

钝缀锦蛤TXNDC5基因克隆及溶藻弧菌胁迫下表达规律研究

杨艳艳^{1,2}, 邢增厚², 任辉², 朱鹏^{1,2}, 青松丽², 许尤厚², 严雪瑜², 余智彩², 潘英^{1*}, 杨家林^{2*}

¹广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁

²北部湾大学, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州

收稿日期: 2022年5月18日; 录用日期: 2022年5月28日; 发布日期: 2022年6月8日

摘要

为探究钝缀锦蛤(*Tapes dorsatus*) TXNDC5基因特征, 本实验采用梯度PCR技术扩增获得TdTXNDC5基因的开放阅读框序列, 其长度为1236 bp, 可编码411个氨基酸残基。预测得知, 钝缀锦蛤TXNDC5蛋白等电点为5.05, 理论分子量为46.40 kD, 分子中具有3个典型的PDI结构域, N末端具有1段长度为20 aa的信号肽。同源性分析结果显示, 钝缀锦蛤TXNDC5蛋白与其它3种海水贝类的同源性为37.9%~70.8%, 表明TXNDC5蛋白在不同种类的海水贝类物种中具有一定的保守性。基于TXNDC5蛋白的氨基酸序列构建系统发育树, 结果显示钝缀锦蛤仅与硬壳蛤聚为一支。实时荧光定量PCR结果显示, TdTXNDC5基因在钝缀锦蛤的8种组织中均有表达, 鳃的表达量最高, 外套膜次之。溶藻弧菌胁迫下, TdTXNDC5基因在钝缀锦蛤鳃和内脏团组织中的表达量均在第3 h时达到峰值, 外套膜在第6 h达到峰值。上述结果表明, TdTXNDC5基因可能参与了钝缀锦蛤应对细菌感染的过程, 在钝缀锦蛤先天免疫防御中具有重要作用。

关键词

钝缀锦蛤, 硫氧还蛋白5, 溶藻弧菌, 免疫防御

Cloning of TXNDC5 Gene of *Tapes dorsatus* and Its Expression Analysis under the Stress of *Vibrio alginolyticus*

Yanyan Yang^{1,2}, Zenghou Xing², Hui Ren², Peng Zhu^{1,2}, Songli Qing², Youhou Xu², Xueyu Yan², Zhicai She², Ying Pan^{1*}, Jialin Yang^{2*}

¹College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning Guangxi

²Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, Beibu Gulf University, Qinzhou Guangxi

Received: May 18th, 2022; accepted: May 28th, 2022; published: Jun. 8th, 2022

*通讯作者。

文章引用: 杨艳艳, 邢增厚, 任辉, 朱鹏, 青松丽, 许尤厚, 严雪瑜, 余智彩, 潘英, 杨家林. 钝缀锦蛤 TXNDC5 基因克隆及溶藻弧菌胁迫下表达规律研究[J]. 水产研究, 2022, 9(2): 37-47. DOI: 10.12677/ojfr.2022.92005

Abstract

In order to explore the characteristics of *TXNDC5* gene in *Tapes dorsatus*, gradient PCR was used to amplify the open reading frame sequence of *TdTXNDC5* gene which was 1236 bp in length and could encode 411 amino acid residues. The isoelectric Point (pI) of TdTXNDC5 protein was 5.05 and the theoretical molecular weight was 46.40 kD. There were three typical PDI domains in TdTXNDC5 and a signal peptide composed of 20 amino acid residues at the N-terminal. The results of homology analysis showed that TXNDC5 protein of *T. dorsatus* had 37.9%~70.8% homology with the other three marine mollusks, indicating that TXNDC5 protein was conserved in different marine shellfish species. The phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequence of TXNDC5 protein, and the results showed that *T. dorsatus* was only clustered with *Mercenaria mercenaria*. Quantitative Real-time PCR results showed that *TdTXNDC5* gene was expressed in all the 8 tissues of *T. dorsatus*, and the highest expression level was found in gill, followed by mantle. The expression of *TdTXNDC5* gene in gill and visceral mass of *T. dorsatus* reached the peak at 3 h and in mantle at 6 h under the stress of *Vibrio alginolyticus*. These results suggest that *TdTXNDC5* gene may be involved in the response to bacterial infection and play an important role in innate immune defense.

Keywords

Tapes dorsatus, *TXNDC5*, *Vibrio alginolyticus*, Immune Defense

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

钝缀锦蛤(*Tapes dorsatus* Lamarck, 1818)隶属瓣鳃纲(Lamellibranchia)、帘蛤目(Veneroidea)、帘蛤科(Veneridae)、缀锦蛤属(*Tapes*), 是一种大型热带、亚热带海洋经济贝类, 主要分布在西南太平洋海域, 在我国主要分布在东海、南海和台湾海峡[1]。钝缀锦蛤主要栖息在潮间带中、低潮区至潮下带及浅海的泥沙底质中, 营埋栖生活, 具有生长速度快、营养价值高和味道鲜美等优点[2] [3]。目前, 有关钝缀锦蛤的研究和报道集中在形态[4] [5] [6]、生态习性[2] [7] [8]、进化地位[9] [10]和繁殖生物学[3] [11] [12]等方面, 免疫相关基因表达规律方面尚未见报道。

我国水产动物养殖因病害造成的经济损失可达 20~30 亿元/年, 细菌性感染是主要原因[13] [14]。已有研究报道细菌性疾病造成长牡蛎(*Crasso streagigas*) [15]、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) [16]和长竹蛭(*Solenstrictus*) [17]等水产动物大量死亡。本课题组前期实验从广西北海市人工养殖的钝缀锦蛤体内分离获得多种细菌, 16S rRNA 鉴定结果表明, 溶藻弧菌在所有菌属中的占比最高。海洋贝类属于低等的无脊椎动物, 免疫防御系统主要依赖于多种分子参与的非特异性免疫应答, 该应答反应具有反应速度快和作用相对稳定的特点。

