

泥蚶(*Tegillarca granosa*)血红蛋白基因(Tg-HbIIA)克隆、分析及免疫表达研究*

汪 青^{1,2} 林志华¹ 包永波¹ 霍礼辉^{1,3} 顾海龙^{1,2}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

提要 通过已构建的泥蚶血液 cDNA 文库, 克隆得到泥蚶 Tg-HbIIA 基因全长 cDNA 序列, 对其进行生物信息学、组织表达及免疫相关分析。结果表明, 泥蚶 Tg-HbIIA cDNA 全长 731bp, 包含 63bp 5' 非编码区(5'-UTR), 246bp 3'非编码区(3'-UTR), 开放阅读框 450bp, 编码 150 个氨基酸; 其氨基酸序列与毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)和不等壳毛蚶(*Scapharca inaequalis*)的序列有较高的同源性, 分别达到 89%和 88%; 对其结构预测显示该蛋白具有血红蛋白功能域, 含有 10 个潜在血红素结合位点。qRT-PCR 检测结果显示: 泥蚶不同组织部位中, Tg-HbIIA mRNA 在血液表达量最大, 其次为外套膜和鳃, 表达量最低的是肝胰脏; 在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、脂多糖、肽聚糖刺激后, 泥蚶血液 Tg-HbIIA mRNA 表达量显著上调, 表明 Tg-HbIIA 在贝类抗菌免疫防御中可能起重要作用, 而 Tg-HbIIA 对不同致病因子免疫反应的灵敏度和表达时序存在一定差异。

关键词 泥蚶, 血红蛋白, 菌刺激, mRNA 表达, 免疫反应

中图分类号 Q789

泥蚶(*Tegillarca granosa*)俗称血蚶、花蚶、粒蚶等, 隶属于瓣鳃纲, 是我国传统养殖贝类之一(孙长森等, 2010), 广泛分布于山东、浙江、福建、广东等地, 浙江是国内泥蚶养殖面积和产量最大的省份。近年来养殖泥蚶病害死亡频发, 因此, 开展泥蚶免疫发生机制和调控机理的研究对发展泥蚶健康养殖具有重要意义。孙虎山等(2001)和刘世良等(2003)认为贝类血细胞与脊椎动物血液内的免疫细胞相似, 承担部分免疫功能。Jiang 等(2007)研究发现人血红蛋白具有潜在类酚氧化酶活性, 能有效杀灭金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等细菌; Nedjar-Arroume 等(2008)发现牛血红蛋白水解片段对藤黄微球菌 A270 (*Micrococcus luteus* A270)等具有抑制作用, 说明哺乳动物血红蛋白具有一定的抗菌免疫作用。鲎(*Limulus*

polyphemus)、龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)、章鱼(*Octopus vulgaris*)和红皱岩螺(*Rapana venosa*)等无脊椎动物的血细胞中, 血蓝蛋白也具有酚氧化酶或类酚氧化酶活性, 可以杀灭细菌(Aspán *et al*, 1991; Salvato *et al*, 1998; Decker *et al*, 2001; Dolashki *et al*, 2011)。本研究以泥蚶为对象, 对泥蚶血红蛋白 Tg-HbIIA 基因进行克隆与分析, 并进行组织表达和免疫相关分析, 为探索贝类血红蛋白进化和抗菌免疫机制等提供参考。

1 材料与方法

1.1 泥蚶 Tg-HbIIA cDNA 全长克隆及核酸与氨基酸序列分析

通过 EST 序列分析, 发现一个 477bp 的 EST 序列与毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)血红蛋白 HbIIA

* 国家自然科学基金项目, 31001097 号; 浙江省自然科学基金项目, Y3100087 号; 国家贝类产业技术体系项目, CARS-48 号。汪 青, E-mail: yiyibajiu1189@126.com

通讯作者: 林志华, E-mail: zhihua9988@126.com; 包永波, E-mail: bobbao2001@gmail.com

收稿日期: 2010-09-21, 收修改稿日期: 2011-01-04

序列高度相似(89%), 以此 EST 序列设计特异引物 Tg-HbIIA-F, R 克隆 Tg-HbIIA 基因。见表 1。用 Tg-HbIIA-R 和通用载体引物 T3 进行 5'RACE 反应, 94℃ 40s, 56℃ 40s, 72℃ 1min, 72℃延伸 10min; 用 Tg-HbIIA-F 和通用载体引物 T7 进行 3'RACE 反应, 程序与 5'RACE 反应相同, 但退火温度为 58℃; 将 PCR 产物克隆进载体 pMD18-T simple vector (TaKaRa, Japan) 中, 并利用 M13-47 和 RV-M 引物双向测序并验证测序结果。使用 DNAMAN5.5.5 分析 Tg-HbIIA cDNA 的核酸和氨基酸序列; 使用 EMBOSS-MODEL 预测分子量和理论等电点(<http://isoelectric.ovh.org/>); 通过 NCBI Blast 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)将泥蚶和其它物种血红蛋白基因序列进行比对; 利用 NCBI CDD 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测蛋白结构域。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 The sequences of PCR Primers

引物名称	引物序列
Tg-HbIIA-F	5'-TTTGTTCCTTGAGACCAG-3'
Tg-HbIIA-R	5'-ATTCAATCTGGATGGGTCA-3'
Tg-18S rRNA-F	5'-CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT-3'
Tg-18S rRNA-R	5'-TCCCGTATTGTATTTTCGTCAC-3'
Tg-HbIIA-Real-F	5'-GCACAGGCTTAATGCTTATGGG-3'
Tg-HbIIA-Real-R	5'-ACATTTCAATCTGGATGGGTCA-3'
M13-47	5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'
RV-M	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3'
T3	5'-ATTAACCTCACTAAAGGGA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

1.2 Tg-HbIIA 多重序列比对与系统发生分析

利用 Mega 4.0 将 Tg-HbIIA 氨基酸序列进行多重序列比对和系统进化树构建(<http://www.megasoftware.net>), 并用 bootstrap 检测系统树的可靠性。

1.3 免疫刺激实验和组织收集

取壳长为 30mm 左右的泥蚶暂养于海水中 1 周时间, 实验期间水温约为 (27±2)℃, 每天更换新鲜海水。在免疫刺激实验中, 用灭菌海水清洗副溶血性弧菌, 并用灭菌海水和副溶血弧菌制成细菌悬液 (2×10⁸cfu/ml, pH 7.8—8.0), 取 20μl 细菌悬液分别注射至 50 个泥蚶的闭壳肌中作为弧菌组; 脂多糖(LPS, Sigma)组和肽聚糖(PGN, Sigma)实验组实验按上述方法实施(LPS 和 PGN 都需溶解在 0.85% NaCl 中, 浓度均

为 0.2mg/ml), 另取 50 个泥蚶注射灭菌海水作为对照组。在注射后 0h、1.5h、3h、6h、12h、24h、48h 每组分别抽取四个健康样本血液, 并离心 1000g 10min 收集血细胞。另取弧菌注射 12h 后的四个样本的 6 种组织(斧足、闭壳肌、外套膜、消化腺、鳃、血液)用以研究 Tg-HbIIA 组织特异性表达, 所有样本放入冻存管中液氮保存, 带回实验室提取 RNA。

1.4 泥蚶总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)试剂盒, 提取组织总 RNA, 并立即使用 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA)除去基因组 DNA, 将处理过的总 RNA 用 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)和引物 Oligo(dT)于 37℃ 下合成 cDNA。

1.5 Tg-HbIIA 基因表达实时定量分析

使用 Stratagene Mx3000P Real-time PCR 仪 (Stratagene, USA)和 SYBR Green quantitative real-time 试剂(TAKARA, Japan)对 Tg-HbIIA 在各组织中表达量和弧菌刺激后泥蚶血液 Tg-HbIIA 短期表达情况进行定量分析, 并用熔解曲线检验基因扩增特异性。用引物 Tg-18SrRNA-F, R 特异性扩增 18SrRNA, 扩增产物 195bp, 并将 18SrRNA 基因作为内参标校对 cDNA 模板量。Tg-HbIIA 特异性荧光定量引物分别为 Tg-HbIIA-Real-F, R, 扩增产物 185bp, 并对扩增产物电泳检验荧光定量 PCR 特异性。

待测基因和管家基因在同一个 96 孔板中进行荧光定量反应, 每个样品三个重复, 反应试剂、反应程序和数据分析参见文献(Bao *et al*, 2008; Livak *et al*, 2001)。所有数据以 Mean±S.E. (N=4)方式表示相对 mRNA 表达量, 并利用 SPSS 13.0 将平均值用 Student *t*-test 检验数据可靠性, one-way ANOVA 进行显著性分析, *P*<0.05 表示差异显著。

2 结果

2.1 Tg-HbIIA cDNA 克隆和序列分析

实验得到 Tg-HbIIA 完整序列, 共 731bp (Genebank 登录号: HQ729976)。cDNA 全长包含 63bp 5'非编码区(5'-UTR)、246bp 3'非编码区(3'-UTR)、终止密码子 TAA 和加尾信号 AATAAA 以及 poly A 尾巴, 450bp 开放阅读框, 编码 150 个氨基酸, 分子量 16.23kDa, 理论等电点 8.836, 该蛋白有具有血红蛋白功能域, 10 个潜在血红素结合位点(M³⁸、T⁴⁸、Y⁵¹、

```

1   ACTTTCGAGTCCAACCTTTTGTCTGAAAACGTTGTCTGCAAACGAGAAGAACTAAAGCAACA
61  AAAATGCTTTGATGTCAGCAGTTGCAAAATGATGCGGCAGTGATGCCATCAAGGCAACCTT
1   M V D A A V A N V C G S D A I K A N L
121 AGAAGAAGCTGGGCGATGTTATCAGCTGATATTGAAAGCACAGGCTTAATGCTTATGGGC
20  R R S W G M L S A D I E S T G L M L M G
181 AATTGTTTGCCTTGAGACCAGACACAAAATCTTACTTCACACGTTTAGGAGATGTACAA
40  N L F A L R P D T K S Y F T R L G D V Q
241 AAAGGAAAGGTAATTCAAATTGAGAGGACGCAATCACGTTGACATACGCACTCAAC
60  K G K G N S K L R G H A I T L T Y A L N
301 AACTTGTGACTCTCTTGATGACCCATCCAGATTGAAATGTGTTGTAGAAAAGTTTGCT
80  N F V D S L D D P S R L K C V V E K F A
361 GTTAATCATATTAACAGAAAAATCAGTGCCGAAGCATTCGGAGCAATCAATGAGCCCATG
100 V N H I N R K I S A E A F G A I N E P M
421 AAGGAGACATTGAAGGCTAGAATGGGAAGCTATTACAGTGATGAGTGTGCTGCTGCATGG
120 K E T L K A R M G S Y Y S D E C A A A W
481 GCCGCTCTGTGTGCTGTAGTCCAAGCTGCCTGTAAATGTAGTTATCTGGACCAACCAT
140 A A L V A V V Q A A L
541 CAATGGACATGCTTAACATTACACTCTACCAATTGTTGATGTTAGATACGTCACCTAGGA
601 GCAATGAACGATTATATCACTAAACATGTAGTTGATGTCGAATTGTTTGTGAGTGTTT
661 CTATTTTGTCTTAGTTTCTTCTGAATTCAATAAAACCTGTAGCATATAGAAAAA
721 AAAAAAAAAA

```

图 1 泥蚶 Tg-HbIIA 核酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of HbIIA in *T. granosa*

注: 有黑色框的核苷酸分别为推测的起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA, 以及 Poly(A) 加尾信号位点, 星号(*)表示终止密码子 TAA, 灰色底纹表示泥蚶 Tg-HbIIA 10 个潜在的血红素结合位点, 下划线表示血红蛋白结构域

F⁵²、H⁷⁰、T⁷³、N¹⁰¹、H¹⁰²、F¹¹²、I¹¹⁵)(图 1)。

2.2 Tg-HbIIA 同源比对与系统发生分析

Tg-HbIIA 和毛蚶、不等壳毛蚶 HbIIA 氨基酸序列多重比对, 显示泥蚶与毛蚶、不等壳毛蚶 HbIIA 氨基酸序列同源性显著, 一致度分别为 89%、88%; 与其它 2 种贝类的同源性较低(*Barbatia lima* 64%, *Anadara trapezia* 66%), 泥蚶与其它动物血红蛋白基因同源性较低(<40%), 软体动物血红蛋白基因有三个保守区域, 分别为 RLKCVV、KFAVNH 和 VVQAAL (图 2), 将泥蚶 2 种血红蛋白基因 Tg-HbI、Tg-HbIIA 和两种毛蚶的血红蛋白 HbIIA 基因以及人血红蛋白 HbA α 、 β 链进行氨基酸序列比对, 发现泥蚶中有 4 个非常重要且保守的氨基酸, F⁵²、H⁷⁰、H¹⁰² 和 F⁹⁸ (F⁹⁸ 在人血红蛋白中, 替换为 L)(图 3)。将 Tg-HbIIA 和其

它动物的血红蛋白氨基酸序列建立进化树(图 4)发现, 所有贝类血红蛋白聚成一类, 不等壳毛蚶和毛蚶首先聚类成独立一支, 再泥蚶 Tg-HbIIA 聚为一支, 而后与 *B. lima*、*A. trapezia*、泥蚶 Tg-HbI、*B. virescens* 聚为一支, 节肢动物聚成独立一支, 后与鱼类、哺乳动物等脊椎动物聚为一支, 软体动物 Hbs 与节肢动物和鱼类亲缘性较近, 但与哺乳动物较远, 符合一般的生物分类系统。

2.3 Tg-HbIIA mRNA 组织特异分布荧光定量检测

实验结果中荧光定量扩增溶解曲线呈单一峰状, 显示此次荧光定量 PCR 反应高度特异, 无非特异性扩增或二聚体干扰, 数据可靠, 实验得到 6 种组织 Tg-HbIIA 表达量数据显示 Tg-HbIIA 在血液中表达量最高($P<0.01$), 其次是鳃、外套膜、斧足和闭壳肌, 在消化腺中表达最低($P<0.01$)(图 5)。

2.4 菌刺激后 Tg-HbIIA 表达的短期变化

实验以 18S 逢源 rRNA 为内参, 应用 qRT-PCR 对弧菌(*V. parahaemolyticus*)、LPS、PGN 刺激后泥蚶血液 Tg-HbIIA mRNA 表达水平进行定量分析, 发现各组泥蚶血液 Tg-HbIIA mRNA 表达量显著上调(图 6)。弧菌组中, 菌刺激 1.5h 后 Tg-HbIIA mRNA 水平显著升高(4 倍于 0h, $P<0.05$); Tg-HbIIA mRNA 表达量从 1.5h 到 3h, 逐渐升高至 0h 的 16 倍; 从 3h 到 12h Tg-HbIIA mRNA 水平急剧升高到达峰值(0h 的 246 倍); 12h 到 24h 表达量快速降低, 但 48h 仍较初始表达值高 12 倍; LPS 组中, Tg-HbIIA mRNA 表达量变化方式与弧菌组相似, 在 12h 后达到 248 倍峰值; 但 6h 和 48h 后, LPS 组 Tg-HbIIA mRNA 表达量显著高于弧菌组和 PGN 组(分别为 0h 的 81 倍和 34 倍); PGN 组中, Tg-HbIIA mRNA 表达量也是快速上升后快速下降, 但 6h 后, PGN 组 Tg-HbIIA mRNA 表达量显著低于其它两组; 12h 后, PGN 组 Tg-HbIIA mRNA 表达量显著高于其它两组(0h 的 487 倍), 48h 后 PGN 组 Tg-HbIIA mRNA 表达量仍有 0h 的 9.2 倍。对照组与 0h 实验组表达量未有显著变化($P>0.05$)。实验 48h 内, 对照组和实验组无死亡个体。

3 讨论

通过已构建的泥蚶血液 cDNA 文库首次克隆了

泥蚶血红蛋白基因 Tg-HbIIA, 发现其全长为 731bp, 编码 150 个氨基酸, 分子量为 16.23kDa。蛋白结构预测表明, 泥蚶 HbIIA 10 个潜在的血红素结合位点(M³⁸、T⁴⁸、Y⁵¹、F⁵²、H⁷⁰、T⁷³、N¹⁰¹、H¹⁰²、F¹¹²、I¹¹⁵)在不壳毛蚶中具有同样保守性(Royer, 1994; Royer *et al*, 1995); 蚶科贝类与人血红蛋白 HbII A、B 链比对结果显示, F⁵²、H⁷⁰、H¹⁰² 和 F⁹⁸(F⁹⁸ 在人血红蛋白中被 L 替换)4 个氨基酸非常保守(图 3), 分别对应人血红蛋白 HbII A、B 链 CD1、E7、F8 和 F4 四个血红素结合位点, 该 4 个位点在其它无脊椎动物中也高度保守(Moens *et al*, 1996)。系统进化树分析表明, 泥蚶 Tg-HbIIA 与毛蚶和不等壳毛蚶亲缘关系最近(一致度为 89%和 88%), 与其它贝类血红蛋白基因亲缘关系较近(40%—66%), 但与节肢动物和脊椎动物亲缘较远。蚶科贝类作为少数具有血红蛋白的贝类, 其在动物进化中可能占有重要地位, 因此研究蚶科贝类基因结构和功能可以更加深入理解血红蛋白功能系统起源与进化规律。

在无脊椎动物与脊椎动物中, 已有研究发现血红蛋白具有抗菌免疫功能。本研究发现, 在菌刺激 12h 后, 泥蚶 6 种组织中都有 Tg-HbIIA mRNA 存在, 且血液表达量最高, 其次为鳃和外套膜, 表现出一定的组织特异性。分析认为一方面血红蛋白是血细胞主要组成成分, 在血液中表达量最高; 鳃是泥蚶呼吸器官, 存在大量的血细胞, 而血窦则位于泥蚶外套膜下方, 故泥蚶鳃和外套膜中检测出较高的 Tg-HbIIA mRNA 表达量, Montagnani 等(2001)亦指出, 血细胞分布于各组织中, 采样过程样品中往往有血液残留, 导致组织表达检测中有目标基因的污染; 另

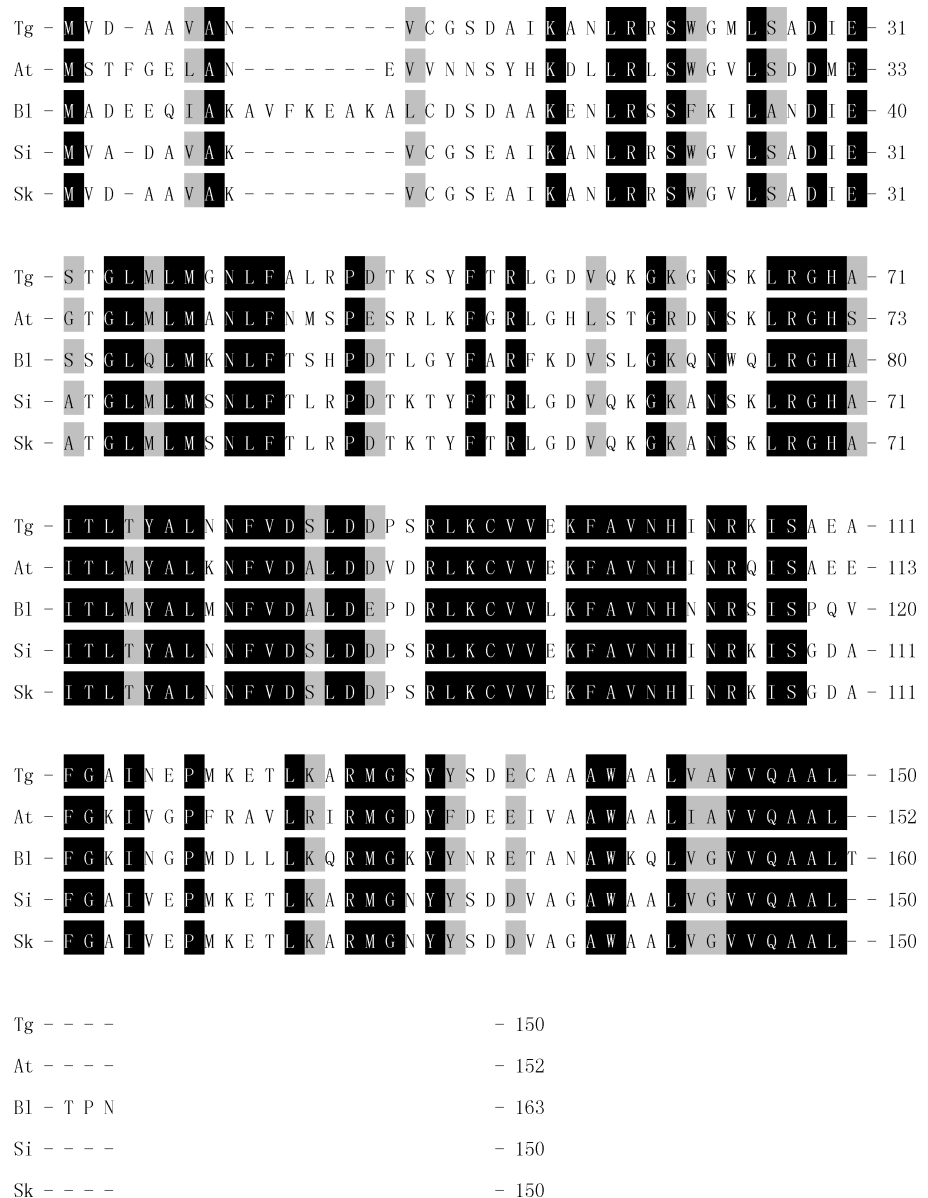


图 2 泥蚶与其它软体动物 HbIIA 氨基酸序列比对结果

Fig.2 Sequence alignment of HbIIA deduced amino acids from *T. granosa* and other mollusc
注: 相同氨基酸以黑色背景标示, 相似氨基酸以灰色背景标示。Tg 代表泥蚶; Si 代表不等壳毛蚶; Sk 代表毛蚶; At 代表 *A. trapezia*; Bl 代表 *B. lima*

一方面血红蛋白在泥蚶免疫刺激中可能起重要作用, 血液是泥蚶免疫防御的主要场所, 外套膜和鳃直接接触外界环境, 是泥蚶过滤防御细菌、病毒等第一道屏障(周永灿等, 1997)。但鳃和外套膜是否合成 Tg-HbIIA 并在抗菌免疫过程中发挥作用还有待进一步研究。

Decker 等(2004)提出动物机体直接抗菌策略, 即机体可利用入侵微生物的毒力因子使自身呼吸蛋白(血红蛋白或血蓝蛋白)自动氧化, 获得较高的制造活

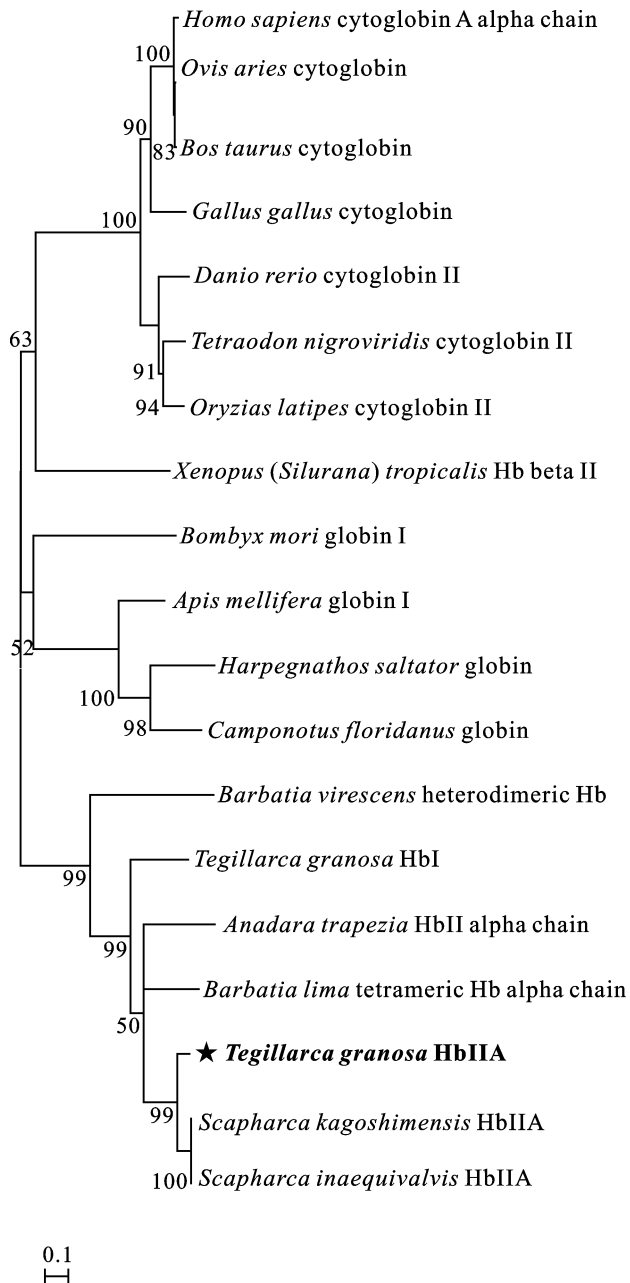


图 4 泥蚶 HbIIA 和其它动物血红蛋白系统进化树分析

Fig.4 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of Hbs of 19 species using MAGE 4.0 software

注: 进化树采用邻接法构建, 用 MEGA 4.0 软件完成, 并用 bootstrap 检验(分支处的数字)。泥蚶 Tg-HbIIA 用★黑体标示

刺激后, Tg-HbIIA 反应程度更为快速, 且效应持久; 在 PGN 刺激后, Tg-HbIIA 反应程度较其它两组缓慢但表达量更大, 因此推测相对于活菌, 细菌致病因子引起的反应更为强烈, 尤其革兰氏阳性菌致病因子; 而革兰氏阴性菌致病因子引起的反应则更为快速而持久。Bao 等(2011)对泥蚶血红蛋白基因 Tg-HbI 的研究与本实验结果相似, 并认为泥蚶血红蛋白具有一

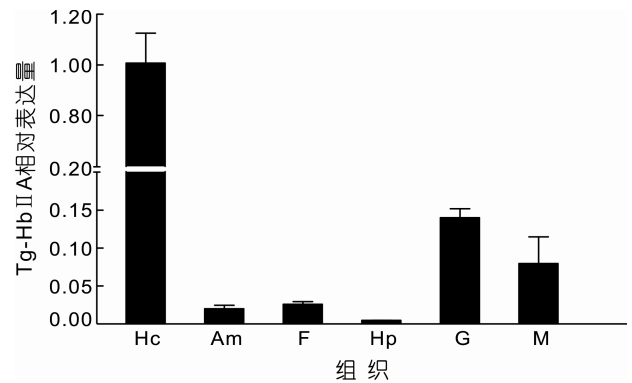


图 5 泥蚶 Tg-HbIIA 组织表达特异性荧光定量分析(Y轴截断柱状图)

Fig.5 Real-time analysis of tissue-specific expression of HbIIA in *T. granosa* (Chart with broken Y axis)

注: Hc: 血液; Hp: 肝胰腺; Am: 闭壳肌; F: 斧足; G: 鳃; M: 外套膜, 以肝胰腺中 Tg-HbIIA mRNA 为基础值

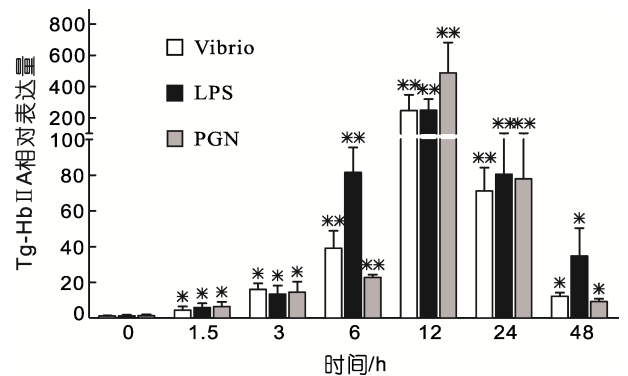


图 6 副溶血弧菌、脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)刺激后泥蚶血液 Tg-HbIIA 表达水平分析

Fig.6 Real-time analysis of the relative expression of HbIIA gene in haemocytes of *T. granosa* challenged by *V. parahaemolyticus*, Lipopolysaccharide and Peptidoglycan

注: 将 0h 与菌刺激后各时间段进行比较, *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示极显著 ($P < 0.01$)(Y 轴截断柱状图); 以各组 0h 血液中 Tg-HbIIA mRNA 为基础值

定的免疫相关性。已有研究证明软体动物罗马蜗牛、红皱岩螺、乌贼、章鱼(Siddiqui *et al*, 2006; Salvato *et al*, 1998; Dolashki *et al*, 2011)等血蓝蛋白具有酚氧化酶活性, 可以杀灭细菌, 然而同样作为呼吸蛋白的泥蚶血红蛋白是否具有直接抗菌功能需要通过蛋白层面研究进一步验证。

参 考 文 献

- 刘世良, 麦康森, 2003. 贝类免疫系统和机理的研究进展. 海洋学报, 25(2): 95—105
- 孙长森, 林志华, 董迎辉等, 2010. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)主要经济性状遗传参数的估算. 海洋与湖沼, 41(6): 907—

913

- 孙虎山, 李光友, 2001. 栉孔扇贝血细胞的吞噬作用及其扫描电镜研究. 高技术通讯, 11(4): 5, 16—19
- 周永灿, 潘金培, 1997. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展. 水产学报, 21(4): 449—454
- Aspán A, Söderhäll K, 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochem, 21: 363—373
- Bao Y, Li L, Zhang G, 2008. The manganese superoxide dismutase gene in bay scallop *Argopecten irradians*: cloning, 3D modelling and mRNA expression. Fish and Shellfish Immunology, 25: 425—432
- Bao Y, Wang Q, Lin Z H, 2011. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbI) is involved in the immune response against bacterial infection. Fish & Shell fish Immunology, 31: 517—523
- Decker H, Jaenicke E, 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Developmental and Comparative Immunology, 28(7—8): 673—687
- Decker H, Ryan M, Jaenicke E *et al*, 2001. SDS-induced phenol-oxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. J Biol Chem, 276: 17796—17799
- Dolashki A, Voelter W, Dolashka P, 2011. Phenoloxidase activity of intact and chemically modified functional unit RvH1-a from molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 160(1): 1—7
- Jiang N, Tan N S, Ho B *et al*, 2007. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. Nature Immunology, 8(10): 1114—1122
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. Methods, 25: 402—408
- Moens L, Vanfleteren J, Peer Y Van de *et al*, 1996. Globins in nonvertebrate species: dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. Molecular Biology and Evolution, 3(2): 324—333
- Montagnani C, Le Roux F, Berthe F *et al*, 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. FEBS Letters, 500: 64—70
- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adjeer Y *et al*, 2008. Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. Peptides, 29: 969—977
- Royer W E Jr, 1994. High-resolution crystallographic analysis of a co-operative dimeric hemoglobin. Journal of Molecular Biology, 235(2): 657—681
- Royer W E Jr, Heard K S, Harrington D J *et al*, 1995. The 2.0Å crystal structure of *Scapharca* tetrameric hemoglobin: cooperative dimers within an allosteric tetramer. Journal of Molecular Biology, 253(1): 168—186
- Salvato B, Santamaria M, Beltrami M *et al*, 1998. The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: odiphenol oxidase activity. Biochemistry, 37: 14065—14077
- Siddiqui N I, Akosung R F, Gielens C, 2006. Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. Biochem Biophys Res Commun, 348(3): 1138—1144

CLONE AND ANALYSIS OF HEMOBLOBIN GENE (Tg-HbIIA) AND IMMUNE EXPRESSION RESEARCH IN *TEGILLARCA GRANOSA*

WANG Qing^{1,2}, LIN Zhi-Hua¹, BAO Yong-Bo¹, HUO Li-Hui^{1,3}, GU Hai-Long^{1,2}

(1. College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 3. College of Life Sciences and Bioengineering, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract The Tg-HbIIA cDNA was cloned and then the bioinformatics, expression and immune defense analysis of Tg-HbIIA cDNA were carried out. The full length of Tg-HbIIA cDNA was 731bp, which consists of an open reading frame of 450bp encoding a polypeptide of 150 amino acids, a 5'-UTR of 63bp and a 3'-UTR of 246bp; the deduced amino acid sequence of Tg-HbIIA shared 89% and 88% similarity with HbIIA from two species of the genus *Scapharca* respectively. The structure prediction of Tg-HbIIA showed the hemoglobin domain and the ten potential heme binding sites. The mRNA expression of Tg-HbIIA in haemocytes was detected highest in all the clam cells/tissues including haemocytes, adductor muscle, foot, hepatopancreas, gill and mantle. The Quantitative Real-time PCR showed that the mRNA transcript level of Tg-HbIIA, significantly up-regulated after *Vibrio parahaemolyticus*, Lipopolysaccharide and Peptidoglycan challenge which indicated that Tg-HbIIA was involved in the immune defense responses against bacterial infection and exposure to bacterial pathogenic factors. However, the temporal and level of expression were different in three challenge groups.

Key words *Tegillarca granosa*, Hemoglobin, Bacteria challenge, mRNA expression, Immune response