

# 文蛤(*Meretrix meretrix*)C-型凝集素基因的 分子克隆及表达分析\*

李 猛 周素明 刘 璐 彭 嶝 王国良

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

**摘要** C-型凝集素是一种重要的模式识别蛋白,本研究以文蛤为材料。利用 PCR 扩增和 RACE 技术首次获得了编码文蛤 C-型凝集素的基因(Mm-CTL)cDNA 序列,全长为 1855bp,其开放阅读框为 519bp,编码 172 个氨基酸。Smart 软件预测 Mm-CTL 的糖识别结构域(CRD)从第 34 个氨基酸到第 168 个氨基酸。BLASTP 序列相似性分析显示, Mm-CTL 与大竹蛭氨基酸序列同源性最高,相似性为 56.5%,与其它无脊椎动物的相似性为 13.5%—23.9%。系统进化树分析与同源分析结果一致,其中 Mm-CTL 与双壳类 C-型凝集素聚在一起,与大竹蛭亲缘性最近。环境胁迫实验显示,溶藻弧菌感染 6h 时 Mm-CTL 表达量明显上升,在 12h 时达到最高值,随后有所下降。盐度胁迫时 Mm-CTL 在盐度 5 时表达量相对较低,在盐度 10—20 中的表达量相对较高。温度胁迫时 Mm-CTL 在 35°C 时表达量相对最高,10°C 时表达量明显较低。研究结果表明,文蛤对环境因子影响可通过调节 Mm-CTL 的表达来应答免疫反应。本研究将为贝类先天性免疫因子研究以及病害的防控奠定基础。

**关键词** 文蛤; C-型凝集素; 基因克隆; 生物信息学; 环境因子

**中图分类号** S917 doi: 10.11693/hyh20150100017

文蛤(*Meretrix meretrix*)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchiata)、帘蛤目(Veneroida)、帘蛤科(Veneridae)、文蛤属(*Meretrix*)。具有很高的食用和药用价值,广泛分布于山东、江苏、广西、浙江等沿海地区。近年来,由于养殖规模扩大,环境恶化,管理方法不当等导致病害滋生,严重阻碍了文蛤养殖业的健康发展。为提高文蛤的抗病害能力,有必要对其免疫相关因子进行深入研究。

凝集素是一类可结合糖类物质的蛋白,最初于植物中发现,在细菌、真菌和动物中同样大量存在。凝集素在多种生命过程包括细胞间通信、蛋白的折叠和装配、信号转导、非己识别等中发挥着重要作用(Vasta *et al*, 2004)。根据凝集素糖类识别结构域 CRD 的结构特征不同,可将凝集素分为 C-、L-、P-、I-、R-和 S-型凝集素等(Janeway *et al*, 2002)。C-型凝集素

家族是目前研究最多的一类凝集素,其主要特征是在蛋白质分子的 C 末端含有糖识别的结构域 CRD,具有保守特征性功能域,其凝集活性具有钙离子依赖性(罗展等, 2010)。贝类动物的免疫机制以非特异性免疫为主,其中 C-型凝集素作为可与糖专一性结合并能促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白,在免疫识别和防御系统中专一地与异物表面特定的糖基结合,从而吸附和凝集异物,促进机体清除和杀灭异物(Tamplin *et al*, 1989)。目前,已经在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(Wang *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2009a)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)(Zhu *et al*, 2008)、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)(胡钰婷等, 2011)、刺参(*Apostichopus japonicus*)(Han *et al*, 2012)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Zhang *et al*, 2009b)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)(于金红等, 2013)等不同海洋动物中发

\* 教育部长江学者与创新团队项目, IRT0734 号; 浙江省海水养殖重点科技创新团队项目, 2010R50025-08 号; 宁波市水产病害防控与安全科技创新团队项目, 2013B82012 号。李猛, 硕士研究生, E-mail: limengka@qq.com

通讯作者: 王国良, 教授, E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-16, 收修改稿日期: 2015-05-25

现并克隆获得 C-型凝集素基因的全长序列,但在文蛤中对 C-型凝集素的研究相对较少。本实验成功获得了文蛤 C-型凝集素基因的 cDNA 全序列,明确了它的序列特征、系统进化关系及其对环境因子胁迫影响的表达变化,为进一步深入研究文蛤 C-型凝集素的免疫功能提供实验依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

文蛤采样于温州市龙湾区文蛤养殖场,选择壳色正常、无异味,健康无发病症状的文蛤于实验室暂养 3 天后进行试验。大肠杆菌 *E.coli* TG1 和溶藻弧菌菌株为本实验室保存,连接载体 pMD18T 购于 TaKaRa 公司。

TRizol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen), 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ Rtase (TaKaRa), 5'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ Rtase (TaKaRa), PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa), GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司), PCR 仪(Bio-Rad), 微量核酸蛋白测定仪(Bio-Rad), 冷冻离心机(Eppendorf), 凝胶成像仪(Bio-Rad)。

### 1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上已有的贝类 C-型凝集素基因序列,设计克隆及定量 PCR 所需引物(表 1, 表 2)。

表 1 文蛤 C-型凝集素基因克隆所用引物及序列

Tab. 1 Primers used to clone the C-type lectin gene of *M. meretrix*

引物	序列	作用
CTL-R1	5'-AGTATGGCAGACAGTGGGAGG-3'	保守序列克隆引物
CTL-F1	5'-ACATCCACATCCATTGCTTGG-3'	
3R1	5'-GGGTCAATGTCAACAAGGAT-3'	3'RACE 引物
3R2	5'-TGGGTGGTGACCTTGTAICTC-3'	
5R1	5'-CAACATTTAACACAACATGGTATG-3'	
5R2	5'-TAGGGGTCAATGTCAACAAG-3'	5'RACE 引物
5R3	5'-CAGAGTATTACGGGGAGCAC-3'	

表 2 定量 PCR 扩增所用特异性引物及序列

Tab.2 Primers used to clone realtime quantitative PCR

引物	序列
P-β-ACTIN-F	5'-ACTGTGCCCATCTATGAAGGTTA-3'
P-β-ACTIN-R	5'-CGTTCGGTAAGGATCTTCATCA-3'
P-C-F	5'-ACAGTGGGAGGTCAAATGAAGAT-3'
P-C-R	5'-CCCTAGCATCATACCATGTTGTGTT-3'

### 1.3 文蛤总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

挑选三只健康文蛤并取肝胰腺组织 20—50mg,

采用 RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent, Invitrogen)提取总 RNA。使用反转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)将之反转录成 cDNA, 37 °C 反转录 15min, 85°C 5s。合成的 cDNA 产物于 -20°C 保存以供后续实验使用。

### 1.4 文蛤 C-型凝集素基因克隆

根据文蛤 C-型凝集素基因(Mm-CTL)的 EST 序列设计一对引物 CTL-R1 和 CTL-F1(表 1), 以 cDNA 为模板 PCR 扩增。扩增体系: 超纯水 15.7μL, cDNA 1.0μL, 10×PCR buffer 2.5μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5μL, dNTP 2.0μL, CTL-R1 1.0μL, CTL-F1 1.0μL, rTaq 0.3μL。反应条件: 94°C 5min, 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 40s, 共 35 个循环, 72°C 延伸 10min。扩增产物经过凝胶电泳后, 利用 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的条带, 与 pMD18T 载体连接并转化进大肠杆菌 TG1 中, PCR 检测正确并送至上海英骏生物公司测序。

根据所得序列分别设计 3'RACE 和 5'RACE 引物(表 1), 按照 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒和 5'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒说明书进行扩增。扩增产物进行凝胶电泳确认, 并将出现的条带割胶回收, 回收产物连接转化, PCR 检测正确并送样测序。

### 1.5 生物信息学分析

将拼接后的 Mm-CTL 进行生物信息学分析。利用 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)程序对所得序列作开放阅读框分析, 预测编码氨基酸序列, 同时利用 Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白的功能域。使用 NCBI 的 blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行氨基酸同源性分析, 用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树。

### 1.6 感染及环境胁迫实验

制备浓度为 10<sup>7</sup> cells/mL 的溶藻弧菌悬液, 取菌悬液以 1 : 100 的比例与过滤海水稀释后, 将文蛤放入其中浸染, 对照组采用过滤后海水, 盐度 20, 温度 25°C。对照组与实验组同步取样, 分别在 0h、6h、12h、24h、48h、72h 随机选取每组三只文蛤提取肝胰腺 RNA, 反转录成 cDNA 备用。

将健康的文蛤随机分成 6 组, 分别放在盐度为 5、10、15、20、25、30 的海水中 25°C 培养, 12h 后每组随机选取 3 只文蛤提取肝胰腺 RNA, 反转录成 cDNA 备用。

将健康的文蛤随机分成 6 组, 分别放在温度分别

为 10、15、20、25、30、35°C 的海水中(盐度 20)培养, 12h 后每组随机选取 3 只文蛤提取肝胰腺 RNA, 反转录成 cDNA 备用。

分别以上述所制备的 cDNA 为模板, 以 P-β-ACTIN-F、P-β-ACTIN-R、P-C-F、P-C-R (表 2)为引物进行目的基因和内参基因 β-actin 的 RT-PCR 扩增, 扩增体系同上。目的基因扩增条件为 94°C 5min, 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s, 共 35 个循环, 72°C 延伸 10min。内参基因扩增条件为 94°C 5min, 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 30s, 共 28 个循环, 72°C 延伸 10min。反应重复三次 RT-PCR。将 PCR 结果用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 在凝胶成像仪下成像。

## 2 结果

**2.1 文蛤 C-型凝集素的基因克隆与生物信息学分析**  
 通过 PCR 和 RACE 技术获得 Mm-CTL 核心序列和 3' 端与 5' 端序列, 经过拼接该基因的全长为 1855bp (GenBank 序列号: JX232217), 其开放阅读框为 519bp, 编码 172 个氨基酸(图 1)。利用 Smart 软件预测蛋白的功能域(图 1, 图 2)。结果显示, 第 34 个蛋白到 168 个蛋白为 Mm-CTL 的糖识别结构域(CRD), 该 CRD 含有的参与二硫键形成的 6 个保守的半胱氨酸, 分别位于 Cys34、Cys47、Cys64、Cys143、Cys159、Cys167。在 CRD 区域中找到决定糖结合的特异性序列“EPN”。

```

1 gtttaggtccagcgtccgtggggggggtataaaaaagtgtatacaggtgaggattaaaaatcacgttataaaattcaagtttatttagggcctatcgtaccactaaat
106 cagacttcattataaaagctttcaaccatttctatacacttgattagtaaacctgatgcaaatgcaaatatcattcgaccctcagagttcaaggagtaaaatt
211 tctctctattcgcgaagatgttgacaacataatacacaatgtttaaaccattcataaaagataagccatttatgtctttttatctaagcagctaacagatgaatc
316 aaatcagtgtttactcgagaagtcttttgaagaaatttattttccttgagactgtactctgaaatcctttaaatttgaatcgtttcaacttcatttcaacaacag
421 cttcagaaaacttttggtagatttaaattcagggtaaatagcaatgaataaaattttaaatttatttggataaacttggcatgattcttccagttctaggcac
526 aaaaacactgtttcaacatgtgatgtaagaataggaaactgcatgatcagcttcagctgttacctagcaaccagtgccatggagataccatcataaggtcaag
631 gtcgaagaggtcagatcaaattggagaagtaatagaggaatttcttccctcagtcacagtttgaagagctagaaaaaacttgtaaaagaaATGAAACATCTT
1 TCAACACAGAGTATTACGGGGAGCAGCAGACTGGAGAGTATGGCAGACAGTGGGAGGTCAAATGAAGATGGTAAAAATAGGGGTCATGTCAACAAGGATTGTG
736 5 S T R V L R G A R R L E S M A D S G R S N E D G K N R G Q C Q Q G F V
841 ACATATGATAACTGGAATTCATGCTACATGTTTCAACATTTAACACAAACATGGTATGATGCTAGGGATTACTGTGTGGCCATGGGTGGTACCTTGATCTCTT
40 T Y D N W N S C Y M F S T F N T T W Y D A R D Y C V A M G G D L V S L
946 GGATCACTTCAGGAACATTTCTGGTTCATTTTGAATGACCCAGAGTACAGCTGACGCTCAAGGCTGGTGGACAGTGGAAACATTCGTGGTAAAAACC
75 G S L Q E H F L V A F H I L N D P E Y S A A Q G W W T S G T F V V K T
1051 AAGCAATGGATGTGGATGCTAACATTGATATTCAACCCGTAACATAGTCAAATGGGCTGTCAACGAGCCCAACGATCAACACGATAAAAACTTCAATGCTG
110 K Q W M W M S N I D I Q P V T Y V K W A V N E P N D Q H D K N L Q C L
1156 ATGATGTACAGGCTTGACGACATGCTCTGGCAGCAGCAATATGTACTGATAGATATAACTTTGTCTGTGAAATACCTGTGGCATAATggaagaacagttttaca
145 M M Y R L D D M L W H D R I C T D R Y N F V C E I P V A *
1261 aacaagctcgttcatatttgaggttaagaccatcaagttttaaaccctctaccactgccactgtgactaacaatattcatttacacagcataacaatattgtaac
1366 ctccagaacattttatgtacagttaaacgaagacaacaaaagggtctttaaaccagatggctcaggttaaatctgtctcaaacctgggagctcctttttcacaggt
1471 gttctttatttcaaggtgatctttattacaagtttagactgtacatgtttcaagctggccaaattttttgccaatcttttgattttggcactgatacctaag
1576 tctattttgaataactcttcttttttgaacttttccataaaatttattattcttctcattatgctgtatagaaacgaagcactttgtattttggtggtacgt
1681 acactaaccttgaaattcaacccaacctgcaactgctcttcttcttcgaacaatgtcctacatagacttgggggtaaacattttgtctcgtgtttaaatt
1786 tcaatattctttatgtttttatctctttataaaattgttgaatgaaagtgttcaaggttaaaaaaaaaa
  
```

图 1 文蛤 C-型凝集素基因 cDNA 序列

Fig.1 cDNA sequences of C-lectin gene in *M. meretrix*  
 阴影表示 CRD, 曲线underline表示决定糖结合特异性的序列(EPN)



图 2 C-型凝集素预测蛋白结构域

Fig.2 Domain analysis on putative C-lectin protein

将拼接后的序列进行同源性比对, 结果显示与日本刺参(*Apostichopus japonicus*), 青鳉(*Oryzias latipes*), 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*), 日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*), 长牡蛎(*Crassostrea gigas*), 大竹蛎(*Solen grandis*)相对应的氨基酸序列相似性分别为 13.5%、13.5%、21.5%、23.2%、23.9%、56.5% (图 3)。

利用 MEGA4.1 软件对 Mm-CTL 进行生物信息学

分析, 构建进化树, 用 N-J 方法进行聚类分析。进化树结果显示(图 4), 不同物种的凝集素各自成簇, 脊椎动物聚在一类, 无脊椎动物聚在一类。从文蛤体内获得的 Mm-CTL 与大竹蛎(*Solen grandis*)聚类在一起, 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)进化距离较近。

### 2.2 环境因子对文蛤 C-型凝集素基因表达量变化的影响

**2.2.1 弧菌感染对文蛤体内 C-型凝集素基因表达量的影响**  
 在溶藻弧菌刺激下, 文蛤肝胰腺 Mm-CTL 表达量变化结果见图 5。溶藻弧菌感染 6h 时表达量明显上升, 在 12h 时达到最高值, 随后有所下降, 72h 时趋于稳定并与对照组无明显差异。

**2.2.2 盐度变化对文蛤体内 C-型凝集素基因表达量的影响**  
 在不同盐度胁迫下, 文蛤肝胰腺 Mm-CTL 表达量变化结果见图 6。在盐度 5 时 Mm-CTL

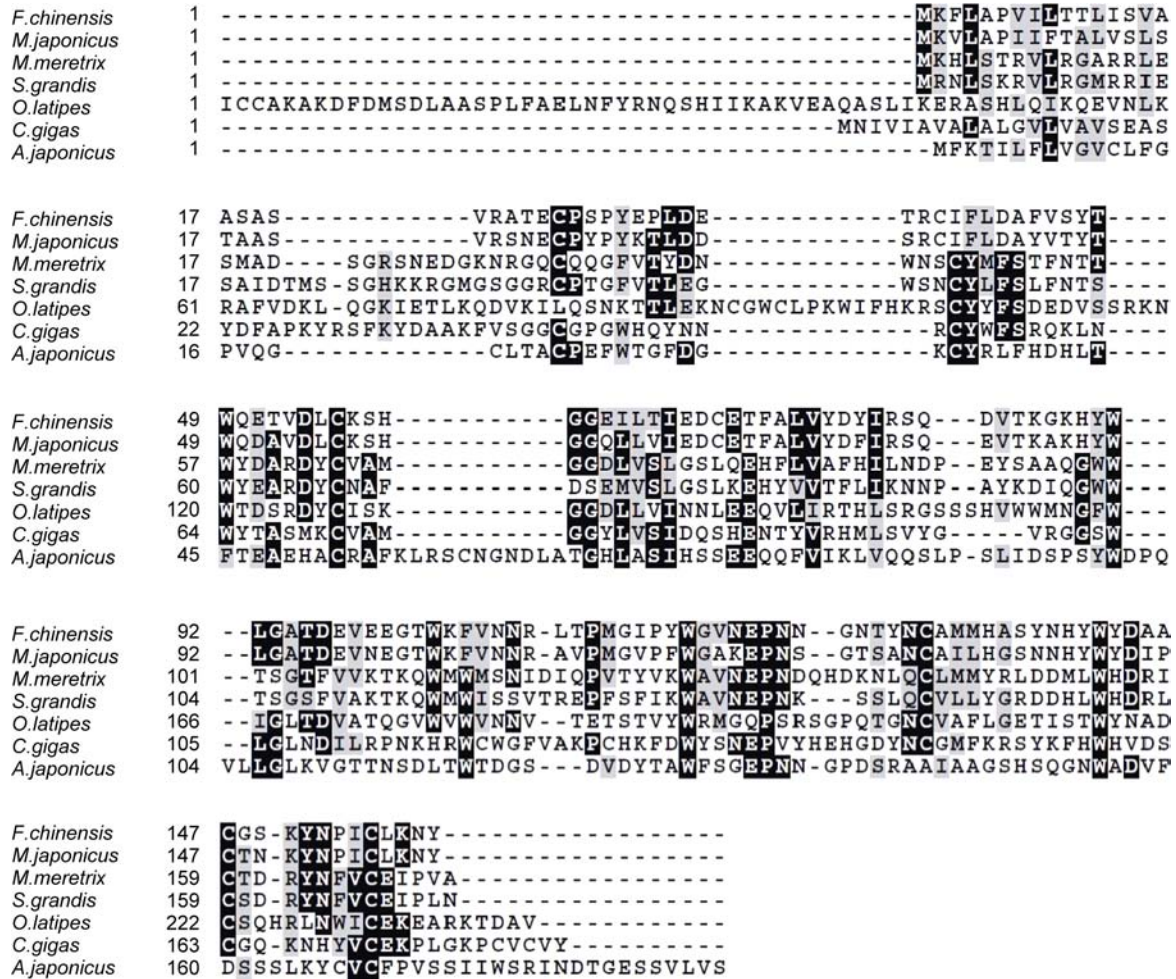


图 3 文蛤 C-型凝集素氨基酸序列与其它物种凝集素氨基酸序列的比对

Fig.3 Multiple alignments of amino acid sequence of C-lectin of *M. meretrix* with other known species genes  
黑色背景表示相同的氨基酸, 灰色背景表示性质相似的氨基酸

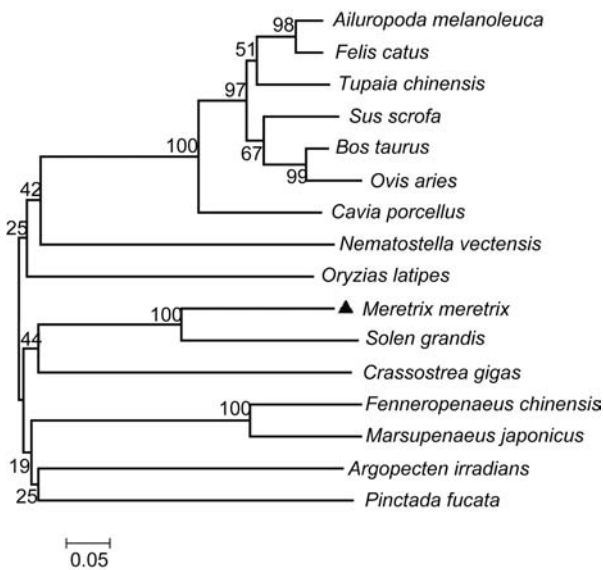


图 4 不同物种凝集素氨基酸序列系统进化树

Fig.4 The evolutionary tree of lectin amino acid sequence of different species

表达量比较低, 在盐度 10—20 范围时 Mm-CTL 表达量相对较高, 当盐度高于 20 时, Mm-CTL 的表达量反而较低。

**2.2.3 温度变化对文蛤体内 C-型凝集素基因表达量的影响** 在不同温度胁迫下, 文蛤肝胰腺 Mm-CTL 表达量变化结果见图 7。在水温 25°C 以上时, 随着水温的上升表达量明显上升, 水温 25°C 以下时, 随着温度下降表达量明显下降。35°C 时表达量相对最高, 10°C 时表达量明显较低。

### 3 讨论

C-型凝集素是一类钙离子依赖活性的糖蛋白, 包含至少一个保守的糖基识别结构域(陈政良, 1997), 低等生物的 C-型凝集素基因一般只有一个 CRD, 而其它物种则有的两个或多个 CRD (Song *et al*, 2010)。对于虾类而言, 日本囊对虾已报道的 C-型凝集素基

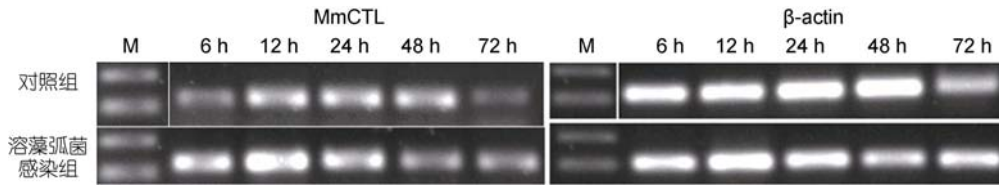


图 5 文蛤肝胰腺 C-型凝集素在溶藻弧菌刺激后的 RT-PCR 电泳图

Fig.5 RT-PCR electrophoregrams of C-lectin gene in hemocytes of *M. meretrix* after *V. alginolyticus* challenge

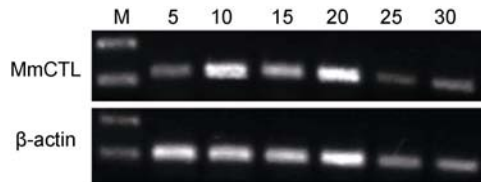


图 6 文蛤肝胰腺 C-型凝集素基因在不同盐度刺激后的 RT-PCR 电泳图谱

Fig.6 RT-PCR electrophoregrams of C-lectin gene in hemocytes of *M. meretrix* in different salinities

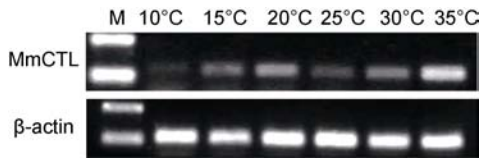


图 7 文蛤肝胰腺 C-型凝集素基因在不同温度刺激后的 RT-PCR 电泳图谱

Fig.7 RT-PCR electrophoregrams of C-lectin gene in hemocytes in *M. meretrix* in different temperatures

因中均只含 1 个 CRD 结构域, 罗氏沼虾已报道的 4 个 C-型凝集素基因中都含 2 个 CRD 结构域(Ren *et al.*, 2012)。中国明对虾和凡纳滨对虾则存在 C-型凝集素基因中既有包含 1 个 CRD 的又有含 2 个 CRD 结构域的情况(Liu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012)。合浦珠母贝和栉孔扇贝 C-型凝集素基因中也包含 1 个 CRD 结构域(胡钰婷等, 2011)。本研究中克隆获得的文蛤 C-型凝集素基因和合浦珠母贝和栉孔扇贝相似, 只含 1 个 CRD 结构域。CRD 结构域中, 主要由 2 个基序与钙离子共同作用完成对糖基分子的结合, 第一个典型的基序为 EPN 或 QPD, 第二个典型的基序为 WND。EPN 可对甘露糖进行识别, QPD 则可识别半乳糖(Drickamer, 1992; Kolatkar *et al.*, 1996)。本研究显示, 文蛤 C-型凝集素基因糖基结合位点为 EPN, 表明文蛤 C-型凝集素可能对甘露糖进行识别并结合。

贝类具有非特异免疫系统, 免疫系统比较简单, 易受外界胁迫影响。在通过先天免疫对病原菌感染的应答过程中, C-型凝集素扮演着重要的作用(Willment

*et al.*, 2008)。吴彪等(2013)用鳗弧菌感染虾夷扇贝后 4h 表达量显著上升, 8h 达到最高峰, 随后下降, 16h 后与对照基本无差异。胡钰婷等(2011)在合浦珠母贝 C-型凝集素基因研究中, 用溶藻弧菌刺激后的 4h 至 24 h 表达量显著上调。本实验用溶藻弧菌感染文蛤, Mm-CTL 在 6h 时表达量明显上升, 在 12h 时达到最高值, 随后有所下降, 72h 时趋于稳定。说明 Mm-CTL 的表达量可受微生物刺激而诱导, 也表明 Mm-CTL 参与对微生物入侵的免疫应答, 有助于提高文蛤的免疫防御能力。

温度和盐度是影响贝类生长, 摄食, 免疫应答等非常重要的环境因子(Kim *et al.*, 2009)。有研究表明, 贝类病害的爆发与盐度的变化有直接的关系, 这可能与盐度胁迫导致贝类免疫能力下降有关。Cheng 等(2004)研究盐度对杂色鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)免疫能力的影响表明, 当杂色鲍由盐度 30 的环境, 转移到盐度 20、25 和 35 的环境中时, 其血细胞数量减少, 酚氧化酶活力、吞噬活力、呼吸爆破活力和清除副溶血弧菌的能力降低, 杂色鲍容易受到致病菌的侵袭而死亡。盐度变化不仅可以通过影响免疫因子活力的方式来影响机体的免疫能力, 还可以通过影响免疫因子表达量变化来影响机体免疫能力。本实验在研究不同盐度对 Mm-CTL 表达量变化时发现, 盐度 10、15 和 20 时 Mm-CTL 的表达量相对较高。表明盐度在一定的变化幅度内能诱导 Mm-CTL 的表达, 起免疫保护作用, 但超出一定范围则免疫功能将受到抑制。

Dang 等(2012)的研究发现欧洲鲍螺(*Haliotis rubra*)在水温由 18°C 升至 21°C 和 24°C 时, 其抗菌活力和抗病毒活力上升, 但长时间胁迫, 会导致欧洲鲍螺抗菌活力和抗病毒活力受到抑制。李晓英等(2009)对青蛤(*Cyclina sinensis*)的研究表明, 短时间内, 温度骤升能提升青蛤超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力, 但长时间的高温刺激, 反而会抑制两种酶活性。本实验结果显示, 在温度高于 25°C 时, Mm-CTL 的表达量随温度升高明显上升, 表明温度的变化可以诱导文蛤免疫因子的表达, 从而调节免疫反应。

## 4 结论

本研究从文蛤中克隆到一种 C-型凝集素的基因, 通过蛋白序列分析, 发现在 Mm-CTL 存在典型的糖基识别结构域。通过表达分析发现, Mm-CTL 的表达不仅受到弧菌感染的影响, 同时也受环境温度和盐度变化的影响。由于贝类是一种海洋无脊椎动物, 其免疫系统极有可能对环境的变化做出响应。本研究结果将为贝类先天性免疫因子表达的调控以及贝类病害的防控奠定基础。

## 参 考 文 献

- 于金红, 潘鲁青, 2013. 三疣梭子蟹 C-型凝集素的原核表达和活性检测. 渔业科学进展, 34(5): 58—63
- 李晓英, 沈睿杰, 董志国等, 2009. 温度骤升和窒息胁迫对青蛤抗氧化酶活性的影响. 中国饲料, 20(1): 39—42
- 吴 彪, 迟长风, 杨爱国等, 2013. 虾夷扇贝 C-型凝集素母源传递与抑菌作用的初步研究. 水产学报, 37(5): 777—783
- 陈政良, 1997. 哺乳类 C-型凝集素超级家族. 生物化学与生物物理展, 24(6): 491—496
- 罗 展, 张继泉, 李富花等, 2010. 凡纳滨对虾 C-型凝集素 LvLec2 对不同刺激的免疫应答. 海洋科学, 34(11): 103—110
- 胡钰婷, 张殿昌, 崔淑歌等, 2011. 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, 35(9): 1327—1336
- Cheng W, Juang F M, Hsu C H, 2004. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. Fish & Shellfish Immunology, 16(3): 295—306
- Dang V T, Speck P, Benkendorff K, 2012. Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. Fish & Shellfish Immunology, 32(5): 732—740
- Drickamer K, 1992. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. Nature, 360(6400): 183—186
- Han L L, Yuan Z, Dahms H U *et al*, 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (AJCTL) from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Immunology Letters, 143(2): 137—145
- Janeway C A Jr, Medzhitov R, 2002. Innate immune recognition. Annual Review of Immunology, 20(1): 197—216
- Kim M, Ahn I Y, Cheon J *et al*, 2009. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GSP) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 152(2): 207—213
- Kolatk A R, Weis W I, 1996. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. The Journal of Biological Chemistry, 271(12): 6679—6685
- Liu Y C, Li F H, Dong B *et al*, 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Molecular Immunology, 44(4): 598—607
- Ren Q, Li M, Du J *et al*, 2012. Immune response of four dual-CRD C-type lectins to microbial challenges in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish & Shellfish Immunology, 33(2): 155—167
- Song X Y, Zhang H, Wang L M *et al*, 2010. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*. Fish & Shellfish Immunology, 28(2): 326—332
- Sun Y D, Fu L D, Jia Y P *et al*, 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. Molecular Immunology, 45(2): 348—361
- Tamplin M L, Fosher W S, 1989. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Applied and Environmental Microbiology, 55(11): 2882—2887
- Vasta G R, Ahmed H, Du S J *et al*, 2004. Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. Glycoconjugate Journal, 21(8—9): 503—521
- Wang H, Song L S, Li C H *et al*, 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Molecular Immunology, 44(5): 722—731
- Wei X M, Liu X Q, Yang J M *et al*, 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. Fish & Shellfish Immunology, 32(1): 132—140
- Willment J A, Brown G D, 2008. C-type lectin receptors in antifungal immunity. Trends Microbiology, 16(1): 27—32
- Zhang H, Wang H, Wang L L *et al*, 2009a. Cflec-4, a multidomain C-type lectin involved in immune defense of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Developmental and Comparative Immunology, 33(6): 780—788
- Zhang Y, Qiu L M, Song L S *et al*, 2009b. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 26(1): 183—192
- Zhu L, Song L S, Xu W *et al*, 2008. Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians*. Fish & Shellfish Immunology, 25(3): 231—238

## MOLECULAR CLONE AND EXPRESSION OF C-TYPE LECTIN IN *MERETRIX MERETRIX*

LI Meng, ZHOU Su-Ming, LIU Lu, PENG Di, WANG Guo-Liang

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** The C-type lectin is one of the most important pattern recognition receptors. In present study, a C-type lectin was cloned from *Meretrix meretrix* (Mm-CTL) for the first time using degenerated PCR and rapid amplification of complementary DNA ends (RACE) method. The full length of the Mm-CTL cDNA was 1855bp containing a 519-bp open reading frame (ORF) encoding a 172-amino-acid polypeptide. Prediction of protein domains revealed that the Mm-CTL contain a typical carbohydrate recognition domain (CRD) that ranged 34th to 168th amino acid. BLASTP analysis showed that the Mm-CTL shared 56.5% identity with the ortholog in *Solen grandis*, and 13.5%—23.9% with other invertebrate orthologs. Mm-CTL is distinctly clustered with mollusk as expected in phylogenetic analysis. After *Vibrio alginolyticus* challenge, the Mm-CTL mRNA was induced significantly in 6h post challenge, and its expression peaked in 12h. Moreover, the Mm-CTL expression reduced in salinity 5 compared to that in salinity 10—20. In a thermal stress, the Mm-CTL expression was down-regulated at 10°C, whilst increased at 35°C. Therefore, the expression of Mm-CTL might response to bacterial infections or environmental stress. The findings may help understanding innate immune factor in molluscs for disease prevention.

**Key words** *Meretrix meretrix*; C-type lectin; gene clone; bioinformatics; environmental factors