

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)氨氮胁迫应答 miR-8245a-5p 靶基因 *GOT* 验证及其表达特征分析*

陈凯锋¹ 董迎辉¹ 姚韩韩¹ 林志华¹ 孙长森²

(1. 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 宁波 315100;

2. 浙江万里学院 宁海海洋生物种业研究院 宁波 315604)

摘要 为鉴定缢蛏(*Sinonovacula constricta*)氨氮胁迫应答相关 miRNA 靶基因及其表达特征, 选择氨氮胁迫下缢蛏肝胰腺组织中表达水平差异显著的 miR-8245a-5p 进行研究。靶基因验证结果显示, 缢蛏 *GOT* 基因表达量极显著高于未胁迫组($P < 0.01$), 表明 *GOT* 是 miR-8245a-5p 的靶基因。缢蛏 *GOT* 基因的 ORF 长 1227bp, 编码 408 个氨基酸; 氨基酸多重序列比对和系统进化树分析发现, 缢蛏等贝类同源性较高, 与其他物种同源性较低。基因时空特征表达分析结果显示, *GOT* 基因在缢蛏肝胰腺中的表达量明显高于其余 6 个组织($P < 0.01$); 140mg/L 氨氮胁迫下缢蛏 *GOT* 基因在肝胰腺中的表达量 1h 内急剧上调, 此后上调逐步减弱, 60mg/L 氨氮水平下第 12h 上调才达峰值; 不同氨氮水平暴露下缢蛏肝胰腺中 *GOT* 活力整体均呈现先升后降趋势, 但在较高氨氮浓度水平下同样表现出更快速的应答特征。这些结果为后续深入研究缢蛏 miR-8245a-5p 及 *GOT* 基因调控氨氮解毒机制提供了理论基础。

关键词 缢蛏(*Sinonovacula constricta*); miRNA; 天冬氨酸转氨酶(*GOT*); 氨氮胁迫

中图分类号 Q789; S968.3 **doi:** 10.11693/hyhz20191200271

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是浙江、福建等地重要的养殖贝类之一, 在我国海水养殖中占有重要的位置, 其生活在滩涂或池塘的泥滩洞穴中, 对污染物具有较高的耐受性(徐凤山等, 2008; Wu *et al.*, 2018)。近年来, 由于环境污染, 导致水体氨氮浓度偏高, 此外, 随着混养模式的推广及饲料的过量投喂, 养殖水体富营养化越来越普遍, 使营穴居生活的缢蛏面临更高浓度氨氮的威胁(王岩, 1999)。有研究表明氨氮过高会造成水生生物组织氧化损伤、细胞凋亡或坏死、抑制免疫系统、增加病原敏感性, 甚至导致高死亡率(Cheng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018)。

microRNA (miRNA)是一类长度约为 21 个核苷酸的非编码内源性单链 RNA, 具有高度保守性、组织特异性和时序性, 其通过与靶 mRNA 裂解或优先与

蛋白质编码基因的非编码区结合, 使得靶 mRNA 降解或者抑制靶 mRNA 翻译(Ambros, 2004; Bartel, 2004)。miRNA 参与调控多个细胞功能, 包括细胞分化、生长、凋亡、代谢以及应激反应等生物学过程(Modlin *et al.*, 2005; Houshmand *et al.*, 2018; Raghuvanshi *et al.*, 2018)。近年来, 越来越多的研究表明, miRNA 与环境胁迫的响应有关。Sun 等(2016)用氨暴露刺激团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)时, 发现大量 miRNAs 被诱导或抑制; Ou 等(2012)检测了感染绒螯螺旋体时中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血液中 miRNA 的变化, 发现 228 个特异性 miRNAs 在正常血细胞和感染血细胞中有显著差异; Zeng 等(2015)通过 WSSV 刺激凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)时, 鉴定出 8 个 miRNAs 在病毒感染后差异

* 国家现代贝类产业技术体系项目, CARS-49 号; 浙江省农业新品种选育重大科技专项, 2016C02055-9 号; 宁波市“科技创新 2025”重大专项项目, 2019B10005 号; 宁波市“环境科学与工程”一流学科项目。陈凯锋, 硕士研究生, E-mail: 15728009063@163.com

通信作者: 孙长森, 博士, 副教授, E-mail: changsen_1977@hotmail.com

收稿日期: 2019-12-23, 收修改稿日期: 2020-01-26

表达; Schmidt(2010)通过深度测序美洲蚶(*Limulus polyphemus*)miRNA 在短期锌和铜胁迫下的总体表达和 miRNA 群体的变化。

最近几年,有关贝类 miRNA 生物学作用的研究逐渐成为热点,Zhao 等(2016)鉴别出 8 个与渗透压调节相关的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)和香港巨牡蛎(*C. hongkongensis*) miRNA; Zhou 等(2014)用温度和灿烂弧菌刺激太平洋牡蛎(*C. gigas*)时,发现大量 miRNAs 被诱导或抑制; Bao 等(2014)筛选到 5 个与镉胁迫应答相关且表达显著差异的泥蚶(*Tegillarca granosa*) miRNAs; 此外, Jiao 等(2015)从马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)生物矿化相关的 miRNA 库中鉴别出一个与珍珠层形成相关的 miRNA; 谢淑媚(2018)从缢蛏(*S. constricta*)8 个发育时期中鉴别出了 7 个与类胰岛素生长因子系统信号途径相关的 miRNA; 宋浩(2018)研究了脉红螺(*Rapana venosa*)变态过程中的 miRNA, 鉴定了 195 条差异显著的 miRNA。

本研究对氨氮胁迫下缢蛏肝胰腺组织中表达水平差异显著的 miR-8245a-5p 靶基因进行预测和验证,并对其靶基因 *GOT* 的序列和表达特征进行了分析,为揭示和探讨缢蛏在氨氮环境胁迫下的解毒代谢机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用缢蛏材料取自宁波市鄞州区丹艳水产养殖基地,壳长(56.96 ± 3.13)mm、体重(13.38 ± 2.40)g,于实验室循环水养殖箱内暂养 7d 后待用(养殖条件为:连续充气,水温 25℃ 左右,盐度 20 左右,每天投喂单胞藻饵料一次)。

1.2 miR-8245a-5p 靶基因的预测与验证

基于 Illumina Hiseq 2500 高通量测序,筛选氨氮胁迫下缢蛏肝胰腺组织表达水平差异显著的 miR-8245a-5p 进行分析。使用 miRBase、miRanda 和 RNAhybrid 数据库软件预测 miR-8245a-5p 的靶基因,并利用 qRT-PCR 筛选 miR-8245a-5p 与氨氮胁迫相关的靶基因。

验证实验所需特异性激动剂 agomir-8245a-5p 和拮抗剂 antagomir-8245a-5p 由上海吉玛制药技术有限公司合成,agomir-NC 和 antagomir-NC 为对照组(与 miRBase 数据库中所有的 miRNA 具有最小的同源性)。通过闭壳肌对缢蛏分别注射特异性和对照组激动剂和拮抗剂,注射浓度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,时间间隔 12h。注

射后的缢蛏分组放入正常海水中养殖,3d 后每组取 6 粒缢蛏解剖取肝胰腺,提取 RNA,反转录为 cDNA,为 qRT-PCR 模板,用 Primer Premier 5 设计引物 q-GOT-F 和 q-GOT-R,用 Vazyme miRNA 设计 miRNA 引物 q-miR8245a5p-F 和 q-miR8245a5p-R,内参基因分别选择 *18S rRNA* 和 *U6*,使用 Light Cycler 480 II PCR 仪进行 qRT-PCR 反应。各组另取肝胰腺,按照重量(g): 体积(mL) = 1:9 的比例加入 PBS (4℃, 0.01mol/L, pH 7.4),匀浆(10000r/min, 30s),离心(10000×g, 10min),取上清, GOT 酶活采用谷草转氨酶比色法测试盒测定。采用相对值 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数据分析,使用 SPSS 19.0 及 Excel 软件进行数据统计分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性的标志。

1.3 *Sc-GOT* 基因生物信息学分析

利用缢蛏转录组文库获得 *Sc-GOT* 基因 EST 片段,设计 RACE 引物 GOT-F 和 GOT-R,进行 PCR 扩增,PCR 产物切胶回收、连接转化到 DH5α 大肠杆菌中,培养 12h,挑选白色单菌落,菌液 PCR 后将阳性克隆进行测序。为验证 *Sc-GOT* 基因的 cDNA 全长,设计引物 GOT-F1 和 GOT-R1 进行 PCR 扩增,产物切胶回收、连接转化步骤同上。

通过 ORF Finder 软件预测 *Sc-GOT* 基因的开放阅读框;使用 ProtParam 软件预测氨基酸序列以及理化性质;利用 ExPASy 软件推测蛋白质理化性质;使用 NetNGlyc 预测糖基化位点;使用 NetPhos 预测磷酸化位点;使用 SMART 软件预测蛋白质功能域;利用 TMHMM 分析蛋白质跨膜区;用 Signal P 分析蛋白质信号肽区域;用 MEGA6.0 软件构建系统进化树。

1.4 *Sc-GOT* 基因的差异表达分析

1.4.1 不同组织中差异表达分析 实验设计 3 个平行,每个平行取 6 粒缢蛏分别活体解剖其水管、足、鳃、肾脏、外套膜、肝胰腺和闭壳肌 7 个组织用于时空表达特征分析, RNA 提取方法及 qRT-PCR 和酶活测定方法参照 1.2 进行。

1.4.2 *Sc-GOT* 基因氨氮胁迫后的表达分析 实验设计 3 个处理,分别是对照组(养殖用海水, 0.01mg/L), 60mg/L 氨氮胁迫组, 140mg/L 氨氮胁迫组, 每个处理设 3 个平行组。在实验室循环水养殖箱内进行试验,每 12h 全换水一次,换水后实验组用氨氮质量浓度为 1000g/L 的 NH_4Cl (优级纯)溶液调节氨氮水平。试验期间不充气,每次换水前 2h 投喂角毛藻,温度保持在 25℃,盐度保持在 20, pH 值保持在 8.00 左右。各

组取 6 粒缢蛏(实验后 1h、3h、6h、12h、24h、48h、72h 取样),解剖其肝胰腺组织冻存于液氮中,一部分用于 RNA 提取,另一部分用于酶活测定, RNA 提取及 qRT-PCR 和酶活测定方法仍参照 1.2 进行。

表 1 实验所用引物及其序列
Tab.1 Primers and sequences used in the experiments

引物	序列	引物信息
GOT-F	AGGACAAGGTGAATCTGAGTGTTGGCG	3'-RACE
GOT-R	CATGAGTGCCATTACACCTTTCGCTG	5'-RACE
GOR-F	GCTATGTGGAGACAACAGATGGAAGGTT	已知片段验证
GOT-R	GAGTTTAGAGAGAGATGCACGTTTCGTGG	已知片段验证
q-GOT-F	TGTTCTTCTCTCGGCACACC	qRT-PCR
q-GOT-R	GTTGGCGCCTATCGTACAGA	qRT-PCR
q-miR8245a5p-F	GCGCGATAGCTGTCGGTAA	qRT-PCR
q-miR8245a5p-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	qRT-PCR
18S-F	TCGGTTCATTGCGTTGGTTTT	内参基因
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	内参基因
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACCA	内参基因
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT	内参基因

2 结果

2.1 miR-8245a-5p 靶基因的预测与验证

使用 miRBase、miRanda 和 RNAhybrid 软件预测 miR-8245a-5p 靶基因(*LPCAT2*, *UP1*, *UP2*, *UP3*, *UP4*, *GOT*), 利用 qRT-PCR 筛选出极显著差异的靶基因 *GOT*(图 1)。再利用 miRBase 取得 miR-8245a-5p 成熟序列(图 2), 从测序结果中选取 *GOT* 的 mRNA 序列。

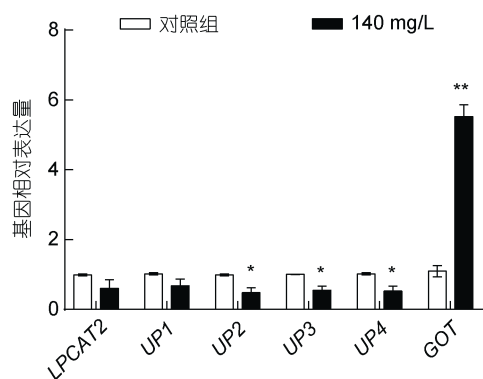


图 1 miR-8245a-5p 靶基因的预测($n=3$)

Fig.1 Prediction of target genes of miRNA-8245a-5p ($n=3$)

注: *代表显著差异($P<0.05$); **代表极显著差异($P<0.01$)

经过 qRT-PCR 检测, agomir-8245a-5p 和 antagomir-8245a-5p 的相对表达量显著升高($P<0.01$)(图 3a)。注射 agomir-8245a-5p, *Sc-GOT* 基因相对表达量及 *Sc-GOT* 酶活显著降低 ($P<0.01$); 相反, 注射 antagomir-8245a-5p, *Sc-GOT* 基因相对表达量及 *Sc-GOT* 酶活显著升高($P<0.01$)(图 3b, c)。

2.2 *Sc-GOT* 基因序列分析

Sc-GOT 基因 cDNA 全长 2594 bp, *Sc-GOT* 基因开放阅读框(ORF)长度 1227bp。ExPASy 软件推导出 ORF 编码 408 个氨基酸, 包含 55 个碱性氨基酸(K, R, H), 43 个酸性氨基酸(D, E), 178 个疏水性氨基酸(A, L, I, F, P, V, W, M)以及 132 个亲水性氨基酸(S, G, T, Y, N, C, Q), 该蛋白质含有很大比例的疏水性氨基酸, 表现为疏水性; 该蛋白的分子量为 45.38ku, 等电点 $pI=8.37$ 。该序列包含 3 个 N-糖基化位点, 30 个磷酸化位点(其中丝氨酸位点 13 个, 苏氨酸位点 13 个, 酪氨酸位点 4 个); TMHMM 和 SignalP 软件预测该蛋白质无跨膜区和信号肽。SMART 软件进行功能域预测显示, *Sc-GOT* 存在 1 个保守结构域: Aminotran_1_2 (29—397aa)。

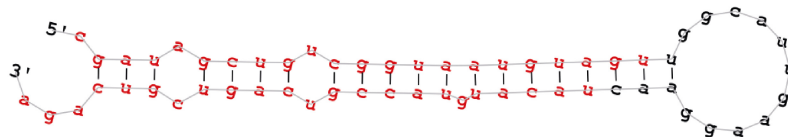


图 2 预测的缢蛏 miR-8245a-5p 的二级茎环结构

Fig.2 Predicted secondary stem ring structure of microRNA-8245a-5p

注: 红色部分为成熟 miRNA 的主要形式

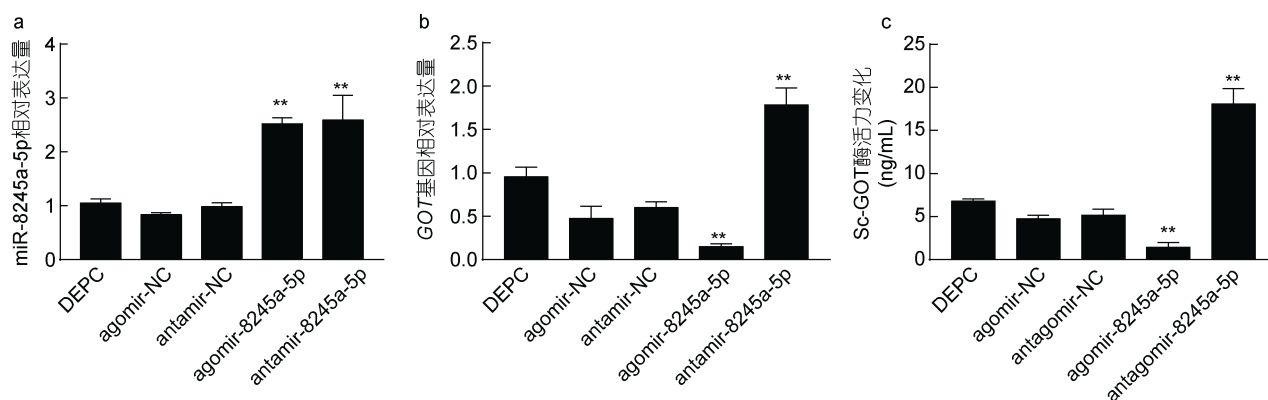


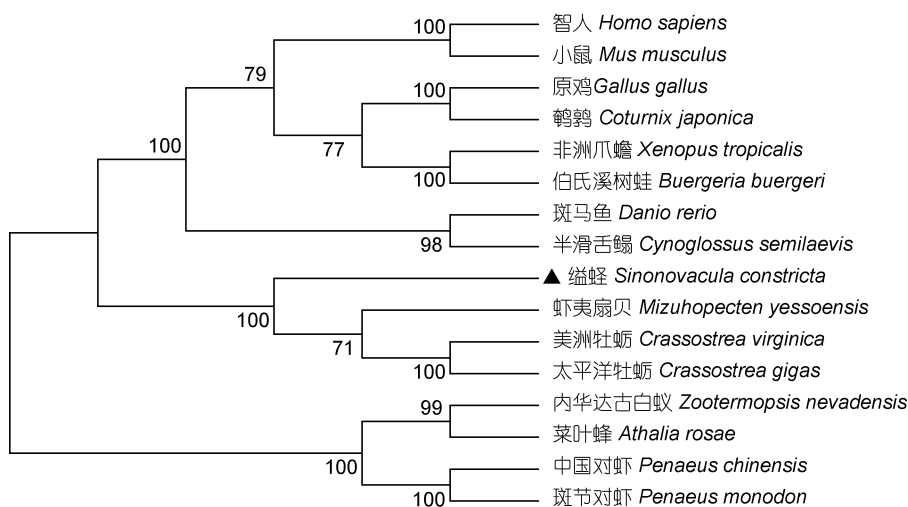
图 3 miR-8245a-5p 靶基因的验证

Fig.3 Verification of the target gene of miRNA-8245a-5p

注: a. agomir-8245a-5p 和 antagomir-8245a-5p 注射后 miR-8245a-5p 相对含量分析($n=3$); b. agomir-8245a-5p 和 antagomir-8245a-5p 注射后 *Sc-GOT* 基因表达分析($n=3$); c. agomir-8245a-5p 和 antagomir-8245a-5p 注射后 *Sc-GOT* 蛋白含量分析($n=3$); **代表极显著差异($P<0.01$)

利用 MEGA6.0 软件对缢蛏和其他 16 个物种的 *GOT* 氨基酸序列进行了序列比对和系统进化树分析 (见图 4)。结果显示, *Sc-GOT* 基因与虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*, OWF49471.1)、太平洋牡蛎 (*C. gigas*, EKC40669.1) 和美洲牡蛎 (*C. virginica*, XP_022339935.1) 同源性较高, 分别为 70.2%、70.4% 和 69.9%, 与智人 (*Homo sapiens*, AAA35563.1)、小鼠 (*Mus musculus*, AAA37263.1)、原鸡 (*Gallus gallus*, NP_990652.1)、鹌鹑 (*Coturnix japonica*, XP_015722585.1)、非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, NP_

998829.1)、伯氏溪树蛙 (*Buergeria buergeri*, BAM10994.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_998222.1)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*, XP_008320093.1)、内华达古白蚁 (*Zootermopsis nevadensis*, KDR10996.1)、菜叶蜂 (*Athalia rosae*, XP_012267682.1)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*, AID18683.1) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*, KP984794.1) 等动物的同源性为 50.5%—66.7%。进化树分析表明, 缢蛏与其他几种贝类动物的亲缘性较近, 与鸟类、两栖类、哺乳类、鱼类等脊椎动物的亲缘性较远。

图 4 采用 MEGA6.0 软件 NJ 法构建 *GOT* 基因的进化树Fig.4 The *GOT* gene phylogenetic tree constructed by MEGA6.0 software using NJ method

2.3 *Sc-GOT* 基因的表达分析

不同组织的 qRT-PCR 结果显示, *Sc-GOT* 基因在缢蛏成体的水管、足、鳃、肾脏、外套膜、肝胰腺和

闭壳肌中均有表达, 该基因在缢蛏肝胰腺中表达量相对其他 6 个组织最高($P<0.01$), 其次是鳃, 在唇瓣组织中的表达量最低(图 5)。

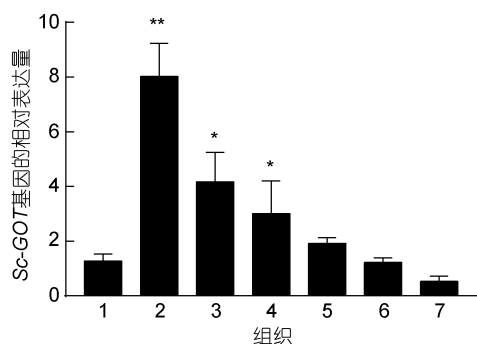


图5 *Sc-GOT* 基因在缢蛏不同组织的表达分析($n=3$)

Fig.5 Expression analysis of *Sc-GOT* gene in different tissues of *S. constricta* ($n=3$)

注: 1. 足, 2. 肝胰腺, 3. 鳃, 4. 肾脏, 5. 外套膜, 6. 水管, 7. 唇瓣。*代表显著差异($P<0.05$); **代表极显著差异($P<0.01$) (与足组织的显著性比较)

氨氮胁迫对缢蛏 *GOT* 基因在肝胰腺中的表达特征见图 6, 从图中结果可以看出不同浓度氨氮胁迫 *Sc-GOT* 基因表达趋势不同。140mg/L 组中 *Sc-GOT* 基因表达在胁迫初始阶段迅速上调, 显著高于对照组($P<0.01$), 之后在胁迫过程中不断下降。60mg/L 组中 *Sc-GOT* 基因表达呈现先升高后下降的趋势, 上调水平在胁迫后 12h 达到峰值。

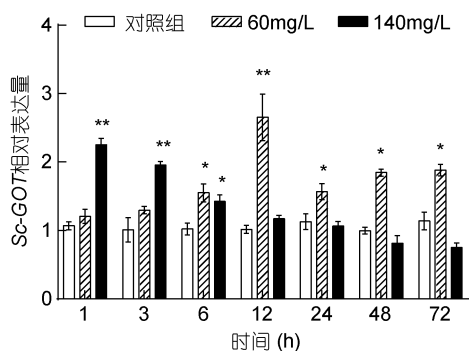


图6 氨氮暴露下肝胰腺中 *Sc-GOT* 基因表达水平变化 ($n=3$)

Fig.6 Variation of *Sc-GOT* gene expression in hepatopancreas of *S. constricta* under high ammonia nitrogen stress ($n=3$)

注: *代表显著差异($P<0.05$); **代表极显著差异($P<0.01$)

图 7 显示了氨氮胁迫后缢蛏肝胰腺组织中 *GOT* 酶活力的变化趋势, 60mg/L 和 140mg/L 两个胁迫组均呈现先上升后下降的特征, 但 140mg/L 氨氮胁迫组较 60mg/L 组 *GOT* 酶活力上升更为快速, 前者峰值出现在胁迫后第 6h, 后者峰值出现在第 24h。

3 讨论

本研究确定了 *GOT* 基因为 miR-8245a-5p 的靶基

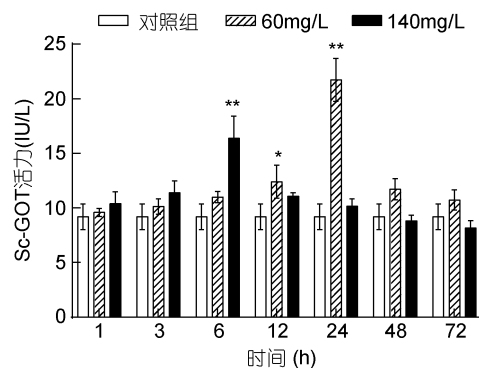


图7 氨氮暴露下缢蛏肝胰腺中 *GOT* 酶活力变化($n=3$)

Fig.7 Variation of *GOT* enzyme activity in hepatopancreas of *S. constricta* under high ammonia nitrogen stress ($n=3$)

注: *代表显著差异($P<0.05$); **代表极显著差异($P<0.01$)

因, 且获得 *Sc-GOT* 基因 cDNA 全长 2594bp, 开放阅读框(ORF)长度 1227bp, 编码 408 个氨基酸, 经过多重序列比对发现, 该氨基酸序列很保守, 属于天冬氨酸超家族(Mehta *et al*, 1993)。该氨基酸与无脊椎动物中太平洋牡蛎、美洲牡蛎和虾夷扇贝同源性较高, 推测其功能较为相似, 而与脊椎动物同源性较低。系统进化分析结果表明缢蛏与太平洋牡蛎归为一支, 同源性为 70.4%。

谷草转氨酶(*GOT*)主要通过辅酶在磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)和磷酸吡哆胺(pyridoxamine phosphate, PMP)之间的转换来完成氨基的转运(王镜岩等, 2002)。本研究表明, *Sc-GOT* 基因在缢蛏各组织中均有表达, 其中肝胰腺的表达量最高, 且鳃和肾脏的表达量处于较高水平, 其中肝胰腺相对于其他组织为极显著差异($P<0.01$), 该结果与中国对虾和斑节对虾 *GOT* 基因的组织表达规律(李少飞, 2014; 陈劲松等, 2016)相似, 可以推测 *Sc-GOT* 基因参与缢蛏氨基酸分解和氨氮代谢的过程。

GOT 通过催化草酰乙酸和谷氨酸生成天冬氨酸, 天冬氨酸参与鸟氨酸循环形成尿素(李少飞, 2014), 而尿素是双壳类贝类排泄氨的方式之一(Hammen, 1968; Weihrauch *et al*, 2004)。为研究 *GOT* 在缢蛏氨氮解毒代谢中的作用, 通过低浓度组与高浓度组对缢蛏进行氨氮胁迫实验, 分析了在不同浓度氨氮胁迫过程中缢蛏 *GOT* 基因在肝胰腺中表达变化趋势。在低浓度组中, *Sc-GOT* 基因表现出先升后降直至平衡的趋势。*Sc-GOT* 基因应对氨氮初始刺激时表达量升高, 表明 *Sc-GOT* 基因对氨氮胁迫反应迅速, 跟斑节对虾结果一致(陈劲松等, 2016)。有研究发现在 6h 表达量下降的原因是体内氨增加, 抑制了天门冬氨

酸转氨酶参与的嘌呤核苷酸联合脱氨基作用,从而减少体内氨的产生(李少飞, 2014)。随着氨氮实验的进行, *GOT* 基因表达量再次上升, 原因是谷草转氨酶催化转氨反应生成天冬氨酸参与尿素的形成。三疣梭子蟹暴露在氨氮环境时, 通过鳃和肝胰腺中的尿素循环, 将体内氨转变成尿素, 再经鳃将其排出体外(岳峰, 2010)。尿素的形成需要大量的能量, 甲壳动物以合成谷氨酰胺作为主要的排氨途径, 因此 48h 后 *GOT* 基因的表达量下降并趋于平衡。而在高浓度组中的情况有所不同, 整体呈现出逐渐下降的趋势。中国对虾应对氨氮胁迫时, 肝胰腺中的吸收细胞转变为分泌细胞, 原来的肝管部位充满大量的溶酶体以及细胞碎片(姜会民, 2012), 因此致使本实验出现这种情况的原因可能也是水体中氨氮浓度过大, 肝细胞遭到破坏, 阻碍了肝细胞正常的解毒代谢功能。

谷草转氨酶在氨的产生和排泄过程中具有重要的作用, 其活性反应机体氨基酸代谢情况, 是反应肝功能的重要指标(Weihrach *et al*, 2004)。两组表现出先升后降趋势, 区别在于达到最大酶活力的时间以及活力大小。胁迫初始阶段, 实验组 *GOT* 活力上升, 表明氨氮对 *GOT* 活性有诱导作用, 加快氨氮的代谢, 减少代谢产物对机体的影响(McKenna *et al*, 2006)。低浓度组 24h 后 *GOT* 活性逐渐下降, 高浓度组 6h 后 *GOT* 活性逐渐下降, 出现该现象的原因可能是在随着氨氮实验的进行, 肝胰腺被破坏, 与上述结论相呼应。

4 结论

本研究筛选并验证了表达差异显著的 miR-8245a-5p 及其靶基因, 并对靶基因 *GOT* 进行生物学信息分析得到其 cDNA 全长 2594bp, 该基因与贝类同源性较高, 表明该基因比较保守。通过测定在氨氮胁迫下转录水平和酶活力水平的变化情况, 表明该基因参与缢蛏氨基酸分解和氨氮代谢的过程, 也表明天冬氨酸转氨酶受氨氮暴露时间和氨氮剂量的影响, 初步探讨了缢蛏在氨氮胁迫下的 miRNA 及分析机制, 以期更好地理解氨氮在机体内的毒性作用以及机体对氨氮的解毒代谢机制。

参 考 文 献

- 王 岩, 1999. 不同单养及混养海水实验围隔水化学的研究. 水产学报, 23(4): 350—356
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 2002. 生物化学. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 306—308
- 李少飞, 2014. 中国对虾氨氮代谢酶基因的 cDNA 克隆及其在氨氮解毒代谢过程中的作用. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文
- 宋 浩, 2018. 脉红螺幼虫变态过程多组学解析及关键基因的调控作用. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士学位论文
- 陈劲松, 周发林, 江世贵等, 2016. 斑节对虾谷氨酰胺合成酶基因的克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响. 上海海洋大学学报, 25(4): 497—507
- 岳 峰, 2010. 三疣梭子蟹在氨氮胁迫下免疫应答与解毒代谢机制的研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 87—95
- 姜会民, 2012. 氨氮胁迫对黄河鲤幼鱼肝胰腺、肾脏抗氧化性的影响. 山东大学学报(理学版), 47(1): 17—22
- 徐凤山, 张素萍, 王少青, 2008. 中国海产双壳类图志. 北京: 科学出版社, 211—213
- 谢淑媚, 2018. 缢蛏类胰岛素生长因子系统 3 个基因表达特征及功能初步分析. 上海: 上海海洋大学博士学位论文
- Ambros V, 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006): 350—355
- Bao Y B, Zhang L L, Dong Y H *et al*, 2014. Identification and comparative analysis of the *Tegillarca granosa* haemocytes microRNA transcriptome in response to cd using a deep sequencing approach. *PLoS One*, 9(4): e93619
- Bartel D P, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281—297
- Cheng C H, Yang F F, Ling R Z *et al*, 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquatic Toxicology*, 164: 61—71
- Hammen C S, 1968. Aminotransferase activities and amino acid excretion of bivalve mollusks and brachiopods. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26(2): 697—705
- Houshmand M, Hagh M N, Soleimani M *et al*, 2018. MicroRNA microarray profiling during megakaryocyte differentiation of cord blood CD133+ hematopoietic stem cells. *Cell Journal*, 20(2): 195—203
- Jiao Y, Zheng Z, Tian R R *et al*, 2015. MicroRNA, Pm-miR-2305, participates in nacre formation by targeting pearl in pearl oyster *Pinctada martensii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9): 21442—21453
- McKenna M C, Hopkins I B, Lindauer S L *et al*, 2006. Aspartate aminotransferase in synaptic and nonsynaptic mitochondria: differential effect of compounds that influence transient hetero-enzyme complex (metabolon) formation. *Neurochemistry International*, 48(6—7): 629—636
- Mehta P K, Hale T I, Christen P, 1993. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *European Journal of Biochemistry*, 214(2): 549—561
- Modlin I M, Kidd M, Latich I *et al*, 2005. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology*, 128(6): 1717—1751
- Ou J T, Meng Q G, Li Y *et al*, 2012. Identification and comparative analysis of the *Eriocheir sinensis* microRNA transcriptome response to *Spiroplasma eriocheiris* infection

- using a deep sequencing approach. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(2): 345—352
- Raghuwanshi S, Gutti U, Kandi R *et al*, 2018. MicroRNA-9 promotes cell proliferation by regulating RUNX1 expression in human megakaryocyte development. *Cell Proliferation*, 51(1): e12414
- Schmidt S A, 2010. Population structure and heavy metal stress response in the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. Newark: Doctor Dissertation of University of Delaware
- Sun S M, Ge X P, Zhu J *et al*, 2016. De novo assembly of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) gill transcriptome to identify ammonia exposure associated microRNAs and their targets. *Results in Immunology*, 6: 21—27
- Weihrauch D, Morris S, Towle D W, 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *Journal of Experimental Biology*, 207(26): 4491—4504
- Wu X P, Feng Y W, Jiang H L *et al*, 2018. A preliminary genetic linkage map of *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) based on microsatellites derived from RAD Sequencing. *Journal of Ocean University of China*, 17(4): 947—956
- Zeng D G, Chen X L, Xie D X *et al*, 2015. Identification of highly expressed host microRNAs that respond to white spot syndrome virus infection in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Research*, 14(2): 4818—4828
- Zhang L, Pan L Q, Xu L J *et al*, 2018. Effects of ammonia-N exposure on the concentrations of neurotransmitters, hemocyte intracellular signaling pathways and immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 75: 48—57
- Zhao X L, Yu H, Kong L F *et al*, 2016. High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes in two *Crassostrea oysters* identifies microRNAs involved in osmotic stress response. *Scientific Reports*, 6: 22687
- Zhou Z, Wang L L, Song L S *et al*, 2014. The identification and characteristics of immune-related microRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 9(2): e88397

IDENTIFICATION AND CHARACTERISTIC EXPRESSION ANALYSIS OF miR-8245a-5p TARGET GENE RELATED TO AMMONIA NITROGEN STRESS IN *SINONOVACULA CONSTRICTA*

CHEN Kai-Feng¹, DONG Ying-Hui¹, YAO Han-Han¹, LIN Zhi-Hua¹, SUN Chang-Sen²

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang Province, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. Ninghai Institute of Marine Biology Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315604, China)

Abstract To identify the miRNA target genes and their expression characteristics of *Sinonovacula constricta* under ammonia nitrogen stress, miR-8245a-5p with significant expression difference in hepatopancreas, was studied in detail. The Result of qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) in target gene verification showed that *GOT* gene expression changed most significantly ($P < 0.01$), indicating that *GOT* gene was the target gene of mir-8245a-5p. Bioinformatic analysis showed that the length of *Sc-GOT* gene was 1227bp, encoding 408 amino acids. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis indicated *S. constricta* had higher homology to scallop and oyster, but lower homology to other species on the *GOT* gene sequences. The results of qRT-PCR in different tissues presented that expression level of *Sc-GOT* gene in hepatopancreas was very significantly higher than in other tissues ($P < 0.01$). Under 140mg/L ammonia nitrogen stress, the expression level of *GOT* gene in hepatopancreas increased abruptly after 1h, and then the upregulated level gradually decreased; and under 60mg/L ammonia nitrogen stress, the upregulated level reached peak value after 12h. Under different ammonia nitrogen levels, the *GOT* enzyme activity in hepatopancreas presented early increase and later decrease trend, but higher ammonia nitrogen level prompted a faster response. These results provide a theoretical basis for further study on the regulation mechanism of miR-8245a-5p and *GOT* gene.

Key words *Sinonovacula constricta*; miRNA; glutamic oxaloacetic transaminase (GOT); ammonia nitrogen stress