

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171220003

http://www.yykxjz.cn/

宋雪松, 徐永江, 柳学周, 史宝, 王滨, 刘永山, 张雅星. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种视黄酸受体RAR α 和RAR γ 克隆及组织表达特性. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 52-64

Song XS, Xu YJ, Liu XZ, Shi B, Wang B, Liu YS, Zhang YX. Molecular cloning and spatial expression of two retinoic acid receptors RAR α and RAR γ from *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 52-64

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种视黄酸受体 RAR α 和 RAR γ 克隆及组织表达特性*

宋雪松^{1,2} 徐永江¹ 柳学周^{1①} 史宝¹
王滨¹ 刘永山^{1,2} 张雅星^{1,2}

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种视黄酸受体 RAR α 和 RAR γ 的 cDNA 全长序列, 并采用定量 PCR 技术分析了其组织表达特性。半滑舌鳎 RAR α cDNA 序列全长为 1823 bp, 编码 443 个氨基酸; RAR γ cDNA 序列全长为 1959 bp, 编码 489 个氨基酸。同源性分析显示, 半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ 同源性高达 60.8%, 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)同源性高达 97.0%, 具有较强的进化保守性。系统进化分析显示, 半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ 分别归属于单独的分支, 且与其他鱼类聚合成簇。组织表达分析显示, RAR α mRNA 在肾中表达量最高, 而 RAR γ mRNA 在脾中表达量最高, RAR α 和 RAR γ mRNA 在其他组织中均有表达, 表明半滑舌鳎 2种 RAR 都可能参与多种生理过程调控。半滑舌鳎 2种 RAR mRNA 在有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤中的表达量依次升高, 且发现 RAR α 在正常有眼侧皮肤的表达高于 RAR γ , 而 RAR γ 在无眼侧正常皮肤中的表达显著高于 RAR α , 无眼侧黑化皮肤中 RAR α 表达高于 RAR γ 。RAR 基因在有眼侧和无眼侧皮肤组织中的差异表达可能和 RA/RAR 系统调节体色有关。

关键词 半滑舌鳎; 视黄酸受体; 基因克隆; 表达模式; 无眼侧黑化

中图分类号 TS201.4; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0052-13

视黄酸(Retinoic acid, RA)是一种脂溶性小分子物质, 又称维甲酸, 是维生素 A(V_A)在机体内经过一系列水解和酶催化作用生成的最终代谢产物。视黄酸合成进入细胞后先与重组人胞内维甲酸结合蛋白-1

(CRABP1)和 CRABP2 蛋白结合, 转运进入细胞核, 形成核受体二聚体, 调节相关基因的表达(Budhu *et al.*, 2002)。RA 的作用是通过定位在靶细胞核内的特异性受体介导的。目前, 已发现两类视黄酸受体: 视黄酸

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017GH05; 2018GH17)、国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)、国家自然科学基金(31502145; 31602133)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022017016)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS) (2017GH05; 2018GH17), China Agricultural Research System (CARS-47), National Natural Science Foundation of China (31502145; 31602133), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017016)]. 宋雪松, E-mail: 746284973@qq.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-20, 收修改稿日期: 2018-01-29

受体(RAR)和视黄酸 X 受体(RXR), 作为配体激活的转录因子(Chambon, 1996)。RAR 是一类细胞核受体, 属于类固醇和甲状腺激素受体超家族, 其通过与 RXR 形成异源二聚体(RAR/RXR), 增加与视黄素应答元件的亲合力, 由此加强本身的转录活性和对配体的敏感性(Kliewer *et al*, 1992; Hallenbeck *et al*, 1992)。哺乳动物 RAR 有 3 种亚型: RAR α 、RAR β 和 RAR γ , 配体为顺式视黄酸(9-cis-RA)和反式视黄酸(ATRA)(Brand *et al*, 1988), 但鱼类中目前没有发现 RAR β 亚型的存在(Jones *et al*, 1995)。研究发现, RA/RAR 系统具有抑制肿瘤生长、保护上皮组织、促进胚胎骨骼心脏功能和视觉发育功能(De Luca, 1991; Zhou *et al*, 2017; Isojima *et al*, 2014), 并且在抑制细胞凋亡(Herget *et al*, 1998)和免疫调节(Erkelenz *et al*, 2017)也有重要生理作用, 是机体维持稳态的重要因子。

RA 及其受体 RAR 系统在鱼类中的研究较少(Faehnrich, 2016; Zhang *et al*, 2013; 冷向军, 2017)。在鲆鲽类中, RA/RAR 系统对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)骨骼发育和眼睛位移等变态发育过程(Haga *et al*, 2002; Martinez *et al*, 2007), 对塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)(Ignacio *et al*, 2009)和大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)(Lewis-McCrea *et al*, 2010)骨骼发育畸形都具有重要的生理调控作用。对牙鲆的研究表明, 利用 9-cis-RA 或者 ATRA 处理变态前仔鱼, 可以通过 RA/RAR 信号通路的介导作用抑制鱼苗眼睛完成位移。同时发现, 牙鲆和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)皮肤的 RA 浓度在有眼侧皮肤高于无眼侧皮肤, 且光照可通过 RA/RAR 信号通路诱导牙鲆无眼侧色素过度沉着(黑化), 表明 RA/RAR 信号通路在半滑舌鳎、牙鲆的体色左右不对称发育模式中起重要调控功能(Shao *et al*, 2017), 但 RA/RAR 系统对半滑舌鳎体色调控的具体机制仍待进一步研究。

半滑舌鳎属鲆形目、舌鳎科、舌鳎属, 为我国近海自然分布的重要经济鱼类, 自人工繁育技术取得突破以来, 其养殖产业得到快速发展, 已成为鲆鲽类三大主导养殖品种之一(邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2006、2014)。养殖生产中发现, 半滑舌鳎无眼侧黑化(色素沉积过多)问题日益凸显, 而无眼侧发生黑化的商品鱼市场价格较无眼侧正常鱼价格低 20% 以上, 成为制约半滑舌鳎养殖产业经济效益的瓶颈之一。目前, 国内外对半滑舌鳎无眼侧黑化发生的相关机制鲜有报道, 本实验室前期研究了半滑舌鳎体色相关功能基因 POMC、MCHR 与 MCH 等的克隆、表达调控及其与体色的关系(史学营等, 2015、2017; 朱学武等,

2016; 徐永江等, 2017), 为认识半滑舌鳎无眼侧体色调控机制积累了资料。本研究拟开展半滑舌鳎 RAR 结构及其表达特性研究, 以期探究 RA/RAR 系统在养殖半滑舌鳎无眼侧黑化调控中的作用机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及样品处理

实验用半滑舌鳎于 2017 年 6~8 月取自山东省海阳市黄海水产有限公司。取样实验鱼 3 尾(都存在一定程度无眼侧黑化), 体长为(33 \pm 3) cm, 体重为(237 \pm 30) g, 用于 RAR 基因克隆与组织表达特性分析。实验鱼以 MS-222 (280 mg/L)麻醉后, 快速取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧正常皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤组织投入液氮速冻后, 转入-80 $^{\circ}$ C 保存, 用于总 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂盒并按照操作说明提取各组织样品总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, NanoDrop 2000 (Thermo, 美国)测定 RNA 浓度。取适量鳃组织总 RNA, 以 PrimeScriptTM II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链。以 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, 美国)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第 1 链, 用于 RAR 基因 RACE 全长克隆。取等量各组织样品的总 RNA, 用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链, 用于 RAR mRNA 组织表达特性及分析。各操作步骤均严格按照使用说明书进行。

1.3 总 RNA 提取和中间片段扩增

根据 GenBank 登记的 XM_017034299.1、XM_008318896.2 预测半滑舌鳎 RARs 序列保守区设计特异引物(表 1), 以肝脏组织为模板, 扩增 RAR α 基因的核心序列, PCR 反应体系(25 μ l): 0.2 μ l *Taq* 酶、2.5 μ l 10 \times PCR Buffer、2 μ l dNTP Mixture、0.5 μ l 模板、1 μ l RAR α -F、1 μ l RAR α -R、17.8 μ l ddH₂O。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增 RAR γ 基因的模板为脾脏, PCR 反应体系和条件同 RAR α ; PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T1 载体(北京全式

表 1 半滑舌鲷 RAR 基因克隆使用的 PCR 扩增引物
Tab.1 Primers used for PCR amplification of RAR of *C. semilaevis*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
RaRa-F1	GGTTCTTCAGGCGGAGCAT	中间片段克隆 1 段
RaRa-R1	TGTGGCTGGACTGCTTTGG	
RaRa-F2	GCCCACCTACTCTACTTCTTCC	中间片段克隆 2 段
RaRa-R2	GCACTCCTGCTTCTTCTCATCCT	
RaR γ -F	GTATCCCTTCGCCTTCAAC	中间片段克隆
RaR γ -R	CACTGTGCCCTCCCAA	
RaRa1	GGGCGGGCTTGGCACTATCTC	5'-RACE PCR
RaRa2	GGGTGGGAAGAAGTAGGAGTAGGTG	
RaRa1	CTACACGCCAGAGCAGGACA	3'-RACE PCR
RaRa2	ACTTGGAGCAGGCGGATAAA	
RaR γ 1	GCGATGGTGAGGGTGGTGAAT	5'-RACE PCR
RaR γ 2	GAGAACTGGGCACCATCTCCTCT	
RaR γ 1	CCTTTGGAAATGGACGATACGG	3'-RACE PCR
RaR γ 2	CTCCTCAGTGCCATCTGCCTCA	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCA	5'和 3'-RACE PCR
NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
qRaRa-F	GTGTGGAGATCGCCAGGACTTG	RaRa qPCR
qRaRa-R	TGATGCTCCTCAGGTCGGTGAT	
qRaR γ -F	CAGTTCTCCGTCTCCACCTCCA	RaR γ qPCR
qRaR γ -R	GCGGTTGCGTGTGACCTTGT	
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	内参基因
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	

金生物公司)连接,转化至 Trans1-T1 感受态细胞(全式金),LB 固体培养基 37℃ 培养过夜,挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序;RAR 的中间序列已上传 NCBI 数据库(RAR α 登录号:MG596268;RAR γ 登录号:MG596269)。

1.4 RAR 的 RACE 扩增

根据克隆验证的中心片段设计 RACE 引物。用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech,美国)进行梯度 PCR 扩增。第 1 次 PCR,反应体系:17 μ l ddH₂O、2.5 μ l Buffer、2 μ l 50 \times dNTP Mix、0.5 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix、1 μ l cDNA、引物 RAR α 1 1 μ l 和 1 μ l UPM,共计 25 μ l。设计 Touchdown PCR,反应条件为 94℃ 30 s,66℃ 30 s,72℃ 2 min,15 个循环, T_m 值每 5 个循环降低 2℃;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,20 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。以第 1 次 PCR 产物稀释 10 倍为模板,进行巢式 PCR,反应体系:17 μ l ddH₂O、2.5 μ l Buffer、2 μ l 50 \times dNTP Mix、0.5 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix、1 μ l cDNA、1 μ l NPM 和 1 μ l RAR α 2 引物,共

计 25 μ l。PCR 反应条件同第 1 次 PCR。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的条带进行胶回收、载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。RAR γ 反应体系与条件同 RAR α 。

1.5 RAR mRNA 定量表达分析

根据获得的半滑舌鲷 RAR α 和 RAR γ 的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物 qRAR α 和 qRAR γ (表 1),以 18S 为内参。利用 Mastercycler ep realplex real-time PCR 仪(Eppendorf,德国),使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa)进行定量扩增,PCR 体系(20 μ l):1 μ l cDNA 模板、上下游引物各 0.8 μ l (10 μ mol/L)、10 μ l SYBR Premix Ex Taq™ II 和 7.4 μ l dd H₂O。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 5 s,58℃ 20 s、共 40 个循环。每个样品测试设置 3 个重复。RAR mRNA 的表达量以 18S mRNA 表达量为基础,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算获得(Livak *et al*, 2001)。

1.6 序列分析及数据处理

半滑舌鲷 RAR 基因的结构、分子量预测、等电

点预测使用 ExPASy 在线数据库预测(www.expasy.org/tools/protparam.html); 氨基酸序列推导、序列拼接和氨基酸同源性分析均使用软件 DNAMAN 6.0, 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。亚细胞定位使用 PSORT II 软件(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)。结构域预测使用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalW 在线软件(<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)和 MEGA 7 软件。通过 SOPMA 软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)分析蛋白质二级结构, 通过 SWISS-MODEL 在线软件(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)分析预测蛋白质三级结构。

实验数据均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 多组数据间比较采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、Duncan 和 SNK 多重比较分析, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果

2.1 RAR cDNA 序列结构

半滑舌鳎 RAR α cDNA 序列全长为 1823 bp (图 1), 包括 17 bp 的 5' 非编码区(UTR)、1332 bp 的开放阅读框(ORF)和 474 bp 的 3' 非编码区(UTR), 编码 443 个氨基酸, 预测编码蛋白分子量为 49 kb, 等电点为 8.47。半滑舌鳎 RAR γ cDNA 序列全长为 1959 bp (图 2), 包括 305 bp 的 5'(UTR)、1497 bp 的 ORF 和 98 bp 的 3' (UTR), 编码 498 个氨基酸, 预测编码蛋白的分子量为 55.8 kb, 等电点为 4.99。预测 2 种 RAR 基因的亚细胞定位均位于细胞核。

2.2 RAR 编码蛋白质空间结构预测

通过 SOPMA 软件分析 RAR 编码蛋白的空间二级结构: 在 RAR α 成熟蛋白的二级结构中, α -螺旋占 34.31%, β -转角占 8.35%, 无规则卷曲占 43.12%, 延伸链占 14.22%。在 RAR γ 成熟蛋白的二级结构中, α -螺旋占 36.75%, β -转角占 9.44%, 无规则卷曲占 40.36%, 延伸链占 13.45%。通过 SWISS-MODEL 网站同源建模方法构建了半滑舌鳎 RAR 编码的蛋白质可能的三级结构, 以同源建模的方法与各自的 50 个 RA 核受体家族模板构建预测可能的蛋白质三级结构, RAR α 获得 6 种三级结构模型, 选取 GMQE 评价价值 0.55、QMEAN 稳定系数 -2.79(负值越大越稳定)构建模型; RAR γ 有 5 种, 选取 GMQE 评价价值 0.61,

QMEAN 稳定系数 -2.13 构建模型。三级结构模型显示(图 3), RAR 蛋白质分为 3 部分, 蓝色的 DBD 区和 LBD 区通过橘黄色的 D 区铰链区相连。

2.3 RAR 的氨基酸序列同源性比较

同源性分析显示, 半滑舌鳎 RAR α 的氨基酸序列与同属鲽形目的牙鲆的同源性最高, 为 97.0%, 其次为银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)92.2%、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*) 87.9%、斑马鱼(*Danio rerio*)86.8%、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)64.6%, 且与两栖类、爬行类、啮齿类、鸟类和人(*Homo sapiens*)的相似度分别为 79.6%、82.2%、80.5%、81.5%和 80.7%。半滑舌鳎 RAR γ 的氨基酸序列同样与牙鲆同源性最高, 达 97%, 与其他鱼类的同源性均达 90.5%以上, 与两栖类、啮齿类和人的相似度分别为 71.4%、84.5%和 80.7%。另外, 半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ 的氨基酸序列相似度为 60.8% (表 2)。

通过结构域预测发现, 半滑舌鳎与鲈鱼、人、斑马鱼具有相似的功能结构域, 都具有 DNA 结合区(DBD 区)和配体结合区(LBD)区。利用 ClustalW 对半滑舌鳎 RAR 的氨基酸序列与其他物种的 RAR 氨基酸序列进行了比较(图 4)。结果发现, 半滑舌鳎与其他鱼类 RAR 的氨基酸序列整体保守性较强, 除在 N 端的 A/B 区和 C 端的 F 区末尾保守型较差外, 中间的 DNA 与配体结合区保守度较高。

2.4 RARs 系统进化分析

利用 NJ 法构建了基于氨基酸序列的半滑舌鳎 RAR α 、RAR γ 和其他脊椎动物的系统进化树(图 5), 半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ 都分别与鲽形目、鲈形目、鲤形目等其他鱼类形成独立的分支, 而两栖类、哺乳类和爬行类形成独立的分支。

2.5 RAR mRNA 的组织表达特性

半滑舌鳎 2 种 RAR 基因在所有检测组织中都有表达。RAR α mRNA 在肾脏和眼中表达量最高, 与除胃的其他组织差异显著, 在胃中的表达也较高, 在脑、脾脏、鳃、无眼侧白皮肤、性腺、有眼侧肌肉、肠、心脏、无眼侧黑化皮肤、无眼侧肌肉、有眼侧皮肤等其他组织中也检测到一定的表达量。半滑舌鳎 RAR γ mRNA 在脾脏和鳃中表达量最高, 在心脏和肾脏表达量也较高, 与其他组织差异显著; 而在无眼侧白皮肤、脑、眼、胃、性腺、无眼侧黑化皮肤、无眼侧肌肉、垂体等其他组织表达量相对较低。在肾脏中, 2 种 RAR mRNA 表达水平都很高。脾脏、心脏、鳃、肾

```

17   ACA TGG ACT GAG CCG TC
1    ATG GCT GGG AAG GGC AAC CCA CAC CTC AAC GGC TTC CCC ATG CCC ACC TAC TCC TAC TTC
1    M  A  G  K  G  N  P  H  L  N  G  F  P  M  P  T  Y  S  Y  F
61   TTC CCA CCC ATG CTG GGA AGC CTG TCA CCT CCA GCT CTG CCA GGA CTG CCC ATC AGT GGG
21   F  P  P  M  L  G  S  L  S  P  P  A  L  P  G  L  P  I  S  G
121  TAC AGC ACC CCG TCA CCA GCC ACT ATC GAG ACC CAG AGT ACC AGC TCA GAG GAG ATA GTG
41   Y  S  T  P  S  P  A  T  I  E  T  Q  S  T  S  S  E  E  I  V
181  CCA AGC CCG CCC TCG CCT CCC CCA CCG CCC CGC GTC TAC AAA CCC TGC TTT GTG TGC CAG
61   P  S  P  P  S  P  P  P  P  P  R  V  Y  K  P  C  F  V  C  Q
241  GAC AAG TCC TCA GGG TAC CAC TAC GGT GTC AGC GCC TGC GAG GGC TGC AAG GGG TTC TTC
81   D  K  S  S  G  Y  H  Y  G  V  S  A  C  E  G  C  K  G  F  F
301  AGG CGG AGC ATC CAG AAG AAC ATG GTG TAT ACC TGT CAC CGG GAG AAG AAC TGT ATC ATC
101  R  R  S  I  Q  K  N  M  V  Y  T  C  H  R  E  K  N  C  I  I
361  AAC AAA GTC ACA CGC AAC CGC TGC CAG TAC TGT CGG CTG CAG AAG TGC CTG GAC GTG GGG
121  N  K  V  T  R  N  R  C  Q  Y  C  R  L  Q  K  C  L  D  V  G
421  ATG TCC AAG GAG TCA GTG AGG AAC GAC AGG AAC AAG AAG AAA AAG GAT GAG AAG AAG CAG
141  M  S  K  E  S  V  R  N  D  R  N  K  K  K  K  D  E  K  K  Q
481  GAG TGC ACG GAG AGC TAC GTG ATG ACT CCT GAC ACG GAG CAG ATG ATC GAC AGG GTC CGC
161  E  C  T  E  S  Y  V  M  T  P  D  T  E  Q  M  I  D  R  V  R
541  AAG GCC CAC CAG GAG ACT TTC CCC TCT CTC TGC CAG CTG GGC AAA TAC ACT ACG ACT AAC
181  K  A  H  Q  E  T  F  P  S  L  C  Q  L  G  K  Y  T  T  T  N
601  AGC TCA GAA CGA CGC GTG TCC TTG GAT GTA GAT CTG TGG GAC AAA TTC AGC GAC CTC TCC
201  S  S  E  R  R  V  S  L  D  V  D  L  W  D  K  F  S  E  L  S
661  ACC AAG TGC ATC ATC AAG ACG GTG GAG TTC GCC AAG CAG CTG CCA GGC TTC ACC ACG CTC
221  T  K  C  I  I  K  T  V  E  F  A  K  Q  L  P  G  F  T  T  L
721  ACC ATC GCT GAC CAG ATC ACT CTC CTC AAA GCA GCC TGT CTC GAC ATC CTG ATA CTG CGG
241  T  I  A  D  Q  I  T  L  L  K  A  A  C  L  D  I  L  I  R
781  ATC TGT ACA CGC TAC ACG CCA GAG CAG GAC ACC ATG ACC TTC TCC GAT GGA CTC ACG TTA
261  I  C  T  R  Y  T  P  E  Q  D  T  M  T  F  S  D  G  L  T  L
841  AAC CGG ACC CAG ATG CAC AAT GCC GGC TTC GGT CCC CTC ACT GAC TTG GTT TTT GCA TTT
281  N  R  T  Q  M  H  N  A  G  F  G  P  L  T  D  L  V  F  A  F
901  GCC AAT CAG CTT CTT CCT CTG GAG ATG GAC GAT GCA GAG ACA GGG CTC CTC AGC GCC ATC
301  A  N  Q  L  L  P  L  E  M  D  D  A  E  T  G  L  L  S  A  I
961  TGT TTG CTG TGT GGA GAT CGC CAG GAC TTG GAG CAG GCG GAT AAA GTG GAC GTC CTT CAG
321  C  L  L  C  G  D  R  Q  D  L  E  Q  A  D  K  V  D  V  L  Q
1021 GAG CCT CTA CTG GAG GCG CTG AAA ATT TAC GTG AGG AAA AGG AGG CCC CAC AAA CCG CAC
341  E  P  L  L  E  A  L  K  I  Y  V  R  K  R  R  P  H  K  P  H
1081 ATG TTC CCC AAG ATG CTG ATG AAG ATC ACC GAC CTG AGG AGC ATC AGT GCT AAA GGA GCT
361  M  F  P  K  M  L  M  K  I  T  D  L  R  S  I  S  A  K  G  A
1141 GAA CGG GTC ATC ACC CTG AAG ATG GAG ATT CCT GGC TCC ATG CCC CCT CTC ATC CAG GAG
381  E  R  V  I  T  L  K  M  E  I  P  G  S  M  P  P  L  I  Q  E
1201 ATG CTA GAA AAC TCT GAA GGT CTG GAG AGT GGG GCC ACG GGT AGT CGT GCC AGT GGC GCC
401  M  L  E  N  S  E  G  L  E  S  G  A  T  G  S  R  A  S  G  A
1261 CCC CCT GGT AGT TGC AGC TCC AGT CTC TCC CCA AGC TCT GCC CAA AGC AGT CCA GCC ACA
421  P  P  G  S  C  S  S  S  L  S  P  S  S  A  Q  S  S  P  A  T
1321 CAT TCA CCG TAG TAG GCA GTG GAA CTG GCT CGC TCT TTT TAT TTT TCC TCA CAG TGC TCT
441  H  S  P  *  *
1381 CTC TCC TCC TCC TTT CAA TGT CCT GAG GAG GAG GAG GAG CGA AGG AGG AAG GCC CTG ACT
1441 GTG ACT GCT GAA AAC AGG AGA CCT GCA GAG CCA ACC TCC TCC CTC TCC TAT CAC AGA GAT
1501 TCC CCA CCT CCT CAT CTG CTT TCT CTC ACT CTG GAA CAC CGT CCT GGC TTG AGG GTG AGG
1561 TAA AGT CAG GGC TGG CCA GGG AGG AGA CGG GGC GCC TCC TGG AGA CCA CAC CGT TAA CAC
1621 TGC TGA TGA TGA TGA TAA CTC CTC CAC GTC CTA CCA TTT TCC TCC TCA TCC TCT TTA CTG
1681 TTC TTG GAA AGA CTA ATA GAG ACT AAA CCT GGA CGA GGC AGA GAC CAG TGT GTG ATG GAG
1741 CTG AGT CTG GTC GGA GAG TGT AGG ACA AAT GTT TGG ACA AGA AAA AAA AAA AAA AAA
1801 AAA AAA

```

图 1 半滑舌鲷 RAR α 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence of *C. semilaevis* RAR α gene and its deduced amino acid sequence

推导的氨基酸序列用单字母表示，从阴影显示的起始甲硫氨酸开始计数。终止密码子用*表示。下同
The deduced amino acid residues were represented as single letter abbreviations and numbered from the initiating methionine which was shadowed. Termination codon was marked with *. The same as below

```

-305 GGT A
-301 TTT AGG TCT GTT ACG GCA GAC AGG GAG CAG CTC ACC CAA GGG CAG GGG GAG ACA GGG AGT
-241 CGG AGA CAA CAG TCA GCT CAG CCA GGC AGG AAC CAG ATC AGC AGT CCA GCT GAG GAG GAA
-181 AGA GAG AAA GTA GGA CAG TGT CAG GAC AGA ACA GGC AGA CGG AGG GAC AGT GAG ACA TAA
-121 GTG AGG ACA GCA GCT CCT GCT AGC TGT TGC TGC CGA CTG TTG TTG TCA CTG CCT CAG CCA
-61 GTG ACG TGA GCA GTG GAA GCA GGA CAG GAC AGG ACA GGA CAG GAC GCA GGC AGG ACA GGG
1 GGA CAG ACA GAC TGG TAG TGA TTT TCT CTG CTG TAG GTT GTG GCT GGT GGG AGG GCT GCC
1 ATG TTC GAC TGT ATG GAG GCT CTG GGA ATG GGC CCC CGT CAG CTG TAT GAT GTC AGC AGC
1 M F D C M E A L G M G P R Q L Y D V S S
61 CGC GGT GCG TGC ATG CTA CGG AAG GCA AGC CCC TTC TTT GCG GGG CTG AAC CCC TTC GCT
21 R G A C M L R K A S P F F A G L N P F A
121 TGG ACA GGC AGT GCG AGC ATT CAG TCC GTG GAG ACC CAG AGC ACC AGC TCA GAG GAG ATG
41 W T G S A S I Q S V E T Q S T S S E E M
181 GTG CCC AGT TCT CCG TCT CCA CCT CCA CGG CCT CGT GTC TAC AAA CCC TGC TTC GTG TGC
61 V P S S P S P P P P R V Y K P C F V C
241 CAG GAC AAG TCC TCG GGG TAC CAC TAT GGG GTC AGC TCC TGT GAG GGC TGC AAG GGA TTT
81 Q D K S S G Y H Y G V S S C E G C K G F
301 TTC CGC CGC AGC ATC CAG AAG AAC ATG GTG TAC ACC TGC CAC CGA GAC AAA AAC TGT CAG
101 F R R S I Q K N M V Y T C H R D K N C Q
361 ATC AAC AAG GTC ACA CGC AAC CGC TGT CAG TAC TGC AGG CTG CAG AAG TGC TTC GAG GTC
121 I N K V T R N R C Q Y C R L Q K C F E V
421 GGC ATG TCG AAG GAA GCC GTG CGC AAC GAC AGG AAC AAG AAG AAG GAG GAG GAG GAG
141 G M S K E A V R N D R N K K K K D V K E
481 GAG GTG GTG CTT CCT GAG AGC TAC GAA CTG AGC GGA GAG TTG GAG GAG TTG GTC AAT AAA
161 E V V L P E S Y E L S G E L E E L V N K
541 GTC AGC AAA GCC CAC CAA GAG ACG TGC CCC TCC CTC TGC CAG CTG GGC AAA TAC ACC ACC
181 V S K A H Q E T C P S L C Q L G K Y T T
601 AAC TCC AGT GCA GAG CAC CGT GTC CAG CTG GAT CTG GGT CTG TGG GAC AAG TTC AGT GAG
201 N S S A E H R V Q L D L G L W D K F S E
661 CTG TCC ACC AAG TGC ATC ATT AAG ATT GTG GAA TTT GCC AAA CGG CTG CCA GGA TTC ACC
221 L S T K C I I K I V E F A K R L P G F T
721 ACC CTC ACC ATC GCA GAC CAG ATC ACT CTG CTG AAG TCG GCC TGT CTG GAC ATA CTG ATG
241 T L T I A D Q I T L L K S A C L D I L M
781 CTG AGG ATC TGT ACA CGC TAC ACT CCA GAA CAG GAC ACT ATG ACC TTC TCA GAT GGT CTG
261 L R I C T R Y T P E Q D T M T F S D G L
841 ACT CTG AAC CGG ACT CAG ATG CAC AAC GCT GGG TTT GGA CCG CTC ACA GAC CTG GTG TTT
281 T L N R T Q M H N A G F G P L T D L V F
901 GCC TTT GCT GGT CAG CTT CTA CCT TTG GAA ATG GAC GAT ACG GAA ACT GGC CTC CTC AGT
301 A F A G Q L L P L E M D D T E T G L L S
961 GCC ATC TGC CTC ATC TGT GGA GAT CGT ATG GAT CTA GAA GAA CCC CAG AAA GTG GAC AAA
321 A I C L I C G D R M D L E E P Q K V D K
1021 CTC CAA GAA CCT CTA CTG GAG GCT CTG AAG ATC TAC GCC CGC CGC CGT CGC CCC AAC AAA
341 L Q E P L L E A L K I Y A R R R R P N K
1081 CCT CAC ATG TTC CCC CGC ATG CTG ATG AAG ATC ACT GAC CTC AGG GGA ATC AGC ACC AAA
361 P H M F P R M L M K I T D L R G I S T K
1141 GGT GCA GAG AGA GCC ATC ACT CTG AAG ATG GAG ATC CCA GGT CCG ATG CCG CCT CTG ATC
381 G A E R A I T L K M E I P G P M P P L I
1201 AGA GAG ATG CTG GAG AAC CCC GAG GCG TTC GAG GAC CAA ACA GAG TGC AAC GAC AGC CCG
401 R E M L E N P E A F E D Q T E C N D S P
1261 CCC CCA CCT CCG CCA CCT CCG CCG CCA GCT ACA GTG AAG CAG GAA GCC GAG GAC GAG GAC
421 P P P P P P P P P A T V K Q E A E D E D
1321 GAC AGC TGG GCT ACG GAA AAC GGC AGC GAG CCT TCA CCG GAG GAG GAG GAC GAG GAC GAC
441 D S W A T E N G S E P S P E E E D E D D
1381 GAT GAT GAC GTG GGA GAC GAG AGA GAC AGG GGC TCG GAC AGT GAC GGG GAG TCC TGG
461 D D D V G D E E R D R G S D S D G E S W
1441 GGG GCT CTG GAT GCC ATC GAT GGG GCG AGG AAA GGC CTT TTT GGG AGG GCA CAG TGA ACA
481 G A L D A I D G A R K G L F G R A Q *
1501 CAG CAT TTC ATA CAC ACA ATC ACG CAC TCA CAC ACA CAC GTT ACA CAC ACA CAC A CA CAC
1561 ACA CAC ACA CAC GCA AAA AAA AAA AAA AAA AA

```

图 2 半滑舌鳎 RAR γ 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列Fig.2 The full-length cDNA sequence of *C. semilaevis* RAR γ gene and its deduced amino acid sequence

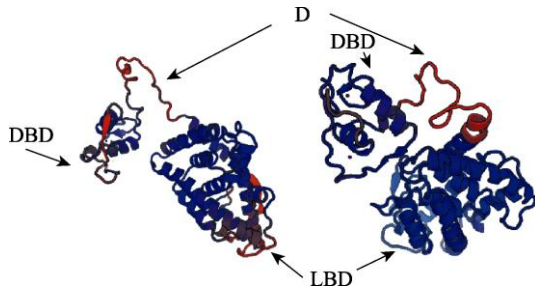


图 3 SWISS-MODEL 预测的半滑舌鳎 RAR α (左)和 RAR γ (右)蛋白质三级结构

Fig.3 Tertiary structure of *C. semilaevis* RAR α (left) and RAR γ (right) proteins predicted by SWISS-MODEL

脏、无眼侧白皮肤等组织中 RAR γ mRNA 表达量高于 RAR α ，而在眼、胃、肠、性腺、肌肉、肝脏、有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤等组织中，RAR α mRNA 表达量高于 RAR γ ，脾脏、心脏、鳃和肾脏组织中 RAR γ 与 RAR α 表达差异显著，而其他组织中 RAR γ 与 RAR α 表达差异不显著。脑中 2 种 RAR mRNA 表达量基本一致，表明这 2 种 RAR 基因在不同组织中的

生理功能可能存在差异，即使在同一组织中其生理功能也多存在一定的差异(图 6)。

分析有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧白皮肤中 2 种 RAR 基因 mRNA 的表达情况(图 7)，发现无眼侧白皮肤的 2 种 RAR mRNA 的表达量最高，其次为无眼侧黑化皮肤，最低的为有眼侧皮肤，其中，RAR γ 表达差异显著。RAR γ 在无眼侧未黑化皮肤中的表达显著高于 RAR α ($P < 0.05$)，而在正常有眼侧皮肤和无眼侧黑化皮肤中，RAR α 的表达高于 RAR γ ，表明可能 RAR α 和 RAR γ 对皮肤组织中色素的调控作用具有不同的调控机制。

3 讨论

本研究获得了半滑舌鳎 RAR 的 2 个亚型 RAR α 和 RAR γ cDNA 序列全长，并研究了其组织表达特性，为研究 RA/RAR 系统对体色异常调控提供了基础材料。本研究获得了半滑舌鳎 2 个 RAR 亚型的结构，预测未发现跨膜结构和信号肽(Napoli, 1996)。同其他

表 2 半滑舌鳎 RAR 氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较

Tab.2 Comparison of homology of the precursor peptide sequences of RAR gene between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank accession No.	与 RAR α 同源性 Homology with RAR α (%)	与 RAR γ 同源性 Homology with RAR γ (%)
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i> - α	MG596268	100	60.80
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i> - γ	MG596269	60.80	100
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> - α	XP_019964742.1	97.00	75.30
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> - γ	XP_019951749.1	63.40	97.00
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> - α	ABF22438.1	64.60	94.60
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> - γ	NP_001027925.1	63.30	95.80
鲈鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i> - α	AEU04706.1	87.90	70.80
鲈鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i> - γ	AEU04705.1	64.30	95.80
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> - α	NP_571481.2	86.80	70.70
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> - γ	CAM16092.1	65.70	90.50
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> - α	NP_001164665.1	79.60	71.70
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> - γ	NP_001081663.1	71.20	84.40
银大麻哈 <i>Oncorhynchus kisutch</i> - α	XP_020309254.1	92.20	71.40
银大麻哈 <i>Oncorhynchus kisutch</i> - γ	XP_020315261.1	64.20	91.10
小鼠 <i>Mus musculus</i> - α	NP_001169999.1	80.50	69.50
小鼠 <i>Mus musculus</i> - γ	AAA40036.1	68.60	84.50
人 <i>Homo sapiens</i> - α	NP_001019980.1	80.70	70.10
人 <i>Homo sapiens</i> - γ	AAA52692.1	69.60	80.70
野猪 <i>Sus scrofa</i> - α	XP_003131521.1	80.10	69.30
鸡 <i>Gallus gallus</i> - α	NP_989867.1	81.50	70.40
北美绿蜥蜴 <i>Anolis carolinensis</i> - α	XP_003222505.1	82.20	70.10

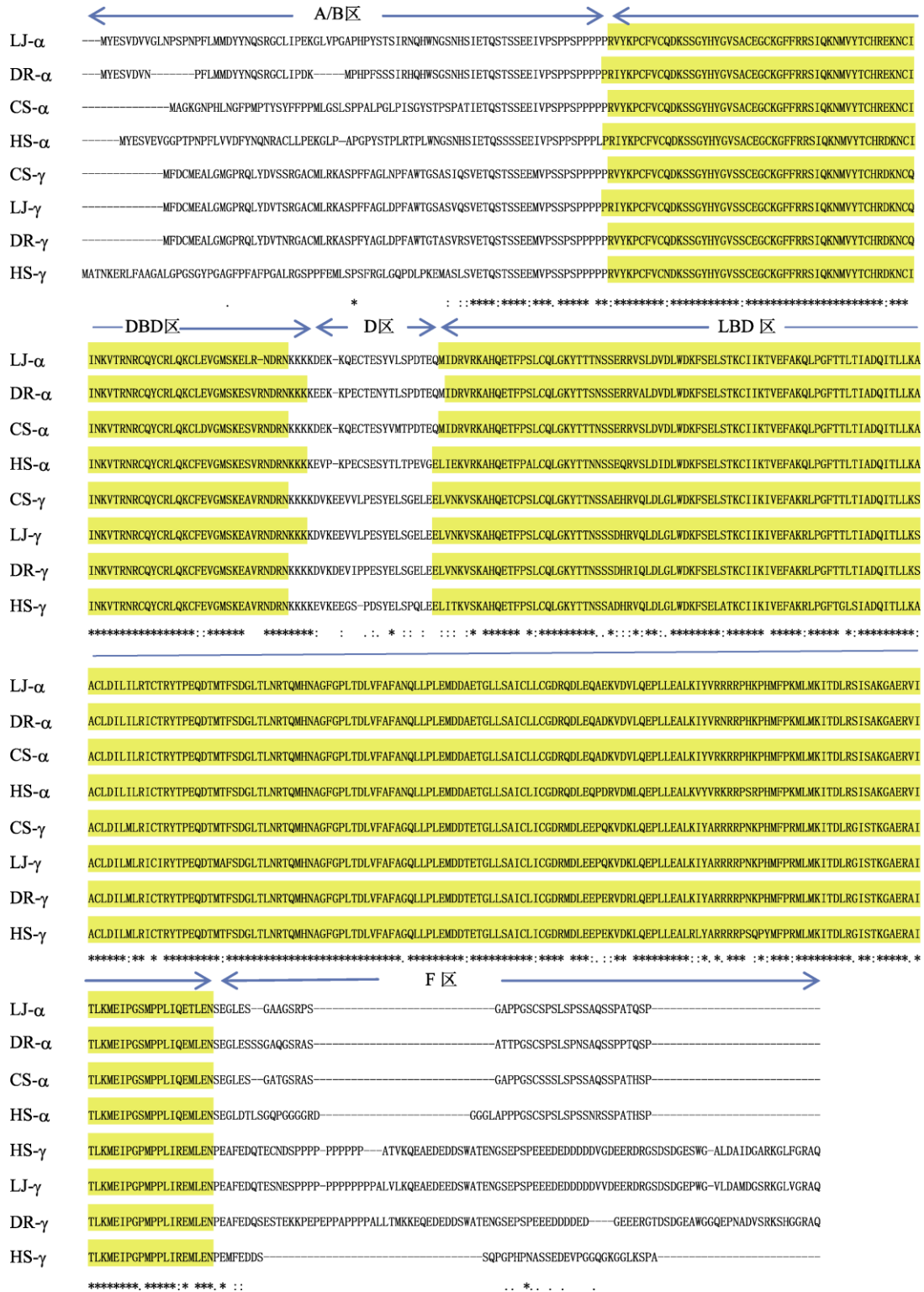


图 4 半滑舌鲷与其他物种的 RAR 氨基酸序列比较

Fig.4 Comparison of the amino acid sequences of *C. semilaevis* RAR and other species

“*”表示一致的氨基酸; “.”表示高度保守度的氨基酸; “.”表示低保守度的氨基酸; 阴影部分表示 DBD 和 LBD 功能结构域; RAR 氨基酸序列号见表 2; CS: 半滑舌鲷; DR: 斑马鱼 LJ: 鲈鱼; HS: 人 Asterisks (*) indicated identical amino acid sequences; Dot (.) indicated highly conserved amino acid sequences; Dot (.) indicated amino acid sequences of low degree conserved; GenBank accession numbers were shown in Tab.2. The shadow part represents the DBD and LBD functional domains

CS: *Cynoglossus semilaevis*; DR: *Danio-erio*; LJ: *Lateolabrax-japonicus*; HS: *Homo sapiens*

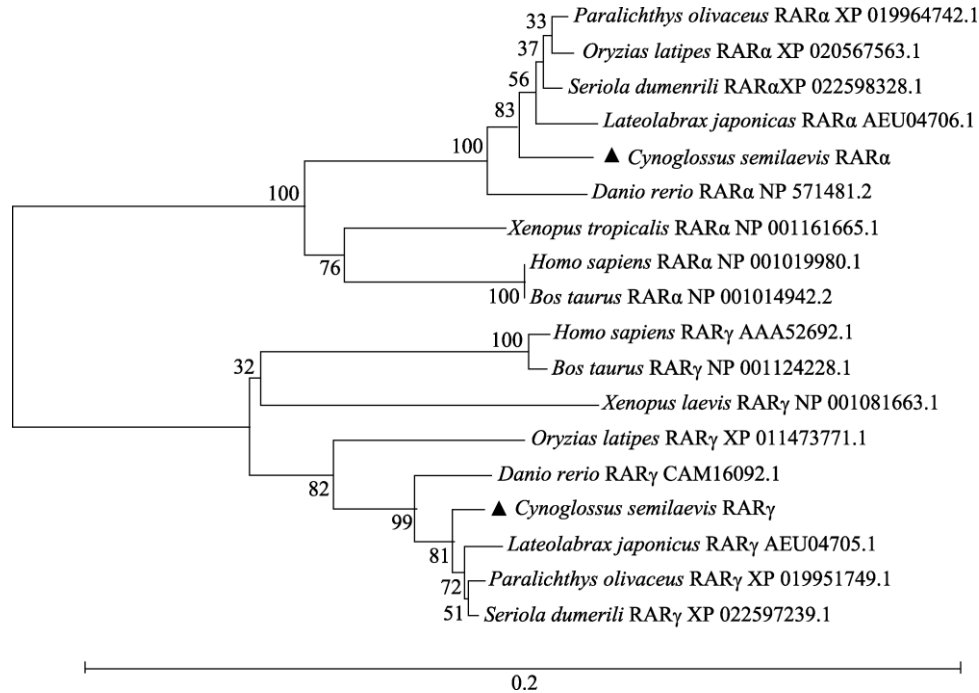


图 5 基于 RAR 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.5 NJ phylogenetic tree based on RAR amino acid sequences

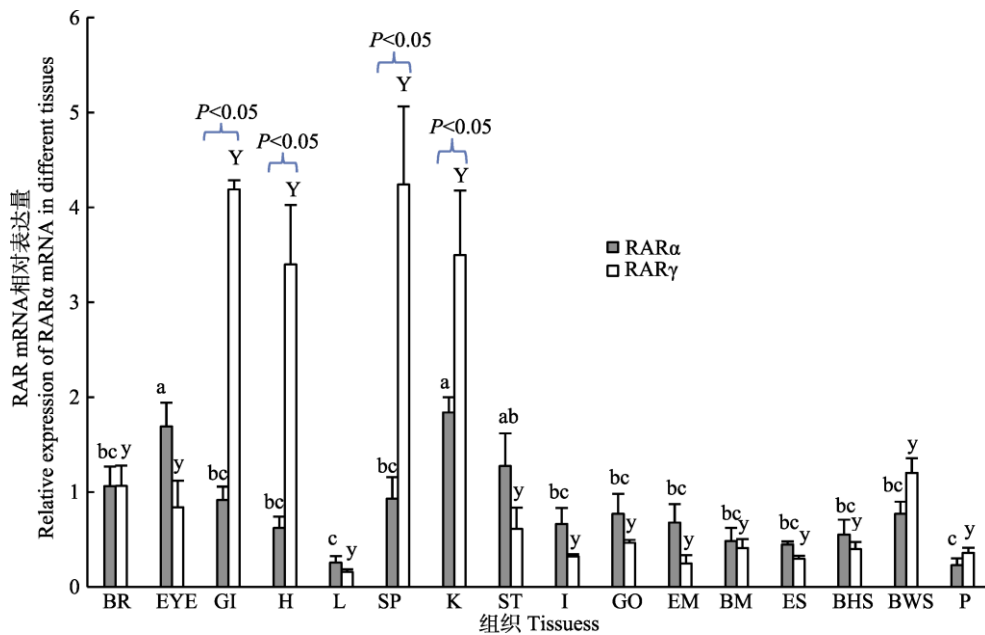


图 6 半滑舌鳎 RAR mRNA 在不同组织中的相对表达量

Fig.6 Relative expression of RAR mRNA in different tissues of *Cynoglossus semilaevis*

BR: 脑; EYE: 眼; GI: 鳃; H: 心脏; L: 肝脏; SP: 脾脏; K: 肾脏; ST: 胃; I: 肠; GO: 性腺; EM: 有眼侧肌肉; BM: 无眼侧肌肉; ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤; BWS: 无眼侧白皮肤; P: 垂体。不同组织表达差异分析中 Y 和 y 字母代表单独分析 RAR γ 的 2 个显著差异集合, RAR α 单独分析使用 a、b、c, 代表 3 个显著差异集合, 同一组 2 种基因表达显著差异 ($P < 0.05$) 用大括号表示, 下同

B: Brain; EYE: Eye; GI: Gill; H: Heart; L: Liver; SP: Spleen; K: Kindey; ST: Stomach; I: Intestine; GO: Gonad; EM: Eye-side muscle; BM: Blind-side muscle; ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side hypermelanosis skin; BWS: Blind-side white skin; P: Pituitary. In different tissue expression analysis, Y and y letters represent two distinct different sets of RAR γ analysis separately, RAR α analysis alone, a, b and c represent three significant different sets. The significant difference in the expression of two genes in the same tissue is expressed in braces ($P < 0.05$), the same as below

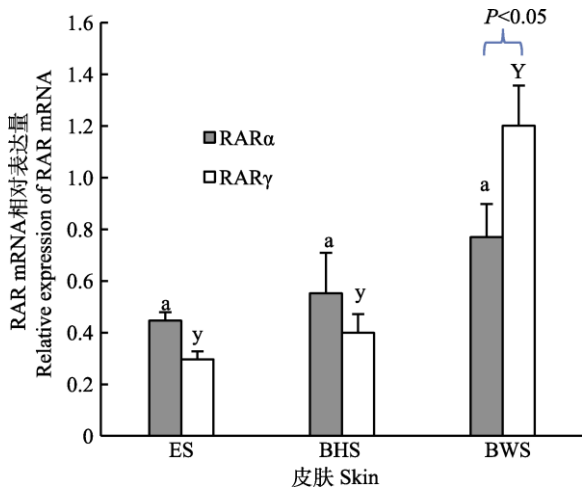


图 7 半滑舌鳎 RAR mRNA 在皮肤组织中的相对表达量

Fig.7 Relative expression of RAR mRNA in the skin of *Cynoglossus semilaevis*

ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤;
BWS: 无眼侧白皮肤

ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side hypermelanosis skin;
BWS: Blind-side white skin

脊椎动物一致, 半滑舌鳎 RAR 具备 A~F 共 6 个功能域, 在进化过程中高度保守, 其中, C 区最为保守, 具有锌指结构功能的为 DBD 区。E 区在配体结合中起辅助作用, 形成疏水氨基酸残基。D 区作为铰链连接 DBD 和 LBD (Leid *et al*, 1992)。同源性分析表明, 半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ 的氨基酸序列与牙鲆的同源性最高, 达 97%, 与其他鱼类、两栖类、爬行类、啮齿类和人的氨基酸同源性也处于较高水平, 表明其在进化过程中保守性较强。同时, 本研究显示, 半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ 的氨基酸同源性达 60.8%, 但在进化树上属于 2 个不同的进化分支, 表明在进化过程中 2 种 RAR 受体基因出现了进化差异。

本研究发现, 半滑舌鳎 2 种 RAR 基因 mRNA 在所有检测组织中均有表达, 表明其均具有广泛的生理作用。RAR α mRNA 在肾脏中表达量最高, 表明肾脏可能为其主要靶器官, 而同时在眼、脑和胃中的表达量高于其他组织, 表明 RAR α 在这些组织器官的生理功能中都可能起重要的调控作用, 这种组织表达分布特征与斑马鱼 (Joore *et al*, 1994)、鲈鱼 (钱云霞等, 2012) 以及哺乳动物 (Meng *et al*, 2011) RAR α 的组织表达特性相似。另外, 半滑舌鳎 RAR γ mRNA 的主要靶器官为脾脏和鳃, 同时, 在心脏和肾脏中均有高表达量, 表明 RAR γ 主要在这些器官中起重要的表达调控作用。2 种 RAR 受体 mRNA 都在肾脏中具有高表达, 推测肾脏可能是 RA/RAR 信号通路的重要作用靶点, 具体作用方式有待于下一步深入研究。对虹鳟 (*Oncorhynchus*

mykiss) 的研究结果表明, 鳃是 RAR 的主要表达器官, 推测与其较高的新陈代谢速率有关, 也可能与 RAR 调节细胞生长与凋亡功能相关 (Alsop *et al*, 2001)。本研究也发现, 鳃中 2 种 RAR 受体基因的表达量较高, 但其具体的生理功能有待于进一步研究。在对鸡 (*Gallus gallus*) 的 RAR γ 研究中, 发现鸡与哺乳动物有相似的表达特异性, 即 RAR γ 表达高度限制在皮肤中 (Michaille *et al*, 1994), 然而, 半滑舌鳎 RAR 表达在皮肤和肌肉相对其他组织较少, 这种组织分布的差异主要可能是由种的差异引起的。

本研究中, 比较了有眼侧皮肤、无眼侧白皮肤和无眼侧黑化皮肤中 2 种 RAR 基因 mRNA 的表达情况和两者的相互关系, 发现在正常有眼侧皮肤中和在无眼侧黑化皮肤中 RAR α 的表达略高于 RAR γ , 而在无眼侧未发生黑化的皮肤中, RAR γ 的表达却显著高于 RAR α 。先前对半滑舌鳎色素细胞的研究表明, 黑色素与虹彩细胞等的数量分布以有眼侧皮肤中最多, 无眼侧黑化皮肤中其次, 而无眼侧白皮肤中无黑色素细胞分布 (史学营等, 2015)。这种不同状态的皮肤组织中 RAR 转录产物表达与黑色素细胞分布的关系表明, RAR γ 与 RAR α 均参与了半滑舌鳎皮肤组织中黑色素细胞的生长发育与分布调控过程, 但其在皮肤组织中黑色素细胞的形成方面具有差异表达调控作用。与 RAR γ 相比, RAR α 与皮肤中黑色素细胞的生长及数量分布调控可能具有更为密切的关系。今后应结合鲆鲽类黑色素相关基因 (如 MCH、MCHR、POMC 等) 的表达和作用机理进行深入研究, 探讨它们之间的相互作用关系。

在牙鲆研究中, RARs 与配体 ATRA 结合作用于苗种骨骼变态和体色沉着 (Haga *et al*, 2003)。Shao 等 (2017) 通过转录组研究发现, 牙鲆和半滑舌鳎有眼侧皮肤 ATRA 和 9-cis-RA 浓度均高于无眼侧皮肤, 但两侧皮肤中 RAR 和 RXR 的基因表达没有明显差异。本研究未能测定不同类型皮肤中的 RAR 配体浓度, 是否是配体浓度梯度的差异导致受体基因表达量的差异有待于今后深入研究。结合本研究 RAR 在皮肤中的分布, 推测半滑舌鳎 RAR 可能与黑色素细胞的发育及分布具有不同的关系。已有研究证明, 在斑马鱼中存在 RAR α -a 和 RAR α -b 亚型 (Hale *et al*, 1993), 而半滑舌鳎基因组预测其具有 RAR α 、RAR β 和 RAR γ 三种亚型, 同时, 每一种亚型又有数种不同的分子形式 (Chen *et al*, 2014), 开展 RAR 基因在不同组织器官中的表达特征和可能的生理功能研究有助于阐明 RA/RAR 系统在无眼侧黑化发生的机理。本研究中, 还发现半滑舌鳎 RAR α 和 RAR γ mRNA 在肾脏、脾

脏、脑、眼、胃、无眼侧白皮肤、性腺等组织中同时具有高表达,且在不同的组织中 2 种受体基因表达量不同,表明半滑舌鳎 2 种 RAR 基因在不同的组织中生理功能不同。Shao 等(2017)在成年牙鲆两侧皮肤中发现,感光视蛋白对光照刺激有应答反应,在光刺激下会影响配体 RA 在体两侧的浓度差,作用于 RA/RAR 系统导致无眼侧发生黑化。工厂化养殖环境中发现,幼鱼通过补充 RAR 的配体 RA 控制了鲆鲽类有眼侧无黑色素沉着现象(白化),而过量的 RA 补充却会导致无眼侧黑色素沉着过多(黑化)(Miwa *et al.*, 1999)。研究发现,改变光照(Shao *et al.*, 2017)、铺沙(Estevez *et al.*, 2001)、栖息环境颜色(Takahashi *et al.*, 2004)和养殖密度(Bolker *et al.*, 2000)等也会影响无眼侧黑色素沉着,且这些外源刺激都与摄食 RA 或通过眼和皮肤的感光视蛋白接收刺激产生 RA,从而调控 RAR 表达,并最终作用于鲆鲽类的体色沉着有一定关系。Isojima 等(2014)研究表明,鲆鲽类体色发生与分布受到多种基因表达调控。深入开展 RA/RAR 系统对体色的调控作用及其信号通路的系统研究将有助于揭示半滑舌鳎无眼侧黑化的分子调控机制。

参 考 文 献

- Alsop D, Brown S, Kraak GVD. Development of a retinoic acid receptor-binding assay with rainbow trout tissue: Characterization of retinoic acid binding, receptor tissue distribution, and developmental changes. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 123(3): 254–267
- Bolker JA, Hill CR. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(5): 1029–1052
- Brand N, Petkovich M, Krust A, *et al.* Identification of a 2nd human retinoic acid receptor. *Nature*, 1988, 332(6167): 850–853
- Budhu AS, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Molecular & Cellular Biology*, 2002, 22(8): 2632–2641
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*, 1996, 10(9): 940–954
- Chen SL, Zhang GJ, Shao CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB Journal*, 1991, 5(14): 2924–2933
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Composition and quantity distribution of the Bohai Sea fish species. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 11–89 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. *海洋水产研究*, 1988(9): 11–89]
- Erkelens MN, Mebius RE. Retinoic acid and immune homeostasis: A balancing act. *Trends in Immunology*, 2017, 38(3): 168–180
- Estevez A, Kaneko T, Seikai T, *et al.* Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism. *Aquaculture*, 2001, 202(1): 131–143
- Faehrich B, Lukas B, Humer E, *et al.* Phytogetic pigments in animal nutrition: Potentials and risks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(5): 1420–1430
- Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T, *et al.* A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2003, 221(1): 381–392
- Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T, *et al.* Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science*, 2002, 19(10): 1105–1112
- Hale LA, Tallafuss A, Yan YL, *et al.* Characterization of the retinoic acid receptor genes RAR α , RAR β and RAR γ during zebrafish development. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(5): 546–555
- Hallenbeck PL, Marks MS, Lippoldt RE, *et al.* Heterodimerization of thyroid hormone (TH) receptor with H-2RIIBP (RXR beta) enhances DNA binding and TH-dependent transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1992, 89(12): 5572–5576
- Herget T, Specht H, Esdar C, *et al.* Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line. *Journal of Neurochemistry*, 1998, 70(1): 47–58
- Ignacio F, Matas P, Juanb OD, *et al.* Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 2009, 295(3–4): 250–265
- Isojima T, Tagawa M. Transplantation of pigmented and non-pigmented scales into the ocular and blind sides of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, suggesting the presence of ocular-side characteristic inducer in pigmented scales. *Fisheries Science*, 2014, 80(5): 1027–1035
- Jones BB, Ohno CK, Allenby G, *et al.* New retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-cis retinoic acid. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(10): 5226–5234
- Joore J, van der Lans GB, Lanser PH, *et al.* Effects of retinoic acid on the expression of retinoic acid receptors during zebrafish embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 1994, 46(2): 137–150
- Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, *et al.* Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling

- pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 1992, 358(6389): 771–774
- Leid M, Kastner P, Chambon P, *et al.* Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, 1992, 17(10): 427–460
- Leng XJ. Research advance in vitamin nutrition of aquatic animals. *Feed Industry*, 2017, 38(16): 1–6 [冷向军. 水产动物维生素营养研究进展. *饲料工业*, 2017, 38(16): 1–6]
- Lewis-McCrea LM, Lall SP. Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity, and lipid peroxidation on skeletal abnormalities in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(2): 334–343
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17–24 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17–24]
- Liu XZ, Zhuang ZM. Reproduction biology and culture technology of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Beijing: China Agriculture Press, 2014, 1–10 [柳学周, 庄志猛. 半滑舌鳎繁育理论与养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 2014, 1–10]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Martinez GM, Baron MP, Bolker JA. Skeletal and pigmentation defects following retinoic acid exposure in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38(3): 353–366
- Meng QY, Chen XN, Zhao J, *et al.* Distribution of retinoic acid receptor- α immunoreactivity in the human hypothalamus. *Neuroscience*, 2011, 174: 132–142
- Michaille JJ, Blanchet S, Kanzler B, *et al.* Characterization of cDNAs encoding the chick retinoic acid receptor gamma 2 and preferential distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during chick skin development. *Developmental Dynamics*, 1994, 201(4): 334–343
- Miwa S, Yamano K. Retinoic acid stimulates development of adult-type chromatophores in the flounder. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 1999, 284(3): 317–324
- Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996, 80(3): 52–62
- Qian YX, Han L, Tong CH, *et al.* Retinoic acid receptor α and retinoic acid receptor γ in *Lateolabrax japonicus*: cDNA cloning and gene expression analysis. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2012, 24(4): 712–721 [钱云霞, 韩柳, 童彩环, 等. 鲈鱼视黄酸受体 α 和视黄酸受体 γ cDNA克隆和基因表达分析. *动物营养学报*, 2012, 24(4): 712–721]
- Shao CW, Chen SL, Bao BL, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119–124
- Shi XY, Liu XZ, Shi Y, *et al.* Molecular characterization of *MCHR* and its correlation with blind-side hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 91–102 [史学营, 柳学周, 石莹, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素聚集素受体(*MCHR*)表达特性及其与无眼侧黑化的关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 91–102]
- Shi XY, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54 [史学营, 柳学周, 徐永江, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体表皮素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45–54]
- Takahashi A, Tsuchiya K, Yamanome T, *et al.* Possible involvement of melanin concentrating hormone in food intake in a teleost fish, barfin flounder. *Peptides*, 2004, 25(10): 1613–1622
- Xu YJ, Zhu XW, Liu XZ, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 81–90 [徐永江, 朱学武, 柳学周, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 81–90]
- Zhang JL, Zuo ZH, Zhu WW, *et al.* Sex-different effects of tributyltin on brain aromatase, estrogen receptor and retinoid X receptor gene expression in rockfish (*Sebastes marmoratus*). *Marine Environmental Research*, 2013, 90(3): 113–118
- Zhou WD, Wang LL, Zhou LB, *et al.* All-trans retinoic acid upregulates the expression of ciliary neurotrophic factor in retinal pigment epithelial cells. *Cell Biochemistry and Function*, 2017, 35(4): 202–208
- Zhu XW, Xu YJ, Liu XY, *et al.* In vitro expression and bioactivity analysis of melanin concentration hormone from *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1595–1605 [朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鳎黑色素聚集激素重组制备与生物活性分析. *水产学报*, 2016, 40(10): 1595–1605]

Molecular Cloning and Spatial Expression of Two Retinoic Acid Receptors RARalpha and RARgamma from *Cynoglossus semilaevis*

SONG Xuesong^{1,2}, XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou^{1①}, SHI Bao¹,
WANG Bin¹, LIU Yongshan^{1,2}, ZHANG Yaxing^{1,2}

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Two retinoic acid receptors, RARalpha and RARgamma, were cloned from *Cynoglossus semilaevis* using RT-PCR and RACE methods, and their spatial expression patterns were investigated using a quantitative PCR assay. The results showed that full-length cDNA sequence encoding the RARalpha gene is 1823 bp in length, its open reading frame (ORF) length is 1332 bp, encoding 443 amino acids; the RARgamma cDNA sequence is 1959 bp in length, and the length of ORF is 1497 bp, encoding 489 amino acids. Homology analysis showed that *C. semilaevis* RARalpha and RARgamma have homology identity of 60.8%, and both have 97% homology identity with the Japanese flounder. Phylogenetic analysis showed that *C. semilaevis* RARalpha and RARgamma clustered into a separate branch with other fish counterparts. Spatial expression analysis showed that the highest expression level of RARalpha mRNA occurred in the kidney, whereas the highest expression level of RARgamma mRNA was in the spleen. RARgamma was also highly expressed in the gill, kidney, and heart. Furthermore, RARalpha and RARgamma mRNA expression were detected in all examined tissues, which indicated that these two retinoic acid receptors were both involved in multiple physiological regulation processes. In addition, the differential expression of these two RAR genes were found in the blind side and ocular skins, wherein they both had highest expression levels in the normal blind side skin, followed by the blacking blind side skin and had the lowest expression levels in the ocular side skin. In ocular skin and blind-side blacking skin, the RARalpha expression levels were higher than RARgamma but without significant difference, wherein in blind-side normal skin, the RARgamma expressed significantly higher than RARalpha. This differential expression pattern indicated that they might play important physiological roles in blind-side hypermelanosis regulation of *Cynoglossus semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Retinoic acid receptor; Gene cloning; Expression pattern; Hyperpigmentation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn