

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190304001

http://www.yykxjz.cn/

魏智薪, 辛鲁生, 白昌明, 李亚楠, 张淑敏, 李成华, 王崇明. 魁蚶 *Ets* 家族 9 个基因的克隆及其在病毒感染应答中的表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 121-130

Wei ZX, Xin LS, Bai CM, Li YN, Zhang SM, Li CH, Wang CM. Cloning of nine genes in the *Ets* family of ark clam (*Scapharca broughtonii*) and their expression in response to oyster herpes virus (OsHV-1) infection. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 121-130

魁蚶 *Ets* 家族 9 个基因的克隆及其在病毒感染应答中的表达分析*

魏智薪^{1,3} 辛鲁生^{2,3} 白昌明^{2,3} 李亚楠³
张淑敏³ 李成华¹ 王崇明^{2,3①}

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 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 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071)

摘要 *Ets* 蛋白是宿主 MAPK 信号通路下游的一类可参与调控病毒基因转录复制的重要转录因子。本研究通过基因克隆成功获得魁蚶(*Scapharca broughtonii*) *Ets* 家族 9 条基因(分别命名为 *ETS-1*~*ETS-9*), 开放阅读框(ORF)大小分别为 1065、1290、1569、912、1344、1404、1521、1968 和 1191 bp, 并分别编码 354、429、522、303、447、468、506、655 和 396 个氨基酸。系统进化树分类表明, 本研究所获得的基因均属 *Ets* 家族。对 *ETS-1* 和 *ETS-3* 的氨基酸序列和三维结构分析表明, 其均含有高度保守的 *ETS* 结构域。在不同水温条件下, 通过人工注射牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)对魁蚶进行感染, 并对病毒拷贝数和 *Ets* 的相对表达量进行定量分析。结果显示, *ETS-1* 和 *ETS-3* 只在高温阳性组中相对表达量显著上调, 与病毒拷贝数在高温条件下增长趋势呈正相关; *ETS-4* 和 *ETS-8* 只在低温阳性组中相对表达量显著上调, 但在高温阳性组中 *ETS-4* 和 *ETS-8* 的相对表达量与病毒拷贝数呈负相关; 初步研究结果显示, 从魁蚶 *Ets* 基因中筛选出 2 条 *Ets* 基因(*ETS-1* 和 *ETS-3*), 在高温条件下(16±2)°C, 其可能参与正向调控病毒 OsHV-1 的复制过程。本研究为进一步探索魁蚶在夏季因感染牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)而导致的大量死亡提供了科学数据。

关键词 魁蚶; *Ets* 家族; OsHV-1; 克隆; 温度

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0121-10

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)属瓣鳃纲(Lamelli-branchia)、翼形亚纲(Pteriomorphia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae)(刘寒苗等, 2017; 李瑶瑶等, 2018), 是一

种底栖冷水性大型贝类, 主要分布于中国黄渤海、日本海、朝鲜半岛及俄罗斯东南部等沿海地区(毛雪英等, 2007; 张启刚等, 2007); 在近海岸水深 3 m 到外海

* 现代农业产业体系专项资金(CARS-49)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022017007; 20603022018014)共同资助[This work was supported by China Aquaculture Research System (CARS-49), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute (20603022017007; 20603022018014)]. 魏智薪, E-mail: weizhixin315@yeah.net

① 通讯作者: 王崇明, 研究员, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-04, 收修改稿日期: 2019-03-11

近 60 m 处的泥沙质或泥质海底均有分布(梁超等, 2010)。其营养价值极高、口感鲜美, 深受消费者喜爱, 成为中国对外出口创汇的重要的经济贝类之一(刘锡胤等, 2002)。

持续扩大的市场需求和有限的养殖环境使贝类养殖业向高密度养殖发展, 随之而来的则是大规模的病害暴发, 在高温季节, 病害问题尤为严重, 严重制约着海水贝类养殖业的可持续发展。贝类的病原(Elston, 1997; Hine *et al.*, 2000)可分为细菌、病毒和寄生虫类等, 其中, 病毒类病原以致死率高、感染速度快等特征引起广泛关注, 尤以牡蛎疱疹病毒 OsHV-1 (Ostreid herpesvirus 1) 的危害最为严重(胡宗福等, 2017; Roque *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2007; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2005)。自 20 世纪 90 年代以来, 该疫病就在法国和美国牡蛎养殖海域连年暴发, 随后蔓延至欧、美、亚等牡蛎养殖场, 造成了巨大的经济损失(Renault *et al.*, 2001; Segarra *et al.*, 2010)。在中国, OsHV-1 已造成了扇贝(Ren *et al.*, 2013)和魁蚶的大规模死亡(Xia *et al.*, 2015)。

病毒复制过程依赖宿主细胞, 包括必需的能量和功能蛋白元件等均需要宿主细胞供给(Ruelas *et al.*, 2013)。OsHV-1 属于双链 DNA 病毒, 需在宿主细胞核内进行转录复制(Jouaux *et al.*, 2013; 胡宗福等, 2017)。Ets(E-Twenty-Six) 转录因子家族是含有 ETS 结构域的一类转录因子, 是宿主细胞核中一类可参与调控病毒基因转录复制的重要转录因子。Ets 转录因子在 MAP 激酶、Ca²⁺ 依赖的信号通路以及 TGF- β 等信号通路的调节下, 参与调控胚胎的发育、细胞的生长、分化和凋亡, 进而调控许多生理和病理过程(曾红等, 2017; Suico *et al.*, 2017)。Pleschka 等(2001)研究表明, 流感病毒的传播受到 RAF/MEK/ERK 信号级联的抑制。Bosselut 等(1990)对 HTLV-1 的研究发现, 人的 Ets1 和 Ets2 蛋白参与调控 HTLV-1 病毒的转录复制过程。本研究基于 Ets 的转录调控功能和 OsHV-1 中存在 Ets 结合位点, 初步推断 Ets 转录因子可能参与 OsHV-1 的复制调控过程。本研究采用基因克隆和实时荧光定量 PCR 技术克隆魁蚶 Ets 转录因子, 研究其在感染 OsHV-1 后的表达变化, 以及进一步对 Ets 转录因子相对表达量变化与病毒拷贝数变化进行相关性分析。以期 OsHV-1 感染魁蚶的致病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用魁蚶捕捞自渤海海域。随机选取 2 龄魁

蚶[壳长为(6.0 \pm 1.0) cm, 壳高为(5.0 \pm 1.5) cm, 体重为(90 \pm 10) g], 实验室室温暂养。实验用魁蚶暂养分为(16 \pm 2) $^{\circ}$ C 的高温暂养和(10 \pm 2) $^{\circ}$ C 的低温暂养, 暂养时间为 1 周。暂养期间, 每天更换 1 次海水, 每次更换 1/2 体积; 魁蚶日常投喂适量小球藻(*Chlorella vulgaris*), 并始终充氧。魁蚶病料为自然感染 OsHV-1 个体, -80 $^{\circ}$ C 保存(用于制备病毒悬液)。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 Trizol (TaKaRa) 法进行样本总 RNA 提取。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取质量。使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计测量其浓度。以提取的总 RNA 为模板, 采用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remove(TOYOBO) 合成第一链 cDNA, 实验方法按照说明书进行。-80 $^{\circ}$ C 保存 cDNA 备用。

1.2.2 魁蚶 Ets 家族基因开放阅读框(ORF)的克隆及测序 根据本实验室的魁蚶转录组测序获得 Ets 家族的部分基因的全序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 ORF 引物(表 1), 并利用 KOD 酶进行扩增。采用扩增体系(20 μ l): cDNA 模板 1 μ l、KOD 酶 0.4 μ l、前引物 0.5 μ l、后引物 0.5 μ l、2 \times KOD 酶缓冲液 10 μ l、超纯水 3.6 μ l、2 mmol/L dNTP 4 μ l; 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58.0 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2.0 min, 35 个循环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(TaKaRa) 将目的条带进行切胶回收。随后, 将回收的目的片段与 pMD19-T 载体(3 : 1) 在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 取 5 μ l 连接产物与 50 μ l 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞在 42 $^{\circ}$ C 热激 30 s。利用载体多克隆位点两侧的引物 RV-M(GAGCGGATAACAATTTTCACACAG) 和 M13-47(CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC) 对单克隆进行菌落 PCR 鉴定。阳性单克隆经验定后送生派生诺(青岛)股份有限公司进行测序。

1.2.3 魁蚶 Ets 家族基因的生物信息学分析 将测序结果正确的目的基因进行 BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 同源性比对, 利用在线网址(<http://www.expasy.org/>) 将 Ets 基因的 cDNA 序列推导成氨基酸序列; 使用 MEGA7.0 进行进化树分析; 利用生物在线网站 (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/cgi-bin/itasser_submit.cgi) 对 ETS-1、ETS-3 编码的蛋白质进行 3D 结构、ETS 结构域及酶催化位点进行预测。

1.2.4 OsHV-1 病毒悬液的制备及拷贝数检测 将本课题组-80 $^{\circ}$ C 保存的自然感染 OsHV-1 的魁蚶放置冰

表 1 本实验用到的引物序列
Tab.1 Sequences of primers used in this study

序列名称 Sequence name	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'~3')
<i>ETS-1</i>	ETS-1-F	ATGGACGATGTTGGACGATG
	ETS-1-R	TAACACACAAGATATCTTTC
<i>ETS-2</i>	ETS-2-F	ATGGCTACTGTCTGCCACC
	ETS-2-R	AATAGACTGCCAACCCGAGG
<i>ETS-3</i>	ETS-3-F	ATGGACATTGAAGCATTGCAG
	ETS-3-R	CTCATCATCTTTGTCCGCCT
<i>ETS-4</i>	ETS-4-F	ATGTCATCATCTTTCTGCAGTCG
	ETS-4-R	ACGTGTGAAAACTTTTGCCTC
<i>ETS-5</i>	ETS-5-F	ATGATTGACATTGACATGGAATTA
	ETS-5-R	ACTGTATTTCTCCCAACCATGAG
<i>ETS-6</i>	ETS-6-F	ATGGATACACTACTTAGTTCAATTC
	ETS-6-R	TAAATTGGAACAATCAATATCTAT
<i>ETS-7</i>	ETS-7-F	ATGGAAAATGACAACAATACCAT
	ETS-7-R	TTAGTTGTATCTACATTTAACGAA
<i>ETS-8</i>	ETS-8-F	ATGGCAAATATCGCTGTGGA
	ETS-8-R	TGGATAAAATGAGCCAACATGT
<i>ETS-9</i>	ETS-9-F	ATATAATATCATAAATGCACGCC
	ETS-9-R	CTCTTCAAAGTTGTCCACGGTAG

上解冻, 随后取外套膜组织 1~2 g, 将样本润洗 2~3 次。无菌剪刀剪碎, 按 1:9(g:ml)加入无菌海水(0.22 μm 过滤), 50 ml 无菌管组织匀浆(5~10 s/3 次)。低速离心去除杂质: 1000 g, 4℃, 5 min。取上清液 4 倍稀释, 过滤滤膜(5 μm-2 μm-0.45 μm-0.22 μm), 4℃ 保存。按 Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit 试剂盒说明书提取病毒悬液 DNA。将提取后产物的病毒拷贝数进行实时荧光定量检测。检测体系(20 μl): 2× Mix 10 μl、BF 引物 0.8 μl、B4 引物 0.8 μl、探针 0.4 μl、超纯水 0.4 μl; 反应程序: 95℃ 10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 15 s, 72℃ 15 s, 35 个循环。使用的探针序列: BP6FAM-ATCGGGGGGGGGGGTTTATBHQ-1; 使用的引物序列为 BF-GTCGCATCTTGGATTTAACAA; B4-ACTGGGATCCGACTGACAAC。定量后的 OsHV-1 病毒悬液用于后续实验。

1.2.5 OsHV-1 感染魁蚶实验 从实验室暂养的魁蚶中选取 80 只, 随机分为 4 组: (16±2)℃ 高温阴性组与高温阳性组, (10±2)℃ 低温阴性组与低温阳性组, 每组分别为 20 只。高温阳性组和低温阳性组通过腹足注射的方式每只魁蚶注射 100 μl 浓度约为 10⁵ copies/μl 的病毒悬液。高温阴性组和低温阴性组

则注射 100 μl 健康魁蚶组织悬液。注射完成后, 将魁蚶静置 10 min, 随后放入实验箱内。分别在注射后的 0、6、12、24、48 和 72 h 进行组织样品采集。随机从各组中选取 3 只魁蚶, 采集血淋巴样品: 用一次性注射器采集魁蚶血液, 混匀后分装到 1.5 ml EP 管中, 每管 1 ml, 4℃ 800 g 离心 5 min 后, 除去血清, 并加入 800 μl Trizol (TaKaRa), 混匀后-80℃ 保存。

1.2.6 魁蚶感染 OsHV-1 病毒后 *Ets* 的表达研究 按照 Trizol 法提取血细胞总 RNA, 对提取的总 RNA 进行质量和浓度检测后, 以总 RNA 为模板, 用反转录试剂盒(Prime ScriptTM cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)合成模板, 操作方法按照说明书进行。以魁蚶 RL15 作为内参基因(Xin *et al*, 2018), 使用 Primer 5.0 设计 *Ets* 定量引物(表 2), 对 *Ets* 进行 qPCR 检测。检测使用 Universal qPCR Master Mix 试剂盒(NEB), 反应体系(20 μl): SYBR[®] Premix Ex Taq II 10 μl、前引物 1 μl、后引物 1 μl、模板 2 μl、超纯水 6 μl; 反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。每组实验均实验重复 3 次。2^{-ΔΔCt} 方法对荧光定量 PCR 检测结果进行分析, 利用 SPSS 20.0 对结果进行显著性分析。

表2 *Ets* 基因定量引物
Tab.2 Quantitative primers of *Ets* genes

序列名称 Sequence name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
<i>ETS-1</i>	ETS-1-RT-F	TGTAAGAATGGTGTCTTGGTCCTA
	ETS-1-RT-R	CTGCCACAGTGTAATGTTAGAATCC
<i>ETS-2</i>	ETS-2-RT-F	TTGCCGAACTTCTTAGAAATTCCAC
	ETS-2-RT-R	TCGTCCTCGACTTCAAAGTCATACC
<i>ETS-3</i>	ETS-3-RT-F	GAAAGAAGTTACGCAGGAAAGAGCC
	ETS-3-RT-R	GGGTCCATAGCCTTGTTGAACAAAT
<i>ETS-4</i>	ETS-4-RT-F	ATGTCAGTCCAACCTCCAACCAGAT
	ETS-4-RT-R	CATAGAGAACTTGGTAACCGGGAC
<i>ETS-5</i>	ETS-5-RT-F	AATCAGACGCATTTGACGATAACGG
	ETS-5-RT-R	TAGACCCCGAAGACTTGTGGTTATT
<i>ETS-6</i>	ETS-6-RT-F	GGCGGACTGAAGCCAATGAGAGAAT
	ETS-6-RT-R	GTAGGTTTCCATCGACTCGCTTCT
<i>ETS-7</i>	ETS-7-RT-F	ACCAAAGTTGTCATCCCCTTCCAG
	ETS-7-RT-R	ACTAACTGAACTCCTTCATCGCCC
<i>ETS-8</i>	ETS-8-RT-F	AGTTGGTTCAGCAATTTTAACGGAC
	ETS-8-RT-R	TATGACGCCATTTTTTGAACATAT
<i>ETS-9</i>	ETS-9-RT-F	CTCGTCCAATCTATCCTATCTTCCA
	ETS-9-RT-R	ATTGCTGTTTGATTCTGGATGGAGT

2 结果与分析

2.1 魁蚶 *Ets* 家族基因的 cDNA 开放阅读框(ORF) 的克隆

从本课题组魁蚶转录组数据库中获得的 9 条 *Ets* 序列片段, 成功克隆获得 9 条 *Ets* 基因的完整的 ORF 序列, 从 *ETS-1* 到 *ETS-9* 对其进行分别命名。这 9 条 *Ets* 基因的开放阅读框(ORF)大小分别为 1065、1290、1569、912、1344、1404、1521、1968 和 1191 bp, 并分别编码 354、429、522、303、447、468、506、655 和 396 个氨基酸(图 1)。

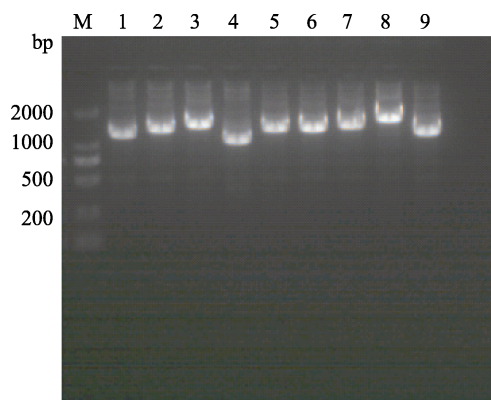


图1 魁蚶 *Ets* 家族基因克隆

Fig.1 The cloning of *Ets* family sequences

M: Marker; 1~9: *ETS-1*~*ETS-9*

2.2 *Ets* 家族进化树分析

通过 NCBI 在线获取其他物种 *Ets* 蛋白序列并与获得的魁蚶 *Ets* 家族基因进行多序列比对, 利用 Mega 7.0 软件建立系统进化树。结果显示, 魁蚶 *Ets* 高度保守, *ETS-1* 与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)的 *Elk-1* 转录因子(OWF55447.1)进化关系较近, 与丘疹旋毛虫的 *Elk-1* 转录因子(KRZ74488.1)关系较远; *ETS-2* 与虾夷扇贝的 *Elf-3-like* 转录因子(XP_021347939.1)进化关系较近; *ETS-3* 与虾夷扇贝的 *C-ets-1-like* 转录因子(XP_021366637.1)进化关系较近, 与卡罗莱纳箱龟(*Terrapene mexicana triunguis*)的 *C-ets-1* 转录因子(XP_024065379.1)关系较远; *ETS-4* 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)*C-ets-2* 转录因子(XP_019928533.1)进化关系较近; *ETS-5* 与长牡蛎的 *Elf-3* 转录因子(XP_019917945.1)进化关系较近; *ETS-6* 与虾夷扇贝的 *ETV6-like* 转录因子(XP_021352365.1)进化关系较近; *ETS-7* 与虾夷扇贝的 *GA bindind* 转录因子(XP_021360845.1)进化关系较近; *ETS-8* 与长牡蛎的 *Erg* 转录因子(EKC21903.1)进化关系较近; *ETS-9* 与虾夷扇贝的 *SAM pointed domain containing Ets* (XP_021365446.1)进化关系较近(图 2)。

2.3 OsHV-1 感染后的病毒拷贝数检测

利用实时荧光定量 PCR 检测 OsHV-1 感染魁蚶

后在不同时间段的病毒拷贝数的变化。结果显示, 在低温阴性组和低温阳性组中, 魁蚶均能够正常生长, *OsHV-1* 拷贝数变化均在 0~100 copies/ng 范围内, 属于本底水平, 病毒没有增殖; 在高温组中, 高温阴性组正常生长, *OsHV-1* 拷贝数变化在 0~100 copies/ng 范围内, 属于本底水平, 病毒没有增殖, 但在高温阳性组中, 病毒拷贝数随感染时间的延长, 病毒拷贝逐步上升, 在 0~6 h, 病毒拷贝数处于本底水平, 在 6~12 h, 病毒拷贝数增长至 1.0×10^3 copies/ng, 在 12~24 h, 拷贝数增长至约 6.0×10^4 copies/ng, 在 24~48 h, 病毒

拷贝数呈现爆炸式增长, 约为 3.4×10^6 copies/ng, 并持续增长, 在 72 h, 病毒拷贝数达到最大值(7.4×10^6 copies/ng), 此时魁蚶均已死亡(图 6)。

2.4 魁蚶感染 *OsHV-1* 病毒后 *Ets* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术对 *OsHV-1* 感染魁蚶后 *Ets* 基因在不同时间点的表达情况分析。结果显示, 在高温阳性组中, *ETS-1* 和 *ETS-3* 的相对表达量显著上调($P < 0.05$), 其中, *ETS-1* 在 12、24、48 和 72 h 分别比高温阴性组上调 3.9、2.8、7.4 和 15.6 倍; 低

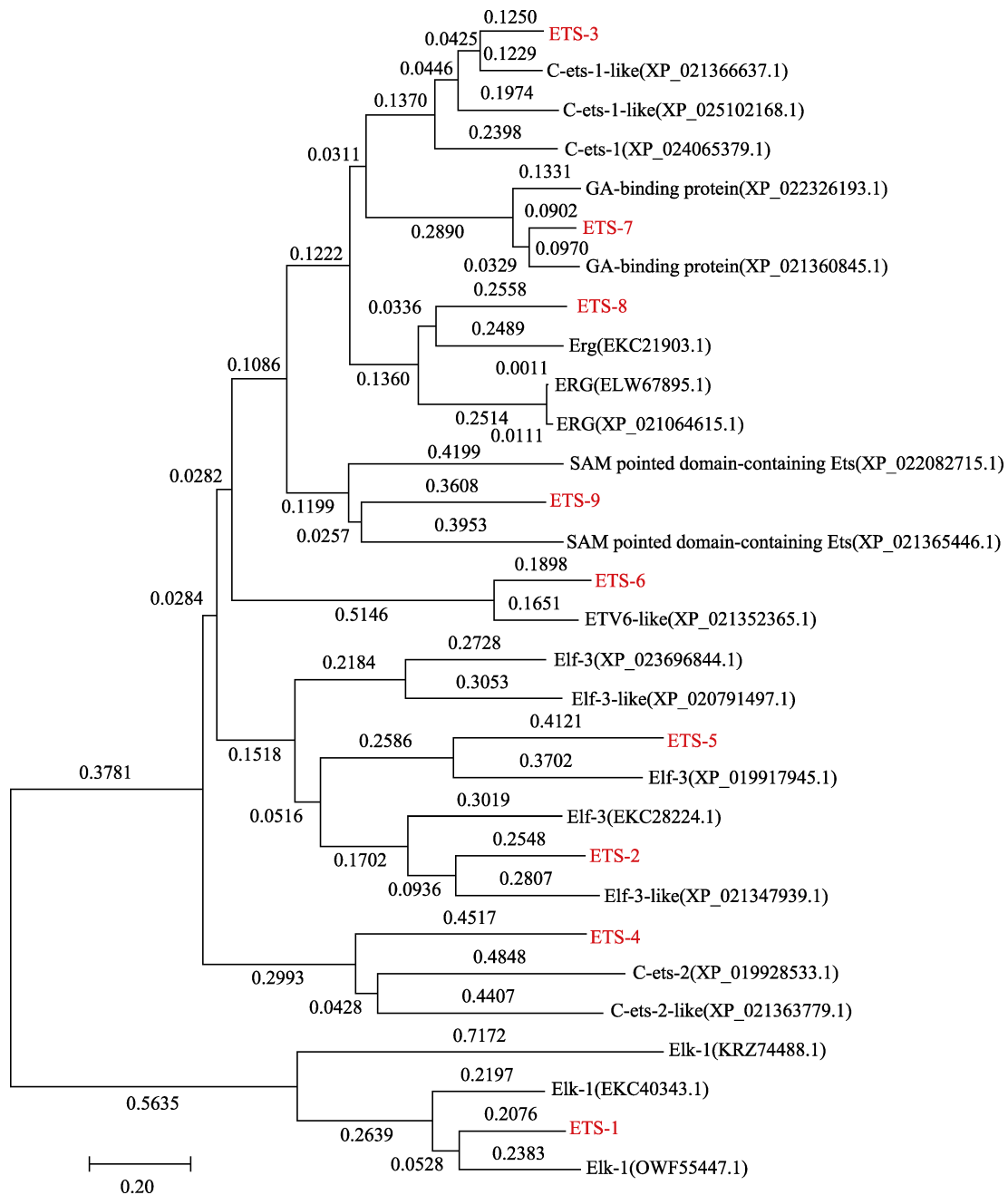


图 2 基于 NJ 法构建的魁蚶 *Ets* 氨基酸序列的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of Ark clam *Ets* constructed based on NJ method

```

1 M D D V G R C G T S S P A L S D S S K C S D N N L
1 ATG GAC GAT GTT GGA CGA TGT GGT ACA TCA TCT CCT GCT TTG TCA GAC TCC TCT AAG TGC TCT GAT AAT AAC CTA
26 D S F N T R L I N A A K S T K G M D S N I T L W Q
76 GAT AGT TTT AAT ACC AGA CTT ATA AAT GCA GCC AAA TCT ACT AAA GGA ATG GAT TCT AAC ATT ACA CTG TGG CAG
51 F L L E L L V G N Q H T H I I O W T N S E G E F K
151 TTT TTA TTG GAA TTA CTC GTT GGT AAC CAA CAC ACA CAC ATA ATA CAA TGG ACA AAC AGT GAA GGA GAG TTC AAA
76 L I N A E E V A K L W G L R K N K N N M N Y D K L
226 CTT ATC AAT GCT GAA GAG GTG GCT AAA CTC TGG GGC CTG AGA AAA AAC AAA AAC AAT ATG AAC TAT GAC AAA CTT
101 S R A L R Y Y Y D K N I I K K V M G Q K F V Y K F
301 AGC AGA GCT TTG AGA TAT TAT TAT GAT AAA AAT ATT ATC AAA AAA GTC ATG GGA CAA AAA TTT GTG TAT AAA TTT
126 V S F P E I V K T E N K I P F K V K M E T L A Q E
376 GTT TCT TTC CCA GAA ATT GTG AAA ACT GAA AAT AAA ATT CCA TTC AAA GIT AAA ATG GAA ACA TTA GCT CAG GAA
151 Y L V L R I F P H F A S Y N A M D I K S S A N Q A T
451 TAT GGA CAG CGC ATA TTT CCT CAC TTT GCC TCA TAC AAT GCC ATG GAT ATC AAA TCG TCT GCT AAT CAA GCA ACC
176 T G T R Q G S S P R T D D F S R S P V P K V N V M
526 ACT GGA ACA AGA CAA GGA TCG TCA CCA AGA CAC GAC GAC TTC AGC AGA AGT CCT GTC CCT AAA GTG AAT GTG ATG
201 E T I S D N K Y L T V K T E S V C S S P G M S L H
601 GAG ACT ATT TCC GAC AAT AAA TAT TTG ACT GTG AAA ACA GAG TCT GTT TGT TCC AGT CCT GGC ATG TCA CTA CAT
226 Q I S P T T V T V Q K P K P I P L S L V A D T
676 CAG ATA TCA CCG ACA ACT ACA GTG ACT GTC CAG AAA CCG AAG CCT ATT CCG TTA TCA TTA AGT TTA GCG GAT ACA
251 S S T A L T A A L G V P V P S P K I A S S T F T T
751 TCA TCA ACT GCC TTA ACT GCC GCT TTA GGT GTA CCA GTG CCT AGT CCA AAA ATA GCT TCA TCG ACT TTC ACG ACG
276 P L V L A S P V I G P R T P F L H F W S S L S P I
826 CCG TTA GTG CTT GCA AGT CCT GTA ATA GGA CCA AGG ACA CCA TTC TTA CAT TTT TGG AGC TCT TTG AGC CCA ATA
301 T M S P R L A T T S A F P F P A F A T N O M T V S
901 ACA ATG AGT CCT CGG TTG GCT ACA ACG TCT GCC TTC CCA TTT CCC GCC TTT GCT ACA AAT CAA ATG ACT GTT TCG
326 P M A L P H F S N V E S L A T P A L T S P T R K J
976 CCA ATG GCG TTG CCG CAT TTT TCT AAT GTA GAA TCT CTT GCC ACG CCG GCA TTG ACT TCA CCA ACA AGA AAG ATA
351 S C V L *
1051 TCTGTGTGTTATGA

```

图 3 ETS-1 碱基和氨基酸序列

Fig.3 The nucleotide and the deduced amino acid sequence of ETS-1

红色下划线表示 ETS 结构域氨基酸序列；黑色下划线表示 BLLF1 superfamliy 结构域氨基酸序列
The red underlined indicates the amino acid sequence of the ETS domain; the black underlined indicates the amino acid sequence of the BLLF1 superfamily domain

```

1 M D I E A L Q S E Y S M D N V E F F A Q E T K K S
1 ATG GAC ATT GAA GCA TTG CAG TCA GAA TAC AGC ATG GAC AAT GTC GAA TTT TTT GCC CAG GAG ACG AAA AAG TCG
26 K N R P P R I P K V V T Y D P E L T R E I D R L N
76 AAA AAT CGT CCA CCC CGG ATT CCG AAA GTG GTG ACC TAT GAC CCA GAG TTG ACT AGA GAA ATT GAC CGC CTG AAT
51 C M L T R Q D S I D H R V P N L G S V P S
151 TGT ATG TTG ACC AGA CAA GAC AGC ATA GAT GAC CAC CGA GTA CCT AAC CTT GGC AGC GTG CAG AAG GTC CCG TCG
76 I S D M D E D N T D I P A T Q V P P L T P G T T Q
226 ATA TCG GAC ATG GAT GAA GAC AAT ACG GAC ATT CCA GCC ACA CAA GTG CCT CCG CTA ACC CCG GGA ACC ACA CAG
101 K M S Q A L L D S F K S F E K D Q Q R F N I P K D
301 AAA ATG TCC CAA GCC TTG CTG GAC AGT TTT AAA AGT TTT GAG AAA GAC CAA CAG AGG TTT AAT ATT CCA AAA GAT
126 P A R W G E L H V V Q W L H W A I O E F T S L E G J
376 CCA GCC AGG TGG GGA GAG TTA CAT GTT GTA CAG TGG TTA CAT TGG GCC ATC CAG GAG TTC AGT CTT GAG GGG ATC
151 N M G N F A M N G O E L V K M E K E N F K L A P
451 AAC ATG GGG AAT TTT GCC ATG AAC GGA CAA GAA CTA GTA AAG ATG GAG AAG GAA AAC TTC CTT AAG TTG GCC CCA
176 P F M G G D I L W E H L D I L Q K E V T Q E R A S L
526 CCC TTC ATG GGG GAT ATC CTA TGG GAA CAT TTA GAT ATT TTA CAG AAA GAA GTT ACG CAG GAA AGA GCC TCA TTA
201 C N V P S N Y S E P V C M P E F G E Q F V Q Q G Y
601 TGT AAC GTC CCA TCT AAT TAT AGC GAA CCA GTA TGT ATG CCC GAG TTT GGA GAA CAA TTT GTT CAA CAA GGC TAT
226 G P P E H P V A Q V P T S K S Y M D N K C T Y N Q
676 GGA CCC CCA GAA CAC CCA GTT GCA CAG GTT CCA ACG AGT AAA TCA TAC ATG GAC AAT AAA TGT ACT TAC AAC CAA
251 I A E S M Q A L N N D V S S D I I N S N Y D T S
751 ATA GCA GAA TCC ATG CAG GCA CTT AAT AAT GAT GTC AGC AGT GAC ATC ATC AAC AGT AAC TAC GAG GAC ACG TCT
276 D Y Q S L E N V N Q N N Y Y D H S P T D F Y P I I
826 GAT TAC CAA AGT TTG GAA AAT GTC AAT CAA AAT AAT TAC TAC GAC CAC AGT CCA ACG GAT TTC TAT CCG ATA ATA
301 P E Q K Y R P P I P G P E N L C Q R G Q F M R Q D
901 CCA GAA CAG AAG TAC CGC CCA CCC ATT CCA GGC CCA GAA AAC TTG TGT CAG AGA GGT CAG TTT ATG CGA CAA GAT
326 S T H A P D S Y Y D Q Q P Y Q M V P T I K Q E C Q
976 TCC ACA CAT GCT CCT GAC AGT TAC TAT GAC CAG CAG CCA TAT CAG ATG GTT CCT ACA ATC AAA CAA GAG TGC CAG
351 W S T Q D C A Q D L S D S W S S S D L R N G L S S
1051 TGG TCA ACC CAG GAC TGT GCT CAG GAC CTA AGT GAT AGC TGG TCA TCT TCT GAC CTT AGA AAC GGT CTG TCC AGC
376 G G Y R S I Q S S P T D H Y P P H L D G K P M I Q
1126 GGC GGA TAT AGA AGT ATC CAG TCA TCA CCA ACA GAT CAT TAC CCG CCA CAT CTT GAC GGG AAA CCA ATG ATA CAG
401 A A A L A G Y S G S G P I O L W O F L L E L L T D
1201 GCA GCT GCC CTG GCT GGA TAT TCA GGG AGT GGA CCA ATC CAA TTG TGG CAG TTT CTT CTT GAA CTA CTG ACA GAC
426 K T C Q H F I S W T G D G W E F K L S D P D E V A
1276 AAA ACA TGC CAG CAT TTT ATA AGC TGG ACT GGA GAT GGT TGG GAA TTC AAA TTA TCC GAT CCA GAC GAG GTA GCC
451 R R W G I R K N K P K M N Y E K L S R G L R Y Y
1351 AGA AGA TGG GGG ATC CGC AAA AAC AAG CCC AAA ATG AAT TAC GAA AAG TTA AGC CGT GGA CTG AGA TAT TAT TAT
476 D K N I I H K T A G K R Y V Y R F V C D L Q S L L
1426 GAT AAG AAT ATC ATA CAC AAG ACA GCG GGA AAA CGT TAC GTG TAT CGC TTT GTC TGC GAT TTA CAA AGC CTG CTG
501 G Y T P E E L F E A C D I K P Q A D K D D E *
1501 GGA TAC ACT CCA GAA GAG TTG TTT GAA GCC TGT GAT ATC AAG CCT CAG GCC GAC AAA GAT GAT GAG TGA

```

图 4 ETS-3 碱基和氨基酸序列

Fig.4 The nucleotide and the deduced amino acid sequence of ETS-3

红色下划线表示 ETS 结构域氨基酸序列；黑色下划线表示 SAM superfamliy 结构域氨基酸序列
The red underlined indicates the amino acid sequence of the ETS domain; the black underline indicates the SAM amino acid sequence of the superfamily domain

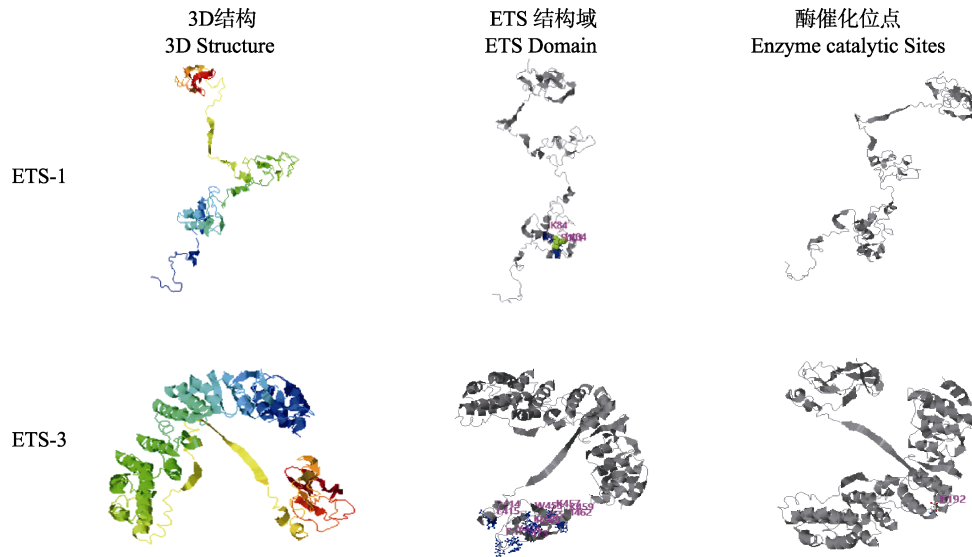


图 5 Ets 蛋白三维结构及功能位点

Fig.5 The three-dimensional structure and function site of Ets

温阴性组与低温阳性组 *ETS-1* 相对表达量无显著差异; 低温阴性组与高温阴性组 *ETS-1* 相对表达量无显著差异(图 7A)。在高温阳性组中, *ETS-3* 在 48 h 后相对表达量显著上调, 48 和 72 h 分别比高温阴性组上调 3.0 和 22.6 倍; 低温阴性组、低温阳性组和高温阴性组 *ETS-3* 相对表达量无显著差异(图 7C)。在低温阳性组中, *ETS-4* 和 *ETS-8* 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), 其中, *ETS-4* 在 24、48 和 72 h 分别比低温阴性组上调 4.3、7.0 和 8.2 倍; 高温阳性组、高温阴性组和低温阴性组 *ETS-4* 相对表达量无显著差异(图 7D)。*ETS-8* 在低温阳性组 24 和 48 h 分别比低温阴性组上调 2.4 和 1.8 倍; 高温阳性组、高温阴性组和低温阴性组 *ETS-8* 相对表达量无显著差异(图 7H)。其余 5 条 *Ets* 转录因子(*ETS-2*、*ETS-5*、*ETS-6*、*ETS-7*、*ETS-9*)相对表达量变化无明显规律(图 7B、图 7E、图 7F、图 7G、图 7I)。

2.5 *ETS-1* 和 *ETS-3* 生物信息学分析

对 *ETS-1* 和 *ETS-3* 进行生物信息学分析, 结果显示, *ETS-1* 和 *ETS-3* 除了含有 ETS 结构域外, *ETS-1* 还含有 BLLF1 superfamily 结构域(图 3), 而 *ETS-3* 还含有 SAM superfamily 结构域氨基酸序列(图 4), 通过 I-TASSER 对 *ETS-1*、*ETS-3* 3D 结构进行预测, *ETS-1* 的结构主要由 4 条 α -螺旋环绕成的复杂结构, ETS 结构域是保守的“螺旋-转角-螺旋”结构, 无酶催化位点; *ETS-3* 的结构主要是由 11 个 α -螺旋构成的复杂结构, ETS 结构域是保守的“螺旋-转角-螺旋”结构, 并且具有酶催化位点(图 5)。

3 讨论

Ets 转录因子的一个显著特征是均含有 1 个约 85 个氨基酸残基的进化保守的 ETS 结构域, 该结构域能介导 *Ets* 蛋白与富含嘌呤的序列为 GGAA/T 和额外的侧翼核苷酸 DNA 序列发生特异性结合, 进而参与靶基因的转录调控(Graves *et al*, 1998)。本研究对魁蚶 *Ets* 家族基因进行了克隆鉴定, 共获得了 9 个家族成员分子, 生物信息学分析表明, 其基因 ETS 结构域高度保守。

Ets 家族蛋白是 MAPK 信号通路下游级联信号转导的参与者(Oikawa *et al*, 2003; Wang *et al*, 2017; Wasylyk *et al*, 1998)。在高等生物中, *Ets* 转录因子不仅参与正常细胞的生长、凋亡、分化等生理过程(Sharrocks *et al*, 2001), 还可参与病毒的转录复制过程(Panagoulis *et al*, 2017), 例如, *Ets* 家族蛋白可参与调控 HIV-1 病毒复制过程(Seth *et al*, 1993); 人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1)长末端重复(LTR)的远端增强子区域对 HIV 复制至关重要, 其包含相邻的 E-box 和 *Ets* 2 个结合位点。Sieweke 等(1998)发现, *Ets-1* 与 USF-1(Upstream stimulatory factor)蛋白相互作用, 并分别与 HIV-1 病毒的 E-box 和 *Ets* 结合位点(-130~-166)结合, 激活病毒复制。*Ets* 在贝类中的功能有待研究(Ma *et al*, 2009)。OsHV-1 是目前贝类中流行的主要病毒性病原, 频繁造成全球范围内养殖贝类的大规模死亡。前期分析 OsHV-1 基因组序列时, 鉴定出诸多 *Ets* 转录因子结合位点, 初步推断魁蚶 *Ets* 转录因子可能参与病毒的复制调控。魁蚶在高温环境中感染

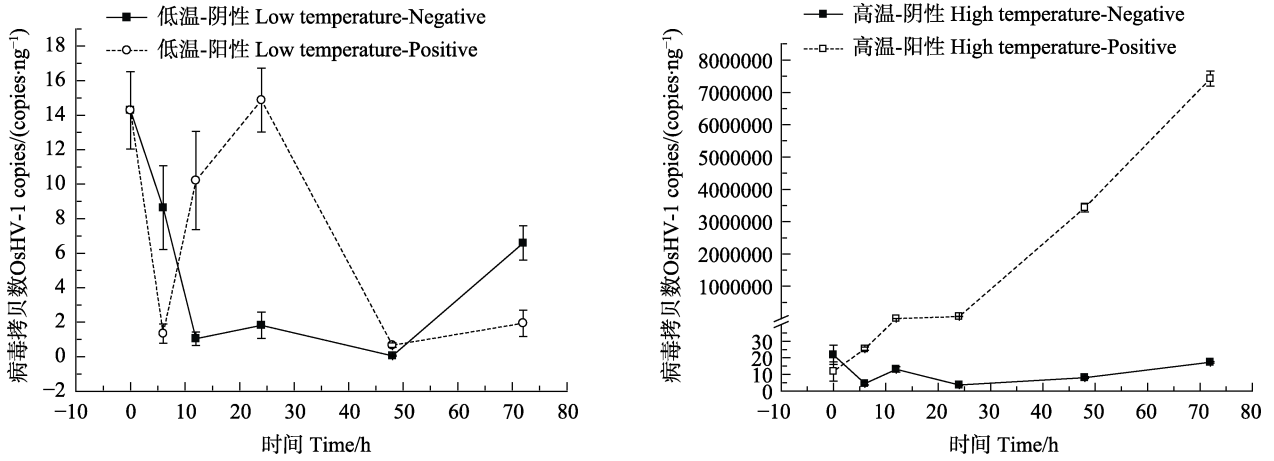


图6 OsHV-1感染后魁蚶血液中病毒拷贝数变化

Fig.6 Kinetics of virus DNA detection in hemocytes of *S. broughtonii* after OsHV-1 infection

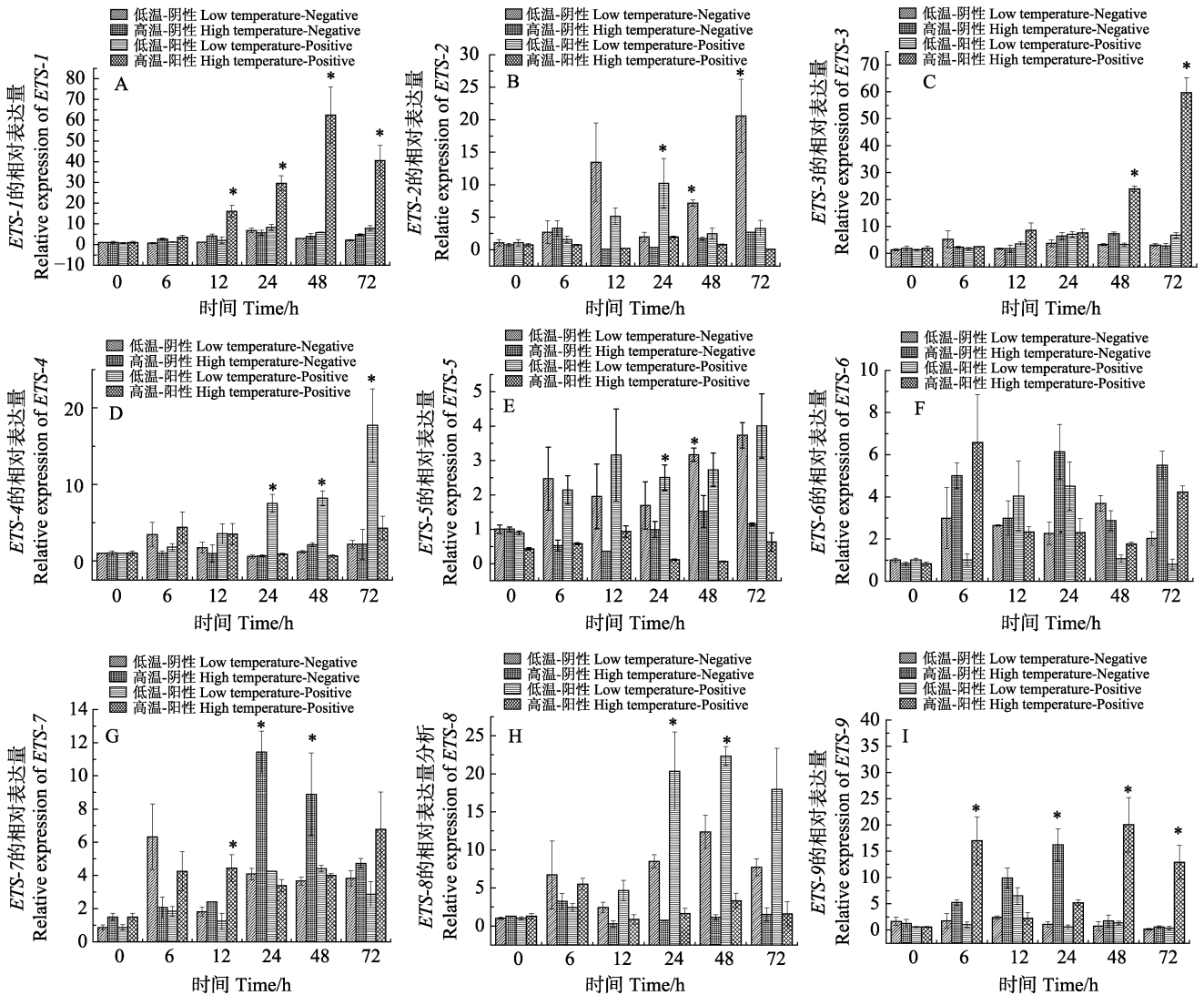


图7 OsHV-1感染后魁蚶血细胞 *Ets* 表达水平

Fig.7 Temporal expression of the *Ets* transcripts in infected blood cell of OsHV-1

*表示实验组和对照组之间差异显著($P < 0.05$)

* indicated the difference between experiment and control group was statistically significant ($P < 0.05$)

OsHV-1 后, *ETS-1* 和 *ETS-3* 相对表达量显著上调, 与病毒的拷贝数增长趋势呈正相关。魁蚶在低温环境中感染 OsHV-1 后, 病毒拷贝数不增加, *ETS-1* 和 *ETS-3* 的相对表达量处于本底水平状态。以上结果表明, *ETS-1* 和 *ETS-3* 与病毒的复制密切相关, 可能参与了病毒的复制调控过程。但它们是通何种机制参与的、在病毒复制过程中是否起主导作用仍需要进一步研究。

本研究成功克隆出魁蚶 9 个 Ets 转录因子家族成员。通过 OsHV-1 人工感染魁蚶后对 9 个家族成员基因表达模式分析, 初步确定了 *ETS-1* 和 *ETS-3* 参与病毒的复制调控。为深入研究魁蚶在夏季感染 OsHV-1 后暴发大规模死亡提供了一定的理论数据。

参 考 文 献

- Barbosa-Solomieu V, Dégremont L, Vázquez-Juárez R, *et al.* Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Research*, 2005, 107(1): 47–56
- Bosselut R, Duvall JF, Gégonne A, *et al.* The product of the c-ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *Embo Journal*, 1990, 9(10): 3137–3144
- Elston R. Bivalve mollusc viruses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 393–403
- Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the *ets* family of transcription factors. *Advances in Cancer Research*, 1998, 75: 1–57
- Hine PM, Thorne T. A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(1): 67–78
- Hu ZF, Ren SJ, Li SG. Research progress of oyster herpes virus (OsHV-1). *Fisheries Science and Technology Information*, 2017, 44(5): 259–264, 267 [胡宗福, 任绍杰, 李树国. 牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)研究进展. *水产科技情报*, 2017, 44(5): 259–264, 267]
- Jouaux A, Lafont M, Blin JL, *et al.* Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 590
- Li YY, Liu YG, Liu XL, *et al.* The taxonomic status of Chinese population of *Scapharca broughtonii* based on sequences of *COI* and *12S rRNA* genes. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 73–80 [李瑶瑶, 刘云国, 刘晓玲, 等. 基于线粒体基因组 *COI* 和 *12S rRNA* 序列的魁蚶中国群体分类学地位研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 73–80]
- Liang C, Yang AG, Liu ZH, *et al.* RAPD analysis of genetic variations in four geographical populations of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 59–64 [梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 59–64]
- Liu HM, Wu B, Liu ZL, *et al.* Genetic diversity and geographic population structures of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 92–99 [刘寒苗, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同地理群体的遗传多样性及种群结构. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 92–99]
- Liu XY, Xu HZ. Seedling technique of Ark clam (*Scapharca broughtonii*) at room temperature. *Scientific Fish Farming*, 2002(10): 14–15 [刘锡胤, 徐惠章. 魁蚶常温育苗技术. *科学养鱼*, 2002(10): 14–15]
- Ma H, Wang J, Wang B, *et al.* Characterization of an ETS transcription factor in the sea scallop *Chlamys farreri*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(9): 953–958
- Mao XY, Yan ZJ, Shao YQ. A new exploration of artificial seedling and seedling preservation in Ark clams (*Scapharca broughtonii*). *Hebei Fisheries*, 2007(4): 38–39 [毛雪英, 阎子娟, 邵雁群. 魁蚶人工育苗及保苗的新探索. *河北渔业*, 2007(4): 38–39]
- Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 2003, 303(1–2): 11–34
- Panagoulis I, Karagiannis F, Aggeletopoulou I, *et al.* Ets-2 acts as a transcriptional repressor of the human immunodeficiency virus type 1 through binding to a repressor-Activator target sequence of 5'-LTR. *Frontiers Immunology*, 2018, 8: 1924
- Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, *et al.* Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the RAF/MEK/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(3): 301–305
- Ren WC, Chen HX, Renault T, *et al.* Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal*, 2013, 10: 110
- Renault T, Lipart C, Arzul I. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24(6): 369–376
- Roque A, Carrasco N, Andree KB, *et al.* First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture*, 2012, 324(3): 303–306
- Ruelas D, Greene W. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell*, 2013, 155(3): 519–529
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, *et al.* Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 2010, 153(1): 92–99
- Seth A, Hodge DR, Thompson DM, *et al.* ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *Aids Research and Human Retroviruses*, 1993, 9(19): 1017–1023
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, *et al.* The ETS-domain transcription factor family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1997, 29(12): 1371–1387

- Sieweke MH, Tekotte H, Jarosch U, *et al.* Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *Embo Journal*, 1998, 17(6): 1728–1739
- Suico MA, Shuto T, Kai H. Roles and regulations of the ETS transcription factor ELF4/MEF. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2017, 9(3): 168–177
- Wang B, Krall EB, Aguirre AJ, *et al.* ATXN1L, CIC, and ETS transcription factors modulate sensitivity to MAPK pathway inhibition. *Cell Reports*, 2017, 18(6): 1543–1557
- Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: Nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends in Biochemical Science*, 1998, 23(6): 213–216
- Webb SC, Fidler A, Renault T, *et al.* Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 2007, 272(1–4): 126–139
- Xia JY, Bai CM, Wang CM, *et al.* Complete genome sequence of *Ostreid herpesvirus-1* associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks. *Virology Journal*, 2015, 12: 110
- Xin LS, Huang BW, Bai CM, *et al.* Validation of housekeeping genes for quantitative mRNA expression analysis in OsHV-1 infected Ark clam, *Scapharca broughtonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 155: 44–51
- Zeng H, Yang Y, An Y, *et al.* Physiological functions of Ets family of transcription factors. *China Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(12): 1645–1650 [曾红, 杨洋, 安输, 等. Ets 转录因子的生理作用研究进展. *中国药理学通报*, 2017, 33(12): 1645–1650]
- Zhang QG, Wang RC, Wang XZ, *et al.* Selective breeding of strain of *Arca (Anadara) inflata* reeve. *Modern Fisheries Information*, 2007, 22(7): 25–26 [张启刚, 王如才, 王兴章, 等. 魁蚶(*Arca (Anadara) inflata* Reeve)品系选育. *现代渔业信息*, 2007, 22(7): 25–26]

(编辑 马璀璨)

Cloning of Nine Genes in the Ets Family of Ark Clam (*Scapharca broughtonii*) and Their Expression in Response to Oyster Herpes Virus (OsHV-1) Infection

WEI Zhixin^{1,3}, XIN Lusheng^{2,3}, BAI Changming^{2,3}, LI Yanan³, ZHANG Shumin³,
LI Chenghua¹, WANG Chongming^{2,3①}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Ets transcription-factor networks represent a model for how combinatorial gene expression is achieved. The characteristic feature of Ets factors is the conserved ETS domain (Helix-Turn-Helix). Thus, the Ets proteins bind to a core GGAA/T consensus sequence and regulate expression of several genes and play an important role in various cellular functions (mitosis, growth, development, differentiation, and apoptosis) and the regulation of immunity. In this experiment, 9 *Ets* genes (named *ETS1*–*ETS9*, respectively) of the Ark clam (*Scapharca broughtonii*) were successfully obtained by gene cloning technology, and the open reading frames (ORFs) were 1065 bp, 1290 bp, 1569 bp, 912 bp, 1344 bp, 1404 bp, 1521 bp, 1968 bp, and 1191 bp, respectively. Moreover, they encoded respectively 354, 429, 522, 303, 447, 468, 506, 655, and 396 amino acids. Evolutionary relationships of taxa showed that all genes in this chapter belonged to the *Ets* family genes. The qPCR detection showed that the expression of two *Ets* genes (*ETS1*, *ETS3*) was significantly increased. Thus, the present study showed that the Ark clam *ETS1* and *ETS3* are involved in the replication process of the OsHV-1 under high temperature conditions (16±2)°C. In conclusion, the results of this study provide a scientific basis for further study concerning the large number of deaths of Ark clams due to infection with OsHV-1 in summer.

Key words *Scapharca broughtonii*; Ets family; OsHV-1; Gene cloning; Temperature

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn