

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180206001

http://www.yykxjz.cn/

赵庆, 吴彪, 刘志鸿, 孙秀俊, 周丽青, 杨爱国, 张高伟. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)血红蛋白 I 基因克隆及表达特征. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 84-91

Zhao Q, Wu B, Liu ZH, Sun XJ, Zhou LQ, Yang AG, Zhang GW. Cloning and expression analysis of hemoglobin gene I of *Scapharca broughtonii*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 84-91

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)血红蛋白 I 基因克隆及表达特征*

赵庆^{1,3} 吴彪^{1,2①} 刘志鸿^{1,2} 孙秀俊^{1,2}
周丽青^{1,2} 杨爱国^{1,2} 张高伟^{1,3}

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的血淋巴中因含有血红蛋白而不同于其他多数双壳贝类。为明确魁蚶血红蛋白基因的结构特征、组织发生分布、免疫活性等特点,本研究以魁蚶转录组数据库中的部分序列为基础,通过cDNA末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术,克隆获得了一种魁蚶血红蛋白基因cDNA全长序列(命名为*SbHb I*),并研究了不同条件下的mRNA表达。序列和结构分析显示,*SbHb I*基因cDNA全长为867 bp,其中包括长度为483 bp的开放阅读框(Open reading frame, ORF),编码160个氨基酸,预测蛋白分子量为17.5 kDa,理论等电点为9.68;氨基酸序列具有多个血红素结合位点,序列与所选其他物种的相似性范围为57%~93%,与蚶科相似性较高。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)结果显示,在魁蚶成体的斧足、鳃、外套膜、闭壳肌、血淋巴、肝胰腺及受精卵至发育23 d的幼虫体内,均能检测到*SbHb I*基因;该基因在成体魁蚶血淋巴中表达量最高,与其他5个组织中的表达量差异显著($P<0.05$);受精卵至23 d幼虫期的表达,基本呈现为先下降后上升的趋势,且在12 d时急剧上升($P<0.05$);在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激和低氧胁迫后,血淋巴中*SbHb I*基因的表达均呈先上升后下降的趋势,表达量最高值均出现在16 h。本研究丰富了贝类血红蛋白相关研究资料。

关键词 魁蚶; 血红蛋白; 基因克隆; 表达特征

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)01-0084-08

血红蛋白(Hemoglobin)为呼吸蛋白中的一员,广泛存在于脊椎动物、部分无脊椎动物以及一些高等植

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项资金(20603022016001; 20603022017002)和农业农村部农业国际合作交流项目——“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作项目共同资助[This work is supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS(20603022016001; 20603022017002) and Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China: Science, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries along the Belt and Road].

赵庆, E-mail: 544241360@qq.com

① 通讯作者: 吴彪, 副研究员, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-02-06, 收修改稿日期: 2018-03-14

物、少数真菌和细菌中(汪青等, 2011)。血红蛋白的主要功能是参与运输和存储 O_2 , 但随着研究的不断深入, 发现不同物种血红蛋白的结构存在一定差异, 尤其是在无脊椎动物中其保守性较低, 这为其新功能的获得提供了基础(叶水英等, 2008)。报道显示, 血红蛋白是一种多功能蛋白, 除携氧功能外, 还具有储存能量、维持渗透压、维持血压和抗菌等多种功能(Brittain, 2002; Kato *et al*, 2017; Wang *et al*, 2013; 齐小琼等, 2014)。例如, 人血红蛋白可以吸收肺中的 NO, 释放到血液中, 从而调节 NO 浓度(Datta *et al*, 2004), 海洋蠕虫(*Arenicola marina*)的血红蛋白能参与体液酸碱平衡的调节(Toulmond, 1973)。软体动物血红蛋白的免疫活性也受到重视, 王素芳等(2014)纯化得到了泥蚶(*Tegillarca granosa*)的血红蛋白, 进一步研究发现, 其具有过氧化物酶活性, 还具有抗恶臭假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*)活性; 荆昭(2011)研究发现, 毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)的血红蛋白能杀灭金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)和四联微球菌(*Micrococcus tetragenus*)等多种细菌。

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是我国重要的大型经济蚶类, 生活于潮间带至数十米的浅海区, 以软泥和泥沙质海底常见, 在我国主要分布于黄、渤海, 东海少见(张素萍, 2008)。魁蚶抗逆性较强, 对低盐、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)等胁迫都具有一定的耐受能力(张广明等, 2017; Zheng *et al*, 2015), 可能与其血淋巴成分有关, 但相关方面的研究报道十分有限。与其他多数双壳贝类不同, 魁蚶血液呈鲜红色。周丽青等(2013、2014)将魁蚶血细胞划分为三类, 即红细胞、白细胞和血栓细胞, 并发现红细胞对病原体有被动吞噬和免疫吸附作用。蚶科贝类的血红蛋白基因已经在泥蚶(Bao *et al*, 2013)和毛蚶(荆昭, 2011)中克隆获得, 相关功能方面的初步研究也已开展。

为更好地了解魁蚶血红蛋白基因结构、时空分布特征以及在胁迫后的表达变化, 本研究拟克隆获得魁蚶血红蛋白基因, 并分别研究该基因在 mRNA 水平上的变化特征, 以期为魁蚶血红蛋白相关功能的研究积累数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与来源

实验魁蚶采自山东省莱州海区, 选取壳长为 40 mm 左右的活力强的个体, 将其表面的泥沙洗刷干净, 低温运至实验室, 于 20℃ 充气海水中暂养 7 d,

每天换水 2 次, 每次换水 1/2, 每 4 h 投喂小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)等单胞藻 1 次; 实验幼虫取自山东省莱州育苗场。

1.2 实验处理及实验组织获得

鳃弧菌刺激实验: 将魁蚶随机分为鳃弧菌处理组、PBS 组和对照组 3 组, 每组 40 个体。鳃弧菌为本实验室保存的菌种, 用 2216E 培养基复苏, 离心弃上清液, 用 PBS 稀释至 $OD_{600\text{ nm}}=0.4$ ($1\text{ OD}=5\times 10^8\text{ cells/ml}$)。鳃弧菌处理组是向魁蚶闭壳肌中注射 50 μl 菌悬液, PBS 组注射 50 μl 灭菌 PBS, 对照组不进行任何处理。分别于 0、2、4、8、16、24、32 和 64 h 随机选取 3 个个体抽取血淋巴, 离心(4℃, 800 r/min, 15 min)收集血细胞, 用于总 RNA 提取。

低氧胁迫处理: 通过调节氮气和空气的充气速度控制海水溶解氧(DO)浓度, 实验共设 4 个 DO 浓度梯度, 分别为 0.5、2.5、4.5 和 7.5 mg/L (对照组), 处理 0、2、4、8、16、24、32 和 64 h 后, 在每组中随机取 3 个魁蚶血淋巴, 离心收集血细胞。

取对照组魁蚶的外套膜、闭壳肌、鳃、肝胰腺、血淋巴和斧足等组织存于液氮中, 用于基因克隆和组织表达分析。为获得发育同步性高的魁蚶幼虫, 在魁蚶育苗场构建 5 个魁蚶家系, 利用筛绢分别富集 0、1、2、3、12、16、18、28 h 及 2、3、5、6、8、9、10、11、12、13、23 d 的幼虫, 保存于液氮中。

1.3 基因克隆与序列分析

1.3.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 RNA 提取参照孙杰等(2010)的方法进行。主要步骤: 将组织样品在液氮中研磨, Trizol 处理 10 min, 加入氯仿抽提蛋白质, 然后再利用异丙醇沉淀 RNA, 用 75%乙醇洗净异丙醇后, 室温干燥, DEPC 水溶解 RNA。采用分光光度计($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$)和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量、纯度和完整性。采用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa), 按照说明书操作步骤合成 cDNA 第一链, PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)合成 cDNA, 用于实时荧光定量 PCR(qRT-PCR), 置于-20℃ 中备用。

1.3.2 *SbHb I* 基因克隆 根据本实验室转录组数据库中的已知序列, 利用 Primer Premier 5 设计特异性引物 *SbHb I*-F 和 *SbHb I*-R, 扩增验证 *SbHb I* cDNA 的中间片段。使用 RACE 试剂盒(Clontech)进行 RACE 扩增, 拼接扩增序列获得基因 cDNA 全长。根据扩增出的中间片段设计 5'RACE(5Hb-R₁ 和 5Hb-R₂)

和 3'RACE(3Hb-F₁ 和 3Hb-F₂)引物, 进行巢式扩增。第一轮使用试剂盒中的 UPM 和 5Hb-R₁ 与 3Hb-F₁ 进行扩增, 以第一轮的扩增产物稀释 30 倍为模板, 以 NUP 和 5Hb-R₂ 与 3Hb-F₂ 进行第二轮扩增。PCR 反应程序: 94℃ 30 s, 72℃ 1 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 1 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1 min, 25 个循环; 4℃ 保存。所用引物见表 1。

表 1 实验所用引物序列
Tab.1 The primers used in this experiment

| 引物 Primer | 序列 Sequence (5'~3') |
|--------------------|---|
| <i>β-actin</i> -F | GAGACCTCAACACCCCGC |
| <i>β-actin</i> -R | TAGGTGGTCTCGTGGATGCC |
| <i>SbHb I</i> -F | TGCGGTAGTGAAGCCATCAA |
| <i>SbHb I</i> -R | AAGTGCGTATGTCAGCGTGA |
| 5Hb-R ₁ | ACCTGTGGCTTCAATATCAGCT |
| 5Hb-R ₂ | ACTCCCCAGCTTCTTCTGAGA |
| 3Hb-F ₁ | GCAAAATTGAGAGGACACGCA |
| 3Hb-F ₂ | CGCAATCACGCTGACATACG |
| UPM | Long: CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACG CAGAGT Short: CTAATACGACTCACTATAGGGC |
| NUP | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT |
| qHb-F | TGAGAGGACACGCAATCACGCT |
| qHb-R | CCCCGAATGCGTCAACCACTGAT |

2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切胶回收目的条带, 连接 T 载体并转化至克隆菌, 挑取阳性单克隆菌株, 测序验证。

1.3.3 序列分析 用 DNASTAR 软件对测序序列进行拼接, 获得完整 cDNA 序列, 查找 ORF 并翻译成氨基酸, 预测蛋白分子量及等电点; 利用 Interproscan 和 Smart 在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>和 <http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测编码蛋白的功能域; 用 TMHMM、SignalP3.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)等在线软件分析蛋白的跨膜结构, 预测信号肽。经 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)查找同源序列, 利用 ClustalX 和 DNAMAN 软件进行多序列同源比对, 利用 Mega 6.0 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 中的 Poisson model 模型构建系统进化树。

1.4 qRT-PCR 分析

设计特异性引物 qHb-F 和 qHb-R, 以稀释 15 倍

的 cDNA 为模板进行定量扩增, 实验用 *β-actin* 作为内参基因(引物序列见表 1)。反应体系: *Taq* 酶 10 μl, 正反向引物各 0.8 μl, ROX Reference Dye II 0.4 μl, 模板 2 μl, ddH₂O 6 μl。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。每个样品设置 3 个重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达量。使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan 多重比较 ($P < 0.05$)。利用 GraphPad prism 软件作图。

2 结果

2.1 基因 cDNA 序列分析

将测序结果进行拼接、比对, 最终得到血红蛋白基因的 cDNA 全长序列(命名为 *SbHb I*, GenBank 登录号为 MF370202), 序列信息如图 1 所示。基因 cDNA 全长为 867 bp, 包括 177 bp 的 5'-UTR、206 bp 的 3'-UTR 和 483 bp 的 ORF, ORF 编码 160 个氨基酸残基, 预测蛋白分子量为 17.5 kDa, 理论等电点为 9.68。3'-UTR 近 poly A 附近具有加尾信号序列(AATAAA)。软件预测 *SbHb I* 编码的蛋白不存在跨膜结构和信号肽, 但存在血红素结合位点, 位点分别在第 61、62、80、83、84、108、111、112、117、121、122 和 125 氨基酸处。

2.2 *SbHb I* 的同源性分析

NCBI 在线比对结果显示, *SbHb I* 编码的氨基酸序列与其他物种血红蛋白编码氨基酸序列具有不同程度的相似度, 其中, 与毛蚶相似度为 93%, 与泥蚶的相似度为 84%, 与人血红蛋白的相似度为 70%, 氨基酸序列比对信息如图 2 所示。

在 GenBank 上搜索选取了具有代表性物种的血红蛋白序列, 使用 Mega 6.0 构建的 NJ 进化树见图 3。结果显示, 属于古菌域的产气荚膜梭菌 (*Halophilic archaeon*)、植物中的马铃薯 (*Rattus norvegicus*) 和棘皮动物中的近辐蛇尾 (*Ophiactis simplex*) 产生分支, 与其他物种距离较远。之后主要分为两大支, 脊索动物聚为一支, 无脊索动物、真菌和细菌聚为一支。本研究中的魁蚶先与毛蚶聚为一支, 再依次与不等壳毛蚶 (*S. inaequalvis*)、泥蚶聚在一起。

2.3 *SbHb I* 组织表达分析

通过 qRT-PCR 检测 *SbHb I* 基因在鳃、血淋巴、外套膜、斧足、闭壳肌和肝胰腺等 6 个组织中的表达情况(图 4)。从图 4 可以看出, 在 6 个组织中均能检测到

```

1  tgacctgga gttccgtag ttttgcaaa actaacggtt ttaagcttcg ttctttcgg aaatgcacaa attgcctgtg gtcacatgtg
91  ttacctcaat gcataagaga atggtataaa aggacactgg acgggttgt catcacttc gagtccaac tattgctgaa agcgtttt ATG
                                          M
181 CAA ACG AGA AGA ACT AAA GCA ACA AAA ATG GTT GAT GCA GCA GTA GCA AAA
    Q  T  R  R  T  K  A  T  K  M  V  D  A  A  V  A  K
232 GTA TGC GGT AGT GAA GCC ATC AAG GCA AAT CTC AGA AGA AGC TGG GGA GTT
    V  C  G  S  E  A  I  K  A  N  L  R  R  S  W  G  V
283 TTA TCA GCT GAT ATT GAA GCC ACA GGT TTA ATG CTG ATG AGC AAT TTG TTT ACC
    L  S  A  D  I  E  A  T  G  L  M  L  M  S  N  L  F  T
337 TTG AGA CCA GAC ACA AAA ACT TAC TTC ACA CGT TTA GGA GAT GTA CAA AAA
    L  R  P  D  T  K  T  Y  F  T  R  L  G  D  V  Q  K
388 GGA AAG GCC AAC AGC AAA TTG AGA GGA CAC GCA ATC ACG CTG ACA TAC GCA
    G  K  A  N  S  K  L  R  G  H  A  I  T  L  T  Y  A
439 CTT AAC AAC TTC GTT GAT TCC CTC GAT GAT CCA TCC AGA TTG AAA TGT GTC GTA
    L  N  N  F  V  D  S  L  D  D  P  S  R  L  K  C  V  V
493 GAA AAG TTT GCT GTT AAT CAT ATC AAC AGA AAA ATC AGT GGT GAC GCA TTC
    E  K  F  A  V  N  H  I  N  R  K  I  S  G  D  A  F
544 GGG GCA ATC ATT GAA CCC ATG AAG GAG ACC CTG AAG GCC AGA ATG GGA AAT
    G  A  I  I  E  P  M  K  E  T  L  K  A  R  M  G  N
595 TAT TAC AGT GAC GAT GTT GCT GGA GCA TGG GCC GCT CTT GTT GGT GTA GTT
    Y  Y  S  D  D  V  A  G  A  W  A  A  L  V  G  V  V
646 CAG GCT GCC TTG TAA actgttAgcgataa tccggataa ggactgtct tgccttaaca ttacattgta acaatgttg atgttagata
    Q  A  A  L  *
731 agtcaactat gatagatta tcaatcaact tgcattgag tcattgatgt cggtttAgtt tgcaagatt tcttatgtt gttattgtt ttctctaca
831 aatcaataa aacctttaag cataaaaaa aaaaaa

```

图 1 *SbHb I* 核苷酸序列及编码氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *SbHb I*

双下划线分别代表起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA), 单下划线的为加尾信号(aataaa), 加粗的氨基酸为血红素结合位点

The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are underlined with double underscore, polyadenylation signals and poly A plus tail signal (aataaa) is underlined, and the bold amino acid show the heme binding site

SbHb I 基因的转录本表达。*SbHb I* 在血淋巴中的表达量最高, 与其他 5 个组织存在显著差异($P < 0.05$), 而这 5 个组织中 *SbHb I* 的表达量差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 *SbHb I* 在幼虫不同发育阶段的表达分析

SbHb I 在幼虫不同发育阶段的表达特征见图 5。从图 5 可知, 卵细胞至发育 11 d 时, 幼虫的 *SbHb I* 表达量虽有变化, 但差异不显著; 幼虫发育 2 d 以后, *SbHb I* 有上调趋势, 幼虫发育至 12 d 时, 其表达量显著高于 1/2 d 时的参照值($P < 0.05$), 同时也达到了所有检测阶段的最高值, 为对照组的 200 多倍。12~13 d 时, *SbHb I* 表达量没有显著差异。相对于 12~13 d 时的表达量, 22 d 幼虫体内 *SbHb I* 的表达量显著下降, 约为参照值的 161 倍($P < 0.05$)。在整个检测阶段中, *SbHb I* 的表达量呈先升高再降低的趋势。

2.5 *SbHb I* 在低氧胁迫和鳗弧菌刺激后的表达分析

低氧胁迫和鳗弧菌刺激后, *SbHb I* 的表达变化见图 6。图 6A 显示, 在 DO 值为 7.5 mg/L 的对照组

中, *SbHb I* 的表达比较稳定, 没有显著变化。低氧胁迫使各处理组 *SbHb I* 具有相似的变化趋势, 基本表现为先下降后上升的趋势。低氧胁迫 2 h 时, 4.5、2.5 和 0.5 mg/L 3 个处理组血淋巴中的 *SbHb I* 出现下降, 均低于 0 h 的表达量, 但未到达显著水平。低氧胁迫 8 h 时, 3 个处理组 *SbHb I* 表达量显著高于 2 h。低氧胁迫 16 h 时, 各组均急剧升高达到峰值, 4.5、2.5 和 0.5 mg/L 组的表达量分别是 7.5 mg/L 组的 11.1 倍、7 倍和 6.45 倍, 且与其他相同处理组所有时间点的表达量存在显著差异($P < 0.05$)。低氧胁迫 24 h 时, *SbHb I* 表达量开始下降, 至 32 h 时基本恢复至对照组水平。鳗弧菌刺激后, *SbHb I* 在血细胞中的表达变化趋势基本与低氧胁迫一致, 也是在 16 h 时急剧上升, 之后显著下降(图 6B)。

3 讨论

魁蚶血液呈红色是一种十分有趣的现象, 其原因是血细胞中含有红细胞。Zhou 等(2017)报道, 魁蚶红

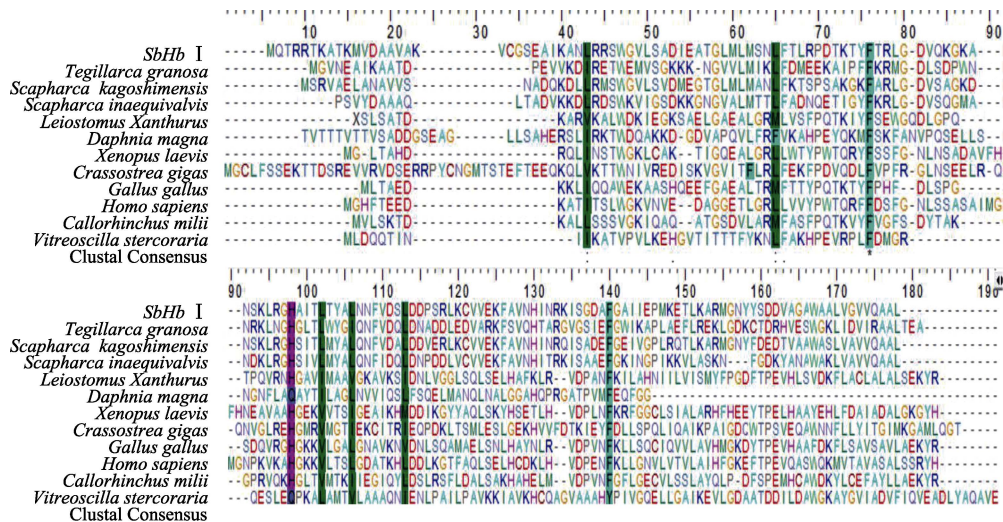


图2 不同物种血红蛋白氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of *SbHb I* with other hemoglobin amino acid sequences

氨基酸序列 GenBank 号: 泥蚶(HQ149306.1); 毛蚶(FJ797701.1); 不等壳毛蚶(6HBI_A); 黄尾平口石首鱼(P56250.1); 大型溞(AAF66070.1); 光滑爪蟾(NM_001088028.2); 长牡蛎(XP_011416055.1); 原鸡(NM_205489.2); 人(DQ659148.1); 叶吻银鲛(NM_001292784.1); 透明颤菌(M30794.1)

The GenBank accession numbers of protein sequences used for analysis are as follows: *T. granosa*(HQ149306.1); *S. kagoshimensis*(FJ797701.1); *S. inaequivalvis*(6HBI_A); *Leioostomus xanthurus* (P56250.1); *Daphnia magna*(AAF66070.1); *Xenopus laevis*(NM_001088028.2); *Crassostrea gigas* (XP_011416055.1); *Gallus gallus* (NM_205489.2); *Homo sapiens*(DQ659148.1); *Callorhinchus milii* (NM_001292784.1); *Vitreoscilla stercoraria*(M30794.1)

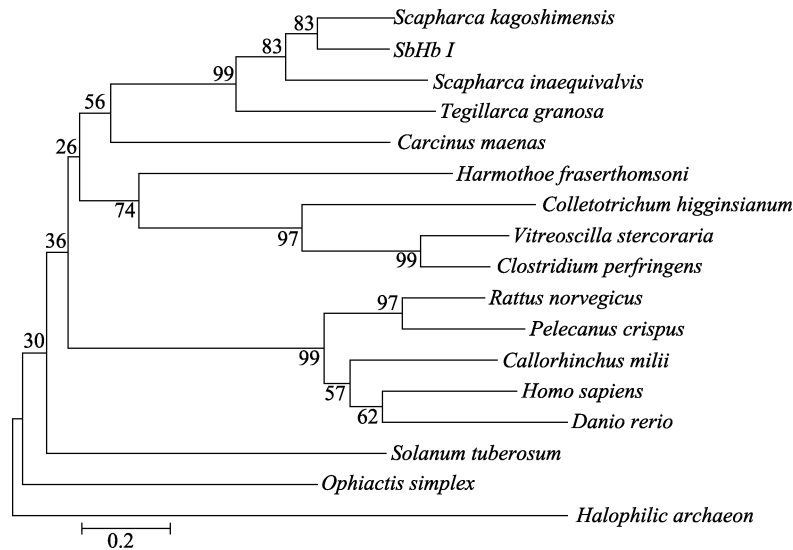


图3 NJ法构建的血红蛋白家族系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree based on the sequences of different hemoglobin family members

进化树中所用蛋白的氨基酸序列的 GenBank 号: 透明颤菌(AAA27584.1); 嗜盐古菌(ATW86944.1); 产气荚膜梭菌(EIA16494.1); 近辐蛇尾(AHN50408.1); 岸蟹(CBN88274.1); 马铃薯(NP001275068.1); 卷羽鹌鹑(NP001289298.1); 人(ABG47031.1); 鳞土蚕(AJP75042.1); 叶吻银鲛(NP_001279713.1); 褐家鼠(NP_037228.1); 斑马鱼(NP_932339.1); 十字花科蔬菜炭疽菌(XP_018156679.1); 泥蚶(HQ149306.1); 毛蚶(FJ797701.1); 不等壳毛蚶(X71387.1)

The GenBank accession numbers of protein sequences used for phylogenetic analysis are as follows: *V. stercoraria*(AAA27584.1); *H. archaeon*(ATW86944.1); *Clostridium perfringens* (EIA16494.1); *O. simplex*(AHN50408.1); *Carcinus maenas*(CBN88274.1); *Solanum tuberosum*(NP001275068.1); *Pelecanus crispus*(NP001289298.1); *H. sapiens*(ABG47031.1); *Harmothoe fraserthomsoni*(AJP75042.1); *C. milii*(NP_001279713.1); *R. norvegicus*(NP_037228.1); *Danio rerio*(NP_932339.1); *Colletotrichum higginsianum*(XP_018156679.1); *T. granosa*(HQ149306.1); *S. kagoshimensis*(FJ797701.1); *S. inaequivalvis* (X71387.1)

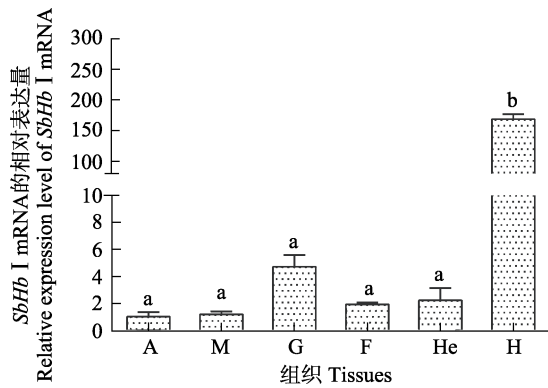


图 4 *SbHb I* mRNA 在不同组织中的表达水平

Fig.4 Relative expression level of *SbHb I* mRNA in different tissues of *S. broughtonii*

A: 闭壳肌; M: 外套膜; G: 鳃; F: 斧足; He: 肝胰腺; H: 血淋巴。不同字母间表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母间表示差异不显著($P > 0.05$), 下同
 A: Adductor muscle; M: Mantle; G: Gill; F: Foot; He: Hepatopancreas; H: Haemocyte. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), and the same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$). The same as below

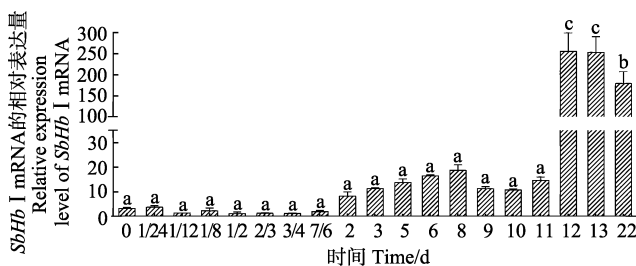


图 5 *SbHb I* mRNA 在幼虫不同发育时间的表达水平

Fig.5 Relative expression level of *SbHb I* mRNA in different developmental time of larvae

细胞具有被动吞噬作用和免疫吸附作用, 在魁蚶免疫防御系统中发挥重要作用。这对于主要依靠非特异性免疫进行机体免疫保护的魁蚶来说有重要意义, 这也可能是魁蚶具有较强抗逆能力的原因之一。而在红细胞中, 其主要的功能蛋白是血红蛋白。在泥蚶、毛蚶等蚶类中已克隆获得血红蛋白基因, 且在同一物种中通常具有多个类型, 同时, 免疫相关的功能研究也已经开展(Bao *et al.*, 2013)。本研究通过 PCR 和 RACE 技术克隆获得了全长为 867 bp 的 cDNA 序列, 序列分析和同源比对发现, 编码 160 个氨基酸残基, 存在多个血红素结合位点, 具有血红蛋白的特征序列; 且与其他物种, 尤其毛蚶、泥蚶等近缘物种的血红蛋白序列具有较高相似度, 从而在分子水平上证实魁蚶中也含有血红蛋白基因。Bao 等(2013)报道泥蚶血红蛋白的 3 个亚基的基因 Tg-Hb I、Tg-Hb II A 和 Tg-Hb II B,

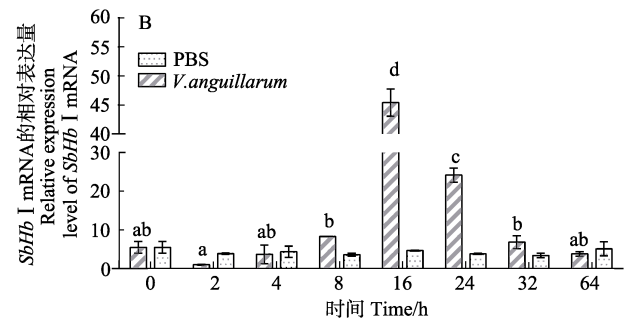
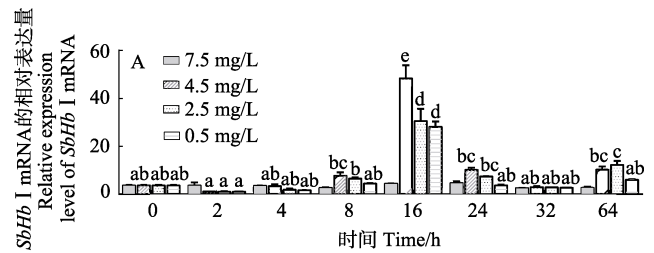


图 6 *SbHb I* mRNA 在低氧胁迫和鳃弧菌刺激后的表达水平

Fig.6 Relative expression level of *SbHb I* mRNA in haemocytes after hypoxia stress and *V. anguillarum* stimulation

魁蚶血红蛋白基因多态性有待进一步研究。

本研究中, 在所收集的鳃、肝胰腺、斧足、外套膜、闭壳肌和血淋巴 6 个组织中均检测到了血红蛋白的转录本, 但血淋巴中的表达量显著高于其他 5 个组织, 是闭壳肌中的 160 多倍, 且其他 5 个组织之间表达量没有显著差异。汪青等(2012)发现, 泥蚶血红蛋白基因 Tg-Hb II 也在血液中表达量最高, 其他组织相对较低。所以, 在 5 个表达量较低的组织中检测到的血红蛋白, 或许是由于魁蚶开放式循环方式而导致的血淋巴“污染”。在幼虫不同发育阶段的表达结果表明, *SbHb I* 在 mRNA 水平上具有母源传递特性, 而且可能在担轮幼虫期开始自身合成, 在壳顶幼虫期(本研究中 12 d 时)其合成系统相对完善, 合成能力显著提升。这与吴彪等(2017)、岳峰(2013)分别报道的魁蚶大防御素和扇贝的几种免疫分子的母源传递及免疫因子合成规律相似。

本研究中, 低氧胁迫后, 3 个处理水平组的血淋巴中 *SbHb I* 的表达模式基本一致, 呈先上升后下降再上升的趋势, 16 h 表达量最高。在机体缺氧时, 血红蛋白能够释放所结合的氧气供组织生命活动所需, 而缺氧时, 机体对氧气的的需求有赖于红细胞数量的增加。这说明在机体感受低氧环境后, *SbHb I* 的上调表达可能是红细胞需求增加的体现。而在多数的同一时间点, 4.5 mg/L 组 *SbHb I* 的响应要比其他 2 个处

理组更灵敏,这可能是由于过低的溶氧已对魁蚶的正常生理活动产生较大影响。结合鳃弧菌刺激后 *SbHb I* 的表达看,发现 *SbHb I* 的表达变化趋势与郑利兵等(2015)、黄永欢等(2016)和沈淑芳等(2018)报道的半乳糖凝集素、过氧化氢酶和 C 型凝集素免疫因子经鳃弧菌刺激后的变化趋势相近。因此,推断 *SbHb I* 在免疫反应过程中也发挥作用,为一种免疫相关因子。

目前,魁蚶免疫因子基因克隆及功能的相关研究已经有大防御素(Li *et al.*, 2012)、锰超氧化物歧化酶(Zheng *et al.*, 2015)和铁蛋白(Zheng *et al.*, 2016)等多个报道。而血红蛋白作为魁蚶血淋巴中极为重要的成分,在机体的生命活动中发挥重要生物学功能,仍需深入研究。本研究初步揭示了魁蚶血红蛋白 I 基因的结构特征和表达模式,为魁蚶血红蛋白后续的功能研究提供了参考资料。

参 考 文 献

- Bao YB, Li PF, Dong YH, *et al.* Polymorphism of the multiple hemoglobins in blood clam *Tegillarca granosa* and its association with disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1320–1324
- Brittain T. Molecular aspects of embryonic hemoglobin function. *Molecular Aspects of Medicine*, 2002, 23(4): 293–342
- Datta S, Machaal A, Thekkudan J, *et al.* Inhaled nitric oxide as rescue therapy for right ventricular insufficiency after orthotopic heart transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2004, 23(2): 158
- Hang YH, Liu ZH, Wu B, *et al.* Gene cloning and expression analysis of catalase in *Scapharca broughtonii*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(6): 856–866 [黄永欢, 刘志鸿, 吴彪, 等. 魁蚶过氧化氢酶基因克隆及表达分析. *水产学报*, 2016, 40(6): 856–866]
- Jin Z. Study on phenoloxidase-like properties and antibacterial activity of hemoglobin from blood clam *Scapharca kagoshimensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [荆昭. 毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)血红蛋白的类酚氧化酶性质及其抗菌活性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]
- Kato Y, Shoji Y, Morita K, *et al.* Evaluation of changes in oxyhemoglobin during Shiritori task in elderly subjects including those with Alzheimers disease. *Psychogeriatrics*, 2017, 17(4): 238–246
- Li M, Zhu L, Zhou CY, *et al.* Molecular characterization and expression of a novel big defensin (*Sb-BDef1*) from ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(5): 1167–1173
- Qi XQ, Wang T. Molecular evolution of hemoglobin families. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(18): 4447–4456 [齐小琼, 王艇. 植物血红蛋白基因家族的分子进化研究. *湖北农业科学*, 2014, 53(18): 4447–4456]
- Shen SF, Zhu L, Li JQ, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of C-type lectin from *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 128–136 [沈淑芳, 朱玲, 李加琦, 等. 魁蚶 C 型凝集素基因 cDNA 的克隆及表达分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 128–136]
- Sun J, Wang BJ, Sun SJ, *et al.* cDNA cloning and sequence analysis of hemocyanin *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 80–88 [孙杰, 王宝杰, 孙姝娟, 等. 中国对虾血蓝蛋白基因 cDNA 的克隆与序列分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 80–88]
- Toulmond A. Tide-related changes of blood respiratory variables in the lugworm *Arenicola marina*. *Respiration Physiology*, 1973, 19(2): 130–144
- Wang SF, Bao YB, Shi NJ, *et al.* Purification and antibacterial activity of hemoglobin from *Tegillarca granosa*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(12): 67–73 [王素芳, 包永波, 施淼江, 等. 泥蚶血红蛋白的制备及其抗菌活性研究. *海洋学报*, 2014, 36(12): 67–73]
- Wang Q, Jiang C, Fang S, *et al.* Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150(3): 1119–1127
- Wang Q, Xiang RH, Bao YB, *et al.* Research progress in animal hemoglobin. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2011, 24(2): 20–24 [汪青, 项荣花, 包永波, 等. 动物血红蛋白研究进展. *宁波大学学报(理工版)*, 2011, 24(2): 20–24]
- Wang Q, Lin ZH, Bao YB, *et al.* Clone and analysis of hemoglobin gene (Tg-Hb II A) and immune expression research in *Tegillarca granosa*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 88–94 [汪青, 林志华, 包永波, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)血红蛋白基因(Tg-Hb II A)克隆、分析及免疫表达研究. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 88–94]
- Wu B, Liu ZH, Zhou LQ, *et al.* Dynamic expression of big-defensin in different developmental stages of early-larva of *Scapharca broughtonii*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(2): 351–357 [吴彪, 刘志鸿, 周丽青, 等. 魁蚶母源大防御素在子代发育早期的动态变化. *海洋与湖沼*, 2017, 48(2): 351–357]
- Ye SY, Chen SZ. The type and function of plant hemoglobin. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2008, 14(17): 82–83, 98 [叶水英, 陈素珍. 植物血红蛋白的类型及其功能. *安徽农学通报*, 2008, 14(17): 82–83, 98]
- Yue F. Study on the ontogenesis of immune system in scallop *Chlamys farreri* and the maternal immunity at its early life. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Science, 2013 [岳峰. 栉孔扇贝免疫系统发生及母源免疫的初步研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2013]
- Zhang GM, Wu B, Yang AG, *et al.* Influence of low salinity challenge on survival and enzyme activities in *Scapharca broughtonii*. *Journal of Ludong University (Natural Science Edition)*, 2017, 33(2): 159–163 [张广明, 吴彪, 杨爱国, 等. 盐度胁迫对魁蚶耐受性及体内酶活性的影响. *鲁东大学学报(自然科学版)*, 2017, 33(2): 159–163]
- Zhang SP. Illustrated handbook of of marine Mollusks in China. Beijing: China Ocean Press, 2008, 268–269 [张素萍. 中国海洋贝类图鉴. 北京: 海洋出版社, 2008, 268–269]
- Zheng LB, Wu B, Liu ZH, *et al.* Cloning and expression analysis of galectin from *Scapharca broughtonii* (*SbGal*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1061–1070 [郑利兵, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)半乳糖凝集素(*SbGal*)基因 cDNA 的克隆及表达分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(5): 1061–1070]

- Zheng LB, Wu B, Liu ZH, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from ark shell, *Scapharca broughtonii*: Molecular characterization, expression and immune activity analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 656–665
- Zheng LB, Liu ZH, Wu B, *et al.* Ferritin has an important immune function in the ark shell *Scapharca broughtonii*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 59(1): 15–24
- Zhou LQ, Yang AG, Wang QY, *et al.* Studies on the hemocytes types and their immunological functions in bloody clam (*Scapharca broughtonii*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 599–606 [周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 魁蚶血细胞分类及其免疫功能的初步分析. *水产学报*, 2013, 37(4): 599–606]
- Zhou LQ, Yang AG, Wang QY, *et al.* Effect of *Vibrio anguillarum* on morphology and immunological function of blood cells in *Scapharca broughtonii*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 536–541 [周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 鳃弧菌对魁蚶血细胞形态及免疫功能的影响. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 536–541]
- Zhou LQ, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Changes in hemolymph characteristics of ark shell *Scapharaca broughtonii* dealt with *Vibrio anguillarum* challenge *in vivo* and various of anticoagulants *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 61(10): 9–15

(编辑 马瑾艳)

Cloning and Expression Analysis of Hemoglobin Gene I of *Scapharca broughtonii*

ZHAO Qing^{1,3}, WU Biao^{1,2①}, LIU Zhihong^{1,2}, SUN Xiujun^{1,2},
ZHOU Liqing^{1,2}, YANG Aiguo^{1,2}, ZHANG Gaowei^{1,3}

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

Abstract Hemoglobin is the main component of haemolymph, which is widely distributed in vertebrates and some invertebrates. It has many biological functions, including transporting oxygen, storing energy, sustaining osmotic pressure, immunological functions, and so on. According to previous reports, the functions of hemoglobin from different organisms are varied, especially in invertebrate animals, because of less conservation in gene structure. However, the study of the immune function of hemoglobin in mollusks is limited. The ark shell, *Scapharca broughtonii*, is one of the important economic marine shellfishes in China, Korea, and Japan, and other places. In particular, previous studies showed that there were three types of hemocytes in *S. broughtonii*: red blood cells, white blood cells, and thrombus cells. To determine the structure, distribution, and immunological activity of the hemoglobin gene, the cDNA sequence of hemoglobin (named *SbHb I*) was obtained using EST and RACE methods. Sequence analysis revealed that the cDNA was 867 bp in length, including an open reading frame (ORF) of 483 bp encoding a polypeptide of 160 amino acid residues. The predicted molecular weight was 17.5 kDa and isoelectric point (pI) was 9.68. The mRNA expression analysis of *SbHb I* in tested tissues by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) revealed that the mRNA of *SbHb I* could all be detected in the foot, gill, mantle, adductor muscle, haemocytes, hepatopancreas, and the larvae aged from oosperm to 23 d. The expression level of *SbHb I* in haemocytes was more than 70 folds that in the adductor muscle. The expression of *SbHb I* in the larvae from the oosperm to 23 d was basically showed a declining tendency at the beginning and increased later, with a sharp increase at 12 d ($P < 0.05$). After being stimulated in *Vibrio anguillarum*, *SbHb I* first showed an upgraded tendency and later descended, and the same tendency occurred during hypoxia stress, during which *SbHb I* reached the maximum ($P < 0.05$) at 16 h at three dissolved oxygen levels (4.5 mg/L, 2.5 mg/L, and 0.5 mg/L). Basic data were provided from the study of hemoglobin in mollusks.

Key words *Scapharca broughtonii*; Hemoglobin; Gene clone; Expression characteristics

① Corresponding author: WU Biao, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn