

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)金属硫蛋白基因克隆及 Cd^{2+} 胁迫下的表达分析

林晓玲^{1,3} 王清¹ 袁泽轶² 于倩^{1,3} 吴惠丰¹ 丛明¹
李斐¹ 赵建民¹

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 烟台 264003;
2. 国家海洋信息中心 天津 300171; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类富含半胱氨酸的小分子蛋白质,参与机体重金属解毒和金属元素代谢等生理过程。本研究采用 RACE 技术,克隆获得了菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)金属硫蛋白(RpMT)的全长 cDNA 序列。RpMT 的 cDNA 全长为 570bp,编码 75 个氨基酸,包含 15 个 MT 所特有的 Cys-Xn-Cys 结构。采用实时荧光定量 PCR 技术,分析了两种壳色菲律宾蛤仔(白蛤和斑马蛤)RpMT 基因在 Cd^{2+} 暴露后的表达变化。结果发现: Cd^{2+} 急性和亚慢性暴露均可导致两种壳色蛤仔消化腺和鳃组织 RpMT 基因表达量的显著上调;暴露后两种壳色蛤仔鳃组织 RpMT 基因表达量的增加幅度均高于消化腺组织,且以白蛤鳃组织基因表达水平的上调幅度较高。上述结果表明, RpMT 可能在菲律宾蛤仔抵御 Cd^{2+} 胁迫过程中发挥了重要作用。

关键词 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*); 金属硫蛋白; 基因克隆; 基因表达; 壳色

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20130900120

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类富含半胱氨酸(Cys)的低分子量蛋白质,常含有 Cys-Cys、Cys-Xn-Cys 等结构,其 Cys 残基中的巯基(SH)能够螯合金属离子,通过降低其它功能蛋白关键靶位的金属浓度,减轻金属的毒性作用(Amiard-Triquet *et al.*, 1998; Silvestre *et al.*, 2005)。研究发现,MT 可被重金属、氧化损伤和免疫刺激等多种环境因素诱导产生;且受到重金属暴露时,机体内重金属含量与 MT 表达水平之间存在着显著相关性(Bebiano *et al.*, 1998; Moraga *et al.*, 2002; Cong *et al.*, 2012)。早在 1979 年, Ridlington 等(1979)在美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* 中报道了软体动物的首个 MT 序列,此后陆续在贻贝 *Mytilus edulis* (Lemoine *et al.*, 2003)、巨牡蛎 *Crassostrea rhizophorae* (Rebelo *et al.*, 2003)、海湾扇贝 *Argopecten irradians* (Wang *et al.*, 2009)和文蛤

Meretrix meretrix (Wang *et al.*, 2010)等多种软体动物体中发现了 MT 的存在。目前,MT 已被联合国环境规划署遴选为海洋环境监测的生物标志物之一(UNEP/RAMOGÉ)。

镉(Cd)是一种有毒的非必需金属元素,具有易富集、难降解、半衰期长等特点。近年来,随着工矿企业排污量的增加,Cd 已成为海洋环境重金属污染的主要种类之一。例如,渤海湾的大沽口、秦口河河口沉积物中 Cd 浓度达到 1.01—1.82mg/kg,造成了较高的生态风险(Meng *et al.*, 2008)。研究表明,Cd 不但能够影响海洋生物的摄食、生长发育和繁殖等生理活动(曾艳艺等, 2010; 廖永岩等, 2007; Ringwood *et al.*, 2004),还可通过食物链的富集作用对人类健康构成潜在威胁(Galay *et al.*, 2001; Seebaugh *et al.*, 2005)。

双壳贝类分布广泛,滤食的特性使其对环境污

*中国科学院重点部署项目, KZZD-EW-14-03 号; 国家自然科学基金项目, 41206105 号。林晓玲, 硕士研究生, E-mail: linx10110@163.com

通讯作者: 赵建民, 研究员, E-mail: jmzhao@yic.ac.cn; 吴惠丰, 研究员, E-mail: hfwu@yic.ac.cn

收稿日期: 2013-09-02, 收修改稿日期: 2013-10-24

染物具有较强的富集能力, 常被用来指示海区的水质状况(Blasco *et al*, 1999; Ji *et al*, 2006; Park *et al*, 2008)。菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* 是一种广泛分布于我国沿海区域的经济贝类, 已被列为我国“贻贝监测计划”的目标监测生物。在前期研究中, 我们发现不同壳色菲律宾蛤仔(白蛤、斑马蛤、两道红)对 Hg 等重金属暴露的代谢响应途径存在显著差异(Liu *et al*, 2011a, b)。本研究以菲律宾蛤仔为实验对象, 克隆获得了 MT 基因的全长 cDNA 序列, 并比较了 Cd²⁺暴露对白蛤和斑马蛤两种壳色菲律宾蛤仔 MT 基因表达模式的影响, 研究结果可为探讨菲律宾蛤仔 MT 的解毒作用及其重金属污染指示功能提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物及镉暴露实验设置

实验所用菲律宾蛤仔购自当地水产市场, 选取壳长 2.0—2.5cm 的个体进行暴露实验。正式实验前, 分别选择白蛤和斑马蛤各 60 只, 在 40L 充气过滤海水中(20±2)°C 驯养 5d。正式实验和驯养期间, 每 24h 换水一次, 定时投喂小球藻和三角褐指藻, 滤食 3h 后换水。暴露实验包括急性暴露和亚慢性暴露两部分, 每个实验均设有暴露组和对照组, 各处理组均设置 3 个重复。根据前期实验结果, 采用 Cd²⁺暴露 48h 半致死浓度(白蛤 11.854mg/L, 斑马蛤 10.597mg/L)的 2%, 即 200μg/L Cd²⁺(CdCl₂)作为 48h 急性暴露浓度。亚慢性暴露浓度的最高值通常设置为 96h 半致死浓度的 5%—20%, 因此, 本研究采用 80μg/L Cd²⁺暴露实验动物 30d (96h 半致死浓度分别为白蛤 1.362mg/L, 斑马蛤 0.633mg/L)。暴露结束后, 分别采集白蛤和斑马蛤各 6 只, 解剖并采集消化腺和鳃组织, 置于-80°C 超低温冰箱中备用。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 制备

总 RNA 提取采用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司), 并按说明书操作。cDNA 反转录按照 M-MLV(美国 Promega 公司)操作手册操作。制备获得的 cDNA 置于-80°C 超低温冰箱中备用。

1.3 基因克隆

根据实验室已有金属硫蛋白 EST 序列, 设计基因特异性引物 P1(5'-GCTCCGATTGCAGGTGTC-3'), 与接头引物 oligo dT 进行 3'末端扩增。PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 5min, 然后进入 35 个循环: 94°C 变性 30s, 59°C 退火 30s, 72°C 延伸 60s; 最后 72°C 延

伸 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 采用凝胶回收试剂盒纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态细胞 *Escherichia coli* Top10F'; 经蓝白斑筛选和 PCR 检测, 挑选 5 个阳性克隆送北京诺赛基因公司进行测序, 所得结果与原始 EST 序列拼接后获得全长序列。

1.4 生物信息学分析

采用 BLAST 在线程序进行 RpMT 序列的同源性比对和相似性分析; 氨基酸序列的特征结构分析采用 ExPASy 网站在线软件分析; 信号肽分析采用 SignalP 4.1 Server 在线分析; 多重比对采用 ClustalX 软件。

1.5 基因表达分析

采用美国应用生物系统公司 7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪, 检测 Cd²⁺暴露前后白蛤、斑马蛤消化腺和鳃组织中金属硫蛋白基因 RpMT 表达量的变化。针对 RpMT 的 cDNA 序列, 设计基因特异性引物 MF(5'-GAAAGGTTGTACTCGGGAAGG-3')和 MR(5'-GGCGAATCTAGGCAAGTGG-3'); 同时, 选取 β -actin 作为内参基因用于模板的校正, 设计引物信息如下: F1(5'-GTCCTGTCACCTTACGCTTCCG-3')和 R1(5'-AACAAGAAATGGAGACGGCTGC-3')。反应条件为: 95°C 预变性 10min, 然后进入 40 个循环: 95°C 变性 5s, 55°C 退火 15s, 72°C 延伸 30s。每次 PCR 反应结束, 通过溶解曲线分析确定 PCR 产物扩增和检测的特异性。基因的相对表达水平用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算(Livak *et al*, 2001), 所得结果以“平均值±标准偏差”表示。对所得数据进行双因子及单因子方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 序列分析

将扩增获得的 PCR 片段与已知 EST 序列拼接, 获得了菲律宾蛤仔 RpMT 的全长 cDNA 序列。经验证发现, RpMT 序列在白蛤和斑马蛤中不存在差异。将 RpMT 的全长 cDNA 序列提交 GenBank 注册(KF214789), 其核苷酸序列及推导的氨基酸序列如图 1 所示。RpMT 的全长 cDNA 包括 570bp, 3'端具有多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 polyA 尾巴; 开放阅读框(open reading frame, ORF)包括 228bp, 编码 75 个氨基酸。RpMT 推导的氨基酸序列中含有 21 个 Cys 残基, 占全部氨基酸总量的 28%; 编码蛋白预测分子量为 7.35kDa, 理论等电点为 7.75。经 SignalP 4.1 软件预测, RpMT 编码蛋白不存在信号肽, 为胞内蛋白。

```

1 aggcgaagacatcggagtagacaattgggaaaaattttgaagctgaactaacaagaagtg
1 M G D P C N C A E S G T C K C S D
61 ctgaaaacaagATGGGTGATCCTTGCAACTGTGCTGAATCTGGAACCTGCAAGTGTCCG
18 Q C T S A D G C R C G P N C K C G S D C
121 ACCAATGTACGAGCGCAGATGGCTGCAGATGTGGCCCTAACTGCAAATGTGGCTCCGATT
38 R C P G C K V A T C K C S G S C A C G K
181 GCAGGTGTCCCGGATGTAAAGTCGCCACCTGCAAGTGCAGTGGTTCATGTGCATGTGGGA
58 G C T R E G T C E C G N D C S C K K *
241 AAGGTTGTACTCGGGAAGGCACGTGCGAATGTGGCAACGACTGCTCGTGCAAAAAGTGAT
301 ggggagatgtcacgtggtttcagcggcatgcgcgacacgtttactaatatcatgttacc
361 acttgccatagattcgcattgctgcaaattcttcagatcagagatggtggtttcata
421 attttcaccaaataacatttgataagacacaagtctttttttatcatctcaaaaccgc
481 gtgacatagatatatttttagaaaaataaatgttaa AATAAAtgcgaaataatcatgaa
541 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图1 RpMT 的 cDNA 全长及推导出的氨基酸序列
 Fig.1 The full-length cDNA and deduced amino acid of RpMT
 *代表终止密码的位置, 加尾信号(AATAAA)用斜体加粗表示。

2.2 同源性分析

经 BLAST 比对分析, RpMT 编码蛋白与其它双壳贝类的 MT 蛋白具有较高的相似性。例如, 与硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*) MT 蛋白的相似性为 82%, 与丽文蛤 (*Meretrix lusoria*) 和长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) MT 蛋白的相似度为 70%, 与其它双壳贝类也

有较高的同源性。采用 ClustalX 软件, 将菲律宾蛤仔 RpMT 氨基酸序列与其他双壳贝类 MT 蛋白进行多序列比对。结果发现, 双壳贝类 MT 蛋白 Cys 残基的分布呈高度保守性, Cys 与邻近氨基酸组成若干 Cys-Xn-Cys 结构, 具有典型的软体动物 MT 保守序列 CKCXXXCXCX(图 2)。

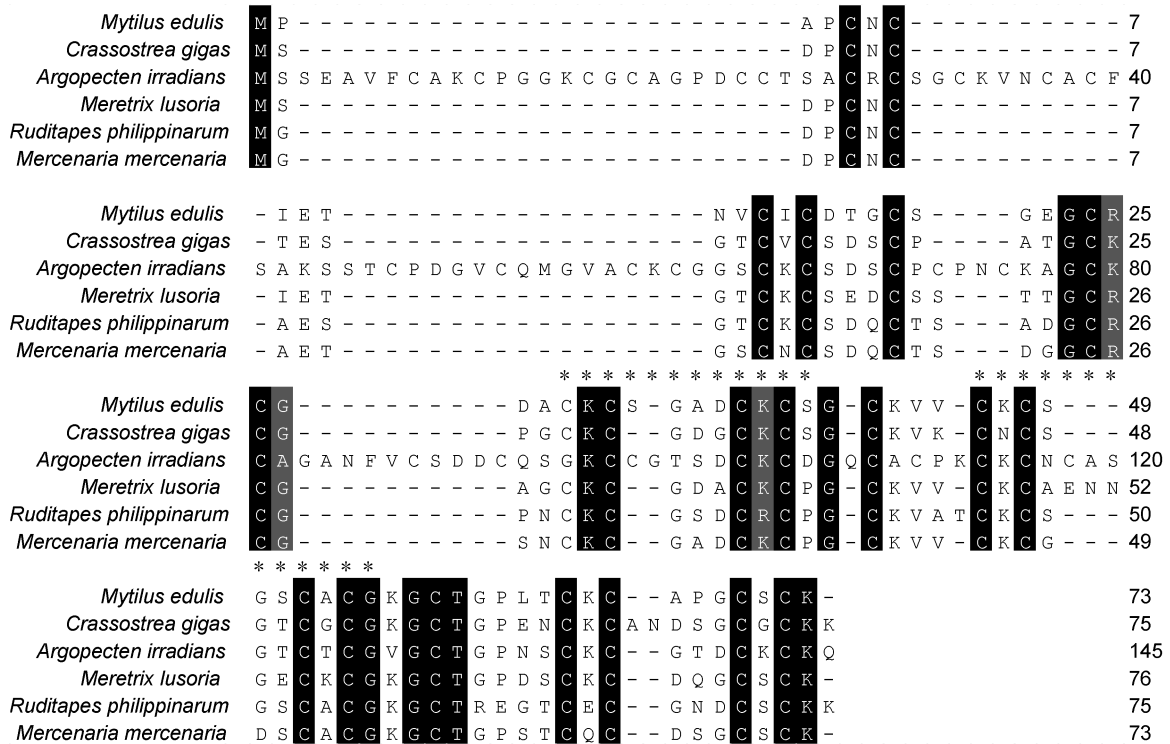


图2 菲律宾蛤仔 RpMT 与双壳贝类 MT 蛋白的多序列比对结果

Fig.2 Multiple alignment of RpMT with metallothioneins from bivalves.

黑色阴影表示相同氨基酸, 灰色阴影表示高度相似氨基酸, 星号表示软体动物 MT 保守序列。

2.3 急性 Cd²⁺暴露后 RpMT 基因的组织表达

以 β -actin 为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 方法检测了 Cd²⁺(200 μ g/L)暴露 48h 后, 白蛤和斑马蛤消化腺和鳃组织中 RpMT 基因的表达情况。本实验样本存在壳色与 Cd²⁺暴露双因子, 首先对 RpMT 基因表达量进行了双因子方差分析。结果表明: 消化腺组织 RpMT 基因表达量对急性 Cd²⁺暴露存在显著响应, 但壳色间无显著差异, 且壳色与 Cd²⁺暴露之间不存在相互作用; 而在鳃组织中, RpMT 基因表达量对急性 Cd²⁺暴露存在显著响应, 且不同壳色间存在显著差异, 双因子的交互作用对 RpMT 基因的表达也具有显著影响(表 1)。进一步的单因子方差分析结果显示, 急性 Cd²⁺暴露导致两种壳色菲律宾蛤仔 RpMT 基因表达量在消化腺和鳃组织中均显著增加($P < 0.05$); 其中, 鳃组织中 RpMT 的表达量变化幅度较消化腺组织更为明显。在白蛤中, 消化腺组织 RpMT 基因表达量在暴露后升高 3.2 倍, 而鳃组织中 RpMT 的表达量则为对照组的 18.4 倍; 对斑马蛤而言, Cd²⁺暴露导致消化腺组织 RpMT 表达量达到对照组的 6.5 倍, 鳃组织中 RpMT 的表达量较对照组升高 18.0 倍(图 3)。

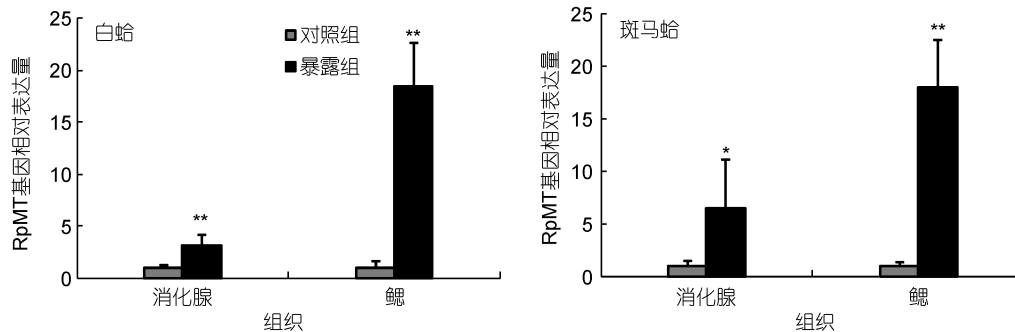


图 3 200 μ g/L Cd²⁺暴露 48h 后 RpMT 基因在两种壳色菲律宾蛤仔中的组织表达

Fig.3 The relative expression of RpMT mRNA in two pedigrees of *Ruditapes philippinarum* exposed to 200 μ g/L Cd²⁺ for 48h

*表示相同组织在 Cd²⁺暴露后 RpMT 基因表达水平与对照组差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。

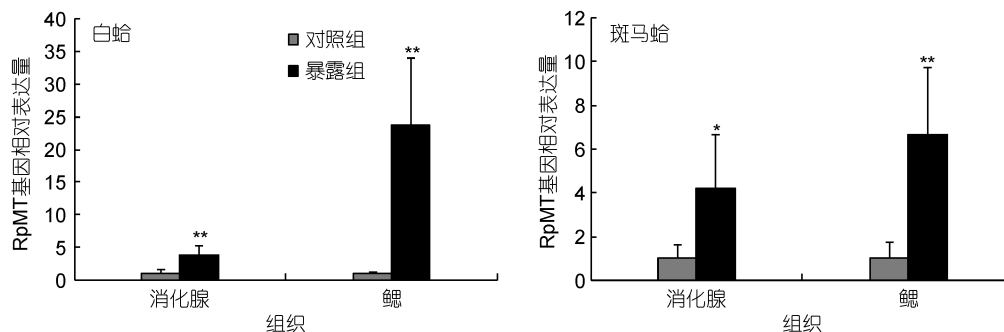


图 4 80 μ g/L Cd²⁺暴露 30d 后 RpMT 基因的组织表达

Fig.4 The relative expression of RpMT mRNA in two pedigrees of *Ruditapes philippinarum* treated with 80 μ g/L Cd²⁺ for 30 days.

*表示相同组织在 Cd²⁺暴露后 RpMT 基因表达水平与对照组差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。

表 1 消化腺和鳃组织 RpMT 基因表达量的双因子方差分析
Tab.1 Two-way analysis of variance (ANOVA) on the expression of RpMT gene in digestive gland and gills under cadmium exposure

RpMT 基因表达		P 值		
		Cd ²⁺	壳色	壳色×Cd
急性暴露	消化腺	<0.001	0.934	0.511
	鳃	<0.001	0.023	0.013
亚慢性暴露	消化腺	<0.001	0.019	0.174
	鳃	<0.001	0.007	0.006

显著性差异加粗表示

2.4 亚慢性 Cd²⁺暴露后 RpMT 基因的组织表达

80 μ g/L Cd²⁺暴露 30d 后, 白蛤与斑马蛤消化腺和鳃组织中 RpMT 基因表达情况如图 4 所示。双因子方差分析结果表明: 在消化腺组织中, RpMT 基因表达量对 Cd²⁺暴露存在显著响应, 两种壳色蛤仔的 RpMT 基因表达也差异显著, 但壳色与 Cd²⁺暴露双因子间不存在相互作用; 而在鳃组织中, RpMT 基因的表达结果与急性 Cd²⁺暴露的结果类似, 对 Cd²⁺暴露存在显著响应, 不同壳色间存在显著差异, 且双因子的交互作用对 RpMT 基因的表达也具有显著影响(表 1)。进

一步单因子方差分析结果显示, 亚慢性 Cd^{2+} 暴露可导致 RpMT 基因在两种壳色菲律宾蛤仔消化腺和鳃组织中的表达量显著增加 ($P < 0.05$); 其中, 鳃组织 RpMT 表达量的变化幅度较消化腺组织更为明显。在白蛤中, 消化腺组织 RpMT 基因的表达量较对照组升高 3.8 倍, 鳃组织中的表达量达到对照组的 23.7 倍; 对斑马蛤而言, 消化腺组织 RpMT 基因的表达水平较对照组增加 4.2 倍, 鳃组织中的表达量为对照组的 6.7 倍(图 4)。

3 讨论

MT 是一类广泛存在于生物体内的金属结合蛋白, 参与机体的重金属解毒、微量元素调节、自由基清除以及应激反应等生理过程(Vasak *et al*, 2000)。本研究通过 RACE 技术, 克隆获得了菲律宾蛤仔 RpMT 的全长 cDNA 序列; RpMT 编码蛋白富含半胱氨酸, 且 Cys 残基分布高度保守。此外, RpMT 编码蛋白含有 15 个 MT 特有的 Cys-Xn-Cy 结构, 并且具有软体动物 MT 蛋白的签名序列 CKCXXXCXCX。与其它双壳贝类 MT 序列比较, RpMT 具有软体动物 MT 的基本特征。

在生物体遭受重金属暴露后, MT 被认为是最先参与重金属解毒和代谢的生物大分子(Amiard-Triquet *et al*, 1998)。已有研究发现, MT 基因的表达量与生物体内重金属浓度具有明显的正相关性。例如, 随 Cd^{2+} 暴露浓度增大, 长牡蛎 *Crassostrea gigas* 消化腺和鳃组织中 MT 转录本的表达量显著升高(Choi *et al*, 2008)。然而, 有学者认为, MT 基因的表达量与生物体内重金属浓度之间存在倒“U”型关系(Butler *et al*, 2001; Wu *et al*, 2006), 即在一定暴露浓度范围内, MT 基因的表达量随暴露浓度的增大而升高, 而当超过某一阈值时, 重金属就会对生物体的细胞功能造成损害, MT 基因的表达水平则随重金属浓度的增大而降低。例如, 当 Cd^{2+} 暴露剂量为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼体重时, 瘤棘鲆 *Scophthalmus maximus* 肝脏中 MT 基因的表达量显著升高, 但当暴露剂量大于 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼体重时, 其表达量随浓度的增大而逐渐降低(George *et al*, 1996)。本研究根据前期实验获得的急性毒性数据, 分别选择 $200\mu\text{g}/\text{L}$ 和 $80\mu\text{g}/\text{L}$ Cd^{2+} 作为急性和亚慢性暴露浓度。结果发现, 急性和亚慢性 Cd^{2+} 暴露均可导致菲律宾蛤仔消化腺和鳃组织中 RpMT 基因表达量的显著升高, 表明 RpMT 在降低 Cd^{2+} 对机体的毒性损害过程中发挥了重要作用。类似的实验结果在紫贻贝 *Mytilus galloprovincialis* (Zorita *et al*, 2007)、斑马纹贻

贝 *Dreissena polymorpha* (Faria *et al*, 2009)、丽文蛤 *Meretrix lusoria* (Chang *et al*, 2007) 和海湾扇贝 *A. irradians* (Wang *et al*, 2009) 等双壳贝类中亦有报道。

作为滤食性动物, 软体动物的鳃组织被认为在重金属的吸收和储存过程中发挥了重要作用(Smaoui-Damak *et al*, 2004)。在本研究中, Cd^{2+} 暴露导致两种壳色蛤仔鳃组织 RpMT 基因表达量的增加幅度均显著高于消化腺组织, 这可能与鳃组织对水相 Cd^{2+} 暴露具有较强的富集能力有关(季向山等, 2006)。Bebiano 等(1993, 1994)和 Romeo 等(1995)研究发现, 十字蛤 *Ruditapes decussata* 经 Cd^{2+} 暴露后, 鳃组织中 MT 含量也较其它组织增加更显著; 而紫贻贝 *M. galloprovincialis* 和贻贝 *M. edulis* 经 Cd^{2+} 暴露后, 消化腺 MT 基因表达量或 MT 蛋白含量高于鳃组织(Raspor *et al*, 2004; Geffard *et al*, 2005)。造成上述差异的原因主要在于 MT 的表达量受到生物种类、暴露途径(水相和食物相)及其它环境因素的影响。

研究发现, 不同壳色菲律宾蛤仔的生长速率、存活率及免疫学指标等方面存在差异(闫喜武等, 2005; 丁鉴锋等, 2012)。Liu 等(2011a, b)研究了三种壳色菲律宾蛤仔(白蛤、斑马蛤、两道红)对 Hg 暴露的代谢响应, 发现不同壳色蛤仔的响应途径存在显著差异; 其中, 白蛤的鳃组织和两道红的消化腺组织在指示重金属污染方面具有更高的灵敏性。在本研究中, 选取白蛤和斑马蛤两种壳色菲律宾蛤仔为研究对象, 比较了 Cd^{2+} 暴露后 RpMT 基因表达量变化的差异。结果发现, 急性和亚慢性 Cd^{2+} 暴露后, 白蛤消化腺组织 RpMT 基因的上调幅度低于斑马蛤, 而鳃组织 RpMT 基因的上调幅度则超过斑马蛤。上述结果表明, 在指示水相 Cd^{2+} 污染方面, 两种壳色蛤仔不同组织的灵敏度存在差异, 其中以白蛤鳃组织的敏感度较高。

参 考 文 献

- 丁鉴锋, 杨 霏, 闫喜武等, 2012. 不同壳色菲律宾蛤仔免疫机能的比较研究. 大连海洋大学学报, 27(5): 411—416
- 闫喜武, 张国范, 杨 凤等, 2005. 菲律宾蛤仔莆田群体两个壳色品系生长发育的比较. 大连水产学院学报, 20(4): 266—269
- 季向山, 赵 燕, 丁 雷等, 2006. 贝海湾扇贝对海水中镉的富集规律研究. 水产学报, 30(6): 801—805
- 曾艳艺, 黄小平, 2010. 重金属对海洋栉足类的影响研究进展. 生态学报, 30(4): 1042—1049
- 廖永岩, 陈润锋, 2007. Cu、Pb、Cd、Hg 亚致死浓度对三疣梭子蟹幼体的影响. 环境科学学报, 27(8): 1347—1358

- Amiard-Triquet C, Rainglet F, Larroux C *et al*, 1998. Metallothioneins in Arctic bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(1): 96—102
- Bebiano M J, Nott J A, Langston W J, 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology*, 27(3—4): 315—334
- Bebiano M J, Serafim M A, Rita M F, 1994. Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(5): 726—732
- Bebiano M J, Serafim M A, 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve mollusks *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussates*. *The Science of the Total Environment*, 214(1—3): 123—131
- Blasco J, Puppo J, 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 122(2): 253—263
- Butler R A, Roesijadi G, 2001. Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Toxicological Sciences*, 59(1): 101—107
- Chang Y T, Jong K J, Liao B K *et al*, 2007. Cloning and expression of metallothionein cDNA in the hard clam (*Meretrix lusoria*) upon cadmium exposure. *Aquaculture*, 262(2—4): 504—513
- Choi Y K, Jo P G, Choi C Y, 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 147(3): 286—292
- Cong M, Wu H F, Liu X L *et al*, 2012. Effects of heavy metals on the expression of a zinc-inducible metallothionein-III gene and antioxidant enzyme activities in *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology*, 21(7): 1928—1936
- Faria M, Carrasco L, Diez S *et al*, 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 149(3): 281—288
- Galay B M, Rainbow P S, 2001. Availability of cadmium and zinc from sewage sludge to the flounder, *Platichthys flesus*, via a marine food chain. *Marine Environmental Research*, 51(5): 417—439
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J C, 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2): 209—220
- George S G, Todd K, Wright J, 1996. Regulation of metallothionein in teleosts: induction of MTmRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(2): 109—115
- Ji J, Choi H J, Ahn I Y, 2006. Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 52(4): 447—468
- Lemoine S, Lulier M, 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT220) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11): 1450—1455
- Liu X L, Zhang L B, You L P *et al*, 2011a. Assessment of clam *Ruditapes philippinarum* as heavy metal bioindicators using NMR-based metabolomics. *Clean-Soil, Air, Water*, 39(8): 759—766
- Liu X L, Zhang L B, You L P *et al*, 2011b. Differential toxicological effects induced by mercury in gills from three pedigrees of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Ecotoxicology*, 20(1): 177—186
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Moraga D, Mdelgi-Lasram E, Romdhane M S *et al*, 2002. Genetic responses to metal contamination in two clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, 54(3—5): 521—525
- Meng W, Qin Y W, Zheng B H *et al*, 2008. Heavy metal pollution in Tianjin Bohai Bay, China. *Journal of Environmental Sciences*, 20(7): 814—819
- Park K I, Tsutsumi H, Hong J S *et al*, 2008. Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(2): 212—219
- Raspor B, Dragun Z, Erk M *et al*, 2004. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? *Science of the Total Environment*, 333(1—3): 99—108
- Rebelo M, Pfeiffe W, Silva H *et al*, 2003. Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Aquatic Toxicology*, 64(3): 359—362
- Ridlington J W, Fowler B A, 1979. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Chemico-Biological Interactions*, 25(2—3): 127—138
- Ringwood A H, Hoguet J, Keppler C *et al*, 2004. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 58(2—5): 151—156
- Romeo M, Gnassia-Barelli M, 1995. Metal distribution in different tissues and in clam subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper or zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 111(3): 457—463
- Seebaugh D R, Goto D, Wallace W G, 2005. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Marine Environmental Research*, 59(5): 473—491
- Silvestre F, Duchene C, Trausch G *et al*, 2005. Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 140(1): 39—45
- Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Bebianno M J *et al*, 2004. Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussates* from the Gulf Gabès (Tunisia). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 139(4): 181—188
- UNEP/RAMOGE, 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP, Athens: 1—92
- Vasak M, Hasler D W, 2000. Metallothionein: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(2): 177—183
- Wang L L, Song L S, Ni D J *et al*, 2009. Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology, Part C, 149(1): 50—57
- Wang Q, Wang X, Wang X *et al*, 2010. Analysis of metallothionein expression and antioxidant enzyme activities in *Meretrix meretrix* larvae under sublethal cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 100(4): 321—328
- Wu S M, Jong K J, Lee Y J, 2006. Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76(4): 595—600
- Zorita I, Bilbao E, Schad A *et al*, 2007. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(2): 186—196

CLONING AND EXPRESSION OF METALLOTHIONEIN GENE IN *RUDITAPES PHILIPPINARUM* EXPOSED TO CADMIUM

LIN Xiao-Ling^{1,3}, WANG Qing¹, YUAN Ze-Yi², YU Qian^{1,3}, WU Hui-Feng¹,
CONG Ming¹, LI Fei¹, ZHAO Jian-Min¹

(1. Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. National Marine Data and Information Service, Tianjin 300171, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Metallothionein (MT) is a family of cysteine-rich, low molecular, and heavy metal-binding proteins. MT plays important roles in detoxifying heavy metals and regulating concentrations of trace elements. In the present study, the full-length cDNA of metallothionein was identified from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (named as RpMT) by RACE approaches. The full-length cDNA of RpMT is of 570bp, encoding 75 amino acids with characteristic repeating cysteine motifs Cys-Xn-Cys. By real time quantitative PCR, the expression profile of RpMT transcript was detected in digestive gland and gill tissues from two pedigrees of clam (white and zebra) post cadmium exposure. It was found that the expression of RpMT gene under Cd²⁺ stress increased significantly in both pedigrees of clam. After exposure under Cd²⁺, variation of RpMT mRNA expression in gill tissues was more significant than that in digestive gland in both white and zebra clams. In addition, the increase of RpMT transcript in gill tissues of white clam was more sensitive than that in the zebra clams. Therefore, RpMT may have played an important role in the detoxification of cadmium contamination.

Key words *Ruditapes philippinarum*; metallothionein; gene cloning; gene expression; pedigree