

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201223002

http://www.yykxjz.cn/

孔祥辉, 王莎莎, 董迎辉, 任建峰, 林志华. 缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 194-203

KONG X H, WANG S S, DONG Y H, REN J F, LIN Z H. Analysis of expression characteristics of related genes in response to acute thermal stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 194-203

缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析*

孔祥辉^{1,2} 王莎莎² 董迎辉^{2①} 任建峰¹ 林志华^{2,3①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

2. 浙江万里学院 浙江水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江 宁波 315100;

3. 浙江万里学院 宁海海洋生物种业研究院 浙江 宁海 315604)

摘要 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)为广温性贝类,自身存在特殊的防御机制以适应外界温度胁迫。为研究高温胁迫对缢蛏热应激相关基因表达的影响,利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术对转录组中筛选的3类11个高温应答候选基因,即分子伴侣类基因(*HSP70*、*HSF1*、*GRP94*、*BAG3*、*PDI46*和*CALR*)、代谢与免疫应答类基因(*MDH*、*CTL*和*CTSL*)和细胞凋亡类基因(*Caspase-3*和*p53*),在不同温度(30℃、32℃和34℃)胁迫下,在鳃和肝胰腺中的表达特征进行了分析。结果显示,分子伴侣类基因受温度影响最为显著,胁迫4h时表达量开始显著升高,与温度呈正相关,且鳃较肝胰腺更早做出响应;代谢与免疫应答类基因和细胞凋亡类基因在鳃、肝胰腺中的表达均随胁迫时间延长呈先升高后下降的趋势;免疫应答类基因在肝胰腺中的响应更显著。综上所述,高温胁迫下缢蛏维持基本生命稳态与这3类基因的调控密切相关。本研究为进一步探索贝类高温响应分子机制奠定理论基础,也为耐高温缢蛏新品种分子标记辅助选育提供候选基因。

关键词 缢蛏; 高温胁迫; qRT-PCR; 基因表达

中图分类号 Q786; S968.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0194-10

水温是影响贝类存活、生长发育、免疫功能和分布的主要环境因子之一。水温超过一定范围,机体会产生热应激反应,导致其生理功能减弱、免疫功能降低,甚至死亡。研究发现,华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)死亡率与水温呈正相关,且具有时间依赖性(Cheng *et al*, 2020);长牡蛎(*Crassostrea gigas*)在夏季

更易受致病菌感染(Ugalde *et al*, 2018); 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)高温胁迫后,肝胰腺中过氧化氢酶(CAT)含量显著降低(Jiang *et al*, 2019); 虾夷扇贝、凸壳肌蛤(*Arcuatula senhousi*)和魁蚶(*Scapharca broughtonii*)耗氧率和排氨率随水温升高呈先上升后下降的趋势(Hao *et al*, 2014; 吕旭宁等, 2018; 薛素燕

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项课题(2018YFD0901405)、浙江省农业新品种选育重大科技专项课题(2016C02055-9)、宁波市“科技创新2025”重大专项(2019B10005)和国家海洋水产种质资源库项目共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901405), Zhejiang Major Program of Science and Technology (2016C02055-9), Ningbo Major Project of Science and Technology (2019B10005), and National Marine Genetic Resource Center Program]. 孔祥辉, E-mail: kongxianghui416@126.com

① 通讯作者: 林志华, 研究员, E-mail: zhizhua9988@126.com; 董迎辉, 教授, E-mail: dongyinghui118@126.com

收稿日期: 2020-12-23, 收修改稿日期: 2021-01-26

等, 2019); 四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)高温胁迫后血细胞吞噬活性和溶菌酶活性降低, 造成其免疫功能抑制(Yu *et al*, 2009)。

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 贝类耐高温分子机制研究取得一系列进展。研究表明, 分子伴侣和未折叠蛋白反应是生物体在应激条件下抵抗外界压力和维持蛋白稳态的关键(Zhu *et al*, 2016; Zhou *et al*, 2019)。对 3 种扇贝和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)研究发现, 热胁迫下机体通过合成 HSPs 维持蛋白稳态(Brun *et al*, 2008; Nie *et al*, 2017; Cheng *et al*, 2020)。热胁迫后, 长牡蛎和虾夷扇贝通过上调未折叠蛋白反应基因 *GRP94*、*GRP78* 和 *PDI6* 增强蛋白折叠功能(Yang *et al*, 2017; Jiang *et al*, 2019)。随胁迫时间延长, 机体内大分子受损, 细胞凋亡途径被激活, 引起凋亡基因表达, 如贻贝(*Mytilus galloprovincialis*、*M. coruscus* 和 *M. californianus*) *Caspase-3/8* 基因表达上调(Yao *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2014)。

随着全球气候变暖和极端高温天气频率增加, 海域温度逐年升高, 生活在潮间带的贝类极易遭受高温胁迫而引发死亡, 造成巨大的经济损失。缢蛏(*Sinonovacula constricta*)属广温性贝类, 我国南北沿海均有分布, 在 8℃~30℃海水中能正常生活(王如才等, 2008), 因其活动范围有限, 自身已进化出特殊的防御机制以抵御高温胁迫, 但高温仍是影响其生长和诱发疾病的重要环境因素之一。因此, 开展缢蛏高温适应性研究对其养殖的可持续发展具有重要意义。目前, 缢蛏基因组已公布(Dong *et al*, 2020), 关于其耐高温性状关联分析及转录组研究也有报道, 如薛宝宝等(2019)开发了 4 个与其耐高温性状相关的 SNP 候选标记; Zhang 等(2019)通过转录组分析发现, 缢蛏通过上调 *BAG3* 和 NF- κ B α 抑制剂(*NFIA*)等的表达应对高温胁迫。尽管如此, 目前对缢蛏高温耐受分子机制的认识仍不全面。本研究基于缢蛏高温胁迫转录组分析, 结合文献资料筛选高温应答相关基因, 并检测其在不同温度骤变后在鳃和肝胰腺中的表达变化规律, 旨在为缢蛏高温响应分子机制的研究提供理论基础, 为后续开展分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用缢蛏于 2019 年 9 月采自浙江宏野海产品有限公司, 挑选活力好的个体约 400 粒[壳长(62.00±2.13) mm、壳高(20.52±0.66) mm、湿重(12.80±1.91) g]

在实验室暂养 3 d, 期间每天 08:00 和 18:00 投喂角毛藻(*Chaetoceros*)和小球藻(*Chlorella* sp.)混合液 500 mL (约 5×10^4 cells/mL), 24 h 持续充气, 每天换水 1 次。

1.2 高温胁迫与样品采集

将缢蛏随机分为 4 组, 即对照组(22℃)和实验组(30℃、32℃和 34℃), 进行急性胁迫, 恒温加热棒控温。期间不投喂, 保持充气, 盐度控制在 20 左右。每组分别在 0、4、8、12、24 和 48 h, 随机挑选 6 粒缢蛏, 取鳃和肝胰腺于液氮速冻, 储存于-80℃冰箱。

1.3 RNA 提取与引物设计

利用 Total RNA extractor 试剂盒(上海生工)提取总 RNA, 1%琼脂糖电泳检测其完整性, 微量分光光度计(Nano300)检测其浓度。用 PrimeScript[®] RT reagent kit with gDNA eraser (TaKaRa, 日本)合成 cDNA, 基于基因组序列开放阅读框设计引物(表 1)。

1.4 实时荧光定量 PCR

以鳃和肝胰腺 cDNA 稀释 100 倍为 qRT-PCR 模板, 18S rRNA (F: TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT, R: CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA)为内参基因, 在 LightCycler[®] 480 Instrument II PCR 仪(Roche, 美国)上进行 qRT-PCR 反应, 总体积 20 μ L: SYBR qPCR master mix (Vazyme) 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 和 ddH₂O 共 8 μ L。反应程序: 95℃预变性 10 min, 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。每组 3 个生物学平行, 3 个技术重复。

1.5 数据分析

以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(Livak *et al*, 2002)计算基因相对表达量, 用平均值±标准误(Mean±SE)表示。用 SPSS 22.0 进行独立样本 *T* 检验。用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

2 结果

2.1 高温胁迫后转录组中候选基因差异表达分析

基于缢蛏高温胁迫鳃和肝胰腺转录组分析(SUB9002458 和 PRJNA695103), 筛选出热应激相关基因(表 2), 结果与 qRT-PCR 表达模式一致。32℃急性胁迫 24 h 后, 不同基因的表达存在组织特异性, 分子伴侣类基因在鳃中响应更明显, 且 *PDI6*、*GRP94* 和 *CALR* 在鳃中的表达量高; 免疫类基因 *CTS1* 和 *CTL* 仅在肝胰腺中上调。细胞凋亡基因 *Caspase 3* 在鳃和肝胰腺中均下调。

表1 基因 qRT-PCR 引物信息
Tab.1 Primer information of genes in qRT-PCR

基因类别 Gene categories	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
分子伴侣类 Molecular chaperones genes	热休克蛋白 70	<i>HSP70</i> F: TCTGCCACCGACAAGAGC R: TCTGCCACCGACAAGAGC
	热休克蛋白转录因子 1	<i>HSF1</i> F: ACAGAAACACTTGAAGCAGCAG R: CAGGGTGCATTACCTCCAAC
	94-KDa 葡萄糖调节蛋白	<i>GRP94</i> F: TTAAGGCTGACAAGGACAACCA R: ACCAGACTTGGCTATTGTACC
	BAG 分子伴侣蛋白 3	<i>BAG3</i> F: ACGATCCGAGATTAAATCCCATG R: ATTTCCCGTACTCTAGGCTCT
	钙网蛋白	<i>CALR</i> F: AAACACGAGCAAAACATCGAC R: TTTCTTGGTTCCTGGTCCGAAA
	蛋白质二硫键异构酶 6	<i>PDI6</i> F: TTGAACAGCTCACTATGGACTTGCG R: CAAACCACAGTTCATCTCCGTTG
免疫与代谢类 Metabolic and immune genes	C-型凝集素	<i>CTL</i> F: CTGTTTCAGCCACGACATAGAGC R: GTCCTCCTCAGCCGTCTCCA
	组织蛋白酶 L	<i>CTSL</i> F: GTATCTGACCTGCCCCGACACT R: ATATTTACCCTCGGGCTTGA
	苹果酸脱氢酶	<i>MDH</i> F: ATAGGGCACAGAGCAATCCA R: CTTCCAAGAACATCCCCACT
细胞凋亡类 Apoptosis genes	半胱氨酸蛋白酶 3	<i>Caspase-3</i> F: GCTTTGCTCCCCATCAGCGTA R: ACACCTAGCCAAGGATTCGG
	p53 凋亡蛋白	<i>p53</i> F: TGGAACAACAAAAGGCCAGCAA R: AAGCTGTCTGTTCATCTCCTCC

表2 相关基因在转录组中的表达水平
Tab.2 Expression levels of genes in the transcriptome

组织 Tissue	差异基因 FPKM 比值 FPKM ratio of differential genes						
	<i>HSP70</i>	<i>PDI6</i>	<i>GRP94</i>	<i>CALR</i>	<i>CTSL</i>	<i>CTL</i>	<i>Caspase 3</i>
鳃 Gill	5.537	4.508	3.961	4.351	0	0	0.035
肝胰腺 Hepatopancreas	6.189	2.063	1.518	1.438	74.458	4.847	0.048

2.2 高温胁迫对分子伴侣类基因 mRNA 表达的影响

高温胁迫下,分子伴侣基因在鳃中表达与温度呈正相关,在肝胰腺中表达随温度升高总体呈先上升后下降趋势,且鳃较肝胰腺更早做出响应(图1和图2)。

30℃时,*HSP70* mRNA 在鳃和肝胰腺中变化基本不显著;32℃时,其在鳃和肝胰腺中表达量分别在8 h (4.06倍)和12 h (5.84倍)达到峰值;34℃时,其在鳃和肝胰腺中表达量均在4 h开始升高,12 h达到峰值,为对照组的17.11倍和6.30倍(图1a1、a2)。

不同温度胁迫下,*HSF1* 基因在鳃和肝胰腺中表达趋势不同。30℃时,鳃和肝胰腺中*HSF1* mRNA 变化基本不显著;32℃时,其在鳃中4 h开始显著升高

($P<0.001$),为对照组的7.19倍,随之逐渐降低,48 h时低于对照组;在肝胰腺中8 h开始显著升高($P<0.01$),12 h略有回落,24 h时达到峰值(3.55倍),随之恢复到对照水平;34℃时,其在鳃和肝胰腺中变化总体呈先升高后下降的趋势,分别在4 h和12 h达到峰值,为对照组的6.14倍和2.17倍(图1b1、b2)。

GRP94 基因在鳃中变化更显著。30℃时,鳃和肝胰腺中*GRP94* 基因表达量在4 h和12 h达到峰值,显著高于对照组($P<0.05$);32℃时,在鳃中表达量4 h开始升高,8 h达到峰值,显著高于对照组($P<0.001$);在肝胰腺中变化不显著;34℃时,其表达量在鳃中呈先升高后下降的趋势,在肝胰腺中持续上升,分别在8 h和48 h达到峰值,为对照组的8.08倍和5.76倍

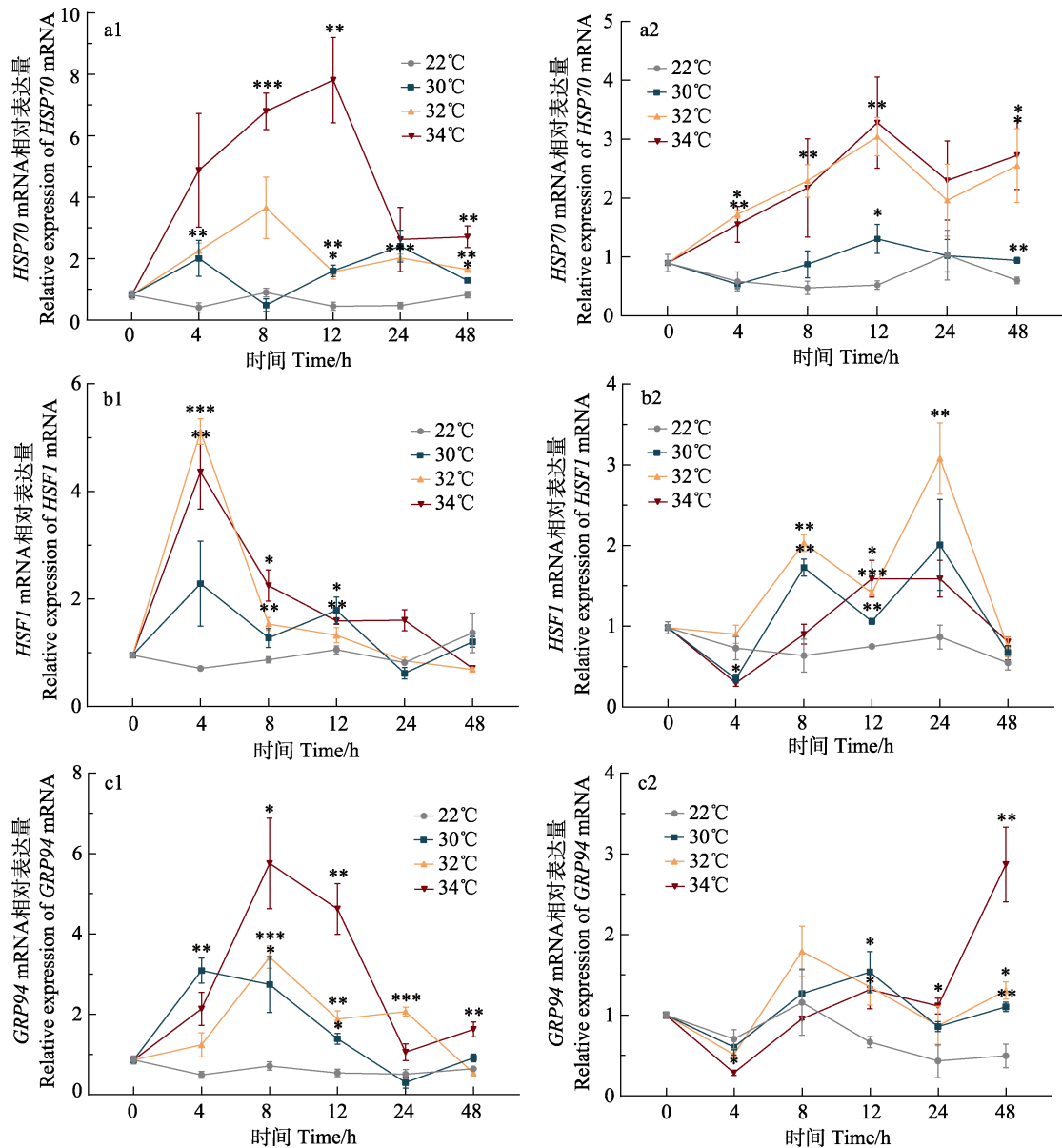


图 1 高温胁迫对缙蛭热休克分子伴侣基因表达的影响

Fig.1 Effects of high-temperature stress on the expression of shock molecular chaperone genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺。*表示与对照组差异显著($P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$), 误差线表示平均值 \pm 标准误($n=3$)。下同
 1: Gill; 2: Hepatopancreas. * represents significant differences between the different temperature stress with control at same time ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). The vertical bars represent the Mean \pm SE ($n=3$). The same as below

(图 1c1、c2)。

30°C时, *BAG3* 基因在鳃和肝胰腺中变化基本不显著; 32°C时, 其在鳃和肝胰腺中变化均呈先升高后下降的趋势, 均在 4 h 时达到峰值; 34°C时, 其在鳃和肝胰腺中变化均呈先升高后降低再升高的趋势, 均在 4 h 达到峰值, 分别为对照组的 6.64 倍和 11.43 倍(图 2a1、a2)。

PDIA6 在鳃中变化较显著。30°C和 32°C时, 其在鳃和肝胰腺中表达均呈先上升后下降的趋势, 均在

4 h 和 8 h 达到峰值, 显著高于对照组($P < 0.05$); 34°C时, 在鳃中 8 h 表达量达到峰值, 为对照组的 8.03 倍; 在肝胰腺中 48 h 时表达量达到峰值(7.39 倍)(图 2b1、b2)。

CALR mRNA 在鳃中变化更加显著。30°C时, 在鳃和肝胰腺中变化均呈先上升后下降的趋势, 分别在 4 h 和 8 h 达到峰值, 为对照组的 4.40 倍和 5.80 倍。32°C时, 其在鳃和肝胰腺中分别在 4 h 和 8 h 表达量开始显著升高($P < 0.05$), 4 h 和 12 h 达到峰值, 为对照组的 9.07 倍和 7.76 倍。34°C时, 其在鳃中 12 h 时

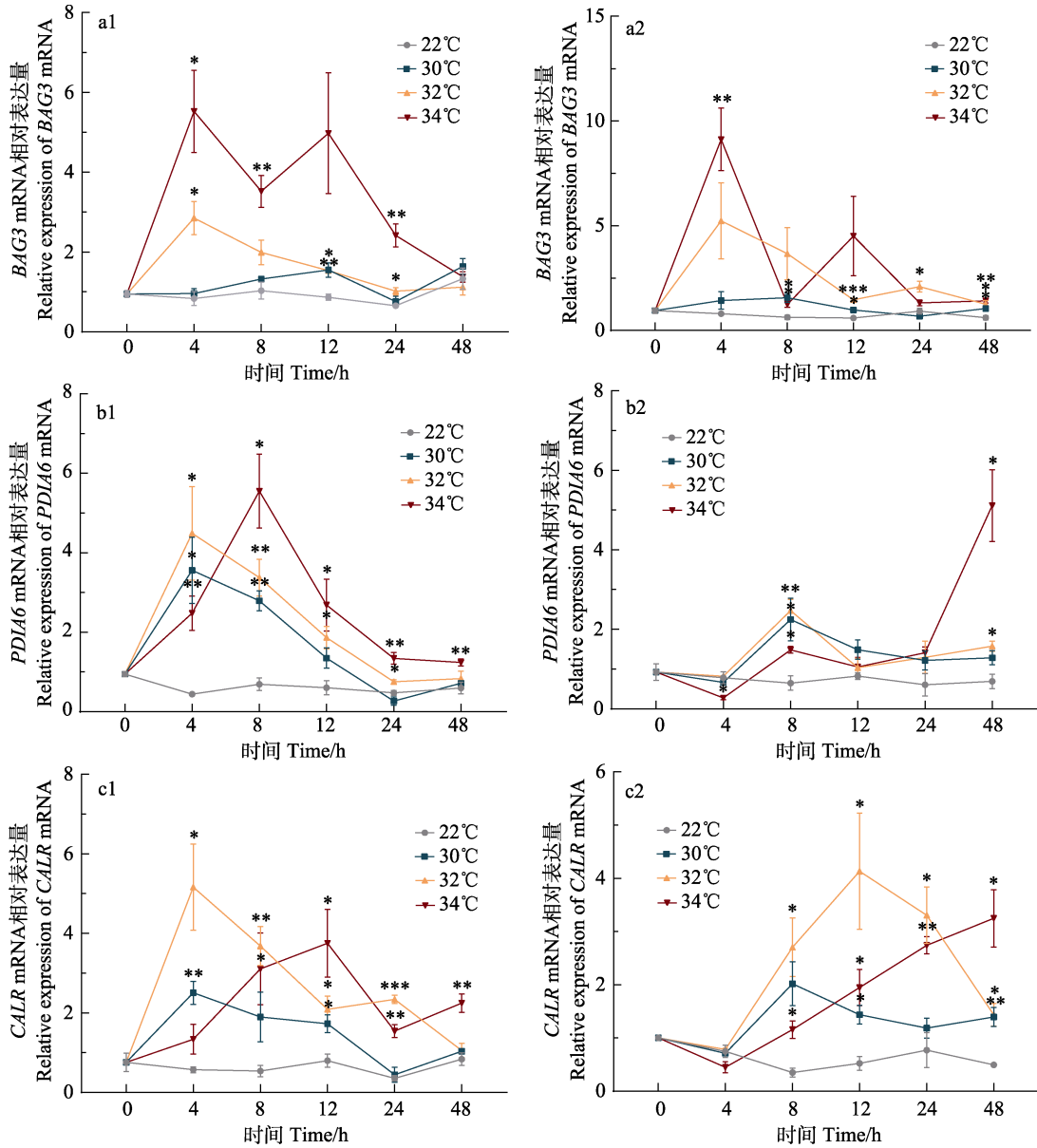


图2 高温胁迫对缙蛭其他分子伴侣基因表达的影响

Fig.2 Effects of high-temperature stress on the expression of other molecular chaperone genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺

1: Gill; 2: Hepatopancreas

表达量达到峰值, 显著高于对照组($P < 0.05$); 在肝胰腺中变化与时间呈正相关, 8 h 开始显著升高 ($P < 0.05$), 48 h 时达到峰值(图 2c1、c2)。

2.3 高温胁迫对代谢与免疫类基因 mRNA 表达的影响

高温胁迫下, 鳃和肝胰腺中的代谢与免疫类基因随温度的升高总体呈先升高后下降的趋势, 肝胰腺响应更加显著, 其中, *CTL* 仅在肝胰腺中表达, 且与温度呈正相关(图 3)。

30°C 时, *MDH* mRNA 在鳃中 12 h 时显著升高且达到峰值($P < 0.05$), 随之略有回落, 48 h 时再次显著

升高($P < 0.05$), 在肝胰腺变化不显著($P > 0.05$); 32°C 时, 其在鳃中变化基本不显著; 在肝胰腺中 24 h 时表达量达到峰值, 为对照组的 2.38 倍; 34°C 时, 其在鳃中表达量 8 h 和 24 h 显著高于对照组($P < 0.05$); 在肝胰腺中表达量在 4 h 时显著低于对照组 ($P < 0.01$), 24 h 达到峰值(图 3a1、a2)。

CTSL 在鳃和肝胰腺中的变化趋势不同。30°C 时, 其在鳃中变化呈先下降再升高又下降的趋势, 48 h 时显著低于对照组($P < 0.01$); 在肝胰腺中变化不显著; 32°C 时, 其在鳃中表达量在 4 h 开始降低, 24 h 时略有上调, 但仍显著低于对照组($P < 0.01$); 在肝胰腺中

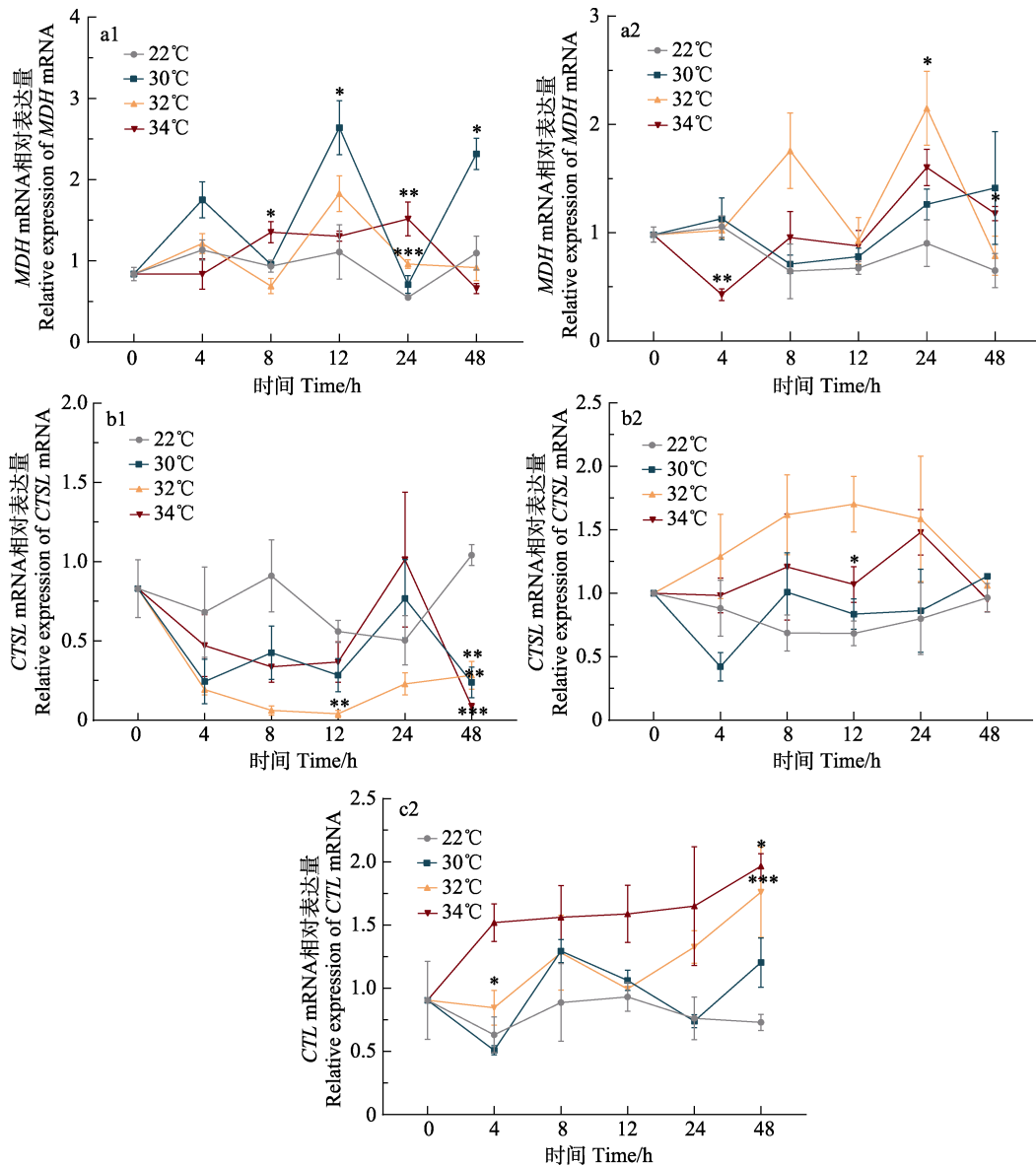


图 3 高温胁迫对缙蛭代谢和免疫类基因表达的影响

Fig.3 Effects of high-temperature stress on the expression of metabolic and immune related genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺

1: Gill; 2: Hepatopancreas

12 h 时表达量达到峰值; 34°C 时, 其在鳃中变化呈先下降后上升再下降的趋势, 48 h 极显著低于对照组 ($P < 0.001$); 在肝胰腺中变化不显著(图 3b1、b2)。

CTL 基因在鳃中未检测到有效信号。在肝胰腺中, 其在 30°C 时变化不显著; 在 32°C 时持续升高, 48 h 达到峰值, 显著高于对照组 ($P < 0.001$); 34°C 时其在 48 h 达到峰值, 显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 3c2)。

2.4 高温胁迫对细胞凋亡类基因 mRNA 表达的影响

温度胁迫后, 细胞凋亡基因在鳃中的表达与温度呈正相关, 在肝胰腺中的表达随温度的升高总体呈先上升后下降的趋势(图 4)。

30°C 时, 鳃和肝胰腺 Caspase-3 mRNA 分别在 8 h 和 12 h 时达到峰值, 为对照组的 5.11 倍和 2.15 倍; 32°C 时, 其在鳃和肝胰腺中表达量分别在 4 h 和 8 h 开始升高, 12 h 和 24 h 达到峰值, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 34°C 时, 其在鳃和肝胰腺中表达量分别在 4 h 和 8 h 开始升高, 均在 12 h 达到峰值, 分别为对照组 5.54 倍和 4.22 倍(图 4a1、a2)。

30°C 时, 鳃和肝胰腺中 p53 mRNA 变化均不显著; 32°C 时, 其在鳃中变化基本不显著; 在肝胰腺中变化呈先升高后下降趋势, 24 h 时达到峰值, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 34°C 时, 其在鳃中表达量 8 h 时

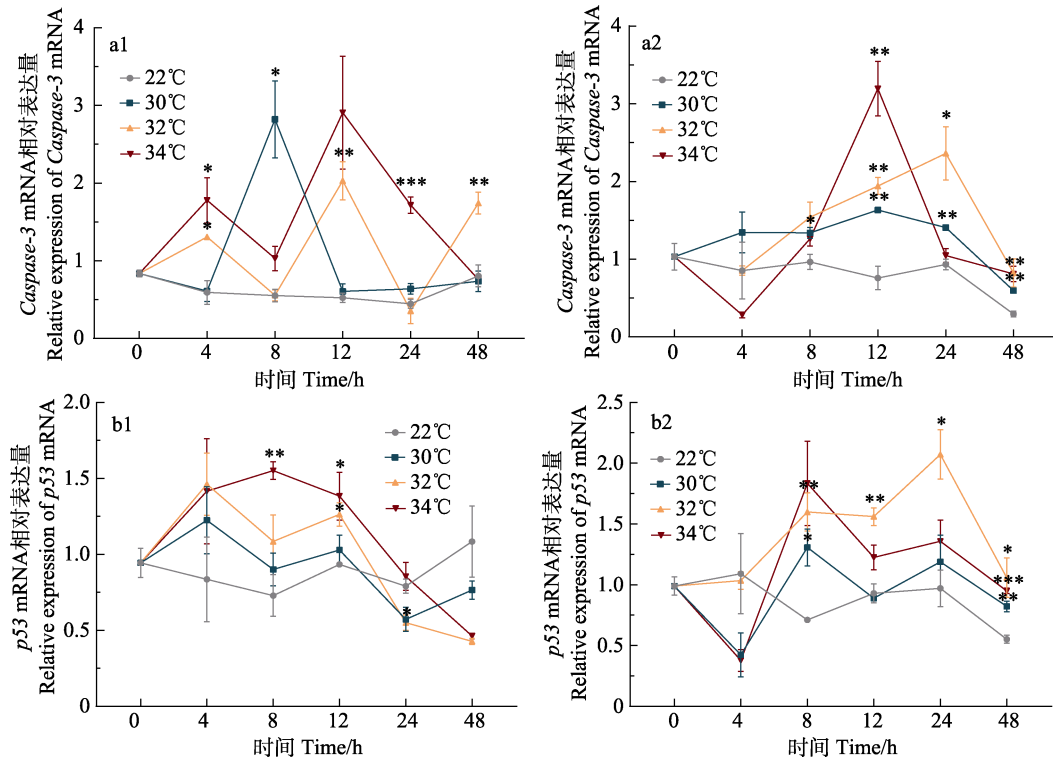


图4 高温胁迫对缢蛏细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig.4 Effects of high-temperature stress on the expression of apoptosis genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺

1: Gill; 2: Hepatopancreas

显著高于对照组($P < 0.01$), 为对照组的 2.13 倍; 在肝胰腺中 8 h 时表达量达到峰值, 为对照组的 2.58 倍(图 4b1、b2)。

3 讨论

高温胁迫下, 机体通过调节体内相关酶和基因的表达以应对热应激。在水生生物中, 鳃为主要的呼吸代谢器官, 直接与海水接触, 可直接感受水温的变化并迅速做出反应; 肝胰腺为主要的代谢与免疫器官, 对环境应激响应敏感。因此, 本研究基于缢蛏高温胁迫后的转录组分析, 筛选了 3 类高温应答相关基因, 并对其在鳃和肝胰腺中的表达特征进行了分析。

3.1 分子伴侣类基因对高温胁迫的响应

HSP 作为主要的分子伴侣, 在参与蛋白质折叠、组装、降解和细胞定位等方面发挥着重要作用(Liu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017)。在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *Pelteobagrus vachelli* ♂)中发现, 高温可诱导 HSP70 的表达(朱凌威等, 2021)。研究表明, HSP 上调可能是长牡蛎适应环境的关键(Zhang *et al.*, 2012)。

热休克因子(HSF)是真核细胞中调控各类热激基因表达的主要蛋白因子。正常情况下, HSF1 主要位于细胞质中, 应激后转移到细胞核, 与 DNA 上热休克元件(HSE)结合(Richter *et al.*, 2010), 激活 HSP 等靶基因转录, 此时 HSP 释放 HSF1, 帮助变性蛋白质修复与降解(Richter *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2015)。在长牡蛎中发现, 热应激可诱导 HSF1 和 HSPs 基因表达上调, 且其中 1 个 HSP70 基因可能受到 HSF1 的调控, 推测 HSF1-HSP 可能存在调控关系(Liu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020)。本研究中, 高温胁迫后缢蛏 HSF1 和 HSP70 在初始阶段开始上调, 且在鳃中表达与温度呈正相关, 推测其可能通过激活 HSF1 促进 HSP70 合成, 降解受损或错误折叠的蛋白。

BAG3 作为分子伴侣, 可与 HSF1 相互作用调节其核穿梭, 进而调节 HSP 表达水平(Jin *et al.*, 2015), 也可通过调节细胞凋亡、发育、细胞骨架组织和自噬等调节细胞对应激的适应性反应(Behl, 2011; Gamberdinger *et al.*, 2011)。本研究中, 高温胁迫 4 h 后, BAG3 mRNA 在鳃和肝胰腺中开始上调, 其在贝类的研究中较少。热应激下, 长牡蛎 BAG 蛋白家族通过与 HSP70/HSC70 直接作用调节其伴侣的功能(Lim

et al, 2016); 对缢蛏足转录组分析显示, 高温胁迫下 *BAG3* 上调高达 30 倍(Zhang et al, 2019)。热应激后, 缢蛏可能通过诱导 *BAG3* 上调激活 *HSF1*, 进而促进 *HSP* 合成以维持体内蛋白质稳态, 抵御温度胁迫(Jin et al, 2015)。

此外, 温度胁迫会导致内质网腔内错误折叠蛋白积累引起内质网应激, 从而激活未折叠蛋白反应, 引起应激基因(*GRPs*、*CALR* 和 *PDIAs*)上调(Tiffany-Castiglioni et al, 2012; Zhang et al, 2012)。*PDI6* 作为重要的分子伴侣之一, 可抑制错误折叠蛋白的聚集; 也可参与未折叠蛋白反应提高蛋白质折叠功能。长牡蛎热应激后血细胞中 *PDI6* 表达量显著上调(Yang et al, 2017)。本研究中, 温度胁迫可诱导缢蛏 *PDI6* 上调, 且在鳃中变化与温度呈正相关, 与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)热胁迫后肝脏和肾脏中 *PDI6* 基因表达模式一致(唐启政, 2018)。热应激下, 缢蛏可能通过上调内质网内腔分子伴侣基因减少错误折叠蛋白的聚集, 维持蛋白质质量控制。

3.2 细胞凋亡类基因对高温胁迫的响应

细胞凋亡是生物体环境适应反应的重要机制, 反映了机体对不同环境胁迫的适应能力。高温胁迫会引起细胞内 DNA、蛋白质等大分子损伤, 造成细胞凋亡, 甚至死亡(Sheikh et al, 2015; Zhou et al, 2019)。热胁迫后, 番红砗磲(*Tridacna crocea*)通过负调控未折叠蛋白反应诱导细胞凋亡(Zhou et al, 2019)。*p53* 作为重要的抑癌因子, 在细胞周期调控、细胞凋亡以及 DNA 损伤修复中发挥重要作用(Sheikh et al, 2015)。本实验中, 胁迫初期, 缢蛏 *p53* 基因表达量与温度呈正相关, 推测机体通过上调 *p53* 基因修复损伤的细胞。随温度的持续升高和胁迫时间的延长, 其表达受到抑制, 可能是高温造成体内 DNA 不可修复, 机体损伤严重, 最终引起死亡, 与暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)和大菱鲆的变化趋势一致(Cheng et al, 2015; 刘晓菲等, 2019)。

Caspase-3 作为细胞凋亡通路中关键的执行者, 其表达量可反映细胞凋亡程度。本研究中, 热应激后, 缢蛏鳃和肝胰腺中 *Caspase-3* 变化呈先上升后下降的趋势, 与暗纹东方鲀血细胞的结果基本一致(Cheng et al, 2015)。可能高温造成机体 DNA 损伤增加, 进而影响其基因组完整性, 启动下游细胞凋亡, 使 *Caspase-3* mRNA 表达水平增加(Yao et al, 2012)。在长牡蛎、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)中也有类似发现(贾旭颖等, 2014; 孙盛明等, 2017; Yang et al, 2017), 说明

Caspase-3 在缢蛏高温应激反应中发挥着重要作用。

4 结论

急性高温胁迫下缢蛏应激相关基因在鳃和肝胰腺中表达变化的研究表明, 缢蛏通过调节蛋白折叠、代谢、免疫以及细胞凋亡等一系列生物过程应对热应激。热激条件下, 缢蛏可能上调分子伴侣类基因表达促进蛋白质折叠和恢复受损或降解变性的蛋白质, 以维持体内蛋白质稳态。分子伴侣在修复或降解受损蛋白的同时, 需要消耗大量 ATP, 机体通过加快代谢速率维持基本生命活动。随温度升高和胁迫时间延长, 体内蛋白损伤程度不断加剧, 代谢和免疫应答受到抑制。此时, 机体通过激活凋亡系统清除体内受损细胞, 进而维持细胞的稳态。本研究为进一步探索缢蛏高温响应分子机制奠定理论基础, 同时为后续分子标记辅助育种提供候选基因。

参 考 文 献

- BEHL C. BAG3 and friends: Co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy*, 2011, 7(7): 795–798
- BRUN N T, BRICELJ V M, MACRAE T H, et al. Heat shock protein responses, in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 358(2): 151–162
- CHENG C H, YANG F F, LIAO S A, et al. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 53: 172–179
- CHENG D W, LIU H X, ZHANG H K, et al. Effects of thermal stress on mortality and *HSP90* expression levels in the noble scallops *Chlamys nobilis* with different total carotenoid content. *Cell Stress and Chaperones*, 2020, 25(1): 105–117
- DONG Y H, ZENG Q F, REN J F, et al. The chromosome-level genome assembly and comprehensive transcriptomes of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 664
- GAMERDINGER M, KAYA A M, WOLFRUM A, et al. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Reports*, 2011, 12(2): 149–156
- HAO Z L, TANG X J, DING J, et al. Effect of high temperature on survival, oxygen consumption, behavior, ammonia-N excretion, and related immune indicators of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Aquaculture International*, 2014, 22(6): 1863–1876
- JIA X Y, ZHANG D, LU Y L, et al. Effects of abrupt change in

- temperature and non-ionic ammonia on the *cyt-C* and *caspase-3* of *Litopenaeus vannamei* in freshwater. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 700–710 [贾旭颖, 张丹, 路允良, 等. 温度突变和非离子氨胁迫对淡水养殖凡纳滨对虾 *cyt-C* 和 *caspase-3* 的影响, *中国水产科学*, 2014, 21(4): 700–710]
- JIANG W W, MEIRONG D, FANG J. Response of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* to acute temperature challenge: Physiological and biochemical parameters. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37: 321–329
- JIN Y, AHN S, KIM S. BAG3 affects the nucleocytoplasmic shuttling of *HSF1* upon heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 464(2): 561–567
- KIM B M, KIM K, CHOI I Y, *et al.* Transcriptome response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* susceptible to thermal stress: A comparison with the response of tolerant oyster. *Molecular and Cellular Toxicology*, 2017, 13(1): 105–113
- LIM H J, KIM B M, HWANG I J, *et al.* Thermal stress induces a distinct transcriptome profile in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics and Proteomics*, 2016, 19: 62–70
- LIU D, CHEN Z. The expression and induction of heat shock proteins in molluscs. *Protein and Peptide Letters*, 2013, 20(5): 602–606
- LIU X F, MA A J, HUANG Z H, *et al.* Expression characteristics analysis of major QTL candidate genes in response to high temperature stress in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(6): 1407–1415 [刘晓菲, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆高温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特性分析. *水产学报*, 2019, 43(6): 1407–1415]
- LIU Y, LI L, HUANG B, *et al.* RNAi based transcriptome suggests genes potentially regulated by *HSF1* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under thermal stress. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 639–654
- LIU Y, ZHU Q, LI L, *et al.* Identification of *HSF1* target genes involved in thermal stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by ChIP-seq. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(9): 167–179
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*, 2002, 25(4): 402–408
- LÜ X N, WANG X Q, WU Y L, *et al.* Effect of temperature on the energy budget of *Arcuatula senhousi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 119–125 [吕旭宁, 王晓芹, 吴亚林, 等. 温度对凸壳肌蛤能量收支的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 119–125]
- NIE H T, LIU L H, HUO Z M, *et al.* The *HSP70* gene expression responses to thermal and salinity stress in wild and cultivated Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture*, 2017, 470: 149–156
- RICHTER K, HASLBECK M, BUCHNER J, *et al.* The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 253–266
- SHEIKH M S, FORNACE A J. Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 182(2): 171–181
- SUN S M, ZHU J, GE X P, *et al.* Cloning of *caspase3* gene in *Megalobrama amblycephala* and analysis of its expression in high temperature stress. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(10): 4090–4099 [孙盛明, 朱健, 戈贤平, 等. 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) *caspase3* 基因克隆及其在高温胁迫中的表达分析. *基因与基因组学*, 2017, 36(10): 4090–4099]
- TANG Q Z. Cloning, expression and function of stress-resistant genes based on the transcriptome of turbot (*Scophthalmus maximus*) skin tissue. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [唐启政. 基于大菱鲆皮肤组织转录组的抗逆基因克隆、表达及功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- TIFFANY-CASTIGLIONI E, QIAN Y. ER chaperone-metal interactions: Links to protein folding disorders. *NeuroToxicology*, 2012, 33(3): 545–557
- UGALDE S C, PRESTON J, OGIER E, *et al.* Analysis of farm management strategies following herpesvirus (OsHV-1) disease outbreaks in Pacific oysters in Tasmania. *Australia Aquaculture*, 2018, 495: 179–186
- WANG R C, WANG Z P. *Science of marine shellfish culture*. Qingdao: China Ocean University Press, 2008 [王如才, 王昭平. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008]
- XUE B B, MENG D L, REN S Y, *et al.* *ScHsc70* gene SNP markers screening and correlation analysis for high temperature resistance of *Sinonovacula constricta* new variety “Shenzhe No.1”. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2439–2448 [薛宝宝, 孟德龙, 任泓好, 等. 缢蛏新品种“申浙1号”*ScHsc70* 基因 SNPs 筛查与耐高温性状的关联性分析. *水产学报*, 2019, 43(12): 2439–2448]
- XUE S Y, WANG J Y, LI J Q, *et al.* Effects of temperature on energy metabolism and antioxidant enzyme activities of *Scapharca broughtonii*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 573–583 [薛素燕, 王金叶, 李家琦, 等. 温度对魁蚶能量代谢及抗氧化酶活性的影响. *水产学报*, 2019, 43(3): 573–583]
- YANG C, GAO Q. The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against acute heat stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 68(1): 132–143
- YAO C L, SOMERO G N. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. *Journal of Experimental Biology*, 2012, 215(24): 4267–4277
- YU J H, SONG J H, CHOI M C, *et al.* Effects of water temperature change on immune function in surf clams,

- Macra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1): 30–35
- ZHANG D, WANG H W, YAO C L. Molecular and acute temperature stress response characterizations of *caspase-8* gene in two mussels, *Mytilus coruscus* and *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 177/178: 10–20
- ZHANG G, FANG X, GUO X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature, 2012, 490(7418): 49–54
- ZHANG W, STOREY K B, DONG Y W. Adaptations to the mudflat: Insights from physiological and transcriptional responses to thermal stress in a burrowing bivalve *Sinonovacula constricta*. Science of the Total Environment, 2019, 710: 136280
- ZHOU Z, LIU Z, WANG L, *et al.* Oxidative stress, apoptosis activation and symbiosis disruption in giant clam *Tridacna crocea* under high temperature. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 84: 451–457
- ZHU L W, ZHANG C Y, LIU Z, *et al.* Cloning, expression of *hsp70* core cDNA and the effects of heat stress on its tissue expression in *Pelteobagrus fulvidraco* ♀×*P. vachelli* ♂. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 47–55 [朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 等. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 47–55]
- ZHU Q, ZHANG L, LI L, *et al.* Expression characterization of stress genes under high and low temperature stresses in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Marine Biotechnology, 2016, 18(2): 176–188

(编辑 冯小花)

Analysis of Expression Characteristics of Related Genes in Response to Acute Thermal Stress in the Razor Clam *Sinonovacula constricta*

KONG Xianghui^{1,2}, WANG Shasha², DONG Yinghui^{2①}, REN Jianfeng¹, LIN Zhihua^{2,3①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 3. Ninghai Institute of Maricultural Breeding and Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ninghai, Zhejiang 315604, China)

Abstract The razor clam, *Sinonovacula constricta*, as a eurythermic bivalve, might have special adaptive mechanisms for defense against environmental stress because of its specialized lifestyle and limited mobility. To understand the expression characteristics of genes involved in different metabolic processes, quantitative reverse transcription PCR technology was used to analyze the expression levels of three types of temperature response candidate genes (molecular chaperone genes, metabolic and immune related genes, and apoptosis genes) based on a transcriptomic analysis in the gills and hepatopancreas of *S. constricta* under different acute high temperature conditions (30°C, 32°C and 34°C). The results showed that the expression of molecular chaperone genes was significantly upregulated at 4 h under thermal stress and was positively correlated with temperature. Meanwhile, gills responded earlier than the hepatopancreas. The mRNA expression of metabolic and immune responses and apoptotic genes increased and then decreased in both tissues with the extension of stress time. In conclusion, the regulation of these genes played significant roles to maintain basic homeostasis in *S. constricta* under heat stress. The expression of immune response genes was more significant in the hepatopancreas. This study provides a theoretical basis for further exploring the molecular mechanisms of high temperature responses of *S. constricta* and provides candidate genes for molecular marker-assisted breeding in this species under thermal stress.

Key words *Sinonovacula constricta*; Thermal stress; qRT-PCR; Gene expression

① Corresponding author: LIN Zhihua, E-mail: zhihua9988@126.com; DONG Yinghui, E-mail: dongyinghui118@126.com