



马氏珠母贝 *Bcl-2-like* 基因克隆及其功能初探

房晓宸^{1,2}, 卢金昭^{1,2}, 梁海鹰^{1,2,3*}, 何军军^{1,2}, 申铖皓^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518108;

3. 广东省水生动物健康评估工程技术研究中心, 广东 深圳 518108)

摘要: B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma, Bcl-2) 基因作为一种重要的细胞凋亡调控基因, 在内源性细胞凋亡通路中发挥着重要的调控作用。实验利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆获得 *PmBcl-2-like* 基因 cDNA 全长序列, 并对其序列进行生物信息学分析; 利用实时定量 PCR(qPCR) 技术分析了 *PmBcl-2-like* 在马氏珠母贝不同组织、不同发育时期以及不同免疫刺激后的表达水平。结果显示, *PmBcl-2-like* cDNA 全长为 2 180 bp, 开放阅读框长度为 1 650 bp, 共编码 549 个氨基酸, 分子量为 21.62 ku; 结构域预测分析表明 *PmBcl-2-like* 含有 Bcl-2 家族典型的 BH1-4 结构域; 多序列比对以及进化树构建结果表明, *PmBcl-2-like* 与其他物种的相似度较高, 保守性较强; 荧光定量结果表明 *PmBcl-2-like* 在马氏珠母贝 8 个组织中均有表达, 在鳃中表达量最高, 其次为性腺, 表达量最低为中央膜区; 在胚胎期表达量较高, 受精卵时期表达量最高。机体受到脂多糖 (LPS) 刺激后, 相对表达量在 24 h 达到最高, 72 h 降到最低, 最高约为最低的 2.5 倍; 肽聚糖 (PGN) 刺激后, 相对表达量在 6 h 达到最高, 48 h 降到最低, 最高约为最低的 7.28 倍; 聚肌胞苷酸 (Poly: IC) 刺激后, 相对表达量在 3 h 达到最高, 12 h 降到最低, 最高约为最低的 6.49 倍。研究表明, *PmBcl-2-like* 可能在马氏珠母贝发育和免疫防御反应中担任着重要的角色。

关键词: 马氏珠母贝; B 淋巴细胞瘤-2; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

内源性细胞凋亡通路 (intrinsic apoptotic pathway) 又称为线粒体凋亡通路 (mitochondrial pathway), 通常由细胞毒性刺激物或环境胁迫因子等刺激激活^[1]。在哺乳动物体内, Bcl-2 家族 (B-cell lymphoma 2 family) 为内源性细胞凋亡通路重要的“调节器”, 其调控线粒体外膜通透性 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP),

导致线粒体蛋白 (细胞色素 C、Endo G、SMAC/Diablo 和 AIF 等) 释放到细胞质中^[2-3], 细胞质中的细胞色素 C 和凋亡酶激活因子 1 (apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) 相结合, 形成多聚体, 该多聚体与 Caspase9 前体结合形成凋亡复合体 (apoptosome), 激活 Caspase 9^[4], 被激活的 Caspase 9 自我剪切活化, 在 dATP、ATP 存在的条

收稿日期: 2020-10-16 修回日期: 2021-03-03

资助项目: 国家自然科学基金 (31472306); 广东省海港建设与渔业产业发展专项 (A201608B15); 深圳市科技计划 (JCYJ20180507183240459)

第一作者: 房晓宸 (照片), 从事水产无脊椎动物增殖和珍珠培育研究, E-mail: 1032181603@qq.com

通信作者: 梁海鹰, E-mail: zjlianghy@126.com



件下激活 Caspase3, 进而激活内源性凋亡通路^[5]。

Bcl-2 家族由凋亡调节因子 Bcl-X 及其同系物组成^[6], 直至目前, 已发现 25 个家族成员^[7]。Bcl-2 家族的显著特征是具有 Bcl-2 同源结构域 (Bcl-2 homology domain, BH), 即 BH1、BH2、BH3、BH4 结构域^[8]。Bcl-2 家族按照所含结构域的不同可划分为 3 个亚家族: 只含 BH3 结构域的 BH3-only 亚家族, 含有 BH1、BH2、BH3、BH4 结构域的 Bcl-2 亚家族, 以及包括 BH1、BH2、BH3 结构域的 Bax 亚家族^[9]。根据功能主要分为抑凋亡 (anti-apoptosis) 亚家族和促凋亡 (pro-apoptosis) 亚家族两类, 抑凋亡的 Bcl-2 亚家族, 主要包括 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等; 促凋亡亚家族包括 Bax 亚家族 (主要有 Bax、Bak 等), 以及 BH3-only 亚家族 (包括 Bid、Bim、Bik、Bad 等)。整个 Bcl-2 家族基因表达的平衡 (抑凋亡亚家族和促凋亡亚家族基因表达) 是细胞发生正常凋亡现象最重要的原因^[10]。Adams 等^[11]发现 Bcl-2 家族基因的过度表达会引发癌症; Merry 等^[12]研究表明 Bcl-2 家族可以保护神经元免受各种有毒物质的伤害; Hildeman 等^[13]研究称 Bcl-2 家族基因参与免疫应答并介导 T 细胞死亡; Opferman 等^[14]研究发现 Bcl-2 家族基因在胚胎发育以及神经系统发育中发挥着重要的作用; Amling 等^[15]研究证明 Bcl-2 可以调节骨骼发育过程中软骨细胞的形成过程。大量研究表明, 在哺乳动物体内, Bcl-2 家族对维持机体内环境稳态以及在发育不同时期中均发挥重要作用。

此前有研究表明, 对于只含有先天性免疫的软体动物来说, 细胞凋亡可以帮助机体应对病原体的感染和侵袭^[16]。伴随着组学技术的发展, 结合基因组、转录组以及蛋白质组, 已经在长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、香港牡蛎 (*C. hongkongensis*) 等软体动物中发现了注释为 Bcl-2 家族的基因。在双壳类动物中, 均成功克隆出 Bcl-2 家族基因, 并且证明机体受到感染时, Bcl-2 家族基因参与免疫调节作用^[17-19]。近年来海洋污染问题日趋严重, 马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 是我国海水人工育珠的主要珠母贝之一, 珍珠产量占整个海水珍珠产量的 95% 以上。近年来由于养殖面积扩大及海水水质日

趋恶化, 使其面临着病害或种质下降等问题, 深入了解马氏珠母贝的免疫调节机制成为当下研究的重点。本实验室此前构建了马氏珠母贝在插核前后的转录组以及蛋白质组数据库, 发现插核后马氏珠母贝凋亡相关基因和蛋白均发生显著性变化^[20-22]。因此, 探究马氏珠母贝凋亡通路相关基因很有必要。

本研究利用 RACE 技术克隆获得了马氏珠母贝 *Bcl-2-like* 基因的 cDNA 序列全长, 并进行了生物信息学分析, 利用荧光定量 PCR 技术检测该基因在马氏珠母贝不同组织、不同发育时期及不同免疫刺激下的相对表达量, 为进一步研究细胞凋亡通路在马氏珠母贝中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取养殖于广东省湛江市徐闻县大井村 1.5 龄马氏珠母贝为实验用贝, 清除贝体表面附着物, 于实验室暂养 5 d 后进行后续实验。

1.2 实验试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司, pMD-19T 载体、RACE 试剂盒等购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒、Trans1-T1 Phage Resistant Chemically感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司, 琼脂糖购自上海生工生物工程有限公司, SYBR[®] Select Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司, DNA Marker 购于大连宝生物工程有限公司。

1.3 *Bcl-2-like* cDNA 全长克隆

从本实验室构建的马氏珠母贝血细胞转录组文库中获得注释为 *Bcl-2* 基因的 unigene 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 (表 1), 使用 Trizol 法提取血细胞中的总 RNA, 通过 10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳以及 Nano Drop ND1000 紫外分光光度计测定各组织 RNA 浓度并分析纯度。参照 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 的说明书, 制备 5'RACE 和 3'RACE 模板。参照 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H) 说明书操作合成实时荧光定量 cDNA 模板。用巢式 PCR 对 3'和 5'进行扩增。获得 PCR 产物后,

表 1 *Bcl-2-like* 基因克隆及荧光定量所用的引物序列Tab. 1 Primer sequence used in the cloning and Real-time PCR of *Bcl-2-like*

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 function
<i>PmBcl-2-like-3I</i>	CAGATCACCTAAACACGTTGCAGAA	3'-RACE
<i>PmBcl-2-like-3O</i>	ACTACTGAAAAGTGCTGTATCTGGGA	3'-RACE
<i>PmBcl-2-like-5I</i>	CCGCAAGATTCATCACAAGGGTCC	5'-RACE
<i>PmBcl-2-like-5O</i>	TTCAGTAAGATGGAGAGGAGCAGC	5'-RACE
<i>PmBcl-2-like-F</i>	TGATGAATCTTGCGGAAGCAGGAG	中间片段验证 middle segment verification
<i>PmBcl-2-like-R</i>	GTATGGATTGTTCTGCAACGTGTT	中间片段验证 middle segment verification
<i>PmBcl-2-like-qpcr-F</i>	GAATCTTGCGGAAGCAGGAG	荧光定量 Real-time PCR
<i>PmBcl-2-like-qpcr-R</i>	AGATGGAGAGGAGCAGCACC	荧光定量 Real-time PCR
β -actin-S	GACCGGATTCATCGTATTCC	内参基因 reference genes
β -actin-A	CGGTACCACCATGTTCTCAG	内参基因 reference genes

进行琼脂糖凝胶电泳检测并用微量核酸分析仪检测 PCR 产物浓度, 而后进行目的片段纯化, 随后将目的片段与 pMD-19T 克隆载体连接过夜, 将产物转入到 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞中, 在 LA 固体培养基中过夜培养, 最后挑选阳性克隆, 送至生工生物工程股份有限公司(广州分部)测序。

1.4 *PmBcl-2-like* 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件将测序获得结果与血细胞转录组的 unigene 序列进行比对, 拼接得到 *PmBcl-2-like* cDNA 全长。利用 NCBI 数据库内 ORF Finder 软件预测开放阅读框 (ORF) 后得到其氨基酸序列; 通过 ExPASy-Prot Param 网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸理化性质; 使用 PSITE V1 软件 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=psite&group=programs&subgroup=proloc>) 分析氨基酸序列活性功能位点; 使用 TMHMM Server v.2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测其跨膜结构域; 采用 Signal P 4.1 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测是否具有信号肽; SMART 软件预测其结构域 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>); ExPASy Prosite 软件 ([\[prosite.expasy.org/\]\(http://prosite.expasy.org/\)\) 预测其活性位点; 使用 SOPMA 软件 \(\[https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html\]\(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html\)\) 在线网站预测二级结构; 采用 SWISS-MODEL \(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>\) 在线网站预测三级结构; 通过 ClustalW 在线软件进行多序列比对; 使用 Mega X 软件构建生物系统进化树。](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.5 *PmBcl-2-like* 组织表达分析

取 6 只规格一致, 活力旺盛的马氏珠母贝的闭壳肌、血细胞、边缘膜、外套膜、中央膜、性腺、鳃以及肝胰腺, 储存于 -80°C 冰箱备用。使用 Trizol 法提取各组织中的总 RNA, 而后参照 Reverse Transcriptase M-MLV(RNaseH) 反转录试剂盒说明书操作。反转录产物作为实时荧光定量 PCR 模板。扩增条件: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 60°C 15 s, 72°C 15 s, 35 个循环; 95°C 10 s, 65°C 60 s, 97°C 1 s; 37°C 30 s。

1.6 *PmBcl-2-like* 不同发育时期表达分析

不同发育时期荧光定量使用马氏珠母贝卵、受精卵、原肠胚期、囊胚期、担轮幼虫、D 型幼虫、早期壳顶幼虫、眼点幼虫、附着变态后期共 9 个时期进行实验。使用 Trizol 法提取各发育

时期的总 RNA, 而后参照 Reverse Transcriptase M-MLV(RNasaH) 反转录试剂盒说明书操作。

1.7 *PmBcl-2-like* 免疫刺激后表达分析

取暂养 5 d 的马氏珠母贝, 随机分成 4 组、每组 60 只, 注射位置为马氏珠母贝闭壳肌, 对照组 (PBS 组) 每只注射 100 μ L 的 PBS, 实验组注射 100 μ L 的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖 (peptidoglycan, PGN)、聚肌胞苷酸 (polyinosinic acid-polycytidylic acid, PolyI: C) 浓度为 100 μ g/mL, 分别为 PBS 组、LPS 组、Poly: IC 组和 PGN 组。各组注射后, 分别于 3、6、12、24、48、72 和 96 h 取 8 只贝的鳃组织, 迅速置于液氮中固定保存。使用 Trizol 法提取不同时间点鳃组织的总 RNA, 而后参照 Reverse Transcriptase M-MLV(RNasaH) 反转录试剂盒说明书操作。

1.8 数据分析

β -actin 作为内参基因, 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。使用 SPSS 18.0 软件对不同组织、不同发育时期以及不同免疫刺激后的实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 LSD、Duncan 氏多重比较, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。对不同刺激后同一时间点的数据, 则用 t 检验进行处理, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *PmBcl-2-like* 基因克隆及序列分析

利用 RACE 技术成功克隆出 *PmBcl-2-like* 基因, 其 cDNA 全长为 2 180 bp, 其中 5'端 UTR 长度为 193 bp, 3'端 UTR 长度为 337 bp, 开放阅读框长度为 1 650 bp, 共编码 549 个氨基酸, ployA 为 24 bp (图 1)。

2.2 *PmBcl-2-like* 蛋白理化性质

预测 *PmBcl-2-like* 蛋白分子量为 21.61 ku, 等电点为 4.96; 亲水平均系数为 0.769, 属于疏水性蛋白, 无信号肽和跨膜结构域。该蛋白有 3 个 Camp 和 Cgmp 依赖的蛋白激酶磷酸化位点、16 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、18 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点、10 个 N- 肉豆蔻酰化位点、9 个 N- 糖基化位点。预

测 *PmBcl-2-like* 蛋白的二级结构, 发现 α -螺旋占整体的 47.18%, β -折叠占 13.11%, 转角占 9.65%, 无规则卷曲占 30.05% (图 2)。结构域预测结果表明, *PmBcl-2-like* 蛋白含有 Bcl-2 结构域 (图 3)。使用 SWISS-MODEL 在线网站预测 *PmBcl-2-like* 蛋白三级结构, 结果表明其与长牡蛎的 Bcl-2-like 蛋白相似度较高 (图 4)。

2.3 *PmBcl-2-like* 多序列比对和进化树构建

利用 NCBI 在线 Blast 获得与 *PmBcl-2-like* 氨基酸序列相似度较高的序列, 包括虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*, XP_021352428.1)、美洲牡蛎 (*C. virginica*, XP_022305873.1)、长牡蛎 (XP_011449013.1)、翡翠贻贝 (*Perna viridis*, AXS76517.1)、紫贻贝 (AGK88246.1)、福寿螺 (*Pomacea canaliculata*, XP_025094120.1)、人 (*Homo sapiens*, 4BPK_A)、鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*, XP_028905056.1)、西海岸袜带蛇 (*Thamnophis elegans*, XP_032079251.1)、钝头鲉 (*Amblyraja radiata*, XP_032897864.1)、*Rhinatrema bivittatum*, XP_029467467.1、银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*, XP_020338728.1)、海鳟 (*Salmo trutta*, XP_029550420.1), 将上述物种与马氏珠母贝进行多序列比对, 发现其种间相似度较高 (图 5)。进化树结果表明, 马氏珠母贝、虾夷扇贝、欧洲大扇贝、翡翠贻贝、紫贻贝、美洲牡蛎、长牡蛎聚为一大支, 马氏珠母贝、美洲牡蛎和长牡蛎聚为一支, 但马氏珠母贝单独为一支 (图 6)。

2.4 *PmBcl-2-like* 组织表达分析

PmBcl-2-like 在马氏珠母贝闭壳肌、血细胞、边缘膜、外套膜、中央膜、性腺、鳃以及肝胰腺 8 个组织中均有表达, 在鳃中表达量最高, 其次为性腺, 表达量最低的为中央膜区 (图 7)。

2.5 不同发育时期 *PmBcl-2-like* 的表达分析

PmBcl-2-like 在发育不同时间的表达差异较为显著, 在胚胎期的受精卵中表达量最高, 但是其在囊胚期、原肠胚期中都不表达, 伴随着发育的进行, 在幼虫期的担轮幼虫到早期壳顶幼虫中表达量比较平稳, 但是眼点期以及变态后期都没有表达 (图 8)。

```

1   ATGGGGACAGTTAAAGGGAAAAATTGTTACCGCACAAAGCGGGTATAAATGTGTAGAAATTTTTATGTTCCGTTTATTAG
2   ACTGAAAGATATACAATTTTCTCTGTGTATGTACAATTAATTTATGCTGAAATGTGTATCAAGTAGAACAGTTCGAAAGTG
163 AACATATCACGTTATTTGAACATAAAGGAAAt g GCTGACTATGTTGATTTTAT AAGGACGACGTACTCTATTGTACTGA
55   M A D Y V D F I R T T Y S I V T D
244 CTTTATAAGTCTTAGTCTCAGATCCCAGGGTATCAATGGAGCGATCCTTCTCAAATCAAGATGCTAGTCAGGCTAAAAC
82   F I S L S L R S Q G Y Q W S D P S S N Q D A S Q A K T
325 AACTAGGCAGCTGAGTGAATGGCGGATGAGTTCGCCAACCGGTACGAGTCAACATTTACTAGTATGATGACAAACTTCA
109 T R Q L S E M A D E F A N R Y E S T F T S M I D K L H
406 TGTTACCTCAGATACTGCTTATTCCATGTTCAAATCGGTCACCGAGGAACGTGTTGCGGATGGTATTAATTGGGGACGAGT
136 V T S D T A Y S M F K S V T E E L F A D G I N W G R V
487 AATTGCCCTTTTCACTTTGGTCGACCTTGTGATGAATCTGCGGAAGCAGGAGAGCTTCAACCCGACAGAGTCTTTGGT
163 I A L F H F G R T L V M N L A E A G E L H P T E S L V
568 GAAAAAGATATCTATTTTATAGAAAGGATACTTGAAGTCATGGATCTTCAAGAGGAGGATGGATGCAGTGCATAGACCA
190 K K I S H F I E G Y L K S W I L Q R G G W M Q C I D H
649 TTTTTCGAAGGCTTTTACAATAGCTCCAGCTTACAAGCGTATGATTCGTCATACCGGACATAGGATGGTGTCTGCTTCT
217 F S K E L L Q I V L P A Y K R M I R L L R T M V L L L
730 CTCCATCTTACTGAATACATCACTTGGCGCAAGACCTAGACTTAAACATGGCGTCGGTACCACAGCAAATGTAGCAAAGCT
244 S I L L N T S L G A R P R L K H G V G T T A N V A K K L
811 TATACTTTGGGTCGTGGAGACGTTGAATTAATCCAGCTCTGAAATTCAGATCGGAAATCTAGAAATCTAGAAATCGGAAA
271 I L W V C G D V E L N P G P G N S R S E I L R R F R K
892 GTCGACGACAGCTCTATTTGATTATGCTATATGAACACTTAAATGATCAATGTTCCGTTCCGAAAGTCTCTGATAAAGA
298 S Q Q S S I L I M L Y E H L N D Q C S V P K S L Y K D
973 TGTACCGCTGGTGGCCTAAGGATACCCCGTTGTCAACATCTCAAATCACAAAAAGAGGAACAATGCATAGCTTG
325 V P A W W P K D T P F V N I S N H K K E E D K C I A C
1054 TTTTCGACATGAGTGTGAACACTGAAAAGTGTGTATCTGGGATTTCCCTGATTTGACCAATATATTAGGACATTACAA
352 F D M S V E L L K S A V S G I S P D L T N I L G H Y K
1135 AGATCTTTTAAACAAATGCGGGGATAAATGCATATCTAGAAATGTGCAAGACAAACTCTTAGATTGGATGGGACGAA
379 D L L N K C G D N A Y L E M C K D K L L D W M G S K K
1216 AATTCAAGAGGCATTACAACAGTAGATACAAAATCATTTCATGGACGATTTGCGACTCAAACGAAAGTCTTGAAGACCT
406 I Q K A L Q T V D T K S F M D D L R L K L K V L E D L
1297 AGCCAATCAAGGGGAGACGATCCCTGATGATATAGCAGACAGAGTGTGAGTGTCAACCTCTCAATTAATAGTCAAAGCG
433 A N Q G E T I P D D I A D R V S A V N L S I N S S K R
1378 AAAACGAAGACGAGAATCAGTTAAGGACAGCTGTCGAAAAGACAAAAGTTCGGGCGATCAAATGGTTCGTGGATGCTAC
460 K R R R E S V K D S C P K R Q K S G D Q N G S S D A T
1459 CTCTAAAAATGTACCGATCATGAAACGATTTGAGATCACCTAACACGTTGCAGAACAAATCACTCTGGCATCGA
487 S K N V P I M K R F C R S P K H V A E Q S N T S G I D
1540 TGATGAGCAAAGCTTTGGGTCATACTGCTTATTCAAATGACTGTTCAATAACATTTGCATCTGCAAAATCAAACCTGGACAA
514 D E A Q S L G H T A Y S N D C S I T F A S A N Q T L D N
1621 CACAGAGATCCAGGAAACGATGCTACTAATGTGTGACAGGTCATCGCGTATGAATACTAATGGATTCGAAATGATGA
541 T E I P G N D A T N C A G S S R M N T N G F E I D D
1702 CGCAACATCTACAACCTTCGACGTTACCTAGTGACTTCTTAATATATACTAGATGAGACAAATACAAATGACGTAATTGC
568 A T S T T S Q L P S D F L N I I L D E T N T N D V I A
1783 TAACCTTGACCTAAATCTTTTTCGAACTCAAGGACAATGACCTAGATTTTGAATAATAt ga AATAAATCTATGCGCATATC
595 S N F N L F N L K D N D L D F E N I *
1864 AGGAAAGTGTGGGAAGTGTATATCCAGTCTTTGCAATCCTCGAAATTTTGTCAATAGTGTGTCGATCTACAATG
1945 TATATCTTTGATAAAGAATGTAAATATCCGATATAAACTAATGGCATGATATGAATTTCTTCCGAGCATAAATGATCCAGTT
2026 CTGCGTGAATTTTGCATTTTGCATATATTATATTGTATGACTGTCTATTGTTATTAAGTAAATAACTGTTGCAATATTG
2107 TAATGTTTGTGTAATGTTTAAAGCGATAGAAAGAAAACATACATGCAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 *PmBcl-2-like* cDNA 序列全长以及氨基酸序列

起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TGA) 标注为小写字母, 阴影部分代表 BH4 结构域, 下划线代表 BH3 结构域, 斜体加粗部分代表 BH1 结构域, 加粗部分代表 BH2 结构域

Fig. 1 Full-length cDNA and amino acid sequence of *PmBcl-2-like*

The initiation codon (ATG) and stop codon (TGA) are labeled with lowercase letters, the shaded part represents the BH4 domain, the underlined part represents the BH3 domain, the bold italic part represents the BH1 domain, the bold part represents the BH2 domain

2.6 不同免疫刺激下 *PmBcl-2-like* 的表达分析

在注射 LPS 后, 自 6 h 开始, *PmBcl-2-like* 相对表达量逐渐升高, 到 24 h 时达到最高值 2.454, 而后又逐渐回落至 72 h 时的最低值, 直至 96 h 时表达量趋于平稳。最高值约为最低值

的 2.5 倍 (图 9, 图 10)。

在注射 PGN 后, 6 h 的相对表达量显著升高, 达到 3.859, 而后急剧下降, 48 h 时表达量达到最高, 为 4.299, 为表达量最低时 [96 h (0.590)] 的 7.28 倍 (图 9, 图 10)。

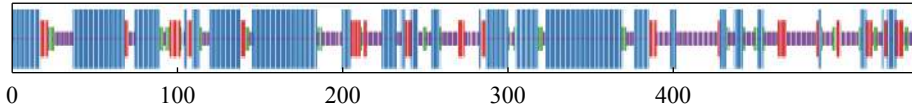


图 2 马氏珠母贝 Bcl-2-like 蛋白质二级结构图

蓝色表示 α -螺旋, 绿色表示 β -转角, 红色表示延伸链, 紫色表示无规则卷曲

Fig. 2 Secondary structure of Bcl-2-like protein in *P. fucata martensii*

Blue areas show the alpha helix, green areas indicate the beta turn, red areas represent the extended strand, and purple shows the random coil



图 3 PmBcl-2-like 蛋白结构域

Fig. 3 PmBcl-2-like protein structure domain

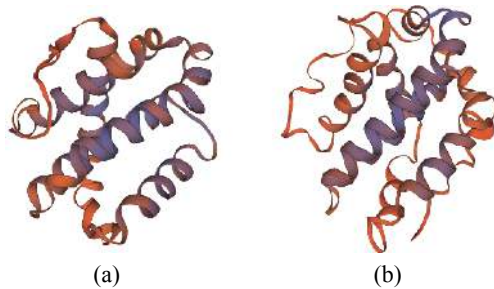


图 4 马氏珠母贝 (a) 和长牡蛎 (b) Bcl-2-like 蛋白分子的空间结构

Fig. 4 Spatial structure of Bcl-2-like protein molecules of *P. fucata martensii* (a) and *C. gigas* (b)

在注射 poly: IC 后, 3 h 时的相对表达量达到最高值, 为 1.000; 6 h 后急剧下降, 在 12 h 时下降到最低值, 为 0.154。最高值约为最低值的 6.49 倍。在 24 h 时又快速上升, 在 48~96 h 逐渐下降 (图 9, 图 10)。

3 讨论

内源性细胞凋亡通路作为调控细胞凋亡的重要通路, 在维持机体正常生命活动中发挥着重要的作用, 哺乳动物的内源性细胞凋亡通路调控机体的免疫应答、生殖和发育^[23-24]。本研究利用 RACE 技术成功获得了马氏珠母贝 *PmBcl-2-like* cDNA 全长, 生物信息学分析结果表明, 其氨基酸序列含有 BH1~4 结构域以及大量的磷酸化位点。有研究表明, Bcl-2 同源结构域 BH1~4 是 Bcl-2 家族发挥功能的重要位点, 例如 BH1 和 BH2 参与 Bcl-2 家族成员的二聚化, BH3 结构域是 Bcl-2 家族成员促凋亡活性不可缺少的结构

域^[25], BH4 结构域是 Bcl-2 家族成员抗凋亡活性所必需的结构域^[26], 这些结构域的存在可以保证 *PmBcl-2-like* 发挥抑制凋亡的相应功能; 此外 *PmBcl-2-like* 含有大量磷酸化位点, 研究表明 Bcl-2 能通过磷酸化在多个位点进行转录后修饰, Bcl-2 家族磷酸化位点会影响细胞周期进程, 推测 *PmBcl-2-like* 可能和哺乳动物 Bcl-2 家族基因一样, 在马氏珠母贝细胞周期进程中发挥着重要的作用, 结合发育不同时期的荧光定量结果, *PmBcl-2-like* 在受精卵中的表达量最高, 推测 *PmBcl-2-like* 在马氏珠母贝胚胎期相比于幼虫期发挥了更重要的作用。TMHMM 预测结果表明, *PmBcl-2-like* 不包含跨膜结构域, 与 Qi 等^[18]对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) Bcl-2 家族以及 Lee 等^[18]对菲律宾蛤仔 *RpBcl-2B* 基因研究的结果一致。

研究某基因功能的基本手段之一是了解该基因在不同组织器官中的表达模式^[27]。本实验采用荧光定量 PCR 技术检测了 *Bcl-2-like* 基因在马氏珠母贝各组织中的表达量, 结果表明, *PmBcl-2-like* 在马氏珠母贝各个组织中均有表达, 鳃中表达量最高, 其次为性腺, 在其他组织中表达量较低。在贝类中, 鳃组织在过滤海水中悬浮物质的过程中发挥关键作用, 同时也可以作为机体的第一道防御屏障^[28-29], 通常被视为马氏珠母贝的免疫器官, *PmBcl-2-like* 在鳃中高表达, 表明了其参与马氏珠母贝免疫调控; 在性腺中的高表达, 推测其在马氏珠母贝繁殖期发挥比较重要的功能^[30]。

为了系统研究 *PmBcl-2-like* 在马氏珠母贝免疫调控中发挥的作用, 实验研究了在马氏珠母贝受到 LPS、PGN 和 Poly: IC 这 3 种免疫刺激后, *PmBcl-2-like* 在鳃中不同时间点的相对表达量 (图 10)。发现在受到不同刺激后, *PmBcl-2-like* 的表达量均显著上调, 表明其参与了机体的

▲ <i>Pinctada martensii</i>	----MADYVDF-I RTTYSI VTDFI SLSLRS QGYQWS DPSSNQDA-----	39
<i>Thamnopis elegans</i>	---MMAHPGI R- DYSNREI VLRYI HYKLLQKGYNWAS S GDRENASS AVGTFFPALGGLVSL	56
<i>Amblyraja radiata</i>	-----MCSSEL VMHFLRYLQQRGHSWSRLCEQDGAERA-----	36
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	-----M-SYSNREL VVFFI SYKLSQRNYPCCQLVLEGASGRTEGDEAI ANGS LGN	49
<i>Salmo trutta</i>	-----M-SYSNREL VVFFI SYKLSQRNYPCCQLVLEGASGRTEGDEAI ANGS LGN	49
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	-----M-ADVSRALVLDVFSYKLRQKGHAWPGLPNGSP-----	32
<i>Homo sapiens</i>	-----GPLGM-SQSNREL VVDFLSYKLSQKGYWSQMA-----	32
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	-----M-SLRNYDLVRDFVSYKLAQRGHDWSRLVDP EAPDT--GAE---G---	39
<i>Pomacea canaliculata</i>	MYVNNKPVI MDVDSRSI VEDYVAYRLERNGLAWQNGQ-RDV-----	42
<i>Crassostrea virginica</i>	---MVKLI RKMDPVGTRYI VVDYL NHRLSKNGHTWTHCPPLQD-----	40
<i>Crassostrea gigas</i>	---MVI ASRKMDRLGTRYI VTDYL NHRLSKNGHTWTHCPPLD-----	40
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	--MSLNNI EMNPTS YRYLVVDFI NYRLSRHGYYTWDNCPPLQA-----	41
<i>Perna viridis</i>	-----MNQYS SRYLVVDFVNDRLRKNGLQWENCPSLEV-----	33
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-----MNQFSSRYLVADFI NDRLRKHGMRDWNCPTLDL-----	33
▲ <i>Pinctada martensii</i>	-----SQAQTRQLSEMADEFANRYESTFTSMIDKLHVTSDTAYSMFKS	83
<i>Thamnopis elegans</i>	PSAAVGNLAAT-EEHPVPQVYSTLCQAGDEF SRRYQRDFTQMSGQLHLTPVTARSHMA	115
<i>Amblyraja radiata</i>	---LNSDVAADFNDRHEAERTCQALREAAEFELRYRRAFSDL SAQLRVPTD AYRRFEQ	93
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	NRNGRSLGMPSSAQGGI EAVKAALRDSVDEFELRYTRAFSDLCSQLHI TPATAYHSES	109
<i>Salmo trutta</i>	NRNGRSLGKPPSSPQGGI EAVKAALRDSVDEFELRYTRAFSDLSSQLHI TPATAYHSES	109
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	-----SCQAEPVKRALQQAGDEFELRYRRAFSDLAAQLLSAECAQSS FQQ	78
<i>Homo sapiens</i>	-----AVKALREAGDEFELRYRRAFSDLTSLQHI TPGTAYQSFEQ	73
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	---AEGGRAAPAAAEDDDEAVRRLREAGDEFVRYRRAFDLAWQLHI TPATAYQSEFQ	96
<i>Pomacea canaliculata</i>	-----TPNEIQRAMRALGDEFESKFSAQFDDMMSQLQLTPDTAYQTFRT	86
<i>Crassostrea virginica</i>	-----PPLKIHI TMREKGFEDLYKI QFQDLVDQLHVTHTDTCYPMFKA	84
<i>Crassostrea gigas</i>	-----PPLKIHTTMRDKGFEEELYKVFQDLVDQLHVTHTDTCYPMFKA	84
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	-----RTNNVHRTLRLALGDEFQERFRTQFDDMVNQLHI TPNTAYPTFHQ	85
<i>Perna viridis</i>	-----PPSQVQLTLRTIGDEFQERFRTQFDDMVDQLHI TEATAYPTFQR	77
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-----PPSQQLKLRSLGDEFQERFRTQFDDMVNQLHI TEATAYPTFQR	77
▲ <i>Pinctada martensii</i>	VTEELFADG-I NWGRVIALFHFGRTLVMNLAEAGELHPTESLVKKSIFIEGYLKS WLQ	142
<i>Thamnopis elegans</i>	VVEELFRDG-VNWGRIVAFEFGGMLCVESASREMSPLVDSIAEWMEYMNGHLHNWI QD	174
<i>Amblyraja radiata</i>	VVGEELFRDG-VNWGRIVAFFCFGAALSVESAEKEMGALVPRIAHWMS TYLESNLEPWI QQ	152
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	VMDEVFRDG-VNWGRVVGLFAFGGALCVCVEKDMSHLVTRIADWMATYLDNHI QPWI QS	168
<i>Salmo trutta</i>	VMDVFRDG-VNWGRVVGLFAFGGALCVCVEKDMSHLVMRIADWMATYLDNHI QPWI QS	168
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	VVTEELFRDG-VNWGRIVAFEFGGALCVESADKMGALVDPVGVMSAYFSQHLEP WVRD	137
<i>Homo sapiens</i>	VVNEELFRDG-VNWGRIVAFEFSGGALCVESVDKEMQVLVSRIAAWMATYLDNHI LEPEWQE	132
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	VVNEELFRDG-VNWGRVVAFFAFGGALCVESADKEMGPLVGRVGSWMATYLDRLDP WIRD	155
<i>Pomacea canaliculata</i>	I VTEIFHDG-VNWGRIVALFGLAGRLAVLSSHQEMPRLIESI VDWVSAAYVDNLKQWITD	145
<i>Crassostrea virginica</i>	VVGEELFQGG-I NWGRVVALFAFSGSLSTRCVEKGMAGLVDSI VDWVTQFIEQDLRQWIDQ	143
<i>Crassostrea gigas</i>	VVEELFQGG-TNWGRVVALFAFSGSLATRCVEKGMAGLVDSI VDWVTQFIEQDLRQWIDQ	143
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	VVQELFDG-VNWGRIVALFGFGGALAVDCVNKGMPHLVDSI VDWVSTYIENNDLQWVTT	144
<i>Perna viridis</i>	VVQELFDGNI NWGRVVALFGFGGALSVECVQNGMPQLVDSI VDWVSVYLCNLEP WITS	137
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VVQELFDGNI NWGRIVALFGFGGALS VKCVQRGMPQLVDSI VDWVSTYLCNSLEQWITD	137
▲ <i>Pinctada martensii</i>	RGGWQCIDHFSKELLQ-I VLPAYKRMI RLLRTMVL-LL-SILLNTSLGARPRLKHGVGT	199
<i>Thamnopis elegans</i>	NGGWDAFVELYSNNIRP-LDLSSLPL-KTILSLAV-VGACITLGAYLGHK-----	222
<i>Amblyraja radiata</i>	HGGWDAFVVL YGNNAAA-RNRELQEKAMKWFVSLMA-LGATLAVAAVYARR-----	202
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	QGGWDRFAEIFGRDAAA-DVRRSQESLKKWLVGVM-LLSGVLVGTLLI MKKQ-----	219
<i>Salmo trutta</i>	QGGWDRFAEIFGRDAAA-DVRRSQESLKKWLVGVM-LLSGVLVGTLLI MKKQ-----	219
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	NGGWDAFVEL YGNNAAA-ESRKRQETFSKWLTLGLS-VAGILLGSYLSRR-----	186
<i>Homo sapiens</i>	NGGWDTFVEL YGNNAAA-ESRKGQER-----	157
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	NGGWDTFVEL YGNDAAA-QSRKQERFNRWLLTGLT-VAAVLLLSLFTTRK-----	204
<i>Pomacea canaliculata</i>	HDGWAGFLFVYAGGPEK-RVKESWPSLKTICGYAAAG-LGITLGFALSQKS-----	195
<i>Crassostrea virginica</i>	HGGWQGFVDFYSRRDQSANDNPNW-----VKYGVLGAVGVVVLGALMTQRT-----	189
<i>Crassostrea gigas</i>	HGGWQGFVDFYSRKDQSNNDNPNW-----VKYGVLGAVGVVVLGALMTQRT-----	189
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	SGGWQGFVEFYKGNTR-RRESPWDNISGVI KYGMLGAI GAVALGAILTQRT-----	195
<i>Perna viridis</i>	NGGWQGFVEYYNQAQNH--NDNQWN-LGEFVRYGAI GVVGALALGALLQRV-----	185
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	NGGWQGFVEAYNQQQNH--NDSPWD-VKGLVYGAIGVI GAMALSALHRT-----	185

图5 PmBcl-2-like 氨基酸序列多序列比对

阴影的深浅代表相似性的高低, 颜色越深表示序列相似性越高

Fig. 5 Multi-alignment of PmBcl-2-like amino acid sequence

The depth of the shadow represents the similarity, the darker the color, the higher the sequence similarity

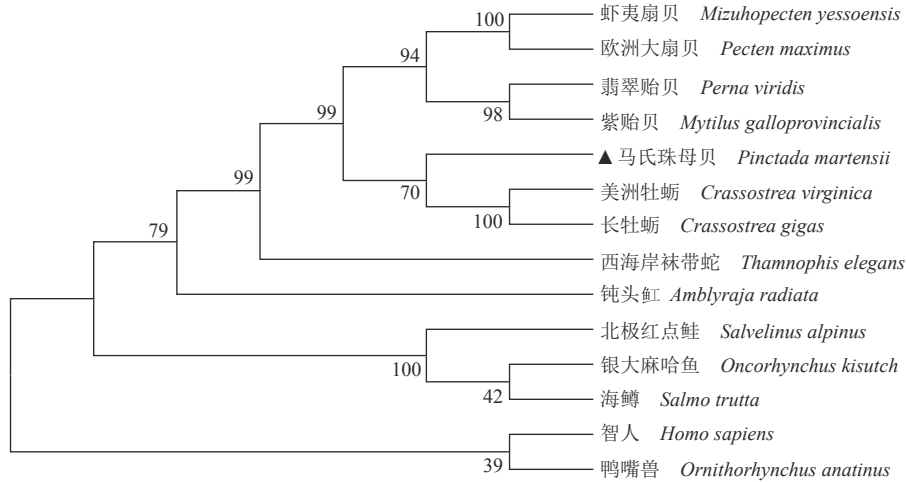


图 6 邻接法构建 PmBcl-2-like 系统进化树

Fig. 6 Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree constructed based on PmBcl-2-like amino acid sequences

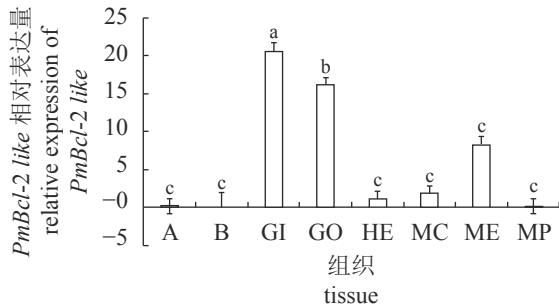


图 7 PmBcl-2-like mRNA 在各组织内的相对表达量

A. 闭壳肌, B. 血细胞, GI. 鳃, GO. 性腺, HE. 肝胰腺, MC. 中央膜, ME. 边缘膜, MP. 外套膜

Fig. 7 Relative expression of PmBcl-2-like mRNA in tissues

A. adductor muscle, B. hemocyte, GI. gill, GO. gonads, HE. hepatopancreas, MC. mantle central, ME. mantle edge, MP. mantle pallial

免疫调节, 但是在受到不同的刺激后, 其表达模式在上调程度以及时间跨度上有所不同, 推测每种刺激可能会引起机体不同程度的细胞凋亡反应。菲律宾蛤仔在受到始仔弧菌 (*Vibrio tapetis*) 感染后, *RpBcl-2B* mRNA 于 3、12 和 48 h 时在鳃组织中出现了高表达^[18], 栉孔扇贝在受到 LPS 感染后, *CfBcl-2* mRNA 在 24 h 表达量最高, 随着时间的推移, 在 24 到 48 h 表达量逐渐下降^[19], 与 *PmBcl-2-like* 在受到 PGN 和 LPS 刺激后的结果较相似。推测在软体动物中, *Bcl-2* 在受到相同刺激后的表达模式具有相似性。此前研究表明, *Bcl-2* 基因家族在哺乳动物的雌性和雄性生殖细胞的凋亡过程中都发挥重要作用,

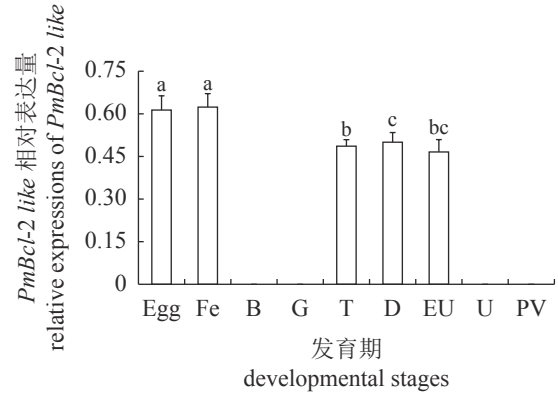


图 8 PmBcl-2-like 在不同发育时期的相对表达量

Egg. 卵, Fe. 受精卵, B. 囊胚期, G. 原肠胚期, T. 担轮幼虫, D. D 型幼虫, EU. 早期壳顶幼虫, U. 眼点期, PV. (附着) 变态后期

Fig. 8 Relative expressions of PmBcl-2-like at different developmental stages

Egg. egg, Fe. fertilization, B. blastula, G. gastrula, T. trochophore stage, D. D-shaped larvae, EU. early umbo larvae, U. eye-spotted larvae, PV. post-veliger stage

细胞凋亡用来消除多余或受损的生殖细胞, 以维持生殖细胞和支持细胞比例平衡, 对于保证生殖细胞的质量有积极作用, 同时也可以保证生殖细胞正常发育^[31-32]。

综上所述, *PmBcl-2-like* 基因与哺乳动物 *Bcl-2* 家族基因类似, 参与了马氏珠母贝发育不同时期以及机体的免疫调节, 但其是否发挥与哺乳动物相同功能需要深入研究。目前为止, 软体动物中内源性凋亡通路相关研究大多局限于基因的克隆以及不同刺激下的表达模式, 少有深

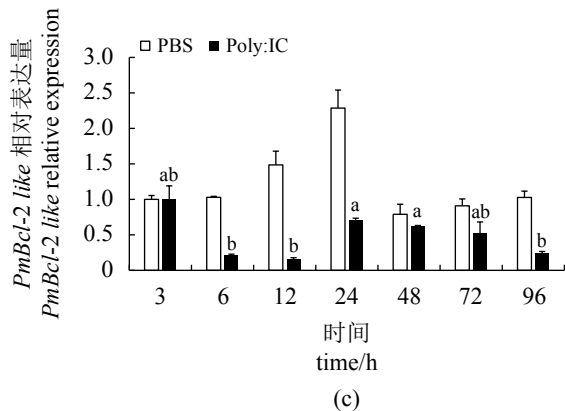
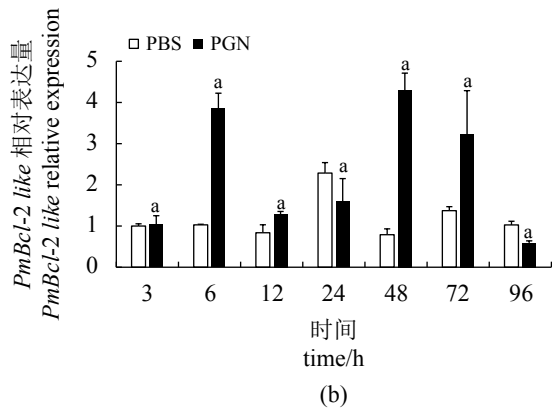
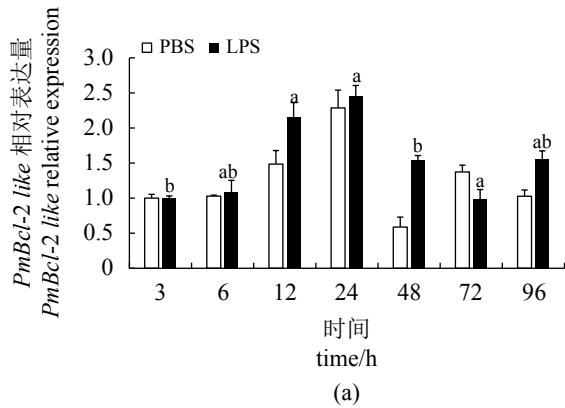


图 9 马氏珠母贝受到不同刺激后在不同时间点 *PmBcl-2-like* 的相对表达量

(a) *PmBcl-2-like* 在 LPS 刺激后不同时间点的相对表达量; (b) *PmBcl-2-like* 在 PGN 刺激后不同时间点的相对表达量; (c) *PmBcl-2-like* 在 Poly:IC 刺激后不同时间点的相对表达量。不同字母表示同一刺激随胁迫时间影响的显著性 ($P<0.05$)

Fig. 9 Expression of *PmBcl-2-like* after adductor injected by different immune stimulation at different time points

(a) expression of *PmBcl-2-like* after adductor injected by LPS; (b) expression of *PmBcl-2-like* after adductor injected by PGN; (c) expression of *PmBcl-2-like* after adductor injected by Poly:IC. Different letters indicate that the same stimulus group has a significant effect with stress time ($P<0.05$)

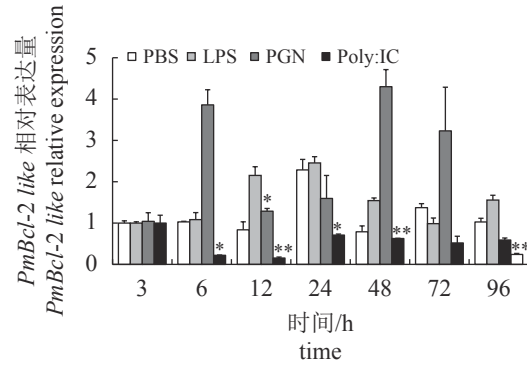


图 10 *PmBcl-2-like* 受到 LPS、PGN、Poly: IC 刺激后不同时间点的相对表达量

*表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)

Fig. 10 Relative expression of *PmBcl-2-like* at different time points after LPS, PGN and Poly: IC injected

*** denotes significant difference ($P<0.05$), **** denotes extremely significant difference ($P<0.01$)

入到调控机制以及具体功能, 后续将探究马氏珠母贝 *Bcl-2-like* 具体功能, 为其免疫调控机制研究奠定理论基础。

参考文献 (References):

[1] 李颖翔. 长牡蛎内源性细胞凋亡通路及 *VDAC2* 基因功能的研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2016.
Li Y X. Elucidation of mitochondrial apoptosis pathway and functional characterization of voltage-dependent anion channel 2 (*VDAC2*) in Pacific oyster[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese).

[2] Brunelle J K, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(4): 437-441.

[3] Liu X S, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c[J]. *Cell*, 1996, 86(1): 147-157.

[4] Acehan D, Jiang X J, Morgan D G, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation[J]. *Molecular Cell*, 2002, 9(2): 423-432.

[5] Raff M. Cell suicide for beginners[J]. *Nature*, 1998, 396(6707): 119.

[6] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326.

[7] Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl - 2 family

- proteins[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2003, 7(3): 249-257.
- [8] Griffiths G J, Dubrez L, Morgan C P, *et al.* Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 144(5): 903-914.
- [9] Reed J C. Bcl-2 family proteins[J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3225-3236.
- [10] Chipuk J E, Green D R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?[J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, 18(4): 157-164.
- [11] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [12] Merry D E, Korsmeyer S J. Bcl-2 gene family in the nervous system[J]. *Annual Review of Neuroscience*, 1997, 20(1): 245-267.
- [13] Hildeman D A, Zhu Y A, Mitchell T C, *et al.* Activated T cell death *in vivo* mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim[J]. *Immunity*, 2002, 16(6): 759-767.
- [14] Opferman J T, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25(1): 37-45.
- [15] Amling M, Neff L, Tanaka S, *et al.* Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1997, 136(1): 205-213.
- [16] Sokolova I M. Apoptosis in molluscan immune defense[J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2009, 6(1): 49-58.
- [17] Xiang Z M, Qu F F, Wang F X, *et al.* ChBax/Bak as key regulators of the mitochondrial apoptotic pathway: cloned and characterized in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 225-232.
- [18] Lee Y, Whang I, Lee S, *et al.* Two molluscan BCL-2 family members from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: molecular characterization and immune responses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1628-1634.
- [19] Qi H, Miao G Y, Li L, *et al.* Identification and functional characterization of two Bcl-2 family protein genes in Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 147-155.
- [20] Jiao Y, Yang S, Cao Y F, *et al.* Genome and transcriptome analyses providing insight into the immune response of pearl oysters after allograft and xenograft transplantations[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 109-117.
- [21] Wang W, Lei Q N, Liang H Y, *et al.* Towards a better understanding of allograft-induced stress response in the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*: insights from iTRAQ-based comparative proteomic analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 186-195.
- [22] Wang W, Wu Y Y, Lei Q N, *et al.* Deep transcriptome profiling sheds light on key players in nucleus implantation induced immune response in the pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 69: 67-77.
- [23] Fulda S, Debatin K M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy[J]. *Oncogene*, 2006, 25(34): 4798-4811.
- [24] Lindsten T, Ross A J, King A, *et al.* The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues[J]. *Molecular Cell*, 2000, 6(6): 1389-1399.
- [25] Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2003, 13(2): 115-123.
- [26] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions[J]. *Molecular Immunology*, 2003, 39(11): 615-647.
- [27] 吴羽媛, 郭志颖, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 *TLR6* 基因的克隆、序列分析与表达[J]. *水产学报*, 2017, 41(11): 1687-1698.
- Wu Y Y, Guo Z Y, Liang H Y, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression studies on *PmTLR6* gene from *Pinctada fucata martensii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(11): 1687-1698(in Chinese).
- [28] Meng X L, Tian X, Liu M, *et al.* The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(2): 287-293.
- [29] Wu Y Y, He J J, Yao G Y, *et al.* Molecular cloning,

- characterization, and expression of two TNFRs from the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 147-159.
- [30] 王志新, 梁海鹰, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝热休克蛋白 *HSP60* 基因的克隆与表达分析[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(6): 14-23.
- Wang Z X, Liang H Y, Du X D, *et al.* Cloning and express characters of *HSP60* gene from *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(6): 14-23(in Chinese).
- [31] Oldereid N B, De Angelis P, Wiger R, *et al.* Expression of *Bcl-2* family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2001, 7(5): 403-408.
- [32] Baum J S, George J P S, McCall K. Programmed cell death in the germline[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005, 16(2): 245-259.

Cloning and preliminary study on the function of *Bcl-2-like* gene in *Pinctada fucata martensii*

FANG Xiaochen^{1,2}, LU Jinzhao^{1,2}, LIANG Haiying^{1,2,3*}, HE Junjun^{1,2}, SHEN Chenghao^{1,2}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, China;

3. Guangdong Provincial Engineering Research Center for Aquatic Animal Health Assessment, Shenzhen 518108, China)

Abstract: As an important apoptosis-regulating gene, *Bcl-2* gene plays an important role in endogenous apoptotic pathways. In this study, *Pinctada fucata martensii Bcl-2* gene (*Pm Bcl-2-like*) was cloned by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technology and its characteristics was analyzed by bioinformatics methods. The expression levels of *PmBcl-2-like* in different tissues, development stages and by immune stimulation were analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR). The results showed that the full length of *PmBcl-2-like* cDNA was 2 180 bp, the length of open reading frame was 1 650 bp, and it encoded a total of 549 amino acids and the molecular weight was 21.62 ku. Domain prediction showed that *PmBcl-2-like* contained BH1-4 domains which are typical domains of *Bcl-2* family. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *PmBcl-2-like* was highly conservative and had high similarity with *Bcl-2* of other species in phylogenetic tree. Quantitative real-time PCR results showed *PmBcl-2-like* was expressed in all the tested eight tissues of *P. fucata martensii*, with the highest expression in the gill, followed by the gonad, and with the lowest expression in the mantle central. At different developmental stages, the expression of *PmBcl-2-like* was higher in the embryonic stage and the highest in the fertilized egg stage. After being stimulated by LPS, the expression of *PmBcl-2-like* reached the maximum at 24 h, and then decreased to the minimum at 72 h, with the maximum being about 2.5 times of the minimum. After PGN stimulation, the expression of *PmBcl-2-like* reached the highest at 6 h and the lowest at 48 h, and the highest was about 7.28 times of the lowest. After Poly: IC stimulation, the relative expression reached its maximum at 3 h, and decreased to its minimum at 12 h, and the maximum was 6.49 times of the minimum. This study suggests that *PmBcl-2-like* may play an important role in the development and immune defense response of *P. fucata martensii*.

Key words: *Pinctada fucata martensii*; *Bcl-2*; gene clone; gene expression

Corresponding author: LIANG Haiying. E-mail: zjlianghy@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472306); Special Project of Harbor Construction and Fishery Industry Development of Guangdong Province (A201608B15); Shenzhen Science and Technology Project (JCYJ20180507183240459)