

文章编号: 1674-5566(2024)02-0308-09

DOI: 10.12024/jsou.20230504188

暗纹东方鲀组织内 TTX 含量与钠离子通道基因表达特征分析

王婧^{1,2}, 王润^{1,3}, 林梦娇^{1,3}, 王亚宁^{3,4}, 鲍宝龙^{1,2}, 龚小玲^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 4. 青岛大学 生命科学学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 为了探究暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)组织内河鲀毒素(Tetrodotoxin, TTX)含量与含毒组织电压门控钠离子通道基因表达特征。分别采用酶联免疫法(ELISA)测定暗纹东方鲀肝脏、心脏等8个组织 TTX 含量, 实时荧光定量(RT-qPCR)方法检测电压门控钠离子通道 α 亚基因家族成员 *scn1aa*, *scn1ab*, *scn4aa*, *scn4ab*, *scn5aa*, *scn5ab*, *scn8aa*, *scn8ab* (以下简称“电压门控钠离子通道基因”)在各组织中的相对表达特征。结果显示: 各组织中 TTX 含量由高到低为脑(9.521±2.816) $\mu\text{g/g}$ 、心脏(4.271±1.129) $\mu\text{g/g}$ 、鳃(1.586±0.527) $\mu\text{g/g}$ 、肌肉(1.494±0.938) $\mu\text{g/g}$ 、肝脏(0.913±0.206) $\mu\text{g/g}$ 、皮肤(0.902±0.235) $\mu\text{g/g}$ 、肠道(0.894±0.215) $\mu\text{g/g}$ 和眼(0.864±0.287) $\mu\text{g/g}$, 脑、心脏组织为弱毒性, 肝脏、皮肤、肌肉、眼、肠道、鳃组织为微毒性。RT-qPCR 结果显示 *scn1aa*, *scn1ab*, *scn4ab*, *scn5aa*, *scn5ab*, *scn8aa*, *scn8ab* 基因均在肝脏组织的相对表达量最高, *scn4aa* 基因仅在肌肉组织表达, 皮肤组织仅有 *scn4ab* 基因表达, 且 *scn4ab* 基因在所有检测组织中均有表达, 表达具有广泛性。钠离子通道基因在斑马鱼和暗纹东方鲀组织表达特征存在差异。

关键词: 暗纹东方鲀; 电压门控钠离子通道; 河鲀毒素; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)隶属于鲀形目(Tetraodontiformes)鲀科(Tetraodontidae)东方鲀属(*Takifugu*)^[1], 主要分布在中国近海(东、黄、渤海)和长江中下游, 属江海洄游性鱼类, 春季亲鱼自海逆河产卵, 幼鱼在长江、湖泊中肥育, 翌年春入海^[2]。河鲀毒素(Tetrodotoxin, TTX)是一种毒性很强的小分子非蛋白神经类毒素, 在自然界广泛存在^[3-4], TTX在暗纹东方鲀体内的分布具有组织差异, 含量也与发育阶段和生活环境密切相关^[5-8]。

电压门控钠离子通道(Voltage-gated sodium channel, Nav/scn)是一类位于细胞膜表面, 由1个 α 亚基、1个或2个 β 亚基组成的跨膜蛋白^[9-10], α 亚基是电压门控钠离子通道基因的主要结构, 也是行使基本功能的单位^[11], 电压门控钠离子通道 α 亚基的4个同源结构域围绕形成一个供钠离子

通过的孔道, TTX能特异性与该孔道结合, 阻碍钠离子内流, 抑制动作电位的去极化和传导^[12], 导致机体因呼吸和心脏血管衰竭死亡^[13]。电压门控钠离子通道基因家族在硬骨鱼类中包含8个同源成员(*scn1aa*, *scn1ab*, *scn4aa*, *scn4ab*, *scn5aa*, *scn5ab*, *scn8aa* 和 *scn8ab*)^[14], 依据对河鲀毒素的敏感性, 分为 TTX 敏感型(TTX-sensitive)和 TTX 耐受型(TTX-resistant)^[15]。但在鲀毒鱼类已发现部分电压门控钠离子通道基因序列在孔道区域发生氨基酸的取代, 使 TTX 结合难度提升, 从而形成对 TTX 的抗性^[14, 16]。电压门控钠离子通道基因家族在哺乳动物^[17]和斑马鱼中表达具有组织特异性, 目前对电压门控钠离子通道基因在鲀毒鱼类含毒组织中的表达特征的研究较少。

本研究以暗纹东方鲀为研究对象, 采用酶联免疫法(ELISA)测定暗纹东方鲀各组织中 TTX 含

收稿日期: 2023-05-20 修回日期: 2023-05-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872546, 32170514)

作者简介: 王婧(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: wjaimz1112@163.com

通信作者: 龚小玲, E-mail: xlgong@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>

量,实时荧光定量(RT-qPCR)方法检测电压门控钠离子通道基因家族在各组织的相对表达特征,分析各组织 TTX 含量与电压门控钠离子通道基因表达特征,以期为东方鲀属鱼类耐受 TTX 机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验所用野生暗纹东方鲀 2022 年 12 月采自江苏省南通市,共采集 20 尾,平均体长(21.595±0.791) cm,平均体质量(252.034±21.916) g。活体运回实验室,随机选取 10 尾进行解剖,各取 2 份肝脏、皮肤、肌肉、心脏、眼、脑、肠道、鳃组织(由于无法分辨雌、雄,故没有提取性腺)放至 2 mL 的无酶离心管中,1 份-20 °C 冰箱保存,用于河鲀毒素的检测,1 份液氮速冻后置于-80 °C 冰箱保存,用于总 RNA 提取。

1.2 各组织 TTX 含量的测定

将各组织称重,按 1:4 比例加入生理盐水(不足 0.25 g 的组织加入 1 mL),使用全自动样品快速研磨仪破碎组织,4 °C 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为待测样品。使用河鲀毒素(TTX) ELISA 检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-9530701),检测肝脏、皮肤、肌肉、心脏、眼、脑、肠道、鳃组织中河鲀毒素含量,单位为每克组织中 TTX 含量(μg)。

1.3 各组织电压门控钠离子通道基因的表达

1.3.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 Trizol 法提取 3 尾暗纹东方鲀各组织的总 RNA,使用 Pultton 微量核酸浓度仪测定 RNA 浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,并使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)(诺唯赞,货号:R312)合成 cDNA。

1.3.2 电压门控钠离子通道 α 亚基序列获取与验证

暗纹东方鲀电压门控钠离子通道基因仅有 *scn4aa* DNA 序列已公布(ON262318.1),其余 7 条序列未知。在 CNGBdb 数据库获得暗纹东方鲀全基因组拼接序列(登录号:CNA0013723),使用同源预测(Homology-based prediction)的方法对暗纹东方鲀电压门控钠离子通道基因进行注释,将序列阅读档案(Sequence read archive, SRA)数据

库获得的暗纹东方鲀无基因结构注释的全基因组序列(登录号为 SRR7081561 和 SRR10127925)作为补充数据,对注释得到的序列进行校准,获得其余 7 条电压门控钠离子通道基因预测序列。

依据预测序列,使用 Primer 5.0 软件设计电压门控钠离子通道基因约 2 000 bp 长度的引物,引物由青岛擎科生物技术有限公司合成(表 1)。使用各组织混合 cDNA 模板进行 PCR 扩增。总体体系为 20 μL:PCR Mix (TaKaRa, 货号:KMM-201) 10 μL, F 1 μL(10 μmol/L), R 1 μL(10 μmol/L), cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,59 °C 退火 5 s,68 °C 延伸 30 s,35 个循环。PCR 产物进行凝胶电泳检测,将条带大小与目的片段一致片段切下,使用胶回收试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:DC301)进行回收纯化。纯化后的产物连接到 T 载体中,转入 Trans1-T1 感受态细胞(北京全式金生物科技股份有限公司,货号:CD201)中,冰浴 30 min 后 42 °C 热激 30 s,置于冰上 2 min 后加入 500 μL 无抗 LB 培养基,37 °C 摇床摇菌 1 h,取 200 μL 菌液于超净工作台中涂板(含 Amp 抗生素),培养过夜。次日,挑单克隆并进行菌液 PCR 验证,将条带大小符合预期的送青岛擎科生物技术有限公司测序。

1.3.3 实时荧光定量检测基因表达

依据测序序列,使用 Primer 5.0 软件设计各基因特异性引物,用于定量研究(青岛擎科生物技术有限公司合成,表 1)。扩增体系参照诺唯赞荧光定量试剂盒(20 μL):10 μL ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:Q711),1 μL cDNA,0.8 μL 基因特异性引物(10 μmol/L),8.2 μL 无酶水,每个样品设 3 个重复。反应在 ABI 7500 Fast 平台进行,反应程序:95 °C 预变性 30 s,两步法(95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环);反应结束后绘制熔解曲线以确保扩增的特异性和准确性。以 *β-actin* 为内参进行 RT-qPCR 分析。利用 2^{-ΔΔC_t} 方法计算各基因的相对表达量。

1.4 数据分析

TTX 含量数据以平均值±标准差(Mean±SD)在表格中显示,使用 Origin 2022 软件绘制标准曲线,采用 SPSS 17.0 软件对 TTX 含量和荧光定量

PCR生成的数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异显著,字母相同代表组间不存在显著性差异。

表1 本研究中所使用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	目的 Purpose
<i>scn1aa-af</i>	GCTCTGTTCCAGTCCGTGAA	ORF verification
<i>scn1aa-ar</i>	CATGCCAACACATTTGCCA	
<i>scn1ab-af</i>	CAGCAAGTACCCTGTGGAGG	ORF verification
<i>scn1ab-ar</i>	ATCTTCAGCAAGCACTCCCC	
<i>scn4ab-af</i>	CGTTTGAGGGAATGAGGCT	ORF verification
<i>scn4ab-ar</i>	CATGTTGACCACGACCAGGA	
<i>scn5aa-af</i>	GGAAGCCAGGTCAGCATCTT	ORF verification
<i>scn5aa-ar</i>	TCAGATCGCCGTCTTCATCG	
<i>scn5ab-af</i>	GACTGAGGAGTTCAACGGCA	ORF verification
<i>scn5ab-ar</i>	GTCAAGCCAGCACCAGTAGT	
<i>scn8aa-af</i>	CATTCCGATTGCTGCGAGTG	ORF verification
<i>scn8aa-ar</i>	GCGCCACATTGTCAAAGTT	
<i>scn8ab-af</i>	CGCCAAGACCTTCCTCATCT	ORF verification
<i>scn8ab-ar</i>	GACACACCAACAGCACGTTT	
β -actin- <i>qf</i>	GAGCGTGGTACTCCTTCAC	RT-qPCR
β -actin- <i>qr</i>	CCATCTCTGCTCGAAGTCC	
<i>scn1aa-qf</i>	AGCTCCTCAGACGCCTCTAA	RT-qPCR
<i>scn1aa-qr</i>	GCTGTCCTGGGACTCCAATT	
<i>scn1ab-qf</i>	TCATGGGCGTCAACCTCTTC	RT-qPCR
<i>scn1ab-qr</i>	GCGGACACTCTCGTTAACCA	
<i>scn4aa-qf</i>	CCCTTCCAAGAACCCGTTGA	RT-qPCR
<i>scn4aa-qr</i>	GACGCTTCTCTTCGCTCTGA	
<i>scn4ab-qf</i>	TGCTCTGATCGAGGAAACT	RT-qPCR
<i>scn4ab-qr</i>	ACATCTCTGGAATCCACCGC	
<i>scn5aa-qf</i>	AACGGAGGGACTGATAGCCT	RT-qPCR
<i>scn5aa-qr</i>	AGGAAGGTGGTGAGGACACT	
<i>scn5ab-qf</i>	CTGCTTCGTGTCTTTAAGCTGG	RT-qPCR
<i>scn5ab-qr</i>	GATGAAAACGATGATGCGGAGG	
<i>scn8aa-qf</i>	CACCTGTTCTGATTGTCTTCC	RT-qPCR
<i>scn8aa-qr</i>	TTCAAAAACCACCAAGTTTCCGA	
<i>scn8ab-qf</i>	GTAAGATAGCCCCGTCTGTC	RT-qPCR
<i>scn8ab-qr</i>	TGCAGTCCCACATGGTTTCA	

2 结果

2.1 各组织 TTX 含量

使用 ELASACalc 软件,以标准品浓度作横坐标,对应 450 nm 处的吸光值作纵坐标,使用四参拟合方程,绘制 TTX 标准曲线(图 1)。暗纹东方鲀的肝脏、皮肤、肌肉、心脏、眼、脑、肠道、鳃等组织均检测出河鲀毒素,脑组织中 TTX 含量最

高,为 9.521 $\mu\text{g/g}$;其次为心脏(4.271 $\mu\text{g/g}$),TTX 含量从高到低依次为脑>心脏>鳃>肌肉>肝脏>皮肤>肠道>眼,最高和最低的组织间相差 11.1 倍(表 2)。按 $< 10 \text{ MU/g}$ (MU:鼠单位;1 MU 相当于约 0.2 μg 的 TTX)为微毒性;10~100 MU/g 为弱毒性; $> 100 \text{ MU/g}$ 为剧毒性^[18-19]。对各组织的毒性进行划分,本批次检测的暗纹东方鲀脑、心脏组织为弱毒性,肝脏、皮肤、肌肉、眼、肠道、鳃组织为微毒性。

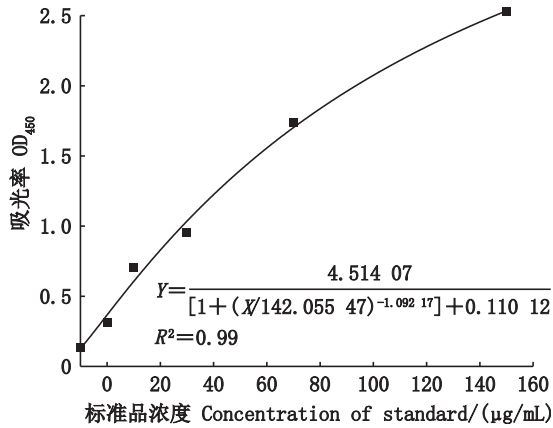


图1 TTX标准曲线

Fig. 1 Standard curve for TTX

表2 暗纹东方鲀各组织 TTX 含量

Tab. 2 TTX content in different tissues of *T. obscurus*
n=10

组织 Tissues	TTX 含量 TTX content/ ($\mu\text{g/g}$)	组织 Tissues	TTX 含量 TTX content/ ($\mu\text{g/g}$)
肝脏 Liver	0.913 \pm 0.206 ^a	眼 Eye	0.864 \pm 0.287 ^a
皮肤 Skin	0.902 \pm 0.235 ^a	脑 Brain	9.521 \pm 2.816 ^c
肌肉 Muscle	1.494 \pm 0.938 ^a	肠道 Intestine	0.894 \pm 0.215 ^a
心脏 Heart	4.271 \pm 1.129 ^b	鳃 Gill	1.586 \pm 0.527 ^a

注:不同上标字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Notes: Different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

2.2 电压门控钠离子通道 α 亚基在各组织中的表达

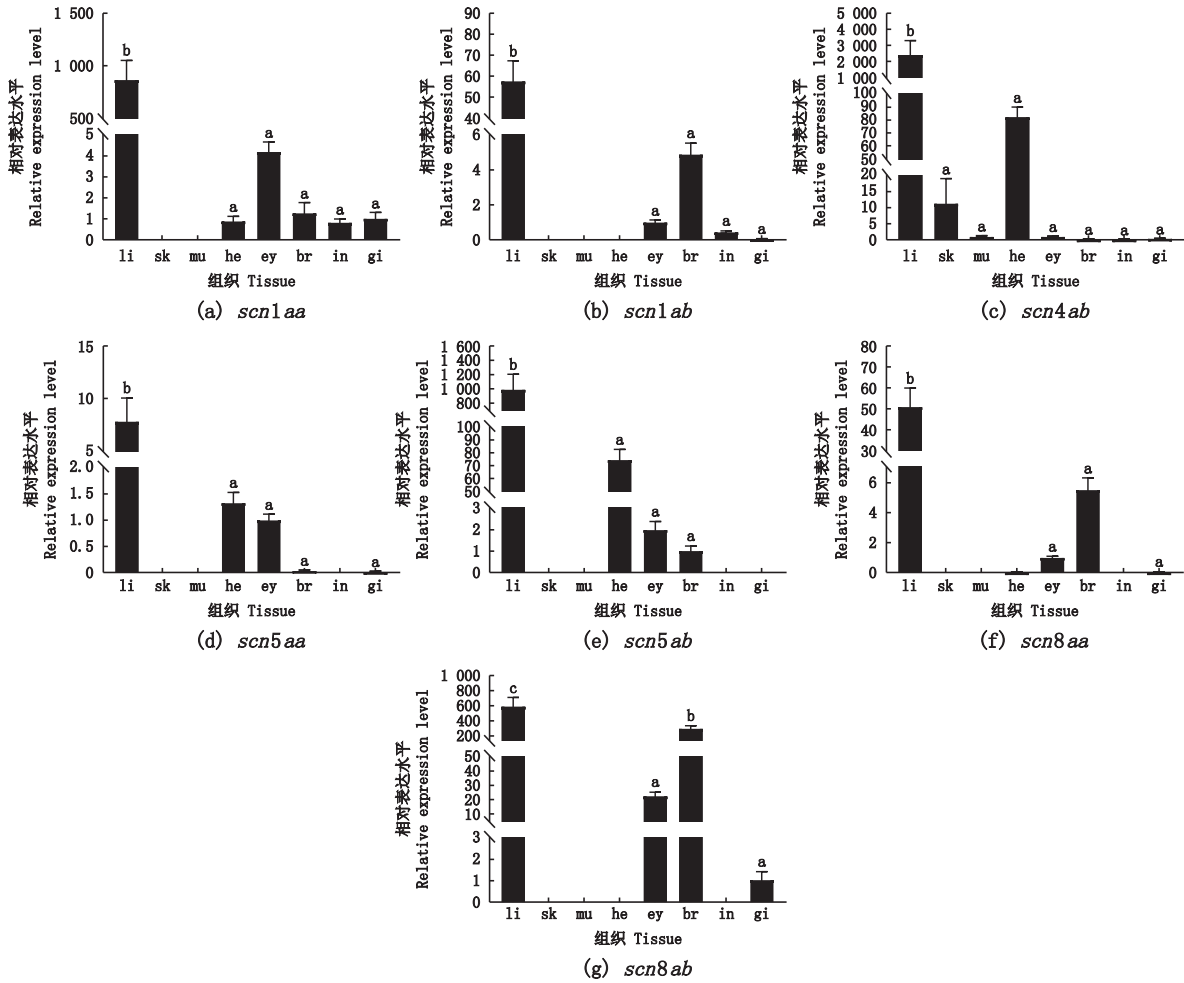
暗纹东方鲀 *scn1aa* 基因在各组织的表达情况如图 2a,以鳃为标准 1.0,该基因在肝脏、心脏、眼、脑、鳃、肠道的表达量分别为 851.8、0.9、4.2、1.2、1.0、0.8,在皮肤和肌肉中未检测到该基因的表达信号。肝脏与其他组织的相对表达量均存在显著性差异($P<0.05$)。与 *scn1aa* 基因类似, *scn1ab* 基因也在肝脏中表达量最高,为 57.0,与其他组织的表达量之间存在显著性差异($P<0.05$),其他组织的表达量由高到低为脑(4.9)、眼(1.0)、肠道(0.5)、鳃(0.04),在皮肤、肌肉、心脏 3 个组织中未检测到 *scn1ab* 基因的表达信号(图 2b)。*scn4aa* 基因仅在肌肉组织中表达。*scn4ab* 基因在所有检测的组织中均有表达,呈现广泛表达特征(图 2c),在肝脏中表达量最高,为 2 319.0,且与在其他组织表达量之间均存在显著性差异($P<0.05$)。*scn5aa* 基因在肝脏组织中

表达量最高,为 7.6(图 2d),在鳃和脑中的表达量较低。*scn5ab* 基因在肝脏、心脏、眼、脑 4 个组织中表达(图 2e),其中在肝脏中表达量最高,为 975.2,与在其他组织表达量之间存在显著性差异($P<0.05$),在脑(1.0)中的表达量最低。*scn8aa*、*scn8ab* 基因均在肝脏、脑、眼和鳃这 4 个组织中表达(图 2f、g),在肝脏的相对表达量均为最高,均与在其他组织的表达量之间存在显著性差异($P<0.05$)。

2.3 各组织中电压门控钠离子通道 α 亚基的表达

依据各组织 TTX 含量的检测结果,弱毒性组包含脑、心脏两个组织,钠离子通道基因在脑组织中除 *scn4aa* 外,其余 7 种钠离子通道基因均有表达,表达量最高的为 *scn8ab* 基因,为 396.5,其次为 *scn8aa* (163.3) 和 *scn1ab* (145.0) 基因,表达量最低的是 *scn5aa* 基因(1.0)(图 3a)。心脏组织检测到 *scn1aa*、*scn4ab*、*scn5aa*、*scn5ab*、*scn8ab* 共 5 种钠离子通道基因的表达(图 3b),表达量最高的是 *scn4ab* 基因(3 165.4),其次为 *scn5ab* 基因(1 384.4),表达量最低的是 *scn8aa* 基因(1.0)。

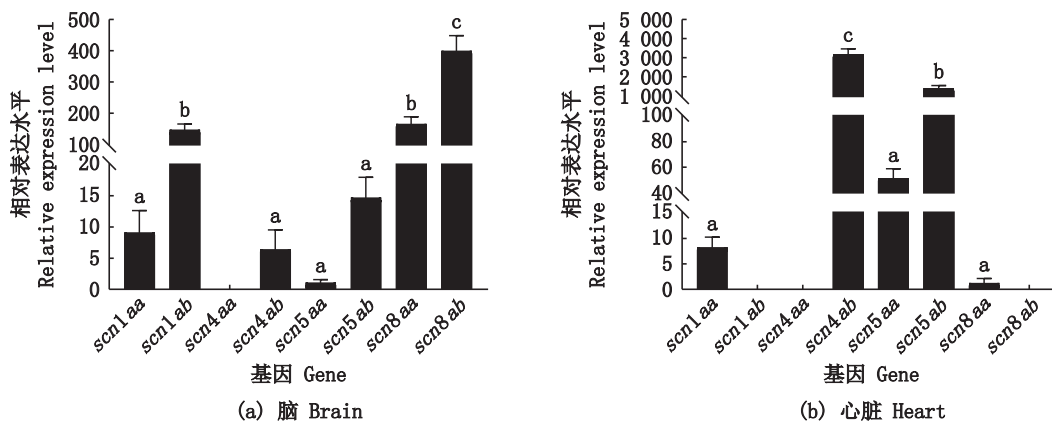
微毒性组有肝脏、皮肤、肌肉、眼、肠道、鳃 6 种组织。皮肤组织仅发现 *scn4ab* 基因的表达。肝脏、眼组织均有除 *scn4aa* 基因外其余 7 种电压门控钠离子通道基因表达(图 4a 和 4c)。肝脏组织表达量最高的是 *scn4ab* 基因(305.4),其次为 *scn5ab* 基因(62.3),表达量最低的是 *scn5aa* 基因(1.0)。眼组织表达量最高的是 *scn5aa* 基因(163.3),其次为 *scn4ab* 基因(27.7),表达量最低的是 *scn8ab* 基因(1.0)。肌肉组织发现 2 种钠离子通道基因表达,为 *scn4aa* 和 *scn4ab* (图 4b)。*scn4ab* 基因表达高于 *scn4aa* 基因,两种基因的表达存在显著性差异($P<0.05$)。肠道组织有 *scn1aa*、*scn1ab*、*scn4ab* 基因表达(图 4d),表达量最高的是 *scn1ab* 基因(2.6),其次为 *scn4ab* (1.0) 和 *scn1aa* (0.98)。*scn1ab* 基因表达与 *scn1aa* 和 *scn4ab* 基因存在显著性差异。*scn1aa* 和 *scn4aa* 基因表达之间不存在显著性差异。暗纹东方鲀鳃组织有 *scn1aa*、*scn1ab*、*scn4ab*、*scn5aa*、*scn8aa*、*scn8ab* 表达(图 4e)。表达量最高的是 *scn4ab* 基因(125.2),其次为 *scn1aa* 基因(65.7),最低的是 *san8aa* 基因(1.0)。



li. 肝脏;sk. 皮肤;mu. 肌肉;he. 心脏;ey. 眼;br. 脑;in. 肠道;gi. 鳃。不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。
li. Liver; sk. Skin; mu. Muscle; he. Heart; ey. Eye; br. Brain; in. Intestine; gi. Gill. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图2 暗纹东方鲀电压门控钠离子通道基因在各组织中实时定量表达

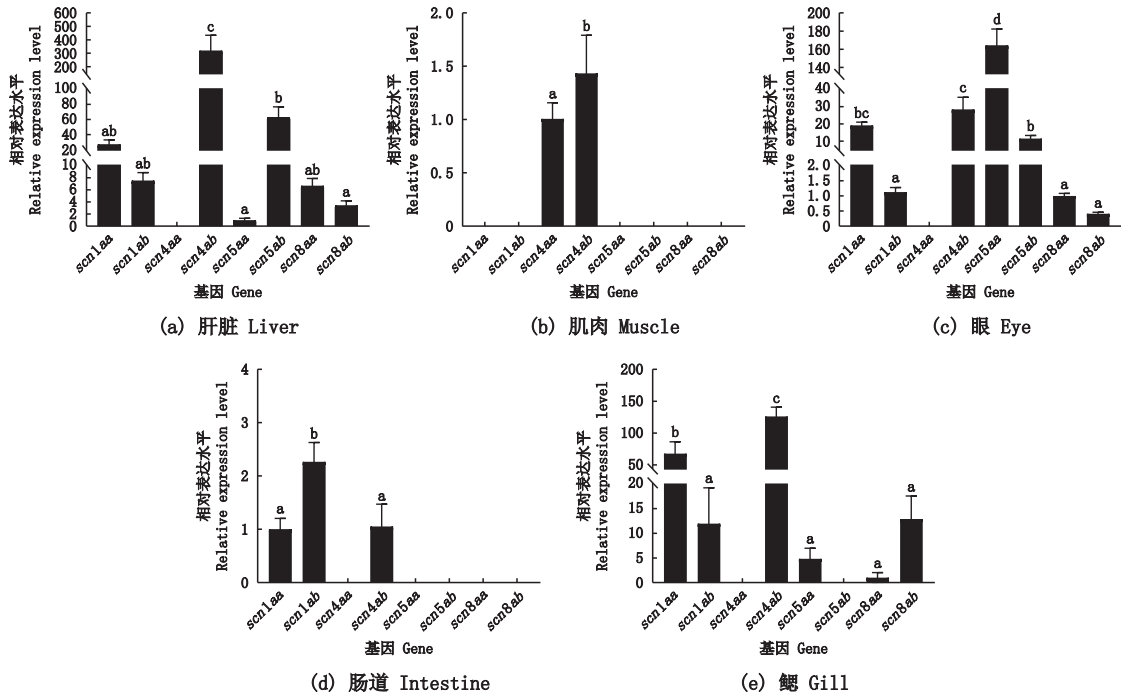
Fig. 2 Real-time quantitative expression of Voltage-gated sodium channel in tissues of *T. obscurus*



不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。
Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图3 电压门控钠离子通道基因在弱毒性组织中的表达

Fig. 3 Expression of voltage-gated sodium channel genes in weakly toxic tissues



不同字母表示组间差异显著(P<0.05)。
Different letters indicate significant differences (P<0.05).

图4 电压门控钠离子通道基因在微毒性组织中的表达
Fig. 4 Expression of voltage-gated sodium channel genes in microtoxic tissues

3 讨论

3.1 各组织 TTX 含量分析

TTX 大多在河鲀鱼卵巢中的含量最高,其次为肝脏和皮肤,其余组织 TTX 含量较少。李春蕾^[20]对 2019 年 12 月采自江苏的野生暗纹东方鲀、横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)、菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)皮肤、肌肉、肝脏、卵巢组织 TTX 含量进行检测,数据显示暗纹东方鲀的肌肉、肝脏、卵巢,菊黄东方鲀肌肉、卵巢组织均可归为微毒性,暗纹东方鲀皮肤,菊黄东方鲀皮肤、肝脏组织为弱毒性,横纹东方鲀 4 个组织均为高毒性,暗纹东方鲀各组织毒素含量皮肤>肌肉>肝脏>卵巢。马廷龙等^[21]2013 年 4 月采自上海芦潮港的野生暗纹东方鲀组织 TTX 含量检测显示,肝脏组织为弱毒性,皮肤、肌肉、眼组织为微毒性。李世平等^[6]于 1998 年对野生已性成熟暗纹东方鲀肌肉、肾脏、胃肠、卵巢、肝脏组织 TTX 含量检测数据显示,野生暗纹东方鲀的卵巢、肝脏、胃肠组织为高毒性,肾脏为微毒性,肌肉组织无毒。国内对养殖暗纹东方鲀不同年龄和季节各组织 TTX 含量测定数据显示,养殖的暗纹东方鲀几乎无毒^[6, 22-24],仅有一例检测出毒素的养殖样品^[25]。

野生暗纹东方鲀组织 TTX 含量分布不一致,这可能与其洄游特性、所处生长发育阶段和生存环境有关,陈永豪^[8]对海水、湖水和潮感区采集的暗纹东方鲀幼鱼肝脏、皮肤、肌肉、胃与肠组织 TTX 含量进行分析,发现生活在海洋中的暗纹东方鲀虽小如葱头,但其肝脏就足以毒死小鼠。生活在潮感带中的暗纹东方鲀幼鱼个体间的组织毒性存在较大差异,肌肉含毒的差异大,整体为皮肤毒性大于肝脏,胃与肠无毒,湖产的均无毒。本研究采集的暗纹东方鲀约在 250 g,各组织均为微毒和弱毒性,说明 TTX 能在暗纹东方鲀多个组织累积。检测得到的毒性强度介于野生和养殖之间,TTX 含量最高的组织也不是普遍报道的“肝脏或皮肤”,推测毒性不高的原因是样本为 1 龄鱼,尚未开始洄游,生活的水环境中 TTX 源较少且未性成熟,TTX 在组织内尚未开始大量累积;亦或是样本为养殖逃逸的暗纹东方鲀,其体内 TTX 处于初始累积阶段。

3.2 电压门控钠离子通道基因表达特征分析

脊椎动物拥有 8 条钠离子通道基因,含 TTX 物种对 TTX 抗性不能仅通过单一通道的进化来实现。因此东方鲀属鱼类电压门控钠离子通道基因序列的研究发现,每条电压门控钠离子通道

基因存在一个或多个特定的突变,这些突变使得电压门控钠离子通道基因对TTX具有一定的抗性。*scn4aa*、*scn5aa*、*scn5ab*基因结构域I的401号位点发生F/Y 401 N/C的非芳香族氨基酸取代芳香族氨基酸,提供了约190~2 000倍的TTX抗性^[26];*scn5ab*基因结构域II T 759 S/N位点突变使基因对TTX的抗性提高2 000倍^[27];*scn1aa*、*scn4ab*基因结构域III M 1 240 T位点突变可以提供15倍抗性^[16];*scn1aa*、*scn1ab*、*scn8aa*基因结构域IV A 1529 G替换,提供1.5倍抗性^[28];*scn4aa*基因结构域DIV的G 1533 T替代带来了约2倍的抗性^[25];*scn8ab*基因结构域IV在I 1524 M的替换能产生5倍对TTX的抗性^[29],这些替换能提供2~2 000倍不等的TTX抗性,但在东方鲀属鱼类的同一物种中未能同时发现这些突变,每个物种中仅存在其中一个或多个突变,因此推测氨基酸突变提供的抗性是东方鲀属鱼类耐受TTX的原因之一,钠离子通道基因还可通过在组织高表达来提供TTX抗性。本研究发现8个组织均含TTX且能检测到1~8种电压门控钠离子通道基因表达。

电压门控钠离子通道基因在组织中分布具有特异性,能通过表达不同的 α 亚基来参与广泛的生理过程^[11]。硬骨鱼类对于电压门控钠离子通道基因表达研究较为详尽的是斑马鱼,研究对象为胚胎和幼鱼^[30]以及成鱼的心脏组织^[31],斑马鱼心脏组织8种电压门控钠离子通道基因均发现在一定程度上表达,*scn5ab*和*scn4ab*为表达的主要亚型,相对表达量最高的是*scn5ab*基因。斑马鱼胚胎和幼鱼的电压门控钠离子通道基因表达则显示,*scn1aa*和*scn1ab*基因都表达于神经系统;*scn4aa*在骨骼肌中表达,*scn4ab*基因在躯干体节中发现,两类钠离子通道基因的表达模式不重叠。*scn5aa*和*scn5ab*基因在神经和肌肉组织中发现表达;斑马鱼*scn8aa*和*scn8ab*基因表现出重叠的表达模式,*scn8ab*基因存在于表达*scn8aa*基因的细胞亚群中。

本研究中钠离子通道基因在暗纹东方鲀和斑马鱼种的表达模式存在差异。暗纹东方鲀心脏为弱毒性,有5种电压门控钠离子通道基因表达,*scn4ab*和*scn5ab*为主要的表达亚型,相对表达量最高的是*scn4ab*基因;而不含河鲀毒素的斑马鱼心脏组织相对表达量最高的是*scn5ab*基因,推

测*scn4ab*基因在TTX调控下高表达来提高心脏组织对TTX的抗性。暗纹东方鲀肝脏组织除未发现*scn4aa*基因表达外,其余7种电压门控钠离子通道基因均显著高表达,这可能是在为后续肝脏组织累积高浓度的TTX做准备。皮肤组织仅发现*scn4ab*基因表达,推测*scn4ab*基因是皮肤组织抵抗TTX的关键基因。

参考文献:

- [1] 成庆泰,王存信,田明诚,等. 中国东方鲀属鱼类分类研究[J]. 动物学报, 1975, 21(4): 359-378.
CHENG Q T, WANG C X, TIAN M C, et al. Studies on the chinese tetraodonoid fishes of the genus *fugu* [J]. Acta Zoologica Sinica, 1975, 21(4): 359-378.
- [2] 王耀辉,郭正龙,黄丽萍,等. 暗纹东方鲀早繁与当年养成技术研究[J]. 科学养鱼, 2022(2): 40-41.
WANG Y H, GUO Z L, HUANG L P, et al. Study on early reproduction and current year cultivation techniques of *takifugu obscurus* [J]. Scientific Fish Farming, 2022 (2): 40-41.
- [3] 陈永平,张素青,李春青,等. 河鲀毒素的起源及检测技术研究进展[J]. 现代渔业信息, 2011, 26(12): 16-19, 15.
CHEN Y P, ZHANG S Q, LI Q C, et al. Progress in study of the methods in detecting and the origin on the tetrodotoxin [J]. Modern Fisheries Information, 2011, 26 (12): 16-19, 15.
- [4] 叶雅萍,伍和星,滕飞,等. 河鲀毒素诱导菊黄东方鲀膜转运蛋白基因的表达[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(4): 692-698.
YE Y P, WU H X, TENG F, et al. Expression of related genes in the accumulation of tetrodotoxin in liver and skin of *Takifugu flavidus* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(4): 692-698.
- [5] 金传荫,刘永定,宋立荣,等. 野生和人工养殖的暗纹东方鲀毒性的比较[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 192-193.
JIN C Y, LIU Y D, SONG L R, et al. Comparison of the toxicities of wild and cultured *Fugu obscurus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(2): 192-193.
- [6] 李世平,赵清良,赵强. 野生和人工养殖暗纹东方鲀不同组织中河豚毒素(TTX)含量的初步研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1998, 21(3): 90-94.
LI S P, ZHAO Q L, ZHAO Q. Preliminary studies on Tetrodotoxin (TTX) concentrations in different tissues of wild and cultured *Fugu obscurus* [J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science), 1998, 21(3): 90-94.
- [7] 姜仁良,张崇文,丁友坤,等. 池养无毒暗纹东方鲀的

- 人工繁殖[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 539-543.
- JIANG R L, ZHANG C W, DING Y K, et al. Artificial propagation of nontoxic *Takifugu obscurus* cultured in pond [J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6): 539-543.
- [8] 陈永豪. 河豚含毒与环境影响[J]. 中国海洋药物, 1990(3): 8-11.
- CHEN Y H. The effect of environment and the toxicity of pufferfish[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 1990(3): 8-11.
- [9] CATTERALL W A, LENAUEUS M J, EL-DIN T M G. Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2020, 60: 133-154.
- [10] WIDMARK J, SUNDRÖM G, DAZA D O, et al. Differential evolution of voltage-gated sodium channels in tetrapods and teleost fishes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(1): 859-871.
- [11] GOLDIN A L, SNUTCH T, LÜBBERT H, et al. Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(19): 7503-7507.
- [12] KATIKOU P, GOKBULUT C, KOSKER A R, et al. An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities [J]. Marine Drugs, 2022, 20(1): 47.
- [13] HWANG D F, NOGUCHI T. Tetrodotoxin poisoning [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2007, 52: 141-236.
- [14] ZAKON H H. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: The first 800 million years [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(supplement_1): 10619-10625.
- [15] GONZÁLEZ-CANO R, RUIZ-CANTERO M C, SANTOS-CABALLERO M, et al. Tetrodotoxin, a potential drug for neuropathic and cancer pain relief? [J]. Toxins, 2021, 13(7): 483.
- [16] JOST M C, HILLIS D M, LU Y, et al. Toxin-resistant sodium channels: parallel adaptive evolution across a complete gene family [J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(6): 1016-1024.
- [17] CATTERALL W A, GOLDIN A L, WAXMAN S G. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels [J]. Pharmacological Reviews, 2005, 57(4): 397-409.
- [18] NOGUCHI T, ARAKAWA O, TAKATANI T. TTX accumulation in pufferfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2006, 1(1): 145-152.
- [19] AMANO M, TAKATANI T, SAKAYAUCHI F, et al. The brain of the wild toxic marine pufferfishes accumulates tetrodotoxin [J]. Toxicon, 2022, 218: 1-7.
- [20] 李春蕾. 常见河鲀鱼中毒快速溯源鉴定及其毒素含量测定的技术研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- LI C L. Study on rapid tracing identification and toxin content determination of common pufferfish poisoning [D]. Qingdao: Qingdao University, 2021.
- [21] 马廷龙, 龚小玲, 管哲成, 等. 云斑裸颊虎鱼体内各组织河鲀毒素的含量[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(5): 675-679.
- MA T L, GONG X L, GUAN Z C, et al. Analysis of the tetrodotoxin content of tissues in *Yongeichthys criniger* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(5): 675-679.
- [22] 萧哲, 杨嘉辉, 罗淇, 等. 珠海河鲀的毒性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(23): 104-107.
- XIAO Z, YANG J H, LUO Q, et al. A toxicological study of puffer fishes collected from Zhuhai, China [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(23): 104-107.
- [23] 赵清良, 赵强, 殷宁, 等. 养殖三龄暗纹东方鲀性腺发育及其毒性[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1999, 22(4): 89-92.
- ZHAO Q L, ZHAO Q, YIN N, et al. Preliminary studies on the sexual glands and toxicity of three year old *Fugu obscurus* cultured in fishery [J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science), 1999, 22(4): 89-92.
- [24] 方彰胜, 但学明, 王昀. 不同季节人工养殖暗纹东方鲀的毒性检测[J]. 海洋与渔业, 2006(9): 18-19.
- FANG Z S, DAN X M, WANG Y. Toxicity detection of artificially cultured pufferfish in different seasons [J]. Ocean And Fishery, 2006(9): 18-19.
- [25] 蔡梅, 马永建, 严隽德, 等. 高效毛细管区带电泳检测河豚鱼中河豚鱼毒素[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(4): 176-178.
- CAI M, MA Y J, YAN J D, et al. Determination of tetrodotoxin in swell by capillary zone electrophoresis [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2003, 24(4): 176-178.
- [26] WU H X, HU Y L, WANG J, et al. Adaptive evolution of *scn4aa* in *Takifugu* and *Tetraodon* [J]. Aquaculture and Fisheries, 2022.
- [27] CHOUDHARY G, YOTSU-YAMASHITA M, SHANG L, et al. Interactions of the C-11 hydroxyl of tetrodotoxin with the sodium channel outer vestibule [J]. Biophysical Journal, 2003, 84(1): 287-294.
- [28] SOONG T W, VENKATESH B. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals [J]. Trends in Genetics, 2006, 22(11): 621-626.
- [29] GEFFENEY S L, FUJIMOTO E, BRODIE III E D, et al. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium

- channels in a predator-prey interaction [J]. *Nature*, 2005, 434(7034): 759-763.
- [30] NOVAK A E, TAYLOR A D, PINEDA R H, et al. Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel α -subunit genes [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(7): 1962-1973.
- [31] HAVERINEN J, HASSINEN M, KORAJOKI H, et al. Cardiac voltage-gated sodium channel expression and electrophysiological characterization of the sodium current in the zebrafish (*Danio rerio*) ventricle [J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2018, 138: 59-68.

Analysis of tetrodotoxin content and voltage-gated sodium channel genes characteristics in the tissues of *Takifugu obscurus*

WANG Jing^{1,2}, WANG Run^{1,3}, LIN Mengjiao^{1,3}, WANG Yaning^{3,4}, BAO Baolong^{1,2}, GONG Xiaoling^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 4. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China)

Abstract: In order to investigate the tetrodotoxin (TTX) content in the tissues of *Takifugu obscurus* and the expression characteristics of voltage gated sodium channel genes in toxic tissues, this study used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the TTX content in 8 tissues, including the liver and heart of *Takifugu obscurus*. Real time fluorescence quantification (RT-qPCR) was used to detect the relative expression of voltage gated sodium channels α subunit gene family, including *scn1aa*, *scn1ab*, *scn4aa*, *scn4ab*, *scn5aa*, *scn5ab*, *scn8aa*, and *scn8ab* in various tissues. The results showed that the TTX content in various tissues ranged from high to low, including brain (9.521 ± 2.816) $\mu\text{g/g}$, heart (4.271 ± 1.129) $\mu\text{g/g}$, gills (1.586 ± 0.527) $\mu\text{g/g}$, muscle (1.494 ± 0.938) $\mu\text{g/g}$, liver (0.913 ± 0.206) $\mu\text{g/g}$, skin (0.902 ± 0.235) $\mu\text{g/g}$, intestine (0.894 ± 0.215) $\mu\text{g/g}$, and eye (0.864 ± 0.287) $\mu\text{g/g}$. Brain and heart tissues were weakly toxic, while liver, skin, muscle, eye, intestine, and gill tissues were slightly toxic. The RT-qPCR results showed that the relative expression levels of *scn1aa*, *scn1ab*, *scn4ab*, *scn5aa*, *scn5ab*, *scn8aa*, and *scn8ab* genes were the highest in liver tissue. The *scn4aa* gene was only expressed in muscle tissue, and only the *scn4ab* gene was expressed in skin tissue. Moreover, the *scn4ab* gene was expressed in all detected tissue types, indicating widespread expression. It is discovered that there are differences in the expression characteristics of sodium channel genes between zebrafish and *Takifugu obscurus* tissues.

Key words: *Takifugu obscurus*; voltage-gated sodium channel; tetrodotoxin; quantitative real-time PCR