

DOI: 10.11758/yykxjz.20161221001

http://www.yykxjz.cn/

沈淑芳, 朱玲, 李加琦, 薛素燕, 李阳, 陈琼琳, 毛玉泽, 庄志猛, 方建光. 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

Shen SF, Zhu L, Li JQ, Xue SY, Li Y, Chen QL, Mao YZ, Fang JG. Molecular cloning and expression analysis of C-type lectin from *Scapharca broughtonii*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 128-136

## 魁蚶 C 型凝集素基因 cDNA 的克隆及表达分析\*

沈淑芳<sup>1,2</sup> 朱玲<sup>2①</sup> 李加琦<sup>2,3</sup> 薛素燕<sup>2,3</sup> 李阳<sup>1,2</sup>  
陈琼琳<sup>1,2</sup> 毛玉泽<sup>2,3</sup> 庄志猛<sup>2</sup> 方建光<sup>2,3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业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;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 通过 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆得到魁蚶(*Scapharca broughtonii*) C 型凝集素(C-type lectin, Sb-Lec1)基因, 该基因全长为 700 bp, 其中, 5'-UTR 为 29 bp, 3'-UTR 为 167 bp, 开放阅读框长度为 504 bp, 编码 167 个氨基酸, 包括长度为 23 个氨基酸的信号肽序列、129 个氨基酸的糖识别结构域(CRD)以及参与二硫键形成的 6 个半胱氨酸。预测蛋白分子量为 19.11 kDa, 理论等电点为 4.74。多序列比对结果显示, Sb-Lec1 基因 CRD 编码的氨基酸序列与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*) C 型凝集素的同源性分别为 38%~40%、34%~35%和 38%~39%, Sb-Lec1 基因编码的氨基酸序列与其他物种的凝集素基因具有相似的结构, 均含有形成二硫键的 4 个保守半胱氨酸。系统进化分析结果显示, 魁蚶先与贝类聚为一支, 再与脊椎动物聚在一起, 表明魁蚶 Sb-Lec1 基因在进化树上的位置与其传统分类所处位置一致。采用荧光定量 PCR 技术, 检测了 Sb-Lec1 基因在组织中的表达情况, 发现其在肝胰腺、血淋巴、鳃、外套膜、闭壳肌、斧足中均有表达, 其中, 肝胰腺表达量最高。同时, 分析了 Sb-Lec1 基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的 mRNA 表达量变化情况。结果显示, 与对照组相比, 菌刺激组 Sb-Lec1 基因 mRNA 在各检测组织中的表达量均显著上调( $P<0.05$ ), 随着刺激时间的延长, 表达量呈先升高后降低的趋势。本研究表明, 魁蚶 Sb-Lec1 基因在机体免疫防御方面发挥重要功能。

**关键词** C 型凝集素; 魁蚶; 鳃弧菌; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S968.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)01-0128-09

C 型凝集素(C-type lectin)是最早发现的动物凝集素, 种类繁多, 几乎存在于所有的多细胞生物中 (Robinson *et al*, 2006)。作为固有免疫中一类重要的模式识别受体(PRR), 能够专一性地识别病原相关分子

\* 国家自然科学基金委员会-山东省人民政府联合资助海洋科学研究中心项目(U1406403)、国家海洋局海洋公益性行业科研专项经费项目(201205031; 201305043)和国家贝类产业技术体系(CARS-48)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (NSFC)-Shandong Joint Fund for Marine Science Research Center(U1406403), National Marine Public Welfare Research Project (201205031; 201305043), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-48)]. 沈淑芳, E-mail: shenshufanga@126.com

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

收稿日期: 2016-12-21, 收修改稿日期: 2017-01-06

模式(PAMP), 与糖类可逆结合, 在病原菌入侵过程中参与“非己”识别, 并能激活一系列免疫防御反应, 从而吸附和凝集异物, 促进机体清除和杀灭异物(Tamplin *et al*, 1989; 张岨, 2010)。C 型凝集素具有钙离子依赖性, 它们均含有约 130 个氨基酸残基构成的糖识别结构域(Carbohydrate-recognition domain, CRD)(Drickamer *et al*, 1993)。每个 CRD 在空间上形成双环状结构, 4 个高度保守的 Cys 形成的 2 对二硫键保持了该结构的稳定性, 含有 4 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点, 其中  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点 2 与糖基特异性结合有关(Zelensky *et al*, 2005)。大多数 C 型凝集素可以与 D 型甘露糖(D-mannose)、D 型葡萄糖(D-glucose)这一类的 Man 型配体(Man-type ligands)或 D 型半乳糖(D-galactose)及其衍生物(Gal 型配体, Gal-type ligands)结合(Kolatkar *et al*, 1996), 在免疫识别方面发挥重要作用。

C 型凝集素作为凝集素家族中研究最多的一类, 越来越受到广泛的关注。近几年, 软体动物 C 型凝集素的研究越来越普遍, 对于其在免疫方面的功能研究越来越深入。目前, 已在皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*)(王圣, 2015)、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)(胡钰婷等, 2011)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)(Zhu *et al*, 2008)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(Wang *et al*, 2007)等软体动物中发现并克隆获得 C 型凝集素的全长序列。

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是一种大型海洋底栖经济贝类, 具有较好的市场前景和开发利用价值, 在太平洋西北部浅海区域广泛分布(唐启升等, 1994)。作为亚洲一种重要的经济贝类(Mao *et al*, 2013), 近几年由于过度捕捞、环境污染、海洋生态系统恶化、不健康养殖导致病害发生, 致使魁蚶资源减退(刘寒苗等, 2017)。魁蚶作为一种软体动物, 固有免疫是其抵御外界病原侵害的主要方式。迄今为止, 国内外对于魁蚶自身免疫系统组成、特点和功能的研究逐渐深入, 有关魁蚶免疫相关基因的报道越来越多, 如杀菌渗透性增强蛋白(BPI)和脂多糖结合蛋白(LBP)(Mao *et al*, 2013)、过氧化氢基因(CAT)(黄永欢等, 2016)、半乳糖凝集素(SbGal)(郑利兵等, 2015)、大防御素(SbBDef1)(Li *et al*, 2012)、锰超氧化物歧化酶(SbMnSOD)(Zheng *et al*, 2015)、铁蛋白(SbFer)(Zheng *et al*, 2016)等基因, 另外, 血细胞作为魁蚶的重要免疫部位, 对其分类和免疫作用也有研究(周丽青等, 2013)。然而, 对魁蚶凝集素的研究几乎空白, 因此, 深入开展魁蚶凝集素相关的研究, 可以丰富魁蚶免疫系统, 为进一步研究魁蚶的免疫防御机制提供材料。

本研究在魁蚶转录组文库的基础上, 筛选得到魁

蚶 C 型凝集素 Sb-Lec1 基因, 运用 RACE 技术扩增得到 cDNA 全长, 同时, 运用实时荧光定量 PCR 技术检测该基因在魁蚶中的组织表达情况及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后的表达响应情况, 探究该基因在魁蚶免疫应答方面的作用, 从而为魁蚶病害防治以及育种提供资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所用魁蚶购自山东省莱州市长渔水产有限公司。壳长约为 60 mm, 于 25℃ 实验室充气暂养, 暂养约 1 周后开始实验, 期间投喂螺旋藻, 实验处理前 2 d 停止投喂。鳃弧菌为本实验室保存的菌种。

### 1.2 魁蚶 C 型凝集素全长的克隆

**1.2.1 总 RNA 的提取** Trizol(TaKaRa, 日本)法提取总 RNA: 解剖组织, 用研磨棒充分研磨后, 12000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液, 加入 200  $\mu\text{l}$  氯仿, 剧烈震荡 3 min, 静置后, 离心 15 min。取上清液 400  $\mu\text{l}$ , 加入相同体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, -20℃ 沉降核酸。75%乙醇洗涤核酸, 干燥后, DEPC 水溶解核酸, 用 DNase(Progema, 美国)去除基因组 DNA。1.0% 琼脂糖检测 RNA 完整性, 核酸分析仪(Eppendorf)检测其纯度和浓度。

**1.2.2 基因全长的克隆与测序** 根据获得的魁蚶 C 型凝集素的部分序列, 设计特异性引物用于扩增 Sb-Lec1 基因的全长。利用载体上的通用引物 T7 与特异性引物 Sb-Lec1-F1 扩增 Sb-Lec1 基因的 3' 末端, 用 pBluescript SK(+/-)载体上的通用引物 T3 与特异性引物 Sb-Lec1-R1 扩增 Sb-Lec1 基因的 5' 末端(表 1)。具体步骤: 扩增体系为 25  $\mu\text{l}$ , 内含 cDNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , 1.5  $\mu\text{l}$  of  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L), dNTPs Mixture(2.5 mmol/L) 2.0  $\mu\text{l}$ , 正向引物、反向引物各 1.0  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), Taq 酶(1U) 0.2  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 15.8  $\mu\text{l}$ ; 3'RACE 反应程序: 94℃ 30 s, 57.5℃ 30 s, 72℃ 30 s, 33 个循环, 5'RACE 反应程序为 94℃ 35 s, 57℃ 35 s, 72℃ 35 s, 32 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, 将目的条带切胶回收、纯化。纯化获得的片段与 pMD18-T 载体连接, 连接产物转化到感受态细胞 TOP10 中。获得的阳性克隆子经菌液 PCR 鉴定后, 由青岛海大蓝科公司测序。

**1.2.3 基因序列分析、同源比对及进化分析** 将筛选拼接得到的魁蚶凝集素基因全长序列, 利用 NCBI

表1 引物序列

Tab.1 Primers used in this study

| 引物名称 Name of primer | 序列 Sequence(5'~3')       | 作用 Purpose         |
|---------------------|--------------------------|--------------------|
| Sb-Lec1-F1          | CTGGTAAACCACATAGCCGA     | 3' Race PCR        |
| Sb-Lec1-R1          | TCGTTAGCGTCGTTTATTTC     | 5' Race PCR        |
| T7                  | GTAATACGACTCACTATAGGGC   | 3' Race-PCR        |
| T3                  | AATTAACCCTCACTAAAGGG     | 5' Race-PCR        |
| $\beta$ -actin-F    | TTGGACTCGGGTGATGGT       | $\beta$ -Actin PCR |
| $\beta$ -actin-R    | TCTCGGCTGTGGTGGTGA       | $\beta$ -Actin PCR |
| qSb Sb-Lec1-F2      | GCCTGCTGGTCTTGGTATTGTTTC | RT-PCR             |
| qSb Sb-Lec1-R2      | TCGTTAGCGTCGTTTATTTCGG   | RT-PCR             |

的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)程序进行开放阅读框分析,预测编码氨基酸序列;利用 ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)对 C 型凝集素分子量(Mw)及理论等电点 pI 进行预测;SignalIP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)查找 C 型凝集素信号肽;SMART (<http://www.expasy.ch/SMART>)进行蛋白质结构域分析;ExPASy PROSITE(<http://prosite.expasy.org/>)查找形成二硫键的半胱氨酸。用 NCBI 的 Blastp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)对序列进行同源检索,选取不同物种的 C 型凝集素氨基酸序列,用 DNAMAN8.0 软件与魁蚶 Sb-Lec1 氨基酸序列进行同源性比对分析,在此基础上用 MEGA6.0 构建系统发育树。

### 1.3 魁蚶 C 型凝集素基因对鳗弧菌刺激的反应

**1.3.1 鳗弧菌刺激** 将魁蚶个体随机分为对照组和处理组,为鳗弧菌刺激实验做准备。鳗弧菌用 LB 液体培养基重悬后,扩大培养,培养至  $OD_{600\text{nm}}=0.4$  ( $1\text{ OD}=5\times 10^8\text{ CFU/ml}$ )(郑利兵等, 2015),取一定体积的菌液离心后取沉淀,用同体积的 PBS 悬浮沉淀备用。用微量注射器向处理组个体的前闭壳肌处注射 50  $\mu\text{l}$  菌悬液,然后放回原养殖槽内。分别在注射后 0、2、4、8、12、24、48、72 h,随机选取 4 个个体解剖,取血( $4^\circ\text{C}$ , 12000 r/min 离心 15 min,收集血细胞沉淀)、外套膜、闭壳肌、斧足、鳃、肝胰腺,用于提取总 RNA,对照组注射等量的 PBS( $0.1\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH}=7.4$ ),每个时间点取 4 个个体作为对照。

**1.3.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)** 为了检测魁蚶凝集素基因的组织分布以及其在鳗弧菌刺激下的响应状态,将解剖获得的各种组织提取总 RNA,根据 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit (TaKaRa, 日本)试剂盒反转录得到的 cDNA 作为进行 qRT-PCR 的模板。根据获得的魁蚶 C 型凝集素全长,运用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物 qSb Sb-Lec1-F2、qSb

Sb-Lec1-R2(表 1),  $\beta$ -actin 作为内参基因,运用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行实验,反应参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(TaKaRa, 日本)试剂盒说明书进行。反转录体系为 20  $\mu\text{l}$ : SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II ( $2\times$ ), 10  $\mu\text{l}$ ; PCR 正向引物( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$ ; PCR 反向引物( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$ ; ROX Reference Dye II ( $50\times$ ), 0.4  $\mu\text{l}$ ; cDNA 模板, 2.0  $\mu\text{l}$ ; DEPC 水, 6.8  $\mu\text{l}$ , 反应程序:  $95^\circ\text{C}$  30 s;  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  34 s, 40 个循环;  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $60^\circ\text{C}$  1 min,  $95^\circ\text{C}$  15 s。实验设置 4 个平行组。反转录产物置于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.3.3 实验数据分析** 根据软件获得的每个反应的  $C_T$  值,对实验结果进行统计分析,采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法(Livak *et al*, 2001)进行。根据每个样品的 4 个平行实验所得的数据计算相对表达量平均值和标准差。

## 2 结果

### 2.1 Sb-Lec1 基因 cDNA 序列分析

运用 PCR 和 RACE 技术扩增 Sb-Lec1 基因 3'、5'端,经过拼接,该基因的全长为 700 bp,其中 5'-UTR 为 29 bp, 3'-UTR 为 167 bp。开放阅读框(Open reading frame, ORF)长度为 504 bp,编码 167 个氨基酸,预测的分子量为 19.11 kDa,理论等电点为 4.74,其起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA, polyA 加尾信号为 AATAAA(图 1)。

信号肽预测结果显示,该氨基酸序列第 1~23 个氨基酸为其信号肽序列,运用 Smart 预测蛋白质的结构域,结果显示,第 2~155 个氨基酸为魁蚶 C 型凝集素的糖识别结构域(CRD),该 CRD 含有的参与二硫键形成的 6 个半胱氨酸,分别位于 Cys27、Cys38、Cys56、Cys129、Cys146、Cys154,其中, Cys56、Cys129、Cys146、Cys154 为其保守的半胱氨酸,分别在 Cys56 和 Cys154、Cys129 和 Cys146 之间形成 2 个二硫键。在 CRD 区域中具有决定糖结合的特异

性序列为“EPN”和“WND”(图 1)。

```

1          TGTTTAAGCAACAGGAATCCATTTTTAAA
30 ATGCGTATAACTACAAATACACTGATATCAAGCCTGGTCTTGGTATTGTTCAATGTT
1  M R I T T N T L I S S L L V L V L F N V
90 TGTTTGTCAGCGCCTGAGTGCATGATGGATGGACAAGGTCGCGAGTTCTTGTACCTT
21  C L S A P E C H D G W T R F A S S C Y L
150 CTGGTAAACCACATAGCCGAGGATGGGACAAGCGGAGAATTATTGCAAGTTATTGGC
41  L V N H I A E G W G Q A E N Y C K L F G
210 GGTATTGCGCGAAATAAACGACGCTAACGAAACAACACTATGTAACAAAATGGTTGTCA
61  G Y L A E I N D A N E N N Y V T K W L S
270 GGGCAACATCTCACAGTTCACCTGTGGATTGGCGAAATGACGTAGAAGCAAAAGCGGTC
81  G Q H L T V P L W I G G N D V E A K G V
330 TATGTATGGACTAGTAGTCATCAGATTTTGTAGTTTCAAACTGGTACCCCGGTGAACCC
101 Y V W T S S H Q I F E F T N W Y P G E P
390 AATGATGTGAACCACTCAGAAGACTGCATAGCTATGTACACAGAGATATAATTTTACA
121 N D V N H S E D C I A M Y T E I V N F T
450 TGGAAATGATTATATATGCAACCCGAAAACAACCTTCATCTGCGAAAATCATCCAAAAGTC
141 W N D Y I C T R K N N F I C E N H P K V
510 GAAATCGATACAATATTGGATGAAGACAATTCGCCCTTCAGCTGTAGCACATTTAAAAG
161 E V D T I I G *
570 ATAAATGAAATGAATATTTCAAAATCAAAGAAGCTGGCGACTGTATCTTTAAAAGACAAA
630 ATTATGTTCAATGTATAAAATAAGACTTTGTAACAAAACAAGTAAATGTAAAAA
690 AAAAAAAAA

```

图 1 魁蚶 Sb-Lec1 基因全长 cDNA 及推测的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of Sb-Lec1 gene of *S. broughtonii*

下划线部分表示信号肽序列, 终止密码子用星号标出; 结构域用波浪线标出, 阴影部分为 Sb-Lec1 的 6 个半胱氨酸, 带框的氨基酸序列为糖结合位点, polyA 信号序列

AATAAA 用双下划线标出

The putative signal peptide is underlined. The asterisk (\*) indicated the stop codon. The carbohydrate-recognition domains (CRD) were wave-underlined and six conserved disulfide-bonded cysteine residues that define the CRD were indicated by shadow.

The sugar binding sites were enclosed in a box. PolyA signal AATAAA was double underlined

## 2.2 Sb-Lec1 基因 cDNA 同源分析

运用 NCBI 将拼接得到的 Sb-Lec1 基因 CRD 编码氨基酸序列进行同源分析。结果显示, 魁蚶 Sb-Lec1 基因 CRD 编码的氨基酸序列与其他物种具有一定的相似性, 例如, 与海湾扇贝(FJ469995、FJ469996)相似性分别为 39%、38%, 与紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*) (KP125900、KP125901)相似性分别为 34%、35%, 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (XM\_011438591、XM\_011452629、XM\_011450108)的相似性分别为 40%、41%、38%, 与九孔鲍(*Haliotis diversicolor*) (JN314432)的相似性为 38%, 与皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*) (EF103335)的相似性为 36%, 与文昌鱼(*Branchiostoma floridae*) (XM\_002613005.1)的相似性为 35%, 与网纹鲷(*Poecilia*

*reticulata*) (XM\_008414919)的相似性为 33%, 与家蝇(*Musca domestica*) (XM\_011296834)的相似性为 41%。

DNAMAN 软件将 Sb-Lec1 基因与上述物种 C 型凝集素基因进行序列比对(图 2), 结果显示, Sb-Lec1 基因所编码的氨基酸序列与其他物种的凝集素基因具有相似的结构, 如都含有形成二硫键 4 个保守的半胱氨酸, 糖结合位点几乎都具有独特的“WND”和“EPN”结构。用 Mega 6.0 软件以邻位相接法(NJ 法)构建基因系统 Sb-Lec1 进化树, 在该系统进化树中, 魁蚶先与海湾扇贝、长牡蛎、九孔鲍、紫贻贝、菲律宾蛤仔等软体动物聚为一起, 再与文昌鱼、网纹鲷、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)几种鱼类聚在一起(图 3)。

## 2.3 Sb-Lec1 基因组织分布

以  $\beta$ -actin 作为内参, 检测 Sb-Lec1 基因在不同组织中的表达(图 4)。结果显示, Sb-Lec1 基因在肝胰腺、血细胞、鳃、斧足、闭壳肌、外套膜 6 种组织中均有表达, 且表达量存在差异。Sb-Lec1 基因在肝胰腺中表达量最大, 为闭壳肌的 21.92 倍( $P < 0.05$ ), 其次是在血细胞中, 其表达量为闭壳肌的 8.40 倍( $P < 0.05$ )。

## 2.4 Sb-Lec1 基因在鳃弧菌感染后的表达响应

运用 qRT-PCR 检测魁蚶血细胞、肝胰腺、外套膜、闭壳肌、鳃、斧足 6 种组织中的 Sb-Lec1 基因对鳃弧菌刺激后的响应(图 5)。结果显示, 鳃弧菌刺激后, Sb-Lec1 基因在 6 种组织中的表达量较对照组均呈现出明显上升的趋势。以对照组 Sb-Lec1 基因的表达量为基准, 鳃弧菌刺激 2 h 后, 肝胰腺、血细胞中的表达量明显高于对照组, 分别为对照组的 4.67 倍和 11.53 倍; 而在鳃和斧足中, 8 h 的表达量出现明显的上升趋势, 分别为对照组的 4.50 倍和 2.83 倍; 在闭壳肌中, 刺激 2 h 就开始出现表达量显著升高的现象, 在 4 h 时达到最高, 为对照组的 9.55 倍; 在外套膜中, 刺激 4 h 时的表达量明显升高且达到最大值, 为对照组的 19.55 倍, 随后各组织表达量均出现回落现象。由此可见, 经鳃弧菌刺激后, Sb-Lec1 基因在各组织中的表达量表现为先升高后降低的变化趋势。

## 3 讨论

由于无脊椎动物缺乏类似于脊椎动物的获得性免疫系统, 只有依靠固有免疫来防止病原的感染, 以维持机体的正常生命活动。C 型凝集素作为固有免疫系统重要的体液免疫因子, 参与固有免疫的多种途径, 包括抗原的识别与清除(张焜, 2010), 在  $Ca^{2+}$  存

|                              |  |     |
|------------------------------|--|-----|
| <i>M.galloprovincialis-1</i> | -----MLFLDL-----TKFLLLAVILP----SYVEGAC       | 24  |
| <i>M.galloprovincialis-2</i> | -----MKSVM-----CVTLFLVLTV----DSVHSIC         | 21  |
| <i>P.reticulata</i>          | -----MASVHYL-----ALLLSLSCVLWNGADAACDCSC      | 29  |
| <i>B.floridae</i>            | -----C                                       | 1   |
| <i>M.domestica</i>           | -----MVKH-L-----WSALSLLICVAT----LMAEAAI      | 23  |
| <i>H.diversicolor</i>        | -----MKTV-LE-----YLAFLSAFVLV----TGQYGTG      | 24  |
| <i>H.discus</i>              | -----MI-----LYIFLAVCFIS----NTAEGFC           | 20  |
| <i>A.irradians-2</i>         | -----MYTV-RV-----SLVFVTLG-----FQVAFGC        | 21  |
| <i>A.irradians-1</i>         | MELQSLFLWIF-FLSGIEGTYFHGVEFNA----TQRASTC     | 35  |
| <i>S.broughtonii</i>         | -----C                                       | 1   |
| <i>C.gigas-2</i>             | -----MRIV-LI-----TSFILGTV--L-----SQPAPC      | 21  |
| <i>C.gigas-1</i>             | -----MPYL-TG-----SLFFLGIV--Y-----AVNSQGC     | 22  |
| <i>C.gigas-3</i>             | -----MWCS-LL-----GLILSTIV--I-----SVNAQGC     | 22  |
| <i>M.galloprovincialis-1</i> | QPG I IHFKTSCYYFSTN--SLN QQ STD ▲ KGRSAQ VSV | 62  |
| <i>M.galloprovincialis-2</i> | PFG I IRFSSCYLFHRS--LST ID STY RSHGAH ATV    | 59  |
| <i>P.reticulata</i>          | PTG S QYGKRCFLFQNT--QKD AS ERT NDFGAN ASI    | 67  |
| <i>B.floridae</i>            | SLG SKYGSVCRAFTG--SVD AG KAA RTKGGR AMP      | 39  |
| <i>M.domestica</i>           | NDK HNLGDFGTIFVEEEQKYN FE WEE AMRNMT IDI     | 63  |
| <i>H.diversicolor</i>        | PAG ASYSESCYKMFPL-A-AT PE AVF KTFGGK AMI     | 62  |
| <i>H.discus</i>              | QDR IQFGDSCYGLIED-D-EG AQ KYL ESRDTH VTI     | 58  |
| <i>A.irradians-2</i>         | PDG SEFDGSCYSVQSQ-E-LN MD MDA HKAHSY VEI     | 59  |
| <i>A.irradians-1</i>         | RVG TRYQNSCYLFVSQ-EKED AE HYH GVLHGY ADI     | 74  |
| <i>S.broughtonii</i>         | HDG TRFASSCYLLVNH-IAEG GQ ENY KLFGGY AEI     | 40  |
| <i>C.gigas-2</i>             | PHG VNRGSSCYAFITD-APDG TE EFY NLMHSR VEI     | 60  |
| <i>C.gigas-1</i>             | RDG LHHGNSCYAFIDA-EPDG IE MFF SSVGAK VEI     | 61  |
| <i>C.gigas-3</i>             | PGG LHHGSSCYAFIDS-EPDG LE MFF SSVKAK VEI     | 61  |
| <i>M.galloprovincialis-1</i> | DTSQENGF AEEVARVG----GSF FDGT QDTEGT I       | 97  |
| <i>M.galloprovincialis-2</i> | QSGSEKDF NGMIQNMP----GQY LDGV DAAEGI E       | 94  |
| <i>P.reticulata</i>          | HDNNEHDF KKLVKTET--GSFQRT VGGH AEKEGV L      | 105 |
| <i>B.floridae</i>            | KDRNTNDF VRLKNGN--SRSVPA IGLN ISHEGR V       | 76  |
| <i>M.domestica</i>           | DTAEKNTI DKVLRNPF--EKCPNL LGGN LGLEGK V      | 101 |
| <i>H.diversicolor</i>        | TDQQEQTF ENYINGLHNSHLTLDI LGGT LLVNQE M      | 102 |
| <i>H.discus</i>              | ESAAENDF KSYARKQ--AVVTDV IGAS IWAEGR R       | 95  |
| <i>A.irradians-2</i>         | GSKKENDF EH-LTGQ--KQDEIF LGGS AVVEDH R       | 95  |
| <i>A.irradians-1</i>         | LDDESTF KTELQRR--HASGQF IGAT VELDQG L        | 111 |
| <i>S.broughtonii</i>         | NDANENNY TKWLSGQ--HLLTVPL IGGN VEAKGV V      | 77  |
| <i>C.gigas-2</i>             | ETAVEDEF RLHLIDS--KATGSF IGLT ILVEGE V       | 97  |
| <i>C.gigas-1</i>             | ETESENN F KRHLQTI G-AT--KNY IGLS AIKEGR V    | 98  |
| <i>C.gigas-3</i>             | ETESENT F KRHLQAIG-TPHNSSY IGLS I IQEGT V    | 100 |
| <i>M.galloprovincialis-1</i> | ASSKE--LDFDTA LPHE SNYE--KNED LMTQK--        | 128 |
| <i>M.galloprovincialis-2</i> | ASTGE--KISNNL YPGE NRSS--PLED MDTST--        | 125 |
| <i>P.reticulata</i>          | SDGSK--FDYNK SSGQ DNTG--SNEH LAINY--         | 135 |
| <i>B.floridae</i>            | EDGHVLWPRQFAD APGE NNMPVGH--GD VKIEKANI      | 113 |
| <i>M.domestica</i>           | SSTGK--RFEFSN SKGQ DNYK--SNEH VHYYT--        | 132 |
| <i>H.diversicolor</i>        | TNTLD--RVKYSN KPGE NNVGSGSSVTED LALMT--      | 137 |
| <i>H.discus</i>              | VGSST--NVTFTD NAGE NGIS--DDEN AELEN--        | 126 |
| <i>A.irradians-2</i>         | MSEYQ--TFNYTN YQDE NNLD--QGES IAAVH--        | 126 |
| <i>A.irradians-1</i>         | TNTDD--PVLTYD GNGE NGDI--AEN ICLHD--         | 141 |
| <i>S.broughtonii</i>         | TSSHQ--IFEFTN YPGE NDVN--HSED IAMYT--        | 108 |
| <i>C.gigas-2</i>             | MSTQT--IAQYTN WPGE NNRN--I-ED AV-ST--        | 126 |
| <i>C.gigas-1</i>             | QTTQD--NVDYTD APGE NDDH--HTED AELFQ--        | 129 |
| <i>C.gigas-3</i>             | QTTQD--RPDFAD GSDE ND LH--HNED IELYQ--       | 131 |
| <i>M.galloprovincialis-1</i> | --GYNGQ N NYA YHSIQFI EHASNDP-----PVG--      | 157 |
| <i>M.galloprovincialis-2</i> | --YINGL N EE NYDHYSI EKPH-----               | 148 |
| <i>P.reticulata</i>          | --EDPTYL N AP TFKYVSI AKNA-----              | 159 |
| <i>B.floridae</i>            | LSAYANR R YI SGHLGFI EK-----                 | 136 |
| <i>M.domestica</i>           | --ITDFE N AP TSKMGFI EENRFLREARRDLQIKKNF     | 170 |
| <i>H.diversicolor</i>        | --SDNYE N AP TDRMYFL EKELDSN-----PIG--       | 166 |
| <i>H.discus</i>              | --SVDYL N DE TKQQHFM ETRFLSV-----VVG--       | 155 |
| <i>A.irradians-2</i>         | --SASRFE R YH EDQNKFI EMRGGG-----WM-VVG--    | 157 |
| <i>A.irradians-1</i>         | --NHQFR V VK NRDFSFI KMRLTEPG--PD-VIG--      | 173 |
| <i>S.broughtonii</i>         | --EIYNFT N YI TRKNNFI E-----                 | 129 |
| <i>C.gigas-2</i>             | --GSLFH N VS SSKCNFI EKESHGE--EN-VIG--       | 157 |
| <i>C.gigas-1</i>             | --PFSFH N AP SVKSNFI EKTLTES--ID-IIG--       | 160 |
| <i>C.gigas-3</i>             | --MKNFH N AP SVKSRFI EITLDGD--SG-ILGK--      | 163 |

图 2 不同物种 C 型凝集素氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of C-type lectin from different species

各物种 GenBank 登录号为海湾扇贝 1(FJ469995), 海湾扇贝 2(FJ469996), 紫贻贝 1(KP125900), 紫贻贝 2(KP125901), 长牡蛎 1(XM\_011438591), 长牡蛎 2(XM\_011452629), 长牡蛎 3(XM\_011450108), 九孔鲍(JN314432), 皱纹盘鲍(EF103335), 文昌鱼(XM\_002613005), 网纹鳕(XM\_008414919), 家蝇(XM\_011296834)。

黑色背景表示相同的氨基酸, 灰色表示性质相似的氨基酸, 保守的半胱氨酸用三角形标出

*A. irradians*1(FJ469995), *A. irradians*2(FJ469996), *M. galloprovincialis*1(KP125900), *M. galloprovincialis*2 (KP125901), *C. giga*1(XM\_011438591), *C. giga*2(XM\_011452629), *C. giga*3(XM\_011450108), *H. diversicolor* (JN314432), *H. discus discus*(EF103335), *B. floridae*(XM\_002613005), *P. reticulata* (XM\_008414919), *M. domestica*(XM\_011296834)。

The identical amino acids were shown with black shadow and the similar amino acids were indicated by gray shadow.

The cysteines constituting disulfide bonds in the structure domain acids were marked with black triangle "▲"

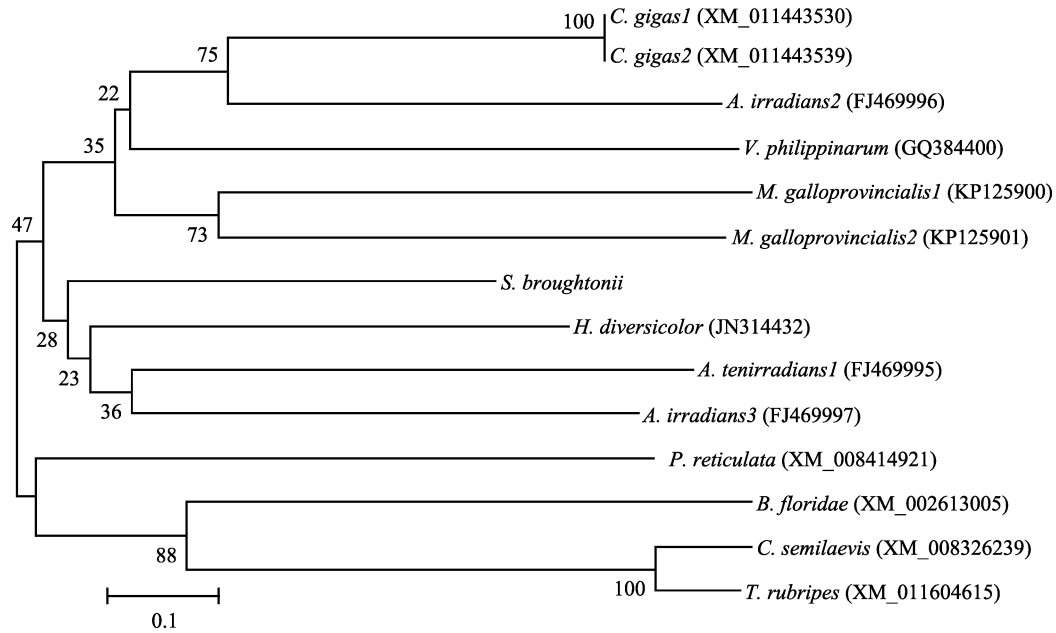


图 3 NJ 法构建 Sb-Lec1 基因系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of Sb-Lec1 gene constructed by Neighbor-Joining method

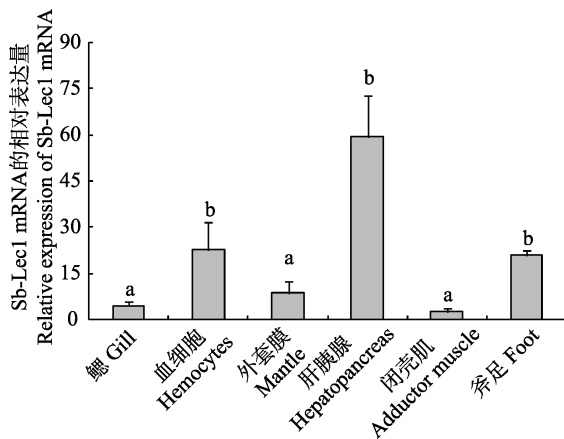


图 4 Sb-Lec1 mRNA 在不同组织中的表达分布

Fig.4 The expression of Sb-Lec1 mRNA in different tissues of *S.broughtonii*

不同字母表示组织之间 Sb-Lec1 基因表达量差异显著 ( $P<0.05$ )。数据以平均值±标准差( $n=4$ )表示,下同  
 Significant differences among tissues were indicated with different alphabets at  $P<0.05$ .  
 Values were shown as Mean±SD ( $n=4$ ), the same as below

在下能够特异性识别病原微生物表面的糖类物质,引起一系列免疫反应,从而有效地清除入侵的病原微生物(邢建晓等, 2016),在软体动物尤其是贝类中得到广泛研究。本研究在以前研究的基础上,将魁蚶作为对象,对其免疫相关基因研究进行补充,通过构建魁蚶高通量测序转录组文库,并利用 RACE 技术获得了魁蚶 Sb-Lec1 基因全长 cDNA;检测了其 mRNA 在魁

蚶中各组织的分布情况和在外源微生物刺激下表达量的变化,对探讨 C 型凝集素在固有免疫防御中发挥的作用具有重要意义。

结构分析显示,Sb-Lec1 基因含有 1 个由 23 个氨基酸构成的信号肽序列,说明该 C 型凝集素基因编码的蛋白质是通过经典的分泌方式分泌到细胞外起作用。Sb-Lec1 含有 1 个 CRD,具有丰富的二硫键,这与许多贝类 C 型凝集素的结构相似,如文蛤(*Meretrix meretrix*)Mm-Lec1 和合浦珠母贝 Po-Lec1 序列中也包含 1 个 CRD 和 6 个保守的半胱氨酸(胡钰婷等, 2011; 李猛等, 2015),而栉孔扇贝 C 型凝集素基因 Cflec-3 和 Cflec-4 中分别含有 3 个和 4 个 CRD,海湾扇贝 AiCTL-6 中含有 1 个 CRD(张岷, 2010)。在 C 型凝集素中,一般含有 EPN 基域和 WND 基域与  $Ca^{2+}$  共同作用完成对糖基分子的结合(胡钰婷等, 2011),Sb-Lec1 含有参与糖基特异性识别的基序 EPN 和 WND,EPN 可以对甘露糖进行识别,且仅在胶原凝集素和选凝素中存在(陈政良等, 1997)。所以,Sb-Lec1 有可能是一种胶凝集素或选择凝集素,而 WND 基序一般只在脊椎动物中有高保守性(胡钰婷等, 2011)。研究发现,文蛤 Mm-Lec1 中含有糖基化位点 QPN,可识别半乳糖(李猛等, 2015),而海湾扇贝 AiCTL-6 中含有 1 个 EPD 基序,栉孔扇贝 Cflec-5 含有的基序为 EPN(张岷, 2010),这些基序与  $Ca^{2+}$  共同作用参与对糖类的识别,在魁蚶 Sb-Lec1 基因中含有 WND 的特殊性,可能与物种的差异有关,有待进一步研究。

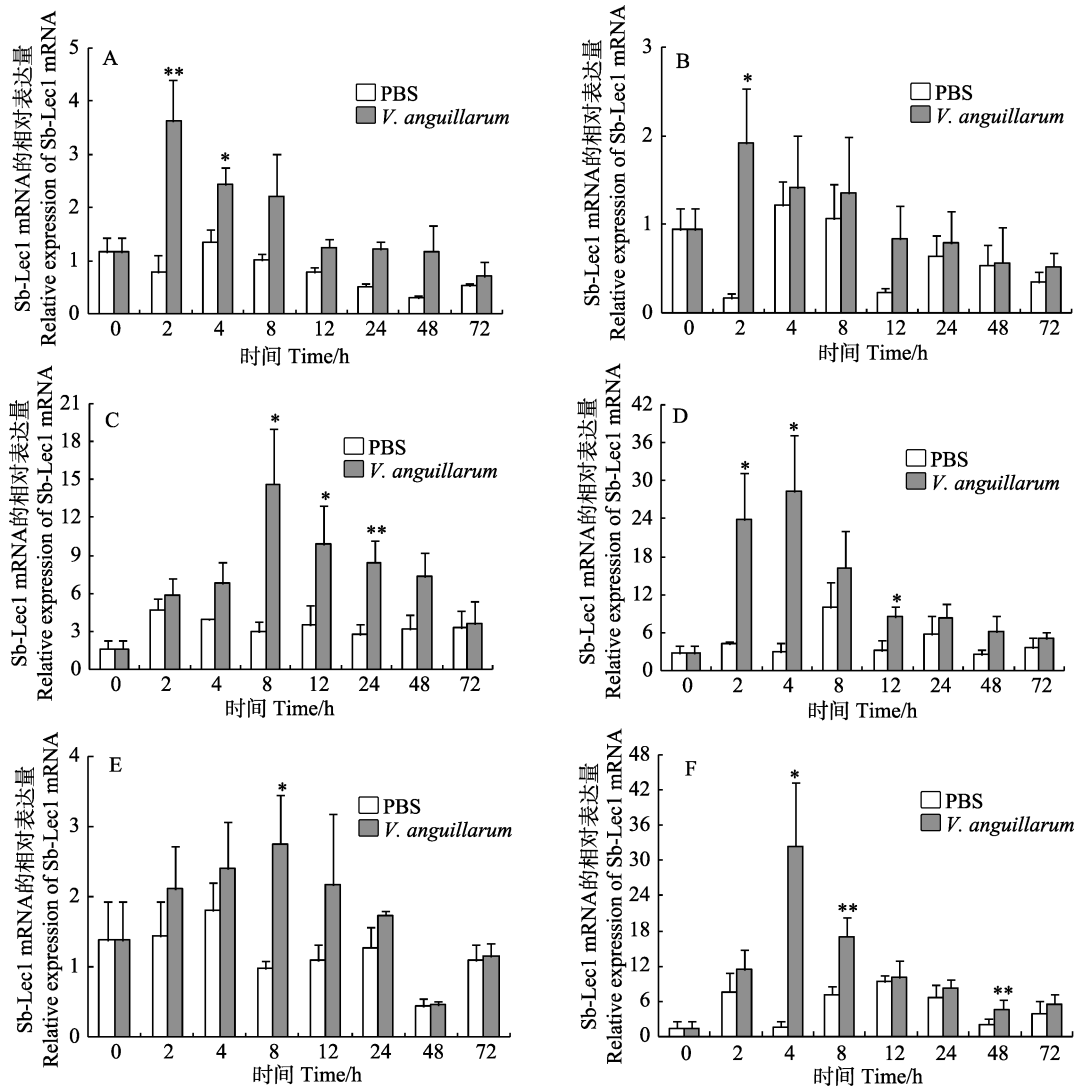


图 5 鳃弧菌感染后魁蚶 6 种组织中 Sb-Lec1 mRNA 的表达  
Fig.5 Sb-Lec1 mRNA expression level after *V. anguillarum* challenge in six tissues

A: 肝胰腺; B: 血细胞; C: 鳃; D: 闭壳肌; E: 斧足; F: 外套膜

与对照组相比, 1 个星号表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 2 个星号表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ )

A: Hepatopancreas; B: Hemocytes; C: Gill; D: Adductor muscle; E: Foot; F: Mantle. Compared with the control group, significant differences were indicated with an asterisk at  $P < 0.05$ , and with two asterisks at  $P < 0.01$

将魁蚶 Sb-Lec1 基因与其他种类进行同源比对分析并构建进化树, 比对结果显示, 魁蚶 Sb-Lec1 基因与其他序列同源性在 33%~41% 之间, 且都具有 1 个结构域和 4 个保守的半胱氨酸, 与长牡蛎、家蝇的相似性最高, 为 41%, 与网纹鲷的相似性最低, 为 33%。进化树分析结果显示, 魁蚶 Sb-Lec1 基因与软体动物亲缘关系较近, 与鱼类关系较远, 与其分类地位一致。将魁蚶与其他物种的 CRD 所编码的氨基酸序列进行同源性和相似性比对, 发现它们的同源性与相似性并不是很高。在张岷(2010)的研究中, 栉孔扇贝的 Cflec-3 基因与其他物种的相似性为 40%~56%, 海湾扇贝 AiCTL-6 基因与其他物种的相似性为

45%~54%, 可见 C 型凝集素是一个进化较快的基因, 但具有高保守性特征序列。

qRT-PCR 检测发现, Sb-Lec1 基因在魁蚶所有组织中均有表达, 这与其他贝类 C 型凝集素基因的研究结果基本一致。Sb-Lec1 基因在肝胰腺中的表达量最高, 血细胞次之, 外套膜中的表达量最少, 在合浦珠母贝中, Po-LEC1 mRNA 在不同组织中的均有表达量, 消化腺中最高, 血细胞中最低(胡钰婷等, 2011), 而文蛤 Mm-Lec1 mRNA 在所检测组织中都有表达, 其中, 鳃中表达量最高(李猛等, 2015); 海湾扇贝中 AiCTL1 和 AiLec 基因分别在海湾扇贝的血细胞和肝胰腺中表达量最高(Zhu *et al.*, 2009); 栉孔扇贝 Cflec-4

基因只在肝胰腺和性腺中表达,而在其他组织中检测不到 mRNA 的表达。鳃是软体动物中免疫系统的“第一道防线”,肝脏和血液是行使免疫功能的主要组织器官。在不同种类的贝类、不同组织中表达量不同,可能是由于不同物种 C 型凝集素的分布及发挥功能不同造成的。

在弧菌刺激下,不同时间、不同组织中 Sb-Lec1 基因表达量均出现先升高后降低的趋势( $P < 0.05$ ),这与文蛤(李猛等, 2015)和栉孔扇贝(胥炜等, 2005)等的表达模式相同。在栉孔扇贝中, C 型凝集素在血细胞中的表达量较低,但在鳃弧菌刺激后, 6 h 时表达量达到最大,随后表达量逐渐减弱,而在文蛤中,弧菌感染 6 h 时, Mm-CTL 基因表达量明显上升,在 12 h 时达到最高值,随后有所下降,说明 C 型凝集素基因的表达受微生物刺激的诱导。本研究表明, 魁蚶 Sb-Lec1 基因能够参与免疫激活反应,并能维持机体的稳态,参与机体的免疫和防御,为进一步研究 C 型凝集素的免疫功能提供了依据。

## 参 考 文 献

- Chen ZL. Mammalian C-type lectin superfamily. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1997, 24(6): 491–496 [陈政良. 哺乳类 C 型凝集素超级家族. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(6): 491–496]
- Drickamer K, Taylor M. Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell Biology*, 1993, 9: 237–264
- Hu YT, Zhang DC, Cui SG, *et al.* Sequence features and functional analysis of the C-type lectin gene (PoLEC1) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(9): 1327–1336 [胡钰婷, 张殿昌, 崔淑歌, 等. 合浦珠母贝 C-型凝集素基因的序列特征和功能分析. 水产学报, 2011, 35(9): 1327–1336]
- Huang 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]
- KolatkAR, Weis WI. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 6679–6685
- Li M, Zhou SM, Liu L, *et al.* Molecular clone and expression of C-type lectin in *Meretrix meretrix*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1186–1192 [李猛, 周素明, 刘璐, 等. 文蛤(*Meretrix meretrix*)C-型凝集素基因的分子克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1186–1192]
- Li M, Zhu L, Zhou C Y, *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
- Liu HM, Wu B, Liu ZH, *et al.* Genetic diversity and geographic population structures of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 92–99 [刘寒苗, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同地理群体的遗传多样性及种群结构. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 92–99]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Mao YZ, Zhou CY, Zhu L, *et al.* Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein (BPI)/lipopolysaccharide-binding protein (LBP) of ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 642–652
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, *et al.* Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature Immunology*, 2006, 7(12): 1258–1265
- Tamplin ML, Fosher WS. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(11): 2882–2887
- Tang QS, Qiu XY, Wang J, *et al.* Resource enhancement of arkshell (*Scapharca (Anadara) broughtonii*) in Shandong offshore waters. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1994, 5(4): 396–402 [唐启升, 邱显寅, 王俊, 等. 山东近海魁蚶资源增殖的研究. 应用生态学报, 1994, 5(4): 396–402]
- Wang H, Song LS, Li CH, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology*, 2007, 44(5): 722–731
- Wang S. Study on the selection of reference genes and the expression regulation of C-type lectin gene in *Haliotis discus hannai*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015, 43–45 [王圣. 皱纹盘鲍内参基因筛选及 C 型凝集素基因表达规律的研究. 上海海洋大学硕士学位论文, 2015, 43–45]
- Xing JX, Liu YJ, Lu YP, *et al.* Cloning and functional analysis of C-type lectin from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(1): 16–24 [邢建晓, 刘艳娟, 路永鹏, 等. 家蝇 C-型凝集素的克隆与功能分析. 昆虫学报, 2016, 59(1): 16–24]
- Xu W, Wang H, Song LS, *et al.* cDNA Cloning and mRNA expression of C-type lectin from scallop *Chlamys farreri*. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(1): 83–88 [胥炜, 王昊, 宋林生, 等. 栉孔扇贝 C 型凝集素基因的克隆与表达研究. 高技术通讯, 2005, 15(1): 83–88]
- Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domains superfamily. *FEBS Journal*, 2005, 272(24): 6179–6217
- Zhang H. Study on the genes and their functions of the complement-like components from scallops. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2010, 17–20 [张焜. 扇贝补体样成分的基因及其功能研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2010, 17–20]



- 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: 15–24
- 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, 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]
- 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]
- Zhu L, Song LS, Xu W, *et al.* Identification of a C-type lectin from the bay scallop *Argopecten irradians*. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(5): 1167–1173
- Zhu L, Song LS, Xu W, *et al.* Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 231–238

(编辑 马璀璨)

## Molecular Cloning and Expression Analysis of C-Type Lectin from *Scapharca broughtonii*

SHEN Shufang<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>2①</sup>, LI Jiaqi<sup>2,3</sup>, XUE Suyan<sup>2,3</sup>, LI Yang<sup>1,2</sup>, CHEN Qionglin<sup>1,2</sup>, MAO Yuze<sup>2,3</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>2</sup>, FANG Jianguang<sup>2,3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** The current study cloned the full-length cDNA of C-type lectin (Sb-Lec1) using RACE (Rapid amplification of cDNA ends) method from *Scapharca broughtonii* with 700 bp that includes a 5' UTR of 29 bp and 3' UTR of 167 bp. The 504 bp open reading frame (ORF) encodes a polypeptide of 167 amino acids, including a signal peptide of 23 amino acids, one carbohydrate-recognition domain (CRD) motif of 129 amino acids and 6 cysteines involved in the formation of disulfide bond. The predicted protein molecular weight is 19.11 kDa, with a theory isoelectric point of 4.74. Multiple sequences alignment and phylogeny analysis showed that the identity of Sb-Lec1 gene shared with *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*, and *Argopecten irradians* was 38%~40%, 34%~35%, and 38%~39%, respectively. The amino acids of CRD motif had many similarities with other species such as 4 conserved Cys. Phylogenetic analysis revealed two main branches including all C-type lectin of molluscs and the C-type lectin of vertebrate, and that the deduced polypeptide of Sb-Lec1 had the characteristics of the C-type lectin family. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to assess the mRNA expression in all tested tissues, including hemocytes, foot, adductor muscle, mantle, gill, and hepatopancreas. The highest and lowest Sb-Lec1 mRNA were in hepatopancreas and adductor muscle, respectively. *Vibrio anguillarum* challenge induced Sb-Lec1 mRNA expression in all tested tissues ( $P < 0.05$ ). These results showed that Sb-Lec1 gene may play an important role in immune defense.

**Key words** C-type lectin; *Scapharca broughtonii*; *Vibrio anguillarum*; Gene clone; Gene expression

① Corresponding author: ZHU Ling, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn