



厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 视蛋白基因的鉴定、进化及表达分析

徐敏慧, 李继姬, 叶莹莹

Analysis of opsin gene expression in *Mytilus coruscus*

Xu Minhui, Li Jiji, Ye Yingying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12284/hyxb2025080>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

厚壳贻贝mTOR信号通路关键基因在幼虫生长发育中的表达模式分析

Analysis of expression patterns of key genes in the mTOR signaling pathway in the larval growth and development of *Mytilus coruscus*
海洋学报. 2024, 46(7): 110–119 <https://doi.org/10.12284/hyxb2024088>

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) *McNF- κ B*基因的克隆及其在发育中的作用

Cloning of the *McNF- κ B* gene of *Mytilus coruscus* and its role in development
海洋学报. 2023, 45(9): 141–151 <https://doi.org/10.12284/hyxb2023114>

厚壳贻贝肠道细菌的生物被膜对其幼虫和稚贝附着的影响

Effects of intestinal bacterial biofilms on settlement process of larvae and plantigrades in *Mytilus coruscus*
海洋学报. 2021, 43(9): 81–91 <https://doi.org/10.12284/hyxb2021112>

海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*) 鞭毛蛋白对生物被膜形成及厚壳贻贝附着的影响

Effects of *Pseudoalteromonas marina* flagellin on biofilm formation and settlement of *Mytilus coruscus*
海洋学报. 2021, 43(4): 75–83 <https://doi.org/10.12284/hyxb2021028>

海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*) *pilZ*基因缺失抑制厚壳贻贝附着变态

Knockout of *Pseudoalteromonas marina pilZ* gene inhibited the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*
海洋学报. 2022, 44(4): 95–103 <https://doi.org/10.12284/hyxb2022090>

缢蛏 *17 β -HSDs*基因家族鉴定及其在性腺发育过程中的表达分析

Identification of *17 β -HSDs* gene family and their expression patterns in gonadal development of *Sinonovacula constricta*
海洋学报. 2023, 45(10): 123–134 <https://doi.org/10.12284/hyxb2023137>

关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐敏慧, 李继姬, 叶莹莹. 厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 视蛋白基因的鉴定、进化及表达分析[J]. 海洋学报, 2025, 47(7): 83–93, doi:10.12284/hyxb2025080

Xu Minhui, Li Jiji, Ye Yingying. Analysis of opsin gene expression in *Mytilus coruscus*[J]. Haiyang Xuebao, 2025, 47(7): 83–93, doi:10.12284/hyxb2025080

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 视蛋白基因的 鉴定、进化及表达分析

徐敏慧¹, 李继姬¹, 叶莹莹^{1*}

(1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

摘要: 厚壳贻贝是我国重要的经济养殖贝类, 光环境可以影响其生活和行为, 但其视蛋白基因在很大程度上是未知的。本研究基于厚壳贻贝全基因组数据, 共鉴定出 7 个视蛋白, 序列分析结果将其分为 5 类 (r-opsin、c-opsin、Go-opsin、neuropsin 和 peropsins)。染色体定位结果显示同一亚家族的视蛋白基因位于同一染色体上。生物信息学结果显示, 除 r-opsin 为亲水蛋白, 其他蛋白质的均为疏水蛋白。保守基序结果显示视蛋白同一亚家族的视蛋白具有高度的保守性, 同时也存在一定的差异。通过实时荧光定量 PCR 检测厚壳贻贝 5 个发育时期的视蛋白基因表达量变化。结果显示, 不同发育时期的视蛋白基因表达量存在显著差异, c-opsin4 和 r-opsin 在眼点期的表达量显著高于其他时期, 表明这两个视蛋白在厚壳贻贝的眼点期中发挥了重要作用。本研究分析了厚壳贻贝视蛋白的分子特征, 并初步探究厚壳贻贝发育过程中视蛋白基因的变化规律, 为研究厚壳贻贝的视觉形成机制并对视蛋白调控厚壳贻贝变态过程关键分子机制提供科学依据。

关键词: 厚壳贻贝; 浮游幼虫; 视蛋白; 表达分析; qPCR

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2025)07-0083-11

1 引言

在各种生物体感知外界环境刺激的过程中, 跨膜 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 起着至关重要的作用。其中, 视蛋白 (opsin) 作为后生动物最重要的感觉受体之一, 在摄食、交流、逃避和求偶等多种行为中发挥着关键作用。视蛋白由约 350 个氨基酸残基构成, 分子量为 30~50 kDa。当与发色团分子 (通常是 11-顺式视黄醛) 结合后, 能形成吸收光子并启动光转导的光色素^[1]。已有研究证实, 视蛋白的多样性促使动物对不同光环境产生适应, 这可能导致新的物种随着时间的推移而逐渐形成^[2]。随着对动物基因组研究的

不断深入, 视蛋白家族的分类与进化研究也得到了进一步的加强。目前, 视蛋白家族其结构和功能特性大致可分为五大谱系: 横纹肌 (r-) 视蛋白 (也称为 Gq 偶联视蛋白)、纤毛型 (c-) 视蛋白、Cnidops、第 4 类视蛋白 (Go-视蛋白、视网膜 G 蛋白偶联受体视蛋白 RGR opsin、peropsin、retinochrome 和 neuropsin) 和 xenopsins^[3-5]。根据视蛋白在视觉成像过程中的直接参与程度, 可分为视觉视蛋白和非视觉视蛋白两大类^[6]。在脊椎动物中, 视觉视蛋白可进一步划分为视杆视蛋白和视锥视蛋白^[1], 而非视觉视蛋白则可细分为 18 个单独的亚家族^[7]。

尽管对于视蛋白在某些脊椎动物中的表达和功

收稿日期: 2024-06-14; 修订日期: 2025-03-24。

基金项目: 舟山市科技计划项目 (2021C21017)。

作者简介: 徐敏慧 (1999—), 女, 浙江省衢州市人, 主要研究方向为海洋生物学。E-mail: xuminhui@zjou.edu.cn

* 通信作者: 叶莹莹, 博士, 副研究员, 主要研究方向为海洋生物学。E-mail: yeyy@zjou.edu.cn

能已有一定的研究^[8-10],但对于无脊椎动物中的视蛋白,特别是非视觉视蛋白,当前对该领域的认知依然非常有限。以往的研究主要集中在眼睛发育良好的物种,如头足类^[11-12]、腹足类^[13]以及甲壳类^[14]。随后学者们才开始关注那些在眼部之外或者其他动物类别里存在的视蛋白。例如,无眼刺胞如多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)和星状海葵(*Nematostella vectensis*)的视蛋白利用光线影响其生殖行为^[15-16]。此外,视蛋白还在水螅的摄食和防御中发挥关键作用^[17]。这些研究成果表明视蛋白对刺胞动物进化及潜在功能上的重要性。而在紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)管足中,opsin4在光感受器细胞区域表达使得该物种获得视觉导向能力^[18]。进一步地,opsin4在(*Asterias ruben*)视觉器官中的表达,为opsin4在棘皮动物的视觉导向功能提供了有力支持^[19]。在双壳动物中,Kong等^[20]通过对剃刀蛤的研究,发现了其视蛋白家族成员高度多样化,并且通过克隆4种相对表达较高的视蛋白,揭示了它们对不同光环境的响应表现出不同的特征。这项研究为理解海洋双壳类动物的视觉蛋白进化和非视觉光敏性的潜在功能提供了有价值的见解。此外,Hasan等^[21]从幼体发育的角度出发,使用基因组注释和系统发育分析,发现蛭形贝类中opsin的丰度存在很大差异,而许多成体没有眼睛的物种,如贻贝,其opsin的基因组丰度却很高。这一发现表明,视蛋白在双壳动物的发育过程中具有重要的调控作用。另一方面,分布在1400 m深处的深海蛭(*Archivesica marissinica*),已完全丧失其视蛋白,可能与它们进入深海无光环境的时间长短有关,这种现象在骨鳞鱼类中也有体现^[22]。而另外两种深海类软体动物,腹足类的(*Phymorhynchus buccinoides*)和双壳类的(*Gigantidas platifrons*)与它们的近缘种相比,具有相似数量的视蛋白基因^[23]。

贻贝属是最重要的世界性海洋属之一,广泛分布于潮下带和潮间带的河口和海洋生境中^[24]。厚壳贻贝[*Mytilus coruscus*(Gould, 1861)]是一种典型的海洋双壳类动物,分布于东海、黄海、渤海,具有重要经济和营养价值^[25]。厚壳贻贝浮游幼虫眼点发育时期被认为是其生命周期中的关键时期,这一时期死亡率最高^[26]。近年来,随着高通量测序和生物信息分析技术的不断进步,厚壳贻贝全基因组和转录组测序数据的不断积累,使得从全基因组和转录组学大数据中挖掘厚壳贻贝视蛋白基因的调控分子机制具有良好的技术基础。本文以厚壳贻贝为研究对象,通过分析视蛋白家族,筛选出视蛋白基因,结合基因组组装和注

释、序列比对等生物信息分析手段,并使用荧光定量技术,初步探讨视蛋白基因在厚壳贻贝5个阶段的表达模式,为深入研究厚壳贻贝的视觉形成机制及视蛋白在其变态过程中的调控作用提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

本研究所用的厚壳贻贝幼虫样本于2023年2月采自浙江省舟山市嵊泗县海洋科技研究所。采集厚壳贻贝幼虫5个时期的样本:担轮期(20 h)、D形期(48 h)、壳顶期(9 d)、眼点期(18 d)和稚贝期(35 d),每个时期收集充足幼虫样本以便于后续RNA的提取(担轮幼虫约1000只;D形幼虫约1000只;壳顶幼虫约在500只;眼点幼虫约500只;稚贝约200只)。保存在RNA储存液中,随后在-80℃下储存备用。

2.2 RNA提取和cDNA合成

RNA提取过程参考TAKARA的总RNA提取试剂盒(宝日生物技术有限公司,北京)。cDNA的合成过程参考TAKARA的通用反转试剂盒(Universal RT-PCR Kit(M-MLV, free Taq polymerase))。通过NanoDrop2000分光光度计测量cDNA浓度后在-80℃下保存,用作后续实验模板。

2.3 厚壳贻贝和深海偏顶蛤视蛋白的筛查

从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载智人(*Homo sapiens*)、文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)和软体动物的部分视蛋白序列(表1),厚壳贻贝全基因组数据(NCBI登录号:PRJEB33342)以及相关注释文件,同时下载已知的厚壳贻贝Go和Gq视蛋白序列(表1),此外,从Dryad Digital Repository(<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.h9942>)下载深海偏顶蛤(*Bathymodiolus platifrons*)全基因组;用blastp将下载的同源基因序列与厚壳贻贝基因组蛋白质序列进行双向比对,得到厚壳贻贝的视蛋白候选基因,比对的e值设为 $1e^{-10}$ 。同时,比对深海偏顶蛤基因组,得到相应的视蛋白候选基因。利用在线网站TMHMM 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测候选视蛋白序列的7次跨膜区的完整性,同时根据ClustalW比对结果查看视蛋白和视黄醛席夫氏碱共价连接起重要作用的K296的赖氨酸。具备两个条件的候选视蛋白为较为可靠的视蛋白。

2.4 厚壳贻贝视蛋白染色体定位和保守基序分析

从基因组注释文件中获得视蛋白基因的染色体位置信息,并且用TBtool分析视蛋白基因的位置^[27]。利用Expasy生物信息学网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析理化性质如氨基酸数目、分子量、等

表1 视蛋白家族序列及其NCBI登录号
Table 1 Sequence of opsin family and their NCBI accession number

物种名	蛋白	登录号	物种名	蛋白	登录号
文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri</i>	opsin6	BAC76024	光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i>	pineal opsin like	XP_055862616
	melanopsin	Q4R114		opsin5 like	XP_055889746
	opsin2	BAC76020	葡萄牙牡蛎 <i>Crassostrea angulata</i>	opsin VA like	XP_052683732
	peropsin	DAC74078		pineal opsin like	XP_052683447
	opsin1	BAC76019	戴河笠贝 <i>Lottia peitaihoensis</i>	r-opsin	WKW95581
	opsin3	BAC76023		neurospin	WKW95586
	opsin5	BAC76022		Go-opsin3	WKW95588
	opsin4	BAC76021		peropsin	WKW95585
	海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	neurospin	DAC74071	虎斑乌贼 <i>Sepia pharaonis</i>	RRH
opsin Gq2		ALO02515	opsin4		CAE1318583
opsin Gq3		ALO02516	地中海贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	r-opsin	VDI13980
opsin Gq4		ALO02517	虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Go-coupled opsin	XP_021355729
opsin Gq1		ALO02514		rhodopsin	UVT38273
Rhabdomeric opsin		AUR34014	欧洲扇贝 <i>Pecten maximus</i>	retinochrome	UUS63783
Go-coupled opsin		AUR34012	夏威夷短尾乌贼 <i>Euprymna scolopes</i>	opsin	ACB05673
Go-coupled opsin1		APB88014		乌贼 <i>Sepia officinalis</i>	rhodopsin
智人 <i>Homo sapiens</i>		encephalopsin	NP055137	尖膀胱螺 <i>Physella acuta</i>	opsin 3 like
	opsin3	AAH36773	硬壳蛤 <i>Mercenaria mercenaria</i>	opsin 5 like	XP_045202610
	blue opsin	P0399		砂海螂 <i>Mya arenaria</i>	opsin 5 like
	rhodopsin	NP000530	<i>Ambigolimax valentianus</i>	rhodopsin	BBA21101
	green opsin	P04001	<i>Ambigolimax valentianus</i>	opsin 5B	BBH84662
	red opsin	P04000	<i>Acanthopleura granulata</i>	r-opsin	r-opsin
	melanopsin	NP150598	<i>Ambigolimax valentianus</i>	retinochrome	BBH84663
	opsin5	QU6736	<i>Chiton virgulatus</i>	opsin	APF30602
	peropsin	NP006574	<i>Chiton tuberculatus</i>	r-opsin	QKY89064
小鼠 <i>Mus musculus</i>	melanopsin	AAF24979	<i>Chiton marmoratus</i>	r-opsin	QKY89065
	peropsin	AAC53344	<i>Chaetopleura apiculata</i>	r-opsin	QKY89066
	opsin5	NP861418	<i>Elysia marginata</i>	rhodopsin	GFS12646
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	opsin5	NP861437	<i>Leptochiton asellus</i>	xenopsin	ASM47594
厚壳贻贝 <i>Mytilus coruscus</i>	opsin3	CAC5413267	<i>Stenoplax conspicua</i>	opsin	APF30603
	opsin5	CAC5413461	<i>Ylistrum balloti</i>	opsin 5 like	XP_060063722
紫贻贝 <i>Mytilus edulis</i>	opsin5	CAG2190128			
	RRH	CAG2194598			
	opsin4	CAG2193259			

电点、不稳定系数、脂肪系数和总平均亲水指数等。利用在线网站 MEME(<http://meme-suite.org/>)预测了厚壳贻贝和深海偏顶蛤视蛋白基因保守基序,将 motif 查找数量定为 10,通过 TBtools 软件将保守基序结果进行可视化。最后利用 ClustalW 对视蛋白的保守氨基酸位点进行解析。

2.5 厚壳贻贝和深海偏顶蛤视蛋白的系统发育

从 NCBI 蛋白数据库中下载已知软体动物拥有完整七次跨膜的视蛋白全序列(表 1)。用 MEGAX 中 ClustalW 对蛋白序列进行多重比对,利用 Iqtree 2.0 软件最大似然法(model: LG+F+R5, Bootstrap method: 1 000)构建软体动物视蛋白基因家族的系统进化树,用 Figtree 软件进行可视化,并用 AdobeIllustrator 进行美化。

2.6 荧光定量实验

将 *EF-1 α* 作为内参基因,基于从厚壳贻贝全基因组中查找到的视蛋白基因序列,用软件 Primer Primers5 设计荧光定量 PCR 引物(表 2)。将厚壳贻贝五个时期的 cDNA 质量浓度定量为 50 ng/ μ L,按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(RR820Q, Takara, 日本)说明书,在 ABI 500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国加利福尼亚州)上进行定量 PCR 反应。反应体系(10 μ L): SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 5 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.2 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase Free dH₂O 3 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 及 40 个扩增循环(95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火

30 s)。每个处理的样品含 3 个生物学重复。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[28]来计算目的基因的相对表达量,其中也包括表达量的均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)。使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $p < 0.05$ 表示有显著性差异, $p < 0.01$ 表示存在极显著性差异,在柱状图中用字母法表示显著差异。

3 结果

3.1 视蛋白基因鉴定和系统发育研究

借助于基因组信息,通过对厚壳贻贝和深海偏顶蛤 2 种双壳纲动物的视蛋白进行了全基因组范围的筛查,最初的同源比对共得到可能的视蛋白序列共 96 条,通过与牛视紫红质蛋白序列的比对,分析发现在厚壳贻贝中存在 7 条有完整的 7 次跨膜结构域并且第 296 位氨基酸是赖氨酸的视蛋白序列。在深海偏顶蛤中,存在 2 条视蛋白序列。序列比对的结果显示厚壳贻贝和深海偏顶蛤的视蛋白与已知的视蛋白相比,在功能相关的重要氨基酸位置都具有较高的保守性(图 1)。第 296 位氨基酸是对视蛋白和视黄醛的席夫氏碱共价连接起重要作用的赖氨酸,对该共价连接起稳定作用的第 113 和 181 位的 E 也较为保守;第 3 跨膜区末端有保守的 G 蛋白结合的氨基酸序列(E/D)RY;同时具有保守的 opsin 家族的特征氨基酸序列 G123、P171、W175;此外,在 r-opsin 和 c-opsin 的特征序列“HPK”和“NKQ”(蓝色方框标出位置)也有较高的保守性。

ML 系统发育分析将厚壳贻贝的 7 条视蛋白序列中归入已知的 4 个视蛋白亚家族(图 2),其中包括 1 个 r-opsin、2 个 c-opsin4、1 个 Go-opsin3、1 个 opsin5 和 2 个 peropsin。深海偏顶蛤的 2 条 opsin 序列分别是 1 个 c-opsin4 和 1 个 r-opsin 视蛋白。根据系统发生树,本研究中鉴定的厚壳贻贝眼点基因与其他海洋软体动物的同源基因聚为一支,且支持率高,这进一步证明了这些序列作为视蛋白的可靠性。

3.2 视蛋白基因的基础信息及染色体定位

通过生物信息学方法,在厚壳贻贝基因组中共鉴定到 7 个视蛋白基因,视蛋白基因分布在 5 条不同的染色体上(图 3),同一亚家族下的视蛋白分布在同一条染色体上。

ExpASy 分析结果表明(表 3),所鉴定的厚壳贻贝视蛋白基因氨基酸数在 303~619 之间,其中 r-opsin 的氨基酸数最多。其氨基酸平均长度为 385 个氨基酸。蛋白质的等电点在 6.96(RRH)~9.44(opsin5)之间,蛋白质的相对分子质量为 33.83~69.22 kDa,平

表 2 本实验所用的引物序列
Table 2 Primer sequences used in this study

蛋白	引物序列(5'-3')
c-opsin4	CATTAGTATGGGCGGTTCTCTC
	TCGTGTTTCCTTATTGCTTTCC
r-opsin	TGAAAACCCCGAGCAACAT
	CATCGCCCCACATCCATT
Go-opsin3	TAGGAAGGTAACATTGGCGTCTC
	GCTGCTCTTGCCAAACATCG
opsin5	CAAACGCCGAGATGCATAA
	TGAACTGATACTATTAGAACACGGA
RRH	ATGCGGACTAACTGGCTAAAA
	CTCCTGACCACGGGTAACAAC
EF1a	CACCACGAGTCTCTCCCTGA
	GCTGTCACCACAGACCATTCC

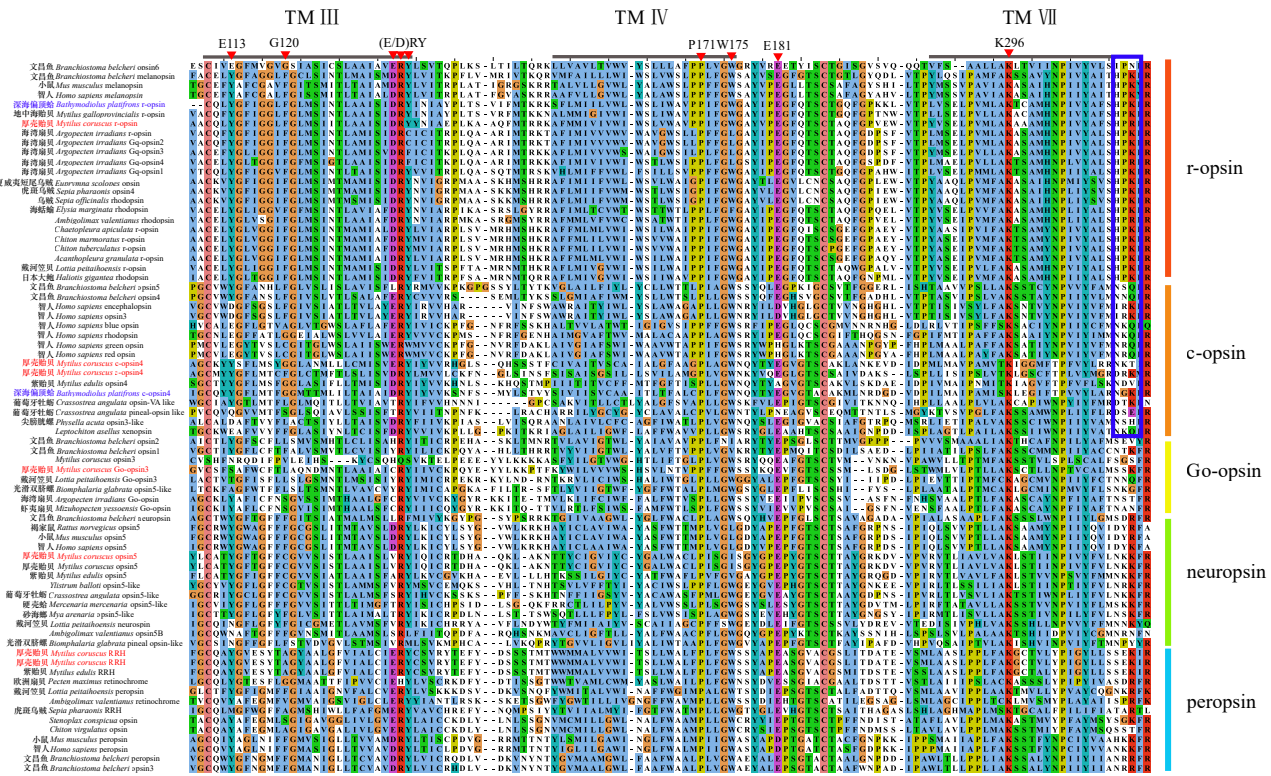


图1 视蛋白基因多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of opsin proteins

红色字体和蓝色字体分别代表本文鉴定的厚壳贻贝和深海偏顶蛤视蛋白序列。图中灰色虚线代表视紫红质的第三、IV和VII跨膜区。依据牛视紫红质对其他物种中opsin序列的氨基酸位置进行编号,我们可以在其中观察到一些被用于区分opsin家族的保守的氨基酸序列位置,这些位置用红色三角箭头表示。同时,蓝色方框中还标注了r-opsin和c-opsin的特征序列“HPK”和“NKQ”

The red and blue fonts represent the opsin sequences identified in this paper, respectively. The dashed gray lines in the figure represent the transmembrane regions III, IV, and VII of the rhodopsin. In the numbering of amino acid positions of opsin sequences in other species by rhodopsin, we can observe some conserved amino acid sequence positions that are used to distinguish the opsin family, and these positions are indicated by red triangular arrows. At the same time, the feature sequences of r-opsin and c-opsin are also marked in the blue box

均为43.74 kDa。GRAVY指数说明除r-opsin为亲水蛋白,其他蛋白质的均为疏水蛋白。

3.3 厚壳贻贝视蛋白的结构域和基序分析

结果表明,厚壳贻贝视蛋白家族在7条序列一共有10种基序,并将其从motif 1到motif 10命名(图4)。视蛋白基因所含motif基序在5~9个范围内。同一亚家族的视蛋白具有高度的保守性,同时也存在一定的差异。两个c-opsin4的基序排列顺序不同,其中一个c-opsin4含有重复的motif 8;opsin5和r-opsin具有相同的motif组成和排列规律,但支持率较低;厚壳贻贝的Go-opsin3与RRH聚为一支,motif基序与RRH有很强的相似性,两个RRH motif的排列有相同的规律性,具有较高的保守性。

3.4 视蛋白在5个发育时期的表达模式

结果显示,这5个视蛋白基因在5个发育时期均有表达(图5)。其中c-opsin4在眼点时期的表达量显著高于其他4个时期,其次是在稚贝时期表达量较高。opsin5在D形时期的表达量显著高于其他4个时

期,在担轮时期和稚贝时期的表达量显著高于壳顶和眼点时期。r-opsin在眼点和壳顶时期的表达量显著高于其他时期,r-opsin在剩下3个时期的表达量没有显著差异。Go-opsin3在D形时期的表达量显著高于其他4个时期。RRH在稚贝时期的表达量最高,之后是担轮时期,在剩余3个时期的表达量无显著差异。

4 讨论

海洋无脊椎动物浮游幼虫的变态发育过程对于其生存和繁殖具有决定性作用,这一过程由一系列感觉受体协同完成,这些受体对物理和化学信号产生响应。其中,一个至关重要的物理信号是光,在某些物种中,光会影响定居过程中关键基因的调控^[29]。尽管视蛋白在多种无脊椎动物幼虫中的趋光行为中发挥着不可忽视的作用,但大多数关于视蛋白功能和进化的研究最初主要集中在脊椎动物和节肢动物眼睛中表达的视蛋白上。早期的双边动物祖先至少有9种不同的视蛋白同源基因:I(Bathypsins、Canonical

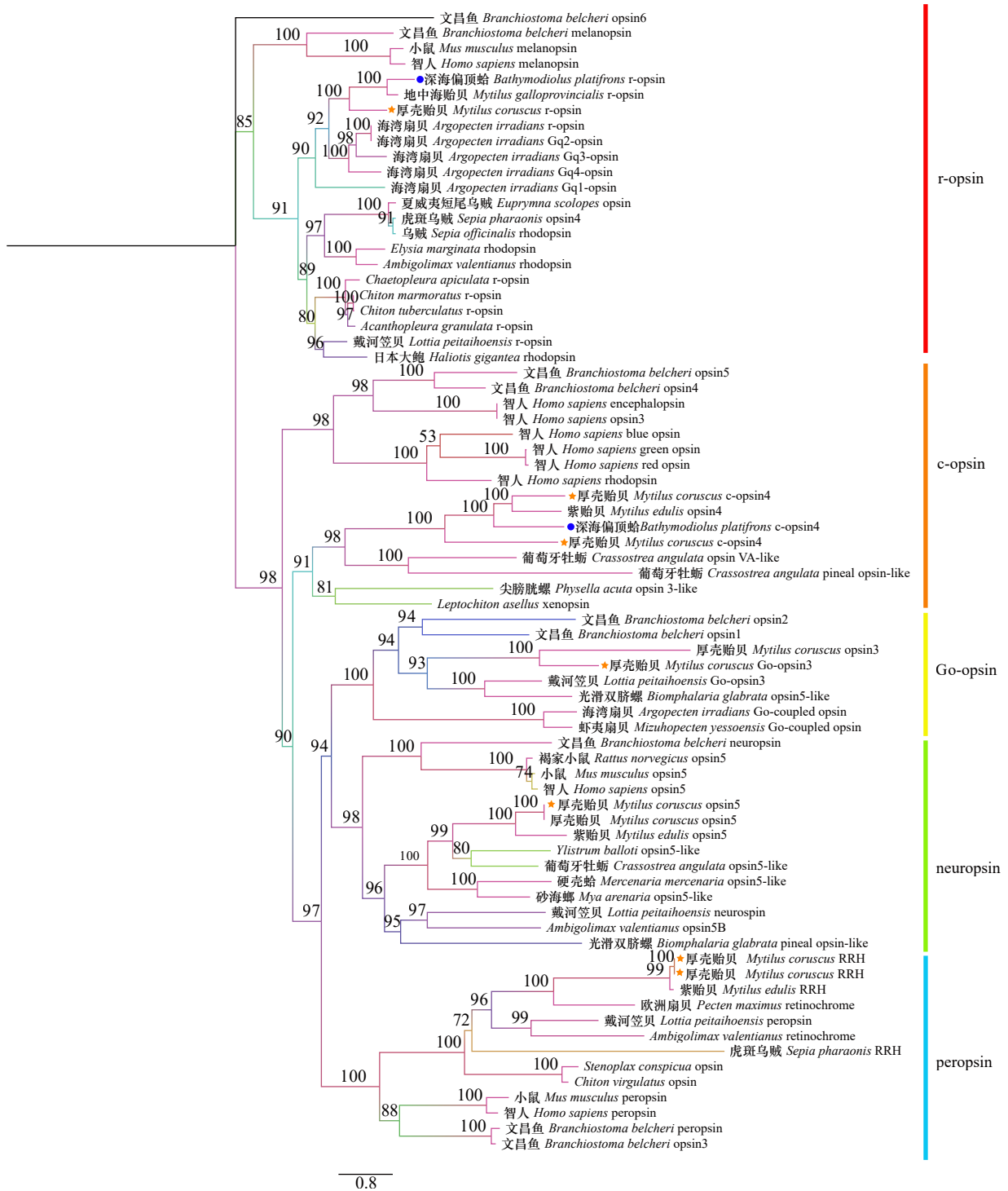


图 2 视蛋白家族 ML 系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic relationship of opsin family based on a ML analysis of protein sequences

厚壳贻贝的视蛋白序列名用橙色星号标出, 深海偏顶蛤的视蛋白序列名用蓝色圆形标出。不同颜色的分枝代表不同的亚家族, 树枝上的数字表示 ML 后验概率

The opsin sequence names of *Mytilus coruscus* are marked with orange asterisks, and those of *Bathymodiolus platifrons* are marked with blue circles. Different colored branches represent different subfamilies, and the numbers on the branches represent ML posteriori probabilities

copsins、Noncanonical ropsins 和 Canonical visual opsins)、II (chaopsins)、III (xenopsins)、IV (RGR/retinochromes/peropsins、Neuropsins 和 Goopsins)。在本研究中, 我们在厚壳贻贝和深海偏顶蛤基因组中分别

筛查到了 7 条和 2 条候选视蛋白基因序列。这对完善我们了解双壳纲动物的视蛋白进化有一定帮助。通过系统发育分析, 将 7 个视蛋白基因分别归入已知的 4 个视蛋白亚家族 (r-opsin、c-opsin、Go-opsin 和

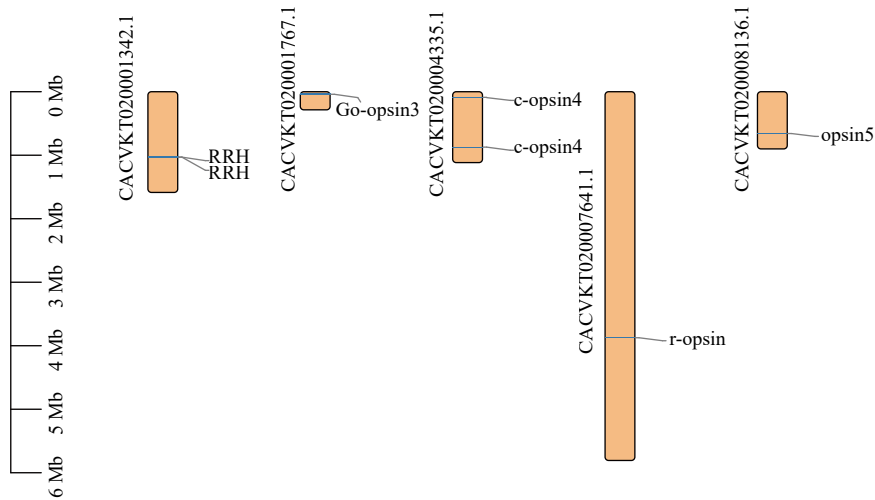


图3 厚壳贻贝视蛋白基因的染色体定位

Fig. 3 Chromosomal mapping of the opsin genes of *Mytilus coruscus*

表3 厚壳贻贝视蛋白家族序列基本信息

Table 3 Basic information of opsin family members in *Mytilus coruscus*

基因	氨基酸数目	等电点/PI	分子量/kDa	不稳定性指数	脂肪族指数	GRAVY指数
c-opsin4	416	9.05	46.18	45.90	101.42	0.316
c-opsin4	424	9.21	47.30	442.81	99.93	0.341
r-opsin	619	8.39	69.22	40.88	83.94	-0.145
Go-opsin3	326	9.05	37.22	29.62	114.42	0.165
opsin5	317	9.44	35.98	42.10	117.98	0.702
RRH	324	7.46	36.48	37.02	99.85	0.527
RRH	303	6.96	33.83	33.27	99.70	0.525

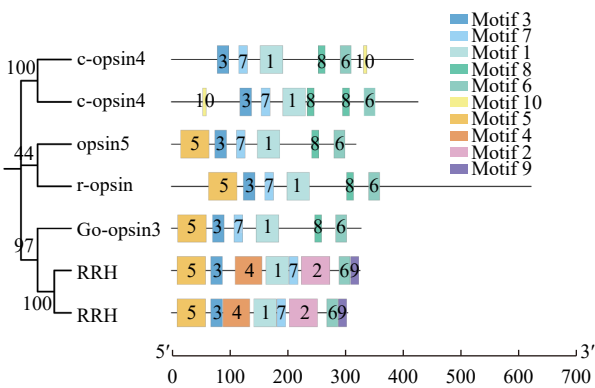


图4 厚壳贻贝视蛋白保守基序结构

Fig. 4 Analysis of conserved motif of *Mytilus coruscus* opsin family members

peropsins)。视蛋白基因在有眼和无眼软体动物中都发挥着重要作用。孙妍^[30]在扇贝、太平洋牡蛎和帽贝中分别筛选到10、10和13条完整的视蛋白序列。厚壳贻贝中视蛋白基因的表达水平在早期幼虫阶段出现显著上调,可能与厚壳贻贝幼虫在水体中的运动

能力以及对环境光线变化的响应有关^[31]。而在眼点时期,显著表达的视蛋白可能与厚壳贻贝在幼虫阶段需要在水柱中进行定向运动和识别附着基质相关,这一阶段的贻贝幼虫需通过光线感知来决定游泳方向和寻找合适的附着点,这使得视蛋白在这些发育阶段发挥重要作用^[32]。Hasan等^[21]发现在翼形亚纲(Pteriomorpha)浮游幼虫时期鉴定出多种视蛋白基因,并且壳顶和眼点时期视蛋白表达量明显增加,并且浮游幼虫对光的响应从壳顶时期的正趋光性转变为眼点时期的负趋光性,这种变化极有可能是由视蛋白的作用所引发。已经有相关研究证明,视蛋白在扁虫(Flatworms)和沙蚕(Platynereis)中的幼虫眼点中也有表达^[33-35]。眼点作为最原始的眼睛由两个细胞组成,一个感光细胞和一个色素细胞,可以感知光的方向和强度,但缺乏空间视觉^[36]。大部分视蛋白在深海偏顶蛤中都是缺失的,在厚壳贻贝中较为完整。McElroy等^[23]发现视蛋白在3种深海软体动物(鳞角腹足蜗牛 *Chrysomallon squamiferum*、*Gigantopelta aegis* 和深海蛸 *A. marissinica*)

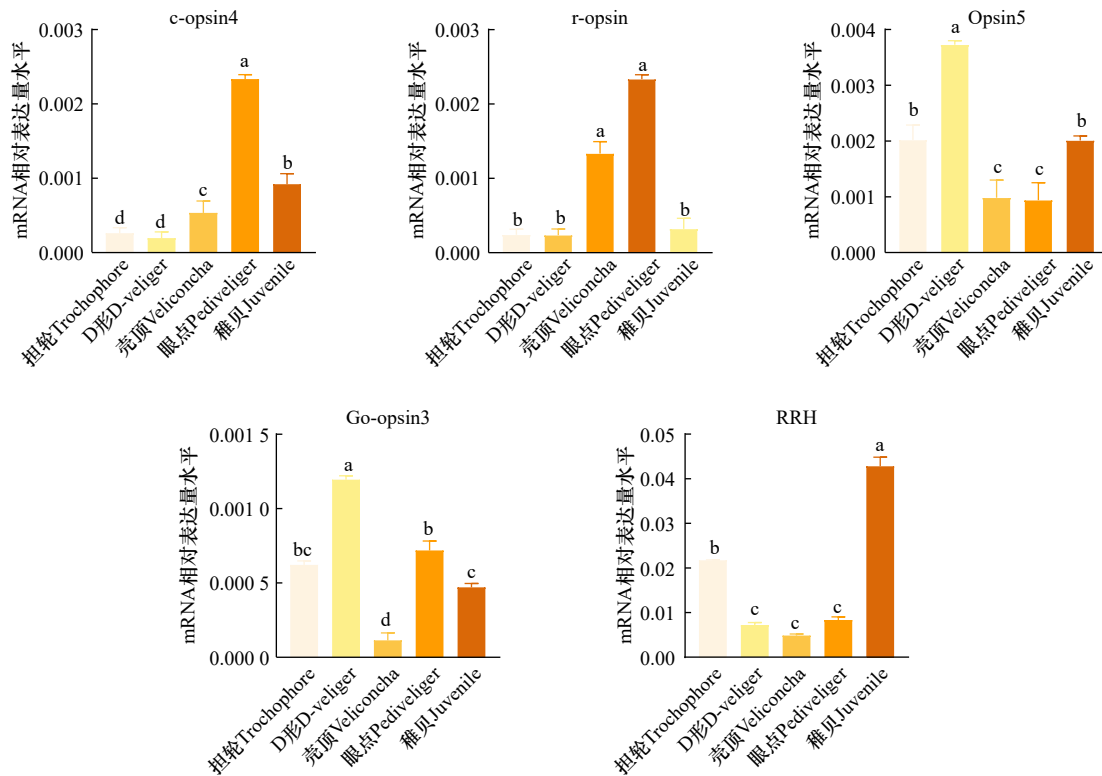


图 5 厚壳贻贝视蛋白家族基因在不同发育时期的表达模式

Fig. 5 Expression of opsin family genes in different development stages in *Mytilus coruscus*

字母不同表示同一时间各实验组之间存在显著性差异 ($p < 0.05$)

Values with the same letters are not significantly different at the same time ($p < 0.05$)

的视蛋白完全丢失,不同于浅海贻贝,深海贻贝具有其独特的“黑暗食物链”,其生长发育不依赖于阳光,深海贻贝为了适应深海环境,其眼睛、消化道或鳃组织逐渐退化或特化。在这种生活环境下,深海偏顶蛤中的视蛋白可能有利于其化学感觉而不是视觉,并且受到潮汐信号的调控^[37]。染色体定位结果显示,厚壳贻贝同一亚家族的视蛋白成员呈现紧密串联分布状态,我们推测同组成员可能是通过基因串联复制产生。保守基序分析结果显示,同一家族的视蛋白基因也存在一定差异,而 opsin5 和 r-opsin 具有相同的 motif 组成和排列规律,串联成员的分化表达与组间成员的协同表达的调控机制是一个尚待深入研究的问题。

目前尚不清楚动物谱系中视蛋白类似物的缺失在多大程度上表明了机体功能的丧失,或者其他视蛋白类似物是否可以接管该功能。不同的动物门使用相关的视蛋白有不同的目的。例如, r-opsin 可能在许多原生动物的眼睛中引导视觉,但脊椎动物视网膜神经节细胞中相关的同源黑视蛋白仅在非视觉任务中起作用。虽然视蛋白是典型的光探测器,但有研究表明,在果蝇中,视蛋白在热感测和检测机械刺激中都有作用^[38-39]。除了在空间视觉中的作用,视蛋白还具

有多种其他功能,例如在深度感知和昼夜节律调节中的重要作用^[40-41]。此外,视蛋白不仅在眼睛中表达,而且在动物的整个身体中也表达。值得注意的是,我们在厚壳贻贝和深海偏顶蛤基因组中发现了 RRH (peropsin) 基因。RRH 与光感视蛋白有 26% 的氨基酸同源性,在视网膜色素上皮(RPE)中独特表达,随后许多脊椎动物中发现其存在表达^[42]。RRH 基因的具体功能尚不清楚,但是根据其基本信息特征以及结构,可以推测出其与 RGR 和视网膜色素功能类似。首先,它可能是一种光受体,对结合的发色团的光异构反应发出信号;其次,RRH 可以通过与一种或多种视网膜异构体结合而被激活(或失活),这种反应不依赖于光照^[43]。基于之前的研究,更加证实了证明 RRH 基因与视觉功能的关系在后生动物中已经建立^[33, 23]。同时,通过荧光定量的分析,我们发现 c-opsin4 和 r-opsin 在眼点时期的表达量显著高于其他时期,表明 c-opsin4 和 r-opsin 可能是厚壳贻贝中利用最多的视蛋白。在脊椎动物中, c-opsin 通过 Gt 型光感应途径来检测光线,其蛋白质与维生素 A 衍生的色素 11-cis-视黄醇结合^[44]。尽管大部分证据集中在脊椎动物和其他动物类群上,但可以推测,在软体动物中, c-opsin 也可能具

有类似的功能和表达模式。此外, r-opsin 的表达量与 Go-opsin 和 c-opsin 相比都比较高, 由于 r-opsin 主要存在于微绒毛型光感受器中, 因此我们推测无脊椎动物主导型的微绒毛光感受器可能是厚壳贻贝幼虫中起主要作用的感光细胞。

5 结论

光、化学和其他环境线索对于具有不同生命阶段的动物可能特别重要。与淡水或陆地环境中大多数头足类和腹足类不同, 大多数海洋双壳类具有形态不同的幼虫阶段。本研究发现厚壳贻贝基因组中存在

较为完整的视蛋白序列, 结果表明, 不同发育阶段的视蛋白表达模式存在显著差异。特别是在眼点期, c-opsin4 和 r-opsin 的表达量显著高于其他发育阶段, 表明这两个视蛋白在厚壳贻贝的视觉系统中具有重要作用, 可能是其在此时期对光环境响应的关键因子。这为研究厚壳贻贝幼虫发育过程中视蛋白基因的表达情况提供了重要的科学见解, 为厚壳贻贝高质量苗种繁育提供指导作用。然而, 在未来的研究领域, 我们可以利用基因编辑技术将进一步深入探究视蛋白的功能, 有助于我们理解这些基因在软体动物感知环境过程中所发挥的作用。

参考文献:

- [1] Terakita A. The opsins[J]. *Genome Biology*, 2005, 6(3): 213.
- [2] Cortesi F, Musilová Z, Stieb S M, et al. Ancestral duplications and highly dynamic opsin gene evolution in percomorph fishes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(5): 1493–1498.
- [3] Porter M L, Blasic J R, Bok M J, et al. Shedding new light on opsin evolution[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 279(1726): 3–14.
- [4] Ramirez M D, Pairett A N, Pankey M S, et al. The last common ancestor of most bilaterian animals possessed at least nine opsins[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2016, 8(12): 3640–3652.
- [5] Döring C C, Kumar S, Tumu S C, et al. The visual pigment xenopsin is widespread in protostome eyes and impacts the view on eye evolution[J]. *Elife*, 2020, 9: e55193.
- [6] Sato K, Yamashita T, Haruki Y, et al. Two UV-sensitive photoreceptor proteins, Opn5m and Opn5m2 in ray-finned fish with distinct molecular properties and broad distribution in the retina and brain[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155339.
- [7] Beaudry F E G, Iwanicki T W, Mariluz B R Z, et al. The non-visual opsins: eighteen in the ancestor of vertebrates, astonishing increase in ray-finned fish, and loss in amniotes[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(7): 685–696.
- [8] 任红乐. 花鲈视蛋白家族分析及 OPN5 对光周期的响应[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
Ren Hongle. Analysis of opsin gene family and response of OPN5 to photoperiod of *Lateolabrax maculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [9] 张志博, 吴燕玲, 张怡宁, 等. 绿光辐照度对红鳍东方鲀视网膜、视蛋白基因及氧化应激的影响[J]. *渔业现代化*, 2024, 51(3): 8–16.
Zhang Zhibo, Wu Yanling, Zhang Yining, et al. Effects of green light irradiance on retinal, opsins genes and oxidative stress of *Takifugu rubripes*[J]. *Fishery Modernization*, 2024, 51(3): 8–16.
- [10] 刘峰, 吴乐乐, 王雨浓, 等. 大菱鲆幼鱼视网膜结构及不同光谱下视蛋白基因表达特征的研究[J]. *海洋科学*, 2023, 47(12): 30–39.
Liu Feng, Wu Lele, Wang Yunong, et al. Development of retinal structures and opsin gene expression under different spectra in juvenile turbot[J]. *Marine Sciences*, 2023, 47(12): 30–39.
- [11] Bellingham J, Morris A G, Hunt D M. The rhodopsin gene of the cuttlefish *Sepia officinalis*: sequence and spectral tuning[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1998, 201(15): 2299–2306.
- [12] Ovchinnikov Y A, Abdulaev N G, Zolotarev A S, et al. Octopus rhodopsin amino acid sequence deduced from cDNA[J]. *FEBS Letters*, 1988, 232(1): 69–72.
- [13] Katagiri N, Terakita A, Shichida Y, et al. Demonstration of a rhodopsin-retinochrome system in the stalk eye of a marine gastropod, *Onchidium*, by immunohistochemistry[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2001, 433(3): 380–389.
- [14] Donohue M W, Carleton K L, Cronin T W. Opsin expression in the central nervous system of the mantis shrimp *Neogonodactylus oerstedii*[J]. *The Biological Bulletin*, 2017, 233(1): 58–69.
- [15] Levy O, Appelbaum L, Leggat W, et al. Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral *Acropora millepora*[J]. *Science*, 2007, 318(5849): 467–470.
- [16] Fritzenwanker J H, Technau U. Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa)[J]. *Development Genes and Evolution*, 2002, 212(2): 99–103.
- [17] Macias-Muñoz A, Murad R, Mortazavi A. Molecular evolution and expression of opsin genes in *Hydra vulgaris*[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 992.
- [18] Ullrich-Lüter E M, Dupont S, Arboleda E, et al. Unique system of photoreceptors in sea urchin tube feet[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(20): 8367–8372.

- [19] Delroisse J, Lanterbecq D, Eeckhaut I, et al. Opsin detection in the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the sea star *Asterias rubens*[J]. *Cahiers de Biologie Marine*, 2013, 54(4): 721–727.
- [20] Kong Fei, Ran Zhaoshou, Zhang Mengqi, et al. Eyeless razor clam *Simonovacula constricta* discriminates light spectra through opsins to guide Ca^{2+} and cAMP signaling pathways[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(1): 105527.
- [21] Hasan M S, McElroy K E, Audino J A, et al. Opsin expression varies across larval development and taxa in pteriomorphian bivalves[J]. *Frontiers in Neuroscience* 2024, 18: 1357873.
- [22] Niemiller M L, Fitzpatrick B M, Shah P, et al. Evidence for repeated loss of selective constraint in rhodopsin of amblyopsid cavefishes (teleostei: amblyopsidae)[J]. *Evolution*, 2013, 67(3): 732–748.
- [23] McElroy K E, Audino J A, Serb J M. Molluscan genomes reveal extensive differences in photopigment evolution across the phylum[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(12): msad263.
- [24] Koehn R K. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*[J]. *Aquaculture*, 1991, 94(2/3): 125–145.
- [25] Li Ronghua, Zhang Weijia, Lu Junkai, et al. The whole-genome sequencing and hybrid assembly of *Mytilus coruscus*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 440.
- [26] Yan Chengrui, Xu Minhui, Ye Yingying, et al. *Hox* gene clusters in the mussel *Mytilus coruscus*: Implications for bivalves' evolution[J]. *Ecological Indicators*, 2023, 154: 110810.
- [27] Chen Chengjie, Chen Hao, Zhang Yi, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [28] 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.
- [29] Say T E, Degnan S M. Molecular and behavioural evidence that interdependent photo- and chemosensory systems regulate larval settlement in a marine sponge[J]. *Molecular Ecology*, 2020, 29(2): 247–261.
- [30] 孙妍. 扇贝眼睛发生和视觉功能遗传基础的基因组学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2016.
Sun Yan. Genomic study on genetic basis of eye development and visual function in scallop[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2016.
- [31] De Vivo G, Crocetta F, Ferretti M, et al. Duplication and losses of opsin genes in lophotrochozoan evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(4): msad066.
- [32] Carl C, Poole A J, Williams M R, et al. Where to settle—settlement preferences of *Mytilus galloprovincialis* and choice of habitat at a micro spatial scale[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52358.
- [33] Vöcking O, Kourtesis I, Tumu S C, et al. Co-expression of xenopsin and rhabdomeric opsin in photoreceptors bearing microvilli and cilia[J]. *eLife*, 2017, 6: e23435.
- [34] Rawlinson K A, Lapraz F, Ballister E R, et al. Extraocular, rod-like photoreceptors in a flatworm express xenopsin photopigment[J]. *eLife*, 2019, 8: e45465.
- [35] Randel N, Bezares-Calderón L A, Gühmann M, et al. Expression dynamics and protein localization of rhabdomeric opsins in *Platynereis* larvae[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2013, 53(1): 7–16.
- [36] Hodgson C A, Burke R D. Development and larval morphology of the spiny scallop, *Chlamys hastata*[J]. *The Biological Bulletin*, 1988, 174(3): 303–318.
- [37] Lorion J, Kiel S, Faure B, et al. Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, 280(1770): 20131243.
- [38] Mat A M, Sarrazin J, Markov G V, et al. Biological rhythms in the deep-sea hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3454.
- [39] Shen Weiping, Mardon G. Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression[J]. *Development*, 1997, 124(1): 45–52.
- [40] Senthilan P R, Piepenbrock D, Ovezmyradov G, et al. *Drosophila* auditory organ genes and genetic hearing defects[J]. *Cell*, 2012, 150(5): 1042–1054.
- [41] Lythgoe J N. *The Ecology of Vision*[M]. New York: Clarendon Press, 1979.
- [42] Bybee S M, Johnson K K, Gering E J, et al. All the better to see you with: a review of odonate color vision with transcriptomic insight into the odonate eye[J]. *Organisms Diversity & Evolution*, 2012, 12(3): 241–250.
- [43] Sun Hui, Gilbert D J, Copeland N G, et al. Peropsin, a novel visual pigment-like protein located in the apical microvilli of the retinal pigment epithelium[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(18): 9893–9898.
- [44] Hagen J F D, Roberts N S, Johnston Jr R J. The evolutionary history and spectral tuning of vertebrate visual opsins[J]. *Developmental Biology*, 2023, 493: 40–66.

Analysis of opsin gene expression in *Mytilus coruscus*

Xu Minhui¹, Li Jiji¹, Ye Yingying¹

(1. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: *Mytilus coruscus* is an economically significant shellfish cultivated in China, with its life and behavior greatly influenced by light conditions. However, much remains unknown about its opsin genes. In this study, seven opsins were identified based on whole-genome sequencing data of *M. coruscus*, and sequence analysis classified them into five types: r-opsin, c-opsin, Go-opsin, neuropsin, and peropsin. Chromosomal localization analysis revealed that opsin genes of the same subfamily are located on the same chromosome. Bioinformatics analysis showed that, except for r-opsin, all identified proteins are hydrophobic. The conserved motifs revealed high sequence conservation among opsin subfamily members, while inter-subfamily comparisons identified specific divergent residues. The expression profiles of opsin genes were examined across five developmental stages using real-time quantitative PCR, which demonstrated significant expression differences at various developmental stages. Notably, c-opsin4 and r-opsin were significantly upregulated during the eyespot stage, suggesting their crucial roles during this period. This study provides insights into the molecular characteristics of opsins in *M. coruscus* and preliminarily explores the expression patterns of opsin genes during its development. Additionally, it contributes to the understanding of visual formation mechanisms in *M. coruscus* and offers a scientific basis for further exploration of the regulatory role of opsins in the metamorphosis process.

Key words: *Mytilus coruscus*; planktonic larvae; opsin; expression analysis; qPCR