

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240112001

http://www.yykxjz.cn/

赵岩峰, 廖梅杰, 葛建龙, 王锦锦, 王印庚, 荣小军, 李彬, 谭颜廷. 刺参 *TRAF7* 基因克隆及其响应高温胁迫下的表达特征分析. 渔业科学进展, 2025, 46(1): 149-160

ZHAO Y F, LIAO M J, GE J L, WANG J J, WANG Y G, RONG X J, LI B, TAN Y T. Cloning, characterization and expression regulation in response to high-temperature stress of *TRAF7* gene in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(1): 149-160

刺参 *TRAF7* 基因克隆及其响应高温胁迫下的表达特征分析*

赵岩峰^{1,2} 廖梅杰^{2,3①} 葛建龙^{2,3} 王锦锦^{2,3} 王印庚^{2,3}
荣小军^{2,3} 李彬^{2,3} 谭颜廷^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 肿瘤坏死因子受体相关因子7 (tumor necrosis factor receptor associated factor 7, TRAF7)作为一种细胞内蛋白,参与信号转导,并介导宿主应激防御调控过程。为研究 *TRAF7* 在刺参(*Apostichopus japonicus*)高温胁迫中的作用,本研究利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)和实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR),克隆了刺参 *TRAF7* (*AjTRAF7*)全长 cDNA 序列,分析了其结构特征和在基因组中的分布,并检测了该基因在刺参不同组织和高温胁迫过程中体壁组织中的表达变化情况。结果显示,*AjTRAF7* 全长 2 576 bp,开放阅读框(ORF)长 1 770 bp,5'UTR 长 345 bp,3'UTR 长 461 bp,编码 589 个氨基酸,预测蛋白分子量为 65.6 kDa,理论等电点(pI)为 7.52。蛋白序列包含 1 个 RING finger 结构域、1 个 Coiled coil 结构域和 6 个 WD40 结构域,N 端包含 1 个螺旋区域。该基因预测蛋白包含 41 个丝氨酸磷酸化位点、20 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点,蛋白 N 端具有 3 个天冬酰胺糖基化位点。刺参基因组中比对到 2 个 *AjTRAF7* 基因拷贝,第一个拷贝包含 18 个外显子和 15 个内含子,第二个拷贝包含 17 个外显子和 14 个内含子。系统进化学分析表明,刺参 *TRAF7* 氨基酸序列与蝠海星(*Patiria miniata*)和紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)相似性较高,分别为 40.58%和 38.37%,刺参与蝠海星和紫色球海胆聚在一支。RT-qPCR 结果显示,*AjTRAF7* 在健康刺参各组织中均有表达,其在雌性性腺中表达量最高,体腔细胞中表达量次之,在呼吸树、体壁、肠道、雄性性腺和纵肌中表达量依次降低,各组织间表达量差异显著($P<0.05$)。在响应高温胁迫的过程中,与对照组相比,体壁组织中 *AjTRAF7* 基因表达量在第 2 天和第 4 天显著上升($P<0.05$),第 6 天基因表达开始下降。综上,*AjTRAF7* 基因可能参与刺参应对高温胁迫的表达调控过程,相关结果将为解析刺参应对高温胁迫的分子机制提供科学依据。

关键词 刺参; *TRAF7*; 高温胁迫; 基因克隆; 表达特征

中图分类号 S966 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2025)01-0149-12

* 山东省重点研发计划(2023LZGC019)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD29)和青岛市重点研发计划(22-3-3-hygg-1-hy)共同资助。赵岩峰, Email: 2272514067@qq.com

① 通信作者: 廖梅杰, 研究员, Email: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-01-12, 收修改稿日期: 2024-01-31

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor associated factor, TRAF)为胞内信号传递蛋白,具有 E3 泛素连接酶活性,介导包括 TNF 受体家族(TNFR)和 Toll 样受体-白细胞介素-1 受体(TLR-1L-1R)家族在内的多个受体家族的信号转导过程,激活 NF- κ B (Nuclear factor- κ B)和 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)在内的多个信号通路(Wang *et al*, 2010; Ha *et al*, 2009; Into *et al*, 2012), 调控先天免疫、获得性免疫、胚胎发育和骨代谢等过程(Xie, 2013; 万春红等, 2016)。TRAFs 的保守结构域均具有重要功能, TRAFs 的 Coiled coil 结构域参与线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS)介导的非特异性免疫过程(Fang *et al*, 2017)。目前,在哺乳动物中,TRAF 家族共鉴定出 7 种 TRAFs, TRAF7 是最后在蛋白网络中被筛选并鉴定的(Bouwmeester *et al*, 2004)。TRAF7 与家族其他蛋白的不同之处在于 TRAF7 缺乏 TRAF 结构域(Zotti *et al*, 2012)。研究人员对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)和马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)等养殖水产动物的 TRAF 基因进行了研究,结果均表明 TRAF 参与有机体应对刺激后的免疫反应过程,验证了半滑舌鳎 *CsTRAF6*、三角帆蚌 *HcTRAF6* 和斜带石斑鱼 *EcTRAF7* 具有激活 NF- κ B 信号通路的功能(李坤明, 2019; 杨曼, 2018; 胡宸曦, 2020; 雷倩楠等, 2016)。在仿刺参(*Apostichopus japonicus*) TRAF 方面,研究人员仅对仿刺参 TRAF6 进行基因克隆并分析刺参在灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)侵染后基因表达模式(Lu *et al*, 2013)。

仿刺参又称刺参,具有重要的食用和药用价值,是我国重要的海水养殖经济物种(郑童潇等, 2023)。刺参属温带种,一般认为其最适生长温度为 10~16 $^{\circ}\text{C}$ (袁秀堂, 2005),半致死温度为(31.7 \pm 0.15) $^{\circ}\text{C}$ (张宇洋等, 2022)。然而,近年来,由于全球气温变暖、厄尔尼诺等原因,我国北方夏季频繁出现极端高温天气,造成池塘养殖刺参大面积死亡,严重影响了刺参养殖业发展(Chang *et al*, 2022; 畅孟阳等, 2023)。目前,已从生理行为、蛋白水平、代谢水平和转录组水平分析了刺参响应高温胁迫的机制,表明刺参应对高温胁迫的免疫机制是一个复杂的调控过程,高温胁迫下刺参氧化应激相关酶活力改变,免疫响应相关蛋白上调,蛋白合成能力受到抑制,能量类物质发生改变,氨基酸、脂类、辅酶和维生素代谢的代谢产物发生变化,碳水化合物代谢减少,热休克蛋白家族相关基因

和 NF- κ B 等通路相关基因表达差异显著,但具体的调控机制尚不清晰(温争争, 2016; 霍达, 2020; Chang *et al*, 2022)。本团队前期在高温胁迫刺参体壁转录组测序结果中发现, *TRAF7* 在对照组健康刺参和高温胁迫组化皮刺参之间表达差异显著(Chang *et al*, 2022), 暗示了其在响应高温胁迫中发挥一定的调控作用,但刺参 *TRAF7* 基因结构及其在高温胁迫下的具体表达模式仍未见相关报道。本研究在前期研究基础上,利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了 *AjTRAF7* 的全长序列,预测其蛋白的理化性质和蛋白结构域,解析该基因在基因组中的分布,构建进化树并结合实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR)分析该基因在刺参不同组织中的表达以及在响应高温胁迫过程中的表达变化,旨在为进一步深入解析刺参高温耐受机制和耐高温品种的培育提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用刺参苗种购自山东省青岛瑞滋集团有限公司,挑选生理活动健康的刺参作为实验对象,实验所用刺参的平均体重为(54.0 \pm 0.5) g/只,正式实验开始前在新鲜海水中暂养 1 周,暂养用海水为砂滤海水,水温为(14.0 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,盐度为 28.0 \pm 0.5,持续充气。

实验分为高温组和对照组,每组设 3 个平行。对照组水温控制在(14.0 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,高温组采用逐步升温的策略,即按照每 24 h 升温 2 $^{\circ}\text{C}$ 的策略升至 32 $^{\circ}\text{C}$ 后维持恒温,该温度近似刺参半致死温度(LT₅₀)(张宇洋等, 2022)。实验水槽为 100 L 白色矩形水桶,每桶注入 75 L 清洁海水并随机放入 25 头实验用刺参,实验过程中每天更换 10 L 新鲜海水,连续充气,高温组水温达到 32 $^{\circ}\text{C}$ 开始计时。在实验开始时,从对照组中随机选取刺参个体,剖取体壁、呼吸树、肠道、纵肌、性腺和体腔细胞等组织,经液氮速冻后保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱,用于该基因不同组织间表达差异检测;分别在第 0、2、4、6、8 天自对照组和高温组中随机抽取刺参个体,剖取各组织用于检测刺参响应高温胁迫过程的表达差异。

1.2 总 RNA 提取与反转录

使用总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 大连)提取刺参各组织总 RNA,使用微量分光光度计 NanoDrop1000 检测 RNA 浓度与纯度,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,利用反转录试剂盒(TaKaRa, 大连)对所提取的 RNA 进行逆转录,获取 cDNA。

1.3 *AjTRAF7* 全长基因克隆

基于本实验室刺参转录组测序文件(Chang *et al.*, 2022), 获取 *AjTRAF7* CDS 片段序列, 以该序列为模版, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物(表 1)。以健康刺参体壁组织 cDNA 为模版进行 PCR 扩增, 反应体系: 2× Rapid Taq Master Mix (Vazyme) 25 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 2 μL, 灭菌去离子水 21 μL; 反应程序: 95 °C 5min, 35 个循环(95 °C 15 s, 60 °C

15 s, 72 °C 10 s), 72 °C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据获得的基因编码区序列设计用于 RACE 和巢式 PCR 的特异性引物(表 1)。利用切胶回收试剂盒(AG 艾科瑞)对巢式 PCR 产物切胶回收, 使用 pMD19-T Vector 载体(TaKaRa)进行 TA 克隆, 并转化至 DH-5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆进行测序, 利用 MEGA 和 SnapGene 确认引物位置, 并对测序获得的序列进行拼接, 获得该基因的全长序列。

表 1 *AjTRAF7* 基因全长克隆所用引物序列
Tab.1 Primer sequences used for full-length cloning of *AjTRAF7* gene

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
5TR-F	ACATTTTGCCGGGCTGTCT	编码区序列扩增
3TR-R	CCAGAGCAGAGGAGCCCTTGGA	编码区序列扩增
5TRGSP1	CAACCGCTTCATTCCATTCTGC	5' RACE PCR
5TRGSP2	AGACAGGCCCGGCAAATGT	5' RACE 巢式 PCR
3TRGSP1	TCGTGCAACTAATGCTAAGCCCCGA	3' RACE PCR
3TRGSP2	TCCAAGGGGCTCCTCTGCTCTGG	3' RACE 巢式 PCR
SP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	巢式 PCR
TRAF7-F4	GCTGCCCTGGACAAGACCATA	RT-qPCR
TRAF7-R4	TGATGAGAAGAGATTGCTACCGGC	RT-qPCR
<i>cytb</i> -F	TGAGCCGCAACAGTAATC	内参基因的 RT-qPCR
<i>cytb</i> -R	AAGGGAAAAGGAAGTGAAAG	内参基因的 RT-qPCR

1.4 序列分析

使用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测序列开放阅读框(ORF); 使用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的分子量、不稳定系数和总平均亲水性等理化性质; 使用 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)网站预测蛋白结构域; 使用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org>)同源建模预测蛋白质三维结构; 使用 SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)预测信号肽; 使用 TM-HMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测蛋白质跨膜结构域; 使用 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)预测蛋白的磷酸化位点; 使用 NetNGlyc-1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/netnglyc/>)预测蛋白质糖基化位点; 使用 prabi (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白二级结构; 使用 DNAMAN 进行序列比对分析; 使用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)和 ESPrpt 3.0

(<https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)绘制序列比对图并计算序列相似性; 使用 MEGA11、NCBI Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)和 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)分析氨基酸序列相似性; 使用 MEGA 11 计算遗传距离并应用邻接法构建系统进化树; 使用 TBtools 将 *AjTRAF7* CDS 序列和本实验室组装的刺参基因组序列(序列号 PRJNA901209)进行比对, 根据基因结构注释信息, 构建基因染色体分布图; 使用软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)对所在基因进行外显子和内含子等结构注释。

1.5 *AjTRAF7* 基因在健康刺参不同组织及响应高温胁迫过程中的表达特征分析

按照反转录试剂盒(TaKaRa)说明书, 以各组织总量 1 μg RNA 为模版, 合成 RT-qPCR 所需 cDNA。基于 *AjTRAF7* 编码区序列, 在 NCBI 上设计 RT-qPCR 引物(表 1), 使用 *cytb*(*Cytochrome b*)作为内参(杨爱馥等, 2010)(表 1)。按照试剂盒(TaKaRa)说明书, 进行 RT-qPCR: TB Green Premix *Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (2×) 10 μL, 上下游引物各 0.8 μL, cDNA 2 μL,

灭菌去离子水 6.4 μL; 程序: 95 °C 30 s, 40 个循环 (95 °C 5 s, 60 °C 30 s), 熔解曲线程序参照荧光定量设备说明书(Eppendorf)。

每种组织 3 个生物学重复、4 个技术性重复。使用 2^{-ΔΔCt} 方法分析 *AjTRAF7* 在健康刺参体壁、呼吸树、肠道、纵肌、性腺和体腔细胞等组织中的相对表达水平及基因在健康刺参第 0 天和 32 °C 高温胁迫第 2、4、6、8 天化皮刺参体壁组织中的相对表达水平, 使用 GraphPad prism 9.0 软件绘制表达分布特征和调控变

化图。显著性水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 *AjTRAF7* 结构特征

利用 RACE 技术克隆获得的 *AjTRAF7* 基因全长为 2 576 bp, 其 ORF 为 1 770 bp, 5'UTR 为 345 bp, 3'UTR 为 461 bp, 编码 589 个氨基酸(图 1); 该基因预测蛋白质的分子量为 65.6 kDa, 理论等电点(pI)为

```

1 gagtcacctgggtgtactctgtttactccacctgggtgcggaatcgaaattatatgagagattggctcttggctcttgggtgttttagg
91 ctagcgcatactatttagcatgtatttgaagccttaggactgccaatgggtacaccaccagcacaccaacaagcaaccctcctcgctaaaa
181 tctttacttcccgccgcaacctgtttagcaccacttgggagtgtaacatacacagacaaactctacagcgttgggtgctcctaaag
271 tcctaggccctagccaatgtggctgctgggtgtgtaggtcccgaaagcgttctggagagcttattgtaaatgcATGTCGATTCACTA
1 M V D S L
361 ATGAGCCAGAAACCAATTATTGTAGAAGCTCCGTCATCTCACTTGTATTGTCCAACATGCAGTGACATCTCAGCGATCCTGTCATCAGT
6 M S Q K P L F V E A P S S H L Y C P T C S D I L S D P V I S
451 GTGGCATGTGGCCATACATTTTCCGGGGCTGTCTGTGCAATTTCAGATGGGACGGTTAAGGTGACCAATTGCCCCGTGGACAGACATTT
36 V A C G H T F C R A C L C N S D G T V K V T N C P V D Q T F
541 ATCCAAAATGGTACCCTGTCGATAACAGGGCTATCCTTTCCAGATTCAGAAATCTGAGAAATATATTGCAGGAATGGAATCAAGCCGTTG
66 I Q N G T T V D N R A I L S Q I Q D L R I Y C R N G M K R L
631 AATTCTCGAAATGACACTGCTGGTACAAAATGGTGTCCAGAGGATTTGTCGATAGCATCAGCCGCTACTCATGTTTTCAGTTTGAC
96 N S R N D T V V V Q N G C P E V L S I A S A A T H V C Q F D
721 GATATAGAATGTCCAAATAGCCCGATCTCGGAAAAGTTCAAGAAAGGCGAACTGGCGGATCACTGTGCATCTCCTGCTGTTTCGTAAGC
126 D I E C P N S P I C G K F K K G E L A D H L S Y S C C F V S
811 TGCCCTAATAAAGGTTGTTCCCATCATGGGACATTAGCTGATATCAGGCAACATCAAATACCTGTCACCTTCTCATGTCCAGCTGAAT
156 C P N K G C S H H G T L A D I R Q H Q I T C P F F M S Q L N
901 TCATCGATCAATACCCAGACAAAATAGTATGAAACCATTCGACTCTGTTAAGAAGATCGGTGATCTGGAACAATCGAGGGCTTAATG
186 S S I N T Q T N S D E T I T T L F K K I G D L E Q S R A V M
991 GAGCAAACTAACAGAGCAAAAGAACTTGATACAGACTTTAGAAAAGAAAGCTAAAGCTACTGGAGGGAGAAGTCCAGTCCAAACAGAA
216 E Q S L T E Q R N L I Q T L E R K L K L L E G E V Q S N Q K
1081 AGETTAGATTTGCCCTCCGTTAATAGACAGAGACCAAGAAGCTCTTCCACGAATCGTGGACAGAAAAGTCTGCTCTGCCAGCTTCGAG
246 R L D V A S V N R Q R P R T S S T N R G Q K L S L S A S F E
1171 AGTCACCTGTGGAGCAGAGAAGCCTGGCACTTACCCTTTGAGTTCAGTGTATCGGCACTTTGAGAGGCCATCAAGGTGCTGCCACAGT
276 S H L W S R E A W H L P F E F K C I G T L R G H Q G A V H S
1261 CTGGCAATTCACAGAGACAAACTTTAATCGGGAGGCTCAGATTGTGTTTATAAAGTTTGAATTTATTGGGACTTAGCAAAAGTTGTGTC
306 L A I H R D K L Y S G G S D C V I K V W N L L G L S K G C V
1351 CAGAACTTAGGGACACACCAAAAGGTTGGTGGCATTGGTAGCTGGGCAATATACCTCTACAGTGTCCCTGGACAAAGACCATACGA
336 Q E L R G H T K Q V V A L V A G Q I Y L Y S A A L D K T I R
1441 TGCTGAAATATGAGACTCCGGCACTGATGTTAAAATATCAAAAATGCCATGATGAAGACATATGCTCTCATAATGCCCGTAGC
366 C W N Y E T P D T D V K I I K N A H D E D I C A L I M A G S
1531 AATCTCTCTCATCATCAAAGTCTGAAGTGAAGATATGGAAGGCTGATACGCTGGAGTTTCTAAAAGCCATATCAGGCCTACATCATTTGG
396 N L F S S S K S E V K I W K A D T L E F L K A I S G L H H W
1621 GTACGGCACTGGCTTTGGACCCCTCATGAGGAGAACTTATACTGTGGCTCCCATAACACGGTACCGCTCTGGGACGCAACCTCTCAGTTC
426 V R A L A L D P H E E N L Y C G S H N T V T V W D A T S Q F
1711 AGCATGAAGAAGAAGTGGACCATTTGTTTGGTTCOGTTTCTCTGCGAGTCAAAACCACTATTGTTTGGCGAACCGAAAAA
456 S M K K K M D H L F G S V F S L A V S N T Y L F V G T E K
1801 GGCATAGTGATCTTTCATGTGACATCCACCACTCCTGAAAACCTTGAACCTCTGAAAGGGTGTTCGTGCAACTAATGCTAAGCCCC
486 G I V I F H V T S H Q L L K T L E P L K G C F V Q L M L S P
1891 GATATGAATTAAGTTCAAGCCATCTGACAGTACTGTAGAGATATACCACCTAGAAAACCTTCTGAGCATACAAGTTTATCCCGT
516 D M N Y L V S S H S D S T V E I Y H L E N F L S I Q V L S R
1981 CATTATGGAAGTGTAAATGCTTGGCAGTAAAAGTCCAAGGGCTCCTCTGCTCTGCATCTGATGATCAGGAAATAAAGATTTTACT
546 H Y G S V N C L A V K S S K G L L C S G S D D Q E I K I F T
2071 TACTTCCCACTCACCCTCACAGTCTTATGGAATCCATATCGAcagggtgctaatactctcttgggagccttttcatcgagactct
576 Y F P L T T H S A Y G I H I *
2161 accaagcaatctttcttaagctaaagttttaaagctcccactgaccatgtctttctctggggttgagaattcgggtgactttcaaatgt
2251 cactttatcttcaataacaggaatcctcgtaaagaatcagcttgtgtaacattgtttggactgctcagtttggtatcactgcttt
2341 atgtcttatttttttatagaaattatgaatttccattatgtaaaacatcattacaataaccccctctccccctctctgtaga
2431 ggaatgatcaaatcaatggataaagaagaatatacatggttttatgatgtcattttaggcttactgaagatctgocctctggtatttg
2521 aaggcaacttgaacatgaaattccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 *AjTRAF7* 基因核酸序列及编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleic acid sequence of the *AjTRAF7* gene and the encoded amino acid sequence

大写字母: 开放阅读框; 小写字母: 非编码区; 黑色框: 起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA);

黄色阴影: WD40 重复片段; 黑色直线: RING finger; 黑色波浪线: Coiled coil 结构域。

Uppercase letters: ORF; Lowercase letters: UTR; Black box: Start codon (ATG) and stop codon (TGA);

Yellow shadow: WD40 Repeat Fragment; Black straight line: RING finger; Black wavy line: Coiled coil structural domain.

7.52, 不稳定系数为 32.34, 不稳定系数低于 40, 表明该蛋白为稳定蛋白, 总平均亲水性(GRAVY)为 -0.150, 表明该蛋白为亲水性蛋白。

蛋白质结构域预测结果见图 2, *Aj*TRAF7 蛋白包含一个 RING finger 结构域, 一个 Coiled coil 结构域, 蛋白 C 端具有与 TRAF 结构域类似的 6 个重复 WD40 结构域, 其中, RING finger 是 TRAFs 的典型结构域。蛋白二级结构结果显示, *Aj*TRAF7 蛋白含 30.05%的 α -螺旋, 6.62%的 β -转角, 36.84%的无规则卷曲和

26.49%的延伸链。该预测蛋白质的三维结构预测结果见图 3, *Aj*TRAF7 蛋白 N 端包含螺旋区域, 与人的 TRAF7 (*Homo sapiens*, NP 115647.2)蛋白三维结构比较, 发现二者三维结构存在差异, 但二者均包含明显的螺旋区域(图 3); 整个编码蛋白未预测到信号肽和跨膜区域, 预测该蛋白为胞质蛋白; 分别预测到 41 个丝氨酸磷酸化位点、20 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点; 在蛋白 N 端具有 3 个天冬酰胺糖基化位点。

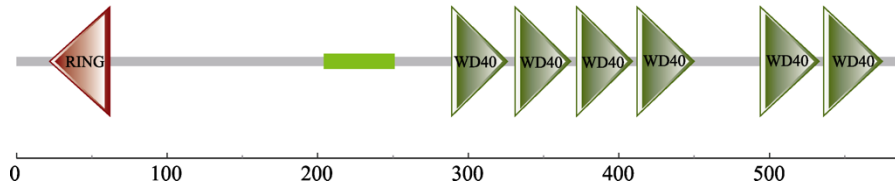


图 2 *Aj*TRAF7 蛋白结构域组成
Fig.2 Domain organization of *Aj*TRAF7 protein

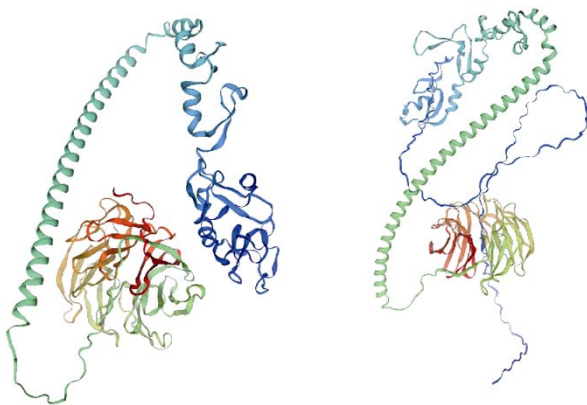


图 3 TRAF7 蛋白分子结构(左: 刺参; 右: 智人)
Fig.3 The structure of TRAF7 protein molecules (Left: *Apostichopus japonicus*; Right: *H. sapiens*)

将 *Aj*TRAF7 CDS 序列与刺参染色体水平全基因组序列进行比对, 与基因组中 2 个 CDS 序列高度相似, 分别为 *evm.model.chr8.1363* (Score: 3158.9 Bits) 和 *evm.model.chr8.1742* (Score: 3125.7Bits); *Aj*TRAF7 氨基酸与 *evm.model.chr8.1363* 和 *evm.model.chr8.1742* 氨基酸序列相似性分别为 98.98%和 98.81%; 综合 ClustalW、MEGA 和 NCBI Blastp 结果, 发现 *Aj*TRAF7、*evm.model.chr8.1363* 和 *evm.model.chr8.1742* 氨基酸相似性均大于 98%, 表明 *evm.model.chr8.1363* 和 *evm.model.chr8.1742* 为 *Aj*TRAF7 基因的 2 个拷贝; *evm.model.chr8.1363* 和 *evm.model.chr8.1742* 基因分别位于 chr8 的序列 25 Mb 和 35 Mb (图 4); 对 2 个拷贝进行结构注释, 结果见图 5, *evm.model.chr8.1363* 基因包含 18 个外显子(包含 UTR 区), 15 个内含子;

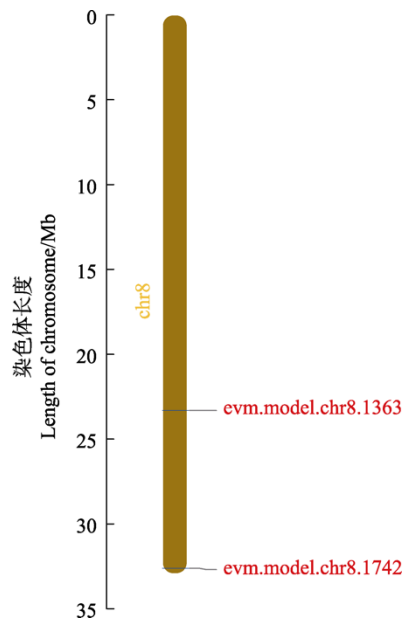


图 4 *Aj*TRAF7 在刺参染色体水平基因组分布图
Fig.4 Genomic distribution of *Aj*TRAF7 at the chromosome level in the sea cucumber

evm.model.chr8.1742 包含 17 个外显子(包含 UTR 区)和 14 个内含子。

2.2 多序列比对和系统进化分析

TRAF7 蛋白的氨基酸序列相似性分析结果见图 6, 刺参与蝠海星(*Patiria miniata*)和紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的氨基酸序列相似性较高, 分别为 40.58%和 38.37%, 刺参与原鸡(*Gallus gallus*)相似性最低, 为 21.39%(表 2); 系统进化分析

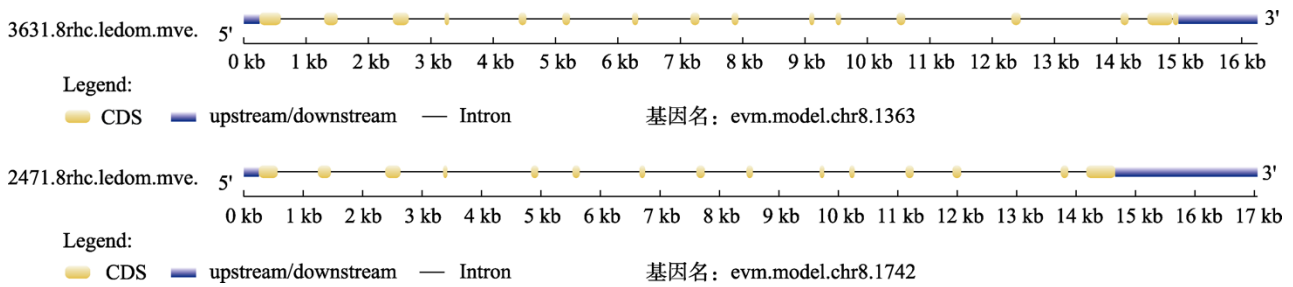


图 5 外显子-内含子结构

Fig.5 Exon-intron structure diagram

蓝色: UTR 区; 黄色: 外显子; 上方黑线: 内含子; 下方黑线: 基因长度。

Blue: UTR region; Yellow: Exons; Upper black line: Introns; Lower black line: Gene length.

表 2 刺参与其他动物 TRAF7 氨基酸序列之间相似性分析与遗传距离

Tab.2 Similarity analysis and genetic distance between the amino acid sequences of the TRAF7 in sea cucumber and other animals

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.82	0.85	1.03	1.11	1.13	1.12	1.12	1.11	1.12
2	40.58		0.67	0.97	1.11	1.08	1.09	1.09	1.12	1.09
3	38.37	46.49		0.94	1.17	1.16	1.22	1.15	1.17	1.16
4	29.03	34.28	36.12		1.14	1.13	1.11	1.11	1.14	1.14
5	21.90	19.40	20.96	24.58		0.08	0.59	0.10	0.03	0.07
6	21.39	19.90	16.34	24.92	92.23		0.56	0.08	0.08	0.03
7	24.45	25.08	16.34	20.90	53.06	55.78		0.53	0.58	0.59
8	22.24	19.40	17.16	25.59	90.30	87.64	55.71		0.10	0.07
9	22.07	19.57	20.79	24.58	95.67	91.44	53.21	90.45		0.07
10	21.90	19.90	16.67	24.75	93.13	97.94	53.51	93.11	92.24	

注: 1. 仿刺参; 2. 蝠海星; 3. 紫色球海胆; 4. 欧洲平牡蛎; 5. 智人; 6. 原鸡; 7. 海百合; 8. 斑马鱼; 9. 小鼠; 10. 绿海龟。右上方为遗传距离, 左下方为相似性(%)。

Note: 1. *Apostichopus japonicus*; 2. *Patiria miniata*; 3. *Strongylocentrotus purpuratus*; 4. *Ostrea edulis*; 5. *Homo sapiens*; 6. *Gallus gallus*; 7. *Anneissia japonica*; 8. *Danio rerio*; 9. *Mus musculus*; 10. *Chelonia mydas*. Genetic distances are shown in the upper right and similarities (%) in the lower left.

结果显示, 棘皮动物中的刺参、蝠海星和紫色球海胆聚在一个分支, 智人和小鼠(*Mus musculus*)聚为一支, 原鸡和绿海龟(*Chelonia mydas*)聚为一支(图 7)。

2.3 *AjTRAF7* 基因在健康刺参组织中表达模式分析

AjTRAF7 在健康刺参不同组织的表达情况见图 8, 结果显示, *AjTRAF7* 在刺参各组织中均表达, 将体壁组织中基因表达量设定为标准值 1.0, 基因在各组织间表达量存在显著差异($P < 0.05$), 其中, 雌性性腺中表达量最高, 为标准值的 3.34 倍, 显著高于其他组织($P < 0.05$), 其次为体腔细胞、呼吸树、体壁和肠道, 分别为标准值的 1.97 倍、1.37 倍、1.00 倍和 0.96 倍, 在雄性性腺和纵肌中相对表达量最低, 分别为标准的

0.23 倍和 0.14 倍。

2.4 高温胁迫后 *AjTRAF7* 基因在体壁中的表达模式

鉴于体壁为高温胁迫后最直接的胁迫反馈组织, 本研究对比分析了高温胁迫不同时间点体壁组织中该基因的表达情况(图 9)。与对照组第 0 天相比, 高温胁迫后 *AjTRAF7* 在第 2、4、6、8 天刺参体壁中的表达出现变化。在高温胁迫后的第 2 和 4 天表达出现显著上升, 为对照组体壁中基因表达量的 2.48 倍和 2.60 倍($P < 0.05$); 第 6 天, 表达上升但不显著, 为对照组体壁中表达量的 1.44 倍; 第 8 天, 表达出现显著下降, 为对照组体壁中基因表达量的 0.48 倍($P < 0.05$)。

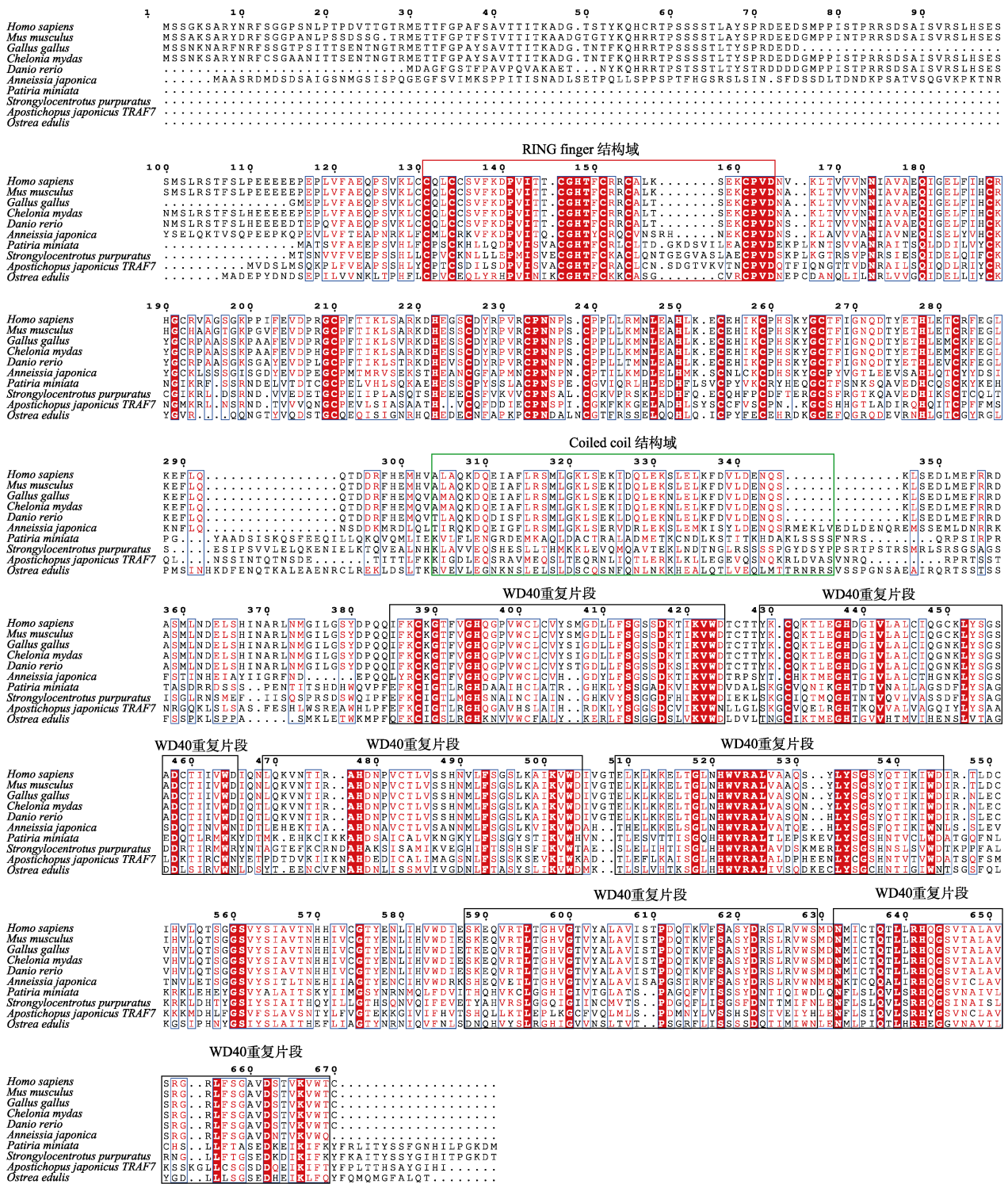


图 6 *Aj*TRAF7 氨基酸序列与其他物种 TRAF7 氨基酸序列多重序列比对

Fig.6 Multiple sequence alignment of *Aj*TRAF7 amino acid sequence with other species' TRAF7 amino acid sequence

红色阴影区域: 完全一致的氨基酸残基; 红色字母: $\geq 75\%$ 相同的残基; 蓝色框: 75%以上相同的残基;

红色框: RING finger 结构域; 绿色框: Coiled coil 结构域; 黑色框: WD40 重复片段

GenBank number: *Homo sapiens* (NP 115647.2); *Mus musculus* (NP 001402080.1); *Gallus gallus* (XP 040503313.1);

Chelonia mydas (XP 043379460.1); *Danio rerio* (NP 001073654.1); *Anneissia japonica* (XP 033122179.1);

Patiria miniatia (XP 038067895.1); *Strongylocentrotus purpuratus* (XP 003725416.2); *Ostrea edulis* (XP 048755261.2).

Red shaded area: Identical amino acid residues; Red letters: $\geq 75\%$ identical residues; Blue boxes: more than 75% identical residues; Red box: RING finger structural domain; Green box: Coiled coil structural domain; Black box: WD40 repeats.

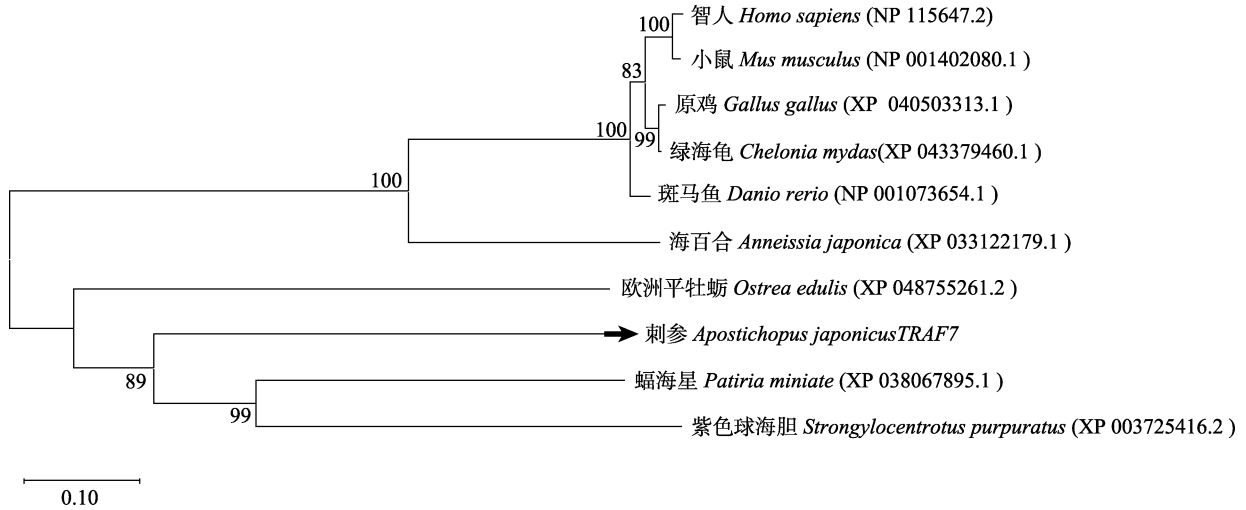


图 7 刺参和其他物种 TRAF7 系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of TRAF7 in *Apostichopus japonicus* and other species

进化树使用 MEGA 11 软件以 Neighbor-Joining 方法构建，节点数值表示 1 000 次重复 bootstrap 的置信度百分比，遗传距离是 0.10，括号内为 GenBank number，箭头位置是刺参 TRAF7。

The evolutionary tree was constructed using MEGA 11 software using the Neighbor-Joining method.

The node values represent the confidence percentage of 1 000 repeated bootstraps, with a genetic distance of 0.10 and GenBank number in parentheses. The arrow position is the *Aj*TRAF7.

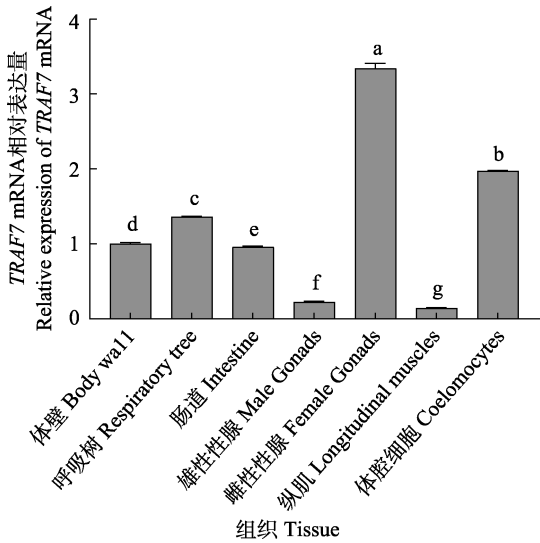


图 8 *Aj*TRAF7 基因在健康刺参各组织中分布特征

Fig.8 Characterization of *Aj*TRAF7 gene expression distribution in various tissues of healthy sea cucumber ($n=3$)

不同字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$)，下同。
Different letters indicate significant differences among different tissues ($P<0.05$), the same below.

3 讨论

本研究克隆了刺参 *Aj*TRAF7 基因全长，序列分析及结构预测结果显示，该基因与水产动物中已报道的 TRAF7 基本一致。*Aj*TRAF7 ORF 长 1 770 bp，比三

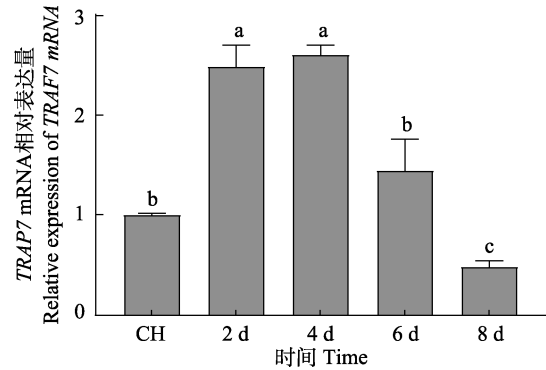


图 9 高温胁迫后 *Aj*TRAF7 基因在体壁中表达模式

Fig.9 Expression pattern of *Aj*TRAF7 gene in the body wall after high temperature stress

以对照组(CH)体壁组织中基因表达量设定为标准值 1.0。

Gene expression in the body wall of the control (CH) was set as a standard value of 1.0.

角帆蚌(ORF 1 803 bp)(胡宸曦, 2020)、马氏珠母贝(ORF 1 809 bp)(雷倩楠等, 2016)、半滑舌鳎(ORF 1 965 bp)(李坤明, 2019)和斜带石斑鱼(ORF 1 977 bp)(杨曼, 2018)等水产动物的基因序列要短。刺参 TRAF7 蛋白未预测到信号肽和跨膜区域，表明该蛋白为胞质蛋白，与软体动物马氏珠母贝 *Pm*TRAF7 (雷倩楠等, 2016)预测的结果一致，且与斜带石斑鱼 *Ec*TRAF7 蛋白的亚细胞定位结果一致(杨曼, 2018)。*Aj*TRAF7 蛋白包含 1 个 RING finger 结构域、1 个 Coiled coil 结

构域和 6 个 WD40 重复片段,未预测到 TRAF 结构域,但 WD40 重复片段与 TRAF 结构域作用类似(Xu *et al.*, 2004; Zotti *et al.*, 2012)。*AjTRAF7* 蛋白与刺参 TRAF6 相比,二者均包含 RING finger 结构域和 Coiled coil 结构域,但 *AjTRAF7* 蛋白包含 WD40 重复片段,刺参 TRAF6 包含 MATH 结构域(Lu *et al.*, 2013)。研究人员对水产物种 TRAF7 蛋白结构域进行了预测,发现半滑舌鳎、三角帆蚌、斜带石斑鱼和马氏珠母贝 TRAF7 蛋白均包含 RING finger 结构域和 7 个 WD40 重复片段,此外,三角帆蚌 *HcTRAF7* 蛋白包含 1 个锌指结构域和 1 个 Coiled coil 结构域,斜带石斑鱼 *EcTRAF7* 蛋白包含 1 个 Coiled coil 结构域,马氏珠母贝 *PmTRAF7* 蛋白包含 Zinc finger TRAF-type profile (李坤明, 2019; 胡宸曦, 2020; 杨曼, 2018; 雷倩楠等, 2016)。*AjTRAF7* 蛋白包含 RING finger 结构域与上述水产物种蛋白结构域一致。但 *AjTRAF7* 蛋白包含 6 个 WD40 重复片段,少于上述水产物种 TRAF7 蛋白结构域预测结果,TRAF7 蛋白能够与 MEKK3 (MAP kinase/ERK kinase kinase 3)特异性相互作用,并在激活 NF- κ B (nuclear factor- κ B)过程发挥重要作用,TRAF7 蛋白的 WD40 结构域可与 c-Myb 特定 DNA 结合域互作而发挥特定生物功能,*AjTRAF7* 蛋白 WD40 重复片段的数量减少可能影响其功能(Bouwmeester *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2005; Tsitsikov *et al.*, 2023)。*AjTRAF7* 蛋白包含 1 个 Coiled coil 结构域,与三角帆蚌和斜带石斑鱼 TRAF7 蛋白结构域预测结果相同,研究提出 TRAF7 蛋白 Coiled coil 结构域参与非特异性免疫过程(胡宸曦, 2020; 杨曼, 2018; Fang *et al.*, 2017)。与三角帆蚌 *HcTRAF7* 相比,*AjTRAF7* 蛋白未预测到锌指结构,却预测到 RING finger 结构域,这 2 个结构域在信号转导过程中均极其重要(胡宸曦, 2020)。TRAF7 蛋白的 RING finger 结构域具有 E3 泛素连接酶活性,可自身泛素化(Jackson *et al.*, 2000),并且该结构域在信号转导过程中起重要作用(Wajant *et al.*, 2001),TRAF7 蛋白通过 RING 结构域促进 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)的 K48 连接的泛素化负调控先天抗病毒免疫(Huang *et al.*, 2023)。推测刺参中该蛋白具有信号转导功能,在刺参响应高温胁迫产生非特异性免疫过程中起到重要作用。

AjTRAF7 在各组织中均有表达,说明 *AjTRAF7* 基因具有广泛的生物学功能。该基因在各组织间相对表达量差异显著,以体壁组织中基因表达量设定为标准值 1.0,其在雌性性腺中相对表达量最高,体腔细胞次之,在呼吸树和肠道组织中的表达量较高,在雄

性性腺和纵肌中的相对表达量较低。作为棘皮动物,刺参自身并不具备特异性免疫,只能依靠非特异性免疫(Rowley *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015),无脊椎动物的体腔细胞作为先天免疫反应的关键影响因子,介导了非特异性免疫反应(Fernanda *et al.*, 2012)。*AjTRAF7* 在雌性性腺中表达量最高,与该基因在三角帆蚌性腺中表达量最高的结果相似(胡宸曦, 2020)。*AjTRAF7* 在体腔细胞中相对表达量较高,与刺参体腔细胞的非特异性免疫功能一致。*AjTRAF7* 在体腔细胞中表达较高,与该基因在马氏珠母贝中主要分布在肝胰腺的结果相似,可能与二者均为免疫组织有关(雷倩楠等, 2016)。*AjTRAF7* 基因在刺参呼吸树分布较高,与该基因在半滑舌鳎主要分布在鳃中及在马氏珠母贝主要分布在鳃中的结果较为相似,该组织均为呼吸相关组织,均为机体接触环境的一道屏障(李坤明, 2019; 雷倩楠等, 2016)。与石斑鱼主要分布在皮肤中的结果具有差异性,猜测可能与物种特异性有关,同时可能与生物生理状态差异有关(杨曼, 2018)。

TRAF7 基因作为 NF- κ B 通路相关基因调控非特异性免疫过程。本研究发现,*AjTRAF7* 基因在高温胁迫过程中的表达量差异显著。这与已有研究中刺参受到高温胁迫后,应激防御相关基因被诱导表达,NF- κ B 通路相关基因表达水平受到影响的结论是一致的(霍达, 2020; 赵欢, 2011)。此外,TRAF7 蛋白依赖不同结构域与对应结合域互作,通过相应的反馈模式参与多个家族信号转导并激活 NF- κ B 和 MAPKs 在内的多个信号通路(Huang *et al.*, 2023),由于涉及多条通路,*TRAF7* 基因在组织中的表达调控模式可能不同,关于高温胁迫后 *TRAF7* 基因具体的表达调控通路需要进一步研究。高温胁迫后 *AjTRAF7* 基因在体壁中表达模式结果显示,在胁迫后的第 2 天和第 4 天,基因表达显著上升($P < 0.05$),第 6 天上升不显著,第 8 天显著下降($P < 0.05$),该结果与石斑鱼、三角帆蚌和半滑舌鳎感染实验中该基因在感染前期上升后期下降的趋势相似(杨曼, 2018; 胡宸曦, 2020)。据此推测,在免疫调控前期,*AjTRAF7* 基因在体壁中上调以响应高温胁迫,后期受长期高温胁迫,免疫力受到严重影响,刺参状态差且出现大量化皮现象,基因表达出现下降(Dong *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008)。

综上,本研究克隆了刺参 *TRAF7* cDNA 全长序列,并对该基因结构和表达模式进行分析。*AjTRAF7* 在各组织中均有分布,在雌性性腺中相对表达量最高,在体腔细胞中次之。随着高温胁迫时间增加,该基因在体壁中呈现先上升后下降的调控模式,表明其可能参与刺参对于高温胁迫的响应过程,而具体的分

子调控机制需要进一步研究。本研究结果可为刺参高温耐受机制研究和耐高温品种的培育提供一定参考。

参 考 文 献

- BOUWMEESTER T, BAUCH A, RUFFNER H, *et al.* A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nature Cell Biology*, 2004, 6(2): 97–105
- CHANG M Y, LI B, LIAO M J, *et al.* Differential expression of miRNAs in the body wall of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* under heat stress. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 929094
- CHANG M Y, LI B, RONG X J, *et al.* Identification of differential expression microRNAs and target genes analysis of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in response to *Vibrio splendidus* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(2): 107–117 [畅孟阳, 李彬, 荣小军, 等. 刺参响应灿烂弧菌感染差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析. *渔业科学进展*, 2023, 44(2): 107–117]
- DONG Y W, JI T T, DONG S L. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Journal of Ocean University of China*, 2007, 6(3): 275–280
- FANG R, JIANG Q, ZHOU X, *et al.* MAVS activates TBK1 and IKK ϵ through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(11): e1006720
- FERNANDA O, CARLA G, CONSTANZA C, *et al.* Cloning and expression analysis of allograft inflammatory factor type 1 in coelomocytes of Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*). *Journal of Shellfish Research*, 2012, 31(3): 875–883
- HA H, HAN D, CHOI Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Current Protocols in Immunology*, 2009, 11: 1–19
- HU C X. Cloning of TRAF gene family in *Hyriopsis cumingii* and their interaction with β -Arrestin. Master's Thesis of Nanchang University, 2020 [胡宸曦. 三角帆蚌 TRAF 家族基因的克隆及与 β -arrestin 蛋白互作. 南昌大学硕士研究生学位论文, 2020]
- HUANG J P, YANG Y X, CHEN T, *et al.* TRAF7 negatively regulates the RLR signaling pathway by facilitating the K48-linked ubiquitination of TBK1. *Virologica Sinica*, 2023, 38(3): 419–428
- HUO D. The physiological response and molecular regulation mechanism of sea cucumbers under thermal and hypoxic stresses. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2020 [霍达. 刺参应对高温低氧胁迫的生理响应与分子调控特征. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2020]
- INTO T, INOMATA M, TAKAYAMA E, *et al.* Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cellular Signalling*, 2012, 24(6): 1150–1162
- JACKSON P K, ELDRIDGE A G, FREED E, *et al.* The lore of the RINGS: Substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10(10): 429–439
- LEI Q N, CUI S F, LIANG H Y, *et al.* Clone and expression analysis of TRAF7 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 7) gene cDNA from *Pinctada martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 79–86 [雷倩楠, 崔少峰, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 TRAF7 基因 cDNA 的克隆及表达分析. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 79–86]
- LI K M. Identification of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) family and PKC- α genes and their role in immune response of *Cynoglossus semilaevis*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 [李坤明. 半滑舌鳎肿瘤坏死因子受体相关因子家族和蛋白激酶 C- α 基因的鉴定及其在免疫应答中的作用研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- LU Y L, LI C H, ZHANG P, *et al.* Two adaptor molecules of MyD88 and TRAF6 in *Apostichopus japonicus* Toll signaling cascade: Molecular cloning and expression analysis. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 498–504
- MORITA Y, KANEI-ISHII C, NOMURA T, *et al.* TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(11): 5433–5444
- ROWLEY A F, POWELL A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *Journal of Immunology*, 2007, 179(11): 7209–7214
- TSITSIKOV E N, PHAN K P, LIU Y, *et al.* TRAF7 is an essential regulator of blood vessel integrity during mouse embryonic and neonatal development. *iScience*, 2023, 26(8): 107474
- WAJANT H, HENKLER F, SCHEURICH P. The TNF-receptor-associated factor family: Scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cellular Signalling*, 2001, 13(6): 389–400
- WAN C H, ZHANG Z, LI S N, *et al.* Research progresses on TRAF7. *China Biotechnology*, 2016, 36(3): 93–101 [万春红, 张志, 李圣纳, 等. TRAF7 的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(3): 93–101]
- WANG F, YANG H, GAO F, *et al.* Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2008, 151(4): 491–498
- WANG J H, ZHAO L Q, LIU J F, *et al.* Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 330–336
- WANG Y, ZHANG P, LIU Y, *et al.* TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(2): 159–168

- WEN Z Z. Study on the cloning, expression and function of genes related to temperature response in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [温争争. 刺参温度应答相关基因的克隆、表达及功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- XIE P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *Journal of Molecular Signaling*, 2013, 8(1): 7
- XU L G, LI L Y, SHU H B. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(17): 17278–17282
- YANG A F, ZHOU Z C, DONG Y, *et al.* Stability comparison of *cytb* and β -actin genes expression in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(1): 79–84 [杨爱馥, 周遵春, 董颖, 等. 仿刺参 *cytb* 和 β -actin 基因表达稳定性比较. 中国农业科技导报, 2010, 12(1): 79–84]
- YANG M. Identification and functional study of seven TRAFs family genes in grouper (*Epinephelus coioides*). Master's Thesis of South China Agricultural University, 2018 [杨曼. 石斑鱼 TRAF 家族 7 个基因鉴定与功能研究. 华南农业大学硕士研究生学位论文, 2018]
- YUAN X T. Studies on physio-ecology and bioremediation of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2005 [袁秀堂. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 生理生态学及其生物修复作用的研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2005]
- ZHANG Y Y, YU S E, LIAO M L, *et al.* Evaluation and prediction of the effects of extreme high temperatures on sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) pond aquaculture in China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(3): 408–420 [张宇洋, 于双恩, 廖明玲, 等. 仿刺参池塘养殖对极端高温的敏感性评估与预测. 中国水产科学, 2022, 29(3): 408–420]
- ZHAO H. Fundamental research on the molecular mechanism in response to heat stress in *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011 [赵欢. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 对温度胁迫响应分子机理的基础研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011]
- ZHENG T X, LIAO M J, LI B, *et al.* Effects of the cooling equipment based on cooled atomization air on environmental physicochemical indexes and sedimental microbial community structure of sea cucumber culture ponds in summer. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 163–175 [郑童潇, 廖梅杰, 李彬, 等. 池塘冷能气雾降温设备对高温期刺参养殖池塘环境理化指标及沉积物细菌群落结构的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 163–175]
- ZOTTI T, VITO P, STILO R. The seventh ring: Exploring TRAF7 functions. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227(3): 1280–1284

(编辑 冯小花)

Cloning, Characterization and Expression Regulation in Response to High-Temperature Stress of *TRAF7* Gene in the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

ZHAO Yanfeng^{1,2}, LIAO Meijie^{2,3①}, GE Jianlong^{2,3}, WANG Jinjin^{2,3},
WANG Yingeng^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, LI Bin^{2,3}, TAN Yanting^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China)

Abstract As an intracellular protein, tumor necrosis factor receptor-associated factor 7 (TRAF7) is involved in signal transduction and regulates host stress defense. In a previous transcriptome sequencing analysis of the high-temperature-stressed sea cucumber body wall, *TRAF7* was significantly differentially expressed between healthy sea cucumbers and ulcered skin in high-temperature-stressed sea cucumbers.

① Corresponding author: LIAO Meijie, Email: liaomj@ysfri.ac.cn

However, the structure of the *TRAF7* gene and its specific expression pattern under high-temperature stress have not been reported. In this study, based on the results of sea cucumber genome sequencing, the full-length sequence of sea cucumber *TRAF7* (named *AjTRAF7*) cDNA was obtained using RACE technology. Its structural features and distribution in the genome were analyzed, and gene expression was examined in different tissues and under high-temperature stress. *AjTRAF7* has a total length of 2,576 bp, an ORF length of 1,770 bp, a 5'UTR length of 345 bp, a 3'UTR length of 461 bp, and encodes 589 amino acids; the molecular weight of the predicted protein is 65.6 kDa, the theoretical isoelectric point (pI) is 7.52, the instability coefficient is 32.34, and the total average hydrophilicity is -0.150. The *AjTRAF7* protein contains a RING finger structural domain, a coiled-coil structural domain, six WD40 repeats, and the N-terminus contains a helical region. The predicted protein contained 30.05% α -helices, 6.62% β -turns, 36.84% irregular coils, and 26.49% extended strands and was predicted as a cytoplasmic protein. It had 41, 20, and 3 serine, threonine, and tyrosine phosphorylation sites, respectively, and the N-terminus of the protein had 3 asparagine glycosylation sites. Aligned with the sea cucumber genome sequences, *evm.model.chr8.1363* and *evm.model.chr8.1742* served as two copies of the gene. *Evm.model.chr8.1363* contained 18 exons and 15 introns, and *evm.model.chr8.1742* contained 17 exons and 14 introns. The evolutionary tree was constructed with the amino acid sequence of TRAF7. The results showed that the sea cucumber, bat starfish (*Patiria miniata*), and purple globular sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) clustered into one branch, and the sea cucumber was more similar to the bat starfish and the purple globular sea urchin, at 40.58% and 38.37%, respectively. RT-qPCR showed that *AjTRAF7* was expressed in all tested tissues of healthy sea cucumbers. Its expression was highest in female gonads, followed by coelomocytes; it decreased in respiratory trees, body walls, intestines, male gonads, and longitudinal muscles in that order, and the difference in expression among tissues was significant ($P < 0.05$). Under high-temperature stress, *AjTRAF7* expression in body wall tissues increased during the first four d and decreased in the subsequent four d. The results indicated that *AjTRAF7* might be involved in regulating expression in response to high-temperature stress in sea cucumbers, and the results provide a scientific basis for analyzing the molecular mechanism of high-temperature stress in sea cucumbers.

Key words *Apostichopus japonicus*; *AjTRAF7*; High temperature stress; cDNA cloning; Characteristics of expression