

张欢,董迎辉,姚韩韩,等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*) GST 和 HSP90 基因克隆及其在氨氮胁迫下的表达特征分析[J]. 海洋学报, 2020, 42(4): 66–78, doi:10.3969/j.issn.0253–4193.2020.04.008

Zhang Huan, Dong Yinghui, Yao Hanhan, et al. Cloning of GST and HSP90 genes of *Sinonovacula constricta* and analysis of their expression characteristics under ammonia nitrogen stress[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(4): 66–78, doi:10.3969/j.issn.0253–4193.2020.04.008

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) GST 和 HSP90 基因克隆及其在氨氮胁迫下的表达特征分析

张欢^{1,2}, 董迎辉², 姚韩韩², 俞凯佳², 胡月亚², 林志华^{2*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315823; 2. 浙江万里学院 生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 克隆获得缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 谷胱甘肽 S-转移酶 (*Sc-GST σ*) 和热休克蛋白 90 (*Sc-HSP90*) 基因的 cDNA 全长, 分析了它们的组织表达差异及其在氨氮胁迫下的表达特征。结果表明, *Sc-GST σ* 的全长 cDNA 为 1 414 bp, 含有 639 bp 的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 编码 212 个氨基酸, *Sc-GST σ* 氨基酸序列与其他物种的 GST 氨基酸序列同源性为 31.88%~43.40%; 而 *Sc-HSP90* 的全长 cDNA 为 2 752 bp, ORF 为 2 181 bp, 编码 726 个氨基酸, 其氨基酸序列与其他物种 HSP90 的氨基酸序列同源性为 76.77%~87.05%。荧光定量 PCR 分析发现, *Sc-GST σ* 和 *Sc-HSP90* 在缢蛏各组织中均有表达, 两者均在肝胰腺中表达量最高。氨氮胁迫后, *Sc-GST σ* 和 *Sc-HSP90* mRNA 在肝胰腺中表达均显著上调 ($p < 0.05$), 表明氨氮胁迫引起机体的应激反应, 2 个基因可能参与机体解毒或防御过程。但胁迫后期表达量下降推测是机体的防御能力有限, 不足以完全保护宿主免受应激诱导的细胞损伤。

关键词: 缢蛏; GST; HSP90; 氨氮; 表达特征

中图分类号: P714⁺.5; Q814

文献标志码: A

文章编号: 0253–4193(2020)04–0066–13

1 引言

随着水产养殖集约化的发展, 养殖动物的排泄物、粪便和残饵积累分解, 导致水体中氨氮浓度偏高^[1]。据报道, 添加到养殖系统中的氮源 (通常在饵料中) 有 52%~95% 未被利用, 导致水体中氨氮浓度急剧升高^[2]。在水环境中, 氨氮主要以游离氨 (NH₃) 和离子氨 (NH₄⁺) 两种形式存在, 二者之和为总氨氮 (Total Ammonium Nitrogen, TAN)。NH₃ 由于脂溶性易穿过细胞膜进入体内, 而其在体内累积则会导致机体中毒, 甚至死亡^[3–5]。氨氮作为水产养殖环境的胁迫因素之一, 其浓度升高显著影响机体内氨基酸代谢、活

性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 代谢、抗氧化过程和免疫应答等过程, 从而严重影响养殖动物的生存和养殖业的发展^[6–8]。

氨氮中毒的早期特征主要是体内积累过量的氨、ROS、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 等, 继而导致氧化应激、机体损伤等^[9], 而氨诱导大量生成的 ROS 是引起细胞毒性的重要因素之一^[10–12]。在氨氮暴露后, 罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 肝和肌肉中的氧化酶活力显著升高, 以应对氨引起的氧化应激^[13], 而欧洲鲈鱼 (*Dicentrarchus labra*)^[14]、亚马逊河虾 (*Macrobrachium amazonicum*)^[15] 则引起体内第二阶段抗氧化酶活性的改变。谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-trans-

收稿日期: 2019–05–27; 修订日期: 2019–08–21。

基金项目: 国家现代贝类产业技术体系项目 (CARS-49); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02055-9); 国家水产种质资源平台运行服务项目 (2019DKA30470); 宁波市“环境科学与工程”一流学科项目。

作者简介: 张欢 (1994—), 女, 浙江省衢州市人, 研究方向为海洋贝类种质资源与遗传育种研究。E-mail: MhuanhuanZ@126.com

* 通信作者: 林志华, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: zhihua9988@126.com

ferases, GST)作为抗氧化系统中第二道防线的主要成员,主要参与有害亲电性的内源性和外源性化合物的解毒过程,包括脂质过氧化产物和致癌物、环境污染物的解毒过程^[16-17]。GST还催化谷胱甘肽(Glutathione, GSH)与亲电子外源化学物结合,将毒性物质转化成易排泄的水溶性形式^[18]。由于其对环境污染物的解毒能力,水生动物中的GST已被广泛用作监测水环境污染的生物标志物^[17, 19]。环境污染物(如重金属、微生物、氨氮等)还可以诱导第二阶段解毒酶的基因表达^[16-17, 20],但目前关于氨氮胁迫导致GST基因变化的报道很少^[21]。氨氮会损害生物的许多生理功能,如干扰蛋白质折叠和运输^[22]。蛋白水平的研究表明,氨氮胁迫下表达水平发生显著改变的蛋白主要参与蛋白质合成和转运,并且抵抗应激刺激^[23],如氨诱导暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)肝脏中热休克蛋白(Heat Shock Proteins, HSP70和HSP90)显著表达,表明氨可引起机体启动应激机制以保护细胞免受损伤^[4]。而作为分子伴侣, HSP有助于细胞从胁迫中恢复,其是具有重折叠应激变性蛋白或协助新生蛋白折叠功能的高度保守性应激蛋白,并调控多种细胞过程(如应激防御、细胞周期控制和细胞凋亡)^[22, 24]。作为热休克蛋白家族的重要成员, HSP90可应对多种环境因子胁迫,其主要通过形成特定复合物来维护关键蛋白,如类固醇受体和蛋白激酶^[22]。由于HSP90在保护生物体免受损害方面具有重要作用,可对多种环境因子胁迫进行调节,被作为监测水环境健康的敏感生物标志物^[24]。有研究表明,氨可诱导脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[25]和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[26]HSP90的表达。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国海水池塘综合养殖的重要底栖经济贝类,其具有养殖周期短、营养价值高、味道鲜美等优点,在浙江、福建等东南沿海广泛养殖,2017年全国养殖总产量达到86.2万t^[27]。缢蛏由于埋栖、滤食及开放式循环特点,易受到水体污染物的暴露和有害影响,同时对污染物也具有高的耐受性^[28-29]。本研究对*Sc-GST σ* 和*Sc-HSP90*基因的序列特征、组织表达和氨氮胁迫后的表达特征进行分析,了解氨氮对水生动物早期毒性作用和机体潜在防御机制,以为缢蛏大规模安全养殖提供科学指导。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验用缢蛏(壳长(63.42±1.57)mm)于2018年4月采自宁波市海洋与渔业研究院科技创新基地。

取健康无病、规格基本一致的20颗缢蛏,用2mL无菌一次性注射器从后闭壳肌取血,置于冻存管中,并解剖取其鳃、肝胰腺、足、外套膜、水管和闭壳肌,液氮速冻后保存在-80℃超低温冰箱中,用于后续RNA提取。

2.2 氨氮暴露实验

暴露实验前清洁缢蛏壳表污物,暂养在盐度22、温度15℃的海水中,24h连续充气,每日全换水1次,暂养期间定时投喂亚心形扁藻。暂养7d后进行实验。

实验分别设置对照组和实验组,每组随机放置80颗缢蛏在100L水体中,以自然海水中的氨氮浓度作为对照组,实验组氨氮依据半致死浓度(244.55mg/L,本实验室未发表数据)分别设置为140mg/L和220mg/L,每天全换水两次,实验期间水体盐度为22.76±0.92、pH值为8.17±0.43、水温为(15.24±3.85)℃,不投饵、不充气,每6h测定各组氨氮浓度,及时用NH₄Cl母液调节氨氮浓度。实验进行到0h、3h、6h、12h、24h、48h、72h和96h后,每组随机取6颗缢蛏,解剖取肝胰腺,液氮速冻后保存在-80℃超低温冰箱中。

2.3 *Sc-GST σ* 和*Sc-HSP90*基因cDNA全长克隆

利用TRIzol试剂(Omega)提取肝胰腺总RNA,采用分光光度计(GE Healthcare, Nanovue Plus)测定RNA的浓度和纯度,并通过电泳检测其完整性。通过SMART™ RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)试剂盒(TaKaRa)将RNA合成cDNA第一链,作为全长克隆的模板。在缢蛏转录组库中检索GST和HSP90基因的EST序列,通过Primer5.0设计克隆引物(表1),根据采用聚合酶(Advantage 2 Polymerase Mix Kit, TaKaRa)进行2个基因的全长扩增,扩增产物经电泳检验后进行回收纯化,纯化的产物与载体T1(TransGen)连接后导入到感受态细胞中,经12h培养后筛选阳性克隆进行测序。测得的序列利用DNA-MAN6.0拼接得到其cDNA全长序列,为确定克隆和测序的准确性,以得到的全长cDNA为模板设计一对特异性引物(表1)进行PCR扩增验证。

2.4 cDNA全长序列分析

获得的cDNA全长序列通过开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)查询器(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测ORF及氨基酸序列;通过蛋白质专家分析系统(Expert Protein Analysis System, ExPASy)在线软件(https://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白质的分子量和等电点;分析蛋白质疏水性(Ex-

表 1 本实验所用引物及序列信息

Table 1 The information of primers and sequences used in this experiment

引物名称	序列(5'-3')	引物信息
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE扩增接头引物
Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE扩增接头引物
T3	GAGAGTGCTCGCAACTTAGAAATCGCCG	<i>Sc-GSTσ</i> 3'RACE扩增
T5	CGGCATGTCTGGTTCCGTTGG	<i>Sc-GSTσ</i> 5'RACE扩增
P3	CGCATCCCTCAATACTCTTGGTCC	<i>Sc-HSP90</i> 3'RACE扩增
P5	CCTCGTCTTCTCCAAATCTCTACCTT	<i>Sc-HSP90</i> 5'RACE扩增
M13 F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	T1载体通用引物
M13 R	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	T1载体通用引物
T F1	TGGAGTCTCTGGGTGATACG	<i>Sc-GSTσ</i> 全长验证引物
T R1	ACAACAACGCTGAACTGGA	<i>Sc-GSTσ</i> 全长验证引物
T F2	TTCTTGTGGAGCAGTACAGTTCTAA	<i>Sc-GSTσ</i> 全长验证引物
T R2	CAAAATCAAAAGGCTGTGCG	<i>Sc-GSTσ</i> 全长验证引物
P F1	GTTACTCAGAAAGACGCACGG	<i>Sc-HSP90</i> 全长验证引物
P R1	CTACTACGACGCATAATGGAGC	<i>Sc-HSP90</i> 全长验证引物
P F2	GGCTGCCAAGAAGAACCTA	<i>Sc-HSP90</i> 全长验证引物
P R2	AAATCACAGATTGAACAATCAAGTA	<i>Sc-HSP90</i> 全长验证引物
RS9 F	TGAAGTCTGGCGTGCAAGT	内参基因荧光定量引物
RS9 R	CGTCTCAAAAGGGCATTACC	内参基因荧光定量引物
GST F	GAACCGACGAGAATCAGAAGA	<i>Sc-GSTσ</i> 荧光定量引物
GST R	AAACATCGCCGAAACCACG	<i>Sc-GSTσ</i> 荧光定量引物
HSP90 F	GATGAAGGGGAGGTGGAAA	<i>Sc-HSP90</i> 荧光定量引物
HSP90 R	GTGTCAATGAGGGTCAAGTGTGT	<i>Sc-HSP90</i> 荧光定量引物

PASy-ProtScale, <https://web.expasy.org/protscale/>); 预测氨基酸是否存在信号肽 (SignalP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 利用 Smart 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对蛋白进行功能域预测, 通过 Swiss Model 在线软件 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白质高级结构; 利用美国国立生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 数据库中的本地序列基本搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行序列比对, 搜索同源序列; 利用 MEGA5.2 软件构建系统进化树, 利用 DNAMAN6.0 软件进行同源序列的多重比较。

2.5 荧光定量 PCR 分析

提取缢蛏组织的总 RNA, 用专用反转录试剂

(TaKaRa, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser) 进行 RNA 反转录, 得到实时荧光定量 PCR (Real-time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) cDNA 模板。根据全长序列设计荧光定量引物 (表 1), 以核糖体蛋白 S9 (Ribosomal Protein S9, RS9) 基因作为内参基因^[30]。用定量 PCR 仪 (Roche, LightCycler® 480) 进行 qRT-PCR 扩增, 每组样本设定 4 个平行, 3 个重复, 所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对相对表达水平进行计算, 结果以平均值±标准偏差 (Mean±SD) 表示, 利用 SPSS13.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 *Sc-GST σ* 基因 cDNA 全长序列分析及特征分析

克隆得到 *Sc-GST σ* 基因 cDNA 全长序列为 1 414 bp

(GenBank 登录号: MK301159), 包含 639 bp 的 ORF, 编码 212 个氨基酸, 根据氨基酸序列推导出 *Sc-GST σ* 基因编码蛋白质的分子量为 24.54 kDa, 理论等电点为 7.68。ExPASy-ProtScale 软件预测显示, 该蛋白质在氨基酸组成上, 极性氨基酸所占比例较高, 表现为亲水性, 且没有明显的信号肽。预测 *Sc-GST σ* 蛋白含有 2 个功能域, 即 GST-N(3-84 aa) 和 GST-C(86-212 aa)(图 1a), 其二级结构由 271 个 H 键、螺旋数 25 和 42 个转角组成。

同源氨基酸序列比对显示, *Sc-GST σ* 与菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*, AEW46327.1) GST σ 的同源性及同源性数据最高(43.40%), 与紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*, AFQ35985.1)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*, ANG56313.1)、刺参(*Apostichopus japonicus*, PIK56346.1) 等无脊椎动物的同源性在 26.67%~40.49%, 与人(*Homo sapiens*, O60760.3)、小家鼠(*Mus musculus*, Q9JHF7.3)、家鸡(*Gallus gallus*, O73888.3) 等脊椎动物的同源性为 26.67%~29.52%。GST σ 同源序列比对显示, *Sc-GST σ* 的保守性较低。*Sc-GST σ* 与其他无脊椎动物 GST 和脊椎动物 PGD 进行多重比较, 确定 N 端结构域显示较保守, C 端结构域多样(图 1b, 图 1c)。系统进化树结果显示, 产生了 4 个不同的簇, 分别是 σ 、 μ 、 Ω 和微粒体 GST, 其中微粒体 GST 与其他 3 个类群保持相当大的遗传距离。每一类贝类 GST 与无脊椎动物 GST 的位置非常接近, 而 *Sc-GST σ* 与菲律宾蛤仔 GST σ 3 最亲密, 其亚群及分支表明缢蛏 *Sc-GST σ* 确实为 σ 亚型(图 2)。

3.2 *Sc-HSP90* 基因 cDNA 全长序列分析及特征分析

Sc-HSP90 基因 cDNA 全长序列为 2 752 bp(GenBank 登录号: MK301157), 其中含有 2 181 bp 的 ORF, 编码 726 个氨基酸。根据氨基酸序列推导出其编码蛋白质的分子量为 83.10 kDa, 理论等电点 4.78。ExPASy-ProtScale 软件预测显示, 该蛋白质表现为亲水性, 没有明显的信号肽。Smart 软件预测得到 *Sc-HSP90* 蛋白也含有 2 个功能域, 分别是 HATPase-C(35-189 aa) 和 HSP90(191-720 aa), 其中含有 5 个家族标签序列(³⁵NKEIFLRELISNASDALDKIR⁵⁵, ¹⁰²LG TIAKSGT¹¹⁰, ¹²⁶IGQFGVGFYSA¹³⁶, ³⁵⁴IKLYVRRVFI³⁶³, ³⁸⁰GVVDSLEDLPLNISRE³⁹⁴)。Swiss model 软件预测显示, *Sc-HSP90* 蛋白的二级结构由 448 个 H 键、螺旋数 31 和 72 个转角组成。

序列同源性分析表明, *Sc-HSP90* 氨基酸序列与已知物种序列的同源性超过 70%。与其他软体动物的 HSP90 的同源性超过 79%, 其中与河蚬(*Corbicula fluminea*, AMM04544.1) 和菲律宾蛤仔(AHY275448.1) 的同源性最高, 分别为 88.32% 和 87.05%。多重序列比对表明, *Sc-HSP90* 具有高度保守性, 特别是在 HSP90 家族标签区域(图 3a)。系统进化树结果显示, 这些蛋白分为两个簇, 一簇包含软体动物、甲壳动物和脊椎动物, 另一簇包含两个昆虫纲。所有脊椎动物聚集在一起, 形成两个分支(HSP90 α 和 HSP90 β 亚型)。而甲壳动物聚集在一起, 与软体动物分支互为姐妹群。显然, *Sc-HSP90* 与软体动物 HSP90 聚为一亚支, 并与菲律宾蛤仔、河蚬的 HSP90 亲缘关系最近(图 3b)。

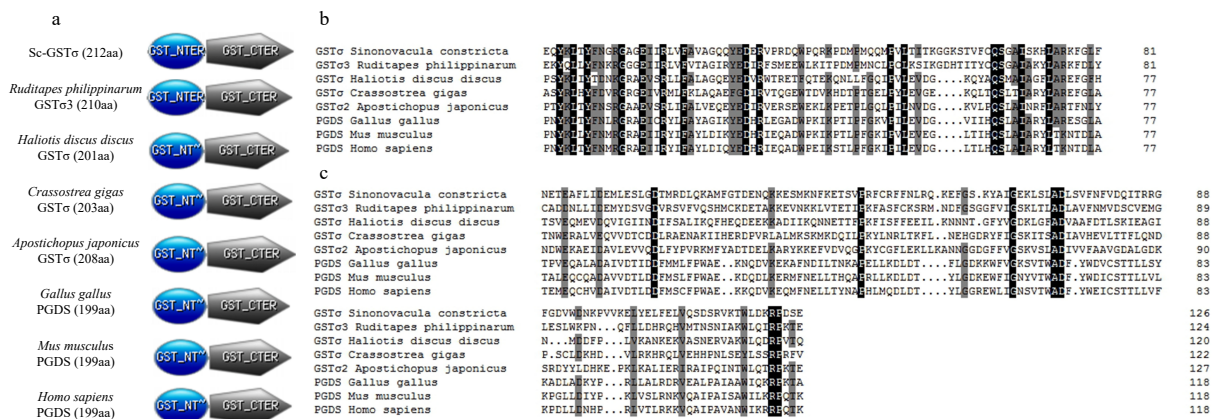


图 1 *Sc-GST σ* 结构域和多重比较

Fig. 1 *Sc-GST σ* domain structure and multiple sequence alignment

a. *Sc-GST σ* 的结构域与挑选的 4 种无脊椎动物的 GST σ 和 3 种脊椎动物的前列腺素 D 合成酶 (PGD, A GST σ) 结构域比较; b. 8 种动物 N 末端结构域多重比较; c. 8 种动物 GST σ C 末端结构域多重比较

a. The structure domains of *Sc-GST σ* were compared with those of four selected other invertebrate GSTs and three vertebrate prostaglandin-D synthases (PGD, a GST σ); b. multiple sequence alignment of N-terminal domain from eight animals; c. multiple sequence alignment of GST σ C-terminal domain from eight animals

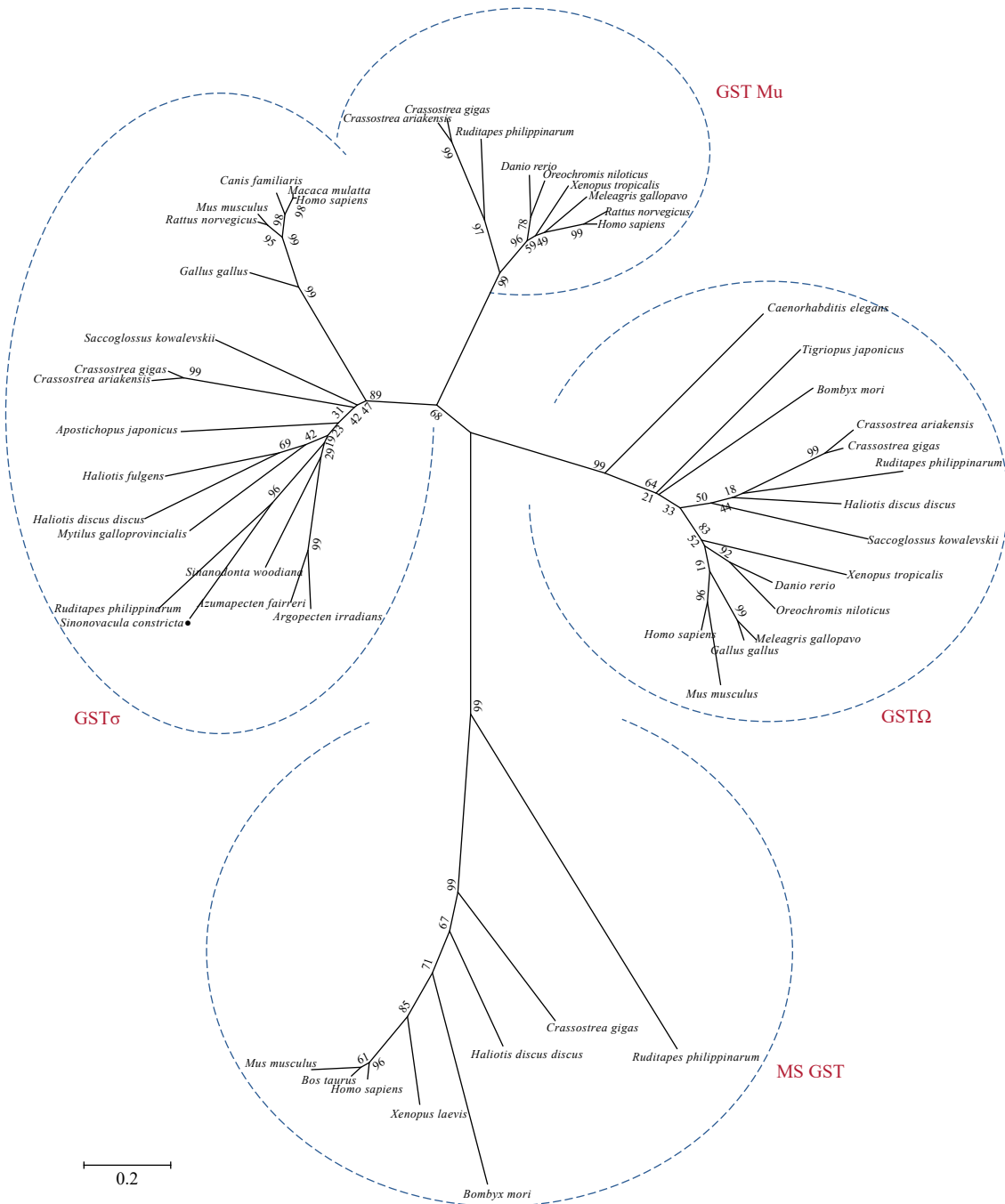


图 2 利用 MEGA5.2 软件邻接法构建的 GST 的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of GST constructed by Neighbor-joining method using MEGA5.2 software

使用序列的登录号见附录表 A1

Accession numbers of the sequences used in construction of tree are attached in the appendix Table A1

3.3 *Sc-GST σ* 和 *Sc-HSP90* 基因在缢蛏 7 个组织中的表达模式

利用 qRT-PCR 技术检测了 *Sc-GST σ* 和 *Sc-HSP90* 基因在鳃、肝胰腺、足、外套膜、血液、水管和闭壳肌 7 个组织中的表达。结果表明, *Sc-GST σ* 在肝胰腺中的表达量最高, 显著高于其他 6 个组织 ($p < 0.05$), 而其他组织间表达量没有显著性差异

(图 4a1)。 *Sc-HSP90* 基因也在肝胰腺中表达量最高 ($p < 0.05$), 其次是鳃、血液和水管, 外套膜中表达量最低(图 4b1)。

3.4 *Sc-GST σ* 和 *Sc-HSP90* 基因在氨氮胁迫下的表达特征分析

氨氮胁迫后缢蛏肝胰腺中 *Sc-GST σ* 和 *Sc-HSP90* 的 mRNA 水平升高(图 4)。在 140 mg/L 氨浓度暴露

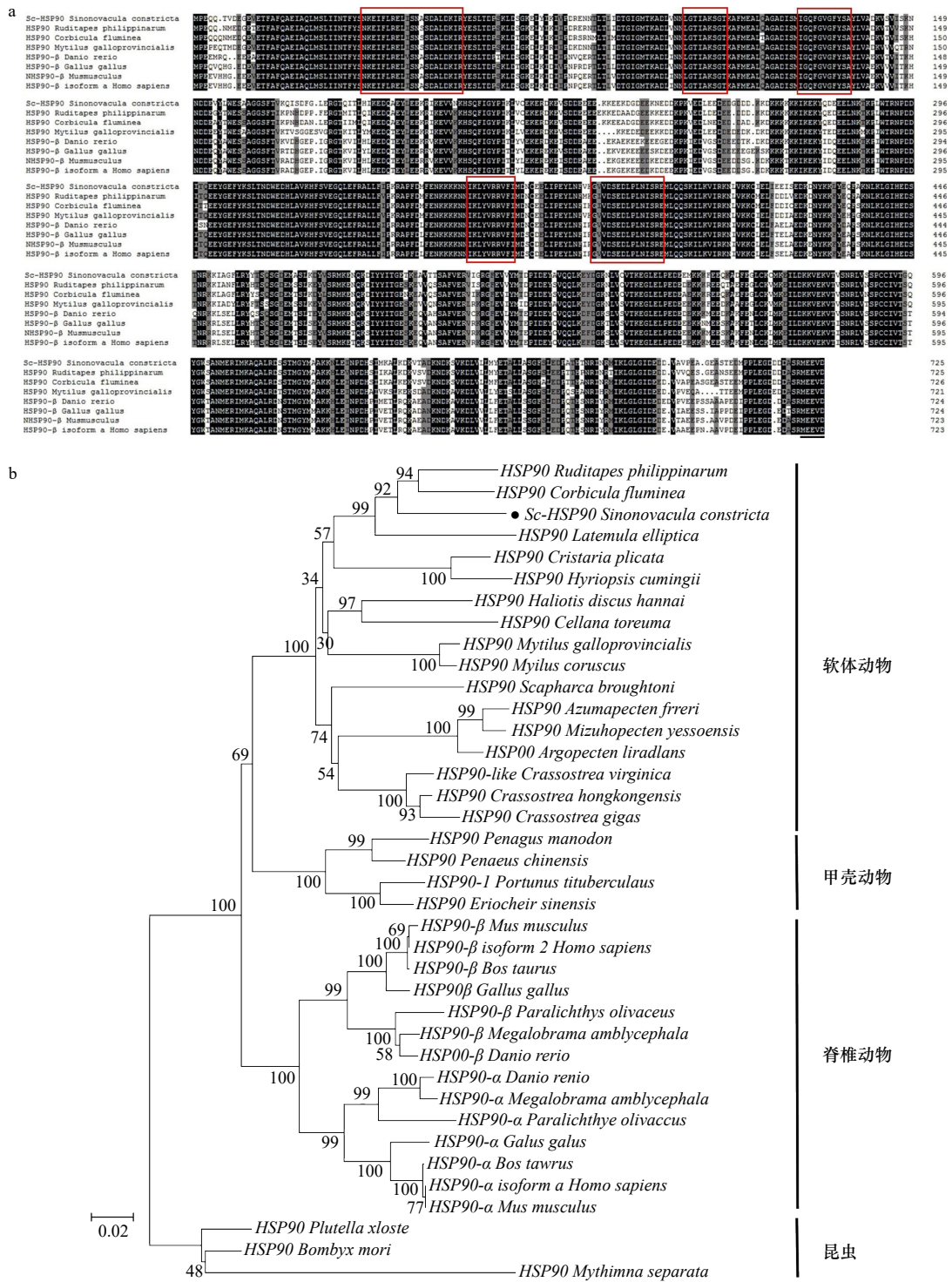


图3 Sc-HSP90基因鉴定及系统进化树

Fig. 3 Sc-HSP90 gene identified and phylogenetic tree

a. 8种动物HSP90氨基酸序列多重比较,红色方框为HSP90家族标签,保守序列MEEVD带有下划线;b.利用MEGA5.2软件采用邻接法构建的HSP90的系统进化树。使用序列的登录号见附录表A2

a. Multiple sequence alignment of HSP90 amino acid sequences from eight animals, HSP90 family signature motifs are red boxes and sequence MEEVD is underlined; b. the phylogenetic tree of HSP90 constructed by Neighbor-joining method using MEGA5.2 software. Accession numbers of the sequences used in construction of tree are attached in the appendix Table A2

下 *Sc-GSTσ* 基因在肝胰腺中的表达量持续上升,在48 h

显著下调,72 h恢复到对照组水平,然而96 h又显著高于对照组。而在220 mg/L氨浓度暴露下, *Sc-GSTσ*

达到峰值,显著高于对照组($p < 0.05$),随后表达量显

著下调,72 h恢复到对照组水平,然而96 h又显著高于对照组。而在220 mg/L氨浓度暴露下, *Sc-GSTσ*

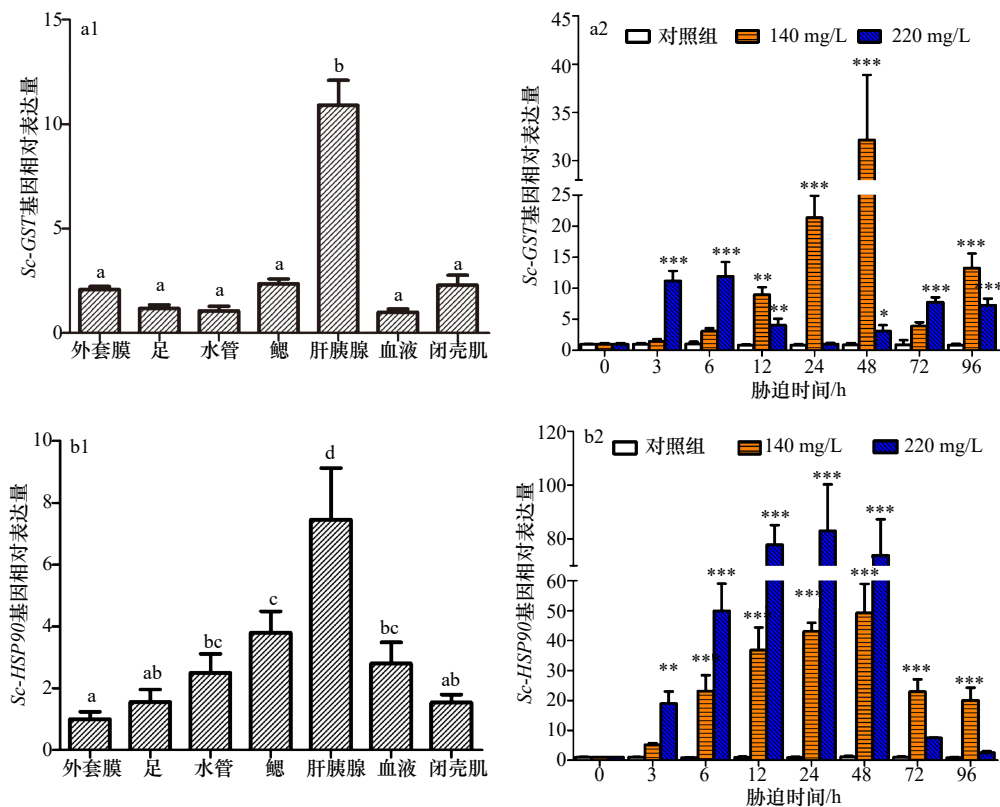


图 4 *Sc-GSTσ* 和 *Sc-HSP90* 基因在缢蛏不同组织中及不同氨浓度胁迫后的表达特征

Fig. 4 The expression characteristics of *Sc-GSTσ* and *Sc-HSP90* genes in different tissues of *S. constricta* and after different ammonia concentration stress

a1. *Sc-GSTσ* 基因的组织表达; a2. 不同氨浓度胁迫后, *Sc-GSTσ* 在缢蛏肝胰腺中的表达量变化; b1. *Sc-HSP90* 基因的组织表达; b2. 不同氨浓度胁迫后, *Sc-HSP90* 在缢蛏肝胰腺中的表达量变化。组织间不同字母的数据差异显著 ($p < 0.05$), 星号 (*) 表示在各时间点胁迫组与对照组之间的显著差异 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

a1. Expression profile of *Sc-GSTσ* in *S. constricta*; a2. expression characteristic analysis of *Sc-GSTσ* in the digestive gland of *S. constricta* after ammonia stress; b1. expression profile of *Sc-HSP90* in *S. constricta*; b2. expression characteristic analysis of *Sc-HSP90* in the digestive gland of *S. constricta* data after ammonia stress. Different letters are significantly different among tissues ($p < 0.05$) and the asterisk (*) indicates a significant difference between the stress group and its respective control at different time (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

mRNA 表达水平在 3 h 显著上升, 在 6 h 达到最大值, 但随后显著下降, 在 24 h 下降到与对照组无显著性差异, 然而之后又缓慢上升直至 96 h (图 4a2)。

在 140 mg/L 和 220 mg/L 氨氮胁迫下, *Sc-HSP90* 的转录水平呈现先升后降的趋势, 分别在 48 h 和 24 h 达到峰值, 显著高于对照组 ($p < 0.05$), 140 mg/L 氨氮胁迫 72~96 h 其表达量有所下降, 但仍显著高于对照组, 而 220 mg/L 氨氮胁迫 72~96 h 表达水平恢复到对照组水平 (图 4b2)。

4 讨论

GST 作为具有解毒和抗氧化等多种生理功能的蛋白酶, 在哺乳动物和水生动物中已被广泛研究^[17,31-32]。本研究克隆得到 *Sc-GSTσ* 基因的全长 cDNA, 其氨基酸序列与其他动物 GST 氨基酸序列比对显示相似度

不高, 该结果与曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*)、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) GST 基因的分析结果相似^[19,33]。Sigma 型 GST 是一个大家族, 包括来自不同有机体的亚型, 因此不同物种 GSTσ 型之间的同源性较弱。结构域分析表明, 在 *Sc-GSTσ* N 端含有一个 GST_N 结构域, 该结构域是 GSH 结合位点 (G 位点), 还存在一个相当保守的酪氨酸残基 (Try, Y⁵) 在催化反应中起重要作用, 而且在 C 末端还存在一个 GST_C 结构域, 是亲电子物质即底物结合位点 (H 位点)。对 GSTσ 的结构域比较分析表明, 所有物种均存在 N 末端和 C 末端结构域, 但多重比较发现含有 G 位点的 N 末端区域较保守, 其与 GST 功能紧密相关, 而含 H 位点的 C 末端显示出高度变异性, 这种差异可能表明物种间存在底物特异性^[34-35]。

作为应激蛋白中的重要成员, 热休克蛋白已被广

泛研究,其中对缙蛭热休克家族的研究包括 Sc-HSP70^[36]和小分子热休克蛋白 Sc-sHAP^[37],而关于HSP90的报道尚未见到。在本研究中,推导 Sc-HSP90氨基酸序列发现,其具有HSP90家族标签序列和腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine triphosphate, ATP)结合域,这与哺乳动物和水生动物的研究一致^[38-40]。根据C末端存在⁷²²MEEVD⁷²⁶序列,则 Sc-HSP90属于细胞溶质HSP90家族^[40-41]。序列多重比较表明,缙蛭 Sc-HSP90序列具有高度保守性,基于系统进化树分析进一步表明, Sc-HSP90是HSP90家族成员。在系统发育树中,脊椎动物存在HSP90 α 和HSP90 β 两个亚型。相比之下,大多数无脊椎动物只有一个HSP90基因。与所有脊椎动物HSP90 β 亚型一样, Sc-HSP90氨基酸序列N末端缺少 α 亚型特有的dsDNA依赖激酶磷酸化位点^[39-41]。这些结果表明, Sc-HSP90应该属于HSP90 β 亚型家族。

本研究通过qRT-PCR方法检测氨暴露下 Sc-GST σ mRNA在肝胰腺中的转录水平,结果表明在氨氮胁迫下 Sc-GST σ 转录水平显著上升,随着暴露时间推移表达水平下降,接近正常水平,并且高浓度氨氮胁迫下 Sc-GST σ 的表达水平明显低于低浓度氨氮胁迫,这与暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)^[12]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[42]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[8]的研究结果相似。由此表明,缙蛭对氨氮胁迫较敏感,氨氮胁迫初始阶段下 GST基因高表达参与氨氮的解毒过程,但在氨氮持续胁迫下, GST的表达降低,解毒能力减弱。研究表明持续胁迫下,抗氧化防御系统未能及时清除 ROS,其在体内过度积累,导致机体代谢能力的降低,从而影响相关基因的表达^[21, 42]。此外,机体氧化应激强度随着氨氮浓度的增加而增加^[13],氨在水生动物组织中积累,引起机体释放大量 ROS,导致氧化损伤^[42]。黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)血液中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性在高浓度氨氮胁迫下低于低浓度氨氮胁迫,而且在高浓

度氨氮胁迫下体内MDA含量显著升高^[43]。氨氮胁迫后期或高氨氮胁迫下体内会累积过量的自由基,超出机体的清除能力,从而造成脂质过氧化,加剧细胞和组织损伤。由此表明,抗氧化酶 mRNA的表达是具有时间和剂量依赖性的,并且与机体的代谢能力相关^[24]。 Sc-GST σ 基因表达上调表明, GST的表达量可以用作指示环境氨氮毒性的生物标记。

ROS对机体细胞有害,具有毒性诱变作用,可诱导蛋白质变性或蛋白毒性^[22]。氨除了诱导 ROS的大量生成,还可能会干扰体内蛋白质和氨基酸平衡、运输,增加细胞中蛋白质碎片化和聚集^[44]。研究发现氨诱导草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[24]、宽体沙鳅(*Aeromonas hydrophila*)^[22]、山黄鳝(*Monopterus albus*)^[44]肝脏中 HSP90的表达水平上调,而在本研究中氨氮胁迫下缙蛭肝胰腺中 Sc-HSP90表达量显著上升,达到峰值后显著下降。这表明氨氮胁迫下,体内高表达的 HSP90可能有助于防止蛋白质变性或损伤从而保护细胞免受损害,这可作为缙蛭对氨氮胁迫的适应性反应。此外其高表达量也可能意味着高氨氮胁迫造成机体高水平的蛋白损伤,其基因表达的增加,可能表明机体对氨氮胁迫的耐受性的增强^[45]。然而,随着胁迫时间延长而表达量减少,这可能是由于HSP90修复受损DNA和蛋白的能力有限,变性的蛋白在体内累积,影响正常细胞的代谢能力^[26]。

5 结论

本研究克隆得到 Sc-GST σ 和 Sc-HSP90基因的cDNA全长序列,同源性分析表明,它们均与菲律宾蛤仔的同源性最高。这2个基因在缙蛭7个组织中均有表达,且均在肝胰腺中表达量最高。经氨氮胁迫后, Sc-GST σ 和 Sc-HSP90的表达量均显著上升,表明这2个基因均参与氨氮胁迫的应激反应,但高浓度氨氮胁迫或胁迫后期,其表达量下降,表明它们在肝胰腺中积极响应氨氮胁迫。研究结果为进一步研究氨氮对缙蛭的早期毒性作用和潜在应激机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘胜男. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)在氨氮胁迫下解毒代谢机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014. Liu Shengnan. Study on detoxification metabolic mechanism of swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to ammonia[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [2] Ip Y K, Chew S F, Randall D J. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion[J]. *Fish Physiology*, 2001, 20: 109-148.
- [3] Miranda-Filho K C, Pinho G L L, Wasielesky W, et al. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(3): 377-382.
- [4] Cheng Changhong, Yang Fangfang, Ling Renzhi, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 164: 61-71.
- [5] Zhang Lan, Pan Luqing, Xu Lijun, et al. Effects of ammonia-N exposure on the concentrations of neurotransmitters, hemocyte intracellular signaling pathways and immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 48-57.

- [6] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1/12): 17–23.
- [7] Wilkinson D J, Smeeton N J, Watt P W. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link[J]. *Progress in Neurobiology*, 2010, 91(3): 200–219.
- [8] Ren Qin, Pan Luqing. Digital gene expression analysis in the gills of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*) exposed to elevated ambient ammonia-N[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 108–114.
- [9] Zhang Muzi, Li Ming, Wang Rixin, et al. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 79: 313–320.
- [10] Zhu Limei, Gao N, Wang Ruifang, et al. Proteomic and metabolomic analysis of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after acute ammonia exposure[J]. *Ecotoxicology*, 2018, 27(3): 267–277.
- [11] Qi Xiaozhou, Xue Mingyang, Yang Shibo, et al. Ammonia exposure alters the expression of immune-related and antioxidant enzymes-related genes and the gut microbial community of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 485–492.
- [12] Cheng Changhong, Guo Zhixun, Wang Anli. Growth performance and protective effect of vitamin E on oxidative stress pufferfish (*Takifugu obscurus*) following by ammonia stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(2): 735–745.
- [13] Hegazi M M, Attia Z I, Ashour O A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(2): 118–125.
- [14] Sinha A K, Zinta G, AbdElgawad H, et al. High environmental ammonia elicits differential oxidative stress and antioxidant responses in five different organs of a model estuarine teleost (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2015, 174–175: 21–31.
- [15] Pinto M R, Lucena M N, Faleiros R O, et al. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 170: 13–23.
- [16] Huang Jia, Wu Shunfan, Ye Gongyin. Molecular characterization of the sigma class glutathione S-transferase from *Chilo suppressalis* and expression analysis upon bacterial and insecticidal challenge[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2011, 104(6): 2046–2053.
- [17] 刘慧慧, 何建瑜, 赵荣涛, 等. 重金属胁迫下厚壳贻贝谷胱甘肽S-转移酶基因表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 274–280.
- Liu Huihui, He Jiayu, Zhao Rongtao, et al. Molecular expression pattern of glutathione S-transferase gene in *Mytilus coruscus* exposed to heavy metals[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(2): 274–280.
- [18] Costa S, Guilhermino L. Influence of long-term exposure to background pollution on the response and recovery of the invasive species *Corbicula fluminea* to ammonia sub-lethal stress: a multi-marker approach with field estuarine populations[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, 226(4): 95.
- [19] Li H, Yang Z, Huang Q, et al. Molecular cloning and characterization of a sigma-class glutathione S-Transferase from the freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2015, 59(4): 219–230.
- [20] Park H, Ahn I Y, Kim H, et al. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(4): 528–536.
- [21] 孙盛明, 朱健, 戈贤平, 等. 团头鲂谷胱甘肽S-转移酶基因的克隆及其在氨氮胁迫中的表达分析[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(1): 295–305.
- Sun Shengming, Zhu Jian, Ge Xianping, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of Mu-tyt glutathione S-transferases from *Megalobrama amblycephala*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(1): 295–305.
- [22] Qin Chuanjie, Shao Ting, Duan Huiguo. The cloning of a heat shock protein 90 β gene and expression analysis in *Botia reevesae* after ammonia-N exposure and *Aeromonas hydrophila* challenge[J]. *Aquaculture Report*, 2016, 3: 159–165.
- [23] Lu Xia, Luan Sheng, Dai Ping, et al. iTRAQ-based comparative proteome analysis for molecular mechanism of defense against acute ammonia toxicity in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 52–61.
- [24] Zhou Xin, Dong Yunwei, Wang Fang, et al. The effect of high ammonia concentration on gill structure alternation and expression of SOD and HSP90 genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 321–328.
- [25] Li Jitao, Han Junying, Chen Ping, et al. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1191–1197.
- [26] Wang Xingqiang, Wang Lingling, Yao Chen, et al. Alternation of immune parameters and cellular energy allocation of *Chlamys farreri* under ammonia-N exposure and *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 741–749.
- [27] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2018中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- The Ministry of Agriculture and Fishery of the People's Republic of China, National Aquatic Technology Promotion Terminal, Chinese Society of Fisheries. Chinese Fishery Statistical Yearbook 2018[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018.
- [28] Guo Xiaoyu, Feng Chenghong. Biological toxicity response of Asian clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 631–632: 56–70.
- [29] Fu Jianping, Zhao Xuelin, Shi Yuhong, et al. Functional characterization of two ABC transporters in *Sinonovacula constricta* gills and their barrier action in response to pathogen infection[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 443–453.
- [30] Zhao Xuelin, Fu Jianping, Jiang Liting, et al. Transcriptome-based identification of the optimal reference genes as internal controls for quantitative RT-PCR in razor clam (*Sinonovacula constricta*)[J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(6): 603–613.
- [31] 陈丽君. 谷胱甘肽S-转移酶基因家族的研究进展[J]. *皖南医学院学报*, 2003, 22(2): 144–146.
- Chen Lijun. Research progress of glutathione S-transferase gene family[J]. *Acta Academiae Medicinae Wannan*, 2003, 22(2): 144–146.

- [32] 程炜轩, 梁旭方, 李观贵, 等. 鳊鱼两种谷胱甘肽S-转移酶基因cDNA的克隆与分析[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4): 537-543.
Cheng Weixuan, Liang Xufang, Li Guangui, et al. Molecular cloning and sequence analysis of alpha-and rho-classes of glutathione S-transferases in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(4): 537-543.
- [33] 余作奔, 王春琳, 母昌考, 等. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)sigma-型谷胱甘肽硫转移酶基因的克隆及重组表达[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 488-492.
Yu Zuoben, Wang Chunlin, Mu Changkao, et al. Molecular cloning and recombinant expression of a sigma-like glutathione S-transferase from *Sepiella maindroni*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 488-492.
- [34] Umasuthan N, Revathy K S, Lee Y, et al. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2012, 155(4): 539-550.
- [35] 张飏, 李永清, 高轩. 谷胱甘肽S-转移酶综述[J]. 吉林畜牧兽医, 2006, 27(6): 11-13.
Zhang Biao, Li Yongqing, Gao Xuan. Summarize of glutathione S-transferases[J]. *Jilin Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006, 27(6): 11-13.
- [36] 冯冰冰, 牛东红, 钟玉民, 等. 缢蛏*ScHsc70* cDNA的分子特性和表达分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 33-44.
Feng Bingbing, Niu Donghong, Zhong Yumin, et al. Molecular characteristics and expression analysis of *ScHsc70* cDNA in agamaki clam (*Sinonovacula constricta*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 33-44.
- [37] 冯冰冰. 缢蛏热休克蛋白Sc-sHSP基因的分子特性与表达分析[C]//2012年中国水产学会学术年会论文摘要集. 郑州: 中国水产学会, 2012.
Feng Bingbing. Molecular characteristics and expression analysis of Sc-sHSP gene from *Sinonovacula constricta*[C]// Abstracts Book of Papers Presented at the 2012 Annual Academic Meeting of the Chinese Fisheries Society. Zhengzhou: China Society of Fisheries, 2012.
- [38] Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, et al. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(3): 754-762.
- [39] Ding J, Wang H, Yin C, et al. Molecular cloning of the heat shock protein 90 gene in scallop *Mizuhopecten yessoensis* and the effects of temperature stress on gene expression[J]. Invertebrate Survival Journal, 2018, 15(1): 2-13.
- [40] Liang H Y, Wang Z X, Lei Q N, et al. Molecular cloning and expression analysis of a pearl oyster (*Pinctada martensii*) heat shock protein 90 (*HSP90*)[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 18778-18791.
- [41] Sun S M, Zhu J, Ge X P, et al. Cloning and expression analysis of a heat shock protein 90 β isoform gene from the gills of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) subjected to nitrite stress[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(2): 3036-3051.
- [42] Ren Hai, Li Jian, Li Jitao, et al. Transcript profiles of mitochondrial and cytoplasmic manganese superoxide dismutases in *Exopalaemon carinicauda* under ammonia stress[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(3): 714-724.
- [43] Li Ming, Chen Liqiao, Qin J G, et al. Growth performance, antioxidant status and immune response in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed different PUFA/vitamin E dietary levels and exposed to high or low ammonia[J]. *Aquaculture*, 2013, 406-407: 18-27.
- [44] Hangzo H, Banerjee B, Saha S, et al. Ammonia stress under high environmental ammonia induces Hsp70 and Hsp90 in the mud eel, *Monopterus albus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(1): 77-88.
- [45] Zhang Chunnuan, Li Xiangfei, Tian Hongyan, et al. Effects of fructooligosaccharide on immune response, antioxidant capability and HSP70 and HSP90 expressions of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) under high ammonia stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(1): 203-217.

附录

表 A1 GST 进化树结构中使用的序列的登录号

Table A1 Accession numbers of the sequences used in GST phylogenetic tress

分类	物种	拉丁学名	基因名	基因登录号
Sigma类	菲律宾蛤仔	<i>Ruditapes philippinarum</i>	GST σ 3	AEW46327.1
	近江牡蛎	<i>Crassostrea ariakensis</i>	GST σ	ACJ06744.1
	盘鲍	<i>Haliotis discus discus</i>	GST σ	ABO26602.1
	太平洋牡蛎	<i>Crassostrea gigas</i>	GST σ	CAE11863.1
	囊舌虫	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	GST σ 2-like	XP_002731487.1
	紫贻贝	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GST σ 3	AFQ35985.1
	刺参	<i>Apostichopus japonicus</i>	GST σ 2	PIK56346.1

续表 A1

分类	物种	拉丁学名	基因名	基因登录号
	海湾扇贝	<i>Argopecten irradians</i>	GST σ	ANG56313.1
	绿鲍	<i>Haliotis fulgens</i>	GST σ	AXR98614.1
	背角无齿蚌	<i>Sinanodonta woodiana</i>	GST σ	AQW43003.1
	栉孔扇贝	<i>Azumapecten farreri</i>	GST σ 2	ADF32019.1
	家鸡	<i>Gallus gallus</i>	PGDS	O73888.3
	家犬	<i>Canis familiaris</i>	PGDS	XP_535659.1
	褐家鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	PGDS	O35543.3
	小家鼠	<i>Mus musculus</i>	PGDS	Q9JHF7.3
	智人	<i>Homo sapiens</i>	PGDS	O60760.3
	猕猴	<i>Macaca mulatta</i>	HPDS	NP_001181141.1
Omega类	菲律宾蛤仔	<i>R. philippinarum</i>	GST Ω	AEW46328.1
	近江牡蛎	<i>C. ariakensis</i>	GST Ω	ACJ06747.1
	太平洋牡蛎	<i>C. gigas</i>	GST Ω	CAD89618.1
	盘鲍	<i>H. discus discus</i>	GST Ω 1	ABO26600.1
	囊舌虫	<i>S. kowalevskii</i>	GST Ω 1-like	XP_002738513.1
	家蚕	<i>Bombyx mori</i>	GST Ω 1	NP_001040131.1
	热带爪蟾	<i>Xenopus tropicalis</i>	GST Ω 1	NP_001011256.1
	虎斑猛水蚤	<i>Tigriopus japonicus</i>	GST Ω	ACE81246.1
	秀丽隐杆线虫	<i>Caenorhabditis elegans</i>	GST Ω 1	NP_498728.1
	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	GST Ω 1	NP_001002621.1
	尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	GST Ω 1	XP_003440188.1
	火鸡	<i>Meleagris gallopavo</i>	GST Ω 1-like	XP_003208190.1
	家鸡	<i>G. gallus</i>	GST Ω 1 X1	XP_015144135.1
	小家鼠	<i>M. musculus</i>	GST Ω 1	NP_034492.1
	智人	<i>H. sapiens</i>	GST Ω 1	AAH00127.1
Mu类	菲律宾蛤仔	<i>R. philippinarum</i>	GST Mu	AEW46330.1
	近江牡蛎	<i>C. ariakensis</i>	GST Mu	ACJ06748.1
	太平洋牡蛎	<i>C. gigas</i>	GST Mu	CAD90167.1
	热带爪蟾	<i>X. tropicalis</i>	GST Mu1	NP_001004964.1
	斑马鱼	<i>D. rerio</i>	GST Mu3	NP_001103586.1
	尼罗罗非鱼	<i>O. niloticus</i>	GST Mu3	XP_003444865.1
	火鸡	<i>M. gallopavo</i>	GST Mu3	AEI70736.1
	褐家鼠	<i>R. norvegicus</i>	GST Mu5	NP_742035.1
	智人	<i>H. sapiens</i>	GST Mu3	AAC17866.1
Microsomal类	菲律宾蛤仔	<i>R. philippinarum</i>	MS GST	AEW46329.1
	太平洋牡蛎	<i>C. gigas</i>	MS GST1	EKC28823.1
	盘鲍	<i>H. discus discus</i>	MS GST1	ABO26660.1
	家蚕	<i>B. mori</i>	MS GST1-like	XP_021205338.1
	非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	MS GST1 L homeolog	NP_001084720.1
	牛	<i>Bos taurus</i>	MS GST	DAA29379.1
	小家鼠	<i>M. musculus</i>	MS GST	AAD51096.1
	智人	<i>H. sapiens</i>	MS GST	AAB17184.1

表 A2 HSP90 进化树结构中使用的序列的登录号

Table A2 Accession numbers of the sequences used in HSP90 phylogenetic tree

	物种	拉丁学名	基因名	基因登录号	
贝类	菲律宾蛤仔	<i>R. philippinarum</i>	HSP90	AHY27548.1	
	褶纹冠蚌	<i>Cristaria plicata</i>	HSP90	AHM26536.1	
	栉孔扇贝	<i>A. farreri</i>	HSP90	AAR11781.1	
	虾夷扇贝	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	HSP90	ASU91375.1	
	海湾扇贝	<i>A. irradians</i>	HSP90	ABS50431.1	
	近江牡蛎	<i>Crassostrea hongkongensis</i>	HSP90- β -like	ADL59936.1	
	皱纹盘鲍	<i>Haliotis discus hannai</i>	HSP90	ACX94847.1	
	紫贻贝	<i>M. galloprovincialis</i>	HSP90	CAJ85741.1	
	厚壳贻贝	<i>Mytilus coruscus</i>	HSP90	ALL27016.1	
	河蚬	<i>C. fluminea</i>	HSP90	AMM04544.1	
	嫁帽螺	<i>Cellana toreuma</i>	HSP90	AGH32328.1	
	魁蚶	<i>Scapharca broughtonii</i>	HSP90	ALZ42089.1	
	南极帽贝	<i>Laternula elliptica</i>	HSP90	ACF35426.1	
	三角帆蚌	<i>Hyriopsis cumingii</i>	HSP90	ALM87690.1	
	太平洋牡蛎	<i>C. gigas</i>	HSP90	ABS18268.1	
	甲壳动物	斑节对虾	<i>Penaeus monodon</i>	HSP90	ACO83357.1
		三疣梭子蟹	<i>Portunus trituberculatus</i>	HSP90-1	ACQ90225.1
中国对虾		<i>Penaeus chinensis</i>	HSP90	ABM92446.1	
中华绒螯蟹		<i>Eriocheir sinensis</i>	HSP90	AHA61463.1	
脊椎动物	斑马鱼	<i>D. rerio</i>	HSP90- α	NP_001038538.1	
	斑马鱼	<i>D. rerio</i>	HSP90- β	O57521.2	
	牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	HSP90- α	ABG56393.1	
	牙鲆	<i>P. olivaceus</i>	HSP90- β	AAO92751.1	
	团头鲂	<i>Megalobrama amblycephala</i>	HSP90- α	AGV06257.1	
	团头鲂	<i>M. amblycephala</i>	HSP90- β	AGI97008.1	
	智人	<i>H. sapiens</i>	HSP90- α isoform 2	NP_005339.3	
	智人	<i>H. sapiens</i>	HSP90- β isoform a	NP_031381.2	
	小家鼠	<i>M. musculus</i>	HSP90- α	NP_034610.1	
	小家鼠	<i>M. musculus</i>	HSP90- β	NP_032328.2	
	牛	<i>B. taurus</i>	HSP90- α	NP_001012688.1	
	牛	<i>B. taurus</i>	HSP90- β	NP_001073105.1	
	家鸡	<i>G. gallus</i>	HSP90- α	NP_001103255.1	
	家鸡	<i>G. gallus</i>	HSP90- β	CAA49704.1	
昆虫	小菜蛾	<i>Plutella xylostella</i>	HSP90	AHA36864.1	
	家蚕	<i>B. mori</i>	HSP90	ADG57739.1	
	粘虫	<i>Mythimna separata</i>	HSP90	ABY55234.1	

Cloning of *GST* and *HSP90* genes of *Sinonovacula constricta* and analysis of their expression characteristics under ammonia nitrogen stress

Zhang Huan^{1,2}, Dong Yinghui², Yao Hanhan², Yu Kaijia², Hu Yueya², Lin Zhihua²

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315823, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: The full-length cDNA of glutathione S-transferase (*Sc-GST σ*) and heat shock protein 90 (*Sc-HSP90*) genes were cloned from *Sinonovacula constricta* and their expression characteristics under ammonia nitrogen stress were analyzed. The results show that the full-length cDNA of *Sc-GST σ* was 1 414 bp, and containing 639 bp open reading frame (ORF), encoding 212 amino acid polypeptides. The homology of amino acid sequence of *Sc-GST σ* with other species' GST amino acid sequence was 31.88%–43.40%. The full-length cDNA of *Sc-HSP90* was 2 752 bp, ORF was 2 181 bp, encoding 726 amino acids. The amino acid sequence was 76.77%–87.05% homology with other species. Quantitative analysis showed that *Sc-GST σ* and *Sc-HSP90* genes were expressed in all tested tissues, the strongest expression being in the digestive gland. After exposure to ammonia, the mRNA expression of *Sc-GST σ* and *Sc-HSP90* were significantly up-regulated ($p < 0.05$) in the digestive gland, indicating that ammonia stress induced stress response, both *GST* and *HSP90* may be participate the process of detoxification or defense. However, the decrease of expression in the later period of stress is presumed to be due to the organism have limited ability to defense, which is not enough to protect the host from stress-induced cell damage.

Key words: *Sinonovacula constricta*; *GST*; *HSP90*; ammonia nitrogen; expression characteristics