

◆特邀栏目◆

温度和光照对克氏原螯虾生物钟基因 *PcClk* 与 *PcCry1* 表达的影响^{*}周慧^{1,2}, 吴海霞², 谢伟², 王芸芸², 蒋琦辰^{3**}, 李鹏²

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院, 江苏南京 210023; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210023; 3. 江苏省淡水水产研究所, 江苏南京 210017)

摘要:生物钟基因 *clock* (*Clk*) 和 *cryptochrome* (*Cry*) 参与生物内在节律调控。克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 是我国重要的水产养殖经济虾类, 为探究温度、光照对克氏原螯虾生长及其生物钟基因 *PcClk* 与 *PcCry1* 节律振荡表达的影响, 采用实时定量 PCR 技术探讨克氏原螯虾 *PcClk* 和 *PcCry1* 基因在脑、眼柄和肝胰腺组织中的 mRNA 表达模式, 并探讨 *PcClk* 和 *PcCry1* 基因在温度和光照周期适应过程中是否发生适应性进化。荧光定量 PCR 检测结果显示, 克氏原螯虾的 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因在脑、眼柄和肝胰腺中均有表达。在不同光照周期培养下, *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因在脑、眼柄中的 mRNA 表达有一定的振荡节律, 在 25℃、12 LD 的培养模式下, 脑中 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因 mRNA 表达的节律性会更明显。选择压力分析显示, 经 PAML 和 Datamonkey 共同筛选出的 *PcCLK* 正选择位点为 71 与 213, *PcCRY1* 正选择位点为 63。以上结果表明, 克氏原螯虾生物钟基因 *PcClk* 和 *PcCry1* 受到了选择压力, 克氏原螯虾 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因是内源性的节律基因。

关键词:昼夜节律 克氏原螯虾 生物钟基因 mRNA 表达 选择压力

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)02-0393-12

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20220526.021

生物钟又称“昼夜节律钟”或“近日时间节律钟”, 是生物体适应环境周期性变化的内在计时机制, 具有重要的功能^[1]。Abe 等^[2] 研究证实生物钟基因调节生物体的稳态, 与炎症反应、血糖平衡、合成和分解代谢等有着密切的关系。昼夜节律的发生是以时钟基

因及其相关蛋白为物质基础^[3], 例如时钟基因 (*clock*, *Clk*) 与生物体生命健康息息相关, 其蛋白产物 CLOCK (CLK) 属于 bHLH/PAS 家族的转录因子, 驱动目标时钟基因以及与组织特异性转录因子相关的其他基因表达^[4]。在生物钟调控系统中, CLK

收稿日期: 2021-09-06

* 国家虾蟹产业技术体系克氏原螯虾种质资源与遗传育种岗位项目 (CARS-48), 江苏省农业重大新品种创制项目 (PZCZ201746), 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (19KJA330001), 江苏省现代农业 (克氏原螯虾) 产业技术体系项目 (JATS[2020]365), 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX20_1241), 江苏省水生生物资源重大专项 (ZYHB16-3) 和江苏省海洋渔业资源环保项目资助。

【作者简介】

周慧 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事水产动物分子毒理学研究, E-mail: zhouhuizhzh97@163.com。

【**通信作者】

蒋琦辰 (1984-), 男, 副研究员, 主要从事环境毒理学、水产养殖与水域生态学研究, E-mail: qichenjiang@qq.com。

【引用本文】

周慧, 吴海霞, 谢伟, 等. 温度和光照对克氏原螯虾生物钟基因 *PcClk* 与 *PcCry1* 表达的影响 [J]. 广西科学, 2022, 29(2): 393-404.

ZHOU H, WU H X, XIE W, et al. Effects of Temperature and Light on the Expression of Circadian Clock Genes *PcClk* and *PcCry1* in *Procambarus clarkii* [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(2): 393-404.

蛋白通常与 CYC 蛋白形成异源二聚体, 激活下游基因转录, 在反馈环中起正调控作用。它主要在视交叉上核和视网膜中表达, 在外周组织器官(肝脏、心脏、肌肉、肾脏、胰脏、睾丸、卵巢等)中也有表达^[5]。在对小鼠的研究中发现, 敲除该基因的小鼠表现出生物节律紊乱, 多巴胺在中脑腹侧腹腹(Ventral Tegmental Area, VTA)的转运增加, 由此推断出 CLK 蛋白与脑回路中的多巴胺运转有关^[6]。敲除斑马鱼 *Clk* 基因, 会导致其他几个相关基因的表达量下降^[7]。

Cryptochrome (*Cry*) 又被称为“隐花色素基因”, 其产物蛋白是一种对蓝光极其敏感的黄素蛋白光受体, 该蛋白是多细胞动物核心昼夜节律振荡器的组成部分, 可调节动物体内昼夜生物钟光导引过程^[8,9]。*Cry* 基因是核心生物钟基因, 可分为 3 种基因类型: *Cry1* (或称果蝇型 *Cry*)、*Cry2* (或称哺乳动物型 *Cry*) 和 *Cry3*。其中 *CRY2* 是昆虫和哺乳动物生物钟的重要组成部分; 而 *CRY1* 在果蝇研究中较为深入, 在睡眠剥夺所引发的血管炎症影响中发现, *CRY1* 可明显抑制血管炎症的发生和发展^[10]。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 肉质结实, 味道清新鲜美, 是我国重要的水产养殖经济虾类。但在克氏原螯虾规模化人工养殖过程中会遇到很多问题, 如苗种繁育不足、个体小型化、疾病防控落后等。谢伟等^[11]研究表明克氏原螯虾诸多生理与行为节律均受体内生物钟基因的调控, 生物钟基因对克氏原螯虾的生长发育和摄食行为具有很大影响。作为重要的经济虾类, 目前对克氏原螯虾生物钟相关基因的种类和功能研究还不够全面, 对其调控机制更是缺少了解, 因此本研究运用生物信息学方法分析 *Clk* 基因 (命名为 *PcClk*) 与 *Cry1* 基因 (命名为 *PcCry1*) 的一些理化性质、功能结构, 并使用荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 探究克氏原螯虾这两个生物钟基因在不同温度和光照协同作用模式下的 mRNA 表达差异情况, 并从进化生物学角度对克氏原螯虾 *PcClk* 与 *PcCry1* 进行选择压力分析, 以期了解温度和光照周期对克氏原螯虾生物钟节律的影响, 为其健康养殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

克氏原螯虾样品均采集于江苏南通野外生境, 选取 8-12 cm 健康的雄性克氏原螯虾个体, 以排除性别对实验的干扰。样品带回实验室后对其进行适应

驯化培养。

暂养驯化培养: 在实验室循环水箱中饲养 2 周, 用全光谱日光灯模拟室外自然光照, 光照周期为 12 h 光照和 12 h 黑暗 (12 LD), 用增氧泵 24 h 不间断充氧并维持室温在 25℃ 左右; 同时, 在养殖箱底铺满沙石, 并放置尼龙管、石块、易拉罐, 为克氏原螯虾提供隐蔽处, 减少其打斗频率。暂养期间于早 (8:00) 晚 (20:00) 投喂虾蟹专用颗粒饲料, 并保证每天投喂量一样, 及时吸取残饵, 2 d 换水一次, 换水量约为原来的 1/3。

驯化 2 周后, 将样品放置在 24 LL (24 h 光照)、12 LD (12 h 光照和 12 h 黑暗) 和 24 DD (24 h 黑暗) 模式下培养。24 h 黑暗处理是将实验室所有门窗使用不透光黑薄膜遮蔽, 仅在喂食和换水时短暂开灯, 其余时间均处于黑暗状态; 24 h 光照处理是将处于自然光照射下的养殖水箱上方放置全光谱日光灯, 并且 24 h 打开。由于在 25℃、12 LD 培养模式下克氏原螯虾的生长状况最好, 在 24 LL、24 DD 或者温度过高时, 其成活率会降低 (数据暂未发表), 所以在每种光照周期下设置恒定温度 25℃, 同时在 12 LD 的光照周期下设置 20℃、25℃ 和 30℃ 3 个不同温度进行研究, 水温由加热棒控制。在驯化期间正常喂食, 驯化结束后分别挑取 52 只健康雄性克氏原螯虾转入各模式下继续培养, 3 d 后于时间点 8:00、12:00、16:00、20:00、00:00, 次日 4:00 和 8:00 分别对每组取样。每个时间点取两只一组, 共取 3 组平行实验组。每组取脑、眼柄、肝胰腺各约 30 mg 的组织, 加入 RNA 保护试剂, 匀浆后于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

将状态良好的克氏原螯虾肝胰腺、脑、眼柄组织分别取出, 按 Trizol 试剂盒 (赛默飞世尔科技有限公司) 说明书的方法提取总 RNA, 用焦碳酸二乙酯 (Diethyl Pyrocarbonate, DEPC) 处理水稀释, 使 RNA 沉淀溶解, 并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量; 使用超微量紫外分光光度计对 RNA 进行浓度定量测定。据 PrimeScript™ RT Master Mix (上海力敏实业有限公司) 说明, 将获得的总 RNA 反转录为 cDNA, -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 cDNA 序列和氨基酸序列分析

用 cDNA 末端快速扩增方法获得的 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因全长, 于美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 进行 *PcClk* 基因 (MN908585) 和 *PcCry1* 基

因(MG659714.1) cDNA 全长完整性验证。使用 ExPASy 服务器 (<https://web.expasy.org/>)^[12] 的 ProtParam 和 ProtScale 工具分析 PcCLK 蛋白、PcCRY1 蛋白的理化性质和疏水性。使用 SignalP 程序^[13] 预测信号肽, MotifScan 程序查找 motif, SMART 软件^[14] 分析结构功能域, PSORT II 软件进行亚细胞定位, TMHMM v. 2.0 软件^[15] 预测跨膜区, SWISS-MODEL 网站预测蛋白质三级结构^[16]。使用 MEGA X 软件的邻接法构建系统发育树, 验证 PcCLK 蛋白与 PcCRY1 蛋白在进化过程中与其他同源蛋白的关系^[17]。

1.4 荧光定量 PCR 检测

使用 Prime Primer 5 软件设计引物[表 1, 以 β -actin 作为内参基因, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成], 并对 *PcClk* 基因、*PcCry1* 基因在不同光照和温度协同作用模式下 7 个时间点的 mRNA 表达情况进行检测。使用 StepOnePlusTM 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国应用生物系统公司)进行定量 PCR 实验, 按照实时定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix-TaqTM II (TliRNaseH

Plus)说明书操作, 荧光定量 PCR 反应体系如下: SYBR[®] Premix ExTaqTM II (2 \times) 10 μ L, PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 0.8 μ L, PCR Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.8 μ L, cDNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, 再加上去离子水 7.4 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 16 $^{\circ}$ C 15 s。反应结束后分析相关数据, 采用比较 C_T 值的方法(基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_T}$)^[18] 来分析 *PcClk* 基因、*PcCry1* 基因的相对表达水平。采用 SPSS17.0 软件对所有数据进行统计分析, 利用单因素方差分析法(ANOVA)对不同处理组样品进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

1.5 适应性进化分析

1.5.1 序列获取

为研究克氏原螯虾 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因的适应性进化, 选择代表性节肢动物物种进行分析, 涉及甲壳亚门、螯肢亚门和六足亚门。所有选取物种的 *Clk* 基因和 *Cry* 基因序列均从 NCBI 数据库直接下载, 相关信息如表 2、表 3 所示。

表 1 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因 mRNA 表达检测所用的引物信息

Table 1 Primers information for detection of *PcClk* and *PcCry1* genes mRNA expression

基因 Gene	引物用途 Primer purpose	引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	登录号 Accession
<i>PcClk</i>	RT-qPCR	qClock-F	AAGATGGAGTGCTGGACTTTAG	MN908588
	RT-qPCR	qClock-R	GGATAAGGGAGCTCTGAAACAA	
<i>PcCry1</i>	RT-qPCR	qCryptochrome-F	AGTCAGTGCAACGAGCTGCGAAAT	MN908586
	RT-qPCR	qCryptochrome-R	AGGTGGAGGTGATGGGTAGTGGTC	
β -actin	RT-qPCR	q β -actin-F	GCACCATCCACCATGAAGATTA	KR135165
	RT-qPCR	q β -actin-R	GGTAGAAAGGGAAGCCAAGATG	

表 2 用于适应性进化分析的各物种 *Clk* 基因序列信息

Table 2 Genetic sequence information of *Clk* in various species for adaptive evolutionary analysis

亚门 Subphylum	纲 Class	物种 Species	登录号 Accession
脊椎动物亚门 Vertebrata	鸟纲 Aves	藏香鸡 <i>Gallus gallus</i>	AF246959.1
	哺乳纲 Mammalia	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AB019258.1
	哺乳纲 Mammalia	绵羊 <i>Ovis aries</i>	EU016223.1
	爬行纲 Reptile	中华鳖 <i>Pelodiscus sinensis</i>	KY624634.1
	辐鳍鱼纲 Actinopterygii	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAI63244.1
甲壳动物亚门 Crustacea	软甲纲 Malacostraca	罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	AY842303.1
	软甲纲 Malacostraca	等足目虫 <i>Eurydice pulchra</i>	AGV28723.1
	甲壳纲 Crustacea	南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	ROT60838.1
	甲壳纲 Crustacea	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	MN908585.1
六足亚门 Hexapoda	昆虫纲 Insecta	柞蚕 <i>Antheraea pernyi</i>	AY330486.1
	昆虫纲 Insecta	米虫 <i>Sitophilus oryzae</i>	MH070263.1
	昆虫纲 Insecta	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	EF174303.1
	昆虫纲 Insecta	二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	MH933743.1
螯肢亚门 Chelicerata	肢口纲 Merostomata	美洲鲎 <i>Limulus polyphemus</i>	KX014718.1

表 3 用于适应性进化分析的各物种 *CryI* 基因序列信息Table 3 Genetic sequence information of *CryI* in various species for adaptive evolutionary analysis

亚门 Subphylum	纲 Class	物种名 Name of species	登录号 Accession
甲壳动物亚门 Crustacea	甲壳纲 Crustacea	南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	ROT79736.1
	甲壳纲 Crustacea	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	MN908586.1
	鳃足纲 Branchiopoda	大型溞 <i>Daphnia magna</i>	LC027222.1
	软甲纲 Malacostraca	等足目虫 <i>Eurydice pulchra</i>	KC885970.1
	软甲纲 Malacostraca	欧洲沙蚤 <i>Talitrus saltator</i>	JQ413343.1
	软甲纲 Malacostraca	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	MG659714.1
六足亚门 Hexapoda	昆虫纲 Insecta	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	AF099734.1
	昆虫纲 Insecta	叶榕传粉榕小蜂 <i>Ceratosolen solmsi</i>	JX409893.1
	昆虫纲 Insecta	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	GQ896502.1
	昆虫纲 Insecta	甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	HQ234484.1
	昆虫纲 Insecta	黑脉金斑蝶 <i>Danaus plexippus</i>	AY860425.1
	昆虫纲 Insecta	麦田灰飞虱 <i>Laodelphax striatella</i>	AVP27638.1
	昆虫纲 Insecta	球菜夜蛾 <i>Agrotis ipsilon</i>	JQ616846.1
	昆虫纲 Insecta	欧洲熊蜂 <i>Bombus terrestris</i>	MK250529.1
	昆虫纲 Insecta	若虫 <i>Modicogryllus siamensis</i>	LC320665.1
脊椎动物亚门 Vertebrata	两栖纲 Amphibian	日本树蟾 <i>Hyla japonica</i>	AB206651.1
	昆虫纲 Insecta	双斑蟋蟀 <i>Gryllus bimaculatus</i>	LC202047.1
	辐鳍鱼纲 Actinopterygii	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AB042248.1
	鸟纲 Aves	原鸽 <i>Columba livia</i>	MG839692.1

1.5.2 构建系统发育树

去除所有序列的终止密码子,使用将获取的节肢动物 *PcClk* 基因、*PcCryI* 基因序列通过 PRANK 软件进行密码子比对^[19]。使用 Trimal 软件处理密码子的比对结果后,删除一些低质量或高变异度的序列区域,仅保留进化保守的区域用于后续分析^[20]。使用 IQ-TREE 自动测试功能并选择最佳替代模型,构建系统发育树^[21]。该系统发育树同时也被用于后续构建选择压力分析的树文件。

1.5.3 选择压力分析

使用 PAML 4.9 软件包的 CODEML 程序计算 ω 值,使用位点模型、分支模型和分支位点模型进行进化分析^[22]。

首先使用位点模型检测 *PcClk* 基因和 *PcCryI* 基因在节肢动物数据集中受正选择的位点,并比较 Ma 和 Ma0, M0 和 M3, M1a 和 M2a, M7 和 M8, M8 和 M8a 模型。接着,利用似然率检测方法计算 $2\Delta\ln L$ 值与自由度之间的卡方分布。然后,利用贝叶斯方法 BEB (Bays Empirical Bays) 计算位点的后验

概率(Posterior Probability, PP),若后验概率 > 0.8 , 则被认为是潜在的正选择位点^[23]。此外,使用 Datamonkey 中的 FEL、SLAC 和 FUBRA 检测正选择位点,设置 FEL 和 SLAC 显著水平小于 0.2, FUBAR 后验概率值大于 0.8^[24]。最后,整合 PAML 和 Datamonkey 筛选的正选择位点,将同时被 PAML 和 Datamonkey 检测到的位点视为显著的正选择位点,并标注在模拟的克氏原螯虾 *PcClk* 基因和 *PcCryI* 基因的蛋白质三维结构中。

2 结果与分析

2.1 *PcClk*、*PcCryI* 基因序列与蛋白结构特征

将 *PcClk* 核苷酸序列在 NCBI 公共数据库中比对,发现其与其他物种的 *Clk* 核苷酸同源性相似度区间为 68% - 92%,其中与十足目通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)的 *Clk* 基因最为相似,相似度为 92%,氨基酸序列比对结果类似。同样地,将 *PcCryI* 核苷酸序列在 NCBI 公共数据库中进行比对后发现,其与其他物种的 *PcCryI* 核苷酸同源性相似度

区间为 73% - 84%, 其核苷酸序列与美洲海螯虾 (*Homarus americanus*) 的 *Cry1* 基因最为相似, 而氨基酸序列比对结果显示 *PcCRY1* 蛋白与美洲海螯虾 (*Homarus americanus*) *CRY2* 蛋白相似性最高, 相似度为 96%。

2.2 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因正选择位点的定位

通过 SWISS-MODEL 网站预测得到克氏原螯虾 *PcCLK* 和 *PcCRY1* 三级结构(图 1), 强烈正选择位点在三级结构中的定位如图 1 标记所示。图中显示 *PcCLK* 蛋白与模板 4f3l. 1. B 蛋白的匹配度最高, 序列相似度为 54. 60%; *PcCRY1* 蛋白与模板 7dlc. 1. A 匹配度最高, 序列相似度为 71. 72%。

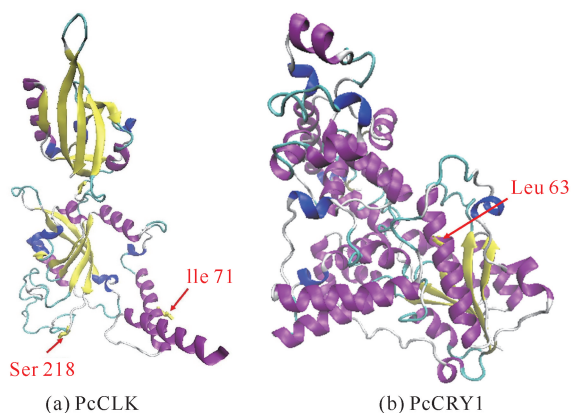


图 1 克氏原螯虾 *PcCLK* 和 *PcCRY1* 蛋白质三维结构预测结果(标注为强烈正选择位点)

Fig. 1 Three-dimensional structure prediction results of *PcCLK* and *PcCRY1* proteins of *Procambarus clarkii* (The strongly positive selection sites were labeled)

2.3 多序列比对和系统发育分析

基于 MEGA X 软件邻接法的系统发育分析显示, *PcCLK* 与甲壳类动物的 CLK 聚在一起, 而 *PcCRY1* 与甲壳类动 *CRY1* 聚在一起(图 2)。克氏原螯虾 *PcCLK* 与南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)、等足目虫 (*Eurydice pulchra*) 的 CLK 蛋白形成甲壳动物亚门分支; 克氏原螯虾 *PcCRY1* 与南美白对虾、大型溞 (*Daphnia magna*)、等足目虫、欧洲沙蚤 (*Talitrus saltator*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的 *CRY1* 蛋白形成甲壳动物亚门分支(图 2)。

2.4 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因表达水平分析

在 12 LD、不同温度条件下, *PcClk* 基因、*Pc-*

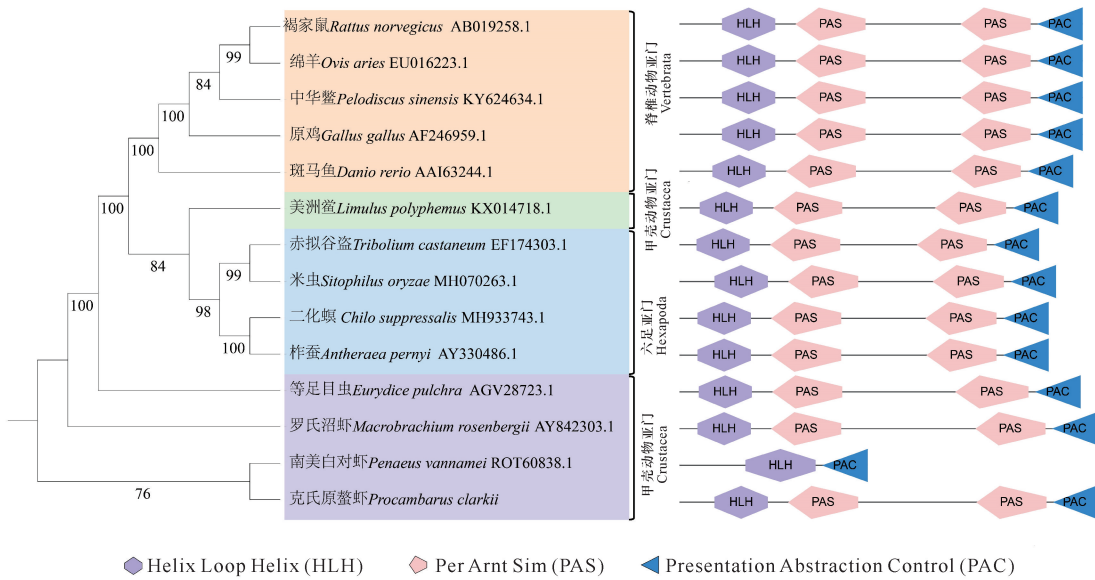
Cry1 基因在脑、眼柄、肝胰腺中的 mRNA 表达情况如图 3 所示。*PcClk* 基因在脑、眼柄、肝胰腺中的 mRNA 表达基本保持 24 h 的振荡规律。随着温度的升高, *PcClk* 基因在脑、眼柄中的 mRNA 表达特征均发生变化, 表现为振荡波动增强、节律性更明显, 尤其在 30°C 条件下, *PcClk* 的 mRNA 表达量整体上明显上调。而在肝胰腺中, 随着温度的升高, *PcClk* 基因的 mRNA 表达波动减弱, 节律性相对 20°C 时变得不明显。同样地, 随着温度的升高, *PcCry1* 基因在脑和眼柄中的 mRNA 表达振荡特征均发生变化, 波动增强, 节律性更明显。与 *PcClk* 基因类似的是, 相对于 20°C, 25°C、30°C 情况下 *PcCry1* 基因在肝胰腺中的 mRNA 表达趋于平缓, 振荡波动减弱, 节律不明显。

在 25°C、不同光照周期培养下, *PcClk* 基因、*Pc-Cry1* 基因在脑、眼柄、肝胰腺中的 mRNA 表达情况如图 4 所示。在 12 LD 的光照周期下, 脑、眼柄、肝胰腺中 *PcClk* 基因的 mRNA 表达有一定的振荡节律; 而在 24 LL 和 24 DD 光照周期下, 振荡节律发生改变, 尤其是眼柄中 *PcClk* 基因的 mRNA 表达表现出无振荡节律。*PcCry1* 基因的 mRNA 在脑和眼柄中的表达都基本遵循着一定的振荡节律, 在 12 LD 和 24 LL 光照周期下, *PcCry1* 的表达量在白天缓慢堆积, 在客观夜晚期间达到峰值, 随后缓慢下降。而 *PcCry1* 基因的 mRNA 在肝胰腺的表达与脑、眼柄有所区别: 在 12 LD 的光照周期下 mRNA 表达有一定的振荡节律, 但在 24 LL 和 24 DD 光照周期下振荡波动减弱, 节律不明显。

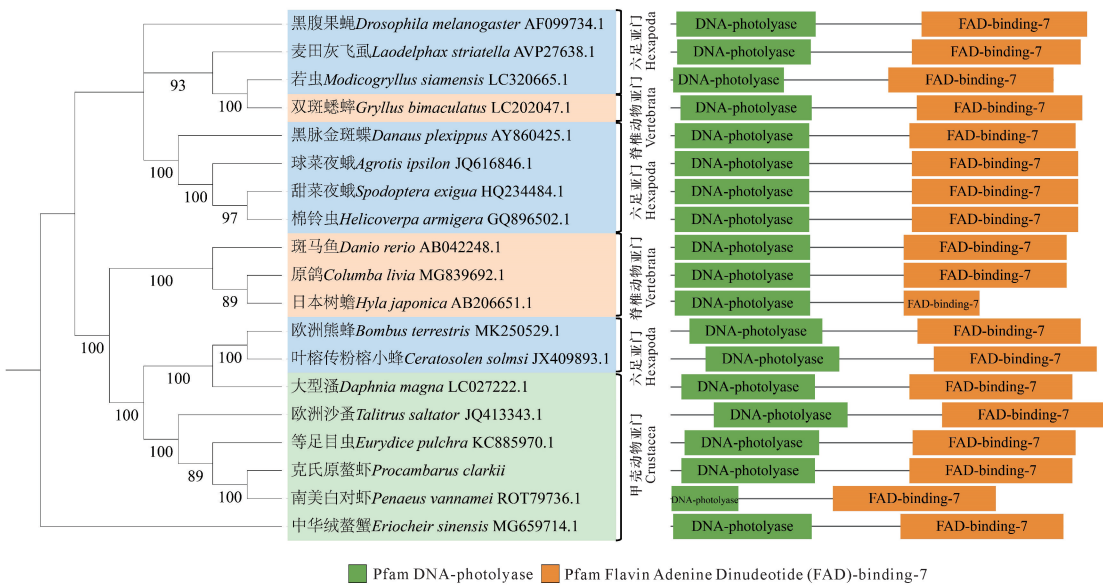
2.5 克氏原螯虾 *PcClk* 基因、*PcCry1* 基因的适应性进化分析结果

2.5.1 系统发育关系

利用包括克氏原螯虾在内的节肢动物 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因序列, 基于最大似然法构建系统发育树。结果如图 5 所示, *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因的系统发育树分为 3 个主要的进化枝: 甲壳动物亚门进化枝 (Crustacea clade)、六足动物亚门进化枝 (Hexapoda clade) 和螯肢动物亚门进化枝 (Chelicerata clade)。



(a) PcCLK与同源蛋白的系统发育树
(a) Phylogenetic tree of PcCLK and its' homologous proteins



(b) PcCRY1与同源蛋白的系统发育树
(b) Phylogenetic tree of PcCRY1 and its' homologous proteins

图2 基于邻接法构建的PcCLK和PcCRY1及其同源蛋白的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of PcCLK and PcCRY1 and their homologous proteins based on neighbor-joining method

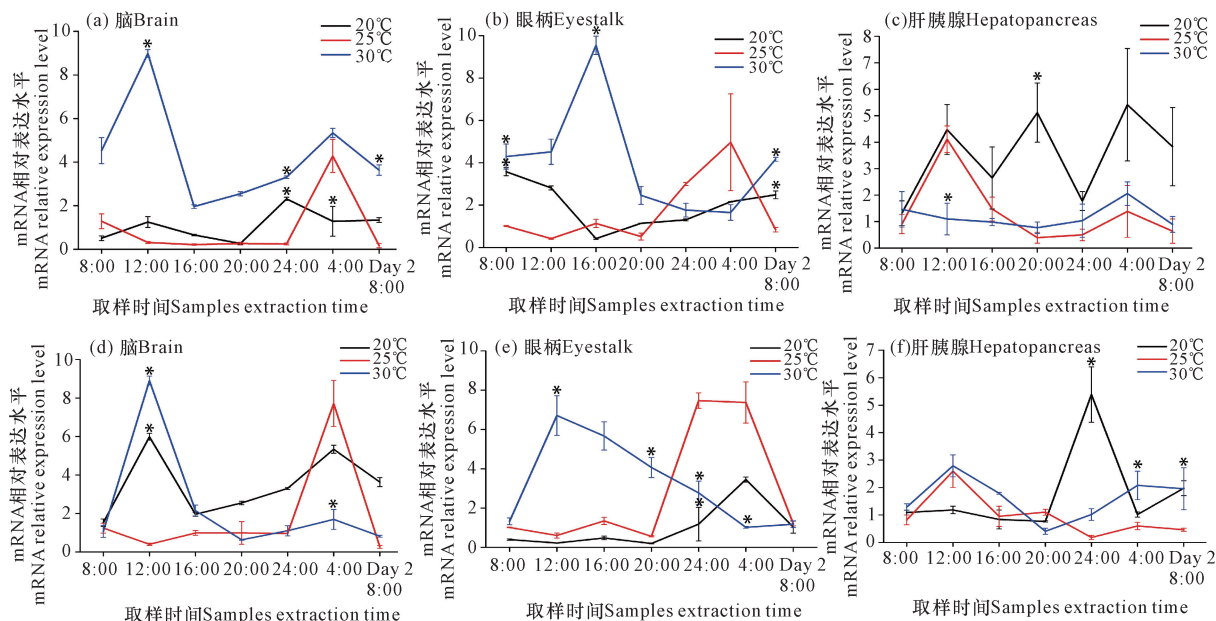
2.5.2 选择压力分析

为研究克氏原螯虾 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因是否受到正选择作用, 首先假设同一个基因的系统发育树所有分支都有同一个 ω 值。 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因 one-ratio 模型结果显示, ω 值分别为 0.023 和 0.029, 显著小于 1, 表明该基因整体上受纯化选择作用(表 4、表 5)。Free-ratio 模型假定系统发育树上每一分支和节点都具有独立的 ω 值, 结果显

示 free-ratio 模型显著优于 one-ratio 模型 ($P < 0.05$), 提示不同支系具有不同的进化速率。以克氏原螯虾为前景枝, 这两个基因 two-ratio 模型拟合效果并没有明显优于 one-ratio 模型 ($P > 0.05$), 表明克氏原螯虾 *PcClk* 基因、*PcCry1* 基因与其他近缘甲壳动物有相似的进化速率(表 4、表 5)。其次, 使用位点模型, 发现这两个基因的 M1a 模型和 M2a 模型、M7 模型和 M8a 模型、M8 模型和 M8a 模型之间均没

有显著差异 ($P > 0.05$), 而 *PcClk* 基因的 M0 模型和 M3 模型有显著差异 ($P < 0.05$)。最后, 使用分位

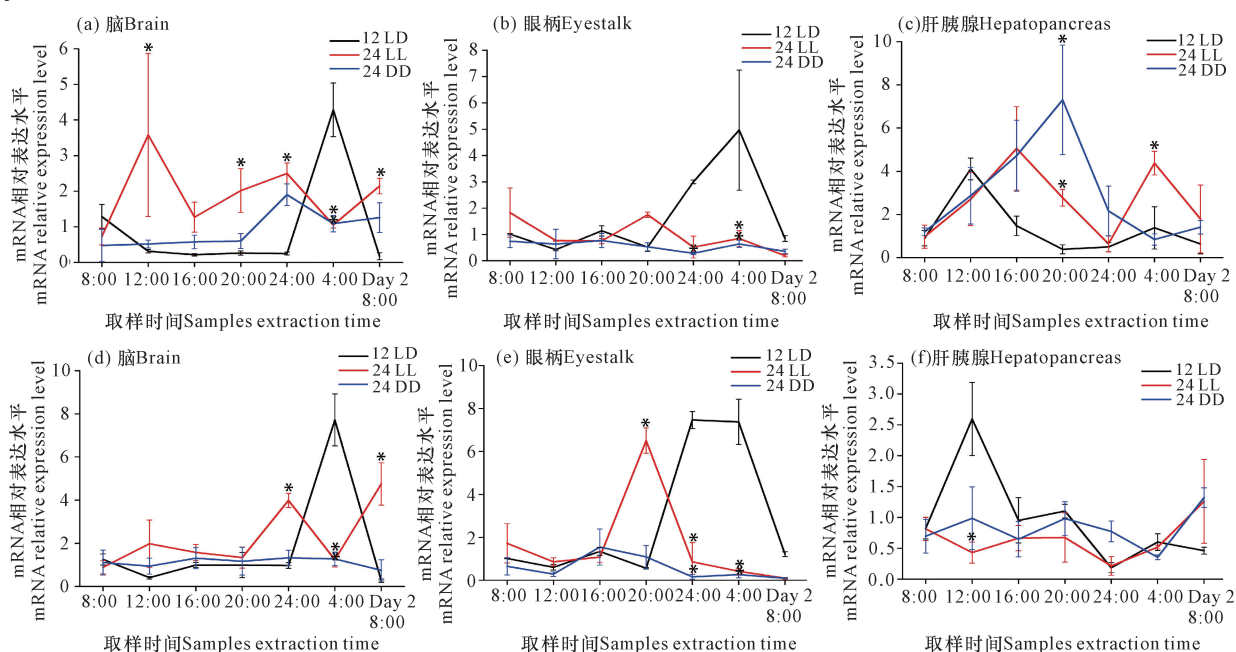
点模型检测 *PcClk* 基因、*PcCry1* 基因, *PcCry1* 基因的 Ma 模型优于 Ma0 模型 ($P < 0.01$)。



*表示在不同的温度下, 与25°C相比, mRNA表达量差异显著 ($P < 0.05$)
* indicates that the level of difference in mRNA expression is significant compared with 25°C at different temperatures ($P < 0.05$)

图3 克氏原螯虾 *PcClk* 基因[(a) - (c)]和 *PcCry1* 基因[(d) - (f)]在不同温度、不同组织中的 mRNA 表达水平(12 LD)

Fig. 3 mRNA expression levels of *PcClk* [(a) - (c)] and *PcCry1* [(d) - (f)] genes of *Procambarus clarkii* under different temperatures and in different tissues (12 LD)



*表示在不同的光照周期下, 与12 LD相比, mRNA表达量差异显著 ($P < 0.05$)
* indicates that the level of difference in mRNA expression is significant under different photoperiods compared with 12 LD ($P < 0.05$)

图4 克氏原螯虾 *PcClk* 基因[(a) - (c)]和 *PcCry1* 基因[(d) - (f)]在不同光照周期、不同组织中的 mRNA 表达水平(25°C)

Fig. 4 mRNA expression levels of *PcClk* [(a) - (c)] and *PcCry1* [(d) - (f)] genes in different tissues of *Procambarus clarkii* under different photoperiods (25°C)

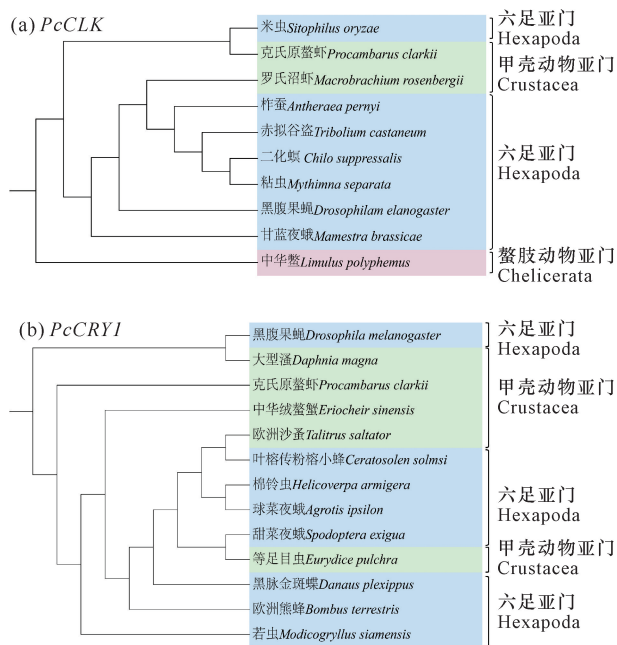


图5 节肢动物 *PcClk* 基因(a)和 *PcCry1* 基因(b)的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic trees of *PcClk* (a) and *PcCry1* (b) genes in arthropods

表4 分支模型、位点模型和分支位点模型对 *PcClk* 基因的选择压力分析

Table 4 Selective pressure analysis of the *PcClk* gene based on branch model, site model and branch-site model

模型 Models	模型比较 Model comparison	-lnL	2ΔlnL	df	P 值 P values	ω 值 ω values	正选择位点 Positive selection sites (PP>0.95)
位点模型 Site model	M3/M0	11 341.852/11 437.834	191.963	4	Nearly 0	—	Not allowed
	M2a/M1a	11 728.389/11 728.392	0.006	2	0.997	—	Not allowed
	M7/M8	11 347.926/11 347.928	0.003	2	0.997	—	Not allowed
	M8a/M8	11 360.329/11 347.928	24.802	1	Nearly 0	—	Not allowed
分支模型 Branch model	Free-ratio/one-ratio	11 419.506/11 437.834	36.655	16	0.002	—	—
	Two-ratio/one-ratio	11 437.829/11 437.834	0.010	1	0.921	ω _{Background} = 0.023, ω _{Foreground} = 0.011	—
分支位点模型 Branch-site model	Ma/Ma0	11 728.389/11 728.389	2.000	1	0.999	Background(a/b): 0.000/1.000	Not allowed

注:“—”表示无此项内容

Note:“—” indicates that the content does not exist

表5 分支模型、位点模型和分支位点模型对 *PcCry1* 基因的选择压力分析

Table 5 Selective pressure analysis of the *PcCry1* gene based on branch model, site model and branch-site model

模型 Models	模型比较 Model comparison	-lnL	2ΔlnL	df	P 值 P values	ω 值 ω values	正选择位点 Positive selection sites (PP>0.95)
位点模型 Site model	M3/M0	21 566.245/21 566.245	0.000	4	1.000	—	Not allowed
	M2a/M1a	22 029.630/22 029.635	0.009	2	0.995	—	Not allowed
	M7/M8	21 558.841/22 029.635	941.588	2	Nearly 0	—	Not allowed
	M8a/M8	22 029.635/22 029.635	0.000	1	1.000	—	Not allowed

通过 PAML 筛选,结果显示 *PcClk* 基因没有正选择位点,而 *PcCry1* 基因中鉴定有 121 个正选择位点(表 6)。为得到更加精确的结果,进一步使用 Datamonkey 网站中的 FEL、FUBAR 和 SLAC 3 种方法检测,共检测到 *PcClk* 基因有 2 个正选择位点,*PcCry1* 基因有 1 个正选择位点。最终,*PcClk* 基因中的 71,218 位点可被 FEL、SLAC 同时检测出来,而 *PcCry1* 基因中的 63 位点可被 PAML、FEL、SLAC 同时检测出来,故这些正选择位点被认为是强烈的正选择位点(表 6,几种方法同时检测出的正选择位点以粗体加波浪线标注)。

续表 5

Continued table 5

模型 Models	模型比较 Model comparison	-lnL	2ΔlnL	df	P 值 P values	ω 值 ω values	正选择位点 Positive selection sites (PP>0.95)
分支模型 Branch model	Free-ratio/one-ratio	21 548.131/21 566.245	36.227	2	0.029	—	—
	Two-ratio/one-ratio	21 566.166/21 566.245	0.159	1	0.690	ω _{Background} = 0.029, ω _{Foreground} = 0.022	—
分支位点模型 Branch-site model	Ma/Ma0	22 021.236/22 029.630	16.788	1	Nearly 0	Background(a/b): 0.000/1.000, Foreground (a/b): 105.267/105.267	2 A 0.953 * , 3 D 0.988 * , 7 G 0.996 * * , 9 A 0.985 * , 14 F 0.985 * , 16 F 0.977 * , et al, a total of 121

注:“—”表示无此项内容;2A,3D,7G,9A……表示氨基酸;*表示后验概率大于0.95;* *表示后验概率大于0.99

Note:“—” indicates that the content does not exist;2A,3D,7G,9A……indicate amino acid;* indicates a posterior probability is greater than 0.95;* * indicates a posterior probability is greater than 0.99

表 6 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因的正选择位点Table 6 Positive selection sites detection of the *PcClk* and *PcCry1* genes

Gene	PAML	Datamokey		
		FEL (P<0.2)	FUBAR (PP>0.8)	SLAC (P<0.2)
<i>PcClk</i>		71 ,124,145,157,163,201,217, 218 ,222,364,376,406, 432,433,445,455,458,460,471,507,513,521,522,525	71 ,136, 218 ,346	
<i>PcCry1</i>	6,18,21,26,27,29,31,33,34,37, 40,41,43,47,51,52,53,56,57,62, 63 ,64,66,68,69,76,80,81,85,65, 99,105,108,110,112,122,123,130, 133,138,139,140,141,147,152, 155,157,158,163,167,168,171, 178,183,185,195,200,205,207, 208,209,211,216,218,226,230, 232,237,238,241,242,243,246, 252,254,256,257,261,271,276, 281,285,293,300,302,303,304, 305,306,310,311,312,318,319, 323,371,385,388,399,404,409, 413,424,425,427,432,434,439, 441,443,447,448,452,453,454, 460,463,475,477,484,489	3,9,15,17,18,21,39,45,52, 63 ,64,65,95,99,133, 134,148,159,177,181,186,191,197,209,215,222, 237,240,247,250,261,266,271,272,273,285,309, 319,334,352,360,361,374,380,389,390,405,406, 407,408,409,411,414,430,437,449,453,470,477	169	1,50,53,55,57, 63 , 70,77,103,125, 131,178,213,239, 280,302,303,340, 400,410,417,462, 478,479

注:粗体加波浪线数字为强烈的正选择位点

Note:Bold plus wavy line numbers are strong positive selection sites

3 讨论

生物钟是生物体对地球上环境因子周期变化长期适应而演变的内在调节机制^[25]。本研究发现 *PcCry1* 基因的 71 与 213 位点受到强烈正选择作用,该位点位于 CLOCK 蛋白的 PAS 结构域中。该功能结构域可介导 CLOCK 蛋白与另一个生物钟基因的二聚体作用,对昼夜节律的产生和维持有一定作用,这与先前对其他甲壳类动物如罗氏沼虾^[26]的研究结果相似。*PcCry1* 基因的 63 位点受到强烈正选择作用,提示克氏原螯虾可能通过增强自身的调节来适应

外界环境的变化,这与李敬^[27]发现鲸 CRY 蛋白对昼夜节律的调控有一定作用的研究结果一致。

迄今关于甲壳动物生物钟基因表达的数据仍然很少。本研究中,在 12 LD 光照周期下,温度升高,脑、眼柄中的 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因 mRNA 表达增强,节律性更明显,但两个基因在胰腺中的 mRNA 表达量减弱,节律性不明显。因此,推测克氏原螯虾的 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因都是由内源性节律驱动。脑作为核心生物钟调控元件组织,在生物钟基因调控中发挥中央指挥者的作用,其时钟基因 mRNA 的表达最先受到调控;眼柄临近脑组织,因此

时钟基因 mRNA 的表达相似; 而外周组织器官离脑较远, 所以对节律性的保持没有脑组织明显。在对果蝇的研究中发现, *Clk* 表达的节律性在脑中比在心脏中更明显^[28], 而在豌豆蚜(*Acyrthosiphon pisum*) 和冈比亚疟蚊(*Anopheles gambiae*) 的研究中, *Cry* 在各自的头部存在更明显的节律性表达^[29]。这与本研究发现的克氏原螯虾的生物钟基因在脑中节律性更明显的结果一致。

在温度为 25℃ 时, 相对于 24 LL 和 24 DD 的光照周期, 12 LD 的光照周期下, 克氏原螯虾脑、眼柄、肝胰腺中 *PcClk* 基因的 mRNA 表达振荡节律更明显; 同样地, 在 25℃、12 LD 培养模式下, 脑和眼柄中 *PcCry1* 基因的 mRNA 表达节律性也较明显。这可能是由于 25℃、12 LD 对克氏原螯虾来说是适宜的温度和光照, 而适宜的温度和光暗循环更有利于克氏原螯虾 *PcClk* 和 *PcCry1* 基因节律性的保持。李龙^[30] 研究显示光照的改变对斑马鱼生物钟基因的调控有很大影响; 蔡明岐^[31] 在研究光照和温度对蚤状溞(*Daphnia pulex*) 的影响时发现, 在 25℃ 且光照和黑暗比为 8:16 时最有利于蚤状溞生物钟基因昼夜节律的保持, 也最适合蚤状溞生长; 徐加元等^[32] 发现在适宜的温度和光照周期下, 适当延长光照周期可促进克氏原螯虾雌虾卵巢的发育, 但过长的光照不仅不会促进雌虾的性腺发育, 反而会抑制其性腺发育。适宜的光照和温度有利于克氏原螯虾生物钟基因的调节, 而生物钟调节的稳定对生物体健康状况意义重大。本研究中, 25℃、12 LD 培养模式最有利于克氏原螯虾 *PcClk* 和 *PcCry1* 基因节律性的保持, 而生物钟节律的稳定可以让克氏原螯虾保持更稳定的健康状态。由此可见, 在克氏原螯虾的养殖过程中选择合适的温度和光照尤为重要。

4 结论

在温度 25℃、12 LD 光照周期下, 克氏原螯虾脑中的 *PcClk* 和 *PcCry1* 的 mRNA 表达都呈现出一定的振荡节律, 说明 *PcClk* 基因和 *PcCry1* 基因是内源性的节律基因。选择压力分析显示, 通过 PAML 和 Datamonkey 共同筛选出的 PcCLK 正选择位点为 71 与 213, PcCRY1 正选择位点为 63。这些位点在节肢动物 CLK 和 CRY1 蛋白进化中起重要作用, 调控 mRNA 翻译过程和蛋白质相互作用, 可能参与节肢动物内在节律的调控。

参考文献

- [1] WOELFLE M A, OUYANG Y, PHANVIJHITSIRI K, et al. The adaptive value of circadian clocks: An experimental assessment in cyanobacteria [J]. *Current Biology*, 2004, 14(16): 1481-1486.
- [2] ABE M, HERZOG E D, YAMAZAKI S, et al. Circadian rhythms in isolated brain regions [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 22(1): 350-356.
- [3] 黎小梅, 金凤. 时钟基因 *CLOCK* 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(8): 1370-1374.
- [4] JOSKA T M, ZAMAN R, BELDEN W J. Regulated DNA methylation and the circadian clock: Implications in cancer [J]. *Biology*, 2014, 3(3): 560-577.
- [5] DODD A N, SALATHIA N, HALL A, et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage [J]. *Science*, 2005, 309(5734): 630-633.
- [6] INADA Y, UCHIDA H, UMEMURA Y, et al. Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos [J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(3): 459-465.
- [7] WHITMORE D, FOULKES N S, STRÄHLE U, et al. Zebrafish *Clock* rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators [J]. *Nature Neuroscience*, 1998, 1(8): 701-707.
- [8] SANCAR A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors [J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103(6): 2203-2237.
- [9] 张达燕, 梁辉, 司马杨虎, 等. 温度与光照节律对家蚕成虫生物钟基因 *Cry1* 和 *Cry2* 表达的影响[J]. *蚕业科学*, 2013, 39(3): 453-459.
- [10] LIN C T, ROBERTSON D E, RAIBEKAS A, et al. Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1 [J]. *Science*, 1995, 269(5226): 968-970.
- [11] 谢伟, 蒋琦辰, 孙宾, 等. 克氏原螯虾 *PcCyc* 基因克隆及其对光周期的表达响应[J]. *水产科学*, 2021, 40(1): 72-80.
- [12] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [M]//WALKER J M. *The proteomics protocols handbook*. Springer protocols handbooks. Totowa NJ: Humana Press Inc., 2005: 571-607.
- [13] ARMENTEROS J J A, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nature Biotechnol*

- nology, 2019, 37(4): 420-423.
- [14] IVICA L, PEER B. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D493-D496.
- [15] KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567-580.
- [16] BORDOLI L, SCHWEDE T. Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL workspace and the protein model portal [M]// ORRY A, ABAGYAN R. Homology modeling. *Methods in molecular biology (Methods and Protocols)*, Totowa NJ: Humana Press, 2012, 857: 107-136.
- [17] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] LÖYTYNOJA A. Phylogeny-aware alignment with PRANK [M]// RUSSELL D J. Multiple sequence alignment methods. *Methods in molecular biology (Methods and protocols)*. Totowa NJ: Humana Press, 2014, 1079: 155-170.
- [20] TALAVERA G, CASTRESANA J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments [J]. *Systematic Biology*, 2007, 56(4): 564-577.
- [21] NGUYEN L T, SCHMIDT H A, VON HAESLER A, et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268-274.
- [22] YANG Z H. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [23] YANG Z H, WONG W S W, NIELSEN R. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(4): 1107-1118.
- [24] WEAVER S, SHANK S D, SPIELMAN S J, et al. Datamonkey 2.0: A modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(3): 773-777.
- [25] DUNLAP J C. Molecular bases for circadian clocks [J]. *Cell*, 1999, 96(2): 271-290.
- [26] CHRISTIE A E, YU A, PASCUAL M G. Circadian signaling in the northern krill *Meganctiphanes norvegica*: *In silico* prediction of the protein components of a putative clock system using a publicly accessible transcriptome [J]. *Marine Genomics*, 2018, 37(1): 97-113.
- [27] 李敬. 海洋哺乳动物睡眠进化的遗传机制[D]. 南京: 南京师范大学, 2018.
- [28] 李秋芳. 增龄与 *Clk* 基因表达下调对果蝇睡眠-活动节律和心跳节律的影响及运动干预效果研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2018.
- [29] CORTÉS T, ORTIZ-RIVAS B, MARTÍNEZ-TORRES D. Identification and characterization of circadian *clock* genes in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19 (Suppl 2): 123-139.
- [30] 李龙. 斑马鱼血管活性肠肽 II 型受体 *Vipr2/Vpac2* 参与生物钟调控进程[D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- [31] 蔡明岐. 光暗循环对蚤状溞衰老的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2020.
- [32] 徐加元, 岳彩锋, 戴颖, 等. 水温、光周期和饲料对克氏原螯虾雌虾成活和性腺发育的影响[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 42(1): 97-101.

Effects of Temperature and Light on the Expression of Circadian Clock Genes *PcClk* and *PcCry1* in *Procambarus clarkii*

ZHOU Hui^{1,2}, WU Haixia², XIE Wei², WANG Yunyun², JIANG Qichen³, LI Peng²

(1. College of Ocean Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu, 210023, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu, 210023, China; 3. Jiangsu Freshwater Fisheries Research Institute, Nanjing, Jiangsu, 210017, China)

Abstract: *Clock (Clk)* genes and *cryptochrome (Cry)* genes are involved in the regulation of biological intrinsic rhythm. *Procambarus clarkii* is an important economic aquaculture shrimp in China. In order to explore the effects of temperature and light on the growth of *Procambarus clarkii* and the rhythmic oscillation expression of clock genes *PcClk* and *PcCry1*, real-time quantitative PCR was used to explore the mRNA expression patterns of *PcClk* and *PcCry1* genes in brain, eyestalk stem and hepatopancreas tissues of *Procambarus clarkii*. The adaptive evolution of *PcClk* and *PcCry1* genes in the adaptation process of temperature and photoperiod was also discussed. The results of fluorescence quantitative PCR showed that *PcClk* and *PcCry1* genes of *Procambarus clarkii* were both expressed in the brain, eyestalk and hepatopancreas. Under different photoperiod, the mRNA expression of *PcClk* and *PcCry1* genes in the brain and eyestalk showed a certain oscillating rhythm, and the mRNA expression of *PcClk* and *PcCry1* genes in the brain was more obvious under the culture mode of 25°C and 12 LD. The selection pressure analysis showed that the positive selection sites of *PcCLK* screened by PAML and Datamonkey were 71 and 213, and the positive selection sites of *PcCRY1* were 63. The above results indicated that the *PcClk* and *PcCry1* genes were subjected to the selection pressure, and *PcClk* and *PcCry1* genes were endogenous rhythm genes.

Key words: circadian rhythm; *Procambarus clarkii*; circadian clock gene; mRNA expression; selection pressure

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>