

文章编号: 1674 - 5566(2011)03 - 0342 - 08

## 三角帆蚌 AMP 基因 cDNA 全序列的克隆及分子特征研究

董姝君<sup>1</sup>, 汪桂玲<sup>1</sup>, 白志毅<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2</sup>

(1. 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; 2. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海 201306)

**摘要:** 以三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 为研究材料, 根据实验室构建的三角帆蚌 cDNA 文库中已标注的 EST 序列, 利用 RACE 克隆了三角帆蚌 AMP 基因的 cDNA 全序列。该 cDNA 序列全长为 970 bp, 5'端非翻译区 123 bp, 3'端非翻译区 526 bp, 开放阅读框 (ORF) 长为 300 bp, 共编码 99 个氨基酸, 包含一段由 27 个氨基酸组成的信号肽和 72 个氨基酸的成熟肽, 分子量为 10 924.7 u。氨基酸序列分析表明, 该序列存在明显的跨膜结构和疏水区。同源性分析表明, 该基因编码的蛋白与海兔 (*Aplysia californica*) theromacin 氨基酸序列的相似度最高为 56%, 而与贻贝等中发现的抗菌肽 defensins、mytilins、myticins 和 mytimycins 相似度较低, 推测属于抗菌肽 *theromacin* 基因家族。Jpred3 软件对三角帆蚌 AMP 蛋白的二级结构预测结果表明, 在第 2~22、57~62 氨基酸残基处存在  $\alpha$  螺旋, 因此, 三角帆蚌的 AMP 蛋白是包含跨膜螺旋的膜蛋白。为进一步研究该基因的表达、功能及三角帆蚌病害防御奠定了分子基础。

**研究亮点:** *theromacin* 不属于常见的抗菌肽基因家族, 报道极少。克隆三角帆蚌 *theromacin* 的 cDNA 全序列, 首次对该基因蛋白二级和三级结构进行预测和分析, 不仅丰富了抗菌肽基因家族的基础研究, 而且为进一步研究三角帆蚌抗菌肽基因的表达及病害防御奠定了基础。

**关键词:** 三角帆蚌; AMP 基因; RACE; 分子特征

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 是绝大多数生物抵御入侵病原生物时, 由基因编码的自然防御体系中的重要成分, 分子量相对较小 (< 10 ku), 且具有两亲性。目前, 从脊椎动物、无脊椎动物和植物等的不同组织中, 发现了不同种类具有广谱抗菌活性的抗菌肽。抗菌肽分子在广阔的进化时间跨度中较为保守, 这些肽对高度变异的目标微生物仍然保持强大活性<sup>[1-4]</sup>。三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 属瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、蚌目 (Unionoida)、蚌科 (Unionidae)、帆蚌属 (*Hyriopsis*), 是中国特有的优良淡水育珠蚌<sup>[5]</sup>。贝类抗菌肽的研究起步较晚<sup>[6]</sup>, 且主要集中在海洋贝类, 例如贻贝<sup>[7-8]</sup>, 在扇贝、牡蛎、鲍等贝类中也有研究<sup>[9-11]</sup>, 淡水贝类抗菌肽在 XU 等<sup>[12]</sup>的研究中首见报道。随着淡水珍珠蚌养殖生产的集

约化、高密度发展等因素导致的水体污染、各种病害频繁发生。抗菌肽是贝类等无脊椎动物重要的免疫因子, 且对机体无害, 因此, 将其开发成为新型医药、饲料添加剂等, 对保护养殖环境、发展生态农业等都有极其重要的意义。本研究利用 RACE 法, 克隆本实验室构建的三角帆蚌 cDNA 文库中已标注的抗菌肽 EST 序列, 经测序后得到 cDNA 全长, 并对其基因结构特征和相应的蛋白质序列进行了初步分析, 不仅丰富了淡水贝类抗菌肽的研究, 也为日后新型药剂的生产奠定了基础。

### 1 材料与amp方法

#### 1.1 材料

实验用 3 龄三角帆蚌采自浙江省金华市威

收稿日期: 2010-11-08 修回日期: 2010-12-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划前期研究专项 (2009CB126000); 国家自然科学基金项目 (30871923)

作者简介: 董姝君 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: dongshujunwell@163.com

通讯作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

望养殖新技术有限公司生产基地,取 5 只于玻璃缸(50 cm × 30 cm × 35 cm)中暂养,投喂小球藻 7 d。

## 1.2 方法

### 1.2.1 三角帆蚌外套膜总 RNA 提取

活体解剖,取三角帆蚌外套膜组织 100 mg 左右置于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL RNAiso Plus 试剂(大连宝生物工程有限公司),经匀浆、氯仿抽提、异丙醇沉淀、75% 酒精清洗,用适量 0.01% 二乙基焦碳酸酯(diethylprocarbonate, DEPC)处理

过的水溶解总 RNA。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性,并用紫外分光光度计进行纯度分析。

### 1.2.2 AMP 基因全长 cDNA 的扩增、克隆和序列测定

根据本实验室构建的三角帆蚌外套膜 cDNA 文库中已标注的 EST 序列<sup>[13]</sup>,用 Primer Premier 5.0 软件并结合 BLAST 程序设计特异性引物,引物均由上海生工生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 克隆 AMP 基因所用引物  
Tab.1 Primers used to amplify the AMP gene

引物名称	序列(5'-3')
3'RACE Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT
3'RACEGSP Primer	5'UPM Long
5'UPM Short	5'NUP
5' GSP	5'NGSP
AACAGACTGCTGGGAAAC	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGACT
CTAATACGACTCACTATAGGGC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT
AGCTGAAAGGATACGA	ACTTCCCTACAGGTACCGGTGGCGT

3'末端扩增使用 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒(TAKARA 公司)。5'末端扩增使用 BD SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage<sup>®</sup> 2 PCR Enzyme System 试剂盒(BD Biosciences Clontech 公司)。5'末端扩增时,做巢式 PCR。首先用引物 UPM 和 5'GSP 做 PCR 扩增,其产物用引物 NUP 和 5'NGSP 再次进行 PCR。

RACE 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,用 TIANgel Midi Purification Kit (北京天根生化科技有限公司)回收目的片段 PCR 产物,纯化后的 RACE 产物与 pMD19-T (大连宝生物工程有限公司)载体连接构建重组质粒,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经 LB 平板(含 Amp<sup>+</sup>、IPTG 和 X-gal)培养后,筛选重组子进行插入片段检测,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。

### 1.2.3 序列分析

通过 BLAST 数据库搜索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),分析核苷酸序列、氨基酸序列的相似性。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

ProtParam 程序、Signal P 3.0 server、TMHMM 及 ProtScale 等软件,分别预测氨基酸序列的物理参数及信号肽,分析氨基酸跨膜结构及氨基酸序列的疏水区。用 Mega 4.1 软件,构建 NJ 系统进化树。蛋白质的二级结构用 Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/index.html>) 进行预测,三级结构通过 ESyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) 提交进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 AMP 基因 cDNA 扩增与克隆测序

将提取的三角帆蚌外套膜总 RNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪观察,得 3 条清晰的条带(图 1),符合三角帆蚌总 RNA 的特点,可见完整性。用 Nanodrop 2 000 C 分光光度计测 OD 值,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.83,表明提取的总 RNA 可以用于 RACE 扩增。以表 1 中,3'特异性引物 3'RACE GSP Primer 和通用引物 3'RACE Primer 进行 3'RACE 扩增,在 790 bp 左右获得 1 条特异性条带(图 1);以 5'特异性引物 5'GSP 和通用引物 5'UPM 做 5'RACE 第一轮 PCR,以第一轮 PCR 的产物为模板,用 5'NGSP 和通用引物 5'

NUP 做第二轮 PCR, 获得 1 条约 338 bp 的特异条带(图 1)。

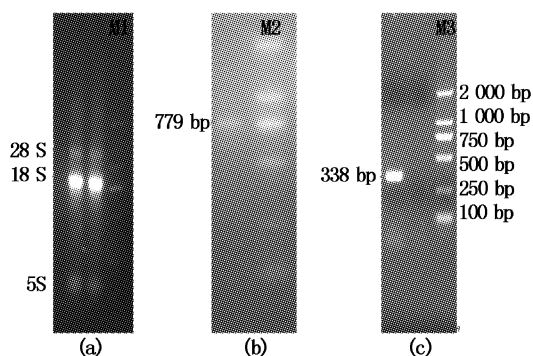


图 1 三角帆蚌总 RNA 完整性检测以及 3', 5'RACE 扩增产物电泳图

Fig. 1 Total RNA integrity detection in mussel and 3', 5'RACE PCR products electrophoresis

(a) 为 RNA 完整性检测; (b) 为 3'RACE 扩增产物; (c) 为 5'RACE 扩增产物; M1、M2、M3 为 DL2000 DNA 分子量标准。

## 2.2 AMP 基因 cDNA 序列特征分析

将测序所得的 3' 和 5'RACE 扩增产物拼接后得到三角帆蚌 AMP 基因的完整 cDNA 序列(图

2), GenBank 登录号为 HM598084, 全长为 970 bp, 其中 5' 端非翻译区(UTR)长为 123 bp, 3' 端非翻译区(UTR)长 526 bp。开放阅读框长为 300 bp, 编码 99 个氨基酸。3'UTR 区含有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAAA 和 PolyA 尾。

## 2.3 AMP 氨基酸序列分析

根据三角帆蚌 AMP 基因的 cDNA 全长推测得到 99 个氨基酸, 分子式为: C<sub>475</sub>H<sub>748</sub>N<sub>128</sub>O<sub>141</sub>S<sub>13</sub>, 分子量为 10 924.7 u, 理论等电点为 7.43。不稳定系数为 52.33, 表明此蛋白质的性质不稳定。半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)的含量较高, 分别为 10.1%、10.1% 和 9.1%; 酪氨酸(Tyr)含量最低, 为 1.0%。本实验中所得三角帆蚌(Hc-AMP)氨基酸与海兔(*Aplysia californica*)、已发现的三角帆蚌(*H. cumingii*)、水蛭(*Hirudo medicinalis*)和肠蛭(*Theromyzon tessulatum*)的 theromacin 氨基酸进行序列对比, 结构显示, 这些序列有 6 个相同的半胱氨酸保守位点(图 3), 而该基因含 10 个半胱氨酸。

```

AAGCAGTGGTATCAACGCGAGTACGCGGGATAGCCATCAGTTAGCACCAAAAGAAAGCT 60
TTAGGCTTGCCTGATTCTGTTCATCAGTTAGCAAGAAGAGAAGTGTGGAAACATCAT 120
TAAATGCGCTTATTCAAGACGGTGACCGTTCTTTTCGGGATTTATGATCCTTGTGGCCATA 180
  M A L F K T V T V L S G F M I L V A I
ATTATGATCCCATCAATTGAGGAAATCCAATAACAGACTGCTGGGAAACATGGAGTCCG 240
  I M I P S I E G N P I T D C W E T W S R
TGTTCAAGATGGAGTTCCTCCCGCAACCGGAATACTCTGGCAATCCTGTGAGGACAGATGT 300
  C S R W S S P A T G I L W Q S C E D R C
AAATGTTTAGGTTACGCCACCGGTACCTGTAGGGAAGTTCCTCAAGGTGTCCTCCACACA 360
  K C L G Y A T G T C R E V P S R C P L T
GACAAGGCTTGGCAGTGTGAGTGTCTGGTACACTATCTGGACCAAAACCAGAAAACGTGT 420
  D K A W Q C Q C S G T L S G P K P E N C
TGATATTGACTTTGAGTGAAATAAGCATATTTTCCTTTGTTGTTTATGAAGGACAGAAAG 480
*
TGCTTGACAGAATATAAATACCAAAATAAACTTAAAGAGTGATAAAGAGCAACTGTTCAAA 540
AACGTTGCGCTGCATAAAGAGACATCTGAACCTAAAATAACACTGACATAAACAGAAATCG 600
ATGAGGCATATTGTTATTTGTTTCGGATGCTTTTGCTTTAACATGAAAAAATGAACATAG 660
ATAACTCGTATCCTTTCCAGCTAACGAAGCTCAAATGTTTGATTGGATTAACCTTTTCG 720
TGGCTAAGTTTATTGTTTTCGGCTGTTTGTATTAATAATCAAGAGCTGAATTTTAAAGTT 780
TCATATTTTATTCAAAATTACAACAGTGGATATCACATAACATGAAATGTTTGATATA 840
TAATTATTGAAATCAGCTGTATGAGAAGAGTGTGCTAGAAATGTTGAAACAGATAAACATT 900
AAATGCTTCAGAGGCAAAATAAAACAAGTTTAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 960
AAAAAAAAA 970

```

图 2 三角帆蚌 AMP 基因 cDNA 序列和预测的氨基酸序列

Fig. 2 AMP gene cDNA sequence in mussel and predicted amino acid sequence

斜体 ATG 表示起始密码子; \* 表示终止密码子; 加尾信号“AATAAA”用下划线标注; ↑ 之前的氨基酸序列为推测的信号肽。

Hc1	MALFKTIVTVLSGFILVAIIMIPSEIGNPITDCWETWSRCSRWSSPATGILWQSCEDRCK	60
Hc2	MAGFNKLSALLVVMALG-YLLAPSTEGFVLSDCYDTWSRCSGWSPALTGILWNTCSERCQ	59
Ac	---MDKKAAN-----GGKEKGGLEACWDEWSRCTGWSSAGTGVLWKSCDDQCK	45
Tt	---MELKSGLSILLCFG-----ICIAVINAGCFEDWSRCSPTSRGTGVLWRDCDSYCK	51
Hm	-----GCFEDWSRCSPTASATGVLWRSCDSYCK	29
	*:: ****: :. **:*. *.. *:	
Hc1	-CLGYATGTCREVP-SRCPLT--DKAWQCQCS--GTLGPKPENC--	99
Hc2	-CLGHADGACHLAQ-TNC-----GEAYQCQCH--GTLNGPRPSNCKF	97
Ac	-KLGKSGGECVLTTP-STCPFTRTDKAYQCQCK--K-----	76
Tt	VCFKADRGECDSPSLNCPQR-LPNNKQCRCINARTAKDNRNPTCWA	97
Hm	VCFKADRGECDSPSLNCPHR-LPNNKQCRCINARTAKDNRNPTCWA	75
	: * * * : **:	

图3 三角帆蚌 AMP 氨基酸序列与已发现 theromacin 氨基酸序列的比较

Fig.3 AMP amino acid sequence compared with amino acid sequences of theromacin found

-表示比较时必要的氨基酸缺口; \*表示保守的氨基酸残基; :表示保守替换的氨基酸残基; .表示相似性氨基酸。

## 2.4 AMP 蛋白结构预测

SignalP 程序中 NN 和 HMM 模型对三角帆蚌 AMP 基因所编码的氨基酸序列进行分析表明,在序列 N 端存在由 27 个氨基酸组成的信号肽,第 28~62 个氨基酸为成熟肽。TMHMM 分析表明,此抗菌肽基因存在跨膜区,位于 N 端第 7~25 个氨基酸。结合图 2 的对比结果可得,6 个保守的半胱氨酸位点位于跨膜区的外侧。ProtScale 在线分析结构表明,三角帆蚌抗菌肽蛋白存在明显的疏水区:第 10~30 个氨基酸有很强的疏水性,其次第 45~55 个、60~70 个氨基酸位置具有一定的疏水性。

Jpred3 软件对三角帆蚌 AMP 基因编码蛋白的二级结构预测结果表明,在第 2~22、57~62 氨基酸残基处存在  $\alpha$  螺旋,在第 29~31、49~52、68~71 以及第 84~88 氨基酸残基处存在  $\beta$  折叠。由此可以说,三角帆蚌的 AMP 基因编码的蛋白是包含跨膜螺旋的膜蛋白。

