

杂色鲍 C 型溶菌酶基因的克隆及表达分析

张 洁^{1,2}, 王国栋^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农村农业部北方海水养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了了解 C 型溶菌酶与杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 的抗菌效应关系, 通过 SMART-RACE 技术克隆到一条杂色鲍 C 型溶菌酶基因 (*HdLysC*) 全长 cDNA, 经生物信息学分析及应激表达分析得到以下结果: 1) 基因全长 591 bp, 开放阅读框 441 bp, 编码 146 个氨基酸, 有 1 个 LYZ1 功能域 (20—146aa)、1 个保守基序 (G/T) SSDYGLFQINS 和两个催化位点 (Glu⁵² 和 Asp⁷⁰)。2) 多重比对和系统发育分析表明, *HdLysC* 与亲缘关系较近的盘鲍 (*Haliotis discus discus*) C2 型溶菌酶基因的同源性最高。3) 组织表达差异实验表明, *HdLysC* 基因在各组织中均有表达且差异显著 ($P < 0.01$), 在外套膜组织中的表达量最高, 而在血淋巴中的表达量最低。4) 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验表明, *HdLysC* 能够响应副溶血弧菌感染, 其表达水平随着感染的不同时相而变动。在副溶血弧菌感染 4 h 后, *HdLysC* 在血淋巴组织中表达量增加 (未达到显著差异), 而在鳃组织中表达量有所下降; 感染 12 h 后, *HdLysC* 在各组织中的表达量都有明显的增加, 呈极显著差异 ($P < 0.01$), 尤其在血淋巴中增加最多; 感染 24 h 后, 其表达量在各组织中都有所降低。

[关键词] 杂色鲍; C 型溶菌酶; 基因克隆; 表达分析

[中图分类号] S 917

Molecular Cloning and Expression Analysis of C-Type Lysozyme Gene in *Haliotis diversicolor*

ZHANG Jie^{1,2}, WANG Guodong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Mariculture for North of Agriculture, Xiamen 361021, China)

Abstract: To understand the relationship between C-type lysozyme in the *Haliotis diversicolor* and the anti-bacterial effect of heterosorbide, the full-length of C-type lysozyme gene cDNA sequence was cloned by SMART RACE in *H. diversicolor*. The results showed that the full-length cDNA sequence is 591bp, with a 441bp open reading frame. The deduced protein contained 146 amino acids, with a LYZ1 domain (20-146aa), a conserved motif (G/T) SSDYGLFQINS and two catalytic sites (Glu⁵² and Asp⁷⁰). Multiple alignments and phylogenetic analysis showed that the C-type lysozyme gene of *H. diversicolor* had the highest homology the C-2 type lysozyme gene of *H. discus discus*. The experimental results showed the C-type lysozyme gene in *H. diversicolor* was expressed in all detected tissues. The highest expression of C-type lysozyme gene was detected in the mantle ($P < 0.01$), and the lowest expression in hemolymph. Real-time quantitative PCR results showed that the expression of

[收稿日期] 2019-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (41006105); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2017FJSCZY02); 青岛海洋科学与技术国家实验室开放基金项目 (OF2015NO11); 大连海洋大学农业农村部北方海水增养殖重点实验室基金项目 (2018-KF-04)

[作者简介] 张洁 (1994—), 女, 硕士生, 从事生物化学与分子生物学方向研究。通信作者: 王国栋 (1977—), 男, 博士, 教授, 从事分子生物学、功能基因研究。E-mail: gdongwang@163.com

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

C-type lysozyme gene in *H. diversicolor* increased in blood lymphoid, the expression in gill was declined at 4 h post challenged by *Vibrio parahaemolyticus*. The expression of C-type lysozyme gene in different tissues increased significantly ($P < 0.01$) at 12 h post challenged, especially in the hemolymph. The expression decreased in various tissues at 24 h post challenged. These results showed C-type lysozyme gene in *H. diversicolor* could respond to the infection of *V. parahaemolyticus*, while the expression fluctuated in different time after infection.

Keywords: *Haliotis diversicolor* ; C-type lysozyme; gene clone; expression analysis

0 引言

脊椎及无脊椎动物的溶菌酶基因在先天性免疫系统中充当着重要角色, 负责抵抗病原微生物的入侵^[1]。作为一种抗菌蛋白, 溶菌酶的催化作用破坏肽聚糖支架, 致使细菌细胞壁破裂, 细胞内所包含的物质向外流出, 导致了细菌因溶解而死亡^[2]。此外, 溶菌酶的非酶杀菌域具有抗菌活力^[3]。在无脊椎动物抵御微生物的感染中, 溶菌酶作为先天免疫因子发挥了重要作用^[4-5]。

溶菌酶参与了机体的多种免疫反应^[6], 因来源不同和氨基酸序列间存在差异, 将其分为: 细菌溶菌酶、g 型溶菌酶、i 型溶菌酶、植物溶菌酶、C 型溶菌酶 (包括胃溶菌酶和结合钙离子的溶菌酶^[7]) 和噬菌体溶菌酶 (p 型)^[8]。本研究从杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) 中克隆 C 型溶菌酶基因 (命名为 *HdLysC*), 分析其在应激条件下的表达情况, 以期更好地揭示了杂色鲍免疫分子机制的运行原理, 并且在此基础上探索杂色鲍相关病害防治的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成体杂色鲍, 平均壳长 45 mm, 平均体重 (8 ± 2) g, 采集自厦门大嶝养殖场, 暂养于实验室水槽中, 喂以新鲜海带, 每隔一天换一半海水。取 12 只健康杂色鲍, 分别采集它们的鳃、外套膜、粘液腺、消化道、肝胰腺和肌肉, 液氮速冻后 -80 ℃ 保存待用。

在杂色鲍副溶血弧菌感染实验中, 实验组腹足肌肉注射 50 μL 1.1 × 10⁸ cfu/mL 副溶血弧菌菌液, 对照组注射 50 μL 灭菌生理盐水, 设三个平行。每组在注射后 0, 4, 12, 24, 48 h, 分别取 8 只个体采集血淋巴、鳃和肝胰腺组织, 液氮速冻后 -80 ℃ 保存待用。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

取杂色鲍各组织样品约 0.1 g, 加入 1 mL TRIzol Reagent 提取总 RNA。利用超微量分光光度计检测其 OD 值和 RNA 浓度, 并用 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用 SMARTTM-RACE cDNA Amplication Kit (Clontech) 合成 3'RACE-Ready cDNA, 备用。另外, 用 Oligo (dT) 18 作为反转录引物, 用反转录酶 M-MLV (Promega, USA) 按试剂盒方法将总 RNA 反转录成 cDNA, 反转录的 cDNA 用于组织表达。

1.2.2 杂色鲍 C 型溶菌酶克隆

从实验室杂色鲍 EST (expressed sequence tag) 数据库筛选获得杂色鲍 C 型溶菌酶基因 *HdLysC* 部分序列, 应用 Premier 5.0 软件设计实验所需的引物 (见表 1), 以杂色鲍肌肉 cDNA 为模板进行 PCR

表 1 实验中用到的引物及序列

Tab. 1 Primers and sequences used in the experiment	
引物名称 Name	引物序列 Primer sequence(5' - 3')
<i>HdLysC</i> -ORF-F	CAGAAAGGATGGGACCAACAGT
<i>HdLysC</i> -ORF-R	GTAAGTGCATCCGTTTCAGGTAGC
<i>HdLysC</i> -3-outer	ATCCACGACTACGGACTCTTCCAAATC
<i>HdLysC</i> -3-inner	TTCACAAGTCCCACTGGCTCAT
<i>HdLysC</i> -5-outer	AAGAGTCCGTAGTCGCTGGATGTTCCG
<i>HdLysC</i> -5-inner	AGTAACCGCCAAGAGCGAGAGAAT
<i>HdLysC</i> -5-F	GGTGGATGGGGTTTCTCGTA
<i>HdLysC</i> -5-R	TGCTGTCCGCAGTCGTAT
β-actin-F	CCGTGACCTTACAGACTACCT
β-actin-R	TACCAGCGGATTCCATAC

扩增。扩增体系 (20 μL): 灭菌水 13 μL , 10 \times PCR Buffer 2 μL , 逆转录 cDNA 模板 1 μL , dNTP 0.5 μL , 正、反向引物各 0.5 μL , Taq 酶 0.5 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (预热); 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (变性), 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (退火), 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (延伸), 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 16 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取 1 μL 产物进行电泳。

1.2.3 cDNA 快速扩增 (RACE)

采用巢式 PCR 进行 3' 和 5' 末端序列扩增。扩增体系 (25 μL): 1 μL 模板 (cDNA 第一条链) 和引物 (0.5 μL 3' outer/5' outer 和 2.5 μL UPM), 17.5 μL 灭菌水, 2.5 μL 10 \times PCR-Buffer, 0.5 μL dNTP 和 Taq 酶。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 循环 30 次; 最后延伸 7 min。产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Omega, USA) 回收、纯化, 并连接于 pMD19-T 质粒载体, 转入感受态细胞 *E. coli* DH 5 α , 于 LB 平板 (含 Amp⁺) 培养, 阳性克隆经 PCR 鉴定后送至上海生工测序。

1.2.4 目的基因的生物信息学分析

运用 BLAST 软件进行序列比对与查找; 用 VecScreen 软件去除载体序列; 用 bl2seq 进行比对拼接, 得到基因全长 cDNA 序列; 用 Compute pI/Mw tool 预测等电点和分子量; 用 SignalP 3.0 Server 查找信号肽; 用 ScanProsite 预测二硫键位置; 用 NetNGlyc1.0 Server 查找糖基化位点; 用 NetPhos 2.0 Server 查找磷酸化位点; 用 TMHMM2.0 Server 预测蛋白跨膜结构域; 用 InterProScan software 预测蛋白质功能结构域; 用 BioEdit 软件进行本地序列多重比对; 用 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构; 用 MEGA 5.0 软件中的邻接法构建系统进化树。

1.2.5 qRT-PCR 检测组织表达差异

采用 qRT-PCR (quantitative real time PCR) 技术检测新克隆基因的组织转录差异性及副溶血弧菌刺激后的免疫应答水平。qRT-PCR 反应体系: 以总 RNA 逆转录形成 cDNA 第一条链为模板, 以杂色鲍 β -actin 为内参基因, 以 1:100 稀释模板浓度。设反应体系 10 μL : cDNA 模板 4.5 μL , 正向和反向引物各 0.25 μL , SYBR Green 5 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 30 次。分析每个组织中溶菌酶基因的表达情况。

1.3 数据处理

利用仪器给的每个样品的 RQ 值, 用 RQ 平均值 \pm 标准误差表示基因表达水平。利用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析, 设显著水平为 $P < 0.05$, 极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果

测序结果和已有片段拼接后, 经查询开放阅读框 (open reading frame, ORF) 设计引物扩增 ORF 片段, 再验证序列正确性。图 1 为验证结果电泳图。根据 pMD19-T 重组载体的测序结果, *HdLysC* ORF 长度为 411 bp。

2.1 *HdLysC* 基因序列分析

HdLysC cDNA 全长 591 bp (5' UTR 29bp、3' UTR 121 bp、ORF 441 bp), 编码 146 个氨基酸、终止密码子 (TGA) 和 1 个多聚腺苷酸信号 (AATAAA), 前 19aa 为信号肽。基因预测蛋白质分子质量为 16.15 ku, 等电点 (PI) 为 6.03。有 8 个二硫键, 1 个糖基化位点, 8 个磷酸化位点, 1 个功能域 (20—146aa), 以及 1 个保守基序 (G/T)SSDYGLFQINS 和 2 个催化位点 Glu⁵² 和 Asp⁷⁰, 无跨膜结构。NCBI Blastx 比对结果显示: 与皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) C 型溶菌酶 (AGQ50330.1) 相似性达

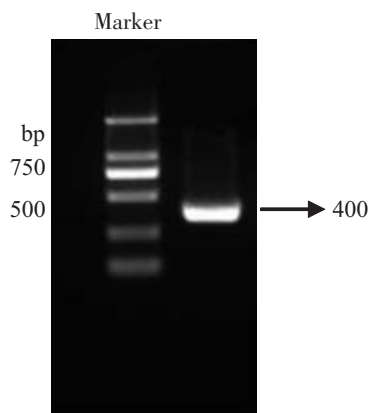
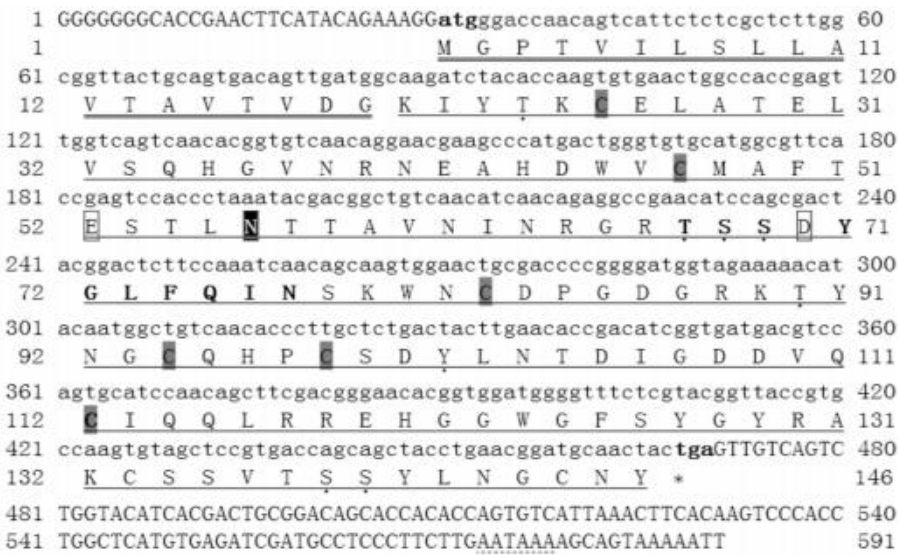


图 1 杂色鲍 *HdLysC* ORF PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis diagram of *HdLysC* ORF PCR product

74%，一致性达 75%；与青蟹 (*Scylla paramamosain*) 溶菌酶 (ADM33942.1) 相似性达 59%，一致性达 45%；与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 溶菌酶 (ACM24796.2) 相似性为 69%，一致性为 42%；与牛 (*Bos taurus*) C 型溶菌酶 (NP_001071297.1) 相似性为 66%，一致性为 41% (见图 2)。



* 为终止密码子;粗体表示起始密码子和终止密码子;双下划线残基表示信号肽;灰色黑体带阴影为二硫键位置;AATAAA 为多聚腺苷酸信号;黑底白字表示糖基化位点;圆点表示磷酸化位点;方框表示两个活性位点 Glu⁵² 和 Asp⁷⁰;加粗黑色为保守基序 (G/T)SSDYGLFQINS;下划线为功能域(20–146aa)。

* is the stop (TAG) codes;bold represented the start codes (ATG) and the stop (TAG) codes;the double-underlined residues represent the signal peptide;the black body shadow is the location of disulfide bond;the AATAAA is polyadenosine signal;the white words on the black background represent the glycation site;the dots represent the phosphorylation site;the box of two active sites are Glu⁵² and Asp⁷⁰;the bold black is the conservative motif (G/T) SSDYGLFQINS;the underline is the functional domain (20–146aa).

图 2 HdLysC 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Base sequence and predicted amino acid sequence of HdLysC gene

2.2 同源分析和系统发育分析

表 2 为同源比对和构建进化树使用的物种基因及登录号。将推导的 HdLysC 氨基酸序列与其他物种溶菌酶序列进行比对，可知 HdLysC 包含了保守基序 (G/T) SSDYGLFQINS (见图 3)。

表 2 HdLysC 基因同源比对及构建进化树用到各物种的名称及基因序列号

Tab.2 The names and gene sequence numbers of each species used in the construction of the evolutionary tree and homologous comparison of C – type lysozyme genes

物种名称 Species name	基因收录号 GeneBank No.	物种名称 Species name	基因收录号 GenBank No.
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AIA57285.1	蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	AKN35212.1
盘鲍 <i>Haliotis discus discus</i>	JX912528.1	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	ADR70996.1
盘鲍 <i>Haliotis discus discus</i>	JX912529.1	紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	AFM43653.1
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	AOX15710.1	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	ACZ63470.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_990612.1	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037448.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAK85299.1	果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	CAA41273.1
人 <i>Homo sapiens</i>	AAA59536.1	刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	ABK34500.2
家鼠 <i>Mus musculus</i>	CDM98775.1		

运用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树，运用 Bootstrap method 方法评估进化树可信度，设置重复次数 1000 次。结果 (见图 4) 显示皱纹盘鲍和盘鲍 (*Haliotis discus discus*) 聚为一小支，紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 等双壳类聚为一支，果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 等节肢动物聚为一小

支，甲壳类中的班节对虾（*Penaeus monodon*）聚为一小支，人（*Homo sapiens*）、原鸡（*Gallus gallus*）等脊椎动物等聚为一支，棘皮动物中的刺参（*Stichopus japonicus*）另聚为一支。

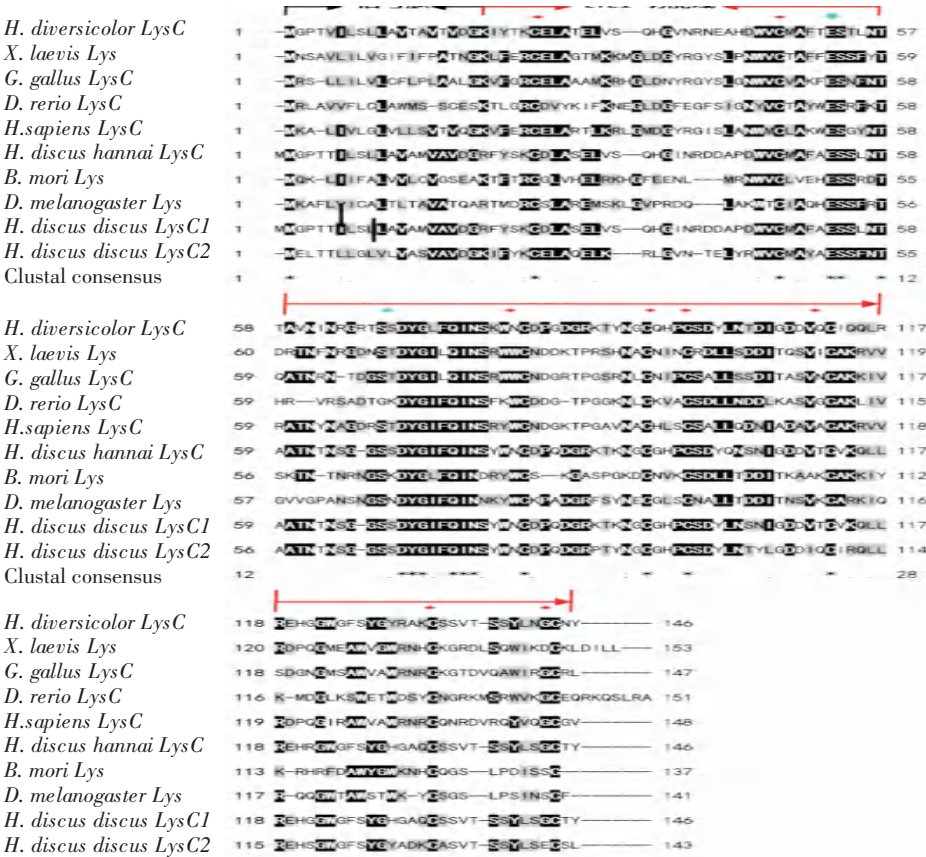


图 3 杂色鲍 *HdLysC* 基因和其他物种溶菌酶基因序列比较分析

Fig.3 Comparative analysis of sequences between *HdLysC* and C-type lysozyme gene of other species

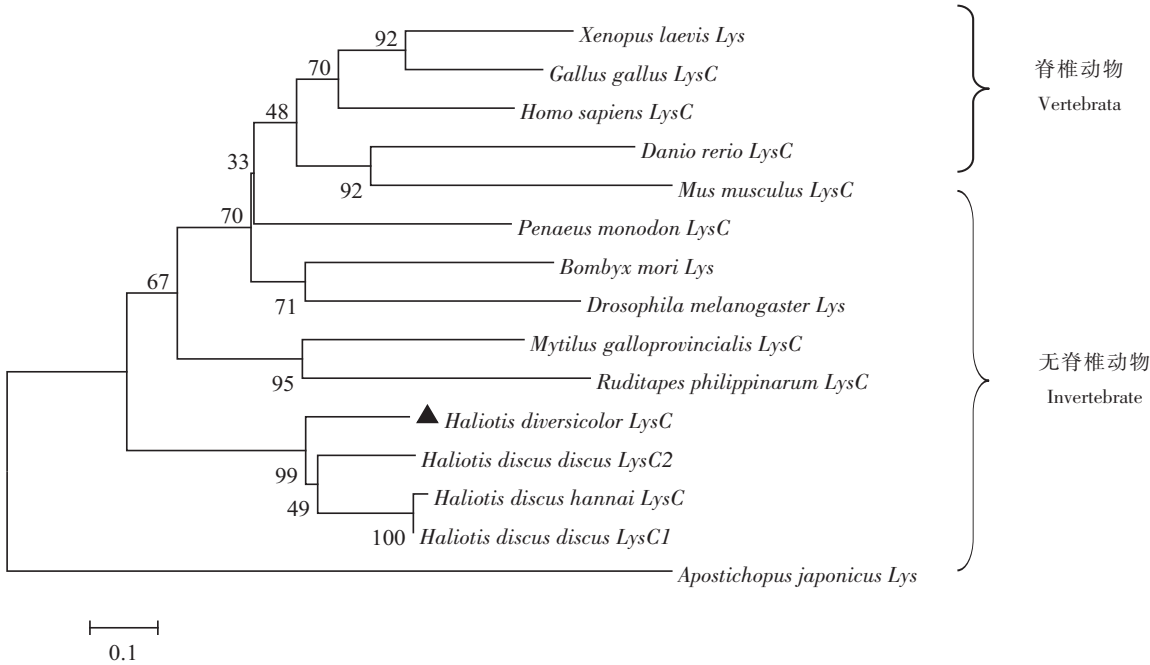


图 4 多物种 C 型溶菌酶基因序列 NJ 进化树

Fig.4 NJ evolutionary tree constructed by sequence of C-type lysozyme of some species

2.3 三维结构预测

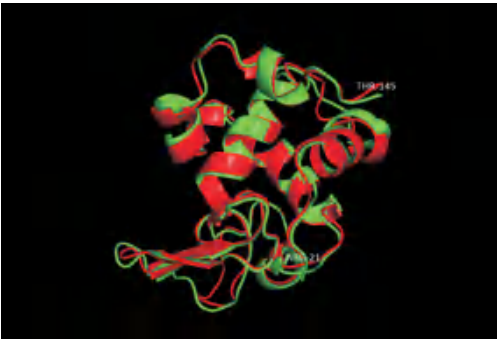
运用 SWISS-MODEL 服务软件的同源建模方法, 将 HdLysC 蛋白序列与 SWISS-MODEL 搜索的鸡的 Lysozyme 为模板进行联配, 构建杂色鲍 HdLysC 基因的三维结构。建模的结果如图 5 所示: 预测的 HdLysC 蛋白 3D 结构包含 5 个 β 折叠, 4 个 α 螺旋; HdLysC 的催化位点的两个氨基酸残基 (Glu 和 Asp) 在 HdLysC 和模板蛋白的空间位置上几乎一致, 表明其具有相同的催化功能; 两者的三级结构相似度为 66.4%, 暗示其功能也类似。

2.4 HdLysC 基因各组织特异性表达

结果显示 (见图 6), HdLysC 基因在各组织中均有表达, 且表达差异显著。在外套膜 (Mn) 中其表达量最高 (呈极显著差异, $P < 0.01$), 在粘液腺 (Mg) 中表达量明显减少, 在消化道 (Dt) 中的表达量相对粘液腺有所减少, 在肝胰腺 (Hp)、鳃 (Gi) 和肌肉 (Ms) 中表达量极少, 而在血淋巴中表达量最低。

2.5 qRT-PCR 分析 HdLysC 基因在副溶血弧菌感染后的表达水平

经副溶血弧菌感染后的杂色鲍各组织 mRNA 的表达模式如图 7 所示。qRT-PCR 分析结果表明: 1) 肝胰腺 (Hp) 组织在副溶血弧菌感染 12 h 后, HdLysC 基因表达量达到最大 (约比 0 h 增加 5 倍), 呈极显著差异 ($P < 0.01$); 感染 24 h 后其表达量显著减少, 转录水平降低; 感染 48 h 后其表达水平稍有回升, 大约与感染 12 h 后的表达水平持平。2) 在血淋巴 (Hm) 组织中, 表达量在感染 4 h 后增加, 但未达到显著差异; 感染 12 h 后转录水平达到峰值 (约为 0 h 的 27 倍), 呈极显著差异 ($P < 0.01$); 感染 24 h 后转录水平明显降低, 表达水平略低于感染 4 h 后的; 感染 48 h 后表达量恢复到正常水平。3) 在鳃 (Gi) 组织中, 感染 4 h 后的表达量最少; 感染 12 h 后的表达量最多, 呈极显著差异; 感染 24 h 后的表达量与 0 h 基本持平; 感染 48 h 后的表达量约为 0 h 的 2 倍。以上结果表明 HdLysC 基因能够响应副溶血弧菌的感染, 其表达水平在感染的不同时相呈上下波动。



绿色 Green—*G.gallus* 红色 Red—*H.diversicolor*
图 5 HdLysC 与鸡的溶菌酶 3D 结构对比结果
Fig.5 3D structure of HdLysC and C-type lysozyme of *G. gallus*

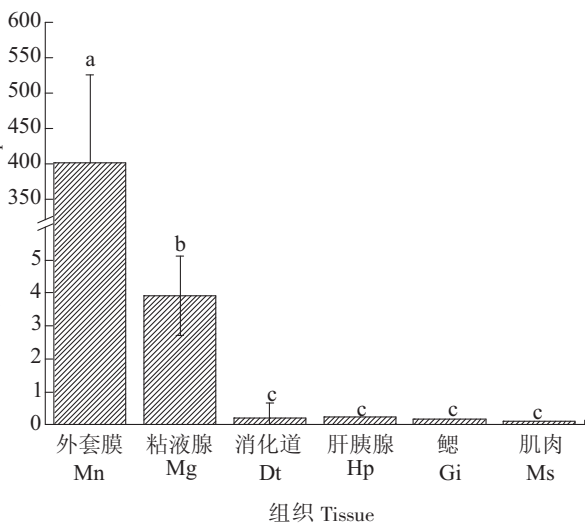


图 6 HdLysC 基因在杂色鲍不同组织中的相对表达分析
Fig.6 Analysis of relative expression of HdLysC in different tissues of *H. diversicolor*

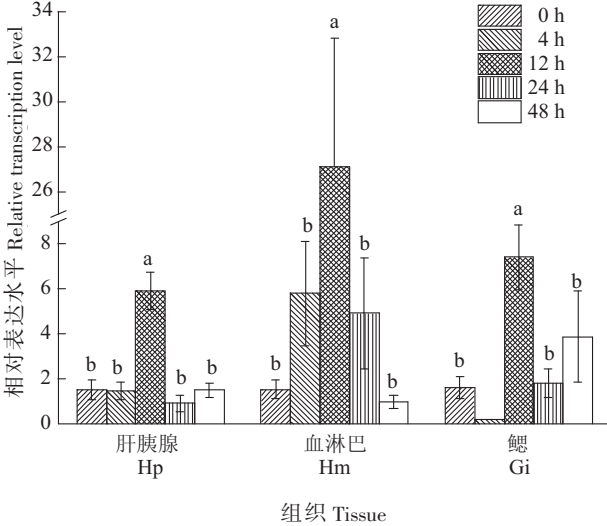


图 7 副溶血弧菌感染后 HdLysC 的表达情况
Fig.7 The expression of HdLysC after *V. parahaemolyticus* challenge

3 讨论

3.1 杂色鲍 *HdLysC* cDNA 序列分析

溶菌酶在溶菌过程中能够破坏和消除入侵体内的异物,其作为机体中重要的非特异性免疫因子,参与了机体免疫防御过程,并诱导和调节其他免疫因子的合成与分泌^[9-10]。

本研究用 SMART-PCR 方法获取杂色鲍 *HdLysC* 基因全长 cDNA。其全长为 591 bp, ORF 为 441 bp, 编码 146aa, 蛋白质分子质量为 16.15 ku, 等电点为 6.03, 含 8 个二硫键和磷酸化位点、1 个糖基化位点, 无跨膜结构, 有一个 LYZ1 功能域 (20—146aa)。

将杂色鲍与其他种类的 C 型溶菌酶进行同源分析, 结果表明其同源性较高。基因序列分析结果显示 *HdLysC* 有保守基序 (G/T) SSDYGLFQINS、2 个催化位点 (Glu⁵² 和 Asp⁷⁰) 和 8 个保守的半胱氨酸残基, 表明杂色鲍与其他种类 C 型溶菌酶氨基酸序列同源性较高。

根据杂色鲍和其他类群 C 型溶菌酶氨基酸基因推导的氨基酸序列系统发育分析表明, 杂色鲍 *HdLysC* 基因与亲缘关系较近的皱纹盘鲍和盘鲍的同源性较高, 而与脊椎动物 (如人、原鸡等) 的同源性相对较低。此结果表明杂色鲍 *HdLysC* 氨基酸序列的同源性符合传统的分类地位。

3.2 组织表达分析

鲍类 C 型溶菌酶基因的表达具有种属和组织特异性, 不同鲍类及不同组织的表达量均有差异。如皱纹盘鲍^[2], 采用 qRT-PCR 方法分析 C 型溶菌酶基因在不同组织的表达情况, 结果发现 C 型溶菌酶基因在外套膜中表达水平最高, 其次为肌肉、鳃和消化腺, 而在血淋巴中的表达水平最低。

已有的研究主要是对表面暴露于外部环境中的外套膜、鳃和其他组织进行双壳类软体动物溶菌酶基因的研究, 该基因被认为与双壳类的免疫功能密切相关^[11]。本研究 qRT-PCR 分析结果表明, *HdLysC* 基因在各组织中均有表达, 在外套膜中表达量高, 呈现显著差异 ($P < 0.05$)。因为外套膜能向外分泌对附着的病原菌等具有抑制和杀菌作用的粘液, 形成了一粘液层, 成为杂色鲍机体免疫防御的第一道防线。本结果表明 *HdLysC* 基因参与了机体的免疫防御过程。除此之外, 本研究在消化道组织中也检测到了溶菌酶的 mRNA 转录物。因为消化道是机体食物消化的主要场所, 本结果说明 *HdLysC* 基因也参与机体的消化作用。

3.3 弧菌感染对 C 型溶菌酶基因表达的影响

据报道^[12], 自 20 世纪 80 年代以来, 养殖和野生的鲍鱼大量死亡, 其原因与寄生虫和细菌的感染有关。一些研究报告^[13-14]说, 鲍鱼大量死亡的主要原因之一是由于弧菌病感染引起的。在本实验研究中, 利用副溶血弧菌感染成体杂色鲍, 实验结果显示: 与 0 h 相比, 在副溶血弧菌感染 4 h 后, *HdLysC* 在血淋巴中表达量增加 (未达到显著差异), 在鳃组织中表达量有所下降, 在肝胰腺中的表达水平基本与 0 h 一致; 感染 12 h 后, *HdLysC* 在各组织中的表达量都有明显的增加, 呈极显著差异, 尤其在血淋巴中差异最显著, 表达量约为 4 h 的 4 倍; 感染 24 h 后, *HdLysC* 表达量在各组织中都所降低; 感染 48 h 后, *HdLysC* 在肝胰腺和血淋巴组织中的表达量基本恢复到 0 h 的水平, 而在鳃组织中的表达量约为 0 h 的 2 倍。此结果说明在受到副溶血弧菌感染后 *HdLysC* 的表达量在各组织中发生了明显的差异变化。

本研究成功克隆得到了 *HdLysC* 全长 cDNA, 对其进行测序, 使对溶菌酶进化的理解有了直接的证据。通过实时定量 PCR 方法, 检测副溶血弧菌感染下杂色鲍溶菌酶基因的表达情况, 结果提示其在清除病原体的防御反应中起着重要作用, 这为将来深入研究 *HdLysC* 在病原体刺激下发挥功能的途径和机理奠定了基础。通过研究其表达情况, 解释杂色鲍溶菌酶基因参与的免疫过程, 为探索病害防治提供了新途径, 保证鲍养殖业的健康发展, 同时也为指导杂色鲍的遗传改良和抗病品系的培育提供理论参考依据。

[参考文献]

- [1] MOIL K, NAKANISHI T, SUZUKI T, et al. Defense mechanisms in invertebrates and fish [J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1989, 34(3): 214-223.
- [2] DING J, LI J, BAO Y, et al. Molecular characterization of a mollusk chicken-type lysozyme gene from *Haliotis discus hannai* Ino, and the antimicrobial activity of its recombinant protein [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 163-172.
- [3] DURING K, PORSCHE P, MAHN A, et al. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes [J]. FEBS Lett, 1999, 449: 93-100.
- [4] ITOH N, XUE Q, LI Y, et al. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2007; 23: 957 -68.
- [5] SOTELO-MUNDOA RR, ISLAS-OSUNAB MA, DE-LA-RE-VEGAA E, et al. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 15: 325 e-31.
- [6] 刘梅, 张士璠. 溶菌酶 C 及其生物学功能 [J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 465-467.
- [7] HIKIMA S, HIKIMA JI, ROJTINNAKORN J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. Gene, 2003, 316: 187-195.
- [8] 钱曦, 华雪铭, 黄旭雄, 等. 异育银鲫 C 型溶菌酶全长 cDNA 序列的生物信息学分析及其组织表达分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 14(04): 336-346.
- [9] SONOMI M, JUNICHI H, IKUO H, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25(5): 439-445.
- [10] CHIPMAN D M, SHARON N. Mechanism of lyozyme action [J]. Science, 1969, 165(892): 454-465.
- [11] NILSEN I W, MYRNES B. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes [J]. Gene, 2001, 269: 27-32.
- [12] CHENG W, HSIAO I S, HSU C H, et al. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17: 235e43.
- [13] NISHIMORI E, HASEGAWA O, NUMATA T, et al. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supertexta* [J]. Fish Pathol, 1998; 33: 495e502.
- [14] NICOLAS J L, BASUYAUX O, MAZURIE J, et al. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata* [J]. Dis Aquat Organ, 2002, 50: 35e43.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)