

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18437

魁蚶 *HIF-1 α* 基因结构特征及对低氧胁迫的响应

张高伟^{1,2}, 吴彪^{1,3}, 刘志鸿^{1,3}, 周丽青^{1,3}, 孙秀俊^{1,3}, 赵庆^{1,2}, 杨爱国^{1,3}

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是低氧信号传导途径中的关键因子, 在动物低氧应答反应中发挥重要作用。为探讨魁蚶(*Scapharca broughtonii*) *HIF-1 α* 基因结构特征及在低氧胁迫下的应答规律, 本研究以魁蚶转录组数据库中的部分序列为基础, 通过 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆获得了魁蚶 *HIF-1 α* 基因 cDNA 全长序列(命名为 *SbHIF-1 α*), 并检测了其 mRNA 的组织分布和低氧胁迫下的表达规律。序列和结构分析显示, *SbHIF-1 α* 基因 cDNA 全长为 2741 bp, 其中包括 2136 bp 的 ORF, 编码 711 个氨基酸, 含有 HIF 保守的 HLH、PAS-A、PAS-B 和 PAC 结构域, 预测蛋白分子量为 80.8 kDa, 理论等电点为 5.57; *SbHIF-1 α* 与所选其他物种 *HIF-1 α* 的序列相似度为 56%~95%; 系统进化分析显示 *SbHIF-1 α* 与软体动物的遗传距离最近。qRT-PCR 结果显示, 在魁蚶的血淋巴、鳃、外套膜、斧足、闭壳肌和肝胰腺 6 个组织内均能检测到 *SbHIF-1 α* 基因, 在血淋巴中表达量最高, 鳃次之, 与其他 4 个组织都存在显著差异($P<0.05$)。海水溶解氧(DO)为 0.5 mg/L、2.5 mg/L、4.5 mg/L 的低氧胁迫下, 每个组织中 *SbHIF-1 α* 都积极响应, 其中血淋巴和鳃比其他四个组织的响应程度大; 血淋巴中, DO 为 0.5 mg/L 胁迫 4 h 后, *SbHIF-1 α* 的表达量较对照组即达到极显著差异($P<0.01$), 胁迫 64 h 后, 表达量达到最高, 是对照组的 519.43 倍; 每个组织对不同浓度 DO 处理响应结果表明, 3 个处理浓度中 0.5 mg/L 处理对 *SbHIF-1 α* 激活程度相对较大。本研究明确了 *SbHIF-1 α* 的基因结构特征、时空表达特征及对低氧胁迫的响应规律, 丰富了海洋贝类 HIF 基因的研究资料。

关键词: 魁蚶; *HIF-1 α* ; 基因特征; 低氧胁迫; 响应规律

中图分类号: S92

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)04-0646-11

低氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor, HIF-1)作为参与缺氧反应的核心因子广泛存在于动物体内, 它可以调控多种靶基因的表达。据报道, 高等动物 HIF 能调控 100 多个基因, 这些基因功能多样, 如调控血管生成、机体氧平衡、能量代谢、细胞凋亡和 B 淋巴细胞发育等^[1-3]。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成的异源二聚体, 其中 HIF-1 α 亚基对氧气敏感, 在常氧细胞中, 可通过脯氨酸羟化酶和泛素蛋白酶体将其降解, 而在

低氧环境下, 脯氨酸羟化酶活性被抑制, *HIF-1 α* 稳定表达, 进而进入细胞核内与 HIF-1 β 结合成异源二聚体。二聚体复合物与低氧反应原件(hypoxia responsive elements, HREs)结合, 再与一些转录因子共同作用调控下游靶基因, 引起机体的生理生化反应^[4]。在人(*Homo sapiens*)、牦牛(*Bos grunniens*)、高原鼯鼠(*Eospalax fontanierii*)和大鼠(*Rattus norvegicus*)等^[5-8]高等动物中, 已有很多 HIF 的报道。水产动物的相关研究主要集中在鱼

收稿日期: 2018-12-26; 修订日期: 2019-01-31.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900304); 山东省重点研发计划项目(2018GHY115030); 农业农村部财政专项项目(NFZX2018).

作者简介: 张高伟(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类免疫方向. E-mail: zhanggw412@outlook.com

通信作者: 刘志鸿, 研究员, 研究方向为贝类免疫方向. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn

类。如武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)^[9]和胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)^[10]等处于缺氧的环境条件下时,一些组织中 *HIF-1 α* 基因的转录水平会显著上调。河鲈(*Perca fluviatilis*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)也有相关报道^[11-13]。无脊椎动物 *HIF-1* 的相关研究较少,海洋软体动物中只有太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[14]和杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)^[15]等少数几个物种 *HIF-1* 基因的相关报道。Kawabe 等^[14]通过 Northern blot 和 Western blot 分析证明,缺氧条件下太平洋牡蛎 *HIF-1 α* mRNA 和蛋白都能够被周期性诱导表达。

低氧在海水养殖环境中经常出现,常给养殖生物带来不利影响。虽然,贝类适应缺氧环境的能力相对较强,但低氧情况下同样会出现免疫下降、生长受阻和 DNA 损伤等现象,从而导致生长速度减慢,生殖力下降,甚至死亡^[16]。研究显示,贝类可以通过增强氧的运送能力、降低能量消耗、提高能量供应和免疫力等多种生理反应来应对低氧环境^[17]。魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是中国重要埋栖型经济贝类,主要分布在中国、朝鲜半岛及菲律宾沿海等,生活在 3~50 m 水深的软泥或泥沙质海底^[18]。赵庆^[19]研究表明,魁蚶的低氧耐受能力较强,用 DO 值为 0.5 mg/L 的条件胁迫 10 d 后,存活率仍高达 15%,而四角蛤蜊(*Macra quadrangularis*)5 d 后死亡率即达到 90%;魁蚶的鳃、外套膜和血液中 SOD 酶活性和 T-AOC 在低氧胁迫后也发生了较大变化,但其基因层面的响应规律和调控机制有待深入研究。

