

青蛤(*Cyclina sinensis*)IKK 基因的克隆及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达分析*

侯梓园¹ 高 姍^{1,2} 潘宝平¹ 闫春财^{1①}

(1. 天津师范大学生命科学学院 天津市动植物抗性重点实验室 天津 300387; 2. 天津市兴南中学 天津 300021)

摘要 利用构建的青蛤(*Cyclina sinensis*)转录组文库, 筛选到青蛤 IKK 基因的类似序列。经设计引物克隆比对后确认为 CsIKK 基因。利用生物信息学软件在线对该基因进行结构分析。采用 PCR 技术克隆基因, 并使用实时荧光定量 PCR 技术克隆得到 CsIKK 基因在青蛤五个不同组织中的表达情况及在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的刺激下 IKK 基因在青蛤血淋巴中的时序性表达情况。综合结果得到, CsIKK 基因序列开放阅读框长 2298bp, 编码 765 个氨基酸。IKK 基因在青蛤的血淋巴、外套膜、闭壳肌、肝脏、性腺和鳃六个组织中均表达, 在血淋巴中表达量最高。青蛤 IKK 基因在鳃弧菌胁迫下表达量在 6h 时达到最大值, 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$), 表明该基因所指导的蛋白是青蛤重要的免疫信号通路蛋白。

关键词 青蛤; CsIKK 基因; 鳃弧菌; 荧光定量 PCR

中图分类号 Q789; S968.3 **doi:** 10.11693/hyhz20181100267

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国的一种常见的海滨底栖双壳类软体动物(庄启谦, 2001)。其可食用部位味道鲜美, 兼有一定的药用功能。然而, 最近几年青蛤养殖在我国面临诸多困境。随着国内青蛤养殖规模的逐年扩大、种群密度的增加, 以及由于环境污染导致的养殖环境的不断恶化, 导致青蛤出现了种质衰退的现象, 甚至有些养殖体已显现出由鳃弧菌等海洋病原微生物引起的疾病等症状, 这些因素都已在我国沿海地区造成青蛤的大面积死亡现象(王斌等, 2002)。

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)隶属于弧菌科(Vibrionaceae)、弧菌属(*Vibrio*), 其为有鞭毛的革兰氏阴性细菌。鳃弧菌是一种引起水产养殖动物病害的重要病原微生物(吴后波等, 2003)。它普遍在近岸及河口海水中生存, 还有一些存在海洋生物的体表及肠道中, 当水产养殖动物在一定环境条件下遭遇不利

刺激或是受伤时, 就会导致各种疾病的产生。青蛤是一种典型的无脊椎动物, 当遭受到病原体的侵害时它只能行使先天的非特异性免疫功能, 这也是大部分无脊椎动物抵御病原体的方式之一, 它们通过启动非特异性免疫机制来抵御外界的伤害, 从而使种群得到长久的生存和发展。

本实验从分子生物学角度对鳃弧菌侵染青蛤展开的各项研究也进一步为阐明青蛤的致病机理提供相应的理论依据。IKK (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase)即 I κ B 激酶, 位于 NF- κ B 信号通路, 参与了由细胞因子引起的细胞内免疫反应, 是一种典型的免疫相关基因。IKK 的激活使 I κ B 被磷酸化, I κ B 从 NF- κ B 上脱落并被泛素化, 使得 NF- κ B 由抑制状态变为激活状态, 然后 NF- κ B 转位入核并激发一系列的反应(闫晓霞等, 2016)。

青蛤的健康养殖抗病害机制及其免疫调控的研

* 天津市自然科学基金项目, 18JCYBJC96100 号; 天津市科学技术普及项目, 17KPXMSF00040 号; 天津市高校“中青年骨干创新人才培养计划”, 135305JF79 号; 天津师范大学基金项目, 043135202-XK1706 号, 043135202-XB1715 号; 天津市高等学校科技发展基金项目, 20090608 号; 天津师范大学引进人才基金项目, 5RL104 号。侯梓园, 硕士研究生, E-mail: 1838742210@qq.com

① 通信作者: 闫春财, 博士, 副教授, E-mail: skyycc@tjnu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-07, 收修改稿日期: 2018-12-11

究迫在眉睫,本研究不仅可以为解决青蛤在养殖过程中出现的死亡现象提供初步的理论研究结果,也可以为进一步研究青蛤及其他软体动物的免疫抗病机制积累重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

活体青蛤(*Cyclina sinensis*)暂养于密度1.02—1.04g/cm³的中性海水中,持续供氧,水温22℃左右(杨莹等, 2015)。投喂5%小球藻。饲喂大约7d,选取体表完好,个体形态差别较小的青蛤(平均壳宽19.12mm±0.56mm,平均壳长29.13mm±1.22mm,平均壳高29.51mm±1.46mm)进行分组实验。

1.2 方法

1.2.1 实验菌液的制备 将实验室中保存的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)于2216E培养基中在28℃条件下培养24h(魏星等, 2015),用以无菌海水洗脱三次,重悬菌体,将以上菌液浓度调至OD₆₀₀=0.4。

1.2.2 青蛤转录组文库的构建与基因克隆 将提取的青蛤的六个组织于液氮中研磨充分后,置于1mL Trizol 中提取组织的总RNA。按照QIAGEN公司的Oligotex mRNA Kits法分离纯化总RNA(高晶等, 2015)。用随机引物逆转录法将纯化后的RNA反转录成cDNA。将得到的cDNA末端修饰、加尾等,用以制备整个文库。采用Unigene编码蛋白框ORF预测分析去冗余后的数据(吴婷等, 2010),再经BLAST分析后,从中筛选得到青蛤IKK基因类似序列。再利用筛选得到的青蛤IKK基因类似序列进行克隆,设计克隆时所用引物CsIKK-F、CsIKK-R,见表1。

1.2.3 青蛤IKK基因生物信息学分析 将克隆得到的青蛤IKK基因类似序列与GenBank核酸数据库进行BLASTX比对分析;采用ORF Finder预测软件对CsIKK基因的开放阅读框进行预测;利用ExPASy软件分析以上两个基因指导合成的蛋白质的性质;使用ProtParam工具在线分析它们的分子式、分子量以及等电点(宋林生, 2005);用SMART软件查找两个蛋白质的结构域并预测信号肽(阎斌伦等, 2009);用ClustalX1.83软件对这个氨基酸序列分别与其他物种中的氨基酸序列进行比对(李姣, 2015),并使用MEGA 5.0构建IKK基因的分子系统树(孟学平等, 2011),分析基因进化的亲缘关系。

1.2.4 IKK基因在青蛤各组织内的表达 随机选取表面无损伤且生理状态良好的10只青蛤,解剖找

到青蛤的肝脏、性腺、血淋巴、闭壳肌、腮、外套膜六个组织,每个组织分别称取50mg后放入液氮中冷冻备用(潘宝平等, 2010)。利用Trizol法提取青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌、性腺和鳃的总RNA,后反转成cDNA,放入-20℃保存备用。以合成的样品为模板,利用PCR技术在体外大量扩增青蛤的 β -actin基因来检测逆转录结果。PCR程序为:预变性94℃ 5min→94℃ 30s(高温变性),60℃ 30s(低温复性),72℃ 30s(中温延伸),进行30次循环→延伸72℃ 10min。

1.2.5 鳃弧菌刺激下CsIKK基因在血淋巴内的时序性表达 选取两组实验青蛤,分别作为实验组和对照组。在对照组的青蛤体内注射灭菌的0.9%的氯化钠溶液50 μ L,在实验组的青蛤闭壳肌内注射鳃弧菌液50 μ L,在注射后的0h、3h、6h、9h、12h、24h、48h和96h分别对其血淋巴进行提取(宋欣等, 2010),放置备用。利用Trizol法提取青蛤被鳃弧菌侵染后各时间点血淋巴的总RNA,反转录成cDNA。荧光定量PCR引物为RT-CsIKK-F、RT-CsIKK-R(表1)。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法进行数据处理,并使用SPSS软件对数据进行分析(王孟强, 2010)。

2 结果

2.1 青蛤IKK基因的结构

青蛤IKK基因cDNA的ORF为2298bp,编码765个氨基酸(如图1),预测其理论分子量为87.38kDa,理论等电点pI=7.18,分子式为C₃₈₆₇H₆₁₈₂N₁₀₆₂O₁₁₅₇S₄₁,氨基酸组成中亮氨酸含量最高,占10.7%。氨基酸序列中无信号肽和跨膜区结构。通过SMART在线分析蛋白结构中存在一个典型的S_{TKc}结构域(10—265aa)。本研究的基因在GenBank登陆注册,CsERK注册号KX840341。

表1 实验中涉及的PCR和QPCR引物
Tab.1 The primers of the CsIKK gene to PCR and QPCR

引物	序列(5'—3')
CsIKK-F	TTATGGAAAAATGAGGAGACAGGTG
CsIKK-R	GTTCAGTATCCTTCTCAAATCTCCC
RT- β -actin-F	ACGAGGACGTAGCTGCTTTGGT
RT- β -actin-R	CCGATAGTGATGACCTGACC
RT-CsIKK-F	TTATGGAAAAATGAGGAGACAGGTG
RT-CsIKK-R	GTTCAGTATCCTTCTCAAATCTCCC

239 atg tcacaagtactaaaaaggaccatggacagtgagagaaatgctaggatctggaggt
 1 M S Q V L K K G P W T V E R M L G S G G
 299 ttggggctgtccatttatggaaaaatgaggagacaggtgagaagatagcattgaagaaa
 21 F G A V H L W K N E E T G E K I A L K K
 359 tgcggcttcagaatgagatgacagagaacacacacagcagtggtggaattcag
 41 C R L Q N E M T E K H K Q R W Q L E V Q
 419 atcatgcgaagactggagcatgaaacgtaattgttgcttggaaagaccagagagttg
 61 I M R R L E H E N V I V A L E V P E E L
 479 aatgtcagagcaaatgaactgecttacttgcaatggaatactgctcaggggagatttg
 81 N V R A N E L P L L A M E Y C S G G D L
 539 agaaggatctgaaccgccacagaactgttgtgttgaaggagatgacagcagatgt
 101 R R I L N Q P Q N C C G L K E Y A V R C
 599 ctcacgcatgtagctgcgggggtagaataccttcattgggaaaaaatcattcacagg
 121 L T H D V A A G V E Y L H G K K I I H R
 659 gacctgaacctgaaaatattgtctttaaacagtggtgacagagattgtctataaata
 141 D L K P E N I V L K T V D D R I V Y K I
 719 atagatctgggttatgcaaaagaattggatcagggagtggtgtacatcatttgttga
 161 I D L G Y A K E L D Q G S V C T S F V G
 779 acattgcaatatttggcaccagaattatttgc tagtcagaagtatacatgtacttggtat
 181 T L Q Y L A P E L F A S Q K Y T C T V D
 839 tactgttcttgggtcagttgtatttggatgtacacaggttacagaccgttccttccc
 201 Y W S F G S V V F E C I T G Y R P F L P
 899 aacagtcctccagtcagtggtcagaaagtggtgcagaaagtcaccagagacatctgt
 221 N S P P V Q W H K E V C R K S P E D I C
 959 gccaggatagatgacatggagaggtgaagttttataaaacctaccttcagccaacaga
 241 A R I D D H G E V K F Y K T L P S A N R
 1019 cttaccaggtcaatgcagacctacttagaagcagtggttacctatgttacctgggat
 261 L T R S M Q T Y L E Q W L R T M L R W D
 1079 ccgaaggctcggaggaggcctgttaacaggaagaagaccagcttgcctccagatgctt
 281 P K A R G G G L L T G R R P A C F Q M L
 1139 gacaacatcctcaaatgaagattatatacttgcgtcatgttccatcaaatgagttgtta
 301 D N I L Q M K I I Y L L H V P S N E L L
 1199 acatatcctgtgttggaacagcacacatgttagatctacagaacgtataggaagaa
 321 T Y P V V E Q H T M L D L Q K R I E E E
 1259 acaaagataccatagacaaacagataattatactagccaatggaatgacctgaacaa
 341 T K I P I D K Q D I I L A N G M T P E Q
 1319 gagaagcctgtcgtcagtgctggtcgaacctacaggaaggtagctatgtatacctt
 361 E K P A A Q C W L E P T E E G S Y V Y L
 1379 ttccaacatggcactgggaattttgaaatggactgcgaagaacagattacttccccca
 381 F Q H G T G N F E N G L R K N R L L P P
 1439 gcagtacagactatagtaaagatccaaacacaaatgattcctttcagtgatcaaaagaaa
 401 A V Q T I V K D P N T M I P F S D Q K K
 1499 gcttggcagagtcagttttcttctgtgaagagcaatgcttggaaattcaaacgactggtt
 421 A W A E S V F F C E E Q C L E F K R L V
 1559 ttaagtcaagagctgcaattttaagcctgacagaattgactcagattttgtgaaagcc
 441 L S Q R A A I L S L I R I D S V F V K A
 1619 aagaacaagatgacaaatgaactggcagcagatggtatcaaatgcttaatttttcttagaa
 461 K N K M T N E L D Q M V S K S N F F L E
 1679 agtttggcgtatgacatgatgttttacaatgaacaagcaataatggtggagtcacctct
 481 S L A Y D M M F Y N E Q A N N G G V T S
 1739 gacagtgtgtactcttaagtggcagaagatgcagagggaagtcagggtttatatacaattg
 501 D S V Y S K W Q K M Q R E V Q G F I Q L
 1799 aaagaacgggtgtcagaattggagagtcagccattgcttacagactaaaattgttgag
 521 K E R V S E L E S Q A I A L Q T K I V E
 1859 ttacagaagagtcatttgcagaacaaacaaagatgatacccttgacgaattagcaaaag
 541 L Q K S P F A R T K Q D D T L D E L A K
 1919 caagccagacagtgtagcaagatttcagaaaaacgcagagaaaacagagatgctata
 561 Q A R T V Y E D F R K T A R E N R D A I
 1979 aaagatcagaacaaatggtatcccttgttgaagtgtgtgtatggagggaataagaaa
 581 K D Q K P M V S L V V K C V V W R D K K
 2039 ctacctgatctctatgctcacttatcgaaattaggctgctgtaaacccaatgtgaacaca
 601 L P D L Y A H L S K L G A C K A N V N T
 2099 ttattgccacaggttagagagctgtcttcaacaaatacttgataattctcgaaactgac
 621 L L P Q V E S C L Q Q I L D N S R K L I
 2159 gactaccaaaaaagacgacaaactgcccatttggaaactcttagaaataactgtacagcaa
 641 D Y Q K R R Q T A I W K L L E I T V Q Q
 2219 gctaacaactcacaacctcagatgccaaactcaaccaacagacatccatggatgtgtctct
 661 A K Q S Q P Q M P T Q P T D S M D V S R
 2279 atgattgcaccgccacagttaccaccaaccagaattatcaacaattaatcgtagcaga
 681 M I A P P Q L P P N P E L S T I N R A A
 2339 agcactacaagtatactacagctcttggcaatgagacatcatcaagtgtgagtcattg
 701 S T T S I L Q S L A M S T S S S A E S L
 2399 aagacatggaggatgccaaagccacaacaaaatgttgaagaacacataggaagtctg
 721 K T L E D A K A T T K M F E E T L G S L
 2459 atggttgaacatgaccagttcacagccacattaagtacttgatatttctgaaacagga
 741 M V E H D Q F T A T L S D L D I S E T G
 2519 agtgcacccacacttga
 761 S A S H S *

图 1 CsIKK 序列的开放阅读框及结构域

Fig.1 The open reading frame and the structural domain of CsIKK
 注: 方框表示起始密码子, *为终止密码子, 阴影部分为 S_TKc 结构域(10—265aa)

2.2 青蛤 IKK 基因的同源性分析

将青蛤 IKK 基因的氨基酸序列与其他 14 个物种进行同源性比对, 并通过 MEGA 构建的系统树结果(如图 2)显示青蛤 IKK 基因的氨基酸序列与软体动物中贝类的亲缘关系较近, 如霸王莲花青螺(XP_009045496)等, 而鱼类的 IKK 基因独立成一支, 如滇池金线鲃(XP_016098582)和文昌鱼(AFS65343)等, 与节肢动物中的昆虫, 如黑腹果蝇(AAF55267)亲缘关系

较远。由此表明青蛤 IKK 基因的分子生物学特性与软体动物在分类学上的进化地位保持一致性(王琳楠等, 2013)。

2.3 青蛤 IKK 基因的表达分析

以 β -actin 基因为对照, 采用实时荧光定量 PCR 的方法, 以各组织提取的 RNA 反转录得 DNA 为模板, 对青蛤的外套膜、闭壳肌、鳃、肝脏、性腺和血淋巴六种组织进行基因的表达量测定, 结果如图 3 所示。根据数

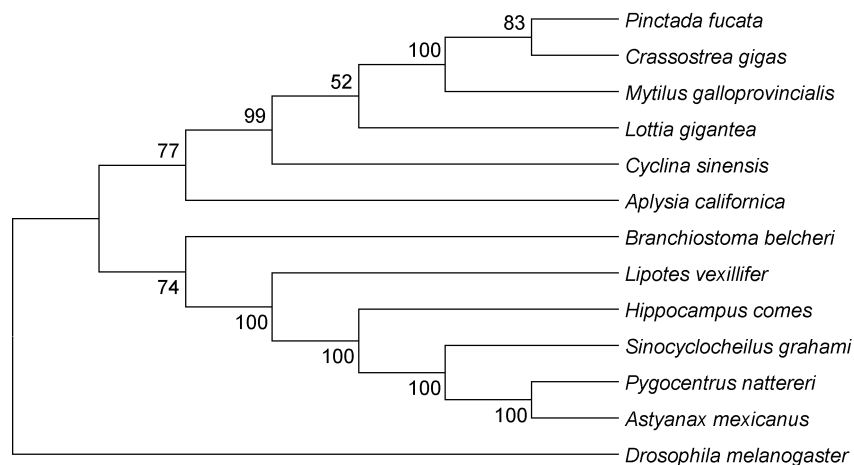


图2 使用比邻法构建 14 个物种的 IKK 基因氨基酸序列系统进化树

Fig.2 The phylogenetic of the amino acid sequences of IKK from 14 species constructed using the Neighbor Joining method
注: 构建青蛤 IKK 基因系统树选用物种及其序列号: *Cyclina sinensis* (KX840341); *Mytilus galloprovincialis* (AH117302); *Branchiostoma belcheri* (AFS65343); *Lottia gigantea* (XP_009045496); *Crassostrea gigas* (XP_011449001); *Lipotes vexillifer* (XP_007455533); *Drosophila melanogaster* (AAF55267); *Otolemyr garnettii* (XP_012667687); *Sinocyclocheilus grahami* (XP_016098582); *Astyanax mexicanus* (XP_007252321); *Pygocentrus nattereri* (XP_017552030); *Hippocampus comes* (XP_019730013); *Pinctada fucata* (AAX56336); *Aplysia californica* (XP_005096610)

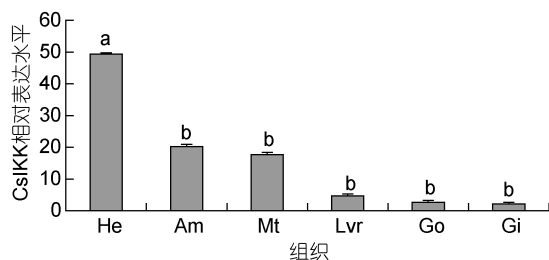


图3 实时荧光定量 PCR 检测 CsIKK 基因在不同组织中的表达量

Fig.3 Tissue-specific expression analysis of IKK mRNA by real-time PCR

注: 柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

据我们得到, CsIKK 基因在青蛤的取出的六个代表组织中均可表达, 但表达水平差异显著。其中 CsIKK 基因表达量最高的组织为血淋巴, 剩下依次为闭壳肌、外套膜、肝脏、鳃; CsIKK 基因在性腺中的表达量最低。

2.4 鳃弧菌胁迫时 CsIKK 的时序性表达情况

以 β -actin 基因作为内参, 注射等量的灭菌海水组作为对照。青蛤在不同时间点鳃弧菌感染后, 通过利用实时荧光定量 PCR 检测 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 96h 几个不同时间点血淋巴中 CsIKK 表达量变化。使用 SPSS 软件对荧光定量 PCR 所得数据进行分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行处理作图, 结果如图 4 所示。对照组内参基因表达量基本稳定, 实验组 CsIKK 表达量在 3h 时开始呈升高趋势, 在 6h 时表达量达到顶峰, 12h 后开始回落并逐渐趋于稳定, 在 96h 基本恢复至原始

水平, 与 β -actin 基因在对应时间点的表达量相比有较大波动, 且有显著差异。

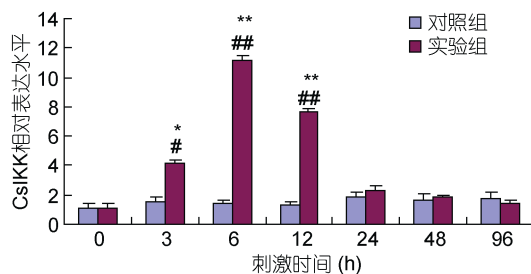


图4 青蛤血淋巴 CsIKK 在鳃弧菌刺激下的相对表达量

Fig.4 Quantitative real-time PCR analysis of CsIKK expression at different time points in hemocytes of *C. sinensis* infected with *V. anguillarum*

注: #表示相同时间点实验组与对照组基因的转录表达水平具有显著差异 ($P < 0.05$) ##表示相比差异极显著 ($P < 0.01$); *表示该时间点基因的转录表达水平与同组注射前(0h)相比差异显著 ($P < 0.05$) **表示相比差异极显著 ($P < 0.01$)

3 讨论

3.1 CsIKK 基因的分子生物学研究及表达分析

近年来, 利用分子免疫学方法探索软体动物先天免疫相关报道日渐增加。本研究通过构建的青蛤转录组文库筛选出青蛤 IKK 基因的类似序列, 利用分子克隆、基因表达等方法同时结合生物信息学分析的方法对青蛤的免疫机制进行了初步探索。分析了青蛤 IKK 基因在青蛤各个组织中的表达情况。结果发现, 该基因在青蛤血淋巴、性腺、鳃、闭壳肌、外套膜和

肝脏这六个组织中都有表达。数据显示 IKK 基因在血淋巴中的表达量与其他组织有显著性差异, 在血淋巴中的表达量最高, 表明 CsIKK 在抵御病原物入侵的过程中发挥着重要作用(Wang *et al*, 2011)。在青蛤的其他免疫通路相关基因的研究中发现, 在血淋巴中的表达量也均明显高于闭壳肌性腺等其他组织, 例如青蛤的 IRAKs 家族中的白介素-1 受体相关激酶-4 (Interleukin-1 receptor-associated kinases-4)基因和 MAPKS 家族中的丝裂原活化蛋白激酶(MAP kinase)基因。软体动物属于开放的血液循环系统, 该系统在无脊椎动物的防御机制中发挥着至关重要的作用(Stefano *et al*, 1999)。贝类免疫主要为非特异性免疫, 在青蛤体内, 血细胞能产生体液因子, 例如凝集素, 非特异性水解酶、抗菌肽等调控因子。因此, 血液在青蛤的免疫系统中起到重要作用, 众多贝类免疫相关基因在血淋巴的表达量显著高于其他组织。

3.2 CsIKK 基因的免疫分析

Toll 样受体信号通路上的各种免疫因子的最重要的功能就是区分和识别各种病原物的入侵同时发挥各因子自身的调控作用(Qiu *et al*, 2007; Montagnani *et al*, 2008; Ge *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2011)。鳃弧菌是一种引起水产养殖动物病害的重要病原微生物。它普遍在近岸及河口海水中生存, 还有一些存在海洋生物的体表及肠道中, 当水产养殖动物在一定环境条件下遭遇不利刺激或是受伤时, 就会导致各种疾病的产生。鳃弧菌的宿主范围极广, 致病条件及环境并不苛刻, 所以鳃弧菌致病后常常会造成大面积的疾病暴发情况, 引起大规模死亡现象, 给水产养殖业带来巨大的经济损失。本实验选用革兰氏阴性菌的鳃弧菌作为致病菌代表刺激青蛤, 在体外鳃弧菌模拟刺激后检测 CsIKK 在青蛤血淋巴中表达量的变化。结果显示, 在鳃弧菌刺激后 CsIKK 的表达量在 3h 时开始升高, 6h 达到顶峰, 12h 后开始回落, 最终在 96h 基本恢复至原始水平。鳃弧菌刺激后 CsIKK 基因与 β -actin 对比有大范围波动, 鳃弧菌入侵一段时间后该基因有明显升高现象, 证明 CsIKK 基因与青蛤的先天性免疫防御有关, 参与了青蛤的免疫应答反应, 并且对于革兰氏阴性细菌的侵入有一定的识别作用。在鳃弧菌侵入青蛤机体时, Toll 样受体通路上的一系列免疫相关因子如 TLR2、IRAK-4、MyD88 等基因在一定时间内均发现发生了上调表达(任毅鹏等, 2014)。在青蛤受到鳃弧菌侵染后会引发先天免疫通路的应答, 通路上的相关因子

相继开始运作抵御病原体入侵。IKK 基因是 NF- κ B 免疫通路中的重要基因, CsIKK 对于鳃弧菌刺激的反应也说明青蛤体内存在 NF- κ B 所介导的信号通路。

4 结论

本研究获得了 CsIKK 基因的 cDNA 序列, 采用生物信息学方法对该基因进行整合分析, 得到了 CsIKK 基因的分子式, 分子量、等电点、编码氨基酸等相关数据; 并通过 NJ 法利用 CsIKK 基因编码的氨基酸序列构建系统发育树, 完成同源性分析。利用实时定量 PCR 技术获得该基因在青蛤 6 个不同组织内的表达情况, 以及在病原菌胁迫下的时序性表达分析, 初步得出结论, 该基因参与青蛤免疫应答系统的调控, 对其抵御病原菌侵染有重要作用。

近年来, 青蛤病害在我国多地连年暴发, 相关产业亟待探索其抗病害机制和防治措施。本文通过研究青蛤 NF- κ B 信号通路上的相关免疫因子 IKK 基因, 结合生物信息学, 分子系统学及分子免疫学手段, 为探索青蛤先天免疫通路调控机制的研究提供了有价值的实验数据, 也为青蛤养殖的病害防治提供了一定的理论基础。

参 考 文 献

- 王 斌, 王 翔, 王莉明, 2002. 我国主要养殖贝类微生物性疾病研究进展. 海洋环境科学, 21(3): 76—80
- 王孟强, 2010. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)Toll 样受体信号通路免疫功能研究. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文
- 王琳楠, 闫喜武, 秦艳杰等, 2013. 中国帘蛤目 16 种经济贝类 DNA 条形码及分子系统发育的研究. 大连海洋大学学报, 28(5): 431—437
- 任毅鹏, 高 晶, 潘宝平等, 2014. 青蛤 (*Cyclina sinensis*)TLR2 基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 45(5): 1037—1043
- 庄后谦, 2001. 中国动物志-软体动物门, 双壳纲, 帘蛤科. 北京: 科学出版社, 236—241
- 闫晓霞, 谢丽君, 刘欢欢等, 2016. 氧化应激对 PRRSV 体外感染 PAMs 后诱导 TLR3/NF- κ B 信号通路相关蛋白的影响. 中国兽医学报, 36(11): 1916—1922
- 李 姣, 2015. 电针“足三里”、“曲池”穴对高血压前期大鼠 IkK/NF- κ B 信号通路的实验研究. 沈阳: 辽宁中医药大学硕士学位论文
- 杨 莹, 高 珊, 潘宝平等, 2015. 青蛤 (*Cyclina sinensis*)IRAK-4 基因的克隆及其组织间的表达分析. 安徽农业科学, 43(27): 33—36
- 吴 婷, 冯一中, 2010. 胰腺癌组织中 NF- κ B/p65、IKK β 的表达及临床意义. 临床与实验病理学杂志, 26(3): 300—304
- 吴后波, 潘金培, 2003. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 27(4): 422—426

- 宋 欣, 张丽岩, 高玮玮等, 2010. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 41(2): 254—258
- 宋林生, 2005. 扇贝生物抗病功能基因的克隆表达与应用. 见: 中国海洋生化学术会议论文荟萃集. 湖北: 中国生物化学与分子生物学会
- 孟学平, 申 欣, 程汉良等, 2011. 双壳纲贝类 18S rRNA 基因序列变异及系统发生. 生态学报, 31(5): 1393—1403
- 高 晶, 任毅鹏, 潘宝平等, 2015. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤(*Cyclina sinensis*)髓样分化因子 88 基因表达的影响. 海洋与湖沼, 46(2): 440—445
- 阎斌伦, 许 冰, 董 丹等, 2009. 鳃弧菌溶血毒素基因 *vah4* 的克隆及表达. 生物技术, 19(5): 7—9
- 潘宝平, 宋 欣, 罗凯娅等, 2010. 青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达. 海洋与湖沼, 41(6): 901—906
- 魏 星, 张海静, 潘宝平, 2015. 青蛤(*Cyclina sinensis*)I κ B 基因的克隆及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达分析. 海洋与湖沼, 46(4): 793—799
- Ge H, Wang G D, Zhang L L *et al*, 2011. Molecular cloning and expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4, an important mediator of toll-like receptor signal pathway, from small abalone *Haliotis diversicolor*. Fish & Shellfish Immunology, 30(4—5): 1138—1146
- Montagnani C, Labreuche Y, Escoubas J M, 2008. Cg-I κ B, a new member of the I κ B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Developmental & Comparative Immunology, 32(3): 182—190
- Qiu L M, Song L S, Yu Y D *et al*, 2007. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Fish & Shellfish Immunology, 23(3): 614—623
- Stefano G B, Salzet-Raveillon B, Salzet M, 1999. *Mytilus edulis* hemolymph contains pro-opiomelanocortin: LPS and morphine stimulate differential processing. Molecular Brain Research, 63(2): 340—350
- Wang M Q, Yang J L, Zhou Z *et al*, 2011. A primitive toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Developmental & Comparative Immunology, 35(4): 511—520
- Zhang Y, He X C, Yu Z N, 2011. Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (I κ B) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Fish & Shellfish Immunology, 30(6): 1354—1361

CLONING AND EXPRESSION OF IKK GENE IN *CYCLINA SINENSIS* AND ITS EXPRESSTON UNDER *VIBRIO ANGUILLARUM* STRESS

HOU Zi-Yuan¹, GAO Shan^{1,2}, PAN Bao-Ping¹, YAN Chun-Cai¹

(1. College of Life Sciences, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;
2. Tianjin Xingnan Middle School, Tianjin 300021, China)

Abstract We obtained the sequence of an inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase (IKK) in *Cyclina sinensis* (termed CsIKK gene) by building a transcriptome library and online analyzed and compared its gene structure in bioinformatics. In addition, we analyzed the expression of some tissues of *C. sinensis* by PCR and RT-PCR, and the expression of CsIKK gene in hemolymph after stimulated by *Vibrio anguillarum*. The result shows that the open reading frame of CsIKK consists of 2298bp encoding 765 amino acids. The CsIKK gene was expressed in the hemolymph, liver, coat film, closed shell, gonad, and gill, and the expression level was the highest in its hemolymph. After stimulated by *V. anguillarum*, the expression level increased obviously and peaked in 6h, which is significantly different from that of the control group ($P < 0.01$). Therefore, we believe that the CsIKK-guided protein is an important immune signaling pathway protein of *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*; CsIKK gene; *Vibrio anguillarum*; real-time quantitative PCR