

鲈3种视黄醇类X受体基因cDNA的克隆和组织表达

童彩环, 钱云霞*, 郑伟贤

(宁波大学生命科学与生物工程学院,应用海洋生物技术教育部重点实验室,浙江宁波 315211)

摘要:视黄醇类X受体(retinoid X receptor, RXR)属于配体激活的核受体家族,在调节细胞内各种信号途径中起重要作用。采用RT-PCR和RACE技术,分离到鲈RXR基因3种亚型RXR α 、RXR β 和RXR γ 的cDNA序列。结果表明,得到的RXR α 是长度为1686bp 3'末端不完整的cDNA序列,其中包括364bp的5'非翻译区和1322bp的编码序列,可编码440个氨基酸。RXR β cDNA全长为1741bp,其中包括150bp的5'非翻译区,256bp的3'非翻译区和1335bp的开放阅读框,共编码444个氨基酸,理论分子量为49.5ku。RXR γ cDNA全长为1847bp,其中5'非翻译区为88bp,3'非翻译区为397bp,开放阅读框为1362bp,共编码453个氨基酸,分子量约为49.9ku。氨基酸序列分析显示,鲈RXR α 、RXR β 和RXR γ 和其它物种的RXRs结构类似,在DNA结合区有P box和D box结构,配体结合区包括12个 α 螺旋和2个 β 折叠结构,H12的C端含有AF-2的激活区。系统进化树分析表明,鲈RXR α 、RXR β 和RXR γ 分别与其他动物的相应亚型聚类。组织分布特异性研究表明,鲈RXR α 在肌肉、心脏、眼、大脑、肠、肾脏、脂肪、脾脏、鳃和肝脏10种组织中均有表达,但表达量较低;RXR β 在这10种组织中都有较高表达,但心脏中表达量较低;在所检测的10种组织中,RXR γ 都有表达,在肌肉、肠、肾脏、脂肪和脾脏表达量较高。

关键词:鲈;视黄醇类X受体;克隆;表达

中图分类号:S 917; Q 785; Q 786

文献标志码:A

视黄醇类X受体(retinoid X receptor, RXR)是MANGELSDORF等^[1]发现的一种核受体,在哺乳动物中存在3种亚型,分别是RXR α 、RXR β 和RXR γ ,三者之间氨基酸序列的相似性很高,但由不同的基因编码。人RXR α 、RXR β 和RXR γ 的编码基因分别位于第9、6和1号染色体,而小鼠的编码基因则分别位于第2、17和1号染色体^[2]。和其他核受体一样,RXR分为4个功能区,即NH₂末端的A/B区,DNA结合区(DNA-binding domain, DBD, C区),铰链区(linker region, D区)和配体结合区(ligand binding domain, LBD, E/F区),在LBD的COOH末端存在配体依赖的转录激活区AF-2。RXRs不仅能自身形成同源二聚体,还可以分别和视黄酸受体

(retinoic acid receptor, RAR),甲状腺激素受体(thyroid-hormone receptor, TR),过氧化物酶体增殖剂激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR),维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)等核受体形成异源二聚体。RXRs二聚体通过识别并结合目标基因DNA元件中的5'-AGGTCA-3'直接重复序列(direct repeat, DR)而调控目标基因的表达。DR根据其两个5'-AGGTCA-3'之间插入的碱基个数(1~5),分别称为DR1、DR2、DR3、DR4和DR5等,不同RXR二聚体识别不同的DR^[3]。RXRs是配体激活的转录因子^[4],二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、植烷酸(phytanic acid, PA)以及维生素A的代谢产物9-顺式视黄酸(9-cis-retinoic

收稿日期:2011-07-05 修回日期:2011-09-23

资助项目:国家自然科学基金项目(30671608);宁波大学学科研究基金(XK109117)

通讯作者:钱云霞, E-mail:qianyunxia@nbu.edu.cn

acid,9-cis-RA)均能激活 RXRs^[5-7]。由于 RXRs 可以和其他多种核受体结合,且能被多种配体激活,因而参与多种激素的信号途径,介导多种生物学功能,包括调节各种代谢途径,参与早期胚胎发育、成体性腺发育和生殖等生命过程^[8-9]。但是,关于鱼类 RXRs 的研究,仅有褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)^[10]、鲟(*Chelon labrosus*)^[11]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[12]的 RXRs 基因被分离和鉴定,在斑马鱼和褐菖鲉中对各亚型的发育表达特征做了分析。

鲈(*Lateolabrax japonicus*),属鲈形目(Perciformes),鲈科(Serranidae),鲈属,属于广盐性鱼类,其肉质细腻,营养丰富,是我国沿海主要的海水养殖鱼类之一。本实验分离了鲈的 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 基因,对其 cDNA 和蛋白序列进行了分析,并对其组织表达特性进行了研究,为进一步研究鲈 RXRs 的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验用二龄鲈购于宁波水产品大世界,平均体质量 469 g,平均体长 27 cm。

MS-222 为 Sigma 公司产品;Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品;逆转录试剂 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Taq 酶和 pMD-18T 载体等均为 TaKaRa 公司产品(大连);SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司,其它试剂为国产分析纯。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由本实验室保存。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

鲈经 MS-222 麻醉后取肝脏,参照 Trizol 试剂操作提取总 RNA,用 NanoDrop 1000 Spectrophotometer 检测 RNA 的浓度和纯度,1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。取 1 μ g 总 RNA 参照 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂操作说明书反转录合成肝脏 cDNA 第一条链。

1.3 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 序列的克隆

根据其他动物的 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 的 cDNA 序列保守区分别设计兼并引物克隆核心片

段(表 1)。以上述肝脏 cDNA 为模板,用 *RXR α* -F/R、*RXR β* -F/R 和 *RXR γ* -F/R 分别扩增 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 核心片段。*RXR α* 的扩增条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 ~ 52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共进行 38 个循环(前 4 个循环退火温度每循环下降 1 $^{\circ}$ C);最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。*RXR β* 和 *RXR γ* 的梯度退火温度分别是 58 ~ 54 $^{\circ}$ C 和 60 ~ 55 $^{\circ}$ C,其它 PCR 条件和 *RXR α* 相同。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,割胶回收后与 pMD-18T 载体连接,连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,经 PCR 检测后将阳性克隆送上海英骏生物工程公司进行测序。

根据测得的核心序列分别设计 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 的 5'RACE 和 3'RACE 特异性巢式引物(表 1)。参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书,用鲈肝脏总 RNA 分别合成 5' Ready 和 3' Ready cDNA,分别扩增 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 的 5' 和 3' 端序列。PCR 产物纯化、克隆和测序方法同上。

1.4 序列分析

应用 BioEdit 软件进行氨基酸序列推导及同源性分析。将鲈 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 与斑马鱼的 *RXR α* (NP_001155023)、*RXR β* (CAK11469)、*RXR γ* (NP_571292) 和人(*Homo sapiens*)的 *RXR α* (AAH63827) 进行氨基酸序列比对分析。使用 MEGA 4.0 软件,通过邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)对鲈 RXRs 和 GenBank 中已收录的其它物种的 RXRs 氨基酸序列进行分子进化树聚类分析。

1.5 RXRs 在组织中表达分析

提取 3 尾实验用鲈的肝脏、肌肉、心脏、眼、肠、肾脏、脂肪、脾脏、鳃和大脑 10 个组织的总 RNA,各取 1 μ g 参照 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录合成各组织的 cDNA。根据得到的 RXRs 序列,分别跨内含子设计 RT-PCR 引物,以 18S 为内参基因(表 1),采用 RT-PCR 检测 *RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 在不同组织中的表达特点。18S 的 PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,54 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,27 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。*RXR α* 、*RXR β* 和 *RXR γ* 的 RT-PCR 退火温度分别 54、53 和 50 $^{\circ}$ C,循环数均为 28,其它条件和体系均与 18S 相同。

表1 PCR扩增用引物
Tab.1 Primers used in PCR

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	引物的作用 usage
RXR α -F	GASATGCCBGTTNGASAAGAT	扩增核心片段 amplification of core fragment
RXR α -R	TTRAAGAARAACARRTGYTCCA	扩增核心片段 amplification of core fragment
RXR α -5RACE-1	GCTCGGGGTACTTCTGTTTGCACT	扩增5'端 amplification of 5'end
RXR α -5RACE-2	TCCGTCTTATCCATCTGCATGTCCC	5'端巢式 PCR nest PCR of 5'end
RXR α -3RACE-1	CCGCTACCAGAAGTGTTTAGCCATG	扩增3'端 amplification of 3'end
RXR α -3RACE-2	CATGCCCGTGGAGAAGATTCTGGAG	3'端巢式 PCR nest PCR of 3'end
RXR α -3RACE-3	GCAGTTGGAATGAACTCCTCATTG	3'端巢式 PCR nest PCR of 3'end
RXR α -RT-F	GACATGCCCGTGGAGAAGATT	半定量 RT-PCR semi-Quantitative RT-PCR
RXR α -RT-R	TAGAAGGATGACCTGGTCGTC	半定量 RT-PCR semi-Quantitative RT-PCR
RXR β -F	GTGGAYAAGMGVCAGMGGAAAYCGC	扩增核心片段 amplification of core fragment
RXR β -R	CTTYGCAAACCKKCCCTGYT	扩增核心片段 amplification of core fragment
RXR β -5RACE-1	AAAGCAATGGAGCGATGGGAGAACG	扩增5'端 amplification of 5'end
RXR β -5RACE-2	CAGGCATCTCTTCACTCCGACA	5'端巢式 PCR nest PCR of 5'end
RXR β -3RACE-1	GTGGAGTGGGCAAAGAGAATCCCTC	扩增3'端 amplification of 3'end
RXR β -3RACE-2	GCATCGTCTCCCATCGTCCATTG	3'端巢式 PCR nest PCR of 3'end
RXR β -FL-F	GGTTCACCTTCTCAGTTATCAGTC	拼接验证 splicing verification
RXR β -FL-R	CATATAGCACCAGCTTGTAGATCAT	拼接验证 splicing verification
RXR β -RT-F	GTTCTCCCATCGCTCCATTGCT	半定量 RT-PCR semi-Quantitative RT-PCR
RXR β -RT-R	GTCAATAGGCGTGTACCAATC	半定量 RT-PCR semi-Quantitative RT-PCR
RXR γ -F	CTCAGGRAAGCAYTAYGG	扩增核心段 amplification of core fragment
RXR γ -R	ARCATCTCCATSAGGAARGT	扩增核心段 amplification of core fragment
RXR γ -5RACE-1	ACACCAACTCGGTACGACTCTATCA	扩增5'端 amplification of 5'end
RXR γ -5RACE-2	CAATCACGCACTCCTTGCTGCTCG	5'端巢式 PCR nest PCR of 5'end
RXR γ -3RACE-1	GAGGCTCTGAGGAAAAAGTTTACGC	扩增3'端 amplification of 3'end
RXR γ -3RACE-2	GAGGCTCTGAGGAAAAAGTTTACGC	3'端巢式 PCR nest PCR of 3'end
RXR γ -FL-F	GCAACCCGCACATTATGGACAGTAG	拼接验证 splicing verification
RXR γ -FL-R	AAAACGGACACCTGAAATTATCTAT	拼接验证 splicing verification
RXR γ -RT-F	TCTTCAGGAAAGCACTACGGC	半定量 RT-PCR semi-Quantitative RT-PCR
RXR γ -RT-R	TACCGTGACTGAGCGATGCGA	半定量 RT-PCR semi-Quantitative RT-PCR
18S-F	GTAGTTCGGACCATAAACGATGCC	扩增18S amplification of 18S
18S-R	AGAAGTTGGACGCCGACCGCAC	扩增18S amplification of 18S

注:引物序列中S代表G或C,B代表G或C或T,R代表A或G,Y代表C或T,M代表A或C,V代表A或G或C,K代表G或T。
Notes:S represents G or C,B for G or C or T,R for A or G,Y for C or T,M for A or C,V for A or G or C,and K for G or T in the primer sequence.

2 结果

2.1 RXRs cDNA 的克隆及序列分析

利用引物 RXR α -F 和 RXR α -R 通过 PCR 从鲈肝脏 cDNA 中克隆得到 635 bp 的核心片段,BLAST 结果显示,所得序列与褐菖鲉(EU888276)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)(AJ567907)和青鳉(*Oryzias latipes*)(EF537036)的 RXR α 核苷酸序列同源性分别为 94.0%、93.0% 和 88.0%,因此,确定为鲈 RXR α 序列。根据 5'RACE 操作流程,两轮 PCR 后获得 1 143 bp 的 RXR α 5'RACE 序列,且有 77 bp 与核心序列完全重叠。用引物 RXR α -3RACE-1 和 RXR α -

3RACE-2 经过两轮 RACE PCR,得到 849 bp 的 3'末端,与核心序列有 554 bp 的重叠,但是与核心序列的 3'端有 78 bp 的不同,重设引物 RXR α -3RACE-3 进行 3'RACE PCR,得到的 3'末端为 699 bp,与核心片段有 335 bp 的重叠,与核心的 3'端也有 78 bp 的不同。序列分析发现所得到的 3'RACE 序列缺失了 H10 ~ H12 结构。将 5'RACE 结果和核心序列进行拼接后得到 1 686 bp 的 RXR α cDNA (3'末端不完整)(GenBank 登录号为 JN226573)。根据与其它物种的 RXR α 序列比对分析推断,1 686 bp cDNA 包括 5'非翻译区(5'-untranslated region,5'-UTR)364 bp,开放阅读框(open reading frame,ORF)1 322 bp,可编码

440个氨基酸(图1),约占 $RXR\alpha$ 整个 ORF 的 95.0%。同源性分析发现,鲈 $RXR\alpha$ 氨基酸序列与人(AAH63827)和小鼠(*Mus musculus*, EDL08372)的 $RXR\alpha$ 同源性分别为 70.0% 和 78.1%。

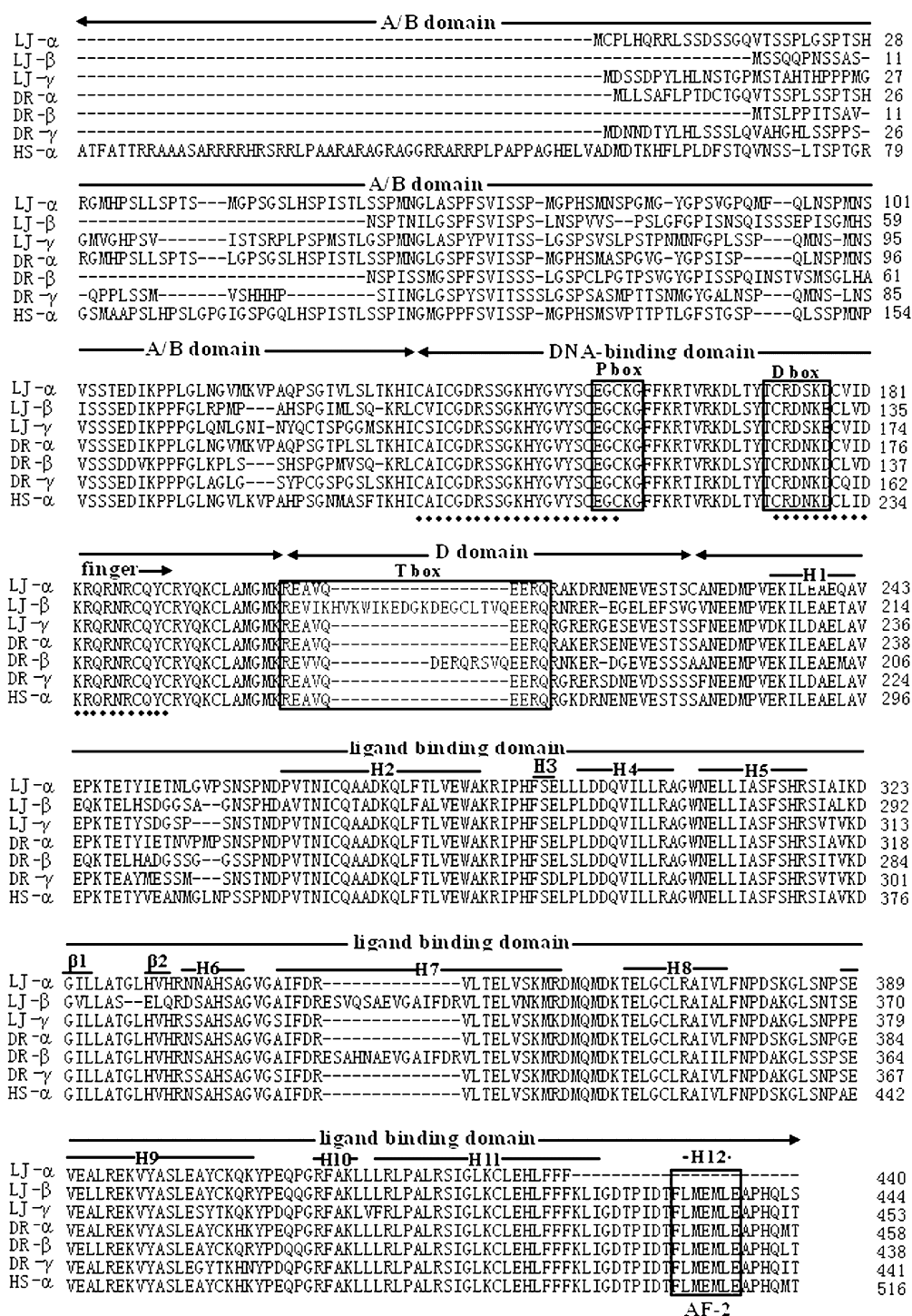


图1 鲈、斑马鱼的 $RXR\alpha$ 、 $RXR\beta$ 和 $RXR\gamma$ 与人 $RXR\alpha$ 氨基酸序列的多重比对

LJ: 鲈, DR: 斑马鱼, HS: 人。方框内所示为 P box, D box, T box 和 AF-2; 12 个 α 螺旋和 2 个 β 结构用直线标出, 锌指结构用圆点标出。

Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequences of $RXR\alpha$, $RXR\beta$ and $RXR\gamma$ among *L. japonicus*, *D. rerio* and $RXR\alpha$ of *H. sapiens*

LJ: *L. japonicus*, DR: *D. rerio*, HS: *H. sapiens*. P box, D box, T box and AF-2 are shown in the rectangle. 12 α -helices and two β -sheets are indicated by line, Zinc fingers are marked with dots.

用兼并引物 *RXRβ*-F 和 *RXRβ*-R 进行 PCR 克隆得到 *RXRβ* 的核心片段 663 bp,在此基础上进行两轮 5'RACE 和 3'RACE PCR 后分别得到 5'末端序列 775 bp 和 3'末端序列 751 bp,与核心序列分别有 70 bp 和 358 bp 的重叠。进行拼接后得到鲈 *RXRβ* cDNA 的全长为 1 741 bp,在此基础上,设计引物 *RXRβ*-FL-F 和 *RXRβ*-FL-R 对拼接得到的全长进行验证 PCR,得到 1 480 bp 的 PCR 结果,因而确定拼接得到 1 741 bp 为 *RXRβ* 的全长 cDNA (GenBank 登录号为 JN226570)。其中包括 5'-UTR 和 3'-UTR 分别为 150 bp 和 256 bp, ORF 为 1 335 bp,共编码 444 个氨基酸(图 1),预测蛋白质分子量约 49.5 ku,理论等电点为 6.62。氨基酸序列比对分析发现,与人(CAI95622)和斑马鱼(CAK11469)的 *RXRβ* 同源性分别为 60.2% 和 79.9%。

用兼并引物 *RXRγ*-F 和 *RXRγ*-R 进行 PCR 得到 889 bp 的 *RXRγ* 的核心片段,经过两轮 5' RACE 和 3' RACE PCR 得到 *RXRγ* 5'和 3'末端序列分别为 608 bp 和 619 bp,与核心序列分别有 72 bp 和 197 bp 的重叠区域,进行拼接后得到 *RXRγ* cDNA 全长为 1 847 bp。用引物 *RXRγ*-FL-F 和 *RXRγ*-FL-R 对拼接结果进行 PCR 验证(PCR 产物为 1 636 bp),确定 *RXRγ* 5'末端,核心片段和 3'末端来自同一基因。*RXRγ* 的全长 cDNA 为 1 847 bp (GenBank 登录号为 HQ839735),其中包含 88 bp 的 5'-UTR 和 397 bp 的 3'-UTR,其 ORF 为 1 362 bp,共编码 453 个氨基酸(图 1),理论等电点为 7.18,蛋白质分子量约为 49.9 ku。同源性分析表明,*RXRγ* 编码的氨基酸序列与褐菖鲈(ACH78358)、人(BAH02297)和小鼠(CAA46964)的 *RXRγ* 同源性分别为 94.9%、72.8% 和 71.5%。

2.2 RXRs 的结构与系统进化分析

用 BioEdit 将鲈 *RXRα*、*RXRβ* 和 *RXRγ* 氨基酸序列和斑马鱼的 *RXRα* (NP_001155023)、*RXRβ* (CAK11469)、*RXRγ* (NP_571292) 以及人 *RXRα* (AAH63827) 的氨基酸序列进行比对分析(图 1),结果表明,和人的 *RXRα* 结构一样,鲈 RXRs 分子结构由 4 个功能区组成,分别是 A/B 区、DBD 区、D 区和 LBD 区,其中 DNA 结合区(DBD)和配体结合区(LBD)比较保守。DBD 含有 2 个锌指结构,从第一个锌指结构末端 3 个氨基酸位置开始有由 5 个氨基酸组成的

P box 结构,到第二个锌指结构前 6 个氨基酸为止有由 7 个氨基酸组成的 D box 结构,在 D 区有 T box 结构。LBD 有 12 个 α 螺旋和 2 个 β 转角结构,在 H12 的 C 端含有 AF-2 的激活区序列 FLMEMLE(图 1)。

用 MEGA 4.0 软件的 NJ 法对鲈 *RXRα*、*RXRβ* 和 *RXRγ* 和其他物种的 RXRs 氨基酸序列构建系统树。从图 2 可以看出,所有 RXRs 在系统进化树中聚成 3 组,即 *RXRα*、*RXRβ* 和 *RXRγ* 3 种亚型各构成一组。鲈的 *RXRα*、*RXRβ* 和 *RXRγ* 均首先与其他鱼类的对应 RXRs 成簇,再与哺乳动物聚合,鲈的 *RXRα* 和 *RXRγ* 分别与褐菖鲈的 *RXRα* 和 *RXRγ* 亲缘关系最近,而鲈的 *RXRβ* 与红鳍东方鲀的 *RXRβ* 亲缘关系最近。

2.3 RXRs 的组织表达分析

分别检测了 *RXRα*、*RXRβ* 和 *RXRγ* 在鲈的肝脏、肌肉、心脏、眼、肠、肾脏、脂肪、脾脏、鳃和大脑 10 个组织中的表达。其中 *RXRα* 在所有组织中都表达,但表达量都不高,心脏中最低。*RXRβ* 只有在心脏中表达量较低,其它 9 个组织中都有较高的表达。*RXRγ* 在 10 个组织中均有表达,其中在肌肉、肠、肾脏、脂肪、脾脏中表达量高于大脑、鳃、肝脏等组织,*RXRα* 和 *RXRγ* 在各个组织中的表达整体上都比 *RXRβ* 低(图 3)。

3 讨论

本实验用 RACE 方法分离了鲈视黄醇类 X 受体 *RXRα* 的部分 cDNA 序列和 *RXRβ*、*RXRγ* 的全长 cDNA 序列。氨基酸序列同源性分析显示,这 3 种亚型间的同源性较高,其中 *RXRα* 与 *RXRβ* 和 *RXRγ* 的同源性分别为 58.8% 和 68.9%,*RXRβ* 和 *RXRγ* 的同源性为 63.6%。

鲈 RXRs 分子结构和其他动物的 RXRs 一样,由 4 个功能区组成,分别是 A/B 区、DBD 区、D 区和 LBD 区,其中 LBD 的 C 末端存在配体依赖的转录激活区 AF-2^[13]。本研究结果表明,鲈 3 种 RXR 的 DBD 氨基酸序列保守性高,均有 DNA 结合所必需的 9 个半胱氨酸,其 N 端有 2 个识别 DNA 所需的锌指结构,在这两个锌指结构处有 P box 和 D box 结构,在第 2 个锌指结构 C 端延伸处还有一个 T box,T box 和 D box 一起参与 RXRs 二聚体对 DNA 的识别过程^[14]。鲈 3 种 RXR 的 P box 区的氨基酸序列完全相同,均

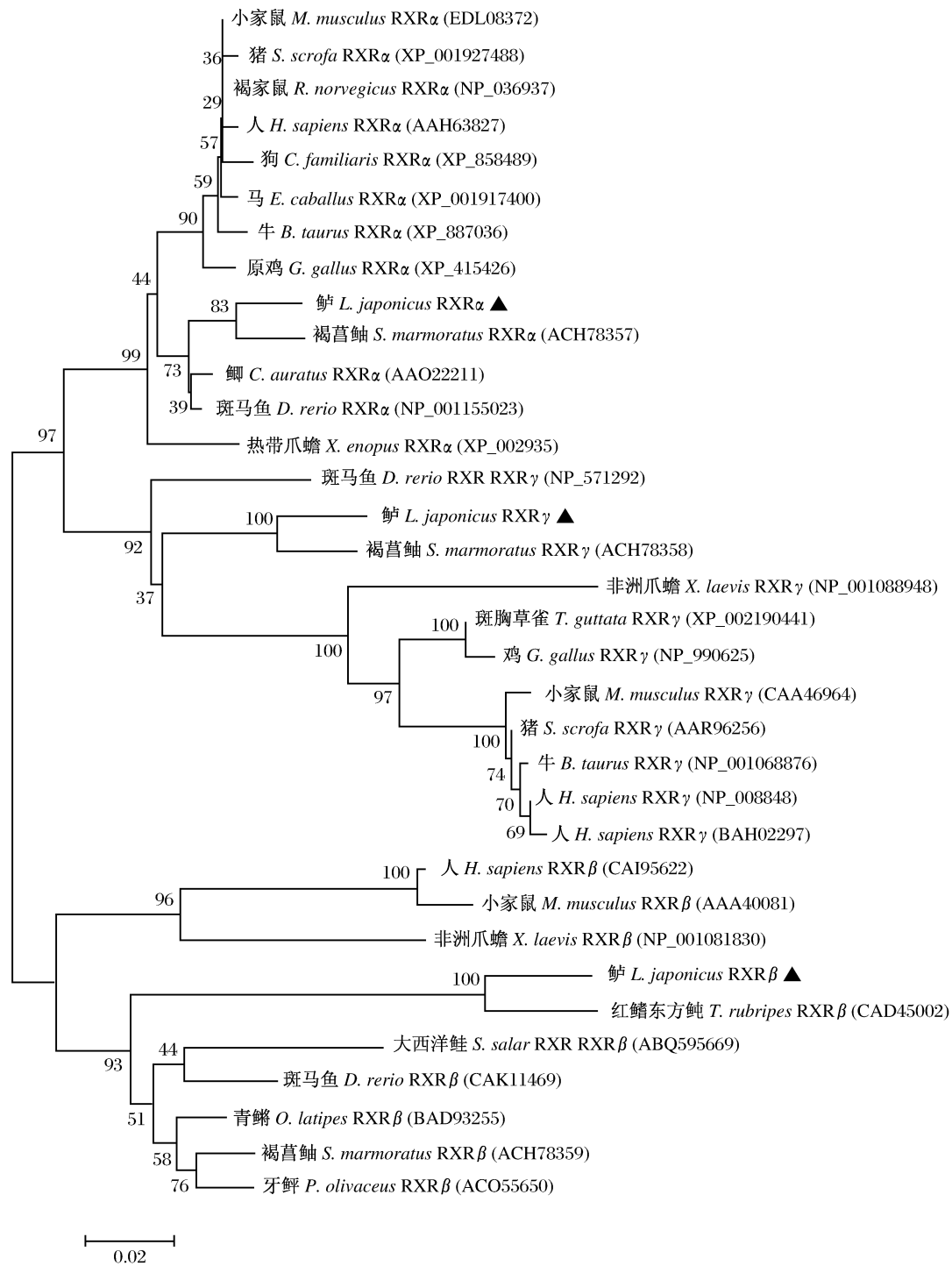


图2 鲈和其他物种 RXRs 氨基酸序列的系统分析

括号内为 GenBank 登陆号。▲所指为鲈 RXRα、RXRβ 和 RXRγ。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of RXRs amino acid sequences of *L. japonicus* and other species

Accession numbers are shown in parentheses. RXRs of *L. japonicus* are marked with ▲.

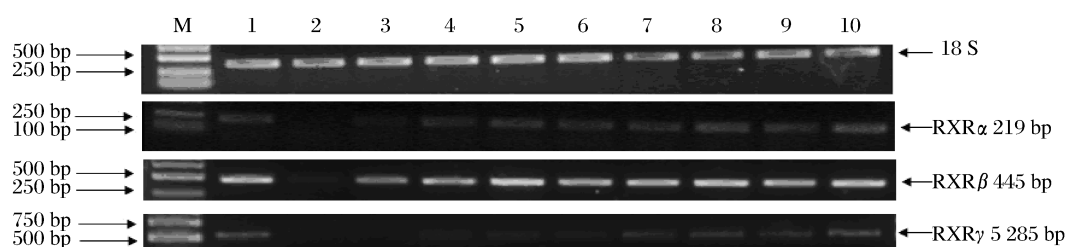


图3 鲈RXR α ,RXR β ,RXR γ 组织表达结果

M. 2 000 bp DNA Marker; 1. 肌肉; 2. 心脏; 3. 眼; 4. 大脑; 5. 鳃; 6. 肝脏; 7. 肠; 8. 肾脏; 9. 脂肪; 10. 脾脏。

Fig. 3 Expression of *L. japonicus* RXR α ,RXR β and RXR γ in various tissues

M. 2 000 bp DNA Marker; 1. muscle; 2. heart; 3. eye; 4. brain; 5. gill; 6. liver; 7. intestine; 8. kidney; 9. fat; 10. spleen.

为EGCKG,且与斑马鱼、褐菖鲈和人的P box完全相同^[10,12]。鲈3种RXR的D box序列各不相同,分别是TCRDSKD、TCRDSKE和TCRDNKE,同样的情况也出现在褐菖鲈中,其3种RXR的D box序列分别为TCRDNKH、TCRDNKD和TCRDCKE,但是也有3种RXR的D box序列相同的情况,如斑马鱼3种RXR的D box序列均为TCRDNKD。T box的功能是和D box一起参与RXRs二聚体对DNA的识别,RXR二聚体识别不同的DR结构的原因可能是RXR的T box不同所引起的。如同样的RXR的D box,如果和RAR的T box结合,则RXR/RAR异源二聚体识别DR2;而如果和RXR的T box结合,则RXR同源二聚体识别DR1^[15]。与RXR α 、RXR γ 不同,鲈RXR β 的T box区内有18个氨基酸的插入,在斑马鱼和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中也发现这种插入,但它们插入的氨基酸数目分别为8个和15个^[16]。

对人RXR α 的结构研究表明,其LBD由12个 α 螺旋(helix,H)组成,其中在H5和H6之间存在保守的 β 折叠结构s1~s2(也叫 β 片层, β -sheets),在H12的C端含有AF-2的激活区FLMEMLE。这12个 α 螺旋在空间形成三层结构,H1~H3形成LBD的一个面,H4、H5、s1~s2、H8和H9形成中心层,H6、H7和H10形成LBD的第2个面。整个分子的下端有一配体结合口袋(ligand-binding pocket,LBP),主要由H3、H5、s1~s2、H6~H7和H11~H12构成,H11几乎和H10垂直,指向LBP,其部分疏水氨基酸残基插入LBP并起到稳定LBP的袋型结构的作用^[17]。本研究表明,鲈RXR β 在H7处有14个氨基酸的插入,这种现象在其它鱼类也有出现,如斑马鱼和褐

菖鲈分别有14和12个氨基酸的插入^[12]。JONES等^[18]认为斑马鱼RXR β H7处氨基酸的插入导致LBP被H3、H4、H5、H6、H10和H12封闭而无法和配体9-cis-RA结合,推测鲈的RXR β 可能也无法与9-cis RA结合。与褐菖鲈RXR α 3'RACE序列缺少H10~H12结构类似^[10],本次实验中得到的鲈RXR α 3'末端序列也缺失了H10~H12结构。

鲈3种RXR在肝脏、肌肉、心脏、眼、肠、肾脏、脂肪、脾脏、鳃和大脑10个组织中均有表达,这表明这些组织都可能存在RXRs的目标基因,鲈RXRs也可能参与多种生理功能^[18]。在哺乳动物中,RXR α 在心脏有大量表达,它参与心肌的生长,RXR α 敲除小鼠由于心室心肌发育不全在胚胎期12.5~16.5 d就死亡^[19]。但鲈RXR α 在心脏中表达较低,而在肌肉、鳃和脾脏中有较高水平表达,这种表达特征与鲮、褐菖鲈相似^[11-12]。RXR α 在鳃中的高表达现象在甲壳动物中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)中也有发现^[20],推测RXR α 对水生生物鳃的功能中起重要作用。鲈RXR β 在除心脏外的9种组织中表达量都很高,这种表达模式与褐菖鲈RXR β 表达特性基本一致。与RXR γ 主要在褐菖鲈的鳃中表达不同,鲈的RXR γ 在肌肉、肠、肾脏和脾脏表达都比鳃中要高,但是RXR β 和RXR γ 这两者心脏中的表达都很低,这点与哺乳动物不同。

参考文献:

- [1] MANGELSDORF D J,ONGE S,DYCK J A, et al. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway [J]. Nature, 1990, 345 (6272): 224-229.

- [2] LEFEBVRE P, BENOMAR Y, STAELS B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2010, 21(11): 676–683.
- [3] RASTINEJAD F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11(1): 33–38.
- [4] MANGELSDORF D J, THUMMEL C, BEATO M, *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade [J]. Cell, 1995, 83(6): 835–839.
- [5] HEYMAN R A, MAGELSDORF D J, DYCK J A, *et al.* 9-Cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor [J]. Cell, 1992, 68(2): 397–406.
- [6] DEURQUIZA A M, LIU S, SJOBERG M, *et al.* Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain [J]. Science, 2000, 290(5499): 2140–2144.
- [7] LEMOTTE P K, KEIDEL S, APFEL C M. Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand [J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 236: 328–333.
- [8] MARK M, GHYSELINCK N B, CHAMBON P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development [J]. Nuclear Receptor Signaling, 2009, 7: e002.
- [9] AHUJA A S, SZANTO A, NAGY L, *et al.* The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death [J]. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents, 2003, 17(1): 29–45.
- [10] 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 & Molecular Biology, 2009, 154: 221–222.
- [11] RAINGERARD D, CANCIO I, CAJARAVILLE M P, *et al.* Cloning and expression pattern of peroxisome proliferator-activated receptor α and retinoid X receptor α in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 149: 26–35.
- [12] TALLAFUSS A, HALE L A, YAN Y L, *et al.* Characterization of retinoid-X receptor genes RXRa, RXRba, RXRbb and RXRg during zebra fish development [J]. Gene Expression Patterns, 2006, 6(5): 556–565.
- [13] BOURGUET W, RUFF M, CHAMBON P, *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha [J]. Nature, 1995, 375: 377–382.
- [14] ARANDA A, PASCUAL A. Nuclear hormone receptors and gene expression [J]. Physiological Reviews, 2001, 81(3): 1269–1304.
- [15] 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.
- [16] 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 & Molecular Biology, 2007, 148(2): 139–150.
- [17] BOURGUET W, RUFF M, CHAMBON P, *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha [J]. Nature, 1995, 375: 377–382.
- [18] JONES B B, OHNO C K, ALLENBY G, *et al.* A new retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-cis retinoic acid [J]. Molecular Cell Biology, 1995, 15(10): 5226–5234.
- [19] SUCOV H M, DYSON E, GUMERINGER C L, *et al.* RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis [J]. Genes & Development, 1994, 8(9): 1007–1018.
- [20] PRIYA T A, LI F, ZHANG J, *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.

Molecular cloning, tissue-specific expression of three retinoid X receptors of *Lateolabrax japonicus*

TONG Cai-huan, QIAN Yun-xia^{*}, ZHENG Wei-xian

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The retinoid X receptor (RXR) is a member of nuclear hormone receptor family proteins and plays an important role in the regulation of intracellular receptor signaling pathways. Three retinoid X receptor subtypes (RXR α , RXR β and RXR γ) cDNAs were obtained from *Lateolabrax japonicus* by RT-PCR and RACE. The obtained cDNA sequence of RXR α was 1 686 bp in length, containing a 5'-untranslated region (UTR) of 364 bp and an uncompleted CDS of 1 322 bp, and encoded a putative protein of 440 amino acids. The full length cDNA sequence of RXR β was 1 741 bp in length, containing a 5' UTR of 150 bp, 3'UTR of 256 bp and an ORF of 1 335 bp which encoded a putative protein of 444 amino acids with an estimated molecular weight of 49.5 ku. The RXR γ cDNA was 1 847 bp in length with 88 bp of 5'-UTR, 397 bp of 3'-UTR and an ORF of 1 362 bp which encoded a putative protein of 453 amino acids with an estimated molecular weight of 49.9 ku. Like other RXRs, the DNA-binding domain (DBD) of *L. japonicus* RXR α , RXR β and RXR γ contain P box and D box and the ligand binding domain (LBD) contains 12 α -helices and 2 β -sheets with a ligand-dependent activation function AF-2 in the COOH terminus of the H12. In the phylogenetic tree, *L. japonicus* RXR α , RXR β and RXR γ were clustered with corresponding subtypes respectively. The tissue-specific expression of each RXR gene was explored using RT-PCR. The mRNA of RXR α were expressed in all tissues examined with low level. The mRNA of RXR β were expressed homogeneously in all tested tissues excepting a low expression in heart. RXR γ mRNA were also expressed in all tissues tested with high levels in muscle, intestine, kidney, fat and spleen. The results lay the foundation for further study of the functions of RXR α , RXR β and RXR γ .

Key words: *Lateolabrax japonicus*; retinoid X receptor; clone; expression

Corresponding author: QIAN Yun-xia. E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn