

DOI: 10.12264/JFSC2022-0328

近江牡蛎 *SLC13* 基因家族的全基因组鉴定及急性高盐胁迫下的表达特征

葛广玉^{1,2,3}, 迟长凤¹, 王振原^{2,3}, 刘志鸿^{2,3}, 王岩^{2,3}, 陈夕^{2,3}, 孙秀俊^{2,3},
周丽青^{2,3}, 吴彪^{2,3}

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;
2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266273

摘要: 溶质载体 13 (solute carrier 13, SLC13) 是 SLC 转运蛋白超家族的重要成员, 编码结构相似的跨膜蛋白, 在介导转运阴离子和柠檬酸循环代谢中间体中发挥重要作用。近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*) 基因家族收缩和扩张分析表明, *SLC13* 家族显著扩张, 可能与渗透压调节密切相关。为进一步探讨近江牡蛎 *SLC13* 基因家族(*CarSLC13*) 特征及在高盐胁迫下的表达变化, 本研究运用生物信息学方法对 *CarSLC13* 进行鉴定, 并分析了其基因结构、染色体定位、系统进化和在急性高盐胁迫后鳃组织中的表达特征。本研究共鉴定出 11 个 *CarSLC13* 基因, 包括 1 个 *CarSLC13A1* 亚家族成员, 6 个 *CarSLC13A2* 亚家族成员和 4 个 *CarSLC13A5* 亚家族成员, 其中 7 个家族成员蛋白的理化性质较为稳定, 不稳定系数均小于 40; 亚细胞定位预测显示, 所有 *CarSLC13* 均定位到细胞膜或内膜; 染色体定位结果显示, 11 个 *SLC13* 基因定位在 6 条染色体上, 在第 3 号染色体上的部分基因发生了串联复制; 该基因家族成员都具有钠-硫酸盐共转运蛋白跨膜结构域(PF00939), 该结构域与渗透压调节功能相关; 盐度为 40 的人工海水急性胁迫近江牡蛎 0 h、6 h 和 12 h 后, 鳃组织中的 *CarSLC13A2* 和 *CarSLC13A5* 亚家族的基因整体上表现为先升高再降低的表达趋势, 而 *CarSLC13A1* 亚家族基因表达量随胁迫时间的增加而降低。本研究明确了 *CarSLC13* 家族的基因特征、系统进化及对急性高盐胁迫的响应规律, 丰富了双壳贝类 *SLC13* 基因家族的研究资料, 为进一步探讨该家族在渗透压调节中的作用提供了参考数据。

关键词: 近江牡蛎; *SLC13* 基因家族; 高盐胁迫; 表达模式

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)02-0127-11

近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*) 属广盐性双壳贝类, 生存的适宜盐度范围为 5~25, 多栖息在江河入海口或内湾区域, 在我国从南向北沿海的多数河口区均有分布^[1-2]。近些年, 由于环境变化、过度捕捞等多种因素, 造成我国北方近江牡蛎野生资源量急剧下降^[3]。同时, 由于未经驯化的近江牡蛎幼虫对高盐水体的适应能力相对较差,

限制了正常海水盐度下的人工繁育和养殖规模。不过近江牡蛎具有较强的盐度适应可塑性, 通过逐步驯化能够显著提升其高盐适应能力, 但适应机制的相关研究还比较匮乏^[4-5]。

盐度是影响海水贝类新陈代谢及生长发育的重要环境因子之一, 机体可以通过生理调节来适应盐度变化^[6]。盐度变化对贝类生理生化方面的

收稿日期: 2022-11-12; **修订日期:** 2022-12-28.

基金项目: 青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费项目(2021QNLMO50103); 山东省重点研发计划项目(2021LZGC028); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2021XT0101); 国家重点研发计划项目(2022YFD2400100).

作者简介: 葛广玉(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类种质资源与遗传育种. E-mail: gegy001@163.com

通信作者: 吴彪, 男, 研究员, 研究方向为贝类种质资源与遗传育种. E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

影响均有很多报道。例如, 科氏牡蛎(*Crassostrea corteziensis*)在不同盐度养殖条件下, 其生长速度和耗氧量会随着盐度的升高而降低^[7]; 低盐度胁迫会导致河口蛤(*Paphia laterisulca*)消化管严重破坏, 上皮细胞空泡化和坏死^[8]; 盐度升高时, 方斑东风螺(*Babylonia areolate*)的消化酶活性会随时间先升高再降低^[9]; 香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)鳃组织中 Na^+ - K^+ -ATP 酶活性和总抗氧化能力(T-AOC)会随盐度的升高呈上升趋势^[10]; 高盐胁迫后, 河蚬(*Corbicula fluminea*)的摄食率下降, Na^+ - K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶和 Mg^{2+} -ATP 酶活性先降低后升高^[11]。生物机体可以通过调节离子和氨基酸的浓度等方式来适应盐度胁迫^[6]。Henry 等^[12]发现马珂蛤(*Rangia cuneata*)体内游离氨基酸浓度随盐度降低而降低; 软体动物能够从外部环境中主动吸收或排出 Na^+ 和 Cl^- , 但当盐度变化超出适宜范围时, 需要消耗自身能量调节渗透压来维持机体稳定^[13-14]。牡蛎是等渗透压动物, 当盐度发生变化时, 可通过多种机制共同调节渗透压^[15-16]。由于野生近江牡蛎生活在河口地区, 常遭受盐度变化的胁迫, 探究近江牡蛎渗透压调节机制具有重要科学意义。

溶质载体 13 (solute carrier 13, SLC13)家族是 SLC 超家族中的一员, 又称为钠-硫酸盐/羧酸盐协同转运蛋白(sodium-sulfate/carboxylate cotransporters), 可协同转运 Na^+ ^[17]。SLC13 家族在哺乳动物中共有 SLC13A1、SLC13A2、SLC13A3、SLC13A4 和 SLC13A5 这 5 个亚家族, 其中 SLC13A1 和 SLC13A4 的主要作用是介导转运阴离子, 对维持机体硫酸根稳态具有重要意义^[18]; SLC13A2、SLC13A3 和 SLC13A5 主要参与柠檬酸循环代谢中间体的转运, 直接影响代谢酶的活性^[19-20]。SLC13 可编码具有 8~13 个跨膜螺旋的转运蛋白, 在哺乳动物中多分布在小肠、肾脏、肝脏、胎盘和脑组织中^[21]。目前, SLC13 家族在人类代谢疾病、家畜生长发育、肉类品质等方面的研究报道较多^[21-24], 但软体动物中较少。Wu 等^[25]的研究发现, 相对于长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、香港牡蛎和美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)等 13 种贝类, SLC13 基因家族在近江牡蛎中发生了显著扩张, 可能在盐度适

应调节中发挥重要作用。

本研究利用生物信息学方法在近江牡蛎全基因组中鉴定出 SLC13 基因家族的 11 个成员, 分析了它们的基因结构、基序组成、染色体定位和系统进化特征, 并利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术研究了所有成员基因在急性高盐胁迫后的表达变化规律, 以期为深入探索 SLC13 基因家族在近江牡蛎渗透压调节过程中的作用提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 CarSLC13 基因家族成员的鉴定和蛋白特征分析

鉴定 CarSLC13 基因家族成员的近江牡蛎基因组(CNA0022698)^[25]和魁蚶(*Scapharca broughtonii*)基因组(CNA0022698)^[26]数据来源于国家基因库(<https://db.cngb.org>), 西印度石鳖(*Acanthopleura granulata*)基因组数据来源于 Dryad 数据库(<https://datadryad.org/stash/dataset/doi:10.5061/dryad.wstqjq2k9>)。同时在 NCBI 数据库中下载长牡蛎(GCA_902806645.1)、香港牡蛎(GCA_015776775.1)和中国真蛸(*Octopus sinensis*) (GCF_006345805.1)的氨基酸序列。以长牡蛎和香港牡蛎 SLC13 蛋白的氨基酸序列为参考, 利用 TBtools 软件(v1.0987663)^[27]的本地 BLASTP 程序在近江牡蛎基因组中进行搜索比对, 最终筛选出 CarSLC13 基因家族成员。利用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线预测 CarSLC13 成员的分子量、等电点、不稳定系数和亲水性平均系数, 用 Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/#>)和 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>)在线对 CarSLC13 成员进行亚细胞定位, 运用 TBtools 软件进行染色体定位和可视化处理。

1.2 CarSLC13 基因家族成员基因结构分析和系统进化树构建

基于 CarSLC13 家族成员的 CDS 序列, 分别在网站 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org/>)^[28]在线绘制基因结构示意图, SMART (<http://smart.embl.de/>)^[29]和 MEME (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>)预测 CarSLC13 结构域和保守基序。根据本地 BLAST 结果, 选取长牡蛎、香港牡蛎、中国真蛸、魁蚶和西印度石鳖 5 个物种 43 个 SLC13 氨基酸序列, 使用 ClustalX 程序(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/>)

msa/clustalw2/)进行多序列比对, 利用 MEGA11 软件中的最大似然法(ML)构建系统进化树。

1.3 盐度胁迫实验

实验用近江牡蛎于 2022 年 1 月采自山东省丁字湾海区, 平均壳长为(56.85±1.94) mm。胁迫实验前, 近江牡蛎在水温 20 ℃、盐度 25 的海水中充气暂养 5 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, 将牡蛎转移到利用海水晶配置的盐度为 40 的水体中进行, 其他养殖条件与暂养时相同, 并分别在胁迫 0 h、6 h 和 12 h 3 个时间点取牡蛎鳃组织并迅速在液氮中速冻后, 转移至-80 ℃保存用于 RNA 提取。

1.4 *CarSLC13* 在高盐胁迫下的表达分析

采用 Trizol 法提取 RNA, 利用微量分光光度计(NanoPhotometer™, 德国)和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和质量。使用 HiScript III RT SurperMix for qPCR (Vazyme, 中国)合成 cDNA, 利用 Primer 6 设计引物(表 1), 以 β -actin 基因为内

参进行 qRT-PCR 检测 *CarSLC13* 成员在急性盐度胁迫前后的表达量。qRT-PCR 反应体系(20 μ L)包括: 上下游引物各 0.4 μ L、模板 cDNA 2 μ L (500 ng/ μ L)、2×ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 10 μ L 和 DEPC 水 7.2 μ L。反应程序为: 95 ℃ 预变性 10 min 后, 以 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s 循环 40 次; 熔解曲线: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s。反应结束后, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。使用 SPSS (v26)进行单因素方差分析, GraphPad Prism (v8.0.2)制作基因表达柱形图。每组 3 个生物重复和 3 个技术重复。

2 结果与分析

2.1 *CarSLC13* 基因鉴定和蛋白特征分析

近江牡蛎基因组中共鉴定出 11 个 *SLC13* 基因家族成员, 包括 1 个 *SLC13A1*, 6 个 *SLC13A2* 和 4 个 *SLC13A5*, 各家族成员的基因名称、蛋白序列长度和等电点等信息如表 2 所示。*SLC13* 家族成员的氨基酸数目范围是 107~857, 分子量大小范围 11.80~94.80 kD, 其中 *SLC13A2f* 最长, 为 857 aa; *CarSLC13A1a* 最短, 为 107 aa。*CarSLC13A2* 成员的氨基酸长度整体上大于 *CarSLC13A5*; 蛋白质等电点范围为 4.87~9.13, 其中 *CarSLC13A5b* 等电点最小, *CarSLC13A2f* 等电点最大。蛋白质不稳定系数小于 40 的包括 *CarSLC13A5c*、*CarSLC13A2a*、*CarSLC13A2b*、*CarSLC13A2c*、*CarSLC13A2e* 和 *SLC13A2f*, 其他大于 40。蛋白疏水性计算分析表明, 除 *CarSLC13A5d* 具有亲水性外, 其他成员均存在不同程度的疏水性。亚细胞定位结果显示, *CarSLC13* 蛋白一般位于细胞膜或细胞器膜中, 其中 *CarSLC13A1a* 位于内质网或内膜中, *CarSLC13A2b* 分布于细胞内的位置最多, 包括细胞膜、内质网膜、细胞质和内膜中; *CarSLC13A5d* 分布于细胞膜、内质网膜和内膜中。

2.2 染色体定位分析

SLC13 基因家族所有成员在近江牡蛎染色体上的位置如图 1。近江牡蛎染色体数目为 2n=20, *SLC13* 家族的 11 个基因定位在 6 条染色体, 其中第 5、7、9 和 10 号条染色体上没有 *SLC13* 基因。*CarSLC13A5b* 定位在第 1 号染色体上;

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>CarSLC13A1a</i>	CCAGTCGCTTTCCTTGCTCCAC CATCAGTGCACTGACGGGAATAGG
<i>CarSLC13A2a</i>	AAGGTTGGTTGCAGTCTCCGTATTC GGCATCAGTATGGTGGCAGTAGC
<i>CarSLC13A2b</i>	TCCCTATGGCTTGCCGATCAAATG AGCGTGGAATGGCGGTGTTAC
<i>CarSLC13A2c</i>	AGCCTTGCTTATACCAGTGACCTC CGTAACTGCTGCTGACCTCCTTG
<i>CarSLC13A2d</i>	GGTGGCGGTGGAAGAAGTCAATC TCAGTCCCAGCATCAGAAGGTTAGG
<i>CarSLC13A2e</i>	AGGCACGGAATCGGCTAGGAAG AACAGCACCACTACCTCCACCTC
<i>CarSLC13A2f</i>	GATTCCACGCCTTCTATATTAG TCCGACAGACCAGATAACC
<i>CarSLC13A5a</i>	GACCAACGATCTGCTCCGCTTAC GATTGACTTCTTCCACCGCCACAG
<i>CarSLC13A5b</i>	CCGAGATGGCTGATGCTTGGAATC CATTGCTGTGGTTGCGGTGTTG
<i>CarSLC13A5c</i>	AGCCTTGCTTATACCAGTGACCTC CGTAACTGCTGCTGACCTCCTTG
<i>CarSLC13A5d</i>	TGTGTGATAGCCGCTTCCCTTTGC AACCAGCCAACGCCATATCCTTC
β -actin	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT TGGGCACCTGAATCGCTCGTT

表 2 *CarSLC13* 基因家族蛋白质组成和理化性质

Tab. 2 Protein composition and physicochemical properties of the *SLC13* gene family in *Crassostrea ariakensis*

基因 ID gene ID	基因名称 gene name	蛋白序列长度 /aa protein length	分子大小/kD molecular weight	等电点 pI	不稳定系数 instability index	疏水性 grand average of hydropathicity	细胞定位 localization
Ori.tig00015477.4	<i>CarSLC13A1a</i>	107	11.80	7.73	57.82	0.949	Er ^a 、IM ^b
Ori.tig00010468.18	<i>CarSLC13A5a</i>	599	64.92	8.55	42.00	0.475	Cm ^{a,b}
Ori.tig01225487.332	<i>CarSLC13A5b</i>	586	64.49	4.87	40.59	0.449	Cm ^a 、IM ^b
Ori.tig00000980.181	<i>CarSLC13A5c</i>	630	68.54	6.62	32.62	0.490	Cm ^a 、IM ^b
Ori.tig00000007.321	<i>CarSLC13A5d</i>	779	86.03	8.29	42.71	-0.096	Cm ^a 、Er ^a 、IM ^b
Ori.tig00015477.5	<i>CarSLC13A2a</i>	457	49.55	6.95	38.68	0.401	Cm ^a 、IM ^b
Ori.tig01225487.359	<i>CarSLC13A2b</i>	784	86.52	6.58	34.74	0.466	Cm ^a 、Cyto ^a 、Er ^a 、IM ^b
Ori.tig00000980.180	<i>CarSLC13A2c</i>	629	68.59	6.62	30.06	0.497	Cm ^a 、IM ^b
Ori.tig00000980.182	<i>CarSLC13A2d</i>	654	70.28	8.57	40.17	0.494	Cm ^a 、IM ^b
Ori.tig00000134.31	<i>CarSLC13A2e</i>	546	59.45	5.94	37.17	0.603	Cm ^a 、IM ^b
Ori.tig00057033.100	<i>CarSLC13A2f</i>	857	94.80	9.13	37.51	0.379	Cm ^a 、IM ^b

注：细胞膜(Cm)；内质网(Er)；内膜(IM)；细胞质(Cyto)。a 为 Euk-mPLoc 2.0 预测结果；b 为 CELLO v.2.5 预测结果。
Note: cell membrane (Cm); endoplasmic reticulum (Er); innerMembrane (IM); cytoplasm (Cyto). a denotes the result predicted by Euk-mPLoc 2.0; b denotes the result predicted by CELLO v.2.5.

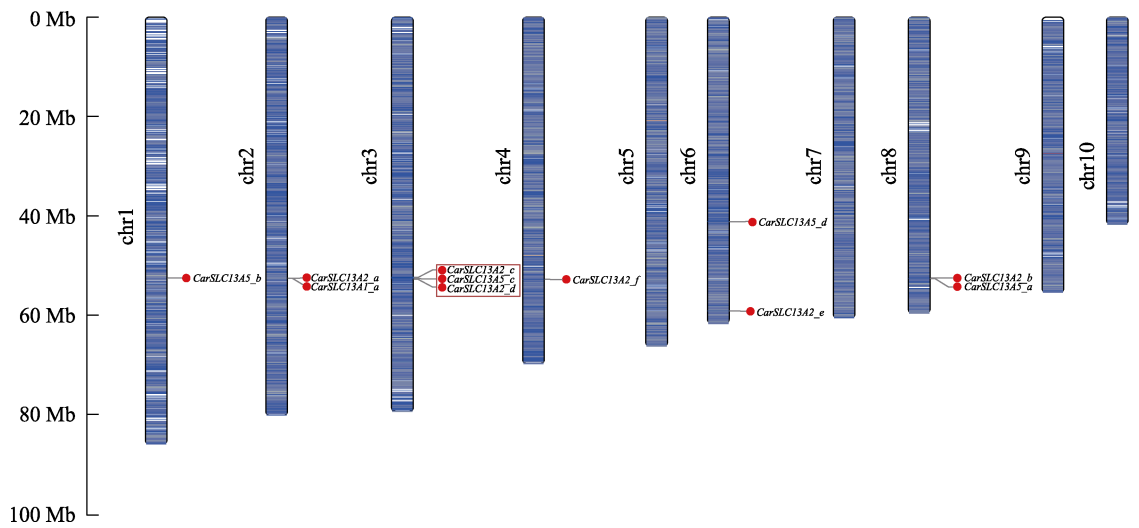


图 1 *CarSLC13* 基因家族染色体分布示意图
红色方框内标注的基因可能发生过串联复制，左侧为染色体长度标尺。

Fig. 1 Chromosome location diagram of *CarSLC13* gene family
The genes marked in the red box may have undergone tandem duplication, and the left is the relative length of the chromosomes.

CarSLC13A2a 和 *CarSLC13A1a* 定位在第 2 染色体上；*CarSLC13A2c*、*CarSLC13A5c* 和 *CarSLC13A2d* 定位在第 3 号染色体上；*CarSLC13A2f* 定位在第 4 号染色体上；*CarSLC13A5d* 和 *CarSLC13A5e* 定位在第 6 号染色体上；*CarSLC13A2b* 和 *CarSLC13A5a* 定位在第 8 号染色体上。其中在第 3 号染色体上的 *SLC13* 基因可能发生了串联复制，分别是 *CarSLC13A2c* 和 *CarSLC13A2d*。

2.3 基因结构特征分析

图 2a 所示的是 *CarSLC13* 家族 11 个成员的基因结构示意图。不同基因在染色体上的总长度有所不同，其中 *CarSLC13A2b* 最长，*CarSLC13A5c* 最短。另外，从图中可以看出不同基因之间的内含子长度和数量存在差异，*CarSLC13A5c* 的内含子数量最少，*CarSLC13A2f* 内含子数量最多。

CarSLC13 家族蛋白保守基序分析表明，所有

成员共有 10 个 motif (图 2b), 氨基酸序列长度在 29~50 aa 之间(表 3)。11 个家族成员中的基序数量不同, 其中 *CarSLC13A1a* 只有 motif 4, 而 *CarSLC13A2f* 有 10 个 motif。另外, 多数家族成员有 motif 1、motif 2、motif 4 和 motif 7, 其中 motif 1 和 motif 2 数量最多。

保守结构域分析表明, 所有的 *SLC13* 蛋白具

有与 Na⁺主动转运相关的钠-硫酸盐共转运蛋白跨膜区 (sodium: sulfate symporter transmembrane region, Na_sulph_symp) 结构域 (图 2c); 除 *CarSLC13A1a*, 其他成员还存在柠檬酸转运蛋白 (citrate transporter, CitMHS) 结构域; 仅有 *CarSLC13A2b* 具有短链脱氢酶 (short chain dehydrogenase, adh_short)保守结构域。

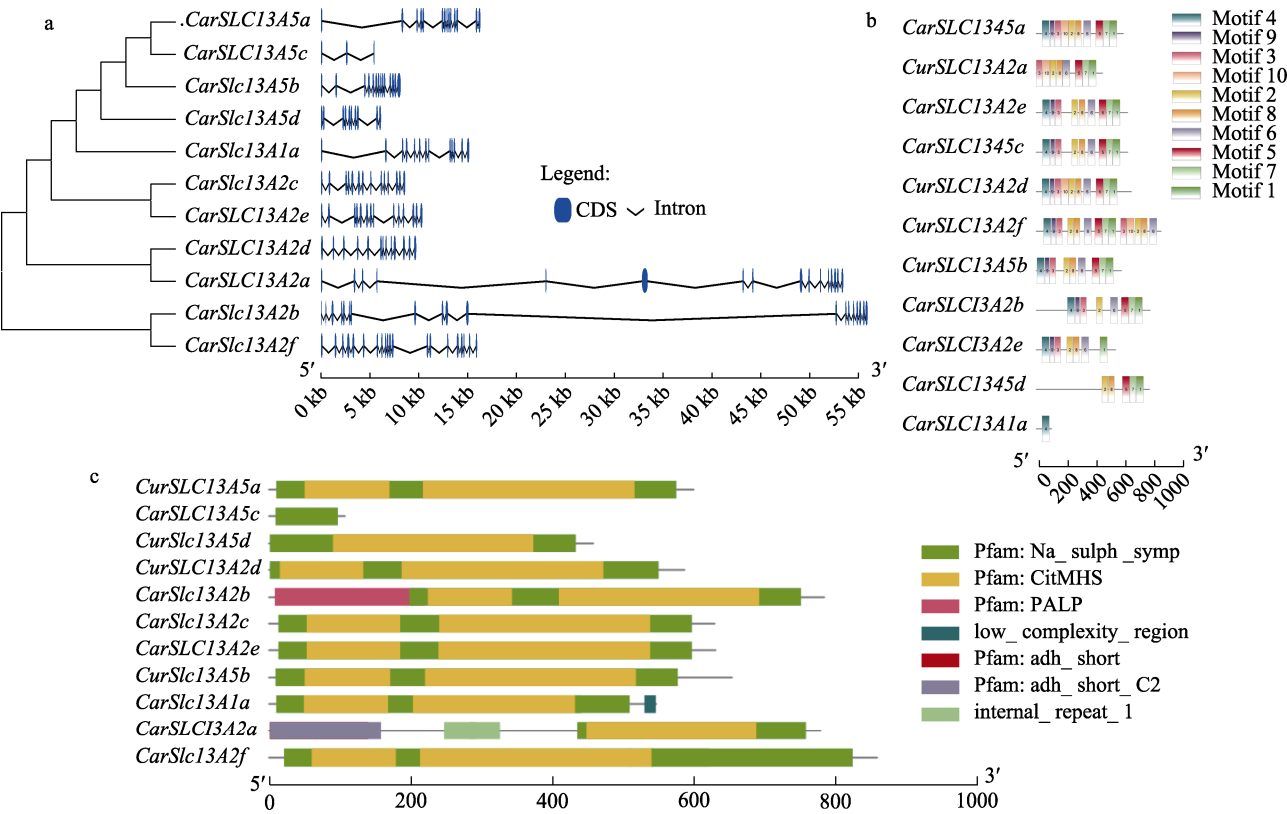


图 2 *CarSLC13* 基因家族结构域示意图
Fig. 2 Schematic diagram of the domains of the *CarSLC13* gene family

表 3 *CarSLC13* 基因家族蛋白基序信息
Tab. 3 *CarSLC13* 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	GSHPLYLMIPAAVACSFAMLPVATPPNAIVFSTGYJKIPDMAVAGLVMN	50	10
Motif 2	IKKMSKGFALCVAYAANIGGIATLTGTTPPNLILKGQADKLF	41	10
Motif 3	MLGLMLPTWFLSMWISNTAATAMMIPIITAVTSQMKELEPN	41	9
Motif 4	RCAYVLIVMAILWLTEALPIPVTALLPIELLPMLGVLPGKEVSSSYVNDT	50	9
Motif 5	DKPKYPPJLDWKTTVEKIPWGVILLGGGFALAKATSASGLSKWVGCSLE	50	9
Motif 6	KEYKKLGRITFGVEVVMLLFIVLALLWIFRDPFGFGWGDIFKEDYKGDY	50	9
Motif 7	DSFEPWVMNLVLSLJVAATEVTSNTATATLLMPILAEIAI	41	9
Motif 8	PGADSGITFASWMGFALPJSJILJLSWJWLQIFFLRFKCY	41	9
Motif 9	GGLIVAVAVEEWNLHKRIALGILSLVGSQ	29	8
Motif 10	QKDGVRRNRFDDVEDSVSNADADVAMTNCNADMEHEAEPKDEKEKKRREE	50	3

2.4 *CarSLC13* 基因家族成员进化分析

聚类结果如图 3 所示, 近江牡蛎、长牡蛎、香港牡蛎、魁蚶、中国真蛸等贝类 *SLC13* 家族成员聚在一起, 而西印度石鳖 *SLC13* 基因家族所有成员单独聚为一支。在 4 种贝类中, 多数来自于

同一亚家族的成员先聚类, 然后再与其他亚家族聚类, 说明 *SLC13* 不同亚家族均具有较高的保守性。多数 *CarSLC13* 基因家族成员与长牡蛎、香港牡蛎聚类关系较近, 魁蚶次之, 西印度石鳖较远, 与传统分类地位基本一致。

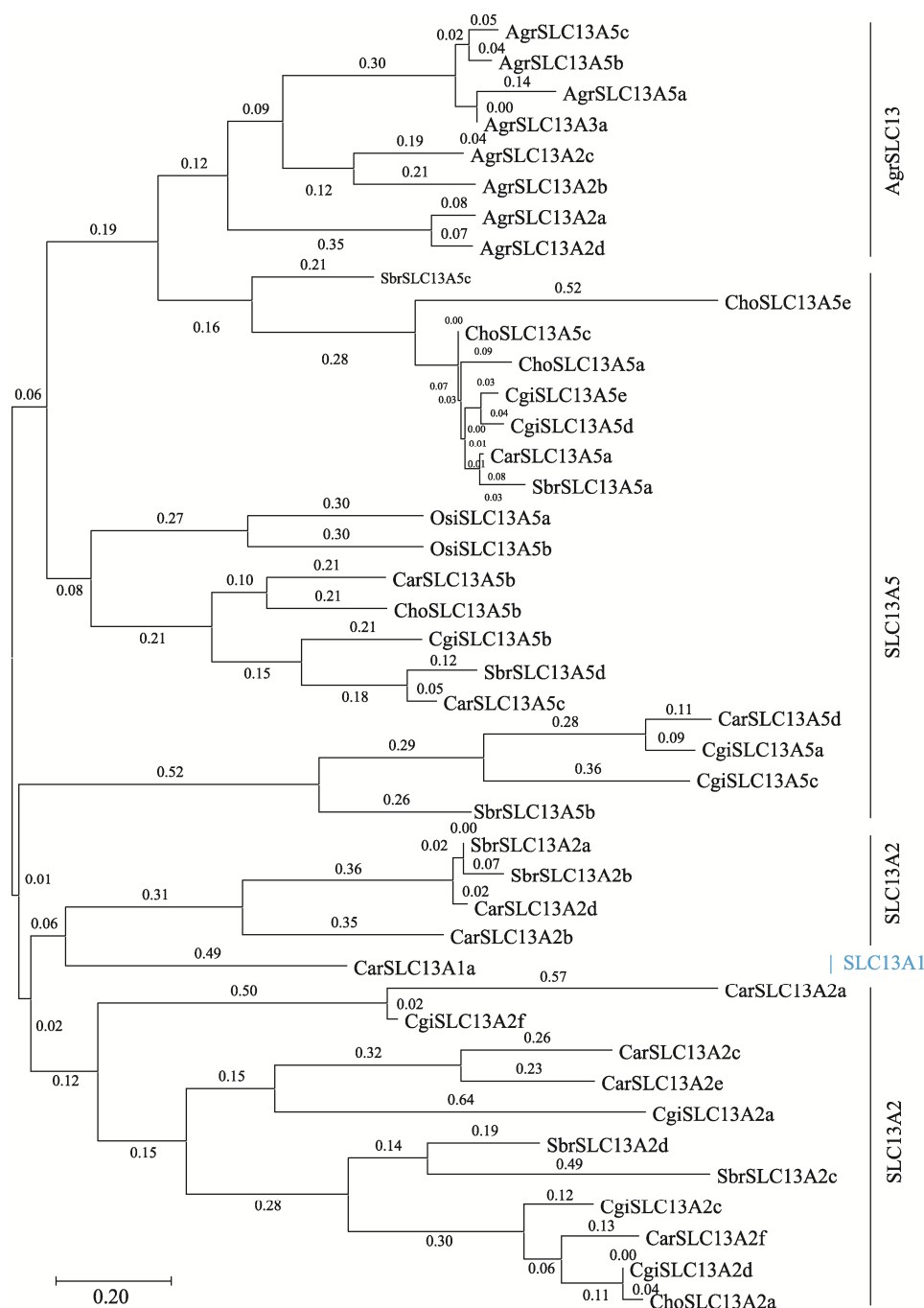


图 3 6 个物种 *SLC13* 基因家族成员系统发育树

Car: 近江牡蛎; Cgi: 长牡蛎; Cho: 香港牡蛎; Sbr: 魁蚶; Osi: 中国真蛸; Agr: 西印度石鳖。

Fig. 3 Phylogenetic tree of *SLC13* gene family members among six species

Car: *Crassostrea ariakensis*; Cgi: *Crassostrea gigas*; CH: *Crassostrea hongkongensis*; Sbr: *Scapharca broughtonii*; Osi: *Octopus sinensis*; Agr: *Acanthopleura granulate*.

2.5 急性高盐胁迫下基因表达模式分析

与 0 h 时相比, *CarSLC13* 基因家族的多数基因在急性高盐胁迫 6 h 和 12 h 的表达发生显著变化。如图 4 所示, *CarSLC13A5* 与 *CarSLC13A2* 亚家族成员基因的表达量变化趋势相似, 整体表现为先升高再降低的趋势; 除 *CarSLC13A1a* 和 *CarSLC13A5b* 外, 所有家族基因在 6 h 时的表达量最高。*CarSLC13A1a*、*CarSLC13A5b* 和 *CarSLC13A5d*

这几个基因的表达变化值得关注, 其中 *CarSLC13A1a* 的表达量变化趋势为先降低再升高, 6 h 和 12 h 相对于 0 h 表达量差异极显著($P<0.01$), 6 h 相对表达量最低且与 12 h 差异显著($P<0.05$); *CarSLC13A5b* 的表达量变化趋势随时间的增加而升高, 12 h 相对表达量最高, 是 0 h 的 1.5 倍, 而 6 h 和 12 h 相对于 0 h 表达量差异极显著($P<0.01$); *CarSLC13A5d* 相对表达量变化趋势为先升高后降低, 6 h 和 12 h

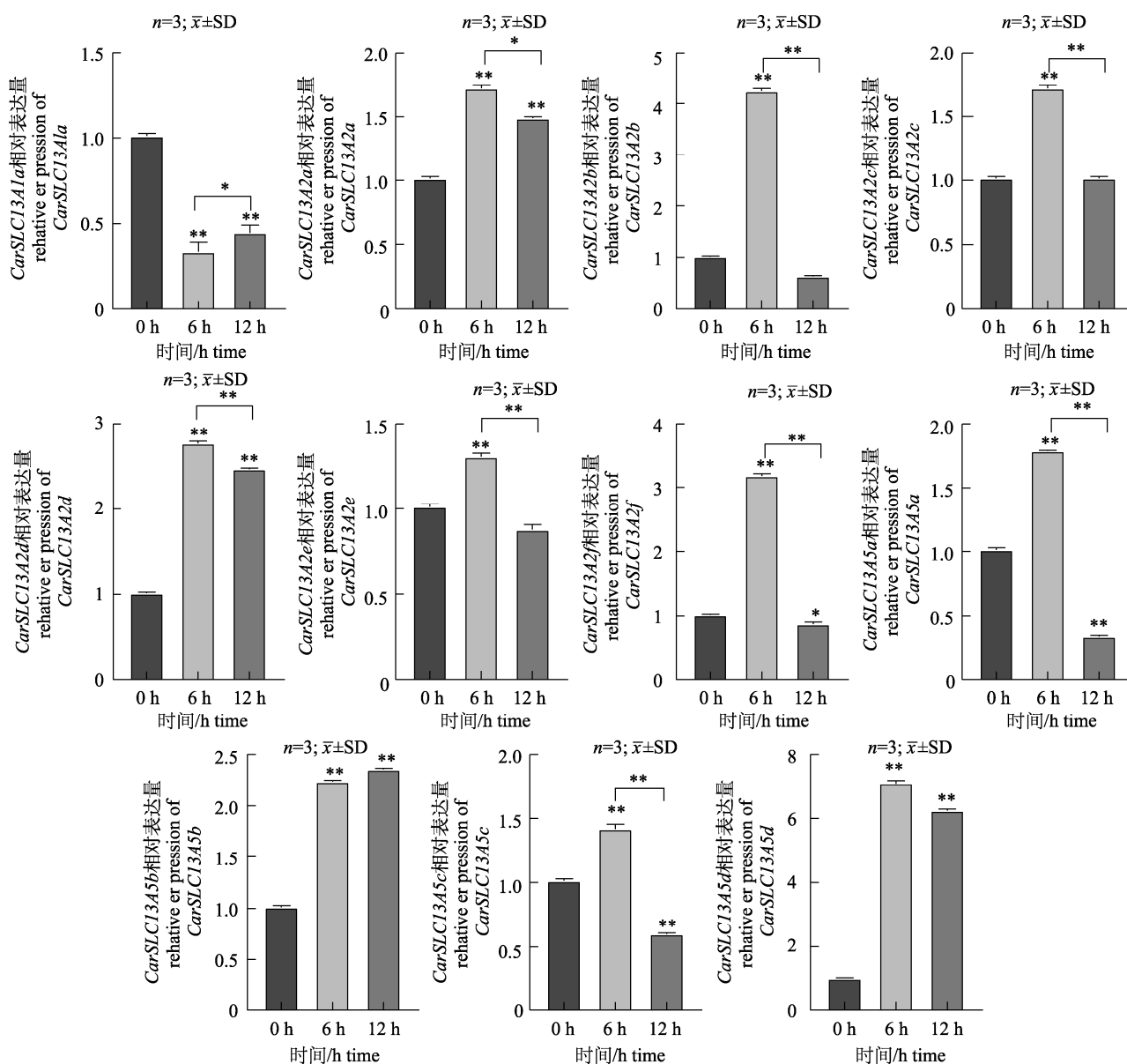


图4 *CarSLC13* 基因家族成员相对表达水平

*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. 4 Relative expression level of *CarSLC13* gene family members

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

相对于 0 h 表达量差异极显著($P<0.01$), 6 h 相对表达量是 0 h 的 7.5 倍, 12 h 相对表达量是 0 h 的 7 倍。

3 讨论

在已报道的人、牛(*Bos taurus*)、猪(*Sus scrofa*)等多种生物的基因组中, *SLC13* 基因家族包括 5 个亚家族, 即 *SLC13A1*、*SLC13A2*、*SLC13A3*、*SLC13A4* 和 *SLC13A5*^[19,23-24], 但是目前软体动物的相关报道较少, 仅在近江牡蛎中报道了 *SLC13* 基因家族^[25]。本研究在近江牡蛎基因组中共鉴定出 11 个 *SLC13* 基因家族成员, 包括了 1 个 *CarSLC13A1* 成员, 6 个 *SLC13A2* 成员和 4 个 *CarSLC13A5* 成员, 未鉴定到 *SLC13A3* 和 *SLC13A4* 的成员。本研究所选的长牡蛎、香港牡蛎、魁蚶和中国真蛸中也未鉴定到这两个亚家族成员, 但西印度石鳖中有 *SLC13A3* 而无 *SLC13A4* 成员, 说明 *SLC13* 基因家族在不同动物门中存在明显差异。

本研究亚细胞定位结果表明 *CarSLC13* 全部是膜蛋白, 而且都表现出不同程度的疏水性, 这与已报道的膜蛋白多具有较强的疏水性这一结论相一致^[30-31]。由于 pI 主要由酸性氨基酸和碱性氨基酸的数量来决定, 而多数 *CarSLC13* 成员蛋白的 pI 小于 7.0, 证明其可能是一类酸性蛋白。蛋白亚细胞定位发现, *CarSLC13* 成员多数存在于内质网、线粒体和细胞膜或内膜的位置。牛、猪等多种生物 *SLC13* 基因家族成员蛋白(*SLC13A1-A5*)也主要定位在质膜、内质网和线粒体上^[23], 这与本研究结果相似。

真核生物在进化过程中经历了频繁的复制事件, 包括全基因组复制、串联复制、片段复制及转座复制等多种不同的形式^[32]。复制事件能导致基因数目的增加, 其中串联复制是使基因家族成员数目变化的常见方式。Holub 等^[33]和 Warner 等^[34]认为, 基因家族的串联复制可能与动植物响应生物和非生物胁迫有关, 基因家族成员数目的扩张可能有利于动植物应对逆境胁迫。Ramamoorthy 等^[35]研究发现, 通过非生物和植物激素处理后的水稻 *WRKY* 基因家族的部分基因发生了串联复制。本

研究中, 近江牡蛎的第 3 号染色体上 *CarSLC13* 家族基因的串联复制增加了 *CarSLC13A2* 亚家族成员数目。同时, 发生串联复制的 *CarSLC13A2c* 和 *CarSLC13A2d* 基因, 在高盐胁迫后的基因表达发生了明显变化。这也说明基因家族的串联复制可能与机体响应胁迫有关。

本研究中一些 *CarSLC13* 基因家族成员共有 motif, 例如 motif 1、motif 2、motif 4 和 motif 7, 表明 *CarSLC13* 基因家族具有较高的保守性。然而, 一些亚家族中仅有特定的基序, 其中 motif 4 仅在 *CarSLC13A1* 亚家族中被发现, 说明 *CarSLC13* 在不同的亚家族中表现出一定程度的功能多样性。一些结构域在生物分子和离子转运中发挥重要作用, 例如 Na_sulph_symp 结构域能够整合膜蛋白介导摄入各种生物大分子, 并伴随摄取 Na^{+} ^[36]; 柠檬酸转运蛋白(*CitMHS*)编码 Mg^{2+} -柠檬酸盐转运蛋白, 和离子转运相关, 在多数细菌离子转运中发挥作用^[34,37]。本研究中的 *CarSLC13* 所有成员均具有 Na_sulph_symp 结构域, 而且部分成员具有 CitMHS, 这表明 *CarSLC13* 在近江牡蛎渗透压调节中也应具有重要作用。Li 等^[38]发现近江牡蛎与香港牡蛎具有较高的基因共线性。*CarSLC13* 基因家族与香港牡蛎、长牡蛎首先聚类, 之后与魁蚶等其他物种聚类。另外, 在 6 个物种中的进化分析发现, 除西印度石鳖外, 不同物种同一亚家族的成员首先聚在一起, 这与传统分类地位关系基本一致。

溶质载体(SLC)是一种膜转运蛋白, 能依赖 Na^{+} 促进跨生物膜的各种底物运输^[39], 在机体渗透压调节中发挥作用。王萍等^[40]发现盐碱胁迫青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)后, 裸鲤肠道中的 *SLC4* 家族成员随胁迫时间均有明显上调表达趋势, 认为 *SLC4* 基因家族能在生物体内参与 HCO_3^{-} 转运, 维持细胞外 pH 以及离子平衡。有研究发现刺参(*Stichopus japonicus*)在受到低盐胁迫后, 其呼吸树中 *SLC6* 成员的表达会随胁迫时间增加呈先增高后降低的趋势^[41]。在本研究中, *SLC13* 基因家族参与到了高盐急性胁迫响应中, 但家族不同成员基因在响应过程中呈现表达差异, 如 *CarSLC13A1a* 的表达呈现为先降低后升高的趋

势, 且差异极显著($P<0.01$), 而 *CarSLC13A5b* 的表达水平则随时间的变化而升高。结合上述的 *CarSLC13* 家族成员生物信息学分析结果, 笔者认为 *CarSLC13* 家族在近江牡蛎的渗透压调节过程中发挥重要作用, 研究结果可为后续深入探究近江牡蛎广盐适应机制提供重要的参考资料。

参考文献:

- [1] Wang H Y, Zhang G F, Liu X, et al. Classification of common oysters from North China[J]. Journal of Shellfish Research, 2008, 27(3): 495-503.
- [2] Zhou M, Jr S K. A review of published work on *Crassostrea ariakensis*[J]. Journal of Shellfish Research, 2003, 22(1): 1-20.
- [3] Zhang X D, Xu C X. Chinese scientists have succeeded in breeding oysters near the river[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2019, 46(4): 236. [张旭东, 徐承旭. 我国科学家养殖近江牡蛎获得成功[J]. 水产科技情报, 2019, 46(4): 236.]
- [4] Yao T, Wang Z P, Yan X W, et al. Effect of salinity on growth and survival of *Crassostrea gigas*, *C. ariakensis* and juvenile hybrids[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1581-1586. [姚托, 王昭萍, 闫喜武, 等. 盐度对长牡蛎和近江牡蛎及其杂交稚贝生长和存活的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1581-1586.]
- [5] Xue L Z, Que H Y, Zhang G F, et al. The effect of salinity on growth and survival of *Crassostrea rivularis* larvae[J]. Marine Sciences, 2007, 31(9): 73-77. [薛凌展, 阙华勇, 张国范, 等. 盐度对近江牡蛎幼虫生长及存活的影响[J]. 海洋科学, 2007, 31(9): 73-77.]
- [6] Nicole H. Effects of environmental contamination on the immune system of the blue mussel *Mytilus* spp. in brackish water systems of the Baltic Sea[D]. Bremen: Jacobs University, 2013.
- [7] Guzmán-Agüero J E, Nieves-Soto M, Hurtado M Á, et al. Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity[J]. Aquaculture International, 2013, 21(2): 283-297.
- [8] Taware S S, Lagade V M, Muley D V. Effect of salinity on digestive gland of estuarine clam *Paphia laterisulca*[J]. Journal of the Marine Biological Association of India, 2017, 59(1): 44-48.
- [9] Zhao W, Tan C M, Zhang Y, et al. Effect of salinity stress on the activities of actions and digestive enzymes of *Babylonia areolata*[J]. Fishery Modernization, 2019, 46(5): 41-45. [赵旺, 谭春明, 张玥, 等. 盐度胁迫对方斑东风螺行为活动及消化酶活性的影响[J]. 渔业现代化, 2019, 46(5): 41-45.]
- [10] She Z C, Jia Z, Peng Y S, et al. Effects of salinity stress on partial biochemical indicators of the Hong Kong oyster *Crassostrea hongkongensis*[J]. Marine Sciences, 2019, 43(3): 40-45. [余智彩, 贾真, 彭业韶, 等. 盐度胁迫对香港牡蛎部分生化指标的影响[J]. 海洋科学, 2019, 43(3): 40-45.]
- [11] Bao T, Liu Y M, Lai Q F, et al. Response of *Corbicula fluminea*'s ingestion rate and branchial ATPase activity to salinity stress[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(6): 671-679. [包锁, 刘一萌, 来琦芳, 等. 盐度胁迫对河蚬摄食率及鳃ATP酶活力变化研究[J]. 海洋渔业, 2021, 43(6): 671-679.]
- [12] Henry R P, Mangum C P. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* III. Reduction of the free amino acid pool during low salinity adaptation[J]. Journal of Experimental Zoology, 1980, 211(1): 25-32.
- [13] Zhan W H, Zhou S H, Yuan C Y, et al. Effect of salinity on lymphocytes phagocytosis and expression of immune-related factor genes in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2021, 34(1): 18-22. [展文豪, 周书洪, 袁春营, 等. 盐度对凡纳滨对虾血细胞吞噬与免疫相关因子基因表达的影响[J]. 水产学杂志, 2021, 34(1): 18-22.]
- [14] Pillai B R, Diwan A D. Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*[J]. Journal of Crustacean Biology, 2002, 22(1): 45-52.
- [15] Zhao X L, Yu H, Kong L F, et al. Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46244.
- [16] Freire C A, Amado E M, Souza L R, et al. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 149(4): 435-446.
- [17] Markovich D, Murer H. The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters[J]. Pflügers Archiv, 2004, 447(5): 816-817.
- [18] Bergeron M J, Cléménçon B, Hediger M A, et al. SLC13 family of Na⁺-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(2-3): 299-312.
- [19] Chen X Z, Shayakul C, Berger U V, et al. Characterization of a rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(33): 20972-20981.
- [20] Chen X, Tsukaguchi H, Chen X Z, et al. Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent

- dicarboxylate transporter[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1999, 103(8): 1159-1168.
- [21] Zhou J Y, Wang J L, Zhang Y H, et al. A case of early-onset infantile epileptic encephalopathy type 25 caused by SLC13A5 gene mutation and literature review[J]. Journal of Epilepsy, 2021, 7(6): 555-559. [周静宜, 王菊莉, 张月华, 等. SLC13A5 基因突变致早发幼儿癫痫性脑病 25 型一例并文献复习[J]. 癫痫杂志, 2021, 7(6): 555-559.]
- [22] Su J, Wang L Y, Ma H M. Study on polymorphism of SLC13A5 gene related to meat quality traits in Ningxiang pigs[J]. Animal Science Abroad (Pigs and Poultry), 2017, 37(4): 53-54. [苏建, 王玲玉, 马海明. 宁乡猪肉品质性状相关基因 SLC13A5 多态性研究[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2017, 37(4): 53-54.]
- [23] Huang M J, Zhang Y, Chen X, et al. Bioinformatics analysis of the protein encoded by the SLC13 gene family in bovine[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(3): 157-166. [黄明捷, 张勇, 陈祥, 等. 牛 SLC13 家族基因编码蛋白的生物信息学分析[J]. 河南农业科学, 2020, 49(3): 157-166.]
- [24] Wang L Y. Cloning, tissue expression profile and SNP analysis of the porcine SLC13A5 and Wnt10b gene[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015. [王玲玉. 猪 SLC13A5 和 Wnt10b 基因的克隆、组织表达及其与生长性状的关联分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.]
- [25] Wu B, Chen X, Yu M J, et al. Chromosome-level genome and population genomic analysis provide insights into the evolution and environmental adaptation of Jinjiang oyster *Crassostrea ariakensis*[J]. Molecular Ecology Resources, 2022, 22(4): 1529-1544.
- [26] Bai C M, Xin L S, Rosani U, et al. Chromosomal-level assembly of the blood clam, *Scapharca (Anadara) broughtonii*, using long sequence reads and Hi-C[J]. GigaScience, 2019, 8(7): giz067.
- [27] 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.
- [28] Hu B, Jin J P, Guo A Y, et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [29] Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2020[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D458-D460.
- [30] Koehler J, Woetzel N, Staritzbichler R, et al. A unified hydrophobicity scale for multispan membrane proteins[J]. Proteins, 2009, 76(1): 13-29.
- [31] Sun S, Mariappan M. C-terminal tail length guides insertion and assembly of membrane proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(46): 15498-15510.
- [32] Freeling M. Bias in plant gene content following different sorts of duplication: Tandem, whole-genome, segmental, or by transposition[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 433-453.
- [33] Holub E B. The arms race is ancient history in Arabidopsis, the wildflower[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(7): 516-527.
- [34] Warner J B, Krom B P, Magni C, et al. Catabolite repression and induction of the Mg(2+)-citrate transporter CitM of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(21): 6099-6105.
- [35] Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N, et al. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments[J]. Plant and Cell Physiology, 2008, 49(6): 865-879.
- [36] Markovich D, Forgo J, Stange G, et al. Expression cloning of rat renal Na⁺/SO₄²⁻ cotransport[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(17): 8073-8077.
- [37] Boorsma A, van der Rest M E, Lolkema J S, et al. Secondary transporters for citrate and the Mg(2+)-citrate complex in *Bacillus subtilis* are homologous proteins[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(21): 6216-6222.
- [38] Li A, Dai H, Guo X M, et al. Genome of the estuarine oyster provides insights into climate impact and adaptive plasticity[J]. Communications Biology, 2021, 4(1): 1-12.
- [39] Döring B, Lütke T, Geyer J, et al. The SLC10 carrier family: Transport functions and molecular structure[J]. Current Topics in Membranes, 2012, 70: 105-168.
- [40] Wang P, Lai Q F, Yao Z L, et al. Differential expressions of genes related to HCO₃⁻ secretion in the intestine of *Gymno-cypris przewalskii* during saline-alkaline water transfer[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(4): 341-348. [王萍, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱环境下青海湖裸鲤肠道 HCO₃⁻ 分泌相关基因表达差异[J]. 海洋渔业, 2015, 37(4): 341-348.]
- [41] Jiang Y N, Tian Y, Li X Y, et al. Adaptive expression of four transporter-related genes in sea cucumber *Apostichopus japonicus* exposed to salinity stress[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(6): 696-702. [蒋亚男, 田隼, 李晓雨, 等. 盐度应激下刺参 4 个转运相关基因的适应表达研究[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(6): 696-702.]

Genome-wide identification of the *SLC13* gene family in *Crassostrea arakensis* and its expression characteristics in gill under acute salt stress

GE Guangyu^{1, 2, 3}, CHI Changfeng¹, WANG Zhenyuan^{2, 3}, LIU Zhihong^{2, 3}, WANG Yan^{2, 3}, CHEN Xi^{2, 3}, SUN Xiujun^{2, 3}, ZHOU Liqing^{2, 3}, WU Biao^{2, 3}

1. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;
2. 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;
3. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Functional Laboratory of Marine Fishery Science and Food Production Process, Qingdao 266273, China

Abstract: The solute carrier 13 (*SLC13*) gene family is one of the members of super transporter families that commonly exist in eukaryotes and prokaryotes, and encodes transmembrane proteins with similar structures for transferring anions and citric acid cycle intermediates. Previous studies have shown that the *SLC13* family significantly expanded in *Crassostrea arakensis*, suggesting that it might be closely related to salinity adaptation and osmotic pressure regulation. In this study, we identified the members of the *CarSLC13* gene family and analyzed their gene structure, chromosome location, and phylogenetic relationship. In addition, qRT-PCR was used to detect the *CarSLC13* mRNA expression at 6 h and 12 h after being exposed to acute salt stress of 40. A total of 11 *CarSLC13* genes were identified, including one *CarSLC13A1* member, six *CarSLC13A2* members, and four *CarSLC13A5* members. The physicochemical properties of these members, including molecular weight, theoretical pI, instability index, and hydropathicity, were also predicted. All *CarSLC13* proteins were predicted to be localized to the cell membrane or inner membrane. The results of chromosome mapping showed that 11 *SLC13* genes were located on six chromosomes, and some genes on chromosome 3 had tandem duplication. In addition, we speculated that this was related to the function of osmotic pressure regulation because all members of the *CarSLC13* gene family had the same Na_sulph_Symp (PF00939) domain. The *CarSLC13A2* and *CarSLC13A5* subfamily genes in the gill tissues of *C. arakensis* generally increased first and then decreased after acute salt stress, and the expression level was the highest after 6 h of salt stress, while the relative expression of *CarSLC13A1* subfamily genes decreased with time. This study clarified the characteristics, phylogeny, and response to high salt stress of the *CarSLC13* gene family, enriching the research data of the *SLC13* gene family in bivalves and providing a reference for further exploration of the role of the *CarSLC13* gene family in osmotic pressure regulation.

Key words: *Crassostrea arakensis*; *SLC13* gene family; high salt stress; expression pattern

Corresponding author: WU Biao. E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn