



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 孤雌卤虫保幼激素相关受体基因 Met 表达特征分析
作者: 刘伟, 穆民, 李志腾, 隋丽英
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240183
收稿日期: 2024-09-12
网络首发日期: 2025-01-16
引用格式: 刘伟, 穆民, 李志腾, 隋丽英. 孤雌卤虫保幼激素相关受体基因 Met 表达特征分析[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20240183>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240183

孤雌卤虫保幼激素相关受体基因 *Met* 表达特征分析

刘伟¹, 穆民², 李志腾¹, 隋丽英¹

(1. 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457; 2. 北京燃气集团(天津)液化天然气有限公司, 天津 300280)

摘要: 保幼激素 (juvenile hormone, JH) 是执行内分泌调节的重要激素之一, 在节肢动物的生殖发育和变态过程中通过与其相关受体结合发挥重要作用。为了探究保幼激素相关受体基因 *Met* 在孤雌生殖卤虫 (*Artemiaparthenogenetica*) 卵巢发育过程中的作用, 本研究对 *ApMet* 基因 (孤雌卤虫保幼激素相关受体基因 *Met*) 进行了相关生物信息学分析, 采用 qRT-PCR 验证该基因在卤虫卵巢 (ovary)、脑神经节 (cerebral ganglion) 和肠道 (intestine) 组织中的时空表达特征。结果显示, *ApMet* 基因的开放阅读框全长 1476 bp, 编码 419 个氨基酸; 该基因具有节肢动物中 4 个保守的典型结构域, 分别是 bHLH、PAS-A、PAS-B 以及 PAC, *ApMet* 蛋白的三级结构主要包含无规则卷和 α -螺旋, 二级结构相似; 在 ML 系统发育树中, 孤雌生殖卤虫与溞状蚤 (*Daphnia pulex*) 和大型蚤 (*Daphnia magna*) 最为相近, 与德国小蠊 (*Blattella germanica*) 等昆虫的亲缘关系较远。基因表达特征分析结果显示, *ApMet* 在肠道中表达量最高, 卵巢次之, 且在卵巢发育过程中呈差异性表达, 表明该基因可能是多功能基因且参与了卤虫的卵巢发育过程。本研究为甲壳动物 *Met* 基因结构及生理功能提供参考和依据。

关键词: 保幼激素相关受体; *ApMet* 分析; 卤虫; 卵巢发育; *ApMet* 表达规律

中图分类号: Q74

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(0000)00-0000-00

Analysis of Expression Profile of Juvenile Hormone Related Receptor Gene

Met in *Artemiaparthenogenetica*

LIU Wei¹, MU Min², LI Zhiteng¹, SUI Liying¹

(1. College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Beijing Gas Group (Tianjin) Liquefied Natural Gas Co., Ltd., Tianjin 300280, China)

Abstract: Juvenile hormone (JH) is one of the key hormones involving in endocrine regulation, playing crucial roles in reproductive development and metamorphosis of arthropods through its associated receptors. The role of juvenile hormone receptor *Met* (Methoprene-tolerant) gene in the ovarian development of *Artemiaparthenogenetica* was investigated in this study through a bioinformatics analysis of the *ApMet* gene (juvenile hormone related receptor gene *Met* in *Artemiaparthenogenetica*), and its spatial and temporal expression patterns in ovary, cerebral ganglion and intestine of *Artemia* were validated using qRT-PCR. The results revealed that the ORF of *ApMet* gene contains 1476 bp, encoding a protein of 419 amino acids. Four conserved domains, namely bHLH, PAS-A, PAS-B, and PAC, are possessed by the *ApMet* gene. The tertiary structure prediction of *ApMet* protein includes irregular coils and α -helices, consistent with the secondary structure prediction results. In the ML phylogenetic tree, *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* are identified as the closest relatives to Parthenogenetic *Artemia*, while a more distant relationship is observed with insects *Blattella germanica*. Gene expression analysis showed that *ApMet* is most highly expressed in the intestine, followed by ovary, and exhibiting differential expression during ovarian development. Our study provides a reference for the bioinformation structure and physiological function of crustacean *Met* gene.

收稿日期: 2024-09-12; 修回日期: 2024-12-02

作者简介: 刘伟(1998—), 女, 山东聊城人, 硕士研究生; 通信作者: 隋丽英, 教授, suily@tust.edu.cn

Key words: juvenile hormone related receptor; *ApMet* analysis; *Artemia*; ovarian development; *ApMet* gene expression pattern

保幼激素 (juvenile hormone, JH) 在抑制节肢动物, 尤其是昆虫的变态和刺激生殖等方面具有不可或缺的作用^[1-2], 是该类群动物十分重要的内分泌激素。在昆虫中, JH 由咽侧体分泌, 它可通过激活脂肪细胞内的磷脂酶 C 和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 传递信号路径, 与胞内受体耐甲氧丙烯 (methoprene-tolerant, Met) 结合, 从而调节下游卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vg) 的合成^[3-4]。JH 在甲壳动物中的作用机制可能与昆虫类似, 通过膜受体和核受体实现逐级调控^[5], 目前推测甲壳动物中 JH 的候选受体基因为 *Met*, 但仍缺乏对该基因结构和组织表达规律的认识。

Met 属于碱性螺旋-环-螺旋 bHLH-PAS 转录因子基因家族的成员^[6], 最初是在探究 *Met* 突变体黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 对 JH 抗性研究中发现的, *Met* 突变体对果蝇幼虫变态的诱导作用强于正常果蝇^[7]。此后有研究^[8]再次表明, JH 可以强烈结合 *Met* 基因且诱导 *Met* 基因转录, 故 *Met* 被证实为 JH 的受体^[9]。JH 促使 *Met* 与类固醇受体共激活因子 (steroid receptor coactivator, SRC) 形成异源二聚体复合物, 随后激活下游转录因子 *Kr-h1* 等^[5]。黑腹果蝇 *Met* 突变体显示出卵黄发生和产卵延迟的现象^[7]。赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 中干扰 *Met* 基因后下调了 *Vg* 基因的表达^[10]。在埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 中, *Met* 基因干扰后会延迟卵巢发育并降低产卵量^[11-12]。

近年来, 对于甲壳类动物 *Met* 基因功能机制研究有了一定的研究进展, 先后报道了三疣梭子蟹、多齿新米虾 (*Neocaridina denticulata*) 以及溞状蚤 (*Daphnia pulex*) 和大型蚤 (*Daphnia magna*) 中的 *Met* 基因序列^[5,13-14]。在溞状蚤和大型蚤中, *Met* 与 SRC 形成异源二聚体复合物响应 MF, 类似昆虫中的保幼激素信号转导机制^[5]。在水蚤中, *Met* 能与 SRC 结合形成二聚体复合物, 并可能作为 MF 的受体发挥作用^[15]。然而, *Met* 基因的结构特征以及是否为甲壳类动物 JH 的受体仍需进一步验证。

基于团队对于孤雌卤虫卵巢发育时期的研究基础, 即孤雌卤虫卵巢发育分为 3 个阶段, 细分为 5 个时期, 分别为卵巢发育期 (Stage I)、成熟前期 (Stage II)、成熟中期 (Stage III)、成熟后期 (Stage IV)、产卵期 (Stage V)^[16]。本研究利用生物信息学的方法探究 *ApMet* 基因的进化关系, 通过 qRT-

PCR 分析 *ApMet* 基因在孤雌卤虫不同组织及卵巢不同发育时期的表达模式, 从而为阐述 *ApMet* 基因在卤虫生长发育过程中发挥功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取新疆艾比湖孤雌生殖 2 倍体卤虫为实验对象, 该品系卤虫具有发育同步性较好、个体大小适中、遗传背景清晰等特点。课题组前期已建立相应研究平台并查明卵巢发育时期、表型特征^[16], 便于实验室内操作。

1.2 卤虫孵化和养殖

卤虫孵化和养殖采用实验室标准化方式: 称取 0.08 g 卤虫卵, 加入盛有 1 L 稀释卤水 (盐度 30) 的孵化管中, 水温恒定保持在 28°C, 光照 2000 lux, 充气孵化。24 h 后收集无节幼体, 置于体积 20 L 盛有稀释卤水 (盐度 70) 的长方形塑料箱中培养, 初始密度为 200 只/L, 孵化后前 2 d 不进行饵料的投喂, 之后每天按照卤虫的大小早中晚 3 次投喂适量的新鲜小球藻 (*Chlorella*) 藻液。根据水体情况, 平均 5 d 换一次水, 并及时清理食物残渣和排泄物。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

使用 Trizol (赛默飞世尔科技公司) 从处于卵巢发育 5 个不同时期^[16]卤虫的脑神经节、卵巢和肠道组织中提取总 RNA, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 通过核酸蛋白测定仪 (德国艾本德公司) 测定浓度及 A260/A280 比值。取 1 μg 通过浓度质量检测的 RNA, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 去除其基因组 DNA 并进行逆转录。

1.4 *ApMet* 基因的生信分析

利用 ORF finder 在线网站获取 *ApMet* 基因的 ORF, 并翻译出对应的氨基酸序列; 利用 NR 数据库对 *ApMet* 基因的氨基酸序列进行 BLAST 比对, 下载相似性高的物种氨基酸序列; 通过 SMART 在线网站进行 *ApMet* 氨基酸保守结构域的预测; 利用 ExPaSy 预测各基因对应氨基酸数量、相对分子质量和等电点; 使用 Target P 1.1 Server 和 PSOR 对各基因的亚细胞定位和线粒体定位进行预测。

采用 DNAMAN 软件进行多种物种的氨基酸序列多重比对分析, 采用最大似然法 (ML) 利用

MEGA10.0 软件,对孤雌卤虫和其他物种的氨基酸序列进行比对,构建系统发育树,分析 *ApMet* 与其他物种 *Met* 基因的进化关系。

1.5 *ApMet* 基因组织分布及时空发育分析

所用引物用 Primer 5.0 自主设计,交由华大基因公司合成。具体引物序列见表 1。

以 β -actin 作为内参基因使表达水平正常化,探

究 *ApMet* 基因在孤雌卤虫不同发育时期的卵巢、脑神经节、肠道组织中的表达分布水平。每个样品 3 次重复,PCR 反应程序为:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 10 s,54℃ 退火 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量,并使用 SPSS 25.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。所有 qRT-PCR 引物列于表 1。

表 1 所用引物序列及扩增长度

Tab.1 Primer sequences and amplification lengths

引物名称	引物序列	序列大小/bp	目的
Met-F	CCAGTCCATCAGTTACC	155	qPCR
Met-R	CGAAGAATAGACGTTTT		
β -actin-F	AGCGGTTGCCATTTATTGTT	141	qPCR
β -actin-R	GTTCGTGACTTGACGGACTATAT		

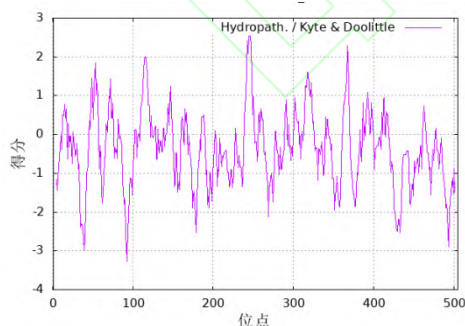
1.6 统计学分析

数据以“平均值±标准差”表示,采用 SPSS 25.0 通过单因素方差分析和 Duncan 多重比较分析显著性,使用 t 检验推断两组之间的统计学显著差异。

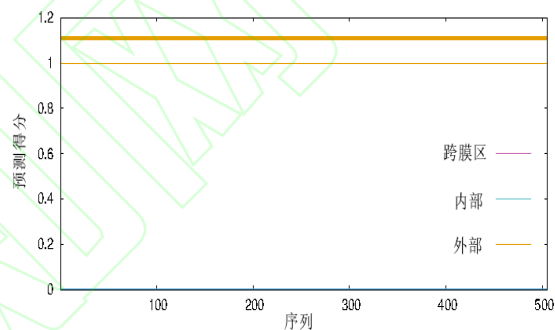
2 结果与分析

2.1 *ApMet* 基因序列特征分析

ApMet 基因的 ORF 全长 1476 bp,编码 419 个氨基酸;*ApMet* 基因编码蛋白的分子式为 $C_{2417}H_{3842}N_{690}O_{742}S_{17}$,相对分子质量 54984,总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.420,*ApMet* 基因氨基酸序列的理论等电点和不稳定指数分别为 8.72 和 48.40。*ApMet* 基因亲/疏水性和跨膜结构域如图 1 所示。该蛋白为亲水性蛋白,*ApMet* 无跨膜结构域。



(a) 亲/疏水性



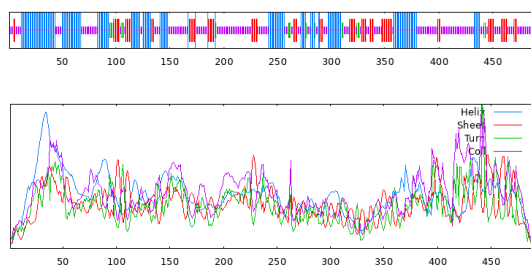
(b) 跨膜结构域

图 1 *ApMet* 基因亲/疏水性和跨膜结构域

Fig. 1 Hydrophilicity and hydrophobicity of *ApMet* gene and transmembrane domain

2.2 *ApMet* 蛋白高级结构分析

ApMet 基因编码蛋白的二级结构和三级结构如图 2 所示。*ApMet* 基因所编码蛋白的二级结构主要包含 4 种不同的折叠形式,*ApMet* 蛋白的三级结构主要包含无规则卷和 α -螺旋,与二级结构的预测结果一致。



(a) 二级结构



(b) 三级结构

图 2 ApMet 基因编码蛋白的二级结构和三级结构

Fig. 2 Secondary structure and tertiary structures of the protein encoded by ApMet gene

2.3 ApMet 保守结构域预测及序列相似性分析

经 Blast 比对, ApMet 基因氨基酸序列与黑腹果蝇的序列相似性最高, 为 38.99%; 保守结构域预测结果表明, 该基因包含 4 个独立的典型结构域 (图 3), 分别是 bHLH (18-71 aa)、PAS-A (87-154 aa)、PAS-B (241-310 aa) 以及 PAC (317-360 aa), 其 PAC 在靠近 PAS-B 的 C 端, 有利于 PAS 的折叠。氨基酸多重序列比对显示, ApMet 与其他甲壳类动物 Mets 基因相似, 序列高度保守 (图 4)。

表 2 Met 氨基酸序列相似性比较

Tab.2 Similarity comparison of amino acid sequence of Met

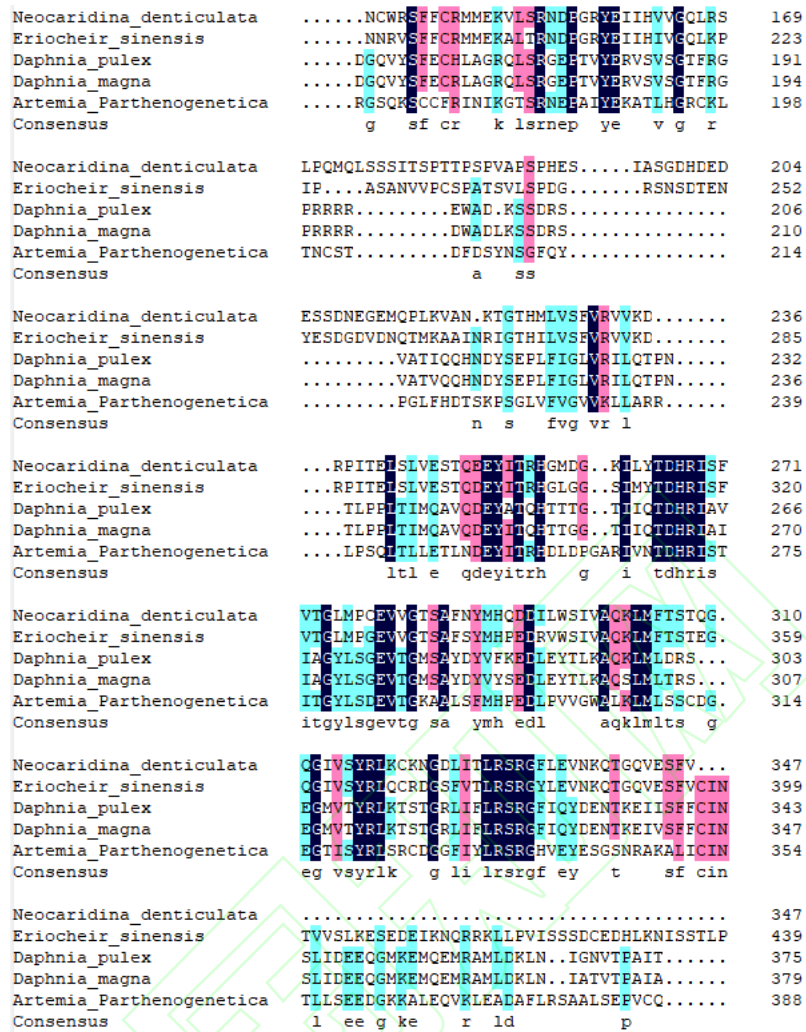
序列号	物种	序列相似性/%
BAM83853.1	<i>Daphnia pulex</i> 溞状蚤	36.79
BAM83855.1	<i>Daphnia magna</i> 大型蚤	38.07
QLH01997.1	<i>Eriocheir sinensis</i> 中华绒螯蟹	35.98
AIY69134.1	<i>Neocaridina denticulata</i> 锯齿新米虾	32.97
NP_001285132.1	<i>Drosophila melanogaster</i> 黑腹果蝇	39.87
BAR92640.1	<i>Zootermopsis nevadensis</i> 湿木白蚁	38.99
AAW82472	<i>Aedes aegypti</i> 埃及伊蚊	31.76
CDO33887.1	<i>Blattella germanica</i> 德国小蠊	31.31
AEW22978.1	<i>Thermobia domestica</i> 斑衣鱼	31.25



图 3 ApMet 氨基酸序列保守结构域预测

Fig. 3 ApMet amino acid sequence conserved domain

Neocaridina_denticulataMRNYAEKRRDKLNITYVAFIASIVFL	26
Eriocheir_sinensis	DMGGEQKFRSSREMRNYAEKRRDKLNININLAGIVFL	80
Daphnia_pulex	...MSETLPSSSREMRNRAEKRRDKLNAYISELYSLVFS	37
Daphnia_magna	MDKMSETLPSSSREMRNRAEKRRDKLNAYISELYSLVFS	40
Artemia_Parthenogenetica	KEGVPVHQLPSSRLMRNIAEKRRDKLNGFINLSALVET	41
Consensus	lpssssremxn aekqrrdkln yi el slvp	
Neocaridina_denticulata	GSGANKRIDKTSVLRLEPNYIRMHKVLK.DDDEASK....	61
Eriocheir_sinensis	GSGGSKRIDKTSVLRLEPNYIRMHKILAKEDDEAEK....	116
Daphnia_pulex	AAAAFRKIDKTSVLRISANFLRIHQNVDLRVKPYNR....	73
Daphnia_magna	AAAAFRKIDKTSVLRISANFLRIHQNVDLRMKPYNR....	76
Artemia_Parthenogenetica	VACAFRKIDKTSVLRLEPNYIRMHKVLKQNVFWAISTRRE...	78
Consensus	a aprkldktstlrlaanlyr hqn r	
Neocaridina_denticulataVPPLLGREVTHSLAEAIG...GFLLVVTSSGK	90
Eriocheir_sinensisVPPVIGGNIAHNLAEAVG...GFLLVVTSTGR	145
Daphnia_pulexWNALAGHTILEKLDLS...FLLVVSCCSGK	99
Daphnia_magnaWNALAGHSILEKLDLS...FLLVVSCCSGK	102
Artemia_ParthenogeneticaKFERKLNFRTRIDFLQNLDLS...FLVVLVSNHAK	109
Consensus	ln h le lds fllvvs sgk	
Neocaridina_denticulata	VLYITEAVDQFFGHTQVLLGHSIYNVIFPDHEIFQQQL	130
Eriocheir_sinensis	VVYVTEAVDQFFGHSQVLLGHSIYNVIFPDHEIFQQQL	185
Daphnia_pulex	IIYVDRVERKLLGHACVDMMGYQLSCFVHQADQEAIEKRL	139
Daphnia_magna	IIYVDRVERKLLGHACVDMMGYQLSCFVHQADQEAIEKRL	142
Artemia_Parthenogenetica	VLHVTEAVENLLSYCADMLGMSLYHFIFPDHGLFRSQI	149
Consensus	v yvte ve llgh qvdmllg sly fihip dhe f ql	



深蓝色、粉红色和蓝色阴影分别表示氨基酸序列一致性为 100%、99%~75%和小于 75%。

图 4 ApMet 氨基酸序列与所选物种比对

Fig. 4 ApMet amino acid sequence alignment with reference species

2.4 ApMet 系统发育树构建

ApMet 氨基酸系统发育树构建结果显示, ApMet 与蚤状蚤、大型蚤聚在一支,表明它们之间的亲缘关系最为密切,其次与多齿新米虾 (*Neocaridina denticulata*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 聚为一大支;而昆虫则形成另一支,表明 ApMet 与甲壳动物的亲缘关系较昆虫更为密切,这与传统分类学的观点一致(图 5)。

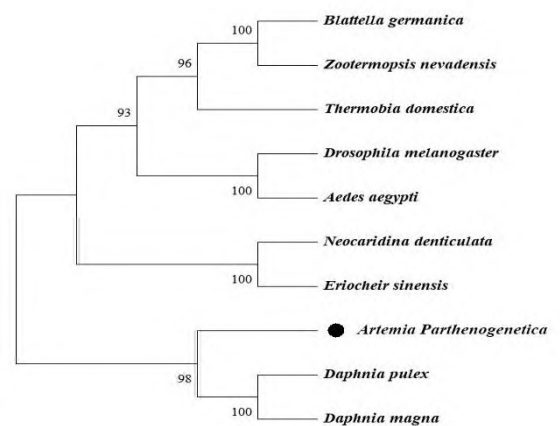


图 5 ApMet 与相关物种氨基酸序列构建的 ML 系统发育树

Fig. 5 ML phylogenetic tree constructed using amino acid sequences of ApMet and reference species

2.5 ApMet 基因在孤雌生殖卤虫不同组织中的表达规

律分析

ApMet 基因在卤虫不同组织中的表达如图 6 所示, 不同小写字母表示组间差异显著水平 ($P < 0.01$)。在卵巢发育 I 期、II 期及 III 期, *ApMet* 在肠道中表达量最高, 卵巢次之, 在脑神经组织中只有少量表达 ($P < 0.01$); 在 IV 期及 V 期, *ApMet* 在肠道中表达量最高, 脑神经节次之, 在卵巢组织中只有少量表达 ($P < 0.01$)。

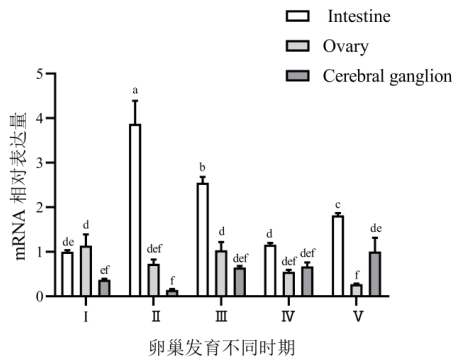


图 6 *ApMet* 基因在卤虫卵巢发育不同时期不同组织中的表达

Fig. 6 Expression of *ApMet* gene in different tissues at different stages ovary of *Artemia*

2.6 *ApMet* 基因在孤雌生殖卤虫卵巢不同发育时期的表达规律分析

为更好地了解 *ApMet* 基因与卵巢发育的相关性, 采用 qRT-PCR 测定了不同卵巢发育阶段 *ApMet* 转录本的相对丰度, 结果如图 7 所示, 不同小写字母表示组间差异显著水平 ($P < 0.01$)。从卵巢成熟前期 (II) 至产卵期 (V), *ApMet* 的表达量呈现先上升后下降趋势, 尤其在成熟中期 (IV) 达到峰值 ($P < 0.01$), 表明其参与卵巢发育、卵黄发生和卵子成熟过程。

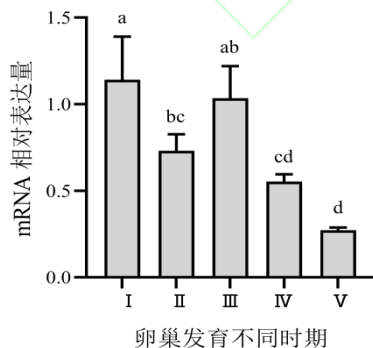


图 7 *ApMet* 基因在卤虫卵巢不同发育时期的表达

Fig. 7 Expression of *ApMet* gene in *Artemia* ovary at different developmental stages

注: 不同小写字母代表显著水平 ($P < 0.01$)

3 讨论

在昆虫中, *Met* 是相应 JH 信号的胞内受体, 进而将 JH 信号传导给下游转录因子, 参与调控昆虫的卵巢发育及交配行为等生理过程^[17-18]。本研究基于孤雌卤虫卵巢转录组数据 (NCBI: SAMN36887526), 筛选出了卵巢不同发育时期差异显著的 *ApMet* 基因。保守结构域预测结果表明, 含有 bHLH-PAS 核转录调节因子家族蛋白典型的结构域^[11,19]。据报道, 昆虫 *Met* 的 PAS-B 结构域含有保守的疏水囊和 8 个特定的氨基酸残基, 以此来结合配体, 8 个氨基酸残基依次是 Try252、Thr254、Ile262、Val280、Val297、Leu318、Thr330 和 Cys347^[20]。与昆虫中特定的 8 个氨基酸残基相比, 本研究中 *ApMet* 只有一个氨基酸残基发生了突变, 即 Thr330 被 Ser 代替。同样, 中华绒螯蟹和凡纳滨对虾中的苏氨酸也被丝氨酸所替代, 这种氨基酸残基替换差异, 可能会导致 *Met* 在昆虫和甲壳动物之间结合不同的配体^[21-22], 是否还具有其他功能差异还需要进一步研究。

Met 基因在节肢动物的各个组织中展现出多样化的表达模式, 这与其配体 JH/MF 在节肢动物中多功能的角色密切相关^[21,23]。在三疣梭子蟹和中华绒螯蟹中, *Met* 均是在肝胰腺中表达量最高, 其次是卵巢^[13,22]。在鳞翅目昆虫家蚕 (*Bombyx mori*) 幼虫中, *Met* 基因于卵巢、精巢和脂肪体中的表达量均较高^[24]。桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*) *Met* 基因在 3 龄幼虫时期, 于马氏管和脂肪体组织中表达量较高, 其次为中肠和表皮^[25]。本研究发现, *ApMet* 在各组织中广泛分布, 在肠道组织中表达量最高, 卵巢组织次之, 因此推断 *ApMet* 基因的功能具有多样性, 此外基因组织分布的差异也可能与采集的个体发育不同阶段的组织有关。但研究表明, 肝胰腺和卵巢均是卵黄发生的重要场所^[26-27], 因此, *ApMet* 基因可能参与调控卵黄发生。

在不同的节肢动物中 *Met* 基因的时空表达模式具有极大差异。中华绒螯蟹中的 *Met* 基因在整个卵巢发育阶段一直处于较低水平, 且无显著变化^[22]。*Met* 基因在眼柄完整的凡纳滨对虾中, 于未成熟阶段时的表达量最低, 于初级卵巢发生阶段和成熟阶段表达量达到峰值^[21]。在褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 中, *Met* 基因在卵期、各龄若虫以及成虫阶段均表现出差异化的表达模式, 其中在卵期表达水平较高^[28]。蟑螂 (*Diploptera punctata*) 中的 *Met* 基因在卵母细胞成熟过程中稳定表达, 无

显著差异^[29]。在本研究中, *ApMet* 于卵巢发育期 (I) 表达量最高, 而卵巢发育期主要是卵巢小体芽发育的过程, 提示此阶段该基因可能参与调节了卵巢发育与卵子成熟^[16]; 卵巢成熟前期 (II) 至产卵期 (V), *ApMet* 的表达量先上升后下调, 表明其在卵黄发生, 卵母细胞成熟过程中发挥重要作用, 但具体功能仍需进一步验证。

本研究对孤雌生殖卤虫的 *Met* 基因进行了生物信息学分析, 表明其氨基酸序列较为保守, 与甲壳动物的亲缘关系较昆虫更为密切。通过 qRT-PCR 探究了 *ApMet* 基因的组织分布及时空表达特征, 发现 *ApMet* 基因参与了生殖过程, 并提示它可能在卵巢发育、卵黄发生及后期卵子成熟中发挥作用。本研究为后期探究 *ApMet* 基因的分子机制及生理功能奠定了基础, 并对完善甲壳动物中生殖发育基础理论具有重要意义。

参考文献:

- [1] WU X, 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.
- [2] LURIA A, FURLOW J D. Spatiotemporal retinoid-X receptor activation detected in live vertebrate embryos[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(24): 8987–8992.
- [3] 谢持真, 陆颖, 邱高峰. 泛甲壳动物激素调控卵黄蛋白原合成的分子机制研究进展[J]. *水产学报*, 2024, 48(2): 3–17.
- [4] 王亮亮, 罗雨涵, 李阳, 等. 昆虫保幼激素的生殖调控机制研究进展[J]. *环境昆虫学报*, 2023, 45(6):1483–1491.
- [5] MIYAKAWA H, TOYOTA K, HIRAKAWA I, et al. A mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans[J]. *Nature communications*, 2013, 4: 1856.
- [6] ASHOK M, TURNER C, WILSON T G. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 2761–2766.
- [7] WILSON T G, FABIAN J. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone[J]. *Developmental biology*, 1986, 118(1): 190–201.
- [8] MIURA K, ODA M, MAKITA S, et al. Characterization of the *Drosophilamethoprenetolerant* gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation[J]. *The FEBS journal*, 2005, 272(5): 1169–1178.
- [9] JINDRA M, UHLIROVA M, CHARLES J-P, et al. Genetic evidence for function of the bHLH-PAS protein Gce/Met as a juvenile hormone receptor[J]. *PLoS genetics*, 2015, 11(7): e1005394.
- [10] PARTHASARATHY R, SUN Z, BAI H, et al. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2010, 40(5): 405–414.
- [11] Li M, MEAD E A, ZHU J. Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2011, 108(2): 638–643.
- [12] ZOU Z, SAHA T T, ROY S, et al. Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2013, 110(24): 2173–2181.
- [13] LIU M, XIE X, TAO T, et al. Molecular characterization of methoprene-tolerant gene (*Met*) in the swimming crab *Portunus trituberculatus*: its putative role in methyl farnesoate-mediated vitellogenin transcriptional activation[J]. *Animal reproduction science*, 2016, 174: 132–142.
- [14] 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.
- [15] KAKALEY E K M, WANG H Y, LEBLANC G A. Agonist-mediated assembly of the crustacean methyl farnesoate receptor[J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 45071.
- [16] DUAN H, SHAO X, LIU W, et al. Spatio-temporal patterns of ovarian development and *VgR* gene silencing reduced fecundity in *Artemia parthenogenetic*[J]. *Open biology*, 2023, 13(11): 230172.
- [17] WEN D, RIVERA-PEREZ C, ABDON M, et al. Methyl farnesoate plays a dual role in regulating *Drosophila*

- metamorphosis*[J]. PLoS genetics, 2015, 11(3): e1005038.
- [18] JINDRA M, MCKINSTRY W J, NEBL T, et al. Purification of an insect juvenile hormone receptor complex enables insights into its post-translational phosphorylation[J]. The journal of biological chemistry, 2021, 297(6): 101387.
- [19] JINDRA M, PALLI S R, RIDDIFORD L M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development[J]. Annual review of entomology, 2013, 58: 181–204.
- [20] CHARLES J-P, IWEMA T, EPA V C, et al. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, methoprene-tolerant[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2011, 108(52): 21128–21133.
- [21] 刘加慧. 保幼激素信号通路基因在凡纳滨对虾卵巢发育中的作用及其分子机制[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022.
- [22] 陈甜甜. *Met* 和 *Kr-h1* 基因在中华绒螯蟹卵巢发育中的作用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022.
- [23] 周长印, 关晴晴, 戴雨琪, 等. 淡色库蚊保幼激素受体基因 *CpMet* 的表达特性和功能分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2021, 32(6): 680–685.
- [24] 李志清. 家蚕 *BmMet* 基因的鉴定、克隆及功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [25] 李亚丽. 桔小实蝇保幼激素信号通路 *Met* 和 *Kr-h1* 基因功能初探[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [26] TSENG DY, CHEN YN, LIU KF, et al. Hepatopancreas and ovary are sites of vitellogenin synthesis as determined from partial cDNA encoding of vitellogenin in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Invertebrate reproduction & development, 2002, 42(2/3): 137–143.
- [27] JIA X, CHEN Y, ZOU Z, et al. Characterization and expression profile of vitellogenin gene from *Scylla paramamosain*[J]. Gene, 2013, 520(2): 119–130.
- [28] 姚云. 褐飞虱 *Met* 基因的克隆及其功能研究[D]. 杭州: 中国计量学院, 2016.
- [29] MARCHAL E, HULT E F, HUANG J, et al. Methoprene-tolerant (*Met*) knockdown in the adult female cockroach, *Diploptera punctata* completely inhibits ovarian development[J]. PLOS ONE, 2014, 9(9): e106737.