

· 农业生物技术 ·

# 昆虫 *TMED* 基因进化及家蚕 *TMED* 基因表达模式分析

王春阳<sup>1</sup>, 郭雨<sup>1</sup>, 李海银<sup>1,2</sup>, 陈萍<sup>1\*</sup>

1 西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

2 贵州大学昆虫研究所 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵州 贵阳 550025

王春阳, 郭雨, 李海银, 陈萍. 昆虫 *TMED* 基因进化及家蚕 *TMED* 基因表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4996-5013.

WANG Chunyang, GUO Yu, LI Haiyin, CHEN Ping. Analyzing the evolution of insect *TMED* gene and the expression pattern of silkworm *TMED* gene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4996-5013.

**摘要:** 跨膜 p24 (transmembrane emp24 domain, *TMED*) 基因与哺乳动物的免疫反应、信号传导、生长发育和疾病发展等密切相关。然而, 昆虫中仅有果蝇 *TMED* 的报道。本研究从基因组鉴定了家蚕、赤拟谷盗、烟草天蛾和意大利蜂的 *TMED* 家族基因, 并发现 1 个  $\alpha$  类、1 个  $\beta$  类、1 个  $\delta$  类和多个  $\gamma$  类的 *TMED* 家族基因成员构成模式产生于膜翅目分化前昆虫的共同祖先, 而果蝇类 *TMED* 家族成员构成在进化中形成了独特模式。昆虫 *TMED* 家族  $\gamma$  类基因进化速度较快, 分化成了 *TMED6-like*、*TMED5-like* 和 *TMED3-like* 这 3 个独立的亚类。*TMED5-like* 基因在膜翅目昆虫发生了丢失, 在鳞翅目昆虫祖先中发生了复制, 在果蝇类发生了重复。昆虫 *TMED* 蛋白除具有典型的 *TMED* 结构特征外, 还有明显的信号肽。家蚕 7 个 *TMED* 基因分布在 6 条染色体上, 1 个基因为单外显子, 6 个基因为多外显子。从幼虫组织克隆了家蚕 7 个 *TMED* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)全序列并登录到 GenBank 数据库。*BmTMED1*、*BmTMED2* 和 *BmTMED6* 在家蚕各个时期和组织中均表达, 所有基因都在家蚕 4 龄、5 龄和丝腺组织中表达。本研究发现了昆虫的 *TMED* 家族成员构成模式、 $\gamma$  类分化特点以及它们的进化历史等, 为进一步研究家蚕以及其他昆虫 *TMED* 基因提供了基础。

**关键词:** 跨膜 p24 (*TMED*); 进化树; 基因克隆; 组织时期表达谱; 家蚕

资助项目: 2021 年重庆市茧丝绸发展专项资金项目(20210607223136209); 重庆市 2022 年现代农业创新团队项目(CQGXNY-2022-09-1)

This work was supported by the 2021 Chongqing Cocoon Silk Development Special Fund Project (20210607223136209) and the Chongqing Modern Agriculture Innovation Team Project in 2022 (CQGXNY-2022-09-1).

\*Corresponding author. E-mail: chenping1918@swu.edu.cn

Received: 2023-04-06; Accepted: 2023-07-21; Published online: 2023-07-25

# Analyzing the evolution of insect *TMED* gene and the expression pattern of silkworm *TMED* gene

WANG Chunyang<sup>1</sup>, GUO Yu<sup>1</sup>, LI Haiyin<sup>1,2</sup>, CHEN Ping<sup>1\*</sup>

1 College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

**Abstract:** Transmembrane emp24 domain (*TMED*) gene is closely related to immune response, signal transduction, growth and disease development in mammals. However, only the *Drosophila TMED* gene has been reported on insects. We identified the *TMED* family genes of silkworm, *Tribolium castaneum*, tobacco moth and Italian bee from their genomes, and found that the *TMED* family gene composition patterns of one  $\alpha$ -class, one  $\beta$ -class, one  $\delta$ -class and several  $\gamma$ -classes arose in the common ancestor of pre-divergent Hymenoptera insects, while the composition of *Drosophila TMED* family members has evolved in a unique pattern. Insect *TMED* family  $\gamma$ -class genes have evolved rapidly, diverging into three separate subclasses, *TMED6-like*, *TMED5-like* and *TMED3-like*. The *TMED5-like* gene was lost in Hymenoptera, duplicated in the ancestors of Lepidoptera and duplicated in *Drosophila*. Insect *TMED* protein not only has typical structural characteristics of *TMED*, but also has obvious signal peptide. There are seven *TMED* genes in silkworm, distributed in six chromosomes. One of seven is single exon and others are multi-exons. The complete open reading frame (ORF) sequences of seven *TMED* genes of silkworm were cloned from larval tissues and registered in GenBank database. *BmTMED1*, *BmTMED2* and *BmTMED6* were expressed in all stages and tissues of the silkworm, and all genes were expressed in the 4th and 5th instar and silk gland of the silkworm. The present study revealed the composition pattern of *TMED* family members, their  $\gamma$  class differentiation and their evolutionary history, providing a basis for further studies on *TMED* genes in silkworm and other insects.

**Keywords:** transmembrane emp24 domain (*TMED*); evolutionary tree; gene cloning; expression profiles of tissues and developmental stages; silkworm (*Bombyx mori*)

跨膜 p24 (transmembrane emp24 domain, *TMED*)蛋白主要参与细胞内蛋白质的运输和囊泡的形成<sup>[1]</sup>, 在免疫反应、信号传导、胚胎发育和疾病发展等方面发挥重要作用<sup>[2]</sup>。鉴定家蚕以及其他昆虫的 *TMED* 家族基因, 分析其蛋白结构特征和进化关系, 并探究相关基因在家蚕中的表达模式, 可为深入研究家蚕 *TMED* 基因的生物功能奠定基础, 并为后期家蚕的利用

以及农林害虫的防控提供线索。

*TMED* 蛋白是一种分子量约为 24 kDa 的 I 型跨膜蛋白, 广泛存在于真核生物, 参与了细胞内分泌途径的早期和晚期, 特别是在内质网和高尔基体之间的早期分泌途径中发挥着重要作用<sup>[3-4]</sup>。*TMED* 蛋白包含 4 个特征结构, 即高尔基体动力学(Golgi-dynamics, GOLD)结构域、假定的卷曲螺旋(coiled-coil, CC)结构域、单个

跨膜结构域和一个胞质侧的短肽段<sup>[5]</sup>,其中N端的GOLD结构域和CC结构域共同形成腔内结构,在蛋白质的识别和转运中起着重要的调节作用;C端胞质侧的短肽段包含与外被体蛋白(coat protein, COP)复合物结合的序列,以便其调节蛋白质在内质网和高尔基体之间的双向运输<sup>[1]</sup>。TMED家族分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 这4种类型,每个类型在进化中独立发展,成员数量因物种而异<sup>[5]</sup>。在哺乳动物中, $\alpha$ 类包含TMED4、TMED9和TMED11这3个成员,主要参与癌细胞增殖转移和自噬体形成<sup>[6-8]</sup>; $\beta$ 类仅TMED2一个成员,在胚胎发育和先天免疫信号传导中发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>; $\gamma$ 类有TMED1、TMED3、TMED5、TMED6和TMED7这5个成员,其中TMED1主要参与调节白介素(interleukin, IL)的信号传导<sup>[11]</sup>,TMED3和TMED5与结肠癌、肝癌、乳腺癌和宫颈癌等密切相关<sup>[12-13]</sup>,TMED6低表达会造成胰岛素分泌下降<sup>[14]</sup>,TMED7主要参与Toll样受体4的信号传导调节<sup>[15]</sup>; $\delta$ 类仅有TMED10一个成员与细胞凋亡、无信号肽的胞质蛋白释放以及阿尔茨海默病有关<sup>[16-18]</sup>。在昆虫中,迄今仅有黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的TMED报道。黑腹果蝇 $\alpha$ 类包括eclair和p24-2两个成员,eclair突变个体将无法发育至成虫,并且神经系统中低表达eclair会导致雌性黑腹果蝇繁殖力下降,p24-2主要在成虫中表达<sup>[19-20]</sup>; $\beta$ 类成员CG9308在雄性组织中表达,在雌性中表达较低,成员CHOp24的突变能够特异性降低雌性的产卵数量但不影响雄性的生育能力<sup>[19-20]</sup>; $\gamma$ 类包括p24-1、logjam、opossum和CG31787这4个成员,p24-1的突变使雌性黑腹果蝇的产卵数减少<sup>[19]</sup>,logjam在神经中的表达与雌性排卵行为紧密相关,其突变将上调核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路下

游的免疫调节基因<sup>[19,21]</sup>,opossum在胚胎发育和Wnt信号通路中发挥着不可或缺的作用<sup>[22]</sup>; $\delta$ 类仅baiser一个成员,它和eclair以及CHOp24参与Wingless/Wnt早期分泌途径<sup>[23]</sup>。

昆虫上有关TMED的报道仅局限于黑腹果蝇,其他昆虫TMED研究较为缺乏。本文通过生物信息学手段,从基因组上鉴定昆虫TMED基因,分析其进化历史和蛋白结构特征以及家蚕TMED基因表达模式,为后续研究提供基础和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

供试家蚕品系为大造品种,由本实验室保存。蚕卵在温度25℃、相对湿度70%–80%条件下催青。幼虫饲养条件:温度28℃、12h光照/12h黑暗、湿度70%–80%。质粒的提取和目的片段回收试剂盒购自Qiagen公司。载体pMD19-T Vector、限制性内切酶和T4 DNA连接酶为TaKaRa公司产品。DNA marker购自Biomed公司。TRIzol、2×Taq Master Mix、2×super-Fidelity Master Mix和反转录试剂盒由ProbeGene公司生产。上样缓冲液3×Gelstain Red Prestain购自苏州恒宇生物科技有限公司。测序和所有引物的合成均由重庆擎科生物科技有限公司完成。放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、一抗稀释液、 $\alpha$ -tubulin(TUBA4A)和山羊抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。PAGE凝胶快速制备试剂盒(10%)和三色预染蛋白Marker为上海雅酶生物医药科技有限公司产品。BmTMED6多克隆抗体由武汉金开瑞生物工程有限公司制备。

### 1.2 昆虫TMED家族鉴定和进化树构建

从GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)检索家蚕(*Bombyx mori*)、赤拟谷盗

(*Tribolium castaneum*)、烟草天蛾 (*Manduca sexta*)、意大利蜂 (*Apis mellifera*)、黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的基因组序列文件、注释文件和蛋白质序列文件。InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 数据库中获得 *TMED* 典型的 EMP24\_GP25L 结构域氨基酸序列模板。利用 HMMER 3.0 软件的 hmm search 程序在家蚕、赤拟谷盗、烟草天蛾和意大利蜂基因组中查找 *TMED* 蛋白, 预测值小于 0.1, 对昆虫 *TMED* 蛋白进行初步筛选。使用 Search InterPro 在线工具和 SMART 软件对获得序列进行分析, 删除不符合 *TMED* 家族结构域的序列。使用 ClustalX 和 DNAMAN 软件将筛选到的蛋白质序列反复进行多序列比对, 删除多余的重叠序列。对鉴定得到的昆虫 *TMED* 蛋白进行多序列比对, 以秀丽隐杆线虫 tmed-13 为外群利用 MrBayes 软件(WAG 模型)构建进化树, 利用 MEGA 11 和 Adobe Illustrator 软件对进化树进行美化 and 注释。

### 1.3 序列分析

利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 与蛋白质结构数据库 (protein data bank, PDB) 进行比对, 获得已解析三维结构的人类 *TMED10* (PDB ID: 5azx)、*TMED2* (PDB ID: 5azw) 和 *TMED1* (PDB ID: 7rrm) 的 GOLD 结构域, 尚未解析 GOLD 结构域的 *TMED* 蛋白用 Search InterPro 在线工具进行预测。信号肽、CC 结构域和跨膜结构域使用 SMART 软件进行预测。序列比对结果利用 Esript (<https://esript.ibcp.fr/ESript/cgi-bin/ESript.cgi>) 网站进行美化, PowerPoint 软件进行注释。在 NCBI 数据库中获取家蚕 *TMED* 基因家族各成员在染色体上的位置信息、DNA 序列和 cDNA 序列信息。在 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 输入家蚕 *TMED* 基因 DNA 序列, 预测开放阅读

框 (open reading frame, ORF)。Splign (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi?textpage=online&level=form>) 输入 cDNA 序列和 DNA 序列, 对家蚕 *TMED* 基因外显子和内含子分布进行分析。家蚕 *TMED* 基因 Gene symbol 分别为: *BmTMED9*: LOC733126、*BmTMED1*: LOC101746327、*BmTMED6*: LOC101740707、*BmTMED3*: LOC101744862、*BmTMED2*: LOC101737070、*BmTMED5*: LOC101740180 和 *BmTMED10*: LOC733098。把克隆测序的序列翻译为氨基酸序列, 使用在线工具 ExPaSy (<https://www.expasy.org/>) 预测蛋白序列基本理化性质。

### 1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

除血淋巴直接加入 TRIzol 外, 用液氮研磨卵、1-5 龄幼虫 (除去消化道内容物)、蛹、雌蛾和雄蛾以及 5 龄 3 d 的神经、表皮、头部、中肠、丝腺、马氏管、精巢、卵巢和脂肪体成粉末后加入 Trizol, 提取总 RNA。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别对 RNA 的完整性纯度和浓度进行检测。最后用 M-MLV 反转录酶系统反转录 RNA 以获得 cDNA 模板。

### 1.5 家蚕 *TMED* 家族基因 ORF 全长克隆

根据鉴定的 7 个家蚕 *TMED* 基因, 利用 Primer 5.0 软件设计 ORF 全长 cDNA 引物 (表 1)。利用表 1 引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增反应体系: 模板 200 ng, 2×Super-Fidelity Master Mix 12.5 μL, 上下游引物各 0.7 μL, 最终加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 25 μL。反应体系配制完成并瞬时离心后置入 PCR 仪进行扩增, 扩增条件: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 退火温度 50 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。取全部 PCR 产物与 5 μL 上样缓冲液混匀, 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 将目的片段进行切胶回收, 并与 pMD-19 Vector 载体连接, 转化挑选阳性克隆, 经过公司测序, 最后得到 cDNA 序列, 将测序

表 1 ORF 全长引物

Table 1 ORF full-length primers

Primer name	Sequences (5'→3')	$T_m$ (°C)
<i>BmTMED9</i>	F: ATGGAGCTTATTAAATTATCTTCAC R: TTACACTAGTTTCTTAGCCTCAA	52
<i>BmTMED2</i>	F: ATGAAGTACTTAAGAATATCACAAT R: TTACACAACACGCTGCACTTC	52
<i>BmTMED3</i>	F: ATGTTTACGGCTCCGCTTTTATTTA R: TTACAATCGGTTGTATAGAGTAGGC	55
<i>BmTMED5</i>	F: ATGCATTTATTAAATTATGTGCTA R: TCAATACATTTTATCTAATCCAGTG	50
<i>BmTMED6</i>	F: ATGCTATCTGCCTCTCTGTCA R: TCATATCCGAGTCTTTGAGGAGTTG	56
<i>BmTMED1</i>	F: ATGCGTTACATATATTTGACTACTA R: TCACTTCGACAAGCCCGGTA	54
<i>BmTMED10</i>	F: ATGGAGGTACAATATCTCGTG R: TTACTCAATTAGCTTCTTT	50

正确的阳性菌液扩大培养，提取重组质粒，-20 °C保存备用。

### 1.6 半定量反转录-聚合酶链式反应(semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, SqRT-PCR)

根据上述克隆的 7 个家蚕 *TMED* 基因序列，利用 Primer 5.0 软件设计 SqRT-PCR 的特异性引物，并且以 GenBank 中家蚕肌动蛋白 A3 (*Bmactin A3*)序列(NCBI 序列号: NM\_001126254)设计内参引物(表 2)。以上述 cDNA 为模板 sqRT-PCR 检测目的基因中的表达情况。PCR 扩增反应体系：模板 100 ng，2×*Taq* Master Mix 7.5 μL，上下游引物各 0.7 μL，最终加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 15 μL，反应体系配制完成并瞬时离心后置入 PCR 仪进行扩增。*Bmactin A3* 扩增条件：94 °C 4 min；94 °C 40 s，55 °C 50 s，72 °C 50 s，共 28 个循环；72 °C 10 min。*BmTMEDs* 扩增条件：94 °C 4 min；94 °C 40 s，60 °C 50 s，72 °C 30 s，共 28 个循环；72 °C 10 min。取 5 μL

PCR 产物与 2 μL 上样缓冲液混匀，用 1%琼脂糖凝胶进行电泳，Bio-Rad 凝胶成像系统成像并分析结果。

### 1.7 Western blotting (WB)分析

取家蚕组织放入提前预冷好的研钵中充分研磨，加入苯基硫脲抑制黑化，按照 RIPA 裂解液说明书提取总蛋白，用 BCA 蛋白浓度测定方法测量总蛋白浓度。将各样品蛋白稀释到相同浓度用 100 °C变性 10 min 后上样(20 μL，蛋白总量 40 μg，根据多次 WB 结果进行微调)，在 200 mA 恒流下进行 SDS-PAGE，转膜 45 min 至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜，5%脱脂奶粉室温摇床孵育 2 h 封闭，含有吐温-20 去垢剂的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST)漂洗 3 次，每次 15 min (室温摇床)，一抗和二抗孵育后，化学发光底物(electrochemiluminescence, ECL)显色液显色。

表 2 半定量引物

Table 2 SqRT-PCR primers

Primer name	Sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>BmTMED9</i>	F: ATAGAAGAAATACCTGACGATACCA R: GAGACAACAGTATTCTATCATTCGG	148
<i>BmTMED2</i>	F: CTTGAAATCGGAGAACCACAAACTA R: GAACGATGGATACGATCACGC	152
<i>BmTMED3</i>	F: AGAGAAGATGCAATATGATTCACAC R: AGAACAGTTGCATGATCTCCTACAC	168
<i>BmTMED5</i>	F: CGTCATCGATCCTAACGGTGTC R: GCCGCTTATCTTTTTTATTTTCTG	189
<i>BmTMED6</i>	F: GTTTATCATCGTCAGCAGCACC R: CCGTCACCTCCTTTCAACACCT	160
<i>BmTMED1</i>	F: ACCAGAGAGCACAGCCGAACG R: GGTGGCTTGATGCTGTGAGAG	160
<i>BmTMED10</i>	F: AGGGATCGGGGAGGCTGC R: CTCTATTATTCGTTGATTCAITGGT	149
<i>Bmactin A3</i>	F: AACACCCCGTCTGCTCACTG R: GGGCGAGACGTGTGATTTCTT	666

## 2 结果与分析

### 2.1 昆虫 *TMED* 基因鉴定及进化分析

根据已得到的家蚕、赤拟谷盗、烟草天蛾和意大利蜂的基因组序列文件、注释文件和蛋白质序列文件, 鉴定了它们的 *TMED* 家族基因, 发现家蚕有 7 个 *TMED* 家族基因, 赤拟谷盗有 6 个 *TMED* 家族基因, 烟草天蛾有 7 个 *TMED* 家族基因, 意大利蜂有 5 个 *TMED* 家族基因。这 4 类昆虫 *TMED* 各自包含 1 个  $\alpha$  类基因、1 个  $\beta$  类基因、1 个  $\delta$  类基因和多个  $\gamma$  类基因(表 3)。

线虫的 *TMED* 基因有 7 个<sup>[2]</sup>, 黑腹果蝇的 *TMED* 基因有 9 个<sup>[24]</sup>。用线虫、家蚕、黑腹果蝇、赤拟谷盗、烟草天蛾和意大利蜂, 共 41 个 *TMED* 基因的氨基酸序列构建进化树, 结果如图 1 所示, 所有 *TMED* 基因聚为  $\alpha$  类、 $\beta$  类、 $\delta$  类、 $\gamma$  类 *TMED3-like*、 $\gamma$  类 *TMED5-like* 和  $\gamma$

类 *TMED6-like* 共 6 个独立的聚集群, 其中  $\alpha$  类聚集群和  $\delta$  类聚集群相聚后与  $\beta$  类聚集群汇合,  $\gamma$  类 *TMED3-like* 聚集群位于它们的外围,  $\gamma$  类其他 2 个聚集群 (*TMED5-like* 群和 *TMED6-like* 群)分布相对较远, 平行靠近树根 (*Cetmed-13*, 线虫  $\gamma$  类基因)。在  $\alpha$  类、 $\delta$  类、 $\gamma$  类 *TMED3-like*、 $\gamma$  类 *TMED5-like* 和  $\gamma$  类 *TMED6-like* 聚集群, 群内的 *TMED* 基因聚集与物种进化关系高度一致。在  $\beta$  类聚集群中, 家蚕与烟草天蛾的  $\beta$  类 *TMED* 基因(*TMED2*)聚成一个小支, 线虫 *Cesel-9* 基因与意大利蜂和赤拟谷盗的 *TMED2* 基因相聚成另一个小支, 黑腹果蝇的 *DmCG9308* 和 *DmCHOp24* 依次坐落于两个小支的外围, 暗示黑腹果蝇  $\beta$  类 *TMED* 基因在进化中可能发生了亚功能化。除  $\gamma$  类 *TMED5-like* 聚集群缺失蜜蜂的 *TMED* 基因外, 每一个聚集群都聚集了所有昆虫的 *TMED* 基因。

表 3 昆虫 *TMED* 家族基因

Table 3 Insect *TMED* family genes

Class	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Bombyx mori</i>	<i>Manduca sexta</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>Apis mellifera</i>
$\alpha$	NP_788616.1 (Dmeclair) NP_001189205.1 (Dmp24-2)	OQ158770 (BmTMED9)	XP_030021299.1 (MsTMED9)	XP_001814757.1 (TcTMED9)	XP_396009.2 (AmTMED9)
$\beta$	NP_001284862.1 (DmCHOp24) NP_611629.1 (DmCG9308)	OQ158766 (BmTMED2)	XP_030021973.1 (MsTMED2)	XP_971914.1 (TcTMED2)	XP_006562000.1 (AmTMED2)
$\gamma$	NP_648027.3 (Dmlogjam) NP_572994.1 (Dmopossum) NP_724105.1 (DmCG31787)	OQ158769 (BmTMED6) OQ158768 (BmTMED5)	XP_037295442.1 (MsTMED6) XP_030038233.2 (MsTMED5)	XP_974756.1 (TcTMED6) XP_966878.1 (TcTMED5)	XP_393466.2 (AmTMED6)
		OQ158765 (BmTMED1)	XP_030036550.2 (MsTMED1)		
	NP_001259465.1 (Dmp24-1)	OQ158767 (BmTMED3)	XP_030026303.1 (MsTMED3)	XP_969755.2 (TcTMED3)	XP_006559710.1 (AmTMED3)
$\delta$	NP_651323.3 (Dmbaiser)	OQ158771 (BmTMED10)	XP_030037929.1 (MsTMED10)	XP_008200551.1 (TcTMED10)	XP_392556.3 (AmTMED10)

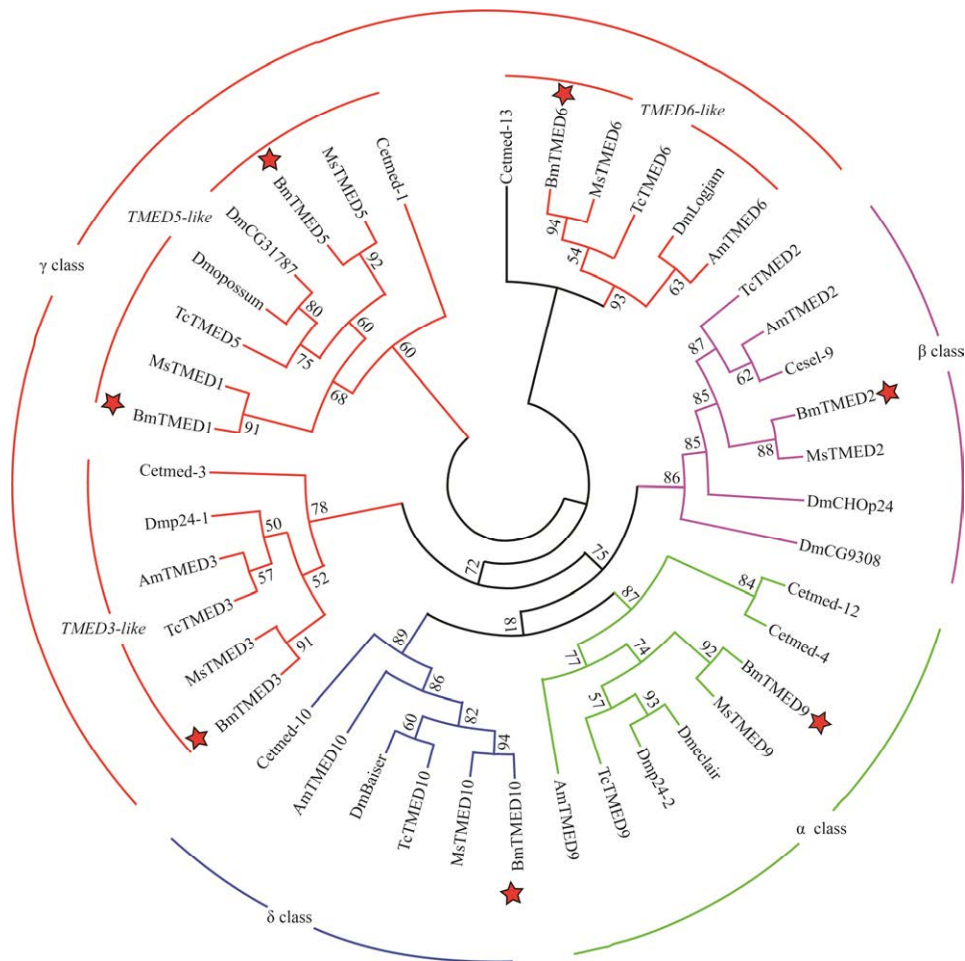


图1 *TMED* 家族基因进化树

Figure 1 Evolutionary tree of the *TMED* gene family. Ce: *Caenorhabditis elegans*, *Cetmed-4* NP\_507861.1, *Cetmed-10* NP\_505879.1, *Cesel-9* NP\_001370673.1, *Cetmed-3* NP\_491892.1, *Cetmed-1* NP\_502288.1, *Cetmed-12* NP\_508054.1, *Cetmed-13* NP\_741426.2.

## 2.2 昆虫 *TMED* 基因的蛋白结构分析

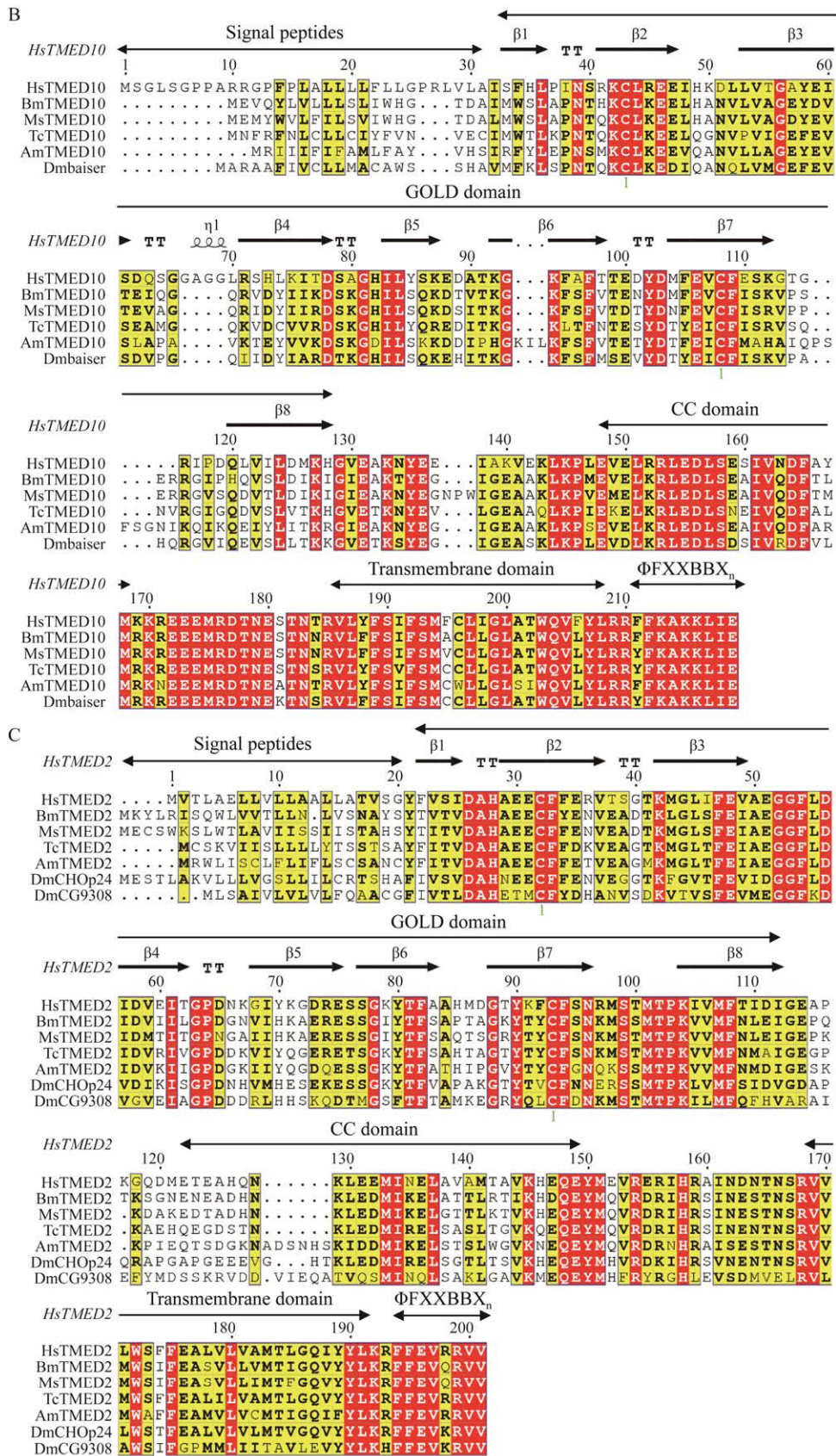
分别分析人类、家蚕、黑腹果蝇、赤拟谷盗、烟草天蛾和意大利蜂 *TMED* 蛋白的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  氨基酸序列, 预测比对 4 类蛋白的结构, 注释 *TMED* 家族典型的 4 个特征结构: GOLD 结构域、CC 结构域、单个跨膜结构域和一个胞质侧的短肽段, 其中 GOLD 结构域由 8 个  $\beta$  折叠构成, C 端胞质侧的短肽段长度不等, 但是大多数都符合  $\Phi\text{FXXBB}(\text{X})_n$  形式 ( $\Phi$  是大的疏水残基, B 是碱性残基, X 可以是任何氨基

酸,  $n \geq 2$ )。昆虫 *TMED* 家族蛋白 N 端都具有明显的信号肽, 属于分泌蛋白, 与 *TMED* 蛋白参与早期和晚期分泌作用吻合(图 2)。

昆虫  $\alpha$  类蛋白的 GOLD 结构域、CC 结构域和跨膜结构域非常保守。除果蝇的  $\alpha$  类 *Dmp24-2* 蛋白外, 其他昆虫  $\alpha$  类蛋白的尾部序列都以  $\Phi\text{FFEAKKLV}$  的形式存在, 该序列有  $\Phi\text{F}$  的结构, 可以结合 COPII 亚基, 参与 COPII 包被的囊泡运输, 同时  $\text{KKLV}$  是经典的  $\text{KKXX}$  序列, 能够直接参与 COPI 蛋白包被的囊泡运







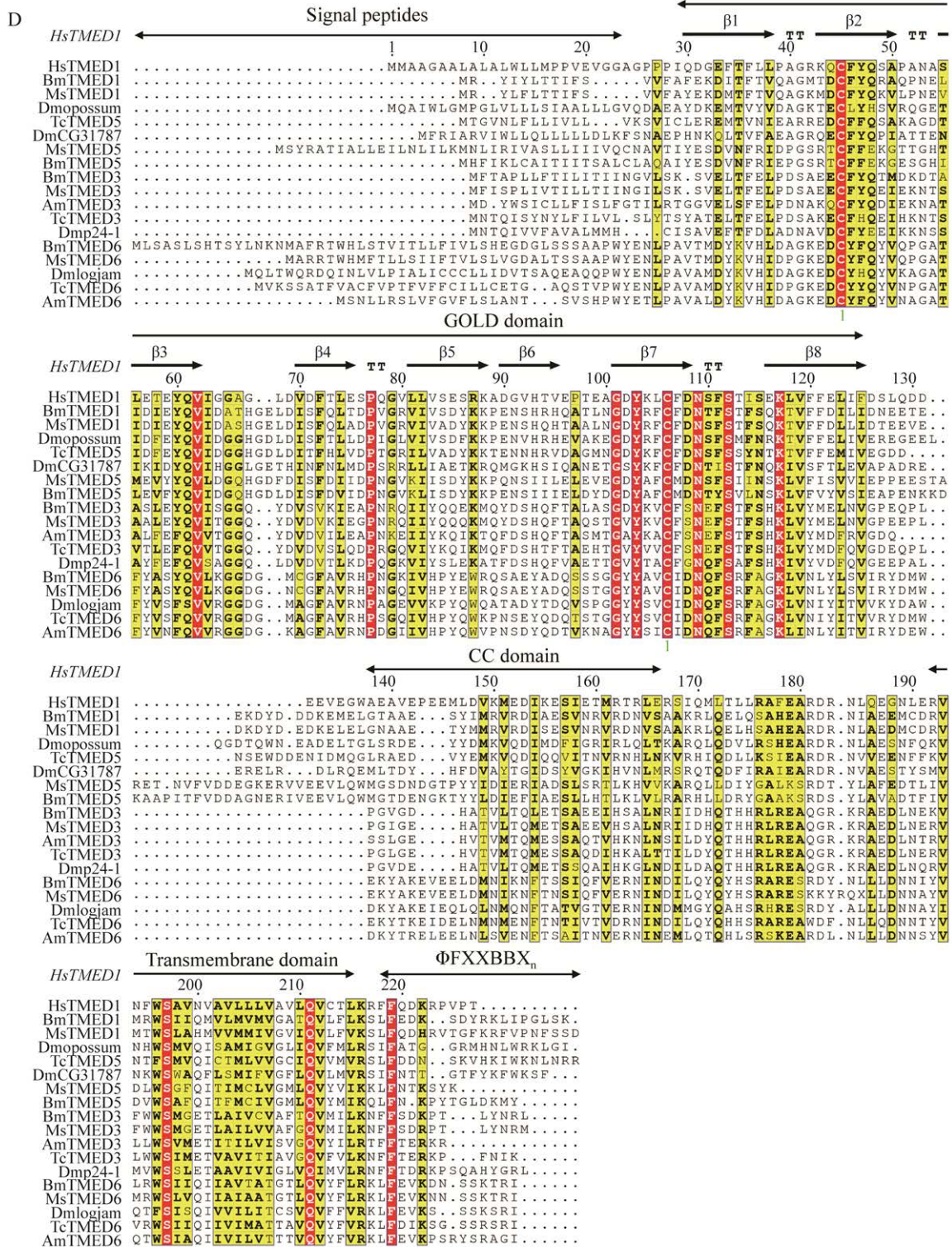


图 2 昆虫 TMED 蛋白多序列比对和结构分析 A: α 类. B: δ 类. C: β 类. D: γ 类

Figure 2 Multiple sequence alignment and structural analysis of insect TMED proteins. A: α class. B: δ class. C: β class. D: γ class. Hs: *Homo sapiens*, HsTMED9 NP\_059980.2, HsTMED10 NP\_006818.3, HsTMED2 NP\_006806.1, HsTMED1 NP\_006849.1.

和跨膜结构域。C 端胞质侧的短肽段存在保守的  $\Phi F$  结构, 可能保留了与 COPII 亚基结合的能力(图 2D)。

### 2.3 家蚕 *TMED* 家族基因克隆

利用设计的全长引物, 以 5 龄幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增成功克隆获得家蚕 7 个 *TMED* 基因全长 ORF, 结果如图 3 所示。

将克隆的基因测序后上传至 GenBank 并获得了相应的登录号, 7 个基因的 ORF 分别为 654、615、633、735、750、678、618 bp, 编码 217、204、210、244、249、225、205 个氨基酸, 外显子数目分别为 4、4、4、1、5、6、5 个。染色体定位分析发现 *BmTMED10* 和 *BmTMED5* 均位于 25 号染色体, 剩下的其他 5 个基因分别分布在家蚕 23、16、6、10、24 号染色体上。

7 个 *TMED* 基因预测蛋白分子量为 25 040.75、23 315.60、23 951.21、27 817.94、28 725.56、26 198.63、23 681.51 kDa, 具有 *TMED* 分子量大小特征。它们的等电点介于 4.70–6.65 (表 4)。

### 2.4 家蚕 *TMED* 家族基因的组织表达模式分析

提取家蚕 5 龄 3 d 幼虫的头、神经、丝腺、中肠、马氏管、脂肪体、血液、精巢、卵巢和表皮 10 个组织的总 RNA, 反转录为 cDNA, 利用 RT-PCR 特异性引物检测各个组织中 *TMED* 家族基因的表达情况。结果如图 4A 所示: *BmTMED2*、*BmTMED1* 和 *BmTMED6* 基因在各组织都有表达, 不同组织之间的表达量相近; *BmTMED9* 在丝腺中大量表达, 在精巢、中肠、马氏管中有较高表达; *BmTMED5* 除在中肠和

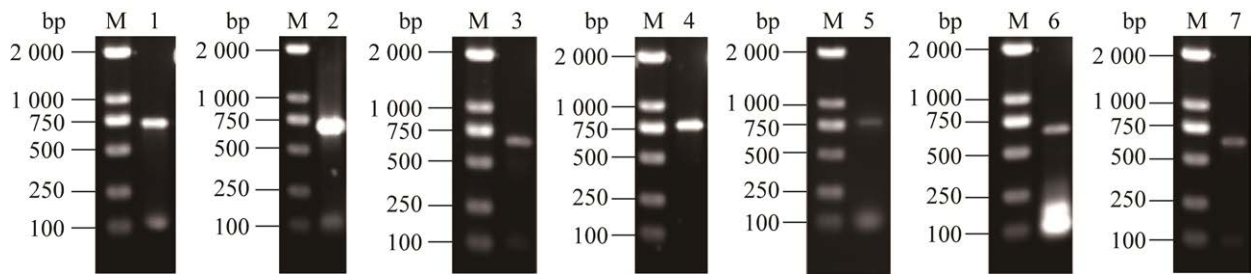


图 3 家蚕 *TMED* 家族基因克隆 1: *BmTMED9*; 2: *BmTMED2*; 3: *BmTMED3*; 4: *BmTMED5*; 5: *BmTMED6*; 6: *BmTMED1*; 7: *BmTMED10*. M: DL2000 marker

Figure 3 Cloning of the *TMED* gene family in the silkworm. 1: *BmTMED9*; 2: *BmTMED2*; 3: *BmTMED3*; 4: *BmTMED5*; 5: *BmTMED6*; 6: *BmTMED1*; 7: *BmTMED10*. M: DL2000 marker.

表 4 家蚕 *TMED* 家族基因特征

Table 4 The characteristics of the *TMED* gene family in the silkworm

Gene	GenBank accession No.	ORF (bp)	Encoding protein (aa)	Chr	Molecular weight (Da)	Isoelectric point	Number of exons
<i>BmTMED9</i>	OQ158770	654	217	23	25 040.75	6.17	4
<i>BmTMED2</i>	OQ158766	615	204	16	23 315.60	5.28	4
<i>BmTMED3</i>	OQ158767	633	210	6	23 951.21	5.11	4
<i>BmTMED5</i>	OQ158768	735	244	25	27 817.94	4.70	1
<i>BmTMED6</i>	OQ158769	750	249	10	28 725.56	6.65	5
<i>BmTMED1</i>	OQ158765	678	225	24	26 198.63	4.77	6
<i>BmTMED10</i>	OQ158771	618	205	25	23 681.51	6.00	5

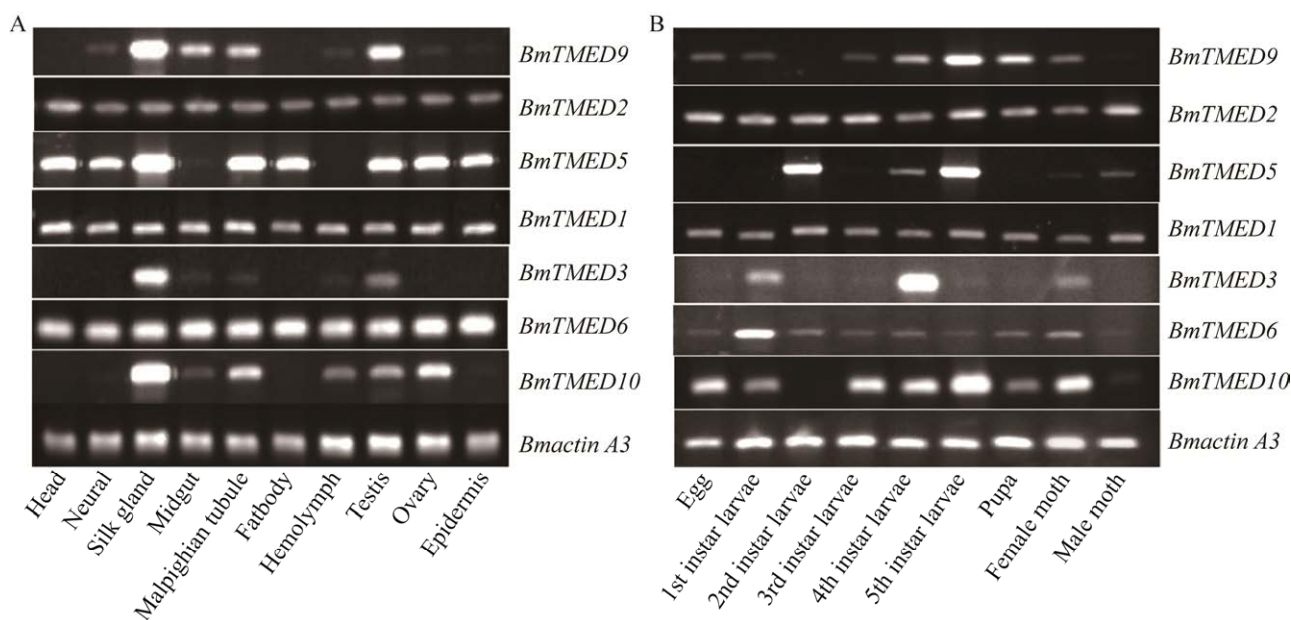


图 4 家蚕 *TMED* 家族基因表达模式 A: 组织特异性表达模式. B: 时期特异性表达模式

Figure 4 Expression patterns of the silkworm *TMED* family genes. A: Tissue-specific expression pattern. B: Developmental stage-specific expression pattern.

血淋巴中不见表达外, 在其他 8 个组织中的表达都较高; *BmTMED3* 仅在丝腺中高表达, 在其他组织不表达或低量表达; *BmTMED10* 表达量在丝腺中最高, 在马氏管和卵巢中次之, 在中肠、血淋巴和精巢中较低。

## 2.5 家蚕 *TMED* 家族基因的时期表达模式分析

提取家蚕卵、1-5 龄幼虫、蛹以及雌蛾和雄蛾的 RNA, 利用 RT-PCR 特异性引物检测 *TMED* 家族基因在家蚕不同时期的表达情况。结果如图 4B 所示: *BmTMED2*、*BmTMED1* 和 *BmTMED6* 基因在各时期均有表达, 其中 *BmTMED2* 和 *BmTMED1* 在不同时期表达量相对稳定, 而 *BmTMED6* 在 1 龄幼虫中的表达显著高于其他时期; *BmTMED9* 和 *BmTMED10* 表达模式相似, 除 2 龄幼虫和雄蛾中不表达外, 其他各时期均有表达, 其中又以 5 龄幼虫中的表达量最高; *BmTMED5* 在 2 龄和 5 龄幼虫中

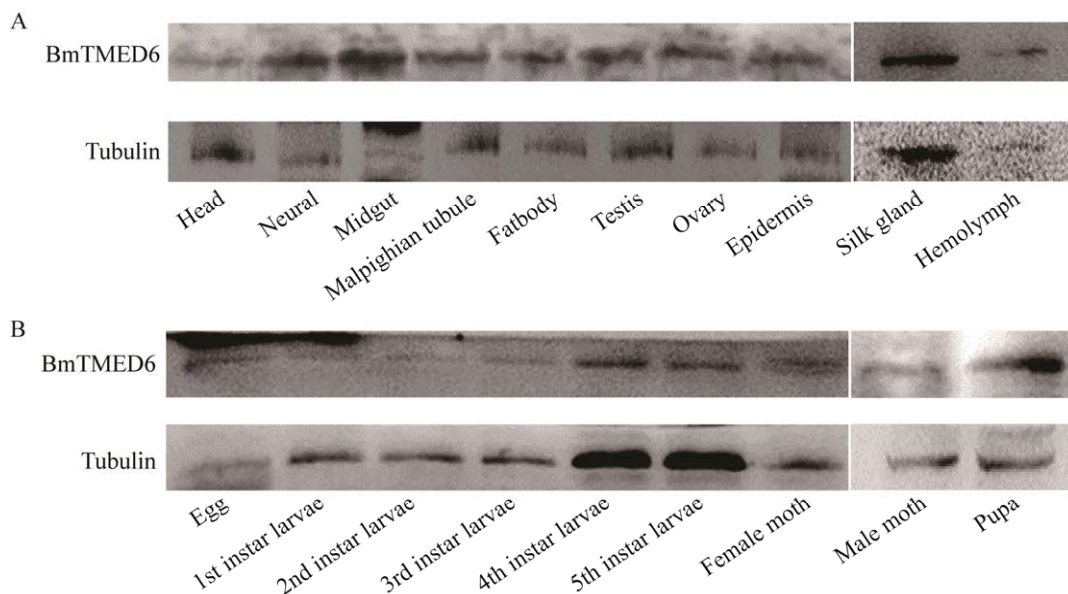
高表达, 在 4 龄幼虫和雌雄蛾中有较低表达, 其他时期未见明显的表达条带; *BmTMED3* 在 4 龄高量表达, 在 1 龄和雌蛾微弱表达, 在其他时期均未见明显的扩增条带。

## 2.6 *BmTMED6* 蛋白水平检测

Western blotting 检测显示, *BmTMED6* 在 5 龄 3 d 各组织(图 5A)和各个时期(图 5B)都有蛋白条带, 而且组织之间或时期之间的条带深度没有明显差异。这个结果与基因转录水平分析结果相似。

## 3 讨论与结论

*TMED* 基因广泛存在于植物和动物内, 动物中 *TMED* 包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  这 4 个类型, 植物中 *TMED* 仅有  $\beta$  和  $\delta$  两个类型<sup>[1]</sup>, 已有研究显示, 哺乳动物中共有 10 个 *TMED* 基因, 线虫共有 7 个 *TMED* 基因, 果蝇共有 9 个 *TMED* 基因<sup>[2]</sup>。本研究从家蚕中共鉴定了 7 个 *TMED* 基



**图 5 BmTMED6 蛋白水平检测** A: 各个组织的 BmTMED6 蛋白. B: 各个时期的 BmTMED6 蛋白  
**Figure 5 BmTMED6 protein level detection.** A: BmTMED6 protein in individual tissues. B: BmTMED6 protein at various stages.

因, 从烟草天蛾中共鉴定了 7 个 *TMED* 基因, 赤拟谷盗中共 6 个 *TMED* 基因, 意大利蜂中共 5 个基因, *TMED* 家族基因数目因物种而异。哺乳动物 *TMED* 家族的构成模式为 3 个  $\alpha$  类成员、1 个  $\beta$  类成员、1 个  $\delta$  类成员和 5 个  $\gamma$  类成员, 同一类型 *TMED* 包含的成员数目在物种间差异较小。两栖动物 *TMED* 的  $\gamma$  类成员比哺乳动物缺少一个, 却在  $\delta$  类拓展出独有的成员<sup>[25]</sup>。分析烟草天蛾、赤拟谷盗、意大利蜂和家蚕, 发现它们的 *TMED* 家族各自都包含 1 个  $\alpha$ 、1 个  $\beta$ 、1 个  $\delta$  和多个  $\gamma$  类基因, 认为这种 1 个  $\alpha$ 、1 个  $\beta$ 、1 个  $\delta$  和多个  $\gamma$  类的 *TMED* 家族构成模式产生于鞘翅目、鳞翅目和膜翅目的共同祖先。黑腹果蝇的 *TMED* 包括 2 个  $\alpha$  类、2 个  $\beta$  类、1 个  $\delta$  类和 4 个  $\gamma$  类基因<sup>[24]</sup>。分析同属双翅目的埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*), 发现它们的 *TMED* 成员构成却是  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\delta$  类各 1 个,  $\gamma$  类多个, 与前

4 种昆虫完全相同。鞘翅目昆虫大约于 284 万 亿年(Ma)前分化形成, 膜翅目昆虫分化形成早于鞘翅目, 鳞翅目和双翅目分化产生晚于鞘翅目<sup>[26]</sup>。因此推断, 1 个  $\alpha$  类、1 个  $\beta$  类、1 个  $\delta$  类和多个  $\gamma$  类的昆虫 *TMED* 家族构成模式产生于约 284 万 亿年(Ma)前, 2 个  $\alpha$  类、2 个  $\beta$  类、1 个  $\delta$  类和多个  $\gamma$  类的 *TMED* 家族构成模式是果蝇类发展形成的独特模式。人类、黑腹果蝇、烟草天蛾、赤拟谷盗、意大利蜂和家蚕 *TMED* 蛋白序列的同源性, 在  $\alpha$  类、 $\beta$  类和  $\delta$  类分别为 69%、67%和 67%, 表现出物种间高度的保守性, 在  $\gamma$  类为 36%, 保守性较低, 进化速度较快。昆虫 *TMED* 的  $\alpha$  类、 $\beta$  类、 $\delta$  类和  $\gamma$  类在构建的进化树中各自独立聚集成群, 而且  $\alpha$  类聚集群与  $\delta$  类聚集群关系最近, 这与哺乳动物 *TMED* 进化树的拓扑结构相似。昆虫 *TMED* 的  $\gamma$  类分化成了 3 个不同的亚类, 这与哺乳动物 *TMED* 的  $\gamma$  类分化以及  $\gamma$  类与  $\beta$  类关

系有很大不同<sup>[25]</sup>。进化树中的  $\alpha$  类聚集群、 $\beta$  类聚集群、 $\delta$  类聚集群、 $\gamma$  类 *TMED3-like* 聚集群和  $\gamma$  类的 *TMED6-like* 聚集群中都聚集了所有昆虫的 *TMED* 基因。 $\gamma$  类 *TMED5-like* 聚集群缺失蜜蜂的 *TMED* 基因, 但线虫 *Cetmed-1* 与昆虫  $\gamma$  类 *TMED5-like* 群聚在一起, 显示了它们之间的同源性。同时, 分析大黄蜂(*Bombus bifarius*)、大虎头蜂 (*Vespa mandarinia*)、阿根廷蚁 (*Linepithema humile*) 和切叶蚁 (*Acromyrmex echinator*), 结果在这 4 种膜翅目昆虫中也没发现  $\gamma$  类 *TMED5-like* 基因。于是推定, *TMED* 家族基因在昆虫祖先中就分化形成了  $\alpha$  类、 $\beta$  类、 $\delta$  类、 $\gamma$  类 *TMED3-like*、 $\gamma$  类 *TMED5-like* 和  $\gamma$  类 *TMED6-like* 这 6 种类型, 膜翅目昆虫在进化中丢失了  $\gamma$  类 *TMED5-like* 基因。此外, 在 *TMED5-like* 聚集群, 家蚕 *TMED5* 与烟草天蛾 *TMED5* 聚成支, 家蚕 *TMED1* 与烟草天蛾 *TMED1* 相聚成支, 而黑腹果蝇的 2 个  $\gamma$  类 *TMED5-like* 聚在一起。分析发现冈比亚按蚊和埃及伊蚊都只有 1 个  $\gamma$  类 *TMED5-like* 基因。这可能是  $\gamma$  类 *TMED5-like* 基因在鳞翅目昆虫祖先中发生了复制事件、在果蝇类发生了重复引起。

本文鉴定的 4 类昆虫共 25 个 *TMED* 蛋白均具有 *TMED* 家族的典型特征结构 (EMP24\_GP25L), 它们 N 端都具有信号肽, 属于分泌蛋白, 这与 *TMED* 家族蛋白存在早期和晚期分泌途径吻合。*TMED* 蛋白的 GOLD 结构域由两个四股反向平行的  $\beta$  折片组成, 主要通过同源寡聚化介导蛋白质的相互作用, 并参与物质的识别<sup>[27]</sup>。例如: *TMED1* 的 GOLD 结构域可以以盐依赖的方式在溶液中形成同源二聚体<sup>[28]</sup>, 同时可以和生长刺激表达基因 2 蛋白 (growth stimulation expressed gene 2, ST2) 的白

细胞介素受体 (Toll/interleukin receptor, TIR) 结构域相互作用参与白介素-33 (interleukin-33, IL-33) 信号的传导<sup>[11]</sup>; *TMED3* 可识别 N-糖基化的膜蛋白, 并把它们募集到 *TMED* 复合物中<sup>[29]</sup>。在昆虫中发现不同类型 *TMED* 的 GOLD 结构域的空间结构较相似, 但其氨基酸序列长度不等, 同一性也较低。 $\alpha$  类的 GOLD 结构域序列非常保守,  $\delta$  和  $\beta$  类的 GOLD 结构域序列相对保守, 而  $\gamma$  类的 GOLD 结构域仅有 9 个保守的氨基酸残基, 推测 *TMED* 的 GOLD 结构特征与其生物学功能相关。CC 结构域是一种在生物大分子中普遍存在的蛋白质结构域, 通过  $\alpha$  螺旋形成一种稳定的螺旋卷曲结构<sup>[30]</sup>。在 *TMED* 蛋白中, CC 结构域参与不同亚型 *TMED* 蛋白之间的相互作用, 以及复合物的形成<sup>[31-32]</sup>。本文类比推测了昆虫 *TMED* 蛋白 CC 结构域所处的大致位置, 发现 CC 结构域在 *TMED* 蛋白内部形成一个螺旋卷曲区域, 认为这个 CC 结构域可能会增加蛋白质的稳定性, 并作为蛋白质相互作用形成二聚体或多聚体的接触界面, 为 *TMED* 蛋白组合多样性和功能多样性提供物理条件。跨膜结构域通常由 17-25 个疏水氨基酸残基组成, 其主要结构为  $\alpha$  螺旋, 具有将蛋白质嵌入细胞膜中的功能, 在胞内物质分选过程中发挥关键作用<sup>[33]</sup>。在 *TMED* 蛋白中, 跨膜结构域对鞘磷脂具有高度选择性, 鞘磷脂能够影响 *TMED* 蛋白的跨膜螺旋二聚化<sup>[34-35]</sup>, 与 C 端胞质侧的短肽段共同决定 *TMED* 蛋白的正确定位<sup>[36-37]</sup>。昆虫同类 *TMED* 蛋白的跨膜结构域序列非常保守, 氨基酸残基数量为 20 左右, 不同类的跨膜氨基酸残基组成却存在差异。这个结果说明昆虫不同类型的 *TMED* 蛋白可能有着不同跨膜能力, 在其运输

途径和分选功能上可能有所不同。C 端胞质侧的短肽段指 TMED 蛋白跨膜区域后面的一段短的氨基酸序列, 通常只包含数个氨基酸残基, 有与 COPI 或者 COPII 复合物相互作用的序列, 保守性低, 具有类型特异性<sup>[38]</sup>。这段短的氨基酸序列调节 TMED 蛋白在细胞内的分布和定位, 参与信号转导、蛋白质的分泌和转运<sup>[1,5,39]</sup>。昆虫  $\gamma$  类 TMED 蛋白中具有非常保守的  $\Phi$ F 结构而无明显的 KKXX 特征序列。 $\delta$  类尾部具有 KKLIE 序列与  $\alpha$  类尾部的 KKLIV 序列相似, 但是 KKLIE 序列与 COPI 亚基的结合能力可能比 KKLIV 序列与 COPI 亚基的结合能力弱<sup>[1]</sup>。 $\beta$  类尾部则为 Q/R/K+RVV 序列, 植物  $\beta$  类的 TMED 蛋白 C 端 RV 序列被提出参与内质网输出<sup>[1]</sup>, 因此推测昆虫  $\beta$  类尾部 Q/R/K+RVV 序列可能影响该类成员在内质网和高尔基体之间的往返运输。有意思的是, 果蝇  $\alpha$  类 Dmp24-2 尾部不含  $\Phi$ F 或 KKXX 序列, 推测其无法直接行使相应功能。利用 Cell-PLoc 2.0 对家蚕 TMED 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果发现除 TMED2 和 TMED10 定位在细胞膜和微粒体, 其他 TMED 蛋白均定位在内质网中, 这符合了 TMED 蛋白参与蛋白合成转运的特点。

在哺乳动物中, *TMED2* 主要参与胚胎发育和免疫信号传导<sup>[40-41]</sup>; *TMED1* 同样与免疫有着密切联系<sup>[11]</sup>; 而 *TMED6* 则影响葡萄糖代谢<sup>[14,42]</sup>。果蝇  $\beta$  类成员 *DmCHOp24* 主要在 Wnt 信号途径和雌性生殖中发挥功能,  $\gamma$  类 *TMED6-like* 的 *Dmlogjam* 则在神经系统中影响雌性排卵行为<sup>[19-20]</sup>。因此推测家蚕 *TMED* 基因在不同组织和时期表达的差异性, 可能源于不同基因负责不同类型的细胞内膜转运、促进不

同蛋白质的合成和运输、调控不同的细胞分化过程, 最后发挥它们各自不同的生物学功能。

*BmTMED2*、*BmTMED1* 和 *BmTMED6* 在各个时期和组织中都有表达, 并且表达量相似, 暗示它们在家蚕的基础生命活动中发挥了作用。利用 *BmTMED6* 蛋白的多克隆抗体进行免疫印迹实验, 结果表明其蛋白水平与转录水平一致。*BmTMED9* 在 5 龄期表达量最高, 尤其在丝腺组织表达浓烈, 在精巢、马氏管和中肠有明显表达带, 推测它与 5 龄丝腺快速增长扩张密切相关, 并与精巢、马氏管和中肠的生物学功能有一定联系。*BmTMED5* 仅在 5 龄期和 2 龄期有明显的表达带, 其中 5 龄期更亮, 且在除中肠和血淋巴以外的 5 龄各个组织中都有明亮的表达带, 推测 *BmTMED5* 在 5 龄期发挥了多种生物学功能。*BmTMED3* 在整个生命周期中仅在 4 龄期有明显表达, 在 5 龄幼虫组织中仅在丝腺有明显表达, 推测 *BmTMED3* 为 4 龄幼虫生长发育以及 5 龄丝物质大量积累提供了独特作用。*BmTMED10* 在除 2 龄以外的各个时期都有明显表达, 表明了它在家蚕生长发育中的重要性; 在丝腺高量表达, 在生殖腺和马氏管也有较高的表达, 暗示它可能在丝蛋白合成分泌、生殖腺发育和马氏管排泄上发挥了作用。这些结果为进一步研究每个 *BmTMED* 基因的具体生物学功能提供了科学依据。

本研究鉴定了家蚕、烟草天蛾、赤拟谷盗和意大利蜂的 *TMED* 家族基因, 发现了 1 个  $\alpha$ 、1 个  $\beta$ 、1 个  $\delta$  和多个  $\gamma$  类的昆虫 *TMED* 家族成员构成模式, 以及 2 个  $\alpha$  类、2 个  $\beta$  类、1 个  $\delta$  类和多个  $\gamma$  类的果蝇 *TMED* 家族成员构成独特模式, 分析了它们的进化历史及蛋白结构特征, 克隆了家蚕 7 个 *TMED* 基因的全长 ORF,

检测了家蚕 *TMED* 基因的表达模式。这是继黑腹果蝇后第二个关于昆虫 *TMED* 的工作。

## REFERENCES

- [1] PASTOR-CANTIZANO N, MONTESINOS JC, BERNAT-SILVESTRE C, MARCOTE MJ, ANIENTO F. p24 family proteins: key players in the regulation of trafficking along the secretory pathway[J]. *Protoplasma*, 2016, 253(4): 967-985.
- [2] ABER R, CHAN W, MUGISHA S, JEROME-MAJEWSKA LA. Transmembrane emp24 domain proteins in development and disease[J]. *Genetics Research*, 2019, 101: e14.
- [3] SCHUIKI I, VOLCHUK A. Diverse roles for the p24 family of proteins in eukaryotic cells[J]. *Biomolecular Concepts*, 2012, 3(6): 561-570.
- [4] MONTESINOS JC, LANGHANS M, STURM S, HILLMER S, ANIENTO F, ROBINSON DG, MARCOTE MJ. Putative p24 complexes in *Arabidopsis* contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(11): 3147-3167.
- [5] STRATINGJRP, MARTENS GJM. The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface[J]. *Biology of the Cell*, 2009, 101(9): 495-509.
- [6] ULLAH MA, TABASSUM T, FARZANA M, MOIN A, ZOHORA US, AHMAN MS. Expression analysis, molecular characterization and prognostic evaluation on *TMED4* and *TMED9* gene expression in glioma[J]. *Biomedical Signal Processing and Control*, 2022, 78: 103922.
- [7] HAN GH, YUN HE, CHUNG JY, KIM JH, CHO H. *TMED9* expression level as a biomarker of epithelial ovarian cancer progression and prognosis[J]. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2022, 19(6): 692-702.
- [8] LI SL, YAN R, XU JL, ZHAO SQ, MA XY, SUN QM, ZHANG M, LI Y, LIU JJ G, CHEN LY, LI S, XU K, GE L. A new type of ERGIC-ERES membrane contact mediated by *TMED9* and *SEC12* is required for autophagosome biogenesis[J]. *Cell Research*, 2022, 32(2): 119-138.
- [9] SUN MS, ZHANG J, JIANG LQ, PAN YX, TAN JY, YU F, GUO L, YIN L, SHEN C, SHU HB, LIU Y. *TMED2* potentiates cellular IFN responses to DNA viruses by reinforcing *MITA* dimerization and facilitating its trafficking[J]. *Cell Reports*, 2018, 25(11): 3086-3098.e3.
- [10] JEROME-MAJEWSKA LA, ACHKAR T, LUO L, LUPU F, LACY E. The trafficking protein *Tmed2/p24beta(1)* is required for morphogenesis of the mouse embryo and placenta[J]. *Developmental Biology*, 2010, 341(1): 154-166.
- [11] CONNOLLY DJ, O'NEILL LAJ, MCGETTRICK AF. The GOLD domain-containing protein *TMED1* is involved in interleukin-33 signaling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(8): 5616-5623.
- [12] ZHANG XM, LUO YL, LI QC. *TMED3* promotes proliferation and migration in breast cancer cells by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13: 5819-5830.
- [13] CHENG XY, DENG XL, ZENG HP, ZHOU T, LI DZ, ZHENG WV. Silencing of *TMED5* inhibits proliferation, migration and invasion, and enhances apoptosis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 2023, 32(6): 677-688.
- [14] WANGXC, YANG RZ, JADHAO SB, YU DZ, HU H, GLYNN-CUNNINGHAM N, SZTALRYD C, SILVER KD, GONG DW. Transmembrane emp24 protein transport domain 6 is selectively expressed in pancreatic islets and implicated in insulin secretion and diabetes[J]. *Pancreas*, 2012, 41(1): 10-14.
- [15] DOYLE SL, HUSEBYE H, CONNOLLY DJ, ESPEVIK T, O'NEILL LAJ, MCGETTRICK AF. The GOLD domain-containing protein *TMED7* inhibits TLR4 signalling from the endosome upon LPS stimulation[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 707.
- [16] WANG HB, XIAO LQ, KAZANIETZ MG. *p23/Tmp21* associates with protein kinase *Cdelta* (*PKCdelta*) and modulates its apoptotic function[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(18): 15821-15831.
- [17] ZHANG M, LIU L, LIN XB, WANG Y, LI Y, GUO Q, LI SL, SUN YX, TAO X, ZHANG D, LV XC, ZHENG L, GE L. A translocation pathway for vesicle-mediated unconventional protein secretion[J]. *Cell*, 2020, 181(3): 637-652.e15.
- [18] CHEN FS, HASEGAWA H, SCHMITT-ULMS G, KAWARAI T, BOHM C, KATAYAMA T, GU YJ, SANJO N, GLISTA M, ROGAEVA E, WAKUTANI Y, PARDOSSI-PIQUARD R, RUAN XY, TANDON A,



- CHECLER F, MARAMBAUD P, HANSEN K, WESTAWAY D, ST GEORGE-HYSLOP P, FRASER P. TMP21 is a presenilin complex component that modulates  $\gamma$ -secretase but not  $\epsilon$ -secretase activity[J]. *Nature*, 2006, 440(7088): 1208-1212.
- [19] SALEEM S, SCHWEDES CC, ELLIS LL, GRADY ST, ADAMS RL, JOHNSON N, WHITTINGTON JR, CARNEY GE. *Drosophila melanogaster* p24 trafficking proteins have vital roles in development and reproduction[J]. *Mechanisms of Development*, 2012, 129(5/6/7/8): 177-191.
- [20] BOLTZ KA, ELLIS LL, CARNEY GE. *Drosophila melanogaster* p24 genes have developmental, tissue-specific, and sex-specific expression patterns and functions[J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(2): 544-555.
- [21] BOLTZ KA, CARNEY GE. Loss of p24 function in *Drosophila melanogaster* causes a stress response and increased levels of NF- $\kappa$ B-regulated gene products[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 1-11.
- [22] BUECHLING T, CHAUDHARY V, SPIROHN K, WEISS M, BOUTROS M. p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands[J]. *EMBO Reports*, 2011, 12(12): 1265-1272.
- [23] LI X, WU YH, SHEN CH, BELENKAYA TY, RAY L, LIN XH. *Drosophila* p24 and Sec22 regulate wingless trafficking in the early secretory pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 463(4): 483-489.
- [24] CARNEY GE, BOWEN NJ. p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities[J]. *Biology of the Cell*, 2004, 96(4): 271-278.
- [25] STRATING JRPM, van BAKEL NHM, LEUNISSEN JAM, MARTENS GJM. A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: identification of a novel tissue-specifically expressed member[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(8): 1707-1714.
- [26] MISOF B, LIU SL, MEUSEMANN K, PETERS RS, DONATH A, MAYER C, FRANSEN PB, WARE J, FLOURI T, BEUTEL RG, NIEHUIS O, PETERSEN M, IZQUIERDO-CARRASCO F, WAPPLER T, RUST J, ABERER AJ, ASPÖCK U, ASPÖCK H, BARTEL D, BLANKE A, et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution[J]. *Science*, 2014, 346(6210): 763-767.
- [27] MENDES LFS, COSTA-FILHO AJ. A gold revision of the Golgi dynamics (GOLD) domain structure and associated cell functionalities[J]. *FEBS Letters*, 2022, 596(8): 973-990.
- [28] MOTA DCAM, CARDOSO IA, MORI RM, BATISTA MRB, BASSO LGM, NONATO MC, COSTA-FILHO AJ, MENDES LFS. Structural and thermodynamic analyses of human TMED1 (p24 $\gamma$ 1) Golgi dynamics[J]. *Biochimie*, 2022, 192: 72-82.
- [29] PARK H, SEO SK, SIM JR, HWANG SJ, KIM YJ, SHIN DH, JANG DG, NOH SH, PARK PG, KO SH, SHIN MH, CHOI JY, ITO Y, KANG CM, LEE JM, LEE MG. TMED3 complex mediates ER stress-associated secretion of CFTR, pendrin, and SARS-CoV-2 spike[J]. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 2022, 9(24): e2105320.
- [30] GROMIHA MM, PARRY DAD. Characteristic features of amino acid residues in coiled-coil protein structures[J]. *Biophysical Chemistry*, 2004, 111(2): 95-103.
- [31] EMERY G, ROJO M, GRUENBERG J. Coupled transport of p24 family members[J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(13): 2507-2516.
- [32] CIUFO LF, BOYD A. Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(12): 8382-8388.
- [33] COSSON P, PERRIN J, BONIFACINO JS. Anchors aweigh: protein localization and transport mediated by transmembrane domains[J]. *Trends in Cell Biology*, 2013, 23(10): 511-517.
- [34] PANNWITT S, STANGL M, SCHNEIDER D. Lipid binding controls dimerization of the coat protein p24 transmembrane helix[J]. *Biophysical Journal*, 2019, 117(9): 1554-1562.
- [35] AISENBREY C, KEMAYO-KOUMKOUA P, SALNIKOV ES, GLATTARD E, BECHINGER B. Investigations of the structure, topology, and interactions of the transmembrane domain of the lipid-sorting protein p24 being highly selective for sphingomyelin-C18[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(24): 2782-2795.
- [36] LIAUNARDY-JOPEACE A, BRYANTCE, GAY NJ. The COP II adaptor protein TMED7 is required to initiate and mediate the delivery of TLR4 to the plasma membrane[J]. *Science Signaling*, 2014, 7(336): e2005275.
- [37] FIEDLER K, ROTHMAN JE. Sorting determinants in the transmembrane domain of p24 proteins[J]. *Journal*

- of Biological Chemistry, 1997, 272(40): 24739-24742.
- [38] AGEE AE, SURPIN M, SOHN EJ, GIRKE T, ROSADO A, KRAM BW, CARTER C, WENTZELL AM, KLIEBENSTEIN DJ, JIN HC, PARK OK, JIN HL, HICKS GR, RAIKHEL NV. MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an *Arabidopsis* myrosinase-associated protein involved in endomembrane protein trafficking[J]. Plant Physiology, 2009, 152(1): 120-132.
- [39] BLUM R, LEPIER A. The luminal domain of p23 (Tmp21) plays a critical role in p23 cell surface trafficking[J]. Traffic, 2008, 9(9): 1530-1550.
- [40] HOU WY, JEROME-MAJEWSKA LA. TMED2/emp24 is required in both the chorion and the allantois for placental labyrinth layer development[J]. Developmental Biology, 2018, 444(1): 20-32.
- [41] FENG LH, CHENG PJ, FENG ZY, ZHANG XY. Transmembrane p24 trafficking protein 2 regulates inflammation through the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. World Journal of Surgical Oncology, 2022, 20(1): 1-13.
- [42] FADISTA J, VIKMAN P, LAAKSO EO, MOLLET IG, ESGUERRA JL, TANEERA J, STORM P, OSMARK P, LADENVALL C, PRASAD RB, HANSSON KB, FINOTELLO F, UVEBRANT K, OFORI JK, DI CAMILLO B, KRUS U, CILIO CM, HANSSON O, ELIASSON L, ROSENGREN AH, et al. Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(38): 13924-13929.

(本文责编 陈宏宇)