

# 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)RXR 基因 克隆及其在蜕皮过程中的表达分析\*

王伟<sup>1,2</sup> 吴旭干<sup>1</sup> 楼宝<sup>3</sup> 徐蕾<sup>1</sup> 刘智俊<sup>1</sup> 成永旭<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海高校知识服务平台水产动物遗传育种中心 上海 201306; 3. 浙江省海洋水产研究所 舟山 316100)

**提要** 本研究通过转录组测序和 RACE 技术克隆了三疣梭子蟹类维甲酸 X 受体 2(PtRXR2)基因 cDNA 全长(登录号: KF914662), 并通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术研究了该基因在三疣梭子蟹不同组织及不同蜕皮阶段的表达情况。结果表明, (1) PtRXR2 基因 cDNA 全长 1718bp, 包括 5'非编码区(5'-UTR)141bp、3'-UTR 209bp 和开放阅读框 1368bp, 编码 455 个氨基酸, 预测分子量和等电点为 49.75kDa 和 6.79。(2) PtRXR2 推导氨基酸序列的 Blastp 结果显示, PtRXR2 与已知甲壳动物 RXR 的一致性为 74%—99%, 系统进化树分析表明 PtRXR2 与其它甲壳动物 RXR 聚为一支。(3) qRT-PCR 结果显示 PtRXR2 在 C 期三疣梭子蟹 Y 器官、鳃、眼柄和大颚器中表达水平较高, 肝胰腺中的表达水平最低。其它 6 个组织中的表达水平居中。(4) 不同蜕皮阶段, PtRXR2 在 Y 器官、眼柄和胸神经中均是 AB 期表达水平最高, E 期最低, 这可能与上述器官的细胞增殖主要发生在 AB 期有关; 肌肉中的 PtRXR2 表达水平在 AB 和 C 期较高, E 和 D 期最低, 与肌肉的生长和营养物质积累主要发生在这两个阶段相对应; 肝胰腺中的 PtRXR2 表达水平在 AB 期最高, C 期最低, 这暗示 PtRXR2 主要参与肝胰腺中的上皮细胞增殖和分化, 对于 C 期的营养代谢调控可能不起关键作用。

**关键词** 三疣梭子蟹; 类维甲酸 X 受体(RXR); 基因克隆; 表达分析; 蜕皮

中图分类号 Q78 doi: 10.11693/hyhz20131200218

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国一种重要的经济蟹类, 在海洋捕捞和海水养殖中都占有重要地位(谢忠明等, 2002)。尽管 2012 年我国三疣梭子蟹的养殖产量已经高达 9.96 万 t (农业部渔业局, 2013), 但是三疣梭子蟹育苗和养殖过程中的蜕皮综合征(molting death syndrome, MDS)一直是困扰该产业健康发展的重要问题(Takeuchi *et al*, 1999a, b; Wu *et al*, 2010a, b; 路允良等, 2012)。MDS 是指蟹类不能顺利完成蜕皮, 在蜕皮过程中或蜕皮不久便大量死亡的一种综合症状, 这给经济蟹类养殖生产造成了巨大的经济损失(Suprayudi *et al*, 2004), 其形成原因

非常复杂, 初步研究结果表明 MDS 可能与饵料营养及环境因子有密切关系(Dan *et al*, 2011; 路允良等, 2012)。深入了解 MDS 的形成机制, 首先必须研究三疣梭子蟹蜕皮的生理机制, 从而为三疣梭子蟹养殖过程中 MDS 的控制提供理论参考和实践依据。

甲壳动物的蜕皮过程受包括蜕皮激素、眼柄神经多肽类和甲基法尼酯等多种激素的联合调控, 它们有着不同的生理功能和调控路径(Riddiford *et al*, 2003)。蜕皮激素在蜕皮过程中扮演着十分重要的角色, 其含量在蜕皮过程中呈周期性变动, 蜕皮前含量最高, 蜕皮间期含量最低(Mykles, 2011; Techa *et al*,

\* 国家自然科学基金项目, 41276158 号; 上海高校水产学一流学科建设项目, 沪教科 2012-62 号; 上海高校创新团队(第二期)项目, 沪教科 2009-26 号; 浙江省重大科技专项计划项目, 2011C12011 号; 浙江省农业科技成果转化资金项目, 2013-171-72 号; 上海市科委工程技术中心能力提升项目, 13DZ2280500 号。王伟, 博士研究生, E-mail: qi\_xing2006@126.com

通讯作者: 成永旭, 教授, 博士生导师, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

收稿日期: 2013-12-02, 收修改稿日期: 2014-02-28

2013)。蜕皮激素对甲壳动物蜕皮过程的生理调控是主要通过与蜕皮激素受体(EcR)和类维甲酸 X 受体(RXR)的二聚体结合来实现的。蜕皮激素与此二聚体的结合体可直接与细胞核上的激素应答原件结合,调节下游基因 E74 及 E75 等的转录,从而调控甲壳动物的蜕皮过程(Riddiford *et al*, 2003; Kim *et al*, 2005; Techa *et al*, 2013)。RXR 是核受体超家族的一员,具有核受体家族的典型特征,在结构上分为 A、B、C、D、E、F 六区,组成四个功能结构域(A/B 域、C 域、D 域和 E/F 域)。目前有关甲壳动物的 RXR 研究主要集中在 RXR 的基因克隆及其表达模式分析,功能研究较少(Wu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005; Priya *et al*, 2009)。先前的研究表明,不同甲壳动物的 RXR 基因序列及结构存在较大的差异(Durica *et al*, 1996; Wu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005),且 RXR 在不同甲壳动物蜕皮过程中的表达模式也有所不同(Asazuma *et al*, 2007; 王文青等, 2010; 王瑶等, 2013)。通过研究 RXR 基因在甲壳动物不同组织及不同蜕皮阶段的表达情况,可以初步了解 RXR 的表达部位、调控位点及其与蜕皮过程的关系,从而为深入研究 RXR 的基因功能奠定基础。迄今为止有关三疣梭子蟹 RXR 基因克隆和表达模式的研究报道极少,仅见 NCBI 中登录的一条三疣梭子蟹 RXR 基因 cDNA 序列。因此,本研究在通过三疣梭子蟹转录组文库获得 RXR 部分 cDNA 序列(contig698)的基础上,进一步通过反转录 PCR(RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术,克隆得到了三疣梭子蟹 RXR2 基因 cDNA 全长,并进行相关生物信息学分析,进一步通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术研究了该基因在三疣梭子蟹不同组织及不同蜕皮阶段的表达情况,结果可以为深入研究三疣梭子蟹 RXR 的基因功能和阐明蟹类蜕皮的调控机制提供基础资料,同时丰富甲壳动物发育生物学的研究内容。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与采样

三疣梭子蟹幼蟹于 2011 年 8 月购自浙江舟山宏福水产养殖场,甲壳宽为 7—9cm,初始体重 50—80g,挑选肢体健全、活力较好、处于蜕皮间期的雌体 60 只,活体运输到研究室,在室内循环水系统中暂养一周,暂养水族箱体积为 150 L(长×宽×高 = 75cm×53cm×47cm),箱底部放置无毒 PVC 管(直径 15cm,长 15cm)作为隐蔽物,每箱放 8—10 只幼蟹,暂养期

间每日下午 19:00 按照蟹体重的 5%—10%投喂章鱼,次日上午 10:00 清理残饵和粪便。

实验用蟹暂养一周后,挑选 32 只肢体健全、活力较好、处于蜕皮间期(C 期)或蜕皮前期(D 期)的个体用于实验。由于三疣梭子蟹极易自相残杀导致成活率偏低,因此正式实验期间每只幼蟹均单独饲养于小型循环水族箱(水体体积 40L,长×宽×高 = 53cm×18cm×45cm)中。实验期间自然光照,水体盐度为 24,水温 24—26°C, pH 7.0—9.0,溶氧>5mg/L; 氨氮<0.5mg/L,亚硝酸盐<0.15mg/L。投喂和日常管理与暂养期间基本一致。根据沈洁等(2011)形态学方法将三疣梭子蟹蜕皮周期分为蜕皮期(E 期)、蜕皮后期(AB 期),蜕皮间期(C 期)和蜕皮前期(D 期),每日检查每只蟹所处的蜕皮阶段,并记录。对到达特定蜕皮时期的三疣梭子蟹进行解剖,采集该蜕皮时期三疣梭子蟹肌肉、肝胰腺、心脏、胃、肠、鳃、Y 器官、大颚器、眼柄、胸神经节、三角膜组织用于后续的实验。每个蜕皮期分别采集 5—8 只个体,所有组织样品液氮速冻后保存于-80°C 冰箱用于总 RNA 的提取。由于 D 期可以分为 D0、D1、D2、D3 和 D4 五个不同的亚期(沈洁等, 2011),考虑到 D 期每个亚期持续时间较短,本实验中 D 期样品均来自较为典型的 D2 亚期。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 全长的克隆

取冻存的三疣梭子蟹 Y 器官,采用总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, Cat.D9108A)进行总 RNA 的提取,分别采用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计法检测 RNA 的完整性和纯度。使用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Cat.634923)进行第一链 cDNA 合成。各取 1 $\mu$ g 总 RNA 为反转录模板,分别用于 5'和 3'端 RACE 扩增。进而采用 Advantage 2 PCR Kit (Clontech, Cat.639207)进行 RACE 扩增,所用引物根据三疣梭子蟹转录组文库(NCBI 登陆号: SRA051608)筛选到 RXR 基因核心序列(序列拼接号: contig698)设计而成,5'-RACE 和 3'-RACE 引物分别命名为 PtRXR5-R1、PtRXR5-R2、PtRXR3-F1 和 PtRXR3-F2,具体序列见表 1。

所得 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后采用 DNA 回收试剂盒(TaKaRa, Cat.9763)进行回收纯化,取 1 $\mu$ L 回收产物与 pMD19-T 载体(TaKaRa, Cat.D104A)连接,连接产物转化至大肠杆菌 Top 10 感受态细胞(天根, Cat.CB104-01)中,在 37°C、200r/min 条件下振荡培养 1—2h,涂布接种后进行蓝白斑筛选,随机挑选 10 个阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序。

表 1 实验用 PCR 引物及序列  
Tab.1 Primers and their sequences used in the experiment

引物名称	核苷酸序列(5'—3')	用途
Universal Primer Mix (UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
PtRXR3-F1	AGGAGCGTCAGAGGACAAAAGGCGA	3' RACE
PtRXR3-F2	ACACCGCAGCATAGGAGTGGAGGATG	3' RACE
PtRXR5-R1	GGTGGTGTATGTTCTGGGTGTCGTGT	5' RACE
PtRXR5-R2	CGTCTGTATGGTCCCACAGCCAAACT	5' RACE
Pt RXR 1F	ACACGACACCCAGAACATACAC	Real-Time PCR
Pt RXR 1R	ATGGTCCCACAGCCAAACTCA	Real-Time PCR
Pt RXR 2F	TCACACACGACACCCAGAACA	Real-Time PCR
Pt RXR 2R	GATGGATGACACGGACATAACAG	Real-Time PCR
18S F	TCCAGTTCGAGCTTCTTCTT	Real-Time PCR
18S R	AACATCTAAGGGCATCACAGACC	Real-Time PCR

所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成

### 1.3 序列分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和目的序列的拼接, 获得 PtRXR 全长 cDNA; 采用 Blast 程序分析 PtRXR 基因与其它动物 RXR 基因的同源性和一致性; 采用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测其开放阅读框 (ORF) 和编码氨基酸。使用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 PtRXR 编码氨基酸的物理参数, 分别用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测其信号肽和跨膜结构。最后采用 ClustalX (<http://www.clustal.org/>) 和 MEGA 5.0 软件 (<http://www.Megasoftware.net/>) 进行多序列比对和 NJ 系统进化树构建。

### 1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

采用总 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa, Cat.D9108A) 对各采样组织进行总 RNA 的提取, 各取 100ng 总 RNA 为反转录模板, 采用反转录试剂盒 (TaKaRa, Cat.D2639A) 进行第一链 cDNA 合成。根据三疣梭子蟹 RXR cDNA 全长序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计定量 PCR 用特异性引物 PtRXR F1/R1 及 PtRXR F2/R2 (表 1)。以三疣梭子蟹 18S-F/R (表 1) 为引物对内参基因 18S rRNA 进行扩增 (Yang *et al*, 2005)。

按照 TaKaRa 定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa, Cat.DRR 420A) 说明, 将模板 cDNA 梯度稀释后进行标准曲线扩增。当无非特异性扩增出现, 目标基因和内参基因的扩增效率在 95%—105%, 标准曲线  $R^2$  大于 0.99 时, 确定 qRT-PCR 反应体系与条件, 最终采用 PtRXR F1/R1 作为 RXR 定量 PCR 扩增引物。qRT-PCR 的

反应体系见表 2, 反应条件为: 95°C 预变性 30s; 95°C 变性 3s, 60°C 退火 30s, 共进行 40 个循环。qRT-PCR 反应体系与条件确定后, 以 C 期三疣梭子蟹肌肉、肝胰腺、心脏、胃、肠、鳃、Y 器官、大颚器、眼柄、胸神经节和三角膜 11 种组织样品的 cDNA 作为模板, 研究 PtRXR 在各组织中表达情况。根据 PtRXR 在各组织中的表达情况, 对 Y 器官、大颚器、眼柄、胸神经节、肝胰腺、鳃和肌肉中不同蜕皮阶段 PtRXR 基因的表达变化进行研究。每个样品重复 4 次, 每个蜕皮阶段重复 5 个体。

表 2 PtRXR 与 18S rRNA 基因荧光定量 PCR 反应体系中各试剂添加量 ( $\mu\text{L}$ )

Tab.2 The volume ( $\mu\text{L}$ ) of each reagent added to the PCR mixture used for qRT-PCR of PtRXR and 18S rRNA

试剂/reagent	PtRXR	18S rRNA
SYBR Premix Ex Taq <sup>TM</sup> (2 ×)	10	10
PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.4	0.3
PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.4	0.3
cDNA template	2.0	2.0
ROX Reference Dye (50 ×)	0.4	0.4
dH <sub>2</sub> O	6.8	7.0
Total volume	20	20

### 1.5 数据分析

采用 18S rRNA 作为内参基因, 计算  $C_t$ , 通过公式  $C_t = C_{t\text{样品}} - C_{t\text{对照}}$  计算  $C_t$ ,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 PtRXR-mRNA 的相对表达水平。采用 SPSS 17.0 软件对 qRT-PCR 数据进行统计分析, 所有数据采用平均值  $\pm$  标准差表示, 采用 Levene's 法进行方差齐性检验, 当不满足齐性方差时对数据进行反正弦或平方根

处理, 采用 ANOVA 对实验结果进行方差分析, 采用 Tukey's 法进行多重比较, 当  $P < 0.05$  时为差异显著。

### 2 结果

#### 2.1 PtRXR cDNA 全长克隆与序列分析

根据三疣梭子蟹转录组文库(NCBI 登陆号: SRA 051608)中 RXR 的 cDNA 片段(序列拼接号: contig698), 设计多条特异性引物进行 RACE 扩增, 直到 3' 和 5' 端分别出现 poly A 和起始密码子及非编码区, 将所得序列进行拼接和验证, 确定本研究中三疣梭子蟹 RXR 基因 cDNA 序列全长为 1718bp, 命名为 PtRXR2, GenBank 登录序列号为 KF914662。序列分析结果表明, 该基因包括 5' 非编码区(5'-UTR)141bp、3'-UTR 209bp 和开放阅读框(ORF)1368bp, 编码 455 个氨基酸。ORF 编码氨基酸的预测分子式为  $C_{2176}H_{3479}N_{605}O_{671}S_{28}$ , 分子量为 49.75kDa, 理论等点 6.79。进一步分析表明该蛋白不存在信号肽序列和跨膜结构区, 因此推测该蛋白不属于分泌蛋白。整体上, PtRXR2 和 NCBI 上已经登录的 PtRXR(AGV08303)存在较大差异, 两者不仅 5'-UTR 的长度不同, 且 PtRXR 在 ORF 中存在 168bp 和 60bp 的核苷酸缺失, 其它多处存在共 15 个核苷酸的序列差异。

PtRXR2 的氨基酸序列从 N 端到 C 端具有 4 个典型功能结构域: A/B 域(转录激活域)、C 域(DNA 结合域, DBD)、D 域(铰链域)、E/F 域(含有配体结合域, LBD)。C 域具有 P-box 和 D-box, D 域中存在 T-box (图 1)。不同甲壳动物 RXR 的氨基酸比对结果表明, 三疣梭子蟹 PtRXR2、招潮蟹(*Uca pugilator*)UpRXR、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)LvRXR 和美洲螯虾(*Homarus americanus*)HaRXR1 在氨基端(25 个氨基酸)序列相对保守, 而这些氨基酸序列在 PtRXR、HaRXR2、黑背陆地蟹(*Gecarcinus lateralis*)GIRXRa、褐虾(*Crangon crangon*)CcRXR1 和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)EsRXRb 的 A/B 域中缺失(图 2 中实线方框标出); 5 种虾蟹类 RXR 的 C 域高度保守, 均含有保守的 P-box 与 D-box, DBD 中含有两个 C2C2 型锌指结构和两个  $\alpha$  螺旋; D 域具有保守的 T-box, 但 PtRXR2、PtRXR、UpRXR、LvRXR 和 HaRXR1 等的 T-box 中存在六个氨基酸残基缺失(图 2 中实线方框标出); E/F 域的 E 区较为保守, 5 种虾蟹类在该区均含有氨基酸序列完全一致的转录激活结构域(AF-2); F 区较短且保守性最低, 但 PtRXR 和 PtRXR2 的 F 区推断氨基酸序列完全一致(图 2)。

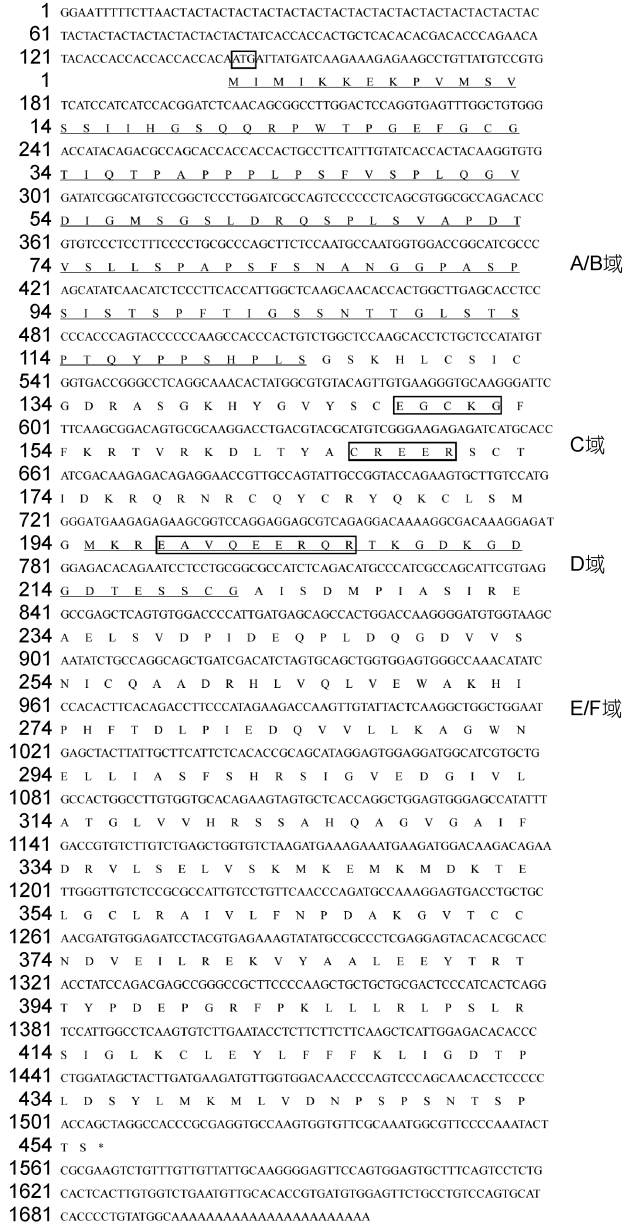


图 1 PtRXR2 基因 cDNA 全长及预测的氨基酸序列  
Fig.1 Full cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of PtRXR2

下划线区域表示 A/B 域和 D 域, 其它区域为 C 域和 E/F 域。\*为终止密码子。起始密码子(ATG)、C 域的 P-box(EGCKG)、D-box (CREER)以及 D 域的 T-box(EAVQEERQR)以方框标出

整体上, PtRXR2 和 PtRXR 一致性最高, 两者差异主要在于 PtRXR 的 A/B 域中存在两段氨基酸序列的缺失(图 2 中上划线标示), 对应于 PtRXR ORF 中缺失的核苷酸序列; PtRXR2 与蓝蟹(*Callinectes sapidus*)两种 RXR 亚型的一致性最高, 分别为 99%和 98%; 与滨蟹(*Carcinus maenas*)RXR 序列的一致性为 97%; 与黑背地蟹三种 RXR 亚型的一致性分别为 87%、86%

和 86%; PtRXR2 与虾类 RXR 的氨基酸序列比对结果显示, PtRXR2 与褐虾 RXR 三种亚型的氨基酸序列一致性较高, 在 84%—85%之间; 与凡纳滨对虾、中国

明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)RXR 氨基酸序列一致性相对较低, 分别为 76%、75%和 74%。

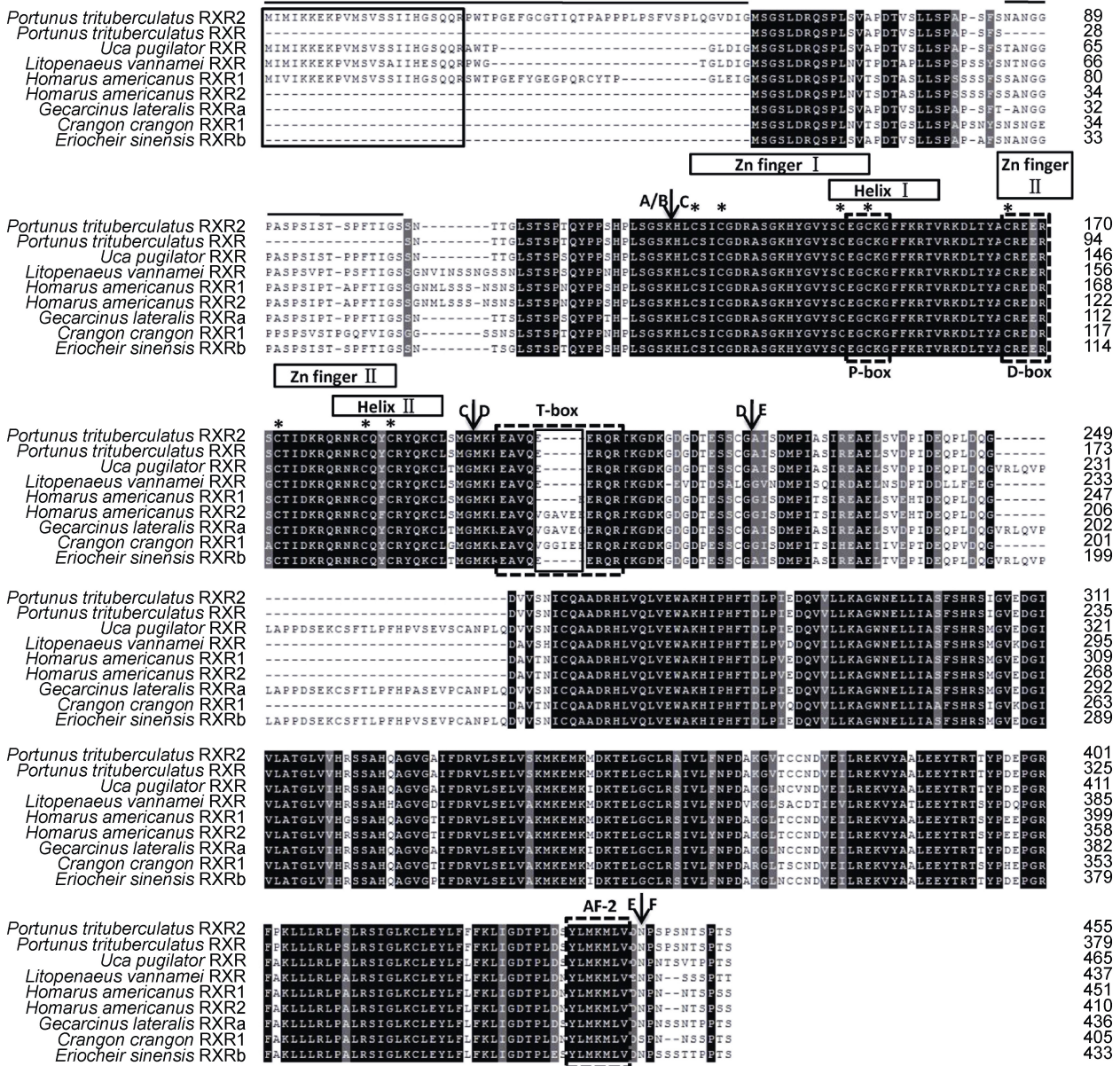


图 2 三疣梭子蟹与其它甲壳动物的 RXR 氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison of amino acid sequences of RXR between *P. trituberculatus* and other crustacean species P-box、D-box、T-box 和 AF-2 结构域以虚线方框框出; 序列间方框标示锌指结构和螺旋; \*表示锌指结构的半胱氨酸位点; 序列内方框标示插入或缺失的氨基酸; 单向箭头指示各功能域分界; 上划线指示三疣梭子蟹 RXR2 与 RXR 氨基酸序列不同的部分

基于 20 种节肢动物(甲壳动物和昆虫)的 RXR/ USP 氨基酸序列, 采用 MEGA(version 5.0)软件邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 结果显示昆虫纲中国蜜蜂(*Apis cerana*)、沙蟋(*Gryllus firmus*)和太平洋折翅蠊(*Diploptera punctata*)聚为一支, 它们与甲壳

动物亲缘关系更近, 与甲壳动物 RXR 聚为一大支, 其余聚为另外一支。甲壳动物中虾蟹类的 RXR, 在进化上更为接近, 飞马哲水蚤(*Calanus finmarchicus*)在甲壳纲为独立一支。三疣梭子蟹、普通滨蟹与滨蟹的 RXR 亲缘关系最近, 它们聚为一支(图 3)。



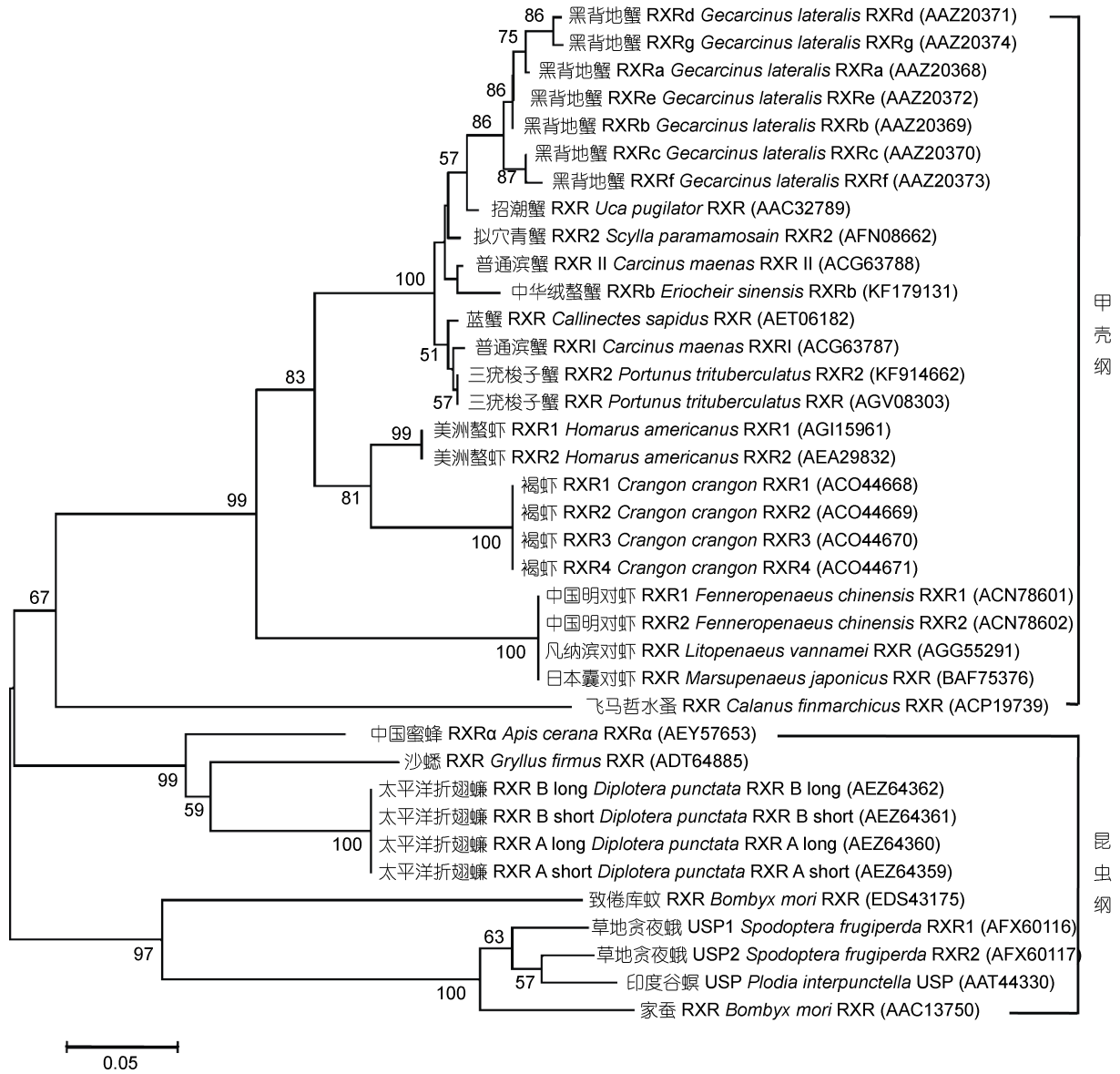


图 3 RXR 氨基酸序列的 NJ 进化树  
Fig.3 The neighbor-joining phylogenetic tree for RXRs

2.2 PtRXR2 在蜕皮间期不同组织中的表达情况

定量 PCR 结果表明, PtRXR2 在三疣梭子蟹 C 期的肌肉、肝胰腺、心脏、胃、肠、鳃、Y 器官、大颚器、眼柄、胸神经节和三角膜中均有表达, 且各组织中的 PtRXR2-mRNA 表达水平差异显著( $P < 0.05$ , 图 4)。Y 器官中的 PtRXR2-mRNA 表达水平最高, 其余依次为鳃>大颚器>眼柄>三角膜>胃>胸神经节>心脏>肠>肌肉>肝胰腺, 其中肝胰腺中的 PtRXR2-mRNA 表达水平仅为 Y 器官的 10.92%。

2.3 PtRXR2 在不同蜕皮阶段的表达情况

根据 PtRXR2 在不同组织中的表达情况, 采用 Y 器官、眼柄、胸神经节、大颚器、肌肉、肝胰腺和鳃

7 个主要组织, 研究 PtRXR2-mRNA 在三疣梭子蟹蜕皮周期中的表达变化情况。结果表明, PtRXR2-mRNA 在 7 种组织中的表达水平均在不同蜕皮阶段变化显著( $P < 0.05$ ), 但不同组织呈现不同的变化模式(图 5)。Y 器官中 PtRXR2-mRNA 的表达水平在 E 期最低, 蜕皮后 AB 期显著升高, 其相对表达量是 C 期的 5 倍以上, C 期和 D 期的表达水平显著下降, 但仍显著高于 E 期; 在整个蜕皮周期中, 眼柄、胸神经节和肝胰腺中 PtRXR2-mRNA 表达变化模式基本一致, 为 E 期表达量较低, AB 期显著升高, C 期显著降低, D 期显著升高; 与上述三个组织的 PtRXR2-mRNA 变化趋势相反, 大颚器中 PtRXR2-mRNA 在 AB 期的表达水平最低,

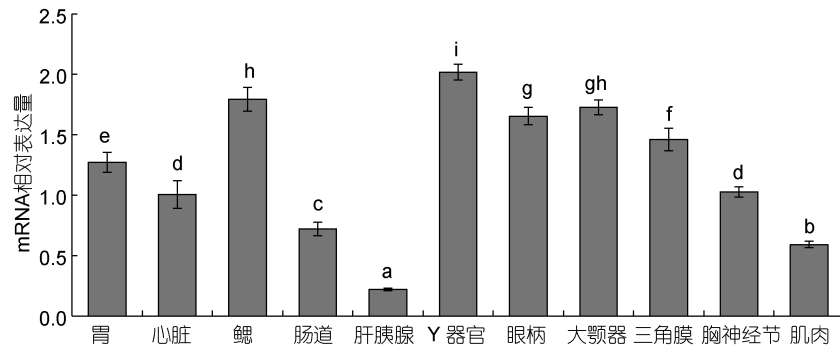


图 4 蜕皮间期三疣梭子蟹各组织中 PtRXR2-mRNA 的表达差异分析

Fig.4 Analysis of expression difference of PtRXR2-mRNA in various tissues of *P. trituberculatus* at intermolt stage  
柱形图上含有不同字母代表不同组织中的 PtRXR2-mRNA 表达量差异显著( $P < 0.05$ )

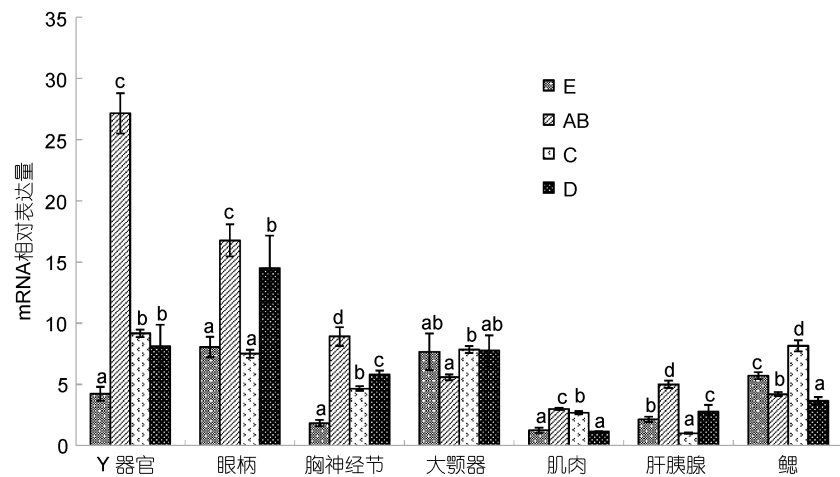


图 5 不同蜕皮阶段三疣梭子蟹七种组织中的 PtRXR2-mRNA 表达差异分析

Fig.5 Analysis of expression difference of PtRXR2-mRNA in seven tissues of *P. trituberculatus* at different molting stages  
E. 蜕皮期; AB. 蜕皮后期; C. 蜕皮间期; D. 蜕皮前期。柱形图上含有不同字母代表同一组织中不同蜕皮阶段的 PtRXR2-mRNA 表达量差异显著( $P < 0.05$ )

其余三个阶段相对表达量无显著差异; 鳃中 PtRXR2-mRNA 在 C 期表达量最高, D 期最低, E 期和 AB 期表达量处于两者之间, 且各期间的相对表达量差异显著( $P < 0.05$ ); 在整个蜕皮周期中, 肌肉中 PtRXR2-mRNA 表达水平相对较低, 各期相对表达量依次为 AB 期 > C 期 > E 期 > D 期(图 5)。

### 3 讨论

#### 3.1 PtRXR2 序列结构分析

本研究通过转录组测序和 RACE 技术, 获得 PtRXR2 基因的 cDNA 全长序列, 该基因与 NCBI 已登录的 PtRXR 基因在 5'-非编码区和 ORF 中存在多处核苷酸和预测氨基酸序列差异, 且 PtRXR 在 A/B 域存在两段氨基酸序列的缺失, 长度分别为 56 和 20 个氨基酸(图 2 中上划线标示), 对应于 PtRXR ORF 序

列中缺失的长度分别为 168bp、60bp 的两段核苷酸序列。因此, 初步推断 PtRXR2 和 PtRXR 为三疣梭子蟹 RXR 的两个不同基因, 而非选择性剪切造成的不同转录本或亚型, 将此基因暂命名为 PtRXR2。整体上, 不同甲壳动物的 RXR 较为保守, 已知虾蟹类的 RXR 与 PtRXR2 氨基酸序列一致性高达 70% 以上, 特别是 C、D 功能结构域和 E 区保守性较高。常见甲壳动物 RXR 的 C 域均含有高度保守的 P-box 和 D-box 典型结构, 其中 P-box 与 RXR 作用元件的 DNA 结合有关, D-box 与同型二聚体的形成有关, 从而保证 RXR 作用元件及二聚体的形成和调控作用的发挥(Devarakonda *et al*, 2003; Asazuma *et al*, 2007); D 域也存在 DNA 识别的 T-box(Kim *et al*, 2005; Priya *et al*, 2009), 但是部分种类的 RXR 或不同转录本存在 6 个氨基酸缺失, 有趣的是在 T-box 中存在这 6 个氨基酸的物种在 A/B

域 N 端都存在 25 个氨基酸残基缺失, 造成这种差异的原因可能与进化或 RNA 的选择性剪切有关(王文青等, 2010); E/F 域含有保守的配体结合域(LBD), 所有物种均具有一个保守的转录激活结构域(AF-2, 见图 2)(Wang *et al*, 2000)。然而, 不同虾蟹类 RXR 的 A/B 域和 E/F 域的 F 区通常存在一定的差异。A/B 域为转录激活域, 不同物种的 RXR 在该序列上差异较大, 同一物种的不同 RXR 亚型也有所不同(Hu *et al*, 2003; Kim *et al*, 2005; Techa *et al*, 2013), 这暗示不同 RXR 基因及同一 RXR 基因的不同亚型生理作用可能有所不同, 这种功能差别可能是通过不同信号通路的转录调控实现的(王文青等, 2010; Dawson *et al*, 2012)。尽管 RXR 的 F 区较短, 但不同物种间 F 区的差别较大, 其氨基酸序列存在较大变化或缺失, 同一物种的不同 RXR 基因 F 区氨基酸序列及长度基本一致(图 2), 但是同一 RXR 基因亚型可能会通过选择性剪切形成不同的转录本, 造成 F 区氨基酸长度不同甚至缺失(Kim *et al*, 2005; Techa *et al*, 2013)。迄今为止, 有关 RXR 的 F 区生物学功能研究极少, 推测认为该区域可以调节配体与 LBD 的结合力、二聚体的形成及参与调节其它调控因子间的交互作用(Wu *et al*, 2004), 如在哺乳动物中, F 区的部分氨基酸序列与转录调控有关(Dawson *et al*, 2012)。

### 3.2 PtRXR2 的生理功能及其与蜕皮的关系

绝大部分动物体内都存在 RXR/USP(昆虫中的超气孔蛋白, 类似于甲壳动物的 RXR)基因, 该基因家族在细胞动物生长发育、形态发生、细胞增殖分化、新陈代谢和细胞内环境平衡稳定等过程中起着非常重要的调控作用(Mangelsdorf *et al*, 1990; Kim *et al*, 2005; Dawson *et al*, 2012)。有关大鼠的研究结果表明, 鼠类存在三种不同的 RXR 基因, 分别命名为 RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 和 RXR $\gamma$ , 这三种 RXR 蛋白的 DBD 和 LBD 极为保守, 但其 A/B 域的氨基酸序列差异较大, 推测它们可能参与了不同的转录调控过程, 起着不同的生理作用(Mangelsdorf *et al*, 1992)。进一步的研究表明, RXR 在肝脏等代谢器官中表达水平较高, 主要参与脂类和维生素 A 的代谢调控, 这是因为 RXR $\alpha$ 的 DNA 反应元件是细胞视黄醇结合蛋白(CRBPII)和载脂蛋白(apoAI)基因启动子的一部分, 而 CRBPII 和 apoAI 主要参与维生素 A 和脂类的运输和代谢; RXR

与老鼠的神经鞘质损伤和睾丸生理功能有关, 但该基因的表达部位较多(Huang *et al*, 2011); RXR $\gamma$ 主

要在神经系统、肌肉和上皮组织中表达, 主要调控细胞的增殖分化和神经信号传导等(König *et al*, 2012)。

迄今为止, 有关甲壳动物的 RXR 基因功能研究较少。现有研究表明, 甲壳动物的 RXR 基因与蜕皮调控有关, 如中国明对虾和中华绒螯蟹 Y 器官中的 RXR-mRNA 在蜕皮后表达水平逐步升高, 在蜕皮前达到最大值(Priya *et al*, 2009; 王瑶等, 2013)。而甲壳动物和昆虫体内的 RXR/USP 具体如何参与蜕皮调控则非常复杂, 如: 对中国明对虾中 RXR 的 RNAi 实验表明, RXR 正向调控中国明对虾几丁质酶的基因表达(Priya *et al*, 2009)。甲壳动物蜕皮前通常需要高含量的几丁质酶水解旧壳中的甲壳素以便旧壳裂开, 从而有利于蜕皮的进行(沈洁等, 2011); 昆虫体内 20-羟基蜕皮酮(20-E)-EcR-USP 复合体可以调控 Br-C、E74、E75 和 E93 等 20-E 初级应答基因的表达, 这些基因触发次级应答基因表达后最终会引起昆虫变态和蜕皮过程中的细胞自噬和凋亡(Liu *et al*, 2009; 李康等, 2011)。值得注意的是, 同一甲壳动物的一种 RXR 基因可以通过选择性剪切得到不同的转录本及蛋白, 从而发挥不同的调控作用(Kim *et al*, 2005; Techa *et al*, 2013)。

本研究结果表明, PtRXR2 在三疣梭子蟹蜕皮间期的 11 个组织中都有表达, 且在内分泌器官(Y 器官和大颚器)、神经系统(眼柄和胸神经)、上皮组织发达的三角膜、肠道和胃, 以及肌肉组织中表达水平相对较高, 在胰腺腺中的表达水平最低(图 4), 这与哺乳动物的 RXR 在不同组织中的表达特性基本一致(Mangelsdorf *et al*, 1992; Huang *et al*, 2011)。此外, 根据 PtRXR2 与哺乳动物的 RXR 氨基酸序列比对结果发现, PtRXR2 也是与 RXR 一致性最高。因此, 作者推测 PtRXR2 可能类似于哺乳动物 RXR 型。先前研究表明, 甲壳动物的 RXR 均在 Y 器官中表达水平较高, 这是因为 Y 器官主要分泌蜕皮酮调节蜕皮过程。就不同甲壳动物种类而言, RXR 在其它器官中的表达水平不尽一致。RXR 在中华绒螯蟹、日本囊对虾和中国明对虾的胰腺腺中表达水平仅次于 Y 器官(Asazuma *et al*, 2007; Priya *et al*, 2009; 王瑶等, 2013), 但本研究 PtRXR2 在胰腺腺中的表达水平最低。造成这种差异的原因可能是由于不同虾蟹中发现的 RXR 基因种类或转录本有所不同, 它们具有不同的生理功能, 因而在不同组织中的表达模式存在差异。如 RXR 主要调节哺乳动物的脂类和维生素 A 代谢, 因此在胰腺腺等代谢器官中表达水平较高, 而 RXR $\gamma$



则调控细胞的增殖分化和神经信号传导等, 故在神经系统、肌肉和上皮组织中表达较高(Mangelsdorf *et al*, 1992; König *et al*, 2012)。本研究结果表明, PtRXR2 在三疣梭子蟹的 Y 器官、眼柄和胸神经节中均是 AB 期表达水平最高, 但是蜕皮过程中的 E 期最低, 这可能是由于上述内分泌器官和神经组织的细胞增殖主要发生在 AB 期(Chang *et al*, 2011), 而 PtRXR2 可能在此阶段参与这些细胞增殖过程; 肌肉中的 PtRXR2 表达水平在 AB 期和 C 期较高, E 期和 D 期最低, 与肌肉的生长和营养物质积累主要发生这两个阶段相对应(沈洁等, 2011); 肝胰腺中的 PtRXR2 在 AB 期最高, 暗示肝胰腺中的上皮细胞增殖和分化主要发生在此阶段, 肝胰腺中 C 期表达水平最低, 也暗示 PtRXR2 主要作用不是参与肝胰腺中的脂类营养代谢过程; 而蜕皮周期中, PtRXR2-mRNA 在鳃和大颚器中的变化原因不详。尽管本研究克隆了 PtRXR2 的 cDNA 全长, 根据其生物学信息学分析及其在蜕皮过程中表达分析结果, 推测该基因可能类似于哺乳动物的 RXR $\gamma$  型, 但由于缺乏相关的功能验证, 故 PtRXR2 在三疣梭子蟹蜕皮过程中的准确生理功能、调控机制及其基因分类有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- 王 瑶, 杨志刚, 郭子好等, 2013. 中华绒螯蟹 RXR 基因全长 cDNA 克隆及表达分析. 水产学报, 37(12): 1761—1769
- 王文青, 朱小玲, 2010. 日本沼虾不同亚型维甲酸类 X 受体 (RXR)cDNA 克隆及组织表达分析. 淡水渔业, 40(1): 4—10
- 农业部渔业局, 2012. 2012 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 33
- 李 康, 李 胜, 曹 阳, 2011. 蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制. 昆虫学报, 5(8): 933—937
- 沈 洁, 朱冬发, 胡泽辉等, 2011. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. 水产学报, 35(10): 1481—1487
- 谢忠明, 刘洪军, 冯 蕾, 2002. 海水经济蟹类养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 15—27
- 路允良, 王 芳, 赵卓英等, 2012. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕皮及能量利用的影响. 中国水产科学, 19(2): 237—245
- Asazuma H, Nagata S, Kono M *et al*, 2007. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Molecular Biology, 148(2): 139—150
- Chang E S, Mykles D L, 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. General and Comparative Endocrinology, 172: 323—330
- Dan S, Hamasaki K, 2011. Effects of salinity and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival, development, and morphogenesis of the larvae of laboratory-reared mud crab *Scylla serrata* (Decapoda, Portunidae). Aquaculture International, 19: 323—338
- Dawson M I, Xia Z B, 2012. The retinoid X receptors and their ligands. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1821: 21—56
- Devarakonda S, Harp J M, Kim Y *et al*, 2003. Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex. The EMBO Journal, 22: 5827—5840
- Durica D S, Hopkins P M, 1996. Expression of the genes encoding ecdysteroid and retinoid receptors in regenerating limb tissues from the fiddle crab, *Uca pugilator*. Gene, 171: 237—241
- Hu X, Cherbas L, Cherbas P, 2003. Transcription activation by the ecdysone receptor (EcR/USP): identification of activation functions. Molecular Endocrinology, 17: 716—731
- Huang J K, Jarjour A A, Oumesmar B N *et al*, 2011. Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. Nature Neuroscience, 14: 45—53
- König R, Stillfried M, Aperdanner P *et al*, 2012. Expression of retinoid X receptor beta is induced in astrocytes during corpus callosum demyelination. Journal of Chemical Neuroanatomy, 43(2): 120—132
- Kim H W, Lee S G, Mykle D L, 2005. Ecdysteroid-responsive genes, RXR and E75, in the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Differential tissue expression of multiple RXR isoforms generated at three alternative splicing sites in the hinge and ligand-binding domains. Molecular and Cellular Endocrinology, 242: 80—95
- Liu Y, Sheng Z T, Liu H *et al*, 2009. Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. Development, 136: 2015—2025
- Mangelsdorf D J, Ong E S, Dyck J A *et al*, 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. Nature, 345(6272): 224—229
- Mangelsdorf D J, Borgmeyer U, Heyman R A *et al*, 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. Genes & Development, 6(3): 329—344
- Mykles D L, 2011. Ecdysteroid metabolism in crustacean. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 127(3—5): 196—203
- Priya T A, Li F, Zhang J *et al*, 2009. Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on E75 and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 153: 121—129
- Riddiford L M, Hiruma K, Zhou X F *et al*, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manuca sexta* and *Drosophila melanogaster*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33(12): 1327—1338
- Takeuchi T, Nakamoto Y, Hamasaki K *et al*, 1999a. Requirement of n-3 highly unsaturated fatty acids for larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 65: 797—803

- Takeuchi T, Satoh N, Sekiya S *et al*, 1999b. The effect of dietary EPA and DHA on the molting rate of larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 65: 998—1004
- Techa S, Chung J S, 2013. Ecdysone and retinoid-X receptors of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning and their expression patterns in eyestalks and Y-organs during the molt cycle. *Gene*, 527(1): 139—153
- Wang S F, Ayer S, Seagraves W A *et al*, 2000. Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 3870—3879
- Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S *et al*, 2010a. Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab (*Portunus trituberculatus*) brookstock. *Aquaculture*, 301:78—64
- Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S *et al*, 2010b. Reproductive performance and offspring quality of the first and the second brood of female swimming crab (*Portunus trituberculatus*) brookstock. *Aquaculture*, 303: 94—100
- Wu X H, Hopkins P M, Palli S R *et al*, 2004. Crustacean retinoid-X receptor isoforms: distinctive DNA binding and receptor-receptor interaction with a cognate ecdysteroid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218: 21—38
- Yang F, Xu H T, Dai Z M *et al*, 2005. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry*, 142(4): 456—464

## CLONING OF RETINOID X RECEPTOR (RXR) AND ITS EXPRESSION ANALYSIS DURING MOLTING IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

WANG Wei<sup>1,2</sup>, WU Xu-Gan<sup>1</sup>, LOU Bao<sup>3</sup>, XU Lei<sup>1</sup>, LIU Zhi-Jun<sup>1</sup>, CHENG Yong-Xu<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Aquatic Animal Breeding Center of Shanghai University Knowledge Service Platform, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316100, China)

**Abstract** We cloned full-length cDNA of a retinoid X receptor (GenBank accession number: KF914662) in *Portunus trituberculatus* by transcriptome sequencing and RACE (rapid amplification of cDNA ends). The relative gene expression levels of PtRXR2 (*P. trituberculatus* RXR2) gene in various tissues were detected by qRT-PCR (quantitative real-time PCR) during the molting cycle. The full-length of receptor PtRXR2 cDNA is 1718bp, including a 1368bp ORF (encoded 455 amino acid residues), a 141bp 5'-UTR and a 209bp 3'-UTR, whereas its calculated molecular weight and isoelectric point are 49.75 kDa and 6.79, respectively. The predicted amino acid sequence of PtRXR2 shared 74%—99% identity with those of other crustaceans as showed in homologous analysis, and PtRXR2 is clustered with crustaceans RXRs in phylogenetic tree. The receptor had highest expression in Y-organ, gill, eyestalk, and mandibular organ, lowest in hepatopancreas, and intermediate in the other six tissues. PtRXR2 was expressed high in stages AB and C of molting cycle in Y-organ, eyestalk and thoracic ganglia, and very low in stage E due probably to cell proliferation in stage AB in these tissues, whereas in the muscle, PtRXR2-mRNA expression was higher in stages AB and C than that in stages E and D, corresponding to the muscular growth and nutrition accumulation. In addition, the peak value of PtRXR2-mRNA in hepatopancreas occurred in stage AB and the lowest level existed in stage C. Therefore, PtRXR2 is involved mainly in the proliferation and differentiation of epithelial cell in hepatopancreas in stage AB, but the metabolism of nutrition in stage C.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; retinoid X receptor (RXR); gene cloning; expression analysis; molting