

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)维甲酸 X 受体基因克隆及其在温盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析*

柳 飞^{1,2} 李 健^{1,3} 李吉涛¹ 葛倩倩¹ 连春盎^{1,2} 常志强¹

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266235)

摘要 为了明确脊尾白虾维甲酸 X 受体基因在环境胁迫和蜕皮周期中的作用, 本研究通过 RACE 技术克隆了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)维甲酸 X 受体 cDNA 全长, 命名为 EcRXR 基因, 该 cDNA 序列全长为 1323 bp, 开放阅读框(ORF)为 855 bp, 编码一个 284 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 30.918 kDa, 理论等电点为 PI 为 6.788; EcRXR 基因推导氨基酸序列经 Blastp 在线比对分析显示, EcRXR 与已知甲壳动物 RXR 的同源性为 71%—90%; 系统进化树分析结果显示, 脊尾白虾 EcRXR 的氨基酸序列与日本沼虾 RXR 的氨基酸序列聚为一支。荧光定量 RT-PCR 分析表明, EcRXR 基因在各组织中均有表达, 而在眼柄相对表达量较高, 血淋巴中最低。EcRXR 基因在蜕皮周期中的表达规律表明, EcRXR 基因表达在不同蜕皮时期存在明显变化, 在眼柄、肝胰腺、胃和肠中整体呈现上升趋势, 在鳃中呈现先下降后上升的趋势, 在表皮中呈现逐渐降低的趋势。EcRXR 基因在温度、盐度胁迫过程中的表达规律分析结果发现, 温度、盐度胁迫均可显著改变 EcRXR 基因在鳃和肝胰腺中的表达模式, 温度胁迫下 EcRXR 基因在鳃中呈先上升后下降的表达趋势, 肝胰腺中整体呈先上升后下降再上升再下降的表达趋势; 盐度对鳃和肝胰腺的调控模式相同, 均呈先升高后下降的变化趋势。本研究结果表明 EcRXR 基因在脊尾白虾蜕皮发育、酶活性调控及渗透压调节中发挥重要作用, 为深入研究甲壳动物维甲酸 X 受体基因的功能提供了重要的基础信息。

关键词 脊尾白虾; RXR; 温度; 盐度; 蜕皮; 基因表达

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyh20160300065

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白虾、迎春虾等, 属于十足目(Decapoda), 长臂虾科(Palaemon), 白虾属(*Exopalaemon*), 系热温带海水底栖虾类(刘瑞玉, 1955), 在我国沿海均有分布, 尤以黄、渤海产量最高(李新正等, 2003)。近年来, 随着中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)等传统虾类养殖难度的日益加大, 以及沿海滩涂养殖的不断扩大, 脊尾白虾以

其生长速度快、繁殖能力强等特点, 已成为重要的海水经济养殖品种(张振华等, 2002; 王兴强等, 2005)。蜕皮贯穿着水生甲壳类的整个生活史, 与其生长、发育、繁殖和附肢再生等密切相关, 水生甲壳类蜕皮发生影响关键因素及其调控机制一直是人们研究的重点(李旭光等, 2014)。影响甲壳动物蜕皮发生的因素有很多, 一方面受内源因子(蜕皮激素、蜕皮激素受体与维甲类 X 受体等)调控, 另一方面受

* 国家虾产业技术体系, CARS-47 号; 山东省泰山产业领军人才工程项目, LJNY2015002 号; 国家自然科学基金项目, 31472275 号。柳飞, 硕士研究生, E-mail: lfei919@126.com

通讯作者: 李健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-22, 收修改稿日期: 2016-05-19

外源因子(温度、盐度、钙离子等)影响(Buchholz *et al.*, 2010)。

维甲酸 X 受体(retinoid X receptor, RXR)属于核受体超家族成员,是一种重要的调控因子,对甲壳动物生长、发育和繁殖具有十分重要的作用(卜文等, 1994)。RXR 基因发挥作用一般是与蜕皮激素核受体(ecdysone receptor, ECR)形成 RXR-ECR 二聚体,共同调控下游基因(E74, E75)的转录,从而对生长和蜕皮过程进行调节(Riddiford *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Techa *et al.*, 2013)。RXR 在结构上一般可分为 A—F 六个区,形成四个独立的功能区。其中以 C 区和 E 区最为保守。A/B 区为转录激活结构域,该结构域保守性较低;C 区为 DNA 结合区(DBD),含两个锌指结构;E/F 区则含配体结合区(LBD);D 区作为铰链连接 DBD 和 LBD (Durica *et al.*, 2002; Devarakonda *et al.*, 2003)。Asazuma 等(2007)在对日本囊对虾的研究中发现,蜕皮激素受体 EcR 在 Y 器官中的表达量显著高于其它组织,而 RXR 是通过与 EcR 形成二聚体共同调节甲壳动物的生长和蜕皮过程,所以说明 RXR 基因参与了蜕皮的调控过程。在罗氏沼虾的研究中发现, RXR 基因的 DNA 结合区与昆虫的 RXR 基因的 DNA 结合区相似度极高,表明了 RXR 基因较高的保守性(Asazuma *et al.*, 2007)。在王伟等(2014)在对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)RXR 基因研究中表明, RXR 基因在各组织中均有所表达,在 Y 器官和眼柄中表达量较高;在不同的蜕皮阶段各组织的表达规律有所差异,表明了 RXR 对蜕皮发生具有一定的调控作用。

近年来,随着脊尾白虾养殖规模的不断发展,脊尾白虾的养殖和繁殖技术日渐成熟。梁俊平等(2012)对脊尾白虾全人工繁育技术进行了相关研究,明确了幼体孵化、培育的适宜温度和盐度范围。栗治国(2013)对脊尾白虾繁殖生物学、胚胎发育、幼体发育及主要环境因子对其早期发育的影响进行了研究,并在此基础上开展了脊尾白虾工厂化育苗技术研究。但对于脊尾白虾蜕皮机理的研究较少,脊尾白虾 RXR 基因在其蜕皮过程中的作用尚不清楚。本文通过 RACE 技术克隆脊尾白虾 RXR 基因 cDNA 全长,利用实时定量 PCR 分析该基因在脊尾白虾各组织中的表达分布及在蜕皮周期中的表达规律,研究其在温度和盐度胁迫后鳃和肝胰腺组织中的表达模式,研究结果将为脊尾白虾 RXR 基因的功能及蜕皮调控机制提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验脊尾白虾由日照海辰水产有限公司提供,挑选活力较好,个体较一致的脊尾白虾作为试验用虾。平均体长为(3.5 ± 0.3)cm。

试验在 200L 的白色 PVC 水族箱内进行,试验水体为 100L,每天投喂基础饲料早晚各一次,沙滤自然海水,水温(16 ± 0.5)°C,每天保持充气,盐度为 29, pH 8.1。每天吸污并换水,暂养 7 天后开始正式实验。

1.2 实验方法

1.2.1 温度、盐度梯度的设置 每个梯度设 3 个重复组,每个重复放置 36 尾虾并设置对照组,连续充气增氧,实验期间不投饵。温度胁迫实验的海水盐度为 29 并以 16°C 为对照组;盐度胁迫实验水温设为 16°C 并以 29 的盐度作为对照组(实验梯度设置如表 1 所示)。

表 1 温度、盐度胁迫实验梯度设计
Tab.1 Design of the gradient in temperature and salinity

分组	温度胁迫组	盐度胁迫组
1	11°C	11
2	16°C	20
3	21°C	29
4	26°C	38

1.2.2 样品采集与处理 在温度、盐度胁迫后 0、3、6、12、24、48、72h 分别从每个实验组取 4 尾虾。血淋巴的采集: 0.5mL 预冷的抗凝剂(4°C)与 0.5mL 血淋巴,配置成抗凝血, (4°C, 3000r/min) 10min, 离心后去掉上清液,向离心管中加入 1mL Trizol(使用方法按照 Invitrogen 说明书操作)置于-80 °C 超低温冰箱保存。鳃、肝胰腺、胃、肠、肌肉、眼柄 6 种组织分别用液氮研磨,天平称取 0.05g 样品后加入含有 1mL Trizol 的 1.5mL 离心管中,震荡混匀后放入-80°C 冰箱中保存用于后续总 RNA 的提取。

1.2.3 引物设计 脊尾白虾 RXR 基因 cDNA 片段的克隆参照 GenBank 上公布的 RXR 基因序列: 中国对虾 (*F. chinensis*) (FJ194479)、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) (KC460323)、日本囊对虾 (*M. japonicas*) (AB295493)、美洲龙虾 (*Homarus americanus*) (KC409355)、招潮蟹 (*Celca pugilator*) (AF032983), 用 DNAMAN 软件进行序列对比,在保守度较高的区域设计兼并引物 RXR-F、RXR-R(如表 2 所示),实验所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司负责合成。

表 2 实验用 PCR 引物及序列
Tab.2 Primers and their sequences used in the experiment

引物类型	引物名称	引物序列(5'—3')
兼并引物	RXR-F	TATGGMGSTACAGYTGTG
兼并引物	RXR-R	TGTCTGTCDGCWGCYTGGCA
5'特异引物	RXR 5'race	GTCCTCCTCTATTCCCCCTACCTG
3'特异引物	RXR 3'race	ATAGAGGAGGAACGCCAACGAACGA
荧光定量引物	RTRXR-F	GGAACGCCAACGAACGAAAAG
荧光定量引物	RTRXR-R	CCTTTCGTTTCGTTGGCGTTC
荧光定量内参引物	18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
荧光定量内参引物	18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
通用引物	M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
通用引物	M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG

1.2.4 脊尾白虾总 RNA 提取及 cDNA 的合成 取出超低温冰箱中保存的样品, 并按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 用核酸定量仪(Thermo Scientific)检测 RNA 的产量与纯度, 使用 1.5%琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。按照 M-MLV Promega 说明书进行 RNA 反转录, 合成 cDNA 第一链。中间片段扩增反应体系如下(10 μ L): 无菌水 6.85 μ L, cDNA 0.5 μ L(肝胰腺), 10 \times PCR buffer 1 μ L, dNTP Mixture 0.8 μ L, proPOF 0.4 μ L, proPOR 0.4 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.05 μ L。PCR 反应程序参照本实验室通用程序进行(王芸等, 2011; 李洋等, 2014), 引物退火温度经过预实验优化为 50 $^{\circ}$ C。琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果以及片段大小, 使用 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)进行胶回收与纯化, 纯化产物与 pMD18-T 载体进行连接, 重组质粒转化至 Top10 感受态细胞, 经过夜培养后挑选阳性克隆, 经 PCR 验证后由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.5 EcRXR 基因的 3'RACE 和 5'RACE 扩增 按照 Clontech 公司的 SMAR-TTM-RACE cDNA 试剂盒的使用说明, 合成用于 3'、5' RACE 扩增的 cDNA; 以测序所得 EcRXR 基因中间片段为模板设计 3'和 5' RACE 所需引物(见表 1), 以鳃和肝胰腺的混合 RNA 为模板, 按照 SMARTTMRACE 试剂盒说明的反应条件与体系进行 3'和 5'RACE 扩增。扩增产物测序等按中间片段步骤进行。

1.2.6 序列分析 采用 DNASTar 对测序结果进行载体序列的去除和目的序列的拼接; 采用 Blast 程序分析 EcRXR 基因与其它物种 RXR 基因的同源性和一致性; 利用 DNAMAN 进行开放阅读框的预测和蛋白

质的翻译, 利用 SMART 和 Interpro Scan 软件进行蛋白质功能域及结构域的预测与分析, 分别用 DNAMAN 和 MEGA 进行多重序列比对和系统进化树构建。

1.2.7 蜕皮周期实验 实验用脊尾白虾暂养一周后, 挑选肢体健全、活力较好的个体用, 用解剖剪剪取尾节末端, 腹面向上置于加有清水的干净载玻片上, 用 Nikon(ECLIPSE Ti-U)倒置显微镜进行观察。根据脊尾白虾尾节刚毛基质、刚毛腔、刚毛圆锥、上皮细胞的变化将蜕皮过程进行分期(都威等, 1997; 王战芳, 2014)。分别在蜕皮前期(D 期, 各亚期持续时间较短以典型特征的 D2 亚期)、蜕皮后期(AB 期)、蜕皮间期(C 期)进行取样, 将取好的鳃、肝胰腺、胃、肠、表皮、眼柄放入液氮保存待用。

1.2.8 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 首先将 cDNA 模板梯度稀释进行标准曲线扩增, 确定最佳反应体系及反应条件。按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (TaKaRa)试剂盒说明书进行操作, 反应体系如表 3 所示。以各实验组脊尾白虾组织总 RNA 为模板, 合成 cDNA。将样品在混匀后加入 96 孔 PCR(Axygen)板中, 瞬时离心后放入荧光定量 PCR 仪(ABI 7500)中进行 PCR 扩增, 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 循环条件为 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 共 40 个循环; 熔解曲线条件为 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 15s。内参基因采用脊尾白虾 18S rRNA, 引物序列如表 2 所示(段亚飞等, 2013), 每个样品及内参基因进行三个重复, 反应完成后, 采用 Real-time PCR (SYBR Green) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法进行计算。

表3 EcRXR 与 18S rRNA 基因荧光定量 PCR 反应体系中各试剂用量(μL)

Tab.3 The volume (μL) of each reagent added to the PCR mixture used for qRT-PCR of EcRXR and 18S rRNA

试剂	EcRXR	18S rRNA
SYBR® Premix Ex Taq™ II(2×)	10	10
Rox reference Dye II(50×)	0.4	0.4
正向引物(10μmol/L)	0.8	0.8
反向引物(10μmol/L)	0.8	0.8
cDNA	1	1
ddH ₂ O	7	7
总体积	20	20

1.3 统计分析

实验数据均为 3 个重复的平均值±标准差以($\bar{x} \pm SD$)表示, 采用 SPSS17.0 进行单因子方差分析, 并进行 Duncan 氏多重比较, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 EcRXR cDNA 全长克隆及序列分析

以脊尾白虾鳃、肝胰腺组织的总 RNA 混合物为模板, 反转录得到 3'RACE 和 5'RACE 的 cDNA 第一链, RACE 克隆后得到 710bp 和 626bp 的两段 cDNA 序列。将两个序列与中间片段进行拼接, 得到脊尾白虾 RXR 基因 cDNA 全长序列, 命名为 EcRXR, GenBank 登录号: KU647675。该基因 cDNA 序列全长

为 1323bp, 其中, 开放阅读框(ORF)855bp, 5'端非编码区(5'-UTR)37bp, 3'非编码区(3'-UTR)433bp。对 EcRXR 基因分析可知, 其编码一个由 284 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 30.918kDa, 理论等电点为 pI 为 6.79。通过软件进一步分析表明, 该蛋白不存在信号肽序列和跨膜结构区, 说明该基因编码的蛋白不属于分泌蛋白。经 BLASTn、BLASTx 以及多序列比对表明, 此氨基酸序列与日本沼虾(*M. nipponense*)、褐虾(*Crangon crangon*)与美洲螯龙虾(*H. americanus*)等的氨基酸序列具有很高的同源性, 可进一步确定此序列为脊尾白虾 RXR 序列。EcRXR 基因从 N 端到 C 端具有 4 个典型的结构功能域: A/B 域(转录激活域)、C 域(DNA 结合域, DBD)、D 域(铰链域)、E/F 域(配体结合域, LBD), 与三疣梭子蟹(王伟等, 2014)和中华绒螯蟹(王瑶等, 2013)RXR 基因具有相同的结构域。C 域中存在 P-box 和 D-box, D 域中存在 T-box(如图 1 所示)。通过与氨基酸序列比对发现, 维甲酸 X 受体基因的特定结构域在几个物种中都存在, 脊尾白虾 E/F 域较其它物种有部分序列缺失(图 2)。

脊尾白虾 RXR 氨基酸序列与日本沼虾(*M. nipponense*)、褐虾(*C. crangon*)与美洲螯龙虾(*H. americanus*)一致性分别为 90%、89%、83%, 与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾(*F. chinensis*)和招潮蟹(*C. pugilator*)一致性分别为 76%、75%和



图1 EcRXR 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 EcRXR

注: 下划直线区域表示 A/B 域和 D 域, 未划线区域即为 C 域和 E/F 域。*表示终止密码子。起始密码子(ATG)、C 域的 P-box(EGCKG)、D-box(CREDR)以及 D 域的 T-box(EAVQVGGIEERQR)以方框框出

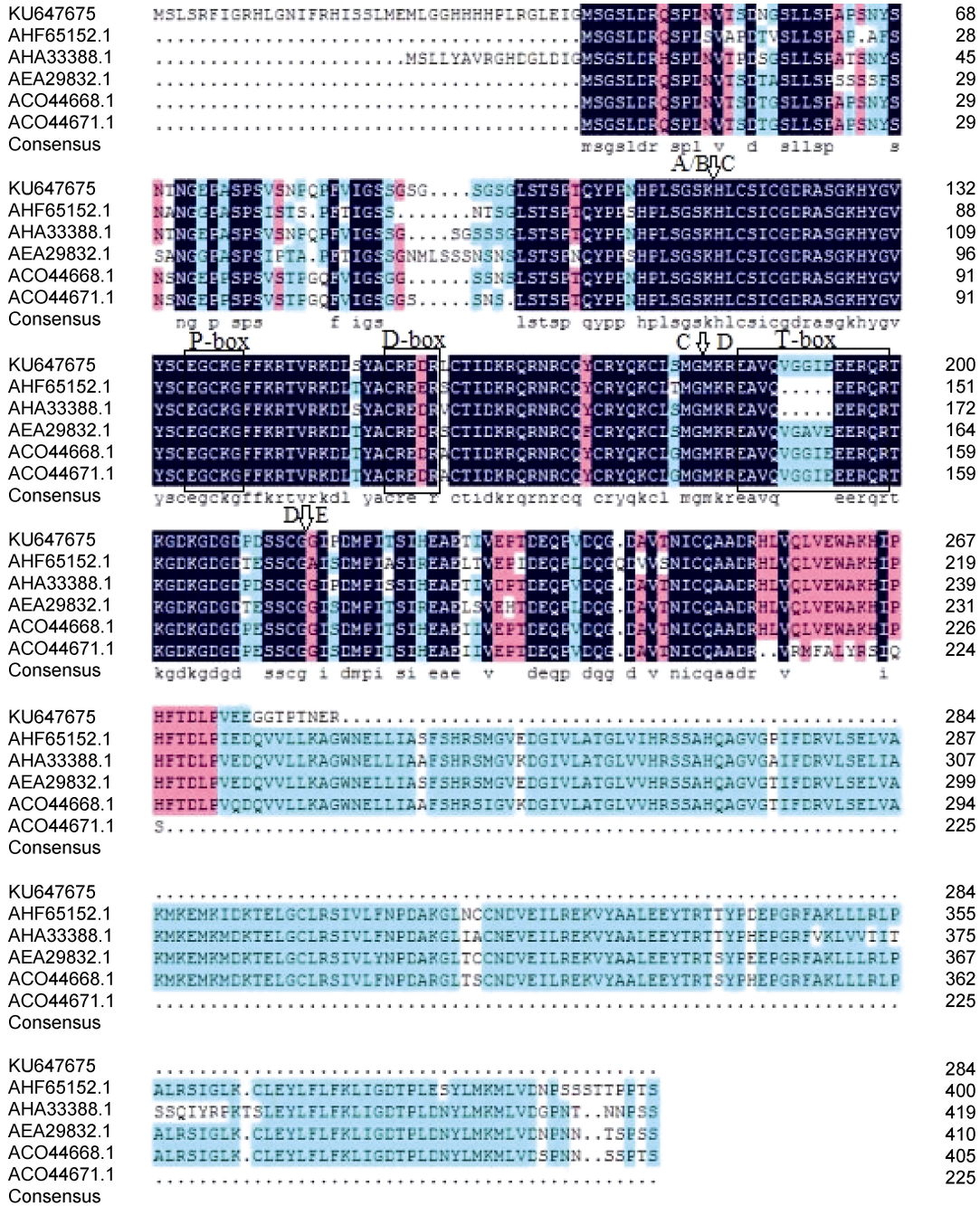


图 2 脊尾白虾与其它甲壳动物的 RXR 氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison of amino acid sequences of RXR between *E. carinicauda* and other crustacean species

注: P-box、D-box、T-box 结构域以方框框出; 箭头指示各功能域分界; 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda* RXR, KU647675); 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* RXR, AHF65152.1); 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense* RXR, AHA33388.1); 美洲螯虾(*Homarus americanus* RXR, AEA29832.1); 褐虾(*Crangon crangon* RXR1, ACO44668.1); 褐虾(*Crangon crangon* RXR4, ACO44671.1)

71%。利用 MEGA 5.0 软件进行系统进化分析表明, 与甲壳动物的 RXR 聚为一支, 其中脊尾白虾与日本沼虾单独聚为一支, 表明其亲缘性最高(图 3)。

2.2 EcRXR 基因组织表达分析

2.2.1 EcRXR 基因的组织表达分布 对脊尾白虾

EcRXR 基因在不同组织中的表达进行荧光定量 PCR 分析, 可以得出: EcRXR 基因在血淋巴、鳃、肝胰腺、胃、肠、肌肉、表皮、眼柄中均有表达。在眼柄中 EcRXR 基因的表达量最高, 鳃、胃、肠、表皮的表达量次之, 而在肝胰腺、肌肉、血淋巴表达量很低(如图 4 所示)。

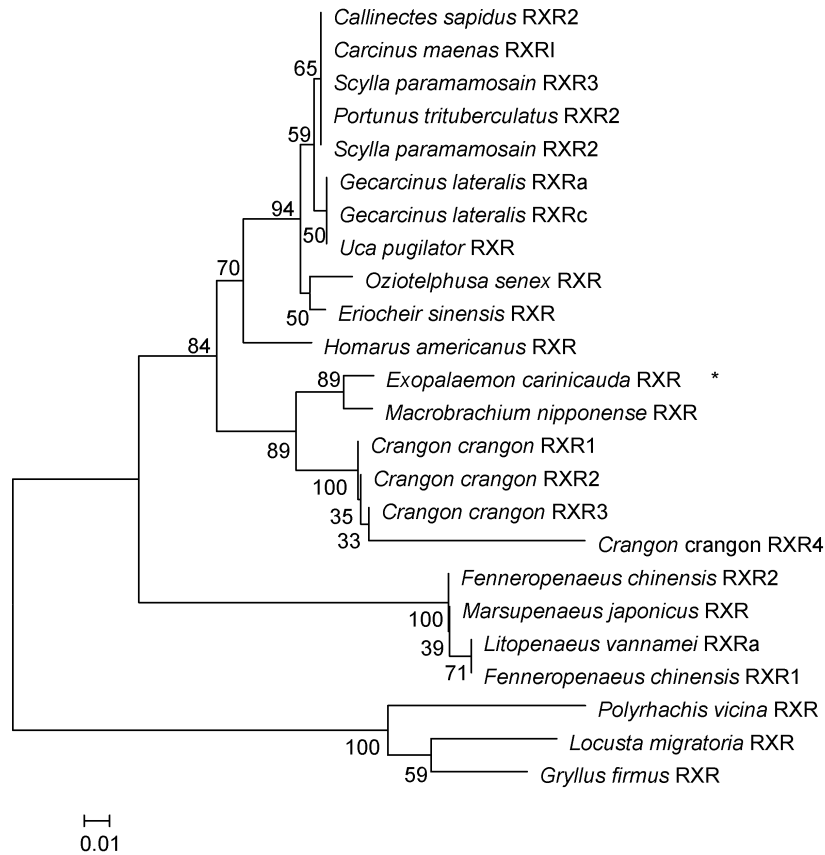


图 3 RXR 氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig.3 The neighbor-joining phylogenetic tree for RXRs

注: 蓝蟹(*Callinectes sapidus* RXR2, AGB34183.1); 普通滨蟹(*Carcinus maenas* RXR1, ACG63787.1); 褐蟹(*Crangon crangon* RXR1, ACO44668.1; RXR2, ACO44669.1); 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* RXR, AHF65152.1); 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*, RXR KU647675); 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis* RXR1, ACN78601.1; RXR2, ACN78602.1); 黑背地蟹(*Gecarcinus lateralis* RXRa, AAZ20368.1; RXRc, AAZ20370.1); 沙螻(*Gryllus firmus* RXR, ADL09403.1); 美洲螯虾(*Homarus americanus* RXR, AEA29832.1); 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* RXRa, AGS94408.1; RXR3, ACO44670.1; RXR4, ACO44671.1); 东亚飞蝗(*Locusta migratoria* RXR, AAQ55293.1); 日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus* RXR, BAF75376.1); 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense* RXR, AHA33388.1); 色拉淡水蟹(*Oziotelphusa senex* RXR, AGW82186.1); 拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina* RXR, AGF50212.1); 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus* RXR2, AHJ81363.1); 拟穴青蟹(*Scylla paramamosain* RXR2, AFN08662.2; RXR3, ALM98948.1); 招潮蟹(*Uca pugilator* RXR, AAC32789.3)

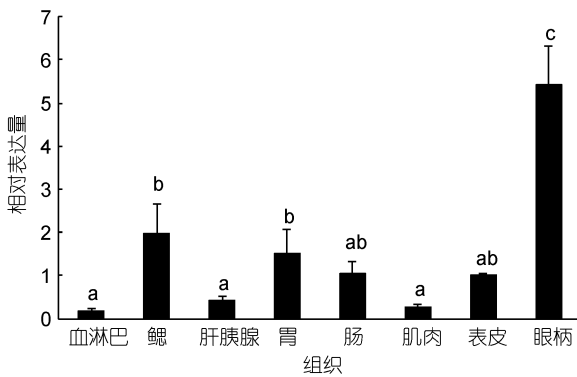


图 4 脊尾白虾 RXR 在各组织中的表达情况

Fig.4 Relative expression of *E. carinicauda* RXR gene in different tissues

注: 不同字母代表处理间差异显著($P < 0.05$), 下同

2.2.2 EcRXR 基因在不同蜕皮周期中的表达分析
根据 EcRXR 基因在各组织中的表达分布情况, 选择鳃、肝胰腺、胃、肠、表皮和眼柄 6 个组织, 研究 EcRXR 基因在不同蜕皮周期中的表达情况如图 5 所示。研究表明, 在不同的蜕皮阶段 EcRXR 基因在 6 种组织中的表达量差异显著($P < 0.05$)。在鳃中, 间期的表达量最高, 前期 EcRXR 基因的表达量出现显著下降, 后期 EcRXR 基因的表达量出现显著上升($P < 0.05$)。在肝胰腺、胃、肠、眼柄中 EcRXR 基因的表达具有相似的变化规律, 间期表达量最低, 在前期表达量显著上升($P < 0.05$), 后期表达量继续显著上升($P < 0.05$)。而在表皮中与上述三种组织中的表达情况正好相反, 间期表达量最高, 前期后期均显著下降($P < 0.05$)。

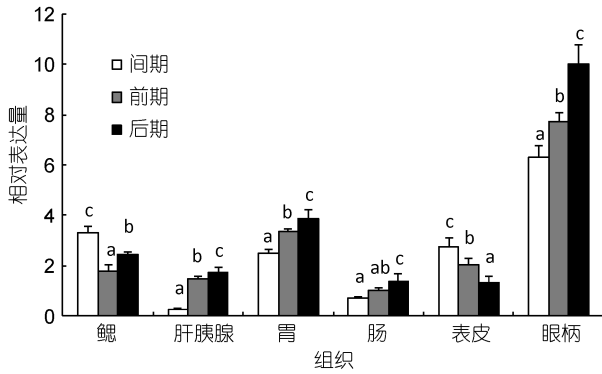


图5 RXR在不同蜕皮时期脊尾白虾6个组织中的表达情况

Fig.5 Relative expression of RXR in six tissues from *E. carinicauda* of different molting stages

2.2.3 EcRXR 基因在温度胁迫中的表达分析 脊尾白虾温度胁迫后, 鳃中 EcRXR 基因的相对表达量如图 6 所示。与对照实验组相比较, 在低温胁迫后, EcRXR 基因表达量在 3h 时轻微上调, 6h 时有所下调, 12h 时达到最大值, 相对表达量为对照组的 2.32 倍, 24h 时表达量显著降低达到最低值, 72h 逐渐恢复到对照组水平。21°C 胁迫组, 在 3h 时表达量显著降低, 6—24h 逐渐升高, 到 24h 达到最大值, 48h 时显著降低, 72h 恢复至对照组水平。26°C 高温胁迫组, 在 6h 时表达量显著降低, 12h 显著升高达到最大值, 24h 降低到最低值 48—72h 相对表达量升高后又有所下降。

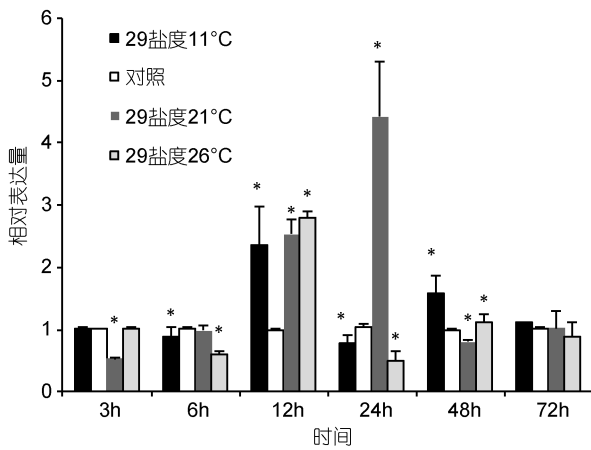


图6 温度胁迫下脊尾白虾鳃中 RXR 基因的表达情况
Fig.6 Expression of RXR gene in *E. carinicauda* gill tissue under temperature stress

注: *表示与对照组差异显著($P < 0.05$), 下同

温度胁迫后, 脊尾白虾肝胰腺中 EcRXR 基因的相对表达量如图 7 所示。与对照实验组相比较, 在低温胁迫后, EcRXR 基因表达量在 3—12h 时逐渐上升,

12h 时达到最大值, 24h 时表达量显著降低, 48h 显著上升, 72h 逐渐恢复到对照组水平。21°C 胁迫组, 在 3h 时显著升高, 6h 有所降低, 到 12—24h 时显著升高, 24h 达到最高值, 72h 恢复至对照组水平。26°C 高温胁迫组, 在 3h 时表达量升高, 6—12h 表达量较低, 24h 达到最大值, 48h 后相对表达量逐渐降低, 在 72h 时显著高于对照组。

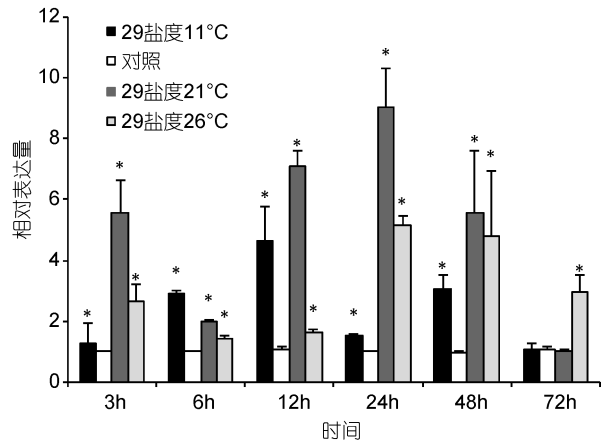


图7 温度胁迫下脊尾白虾肝胰腺中 RXR 基因的表达情况
Fig.7 Expression of RXR gene in *E. carinicauda* hepatopancreas tissue under temperature stress

2.2.4 EcRXR 基因在盐度胁迫中的表达分析 温度胁迫后, 脊尾白虾鳃中 EcRXR 基因的相对表达量如图 8 所示。与对照实验组相比较, 11 的低盐胁迫后, 3—12h 相对表达量逐渐升高, 12h 达到最大值, 24—72h 逐渐降低, 72h 时显著低于对照组。20 的中低盐度胁迫后, 3h 时表达量上升, 6—24h 逐渐降低且保持在较低范围, 48h 显著升高, 72h 有所降低并显著

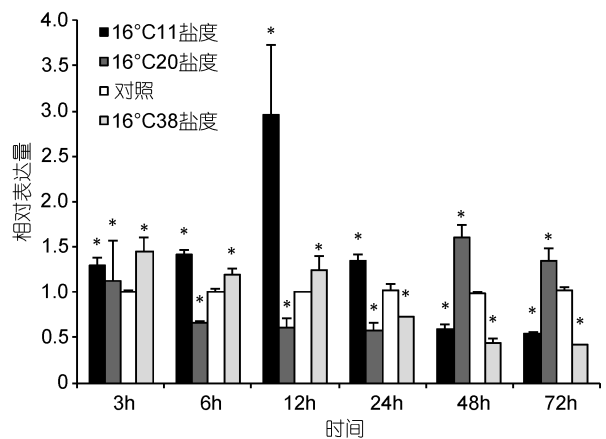


图8 盐度胁迫下脊尾白虾鳃中 RXR 基因的表达情况
Fig.8 Expression of RXR gene in *E. carinicauda* gill tissue under salinity stress

高于对照组。38的高盐胁迫后,3h表达量升高,6—12h表达量上升,24—72h逐渐降低并显著低于对照组。

温度胁迫后,脊尾白虾肝胰腺中的EcRXR基因相对表达量如图9所示。与对照实验组相比较,11的盐度胁迫后,3h相对表达量升高,后逐渐降低,48h达到最低值,72h时恢复对照组水平。20的中低盐度胁迫后,3h时表达量上升,6h达到最高值,12—24h逐渐降低,24h达到最低值,48h显著升高,到72h恢复对照组水平。38的高盐胁迫后,3—12h表达量上升,12h达到最高值,24h降低到最低水平,48h上高后趋于稳定。

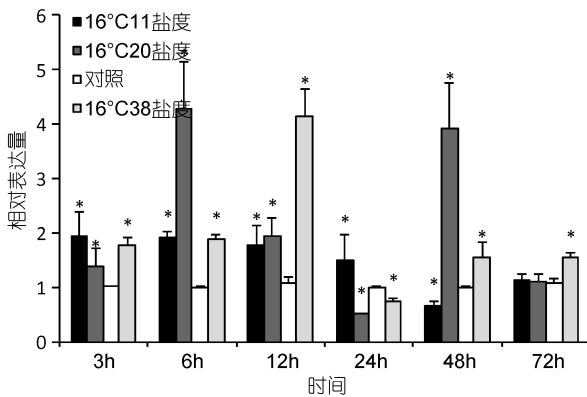


图9 盐度胁迫下脊尾白虾肝胰腺中RXR基因的表达情况
Fig.9 Expression of RXR gene in *E. carinicauda* hepatopancreas tissue under salinity stress

3 讨论

维甲酸X受体是核受体家族中重要的一员,可与多种其它核受体如维甲酸受体(RAR)、甲状腺激素受体(TR)和维生素D受体(VDR)等形成二聚体作为转录因子,参与动物个体发育、代谢、细胞分化、细胞增殖以及细胞凋亡等众多生理学过程(卜文等,1994;李维等,2013)。本研究克隆得到全长为1323bp的维甲酸X受体基因EcRXR。氨基酸序列比对结果表明EcRXR存在RXR基因的典型的结构域,可以确定为RXR基因。进化树分析表明其与甲壳动物聚为一支,日本沼虾单独聚为一支,表明本研究克隆得到的RXR基因确定为脊尾白虾RXR基因。

甲壳动物的蜕皮发生贯穿整个生命周期,与其生长、发育及繁殖息息相关,甲壳动物的蜕皮是由神经和内分泌间协调作用,以及外源因子的干扰作用等共同决定蜕皮周期的长短,影响生长发育。维甲酸X受体属于核受体超家族成员,是一种重要的内源调控因子,对甲壳动物的生长、繁殖起重要作用(Ahuja

et al, 2003; Mark *et al*, 2009)。甲壳类蜕皮激素的作用靶标是核受体家族成员蜕皮激素受体(ECR)和维甲酸X受体(RXR)组成,蜕皮激素受体与维甲酸X受体(ECR/RXR)位于甲壳类蜕皮周期过程中信号通路调控的上游端,是参与调控蜕皮过程的关键基因(Riddiford *et al*, 2003; 李旭光等, 2014)。目前为止,已对日本沼虾(*M. nipponensis*) (Asazuma *et al*, 2007)、凡纳滨对虾(*L. vannamei*) (蒋丹, 2010)、中华绒螯蟹(*E. sinensis*) (王瑶等, 2013)、蓝蟹(*C. sapidus*) (Techa *et al*, 2013)、三疣梭子蟹(*P. trituberculatus*) (王伟等, 2014)等物种的维甲酸X受体基因已经有所研究,RXR基因在不同甲壳动物组织中的表达量有所差异,在各蜕皮周期中表达也有所差异。在对日本沼虾、日本囊对虾、陆地蟹等物种的研究中发现,RXR基因在性腺中具有较高的表达量,由此推测RXR基因不仅与蜕皮相关,还与性腺发育与繁殖相关(Durica *et al*, 1996)。

实验组织荧光定量表达结果显示,EcRXR基因在血淋巴、鳃、肝胰腺、胃、肠、表皮、眼柄中均有表达,在眼柄中表达量最高,说明眼柄是该基因的主要调控器官。实验结果表明,眼柄中的EcRXR在后期表达量最高,间期表达量最低,表明眼柄中的内分泌细胞的增殖分化主要在后期(Chang *et al*, 2011);肝胰腺、胃、肠中,与间期相比,前期后期表达量逐渐上升,后期表达量最高,表明肝胰腺、胃、肠中细胞的增殖分化主要发生在蜕皮后期,肝胰腺间期表达量最低,也表明肝胰腺中的脂类营养代谢过程不是由EcRXR调控的。

温度是影响甲壳类蜕皮过程重要的环境因子。在适当的温度范围内,较高的温度能够提高体内酶的活性,加速代谢过程,促进蜕皮发生频率,促进生长发育。鳃和肝胰腺是虾蟹类的主要呼吸和代谢器官,温度能影响呼吸代谢相关的酶活性进而影响其生命活动(李旭光等, 2014)。本实验通过设置不同的温度梯度,研究其对EcRXR基因在鳃和肝胰腺的表达的规律。研究结果表明,温度胁迫后鳃中EcRXR基因表达总体上呈现先降低后升高,再降低后升高至正常水平;肝胰腺中EcRXR表达呈现先升高后降低,再升高后降低的变化趋势。鳃和肝胰腺在温度胁迫下EcRXR基因表达发生显著的调控过程,这说明EcRXR不仅参与了蜕皮过程也参与了脊尾白虾体内酶活性的调控作用,印证了维甲酸信号通路中关于酶活性的调控作用(Evans *et al*, 1999)。

盐度是影响水生甲壳类的蜕皮发生的另一个关

键影响因子,在一定范围内的盐度变化能够加速蜕皮过程的进行,盐度过低或过高,都会影响甲壳类的蜕皮周期时间与蜕皮频率(李旭光等,2014)。水生甲壳动物为了适应水中渗透压的变化,通过内分泌调控系统第二信使环状腺苷酸(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)、钙调节蛋白(CaM)等激活 Na^+/K^+ 泵和 Cl^- 离子通道,对体内渗透压进行调控(Zanotto *et al*, 2002)。鳃是水生甲壳动物呼吸的重要器官,能够对体内渗透压和离子平衡进行有效调节(韩晓琳等,2014),胰腺也参与了部分离子转运过程。本研究在不同盐度胁迫后发现, EcRXR 基因表达呈现规律性变化。鳃中 EcRXR 总体呈现先升高在降低的变化趋势;胰腺中 EcRXR 呈现先升高在降低后升高在降低到对照组水平。实验结果表明, EcRXR 基因除了对脊尾白虾蜕皮过程起调控作用外,还参与了脊尾白虾体内渗透压的调控作用。

4 结论

本实验通过设计引物,克隆了脊尾白虾 EcRXR 基因 cDNA 序列全长,分析了 EcRXR 基因在脊尾白虾组织和蜕皮周期的表达规律,并探究了在温度、盐度胁迫过程中的表达模式。研究结果表明 EcRXR 基因在脊尾白虾蜕皮、酶活性调控、渗透压调节中都发挥了重要的作用,进一步推测 EcRXR 可能是温度、盐度影响脊尾白虾蜕皮的重要调控因子之一,为深入研究 RXR 在脊尾白虾和其它甲壳动物蜕皮机制中的功能提供了重要信息。

参 考 文 献

卜文, 欧阳仁荣, 1994. 维甲类 X 受体研究现状. 国外医学输血及血液学分册, 17(1): 11—13

王伟, 吴旭干, 楼宝等, 2014. 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. 海洋与湖沼, 45(5): 1105—1114

王芸, 李健, 李吉涛等, 2011. pH 胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响. 中国水产科学, 18(3): 556—564

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

王兴强, 阎斌伦, 马甦等, 2005. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展. 齐鲁渔业, 22(8): 21—23

王战芳, 2014. 中华锯齿米虾繁殖及蜕皮特征的研究. 保定: 河北大学硕士学位论文

刘瑞玉, 1955. 中国北部的经济虾类. 北京: 科学出版社, 48—49

李洋, 刘萍, 李健等, 2014. 脊尾白虾酚氧化酶原基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 45(2): 299—306

李维, 王淑红, 王艺磊等, 2013. 软体动物维甲酸 X 受体研究进展. 动物学杂志, 48(4): 655—664

李旭光, 周刚, 谷孝鸿, 2014. 水生甲壳类蜕皮发生过程及其影响因素的研究与进展. 动物学杂志, 2014, 49(2): 294—302

李新正, 刘瑞玉, 梁象秋, 2003. 中国长臂虾总科的动物地理学特点. 生物多样性, 11(5): 393—406

张振华, 李国峰, 严少华, 2002. 沿海咸淡水滩塘脊尾白虾的养殖技术. 江苏农业科学, (1): 62—65

段亚飞, 刘萍, 李吉涛等, 2013. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)组织蛋白酶 D 基因的克隆及其表达分析. 海洋与湖沼, 44(3): 599—605

都威, 姜秀凤, 1997. 中国对虾蜕皮与附肢刚毛发生关系的研究. 中国水产科学, 4(3): 30—32

栗治国, 2013. 脊尾白虾繁殖生物学及人工种苗繁育技术的研究. 青岛: 中国科学院研究生院硕士学位论文

梁俊平, 李健, 刘萍等, 2012. 脊尾白虾生物学特性与人工繁育的研究进展. 中国农学通报, 28(17): 109—116

蒋丹, 2010. 凡纳滨对虾 EcR 和 RXR 基因的克隆及功能分析. 广州: 华南师范大学硕士学位论文

韩晓琳, 高保全, 王好锋等, 2014. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和胰腺显微结构及家系存活的影响. 渔业科学进展, 35(1): 104—110

Ahuja H S, Szanto A, Nagy L *et al*, 2003. The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 17(1): 29—45

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*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148(2): 139—150

Buchholz F, Buchholz C, 2010. Growth and moulting in northern krill (*Meganyctiphanes norvegica* Sars). In: Tarling G A ed. Advances in Marine Biology-Biology of Northern Krill-57. Amsterdam: Elsevier, 173—197

Chang E S, Mykles D L, 2011. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives. General and Comparative Endocrinology, 172(3): 323—330

Devarakonda S, Harp J M, Kim Y *et al*, 2003. Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex. The EMBO Journal, 22(21): 5827—5840

Durica D S, Hopkins P M, 1996. Expression of the genes encoding the ecdysteroid and retinoid receptors in regenerating limb tissues from the fiddler crab, *Uca pugilator*. Gene, 171(2): 237—241

Durica D S, Wu X H, Anilkumar G *et al*, 2002. Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation. Molecular and Cellular Endocrinology, 189(1—2): 59—76

Evans T R J, Kaye S B, 1999. Retinoids: present role and future potential. British Journal of Cancer, 80(1—2): 1—8

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(1—2): 80—95
- Mark M, Ghyselinck N B, Chambon P, 2009. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nuclear Receptor Signaling*, 7: e002
- 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 *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1327—1338
- 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
- Zanotto F P, Wheatly M G, 2002. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(3): 645—660

CLONING AND EXPRESSION OF RETINOID X RECEPTOR UNDER TEMPERATURE AND SALINITY STRESSES AND MOLTING CYCLES IN *EXOPALAEEMON CARINICAUDA*

LIU Fei^{1,2}, LI Jian^{1,3}, LI Ji-Tao¹, GE Qian-Qian¹, LIAN Chun-Ang^{1,2}, CHANG Zhi-Qiang¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China)

Abstract Retinoid X receptor is an important endogenous regulatory factor for the growth and reproduction of crustacean. We cloned full-length cDNA of a retinoid X receptor in *Exopalaemon carinicauda* by RACE (rapid amplification of cDNA ends). The full-length cDNA of EcRXR was 1323 bp, containing an open reading frame (ORF) in 855 bp, encoding a 284 amino-acid polypeptide; molecular weight was predicted for 30.918 kDa and isoelectric point estimated for 6.788. The predicted amino acid sequence of EcRXR shared 71%—90% identity with those of other crustaceans as showed in homologous analysis, and EcRXR is clustered with crustaceans RXRs in phylogenetic tree. Homologous analysis showed that EcRXR has the highest homology to RXR of *Macrobrachium nipponensis*. The quantitative real-time RT-PCR showed that EcRXR gene could be detected in all tested tissues of *E. carinicauda*. And the eyestalk is in highest expression level, hemolymph in lowest, and the other six tissues in-between. During the molting cycle, the expression of EcRXR gene in eyestalk, hepatopancreas, stomach and intestine, kept rising. However, in gill, fell first, then rose. Andin cuticle kept falling. After challenged by temperature and salinity, the expressions of EcRXR gene in gill and hepatopancreas of *E. carinicauda* showed different trends. The expressions of EcRXR gene in gill rose first, then fell under temperature stress; the expressions of EcRXR gene in hepatopancreas increased after the first drop rise again under salinity stress. Analysis of the moulting cycle, temperature and salinity stimulation provided further evidence that EcRXR played pivotal roles during molting in osmotic regulation. Future investigations should focus on the functions of RXR in *E. carinicauda* and other crustaceans.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; retinoid X receptor (RXR); temperature; salinity; molting; gene expression