为探究魁蚶 *HIF-1 α* 的基因结构特征和对低氧的响应,本研究克隆获得了魁蚶 *HIF-1 α* 基因的 cDNA 全长,并对其组织分布、低氧胁迫下的表达进行了研究,将为揭示魁蚶应对低氧的适应机制提供研究资料,也为进一步丰富贝类 *HIF* 的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与来源

实验用魁蚶来自于长岛海区,选取壳长为 30 mm 左右的健康个体,低温运至实验室,于 18℃ 充气

海水中暂养 14 d,每天换水 2 次,每次换水量 50%,每 4 h 投喂单胞藻一次。

1.2 实验处理及实验组织获得

低氧胁迫处理参照赵庆实验方法加以改进^[19]:利用调节氮气和空气的充气速度控制 DO,实时监测并适度调节以保证氧浓度符合实验要求。实验共设 4 个 DO 浓度梯度,分别为 0.5 mg/L、2.5 mg/L、4.5 mg/L 和 7.5 mg/L(对照组),处理 0 h、4 h、8 h、16 h、24 h、36 h、48 h 和 64 h 后,在每组中随机取 3 个魁蚶的血淋巴、鳃、外套膜、斧足、闭壳肌和肝胰腺 6 个组织置于液氮中,用于 RNA 提取。基因克隆和组织分布研究材料来自于对照组。

1.3 基因克隆与序列分析

1.3.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 RNA 提取采用 TRIzol 法^[20],稍加改动。主要步骤为:将组织样品在液氮中研磨,TRIzol 处理 10 min,加入氯仿抽提蛋白质,然后再利用异丙醇沉淀 RNA,用 75%乙醇连续洗净异丙醇后室温干燥,DEPC 水溶解。最后测定 RNA 浓度和利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量、纯度和完整性。利用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa)按照说明书操作步骤合成 cDNA 第一链,PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)获得用于 qRT-PCR 实验的 cDNA 第一链,置于-20℃中备用。

1.3.2 *SbHIF-1 α* 基因克隆 根据实验室已得转录组数据库中的序列,利用 Primer 5 分别设计基因的两个特异性引物(*HIF-1 α* -F、*HIF-1 α* -R)扩增 *SbHIF-1 α* cDNA 的中间片段。根据扩增出的中间片段再分别设计出两对 5'和 3'RACE 引物(*RHIF-1 α* -R1、*RHIF-1 α* -R2)和(*RHIF-1 α* -F1、*RHIF-1 α* -F2)使用 RACE 试剂盒(Clontech)分别进行巢式扩增获得基因 cDNA 全长。第一轮使用试剂盒中的 UPM 分别和(*RHIF-1 α* -R1、*RHIF-1 α* -F1)进行四个体系扩增,再以第一轮扩增产物稀释 50 倍为模板,以 NUP 和(*RHIF-1 α* -R2、*RHIF-1 α* -F2)进行第二轮扩增。第一轮 PCR 反应程序为 94℃ 30 s, 72℃ 1 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 1 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1 min, 20 个循环; 4℃ 保存。第二轮 PCR 反应程序为 94℃

30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 2 min, 20 个循环; 72℃ 2 min; 4℃ 保存。所用引物见表 1。

表 1 基因克隆和荧光定量 PCR 所用引物序列
Tab. 1 The primers used in gene clone and qRT-PCR experiments

引物 primer	序列 sequence (5'-3')
β -actin-F	GAGACCTTCAACACCCCGC
β -actin-R	TAGGTGGTCTCGTGGATGCC
HIF-1 α -F	AGTGTCTGTGTGCGAGTGAG
HIF-1 α -R	GAAAAATTGATGCCGGGCCC
RHIF-1 α -R1	CCGACCGCAGCTAAAAATGG
RHIF-1 α -R2	CAAGTTGGGAGGCCATGGAT
RHIF-1 α -F1	CGGAGTCCGTGTTCATTCT
RHIF-1 α -F2	ATGGAAGCATGCCAGTGGA
UPM	long: CTAATACGACTCACTATAGGG- CAAGCAGTGGTATCAACG CAGAGT short: CTAATACGACTCACTATAGGG
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
QHIF-1 α -F	CGGGCCCACTGAAAAAC
QHIF-1 α -R	AGCTCGGACTCCAAAGCTTC

用 1.2% 的琼脂糖胶对 PCR 产物进行电泳检测, 对目的条带进行切胶回收, 连接 T 载体并转化至克隆菌, 再挑取阳性单克隆菌株, 测序验证。

1.3.3 序列分析 使用 SeqMan 对测序结果进行拼接, 获得完整 cDNA 序列。通过 EditSeq 软件翻译序列的 ORF, 预测蛋白分子量大小及等电点; 利用 Interproscan 和 Smart 在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, <http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测编码蛋白的功能域; 通过同源建模服务器 (SWISS-MODEL) 对蛋白三级结构进行预测; 经 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)查找同源序列, 利用 ClustalX 和 DnaMan 软件进行多序列同源比对, 利用 Mega 6.0 构建系统进化树。

1.4 荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析

用上述实验所得 cDNA 稀释 15 倍后作为 qRT-PCR 反应模板, 设计特异性引物 (QHIF-1 α -F、QHIF-1 α -R), 选用 β -actin 作为内参基因(表 1)。反应体系为 TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L 正反向引物各 0.8 μ L, ROX ReferenceDye II(50 $\times$) 0.4 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。反应程序为: 95℃

30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。应用 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System 进行 qRT-PCR 实验, 每个样品做 3 个重复, 数据结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。应用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时为显著性差异, $P < 0.01$ 时为极显著差异。采用 GraphPad prism 6.0 软件进行作图分析。

2 结果与分析

2.1 基因 cDNA 序列分析

将测序结果进行拼接比对, 最终得到 HIF-1 α 基因的 cDNA 全长序列(命名为 *SbHIF-1 α* , GenBank 登录号为 MH936548)(图 1)。

SbHIF-1 α 基因 cDNA 全长为 2741 bp, 包括 194 bp 的 5'-UTR, 411 bp 的 3'-UTR 和 2136 bp 的 ORF, ORF 编码 711 个氨基酸残基, 预测蛋白分子量为 80.8 kDa, 理论等电点为 5.57。3'-UTR 近 poly A 附近具有加尾信号序列(AATAAA); 软件预测 *SbHIF-1 α* 含有两个糖基化位点, 一个脯氨酸羟化酶结合位点 LxxLAP。

2.2 *SbHIF-1 α* 的同源性分析

在线比对结果显示, *SbHIF-1 α* 编码的氨基酸序列与其他物种 *HIF-1 α* 编码的氨基酸序列具有较高相似度, 与杂色鲍、美洲牡蛎(*C. virginica*) *HIF-1 α* 的相似度分别为 93% 和 92%, 与人 *HIF-1 α* 的相似度也高达 77%。序列保守性相对较强, 氨基酸对比信息见图 2。

对魁蚶 HIF-1 α 蛋白功保守结构域进行分析, 结果见图 3, 魁蚶 HIF-1 α 蛋白的 N 端相对保守, 共有 4 个保守结构域: 1 个 HLH 结构域, 由第 16 位氨基酸到第 69 位氨基酸之间的 54 个氨基酸残基构成; 2 个 PAS 结构域, 其中 PAS-A 由第 79 位氨基酸到第 145 位氨基酸之间的 67 个氨基酸残基构成; PAS-B 由第 214 位氨基酸到第 280 位氨基酸之间的 67 个氨基酸残基构成; 1 个 PAC 结构域, 由第 286 位氨基酸到第 329 位氨基酸之间的 44 个氨基酸残基构成, 这些保守结构域与图 2 深色保守区域相对应。

SBHIF-1a
Acipenser baerii
Crassostrea virginica
Ctenopharyngodon idella
Cynoglossus semilaevis
Haliotis discus hannai
Homo sapiens
Hypophthal michthys molitrix
Megalobrama amblycephala
Mizuhopecten yessoensis
Mus musculus
Pseudorasbora parva
Xenopus laevis

SBHIF-1a
Acipenser baerii
Crassostrea virginica
Ctenopharyngodon idella
Cynoglossus semilaevis
Haliotis discus hannai
Homo sapiens
Hypophthal michthys molitrix
Megalobrama amblycephala
Mizuhopecten yessoensis
Mus musculus
Pseudorasbora parva
Xenopus laevis

SBHIF-1a
Acipenser baerii
Crassostrea virginica
Ctenopharyngodon idella
Cynoglossus semilaevis
Haliotis discus hannai
Homo sapiens
Hypophthal michthys molitrix
Megalobrama amblycephala
Mizuhopecten yessoensis
Mus musculus
Pseudorasbora parva
Xenopus laevis

SBHIF-1a
Acipenser baerii
Crassostrea virginica
Ctenopharyngodon idella
Cynoglossus semilaevis
Haliotis discus hannai
Homo sapiens
Hypophthal michthys molitrix
Megalobrama amblycephala
Mizuhopecten yessoensis
Mus musculus
Pseudorasbora parva
Xenopus laevis

SBHIF-1a
Acipenser baerii
Crassostrea virginica
Ctenopharyngodon idella
Cynoglossus semilaevis
Haliotis discus hannai
Homo sapiens
Hypophthal michthys molitrix
Megalobrama amblycephala
Mizuhopecten yessoensis
Mus musculus
Pseudorasbora parva
Xenopus laevis

SBHIF-1a
Acipenser baerii
Crassostrea virginica
Ctenopharyngodon idella
Cynoglossus semilaevis
Haliotis discus hannai
Homo sapiens
Hypophthal michthys molitrix
Megalobrama amblycephala
Mizuhopecten yessoensis
Mus musculus
Pseudorasbora parva
Xenopus laevis

图 2 不同物种 *HIF-1a* 氨基酸序列比对

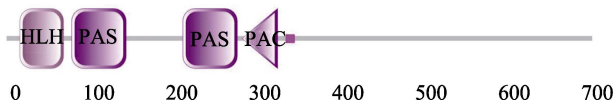
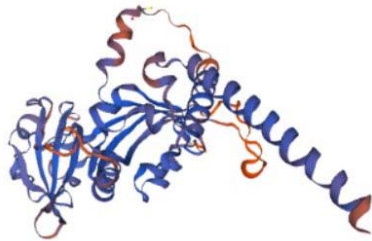
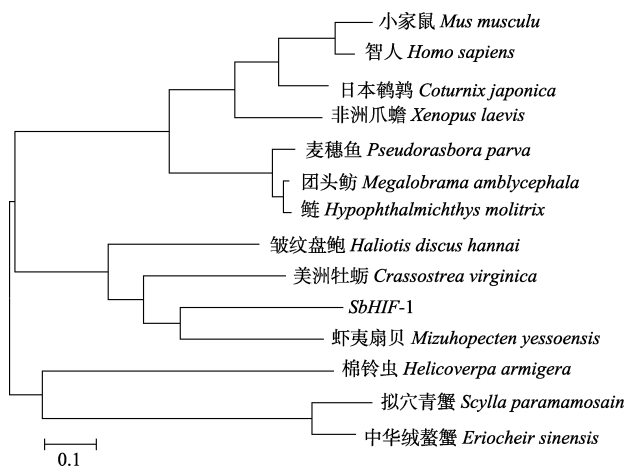
深色覆盖表示保守的氨基酸残基, 浅色覆盖表示相似的氨基酸残基。

分析所用的氨基酸序列 GenBank 登录号如下: 西伯利亚鲟, KY174955.1; 美洲牡蛎, HM441076.1; 草鱼, AY450269.2; 半滑舌鲷, NM_001294187.1; 皱纹盘鲍, MH135278.1; 人, NM_181054.2; 鲑, HM146310.1; 团头鲂, GU363498.1; 虾夷扇贝, XM_021497943.1; 小家鼠, BC026139.1; 麦穗鱼, FJ794604.1; 非洲爪蟾, NM_001086980.1。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of *SbHIF-1a* with other hemoglobin amino acid sequences

Fully conserved residues are highlighted in dark. Strongly conserved residues among sequences are shaded in light colour.

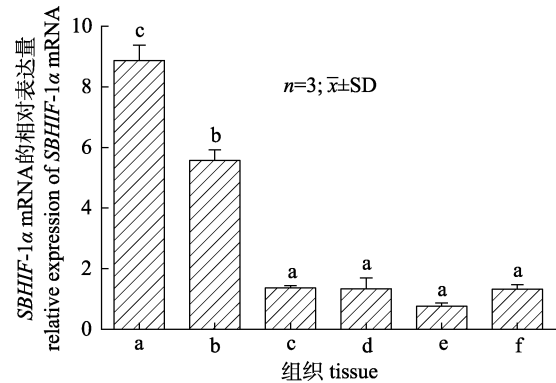
The GenBank accession numbers of protein sequences used for analysis are as follows: *Acipenser baerii*, KY174955.1; *Crassostrea virginica*, HM441076.1; *Ctenopharyngodon idella*, AY450269.2; *Cynoglossus semilaevis*, NM_001294187.1; *Haliotis discus hannai*, MH135278.1; *Homo sapiens*, NM_181054.2; *Hypophthalmichthys molitrix*, HM146310.1; *Megalobrama amblycephala*, GU363498.1; *Mizuhopecten yessoensis*, XM_021497943.1; *Mus musculus*, BC026139.1; *Pseudorasbora parva*, FJ794604.1; *Xenopus laevis*, NM_001086980.1.

图 3 魁蚶 HIF-1 α 保守结构域Fig. 3 Domains of hypoxia inducible factor-1 α of *Scapharca broughtonii*图 4 魁蚶 HIF-1 α 三级结构Fig. 4 The tertiary structure of hypoxia inducible factor-1 α of *Scapharca broughtonii*图 5 Maximum likelihood 模型构建的 *SbHIF-1 α* 系统进化树

进化树中所用蛋白的氨基酸序列的 GenBank 登录号: 拟穴青蟹, KU644140.1; 中华绒螯蟹, KF825558.1; 棉铃虫, KU552106.1; 美洲牡蛎, HM441076.1; 日本鹌鹑, XM_015865743.1; 皱纹盘鲍, MH135278.1; 人, NM_181054.2; 鲢, HM146310.1; 团头鲂, GU363498.1; 虾夷扇贝, XM_021497943.1; 小家鼠, BC026139.1; 麦穗鱼, FJ794604.1; 非洲爪蟾, NM_001086980.1.

Fig. 5 The phylogenetic tree based on the sequences of different *SbHIF-1 α* family members

The GenBank accession numbers of protein sequences used for phylogenetic analysis are as follows: *Scylla paramamosain*, KU644140.1; *Eriocheir sinensis*, KF825558.1; *Helicoverpa armigera*, KU552106.1; *Crassostrea virginica*, HM441076.1; *Coturnix japonica*, XM_015865743.1; *Haliotis discus hannai*, MH135278.1; *Homo sapiens*, NM_181054.2; *Hypophthalmichthys molitrix*, HM146310.1; *Megalobrama amblycephala*, GU363498.1; *Mizuhopecten yessoensis*, XM_021497943.1; *Mus musculus*, BC026139.1; *Pseudorasbora parva*, FJ794604.1; *Xenopus laevis*, NM_001086980.1.

图 6 *SbHIF-1 α* 在魁蚶不同组织中的表达分布

a: 血淋巴, b: 鳃, c: 外套膜, d: 斧足, e: 闭壳肌, f: 肝胰腺. 不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 6 Distribution of *SbHIF-1 α* gene in different tissues of *Scapharca broughtonii*

a: Haemocyte, b: Gill, c: Mantle, d: Foot, e: Adductor muscle, f: Hepatopancreas.

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

高后降低再升高的变化趋势也体现外套膜(图 7C)、斧足(图 7D)、闭壳肌(图 7E)和肝胰腺(图 7F)中, 不过这 4 个组织中 *SbHIF-1 α* 的变化幅度相对于血淋巴和鳃小很多, 如 0.5 mg/L 实验组外套膜、闭壳肌和肝胰腺中 *SbHIF-1 α* 的最大值分别是对照组的 95.98 倍、42.35 倍和 52.31 倍。另外, 6 个组织中 *SbHIF-1 α* 对不同 DO 处理响应程度具有一定的相似性, 随 DO 值降低即胁迫程度的增强, *SbHIF-1 α* 响应程度更加强烈。如血淋巴中, 0.5 mg/L 的低氧处理组相较 2.5 mg/L 和 4.5 mg/L 这两个低氧组响应更积极, 相对表达变化更大, 从胁迫开始便积极响应, 上升趋势较 2.5 mg/L 和 4.5 mg/L 这两个低氧组更为明显, 显著水平在 4 h 时就达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

3 讨论

高等动物耐低氧能力差, 任何长时间的缺氧都会导致机体衰竭甚至死亡^[21]。然而, 某些低等动物如海洋无脊椎动物已经进化到在一段时间内利用少量的氧气也可以存活^[22]。为了应对缺氧取环境, 生物机体形成了一系列的调节机制, 其中 HIF-1 就是一种最主要的应答细胞内氧气浓度降低的转录因子成员之一, 可以对多种基因进行调控^[23]。海洋软体动物中, 已经有太平洋牡蛎^[14]和杂色鲍^[24]等 *HIF-1 α* 基因被进行克隆和表达研究。

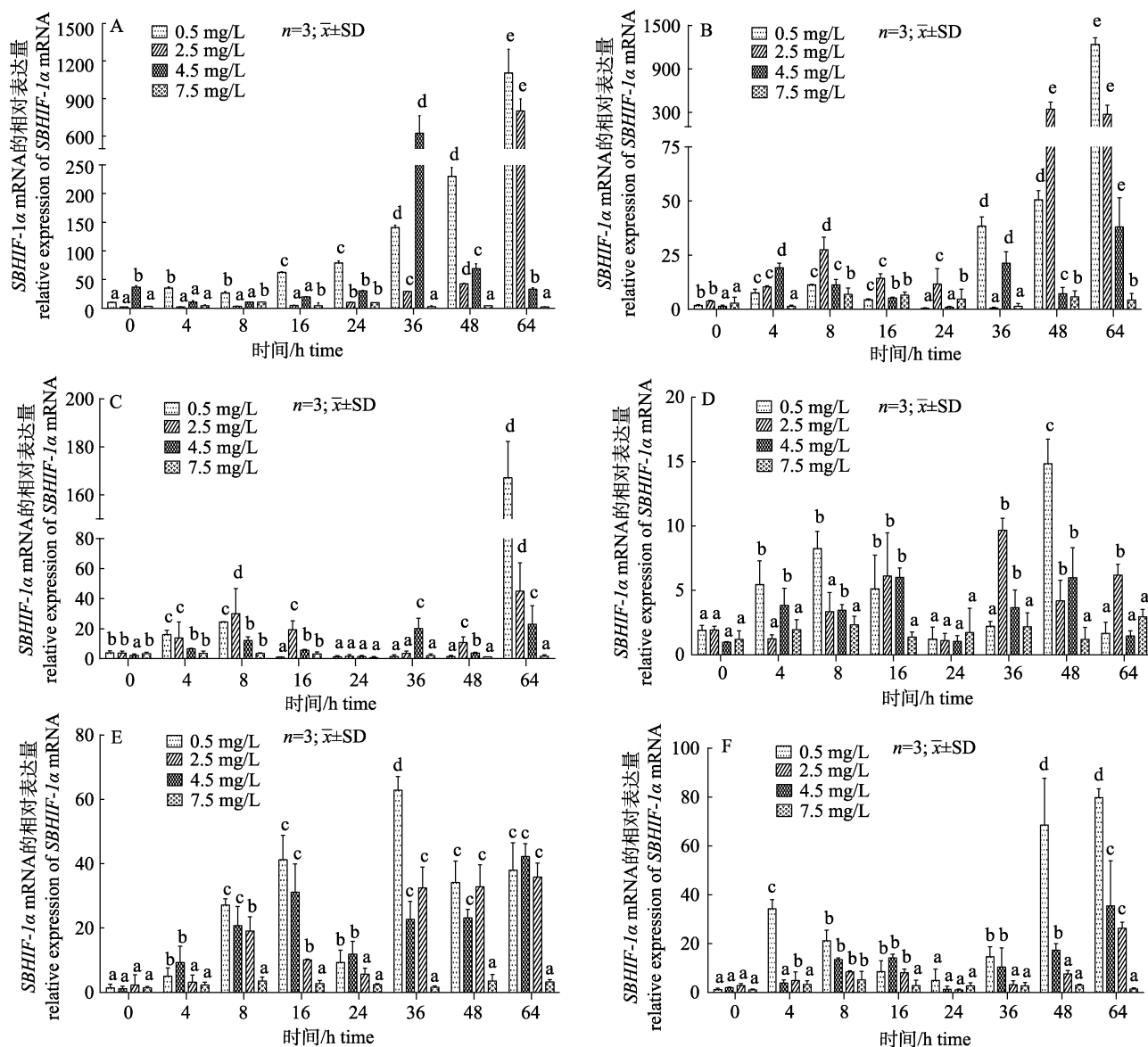


图 7 各组织 *SbHIF-1α* 在低氧胁迫后 mRNA 表达水平变化

同一实验组不同字母表示差异性极显著 ($P < 0.01$).

Fig. 7 *SbHIF-1α* mRNA expression level after hypoxia stress in various organizations
Different letters in the same experimental group indicate highly significant difference ($P < 0.01$).

本研究通过 PCR 和 RACE 技术克隆获得了一种 *HIF-1α* 基因 cDNA 全长序列。序列和结构分析表明, *SbHIF-1α* 具有与其他物种 *HIF-1α* 相似性较高的基因序列, 且拥有 *HIF-1α* 基因保守的 HLH、bHLH、PAS-A、PAS-B 和 PAC 结构域, 这说明 *SbHIF-1α* 基因在进化上保留了比较保守的结构域和功能位点^[25]。不过, *SbHIF-1α* 与其他物种的 *HIF-1α* 相比也存在一定的差异。比如, 人等高等动物以及节肢动物门中小长臂虾的 *HIF-1α* 中都

具有两个保守的脯氨酸羟化酶结合位点在^[26-27], 而 *SbHIF-1α* 只含有一个脯氨酸羟化酶结合位点 LxxLAP, 但这与太平洋牡蛎^[14]和杂色鲍^[24]等近缘物种一致, 这可能是软体动物在 *HIF* 基因进化上形成的特有特点。魁蚶和栉孔扇贝 *HIF-1α* 两个基因的氨基酸序列相似度为 90%, 序列差异不明显, 但是两种贝类的耐低氧能力差异明显^[28]。据报道, 从线虫到人类, 低氧信号都启动结构相同或相似的同源基因转录和调控, 并激活类似的生

理、生化反应^[29]。所以造成不同贝类对氧气不同适应能力的原因可能是发生在 HIF-1 信号通路效应基因的差别上, 这一结果与鱼类不同物种 *HIF-1* 基因相似而耐低氧能力差距大的结果相似^[30]。

本研究中, 在血淋巴、外套膜、鳃、斧足、肝胰腺和闭壳肌共 6 个组织中均检测到了 *SbHIF-1 α* 基因转录本, 说明了 HIF 分布的广泛性, 这一结果也与 *HIF-1 α* 在美洲牡蛎和蓝蟹(*Callinectes sapidus*)等水生无脊椎动物中各组织的表达分布一致^[31-32]。*SbHIF-1 α* 在闭壳肌中表达量最低, *SbHIF-1 α* 在血淋巴中表达量最高, 是闭壳肌的 11.45 倍, 其他组织的相对表达量也都比较低。Cai 等^[33]发现杂色鲍 *HIF-1 α* 基因也是在血淋巴和鳃中表达量较高, 其他组织相对较低, 与本研究结果较为一致。不过, 美洲牡蛎、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)以及杂色鲍等其他水生无脊椎动物中 *HIF-1 α* 均是在鳃组织中表达量最高^[31, 33-34], 推测原因可能是魁蚶血淋巴比鳃在对外界刺激的防御方面发挥更重要的作用, 赵庆^[19]和黄永欢等^[35]研究也显示魁蚶的血淋巴在应对外界刺激应答中发挥较积极的作用。

本研究丰富了不同浓度低氧胁迫下, 各个组织 *HIF-1 α* 基因的表达谱。魁蚶受到低氧胁迫时, *HIF-1 α* 在各组织中均做出及时反应。血淋巴受较强低氧胁迫后 *SbHIF-1 α* 的表达量变化总体趋势是逐步升高, 且溶氧越低的实验组对胁迫响应更积极, 上升趋势较更为明显, 0.5 mg/L 实验组在 4 h 时就达到极显著水平($P<0.01$)。这说明魁蚶 *HIF-1 α* 在低氧胁迫初期到低氧胁迫的整个过程都在发挥重要的作用, 这一点与 Cai 等^[33]研究结果一致, 而本研究更全面地分析了不同低氧条件下及更长处理时间下 *HIF-1 α* 的表达规律。本研究中鳃、外套膜、斧足、闭壳肌和肝胰腺组织低氧胁迫使各处理组 *SbHIF-1 α* 的表达量变化的总体趋势基本是升高后降低再上升的趋势, 这一结果与已经研究的太平洋牡蛎、凡纳滨对以及杂色鲍等水生动物的相关研究结果有一定差别^[31, 33], 这说明与其他海洋软体动物相比, 魁蚶可能具有一套特别的耐低氧适应机制, 推测与其含有红细胞有关, 相关机理还需进一步研究。导致这一

变化趋势的原因可能是机体受到低氧刺激后, *SbHIF-1 α* 积极响应后与 *HIF-1 β* 基因相结合进一步调控下游基因, 从而表达量先减少。但是由于更高强度的低氧胁迫可能使机体需要更多的适应调控来应对, 所以 *SbHIF-1 α* 基因在各组织中的表达量会继续上升以对机体进行更多方面的适应性调控。上述变化趋势与魁蚶铁蛋白基因在受到外界刺激后的变化趋势一致^[36], 推测这两个基因受到外界环境胁迫后的调节机制相似。本研究开展了 *SbHIF-1 α* 在外套膜、斧足、闭壳肌和肝胰腺组织在低氧胁迫下转录水平的研究, 蛋白质水平的响应规律还有待进一步进行。

目前, 关于 HIF-1 的研究多集中在哺乳类上, 而贝类 HIF-1 的研究相对较少。而 HIF-1 作为机体调节氧平衡的主要转录因子, 在呼吸调节和应对外界刺激的免疫防御方面发挥作用, 仍有许多后续深入研究亟待开展。本研究初步揭示了魁蚶 *HIF-1 α* 基因的结构特征和表达模式, 为魁蚶 HIF-1 信号通路和低氧适应机制研究提供了参考。

参考文献:

- [1] Wang G, Semenza G. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270: 1230-1237.
- [2] Cai X H, Huang Y T, Zhang Z P, et al. Hypoxia inducible factor- 1 (HIF- 1) and its research advance in aquatic[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(1): 119-132. [蔡秀红, 黄贻涛, 张子平, 等. 缺氧诱导因子-1(HIF-1)及其在水生动物中的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(1): 119-132.]
- [3] Manolescu B, Oprea E, Busu C, et al. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway[J]. Biochimie, 2009, 91(11-12): 1347-1358.
- [4] Li Q F. Regulation of gene expression by HIF-1 α and HIF-2 α [J]. Journal of International Pathology and Clinical Medicine, 2005, 25(5): 447-449. [李启芳. HIF-1 α 和 HIF-2 α 对基因表达的调控[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(5): 447-449.]
- [5] Jewell U R, Kvietikova I, Scheid A, et al. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous[J]. The FASEB Journal, 2001, 15(7): 1312-1314.
- [6] Li C Y, Wang L, Wu K N, et al. Cloning and bioinformatics analysis of HIF-3A in Jinchuan yak[J]. Biotechnology, 2017, 5(12): 472-477. [李晨阳, 王利, 吴开年, 等. 金川牦牛

- HIF-3A 克隆及生物信息学分析[J]. 生物技术, 2017, 5(12): 472-477.]
- [7] Lü Y Q, Li X, Cao Y B, et al. Site-directed mutagenesis and eukaryotic expression of HIF-2 α in *Myospalax baileyi*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 1228-1231. [吕雅琪, 李鑫, 曹诣斌, 等. 高原鼢鼠 HIF-2 α 的定点突变与真核表达[J]. 山西农业科学, 2017, 45(8): 1228-1231.]
- [8] Xu G, Zhao X J, Xiang X Y, et al. Pulmonary vascular remodeling in a rat model and the role of HIF-1 α in the pathogenesis[J]. Journal of Medical Research, 2016, 2(4): 127-130. [许果, 赵兴吉, 向小勇, 等. 大鼠肺血管重塑动物模型的建立及 HIF-1 α 在其中的作用[J]. 医学研究杂志, 2016, 2(4): 127-130.]
- [9] Shen R J, Jiang X Y, Pu J W, et al. HIF-1 α and -2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 157(3): 273-280.
- [10] Chen N, Chen L P, Zhang J, et al. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α /2 α /3 α of the hypoxia-sensitive freshwater species, Chinese sucker[J]. Gene, 2012, 498(1): 81-90.
- [11] Rimoldi S, Terova G, Ceccuzzi P, et al. HIF-1 α mRNA levels in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) exposed to acute and chronic hypoxia[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4009-4015.
- [12] Wang Z S, Qi Z T, Qiu M, et al. Changes of globins expression in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) in response to short-term hypoxia[J]. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 2011, 41(3): 179-184.
- [13] Zhang H. Cloning of the hypoxia inducible factor-1 α and gene expression analysis of *Pelteonagrus fulvidisco*[D]. Baoding: Hebei University, 2010. [张慧. 黄颡鱼 HIF-1 α 基因克隆与表达特征分析[D]. 保定: 河北大学, 2010.]
- [14] Kawabe S, Yokoyama Y. Role of hypoxia-inducible factor α in response to hypoxia and heat shock in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Marine Biotechnology, 2011, 14(1): 106-119.
- [15] Cai X H, Huang Y T, Zhang X, et al. Cloning, characterization, hypoxia and heat shock response of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Gene, 2014, 534(2): 256-264.
- [16] Wang Z S. Cloning of Hif-1, Hb-1 and Tf genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and expression analysis under hypoxia[D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2012. [王资生. 半滑舌鲷 HIF-1 α 、Hb- α 1 和 Tf 基因克隆及在低氧胁迫下的表达分析[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2012.]
- [17] David E, Tanguy A, Pichavant K, et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions[J]. FEBS Journal, 2005, 272(21): 5635-565.
- [18] Wang S F, Bao Y B, Shi M J, et al. Purification and antibacterial activity of hemoglobin from *Tegillarca granosa*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2014, 36(12): 67-73. [王素芳, 包永波, 施淼江, 等. 泥蚶血红蛋白的制备及其抗菌活性研究[J]. 海洋学报, 2014, 36(12): 67-73.]
- [19] Zhao Q. Molecular cloning and functional analysis of hemoglobin genes from Ark Shell *Scapharca Broughtonii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018. [赵庆. 血红蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.]
- [20] Sun J, Wang B J, Sun S J, et al. cDNA cloning and sequence analysis of hemocyanin in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(1): 82-90. [孙杰, 王宝杰, 孙姝娟, 等. 中国对虾血蓝蛋白基因 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 82-90.]
- [21] Semenza G L, Agani F, Feldser D, et al. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases[M]// Oxygen Sensing. Boston, Springer, 2002, 475: 123-130.
- [22] Cheng W, Liu C H, Cheng S Y, et al. Effect of dissolved oxygen on the acid-base balance and ion concentration of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Aquaculture, 2004, 231(1-4): 573-586.
- [23] Yuan Y, Zhong H. Progress of structure and function of hypoxia-inducible factor-1[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(5): 961-963. [袁源, 钟站. 缺氧诱导因子-1 结构及功能的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 961-963.]
- [24] Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, et al. Oxygenregulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(32): 20055-20062.
- [25] Shen R J. Structural and functional studies of hypoxia inducible factors in *Megalobrama amblycephala*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011. [沈睿杰. 团头鲂缺氧诱导因子的结构和功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.]
- [26] Kawabe S, Yokoyama Y. Role of hypoxia-inducible factor α in response to hypoxia and heat shock in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Marine Biotechnology, 2011, 14(1): 106-119.]

- [27] Li T, Brouwer M. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: Molecular characterization and response to hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 147(1): 11-19.
- [28] Semenza G L, Jiang B H, Leung S W, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(51): 32529-32537.
- [29] Xiao W H. Hypoxic signal transduction pathway and hypoxic adaptation in fish[J]. Scientia Sinica Vitae, 2012, 44(12): 1227-1235. [肖武汉. 低氧信号传导途径与鱼类低氧适应[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 44(12): 1227-1235.]
- [30] Han Q Q, Wang H, Li X, et al. Research progress of HIF-1 in Cyprinidae[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2018, 46(9): 1587-1590. [韩青青, 王华, 李鑫, 等. 鲤科鱼类 HIF-1 的研究进展[J]. 山西农业科学, 2018, 46(9): 1587-1590.]
- [31] Piontkivska H, Chung J S, Ivanina A V, et al. Molecular characterization and mRNA expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin): Hypoxia-inducible factor α (HIF- α) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2011, 6(2): 103-114.
- [32] Hardy K M, Follett C R, Burnett L E, et al. Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue and muscle fiber type dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2012, 163(1): 137-146.
- [33] Cai X H, Huang Y T, Zhang X, et al. Cloning, characterization, hypoxia and heat shock response of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Gene, 2014, 534(2): 256-264.
- [34] Soñanez-Organis J G, Peregrino-Uriarte A B, Gómez-Jiménez S, et al. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(3): 395-405.
- [35] Huang Y H. Gene cloning, expression and function of MyD88, CAT and GST in *Scapharca broughtonii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016. [黄永欢. 魁蚶 MyD88、CAT 和 GST 的克隆及功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.]
- [36] Zheng L B. Construction, analysis of the transcriptome library, and cloning, expression, antibacterial activity study of immune-related genes in *Scapharca broughtonii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [郑利兵. 魁蚶转录组文库的构建分析及免疫相关基因的克隆、表达、抗菌活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]

Structural characteristics of *HIF-1 α* from *Scapharca broughtonii* and expression analysis under hypoxia

ZHANG Gaowei^{1,2}, WU Biao^{1,3}, LIU Zhihong^{1,3}, ZHOU Liqing^{1,3}, SUN Xiujun^{1,3}, ZHAO Qing^{1,2}, YANG Aiguo^{1,3}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: Hypoxia-inducible factor is a key factor in HIF signaling pathway and plays an significant role in Hypoxia response in animals. To determine the response of hypoxia-inducible factor (HIF-1) gene of *Scapharca broughtonii* under hypoxia stress and to reveal the unique hypoxia-adapting mechanism of *Scapharca broughtonii*. The cDNA sequence of HIF-1 α (named *SbHIF-1 α*) by EST and RACE methods were obtained. The mRNA expression in the gene under hypoxia stress was also studied. Sequence analysis revealed that the *SbHIF-1 α* cDNA was 2741 bp in length, including an open reading frame (ORF) of 2136 bp encoding a polypeptide of 711 amino acid residues with conserved HLH, PAS-A, PAS-B and PAC motif. The predicted molecular weight is 80.8 kDa and isoelectric point (pI) is 5.57. The analysis of structure and putative functional sites showed *SbHIF-1 α* shared 56%-95% with other species, the highest with *Chlamys farreri* HIF-1 α for 95%. Phylogenetic analysis showed that *SbHIF-1 α* and the corresponding homologous molecule in mollusks clustered into one branch. The mRNA expression analysis of *SbHIF-1 α* in tested tissues by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) revealed that the mRNA of the the gene could be all detected in foot, gill, mantle, adductor muscle, haemocytes and hepatopancreas. The expression level of *SbHIF-1 α* in haemocytes were more than that in other tissues. Under the hypoxic stress of 0.5 mg/L, 2.5 mg/L and 4.5 mg/L dissolved oxygen (DO) in seawater, *SbHIF-1 α* in each tissue responded positively, and hemolymph and gill were more responsive than the other four tissues. n haemolymph, the expression of *SbHIF-1 α* was significantly different from that of control group after 4 hours of DO stress ($P<0.01$). After 64 hours of stress, the expression of *SbHIF-1 α* reached the highest level, which was 519.43 times of that of control group. The response of each tissue to at different DO concentrations showed that the activation of *SbHIF-1 α* was relatively high in 0.5 mg/L of the three treatment concentrations. This study clarified the structural characteristics, temporal and spatial expression characteristics of *SbHIF-1 α* gene and its response to hypoxia stress, which enriched the research data of marine shellfish HIF gene.

Key words: *Scapharca broughtonii*; *HIF-1 α* ; gene characteristics; hypoxia; response laws

Corresponding author: LIU Zhihong. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn