

中华绒螯蟹 RXR 基因全长 cDNA 克隆及表达分析

王 瑶, 杨志刚, 郭子好, 姚琴琴, 曾奇韬, 杨筱珍, 成永旭*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 根据陆地蟹 RXR 基因保守区序列设计上下游引物, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 以及 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆中华绒螯蟹 RXR 基因并进行各组织间的表达分析。序列分析表明, 中华绒螯蟹 RXR cDNA 全长 1 517 bp, 编码 433 个氨基酸。经 BLASTn 和 BLASTx 分析表明, 中华绒螯蟹 RXR 基因的氨基酸序列与陆地蟹 RXR 基因的氨基酸序列相似性最高, 为 96%。系统进化树分析显示, 中华绒螯蟹 RXR 的氨基酸序列与陆地蟹 RXR 聚为一支。荧光定量 PCR 结果显示, RXR 在所有检测的组织中均有表达, 且在中华绒螯蟹 Y 器官中表达量最高, 肝胰腺、鳃和肌肉中少量表达, 心脏、胃、肠、胸神经节和脑神经节中微量表达。在中华绒螯蟹不同的蜕皮时期, Y 器官中 RXR 表达量在 D 期最高, 与 AB 期、C 期呈显著性差异 ($P < 0.05$); 肌肉中 RXR 在 AB 期表达量最高, 与其他蜕皮时期呈显著性差异 ($P < 0.05$); 肝胰腺和鳃中 RXR 在 AB 期表达量最高, E 期表达量最低, 但各蜕皮时期表达量之间差异不显著。

关键词: 中华绒螯蟹; 维甲类 X 受体 (RXR); 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 966.16

文献标志码: A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 又称河蟹, 属甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 方蟹科 (Grapsidae), 绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 是我国一种重要的经济蟹类。近几年来, 我国的中华绒螯蟹养殖业发展迅速, 已成规模化。蜕皮, 即长出新的外骨骼并蜕去旧的外骨骼的过程, 是甲壳动物生长和发育的重要标志特征^[1]。中华绒螯蟹一生要经过多次蜕皮, 从而完成体增长、形态改变以及断肢再生。蜕皮一方面受体内蜕皮激素的调控, 另一方面与盐度、光照、营养水平等外界生态因子密切相关^[2]。短尾类的蜕皮周期分为蜕皮后期 (postmolt, AB 期)、蜕皮间期 (intermolt, C 期) 和蜕皮前期 (premolt, D 期) 和蜕皮期 (ecdysis, E 期)。

维甲类 X 受体 (retinoid X receptor, RXR), 属于核受体超家族 (nuclear receptor super family) 成员, 是一种重要的调控因子, 对甲壳动物完成生长

发育和繁殖具有十分重要的作用^[3]。RXR 通过与蜕皮激素受体 (ecdysone receptor, EcR) 形成二聚体, 进一步指导调控下游基因 E74 和 E75 的转录, 从而调节动物的生长和蜕皮过程^[4-5]。RXR 在结构上可分为 6 个区, 从氨基端到羧基端依次为 A~F 区, 它们组成 4 个独立的功能结构域^[6]。氨基端的 A/B 区为转录激活结构域, 该结构域保守性较低; C 区为高度保守的 DNA 结合结构域 (DBD); D 区为可变的铰链区; 羧基端 E/F 区含有配体结合区域 (LBD), 介导配体结合和二聚化过程^[7-10]。

蜕皮是甲壳动物生长和发育过程中不可缺少的因素, 近年来, 国内外对甲壳动物蜕皮的研究由浅至深。RXR 基因是调节甲壳动物蜕皮过程的重要基因, 目前关于 RXR 基因的研究报道越来越多, 但是在中华绒螯蟹这种重要的水产经济动物中尚未见报道。本研究通过克隆中华绒螯蟹

收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-10-16

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A409-5); 国家农业科技成果转化项目 (2012GB2C000147); 国家自然科学基金项目 (31272677); 上海教委知识服务平台项目 (ZF1206); 上海市科委优秀学术带头人项目 (12XD1402700)

通信作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

RXR 基因以及构建组织表达谱,旨在了解中华绒螯蟹 RXR 基因的结构、功能以及在各组织间的表达情况;同时,通过比较 RXR 基因在中华绒螯蟹不同蜕皮时期部分组织中的相对表达量,以了解 RXR 基因在中华绒螯蟹不同蜕皮时期相对表达量的变化,为今后进一步研究中华绒螯蟹 RXR 基因的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

一龄未成熟的中华绒螯蟹(平均体质量10 g)

取自上海海洋大学竖新养殖基地,在实验室养殖间暂养,循环水养殖,喂食商业饲料。用解剖剪剪取中华绒螯蟹第三颚足外肢末端,腹面朝下置于加有清水的载玻片上,Olympus-2 光学显微镜观察(放大倍数 100)并拍照(图 1)。随机取 3 只处于 C 期的中华绒螯蟹,取肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、Y 器官、胸神经节、脑神经节等组织,同时各取 3 只 AB 期、D 期及 E 期的中华绒螯蟹的 Y 器官、肝胰腺、鳃和肌肉组织,用液氮速冻后置于 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

