

重金属胁迫对泥蚶(*Tegillarca granosa*)能量代谢酶 转录水平的研究*

张春丹¹ 周君¹ 李晔¹ 李成华¹ 苏秀榕¹ 李太武^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 利用 PCR 扩增技术, 从泥蚶的 cDNA 文库中克隆出了 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因。F₀F₁-ATP 合酶是生物体能量代谢的重要合成酶, ATP 合酶 F₁-β 亚基是其重要组成部分。序列分析结果表明, 泥蚶的 ATP 合酶 F₁-β 亚基全长 1944bp, 包括 5' 端非翻译区(5'-UTR)序列 246bp, 3' 端非翻译区(3'-UTR)序列 126bp 和 1572bp 的开放阅读框序列(ORF), 编码 523 个氨基酸, 预测分子量大小和等电点分别为 54.13kDa 和 4.73。在重金属镉、铜、铅胁迫下, 检测 ATP 合酶 F₁-β 亚基和精氨酸激酶基因在转录水平的调控变化。

关键词 泥蚶, 重金属, ATP 合酶 F₁-β 亚基, 精氨酸激酶, 荧光定量 PCR

中图分类号 Q346

泥蚶(*Tegillarca granosa*), 俗称血蚶、蚶子等, 隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae)、泥蚶属(*Tegillarca*), 是一种栖息于沿海滩涂的广温性双壳贝类, 广泛分布于黄、渤海以南的沿海地区, 为我国沿海常见种, 是我国四大传统养殖贝类之一(王日昕等, 2005; 苏秀榕等, 2005)。

随着社会经济的迅速发展, 大量富含重金属的工业污水排入海洋, 使海洋受到污染, 特别是给沿海地区的泥蚶养殖业带来了巨大的影响。泥蚶在重金属浓度过高的养殖水体中, 其生长、发育均会受到不同程度的影响, 甚至死亡。目前, 泥蚶在重金属胁迫环境下的研究已有报道, 如在泥蚶中的行为研究(刘琴, 2008)¹⁾、免疫相关基因的调控(Jin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011)、对重金属的生物富集动力学等(李学鹏等, 2008)。但是, 关于重金属胁迫下泥蚶能量代谢相关酶的研究目前还未见相关文献报道。

ATP 合酶是生物体内催化合成 ATP 的关键酶, 而位于 ATP 合酶上的β亚基是其催化中心(赖呈纯等,

2010); 精氨酸激酶为无脊椎动物的生命活动提供能量, 并维持 ATP 的动态平衡(Ellington, 2001), 两者在无脊椎动物的能量代谢中起到了至关重要的作用。

本研究克隆了泥蚶 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因, 并选取 ATP 合酶 F₁-β 亚基及精氨酸激酶为研究对象, 检测了在重金属镉、铜、铅胁迫下的变化, 探讨其对重金属的代谢适应机制, 有助于阐明重金属胁迫对泥蚶能量代谢的影响机制, 同时也可作为贝类养殖环境的调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用泥蚶购自宁波镇海水产市场; 泥蚶 cDNA 文库由实验室构建(贺静静等, 2009), pMD18-T 和 *rTaq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自上海捷瑞生物公司, 其它试剂均购自上海生工生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 泥蚶 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因的克隆 泥蚶

* 国家自然科学基金项目, 30771665 号。张春丹, 实验师, 博士研究生, E-mail: zhangchundan@nbu.edu.cn

1) 刘琴, 2008. 重金属 Pb、Cd 和 Cr 在泥蚶中的行为研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 16—21

通讯作者: 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-23, 收修改稿日期: 2012-02-14

cDNA 文库测序后, 经 BlastN 分析得到与已知物种 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因类似片段。根据已获得的 EST 序列设计扩增 5' 端的引物 F1: 5'-ACCAACAACGGAT ACAACTCT-3', 和文库质粒 pDNR-LIB 的 M13-47 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 2.5 μ l 10 \times buffer、1.5 μ l Mg^{2+} (25mmol/L)、2.0 μ l dNTP (2.5mmol/L)、0.5 μ l cDNA 文库质粒为模板、引物各 1 μ l (10 μ mol/L)、1U *rTaq*, ddH₂O 补足至 25 μ l。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收后测序。将测序返回的结果和文库获得的已知序列拼接后, 得到 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因的全长序列。

1.2.2 泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因的生物信息学分析 利用 DNASTar 软件, 预测开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)并对其编码的氨基酸序列进行比对; 使用 <http://kr.expasy.org/tools/> 网站中的工具分析蛋白质的基本理化性质; NCBI 网站中的 BlastX 比对序列相似度, 利用 MEGA 3 软件构建系统进化树。

1.2.3 重金属胁迫下对泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因表达的影响 利用实时荧光定量 PCR 方法, 以泥蚶 β -actin 为内参基因, 检测重金属胁迫下对泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因在不同时间段转录水平的影响。实验具体方法为: 将泥蚶分为四组, 分别为 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 实验组和对照组(每组样本 > 50 个), 实验组在海水中分别加入终浓度为 10 μ mol/L 的 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 。在 0、6、12、24 和 48h 五个时间点, 每组分别提取血细胞和肝胰腺的总 RNA, 利用 M-MLV 第一链反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA 作为模板。根据 β -actin 与 ATP 合酶 F_1 - β 亚基 ORF 序列, 设计荧光定量 PCR 引物 F2: 5'-GTGTTGGCGTACAAGTCCT-3'、F3: 5'-CCGCTTCTTCATCCTCAT-3'和 F4: 5'-ATACGGACAGATGAACGAG-3'、F5: 5'-GGAATACGACCCAACAAA-3'。使用 QIAGEN 公司的 RotorGene 6000 PCR 仪进行扩增, 扩增程序为预变性 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 54 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20s; 进行 40 个循环, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行分析。

1.2.4 重金属胁迫下对泥蚶精氨酸激酶基因表达的影响 具体实验方法同上, 根据精氨酸激酶 ORF 序列设计引物 F6: 5'-TAAGTTCTGCCCTCAGTCAC-3'和 F7: 5'-TATCCACCAGCATCTCCCA-3'进行荧光定量 RCR 检测。反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 53 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20s; 40 个循环, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行分析。

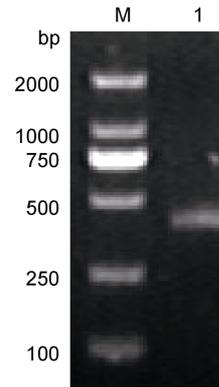


图 1 泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因 5' 端序列扩增电泳图谱
Fig.1 The pattern of 5' region sequence of *T. granosa* ATP synthase F_1 - β subunit
注: M. DL2000 DNA Marker, 1. 泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因 5' 端序列扩增产物

2 结果

2.1 泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因的克隆

以泥蚶 cDNA 文库质粒为模板, 利用引物 F1 和 M13-47 扩增得到 5' 端的特异序列片段大小约为 450bp(图 1)。测序后与文库已获得的部分片段进行拼接, 获得基因 cDNA 的全长序列。cDNA 序列(图 2)全长为 1944 bp, 包括 5' 非翻译区(Untranslated Region, UTR)序列 246bp, 3'-UTR 序列 126bp 和 1572bp 的 ORF, 编码 523 个氨基酸, 预测分子量和等电点分别为 54.13kDa 和 4.73。

2.2 泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因的生物信息学分析

利用 Expasy 网站的 Predict-Protein 在线工具分析, 结果显示预测蛋白质存在 N-糖基化位点 NITG 和 NTSK, N-酰基化位点 9 个, 依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 KKGS, 蛋白激酶 C 磷酸化位点 8 个, 酪蛋白激酶磷酸化位点 7 个, 酪氨酸激酶磷酸化位点 RGISELGIY, ATP/GTP 结合位点基序 A-GGAG VGKT 和 ATP 合酶 α 和 β 亚基标签序列 PAVDPLDSNS; SignalP 分析 5' 端无信号肽。

将泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因与已报道的各种 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因进行同源性分析, 利用 MEGA 3 软件, 采用邻位相连法(Bootstrap=1000)构建系统进化树。结果表明(图 3), ATP 合酶 F_1 - β 亚基序列与合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)的相似度最高, 单独成为一支, 与脊椎动物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)的距离比节肢动物丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)和棘皮动物紫石海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的距离更近, 与弓形虫(*Toxoplasma gondii*)的进化距离最远。利用 BlastX 比对泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基氨基酸序列, 结果显示, 泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基与合浦珠母贝(*P. fucata*)相似度最高, 达到 85%, 与其它上述物种相似度也在 70% 以上。

2.3 重金属胁迫对泥蚶 ATP 合酶 F_1 - β 亚基基因表达的影响

在不同重金属胁迫下, 泥蚶肝胰腺组织中 ATP

```

CGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCTAGAGATTTGTAACACGCGCCAGTAGACTGTAAACGACTCAC 75
TATAGGGCGTAGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGAGGAGTCACTGAGCGAGGAGGAGCGCCGATAACTT 150
CGTATAGCATACATTATACCAAGTTATCAGTCGCGGTTACCGGACATATGCCCGGAAATTCGCCATTACGGCCG 225
GGGGACAAAAGCCGGTGGCCATGATGCGAGCAGTTCCGGCAAGCATGACTGGAGTTTGGAGGGCGAGAAAGCC 300
      M M Q A V R Q A C T G V L R A T K A
GCCTTCTCAACCCAGGAGTACAAAATAAGCTGCAAACTCCTCCCTGGTTATTTACCACACATCGACAATAT 375
A F S T P G V Q N K A A N L L P G Y F T T H R Q Y
GCAACAGAACCAGCAGCTGCTGAGGTAACATCAGGGCAGAGTTGTATCCGTTGGTACCGTTGAGACGTA 450
A T E P A A A A G N I T G R V V S V V G T V V D V
CAGTTTATGATGACTTACCATACTCTAAATGCCTTGGAGGTCAAAGGTAGACAACCCAGACTCATTCTGGAA 525
Q F D D D L P S I L N A L E V K G R Q P R L I L E
GTTGCACACATTAGGTGAAGCAGAGTAAACAATGCTATGGACGGTACAGAAGGTTAGCTAGAGGTACA 600
V A Q H L G E S T V R T I A M D G T E G L A R G T
GAATGTATCGACATTTGGTACTCCAATTCAGTCCGACCAACATTTGGTGAATTTATCAATGTAAT 675
E C I D I G T P I R I P V G I K V A T L D L R I N Y A K
GGTGAACCAATGATGAAAGGGGACCAGTAAATACAGACAAATATGCAGTATCCATGCTGAAGTCCAGAATCT 750
G E P I D E R G P V N T D K Y A A I H A E A P E S
GTAGAAATGAGTGCAGAACAAATCTTAAAGACTGGTATTAAGTTGAGACTTATGGCCGCATATGCCAAG 825
V E M S V E Q E I L E T P V I K V V D L R A P Y A K
GGAGTAAATTTGGCTTTTCGGAGGTGCAGGAGTAGGAAAGACTGTATTGATTATGGAAGTATTAACAATGTA 900
G G K I G L F G G A G V G K T V L I M E L I N N V
GCTAAAGCTCATGGTGTACTCAGTGTTCGTTGGAGTAGGAGAAAGCAGAGAAGAAATGACTTGTACCAT 925
A K A H G G Y S V F A G V G E R T R E G N D L Y H
GAAATGATCAGTCAAAAGTCATCAGCTTACAGACAAACATCAAAGGTATCTTTGGTATACGGACAGATGAAC 1050
E M I T S K V I S L T D N T S K V S L V Y G Q M N
GAGCCCCAGGAGCCGCTGCTGAGCTTTAACAGGGTTGACTGTGCTGAGTATTTCCGTGACAGGAAGGA 1125
E P P G A R A R V A L T G L T V A E Y F R D Q E G
CAGGATGATTTGTTATTTATGACAAACATTTTCAGATTCACACAGGCTGGTTCAGAGGTATCTGCTTTGGTGGT 1200
Q D V L L F I D N I F R F T Q A G S E V S A L L G
CGTATTCATCAGCTGATGTTACCAACCAACATTTGCCACTGATATGGTACTATGAGGAAAGAAATACAAAC 1275
R I P S A V G Y Q P T L A T D M G T M Q E R I T T
ACCAAAAAGGATCCATTAGTACAGGCTATTTACGTACCTGACAGATTTGACAGATCTGCTGCCCCAGCC 1350
T K K G S I T S V Q A I Y V P A D D L T D P A P A
ACAACATTCGCTCACTTGGACGCCCACTGTATTTGCTCGTGGTATTTCTGAGTTGGTATCTACCCAGCTGTA 1425
T T F A H L D A T T V L S R G I S E L G I Y P A V
GATCCTCTGGATTTCAACTCTTGTATCCTTGATATCAACGCTGAGGAGAACAACTTACACTGTGCTCGTGGT 1500
D P L D S N S C I L D I N V V G E Q H Y T V A R G
GTACAGAAGATCCTCAGGATTACAAATCCCTTCAGGATATTTATGCTATCTTGGTATGGATGAATGTCAGAA 1575
V Q K I L Q D Y K S L Q D I I A I L G M D E L S E
GAAGACAAAATGACTGTGCCGTCGCGTAAAGTCCAGAAATTTGTCACAACCCCTCCAGGTAGCTGAAGTG 1650
E D K M T V S R A R K I Q K F L S Q P F Q V A E V
TTTACTGGCTTTGAAGAAAATATGTACCCTTATAGAAACAATTAAGGGATTGAAAAGATTTAAATGGCGAA 1725
F T G F E G K Y V P L I E T I K G F E K I L N G E
TTTGTATGATGACAGAGGTAGCTTTTACATGGTTGGCCCAATGAAGAGGTAGTAGCAAGGCTGAAAGACTA 1800
F D H V P E V A F Y M V G P I E E V V A K A E R L
GCTGAAGAACAGTCATAACGTACAGTACATTTAGAACTGAAAATTTTATTTGGAAATAATTAGTGTATATTTA 1875
A E E Q S .
AAAAAAGCTGGAAATTTAAAGTTGTGTGTGTCAGGATATACGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1944

```

图2 泥蚶 ATP 合酶 F₁-β 亚基 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig.2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *T. granosa* ATPsynthase F₁-β subunit

合酶 F₁-β 亚基基因的转录水平均呈现上升趋势(图 4)。Cu²⁺、Pb²⁺胁迫下, 在 24h 表达量达到最高, 分别为 3.79 倍和 3.92 倍; 而 Cd²⁺胁迫下则为 48h, 表达量为正常的 3.81 倍。在泥蚶血细胞中, ATP 合酶 F₁-β 亚基 mRNA 表达量出现波动(图 5), 总体上呈增加的趋势。在 Cu²⁺、Pb²⁺及 Cd²⁺胁迫下, mRNA 表达量最高的时间点分别为 24h、24h 和 6h, 为正常的 3.74 倍、3.60 倍和 2.58 倍。

2.4 重金属胁迫对泥蚶精氨酸激酶基因表达的影响

在不同重金属胁迫下, 泥蚶肝胰腺组织中精氨酸激酶基因的转录水平均呈现下降的趋势(图 6), mRNA 的表达量均在 24h 下降到最低水平。在血细胞

中, 精氨酸激酶基因转录水平均出现了大幅下调(图 7), 在 Cd²⁺及 Pb²⁺胁迫下, 达到最低水平后, 随着时间的延长有恢复的趋势; Cu²⁺胁迫下不同的时间点 mRNA 的表达量则出现波动。

3 讨论

ATP 合酶是生物体能量代谢最为关键的酶, 其包含 F₁ 和 F₀ 两个功能结构域, 参与 ATP 的合成与水解。ATP 合酶 F₁-β 亚基是 ATP 合酶的催化中心, 具有 ATP 的合成与水解活性(俞丽丽等, 2008; 赖呈纯等, 2010)。因此对泥蚶 ATP 合酶 F₁-β 亚基的研究可以直接反映出 ATP 合酶与重金属离子胁迫的关系。本实验克隆了泥蚶 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因, 全长为 1944bp, 其中 ORF 为 1572bp, 编码 523 个氨基酸, 预测分子量大小和等电点分别为 54.13kDa 和 4.73。该基因与其它软体动物 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因有着较高的相似性。

肝胰腺是多种营养代谢和储存的主要场所, 新陈代谢非常旺盛, 并且在消除毒性物质对机体的影响方面发挥着重要作用。肝胰腺能将外源或内源的有毒物质转变为无毒或毒性较小的物质, 加速其排出体外, 从而维持机体正常的生理功能(金芬芬等, 2011)。血细胞在软体动物抵御外界刺激、保持机体正常代谢过程中起了重要的作用, 因此选择这两个组织作为检测对象。在重金属

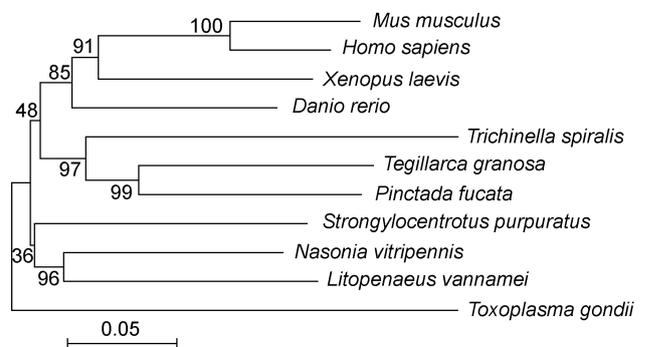


图3 泥蚶 ATP 合酶 F₁-β 亚基序列构建系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree constructed with the gene sequence of *T. granosa* ATPsynthase F₁-β subunit

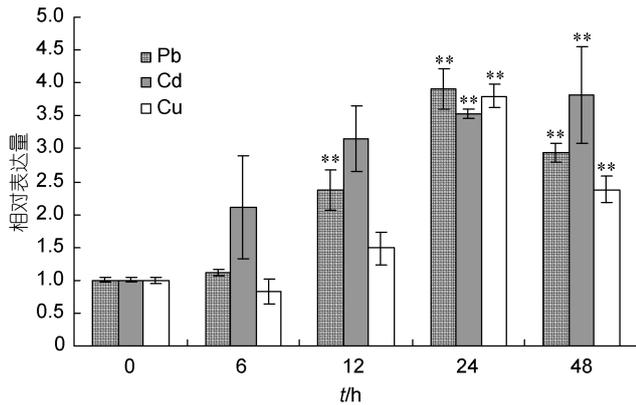


图 4 荧光定量 PCR 检测重金属离子对泥蚶肝胰腺中 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因的影响

Fig.4 Real-time PCR of *T. granosa* ATPsynthase F₁-β subunit gene in hepatopancreas exposed to heavy metalions
注: n=3, *P<0.05, **P<0.01

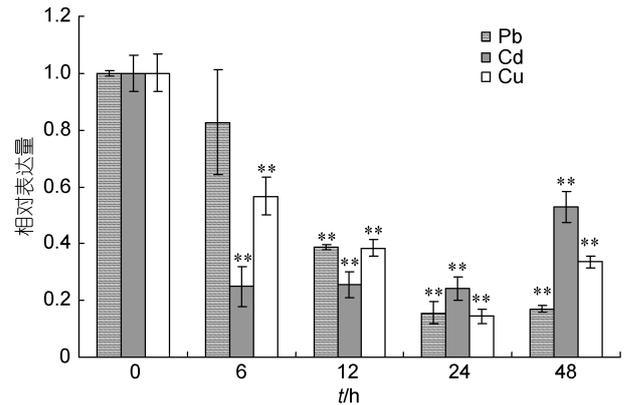


图 6 荧光定量 PCR 检测重金属离子对泥蚶肝胰腺中精氨酸激酶基因的影响

Fig.6 Real-time PCR of *T. granosa* arginine kinase gene in hepatopancreas exposed to heavy metalions
注: n=3, *P<0.05, **P<0.01

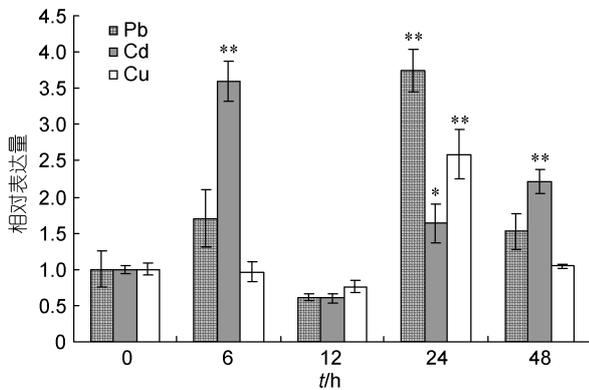


图 5 荧光定量 PCR 检测重金属离子对泥蚶血细胞中 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因的影响

Fig.5 Real-time PCR of *T. granosa* ATPsynthase F₁-β subunit gene in haemocytes exposed to heavy metalions
注: n=3, *P<0.05, **P<0.01

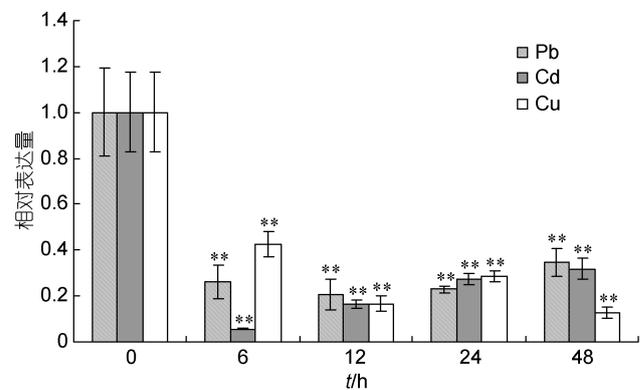


图 7 荧光定量 PCR 检测重金属离子对泥蚶血细胞中精氨酸激酶基因的影响

Fig.7 Real-time PCR of *T. granosa* arginine kinase gene in haemocytes exposed to heavy metalions
注: n=3, *P<0.05, **P<0.01

离子处理后, 泥蚶肝胰腺的 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因转录水平在两个组织中总体水平都有提高, 这说明泥蚶机体对重金属离子引起的一系列毒害作用进行抵抗, 机体解毒的过程中, 需要 ATP 合酶作为机体合成大量 ATP 而产生能量的主要酶, 因此其转录水平提高。在不同组织中, 肝胰腺的 ATP 合酶 F₁-β 亚基基因转录水平均有较明显的提高, 而在血细胞中先上升后降低, 而后又出现升高的趋势, 这可能是因为在不同的组织在机体应对重金属离子胁迫下所起的作用不同。

精氨酸激酶是无脊椎动物体内调节能量代谢的重要酶类之一, 它能够可逆地催化无脊椎动物体内高能磷酸键在精氨酸和 ADP 之间的转移。当无脊椎动物体内能量充足时, 精氨酸激酶催化形成磷酸精

氨酸储存能量, 在机体能量需求过大时, 将磷酸精氨酸中的高能磷酸键转移给 ADP 形成 ATP 及精氨酸 (Ellington, 1989)。精氨酸激酶不仅对维持无脊椎动物体内 ATP 的动态平衡及能量代谢起了重要的作用, 而且还直接或间接地参与机体的免疫应答(管越强等, 2009)。在 Cd²⁺、Cu²⁺和 Pb²⁺的胁迫下, 泥蚶肝胰腺和血细胞中精氨酸激酶的表达降低, 在 48h 内均受到了抑制。有研究表明, 在 Cd²⁺胁迫下, 中华绒螯蟹鳃的精氨酸激酶表达量明显减少(Silvestre *et al*, 2006); 也有研究发现, 用 Cu²⁺处理后的丰年虾幼虫, 精氨酸激酶的表达量明显下降(Zhou *et al*, 2010)。另有研究显示, Cu²⁺对海参精氨酸激酶的活性有明显的抑制作用(刘陶陶等, 2011)。这说明 Cd²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺等重金属

离子对精氨酸激酶的表达及活性有明显的抑制作用, 从而破坏无脊椎动物体内能量平衡, 影响其能量代谢。而对于重金属离子影响精氨酸激酶表达的机制还需要进一步深入研究。

近年来, 随着沿海地区经济的发展, 重金属污染可能是水体污染的主要因素之一, 对泥蚶的养殖造成了非常大的影响, 也对泥蚶基础生物学研究提出了更高的要求。利用现代生物学技术研究泥蚶能量代谢变得越来越重要。作为泥蚶体内重要的能量代谢酶, ATP 合酶 F_1 - β 亚基的克隆及其与精氨酸激酶在重金属离子胁迫下的表达特征研究具有重要的意义。

参 考 文 献

- 王日昕, 李太武, 吕振明等, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究. 海洋与湖沼, 36(3): 227—234
- 刘陶陶, 王希成, 2011. 铜离子对海参精氨酸激酶活力与结构的影响. 海洋科学, 35(1): 17—21
- 苏秀榕, 吕振明, 李太武等, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)个体发育过程中同工酶基因表达与调控的研究. 海洋与湖沼, 36(1): 81—87
- 李学鹏, 励建荣, 段青源等, 2008. 泥蚶对重金属铜、铅、镉的生物富集动力学. 水产学报, 32(4): 592—600
- 金芬芬, 徐 团, 秦圣娟, 2011. 镉对长江华溪蟹肝胰腺线粒体抗氧化酶活力和脂质过氧化水平的影响. 水生生物学报, 35(6): 1019—1024
- 俞丽丽, 张元军, 张 霞等, 2008. 人 F_1F_0 -ATP 合酶 β 亚基的原核表达、纯化及抗体制备. 细胞与分子免疫学杂志, 24(3): 253—256
- 贺静静, 李 晔, 李太武等, 2009. 泥蚶(*Tegillarca granosa*) cDNA 文库的构建及铁结合蛋白基因(Ferritin)序列分析. 海洋与湖沼, 40(3): 289—295
- 赖呈纯, 赖钟雄, 方智振等, 2010. 龙眼胚性愈伤组织线粒体 ATP 合酶 β 亚基基因克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析. 中国农业科学, 43(16): 3392—3401
- 管越强, 王慧春, 李 利, 2009. 硫化物胁迫对日本沼虾呼吸代谢和能量代谢酶的影响. 生态环境学报, 18(6): 2017—2012
- Ellington W R, 1989. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens. J Exp Biol, 143(1): 177—194
- Ellington W R, 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annu Rev Physiol, 63: 289—325
- Jin C H, Li C H, Su X R *et al*, 2011. Identification and characterization of a *Tegillarca granosa* ferritin regulated by iron ion exposure and thermal stress. Dev Comp Immunol, 35: 745—751
- Li C H, He J J, Su X R *et al*, 2011. A manganese superoxide dismutase in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 159: 64—70
- Silvestre F, Dierick J F, Dumont V *et al*, 2006. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium. Aquatic Toxicol, 76(1): 46—58
- Zhou Q, Wu C G, Dong B *et al*, 2010. Proteomic analysis of acute responses to copper sulfate stress in larvae of the brine shrimp, *Artemia sinica*. Chin J Oceanol Limnol, 28(2): 224—232

THE STUDY OF HEAVY METAL STRESS EFFECTS ON THE TRANSCRIPTIONAL LEVEL OF ENERGY METABOLISM ENZYMES OF *TEGILLARCA GRANOSA*

ZHANG Chun-Dan¹, ZHOU Jun¹, LI Ye¹, LI Cheng-Hua¹, SU Xiu-Rong¹, LI Tai-Wu^{1,2}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract By the PCR method, the full length ATP synthase F_1 - β subunit gene was cloned from cDNA library of *Tegillarca granosa*. F_0F_1 -ATP synthase is the crucial enzyme in energy metabolism and β subunit is the important component of F_0F_1 -ATP synthase. Sequence analysis indicated that total of the gene contain 1944bp, including a 5'-terminal untranslated region (UTR) of 246bp, a 3'-UTR of 126bp and a 1572bp open reading fragment (ORF), encoding 523 amino acid residues, calculated molecular weight and predicted pI were 54.13kDa and 4.73, respectively. After exposed to cadmium, copper and lead, the transcriptional levels of ATP synthase F_1 - β subunit and arginine kinase gene were measured.

Key words *Tegillarca granosa*, Heavy metal, ATP synthase F_1 - β subunit, Arginine kinase, Fluorescence quantitative PCR