

文章编号: 1000-0615(2018)12-1869-11

DOI: 10.11964/jfc.20180811409

厚壳贻贝5-羟色胺2A受体(5-HT_{2A}AR)基因克隆和时空表达

梁 箫^{1,2,3}, 陈 珂^{1,2}, 陈艳文^{1,2}, 刘钰珠^{1,2}, 李一峰^{1,2,3}, 杨金龙^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

2. 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;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为探究5-羟色胺2A受体(5-HT_{2A} receptor, 5-HT_{2A}AR)基因在海水贝类生长发育中的作用, 本研究通过RACE技术和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)克隆了厚壳贻贝5-HT_{2A}AR基因的cDNA全长, 并分析该基因的时空表达。结果显示, 5-HT_{2A}AR基因全长2 636 bp, 开放阅读框(ORF)2 124 bp, 共编码707个氨基酸。序列分析结果显示该序列与人、小鼠、斑马鱼、长牡蛎和虾夷扇贝等物种分别具有45%、45%、48%、49%和67%的同源性。厚壳贻贝雌雄成体各组织和器官中均有5-HT_{2A}AR基因表达, 雄性中的鳃表达量最高, 而在雌性鳃、外套膜和性腺中的表达稍高于其他组织和器官; 推测该基因可能与厚壳贻贝的摄食、对外界环境的感知及促进卵母细胞成熟有关。5-HT_{2A}AR基因在厚壳贻贝各发育阶段均有表达, 且稚贝的表达量为眼点幼虫的1.4倍, 推测5-HT_{2A}AR基因可能参与了调控厚壳贻贝幼虫的生长发育过程。本研究为进一步了解5-HT基因家族在双壳贝类中的功能奠定了基础。

关键词: 厚壳贻贝; 5-HT_{2A}AR基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

作为一种生物单胺类物质, 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)广泛分布于动物体内, 并在其各种行为中发挥关键性调控作用^[1]。在哺乳动物中, 5-HT可以影响生物的各种生理活动, 包括学习、情绪、睡眠、运动、生殖和疼痛感知等^[1-2]。在无脊椎动物中, 5-HT参与调节了生物的生长发育、记忆、交配及生物节律等^[3-4]。在软体动物中, 5-HT及其受体也被证明参与了多种生理活动, 包括摄食^[5]、记忆^[6]、运动^[7]、生殖^[8-9]和昼夜节律^[10]等。5-HT通过控制和启动生殖细胞的释放以及影响生殖细胞的成熟而在一些软体动物的繁殖过程中发挥重要作用^[11-12]。

5-羟色胺受体家族(5-HT receptors, 5-HTRs)除了5-HT₃受体是配体门控离子通道外, 其余均属于G蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptors, GP-

CRs)超家族^[13-14], 至少包含14个不同的亚型, 是神经递质受体最复杂的家族之一^[15]。GPCRs是七次跨膜的受体, 在一些海洋无脊椎动物幼虫, 例如厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)^[16-19]的生长发育尤其是附着变态中起到重要的调控作用。

厚壳贻贝是我国重要的经济贝类^[16, 20]和污损生物^[19], 厚壳贻贝的生活史具有浮游和底栖两个阶段, 附着变态是衔接这两个阶段的重要过程, 若幼虫不能顺利完成附着变态这一环节则会大量死亡。本课题组以往研究发现5-HT能促进厚壳贻贝幼虫的变态发育, 且5-HT免疫阳性信号最初出现于担轮幼虫早期的顶感受器细胞, 推测其在幼虫变态发育过程中发挥重要调控作用^[16, 21], 然而其受体基因的潜在功能尚未得知。本研究通过RACE技术首次获得了厚壳贻

收稿日期: 2018-08-14 修回日期: 2018-10-08

资助项目: 国家自然科学基金(41606147, 31101885); 上海高校水产高峰学科建设项目

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

贝5-HT2AR基因的全长cDNA序列,利用qRT-PCR检测5-HT2AR基因在厚壳贻贝各发育阶段及成体各组织的表达情况,旨在为研究5-HTR家族基因在贝类生长、发育过程中的调控作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

厚壳贻贝成贝采自浙江舟山嵊泗枸杞岛附近海域,成贝取回实验室后暂养1周,暂养结束后解剖取得雄性和雌性成贝的血淋巴、闭壳肌、足、外套膜等组织样品,以及鳃、性腺和消化腺等器官样品。收集厚壳贻贝附着变态前后5个发育阶段样品,包括担轮幼虫、D形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫、稚贝。样品收集后立即在液氮中速冻,储存在-80℃冰箱中用于随后的RNA提取。

1.2 Total RNA提取和cDNA第一链合成

使用RNAiso Plus试剂(TaKaRa,美国),参照说明书提取厚壳贻贝样品的总RNA,使用Turbo DNase试剂盒(Ambion,美国)去除RNA中残留的基因组DNA污染,RNA的浓度和完整性通过Nanodrop 2000超微量分光光度计(Thermo Scientific,美国)和琼脂糖凝胶(1%)电泳检测。使用SMARTer™ RACE 5'/3' Kit(Clontech,日本),参照说明书合成RACE cDNA第一条链。按照制造商的说明,通过Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche, Germany)进行cDNA的制备。

1.3 5-HT2AR基因克隆

本实验采用RACE克隆技术获得5-HT2AR基因的全长,在厚壳贻贝转录组数据库中找到5-HT2AR基因序列,根据该序列设计3'RACE和5'RACE的特异性扩增引物(表1),使用Clontech RACE的试剂盒进行3'和5'RACE扩增。扩增得到的目的片段经DNA回收试剂盒(生工生物,上海)回收,连接到pMD 19-T载体(TaKaRa,大连)上并转入大肠杆菌感受态细胞DH5 α (天根,北京)菌株中,37℃培养过夜,经阳性克隆筛选后,将目的菌送至上海生工测序。将3'和5'RACE序列拼接,获得序列经BLAST比对分析后确定为5-HT2AR基因。

1.4 序列分析

使用BLAST对5-HT2AR基因全长进行同源

表1 厚壳贻贝5-HT2AR基因克隆和定量所用引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used for amplification and quantification of *M. coruscus* 5-HT2AR gene

引物名称 prime name	序列 (5'-3' sequence)	用途 usage
5-HT2AR-3' RACE	TCATCTGGCTCCGACTTTCTAAC	3' RACE
5-HT2AR-5' RACE	ATGTAGAAGGCAAACACAGACCC	5' RACE
5-HT2AR-RT-F	ATGAAGGCTCACACGGCAT	qRT-PCR
5-HT2AR-RT-R	TTGGGATATGTTGGCAGGCA	qRT-PCR
α -Tubulin Rma-F	TTGCAACCATCAAGACCAAG	qRT-PCR
α -Tubulin Rma-R	TGCAGACGGCTCTCTGT	qRT-PCR
EF1- α Rma-F	CACCACGAGTCTCTCCCTGA	qRT-PCR
EF1- α Rma-R	GCTGTCACCACAGACCATTCC	qRT-PCR

性检测;在线ORF Finder查找开放阅读框(ORF)及其编码的氨基酸序列;ProtParam预测编码蛋白的理化性质;PredictProtein Server预测蛋白质的跨膜结构;NetPhos 3.0 Server预测蛋白质磷酸化位点;NetNGlyc 1.0 Server预测糖基化位点。氨基酸序列使用Clustal W进行氨基酸序列多重比对,PhyML 3.0构建系统发生树。

1.5 qRT-PCR分析

提取厚壳贻贝雌雄成贝不同组织、器官及不同发育阶段的总RNA,并分别反转录成cDNA。根据所克隆的5-HT2AR基因序列,使用Premier 5.0软件设计荧光定量引物5-HT2AR-RT-F、5-HT2AR-RT-R(表1),内参基因选用EF1- α rRNA和 α -Tubulin rRNA,一并设计荧光定量引物(表1)。使用FastStart Essential DNA Green Master试剂盒(Roche,瑞士),按照说明书进行实验操作,对5-HT2AR基因在厚壳贻贝不同组织、器官和不同发育阶段的定量表达进行qRT-PCR检测,每个样品做4个平行。采用梯度稀释法对每个基因进行分析,对初始模板浓度与扩增循环数建立相关的标准曲线进行分析。以标准曲线为基础,通过拷贝数分析了各文本的相对丰度。qPCR反应不同的效率为90%~102%, $R^2 \geq 0.99$,空白对照的模板用超纯水替换cDNA。将5-HT2AR基因在不同样品中的表达量输入SPSS 19.0软件,对其进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示显著性差异, $P < 0.01$ 表示极显著性差异。

2 结果

2.1 厚壳贻贝5-HT2AR基因全长序列及其分析

通过RACE克隆技术获得厚壳贻贝5-HT2AR基因cDNA, 该基因全长2 636 bp, 包括一段5'端未翻译区(UTR)长407 bp, 一段3'端UTR长105 bp, 一个开放阅读框(ORF)长2 124 bp, 编码707个氨基酸, 序列提交GenBank, 登录号为MH746801。根据氨基酸序列预测蛋白分子量为80.695 ku, 等电点为8.87。PredictProtein分析显示5-HT2AR包含一个7次跨膜域, 在克隆的5-HT2AR基因序列中, 在细胞外N末端区域内含3个N-连接糖基化位点, 存在一个相对较长的第三胞质环和一个短的第四C端结构域, 在第三个胞质环中有12个位点被蛋白激酶A或C磷酸化(图1), 5-HT2AR受体和其他物种的5-HT2AR受体具有相似的氨基酸序列, 将从厚壳贻贝中克隆获得的5-HT2AR受体序列与双壳贝类中的虾夷扇贝、长牡蛎以及亲缘型较远的脊椎动物斑马鱼、人和小鼠的5-HT2AR受体序列进行比对, 序列同源性分别为67%、49%、48%、45%和45%。收集厚壳贻贝、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)的5-HT2AR受体的氨基酸序列进行多序列比对, 比对结果显示不同物种中5-HT2AR受体的氨基酸序列具有很多相似的特征, 例如都具有7个跨膜区域, 含有高度同源的保守氨基酸序列, 以及比非跨膜区有更多保守氨基酸序列的跨膜区(图2)。基于氨基酸序列的系统发生树分析显示, 厚壳贻贝首先与虾夷扇贝聚为一支, 后与长牡蛎聚为一支, 再依次与毕氏粗角猛蚁(*Ooceraea biroii*)和温带臭虫(*Cimex lectularius*)等聚为一支(图3), 5-HT2AR基因的系统发育关系与传统进化关系一致。

2.2 5-HT2AR基因在厚壳贻贝雌雄成体不同组织及器官中的表达分析

利用qRT-PCR对5-HT2AR基因在厚壳贻贝雌雄成体组织及器官中的表达进行了分析。结果发现在成贝各组织及器官中, 5-HT2AR基因均有表达(图4)。其中, 5-HT2AR在雄性组织中鳃表达量显著高于性腺、消化腺等器官和组织($P < 0.05$)。在雌性成贝中, 各组织和器官的表达量无显著

性差异($P > 0.05$), 鳃、外套膜和雌性性腺的表达稍高于其他组织。

2.3 5-HT2AR基因在厚壳贻贝不同发育阶段的表达分析

5-HT2AR基因在厚壳贻贝幼虫发育过程中的定量表达结果显示, 5-HT2AR基因在厚壳贻贝不同发育阶段均有表达, 各组间无显著性差异($P > 0.05$)。5-HT2AR基因在稚贝阶段表达量有所上调, 为眼点幼虫的1.4倍(图5)。

3 讨论

本研究通过基因克隆得到厚壳贻贝5-HT2AR基因全长序列, 该基因编码707个氨基酸, 在细胞外的N末端区域存在3个N-连接糖基化位点, 5-HT2AR基因结构域中包含一个相对较长的第三个胞质环和一个短的第四个C端结构域, 在第三个胞质环中有12个位点通过蛋白激酶A或C进行磷酸化, 上述结果与5-HTR基因家族的特征一致^[22-23]。通过氨基酸序列比对及构建最大似然系统发生树分析发现, 厚壳贻贝5-HT2AR与双壳贝类的虾夷扇贝、长牡蛎进行比对具有较高的同源性, 分别为67%和49%, 并且与斑马鱼、人和小鼠的5-HT2AR同源性也有45%以上, 说明5-HT2AR基因的系统发育关系与传统进化关系一致。

在本研究中, 5-HT2AR基因在厚壳贻贝的各个组织和器官中均有表达, 这表明5-HT2AR基因在厚壳贻贝的体内有广泛的分布。在雄性中, 5-HT2AR基因在鳃中表达量最高; 而在雌性中, 5-HT2AR基因在鳃、外套膜和雌性性腺中表达量较高。实验结果表明, 不论是雄性个体还是雌性个体, 5-HT2AR基因均在鳃中表达量最高, 推测5-HT2AR基因可能在厚壳贻贝的摄食及对外界环境的感知方面发挥重要作用。有研究发现, 5-HT可促进贝类卵细胞的成熟^[24], 例如促使菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)生发泡破裂^[25], 诱导沟纹蛤仔(*R. decussatus*)、菲律宾蛤仔、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和紫贻贝(*M. galloprovincialis*)产卵^[26]。另外, 在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)的卵巢中发现5HT2AR受体基因的显著富集^[27]。这些研究表明5-HT在无脊椎动物的卵母细胞发育中发挥着重要的作用。本研究发现厚壳贻贝的雌性组织中, 5-HT2AR基因在性腺中的表达量最高, 由此推测5-HT2AR基因在

1 ACATGGGGGATTAGATGATATCTACAGTGGGATGGAATGTATATATCGGAGGTTGTAAA
 61 TAGTTTTTCATCAACATCATCTTTTGCCTTTTCACATCTTTAAATAATTTAAACATTAATGA
 121 AACTTTTAAAGTGCATTGTACTTTGTATACTTCTAAAGGAATTTTGTGGTTTTTATAATA
 181 CACATGTTTGTACAAAAATAAATGCACGATCTAGACAGTTTTGGAAAAATAATTTATATG
 241 AAAAAAGTTTAAAACTTGTAATAATTAAGTTGGATTTATTTCTGAACATAATTAAGAAAAG
 301 GAGAAATTATTTGTCAATGATAAACATGGATTAAGCCTGTGATTTCAAATTTAATAAAA
 361 AAAAAAATGGAGAAAATAGTGATAGACTAAATCAACAGGATCAACAATGAATGAAAATA
 M N E N
 421 GTTCTGCCTTAAATGGAAGTCTTAATGTCACACTGACAGTTTTGAAGATGAACAAGAATGA
 S S A L N G S L N V T D S F E D E Q E L
 481 GATGGGGAATGCTATCTTTGTTAGCTCTGATATTTTGTACAACGTTAGGAAAATTTATTAG
 R W G M L S L L A L I F C T T L G N L L
 541 TGTGCCTTGCCGTAATATGGGATCGACGATTACAGAATATGACCAATTAATTTCTGATGT
 V C L A V I W D R R L Q N M T N Y F L M
 601 CTCTCGCCATTGCAGATTTCTGGTCTCAATTCTAGTCATGCCCTTTGGCATGGTGTAG
 S L A I A D F L V S I L V M P F G M V V
 661 AAATTTATGGTACATTTCCATTTCCGGGCTGAGTTATGCATGTCTGGGTGACAATGGATG
 E I Y G T F P F R A E L C M F W V T M D
 721 TTCTCATGTGTACAGCCTCCATTTGGCACATGTGCACAATGTCAATGGATCGGTATTTTA
 V L M C T A S I W H M C T M S M D R Y F
 781 CATTAAAATATCCGATGCGATATGGACGAAACAAGACGAAAATGATGGTGTGTGTA
 T L K Y P M R Y G R N K T K M M V V L K
 841 TATTCTTTGTATGGGCTGTCTCCATAACTATCAGTAGCCTCTTTGTATTTATGGAATTC
 I F F V W A V S I T I S S P L C I Y G I
 901 AAGACAGTAAATATATCTTAAATGATGGACTTTGTGCTCCAGCCATTGAAGACTTTGTAA
 Q D S K Y I L N D G L C A P A I E D F V
 961 TATATGGGTCTGTGTTTGCCTTCTACATTCCGTTAGTAATAATGCTTGTACATATATAT
 I Y G S V F A F Y I P L V I M L V T Y I
 1 021 TGACTATTAGAATTCTGTGGCAAAATCAAGTTAACATGCAAAGGATTGACAGATCAGATT
 L T I R I L W Q N Q V N M Q R I D R S D
 1 081 TAAGATATAAAACAAAAGAAAGATAAAAAGAAAAAGTCTTTCAAAGCATTCTGTACCAC
 L R Y K Q K K D K K K K S F K A F L S P
 1 141 CAAGTGATGAAGGCTCACAACGGCATAGTGTGGAACAGCTTGAGAGTGATACAGACAATA
 P S D E G S Q R H S V E Q L E S D T D N
 1 201 CTGTACTGGCTTCAATTCCAGTGCTTCTCAAAGGACCATCTATACACAGAGAAATGTG
 T V L A S I P V L P Q K D H L Y T E K C
 1 261 TCTGCAAAAAGATCCAAAACCGAAACACAACACTGGGAAAAGACGTAAGCATCTTCTTTCA
 V C K K I P K P K H N W E R R K A S S F
 1 321 CATGCCTGCCAACATATCCCAAATATACAACACTATCAAACAAAAGAGCAGACATCTGATC
 T C L P T Y P K Y T T I K P K E Q T S D
 1 381 TATTACGCGTAAATTCATTGAAAAATGTTTCAAAGGGAAAAATATATTTGGTGCTTCAT
 L L R V N S I E N V S K G K N I F G A S
 1 441 CTTTTTGTAACTTAAATGACTCTGATACTCCATTTGGAGGAGGTATGAGAAATGTCATGT
 S F C N L N D S D T P F G G G M R N V M

(图 1 Fig. 1)

```

1 501  TTCATAGTTGTGAAATCTGGATTTCAAATCTGCAGGGTGAAACAAAATTATTTCCAGA
      F H S C G N L D F K S A G W K Q N Y F Q
1 561  TTCAAA▲GCGAAATGGACCAAATTATACGAGATGGAGAAAAGGAGAACAAAAGAGCTTCAC
      I Q S E M D Q I I R D G E K E N K R A S
1 621  CTGAGTCACTTCCGATATGAAACTTCACAAAATACAGGACTGGTCGGAAATGAAGCTTC
      P E S L S D M K L H K I Q D W S E M K L
1 681  ATAAAATACAAGACTCAATGTTGGACATGAAGCTCCATAAAATACCCGATTCAATACTGG
      H K I Q D S M L D M K L H K I P D S I L
1 741  ATACAAAATACAAAACCAGAGGACTGCATGTCTGACATAAAACTTCATGATCTATCAG
      D T K I Q K P E D C M S D I K L H D L S
1 801  AGGATAGTGGTGCTCCTAACTTACTAGGTCTACCAGCATCAAAGGTCGTATCAGAATCAG
      E D S G A P N L L G L P A S K V V S E S
1 861  AGGATTCACTAGATGAAACGCTTTCATCTGGCTCCGACTTCTAACAATCAAACTTCGCC
      E D S L D E T S S S G S D F L T I K L R
1 921  CACAATCTTCCATATGTATAAACTAAACACACCAATACAAACTTCTTCAAGTCCATTAC
      P Q S F H M Y K L N T P I Q T S S S P L
1 981  TGGGGAATCAACCACCAAAAATCATGTAATGGATACTGTCAAAAATGTATGATACCA
      L G N S T T K N H V N G Y C Q K M Y D T
2 041  CAAAATCAAGCGAGTCTCTAGCTTCTTTCATCTGACAGACCTGAAGTCTCGAGGAGTATCA
      T K S S E S L A S S S D R P E V S R S I
2 101  AAAATCTTCTCACAATTCACA AAAACTCAGGATGCTAAGCACACCATGTCAAGAAAGG
      K N L L H K F N K T Q D A K H T M S R K
2 161  CTACTCAAATGAGAAAAGGCATCAAAAAGTACTAGGCATAATATTTGGTGTATTTGTAG
      A T S N E K K A S K V L G I I F G V F V
2 221  TTTTATGGACACCATTCTTTTTGTAACATAATGTCTGGAATCTGTGAGTCTTGCATGG
      V L W T P F F F V N I M S G I C E S C M
2 281  GAAGTGTGACTCCTTATATGATGTCCATATTTCTGTGGATGGGTTACGTGGCTCATTAG
      G S V T P Y M M S I F L W M G Y V A S L
2 341  CCAACCTATCATTTACACAATGTTCAATACAGCATTTCGCCGAGCTTTTATTAGAATTT
      A N P I I Y T M F N T A F R R A F I R I
2 401  TAAAATGTCATTTATGTACAAAAGGACATATAAGATCAGACATATACAATGCAAGTTTTC
      L K C H L C T K G H I R S D I Y N A S F
2 461  CGACATCCCATAATATCACAATGATCGTAGAAATACAGTGACAGTTTAAATTAAGGATG
      P T S H N I T N D R R N T V T V L I K D
2 521  AGATTAGATAATGAACTTTTTGATTTTTAAATTTACATATCTTTATTGTCAATTACAAA
      E I R *
2 581  CAATTA AACATATTTATTTATCTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

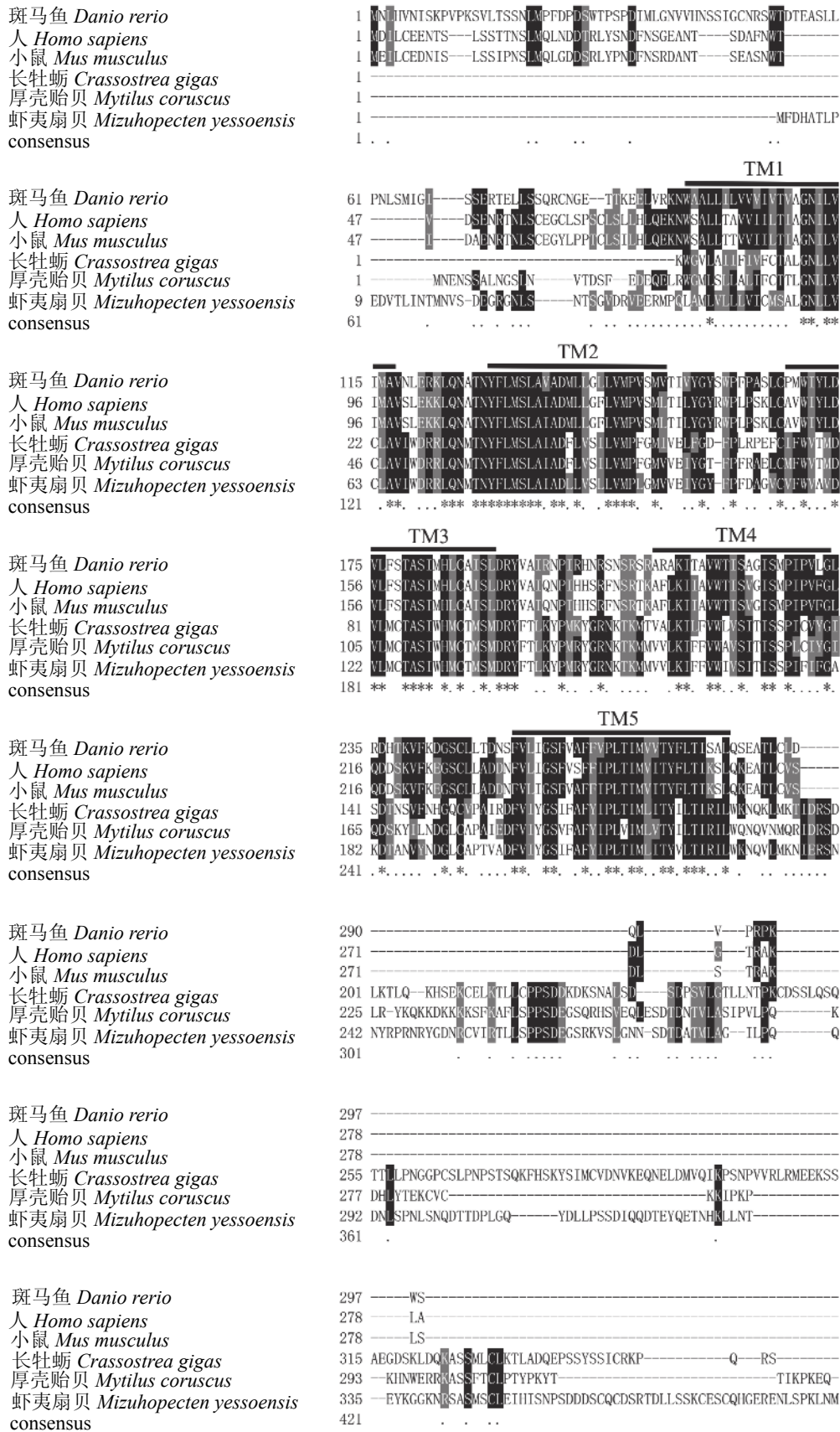
```

图 1 从厚壳贻贝中克隆获得的5-HT2AR受体的氨基酸序列

下划线表示起始密码子ATG; “*”表示终止密码子, “●”表示N-连接糖基化位点; “▲”表示蛋白激酶A/C磷酸化位点

Fig. 1 Amino acid sequence of 5-HT2ARs cloned from *M. coruscus*

The start codon ATG is underlined; the stop codon indicated by an asterisk; “●” indicates the N-linked glycosylation site; “▲” indicates protein kinase A/C phosphorylation site



(图 2 Fig. 2)

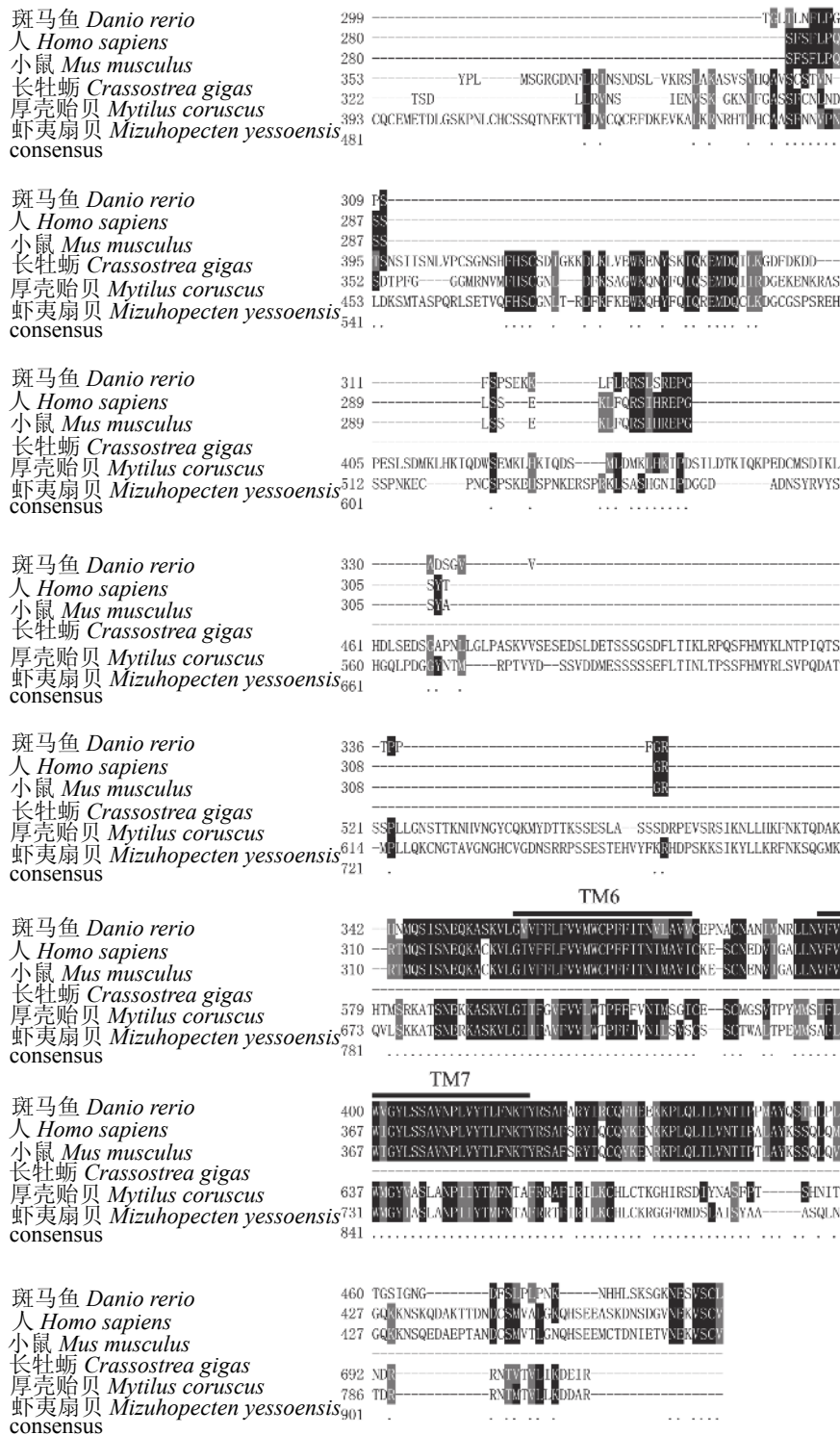


图 2 不同物种5-HT2AR氨基酸序列多重比对分析

一致性或相似度高的部分以阴影或黑色表示; 序列中氨基酸一致的用“*”表示, 相似的用“.”表示

Fig. 2 Multiple alignment of the 5-HT2AR amino acid sequences from different species

The portions of consensuses or high similarities among sequences are marked by black or shadow. Consensuses and similar amino acids are marked by asterisks and dots, respectively

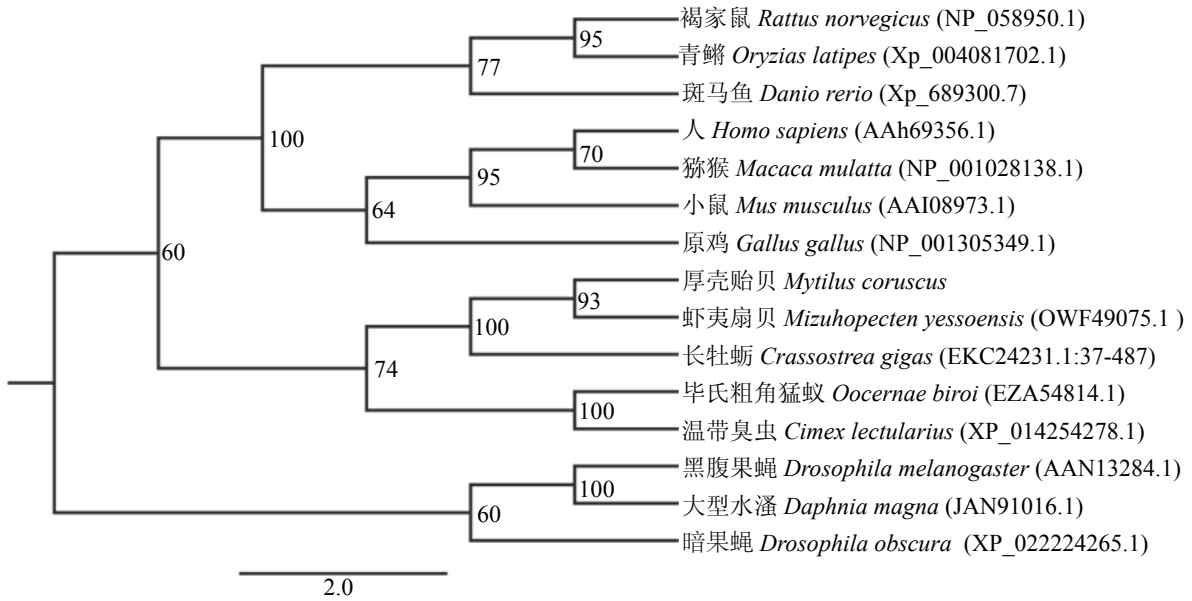


图3 利用最大似然法对5-HT2AR进行系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 5-HT2AR using the maximum-likelihood approach

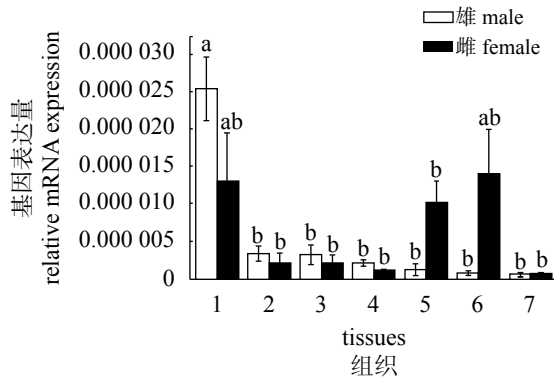


图4 5-HT2AR基因在厚壳贻贝不同组织中的表达情况

1. 鳃; 2. 血淋巴; 3. 闭壳肌; 4. 足; 5. 外套膜; 6. 性腺; 7. 消化腺。不同字母表示差异显著(P<0.05), 下同

Fig. 4 Expression of 5-HT2AR gene in different tissues of *M. coruscus*

1. gill; 2. hemocytes; 3. adductor muscle; 4. foot; 5. mantle; 6. gonad; 7. digestive gland. Bars with different letters were significantly different (P<0.05), the same below

早期胚胎发育方面发挥作用, 需要进一步研究。

附着变态过程是双壳贝类幼虫生长发育中非常重要的一个阶段。化学物质在诱导或抑制海洋无脊椎动物幼虫的变态发育过程中起着显著的作用。5-HT作为一种重要的神经递质, 在许多海洋无脊椎动物中发挥着调节信号转导的作用。对于软体动物, 如东泥织纹螺(*Ilyanassa obsoleta*)^[28-29], 大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[30], 企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)^[31], 5-HT能够诱导幼虫

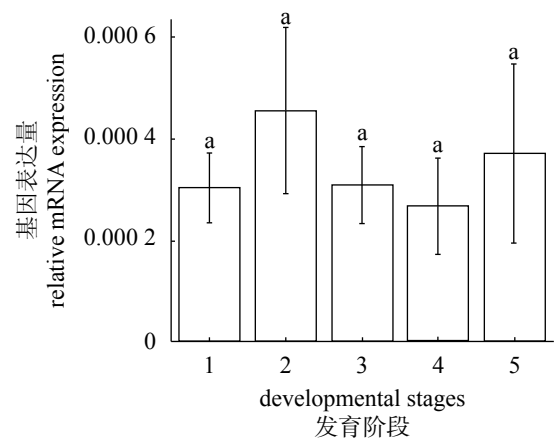


图5 5-HT2AR基因在厚壳贻贝不同发育阶段的表达情况

1. 担轮幼虫; 2. D形幼虫; 3. 壳顶幼虫; 4. 眼点幼虫; 5. 稚贝

Fig. 5 Expression of 5-HT2AR gene in different developmental stages of *M. coruscus*

1. trochophore; 2. D-veliger larvae; 3. umbo veliger larvae; 4. pediveliger larvae; 5. juvenile

的附着行为, 这表明5-HT在这些软体动物幼虫的附着行为中起着重要的作用。但是, 对于一些软体动物, 如红鲍(*Haliotis rufescens*)^[32], 诗博加蓑海牛(*Phestilla sibogae*)^[33], 5-HT却没有表现出诱导活性。因此, 5-HT在不同海洋无脊椎动物幼虫变态发育过程中的调控机制可能是不同的, 究其根本仍需进一步的探索。尽管5-HT2AR基因在具备附着变态能力的厚壳贻贝眼点幼虫期间

和完成了变态的稚贝期间表达量无显著性变化, 但稚贝的表达量是幼虫阶段的 1.4 倍, 推测其参与调控幼虫附着变态过程。在本研究中, 5-HT_{2A} 受体基因在发育的各个阶段均有表达且表达量稳定, 可能是厚壳贻贝幼虫基本生理活动的必需受体。结合 5-HT_{2A} 受体在雌性性腺中的高表达量, 推测 5-HT_{2A} 在胚胎早期发育过程中可能发挥重要作用。厚壳贻贝的附着变态过程可能与 5-HT 家族其他基因有关, 对于调控厚壳贻贝附着变态过程的分子机制还需要进一步研究。

本研究克隆得到了厚壳贻贝 5-HT_{2A} 基因全长, 通过分析雌雄各组织、器官和不同发育阶段中 5-HT_{2A} 的表达量, 推测该基因在厚壳贻贝成体中对摄食、感知外界环境方面具有重要作用, 并参与厚壳贻贝早期胚胎发育和幼虫发育过程。

参考文献:

- [1] Berger M, Gray J A, Roth B L. The expanded biology of serotonin[J]. *Annual Review of Medicine*, 2009, 60(1): 355-366.
- [2] Weiger W A. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview[J]. *Biological Reviews of The Cambridge Philosophical Society*, 1997, 72(1): 61-95.
- [3] Johnson O, Becnel J, Nichols C D. Serotonin receptor activity is necessary for olfactory learning and memory in *Drosophila melanogaster*[J]. *Neuroscience*, 2011, 192: 372-381.
- [4] Norville K, Sweeney S T, Elliott C J H. Postmating change in physiology of male drosophila mediated by serotonin (5-HT)[J]. *Journal of Neurogenetics*, 2010, 24(1): 27-32.
- [5] Kawai R, Kobayashi S, Fujito Y, *et al.* Multiple subtypes of serotonin receptors in the feeding circuit of a pond snail[J]. *Zoological Science*, 2011, 28(7): 517-525.
- [6] Kandel E R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses[J]. *Bioscience Reports*, 2004, 24(4-5): 475-522.
- [7] Filla A, Hiripi L, Elekes K. Serotonergic and dopaminergic influence of the duration of embryogenesis and intracapsular locomotion of *Lymnaea stagnalis* L[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2004, 55(1-4): 315-321.
- [8] Fong P P, Warner M. Serotonin-induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium (Musculium) transversum* (Say)[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1995, 272(2): 163-166.
- [9] Panasophonkul S, Apisawetakan S, Cummins S F, *et al.* Molecular characterization and analysis of a truncated serotonin receptor gene expressed in neural and reproductive tissues of abalone[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2009, 131(5): 629-642.
- [10] Levenson J, Byrne J H, Eskin A. Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training[J]. *Journal of Neuroscience*, 1999, 19(18): 8094-8103.
- [11] Vaca A A, Alfaro J. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection[J]. *Aquaculture*, 2000, 182(3): 373-385.
- [12] Zatylny C, Durantou F, Boucaud-Camou E, *et al.* Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, 55(2): 182-188.
- [13] Gray J A, Roth B L. Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists[J]. *Brain Research Bulletin*, 2001, 56(5): 441-451.
- [14] Lanfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, *et al.* Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders[J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2008, 32(6): 1174-1184.
- [15] Medrihan L, Sagi Y, Inde Z, *et al.* Initiation of behavioral response to antidepressants by cholecystokinin neurons of the dentate gyrus[J]. *Neuron*, 2017, 95(3): 564-576.
- [16] Yang J L, Li S H, Li Y F, *et al.* Effects of neuroactive compounds, ions and organic solvents on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2013, 396: 106-112.
- [17] Yang J L, Li W S, Liang X, *et al.* Effects of adrenoceptor compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 426: 282-287.
- [18] 杨金龙, 陈芋如, 郭行磐, 等. 胆碱受体化合物对厚壳贻贝幼虫变态的调控作用[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 2012-2017.
- Yang J L, Chen Y R, Guo X P, *et al.* Effects of cholinergic compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 2012-2017(in Chinese).

- [19] Liang X, Chen Y R, Gao W, *et al.* Effects on larval metamorphosis in the mussel *Mytilus coruscus* of compounds that act on downstream effectors of G-protein-coupled receptors[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2018, 98(2): 333-339.
- [20] 徐跃峰, 李一峰, 梁箫, 等. 厚壳贻贝 Wnt4 基因时空表达[J]. 水产学报, 2016, 40(10): 1567-1575.
Xu Y F, Li Y F, Liang X, *et al.* Temporal-spatial expression of Wnt4 gene in the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1567-1575(in Chinese).
- [21] 杨金龙, 李树恒, 刘志伟, 等. 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, 2013, 37(4): 512-519.
Yang J L, Li S H, Liu Z, *et al.* Primary study on neuronal development of the embryo and early larvae of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 512-519(in Chinese).
- [22] Albert P R, Tiberi M. Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2001, 12(10): 453-460.
- [23] Tierney A J. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, 128(4): 791-804.
- [24] Hamida L, Medhioub M N, Cochard J C, *et al.* Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae)[J]. *Aquaculture*, 2004, 239(1-4): 413-420.
- [25] Guerrier P, Leclerc-David C, Moreau M. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*[J]. *Developmental Biology*, 1993, 159(2): 474-484.
- [26] 刘洪军, 相建海. 几种生化信号物质对双壳类催产效应的研究[J]. 海洋科学, 1994, 6: 35-37.
Liu H J, Xiang J H. Studies on induction of spawning by biotechnical signal molecules in several bivalves[J]. *Marine Science*, 1994, 6: 35-37(in Chinese).
- [27] Wang Q, He M X. Molecular characterization and analysis of a putative 5-HT receptor involved in reproduction process of the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 204: 71-79.
- [28] Couper J M, Leise E M. Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*[J]. *The Biological Bulletin*, 1996, 191(2): 178-186.
- [29] Leise E M, Thavaradhara K, Durham N R, *et al.* Serotonin and nitric oxide regulate metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*[J]. *American Zoologist*, 2001, 41(2): 258-267.
- [30] Zhao B, Zhang S, Qian P Y. Larval settlement of the silver-or goldlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues[J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 883-901.
- [31] Wassnig M, Southgate P C. Effects of settlement cues on behaviour and substrate attachment of hatchery reared winged pearl oyster (*Pteria penguin*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2012, 344: 216-222.
- [32] Morse D E, Hooker N, Duncan H, *et al.* γ -Aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis[J]. *Science*, 1979, 204(4391): 407-410.
- [33] Hadfield M G. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles[J]. *Aquaculture*, 1984, 39(1-4): 283-298.

5-HT_{2A}AR gene clone and temporal-spatial expression in the mussel *Mytilus coruscus*

LIANG Xiao^{1,2,3}, CHEN Ke^{1,2}, CHEN Yanwen^{1,2}, LIU Yuzhu^{1,2}, LI Yifeng^{1,2,3}, YANG Jinlong^{1,2,3*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To understand the role of serotonin 5-HT_{2A} receptor (5-HT_{2A}AR) gene in the growth and development of the mussel *Mytilus coruscus*, we cloned the 5-HT_{2A}AR gene cDNA full length of *M. coruscus* through RACE technology and analyzed the temporal and spatial expression of this gene via the real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The full length of 5-HT_{2A}AR gene was 2 636 bp and 2 124 bp of open reading frame (ORF) encoding 707 amino acids. Homologous analysis of the amino acids of 5-HT_{2A}AR gene in *M. coruscus* shared high similarity with *Homo sapiens* (45%), *Mus musculus* (45%), *Danio rerio* (48%), *Crassostrea gigas* (49%) and *Mizuhopecten yessoensis* (67%), respectively. This study showed that 5-HT_{2A}AR mRNA expression was detected in all tissues and the highest expression was found in gill and female gonad, indicating that 5-HT_{2A}AR gene may play an important role in perception of the external environment and promotion of mature oocytes. The 5-HT_{2A}AR mRNA was expressed at all developmental stages, suggesting that 5-HT_{2A}AR gene may be involved in the regulation of the growth and development. Taken together, our findings may provide new insights into clarifying the function of 5-HT gene family in molluscs.

Key words: *Mytilus coruscus*; 5-HT_{2A}AR gene; gene cloning; expression analysis

Corresponding author: YANG Jinlong. E-mail: jlyang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41606147, 31101885); Peak Discipline Program for Fisheries from the Shanghai Municipal Government