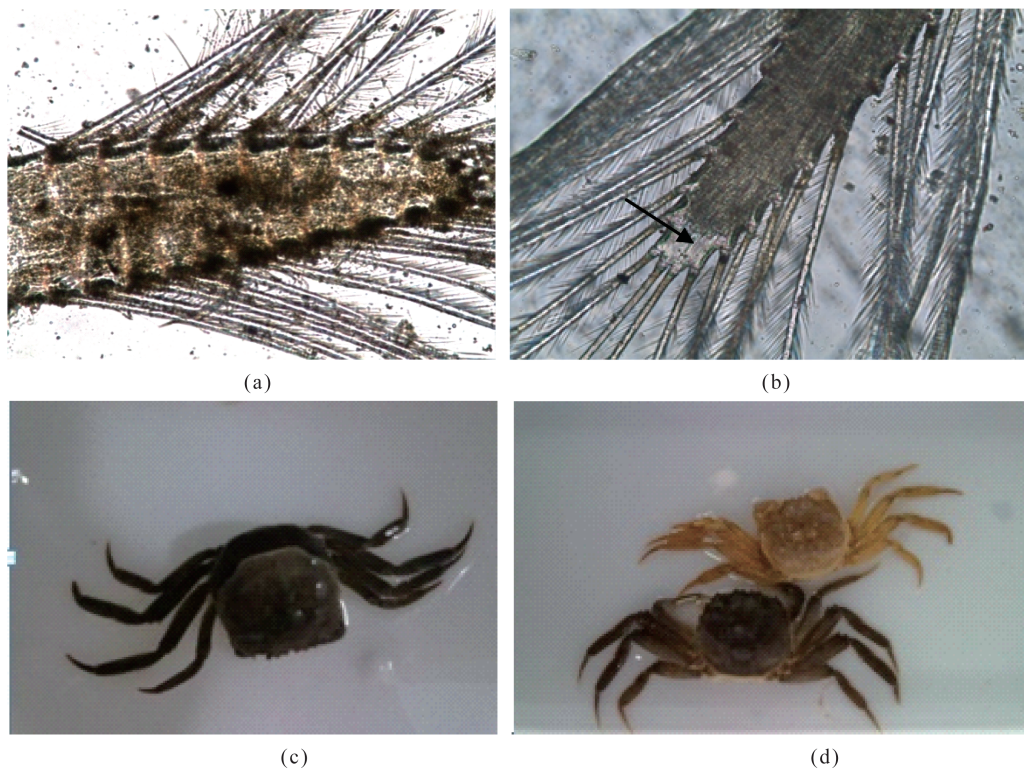


图 1 中华绒螯蟹蜕皮过程的 C 期、D 期、E 期、AB 期

(a) 蜕皮间期(C 期)第三颚足外肢末端; (b) 蜕皮前期(D 期)第三颚足外肢末端; (c) 蜕皮期(E 期); (d) 蜕皮后期(AB 期)

Fig.1 *Eriocheir sinensis* molting process stages C,D,E and AB periods

(a) third maxilliped of intermolt(C period) crab; (b) third maxilliped of premolt(D period) crab; (c) ecdysis(E period); (d) postmolt (AB period)

1.2 总 RNA 的提取与反转录反应

取冻存的中华绒螯蟹各组织,参照 RNAiso™ Plus(TaKaRa) 操作说明书进行总 RNA 的提取,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整度、紫外分光光度计(Q5000)检测 RNA 纯度。

根据 Primscript™ Reverse transcriptase (TaKaRa)说明书操作,取 1 μg 中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA,用于 PCR

的扩增;利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)反转录合成 cDNA 第一链,作为基因 3'和 5'端序列快速扩增的模板。其余 RNA 置于 -80 ℃ 冰箱中保存,用于荧光定量 PCR 反应。

1.3 引物设计和 PCR 扩增反应

根据 GenBank 中陆地蟹 (*Gecarcinus lateralis*) RXR 基因(DQ067281)保守区序列设计上下游引物 HXRXR-1/HXRXR-2,引物由上海生

工生物工程有限公司合成(表 1)。以中华绒螯蟹 行 RXR 基因 cDNA 片段的扩增。
的 cDNA 为模板,HXRXR-1/HXRXR-2 为引物进

表 1 核苷酸引物序列
Tab.1 Oligo nucleotide primer sequence

引物名称 primer name	核苷酸序列(5'-3') sequence	用途 usage
Universal Primer Mix (UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
HXRXR-1	AGGCTTCAGGTTCCACTCGC	RT-PCR
HXRXR-2	GTGTACGCTGCCCTGGAGGA	RT-PCR
HXRXR-3	TTGTGCTGGCCACTGGGCTCG	3'-RACE
HXRXR-4	GCCGACAGACACCTGGTGCAGCTGG	5'-RACE
HXRXR-5	CCTCCGCTCCATCGTCTCTAT	Real-Time PCR
HXRXR-6	GGTGCGTGTGTACTCTCCA	Real-Time PCR
<i>β-actin-1</i>	ACCTCGGTTCTATTTGTCGG	Real-Time PCR
<i>β-actin-2</i>	ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC	Real-Time PCR

PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, *rTaq* 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 加灭菌超纯水至总体积 25 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。取 PCR 扩增产物 3 μL 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.4 RXR 基因 cDNA 的克隆

将目的片段产物按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Tiangen) 说明书进行回收纯化后, 取 1 μL 回收产物与 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 连接, 连接产物经热激后转化至大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中, 转化产物在 37 ℃ 200 r/min 条件下振荡培养 1 h 后涂布于含有 X-Gal、IPTG 以及氨苄的 LB 固体培养基上, 置恒温培养箱中 37 ℃ 过夜培养 (12 ~ 16 h)。次日在长出的蓝白斑菌落中挑选白斑, 接种于含氨苄的 LB 液体培养基中继续振荡培养 4 h 后, 进行菌液 PCR 验证并筛选出阳性克隆后由生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

根据已获得的 RXR 基因片段设计 3'-RACE 上游引物 HXRXR-3、5'-RACE 下游引物 HXRXR-4 (表 1), 以 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 用 3'-RACE 和 5'-RACE 引物与 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物

(UPM) 配对, 并按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 RXR 基因 3'端和 5'端序列的扩增。PCR 扩增产物的回收纯化、克隆和测序与 RXR 基因片段的克隆所述相同。

1.5 序列的拼接与生物信息学分析

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拼接。利用 ORF (open reading frame) finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找开放阅读框; 用 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)、ClustalW 及 DNAMAN 等软件进行序列的验证、翻译及蛋白质相似性分析; 使用 Compute pI-Mw (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html) 进行蛋白质等电点和相对分子质量的计算。用 MEGA 4.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 进行系统进化树的构建。

1.6 RXR 基因的组织表达分析

以获得的基因序列为模板, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对用于定量 PCR 的特异性引物 HXRXR-5/HXRXR-6 (表 1), 对不同阶段的各组织中 RXR 基因的表达进行检测, 并根据 GenBank 中华绒螯蟹 *β-actin* 基因全长序列 (GenBank accession no. HM053699.1) 设计一对内参引物 *β-actin-1*/*β-actin-2* (表 1)。利用 ABI PRISM[®] 7500 序列检测系统进行定量 PCR 扩增反应, 反应体系为 20 μL: 10 μL SYBR Premix Ex

*Taq*TM (2 ×); 0.4 μL PCR Forward Primer (10 μmol/L); 0.4 μL PCR Reverse Primer (10 μmol/L); 0.4 μL ROX; 2.0 μL cDNA 模板; 6.8 μL dH₂O。反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 59 °C 34 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 65 °C 60 s, 95 °C 15 s; 样品和内参分别设 3 个重复, *β-actin* 为内参。荧光定量 PCR 数据分析采用相对 2^{-ΔΔC_t} 法, 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 RXR 基因片段 cDNA 的序列分析

以中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA 为模板扩增获

得的 cDNA 序列全长 1 517 bp, 其中包括 122 bp 的 5' 非编码区 (UTR), 93 bp 的 3' 非编码区 (UTR), 开放阅读框 (ORF) 长 1 302 bp, 编码 433 个氨基酸, 加尾信号 (AATAAA) 以及 Poly-A 尾 (图 2)。序列编码的蛋白理论等电点为 6.39, 分子量为 47.47 ku。经 BLASTn、BLASTx 以及多序列比对表明, 此氨基酸序列与陆地蟹、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 以及人 (*Homo sapiens*) 等的 RXR 氨基酸序列具有高度的相似性 (图 3), 而且具有 RXR 基因的典型结构, 由此确定此序列为中华绒螯蟹 RXR 序列。

```

1TGGGACTGATCATCGGCCCCGGTCGCCTCACTCTCGCTGACTACCAACCGATCACC GG
61ACACACTCACAACGACAGACACCTGGTGACGTGGGTGCCCCCTGAACCCACCGCCACT
121TCATGTCCTGGCTCCCTGGATCGCCAGTCTCCCTCAGCGTGGCGCCAGACACTGTGTCC
1  M S G S L D R Q S P L S V A P D T V S L
181 TCCTCTCCCTGCGCCAGCCTTCTCTAATGCCAATGGTGGACCGGCGTCGCCCAGCATAT
21  L S P A P A F S N A N G G P A S P S I S
241 CAACATCTCCCTTACCATTTGGCTCCAGCAACACCAGCGCCTGAGTACTTCCCCACCC
41  T S P F T I G S S N T S G L S T S P T Q
301 AGTACCCGCAAGCCACCCTCTGTCTGGCTCCAAGCACCTCTGCTCCATCTGTGGTGACC
61  Y P P S H P L S G S K H L C S I C G D R
361 GCGCCTCAGGCAAGCACTATGGCGTCTACAGCTGTGAGGGGTGCAAGGGTCTTCAAGC
81  A S G K H Y G V Y S C E G C K G F F K R

                                P-box
421 GGACGGTGCGCAAGGACCTGACGTACGCGTGCCGTGAGGAGCGGTCATGCACCATCGACA
101  T V R K D L T Y A C R E E R S C T I D K

                                D-box
481 AGCGCCAGAGGAACCGTTGCCAATACTGCCGCTACCAAAAATGCTTGACCATGGGATGA
121  R Q R N R C Q Y C R Y Q K C L T M G M K
541 AGAGAGAAGCGGTCCAGGAGGAGCGCCAGCGGACAAAGGGCGACAAGGGTGATGGGGACA
141  R E A V Q E E R Q R T K G D K G D G D T

                                T-box
601 CAGAGTCATCTGCGGTGCCATCTCAGACATGCCGATCGCCAGCATAACGGGAGGCTGAGC
161  E S S C G A I S D M P I A S I R E A E L
661 TCACTGTGGAACCCATAGATGAGCAGCCGCTGGACCAAGGGGTGAGGCTTCAAGTTCCAC
181  T V E P I D E Q P L D Q G V R L Q V P L
721 TCGCACCTCCTGATAGTGAAGAGTGTAGCTTTACTTTACCTTTTCATCCTGTCACTGAAG
201  A P P D S E K C S F T L P F H P V S E V
                                5' RACE Primer
781 TACCCTGTGCTAACCTCTGCAGGATGTGGTGAGCAACATCTGCCAGGCAGCCGACAGAC
221  P C A N P L Q D V V S N I C Q A A D R H
841 ACCTGGTGCAGCTGGTGGAGTGGGCCAAGCACATCCCTCACTTCACAGACCTTCCCATAG
241  L V Q L V E W A K H I P H F T D L P I E
901 AGGACCAAGTGGTGTACTCAAAGCTGGCTGGAACGAGCTGCTCATCGCCTCCTTCTCCC
261  D Q V V L L K A G W N E L L I A S F S H

```

AB ☒

C ☒

D ☒

E/F ☒

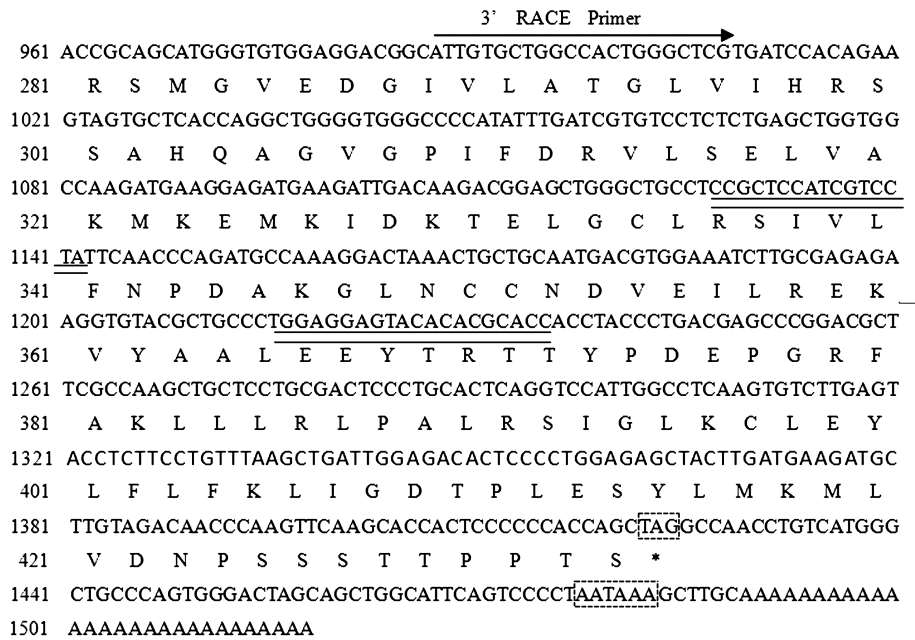


图 2 中华绒螯蟹 RXR 基因全长 cDNA 核苷酸序列及其氨基酸序列推测

3'-RACE PCR 引物用“→”表示,5'-RACE PCR 引物用“←”表示,荧光定量 PCR 引物用长双下划线表示。Poly(A)具有加尾信号 AATAAA,出现在距 Poly(A)尾 6 bp 处。A/B、C、D、E/F 功能域分别标出。C 区的 P 盒、D 盒以及 D 区的 T 盒用阴影标出

Fig. 2 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of E. sinensis RXR gene

“→” stand for 3'-RACE PCR primers, and “←” stand for 5'-RACE PCR primers, double-underlined stand for real-time PCR primers, The poly(A) addition signal AATAAA begins 6 bp from the poly(A) tail. The functional domains are indicated with boxes, and the shadows stand for P-box, D-box and T-box

