

# 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)*Hox* 基因家族的鉴定、进化与表达分析\*

徐敏慧<sup>1</sup> 颜成瑞<sup>1</sup> 顾忠旗<sup>2</sup> 黄继<sup>2</sup> 李继姬<sup>1</sup> 叶莹莹<sup>1①</sup> 夏立萍<sup>1①</sup>

(1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江舟山 316022; 2. 嵊泗县海洋科技研究所 浙江嵊泗 202450)

**摘要** 为探究厚壳贻贝 *Hox* 基因家族的定位、进化以及在不同成体组织中的表达模式, 基于厚壳贻贝全基因组数据, 结合生物信息学方法, 鉴定分析厚壳贻贝 *Hox* 基因家族成员的理化性质、染色体分布、系统进化关系、基因结构以及表达分析。结果显示, 从厚壳贻贝全基因组数据中鉴定出 11 条 *Hox* 基因序列, 并分别命名为 *Hox1-5*、*Antp*、*Lox2*、*Lox4*、*Lox5*、*Post1*、*Post2*。对 11 条 *Hox* 序列的基本特征分析发现最长的是编码 703 个氨基酸的 *Hox2*, 最短的是编码 190 个氨基酸 *Post2*, 等电点 5.11~10.22, 且不均等分布于同一条染色体上。亚细胞定位预测结果显示, 除 *Post1* 基因在细胞质和细胞核中均有发现, 其余 10 个基因亚细胞均定位在细胞核内。系统进化分析发现, 使用厚壳贻贝中鉴定出的 101 条氨基酸序列进行建树, 聚类的结果倾向于四类, 而从已鉴定的厚壳贻贝 11 个基因结合软体动物 *Hox* 建树结果分析, *Post1* 和 *Post2* 聚为一支, *Hox4*、*Antp*、*Lox5*、*Lox2* 和 *Lox4* 聚为一个类, *Hox1*、*Hox2* 和 *Hox3* 各自聚为一类 *Hox*, 此外, *Hox5* 单独聚为一类。厚壳贻贝不同组织的 qRT-PCR 结果显示, 在鳃组织中 *Lox2*、*Lox4*、*Lox5* 的表达量远超其他基因的表达, 且这三个基因表达水平相差无几, 这可能与鳃组织的较快的新陈代谢速率有关。*Hox4* 在性腺中的高表达, 推测可能与厚壳贻贝性腺发育有关。上述结果说明, *Lox2*、*Lox4* 和 *Lox5* 可能与鳃上纤毛相关细胞的生长、分化以及其他调控有关, *Hox2*、*Hox3* 和 *Hox5* 以 *Hox4*“为首”在外套膜中展现出高水平表达, 表明这四个 *Hox* 基因可能在贝壳形成方面具有重要作用。此结果为软体动物 *Hox* 基因家族功能提供新的研究视野, 同时对厚壳贻贝 *Hox* 基因的分类以及在成体中的调控和表达模式提出了新的证据。

**关键词** 厚壳贻贝; *Hox* 基因家族; 基因鉴定; 表达分析

中图分类号 S917 doi: 10.11693/hyhz20221000279

同源异型盒基因(homeobox gene)包含一条约 180 个碱基的保守 DNA 序列, 约编码 60~61 个氨基酸的同源结构域(homedomain, HD) (Bürglin, 2011)在控制脊椎动物生长和发育, 体轴发育、中枢神经系统和肢体发育中均发挥重要的作用(陈远, 2013)。从植物和酵母细胞到动物和人类组织均存在同源异型盒基因的多个拷贝, 其中最具有代表性的是 *Hox* 基因家族(He *et al*, 2018)。作为一种含有同源结构域基因, 它通

常在染色体中呈簇状分布, 保守性较高。并且, 它在对躯体和组织特征的决定以及胚胎发育中器官的形成方面起着重要的调节作用(王师等, 2017)。

高度保守的 *Hox* 基因家族是生物成体形态的主要架构者, 为生物体正常的身体模式所必需的基因时空表达提供了基础。*Hox* 基因自被发现以来, 一直被认为是动物界中形态进化的主要驱动因素(Pearson *et al*, 2005)。在软体动物 *Hox* 基因的来源及组成上,

\* 国家自然科学基金项目, 42107301 号; 浙江省教育厅一般科研项目, Y202147628 号。徐敏慧, 硕士研究生, E-mail: xuminhui@zjou.edu.cn

通信作者: 叶莹莹, 硕士生导师, 助理研究员, E-mail: yeyy@zjou.edu.cn; 夏立萍, 实验师, E-mail: Xialp@zjou.edu.cn

收稿日期: 2022-10-28, 收修改稿日期: 2023-01-03

De Rosa 等(1999)首先推测 *Hox* 基因在进化过程中, 数目由原口动物共同祖先中的 8 个变为冠轮动物共同祖先中的 10 个; Winnepeninckx 等(1996)分析了分子数据中大量的信息, 并认为, 软体动物是单源起源的; Callaerts 等(2002)推测软体动物基因组中仅含有一个 *Hox* 基因簇; 此后, Iijima 等(2006)分离鉴定了 *Hox* 基因在 7 个物种中的分布情况, 并认为软体动物最初至少含有 12 个 *Hox* 基因(*Hox1*、*Hox2*、*Hox3*、*Hox4*、*Hox5a*、*Hox5b*、*Hox6a*、*Hox6b*、*Hox7*、*Hox8*、*Post1* 和 *Post2*); 同时, 基于冠轮动物和蜕皮动物 *Hox* 基因调控中后区的明显区别, 将两者的 *Hox* 基因分别命名, 前者为 *Lox5*、*Lox2*、*Lox4*、*Post1*、*Post2*, 而后者为 *ftz*、*Antp*、*Ubx*、*Abd-A*、*Abd-B* (Balavoine *et al.*, 2002); 在笠贝(*Lottia gigantea*)中, 完整的 *Hox* 基因簇首先被发现和提及。软体动物一个完整的 *Hox* 基因簇包含 *Hox1*、*Hox2*、*Hox3*、*Hox4*、*Hox5*、*Antp*、*Lox2*、*Lox4*、*Lox5*、*Post1* 和 *Post2* 总共 11 个基因, 王师等(2017)研究发现双壳贝类物种的 *Hox* 基因簇也含有 11 个 *Hox* 基因, 并且 *Hox* 基因的转录方向与 *L. gigantea* 的一致。在后生动物胚胎发育过程中, *Hox* 基因参与了前后轴身体结构的调控。有人认为, 不同物种类群之间表现出的丰富的形态多样性可能与 *Hox* 基因簇的变化有关, 尤其是关于基因簇复制, 基因复制、基因丢失、基因表达变异和调控相互作用 (Garcia-Fernández, 2005)。事实上, 已经存在较多对于软体动物 *Hox* 基因的研究和调查。Hinman 从腹足类物种驴耳鲍(*Haliotis asinina*)中提取出 *Hox1*、*Hox2*、*Hox3*、*Hox4* 和 *Hox5* 基因。*Hox2*、*Hox3* 和 *Hox4* 在转子腹侧的神经外胚层细胞中表达, 与 *Hox5* 一起在发育中的神经节中表达; *Has-Hox1* 和 *Has-Hox4* 在壳形成区域表达, 表明这两个基因参与腹足动物壳的形态发生 (Samadi *et al.*, 2009)。在腹足类中, Samadi 等(2009)报告了 *Gibbula varia* 物种中 *Hox1*、*Post1* 和 *Post2* 参与胚胎、幼虫和成虫壳的形成。Brooke 等(1998)认为 *Hox* 基因簇最初可能以单一基因簇的形式存在, 通常称为 magacuster 类 *ANTP*。在后生动物进化的早期阶段, 单一基因簇的 *ANTP* 通过串联复制产生了其他的旁系同源基因簇, 例如 *ParaHox* 基因簇。Carpintero 等(2004)第一次从双壳贝类 *Pecten maximus* 中分离得到了 *ParaHox* 基因 *caudal* 和 *ANT-C*

中的 *Pb* 基因, 说明了 *Hox* 基因在双壳贝类中的存在; 在对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)*Hox* 基因研究发现, 11 个 *Hox* 基因完整存在, 研究结果发现 *Hox* 最早在原肠胚时期开始表达, 在功能上, *Hox1*、*Hox4*、*Post1* 和 *Post2* 基因可能与初生壳形成有关; *Antp* 与 *Hox5* 基因可能与菲律宾蛤仔底栖生活适应有关; *Hox2* 和 *Hox3* 基因可能与菲律宾蛤仔足形成有关 (牟政强, 2015)。总体来说, *Hox* 基因表现出多样性的表达, 表明其在成体或幼体特定组织中具有不同的功能。

软体动物作为原口动物的第二大类群, 存在于海洋、淡水以及陆地等多种环境中。目前已知的软体动物化石类群有 6 万种以上, 是动物界中仅次于节肢动物的第二大门类。厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)作为双壳纲代表性的物种之一, 在水生环境中发挥着重要的生态作用, 包括栖息地创造悬浮有机废物过滤和海岸线保护等 (Ekstrom *et al.*, 2015)。厚壳贻贝作为沿海重要的经济物种, 含有相对较高的粗蛋白和粗脂肪, 氨基酸种类丰富, 是补充人体营养的理想食品。软体动物在进化史上占据重要的地位, *Hox* 基因除了在软体动物发育过程中所起到的作用, 在成体各组织中也会表达并执行一定的生物学功能。然而当前 *Hox* 基因在软体动物各组织中的表达模式尚未有太多研究, 软体动物 *Hox* 基因在成体中的表达数据需要被挖掘。同时, *Hox* 作为一类重要的调控基因家族, 其基因数目, 基因排列顺序, 相关调控因子都直接与软体动物体态结构的多样性有关。因此, 需要对 *Hox* 基因进行更进一步的研究, 来对 *Hox* 的表达以及对应形成的机制进行修正和阐释。而软体动物作为原口动物中最重要的类群, 研究其中 *Hox* 基因的多种变化, 也有助于研究理解双侧对称动物的进化与遗传。因此, 本研究通过荧光定量 PCR 技术探究 *Hox* 基因在厚壳贻贝鳃、性腺、外套膜、闭壳肌、足、消化腺六个组织中的表达模式, 以探究 *Hox* 基因在厚壳贻贝组织中可能起到的功能和作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

为了鉴定厚壳贻贝中含有 homeodomain 同源保守结构域的基因, 从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载了厚壳贻贝全基因组数据 (NCBI

登录号: PRJEB33342)以及相关注释文件,同时结合本课题组已完成的厚壳贻贝基因组解析(SRA 数据库登录号: PRJNA635756)构建厚壳贻贝全基因组蛋

白数据库。此外,下载了 NCBI 数据库中软体动物的 *Hox* 蛋白序列(16 个物种, 109 条序列, 具体登录号见表 1)。

表 1 软体动物 *Hox* 序列及其 NCBI 登录号  
Tab.1 The *Hox* sequence of mollusks and their NCBI accession numbers

物种名	基因名	登录号	物种名	基因名	登录号
<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Hox1</i>	QCF47205	<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Antp</i>	APD15669
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox1</i>	AKV16302	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Antp</i>	AKV16307
<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Hox1</i>	APD15663	<i>Wirenia argentea</i>	<i>Lox2</i>	APD15716
<i>Nucula tumidula</i>	<i>Hox1</i>	APD15698	<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Lox2</i>	APD15670
<i>Antalis entalis</i>	<i>Hox1</i>	APD15651	<i>Scutopus ventrolineatus</i>	<i>Lox2</i>	APD15709
<i>Plakobranthus ocellatus</i>	<i>Hox1</i>	GFO20336	<i>Antalis entalis</i>	<i>Lox2</i>	APD15657
<i>Lottia goshimai</i>	<i>Hox1</i>	QCF47216	<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Lox2</i>	QCF47213
<i>Steromphala varia</i>	<i>Hox2</i>	ADJ18233	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Lox2</i>	APD15647
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox2</i>	CAG2258121	<i>Lottia goshimai</i>	<i>Lox2</i>	QCF47224
<i>Plakobranthus ocellatus</i>	<i>Hox2</i>	GFO48376	<i>Steromphala varia</i>	<i>Lox2</i>	ADJ18238
<i>Elysia marginata</i>	<i>Hox2</i>	GFS11912	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Lox2</i>	AMT82759
<i>Steromphala varia</i>	<i>Hox2</i>	ADJ18233	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Lox4</i>	APD15648
<i>Elysia marginata</i>	<i>Hox2</i>	GFN88056	<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Lox4</i>	QCF47212
<i>Xipholeptos notoides</i>	<i>Hox3</i>	APD15688	<i>Nucula tumidula</i>	<i>Lox4</i>	APD15703
<i>Antalis entalis</i>	<i>Hox3</i>	APD15653	<i>Wirenia argentea</i>	<i>Lox4</i>	APD15717
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox3</i>	APD15643	<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Lox4</i>	APD15671
<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Hox3</i>	QCF47207	<i>Plakobranthus ocellatus</i>	<i>Lox4</i>	GFO19732
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox3</i>	CAG2258122	<i>Elysia marginata</i>	<i>Lox4</i>	GFR63780
<i>Nucula tumidula</i>	<i>Hox3</i>	APD15700	<i>Antalis entalis</i>	<i>Lox4</i>	APD15658
<i>Wirenia argentea</i>	<i>Hox3</i>	APD15711	<i>Lottia goshimai</i>	<i>Lox4</i>	QCF47223
<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Hox3</i>	APD15665	<i>Steromphala varia</i>	<i>Lox4</i>	ADJ18237
<i>Lottia goshimai</i>	<i>Hox3</i>	QCF47218	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Lox4</i>	AMT82758
<i>Steromphala varia</i>	<i>Hox3</i>	ADJ18232	<i>Plakobranthus ocellatus</i>	<i>Lox5</i>	GFO19711
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox3</i>	AKV16304	<i>Elysia marginata</i>	<i>Lox5</i>	GFR91347
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox3</i>	CAG2234314	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Antp</i>	APC93964
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox3</i>	CAG2234315	<i>Wirenia argentea</i>	<i>Antp</i>	APD15715
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox3</i>	CAG2235200	<i>Wirenia argentea</i>	<i>Lox5</i>	APD15714
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox3</i>	CAG2234320	<i>Nucula tumidula</i>	<i>Lox5</i>	APD15702
<i>Nucula tumidula</i>	<i>Hox4</i>	APD15701	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Lox5</i>	APD15646
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox4</i>	APD15644	<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Lox5</i>	QCF47210
<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Hox4</i>	QCF47208	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Lox5</i>	AMT82757
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox4</i>	AKV16305	<i>Steromphala varia</i>	<i>Lox5</i>	ADJ18236
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox4</i>	CAG224127	<i>Wirenia argentea</i>	<i>Post1</i>	APD15718
<i>Lottia goshimai</i>	<i>Hox4</i>	QCF47219	<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Post1</i>	APD15672
<i>Antalis entalis</i>	<i>Hox4</i>	APD15654	<i>Antalis entalis</i>	<i>Post1</i>	APD15659
<i>Wirenia argentea</i>	<i>Hox4</i>	APD15712	<i>Nucula tumidula</i>	<i>Post1</i>	APD15704
<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Hox4</i>	APD15666	<i>Lottia goshimai</i>	<i>Post1</i>	QCF47226
<i>Scutopus ventrolineatus</i>	<i>Hox5</i>	APD15708	<i>Steromphala varia</i>	<i>Post1</i>	ACX84673
<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Hox5</i>	QCF47209	<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Post2</i>	QCF47214
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox5</i>	AKV16306	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Post2</i>	AKV16308

续表

物种名	基因名	登录号	物种名	基因名	登录号
<i>Plakobranthus ocellatus</i>	<i>Hox5</i>	GFO39532	<i>Wirenia argentea</i>	<i>Post2</i>	APD15719
<i>Elysia marginata</i>	<i>Hox5</i>	GFR79648	<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Post2</i>	APD15673
<i>Lottia goshimai</i>	<i>Hox5</i>	QCF47220	<i>Xipholeptos notooides</i>	<i>Post2</i>	APD15690
<i>Steromphala varia</i>	<i>Hox5</i>	ADJ18234	<i>Nucula tumidula</i>	<i>Post2</i>	APD15705
<i>Xipholeptos notooides</i>	<i>Hox5</i>	APD15689	<i>Antalis entalis</i>	<i>Post2</i>	APD15660
<i>Antalis entalis</i>	<i>Hox5</i>	APD15655	<i>Plakobranthus ocellatus</i>	<i>Post2</i>	GFN88054
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Hox5</i>	CAG2241278	<i>Elysia marginata</i>	<i>Post2</i>	GFS11817
<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Hox5</i>	APD15645	<i>Acanthochitona crinita</i>	<i>Post2</i>	APD15649
<i>Xipholeptos notooides</i>	<i>Antp</i>	APD15687	<i>Lottia goshimai</i>	<i>Post2</i>	QCF47225
<i>Lottia goshimai</i>	<i>Antp</i>	QCF47222	<i>Steromphala varia</i>	<i>Post2</i>	ACX84674
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Antp</i>	CAG224128	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Genome	PRJNA747524
<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	<i>Antp</i>	QCF47211	<i>Crassostrea gigas</i>	Genome	PRJEB35351
<i>Gymnomenia pellucida</i>	<i>Lox5</i>	APD15668	<i>Elysia chlorotica</i>	Genome	PRJNA29229
<i>Antalis entalis</i>	<i>Lox5</i>	APD15656	<i>Mytilus coruscus</i>	Genome	PRJEB33342
<i>Lottia goshimai</i>	<i>Lox5</i>	QCF47221			

## 1.2 厚壳贻贝 *Hox* 基因家族鉴定

使用 TBtools 软件对厚壳贻贝蛋白数据库和软体动物 *Hox* 蛋白序列(虾夷扇贝 *Mizuhopecten yessoensis*, 太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*, 绿叶海蜗牛 *Elysia chlorotica*, 厚壳贻贝 *M. coruscus*)进行 blast 比对, 结合 NCBI 中 Protein Blast 功能, 对目的 *Hox* 基因家族序列进行进一步的鉴定和确认。使用 ExPasy 网站在线工具([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))预测了厚壳贻贝 *Hox* 序列的分子量(MW), 等电点(pI)和疏水值(GRAVY); 运用 Euk-mPLoc2.0 在线网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>)推测 *Hox* 基因家族成员的亚细胞定位。

## 1.3 厚壳贻贝 *Hox* 基因系统进化树构建

为了获得贻贝中 *Hox* 基因的系统发育关系, 对所有鉴定出含有 homeodomain 的 101 条序列, 采用最大似然法(Maximum Likelihood)并利用 MEGA 7.0 (Tamura *et al*, 2011)软件构建系统发育树, bootstrap 设置为 2 000 个重复。另一方面, 对所有从 NCBI 上下载的部分软体动物 *Hox* 蛋白序列进行同样的多序列比以及构建系统发育树, 最后应用 ITOL 在线网站(<https://itol.embl.de/>)完成系统发育树的可视化和美化。相关序列的 NCBI 登录号如表 1 所示。

## 1.4 *Hox* 基因家族结构及染色体定位分析

利用获得的厚壳贻贝 *Hox* 基因家族注释信息, 提取厚壳贻贝 11 个 *Hox* 基因的染色体定位信息, 通

过 TBtools 软件可视化。

## 1.5 *Hox* 基因家族保守基序及基因结构分析

通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI 中的 CD-search 功能(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)找出目的基因功能域的结构。利用 MEME (<http://meme-suite.org/index.html>)在线工具对厚壳贻贝 *Hox* 基因家族成员进行 Motif 分析, 输出结构域数目最大值设置为 10, 所得结果与使用 MEGA7.0 软件构建的厚壳贻贝 *Hox* 基因进化树在 TBtools 软件中进行可视化。

## 1.6 实时荧光定量 PCR 分析和表达分析

厚壳贻贝成贝来自浙江省舟山市嵊泗列岛周围海域(122°46'E, 30°7'N), 选取贝体完整、健康、大小均一的厚壳贻贝作为样本, 解剖获取鳃、性腺、外套膜、闭壳肌、足、消化腺六个组织, 解剖获得组织后当场放入含有 RNAlater 溶液的 2 mL 冻存管中, 置于 -80 °C 冰箱保存以便用于 RNA 的提取。厚壳贻贝不同成体组织按照 RNA 提取试剂 RNAiso Plus (TaKaRa, Japan)提取方法提取 RNA, 而后测定各样 RNA 浓度, 依据 PrimerScript RTreagent Kit (Thermo Fisher Scientific)试剂盒提供方法进行反转录, 反转录 cDNA 用于后续 qRT-PCR 分析。基于厚壳贻贝全基因组中筛选到的 11 条 *Hox* 基因序列, 用软件 Primer Primers5 设计荧光定量 PCR 引物, 并以 *EF1a* 基因为内参(龙治海等, 2018)。由上海生工生物公司提供引

物合成技术服务, 引物浓度 10  $\mu\text{mol/L}$  (表 2), 用 TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus) RR820A (TaKaRa, Japan)试剂盒进行荧光定量 PCR 反应, 使用 Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)进行 *Hox* 基因在厚壳贻贝成体不同组织的相对定量表达分析。荧光定量 PCR 反应采用 10  $\mu\text{L}$  反应体系: TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2X), 5  $\mu\text{L}$ ; PCR Forward Primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$ ; PCR Reverse Primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$ ; ROX Reference Dye II (50X) $\times$ 2, 0.2  $\mu\text{L}$ ; cDNA, 1  $\mu\text{L}$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ , 3.4  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 50  $^\circ\text{C}$ , 2 min; 95  $^\circ\text{C}$ , 30 s; 95  $^\circ\text{C}$ , 40 个 15 s 循环; 58  $^\circ\text{C}$ , 45 s; 95  $^\circ\text{C}$ , 15 s; 72  $^\circ\text{C}$ , 5 min。EF1a 作为内参, 对目的基因的表达水平进行标准化。2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 法用来计算目的基因的相对表达量, 其中也包括表达量的均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)。用 TBtools 软件可视化分析厚壳贻贝 *Hox* 基因家族在不同组织内的表达谱。

## 2 结果

### 2.1 厚壳贻贝 *Hox* 基因的鉴定和命名

利用已知的软体动物 *Hox* 基因, 从厚壳贻贝全基因组数据中筛选出全部含有 homeodomain 同源保守区的序列, 共 101 条。通过与其他软体动物的 *Hox* 基因序列进行比对, 鉴定出厚壳贻贝中的 11 条 *Hox* 序列(表 3)。按照软体动物 *Hox* 基因命名的方式, 将 11 条厚壳贻贝 *Hox* 基因序列命名为 *Hox1*、*Hox2*、*Hox3*、*Hox4*、*Hox5*、*Antp*、*Lox2*、*Lox4*、*Lox5*、*Post1* 和 *Post2*。对 *Hox* 蛋白理化性质分析发现, CD<sub>s</sub> 的长度范围在 573~2 112 bp 之间。其中序列长度最长的是 *Hox2*, 编码 703 个氨基酸, 最短的是 *Post2*, 编码 190

个氨基酸。对应的蛋白分子质量在 21.9~77.9 kDa 之间。11 个 *Hox* 蛋白的 GRAVY 疏水性值都为负值, 说明 *Hox* 对应的蛋白都是亲水蛋白, pI 值的范围在 5.11~10.22 之间, 除了 *Hox2* 为偏酸性蛋白, 其他 *Hox* 蛋白都是偏碱性蛋白。

表 2 荧光定量所用引物  
Tab.2 Primers for qRT-PCR

引物名称	引物序列 5'~3'
<i>Hox1F</i>	ATGAATACGGAGAGTGATTACACAC
<i>Hox1R</i>	CATTGCTGTCATTGAAAGTCCAT
<i>Hox2F</i>	AGGGAAGAGAGTCTGGCTTTATTA
<i>Hox2R</i>	CTTGGTATTCGGCTGTTGT
<i>Hox3F</i>	CAAACGCCGAGATGCATAA
<i>Hox3R</i>	TGAACTGATACTATTAGAACACGGGA
<i>Hox4F</i>	GAACCCTAATTCATATACGGAGC
<i>Hox4R</i>	GTAAATCGGCGGGATGTAG
<i>Hox5F</i>	CTACTTCGTCAATTCCTGTCTACA
<i>Hox5R</i>	TTCTTTCTCCATTTTCATTCGG
<i>AntpF</i>	AGTTTTGGCAGCGCAGAATT
<i>AntpR</i>	TTTCTTTTTTCCACTTCATCCG
<i>Lox2F</i>	CGTTATAGGGAAACTTGTCCG
<i>Lox2R</i>	TATTCGTCTTCGTCTCGTGAG
<i>Lox4F</i>	TTATCCAGCGTCGTTTTTC
<i>Lox4R</i>	CATGTTCCGCACTATTTC
<i>Lox5F</i>	CACCAGCATCACCAACTCCC
<i>Lox5R</i>	ATTTCTATTCGCCTTCGTCTC
<i>Post1F</i>	GTATGCCTTTCGTGGGTGG
<i>Post1R</i>	TGCTGCTTTGCTGTTTCCG
<i>Post2F</i>	TCCTCTCAATCCTATGAACCA
<i>Post2R</i>	GACACCGAACTCCGACAATCT
<i>EF1aF</i>	CACCACGAGTCTCTCCCTGA
<i>EF1aR</i>	GCTGTACCACAGACCAATTC

表 3 厚壳贻贝 *Hox* 基因序列基本特征  
Tab.3 Characteristics of *Hox* gene sequences in *M. coruscus*

基因名称	氨基酸数	亲水性	分子质量	等电点 pI	GenBank 登录号
<i>Hox1</i>	304	-0.827	33.86	8.35	OM037102
<i>Hox2</i>	703	-0.917	77.90	5.11	OM037101
<i>Hox3</i>	423	-1.208	47.81	7.76	OM037100
<i>Hox4</i>	254	-1.075	29.12	9.45	OM037099
<i>Hox5</i>	274	-1.157	31.55	9.85	OM037098
<i>Antp</i>	225	-1.243	26.85	8.93	OM037097
<i>Lox2</i>	234	-1.036	27.26	9.74	OM037105
<i>Lox4</i>	271	-1.214	31.12	8.16	OM037106
<i>Lox5</i>	295	-1.052	34.09	8.33	OM037107
<i>Post1</i>	248	-0.920	28.59	9.59	OM037103
<i>Post2</i>	190	-0.958	21.90	10.22	OM037104

### 2.2 厚壳贻贝 *Hox* 基因家族系统进化分析

探究厚壳贻贝中鉴定出的 *Hox* 基因的系统发育关系, 利用最大似然法对从厚壳贻贝全基因组数据中筛选出全部含有 homeodomain 同源保守区的序列的 101 条蛋白序列进行系统发育分析(图 1)。依据软体动物 *Hox* 基因家族分类标准, 将 101 条序列分属为四类, 同样用红、蓝、绿、紫四种颜色来区分。同时聚类分支的节点自展值都在 0.5 以上, 说明聚类结果存在一定的可信度。为了进一步探究 *Hox* 基因的系统发育关系, 从 NCBI 数据库中下载了所有已上传的软体动物的 *Hox* 基因蛋白序列, 并利用最大似然法对厚壳贻贝 *Hox* 基因蛋白序列和其他软体动物 *Hox* 基因蛋白序列进行系统发育分析(图 2)。*Hox* 基因家族不同成员分别聚为一支, 表明 *Hox* 家族成员在物种间的保守性高于在家族成员间的保守性, 支持了上述序列分析对 *Hox*

基因的分类。同时发现, 在 *Hox* 基因簇上的位置靠近的基因在聚类树上的关系更相近, 基因簇上位置较远的基因在聚类上关系也更远。比如 *Post1* 和 *Post2* 聚为一支, *Hox4*、*Antp*、*Lox5*、*Lox2* 和 *Lox4* 聚为一个大类, *Hox1*、*Hox2* 和 *Hox3* 各自聚为一类, 此外, *Hox5* 单独聚为一类。然而不同的是, 各个物种的 *Antp* 基因虽然在系统进化树中亲缘关系较近, 但并不像其他基因一样聚为一支。此外, 在进化树中, 发现软体动物 *Hox* 基因序列并非完全严格按照腹足纲、双壳纲、头足纲等来进行聚类, 存在一定程度的混乱。例如 *Hox1* 中的厚壳贻贝并未和双壳纲的其他物种聚为一支, 同样在其他基因, 比如 *Hox2*、*Hox4*、*Hox5* 中, 又各自聚为一支。这样的结果提示 *Hox* 基因家族成员在软体动物中的进化速率是不一样的。通过以上结果, 也能确定鉴定出 11 个 *Hox* 基因均属直系同源基因。

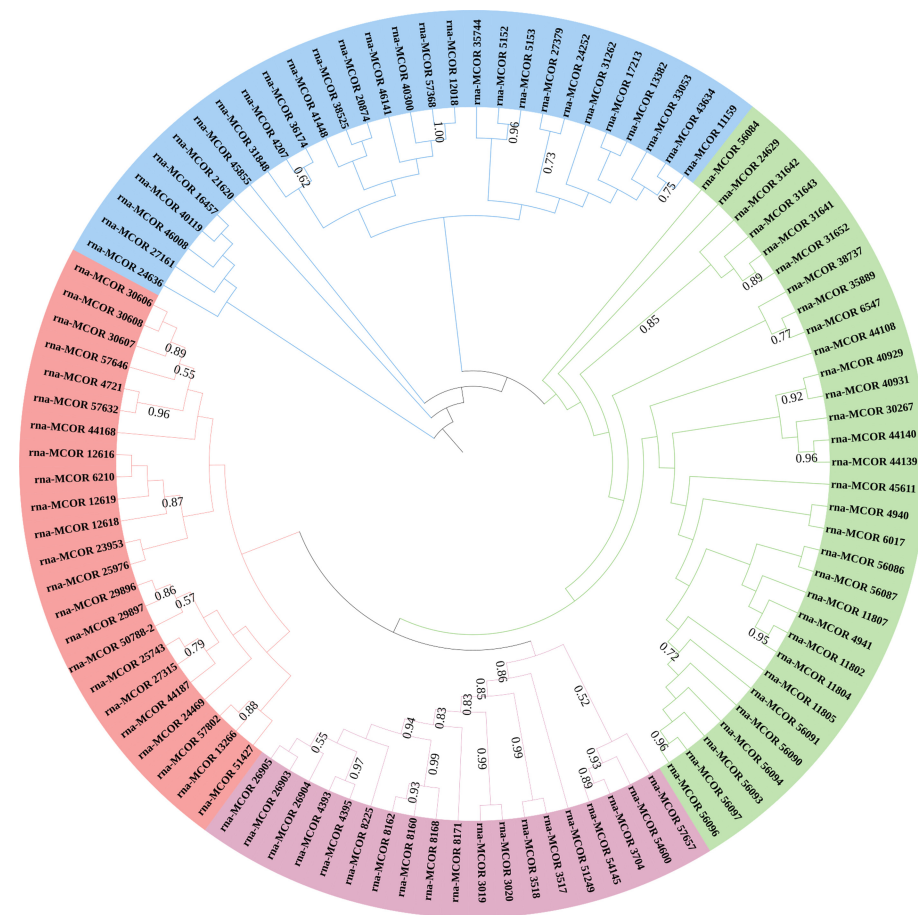


图 1 厚壳贻贝 101 条序列的 ML 系统进化树  
 Fig.1 ML phylogenetic tree of *M. coruscus* based on 101 sequences  
 注: 不同颜色代表不同的亚家族

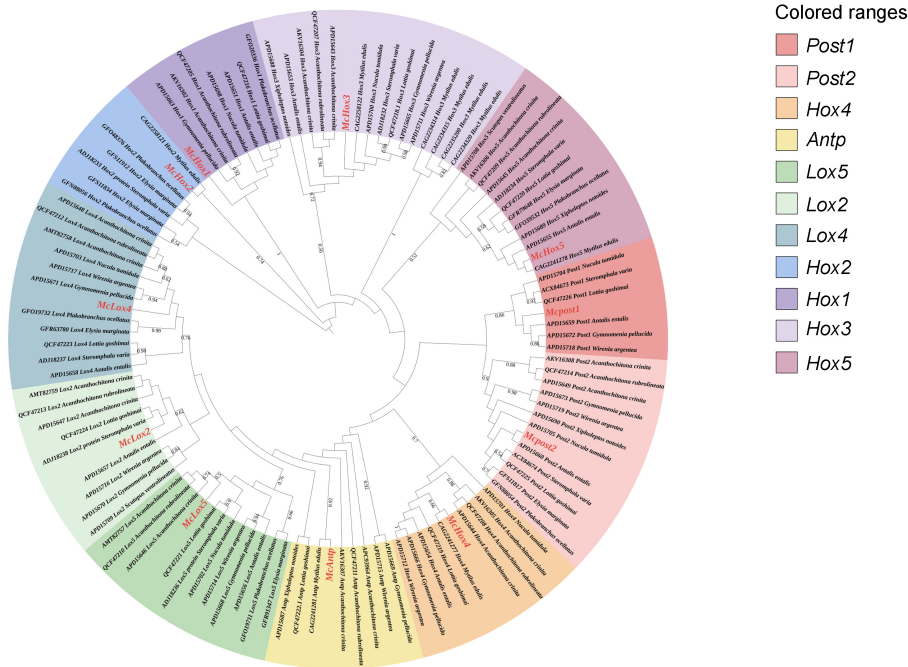


图 2 基于 NCBI 上软体动物 11 条 *Hox* 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 11 *Hox* sequences in mollusk in NCBI

注: 不同的颜色代表不同 *Hox* 基因的亚家族, 11 个厚壳贻贝的 *Hox* 基因被标记为红色

### 2.3 厚壳贻贝 *Hox* 基因家族染色体分布

结果如图 3 所示, 11 个 *Hox* 基因分布在一个染色体片段中, 形成一个基因簇。按 5'到 3'的顺序, *Hox* 排列顺序为 *Hox1*、*Hox2*、*Hox3*、*Hox4*、*Hox5*、*Lox5*、*Antp*、*Lox4*、*Lox2*、*Post2* 和 *Post1*。此外, 观察各个 *Hox* 基因之间的距离, 可以看到 11 个 *Hox* 基因可以被分为四簇: *Hox1*、*Hox2* 和 *Hox3* 为一簇(S1), *Hox4* 和 *Hox5* 为一簇(S2), *Lox5*、*Antp*、*Lox4* 和 *Lox2* 为一簇(S3), *Post1* 和 *Post2* 为一簇(S4), 并且我们分别用红、橙、黄、紫四个颜色进行区分。

### 2.4 厚壳贻贝 *Hox* 基因家族保守基序

将厚壳贻贝 11 条 *Hox* 基因序列的 Motif 结构和系统发育关系结合起来进行分析(图 4)。 *Hox4*、*Hox5*、*Lox5* 和 *Antp* 在系统发育树中聚为一支, 另一支由 *Lox2* 和 *Lox4* 组成, 暗示着他们之间的结构相似性或功能上的相关性。在 Motif 组成上, 在聚为同一簇的 *Hox* 基因中看到一定的保守性, 比如 *Lox2* 和 *Lox4* 的 Motif 在组成、位置、长度上基本一致。Motif1 位于同源结构域, 在所有 *Hox* 基因中均存在。然而个别基因仍存在独特的 Motif 元件。比如, Motif8 只存在于 *Hox1* 和 *Hox4*; Motif10 是 *Hox3* 和 *Antp* 所特有的; Motif5 是 *Hox2* 和 *Post1* 特有的。

### 2.5 厚壳贻贝 *Hox* 基因家族在成体不同组织中的表达分析

荧光定量 PCR 检测的 11 个 *Hox* 基因在厚壳贻六个组织中的表达(图 5, 图 6)。 *Hox1* 主要在性腺、外套膜和足三个组织中存在一定量表达, 其中在性腺

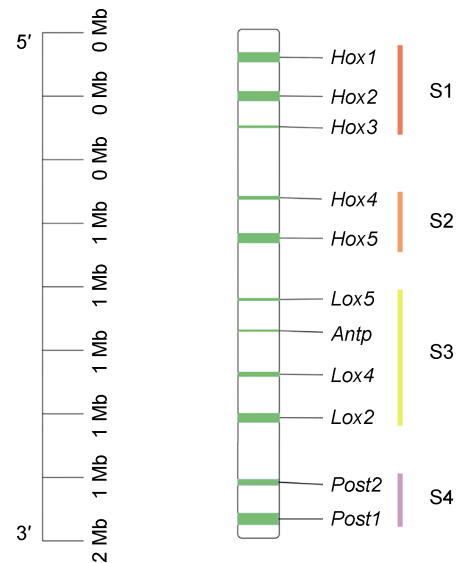


图 3 厚壳贻贝 11 条 *Hox* 序列在染色体上的位置

Fig.3 Chromosomal positions of 11 *Hox* sequences in *M. coruscus*

注: 红色: S1; 橙色: S2; 黄色: S3; 紫色: S4

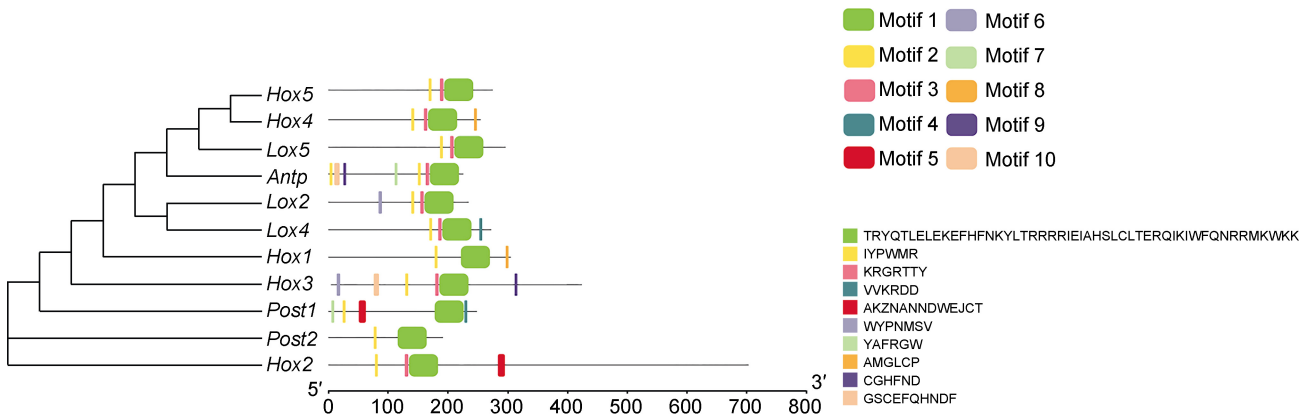


图 4 厚壳贻贝 11 条 *Hox* 序列的系统发育关系与 Motif 结构  
 Fig.4 Phylogenetic relationship and Motif structures of 11 *Hox* sequences in *M. coruscus*

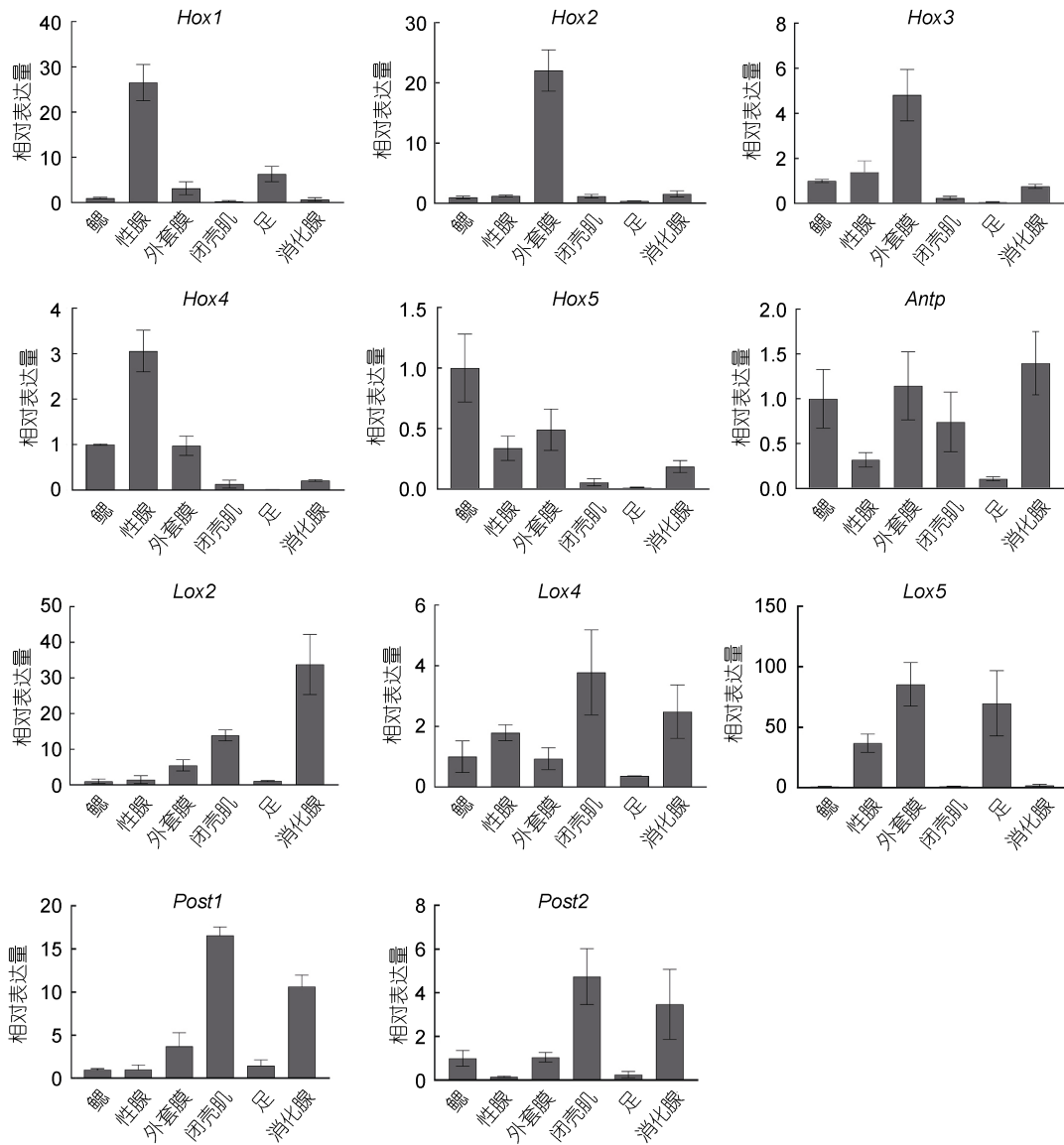
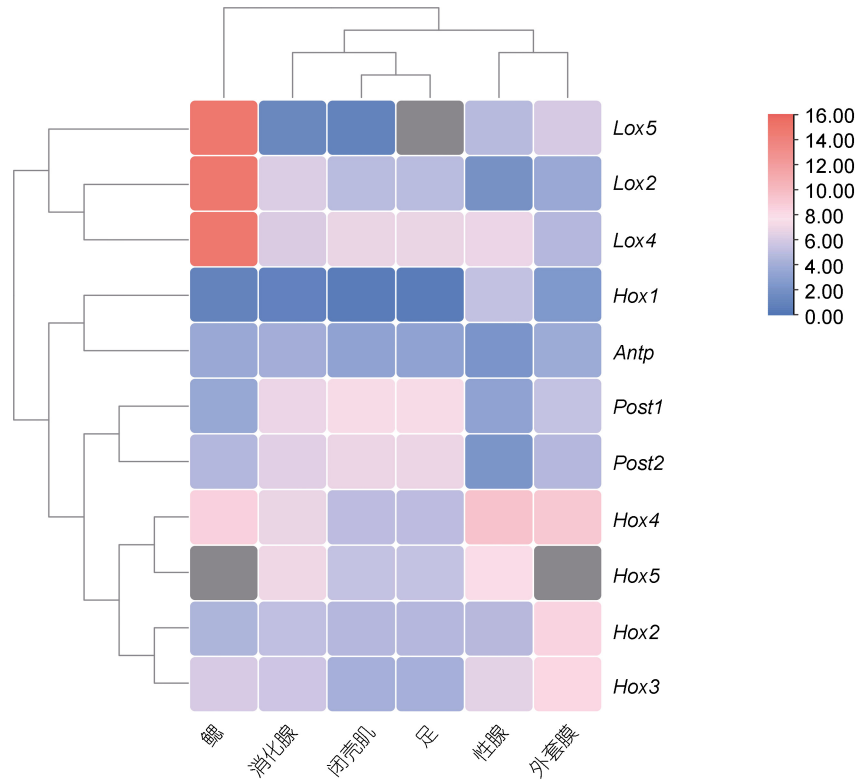


图 5 厚壳贻贝 11 条 *Hox* 基因在六个成体组织的表达量  
 Fig.5 Expressions of 11 *Hox* genes at six adult tissues in *M. coruscus*



图 6 厚壳贻贝不同成体组织 *Hox* 表达谱Fig.6 The *Hox* genes expression profiles of *M. coruscus* in different adult tissues

中的表达水平要显著高于其他组织; 在鳃、闭壳肌和消化腺三个组织中尚未检测到表达或存在微量表达; *Hox2* 在外套膜组织中的表达要显著高于其他组织, 在鳃、性腺等组织中虽然存在一定量的表达, 但都较低; *Hox3* 主要在鳃、性腺、外套膜和消化腺中存在表达, 在外套膜中的表达要显著高于其他组织, 在足和闭壳肌中不表达或存在微量表达; *Hox4* 在性腺组织中的表达水平相对最高, 其次是鳃和外套膜, 这两个组织的表达水平持平, 而在闭壳肌和消化腺中微量表达, 在足中未检测到表达; *Hox5* 在除了足中的其他五个组织中都存在一定量表达, 其中在鳃组织的表达量最高, 其次是外套膜和性腺; *Antp* 在六个组织中皆检测到一定水平的表达, 其中主要在鳃、外套膜、消化腺中的表达较高, 而在这三个组织中表达量水平最高的为消化腺组织; *Lox2* 在消化腺水平最高, 其次是闭壳肌和外套膜; *Lox4* 在六个组织中都存在一定量表达, 在闭壳肌中表达最高, 其次是消化腺, 在鳃和外套膜中的表达基本持平, 在足中的表达量最低; *Lox5* 只在性腺、外套膜、足三个组织中检测到了表达, 在鳃、闭壳肌、消化腺三个组织中并未检测到

表达, 而在表达的三个组织中, 外套膜和足的表达量较高, 在性腺中的表达量较低; *Post1* 在六个组织中都存在表达, 其中在闭壳肌中表达量最高, 其次是在消化腺中存在较高表达量, 在其他四个组织中表达都较低; *Post2* 与 *Post1* 的表达模式类似, 在闭壳肌中表达量最高, 其次在消化腺中也有一定表达量。略微不同的是, *Post2* 的整体表达水平比 *Post1* 略低一点, 此外 *Post2* 在鳃中的表达要稍微高于 *Post1* 的表达水平。从组织角度上来看表达量, 可以总结为: 在鳃中 *Lox2*、*Lox4* 和 *Lox5* 的表达量远超其他基因的表达, 且这三个基因表达水平持平; 在性腺中, *Hox4* 高量表达, 同时伴随 *Hox5* 一定水平的表达; 在外套膜中, *Hox2*、*Hox3*、*Hox4* 和 *Hox5* 的表达量都很高, 其中 *Hox4* 表达水平最高; 在闭壳肌中, *Post1*、*Post2* 和 *Lox4* 都有较高的表达量, 其中 *Post1* 最高; 在足中 *Lox4* 的表达水平很高; 而在消化腺中, 几乎大部分 *Hox* 基因都有参与, 而且都有较高的表达水平。值得注意的是, *Post1* 和 *Post2* 的表达水平相似, *Lox2* 和 *Lox4* 的表达水平相似, *Hox4* 和 *Hox5* 的表达水平相似, *Hox2* 和 *Hox3* 的表达水平相似。

### 3 讨论

目前在双壳纲贝类中,已经有部分物种 *Hox* 基因被鉴定出来,例如长牡蛎、虾夷扇贝等。王师等(2017)根据其团队研究结果,认为双壳纲贝类普遍含有一个完整的具有 11 个 *Hox* 基因基因簇。在贻贝科物种中,紫贻贝的四个 *Hox* 基因通过扩增技术被挖掘(Pérez-Parallé *et al.*, 2005),然而这并非是在基因组水平上进行挖掘,挖掘的 *Hox* 基因数量有限。Sun 等(2017)对深海偏顶蛤(*Bathymodiolus platifrons*)和菲氏偏顶蛤(*Modiolus philippinarum*)的基因组信息进行了更加深层次的研究,而厚壳贻贝基因组信息缺乏。针对这 101 条序列进行系统发育分析,得到的进化树将这 101 条序列大致分为四个分支。分支内的序列表明了各自之间序列以及功能的相似性,包括亲缘关系。早先 Brooke 等(1998)对双侧体 *Hox* 基因的分子系统发育和基因组组织分析表明,无脊椎动物的单倍体基因组中有一个 *Hox* 簇,在所有动物门中, *Hox* 簇由四个基因群组成。因此,本研究中对厚壳贻贝 *Hox* 序列系统发育分析得到的四类分支结果并非偶然。从功能上来看,聚为一类的序列往往在生物体内行使相同的功能或者调控相似的通路,因此,聚为四类的厚壳贻贝 *Hox* 序列在厚壳贻贝发育过程中可能对应调控着四个不同的区块或者不同的功能。而在用软体动物 *Hox* 基因进一步进行系统发育分析时发现其中部分基因聚类为一个大类,例如 *Lox2* 和 *Lox4*, 或 *Post1* 和 *Post2*。我们推测这可能与基因来源有关, *Lox2* 和 *Lox4* 基因被认为是从一个祖先复制而来的(Balavoine *et al.*, 2002)。它们在头足类、腹足类、双壳类和腕足类中的存在可能表明这种重复发生在 Lophotrochozoa 和其他原口动物之间的分化之前(Canapa *et al.*, 2005)。此外,系统发育树结果显示, *Antp* 相比于其他 *Hox* 基因虽然亲缘关系相近然而并未聚为一支,这暗示着,在不同物种中, *Antp* 的进化速率可能出现了差异,相比于其他 *Hox* 基因, *Antp* 基因序列中的变化要显得更快。

*Hox* 基因主要作为生物体发育过程中体轴形成以及神经器官发育相关的重要调控基因被研究。然而 *Hox* 基因不止在发育过程中起作用,当前研究表明, *Hox* 基因在成体中仍存在重要的功能,例如,在各种肿瘤及泌尿系统疾病患者中 *Hox* 基因的表达存在异

常。Crow 等(2006)等通过 Northern 印迹等方法研究发现, *HoxA10* 基因存在低分化,非正常的子宫内膜腺癌中的表达明显高于在正常的、增生的、高分化的子宫内膜中的表达。此外,在急性髓系白血病患者体内,研究发现 *Hox* 基因在白血病细胞内广泛表达,并且 *Hox* 基因通过与某些转录因子联合造成疾病的发生(蒋琼等, 2013)。软体动物在进化史上占据重要的地位,除了研究 *Hox* 在软体动物发育过程中所起到的作用,对软体动物各个成体组织中 *Hox* 功能的研究,也能为进一步了解 *Hox* 基因的功能以及与相关细胞活动或疾病的发生奠定相关理论基础。然而当前 *Hox* 基因在软体动物成体组织中的表达模式尚未有太多研究,因此,本研究通过荧光定量 PCR 技术探究 *Hox* 基因在厚壳贻贝鳃、性腺、外套膜、闭壳肌、足、消化腺六个组织中的表达模式,以探究 *Hox* 基因在成体组织中可能起到的功能和作用。*Hox* 基因在发育时期表达的特定模式,决定了相关细胞的命运和分化。虽然在幼体发育过程中的功能十分重要,但 *Hox* 基因在成体中的调控以及表达模式也不可忽视。

我们猜测高表达量的 *Hox* 基因在不同组织中可能行使的功能。*Hox* 基因在持续更新的器官系统中一般表达更高,例如造血干细胞、血管重塑过程中的内皮细胞、子宫内膜细胞、成纤维细胞和骨骼干细胞。鳃作为双壳贝类的主要呼吸器官,每一鳃片鳃轴的两侧或一侧生有鳃丝,鳃上生有纤毛。依纤毛的运动使呼吸水流按一定线路通过鳃进行气体交换,同时包括一些滤食的行为(王芳等, 1998)。我们认为,厚壳贻贝鳃中高表达的 *Lox2*、*Lox4* 和 *Lox5* 可能是与鳃上纤毛相关细胞的生长,分化以及其他调控有关,鳃上纤毛细胞的更迭保证了气体交换的效率。然而当前 *Lox2*、*Lox4* 和 *Lox5* 主要被认为与神经形成有关,是否与双壳纲鳃部纤毛细胞的调控有关,仍需要进一步的探究。*Lox4* 基因不仅在鳃中高表达,同样的还有足中。贝类的神经系统由脑、足、侧、脏 4 对神经节和与其联络的神经构成,足神经节位于足的前部(杨金龙等, 2013)。我们的结果与当前对 *Lox* 类基因的结论一致, *Lox4* 在足中的高表达可能与厚壳贻贝足神经的发育调控有关。*Hox4* 在性腺中的高表达,我们推测, *Hox4* 可能与厚壳贻贝性腺发育有关。然而不同的是,在凡滨纳对虾中,精巢和卵巢几乎涵盖了所有

的 *Hox* 基因, 这可能是与不同物种生殖细胞特性有关 (Krumlauf *et al.*, 1993; 孙晓晴, 2015)。贝类的外套膜是一个与生物矿化相关的组织, 通过许多贝壳有机质的分泌和离子的转运, 调控  $\text{CaCO}_3$  晶体沉淀形成贝壳。Irvine 等(2000)发现 *Hox1* 和 *Hox4* 在多毛纲动物的外套膜中表达, 在本文中, *Hox2*、*Hox3* 和 *Hox5* 以 *Hox4*“为首”在外套膜中展现出高水平表达, 表明这四个 *Hox* 基因可能在贝壳形成方面具有重要作用。我们推测消化腺中普遍表达的 *Hox* 基因可能与 *Hox* 的协同调控某种机制相关。早先有相关研究表明, *Hox* 基因在幼体发育时期的版本可以通过表观遗传机制保留在成体内, 其中, *Hox* 基因通过表达或抑制表达, 来维持或决定细胞身份以及所需要的功能, 即成体中 *Hox* 基因的区域表达模式通常反映了胚胎的表达模式 (Pai *et al.*, 2020)。我们发现, 每个组织中都有一个或多个“负责”的, 可以按表达量区分的 *Hox* 亚簇, 例如鳃中的 *Lox2*、*Lox4* 和 *Lox5*, 外套膜中的 *Hox2*、*Hox3*、*Hox4* 和 *Hox5*, 同时在表达量上, *Lox4* 总是要高于 *Lox2* 和 *Lox5*, *Hox4* 总是要高于 *Hox5*, 其他组织也具有相似的规律。因此我们推测, *Hox* 基因在成体组织中也具有一定水平的保留, 这样的保留使得相关器官或神经在发育阶段和成体阶段形成位置上的同一性。

#### 4 结论

*Hox* 作为调控生物体轴与发育的一类重要的因子, 其多样化的表达为生物体形态多样性提供了重要的分子基础。因此, 通过本课题组以及 NCBI 数据库中获取的厚壳贻贝全基因组数据进行挖掘, 并从调控元件组成、染色体位置、系统发育关系以及六个成体组织表达谱上, 对厚壳贻贝 *Hox* 进行初步的探究。厚壳贻贝 *Hox* 在种内的聚类为 4 支, 而在整个软体动物水平上聚类为 10 支。我们推测这可能与双壳纲贝类 *Hox* 功能分化有关。而 *Hox* 基因在不同成体组织表现出多样性的表达, 在不同纲物种中表现出不同的功能, 在成体特定组织中也具有不同的功能。总之, 本研究为进一步探究厚壳贻贝 *Hox* 基因家族功能奠定基础, 也为其他软体动物 *Hox* 研究提供参考数据, 但具体影响机制仍需进一步研究。

#### 参 考 文 献

王师, 杨志辉, 李语丽, 等, 2017. *Hox* 基因及其在软体动物中的研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 47(8): 23-30.

- 王芳, 董双林, 范瑞青, 等, 1998. 四种滤食性贝类滤食器官鳃的扫描电镜观察[J]. 青岛海洋大学学报, 28(2): 240-244.
- 龙治海, 陈虎, 汪斌, 等, 2018. 达氏鲟内参基因  $\beta$ -actin、*GAPDH* 和 *EF1- $\alpha$*  的克隆及表达稳定性[J]. 农业生物技术学报, 26(11): 1846-1855.
- 孙晓晴, 2015. 凡纳滨对虾 *Hox* 基因结构和表达的初步研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所): 15.
- 牟政强, 2015. 菲律宾蛤仔不同发育时期转录组及 *Hox* 家族表达分析[D]. 大连: 大连海洋大学: 28-32.
- 杨金龙, 李树恒, 刘志伟, 等, 2013. 厚壳贻贝胚胎和早期幼虫神经系统发育的初步研究[J]. 水产学报, 37(4): 512-519.
- 陈远, 2013. 鲸类 *Hox* 基因的适应性进化及与体轴发育的关系 [D]. 南京: 南京师范大学: 7-9.
- 蒋琼, 刘文君, 2013. *Hox* 基因与急性髓系白血病相关性的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 21(5): 1340-1344.
- BALAVOINE G, DE ROSA R, ADOUTTE A, 2002. *Hox* clusters and bilaterian phylogeny [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 24(3): 366-373.
- BROOKE N M, GARCIA-FERNÁNDEZ J, HOLLAND P W H, 1998. The *ParaHox* gene cluster is an evolutionary sister of the *Hox* gene cluster [J]. Nature, 392(6679): 920-922.
- BÜRGLIN T R, 2011. Homeodomain subtypes and functional diversity [M] // HUGHES T R. A Handbook of Transcription Factors. Dordrecht: Springer: 95-122.
- CALLAERTS P, LEE P N, HARTMANN B, *et al.*, 2002. *Hox* genes in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: implications for the evolution of complex body plans [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(4): 2088-2093.
- CANAPA A, BISCOTTI M A, OLMO E, *et al.*, 2005. Isolation of *Hox* and *ParaHox* genes in the bivalve *Pecten maximus* [J]. Gene, 348: 83-88.
- CARPINTERO P, PAZOS A J, ABAD M, *et al.*, 2004. Presence of proboscipedia and caudal gene homologues in a bivalve mollusc [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37(5): 625-628.
- CROW K D, STADLER P F, LYNCH V J, *et al.*, 2006. The "fish-specific" *Hox* cluster duplication is coincident with the origin of teleosts [J]. Molecular Biology and Evolution, 23(1): 121-136.
- DE ROSA R, GRENIER J K, ANDREEVA T, *et al.*, 1999. *Hox* genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution [J]. Nature, 399(6738): 772-776.
- EKSTROM J A, SUATONI L, COOLEY S R, *et al.*, 2015. Vulnerability and adaptation of US shellfisheries to ocean acidification [J]. Nature Climate Change, 5(3): 207-214.
- GARCIA-FERNÁNDEZ J, 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters [J]. Nature Reviews Genetics, 6(12): 881-892.
- HE B, NI Z L, KONG S B, *et al.*, 2018. Homeobox genes for embryo implantation: from mouse to human [J]. Animal Models and Experimental Medicine, 1(1): 14-22.
- IJIMA M, AKIBA N, SARASHINA I, *et al.*, 2006. Evolution of *Hox* genes in molluscs: a comparison among seven morphologically diverse classes [J]. Journal of Molluscan

- Studies, 72(3): 259-266.
- IRVINE S Q, MARTINDALE M Q, 2000. Expression patterns of anterior *Hox* genes in the polychaete *Chaetopterus*: correlation with morphological boundaries [J]. *Developmental Biology*, 217(2): 333-351.
- KRUMLAUF R, MARSHALL H, STUDER M, *et al*, 1993. *Hox* homeobox genes and regionalisation of the nervous system [J]. *Journal of Neurobiology*, 24(10): 1328-1340.
- PAI P, SUKUMAR S, 2020. *Hox* genes and the NF- $\kappa$ B pathway: a convergence of developmental biology, inflammation and cancer biology [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1874(2): 188450.
- PEARSON J C, LEMONS D, MCGINNIS W, 2005. Modulating *Hox* gene functions during animal body patterning [J]. *Nature Reviews Genetics*, 6(12): 893-904.
- PÉREZ-PARALLÉ M L, CARPINTERO P, PAZOS A J, *et al*, 2005. The *Hox* gene cluster in the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Biochemical Genetics*, 43(7): 417-424.
- SAMADI L, STEINER G, 2009. Involvement of *Hox* genes in shell morphogenesis in the encapsulated development of a top shell gastropod (*Gibbula varia* L.) [J]. *Development Genes and Evolution*, 219(9): 523-530.
- SUN J, ZHANG Y, XU T, *et al*, 2017. Adaptation to deep-sea chemosynthetic environments as revealed by mussel genomes [J]. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5): 0121.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al*, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- WINNEPENNINCKX B, BACKELJAU T, DE WACHTER R, 1996. Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 13(10): 1306-1317.

## IDENTIFICATION, EVOLUTION, AND EXPRESSION PATTERN OF *HOX* FAMILY IN *MYTILUS CORUSCUS*

XU Min-Hui<sup>1</sup>, YAN Cheng-Rui<sup>1</sup>, GU Zhong-Qi<sup>2</sup>, HUANG Ji<sup>2</sup>, LI Ji-Ji<sup>1</sup>, YE Ying-Ying<sup>1</sup>, XIA Li-Ping<sup>1</sup>  
(1. Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhoushan 316022, China; 2. Shengsi Marine Science and Technology Institute, Shengsi 202450, China)

**Abstract** To elucidate the localization, evolution, and expression patterns of the *Hox* gene (homeobox gene) family in different tissues of adult *Mytilus coruscus*, the physical and chemical properties, chromosomal distribution, phylogenetic relationships, gene structure, and expression of the gene family were analyzed with the whole genome data of *M. coruscus* and bioinformation methods. Eleven *Hox* sequences were identified from the whole mussel genome data, of which the longest encoded 703 amino acids, and the shortest one encoded 190 amino acids. The isoelectric points of the 11 *Hox* sequences ranged 5.11~10.22 and they distributed unequally on the same chromosome. Except for one gene that located in nucleus and cytoplasm, the remaining 10 genes are localized in the nucleus subcellularly. In addition, phylogenetic analysis on 101 amino acid sequences and the 11 *Hox* sequences of *M. coruscus* was conducted, 101 from which four general groups (clusters) could be recognized. The qRT-PCR results show that members of the family were expressed at different levels, from which we could infer that those members were related to specific functions, such as metabolism, gonad development, and shell formation. This study provided new insights on the function of the molluscan *Hox* gene family and presented new evidence on the classification of *Hox* genes of adult thick-shelled mussel as well as their regulation and expression patterns.

**Key words** *Mytilus coruscus*; *Hox* gene family; gene identification; expression analysis