

温度、盐度变化及鳃弧菌刺激对菲律宾蛤仔 I型溶菌酶基因表达的影响

祝艳霞^{1,2}, 母昌考^{1,2}, 王春琳^{1,2*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为研究在环境因素变化后, 菲律宾蛤仔I型溶菌酶参与免疫应答反应的变化模式, 实验采用cDNA末端快速扩增技术, 从菲律宾蛤仔体内克隆获得了一种I型溶菌酶基因的全长cDNA序列(命名为*RpiLYZ-2*), 该序列开放阅读框(ORF)为471 bp, 编码156个氨基酸。*RpiLYZ-2*基因在所检测组织中均有表达, 其中在外套膜中表达量最高, 在肌肉组织中表达量最低。采用荧光定量PCR法, 研究了不同温度[(29±1)、(21±1)和(13±1)°C]、盐度(32、22和12)及鳃弧菌刺激对菲律宾蛤仔I型溶菌酶基因表达的影响。结果显示, 在温度21 °C和盐度22胁迫处理后, *RpiLYZ-1*基因的表达量呈现先上升后下降的趋势, 而*RpiLYZ-2*基因的表达量则呈现先下降后上升的趋势。在高温29 °C和低盐12胁迫条件下, *RpiLYZ-1*基因表达量总体呈下降趋势, 而*RpiLYZ-2*基因表达量总体呈上升趋势; 经鳃弧菌刺激后, *RpiLYZ-1*基因的表达量得到显著诱导, 而*RpiLYZ-2*基因表达量则表现为先降低后上升的趋势。研究表明, 环境因子变化和病原菌刺激能够显著影响菲律宾蛤仔两种I型溶菌酶基因的表达量, 且*RpiLYZ-1*和*RpiLYZ-2*可能存在着功能分化。

关键词: 菲律宾蛤仔; I型溶菌酶; 基因克隆; 温度; 盐度; 鳃弧菌

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

溶菌酶(lysozyme, LYZ)是一种水解酶, 又称为1, 4-β-N-乙酰胞壁质酶。它最早由Fleming^[1]在1922年发现, 主要功能是催化肽聚糖N-乙酰葡萄糖胺(NAG)和N-乙酰胞壁酸(NAM)之间β-1, 4糖苷键的水解, 从而破坏细菌细胞壁中肽聚糖骨架, 导致细胞壁破裂、内容物溢出而使细菌死亡。近年来的研究发现, 溶菌酶是生物体重要的固有免疫因子之一, 其参与机体的多种免疫反应, 具有改善和增强巨噬细胞吞噬活性的功能^[2]。此外, 溶菌酶也具有消化功能, 并能够诱导机体其他免疫因子的合成与分泌, 且能协同其他免疫因子(抗菌肽等)参与机体的免疫防御^[3-4]。根据溶菌酶的不同生物来源、免疫学特性和氨基酸序列的差异, 可将溶菌酶分为6类, 即C型

(chicken type)、I型(invertebrate type)、G型(goose type)、噬菌体型(phage type)、植物型(plant type)及细菌型(bacterial type)^[5-8]。1975年, Bachali等^[7]在海星(*Asterias tubens*)中发现了新型溶菌酶的存在, 并将之命名为I型溶菌酶。近年来的研究发现, I型溶菌酶主要存在于软体动物、环节动物和棘皮动物等无脊椎动物中, 且同种生物体中含有多种亚型的I型溶菌酶^[9-11]。

软体动物缺乏获得性免疫系统, 更多地依赖于固有免疫来抵御病原的侵染和逆境胁迫。鉴于软体动物的免疫系统相对简单, 外源环境因子(水温、盐度等)的改变和病原侵袭易造成体内代谢途径的紊乱, 从而导致机体免疫机能的受损^[12]。已有研究表明, 作为软体动物重要免疫

收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-07-22

资助项目: 国家科技支撑计划(2011BAD13B0903)

通信作者: 王春琳, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

防御因子的溶菌酶,其含量会受多种环境因子和病原侵袭的影响^[13]。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)隶属于双壳纲(Bivalvia)、帘蛤科(Veneridae)、蛤仔属(*Ruditapes*),是我国重要的海水滩涂增养殖贝类之一^[14]。本实验采用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术,从菲律宾蛤仔体内克隆获得了一种I型溶菌酶cDNA全长序列(RpiLYZ-2),并比较了两种I型溶菌酶基因(RpiLYZ-2和RpiLYZ-1, RpiLYZ-1为已有序列^[15])在不同温度、盐度和鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染下的时序表达特征,以期为菲律宾蛤仔的健康养殖和病害防控提供参考和指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物及药品试剂

实验用菲律宾蛤仔(壳长3~4 cm)购自当地水产市场,置于砂滤海水中暂养10 d,暂养期间持续曝气,每天定时定量投喂小球藻,2 h后完全更换海水。

Trizol试剂购自Invitrogen公司, M-MLV反转录酶购自Promega公司, Taq DNA Polymerase、DNA Marker、SYBR Premix Ex Taq™、MiniBEST DNA Fragment Purification Kit均为宝生物工程有限公司产品,凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司,其余试剂均购自国药集团。

1.2 实验方法

分别采集对照组的外套膜、血淋巴细胞、鳃、肝胰腺、性腺和肌肉组织,用以测定目的基因的组织表达,每个组织采集6个平行样本。

温度胁迫实验 设置3个实验组,分别为(13±1)、(21±1)和(29±1) °C。温度胁迫实验起始水温为13 °C,设定此温度处理组为对照组;21和29 °C为升温实验组,升温组采用HOPAR™公司加热棒进行加热处理。在升温应激实验中,水温经过5 d从13 °C逐渐升至设定温度并维持稳定,每天预热海水,避免更换海水造成温差应激。分别在胁迫的0、1、4和7 d采集血淋巴细胞、肝胰腺和鳃组织,每个时间点随机采集6个平行样本。

盐度胁迫实验 设置3个实验组,分别为盐度32、22和12;其中,盐度32为对照组,22和

12为低盐度组,3个实验组均处于同一环境温度。采用曝气24 h的自来水与海水素混合配制不同盐度的海水,用盐度计(日本ATAGO公司盐度计)测量盐度,采用盐度骤降的方式胁迫菲律宾蛤仔。样品采集同温度胁迫实验。

病原菌刺激实验 将鳗弧菌接种于2216 E液体培养基中,28 °C培养至对数生长期后离心(10 000 r/min, 4 min)收集菌体,用灭菌过滤海水重悬菌体,以10⁷ CFU/mL浓度浸泡处理菲律宾蛤仔。分别在暴露的0、6、12、24、48和72 h解剖菲律宾蛤仔,采集肝胰腺和鳃组织,每个时间点随机采集6个平行样本。

1.3 总RNA提取和cDNA合成

总RNA提取采用Trizol试剂,并用Nanodrop 2000c分光光度计(Thermo Scientific公司)定量至500 ng/mL; cDNA合成按照Promega公司的M-MLV反转录酶说明书进行,以定量后的总RNA为模板, Oligo dT为逆转录引物,反应条件:70 °C 5 min,冰上放置2 min,稍离心,42 °C 60 min,95 °C 5 min终止反应。

1.4 目的基因全长cDNA的扩增

根据已有的EST序列,分别设计基因特异性引物: RpiLYZ 3'-RACE正向引物(RpiLYZ-2-F1、RpiLYZ-2-F2)和反向引物Oligo dT; RpiLYZ 5'-RACE反向引物(RpiLYZ-2-R1、RpiLYZ-2-R2)和正向引物dG,并由上海生工生物工程有限公司合成。通过RACE PCR扩增目的基因,PCR反应条件:94 °C预变性5 min,然后进入35个循环:94 °C变性30 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸45 s;最后72 °C延伸10 min。测序工作由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

1.5 RpiLYZ基因的时序表达

采用ABI7500荧光定量PCR系统,测定目的基因在不同盐度、温度胁迫和鳗弧菌刺激后的时序表达情况。以菲律宾蛤仔 β -actin为内参基因,两种I型溶菌酶基因的特异性引物分别为RpiLYZ-1-F、RpiLYZ-1-R和RpiLYZ-2-F、RpiLYZ-2-R(表1)。荧光定量PCR的反应条件为50 °C预热20 s,95 °C预变性7 min,然后进入40个循环:95 °C变性15 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸15 s。每次PCR反应结束,通过熔解曲线分析确定PCR产物扩增和检测特异性。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16],

Tab. 1 Primer sequence

引物 primer	用途 usage	引物序列 primer sequence
RpiLYZ-2-F1	3'-RACE	5'-GGCAACAAC TTCCTGTACTGACG-3'
RpiLYZ-2-F2	3'-RACE	5'-ACAAGAACGGG CAGGGTCA-3'
Oligo dT	3'-RACE	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
RpiLYZ-2-R1	5'-RACE	5'-GGCAACAAC TTCCTGTACTGACG-3'
RpiLYZ-2-R2	5'-RACE	5'-ACAAGAACGGG CAGGGTCA-3'
dG	5'-RACE	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGG-3'
β-actin-F	qRT-PCR	5'-CGCACTTCCTCACGCCATCAT-3'
β-actin-R	qRT-PCR	5'-GCAGCCGTCTCCATTCTTGTTTC-3'
RpiLYZ-1-F	qRT-PCR	5'-AGGTTGTGCGCATGGTAGTAGGATC-3'
RpiLYZ-1-R	qRT-PCR	5'-CGGTAGTGGGTGGCGTATCTTT-3'
RpiLYZ-2-F	qRT-PCR	5'-TGGCAACAAC TTCCTGTACTGACG-3'
RpiLYZ-2-R	qRT-PCR	5'-CAGCCACTGTCTGGTACTGGTTTG-3'

数据处理时样本个数 n 为4~6。采用Origin 9.0软件作图, SPSS 16.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 认定为差异显著, $P < 0.01$ 认定为差异极显著。

通过序列拼接, 获得了*RpiLYZ-2*基因的全长cDNA序列(GenBank注册号KU221017)。*RpiLYZ-2*基因的开放阅读框(ORF)包括471 bp, 编码156个氨基酸, 预测分子量为17.78 ku, 理论等电点为8.16。对氨基酸序列分析发现, 其N端含有典型的信号肽序列, 其后具有一个完整的失稳酶(destabilase)结构域(Leu²⁵-Tyr¹⁵⁰)。*RpiLYZ-2*与发表的*RpiLYZ-1*氨基酸序列(ACU83237.1)之间的相似性为37%, 表明二者为I型溶菌酶的不同亚型。

采用实时定量PCR法,对*RpiLYZ-2*基因在各组织中的相对表达量进行了分析,其中设定血淋巴细胞中*RpiLYZ-2*表达量为1。*RpiLYZ-2*基因在肌肉中表达量最低,而在外套膜组织中表达量最高(图2)。*RpiLYZ-2*基因表达量从高到低依次为外套膜>鳃>肝胰腺>性腺>血淋巴细胞>肌肉。

与对照组相比, 21 °C胁迫处理1 d时, *RpiLYZ-1* 基因的表达量在鳃和血淋巴细胞中显著上升 ($P<0.05$)。随胁迫时间的延长, *RpiLYZ-1* 基因表

1 CTTAATTGTTGTCCTTAITGAGAAAGGAGGAACATTGAGATAAACCTTATGCAACGTGAA
1 M L G V F V F S V L L N M A M S G V
61 GAAAAACAATCGTGGGTGCTTTGTGTTTCAGTGATATTAACATGGCAATGTCAGGTG
19 I E N P V S L M C L N C M C K V A T T S
121 TGATAGAAAATCTGTATCATTTGATGTGCTAAATTCAGTGTGAAGGTGGCAACAACCT
21 T C D V G C N H D R E G I A C G G Y Q I
181 CCTGTACTGACGTAGGCTGTAACCATGACCGCGAGGGAATTGCGTGGCGGATATTACCAAA
59 H Y G Y Y I D C Y K P V P D S G C R G L
241 TCCATTATGTTACTATTAATTGATTGCTACAAACCAAGTACCAGACAGTGCGCTGAGAGGCC
79 S E Q E C W M K C S R D K P C A E R C I
301 TCTCAGAAACAAGATGCTGGATGAAATGTTCCAGAGATAAACCCCTGTGCAGAAAGGTGTA
99 Q S Y M L R Y R N K N G A G S D C E N Y
361 TCCAGCTTTCATGTTACCGGTACAGGAAACAACGAGCCGGGCGGGTCAGACTGTGAGAACCT
119 V R L H A G G C P Y G A A K W N Q S W Y N
421 ACGTGAGACTACATGCGCGCGGACCATATGGTCAGCAAAAATGGAATCAGTCTGTGTACA
139 R T S Y Y W N Y A R A Y G C V W N S *
481 ACCGAAACAAGTTATTATTGGAACATATGCGAGAGCTTACGGGTGCGTCTGGAATTCAATAGA
541 TCGTGTTTGGGAAGAGTGGTCTTTTTGTCGAGTTTGAAAAATAATCTTCTAATTGTTGAC
601 TTGTGATAAATCTACGATACATGTAGGCATAATTAACGTGTTCTTATTGAGAGATAATGC
661 TCTGCTGTGAATGAGATAAATACGTGTGTAATTTCAAAAAAAAATAAAAAAAA

Circle illustrates the initiation codon; the asterisk illustrates the termination codon; the part of underlined illustrates the signal peptide; box illustrates transcription and modification points

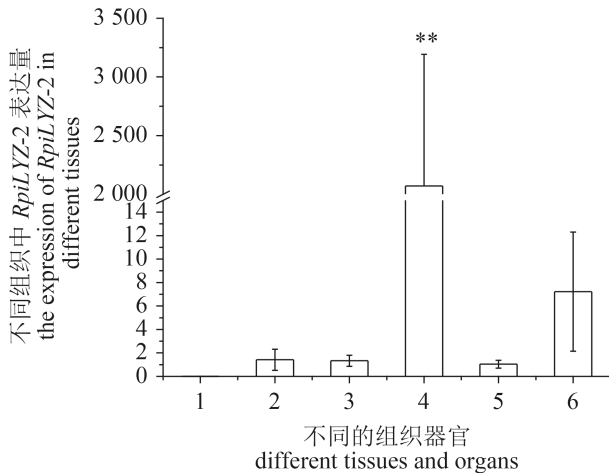


图2 *RpiLYZ-2*基因在菲律宾蛤仔中的组织分布特征

1. 肌肉; 2. 肝胰腺; 3. 性腺; 4. 外套膜; 5. 血淋巴细胞; 6. 鳃;
** 表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Tissue distribution of *RpiLYZ-2* gene determined by qRT-PCR

1. muscle; 2. hepatopancreas; 3. gonad; 4. mantle; 5. hemocyte; 6. gill;
** mean significant difference ($P < 0.05$)

达量在鳃组织中呈现先下降后上升的趋势; 而在血淋巴细胞中, *RpiLYZ-1*基因表达量在胁迫处理4 d时升至最高($P < 0.01$); 在肝胰腺组织中, *RpiLYZ-1*基因表达量在21 °C胁迫处理7 d时显著降低($P < 0.05$)。当温度升至29 °C时, 鳃组织和血淋巴细胞中*RpiLYZ-1*基因表达量在1 d时上升, 然后呈下降趋势; 而在肝胰腺组织中, *RpiLYZ-1*基因表达量受到极显著的抑制($P < 0.01$)(图3-a, 3-b, 3-c)。

21 °C胁迫处理1 d时, 血淋巴细胞和鳃组织中*RpiLYZ-2*基因表达量均下降, 随胁迫时间的延长, *RpiLYZ-2*基因表达水平总体呈现上升趋势; 而在肝胰腺组织中, *RpiLYZ-2*基因的表达变化趋势不明显。当温度升至29 °C时, *RpiLYZ-2*基因表达量在1 d后总体呈现上升趋势, 鳃组织和血淋巴细胞在胁迫处理7 d时呈现极显著上升($P < 0.01$)(图3-d, 3-e, 3-f)。

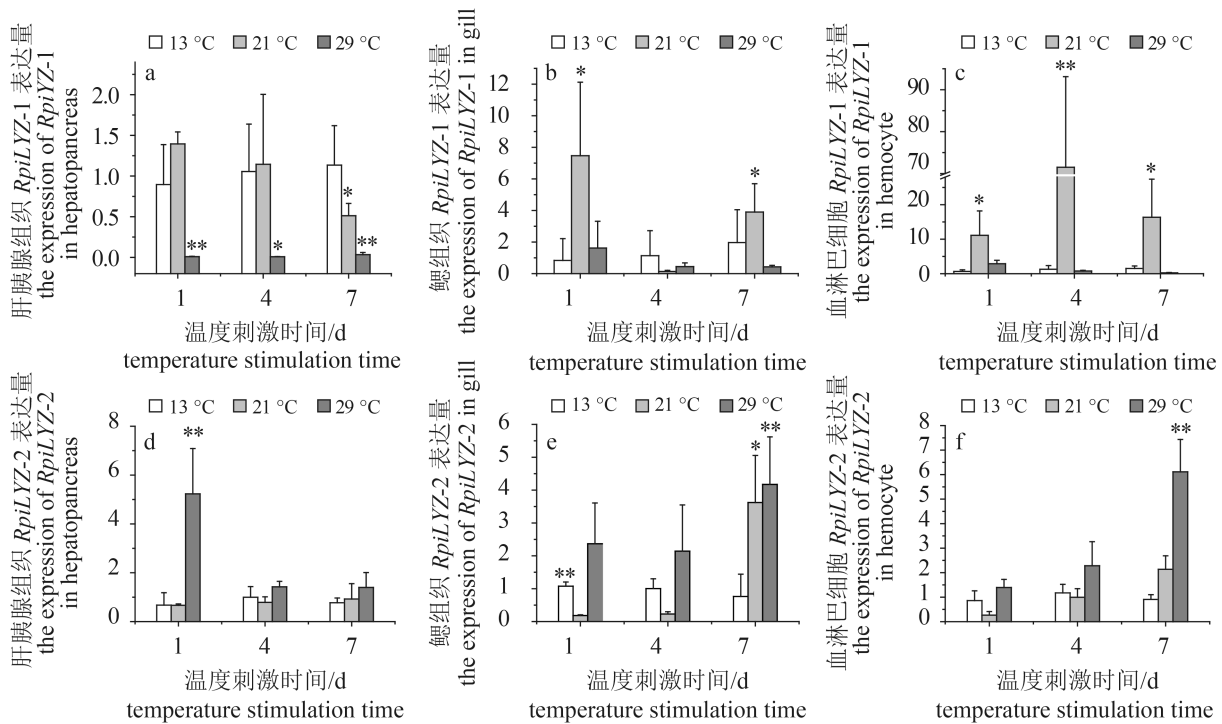


图3 不同温度应激下菲律宾蛤仔*RpiLYZ-1*和*RpiLYZ-2*基因在不同组织中表达量的变化

a, b, c. *RpiLYZ-1*基因在肝胰腺、鳃和血淋巴细胞中的表达量变化; d, e, f. *RpiLYZ-2*基因在肝胰腺、鳃和血淋巴细胞中的表达量变化。
*表示受到温度应激处理组的基因表达水平与对照组水平存在显著差异($P < 0.05$), **表示受到温度应激处理组的基因表达水平与对照组水平存在极显著差异($P < 0.01$), 下同

Fig. 3 The expression of *RpiLYZ-1* and *RpiLYZ-2* transcripts in *R. philippinarum* under different temperature stress

a, b, c. the expression of *RpiLYZ-1* respectively in hepatopancreas, gill and hemocyte; d, e, f. the expression of *RpiLYZ-2* respectively in hepatopancreas, gill and hemocyte. *. significant difference ($P < 0.05$), **. highly significant difference ($P < 0.01$), the same below

2.4 盐度应激对 *RpiLYZ* 基因表达的影响

在低盐度22胁迫处理时, 3个组织中*RpiLYZ-1*基因的表达量均呈现为先上升后下降的趋势, 肝胰腺和鳃组织中基因表达量在1 d时升至最高, 而血淋巴细胞中*RpiLYZ-1*基因胁迫处理4 d时上调至最高水平($P<0.05$)。当盐度降低至12时, 3个组织中*RpiLYZ-1*基因的表达量在胁迫处理1 d时极显著上调($P<0.01$); 随着胁迫时间的延长, *RpiLYZ-1*基因的表达量逐渐下降且低于正常水平(图4-a, 4-b, 4-c)。

在低盐度22胁迫处理1 d时, *RpiLYZ-2*基因在血淋巴细胞和鳃组织中的表达量极显著降低($P<0.01$); 随着胁迫时间的延长, *RpiLYZ-2*基因的表达量呈现上升的趋势。在肝胰腺组织中, *RpiLYZ-2*基因的表达量也呈上调趋势, 但变化趋势不明显。当盐度降低至12时, 在血淋巴细胞和鳃组织中*RpiLYZ-2*基因表达量随时间呈现逐步上升趋势; 而在肝胰腺组织中, *RpiLYZ-2*基因表达量在胁迫处理4和7 d时呈现极显著上升($P<0.01$) (图4-d, 4-e, 4-f)。

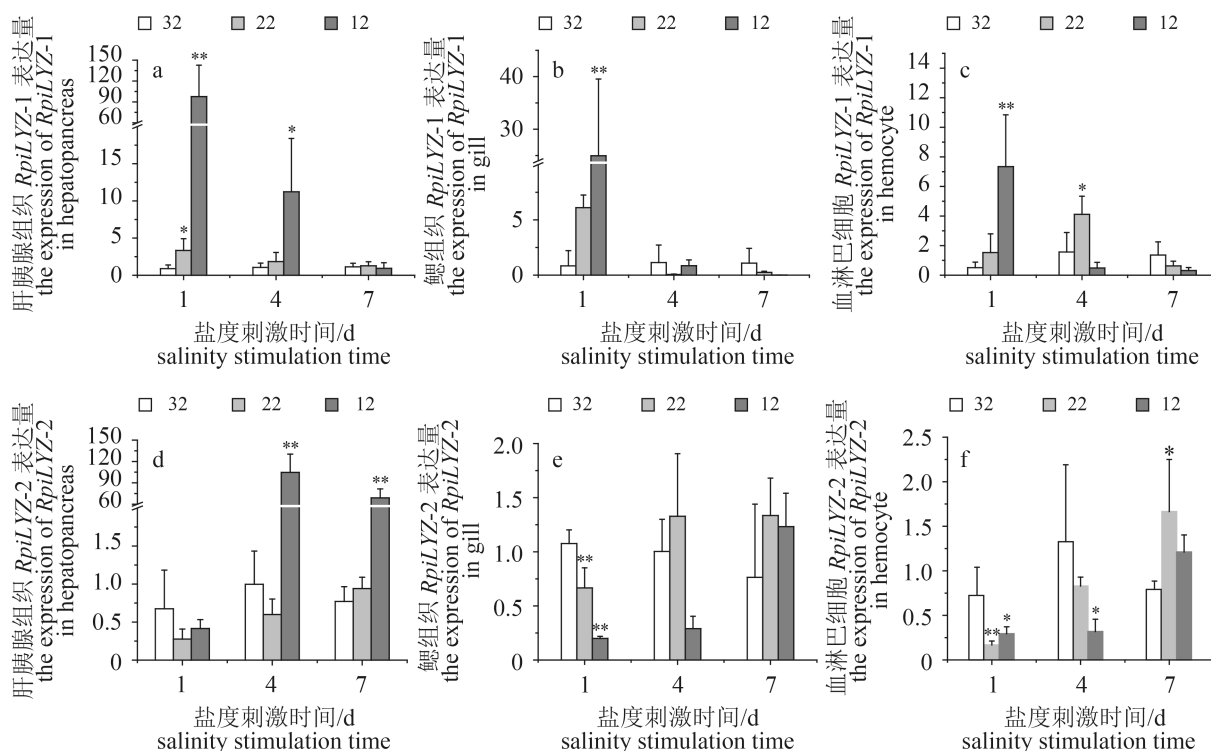


图4 盐度应激下菲律宾蛤仔 *RpiLYZ-1* 和 *RpiLYZ-2* 基因在不同组织中表达量的变化

Fig. 4 The expression of *RpiLYZ-1* and *RpiLYZ-2* transcripts in *R. philippinarum* under different salinity stress

2.5 鳗弧菌刺激对 *RpiLYZ* 基因表达的影响

在鳗弧菌刺激6 h后, *RpiLYZ-1*基因在两种组织中都出现显著升高($P<0.05$), 其总体趋势均表现为先上升后下降再上升。肝胰腺和鳃组织中的*RpiLYZ-1*基因都在鳗弧菌刺激24 h时表达量最低。但肝胰腺组织中只有在鳗弧菌刺激12 h时, *RpiLYZ-1*表达量出现极显著上升($P<0.01$); 而鳃组织中*RpiLYZ-1*表达量在鳗弧菌刺激6、12、48和72 h均出现极显著上升($P<0.01$) (图5-a, 5-b)。

在鳗弧菌刺激后, *RpiLYZ-2*基因在肝胰腺和鳃组织中的表达趋势一致, 都表现为先下降后

上升, 均在72 h时恢复至正常水平。肝胰腺组织中*RpiLYZ-2*基因在菌刺激12和24 h时表达量出现显著降低($P<0.05$); 而鳃组织中*RpiLYZ-2*表达量在菌刺激6、12、24和48 h时均出现极显著降低($P<0.01$) (图5-c, 5-d)。

3 讨论

软体动物由于缺乏获得性免疫系统, 主要依赖于固有免疫系统来抵御病原侵袭^[17-18]; 细胞免疫主要依靠血淋巴细胞的吞噬作用, 而体液免疫则主要通过溶菌酶、凝集素和抗菌肽等免

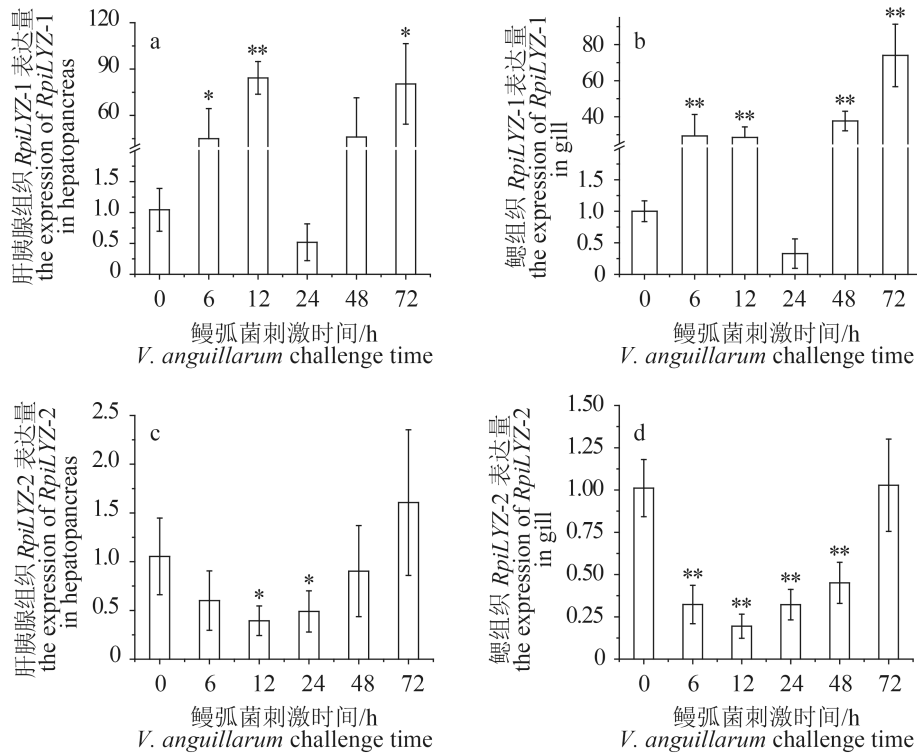


图5 鳗弧菌刺激下菲律宾蛤仔 *RpiLYZ-1* 和 *RpiLYZ-2* 基因在不同组织中表达量的变化

Fig. 5 The expression of *RpiLYZ-1* and *RpiLYZ-2* transcripts in *R. philippinarum* challenged by *V. anguillarum*

疫效应因子发挥免疫防御功能^[19-20]。已有研究表明, 水体环境因子变化能够对软体动物的免疫系统造成影响, 其程度受个体差异、胁迫类型、强度和时间的诸多因素影响^[21-22]。

目前, I型溶菌酶已被发现广泛存在于软体动物中, 且其不同物种中的组织分布也存在种间差异。例如, 文蛤(*Meretrix meretrix*)的I型溶菌酶(HM008915)主要存在于肝胰腺和鳃中^[23], 而美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的I型溶菌酶(AB252064)主要存在于消化腺和血淋巴细胞中^[24]。在本实验中, *RpiLYZ-2*基因在外套膜中的表达量最高, 在鳃组织中次之。I型溶菌酶基因在不同物种中的组织表达存在差异, 被认为可能与其功能的分化相关^[2]。鳃作为双壳类的呼吸和摄食器官, 经常面临各类病原体的侵袭^[11], 而且外套膜也被认为是双壳贝类免疫防御系统的主要屏障^[25]; 因此, *RpiLYZ-2*基因主要在菲律宾蛤仔的鳃和外套膜中表达被认为可能与其免疫防御功能密切相关。

温度作为一种重要的环境因子可影响贝类的摄食、生长和免疫防御等生命活动^[26]。许友卿等^[27]研究表明, 温度可影响近江牡蛎(*Ostrea rivu-*

laris) Gould的I型溶菌酶基因的表达, 从而调节其免疫功能和对外环境的应激反应。在本研究中, 当水温升至21℃时, 鳃和血淋巴细胞中的*RpiLYZ-1*和*RpiLYZ-2*基因表达量呈现波动变化并稍高于正常水平。这与22℃水温是菲律宾蛤仔的最适宜温度相一致^[28]。然而, 有学者^[29-30]研究指出, 高温能够引起贝类的应激反应, 影响机体的能量分配, 且能导致血淋巴细胞分泌的溶菌酶减少。在水温升至29℃时, *RpiLYZ-1*基因表达量在组织中呈下降趋势, 而*RpiLYZ-2*基因表达量在鳃组织和血淋巴细胞中呈上升趋势, 这被认为可能与*RpiLYZ-2*溶菌酶的功能分化有关。

盐度也是影响贝类生存和生长的重要环境因子, 盐度改变能够引起激素水平和能量代谢途径改变等多种应激反应, 也会造成贝类体内渗透压的改变, 影响滤水、摄食等生命活动, 同时会对其免疫系统造成影响^[31-34]。菲律宾蛤仔是广盐性物种, 最适盐度为25~35。在本研究中, 当盐度下降至22时, *RpiLYZ-1*和*RpiLYZ-2*基因表达量波动范围不大, 表明菲律宾蛤仔能适应一定范围内的盐度改变^[35]。但当盐度12刺激1 d时, *RpiLYZ-1*基因在各组织中的表达量均极显著升高,

并随着胁迫时间的延长基因表达量逐渐下降, 而*RpiLYZ-2*基因表达量则随应激时间延长主要呈升高趋势。这表明当盐度变化超出其适应范围时, 机体的正常代谢会受到影响, 进而影响其免疫功能。有研究发现, 15的低盐度处理可损害菲律宾蛤仔的正常代谢活动, 且伴随有鳃、肝胰腺等组织的病理损伤^[35-36]。

鳎弧菌是海洋中危害最严重的病原微生物之一, 已被发现是多种海水养殖贝类的致病病原。在贝类中的研究发现, 弧菌刺激能够引起贝类的免疫反应^[23, 37-38], 且I型溶菌酶对鳎弧菌具有明显的抗菌活性。在本研究中, 鳎弧菌刺激6 h后导致*RpiLYZ-1*基因的表达量明显上调, 且刺激72 h时其基因表达量依然很高; 然而, *RpiLYZ-2*基因的表达量在鳎弧菌刺激后总体呈下降趋势, 并在72 h时恢复至正常水平左右。这可能是*RpiLYZ-1*和*RpiLYZ-2*在鳎弧菌侵袭过程中参与了不同的免疫应答反应。

综上所述, 温度升高、盐度下降以及病原菌刺激都能够引起*RpiLYZ-1*和*RpiLYZ-2*基因表达的显著变化, 且两种I型溶菌酶基因的表达模式存在显著差异, 提示这两种I型溶菌酶可能存在免疫功能分化, 分别参与了菲律宾蛤仔应激反应的不同过程, 其具体的功能分化研究有待于进一步开展。

参考文献:

- [1] Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1922, 93(653): 306-317.
- [2] 吴丹. 褶纹冠蚌i-型溶菌酶基因表达及蛋白活性分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
Wu D. Expression analysis of i-type lysozyme gene from *Cristaria plicata* and enzymatic activity analysis[D]. Nanchang: Nanchang University, 2012(in Chinese).
- [3] 张冉冉. 短蛸无脊椎动物型溶菌酶的分子克隆和功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Zhang R R. Molecular cloning and function analysis of an invertebrate-type lysozyme from mollusk *Octopus ocellatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015(in Chinese).
- [4] Friedrich C L, Rozek A, Patrzykat A, *et al.* Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(26): 24015-24022.
- [5] Bachali S, Bailly X, Jollès J, *et al.* The lysozyme of the starfish *Asterias rubens*: a paradigmatic type i lysozyme[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(2): 237-242.
- [6] Liu M, Zhang S C, Liu Z H, *et al.* Characterization, organization and expression of AmphiLysC, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*[J]. Gene, 2006, 367: 110-117.
- [7] Bachali S, Jager M, Hassanin A, *et al.* Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function[J]. Journal of Molecular Evolution, 2002, 54(5): 652-664.
- [8] Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research?: always a model system, today as yesterday[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1984, 63(2): 165-189.
- [9] 王赞, 龙高群, 张春林, 等. 美洲大蠊i型溶菌酶基因的克隆及其功能预测[J]. 动物医学进展, 2007, 23(7): 542-547.
Wang Y, Long G Q, Zhang C L, *et al.* Molecular cloning and function predicting of i-type lysozyme gene from *Periplaneta americana*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2007, 23(7): 542-547(in Chinese).
- [10] Van Herreweghe J M, Michiels C W. Invertebrate lysozymes: diversity and distribution, molecular mechanism and *in vivo* function[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(2): 327-348.
- [11] Callewaert L, Michiels C W. Lysozymes in the animal kingdom[J]. Journal of Biosciences, 2010, 35(1): 127-160.
- [12] 时少坤. 环境因子对贝类几种免疫因子影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
Shi S K. Studies on the immune parameters of mollusc stimulated by environmental factors[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013(in Chinese).
- [13] Chu F L E, La Peyre J F. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 54(2): 224-232.
- [14] 丁鉴锋, 王锐, 闫喜武, 等. 菲律宾蛤仔3种壳色群体低盐耐受能力的比较研究[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 264-268.
Ding J F, Wang R, Yan X W, *et al.* Comparative

- tolerance to low salinity stress in Manila clam *Ruditapes philippinarum* with three shell colors[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(3): 264-268(in Chinese).
- [15] Zhao J M, Qiu L H, Ning X X, *et al.* Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 156(1): 56-60.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Canesi L, Gallo G, Gavioli M, *et al.* Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves[J]. Microscopy Research and Technique, 2002, 57(6): 469-476.
- [18] 章盈盈, 袁泽轶, 王清, 等. 菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*)Rho型GST和微粒体型GST的序列分析及表达特征研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 798-805. Zhang Y Y, Yuan Z Y, Wang Q, *et al.* Sequence and transcriptional profiles of Rho and microsomal class GST genes in Manila clam *Venerupis philippinarum*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(4): 798-805(in Chinese).
- [19] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates[J]. Aquaculture, 1999, 172(1-2): 125-145.
- [20] 王清, 杨红生, 王晓宇. 镉和苯并芘胁迫对文蛤血淋巴细胞功能的影响[J]. 海洋科学, 2010, 34(9): 82-86. Wang Q, Yang H S, Wang X Y. The effects of cadmium and benzo[a]pyrene exposure on the immune function of *Meretrix meretrix* hemocytes[J]. Marine Sciences, 2010, 34(9): 82-86(in Chinese).
- [21] 樊甄姣. 环境因子和外源刺激对栉孔扇贝免疫活性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005. Fan Z J. Study on the immune activities of *Chlamys farreri* stimulated by environmental changes and exogenous factors[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005(in Chinese).
- [22] Fevolden S, Røed K, Fjalestad K. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness[J]. Aquaculture, 2003, 216(1-4): 67-76.
- [23] Yue X, Liu B Z, Xue Q G. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 550-558.
- [24] Xue Q G, Itoh N, Schey K L, *et al.* A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64(1): 82-95.
- [25] Itoh N, Okada Y, Takahashi K G, *et al.* Presence and characterization of multiple mantle lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea fiftas*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 126-135.
- [26] Kim M, Ahn I Y, Cheon J, *et al.* Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 152(2): 207-213.
- [27] 许友卿, 吴卫君, 丁兆坤, 等. 近江牡蛎i-型溶菌酶基因分析及温度对基因表达的影响[J]. 热带海洋学报, 2012, 31(6): 69-75. Xu Y Q, Wu W J, Ding Z K, *et al.* Analysis of i-type lysozyme gene from *Crassostrea hongkongensis* and the effect of temperature on the gene expression[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2012, 31(6): 69-75(in Chinese).
- [28] 董波, 薛钦昭, 李军. 温度对菲律宾蛤仔滤食率、清滤率和吸收率的影响[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3), 37-42. Dong B, Xue Q Z, Li J. The effect of temperature on the filtration rate, clearance rate and absorption efficiency of Manila clam, *Ruditapes Philippinarum*[J]. Marine Fisheries Research, 2000, 21(3), 37-42(in Chinese).
- [29] Fearman J, Moltschaniwskyj N A. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquaculture, 2010, 305(1-4): 20-25.
- [30] Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 59(3): 249-262.
- [31] 王贵宁, 姜令绪, 王韶华, 等. 盐度对菲律宾蛤仔摄食率和清滤率的影响[J]. 海洋科学, 2010, 34(6): 6-8. Wang G N, Jiang L X, Wang S H, *et al.* Influence of salinity on the ingestion rate and clearance rate of

- Ruditapes philippinarum*[J]. Marine Sciences, 2010, 34(6): 6-8(in Chinese).
- [32] 王帅, 高如承, 温扬敏, 等. 盐度突变对中国血蛤非特异性免疫酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2008(5): 213-215.
- Wang S, Gao R C, Wen Y M, *et al.* Effects of abrupt decline in salinity on nonspecific immune enzyme activities of *Hiatula chinensis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008(5): 213-215(in Chinese).
- [33] 阎希柱, 王桂忠, 李少菁. 盐度对九孔鲍能量收支的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(8): 1520-1524.
- Yan X Z, Wang G Z, Li S J. Effects of water salinity on energy budget of *Haliotis diversicolor aquatilis*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(8): 1520-1524(in Chinese).
- [34] 时少坤, 王瑞旋, 王江勇, 等. 盐度胁迫对近江牡蛎几种免疫因子的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(3): 26-30.
- Shi S K, Wang R X, Wang J Y, *et al.* Effects of salinity stress on immune factors of *Crassostrea hongkongensis* [J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(3): 26-30(in Chinese).
- [35] 宋晓楠, 马峻峰, 秦艳杰, 等. 盐度骤降对菲律宾蛤仔抗氧化酶活力及组织结构的影响[J]. 农学学报, 2013, 3(1): 50-56, 70.
- Song X N, Ma J F, Qin Y J, *et al.* Effects of abrupt decline in salinity on the antioxidant enzyme activities and histological structure in *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Agriculture, 2013, 3(1): 50-56, 70(in Chinese).
- [36] Kim W S, Huh H T, Huh S-H, *et al.* Effects of salinity on endogenous rhythm of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae)[J]. Marine Biology, 2001, 138: 157-162.
- [37] 潘宝平, 宋欣, 罗凯娅, 等. 青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 901-906.
- Pan B P, Song X, Luo K Y, *et al.* Expression of lysozyme gene in *Vibrio anguillarum* challenged *Cyclina sinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 901-906(in Chinese).
- [38] Bassem A, Christine P, Michel A, *et al.* Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 384-397.

Expression analysis of two I-type lysozyme genes from *Ruditapes philippinarum* under temperature and salinity stress and *Vibrio anguillarum* challenge

ZHU Yanxia^{1,2}, MU Changkao^{1,2}, WANG Chunlin^{1,2*}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo 315211, China)

Abstract: I-type lysozymes have been found to play significant roles in the innate immune responses of mollusk. In the present study, the full-length cDNA of an I-type lysozyme (designated RpiLYZ-2) was cloned from *Ruditapes philippinarum* by RACE approaches. The open reading frame of RpiLYZ-2 was 471 bp and encoded a polypeptide of 156 amino acids. The *RpiLYZ-2* transcript was expressed in all detected tissues with the highest expression level in mantle and the lowest expression level in muscle. After being exposed to temperature[(29±1), (21±1), (13±1)°C], salinity (32, 22 and 12) stress and *Vibrio anguillarum* challenge, the expression of *RpiLYZ-1* and *RpiLYZ-2* displayed distinct pattern in the detected tissues. After being stimulated by elevated temperature (21 °C) or salinity 22 stress, the expression pattern of *RpiLYZ-1* transcript was decreased after the initial increase, while the expression pattern of *RpiLYZ-2* transcript displayed an opposite trend. After being stimulated by elevated temperature 29 °C or salinity 12 stress, the expression pattern of *RpiLYZ-1* transcript was down-regulated as time progressed on, while the expression of *RpiLYZ-2* mRNA showed an opposite trend. After being challenged with *V. anguillarum*, a significant up-regulation of *RpiLYZ-1* was observed except 12 h, while the expression of *RpiLYZ-2* mRNA was significantly inhibited at the early stage of bacterial challenge and recovered at 72 h. The above results suggested that environmental factors and pathogenic stimulation affected the clam's innate immune responses and the expression of *RpiLYZ-1* and *RpiLYZ-2*, and functional division perhaps existed between *RpiLYZ-1* and *RpiLYZ-2*.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; I-type lysozyme; gene cloning; temperature; salinity; *Vibrio anguillarum*

Corresponding author: WANG Chunlin. E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

Funding projects: National Key Technology Support Program(2011BAD13B0903)