

酆琪钧, 郑向阳, 柳燕子, 等. 缢蛭生物钟基因 *Tim* 的鉴定、昼夜表达模式及对性激素分泌的影响[J]. 海洋学报, 2023, 45(12): 101–111, doi:10.12284/hyxb2023181

Li Qijun, Zheng Xiangyang, Liu Yanzi, et al. Identification and circadian expression patterns of circadian clock gene *Tim* and its effects on sex hormone secretion in *Sinonovacula constricta*[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(12): 101–111, doi:10.12284/hyxb2023181

缢蛭生物钟基因 *Tim* 的鉴定、昼夜表达模式 及对性激素分泌的影响

酆琪钧¹, 郑向阳¹, 柳燕子¹, 严玉箫¹, 陈妍蕾¹, 姚韩韩^{1*}, 董迎辉^{2*}

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100; 2. 宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁海 315604)

摘要: *Tim* (*Timeless*) 是继 *Per* 基因发现后的第 2 个核心生物钟基因, 在动物繁殖调控中发挥重要作用。为探讨生物钟基因 *Tim* 对缢蛭夜间产卵的调控作用, 本研究克隆了缢蛭 *Tim* 基因的 cDNA 全长序列并进行序列分析, 利用 qRT-PCR 和免疫荧光技术研究了 *Tim* 基因/蛋白在不同组织中的昼夜表达模式, 并用 siRNA 干扰技术初步研究了 *Tim* 基因对性激素分泌的影响。结果显示, 缢蛭 *Tim* 基因开放阅读框序列为 3 090 bp, 编码 1 029 个氨基酸, 具备 3 个保守结构域 (TIMELESS superfamily、TIMELESS_C 和 Fli1); *Tim* 基因在缢蛭各个组织中均有表达, 其中在肝胰腺、水管、卵巢、精巢中的表达水平较高; *Tim* 基因在卵巢和精巢中呈现昼夜规律性表达, 均在白天 12:00–18:00 较高, 夜间 00:00–06:00 较低; *Tim* 蛋白主要定位在肝胰腺的肝细胞、水管末端的上皮细胞、卵巢的成熟卵母细胞及精巢的精子细胞中, 且在卵巢和精巢中的阳性信号均是白天 12:00 稍强于夜间 00:00; siRNA 干扰后, *Tim* 基因在精巢、卵巢中的表达量均在干扰后第 3~7 天显著下降 ($P < 0.05$), 而精巢中睾酮和卵巢中雌二醇含量均在干扰后第 1~9 天极显著下降 ($P < 0.01$)。由此可见, *Tim* 基因/蛋白在精巢和卵巢中的表达均呈昼夜规律性变化, 并且其被干扰后性激素含量显著降低, 推测 *Tim* 基因可能通过介导性激素的分泌进而调控缢蛭夜间产卵过程。本研究初步探讨了缢蛭生物钟基因 *Tim* 的昼夜表达模式及其对性激素分泌的影响, 将对深入解析贝类产卵机制和优化工厂化育苗技术具有重要应用价值。

关键词: 缢蛭; 生物钟; *Tim*; 基因表达; siRNA; 性激素

中图分类号: P735

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)12-0101-11

1 引言

生物钟 (Circadian Clock) 是生物用以预测时间变化和调整生理稳态的一种内在机制, 它调控从分子、生化、细胞、生理到行为各个水平的昼夜节律, 生物钟的紊乱势必对生物的生存和健康造成严重损害^[1]。

业已证实, 动物诸多有关生存、繁殖等重大事件, 如迁徙、交配、产卵等, 均与生物钟关系密切, 而其中生殖与生物钟关系的研究是重点和热点研究领域之一^[2]。研究表明, 生物钟在生殖系统的正常生理活动维持中扮演重要角色, 不仅影响性腺发育、排卵过程, 而且还控制着体内类固醇激素的释放^[3]。目前已鉴定的生

收稿日期: 2023-07-14; 修订日期: 2023-11-27。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31902393); 宁波市重大科技攻关暨“揭榜挂帅”项目 (2021Z114); 宁波市公益性科技计划项目 (2022S168); 国家海洋水产种质资源库项目 (2023); 浙江省一流学科“生物工程”学生创新项目 (CX2023007)。

作者简介: 酆琪钧 (1999—), 男, 浙江省绍兴市人, 主要从事贝类分子遗传学研究。E-mail: 1063999318@qq.com

* **通信作者:** 姚韩韩 (1984—), 女, 高级实验师, 主要从事贝类分子遗传学研究。E-mail: yaohanhan1020@126.com; 董迎辉 (1980—), 男, 教授, 主要从事贝类分子育种学研究。E-mail: dongyinghui118@126.com

物钟基因有 *Per*(*Period*)、*Tim*(*Timeless*)、*Bmall*、*Clock* 等,组成了“转录-翻译-负反馈环路”(Transcription-Translation Feedback Loops, TTFLS)^[3-4]。

Tim 基因最早在果蝇生物钟研究中被发现,是继 *Per* 基因发现后的第 2 个生物钟基因,可以被 *Clock*/*Cycle* 二聚体激活转录,在细胞质中积累,累积到午夜到达最高值后与 *Per* 蛋白形成 *Tim*/*Per* 异二聚体进入核内,抑制 *Clock*/*Cycle* 的活性,从而形成负反馈环路^[5-6]。研究表明,*Tim* 基因不仅参与维持动物的昼夜节律变化,还在繁殖调控中发挥着重要作用^[7]。如在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中,*Tim* 基因在雌性果蝇包膜卵母细胞的卵泡细胞中持续表达,其缺失可导致成熟雌性果蝇繁殖力下降、未成熟雌性果蝇卵母细胞产量下降^[8],而雄性果蝇缺失 *Tim* 基因将导致精囊的精子数量下降,并且其子代数明显降低^[9];在沙漠蝗虫(*Schistocerca gregaria*)中,*Tim* 基因在生殖组织中呈现昼夜节律性表达,且其被干扰后将导致雌性蝗虫的产卵数量减少,进而影响生殖能力,推测 *Tim* 基因在蝗虫卵子发生等生殖方面发挥重要作用^[10];在日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)中,*Tim* 基因在卵巢中呈现季节性表达且在卵巢不同发育时期规律性表达,推测其参与了日本沼虾的季节性生殖调控和卵巢发育^[11]。然而,关于 *Tim* 基因在贝类繁殖调控的研究尚未见报道。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国东南沿海贝类养殖的代表种之一^[12]。在长期的人工育苗和育种实践中发现,缢蛏的产卵与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)等绝大多数双壳贝类不同,在白天即使采用升温、阴干、流水刺激、降低盐度、遮光等多种催产方法也不能成功催产,其产卵时间严格限定在夜间,黎明之后不再产卵^[13-16],这表明缢蛏产卵可能受环境因子之外的内源生物钟基因的严格调控。前人研究已发现缢蛏的摄食率、心率、消化酶活性等呈现昼低夜高的变化规律,认为缢蛏是夜行性动物^[17-18];闫红伟^[19]发现缢蛏性激素(睾酮和雌二醇)含量随着配子而发生而逐步升高,在产卵结束后迅速下降,推测性激素可能是影响产卵的重要内部因素;Liu 等^[18]研究进一步表明,缢蛏性激素含量的昼夜规律性变化可能是导致夜间产卵的关键因素,卵巢生物钟基因 *Bmall* 和 *Period* 可能通过介导性激素的分泌调控缢蛏夜间产卵过程。然而关于缢蛏生物钟基因 *Tim* 的研究尚未见报道。基于此,本研究克隆了生物钟基因 *Tim* 的 cDNA 全长序列,利用 qRT-PCR 技术研究了 *Tim* 基因在不同组织中的昼夜表达

规律,用免疫荧光技术对 *Tim* 蛋白进行细胞学定位,并利用 siRNA 干扰技术探究了 *Tim* 基因对性激素分泌的影响,旨在初步探讨缢蛏夜间产卵的分子机制,将对深入解析贝类产卵机制和优化工厂化育苗育种技术提供重要的应用价值。

2 材料与方法

2.1 实验材料

在缢蛏繁殖盛期(10月),于宁波海洋与渔业科技创新养殖基地选取性腺饱满、大小均等的缢蛏活体[平均壳长为(6.10±0.25)cm,平均湿重为(18.50±1.10)g]1 000 颗,随机分为 3 组,置于养殖槽内进行室内养殖。实验模拟自然光照(12L:12D,08:00-20:00 用日光灯照射模拟白天,20:00 至次日 08:00 用黑布遮盖模拟夜间),控制光强度为(359±20)lx,海水温度为(20.0±1.0)℃,盐度为 20.0±1.0,24 h 连续充气,每天全换水 1 次,每天早晚各投喂 1 次牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和小球藻(*Chlorella vulgaris*)混合液。

室内暂养缢蛏 7 d 后,在昼夜 72 h 内不同时间点(00:00、06:00、12:00、18:00),随机选取雌、雄各 6 颗($n=6$),活体解剖取闭壳肌、卵巢、精巢、肝胰腺、水管、鳃、水管、血液等组织,一部分样品液氮速冻,用于 RNA 和蛋白提取,另一部分样品用 4% 多聚甲醛固定,用于免疫荧光实验。

2.2 缢蛏 *Tim* 基因的 cDNA 全长克隆

利用 Trizol 法[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取缢蛏精巢组织总 RNA,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,Nanovue Plus 核酸检测仪检测 RNA 纯度和浓度。基于缢蛏基因组(WSYO00000000.1)信息,筛查 *Tim* 基因序列,并设计合成 *Tim* 基因的 RACE 引物(表 1),利用 SMARTer® RACE 5'/3'试剂盒(Clontech)和 Advantage® 2 Polymerase Mix(Clontech)扩增 *Tim* 基因的 cDNA 全长序列。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根)对 PCR 产物进行割胶回收、纯化,并将纯化过的 PCR 产物进行连接、克隆,阳性克隆送杭州擎科生物公司进行测序。基于获得的 *Tim* 基因 ORF 序列设计引物(表 1),利用 2×Tag MasterMix 试剂(康为世纪)进行序列验证。

2.3 缢蛏 *Tim* 基因及蛋白序列的生物信息学分析

使用 EBI Tools 软件(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)对缢蛏 *Tim* 基因序列进行拼接,用 NCBI 的 ORF Finder 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行开放阅读框(ORF)预测;利用 ProtParam 在线软件

表 1 实验所用引物序列信息
Table 1 Information of primers used in the experiments

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
RACE- <i>Tim</i> -5	CCATAGACCTTTGTGCGCGAGTTGCTGT	基因克隆
RACE- <i>Tim</i> -3	TGGCGACACCTACTTCAGGGCTTTTATT	基因克隆
<i>Tim</i> -F1	GTAATGAACGGAATGGGGCT	序列验证
<i>Tim</i> -R1	ATGGGGCTAAATGGAAGTCTCA	序列验证
<i>Tim</i> -F2	GGAACACCTACTGGATGACGAC	序列验证
<i>Tim</i> -R2	TGTTATGGCTGGTGGCAATG	序列验证
<i>Tim</i> -F3	AATCAACTTTTCAAGGGGACG	序列验证
<i>Tim</i> -R3	GTCTTCTCTTTGATTGATGTCGTG	序列验证
Real- <i>Tim</i> -F	CGGAATGGGGCTAAATGG	荧光定量
Real- <i>Tim</i> -R	CGTCATCCAGTAGGTGTTCCA	荧光定量
<i>18S rRNA</i> -F	TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT	荧光定量
<i>18S rRNA</i> -R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	荧光定量
siRNA- <i>Tim</i> -F	GGAAGGAAAUAGAGUUUAATT	siRNA干扰
siRNA- <i>Tim</i> -R	UUAAACUCUAUUUCCUUCCTT	siRNA干扰
NC-F	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	siRNA干扰
NC-R	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	siRNA干扰

(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白理化性质分析;用 Cell-PLoc 2.0 在线软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测蛋白的亚细胞定位;用 NCBI Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行蛋白的同源序列搜索,查找已知物种 *Tim* 蛋白的氨基酸序列,使用 DNAMAN 软件中的 ClustalW 分析工具进行多序列比对;用 NCBI CD-search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测蛋白保守结构域,使用 MEME 在线软件 (<https://meme-suite.org/meme/tools/streme>)预测蛋白保守基序 motif,并用 TBtools 软件进行可视化;使用 MEGA7.0 软件的最大似然法(Maximum Likelihood Method)构建系统进化树(Bootstrap 值 = 1 000),并用在线软件 iTOL(<https://itol.embl.de/>)进行美化。

2.4 *Tim* 基因的时空表达分析

用 Trizol 法提取缙蛭不同组织(闭壳肌、卵巢、精巢、肝胰腺、水管、鳃、血液, $n = 6$)和 72 h 内昼夜不同时间(0:00、6:00、12:00、18:00)的肝胰腺、水管、卵巢以及精巢组织样品($n = 6$)的总 RNA,利用反转录试剂盒(TAKARA)反转录获得 cDNA 第一链。根据缙蛭 *Tim* 基因的 ORF 序列,设计荧光定量引物(表 1),以 *18S rRNA* 作为内参基因进行荧光定

量 PCR。PCR 反应体系为 25 μ L:SYBR Green Mix 12.5 μ L(诺唯赞),上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 第一链 2.0 μ L, RNase-Free 水补至 25 μ L。使用 Roche Light-Cycler 480 II 荧光定量 PCR 仪进行扩增,扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 s, 40 个循环:95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s。基因相对表达水平用相对值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,采用 SPSS 24.0 进行单因素方差分析和 Turkey test 检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2.5 *Tim* 蛋白在不同组织中的昼夜表达分析

用 Western blot 技术验证 *Tim* 蛋白一抗的特异性:用 RIPA 高效裂解液(索莱宝)提取缙蛭肝胰腺、水管、卵巢、精巢组织样品的总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度并进行定量;取等量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后进行转膜、5% BSA 封闭、*Tim* 蛋白一抗(1:400 稀释,杭州华安制备)孵育、带有 HRP 标记的驴抗兔二抗(1:8 000 稀释,杭州华安)孵育、ECL 显影,最后置于 Bio-Rad 凝胶成像仪下拍照。

用免疫荧光技术对 *Tim* 蛋白进行细胞学定位:将特异性较好的缙蛭 *Tim* 蛋白一抗进行免疫荧光实验。将保存于 4% 多聚甲醛中的 72 h 内昼夜不同时间(0:00、12:00)的肝胰腺、水管、卵巢以及精巢组织

样品进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(厚度为 4 μm)、烤片;然后将切片进行二甲苯脱蜡、梯度酒精复水、柠檬酸钠抗原修复、5%BSA 封闭 1 h,再用 Tim 蛋白一抗(1:500 稀释)孵育过夜,最后用 FITC 标记的驴抗兔二抗(1:200 稀释,杭州华安)孵育 1.5 h, DAPI(Beyotime, 上海)染色,在 Nikon 80i 荧光显微镜下拍照观察。

2.6 Tim 基因的 siRNA 干扰及性激素含量的测定

以缢蛏 *Tim* 基因的 ORF 序列为模板,设计 *Tim* 基因的 siRNA 链。根据预实验筛选出有效 siRNA 链 (siRNA-*Tim*-F 和 siRNA-*Tim*-R, 表 1), 送往上海生工生物公司合成。选取健康、无伤病的缢蛏 500 颗 [平均壳长为(6.10 \pm 0.25) cm, 平均总重为(18.50 \pm 1.10) g], 随机分为 3 组(每组 3 个重复): 实验组(注射 *Tim* 基因的 siRNA 干扰链)、空白对照组(注射 DEPC 水)、阴性对照组(注射 NC siRNA)。将 20 μL *Tim* 基因的 siRNA 干扰链(150 ng/ μL)、DEPC 水和 NC 干扰链(150 ng/ μL)分别注射到实验组、DEPC 组和 NC 组缢蛏的性腺组织中。在注射 0 d、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 后从各组中分别取出若干缢蛏, 解剖取性腺组织, 取少许性腺置于显微镜下观察, 若为游动精子的判定为雄性, 若为圆形或椭圆形卵细胞的判定为雌性。取雌、雄缢蛏各 6 颗, 利用 Trizol 提取性腺组织的总 RNA, 经反转录、qRT-PCR 检测 siRNA 干扰后 *Tim* 基因的表达量变化。

取 *Tim* 基因 siRNA 干扰后不同时间点的缢蛏雌、雄个体各 6 颗, 称量精巢/卵巢样品约 0.1 g, 加入 900 μL 生理盐水进行组织匀浆, 分别利用贝类雌二醇(E2)和睾酮(T)ELISA 检测试剂盒(上海桥杜生物科技有限公司, 货号分别为 YX-000200S 和 YX-00020S)测定 siRNA 干扰后不同时间点的睾酮和雌二醇含量变化。数据采用 SPSS 24.0 进行单因素方差分析和 Turkey

test 检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

3 结果

3.1 缢蛏 *Tim* 基因及蛋白的保守基序和结构域分析

缢蛏 *Tim* 基因 (GenBank 登录号: OQ992660) 的 ORF 全长为 3 090 bp, 共编码 1 029 个氨基酸。缢蛏 *Tim* 蛋白的分子量为 116.22 kDa, 理论等电点 $pI = 4.98$, 无信号肽和跨膜区域, 是一个亲水性蛋白, 主要定位于细胞核。

将人 (*Homo sapiens*), 小鼠 (*Mus musculus*), 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*), 斑马鱼 (*Danio rerio*), 凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*), 果蝇、大红葬甲 (*Nicrophorus vespilloides*) 等昆虫, 光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、缢蛏等贝类共 11 个物种的 *Tim* 蛋白进行保守基序 (motif) 和结构域预测。

保守基序分析结果表明, 在 11 个物种中共鉴定出 10 个保守 motif, 其中 motif 1、2、3、5、6、9 为 11 个物种所共有, 表现出高度的保守性。在缢蛏 *Tim* 蛋白中共鉴定到 9 个 motif (motif 1、2、3、4、5、6、7、9、10)。与哺乳动物相比, 缢蛏 *Tim* 蛋白缺失了 motif 8; 与昆虫相比, 缢蛏 *Tim* 蛋白增加了 motif 10。在贝类中, 与太平洋牡蛎和美洲牡蛎相比, 缢蛏 *Tim* 蛋白增加了 motif 7 和 10 (图 1b)。

结构域预测结果表明, 在 11 个物种中共鉴定出 4 个保守结构域。除非洲爪蟾外, 其余物种 *Tim* 蛋白均包含 TIMELESS_C 结构域。缢蛏 *Tim* 蛋白共有 3 个保守结构域, 分别为 TIMELESS superfamily (25~238 aa)、TIMELESS_C (833~934 aa) 和 Fil1 (769~872 aa) 结构域。与脊椎动物和昆虫相比, 甲壳动物和贝类 *Tim* 蛋白缺失结构域 TIMELESS, 而新增结构域 TIMELESS superfamily。而与太平洋牡蛎等其他贝类

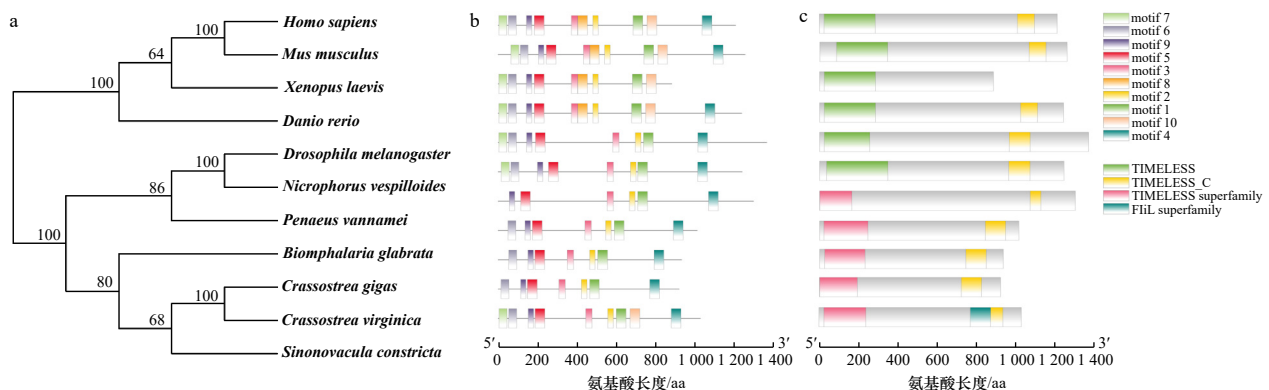


图 1 Tim 蛋白的系统进化树 (a)、motif (b) 及结构域 (c) 分析

Fig. 1 Phylogenetic tree (a), motif (b) and domain (c) analysis of the *Tim* proteins

不同的是, 缢蛏 *Tim* 蛋白新增结构域 FIil (图 1c)。

3.2 缢蛏 *Tim* 蛋白的氨基酸序列比对和系统进化分析

选取人、小鼠、非洲爪蟾、斑马鱼、凡纳滨对虾、硬壳蛤、缢蛏等 23 个物种的 *Tim* 蛋白进行氨基酸序列比对和系统进化分析(物种信息见图 2)。氨基酸序列比对结果表明, 缢蛏 *Tim* 蛋白与其他物种的氨基酸相似度(Similarity)在 21.2%~61.5% 之间, 一致性(Identity)在 11.0%~48.9% 之间。其中缢蛏 *Tim* 蛋白与同为双壳贝类的硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)、斑马贻贝(*Dreissena polymorpha*)、砂海螂(*Mya arenaria*)的相似性均在 50% 以上, 一致性均在 40% 左右, 表现出较高的同源性。

系统进化树结果表明, 缢蛏 *Tim* 蛋白首先与硬壳蛤、斑马贻贝和砂海螂首先聚为一支, 再与太平洋牡蛎、美洲牡蛎等双壳贝类聚在一起, 而后与光滑双脐螺、福寿螺(*Pomacea canaliculata*)等腹足纲聚成软体动物一大支, 再与节肢动物(甲壳动物和昆虫)聚为一

支, 最后与脊椎动物聚在一起(图 2)。

3.3 缢蛏 *Tim* 基因的时空表达分析

组织表达结果表明, 缢蛏 *Tim* 基因在各个组织中均有表达(图 3)。其中 *Tim* 基因在肝胰腺和卵巢的表达水平较高, 显著高于其他组织($P < 0.05$), 其次为水管、精巢等, 而在闭壳肌、血液、外套膜中的表达水平较低且无显著差异。

昼夜表达结果表明, *Tim* 基因在卵巢和精巢中的表达呈现昼夜规律性变化, 基本上均在白天 12:00–18:00 较高, 夜间 00:00–06:00 较低; 在肝胰腺中, *Tim* 基因在第 1 天白天 12:00–18:00 表达量较高, 而在第 2 天、第 3 天夜间 00:00–06:00 较高, 变化规律不明显; 在水管中, *Tim* 基因的表达量在第 1 天和第 3 天白天 12:00–18:00 较高, 夜间 0:00–6:00 较低, 然而第 2 天表达水平与之相反(图 4)。

3.4 缢蛏 *Tim* 蛋白在不同组织中的昼夜表达分析

Western-blots 结果表明, 在不加 *Tim* 蛋白一抗的

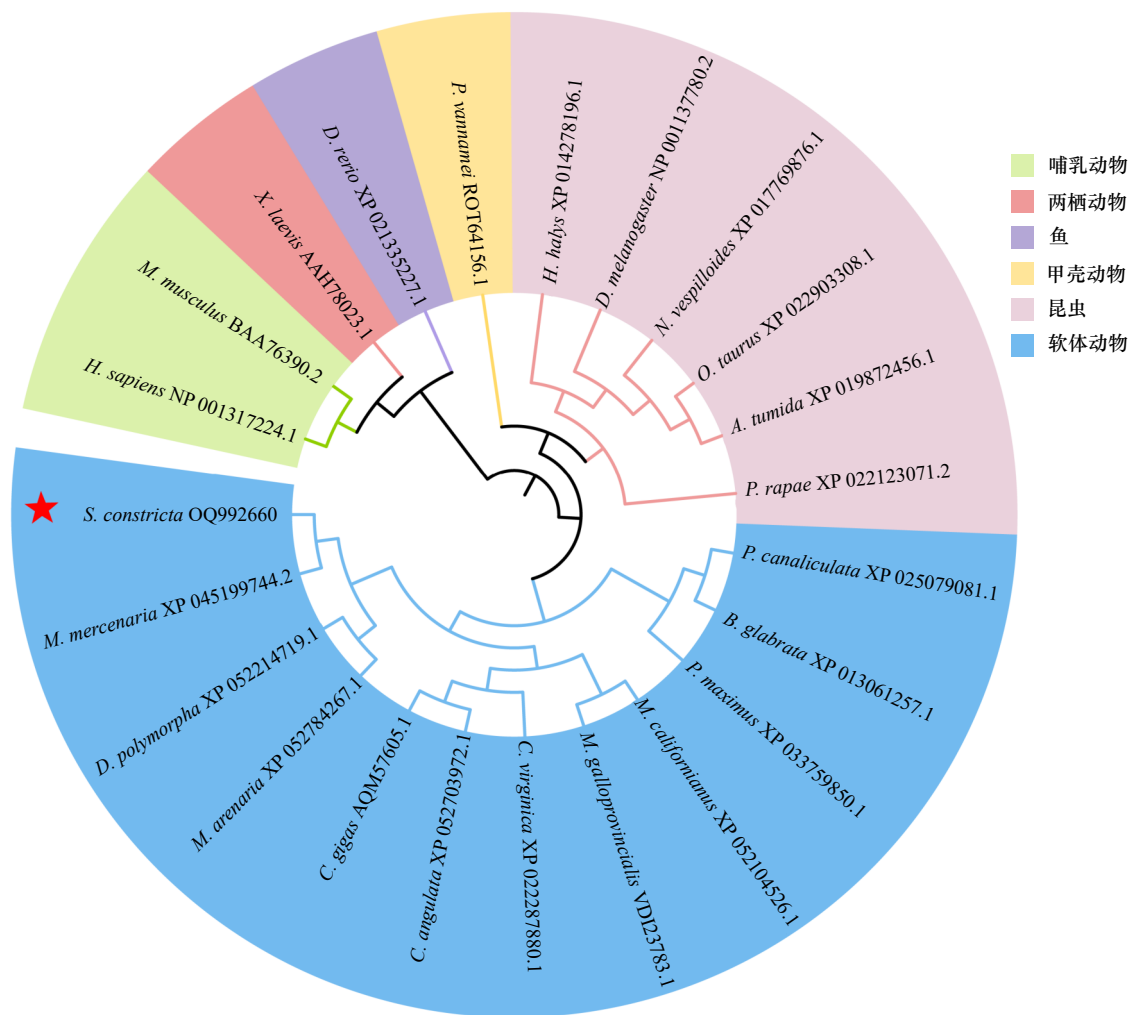


图 2 *Tim* 蛋白的系统进化树(最大似然法, Bootstrap 值 = 1 000)

Fig. 2 Phylogenetic tree of the *Tim* proteins (maximum likelihood method, Bootstrap value = 1 000)

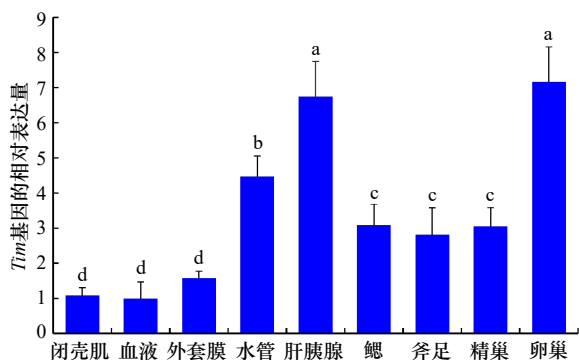


图3 缢蛏 *Tim* 基因在不同组织中的表达分析 ($n=6$, 不同小写字母代表差异显著 $P<0.05$)

Fig. 3 Relative expression of *Tim* gene in different adult tissues of *Sinonovacula constricta* ($n=6$, superscript letters represent statistically significant differences at $P<0.05$)

情况下, 在 116.22 kDa 处肝胰腺、水管、卵巢、精巢组织均未见蛋白条带, 说明未产生非特异性结合; 加入 *Tim* 蛋白一抗时, 在 116.22 kDa 处各个组织中均可见明显、单一的蛋白条带, 表明 *Tim* 蛋白一抗的特异性较好, 可用于免疫荧光实验(图5)。

免疫荧光结果显示, 缢蛏 *Tim* 蛋白在肝胰腺、水管、成熟的卵巢和精巢组织中均有表达(绿色 FITC 为阳性信号), 其主要定位在肝胰腺中的肝细胞(HC)中, 水管末端的上皮细胞(EC)中, 卵巢的成熟卵母细

胞(MO)及精巢的精子细胞(ST)中(图6)。

在相同的拍摄条件(曝光度、曝光时间等)下, *Tim* 蛋白在卵巢和精巢中的阳性信号均是白天 12:00 稍强于夜间 00:00(图6), 而在肝胰腺和水管组织中无明显差异, 表明 *Tim* 蛋白在卵巢和精巢中的表达水平呈现昼夜差异。

3.5 siRNA 干扰对 *Tim* 基因的表达及性激素分泌的影响

siRNA 干扰后, *Tim* 基因在精巢和卵巢中的表达量及性激素含量均呈下降趋势(图7)。在精巢中, *Tim* 基因的表达量在干扰后的第1天开始下降, 在第3天、5天、7天持续下降且显著低于 NC 组($P<0.05$), 在第9天恢复至正常水平(图7a1)。同时精巢中睾酮含量变化趋势与基因表达变化趋势基本一致, 即在干扰后第1天睾酮含量开始显著下降, 并在第3天、5天、7天、9天时均极显著低于 NC 组($P<0.01$)(图7b1)。

在卵巢中, *Tim* 基因的表达量在第1天开始下降, 在第3天、5天显著低于 NC 组($P<0.05$), 在第7天继续下降且极显著低于 NC 组($P<0.01$), 在第9天恢复至正常水平(图7a2)。同时卵巢中雌二醇含量在干扰后的第1~9天均极显著低于 NC 组($P<0.01$)(图7b2)。

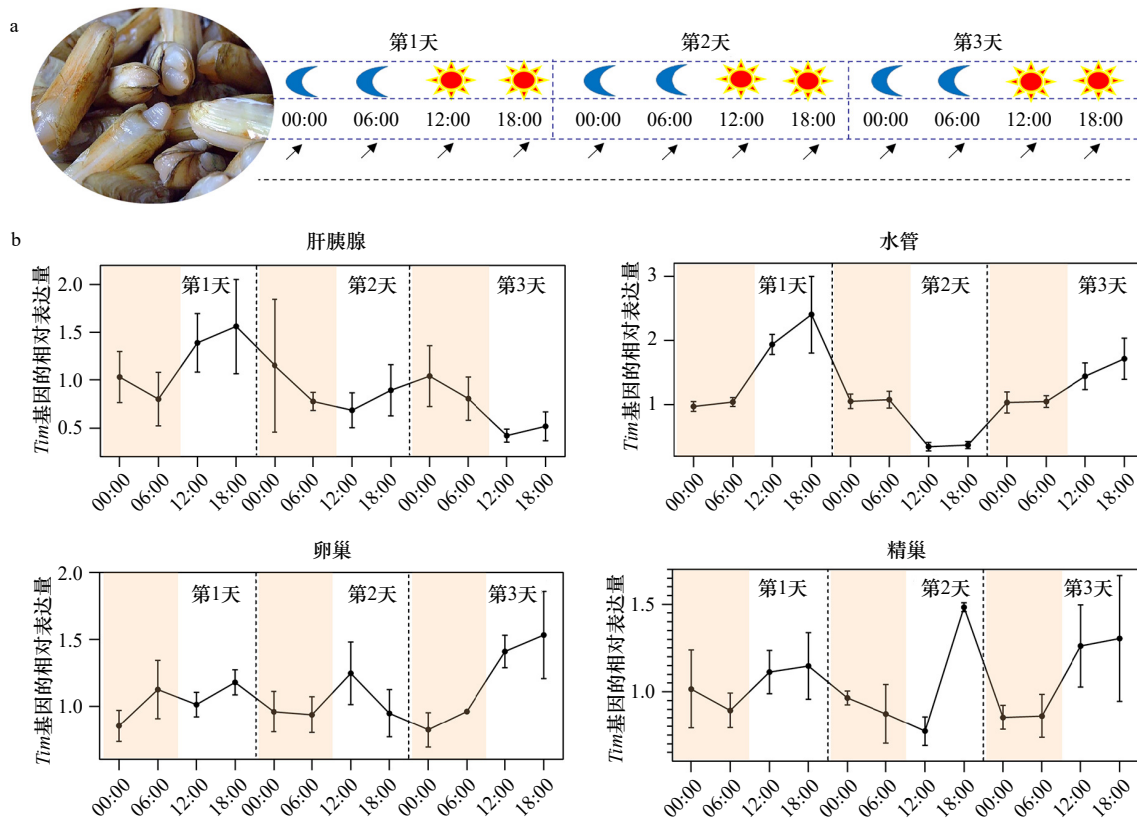
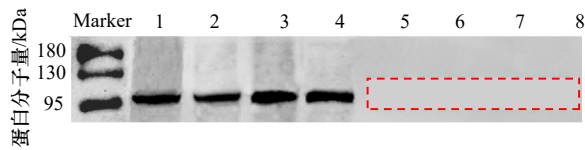


图4 缢蛏 *Tim* 基因在4个组织中的昼夜表达分析 ($n=6$)

Fig. 4 Diurnal expression analysis of *Tim* gene in four tissues of *Sinonovacula constricta* ($n=6$)

图5 缢蛏 *Tim* 蛋白抗体的特异性检测Fig. 5 Specificity of *Tim* antibody in *Sinonovacula constricta*

1: 肝胰腺; 2: 水管; 3: 卵巢; 4: 精巢; 5, 6, 7, 8: 分别代表肝胰腺、水管、卵巢、精巢未加一抗的空白对照

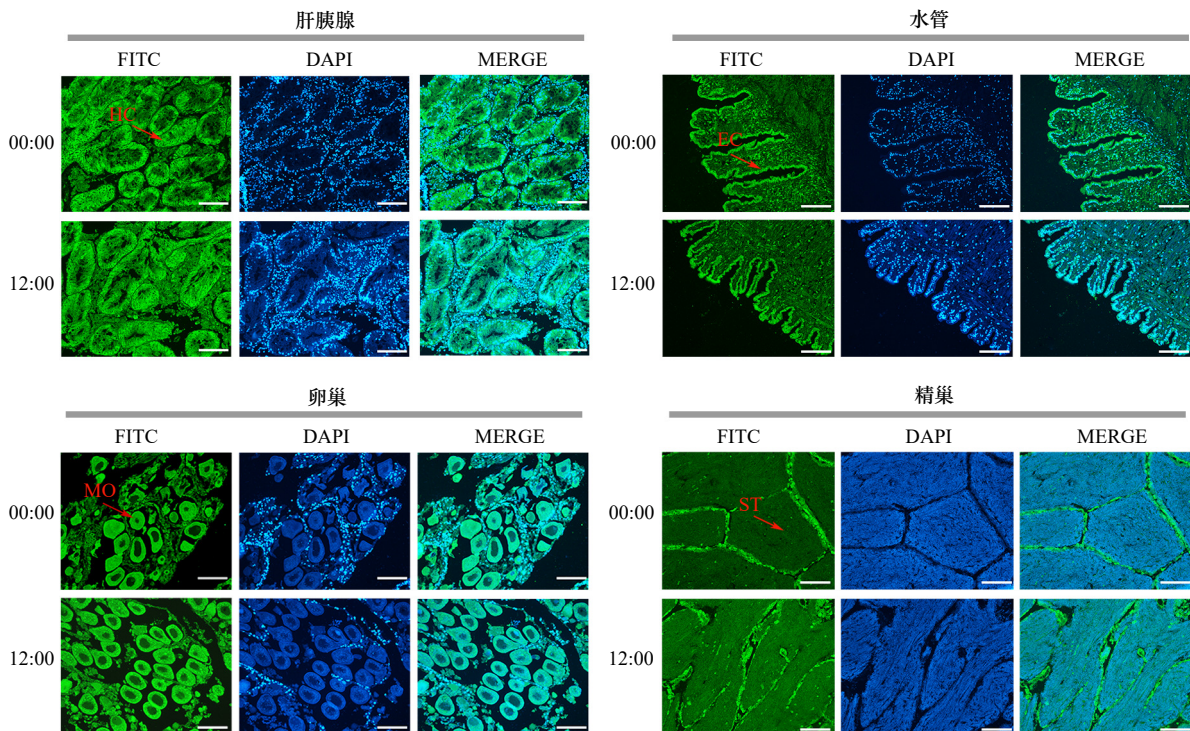
1: Hepatopancreas; 2: siphon; 3: ovary; 4: testis; 5, 6, 7, 8: lacking the primary antibody in hepatopancreas, siphon, ovary and testis, respectively

4 讨论

在果蝇中, 生物钟调控主要由正向转录因子 *Cycle*、*Clock* 和负向调节因子 *Per*、*Tim* 形成的以 24 h 为周期的转录/翻译负反馈环路来驱动和调节基因的节律性表达。其中 *Tim* 蛋白受到光因子调控, 可与 *Per* 蛋白形成异二聚体通过正、负调控方式调节果蝇的昼夜节律^[5-6]。而在哺乳动物中, *Per* 蛋白是与 *Cry* 形成异二聚体在反馈回路中发挥作用, 即 *Cry* 替代了果蝇的 *Tim* 而行使生物钟功能^[20], 表明哺乳动物与果蝇等无脊椎动物的生物钟调控机制存在一定差异。本研究克隆获得了缢蛏 *Tim* 基因的 cDNA 全长序列, 并发现其编码蛋白具有 *Tim* 家族典型特征结构

域 *TIMELESS* superfamily 和 *TIMELESS_C*, 这与日本沼虾^[11]、粘虫 (*Mythimna separata*)^[21] 等研究结果保持一致, 表现出高度的保守性。氨基酸序列比对和系统进化分析进一步表明, 缢蛏 *Tim* 蛋白与贝类相似性高并且首先聚为一支, 然后再与甲壳类和昆虫聚在一起, 最后与脊椎动物聚在一起, 表明缢蛏 *Tim* 蛋白与甲壳类和昆虫有较高的亲缘关系^[8, 22]。由此推测, *Tim* 基因可能在不同物种中扮演相似的角色, 贝类 *Tim* 基因/蛋白可能具有类似果蝇的生物钟调控机制。

在高等物种中, 生物钟系统分为中枢时钟系统和外周时钟系统^[23]。中枢时钟系统位于下丘脑腹侧的视交叉上核 (SCN), 是哺乳动物生物钟系统的主起搏器^[24]; 外周时钟系统遍布于机体几乎所有器官与组织, 包括肝脏、胰腺、卵巢、精巢等, 协同 SCN 共同维持机体的生理活动^[24-25]。研究表明, *Tim* 基因作为生物钟系统的核心基因, 广泛分布于生物体的各个组织中^[26], 在生殖发育、DNA 损伤修复、免疫、肿瘤形成等发挥重要作用^[7]。本研究中, 缢蛏 *Tim* 基因/蛋白在各个组织中均有表达, 推测其功能也是广泛的, 参与多种生命活动。除缢蛏卵巢外, *Tim* 基因在肝胰腺和水管中的表达量均较高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。从低等的真菌到高等的哺乳动物, 生物钟与

图6 缢蛏 *Tim* 蛋白在4个组织中的昼夜表达分析Fig. 6 Diurnal expression analysis of *Tim* protein in four tissues of *Sinonovacula constricta*

HC: 肝细胞, EC: 上皮细胞, MO: 成熟卵母细胞, ST: 精子细胞; 比例尺为 100 μm

HC: Hepatocytes, EC: epithelial cell, MO: mature oocytes, ST: spermatid; scale bars were 100 μm

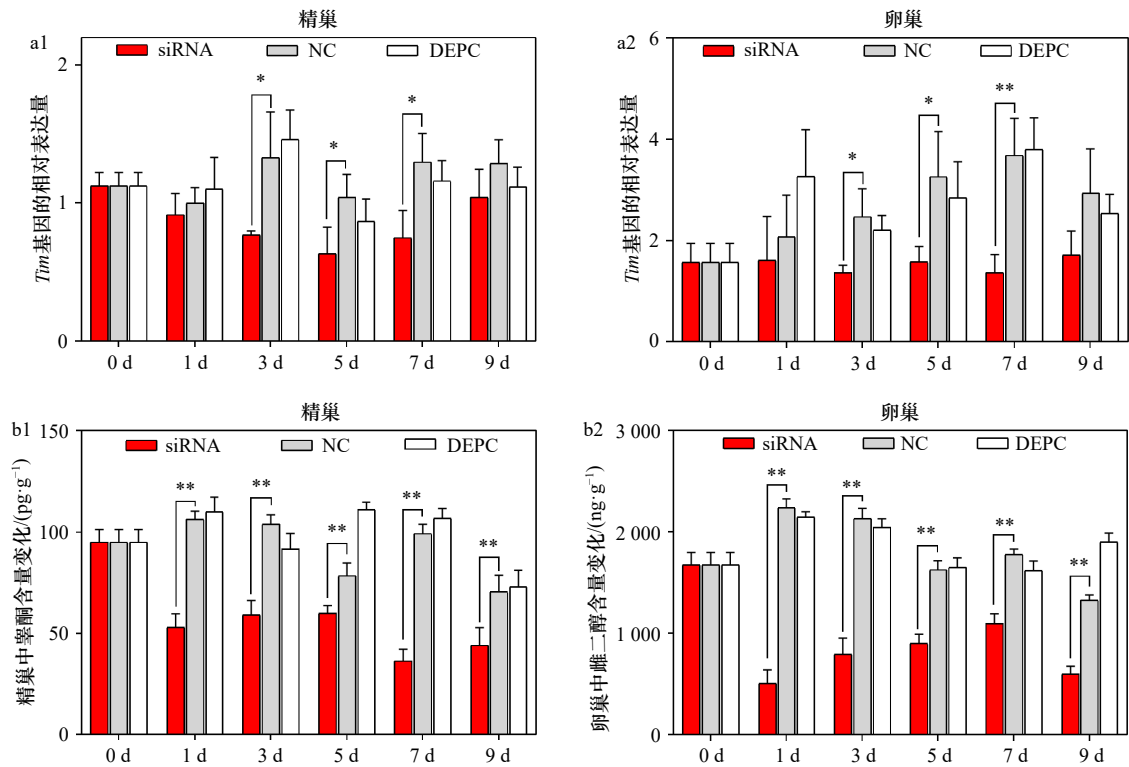


图 7 siRNA 注射后 *Tim* 基因表达及睾酮和雌二醇含量变化 ($n=6$)

Fig. 7 Gene expression of *Tim* and testosterone and estradiol contents after siRNA injection ($n=6$)

a1, a2: siRNA 干扰后 *Tim* 基因在精巢和卵巢中的表达变化; b1, b2: siRNA 干扰后精巢中睾酮和卵巢中雌二醇的含量变化;

*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$

a1, a2: Relative expressions of *Tim* in testis and ovary among groups after siRNA injection; b1, b2: the testosterone (testis) and estradiol (ovary) content changes among groups after siRNA injection; * represents $P < 0.05$, and ** represents $P < 0.01$

能量代谢之间存在着密切的关联性^[27]。对于贝类而言,肝胰腺是脂类等营养物质消化、代谢的关键组织器官^[13]。Liu 等^[17]发现缢蛏肝胰腺中的淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等酶活性呈现昼夜节律性变化,表明缢蛏肝胰腺中存在生物钟,其摄食、消化、代谢等主要在夜间进行。缢蛏 *Tim* 基因在肝胰腺中表达量较高,进一步表明其可能参与调控缢蛏消化、代谢的节律性变化,这与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 等研究结果一致^[28]。缢蛏营穴居生活,其洞穴深度为体长的 5~8 倍,伸出水管至穴口来摄取食物和排泄废物^[13]。因此缢蛏水管对外界环境刺激具有高度的敏感性, *Tim* 基因在水管组织表达量较高且蛋白主要定位在水管末端的上皮细胞,推测缢蛏可能通过水管末端组织感知外界昼夜的环境变化,进而通过 *Tim* 基因调控缢蛏各项生理活动的昼夜规律性变化。这将对探究 *Tim* 基因对其他贝类生物节律的调控研究提供一定的理论支持。

生物钟在动物生殖系统的正常生理活动维持中扮演重要角色,不仅影响性腺发育进程,而且对产卵

过程具有重要的调控作用^[2]。排卵或产卵是动物繁殖过程的关键一步,对于成功受精和后代繁衍至关重要。在无脊椎动物中,生物钟基因 *Tim* 在动物繁殖、产卵过程中发挥着重要作用^[7,11]。干扰沙漠蝗虫的 *Tim* 基因,将导致雌性蝗虫产卵数量减少进而影响生殖能力,表明其在卵子发生过程中发挥重要作用^[10]; *Tim* 基因在日本沼虾的卵巢中呈现季节性表达且在卵巢不同发育时期规律性表达,推测其可能参与了卵巢发育和卵子发生^[11]。在雌性果蝇中, *Tim* 基因/蛋白在包膜卵母细胞的卵泡细胞中持续表达,缺失 *Tim* 基因将导致成熟雌性果蝇繁殖力下降约 50%、未成熟雌性果蝇卵母细胞的产量严重下降^[8]。值得注意的是, *Tim* 基因/蛋白在缢蛏卵巢和精巢中表达量均较高,蛋白主要定位在卵巢的成熟卵母细胞和精巢的精子细胞中并呈现昼高夜低的表达模式,表明 *Tim* 基因可能参与调控缢蛏产卵等繁殖过程。

在高等动物中,生物钟被认为是通过一个极其复杂的神经和内分泌网络调控性类固醇激素的分泌,进而调控产卵过程^[2]。对于大多数体外受精的贝类而

言,产卵受到外界环境条件和内源激素水平的双重影响^[29-30]。影响贝类产卵的外界环境因子主要有水温、水流、盐度、光照等^[19],据此在人工育苗过程中也已研发出一系列人工催产技术,如升降温、阴干、流水刺激、降低盐度、遮光等。影响贝类产卵的内部因素可能是类固醇激素^[31-32],通过外源添加类固醇激素均会影响贝类产卵,如体外水体添加雌二醇可诱导虾夷扇贝(*Patinopectin yessoensis*)产卵^[33];体外添加、体内注射雌二醇和孕酮均能诱导海扇贝(*Placopecten magellanicus*)排放精、卵^[34]。研究表明,缢蛭卵巢中的雌二醇和精巢中的睾酮含量和配子发生、产卵过程密切相关,即随着性腺发育、配子而发生而升高,产卵结束后迅速下降,表明性激素可能是缢蛭产卵中重要的内源调节因子^[19]。Liu等^[18]发现缢蛭性成熟期精巢中睾酮和卵巢中雌二醇含量均呈现昼低夜高的规律性变化,推测性激素含量的昼夜变化可能是导致夜间产卵的关键因素。在本研究中,*Tim*基因在被siRNA干扰后,随着*Tim*基因表达量的下降,卵巢中雌二醇和精巢中睾酮含量也呈现显著下降趋势,表明*Tim*基因可能参与调控性腺组织中性激素的合成及分泌。综合表明,缢蛭*Tim*基因/蛋白在精巢和卵

巢中的表达呈现昼夜规律性变化,且其在被干扰后性激素含量显著降低,推测*Tim*基因可能是通过介导性激素的分泌调控缢蛭夜间产卵。该结果对深入解析生物钟对其他贝类产卵等繁殖过程的调控机制研究提供了基础数据。

5 结论

本研究克隆获得了缢蛭生物钟基因*Tim*的cDNA全长序列,并进行了序列分析。*Tim*基因/蛋白在缢蛭各个组织中均有表达,其中在卵巢和精巢中呈现昼高夜低的节律性表达;*Tim*基因在被干扰后,精巢中睾酮和卵巢中雌二醇含量均显著下降,表明*Tim*基因可能通过介导性激素的分泌进而调控缢蛭夜间产卵过程。本研究初步探讨了缢蛭*Tim*基因的昼夜表达模式及其对性激素分泌的影响,为深入解析贝类产卵的分子机制及优化工厂化育苗育种技术奠定了理论基础。然而生物钟基因*Tim*调控缢蛭产卵、性激素分泌的调控网络尚不清楚,并且在其他贝类中也缺乏相似的、可资借鉴的研究,因此后续还需进行生物钟基因的功能验证,全面发掘生物钟基因调控产卵的信号通路和分子调控网络。

参考文献:

- [1] Fustin J M, Doi M, Yamaguchi Y, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock[J]. *Cell*, 2013, 155(4): 793-806.
- [2] Miller B H, Takahashi J S. Central circadian control of female reproductive function[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2013, 4: 195.
- [3] Miller B H, Olson S L, Turek F W, et al. Circadian *clock* mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy[J]. *Current Biology*, 2004, 14(15): 1367-1373.
- [4] Nakao N, Yasuo S, Nishimura A, et al. Circadian *clock* gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(7): 3031-3038.
- [5] Huang Jian, Zhong Zhaomin, Wang Mingyong, et al. Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2015, 35(6): 2572-2587.
- [6] Ulgherait M, Chen Anna, Oliva M K, et al. Dietary restriction extends the lifespan of circadian mutants *tim* and *per*[J]. *Cell Metabolism*, 2016, 24(6): 763-764.
- [7] Boden M J, Varcoe T J, Kennaway D J. Circadian regulation of reproduction: from gamete to offspring[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2013, 113(3): 387-397.
- [8] Beaver L M, Gvakharia B O, Vollintine T S, et al. Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(4): 2134-2139.
- [9] Beaver L M, Rush B L, Gvakharia B O, et al. Noncircadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*[J]. *Journal of Biological Rhythms*, 2003, 18(6): 463-472.
- [10] Tobback J, Boerjan B, Vandersmissen H P, et al. Male reproduction is affected by RNA interference of *period* and *timeless* in the desert locust *Schistocerca gregaria*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42(2): 109-115.
- [11] Chen Suhua, Qiao Hui, Fu Hongtuo, et al. Molecular cloning, characterization, and temporal expression of the clock genes *period* and *timeless* in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* during female reproductive development[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 207: 43-51.
- [12] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China Fishery Statistical Yearbook*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022.
- [13] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.

- Wang Rucai, Wang Zhaoping, Zhang Jianzhong. Science of Marine Shellfish Culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008.
- [14] 吴洪喜, 徐爱光. 缢蛭人工育苗试验 [J]. 海洋科学, 2000, 24(2): 15–17.
Wu Hongxi, Xu Aiguang. A test of artificial cultivation of *Sinonovacula constricta*[J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(2): 15–17.
- [15] 徐义平. 关于缢蛭的养殖技术之二缢蛭生产性人工育苗技术总结 [J]. 中国水产, 2000(11): 42–44, 47.
Xu Yiping. Summary of productive techniques of artificial breeding *Sinonovacula constricta*[J]. *China Fisheries*, 2000(11): 42–44, 47.
- [16] 莫永凯. 贝类养殖技术之三连云港沿海缢蛭工厂化人工育苗技术 [J]. 中国水产, 2008(6): 55.
Mo Yongkai. Industrialized artificial breeding techniques for *Sinonovacula constricta* in coast of Lianyungang[J]. *China Fisheries*, 2008(6): 55.
- [17] Liu Yanzi, Yao Hanhan, Zhou Tingting, et al. The discovery of circadian rhythm of feeding time on digestive enzymes activity and their gene expression in *Sinonovacula constricta* within a light/dark cycle[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 744212.
- [18] Liu Yanzi, He Qinyuan, Yao Hanhan, et al. Circadian clock genes *Bmal1* and *Period* may regulate nocturnal spawning by controlling sex hormone secretion in razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1074816.
- [19] 闫红伟. 缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) 和青蛤 (*Cyclina Sinensis*) 繁殖生理学的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Yan Hongwei. Studies on reproductive physiology of *Sinonovacula constricta* and *Cyclina sinensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [20] Raible F, Takekata H, Tessmar-Raible K. An overview of monthly rhythms and clocks[J]. *Frontiers in Neurology*, 2017, 8: 189.
- [21] 冀佳悦, 张蕾, 程云霞, 等. 粘虫生物钟 *timeless* 基因的克隆及时空和昼夜表达分析 [J]. 植物保护学报, 2018, 45(4): 670–678.
Ji Jiayue, Zhang Lei, Cheng Yunxia, et al. Molecular cloning and spatiotemporal and diurnal expression of the clock gene *timeless* in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker)[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(4): 670–678.
- [22] Summa K, Urbanski J M, Zhao Xiumei, et al. Cloning and sequence analysis of the circadian clock genes *period* and *timeless* in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)[J]. *Journal of Medical Entomology*, 2012, 49(3): 777–782.
- [23] Brown S A, Ripperger J, Kadener S, et al. *Period1*-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator[J]. *Science*, 2005, 308(5722): 693–696.
- [24] Sellix M T. Circadian clock function in the mammalian ovary[J]. *Journal of Biological Rhythms*, 2015, 30(1): 7–19.
- [25] 张正敏, 曹洪战, 芦春莲, 等. 生物钟对动物糖脂代谢的影响研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(1): 30–34.
Zhang Zhengmin, Cao Hongzhan, Lu Chunlian, et al. Research progress on effect of biological clock on animal glucose and lipid metabolism[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2020, 56(1): 30–34.
- [26] Myers M P, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, et al. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock[J]. *Science*, 1996, 271(5256): 1736–1740.
- [27] Redlin U, Nusslein B, Schmidt I. Circadian changes of brown adipose tissue thermogenesis in juvenile rats[J]. *American Journal of Physiology*, 1992, 262(3): R504–R508.
- [28] 李豪. 中华绒螯蟹 *Myosin Va*、*CHH* 和 *Timeless* 基因在其不同发育阶段的表达谱分析 [D]. 南京: 南京师范大学, 2018.
Li Hao. Expression profile analysis of *Myosin Va*, *CHH* and *Timeless* genes in different developmental stages of *Eriocheir sinensis*[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018.
- [29] Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, et al. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 118(4): 811–817.
- [30] Siah A, Pellerin J, Benosman A, et al. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 132(2): 499–511.
- [31] Di Cosmo A, Di Cristo C, Paolucci M. Sex steroid hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 289(1): 33–47.
- [32] Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard J C. Estradiol-17 β and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(2): 133–139.
- [33] Osada M, Mori K, Nomura T. *In vitro* effects of estrogen and serotonin on release of eggs from the ovary of the scallop[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(2): 223–227.
- [34] Wang Chunde, Croll R P. Effects of sex steroids on *in vitro* gamete release in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*[J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2003, 44(2/3): 89–100.

Identification and circadian expression patterns of circadian clock gene *Tim* and its effects on sex hormone secretion in *Sinonovacula constricta*

Li Qijun¹, Zheng Xiangyang¹, Liu Yanzi¹, Yan Yuxiao¹, Chen Yanlei¹, Yao Hanhan¹, Dong Yinghui²

(1. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. Ninghai Marine Biological Seed Industry Research Institute, Ninghai 315604, China)

Abstract: *Tim* (*Timeless*) is the second core circadian clock gene identified after the discovery of *Per*, which plays an important role in the regulation of animal reproduction. In order to explore the molecular mechanisms of *Tim* to regulate spawning in *Sinonovacula constricta*, the cDNA sequence of *Tim* was cloned and analyzed, the circadian expression patterns of *Tim* gene/protein in different tissues were analyzed by qRT-PCR and immunofluorescence technology, and the regulatory effects of *Tim* on sex hormone secretion were investigated by siRNA technology. The ORF sequence of *Tim* was 3 090 bp, encoding 1 029 amino acids and containing three conserved domains (TIMELESS superfamily, TIMELESS_C and FIl1). *Tim* was expressed in test tissues, and showed higher expression levels in the hepatopancreas, siphon, ovary and testis. The expression levels of *Tim* were higher at 12:00–18:00 in the daytime and lower at 00:00–06:00 in the night time, which exhibited circadian rhythmic expression patterns in the ovary and testis. *Tim* protein was mainly expressed in hepatocytes of the hepatopancreas, epithelial cells of siphons, mature oocytes of the ovary, and spermatids of the testis. And protein fluorescence signals of *Tim* were slightly stronger at 12:00 during the day than at 00:00 during the night in the ovary and testis. After siRNA injection, the expression levels of *Tim* significantly decreased from the 3rd to 7th day in the siRNA treatment groups of the ovary and testis ($P < 0.05$). Meanwhile, the contents of testosterone in the testis and estradiol in the ovary decreased significantly from the 1st to 9th day after siRNA injection ($P < 0.01$). Consequently, it could be concluded that *Tim* gene/protein exhibited circadian rhythmic expression patterns in the ovary and testis, and the contents of sex hormones significantly decreased after *Tim* interference, which suggested that *Tim* might regulate the nocturnal spawning by mediating the secretion of sex hormones in *S. constricta*. These findings preliminarily explored the regulatory effects of circadian clock gene *Tim* on nocturnal spawning of *S. constricta*, which will provide important application value for in-depth analysis of spawning mechanism and optimizing industrialized seedling breeding technology in mollusks.

Key words: *Sinonovacula constricta*; circadian clock; *Tim*; gene expression; siRNA; sex hormone