

泥蚶卵黄原蛋白基因的克隆及其在 Pb 胁迫下的表达特征

吴林德^{1,2}, 陈彩芳², 林志华^{2*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源高效利用重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 利用 SMART RACE 技术克隆获得泥蚶卵黄原蛋白(Vitellogenin Vg)部分 cDNA 序列, 长为 1 411 bp, 包含 1 362 bp 的开放阅读框, 编码 454 个氨基酸. 空间表达结果发现泥蚶 Vg mRNA 主要在卵巢和消化腺中表达. 在 1, 3, 6, 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅(Pb)胁迫 28 d 后检测发现, 前 3 个质量浓度组泥蚶消化腺中的 Vg 表达量呈先抑制后升高趋势; 而在 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 暴毒组中, Vg 在整个实验过程中均被诱导表达, 表达量呈先升高后降低趋势. 4 个实验组中, 泥蚶消化腺 Vg 表达量均在 21 d 达到最大值($P<0.01$). 故泥蚶消化腺 Vg 表达量和 Pb 胁迫具有一定的时间效应和剂量效应, 推测其抗氧化剂功能在 Pb 胁迫引起的氧化损伤中起作用.

关键词: 泥蚶; 卵黄原蛋白; 铅; 抗氧化剂

中图分类号: S944

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 02-0006-06

泥蚶(*Tegillarca granose*)主要分布在我国山东以南沿海一带, 是我国传统的四大经济养殖贝类之一. 但近年来对贝类的抽样调查发现, 泥蚶中重金属超标现象严重^[1-3]. 如果重金属在生物体内富集, 则会与 DNA 相互作用导致遗传突变^[4]; 此外还会促进活性氧自由基形成, 活性氧自由基则会攻击细胞膜中多不饱和脂肪酸, 造成机体内过氧化物的增加, 从而造成氧化损伤^[5-7]. 因此, 在重金属污染产生不可修复的危害之前, 寻求一种高效灵敏的监测方法是当务之急. 水体中重金属污染监测方法主要有化学分析法和生物标志物法, 前者往往很难评估重金属污染的潜在毒性, 而后者灵敏性高, 将其作为重金属污染的“早期预警”更适宜^[8-9]. 目前, 监测重金属污染的生物标志物主要有金属硫蛋白(MT)^[10]及抗氧化酶系统^[11], 这些生物标志物所适用的条件、物种及有效性仍待定. 所以探讨滩涂贝类在重金属胁迫下的调控机制, 从中筛选指示重金属污染的生物指标, 对水体重金属污染监测具有重要的意义.

卵黄原蛋白(Vitellogenin Vg)是卵黄蛋白(Vite-

llin Vn)的前体, 为机体的胚胎发育提供营养物质, 还参与动物的免疫防御过程, 具有抗氧化剂、凝集素和调脂素作用. 正常情况下, Vg 作为一种“雌性特异性”蛋白, 在成熟雌性个体中含量较高, 而在幼体和雄性个体中含量低, 甚至检测不到^[12]. 重金属作为环境类雌激素能诱导幼体、雄性和非繁殖期雌性动物合成 Vg^[13], 使机体内 Vg 浓度大幅升高, 并且 Vg 将在体内保持很长时间, 此特性为检测水生环境重金属污染物的雌激素效应提供了有效方法^[14]. 本研究首次克隆获得泥蚶 Vg 基因的部分序列, 并对其进行生物信息学、空间表达及 Pb 胁迫下泥蚶 Vg 的表达规律研究, 探索 Vg 基因作为 Pb 富集的生物标志物的机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

泥蚶由宁波甬盛水产种业有限公司提供, 分别在泥蚶的繁殖期和非繁殖期选取活力好、大小均一的 2 龄泥蚶, 长度(2.94 ± 0.16)cm. 繁殖期泥蚶经活体解剖, 取闭壳肌、鳃、消化腺、外套膜、斧足、

收稿日期: 2015-03-11.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://nbdxlg.paperopen.com/>

基金项目: 国家贝类产业技术体系(CARS-48); 宁波市自然科学基金(2014A610188); 浙江万里学院省重中之重(KF2014001, CX2014025).

第一作者: 吴林德(1989-), 男, 浙江丽水人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋贝类环境生物学. E-mail: 15257493225@163.com

*通信作者: 林志华(1965-), 男, 浙江温州人, 研究员, 主要研究方向: 海洋贝类遗传育种及养殖. E-mail: zhihua9988@126.com

卵巢和血液 7 个组织。卵巢组织用于 *Vg* 基因的克隆实验, 其他 6 个组织用于空间表达实验。非繁殖期泥蚶作为 Pb 胁迫实验材料。参照顾海龙研究方法^[11], 非繁殖期泥蚶先在海水中暂养 7 d, 实验所用海水水温(25±1.0)°C。Pb(NO₃)₂ 试剂配制成 Pb²⁺ 质量浓度为 1.000 g·L⁻¹ 母液备用; 根据《海水水质标准(GB 3097-1997)》Pb 质量浓度为 5 μg·L⁻¹ 的限量, 设置各实验组水体的 Pb²⁺ 浓度依次为 0, 1, 3, 6, 9 μg·L⁻¹, 其中, 0 μg·L⁻¹ 作为对照组, 1 μg·L⁻¹ 和 3 μg·L⁻¹ 为低于水质标准的实验浓度, 6 μg·L⁻¹ 和 9 μg·L⁻¹ 为高于水质标准的实验浓度。实验开始前用等浓度 Pb²⁺ 的实验水体浸泡塑料箱 24 h, 消除容器对重金属的吸附作用。每个实验组加入实验水体 20 L, 每箱放置 40 颗泥蚶, 实验期间连续充气。分别在实验开始的 0, 7, 14, 21, 28 d 进行取样, 每箱取 3 颗泥蚶, 解剖后取其消化腺, 用液氮速冻, 保存于 -80°C 冰箱中。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

参照 Trizol 总 RNA 提取说明书上的方法, 提取繁殖期泥蚶血液、外套膜、斧足、消化腺、鳃、闭壳肌和卵巢的总 RNA, 合成 cDNA 第一链, 用于泥蚶 *Vg* 基因的空间表达实验。泥蚶卵巢 cDNA 第一链也用于泥蚶 *Vg* 基因克隆实验。对 Pb 胁迫的非繁殖期泥蚶取其消化腺, 获得 cDNA 第一链用于 Pb 胁迫下泥蚶 *Vg* 表达变化实验。

1.3 泥蚶 *Vg* 基因克隆

根据同源克隆法, 以太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、栉孔扇贝(*Azumpecten farreri*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*) *Vg* 保守区域为模板设计简并引物 *Vg*-TY-F 和 *Vg*-TY-R(表

1), 以泥蚶卵巢的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得长为 608 bp 的泥蚶 *Vg* 片段(GenBank 登录号为 JQ266265)。并在此片段基础上设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异引物 *Vg*-RACE-F 和 *Vg*-RACE-R(表 1), 进行泥蚶 *Vg* 基因的全长克隆研究。

1.4 泥蚶 *Vg* 基因序列的生物信息学分析

将测序得到的序列在 NCBI 中进行 blast 检索, 以验证 cDNA 序列为泥蚶 *Vg* 基因; 在 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 中进行开放阅读编码框的预测; 经在线分子量和等电点计算 (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html) 得出该序列的分子量和等电点, 利用 PSORT II Prediction 进行氨基酸序列分析; Clustal W 程序进行多序列比对; Mega 6.0 软件的 Neighbor Joining 构建系统进化树。

1.5 泥蚶 *Vg* 基因的表达规律研究

用 Primer 5.0 设计荧光定量引物, 以合成的 cDNA 第一链为模板对引物进行筛选, 选取扩增产物无非特异性扩增和引物二聚体的引物, 获得目的基因引物 *Vg*-real-F、*Vg*-real-R 和内参基因引物 β -actin-F、 β -actin-R(表 1)进行 real-time PCR 进行泥蚶 *Vg* 基因空间表达和 Pb 胁迫下泥蚶 *Vg* 表达变化规律研究。

所有数据用 SPSS 16.0 One-Way ANOVA 进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示存在显著差异, $P < 0.01$ 为存在极显著差异。

2 结果

2.1 泥蚶 *Vg* 基因克隆及分析

通过 SMART RACE 克隆获得长为 1 411 bp 的泥蚶 *Vg* 核酸序列, 推导分子量为 52 356.04 Da, 理

表 1 实验所用到的引物序列

引物	序列(5'→3')	引物信息
<i>Vg</i> -TY-F	CAATGGGSAGCACGATTTATTCC	同源克隆引物
<i>Vg</i> -TY-R	CTGMTCCCTGACACATTCGGGC	-
<i>Vg</i> -RACE-F	CAAGGCACTACGGCTTATCCCACGAC	3' RACE 扩增
<i>Vg</i> -RACE-R	CGCAGTAATCTGCCCTCTTCTCCATTT	5' RACE 扩增
<i>Vg</i> -real-F	TATGGAGCCAAGCATTGGTGG	荧光定量引物
<i>Vg</i> -real-R	GAAGGAAGCCCCGATTTAGACA	-
β -actin-F	GTTATGGTTGGTATGGGACAG	荧光定量内参基因引物
β -actin-R	GCTTTTGGATTTAGAGGTGCT	-

论等电点为 9.13, 第 13、14 个氨基酸间为裂解位点, 且第 1~13 个氨基酸为裂解信号肽(图 1)。

2.2 泥蚶 *Vg* 的系统进化树构建

对泥蚶和 11 种水生动物 *Vg* 氨基酸序列进行比对并构建系统进化树(图 2)。所选物种为太平洋牡蛎、虾夷扇贝、栉孔扇贝、欧洲大扇贝、皱纹盘鲍、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、北方蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、大西洋龙虾(*Homarus americanus*)、南美白对虾(*Metapenaeus ensis*)、墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)。由图 2 可见, 泥蚶与瓣鳃纲贝类亲缘关系最近, 其次为腹足纲贝类, 最后与虾类和鱼类聚为一支。其聚类顺序与传统分类基本相一致。

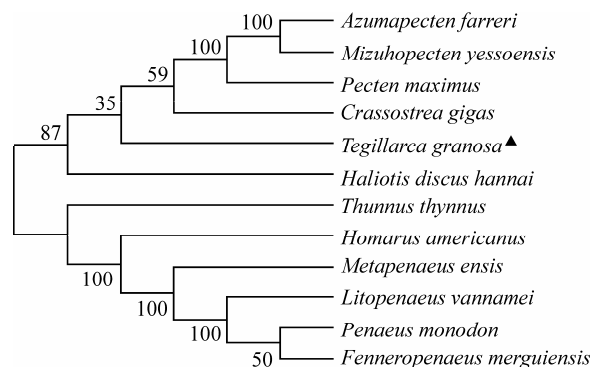


图 2 12 种水生动物 *Vg* 基因的系统进化树

2.3 泥蚶 *Vg* mRNA 的表达规律

经 Real-time PCR 检测发现, 在繁殖期泥蚶中, *Vg* mRNA 主要在卵巢和消化腺中表达, 但在其他组织中则不表达, 且卵巢和消化腺的 *Vg* 表达量成

```

1  ACATGGGGGCTCTGGTCATTTTGGTAGCCAACTCCAGCGGTAGTCGCCATTCGTTTG
1  CTGCTGGTAGCGGCGGTGGCCAGCGCTTTAAAAATACATCCGGGTCAGGAATACACATAT
61  L L V A A V A S A L K I H P G Q E Y T Y
5  CAATATGAGACACAGATAACGACGGGTGTCCTACAGAAAGTACGATTTATTCGGGTTG
121  Q Y E T Q I T T G V P T E S T I Y S G L
25  AAGCTGAAGTGCACAGTCAGATTCCAAACGCTTACGTCATCCATGACCATGAAGTTT
181  K L K C T V R F Q T L T S S S M T M K F
45  GAAAATCCGACTTTGTTGAGTTTGAACGGGCAAGTCACTACGGCTGATCCACGACTGAA
241  E N P T L L S L N G Q V T T A D P T T E
65  CAGTGGCGGAAGATATGTTCAAACATTAAATGGAGAAGAGGGCAGATTACTGCGTGAA
30  Q L P E D M F K P L N G E E G R L L R E
85  TTCTTGTCAAAACCTGTCAAATTTACGTATATTAGAGGAAGTTTCAGTAACGTTTCAGACG
361  F L S K P V K F T Y I R G S F S N V Q T
105  GAATCAGATGACCCCGAGTGGTCAGTCAACATAAAACGTGGATTGTTGAGTCTGGGGGTC
421  E S D D P E W S V N I K R G L L S L G V
125  ATAACTTTGAAGAAAGAAATGCGCTTGACCCCGTCAGCAGAATGTTAAACACTGGACGA
481  I N F E E R R S L D P V S R M L N T G R
145  CTTCCACAAGACCAGACAGAAATATATCTCAGTTATGGAGACAAGCATTGGTGGTGAGTGT
541  L P Q D Q T E I Y S V M E T S I G G E C
165  GAGACCGTGTACAACGTTAGACCATTTGAGTCACTCGAGTGGAGAACCTAGAAATGTTT
601  E T V Y N V R P L L D S S G E P R M F
185  GTTACAAAACCTAGAAACTACATGAAATGTCTAAATCGGGCTTCTTTCACCAACAATATA
661  V T K T R N Y M K C L N R A S F T N N I
205  TACCATGGTCATACATGTGCGCAATGTGAAAGAGACAGGACGGAACCAAGTGAAGTCTGGA
721  Y H G H T C A E C E K D R T E P V K S G
225  TCACAGATTTCATTATGTTATACTTGGAATAAGAGGGAATACCTTGTGAGAGCATTATT
781  S Q I H Y V I L G N K R E Y L V E S I I
841  GCAGAAAGTCAGCAGCTCTTTACCATATTTCTGAGAAAGGAGGCAATGTAGCCACTTAC
265  A E S Q H V F T P Y S E K G G N V A T Y
901  ATCAATCAAAACGTTGATCTTGACTGGTGTGAAAGAGCAACAAGAAGAGTATCCCTGCGA
285  I N Q T L I L T G V K E Q Q E R V S L R
961  AGCCCAAAAAGACAGCCATCTGACCTTCTAGCACAACTACCGGGTCAAAGGAAACAACAG
305  S P K R Q P S D L L A Q L P G Q R K Q Q
1021  CAACAACAGGAAGAGCAGTCAAGAACAAGAGAGTAGTAGTCAGGAACAACAGAAAGACGA
325  Q Q Q E S S Q E Q E S S S Q E Q P E R R
1081  CGTCAACCAGTAAGTCGGGATCAGCAACAATCATCTCAACAGAGACGACGTCACAAAGG
345  R Q P V S R D Q Q Q S Q Q R R R Q Q R
1141  CGACGACAAAGACAGGAACAACAAGAACAACAATCACAGGAAGAACAACAGAGATCA
365  R R Q R Q E Q Q E Q Q Q Q E E Q Q R S
1201  TTGCAAAAGATTGATAAATTATTGCACACTCTTTTCGACGTTTACTGATGTAACTATTCAA
385  L Q K I D K L L H T L S T F T D V T I Q
1261  GAAGAGGCCCGGACCATTCGTTTGGATTGTTGAGGAATACCAAAAAGCAGCAGCATT
405  E E A G P F V L L L E E Y Q K A D D I
1321  GTGTTGAGACAGCTGTTCCAGAAATATTGTTTTCAGAACGAAACCAAGTAACCCCAATC
425  V L R Q L F Q K Y C S E R N P S N P Q I
1381  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGC
445  K K K K K K K K K K

```

方框表示起始密码子, 虚线表示裂解信号肽, 竖线表示可能的裂解位点, 点虚线为富含 A 的区域

图 1 泥蚶 *Vg* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

极显著差异($P<0.01$)(图 3).

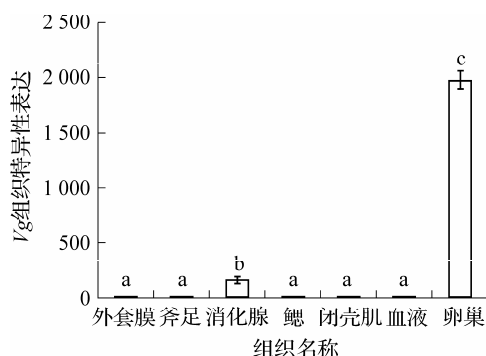


图3 V_g 基因在繁殖期泥蚶 7 种组织中的表达差异分析

不同 Pb 浓度胁迫下泥蚶消化腺 V_g mRNA 的表达差异如图 4 所示. 由图可见, 在不同浓度 Pb 胁迫下, V_g mRNA 表达量不同. 其中 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 胁迫下, V_g 的表达在第 7 天被抑制, 之后被诱导; 21 d, V_g mRNA 的表达量达到最大值, 为对照组的 4.4 倍, 与同浓度的其他实验组差异极显著($P<0.01$); 28 d, V_g mRNA 的表达量相对于 21 d 极其显著降低($P<0.01$)(图 4(a)). 在 $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 胁迫下, 14 d 时, V_g mRNA 的表达量被抑制, 其表达量显著低于对照组($P<0.05$), 为对照组的 0.1 倍; 在 21 d 被诱导达到最大值, 为对照组的 3.8 倍, 与同浓度的其他实验组差异极显著($P<0.01$); 28 d, V_g mRNA 的表达量极其显著低于 21 d($P<0.01$)(图 4(b)). $6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胁迫下, 前 14 d V_g 被抑制表达; 21 d 被诱导达到最大值, 表达量为对照组的 13.1 倍, 极其显著高于同浓度的其他实验组($P<0.01$); 28 d, V_g 的表达量迅速下降, 相对于 21 d 差异极其显著($P<0.01$)(图 4(c)). $9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胁迫下, 整个实验过程中均被诱导表达; 21 d 表达量达到最大值, 为对照组的 29.2 倍, 极其显著高于同浓度的其他实验组($P<0.01$); 28 d 的表达量相对于 21 d 极其显著降低($P<0.01$)(图 4(d)); 在对照组中, 各个时间点表达量没有显著差异($P>0.05$).

3 讨论

通过 RACE 获得 V_g 基因 1411 bp, 其中开放阅读框 1362 bp, 编码 454 个氨基酸. 分子量 52 356.04 Da, 理论等电点为 9.13, 第 13 个和第 14 个氨基酸之间为裂解位点, 且第 1~13 个氨基酸为裂解信号肽. 在进行 3'-RACE 扩增后, 未能获得该基因的 cDNA 3'端全部序列. 孙大鹏等^[15]在栉孔扇贝 V_g

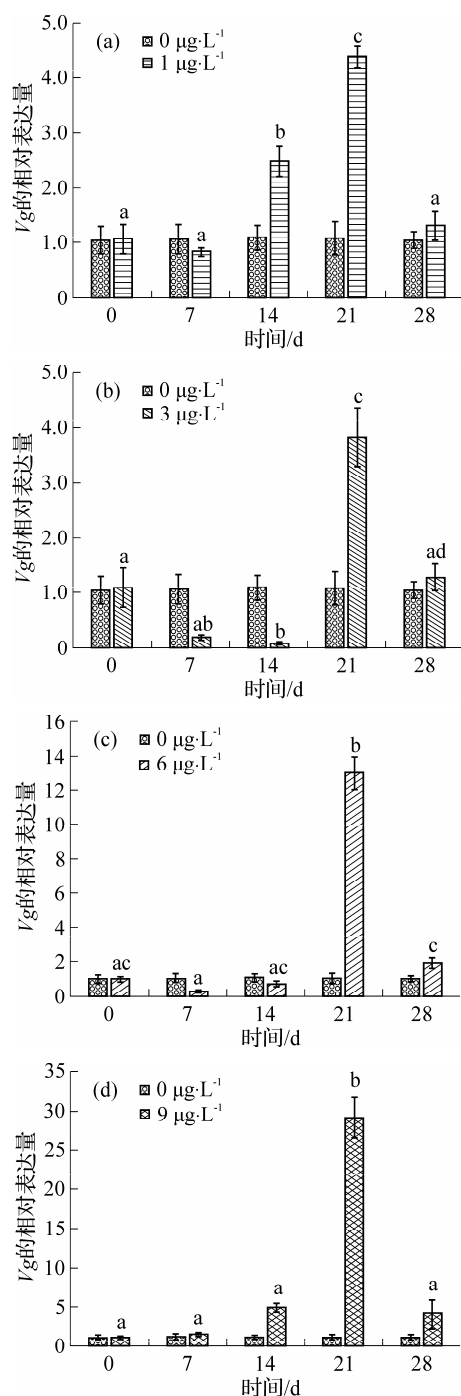


图4 不同质量浓度 Pb 下泥蚶消化腺中 V_g 表达水平分析基因的克隆中也发生过类似情况. 这可能是与 V_g mRNA 3'端富含 A, 在反转录过程中较易同引物 3'-RACE CDS Primer A 中的 polyT 序列错配有关.

双壳类 V_g 基因的合成部位已经有广泛研究, 通过透射电镜对泥蚶^[11]、太平洋牡蛎^[17]、文蛤 (*Meretrix meretrix*)^[18]、青蛤 (*Cyclina sinensis*)^[19] 的研究发现 V_g 在消化腺和卵巢中均会表达, 且与本文

结果类似,但笔者发现卵巢是其表达的主要部位,这与上述研究^[11,17-19]结果不同。有研究发现 *Vg* 基因合成的主要场所与所选实验材料发育时期有关。程翔等^[20]对中国明对虾(*Penaeus chinensis*)的研究发现,在次级卵黄发生时期, *Vg* 主要在消化腺中表达,而在发育其他阶段 *Vg* 主要在卵巢中表达,在发育消退期,卵巢中 *Vg* 的表达量明显高于消化腺。

消化腺是贝类储存 Pb 的主要器官^[21]。在繁殖期泥蚶 *Vg* 的空间表达实验中发现, *Vg* 在消化腺中表达量较高,机体本身其高表达 *Vg* 的这种现象会对本文研究 Pb 胁迫下 *Vg* 表达变化产生影响,通过其他研究笔者发现在非繁殖期机体中 *Vg* 表达量很低^[16],甚至不表达^[12],故选择非繁殖期泥蚶作为研究对象。笔者发现在 1, 3, 6, 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 胁迫下,泥蚶 *Vg* 均会被诱导表达,在 21 d 达到最大值,且泥蚶 *Vg* mRNA 表达具有剂量效应。顾海龙^[11]发现在 Cd 胁迫下,非繁殖期泥蚶消化腺 *Vg* 能够被显著诱导表达,且表达量会维持在较高水平。张倩等^[22]也发现污水厂排放的污水能诱导文蛤血液 *Vg* 表达。另外, Nelson 等^[23]发现蜜蜂能通过 *Vg* 清除体内自由基来降低体内氧化压力而延长寿命。而在贝类中, Seehuus 等^[24]发现华贵栉孔扇贝(*Mimachlamys nobilis*) *Vg* 具有抗氧化活性,所以笔者推测由于 Pb 在泥蚶消化腺中富集促进活性氧自由基(ROS)产生,打破机体内自由基的平衡,使得机体处于氧化应激状态,从而使 *Vg* 基因被大量诱导表达,清除氧化自由基,缓解氧化压力,维持机体内自由基平衡。在 28 d, *Vg* mRNA 表达量相对于 21 d 的表达量极显著下降。刘春等^[25]对剑尾鱼的研究也发现类似现象。原因可能是因为 Pb 在泥蚶消化腺中富集后,和蛋白质的羟基、氨基和巯基结合,使其失活,从而减少 *Vg* 的表达量;另一种原因可能是机体启动其他更加有效的防御措施,如通过诱导 MT 表达来缓解重金属的毒性作用^[26]。

4 结论

通过 SMART RACE 技术克隆获得泥蚶 *Vg* 部分序列,对其进行生物信息学进行分析,并利用 real-time PCR 研究 *Vg* 空间表达,发现在繁殖期泥蚶中 *Vg* 主要在消化腺和卵巢中表达。探索在不同浓度 Pb 胁迫,泥蚶消化腺中 *Vg* 表达变化规律,初

步探讨 *Vg* 对重金属 Pb 胁迫的应答反应机制,推测 Pb 胁迫下泥蚶 *Vg* 的抗氧化剂功能在重金属引起的氧化损伤中发挥重要作用。且泥蚶消化腺中 *Vg* 表达与 Pb 胁迫浓度呈现时间和剂量效应,可以作为监测重金属污染的生物标志物。

参考文献:

- [1] 王成钢, 张卫兵, 周颖, 等. 南通沿岸经济贝类体内重金属含量分析[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(3):45-49.
- [2] 唐以杰, 钟诚, 陈明旺, 等. 海陵岛沿岸经济贝类体内重金属含量及食用安全分析[J]. 中国现代医药科技, 2004, 4(3):8-10.
- [3] 陈玲, 傅晖蓉, 曾志定. 泉州市贝类产品中重金属元素污染情况分析[J]. 检验医学与临床, 2004, 1(2):62-63.
- [4] 王晓宇, 杨红生, 王清. 重金属污染胁迫对双壳贝类生态毒理效应研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 33(10):112-118.
- [5] STOHS S J, BAGCHI D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1995, 18(2):321-336.
- [6] GAETKE L M, CHOW C K. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients[J]. Toxicology, 2003, 189(1/2):147-163.
- [7] MCGEER J C, NIYOGI S, SMITH D S. 3-Cadmium[J]. Fish Physiology, 2011, 31(2):125-184.
- [8] DEL A, TORRE F R, FERRARI L, et al. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a periurban polluted river of Argentina[J]. Chemosphere, 2005, 59(4):577-583.
- [9] CARAJAVILLE P, BEBIANNO J, BLASCO J, et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: A practical approach[J]. The Science of the Total Environment, 2000, 247:295-311.
- [10] BEBIANNO M J, LANGSTON W J. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* [J]. Comp Biochem Physiol, Part C, 1992, 103(1):79-85.
- [11] 顾海龙. Cd、Pb、Hg 暴露下泥蚶的分子生态毒理学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [12] DAESIK H, KYUN WOO L, JEONGHOON H, et al. Molecular characterization and expression of vitellogenin (*Vg*) genes from the cyclopoid copepod: Paracyclops nana exposed to heavy metals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology & Part C, 2010, 151:360-368.
- [13] FLOURIOT G, PAKDEL F, DUCOURET B, et al. In

- uence of xenobiotics on rainbow-trout liver estrogen-receptor and vitellogenin gene-expression[J]. Molecular Endocrinology, 1995(15):143-151.
- [14] MITSUI N, TOOI O, KAWAHARA A. Sandwich ELISAs for quantification of *Xenopus laevis* vitellogenin and albumin and their application to measurement of estradiol-17 β effects on whole animals and primary-cultured hepatocytes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology & Pharmacology, 2003, 135(3):305-313.
- [15] 孙大鹏. 青岛流清河湾扇贝养殖笼大型污损生物的挂板调查和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)卵黄原蛋白基因 cDNA 全长的克隆机表达分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [16] 吴彪. 虾夷扇贝卵黄原蛋白基因克隆、表达和免疫功能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [17] 任素莲, 王德秀, 王如才. 太平洋牡蛎卵母细胞发育及卵黄发生的超微结构[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4):1-5.
- [18] 应雪萍. 文蛤卵母细胞卵黄发生的超微结构[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2):125-128.
- [19] 曾志南, 李复雪. 青蛤卵母细胞发育过程和卵黄发生的超微结构研究[J]. 海洋学报, 1991, 13(5):679-683.
- [20] 程翔, 蔡生力, 刘红, 等. 中国明对虾卵黄原蛋白 mRNA 在卵巢和肝胰腺中表达量的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 12(1):1-6.
- [21] REGOLI F. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1998, 34 (1), 48-63.
- [22] 张倩, 孟范平, 付文超, 等. 市污水厂尾水对文蛤卵黄原蛋白的诱导效应研究[J]. 中国海洋大学学报, 2014, 44(12):100-105.
- [23] NELSON C. MINDY I. KATE E, et al. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization[J]. Plos Biology, 2007, 5(3):673-677.
- [24] SEEHUUS S, NORBERG K, GIMSAU U, et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress[J]. Proceedings of the National Academy Sciences, 2006, 103(4):962-967.
- [25] 刘春, 李凯彬, 王芳, 等. 剑尾鱼卵黄原蛋白 C(Vg C) 全长 cDNA 的克隆及表达[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1441-1449.
- [26] PARKJ D, LIU Y, KLAASSEN C. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals[J]. Toxicology, 2001, 163:93-100.

Molecular Cloning and Expression of Pattern Features under Pb Stress for Vitellogenin from *Tegillarca granosa*

WU Lin-de^{1,2}, CHEN Cai-fang², LIN Zhi-hua^{2*}

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

2.Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: Using the SMART RACE method, Vitellogenin(Vg) part cDNA sequence is obtained. The fragment cDNA of Vg gene is 1 411 bp, which consists of an open reading frame of 1 362 bp encoding a polypeptide of 454 amino acids. Homology alignment results reveal that the similarity of deduced amino acid sequence with other bivalve shellfish is higher than 49%. The results of tissue-specific expression by real time PCR show that Vg of *Tegillarca granosa* in breeding period is mainly expressed in ovarian and digestive gland. After challenged by 1, 3, 6, 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration of Pb for 28 days, the results of relative expression in digestive gland of *Tegillarca granosa* in non-breeding period of Vg mRNA is obtained showing that the first three groups are first slightly reduced followed by a significant increase. Throughout the experiment, Vg mRNA is used as the induced expression and the expression quantity is obtained after the first rise followed by decrease under stress of the concentrations of 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb. Vg expression reaches highest at 21 d under Pb stress ($P<0.01$). In addition, Pb induces Vg expression with the relationship between dose-effect and time-effect. It is speculated that the antioxidant functions play a role in the oxidative damage caused by Pb stress.

Key words: *Tegillarca granosa*; vitellogenin; Pb; antioxygen

(责任编辑 章践立)