ttt <u>F</u> ttc S tag R aaaa N agt	gat I gct L acg R tat <u>M</u> gac <u>T</u> aaaa N cta Y a <b>ta</b>	aat M tca H aaa gcc P act L tgc A tgc A a 1	ggt V cac T gcg R sgtt <u>F</u> att F tttt F tac T 158	ttg C gaa N aat <u>F</u> ctg w cat I gaa N	ttt L cta Y aaaa K ctc S gat I caa K tat I	gta Y tca H gcg Ctg Cgg G act L ctc S	tgt V tag S tga <u>P</u> gta <u>Y</u> gct L aga D	aaa K tgg G aca <u>H</u> tgt V ctt F caa K cca H	aat: I Cect: L taa: <u>K</u> aat I taa N act L caa: K	ata Y att agc Cac T ttc S tga E aga D	ttt, L ggc A agc A aaaa N ctg C A aaaa K cat, M	gga E caa N taa Cat I tct L gac T	agc A cgg: G aac; T ctg: C aaaa N ccgg R aag S	tcg R aag S gct; <u>L</u> ccaa Q cccc P ttg C cgt V	caga R tcga R gggg G agag E tata I tttc F tcat H	675 225 750 250 825 275 900 300 975 325 1050 350 1125 375

#### 图 1 OsOARβ2R 的序列及推导的氨基酸序列

#### Fig. 1 ORF and amino acid sequences of $OsOAR\beta 2R$

小写字母为核苷酸序列,大写字母为对应编码的氨基酸序列;起始密码子 atg 和终止密码 taa 用加粗表示;下划线部分表示7个跨膜结构域 Lowercase letters represent the nucleotide sequence, and capital letters below the nucleotide sequence are the corresponding encoded amino acid sequence; The initiation codon (atg) and the stop codon (taa) are shown in bold; The underlined parts represent the seven transmembrane domains (TMs)



图 2 *Os*OARβ2R 蛋白质三级结构 Fig. 2 Tertiary structure of the *Os*OARβ2R protein

(Plakobranchus ocellatus, 登录号: GFN90552.1)、美洲 牡蛎(登录号: XP\_022286284.1)等 12 种无脊椎动物 OAR 与 OsOARβ2R 进行氨基酸序列一致性的比较(图 3),结果显示, OsOARβ2R 与加州双斑蛸 OAR 的一致 性最高,达 81.50%,与福寿螺、海天牛、加州海兔的 OAR 分别达到 48.24%、47.36%和 46.48%,其中,TM3 最保守。系统进化树结果显示(图 4), OsOARβ2R 与软 体动物门的加州双斑蛸聚为一支,再与软体动物门的 其他物种聚为一大支,另一大支为节肢动物门(表 2)。

## 2.3 OsOARβ2R 在不同组织/器官、不同饥饿 时间及不同胚胎发育时期的表达水平

QRT-PCR 结果显示: 在成体 10 个组织/器官中, OsOARβ2R 均有表达,在后唾液腺中的表达水平最高,其次是脑和小肠(图 5)。饥饿对中华蛸幼体的存 活、体态和游动行为有显著的影响。随着饥饿时间 的增加,饥饿第 3 天时,中华蛸体色变浅,趋光性变 弱,部分沉入桶底。至饥饿第 5 天,出现体色发白, 绝大多数死亡的现象;在幼体饥饿实验中,随着饥 饿时间的推移, OsOARβ2R 的表达水平在饥饿 2 d 后 显著降低,紧接着在饥饿 3 d 时表达水平显著升高, 且表达水平达到最高,之后表达水平开始回落(图 6)。 OsOARβ2R 在中华蛸整个胚胎发育周期中均可检测 到,且在多细胞期表达水平最高,后显著下降,黑珠 期显著高于红珠期及初孵幼体(图 7)。

## 研究报告 REPORTS

		TM1		TM2
▲ Octopus sinensis Octopus bimaculoides Aplysia californica Aplysia kurodai Plakobranchus ocellatus Biomphalaria glabrata Pomacea canaliculata Pecten maximus Mizuhopecten yessoensis Crassostrea virginica Zerene cesonia Helicoverpa armigera Trichophusia ni Papilio machaon Clustal Consensus	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	F R S I AM VA IM V CA VF GN F L V F R S I AM VA IM V CA VF GN F L V L R GMAMAA IM V GA IF GN V L V L R GMAMAA IM V GA IF GN V L V L R GMAMAA IM V GA IF GN V L V V K G L VM T L IM V GA IF GN V L V V K T A VM VA VM L SA V L GN F L V V K T A VM VA VM L SA V L GN F L V L K A VAM T I IM GA A I V GN S L V L K C I IM LF I I L AA IF GN L L V L K C I IM LF I I L AA IF GN L L V L K C I IM LF I I L AA IF GN L L V L K C I IM LF I I L AA IF GN L L V M X Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y	I I S V YK F Y R L R V - L T N YF I V S L A F A I S S V L R F G R I R A - I T N F F I V S L A F A S S V L R F G R I R A - I T N F F I V S L A F A S S V L R F E R L R A - I T N F F I V S L A F A I S S V L R F E R L R G - I T N F F I V S L A F A I S S V L R F E R L R G - I T N F F I V S L A F A M S V K F E R L R A V I T N YF V V S L A F A M S V I K F E K L R A T V T N YF I V S L A F A I S V K K F E K L R A T V T N YF I V S L A F A I S V K K F E K L R A T V T N YF I V S L A F A I S V K K F E K L R A T V T N YF I V S L A F A I S V K K F E K L R A T V T N YF I V S L A F A I V S V M R H R K L R V - I T N YF V V S L A L A V S V M R H R K L R V - I T N YF V V S L A L A I V S V M R H R K L R V - I T N YF V V S L A L A I V S V M R H R K L R V - I T N YF V V S L A L A	DLLVALMVMPFSASIEIMNGQWFFG DLLVALMVMPFSASMEIS-GKWVFG GODLLVAILVMPFSASMEIS-GKWVFG DLLVAILVMPFNASMEIS-GKWVFG DLLVAILVMPFNASMEIS-GKWVFG GODLLVAILVMPFNASMEIS-GKWVFG DLLVAILVMPFNASMEIS-GKWVFG DLLVAILVMPFNASMEIS-GKWVFG DLLVAVVVMPFNASIEIT-DKWIFG ODLLVAVVVMPFNASIEIT-GKWIFG DLLVAVVVMPFNASQEIT-GKWIFG DLLVAVVVMFFNASQEIT-GKWIFG ODLLVAVVVMFFNASQEIT-GKWIFG ODLLVAVVVMFFNASQEIT-GKWIFG ODLLVAVVVMFFNASVEITNGEWLFG OMLVAIWAMCFNFSVEITNGEWLFG OMLVAIWAMCFNFSVEITNGEWLFG OMLVAIWAMCFNFSVEITNGEWLFG OMLVAIWAMCFNFSVEITNGEWLFG OMLVAIWAMCFNFSVEITNGEWLFG MLVAIWAMCFNFSVEI
▲ Octopus sinensis Octopus bimaculoides Aplysia californica Aplysia karodai Plakobranchus ocellatus Biomphalaria glabrata Pomacea canaliculata Pecten maximus Mizuhopecten yessoensis Crassostrea virginica Zerene cesonia Helicoverpa armigera Trichoplusia ni Papilio machaon Chustal Consensus	70 70 69 69 69 70 70 70 70 70 70 70 70 70	R TMCD I FNAND VL F S TA S I L R TMCD I FNAND VL F S TA S I L R TMCD I FNAND VL F S TA S I I R TMCD I FNAND VL F S TA S I I R TMCD I FNAND VL F S TA S I L R TMCD I FNAND VL F S TA S I L R TMCD I FNAND VL F S TA S I L R TMCD I FN SND VL F S TA S I L R TMCD I FN SND VL F S TA S I L R TMCD I FN SND VL F S TA S I L R TMCD I FN SND VL F S TA S I L Y FMCD VWN S L D VYF S SA S I L Y FMCD VWN S L D VYF S SA S I L Y FMCD VWN S L D VYF S SA S I L Y FMCD VWN S L D VYF S SA S I L	H L C C I S MD R Y I A IMY P L K YD CHMT R H L C C I S MD R Y I A IMY P L K YD S HMT R H L C C I S MD R Y I A I L H P L Q YE S KMT R H L C C I S MD R Y I A I L H P L Q YE S KMT R H L C C I S MD R Y I A I L H P L Q YE T KMT Q H L C C I S MD R Y I A I L H P L Q YE T KMT Q H L C C I S MD R Y I A I L H P L K YE I KMT R H L C C I S MD R Y I A I M P L H YE T K L T K H L C C I S VD R Y I A I M P L H YE T K L T K H L C C I S VD R Y I A I M P L H YE T K L T K H L C C I S VD R Y I A I M P L H YE T K L T K H L C C I S VD R Y I A I M Y P L Q YD S KMT K H L C C I S VD R Y I A I M Y P L Q H D Y P L I M T H L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T H L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T H L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T H L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T M L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T M L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T M L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T M L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T M L C C I S VD R Y A I V Q P L D Y P L I M T	VR VL VML VI TWVS S VC I S Y I P VH S Q       139         VR VL VML VI TWVS S VC I S Y I P VH S Q       139         P RALLMLG VTWVA S VL I S Y I P VY S Q       138         S RAL FMLG VTWVA S VL I S Y I P VY S Q       138         S RAL MLG VTWVA S VL I S Y I P VY S Q       138         S RAL CML G VTWVS S VL I S Y I P VY S Q       138         S RAL CML G VTWVS S VL I S Y I P VY S Q       138         S RAL CML G VTWVS S I L I S Y I P VY S Q       138         S RAL CML G VTWVS S I L I S Y I P VY S Q       138         R VA VML T VTWVA S I L I S Y I P VY S Q       138         R VA LM I A VTWI S S LL I S Y I P I H S Q       139         R C A C AM I L A TWI A S G L I S Y I P I H S Q       139         A R L G WL A VWC S P A L V S F L P I F MG       139         A K L G I ML A VWC S P A L V S F L P I F MG       139         G K L G I ML A VWC S P A L V S F L P I F MG       139         G K L G I ML A VWC S P A L V S F L P I F MG       139
▲ Octopus sinensis Octopus bimaculoides Aplysia californica Aplysia kurodai Plakobranchus ocellatus Biomphalaria glabrata Pomacea canaliculata Pecten maximus Mizuhopecten yessoensis Crassostrea virginica Zerene cesonia Helicoverpa armigera Trichophusia ni Papilio machaon Clustal Consensus	140 140 139 139 139 140 140 140 140 140 140	L Y I T K E N VL E L YN A T N T C P F L Y T T K E N VL E L YN S T N T C P F L Y T T R Q N VQ A L L T D P D S C P F L Y T T R Q N VQ A L L T D P D S C P F L Y T T E E N R Q Q L I R D P D S C P F L Y T T E E N ME A L I Q D P D S C P F L Y T T R Q H F Q Q L E T H P H S C V F F Y T T D E N I Q E L S VN P D S C K F F Y T T D E N Y K M L Q Q N D S C T F WY T T V E H L D F R K K H P K V C S F WY T T E D H L N F R K F P N V C S F WY T T H E H L D F R R K H P K V C S F	INIS         VVN I Q YA VM S S F V S F W I P GA I M VC L         VVN I Q YA VM S S F V S F W I P GA I M VC L         I VNK VYAG V S S S V S F W I P C T I M I F V         I VNK VYAG V S S S V S F W I P C T I M I F V         I VNK VYAG V S S S V S F W I P C T I M I F V         I VNK VYAG V S S S V S F W I P C T I M I F V         I VNK VYAG V S S S V S F W I P C T I M VF V         I VNK I YAG V S S S V S F W I P C T I M VF V         VNR I YA V V S S S V S F W I P C T I M VF V         VNR I YA V V S S S V S F W I P C T I M VF V         VNR I YA V V S S S V S F W I P C T I M VF V         VNR I YA V S S S V S F W I P C T I M VF V         VNR I YA V S S S V S F W I P C T I M VF V         VNR I YA V S S S V S F W I P C T I M I F V         VNK VA V I S S S V S F W I P G V I M L YM         VNK VYA V I S S S V S F W I P G V I M L YM         VNK VYA V I S S S V S F W I P G V I M L YM         VNK VYA V I S S S V S F W I P G V I M L YM         VNK VYA V I S S S V S F W I P G V I M L YM         VNK VYA V I S S S V S F W I P G V I M I M F M	Y VK I YLEARRQEHA IQSTVMLHTNY 209 Y VK I YLEARRQEHA IQSTVMLHTNY 209 Y IRIFLEARKQEKLIQSSTLYMHYS 208 Y IRIFLEARKQEKLIQSSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQSSALYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQSSALYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQTSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQTSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQTSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQTSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQTSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKMIQTSTLYMHYS 208 Y ARIFMEARKQEKYIRSASVCSTEL 209 Y FRIFITARRQEKHIRSTSFHSYKY 209 Y Y RIFTARRQEKMIYRSKVAALLL 209 Y Y RIYMEADRQERMLYRSKVAALLL 209 Y Y RIYVEADRQERMLYRSKVAALLL 209 Y Y RIYVEADRQERMLYRSKVAALLL 209 Y TM6
▲ Octopus sinensis Octopus bimaculoides Aplysia californica Aplysia kurodai Plakobranchus ocellatus Biomphalaria glabrata Pomacea canaliculata Peaten maximus Mizuhopecten yessoensis Crassostrea virginica Zerene cesonia Helicoverpa armigera Trichophusia ni Papilio machaon Clustal Consensus	210 210 209 209 209 210 210 210 210 210 210 210 210 210	H S G L L AN G S R Y T D T H S G L L AN G S R Y T D T AAR	S E Q R N E R K R I K RE H K A A K T L G I I S E Q R N E R K R I K RE H K A A K T L G I I D A Q R S E R R M K RE H K A A K T L G I I D A Q R S E R R M K RE H K A A K T L G I I D A H R S E R R M K RE H K A A K T L G I I E V Q R - S E R R M K RE H K A A K T L G I I E V Q R - S E R R M K RE H K A A K T L G I I K N S RD I S E R K R L K RE H K A A K T L G I I K S S R D M S E R K R L K RE H K A A K T L G I I S S R D M S E R K R L K RE H K A A K T L G I I S S Q M Q P M A S - K M K R E R K A A R T L G I I S I Q M Q P M A S S K M K R E R K A A R T L G I I S I Q M Q P M A S S K M K R E R K A A R T L G I I S I Q M Q P M A S S K M K R E R K A A R T L G I I S I Q M Q P M A S S K M K R E R K A A R T L G I I S I Q M Q P M A S S K M K R E R K A A R T L G I I	MGAFLACFMPFFSWYVITNICQEAC       271         MGAFLACFMPFFSWYVITNICQEAC       271         MGAFILCFLPFFSWYVATTMCRDSC       268         MGAFILCFLPFFSWYVATTMCRDSC       268         MGAFILCFLPFFSWYVATTMCRDSC       268         MGAFILCFLPFFSWYVATTMCRVCZ       271         MGAFILCFLPFFSWYVATTMCRVCZ       272         MGAFILCFLPFFSWYVATTMCRVCZ       277         MGAFILCFLPFFSWYLTTSLCREKC       277         MGAFILCFLPFFSWYLITSLCREKC       271         MGAFILCFLPFFSWYLITSLCREKC       277         MGAFILCFLPFFFSWYLITSLCREKC       277         MGAFILCFCFFFFFSWYLITSLCREKC       277         MGAFLACWLPFFFSWYLITSLCREKC       277         MSAFLACWLPFFLWYITTALCGDAC       278         MSAFLACWLPFFLWYITTALCGDAC       278         MSAFLACWLPFFLWYITTALCGDAC       278
▲ Octopus sinensis Octopus bimaculoides Aplysia californica Aplysia kurodai Plakobranchus ocellatus Biomphalaria glabrata Pomacea canaliculata Pecten maximus Mizuhopecten yessoensis Crassostrea virginica Zerene cesonia Helicoverpa armigera Trichoplusia ni Papilio machaon Clustal Consensus	272 272 269 272 269 278 272 271 273 278 279 279 279	P Y P P VL S S T L F WI G Y F N S C L P Y P P VL S S T L F WI G Y F N S C L P Y P P VL S S T L F WV G Y F N S C L P Y P P L L G S A L F WVG Y F N S C L P Y P P L L G S A L F WVG Y F N S C L P Y P P V VG S M L F WVG Y F N S C L Q Y P P L L G T I L F WVG Y F N S C L Q Y P P L L G T I L F WVG Y F N S C L P Y P P V VA A V F WVG Y F N S A L P S P P P V VA A V F WVG Y F N S A L P S P P P V VA A V F WVG Y F N S A L P S P P P V VA A V F WVG Y F N S A L P S P P P V VA A V F WVG Y F N S A L	N P I I YA YF N RDF R NAF I K L N P I I YA YF N RDF R NAF I K I. N P V I YA YF N R F F R T AF K K I. N P V I YA YF N R F F R T AF K K I. N P T I YA YF N R F F R T AF K K I. N P I I YA YF N R F F R T AF K K L N P I I YA YF N R F F R T AF K K I. N P I I YA YF N R F F R T AF K K I. N P T I YA YC N R F F R QAF K K I. N P I I YA YC N R F F R QAF K K I. N P I I YA YY N I. F F R AA F K K I. N P I I YA YF N RD F R AA F R K T N P I. I YA YF N RD F R AA F R K T N P I. I YA YF N RD F R AA F R K T N P I. I YA YF N RD F R AA F R K T N P I. I YA YF N RD F R AA F R K T N P I. I YA YF N RD F R AA F R K T	310 310 307 307 310 307 316 310 309 311 316 311 316 317 317 317

## 图 3 OsOARβ2R 与其他动物 OAR 氨基酸序列的比对

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequence of OsOARβ2R and other invertebrate OAR



图 4 不同物种 OAR 系统进化树 Fig. 4 Phylogenetic tree of OAR from different species



Senetic analysis of Ortic	
物种名称	基因登录号
加州海兔(Aplysia californica)	NP_001191606.1
黑斑海兔(Aplysia kurodai)	AAF28802.1
海天牛(Plakobranchus ocellatus)	GFN90552.1
光滑双脐螺(Biomphalaria glabrata)	XP_013096128.1
福寿螺(Pomacea canaliculate)	XP_025094782.1
美洲牡蛎(Crassostrea virginica)	XP_022286284.1
欧洲大扇贝(Pecten maximus)	XP_033757386.1
虾夷扇贝(Mizuhopecten yessoensis)	XP_021378407.1
中华蛸(Octopus sinensis)	XP_029646079.2
加州双斑蛸(Octopus bimaculoides)	XP_014771877.1
金凤蝶(Papilio machaon)	KPJ13529.1
棉铃虫(Helicoverpa armigera)	XP_021187626.1
粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)	XP_026729368.1





Different letters indicate a significant difference at P < 0.05, the same below



图 6 OsOARβ2R 在幼体饥饿过程中的表达情况 Fig. 6 Expression of OsOARβ2R during larval starvation



图 7 OsOARβ2R 在不同发育时期的表达情况

Fig. 7 Expression of  $OsOAR\beta 2R$  at different stages of development

## 3 讨论

本研究克隆了 OsOARβ2R, 该序列编码 385 个氨 基酸, 包含 7 个跨膜结构域。已知 G 蛋白偶联受体 7 个跨膜结构分别扮演不同的功能, TM1 参与受体的 构象活化过程及与配基的结合; TM2 影响 G 蛋白的 偶联和信号的产生; TM3 在受体的活化、磷酸化、结构的完整性、表达等方面发挥重要的作用; TM4 参与 配基结合和信号传递; TM5 对受体组装、表达和信号 产生有一定影响; TM6 参与受体的表达及其与配基 的结合; TM7 对配基的传递和信号传导产生一定的 影响<sup>[10]</sup>。中华蛸 *Os*OARβ2R 跨膜结构 TM3、TM5、 TM6、TM7 相对保守, 推测具有识别配体, 激活 G 蛋白的功能。跨膜结构域 TM4 最不保守, 其可能与 识别不同的 G 蛋白如 Gi 与 Gq 蛋白有关。多重序列 比对结果显示, *Os*OARβ2R 与加州双斑蛸的 OAR 的 一致性达 81.50%; 系统进化树结果显示, *Os*OARβ2R 与软体动物门的加州双斑蛸聚为一支, 再与软体动 物门的其他物种聚为一大支, 系统进化关系与传统 进化关系一致, 这些结果充分表明本研究所得到的 基因序列为 *OsOARβ2R*。

蔡英亚等[16]认为八腕目的唾液腺有分泌蛋白酶 和淀粉酶等各种消化酶及蛋白毒素的功能;长蛸(O. variabilis)的唾液腺能够分泌具有黏合食物、润滑消 化道的黏多糖,同时能够分泌消化酶及毒素[17]。中华 蛸雌蛸的护卵行为是卵孵化率较高的前提保证,其 护卵行为使受精卵免受病、敌害的侵害,在无雌蛸的 看护下,密集的卵群易遭受病、敌害如水霉菌、原生 动物和桡足类等的侵袭<sup>[18]</sup>。章鱼胺与 OAR 控制着昆 虫的许多生理行为, 过高的章鱼胺浓度影响着昆虫的 正常生理行为,达到驱杀的目的<sup>[11]</sup>;章鱼胺与 OAR 也参与厚壳贻贝(Mytilus coruscus)的免疫反应<sup>[14]</sup>。荧 光定量 PCR 结果显示, OsOARB2R 在 10 个组织/器官 中均有表达,在后唾液腺中的表达水平显著高于其 他组织, 据此推测中华蛸唾液蛋白毒素中章鱼胺含 量较高, 护卵雌蛸分泌唾液保护受精卵免遭病、敌害 的侵袭。

本实验中,饥饿对中华蛸幼体的存活有显著的 影响。饥饿第 3 天,中华蛸体色变浅,趋光性变弱, 部分沉入桶底,至饥饿第 5 天,出现体色发白,绝大 多数死亡的现象,因此,幼体不可逆点为饥饿后第 3 天, OsOARβ2R 的表达水平可作为幼体代谢是否正 常的一个指标。

在中华蛸幼体饥饿实验中,随着饥饿时间的推移, OsOARβ2R 的表达水平在饥饿2d后显著降低,紧接着在饥饿3d时表达水平显著升高,且表达水平达到最高,之后表达水平开始回落。这一趋势与课题组先前关于饥饿后中华蛸幼体中的糖酵解基因 PK、 GPI 和脂肪代谢基因 GOT2、MTTP、PLPPI<sup>[19]</sup>及 *FAXDC2*<sup>[20]</sup>的相关表达结果一致。OAR 作为典型的 G蛋白偶联受体,参与机体的众多生命代谢活动,推 测OAR参与了饥饿条件下幼体的糖酵解及脂质代谢 过程,在维持机体生命活动的过程中起重要作用。

本次试验是在有母蛸护卵的情况下进行的。不同的胚胎发育时期 OsOARβ2R 表达水平测定结果表明: OsOARβ2R 在中华蛸整个发育周期均可检测到, 且在多细胞期表达水平最高,后显著下降,黑珠期显著高于红珠期及初孵幼体。詹萍萍等<sup>[21]</sup>研究长蛸胚胎发育可溶性蛋白中发现,可溶性蛋白含量随着长蛸胚胎的发育逐渐减少。在多细胞期时,需要大量的活性蛋白以满足机体细胞分裂与分化,OsOARβ2R 在加工与修饰蛋白维持机体发挥很大的作用,因此, 表达水平最高;伴随机体发育,从红珠期开始,胚胎 已发育出的各种组织与器官<sup>[22-24]</sup>,能满足基本的物质循环与能量流动,表达水平显著下降。在黑珠期胚 胎发生一次反转<sup>[22]</sup>,需要消耗较多的能量,黑珠期 OsOARβ2R 表达水平显著高于红珠期及初孵幼体。

生产中作者发现,在中华蛸受精卵孵化过程中, 在红珠期前,没有雌蛸护卵的受精卵会腐烂死亡, 有护卵的则能正常发育,而从红珠期后母蛸有没有 护卵,受精卵均能正常孵出。推测在红珠期前,需由 母蛸唾液中的章鱼胺来维持幼体 OsOARβ2R 表达在 正常的水平范围内,母蛸唾液中的章鱼胺使受精卵 不但可以抵御病原生物的侵袭,同时也维持胚胎的 正常代谢及发育,从红珠期开始,胚胎发育已形成 幼体雏形,胚胎自身可产生的足够量的章鱼胺以抵 御病原生物的侵袭,有无雌蛸护卵均可正常发育。不 同发育时期 OsOARβ2R 表达水平的变化,将为今后 无雌蛸护卵的受精卵孵化技术的研究提供一个基础 数据。

#### 参考文献:

- AMOR M D, NORMAN M D, CAMERON H E, et al. Allopatric speciation within a cryptic species complex of Australasian octopuses[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98982.
- [2] IAN G. Octopus sinensis d'Orbigny, 1841 (Cephalopoda: Octopodidae): Valid species name for the commercially valuable East Asian common octopus[J]. Species Diversity, 2016, 21(1): 31-42.
- [3] IGLESIAS J, SÁNCHEZ F J, BERSANO J, et al. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends[J]. Aquaculture, 2007, 266(1-4): 1-15.

- [4] 马之明,徐实怀,贾晓平. 蛸类渔业概况及增养殖研究现状与展望[J]. 南方水产, 2008, 4(5): 5.
  MA Zhiming, XU Shihuai, JIA Xiaoping. Research status and exploitation prospectin production basicbiologe and aquaculture of Octopus[J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(5): 5.
- [5] 任静,何卫彤,王丽华,等.中华蛸寄生丛集球虫(顶复亚门:丛集球虫科)新种的形态学与分子生物学研究[J].海洋与湖沼,2021,52(5):1323-1331.
  REN Jing, HE Weitong, WANG Lihua, et al. Morphological and molecular characterization of a new species of aggregate (apicomplexa: aggregatidae) infecting *Octopus sinensis*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2021, 52(5): 1323-1331.
- [6] LI F H, LIU Y Y, QIN B, et al. Sequence and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome for the East Asian common octopus, *Octopus sinensis* (Octopodidae: Octopoda)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2021, 6(8): 2120-2122.
- [7] SHIGEKI D, SHODAI S, ARATA T, et al. Changes in behavioural patterns from swimming to clinging, shelter utilization and prey preference of East Asian common octopus *Octopus sinensis* during the settlement process under laboratory conditions[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2021, 539: 151537.
- [8] 叶守建,周劲望,杨铭霞,等.全球头足类资源开发现 状分析及发展建议[J]. 渔业信息与战略, 2014, 29(1): 7. YE Shoujian, ZHOU Jinwang, YANG Mingxia, et al. Exploitation of cephalopod resources in the world and development suggestion[J]. Fishery Information & Strategy, 2014, 29(1): 7.
- [9] GAO Y M, NATSUKARI Y. Karyological studies on seven cephalopods[J]. Venus, 1990, 49(2): 126-145.
- [10] 郭志云,张怀渝,梁龙.G 蛋白偶联受体的结构与功能[J]. 生命的化学,2004,24(5):412-414.
  GUO Zhiyun, ZHANG Huaiyu, LIANG Long. Structures and functions of G protein-coupled receptors[J]. Chemistry of Life, 2004, 24(5): 412-414.
- [11] 李慧敏. 桔小实蝇章鱼胺受体基因 BdOctβ1R 和 BdOctβ2R 的生理功能及药理学特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
  LI Huimin. Studies on the physiological function and pharmacological properties of BdOct β1R and BdOct β

pharmacological properties of  $BdOct \beta$  IR and  $BdOct \beta$ 2R in Bactrocera dorsalis(Hendel)[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.

- [12] COON S L, BONAR D B. Pharmacological evidence that alpha 1-adrenoceptors mediate metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Neuroscience, 1987, 23(3): 1169-1174.
- [13] COON S L, FITT W K, BONAR D B. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea*

gigas[J]. Marine Biology, 1990, 106(3): 379-387.

- [14] 陈艳文. 章鱼胺受体 McOAR2 在厚壳贻贝发育及免疫过程的作用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
   CHEN Yanwen. Effect of Octopamine receptor McOAR2 on metamorphosis and immunoreactions in Mytilus coruscus[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [15] PRYCE K, SAMUEL D, LAGARES E, et al. Presence of octopamine and an octopamine receptor in *Crasso-strea virginica*.[J]. Vivo, 2015, 37(1): 16.
- [16] 蔡英亚,张英,魏若飞.贝类学概论[M].上海:上海 科技出版社, 1982: 54-56.
  CAI Yingya, ZHANG Ying, WEI Ruofei. Conspectus of mollusca[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1982: 54-56.
- [17] 崔龙波,赵华.长蛸唾液腺和消化腺的组织学与组织 化学研究[J].海洋科学,2001,25(7):38-40.
  CUI Longbo, ZHAO Hua. Histological and histochemical studies on salivary glands and digestive glands of *Octopus variabilis* SASAKI[J]. Marine Sciences, 2001, 25(7): 38-40.
- [18] 林国清,黄健,胡荣炊,等. 真蛸人工繁殖初步试验[J]. 福建水产, 2008, 9(3): 16-20.
  LIN Guoqing, HUANG Jian, HU Rongchui, et al. Preliminary experimention artificial propagation of *Octopus vulgaris*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2008, 9(3): 16-20.
- [19] SUN Y L, YAO C J, ZHU Y F, et al. Metabolism response of fasting in *Octopus sinensis* paralarvae revealed by RNA-seq[J]. Aquaculture, 2022, 550: 737859.
- [20] 肖懿哲,姚成杰,朱友芳,等. 真蛸 FAXDC2 基因的 克隆及其表达分析[J]. 海洋科学, 2019, 43(8): 56-63.
  XIAO Yizhe, YAO Chengjie, ZHU Youfang, et al. Cloning and expression of FAXDC2 in Octopus vulgaris[J].
  Marine Sciences, 2019, 43(8): 56-63.
- [21] 詹萍萍, 王春琳, 张晓梅, 等. 长蛸胚胎发育过程中可溶性蛋白含量及组成变化[J]. 海洋学研究, 2010, 28(4): 65-69.
  ZHAN Pingping, WANG Chunlin, ZHANG Xiaomei, et al. Variation of the content and composition of soluble

al. Variation of the content and composition of soluble proteins during embryonic development of *Octopus variabilis*[J]. Journal of Marine Sciences, 2010, 28(4): 65-69.

[22] 郑小东,刘兆胜,赵娜,等. 真蛸(Octopus vulgaris) 胚胎发育及浮游期幼体生长研究[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(2): 317-323.
ZHENG Xiaodong, LIU Zhaosheng, ZHAO Na, et al. Embryonic development and paralarval growth of Octopus vulgaris[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(2): 317-323.

[23] 刘兆胜. 真蛸基础生物学和繁育技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.LIU Zhaosheng. Studies on fundamental biology and artificial reproductive technique of *Octopus vulga-ris*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.

[24] 蔡厚才, 庄定根, 叶鹏, 等. 真蛸亲体培育、产卵及 孵化试验[J]. 海洋渔业, 2009, 31(1): 58-65. CAI Houcai, ZHUANG Dinggen, YE Peng, et al. Experiment on stock culturing spawning and hatching of *Octopus vulgaris*[J]. Marine Fisheries, 2009, 31(1): 58-65.

# Cloning and expression analysis of OAR<sup>β</sup>2R gene from Octopus sinensis

# XIAO Yi-zhe<sup>1</sup>, CHEN Xiao-ling<sup>2</sup>, SUN Yu-long<sup>3</sup>, ZHANG Zi-ping<sup>3</sup>, WANG Yi-lei<sup>2</sup>, ZHU You-fang<sup>1</sup>

(1. Putian Municipal Institute of Fishery Science, Putian 351100, China; 2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Received: Dec. 27, 2021

Key words: Octopus sinensis;  $OAR\beta 2R$ , starvation; embryonic development

Abstract: To understand the mechanism of hatching and larval development in Octopus sinensis, we cloned its  $OsOAR\beta 2R$  gene and performed a bioinformatics analysis. Meanwhile, the expression of  $OsOAR\beta 2R$  in different tissues/organs after different periods of starvation in newly hatched larvae and at different stages of embryonic development was analyzed. The results revealed that the open reading frame of  $OsOAR\beta 2R$  is 1158 bp long, encodes 385 amino acids, and contains 7 transmembrane domains (TMs), which have commonality with G protein-coupled receptors. Among the TMs, TM3, TM5, TM6, and TM7 are relatively conserved. According to the amino acid homology comparison and phylogenetic tree analysis,  $OsOAR\beta 2R$  shares the highest identity with the OAR of O. bimaculoides. The results of quantitative polymerase chain reaction revealed that the expression of  $OsOAR\beta 2R$  was widespread in the 10 examined tissues/organs, with the highest expression level in the posterior salivary gland, followed by the brain and intestine. In the larval starvation experiment, the expression of  $OsOAR\beta 2R$  decreased significantly after 2 days of starvation; increased significantly, reaching a peak at 3 days of starvation; and then declined to normal levels.  $OsOAR\beta 2R$  could be detected throughout the embryonic development cycle, and its expression level was the highest at the multicellular stage, decreasing significantly thereafter. Os  $OAR\beta 2R$  expression was also significantly higher in the black-bead stage than in the red-bead stage and in newly hatched larvae. These results provide basic data for studying the hatching and larval development mechanisms of fertilized O. sinensis eggs and for improving the efficiency of artificial seeding with O. sinensis.

(本文编辑: 谭雪静)