DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18437

魁蚶 HIF-1α 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-1a* 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 amplication of cDNA ends, RACE)技术克隆获 得了魁蚶 *HIF-1a* 基因 cDNA 全长序列(命名为 *SbHIF-1a*),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-1a* 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-1a* 与所选其他物种 *HIF-1a* 的序列相似度为 56%~95%;系统进化分析显示 *SbHIF-1a* 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-1a* 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-1a* 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-1a* 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-1a* 激活程度相对较大。本研究明确了 *SbHIF-1a* 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-1α*;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-1α和HIF-1β两个亚基组成的异源二聚体,其 中 HIF-1α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-1a* 稳定表达, 进而进入细胞核内与 HIF-1β 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*)、高原鼢鼠(*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-1α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-1α 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10d后,存活率仍高达15%,而四角蛤蜊(Mactra 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-1α* 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-1α* 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30mm 左右的健康个体,低温运至实验室,于 18℃充气 海水中暂养14d,每天换水2次,每次换水量50%, 每4h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0h、4h、8h、 16h、24h、36h、48h和64h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-1a* **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-1α*-F、*HIF-1α*-R)扩增*SbHIF-1a* 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-1a*-R1、*RHIF-1a*-R2)和(*RHIF-1a*-F1、*RHIF-1a*-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-1a*-R1、*RHIF-1a*-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-1a*-R2、*RHIF-1a*-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, 68℃ 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。

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

引物 primer	序列 sequence (5'-3')
β -actin-F	GAGACCTTCAACACCCCCGC
β -actin-R	TAGGTGGTCTCGTGGATGCC
<i>HIF-1α</i> -F	AGTGTCTGTGTGCGAGTGAG
<i>HIF-1α</i> -R	GAAAAATTGATGCCGGGCCC
<i>RHIF-1α</i> -R1	CCGACCGCAGCTAAAAATGG
<i>RHIF-1α</i> -R2	CAAGTTGGGAGGCCATGGAT
<i>RHIF-1α</i> -F1	CGGAGTCCGTGTTCATTCCT
<i>RHIF-1α</i> -F2	ATGGAAGCATGCCAGTGGAA
UPM	long: CTAATACGACTCACTATAGGG- CAAGCAGTGGTATCAACG CAGAGT
	short: CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
<i>QHIF-1α</i> -F	CGGGCCCACAACTGAAAAAC
<i>QHIF-1α</i> -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-* 1α -F、*QHIF-1α*-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 µL 正反向引物各 0.8 µL, ROX ReferenceDye II(50×) 0.4 µL,模板 2 µL, ddH₂O 6 µL。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^{-ΔΔCt} 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-1α
基因的 cDNA 全长序列(命名为 *SbHIF-1α*, Gen-Bank 登录号为 MH936548)(图 1)。

SbHIF-1α 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-1α* 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-1α 的同源性分析

在线比对结果显示, SbHIF-1a 编码的氨基酸 序列与其他物种 HIF-1a 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-1α的相似度分别为93%和92%,与人HIF-1α 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-1α 蛋白功保守结构域进行分析, 结果见图 3, 魁蚶 HIF-1α 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。

100 aaaatecaacttaaaagaaaatattaacagcaactagaataagaaagtaaatttaaagtggtetgtatgtgttgtagactagttteecea 192 ata ATG GCC GGT AAAAGA AGG AAT TCT GAAAAAA CGT AAA GAG AAG TCT AGA M A G K R R N S E K R K E K S R 243 GAT GCT GCA AGA TGC AGG CGA GGA AAA GAA TCA GAG GTC TTT ACA GAA TTG D A A R C R R G K E S E V F T E L 294 GCT CAA CAA CTA CCA ATT GCA GAA TCC ATG GCC TCC CAA CTT GAC AAG GCC A Q Q L P I A E S M A S Q L D K A 345 TCG GTC ATG AGG CTA GCT TTA AGC CAT TTA CAG ATA AGC CAG ATT ATG ATG н S V M R L A L S H L Q I S Q I M M 397 AAAAGAAAT AAT GAG GAA GAA GAA GTT GAA GAC TGC AAA CTG GAT TAT TTG ACA K R N N E E E V E D C K L D Y L T 448 TTT AAA GCA TTA GAT GGC TTT ATA TTG ATG TTG TCC AAG $\,$ GAT GGA GAC TTG $\,$ М $\label{eq:rescaled} \begin{array}{cccccccc} F & K & A & L & D & G & F & I & L & M & L & S & K & D & G & D & L \\ \end{tabular}$ 499 ATC TAT GTA TCA GAA AGT GTT GTG & AAG TAC CTT GGA ATA CAA CAG ATT GAC I Y V S E S V V K Y L G I Q Q I D 550 ATG ATG GGA CAG AGT ATT TAC GAG TTT GCA CAC CCA TGT GAT CAT GAG GAG M M G Q S I Y E F A H P C D H D E 601 ATT AAA GAT GTC CTG TTA TCC AAA TCT GGC CAC AAG GAT AAT CAG ATA TTT I K D V L L S K S G H K D N Q I F 622 TTTATT COT ATG AAG TG CACA ATA ACA AGT AAA GGA AGA AGT GT CAAT CAG F I R M K C T I T S K G R S V N L 703 AAA TCA GCT TCA TAC AAG GTT ATT AAG TGT AGT GGA CGC ATG CTT GAC CCA K S A S Y K V I K C S G R M L D P 734 TAT GAC ATA AAC GGC CAA GAC GTA AAA AAC AGC AAA GAT TCT CGT CCA TTT Y D I N G Q D V K N S K D S R P F 805 TTA GCT GCG GTC GGC GAA CCC ATT CCC CAT CCA AAC ATT GAA GTA CCA

1260 ATG TCC ACA GAG GAT GTA TTC CAG COLLECT M S T E D V F Q P R P C D M D D E 1311 GAT TTC TAC TTC CAC ACA GA ACAAG AAA GTG GAA CAA CAG ACAAAAA F P P G T K K V E Q Q T K V E Q Q T K 1359 TTG GTC GAT CTT ACT CAT TTG GCT CCC AAT GCT GGA GAT GTG TGT ATC CCA L V D <u>L T H L A P</u> N A G D V C I P 1410 CTC TCA TTC CCA ATG GCA TCT GCA GAT AAG AGA TTG GAC TTT AGC AAA TTT L S F P M A S A D K R L D F S K F 1461 ATG GAA CAA ACA CGC ACA CAA ACT GAC AAG GAT TTG CCA GTG ATT CAA ATT $\begin{array}{cccc} K & E & P & G & V & \underline{N & P & T} & S & F & C & N & K & E & R \\ 1560 \mbox{ TCA CCA TAC AAC AAC GGT TCT ATG GCT TCT TCA CCC AAA TCA CAG ACC ATG \\ \end{array}$ S P Y N <u>N G S</u> M A S S P K S Q T M 1611 AGT CCA ATG GGT AGT CCA GTG GAA TAT CTG ACC ACC ATC AAT ACA GCT GAT S P M G S P V E Y L T T I N T A D 1662 ATA AGC GCC ATG GAC AAA TTC TTC TCT GCC CTG GAT CCA TCT ACA GAT TTC V K V C L E R P P E T F N I K Q 2013ATG AAAAAGA CCG TIT GACAAAAGT TCAAATG GAG AAA GGT CCT CCT GCT AAA M K R P F D K S S M K R P F D K S S M E K G P P A K 2064GAAAGAAAAATT GAT GCC GGG CCC ACAACT GAAAAA CCAAAAG CCC AAT AGT E R K I D A G P T T E K Q K P N S 2115 GTT TTG ATG AAT TTA CTT TTG CGA GGA GAA GAT ACA AAA GCT GGT TAC TCA V L M N L L L R G E D T K A G Y S 2166 GTT AAT AAC GCA ATC AGA GAA ATC AAC ACA AAA CAG AAA TTT GGA TTA CAA V N N A I R E I N T K Q K F G L Q 2217 CAG AAA CAA ACT CAA CAT TTT CCA GGA CTG ATT AAT CAA CAT GGA AGC ATG 2319 CAG CAT TAT TGA aataatggatttttgagttc Q H Y * taactgaagtagca

2405 tatagtgtggactoataaagttgttgattgttttaattgtaagacagtgttgttgagttgtaatttigactgaagacaaagtgttgttaaggt 2501 gatatcoaagagttttaaaastgtttigatgtgtatattgttgaactg<u>taataaa</u>accgaactcaatcgcacaagacactgactgac 2593 gacacgggcaattcttgcttalacttigccaggtgtgccttaagegattticctttcgcccccagggccgggaagtcgg 2644 aacatagtaggaacccggggaagtgttcicctaaccgggAgagagagagagagagaga

图 1 SbHIF-1α核苷酸序列及编码氨基酸序列 方框内分别代表起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA), 单下划线的为加尾信号(aataaa),

双下划线的氨基酸为糖基化位点,加粗下划线的氨基酸 为脯氨酸羟化酶结合位点,poly(A)用波浪线表示.

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of SbHIF-1α The start codon (ATG) and stop codon (TAG) are boxed; polyadenylation signals (aataaa) are underlined with underscore;
N-glycosylation sites are double underlined; the proline hydroxylase binding site is overstriking underlined; poly (A) tail are marked by wavy lines. 对魁蚶 bHIF-1α 蛋白三级结构进行预测,如 图 4 所示。其中一致性最高的区域为 22~326 位氨 基酸残基,恰好是两个图 3 预测 4 个保守结构域 所在区域。

利用 Mega 6.0 软件的 Maximum likelihood 模型构建的进化树如图 5。本研究中的魁蚶先与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)聚为一支,再与杂色鲍和美洲牡蛎相聚,它们的亲缘关系最近,形成一个相对独立的大分支,接着与脊索动物聚为一支,而与属节肢动物门的棉铃、拟穴青蟹和中华绒螯蟹的亲缘关系则相对较远。这显示魁蚶*HIF-1a* 基因的分子进化地位与其生物学分类地位基本一致。

2.3 SbHIF-1α 组织表达分析

qRT-PCR 检测 SbHIF-1α 基因在血淋巴、鳃、 外套膜、斧足、闭壳肌和肝胰腺 6 个组织中的表 达结果如图 6 所示。从图可以看出,在所检测的 6 个组织中均能检测到 SbHIF-1α 的转录本,血淋巴 中表达量最高,鳃组织次之,闭壳肌中最低。显著 性分析结果显示, SbHIF-1α 在外套膜、闭壳肌、 肝胰腺、斧足四个组织中的表达量没有显著差异 (P>0.05),相对于闭壳肌,血淋巴中表达量是闭 壳肌的 11.45 倍,达到显著差异(P<0.05),鳃中的 表达量也达到差异水平(P<0.05);同时, SbHIF-1α 在血淋巴和鳃中的表达量也有显著差异。

2.4 SbHIF-1α 在低氧胁迫后各组织的表达分析

SbHIF-1α在低氧胁迫后各组织中的表达变化 如图 7 所示。作为对照组, DO 值为 7.5 mg/L 的对 照组中 SbHIF-1α 基因在各组织的表达量低且表 达稳定。整体来看,血淋巴(图 7A)和鳃(图 7B)中 SbHIF-1α 相比其他组织响应较为积极,表达量变 化幅度也相对高于其他组织,最高值分别为对照 组的 519.43 倍和 124 倍,且表达量随胁迫时间增 加而总体升高。血淋巴中,0.5 mg/L、2.5 mg/L 的 低氧胁迫下,SbHIF-1α 表达随时间延长而逐步增 加,4.5 mg/L 组在 36 h 急剧上升达到最高值后又 快速回调。鳃中 SbHIF-1α 的表达量趋势与血淋巴 相似,但胁迫组在 16 h 时有个小的回调,36 h 开始 显著上调,64 h 达到最高值。而 SbHIF-1α 这种升

650

SBHIF-1a SBHIF-1a Acipenser baerii Crassostrea virginica Ctenopharyngodon Idella Cynoglossus semilaevis Haliotis discus hannai Haitotis discus hannai Homo sapiens Hypophihal michthys molitrix Megalobrama amblycephala Mizuhopecten yessoonsis Mus musculus Pseudorasbora parva Xenopus laevis

.....MAC

.....MSSTT .MCTGVVTEK .MCTGIVFEKMTSKD MEGACGANCK .MCTGVVTEK .MCTGVVTEK .MCTGVVTEK

MTASC MEGACGENET

MEGSVVVN

METCVVIEKKE

H<mark>K.....ENCIFFI IKKGKEHNTERSFFI</mark>

TKKCKEHNTERSFE CKKKKSSLCYHTBF SKKKECNTERSFE SKKKECNTERSFE GARAVSEE..RTTF VKKGECNTCRSFE SKKTECOTTERSFE SKKTECOTTERSFE HKCVECCAFEHSVE VKKKELTURGSFE

SBHIF-1a Acipenser baerii Crassostrea virginica Ctenopharyngodon Idella Cynoglossus semilaevis Haliotis discus hannai Homo sajens Hypophhal 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 Haitons aiscus nannai 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 sonians Homo sapiens Hypophihal michthys mo Megalobrama amblycepi Mizuhopecten yessoensis Mus musculus Pseudorasbora parva Xenopus laevis

SBHIF-1a Acipenser baerii Crassostrea virginica Ctenopharyngodon Idella Cynoglossus semilaevis Haliotis discus hannai Homo sanjens Homo sapiens Hypophthal michthys molitri Megalobrama amblycephala Mizuhopecten yessoensis Mus mûsculus Pseudorasbora parva Xenopus laevis

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

COLORE CHARGE LANDING & COL	TATIONA COLDIZAOUND TATIOUTOC	TNNUT NNE PERIODOU	T PUT TERMAT DO	TINT CUDONT TWO CE CER
AARORRGENSDVPTDLACCL	FIAESMASCILKASMARIAISHICISC	IMPER.NNE EEVELCE.	ILYLTEWALLG	TIMISKLOPITYVSESVV
AARORRGKDSDVDYDI SHEL	PLEHNVISHIDKASIMBLIISYIRMEN	VIG.AAGUCKEESELESC.	FUNE AL RALLE	VMVLSECGDMVYLSENVS
AARCRECED TO TO SOI AECT	ECYSGSHGOLDKASTMELATSHIKTSK	IMETC.RNNRHAPCEE	FEPLYSRAIDG	VIIISNEGDITE ISESVS
AARSRECKESEVEYELAHCL	PLEHNVTSHICKASIMPLTISYIRMRK	II SSEETEKENFLEGC .	INGFYLKAIFG	IMVLSEDGDMVYLSENVS
AARCRECKESPVEYELACCI	PLEHSISSSICKASIMELTISYIRIRK	LINFCOMMAKEETELCIC.	INSSYLKAIDG	IMVISEGODITYLTENVN
AABORRSKETPVEYELACNI	PLESSVSTOLCKASTMET TTSETKICK	TREEKKWHCCEECGE I	EKRTHCMYFKATEG	IVI TI SREAD TVYI PENTA
AARSERSKESPVEYELAHCI	PLEHNVSSHICKASVARI TISYIRVRK	IICAGELEIECEMKAC.	MNCFYLKAIDG	IVMVLTEEGENTYISENVN
AABSERCKESPVEYELAHCL	PLEHNVTSHLCKASTMELTTSYLEVEK	LL. SSEENEKENGLESC.	INGEYI KALDG	INVISEDONVYI SENVS
AARSERCKESEVEYET AHOT	PLEENVESELEKASINELEESVERVER	IT SSPETEKENEVESC	INCENT KATEG	INVISEDONVYI SENVS
AARCRECKSTRUSSELAKET	PLEE FUNCIERASWARVATSHIKTRC	TNERN EVENTESKESTER	VENT YCKATES	WWTTSCNOLTAYUSESUA
AAR SRESKIDSDURYDI AHOT	PT FHNUSSHI DKASUVET TTSVIEVEK		MECENTRATE	WWITTEEGAWVYTSENW
AND SPECKES SPUT MELAUCT	DI CHANT SHI DRASTADI TI SVI PADR	IT COPPTER NEEDOC	INCEVIENTEC	TMUT CELCOMUNT CENT
AND ODDORED ON DANDI CHUT	PLENNUCONT DZASTARI TI STICTUZ	II DAODI DOPTEL DEC	INCENTRATIC	UTUT TEECONTYL CENUS
MARCHASING SUVE INICHEL	TEHNOOR DATE TO THE THE	LTLACLIDCEIEIDA.	LIVEF ILIVATED	VIVI TEEGO, TITSENVP
aar II eerer			ary	r u
CRSVNI KSASYKVI KUSCRM	ILP	CL.VKNSKLSRFELAAN	GREIFHESNIEVEL	SKIELSH NELPKETEC
GRIVNIKSATWKVIHCICHI	RVCEPSK	GECNNCCYKERFMISMVLI	CDETERESNIEVEL	SKIFTSRECLEMKESYCI
CKNVNIKSATYKVIKESCKI	VKCEV	KREAGGEGSAFYIIII	GEPTIFIE SNIEVPL	DRMIFTSRENMEMKETYCI
GRIVNIKSATWKVIHCACH V	RVCERSE	.GSGESGFKEFFLTYLVLI	CDPHEHESNIEVPL	SKIFTSR TILMKESYCI
CRTVNVKSATWKVIHCSCHV	RVYENNT	ECTNGHKEFFVFYI II I	CDETTEHE SNIE APL	TKTFISRHTMCMKFTYCI
CKSVNI KSATYKV IKCICRI	WA	KS.KKEACCASMYFYILA	GEPTPHPANIEVPL	OSSITETSKENMINTETYCI
CRTMN IKSATWKVI HCTCHI	HVYETNS	.NCFCCCYKKFFMICIVII	CEPTEHESNIETEL	SKIFISRHSICMESYCI
CRTWN TKSATWKWT HCACHV		COORDONNER PROVINCE	and the second se	
	RVC	.GSGESGEKEEPETTYLVLI	COPTEMPSNIPVEL	SKUFUSRITICMERSYCU
GRTWNTKSATWKVI HCAGHV	RVCERSE	.GSGESGEKEEPLIYLVII	CDPTEHPSNIDVPL CDPTEHPSNIDVPL	SKUFTSRETICMKESYCT SKUFTSRETICMKESYCT
CRTVNTKSATWKVTHCACHV CRSVNTKSASYKVTKFTCKT	RVCFRSE RVCFRSE IE IREERMVRKEFEEEEVCLI DE DACO	.GSGESGEKEEPLIYIVI .GSGESGEKEEPLIYIVI EEEEKVEKEERRICYFIG	CDETERESNIEVEL CDETERESNIEVEL GEETERESNIEVEL	DSKUFLSRETLEMKFSYCL DSKUFLSRETLEMKFSYCL DSKUFLSRENMESKFTYCL
GRTVNTKSATWKVTHCAGHV GRSVNLKSASYKVTKFTGKL GRTMNTKSATWKVTHCTGHT	RVC. ERSE RVC. ERSE IF IREERMVRKEFEEFEVCCLDECMCC HVY. CTNS	CSCLSCFKEFFLTYIVI CSCLSCFKEFFLTYIVI EEEEKMEKEFRRTCYFIC NCFCCCYKKFFMTCIVI	CDETERESNIEVET CDETERESNIEVET GEPTERESNIEVIT CEPTERESNIETET	DSKTFLSRETLCMKFSYCC DSKTFLSRETLCMKFSYCC CKTVLSRENMESKFTYCC DSKTFLSRESLCMKFSYCC

VRKGKELI	VIC <mark>RSF</mark> EI	I RMKCT	T <mark>SR</mark> C	RTMN	IKSA <mark>T</mark> I	KVIH	TGHI	T <mark>HV</mark> Y				ET	INS.NCI	FOOGYF	KFFMI	CIVIIC	FEIISHE	SNIFT	PLDSK	T <mark>FLS</mark> F	HSI D	KESY	DERI	TEIMCY	EPEDI	LGRST	(EYYHA)	I CSCHI	l t <mark>k</mark> thhd
SKKIKECI	VIERSFEI	I RMKCT	ISRC	RTVN:	KSAT	KVIH	VEH V	RVC				<mark>E</mark> F	RSE.CS	GESCEP	(EFFLT)	YIVI IC	EPIPHP	SNIPA S	PLDSK	TELSE	TITT	VKVSY	DERI	TEIMCY	EFCDI	INRSV	(EYYEA)	LDSCHI	l t <mark>k</mark> thhn
AKKGKEC	ITERSFE	RMKCT	IISR C	RTVN.	KSAT	KVIH	TCH	RVY				<mark>E</mark> N	VAN . NÇI	NHCCYF	KEEWIG	OMANIC	EFIERE	SNIPF	PLDSK	IFLSF	SIC	KFSY	DERV	TETVCY	EFCEI	LGREV	(EXYLA	LESCHI	LTKAHHN
	L.	LILKCL	ιų		ĸза	7.V	9										othub	IIIe	10	L 15			u I	1 95	1	5	y II	us	
					_	_	-			_		_							_	_					_				
LESKCOT	TGCYRF	AKHCCI	WWVT	TOGT	TYNS	TCKEC	CVVC	WH <mark>FV</mark> T	SSYFC	TNIT	SEV	EAFEVV	/FVEEL	ASPIM.			STEEVE	CFRFC	CMDDE	DFYFE	FGTK	κν		FCCTKI	VDT TH		DVCTP	I SEFM	ASACKRL
LEAKGOAT	TGCYRM	AKKCG	WWVF	TOAT	TYNT	NSOP	CTVC	WNYV T	SGVVG	FELV	SIG	TENVI R	KEVE					SP	CACIT	KT T MC	VCPE	NTN.	SIFE	KI KEEF	FATT		DTITS	DESKS	SC
I VAKGOV	TGCYRE	AKTCO	T MWAT	TOGT	TYNS	TCKFC	CIVC	WH <mark>YV</mark> I	SGIEN	PSI T	SIS	CSYSCO	VPML PI	LEVKL.			STEEVE	CFRFC	VVKVE	EFYFF	PGTK	IPS		MKIDES	VDI TH	LAPTS	DTCV P	Γ	
LEAKGOA	TTGCY <mark>H</mark> M	VAKKCCI	WWVF	TOAT	TYNP	NSOP	CTVC	WN <mark>YV</mark> T	SGIVE	GEIV	STO	TMTEPR	AVERE:	SCK			V	ECEAS	EVCML	KI FKF	FNIK	PMECS	SCI YE	CI KEEE	FAT TV		D TI <mark>T</mark> S	T DENNS	3 <mark>0</mark>
LEAKGOVS	TGCYRM	AKRCC	WW	TOAT	/TYNN	NSOF		WNEVI	SGICE	EKI 🗖	SIE	TECVE	VKEECI	FFFKAF	VISGIS	SEMPLI	LIKEFE	CIKVE	FLEVT	KVFTC	SVETS	sss	. IYD	CLEGEE	EALTI		ad III IS	I DESCS	SF
I FAKCOT	TGCYRE	AKNCC	TWNT	тост	THNN	TCKFC	www	WH <mark>YV</mark> T	SAVCE	KNM T	SEW	CCTAEL	CL.IS	FKMEC.			STEKIF	GFRTK	EMECN	YFVPF	FIKN	NIT		T VNNEF	ADTSY		III CO <mark>V</mark> O	GFFT	(SC
METIKGOV	TGCYRM	AKRCO	WINE	TOAT	TYNT	NSOF	CTVC	WN <mark>YV</mark> V	SCIIC	HEL T	SLO	TECVLE	KEVE					SS	CMKNT	OL FTK	VESE	CTS	SIFE	KI KKEF	CAUTI		DTITS	I DECSI	T
LEAKGOAT	TGCYRM	AKKCC	WW	TOAT	TYNP	NSOF	CTVC	WNYVI	SGIVE	GEIV	SLOC	TMTEF	KAVEKES	SCK			M	ECEAS		KI FKF	FNI KO	PMECS	SCI YE	CI KEEF	EALTI		D TITS	I CENNS	SE
T FAKCOA	TGCYRM		WVF	TOAT	TYNP	NSOP	CTVC	WN <mark>YV</mark> T	SGTVF	GETV	STO	TMTEP		SHK			T	ECEVS	EVENT:	KT F K F	FNTK	PMFCS	SET YE	CI KEFE	EAT TV		TTT S	T CENNS	а <mark>г</mark> т
TEAKCOM	TGCYRE		WWVT	TOAT	TYNS	TCKEC	СТУС	WHYT T	SCVEC	ENVV	SEV	KAEVKT	FREE	VKEVTO	WSFG.	F	STREVE	VSKTE	ECEKA	DEVEC	FEVE			KSCSKC	MDICH	LAPTAC	DACNE	TTTE	NG
METKCOV	TECYRM	AKRCO	WW	TOAT	TYNT	NSOF	CTVC	WNYVV	SCIIC	HET T	SLO	TESVIE	KEVE							OL FTK	VESE	ATS.	CIFE	KI KKEF	CATT		TITS	TEFCS	ГТ
TETROOM	TGCYRM	AFRCO	WW	TOAT	TYNP	NSOP	CTVC	WNYVT	SCIVE	GEVV	STO	TVKEFR	AVERE	SCE			M	ECCAP	ET DMT	KT FRF	FGER	PMESS	SET YE		FATTV		DIFTS	T DENNS	ST
METIKCOV	TGCYRM	AKKCC	WW	TOATIN	TYNS	NSOF	CTVC	WNYVT	SEVVE	KET T	STG	TASVLT						SC	TKNP	ETETE	UNEET	NSF .	CIFC		ESTTV		DETTE	TERSS	.
79 <u>9</u>	-993	99		ug u	T 11	P	1 10		5		5 0	1													-	Tub ?	. גע	-	
FECKENE	יידסיריי		ששאדי	EC	UNI	TOTO	a	KLD	CEV		MNC	NACCER	CUL	ENC						0		TTT TNO		TONTR	TESAT			CACCE	TEEFZD
TSETKKI	FRUETV	TWIT D	SSER	NT		TEPTE	מאואנ		PEVIN	VENZ		SSACETC	TTRETT	CTEPT	DID	SPARS	ייים דפר קד דפר			EGG	ESPY	FRUE	TRSC	FERNET	VENTE	ATCTER	APTERT	TOVAL	TRATA
· LOUGINN			A A B B			an F II	- • • • • •				CINE D.	APPETE	STOL TT	COLLER		· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	ALL'E.		• • • • •		1.051	SET VE	THE LOCA	E E F E E	VEALE	Hard I for	1010101	TOAHD	

	DESKEMECTRICICKEI PVICIKEEFG	VNPISECNKERSPY	NNCSMASSFKSCTMSFMG		.SEVEYLTTINTAC	ISAMEKFESALCESTE	ECSESCACCED	TEFEKR
	.ISEIKKLEEVELYNDVMLPSSSEKML	MSPI FFTEVVKFI I SSHD <mark>F</mark> VI NVEV	VT <mark>KIF</mark> SSAGFIGISFTIFCIFCIFLFIF	.SATCSLFEF	S <mark>SF</mark> SCYCFKVETEFSG	EFKM <mark>C</mark> IVEKLEAID <mark>T</mark> EZ	RTFFTTCVAC	FCIEML
	IGEKCICESICEMPALKEEFE	MESTRVC			SFMCYTTPITESV	VCAMCKFFSAVETY	FRN DCATADI	
a	SEMCLVKEVFLYNDVMLPSSSEKLPIS	SLSALTESCPTPALS	KLETRAFCFPFSSVSCRVPCSANTPS.	.TSGLCSSGF	NSEMEYCECVESEISS	EFKI <mark>DIVEKIFAID</mark> TEZ	KTPFTNCATED	L
	.CSEICLINCAFLYNDWIF.FSEFIN	ITVIIG	KSESYAPPEPAATTSNCSS	ET	CSCIEFCFFMES	CFKL <mark>C</mark> YVEKLFAIC <mark>T</mark> EF	KISENSE IMAL	ICIEML
	VACEACMERT PPPMCKFEPE	.FGPREVHR	SCEFNSNNFSFASI SFRIC		.SFCFYCTLASETC	VELMEKFESTMEAT	CKAGSESEME	
	. ETCECCLEEVELYNDYMLESENEKLCNINLA	ANSPLETAETEKELRSSACEALNCEV	AT KLEENPESLELSETMECICECTESES	CSTRCS <mark>S</mark> FEF	NSESEYCEYVESEMVN	EFKI <mark>FIVEKI FAED</mark> TEA	KNPESTCET.	LCIEML
litrix	SEMCLVKEVFFYNDVMLESSSEKLPIS	SISALTESEPTEALS	KLETGVECEPESSASERVPESANTES.	.TSGLCSSGF	NSEMEYCECVESEISS	EFKI <mark>LIVEKIFAID</mark> TEA	KTFFTNCAIE	
hala	SEMCLIKEVEVYNDVMLESSSEKLPIS	SISALATSCPTPALE	KLETGAECEPESSASERVECSANTES.	.TSGLCSSGF	NSFMEYCECVESEISS	EFKI <mark>CIVEKIFAID</mark> TEA	KTFFTNCGIE	CLEMT.
7		MPLCSGHEPKMISPT	STACSTELSASEMHSEAFE		.ITCCFLITINFAC	IVANECEFTIME . MICH	CMSESCLAGE	TEME TR
	.ETECCLECVELYNDYMFESSNEKLN, INLA	AVSPI ESSETEKEI RSSAC <mark>P</mark> AI NCEV	ALKIESSPESIGISETMECICECEASES	CSTRCSSFERLLCENVNTFNFSCF	NSESEYCEDVESEMVN	VFKLELVEKLFAED <mark>T</mark> EA	KNFFSTCET.	LTEM
	SEMCT I KEVELYNDYNT ESSSEKT P TS	ST SAT TPSEST PVT S	KI ETGAECEPESSASCHVPCSTNKES.	.TSGICSSGF	NSETEYFECVEPETST	FFKT CVFKT FATC	KTEINSCAME	TMATCH
	SEKPYFEVFLYNDYMI HSTSNKLESTE	PTTPI PAFEMEKEI RSNVCPATNREV	VIKMESNPECIFLAFTIECIS.KFCSES	ISSSCS <mark>S</mark> TEF	NTE.EYCEDVESEMAS	EFKI <mark>DI VEKI FATD</mark> TEZ	KAPETTCET.	L CI EML
	AFYTEM THE HOLST LEMSTEELEHINS		VV. FAPPOPTRTKI	REMI FOSTVKVCI F	RPPE	TEN. TKCMKREFEKSS	FKGEP.AKER	KTRACP

AFYIFMD	DEFCIRTIECISSIEFISAS	PPDIF	HKACTVVTFAFT.	A	AKYEVLPLISIV	SPLEMTEEVE	SAPNSPESGE	KNSCILSPIR	KSACFLVKLEE	CSNCSHPG	TPLRSKE	PTAFCE	ISEKMI	ACRK
AFYTEMN	KKE <mark>DF</mark> SLIF <mark>F</mark> TSDALFSIN <mark>S</mark>	EFNFGLF	GRIESVEVEKCK.		IYCEPFKEF	RMSIRCMIN	GSTAVASIE.			.CFFCIF.	NI CI KRF	LEMNSL	KGFFVK	KRFICE
AFYIFM	CEFCLEVESPICELESSES	VSAMSSIF	CFLPSFASFASS.	ss	IAVKKEPSSRAF	SPIHLICEVO	SAFVSFFSG.	SRCTSPAR		SFTECSSN	CLINF	<mark>B</mark>	I SEKMI	AICNVCRK
AFYIFM	DEFCIRCLIFEEPITG				VCVKSCHS	SPIHIKCELI	CSYPSSEAS.	RTASPAL		FEFVNSLN	.LARLICKE	SECSEK	VSLRTI	VACNTCRK
AFYTEMN	ACECESIVEESTESIFTICS	EFNPGL	GRIESVEMCKN		AFEIFRCPM	.CFSIREMIC	CSTVVASIK.			.CFFEIM.	IICVKRE	LEMNSI	KGFFVA	KAVKRNEF
AFYIFM	CEFCIRSFECI SPIESSSAS	FESASECSTVTVE	CICICEPTANAT.	ITTATTEELKTVIKE	RMECIKILIASE	SPTHINKETI	SATSSFYRC	ICSRIASENR	.ACKGVIECTE	KSHERSPN	VLSVALSCF	TTVPEE	INFKIL	ALCNACRK
X AFYIEM <mark>D</mark>	E <mark>EFCIRIFSPIEPIPSSSI</mark> S	CISVMSS <mark>I</mark> F	CELESFASEASS.		SAVKKEPSSRAF	SFIRICEVC	SAFVSFESG.	SRCTSFAR		SFTECSNN	CLNNF	<mark>E</mark>	I S <mark>F</mark> KMI	AICNVCRK
AFYIFMD	CEFCI RIFSFI CEL FSSSI S	VSAMSSI	CFLPSFGSFASS.		SAVKKEPSSRAF	SPIHILCEVC	SAFVSFESG.	SRCTSPIR		SFTECSSN	CLNNF		I SFKMI	AICNICRK
AFYIFM	SSECESILFPAFEELFNLG	EFNPGLF	GRIESVFISKCK.		IFFEEFPCK	BRESLWEMLE	CSTTVATIK.			.REVENG.	IMCMKRF	LEKTNO	KGFPIA	KKSRPEICH
AFYTEM	EFCI RSFECT SPI ESNSPS	FFSMSTVTGF	CTCT CKPTTTATA	ITTATTCESKTETKC	NKEDTKTI TAS <mark>E</mark>	SSTCVFCFT7	TAKASAYSG	THSRTASPER	.ACKRVTECTE	KAH <mark>FRS</mark> T N	.TSATTNCF	NTVPEE	T NFKTT	ASCNACRK
AFYTEM	CCYCERTESPIEPT PSSSIS	VSSMSST	FCFT PSFASFASS.		SAVKCEPSSRAF	SPTHITCFVC	SAPVSPESG.	SCETSPAR		SPTFCSCS	CT NNF	F	T SFKMT	AMKNTCRK
AFYIFMD	DEFCIRIFICISSIECESSI	FCILGSMITLE	HCSLSFSTSDFK.	FEC	AMSDIKTIICSF	VHMMKESI	SAFVSFYNG	NRSRISSEVR	. FAKAVVCKTE	KSREGIPN	.LFVFLNKF	CTILCE	INFKMI	ALHNVCRKF
арутын														

	TTEKCKPNSVIMVIIIRGEETKAGYSVNNATREINTKCKFGICCKCTCHEFGIINCHGSMEVESMEVESMEVE
	KLESGLSTSKAVGTGTOTHCHEGTI KRSKASVESGKEVRT.HKTITLPTDLASRI LACSFENSGLEGTRYCCEVNAPVCCKCT <mark>I LCG</mark> EDT IR <mark>AL</mark> CCVS
	YCEVP_KKHSVINS <mark>LI</mark> VNGEEFSTGYSVVGRKFFCCFFIFCAFAYYFLIGKCSHSCCKCIAALFCEFFVNFTFCI <mark>LIC</mark> NFCTIAALFLFIFNSELM
	KLEEVTS <mark>L</mark> SEAVGLGA <mark>LL</mark> CSVESAIEFCKRAKVLEVKGSSVLCGNRTHILLESEVASRLLCSSLESSGCLECLTRYCCEVNAPVCERHE <mark>LLCGEELLRAL</mark> CCVN
	KICEIKEIIECGTIIEGCGECCKKIKATEIGSTTTIIIEFSELASRIIGSTSEGTGSIF.TIEHITRYCEVNAPICGRCY <mark>IICGEPTIRAI</mark> CHVI
	PLIGVMP_TPSRCFCT <mark>TI</mark> IPPFFMRFMTFCKSCRFSVNFFCIFFGIPTKESVIINILITGFERNHGYKVNSTICRMRGIKHETIFTCITRCECEVNAFVCSCH <mark>IIGRED</mark> RCALCAETKRNIAAA
	KMEHEGSI FCAVGII
x	KLEEVTSLSEAVGLGALLCSVESVIEFGKRAKVLEVKGSSVLG.NRTILILFSEVASRLIFSSIESNGGLECLTRYECEVNAFVCERHHLIGGEELLRALCCVN
	KIGEVTSI SEAVGIGALICSVESAIE FEKRAKVIEVKGSSVICGNRTIIIIFSEVASRIICSSIESSCGIECITRYDCEVNAPVCERHHIIGFETIRALDOVN
	KSLSRGPLGSESVI NNT LITGEDHSYGYKVFNARNEKTANTSSNI KCI FENASKWGI TKSVFI FKITCHECEVNAPSFPCEGI I CGEA TICAL FREAVFOCT I
	KMEHEGST FCAAGTGTT LCCEGECAPTMST SKKRVKCFTSSECNGTF.CKTTTTTFSETACRTTGCSMEFSGTECTTSYECEVNAPTCCSRNTTCGEFTTRATECVN
	KLEEVTSI SEAVGLGALICSVDGAVE FCKRTKVLEVKGSGVLGGNKTILLI FSEVASRI ICSSLEGRGG LECLTRYDCEVNAPVCDRHHLICGEET LRALDCVN
	KMESCGPLEQAIGIGILECINVCPGENSSLCAKRVKCSCSERISSAE.CPTILLISTDMASCLICCSFCCTVLECLICYCCEVNAPVHGIRNLLCGEELLRALCCAN

图 2 不同物种 HIF-1α 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;

半滑舌鳎, NM 001294187.1; 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. 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.

CETELVI I.SKSC. FET REMT THRIGS FET TE IFHSNGR. FET REMT VHRTY. FET REMT HHRSG. FET REMT HHRSG. FET REMT VHRTY. CETALMSAKS. FET REMT HHRSP. FET REMT HHNSP. FET REMT HHNSP. FET REMT VHRSG.

ELREML TERNCE

E IVE<mark>K</mark>AYKD CHI TKTHHD

EVICHSYRN CHIT<mark>K</mark>THHN HINKTHH

CHINKTHHS EVVEKAFKD CHITKTHHD CHITKTHHN CHITKTHHN STICKAYKD

HFC







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-1a 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-1a 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-1a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-1a 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-1α* 基因被进行克隆和表达研究。





本研究通过 PCR 和 RACE 技术克隆获得了一种 HIF-1a 基因 cDNA 全长序列。序列和结构分析表 明, SbHIF-1a 具有与其他物种 HIF-1a 相似性较高 的基因序列,且拥有 HIF-1a 基因保守的 HLH、 bHLH、PAS-A、PAS-B 和 PAC 结构域,这说明 SbHIF-1a 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-1a 与其他物种的 HIF-1a 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-1a 中都 具有两个保守的脯氨酸羟化酶结合位点在^[26-27], 而 *SbHIF-1a* 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-1a* 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-1a基因转录本,说明了HIF分布的广泛性, 这一结果也与 HIF-1a 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-1a 在闭壳肌中表达量最低, SbHIF-1a 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-1α 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-1α 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-1α 基因的表达谱。魁蚶受到低氧胁迫时, HIF-1a 在各组织中均做出及时反应。血淋巴受较 强低氧胁迫后 SbHIF-1α 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-1α 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-1α 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-1α 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-1α 积极响应后与 HIF-1β 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-1α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-1α 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-1a 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:

- 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-1α and HIF-2α[J]. Journal of International Pathology and Clinical Medicine, 2005, 25(5): 447-449. [李启芳. HIF-1α和 HIF-2α 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-1α 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-2α 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-2α 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-1α 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-1α 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-1α and -2α 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-1α/2α/3α 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-1α 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-1α and gene expression analysis of *Pelteonagrus fulvidsco*[D]. Baoding: Hebei University, 2010. [张慧. 黄颡鱼 *HIF-1α* 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 舌鳎 HIF-1α、Hb-α1 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, 施森江, 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 pathophysiologi 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, 钟述. 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 hypoxiainducible 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;
- National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China;
- 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-1a 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-1a 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-1α*; gene characteristics; hypoxia; response laws **Corresponding author:** LIU Zhihong. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn