

DOI: 10.12264/JFSC2023-0179

菲律宾蛤仔 *GST* 基因家族的全基因组鉴定及急性盐度胁迫下的表达特征

蒋欣月^{1,2}, 周丽青^{1,2}, 孙秀俊¹, 井浩^{1,2}, 葛广玉¹, 吴彪¹, 刘志鸿¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 为阐明菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因(*RpGST*)家族特征及其在应对急性盐度变化中所起的作用, 本研究通过生物信息学方法对 *RpGST* 基因家族进行了全基因组水平的鉴定、染色体定位、结构特征分析、进化分析和表达特征分析, 共鉴定出 7 个 *RpGST* 基因家族成员, 分别命名为 *RpGSTA1*、*RpGSTA2*、*RpGSTA3*、*RpGSTA4*、*RpGST_C_3a*、*RpGST_N_M1*、*RpGST_N_M2*。*RpGSTs* 不均匀地定位在 5 条染色体上, 其编码蛋白的理化性质呈现出不同程度的亲水性。*RpGST* 蛋白均定位于细胞质中, 该基因家族成员都具有谷胱甘肽转移酶结构域(PF00043、PF02798), 表明 *RpGSTs* 蛋白参与抗氧化和解毒过程; 系统发育分析显示, *RpGSTs* 分为 3 个亚家族且在进化上保守。实时荧光定量分析显示, 急性盐度胁迫菲律宾蛤仔 0 h、12 h 和 24 h 后, 急性高盐(40)胁迫下肝胰腺中 *RpGSTA* 和 *RpGST_N_M* 亚家族的基因整体表达水平随时间逐步升高, *RpGST_C_3* 亚家族的基因表达水平随时间先降低后升高; 急性低盐(15)胁迫下肝胰腺中 *RpGSTA*、*RpGST_C_3a* 和 *RpGST_N_M* 亚家族的基因整体表达水平随时间逐步升高; 急性低盐胁迫下谷胱甘肽转移酶表达量显著高于急性高盐胁迫, 说明急性低盐胁迫对菲律宾蛤仔的影响大于急性高盐胁迫。以上研究结果明确了 *RpGST* 基因家族的序列结构特征、系统进化以及对急性高盐和急性低盐胁迫的响应机制, 证明 *RpGST* 基因家族在菲律宾蛤仔抗氧化和解毒过程中发挥了重要作用, 为菲律宾蛤仔抗逆分子选择育种研究提供了理论依据。

关键词: 菲律宾蛤仔; *RpGST* 基因家族; 急性盐度胁迫; 表达模式

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)09-1055-12

近年来, 由于频繁出现高温干旱和强降雨天气, 部分滩涂或浅海的盐度常发生急骤变化, 影响了海洋贝类的生长、存活及生理代谢^[1-2]。低盐可以导致贝类体内的病原体大量繁殖^[3], 而高盐会使贝类组织造成不可逆性的损伤甚至死亡, 因此无论高盐还是低盐环境均会威胁到贝类的生长和存活。前期已有学者从生理生化、分子、组学分析等几个层面研究了贝类机体对盐度变化的响应机制, 进一步证实盐度的变化会影响贝类的组织结

构、生理代谢和能量代谢相关基因的表达等^[4-5]。然而, 对盐度变化对海洋贝类抗氧化防御及解毒功能的影响仍知之甚少。

为适应海洋环境中的盐度波动, 海洋生物体内会产生大量的活性氧, 并通过相关的抗氧化防御机制适应盐度变化, 从而减轻盐度变化对机体的危害^[6]。谷胱甘肽转移酶(GST, EC2.5.1.1.8)作为抗氧化防御机制中的一种广泛分布的多功能酶, 主要参与解毒代谢和抗氧化防御过程^[7-8], 能有

收稿日期: 2023-08-17; 修订日期: 2023-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32273107); 崂山实验室科技创新项目(LSKJ202203803); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022022001); 青岛市市南区科技计划项目(2022-2-026-ZH); 莆田市科技计划项目(2021NJ002).

作者简介: 蒋欣月(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类遗传育种研究. E-mail: 1774581414@qq.com

通信作者: 周丽青, 副研究员, 研究方向为贝类遗传育种研究. E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn.

效清除活性氧自由基^[9]。国内外学者研究发现 *GSTs* 基因的表达与盐度变化应激有密切关系,例如,牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) *GSTs* 基因在盐度胁迫下表达水平平均升高^[10-11];长牡蛎(*Crassostrea gigas*) *GSTs* 基因在急性盐度胁迫下和长期慢性盐度胁迫下均表现出显著差异表达^[12]。因此,揭示海洋生物 *GSTs* 基因在盐度变化过程中的表达模式和响应规律,对于阐明其抗氧化防御机制及培育耐盐品种具有重要的理论意义和应用价值。

菲律宾蛤仔隶属于软体动物门(Mollusea)、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤科(Veneridae)、蛤仔属(*Ruditapes*),属广温、广盐性滩涂贝类。菲律宾蛤仔广泛分布于我国的南北沿海地区,是我国四大传统海水养殖贝类之一^[13]。菲律宾蛤仔的年产量超过 300 万 t,占世界总产量的 90%^[14],具有极其重要的经济价值。研究发现,高盐或低盐环境对菲律宾蛤仔的生长和存活具有显著影响^[15]。近年来,代谢组研究发现菲律宾蛤仔谷胱甘肽代谢可能参与盐度胁迫下抗氧化防御系统调节,并结合离子通道激活、神经适应和能量代谢来维持渗透压平衡^[16]。然而,菲律宾蛤仔 *GSTs* 基因在盐度变化过程中的表达模式和响应规律仍尚未明确。因此,查明菲律宾蛤仔 *GSTs* 基因在急性盐度变化下的响应机制,探讨其在蛤仔抗氧化防御中的作用机制,能够为培育耐盐群体及提高养殖产量提供理论指导和科学依据。

为查明菲律宾蛤仔 *GST* 基因家族及其急性盐度胁迫下的表达特征,本研究基于全基因组鉴定菲律宾蛤仔的 *GST* 基因家族(*RpGSTs*)成员,并对 *RpGSTs* 进行了序列特征分析和系统进化分析,通过实时荧光定量 PCR 方法揭示 *RpGST* 基因家族在菲律宾蛤仔响应急性盐度胁迫过程中的表达模式,研究结果将为阐明菲律宾蛤仔抗氧化防御机制及耐盐群体选育提供理论参考和科学依据。

1 材料与方法

1.1 *RpGST* 基因家族成员鉴定及理化性质分析

从 NCBI 数据库中下载菲律宾蛤仔基因组

(GCA_009026015.1),硬壳蛤[*Mercenaria mercenaria* (GCA_021730395.1)]、长牡蛎[*Crassostrea gigas* (GCA_902806645.1)]、虾夷扇贝[*Patinopecten yessoensis* (GCA_002113885.2)]的 *GST* 蛋白序列,通过 TBtools (v1.098769)^[17]软件的 BLASTP 程序鉴定菲律宾蛤仔 *GST* 基因;使用“hmmsearch”扫描预测蛋白质序列,查找 HMMER (v3.2.1)中 *GST_C* 结构域和 *GST_N* 结构域(PF00043、PF02798)的(HMM)图谱;为验证 HMM 结果,使用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、简单模块化架构研究工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI 保守域数据库(NCBI-CDD)工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)分析这些潜在序列,最终以 HMM、PFAM、SMART 和 NCBI-CDD 中发现的保守 *GST* 结构域为标准,筛选出菲律宾蛤仔 *GST* 基因家族成员;利用在线软件 ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>)分析菲律宾蛤仔 *GST* 基因家族成员的基因长度、蛋白质分子量、理论蛋白等电点、亲水性总平均值和脂肪族氨基酸指数;使用在线亚细胞定位工具 Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/#>)对 *RpGST* 基因家族成员表达产物进行亚细胞定位预测;利用 Tbtools 软件在线绘制染色体定位图。

1.2 *RpGST* 基因家族系统发育分析

为分析菲律宾蛤仔 *GST* 基因的进化关系,对硬壳蛤、长牡蛎、虾夷扇贝、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和斑马鱼(*Danio rerio*) *GST* 的氨基酸序列进行系统发育分析,所有 *GST* 氨基酸序列通过 MEGA 7.0 软件中的 ClustalW 程序,使用默认参数进行对齐,运用邻接(Neighbor-Joining)法构建系统发育树,校验参数 bootstrap 值设置为 1000 次重复。

1.3 *RpGST* 基因家族的基因结构、基序分析和结构域预测

基于鉴定出的 *RpGST* 基因家族成员的保守蛋白结构域的氨基酸序列,在 Tbtools 软件上在线绘制基因结构示意图;使用默认参数的 MEME Suite (v5.3.3, <http://meme-suite.org/index.html>)分析了 *RpGST* 的基序;NCBI-CDD 预测了 *RpGST*

的保守结构域。

1.4 盐度胁迫实验

实验材料于 2022 年 10 月采自山东省莱州市, 平均壳长为(27.4±1.94) mm。在盐度胁迫实验前, 菲律宾蛤仔在水温 20 ℃、盐度 30 的海水中充气暂养 7 d, 期间每天换水 1 次, 早晚各投喂小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 1 次。盐度胁迫时, 将菲律宾蛤仔转移到利用海水晶配制的盐度为 40 和通过添加淡水配置的盐度为 15 的水体中分别进行急性高盐胁迫和急性低盐胁迫, 其他养殖条件与暂养时相同。胁迫 0 h、12 h、24 h 共 3 个时间点后取菲律宾蛤仔的肝胰腺组织并存放至-80 ℃保存, 以便后续用于 RNA 提取实验, 其中 0 h 为实验对照组。

1.5 急性盐度胁迫下 *RpGSTs* 在菲律宾蛤仔肝胰腺中的表达分析

实验采用 Trizol 法提取 RNA, 利用微量分光光度计(NanoPhotometer™, 德国)检测 RNA 的纯度, 选用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.1 之间的 RNA 样品用于后续实验, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量; HiScript III RT SurperMix for qPCR (Vazyme, 中国)合成 cDNA, 荧光定量实验所需引物通过 Primer 5.0 (<http://www.premierbiosoft.com/>)软件设计(表 1), 实验以 β -actin 基因为内参基因进行

qRT-PCR, 检测 *RpGST* 基因家族成员在急性高盐和急性低盐胁迫后肝胰腺组织中的表达量。qRT-PCR 反应体系(20 μ L)包括: 2×ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L、DEPC 水 7.2 μ L, 模板 cDNA 2 μ L (500 ng/ μ L), 反应程序为: 95 ℃预变性 10 min 后, 95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s 循环 40 次; 熔解曲线为: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s。待反应结束后, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量, SPSS (v26.0)软件进行单因素方差分析, GraphPad Prism (v8.0)软件绘制基因表达柱形图。每个组别设置 3 个生物重复和 3 个技术重复。

2 结果与分析

2.1 *RpGST* 基因家族成员鉴定及理化性质分析

菲律宾蛤仔基因组中共鉴定出 7 个 *RpGST* 基因家族成员, 包括 4 个 *RpGstA*、1 个 *RpGST_C_3* 和 2 个 *RpGST_N_Mu*, *RpGST* 蛋白的理化性质分析结果(表 2)显示 *RpGST* 基因家族成员的氨基酸数目长度范围为 168~1722 aa, *RpGstA3* 最长, 为 1722 aa; *RpGST_N_M1* 最短, 为 168 aa; *RpGST* 蛋白的分子量(MWs)在 19.40~190.17 kD 之间, 其中 *RpGSTA3* 最大, *RpGST_N_M1* 最小; 预测的理论蛋白等电点范围为 5.06~9.74, 其中 6 个 *RpGST* 蛋白等电点都小于 7, 表明大部分家族成员为弱酸性蛋白, *RpGstA3* 等电点最大, *RpGST_C_3a* 等电点最小; 蛋白疏水性计算分析表明, 所有成员均存在不同程度的亲水性; 脂肪族氨基酸指数范围为 54.87~96.41, 平均为 82.08; 亚细胞定位结果显示, *RpGSTs* 蛋白均定位于细胞质中。

2.2 *RpGSTs* 的染色体定位

通过染色体定位发现, 7 个菲律宾蛤仔 *GST* 家族成员不均匀地分布在 5 条染色体上(图 1), 其中 *RpGstA1* 定位在第 1 号染色体; *RpGstA2*、*RpGST_N_M1* 和 *RpGST_N_M2* 定位在第 2 号染色体; *RpGstA3* 定位在第 4 号染色体; *RpGstA4* 定位在第 10 号染色体; *RpGST_C_3a* 定位在第 16 号染色体。

表 1 实时荧光定量 PCR 实验中使用的引物
Tab. 1 Primers used in RT-qPCR experiments

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<i>RpGSTA1</i>	TGATGCCAGACGATCCTTACACAG CCGCAGTACCCTTGACCAAATTTTC
<i>RpGSTA2</i>	GGAAAGTTTCGCCGCCATTCG TATCCGACAAGCAGGGTTTATCCG
<i>RpGSTA3</i>	GAATGAGTCGGGTGCGATTTGC CGGCTCTCTCGTTGACATCCTG
<i>RpGSTA4</i>	TCAGAGGAGGAAGGCATTGAAACC CACAGGTCGCCGGTGAAGTC
<i>RpGST_C_3a</i>	GTCCTTGCGGTCGCTGGAAC AGGCAGCGTTCCCTGTGGTG
<i>RpGST_N_M1</i>	AGGCAATGGATCTCAGGCATGG CCCAGCAAACCAGTCATTACAC
<i>RpGST_N_M2</i>	ACGGTCAAACGGTGGCATGG GGTGGTGTGTGTCTGTTGTG
β -actin	CTCCCTTGAGAAGAGCTACGA GATACCAGCAGATTCCATACCC

表 2 *RpGST* 基因家族蛋白质组成和理化性质

Tab. 2 Protein composition and physicochemical properties of the *RpGST* gene family

基因名称 gene name	基因 ID gene ID	染色体 chromosome	氨基酸数目/aa number of amino acids	分子量/kDa molecular weight	理论等电点 theoretical pI	亲水性总平均值 grand average of hydropathicity	脂肪族 氨基酸指数 aliphatic index
<i>RpGst A1</i>	RpG00019457	1	233	26.82	5.97	0.181	88.63
<i>RpGst A2</i>	RpG00005358	2	262	30.4	6.5	0.21	96.41
<i>RpGst A3</i>	RpG00013161	4	1722	190.17	9.74	0.788	54.87
<i>RpGst A4</i>	RpG00022328	10	262	30.42	6.5	0.21	96.41
<i>RpGST_C_3a</i>	RpG00069394	16	295	33.09	5.06	0.499	84.34
<i>RpGST_N_M1</i>	RpG00006490	2	168	19.4	6.43	0.354	86.96
<i>RpGST_N_M2</i>	RpG00006496	2	544	60.36	5.58	0.329	66.99

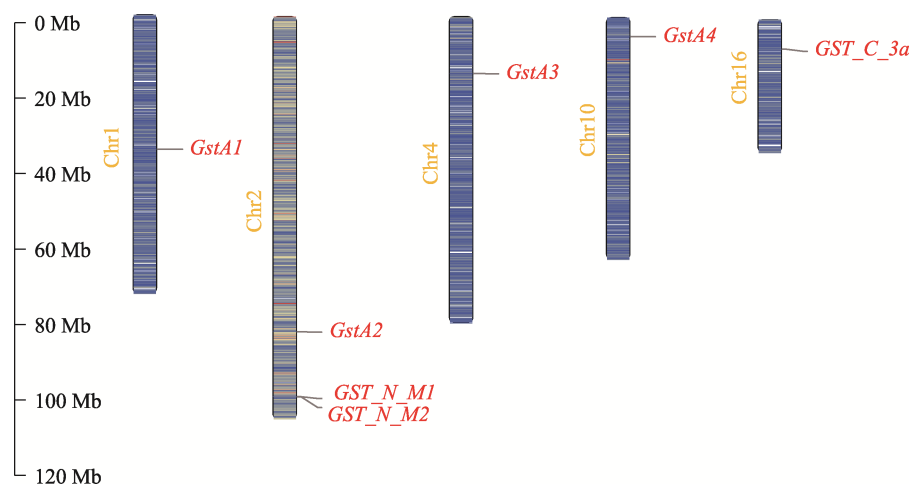


图 1 *RpGST* 基因家族染色体分布示意图

染色体中的不同颜色代表基因密度，左侧为染色体长度标尺。

Fig. 1 Chromosome location diagram of *RpGST* gene family

Different colors in the chromosomes represent the gene density, and the chromosome length scale is on the left.

2.3 *RpGSTs* 基因结构、基序分析和结构域分析

RpGST 基因家族 7 个成员的基因结构示意图如图 2 所示，不同基因的总长度不同，*RpGstA3* 最长，*RpGST_N_M1* 最短，*RpGstA3* 基因有 1 个非翻译区(UTR)，除了少数基因(*RpGstA3*、*RpGST_N_M1* 和 *Rp GST_N_M2*)的编码序列(CDS)数量存在差异外，同类型基因的 CDS 数量和长度保持了极高的一致性。

7 个 *RpGSTs* 家族成员中共鉴定出 10 个保守的 motif (图 3)，氨基酸序列长度范围 13~50 aa (表 3)。多数家族成员有 motif 1、motif 5 和 motif 6，其中 motif 5 数量最多，有 7 个家族成员。家族成员具有的 motif 数量有一定差别，*RpGSTA1* 和

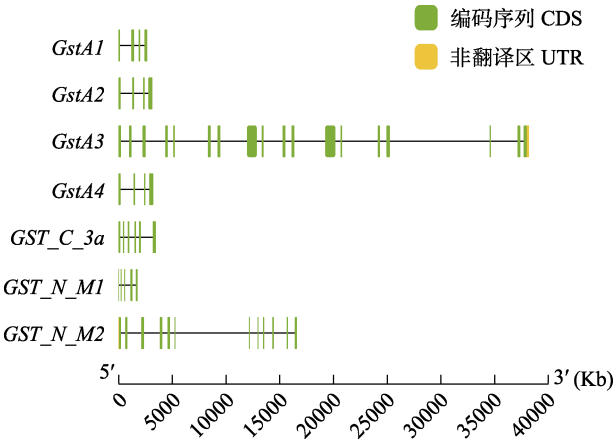


图 2 *RpGST* 家族 7 个成员的基因结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the gene structure of 7 members in the *RpGST* family

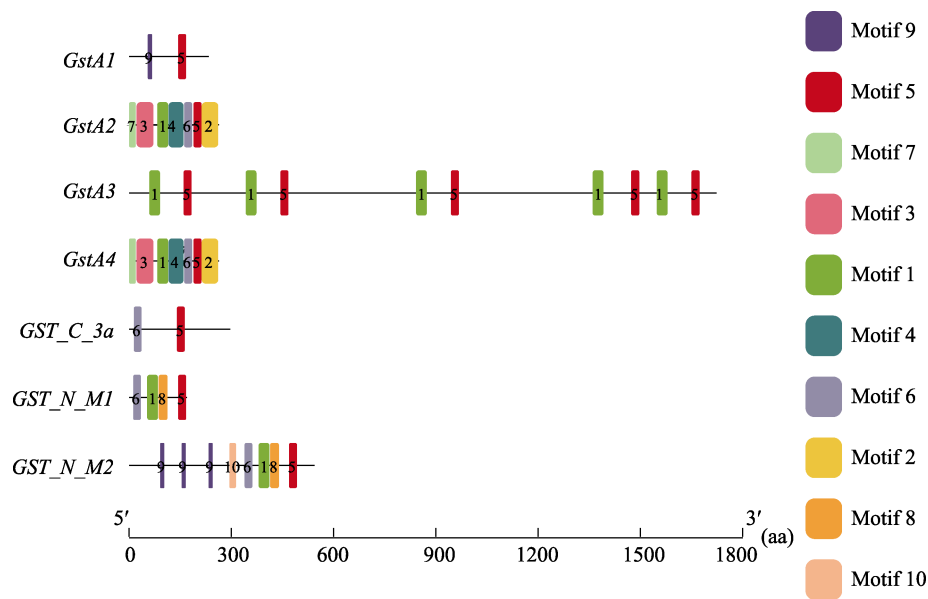


图 3 *RpGST* 家族 7 个成员的保守基序元件的分布

Fig. 3 Distribution of conserved motif elements of the 7 members in the *RpGST* family

表 3 *RpGST* 基因家族蛋白基序信息

Tab. 3 *RpGST* gene family protein motif information

基序 motif	蛋白序列 protein sequence	氨基酸数目 number of amino acids	所在基因个数 number of genes
Motif 1	EIHPPPELPIYIDGDVLITESPAILTYLARKY	32	5
Motif 2	QAEWSGTFKFMWPHVEKWLSRVKNQVH WDTVHMSHSMYLRELERCALFD	49	2
Motif 3	AVFSGKMNGLNGVHRRPVELYLIRINPAC RIIWFYALQHNIPHILIDVDF	50	2
Motif 4	DFAGYGITLQNRLLTESLISWANSELHRA VGHSYIYPQFLEQYA	44	2
Motif 5	LGDSDFLTGNRITVADSFVYPILL	24	7
Motif 6	AEPARLVLVYAGLKFEDRQLEIG	23	5
Motif 7	MSEEEGIETEAKYHGKFRRH	20	2
Motif 8	DGVTVNEKAVVDMLEEAMDLRNGIV	26	3
Motif 9	CLGQCCPICHDDV	13	5
Motif 10	DCDVRVKPVGACCFYCEEKY	20	2

RpGST_C_3a 有两个 motif, 而 *RpGsta2* 和 *RpGsta4* 有 7 个 motif, 且都按照 motif 7、3、1、4、6、5、2 的顺序排列。大多数 *RpGSTA* 亚家族中 motif 的数量和类型相对保守。

所有的 *RpGST* 蛋白都具有保守的结构域(图 4)。motif 3 只存在于 *GSTA* 类别中, 表明 *GSTA* 类别拥有特定的功能。*RpGSTs* 蛋白都具有 *GST* 结构域, 但 *RpGsta3* 还具有疱疹病毒主要外包膜糖蛋白超家族 (*Herpes_BLLF1* superfamily) 结构域, *RpGST_N_M2* 还具有 von Willebrand 因子 C 型

(*VWC* superfamily)结构域。

2.4 *RpGSTs* 系统发育分析

为探明菲律宾蛤仔 *GST* 基因的进化, 对菲律宾蛤仔、硬壳蛤、长牡蛎、虾夷扇贝、中华绒螯蟹和斑马鱼的 28 个 *GST* 氨基酸序列构建了系统发育树(图 5), 结果显示, 这 28 个 *RpGST* 蛋白分为 *RpGSTM* (9 个成员)、*RpGSTP* (7 个成员)、*RpGSTA* (6 个成员)和 *RpGST_C_3* (6 个成员) 4 类, *RpGSTM* 类成员最多, *RpGSTs* 进化不断演变成独立的集群, 如 *RpGSTM* 类和 *RpGSTA* 类。

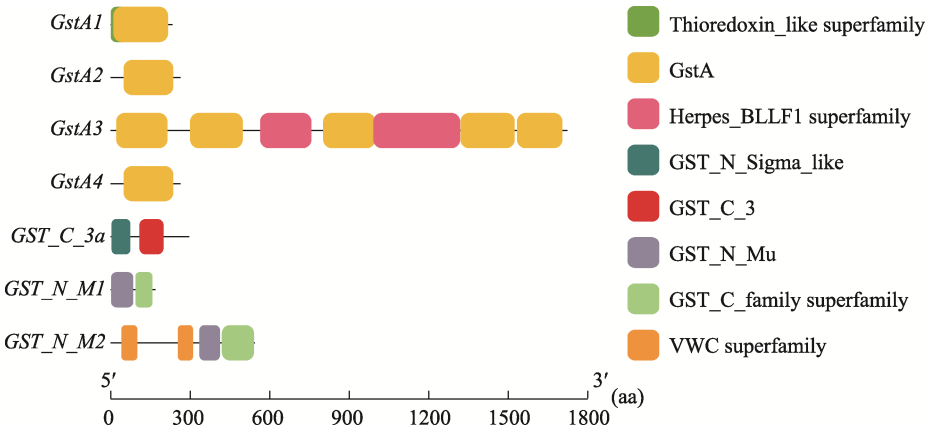


图 4 *RpGST* 家族 7 个成员的保守结构域分析

Fig. 4 Conservative domain analysis of 7 members of the *RpGST* family

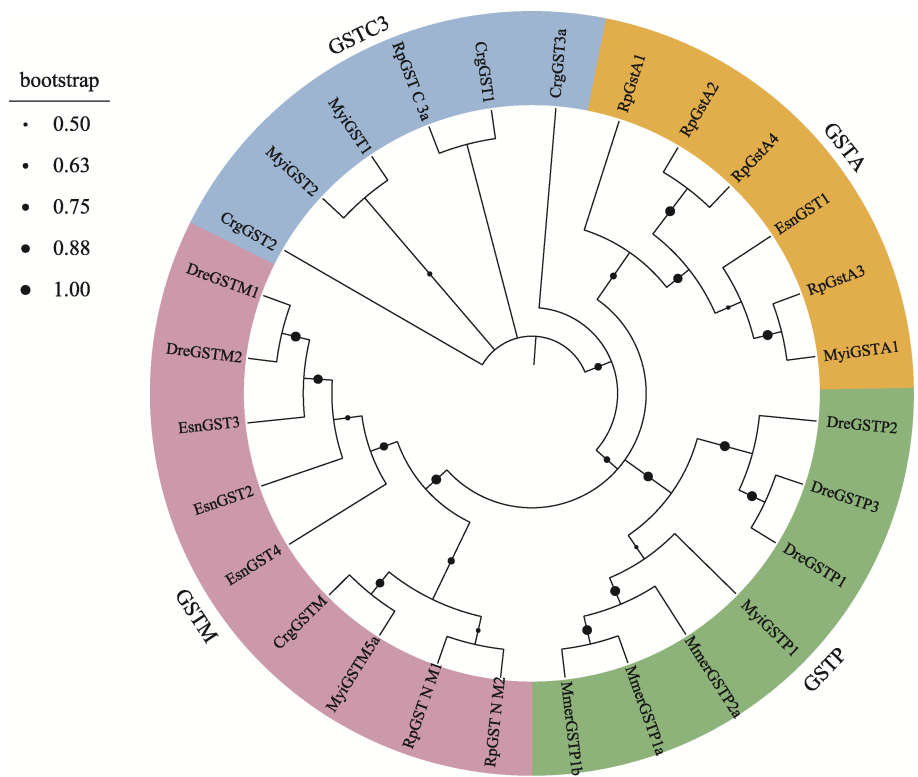


图 5 6 个物种 *RpGST* 基因家族成员系统发育树

Rp: 菲律宾蛤仔; Mmer: 硬壳蛤; Cgi: 长牡蛎; Myi: 虾夷扇贝; Esn: 中华绒螯蟹; Dre: 斑马鱼.

Fig. 5 Phylogenetic tree of *RpGST* gene family members among six species

Rp: *Ruditapes philippinarum*; Mmer: *Mercenaria mercenaria*; Cgi: *Crassostrea gigas*;
Myi: *Mizuhopecten yessoensis*; Esn: *Eriocheir sinensis*; Dre: *Danio rerio*.

2.5 高盐胁迫下菲律宾蛤仔肝胰腺 *GST* 基因的表达模式

RpGSTs 在胁迫 24 h 后表达量都处于最高值 (图 6)。 *RpGSTA1*、 *RpGSTA2*、 *RpGST_N_M1* 和 *RpGST_N_M2* 的表达水平随胁迫时间的增加而升

高; 其中 *RpGSTA1* 和 *RpGST_N_M2* 相对表达量变化明显, *RpGSTA1* 的表达水平随胁迫时间延长极显著升高, 24 h 表达量约为 0 h 的 20 倍 ($P<0.01$); *RpGST_N_M2* 的表达水平随胁迫时间延长极显著升高, 12 h 表达量约为 0 h 的 4 倍 ($P<0.01$), 24 h 表

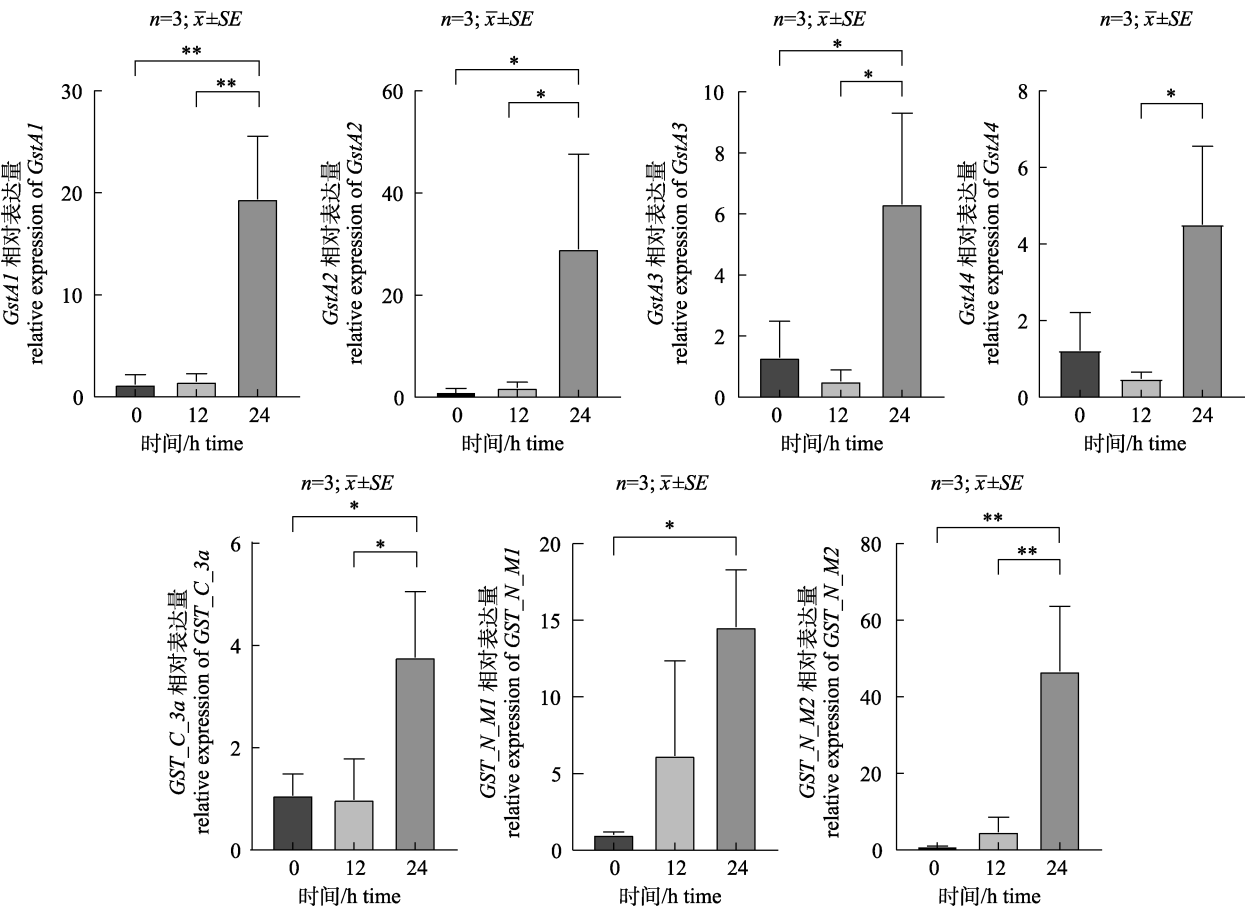


图 6 急性高盐胁迫下 *RpGST* 基因家族成员在菲律宾蛤仔肝胰腺中的相对表达水平
*表示与 0 h 相比差异显著($P<0.05$); **表示与 0 h 相比差异极显著($P<0.01$).
Fig. 6 Relative expression levels of *RpGST* gene family members in the hepatopancreas of *Ruditapes philippinarum* under acute high-salt stress
* indicates significant difference compared with 0 h ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference compared with 0 h ($P<0.01$).

达量约为 0 h 的 46 倍($P<0.01$); 而 *RpGSTA3*、*RpGSTA4* 和 *RpGST_C_3a* 的表达水平随胁迫时间的增加先降低后升高。

2.6 低盐胁迫下菲律宾蛤仔肝胰腺 *GST* 基因的表达模式

RpGSTs 在急性低盐胁迫下的表达变化见图 7。 *RpGSTA1*、*RpGSTA4*、*RpGST_C_3a*、*RpGST_N_M1* 和 *RpGST_N_M2* 的表达水平随着胁迫时间的增加逐步升高, 其中 *RpGSTA1* 和 *RpGSTA4* 的相对表达量变化显著($P<0.05$), 胁迫 12 h 后 *RpGSTA1* 的表达量是 0 h 的 120 倍, 24 h 表达量是 0 h 的 150 倍; 处理 24 h 后 *RpGSTA4* 的表达量是 0 h 的 150 倍; 而 *RpGSTA2* 的相对表达量变化随胁迫时间的增加呈现先降低后升高的趋势,

RpGSTA3 的相对表达量变化则随着胁迫时间的增加先升高后降低。

3 讨论

3.1 *RpGSTs* 基因序列特征及进化分析

前期有学者对水生动物 *GST* 基因家族进行了全基因组分析, 包括紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、沙尖鱼(*Sillago sihama*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等^[18-20], 但尚未对菲律宾蛤仔中的 *GST* 基因家族进行系统研究。本研究共鉴定出 7 个菲律宾蛤仔 *GST* 基因, 分为 3 个类别, 包括 4 个 *RpGstA*、1 个 *RpGST_C_3* 和 2 个 *RpGST_N_Mu*。 *GST_C* 被认为从硫氧还蛋白样祖先进化而来, *GST_N* 结构域可能由谷氧还蛋白(*GRX*)进化而来, 两种结构

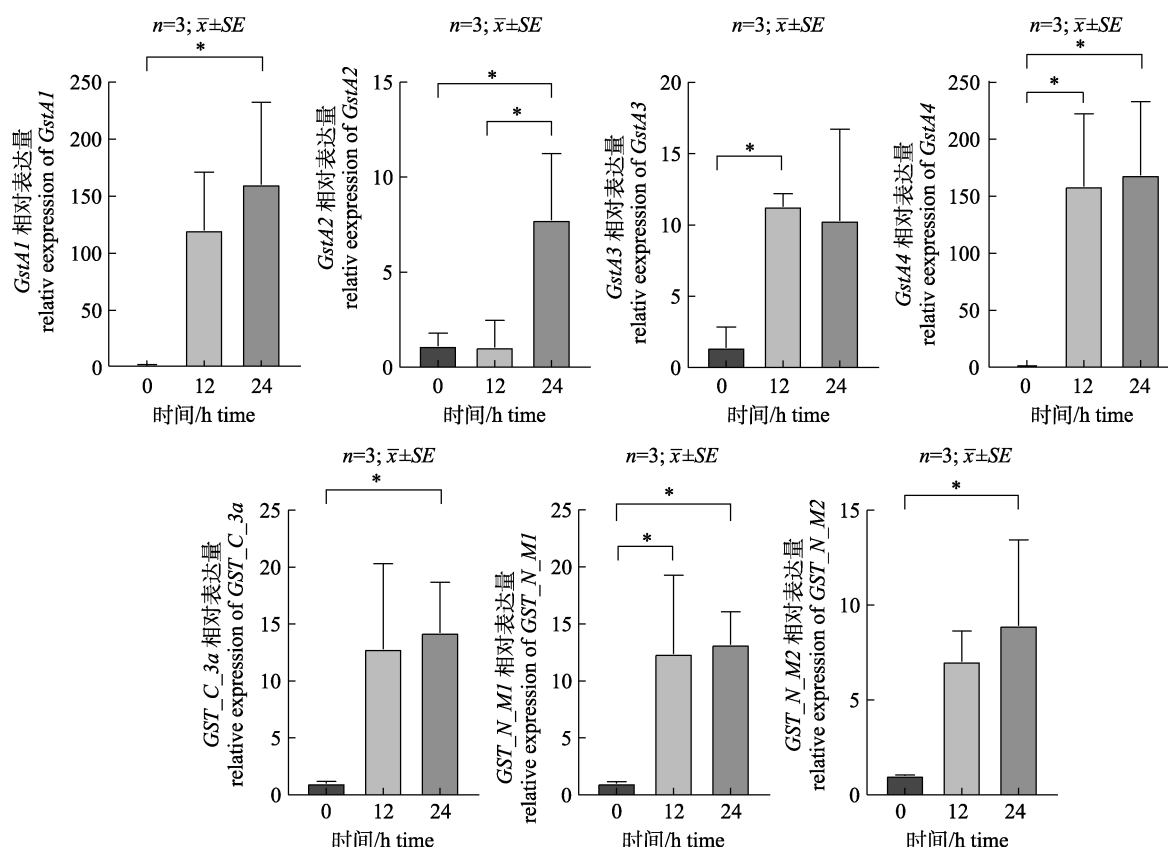


图 7 急性低盐胁迫下 *RpGST* 基因家族成员在菲律宾蛤仔肝胰腺中的相对表达水平

*表示与 0 h 相比差异显著($P<0.05$); **表示与 0 h 相比差异极显著($P<0.01$).

Fig. 7 Relative expression levels of *RpGST* gene family members in the hepatopancreas of *Ruditapes philippinarum* under acute low-salt stress

* indicates significant difference compared with 0 h ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference compared with 0 h ($P<0.01$).

域均参与机体氧化应激的生物学过程^[21-24]。本研究中发现大多数 *RpGSTs* 同时含有以上两种结构域,这可能与菲律宾蛤仔抗氧化性较强有关,反映了菲律宾蛤仔能较快适应因盐度变化导致的溶氧变化这一特点。本研究确定的基序 1 中含有硫氧还蛋白成分,支持 *GST_C* 由硫氧还蛋白样祖先进化而来这一观点。所有 *RpGSTs* 的基序都具有保守的谷胱甘肽转移酶结构域,该结构域与抗氧化及解毒功能相关^[25-26],基序 3 和基序 8 还存在其他的结构域,这可能被赋予了其他的功能,虽然 *RpGSTs* 的组成各不相同,但其保守基序在相同的类别中基本相同,说明 *RpGSTs* 既具有结构功能的相对高度保守性,又有结构多样性来适应环境变化。Ciacci 等^[27]将紫贻贝的鳃组织暴露于六价铬下发现, *GST* 可以结合谷胱甘肽并在保护组织免受氧化应激方面起关键作用; Li 等^[28]在

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)腹腔中注射微囊藻毒素-LR 反应后发现,肝脏中 *GST* 活性显著增加,而 *GSH* 含量显著降低,表明 *GST* 可以催化 *GSH* 和微囊藻毒素-LR (*MC-LR*)结合,然后通过 *ABCC* (*ATP-binding cassette C subfamily*)转运蛋白排出体外,揭示了肝脏 *GST* 的解毒功能。

系统发育分析显示, 7 种 *RpGSTs* 中 A 类成员最多,在菲律宾蛤仔中有 4 个, *RpGSTs* 均进化成独立的簇,如 *RpGSTA* 和 *RpGSTM*,这与菲律宾蛤仔具有广泛分布和适应能力强的特点有关,该结果可以为后续选育耐高盐或耐低盐的菲律宾蛤仔群体提供参考依据。

3.2 *RpGSTs* 功能及表达特征

前期研究发现 *GST* 在多种生物体遭遇逆境胁迫时起至关重要的作用,如盐度^[29]、干旱^[30]、氧化应激等^[31]。近年来,由于全球环境的恶化和气

候的多变,导致贝类面临温度升高、盐度变化等一系列不利状况,而温度升高促使细菌病原体繁殖并在生物体内产生毒素,GST 是生物解毒系统第二阶段的酶,当生物体内毒素产生时,GST 的活性会因诱导而升高^[32],通过催化 GSH 与广泛的疏水和亲电底物的结合来解毒异生素^[33]。GST 还可以作为监测胁迫因素的生物标志物,如长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中的 Ω 和 μ GST 类别可用作碳氢化合物胁迫下的标志物, π 和 Σ GST 类别可用作农药胁迫下的标志物^[34];马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)在镉和细菌的胁迫下,主要在肝胰腺中检测到 GST3 基因表达产物,*PmMGST3* mRNA 水平在暴露于镉 2 d 后增加了 4.3 倍后呈下降趋势,而细菌攻击 *PmMGST3* mRNA 水平呈现先降低后升高的表达趋势,以上结果说明了肝胰腺在异生解毒和抗过氧化中起着重要作用,*PmMGST3* 通过在细胞防御镉和细菌引起的氧化应激中发挥的作用来维持细胞的正常功能^[35]。因此,通过监测 GST 类别及含量变化能提前应对沿海生态系统中不利因素对双壳贝类代谢产生的影响,可以感知这些不利条件对双壳贝类生理及代谢的变化,从而有望指导实际生产操作调整来减少损失。GST 的表达与生物逆境胁迫耐受性之间存在密切关系,当鲍(*Haliotis discus discus*)受到热休克、重金属和内分泌干扰物(EDC)刺激时,*HdGSTO1* 在鲍的所有组织中均表达,而 *HdGSTO2* 在性腺和消化道中表现出特异性表达^[36],说明不同的 *HdGSTO* 基因在响应逆境胁迫的能力上是不同的;肝胰腺是生物体内主要的药物代谢器官,合浦绒螯蟹(*Eriocheir hepensis*)的肝胰腺组织中 *GSTM3*、*GSTT1* 和 *GSTDL* 的表达水平均在印楝素胁迫下 6 h 和 24 h 后显著升高,说明 GST 参与肝胰腺药物代谢并发挥了解毒作用^[37]。

本研究比较了菲律宾蛤仔肝胰腺 GST 基因响应急性高盐和急性低盐胁迫的表达模式,发现大多数 *RpGST* 基因家族成员在响应过程中均有表达差异,*RpGSTA1*、*Rp GST_N_M1* 和 *RpGST_N_M2* 的表达在高盐和低盐胁迫中表达趋势相一致,均随胁迫时间升高相对表达量增加;而 *RpGSTA2*、

RpGSTA3、*RpGSTA4* 和 *RpGST_C_3a* 在急性高盐和急性低盐胁迫下表达量趋势并不一致,低盐胁迫 24 h 后 *RpGSTA1* 和 *RpGSTA4* 的表达量与对照组相比可以高达 150 倍,说明了菲律宾蛤仔在急性低盐环境比在急性高盐环境需要更多的谷胱甘肽转移酶来维持其细胞的正常稳态,这与笔者前期预实验菲律宾蛤仔在低盐环境中的高死亡率结果一致,表明控制盐度变化是菲律宾蛤仔生产上重要的管理操作之一。结合上述结果认为,*RpGST* 基因家族成员在菲律宾蛤仔肝胰腺的解毒和抗氧化功能中起重要作用,不同亚类基因在不同盐度应激中发挥抗氧化及解毒功能且均有表达变化,进一步证实了 *RpGST* 基因家族在盐度胁迫耐受性中发挥了重要作用。

参考文献:

- [1] Fan C. The influence of salinity and temperature stress on growth and survival of Manila clam *Ruditapes philippinarum* and selection of complete set line of thermal resistance[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016. [范超. 盐度和温度对菲律宾蛤仔生长和存活的影响及抗高温配套系选育[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.]
- [2] Ding H B. Effects of high salinity on growth, physiological and energy metabolism related gene expression of *Sinonovacula constricta*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021. [丁红兵. 高盐对缢蛏生长、生理和能量代谢相关基因表达的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.]
- [3] Chen M Y. Basic study on ecological immune mechanism of *Chlamys farreri* in *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2007. [陈慕雁. 栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 生态免疫机制的基础研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2007.]
- [4] Cao W. Effects of high salinity stress on the survival, physiological and biochemical, and transcriptome in razor clam *Sinonovacula constricta*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022. [曹伟. 高盐胁迫对缢蛏存活、生理生化及转录水平的影响[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.]
- [5] Chen Y H, Ye B, Niu D H, et al. Changes in metabolism and immunity in response to acute salinity stress in Chinese razor clams from different regions[J]. Aquaculture Reports, 2021, 19: 100624.
- [6] Zhou D, Mu C K, Song W W, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme and ATPase activities in tissues of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Ecological Science, 2014, 33(4): 698-703. [周东, 母昌考, 宋微微, 等.

- 低盐胁迫对三疣梭子蟹组织中抗氧化酶和 ATP 酶活力的影响[J]. 生态科学, 2014, 33(4): 698-703.]
- [7] Ahmadi S, Ghafouri H, Tarazi S, et al. Cloning, purification and biochemical characterization of two glutathione S-transferase isoforms from *Rutilus frisii kutum*[J]. Protein Expression and Purification, 2021, 179: 105800.
- [8] Gui Y P, Feng M L, Lu W T, et al. Detoxification and antioxidant functions and regulatory mechanisms of two Delta-class GSTs in paddy crayfish (*Procambarus clarkii*) after imidacloprid stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP, 2023, 271: 109674.
- [9] Zaccaron da Silva A, Zanette J, Fernando Ferreira J, et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 62(3): 376-382.
- [10] Choi C Y, An K W, An M I. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2008, 149(3): 330-337.
- [11] Qi T T, Liu J, Zhao P S, et al. A novel modulation of physiological regulation in cultured Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to consistent salinity changes[J]. Gene, 2020, 756: 144914.
- [12] Chen L P, Zhang X M, Wang Z H, et al. Proteomics analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) under acute and longer-term chronic salinity stress treatment as examined by label-free mass spectrometry[J]. Aquaculture, 2022, 551: 737868.
- [13] Zhou L Q, Jing H, Ge G Y, et al. Effects of three dissolved oxygen modes on oxidative stress and physiological metabolism in *Ruditapes philippinarum* gill tissue and hemolymph[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(3): 361-370. [周丽青, 井浩, 葛广玉, 等. 溶氧变化模式对菲律宾蛤仔鳃组织和血淋巴氧化应激及生理代谢的影响[J]. 中国水产科学, 2023, 30(3): 361-370.]
- [14] Dong S P. Construction of individual growth model and estimation of carrying capacity of *Ruditapes philippinarum* in Jiaozhou Bay[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [董世鹏. 胶州湾菲律宾蛤仔个体生长模型构建及养殖容量评估研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [15] Fan C, Wen Z C, Huo Z M, et al. Influence of salinity stress on growth and survival of Manila clam *Ruditapes philippinarum* at various developmental stages[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(5): 497-504. [范超, 温子川, 霍忠明, 等. 盐度胁迫对不同发育时期菲律宾蛤仔生长和存活的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(5): 497-504.]
- [16] Sun X J, Wu B A, Tu K, et al. Transcriptome and metabolome analyses provide insights into the salinity adaptation of clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Aquaculture Reports, 2022, 27: 101368.
- [17] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [18] Vodiasova E A, Meger Y V, Lantushenko A O. Identification and characterization of the novel genes encoding glutathione S-transferases in *Mytilus galloprovincialis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics & Proteomics, 2021, 40: 100926.
- [19] Pan Y Y, Lin X H, Chen F Y, et al. Genome-wide identification and expression profiling of glutathione S-transferase family under hypoxia stress in silver Sillago (*Sillago sihama*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics & Proteomics, 2021, 40: 100920.
- [20] Chen B H, Peng W Z, Xu J A, et al. Genomic analysis of glutathione S-transferases (GST) family in common carp: Identification, phylogeny and expression[J]. Pakistan Journal of Zoology, 2017, 49(4): 1437-1448.
- [21] Koonin E V, Mushegian A R, Tatusov R L, et al. Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain—study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling[J]. Protein Science: a Publication of the Protein Society, 1994, 3(11): 2045-2054.
- [22] Martin J L. Thioredoxin—a fold for all reasons[J]. Structure, 1995, 3(3): 245-250.
- [23] Oakley A J. Glutathione transferases: New functions[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2005, 15(6): 716-723.
- [24] Fernandes A P, Holmgren A. Glutaredoxins: Glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2004, 6(1): 63-74.
- [25] Liu Z Q, Zhang Y N, Zheng Y Y, et al. Genome-wide identification glutathione-S-transferase gene superfamily in *Daphnia pulex* and its transcriptional response to nanoparticles[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 230: 123112.
- [26] Hoarau P, Garello G, Gnassia-Barelli M, et al. Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(17): 4359-4366.

- [27] Ciacci C, Barmo C, Gallo G, et al. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120-121: 109-118.
- [28] Li X H, Feng C, Sha H, et al. Identification and characterization of ABCC gene family and their roles in the response to intraperitoneal injection of microcystin-LR in liver of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Aquaculture Reports, 2023, 30: 101592.
- [29] Jha B, Sharma A, Mishra A. Expression of SbGSTU (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(7): 4823-4832.
- [30] Cicero L L, Madesis P, Tsaftaris A, et al. Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses[J]. Phytochemistry, 2015, 116: 69-77.
- [31] Yun B. Experimental study on the effect of GP17 on the expression of HO-1, NQO1 and GST in oxidative stress in skin photoaging mice[D]. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018.[云博. GP17 对皮肤光老化小鼠氧化应激中 HO-1、NQO1、GST 表达影响的实验研究[D]. 辽宁中医药大学, 2018.]
- [32] Liu Y, Ling Q F, Wang L, et al. Effects of ammonia-N stress on GST activities of livers of four-naris carp[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(7): 13-15. [刘洋, 凌去非, 王磊, 等. 氨氮胁迫对四鼻须鲤鱼肝脏 GST 酶活力的影响[J]. 水产养殖, 2011, 32(7): 13-15.]
- [33] Frova C. The plant glutathione transferase gene family: Genomic structure, functions, expression and evolution[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 119(4): 469-479.
- [34] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases Pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides[J]. Marine Biology, 2004, 146(1): 53-64.
- [35] Chen J H, Xiao S, Deng Y W, et al. Cloning of a novel glutathione S-transferase 3 (GST3) gene and expression analysis in pearl oyster, *Pinctada martensii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(6): 823-830.
- [36] Wan Q, Whang I, Lee J S, et al. Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP, 2009, 150(4): 558-568.
- [37] Liu K, Liu J X, Ren T J, et al. Cloning and analysis of three glutathione S-transferases in *Eriocheir hepuensis* and their expression in response to azadirachtin stress[J]. Aquaculture Reports, 2021, 19: 100635.

Genome-wide identification of the *Ruditapes philippinarum* *GST* gene family and its expression characteristics in the hepatopancreas under acute salinity stress

JIANG Xinyue^{1,2}, ZHOU Liqing^{1,2}, SUN Xiujun¹, JING Hao^{1,2}, GE Guangyu¹, WU Biao¹, LIU Zhihong¹

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources Exploration and Utilization, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Glutathione S-transferase (GSTs, EC 2.5.1.18), a class of multifunctional detoxification enzymes widely distributed in organisms, is involved in the metabolism of many toxic substances from both internal and external sources, and plays an important role in protecting cells against biological and abiotic stresses. This study investigated the characteristics of the *Ruditapes philippinarum* gene family (*RpGST*) and its function in response to acute hypersalinity and acute hyposalinity stress. Bioinformatics methods were used to identify *RpGST* gene family members and analyze their structural characteristics, chromosome localization, phylogeny, and expression

characteristics in the hepatopancreas after acute salt stress. A total of seven *RpGST* genes were identified, namely *GSTA1*, *GSTA2*, *GSTA3*, *GSTA4*, *GST_C_3a*, *GST_N_M1*, and *GST_N_M2*. Chromosome localization results revealed that these seven *GST* genes were located on five chromosomes. The hydrophobicity analysis showed that all protein members had different degrees of hydrophilicity. The average aliphatic amino acid index was 82.08; subcellular localization found that *RpGST* proteins were all located in the cytoplasm; and all members of this gene family possess the glutathione transferase domain (PF00043, PF02798), which is associated with antioxidant and detoxification functions. Phylogenetic analysis revealed that *RpGSTs* were divided into three subfamilies and were evolutionarily conserved. The seven *RpGSTs* were divided into three distinct classes, with the *GSTA* class being the largest, consisting of four members within the *Ruditapes philippinarum* family, whereas the *GSTM* class consisted of two members and the *GST_C_3* class of one member. All *GSTs* in the *Ruditapes philippinarum* family evolved into separate clusters, such as *RpGSTA* and *RpGSTM*, related to the wide distribution and strong adaptability of the family. These results can provide a reference for the subsequent breeding of *Ruditapes philippinarum* with high and low salinity tolerance. After acute salinity stress in *Ruditapes philippinarum* for 0 h, 12 h and 24 h, the hepatopancreatic expression levels of *RpGST* members in acute hypersaline (40) and hyposaline (15) stress were detected by qRT-PCR. The results evidenced that the relative expression levels of *RpGSTA1*, *RpGSTA2*, *RpGST_N_M1*, and *RpGST_N_M2* in the hepatopancreas of *Ruditapes philippinarum* increased with time, and the expression levels of *RpGSTA1* and *RpGSTM2* were significantly different from those of the control group ($P < 0.01$), whereas the relative expression levels of *RpGSTA3*, *RpGSTA4* and *Rp GST_C_3a* first decreased and subsequently increased. The relative hepatopancreatic expression levels of *RpGSTA1*, *RpGSTA4*, *RpGST_C_3a*, *RpGST_N_M1*, and *RpGST_N_M2* in *Ruditapes philippinarum* increased over time under acute hyposaline stress. Specifically, those of *RpGSTA1* and *RpGSTA4* significantly changed during acute hyposaline stress, gradually increasing with time, and this difference was significant compared with the control group ($P < 0.05$). In contrast, the relative expression levels of *RpGSTA2* initially decreased and subsequently increased over time, while the relative expression of *RpGSTA3* first increased and then decreased. The expression of glutathione transferase under acute low-salt stress was significantly higher than that under acute high-salt stress, indicating that acute low-salt stress had a more pronounced effect on Philippine clams than acute high-salt stress. This study clarified the gene characteristics, phylogeny and response mechanism of the *RpGST* gene family in the context of acute hypersaline and hyposaline stress. It enriches the research data on the *RpGST* gene family in bivalve shellfish and provides a reference for further study on the role of this gene family in regulating salinity stress.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; *RpGST* gene family; acute salt stress; expression pattern

Corresponding author: ZHOU Liqing. E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn.