

厚壳贻贝 M7 lysin 分子的克隆与表达

刘慧慧^{1*}, 薛超波², 常抗美¹, 杨刚¹

(1. 浙江海洋学院海洋科学学院, 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室, 浙江 舟山 316000;

2. 舟山市质量技术监督检测院, 浙江 舟山 316000)

摘要: M7 lysin 位于贻贝精子顶体中, 是溶解卵黄膜、促进受精作用的重要蛋白质, 决定了贻贝种间精卵识别的特异性。采用同源克隆法得到厚壳贻贝 M7 lysin 分子, 并在原核生物中对该分子进行重组表达。结果表明, 扩增产物为 540 bp 左右的片段, 进一步测序发现其开放阅读框 cDNA 为 543 bp, 与贻贝、地中海贻贝、盖勒贻贝具有较高的相似性; 在线翻译所得蛋白质片段中含有 180 个氨基酸, 分子量为 20 ku, 等电点为 8.48; 通过 M7 lysin 氨基酸序列构建系统进化树发现, 贻贝和地中海贻贝亲缘关系最近, 其次为盖勒贻贝, 最后是厚壳贻贝; 将 M7 lysin 分子在 *E. coli* Rosseta (DE3) 中融合表达, 得到包括载体氨基酸序列在内的 25 ku 蛋白质, 符合预期分子质量。

关键词: 厚壳贻贝; 精子; M7 lysin; 表达

中图分类号: S 917

文献标志码: A

海洋无脊椎动物在受精过程中将精子及卵细胞播于水中, 二者通过化学吸引力结合到一起, 精子顶体泡打开, 内容物释放并溶解卵黄膜, 精子从打开的卵黄膜孔道进入, 从而使卵子受精, 随后完成胚胎发育过程^[1]。在此受精过程中, 精子顶体蛋白在溶解卵黄膜过程中起到重要作用, 决定受精作用的特异性, 目前关于该种蛋白特征研究最清楚的是鲍 (*Haliotis iris*) 细胞溶素 (lysin)^[2] 和海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 结合素 (bindin)^[3], 对于贻贝精子内起到相似作用的 M7 lysin 人们也进行了探索性研究^[4-5], 其中贻贝 (*Mytilus edulis* Linnaeus)、地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck)、盖勒贻贝 (*Mytilus trossulus* Gould) M7 lysin 序列已经测得, 经比对发现, 其进化与 lysin、bindin 类似, 为正向选择方式, 并在生殖隔离及物种进化中起重要作用, 但关于厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus* Gould) M7 lysin 的研究尚未见报道。

厚壳贻贝是浙江省贝类养殖的主要品种, 其生长速度快、养殖产量高, 并具有肉味鲜美、营养丰

富、宜鲜食或加工成干制品等优点, 一直以来都是国内外市场上供不应求的优质海产品。近年来, 由于种质、病害和环境等因素的影响, 厚壳贻贝出现了自身体质下降、幼苗成活率低、性成熟过早、出肉率低等问题, 因此培育生长状态好、抗逆能力强的优良品种成为解决贻贝养殖可持续发展的技术关键之一。杂交育种是培育良种的一条有效途径, 为解决我国养殖贝类大规模死亡和一些重要经济贝类生长慢、生产周期长等问题开辟了崭新途径。因此, 探明厚壳贻贝生殖隔离机制, 将促进其杂交育种快速实现, 为培育厚壳贻贝良种提供科学依据。

本研究通过同源克隆法获得在厚壳贻贝生殖隔离中起到重要作用的 M7 lysin 分子, 对其 cDNA 序列和推导的氨基酸序列进行了分析, 并将该分子克隆到原核生物中进行表达, 为进一步揭示厚壳贻贝生殖隔离机理提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

厚壳贻贝 12 只, 2010 年 10 月采自舟山市嵊

收稿日期: 2011-03-26 修回日期: 2011-05-26

资助项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y307381); 国家科技支撑计划 (2011BAD13B08); “海洋渔业科学与技术”省重中之重学科开放课题 (20100202)

通讯作者: 刘慧慧, E-mail: liuhuihui_77@163.com

泗县嵎山列岛养殖海区,活体解剖观察性腺,雌性为橘黄色,雄性为乳白色。取雄性性腺组织置液氮中快速冷冻后,于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

宿主菌 *E. coli* DH5 α 、RossetaTM (DE3)、表达载体 pET-28a、Trizol 试剂、反转录试剂盒、*rTaq* 酶、dNTP、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam* HI均为大连宝生物工程有限公司产品;PCR 产物纯化试剂盒 AxyGEN Gel Extraction Kit 购自爱思进生物技术有限公司;TA 克隆试剂盒 T-Vector PCR Product Cloning Kit 购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 实验方法

厚壳贻贝 cDNA 模板的获得 厚壳贻贝总 RNA 提取及反转录按 RNAisoPlus(大连宝生物公司)试剂盒说明书进行,所得模板以贻贝 β -actin 检测,引物序列如下,actin-F: 5'-TGCTATGTTGCTCTTGA-3', actin-R: 5'-ATGGTGGTACCACAGAC-3',反应体系:模板 0.4 μL ,引物各 0.5 μL (10 nmol/L),dNTP 0.2 μL (2.5 mmol/L),10 \times Easy *Taq* Buffer 1 μL ,*Taq* 酶(5 U/ μL)0.2 μL ,以去离子水补足 10 μL ;扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

厚壳贻贝 M7 lysin 基因的克隆 根据贻贝 (DQ 151465)、地中海贻贝 (EF 079806)、盖勒贻贝 (AY 131182) M7 lysin 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计兼并性引物,引物名称及序列分别如下: M7-F: 5'-GGWTTACCATAYGGCTGGGAG-AAAA-3', M7-R: 5'-TTAAGSTTTTGTCTTGCA-GACATAG-3'。以上述雄性生殖腺 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系:模板 cDNA 2 μL ,引物各 2.5 μL (10 nmol/L),dNTP 1 μL (2.5 mmol/L),10 \times Easy *Taq* Buffer 5 μL ,*Taq* 酶(5 U/ μL)1 μL ,以去离子水补足 50 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段用胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit, AxyGen) 纯化后,与 pMD18-T 载体连接,转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,利用蓝白斑筛选阳性克隆,所获得的克隆利用原 PCR 扩增引物进行菌落 PCR 鉴定后,送上海英骏生物公司测序。

数据处理与分析 测序结果经去除载体序

列后,在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行在线 BLAST 同源检索进行;推导成熟肽的分子量及等电点,利用在线软件 (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测;序列比对分析采用 MEGA 4.0 软件中 Clustal W 模块进行,同时对贻贝、太平洋贻贝、厚壳贻贝 M7 lysin 的氨基酸序列构建 Neighbour-Joining (NJ) 系统进化树。

厚壳贻贝 M7 lysin 的原核表达 以测序正确 pMD18-T-M7 lysin 为模板,扩增带有限制性内切酶位点 (*Bam*H I 和 *Eco*R I 的目的片段,引物序列如下: M7 lysin-F: 5'-CGGGATCCGGTTT-ACCATATGGC-3', M7 lysin-R: 5'-CGGAATT-CAGCTTTTGTCTTGCA-3', PCR 体系及反应条件同前,割胶回收后,以 *Bam*H I、*Eco*R I 对目的片段和 PET28a 质粒分别进行双酶切,回收后以 *T*₄ 连接酶连接后,转化 DH5 α ,经测序验证正确后提取质粒转化宿主菌 *E. coli* RossetaTM (DE3) 感受态细胞,挑取单菌落接种氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养至 OD_{600 nm} = 0.4 ~ 0.6,加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h,收集菌体,重悬于 PBS 中,进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果

2.1 厚壳贻贝 M7 lysin 基因的克隆

反转录得到的厚壳贻贝雄性性腺 cDNA,经 β -actin 特异性引物 (依据贻贝 β -actin 序列) 扩增,得到如图 1 所示的 270 bp 片段,与预期结果一致,该 cDNA 可作为模板;进一步以兼并引物对 M7 lysin 分子的开放阅读框进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示,扩增产物为 540 bp 左右片段,与已发表的贻贝、地中海贻贝、盖勒贻贝相应分子大小一致。

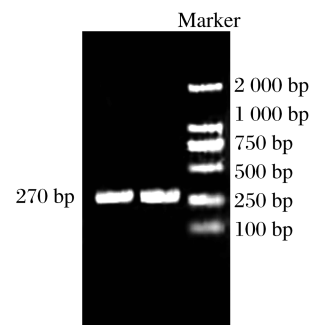


图 1 厚壳贻贝 β -actin 扩增凝胶电泳图

Fig. 1 Amplification of *M. coruscus* β -actin by PCR

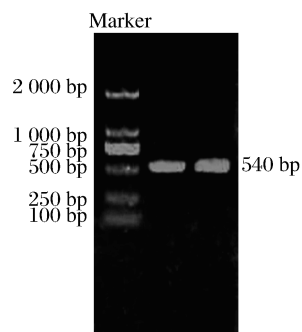


图2 厚壳贻贝 M7 lysin 扩增凝胶电泳图

Fig. 2 Amplification of *M. coruscus* M7 lysin by PCR

2.2 厚壳贻贝 M7 lysin cDNA 序列分析

将 PCR 扩增条带进行割胶回收,连接入 T 载体并转入大肠杆菌,筛选阳性克隆送公司测序。

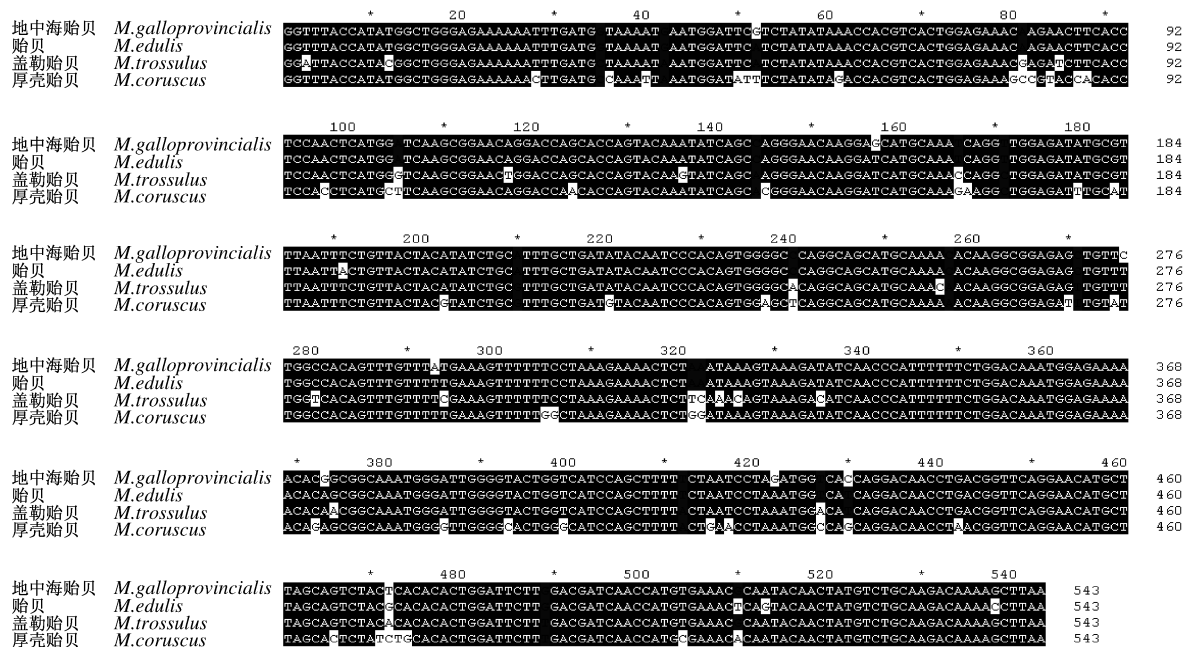


图3 贻贝 M7 lysin cDNA 序列比对结果

Fig. 3 Alignment of M7 lysin cDNAs from mussel

2.3 厚壳贻贝 M7 lysin 氨基酸序列分析

所得 ORF 序列经 DNAMAN 软件翻译为 180 个氨基酸的多肽链, <http://www.expasy.ch/tools/> 在线预测分子量为 20 ku, 等电点为 8.48, 低于腹足类 lysin 分子的等电点 (10.0 ~ 11.6)^[6], 尽管腹足类与双壳类具有共同的祖先, 但二者的 lysin 分子没有明显的同源性。厚壳贻贝氨基酸序列较其他贻贝分化较大(图 4), 与贻贝和地中海贻贝的相似度为 91%, 与盖勒贻贝相似性为 89.4%。对贻贝、地中海贻贝、盖勒贻贝、厚壳贻贝 M7 lysin 的氨基酸序列构建 NJ 系统进

测序结果经分析并去除载体序列, 得到厚壳贻贝 M7 lysin 的 ORF 序列, 结合已发表贻贝 (DQ 151465)、地中海贻贝 (EF 079806)、盖勒贻贝 (AY 131182) 相应分子序列进行比对, 如图 3 所示, 共存在 77 个突变位点, 占总碱基数量的 14.2%。其中贻贝和地中海贻贝高度相似(相似度 97.8%), 仅 12 个碱基有突变, 原因在于二者同属贻贝。盖勒贻贝与上述两个贻贝略有差别(34 个碱基突变), 相似度 93.7%; 厚壳贻贝则差别较大, 与贻贝相似度为 88.6% (62 个碱基突变), 与地中海贻贝相似度为 89% (60 个碱基突变), 与盖勒贻贝相似度为 89% (60 个碱基突变)。因此, 从 M7 lysin 分子判断盖勒贻贝与贻贝及地中海贻贝具有比厚壳贻贝更近的亲缘关系。

化树, 贻贝与地中海贻贝首先聚为一支, 其次为盖勒贻贝, 最后则是厚壳贻贝(图 5)。

2.4 厚壳贻贝 M7 lysin 的原核表达

鉴定后的阳性重组质粒转化 *E. coli* Rosseta™ (DE3), 37 °C 振荡培养, 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 通过 SDS-PAGE 进行分析, 以空白质粒转化菌做为阴性对照, 诱导菌株在分子量 25 ku 处可见一特异蛋白带, 其中载体融合蛋白分子量大小为 5 ku, 目的蛋白分子量大小为 20 ku, (图 5), 符合构建质粒表达蛋白质的理论大小, 因此确定该条带为融合表达的 M7 lysin 重组蛋白。

贻贝	<i>M.edulis</i>	GLPYGWERKFDGRMNGFIYINHVVTGETRTRSPPTHGSSGTGPAPVQISAREQSSCKGWRVAFNFCYYISAFADIQSHSGAQAAACK QGGELFWP	94
地中海贻贝	<i>M.galloprovincialis</i>	GLPYGWERKFDGRMNGFIYINHVVTGETRTRSPPTHGSSGTGPAPVQISAREQSSCK GWRVAFNFCYYISAFADIQSHSGAQAAACK QGGELFWP	94
盖勒贻贝	<i>M.trossulus</i>	GLPYGWERKFDGRMNGFIYINHVVTGETRTRSPPTHGSSGTGPAPVQISAREQSSCK GWRVAFNFCYYISAFADIQSHSGAQAAACK QGGELFWP	94
厚壳贻贝	<i>M.coruscus</i>	GLPYGWERKFDGRMNGFIYINHVVTGETRTRSPPTHGSSGTGPAPVQISAREQSSCKGWRVAFNFCYYISAFADIQSHSGAQAAACK QGGELFWP	94
贻贝	<i>M.edulis</i>	QFVFSFPLKKTLDKVKIISTHFFWTNGEKHSKMDMGTGHPAFTNPKMSGQPDGSGTCLAVY HTGFDQPCBTQYNYVCKTRP	180
地中海贻贝	<i>M.galloprovincialis</i>	QFVFSFPLKKTLDKVKIISTHFFWTNGEKHSKMDMGTGHPAFTNPKMSGQPDGSGTCLAVY HTGFDQPCBTQYNYVCKTRP	180
盖勒贻贝	<i>M.trossulus</i>	QFVFSFPLKKTLDKVKIISTHFFWTNGEKHSKMDMGTGHPAFTNPKMSGQPDGSGTCLAVY HTGFDQPCBTQYNYVCKTRP	180
厚壳贻贝	<i>M.coruscus</i>	QFVFSFPLKKTLDKVKIISTHFFWTNGEKHSKMDMGTGHPAFTNPKMSGQPDGSGTCLAVY HTGFDQPCBTQYNYVCKTRP	180

图4 贻贝 M7 lysin 氨基酸序列比对结果

Fig. 4 Alignment of M7 lysin amino acid from mussel

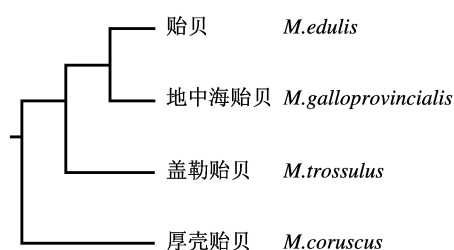


图5 贻贝 M7 lysin 分子进化树

Fig. 5 Molecular phylogenetic tree of mussel M7 lysin

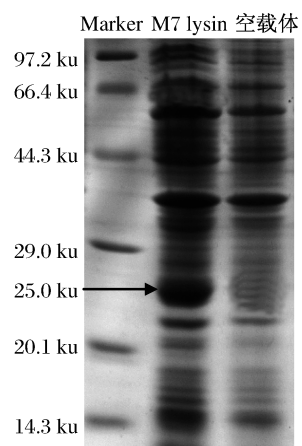


图6 厚壳贻贝 M7 lysin 表达的 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant protein of M7 lysin in *M. coruscus*

3 讨论

3.1 厚壳贻贝 M7 lysin 序列分析

无脊椎动物的精子顶体蛋白 lysin 在受精过程中担负着溶解卵黄膜、促进精子与卵细胞相结合的重要功能,因其参与前合子生殖隔离和物种形成而受到广泛重视。与其他 lysin 分子相同,贻贝 M7 lysin 位于精子顶体中,能够溶解卵黄膜^[7],但其结构不与鲍 lysin 相似^[8],主要原因在于该类分子进化速度极快^[9],种间的这种高度分

化特征因此显而易见,本研究也证实了该结论,克隆得到的厚壳贻贝 M7 lysin 序列通过 BLAST 在线检索,除了与贻贝、地中海贻贝、盖勒贻贝具有 88% ~ 89% 的相似性外,并未找到包括腹足类精子蛋白在内的任何与之具有明显相似性的序列,该结果表明,M7 lysin 参与了贻贝受精作用的种的特异性。虽然贻贝、地中海贻贝、盖勒贻贝分布区域相互重叠,但各物种之间的分化特征仍旧明显,种间杂交的现象并不普遍,尽管自然界由于基因漂变与渐渗而产生贻贝与地中海贻贝及厚壳贻贝的杂交后代^[10],但杂交贻贝在自然界的数量并不多。在实验室条件下,实现两种贻贝杂交则需要高浓度的精子参与,因此对 M7 lysin 特征的研究将有利于阐明贻贝生殖机理,促进杂交育种的实践探索。

3.2 M7 lysin 的分子标记特征

贻贝属的广泛分布及生存环境对其贝壳外形的影响使该属的分类相对混乱,在贻贝分类研究方面,国内外学者做了大量的研究,特别是贻贝、地中海贻贝和盖勒贻贝的形态极其相似而难以区分。随着分子生物学的迅速发展,分子标记被广泛应用于贻贝属的分类研究。很多研究者通过同工酶基因位点^[11]、线粒体基因组全序列^[12]、12S rRNA、16S rRNA 及 CO I 序列等^[13]对贻贝分类开展了系列研究,普遍认为,地中海贻贝和贻贝最相似,两者与盖勒贻贝遗传距离稍远,其次为厚壳贻贝^[14],本研究以 M7 lysin 作为分子标记所得到的系统进化树同样得到了该结论。SPRINGER 等^[15]研究认为,贻贝 M7 lysin 进化速度极快,降低了各贻贝配子种间的相容性,形成了贻贝群体间生殖隔离,促进新物种的形成,因此,以 M7 lysin 作为分子标记,更能反映贻贝生物多样性的迅速变化,并丰富国际上生物多样性的研究理论

和方法,为其它种类生物多样性研究提供必要的理论依据。

3.3 厚壳贻贝 M7 lysin 的原核表达

研究中厚壳贻贝 M7 lysin 通过重组表达获得 25.0 ku 蛋白,是含有部分载体氨基酸序列的融合蛋白,比推测的理论分子质量大,而空载体转化菌在相应位置未见有特异性蛋白条带,表明此蛋白条带是重组质粒 pET28a-M7 lysin 的诱导表达产物,且与该蛋白质理论分子量相近。M7 lysin 分子氨基酸比对发现,半胱氨酸的位置高度保守(第 54、65、84、153、168、176 位),所形成二硫键的位置与 C 型凝集素的碳水化合物识别区(CRD)很相近,因此推断 M7 lysin 通过结合卵黄膜中糖基及糖蛋白成分溶解卵黄膜,促进受精过程的完成,并有研究认为,推断该分子为钙离子依赖型半乳糖结合蛋白^[16]。上述特征与已报道的腹足纲鲍的受精机理不同,后者的 lysin 分子在此过程中通过疏水作用力与细胞溶素受体蛋白(VERL)结合^[1],使 VERL 纤维分子失去亲和力并分散开,形成小孔,精细胞就从此进入与卵细胞融合。目前关于贻贝 M7 lysin 溶解卵黄膜的机理尚不清楚,还需对其分子特征、理化性质、与卵黄膜的相互作用等方面开展进一步的研究。

参考文献:

- [1] 刘慧慧,李太武,苏秀榕,等. 鲍配子识别蛋白的研究[J]. 动物学杂志,2003,38(6):104-106.
- [2] CLARK N L, FINDLAY G D, YI X, *et al.* Duplication and selection on abalone sperm lysin in an allopatric population[J]. *Molecular Biology and Evolution*,2007,24(9):2081-2090.
- [3] LEVITAN D R, STAPPER A P. Simultaneous positive and negative frequency-dependent selection on sperm bindin, a gamete recognition protein in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* [J]. *Evolution*,2010,64(3):785-97.
- [4] RIGINOS C, WANG D, ABRAMS A J. Geographic variation and positive Selection on M7 Lysin, an acrosomal sperm protein in mussels [J]. *Molecular Biology and Evolution*,2006,23(10):1952-1965.
- [5] STUCKAS H, MESSERSCHMIDT K, PUTZLER S. Detection and characterization of gamete-specific molecules in *Mytilus edulis* using selective antibody production [J]. *Molecular Reproduction & Development*,2009,76(1):4-10.
- [6] VACQUIER V D, SWANSON W J, LEE Y H. Positive Darwinian selection on two homologous fertilization proteins: what is the selective pressure driving their divergence? [J]. *Journal of Molecular Evolution*,1997,44:15-22.
- [7] STUCKAS H, MESSERSCHMIDT K, PUTZLER S, *et al.* Detection and characterization of gamete-specific molecules in *Mytilus edulis* using selective antibody production [J]. *Molecular Reproduction & Development*,2009,76:4-10.
- [8] KRESGE N, VACQUIER V D, STOUT D C. The crystal structure of a fusagenic sperm protein reveals extreme surface properties [J]. *Biochemistry*,2001,40:5407-5413.
- [9] HELLBERG M E, MOY G W, VACQUIER V D. Positive selection and propeptide repeats promote rapid interspecific divergence of a gastropod sperm protein [J]. *Molecular Biology and Evolution*,2000,17(3):458-466.
- [10] 沈玉帮,李家乐,牟月军. 厚壳贻贝与贻贝遗传渐渗的分子生物学鉴定[J]. 海洋渔业,2006,28(3):195-200.
- [11] MCDONALD J H, SEEDR R, KOEHN R K. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres [J]. *Marine Biology*,1991,111(3):323-333.
- [12] 宋文涛,高祥刚,李云峰,等. 双壳贝类线粒体基因组结构的比较[J]. 遗传,2009,31(11):1-11.
- [13] GERARD K, BIERNE N, BORSA P, *et al.* Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. Mussels from northern and southern hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,2008,49(1):84-91.
- [14] 毛阳丽,蔡厚才,李成久,等. 基于线粒体 CO I 与 16S rRNA 基因序列探讨贻贝属的系统发育[J]. 南方水产,2010,6(5):27-35.
- [15] SPRINGER S A, CRESPI B J. Adaptive gamete-recognition divergence in a hybridizing *Mytilus* population [J]. *Evolution*,2007,61(4):772-783.
- [16] TAKAGI T, NAKAMURA A, DEGUCHI R, *et al.* Isolation, characterization, and primary structure of three major proteins obtained from *Mytilus edulis* sperm lysin [J]. *Journal of Biochemistry*,1994 116:598-605.

The cloning and expression of M7 lysin in *Mytilus coruscus*

LIU Hui-hui^{1*}, XUE Chao-bo², CHANG Kang-mei¹, YANG Gang¹

(1. Key Laboratory of Zhejiang Provincial Marine Culturing Equipments and Engineering Technology,
Marine Science School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

2. Zhoushan Center of Calibration and Testing for Qualitative Technical Supervision Zhejiang, Zhoushan 316000, China)

Abstract: M7 lysin is located in the mussel sperm acrosome. As an important protein for fertilization, it can dissolve vitelline membrane and determine the specificity of sperm-egg recognition of mussel. At present, the M7 lysin sequences of *Mytilus edulis* Linnaeus, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus* have been recognized, but it hasn't been reported in *M. coruscus*. In this study, we cloned M7 lysin of *M. coruscus* with homology cloning method, and it was expressed in *E. coli* Rosseta (DE3). The results showed that the amplified product was about 540 bp fragment. The further sequencing revealed that the cDNA of open reading frame was 543 bp, and it had high similarity with those of *M. edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. The protein included 180 amino acids through online translation, its molecular weight was 20 ku, and its isoelectric point was 8.48. The phylogenetic tree from the amino acid sequence of M7 lysin showed that *M. edulis* and *M. galloprovincialis* had closest relationship, followed by *M. trossulus*, and finally *M. coruscus*. The results suggested that M7 lysin could be used as molecular markers to study mussel's evolution. The protein of 25 ku was showed in SDS-PAGE when M7 lysin was expressed in the prokaryotes, which included the amino acid sequences in vector. This band was consistent with the expected molecular weight. Disulfide bonds' positions in M7 lysin were highly conservative, which was similar to C-type lectin carbohydrates identification area (CRD). We speculated that M7 lysin dissolved the yolk membrane through combining its sugar and sugar-based protein. The conclusions helped us to reveal the mussel's reproductive mechanism, and further provide a reference for the cross breeding of mussels.

Key words: *Mytilus coruscus*; sperm; M7 lysin; expression

Corresponding author: LIU Hui-hui. E-mail: liuhuihui_77@163.com