

# 三角帆蚌金属硫蛋白基因的克隆及序列分析

袁一鸣 汪桂玲 李家乐 \*

( 上海海洋大学 省部级共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;  
上海市高校水产养殖学 E 研究院 上海 201306)

**摘要:** 采用 RACE 技术,获得了三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 金属硫蛋白基因的全长 cDNA 序列。该序列全长 467 bp,由长 92 bp 的 5' UTR (untranslated region), 159 bp 的 3' UTR, 和 216 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 组成。共编码 71 个氨基酸,分子量大约为 7.1 ku,理论等电点为 7.24。该蛋白序列中半胱氨酸含量最丰富 (29.6%),其次是甘氨酸 (14.1%),存在软体动物金属硫蛋白的特征序列 CKCXXXCX,且 C-末端的氨基酸序列也符合软体动物金属硫蛋白标签序列 C-X-C-X(3)-C-T-G-X(3)-C-X-C-X(3)-C-X-C-K。蛋白序列特征分析表明,该序列与其他贝类的金属硫蛋白基因具有很高的相似性,具备金属硫蛋白的典型特征,是金属硫蛋白家族的成员。

**关键词:** 三角帆蚌;金属硫蛋白基因;RACE;cDNA

**中图分类号:** Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)05-98-07

## Cloning and Sequence Analysis of Metallothionein Gene in *Hyriopsis cumingii*

YUAN Yi-Ming WANG Gui-Ling LI Jia-Le \*

( Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,  
Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306;  
Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A 467 bp full-length cDNA sequence of metallothionein (named as HCMT) gene was obtained using rapid amplification of cDNA end (RACE) technique in *Hyriopsis cumingii*. It consists of a 92 bp 5' untranslated region (UTR), a 216 bp open reading frame (ORF) and a 159 bp 3' UTR. The translated protein was composed of 71 amino acids, with a molecular weight of 7.1 ku, and its calculated isoelectric point was 7.24. The contents of cysteine and glycine in the predicted HCMT amino acid sequence were 29.6% and 14.1%, respectively. The conserved motif CKCXXXCX of molluscan MT was also found in HCMT. A specific pattern of molluscan MT C-X-C-X(3)-C-T-G-X(3)-C-X-C-X(3)-C-X-C-K was located at the C-terminal. The predicted protein sequence analysis showed that the MT of *H. cumingii* had the typical characteristics of MT family and shared a high similarity with that of other molluscans.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; Metallothionein; RACE; cDNA

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 30871923), 国家科技支撑项目 (No. 2006BAD01A13), 上海市科委地方院校能力建设项目 (No. 08390510100), 上海市水产养殖重点学科建设项目 (No. Y1101);

\* 通讯作者, E-mail: jlli@shou.edu.cn;

**第一作者介绍** 袁一鸣,女,硕士研究生;研究方向:水产动物种质资源与种苗工程;E-mail: yiming.yuan@yahoo.com.cn。

**收稿日期:** 2009-04-08, **修回日期:** 2009-06-26

金属硫蛋白(metallothionein, MT)于1957年首次被科学家 Margoshes 和 Vallee 发现于马(*Equus caballus*)肾皮层细胞中<sup>[11]</sup>。MT 是一类普遍存在于生物体内的富含半胱氨酸、低分子量并能被金属诱导的金属结合蛋白。之后人们对 MT 的结构、性质、功能等方面进行了大量深入的研究, MT 参与体内微量元素的储存、转运和代谢,拮抗电离辐射,清除自由基以及对重金属的解毒作用,还与机体生长发育、衰老及某些疾病有关(如帕金森、癌症、癫痫等)<sup>[12,31]</sup>。MT 基因作为一种重要的免疫基因,已有许多报道,但多集中于脊椎动物<sup>[4~7]</sup>。20 世纪 70 年代中期首次报道了海洋无脊椎动物——美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的 MT<sup>[8]</sup>。近 30 年来,无脊椎动物 MT 结构研究取得了很大进展,已发现大多数主要无脊椎动物中都存在 MT<sup>[9~11]</sup>。国外对贝类 MT 基因的研究主要集中在贻贝(如紫贻贝 *Mytilus edulis*)<sup>[10]</sup>和牡蛎(如美洲牡蛎)<sup>[12]</sup>。国内对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)<sup>[13]</sup>和大珠母贝(*Pinctada maxima*)<sup>[14]</sup>也有相关研究,但在淡水贝类方面还没有相关报道。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)属瓣鳃纲(Lamellibranchia)蚌目(Unionoida)蚌科(Unionidae)帆蚌属,是中国独有的优良淡水育珠蚌,简称“帆蚌”。分布于安徽、江苏、浙江、江西、湖北和湖南等省的湖泊及河流内<sup>[15~17]</sup>。国内以三角帆蚌所产的珍珠质量最佳,珠质细腻、光滑,色泽鲜艳,形状较圆。随着分子生物学技术的发展和不断完善,从无脊椎动物中分离克隆功能基因已成为生物技术发展的一大热点,开发并利用这些功能基因也是该领域的一大发展趋势。

本研究克隆得到了三角帆蚌 MT 基因全长 cDNA 序列,并对其进行相关的分析讨论,以期成为 MT 家族的进化研究,以及为进一步研究三角帆蚌 MT 基因的性质、表达特点及功能提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料 实验用三角帆蚌采自浙江省金华

市威望养殖新技术有限公司生产基地。RNAiso Plus、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、TaKaRa pMD19-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司; *E. coli* DH5、TIANGel Midi Purification Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司; SMARTIM RACE cDNA Amplification Kit、Advantage<sup>R</sup> 2PCR Enzyme System 购自 BD Biosciences Clontech 公司。

### 1.2 MT 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

1.2.1 三角帆蚌血液总 RNA 提取 从三角帆蚌闭壳肌抽取血液,用 RNAiso Plus 试剂并按照其说明提取总 RNA。

1.2.2 全长 cDNA 的克隆和序列测定 三角帆蚌血液 cDNA 文库来自本实验室<sup>[18]</sup>。3 末端扩增使用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒,用 Primer primer 5.0 设计上游特异性引物 Mf:5'-CAACTGCCTTGAGACTGG-3',下游引物为试剂盒中的 M13 Primer M4:5'-GTTTCCCACTCACGAC-3'。扩增 3 端的 PCR 反应参数:首先 94 3 min;然后 30 个循环为 94 30 s,60 30 s,72 30 s;最后 72 延伸 10 min。5 末端扩增使用 SMARTIM RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage<sup>R</sup> 2PCR Enzyme System 试剂盒,用 Primer primer 5.0 设计下游特异性引物 Mr:5'-GTCCA GTGCA GCCCTTACCACAGTC-3',上游引物为试剂盒中的 UPM:5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGF3 (Long); 5'-CTAATACGACTCACTATA GGGC-3' (Short)。扩增 5 端的 PCR 反应参数:首先 94 3 min;然后 25 个循环为 94 30 s,60 30 s,72 3 min;最后 72 延伸 10 min。

扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,用 TIANGel Midi Purification Kit 回收目的片段 PCR 产物,连入克隆载体 pMD19-T,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5,所获得的阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.3 MT 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析 将获得的三角帆蚌 MT 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih>。

gov/BLAST)分析。同时将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列,应用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定正确的开放阅读框(open reading frame,ORF)。用 BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索,再用 Clustal X<sup>[19]</sup> 软件对相应的氨基酸序列进行分析。用 MEGA 4.0<sup>[20]</sup> 软件构建三角帆蚌与其他 10 种软体动物 MT 氨基酸序列的系统树,并用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

## 2 结果

### 2.1 血液总 RNA 及 RACE 产物的鉴定 对提

取的血液总 RNA 进行电泳分析和 OD 值检测。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察,可见完整性(图 1 A)。用分光光度计测 OD 值,记录 R 值( $OD_{260}/OD_{280}$ )为 1.98,结果表明提取的总 RNA 纯度高,符合 RACE 扩增要求。对 3 RACE 及 5 RACE 的产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳(图 1,Marker 均为 D2000 DNA 分子量标准),所得产物分别约为 350 bp(图 1 B)和 250 bp(图 1 C)。

### 2.2 MT 编码基因 cDNA 全长序列的特征

扩增测序得到三角帆蚌 MT 基因的全长 cDNA 序列,推导获得其氨基酸序列。获得的 cDNA

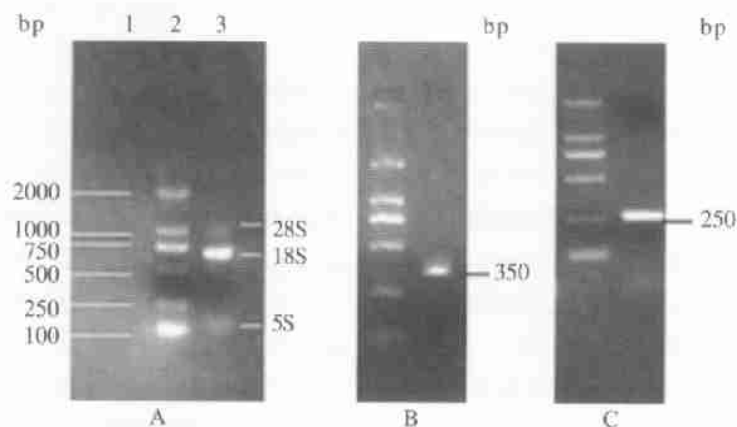


图 1 三角帆蚌总 RNA 完整性的检测以及 3、5 RACE 扩增产物电泳图

Fig. 1 The gel electrophoresis pattern of total RNA and 3, 5 RACE product from *H. cumingii*

A: RNA 完整性检测; B: 3 RACE 产物; C: 5 RACE 产物。

1: 空白对照; 2: D2000 DNA 分子量标准; 3: 三角帆蚌总 RNA 提取产物。

A: The gel electrophoresis pattern of total RNA; B: 3 RACE product; C: 5 RACE product.

1: Blank control; 2: D2000 DNA Maker; 3: Total RNA product of *H. cumingii*.

序列全长 467 bp (GenBank 登录号: CQ184290), 5' UTR 为 92 bp, 3' UTR 为 159 bp。开放阅读框长度为 216 bp, 可编码 71 个氨基酸。图 2 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点 (polyadenylation signal site)。

### 2.3 MT 氨基酸的序列特征

推导得到的氨基酸共有 21 个 Cys 残基, 它们与邻近的氨基酸组成了若干个金属硫蛋白的保守性结构 Cys-X<sub>n</sub>-Cys。预测的氨基酸分子量大约为 7.1 ku, 理论等电点为 7.24。半胱氨酸 (Cys) 含量 29.6%, 甘氨酸 (Gly) 含量 14.1%, 不含谷氨酰

胺 (Gln)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)。带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 9 个, 带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 10 个。脂肪族氨基酸指数为 16.48。序列经 BLASTp 检索, 与其他双壳类软体动物的 MT 表现出较高的相似性。其中与英国石蚌 (*Unio tumidus*) 的 MT 相似性最高, 为 92%。与丽文蛤<sup>[21]</sup> (*Meretrix lusoria*) 的 MT 相似性为 77%。与河蚬 (*Corbicula fluminea*) 的 MT 相似性为 78%。

用 Clustal X 软件将三角帆蚌与其他 6 种双

```

1  acgcgggggtttcacgtagcacacggcataactaagacgcagattgctctggtcatactagaattcaga
69  ttttgaagcaccgaagattaataaa
93  ATGTCTGACGCATGCAACTGCCTTGAGACTGGAGAATGCAAG
   M S D A C N C L E T G E C K
135 TGTGTGGTGAAAGTACTGGGGACTGCAGATGCGGGAAAGAC
   C C G E S T G D C R C G K D
177 TGCAAAATGTGGCGATGCCTGCAAGTGTCTCTGGATGTAAGTGC
   C K C G D A C K C P G C K V
219 GTCTGCAAGTGTCTTAGTTCTTGTGACTGTGGTAAAGGGCTGC
   V C K C S S S C D C G K G C
261 ACTGGACCCAGCACATGCAAGTGTGACTCTGGATGTTTCATGC
   T G P S T C K C D S G C S C
303 AAATGA
   K *
309 tgcagtgaatgactgtatgacaagaatatcatggaccaacatgtataataattctggattctagtctagt
381 aaagtaataaaaacaagttaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
447 aa(aataaa)aaaaaaaaaaaaaa467

```

图2 金属硫蛋白编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of MT in *H. cumingii*

小写字母代表 3'、5' 端非翻译区;大写字母部分为编码区,且上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列;方框标出的是多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA;下划线标出的是符合无脊椎动物 MT 氨基酸的特征序列;阴影标出的是符合软体动物 MT 的标签序列; \* 表示终止密码子。

3', 5' untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotides and the lower shows the amino acids; Putative polyadenylation signals (AATAAA) are boxed; Characteristic sequences of MT from invertebrates are underlined; Tag sequences of MT from mollusks are shadowed; Stop codon is marked with asterisk (\*).

壳贝类的 MT 氨基酸序列进行多序列比对分析,可发现三角帆蚌与其他 6 种软体动物金属硫蛋白在 Cys 的排列方式上显示出较高的保守性(图 3)。用 Bioedit<sup>[22]</sup> 软件将三角帆蚌与其他 10 种软体动物的 MT 氨基酸序列进行多序列比对,再用 MEGA 4.0 软件以邻位相接法(NJ 法)构建 MT 的系统树(图 4),采用 Bootstrap 检验。在该进化树中,瓣鳃纲与腹足纲(Gastropoda)分为两大支,瓣鳃纲中的蚌目与蚶目(Arcoida)聚为一支,再与贻贝目(Mytiloida)聚在一起,然后与珍珠贝目(Pteroida)聚在一起。三角帆蚌 MT 的分子进化地位与三角帆蚌的生物分类地位一致。

### 3 讨论

本研究采用 RACE 技术,获得了三角帆蚌 MT 的全长 cDNA 序列和开放阅读框。无脊椎动物 MT 氨基酸组成的 Cys 含量很高<sup>[23]</sup>,三角

帆蚌 MT 的氨基酸序列具有这一典型特征,序列中含 Cys 达 29.6%,并且按照 MT 特征序列 Cys-X(1-3)-Cys 排列<sup>[13]</sup>。这些 Cys 残基在 MT 中的空间分布非常重要,它们构成 MT 的金属结合配位体,其巯基能共价结合金属离子,最常见的结合金属有 Zn、Cu 和 Cd 等重金属。另外, Gly 含量 14.1%,符合软体动物 MT Gly 含量较高的特征<sup>[24]</sup>。与其他无脊椎动物的 MT 一样<sup>[23]</sup>,三角帆蚌 MT 富含 Cys-X(1-3)-Cys 结构,其中 9 个 Cys-X-Cys 结构,1 个 Cys-X(2)-Cys 结构,6 个 Cys-X(3)-Cys 结构,1 个 Cys-Cys 结构,这些 Cys 位置及排列方式在软体动物之间是保守的<sup>[23,25]</sup>。软体动物 MT 氨基酸序列中有一保守特征,即 CKCXXXCXCX 特征序列<sup>[26]</sup>,在三角帆蚌 MT 中有 3 段序列符合此模式。软体动物 MT C-末端有一个保守的特征序列 C-X-C-X(3)-C-T-G-X(3)-C-X-C-X(3)-C-X-C-K<sup>[27]</sup>,三角帆蚌 MT 序列 C-端的 CDCGKCTGSPSTCKCDSGCSCCK

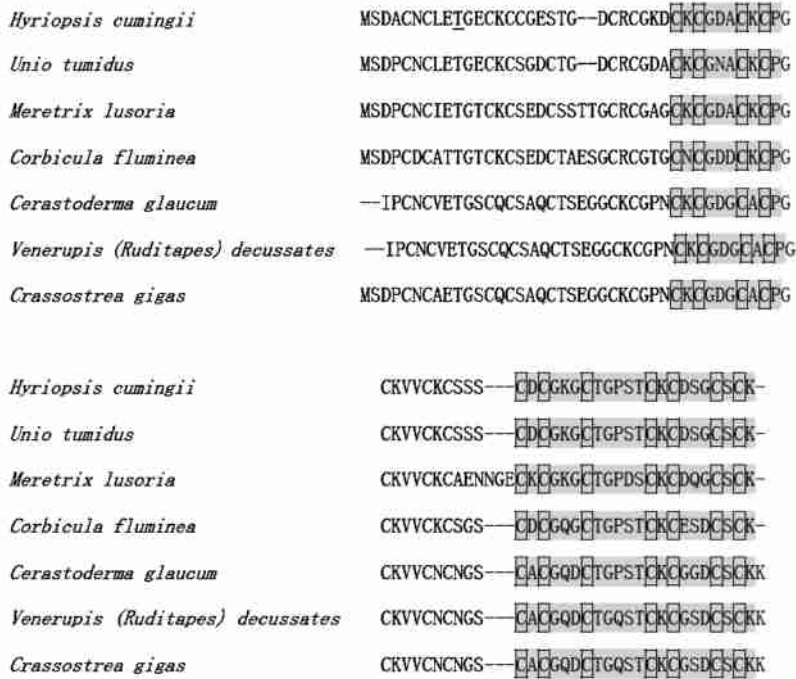


图 3 三角帆蚌与其他几种双壳贝类金属硫蛋白氨基酸的多序列比对结果

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of MT in *H. cumingii* and other mollusk animals

方框表示保守的 Cys 的位置,阴影部分表示无脊椎动物和软体动物金属硫蛋白的特征序列。*Unio tumidus*: 英国石蚌 (ABP01350.1); *Meretrix lusoria*: 丽文蛤 (AAS92877.1); *Corbicula fluminea*: 河蚬 (ABM55725.1); *Cerastoderma glaucum*: 灰鸟尾蛤 (ACB05816.1); *Venerupis (Ruditapes) decussates*: 帘蛤 (ABS20116.1); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎 (CAC82788.1)。

The sites of conservative Cys are boxed, characteristic sequences of MT from invertebrates and mollusks are shadowed.

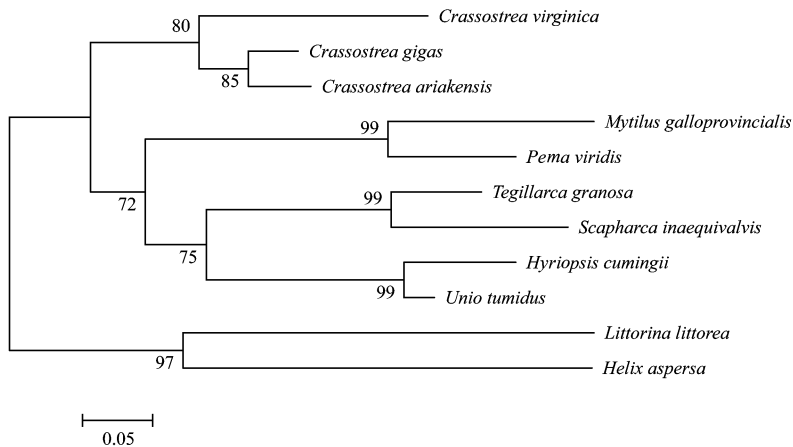


图 4 根据金属硫蛋白氨基酸序列使用 NJ 构建的系统进化树

Fig. 4 The NJ phylogenetic tree of vertebrate based on the amino acid sequences of *H. cumingii*

*Crassostrea virginica*: 美洲牡蛎 (AAQ23908.1); *C. gigas*: 太平洋牡蛎 (CAB64869.1); *C. ariakensis*: 近江牡蛎 (ABC69708.1); *Mytilus galloprovincialis*: 紫贻贝 (AAT72935.1); *Perna viridis*: 翡翠贻贝 (AAF22487.1); *Tegillarca granosa*: 泥蚶 (AAS75318.1); *Scapharca inaequivalvis*: 不等壳毛蚶 (AAZ76545.1); *Hyriopsis cumingii*: 三角帆蚌; *Unio tumidus*: 英国石蚌 (ABP01350.1); *Littorina littorea*: 滨螺 (AAK56498.1); *Helix aspersa*: 蜗牛 (ABL73910.1)。

是完全符合这一特征的序列。在软体动物中,通过 NCBI 上比对得到与三角帆蚌 MT 氨基酸同源性较高的紫贻贝有多种亚型,如 MT-10<sup>-</sup> (P80247.3)、MT-10<sup>-</sup> b (O62554.3)、MT-10<sup>-</sup> a (P80246.2) 等,但由于 MT 基因在国际上至今没有统一的系统命名,所以未对三角帆蚌 MT 基因进行归类。NJ 建树结果显示,淡水贝类三角帆蚌与常出现在稍有淡水流入的内湾环境中的蚶目<sup>[28,29]</sup>亲缘关系更接近,而与生活在沿海的贻贝<sup>[29]</sup>及几乎遍布全世界的牡蛎<sup>[14]</sup>亲缘关系较远,生态环境的不同是否与这几种贝类的进化程度有关,还需深入研究。

到目前为止,对无脊椎动物 MT 的高级结构知之甚少。圆二色性(CD)光谱和核磁共振(NMR)研究表明,无脊椎动物 MT 的三级空间结构以两个球状结构域为特征,两个结构域在主链上的位置物种间存在差异<sup>[25]</sup>。无脊椎动物 MT 结构特征及其结合金属性质都与哺乳类 MT 的整体安排结构类似,并且还具与哺乳类 MT 相同数目的金属螯合构象 Cys-Cys、Cys-X-Cys 和 Cys-X-X-X-Cys 特征,但除此之外,两者之间的密码区没有明显的序列关系<sup>[30]</sup>。无脊椎动物 MT 具有广泛的遗传多样性,主要表现在同形体及其变体蛋白和基因多样性两个方面。如天然罗马陆生蜗牛(*Helix pomatia*)中肠腺 MT 与外套膜 MT 的初级结构同源率只有 58%,在体内行使着不同的生理功能<sup>[31]</sup>。在三角帆蚌的其他组织中是否存在与血液中具有差异的 MT 还有待于进一步研究。

三角帆蚌从野生状态被迫高密度吊养于人工养殖环境后,严重改变了它原有的自然习性,产生疾病也属正常现象,但蚌病的研究历史却极为短暂<sup>[32]</sup>,对三角帆蚌的分子生物学基础研究以及相关应用技术的研究远远跟不上生产发展的需要。有关海洋软体动物(特别是双壳纲)体内能聚集高浓度镉的研究已有许多<sup>[23,33,34]</sup>,如近几年发展起来的双箱动力学模型已用于紫贻贝<sup>[35]</sup>、牡蛎<sup>[36]</sup>、甲壳类<sup>[37,38]</sup>等的富集实验。三角帆蚌是淡水底栖滤食性动物,对重金属等污染物有较强的吸附累积能力,而相关的深入

研究少之又少。科学地运用 MT 的功能是有效地解离、解毒重金属的一种生物途径,而无脊椎动物 MT 生化结构、理化性质和生理功能又具有多样性,这意味着水生无脊椎动物作为重金属暴露的生物标志物有着相当广泛的适用范围。三角帆蚌是淡水生态系统中重要的初级消费者,作为主要淡水珍珠养殖贝类,在全国广泛养殖<sup>[39]</sup>,且养殖密度高。本研究克隆得到三角帆蚌 MT 基因 cDNA 全序列,为今后对其进行深入研究奠定了基础,相信会为将来三角帆蚌 MT 的表达和功能实验以及开展防治蚌病工作带来新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium binding protein from equine renal cortex. *J Am Chem Soc*, 1957, **79**: 4 813.
- [2] 于小倩,彭双清.金属硫蛋白在中枢神经系统损伤和修复中的作用.中国新药杂志,2008, **17**(16): 1 385 ~ 1 389.
- [3] 姚朝阳,朱文文,牛敬媛等.金属硫蛋白医学研究进展.微量元素与健康研究,2005, **24**(3): 53 ~ 63.
- [4] Reeve V E, Nishimura N, Bosnic M, et al. Lack of metallothionein<sup>-</sup> and<sup>-</sup> exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice. *Immunology*, 2000, **100**(3): 399 ~ 404.
- [5] 闫学春,孙效文,梁利群等.金属硫蛋白基因对转基因鲤及实验动物体内重金属累积的影响.水产学报,2005, **29**(2): 281 ~ 284.
- [6] Hunziker P E, Kaur P, Wan M, et al. Primary structures of seven metallothioneins from rabbit tissue. *Biochemistry J*, 1995, **306**: 265 ~ 270.
- [7] 路延笃,黄巧云,陈雯莉等.猴金属硫蛋白<sup>-</sup>域(MT-cDNA)突变体的构建、表达及工程菌对重金属的吸附.环境科学学报,2008, **28**(9): 1 763 ~ 1 770.
- [8] Ridlington J W, Fowler B A. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Chemico-Biological Interactions*, 1979, **25**(2/3): 127 ~ 138.
- [9] Roesijadi G, Fowler B A. Purification of invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 1991, **205**: 263 ~ 273.
- [10] Lemoine S, Laulier M. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, **46**(11): 1 450 ~ 1 455.

- [11] Rebelo M, Pfeiffe W, Silva H, *et al.* Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Aquatic Toxicology*, 2003, **64** (3): 359 ~ 362.
- [12] Butler R A, Roesijadi G. Metallothionein (MT) gene expression and cadmium-induced immunotoxicity in hemocytes of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 2000, **50**: 470.
- [13] 刘维青,倪多娇,宋林生等. 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 金属硫蛋白基因的克隆与分析. 海洋与湖沼, 2006, **37** (5): 444 ~ 449.
- [14] 唐任生,夏建红,王玉梅等. 大珠母贝金属硫蛋白 cDNA 克隆与序列特征分析. 安徽农业科学, 2009, **37** (7): 2 888 ~ 2 890, 2 900.
- [15] 董聿茂. 浙江(软体)动物志. 杭州:浙江科学技术出版社, 1989, 202 ~ 203.
- [16] 刘月英,张文珍,王耀先. 中国经济动物志(淡水软体动物). 北京:科学出版社, 1979.
- [17] 蔡英亚,张英,魏若飞. 贝类学概论. 上海:上海科学技术出版社, 1995.
- [18] Bai Z Y, Yin Y X, Hu S N, *et al.* Identification of genes involved in immune response, microsatellite and SNP markers by expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel. *Mar Biotechnol*, 2009, **11**: 520 ~ 530.
- [19] Thompson J D, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4 876 ~ 4 882.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**: 1 596 ~ 1 599.
- [21] Chang Y T, Liao B K, Wu S M. Cloning and expression of metallothionein cDNA in the hard clam. *Aquaculture*, 2007, **262** (2 - 4): 504 ~ 513.
- [22] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, **41**: 95 ~ 98.
- [23] 牛长缨,姜勇,雷朝亮等. 无脊椎动物金属硫蛋白的研究. 动物学杂志, 2002, **37** (1): 72 ~ 75.
- [24] Engelken J, Hildebrandt A. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochemistry and Cell Biology*, 1999, **77**: 237 ~ 241.
- [25] 叶属峰,陆健健. 无脊椎动物金属硫蛋白(MTs)多样性及其生态服务功能. 生物多样性, 2000, **8** (3): 317 ~ 324.
- [26] Imagawa M, Onozawa T, Okumura K, *et al.* Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 1990, **268**: 237 ~ 240.
- [27] Binz P A, Kägi J H R. Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Klaassen C ed. *Metallothionein*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1999, 7 ~ 13.
- [28] 梁象秋,方纪祖,杨和荃. 水生生物学. 北京:中国农业出版社, 2000, 231 ~ 267.
- [29] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1998, 72 ~ 302.
- [30] Riek R, Precheur B, Wang Y Y, *et al.* NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *The Journal of Molecular Biology*, 1999, **291**: 417 ~ 428.
- [31] Dallinger R, Berger B E, Hunziker P, *et al.* Structure and function of metallothionein isoforms in terrestrial snails. In: Klaassen C ed. *Metallothionein*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1999, 173 ~ 178.
- [32] 张根芳,吴信忠,李家乐. 三角帆蚌病害及防治技术研究进展. 上海水产大学学报, 2005, **14** (3): 313 ~ 318.
- [33] Mackay E A, Overnel J, Dunbar B, *et al.* Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur J Biochem*, 1993, **218**: 183 ~ 194.
- [34] Unger M E, Chen T T, Murphy C M, *et al.* Primary structure of molluscan metallothioneins deduced from PCR-amplified cDNA and mass spectrometry of purified proteins. *Biochem Biophys Acta*, 1991, **1074**: 371 ~ 377.
- [35] Boisson F. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following up take from seawater. *The Science of the Total Environment*, 1998, **222** (1/2): 55 ~ 61.
- [36] 王晓丽,孙耀,张少娜等. 牡蛎对重金属生物富集动力学特性研究. 生态学报, 2004, **24** (5): 1 086 ~ 1 090.
- [37] Kahle J, Zauke G P. Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoides acutus* from the Weddell Sea (Antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquatic Toxicology*, 2002, **59** (1/2): 115 ~ 135.
- [38] Zauke G P. Validation of estuarine gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in semi-controlled toxicokinetic flow-through experiment. *Environmental Pollution*, 1995, **90** (2): 209 ~ 219.
- [39] 张根芳,方爱萍,李家乐. 淡水蚌类繁殖生物学研究进展. 水产学报, 2005, **29** (4): 560 ~ 564.