

## 杂色鲍同种移植炎症因子 1 的克隆及其在 应激下的表达

黄贻涛<sup>1</sup>, 蔡秀红<sup>1</sup>, 张子平<sup>2</sup>, 王国栋<sup>1</sup>,  
邹志华<sup>1</sup>, 王淑红<sup>1</sup>, 王艺磊<sup>1\*</sup>

(1. 集美大学水产学院,农业部东海海水健康养殖重点实验室,福建 厦门 361021;  
2. 西东大学生物系,新泽西州 美国 07079)

**摘要:** 同种移植炎症因子 AIF-1 (allograft inflammatory factor 1, AIF-1) 是一种由干扰素  $\gamma$  诱导的含有 EF-hand 结构域的钙离子结合蛋白,其功能主要是参与移植排斥、免疫炎症反应、自身炎性和非炎性的损伤等。首次克隆了杂色鲍 AIF-1 基因 cDNA 全序列,命名为 *HdAIF-1*,其全长为 942 bp,开放阅读框为 456 bp,编码 151 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 结果表明:*HdAIF-1* 在杂色鲍各组织中均有表达,其中在血淋巴和鳃中表达量最高。高温应激下,*HdAIF-1* 在鳃组织中各时相表达均显著上调,并在温度升至 31 °C 时达到最高。而血淋巴和肝胰腺中 *HdAIF-1* 在高温应激前 4 个时相表达无显著差异,到了 96 h 均显著上调。缺氧应激下,*HdAIF-1* 在血淋巴中表达变化没有显著差异,而鳃中 24 h 显著下调,192 h 显著上调。副溶血弧菌感染实验表明 *HdAIF-1* 基因在感染后 3、24 和 48 h 均检测到 *HdAIF-1* 的表达量显著上调。高温和缺氧应激以及弧菌感染均显示 *HdAIF-1* 基因表达量发生显著变化,说明 *HdAIF-1* 可能作为免疫因子在杂色鲍应激等状况下发挥重要作用。

**关键词:** 杂色鲍; 同种移植炎症因子; 高温; 缺氧; 副溶血弧菌

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 隶属软体动物门 (Mollusca)、腹足纲 (Gastropoda)、原始腹足目 (Archaeogastropoda)、鲍科 (Haliotidae)、鲍属 (*Haliotis*), 是中国福建广东等省重要的经济养殖贝类。然而近年来,随着水环境污染的加剧,而沿海地区养殖规模却不断壮大,杂色鲍养殖过程中各种疾病频繁发生,不仅给养殖户带来重大的经济损失,也影响着杂色鲍的持续健康养殖<sup>[1]</sup>,另外夏季的高温及缺氧也是杂色鲍大规模死亡的主要原因<sup>[2-3]</sup>,因此克隆获得杂色鲍在应对环境刺激时表达的炎症相关因子基因可了解鲍的免疫机制提供基础资料。

同种移植炎症因子 (allograft inflammatory factor 1, AIF-1) 是一种由干扰素  $\gamma$  诱导的含有

EF-hand 结构域的钙离子结合蛋白<sup>[4]</sup>,最早克隆自小鼠异源心脏移植物的巨噬细胞<sup>[5-7]</sup>。其结构与离子化的钙结合接头分子 (ionized calcium binding adaptor molecule-1) 及小神经胶质反应因子 1 (microglia response factor-1) 相似<sup>[8]</sup>。自从发现 AIF-1 后,许多研究都表明它是在巨噬细胞激活作用过程中调节免疫反应的基因,在同种移植、自身免疫炎症反应及动脉损伤的血管平滑肌细胞中都发挥重要的作用<sup>[9-11]</sup>。作为先天免疫重要因子, AIF-1 基因在软体动物中的作用近年来开始受到学者们的关注,目前仅见的研究发现在副溶血弧菌感染后,马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*)、文蛤 (*Venerupis philippinarum*) 和盘鲍 (*H. discus discus*) 血淋巴中 AIF-1 基因的表达量

收稿日期:2012-12-03 修回日期:2013-03-31

资助项目:国家自然科学基金项目(41006105;41176152);集美大学创新团队基金(2010A001)

通信作者:王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

均显著上调,显示其在免疫反应中的重要作用<sup>[12-14]</sup>,但关于其在高温、缺氧等应激状态下的反应未见报道。实验首次克隆了杂色鲍 *AIF-1* 基因(命名为 *HdAIF-1*)全长 cDNA,并对 *HdAIF-1* 在杂色鲍中的各组织表达谱以及 31 °C 应激之后多个时相血淋巴、肝胰腺和鳃,缺氧情况下血淋巴和鳃以及副溶血弧菌注射之后血淋巴的表达变化进行分析,可望为杂色鲍在高温、缺氧等应激及弧菌感染条件下的机体免疫机制的研究带来新的视野。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

杂色鲍取自福建漳浦宏运鲍鱼养殖厂,体长(5.18 ± 0.39)cm,体质量(15.70 ± 2.48)g,于实验室 25 °C 的海水循环系统中暂养 10 d 后用于实验。

### 1.2 方法

**高温应激实验** 对照组以杂色鲍生长最适温度(22 ~ 28 °C)的中间温度 25 °C 进行实验。高温组根据刘贤德等<sup>[15]</sup>和游伟伟等<sup>[16]</sup>报道的杂色鲍温度生长实验先进行预实验,设定 28、31、33 及 35 °C 4 个高温梯度,观察杂色鲍的生长状况:28 °C 下 20 只鲍生长均良好,活力仍较好;31 °C 初始一段时间鲍反应有些大,腹足收缩较为频繁,24 h 之后,活力有所恢复,96 h 有 30% 的鲍死亡;33 °C 应激下,鲍在 96 h 内全部死亡;35 °C 应激下,鲍在 12 h 内全部死亡。根据数据统计及活力观察,最终确定以 31 °C 进行高温应激实验。高温组从 25 °C 按照 1 °C/h 升温,温度升至 28 °C 时作为第 1 时相取样,升至 31 °C 时作为第 2 时相取样,在 31 °C 持续高温应激下,取 4、24、96 和 192 h 时间点依次做为第 3、4、5、6 时相。实验组和对照组各取 8 只杂色鲍的血淋巴、鳃和肝胰腺,保存于液氮中,用以 RNA 提取。

**缺氧诱导实验** 根据 Ivanina 等<sup>[17]</sup>进行的太平洋牡蛎(*Crassostrea virginica*)缺氧相关实验设定 2 mg/L 的溶氧量为实验组,对照组为空气曝气(溶氧约为 5.5 mg/L)。分别于 4、24、96 和 192 h 取实验组和对照组各 8 只杂色鲍的血淋巴和鳃,保存于液氮中,用以 RNA 提取。

**副溶血弧菌感染实验** 根据 Ge 等<sup>[18]</sup>的方法进行,杂色鲍腹足肌肉注射 50 μL 感染的副溶

血弧菌菌液(实验组,弧菌菌液浓度为  $1.1 \times 10^8$  cfu/mL),对照组注射 50 μL 灭菌生理盐水。注射后 0、3、6、12、24 和 48 h,分别取实验组和对照组各 8 只杂色鲍的血淋巴,保存于液氮中,用以 RNA 提取。

**总 RNA 的提取及 cDNA 的合成** 按照实验室自制的 RDP 试剂及本实验室常规使用的方法提取杂色鲍鳃、肝胰腺和血淋巴总 RNA<sup>[19]</sup>。用分光光度计测定总 RNA 在 OD<sub>260</sub> 的值,以计算浓度,并测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值检测 RNA 的纯度。取 1.5 μL 总 RNA 样品用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 的质量。

取 3 μg 血淋巴 RNA 与 1 μL oligo(dT)(10 μmol/L)、1 μL 的 5'/3'CDS Primer(10 μmol/L)分别制备 RACE 模板。合成 5'CDS 第一链需再加 1 μL 的 SMART II,混合,加水至 6 μL。混匀后 70 °C 下 5 min,冰上放置 2 ~ 5 min 后,加入 2 μL 5 × First-strand Buffer,1 μL dNTP Mix(10 μmol/L),1 μL MMLV 逆转录酶(200 U/μL,购自 Promega 公司)。混匀后置 PCR 仪中:37 °C 90 min,70 °C 15 min。(逆转录所用引物:UPM、NUP、5'CDS primer、3'CDS primer 以及 SMART II 见表 1)

***HdAIF-1* 基因片段的获得和全长 cDNA 的克隆** 从本实验室杂色鲍转录组测序(依托上海众信生物技术有限公司完成)所获得的杂色鲍 EST 库中筛选出 *HdAIF-1* 基因片段,采用 SMART-RACE 方法,合成 cDNA 序列第一条链,并根据已知的基因片段,利用 Primer 5.0 所设计的 RACE 引物(表 1)扩增其基因的全长 cDNA 序列,并用 head to toe PCR 验证其开放阅读框(open reading frame,ORF)的正确性,引物见表 1。

***HdAIF-1* 的生物信息学分析** 利用 NCBI 数据库中 VecScreen、Blast、ORF Finder 等软件分析测序结果,比对是否为目的基因并将其拼接成目的基因的全长 cDNA 序列。使用 ExPASy([http://cn.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html))预测基因的等电点及分子量,SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)寻找基因可能存在的信号肽序列,使用 NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测磷酸化位点,使用 NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测糖基

化位点,采用 PSIPRED Protein Structure Prediction Server(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)进行二级结构的预测,采用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行三级结构的预测,利用 BioEdit(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>)软件进行序列的多重比对,利用 MEGA 4.0 软件中邻位相接法构建系统进化树。

*HdAIF-1* 基因在不同组织及不同应激下的表达 以随机引物逆转录合成的 cDNA 第一条链为模板, $\beta$ -actin 为内参基因,引物  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R 见表 1,qRT-PCR 的反应体系为 20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L SYBR Green Realtime PCR Master

Mix (购自 TOYOBO 公司), 10  $\mu$  mol/L 的 *HdAIF-1* RT-F 和 R 引物(表 1)各 0.5  $\mu$ L, 9  $\mu$ L cDNA 第一条链,反应条件为 95  $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环(95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min)。检测基因的溶解曲线和扩增曲线,对产物割胶测序,以验证是否为基因特异产物。每个阶段的杂色鲍分析 5 个样品,并根据仪器分析得出各个样品的 RQ 值即  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ,基因表达水平由 RQ 平均值  $\pm$  标准误差的平均值(mean  $\pm$  SE)来表示,SPSS 软件对数据进行样本 *t*-test 分析,显著性差异表示为  $P < 0.05$ 。

表 1 实验中用到的引物及其序列  
Tab. 1 Oligonucleotide primers used in the experiments

引物名称 primer	引物序列(5' $\rightarrow$ 3') primer sequence
5'RACE outer Primer	AAGTTTCTCGGGCAGGTCTCCAC
5'RACE inner Primer	CGTTATCCCGATGAATCCCTGG
3' RACE outer Primer	AGTCCTCCGTCCTCAAATTATC
3' RACE inner Primer	CATAGACTCACGGCATTCTCAAC
UPM( Universal Primer Mix)	Long:CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT Short:CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP(Nested Universal primer)	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
5'CDS primer*	(T)25VN
3'CDS primer*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN
SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
head primer	GTGAGCCTTGAGGTTGGATA
toe primer	TTCAGAAGAATCGCTGTTTGC
<i>HdAIF-1</i> RT-F	ACGGAAAATTATTGGAGGAGT
<i>HdAIF-1</i> RT-R	AAGTCGGTGTAGTTGATGGTG
$\beta$ -actin-F	CCGTGACCTTACAGACTACCT
$\beta$ -actin-R	TACCAGCGGATTCCATAC

\* N = A, C, G 或 T; V = A, G 或 C。

## 2 结果

### 2.1 *HdAIF-1* 基因全长克隆及序列分析

*HdAIF-1* 的 cDNA 全长 942 bp, 包括 52 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR), 434 bp 的 3'UTR 和 453 bp 的 ORF, 该段 ORF 编码 151 个氨基酸。预测蛋白质分子量为 17.1 ku, 等电点为 5.18。SignalP 分析其不含信号肽序列, 该序列第 64 位、106 位、117 位氨基酸均含有糖基化位点。第 66 位和第 148 位氨基酸含有丝氨酸磷酸化位

点, 第 99 位、100 位和第 135 位含有苏氨酸磷酸化位点(图 1)。

### 2.2 *HdAIF-1* 空间结构模拟

采用 SWISS-MODEL 软件的同源建模方法, 将 *HdAIF-1* 蛋白序列与软件搜索得到的模板(PDB code: d1y1xa)(Penta-EF-hand proteins)人工进行联配, 以 *HdAIF-1* 推导的氨基酸构建其三维结构, *HdAIF-1* 由 5 个  $\alpha$  螺旋组成, 不含  $\beta$  折叠片(图 2)。

```

1 GACACATCAGCTGTCTGTGAGCCTTGGAGGTTGGATAGAGATTACGTTAAACatgcctag 60
1 M P S 3
61 cgtaaggccgacgttgtggatccacaaggtgaaaggcgtacggaaaattattggagga 120
4 V K A D V V D P Q G G K A Y G K L L E E 23
121 gtatgaagccaaactggatgaaattaaccagggttcatcggggataacgatttcaaaga 180
24 Y E A K L D E I N Q G F I G D N D F K E 43
181 ggtggaggacctgcccgaaacttgaagcctataaactcaaatttatggagtgtgatcg 240
44 V E D L P E K L E A Y K L K F M E C D R 63
241 taaccactcggggacctcgacatgatggatgtaaagtacatggttgagaagctgggaca 300
64 N H S G D L D M M D V K Y M L E K L G Q 83
301 ggcaaagacgcacttggagctgaagaagatgatccaggaagtggacaccaccaagtccgg 360
84 A K T H L E L K K M I Q E V D T T K S G 103
361 caccatcaactacaccgactttgtccggatgatccttgggaataagtcctccgtcctcaa 420
104 T I N Y T D F V R M M L G N K S S V L K 123
421 acttatcctgatgttcgaagagaaggttaaaccaccgaaaaaccagtcggtcttccacc 480
124 L I L M F E E K V K P T E K P V G L P P 143
481 aaagagagacatcagtagtctcccctgaAAAAGCACATACTGTCTACGTCATCACACAG 540
144 K R D I S S L P * 151
541 GATCTCTTCGTCGTTTCAGTTCATCACGTGACCAGCCTTCCGCACCACTCTTTGCAAAC 600
601 AGCGATTCTTCTGAATAATTATGCTTTGGCAAAACATTCCAAGACGGAGCCCGTTTTTC 660
661 AAGCGATACAACGCAGTAACCTTGAGAGCGGTTACTTTTCAACGTCATTGATCACACATAC 720
721 ATATGTAGAAGGGTATCTTTGATGGCCAGCCATAGACTCACGGCATTCTCAACCGCGA 780
781 TACATGTACATATCTGCTTTGTTCTGTGTAATTCACCTCGTTATCAGTGACATATGAGA 840
841 GAGATCAAGATGTGTGCTACATTCAGATTTTTAACTACCAGTTTATGGCTGTCTTTATAG 900
901 CAACGTCATATTCACAAAGCCACAAAAAAAAAAAAAAAAAA 942

```

图 1 杂色鲍 *HdAIF-1* 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

大写字母分别代表 5' 和 3' 非编码区序列,小写字母代表编码区序列;上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)用加粗标示;糖基化位点用双下划线标示;磷酸化位点用单下划线标示;加尾信号用波浪线标示;Calcium-binding EF-hand 结构域用加粗倾斜标示;Allograft inflammatory factor-1 结构域用灰色底纹标示。

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *HdAIF-1* gene from *H. diversicolor*

Capital letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region separately. Lowercase letters represent the coding sequence, with nucleotide sequence above and coded amino sequence below. The initiation codon(ATG) and the stop codon(TGA) are characterized in bold. Potential glycosylation sites are double underlined and phosphorylation site is underlined. The polyadenylation signal sequence(AATAA) is labeled with wavy line. Calcium-binding EF-hand domain is both in bold and italic, and Allograft inflammatory factor-1 structural domain is shaded gray.

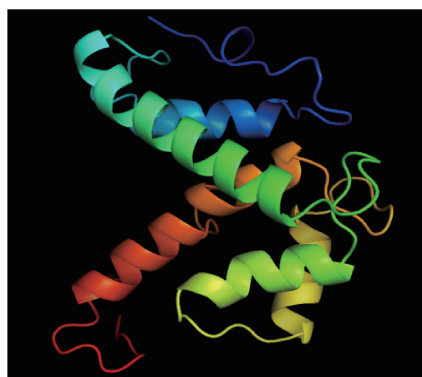


图 2 HdAIF-1 空间结构模拟

Fig.2 The predicted three-dimensional structure of HdAIF-1

### 2.3 HdAIF-1 与其他物种 AIF-1 的多重比对及系统进化树分析

将HdAIF-1推导的氨基酸序列与其他物

种的 AIF-1 蛋白进行多序列比对(图 3),结果显示杂色鲍与耳鲍(*H. asinine*)和盘鲍含有一个较为相对保守的 EF-hand 结构域。

N-J 系统进化树表明:哺乳纲 AIF-1 基因聚为一支,鱼纲 AIF-1 基因聚为一支,两支合并为一大支;杂色鲍和盘鲍、耳鲍单独一支,同时又与巨牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)、马氏珠母贝(*Pinctada martensis*)、巨蟹皮海绵(*Suberites domuncula*)等软体动物聚为一大支(图 4)。

### 2.4 HdAIF-1 在杂色鲍不同组织中的表达

*HdAIF-1* 基因在所检测的 7 个组织均有表达,其中在血淋巴中的表达量最高,其次是鳃和肝胰腺,消化道中的表达量最低。

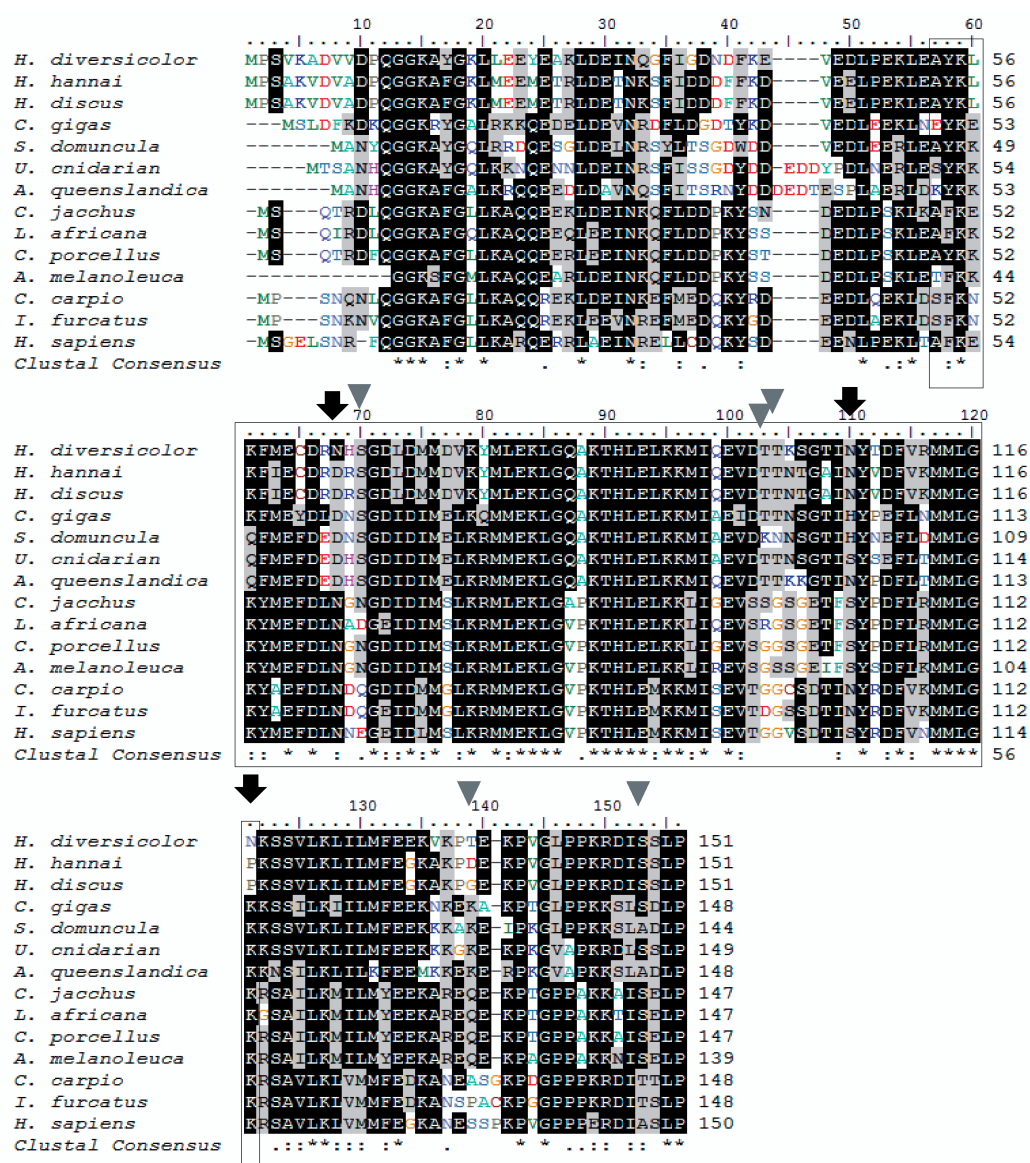


图3 HdAIF-1 和其他物种 AIF-1 氨基酸序列的多重比较

左侧物种名称及相应的登录号分别为杂色鲍, JX912883; 耳鲍, ABH10674; 盘鲍, ACJ65689; 长牡蛎, EKC34896; 寄居蟹皮海绵, CAC38780; 刺胞动物, ABA42882; 安非墨冬, XP003387413; 普通獾, XP002746387; 非洲象, XP003422258; 天竺鼠, XP003474029; 大熊猫, EFB18172; 鲤, BAA32796; 蓝鲛, ADO28397; 人, BAB14269。

糖基化位点和磷酸化位点分别用下箭头和三角标出, EF-hand 结构域(53 ~ 117 aa)用矩形框标示。

Fig. 3 Multiple alignment of the AIF-1 amino acid sequence between *H. diversicolor* and other species

Species and GenBank Accession numbers are listed on the left: *H. diversicolor*, JX912883; *H. hannai*, ABH10674; *H. discus*, ACJ65689; *Crassostrea gigas*, EKC34896; *Suberites domuncula*, CAC38780; *Uncultured cnidarian*, ABA42882; *Amphimedon queenslandica*, XP003387413; *Callithrix jacchus*, XP002746387; *Loxodonta africana*, XP003422258; *Cavia porcellus*, XP003474029; *Ailuropoda melanoleuca*, EFB18172; *Cyprinus carpio*, BAA32796; *Ictalurus furcatus*, ADO28397; *Homo sapiens*, BAB14269.

Glycosylation sites and phosphorylation sites are marked by arrows and triangles respectively, EF-hand domain (53 - 117 aa) is indicated by rectangle.

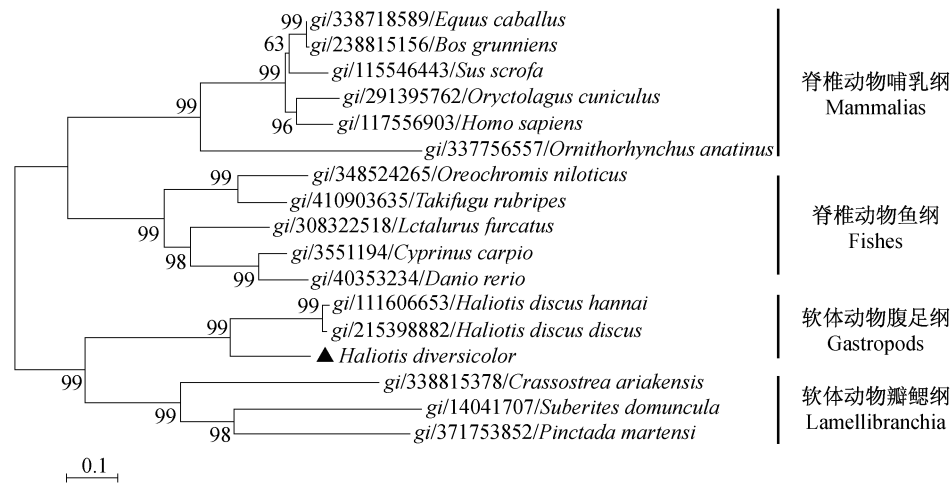


图 4 HdAIF-1 和其他物种 AIF-1 氨基酸序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the AIF-1 amino acid sequences between *H. diversicolor* and other species

*Equus caballus*: 野马; *Bos grunniens*: 牦牛; *Sus scrofa*: 野猪; *Oryctolagus cuniculus*: 家兔; *Homo sapiens*: 智人; *Ornithorhynchus anatinus*: 鸭嘴兽; *Oreochromis niloticus*: 罗非鱼; *Takifugu rubripes*: 红鳍东方鲀; *Lctalurus furcatus*: 斑点叉尾鲷; *Cyprinus carpio*: 鲤; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Haliotis discus hannai*: 皱纹盘鲍; *Haliotis discus discus*: 盘鲍; *Haliotis diversicolor*: 杂色鲍; *Crassostrea ariakensis*: 巨牡蛎; *Suberites domuncula*: 巨蟹皮海绵; *Pinctada martensi*: 马氏珠母贝.

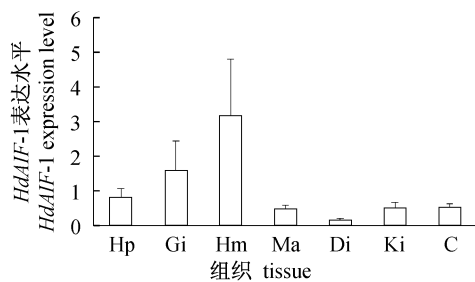


图 5 HdAIF-1 基因在杂色鲍不同组织中的表达

Hp. 肝胰腺; Gi. 鳃; Hm. 血淋巴; Ma. 外套膜; Di. 消化道; Ki. 肾脏; C. 粘液腺.

Fig. 5 Distribution pattern of HdAIF-1 in different tissues of *H. diversicolor*

Hp. hepatopancreas; Gi. gill; Hm. hemolymph; Ma. mantle; Di. digestive tract; Ki. kidney; C. colleterial gland.

## 2.5 HdAIF-1 在杂色鲍高温和缺氧应激及弧菌感染后的表达

**高温应激下 HdAIF-1 基因在鳃、血淋巴和肝胰腺的表达谱** 实验发现,高温应激下,杂色鲍鳃中 HdAIF-1 的表达量显著上调,并在温度升至 31 °C 时表达量达到最高,192 h 仍高于对照组,但差异不显著(图 6-a)。在高温应激的开始一段时间,杂色鲍血淋巴中 HdAIF-1 的表达量并没有发生明显变化,当 31 °C 下持续到 96 h 时,高温组表达量显著高于对照组,192 h 虽有所降低,但高温组仍然显著高于常温对照组(图 6-b)。高温应激下初始一段时间 HdAIF-1 在肝胰腺中的表达量并

没有发生明显变化,到 96 h 的时候,高温组的表达量显著高于对照组(图 6-c)。

**缺氧应激下 HdAIF-1 基因在鳃和血淋巴的相对表达** 缺氧应激下, HdAIF-1 在血淋巴中表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 7-a)。缺氧应激 24 h, HdAIF-1 在鳃中表达量显著下调,96 h 恢复到正常水平,到了 192 h,缺氧组的 HdAIF-1 表达量又显著上升(图 7-b)。

**弧菌感染后 HdAIF-1 在血淋巴中的表达变化** 副溶血弧菌注射感染之后,3 h 实验组的 HdAIF-1 在血淋巴中的表达量达到最高,并显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),随后逐渐降低,12 h 降至对照组水平,随后实验组表达量又上调,并在 48 h 显著高于对照组(图 8)。

## 3 讨论

AIF-1 大约由 151 个左右的氨基酸组成,是一个进化上高度保守的炎症相关因子,人 AIF-1 是由 143 个氨基酸组成的含有 1 个 EF 螺旋结构的细胞质钙结合蛋白,它被定位于第六号染色体的主要组织相容性复合体 III 区,该区具有很多与免疫功能相关的基因<sup>[4]</sup>。王利等<sup>[20]</sup> 从齐口裂腹鱼 (*Sclizothorax prenanti*) 脾脏克隆获得 AIF-1 基因的 cDNA 全序列,编码 147 个氨基酸,其二级结构也是以  $\alpha$ -螺旋为主,未见  $\beta$ -折叠区。本研究克隆获得杂色鲍 HdAIF-1 的

cDNA 全序列, 编码 151 个氨基酸, 三级结构预测 HdAIF-1 含有 5 个  $\alpha$ -螺旋, 无  $\beta$ -折叠结构, 与齐口裂腹鱼极为相似。该序列第 53 ~ 117 氨基酸残基为 EF-hand 结构域, 这一结构域可以被多种重金属结合后激活, 从而影响钙调信号通路并导致疾病的发生<sup>[21]</sup>。同时, 根据其推测的氨基酸序列与其他物种 AIF-1 进行序列多重比对和系统进化树分析, 结果表明不同物种 AIF-1 具有较高的相似性, 这也说明 AIF-1 在进化过程中相对保守。

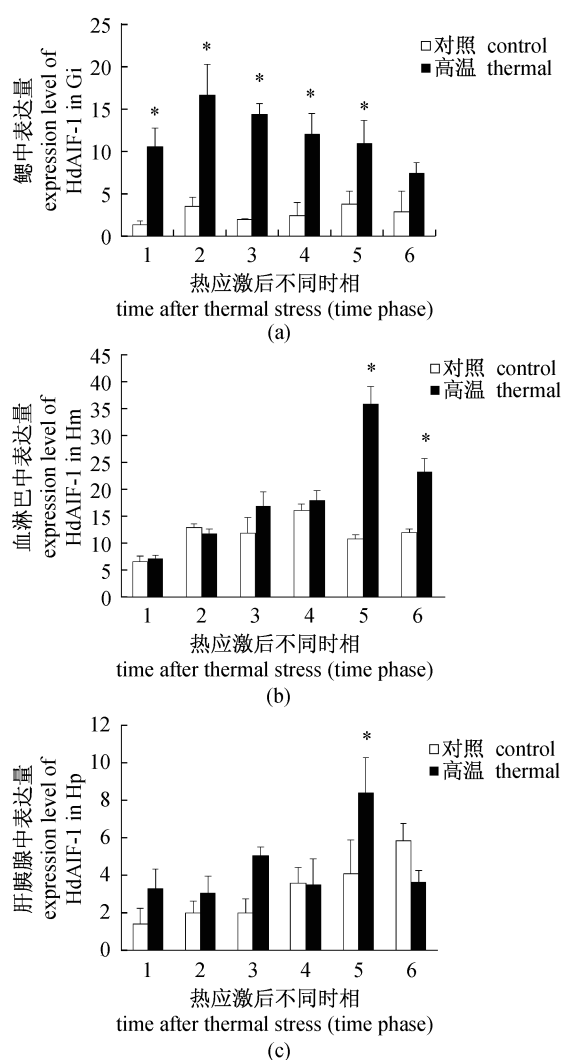


图6 高温应激下 HdAIF-1 基因在鳃、血淋巴和肝胰腺的表达谱

(a)、(b)和(c)分别表示鳃、血淋巴和肝胰腺3个不同组织。

**Fig. 6 The expression pattern of HdAIF-1 after thermal stress in gill, hemolymph and hepatopancreas**  
(a), (b) and (c) indicate gill, hemolymph and hepatopancreas respectively.

1. 28 °C, 2. 31 °C (0 h), 3. 31 °C (4 h), 4. 31 °C (24 h), 5. 31 °C (96 h), 6. 31 °C (192 h), “\*”:  $P < 0.05$ .

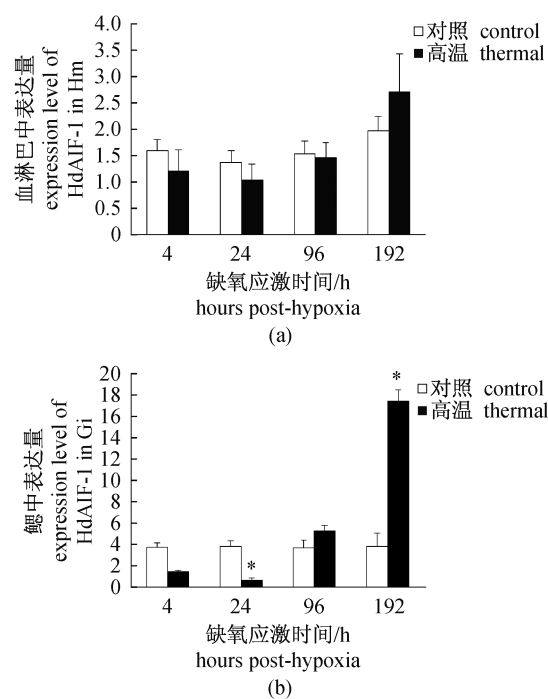


图7 缺氧应激下 HdAIF-1 基因在鳃和血淋巴的表达谱

(a)、(b)分别表示鳃和血淋巴两个不同组织。

**Fig. 7 The expression pattern of HdAIF-1 after hypoxia stress in gill and hemolymph**

(a) and (b) indicate gill and hemolymph respectively.

“\*”:  $P < 0.05$ .

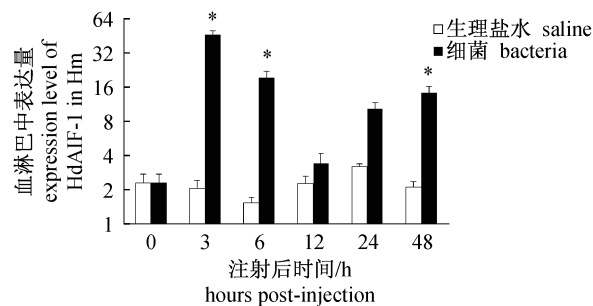


图8 弧菌感染后 HdAIF-1 基因在血淋巴中的表达谱

**Fig. 8 The expression pattern of HdAIF-1 after *V. parahaemolyticus* challenge in hemolymph**

“\*”:  $P < 0.05$

许多研究表明 AIF-1 基因在机体各组织中均有表达, 如 Nakai 等<sup>[22]</sup> 研究发现 AIF-1 基因在小鼠各组织均表达, 其中在脾脏和淋巴结的表达水平较高。Zhang 等<sup>[13]</sup> 从花蛤 (*Venerupis philippinarum*) 中克隆了 AIF-1 基因, RT-PCR 结果得出 AIF-1 在血细胞、鳃和肝胰腺要比在外套膜、肌肉和足中的表达量高, 本实验检测到的杂色

鲍 *HdAIF-1* 基因在各组织也均有表达,且在血淋巴、鳃和肝胰腺的表达量相对较高。

在多数情况下,*AIF-1* 在正常情况下不表达或表达量很低,但在应激条件下,如受感染启动免疫反应时,其表达量就会迅速上调<sup>[6]</sup>。高温应激情况下,杂色鲍鳃中 *HdAIF-1* 在应激之后表达量迅速上升,虽之后有所下调,但都高于对照组。在杂色鲍肝胰腺和血淋巴中,*HdAIF-1* 在高温应激初始一段时间表达量未高于对照组,但到 96 h,高温组的表达量显著高于对照组。鳃是抵御外界环境变化的第一道防线,鳃中的 *HdAIF-1* 对温度最为敏感,暗示着通过 *HdAIF-1* 的快速高量的表达来启动鳃对高温的应激。之后肝胰腺和血淋巴的 *HdAIF-1* 的表达也被启动,使整个机体均参与对高温的应激。

机体在缺氧状况下,有氧代谢受抑制,只能依靠葡萄糖无氧酵解产生能量,代谢率降低。目前 *AIF-1* 在哺乳动物缺氧应激下的研究主要集中于心脑血管方面的疾病<sup>[23-24]</sup>,软体动物尚未报道。本研究发现,缺氧条件下杂色鲍鳃中 *HdAIF-1* 基因的表达先出现了显著下调,到 192 h 显著上调,推测可能是缺氧的初始阶段,通过关闭或降低鳃 *HdAIF-1* 参与的一些快速调节途径以应对环境的变化,但到后期,鳃启动了由 *HdAIF-1* 参与的调节以应对应激导致的不良反应。血淋巴中的 *HdAIF-1* 在整个缺氧应激期间表达量一直保持和对照组基本一致,说明血淋巴中的 *HdAIF-1* 对缺氧不敏感。同时,通过高温和缺氧实验对比发现,杂色鲍鳃及血淋巴中 *HdAIF-1* 对高温引起的应激较缺氧的应激敏感。这可能与杂色鲍自身具有较好的低氧耐受能力相关。因此推测 *AIF-1* 调节高温和缺氧的应激机制不同。这是首次报道 *AIF-1* 基因在高温和缺氧应激下的表达变化,因此究竟存在何种差异有待进一步研究。

*AIF-1* 作为一种炎症相关因子涉及到几种类型细胞的炎性过程,如巨噬细胞和神经胶质细胞<sup>[25]</sup>。*AIF-1* 是机体对同种(异体)抗原免疫反应的调节基因,能调控宿主对炎性刺激的反应<sup>[26-28]</sup>。Nakai 等<sup>[22]</sup>研究发现在细菌脂多糖的刺激下,转染了 *AIF-1* cDNA 的鼠巨噬细胞发生了较为明显的形态学变化,并且与对照组相比,白介素(IL)-6, IL-10 和 IL-12 p40 表达显著增加。Wang 等<sup>[29]</sup>通过构建杂色鲍血淋巴抑制差减文库筛选报道了 *AIF-1* 等 34 个细菌刺激后上调表达

基因。Zhang 等<sup>[13]</sup>研究发现副溶血弧菌感染后,花蛤血细胞中的 *AIF-1* 表达量在注射弧菌 12 h 后下调,但在 72 h 达到了最高峰,96 h 又恢复到 48 h 的表达量水平。De Zoysa 等<sup>[14]</sup>从盘鲍中克隆获得 *AIF-1* 的 cDNA 全长,并进一步分析发现在注射细菌后,血淋巴中 *AIF-1* 的表达量上调,但是表达变化较鳃更明显。本研究从杂色鲍血淋巴出发,研究了弧菌感染后 *HdAIF-1* 基因的表达变化,在 3 h 时 *HdAIF-1* 的表达显著上升,12 h 下调至对照组表达水平,随后又逐渐上调,并在 48 h 达到显著高于对照组水平。这说明弧菌刺激下,*AIF-1* 参与了机体的免疫应答。

总之,从杂色鲍中克隆得到 *HdAIF-1* 的 cDNA 全长,实时荧光定量 PCR 结果表明在高温和缺氧应激以及弧菌感染情况下多个组织中表达量发生了显著变化。该基因作为先天免疫防御中的重要因子在抵御外界环境刺激时可发挥重要作用,这为研究杂色鲍应激下的防御分子机制提供了参考资料。

#### 参考文献:

- [1] 王宝珍,张子平,王艺磊,等. 杂色鲍  $\beta$ -1,3-葡聚糖识别蛋白基因的克隆和表达[J]. 海洋科学,2011,35(8):67-75.
- [2] 周晶,蔡俊鹏,杨洪志. 南方杂色鲍苗大规模死亡病原菌的分离鉴定及其回归感染实验[J]. 海洋湖沼通报,2006(3):54-59.
- [3] 林旭吟,赵东海,梁君荣. 鲍苗死亡原因的研究进展及对策[J]. 福建水产,2006(1):29-32.
- [4] 王利,吴信忠. DAD1 和 AIF-1 细胞因子在鱼类中的研究进展[J]. 中国水产科学,2011,18(1):237-242.
- [5] Berglund L M, Kotova O, Osmark P, et al. NFAT regulates the expression of AIF-1 and IRT-1; Yin and yang splice variants of neointima formation and atherosclerosis[J]. Cardiovascular Research, 2012, 93(3):414-423.
- [6] Autieri M V, Carbone C, Mu A. Expression of allograft inflammatory factor-1 is a marker of activated human vascular smooth muscle cells and arterial injury[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000, 20(7):1737-1744.
- [7] Autieri M V, Chen X. The ability of AIF-1 to activate human vascular smooth muscle cells is lost by mutations in the EF-hand calcium-binding region[J]. Experimental Cell Research, 2005, 307(1):204-211.



- [ 8 ] Postler E, Rimner A, Beschoner R, *et al.* Allograft-inflammatory-factor-1 is upregulated in microglial cells in human cerebral infarctions [ J ]. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 108( 1 - 2 ): 244 - 250.
- [ 9 ] Kuschel R, Deininger M H, Meyermann R, *et al.* Allograft inflammatory factor-1 is expressed by macrophages in injured skeletal muscle and abrogates proliferation and differentiation of satellite cells [ J ]. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2000, 59( 4 ): 323 - 332.
- [ 10 ] Deininger M H, Seid K, Engel S, *et al.* Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas [ J ]. *Acta Neuropathologica*, 2000, 100( 6 ): 673 - 680.
- [ 11 ] Liu G, Ma H, Jiang L, *et al.* Allograft inflammatory factor-1 and its immune regulation [ J ]. *Autoimmunity*, 2007, 40( 2 ): 95 - 102.
- [ 12 ] 李军, 陈金辉, 张扬, 等. 马氏珠母贝同种移植炎症因子-1 的克隆和表达分析 [ C ]. 中国海洋湖沼学会会员类学分会第九次会员代表大会暨第十五次学术讨论会会议摘要, 2011.
- [ 13 ] Zhang L, Zhao J, Li C, *et al.* Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1 ( AIF-1 ) from Manila clam *Venerupis philippinarum* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30 ( 1 ): 148 - 153.
- [ 14 ] De Zoysa M, Nikapitiya C, Kim Y, *et al.* Allograft inflammatory factor-1 in *disk abalone* (*Haliotis discus discus*): Molecular cloning, transcriptional regulation against immune challenge and tissue injury [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29( 2 ): 319 - 326.
- [ 15 ] 刘贤德, 闫玉华, 王志勇, 等. 杂色鲍对高温和低盐耐受力的初步研究 [ J ]. 集美大学学报: 自然科学版, 2008, 13( 4 ): 301 - 303.
- [ 16 ] 游伟伟, 林焕阳, 骆轩, 等. 温度对杂色鲍不同群体生长率与存活率的影响 [ J ]. 台湾海峡, 2012, 30 ( 4 ): 583 - 588.
- [ 17 ] Ivanina A V, Kurochkin I O, Leamy L, *et al.* Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation [ J ]. *The Journal of Experimental Biology*, 2012, 215 ( Pt18 ): 3142 - 3154.
- [ 18 ] Ge H, Wang G, Zhang L, *et al.* Characterization of Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1 gene in small abalone *Haliotis diversicolor* [ J ]. *Gene*, 2012, 506( 2 ): 417 - 422.
- [ 19 ] Zhang Z, Wang Y, Jiang Y, *et al.* Ribosomal protein L24 is differentially expressed in ovary and testis of the marine shrimp *Marsupenaeus japonicus* [ J ]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 147 ( 3 ): 466 - 474.
- [ 20 ] 王利, 魏勇, 龙钟明, 等. 齐口裂腹鱼同种移植炎症因子 AIF-1 的克隆及蛋白质结构预测 [ J ]. 西南农业学报, 2012, 25( 2 ): 723 - 727.
- [ 21 ] Shivesh K, Ejaz A, Sanjeev K, *et al.* Structural and thermodynamic studies of Calcium Binding Protein-1 from *Entamoeba histolytica* with  $Pb^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , and  $Sr^{2+}$  [ J ]. *BMC Biophysics*, 2012, 127 ( 6 ): 1737 - 1743.
- [ 22 ] Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, *et al.* Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice [ J ]. *Blood*, 2004, 104( 7 ): 2051 - 2059.
- [ 23 ] AI Ahmad A, Gassmann M, Ogunshola O O. Involvement of oxidative stress in hypoxia-induced blood-brain barrier breakdown [ J ]. *Microvascular Research*, 2012, 84( 2 ): 222 - 225.
- [ 24 ] 刘中洋, 伏丽晶, 刘静莉, 等. 缺氧诱导因子在肺疾病中作用的研究进展 [ J ]. 国际呼吸杂志 ISTIC, 2012, 32( 7 ): 552 - 556.
- [ 25 ] Fukui M, Tanaka M, Toda H, *et al.* The serum concentration of allograft inflammatory factor-1 is correlated with metabolic parameters in healthy subjects [ J ]. *Metabolism: clinical and experimental*, 2012, 61( 7 ): 1021 - 1025.
- [ 26 ] Ekberg K, Lorente-Cebrian S, Arner P, *et al.* Allograft inflammatory factor 1 is a new human adipokine regulating adipose inflammation [ J ]. *European Society of Endocrinology*, 2012, 29: 1258.
- [ 27 ] Chen H C, Fong T H, Lee A W, *et al.* Autophagy is activated in injured neurons and inhibited by methylprednisolone after experimental spinal cord injury [ J ]. *Spine*, 2012, 37( 6 ): 470 - 475.
- [ 28 ] Autieri M V. cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissue distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 228( 1 ): 29 - 37.
- [ 29 ] Wang K J, Ren H L, Xu D D, *et al.* Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846 ) challenged with bacteria [ J ]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32 ( 11 ): 1326 - 1347.

## Molecular cloning and expression of allograft inflammatory factor 1 in *Haliotis diversicolor* under stresses

HUANG Yitao<sup>1</sup>, CAI Xiuhong<sup>1</sup>, ZHANG Ziping<sup>2</sup>, WANG Guodong<sup>1</sup>,  
ZOU Zhihua<sup>1</sup>, WANG Shuhong<sup>1</sup>, WANG Yilei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College,  
Jimei University, Xiamen 361021, China;

(2. Department of Biological Science, Seton Hall University, New Jersey 07079, USA)

**Abstract:** Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is a kind of calcium-binding protein with EF-hand domain. *AIF-1* mRNA is robustly induced by IFN- $\gamma$  in murine macrophages. It is involved in transplant rejection, immune inflammatory reaction, non-inflammatory injury and so on. In this study, a molluscan *AIF-1* gene, *HdAIF-1*, was cloned for the first time from *Haliotis diversicolor*. Its full-length cDNA sequence is 942 bp, with a 456 bp open reading frame encoding a protein of 151 aa. Quantitative real-time PCR results indicated that *HdAIF-1* could be detected in all examined tissues, with the highest level in hemolymph and gill. Under thermal stress, *HdAIF-1* was up-regulated in gill significantly at temperature-rise period and achieved the highest level when up to 31 °C. However, the expression level of *HdAIF-1* in hemolymph and hepatopancreas did not show significant difference between thermal group and control group from the first phase to the fourth, and its expression level was up-regulated significantly at 96 h in these two tissues. Under hypoxia stress, the expression level of *HdAIF-1* in hemolymph showed no significant difference between control and exposed groups. However, it was down-regulated at 24 h and up-regulated at 192 h remarkably in gill. After *Vibrio parahaemolyticus* challenge, the *HdAIF-1* expression level achieved the highest level at 3 h in hemolymph, reduced to the control level at 12 h, and then up-regulated significantly at both 24 h and 48 h. These results suggest that *HdAIF-1* may play important roles as an immune factor under different stresses.

**Key words:** *Haliotis diversicolor*; allograft inflammatory factor 1 (AIF-1); thermal; hypoxia; *Vibrio parahaemolyticus*

**Corresponding author:** WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn