



罗氏沼虾 *RXR* 基因克隆及其对蜕皮相关基因的调控

姜群, 高炜峰, 许文静, 纪鹏, 顾舒文,
张颖杰, 高晓建, 张晓君*

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 为研究维甲酸类 X 受体 (*RXR*) 在甲壳动物蜕皮过程中的调控作用, 实验采用 RACE 技术克隆获得罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析了 *Mr-RXR* 及其他蜕皮相关基因 (*MIH*、*EcR*、*E75* 和 *CHIT*) 在罗氏沼虾不同组织、不同蜕皮阶段的表达情况, 并采用 RNA 干扰 (RNAi) 探究 *Mr-RXR* 对罗氏沼虾蜕皮相关基因表达的调控作用。结果显示, *Mr-RXR* 基因 cDNA 全长 2 241 bp (GenBank 登录号 MZ501612), 包括 36 bp 的 5' 末端非翻译区 (UTR) 和 719 bp 的 3'UTR, 开放阅读框 (ORF) 为 1 386 bp, 共编码 461 个氨基酸。罗氏沼虾 *RXR* 氨基酸序列与甲壳动物同源性较高, 存在保守的 DNA 结合域 (DBD) 和配体结合域 (LBD)。*Mr-RXR* 在罗氏沼虾所有组织中均表达, 精巢、眼柄、心脏等组织中表达量较高, 其表达水平随蜕皮周期改变, 眼柄和肌肉组织中均在蜕皮前期表达量最高, 与 *EcR* 基因表达模式基本同步; *E75* 和 *CHIT* 基因表达模式较为相似, 眼柄和肌肉组织分别在蜕皮前期和蜕皮后期高表达; *MIH* 基因仅在眼柄组织表达, 且蜕皮间期表达量最高。采用 3 μ g dsRNA/g 虾的剂量进行为期 12 d 的 RNAi 实验诱导 *Mr-RXR* 沉默, 罗氏沼虾出现大量死亡, qRT-PCR 显示, 眼柄和肌肉中 *Mr-RXR* 干扰效率分别为 79% 和 55%。眼柄组织中 *Mr-RXR* 基因沉默后, *MIH* 基因表达未受影响, *EcR*、*E75* 和 *CHIT* 基因表达水平显著降低, 肌肉组织中, *Mr-RXR* 沉默仅造成 *CHIT* 基因表达水平的显著下降, 推测 *Mr-RXR* 可能通过影响 *EcR*、*E75* 和 *CHIT* 基因表达调控罗氏沼虾蜕皮过程。本研究结果将为甲壳动物蜕皮调控机制研究提供基础资料。

关键词: 罗氏沼虾; *RXR* 基因; 蜕皮; 表达分析; RNA 干扰 (RNAi)

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

节肢动物生长发育过程中会周期性地蜕掉旧的外骨骼, 生成新的外骨骼, 这种现象称为蜕皮。甲壳动物是节肢动物门中具有较高经济价值的水产动物, 蜕皮贯穿其整个生命周期, 对甲壳动物的生长、发育、繁殖、生存等具有重要影响^[1-2]。甲壳动物蜕皮过程中机体抵抗力较弱, 易感染病原并引发伤亡^[3]。例如三疣梭子蟹 (*Portunus*

trituberculatus) 中常发生蜕壳不遂或蜕壳后死亡现象, 严重影响经济效益^[4]。此外, 有研究表明, 甲壳动物蜕皮频率过高可能加速性腺发育, 导致性早熟现象^[5]。鉴于蜕皮对甲壳动物的重要影响, 探究甲壳动物蜕皮调控机制, 为蜕皮发生的人工控制提供理论基础, 对甲壳动物产业发展具有重大意义。

收稿日期: 2022-01-31 修回日期: 2022-04-16

资助项目: 国家自然科学基金 (32002386); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 [JBGS(2021)120]; 江苏现代农业产业技术体系建设专项 [JATS(2021)505]

第一作者: 姜群 (照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: jiangqun1013@163.com

通信作者: 张晓君, 从事水产养殖学研究, E-mail: zxj9307@163.com



蜕皮的发生由多种激素协同分级调控^[6-7], 其中蜕皮激素在此过程中扮演着十分重要的角色^[8-9]。前期研究表明, 蜕皮激素调控蜕皮发生的信号由蜕皮激素受体 (ecdysone receptor, EcR) 与维甲酸 X 受体 (retinoid X receptor, RXR, 或昆虫超气门蛋白 USP) 组成的异源二聚核受体复合物介导^[10], EcR/RXR (或 EcR/USP) 聚合体通过与激素应答元件 (response element, RE) 结合, 调控下游基因 *E74* 和 *E75* 的转录, 进而调控蜕皮过程^[11-12]。

RXR 是蜕皮激素发挥功能的重要调控因子, 属于核受体超家族, 目前已在多种甲壳动物中获得 RXR 基因全序列, 例如三疣梭子蟹^[4]、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[13]、蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)^[9]、侧身地蟹 (*Gecarcinus lateralis*)^[14]、招潮蟹 (*Leptuca pugilator*)^[15]、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)^[16]、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[17]、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)^[18] 等。然而, 前期研究主要集中在 RXR 基因的组织特异性表达分析及其随蜕皮周期的表达变化, RXR 调控蜕皮发生的机制研究较少。本研究拟克隆获得罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) RXR 基因, 分析 RXR 及其他蜕皮相关基因 [*MIH* (蜕皮抑制激素基因)、*EcR* (蜕皮激素受体基因)、*E75* (转录因子基因) 和 *CHIT* (几丁质酶基因)] 在罗氏沼虾不同组织、不同蜕皮阶段的表达情况, 并通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 探究 RXR 对 *MIH*、*EcR*、*E75* 和 *CHIT* 等的调控作用, 为甲壳动物蜕皮调节机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验设计与样品采集

实验材料取自江苏省高邮市扬州富源水产有

限公司养殖的健康罗氏沼虾, 暂养于水泥池中, 养殖水温维持在约 26 °C, 日投喂商品饲料 2 次, 持续增氧。暂养 2 周后, 随机选取仔虾 (约 0.2 g), 全虾于液氮速冻后 -80 °C 保存, 用于基因克隆实验。随机选取规格为 (2.2±0.3) g 的稚虾, 根据头胸甲的硬度、显微镜下游泳足末端形态变化^[19] 等特征, 鉴定样品的蜕皮周期, 选取蜕皮后期 (AB 期)、蜕皮间期 (C 期) 和蜕皮前期 (D 期) 的个体各 6 只 (图 1), 取其肌肉和眼柄组织, 液氮速冻后 -80 °C 保存, 用于蜕皮周期基因表达分析; 随机选取成虾 [(10±1) g] 雌雄个体各 6 只, 取其眼柄、心脏、肝胰腺、肌肉、鳃、腹部神经节、肠道、胃、脑、精巢和卵巢共 11 个组织, 液氮速冻后 -80 °C 保存, 用于组织特异性表达分析。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范。

1.2 罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因全长 cDNA 的克隆及测序

基于 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 方法开展罗氏沼虾 RXR 基因克隆。取 -80 °C 保存的仔虾, 全虾组织研磨后, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测 RNA 质量和浓度, 采用 SMARTer RACE 5'/3' Kit (TaKaRa) 合成 3' 和 5' RACE cDNA 模板。根据课题组前期转录组数据中 RXR 基因序列信息^[20], 运用 Primer premier 5.0 软件设计 3' 和 5' RACE 特异性引物 (RXR-3-gsp1、RXR-3-gsp2、RXR-5-gsp1 和 RXR-5-gsp2), 通用引物 (Long primer 和 Short primer) 来自 SMARTer RACE 5'/3' Kit, 引物序列信息见表 1。根据 SMARTer RACE 5'/3' Kit (TaKaRa) 的说明书, 采用 RXR-3-gsp1、RXR-3-gsp2 与通用引物 (Long primer 和 Short primer)

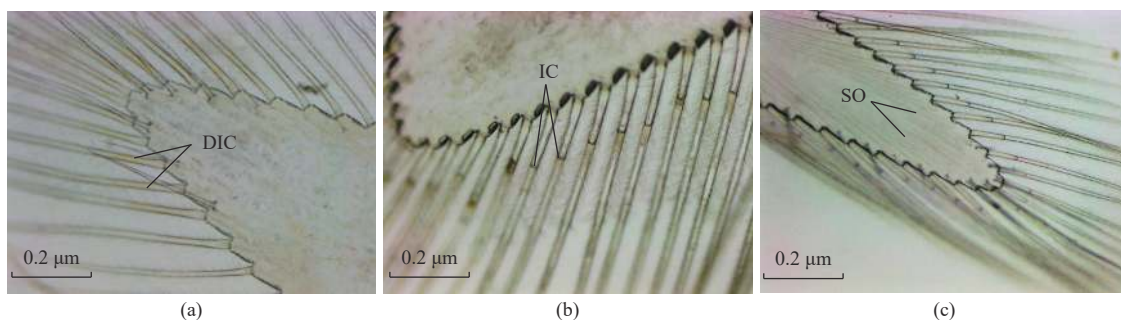


图 1 不同蜕皮阶段的罗氏沼虾游泳足末端显微观察

(a) 蜕皮后期, (b) 蜕皮间期, (c) 蜕皮前期; DIC. 发育中的内锥, IC. 内锥, SO. 刚毛器官。

Fig. 1 Microstructure of the swimming foot of *M. rosenbergii* with different molting stages

(a) postmolt stage, (b) intermolt stage, (c) premolt stage; DIC. developing internal cone, IC. internal cone, SO. setal organ.

表 1 实验用引物序列

引物名称 primer	序列 (5'-3') sequence (5'-3')
RXR-3-gsp1	TCGCACAACCTACCCACATGAACCAG
RXR-3-gsp2	ACGGTTACCAGCTCTCAGATCTATAGGC
RXR-5-gsp1	TCAACAGGCTGCTCATCTGTAGGGT
RXR-5-gsp2	TCTATCCCCCTACCTGGACCCT
Long primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT GGTATCAACGCAGAGT
Short primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC
RXR-ds-F	CTGTTGATCAAGGGGATGCT
RXR-ds-R	TGCAAGTCCTGTAGCTGGTG
RXR-ds-T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGCTGTTGATC AAGGGGATGCT
RXR-ds-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGCAAGTCC TGTAGCTGGTG
RXR-RT-F	TCAAGCTGGTGTGGTGCAA
RXR-RT-R	GTGGGTAGGTGTGCGAGTG
EcR-RT-F	AGGCGGAAGTGTGAGGAGTG
EcR-RT-R	TGCTCTCGTTTCACCTGGCA
MIH-RT-F	GTAAACCAGACAACGCAAGGG
MIH-RT-R	GCATAGACGCACCACAAGAAG
E75-RT-F	TCCAGAACGCCAAATCTGC
E75-RT-R	CATGAGCGGTAATCCCAGGC
CHIT-RT-F	ACAAGACCACCAACCCTGGA
CHIT-RT-R	AGTGGGTGCAGTCGTTAGGA
EF-1 α -F	TGGACGTGTGGAGACTGGCATC
EF-1 α -R	ATCGCCTGGAACAGCCTCAGTC
β -actin-F	GTCGTGACTTGACCGATTACCT
β -actin-R	TCTGGGCACCTGAACCTCTC

通过巢式 PCR 进行 3' RACE 扩增, 采用 RXR-5-gsp1、RXR-5-gsp2 与通用引物 (Long primer 和 Short primer) 通过巢式 PCR 进行 5' RACE 扩增。扩增产物与 pMD19-T 载体连接, 挑取阳性克隆进行测序, 测序结果去除载体序列后进行拼接, 最终获得 cDNA 全序列。

1.3 罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因生物信息学分析

获得罗氏沼虾 *Mr-RXR* 全序列后, 采用 ORF finder 在线预测开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), SMART 在线翻译蛋白氨基酸序列 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), BLAST 对氨基酸序列进行验证和同源性分析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ProtParam 预测由 *Mr-RXR* 所编码蛋白质的等电点、分子质量、不稳定系数和亲水性等特征 (<https://web>

[expasy.org/protparam/](https://www.expasy.org/protparam/)), Signal 5.0 在线软件预测蛋白的信号肽 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>), 与保守结构域数据库比对, 预测功能结构域 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 在线分析 α 螺旋、延伸链以及无规则卷曲等蛋白质二级结构组成 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), I-TASSER 软件预测 3D 结构 (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), 下载甲壳动物及其他物种的 RXR 氨基酸序列, 通过 DNAMAN 进行多序列比对, 采用 MEGA 6.0 以 Neighbor Joining 法构建系统进化树。

1.4 蜕皮相关基因的时空表达分析

采用 TRIzol 法提取罗氏沼虾 11 个组织 (眼柄、心脏、肝胰腺、肌肉、鳃、腹神经节、肠道、胃、脑、卵巢和精巢)、3 个蜕皮阶段 (蜕皮前期、蜕皮间期和蜕皮后期) 肌肉和眼柄组织的总 RNA, 检测方法同“罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因全长 cDNA 的克隆及测序”。选取高质量的 RNA 样品, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒反转录获得 cDNA, 用于后续的实时荧光定量 PCR 分析 (qRT-PCR)。根据 *Mr-RXR* 基因序列信息, 采用 Primer premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物 (RXR-RT-F 和 RXR-RT-R), 选用 *EF-1 α* 和 *β -actin* 为内参基因, 采用 TB Green™ Premix ExTaq™ II (TaKaRa) 试剂盒进行 qRT-PCR, 检测罗氏沼虾不同组织中 *Mr-RXR* 基因的表达水平, 检测不同蜕皮阶段罗氏沼虾肌肉和眼柄组织中 *Mr-RXR*、*MIH*、*EcR*、*E75* 和 *CHIT* 基因的表达水平, 引物信息见表 1, 反应体系及程序参照试剂盒说明书进行, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行处理。

1.5 *Mr-RXR* 基因的 dsRNA 干扰

利用 SnapDrag (https://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl) 在线设计 RNAi 引物 (RXR-ds-F 和 RXR-ds-R), 引物信息见表 1, 引物 5' 端加上 T7 启动子序列: TAATACGACTCACTA TAGGG (RXR-ds-T7-F 和 RXR-ds-T7-R), 扩增含有 *Mr-RXR* 基因开放阅读框的 PCR 片段, 采用 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB) 制备 dsRNA, 纯化后置于 -80°C 冰箱备用。采用 60 尾规格均一 [(4.2 \pm 0.2) g] 的罗氏沼虾平均分为 2 组, RNAi 实验组按照 3 μg dsRNA/g 虾的剂量注

射 dsRNA, 对照组注射等体积的生理盐水, 实验组和对照组各设置 3 个平行。注射部位为第 5 腹足基部, 注射频率为 3 d 1 次, 实验周期为 12 d, 实验结束后解剖获取眼柄和肌肉组织, TRIzol 法提取 RNA, 通过 qRT-PCR 检测 *Mr-RXR* 基因干扰效率及 *MIH*、*EcR*、*E75* 和 *CHIT* 的表达水平。

1.6 数据分析

数据采用平均值±标准误的形式表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 采用 Duncan 氏多重比较进行组间差异分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 *Mr-RXR* 基因的克隆及序列分析

以罗氏沼虾仔虾全组织的混合 cDNA 为模板进行 3' 和 5' RACE, 扩增片段与课题组前期的转录组序列拼接, 得到完整的罗氏沼虾 *RXR* 基因的 cDNA, 命名为 *Mr-RXR* (GenBank 登录号: MZ501612)。基因序列信息如图 2 所示, 序列全长共 2 241 bp, 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 为 36 bp, 3' UTR 为 719 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 386 bp, 编码 461 个氨基酸, 分子质量为 50.6 ku, 理论等电点为 7.02。Mr-RXR 不稳定系数为 48.42, 亲水性总平均值 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.340, 推断其为不稳定的两性蛋白。经 BLASTx 分析和氨基酸同源性分析发现, *Mr-RXR* 与同属于十足目 (Decapoda) 的日本沼虾的 *RXR* 基因的氨基酸一致性最高, 为 96.3%, 与十足目其他物种一致性均高于 80%, 表明十足目物种 *RXR* 基因较为保守。

2.2 *Mr-RXR* 的结构与系统进化分析

NCBI 的保守结构域 (CDD) 数据库分析发现, 罗氏沼虾 *RXR* 存在 1 个 DBD_ *RXR* (130~211 aa) 结构域和 1 个 LBD_ *RXR*_like (232~434 aa) 结构域 (图 3-a), 且不含有信号肽序列和跨膜结构区, 表明罗氏沼虾 *RXR* 不属于分泌蛋白。蛋白质二级结构中 α -螺旋占 40.78%, 延伸链占 10.20%, β 转角占 4.12%, 无规则卷曲占 44.90%; I-TASSER 预测 3D 结构见图 3-b。

利用 DNAMAN 软件将罗氏沼虾 *RXR* 氨基酸序列与日本沼虾 (AHA33387.1)、日本囊对虾 *Mar-supenaesus japonicus* (BAF75376.1)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*, AGG55291.1)、美洲螯龙虾

(*Homarus americanus*, AGI15961.1)、蓝蟹 (AET-06182.1)、中华绒螯蟹 (AHF65152.1)、三疣梭子蟹 (AHJ81363.1)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*, ALM98948.1) 的氨基酸序列进行同源比对, 发现罗氏沼虾 *RXR* 氨基酸序列从 N 到 C 端具有 4 个功能区, 即转录激活结构域 (A/B 区), DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD, C 区), 铰链区 (D 区) 和配体结合域 (ligand binding domain, LBD, E/F 区), 9 种甲壳动物 *RXR* 的转录激活结构域差异较大, DNA 结合域高度保守, 均含有 P-box 与 D-box, 并且含有 2 个型锌指结构和 2 个 α 螺旋, 铰链区具有保守的 T-box, 但日本囊对虾与罗氏沼虾 *RXR* 的 T-box 较其他甲壳动物多 5 个氨基酸残基, 配体结合域中 E 区较为保守, 9 种甲壳动物在该区均含有保守的转录激活结构域 (AF-2), F 区最短且保守性最低 (图 4)。

基于以上 9 种甲壳动物以及红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*, AJT60337.1)、中国明对虾 (ACN78601.1)、斑节对虾 (*P. monodon*, APP913 26.1)、招潮蟹 (AAC32789.3)、印度谷螟 (*Plodia interpunctella*, AAT44330.1)、大黄粉虫 (*Tenebrio molitor*, CAB75361.1)、西方蜜蜂 (*Apis mellifera*, NP_001011634.1)、无刺蜜蜂 (*Melipona scutellaris*, AAW02952.1)、铜绿蝇 (*Lucilia cuprina*, AAG015 69.1)、家蚕 (*Bombyx mori*, NP_001037470.1)、斑马鱼 *RXR α* (*Danio rerio*, Q90415.1)、斑马鱼 *RXR β* (Q7SYN5.1)、斑马鱼 *RXR γ* (Q90416.2)、野猪 *RXR α* (*Sus scrofa*, ABC33911.1)、野猪 *RXR β* (CAN13298.1)、野猪 *RXR γ* (AAR96256.1)、非洲爪蟾 *RXR α* (*Xenopus laevis*, P51128.1)、非洲爪蟾 *RXR β* (NP_001080936.1)、非洲爪蟾 *RXR γ* (P51129.1)、大鼠 *RXR α* (*Rattus norvegicus*, CAL 25727.1)、大鼠 *RXR β* (AAH99776.1)、大鼠 *RXR γ* (NP_113953.1)、人 *RXR α* (*Homo sapiens*, AAH 63827.1)、人 *RXR β* (NP_068811.1)、人 *RXR γ* (NP_008848.1)、小鼠 *RXR α* (*Mus musculus*, NP_035435.1)、小鼠 *RXR γ* (NP_033133.1) 的 *RXR* 或 USP 氨基酸序列, 采用 MEGA 6.0 软件以 Neighbor Joining 法构建系统进化树 (图 5)。结果显示, 脊椎动物的 *RXR* 可分为 α 、 β 和 γ 3 种亚型, 而昆虫和甲壳动物的 USP 或 *RXR* 无亚型的区分, 甲壳动物中的 12 个物种聚为一大支, 并细分为 4 小支, 罗氏沼虾与同属于真虾下目 (Caridea) 长臂虾科 (Palaemonidae) 沼虾属 (*Macrobrachium*) 的日本沼虾聚为一支, 表明其亲缘关系最近。此外, 螯

```

1          1          2          3          4          5          6          7          8          9          10         11         12         13         14         15         16         17         18         19         20         21         22         23         24         25         26         27         28         29         30         31         32         33         34         35         36         37         38         39         40         41         42         43         44         45         46         47         48         49         50         51         52         53         54         55         56         57         58         59         60         61         62         63         64         65         66         67         68         69         70         71         72         73         74         75         76         77         78         79         80         81         82         83         84         85         86         87         88         89         90         91         92         93         94         95         96         97         98         99         100        101        102        103        104        105        106        107        108        109        110        111        112        113        114        115        116        117        118        119        120        121        122        123        124        125        126        127        128        129        130        131        132        133        134        135        136        137        138        139        140        141        142        143        144        145        146        147        148        149        150        151        152        153        154        155        156        157        158        159        160        161        162        163        164        165        166        167        168        169        170        171        172        173        174        175        176        177        178        179        180        181        182        183        184        185        186        187        188        189        190        191        192        193        194        195        196        197        198        199        200        201

```

图 2 罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

cDNA 序列中大写字母代表开放阅读框, 小写字母代表 5' 和 3' 非编码区, 黑色方框内为起始密码子和终止密码子, 黑色下划线表示多聚腺苷酸加尾信号和 polyA 信号, 蓝色下划线表示 DBD 保守结构域, 红色下划线表示 LBD 保守结构域。

Fig. 2 Nucleotide sequences and deduced amino acids sequences of *Mr-RXR* in *M. rosenbergii*

Uppercase letters in cDNA represent open reading frame, lowercase letters represent the 5' and 3' noncoding regions, black frames indicate the start codon and stop codon, respectively, black underline indicates poly adenosine tail signal and polyA tail sequence, blue underline indicates DBD conserved domain, red underline indicates LBD conserved domain.

虾下目 (Astacidea) 中的红螯光壳螯虾与美洲螯龙
虾聚为一支, 短尾下目 (Brachyura) 中的中华绒螯

蟹、招潮蟹、蓝蟹和三疣梭子蟹聚为一支, 枝鳃
亚目 (Dendrobranchiata) 对虾科的中国明对虾、斑

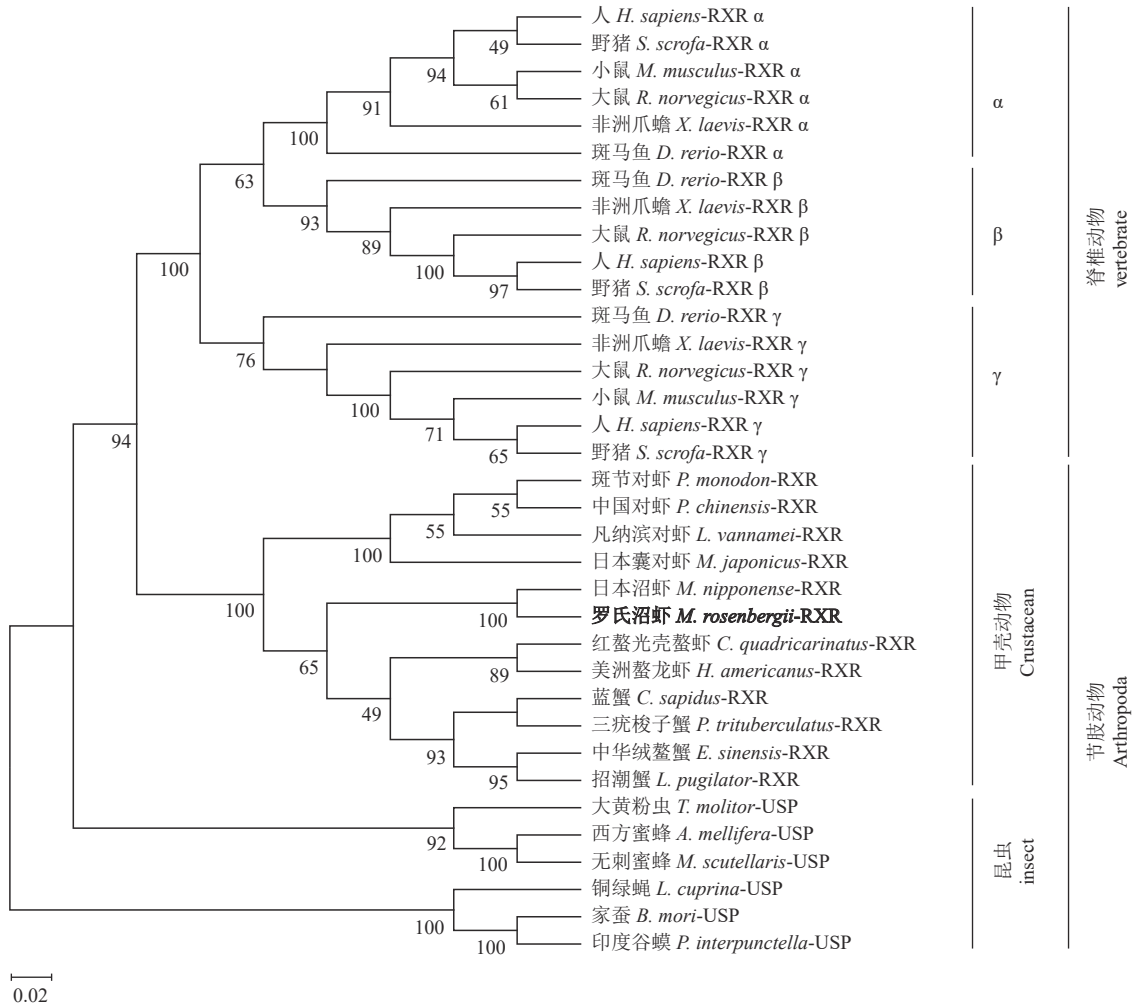


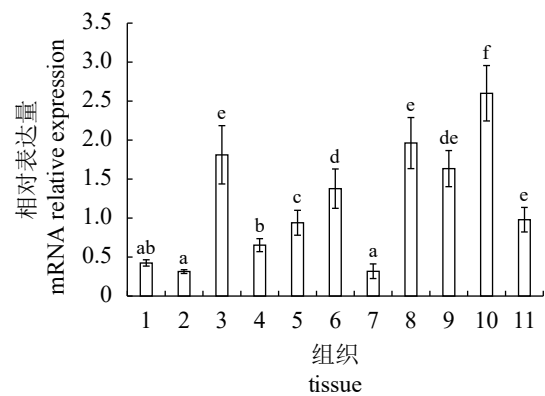
图5 RXR/UPS 氨基酸序列系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences of RXR or UPS

节对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾聚为一支，甲壳动物的 RXR 氨基酸在进化上较为接近，且系统进化树结果与物种分类地位一致。

2.3 不同组织、不同蜕皮阶段蜕皮相关基因表达分析

采用 qRT-PCR 分析罗氏沼虾 11 个组织中 *Mr-RXR* 的表达水平，结果发现，*Mr-RXR* 在检测组织中普遍表达，其中精巢、眼柄、脑、心脏和肌肉组织中表达量较高，鳃、肝胰腺、胃组织中表达量较低 (图 6)。为进一步分析 *Mr-RXR* 基因调控罗氏沼虾蜕皮发生的作用机制，选取不同蜕皮周期 (蜕皮后期、蜕皮间期和蜕皮前期) 罗氏沼虾的眼柄和肌肉组织，分析 *Mr-RXR*、*MIH*、*EcR*、*E75*、*CHIT* 基因表达，以蜕皮间期 *Mr-RXR* 的表达为标准样本进行相对定量分析。结果显示，大部分基因的表达水平在眼柄和肌肉组织中存在差异，且

图6 *Mr-RXR* 基因在罗氏沼虾组织中的表达模式

1. 胃, 2. 鳃, 3. 脑, 4. 腹神经节, 5. 肠道, 6. 肌肉, 7. 肝胰腺, 8. 眼柄, 9. 心脏, 10. 精巢, 11. 卵巢; 不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Tissue expression analysis of *Mr-RXR* in *M. rosenbergii*

1. stomach, 2. gill, 3. brain, 4. abdominal ganglion, 5. intestine, 6. muscle, 7. hepatopancrease, 8. eyestalk, 9. heart, 10. testis, 11. ovary; different letters indicated significant differences, $P < 0.05$.

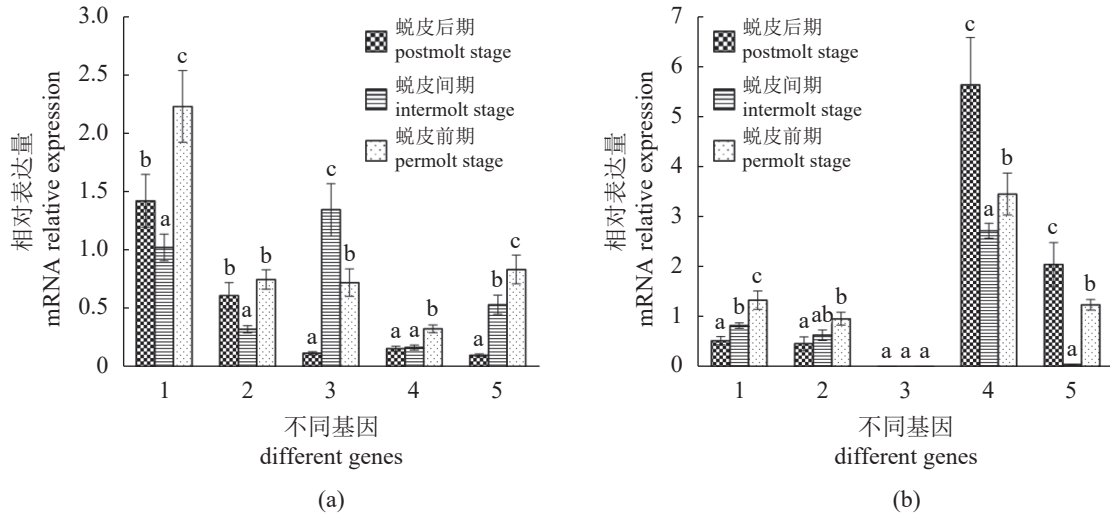


图7 不同基因在罗氏沼虾不同蜕皮阶段的表达情况

(a) 眼柄, (b) 肌肉; 1. *RXR*, 2. *ECR*, 3. *MIH*, 4. *E75*, 5. *CHIT*; 不同字母代表同一基因不同蜕皮阶段表达量存在显著差异, $P < 0.05$; 下同。

Fig. 7 Expression analysis of genes in *M. rosenbergii* at different molting stages

(a) eyestalk, (b) muscle; 1. *RXR*, 2. *ECR*, 3. *MIH*, 4. *E75*, 5. *CHIT*; different letters indicate the significant difference in the expression level of the same gene between different molting stages, $P < 0.05$; the same below.

随蜕皮周期改变 (图 7), *Mr-RXR* 和 *EcR* 基因表达模式基本同步, 眼柄和肌肉组织中的表达量均在蜕皮前期最高; *E75* 和 *CHIT* 基因表达模式较为相似, 眼柄组织中蜕皮前期 > 蜕皮间期 > 蜕皮后期, 肌肉组织中蜕皮后期 > 蜕皮前期 > 蜕皮间期; *MIH* 基因只在眼柄组织表达, 蜕皮间期表达量最高, 蜕皮后期表达量最低。

2.4 *Mr-RXR* 基因沉默对罗氏沼虾蜕皮相关基因表达的影响分析

采用 $3 \mu\text{g}$ dsRNA/g 实验虾的剂量进行 RNAi

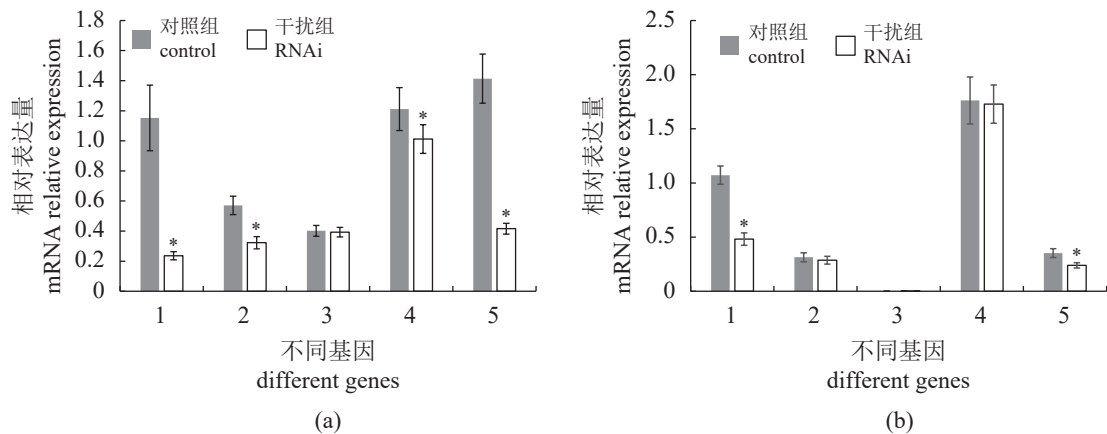


图8 *Mr-RXR* 基因干扰后蜕皮相关基因表达模式

干扰周期为 12 d, *代表同一基因表达量在对照组和干扰组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 8 Expression pattern of genes in *M. rosenbergii* after interferenc of *Mr-RXR*

Interference period is 12 days, * indicate the significant difference in the expression level of the same gene between control group and RNAi group ($P < 0.05$).

水平降低, 其中 *CHIT* 基因表达量下降至对照组的 29%; 肌肉组织中, *Mr-RXR* 干扰对 *EcR* 和 *E75* 表达水平影响不大, 仅 *CHIT* 表达量下降至对照组的 68%。

3 讨论

本研究采用 RACE 技术克隆获得罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因的 cDNA 全长序列, 其分子结构与其他物种 RXR 较为相似, 由转录激活结构域 (A/B 区)、DNA 结合域 (DBD, C 区)、铰链区 (D 区) 和配体结合域 (LBD, E/F 区) 4 个功能区组成。序列对比发现, 甲壳动物 C 区氨基酸序列保守性最高, 包含罗氏沼虾在内的 8 种甲壳动物 C 区均具有 9 个半胱氨酸和 2 个锌指结构, 用于 DNA 的识别与结合。2 个锌指结构处分别含有 P-box 和 D-box 结构, P-box 决定与 DNA 结合的特异性^[21], 其氨基酸序列高度保守, 用于序列比对的 8 种甲壳动物序列均为 EGCKG, 该序列信息与花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[22]、褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*)^[23] 等脊椎动物完全相同。D-box 结构调控同型 RXR 二聚体的形成^[18], 其氨基酸保守性较 P-box 弱, 在比对的 8 种甲壳动物中, D-box 氨基酸存在 CREER 和 CREDR 两种序列, D-box 氨基酸序列的改变在脊椎动物不同物种及同一物种不同亚型中也有发现^[22-23]。除 P-box 和 D-box 结构外, RXR 的 D 区存在具有 DNA 识别作用的 T-box 结构^[17], 其氨基酸序列在不同物种或同一物种不同亚型之间也存在一定差异, 然而与 D-box 不同的是, T-box 的变化主要表现为氨基酸的插入, 在比对的 8 个甲壳动物中, 日本囊对虾和罗氏沼虾的 T-box 区内有 5 个氨基酸的插入, 相似的结果在日本囊对虾^[18]、花鲈^[22] 和斑马鱼^[24] 中也有发现, 其插入氨基酸数分别为 15、18 和 8 个。D-box 和 T-box 是调控 RXRs 二聚体识别 DNA 的重要因子^[25], 其氨基酸序列的差异可影响 RXRs 二聚体识别不同的直接重复序列结构 (direct repeats, DR)。例如, RXR 的 D-box 与 RAR 的 T-box 结合, RXR/RAR 异源二聚体识别 DR2, RXR 的 D-box 与 RXR 的 T-box 结合, 则 RXR 同源二聚体识别 DR1^[26]。因此推测, 不同物种或同一物种不同亚型 RXR 可能通过 D-box 和 T-box 氨基酸序列的差异, 影响 RXRs 二聚体识别的序列, 进而影响下游基因的表达, 发挥不同功能。

RXR 作为核受体家族成员, 普遍存在于动物体内, 在个体生长发育、细胞分化、新陈代谢等生理活动中起重要调控作用^[27-29]。脊椎动物 RXR 包含 RXR α 、RXR β 和 RXR γ 三个亚型, 表现出不同的组织特异性表达模式, 发挥不同的生理作用。例如大鼠中 RXR α 主要调控营养物质 (如脂类和维生素) 的代谢, 在代谢器官 (如肝脏) 中高表达^[30], RXR β 影响神经鞘质发育和睾丸生理功能, 在神经系统和生殖系统等组织中高表达^[31], RXR γ 参与调控细胞的增殖分化和神经信号传导, 主要在上皮组织、神经系统中表达^[32]。罗氏沼虾 *Mr-RXR* 基因在眼柄、心脏、胰腺、肌肉、鳃、腹神经节、肠道、胃、脑、卵巢和精巢 11 个组织中均有表达, 推测罗氏沼虾多个组织可能均存在 *Mr-RXR* 的靶基因, *Mr-RXR* 可能参与调控罗氏沼虾多种生理活动。目前, 甲壳动物 RXR 基因功能研究尚处于起步阶段, 现有研究主要集中于 RXR 基因的克隆与组织特异性表达分析。前期研究认为, 甲壳动物 RXR 与 *EcR* 可形成二聚体, 介导由蜕皮激素调控的蜕皮活动。本研究发现, 罗氏沼虾眼柄和肌肉组织中, *RXR* 与 *EcR* 的表达水平随蜕皮周期发生变化, 且表达模式较为相似, 蜕皮前期表达量最高, 这与中华绒螯蟹、中国明对虾等甲壳动物研究结果一致^[13, 17], 此蜕皮阶段蜕皮信号通路初级应答转录因子 (*E75*) 和水解甲壳动物外壳中的甲壳素的几丁质酶 (*CHIT*) 基因表达水平也较高。此外, RNAi 诱导 *Mr-RXR* 基因沉默可显著降低罗氏沼虾 *EcR*、*E75* 和 *CHIT* 基因表达, 以上研究结果表明, 罗氏沼虾可能通过调控 *EcR*、*E75* 和 *CHIT* 蜕皮相关基因的表达, 影响罗氏沼虾蜕皮的发生。值得注意的是, 罗氏沼虾体内 *Mr-RXR* 的沉默并未影响 *MIH* (蜕皮抑制激素) 基因的表达, 推测 *Mr-RXR* 可能不参与蜕皮抑制激素的调控。

组织特异性分析显示, *Mr-RXR* 在罗氏沼虾性腺组织中表达量较高 (精巢是表达量最高的组织), 相似的表达模式在日本囊对虾^[18]、侧身地蟹^[14] 等甲壳动物中亦有发现, 推测 *RXR* 在甲壳动物性腺发育中起重要调控作用, *RXR* 对性腺发育的调控功能在软体动物中也有报道^[33]。如疣荔枝螺 (*Thais clavigera*) 中阴茎和输精管 *RXR* 的表达量显著高于其他组织, 且在有机锡暴露导致的疣荔枝螺性畸变个体中, 阴茎和输精管 *RXR* 基因表达

量显著高于正常个体, 暗示了 RXR 对软体动物正常雄性个体和性畸变个体性器官分化的调控作用^[34]。除性腺外, *Mr-RXR* 在罗氏沼虾心脏、脑、眼柄组织中大量表达, 采用 RNAi 诱导 *RXR* 沉默可导致个体死亡, *RXR* 沉默后致死的现象在小鼠中也有报道, 小鼠中 *RXR* 基因的缺失可导致心室心肌发育异常, 最终引发死亡^[35], 罗氏沼虾中 *Mr-RXR* 基因在心脏组织中表达水平较高, 可能参与调控心脏生理活动, 然而 *Mr-RXR* 基因沉默导致罗氏沼虾个体死亡是否与心脏有关仍需进一步探究。罗氏沼虾中肝胰腺组织 *Mr-RXR* 表达量最低, 推测该基因可能较少地参与罗氏沼虾营养代谢, 该结果与三疣梭子蟹相似, 但是在中国明对虾^[17]、中华绒螯蟹^[13] 和日本囊对虾^[18] 中, 肝胰腺组织中 *RXR* 基因表达均处于较高水平, 这种组织特异性表达水平的差异可能与发现的 *RXR* 基因种类或转录本不同有关。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Zou E M. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: a current review[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 293: 113470.
- [2] 李旭光, 周刚, 谷孝鸿. 水生甲壳类蜕皮发生过程及其影响因素的研究与进展[J]. *动物学杂志*, 2014, 49(2): 294-302.
Li X G, Zhou G, Gu X H. Review of aquatic crustaceans molting and its influencing factors[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2014, 49(2): 294-302 (in Chinese).
- [3] 王文青, 朱小玲. 日本沼虾不同亚型维甲酸类X受体(RXR)cDNA克隆及序列分析[J]. *淡水渔业*, 2010, 40(1): 3-10.
Wang W Q, Zhu X L. cDNA Cloning and sequence analysis of retinoid X receptor (RXR) isoforms of the prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(1): 3-10 (in Chinese).
- [4] 王伟, 吴旭干, 楼宝, 等. 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[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(5): 1105-1114.
Wang W, Wu X G, Lou B, et al. Cloning of retinoid X receptor (RXR) and its expression analysis during molting in *Portunus trituberculatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(5): 1105-1114 (in Chinese).
- [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): 8-10,108.
Yao J J, Zhao Y L. Regulation mechanisms of molting in crustaceans[J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(6): 8-10,108 (in Chinese).
- [6] Weiner A C, Chen H Y, Roegner M E, et al. Calcium signaling and regulation of ecdysteroidogenesis in crustacean Y-organs[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 314: 113901.
- [7] Legrand E, Bachvaroff T, Schock T B, et al. Understanding molt control switches: transcriptomic and expression analysis of the genes involved in ecdysteroidogenesis and cholesterol uptake pathways in the Y-organ of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0256735.
- [8] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3-5): 196-203.
- [9] Techa S, Chung J S. 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[J]. *Gene*, 2013, 527(1): 139-153.
- [10] Gouveia D, Bonneton F, Almunia C, et al. Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3793.
- [11] Sin Y W, Kenny N J, Qu Z, et al. Identification of putative ecdysteroid and juvenile hormone pathway genes in the shrimp *Neocaridina denticulata*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 214: 167-176.
- [12] King-Jones K, Thummel C S. Nuclear receptors-a perspective from *Drosophila*[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(4): 311-323.
- [13] 王瑶, 杨志刚, 沈城, 等. 中华绒螯蟹*EcR*基因全长cDNA克隆及表达分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(5): 651-661.
Wang Y, Yang Z G, Shen C, et al. The full length cDNA cloning and expression analysis of *EcR* from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 651-661 (in Chinese).
- [14] 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 and Cellular Endocrinology*, 2005, 242(1-2): 80-95.
- [15] Wu X H, Hopkins P M, Palli S R, et al. Crustacean retinoid-X receptor isoforms: distinctive DNA binding and receptor-receptor interaction with a cognate ecdysteroid receptor[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 218(1-2): 21-38.

- [16] Li Z, Wang W Q, Zhang E F, *et al.* Identification of spliced mRNA isoforms of retinoid X receptor (RXR) in the oriental freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(2): 3914-3926.
- [17] Priya T A J, Li F H, Zhang J Q, *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 and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 121-129.
- [18] 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 japonicus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(2): 139-150.
- [19] 卢徐斌, 姜群, 闵悦, 等. 罗氏沼虾蜕皮周期的划分及蜕皮频率对生长的影响[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(6): 88-93.
- [20] Lu X B, Jiang Q, Min Y, *et al.* Molt staging and the effect of molting frequency on growth of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(6): 88-93 (in Chinese).
- [21] Jiang Q, Min Y, Yang H, *et al.* De novo transcriptome analysis of eyestalk reveals ovarian maturation related genes in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 280-288.
- [22] Devarakonda S. Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(21): 5827-5840.
- [23] 童彩环, 钱云霞, 郑伟贤. 鲈3种视黄醇类X受体基因cDNA的克隆和组织表达[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1761-1769.
- [24] Tong C H, Qian Y X, Zheng W X. Molecular cloning, tissue-specific expression of three retinoid X receptors of *Lateolabrax japonicus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12): 1761-1769 (in Chinese).
- [25] He C Y, Wang C G, Li B W, *et al.* Tissue-specific and embryonic expression of the retinoid X receptors in *Sebastes marmoratus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(2): 221-228.
- [26] Tallafuss A, Hale L A, Yan Y L, *et al.* Characterization of retinoid-X receptor genes *rxra*, *rxrba*, *rxrbb* and *rxrg* during zebrafish development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(5): 556-565.
- [27] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3): 1269-1304.
- [28] Rastinejad F, Wagner T, Zhao Q, *et al.* Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(5): 1045-1054.
- [29] Chen L Q, Wu L J, Zhu L Y, *et al.* Overview of the structure-based non-genomic effects of the nuclear receptor RXR α [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2018, 23: 36.
- [30] Krężel W, Rühl R, de Lera A R. Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2019, 491: 110436.
- [31] Li B X, Cai S Y, Boyer J L. The role of the Retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2021, 1867(5): 166085.
- [32] Gyamfi M A, Tanaka Y, He L, *et al.* Hepatic effects of a methionine-choline-deficient diet in hepatocyte RXR α -null mice[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 234(2): 166-178.
- [33] Huang J K, Jarjour A A, Oumesmar B N, *et al.* Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination[J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(1): 45-53.
- [34] König R, Stillfried M, Aperdanner P, *et al.* Expression of retinoid X receptor beta is induced in astrocytes during corpus callosum demyelination[J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2012, 43(2): 120-132.
- [35] 李维, 王淑红, 王艺磊, 等. 软体动物维甲酸X受体研究进展[J]. *动物学杂志*, 2013, 48(4): 655-664.
- [36] Li W, Wang S H, Wang Y L, *et al.* Retinoid X receptor in mollusc[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2013, 48(4): 655-664 (in Chinese).
- [37] Horiguchi T, Nishikawa T, Ohta Y, *et al.* Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *Thais clavigera*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84(3): 379-388.
- [38] Sucov H M, Dyson E, Gumeringer C L, *et al.* RXR α mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(9): 1007-1018.

Cloning and effect of *RXR* on molting-related genes expression in *Macrobrachium rosenbergii*

JIANG Qun, GAO Weifeng, XU Wenjing, JI Peng, GU Shuwen,
ZHANG Yingjie, GAO Xiaojian, ZHANG Xiaojun*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Like all arthropods, crustaceans shed the exoskeleton periodically through their life cycle, which is called ecdysis. Molting occurs throughout the life cycle of crustaceans and significantly influences their growth, reproduction, and survival. This physiological event is regulated by several hormones, in which ecdysteroids are the important part. The effect of ecdysteroids is mediated by a heterodimer of ecdysone receptor (EcR) and retinoid X receptor (RXR) homolog, ultraspiracle (USP) in insects or RXR in crustaceans. EcR/RXR or EcR/USP complex could bind to response elements to elicit expression of early ecdysone responsive genes, such as *E75*, and eventually to regulate downstream transcriptional ecdysteroid cascade reaction. RXR, belonging to a nuclear receptor family, plays an important role in the regulation of molting. In recent years, RXR has been identified in several crustaceans, such as *Eriocheir sinensis*, *Callinectes sapidus*, *Gecarcinus lateralis*, *Leptuca pugilator*, *Macrobrachium nipponense* and so on. However, most of the studies focused on the cloning and specific expression analysis among different tissues or different molting stages, its regulation of other molting-related genes remains unclear. Therefore, this study identified a retinoid X receptor (RXR) in *M. rosenbergii* termed *Mr-RXR* and further investigated its regulation function through its mRNA expression analysis at different molting stages and RNA interference (RNAi). The full length of the *Mr-RXR* was 2241 bp, consisting of a 36 bp 5' UTR (untranslated regions), a 719 bp 3'-UTR, and a 1386 bp ORF (open reading frame). It encoded 461 amino acids with a predicted molecular weight of 50.6 ku and the theoretical isoelectric point of 7.02. *Mr-RXR* showed high similarity to other crustaceans with conserved DNA binding domain (DBD) and ligand binding domain (LBD). Phylogenetic analyses showed that the RXR of crustaceans clustered in a group, with the closest relationship between *M. rosenbergii* and *M. nipponense*. The expression of *Mr-RXR* was detected in 11 tissues of *M. rosenbergii*, including the stomach, gill, brain, abdominal ganglion, intestine, muscle, hepatopancreas, eyestalk, heart, testis, and ovary. The result showed that *Mr-RXR* was expressed in all tissues with relatively high expression level in the testis, eyestalk, heart, brain, muscle, and relatively low expression in the gill, hepatopancreas and stomach. The expression level of *Mr-RXR* changes at different molting stages, showing the highest level at premolt stages in both eyestalk and muscle tissues. Besides, the temporal expression of four molting-related genes, including *EcR*, *E75*, *CHIT* and *MIH*, were also examined. The expression pattern of *EcR* followed the same trend as *Mr-RXR*, while *E75* and *CHIT* showed similar mRNA expression patterns with the highest level at premolt and postmolt in the eyestalk and muscle tissues, respectively. *MIH* was only expressed in eyestalk, reaching its peak at intermolt. To further investigate the function of *Mr-RXR*, RNAi was conducted for 12 days, which caused the death of 63% of individuals. The expression of *Mr-RXR* was extremely reduced and the efficiency of silence was 79% and 55% in the eyestalk and muscle, respectively. In the eyestalk, *Mr-RXR* dsRNA injection did not alter the expression of *MIH*, but significantly reduced the expression of *EcR*, *E75* and *CHIT*. In the muscle, however, RNAi of *Mr-RXR* only induced significantly declined expression of *CHIT*. The correlation between *Mr-RXR* and other molting-related genes indicated that *Mr-RXR* might be involved in the regulation of *EcR*, *E75* and *CHIT* transcription and further mediate the molting process in *M. rosenbergii*. Results in this study contribute to better understanding of the mechanism of molting in crustaceans.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; *RXR* gene; molting; expression analysis; RNA interference (RNAi)

Corresponding author: ZHANG Xiaojun. E-mail: zxj9307@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32002386); Revitalizing of Seed Industry - Oriented Projects (JBGS[2021]120); Armarked Fund for Jiangsu Agricultural Industry Technology System [JATS (2021) 505]