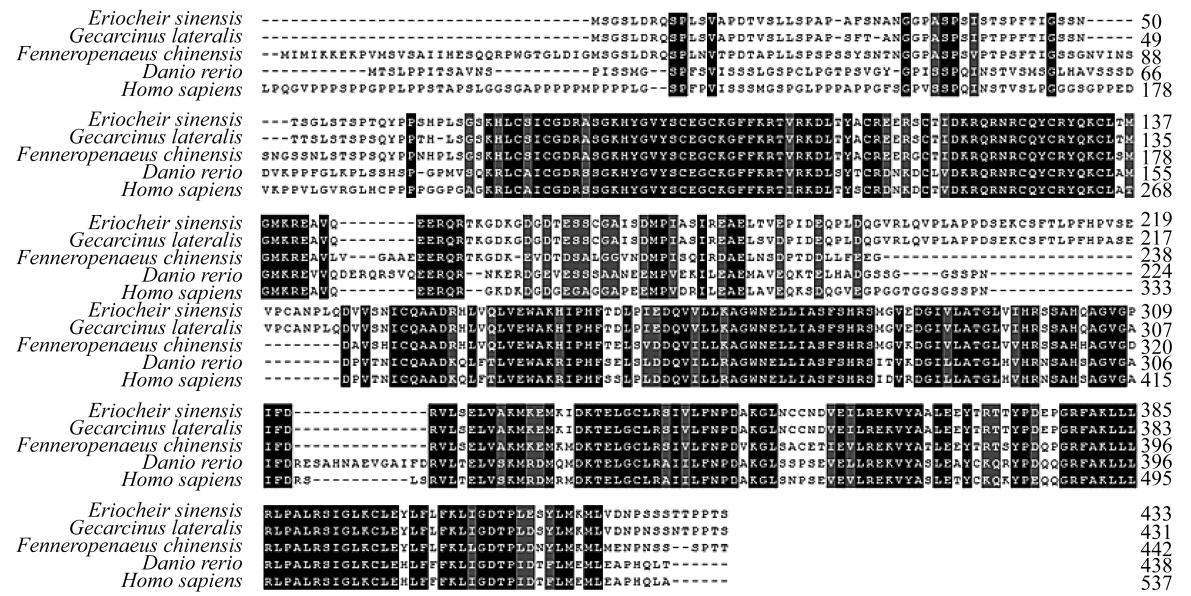


图 3 中华绒螯蟹 RXR 氨基酸序列与其它物种 RXR 氨基酸序列比较

Fig. 3 RXR amino acid sequences comparison of E. sinensis with different animals

GenBank accession number: Eriocheir sinensis(中华绒螯蟹:KF179131), Gecarcinus lateralis(陆地蟹:AAZ20371.1), Fenneropenaeus chinensis(中国对虾:ACN78601.1), Danio rerio(斑马鱼:NP_571350.1), Homo sapiens(人:NP_001257330.1)

2.2 同源性分析以及蛋白系统进化树的构建 洲螯龙虾 (Homarus americanus), 褐虾 (Crangon crangon), 日本囊对虾 (Marsupenaeus japonicus), 将中华绒螯蟹 RXR 氨基酸序列与陆地蟹, 美

中国对虾, 斑马鱼, 花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 以及人 (*Homo sapiens*) 的 RXR 氨基酸进行对比, 其相似性分别为 96%, 90%, 89%, 86%, 85%, 73%, 73% 和 73%。利用 MEGA 4.0 软件的邻接法将上述相关氨基酸序列构建系统进化树, 结果显示甲壳动物的 RXR 聚为一支, 其中中华绒螯蟹 RXR 与陆地蟹 RXR 独聚为一支, 表明其亲缘性最近 (图 4)。

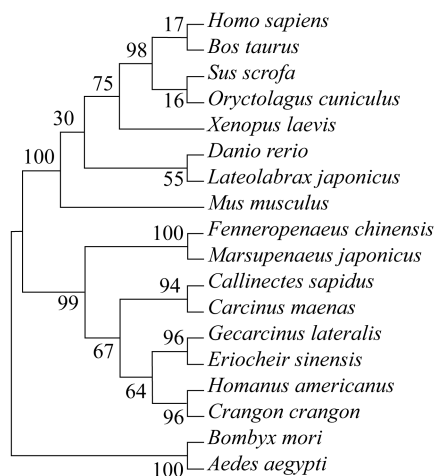


图 4 基于 RXR 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on RXR amino acid sequences

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis* (中华绒螯蟹: KF179131), *Gecarcinus lateralis* (陆地蟹: AAZ20371.1), *Callinectes sapidus* (蓝蟹: AET06182.1), *Carcinus maenas* (青蟹: ACG63787.1), *Homarus americanus* (美洲螯龙虾: AEA29832.1), *Crangon crangon* (褐虾: ACO44668.1), *Fenneropenaeus chinensis* (中国对虾: ACN78601.1), *Marsupenaeus japonicus* (日本囊对虾: BAF75376.1), *Aedes aegypti* (埃及伊蚊: XP_001656078.1), *Bombyx mori* (家蚕: NP_001037470.1), *Xenopus laevis* (非洲爪蟾: NP_001015937.1), *Lateolabrax japonicus* (花鲈: AEU04704.1), *Danio rerio* (斑马鱼: NP_571350.1), *Oryctolagus cuniculus* (兔: XP_002714529.1), *Sus scrofa* (野猪: NP_001177175.1), *Bos taurus* (牛: NP_001077109.1), *Mus musculus* (小鼠: NP_035435.1), *Homo sapiens* (人: NP_001257330.1)

2.3 中华绒螯蟹 RXR 基因的表达分析

以 HXRXR-5/HXRXR-6 为荧光定量 PCR 引物, 中华绒螯蟹肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、Y 器官、胸神经节和脑神经节 9 个组织的 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因, 利用荧光定量 PCR 方法研究中华绒螯蟹 RXR mRNA 的组织表达特征, 设定中华绒螯蟹 RXR 在心脏中的表达量为 1, 根据 RXR 在各个组织中的相对表达量作柱形

图 (图 5)。从图 5 中可以看出, RXR 在所有检测的组织中均有表达, 且在中华绒螯蟹 Y 器官中表达量最高, 与其它组织的表达量均呈显著差异 ($P < 0.05$); 肝胰腺、鳃和肌肉中有少量表达; 心脏、胃、肠、胸神经节和脑神经节中有微量表达。

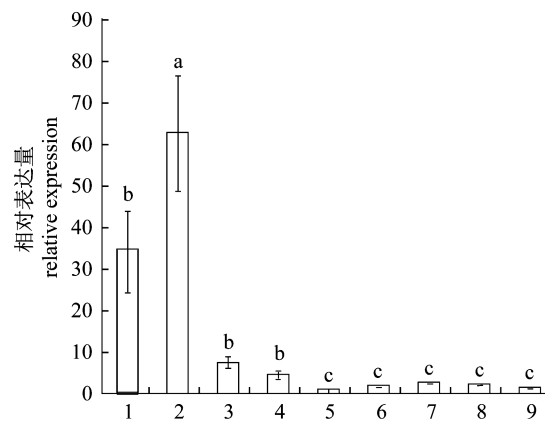


图 5 中华绒螯蟹 RXR 在各组织中的表达情况

1. 肝胰腺; 2. Y 器官; 3. 鳃; 4. 肌肉; 5. 心脏; 6. 胃; 7. 肠; 8. 胸神经节; 9. 脑神经节。不同字母代表与对照组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 5 The relative expression of *E. sinensis*

RXR gene in different tissues

1. hepatopancreas; 2. Y-organ; 3. gill; 4. muscle; 5. heart; 6. stomach; 7. intestine; 8. thoracic ganglia; 9. cephalic ganglion
Expression level of RXR gene was calculated as a ratio relative to β -actin in the same sample of three individuals, and as fold expression based on heart. Data were expressed as the mean \pm SD. Letters indicate the significant difference at $P < 0.05$ with respect to control

取不同蜕皮时期的中华绒螯蟹 Y 器官、肌肉、肝胰腺和鳃, 利用荧光定量 PCR 方法检测 RXR mRNA 在这些组织中的表达情况。荧光定量 PCR 结果显示, 同一蜕皮时期的中华绒螯蟹 RXR 在 Y 器官中表达量最高 (图 6); 在不同蜕皮时期中, 中华绒螯蟹 Y 器官中 RXR 在 AB 期、C 期和 D 期表达量依次升高, 到 E 期有所下降, 其中 RXR 在 D 期表达量与 AB 期、C 期呈显著性差异 ($P < 0.05$); 肌肉中 RXR 在 AB 期表达量最高, 与其他蜕皮时期呈显著性差异 ($P < 0.05$); 肝胰腺和鳃中 RXR 在 AB 期表达量最高, E 期表达量最低, 但各蜕皮时期表达量之间差异不显著。

3 讨论

本研究首次克隆得到中华绒螯蟹 RXR 基因的全长 cDNA 序列, 基因全长 1 517 bp, 包括 122 bp

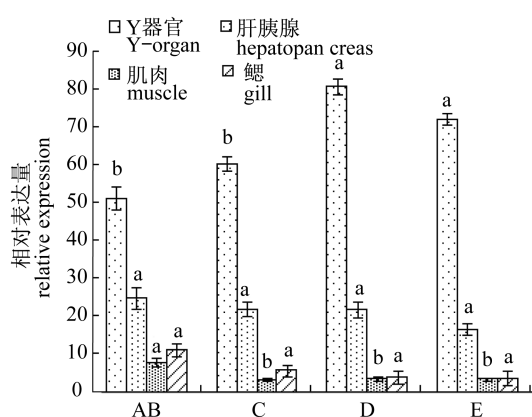


图6 RXR 在不同蜕皮时期中华绒螯蟹 4 个组织中的表达情况

Fig. 6 The relative expression of RXR in four tissues from crabs of different molting stages

Expression level of RXR gene was calculated as a ratio relative to β -actin in the same sample of three individuals. Data were expressed as the mean \pm SD. Letters indicate the significant difference at $P < 0.05$ with respect to control

的 5'非编码区(UTR), 93 bp 的 3'非编码区(UTR)。开放阅读框(ORF)长 1 302 bp, 编码 433 个氨基酸, 3'非编码区存在加尾信号(ATTTAA)以及 Poly-A 尾(图 2), 可初步判定其 cDNA 序列的完整性。利用 NCBI 的 BlastP 程序, 在蛋白保守区数据库(conserved domain database, CDD)对 RXR 进行蛋白保守区预测, 显示其具有 RXR 核受体家族蛋白所具有的 A-F 区域的完整结构, 其中 C 区、D 区以及 E/F 区的保守性较高, 与陆地蟹的 RXR 氨基酸序列有 96% 的一致性。从 N 端到 C 端, 中华绒螯蟹 RXR 氨基酸序列的 C 区存在高度保守的 P-box (EGCKG) 和 D-box (CREER) 两个典型的特殊结构, 其中 P-box 决定着与 DNA 结合的特异性, D-box 与同型二聚体的形成有关, 从而保证了调控识别应答元件、形成二聚体的功能^[12]; 此外, D 区存在有 DNA 识别作用的 T-box (EAVQEERQR) (图 3)。这与该基因在陆地蟹、日本囊对虾以及日本沼虾^[14-16]等甲壳动物中的研究结果相同。从系统进化树中也可以发现, 甲壳动物的 RXR 聚为一支, 其中中华绒螯蟹 RXR 与陆地蟹 RXR 独聚为一支, 表明其亲缘关系最近(图 4), 符合物种的分子进化关系。由此, 初步确定此序列为中华绒螯蟹 RXR 序列。

RXR 在在中华绒螯蟹肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、Y 器官、胸神经节和脑神经节 9 个组织中均有表达, 这与 RXR 在其他动物中的表达情况

是一致的。RXR 在中华绒螯蟹 Y 器官中表达量显著高于其他组织, Y 器官是非神经上皮内分泌腺的重要器官之一, 是控制甲壳动物蜕皮的内分泌器官^[11]。在日本囊对虾的研究中发现, 蜕皮激素受体 EcR 基因在 Y 器官中表达量显著高于其他组织, 而 RXR 通过与 EcR 形成二聚体调节甲壳动物的生长和蜕皮过程, 推测 RXR 基因与中华绒螯蟹蜕皮有关。在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中的研究显示肌肉中 RXR 表达量最高, 这与日本囊对虾、日本沼虾及本研究结果不同, 可能是不同物种差异所致^[12-13]。同时, 在早期对陆地蟹、日本沼虾、日本囊对虾等研究中发现, RXR 在性腺中的表达量较高^[14-16], 由此推测 RXR 可能参与甲壳动物个体性腺的发育和繁殖过程, 有关 RXR 在中华绒螯蟹性腺发育中的作用有待进一步研究。

甲壳动物的蜕皮周期可明显的分为蜕皮后期 (AB 期)、蜕皮间期 (C 期) 和蜕皮前期 (D 期) 和蜕皮期 (E 期) 四个时期。蜕皮后期 (AB 期) 的动物体尚柔软, 外骨骼未完全钙化; 蜕皮间期 (C 期) 的表皮厚度增加, 钙化完成, 色素增加; 蜕皮前期 (D 期) 主要特征为第三颚足外肢末端刚毛内的上皮组织回缩, 与外骨骼分离, 产生透明空隙, 标志蜕皮前期开始; 蜕皮期 (E 期), 动物蜕去旧的外骨骼, 形成新的外骨骼^[17]。目前, 有关 RXR 在甲壳动物不同蜕皮时期表达量的研究非常少, 仅有国外对日本囊对虾和中国明对虾^[18]中有研究。本实验研究了 RXR mRNA 在中华绒螯蟹不同蜕皮时期的 Y 器官、肝胰腺、鳃和肌肉组织中的表达量, 结果显示在不同蜕皮时期中, Y 器官中 RXR mRNA 在 AB 期、C 期和 D 期表达量依次升高, 到 E 期有所下降, 这与蜕皮激素与蜕皮激素受体 EcR 在甲壳动物蜕皮过程中的变化趋势一致^[13], 而研究显示 RXR 通过与蜕皮激素受体 EcR 形成二聚体, 调控下由基因转录, 从而调节甲壳动物蜕皮过程, 说明 RXR 基因确实参与调节中华绒螯蟹个体的蜕皮过程^[11], 此外, 有关中华绒螯蟹蜕皮激素受体 EcR 有待进一步研究; 肝胰腺和鳃中的 RXR mRNA 在 AB 时期表达量相对较高, E 期的表达量较低, 但各蜕皮时期表达量差异不显著, 这与日本囊对虾中的研究结果一致, 推测 RXR 基因在这两个组织中表达较为恒定且作用有限; 肌肉中的 RXR 在 AB 期表达量最高,

且与其它蜕皮时期表达量差异显著,这也与日本囊对虾 RXR 基因研究结果是一致的。RXR 在不同组织中表达量的变化,可能与 RXR 不仅仅是作为蜕皮激素的配体而存在,还有其他的功能有关。例如 RXR 基因在细胞的增殖分化、生长发育、形态发生、代谢以及内环境的稳定平衡过程中都起到重要的调节作用^[19-20]。对中华绒螯蟹 RXR 基因的功能结构域分析也发现,其不仅仅存在与 EcR 的结合位点,同时还可以和 PPAR、RAR 等其他基因形成异构体,这与凡纳滨对虾中的研究结果也是一致的,说明 RXR 除调节甲壳动物蜕皮功能以外,还有其它调节作用。RXR 在不同蜕皮时期表达量不同的具体机理,及其在甲壳动物中的生理功能还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 朱小明,李少菁. 甲壳动物幼体蜕皮的调控[J]. 水产学报,2001,25(4):380-384.
- [2] 申玉春,陈作洲,刘丽等. 盐度和营养对凡纳滨对虾蜕皮和生长的影响[J]. 水产学报,2012,36(2):291-299.
- [3] 卜文,欧阳仁荣. 维甲类 X 受体研究现状[J]. 国外医学输血及血液学分册,1994,17(1):11-13.
- [4] Riddiford L M, Hiruma K, Nelson C A, *et al.* Insight into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Biochem Molecular Biology*, 2003, 33(12):1327-1338.
- [5] 姚俊杰,赵云龙. 甲壳动物蜕皮的调节机制研究进展[J]. 水利渔业,2006,26(6):8-10.
- [6] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression [J]. *Physiology Review*, 2001, 81(3):1269-1304.
- [7] Chung A C, Durica D S, Clifton S W, *et al.* Cloning of crustacean ecdysteroid receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid [J]. *Molecular Cell Endocrinol*, 1998, 139(1-2):209-217.
- [8] Durica D S, Wu X, Anilkumar G, *et al.* Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation [J]. *Molecular Cell Endocrinol*, 2002, 189(1-2):59-76.
- [9] Lee M S, Wattson R D, Roer R D. Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding [J]. *Science*, 1993, 260(5111):1117-1121.
- [10] Devarakonda S, Harp J M, Kim Y C, *et al.* Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex [J]. *Embo Journal*, 2003, 22(21):5827-5840.
- [11] Skinner D M, Biiss D E, Mantei L H, *et al.* Molting and regeneration [M] // *The biology of crustacea*. New York: Academic Press, 1985:43-46.
- [12] Asazuma H, Nagata S, Kono M, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 148(2):139-150.
- [13] 王文青,朱小玲. 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[J]. 淡水渔业,2010,40(1):4-10.
- [14] Durica D S, Hopkins P M. Expression of the genes encoding ecdysteroid and retinoid receptors in regenerating limb tissues from the fiddle crab, *Uca pugilator* [J]. *Gene*, 1996, 171(12):237-241.
- [15] Kim H W, Lee S G, Mykles D L. 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 [J]. *Molecular Cell*, 2005, 242(1-2):80-95.
- [16] Forman B M, Umesono K, Chen J, *et al.* Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors [J]. *Cell*, 1995, 81(4):41-50.
- [17] 康现江,田志环,吴江立,等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性的变化[J]. 中国水产科学,2012,19(5):806-812.
- [18] Jose T A, Fuhua L, Jiquan Z, *et al.* Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor(RXR) on E75 and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2009, 153(1):121-129.
- [19] Mangelsdorf D J, Ong E S, Dyck J A, *et al.* Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway [J]. *Nature*, 1990, 345(6272):224-229.
- [20] Arand A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression [J]. *Physiology Review*, 2001, 81(3):1269-1304.

The full length cDNA cloning and expression analysis of RXR from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

WANG Yao, YANG Zhigang, GUO Zihao, YAO Qinqin, ZENG Qitao,
YANG Xiaozhen, CHENG Yongxu*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Retinoid X receptor (RXR) is a member of the second subfamily of nuclear receptor superfamily. In the insect and the crustacean, RXR is an important signaling protein with varied roles in regulating aspects of reproductive maturation, molting and embryo development. In this study, we cloned RXR gene from *Eriocheir sinensis* using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE), and primers were designed according to the conserved sequence of RXR from *Gecarcinus lateralis*. The full-length cDNA sequence of RXR is 1 517 bp and codes a protein of about 433 amino acids. The amino acid sequence comparison results showed that the RXR gene of *Eriocheir sinensis* shared 96% identity with *Gecarcinus lateralis*, using BLASTn and BLASTx software. Phylogenetic tree of RXR gene generated by Neighbor Joining method suggested that RXR is clustered closely with that of *Gecarcinus lateralis*. The expression of the gene in different tissues and molting stages of *E. sinensis* was analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. The result showed the RXR mRNA was expressed in all tissues examined and highly in Y-organ, with small amount in hepatopancreas, gill and muscle, trace in heart, stomach, intestine, thoracic ganglion and brain ganglion. RXR mRNA was detected with high volume in Y-organ compared to hepatopancreas, muscles and gill at the same molting stages of the crab. RXR mRNA of Y-organ in stage D was significantly ($P < 0.05$) higher than that of stage AB and stage C. It also had significant difference ($P < 0.05$) between muscles at stage AB and stage E, and there was no significant difference expression in hepatopancreas and gill tissues in different molting stages.

Key words: *Eriocheir sinensis*; RXR; gene cloning; expression analysis

Corresponding author: CHENG Yongxu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn