

厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的 cDNA 基因的克隆与序列分析

廖智, 刘梅, 王日昕, 武梅, 杨丽佳, 鲁涛, 徐田军, 石戈*

(浙江海洋学院海洋科学学院, 海洋生物资源和分子工程实验室, 浙江舟山 316004)

摘要: 抗菌肽是贻贝免疫系统中的一个重要组成部分,也是目前海洋生物抗菌肽研究的重要内容。在贻贝抗菌肽家族中,mytilin 和 myticin 是目前贻贝抗菌肽研究中发现成员最多,丰度最高的两个家族,在贻贝免疫系统中占有重要的地位。为了解厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的基因组成及其多样性机制,通过设计特异性引物,以厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增以筛选文库,共克隆到 8 条 mytilin 的同源 cDNA 序列和 9 条 myticin 的同源 cDNA 序列,并对其基因序列及推导的氨基酸序列进行了序列比对和变异位点初步分析。上述研究为将来深入研究厚壳贻贝的免疫机制及筛选具有开发价值的抗菌肽分子奠定了理论基础。

关键词: 厚壳贻贝; 抗菌肽; mytilin; myticin; cDNA

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

贻贝属于软体动物门,双壳纲,翼形亚纲,贻贝目,其本身缺乏类似于高等脊椎动物那样的特异免疫系统,但其体内富含各种具有杀菌活性的多肽成分(抗菌肽),这些抗菌肽构成了贻贝的天然防御屏障,其特殊的结构与高效的抗菌功能使其具有重要的理论研究价值和开发前景,是目前海洋生物抗菌肽研究的重要对象^[1]。

目前从 NCBI 数据库中搜索到的贻贝抗菌肽蛋白序列和基因序列可归纳为 4 个家族,分别为 mytilin, myticin, MGD 和 mytimycin^[2-6],主要分离自地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和紫贻贝(*Mytilus edulis*)。在贻贝抗菌肽家族中,mytilin 和 myticin 是目前贻贝抗菌肽研究中发现成员最多,丰度最高的两个家族,在贻贝防御系统中占有重要的地位^[1,7]。目前已从不同物种的贻贝中分离纯化到 5 种 mytilin 分子(mytilin A, B, C, D 和 G1)^[2-3],3 种 myticin 分子(myticin A, B 和 C)^[6,8]。上述抗菌肽分子均呈现出明显的分子多样性现象,其中,Parisi 等^[9]在地中海贻贝 mytilin B 的 mRNA 的基因多态性研究中,通过

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)检测到单个体贻贝中 mytilin B 分子的 mRNA 种类可以达到 10 种;此外, Pallavicini 等^[10]也在地中海贻贝的单个体贻贝中检测到 myticin C 的 mRNA 的数量多达 24 种,目前,在 NCBI 中进行同源检索发现相关 myticin 序列达到 107 条。大量研究表明,mytilin 和 myticin 分子在贻贝中存在明显的基因多样性现象,而且这两类抗菌肽分子具有较快的进化速率,使贻贝具备抵御不同环境和不同微生物侵袭的能力^[8-10]。因此,对这两类抗菌肽分子的研究有助于人们深入了解贻贝的抗菌肽的分子多样性及其进化机制,同时也有助于人们从这两类分子中筛选具有应用价值的抗菌肽分子。

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)是我国具有重要经济价值的养殖贝类,对其血清中的抗菌肽研究目前尚不多见。在前期研究中,我们曾对厚壳贻贝血清中的抗菌肽分子进行了初步分析并获得了 2 种 mytilin 分子的 cDNA 的序列(Genebank 检索号:FJ973154 和 FJ973155)^[11]。为进一步研究厚

收稿日期:2010-03-22 修回日期:2010-04-03

资助项目:国家科技支撑计划(2007BAD43B08);农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室开放课题(开-09-10);浙江省科技厅重大项目(2007C02001);浙江省科技厅面上科研农业项目(2008C22026,2009C32016);舟山市科技局项目(Y20082080);浙江省大学生科技创新项目;浙江省大学生创新创业孵化项目

通讯作者:石戈,E-mail:shige2046312@163.com

壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 家族的 cDNA 基因序列及其分子多样性机制,我们以厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库为模板,通过设计特异性引物进行 PCR,以筛选 mytilin 和 myticin 抗菌肽 cDNA 基因并进行序列分析。通过上述方法,从厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库中分别克隆到 8 条 mytilin 和 9 条 myticin 的新 cDNA 基因序列,并对其进行了序列分析。上述研究将有助于了解厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的分子多样性机制,并为将来深入研究厚壳贻贝的免疫机制以及从中筛选具有开发价值的抗菌肽分子奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 成年厚壳贻贝采自浙江舟山海域,在通氧条件下饲养于装有洁净海水恒温水族箱里(18~20℃)。

试剂 *Taq* DNA Polymerase、dNTP、pMD19-T 为 TaKaRa 公司产品;5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Ampicillin)购自上海捷瑞公司;胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)为 OMEGA 公司产品,其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。实验用去离子水由 Millipore synergy 纯水系统(美国 Millipore 公司)制取。

1.2 实验方法

厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 的基因克隆 在前期工作中利用 Invitrogen 公司的 Super Script™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning 试剂盒成功构建厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库^[12]。

根据前期所克隆得到的厚壳贻贝 mytilin 的 cDNA 序列(Genebank 登录号:FJ973154 和 FJ973155)的 3'端非翻译区保守序列设计下游引物[mytilinR:5'-CA(G/A)G(G/T)TCATCATCACTTC-3'],上游引物用文库载体特异引物(SP6:ATTTAGGTGACACTATA),以厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库为模板,进行 PCR 扩增以从中筛选厚壳贻贝血细胞抗菌肽 mytilin 基因,体系如下:10×Easy *Taq* Buffer 5 μL;10 mmol/L dNTP 1 μL;10 μmol/L SP6 1 μL;10 μmol/L mytilin R 1 μL;5 U/μL DNA Polymerase 0.5 μL;模板:3 μL;用水补足 50 μL。反应条件如下:94℃预变

性 3 min;PCR 设 35 个循环:94℃,30 s;54℃,30 s;72℃,1 min。最后 72℃延伸 7 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段用胶回收试剂盒纯化后,与 pMD19-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,利用引物对 SP6/mytilinR 进行菌落 PCR 鉴定后,送上海英骏生物公司测序。

厚壳贻贝抗菌肽 myticin 的基因克隆 根据从 NCBI 中搜索到的地中海贻贝 myticin 的基因序列(GenBank 登录号:AF162335 和 AF162334)中的保守区域设计上游引物(myticin2F:5'-CAAACGTACAACATGA-AGG-3'),下游引物为载体特异性引物(T7:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'),克隆、筛选及测序方法同厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 的基因克隆。

序列处理与分析 测序结果经去除载体序列和引物序列后,利用 Lasergene v7.1 软件中的 EditSeq 模块进行开放阅读框(open reading frame,ORF)分析;信号肽用 SignalP 3.0 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测^[13];成熟肽分子量及等电点利用在线软件(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行计算;序列在线 BLAST 同源检索在 NCBI 中进行(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);序列比对分析采用 MEGA 4.0 软件中 Clustal W 模块进行^[14],同时对 mytilin ORF 和 myticin ORF 构建 Nj 系统进化树,以 Bootstrap 方法对构建的进化树进行评估^[14]。

2 结果

2.1 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的基因克隆

分别用引物对 SP6/mytilinR 和 myticin2F/T7,以构建好的厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增筛选,扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测,结果如图 1 所示。扩增片段大小分别约为 500 bp(mytilin)和 750 bp 单一条带(myticin),和预期的 mytilin 及 myticin 的 cDNA 长度一致。

2.2 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的 cDNA 序列分析

图 1 中获得的的目的片段经胶回收、载体连接及转化后,筛选阳性克隆测序。共获得 107 个测序结果,其中 mytilin 的 cDNA 基因序列 74 个,去除冗

余序列后共 8 条 mytilin,分别命名为 mytilin-1 ~ mytilin-8(其中,mytilin-1,3,4的克隆数分别为34,

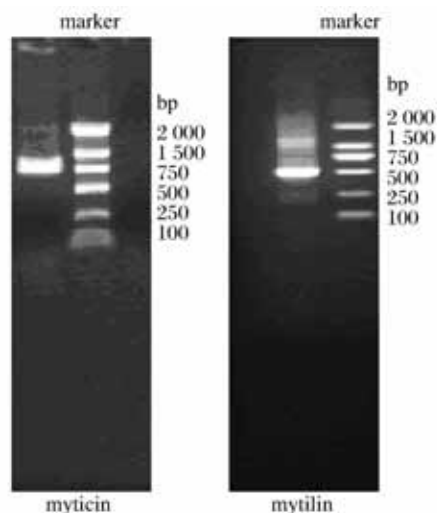


图 1 Mytilin 和 myticin 的 PCR 产物电泳结果

Fig.1 PCR amplification profile of mytilin (right panel) and myticin(left panel)

11,18 个,其他 5 条 mytilin 的克隆数为 1 ~ 5 个不等。);myticin 的 cDNA 基因 33 个,去除冗余序列后共 9 条 myticin,分别命名为 myticin-1 ~ myticin-9(其中,myticin-1,4 的克隆数分别为 15 和 6 个,其余 7 条 myticin 的克隆数为 1 ~ 2 个不等)。所有序列经软件分析得到 ORF,提交 NCBI 数据库,获得 GenBank 登录号分别为 GU324718 ~ GU324723 (mytilin3 ~ 8) 和 GU324724 ~ GU324732(myticin1 ~ 9)。

图 2 为厚壳贻贝 mytilin 分子 8 条 cDNA 基因的 ORF 序列的比对结果。对于厚壳贻贝的 8 条 mytilin 的 ORF 序列,mytilin-1,3 和 5 ORF 全长为 306bp,mytilin-2,4,6,7 和 8 全长为 312 bp;其中,信号肽区域均为 66 bp,推导的成熟肽区域均为 102 bp,而成熟肽后区域(COOH-terminus)有所差别(mytilin-1,3 和 5 的成熟肽后区域为 138 bp,mytilin-2,4,6,7 和 8 的成熟肽后区域为 144 bp)。

GeneBank 登录号		
mytilin-1	FJ973154	ATGAAGGTAG CAATTATICT GGCTATTGCT CTTCAGTAC TICTTATAGT TCATGAATCA GATGCAAGTT GTGCTTCC
mytilin-2	FJ973155 A GC .. C . C . GG A
mytilin-3	GU324718 A GC .. C . C . GG A
mytilin-4	GU324719 A GC .. C . C . GG A
mytilin-5	GU324720 A GC .. C . C . GG A
mytilin-6	GU324721 A GC .. C . C . GG A
mytilin-7	GU324722 A GC .. C . C . GG A
mytilin-8	GU324723 A GC .. C . C . GG A
mytilin-1	FJ973154	AGATGTAATAA GTCGTGTAG AGCCAGACGC TGTAAAGTT ATCCGGCAGT CAGTTTGGG AGACGATGA TCTGCAAA
mytilin-2	FJ973155	GT G CC .. C .. A GG .TA .. T .T .. TTC .A .C .T .G .G . T . CT .A G.
mytilin-3	GU324718 A A
mytilin-4	GU324719	GTG G CC .A . C . A GG .TA .. T .T .. TTC .A .C .T .G .G . T . CT .A G.
mytilin-5	GU324720 G
mytilin-6	GU324721	GTG G CC .A . C . A GG .TA .. T .T .. TTCCA .C .T .G .G . T . CT .A G.
mytilin-7	GU324722	GTG G CC .A . C . A GG .TA .. T .T .A .TTC .A .C .T .G .G . T . CT .A G.
mytilin-8	GU324723	GTG G CC .A . C . A GG .TA .. T .T .. TTC .A .C .T .G .G . T . CT .A G.
mytilin-1	FJ973154	IGTITCCGII GTGCCAGTGA GCATAACATG AAATTCCCTG AAAATGAAGG ATCAACTC—AGATGI ITCCACAG
mytilin-2	FJ973155	... C .T T .A .CT TCTG
mytilin-3	GU324718
mytilin-4	GU324719	... C .T T .A .CT TCTG
mytilin-5	GU324720
mytilin-6	GU324721	... C .T T .A .CT TCTG
mytilin-7	GU324722	... C .T T .A .CT TCTG
mytilin-8	GU324723	... CCT T .A .CT TCTG
mytilin-1	FJ973154	ATAAATGACA ATGAGGACAC TGAACCTCCC CAGGATATTC CGAAAGGACA CACCGATCAA GGTGAAACTG GCATGTAA
mytilin-2	FJ973155	.G AA .. GC .. TT C .C .AA G .A G A A .T
mytilin-3	GU324718 G
mytilin-4	GU324719	.G AA GC .. TT C .C .AA A .A G A A .T
mytilin-5	GU324720
mytilin-6	GU324721	.G AA GC .. TT C .C .AA A .A G A A .T
mytilin-7	GU324722	.G AA GC .. TT C .C .AA G .A G A A .T
mytilin-8	GU324723	.G AA GC .. TT C .C .AA G .A G A A .T

图 2 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 的 cDNA 序列比对

信号肽区域以下划线标注;推导成熟肽区域用灰色底纹显示;相同核苷酸以“.”标注;“-”代表序列中的空格。

Fig.2 Alignment of mytilin cDNAs from *M. coruscus*

The underline shows signal peptide region, the part in shade represents mature peptide region, followed by COOH-terminus region. Identity is indicated by dots, gaps used to maximize the alignment are shown by dashes.

序列比对结果表明,在厚壳贻贝 8 条 mytilin ORF 序列中,共存在 70 个变异位点。其中,信号

肽区域存在 8 个变异位点,成熟肽序列和成熟肽后序列分别存在 36 和 26 个变异位点。

图3为厚壳贻贝 myticin 分子的 ORF 序列比对图,9条 myticin ORF 序列全长均为 291 bp,其中,信号肽区域均为 60 bp,成熟肽区域均为 120 bp,成熟肽后区域均为 111 bp。序列比对结

果表明,在全长 ORF 中,共存在 88 个变异位点,其中,信号肽区域含 9 个变异位点,而成熟肽区域和成熟肽后区域分别含 46 和 33 个变异位点。

GeneBank 登录号		ATGAAGGCAA CAATCTTGT AGCGGTGTG GTGGCAGTCT TTGTCGCAGG TACGGAAGCT CATTGCGATG CTT																		
myticin-1	GU324724	ATGAAGGCAA	CAATCTTGT	AGCGGTGTG	GTGGCAGTCT	TTGTCGCAGG	TACGGAAGCT	CATTGCGATG	CTT											
myticin-2	GU324725
myticin-3	GU324726
myticin-4	GU324727
myticin-5	GU324728
myticin-6	GU324729
myticin-7	GU324730
myticin-8	GU324731
myticin-9	GU324732
		ECGCAATCGTA CTACTGTAGC AAGTCTGTG GGACTGCTAG TTGCACACAT TACTTATGCC GAGTACTTCA TCC																		
myticin-1	GU324724	ECGCAATCGTA	CTACTGTAGC	AAGTCTGTG	GGACTGCTAG	TTGCACACAT	TACTTATGCC	GAGTACTTCA	TCC											
myticin-2	GU324725
myticin-3	GU324726
myticin-4	GU324727
myticin-5	GU324728
myticin-6	GU324729
myticin-7	GU324730
myticin-8	GU324731
myticin-9	GU324732
		EGGGAACCT TCGCTGTG TTAATTCAG CAGGTAATAA AATCCTTCA GAGCTACTCA AGATGCTAAA AGT																		
myticin-1	GU324724	EGGGAACCT	TCGCTGTG	TTAATTCAG	CAGGTAATAA	AATCCTTCA	GAGCTACTCA	AGATGCTAAA	AGT											
myticin-2	GU324725
myticin-3	GU324726
myticin-4	GU324727
myticin-5	GU324728
myticin-6	GU324729
myticin-7	GU324730
myticin-8	GU324731
myticin-9	GU324732
		ATTAACGAAT TGGATTACAC TCCACTAATG AAGTCGATGG AAAATTTGGA CAACGGAATG GATATGTTAT AA																		
myticin-1	GU324724	ATTAACGAAT	TGGATTACAC	TCCACTAATG	AAGTCGATGG	AAAATTTGGA	CAACGGAATG	GATATGTTAT	AA											
myticin-2	GU324725
myticin-3	GU324726
myticin-4	GU324727
myticin-5	GU324728
myticin-6	GU324729
myticin-7	GU324730
myticin-8	GU324731
myticin-9	GU324732

图3 厚壳贻贝 myticin 的 cDNA 序列比对

相同核苷酸以“.”标注;信号肽区域以下划线标注;推导成熟肽区域以灰色底纹显示。

Fig. 3 Alignment of myticin cDNAs from *M. coruscus*

The underline shows signal peptide region, the part in shade represents mature peptide region, followed by COOH-terminus region. Identity is indicated by dots.

2.3 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的推导氨基酸序列分析

所得 ORF 序列经 Lasergene v7.1 软件中的 EditSeq 模块翻译成前体肽,通过 SignalP 3.0 在线软件进行信号肽预测后,对所得成熟肽序列进行分子量和等电点计算,结果分别见图 4(mytilin)和图 5(myticin)。

图 4 为厚壳贻贝 mytilin 推导成熟肽序列经在线 Blast 搜索后的序列比对,8 条 mytilin 成熟肽分子量在 4 ku 左右,均由 34 个氨基酸残基组成,其序列中富含碱性氨基酸($pI > 9.45$)。其中,在含 34 个氨基酸的成熟肽中,18 个位点是一致的,16 个位点发生了氨基酸取代。以厚壳

贻贝 mytilin 的 cDNA 所编码的抗菌肽成熟肽部分氨基酸序列为模板,使用 NCBI BLAST 中的 blastp 程序对上述序列进行同源性检索,结果发现在 8 条 mytilin 成熟肽序列中,mytilin-1,3 和 5 与地中海贻贝 mytilin D 的成熟肽序列相似性较高(69%~72%);而 mytilin-2,4,6,7 和 8 与地中海贻贝 mytilin B 的成熟肽序列相似性较高(69%~88%)。

图 5 为厚壳贻贝 myticin 推导成熟肽序列经在线 Blast 搜索后的序列比对图。如图 5 所示,厚壳贻贝的 9 条 myticin 的成熟肽分子量在 4.3 ku 左右,由 40 个氨基酸组成,其序列中同样富含碱性氨基酸($pI > 8.1$)。其中,在含 40 个氨基酸的

成熟肽中,21 个位点是一致的,19 个位点发生了氨基酸取代。将厚壳贻贝 myticin 所编码的抗菌肽成熟肽部分氨基酸序列进行 blast 搜索发现,在 9 条 myticin 成熟肽序列中,myticin-1,2,3,4,6,7,8 与地中海贻贝的 myticin B 序列相似性较高(80%~87%);而 myticin-5,9 与地中海贻贝的

myticin C 序列相似性均为 87%。

以上通过对 mytilin 和 myticin 成熟肽序列变异位点的分析,发现,虽然二者都存在高的氨基酸取代位点,但是,贻贝抗菌肽所具有的一致性特点,即半胱氨酸的数量和位置并没有因突变位点的存在而发生改变。

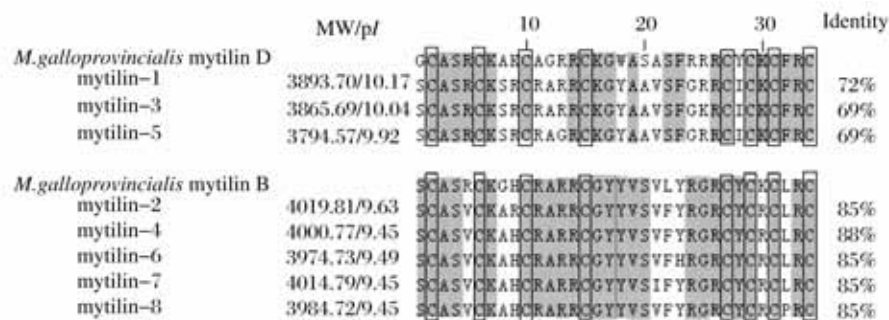


图 4 厚壳贻贝 mytilin 推导成熟肽序列经在线 Blast 搜索后的序列比对图

相同氨基酸用灰色底纹显示,8 个半胱氨酸以矩形框标注。

Fig. 4 Alignment of deduced mature peptides of mytilin from *M. coruscus* with mytilin from other *Mytilus*

Identical residues are highlighted by gray and cysteines are boxed with the consensus cysteine array.

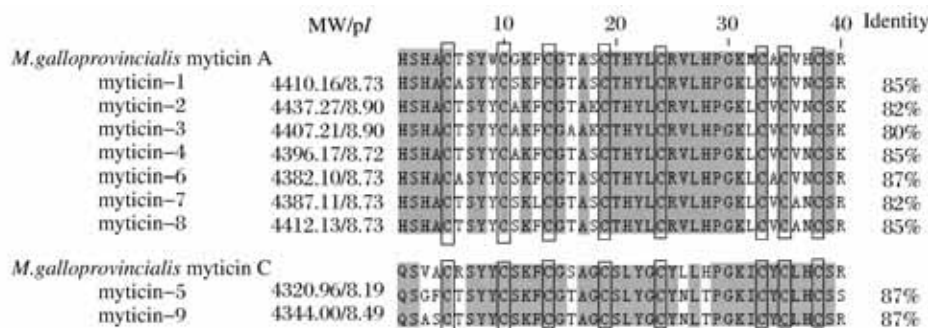


图 5 厚壳贻贝 myticin 推导成熟肽序列经在线 Blast 搜索后的序列比对图

相同氨基酸用灰色底纹显示,8 个半胱氨酸以矩形框标注。

Fig. 5 Alignment of deduced mature peptide of myticin from *M. coruscus* with myticin from other *Mytilus*

Identical residues are highlighted by gray and cysteines are boxed with the consensus cysteine array.

2.4 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的系统进化分析

因本次试验所获得的厚壳贻贝的 mytilin 和 myticin 分别与地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*) 的 mytilin 和 myticin 具有较高的序列相似性,因此,在构建进化树过程中,以本次试验中新获得的厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 基因并结合其他物种的同源序列(前者结合 *M. galloprovincialis* 的 mytilin B, mytilin D 基因和 *M. trossulus* 的 mytilin C 基因;后者结合 *M. galloprovincialis* 的 myticin A, myticin B 和 myticin C 基因)构建了 Nj

系统进化树。结果分别如图 6 和图 7 所示。

图 6 为厚壳贻贝 mytilin 的进化树分析结果,结果表明本次试验所获得的厚壳贻贝 mytilin 同源 cDNA 基因可以分为两枝,其中 mytilin-1,3,5 和 *M. galloprovincialis* mytilin D (EU810204) 聚为一枝;而 mytilin-2,4,6,7,8 和 *M. galloprovincialis* mytilin B (AF162336) 聚为一枝后再与 *M. trossulus* mytilin C (AY730626) 聚为一大枝;说明本次试验中所获得的厚壳贻贝 mytilin 同源 cDNA 基因属于 mytilin B 和 mytilin D 两个亚家族。

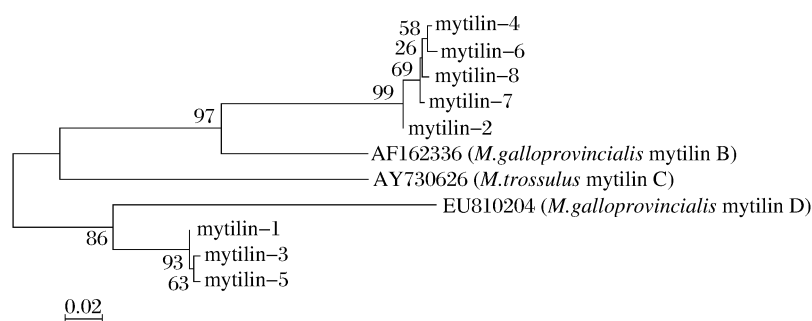


图6 利用 Nj 法绘制的厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和其他贻贝 mytilin 分子进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree of mytilin from *M. coruscus* compared with *M. galloprovincialis* mytilin B, mytilin D and *M. trossulus* mytilin C

图7为厚壳贻贝 myticin 的进化树,结果表明,本次试验所获得的厚壳贻贝的 myticin 同源 cDNA 基因明显分为两枝,即 myticin-5, 9 与 *M. galloprovincialis* myticin C (EU927425) 聚为一枝; myticin-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 与 *M. galloprovincialis*

myticin A (AF162334) 聚为一枝后再与 *M. galloprovincialis* myticin B (AF162335) 聚为一大枝。说明本次试验中所获得的厚壳贻贝 myticin 同源 cDNA 基因主要属于 myticin A 和 myticin C 两个亚家族。

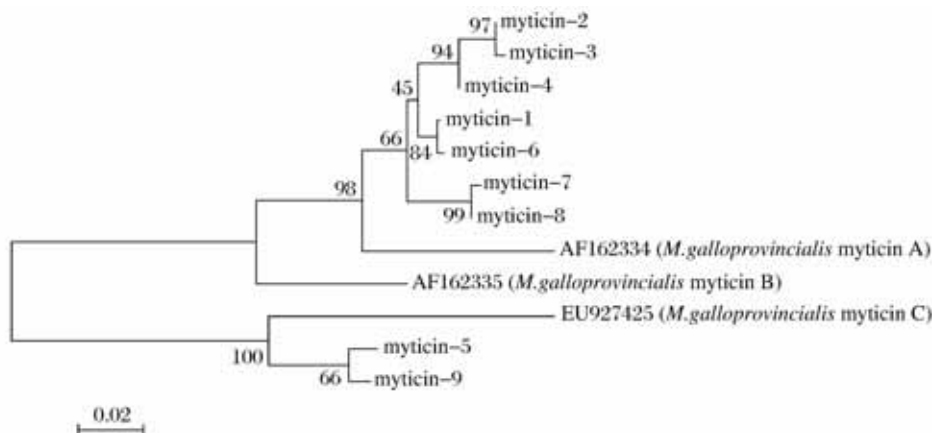


图7 利用 Nj 法绘制的厚壳贻贝抗菌肽 myticin 和其他贻贝 myticin 分子进化树

Fig. 7 The phylogenetic tree of myticin from *M. coruscus* compared with *M. galloprovincialis* myticin A, B and C

3 讨论

作为贻贝血清中丰度最高,成员最多的两种抗菌肽家族,mytilin 和 myticin 在贻贝的免疫系统中发挥着至关重要的作用,同时也是研究抗菌肽的抗菌机制和分子进化的好材料^[1]。目前从贻贝中分离到的 mytilin 根据其序列特征和来源种属分为 5 个亚家族,分别为 mytilin A, B, C, D 和 G1,其中 mytilin A 在 *M. edulis* 被发现^[2], mytilin B 在 *M. edulis* 和 *M. galloprovincialis* 中均有发现^[2-3], mytilin C 主要来自 *M. galloprovincialis* 和 *M. trossulus*^[3],而 mytilin D 和 G1 则主要发现于 *M.*

galloprovincialis^[3]。目前 myticin 基因家族鉴定到 3 个亚家族,分别为 myticin A, B 和 C,均在 *M. galloprovincialis* 中发现^[6,8]。

厚壳贻贝是我国东海海域重要的经济贻贝,关于其抗菌肽的报道目前尚不多见。为了解厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的序列特征及其分子多样性机制,我们利用两对引物 SP6/mytilinR 和 myticin2F/T7 从厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库中分别克隆了抗菌肽 mytilin 和 myticin 的 cDNA 基因,并获得了完整的 ORF。通过序列分析,共鉴定到 8 条 mytilin 和 9 条 myticin 的同源 cDNA 序列。根据序列特征以及进化树分析可将 mytilin

和 myticin 分别分为两个亚家族,即 8 条 mytilin 分为 mytilin D (mytilin-1, 3 和 5) 和 mytilin B (mytilin-2, 4, 6, 7 和 8) 两个亚家族; 9 条厚壳贻贝 myticin 可分为 myticin A (myticin-1, 2, 3, 4, 6, 7 和 8) 和 myticin C (myticin-5 和 9) 两个亚家族。通过序列搜索和比对分析发现, 本次研究中所克隆的厚壳贻贝 mytilin 和 myticin 序列分别与地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*) 的 mytilin 和 myticin 具有较高的序列相似性, 提示两种贻贝的抗菌肽可能来自同一祖先基因。本次研究中我们没有从厚壳贻贝 cDNA 文库中鉴定到 mytilin A, C 和 G1 以及 myticin C 亚家族成员, 推测有以下几种可能的原因: ① 不同亚家族的抗菌肽分子可能存在于不同种属的贻贝中; ② 某些抗菌肽亚家族在厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库中丰度太低, 以至于未能在本次研究中克隆到。

通过对厚壳贻贝两种抗菌肽家族的序列进行分析, 厚壳贻贝 8 条 mytilin 的成熟肽分子量在 4 ku 左右, 由 34 个氨基酸残基组成, 其序列中富含碱性氨基酸 ($pI > 9.45$), 同时, 序列中还含有 8 个半胱氨酸, 且位置非常保守, 其半胱氨酸排列模式为 $C_I X_3 C_{II} X_3 C_{III} X_4 C_{IV} X_{11} C_V X_1 C_{VI} X_1 C_{VII} X_2 C_{VIII}$ (其中 C 代表半胱氨酸, 罗马数字代表半胱氨酸在序列中的序号, X 代表非半胱氨酸, 数字代表氨基酸数目); 而厚壳贻贝的 9 条 myticin 的成熟肽分子量在 4.3 ku 左右, 由 40 个氨基酸组成, 其序列中同样富含碱性氨基酸 ($pI > 8.1$), 8 个保守的半胱氨酸的排列模式为 $C_I X_4 C_{II} X_3 C_{III} X_4 C_{IV} X_4 C_V X_8 C_{VI} X_1 C_{VII} X_2 C_{VIII}$ 。

通过分别比较上述两种厚壳贻贝抗菌肽基因家族的 cDNA 序列, 厚壳贻贝 mytilin 和 myticin 的变异位点主要发生在成熟肽区域和成熟肽后区域, 而信号肽区域则相对保守 (图 2 和图 3), 这种序列特征在地中海贻贝 mytilin B 及 myticin C 的 mRNA 序列中也有类似发现^[9]。其中, 信号肽区域涉及到抗菌肽的分泌机制, 因而具有较强的保守性; 而成熟肽后区域则在抗菌肽表达后会被剪切, 尽管成熟肽后区域在贻贝抗菌肽 cDNA 序列中存在的意义目前尚不清楚, 但其对抗菌肽的最终功能并没有影响^[3], 因此对其变异位点不是我们所关注的重点; 而成熟肽区域的变异则直接影响到抗菌肽的结构与功能, 因此受到人们的关注。厚壳贻贝 mytilin 和 myticin 的 cDNA 成熟肽区域

分别存在 36 个和 46 个变异位点, 分别涉及到 16 个和 19 个氨基酸残基的变化, 通过对氨基酸序列的分析, 我们发现, 半胱氨酸是非常保守的, 其数目和位置在厚壳贻贝 8 条 mytilin 及 9 条 myticin 中没有任何变化。此前对地中海贻贝 mytilin 的空间结构研究表明, mytilin 采取了典型的二硫键稳定的 α/β 结构, 其 8 个半胱氨酸形成 4 对二硫键 (Cys I -Cys V、Cys II -Cys VI、Cys III -Cys VII 和 Cys IV -Cys VIII), 通过 4 对二硫键稳定了 mytilin 的空间结构, 因此, 涉及到半胱氨酸的突变将严重影响 mytilin 的空间结构, 从而严重影响其抗菌功能, 这在进化上将是极为不利的^[15-16]。

通过对厚壳贻贝 8 条 mytilin 和 9 条 myticin 的推导成熟肽区进行序列分析, 我们发现, 除了半胱氨酸外, 部分碱性氨基酸也呈现非常保守的特征, 例如, 厚壳贻贝 8 条 mytilin 分子的推导成熟肽区域的 Lys7, Arg11, Arg14, Arg26 和 Arg33 是保守的 (图 4), 而 9 条 myticin 的推导成熟肽区域中, Lys12 和 Lys31 也是保守的 (图 5)。以往的研究表明, 多数抗菌肽分子都依赖于其碱性氨基酸与原核细胞富含酸性脂质从而带大量负电荷的细胞膜之间产生静电结合, 从而导致原核生物细胞膜的损伤而使抗菌肽发挥抗菌功能^[17-18], 这在贻贝 mytilin 分子的结构与功能的研究中也获得证实^[16]。因此, 我们推测, 厚壳贻贝 mytilin 和 myticin 分子中存在的保守性的碱性氨基酸可能与其抗菌功能存在关联; 同时, 在厚壳贻贝 mytilin 和 myticin 的成熟肽区域中也存在不少碱性氨基酸的突变位点, 例如 mytilin 分子中的 Arg5, Arg9, Arg13, Arg23, Arg24 和 Arg30 (图 4) 以及 myticin 分子中的 Lys18, Arg25 和 Arg40 等位点均存在变异现象 (图 5)。在此前的研究中, 人们发现贻贝抗菌肽 mytilin 家族中不同成员具有不同的抗菌谱, 例如, mytilin B、mytilin C 和 mytilin D 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制活性, mytilin G1 则只对革兰氏阳性菌有抗菌活性^[2], 而 mytilin B 和 mytilin D 还具有强的抗真菌活性^[3]。因此, 我们推测, 这一现象的产生机制可能在于不同的 mytilin 亚家族由于其序列中部分碱性氨基酸的变异而造成其抗菌谱的改变, 这对于抗菌肽的进化以及贻贝抵御不同环境下不同微生物的侵袭具有重要意义。

在厚壳贻贝 8 条 mytilin 分子的 cDNA 中, 不

同成员的克隆数是不一样的,在 74 个克隆中,mytilin-1,3 和 4 有 63 个,其他 5 种 mytilin 仅 11 个;而在 9 条 myticin 分子的 cDNA 的 33 个克隆中,myticin-1 和 4 有 21 个,其他 7 种 myticin 的克隆数仅 9 个。Parisi 等^[9]在对地中海贻贝 mytilin B 的研究中发现,虽然单个体贻贝的 mytilin B 的 mRNA 有 2~10 种,但编码的成熟肽的氨基酸序列和分子量却是唯一的。由于本次研究中所使用的厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库是混合文库,因此本实验中克隆到的 8 条 mytilin 序列和 9 条 myticin 序列的丰度差异是否来源于厚壳贻贝的个体差异尚需进一步实验证实。目前,关于贻贝抗菌肽分子多样性的形成机制尚不明确,但 Pallavicini 等^[10]在地中海贻贝抗菌肽 myticin C 的分子多样性研究中初步发现,地中海贻贝 myticin C 的序列多样性与贻贝的地理来源、年龄、性别和性腺的成熟程度没有关系,而与贻贝所处的生活环境有关。贻贝在其正常的生活过程中,会面临各种各样潜在的病原体,为了抵御这些病原体,贻贝在其进化选择过程中,逐渐形成了抗菌肽分子的高度多样性。关于厚壳贻贝抗菌肽分子多样性的形成机制,仍需进一步深入研究。上述研究结果为深入了解厚壳贻贝抗菌肽的组成以及分子多样性机制,并从中筛选和开发具有应用价值的抗菌肽分子奠定了基础。

参考文献:

- [1] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity[J]. FEBS Lett,2000,486(3):185-190.
- [2] Charlet M, Chernysh S, Philippe H, et al. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis*[J]. J Biol Chem,1996,271:21808-21813.
- [3] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, et al. Involvement of Mytilins in mussel antimicrobial defense[J]. J Biol Chem,2000,275(17):12954-12962.
- [4] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, et al. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge[J]. J Cell Sci, 1999, 112 (23): 4233-4242.
- [5] Mitta G, Hubert F, Dyrinda E A, et al. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis[J]. Dev Comp Immunol,2000,24(4):381-393.
- [6] Mitta G, Hubert F, Noë T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Eur J Biochem,1999,265(1):71-78.
- [7] Mitta G, Vandenbulcke F, Noë T, et al. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel[J]. J Cell Sci,2000,113(15):2759-2769.
- [8] Padhi A, Verghese B. Molecular diversity and evolution of myticin-C antimicrobial peptide variants in the *Mediterranean mussel*, *Mytilus galloprovincialis* [J]. Peptides,2008,29:1094-1101.
- [9] Parisi M G, Li H, Toubiana M, et al. Polymorphism of mytilin B mRNA is not translated into mature peptide[J]. Mol Immunol,2009,46(3):384-392.
- [10] Costa M M, Dios S, Alonso-Gutierrez J, et al. Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. Dev Comp Immunol,2009,33:162-170.
- [11] 王日昕,刘梅,廖智,等. 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 的初步鉴定[J]. 水产学报,2010,34(1):153-159.
- [12] 王日昕,廖智,刘梅,等. 厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库的构建及部分 EST 序列分析[J]. 海洋与湖沼,2009,40(5):603-607.
- [13] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides; SignalP 3.0 [J]. J Mol Biol,2004,340(4):783-795.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution,2007,24(8):1596-1599.
- [15] Roch P, Yang Y, Toubiana M, et al. NMR structure of mussel Mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides [J]. Dev Comp Immunol,2008,32(3):227-238.
- [16] Romestand B, Molina F, Richard V, et al. Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity [J]. Eur J Biochem,2003,270(13):2805-2813.
- [17] Brogden K A, de Lucca A J, Bland J, et al. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica* [J]. Proc Natl Acad Sci,1996,93(1):412-416.
- [18] McPhee J B, Hancock R E W. Function and therapeutic potential of host defence peptides [J]. J Peptide Sci,2005,11(11):677-687.

cDNA clone and sequence analysis of mytilin and myticin from *Mytilus coruscus*

LIAO Zhi, LIU Mei, WANG Ri-xin, WU Mei, YANG Li-jia, LU Tao, XU Tian-jun, SHI Ge*

(Laboratory of Marine Biological Resources and Molecular Engineering, Marine Science College,
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Abstract: Antimicrobial peptides not only represent an important component of innate host defense against microbial colonization and a link between innate and adaptive immunity, but also form a foundation for the development of new therapeutic agents. As the most important antimicrobial peptide families in mussel, mytilin and myticin contain many members referred to as isofoms and have the highest abundance in mussel serum, which means these two families play a key role in mussel innate immunity. To investigate the molecular diversity and the sequence characterization of mytilin and myticin from *Mytilus coruscus*, the cDNA of mytilin and myticin were cloned respectively by PCR method using *M. coruscus* hemocyte cDNA library as template. Eight deferent mytilin cDNAs and nine deferent myticin cDNAs were cloned from *M. coruscus* hemocyte cDNA library, respectively. The precursor translated from mytilin cDNA contains a putative signal peptide of 22 residues, a processing peptide sequence of 34 amino acids, and a C-terminal extension of 46 residues rich in acidic residues; while the precursor translated from myticin cDNA contains a putative signal peptide of 20 residues, a processing peptide sequence of 40 amino acids, and a C-terminal extension of 37 residues. Both mytilin and myticin of *M. coruscus* are characterized by abundant cationic amino acids and eight cysteins which formed four disulfides. Sequence analysis of the coding frame showed that the variation loci of these two kinds of antimicrobial peptide mainly occurred on mature peptide region, which might result from direct interaction of these peptides with the surrounding pathogens in the changing environment and thus become a likely cause of molecular adaptation of certain amino acid sites in mytilin and myticin variants. This study laid the foundation for intensive study on immune mechanisms as well as screening antimicrobial peptide molecules from *M. coruscu* antimicrobial peptides.

Key words: *Mytilus coruscus*; antimicrobial peptide; mytilin; myticin; cDNA

Corresponding author: SHI Ge. E-mail: shige2046312@163. com