

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)硒结合蛋白 1 基因的克隆及其应激表达*

张 鑫 蔡秀红 黄贻涛 张子平 王国栋 邹志华 王淑红 王艺磊

(集美大学水产学院 农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门 361021)

摘要 硒结合蛋白 1(selenium-binding protein 1, SBP1)是一种高度保守的蛋白,广泛参与了机体的多个理化过程。本研究首次获得了杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)SBP1 基因的全长 cDNA 序列 2269 bp,并命名为 HdSBP1, ORF 为 1494 bp,共编码 497 个氨基酸。荧光定量 PCR 结果显示,HdSBP1 基因在杂色鲍各组织中均有表达,其中在鳃和肾中的表达量相对较高。缺氧处理后,HdSBP1 在鳃组织和血细胞中的表达量分别在处理 24 h 和 192 h 后显著升高($P<0.05$);高温应激之后,在鳃组织中,HdSBP1 的表达量在第 1 时相与第 3 时相显著升高($P<0.05$),而在血细胞中只有在第 3 时相表现出显著性差异;缺氧和高温联合应激之后,鳃组织中 HdSBP1 的表达量在 192 h 显著上调($P<0.05$),在血细胞中 HdSBP1 的表达量在 0 h、4 h 和 24 h 时均显著升高($P<0.05$);副溶血弧菌注射感染之后,在鳃组织中 HdSBP1 的表达量在 6 h 和 24 h 时显著性上调($P<0.05$),而血细胞中 HdSBP1 基因的表达量在每个时相的实验组都显著高于对照组($P<0.05$)。以上不同的应激条件均会导致 HdSBP1 在不同组织中的表达量的显著变化,说明 HdSBP1 在杂色鲍的免疫反应中可能扮演着重要的角色。

关键词 杂色鲍; SBP1 基因; 高温应激; 缺氧诱导; 高温和缺氧联合应激; 副溶血弧菌感染

中图分类号 S917 doi: 10.11693/hyh20140500139

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)是一种海生软体动物,我国于 20 世纪 70 年代培育出杂色鲍苗,并成功进行了人工养殖。如今,杂色鲍已成为我国东南沿海最重要的经济养殖鲍类之一(苏天凤, 2006)。然而,随着温室效应的不断加剧,使得一些海洋和陆地生态系统的温度也随之升高(Pörtner, 2001)。而高温又必然会伴随着水中氧浓度的降低(Pörtner, 2001; Huey *et al.*, 2005)。这些因素都会对杂色鲍的生存环境产生很大的影响,并且导致杂色鲍的大量死亡(周晶等, 2006)。

硒结合蛋白 1(selenium-binding protein 1, SBP1)是一类不含硒半胱氨酸并且在生物体内普遍存在且高度保守的含硒蛋白。按照分子量的不同可以分为两类——14 kDa SBP 和 54 kDa SBP。14 kDa SBP 作为脂肪酸结合蛋白首先是在鼠的肝脏中被发现的(Bansal

et al., 1989)。54 kDa SBP 则是在线虫、植物和哺乳动物中被发现的一种高度保守的蛋白(Bansal *et al.*, 1989; Bevan *et al.*, 1998)。研究表明,氧化应激可以诱导 SBP 的表达(Hassan *et al.*, 1983)。此外,SBP 还可能参与抑制癌细胞的生长(Morrison *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1998)、还原/氧化反应的调控(Yang *et al.*, 1998)、解毒(Ishii *et al.*, 1996)和高尔基体蛋白转运(Porat *et al.*, 2000)等过程。在软体动物中,SBP1 仅在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)中有相关报道。Song 等(2006)的研究表明,栉孔扇贝在被微生物感染以及 H_2O_2 的氧化应激处理之后,SBP 的表达量逐渐上升。Zhang 等(2011)通过研究发现:当皱纹盘鲍每天摄入足够的硒、铁和锌时可以使 SBP 的 mRNA 表达量增加。目前尚未有 SBP1 参与杂色鲍免

* 国家自然科学基金项目, 41176152 号, 41006105 号; 集美大学创新团队基金, 2010A001 号。张鑫, 硕士研究生, E-mail: zhangxinexe@126.com

通讯作者: 王艺磊, 教授, 博士生导师, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2014-05-14, 收修改稿日期: 2014-09-17

疫调控的相关报道, 本研究将可为此提供一定的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂

1.1.1 实验动物 从宏运鲍鱼场(福建漳浦)购买杂色鲍健康个体, 体长(6.20 ± 0.50)cm, 体质量(18.70 ± 2.50)g, 分批暂养于本实验室(25 ± 1.50)°C 的海水循环系统中, 每日晚间投喂海带 1 次, 暂养 10 d 后用于实验。

1.1.2 试剂与工具酶 总 RNA 提取试剂 RDP 由本实验室自行配制, 逆转录所用的逆转录酶(M-MLV)以及荧光定量实验所用的 SYBR Green Master Mix 均购自 Promega 公司, GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于捷瑞生物公司(上海), 连接所用的 pMD19-T 试剂盒购自宝生物(大连)公司。大肠杆菌 JM109 感受态细胞和副溶血弧菌菌种均为本实验室保种。

1.1.3 引物 根据本课题组已发表的文章中所用的通用引物(张鑫等, 2014), 以及从本实验室已有的杂色鲍转录组 EST 数据库(依托上海众信生物技术有限公司完成)中获得的 SBP1 基因的部分序列, 利用 Primer 软件设计出特异性的 RACE 引物来获得全长。之后, 再根据完整的 HdSBP1 的 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 引物以及 head to toe 验证引物, 以上所有引物均是由捷瑞生物工程有限公司(上海)合成的。主要的引物序列列于表 1。

表 1 主要的引物序列信息

引物名称	引物序列(5'—3')
Outer Primer for 5' RACE	GGCAATATGTTGGCGATTTCAGG
Inner Primer for 5' RACE	CCGTCATCGTGCTGTTTCCTACT
Outer Primer for 3' RACE	CCTTGATGACCGATACCTCTACT
Inner Primer for 3' RACE	TCACCGACAGAAGCAACCCT
head primer	ATGACGGAACAGGCTGAACAAC GAC
toe primer	CAGCCAGATATCGACGTGCAA
HdSBP1 RT-F	TGAGAAGGATCGTCCCGACT
HdSBP1 RT-R	CTCAGAGGGCTGCACTATCG

1.2 方 法

1.2.1 杂色鲍高温应激实验、缺氧诱导实验、副溶血弧菌感染实验以及高温和缺氧联合应激实验 参照本课题组已发表的文章(张鑫等, 2014)中的实验方法, 实验组与对照组的杂色鲍均各取 8 只, 分别取血

淋巴和鳃组织, 将离心后得到的血细胞保存于 -80°C 超低温冰箱; 鳃组织部分保存于 RNAlater 中, 部分保存于液氮中, 用于 RNA 的提取。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 杂色鲍鳃组织和血细胞的总 RNA 的提取根据本实验室自制的 RDP 试剂的常规使用方法进行(王艺磊等, 2003)。总 RNA 的完整性利用 2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 同时使用微量分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的值以及 RNA 的浓度。cDNA 的合成按照逆转录试剂盒的具体说明严格操作。

1.2.3 HdSBP1 基因 cDNA 全长的克隆 利用 Primer 5.0 软件, 根据从本实验室的杂色鲍转录组测序所获得的 EST 序列中筛选出的 HdSBP1 基因片段, 设计特异引物。使用 SMART-RACE 的方法扩增得到基因的全长 cDNA 序列, 并用 head to toe 引物对其 ORF (open reading frame)的准确性进行验证。引物列于表 1。

1.2.4 HdSBP1 的生物信息学分析 分别使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的不同工具对测序结果进行验证、拼接以及开放阅读框的确定。HdSBP1 蛋白的等电点及分子量则是使用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)进行预测。序列中可能存在的信号肽序列通过 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行查询。潜在的糖基化位点和磷酸化位点分别使用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)以及 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行预测。通过 The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)进行蛋白质二级结构的预测, 同时利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive/>)对 HdSBP1 蛋白的三级结构进行预测。序列的多重比对通过 BioEdit 软件进行, 随后使用 MEGA5.05 软件完成系统进化树的构建。

1.2.5 HdSBP1 基因在杂色鲍各组织及不同应激条件下的表达 实时荧光定量 PCR 使用的 cDNA 模板以随机引物逆转录合成, 选用 β -actin 作为内参基因(张鑫等, 2014)。qRT-PCR 采用 20 μ L 的反应体系: 10 μ L SYBR Green Realtime PCR Master Mix(购自 Promega 公司), 10 μ mol/L 的 HdSBP1RT-F Primer 和 HdSBP1RT-R Primer(表 1)各 0.5 μ L, cDNA 模板 9 μ L。具体反应条件如下: 95°C 1 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 45 个循环。每个时相分别取 5 个样品进行分析, 并根据仪器分析得出的 Ct 值计算 RQ 值即 2^{-Ct} , 随后利

用 SPSS 20.0 和 Microsoft office 2010 软件对所得数据进行分析与作图, 显著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 HdSBP1 基因的克隆及序列分析

杂色鲍 cDNA 全长序列为 2269 bp (GenBank 登录号: KJ459335), 包括 5'UTR 113 bp, 3'UTR 662 bp 和 1494 bp 的 ORF, 可编码 497 个氨基酸。推测蛋白的分子质量为 55.69 kDa, 等电点为 5.53。SignalP 在线分析的结果表明, HdSBP1 基因中不含有信号肽序列。另外, 7 个苏氨酸磷酸化位点、11 个丝氨酸磷酸化位点、7 个酪氨酸磷酸化位点以及 1 个糖基化位点也分别包含在该序列之中(图 1)。在 HdSBP1 的氨基酸序列的 N 端还包含着一个典型的还原信号基序₁₀₅CSSC₁₀₈ (CXXC, X 代表任意氨基酸残基)和一个内质网整合信号基序(₉₅DELHIJ₉₉)。同样, 一些 CXXC 的衍生序列(₃₀TSECC₃₄, ₁₂₃CINS₁₂₆, ₁₆₆CLGS₁₆₉, ₂₉₃CALS₂₉₆ 和 ₃₈₁CKGG₃₈₄)也包含其中(Chivers *et al.*, 1997; Fomenko *et al.*, 2003)。另外, 在 HdSBP1 的氨基酸序列还包含着多个金属位点的结合序列(₁₆₂HTTH₁₆₅, ₃₅₄HGD₃₅₆, ₁₇₁HIM₁₇₃, ₂₂₀HNVM₂₂₃, ₂₅₀HSIHVWDWTTH₂₆₀ 和 ₄₄₈MFLM₄₅₁) (She *et al.*, 2003; Urvoas *et al.*, 2003)。

2.2 HdSBP1 空间结构模拟

通过 PSIPRED v3.3 对 HdSBP1 的二级结构进行预测, 结果显示, 该蛋白共含有 3 个 α -螺旋和 32 个 β -折叠。此外, 利用 SWISS-MODEL 在线软件将推导的 HdSBP1 蛋白序列与软件数据库中已有的 PDB code: 2eceA 模板进行人工配联, 并最终构建 HdSBP1 蛋白的三维空间结构模型(图 2)。

2.3 同源性分析以及对 HdSBP1 蛋白系统进化树的构建

使用 BioEdit 软件将已推导的 HdSBP1 的氨基酸序列和其它物种的 SBP1 的氨基酸序列一起进行多重比较(图 3)。比较分析的结果表明, 不同物种的 SBP1 氨基酸序列具有很高的保守型, 并且 HdSBP1 与栉孔扇贝、人(*Homo sapiens*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*) 和线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 SBP1 氨基酸序列的一致性分别为 62%、62%、67%、53%和 49%, 其中与皱纹盘鲍的一致性最高, 达到了 93%。

根据 NCBI 上已有的 SBP1 的氨基酸序列, 利用 MEGA5.05 软件, 以邻位相连法构建了 15 种生物的系统进化树(图 4)。分析表明, 脊椎动物和无脊椎动

物分别聚在两个大支, 在无脊椎动物里, 杂色鲍与软体动物皱纹盘鲍和栉孔扇贝聚为一支。

2.4 杂色鲍 HdSBP1 基因在不同组织器官中的表达

以杂色鲍的 7 种不同组织作为检测对象, 实时荧光定量 PCR 结果显示(图 5), HdSBP1 基因在各组织中均有表达, 并且在鳃和肾中的表达量显著性高于肝胰腺、肌肉、消化道、粘液腺和血细胞中的表达量 ($P < 0.05$)。

2.5 HdSBP1 基因在缺氧诱导、高温应激、高温缺氧联合应激以及弧菌感染后的表达

通过 qRT-PCR 对经过不同外界刺激后 HdSBP1 基因在杂色鲍鳃组织中的表达情况进行分析, 结果显示: 缺氧诱导处理之后, 实验组 HdSBP1 的表达量在处理 24 h 时显著性高于对照组 ($P < 0.05$), 而在 4 h、96 h 和 192 h 时, 实验组的表达量和对照组相比无显著差异(图 6a); 高温应激之后, 实验组 HdSBP1 基因的表达量在第 1 时相(28°C)和第 3 时相(31°C, 4 h)显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其它各时相实验组与对照组无显著差别(图 6b)。缺氧和高温联合应激之后, 实验组 HdSBP1 的表达量在 192 h 时显著性高于对照组 ($P < 0.05$), 而在其它各时相实验组的表达量和对照组相比无显著性差异(图 6c); 副溶血弧菌注射感染之后, 在 6 h 和 24 h 时, 实验组的表达量显著性高于对照组 ($P < 0.05$), 而在 3 h 和 12 h 时实验组和对照组的表达量并未表现出显著性的差异(图 6d)。

在经过缺氧应激的杂色鲍血细胞中, 实验组 HdSBP1 的表达量在 192 h 时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而在其它时相实验组和对照组的表达量无显著差异(图 7a); 高温应激后, 实验组 HdSBP1 的表达量在第 3 时相时显著性高于对照组 ($P < 0.05$), 其它各时相均没有显著性变化(图 7b); 缺氧和高温联合应激后, 实验组 HdSBP1 的表达量在 0 h、4 h 和 24 h 时显著性高于对照组 ($P < 0.05$), 而在 96 h 和 192 h 时, 实验组的表达量和对照组相比并无显著差异(图 7c); 副溶血弧菌注射感染之后, 实验组的 HdSBP1 基因在每个时相的表达量都显著性地高于对照组 ($P < 0.05$)(图 7d)。

3 讨论

硒结合蛋白 1 是一种高度保守的蛋白(Bansal *et al.*, 1989; Bevan *et al.*, 1998)。它广泛参与抑制癌细胞的增长(Morrison *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1998)、氧化/还原反应的调控(Yang *et al.*, 1998)、解毒(Ishii *et al.*, 1996)以及高尔基体蛋白的转运(Porat *et al.*, 2000)等过

```

1  CACAAGAAAGTTTGTGAGATGACCCCTGGATTTCAGTCAGCACGTTTGAATGAAAAGGTCAA 60
61 GGGGACTCTCTAGGCTGGCTCGGCTCGTACGTCATTTCAGTAGGAAACAGCACGatgacgg 120
1  M T E 3
121 aacagcgtgaacaacgactgcagcagctccagacagtggttacgacatggcaatggcggag 180
4  Q A E Q R L Q Q L Q T V L R H G N G G 23
181 gcaacatacagacacatgtgacatcagaatgctgcaagggccggggtatgccacgcccc 240
24  N I Q T H V T S E C C K G P G A T P L 43
241 tggaggctatgaaagcccccaggagaaagatcgtctatataccctgcattatfctgaga 300
44  E A M K G P R E K I V Y I P C I I P E K 63
301 aggatcgtcccactacctatctacagtcgacgtggaccctgaatgcccaacatattgcc 360
64  D R P D A L S T V D V D P E S P T A C Q 83
361 aggtgatccaccgtctatataatgccctacgttggatgaacttcacactctggctgga 420
84  V I H R L Y M P Y V A D E L H H S G W N 103
421 acgcttgctccagttgctatgacgacggcagtaaacggcggaaccggatgggtcttccct 480
104  A C S C A D D G S K R R N R M V L P C 123
481 gcatcaatagtgcagagtgatcatagttgacacaggcaccgatccgaggagccatccc 540
124  I N S D R V Y I V D T G T D P R R P S L 143
541 ttcacacagatagtcagccctctgaggttcaatccaagaccggtcttgggtctcccaca 600
144  H T I V Q P S E V H S K T G L G A P H T 163
601 caacccttgcctggggtcagggcacatcatgatcagctgattggcaaccagaaccggag 660
164  T H C L G S G H I M I S C I G N Q N G D 183
661 atggaatagtggttcttctggttggacgggtccaactccgggtctcggcaagtggg 720
184  G N S G F F L L D G S N F R V L G K W E 203
721 agaattccccgcctcctgagatggctacgacttctggatcagccgagacacaacgtaa 780
204  N S P A P E Y G A D F W Y Q P R H N V M 223
781 tgcctcagttccgagtggtgctccgaatgcttggagaaatggattcaacccccgagcac 840
224  L S S E W G A P N A W R N G F N P E H V 243
841 tgaacaaggtctgtacggtcacagattacagctgtgggactggacaacacacagcagcta 900
244  K Q G L Y G H S I H V W D W T T H E R I 263
901 tccagacccttgacctggagatgagggactgattccccctcgagatcaggttctccata 960
264  Q T L D L G D E G L I P L E I R F L H N 283
961 acccgacacgaccgagggctatgtggggtgcgcgctcagctcaacagattcagattct 1020
284  P D T T E G A V G C A L S S T V F R F F 303
1021 tcaacttccgaatggaagatgggacagcagagaaggtgatcactatacctaacaagcgg 1080
304  K L P N G R W D S E K V I T I P N K T V 323
1081 tagagggattcgcctccagagctgcctggtgatcactgacatcattctctccttgg 1140
324  E G F A L P E L P G L I T D I I L S L D 343
1141 atgacgatacctctacttcagcaactggctccacggagacatccgacagtacgacata 1200
344  D R Y L Y F S N W L H G D I R Q Y D I T 363
1201 ccgacagaagcaaccctaaactgggtggacaggtgttctcggcgggatgatatgcaaag 1260
364  D R S N P K L V G Q V F L G G M I C K G 383
1261 gtggggacatcactgtcacgacgaccgggaagacaggggtcagcctgatccgggttta 1320
384  G D I T V T H D P E G Q G Q P D P V F I 403
1321 tccgtccaagaggttgaggaggaccaccagatgttgacgttagtctagatgggactc 1380
404  R S K R L E G G P Q M L Q L S L D G T R 423
1381 gcccttacgttacaacgtcactttcagcgcctgggacaaacagttctaccaccaataga 1440
424  L Y V T T S L F S A W D K Q F A P N M I 443
1441 tcaaatctggataaatgttctgatgattgacgtcgatcagctcaacggaggactgaaac 1500
444  K S G S M F L M I D V D T V N G G L K L 463
1501 tgaaccagactttcagtcgactacggctggaacctgcagaccagtggttcgccacc 1560
464  N P D F A V D Y G L E P A G P V F A H E 483
1561 aaattcggatccagcggggatgacagtcgatctcggctgtaaTATCCCATCCGTT 1620
484  I R Y P G G D C T S D I W L * 497
1621 GATCGTGATATTATAACAACGCTCCTACGGTCGAAAACAGATTTCACAGTTCGTTAT 1680
1681 TTACACAGACGTTGTTATGTTTCATGTATCTGTGACACATTGATATATGTAAGCTTGATTA 1740
1741 CGGTGCGATCATGGAACAGCTTATTCAATTAACAGCTTTAGATAATGAAAAGCCTTAG 1800
1801 ATTCGGAATCCTAACAAAAGCGTAACAATTCACACCCGAAGGTGAATACTTATATAGTA 1860
1861 CTTACATACATATTAACAATATCATACAAAACGGATACGCACACTGTCATCACTTTTAT 1920
1921 TTGGACATGTATATTATTCGTTACTTCATGTTCCAAACTAATGGTTTGTGCATGGAGTTA 1980
1981 TGCTTTACGCAAGGACTATAACTTAAAGCTTTGTTGTAAGTTTACACTGCCTCACG 2040
2041 AACGCTTTGTGAATCTTAACACGGACAATGCACACATTACAACAGCTTCTCTTGAAT 2100
2101 GGCAGAACATACTCGTCAATATATAGTGATTGATTGTTTTTACATATGTAACATGATGT 2160
2161 TTATTGATCAGTGAACGACCTGAAGAAAATCATGCCACATGTTTTCCGGACCATATCCGA 2220
2221 TTTTCATGTCATAAAGTTAAATACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2269

```

图 1 杂色鲍 HdSBP1 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of HdSBP1 gene from *H. diversicolor*
5'和 3'非编码区序列分别用大写英文字母表示, 编码区序列用小写字母代表; 编码区内, 上方所示为 HdSBP1 的核苷酸序列信息, 下方对应的是其所编码的氨基酸序列的相关信息; atg(起始密码子)与 taa(终止密码子)均用粗体显示; 双下划线标注的为 1 个糖基化位点; 圆圈标注的是 11 个丝氨酸磷酸化位点; 箭头所指的是 7 个苏氨酸磷酸化位点; 7 个酪氨酸磷酸化位点则是用三角形来加以标注; 一个内质网整合信号(DELHH)用方框粗体标出; 金属螯合基序(HTTH, HIM, HNVM, HSIHVWDWTH, HGD and MFLM)用粗体下划线标示; CSSC 氧化还原蛋白基序用粗体阴影标示; 其它的一些由 CXXC 加尾信号用单下划线和加粗处理来标示



图2 HdSBP1 的三维空间结构模型

Fig.2 The predicted three-dimensional space structure of HdSBP1

程中。本实验首次成功克隆了杂色鲍 HdSBP-1 基因的全序列，共编码 497 个氨基酸，二级结构预测结果显示其结构以 β -折叠为主，仅含有少数 α -螺旋。多重比对结果表明，不同物种中的 SBP-1 具有很高的相似性。而杂色鲍 SBP-1 蛋白与同为软体动物的皱纹盘鲍的 SBP-1 蛋白的一致性达到了 93%，与斑马鱼的一致性也达到了 67%。另外，在 HdSBP-1 的氨基酸序列中包含有保守的硒结合蛋白信号基序，如：CXXC 基序、金属整合基序和内质网整合信号等等。CXXC 基序普遍存在于巯基/二硫键氧化还原酶中，主要负责催化氧化巯基以及还原蛋白质异构体的二硫键

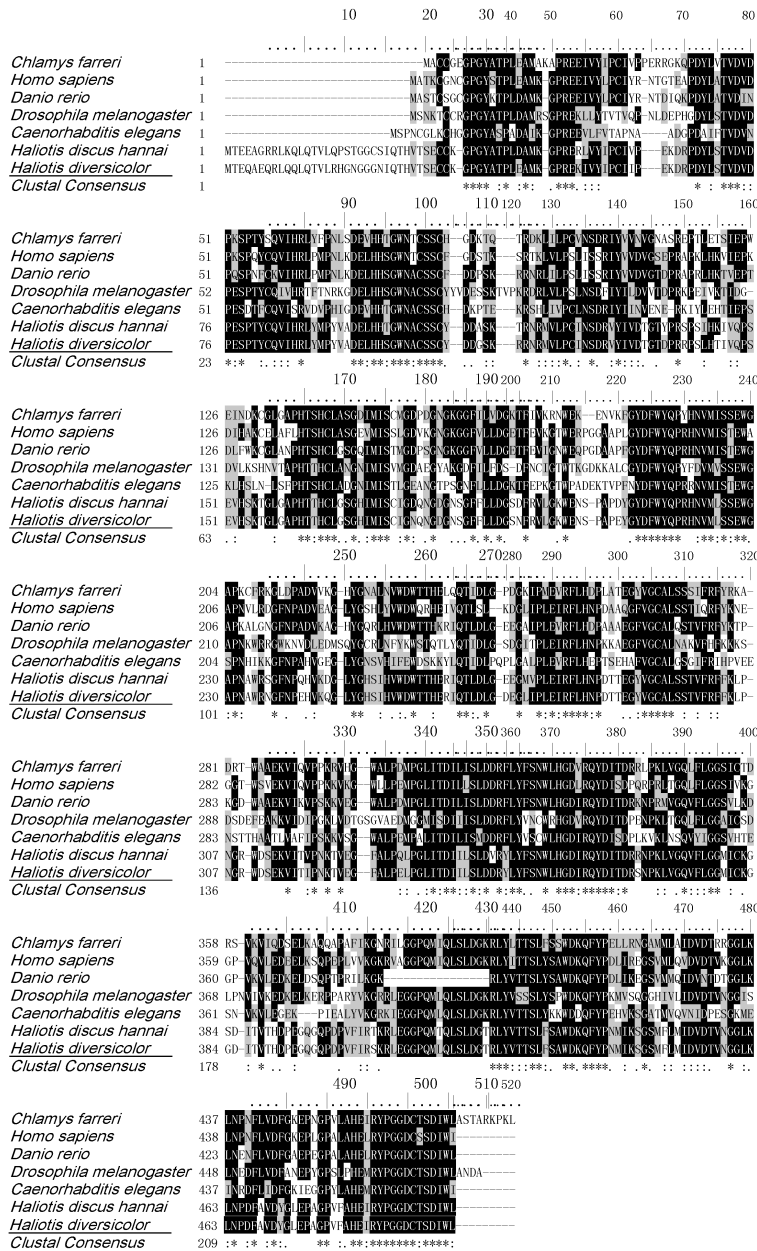


图3 氨基酸序列的多重比对

Fig.3 Multiple alignment of the SBP1 amino acid sequence

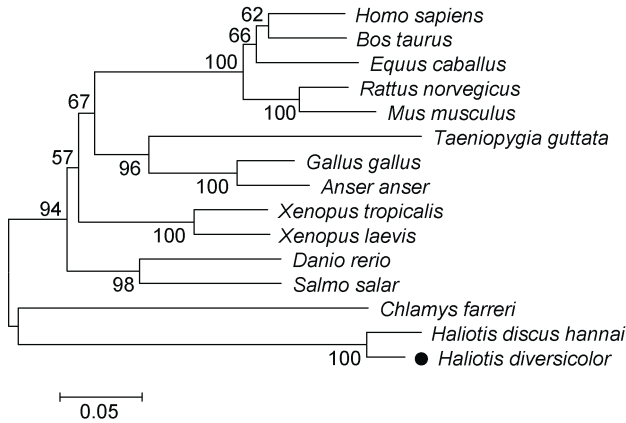


图 4 HdSBP1 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the SBP1 amino acid sequences between *H. diversicolor* and other species
 系统进化树所用 GenBank 上的登录号: 人 *Homo sapiens*, AAH09084; 牛 *Bos taurus*, NP_001039513; 家马 *Equus caballus*, XP_001492277; 褐家鼠 *Rattus norvegicus*, AAH74008; 小家鼠 *Mus musculus*, NP_033176; 斑胸草雀 *Taeniopygia guttata*, XP_002192181; 原鸡 *Gallus gallus*, XP_423397; 大雁 *Anser anser*, ABP24366; 热带爪蟾 *Xenopus tropicalis*, AAH92556; 非洲爪蟾 *Xenopus laevis*, AAH94129; 斑马鱼 *Danio rerio*, AAH56590; 大西洋鲑 *Salmo salar*, NP_001133645; 栉孔扇贝 *Chlamys farreri*, AAX39709; 皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai*, ACZ65578.1, 杂色鲍 *Haliotis diversicolor*, KJ459335 (标记为黑色圆点)

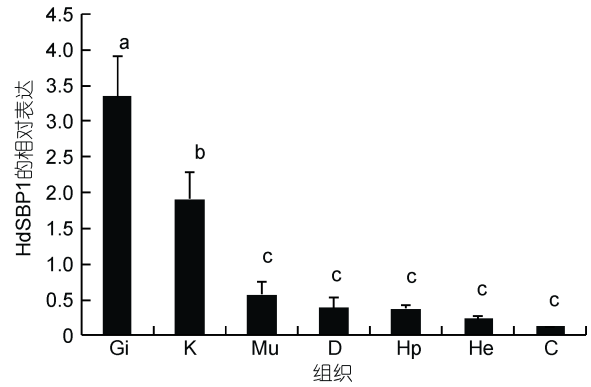


图 5 HdSBP1 基因在不同组织器官中的表达情况

Fig.5 Distribution pattern of HdSBP1 in different tissues of *H. diversicolor*
 Gi. 鳃, K. 肾, Mu. 肌肉, D. 消化道, Hp. 肝胰腺, He. 血细胞, C. 黏液腺

(Chivers *et al*, 1997; Fomenko *et al*, 2003)。相关研究已经表明 CXXC 特征基序对于硒和其它重金属离子具有很强的结合特性(Jamba *et al*, 1997; Liu *et al*, 1997)。同时, 多个保守的金属结合位点(如 HXXH 和 HXD 等)也包含在 HdSBP-1 的氨基酸序列中, 这些位点都有可能参与到了对硒离子以及其它重金属离子的结合的过程中(She *et al*, 2003; Urvoas *et al*, 2003)。

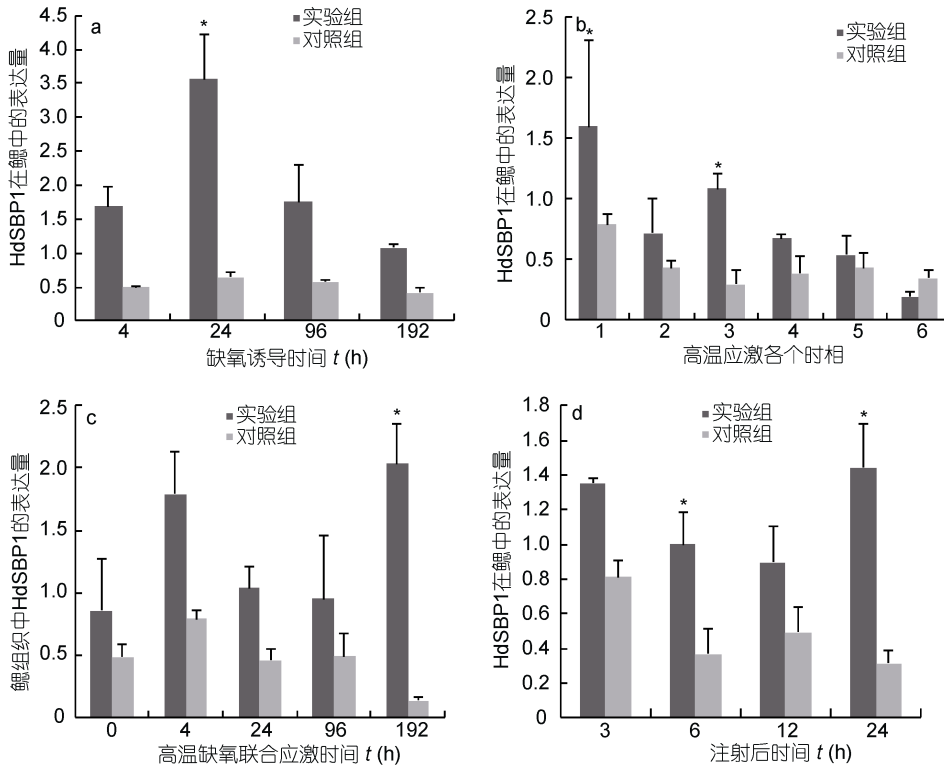


图 6 在各种应激下 HdSBP1 基因在杂色鲍鳃组织中的表达

Fig.6 The change of HdSBP1 expression in gills after various types of stresses
 图 6b 中高温应激各个时相分别代表: 1: 28°C, 2: 31°C (0 h), 3: 31°C (4 h), 4: 31°C (24 h), 5: 31°C (96 h), 6: 31°C (192 h)。*表示与对照组差异显著($P < 0.05$)

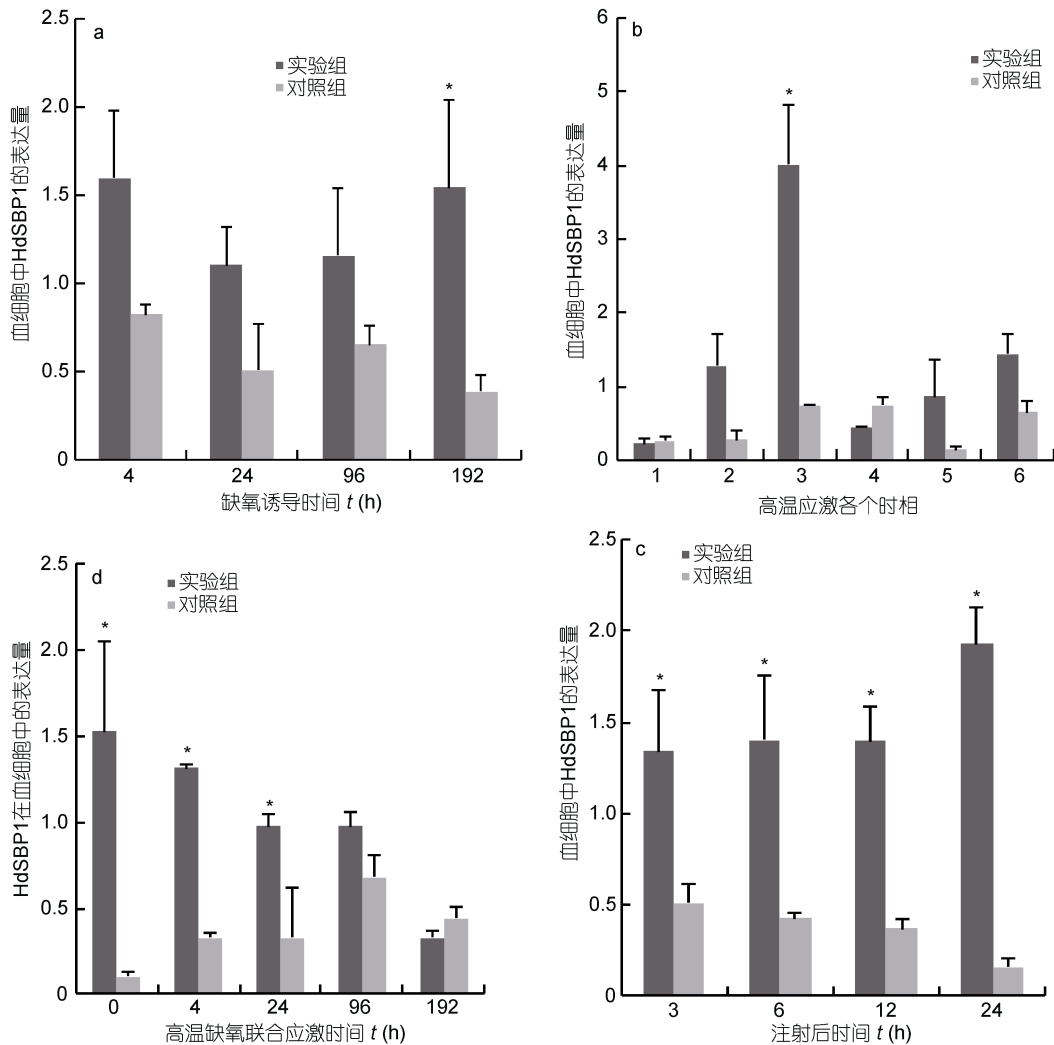


图 7 在各种应激下 HdSBP1 基因在杂色鲍血细胞中的表达

Fig.7 The change of HdSBP1 expression in haemocytes after various types of stresses
图 7b 中高温应激后横坐标所代表的各时期参考图 6b。*表示与对照组差异显著($P < 0.05$)

此外,在 HdSBP-1 的氨基酸序列中还包含有一个内质网整合信号基序,这也表明 HdSBP-1 可能参与细胞膜的流动运输以及高尔基体转运蛋白的过程(Porat *et al.*, 2000; Teo *et al.*, 2001)。

目前 SBP1 作为一种肿瘤标记物已在人类中得到了广泛研究,并且已被证明在多种组织(如:心、肝、肾和肺)以及细胞系中均有表达(Chang *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998)。在本实验中所检测的杂色鲍各组织中,同样均有 HdSBP-1 基因的表达,并且在鳃组织中的表达量显著性地高于其它组织。针对这一结果,推测原因可能是由于在较为低等的软体动物以及甲壳动物中均不含有免疫球蛋白,而鳃组织作为水生生物的主要呼吸器官,在免疫系统中就扮演了第一道防线的重要角色。因此, HdSBP-1 基因在鳃组织中的

高表达,也间接表明了该基因可能参与到了杂色鲍应对外界环境变化的免疫调节机制中。

在软体动物中, Song 等(2006)在研究栉孔扇贝被微生物感染以及 H_2O_2 的氧化应激处理之后发现, SBP 的表达量逐渐上升。通过实时荧光定量 PCR 技术,本实验报道了在应对不同环境因子的应激条件下, HdSBP-1 的表达情况。结果表明,在缺氧诱导的环境条件下杂色鲍鳃组织中的 HdSBP-1 表达在 24 h 时显著上调,随后表达量虽有所下降但实验组中的表达量均要高于对照组。在血细胞中,直到 192 h 时,实验组的表达量才表现出显著性上调。产生这一现象的可能原因是鳃组织作为低等水生生物的免疫系统第一道防线,当环境中的氧浓度下降时, HdSBP-1 在鳃中率先表达,并由此开启了机体对外界刺激的免疫

调控机制, 随后, HdSBP-1 在血细胞中的表达也被开启, 这样就开启了整个机体应对缺氧环境的调节机制。高温应激下, 无论是在杂色鲍鳃组织还是在血细胞中, HdSBP-1 的表达都在应激初期表现出显著性上调, 这一现象表明在高温初始阶段, 机体的免疫调节机制被迅速激活, 从而使 HdSBP-1 的表达在第 1 时相和第 3 时相显著上调以阻止细胞凋亡。随着高温持续时间的延续, 机体对这一环境的变化逐渐适应, 并由此导致 HdSBP-1 的表达量逐渐回归到与对照组相当的表达水平。通过对高温和缺氧实验结果的对比, 发现杂色鲍鳃组织和血细胞中的 HdSBP-1 在应对高温引起的环境压力方面较缺氧应激敏感。为进一步研究这两种应激同时存在时杂色鲍的免疫调节机制, 作者进行了高温和缺氧的联合应激实验, 结果表明在鳃组织中, 应激 192 h 时才检测到 HdSBP-1 的显著性变化, 由此说明, 高温和缺氧双重因子的联合作用并未使 HdSBP-1 在杂色鲍鳃组织中的免疫调节机能得到更进一步的加强, 而是有可能激活了别的调节途径来共同应对更加复杂的外界环境变化。血细胞中, 在双重环境因子的共同作用下, 实验组 HdSBP-1 在 0 h、4 h 和 24 h 时的表达均显著高于对照组, 这也表明了 HdSBP-1 在血细胞中的表达相对鳃组织而言对环境因子的依赖性更强。此外, 当被副溶血弧菌感染以后, HdSBP-1 在血细胞的整个应激阶段以及鳃组织中的初期和末期也均表现出了显著上调的现象, 这一结果也与对栉孔扇贝进行的研究结果存在一定的相似性(邹慧斌, 2005), 同时也表明了 HdSBP-1 基因参与到了杂色鲍应对弧菌感染的免疫应答过程中。但是, 在上述不同应激条件下 HdSBP-1 的具体作用机理还不清楚, 仍需进一步深入研究。

总之, 本实验成功克隆了杂色鲍 HdSBP-1 的全长 cDNA 序列。实时荧光定量 PCR 结果显示, HdSBP-1 基因在高温应激、缺氧诱导、高温和缺氧联合应激以及副溶血弧菌感染的情况下, 无论是在血细胞还是鳃组织中的表达量均有显著性变化的发生。通过本实验的一些基础研究, 可以在一定程度上表明该基因作为一种免疫相关基因, 无论是在应对环境刺激还是病菌感染时都在杂色鲍的免疫应答机制中起到了重要的作用。同时, 这些数据也可以为今后更进一步揭示杂色鲍在不同应激条件下的分子防御机制提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- 王艺磊, 张子平, 2003. 日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建. 动物学杂志, 38(6): 9—13
- 苏天凤, 2006. 杂色鲍与九孔鲍种质资源研究进展. 南方水产, 2(2): 64—67
- 邹慧斌, 2005. 栉孔扇贝和海湾扇贝 G 型溶菌酶基因及栉孔扇贝硒结合蛋白基因的克隆和表达研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 31—34
- 张 鑫, 黄贻涛, 蔡秀红等, 2014. 杂色鲍 14-3-3 基因的克隆及其在应激下的表达. 水产学报, 38(4): 491—501
- 周 晶, 蔡俊鹏, 杨洪志, 2006. 南方杂色鲍苗大规模死亡病原菌的分离鉴定及其回归感染试验. 海洋湖沼通报, 03: 54—59
- Bansal M P, Cook R G, Danielson K G *et al*, 1989. A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 13780—13784
- Bevan M, Bancroft I, Bent E *et al*, 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391: 485—488
- Chang P W, Tsui S K, Liew C C *et al*, 1997. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64: 217—224
- Chivers P T, Prehoda K E, Raines R T, 1997. The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry*, 36: 4061—4066
- Fomenko D E, Gladyshev V N, 2003. Identity and functions of CXXC-derived motifs. *Biochemistry*, 42: 11214—11225
- Hassan M, Stohs S, Murray W, 1983. Comparative ability of TCDD to induce lipid peroxidation in rats, Guinea pigs, and Syrian golden hamsters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31: 649—657
- Huey R B, Ward P D, 2005. Hypoxia, global warming, and terrestrial Late Permian extinctions. *Science*, 308: 398—401
- Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T *et al*, 1996. A coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver. *Chemosphere*, 32: 509—515
- Jamba L, Nehru B, Bansal M, 1997. Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium exposures in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 177: 169—175
- Liu S Y, Stadtman T C, 1997. Heparin-binding properties of selenium-containing thioredoxin reductase from HeLa cells and human lung adenocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 6138—6141
- Morrison D G, Dishart M K, Medina D, 1988. Intracellular 58-kD selenoprotein levels correlate with inhibition of DNA synthesis in mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, 9: 1801—1810
- Pörtner H, 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88: 137—146
- Porat A, Sagiv Y, Elazar Z, 2000. A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 14457—14465

- She Y M, Narindrasorasak S, Yang S *et al*, 2003. Identification of metal-binding proteins in human hepatoma lines by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2: 1306—1318
- Song L, Zou H, Chang Y *et al*, 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri*. *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 265—273
- Teo M, Tan L, Lim L *et al*, 2001. The tyrosine kinase ACK1 associates with clathrin-coated vesicles through a binding motif shared by arrestin and other adaptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 18392—18398
- Urvoas A, Amekraz B, Moulin C *et al*, 2003. Analysis of the metal-binding selectivity of the metallochaperone CopZ from *Enterococcus hirae* by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17: 1889—1896
- Yang M, Sytkowski A J, 1998. Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 58: 3150—3153
- Zhang W, Wu C, Mai K *et al*, 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 from Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 280—286

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF SELENIUM-BINDING PROTEIN 1 IN *HALIOTIS DIVERSICOLOR* UNDER STRESSES

ZHANG Xin, CAI Xiu-Hong, HUANG Yi-Tao, ZHANG Zi-Ping,
WANG Guo-Dong, ZOU Zhi-Hua, WANG Shu-Hong, WANG Yi-Lei

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract Selenium-binding protein 1 (SBP1) is a highly conserved protein which is widely involved in multiple physical and chemical processes. We cloned a full-length cDNA of SBP1 from *Haliotis diversicolor* for the first time and named it HdSBP1. The full-length cDNA sequence is 2269 bp, with an open reading frame of 1494 bp encoding a protein of 497 amino acids. The real-time quantitative PCR results showed that ubiquitous expression of HdSBP1 in all examined tissues, with highest expression in gills and kidney. HdSBP1 transcripts were compared under normoxia, and environmental stresses (hypoxia, heat, and *Vibrio*) in the gills and haemocytes of the abalone. Under hypoxia, the expression of HdSBP1 mRNA in gills and haemocytes was significantly increased at 24 h and 192 h respectively ($P < 0.05$). Under thermal stress, it was significantly up-regulated in gills at the first phase (when temperature reached 28°C) and the third phase (3 h post thermal stress), so did in haemocytes at the third phase ($P < 0.05$). Under thermal plus hypoxia stress, it was significantly up-regulated in gills at 192 h ($P < 0.05$), and in haemocytes, the expression was significantly up-regulated at 0, 4, and 24 h. After *Vibrio parahaemolyticus* injection, the expression was significantly up-regulated in gills at 6 h and 24 h and so did in haemocytes at all phases ($P < 0.05$). All these results indicate that HdSBP1 may play important roles in immunoreaction of *H. diversicolor*.

Key words *Haliotis diversicolor*; SBP1 gene; thermal stress; hypoxia stress; thermal & hypoxia stress; *Vibrio parahaemolyticus*