Chawsheen 等[18]研究表明, 包括硫氧还蛋白 5 (TXNDC5)在内的硫氧还蛋白家族成员可参与细胞炎症反应。TXNDC5, 又称 ERp46, 是蛋白二硫化物异构酶(Protein disulfide isomerase family, PDI)中的一员, 同属硫氧还蛋白(Thioredoxin, TRX)家族[19], 具有依赖于半胱氨酸残基进行氧化还原反应的活性位点[20]。TXNDC5 在炎症反应[18]、蛋白质正确折叠[21]、氧化还原调节[22]、抗氧化应激[23]、蛋白二硫键重排

和凋亡阻滞[22] [24]等生命过程中具有重要作用。研究表明, *TXNDC5* 基因在类风湿性关节炎患者的滑膜成纤维细胞[25]、肺纤维化疾病的组织[26]以及癌症患者的组织和细胞[18] [27]中高表达。水产动物 *TXNDC5* 基因的研究相对较少, 仅有 Sandamalik 等[28]和 Liyanage 等[29]分别报道了大肚海马(*Hippocampus abdominalis*)和盘鲍(*Haliotis discus*)的 *TXNDC5* 基因特征和表达规律。

目前, 瓣鳃纲贝类的 *TXNDC5* 基因在细菌胁迫下的表达规律尚未见报道。本实验旨在研究钝缢锦蛤 *TXNDC5* (*TdTXNDC5*)基因的序列特征及响应溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)胁迫的表达规律, 通过人工注射法向钝缢锦蛤的前闭壳肌注射溶藻弧菌溶液, 检测注射后不同时间点钝缢锦蛤的鳃、外套膜、消化盲囊和内脏团中 *TdTXNDC5* 基因的表达量的变化情况, 为探究 *TdTXNDC5* 基因在钝缢锦蛤体内的免疫机理提供参考, 为海洋贝类细菌性疾病的防治提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2021年10月5日在广西北海市南珠市场购买150只无外伤的钝缢锦蛤(壳长 $6.38 \text{ cm} \pm 0.58 \text{ cm}$, 质量 $43.40 \text{ g} \pm 5.04 \text{ g}$), 置于海水运至北部湾大学海洋学院养殖室, 在养殖箱($45 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$)暂养, 每箱15只。海水高度20 cm, 盐度25~27, 水温 $25^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$, 溶解氧 $> 5.0 \text{ mg/L}$ 。暂养7 d, 期间采用自然光照, 每天投喂亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)溶液1次, 每次1 L。

2.2. 组织 RNA 提取和 cDNA 文库构建

参考 Lu 等[30]方法, 暂养结束后, 从养殖箱随机捞取3只钝缢锦蛤置于冰上麻醉, 取75%酒精棉球擦拭贝壳, 用无菌解剖工具依次剪取钝缢锦蛤的心脏、鳃、斧足、外套膜、出水管、闭壳肌、消化盲囊和内脏团等8种组织到匀浆管, 加入 RNAiso Plus 溶液匀浆破碎。根据 RNAiso Plus 试剂说明书(TaKaRa)分别提取上述8种组织的总 RNA, 参照 PrimeScript RT reagent Kit 说明书(TaKaRa)合成 cDNA 第一链, 产物置于 -80°C 保存。根据本课题组已测序的钝缢锦蛤基因组信息数据库查找 *TdTXNDC5* 基因序列的上、下游非编码区序列信息, 利用 Oligo 6.0 软件设计克隆引物和定量引物(表1), 并委托公司(上海生工)合成。

Table 1. The primers used in this paper

表 1. 本文所用引物

引物 Primers	序列 Sequence	长度/bp Length/bp	用途 Purpose
TdTXNDC5F	CGTTACTTTCGCATTGTATAT	1269	克隆
TdTXNDC5R	GCCATTTTTTTTTTCTAAATCT		
qTdTXNDC5F	CGGCCTTTACGATCTTA	129	定量
qTdTXNDC5R	CCAGCAAGTCTCTCCCAAGTT		
qEF-1 α F	GATCACAGGGACATCTCAAGC	122	定量
qEF-1 α R	AAGTAAAGGCAAGCAAAGCAT		

2.3. *TdTXNDC5* 基因克隆、测序和生物信息学分析

参考朱鹏等[31]实验方法, 以步骤1.2反转录所得 cDNA 为模板, 参照 TksGflex Polymerase 试剂说明书(TaKaRa)扩增 *TdTXNDC5* 基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)序列。PCR 反应体系为: $2 \times$ Buffer $12.5 \mu\text{L}$, 上、下游引物(浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)各 $1 \mu\text{L}$, Tks 酶 $0.5 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $1 \mu\text{L}$, 补加超纯水

至 25 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s (5 个循环); 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s (5 个循环); 94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s (20 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。克隆产物连接到 Peasy-Blunt Simple 载体(北京全式金)获得重组载体,将重组载体导入 Trans1-T1 感受态细胞(北京全式金),阳性克隆菌株送至公司(上海生工)测序。测序结果利用 SeqMan 软件拼接,用 TBtools 软件预测完整的 ORF 序列。

用 EXPASY 服务器解析 TXNDC5 蛋白的分子式、分子大小、各种氨基酸占比及等电点(pI)等信息。用 Softberry 在线软件预测该蛋白质的亚细胞定位, SignIP 软件预测 TXNDC5 蛋白的信号肽, DNASTar 的 Protean 程序预测蛋白质二级结构。利用 MEGA 7.0 软件根据 TXNDC5 蛋白的氨基酸序列构建系统发育树(Bootstraps 设为 1000)。

2.4. 钝缙锦蛤人工感染及实时荧光定量 PCR

根据预实验结果得知,溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)对钝缙锦蛤的半致死浓度(LC₅₀)为 1.0×10^8 CFU/50 g,因此在该浓度进行人工感染实验。本实验随机挑选 90 只钝缙锦蛤,平均分成两组(每组 45 只),将 45 只钝缙锦蛤分到 3 个养殖箱中,每箱 15 只。用一次性注射器向钝缙锦蛤的前闭壳肌注射 0.1 mL 溶藻弧菌溶液(1.0×10^9 CFU/mL),对照组注射等量的灭菌海水。分别在注射后的第 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 采集鳃、外套膜、消化盲囊和内脏团等组织,每个时间点取样 3 只,参照步骤 1.2 分别提取组织总 RNA 并反转录成 cDNA。

为检测溶藻弧菌胁迫下,钝缙锦蛤不同组织中 *TdTXNDC5* 基因的表达规律,本实验采用 qRT-PCR 技术检测注射后不同时间点 *TdTXNDC5* 基因的相对表达量,并以 *EF-1 α* 为内参基因。反应体系: 2 \times SYBR Green PreMix Ex Taq (TaKaRa) 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 上、下游引物各 0.3 μ L, 最后补加超纯水至 20 μ L, 每个样品 3 个重复。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (39 个循环), 95 $^{\circ}$ C 10 s, 溶解曲线: 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C (增幅为 0.5 $^{\circ}$ C), 5 s。钝缙锦蛤不同组织 *TdTXNDC5* 基因的相对表达量根据 qRT-PCR 结果的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

2.5. 统计学分析

实时荧光定量 PCR 结果利用 SPSS 软件的 ANOVA 程序和 Tukey's 程序分析。利用 t 检验对数据进行比较,统计显著性的判断标准为 $p < 0.05$,极显著性的判断标准为 $p < 0.01$ 。

3. 结果与分析

3.1. *TdTXNDC5* 基因特征分析

TdTXNDC5 基因克隆产物的电泳结果见图 1,分子大小为 1326 bp (包含 49 bp 的 5'非编码区和 41 bp 的 3'非编码区),与目标分子大小一致,可用于后续测序和序列分析。测序结果用 TBtools 软件预测基因的 ORF 序列,结果表明, *TdTXNDC5* 基因的 ORF 长度为 1236 bp。将上述 ORF 序列上传至 GenBank 数据库(登录号: OM891503),并利用 Primer Premier5.0 软件预测 *TdTXNDC5* 基因对应的氨基酸序列,与数据库现有的序列进行比对。

TdTXNDC5 蛋白的理化性质预测结果显示,蛋白分子中包含 411 个氨基酸残基,组成分子式为 C₂₀₅₈H₃₁₉₇N₅₃₅O₆₄₃S₂₁,含量最高的是赖氨酸(Lys)为 9.0%,其次是谷氨酸(Glu)为 8.5%,最低的是色氨酸(Trp)为 1.2%。蛋白的等电点为 5.05,理论分子量是 46.40 kD。亚细胞定位和信号肽预测结果显示, *TdTXNDC5* 蛋白主要存在于真核细胞的内质网(Endoplasm reticulum),N 末端含有 1 段长度为 20 aa 的信号肽(序列为 MQNFIFGCVICICLIADVTS)。

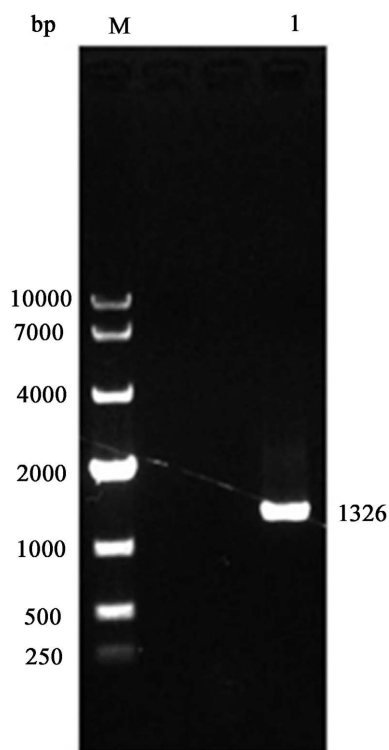


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *TdTXNDC5* gene
图 1. *TdTXNDC5* 基因琼脂糖凝胶电泳图

TdTXNDC5 蛋白的氨基酸组成见图 2，序列中包含 3 个典型的 Cys-X-X-Cys 结构(红色方框标记)，分别位于氨基酸序列的 N 末端第 8~11 位、54~57 位和 194~197 位。*TdTXNDC5* 蛋白的内质网滞留信号(ER retention signal)位于 C 末端，可负责在内质网上的定位(绿色方框标记)。

```

1   ATGCAGAATTTATTTTTGGTGTGTGATATGATATGCCTCATCGCAGTGGTTACATCAGACGATCATGGTAAAAATGTAGTGCATAT
1   M Q N F I F G C V I C I C L I A V V T S D D H G E N V V S Y
91  ACGAAAACAACATTTAACGAAGCCATCGCCAACGAAGAAATTCGTTTGTGATGTTTATGCTCCATGGTGGACATGTAAAAAGACTT
31  T K T T F N E A I A N E E I L F V M F Y A P W C G H C K R L
181 TCACCAATATGGGATGATCTAGTAAGGATTTCAACATTGAAGGTCGTCAACTCACTGTTGAAAAGGTTGATGTACAAAAGAGACGGAT
61  S P I W D D L A K D F N I E G R Q L T V G K V D C T K E T D
271 CTATGTAGTGACCATTGGTTCGAGGATATCCCCTGAAATACTTCCATAAAACCAATATCGGTATTAATATGGAATGAACGCACC
91  L C S D H L V R G Y P T V K Y F H K T N I G I K Y G N E R T
361 GTAGACGCTTTAAGACATTCATAGCAGATGCTTTATCCAAGGGTGAAGTCTCAATATGCAGAAGCTGAGCAACCCGCTCGGAAAAG
121 V D A F K T F I A D A L S K G E S L N M Q K L E Q P A A E K
451 AAAGATGAGAAGGCAGACCAGAAAAGCCGGAAGTTGTCGTGACTGACGGCCCTTACGATCTTAACGATGACACGCTTCCAGTCACGTT
151 K D E K A D Q K E P E V V V T D G L Y D L N D D T F S S H V
541 GCTCAGGGACATCATTCATCAAAATCTACGCCCTGGTGTGGACATGTAAAGGACTGGCTCCAATGGGAAGAACTGCTGGTCTA
181 A Q G H H F I K F Y A P W C G H C K R L A P T W E E L A G L
631 TACAAAGACAGTGATAAAGTGAAGTTGGCAAGATTGACTGTACCCAGAATAGGGCGACCTGTCTAAATTTGGTATCCGAGGATACCCA
211 Y K D S D K V K V G K I D C T Q N R A T C S K F G I R G Y P
721 ACCATTCTCTGGCTGACCAATGGAAAGGAGCGAGGATTACAGAGGTCAGAGGTC AATTGAAGAGCTGACGAAGTTTGTGGTAAAGATG
241 T I L W L T N G E R S E D Y R G Q R S I E E L T K F V V K M
811 ACGAGTGTAGATCGGAGACGCCAAGACGTC AATGACCGAACCTTCCCGATATTTGAAGATGAACCAGAAGTGGGAGTGGTGGCT
271 T S V E S E T A K T S N D G T V P D I L K D E P E V G V V A
901 TTGACTGATGAAGATTTAAAGAATCGGTGTCGGAAGATTTACGTTAGCTGATTTGACGATGATGTTAAAGAATGGAAGCAGTATTG
301 L T D E D F K E S V S E D F T L A V F D D D V K R M E A V L
991 CCCACGTTGGAGAACTGGCAGAAGTACGTTACCAAAACCGGACTATTAGTCGCTACCATTGACTGTACGAAAGATCCAGAAACGTTG
331 P T L E K L A E R Y V T K P E L L V A T I D C T K N P E T C
1081 AAAAGCCAGGATGCCAGTGGCCATATCCTCAGTACAAGTTGTACCATAATGGAGCGGCCATTGTATCATATCAAGGAGAGAACTGTT
361 K S Q D A S G P Y P Q Y K L Y H N G A A I V S Y Q G E K T V
1171 GTTGCCATGAAAACCTATATTAATGAGATGATGAAGAAATATGGCAAAGATCACGATGAATTA
391 V A M E T Y I N E M M K K Y G K D H D E L *

```

Figure 2. *TdTXNDC5* gene sequence and corresponding amino acid sequence
图 2. *TdTXNDC5* 基因序列及对应的氨基酸序列

TdTXNDC5 蛋白的二级结构预测结果见图 3，二级结构中包含 17 个 α -螺旋、9 个 β -折叠、24 个 β -转角和 19 个无规则卷曲。

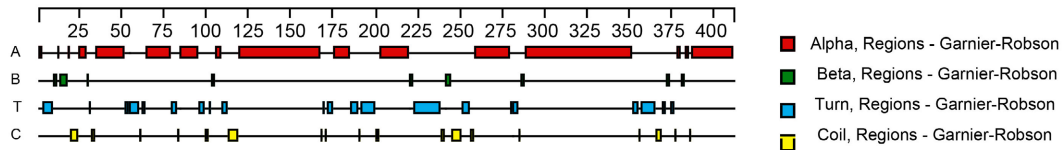


Figure 3. Prediction of secondary structure of *TdTXNDC5* protein
图 3. *TdTXNDC5* 蛋白二级结构预测

3.2. *TdTXNDC5* 蛋白序列同源性及进化关系分析

基于 *TXNDC5* 蛋白的氨基酸序列的多序列比对结果见图 4，钝缢锦蛤 *TXNDC5* 与硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)同源性最高，为 70.77%，与美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的同源性为 37.92%，与长牡蛎的同源性为 39.19%。上述结果表明，*TXNDC5* 蛋白在不同海水贝类中具有一定的保守性，均含 3 个 PDI 结构域，分别标记为 Thioredoxin 结构域(红色箭头)、PDI_a_ERp46 结构域(蓝色箭头)和 PDI_a_ERp38 结构域(绿色箭头)。

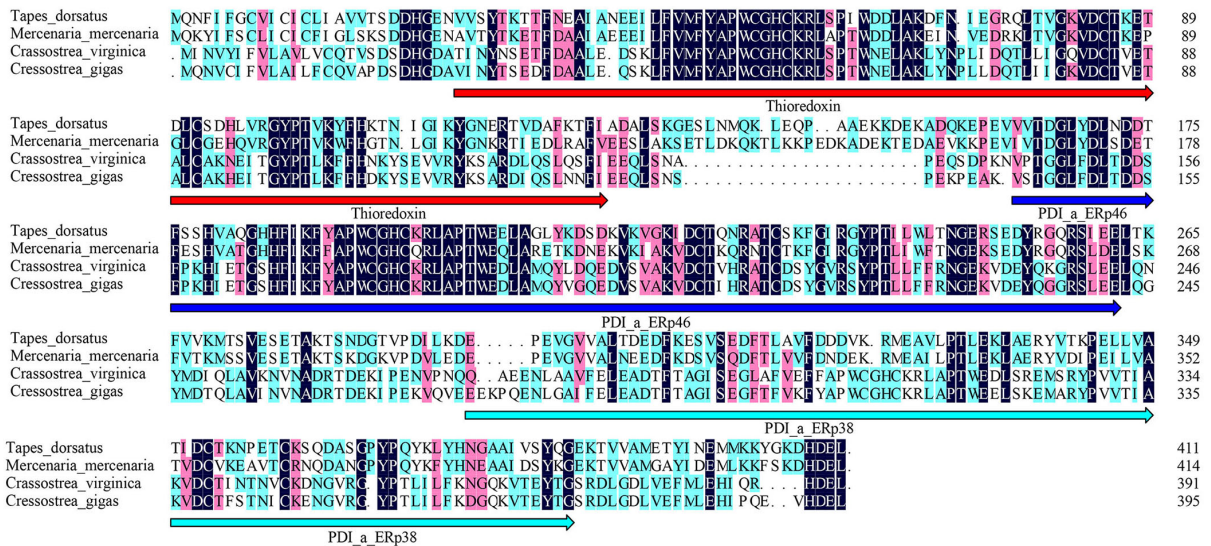


Figure 4. Comparison of multiple sequences of *TdTXNDC5* protein and homologous family protein
图 4. *TdTXNDC5* 蛋白及同源家族蛋白多序列比较

基于 *TXNDC5* 氨基酸序列构建的系统发育树见图 5，钝缢锦蛤 *TXNDC5* 蛋白仅与硬壳蛤聚为一支，与长牡蛎、美洲牡蛎及盘鲍等海水贝类并没有聚在一起。

3.3. *TdTXNDC5* 基因在不同组织表达结果分析

钝缢锦蛤不同组织中 *TdTXNDC5* 基因的表达量见图 6，*TdTXNDC5* 基因在钝缢锦蛤的鳃、外套膜、心脏、斧足、出水管、内脏团、闭壳肌和消化盲囊等 8 种组织中均可表达。鳃组织的表达量最高，是消化盲囊表达量的 8.75 倍，外套膜和心脏组织的表达量仅次于鳃，分别是消化盲囊表达量的 7.33 倍和 6.10 倍。

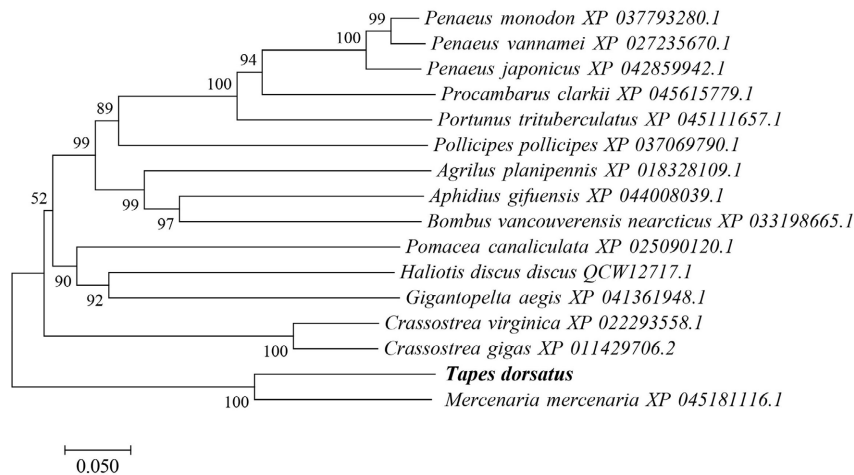
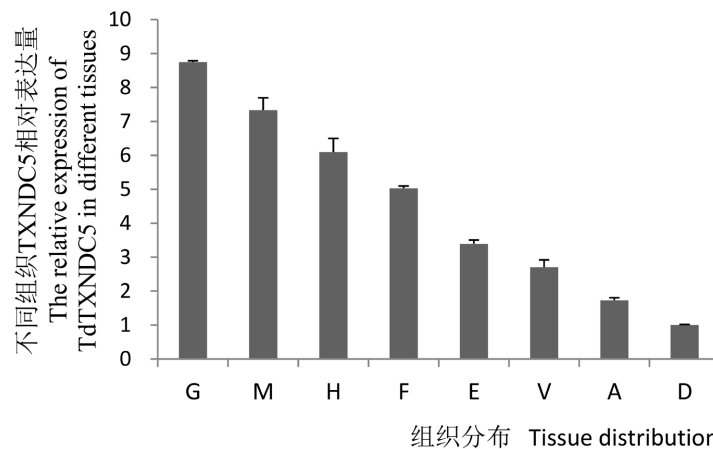


Figure 5. Phylogenetic tree based on *TXNDC5* amino acid sequence

图 5. 基于 *TXNDC5* 氨基酸序列构建系统发育树



注：横坐标不同字母代表钝缀锦蛤的组织，纵坐标为 *TdTXNDC5* 基因的相对表达量。G：鳃；M：外套膜；H：心脏；F：斧足；E：出水管；V：内脏团；A：闭壳肌；D：消化盲囊。

Figure 6. Distribution of *TdTXNDC5* gene in different tissues of *T. dorsatus*

图 6. *TdTXNDC5* 基因在钝缀锦蛤不同组织的分布

3.4. 溶藻弧菌胁迫下 *TdTXNDC5* 基因表达规律

溶藻弧菌胁迫下，*TdTXNDC5* 基因在钝缀锦蛤不同组织的表达时序结果见图 7。钝缀锦蛤鳃、外套膜、消化盲囊和内脏团等四种组织中 *TdTXNDC5* 基因的表达量总体呈现先上升后下降、再上升的趋势。鳃组织在注射后的第 3 h 表达量达到峰值，是对照组的 3.24 倍 ($p < 0.01$)。外套膜和内脏团在注射后的第 6 h 表达量达到峰值，分别是对照组的 18.67 倍和 6.02 倍 ($p < 0.01$)。消化盲囊在注射后的第 48 h 表达量达到峰值，是对照组的 2.18 倍 ($p < 0.01$)。

4. 讨论

4.1. *TXNDC5* 生物信息学分析

TXNDC5 是最早被鉴别为 TRX 家族的新成员，在细胞生长、增殖、凋亡和炎症反应等多方面具有调

节作用[32]。本研究利用梯度 PCR 技术首次克隆获得钝缙锦蛤 *TXNDC5* 基因的 ORF 序列, 长度为 1236 bp, 可编码 411 个氨基酸残基, 理论分子量为 46.40 kD。*TdTXNDC5* 蛋白分子中含有 3 个典型的 PDI 结构域, N 末端具有 1 段长度为 20 aa 的信号肽, C 末端具有 1 个内质网滞留信号结构(³⁹⁹D-E-⁴¹¹L)。本实验结果与已报道的大肚海马[28]和盘鲍[29]等物种的 *TXNDC5* 蛋白结构和理化性质高度一致, 说明 *TXNDC5* 蛋白在不同种类海洋动物中高度保守, 因此推测其在生命体内可能具有重要作用。

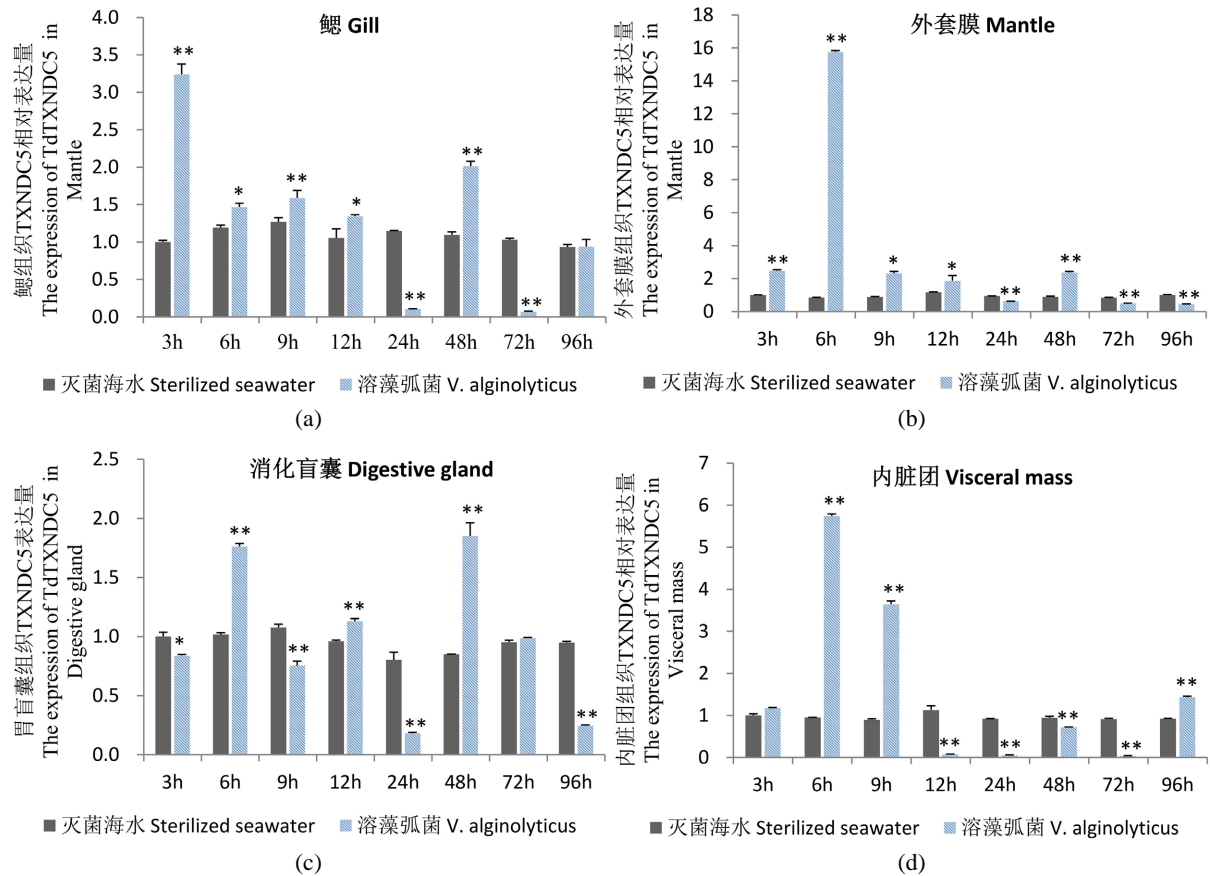


Figure 7. Changes of *TdTXNDC5* gene expression in tissues of *T. dorsatus* under the stress of *V. alginolyticus*

图 7. 溶藻弧菌胁迫下钝缙锦蛤组织 *TdTXNDC5* 基因表达变化

4.2. *TXNDC5* 基因的组织表达差异性分析

目前, 有关人类或其他哺乳动物 *TXNDC5* 基因的报道较多, 且集中在人类或其他动物的疾病方向。Yu 等[20]研究表明, *TXNDC5* 基因高表达于类风湿性关节炎患者滑膜组织中; 当抑制 *TXNDC5* 基因的表达后, 类风湿性关节炎滑膜细胞的增殖和迁移能力明显降低、凋亡率明显增加[21]。作为内质网应激通路上的重要蛋白, Nakamura 等[23]研究表明, *TXNDC5* 蛋白可参与小鼠肺组织纤维化过程。Wang 等[25]细胞实验结果表明, LPS 刺激后, 滑膜成纤维细胞中 *TXNDC5* 基因的表达量上调, 若抑制 *TXNDC5* 基因的表达, 滑膜成纤维细胞中 *TNF α* 和 *IL-6* 基因的表达量也会下降, 因此猜测 *TXNDC5* 基因在 NF- κ B 信号通路上可能具有重要作用。张永丽等[33]研究结果表明, 沉默前列腺癌 PC3 细胞中的 *TXNDC5* 基因后, 过氧化物还原酶 2 (Prx2) 基因的表达可被抑制。另外, Zeng 等[34]研究表明, *TXNDC5* 基因还可在脓毒性败血症患者的血浆中高表达。

本实验结果表明, *TdTXNDC5* 基因在钝缙锦蛤的 8 种组织中均有表达, 表达量从高到低依次是鳃、

外套膜、心脏、斧足、出水管、内脏团、闭壳肌和消化盲囊,其中鳃、外套膜和心脏等免疫相关组织中的表达量分别是消化盲囊表达量的 8.75 倍、7.33 倍和 6.10 倍。与本实验结果一致, Kulatunga 等[24]研究结果表明, *TXNDC5* 的同家族成员 *TXNDC12* 基因也是在斑马鱼(*Danio rerio*)的鳃组织高表达。Sandamalika 等[28]研究结果表明, *ShTXNDC5* 基因在大肚海马的卵巢、鳃和育儿袋中高表达,其表达量分别是肝脏表达量的 46.9 倍、43.5 倍和 12.02 倍。Liyanage 等[29]研究结果表明, *AbTXNDC5* 基因盘鲍的消化腺和血细胞中高表达。

4.3. 胁迫下 *TXNDC5* 基因表达规律分析

溶藻弧菌胁迫下, *TdTXNDC5* 基因在钝缢锦蛤的鳃、外套膜、消化盲囊和内脏团组织中的表达趋势一致,呈现先上升后下降、再上升的趋势,鳃的表达量在第 3 h 达到峰值,外套膜和内脏团在第 6 h 达到峰值。斑马鱼暴露于 H_2O_2 、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)或寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*), *TXNDC12* 基因表达量也显著上调[24]。大肚海马在 LPS、Poly (I:C)、迟缓爱德华氏菌或海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)刺激下,血液和肾脏组织中 *ShTXNDC5* 基因的表达量均显著上调($p < 0.05$) [28]。盘鲍在副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、Poly (I:C)、LPS 或出血性败血症病毒(VHSH)等外源刺激下,血细胞和鳃中 *AbTXNDC5* 基因的表达上调,且均在第 12 h 达到峰值($p < 0.05$) [29]。

综上所述, *TXNDC5* 基因从低等的海水贝类和硬骨鱼类,到人类及其他哺乳动物的组织和器官中均可表达,且在外源异物刺激或内源病变的组织器官中高表达。因此猜测, *TXNDC5* 基因在机体应对外源刺激或内源病变过程中可能发挥着不可或缺的作用。本实验首次克隆了瓣鳃纲物种的 *TXNDC5* 基因,并分析了其分子结构、理化性质及溶藻弧菌胁迫下不同组织的表达规律,其分子功能和作用机制有待进一步阐明。

5. 结论

本文利用梯度 PCR 技术克隆获得钝缢锦蛤 *TXNDC5* 基因的 ORF 序列,蛋白结构预测和进化关系结果显示, *TdTXNDC5* 蛋白分子中包含 3 个典型的 PDI 结构域,与硬壳蛤的亲缘关系最近。*TdTXNDC5* 基因在钝缢锦蛤所有组织中均可表达,特别是在免疫相关组织中高表达。溶藻弧菌胁迫下, *TdTXNDC5* 基因在钝缢锦蛤鳃、外套膜、消化盲囊和内脏团等四种组织中的表达量呈现先上升后下降、再上升的趋势,因此猜测其在钝缢锦蛤应答溶藻弧菌感染中可能发挥了重要功能。

基金项目

广西科技重大专项(AA19254008-3, AA19254032)、大学生创新创业项目(S202111607045)。

参考文献

- [1] 杨家林, 邹杰, 彭慧婧. 温度、盐度和体质量对钝缢锦蛤滤食率和同化率的影响[J]. 水产科学, 2019, 38(1): 104-108.
- [2] 黄洋, 杜涛, 杨世平, 等. 钝缢锦蛤生态习性的初步研究[J]. 水产科学, 2008, 4(3): 175-178.
- [3] 连昌朋, 吴韬, 王超奇, 等. 广西北海营盘钝缢锦蛤(*Tapes conspersus*)卵巢发育、卵子和卵黄发生的研究[J/OL]. 热带海洋学报, 2022: 1-11. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1500.P.20220218.1133.002.html>
- [4] 庄志谦. 中国动物志软体动物门双壳纲帘蛤壳[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] 张玺, 齐忠彦, 李洁民, 等. 南海的双壳类软体动物[M]. 北京: 科学出版社, 1960.
- [6] 巫旗生, 曾志南, 宁岳, 等. 钝缢锦蛤形态性状对活体质量的影响[J]. 水产科学, 2018, 37(1): 110-114.
- [7] Paterson, K.J. and Nell, J.A. (1997) Effect of Different Growing Techniques and Substrate Types on the Growth and Survival of the Clams *Tapes dorsatus* (Lamarck) and *Katelsysia rhytiphora* (Lamy). *Aquaculture Research*, **28**, 707-715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1997.tb01093.x>

- [8] Nell, J.A. and Paterson, K.J. (1997) Salinity Studies on the Clams *Katelysia rhytiphora* (Lamy) and *Tapes dorsatus* (Lamarck). *Aquaculture Research*, **28**, 115-119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1997.tb01023.x>
- [9] Mikkelsen, P.M., Bieler, R., Kappner, I., et al. (2006) Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) Based on Morphology and Molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **148**, 439-521. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00262.x>
- [10] Wang, Y., Yang, Y., Liu, H.Y., et al. (2020) Phylogeny of Veneridae (Bivalvia) Based on Mitochondrial Genomes. *Zoologica Scripta*, **50**, 58-70. <https://doi.org/10.1111/zsc.12454>
- [11] John, A.N., Wayne, A.O., Rosalind, E.H., et al. (1995) Hatchery Production of Diploid and Triploid Clams, *Tapes dorsatus* (Lamarck 1818): A Potential New Species for Aquaculture. *Aquaculture*, **130**, 389-394. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)92761-Q](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)92761-Q)
- [12] 巫旗生, 文字, 曾志南, 等. 钝缀锦蛤繁殖周期和胚胎发育[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 488-496.
- [13] 陈爱平. 2004年中国水产养殖病害监测报告(二)[J]. 科学养鱼, 2005(10): 53-54.
- [14] 陈爱平. 2006年中国水产养殖病害监测报告(一)[J]. 科学养鱼, 2007(7): 48-49.
- [15] 高晓建, 姚东瑞, 孙晶晶, 等. 4株长牡蛎(*Crassostrea gigas*)致病性哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)鉴定及其毒力基因检测[J]. 海洋湖沼通报, 2015(3): 87-96.
- [16] 李启蒙, 朱贝贝, 方皓, 等. 一起菲律宾蛤仔出血病原的鉴定[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(10): 7-8.
- [17] Wang, Q., Li, J. and Guo, H.M. (2019) Transcriptome Analysis and Discovery of Genes Involved in Immune Pathways in *Solen strictus* (Gould, 1861) under *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, **88**, 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.024>
- [18] Chawsheen, H.A., Ying, Q., Jiang, H., et al. (2018) A Critical Role of the Thioredoxin Domain Containing Protein 5 (TXNDC5) in Redox Homeostasis and Cancer Development. *Genes & Diseases*, **5**, 312-322. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.09.003>
- [19] Knoblach, B., Keller, B.O., Groenendyk, J., et al. (2003) ERp19 and ERp46, New Members of the Thioredoxin Family of Endoplasmic Reticulum Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **2**, 1104-1119. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300053-MCP200>
- [20] Yu, S., Ito, S., Wada, I., et al. (2018) ER-Resident Protein 46 (ERp46) Triggers the Mannose-Trimming Activity of ER Degradation-Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 3 (EDEM3). *Journal Biological Chemistry*, **293**, 10663-10674. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003129>
- [21] Jennifer, L.M. (1995) Thioredoxin—A Fold for All Reasons. *Structure*, **3**, 245-250. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00154-X)
- [22] Ravi, D., Muniyappa, H. and Das, K.C. (2005) Endogenous Thioredoxin Is Required for Redox Cycling of Anthracyclines and p53-Dependent Apoptosis in Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 40084-40096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507192200>
- [23] Nakamura, H. (2005) Thioredoxin and Its Related Molecules. *Antioxidants & Redox Signaling*, **7**, 823-828. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.823>
- [24] Kulatunga, D.C.M., Dananjaya, S.H.S., Chamilani, N., et al. (2018) Stress-Immune Responses and DNA Protection Function of Thioredoxin Domain Containing 12 in Zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, **84**, 1030-1040. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.052>
- [25] Wang, L., Dong, H., Song, G., et al. (2018) TXNDC5 Synergizes with HSC70 to Exacerbate the Inflammatory Phenotype of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis through NF- κ B Signaling. *Cellular & Molecular Immunology*, **15**, 685-696. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.20>
- [26] Chen, X., Li, C., Liu, J., et al. (2021) Inhibition of ER Stress by Targeting the IRE1 α -TXNDC5 Pathway Alleviates Crystalline Silica-Induced Pulmonary Fibrosis. *International Immunopharmacology*, **95**, Article ID: 107519. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107519>
- [27] Lu, H., Gao, L. and Lv, J. (2021) Circ_0078710 Promotes the Development of Liver Cancer by Upregulating TXNDC5 via miR-431-5p. *Annals of Hepatology*, **27**, Article ID: 100551. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100551>
- [28] Sandamalika, W.M.G., Samaraweera, A.V., Yang, H., et al. (2021) A Newly Discovered Teleost Disulfide Isomerase, Thioredoxin Domain Containing 5 (TXNDC5), from Big-Belly Seahorse (*Hippocampus abdominalis*): Insights into Its Molecular and Functional Properties and Immune Regulatory Functions. *Developmental and Comparative Immunology*, **114**, Article ID: 103827. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103827>
- [29] Liyanage, D.S., Omeka, W.K.M., Sandamalika, W.M.G., et al. (2021) PDI Family Thioredoxin from Disk Abalone (*Haliotis Discus Discus*): Responses to Stimulants (PAMPs, Bacteria, and Viral) and Functional Characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, **120**, 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.037>

-
- [30] Lu, M., Yang, J.L., Wang, Z.L., *et al.* (2021) Cloning and Expression of the *ChGsta* and *ChGstk* Genes in the Gills of *Crassostrea hongkongensis* under Nanoparticulate and Ionic Zn Stress. *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, **244**, Article ID: 109007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109007>
- [31] 朱鹏, 胡舒, 乔瑞峰, 等. 卵形鲳鲹组织蛋白酶 B 基因的克隆及表达分析[J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 289-295.
- [32] 李健, 常晓天. TXNDC5 研究的新进展[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(3): 448-450.
- [33] 张永丽, 张若佳, 范焕彩, 等. TXNDC5-Prx2 途径对前列腺癌细胞耐药性的调控[J]. 山东大学学报(医学版), 2017, 48(8): 473-478.
- [34] Zeng, Y., Ma, W., Ma, C., *et al.* (2021) Inhibition of TXNDC5 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock by Altering Inflammatory Responses. *Laboratory Investigation*, **102**, 422-431. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00711-5>