

瘤背石磺低频听力相关基因 *OrNXN* 克隆及表达分析

陈锡林, 钱畅, 肖海明, 饶榕城, 张小明, 沈和定

Cloning and expression analysis of *OrNXN* gene associated with low frequency hearing in *Onchidium reevesii*

CHEN Xilin, QIAN Chang, XIAO Haiming, RAO Rongcheng, ZHANG Xiaoming, SHEN Heding

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211203638>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

瘤背石磺磷脂酶C基因的克隆及在不同声波刺激下的表达

Cloning and expression of the phospholipase C gene in *Onchidium reevesii* under different frequency sound wave stimulation
上海海洋大学学报. 2022, 31(1): 29 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200803152>

凡纳滨对虾繁育相关基因 *Allatostatin-AR* 的克隆与表达分析

Cloning and expression of breeding- & development-related gene *Allatostatin-A receptor* from *Litopenaeus vannamei*
上海海洋大学学报. 2023, 32(1): 20 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503463>

三角帆蚌中 *WNT4* 基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*
上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

尼罗罗非鱼 *TIRAP* 基因克隆、组织表达及其在无乳链球菌、脂多糖和聚肌胞苷酸刺激下的免疫应答

Cloning and expression of *TIRAP* gene and immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*, lipopolysaccharides and polyinosinic polycytidylic acid stress
上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 857 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-318>

三角帆蚌 *KLHL10* 基因的特征和表达分析

Characterization and expression analysis of *KLHL10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*
上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 389 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402983>

瘤背石磺低频听力相关基因 *OrNXN* 克隆及表达分析

陈锡林^{1,2}, 钱 畅^{1,2}, 肖海明^{1,2}, 饶榕城^{1,2}, 张小明^{1,2}, 沈和定^{1,2}

(1. 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

摘 要: 从瘤背石磺不同频率声音基因转录组中将有显著差异表达的基因与 IMPC 人类听觉感知和耳聋相关基因对比发掘出与听力相关的基因 *NXN*。利用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆获得 *OrNXN* 基因 cDNA 全长序列, 并对其序列进行生物信息学分析; 利用实时定量 PCR(qPCR)技术分析 *OrNXN* 在瘤背石磺不同组织、不同声音频率及不同潮汐节点的表达水平。结果显示, *OrNXN* 基因 cDNA 全长为 1 593 bp, 开放阅读框长度为 432 bp, 共编码 143 个氨基酸, 相对分子质量为 15.57 ku; 结构域预测分析表明, *OrNXN* 含有 Thioredoxin 家族典型的硫氧还蛋白结构; 多序列比对以及进化树构建结果表明, *OrNXN* 与其他物种的相似度较高, 保守性较强; 荧光定量结果表明, 在瘤背石磺 7 个组织中 *OrNXN* 在肠、神经节、性腺和腹足中均有表达, 在肠中表达量最高, 其次为神经节。不同声音频率刺激下, *OrNXN* 在 200 和 50 Hz 处有差异表达, 在不同潮汐节点, *OrNXN* 表达量均不同, 表达量基本与潮汐水位变化一致。研究表明, *OrNXN* 可能在瘤背石磺参与感知潮汐节律时对潮汐发出的低频声音产生了响应。

关键词: 瘤背石磺; *OrNXN*; 基因筛选; 低频听力; 潮汐

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

瘤背石磺隶属软体动物门(Mollusca)腹足纲(Gastropoda)肺螺亚纲(Pulmonata)柄眼目(Stylommatophora)^[1], 广泛分布于我国江苏、上海、广州等东南沿海地区^[2]。瘤背石磺作为由海洋向陆地过渡的贝类生物, 在水下主要用表皮和鳃呼吸, 陆上用肺囊呼吸, 导致水下摄氧能力有限。野生瘤背石磺在海边栖息模式一般为潮水退去时出来摄食, 潮水即将上涨前返回栖息洞穴中规避海浪^[3], 具有准确感知潮汐水位的独特能力^[4], 因此, 有研究者^[5]提出瘤背石磺可以通过其特殊结构平衡囊和耳石感知潮汐产生的低频声音去准确规避潮水对自身生存环境所造成的威胁。然而, 对于瘤背石磺如何感知低频声音的相关研究却较少。

NXN 基因全名为核氧化还原蛋白基因, 于 1996 年被 KUROOKA 等^[6]首次发现并克隆所得。*NXN* 是一种氧化还原蛋白, *NXN* 含有 3 个硫氧还

蛋白结构域, 中心结构域包括 1 个催化活性的 WCPPC(Trp Cys Pro Cys)结构, 该结构参与靶蛋白中二硫键的氧化和还原^[6], 该结构最初是在细胞核中检测到的, 但后来主要定位于细胞质^[6-7]。最近的一项蛋白质组学研究发现, 在缺乏 *NXN* 的神经细胞中还原蛋白的比例较高, 研究^[8]表明缺乏 *NXN* 的神经细胞培养条件下, *NXN* 具有明显的氧化酶样活性。目前对 *NXN* 的研究主要集中于其在 WNT 信号通路中的作用^[9], *NXN* 借助氧化还原功能与 WNT 抑制剂 DVL 相互作用从而抑制 WNT 信号通路^[10-11]。*NXN* 参与调节的 WNT 信号通路调节胃肠上皮细胞的生理性自我更新^[12-13], 氧化还原稳态的丧失导致了多种胃肠道疾病的产生与恶化, 氧化还原信号在胃肠道生理和病理中起着重要作用^[14]。在小鼠体内胚胎期 *NXN* 基因的缺失导致颅骨缺陷以及畸形, 这说明 *NXN* 相比其他氧化还原蛋白具有独特功能, 在小

收稿日期: 2021-12-05 修回日期: 2022-03-05

基金项目: 协同创新中心任务团队经费项目(A1-3605-21-000202)

作者简介: 陈锡林(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为瘤背石磺低频听力基因筛选验证。E-mail:1075443268@qq.com

通信作者: 沈和定, E-mail:hdshen@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

鼠体内主要分布在脑和心脏,主要在海马神经元表达。最新研究^[15]发现 *NXN* 参与钙调激酶 Camk2 的相互作用,以维持 Camk2 的氧化状态,从而保持其活性。此外,*NXN* 支持其他突触和线粒体蛋白的氧化,以及线粒体自身呼吸。*NXN* 的促氧化功能缺陷会导致小鼠探索动力的丧失和奖励兴趣的降低,并且 *NXN* 缺陷的小鼠在社交、学习记忆方面均存在缺陷,小鼠的探索行为需要依赖 *NXN* 的氧化功能^[15]。有研究者^[8]利用缺失 *NXN* 的 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞,对神经源性细胞中受影响的生物学过程和分子功能进行分析,结果表明,*NXN* 在代谢途径、细胞形态和信号转导的氧化还原调节中具有多种功能。*NXN* 在结构和功能上都是特别的,但迄今为止对其结构和功能的研究很少。

无论是 *NXN* 基因还是瘤背石磺低频听力相关基因的筛选研究都很少,本文从小鼠表型数据库中选择与听觉脑干反应相关的基因,与 100、300、500 Hz 低频声音处理瘤背石磺转录组中具有显著差异表达的基因进行比对,进行关于低频声音的初步筛选,以获得瘤背石磺体内可能与声音相关的基因 *OrNXN*,并克隆其全长,以 qPCR 技术验证其在低频声音处理下是否有差异表达,并结合潮汐对其感知低频声音躲避潮水的功能进行探究。实验对贝类动物瘤背石磺进化发展中产生的独特低频声音感知能力进行初步探究,也为深入研究低频听力相关基因的进化做了铺垫。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2021 年 5 月从盐城采集瘤背石磺,于实验室内培养,每日浇水以防土壤干涸,每日定时投喂适量玉米粉,维持培养温度 25 °C,暂养 7 d 后取生物学表现健康,大小均匀的瘤背石磺进行实验。

1.2 候选基因法筛选低频声音相关基因

从本实验室曾进行低频声音处理转录组中筛选显著性差异的注释基因,对比 IMPC(国际小鼠表型分型协会 <https://www.mousephenotype.org/>)中与 ABR 类别相关的基因,包括影响小鼠与人类听觉感知和耳聋相关基因,共 289 个,通过 Excel 中 if count 算法筛得转录组中与声音刺激相关的具有显著差异的基因。

1.3 RNA 提取并反转 cDNA

使用 Trizol 法提取神经节、肝、肠、口器、性腺、背皮、腹足总 RNA,神经节构造如图 1 所示,取瘤背石磺完整神经节进行后续实验,通过 10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳以及 NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, US)紫外分光光度计测定各组织 RNA 质量浓度并分析纯度。使用 HiScriptRQRT SuperMix for qPCR (Vazyme, 美国)试剂按说明书操作反转录合成 cDNA, -20 °C 保存。

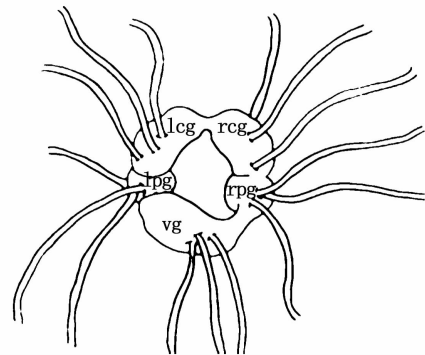


图 1 瘤背石磺神经环示意图^[16]

Fig. 1 The ganglion of *O. reevesii*^[16]

1.4 *OrNXN* 片段验证与克隆

从本实验室构建的瘤背石磺转录组文库中筛选获得注释为 *NXN* 基因的 unigene 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 *NXN*-1F/*NXN*-1R、Outer Primer、Inner Primer(表 1),*NXN*-1F/*NXN*-1R 按照上下游引物各 0.6 μL、cDNA 模板 0.8 μL、2 × SuperTaqMix (novoprotein, 苏州) 10 μL、ddH₂O 8 μL 普通 PCR 体系进行片段验证。参照生工 3'RACE、5'RACE 试剂盒(BBI 公司)的说明书,制备 5'RACE 和 3'RACE 模板。用巢式 PCR 对 3'和 5'进行扩增。获得 PCR 产物后,经过割胶回收试剂盒(天根,北京)回收目的条带,并与 pGEM-TEasy vector (Promega, 美国)进行连接,接着转化到感受态 DH5α 大肠杆菌细胞后涂布于含有氨苄的选择性培养基上, 37 °C 培养 16 ~ 24 h,经过和蓝白斑筛选后,选取白斑菌落,进行菌液 PCR 反应检测,挑取与目的片段一致的菌液送上海生工公司测序。

1.5 基因生物学分析

利用 NCBI ORFfinder 寻找序列中开放阅读框(ORF),在 predictprotein 上预测基因 *OrNXN* 编

码蛋白的二级结构, Swiss Model 建立蛋白三级结构模型, NCBI -Blast 比对同源性, <http://smart.embl-heidelberg.de/> 上查找蛋白结构域, ProtParam 上估测蛋白理化性质, MEGA X 构建进化树, bioedit 进行多重序列比对。

1.6 组织差异表达分析

选取 9 只健康有活力的瘤背石磺分成 3 个样品组, 每组 3 只瘤背石磺进行混样, 解剖取瘤背石磺的神经节、口器、肝、肠、性腺、背皮和腹足等 7 个组织进行 RNA 提取, 检测完 RNA 质量浓度及 OD 值合格后, 用 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) 试剂盒反转录 7 个组织

RNA 制备 cDNA, 运用 genscript 网站在线工具, 在 *OrNXN* 开放阅读框范围内设计荧光定量引物 RT-*NXN*-F 和 RT-*NXN*-R, 选择 β -actin 作为内参引物。荧光定量反应在 QuantStudio[™] 6 Flex (Thermo Scientific, US) 中进行, 按 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书配制 PCR 体系: $2 \times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, RT-*NXN*-F 0.4 μ L, RT-*NXN*-R 0.4 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。按照说明书三步法进行程序设置。得出基因的相对表达量使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>NXN</i> -IF	AACAAGAAGCAGCGAAGATGCC	PCR
<i>NXN</i> -IR	TTTCTCTACAGCGTAAGCA	PCR
<i>NXN</i> 5'RACE outer	ACCTCTCTCTCACTTCGGTCAAG	5'RACE
<i>NXN</i> 5'RACE inner	GCAGAGAAGTAGACGCCGATCACATC	5'RACE
<i>NXN</i> 3'RACE outer	ACCGAAGTGAGGAGGAGGTAAGA	3'RACE
<i>NXN</i> 3'RACE inner	GGCAAAGTCCAAAATGATCCCAACGG	3'RACE
RT- <i>NXN</i> -F	ACTACTTCAGCACCATGCCT	qRT-PCR
RT- <i>NXN</i> -R	CTGGTCTCCGTTGGGATCAT	qRT-PCR
β -actin-F	GTCCACCGCAAGTGCTTCT	qRT-PCR
β -actin-R	CGGTCGTGTTGTTTCATT	qRT-PCR

1.7 不同频率声音刺激下瘤背石磺 *OrNXN* 相对表达量检测

潮汐能发出 0 ~ 200 Hz 的声音^[17], 而一次潮汐高潮到低潮持续 6 h, 本实验使用 SA-SG020 型扫描信号发生器 (SHIAO, 无锡), SA-PA 功率放大器 (SHIAO, 无锡) 以 50、100、150 和 200 Hz 等 4 组不同频率的低频声音刺激瘤背石磺持续 6 h, 每个样本组 9 个样品, 3 个样品混样, 分为 3 个平行组, 样本放在贴有隔声海绵的泡沫培养箱中, 培养箱底部铺 3 cm 东海潮间带泥土, 保持室内温度 25 $^{\circ}$ C, 暂养 7 日以适应环境再进行实验。将每组 9 只瘤背石磺快速进行解剖, 取神经结组织后提取 RNA 反转 cDNA 保存, 以 qPCR 检测 *OrNXN* 基因在不同频率声音刺激后 6 h 的表达量, 反应体系、引物和反应程序与 1.5 节相同。得出基因的相对表达量使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有显著

性差异。

1.8 潮汐节律刺激下瘤背石磺 *OrNXN* 相对表达量检测

为探究瘤背石磺在潮汐刺激下低频听力相关基因 *OrNXN* 表达情况, 取 7 月当月最高潮水位即 7 月 25 日作为采样时期。在 7 月 25 日当日采样第 1 次高潮点 12:13, 落潮期 14:00、17:00, 低潮点 18:41, 涨潮期 20:00、22:00, 第 2 次高潮点 24:00 等 7 个时间点, 7 个潮汐时间点代表了 1 次完整潮汐。每个时间点取 9 只瘤背石磺, 分成 3 个样品组, 每个样品组 3 只瘤背石磺混样, 取其神经节, 使用 Trizol 法提取 RNA, 反转为 cDNA, 以 qPCR 检测 *OrNXN* 基因在潮汐节点刺激时的表达量, 反应体系、引物和反应程序与 1.5 节相同。得出基因的相对表达量使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 候选基因筛选

在 Excel 表中运用 count if 算法对比 2 个数据表间重复出现的基因,筛得与听觉感知相关并在声音处理后具有显著差异的 5 个基因:*CDIPT*、*RRBP1*、*NXN*、*HERC1*、*RAB10*。其中 *NXN* 在 ABR 实验中受到声音刺激的阈值最低,为 6 kHz。

2.2 *OrNXN* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列分析

RACE 所得 *OrNXN* 全长 1 593 bp,开放阅读框 ORF 长度为 432 bp,共编码 143 个氨基酸,5' 端非编码区长 171 bp,3' 非编码区长 990 bp(图 2)。使用 smart 网站在线工具预测蛋白的结构域,结果显示在蛋白序列中含有一个硫氧还蛋白结构(19~90 aa),包括 1 个催化活性的 WCPPC (Trp Cys Pro Cys) 结构,该结构参与靶蛋白中二硫键的氧化和还原,符合核氧化还原蛋白的特征(图 3)。GenBank 登录号为 OK563728。

通过 ExPASy ProtParam tool 在线工具预测 *OrNXN* 共编码 143 个氨基酸,等电点为 4.83,相对分子质量为 15.570 ku,带负电的残基总数(Asp + Glu)为 21 个、带正电的残基总数(Arg + Lys)为 15 个,天冬氨酸(Asp)与甘氨酸(Gly)含量最高,占比为 9.8% 和 10.5%(表 2)。分子式为 C703H1087N177O212S5,总原子数为 2 184 个,脂肪指数 83.65,平均亲水指数 -0.155,信号肽预测该蛋白质序列无信号肽,蛋白质二级结构中 α 螺旋和 β 折叠分别占 12.58% 和 26.57%(图 4),三级机构中同时含有螺旋与折叠(图 5)。

2.3 *NXN* 基因系统发育分析

NCBI 上对比 *OrNXN* 氨基酸序列获得相似序列,来自青翼海兔(*Elysia marginata*)、加州海兔(*Aplysia californica*)、鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、宙斯盾巨佩托螺(*Gigantopelta aegis*)、多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)、萼形柱珊瑚(*Stylophora pistillata*)、星状海葵(*Nematostella vectensis*)、柄海鞘(*Styela clava*)、棘冠海星(*Acanthaster planci*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)。通过 DNAMAN 将序列进行多重比对,发现具有高度同源性(图 6)。利用 MEGA 软件构建系统进化树,结果表明:瘤背石磺

和青翼海兔先合为一支,然后与光滑双脐螺合为一支,接着与加州海兔合为一大支;鸭嘴海豆芽和虾夷扇贝合并为一支;另一大分支包括鱼类、鸟类、两栖类。进化树结果显示瘤背石磺 *OrNXN* 蛋白的分子进化地位与其生物学分类一致(图 7)。

2.4 *NXN* 基因在瘤背石磺体内组织分布

本实验取瘤背石磺背皮、肠、肌肉、口器、神经节、性腺、腹足等 7 个组织的样本进行荧光定量 qPCR 检测 *OrNXN* 在组织间的分布情况(图 8),结果表明 *OrNXN* 基因在瘤背石磺肠内表达最高,神经节组织中表达量其次,性腺和腹足中也有表达,而背皮、肌肉和口器中表达量低($P < 0.05$)。

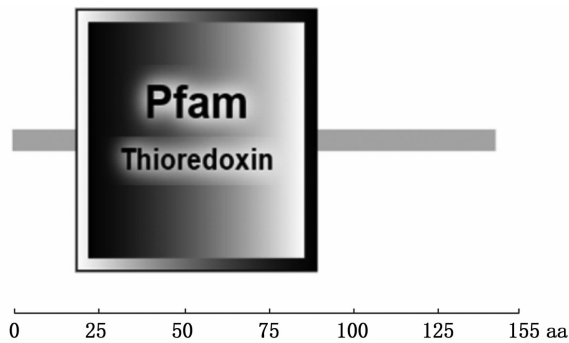
```

1      ttgagagtaaaagccctggtacaaccctcgtagggtgggaagtgtaaaagatcctaggtct
61     gtgctcgaagtctattcagcagttgtgccggtcgatagaatcaacaagtaggcctgatat
121    cagccatataagtgtaagcgtttacagatctaaacaagaagcagcgaagATGGCCAC
1      M A H
181    CTTGAAGCTTTGTTGGCAC TGAAGTCAT TGGAAAAGGATGGGGAAAGTGGCTGTTAGC
3      L E A L F G T E V I G K D G G N V A V S
241    TCACTAGCAGACAAAGATGTGATGGGTCTACTTCTCTGCCACTGGTGCCCTCCATGC
23     S L A D K D V I G V Y F S A H W C P P C
301    CGAGGATTCACCCAGCTCTGGGTGACTGCTACACAAAGTGACCAGTGCCGCAAGAAG
43     R G F T P A L G D C Y T K V T S A G K K
361    TTGGAGATCATCTTGTGTTAGTCTTGACCGAAGTGAAGGAGGGGTAAGACTACTTCAGC
63     L E I I F V S L D R S E E E G K D Y F S
421    ACCATGCCITGGCTTCTTTCGCCCTTTGATAGTGAOCGAAAGGAAAGTTCTTACCGATAAA
83     T M P W L L L P F D S D Q K E V L T D K
481    TTGGAACTCTAGGAATTCGCCCTGGTCTTATGATGCCAAGACGGGACCTCATC
103    F G I S G I P A L V L I D A K T G D L I
541    ACGAAGATGCTCGTGGCAAGTCCAAAATGATCCAAAGGAGACCAGTCCCATGGAAG
123    T K D G R G K V Q N D P N G D Q F P W K
601    TAAcctaggtcagctctatattagaattatttactcgtcagcagcagcgtttgcattggt
143    *
661    attatgttaagataaccagtgagtgattgttttccctttgtgtatgttgcacatcagt
721    gtgtctacctgtatgtttgtcctatcttttaacatcacataatgctgtgtttgtggaa
781    tccaatcaagatagtgtcagatattttacaggtgtgggagagctttatccaaaaaacat
841    acaaaaaacaaaaaacatgtgtttatgtctaatgctaccgctgaggagaaaaa
901    gaaaaacccaagagacaaaatcgttgatgtagctttccaatatacgtgcatgtgtta
961    gtagacatataatattagacagtgaaagatcagcatcttctgctcctgtctctgaaaaaga
1021   tggtcaaaaagagtgtaaaaaaatgttaataagaanaatgaccattgtgtgtgagtg
1081   ttgtgtatgagcagattctatcttttctaatttagccagcttctgtgtgtttatcc
1141   ttgttctctcaatggactactttttgaaaagtgatctcaattttgtccatgaattg
1201   cacaataaaactgattagatctgactttatgacacctctacataggtttctatatttctc
1261   tatgaattatagcactgtgagcattgtcttcttttaggatatacttaataatggtgag
1321   ttttttagcatttctcaggatgttcataataataactagactatgtaataacacgtgt
1381   tggctctatttattcatgaactttcaataccttatttgcaataattgttttctactgt
1441   gtgtgtatgtcagtggtgtgacataaattgttcacccccctctcgggaactagaca
1501   taaatgaccattttttctctacggtgtttttgtgtttttatcacaaccaggaaata
1561   aaacacatcagatgaaaaaa3333333333333333

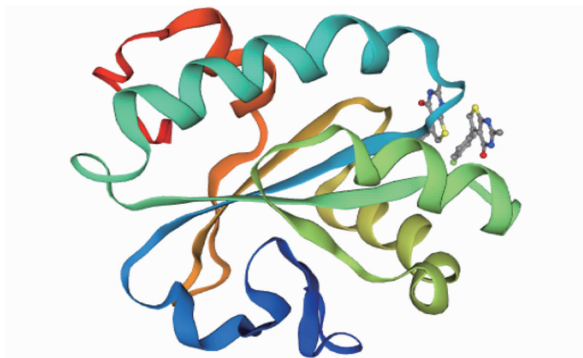
```

3'-UTR 和 5'-UTR 以小写字母标示,方框标出位置为起始密码子与终止密码子,加尾信号以双下划线标示,波浪线标出 poly-A 结构,红色字体为催化活性的 WCPPC 结构。3'-UTR and 5'-UTR are marked with lowercase letters, box positions for start and stop codons, and end signals is marked by double underscores while the poly-A structure is shown with wavy lines, the red font shows the catalytic activity of WCPPC structure.

图 2 *OrNXN* cDNA 完整序列以及编码氨基酸序列
Fig.2 Full cDNA length and encoded amino acid sequence of *OrNXN* gene

图3 *OrNXN* 的蛋白结构域分析Fig. 3 Protein domain analysis of *OrNXN*

图中红色部分表示 α 螺旋, 蓝色部分表示 β 折叠。
Alpha helices are shown in red and beta folds are shown in blue.

图4 *OrNXN* 的二级结构预测Fig. 4 Secondary structure prediction of *OrNXN*图5 *OrNXN* 的三级结构预测Fig. 5 Tertiary structure prediction of *OrNXN*

2.5 *OrNXN* 基因在低频声音刺激下表达差异

以 50、100、150 和 200 Hz 等 4 种频率低频声音持续刺激瘤背石磺 6 h, 结果显示: 瘤背石磺 *OrNXN* 基因在 50 和 200 Hz 频率下刺激 6 h 表达量显著增高(图 9); 100 与 150 Hz 频率下 *OrNXN* 基因的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.6 *NXN* 基因在不同潮汐时间点表达差异

第一次高潮时(12:13)潮水高度为 435 cm, 低潮点(18:41)时潮水位置为 53 cm(图 10), 荧光定量结果显示 *OrNXN* 表达量随着潮水涨潮落差呈现基本一致的趋势(图 11), 在 12:13 高潮点

时表达量最高 ($P < 0.05$), 14:00 落潮点时表达量显著下降 ($P < 0.05$), 在低潮点 18:41 左右表达量降低到底部 ($P < 0.05$), 最高表达量约为最低点的 35 倍; 在 17:00 ~ 20:00 潮水位低于 120 cm, 基因表达量都显著降低 ($P < 0.05$)。随着潮水上涨, *OrNXN* 表达量逐渐升高 ($P < 0.05$), 至 24:00 高潮点, 表达再次升高 ($P < 0.05$)。

表 2 瘤背石磺 *OrNXN* 编码蛋白的氨基酸成分Tab. 2 Amino acid composition of *Onchidium reevesii OrNXN* protein

氨基酸 Amino acid	含量 Content/(g/N)	百分比 Percentage/%
Ala (A)	9	6.3
Arg (R)	3	2.1
Asn (N)	3	2.1
Asp (D)	14	9.8
Cys (C)	3	2.1
Gln (Q)	3	2.1
Glu (E)	7	4.9
Gly (G)	15	10.5
His (H)	2	1.4
ILE (I)	8	5.6
Leu (L)	13	9.0
Lys (K)	12	8.4
Met (M)	2	1.4
Phe (F)	8	5.6
Pro (P)	8	5.6
Ser (s)	9	6.3
Thr (T)	8	5.6
Trp (W)	3	2.1
Tyr (Y)	3	2.1
Val (V)	10	7.0
Pyl (O)	0	0.0
Sec (U)	0	0.0

3 讨论

此前就有研究者^[18]利用小鼠表型数据库对比筛选不同菊头蝠亚种之间听力频率变异相关基因, 通过转录组与小鼠表型数据库联合筛选数据, 得出与瘤背石磺听力相关的基因, 结果来源更加可靠, 并且候选数据多, 能为后续瘤背石磺低频听力相关研究提供更多思路。

本文克隆了瘤背石磺 *OrNXN* 基因全长 1 593 bp, ORF 框内共有 143 个氨基酸, 蛋白结构预测显示其中包含 *NXN* 特有的硫氧还蛋白结构域, 中心结构域包括一个具有催化活性的 WCPPC 结构。同源比较和进化树结果均表明, *OrNXN* 与青翼海兔、加州海兔、光滑双脐螺氨基酸序列相似

度高,在进化树位置相近合为一支,说明 *NXN* 基因在软体动物体内保守。

组织定量结果显示, *OrNXN* 基因在肠组织内表达量最高, *NXN* 参与调节胃肠上皮细胞更新,同时 *NXN* 氧化功能的缺失导致肠胃内疾病的发生与恶化^[14],瘤背石磺作为潮间带的偏植食性的杂食动物并且吞食量大,摄食与排泄可同时进行,这需要胃肠道具有强大的氧化还原功能以及稳定的环境做支撑^[19]。此前研究^[15]显示在成年小鼠大脑皮质、小脑、海马和脑室下区域以及在周围神经系统感觉神经节和神经中 *NXN* 皆高表达,与本文中定量结果一致,瘤背石磺长期处于潮间带,感觉神经对潮水产生的低频听力敏感,

OrNXN 在神经节中的高表达符合其参与低频听力感知之推论。有研究者利用吗啉诺反义寡核苷酸(MO)注射非洲爪蟾以下调 *NXN* 的表达,导致非洲爪蟾头部畸形^[20],而 *NXN* 缺陷的小鼠头部发育也畸形^[21],上述研究表明, *NXN* 对大脑发育至关重要,因此 *OrNXN* 在神经节内的高表达也印证 *OrNXN* 参与瘤背石磺神经节的早期发育与形成。此外, *NXN* 在神经节中的高表达量与 *NXN* 参与调控神经细胞生理活动有直接关系, *NXN* 支持其他突触和线粒体蛋白的氧化,低频听力刺激作为外界信号直接影响突触蛋白活动, *NXN* 在神经节中高表达显示 *OrNXN* 或参与瘤背石磺低频听力感知。

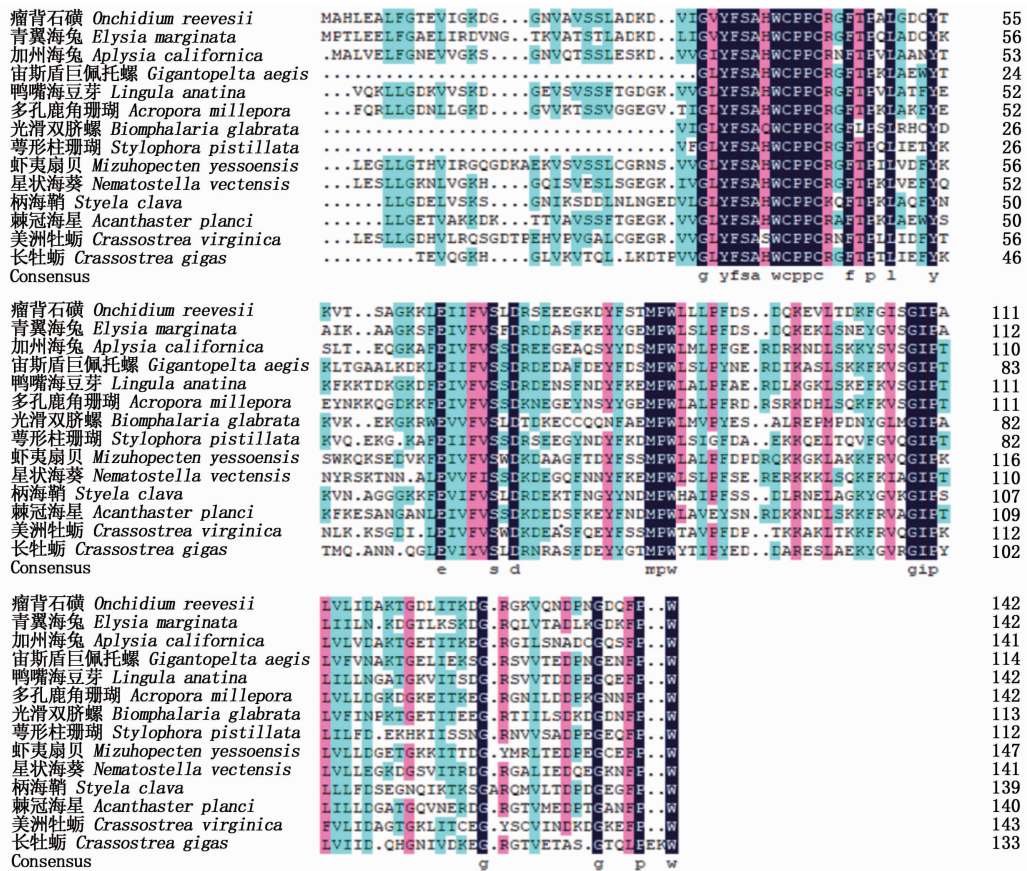


图 6 瘤背石磺 *OrNXN* 与其他物种 *NXN* 氨基酸序列对比

Fig. 6 Amino acid sequence comparison between *Onchidium reevesii OrNXN* and *NXN* of other species

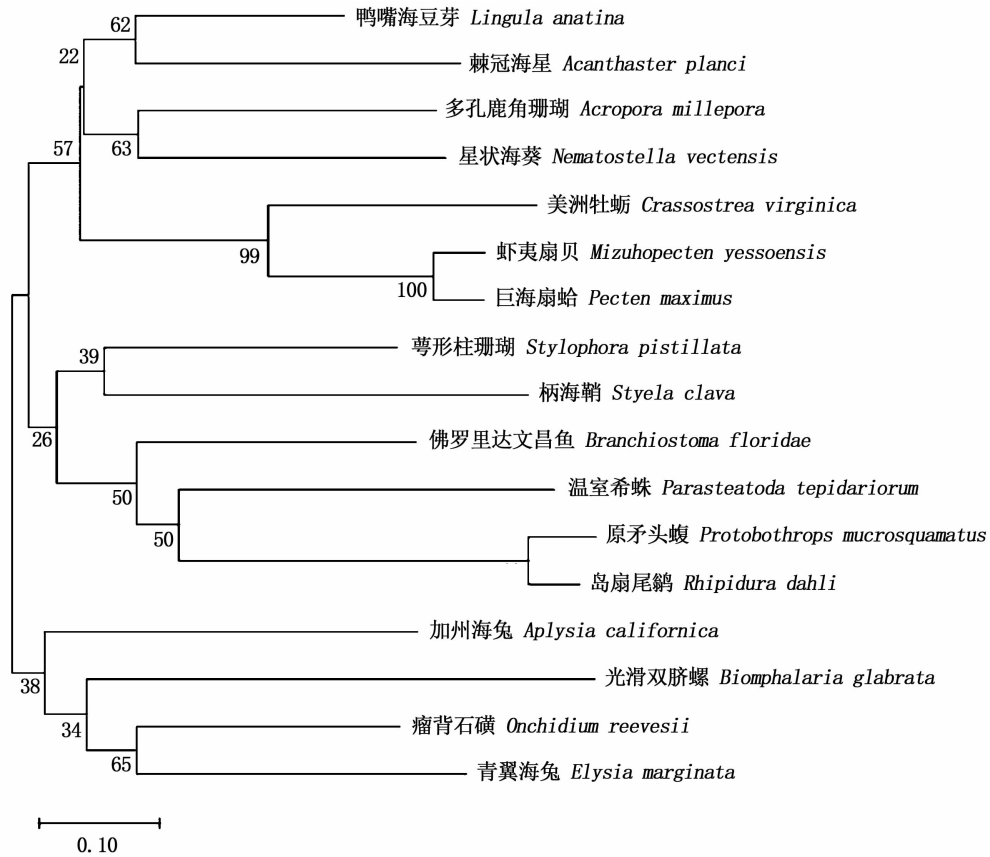
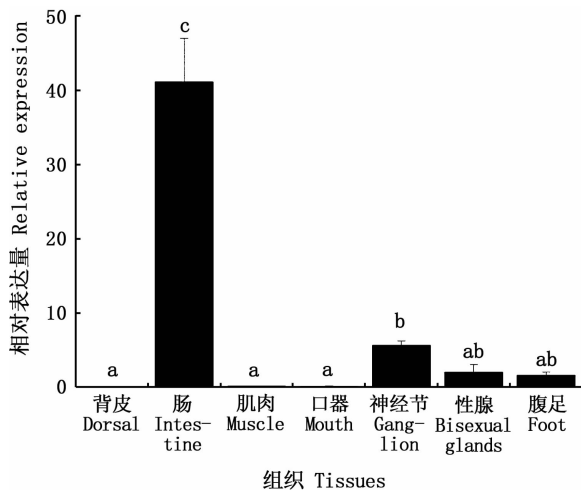


图 7 *OrNXN* 氨基酸序列进化树

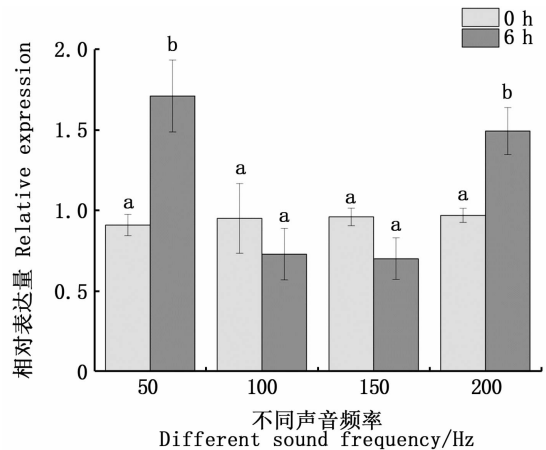
Fig. 7 Amino acid sequence alignment tree of *OrNXN*



图中不同小写字母代表处理组之间差异性显著 ($P < 0.05$)。Difference of lowercase letters in the figure indicates that there are significant differences between the treatment groups ($P < 0.05$).

图 8 *OrNXN* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *OrNXN* gene in different tissues



图中不同小写字母代表处理组之间差异性显著 ($P < 0.05$)。Difference of lowercase letters in the figure indicates that there are significant differences between the treatment groups ($P < 0.05$).

图 9 *OrNXN* 基因在不同频率低频声音刺激下的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of *OrNXN* gene under different frequencies of low frequency sound stimulation

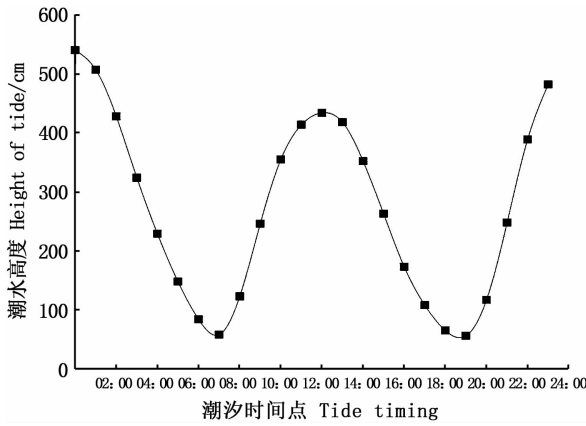
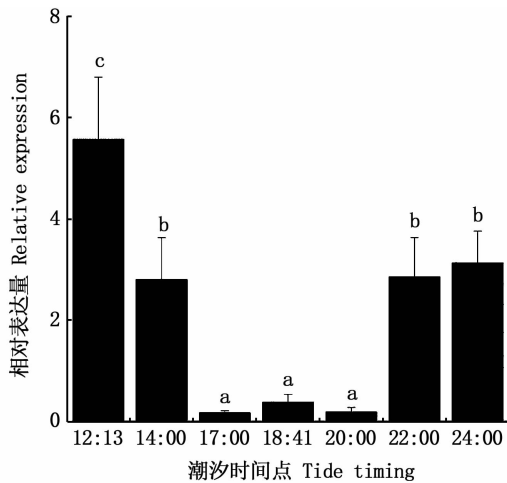


图 10 芦潮港 2021 年 7 月 25 日潮位变化图
Fig. 10 Tide changes of Luchaogang on July 25, 2021



图中不同小写字母代表处理组之间差异性显著 ($P < 0.05$)。Difference of lowercase letters in the figure indicates that there are significant differences between the treatment groups ($P < 0.05$).

图 11 *OrNXN* 基因在不同潮汐时间点刺激下的相对表达量
Fig. 11 Relative expression levels of *OrNXN* gene at different tidal timing

低频声音刺激结果表明 *OrNXN* 基因在 50 和 200 Hz 下表达量有显著升高,瘤背石磺在响应低频声音的刺激时,突触及线粒体蛋白氧化呼吸加剧,影响 *OrNXN* 的表达。前人研究^[22]发现 *NXN* 通过维持 Camk2 的氧化状态,从而保持其活性,而 Camk2 主要定位于突触后部位和树突棘,参与神经元可塑性的功能和结构形式。长期潮汐低频声音刺激下,瘤背石磺体内神经元可塑性改变,形成与低频听力相联系的长期记忆。低频听力条件触发时,长时程增强效应通过 Camk2 间接使得 *OrNXN* 的表达量发生变化。*NXN* 基因参与

生物大脑早期发育过程,瘤背石磺在早期发育过程中形成具有特殊听觉功能的耳石^[5],*NXN* 可能参与瘤背石磺耳石的发育与功能的形成。也有研究表明,*NXN* 与 PP2A 相互作用并影响其活性^[23],而 PP2A 是哺乳动物细胞响应外界信号的主要调节因素^[24],*NXN* 通过 PP2A 参与哺乳动物细胞响应外界信号,而在软体动物瘤背石磺体内,*NXN* 也对 50 和 200 Hz 两个特殊频率产生响应,证明 *OrNXN* 可能参与瘤背石磺对低频声音信号的响应。

不同潮汐节点下,瘤背石磺 *OrNXN* 相对表达量与潮水呈现基本一致的趋势,低潮点时 *OrNXN* 显著降低,高潮点 *OrNXN* 表达量升至最高,故推测 *OrNXN* 在潮汐胁迫下主要参与感知潮汐功能,潮汐发出的声音为 0 ~ 200 Hz 的低频声音,瘤背石磺感知潮汐的功能可能是由于感知到潮汐发出低频声音。此前有研究表明 *OrNXN* 在视网膜和松果体内有高表达^[25],瘤背石磺体表也分布着背眼,能感受到光信号^[3],夜晚 24:00 高潮水位为 526 cm,白天 12:35 时高潮水位为 435 cm,低于夜晚水位,而夜晚 *OrNXN* 的表达量却低于白天,可能是由于 *OrNXN* 在松果体感光细胞内参与光信号的处理,受光信号刺激产生不同表达,这与之前在小鼠体内 *NXN* 的感光性研究结果一致^[26]。

本实验从瘤背石磺不同声音频率刺激转录组中利用比较转录组法筛选 *OrNXN* 基因并进行全序列克隆、蛋白质结构分析、系统进化树比较以及低频声音与潮汐刺激表达水平的分析。结果显示,瘤背石磺 *OrNXN* 基因的结构存在 WCPPC 结构,并在对应编码的氨基酸序列中第 19 位至 90 位之间存在硫氧还蛋白结构。系统进化树显示,瘤背石磺 *OrNXN* 基因与青翼海兔、加州海兔、光滑双脐螺合并为一支,符合形态学分类。荧光定量结果显示:*OrNXN* 基因在瘤背石磺肠组织中的表达量最高,推测可能参与胃肠道氧化还原以及肠道上皮更新反应;在神经节中的高表达可能是由于 *OrNXN* 参与神经细胞的发育并在神经节中参与响应低频听力信号;不同频率声音刺激与潮汐刺激下的表达揭示了 *OrNXN* 基因对外界低频听力信号的响应。本实验为探究海洋软体动物在两栖进化过程中对环境的适应过程提供分子依据。

参考文献:

- [1] SHEN H D, LI K, CHEN H C, et al. Experimental ecology and hibernation of *Onchidium struma* (Gastropoda; Pulmonata: Systellommatophora) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2011, 396(2): 71-76.
- [2] 黄金田, 王爱民. 瘤背石磺营养成分分析及品质评价[J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 29-35.
HUANG J T, WANG A M. Determination of the nutrients of *Onchidium struma* and evaluation of its quality[J]. Marine Sciences, 2008, 32(11): 29-35.
- [3] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海4种石磺形态学比较[J]. 动物学杂志, 2010, 45(6): 92-100.
WU X F, SHEN H D, WU W J, et al. Comparison on morphology of Onchidiidae in eastern coast of China [J]. Chinese Journal of Zoology, 2010, 45(6): 92-100.
- [4] XU G, YANG T Z, SHEN H D. Effect of circadian clock and light-dark cycles in *Onchidium reevesii*: Possible implications for long-term memory [J]. Genes, 2019, 10(7): 488.
- [5] 刘深泉, 范涛. 海若螺平衡囊神经系统的混沌特性[J]. 医用生物力学, 2006, 21(1): 38-42.
LIU S Q, FAN T. Chaos property of statocyst systems of Clione [J]. Journal of Medical Biomechanics, 2006, 21(1): 38-42.
- [6] KUROOKA H, KATO K, MINOGUCHI S, et al. Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin [J]. Genomics, 1997, 39(3): 331-339.
- [7] FUNATO Y, MIKI H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2007, 9(8): 1035-1057.
- [8] URBAINSKY C, NÖLKER R, IMBER M, et al. Nucleoredoxin-dependent targets and processes in neuronal cells [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 4829872.
- [9] KORSWAGEN H C. Regulation of the Wnt/ β -catenin pathway by redox signaling [J]. Developmental Cell, 2006, 10(6): 687-688.
- [10] FUNATO Y, MICHIEU T, ASASHIMA M, et al. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt- β -catenin signalling through dishevelled [J]. Nature Cell Biology, 2006, 8(5): 501-508.
- [11] FUNATO Y, MICHIEU T, TERABAYASHI T, et al. Nucleoredoxin regulates the Wnt/planar cell polarity pathway in *Xenopus* [J]. Genes to Cells, 2008, 13(9): 965-975.
- [12] VAN DER FLIER L G, CLEVERS H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium [J]. Annual Review of Physiology, 2009, 71: 241-260.
- [13] BJERKNES M, CHENG H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse [J]. American Journal of Anatomy, 1981, 160(1): 65-75.
- [14] PÉREZ S, TALÉNS-VISCONTI R, RIUS-PÉREZ S, et al. Redox signaling in the gastrointestinal tract [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 104: 75-103.
- [15] TRAN B N, VALEK L, WILKEN-SCHMITZ A, et al. Reduced exploratory behavior in neuronal nucleoredoxin knockout mice [J]. Redox Biology, 2021, 45: 102054.
- [16] 黄笑含. 瘤背石磺低频听力基因的克隆验证及其潮汐感知能力的初步探究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
HUANG X H. Cloning and verification of low-frequency hearing gene and preliminary exploration of tide-sensing ability in *Onchidium reevesii* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [17] THORNE P D. Laboratory and marine measurements on the acoustic detection of sediment transport [J]. The Journal of the Acoustical Society of America, 1986, 80(3): 899-910.
- [18] WANG J Y, ZHAO A, SUN H J. The complete mitochondrial genome of the least horseshoe bat (*Rhinolophus pusillus*) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(1): 881-882.
- [19] 沈和定, 李家乐, 张缓溶. 石磺的生物学特性及其增殖前景分析[J]. 中国水产, 2004(1): 60-63.
SHEN H D, LI J L, ZHANG H R. Biology characteristics and enhancement foreground of *Onchidium verruculatum* cuvier [J]. China Fisheries, 2004(1): 60-63.
- [20] FUNATO Y, MIKI H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin [J]. Free Radical Research, 2010, 44(4): 379-388.
- [21] BRAULT V, MOORE R, KUTSCH S, et al. Inactivation of the (β)-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development [J]. Development, 2001, 128(8): 1253-1264.
- [22] STEPHENSON J R, WANG X H, PERFITT T L, et al. A novel human CAMK2A mutation disrupts dendritic morphology and synaptic transmission, and causes ASD-related behaviors [J]. Journal of Neuroscience, 2017, 37(8): 2216-2233.
- [23] LECHWARD K, SUGAJSKA E, DE BAERE I, et al. Interaction of nucleoredoxin with protein phosphatase 2A [J]. FEBS Letters, 2006, 580(15): 3631-3637.
- [24] HUNTER T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling [J]. Cell, 1995, 80(2): 225-236.
- [25] SAHEL J A, LÉVEILLARD T, PICAUD S, et al. Functional rescue of cone photoreceptors in retinitis pigmentosa [J]. Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2013, 251(7): 1669-1677.
- [26] WOLLOSCHKE T, KUNST S, KELLEHER D K, et al. Transcriptional regulation of nucleoredoxin-like genes takes place on a daily basis in the retina and pineal gland of rats [J]. Visual Neuroscience, 2015, 32: E002.

Cloning and expression analysis of *OrNXN* gene associated with low frequency hearing in *Onchidium reevesii*

CHEN Xilin^{1,2}, QIAN Chang^{1,2}, XIAO Haiming^{1,2}, RAO Rongcheng^{1,2}, ZHANG Xiaoming^{1,2}, SHEN Heding^{1,2}

(1. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The genes with significantly different expressions were selected from the different frequency sound gene transcriptomes of *Onchidium reevesii*. We compared these genes with the genes related to human auditory perception and deafness in IMPC, and the hearing-related gene *NXN* was discovered. The cDNA sequence of *OrNXN* gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, and the sequence was analyzed by bioinformatics; real-time quantitative PCR (qPCR) technology was used to analyze the relative expression in different tissues, different frequency sounds, and different tide nodes. The results show that the length of *OrNXN* is 1 593 bp with 432 bp of open reading frame. *OrNXN* protein is encoded by 143 amino acids. The molecular mass of *OrNXN* is 15.57 ku. Domain prediction analysis shows that *OrNXN* contains a typical sulfur redox protein structure of the Thioredoxin family. The results of multiple sequence alignment and the phylogenetic tree construction showed that *OrNXN* has high similarity with other species. The qPCR results show that *OrNXN* is expressed in the intestine, ganglia, gonads and gastropods of *O. reevesii*. The expression is highest in the intestine, followed by ganglia. *OrNXN* is expressed differently at 200 and 50 Hz under different sound frequency stimulation. The relative expression level of *OrNXN* is different at different tidal nodes, and it basically changes with the tide water level. Studies have shown that *OrNXN* may respond to the low-frequency sound emitted by the tide when *O. reevesii* senses the tidal node rate.

Key words: *Onchidium reevesii*; *OrNXN*; gene screening; low frequency listening; tide