以 Sascha Jun (<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2K35>) 报道的水螅 (*Hydra magnipapillata*) Hydramacin-1 A 链三级结构 (PDB id: 2k35) 为模板,通过 ESyPred3D 预测获得了三角帆蚌 AMP 蛋白的三级结构。三级结构预测结果包含第 29~88 氨基酸残基,与水螅的 Hydramacin-1 三级结构相似,其模式见图 4 中 (a) 和 (b)。由预测结构分析二级结构也可知,其二级结构同时包含螺旋和折叠。此外,对本研究中 theromacin (a)、许巧晴等研究中 theromacin (c) 及海兔 (*Aplysia californica*) theromacin (d) 的氨基酸进行蛋白三级结构的预测并进行比较(下文用 a、c、d 代表上述 theromacin) (图 4)。结果表明, (a)、(c) 两者在成熟肽的相同部位都含有 10 个半胱氨酸, (d) 含有 8 个半胱氨酸,三者都是存在跨膜  $\alpha$  螺旋结构的膜蛋白。图 4 表明, (a) 和 (d) 中都含有两个  $\alpha$  螺旋, (c) 图中含有 1 个  $\alpha$  螺旋。

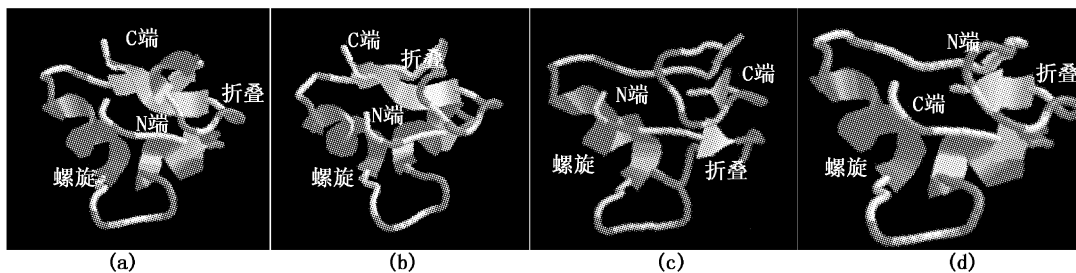


图4 ESyPred3D 预测的三角帆蚌 AMP 蛋白 (a)、模板 (b)、许巧晴等中 theromacin (c) 及海兔 (*Aplysia californica*) theromacin (d) 蛋白三级结构预测结果

Fig.4 AMP (a), template (b), theromacin in Xu Q Q et al (c), and theromacin in *Aplysia californica* (d) protein tertiary structure by ESyPred3D

## 2.5 三角帆蚌 AMP 氨基酸序列同源性及分子进化分析

将本实验所得 AMP 氨基酸序列经 Blast 比对发现,与海兔(*A. californica*) theromacin 的相似度最高,为 56%;与已发现的三角帆蚌(*H. cumingii*)、水蛭(*H. medicinalis*)和肠蛭(*T. tessulatum*)的相似度分别为 48%、39%和 32%。目前,Theromacin 基因在不同物种中的发现并不多,故将本实验所得三角帆蚌 AMP 基因命名为 theromacin。

用 Clustal W 软件将本实验所得的氨基酸序列与其他物种的不同抗菌肽的氨基酸序列进行多重序列比对,再结合 Mega 4.1 软件将比对结果以邻接法(NJ 法)构建系统树(图 5),并用重复

1 000 次的自展(Bootstrap)检验计算各分支的置信值。结果显示,不同物种、不同类型的抗菌肽独立占据进化树上的不同分支:两种贻贝(*Mytilus edulis*、*Mytilus galloprovincialis*)防御素聚在一起后与太平洋牡蛎防御素聚在同一分支,再与贝类其他类型抗菌肽,例如贻贝素(Mytilins)和贻贝肽(Myticins),聚在一起。水蛭、鲍鱼抗菌肽分别聚在一起,脊椎动物(小鼠与人)抗菌肽聚在一起。本实验克隆所得三角帆蚌 AMP 与已发表的几种无脊椎动物抗菌肽相聚,而不与两种贻贝的抗菌肽聚集在一起,推测此基因与这两种贻贝中发现的抗菌肽不属于同一种类型。

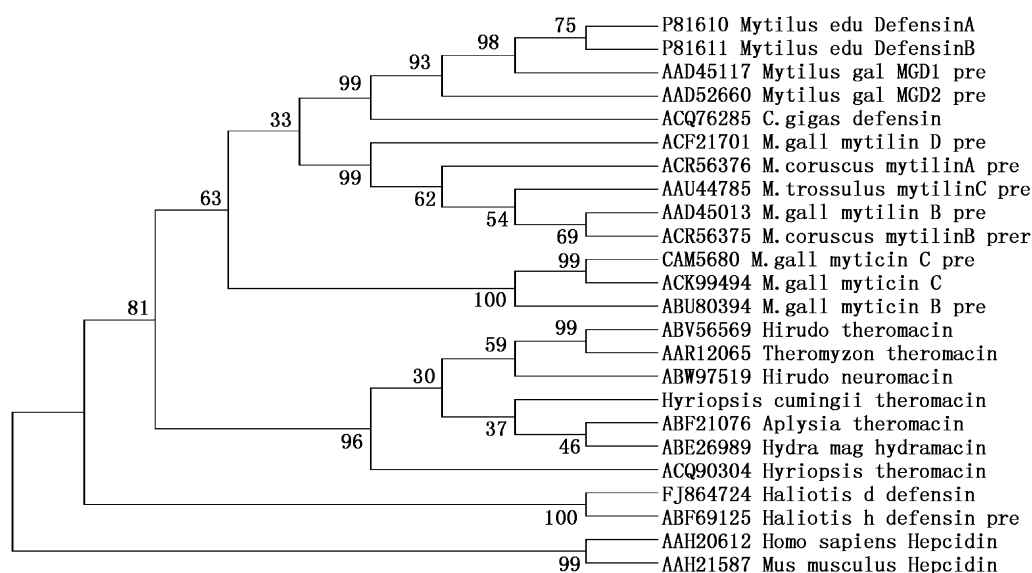


图 5 不同类型抗菌肽氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 5 NJ phylogenetic tree of different types of amino acid sequences of antimicrobial peptides

编号代表 GenBank 序列号;节点上的数字为重复 1 000 次的自展(bootstrap)检验置信值。

## 3 讨论

当病原生物入侵绝大多数生物时,在体内会迅速合成的一种具有广谱抗菌活性的两亲性肽类——抗菌肽<sup>[14]</sup>。自 1980 年瑞典科学家 STERNER 等<sup>[15]</sup>在惜古比天蚕蛹中发现世界上第一种抗菌肽 Cecropins,到目前为止,人们发现并分离获得具有抗菌活性的多肽 1 200 多种<sup>[16]</sup>。贝类抗菌肽起步较晚,海洋贝类的抗菌肽研究主要集中在贻贝<sup>[17-18]</sup>。2000 年, PADHI 和 VERGHESE<sup>[19]</sup>及 GUILLAUME 等<sup>[3,20]</sup>从两种贻

贝(*M. edulis*、*M. galloprovincialis*)中分离到多种抗菌肽,根据其一级结构和二硫键形成的不同形式可分为 4 类:防御素(defensins)、贻贝素(mytilins)、贻贝肽(myticins)和贻贝霉素(mytimycins),这几类抗菌肽各有不同的作用范围,互为补充,构成贻贝自然免疫系统的广谱抗菌活性<sup>[21]</sup>;扇贝<sup>[9]</sup>、牡蛎<sup>[11]</sup>、鲍鱼<sup>[22]</sup>等海洋贝类的抗菌肽也有研究。许巧晴等<sup>[12]</sup>首次在三角帆蚌中克隆了抗菌肽基因 cDNA 全长,推测编码 97 个氨基酸,经同源分析后,与海兔(*A. californica*) theromacin 的同源性最高,为 47%,因此,将此抗

菌肽基因命名为 *theromacin*。

本实验利用 RACE 法,克隆了三角帆蚌文库中标注的 AMP 基因 cDNA 的全长,并利用软件对此基因编码的蛋白进行二级结构和三级结构预测。该基因 cDNA 全长为 970 bp,分子量为 10 924.7 u,理论等电点为 7.43,300 bp 的开放阅读框编码 99 个氨基酸,其中含有 10 个半胱氨酸残基。二级结构中存在明显的跨膜结构和疏水区,含有由 27 个氨基酸组成的信号肽,推测 AMP 基因编码氨基酸的成熟肽很可能由传统的加工机制合成后,分泌到胞外基质中,属于细胞内分泌蛋白。以水螅 Hydracin-1 A 链三级结构 (PDB id:2k35) 为模板,通过 ESyPred3D 预测三角帆蚌 AMP 基因编码蛋白的三级结构,发现三角帆蚌 AMP 基因编码蛋白与水螅 (*H. magnipapillata*) 的 Hydracin-1 三级结构极其相似。利用 Blast 对三角帆蚌 AMP 进行相似性分析显示,此氨基酸序列与贻贝等已知的抗菌肽类的相似度较低,与海兔 (*A. californica*) 的 *theromacin* 氨基酸序列相似度最高为 56%,故将此 AMP 基因命名为 *theromacin*;构建的系统发育树表明,本实验的 AMP 蛋白与海兔等中发现的抗菌肽首先聚在一起,而不与贻贝中抗菌肽聚在同一支。这些都表明三角帆蚌中的 AMP 与海兔、水螅等中发现的抗菌肽进化关系较近,与贻贝等海洋贝类中的抗菌肽进化关系较远。有研究认为<sup>[19]</sup>,这种富含半胱氨酸的抗菌肽可能在起源上较为古老,因此,本实验中含 10 个半胱氨酸残基的 AMP 可以被认为是一种半胱氨酸富集的古老的抗菌肽。

本研究中 *theromacin* (a)、许巧晴等研究中 *theromacin* (c) 及海兔 (*A. californica*) *theromacin* (d) 的蛋白三级结构表明,三者都是存在跨膜  $\alpha$  螺旋结构的膜蛋白:(a) 和 (d) 中含有两个  $\alpha$  螺旋,(c) 中含有一个  $\alpha$  螺旋。目前,公认的抗菌肽作用机制是:抗菌肽通过蛋白中的  $\alpha$  螺旋结构,插入入侵病菌细胞的双层细胞膜,使此细胞膜破裂,细胞内容物泄漏,最终导致细胞死亡<sup>[2]</sup>。由此可知,在破坏病菌细胞膜完整性方面,(a) 和 (d) 蛋白较强,而三者具体的抑菌作用则有待进一步研究。此外,同源性分析可知,(a)、(c) 与 (d) 的同源性分别为 56%、47%,由此推测,本实验所得的 *theromacin* 与 (c) 可能是 *theromacin* 基因家族中的不同种类。

贝类生活在水环境中,开放式的循环系统使其更易接触各种病菌的侵害,频频发生各种细菌性和病毒性疾病<sup>[23-24]</sup>。抗生素的使用基本可解决问题,但病害防治过程中抗生素的大量使用,破坏了自然水环境的微生态平衡,某些病原体产生了耐药性<sup>[25]</sup>。而抗菌肽是机体对病原物侵染而产生的一系列由基因编码的免疫应答产物,广泛存在于生物体内,具有较强的广谱抗菌能力,被认为是“天然抗生素”,已经成为近年来研究的热点<sup>[1,14]</sup>。抗菌肽中 defensins、mytilins、myticins 和 mytimycins 四类基因家族研究较多,而 *theromacin* 基因不属于上述四大种类,报道极少。本研究根据已构建的三角帆蚌 cDNA 文库中标注的 EST 序列,利用 RACE 法克隆了三角帆蚌 AMP 基因的 cDNA 全序列,利用生物信息学的方法对其蛋白序列进行预测和分析。本研究结果不仅丰富了抗菌肽基因家族的基础研究,而且为进一步研究三角帆蚌抗菌肽基因的时空表达、基因蛋白的原核表达及病害防御奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] SANG Y M, FRANK B. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2008, 9(2):227-235.
- [2] REDDY K V R, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6):536-547.
- [3] GUILLAUME M, FRANCK V, PHILIPPE R. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity [J]. *FEBS*, 2000, 486(3):185-190.
- [4] SERGIO H M, GLORIA A. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2003, 6(2):271-284.
- [5] 陈友明,李家乐,白志毅. 肌肉注射维生素 C 对三角帆蚌血淋巴抗氧化酶活力的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(4):418-422.
- [6] STÉPHANE C, ALEXANDRE G, CHARLES H, et al. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(26):19239-19245.
- [7] 杨明,侯敢,黄迪南,等. 海洋贝类体液防御机制的研究进展 [J]. *水产科学*, 2006, 25(8):428-430.
- [8] XU W, FAISAL M. Defensin of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Molecular structure, in vitro expression, antimicrobial activity, and potential functions [J]. *Molecular Immunology*, 2010, 47(11/12):2138-2147.
- [9] ZHAO J M, SONG L S, LI C, et al. Molecular cloning,

- expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4):360-368.
- [10] ZOYSA M D, WHANG I, LEE Y D, et al. Defensin from disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(2):261-266.
- [11] SEO J K, CRAWFORD J M, STONE K L, et al. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(1):1998-2004.
- [12] XU Q Q, WANG G L, YUAN H W, et al. cDNA sequence and expression analysis of an antimicrobial peptide, thromacin, in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2010, 157(1):119-126.
- [13] BAI Z Y, YIN Y X, HU S N, et al. Identification of genes involved in immune response, microsatellite, and SNP markers from expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) [J]. *Mar Biotechnol*, 200, 11(4):520-530.
- [14] DIAMOND G, BECKLOFF N, WEINBERG A, et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense [J]. *Author Manuscript*, 2009, 15(21):2377-2392.
- [15] STERNER H, HULTMARK D, ENGSTRÖM Ä, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity [J]. *Nature*, 1981, 292:246-248.
- [16] 于道德, 宁璇璇, 任贵如, 等. 贻贝抗菌肽的研究进展 [J]. *海洋科学*, 2009, 33(11):95-99.
- [17] RICHARD K P, SOPHIA R F, JACKIE A C. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis* [J]. *Cell and Tissue Research*, 1997, 289(3):537-545.
- [18] GUILLAUME M, FLORENCE H, NOËL T. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *FEBS*, 1999, 265(1):71-78.
- [19] PADHI A, VERGHESE B. Molecular diversity and evolution of myticin-C antimicrobial peptide variants in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Peptides*, 2008, 29(7):1094-1101.
- [20] GUILLAUME M, FLORENCE H, ELISABETH A D, et al. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 24(4):381-393.
- [21] GUILLAUME M, FRANCK V, FLORENCE H, et al. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(17):12954-12962.
- [22] ZOYSA M D, NIKAPITIYA C, WHANG I, et al. Abhisin: A potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(5):639-646.
- [23] BERTHE F C J, ROUX F L, ADLARD R D, et al. Marteiliosis in molluscs: A review [J]. *Aquatic Living Resources*, 2004, 17(1):433-448.
- [24] 叶星, 白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景 [J]. *大连水产学院学报*, 2000, 15(4):274-279.
- [25] VIZIOLI J, SAIZET M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23(11):494-496.

## Full-length cDNA cloning and molecular characteristic research of AMP gene in *Hyriopsis cumingii*

DONG Shu-jun<sup>1</sup>, WANG Gui-ling<sup>1</sup>, BAI Zhi-yi<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** According to the EST sequence in cDNA library in our lab, the full-length cDNA sequence of AMP gene was cloned in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* by the RACE-PCR. A 970 bp cDNA sequence contained a 123 bp 5'-untranslation region, 526 bp 3'-untranslation region and 300 bp open reading frame (ORF), which encoded 99 amino acids with a signal peptides of 27 amino acids and a mature peptide of 72 amino acids, and molecular mass is 10 924.7 u. Amino acid sequence analysis shows that in the sequence there exist an obvious transmembrane and a hydrophobic region. Homology analysis indicates that this full-length amino acid sequence showed the highest similarity with *Aplysia californica* theromacin (56%), lower similarity with defensins, mytilins, myticins and mytimycins in mussels, so it is speculated that this gene belongs to *theromacin* gene families of antibacterial peptides. The prediction results of Jpred3 software for *H. cumingii* AMP protein secondary structure show that the places of 2 – 22, 57 – 62 amino acid residues had the alpha helix, accordingly, AMP in *H. cumingii* is the membrane protein containing transmembrane spiral. This study may lay the molecular basis for further research on the gene expression, function and disease defense of *H. cumingii*.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; AMP gene; rapid amplification of cDNA ends; molecular characteristics