

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00736

虾夷扇贝脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 *LITAF* 基因的克隆及表达分析

赫崇波^{1,2}, 朱宝¹, 刘卫东², 鲍相渤², 李云峰², 单忠国³, 李宏俊⁴

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029;
2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 大连 116023;
3. 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005;
4. 国家海洋环境监测中心, 大连 116023

摘要: 脂多糖诱导的肿瘤坏死因子(Lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor, LITAF)是一类重要的炎症细胞因子, 在先天性免疫系统中发挥重要的介质作用。文章根据虾夷扇贝 *LITAF* 基因 EST 序列, 应用 RACE 技术克隆了虾夷扇贝 *LITAF* 全长 cDNA, 对序列及编码的氨基酸进行生物信息学分析。结果显示, 该基因 cDNA 全长 1 551 bp, 其 5'非编码区包含 76 bp, 3'非编码区包含 1 001 bp; 开放阅读框(ORF)为 474 bp, 编码 157 个氨基酸, 氨基酸序列中存在一个保守的 LITAF 结构域; 理论分子量 16.99 kDa, 等电点为 6.24。*LITAF* 基因序列为 3 698 bp, 由 3 个外显子和两个内含子组成。利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *LITAF* 在虾夷扇贝不同组织、不同胚胎发育阶段以及鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后各时间段的表达情况。结果表明: *LITAF* 基因在所检测的 6 个成体组织中均有表达, 其中肾脏的表达量最高; 胚胎发育的 7 个时期中, 担轮幼体时期表达量最高; 菌刺激 36 h 实验组与对照组的表达量差异大。*LITAF* 基因是 LITAF 家族的一员, 推测 *LITAF* 基因参与虾夷扇贝的先天性免疫反应。

关键词: 虾夷扇贝; 脂多糖诱导的肿瘤坏死因子; 序列分析; 胚胎发育; 基因表达

Cloning and expression analysis of lipopolysaccharide-induced TNF- α (LITAF) of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*)

HE Chong-Bo^{1,2}, ZHU Bao¹, LIU Wei-Dong², BAO Xiang-Bo², LI Yun-Feng², SHAN Zhong-Guo³, LI Hong-Jun⁴

1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;
2. Key Lab of Marine Fishery Molecular Biology of Liaoning Province, Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China
3. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Dalian 361005, China;
4. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China

收稿日期: 2011-10-28; 修回日期: 2012-02-21

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(编号: 200805037)和国家自然科学基金项目(编号: 31140073)资助

作者简介: 赫崇波, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 水产分子遗传学。E-mail: hechongbo@hotmail.com

网络出版时间: 2012-4-24 11:44:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120416.1554.005.html>

Abstract: The lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*) is an inflammatory cytokine, which plays an important role in innate immunity system. Based on the expressed sequence tag (EST) of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*), the cDNA of *LITAF* gene was amplified using rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach. Results showed that the full-length cDNA of *LITAF* is 1 551 bp consisting of a 5' untranslated region (UTR) of 76 bp, a 3' UTR of 1 001 bp, and an open reading frame (ORF) of 474 bp encoding a polypeptide of 157 amino acids, and there is a conserved *LITAF* domain in amino acid sequences. The estimated molecular mass is 16.99 kDa and the theoretical isoelectric point is 6.24. The total length of *LITAF* is 3 698 bp, which includes three exons and two introns. Real-time quantitative PCR was carried out to measure *LITAF* mRNA expression in adult tissues and monitor mRNA expression patterns during embryonic development after bacteria (*Vibrio anguillarum*) challenged. The expression level of *LITAF* mRNA was detected in all the adult tissues with the highest in the kidneys. The trochophore owns the highest expression level of *LITAF* in embryonic development. *LITAF* expression showed significant difference ($P < 0.01$) between the control and bacteria challenged specimens at 36 h. These results suggest that the *LITAF* should be a member of the *LITAF* family that perhaps involved in the innate immune response of Japanese scallop.

Keywords: Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*); lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*); sequence analysis; embryonic development; gene expression

传统上将免疫系统分为先天性和获得性成分, 它们各自具有不同的功能和作用。无脊椎动物缺乏获得性免疫系统, 主要依靠先天性免疫来防御外源物的感染^[1]。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)可诱导单核细胞和巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)。TNF- α 作为前炎性细胞因子介导炎症反应和免疫调节反应^[2~5], 能直接造成肿瘤细胞的死亡并且参与机体内炎症和免疫应答的调节^[6], 促进巨噬细胞激活和分化、调节嗜中性粒细胞的迁移、提高淋巴细胞的增值和吞噬作用^[7,8]。

脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 α 因子可特异性被脂多糖诱导表达, 表达出来的蛋白又能调节 TNF- α 的表达, 因此被命名为脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 (Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor, *LITAF*)^[9]。该基因在哺乳动物和非哺乳动物中均被分离出来^[10~13], 并证实 *LITAF* 蛋白在 LPS 诱导 TNF- α 的表达过程中起到重要作用。当受到脂多糖刺激时, *LITAF* 和 STAT6(B)会形成复合体进入细胞核, 促进 TNF- α 等细胞因子的表达^[14]。

虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 是一种重要的经济贝类, 广泛分布于日本北部沿海、俄罗斯库页岛海域和朝鲜半岛北部^[15]。1982 年, 辽宁省海洋水产科学研究院首次从日本将该种引进到我国并进行繁殖和养殖技术研究, 经过 20 多年的探索与推广,

虾夷扇贝已经成为我国北方重要的扇贝养殖品种^[16]。近年来, 虾夷扇贝在养殖过程中出现生病率高、死亡率不断上升的现象, 这给养殖业带来了巨大的经济损失。因此开展虾夷扇贝抗病及免疫相关基因的研究, 可为虾夷扇贝的遗传育种工作提供参考资料。本研究在对本实验室前期建立的虾夷扇贝外套膜 cDNA 文库进行功能基因筛选时发现一条 EST 序列, 利用 PCR 扩增得到该基因 cDNA 全长, 经比对发现该基因的氨基酸序列与其它物种的 *LITAF* 序列具有较高的相似性, 在此命名为 *LITAF*。利用生物信息学分析虾夷扇贝 *LITAF* 基因的序列特征, 观察并分析该基因在不同组织、不同发育阶段以及在受到鳃弧菌刺激后的表达情况, 为进一步研究该基因在虾夷扇贝中的功能提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

虾夷扇贝实验样品分为成年虾夷扇贝及其不同发育时期, 包括受精卵、多细胞期、膜内转期、担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶期和稚贝期, 所有样品均取自辽宁省海洋水产科学研究院扇贝引育种中心实验基地。实验所用鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 为本实验室从患病虾夷扇贝个体中分离纯化而来。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的获得

取新鲜的组织约 30 mg, 按照 RNeasy pure Tissue Kit(北京天根生化科技公司)说明书提取组织总 RNA, 利用核酸分析仪检测 RNA 浓度及质量。反转录过程遵循 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录试剂盒(TaKaRa 公司)的说明, 反应条件为 37 15 min, 85 5 s。

1.2.2 虾夷扇贝 *LITAF* 基因的克隆

根据虾夷扇贝外套膜 cDNA 文库中 *LITAF* 的 EST 序列(GenBank 登录号: GR867954), 利用 FastPCR 软件设计 3'Race 特异性引物 *LITAF*-F1 和 *LITAF*-F2(表 1), 以总 RNA 为模板, 按 3'Race 试剂盒说明步骤合成 3'RACE cDNA 第一链, 再以第一链为模板进行 3'Race PCR 扩增。PCR 产物经纯化后连接到 pMD19-T 载体上(TaKaRa), 转化感受态 DH5 α , PCR 检测阳性克隆后测序。反应条件为: 94 变性 3 min; 94 30 s, 57 30 s, 72 2 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min。根据 *LITAF* 的 mRNA 序列设计一对特异引物(引物信息见表 1), 以虾夷扇贝 DNA 为模板扩增 *LITAF* 基因的内含子序列, 上游引物位于 5'非编码区内, 下游引物位于 3'非编码区内。PCR 程序为: 94 变性 1 min; 98 10 s, 68 15 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 对目的条带进行回收并测序。

1.2.3 统计分析

利用蛋白质亚细胞定位服务器(<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>)对蛋白质进行定位, 信号肽预测使

用 SignalP 3.0 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 利用 NCBI 在线软件 BLAST 进行序列比对。

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 统计数据以平均数 \pm 标准差表示。组间差异采用单因素方差(one way ANOVA)分析, 两组比较采用 Student t-test 进行分析。 $P < 0.05$ 代表差异显著, $P < 0.01$ 代表差异极显著。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

提取虾夷扇贝血、外套膜、肝胰脏、闭壳肌、腮和肾 6 种组织的总 RNA 和受精卵、多细胞、膜内转、担轮、D 形期、壳顶期和稚贝期等 7 个发育阶段的总 RNA, 反转录 cDNA 作为实时荧光定量 PCR 的模板。挑选健康的虾夷扇贝成体, 分成实验组和对照组, 实验组体腔注射浓度为 5×10^7 CFU/mL 的鳗弧菌菌液 0.5 mL, 对照组体腔注射 0.5 mL 无菌海水, 分别采集 0、3、6、9、12、24、36 h 实验组和对照组血淋巴样本, 提取其 RNA 并反转录得到 cDNA 模板。

根据 3' RACE 扩增得到的 cDNA 全序列设计一对荧光定量引物 QLITAF-F 和 QLITAF-R, 以 β -actin 为内参照(引物信息见表 1)。采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara)染料, 使用 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪进行定量分析。PCR 扩增反应总体积为 15 μ L, 包括 $2 \times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 7.5 μ L, ROX II 0.1 μ L, 正反向引物各 0.3 μ L, 模板 cDNA 1.5 μ L, 超纯水 5.3 μ L。扩增程序为: 95 预变性 30 s; 95 10 s, 59 25 s, 72 25 s, 40 个循环。实验重复 3 次, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算结果, 观察虾夷扇贝 *LITAF* 的表达情况。

表 1 *LITAF* 基因序列扩增和实时荧光定量 PCR 所用的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
LITAF-F1	GCAAACAATCTGGACCAGCAGTG	cDNA 3'Race
LITAF-F2	TTCAGTGATGACACATTGTGGAG	
LITAF-F3	CACCAATCTTTGTCAGTGCTCTAG	扩增内含子
LITAF-R1	CCTAATCCCTCAAGGAATGAAGC	
QLITAF-F	ATCAGCACAGCCCTGGAATACG	实时荧光定量 PCR
QLITAF-R	CACTTGTGCTGGACATCAGACAG	
Q β -actin F	AGTCCCAATCTACGAAGGTTATG	内参基因
Q β -actinR	CCAGTGATGAGGAGGAAGCAG	

2 结果与分析

2.1 虾夷扇贝 *LITAF* 基因 cDNA 序列

根据虾夷扇贝 *LITAF* 基因 EST 序列设计特异性引物, 通过 3'RACE PCR 的方法获得其 cDNA 全长 (GenBank 登录号: JF708046), 共包含 1 551 bp, 其编码区为 474 bp, 编码 157 个氨基酸。该序列 5'非编码区为 76 bp, 3'非编码区为 1 001 bp, 包含 4 个 mRNA 末端不稳定信号 (ATTTA) 和两个加尾信号 (AATAAA), 序列末端含有典型的 polyA 尾。*LITAF* 基因序列为 3 698 bp, 由两个内含子和 3 个外显子组成, 两个内含子分别为 1 902 bp 和 245 bp, 所有外显子-内含子边界符合 GT-AG 规则。

2.2 氨基酸序列分析

利用生物信息学分析编码的多肽, 得知该多肽的理论分子量为 16.9872 kDa, 等电点为 6.24, 未发现信号肽存在, 氨基酸序列定位结果显示该蛋白位于细胞核中的可能性是 65.2%, 位于线粒体中的可能性是 13%, 位于其他细胞器中的可能性较小。

虾夷扇贝 *LITAF* 的氨基酸序列与其他物种进行序列相似性比较, 结果发现, 与鲍鱼 (*Haliotis diversicolor supertexta*) *LITAF* 的相似性为 57%, 与斑马鱼 (*Danio rerio*)、家鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) *LITAF* 的相似性分别为 49%、47%、45%, 与栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 和文蛤 (*Meretrix meretrix*) *LITAF* 的相似性均为 44%。

2.3 *LITAF* 基因的表达

2.3.1 *LITAF* 基因在 6 种组织的表达情况

利用实时荧光定量 PCR 检测 *LITAF* mRNA 在成年虾夷扇贝血、腮、肾、外套膜、闭壳肌、肝胰脏 6 种正常组织中的表达情况, 结果显示 *LITAF* mRNA 在 6 种组织中均可见不同丰度的表达。以血细胞中 β -actin 标准化后的表达量为内参照, 比较结果发现, *LITAF* 基因在血细胞中的表达量最低, 肾脏中的表达量最高 (图 3)。

2.3.2 *LITAF* 基因在不同发育时期的表达

利用实时荧光定量 PCR 检测 *LITAF* 在受精卵、多细胞、膜内转、担轮、D 形、壳顶期及稚贝 7 个时期中的表达情况, 结果显示 *LITAF* 基因在 7 个发

育时期中均可见表达, 在担轮幼虫期表达量最高, 其次是稚贝、D 形幼虫时期和多细胞时期, 壳顶期幼虫的表达量与受精卵时期的表达量基本相同 (图 4)。

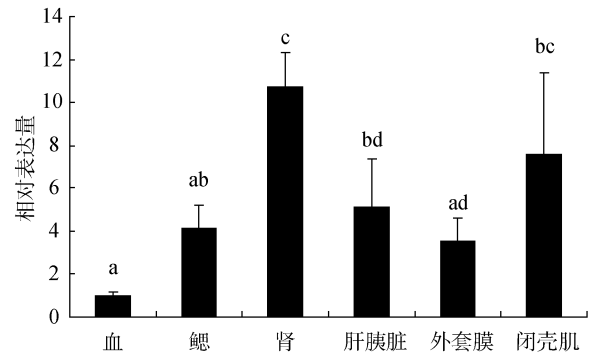


图 3 *LITAF* 在虾夷扇贝各组织中的相对表达情况

不同组织间的显著差异用字母 a、b、c、d 表示, 组间含有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 组间不含相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

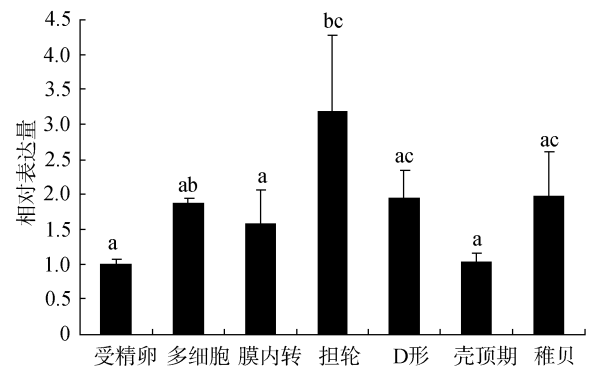


图 4 *LITAF* 在虾夷扇贝不同发育时期的相对表达情况

不同组织间的显著差异用字母 a、b、c 表示, 组间含有相同字母表示差异不显著, 组间不含相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3.3 *LITAF* 基因在鳃弧菌刺激后的表达

实时荧光定量 PCR 检测虾夷扇贝在人工感染鳃弧菌后不同时间点的表达结果发现 (图 5), 随着感染时间的延长, *LITAF* 基因表达量不断变化, 与对照组相比, 实验组在 12 h 和 36 h 的表达量有着明显的提高, 而在 36 h 的相对表达量达到最高, 是其对照组的 2 倍 ($P < 0.01$)。

3 讨论

细胞因子是免疫系统的重要调节因子, 也是哺乳动物先天免疫系统的重要组成部分。哺乳动物细

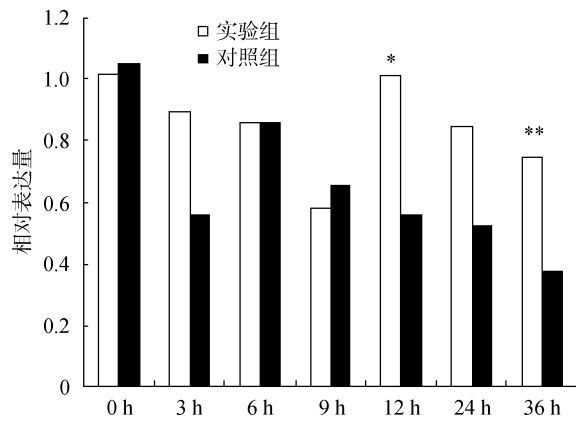


图 5 鳃弧菌刺激后不同时间虾夷扇贝血 *LITAF* 的相对表达情况

*表示显著 $P < 0.05$; **表示极显著 $P < 0.01$ 。

胞因子目前被广泛研究,但是在软体动物中却少有相关报道。*LITAF* 是一类重要的炎症细胞因子,它通过与 *STAT6(B)*结合来调节 *TNF- α* 的转录^[14]。

通过与其他已知物种比对发现,虾夷扇贝 *LITAF* 的氨基酸序列与他们具有较高的序列相似性^[10-13],并且都具有高度保守的 *LITAF* 结构域。*LITAF* 结构域由 N 端的 *CXXC* 区、25 个氨基酸长的疏水区和 C 端(H)*XCXXC* 区组成,疏水区插入到细胞膜中,将 N 端和 C 端的 *CXXC* 区域结合在一起,形成紧密结合的 Zn^{2+} 结构^[17]。

LITAF 基因在外周血细胞、淋巴结和脾等淋巴组织中均有不同程度的表达,在非淋巴器官中也有表达^[14,18]。本研究中 *LITAF* 在虾夷扇贝所有被检测组织中均有表达,肾脏中表达量最高,这与 *LITAF* 基因在栉孔扇贝和文蛤中的组织分布情况有所不同,二者的最高表达量分别发生在性腺和鳃^[11,19],表明 *LITAF* 虽然可以在不同组织中表达但表达的水平会随物种的不同而不同。与其他已知物种研究相比,本研究采样增加了肾脏组织,推断肾脏可能在无脊椎动物先天性免疫方面起到重要作用。

担轮幼体是贝类胚胎发育过程中一个重要的过渡期,同时也是一个变态发育时期,在其之前是不具有贝壳的原肠胚时期,在其之后是顶端含有较短鞭毛且具有贝壳的 D 型幼体时期^[20]。本研究结果显示, *LITAF* 表达量在担轮幼体中最高,也就是在幼体的变态阶段表达量最高,这可能是虾夷扇贝担轮幼体时期极易受到病原菌的侵害,故免疫基因

LITAF 的表达量有所提高。贝类的免疫反应包括细胞免疫和体液免疫,主要是靠血淋巴细胞来完成,血细胞在双壳类动物先天性免疫系统起重要作用^[1,21,22],经常作为研究免疫相关基因的组织材料^[19,23]。本研究结果显示,菌刺激可诱导 *LITAF* 基因的表达,血细胞中 *LITAF* 基因的表达量随着菌刺激时间的变化而变化。

参考文献(References):

- [1] Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Zhang SM, Kepler TB. Invertebrate immune systems - not homogeneous not simple, not well understood. *Immunol Rev*, 2004, 198(1): 10-24.
- [2] Chappell VL, Le LX, LaGrone L, Mileski WJ. STAT proteins play a role in tumor necrosis factor alpha gene expression. *Shock*, 2000, 14(3): 400-403.
- [3] Marrack P, Kappler J. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature*, 1988, 332(6167): 840-843.
- [4] 向萍霞, 李艳, 张平安. 冠心病患者 *TNF- α* 水平及其基因多态性的研究. *遗传*, 2004, 26(6): 807-810.
- [5] Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*, 1996, 334(26): 1717-1725.
- [6] García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor α from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics*, 2002, 54(3): 200-207.
- [7] Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(3-4): 185-191.
- [8] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 2005, 115(1): 1-20.
- [9] Tang XR, Fenton MJ, Amar S. Identification and functional characterization of a novel binding site on *TNF- α* promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 4096-4101.
- [10] Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Park DW, Lillehoj EP. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced *TNF- α* factor (*LITAF*). *Dev Comp Immunol*, 2006, 30(10): 919-929.
- [11] Yu YD, Qiu LM, Song LS, Zhao JM, Ni DJ, Zhang Y. Molecular cloning and characterization of a putative

- lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 23(2): 419–429.
- [12] Park EM, Kim YO, Nam BH, Kong HJ, Kim WJ, Lee SJ, Kong IS, Choi TJ. Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(1): 11–17.
- [13] Zhang DC, Jiang JJ, Jiang SG, Ma JJ, Su TF, Qiu LH, Zhu CY, Xu HP. Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF-alpha factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(3): 391–396.
- [14] Tang XR, Marciano DL, Leeman SE, Amar S. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF alpha factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(14): 5132–5137.
- [15] Nagashima K, Sato M, Kawamata K, Nakamura A, Ohta T. Genetic structure of Japanese scallop population in Hokkaido, analyzed by mitochondrial haplotype distribution. *Mar Biotechnol*, 2005, 7(1): 1–10.
- [16] 刘卫东, 鲍相渤, 宋文涛, 周遵春, 赫崇波, 虞星炬. 虾夷扇贝遗传连锁图谱的初步构建. *遗传*, 2009, 31(6): 629–637.
- [17] Ponting CP, Mott R, Bork P, Copley RR. Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome Res*, 2001, 11(12): 1996–2008.
- [18] Bolcato-Bellemin AL, Mattei MG, Fenton M, Amar S. Molecular cloning and characterization of mouse LITAF cDNA: role in the regulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression. *J Endotoxin Res*, 2004, 10(1): 15–23.
- [19] Li HJ, Yang Q, Gao XG, Su H, Wang J, He CB. Identification and expression of a putative LPS-induced TNF- α factor from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix*. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 865–871.
- [20] Culliney JL. Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Biol Bull*, 1974, 147(2): 321–332.
- [21] Lacoste A, De Cian MC, Cueff A, Poulet SA. Noradrenaline and alpha-adrenergic signaling induce the *hsp70* gene promoter in mollusc immune cells. *J Cell Sci*, 2001, 114(19): 3557–3564.
- [22] Lacoste A, Cueff A, Poulet SA. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate β -adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *J Cell Sci*, 2002, 115(4): 761–768.
- [23] Shan ZG, Li HJ, Bao XB, He CB, Yu HN, Liu WD, Hou L, Wang J, Zhu D, Sui LJ, Zhu B, Li YF. A selenium-dependent glutathione peroxidase in the Japanese scallop, *Mizuhopecten yessoensis*: cDNA cloning, promoter sequence analysis and mRNA expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2011, 159(1): 1–9.