

栉孔扇贝 BI-1 基因的克隆与表达分析*

苗国英^{1,2} 亓海刚¹ 李 莉¹ 阙华勇¹ 张国范¹ 胡晓丽³

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 中国海洋大学 青岛 266003)

提要 本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术首次获得了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) BI-1 基因(CfBI-1) cDNA 全长序列, 长度 957bp, 5'和 3'非编码区长度分别为 48bp 和 195bp, 开放阅读框为 714bp, 预测编码一个含有 237 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 27kDa; 结构预测显示, CfBI-1 蛋白包含 6 个跨膜结构域。同源和分子进化聚类分析显示, CfBI-1 蛋白序列与其他一些物种中的 BI-1 蛋白序列相似性很高, 表明 BI-1 具有很高的保守性。通过荧光定量 PCR 的方法检测了 CfBI-1 mRNA 在栉孔扇贝正常组织中和在干露、脂多糖以及扇贝急性病毒性坏死病毒感染后的表达水平的变化。结果表明, CfBI-1 在栉孔扇贝各组织中广泛分布, 其中闭壳肌中的表达量最高, 血淋巴中的表达量最低。在干露和病毒刺激以后, CfBI-1 基因表达水平较对照组都有显著上调($P < 0.05$), 表明 CfBI-1 基因可能参与了干露刺激和急性病毒性坏死病毒感染后的细胞应激响应及其诱导的细胞凋亡过程。综合上述分析, 我们认为 CfBI-1 基因在栉孔扇贝细胞凋亡调控过程中可能起到重要作用, 可为栉孔扇贝凋亡相关基础研究提供参考。

关键词 栉孔扇贝; BI-1 基因; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 Q78 **doi:** 10.11693/hyhz20140100005

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国重要的养殖贝类, 自然分布于我国北方黄渤沿海以及朝鲜和日本沿海(王如才等, 1993)。贝类的大规模人工繁育以及养殖生产实践表明, 优良种质是决定贝类产业能否健康可持续发展的首要因素, 选育抗逆性强、生长性状优良的品系, 是贝类育种的重要目标(张国范, 2006)。开展栉孔扇贝功能基因研究, 有助于从分子水平上研究重要生命现象的基本规律, 推动栉孔扇贝基础研究并为良种选育提供参考。

凋亡(apoptosis)是细胞在特定应激条件下或者特定发育阶段下发生的可调控的死亡现象, 又称细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)。凋亡本质上是一种具有自我保护和调节性质的细胞死亡事件, 涉及一系列相关基因的激活、表达及调控等作用, 是由基因控制的基本生物学过程之一(张晓晖等, 2002)。

Bax Inhibitor-1 (BI-1)基因是一种细胞凋亡调控

因子, 存在于所有脊椎动物中, 该基因主要定位于大鼠的 7 号染色体、小鼠的 15 号染色体、猪的 5 号染色体和人的 12q12-q13 (Walter *et al*, 1994, 1995; Kim *et al*, 2003)。该基因首先是在 1994 年由 Walter 等人小鼠的睾丸基因库中发现的, 并命名为 TEGT (testis enhanced gene transcript) (Walter *et al*, 1995), 其后 Xu 等(1998)在酵母中克隆出了能抑制 Bax 作用的基因, 命名为 Bax Inhibitor-1, 即 BI-1。BI-1 蛋白是一个大小为 25—27kDa 的跨膜蛋白, 一般含有 6—7 个跨膜结构域(Bolduc *et al*, 2003; Kawai-Yamada *et al*, 2004), 主要定位在细胞的内质网膜、核外膜, 包含多个苏氨酸磷酸化位点, 但缺乏 O-糖基化位点及 N-糖基化位点(Xu *et al*, 1998; Kawai-Yamada *et al*, 2001; Bolduc *et al*, 2003)。BI-1 基因主要通过参与线粒体和内质网途径发挥对细胞凋亡的调节功能(Kawai *et al*, 1999; Tsujimoto *et al*, 2003; Chae *et al*,

*典型海洋生物重要功能基因开发与利用资助项目, 2012AA092204 号; 贝类产业技术体系项目, CARS-48 号; 泰山学者及泰山攀登计划。苗国英, 硕士研究生, Email: miaoguoying@126.com

通讯作者: 阙华勇, 研究员, E-mail: hque@qdio.ac.cn

收稿日期: 2014-01-06, 收修改稿日期: 2014-03-31

2004)。

BI-1 基因作为一种重要的凋亡调控因子, 在一些物种中已有了深入的研究(Hückelhoven *et al*, 2001; Bolduc *et al*, 2002; Coupo *et al*, 2004; Watanabe *et al*, 2009), 但是在贝类中的分子类型和作用还没有被揭示。因此, 本研究通过 RACE 技术克隆了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中的 BI-1 基因全长 cDNA 序列, 并进一步采用荧光定量 PCR 技术揭示了该基因在栉孔扇贝不同组织中的表达情况和在不同应激条件下的表达变化特点。本研究旨在为开展栉孔扇贝 BI-1 基因的功能以及栉孔扇贝凋亡相关基础研究提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用栉孔扇贝(壳长 50mm±5mm)均来自青岛胶南山东头村扇贝养殖场, 扇贝取回后清除表面污物和附着生物, 于 18°C 海水中充气暂养, 每日更换过滤海水, 并投喂三角褐指藻、金藻和螺旋藻粉混合饵料, 一周后用于实验。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

取健康的栉孔扇贝, 抽取其血液, 按照 Trizol 法提取总 RNA。总 RNA 的完整度用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。取 1μg 总 RNA, 参照乐陶宛 Fermentas 公司的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明, 反转录合成 cDNA 模板, 置于 -20°C 的冰箱保存备用。

1.3 CfBI-1 基因 cDNA 片段的克隆

在 GenBank 上找到人、非洲爪蟾、果蝇等物种的 BI-1 蛋白序列, 并将这些序列用 tBLASTn 程序与栉孔扇贝转录组测序序列进行比对, 得到了与这些物种 BI-1 相近的基因片段, 根据期望值、相似度、得分等参数将基因片段筛选, 从而获得 CfBI-1 基因的候选序列片段。根据获得的基因片段设计扩增引物 F1 和 R1 (表 1)。以栉孔扇贝的 cDNA 为模板, F1 和 R1 为引物, 进行 CfBI-1 基因片段的扩增与测序验证。PCR 反应体系为 25μL, 反应条件如下: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 56°C 退火 30s 和 72°C 延伸 1min, 35 个循环; 72°C 延伸 10min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小后, 产物使用 DNA 胶回收试剂盒(上海生物工程技术服务公司)回收目的片段产物。回收的目的片段连接到 PMD19-T 载体(TaKaRa), 重组质粒转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(北京全式金

生物技术公司), 涂板, 37°C 过夜培养, 挑取抗氨苄青霉素的阳性克隆, 菌落 PCR 验证目的片段符合预期大小后, 送上海生物工程技术服务公司测序。

1.4 CfBI-1 基因全长 cDNA 的获得

采用巢式 PCR 和 RACE 方法扩增基因的 3' 和 5' 末端。上述测序结果经过 BLASTx 比对后验证为 CfBI-1 基因片段, 根据其分别设计 3'RACE 和 5'RACE 的引物 3'F1、3'F2、5'R1、5'R2 (表 1)。3' 末端首轮 PCR 反应体系为 Premix LA Taq 12.5μL, 引物 3'F1 1μL, Oligo(dT)-adapterprimer(dTAP) 2.5μL, 模板 cDNA 1μL, 灭菌双蒸水 8μL; 反应程序为: 94°C 预变性 5min; 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min 30s, 35 个循环; 72°C 延伸 10min。第二轮 PCR 引物为 3'F2 和 AP (表 1), PCR 模板为首轮扩增产物, 退火温度为 56°C, 其他条件同首轮。5' 末端扩增时, 首先使用末端转移酶在 cDNA 3' 末端加上 poly C 尾, 以加尾的 cDNA 为 PCR 模板; 首轮 PCR 反应体系为 Premix LA Taq 12.5μL, 引物 5'R1 和 Oligo(dG)-adapterprimer(dGAP) (表 1) 各 1μL, 模板 1μL, 灭菌双蒸水 9.5μL; 反应程序: 94°C 预变性 5min; 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1min 30s, 35 个循环; 72°C 延伸 10min。次轮 PCR 引物为 5'R2 和 AP, PCR 模板为首轮扩增产物, 退火温度为 58°C, 其他条件同首轮。PCR 扩增产物的电泳检测、回收纯化、克隆测序等操作同上述 cDNA 片段克隆。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

名称	序列(5'→3')	用途
F1	ATGAACCGACACTCAGAAAGAAACC	cDNA 片段克隆
R1	TTAATTCCTATCCTTCTCTTGTC	cDNA 片段克隆
3'F1	GGTTGTGTCTGGCTGGACTCCTAAA	3'RACE
3'F2	GTTGGTCTGTTTGTGTTTTGTGCCT	3'RACE
5'R1	GAACATAGGCCCCAGCGAAGGCGGT	5'RACE
5'R2	AATAACTGTGGTGGAGGAAATTGGT	5'RACE
dTAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT16	3'RACE
dGAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACG10	3'RACE
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'和 5'RACE
CfBI-1F'	TATCCTGACCATGCTTGCCCTATTG	荧光定量 PCR
CfBI-1R'	CAGGTCCAAGTGACATTCCTGAGAA	荧光定量 PCR
β-actinF'	CAAAACAGCAGCCTCCTCGTCAT	荧光定量 PCR
β-actinR'	CTGGGCACCTGAACCTTTTCGTT	荧光定量 PCR

1.5 CfBI-1 基因的序列分析和系统进化分析

用 Bioedit 软件对上述所获测序序列进行全长拼接; ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

projects/gorf/)预测开放阅读框, 并获得编码的氨基酸序列; 用 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白结构域的预测; 从 GenBank 下载小鼠、人、斑马鱼、紫贻贝等物种的 BI-1 基因的蛋白序列, 用 ClustalX 程序进行蛋白多序列比对后, 用 MEGA5.0 程序中的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建基因系统发生树。

1.6 干露刺激

将 60 只暂养一周的栉孔扇贝放于干燥的玻璃板上, 室温温度控制在 20℃, 分别在 0、2、4、6、8、12、24h 随机取 6 只扇贝, 取血淋巴, 500g, 4℃, 离心 10min, 弃上清, 留血淋巴用于 RNA 制备。

1.7 脂多糖(LPS)刺激

将 100 只暂养一周的栉孔扇贝随机分为两组, 每组约 50 只, 为实验组和对照组, 分别养殖在两个水池中。实验组的扇贝每只注射 100μL LPS (0.5mg/mL), 对照组的扇贝每只注射 100μL 灭菌的磷酸盐缓冲液(PBS)。分别在注射 0、3、6、12、24、48、72h 从各组随机取 6 只扇贝, 取血淋巴, 500g, 4℃, 离心 10min, 弃上清, 留血淋巴用于 RNA 制备。

1.8 急性病毒性坏死症病毒(Acute Viral Necrobiotic Disease Virus, AVNV)刺激

将急性病毒性坏死症病毒所感染的组织(由黄海水产研究所王崇明老师提供)称重, 每克组织加 9mL 的 PBS 缓冲液, 冰浴研磨匀浆, 4℃, 4000×g 离心 5min, 将上清液移到新的离心管中, 将沉淀再进行一次研磨, 8000×g 离心 5min, 将两次的上清液合并到一个管中, 13000×g 离心 10min, 澄清的组织匀浆在无菌的条件下, 用 2、0.8、0.22μm 的滤膜过滤, 将所得到的滤液-20℃保存备用。

将 120 只栉孔扇贝随机分为两组, 每组约 60 只, 为实验组和对照组。实验组的扇贝每只注射 100μL 的病毒液, 对照组的扇贝每只注射 100μL 的灭菌的 PBS。分别于注射后 0、3、6、12、24、48、72h 从各组随机取 6 只扇贝, 取血淋巴, 500×g, 4℃, 离心 10min, 弃上清, 留血淋巴用于 RNA 制备。

1.9 CfBI-1 基因的表达分析

参照 Trizol(Invitrogen)说明书提取栉孔扇贝各组织(血淋巴、鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、消化腺)及干露、LPS、病毒刺激实验样品的总 RNA, 用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara)试剂盒合成一链 cDNA 用于荧光定量表达分析。根据栉孔扇贝 BI-1 基因和内参基因 β -actin (GenBank 序列

号为 AAP88387), 分别设计一对荧光定量的引物 CfBI-1F'和 CfBI-1R', β -actinF'和 β -actinR' (表 1)。荧光定量 PCR 的反应体系为 20μL: 2×SYBR® Premix Ex Taq™ 10μL cDNA 模板 2μL, 荧光定量引物各 0.4μL, 50×ROX Reference Dye II 0.4μL, DEPC 水 6.8μL。每个样品设置 3 个重复。反应程序为 95℃ 预变性 2min; 95℃ 15s, 60℃ 25s, 68℃ 20s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 CfBI-1 基因的表达量, 并采用 SPSS 18.0 软件和 SAS 9.1 软件分别进行 one-way ANOVA 分析和 Duncan 检验, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 CfBI-1 基因的全长 cDNA 序列分析

根据设计的特异性引物克隆得到 CfBI-1 基因的部分片段, 然后根据该片段设计 RACE 引物进行 3' 和 5'端的扩增, 得到 3'和 5'末端的序列, 最后拼接得到一条完整的 cDNA 序列。其全长为 957bp (Genbank 注册号为 KF913642), 其开放阅读框(ORF)长度为 711bp, 5'非编码区(5'-UTR)为 48bp, 3'-UTR 为 195bp, 3'-UTR 区含有多腺苷酸化加尾信号 aataa (图 1)。CfBI-1 基因预测编码一个含有 237 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 27kDa, 结构域预测发现 CfBI-1 蛋白含有六个跨膜结构域。

2.2 CfBI-1 基因的系统进化分析

将 CfBI-1 蛋白序列与其他物种的同源蛋白在 ClustalX 中进行多序列比对分析发现, 栉孔扇贝 BI-1 基因与小鼠 (*Mus musculus*)、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)、人 (*Homo sapiens*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)及果蝇 (*Drosophila melanogaster*)的 BI-1 氨基酸同源性分别为 48.95%、63.56%、49.37%、49.79%和 36.29% (图 2)。使用 MEGA 软件构建 BI-1 氨基酸系统进化树显示, 栉孔扇贝 BI-1 基因与紫贻贝聚为一支, 之后又与猪蛔虫 (*Ascaris suum*)和斑马鱼等聚类 (图 3)。该基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致。

2.3 CfBI-1 基因的表达分析

2.3.1 CfBI-1 基因在各组织的表达分析 通过 Real-time PCR 技术检测 CfBI-1 基因在栉孔扇贝不同组织中的表达情况, 结果显示, CfBI-1 在所检测的鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、消化腺和血淋巴六个组织中均有表达, 且在闭壳肌中表达量最高, 而在血淋巴中表达量最低(图 4)。

I M N R H

```

1  tgacgaagacgacaatcggaagcgaccgttgcataaaagcagaaaaATGAACCGACAC
5  S E R N Q F P P P Q L F K F D N L E N H
61 TCAGAAAGAAACCAATTTCTCCACCACAGTTATTCAAATTTGATAACTTGGAGAACCAT
25 V Q D H L K R V Y G C L S I S M F T A F
121 GTTCAGGATCATCTGAAGAGGGTGTATGGCTGCCTCTCCATCTCCATGTTACCGCCTTC
45 A G A Y V H L Y T A W L Q A G I L T M L
181 GCTGGGGCCTATGTTACCTGTACACAGCCTGGCTACAGGCTGGTATCCTGACCATGCTT
65 A S L G L M F W L A A T H H S K E N E T
241 GCCTCATTTGGGCCTGATGTTTGGCTTGCCGCTACCCATCACTCGAAGGAGAATGAAACC
85 K R L G I F A G F T F F S G M S L G P V
301 AAGAGACTGGGTATCTTTGCTGGCTTCACATTCTTCTCAGGAATGTCACTTGGACCTGTC
105 L D Y V I M V D P S I I V T A L M G T S
361 TTGGACTACGTCATCATGGTTGACCCAAGCATCATCGTGACAGCACTCATGGGAATTCA
125 V I F I S F S L A A L F N N N R T F L Y
421 GTCATTTTCATTAGTTTTTCACTGGCAGCTCTGTTCAATAACAACCGTACCTTCTGTAC
145 M G G F L L S A L S W L C L A G L L N I
481 ATGGGAGGATTCTTTTGTAGTGCATTGAGCTGGTTGTGTCTGGCTGGACTCCTAAACATT
165 F I G S S L I W Q A Q I Y V G L F V F C
541 TTCATCGTTCAAGTTTAATCTGGCAGGCTCAGATCTATGTTGGTCTGTTTGTGTTTTGT
185 A F V L Y D T Q M I V E R K R M G D G D
601 GCCTTCGTGCTGTACGATACCCAGATGATCGTAGAGAGGAAACGAATGGGCGACGGTGAC
205 Y I W H S V S L F L D F M H I F R R L L
661 TACATCTGGCATAGTGTGAGTTTGTCTTGGACTTCATGCATATCTCCGTCGTCTCCTC
225 I I L A S K D K K K D R N *
721 ATCATTCTGGCCAGCAAGGACAAGAAGAAGGATAGGAATTAAAgagatggacaattgacaa
781 gatttggcagatggctgttattgagatgactactccaaaacatgtaaagaaagtctta
841 catcctgaagtacaggatcatggatagcatacaagaattataacagaactgtactttta
901 aaataaaaaatatttggatgaaatgtgctacagagttttggaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 CfBI-1 基因 cDNA 全长及预测的氨基酸序列

Fig.1 CfBI-1 full-length cDNA and deduced amino acid sequence

小写字母代表 UTR 序列, 大写字母代表编码序列; 方框分别表示起始密码子和终止密码子; 方框分别代表翻译的起点和终点; 下划线代表跨膜结构域; 双划线代表加尾信号

2.3.2 CfBI-1 基因在干露刺激下的表达分析
Real-time PCR 检测了栉孔扇贝在干露刺激后不同时间点血淋巴中的 BI-1 基因的表达变化(图 5)。结果表明: 在干露刺激初期(0—2h), BI-1 基因的表达水平没有明显变化; 在干露刺激后 4h, BI-1 基因的表达水平迅速升高, 达到 0h 的约 3.09 倍($P<0.05$); 在干露刺激后 6h, BI-1 基因的表达水平达到最高, 约为 0h 的 25.50 倍($P<0.05$), 在刺激后期(8—24h), BI-1 基因的表达水平略有下降, 但与 0h 仍有显著性差异($P<0.05$)。

2.3.3 CfBI-1 基因在 LPS 刺激下的表达分析
Real-time PCR 检测了栉孔扇贝在 LPS 刺激后不同

时间点血淋巴中的 BI-1 基因的表达变化(图 6)。结果表明, 在 LPS 刺激的过程中, 实验组与对照组的表达均没有明显升高, 并且两组之间没有明显差异。

2.3.4 CfBI-1 基因在急性病毒性坏死症病毒刺激下的表达分析
Real-time PCR 检测了栉孔扇贝在急性病毒性坏死症病毒刺激后不同时间点血淋巴中的 BI-1 基因的表达变化(图 7)。结果表明: 在病毒刺激以后, 实验组的 BI-1 基因的表达水平呈现先升高后下降的趋势, 在刺激后 24h, 实验组的表达量为对照组的 1.82 倍($P<0.05$), 在病毒刺激后 48h 实验组达到最高值, 约为对照组的 1.75 倍($P<0.05$)。

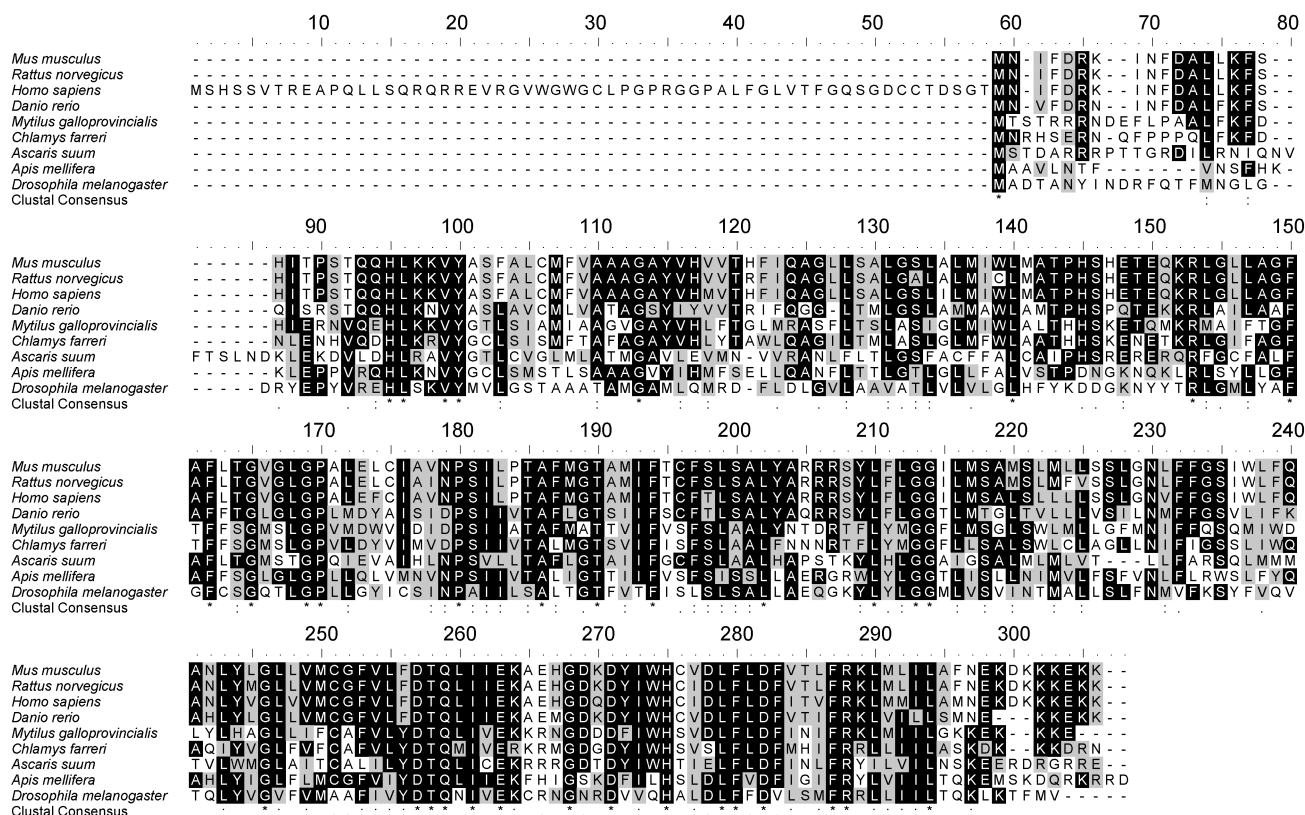


图2 不同物种 BI-1 氨基酸序列多重比对分析

Fig.2 Multiple alignment of the amino acid sequence of BI-1 among different species

阴影区显示同源性的氨基酸。Mus musculus: 小鼠; Rattus norvegicus: 大鼠; Homo sapiens: 人; Ascaris suum: 猪蛔虫; Danio rerio: 斑马鱼; Apis mellifera: 蜜蜂; Mytilus galloprovincialis: 紫贻贝; Chlamys farreri: 栉孔扇贝; Drosophila melanogaster: 果蝇

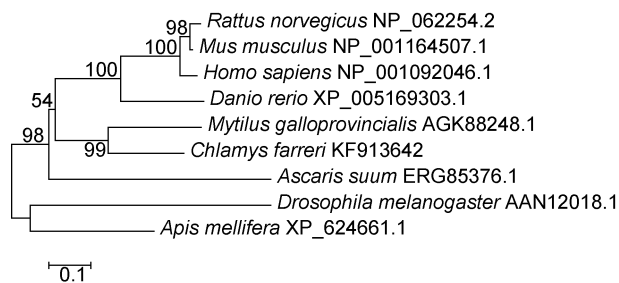


图3 CfBI-1 基因的 NJ 系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree of the CfBI-1 gene sequences

Mus musculus NP_001164507.1: 小鼠; Rattus norvegicus NP_062254.2: 大鼠; Homo sapiens NP_001092046.1: 人; Danio rerio XP_005169303.1: 斑马鱼; Mytilus galloprovincialis AGK88248.1: 紫贻贝; Chlamys farreri KF913642: 栉孔扇贝; Ascaris suum ERG85376.1: 猪蛔虫; Drosophila melanogaster AAN12018.1: 果蝇; Apis mellifera XP_624661.1: 蜜蜂

3 讨论

目前, 在水生生物中 BI-1 基因的研究还比较少, 尤其是在贝类中的特点和功能仍有待研究和揭示。本研究首次通过 RACE 技术获得了栉孔扇贝 BI-1 基因

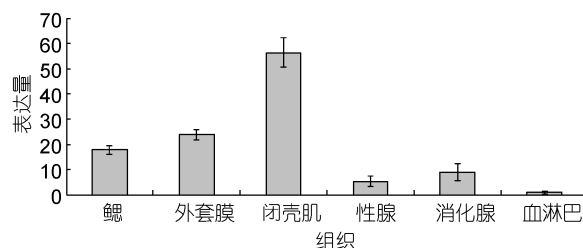


图4 CfBI-1 基因在栉孔扇贝不同组织中的表达

Fig.4 Expression levels of CfBI-1 in different tissues of Chlamys farreri

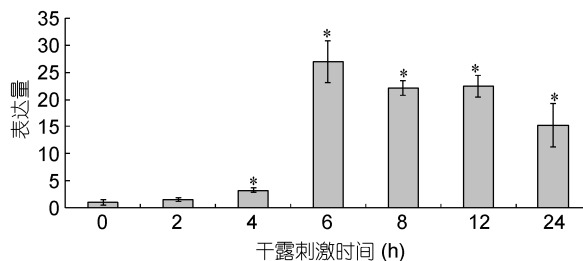


图5 CfBI-1 基因在干露刺激后的表达水平

Fig.5 Expression levels of CfBI-1 under air exposure stimulation

的 cDNA 序列, 并获得可能的编码蛋白序列。同源分

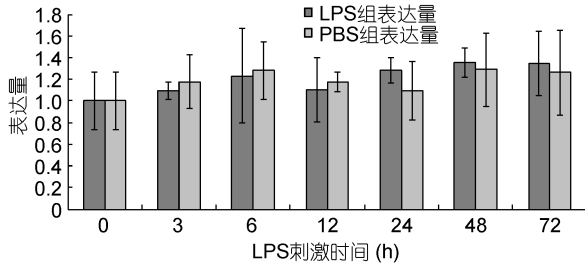


图 6 CfBI-1 基因在 LPS 刺激后的表达水平

Fig.6 Expression levels of CfBI-1 under lipopolysaccharide (LPS) stimulation

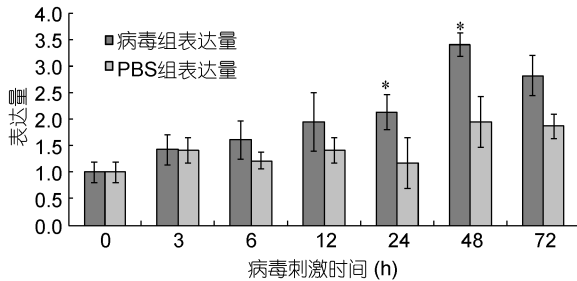


图 7 CfBI-1 基因在急性病毒性坏死症病毒刺激后的表达水平
Fig.7 Expression levels of CfBI-1 under acute viral necrobiosis disease virus (AVNV) stimulation

析和分子进化聚类分析结果显示, CfBI-1 蛋白序列与其他一些物种 BI-1 序列具有很高的相似性, 表明该基因在进化上和功能上的高度保守性。BI-1 蛋白在哺乳动物和植物中主要定位在细胞的内质网膜、核外膜, 蛋白包含多个苏氨酸磷酸化位点, 但缺乏 O-糖基化位点及 N-糖基化位点(Xu *et al.*, 1998; Kawai-Yamada *et al.*, 2001; Bolduc *et al.*, 2003), 结构域预测 CfBI-1 蛋白含有六个跨膜结构域, 表明 CfBI-1 蛋白在栉孔扇贝中的细胞定位可能与哺乳动物相同。

BI-1 基因不仅在人体心脏、胎盘、脑、肝、肺、骨骼肌等组织中广泛表达(Adams *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998), 且在多种恶性肿瘤细胞中高度表达, 这与其对凋亡的抑制作用紧密相关(Villalva *et al.*, 2002; Grzmil *et al.*, 2003)。本研究发现 CfBI-1 基因在栉孔扇贝的鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、消化腺和血淋巴六个组织中均有表达, 表明 CfBI-1 对栉孔扇贝的正常生命活动起到一定作用, 且表达无明显的组织特异性; 在闭壳肌中表达量显著高于其他组织, 表明在闭壳肌中较高浓度的 BI-1 蛋白抑制细胞凋亡水平对维持闭壳肌正常生理功能可能有重要作用。

为进一步探究 CfBI-1 基因在栉孔扇贝中的功能, 本研究分别检测了干露、LPS 和急性病毒性坏死症病毒刺激栉孔扇贝后 CfBI-1 基因的表达变化。在干露

和病毒刺激以后, 在不同时间点, 表达水平发生了明显的升高, 而在 LPS 刺激以后没有明显变化, 说明不同的刺激源引起的细胞应激类型、细胞凋亡程度和凋亡信号通路可能有所不同。干露作为一种物理刺激, 主要导致扇贝处于脱水低氧的胁迫状态, 在干露刺激后 4—6h CfBI-1 表达即显著上调, 上调幅度较大, 能够维持至刺激后 24h, 说明 CfBI-1 基因参与了细胞干露应激的响应过程, 干露可能会在较短时间内导致细胞内稳态变化并启动凋亡程序。病毒刺激后 24、48h CfBI-1 表达显著高于对照, 表明 CfBI-1 基因参与了病毒介导的免疫反应。Taura 综合症病毒感染后的南美白虾中包含 BI-1 结构域的基因表达量也显著上调(Zeng *et al.*, 2013), 与我们的研究结果类似。但是病毒刺激后 CfBI-1 上调幅度较小, 72h 后表达量开始回落, 推测病毒感染后免疫反应导致的细胞凋亡程度可能低于干露刺激。而在 LPS 刺激后, 在 0—72h 内均未观察到 CfBI-1 表达变化, 表明 CfBI-1 对 LPS 刺激无明显响应过程。综上, 我们认为 CfBI-1 基因参与了干露刺激和急性病毒性坏死症病毒感染应激过程, 在这些刺激所导致的细胞凋亡过程中可能发挥重要凋亡调节功能。

致谢 感谢中国水产科学研究院黄海水产研究所王崇明老师提供扇贝急性病毒性坏死症病毒病料组织。

参 考 文 献

- 王如才, 王昭萍, 张建中, 1993. 海水贝类养殖学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 156
- 张国范, 2006. 海洋贝类遗传育种研究 20 年. 厦门大学学报(自然科学版), 45: 190—194
- 张晓晖, 姚天明, 黄高昇等, 2002. 细胞凋亡的最新研究进展. 第四军医大学学报, 23(1): 42—44
- Adams M D, Kerlavage A R, Fleischmann R D *et al.*, 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*, 377(6547 Suppl): 3—174
- Bolduc N, Brisson L F, 2002. Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Letters*, 532(1): 111—114
- Bolduc N, Ouellet M, Pitre F *et al.*, 2003. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta*, 216(3): 377—386
- Chae H J, Kim H R, Xu C *et al.*, 2004. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Cell*, 15(3): 355—366
- Coupe S A, Watson L M, Ryan D J *et al.*, 2004. Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase

- homologues. *Journal of Experimental Botany*, 55(394): 59—68
- Grzmil M, Thelen P, Hemmerlein B *et al*, 2003. Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *The American Journal of Pathology*, 163(2): 543—552
- Hückelhoven R, Dechert C, Trujillo M *et al*, 2001. Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*, 47(6): 739—748
- Kawai M, Pan L, Reed J C *et al*, 1999. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS letters*, 464(3): 143—147
- Kawai-Yamada M, Jin L, Yoshinaga K *et al*, 2001. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21): 12295—12300
- Kawai-Yamada M, Ohori Y, Uchimiya H, 2004. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *The Plant Cell Online*, 16(1): 21—32
- Kim J, Nonneman D, Vallet J *et al*, 2003. Linkage mapping of the porcine testis enhanced gene transcript (TEGT) gene to chromosome 51, 2. *Nature*, 409: 934—941
- Tsujimoto Y, 2003. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of Cellular Physiology*, 195(2): 158—167
- Villalva C, Tremat P, Greenland C *et al*, 2002. Isolation of differentially expressed genes in NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 118(3): 791—798
- Walter L, Dirks B, Rothermel E *et al*, 1994. A novel, conserved gene of the rat that is developmentally regulated in the testis. *Mammalian genome*, 5(4): 216—21
- Watanabe N, Lam E, 2009. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(7): 3149—3167
- Walter L, Marynen P, Szpirer J *et al*, 1995. Identification of a novel conserved human gene, TEGT. *Genomics*, 28(2): 301—304
- Xu Q, Reed J C, 1998. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular Cell*, 1(3): 337—346
- Zeng D, Chen X, Xie D *et al*, 2013. Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas in response to Taura syndrome virus (TSV) experimental infection. *PloS One*, 8(2): e57515

CLONING AND EXPRESSION OF BAX INHIBITOR-1 GENE OF ZHIKONG SCALLOP *CHLAMYS FARRERI*

MIAO Guo-Ying^{1,2}, QI Hai-Gang¹, LI Li¹, QUE Hua-Yong¹, ZHANG Guo-Fan¹, HU Xiao-Li³

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract The full length cDNA of Bax inhibitor-1 in Zhikong scallop *Chlamys farreri* (CfBI-1) was first cloned using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). A 957-bp sequence was acquired. The sequence contains a 48-bp 5' untranslated region (5'-UTR), a 195-bp 3'-UTR, and an open reading frame (ORF) of 714bp encoding a polypeptide of 273 amino acid in molecular weight of 27kDa. The homology and phylogenetic analysis revealed that the amino acid sequence of CfBI-1 showed high homology with that of other species, indicating that CfBI-1 was highly conservative. We used quantitative real-time PCR to estimate mRNA expression level of CfBI-1 in various tissues and its induced expression following air exposure stimulation, lipopolysaccharide infection, and scallop acute viral necrobiotic disease virus (AVNV) infection. The results show that CfBI-1 expression existed in all tested tissues of *Chlamys farreri*, including adductor muscle, digestive gland, gill, mantle, gonad, and haemolymph. CfBI-1 expression was the highest in adductor muscle and lowest in haemolymph. The levels of CfBI-1 mRNA increased clearly after air exposure stress and AVNV infection, implying that CfBI-1 may be involved in the apoptosis process induced by air exposure stimulation and AVNV infection. Therefore, CfBI-1 may play an important role in apoptosis of *Chlamys farreri*, which will provide new data for apoptosis study of the scallop.

Key words *Chlamys farreri*; BI-1; gene cloning; gene expression